



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 33 211 T2** 2006.09.21

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 009 768 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 33 211.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/19163**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 948 217.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/014235**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.09.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/475** (2006.01)

C07K 16/26 (2006.01)

C12N 15/18 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

931858 16.09.1997 US

(73) Patentinhaber:

Washington University, St. Louis, Mo., US

(74) Vertreter:

TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

JOHNSON, M., Eugene, St. Louis, MO 63146, US;
MILBRANDT, D., Jeffrey, St. Louis, MO 63105, US;
KOTZBAUER, T., Paul, Aston, PA 19014, US;
LAMPE, A., Patricia, St. Louis, MO 63123, US;
KLEIN, Robert, Palo Alto, CA 94301, US;
DeSAUVAGE, Fred, Foster City, CA 94404, US

(54) Bezeichnung: **HUMANES PERSEPHIN**

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

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

Beschreibung

Hinweis auf staatliche Förderung

[0001] Die Erfindung wurde mit staatlicher Unterstützung, Fördernummern NS24679 und CA53524 gemacht. Der Staat hat gewisse Rechte an dieser Erfindung.

Verwandte Anmeldungen

[0002] Die Anmeldung ist eine Teilfortsetzung der Anmeldung Nr. 08/881,172, angemeldet am 23. Juni 1997, welche eine Teilfortsetzung der Anmeldung Nr. 08/615,944, angemeldet am 14. März 1996, und eine Teilfortsetzung der Anmeldung PCT/US97/03461, angemeldet am 14. März 1997, ist.

Hintergrund der Erfindung

(1) Gebiet der Erfindung

[0003] Die Erfindung betrifft allgemein Nahrungs- oder Wachstumsfaktoren und insbesondere neue Wachstumsfaktoren der Neurturin-GDNF-Familie von Wachstumsfaktoren.

(2) Beschreibung des Standes der Technik

[0004] Die Entwicklung und die Instandhaltung von Geweben in komplexen Organismen erfordert die präzise Kontrolle über die Prozesse der Zellvermehrung, -differenzierung, des Zellfortbestands bzw. -überlebens und der Zellfunktion. Ein Hauptmechanismus, durch den die Prozesse kontrolliert bzw. reguliert werden, verläuft über die Wirkungen von Polypeptiden, welche als "Wachstumsfaktoren" bekannt sind. Diese strukturell unterschiedlichen Moleküle wirken durch spezifische Zelloberflächenrezeptoren unter Hervorrufen dieser Wirkungen.

[0005] Wachstumsfaktoren, bezeichnet als "neurotrophe Faktoren", fördern die Differenzierung, das Wachstum und den Fortbestand/das Überleben von Neuronen und befinden sich in dem Nervensystem oder in innerierten Geweben. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) war der erste neurotrophe Faktor, welcher identifiziert und charakterisiert wurde (Levi-Montalcini et al., J. Exp. Zool. 116: 321, 1951, welches als Referenz aufgenommen wird). NGF existiert als ein nicht-kovalent gebundenes Homodimer, welches das Überleben und das Wachstum von sympathischen, Neuralleisten-abgeleiteten Sensoren und von cholinergen Basalvorderhirn-neuronen fördert. In sympathischen Neuronen bildet diese Substanz einen Neurit-Auswuchs in vitro und ein erhöhtes axonales und dendritisches Wachstum in vivo. (Siehe Levi-Montalcini und Booker, Proc Nat'l Acad Sci 46: 384, 1960; Johnson et al. Science 210: 916-918, 1980; Crowley et al., Cell 76: 1001-12, 1994, welche als Referenz aufgenommen werden).

[0006] NGF weist Wirkungen auf die Erkennung und neuronale Formbarkeit auf und kann den Fortbestand bzw. das Überleben von Neuronen, welche aufgrund einer Vielzahl von mechanischen, chemischen, viralen und immunologischen Einflüssen einen Schaden erlitten haben, unterstützen bzw. fördern (Snider und Johnson, Ann Neurol 26: 489-506, 1989; Hefti, J Neurobiol 25: 1418-35, 1994, welche hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind). NGF ist ebenso dafür bekannt, mit dem endokrinen System und Immun- und Entzündungsprozessen erheblich wechselzuwirken. (Zusammengefasst in Scully und Otten, Cell Biol Int 19: 459-469, 1995; Otten und Gadiant, Int. J. Devl Neurosci 13: 147-151, 1995, welche hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind). Beispielsweise fördert NGF das Überleben von Mastzellen. (Horigome et al. J Biol Chem 269: 2695-2707, 1994, welches hierin durch Bezugnahme aufgenommen ist).

[0007] In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass Wachstumsfaktoren sich in Klassen, d. h. Familien oder Superfamilien, auf der Basis von Ähnlichkeiten in deren Aminosäuresequenzen einteilen lassen. Diese Familien umfassen beispielsweise die Familie der Fibroblast-Wachstumsfaktoren, die Neurotrophin-Familie und die Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β). Als ein Beispiel für Familienmitglied-Sequenzähnlichkeiten besitzen die TGF- β -Familienmitglieder sieben kanonische Gerüst-Cystein-Reste, welche die Mitglieder dieser Superfamilie identifizieren.

[0008] NGF ist der Prototyp solch einer Familie von Wachstumsfaktoren. Der Hirn-abgeleitete neurotrophe Faktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF), das zweite Mitglied dieser entdeckten Familie, zeigte sich als zu NGF verwandt aufgrund des Erhalts sämtlicher sechs Cysteine, welche die drei inneren Disulfide des

NGF-Monomeren bilden (Barde, Prog Growth Factor Res 2: 237–248, 1990 und Liebrock et al. Nature 341: 149–152, 1989, welche als Referenz aufgenommen werden). Unter Verwendung der durch BDNF vermittelten Information über die hochkonservierten Anteile der zwei Faktoren wurden zusätzliche Mitglieder (NT-3, NT-4/5) dieser Neutrotrophinfamilie durch verschiedene Gruppen schnell gefunden (Klein, FASEB J 8: 738–44, 1994, welches als Referenz aufgenommen wird).

[0009] Strukturell zu NGF unverwandte neurotrophe Faktoren wurden kürzlich identifiziert. Diese umfassen Faktoren, welche ursprünglich auf der Basis einer "neurotrophen Wirkung" isoliert wurden, wie der ziliäre neurotrophe Faktor (CNTF) (Lin et al., Science 246: 1023–5, 1989, welches als Referenz aufgenommen wird), zusammen mit anderen ursprünglich als ein Ergebnis von nicht-neuronalen Aktivitäten isolierten Faktoren (z. B. Fibroblast-Wachstumsfaktoren (Cheng und Mattson, Neuron 1: 1031–41, 1991, welches als Referenz aufgenommen wird), IGF-I (Kanje et al, Brain Res 486: 396–398, 1989, welches als Referenz aufgenommen wird), Leukämie-inhibierender Faktor (Kotzbauer et al., Neuron 12: 763–773, 1994, welches als Referenz aufgenommen wird)).

[0010] Der Glial-abgeleitete neurotrophe Faktor (GDNF) ist ein solcher neurotropher Faktor, welcher strukturell unverwandt zu NGF ist. GDNF war folglich ein einzigartiger Faktor, welcher bis jetzt nicht als ein Mitglied irgendeiner Subfamilie von Faktoren bekannt war. Die Entdeckung, Reinigung und Klonierung von GDNF ergab sich aus der Suche nach Faktoren, welche für das Überleben von dopaminergen Mittelhirnneuronen entscheidend sind, welche in der Parkinsonschen Krankheit degenerieren. GDNF wurde aus Ratten-B49-Glial-Zellen-konditionierten Medien (Lin et al., Science 260: 1130–2, 1993) aufgereinigt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass es ein entferntes Mitglied der TGF- β -Superfamilie von Wachstumsfaktoren mit ungefähr 20 % Identität in erster Linie auf der Basis der charakteristischen Aneinanderreihung (Alignment) der sieben kانونischen Gerüstcysteinreste ist (Lin et al., Science 260: 1130–2, 1993, welches als Referenz aufgenommen wird). Folglich könnte GDNF möglicherweise eine neue Unterfamilie innerhalb der TGF- β -Superfamilie darstellen.

[0011] In Bakterien gebildetes rekombinantes GDNF fördert spezifisch den Fortbestand bzw. das Überleben und die morphologische Differenzierung von dopaminergen Neuronen (Lin et al., Science 260: 1130–2, 1993); Tomac et al., Nature 373: 335–9, 1995; Beck et al., Nature 373: 339–41, 1995 und Ebendal et al., J Neurosci Res 40: 276–84, 1995, welche als Referenz aufgenommen werden) und Motoneuronen (Henderson et al., Science 266: 1062–4, 1994; Yan et al., Nature 373: 341–4, 1995; Oppenheim et al., Nature 373: 344–6, 1995, welche hierin durch Bezugnahme aufgenommen sind). Insgesamt war GDNF ein potenterer Faktor für die Förderung des Fortbestands bzw. das Überleben von Motoneuronen als die anderen Faktoren, und es war der einzige Faktor, welcher eine neuronale Atrophie als Antwort auf diese Läsionen verhinderte, wodurch es sich als ein vielversprechendes Therapeutikum für Motoneuronenerkrankungen darstellte.

[0012] Es wird jetzt allgemein angenommen, dass neurotrophe Faktoren viele Aspekte der neuronalen Funktion regulieren, einschließlich des Fortbestands bzw. Überlebens und der Entwicklung im fötalen Stadium, sowie der strukturellen Beständigkeit und Formbarkeit im Alter. Da sowohl akute Nervensystemerkrankungen als auch chronische neurodegenerative Erkrankungen durch strukturelle Schädigungen und möglicherweise durch erkrankungsinduzierte Apoptose gekennzeichnet sind, ist es wahrscheinlich, dass neurotrophe Faktoren in diesen Erkrankungen eine gewisse Rolle spielen. In der Tat sprechen viele Beweise dafür, dass neurotrophe Faktoren wertvolle therapeutische Mittel zur Behandlung dieser neurodegenerativen Erkrankungen/Bedingungen darstellen können, welche möglicherweise die sozial und ökonomisch zerstörerischsten Erkrankungen darstellen, welche derzeit unsere Gesellschaft bedrohen. Nichtsdestotrotz verbleibt ein anhaltender Bedarf an der Identifizierung neuer Mitglieder von Familien neurotropher Faktoren zur Verwendung in der Diagnose und Behandlung von einer Vielzahl von akuten und chronischen Erkrankungen des Nervensystems, weil unterschiedliche neurotrophe Faktoren potenziell vorzugsweise durch unterschiedliche Rezeptoren und auf unterschiedliche neuronale oder nicht-neuronale Zellarten wirken.

Zusammenfassung der Erfindung

[0013] Kurz gesagt richtet sich die vorliegende Erfindung daher auf die Identifizierung und Isolierung von im Wesentlichen aufgereinigten Faktoren, welche den Fortbestand bzw. das Überleben und das Wachstum von Neuronen sowie von nicht-neuronalen Zellen unterstützen. Folglich hatten die Erfinder hierin Erfolg in der Entdeckung neuer Proteinwachstumsfaktoren, welche zu einer Familie von Wachstumsfaktoren gehören, für die GDNF das erste bekannte Mitglied war. Das erste solche neu entdeckte Familienmitglied war Neurturin. Auf der Basis der Sequenz von GDNF und Neurturin haben die Erfinder hierin ein weiteres Mitglied der GDNF-Neurturin-Familie von Wachstumsfaktoren entdeckt, welches hierin als Persephin (PSP) bezeichnet wird.

Man nimmt an, dass dieser Wachstumsfaktor mindestens 75% Sequenzidentität unter homologen Sequenzen unterschiedlicher Säugerarten zeigt, obwohl die Sequenzhomologie in Nichtsäuger-Arten, wie bei Vogelarten, lediglich 65% betragen kann. Tatsächlich zeigen die reifen Maus-, Ratten- und Menschpersephin-Sequenzen von ungefähr 80% bis ungefähr 94% Sequenzidentität. Reife Persephinproteine, welche hierin angegeben sind, umfassen Maussequenzen, wie sie in den SEQ ID NOS: 79 und 187 angegeben sind ([Fig. 1B](#); jeweils die Aminosäuren 66 bis 154 und 61 bis 156), Rattensequenzen, wie sie in den SEQ ID NOS: 82 und 196 angegeben sind ([Fig. 2B](#); jeweils Aminosäuren 6 bis 94 und 1 bis 96), und Menschsequenzen, wie sie in den SEQ ID NOS: 221 und 223 angegeben sind.

[0014] Persephin wurde durch ein Verfahren, welches auf den erhaltenen konservierten Regionen der GD-NF-Neurturin-Familie beruht, von den Erfindung hierin identifiziert und erhalten. Dementsprechend wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches degenerierte Primer, die aus den Sequenzen dieser erhaltenen konservierten Regionen aufgebaut sind, zur Verwendung in dem Polymerase-Kettenreaktionsverfahren verwendet. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden die Maus-, Ratten- und Menschorthologen des neuen Familienmitglieds, Persephin, identifiziert und erhalten.

[0015] Das vorliegende Verfahren offenbart folglich sowohl Aminosäuresequenzen als auch Nucleotidsequenzen, welche für menschliches Persephin kodieren, einschließlich der Aminosäuresequenzen von SEQ ID NOS: 221 und 223 und der Nucleotidsequenzen von SEQ ID NOS: 183, 193 und 199 und 201 sowie der Komplementäre solcher Nucleotidsequenzen (SEQ ID NOS: 184, 194, 200 und 202). Zusätzlich schließt die vorliegende Erfindung Pre-, Pro- und Pre-Pro-Bereiche ebenso wie Pre-Pro-Persephinaminosäure- und -nucleotidsequenzen ein.

[0016] Erfindungsgemäß wird folglich ein isolierter und gereinigter Wachstumsfaktor vorgesehen, welcher die Polypeptidsequenz von SEQ ID NO: 217 oder SEQ ID NO: 223 umfasst, wobei der Wachstumsfaktor das Überleben in Mittelhirnzellen fördert. Die Erfindung stellt auch zur Verfügung:

- einen isolierten und gereinigten Wachstumsfaktor, umfassend eine Persephin-Sequenz, wie in SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221 oder SEQ ID NO: 223 dargestellt;
- und
- ein isoliertes und gereinigtes Polypeptid, umfassend:
 - (a) einen Pre-Pro-Abschnitt von Persephin, wie dargestellt in SEQ ID NO: 218;
 - (b) einen Pre-Abschnitt von Persephin, wie er in SEQ ID NO: 219 dargestellt ist; oder
 - (c) einen Pro-Abschnitt von Persephin, wie er in SEQ ID NO: 220 dargestellt ist.

[0017] Die Erfindung stellt auch ein isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül bereit, umfassend eine Nucleotidsequenz kodierend für einen erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor oder ein Fragment der Nucleotidsequenz umfassend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nucleotide, oder ein Nucleinsäuremolekül, welches dazu komplementär ist.

[0018] Zusätzlich liefert die Erfindung ein isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül umfassend:

- (a) eine Pre-Pro-Persephin-Nucleotid-Sequenz, wie in SEQ ID NO: 203 dargestellt, oder das Komplement davon;
- (b) einen Pre-Pro-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie in SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215 dargestellt, oder das Komplement von einem der beiden;
- (c) einen Pre-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie in SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 dargestellt, oder das Komplement von einem der beiden;
- (d) einen Pro-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie in SEQ ID NO: 211 dargestellt, oder das Komplement davon; oder
- (e) ein Fragment einer Sequenz, wie sie in irgendeinem von (a) bis (d) dargestellt ist, umfassend mindestens 15 zusammenhängende Nucleotide, worin das Fragment nicht in SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 190 oder dem Komplement von einem der beiden auftritt.

[0019] Expressionsvektoren und stabil transformierte Zellen, umfassend Persephin-Polynucleotide, sind ebenfalls innerhalb des Schutzzumfanges dieser Erfindung. Die transformierten Zellen können in einem Verfahren zur Herstellung von Persephin verwendet werden.

[0020] Folglich stellt die Erfindung ein rekombinantes Verfahren bereit, umfassend:

- (a) Subklonieren eines Polynucleotids, welches für den Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert, in einen Expressionsvektor, umfassend Regulationselemente, operabel verknüpft mit dem Polynucleotid;

- (b) Transformieren einer Wirtszelle mit dem Expressionsvektor;
- (c) Anwachsen der Wirtszelle in einer Wirtszellenkultur; und
- (d) Gewinnen des Wachstumsfaktors und/oder des Polynucleotids aus der Wirtszellenkultur.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform kann eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen Persephins zur Vorbeugung oder Behandlung von zellulärer Degeneration verwendet werden. Ebenfalls kann ein Patient durch Implantieren von transformierten Zellen, welche Persephin exprimieren, oder einer DNA-Sequenz, welche für Persephin kodiert, in einen Patienten, oder von Zellen, welche in Persephin kultiviert oder durch Wachstum vermehrt wurden, behandelt werden.

[0022] Die Erfindung stellt folglich bereit:

- einen erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor oder ein Polynucleotid, welches für einen solchen Wachstumsfaktor kodiert, zur Verwendung in der Vorbeugung oder Behandlung von Zelldegeneration oder -insuffizienz in einem Individuum;
- Verwendung eines Wachstumsfaktors der Erfindung zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in der Behandlung einer Zelldegeneration oder -insuffizienz, wobei die Zelldegeneration oder -insuffizienz (a) eine neuronale Degeneration ist, die verursacht wird durch eine periphere Neuropathie, amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer Krankheit, Parkinsonsche Krankheit, Huntington Erkrankung, Ischämischen Infarkt, akute Hirnverletzung, akute Rückenmarksverletzung, Tumore des Nervensystems, Multiple Sklerose oder Infektionen; (b) hämatopoetische Zelldegeneration oder -insuffizienz, die verursacht wird durch Eosinopenie, Basopenie, Lymphopenie, Monocytopenie, Neutropenie, Anämien, Thrombocytopenie oder Stammzell-Insuffizienzen davon; oder (c) Herzmuskeldegeneration oder -insuffizienz, die verursacht wird durch Kardiomyopathie oder kongestive Herzinsuffizienz;
- eine mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Zelle, und welche den erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor exprimiert zur Verwendung in der Vorbeugung oder Behandlung von Zelldegeneration oder -insuffizienz in einem Individuum;
- ein Verfahren zur Detektion der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe aus einem Patienten, umfassend Detektion und/oder Quantifizierung der Anwesenheit in der Probe von mRNA, kodierend für einen erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor;
- ein in vitro Verfahren zur Detektion von Persephin-Gen-Veränderungen, umfassend Nachweisen der Anwesenheit eines nicht-inakten Persephingens in einer Zelle wobei die Anwesenheit des nicht-intakten Gens die Anwesenheit von Genveränderungen anzeigt;
- Verfahren zur Förderung des Wachstums und/oder der Differenzierung einer Zelle in einem Kulturmedium, umfassend Zugeben zu dem Kulturmedium den erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor;
- ein isoliertes und gereinigtes Antisense-Polynucleotid, umfassend eine Sequenz komplementär zu einer Nucleotid-Sequenz der Erfindung mit der Fähigkeit zur Hybridisierung mit einer natürlich vorkommenden DNA- oder mRNA-Polynucleotid-Sequenz, kodierend für Persephin zur Verhinderung der Transkription und/oder Translation eines kodierten Persephinpolypeptids; und
- ein Antisense-Polynucleotid, wie oben beschrieben, zur Verwendung in der Behandlung einer Erkrankung, ausgelöst durch Expression von Persephin in einer Zellpopulation.

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt ebenso Zusammensetzungen und Verfahren zur Detektion von Persephin zur Verfügung. Ein Verfahren basierend auf Persephin-Antikörpern, und andere Verfahren beruhen auf der Detektion von mRNA oder cDNA oder Genom-DNA, welche für Persephin kodieren, unter Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken.

[0024] Die Erfindung stellt folglich bereit:

- isolierte und gereinigte Antikörper, welche zur spezifischen Reaktion mit einem erfindungsgemäßen Wachstumsfaktor oder einem Epitop davon in der Lage sind;
- ein Verfahren zur Detektion der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe aus einem Patienten, umfassend Reagierenlassen der Antikörper, wie oben beschrieben, mit einem Wachstumsfaktor, welcher in einer Probe anwesend ist, und Detektion des Bindens der Antikörper an den Wachstumsfaktor; und
- ein Kit zur Detektion der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe aus einem Patienten, umfassend Antikörper, wie oben beschrieben, welche in der Lage sind, detektierbar mit dem Wachstumsfaktor zu reagieren, verpackt in einem Behälter.

[0025] Unter den zahlreichen gefundenen Vorteilen, welche von der vorliegenden Erfindung erzielt werden, können daher die Bereitstellung eines neuen Wachstumsfaktors, Persephin, zur Verwendung in der Vorbeugung von Atrophie, der Degeneration oder dem Tod von bestimmten Zellen, insbesondere Neuronen, das heißt zur Vorbeugung oder Behandlung von Erkrankungen, hervorgerufen durch zelluläre Degeneration, und im Be-

sonderen neuronaler Degeneration; die Bereitstellung von menschlichem Persephin; die Bereitstellung von Verfahren zur Herstellung von Persephin durch rekombinante Techniken; die Bereitstellung von Verfahren, welche Persephingehalte in einer Probe aus einem Patienten detektieren und verfolgen bzw. aufzeichnen können; und die Bereitstellung von in vitro Verfahren, welche Veränderungen in dem Persephin-Gen detektieren können, genannt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen/Figuren

[0026] Die **Fig. 1** zeigt (A) Mauspersephin-Gen in voller Länge (SEQ ID NO: 177) mit Pfeilen, die ein 88 Basenpaar Intron von Positionen 155–242 anzeigen, und (B) die Nucleotidsequenz von Maus-Pre-Pro-Persephin (SEQ ID NO: 179) mit kodierter Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 185);

[0027] **Fig. 2** zeigt (A) Rattenpersephin-Gen in voller Länge (SEQ ID NO: 188) mit Pfeilen, die ein 88 Basenpaar Intron von Positionen 155–242 anzeigen, und (B) die Nucleotidsequenz von Ratten-Pre-Pro-Persephin (SEQ ID NO: 190) mit kodierter Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 196);

[0028] **Fig. 3** zeigt chimäre Mausmoleküle (A) PSP/NTN, enthaltend das Persephinfragment (Reste 1–63) und das Neurturinfragment (Reste 68–100) und (B) NTN/SPS, enthaltend das Neurturinfragment (Reste 1 bis 67) und das Persephinfragment (Reste 64 bis 96) mit Pfeilen, die den Kreuzpunkt (crossover point) in beiden anzeigen;

[0029] **Fig. 4** zeigt den überlebensfördernden Effekt von Persephin in Maus-Mittelhirnzellen am embryonalen Tag 14, kultiviert innerhalb von drei Tagen (a) in Abwesenheit von Persephin, wobei fast alle Zellen abgestorben sind, und (b) in Anwesenheit von Persephin (100 ng/ml), wobei ein deutliches Überleben der neuronalen Zellen ersichtlich ist;

[0030] **Fig. 5** zeigt RT/PCT-Studie für Persephinexpression in Geweben von adulten Mäusen, welche Persephinexpression in Nierenzellen zeigen.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

[0031] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Identifizierung, Isolierung und Sequenzierung eines DNA-Moleküls, welches für einen neuen Wachstumsfaktor, Persephin, kodiert. Persephin fördert das Zellüberleben und insbesondere das Überleben von neuronalen Zellen. Vor dieser Erfindung war Persephin unbekannt und war weder als eine einzelne biologische Substanz identifiziert, noch war es in reiner Form isoliert.

[0032] Der Wachstumsfaktor Neurturin (NTN) wurde wie in der ebenfalls anhängigen Anmeldung Nr. 08/519,777, eingereicht am 28. August 1995, angegeben identifiziert und isoliert. Aus der Sequenz von Neurturin und der Sequenz des eng verwandten Wachstumsfaktors, des Glial-abgeleiteten neurotrophen Faktors (GDNF), haben die Erfinder hierin Strategien entwickelt und verfolgt, um zusätzliche verwandte Faktoren aufzufinden. Neurturin ist ungefähr zu 40% identisch mit GDNF, allerdings weniger als 20% identisch mit irgendeinem anderen Mitglied der TGF- β -Superfamilie. Zusammen definieren diese beiden Proteine eine neue Subfamilie innerhalb der TGF- β -Superfamilie. Zahlreiche Sequenzabschnitte innerhalb von Neurturin und GDNF wurden identifiziert, welche hochkonserviert sind, so dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit in jedem zusätzlichen Mitglied dieser Subfamilie vorliegen. Diese Sequenzinformation kann daher verwendet werden, um vorher unbekannte Mitglieder dieser Subfamilie durch den Entwurf von degenerierten Oligonucleotiden zu isolieren, welche entweder als Primer in PCR-Reaktionen oder als Sonden in Hybridisierungsstudien verwendet werden.

[0033] Unter Verwendung der PCR-Strategie mit dem neu degenerierten Primer, wie in Beispiel 11 der ebenfalls anhängigen Anmeldung Nr. 08/519,777 beschrieben, konnten die Erfinder hierin einen dritten Faktor, Persephin, identifizieren, welcher ungefähr 40–50% identisch zu sowohl GDNF als auch Neurturin ist. Die der Aminosäuresequenz von erhaltenen/konservierten Abschnitten von Neurturin und GDNF entsprechenden Primer (SEQ ID NO: 42 und SEQ ID NO: 44) wurden zur Amplifizierung/Verstärkung eines 77 nt-Fragments aus Rattengenom-DNA verwendet. Die resultierenden Produkte wurden in das Bluescript-KS-Plasmid subkloniert und sequenziert. Die Sequenz eines der amplifizierten Produkte sagte Aminosäuresequenzdaten, intern in den PCR-Primern, voraus, welche von denen von GDNF oder Neurturin unterschiedlich waren, wiesen aber mehr als 20% Identität mit GDNF und Neurturin auf, wohingegen die Sequenzen anderer amplifizierter Produkte, die wir erhalten haben, GDNF oder Neurturin entsprachen, wie es erwartet wurde. Die 22-Nucleotidsequenz (SEQ ID NO: 90) wurde anschließend mit den Rattensequenzen von GDNF und Neurturin aneinandergereiht/align

und als einzigartig gefunden. Diese neue Sequenz legte daher nahe, dass ein neues Familienmitglied identifiziert worden war, welches hierin als Persephin bezeichnet wird.

[0034] Um zusätzliche Persephin-Sequenzinformationen zu erhalten, wurden Primer, welche die einzigartige 22-Nucleotidsequenz des amplifizierten Fragments enthalten, in der Technik der schnellen Amplifikation von cDNA-Enden (RACE-Technik) verwendet (Frohman M.A. *Methods in Enzymology* 218: 340–356, 1993), wobei cDNA verwendet wurde, die aus neonatalem Rattenhirn erhalten wurde. Ein ungefähr 350 nt-Fragment wurde in dieser PCR-Reaktion erhalten, welches eine Rattenpersephin-c-DNA-Teilsequenz von ungefähr 350 Nucleotiden (SEQ ID NO: 106) darstellte. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz dieser cDNA wurde mit der von GDNF und Neurturin verglichen, und es wurde gefunden, dass sie ungefähr 40% Identität mit jedem dieser Proteine aufwies. Wichtigerweise war der charakteristische Abstand der kanonischen Gerüstcysteinreste in den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie anwesend. Darüber hinaus war zusätzlich zu dem Ähnlichkeitsabschnitt, welcher durch die zur Isolierung von Persephin verwendeten degenerierten Primer kodiert wird, ein weiterer Abschnitt hoher Homologie, welcher von GDNF und Neurturin geteilt wird, allerdings in anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie nicht vorliegt, ebenso anwesend in Persephin.

GDNF	ACCRPVAFDDDLFLDD	(aa 60-76)	(SEQ ID NO: 98)
NTN	PCCRTAYEDEVSFKDV	(aa 61-77)	(SEQ ID NO: 99)
PSP	PCCQPTSYAD-VTFLDD	(aa 57-72)	(SEQ ID NO: 100)

[0035] (Die Aminosäure-Nummerierung verwendet den ersten Cys-Rest als Aminosäure 1).

[0036] Mit der Bestätigung, dass Persephin in der Tat ein neues Mitglied der GDNF/NTN-Subfamilie darstellt, isolierten wir Mausgenom-Klone von Persephin, um zusätzliche Sequenzinformationen zu erhalten. Es wurden der Ratten-cDNA-Sequenz entsprechende Primer in einer PCR-Reaktion zur Verstärkung/Amplifizierung eines 155-Nucleotid- (nt) Fragments aus Mäusegenom-DNA verwendet, welches zu der Rattenpersephin-cDNA-Sequenz homolog war. Diese Primer wurden anschließend verwendet, um Mauspersephin-Genomklone aus einer Maus-129/Sv-Bibliothek in einem P1-Bakteriophagen-Vektor zu erhalten (library screening service of Genome Systems, Inc., St. Louis, MO).

[0037] Die Restriktionsfragmente (3,4 kb Nco I und ein 3,3 kb Bam HI) aus diesem P1-Klon, welche das Persephingen enthielten, wurden durch Hybridisierung mit einem 210 nt-Fragment von Persephin, erhalten durch PCR unter Verwendung von Mäusegenom-DNA und persephinspezifischen Primern, identifiziert. Die Nco I- und Bam HI-Fragmente wurden sequenziert, und es wurde gefunden, dass sie einen Abschnitt von Aminosäuren kodieren, welche denen entsprechen, die in dem Rattenpersephin-RACE-Produkt vorlagen, und homolog zu den reifen bzw. entwickelten Abschnitten von sowohl Neurturin als auch GDNF sind (**Fig. 11**).

[0038] Menschliches Persephin wurde auf eine Weise erhalten, welche ähnlich der von Mauspersephin ist. Degenerierte PCR-Primer wurden verwendet, um menschliche genomische DNA zu amplifizieren, und ein Klon wurde mit einer Sequenz homolog zu Mauspersephin bestimmt. Primer basierend auf der identifizierten Sequenz wurden dann verwendet, um cDNA-Bibliotheken zu screenen. Positive Klone wurden durch Hybridisierung mit einer DNA-Probe, abgeleitet aus der identifizierten Sequenz, identifiziert, und diese Klone wurden dann sequenziert.

[0039] Wenn die Aminosäuresequenzen von reifem Maus-GDNF, -NTN und -PSP unter Verwendung des ersten kanonischen Gerüstcysteins als Ausgangspunkt aneinandergereiht/alignt werden, was erfolgt, weil Änderungen in den Spaltungsstellen zwischen den Familienmitgliedern eine Variabilität in den Segmenten aufwärts des ersten Cysteins hervorrufen, ist Persephin (91 Aminosäuren) etwas kleiner als sowohl Neurturin (95 Aminosäuren) als auch GDNF (94 Aminosäuren). Die Gesamtidentität innerhalb dieses Bereichs beträgt ungefähr 50% mit Neurturin und ungefähr 40% mit GDNF.

[0040] Ein weiteres Nucleotid-Sequenzieren des Mauspersephin-NcoI-Fragments ergab die Nucleotidsequenz des gesamten Mauspersephin-Gens, wie in der **Fig. 1** gezeigt. Zusätzlich wurde das gesamte Rattenpersephin-Gen durch Sequenzieren eines PCR-verstärkten, PCR-amplifizierten Fragments der Ratten-Genom-DNA bestimmt, wie in der **Fig. 2** gezeigt. In sowohl dem Maus- als auch dem Rattenpersephin-Gen erstreckte sich von der Sequenz, welche für ein Initiator-Methionin kodiert, bis zu einem Stoppkodon an den Positionen 244–246 ein offener Leserahmen (open reading frame). Jedoch trat irgendwo in dieser Sequenz eine erkennbare Anomalie auf, sodass die für die RXXR-Spaltungsstelle kodierende Sequenz (Positionen 257–268) und die dem entsprechenden reifen Persephinprotein entsprechende Sequenz (Positionen 269–556) mit diesem offenen Leserahmen nicht co-linear sind. Anstelle dessen kodiert ein zweiter Leserahmen für die Spal-

tungsstelle und das reife Persephin. Unabhängig von dieser erkennbaren Anomalie wurde gefunden, dass Säugerzellen Persephin entweder von der Maus- oder der Ratten-Genomsequenz vollständiger Länge exprimieren (siehe Beispiel 14 unten).

[0041] Um den Ursprung dieser Anomalie zu verfolgen, stellten wir Säugerexpressionsvektoren für sowohl Maus- als auch Rattenpersephin her. Zur Konstruktion des Mausplasmids wurde ein P1-Klon, enthaltend das Mauspersephin-Gen, als ein Templat in einem PCR-Assay verwendet. Primer wurden entworfen, so dass das erhaltene/resultierende Fragment das Persephingen von dem Initiator-Methionin bis zum Stoppkodon enthält. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vorwärtsprimer M3175 [5'-TGCTGTCACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA] und einen Rückwärtsprimer/Reverse-Primer M3156 [5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC]. Zur Konstruktion des analogen Rattenplasmids wurde Rattengenom-DNA als ein Templat in einem PCR-Assay verwendet. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vorwärtsprimer M3175 [5'-TGCTGTCACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA] und einen Rückwärtsprimer/Reverse-Primer M3156 [5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC]. Die amplifizierten Produkte wurden in BSKS kloniert und sequenziert, um zu bestätigen, dass der korrekte Klon erhalten wurde. Die Ratten- und Mauspersephin-Fragmente wurden unter Verwendung von Sma I und Hind III ausgeschnitten und in Asp718 (blunted) und Hind III-Schnittstellen des Säugerexpressionsvektors pCB6 kloniert.

[0042] COS-Affenzellen wurden mit entweder den Ratten- oder Mauspersephin-Expressionsvektoren oder dem nicht-rekombinanten Vektor selbst (pCB6) transfiziert bzw. transfiziert. Nach achtundvierzig Stunden wurden die Zellen lysiert, die Proben auf ein 15% SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, und die Proteine wurden durch Elektrophorese getrennt. Die Proteine wurden dann durch Elektroblothing auf Nitrocellulose übertragen. Diese Nitrocellulosemembran wurde mit Anti-Persephin-Antikörpern inkubiert (welche gegen ausgereiftes Persephin, hergestellt in Bakterien aus einem pET-Plasmid, erzeugt wurden), um die Anwesenheit von Persephin in den Lysaten zu detektieren. Die Lysate aus den transfizierten Zellen mit entweder den Ratten- oder Mauspersephin-Expressionsvektoren, jedoch nicht das Lysat aus den Zellen, welche mit pCB6 transfiziert wurden, enthalten hohe Mengen an Persephin. Die Größe detektierten Persephins war 10–15 kD, konsistent mit der vorhergesagten Größe für das prozessierte Persephin (das heißt reife Form des Persephins). Konditioniertes Medium, welches aus diesen Zellen geerntet wurde, enthielt ebenfalls reifes Persephin. Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Maus- als auch die Rattenpersephin-Gene dazu in der Lage sind, die Synthese eines ordentlich prozessierten Persephimoleküls zu veranlassen.

[0043] Zum Auffinden des Mechanismus, durch welchen dieses geschieht, isolierten wir RNA aus Zellen, welche mit entweder dem Ratten- oder dem Mauspersephin-Expressionsvektor transfiziert wurden. RT/PCR-Analyse wurde unter Verwendung von Primern, entsprechend dem Initiator-Met und dem Stoppkodon, durchgeführt. Wir detektierten zwei Fragmente: eines korrespondierte mit der vorhergesagten Größe des Persephingens, und das andere war etwas kleiner, was darauf hinweist, dass RNA-Spleißen stattfindet. Wir bestätigten dies mit einer Anzahl anderer Primerpaare. Sowohl die großen als auch die kleinen Persephinfragmente wurden kloniert und sequenziert. Wie erwartet korrespondierte das größere Fragment mit dem Persephin-Gen. Das kleinere Fragment korrespondierte mit einer gespleißten Version von Persephin. Ein kleines 88 nt-Intron innerhalb der Pro-Domäne (lokalisiert 154 nt abwärts des Start-Kodons) wurde ausgespleißt. Nach diesem Spleißvorgang war der "Frameshift" nicht mehr vorhanden (das heißt, das Initiator-Met und der reife Abschnitt sind im gleichen Rahmen (in-frame)) in sowohl dem Ratten- als auch dem Mauspersephin.

[0044] Der N-Terminus von Persephin wurde durch Bezugnahme auf die N-terminalen Abschnitte von Neurturin oder GDNF vorhergesagt. Unter Verwendung der Neurturin-Sequenzhomologie und der Spaltungssignale liegt ein kennzeichnendes RXXR-Spaltungsmotiv, beginnend 9 Reste aufwärts des ersten kanonischen Gerüst-Cysteins von Persephin, vor, was nahelegt, dass reifes Mauspersephin 5 Aminosäuren (ALAGS) (SEQ. ID NO: 103) aufwärts dieses Cysteins enthält (wie es ebenso bei Neurturin der Fall ist). Die korrespondierenden 5 Aminosäuren in dem Rattenpersephin sind ALPGL (SEQ. ID NO: 112), und die in dem menschlichen Persephin sind ALSGP (SEQ. ID NO: 224). Unter Verwendung dieser Parameter würde reifes Persephin aus 96 Aminosäuren bestehen und hat eine vorhergesagte Molekularmasse von 10,4 kD.

[0045] Unter "reifem" Wachstumsfaktor wird hierin die ab- bzw. ausgeschiedene Form des Wachstumsfaktors verstanden, in der jegliche Pre- oder Pro-Abschnitte (ab)gespalten wurden, und welcher als ein Monomer oder in Analogie zu anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie in der Form eines Homodimers, welches durch Disulfidbrücken verbunden ist, vorliegen kann.

[0046] Die Entwicklung des neuen Wachstumsfaktors, Persephin, wie oben beschrieben, ist ein Ergebnis der früheren Entwicklung durch die Erfinder von Neurturin. Somit sind die Experimente, welche zu der Entwicklung

von Neurturin führten, relevant in der jetzigen Entwicklung von Persephin ebenso wie der biologischen Aktivität von Persephin. Die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von Neurturin ist detailliert unten in den Beispielen 1–5 beschrieben.

[0047] Im Wesentlichen homologe Wachstumsfaktoren können nativ zu einem Gewebe oder Arten sein, und ähnlich kann die biologische Aktivität in einer beliebigen Zahl von biologischen Assaysystemen charakterisiert werden.

[0048] Der Bezug auf Pre-Pro-Persephin soll derartig ausgelegt werden, dass Pre-Pro-Wachstumsfaktoren eingeschlossen sind, welche einen Pre- oder Führungs- oder Signalsequenzabschnitt, einen Pro-Sequenzbereich und Persephin, wie hierin definiert, enthalten.

[0049] Der Begriff "biologisch äquivalent" soll bedeuten, dass die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung zum Zeigen eines Teils oder sämtlicher Wachstumsförderungeigenschaften in ähnlicher Weise, allerdings nicht notwendigerweise zu demselben Grad, in der Lage sind, wie das rekombinant hergestellte Mensch-, Maus- oder Ratten-Persephin, wie hierin identifiziert.

[0050] Unter "im Wesentlichen homolog" wird verstanden, dass der Grad der Sequenzidentität von Persephin-Orthologen, einschließlich Mensch-, Maus- und Rattenpersephin, sowie Persephin aus irgendeiner anderen Art, größer ist als der zwischen Paralogen, wie Persephin und Neurturin oder Persephin und GDNF, und größer als der früher für Mitglieder der TGF- β -Superfamilie angegebene ist. (Hinsichtlich der Diskussion der Homologie von TGF- β -Superfamilien-Mitgliedern siehe Kingsley, Genes and Dev. 8: 133–46, 1994).

[0051] Die Sequenzidentität oder prozentuale Identität soll der Prozentanteil der selben Reste zwischen zwei Sequenzen bedeuten. Die Referenzsequenz ist menschliches Persephin bei Bestimmung der prozentualen Identität mit Maus- oder Rattenpersephin und mit den Nicht-Persephin-Wachstumsfaktoren, menschliches Neurturin oder menschliches GDNF. Die Referenzsequenz ist Mauspersephin bei Bestimmung der prozentualen Identität mit Maus-GDNF und Mausneurturin und Rattenpersephin bei Bestimmung der prozentualen Identität mit Ratten-GDNF und Rattenneurturin. Auf menschliches Neurturin wird Bezug genommen bei Bestimmung der prozentualen Identität mit nicht-menschlichem Neurturin, und auf menschliches GDNF. In allen der obigen Vergleiche werden die zu vergleichenden Sequenzen unter Verwendung des Clustal-Verfahrens (Higgins et al., Cabios 8: 189–191, 1992) der mehrfachen Sequenzaneinanderreihung (Alignment) in der Lasergene biocomputing Software (DNASTAR, INC, Madison, WI) aneinandergereiht/alignt. In diesem Verfahren werden mehrfache Aneinanderreihungen in progressiver Weise durchgeführt, wobei größere und größere Vergleichsgruppen unter Verwendung von Ähnlichkeitszahlen, berechnet aus einer Reihe von paarweisen Vergleichen, aufgebaut werden. Die optimalen Sequenzaneinanderreihungen werden durch das Auffinden der maximalen Aneinanderreihungszahl erhalten, welche der Mittelwert aller Zahlen zwischen den getrennten Resten in der Aneinanderreihung, bestimmt aus einer Restgewichtstabelle, welche die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines gegebenen Aminosäurewechsels in zwei verwandten Proteinen innerhalb eines angegebenen Evolutionsabschnitts darstellt, ist. Abzüge für das Öffnen und Verlängern von Lücken in der Aneinanderreihung tragen zu der Zahl bei. Die bei diesem Programm verwendeten Grundeinstellungen sind wie folgt: Lückenabzug für mehrfache Aneinanderreihung = 10; Lückenlängenabzug für mehrfache Aneinanderreihung = 10; k-Tupel-Wert in paarweiser Aneinanderreihung = 1; Lückenabzug in paarweiser Aneinanderreihung = 3; Fensterwert bei der paarweisen Aneinanderreihung = 5; gesicherte Diagonalen in paarweiser Aneinanderreihung = 5. Die Restgewichtstabelle, welche für das Vergleichsprogramm verwendet wird, ist PAM 250 (Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, Hrgb., NBRF, Washington, Band. 5, Ergänzung 3, S. 345, 1978).

[0052] Der prozentuale Erhalt bzw. die prozentuale Konservierung wird aus der obengenannten Aneinanderreihung durch Addition des Prozentanteils der identischen Reste zu dem Prozentanteil der Positionen, an denen die zwei Reste eine bewahrte/konservierte Substitution darstellen (definiert als einen log ungerade Zahlen-Wert von größer als oder gleich 0,3 in der PAM250-Restgewichtstabelle aufweisend), berechnet. Die bevorzugten Aminosäure-Änderungen, unter Verwendung dieses Kriteriums sind: R-K; E-D, Y-F, L-M; V-I, Q-H. Die Bewahrung/Konservierung ist bezogen auf menschliches Persephin, wenn die prozentuale Bewahrung/Konservierung mit Persephin von anderen Arten oder mit Nicht-Persephin-Wachstumsfaktoren bestimmt wird; sie ist auf menschliches Neurturin bezogen, wenn die prozentuale Bewahrung mit nicht-menschlichem Neurturin oder mit Nicht-Persephinen-Nicht-Neurturin-Wachstumsfaktoren bestimmt wird.

[0053] Die Tabelle 1 zeigt die Vergleiche der Identität (I) und der Bewahrung bzw. Konservierung (C) für Vergleiche von reifem Persephin, reifem Neurturin und reifem GDNF für verschiedene Arten. Die Vergleiche wur-

den zwischen reifem menschlichem Persephin (hPSP) und reifem Maus- und Rattenpersephin (mPSP bzw. rPSP) und zwischen reifem menschlichem Persephin und reifem menschlichem GDNF oder Neurturin (jeweils hGDNF bzw. hNTN) durchgeführt. Neurturin-Vergleiche wurden zwischen reifem menschlichem und reifem Mausneurturin (jeweils hNTN bzw. mNTN) und zwischen jedem dieser und reifem menschlichem, Ratten- und Maus-GDNF (jeweils hGDNF, rGDNF bzw. mGDNF) durchgeführt, wie in der Tabelle gezeigt.

Tabelle 1

VERGLEICH	% IDENTITÄT	% BEWAHRUNG
hPSP v. mPSP	81	81
hPSP v. rPSP	80	81
mPSP v. rPSP	94	96
hPSP v. hNTN	49	50
hPSP v. hGDNF	40	43
hNTN v. mNTN	90	93
hNTN v. rGDNF	44	53
hNTN v. mGDNF	43	52
hNTN v. hGDNF	43	53
mNTN v. rGDNF	42	52
mNTN v. mGDNF	41	51
mNTN v. hGDNF	41	52

[0054] Der Homologiegrad zwischen dem menschlichen Persephin und dem Maus- oder Rattenpersephin beträgt ungefähr 80%, während der Homologiegrad zwischen dem Maus- und Rattenpersephin bei ungefähr 94% liegt. Die Neurturin-Vergleiche, wie sie in Tabelle 1 gezeigt sind, zeigen an, dass die reifen Maus- und menschlichen Neurturin-Proteine ungefähr 90% Sequenzidentität aufweisen. Darüber hinaus nimmt man an, dass sämtliche Persephin- und Neurturin-Homologen von nicht-menschlichen Säugerarten in ähnlicher Weise mindestens ungefähr 75% Sequenzidentität mit menschlichem Persephin, menschlichem Neurturin oder menschlichem GDNF aufweisen. Für Nichtsäugerarten, wie beispielsweise Vogelarten, wird angenommen, dass der Grad an Homologie mit Persephin bei mindestens ungefähr 65% Identität zu menschlichem Persephin oder Neurturin, menschlichem Neurturin oder menschlichem GDNF liegt. Zum Vergleich können die Variationen zwischen Familienmitgliedern der Neurturin-Persephin-GDNF-Familie von Wachstumsfaktoren durch den Vergleich von Persephin und GDNF oder Neurturin und GDNF erkannt werden. Menschliches Persephin hat ungefähr 40% Sequenzidentität und ungefähr 43% Sequenzerhalt/-konservierung mit menschlichem GDNF; und ungefähr 49% Sequenzidentität und ungefähr 50% Sequenzerhalt/-konservierung mit menschlichem Neurturin. In ähnlicher Weise besitzt menschliches Neurturin ungefähr 40% Sequenzidentität und ungefähr 50% Sequenzbewahrung mit menschlichem GDNF. Es wird angenommen, dass die unterschiedlichen Familienmitglieder ebenso eine ähnliche Sequenzidentität von ungefähr 40% der von Neurturin, ungefähr 40% der von Persephin und ungefähr 40% der von GDNF aufweisen, und innerhalb eines Bereiches von ungefähr 30% bis ungefähr 75% Identität mit Neurturin, innerhalb eines Bereiches von ungefähr 30% bis ungefähr 75% Identität mit Persephin oder innerhalb eines Bereiches von ungefähr 30% bis ungefähr 75% Sequenzidentität mit GDNF vorliegen.

[0055] Folglich wird erwartet, dass ein gegebenes Mitglied der GDNF-Neurturin-Persephin-Familie eine geringere Sequenzidentität mit irgendeinem anderen Familienmitglied derselben Art aufweist als das, welches in Orthologen dieses Familienmitgliedes in anderen Arten vorliegt, ebenso wie menschliches GDNF und menschliches Neurturin zu Maus-GDNF und Maus-Neurturin jeweils enger verwandt sind als zueinander oder zu GDNF, und es wird angenommen, dass irgendein gegebenes Familienmitglied eine größere Sequenzidentität mit

einem anderen Familienmitglied als zu irgendeinem anderen bekannten Mitglied der TGF- β -Superfamilie aufweist (Kingsley, supra).

[0056] Homologe von Pre-Pro-Persephin in nichtmenschlichen Säugerarten können mittels des Persephin-anteils der Aminosäuresequenz mit mindestens ungefähr 75% Sequenzidentität mit menschlichem Persephin identifiziert werden, und Homologe von Pre-Pro-Persephin in Nichtsäugerarten können mittels des Persephin-anteils der Aminosäuresequenz mit mindestens ungefähr 65% Identität mit menschlichem Persephin identifiziert werden.

[0057] Persephin, wie der Begriff hierin verwendet wird, kann ebenso Hybrid- und modifizierte Formen von Persephin einschließen, einschließlich Fusionsproteine und Persephinfragmente und Hybrid- und modifizierte Formen, in denen bestimmte Aminosäuren deletiert oder ersetzt wurden, sowie Modifikationen, in welchen beispielsweise eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht wurde(n) gegen eine modifizierte Aminosäure oder ungewöhnliche Aminosäure, und Modifikationen, wie beispielsweise Glycosolierungen, solange die Hybrid- oder modifizierte Form die biologische Aktivität von Persephin beibehält. Unter Beibehalten der biologischen Aktivität wird verstanden, dass das neuronale Überleben gefördert wird, obwohl nicht notwendigerweise auf demselben Potenzniveau, wie das des Human-, Maus- oder Ratten-Persephins, wie hierin identifiziert.

[0058] Ebenso enthalten in der Bedeutung von im Wesentlichen homolog ist ein beliebiges Persephin, welches mittels Kreuzreaktivität bzw. Cross-Reaktivität mit Antikörpern gegen Persephin isoliert werden kann oder dessen kodierende Nucleotidsequenzen, einschließlich Genom-DNA, mRNA oder cDNA, durch Hybridisierung mit der komplementären Sequenz der Genom- oder Subgenom-Nucleotidsequenzen oder cDNA von Persephin oder deren Fragmente isoliert werden können. Es ist ebenso für den Durchschnittsfachmann von Wert, dass degenerierte DNA-Sequenzen für menschliches Persephin kodieren können, und diese sollen ebenso innerhalb der vorliegenden Erfindung liegen, wie es für allelische Varianten von Persephin der Fall ist.

[0059] Konservativ/erhaltend substituierte Persephin-Proteine sind ebenfalls innerhalb des Schutzzumfangs der vorliegenden Erfindung. Konservativ/erhaltende Aminosäure-Substitutionen beziehen sich auf die Austauschbarkeit von Resten mit ähnlichen Seitenketten. Konservativ/erhaltend ausgetauschte Aminosäuren können gemäß ihrer chemischen Eigenschaften ihrer Seitenketten gruppiert werden. Zum Beispiel schließt eine Gruppierung von Aminosäuren solche Aminosäuren mit neutralen und hydrophoben Seitenketten ein (A, V, L, I, P, W, F und M); eine andere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit neutralen und polaren Seitenketten (G, S, T, Y, C, N und Q); eine andere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit basischen Seitenketten (K, R und H); eine andere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit sauren Seitenketten (D und E); eine andere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten (G, A, V, L und I); eine weitere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit aliphatischen Hydroxyl-Seitenketten (S und T); eine weitere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit aminenthaltenden Seitenketten (N, Q, K, R und H); eine weitere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (F, Y und W); und eine weitere Gruppierung ist eine solche von Aminosäuren mit Schwefel enthaltenden Seitenketten (C und M). Bevorzugte erhaltene/konservative Aminosäure-Substitutionsgruppen sind: R-K,; E-D, Y-F, L-M; V-I und Q-H. Zusätzlich wird angenommen, dass Q-R-H und A-V bevorzugte Substitutionen für Persephin in sofern sind, dass sie innerhalb Mensch-, Maus- und Ratten-Paraloga von Persephin auftreten.

[0060] In dem Fall von Pre-Pro-Neurturin können alternativ gespleißte Proteinprodukte, resultierend aus einem Intron, lokalisiert in der Kodierungssequenz des Pro-Abschnitts existieren. Es wird angenommen, dass das Intron in der Genomsequenz an einer Position vorliegt, welche der Position zwischen den Nucleinsäuren 169 und 170 der cDNA entspricht, welche wiederum einer Position innerhalb der Aminosäure 57 in sowohl den Maus- als auch Mensch-Pre-Pro-Neurturin-Sequenzen entspricht. Folglich kann ein alternatives Spleißen an dieser Position eine Sequenz bilden, die sich von der hierin für Mensch- und Maus-Pre-Pro-Neurturin identifizierten Sequenz (jeweils SEQ ID NO: 11 bzw. SEQ ID NO: 12) an der identifizierten Aminosäurestelle durch Einfügen und/oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren unterscheidet. Es sollen sämtliche alternativ gespleißten Pre-Pro-Neurturin-Proteine innerhalb des Begriffes Pre-Pro-Neurturin enthalten sein, und ähnlich sollen sämtliche alternativ gespleißten Pre-Pro-Persephin-Proteine innerhalb des hierin verwendeten Begriffes Pre-Pro-Persephin enthalten sein.

[0061] Obwohl die Erfinder der vorliegenden Erfindung an keine Theorie gebunden sein wollen, wird angenommen, dass die hierin identifizierten Mensch-, Maus- und Ratten-Proteine sowie die Homologen aus anderen Geweben und Arten als Dimere in ihrer biologisch aktiven Form auf eine Weise existieren können, die konsistent mit dem ist, was für andere Faktoren der TGF- β -Superfamilie bekannt ist.

[0062] Zusätzlich zu Homodimeren können die monomeren Einheiten der Dimeren von Persephin zum Aufbau von stabilen Wachstumsfaktor-Heterodimeren oder -Heteromultimeren, umfassend mindestens eine Monomereinheit, welche von Persephin abgeleitet ist, verwendet werden. Dieses kann durch Dissoziieren eines Homodimers von Persephin in seine monomeren Komponenteneinheiten und Reassoziierung in Gegenwart einer monomeren Einheit eines zweiten oder folgenden homodimeren Wachstumsfaktors erfolgen. Dieser zweite oder folgende homodimere Wachstumsfaktor kann aus einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren ausgewählt sein, einschließlich Neurturin, GDNF, einem Mitglied der NGF-Familie, wie NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5, einem Mitglied der TGF- β -Superfamilie, einem Endothelgewebe-Wachstumsfaktor, einem Mitglied der CNTF/LIF-Familie oder ähnlichem.

[0063] Man nimmt an, dass Wachstumsfaktoren als spezifische Rezeptoren wirken. Beispielsweise wurden die Rezeptoren für TGF- β und Aktivine identifiziert und einer Familie von Ser/Thr-Kinase-Transmembran-Proteinen zugeordnet (Kingsley, *Genes and Dev.* 8: 133–146, 1994; Bexk et al. *Nature* 373: 339–341, 1995). In der NGF-Familie bindet NGF an den TrkA-Rezeptor in peripheren, sensorischen und sympathischen Neuronen und in den Neuronen des basalen Vorderhirns; BDNF und NT-4/5 binden an trkB-Rezeptoren; und NT-3 bindet primär an trkC-Rezeptoren, welche innerhalb des ZNS eine besondere Verteilung besitzen (Tuszynski et al., *Ann. Neurol.* 35: S9–S12, 1994). Es scheint, dass Persephin-Neurturin-GDNF-Familien-Mitglieder über spezifische Rezeptoren mit besonderen Verteilungen wirken, wie es für andere Wachstumsfaktor-Familien gezeigt wurde. Kürzlich wurde gezeigt, dass GDNF über einen Multikomponenten-Rezeptorkomplex wirkt, in welchem eine Transmembran-Signal transduzierende Komponente, das Ret-Tyrosin-Kinase-Protein (Ret PTK), beim Binden des GDNF mit einem anderen Protein, genannt GDNF-Rezeptor α (GDNFR- α), welches keine Transmembran-Domäne hat und an die Zelloberfläche über Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) Bindung verknüpft ist, aktiviert wird (Durbec et al., *Nature* 381: 789–793, 1996; Jing et al., *Cell* 85: 1113–1124, 1996; Treanor et al., *Nature* 382: 80–83, 1996; Trupp et al., *Nature* 381: 785–789, 1996). Überdies wurde gezeigt, dass die Signalgebung von Neurturin und GDNF über den Ret-Tyrosin-Kinase-Rezeptor durch eine Familie von Co-Rezeptoren bewirkt wird, einschließlich dem Co-Rezeptor-Protein GDNFR- α , ebenfalls bezeichnet als TrnR1, und den Co-Rezeptor-Protein TrnR2, wobei jedes einen funktionellen Rezeptorkomplex mit Ret bilden kann für sowohl Neurturin als auch GDNF (Baloh et al., *Neuron* 18: 793–802, 1997). Es wird erwartet, dass durch die Bildung von Heterodimeren oder Heteromultimeren von Persephin und einem oder mehreren anderen Wachstumsfaktoren der resultierende Wachstumsfaktor zum Binden an mindestens zwei verschiedene Rezeptortypen mit vorzugsweise einer unterschiedlichen Gewebeverteilung in der Lage ist. Die resultierenden Heterodimere oder Heteromultimere hätten erwartungsgemäß ein verschiedenes und möglicherweise ein vergrößertes Spektrum an Zellen, auf die sie wirken könnten, oder eine größere Potenz. Es ist ebenso möglich, dass das Heterodimer oder Heteromultimer synergistische Effekte bereitstellen, welche bei Homodimeren oder Homomultimeren nicht beobachtet werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Kombination von Faktoren unterschiedlicher Klassen das Langzeitüberleben von Oligodendrozyten fördert, wohingegen einzelne Faktoren oder Kombinationen solcher Faktoren innerhalb derselben Klasse ein Kurzzeitüberleben förderten (Barres et al., *Development* 118: 283–295, 1993).

[0064] Heterodimere können durch eine Vielzahl von Verfahren gebildet werden. Beispielsweise können Homodimere gemischt und Bedingungen unterzogen werden, bei denen Dissoziation/Auffalten auftritt, wie in Gegenwart eines Dissoziations/Entfaltungsmittels, gefolgt von dem Anwenden von Bedingungen, welche die Monomer-Reassoziierung und Bildung von Heterodimeren erlauben. Dissoziations-/Entfaltungs-Mittel umfassen jegliche Mittel, welche zum Fördern der Dissoziation von Proteinen bekannt sind. Solche Mittel umfassen, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, Guanidinhydrochlorid, Harnstoff, Kaliumthiocyanat, pH-erniedrigende Mittel, wie gepufferte HCl-Lösungen, und polare, wassermischbare organische Lösungsmittel, wie Acetonitril oder Alkohole, wie Propanol oder Isopropanol. Zusätzlich können für durch Disulfidbindungen kovalent verbundene Homodimere, wie es bei TGF- β -Familienmitgliedern der Fall ist, Reduktionsmittel, wie Dithiothreitol und β -Mercaptoethanol, zur Dissoziation/Entfaltung und zur Reassoziierung/Rückfaltung verwendet werden.

[0065] Heterodimere können ebenso zum Transfektieren/Transfizieren einer Zelle mit zwei oder mehreren Faktoren hergestellt werden, sodass die transformierte Zelle Heterodimere produziert, wie es mit den Neurotrophinen durchgeführt wurde. (Heymach und Shooter, *J. Biol. Chem.* 270: 12297–12304, 1995).

[0066] Ein weiteres Verfahren zur Bildung von Heterodimeren liegt in der Kombination von Persephin-Homodimeren und einem Homodimer eines zweiten Wachstumsfaktors und Inkubieren der Mischung bei 37°C.

[0067] Wenn Heterodimere aus Homodimeren hergestellt werden, können die Heterodimere anschließend von den Homodimeren unter Verwendung von dem Fachmann verfügbaren Verfahren abgetrennt werden, wie beispielsweise durch Eluierung von präparativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Alternativ kön-

nen Heterodimere unter Verwendung von Hochdruckkationenaustauschchromatographie, wie mit einer Mono-S-Kationenaustauschsäule, oder durch Sequenzimmunoaffinitätssäulen aufgereinigt werden.

[0068] Es ist im Stand der Technik bekannt, dass viele Proteine in einer Zelle mit einer Signalsequenz an dem N-Terminus der reifen Proteinsequenz synthetisiert werden, und das solch eine Leitsequenz tragende Protein wird als Preprotein bezeichnet. Der Pre-Teil des Proteins wird während des zellulären Prozessierens des Proteins abgespalten. Zusätzlich zu der Pre-Leitsequenz enthalten viele Proteine eine besondere Pro-Sequenz, welche einen Abschnitt auf einem Protein beschreibt, der ein stabiler Precursor des reifen Proteins darstellt. Mit sowohl Pre- als auch Pro-Bereichen synthetisierte Proteine werden als Preproproteine bezeichnet. Hinsichtlich des Prozessierungsvorgangs, der bekanntermaßen bei anderen TGF- β -Familienmitgliedern als auch bei den hierin bestimmten Sequenzen auftritt, nehmen die Erfinder an, dass die Form des Persephin-Proteins, wie es innerhalb einer Zelle synthetisiert wird, das Pre-Pro-Persephin ist. Man nimmt an, dass das menschliche Pre-Pro-Persephin eine N-terminale 23-Aminosäuresignalsequenz (menschliche Pre-Signalsequenz, SEQ ID NO: 219, kodiert durch SEQ ID NOS: 208–209) enthält. Es ist bekannt, dass die volle Länge einer Leitsequenz nicht notwendigerweise für das Wirken der Sequenz als eine Signalsequenz erforderlich ist, und daher sind in der Definition des Pre-Abschnitts von Persephin die Fragmente davon, gewöhnlich N-terminale Fragmente, enthalten, welche die Eigenschaft der Fähigkeit zur Wirkung als eine Signalsequenz beibehalten, d. h. die Erleichterung von co-translatorischer Einfügung in die Membranen von einer oder mehreren zellulären Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum, Mitochondrien, dem Golgi-Apparat, der Plasmamembran und ähnlichem.

[0069] Der Persephin-Signalsequenz schließt sich eine Pro-Domäne an, welche eine RXXR-Proteolyse-Prozessierungsstelle direkt vor der N-terminalen Aminosäuresequenz für das reife Persephin enthält. (Menschliche Pro-Bereich-Sequenz, SEQ ID NO: 220, kodiert durch die Nucleinsäuresequenz SEQ ID NO: 221).

[0070] Die Persephin-Pre- und -Pro-Bereiche umfassen zusammen eine Pre-Pro-Sequenz, welche als die menschliche Pre-Pro-Sequenz identifiziert wurde (SEQ ID NO: 219, kodiert durch SEQ ID NOS: 213 and 215, Nucleinsäuren 1 bis 285). Die Pre-Bereichssequenzen und Pro-Bereichssequenzen sowie die Pre-Pro-Bereichssequenzen können für nicht-menschliche Säugerarten und für Nicht-Säugerarten mittels der Sequenzen, welche innerhalb des Pre-Pro-Persephins, wie es hierin definiert ist, enthalten sind, identifiziert und erhalten werden.

[0071] Unter Verwendung der obengenannten Charakteristika hat die menschliche Persephin-cDNA einen 471 bp offenen Leserahmen kodierend für ein 156 Aminosäure langes Protein (vorhergesagtes Molekulargewicht 16,6 kDa). Abspaltung des 23 Aminosäure langen vorhergesagten Signalpeptids führt zu einem 133 Aminosäure langen Pro-Persephin-Molekül (Molekularmasse 14,2 kDa). Proteolytische Abspaltung des Pro-Persephins bei einer RXXR-Konsens-Sequenz sollte ein 96 Aminosäure langes reifes Protein mit einer molekularen Masse von 10,3 kDa ergeben. Das reife, sekretierte Persephin-Molekül wird wahrscheinlich ein über Disulfid verbundenes Homodimer analog anderer Mitglieder der TGF- β -Familie bilden.

[0072] Die Nucleotid-Sequenzen von Persephin-Pre- und/oder -Pro-Abschnitten oder ähnlichen Abschnitten, von denen man annimmt, dass sie mit Persephin-DNA verbunden sind, können zum Aufbau von chimären Genen mit den Kodierungssequenzen anderer Wachstumsfaktoren oder Proteine verwendet werden. (Booth et al., Gene 146: 303–8, 1994; Ibanez, Gene 146: 303–8, 1994; Storici et al., FEBS Letters 337: 303–7, 1994; Sha et al., J. Cell. Biol. 114: 827–839, 1991). Solche chimären Proteine können eine veränderte Bildung oder Exprimierung der aktiven Proteinarten aufweisen.

[0073] Ein erfindungsgemäß bevorzugtes Persephin wird durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt, obwohl angenommen wird, dass Persephin in gereinigter Form aus zellkonditioniertem Medium isoliert werden kann, wie es für Neurturin gemacht wurde.

[0074] Unter "reiner Form" oder "aufgereinigter Form" oder "im Wesentlichen aufgereinigter Form" wird hierin verstanden, dass eine Persephin-Zusammensetzung im Wesentlichen frei von anderen Proteinen ist, welche nicht Persephin sind. Vorzugsweise umfasst eine im Wesentlichen aufgereinigte Persephin-Zusammensetzung mindestens ungefähr 50% Persephin auf einer molaren Basis verglichen mit der Gesamtproteinmenge oder anderen anwesenden makromolekularen Spezies. Bevorzugter wird eine im Wesentlichen aufgereinigte Persephin-Zusammensetzung mindestens ungefähr 80 bis ungefähr 90 Mol-% der Gesamtproteinmenge oder anderen anwesenden makromolekularen Spezies darstellen und stärker bevorzugt mindestens ungefähr 95 Mol-% oder mehr.

[0075] Rekombinantes Persephin kann durch Expressieren der DNA-Sequenzen, welche für Persephin kodieren, in einer geeigneten transformierten Wirtszelle gebildet werden. Unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren kann die Persephin-kodierende DNA an einen Expressionsvektor gebunden werden, in eine Wirtszelle transformiert werden und Bedingungen unterzogen werden, welche zur Expression von Persephin durch die transformierte Zelle geeignet sind.

[0076] Ein beliebiger geeigneter Expressionsvektor kann zur Herstellung von rekombinantem menschlichen Persephin verwendet werden, wie beispielsweise der Säuger-Expressionsvektor pCB6 (Brewer, Meth. Cell. Biol. 43: 233–245, 1994), oder die E. Coli-pET-Expressionsvektoren, insbesondere pET-30a (Studier et al., Methods Enzymol. 185: 60–89, 1990), welche beide hierin verwendet wurden. Andere geeignete Expressionsvektoren zur Expression in Säuger- und Bakterienzellen sind im Stand der Technik ebenso wie Expressionsvektoren zur Verwendung in Hefen oder Insektenzellen bekannt. Baculovirus-Expressionssysteme können ebenso eingesetzt werden.

[0077] Persephin kann in den monomeren Einheiten exprimiert werden, oder eine solche monomere Form kann durch die Herstellung unter reduzierenden Bedingungen gebildet werden. In solchen Fällen kann das Rückfalten und die Renaturierung unter Verwendung eines der oben angegebenen Mittel erreicht werden, welches zur Förderung der Dissoziation/Assoziation von Proteinen bekannt ist. Beispielsweise kann die monomere Form mit Dithiothreitol inkubiert werden, gefolgt von der Inkubierung mit oxidiertem Glutathion-Dinatriumsalz, gefolgt von der Inkubierung mit einem Puffer, welcher ein Rückfaltungsmittel, wie Harnstoff, enthält.

[0078] Persephin kann als ein Dimer oder ein anderes Multimer vorliegen und kann glykosyliert oder auf andere Weise chemisch modifiziert sein. Reifes menschliches Persephin enthält keine N-verknüpften glykosylierten Stellen (SEQ ID NO: 221). Mögliche O-verknüpften Glykosylierungsstellen treten in reifem menschlichem Persephin an den Stellen 3, 10, 12, 14, 24, 36, 43, 67, 70 und 88 in SEQ ID NO: 221 auf.

[0079] Wie oben bezeichnet lässt die Mensch-Nucleinsäuresequenz vermuten, dass Persephin anfänglich als Pre-Pro-Polypeptid translatiert wird und dass die proteolytische Prozessierung der Signalsequenz und des "Pro"-Teils dieses Moleküls in der reifen Sequenz resultiert, welche hierin als "reifes Persephin" bezeichnet wird, wie es in menschlichen und nicht-menschlichen Arten in homologer Form existiert. Daher umfasst Persephin sämtliche "reife Persephin"-Sequenzen von menschlichen und nicht-menschlichen Arten, sowie sämtliche Pre-Pro-Persephin-Polypeptide, welche von dem Persephin-Gen translatiert werden können.

[0080] In Analogie zu dem Neurturin-Protein ist es möglich, dass Isoformen von Persephin existieren. Zum Beispiel können verschiedene mögliche Spaltungsstellen (wie beispielsweise RXXR-Stellen) in der Pre-Pro-Neurturin-Sequenz vorliegen, sodass mehr als eine mögliche Isoform des Pre-Pro-Neurturins existieren kann. Auf diese Weise kann das reife Neurturin-Protein eine variable Anzahl von Aminosäuren aufweisen, die dem ersten kanonischen Cystein vorangehen. Solche sich verändernde Spaltungsstellen könnten bei verschiedenen Organismen und bei unterschiedlichen Geweben desselben Organismus auf verschiedene Weise verwendet werden. Die N-terminalen Aminosäuren, welche dem ersten der sieben erhaltenen/konservierten Cysteine in der reinen Form der Mitglieder der TGF- β -Familie vorangehen, variieren weitreichend sowohl in der Länge als auch in der Sequenz. Darüber hinaus beeinflusst das Einfügen einer Sequenz von zehn Aminosäuren zwei Reste aufwärts des ersten erhaltenen/konservierten Cysteins nicht die bekannten biologischen Wirkungen eines Familienmitglieds, Dorsalin (Basler et al., Cell 73: 687–702, 1993). Analog ist es auch möglich, dass Persephin-Proteine, welche Sequenzen von verschiedener Länge vor dem ersten kanonischen Cystein enthalten, existieren können oder hergestellt werden können und dass diese ihre biologische Aktivität beibehalten können.

[0081] Die Erfinder glauben hierin, dass mindestens die Sequenz eines Persephin-Neurturin-GDNF-Wachstumsfaktors, welcher biologische Wirkung zeigt, die Sequenz von dem ersten bis zum siebten kanonischen Cystein enthalten wird. Diese Sequenz des menschlichen Persephins reicht von Cystein 66 bis Cystein 154 wie gezeigt in SEQ ID NO: 223. Die vergleichbare Sequenz für Maus-Persephin reicht von Cystein 1 bis Cystein 87 (SEQ ID NO: 79), und die von Ratten-Persephin reicht von Cystein 1 bis Cystein 87 (identifiziert als SEQ ID NO: 82). Aus diesem Grund liegen innerhalb des Umfangs der erfindungsgemäßen Persephin-Proteine die Aminosäuresequenzen, enthaltend die SEQ ID NO: 217 bis SEQ ID NO: 221 oder SEQ ID NO: 223, und die Nucleotidsäuremoleküle, enthaltend Sequenzen, welche für diese Aminosäuresequenzen kodieren.

[0082] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenso Nucleinsäuremoleküle, umfassend Sequenzen, welche für Maus-, Ratten- und Mensch-Persephin kodieren (**Fig. 8**). Ebenfalls eingeschlossen in den Umfang der Erfindung sind Sequenzen, welche im Wesentlichen zu den Nucleinsäure-Sequenzen, welche für Persephin kodieren.

ren, identisch sind. Solche im Wesentlichen identischen Sequenzen sind beispielsweise substituiert mit Kodons, welche in einer gegebenen Wirtszelle, wie *E. coli*, gemäß bekannten Verfahren und Standardverfahren leichter exprimiert werden. Solche modifizierten Nucleinsäure-Sequenzen sind innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung enthalten.

[0083] Spezifische Nucleinsäure-Sequenzen können durch den Fachmann modifiziert werden, und folglich können sämtliche Nucleinsäure-Sequenzen, welche für die Aminosäure-Sequenzen von Pre-Pro-Persephin oder die Pre-Region oder die Pro-Region von Persephin kodieren, in ähnlicher Weise modifiziert sein. Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls Nucleinsäure-Sequenzen mit einer oder mehreren Substitutionen, Deletionen oder Einfügungen ein, wobei die Nucleinsäure-Sequenzen mit einer Persephin-Nucleinsäure-Sequenz hybridisiert wird, oder Komplemente davon, sofern diese geeignet sind.

[0084] Spezifische Hybridisierung bedeutet hierin die Bildung von Hybriden zwischen einem Polynucleotid (z. B. einem Persephin-Polynucleotid, welches eine oder mehrere Substitutionen, Deletionen und/oder Einfügungen einschließen kann) und einem spezifischen Referenz-Polynucleotid (z. B. Polynucleotide, welche für reifes Persephin kodieren und die die Sequenzen von SEQ ID NO: 183, 184, 194, 195, 199, 200, 201 oder 202 haben), wobei das Polynucleotid vorzugsweise mit dem spezifischen Referenzpolynucleotid hybridisiert. Zum Beispiel wird ein Polynucleotid, welches für ein reifes Persephin kodiert, spezifisch mit einem Referenz-Persephin-Polynucleotid (z. B. SEQ ID NO: 183, 184, 194, 195, 199, 200, 201 oder 202) hybridisieren und nicht mit einem Referenz-Neurturin-Polynucleotid (z. B. SEQ ID NO: 9 oder 10 oder Sequenzen, welche komplementär dazu sind). Die spezifische Hybridisierung erfolgt vorzugsweise unter hochstringenten Bedingungen, welche von dem Durchschnittsfachmann gut verstanden sind, welche durch eine Anzahl von Faktoren während der Hybridisierung und während dem Waschverfahren bestimmt werden, einschließlich Temperatur, Ionenstärke, Zeitlänge und Konzentration des Formamids (vergleiche zum Beispiel Sambrook et al., 1989, supra).

[0085] Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls Nucleinsäure-Sequenzen ein, welche für Polypeptide kodieren, die eine überlebens- oder wachstumsfördernde Aktivität aufweisen und welche von Antikörpern, welche an Persephin binden, erkannt werden.

[0086] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenso Vektoren, die ein die Expression regulierendes Element, operabel verbunden mit einer beliebigen Nucleinsäure-Sequenz, welche innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung eingeschlossen ist, umfassen. Die Erfindung umfasst ebenso Wirtszellen – irgendeiner Art – welche mit solchen Vektoren transformiert wurden.

[0087] Verfahren zur Herstellung von Persephin sind ebenso zur Verfügung gestellt. Die Herstellung kann durch Isolierung von einem konditionierten Medium von einer Vielzahl von Zellarten erfolgen, solange die Zellart Persephin bildet. Ein zweites und bevorzugtes Verfahren schließt die Verwendung von rekombinanten Verfahren zur Isolation einer Nucleinsäuresequenz, die für Persephin kodiert, Klonierung der Sequenz zusammen mit geeigneten Regulationssequenzen in einen geeigneten Vektor und Zellarten, und Expression der Sequenz zur Herstellung von Persephin ein.

[0088] Eine Säugergenfamilie, welche vier neurotrophe Faktoren umfasst, wurde identifiziert, einschließlich des Nervenwachstumsfaktors (NGF), des aus dem Hirn abgeleiteten neurotrophen Faktors (BDGF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5). Diese Faktoren teilen ungefähr 60% Nucleinsäuresequenz-Homologie (Tuszynski und Gage, Ann. Neurol. 35: S9–S12, 1994). Das Persephin-Protein und das Neurturin-Protein zeigen keine signifikante Homologie zu der NGF-Familie von neurotrophen Faktoren. Entweder Persephin oder Neurturin teilt weniger als ungefähr 20% Homologie mit der TGF- β -Superfamilie von Wachstumsfaktoren. Jedoch zeigen sowohl Persephin als auch Neurturin ungefähr 40% Sequenzidentität mit GDNF und ungefähr 50% Sequenzidentität untereinander. Insbesondere sind die Positionen der sieben Cysteinreste, welche in Persephin, Neurturin und GDNF vorliegen, annähernd exakt erhalten/konserviert. Die Erfinder glauben hierin, dass andere unidentifizierte Gene existieren könnten, welche für Proteine kodieren, die eine erhebliche Aminosäuresequenz-Homologie zu Persephin, Neurturin und GDNF aufweisen und welche als Wachstumsfaktoren selektiv für dieselben oder unterschiedliche Gewebe und dieselben oder unterschiedlichen biologischen Aktivitäten fungieren und welche an denselben oder unterschiedlichen Rezeptoren wirken können. Ein unterschiedliches Wirkungsspektrum hinsichtlich der betroffenen Gewebe und/oder der bewirkten Antwort könnte von einer vorherigen Aktivierung von unterschiedlichen Rezeptoren durch unterschiedliche Familienmitglieder herrühren, wie es für Mitglieder der NGF-Familie von neurotrophen Faktoren bekannt ist (Tuszynski und Gage, 1994, supra).

[0089] Als eine Konsequenz für Mitglieder einer besonderen Genfamilie, welche im Wesentlichen den Er-

halt/Konservierung der Aminosäuresequenz in den Proteinprodukten der Familienmitglieder zeigen, kommt es zu einem deutlichen Erhalt/Konservierung von Sequenzen auf der DNA-Stufe. Dies bildet die Basis für einen neuen Ansatz zur Identifizierung von anderen Mitgliedern der Genfamilie, zu der GDNF, Neurturin und Persephin gehören. Das für eine solche Identifizierung verwendete Verfahren stellt die Kreuzhybridisierung dar, welche von einem Familienmitglied abgeleitete Nucleinsäuresonden verwendet, wobei ein stabiles Hybrid-Duplex-Molekül mit einer Nucleinsäuresequenz von unterschiedlichen Mitgliedern der Genfamilie gebildet wird oder wobei Nucleinsäuresequenzen von unterschiedlichen Familienmitgliedern verstärkt/amplifiziert werden. (Siehe beispielsweise Kaisho et al., FEBS Letters 266: 187–191, 1990). Die Sequenz aus dem unterschiedlichen Familienmitglied muss nicht identisch mit der Sonde sein, wird allerdings nichtdestotrotz zu der Sondensequenz ausreichend verwandt sein, um mit der Sonde zu hybridisieren. Alternativ kann die PCR unter Verwendung von Primern von einem Familienmitglied zur Identifizierung von zusätzlichen Familienmitgliedern verwendet werden.

[0090] Die oben genannten Ansätze waren bisher in der Identifizierung anderer Genfamilienmitglieder nicht erfolgreich, weil nur ein Familienmitglied, GDNF, bekannt war. Mit der Identifizierung von Neurturin in der ebenfalls anhängigen Anmeldung Nr. 08/519,777 können jedoch einzigartige neue Sonden und Primer hergestellt werden, welche Sequenzen von den erhaltenen/konservierten Regionen dieser Genfamilie enthalten. Dieselben erhaltenen/konservierten Regionen werden ebenso in dem dritten Familienmitglied, Persephin, gefunden. Insbesondere wurden drei erhaltene/konservierte Regionen hierin identifiziert, welche als eine Basis zum Aufbau neuer Sonden und Primer verwendet werden können. Die neuen Sonden und Primer, welche durch die Arbeit mit Neurturin und Persephin zugänglich wurden, ermöglichen diesen vielseitigen neuen Ansatz, welcher nun erfolgreich andere Genfamilienmitglieder identifizieren kann. Unter Verwendung dieses neuen Ansatzes kann nach zu GDNF, Neurturin und Persephin hinsichtlich der Sequenzhomologie verwandten Genen durch Herstellen von DNA- oder RNA-Sonden auf der Basis der erhaltenen/konservierten Abschnitte in den GDNF- und Neurturin-Molekülen gescreent werden. Daher umfasst eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung Sonden und Primer, welche einer Nucleotidsequenz, welche für solche erhaltenen/konservierten Abschnitte kodieren, entsprechen oder davon abgeleitet sind, sowie ein Verfahren zur Identifizierung weiterer Mitglieder der Neurturin-Persephin-GDNF-Genfamilie.

[0091] Die Aminosäuresequenzen des erhaltenen/konservierten Abschnitts/Bereichs wurden hierin identifiziert und umfassen Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr, worin Xaa₁ Ser, Thr oder Ala und Xaa₂ Glu oder Asp darstellt (SEQ ID NO: 108); Glu-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₄-Gly-Xaa₅-Cys, worin Xaa₁ Thr, Glu oder Lys darstellt, Xaa₂ Val, Leu oder Ile darstellt, Xaa₃ Leu oder Ile darstellt, Xaa₄ Ala oder Ser darstellt und Xaa₅ Ala oder Ser darstellt (SEQ ID NO: 113); und Cys-Cys-Xaa₁-Pro-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Phe-Leu-Asp-Xaa₉, worin Xaa₁ Arg oder Gln darstellt, Xaa₂ Thr oder Val oder Ile darstellt, Xaa₃ Ala oder Ser darstellt, Xaa₄ Tyr oder Phe darstellt, Xaa₅ Glu, Asp oder Ala darstellt, Xaa₆ Glu, Asp oder keine Aminosäure darstellt, Xaa₇ Val oder Leu darstellt, Xaa₈ Ser oder Thr darstellt und Xaa₉ Asp oder Val darstellt (SEQ ID NO: 114). Die Nucleotidsequenzen, welche eine Kodierungssequenz für die obigen erhaltenen/konservierten Sequenzen oder Fragmente der obigen erhaltenen/konservierten Sequenzen aufweisen, können als Sonden verwendet werden. Beispielhafte Sonden- und Primersequenzen kodieren für Aminosäuresequenzen und SEQ ID NOS: 125–129; Primer, deren reverse komplementäre Sequenzen für Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 130 kodieren; und insbesondere Nucleotidsequenzen, SEQ ID NOS: 115–124. Zusätzliche Primer auf der Basis von GDNF und Neurturin umfassen Nucleinsäuresequenzen, kodierend für Aminosäuresequenzen SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40 und SEQ ID NO: 41; Primer, deren reverse komplementäre Sequenzen SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 und SEQ ID NO: 39 kodieren; und insbesondere Nucleinsäuresequenzen SEQ ID NOS: 42–48.

[0092] Die Hybridisierung unter Verwendung der neuen Sonden von erhaltenen/konservierten Abschnitten der Nucleinsäuresequenzen werden unter verminderten Stringenzbedingungen durchgeführt. Die in der Bestimmung der Stringenzbedingungen involvierten Faktoren sind im Stand der Technik bekannt (siehe beispielsweise Sambrook et al., Molecular Cloning, 2. Auflage, 1989). Nucleinsäurequellen zum Screenen umfassen Genom-DNA-Bibliotheken von Säugerarten oder cDNA-Bibliotheken, welche unter Verwendung von RNA, erhalten von Säugerzellen, erstellt wurden, kloniert in irgendeinen geeigneten Vektor.

[0093] PCR-Primer werden unter PCR-Bedingungen einer verminderten Annealtemperatur, welche die Vielfältigkeit der Sequenzen von Genfamilienmitgliedern abgesehen von GDNF, Neurturin und Persephin erlauben, verwendet. Nucleinsäurequellen zum Screenen umfassen Genom-DNA-Bibliotheken aus Säugerarten, welche in irgendeinen geeigneten Vektor kloniert sind, von RNA transkribierte cDNA, erhalten aus Säugerzellen, und Genom-DNA von Säugerarten.

[0094] Auf der Basis der Hybridisierung oder von PCR-Assays identifizierte DNA-Sequenzen werden sequenziert und mit GDNF, Neurturin und Persephin verglichen. Die DNA-Sequenzen, welche für die Gesamtsequenz des neuen Faktors kodieren, würden anschließend auf die gleiche Weise wie hierin beschrieben erhalten. Genom-DNA oder Bibliotheken von Genom-Klonen können ebenso als Template verwendet werden, weil die Intron-/Exon-Strukturen von GDNF und Neurturin erhalten/konserviert werden und die Kodierungssequenzen der reifen Proteine nicht von Introns unterbrochen werden.

[0095] Unter Verwendung dieses oben beschriebenen Ansatzes wurden die von den erhaltenen/konservierten Abschnitten von Neurturin und GDNF entworfenen/designten Primer zur Identifizierung und zum Erhalt der Sequenz des neuen hierin beschriebenen Familienmitglieds, Persephin, verwendet. Degenerierte Primer, welche von Persephin, Neurturin und GDNF entworfen/designiert sind, können weiterhin zur Identifizierung und zum Erhalt zusätzlicher Familienmitglieder verwendet werden.

[0096] Es wird angenommen, dass sämtliche GDNF-Neurturin-Persephin-Familienmitglieder einen hohen Grad an Sequenzidentität mit einem oder mehreren der drei Consensusabschnitten der identifizierten Familienmitglieder in dem Abschnitt der Sequenz zwischen dem ersten und siebten kanonischen Gerüstcystein aufweisen. Insbesondere wird bei einem neuen Familienmitglied mindestens eine Identität von 62,5% mit dem Consensusabschnitt-Octapeptid, Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr, worin Xaa₁ Ser, Thr oder Ala darstellt, und Xaa₂ Glu oder Asp darstellt (SEQ ID NO: 108), oder mindestens eine Sequenzintensität von 62,5% mit dem Consensusabschnitt-Octapeptid, Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys, worin Xaa₁ und Xaa₂ Alanin oder Serin darstellen (SEQ ID NO: 109), oder mindestens eine Sequenzintensität von 50% mit dem Consensusabschnitt-Octapeptid, Asp-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Leu-Asp-Xaa₄, worin Xaa₁ Asparaginsäure oder Glutaminsäure oder keine Aminosäure darstellt, Xaa₂ Valin oder Leucin ist, Xaa₃ Serin oder Threonin darstellt; und Xaa₄ Valin oder Asparaginsäure ist (SEQ ID NO: 110), erwartet. Die Erfinder glaubten hierin, dass jedes neue Familienmitglied 28 Aminosäuren in der aneinander gereihten Sequenz zwischen dem ersten und siebten kanonischen Gerüst-Cystein-Rest aufweist, wie es in **Fig. 15** gezeigt ist, wobei die Reste von dem N-terminalen Ende der aneinander gereihten Sequenz des Familienmitglieds (1) Cys, (3) Leu, (10) Val, (13) Leu, (14) Gly, (15) Leu, (16) Gly, (17) Tyr, (21) Glu, (25) Phe, (26) Arg, (27) Tyr, (28) Cys, (30) Gly, (32) Cys, (44) Leu, (47) Leu, (58) Cys, (59) Cys, (61) Pro, (66) Asp, (69) Phe, (70) Leu, (71) Asp, (83) Ser, (84) Ala, (87) Cys und (89) Cys sind. Jedoch ist es möglich, dass es bis zu drei Nicht-Übereinstimmungen kommt.

[0097] Auf der Basis der strukturellen Ähnlichkeiten von Persephin zu den Sequenzen von Neurturin und GDNF wird ebenso angenommen, dass Persephin das Überleben und das Wachstum von neuronalen sowie von nicht-neuronalen Zellen fördert. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Neurturin das Überleben von oberen Halswirbel-Gangliazellen und Knoten- (Nodose)-Sensor-Ganglia-Neuronen fördert (siehe Beispiele 1 bis 3). Es wurde weiterhin gezeigt, dass GDNF auf dopaminerge, sympathische Motor- und verschiedene Sensorneuronen wirkt (Henderson et al. supra, 1994; Miles et al, J Cell Biol 130: 137–148, 1995; Yan et al, Nature 373: 341–344, 1995; Lin et al, Science 260: 1130–1132, 1993; Trupp et al, J Cell Biol 130: 137–148, 1995; Martin et al Brain Res 683: 172–178, 1995; Bowenkamp et al J Comp Neurol 355: 479–480, 1995). Folglich zeigten alle anderen bisher isolierten Wachstumsfaktoren eine Wirkung auf viele unterschiedliche Zellarten (siehe beispielsweise Scully und Otten, Cell Biol Int 19: 459–469, 1995; Hefti, Neurotrophic Factor Therapy 25: 1418–1435, 1994). Folglich ist es wahrscheinlich, dass Persephin Aktivität auf eine Vielzahl von verschiedenen neuronalen Zellen, sowohl periphere als auch zentrale, ebenso wie auf nicht-neuronale Zellen zeigt. Bezüglich der peripheren-neuronalen Zellen scheint das Zellprofil, für welches Persephin eine das Überleben fördernde Aktivität zeigt, verschieden von dem von Neurturin oder GDNF zu sein. Im Gegensatz zu der das Überleben fördernden Aktivität, welche durch Neurturin und GDNF in sympathischen und sensorischen Neuronen verursacht wird, zeigt Persephin keine Aktivität in diesen Geweben bei den getesteten Konzentrationen. Nichts desto weniger zeigt Persephin eine das Überleben fördernde Aktivität in Mittelhirnzellen, welche aus embryonalen Rattenhirnen erhalten wurden. Weiterhin kann eine Persephin-Aktivität auf einen speziellen Zielzelltyp durch Routine-Experimentation unter Verwendung von Standardreferenzmodellen bestimmt werden. Weiterhin haben die Erfinder hierin Hirn- und Herzgewebe als Persephin exprimierende Gewebe identifiziert, was die Schlussfolgerung weiter stützt, dass Persephin wirken kann, um das Überleben und das Wachstum in einer Vielzahl von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zu fördern.

[0098] Als ein Beispiel für die Wirkungen von neurotrophen Faktoren auf nicht-neuronale Gewebe wirkt der prototypische neurotrophe Faktor, NGF, ebenso auf Mastzellen, sodass deren Anzahl bei Injektion in neugeborene Ratten erhöht wird (Aloe, J. Neuroimmunol. 18: 1–12, 1988). Zusätzlich exprimieren Mastzellen den trk-Rezeptor und antworten auf NGF, sodass NGF ein Mastzellen-Sekretagogum und ein das Überleben fördernder Faktor ist (Horigome et al., J. Biol. Chem. 269: 2695–2707, 1994). Darüber hinaus wirken Mitglieder der TGF- β -Superfamilie auf viele Zelltypen mit unterschiedlicher Funktion und embryologischem Ursprung.

[0099] Die Erfinder haben hierin Gehirn und Herz als Gewebe identifiziert, worin Persephin exprimiert wird, und es wird weiterhin angenommen, dass Persephin in einer Anzahl von anderen neuronalen und nicht-neuronalen Geweben exprimiert wird. Das verwandte Familienmitglied, Neurturin, wird in einer Anzahl von nicht-neuronalen Geweben exprimiert, einschließlich Blut, Knochenmark, neonatalen Leber- und Mastzellen. Dieses legt eine Rolle für Neurturin in der Hämatopoese, Entzündung, Allergie und Kardiomyopathie nahe. Persephin kann ein ähnliches Aktivitätsprofil aufweisen.

[0100] Es wird angenommen, dass neurotrophe Faktoren der NGF-Familie über Faktor-spezifische Rezeptoren hoher Affinität wirken (Tuszynski und Gage, 1994, *supra*). Nur besondere Abschnitte des Proteins, welche an einer Rezeptorstelle wirken, sind für das Binden an den Rezeptor erforderlich. Solche besonderen Abschnitte oder diskreten Fragmente können als ein Agonist wirken, wenn die Substanz den Persephin-Rezeptor unter Auslösen der fördernden Wirkung auf das Zellüberleben und das -wachstum aktiviert, und als Antagonisten zu Persephin, wenn sie an den Rezeptor binden, allerdings diesen nicht aktivieren, oder ein Überleben und Wachstum fördern. Solche Abschnitte oder Fragmente, welche Agonisten darstellen, und jene, die Antagonisten sind, liegen ebenso innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

[0101] Synthetische Form(pan)-Wachstumsfaktoren können ebenso durch Kombinieren der aktiven Domänen von Persephin mit den aktiven Domänen von ein oder mehreren anderen Nicht-Persephin-Wachstumsfaktoren aufgebaut werden. (Siehe beispielsweise Ilag et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 92: 607–611, 1995). Diese Form-Wachstumsfaktoren, so wird angenommen, weisen die kombinierten Aktivitäten oder andere vorteilhafte Eigenschaften von Persephin und dem einen oder den mehreren anderen Wachstumsfaktoren auf. Ebenso wird angenommen, dass diese Form-Wachstumsfaktoren potente und multispezifische Wachstumsfaktoren darstellen, welche in der Behandlung eines breiten Spektrums von degenerativen Erkrankungen und Zuständen, einschließlich von Erkrankungen, welche durch sämtliche der zugrunde liegenden Faktoren, von denen die aktiven Domänen erhalten wurden, behandelt werden können, nützlich sind. Solche Form-Wachstumsfaktoren können ebenso synergistische Effekte jenseits der Aktivitäten der Eltern-Faktoren zur Verfügung stellen (Barres et al., *supra*).

[0102] Form-Wachstumsfaktoren können ebenso chimäre oder Hybrid-Polypeptide einschließen, welche aus Abschnitten von Fragmenten von mindestens zwei Wachstumsfaktoren aufgebaut sind. Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie sind strukturell verwandt mit hoch-konservierten Sequenzgrenzen, wodurch die Familienmitglieder identifiziert werden. Insbesondere sind sieben kanonische Grundgerüst-Cystein-Reste annähernd invariant in den Mitgliedern der Superfamilie (Kingsley, *Genes & Dev.* 8: 133–146, 1994) (siehe **Fig. 1**). Chimäre Polypeptidmoleküle können daher aus einer Sequenz aufgebaut sein, welche im Wesentlichen identisch zu einem Abschnitt des Persephin-Moleküls ist, bis zu ein oder mehreren Kreuzpunkten, und ein oder mehreren Sequenzen, die jeweils im Wesentlichen identisch sind mit einem Abschnitt eines anderen TGF- β -Superfamilien-Mitglieds, welches sich auf der anderen Seite des/der entsprechenden ein oder mehreren Kreuzpunkte erstreckt. Beispielsweise kann ein Abschnitt des amino-terminalen Endes des Persephin-Polypeptids mit einem Abschnitt des carboxy-terminalen Endes eines Neurturin-Polypeptids kombiniert werden, oder alternativ kann ein Abschnitt des aminoterminalen Endes eines Neurturin-Polypeptids mit einem Abschnitt des carboxy-terminalen Endes eines Persephin-Polypeptids kombiniert werden. Solche Abschnitte von Neurturin- oder Persephin-Polypeptiden reichen vorzugsweise von ungefähr 5 bis ungefähr 95, besonders bevorzugt von ungefähr 10 bis ungefähr 90, noch mehr bevorzugt von ungefähr 20 bis ungefähr 80 und am meisten bevorzugt von ungefähr 30 bis ungefähr 70 zusammenhängenden Aminosäuren, und solche Abschnitte eines anderen Nicht-Persephin- oder, je nach dem, Nicht-Neurturin-TGF- β -Superfamilien-Mitglieds beinhalten bevorzugt ungefähr 5 bis ungefähr 95, besonders bevorzugt ungefähr 10 bis ungefähr 90, noch mehr bevorzugt ungefähr 20 bis ungefähr 80 und am meisten bevorzugt ungefähr 30 bis ungefähr 70 zusammenhängende Aminosäuren. Beispielsweise kann ein besonderer Kreuzpunkt zwischen den dritten und vierten kanonischen Gerüst-Cystein-Resten liegen. Ein solches beispielhaftes Konstrukt würde an dem 5'-Ende eine Sequenz, welche eine Persephinsequenz vom Rest 1 bis zum dritten kanonischen Gerüst-Cystein-Rest 37 und bis zu einem Kreuzpunkt irgendwo zwischen dem Rest 37 und dem Rest 63, allerdings ohne den vierten kanonischen Gerüst-Cystein-Rest 64 einzuschließen, umfasst, enthalten (zur Verdeutlichung siehe das reife Persephin, SEQ ID NO: 80). Das 3'-Ende des Hybrid-Aufbaus würde eine Sequenz darstellen, welche von einem anderen TGF- β -Superfamilienmitglied abgeleitet ist, wie beispielsweise Neurturin, welches ein anderes TGF- β -Superfamilienmitglied darstellt, welches Persephin nah verwandt ist. Unter Verwendung von Neurturin als anderes TGF- β -Familienmitglied würde der Hybrid-Aufbau jenseits des Kreuzpunktes eine Sequenz umfassen, welche an dem gewünschten Kreuzpunkt in der Neurturin-Sequenz zwischen dem dritten kanonischen Gerüst-Cystein-Rest 37 und dem vierten kanonischen Gerüst-Cystein-Rest 67 von Neurturin beginnt und über den Rest 100 an dem 3'-Ende von Neurturin sich fortsetzt. Ein zweiter beispielhafter Hybrid-Aufbau würde den Rest 1 über einen Kreuzpunkt zwischen den Resten 37 und 67 von Neurturin umfassen, angrenzend verknüpft mit

Resten von dem Kreuzpunkt zwischen den Resten 37 und 64 bis zum Rest 96 von Persephin. Die obengenannten Konstrukte mit Persephin und Neurturin sollen lediglich als Beispiele dienen, wobei das spezifische TGF- β -Familienmitglied aus den Familienmitgliedern ausgewählt ist, einschließlich, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, dem transformierenden Wachstumsfaktor- β 1 (TGF β 1), dem transformierenden Wachstumsfaktor- β 2 (TGF β 2), dem transformierenden Wachstumsfaktor- β 3 (TGF β 3), Inhibin- β A (INH- β A), Inhibin- β B (INH- β B), dem Nodal-Gen (NODAL), den morphogenetischen Knochenproteinen 2 und 4 (BMP2 und BMP4), dem Drosophila decapentaplegic-Gen (dpp), den morphogenetischen Knochenproteinen 5–8 (BMP5, BMP6, BMP7 und BMP8), der Drosophila-60A-Genfamilie (60A), dem morphogenetischen Knochenprotein 3 (BMP3), dem Vgl-Gen, den Wachstumsdifferenzierungsfaktoren 1 und 3 (GDF1 und GDF3), Dorsalin (drsl), Inhibin- α (INH- α), dem MIS-Gens (MIS), Wachstumsfaktor 9 (GDF-9), dem Glial-abgeleiteten neutrotrphen Wachstumsfaktor (GDNF), Neurturin (NTN) und Persephin. Zusätzlich kann der Kreuzpunkt irgendeinen Rest zwischen den ersten und siebten kanonischen Gerüst-Cystein-Molekülen von Neurturin und dem speziellen anderen Familienmitglied darstellen. Darüber hinaus können zusätzliche Kreuzpunkte zum Einführen irgendeiner erwünschten Zahl von Persephin-Abschnitten oder -Fragmenten mit Abschnitten oder Fragmenten von irgendeinem oder mehreren anderen Familienmitgliedern verwendet werden.

[0103] Beim Aufbau eines besonderen chimären Moleküls werden die Abschnitte von Persephin und die Abschnitte des anderen Nicht-Persephin-Wachstumsfaktors unter Verwendung von PCR vervielfältigt/amplifiziert, gemischt und als Templat für eine PCR-Reaktion unter Verwendung des Forward-Primers (Vorwärts-Primer) von dem einen und des Reverse-Primers (Rückwärts-Primer) von dem anderen der beiden Komponentensegmente des chimären Moleküls eingesetzt. Folglich sind beispielsweise ein Vorwärts- und Rückwärts-Primer ausgewählt, um den Abschnitt von Persephin von dem Anfang bis zu dem ausgewählten Kreuzpunkt zwischen den dritten und vierten kanonischen Cystein-Resten zu vervielfältigen bzw. zu verstärken, wobei ein Persephin-Plasmid als Templat verwendet wird. Ein Vorwärts-Primer mit einem mit der Persephinsequenz überlappenden 5'-Abschnitt und ein Rückwärts-Primer werden anschließend zur Vervielfältigung des Abschnitts des anderen Nicht-Persephin-Wachstumsfaktors-Mitglieds der TGF- β -Superfamilie von dem entsprechenden Kreuzpunkt bis zum 3'-Ende unter Verwendung eines Plasmid-Templats, welches die Kodierungssequenz für das Nicht-Persephin-TGF- β -Familienmitglied enthält, verwendet. Die Produkte der zwei PCR-Reaktionen werden gelgereinigt und zusammen vermischt, und eine PCR-Reaktion wird durchgeführt. Unter Verwendung eines Aliquots dieser Reaktion als Templat wird eine PCR-Reaktion unter Verwendung des Persephin-Vorwärts-Primers und des Rückwärts-Primers für den Nicht-Persephin-Wachstumsfaktor durchgeführt. Das Produkt wird anschließend in einen Expressionsvektor zur Bildung des chimären Moleküls kloniert.

[0104] Man nimmt an, dass die chimären Wachstumsfaktoren in der Förderung des Wachstums und der Entwicklung von Zellen und zur Verwendung in der Vorbeugung der Atrophie, der Degeneration oder dem Tod von Zellen, insbesondere in Neuronen, wirksam sind. Die chimären Polypeptide können ebenso als Rezeptor-Antagonisten einer oder beider der Wachstumsfaktoren in voller Länge, von denen das chimäre Polypeptid abgeleitet wurde, oder als ein Antagonist irgendeines anderen Wachstumsfaktors, der an demselben Rezeptor oder denselben Rezeptoren wirkt, dienen.

[0105] Die vorliegende Erfindung umfasst ebenso therapeutische oder pharmazeutische Zusammensetzungen, welche Persephin oder Neurturin in einer wirksamen Menge enthalten, zur Behandlung von Patienten mit einer zellulären Degeneration oder Fehlfunktion und Persephin zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers. Eine Vielzahl von degenerativen Erkrankungen kann unter Verwendung von Persephin und den oben beschriebenen Zusammensetzungen behandelt werden. Wenn die zelluläre Degeneration die neuronale Degeneration einschließt, umfassen diese Erkrankungen, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, die periphere Neuropathie, amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer-Krankheit, Parkinsonismus, Huntington-Chorea, den ischämischen Infarkt, akute Hirnverletzung, akute Rückenmarksverletzung, Tumore des Nervensystems, Multiple Sklerose, periphere Nervenverletzungen oder -verletzungen, Aussetzung gegenüber Neurotoxinen, metabolische Erkrankungen, wie Diabetes oder Nierenfunktionsstörungen und die durch infektiöse Mittel bedingte Schäden. Insbesondere die Fähigkeit von Persephin, das Überleben in Mitochondrien zu fördern, legt eine Anwendbarkeit dieses Wachstumsfaktors in der Behandlung von neuronalen degenerativen Erkrankungen des ZNS, wie der Parkinsonschen Erkrankung, nahe.

[0106] Wenn die zelluläre Degeneration eine Knochenmarkszellendegeneration einschließt, umfassen diese Erkrankungen, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, Erkrankungen unzureichender Blutzellen, wie beispielsweise Leukopenien, einschließlich Eosinopenie und/oder Basopenie, Lymphopenie, Monocytopenie, Neutropenie, Anämien, Thrombocytopenie sowie eine Insuffizienz der Stammzellen bei einer der obengenannten Erkrankungen. Die zelluläre Degeneration kann ebenso Herzmuskelzellen bei Krankheiten, wie der Kardiomyopathie und der kongestiven Herzinsuffizienz, einschließen. Die oben genannten Zellen und Gewebe kön-

nen ebenso hinsichtlich einer unterdrückten bzw. verminderten Funktion behandelt werden.

[0107] Das Persephin und die Zusammensetzungen hierin können ebenso zur Vorbeugung der Degeneration und/oder zur Förderung des Überlebens in anderen nicht-neuronalen Geweben verwendet werden. Der Fachmann kann unter Verwendung einer Vielzahl von Assays, welche im Stand der Technik zur Identifizierung bekannt sind, leicht bestimmen, ob Persephin in der Förderung des Überlebens oder der Funktion in einem spezifischen Zelltyp nützlich ist.

[0108] Unter bestimmten Umständen kann es ebenso wünschenswert sein, die Menge an exprimiertem Persephin zu modulieren oder zu verringern. Folglich können in einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotide bereitgestellt werden zur Verwendung in der Verminderung des Anteils der Expression von Persephin durch eine Zelle durch Verabreichung eines oder mehrerer Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotide. Unter Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotiden werden hierin Oligonucleotide verstanden, welche eine Nucleotidsequenz aufweisen, die über Basenpaarung mit einer spezifischen komplementären Nucleinsäuresequenz, welche in der Exprimierung von Persephin involviert ist, wechselwirken, sodass die Exprimierung von Persephin vermindert wird. Vorzugsweise ist die in der Exprimierung von Persephin involvierte spezifische Nucleinsäuresequenz ein Genom-DNA-Molekül oder mRNA-Molekül, welches Sequenzen des Persephin-Gens enthält. Dieses Genom-DNA-Molekül kann flankierende Abschnitte des Persephin-Gens, untranslatierte Abschnitte von Persephin-mRNA, die Pre- oder Pro-Abschnitte des Persephin-Gens oder die Kodierungssequenz für reifes Persephin-Protein umfassen. Der Begriff komplementär zu einer Nucleotid-Sequenz im Kontext von Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotiden und Verfahren dafür bedeutet ausreichend komplementär zu einer solchen Sequenz, um die Hybridisierung mit dieser Sequenz in einer Zelle, d.h. unter physiologischen Bedingungen, zu erlauben. Die Persephin- Anti-Sense-Oligonucleotide umfassen vorzugsweise eine Sequenz, welche ungefähr 8 bis ungefähr 100 Nucleotide enthält, und besonders bevorzugt umfassen die Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotide ungefähr 15 bis ungefähr 30 Nucleotide. Die Persephin-Anti-Sense-Oligonucleotide können ebenso eine Vielzahl von Modifikationen enthalten, die eine Resistenz gegenüber nucleolytischem Abbau verleihen, wie beispielsweise modifizierte Internucleosid-Bindungen (Uhlmann und Peyman, Chemical Reviews 90: 543–548, 1990; Schneider und Banner, Tetrahedron Lett. 31: 335, 1990), modifizierte Nucleinsäurebasen und/oder Zucker und ähnliches.

[0109] Die therapeutischen oder pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können durch eine jegliche geeignete im Stand der Technik bekannte Route verabreicht werden, einschließlich beispielsweise der intravenösen, subkutanen, intramuskulären, transdermalen, intrathecalen oder intracerebralen Verabreichung. Die Verabreichung kann entweder schnell durch Injektion oder innerhalb einer Zeitdauer durch langsame Infusion oder Verabreichung von einer langsam freisetzenden (slow release) Zubereitung erfolgen. Zur Behandlung von Geweben in dem Zentralnervensystem kann die Verabreichung durch Injektion oder Infusion in das cerebrospinale Fluid (CSF) erfolgen. Wenn Persephin zu Zellen in dem Zentralnervensystem verabreicht werden sollen, kann die Verabreichung mit ein oder mehreren Mitteln, welche zur Förderung des Eindringens von Persephin durch die Blut-Hirn-Schranke in der Lage sind, erfolgen.

[0110] Persephin kann ebenso mit Mitteln verbunden oder konjugiert werden, welche die erwünschten pharmazeutischen oder pharmakodynamischen Eigenschaften verleihen. Beispielsweise kann Persephin an irgendeine im Stand der Technik zur Förderung der Penetration bzw. des Eindringens oder des Transports durch die Blut-Hirn-Schranke bekannten Substanz gekoppelt sein, wie beispielsweise ein Antikörper an den Transferrin-Rezeptor, und mittels intravenöser Injektion verabreicht werden. (Siehe beispielsweise Friden et al., Science 259: 373–377, 1993). Darüber hinaus kann Persephin an ein Polymer, wie Polyethylenglykol, stabil gebunden sein, um wünschenswerte Eigenschaften hinsichtlich der Solubilität, Stabilität, der Halbwertszeit und anderer pharmazeutisch annehmbarer Eigenschaften zu erhalten. (Siehe beispielsweise Davis et al., Enzyme Eng. 4: 169–73, 1978; Burnham, Am. J. Hosp. Pharm. 51: 210–218, 1994).

[0111] Die Zusammensetzungen werden gewöhnlich in der Form von pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt. Solche Zubereitungen werden in einer im pharmazeutischen Stand der Technik bekannten Weise hergestellt. Eine bevorzugte Zubereitung verwendet ein Vehikel von physiologischer Salzlösung, allerdings wird in Erwägung gezogen, dass andere pharmazeutisch annehmbare Träger, wie physiologische Konzentrationen anderer nichttoxischer Salze, 5%-ige wässrige Glucoselösung, steriles Wasser oder ähnliches, ebenso verwendet werden können. Es kann ebenso wünschenswert sein, dass ein geeigneter Puffer in der Zusammensetzung vorliegt. Solche Lösungen können, sofern dieses erwünscht ist, lyophilisiert und in einer sterilen Ampulle, welche für die Wiederherstellung durch Zugabe von sterilem Wasser für die Injektion vorgesehen sind, gelagert werden. Das primäre Lösungsmittel kann wässrig oder alternativ nicht wässrig sein. Persephin kann ebenso in eine feste oder halbfeste biologisch kompatible Matrix, welche in eine Behandlung erfordernde

Gewebe implantiert werden kann, eingefügt werden.

[0112] Der Träger kann ebenso andere pharmazeutisch annehmbare Exzipienten zur Modifizierung oder zum Erhalt des pH-Wertes, der Osmolarität, der Viskosität, der Klarheit, der Farbe, der Sterilität, der Stabilität, der Auflösungsrate oder des Geruchs der Zubereitung enthalten. In ähnlicher Weise kann der Träger noch weitere pharmazeutisch annehmbare Hilfsmittel/Exzipienten zur Modifizierung oder zum Erhalt der Freisetzung oder der Absorption oder der Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke enthalten. Solche Exzipienten sind solche Substanzen, welche gewöhnlich und herkömmlich zur Formulierung von Dosierungen für die parenterale Verabreichung in entweder Einheitsdosierungs- oder Mehrfachdosierungs-Form oder für die direkte Infusion in das cerebrospinale Fluid durch kontinuierliche oder periodische Infusion eingesetzt werden.

[0113] Die Dosierungsverabreichung kann in Abhängigkeit von den pharmakokinetischen Parametern der Dosierungsformulierung und der verwendeten Verabreichungsroute wiederholt werden.

[0114] Es wird ebenso in Erwägung gezogen, dass bestimmte Formulierungen, welche Persephin enthalten, oral verabreicht werden. Solche Zubereitungen sind vorzugsweise verkapselt und mit geeigneten Trägern in festen Dosierungsformen formuliert. Einige Beispiele geeigneter Träger, Exzipienten und Verdünnungsmittel umfassen Lactose, Dextrose, Saccharose, Sorbit, Mannit, Stärken, Akaziengummi, Calciumphosphat, Alginate, Calciumsilicat, mikrokristalline Cellulose, Polyvinylpyrrolidon, Cellulose, Gelatine, Sirup, Methylcellulose, Methyl- und Propylhydroxybenzoate, Talk, Magnesium, Stearat, Wasser, Mineralöl und ähnliches. Die Zubereitungen können zusätzlich Schmier- bzw. Gleitmittel, Benetzungsmittel, Emulgierungs- und Suspendierungsmittel, Konservierungsmittel, Süßstoffe und Geschmacksstoffe enthalten. Die Zusammensetzungen können derartig formuliert sein, dass eine schnelle, andauernde oder verzögerte Freisetzung der Wirkstoffbestandteile nach der Verabreichung an den Patienten durch Einsetzen von im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Verfügung gestellt wird. Die Zubereitungen können ebenso Substanzen enthalten, welche den proteolytischen Abbau vermindern und die Absorption fördern, wie beispielsweise oberflächenaktive Mittel.

[0115] Die spezifische Dosierung wird gemäß dem ungefähren Körpergewicht oder der Körperoberfläche des Patienten oder dem Volumen des zu belegenden Körperraums berechnet. Die Dosierung wird ebenso in Abhängigkeit der ausgewählten spezifischen Verabreichungsroute berechnet. Eine darüber hinausgehende Verfeinerung der Berechnungen, welche zur Bestimmung der geeigneten Dosierung für die Behandlung notwendig ist, wird routinemäßig vom Fachmann vorgenommen. Solche Berechnungen können ohne unzumutbares Experimentieren vom Fachmann im Lichte der Aktivität von Persephin vorgenommen werden. Für Neurturin sind die Daten hinsichtlich der Aktivität in den Zielzellen hierin sowie in der ebenfalls anhängigen Anmeldung Nr. 08/519,777 beschrieben, und es wird angenommen, dass die für die Aktivität in einem zellulären Niveau erforderliche Konzentration von Persephin ähnlich zu der von Neurturin ist. Die Persephin-Aktivität auf Mittelhirnzellen ist unten in Beispiel 17 beschrieben. Die Persephin-Aktivität auf einem spezifischen Zielzellentyp kann durch Routine-Experimente bestimmt werden. Die exakten Dosierungen werden in Verbindung mit Standard-Dosierungs-Antwort-Studien bestimmt. Es versteht sich von selbst, dass die Menge der letztendlich verabreichten Zusammensetzung durch einen praktischen Arzt im Lichte der relevanten Umstände, einschließlich der zu behandelnden Erkrankung oder Erkrankungen, der Wahl der zu verabreichenden Zusammensetzung, des Alters, des Gewichts und der Antwort des einzelnen Patienten, der Schwere der Symptome des Patienten und der gewählten Verabreichungsroute, bestimmt wird.

[0116] Das erfindungsgemäße Persephin kann therapeutisch durch Implantieren von Vektoren oder transformierten Zellen in Patienten verabreicht werden, welche in der Lage sind, eine biologisch aktive Form von Persephin oder einen Precursor von Persephin, d.h. ein Molekül, welches leicht in eine biologisch aktive Form von Persephin durch den Körper überführt werden kann, zu produzieren. In einem Ansatz können Persephin-ausschüttende Zellen in semipermeable Membranen zur Implantierung in einen Patienten eingekapselt werden. Die Zellen können Zellen darstellen, die Persephin oder eine Vorstufe davon normal exprimieren, oder die Zellen können zur Expression von Persephin oder eines Vorläufers davon transformiert werden. Es ist bevorzugt, dass die Zelle menschlichen Ursprungs ist und dass das Persephin menschliches Persephin darstellt, wenn der Patient ein Mensch ist. Jedoch können die Zubereitungen und Verfahren hierin für veterinäre sowie für menschliche Anwendungen verwendet werden, und der Begriff "Patient", wie er hierin verwendet wird, soll menschliche und veterinäre Patienten einschließen.

[0117] Zellen können ex vivo für die Verwendung in der Transplantation oder der Verpflanzung in Patienten gezüchtet werden (Muench et al., Leuk & Lymph 16: 1–11, 1994). In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann Persephin zur Förderung der ex vivo-Vermehrung von einer Zelle für die Transplantation oder Verpflanzung verwendet werden. Bisherige Verfahren haben Bioreaktor-Kultur-Systeme, welche

Faktoren enthalten, wie Erythropoietin, koloniestimulierende Faktoren, Stammzellenfaktor und Interleukine, zur Vermehrung der hämatopoethischen Stammzellen für Erythrocyten, Monocyten, Neutrophile und Lymphocyten verwendet (Verfaillie, *Stem Cells* 12: 466–476, 1994). Diese Stammzellen können aus dem Knochenmark eines menschlichen Spenders, aus menschlichem peripheren Blut oder aus Nabelschnurblutzellen isoliert werden. Diese erweiterten Blutzellen werden zur Behandlung von Patienten verwendet, denen es an diesen Zellen als ein Ergebnis spezifischer Erkrankungen oder als ein Ergebnis einer hochdosierten Chemotherapie zur Behandlung eines bösartigen Tumors mangelt (George, *Stem Cells* 12 (Suppl. 1): 249–255, 1994). In dem Fall eines Zelltransplantats nach der Chemotherapie können autologe Transplantate durch Entfernung von Knochenmarkzellen vor der Chemotherapie, das Vermehren/Expandieren der Zellen ex vivo unter Verwendung von Verfahren, welche ebenso zum Eliminieren von bösartigen Zellen dienen, und durch Transplantieren der vermehrten Zellen zurück in den Patienten nach der Chemotherapie durchgeführt werden (als Überblick siehe Rummel und Van Zant, *J. Hematotherapy* 3: 213–218, 1994). Da Persephin und der verwandte Wachstumsfaktor Neurturin in dem sich entwickelnden Tier in besonderen Geweben, bei denen die Proliferation und Differenzierung von Progenitor-Zellen auftritt, exprimiert wird, nimmt man an, dass Persephin zur Regulierung bzw. Kontrolle der Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen und der Differenzierung von reifen hämatopoetischen Zellen dienen kann. Folglich könnte die Zugabe von Persephin zu Kultursystemen, welche für die ex vivo-Vermehrung von Zellen verwendet werden, die Rate, bei der bestimmte Populationen von Zellen sich vermehren oder differenzieren, stimulieren und die Effektivität dieser Vermehrungssysteme in der Bildung von für die Transplantation benötigten Zellen verbessern.

[0118] Es wird ebenso angenommen, dass Persephin für die ex vivo-Vermehrung von Vorläuferzellen in dem Nervensystem verwendet werden kann. Die Transplantation oder Verpflanzung von Zellen wird momentan als eine Therapie für Erkrankungen untersucht, bei denen bestimmte Populationen von Neuronen aufgrund der Degeneration verloren gingen, wie beispielsweise in der Parkinsonschen Krankheit (Bjorklund, *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 683–689, 1992). Neuronale Vorläuferzellen können von tierischen oder menschlichen Spendern oder von menschlichem Fötalgewebe erhalten werden und anschließend in einer Kultur unter Verwendung von Persephin vermehrt werden. Diese Zellen können dann in die Patienten verpflanzt werden, wo sie zum Ersatz einiger der aufgrund der Degeneration verlorenen Zellen dienen können. Weil sich gezeigt hat, dass Neurotrophine zur Stimulierung des Überlebens und der Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in der Lage sind, wie beispielsweise zur NT-3-Stimulierung von sympathischen Neuroblast-Zellen (Birren et al., *Develop.* 119: 597–610, 1993), könnte Persephin ebenso in ähnlicher Weise während der Entwicklung des Nervensystems fungieren und könnte in der ex vivo-Vermehrung von neuronalen Zellen nützlich sein.

[0119] In einer Anzahl von Umständen wäre es wünschenswert, die Anteile von Persephin in einem Patienten zu bestimmen. Die Identifizierung von Persephin zusammen mit dem vorliegenden Bericht, dass Persephin durch bestimmte Gewebe exprimiert wird, liefert die Basis für den Rückschluss, dass die Anwesenheit von Persephin eine normale physiologische Funktion hinsichtlich des Zellenwachstums und -überlebens ausübt. In der Tat sind andere neurotrophe Faktoren dafür bekannt, dass sie eine Rolle in der Funktion von neuronalen und nichtneuronalen Geweben spielen. (Als Überblick siehe Scully und Otten, *Cell. Biol. Int.* 19: 459–469, 1995; Otten und Gadiant, *Int. J. Devl. Neurosciences* 13: 147–151, 1995). Endogen gebildetes Persephin kann ebenso eine Rolle in bestimmten Erkrankungen spielen, insbesondere wo eine zelluläre Degeneration auftritt, wie in neurodegenerativen Zuständen oder Erkrankungen. Andere neurotrophe Faktoren sind dafür bekannt, dass sie sich während des Erkrankungsverlaufs ändern. Beispielsweise werden bei der Multiplen Sklerose die Anteile an NGF-Protein in dem cerebrospinalen Fluid während den akuten Phasen der Erkrankung erhöht (Bracci-Laudiero et al., *Neuroscience Lett.* 147: 9–12, 1992), und bei systemischem Lupus erythematosus besteht ein Zusammenhang zwischen den Entzündungsabschnitten und NGF-Anteilen in den Seren (Bracci-Laudiero et al., *NeuroReport* 4: 563–565, 1993).

[0120] Unter der Annahme, dass Persephin in bestimmten Geweben exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass der Anteil an Persephin sich in einer Vielzahl von Erkrankungen ändern kann und dass die Quantifizierung des Persephin-Niveaus klinisch nützliche Informationen zur Verfügung stellen kann. Darüber hinaus können in der Behandlung von degenerativen Erkrankungen Zusammensetzungen, welche Persephin enthalten, verabreicht werden, und es wäre äußerst wünschenswert, bestimmte Zielniveaus von Persephin in dem Serum, in dem cerebrospinalen Fluid oder in irgendeinem gewünschten Gewebe-Abschnitt zu erhalten. Es wäre daher von Vorteil, dazu in der Lage zu sein, die Anteile an Persephin in einem Patienten zu verfolgen. Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ebenso Verfahren zur Detektierung der Anwesenheit von Persephin in einer Probe von einem Patienten zur Verfügung.

[0121] Der Begriff "Detektierung", wie er hierin in dem Kontext der Detektierung der Anwesenheit von Persephin in einem Patienten verwendet wird, soll die Bestimmung der Menge von Persephin oder der Fähigkeit,

eine Menge an Persephin in einem Patienten zu exprimieren, die Unterscheidung von Persephin von anderen Wachstumsfaktoren, die Abschätzung der Vorhersage hinsichtlich des möglichen Ausbruchs einer degenerativen Erkrankung und der Aussicht auf Heilung, die Verfolgung des Persephin-Niveaus innerhalb einer Zeitdauer als Maß des Status der Erkrankung sowie das Verfolgen des Persephin-Niveaus zur Bestimmung einer bevorzugten therapeutischen Behandlung für den Patienten einschließen.

[0122] Um die Anwesenheit von Persephin in einem Patienten zu detektieren, wird eine Probe von dem Patienten genommen. Die Probe kann eine Gewebebiopsieprobe oder eine Blut-, Plasma-, Serum-, CSF- oder eine ähnliche Probe darstellen. Persephin wird in Nieren- und Gehirngeweben exprimiert, wie in Beispiel 18 gezeigt ist, und es wird angenommen, dass Persephin ebenso in einer Vielzahl von anderen noch nicht getesteten Geweben exprimiert wird. Folglich können Proben für die Detektierung von Persephin von jeglichen Geweben genommen werden, welche Persephin exprimieren. Wenn das Periphär-Niveau von Persephin beurteilt wird, ist es bevorzugt, dass die Probe eine Blut-, Plasma- oder Serum-Probe oder alternativ eine Gewebebiopsie-Probe darstellt. Wenn das Niveau von Persephin in dem zentralen Nervensystem bestimmt wird, ist eine bevorzugte Probe eine aus dem cerebrospinalen Fluid stammende Probe.

[0123] In einigen Fällen ist es wünschenswert, zu bestimmen, ob das Persephin-Gen in dem Patienten oder in einem Gewebe oder einer Zelllinie innerhalb des Patienten intakt ist. Unter einem intakten Persephin-Gen wird verstanden, dass keine Veränderungen in dem Gen, wie Punktmutationen, Deletionen, Insertionen, Chromosomenbrüche, Chromosomen-Neuanordnungen und ähnliches, auftreten, wobei solche Veränderungen die Bildung von Persephin oder deren biologische Aktivität, Stabilität oder ähnliches ändern kann, was zu Erkrankungsprozessen oder Empfindlichkeit gegenüber zellulären degenerativen Erkrankungen führt. Umgekehrt wird hierin unter einem nicht-intakten Persephin-Gen verstanden, dass solche Veränderungen vorliegen. Folglich wird in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Detektierung und Charakterisierung jeglicher Veränderungen in dem Persephin-Gen zur Verfügung gestellt. Das Verfahren umfasst die Bereitstellung eines Oligonucleotids, welches die Persephin-cDNA, Genom-DNA oder ein Fragment davon oder ein Derivat davon enthält. Unter einem Derivat eines Oligonucleotids wird verstanden, dass das abgeleitete Oligonucleotid im Wesentlichen dasselbe ist wie die Sequenz, von der es abgeleitet ist, dahingehend dass die abgeleitete Sequenz ausreichende Sequenzkomplementarität zu der Sequenz aufweist, von der sie abgeleitet ist, um an das Persephin-Gen zu hybridisieren. Die abgeleitete Nucleotidsequenz ist nicht notwendigerweise physisch bzw. physikalisch von der Nucleotidsequenz abgeleitet, sondern kann in irgendeiner Weise gebildet werden, einschließlich beispielsweise der chemischen Synthese oder DNA-Replikation oder der reversen Transkription oder Transkription.

[0124] Typischerweise wird eine Patienten-Genom-DNA von einer Zellprobe des Patienten isoliert und mit ein oder mehreren Restriktions-Endonukleasen, wie beispielsweise TagI und AluI, verdaut. Unter Verwendung des Southern-Blot-Protokolls, welches im Stand der Technik bekannt ist, bestimmt dieser Assay, ob ein Patient oder ein bestimmtes Gewebe in einem Patienten ein intaktes Persephin-Gen oder eine Persephin-Gen-Anomalität aufweist.

[0125] Die Hybridisierung an das Persephin-Gen würde die Denaturierung der Chromosomen-DNA unter Erhalt einer Einzelstrang-DNA; das Kontaktieren der Einzelstrang-DNA mit einer Gensonde, welche mit der Persephin-Gen-Sequenz verbunden ist; und die Identifizierung der hybridisierten DNA-Sonde zur Detektierung der Chromosomen-DNA, welche mindestens einen Teil des menschlichen Persephin-Gens enthält, einschließen.

[0126] Der Begriff "Sonde", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf eine Struktur, welche ein Polynucleotid umfasst, das eine Hybridstruktur mit einer Zielsequenz aufgrund der Komplementarität der Sondensequenz mit einer Sequenz in dem Zielbereich bildet. Die Sonden müssen nicht die exakte Sequenz der Zielsequenz wiedergeben, jedoch muss sie ausreichend komplementär sein, um selektiv mit dem zu amplifizierenden Strang zu hybridisieren. Unter selektiver Hybridisierung oder spezifischer Hybridisierung wird verstanden, dass ein Polynucleotid vorzugsweise an ein Ziel-Polynucleotid hybridisiert. Oligomere, welche zur Verwendung als Sonden geeignet sind, können ein Minimum von ungefähr 8 bis 12 aufeinanderfolgenden Nucleotiden enthalten, welche zu der Zielsequenz komplementär sind, und vorzugsweise ein Minimum von ungefähr 15 Nucleotiden aufweisen, obwohl Polynucleotide mit bis zu 20 Nucleotiden und bis zu 100 Nucleotiden oder sogar mehr innerhalb des Schutzzumfangs der Erfindung liegen.

[0127] Die Persephin-Gen-Sonden der vorliegenden Erfindung können DNA- oder RNA-Oligonucleotide darstellen und können durch irgendein im Stand der Technik bekanntes Verfahren hergestellt werden, wie beispielsweise durch Ausschneiden, Transkription oder chemische Synthese. Sonden können mit jeglichen im Stand der Technik bekannten Labeln, wie beispielsweise mit radioaktiven oder fluoreszierenden Labeln oder

enzymatischen Markern, gelabelt sein. Das Labeln der Sonde kann durch irgendein im Stand der Technik bekanntes Verfahren erfolgen, wie durch PCR, Randompriming, End-Labeln, Nick-Translation oder ähnliches. Der Fachmann wird ebenso feststellen, dass andere Verfahren, welche keine gelabelte Sonde einsetzen, zur Bestimmung der Hybridisierung verwendet werden können. Beispiele für Verfahren, welche zur Detektierung der Hybridisierung verwendet werden können, umfassen den Southern-Blot, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Einzelstrangkonnformationspolymorphismus mit PCR-Amplifikation.

[0128] Die Hybridisierung wird typischerweise bei 25 bis 45°C, besonders bevorzugt bei 32 bis 40°C und ganz besonders bevorzugt bei 37 bis 38°C durchgeführt. Die für die Hybridisierung erforderliche Zeit reicht von ungefähr 0,25 bis ungefähr 96 Stunden, besonders bevorzugt von ungefähr 1 bis ungefähr 72 Stunden und am meisten bevorzugt von ungefähr 4 bis ungefähr 24 Stunden.

[0129] Persephin-Gen-Anomalien können ebenso unter Verwendung des PCR-Verfahrens und von Primern, welche innerhalb des Persephin-Gens liegen oder dieses flankieren, detektiert werden. Das PCR-Verfahren ist im Stand der Technik bekannt. Kurz gesagt wird dieses Verfahren durchgeführt unter Verwendung von zwei Oligonucleotid-Primern, welche zur Hybridisierung der Nucleinsäuresequenzen, welche eine Zielsequenz flankieren, die innerhalb eines Persephin-Gens liegt, in der Lage sind, sowie unter Amplifizieren der Zielsequenz. Der Begriff "Oligonucleotid-Primer", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen kurzen Strang der DNA oder RNA typischerweise im Längenbereich von ungefähr 8 bis ungefähr 30 Basen. Die Aufwärts- und Abwärts-Primer reichen typischerweise von ungefähr 15 bis ungefähr 20 Basenpaaren und bis ungefähr 30 Basenpaare oder mehr in der Länge. Die Primer können an die flankierenden Bereiche zur Replikation der Nucleotidsequenz hybridisieren. Die Polymerisation wird durch eine DNA-Polymerase in Gegenwart von Deoxynucleotid-Triphosphaten oder Nucleotid-Analoga unter Bildung von doppelsträngigen DNA-Molekülen katalysiert. Die Doppelstränge werden anschließend durch irgendein Denaturierungsverfahren, einschließlich dem physikalischen, chemischen oder enzymatischen, getrennt. Normalerweise wird das Verfahren der physikalischen Denaturierung verwendet, welches das Erwärmen der Nucleinsäure, typischerweise auf Temperaturen von ungefähr 80°C bis 105°C innerhalb von Zeitdauern im Bereich von ungefähr 1 bis ungefähr 10 Minuten einschließt. Das Verfahren wird bis zur gewünschten Anzahl von Zyklen wiederholt.

[0130] Die Primer sind derartig ausgewählt, dass sie zu dem Strang der zu amplifizierenden DNA im Wesentlichen komplementär sind. Daher müssen die Primer nicht die exakte Sequenz des Templats wiedergeben, sondern müssen ausreichend komplementär sein, um mit dem zu amplifizierenden Strang selektiv zu hybridisieren. Unter selektiver Hybridisierung oder spezifischer Hybridisierung wird verstanden, dass ein Polynucleotid vorzugsweise an ein Ziel-Polynucleotid hybridisiert.

[0131] Nach der PCR-Verstärkung bzw. -Amplifizierung wird die DNA-Sequenz, welche Persephin oder Pre-Pro-Persephin oder ein Fragment davon umfasst, anschließend direkt sequenziert und durch Vergleich der Sequenz mit den hierin offenbarten Sequenzen analysiert, um die Veränderungen zu identifizieren, welche die Aktivität oder das Expressionsniveau oder ähnliches ändern könnten.

[0132] In einer weiteren Ausführungsform wird ein Verfahren zur Detektierung von Persephin auf der Basis einer Gewebeanalyse, welche das Persephin-Gen exprimiert, zur Verfügung gestellt. Es wurde gefunden, dass bestimmte Gewebe, wie die unten in Beispiel 18 identifizierten, dass Persephin-Gen exprimieren. Das Verfahren umfasst das Hybridisieren einer Polynucleotid-Sonde an mRNA aus einer Probe von Geweben, welche normalerweise das Persephin-Gen exprimieren, oder aus einer cDNA, hergestellt aus der mRNA der Probe. Die Probe wird von einem Patienten, welcher unter dem Verdacht steht, eine Anomalität in dem Persephin-Gen aufzuweisen, oder aus einem speziellen Patienten-Gewebe oder -Zelltyp erhalten, welche unter dem Verdacht stehen, eine Anomalität in dem Persephin-Gen aufzuweisen. Die Referenz-Persephin-Polynucleotid-Sonde kann die SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NOS: 203 bis 206 oder deren Derivate oder deren Fragmente umfassen, solange solche Derivate oder Fragmente spezifisch an die Persephin-mRNA hybridisieren, oder aus einer cDNA hergestellt aus einer Persephin-mRNA.

[0133] Zur Detektierung der Anwesenheit von das Persephin-Protein kodierender mRNA wird eine Probe von einem Patienten entnommen. Die Probe kann dem Blut oder einer Gewebebiopsie-Probe entstammen. Die Probe kann zur Extraktion der Nucleinsäuren, welche darin enthalten sind, behandelt werden. Die resultierende Nucleinsäure aus der Probe wird einer Gelelektrophorese oder einer anderen Technik zur Größentrennung unterzogen.

[0134] Die mRNA der Probe wird mit einer Nucleinsäure-Sequenz, welche als eine Sonde fungiert, unter Bildung von Hybrid-Duplexen in Kontakt gebracht. Die Verwendung von gelabelten Sonden, wie oben diskutiert,

erlaubt die Detektierung des resultierenden Duplex.

[0135] Bei Verwendung der Persephin-Protein kodierenden cDNA oder eines Derivats der cDNA als Sonde können hochstringente Bedingungen verwendet werden, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern, d. h. die Hybridisierung und scheinbare Detektion von Persephin-Nucleotidsequenzen, wobei eigentlich ein intaktes und funktionierendes Persephin-Gen nicht vorliegt. Bei Verwendung von Sequenzen, welche von Persephin-cDNA abgeleitet sind, können weniger strikte Bedingungen verwendet werden. Jedoch würde dieses einen weniger bevorzugten Ansatz darstellen, da die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Ergebnissen existiert. Die Stringenz der Hybridisierung wird durch eine Vielzahl von Faktoren während der Hybridisierung und während des Waschverfahrens, einschließlich der Temperatur, der Ionenstärke, der Zeitdauer und der Konzentration an Formamid, bestimmt. Diese Faktoren sind beispielsweise in Sambrook et al. ausgeführt (Sambrook et al., 1989, supra).

[0136] Um die Empfindlichkeit der Detektierung in einer Probe der das Persephin-Protein kodierenden mRNA zu erhöhen, kann die Technik der reversen Transkription/Polymerisationskettenreaktion (RT/PCR) verwendet werden, um von mRNA transkribierte cDNA, welche für das Persephin-Protein kodiert, zu amplifizieren. Das Verfahren der RT/PCR ist im Stand der Technik bekannt (siehe Beispiel 9).

[0137] Das RT/PCR-Verfahren kann wie folgt durchgeführt werden. Die gesamte zelluläre RNA wird beispielsweise durch das Standard-Guanidiniumisothiocyanat-Verfahren isoliert, und die gesamte RNA wird revers-transkribiert. Das Reverse-Transkriptions-Verfahren umfasst die Synthese von DNA auf einem Templat von RNA unter Verwendung eines Reverse-Transkriptase-Enzyms und eines 3'-End-Primers. Typischerweise enthält der Primer eine Oligo(dT)-Sequenz. Die so gebildete cDNA wird anschließend unter Verwendung des PCR-Verfahrens und Persephin-spezifischen Primern amplifiziert. (Belyavsky et al., Nucl. Acid. Res. 17: 2919–2932, 1989; Krug und Berger, Methods in Enzymology, Academic Press, N.Y., Vol. 152, Seiten 316–325, 1987).

[0138] Das Polymerase-Kettenreaktions-Verfahren wird wie oben beschrieben durchgeführt, wobei zwei Oligonucleotid-Primer verwendet werden, welche zu den zwei flankierenden Bereichen des zu verstärkenden bzw. zu amplifizierenden DNA-Segments im Wesentlichen komplementär sind.

[0139] Nach der Amplifizierung wird das PCR-Produkt anschließend einer Elektrophorese unterzogen und durch Ethidiumbromid-Färbung oder durch Phospho-Kennzeichnung (Phospho-Imaging) detektiert.

[0140] Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin Verfahren zur Detektierung der Anwesenheit des Persephin-Proteins in einer von einem Patienten erhaltenen Probe zur Verfügung. Ein jedes im Stand der Technik zur Detektierung von Proteinen bekanntes Verfahren kann verwendet werden. Solche Verfahren umfassen, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, die Immunodiffusion, Immunoelktrophorese, immunochemische Verfahren, Binder-Ligand-Assays, immunohistochemische Techniken, Agglutinierung und Komplementär-Assays. (Siehe beispielsweise Basic and Clinical Immunology, Sites und Terr, Herausgeber, Appleton & Lange, Norwalk, Conn. Seiten 217–262, 1991). Bevorzugt sind Binder-Ligand-Immunoassay-Verfahren, welche die Umsetzung von Antikörpern mit einem Epitop oder Epitopen des Persephin-Proteins oder deren Derivate oder das kompetitive Ersetzen eines gelabelten Persephin-Proteins oder eines Derivats davon umfassen.

[0141] Wie hierin verwendet soll ein Derivat des Persephin-Proteins ein Polypeptid einschließen, in welchem bestimmte Aminosäuren deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt oder gegen modifizierte oder unübliche Aminosäuren ausgetauscht wurden, worin das Persephin-Derivat biologisch äquivalent zu Persephin ist und/oder worin das Polypeptid-Derivat mit Antikörpern, welche gegen jeweils das Persephin-Protein erzeugt wurden, kreuzreagieren. Unter Kreuzreaktion bzw. Cross-Reaktion wird verstanden, dass ein Antikörper mit einem Antigen reagiert, welches sich von dem Antigen unterscheidet, welches seine Bildung induziert hat.

[0142] Eine Vielzahl kompetitiver und nichtkompetitiver Proteinbindungsmunoassays sind im Stand der Technik bekannt. In solchen Assays verwendete Antikörper können ungelabelt sein, wie sie beispielsweise in Agglutinationstests verwendet werden, oder zur Verwendung in einer breiten Vielfalt von Assay-Verfahren gelabelt sein. Labels, welche verwendet werden können, umfassen Radionuklide, Enzyme, fluoreszierende Label, chemilumineszierende Label, Enzymsubstrate oder Co-Faktoren, Enzyminhibitoren, Teilchen, Farbstoffe und ähnliches zur Verwendung in Radioimmunoassays (RIA), Enzymimmunoassays, z. B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Fluoreszenzimmunoassays und ähnliches.

[0143] Polyklonale oder monoklonale Antikörper für das Persephin-Protein oder für ein Epitop davon können

zur Verwendung in Immunoassays durch irgendeines der Vielzahl der im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden. Bei Epitop wird auf eine antigene Determinante eines Polypeptids Bezug genommen. Der Begriff Epitop kann auch Persephin-spezifische B-Zellepitope oder T-Helferzellenepitope einschließen. Ein Epitop könnte drei Aminosäuren in einer räumlichen Konformation umfassen, welche für das Epitop einzigartig ist. Im Allgemeinen besteht ein Epitop aus mindestens 5 solcher Aminosäuren. Verfahren zur Bestimmung der räumlichen Konformation bzw. Anordnung der Aminosäuren sind im Stand der Technik bekannt und umfassen beispielsweise die Röntgenkristallographie und zweidimensionale Kernspinresonanz.

[0144] Ein Ansatz für die Herstellung von Antikörpern für ein Protein ist die Auswahl und Herstellung einer Aminosäuresequenz des gesamten oder eines Teils des Proteins, die chemische Synthese der Sequenz und deren Injektion in ein geeignetes Lebewesen/Tier, gewöhnlich einen Hasen oder eine Maus (siehe Beispiel 10).

[0145] Oligopeptide können als Kandidaten für die Herstellung eines Antikörpers für das Persephin-Protein auf der Basis der in hydrophilen Bereichen liegenden Oligopeptide ausgewählt werden, welche folglich leicht in das reife Protein exponiert werden.

[0146] Antikörper für Persephin können ebenso gegen Oligopeptide erzeugt sein, welche ein oder mehrere der erhaltenen bzw. konservierten Bereiche aufweisen, die hierin identifiziert wurden, sodass der Antikörper mit anderen Familienmitgliedern kreuzreagieren kann. Solche Antikörper können zur Identifizierung und Isolierung der anderen Familienmitglieder verwendet werden.

[0147] Verfahren zur Herstellung des Persephin-Proteins oder eines Epitops davon umfassen, allerdings ohne auf die chemische Synthese begrenzt zu sein, rekombinante DNA-Techniken oder die Isolierung aus biologischen Proben. Die chemische Synthese eines Peptids kann beispielsweise durch die klassische Merrifeld-Methode der Festphasenpeptid-Synthese (Merrifeld, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963) oder durch die Fmoc-Strategie auf einem Rapid Automated Multiple Peptide Synthesis System durchgeführt werden (DuPont Company, Wilmington, DE) (Caprino und Han, J. Org. Chem. 37: 3404, 1972).

[0148] Polyklonale Antikörper können durch Immunisieren von Hasen oder anderen Lebewesen/Tieren durch Injizierung des Antigens, gefolgt von anschließenden Boosts in geeigneten Intervallen hergestellt werden. Man lässt die Tiere ausbluten und untersucht die Seren gegenüber gereinigtem Persephin-Protein gewöhnlich durch ELISA oder durch einen Bioassay auf der Basis der Fähigkeit, die Wirkung von Persephin zu blockieren. Wenn Vogelarten verwendet werden, z. B. Hühner, Truthähne oder ähnliches, kann der Antikörper aus dem Dotter des Eis isoliert werden. Monoklonale Antikörper können nach dem Verfahren von Milstein und Kohler durch Verschmelzen von Splenozyten aus immunisierten Mäusen mit kontinuierlich replizierenden Tumorzellen, wie Myelom- oder Lymphom-Zellen, hergestellt werden. (Milstein und Kohler, Nature 256: 495–497, 1975; Gutfre und Milstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73: 1–46, Langone und Banatis Herausgeber, Academic Press, 1981). Die so gebildeten Hybridoma-Zellen werden anschließend durch limitierende Verdünnungsverfahren kloniert, und die Überstände werden hinsichtlich der Antikörperbildung durch ELISA, RIA oder Bioassays geprüft.

[0149] Die einzigartige Fähigkeit von Antikörpern, Zielproteine zu erkennen und spezifisch zu binden stellt einen Ansatz zur Behandlung einer Überexprimierung des Proteins dar. Folglich können die spezifischen Antikörper gegen das Persephin-Protein zur Vorbeugung oder Behandlung von Erkrankungen, welche eine Überexprimierung des Persephin-Proteins einschließen, durch Behandlung eines Patienten verwendet werden.

[0150] Spezifische Antikörper, entweder polyklonal oder monoklonal, für das Persephin-Protein können durch jegliche im Stand der Technik, wie oben diskutiert, bekannte geeignete Verfahren gebildet werden. Beispielsweise können Maus- oder menschliche monoklonale Antikörper durch die Hybridoma-Technologie hergestellt werden, oder alternativ können das Persephin-Protein oder ein immunologisch wirksames Fragment davon oder ein antiidiotyptischer Antikörper oder ein Fragment davon einem Lebewesen/Tier verabreicht werden, um die Bildung von Antikörpern auszulösen, welche zur Erkennung von und Bindung an das Persephin-Protein in der Lage sind. Solche Antikörper können aus irgendeiner Klasse von Antikörpern gebildet sein, einschließlich, allerdings ohne darauf begrenzt zu sein, IgG, IgA, IgM, IgD und IgE, oder in dem Fall von Vogelarten IgY sowie aus jeder Subklasse der Antikörper.

[0151] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung werden in den folgenden Beispielen beschrieben. Andere Ausführungsformen innerhalb des Umfangs der Ansprüche hierin werden dem Fachmann in Betrachtung der Beschreibung oder der Praxis der Erfindung, wie sie hierin beschrieben ist, ersichtlich werden. Die Beschreibung soll zusammen mit den Beispielen nur exemplarisch verstanden werden.

Beispiel 1

[0152] Dieses Beispiel verdeutlicht die Isolierung und Reinigung von Neurturin aus einem konditionierten CHO-Zellen-Medium.

Herstellung des konditionierten CHO-Zellenmediums:

[0153] Ein Derivat von DG44-Eierstockzellen des chinesischen Hamsters, DG44CHO-pHSP-NGFI-B (CHO)-Zellen, wurde verwendet (Day et al., J. Biol. Chem. 265: 15253–15260, 1990). Die Erfinder haben ebenso Neurturin in teilweise gereinigter Form aus anderen Derivaten der DG44-Eierstockzellen des chinesischen Hamsters erhalten. Die CHO-Zellen wurden in 20 ml Medium gehalten, welches minimales essentielles Medium (MEM)-alpha (Gibco-BRL Nr. 12561, Gaithersburg, MD) enthielt, das 10% fötales Kalbserum (Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM 1-Glutamin, 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 25 nM Methotrexat unter Verwendung von 150 cm²-Flaschen (Corning Inc., Corning NY) aufwies. Für den Durchlass und die Vermehrung wurde Medium aus einer konfluenten Flasche eingezogen; die Zellen wurden mit 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS), enthaltend in g/l 0,144 KH₂PO₄, 0,795 Na₂HPO₄ und 9,00 NaCl, gewaschen; und die Flasche wurde anschließend zwei bis drei Minuten mit 2 ml 0,25% Trypsin in PBS inkubiert. Die Zellen wurden anschließend von der Flaschenoberfläche entnommen, 8 ml des Mediums wurden zugesetzt, und die Zellen wurden mehrere Male mit einer Pipette trituriert. Die Zellen wurden 1:5 oder 1:10 aufgeteilt, bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5% CO₂ in Luft inkubiert und 3 bis 4 Tage lang bis zum Zusammentreffen (Konfluenz) wachsen gelassen.

[0154] Anschließend ließ man die Zellkultur in 850 cm²-Rollflaschen (Becton Dickinson, Bedford, MA) sich vermehren. Eine konfluente 150 cm²-Flasche wurde trypsinisiert und in eine Rollflasche, enthaltend 240 ml des obengenannten modifizierten MEM-Mediums ohne Methotrexat, gesetzt. Der pH wurde entweder durch Überlagern des Mediums mit 5% CO₂ in Luft oder durch Herstellen des Mediums mit 25 mM HEPES pH 7,4 (Sigma, St. Louis, MO) gehalten. Die Rollflaschen wurden bei 0,8 bis 1,0 Umdrehungen pro Minute routieren gelassen. Die Zellen erreichten eine Konfluenz in 4 Tagen.

[0155] Zum Sammeln des konditionierten Mediums wurde serumfreies CHO-Zellen-Medium (SF-CHO) verwendet. SF-CHO wurde unter Verwendung von 1:1 DME/F12-Basis-Medium hergestellt, welches durch Mischen von 1:1 (v/v) DMEM (Gibco-BRL Produkt Nr. 11965, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) mit Ham's F12 (Gibco-BRL Produkt Nr. 11765) hergestellt wurde. Das fertige SF-CHO-Medium enthielt 15 mM HE-PES pH 7,4 (Sigma, St. Louis, MO), 0,5 mg/ml bovines Serum-Albumin (BSA, Sigma, St. Louis, MO), 25 µg/ml Heparin, (Sigma, St. Louis, MO), ein 1X Insulin-Transferrin-Selenit-Supplement (bovines Insulin, 5 µg/ml; humanes Transferrin, 5 µg/ml; Natriumselenit, 5 ng/ml; Sigma, St. Louis, MO), 2 mM 1-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Das Medium aus den konfluenten Rollflaschen wurde entfernt, und die Zellen wurden einmal mit 30 ml SF-CHO-Medium zur Entfernung der Serumproteine gewaschen. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C 16 bis 24 Stunden lang in 80 ml SF-CHO-Medium zur weiteren Entfernung von Serumproteinen inkubiert. 80 ml Medium wurden entfernt und verworfen. Es wurde ein Volumen von 120 ml SF-CHO-Medium zu der Flasche zugesetzt, und die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Weitere 48 Stunden später wurden 120 ml entnommen und durch dasselbe Volumen SF-CHO-Medium ersetzt. Die gesammelten Medien wurden gepoolt und bei 4°C in konischen Polypropylenrohren zur Entfernung von zellulärer Debris zentrifugiert, und der Überstand wurde bei -70°C gelagert. Die Medien wurden fünfmal innerhalb von 10 Tagen gesammelt, um insgesamt ungefähr 600 ml konditioniertes Medium pro Rollflasche zu erhalten.

[0156] Die gesammelten Fraktionen aus den Säulen wurden bei jeder Reinigungsstufe hinsichtlich der biologischen Aktivität unter Verwendung des neuronalen Überlebensassays und hinsichtlich des Proteingehalts durch den Farbstoffbindungsassay von Bradford (Anal. Biochem. 72: 248 et seq., 1976) untersucht. Die Gesamt-mg an Protein in dem Ausgangsvolumen, typischerweise 50 l, des konditionierten Mediums wurden bestimmt.

Höheres Cervical-Ganglion-Überlebens-Assay (Superior Cervical Ganglion Survival Assay):

[0157] Die neurotrophe Aktivität von konditioniertem CHO-Medium-Ausgangsmaterial wurde bei verschiedenen Aufreinigungsstufen unter Verwendung des höheren Cervical-Ganglion-Überlebens-Assay-Systems, von dem bereits früher berichtet wurde (Martin et al., J. of Cell Biology 106: 829–844; Deckwerth und Johnson, J. Cell. Bio. 123: 1207–1222, 1993), welches hierin durch Bezugnahme eingeschlossen ist, untersucht. Es wurden primäre Kulturen sympathischer Neuronen aus dem höheren/oberen Cervical-Ganglion (SCG) durch Entnahme von Gewebe aus dem Rattenembryo am Tag 20–21 (E20–E21) hergestellt. Die SCG's wurden in Lei-

bovitz's L15-Medium mit 1-Glutamin (Cat #11415-023 Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) gegeben, 30 Minuten lang mit 1 mg/ml Kollagenase (Cat #4188 Worthington Biochemical, Freehold, NJ) in Leibovitz's L15-Medium bei 37°C digeriert, gefolgt von einer 30-minütigen Digerierung in lyophilisiertem und bestrahltem Trypsin (Typ TRLVMF Cat #4454 Worthington Biochemical, Freehold, NJ), welches in modifizierter Hanks'Balanced Salt Solution (Cat #H-8389 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) resuspendiert wurde. Die Digerierung wurde unter Verwendung von AM50 gestoppt, welches minimales essentielles Medium (Minium Essential Medium) mit Earle's Salzen und ohne 1-Glutamin (Cat #11090-016 Gibco-BRL), 10% fötales Kalbsserum (Cat #1115 Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM 1-Glutamin (Cat #G5763 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µM FuDr (F-0503 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µM Uridine (Cat #3003 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 100 U/ml Penizillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 ng/ml 2,5 S NGF enthält. Die Zellen wurden in eine Suspension einzelner Zellen unter Verwendung einer silanierten und flammpolierten Pasteur-Pipette aufgetrennt. Nach der Filtration der Suspension durch einen Nitex-Filter (Größe 3-20/14, Tetko Inc., Elmsford, NY) wurden die Zellen in ein AM50-Medium wie oben angegeben überführt und auf eine 100 mm Falcon- oder Primaria-Kulturplatte (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) gegeben, um die Anzahl von nichtneuronalen Zellen zu vermindern. Nach 2 Stunden wurde das Medium, welches die ungebundenen neuronalen Zellen enthielt, von diesen Platten entfernt und wiederum durch eine silanierte und flammpolierte Pasteur-Pipette trituriert. Die Einzelzellsuspension wurde auf 24-Well-Gewebekulturplatten (Costar, Wilmington, MA) gegeben, welche vorher mit einer Doppelschicht aus Kollagen überzogen wurden, wobei eine Kollagenschicht ammonisiert wurde und eine zweite Kollagenschicht luftgetrocknet wurde. Man ließ sie 30 Minuten bis 2 Stunden lang anhaften. Eine spezifische Zahl viabler bzw. lebensfähiger Zellen, gewöhnlich ungefähr 1.200 bis ungefähr 3.000 Gesamtzellen pro Well, oder ein spezifischer Prozentanteil des Ganglions, gewöhnlich 25% der pro Ganglion erhaltenen Zellen, wurden in jedes Well gegeben. Sofern das Auszählen der Zellen durchgeführt werden musste, wurden sie in 24-Well-Platten, wie oben angegeben, oder alternativ in 2-Well-Kammer-Slides (Nunc, Naperville, IL) überführt. Die Kulturen wurden anschließend 5 bis 6 Tage bei 37°C in AM50-Medium in einer 5% CO₂/95% Luftatmosphäre inkubiert. Der Tod der kultivierten Neuronen wurde durch Austausch des Mediums mit Medium ohne NGF und mit 0,05% Ziegen-Anti-NGF (finaler Titer in den Wells ist 1:10) induziert. Dieser NGF-Verlust resultiert in dem Tod der Neuronen innerhalb einer Zeitdauer von 24 bis 72 Stunden. Aliquots von teilweise aufgereinigtem oder gereinigtem Faktor oder geeignete Kontrollen wurden zu den Kulturen zur Zeit der NGF-Entfernung zugesetzt, um die Fähigkeit des Vorbeugens bzw. Verhinderns des neuronalen Todes zu bestimmen.

[0158] Die Evaluierung der Fähigkeit der Säulenfraktion, der Gel-Eluat oder des gereinigten Faktors zur Vorbeugung des neuronalen Todes wurde durch visuelle Inspektion der Kulturen unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop vorgenommen. Die viablen Neuronen verblieben in der hellen Phase mit intakten Neuriten, wohingegen die toten Neuronen zusammengeschrumpft in der dunklen Phase waren, unregelmäßige Membranen aufwiesen und fragmentierte Neuriten zeigten. Wenn eine genaue Quantifizierung des neuronalen Überlebens erforderlich war, wurden die Kulturen in 4% Paraformaldehyd oder 10% Formalin in PBS fixiert und mit Crystal Violet-Lösung angefärbt (Huntoon Formula Harleco E. M. Diagnostics Systems, Gibbstown, NJ). Wenn 24-Well-Platten verwendet wurden, wurde 1 µl Crystal Violet-Lösung zu jedem Well, enthaltend 10% Formalin, zugesetzt, und die Zellen wurden unter Verwendung eines Phasen-Kontrast-Mikroskops gezählt. Wenn die 2-Well-Kammer-Slides verwendet wurden, wurden die Kulturen fixiert, mit Crystal Violet angefärbt, mit Wasser gewaschen, in steigenden Ethanolkonzentrationen gegenüber Toluol entwässert und in einer Toluol-basierten Mounting-Lösung befestigt. Die Neuronen wurden als lebensfähig gezählt, wenn sie einen klaren Nucleolus aufwiesen, und die Kerne mit Crystal Violet deutlich gefärbt waren.

[0159] Die Aktivität wurde durch Berechnung einer "Überlebenseinheit" quantifiziert. Die Gesamtüberlebenseinheiten in einer Probe wurden als das minimale Volumen eines Aliquots der Probe definiert, welches ein maximales Überleben, geteilt durch/in das Gesamtvolumen der Probe, hervorruft. Die spezifische Aktivität wurde als die Überlebenseinheiten, geteilt durch die mg-Gesamtprotein, berechnet.

[0160] Überlebenseinheiten wurden in einem Assay unter Verwendung von ungefähr 1.200 lebensfähigen Neuronen in einem 0,5 ml-Kulturassay und einer Kulturdauer von 48 Stunden, die der Zugabe der Fraktion folgt, bestimmt. Das Überleben wurde visuell nach den 48 Stunden bestimmt. Die intrinsische Aktivität wurde in einem Assay unter Verwendung von ungefähr 2.700 Neuronen und einer Kulturdauer von 72 Stunden bestimmt. Das Überleben wurde durch Fixieren der Neuronen und Zählen der Anzahl der überlebenden Neuronen beurteilt. Weil die Stabilität, wie mittels des Halbwertslebens der Aktivität beurteilt, für Neurturin mit steigender Anzahl der Neuronen abnimmt, wurde angenommen, dass die Messung der intrinsischen Aktivität geringer ist als die durch die Specific Activity-Bestimmungen vorausgesagten. Man würde ebenso erwarten, dass die Messung der intrinsischen Aktivität geringer ist als die durch die spezifische Aktivität vorausgesagte, da das Überleben nach 72 Stunden anstelle von 48 Stunden gemessen wurde.

[0161] Um die Wiederholbarkeit dieser Aktivitätseinheitsassays sicher zu stellen, war es notwendig, die primären Neuronal-Kulturen bei reproduzierbaren Zelldichten zu plattieren, da die Stabilität der Aktivität deutlich mit einem Anstieg der neuronalen Dichte abnimmt. Der Bereich der Zelldichten reichte von ungefähr 1.200 bis 2.700 Zellen pro Well. Die Anwesenheit von löslichem Heparin in dem Assay-Medium hatte keinen Effekt auf die Kurzzeit- (ungefähr 3 Tage) Stabilität der Überlebensaktivität.

Reinigung von Neurturin:

[0162] Gepooltes konditioniertes Medium wurde durch 0,2 µl-Poren-Flaschenaufsatz-Filter (Celluloseacetatmembran, Corning Inc., Corning, NY) filtriert. Typischerweise wurden 50 l des konditionierten Mediums verwendet und in 25-l-Ansätzen verarbeitet. Jeder 25-l-Ansatz wurde in einer Rate von 20 ml/Min auf eine 5 × 5 cm Säule geleitet, welche 100 ml Heparin-Agarose (Sigma, St. Louis, MO) enthielt, äquilibriert mit 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer mit 150 mM NaCl. Die Säule wurde anschließend mit ungefähr 1.000 ml 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, bei 20 ml/Min gewaschen, und die Aktivität wurde anschließend mit 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl eluiert. Nach dem Umschalten auf den 1,0 M NaCl-Elutions-Puffer wurden die ersten 50 ml Puffer verworfen, und anschließend wurde eine 300 ml-Fraktion gesammelt.

[0163] Gepooltes Material, eluiert aus der Heparin-Agarose-Säule, wurde anschließend 1:1 (v/v) mit 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,04% TWEEN 20, auf eine NaCl-Konzentration von 0,5 M verdünnt und in eine 1,5 cm × 9 cm-Säule, enthaltend 16 ml SP SEPHAROSE® High Performance-Ionenaustauschharz (Pharmacia, Piscataway, NJ), äquilibriert in 25 mM HEPES 7,4, enthaltend 0,5 M NaCl und 0,02% TWEEN 20, geleitet. Die Säule wurde anschließend mit 160 ml 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl und 0,02% TWEEN 20, gewaschen, und die Aktivität wurde mit 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl und 0,02% TWEEN 20 bei einer Fließrate von 2 ml/Min eluiert. Eine 50 ml-Fraktion wurde nach den ersten 7 ml Eluat von der Säule entnommen.

[0164] Das von der SP SEPHAROSE®-Säule eluierte Material wurde unter Verwendung von schneller Protein-Flüssigchromatographie (fast protein liquid chromatography; FPLC) auf einer Chelating Superose HR 10/2-Säule, welche mit Cu⁺⁺ beladen war (Pharmacia, Piscataway, NJ), fraktioniert. Die Säule wurde durch Waschen mit 10 ml Wasser, beladen mit 3 ml 2,5 mg/ml CuSO₄·5H₂O, Waschen mit 10 ml Wasser und Äquilibrieren mit 10 ml 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl und 0,02% TWEEN 20, hergestellt. Das Eluat wurde in die Säule in 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl in einer Rate von 1,0 ml/Min eingeleitet. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten steigender Glycin-Konzentration (0–300 mM) in 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl, in einer Rate von 1,0 ml/Min. eluiert. Der Gradient wurde durch ein Pharmacia-FPLC-System unter Verwendung eines LCC-500-Controllers und P-500-Pumpen gebildet, sodass ein 0–300 mM-Glycin-Gradient in 40 ml bei 1,0 ml/Min. bereitgestellt wurde. So stieg der Gradient um 7,5 mM Glycin pro Minute. Es wurden 1 ml-Fraktion gesammelt und hinsichtlich der SCG-Überlebenspromotion untersucht. Die Peak-Aktivität wurde in den Fraktionen 17–20 beobachtet, d. h. 17 bis 20 Minuten oder ml von dem Startpunkt des Gradienten.

[0165] Die Absorbanz-Messungen bei 280 nm durch einen Inline-UV-Monitor zeigte an, dass die meisten Proteine vor der Überlebensaktivität in den Fraktionen 17–20 eluiert wurden. Somit wurde eine deutliche Aufreinigung bei diesem Schritt erreicht. Ein 25 kD-Band wurde mit der Überlebensaktivität co-gereinigt.

[0166] Die kombinierten eluierten Fraktionen der Cu⁺⁺-Superose-Säule wurden auf 0,45 M NaCl unter Verwendung von 25 mM HEPES pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,02% TWEEN 20, verdünnt und in eine Mono-S-HR 5/5-Kationenaustauschsäule (Pharmacia, Piscataway, NJ) für die weitere FPLC-Reinigung geleitet. Die Säule wurde mit 25 mM HEPES pH 7,4-Puffer, enthaltend 0,45 M NaCl, enthaltend 0,02% TWEEN 20, äquilibriert. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten ansteigender NaCl-Konzentration (0,45–1,0 M) eluiert. Der Gradient wurde wie oben beschrieben aus 0,45 M–1,0 M NaCl in 35 ml bei 1,0 ml/Min gebildet, wodurch die Konzentration um 0,0157 M pro ml oder Minute stieg. Dreizehn 1,0 ml-Fraktionen (Fraktionen 1–13) wurden gesammelt, gefolgt von 44 0,5 ml-Fraktionen (Fraktionen 14–53). Die Peak-Aktivität in dem SCG-Assay lag in den Fraktionen 26–29. Eine jede Fraktion wurde in dem SCG-Überlebens-Assay innerhalb eines Bereichs von Volumina von 0,1 bis 1,0 µl pro 0,5 ml Kulturmedium untersucht.

[0167] Ein Prozent (5 µl) einer jeden Fraktion wurde auf ein nichtreduzierendes, 14%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel gegeben und für 750 V-Stunde bei 25°C einer Elektrophorese unterzogen. Die Proteine wurden mittels Silberfärbung visualisiert.

[0168] Ein 25 kD-Band erschien bei den Fraktionen 25–30, ein 28 kD-Protein wurde früher in dem Gradienten eluiert, und ein 18 kD wurde später in dem Gradienten eluiert.

[0169] Um zu zeigen, dass das 25 kD-Band für die überlebensfördernde Aktivität verantwortlich ist, wurde das 25 kD-Protein von dem Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese eluiert und hinsichtlich der Überlebensaktivität in dem SCG-Assay untersucht. Nach der Elektrophorese von 150 µl der SP SEPHAROSE® 1,0 M NaCl-Fraktion in einer Reihe eines oben beschriebenen nichtreduzierenden 14%-igen SDS-Polyacrylamid-Gels wurde die Reihe in 12 Streifen geschnitten, und jeder Streifen wurde zerstoßen und durch Diffusion unter Schwenken in Puffer, enthaltend 25 mM HE-PES, pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,02% Tween-20, innerhalb von 18 Stunden bei 25°C eluiert. BSA wurde zugesetzt, um eine finale Konzentration von 200 µg/ml zu eluieren, und das Eluat wurde durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um Acrylamidgel-Fragmente zu entfernen. Das Filtrat wurde anschließend einer SP SEPHAROSE®-Säule zugesetzt, um die Probe aufzukonzentrieren und zu reinigen. Vor der Elution der Probe wurde die Säule einmal in 400 ml µl 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, 0,02% Tween-20 und 200 µg BSA pro ml, und einmal in 400 µl 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,02% Tween-20 und 200 µg BSA pro ml, gewaschen. Die Säule wurde anschließend wiederum in 400 µl 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 0,5 M NaCl, 0,02% Tween-20 und 200 µg BSA pro ml, gewaschen. Die Probe wurde mit 25 mM HEPES, pH 7,4 Puffer, enthaltend 1,0 M NaCl, 0,02% Tween-20 und 200 µg BSA pro ml, eluiert. Die Proben wurden anschließend hinsichtlich ihrer Überlebensaktivität analysiert. Nur der Streifen, welcher dem 25 kD-Band entsprach, zeigte den Beweis für eine Überlebensaktivität. Das 25 kD-Protein, gereinigt aus den konditionierten CHO-Zellenmedien, wird als ein Homodimer angenommen.

[0170] Die Ausbeute aus der oben beschriebenen Aufreinigung betrug typischerweise 1–1,5 µg für 50 l konditioniertes CHO-Zellenmedium. Die Gesamtgewinnung wird auf 10 bis 30% geschätzt, was in einer Aufreinigung von ungefähr 390.000-fach resultiert.

[0171] Die progressive Reinigung unter Verwendung der obigen Schritte ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Protein ^a (mg)	Aktivität ^b (Einheiten)	Spezifische Aktivität ^d (Einheiten/mg)	Ausbeute (%)	Aufreinigung (-fach)
Konditioniertes Medium	5000	48000 ^c	9,6	-	-
Heparin- Agarose	45	48000	1068	100	111
SP-Sepharose	5,3	48000	9058	100	943
Cu++-Superose	0,31	30000	96700	62	10070
Mono S	0,004	15000	3750000	31	390000

a. mg Protein wurde bestimmt unter Verwendung der Farbstoffbindungsmethode von Bradford (Anal Biochem 72:248, 1976)

b. Die Gesamtaktivitätseinheiten oder Überlebenseinheiten in einer Probe wurden als das minimale Volumen eines Aliquots der Probe definiert, welches ein maximales Überleben, geteilt in/durch das Gesamtvolumen der Probe, bildete.

c. Die Aktivität für das konditionierte Medium wurde von der Annahme abgeleitet, dass 100% der Aktivität in der Heparin-Agarose-Fraktion gewonnen wurde, weil die Aktivität des konditionierten Mediums zur direkten Bestimmung zu gering war.

d. Spezifische Aktivität war die Aktivitätseinheiten, geteilt durch Gesamt-mg Protein.

Beispiel 2

[0172] Diese Probe verdeutlicht die Charakterisierung von Neurturin und verschiedenen Mitgliedern der TGF-β-Familie von Wachstumsfaktoren in dem SCG-Assay sowie die Abwesenheit der Kreuzreaktivität von Anti-GNDF-Antikörpern mit Neurturin.

[0173] Der SCG-Assay des aufgereinigten Proteins zeigte, dass der Faktor bei einer Konzentration von ungefähr 3 ng/ml oder ungefähr 100 pM maximal wirksam bzw. aktiv ist, und dass der EC_{50} ungefähr 1,5 ng/ml oder ungefähr 50 pM in dem erwarteten Bereich für einen diffusionsfähigen Peptid-Wachstumsfaktor lag.

[0174] Mehrere Mitglieder der TGF- β -Familie beeinflussen die Neuropeptid-Gen-Expression in sympathischen Neuronen, während andere das Überleben unterschiedlicher neuronaler Populationen fördern. Neurturin, welches ein entferntes Mitglied dieser Proteinfamilie darstellt, ist zur Förderung des annähernd vollständigen Überlebens von sympathischen Neuronen innerhalb von drei Tagen in der Lage. Zusätzlich zeigte ein weiteres Kultivieren der SCG-Zellen, dass Neurturin den Erhalt dieser Neuronen innerhalb von mindestens 10 Tagen nach der Entfernung von NGF fortsetzen konnte.

[0175] Wir haben verschiedene andere Mitglieder der TGF- β -Familie hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Unterstützung des Überlebens in dem SCG-Assay untersucht, einschließlich von TGF- β 1, Aktivin, BMP-2, BMP-4, BMP-6 und GDNF. Unter diesen Faktoren zeigte nur GDNF eine überlebensfördernde Aktivität. Jedoch war die Aktivität von GDNF viel weniger potent als die von Neurturin hinsichtlich dieser Aktivität, welches einen EC_{50} von 2–4 nM in dem 3-Tages-Überlebensassay zeigt. Das in diesem Assay untersuchte GDNF war rhGDNF, welches von E. Coli, erhalten von Prepro Tech, Inc., Rocky Hill, N. J., gebildet wurde. Die Dauer der Wirkung von GDNF war ebenso geringer als die von Neurturin, dahingehend, dass die Fähigkeit von GDNF (50 ng/ml), ein Überleben von länger als 3 Tagen zu bewerkstelligen, wesentlich nachließ. Diese Experimente legen die Möglichkeit nahe, dass GDNF ein schwacher Agonist für den Neurturin-Rezeptor ist. Darüber hinaus legt die Unfähigkeit von Aktivin und BMP-2, das Überleben im Gegensatz zu ihrer starken Induktion der Transmitter-bezogenen Gen-Expression in diesen Neuronen zu fördern (Fann und Paterson, Int. J. Dev. Neurosci. 13: 317–330, 1995; Fann und Patterson, J. Neurochem. 61: 1349–1255, 1993), nahe, dass sie über andere Rezeptoren oder Signalübertragungswege signalisieren.

[0176] Um die Kreuzreaktivität von Anti-GDNF-Antikörpern mit teilweise aufgereinigtem Neurturin zu bestimmen, wurden SCG-Neuronen, welche wie in Beispiel 1 beschrieben entnommen und plattiert wurden, am Tag 6 mit 1 ng/ml, 3 ng/ml, 10 ng/ml oder 30 ng/ml GDNF (Prepro Tech, Inc., Rocky Hill, N. J.) in Gegenwart von Anti-NGF allein oder in Gegenwart von Anti-NGF und Anti-GDNF (Ziegen-IgG-Antikörper gegenüber E. coli-abgeleitetem rhGDNF, R & D Systems, Minneapolis, Minn) behandelt. Eine teilweise gereinigte 1,0 M SP Sepharose-Fraktion von Neurturin wurde in dem Assay in geeigneten Konzentrationen von 375 pg/ml, 750 pg/ml, 1,5 ng/ml und 3 ng/ml verwendet. Diese Fraktion wurde in Gegenwart von Anti-NGF alleine und in Anwesenheit von Anti-NGF und Anti-GDNF untersucht. Der Anti-GDNF-Antikörper blockierte die überlebensfördernde Aktivität von GDNF bei einer Konzentration bis zu 30 ng/ml, blockierte allerdings nicht die überlebensfördernde Aktivität von Neurturin.

Beispiel 3

[0177] Dieses Beispiel verdeutlicht die Wirkung von Neurturin auf Sensorneuronen in einem Knoten-Ganglion-Überlebensassay.

[0178] Konditionierte CHO-Zellen-Medien, welche teilweise auf der SP Sepharose-Säule gereinigt wurden, wurden hinsichtlich der neurotrophen Aktivität gegenüber Sensorneuronen unter Verwendung von Knoten-Ganglien untersucht. Der Überlebensassay stellt eine Modifikation des vorstehend Beschriebenen hinsichtlich der höheren Cervical-Ganglien dar. Primär dissoziierte Kulturen von Knoten-Ganglien wurden durch Entnahme von Gewebe von E18-Sprague-Dawley-Ratten-Jungen hergestellt. Die Knoten-Ganglien (Nodose-Ganglien) wurden in Leibovitz's L15 mit 2 mM 1-Glutamin (Cat # 11415–023, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) gegeben und die Gewebe wurden entnommen, 30 Minuten mit 1 mg/ml Collagenase (Cat #4188, Worthington Biochemical, Freehold, New Jersey) in Leibovitz's L15-Medium bei 37°C digeriert, gefolgt von 30 minütiger Digerierung in Trypsin (lyophilisiert und bestrahlt, Typ TRLVMF, Cat #4454 Worthington Biochemical, Freehold, NJ), und auf eine finale Konzentration von 0,25% in modifizierter Hank's Balanced Salt Solution (Cat #H8389, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) resuspendiert. Die Digerierung wurde unter Verwendung von AMO-BDNF100, einem Medium, welches Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen und ohne 1-Glutamin (#11090–016 GIBCO-BRL), 10% fötales Kalbsserum (Cat #1115, Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM 1-Glutamin (Cat #G5763 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 μ M FuDr (F-0503, Sigma Chemical Co.), 20 μ M Uridine (Cat #3003, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 100 U/ml Penizillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 ng hirnableitenden neurotrophen Faktor (BDNF, Amgen, Thousand Oaks, CA) enthält, gestoppt. Die Zellen wurden in eine Suspension von Einzelzellen unter Verwendung einer silanierten und flammpolierten Pasteur-Pipette in das AMO-BDNF100-Medium dissoziiert und auf einer 100 mm-Falcon- oder Primaria-Kulturplatte (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) zur Entfernung von nichtneuronalen Zellen präplattiert. Nach

2 Stunden wurde das Medium, welches die nichtbefestigten neuronalen Zellen enthielt, von diesen Platten entfernt und erneut durch eine silanierte und flampolierte Pasteur-Pipette trituriert. Die Einzelzellensuspension wurde auf 24-Well-Gewebe-Kultur-Platten (Costar, Wilmington, MA) gegeben, welche vorher mit einer Kollagendoppelschicht überzogen wurden, wobei eine Schicht ammonisiert wurde und die zweite Schicht luftgetrocknet wurde. Die Ganglien von 10 E18-Rattenembryos wurden in 2,5 ml Medium dissoziiert, und 100 µl dieser Suspension wurde zu jedem Well zugesetzt. Die Zellen ließ man 30 Minuten in einem 37°C-Inkubator mit 5% CO₂/95% Luft anhaften. Die Wells wurden mit AM0-BDNF100-Medium über Nacht versehen.

[0179] Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal 20 Minuten lang jeweils mit AM0-Medium, welches kein BDNF enthielt, gewaschen. Diese Wells wurden mit 0,5 ml dieses Mediums alleine oder dieses Mediums, welches entweder 50 ng/ml NGF, 100 ng/ml BDNF (Amgen, Thousand Oaks, CA), 100 ng/ml GDNF (Prepro Tech, Inc., Rocky Hill, N. J.) oder 3 ng/ml Neurturin enthielt, versehen. Die Zellen wurden bei 37°C in einem 5% CO₂/95% Luft-Inkubator drei Tage lang inkubiert, mit 10% Formalin fixiert, mit Crystal Violet gefärbt (1 µl/ml 10% Formalin) und gezählt. Das Überleben wurde wie vorstehend angegeben festgestellt.

[0180] Das neuronale Überleben von Knoten-Neuronen, kultiviert in BDNF, wurde kürzlich vorgestellt (Thaler et al., *Develop. Biol.* 161: 338–344, 1994). Dieses wurde als Standard für das Überleben dieser Neuronen verwendet, und ihm wurde der Wert von 100% Überleben bzw. Fortbestand verliehen. Knoten-Ganglien, welche keinen trophischen Träger (AMO) aufwiesen, zeigten 20% bis 30% Überleben, genau so wie Neuronen, welche in Gegenwart von 50 ng/ml NGF kultiviert wurden. Die in Gegenwart von 3 ng/ml Neurturin und in Abwesenheit von BDNF kultivierten Neuronen zeigten ein Überleben, welches dem von in Gegenwart von BDNF (100 ng/ml) kultivierten Neuronen ähnlich ist. GDNF bei einer Konzentration von 100 ng/ml förderte das Überleben von Knoten-Neuronen in höherem Maße als BDNF (100 mg/ml). Ähnliche Ergebnisse mit GDNF wurden kürzlich für Sensorneuronen vom Huhn vorgestellt (Ebendal, T. et al., *J. Neurosci. Res.* 40: 276–284, 1995).

Beispiel 4

[0181] Dieses Beispiel verdeutlicht die Bestimmung von Teilaminosäuresequenzen von Neurturin, isoliert aus konditioniertem CHO-Zellenmedium.

[0182] Um eine N-terminale Aminosäuresequenz aus einer aufgereinigten Zubereitung von ungefähr 1 µg Neurturin zu erhalten, wurden die Mono-S-Fractionen 26 bis 29, welche den Peak der Aktivität enthielten, auf 25 µl durch Zentrifugalultrafiltration in einem Microcon-3-Konzentrator (Amicon, Inc., Beverly, MA) aufkonzentriert und auf ein nichtreduzierendes 14%-iges SDS-Polyacrylamidgel beladen. Nach elektrophoretischer Trennung wurden die Proteine gegen eine PVDF-Membran elektrogeblottet (Bio-Rad, Hercules, CA) und mit 0,1%-igem Coomassie Blue gefärbt. Das 25 kD-Band wurde ausgeschnitten und in die Reaktionskartusche eines automatischen Sequenzierers (Model 476, Applied Biosystems, Foster City, CA) eingesetzt. Eine Phenylthiohydantoin-Aminosäure-Gewinnung (PTH-aa) in den ersten 2–3 Zyklen eines automatischen Sequenzierens durch Edman-Abbau zeigte eine Sequenzierungsausbeute von 4 pMol, was ungefähr 10% der abgeschätzten Menge des auf das SDS-Gel beladenen Proteins entspricht.

[0183] Zwei N-terminale Sequenzierungsdurchläufe wurden aus zwei 50 1-Aufreinigungszubereitungen durchgeführt. In dem ersten Durchlauf wurden 1 µg Protein in drei gepoolten Fraktionen mit 1,5 ml Gesamtvolumen auf 25 µl aufkonzentriert und bei 100 V zwei Stunden lang bei 25°C unter Verwendung eines Elektrophoret-Puffers aus 10 mM CAPS pH 11,0 Puffer (Sigma, St. Louis, MO), enthaltend 5% Methanol, elektrogeblottet. Die Aminosäuresequenz wurde aus 13 Zyklen Edman-Abbau erhalten, und die Sequenzierungsausbeute betrug 4 pMol, wie oben.

[0184] In dem zweiten Durchlauf wurden 1,5 µg Protein in vier gepoolten Fraktionen mit 2,0 ml Gesamtvolumen auf 25 µl aufkonzentriert und bei 36 V 12 Stunden lang bei 4°C unter Verwendung eines Elektrophoret-Puffers aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,04% SDS und 17% MeOH elektrogeblottet. Die Sequenzierungsausbeute betrug 15 pMol, und die Sequenz nach 16 Zyklen war SGARPXGLRELEVSVS (SEQ ID NO: 3). Die nach 16 Zyklen erhaltene Sequenz entspricht der kürzeren Sequenz, welche in dem ersten Durchlauf erhalten wurde. Definitive Zuordnungen konnten bei drei der Aminosäurereste in der Sequenz nicht vorgenommen werden (Reste 1, 6 und 11 vom N-terminalen Ende). Eine Recherche in Protein-Datenbanken detektierte keine deutlich homologen Sequenzen, was nahelegt, dass der aufgereinigte Faktor ein neues Protein war.

[0185] Diese ersten N-terminalen Aminosäuresequenzdaten ermöglichten nicht die Isolierung von cDNA-Klonen unter Verwendung von degenerierten Oligonucleotiden als PCR-Primer oder Sonden zum Screenen von Bibliotheken. Um diese Ansätze zu erleichtern, wurde zusätzliches Protein aufgereinigt, um eine interne Ami-

nosäuresequenz aus proteolytischen Fragmenten zu erhalten. Um die interne Aminosäuresequenz aus Neurturin zu erhalten, wurden zusätzliche 50 l des konditionierten CHO-Zellenmediums unter Verwendung nur der ersten drei Chromatographieschritte, wie sie oben angegeben sind, aufgereinigt, außer dass der zum Eluieren der Cu⁺⁺-Chelating-Superose-Säule verwendete Gradient wie folgt lautete: 0–60 mM Glycin (4 ml), 60 mM Glycin (10 ml), 60–300 mM Glycin (32 ml). Die Fraktionen Nr. 20–23, welche Neurturin enthielten, wurden auf 25 µl durch Ultrafiltration (Amicon Microcon 3, Amicon, Beverly, MA) aufkonzentriert und auf ein nichtreduzierendes SDS-Polyacrylamid-Gel geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie Blue angefärbt, und das 25 kD-Neurturinband wurde ausgeschnitten. Neurturin wurde in dem Gelstreifen mit Endoproteinase-Lys-C digeriert bzw. aufgeschlossen, und die eluierten proteolytischen Fragmente wurden durch reverse Phasen-HPLC aufgereinigt. Nur ein Peak wurde durch HPLC-Auftrennung der eluierten Peptide beobachtet, welcher eine Aminosäuresequenzinformation aus 23 Zyklen bei dem 1 pMol-Signallevel unter Verwendung des automatischen Sequenzierers ergab (internes Fragment P2, SEQ ID NO: 5).

[0186] Die Aminosäureanalyse, welche bei 10% der oben angegebenen Probe vor deren Unterziehen einer Digerierung durchgeführt wurde, zeigte, dass 150 pMol Protein in dem Gelstreifen vorlagen, bestehend aus 7,6% Lysin und 19,5% Arginin. Der einzige Peak niedrigen Niveaus aus der Lys-C-Digerierung deutete an, dass die Digerierung und Eluierung der Peptide ineffizient war. Derselbe Gelstreifen wurde erneut mit Trypsin digeriert, und die eluierten Peptide wurden durch HPLC aufgetrennt. Zwei Peaks wurden in der HPLC beobachtet, was in der Sichtbarmachung von zwei zusätzlichen Aminosäuresequenzen mit 10 Resten resultierte (4–5 pMol Signalanteil, internes Fragment P1, SEQ ID NO: 4, und internes Fragment P3, SEQ ID NO: 6), welche sich von den N-terminalen und vorstehenden internen Aminosäuresequenzen unterschieden. Die in situ-Digerierung, Elution und Aufreinigung von Peptiden und das Peptidsequenzieren wurde durch die W. M. Keck Foundation Biotechnology Resource Laboratory an der Yale University gemäß Standardprotokollen für diesen Service durchgeführt.

Beispiel 5

[0187] Das folgende Beispiel verdeutlicht die Isolierung und Sequenzanalyse von Maus- und Human-Neurturin-cDNA-Klonen.

[0188] Es wurden entartete bzw. degenerierte Oligonucleotide, welche verschiedene Strecken zuverlässiger Aminosäuresequenzdaten entsprachen, synthetisiert und als Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von cDNA-Sequenzen von revers-transkribierter mRNA verwendet. Ein Vorwärts-Primer (M1676; 5'-CCNACNGCNTAYGARGA, SEQ ID NO: 50), entsprechend der Peptidsequenz P2 Xaa₁-Xaa₂-Val-Glu-Ala-Lys-Pro-Cys-Cys-Gly-Pro-Thr-Ala-Tyr-Glu-Asp-Xaa₃-Val-Ser-Phe-Leu-Ser-Val, worin Xaa₁ und Xaa₂ unbekannt waren, Xaa₃ Gln oder Glu war (SEQ ID NO: 5), in Kombination mit einem Rückwärts-Primer (M1677; 5'-ARYTCYTGNGRTGRTGRTA (SEQ ID NO: 52), entsprechend der Peptidsequenz P3 (Tyr-His-Thr-Leu-Gln-Glu-Leu-Ser-Ala-Arg) (SEQ ID NO: 6), wurden zur Amplifizierung eines 69-Nucleotid-Produkts von aus E21-Ratten- und erwachsenem Mäusehirn abgeleiteten cDNA-Templaten verwendet. Die PCR-Parameter waren: 94°C für 30 Sekunden; 55°C für 30 Sekunden; 72°C für 1 Minute für 35 Zyklen. Das Produkt wurde in den Bluescript KS-Plasmid subkloniert und sequenziert. Sämtliche Nucleotidsequenzierungen wurden unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffterminator-Technologie gemäß den Herstellerangaben auf einem automatischen Applied Biosystems-Sequenzierer vom Modell Nr. 373 (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Die Plasmid-DNA zum Sequenzieren wurde unter Verwendung des Wizard Miniprep-Kits (Promega Corp., Madison, WI) gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Die Sequenz des amplifizierten Produkts sagte die Aminosäuresequenzdaten innerhalb der PCR-Primer korrekt voraus.

[0189] Die Primer, welche der amplifizierten Sequenz entsprechen, wurden in Kombination mit den entarteten Primern in der schnellen Verstärkung der cDNA-Enden (RACE)-Technik (Frohman, M. A. Methods in Enzymology 218: 340–356, 1993) unter Verwendung des Marathon-RACE-Kits (CLONTECH, Palo Alto, CA) gemäß den Herstellerangaben verwendet, außer dass die Synthese des ersten cDNA-Strangs bei 50°C unter Verwendung von Superscript-II-Reverse-Transkriptase (Gibco-BRL) durchgeführt wurde. Kurz gesagt wurde ein Doppelstrang-Adaptor-Oligonucleotid an die Enden einer Doppelstrang-cDNA ligiert, synthetisiert aus Rattenhirn-mRNA am postnatalen Tag 1. Unter Verwendung von verschachteltem Vorwärts-Neurturin-PCR-Primer (M1676: 5'-CCNACNGCNTAYGARGA, SEQ ID NO: 50 und 1678: 5'-GACGAGGGTCCTTCCTGGACGTACA-CA, SEQ ID NO: 53) in Kombination mit Primern des in dem Kit bereitgestellten gebundenen Adapters (AP1, AP2) wurde das 3'-Ende der Neurturin-cDNA durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen amplifiziert (Erstens: M1676 und AP1 unter Verwendung von 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden und 72°C für 2 Minuten für 35 Zyklen; Zweitens: M1678 und AP2 unter Verwendung von 94°C für 30 Sekunden und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen). Ein 5'-Abschnitt der Ratten-Neurturin-cDNA wurde durch zwei aufeinanderfolgen-

de PCR-Reaktionen unter Verwendung der gelinkerten cDNA als Templat erhalten. Die erste Reaktion verwendete Primer M1677 (SEQ ID NO: 52) und AP1; unter Verwendung von 94°C für 30 Sekunden; 55°C für 30 Sekunden; und 72°C für 2 Minuten für 35 Zyklen. Die zweite Reaktion verwendete M1679 5'-TAGCGGCTGTG-TACGTCCAGGAAGGACACCTCGT (SEQ ID NO: 54) und AP2 bei 94°C für 30 Sekunden und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen. Diese Reaktionen resultierten in einer trunkierten Form des 5'-Endes der Neurturin-cDNA, dem Anschein nach das Ergebnis von vorzeitigem Abbruch der cDNA während der reversen Transkription. Die 5'- und 3'-RACE-Produkte wurden in das Plasmid Bluescript KS subkloniert und sequenziert. Die Sequenz dieser 3'- und 5'-RACE-Produkte resultierte in einer teilweisen Ratten-Neurturin-cDNA-Sequenz mit 220 nt. Die Primer (#467921 5'-CAGCGACGACGCGTGCGCAAAGAGCG, SEQ ID NO: 55; und M1679, SEQ ID NO: 54), entsprechend der teilweisen Ratten-cDNA-Sequenz, wurden verwendet (PCR-Parameter 94°C für 30 Sekunden und 68°C für 1 Minute für 35 Zyklen) zur Amplifizierung eines 101-Nucleotid-PCR-Produkts aus Maus-Genom-DNA, welches zu der Ratten-Neurturin-cDNA-Sequenz homolog war.

[0190] Diese Primer wurden anschließend verwendet, um murine Neurturin-Genom-Klone durch Amplifizieren von Genfragmenten in einer Maus-129/Sv-Bibliothek in einem P1-Bakteriophagen-Vektor zu erhalten (library screening service von Genome Systems, Inc., St. Louis, MO). Ein 1,6 kb Nco I-Fragment aus diesem P1-Klon, enthaltend das Neurturin-Gen, wurde mittels Hybridisierung mit dem Primer (#465782; 5'-TAYGAR-GACGAGGTGTCCTTCCTGGACGTACACAGCCGCTAYCAYAC, SEQ ID NO: 56) identifiziert. Dieses Nco I-Fragment wurde sequenziert, und es wurde gefunden, dass es einen Abschnitt der Kodierungssequenz enthielt, welche den N-terminalen und internen Aminosäuresequenzen, welche durch das Sequenzieren des aktiven Proteins, isoliert aus konditionierten CHO-Zellenmedien, erhalten wurde, entsprach. Beginnend mit der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Proteins kodiert diese Nucleotid-Sequenz ein 100-Aminosäure-Protein mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 11,5 kD. Eine Recherche in Protein- und Nucleinsäure-Datenbanken identifizierte Neurturin als ein neues Protein, welches ungefähr 40% identisch zu Glial-abgeleitetem neurotrophen Faktor (GDNF) ist. GDNF wurde aufgereinigt und als ein Faktor kloniert, welcher das Überleben von dopaminergen Mittelhirn-Neuronen förderte und welcher ein entfernt verwandtes Mitglied der TGF- β -Superfamilie darstellt, welche nun mehr als 25 unterschiedliche Gene enthält, die eine breite Vielfalt von vielfältigen und unterschiedlichen Wirkungen zeigen. Obwohl GDNF weniger als 20% identisch ist zu jeglichen anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie, enthält es die sieben Cystein-Reste, welche innerhalb der gesamten Familie erhalten sind und von denen man annimmt, dass sie die Basis für eine erhaltene Cystein-Knoten-Struktur darstellt, welche in der Kristallstrukturbestimmung von TGF- β 2 beobachtet wurde. Neurturin enthält ebenso diese sieben Cystein-Reste, allerdings ist es wie GDNF weniger als 20% homolog zu irgendeinem anderen Mitglied der TGF- β -Familie. Folglich scheinen Neurturin und GDNF eine Subfamilie von Wachstumsfaktoren zu repräsentieren, welche sich von dem Rest der TGF- β -Superfamilie deutlich unterscheidet.

[0191] Um die Sequenz der vollen Länge der Maus-Neurturin-cDNA zu bestimmen, wurde eine 5'- und 3'-RACE-PCR durchgeführt, wie sie oben für die Ratte angegeben ist, wobei verschachtelte Primer, die von der Maus-Genom-Sequenz vorausgesagt wurden, und cDNA aus neonatalem Mäusehirn verwendet wurden. Die erste Reaktion für das 3'-Ende verwendete Primer: M1777 5'-GCGGCCATCCGCATCTACGACCGGG (SEQ ID NO: 57) und AP1 bei 94°C für 30 Sekunden; 65°C für 15 Sekunden; und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen. Die zweite Reaktion verwendete Primer #467921 (SEQ ID NO: 55) und AP2 bei 94°C für 30 Sekunden; 65°C für 15 Sekunden; und 68°C für 2 Minuten für 20 Zyklen. Das 5'-Ende wurde erhalten unter Verwendung des Primers M1759 für die erste Reaktion, 5'-CRTAGGCCGTGCGGCGRCARCACGGT (SEQ ID NO: 58) und AP1 bei 94°C für 30 Sekunden; 65°C für 15 Sekunden; und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen. Die zweite Reaktion verwendete Primer M1785, 5'-GCGCCGAAGGCCAGGTCGTAGATGCG (SEQ ID NO: 59) und AP2 bei 94°C für 30 Sekunden; 65°C für 15 Sekunden; und 68°C für 2 Minuten für 20 Zyklen. Beide Sätze an PCR-Reaktionen verwendeten 5% DMSO. Die 5'- und 3'-Maus-RACE-Produkte wurden in das Plasmid Bluescript KS subkloniert und sequenziert. Unter Verwendung der Sequenz von RACE-Produkten konnte eine 1,0 kb-Maus-Neurturin-cDNA-Sequenz zusammengestellt werden. Diese cDNA-Sequenz enthält einen offenen Leserahmen von 585 Nucleotiden, welcher ein Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kD kodiert. Diese Maus-cDNA-Sequenz ist in voller Länge in SEQ ID NO: 12 gezeigt. In Übereinstimmung mit den Prozessabläufen, welche bekanntermaßen bei den TGF- β -Familienmitgliedern auftreten, enthält das 24 kD-Neurturin-Protein eine Amino-terminale 19-Aminosäure-Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Domäne, die eine proteolytische RXXR-Prozessstelle unmittelbar vor der N-terminalen Aminosäuresequenz, die beim Sequenzieren des aus konditioniertem CHO-Zellenmedien gereinigten Proteins erhalten wird, enthält. Unter Verwendung dieser Charakteristika wird vorausgesagt, dass das reife 11,5 kD-Neurturin-Molekül 11,5 kD aufweist, und es wird durch Analogie zu anderen Mitgliedern der TGF- β -Familie vorausgesagt, dass es ein Disulfid-gebundenes Homodimer mit 23 kD bildet, was mit der 25 kD Masse des aus konditioniertem CHO-Zellenmedien gereinigten Protein konsistent ist, wie es durch SDS-PAGE-Analyse abgeschätzt wurde.

[0192] Zur Isolierung von Human-Genom-Klonen wurden Primer (#467524; 5'-CGCTACTGCGCAGGCG-CGTGCGARGCGC, SEQ ID NO: 60 und # 1005, 5'-CGCCGACAGCTCTTGACGCGTRTGGTA, SEQ ID NO: 61), vorausgesagt von der Sequenz von Maus-Neurturin, zur Amplifizierung (PCR-Parameter: anfängliche Denaturierung bei 95°C für 1 Minute 30 Sekunden, gefolgt von 94°C für 30 Sekunden; 60°C für 15 Sekunden; und 68°C für 60 Sekunden für 35 Zyklen) eines 192-Nucleotid-Fragments aus Human-Genom-DNA verwendet. Die Sequenz des PCR-Produkts zeigte, dass es das menschliche Homologe von Maus-Neurturin war. Die Primer wurden anschließend verwendet, um eine Humangenom-Bibliothek zu screenen, aufgebaut in dem P1-Vektor (library screening service, Genome Systems, Inc.), und es wurden zwei Klone erhalten, welche den Human-Neurturin-Genom-Lokus enthielten.

[0193] Dieselbe Strategie wurde verwendet zur Bestimmung der menschlichen Sequenz, wie sie oben für die Maus-Sequenz diskutiert wurde. Ein Oligo (#30152, GACCTGGGCCTGGGCTACGCGTCCGACGAG, SEQ ID NO: 62) wurde als eine Sonde in einer Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung der Restriktions-Fragmente der P1-Klone verwendet, welche die Human-Neurturin-Kodierungssequenz enthielten. Diese Restriktionsfragmente (Eag I, Pvu II, Hind III, Kpn I) wurden in das Bluescript K5-Plasmid subkloniert und sequenziert.

[0194] Die Ergebnisse des Subklonierens und Sequenzierens von Human-Genom-Fragmenten war wie folgt. Es wurde gefunden, dass das Eag I-Fragment eine Größe von ungefähr 6 kb aufwies mit der 3'-Eag I-Stelle 60 bp unterhalb des Stopkodons angeordnet. Das Pvu II-Fragment war ungefähr 3,5 kb groß mit der 3'-Pvu II-Stelle 250 bp unterhalb des Stopkodons angeordnet. Das Hind III-Fragment war ungefähr 4,8 kb groß mit der 3'-Hind III-Stelle 3 kp unterhalb des Stopkodons angeordnet. Das Kpn I-Fragment war ungefähr 4,2 kb groß mit der 3'-Kpn I-Stelle 3,1 kb unterhalb des Stopkodons angeordnet.

[0195] Das zweite Kodierungsexon wurde unter Verwendung dieser subklonierten Fragmente sequenziert. Zusätzlich wurde eine Sequenz von 250 bp, die die 3'-Seite des zweiten Exons flankiert, erhalten. Die Sequenz wurde ebenso von 1.000 bp erhalten, welche die 5'-Seite des Kodierungsexons flankieren. Von diesen Flankierungs-Sequenzen wurden der Vorwärts-Primer 30341 (5'-CTGGCGTCCCAMCAAGGGTCTTCG-3', SEQ ID NO: 71) und der Rückwärts-Primer 30331 (5'-GCCAGTGGTGCCGTCGAGGCGGG-3', SEQ ID NO: 72) derartig entworfen, dass die Gesamt-Kodierungssequenz des zweiten Exons durch PCR amplifiziert werden konnte.

[0196] Das erste Kodierungsexon wurde nicht relativ zu den Restriktionsstellen oben gemapped, sondern war in dem Eag I-Fragment enthalten. Die Sequenz dieses Exons wurde aus dem subklonierten Eag I-Fragment unter Verwendung des Maus-Primers 466215 (5'-GGCCCAGGATGAGGCGCTGGAAGG-3', SEQ ID NO: 73), erhalten, welcher das ATG-Initialisierungskodon enthält. Die weitere Sequenz des ersten Kodierungsexons wurde erhalten mit dem reversen Primer 20215 (5'-CCACTCCACTGCCTGAWATTCWACCCC-3', SEQ ID NO: 74), entworfen aus der mit dem Primer 466215 erhaltenen Sequenz. Der Vorwärts-Primer 20205 (5'-CCATGT-CATTATCGACCATTCGGC-3', SEQ ID NO: 75) wurde aus der mit dem Primer 20215 erhaltenen Sequenz entworfen. Die Primer 20205 und 20215 flankieren die Kodierungssequenz des ersten Kodierungsexons und können zur Amplifizierung dieser Kodierungssequenz unter Verwendung von PCR verwendet werden.

Beispiel 6

[0197] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung von Expressionsvektoren, welche Neurturin-cDNA enthalten.

[0198] Zur Expression von rekombinantem Neurturin in Säugerzellen wurde der Neurturin-Vektor pCMV-NTN-3-1 hergestellt. Der offene 585-Nucleotid-Leserahmen der Neurturin-cDNA wurde durch PCR unter Verwendung eines Primers, welcher die ersten 27 Nucleotide der Neurturin-Kodierungssequenz (5'-GC-GACGCGTACCATGAGGCGCTGGAAGGCAGCGGCCCTG, SEQ ID No. 63) enthält, und eines Primers, welcher die letzten 5 Kodons und das Stopkodon (5'-GACGGATCCGCATCACACGCACGCGCACTC) (SEQ ID NO: 64) enthält, amplifiziert, wobei revers-transkribierte Maushirn-mRNA am postnatalen Tag 1 als Templat verwendet wurde, wobei PCR-Parameter eingesetzt wurden: 94°C für 30 Sekunden; 60°C für 15 Sekunden; und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen, einschließlich 5% DMSO in der Reaktion. Das PCR-Produkt wurde in die Eco RV-Stelle von BSKS subkloniert und sequenziert, um zu verifizieren, dass es keine PCR-generierten Mutationen enthielt. Die Neurturin-Kodierungssequenz wurde anschließend aus diesem Vektor ausgeschnitten, wobei Mlu I (5'-Ende) und Bam H1 (3'-Ende) verwendet wurden, und unterhalb des CMV IE-Promoters/Enhancers in den Säugerexpressionsvektor pCB6 eingesetzt (Brewer, C. B. Methods in Cell Biology 43: 233-245, 1994), um den pCMV-NTN-3-1-Vektor unter Verwendung dieser Stellen zu bilden.

[0199] Zur Expression von rekombinantem Protein in E. Coli wurde der reife Kodierungsabschnitt von Maus-Neurturin durch PCR amplifiziert, wobei ein Primer, der die ersten sieben Kodons von der reifen Kodierungssequenz (5'-GACCATATGCCGGGGGCTCGGCCTTGTGG) (SEQ ID NO. 65) enthielt, und ein Primer, welcher die letzten fünf Kodons und das Stopkodon 5'-GACGGATCCGCATCACACGCACGCGCACTC (SEQ ID NO: 66) enthielt, unter Verwendung eines Fragments, enthaltend das Murin-Neurturin-Gen als Templat, verwendet wurde, wobei PCR-Parameter verwendet wurden: 94°C für 30 Sekunden; 60°C für 15 Sekunden und 68°C für 90 Sekunden für 25 Zyklen mit 5% DMSO, welches zu der Reaktion zugesetzt wurde. Das amplifizierte Produkt wurde in die Eco RV-Stelle von BSKS subkloniert, die Nucleotid-Sequenz wurde verifiziert, und dieses Fragment wurde anschließend in dem Expressionsvektor pET-30a (Novagen, Madison, WI) unter Verwendung einer Nde 1-Stelle (5'-Ende) und einer Eco R1-Stelle (3'-Ende) transferiert. Der pET-Neurturin-Vektor (pET-NTN) kodiert für ein Initiator-Methionin vor der ersten Aminosäure des reifen Maus-Neurturin-Proteins, vorausgesetzt auf der Basis der N-terminalen Aminosäuresequenz von Neurturin, welche aus dem konditionierten CHO-Zellenmedium gereinigt wurde.

Beispiel 7

[0200] Dieses Beispiel verdeutlicht die vorübergehende Transfizierung von NIH3T3-Zellen mit dem Neurturin-Expressions-Vektor pCMV-NTN-3-1, und dass das Produkt der Genom-Sequenz in Beispiel 5 biologisch aktiv ist.

[0201] Um zu zeigen, dass geklonte Neurturin-cDNA ausreichte, um die Synthese von biologisch wirksamem Neurturin hervorzurufen, wurde das pCMV-NTN-3-1-Plasmid in NIH3T3-Zellen vorübergehend eingefügt, wobei das Lipofectamin-Verfahren der Transfizierung verwendet wurde. Die NIH3T3-Zellen wurden bei einer Dichte von 400.000 Zellen pro Well (34,6 mm Durchmesser) auf 6 Well-Platten (Corning, Corning, NY) 24 Stunden vor der Transfizierung gegeben. DNA-Liposom-Komplexe wurden hergestellt und zu den Zellen gemäß dem Herstellerprotokoll zugesetzt, wobei 1,5 µg CMV-Neurturin-Plasmid-DNA (isoliert und gereinigt unter Verwendung einer Qiagen- (Chatsworth, CA) Tip-500-Säule gemäß dem Herstellerprotokoll) und 10 µl Lipofectamin-Reagenz (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) in 1:1 DME/F12-Medium, enthaltend 5 µg/ml Insulin, 5 µg/ml Transferrin und 5 ng/ml Natriumselenit (Sigma, St. Louis, MO), verwendet wurde. Fünf Stunden nach der Zugabe von DNA-Liposom-Komplexen in 1 ml Medium pro Well wurden 1 ml DME-Medium, enthaltend 20% Kalbsserum, zu jedem Well zugesetzt. 24 Stunden nach der Zugabe der DNA-Liposom-Komplexe wurden die obigen 2 ml Medium durch 1 ml DME-Medium, enthaltend 10% Kalbsserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Heparin, ersetzt. Die Zellen wurden zusätzliche 24 Stunden inkubiert, bevor das konditionierte Medium geerntet, zur Entfernung von zellulärer Debris zentrifugiert und eingefroren wurde.

[0202] Als Kontrolle wurden NIH3T3-Zellen wie oben transfiziert, wobei 1,5 µg CMV-Neo-Expressions-Plasmid (enthaltend keinen cDNA-Einsatz) anstelle von 1,5 µg CMV-Neurturin-Plasmid verwendet wurden. Das konditionierte Medium aus NIH3T3-Zellen, welches mit entweder Kontrollplasmid oder CMV-Neurturin-Plasmid transfiziert worden ist, wurde durch direkte Zugabe zu dem SCG-Kulturmedium zu der Zeit der NGF-Deprivation untersucht. Die Zugabe von 0,25 ml konditioniertem Medium aus CMV-Neurturin-transfizierten Zellen förderten 70% Überleben der sympathischen Neuronen, und ein Überleben von > 90% konnte mit 0,45 ml dieses konditionierten Mediums erhalten werden. Es konnte keine signifikante überlebensfördernde Wirkung in dem konditionierten Medium der transfizierten Kontroll-NIH3T3-Zellen detektiert werden.

Beispiel 8

[0203] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung von Eierstockzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit Neurturin-cDNA transformiert wurden. DG44-Zellen, ein Eierstockzellen-Derivat des chinesischen Hamsters, dem es an Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) mangelt (Urlaub et al. Cell. 3: 405–412, 1983), wurden mit Expressionsplasmid (pCMV-NTN-3-1) und einem DHFR-Expressionsplasmid (HLD) (McArthur, und Stanners J. Biol. Chem. 266: 6000–6005, 1991) stabil cotransfiziert.

[0204] Am Tag 1 wurden DG44-Zellen in 1×10^6 Zellen pro 10 cm Platte in Ham's F12-Medium mit 10% fötalem Kalbsserum (FCS) platziert. Diese Dichte darf nicht überschritten werden, oder die Zellen würden überwuchern, bevor das Selektionsmedium am Tag 5 zugesetzt wird.

[0205] Am Tag 2 wurden die Zellen mit einem 9:1-Verhältnis von pCMV-NTN zu DHFR-Expressionsplasmid unter Verwendung der Calciumphosphatmethode (10 µg DNA/10 cm Platte) (Chen und Okayama, Mol. Cell. Biol. 7: 2745–2752, 1987 welche durch Bezugnahme hierin eingeschlossen ist) transfiziert.

[0206] Am Tag 3 wurden die transfizierten Zellen mit Ham's F12-Medium und mit 10% FCS gefütterten Ham's F12 gewaschen.

[0207] Am Tag 5 wurden die Zellen mit MEM-alpha-Medium gewaschen und mit Selektionsmedium, welches MEM-alpha mit 10% FCS und 400 µg/ml G418 darstellt, gefüttert. Die Zellen wurden in dem Selektionsmedium gehalten und alle 4 Tage gefüttert. Die Kolonien begannen ungefähr 14 Tage nach der Transfizierung sichtbar zu werden. Die in dem Selektionsmedium wachsenden Kolonien wurden anschließend in eine 24-Well-Platte überführt und am nächsten Tag trypsinisiert, um die Zellen zu dispergieren. Man ließ die Zellen in entweder 24-Well- oder 6-Well-Platten zur Konfluenz zusammenwachsen, um die Zellen hinsichtlich der Expression von rekombinantem Protein zu screenen. Die Expression von Neurturin wurde in 10 Klonreihen bestimmt, und zwei hochexprimierende Reihen wurden unter Verwendung des SCG-Überlebensassays detektiert. Diese Klonreihen wurden vermehrt, und die Expression in diesen ausgewählten Zellreihen wurde durch Selektion in 50 mM Methotrexat (MTX) amplifiziert. Für die Selektion in MTX ließ man Zellen bis auf 50% Konfluenz in einer 150 cm²-Flasche in dem Selektionsmedium wachsen. Das Medium wurde nach MEM-alpha, enthaltend 50 nM MTX-Konzentration geändert (es war nicht notwendig, G418 während der MTX-Amplifikation zu verwenden). Nach Platzieren in 50 mM MTX starb die Mehrzahl der Zellen ab, und Kolonien der resistenten Zellen traten in 1 bis 2 Wochen erneut auf. Dann wurden die Zellen trypsinisiert, um die Kolonien zu dispergieren, und aufgeteilt, wenn die Zellen die Konfluenz erreichten. Die Zellen erreichten letztendlich dieselbe Wachstumsrate wie vorher. Die ausgewählten Zellen wurden hinsichtlich der Expression von rekombinantem Protein gescreent. Ein 2–3-facher Anstieg in der Expression wurde nach der Selektion in 50 mM MTX beobachtet. Gefrorene Stocks wurden gehalten für Zelllinien, die von der ursprünglichen Selektion und der 50 mM MTX-Selektion erhalten wurden. Eine weitere Selektion konnte in zunehmendem MTX fortgesetzt werden, bis erwünschte Expressionsniveaus erhalten wurden.

[0208] Unter Verwendung des obengenannten Verfahrens konnten als DG44CHO5-3(G418) (pCMV-NTN-3-1) und DG44CHO5-3 (50nMMTX) (pCMV-NTN-3-1) identifizierte Zellen isoliert werden. Die Zellen des DG44CHO5-3 (50nMMTX) (pCMV-NTN-3-1)-Stammes exprimierten Mengen von ungefähr 100 µg biologisch aktives Protein pro Liter konditioniertem Medium, wie es durch direkte Untersuchung des konditionierten Mediums in dem SCG-Assay gemäß dem Verfahren im Beispiel 1 bestimmt wurde.

Beispiel 9

[0209] Dieses Beispiel verdeutlicht die Expression von Neurturin in verschiedenen Geweben.

[0210] Es wurde eine Studie der Neurturin- und GDNF-Expression in Rattenembryo-Geweben (E10, Tag 10 nach der Empfängnis), neonatalen Geweben (P1, postnataler Tag 1) und erwachsenen Geweben (> 3 Mos) unter Verwendung von semiquantitativer RT/PCR durchgeführt (Estus et al., J. Cell. Biol. 127: 1717–1727, 1994). Die RNA-Proben wurden aus verschiedenen Geweben erhalten, und PCR-Produkte wurden entweder durch Autoradiographie nach der Inkorporierung von α -³²P-dCTP in der PCR und Elektrophorese auf einem Polyacrylamidgel oder durch Ethidiumbromid-Färbung der DNA nach der Elektrophorese auf Agarosegelen (Tabellen 3 und 4) detektiert. Das Neurturin-Fragment mit 101 Basenpaaren wurde unter Verwendung des Vorwärts-Primers CAGCGACGACGCGTGCGCAAAGAGCG (SEQ ID NO: 67) und des Rückwärts-Primers TAGCGGCTGTGTACGTCCAGGAAGGACACCTCGT (SEQ ID NO: 68) erhalten, und das GDNF-Fragment mit 194 Basenpaaren wurde unter Verwendung des Vorwärts-Primers AAAAATCGGGGGTGYGTCTTA (SEQ ID NO: 69) und des Rückwärts-Primers CATGCCTGGCCTACYTTGTCA (SEQ ID NO: 70) erzielt.

[0211] Es wurde keine Neurturin- oder GDNF-mRNA im frühesten embryonalen Alter (embryonaler Tag 10, E10), welches erfasst wurde, detektiert.

[0212] Bei Neugeborenen (postnataler Tag 1, P1) wurden beide Transkripte/Kopien in vielen Geweben exprimiert, obwohl Neurturin dazu neigte, eine größere Expression in den meisten Geweben zu zeigen, als es bei GDNF der Fall war (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

	NEURTURIN	GDNF
Leber	+++	-
Blut	+++	+
Thymus	+	-
Gehirn	++	+
Ischiasnerv	-	+
Niere	++	++
Milz	++	+
Kleinhirn	++	+
Herz	++	+
Knochen	+	+

[0213] Wie in Tabelle 3 gezeigt ist, wurden Unterschiede in den Gewebeverteilungen von Neurturin und GDNF verzeichnet. Insbesondere wurde kein GDNF in Leber und Thymus detektiert, worin eine Neurturin-Expression detektiert wurde, und kein Neurturin wurde in dem Ischiasnerv detektiert, wo GDNF detektiert wurde.

[0214] Neurturin- und GDNF-mRNA wurden in vielen Geweben in dem erwachsenen Tier detektiert, allerdings war das gewebespezifische Muster der Expression für diese zwei Gene äußerst unterschiedlich (Tabelle 4).

Tabelle 4

	NEURTURIN	GDNF
Leber	-	-
Blut	+	-
Thymus	+	++
Gehirn	+	-
Ischiasnerv	-	-
Niere	++	+
Milz	-	+
Kleinhirn	-	-
Gebärmutter	++	-
Knochenmark	++	-
Hoden	++	++
Eierstock	+	+
Plazenta	+	-
Skelettmuskel	+	-
Rückenmark	+	-
Nebenniere	++	++
Darm	+	++

[0215] Wie in Tabelle 4 gezeigt ist, wurde gefunden, dass Neurturin im Gehirn und Rückenmark sowie im Blut und Knochenmark exprimiert wurde, wo kein GDNF detektiert wurde. Das Expressionsniveau von Neurturin im Gehirn und Blut war jedoch geringer als das, welches in neonatalem Gewebe detektiert wurde.

[0216] Neurturin wurde ebenso in frisch isolierten Rattenbauchfell-Mastzellen hoch exprimiert, wohingegen GDNF nur eine geringe oder keine Expression zeigte.

Beispiel 10

[0217] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung von Antiseren gegenüber Neurturin durch Immunisieren von Kaninchen mit einem Neurturinpeptid.

[0218] Die Peptidsequenz, welche den Aminosäuren 73–87 des reifen Murin-Neurturin-Proteins entsprach, wurde synthetisiert und an Keyhole-Limpet-Hemocyanin (KLH) gekoppelt, wie bereits früher beschrieben wurde (Harlow und Lane, *Antibodies: a laboratory manual*, 1988. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY., Seiten 72–81). Das KLH-gekoppelte Peptid wurde an die Caltag, Inc. geschickt, und ein jeder von zwei Hasen wurden immunisiert. Die Immunisierung wurde durch subkutane Injektion an 7–10 Stellen durchgeführt. Die erste Injektion erfolgte mit 150 µm KLH-gekoppeltem Peptid, welches in 0,5 ml Salzlösung resuspendiert wurde und mit 0,5 ml Freundschem kompletten Adjuvants emulgiert wurde. Es wurden Boost-Injektionen 4 Wochen nach der ersten Injektion begonnen und einmal in 7 Tagen wie oben für insgesamt 5 Injektionen durchgeführt, außer dass 100 µg KLH-gekoppeltes Peptid und Freundsches inkomplettes Adjuvants verwendet wurde. Serumproben wurden 1 Woche nach dem fünften Boost gesammelt.

[0219] Ein gepooltes Volumen von 20 ml Serum, welche von beiden Kaninchen eine Woche nach der fünften Injektion gesammelt wurde, wurde aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurde eine Peptidaffinitätssäule durch Kupplung des obengenannten Peptids and Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B gemäß dem Herstellerprotokoll (Pharmacia Biotech) präpariert. Das Serum wurde 10-fach in 10 mM Tris pH 7,5 Puffer verdünnt und durch behutsames Schwenken 16 Stunden lang bei 4°C mit 0,5 ml Peptid-Agarose-Matrix, enthaltend 5 mg gekoppeltes Peptid, gemischt. Die Matrix wurde auf eine Säule gegeben, mit 5 ml 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl gewaschen, mit 5 ml 10 mM Tris pH 7,5-Puffer, enthaltend 0,4 M NaCl, gewaschen und mit 5,5 ml 100 mM Glycin pH 2,5-Puffer eluiert. Ein zehntel Volumen von 1,0 M Tris pH 8,0 Puffer wurde zu dem Eluat direkt nach der Elution zugesetzt, um den pH zu neutralisieren. Das Glycin-Eluat wurde über Nacht gegenüber 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl dialysiert.

[0220] Die Affinitäts-gereinigten Antikörper wurden in einem Western Blot verwendet, um die spezifische Erkennung des rekombinanten Neurturin-Proteins zu zeigen. 10 ml konditioniertes Medium, gesammelt aus DG44CHO5-3 (G418) (pCMV-NTN-3-1)-Zellen, wurden über SP-Sepharose, wie in Beispiel 1 beschrieben, gereinigt, und die Proteine wurden auf einem reduzierenden SDS-PAGE-Gel in dem Tricine-Puffer-System (Schagger und von Jagow *Analytical Biochemistry* 166: 368–479, 1987) elektrophoresiert. Die Proteine wurden an eine Nitrocellulose-Membran in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,04% SDS, 17% Methanol bei 4°C 16 Stunden lang elektrogeblottet. Die Membran wurde mit den Affinitäts-gereinigten Anti-Neurturin-Peptid-Antikörpern und anschließend mit Meerettich-Peroxidase-gekoppelten Schaf-Anti-Kaninchen-IgG inkubiert (Harlow und Lane, *supra*, Seiten 498–510). Die gebundenen Antikörper wurden mit verstärkter Chemilumineszenz detektiert (ECL Kit, Amersham, Buckinghamshire, England). Die Anti-Neurturin-Antikörper erkannten ein einzelnes ungefähr 11,5 kD-Protein-Band in dem konditionierten Medium der DG44CHO5-3 (G418) (pCMV-NTN-3-1)-Zellen. Unter Verwendung dieser Anti-Neurturin-Antikörper konnte Neurturin-Protein in 10 ml konditioniertem Medium aus DG44CHO5-3 (G418) (pCMV-NTN-3-1)-Zellen detektiert werden, konnte allerdings nicht in 10 ml Medium, konditioniert mit DG44-Zellen detektiert werden, welche nicht mit dem Neurturin-Expressionsvektor transformiert worden waren.

Beispiel 11

[0221] Das folgende Beispiel verdeutlicht die Identifizierung von zusätzlichen Mitgliedern der GDNF/Neurturin/Persephin-Gen-Subfamilie.

[0222] Die TGF-β-Superfamilie enthält derzeit über 25 unterschiedliche Genmitglieder (als Überblick siehe Kingsley, *Genes and Development* 8: 133–146, 1994). Die einzelnen Familienmitglieder zeigen unterschiedliche Homologiegrade miteinander auf, und nähere Subgruppen können innerhalb der Superfamilie durch phylogenetische Analyse unter Verwendung des Clustal V-Programms (Higgins et al., *Comput. Appl. Biosci.* 8: 189–191, 1992) und durch Bootstrap-Analyse von phylogenetischen Bäumen (Felsenstein, *Evolution* 39: 783–791, 1985) definiert werden. Neurturin oder Persephin ist ungefähr 40% identisch zu GDNF, allerdings weniger als 20% identisch zu jedem anderen Mitglied der TGF-β-Superfamilie. Nähere Sequenzbereiche in Neurturin können identifiziert werden ([Fig. 5](#)), welche innerhalb der GDNF/Neurturin/Persephin-Subfamilie, allerdings nicht innerhalb der TGF-β-Superfamilie hoch konserviert bzw. hoch erhalten sind. Diese erhaltenen Bereiche können wahrscheinlich eine Subfamilie kennzeichnen, die bisher unisolierte Gene enthält, welche nun unter Verwendung der erhaltenen Sequenzbereiche isoliert werden können, die durch die Entdeckung und Sequenzierung der Neurturin- und Persephin-Gene identifiziert wurden. Die Bereiche hoher Sequenz-Konservie-

rung bzw. hohem Sequenzerhalt zwischen Neurturin, Persephin und GDNF erlauben den Entwurf von entarteten bzw. degenerierten Oligonucleotiden, welche entweder als Sonden oder Primer verwendet werden können. Aminosäuresequenzen konservierter Bereiche wurden hierin identifiziert und umfassen Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr, worin Xaa₁ Ser, Thr oder Ala ist, und Xaa₂ Glu oder Asp darstellt (SEQ ID NO: 108); Glu-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₄-Gly-Xaa₅-Cys, worin Xaa₁ Thr, Glu oder Lys darstellt, Xaa₂ Val, Leu oder Ile ist, Xaa₃ Leu oder Ile darstellt, Xaa₄ Ala oder Ser ist und Xaa₅ Ala oder Ser darstellt, (SEQ ID NO: 113); und Cys-Cys-Xaa₁-Pro-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Xaa₅-Asp-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Phe-Leu-Asp-Xaa₉, worin Xaa₁ Arg oder Gln ist, Xaa₂ Thr oder Val oder Ile darstellt, Xaa₃ Ala oder Ser ist, Xaa₄ Tyr oder Phe ist, Xaa₅ Glu, Asp oder Ala darstellt, Xaa₆ Glu, Asp oder keine Aminosäure ist, Xaa₇ Val oder Leu ist, Xaa₈ Ser oder Thr darstellt und Xaa₉ Asp oder Val ist (SEQ ID NO: 114). Nucleotidsequenzen, welche eine Kodierungssequenz für die obengenannten konservierten Sequenzen oder Fragmente der obengenannten konservierten Sequenzen enthalten, können als Sonden verwendet werden. Beispielhafte Sonden- und Primer-Sequenzen, welche aus diesen Bereichen bzw. Abschnitten erstellt werden können, sind die folgenden:

Vorwärts-Primer,

Primer A (M3119): 5'-GTNDGNGANYTGGGNYTGGGNTA (SEQ ID NO: 115) 23 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr kodiert, worin Xaa₁ Thr, Ser oder Ala darstellt und Xaa₂ Glu oder Asp ist (SEQ ID NO: 125);
 Primer B (M3123): 5'-GANBTNWCNTTTYTNGANG (SEQ ID NO: 116) 19 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Leu-Xaa₄-Xaa₅ kodiert, worin Xaa₁ Asp oder Glu darstellt, Xaa₂ Val oder Leu ist, Xaa₃ Thr oder Ser ist, Xaa₄ Asp oder Glu ist, und Xaa₅ Asp oder Val ist (SEQ ID NO: 126);
 Primer C (M3126): 5'-GANBTNWCNTTTYTNGANGW (SEQ ID NO: 117) 20 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Leu-Xaa₄-Xaa₅ kodiert, worin Xaa₁ Asp oder Glu darstellt, Xaa₂ Val oder Leu ist, Xaa₃ Thr oder Ser ist, Xaa₄ Asp oder Glu ist, und Xaa₅ Asp oder Val ist (SEQ ID NO: 126);
 Primer D (M3121): 5'-TTYMGNTAYTGYDSNGGNDSENTG (SEQ ID NO: 118) 23 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys kodiert, worin Xaa₁ Ser oder Ala darstellt und Xaa₂ Ser oder Ala ist (SEQ ID NO: 127);
 Primer E (M3122): 5'-GTNDGNGANYTGGGNYTNGG (SEQ ID NO: 119) 20 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly kodiert, worin Xaa₁ Thr, Ser oder Ala darstellt und Xaa₂ Asp oder Glu ist (SEQ ID NO: 128); und
 Primer F (M3176): 5'-GTNDGNGANYTGGGNYTGGGNTT (SEQ ID NO: 120) 23 nt, welcher für die Aminosäuresequenz Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Phe kodiert, worin Xaa₁ Thr, Ser oder Ala darstellt und Xaa₂ Glu oder Asp ist (SEQ ID NO: 129).

Rückwärts-Primer,

Primer G (M3125): 5'-WCNTCNARRAANGWNAVNTC (SEQ ID NO: 121) 20 nt, dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Leu-Xaa₄-Xaa₅ kodiert, worin Xaa₁ Asp oder Glu darstellt, Xaa₂ Val oder Leu ist, Xaa₃ Thr oder Ser ist, Xaa₄ Asp oder Glu ist und Xaa₅ Asp oder Val ist (SEQ ID NO: 126);
 Primer H (M3124): 5'-WCNTCNARRAANGWNAVNT (SEQ ID NO: 122) 19 nt, dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Leu-Xaa₄-Xaa₅ kodiert, worin Xaa₁ Asp oder Glu darstellt, Xaa₂ Val oder Leu ist, Xaa₃ Thr oder Ser ist, Xaa₄ Asp oder Glu ist und Xaa₅ Asp oder Val ist (SEQ ID NO: 126);
 Primer I (M3120): 5'-CANSHNCCNSHRCARTANCKRAA (SEQ ID NO: 123) 23 nt, dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys kodiert, worin Xaa₁ Ser oder Ala darstellt und Xaa₂ Ser oder Ala ist (SEQ ID NO: 127); und
 Primer J (M3118): 5'-CANSHNCCNSHRCARTANCKRAANA (SEQ ID NO: 124) 25 nt, dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Xaa₁-Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₂-Gly-Xaa₃-Cys kodiert, worin Xaa₁ Ile oder Leu darstellt, Xaa₂ Ser oder Ala ist und Xaa₃ Ser oder Ala ist (SEQ ID NO: 130).

[0223] Zusätzlich zu den Obengenannten basieren die folgenden Primer auf konservierten Abschnitten in GDNF und Neurturin (SEQ ID NOS: 33–35).

Primer 1, GTNWSNGANYTNGGNYTNGGNTA (SEQ ID NO: 42), welche für die Aminosäuresequenz Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr kodiert, worin Xaa₁ Ser oder Thr ist und Xaa₂ Glu oder Asp darstellt (SEQ ID NO: 33);

Primer 2, TTYMGNTAYTGYDSNGGNDSENTGYGANKCNGC (SEQ ID NO: 43), welche für die Aminosäuresequenz Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Ala kodiert, worin Xaa₁ Ala oder Ser darstellt, Xaa₂ Ala oder Ser ist, Xaa₃ Glu oder Asp ist und Xaa₄ Ser oder Ala ist (SEQ ID NO: 36);

Primer 3, reverse GCNGMNTCRCANSHNCCNSHRTANCKRAA (SEQ ID NO: 44), dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Ala kodiert, worin Xaa₁ Ala oder Ser darstellt, Xaa₂ Ala oder Ser ist, Xaa₃ Glu oder Asp ist und Xaa₄ Ser oder Ala ist (SEQ ID NO: 37);

Primer 4, reverse TCRTCNTCRWANGCNRYNGGNCKCARCA (SEQ ID NO: 45), dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Cys-Cys-Arg-Pro-Xaa₁-Ala-Xaa₂-Xaa₃-Asp-Xaa₄ kodiert, worin Xaa₁ Ile oder Thr oder Val darstellt, Xaa₂ Try oder Phe ist, Xaa₃ Glu oder Asp ist und Xaa₄ Glu oder Asp ist (SEQ ID NO: 38);

Primer 5, reverse TCNARRAANSWNAVNTCRTCNTCRWANGC (SEQ ID NO: 46), dessen reverse komplementäre Sequenz für die Aminosäuresequenz Ala-Xaa₁-Xaa₂-Asp-Xaa₃-Xaa₄-Ser-Phe-Leu-ASP kodiert, worin Xaa₁ Tyr oder Phe darstellt, Xaa₂ Glu oder Asp ist, Xaa₃ Glu oder Asp ist und Xaa₄ Val oder Leu ist (SEQ ID NO: 39);

Primer 6, GARRMNBNTHTNTTYMGNTAYTG (SEQ ID NO: 47), welche für die Aminosäuresequenz Glu-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Arg-Tyr-Cys kodiert, worin Xaa₁ Glu oder Thr darstellt, Xaa₂ Leu oder Val ist und Xaa₃ Ile oder Leu ist (SEQ ID NO: 40);

Primer 7, GARRMNBNTHTNTTYMGNTAYTGYDSNGGNDSTGHGA (SEQ ID NO: 48), welche für die Aminosäuresequenz Glu-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₄-Gly-Xaa₅-Cys-Xaa₆ kodiert, worin Xaa₁ Glu oder Thr darstellt, Xaa₂ Leu oder Val ist, Xaa₃ Ile oder Leu ist, Xaa₄ Ser oder Ala ist, Xaa₅ Ser oder Ala ist und Xaa₆ Glu oder Asp ist. (SEQ ID NO: 41).

[0224] Die obigen Sequenzen können als Sonden zum Screenen von Bibliotheken für Genomklone oder Primer zur Amplifizierung von Genfragmenten aus Genom-DNA oder Bibliotheken von Genomklonen oder von revers-transkribierter cDNA unter Verwendung RNA-Templaten aus einer Vielzahl von Geweben verwendet werden. Genom-DNA oder Bibliotheken von Genom-Klonen als Template verwendet werden, weil die Neurturin-, Persephin- und GDNF-kodierenden Sequenzen für die reifen Proteine nicht durch Introns unterbrochen sind.

[0225] Ein entartetes Oligonucleotid kann als eine Mischung von Oligonucleotiden synthetisiert werden, welche sämtliche der möglichen Nucleotidsequenzen enthält, die für die konservierte Aminosäuresequenz kodieren. Um die Anzahl unterschiedlicher Oligonucleotide in einer entarteten Mischung zu vermindern, kann ein Inosin oder eine Universalbase (Loakes et al., Nucleic Acids Res. 22: 4039–43, 1994) in die Synthese an Positionen eingefügt werden, wo sämtliche vier Nucleotide möglich sind. Das Inosin oder die Universalbase bildet Basenpaare mit jedem der vier normalen DNA-Basen, welche weniger stabilisierend sind als AT- und GC-Basenpaare, welche allerdings ebenso weniger destabilisierend sind als Fehlordnungen zwischen den normalen Basen (d. h. AG, AC, TG, TC).

[0226] Um Familienmitglieder zu isolieren, kann ein obiger Primer mit ³²P unter Verwendung von T4-Polynucleotid-Kinase endgelabelt werden und an Bibliotheken humaner Genomklone gemäß Standardverfahren hybridisiert werden.

[0227] Ein bevorzugtes Verfahren zur Isolierung von Familienmitglieds-Genen wäre die Verwendung verschiedener Kombinationen der obigen entarteten Primer als Primer in der Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Genom-DNA als ein Templat. Die verschiedenen Kombinationen von Primern können sequenzielle PCR-Reaktionen unter Verwendung von verschachtelten Primern oder die Verwendung eines Vorwärts-Primers, gepaart mit einem Oligo-dT-Primer, einschließen. Zusätzlich kann einer der entarteten Primer mit einem Vektorprimer verwendet werden, ein einzelner Primer kann in einem invertierten PCR-Assay verwendet werden, oder die PCR kann mit einem entarteten Primer und einem randomisierten Primer durchgeführt werden. Als ein Beispiel, welches den obigen Satz Primer verwendet, kann Primer 2 (SEQ ID NO: 43) mit Primer 4 (SEQ ID NO: 45) in der PCR mit 1 µg Humangenom-DNA und zyklierenden Parametern von 94°C für 30 Sekunden, 50°C für 30 Sekunden und 72°C für 60 Sekunden verwendet werden. Die obengenannten PCR-Bedingungen sind nur beispielhaft, und der Fachmann wird leicht erkennen, dass ein Bereich geeigneter Bedingungen und Primer-Kombinationen verwendet oder optimiert werden können, wie unterschiedliche Temperaturen und variierende Salzkonzentrationen in dem Puffermedium und ähnliches. Es ist bevorzugt, dass DMSO zu der PCR-Reaktion in einer finalen Konzentration von 5% zugesetzt wird, da gefunden wurde, dass dieses für die Amplifizierung dieses Abschnitts des Neurturin-Gens notwendig ist. Die PCR-Reaktion, wenn sie auf einem Agarose-Gel laufen gelassen wird, sollte Produkte in dem Größenbereich von 100–150 Basenpaaren enthalten, da eine Ein-Aminosäure-Spalte in die Neurturin-Sequenz eingefügt wird und eine Fünf-Aminosäure-Spalte in die Persephin-Sequenz eingefügt wird, wenn eine der beiden Sequenzen mit GDNF ausgerichtet/abgeglichen wird, und folglich können die Familienmitgliedsgene ebenso einen leicht variablen Abstand zwischen den konservierten Sequenzen der Primer 2 und 4 enthalten. Die PCR-Produkte in dem Bereich von

100 bis 150 Basenpaaren sollten mehrfach amplifizierte Genprodukte enthalten, einschließlich GDNF, Neurturin und Persephin sowie bisher unisolierte Familienmitglieder. Um die Sequenzen dieser Produkte zu identifizieren, können sie gelgereinigt und in das Bluescript-Plasmid (Stratagene) ligiert werden und anschließend in den XL1-Blue E. Coli-Wirtsstamm (Stratagene) transformiert werden. Die Bakterienkolonien, welche einzelne Subklone enthalten, können für die Isolierung herausgegriffen und auf Nitrocellulose-Filter in zwei Repliken platiert werden. Jeder der Replikfilter kann mit einer Oligonucleotidsonde nach entweder einzelner GDNF- oder einzelner Neurturin- oder einzelner Persephin-Sequenz in dem amplifizierten Abschnitt gescreent werden. Subklone, welche weder an GDNF noch an Neurturin oder Persephin hybridisieren, können sequenziert werden und, sofern sie als die bisher unisolierten Familienmitglieder kodierend gefunden werden, kann die Sequenz zur Isolierung der cDNA-Klone voller Länge und der Genomklone verwendet werden, wie es für Neurturin vorgenommen wurde (Beispiel 5). Ein ähnliches Verfahren wurde zur Isolierung neuer Genmitglieder (GDF-3 und GDF-9) der TGF- β -Superfamilie auf der Basis der Homologie zwischen den bisher identifizierten Genen verwendet (McPherron, J. Biol. Chem. 268: 3444–3449, 1993).

[0228] Die vorliegenden Erfinder glauben, dass der am meisten bevorzugte Weg zur Isolierung der Familienmitgliedergene die Anwendung des obengenannten PCR-Verfahrens als Screening-Verfahren zur Isolierung der einzelnen Familienmitglieder-Genomklone aus einer Bibliothek sein kann. Dieses liegt daran, weil nur ein Exon für den Kodierungsabschnitt sowohl von reifem Neurturin als auch von GDNF existiert. Wenn beispielsweise die obengenannte PCR-Reaktion mit den Primern 2 und 4 Produkte geeigneter Größe unter Verwendung von Humangenom-DNA als Templat bildet, kann dieselbe Reaktion durchgeführt werden, wobei als Templat Pools von Genomklonen in dem P1-Vektor gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden, beispielsweise jenes, das für die Isolierung von Neurturin-Humangenomklonen verwendet wurde (Beispiel 5). Pools bzw. Datensammlungen, welche das Neurturin-Gen in dieser Bibliothek enthalten, wurden früher identifiziert, und Persephin und GDNF-enthaltende Pools können leicht durch Screening mit GDNF-spezifischen Primern identifiziert werden. Folglich werden Nicht-Neurturin-, Nicht-Persephin-, Nicht-GDNF-Pools, welche ein Produkt der richtigen Größe bilden unter Verwendung der entarteten Primer, leicht als die bisher unisolierten Familienmitglieder erkannt werden. Die PCR-Produkte, welche aus diesen Pools gebildet werden, können direkt unter Verwendung automatischer Sequenzierer sequenziert werden, und Genomklone können durch weitere Unterteilung und Screenen der gepoolten Klone als ein von Genom Systems, Inc. angebotener Standardservice isoliert werden.

Beispiel 12

[0229] Das folgende Beispiel verdeutlicht die Isolierung und Identifizierung von Persephin unter Verwendung der in Beispiel 11 beschriebenen Verfahren und Primer.

[0230] Die von den Erfindern hierin ausgearbeitete entartete bzw. degenerierte PCR-Strategie wurde nun erfolgreich zur Identifizierung eines dritten Faktors, Persephin, verwendet, welches ungefähr 35 bis 50% identisch zu sowohl GDNF als auch Neurturin ist. Der experimentelle Ansatz war der oben beschriebene und wurde detaillierter wie folgt durchgeführt. Primer, entsprechend der Aminosäuresequenz Val-Xaa₁-Xaa₂-Leu-Gly-Leu-Gly-Tyr, worin Xaa₁ Ser oder Thr ist und Xaa₂ Glu oder Asp darstellt, SEQ ID NO: 33) [M1996; 5'-GTNWSNGANYTNGGNYTNGGNTA (SEQ ID NO: 42)], und Phe-Arg-Tyr-Cys-Xaa₁-Gly-Xaa₂-Cys-Xaa₃-Xaa₄-Ala, worin Xaa₁ Ala oder Ser ist, Xaa₂ Ala oder Ser ist, Xaa₃ Glu oder Asp darstellt, und Xaa₄ Ser oder Ala darstellt (SEQ ID NO: 37) [M1999; 5'-GCNGMNTCRCANSHNCCNSHRCARTANCKRAA (SEQ ID NO: 44)], wurden zur Amplifizierung eines 77 nt-Fragments aus Rattengenom-DNA unter Verwendung von KlenTaq-Enzym und Puffer unter den folgenden Bedingungen verwendet: 94°C für 30 Sekunden, 44°C für 30 Sekunden; 72°C für 30 Sekunden für 40 Zyklen. Das resultierende Produkt wurde in das Bluescript KS-Plasmid subkloniert und sequenziert. Sämtliches Nucleotid-Sequenzieren wurde unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoff-Terminatortechnologie gemäß den Benutzeranweisungen auf einem automatischen Sequenzierer von Applied Biosystems Modell #373 (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Die Plasmid-DNA zum Sequenzieren wurde unter Verwendung des Wizard-Miniprep-Kits (Promega Corp., Madison, WI) gemäß den Betriebsanleitungen hergestellt.

[0231] Die Sequenz eines der amplifizierten Produkte sagte Aminosäuresequenzdaten innerhalb der PCR-Primer voraus, welche unterschiedlich von denen von GDNF oder Neurturin waren, welche allerdings mehr als 20% Identität mit GDNF und Neurturin aufwiesen, wohingegen die Sequenzen anderer, die wir beobachtet haben, GDNF oder Neurturin entsprachen, wie es erwartet wurde. Es wird angenommen, dass die neue Sequenz ein neues Mitglied dieser Familie identifiziert, welches wir Persephin genannt haben.

[0232] Die Sequenz dieses Fragments innerhalb der Primer war 5'-TGCCTCAGAGGAGAAGATTATC (SEQ

ID NO: 90). Diese kodiert das letzte Nucleotid des Tyr-Codons und kodiert anschließend die Aminosäuren: Ala-Ser-Glu-Glu-Lys-Ile-Ile (SEQ ID NO: 91). Diese Sequenz wurde anschließend mit den Rattensequenzen von GDNF und Neurturin ausgerichtet/abgeglichen. Diese Analyse bestätigte, dass Persephin einzigartig war.

LGLGYETKEELIFRYC	GDNF	(Ratte)	(SEQ ID NO: 92)
LGLGYTSDETVLFYRC	NTN	(Ratte)	(SEQ ID NO: 93)
LGLGYASEEKIIFRYC	PSP	(Ratte)	(SEQ ID NO: 94)

[0233] Um eine zusätzliche Persephinsequenz zu erhalten, wurden Primer, welche Abschnitte der einzigartigen 22 nt des amplifizierten Fragments oben enthalten, in der schnellen Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE)-Technik (Frohman, M.A. Methods in Enzymology 218: 340–356, 1993) unter Verwendung des Marathon-RACE-Kits (CLONTECH, Palo Alto, CA) gemäß der Betriebsanleitung verwendet, außer dass die Synthese des ersten cDNA-Strangs bei 50°C unter Verwendung von Superscript II-Reverse-Transkriptase (Gibco-BRL) ausgeführt wurde. Kurz gesagt wurde ein Doppelstrang-Adapter-Oligonucleotid an die Enden der Doppelstrang-cDNA legiert, synthetisiert aus Rattenhirn-mRNA am postnatalen Tag 1. Unter Verwendung von verschachtelten Vorwärts-Persephin-PCR-Primern (10135; 5'-AGTCGGGGTTGGGGTATGCCTCA, SEQ ID NO: 95 und M2026; 5'-TATGCCTCAGAGGAGAAGATTATCTT, SEQ ID NO: 96) in Kombination mit Primern zu dem in dem Kit zugeführten ligierten Adapter (AP1, AP2) wurden die 3'-Enden der Persephin-cDNA durch zwei sukzessive PCR-Reaktionen amplifiziert (Erstens: 10135 und AP1 unter Verwendung von 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 15 Sekunden und 68°C für 2 Minuten für 35 Zyklen; Zweitens: M2026 und AP2 unter Verwendung von 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 15 Sekunden und 68°C für 2 Minuten für 21 Zyklen). Ein ungefähr 350 nt-Fragment wurde aus dieser PCR-Reaktion erhalten, und dieses Fragment wurde unter Verwendung des Primers M2026 direkt sequenziert. Die Sequenz dieses 3'-RACE-Produkts resultierte in einer partiellen Ratten-Persephin-cDNA-Sequenz mit ungefähr 350 nt (SEQ ID NO: 97). Die vorausgesagte Aminosäuresequenz dieser cDNA wurde mit der von GDNF und Neurturin verglichen, und es wurde gefunden, dass sie ungefähr 40% homolog zu jedem dieser Proteine ist. Wichtigerweise waren die charakteristischen Abstände der Cystein-Reste in den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie anwesend. Darüber hinaus war zusätzlich zu dem Ähnlichkeitsbereich, welcher durch die zur Isolierung von Persephin verwendeten degenerierten Primer kodiert wird, ein weiterer Bereich hoher Homologie, welcher von GDNF und Neurturin geteilt wird, allerdings den anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie abwesend ist, ebenso anwesend in Persephin.

GDNF	ACCRPVAFDDDLFLDD	(AS 60-76)	(SEQ ID NO: 98)
NTN	PCCRPTAYEDEDVSFKDV	(AS 61-77)	(SEQ ID NO: 99)
PSP	PCCQPTSYAD-VTFLDD	(AS 57-72)	(SEQ ID NO: 100)

(Aminosäurenummerierung verwendet den ersten Cys-Rest als Aminosäure 1).

[0234] Mit der Bestätigung, dass Persephin in der Tat ein neues Mitglied der GDNF/Neurturin-Subfamilie ist, isolierten wir murine Genomklone von Persephin, um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten. Die Primer (vorwärts, M2026; 5'-TATGCCTCAGAGGAGAAGATTATCTT, SEQ ID NO: 96 und rückwärts, M3028; 5'-TCATCAAGGAAGGTCACATCAGCATA, SEQ ID NO: 101), welche der Ratten-cDNA-Sequenz entsprechen, wurden in einer PCR-Reaktion verwendet (PCR-Parameter: 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden für 35 Zyklen), um ein 155 nt-Fragment aus Maus-Genom-DNA zu amplifizieren, welches zu der Ratten-Persephin-cDNA-Sequenz homolog war. Diese Primer wurden anschließend verwendet, um murine Persephin-Genom-Klone aus einer Maus-129/Sv-Bibliothek in einem P1-Bakteriophagen-Vektor zu erhalten (Library Screening Service von Genome Systems, Inc., St. Louis, MO).

[0235] Restriktions-Fragmente (3,4 kb Nco I und ein 3,3 kb Bam H1) dieses P1-Klons, welcher das Persephin-Gen enthielt, wurden durch Hybridisierung mit einem 210 nt-Fragment identifiziert, welches durch PCR unter Verwendung von Maus-Genom-DNA mit Primern (vorwärts, M2026; SEQ ID NO: 96 und rückwärts, M3159; 5'-CCACCACAGCCACAAGCTGCGGSTGAGAGCTG, SEQ ID NO: 102) und den PCR-Parametern: 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden und 72°C für 30 Sekunden für 35 Zyklen, erhalten wurde. Die Nco I- und Bam H1-Fragmente wurden sequenziert, und es wurde gefunden, dass sie einen Aminosäureabschnitt kodieren, welcher dem entspricht, der in dem Ratten-Persephin-RACE-Produkt vorlag, und welcher zu den reifen Abschnitten von sowohl Neurturin als auch GDNF homolog ist.

[0236] Wenn die Aminosäuresequenzen von Murin-GDNF, Neurturin und Persephin unter Verwendung des ersten Cysteins als Ausgangspunkt abgeglichen werden (was vorgenommen wird, weil Änderungen in den Spaltungsstellen zwischen den Familienmitgliedern eine Variabilität in den Segmenten oberhalb des ersten Cy-

steins bilden), ist Persephin (91 Aminosäuren) etwas kleiner als sowohl Neurturin (95 Aminosäuren) als auch GDNF (94 Aminosäuren). Die Gesamtidentität innerhalb dieses Bereichs beträgt ungefähr 50% mit Neurturin und etwa 40% mit GDNF.

[0237] Ein weiteres Nucleotid-Sequenzieren des murinen Persephin-Nco I-Fragments ergab die Nucleotid-Sequenz des gesamten Murin-Persephin-Gens (SEQ ID NO: 131; [Fig. 1A](#)). Ein offener Leserahmen erstreckt sich von der Sequenz, welche für ein Initiator-Methionin kodiert, bis zu einem Stopkodon an den Positionen 244–246. Jedoch ist irgendwo in dieser Sequenz eine scheinbare Anomalie, sodass die Sequenz, welche die RXXR-Spaltungsstelle (Nucleotide an den Positionen 257–268) kodiert, und die Sequenz, welche das reife Persephin-Protein (Positionen 269–556) kodiert, nicht mit diesem offenen Leserahmen co-linear sind. Anstelle dessen kodiert ein zweiter Leserahmen die Spaltungsstelle und das reife Persephin.

[0238] Ein zusätzliches Sequenzieren des Ratten-Persephins wurde ebenso durchgeführt. Ratten-Genom-Fragmente wurden durch PCR unter Verwendung von KlenTaq und Ratten-Genom-DNA als ein Templat amplifiziert. Der Vorwärts-Primer #40266 (5'-AATCCCCAGGACAGGCAGGGAAT; SEQ ID NO: 137), entsprechend einem Abschnitt oberhalb des Maus-Persephin-Gens, und ein Rückwärts-Primer M3156 (5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC, SEQ ID NO: 138), entsprechend einem Abschnitt innerhalb der reifen Ratten-Persephin-Sequenz, wurden mit den folgenden Parametern verwendet (95°C für 15 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden, 68°C für 45 Sekunden × 30 Zyklen). Das amplifizierte Produkt wurde einer T4-Polynucleotid-Kinase unterzogen, die Enden wurden mit E. Coli-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) abgeschlossen (geblundet) und in BSKS-Plasmid kloniert.

[0239] Das Nucleotid-Sequenzieren wurde durchgeführt, um die Sequenz des gesamten Ratten-Persephin-Gens aufzufinden (SEQ ID NO: 134; [Fig. 2A](#)). Ein offener Leserahmen wurde als von einer Sequenz, welche für ein Initiator-Methionin kodiert, bis zu einem Stop-Kodon an den Positionen 244–246 erstreckend gefunden, wie es bei Murin-Persephin der Fall war. Wie ebenso bei Murin-Persephin wurde eine auftretende Anomalie zwischen der Sequenz, welche das Initiator-Methionin kodiert, und der die Spaltungsstelle für das reife Ratten-Persephin kodierenden gefunden, sodass zwei überzeugende Leserahmen existieren. Unabhängig von dieser Anomalie exprimieren Säugerzellen Persephin von entweder der Murin- oder Ratten-Genom-Sequenz in voller Länge, wie nachstehend angegeben ist (siehe Beispiel 14).

[0240] Um dem Ursprung dieser Anomalie nachzugehen wurden Säugerexpressionsvektoren für sowohl Maus- als auch Ratten-Persephin hergestellt. Um das Maus-Plasmid zu bilden, wurde ein P1-Klon, enthaltend das Maus-Persephin-Gen, als Templat in einem PCR-Assay verwendet. Die Primer wurden derartig entworfen, dass das resultierende Fragment das Persephin-Gen enthalten würde, erstreckend von dem Initiator-Methionin zu dem Stopkodon. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vorwärts-Primer M3175 [5'-TGCTGTACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA] und einen Rückwärts-Primer M3156 [5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC]. Um das analoge Ratten-Plasmid zu bilden, wurde Ratten-Genom-DNA als ein Templat in einem PCR-Assay verwendet. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vorwärts-Primer M3175 [5'-TGCTGTACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA] und einen Rückwärts-Primer M3156 [5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC]. Die verstärkten Produkte wurden in BSKS geklont und sequenziert, um zu verifizieren, dass der korrekte Klon erhalten worden ist. Die Ratten- und Maus-Persephin-Fragmente wurden unter Verwendung von Sma I und Hind III ausgeschnitten und in Asp718- (geblundet) und Hind III-Stellen des Säuger-Expressions-Vektors pCB6 kloniert.

[0241] COS-Affenzellen wurden mit entweder den Ratten- oder Maus-Persephin-Expressions-Vektoren oder dem nichtrekombinanten Vektor (pCB6) selbst transfiziert. Achtundvierzig Stunden später wurden die Zellen lysiert, die Proben wurden auf ein 15% SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, und die Proteine wurden durch Elektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend in Nitrozellulose durch ElektrobloTTing transferriert. Diese Nitrozellulose-Membran wurde mit Anti-Persephin-Antikörper inkubiert (welche wir gegen reifes Persephin richteten, hergestellt in Bakterien aus einem pET-Plasmid), um die Anwesenheit von Persephin in den Lysaten zu detektieren. Lysate aus Zellen, welche mit entweder dem Ratten- oder Maus-Persephin-Expressionsfaktor transfiziert wurden, allerdings nicht die Lysate aus mit pCB6 transfizierten Zellen, enthalten hohe Mengen an Persephin. Die Größe des detektierten Persephins betrug 10–15 kD, was mit der für das prozessierte (d.h. der reifen Form von Persephin) vorausgesagten Größe konsistent ist. Konditionierte Medien, welche diesen Zellen entnommen wurden, enthielten reifes Persephin. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Maus- als auch Ratten-Persephin-Gene zur Führung der Synthese eines angemessen prozessierten Persephin-Moleküls in der Lage sind.

[0242] Um den Mechanismus, durch den dieses auftritt, zu erforschen, isolierten wir RNA aus mit entweder

Ratten- oder Maus-Persephin-Expressionsfaktor transfizierten Zellen. Die RT/PCR-Analyse wurde unter Verwendung von Primern durchgeführt, welche zu dem Initiator Met und dem Stoppkodon korrespondierend waren. Es wurden zwei Fragmente detektiert: eines entsprechend der vorhergesagten Größe des Persephin-Gens und das andere ein wenig kleiner, was darauf hindeutet, dass ein RNA-Spleißen (RNA-Splicing) auftrat. Wir bestätigten dieses mit einer Vielzahl anderer Primerpaare. Sowohl das große als auch das kleine Persephin-Fragment wurde kloniert und sequenziert. Wie erwartet entsprach das größere Fragment dem Persephin-Gen. Das kleine Fragment entsprach einer gespleißten Version von Persephin. Ein kleines 88 nt-Intron innerhalb der Pro-Domäne (situiert 154 nt unterhalb des Startkodons) wurde herausgespleißt. Nach diesem Spleißen war der "Frameshift" nicht länger anwesend (d.h. der Initiator Met und die reife Region waren innerhalb des Rahmens) sowohl in dem Ratten- als auch dem Maus-Persephin (siehe [Fig. 1B](#) und [Fig. 2B](#)).

Beispiel 13

[0243] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors für murines Persephin und dessen Einführen in *E. Coli* zur Expressierung von rekombinatem reifen Persephin.

[0244] Das Persephin-Polynucleotid, welches das reife Murin-Persephin-Protein kodiert, das fünf Aminosäuren oberhalb des ersten Gerüst-Cys-Restes beginnt (SEQ ID NO: 80), wurde in den pET-Expressionsvektor pET-30a an den Nde I- und Bgl II-Stellen geklont. Dieses Persephin-Polynucleotid wurde durch PCR unter Verwendung des Murin-Persephin-P1-Genom-Klons als ein Templat gebildet. Ein Vorwärts-Primer M3157 (5'-GGACTATCATATGGCCCACCACCACCACCACCACCACCACGACGACGACGACAAGG CCTTGG-CTGGTTCATGCCGA, SEQ ID NO: 139), welcher eine Nde I-Stelle, acht Histidin-Reste und eine Enterokinase-Stelle kodiert, und ein Rückwärts-Primer M3156 (5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCA-CAAGC, SEQ ID NO: 138), welcher der Sequenz entspricht, welche die letzten drei Aminosäurereste der reifen Persephinsequenz, das Stoppkodon und eine Bgl II-Stelle kodiert, wurden verwendet. Die PCR-Reaktionsbedingungen betrugen 95°C für 15 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden, 68°C für 60 Sekunden × 25 Zyklen. Dieses PCR-Produkt wurde an der EcoRV-Stelle des BSKS-Plasmids subkloniert und sequenziert, um zu verifizieren, dass es keine Mutationen aufwies. Die Persephin-Sequenz wurde anschließend aus diesem Vektor geschnitten unter Verwendung von Nde I und Bgl II und in die Nde I-(5') und Bgl II-(3')-Stellen des bakteriellen Expressionsvektors pET-30a (Novagen, Madison, WI) kloniert. Dieser Expressionsfaktor würde daher die reife Form des Persephin-Proteins bilden, welches einen Amino-terminalen Marker aufweist, bestehend aus acht Histidin-Resten, gefolgt direkt von einer Enterokinase-Stelle.

[0245] Das Plasmid wurde in den *E. Coli*-Stamm BL21 (DE3) eingefügt. Um Persephin zu bilden, wurden dieses Plasmid enthaltende Bakterien 16 Stunden lang gezüchtet, geerntet und unter Verwendung von 6 M Guanidin-HCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris bei pH 8,0 lysiert, und rekombinantes Persephin-Protein wurde aus diesen Lysaten via Chromatographie über einem Ni-NTA-Harz (Qiagen) gereinigt. Das Protein wurde unter Verwendung von drei Säulenvolumina Puffer E, enthaltend 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris, bei pH 4,5 eluiert. Das Persephin wurde anschließend durch Dialyse in einem Renaturierungspuffer, bestehend aus 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris bei pH 8,3, 0,15 M NaCl, 3 mM Cystein, 0,02% Tween-20, 10% Glycerin und enthaltend abnehmende Konzentrationen an Harnstoff, beginnend mit 4 M für 16 Stunden, gefolgt von 2 M für 16 Stunden, 1 M für 72 Stunden und 0,5 M für 16 Stunden, renaturiert. Die Persephinkonzentration wurde anschließend unter Verwendung eines Dot Metric-Assays (Geno Technology, St. Louis, MO) bestimmt und bei 4°C gelagert.

[0246] Dieses bakteriell gebildete rekombinante Persephin wurde als ein Immunogen in Hasen zur Bildung von Antikörpern gegenüber reifem Persephin verwendet. Sämtliche der immunogenen Injektionen und Blutentnahmen wurden bei Cal Tag Inc. (Healdsburg, CA) durchgeführt. Es zeigt sich, dass das Anti-Persephin-Antiserum spezifisch Persephin erkennt, allerdings nicht Neurturin oder GDNF, unter Verwendung der Protein-Blot-Analyse. Dieses Persephin-spezifische Antiserum wurde anschließend zur Detektion von Persephin in Lysaten, welche aus transfizierten COS-Zellen gebildet wurden, verwendet.

Beispiel 14

[0247] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung von Säuger-Expressions-Vektoren, welche Murin- oder Ratten-Persephin-Gene enthalten, sowie deren Einfügen in Säugerzelllinien zur Herstellung von reifem Persephin. Um das Murin-Plasmid zu bilden, wurde ein P1-Klon, enthaltend das Murin-Persephin-Gen, als ein Templat in einem PCR-Assay verwendet. Primer wurden derartig entworfen, dass das resultierende Polynucleotid das Persephin-Gen enthält, welches sich von dem Initiator-Methionin-Kodon zu dem Stoppkodon 3' zu der reifen Persephin-Kodierungs-Sequenz (SEQ ID NO: 131) erstreckt. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vor-

wärts-Primer M3175 (5'-TGCTGTCACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA, SEQ ID NO: 140) und Rückwärts-Primer M3156 (5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC, SEQ ID NO: 138). Um das analoge Ratten-Plasmid zu bilden, wurde Ratten-Genom-DNA als ein Templat in einem PCR-Assay verwendet. Die PCR-Reaktion verwendete einen Vorwärts-Primer M3175 (5'-TGCTGTCACCATGGCTGCAGGAAGACTTCGGA, SEQ ID NO: 140) und Rückwärts-Primer M3156 (5'-CGGTACCCAGATCTTCAGCCACCACAGCCACAAGC, SEQ ID NO: 138). Beide PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von KlenTaq und den folgenden Parametern durchgeführt: 95°C für 15 Sekunden, 55°C für 15 Sekunden, 68°C für 45 Sekunden × 25 Zyklen. Die amplifizierten Produkte wurden einer T4-Polynucleotid-Kinase unterzogen, die Enden wurden mit E. Coli-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) gebluntet und in das BSKS-Plasmid kloniert. Ein Nucleotid-Sequenzieren wurde durchgeführt, um zu verifizieren, dass der korrekte Klon erhalten wurde. Die Ratten- und Murin-Persephin-Polynucleotide wurden unter Verwendung von Sma I und Hind III ausgeschnitten, und jedes wurde in eine Asp718- (gebluntet) und Hind-III-Stelle des Säugerexpressionsvektors pCB6 kloniert.

[0248] COS-Affenzellen wurde mit entweder den Ratten- oder Murin-Persephin-Expressionsvektoren (16 µg pro 5×10^5 Zellen) oder dem nicht rekombinanten Vektor (pCB6) selbst transfiziert, wobei das Calciumphosphat-Ausfällungsverfahren (Chen und Okayama, Mol. Cell. Biol. 7: 2745–2752, 1987) verwendet wurde. 48 Stunden später wurden die Zellen in IP-Puffer, enthaltend 50 mM Tris bei pH 7,5, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholat, 10 mM EDTA, 0,1% SDS, 5 µg/ml Leupeptin, 7 µg/ml Pepstatin und 250 µM PMSF, lysiert. Die Proben wurden auf ein 15%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen, und die Proteine wurden durch Elektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend in Nitrocellulose durch Elektroblootting transferiert. Diese Nitrocellulose-Membran wurde mit Anti-Persephin-Antikörpern inkubiert, um die Anwesenheit von Persephin in den Lysaten zu detektieren.

[0249] Lysate aus Zellen, welche mit entweder dem Ratten- oder Murin-Persephin-Expressionsvektor transfiziert wurden, allerdings nicht die Lysate aus mit pCB6 transfizierten Zellen, enthalten hohe Mengen an Persephin. Die Größe des detektierten Persephins betrug ungefähr 14 kD, was mit der für das prozessierte, d. h. die reife Form von Persephin, vorausgesagten Größe konsistent ist. Dieses zeigt, dass sowohl die Murin- als auch Ratten-Persephin-Gene zur Führung der Synthese eines angemessen prozessierten Persephin-Moleküls in der Lage sind.

Beispiel 15

[0250] Das folgende Beispiel verdeutlicht die Isolierung und Identifizierung von menschlichem Persephin (Human-Persephin).

[0251] Um das menschliche Homologe von Persephin oder zusätzlichen Mitgliedern der GDNF-Familie zu identifizieren, wurden degenerierte PCR-Primer auf der Basis von Human-Neurturin- und GDNF-Sequenzen entworfen und zur Amplifizierung von Human-Genom-DNA verwendet. Die folgenden Primer wurden verwendet (SEQ ID NOS: 225–228):

DhNeurturin1 (DN1)	GTSASYGASYTGGGYCTGGGCTAY	REF:B-46Z
DhNeurturin2 (DN2)	TTYMGSTACTGCRSMGGCKCYTGC	REF:B-46X
DhNeurturin3r (DN3)	RWAGGCSRTSGGKCKGCARCAKGS	REF:B-46V
DhNeurturin4r (DN4)	MKCRTCYARRAASGACASSTC	REF:B-46W

[0252] Human-Genom-DNA (Clontech 6550–1 0,1 µg/µl) wurde mit sämtlichen 4 möglichen Primer-Kombinationen amplifiziert (DN1-DN3r, DN1-DN4r, DN2-DN3r, DN2-DN4r). Die Reaktionsmischungen enthielten 5 µl $10 \times$ KlenTaq-Puffer, 0,5 µl dNTP (20 mM); 1 µl Human-Genom-DNA, 0,6 µl KlenTaq (Clontech) und 1,5 µl eines jeden Primers (0,1 OD/µl) in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Die DNA wurde durch Touchdown-PCR auf einem Perkin Elmer Gene AMP 9600 unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: Eingangsdenaturierung bei 98°C für 2', anschließend 5 Zyklen [98°C 30", 72°C 1,5'], 5 Zyklen (98°C 30", 70°C 1,5') und 25 Zyklen [98°C 30', 68°C 1,5'], gefolgt von einem letzten Verlängerungsschritt bei 68°C für 5'.

[0253] Die PCR-Produkte von ungefähr 130 bis 200 bp wurden nach der Elektrophorese auf einem Agarose-Gel identifiziert, gereinigt und in einen pCR 2.1-Vektor unter Verwendung eines In Vitrogen TA Cloning Kit (Cat # K2000–01) kloniert. Klone, enthaltend einen 130–200 bp-Einschub (nach EcoRI-Digerierung), wurden sequenziert, und einer von ihnen (Klon A3), erhalten mit dem Primer-Paar DN1-DN3r, hatte eine zu Maus-Persephin homologe Sequenz und entsprach Human-Persephin.

[0254] Die Teilsequenz der Human-Persephin-Genom-DNA in Klon A3 ist nachstehend gezeigt (SEQ ID NO:

229):

CGGCTTGTGACCGAGCTGGGCTGGGCTACGCCTCAGAGGAGAAGGTCATCTTCCGCT
 ACTGCGCCGGCAGCTGCCCCGTGGTGCCCGCACCCAGCATGGCCTGGCGCTGGCCC
 GGCTGCAGGGCCAGGGCCGAGCCACGGCGGGCCCTGCTGCCGCCCCATGGCC

[0255] Um eine Quelle zu identifizieren, aus der ein cDNA-Klon von Human-Persephin voller Länge isoliert werden kann, wurden cDNA-Bibliotheken durch PCR-gescreent, wobei exakt passende Primer, entworfen auf der Basis der oben beschriebenen Genom-DNA-Sequenz, verwendet wurden. Zwei Sets von spezifischen Human-Persephin-Primern wurden hergestellt (SEQ ID NOS: 230–233),

hPSP-5'.1	GAGGAGAAGGTCATCTTCCG	REF:B-95K
hPSP-3'.1	GCCGTGGGCTCGGCCCTGGC	REF:B-95L

und

hPSP-5'.3	AGAGGAGAAGGTCATCTTCCGCTA	REF:C-62Y
hPSP-3'.4	CTCGGCCCTGGCCCTGCAGC	REF:C-62X

und zur Amplifizierung der Einzelstrang-DNA von pRK5 cDNA-Bibliotheken (1 µl von 200 ng/µl) oder dem Stratagene's Quickscreen Pannel (3 µl einer jeden Bibliothek) unter Verwendung derselben Bedingungen, wie sie oben beschrieben wurden, verwendet. Die PCR-Produkte der erwarteten Größe (108 bp für hPSP-5'.1 mit hPSP-3'.1 und 101 bp für hPSP-5'.3 mit hPSP-3'.4) wurden in fötaler Lunge, fötaler Leber, fötaler Niere, in dem Dünndarm, der Netzhaut, dem Kleinhirn und hT+13-Lymphoblasten detektiert.

[0256] Um cDNA-Klone, welche für Human-Persephin kodieren, zu isolieren, wurden pRK5-Bibliotheken aus Humangewebe hinsichtlich Persephin-cDNA-Klonen durch Verlängern von Einzelstrang-DNA aus Plasmid-Bibliotheken, welche in einem dut⁺/ung⁻-Host unter Verwendung von einem der beiden folgenden Primer (SEQ ID NOS: 233–234) gezüchtet wurden, angereichert:

hPSP-3'.2	TGCAGCCGGGCCAGCGCCAG	REF:D-68T
hPSP-3'.4	CTCGGCCCTGGCCCTGCAGC	REF:C-62X

in einer Reaktion, enthaltend 10 µl 10 × PCR-Puffer (Perkin Elmer), 1 µl dNTP (20 mM), 1 µl Biobliotheks-DNA (200 ng), 0,5 µl Primer, 86,5 µl H₂O und 1 µl Amplitaq (Perkin Elmer), zugesetzt nach einem warmen Start. Die Reaktion wurde für 1 Minute bei 95°C denaturiert, für 1 Minute bei 50, 60 oder 68°C abkühlen gelassen und anschließend innerhalb von 20 Minuten bei 72°C verlängert. Die DNA wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und anschließend durch Elektroporation in DH10B-Wirtsbakterien transformiert.

[0257] Ungefähr 40.000 Kolonien einer jeden Transformation wurden auf Nylonmembranen gehoben und mit einer DNA-Sonde, abgeleitet von der Sequenz des Klons A3 (oben beschrieben), gescreent. Das Fragment wurde unter Verwendung des Random-Oligonucleotid-Verfahrens unter Verwendung von [32P]-dCTP gelabelt. Filter wurden über Nacht bei 42°C in 50% Formamid, 5 × SSC, 10 × Denhardt's 0,05M Natriumphosphat (pH 6,5), 0,1% Natriumpyrophosphat, 50 µg/ml beschallter Lachssperma-DNA hybridisiert. Die Filter wurden anschließend in 2 × SSC gespült und gewaschen in 0,1 × SSC, 0,1% SDS, und anschließend über Nacht Kodak-Röntgenfilmen ausgesetzt. Reine positive Klone wurden nach dem sekundären Screening erhalten, und die isolierten Klone wurden anschließend sequenziert. Human-Persephin-Klone wurden aus Bibliotheken fötaler Lunge, fötaler Niere und fötaler Leber isoliert. Sämtliche dieser isolierten Persephin-Klone gehören zu zwei Kategorien: ungespleißt (10 Klone) oder chimär (6 Klone). Ungespleißte Klone waren ungefähr 900 bp lang und enthalten ein Bereich, welcher für ein Fragment, welches Human-Persephin entspricht, kodiert. Es liegt allerdings dort kein Initiations-Methionin und Signalpeptid in dem Leserahmen (Rahmen +2) vor. Ein potentielles Upstream-Initiations-Kodon (ATG) liegt in einem anderen Leserahmen (+1) vor und wird von einer hydrophoben Sequenz, entsprechend einem potentiellen Signal-Peptid, nachgefolgt. Dieses legt nahe, dass solche cDNAs unvollständig gespleißt sind und dass ein Intron zwischen den Exons verbleibt, welches für das Signal-Peptid und das Persephin-Protein kodieren. Übereinstimmende Spleiß-Donor- und Akzeptor-Sequenzen können in der Tat an den Positionen 340 und 425 jeweils identifiziert werden. Ein Spleißen eines zwischen diesen Positionen befindlichen Introns würde zu einer cDNA führen, worin die Persephin-Kodierungs-Sequenz "innerhalb des Rahmens" mit dem Initiator Methionin liegt. Interessanterweise wurden abweichende chimäre Klone identifiziert, welche aus der Verbindung einer cDNA resultieren, kodierend für das vorausgesagte Exon 2 des Persephins, exakt an der Spleiß-Akzeptor-Stelle, wie sie an Position 425 vorliegt. Das entsprechende Transkript wurde wahrscheinlich durch irrtümliches Spleißen gebildet, bestätigt allerdings die Anwesenheit ei-

ner Spleiß-Akzeptor-Stelle an Position 425.

[0258] Als ein alternativer Ansatz zur Isolierung eines Human-Persephin-cDNA-Klons wurden 3 Millionen Klone einer Human-Kleinhirn-cDNA-Bibliothek in Lambda-ZAP (Stratagene cat #935201) mit einer DNA-Sonde, entsprechend Klon A3, gelabelt durch das Random-Oligonucleotid-Verfahren unter Verwendung von [32P]-dCTP, gescreent. Die Bibliothek wurde unter äußerst stringenten Hybridisierungsbedingungen gescreent. Die Filter wurden prähybridisiert für 2 Stunden, anschließend über Nacht bei 42°C in 50% Formamid, 5 × SSC, 10 × Denhardt's, 0,05 M Natriumphosphat (pH 6,5), 0,1% Natriumpyrophosphat, 50 µg/ml beschallter Lachssperma-DNA hybridisiert. Die Filter wurden anschließend in 2 × SSC abgespült und einmal in 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 60°C gewaschen. Die Filter wurden über Nacht Kodak-Röntgenfilmen ausgesetzt.

[0259] Vier positive Klone (Cere 1.1, 1.2. 6.1, 6.2) wurden aufgenommen und Plaquegereinigt. Der innerhalb der Lambda-ZAP-Phagenarme enthaltene Plasmid wurde gemäß der Herstellerangaben unter Verwendung einer Ex Assist Helper-Phage gerettet. Das Sequenzieren der vier Klone gab an, dass diese Klone Geschwister waren und zwei stille Mutationen enthielten, wenn sie mit Human-Persephin-Klonen, die aus der oben beschriebenen pRK5-Bibliothek isoliert wurden, verglichen wurden. Diese stillen Mutationen traten an den Positionen 30 (T → C) und 360 (T → C) der in **Fig. 24** gezeigten Sequenz auf. Eine direkte Sequenzierung des Human-Persephin-Gens ergab, dass diese stillen Mutationen eigentlich Allel-Variationen in dem Gen darstellen.

[0260] Um zu bestimmen, ob das korrekte Protein aus der oben identifizierten ungespleißten cDNA exprimiert werden kann, wurden Konstrukte gebildet, worin die Sequenz, welche für ein Flag-Tag kodiert, kurz vor dem Stoppkodon an der Position 685 (Rahmen +1) oder an Position 746 (Rahmen +2), startend an dem an Position 46 oder 193 vorliegenden ATG-Kodon, eingesetzt wurde. Alle vier möglichen Konstrukte wurden durch PCR unter Verwendung der folgenden Primer (SEQ ID NOS: 235–238) gebildet:

hPSP1stMet.F	5' CGC GGA TCC ATG CCT GGA TTC GAG GGT GCA G 3'	
		REF:B-127R
hPSP2ndMet.F	5' CGC GGA TCC ATG GCC GTA GGG AAG TTC CTG C 3'	
		REF:B-127S
hPSP.FLAG.R	5' CTC CCA AGC TTT TAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG	
	TCG CCA CCA CAG CCG CAG GCA GCC 3'	REF:A-120C
hPSP.sig.FLAG.R	5' CTC CCA AGC TTT TAC TTG TCA TCG TCG TCC TTG TAG	
	TCT CGA GGA AGG CCA CGT CGG TG 3'	REF:A-120B

[0261] In allen vier PCR-Reaktionen wurde der Cere 1.2-Klon als Templat verwendet und mit Pfu-Polymerase auf einem Stratagene Robocycler Gradient Cyclyer 96 amplifiziert. Die PCR-Bedingungen betrugen 95°C für 2', 30 Zyklen von [95°C 30", 1' bei 52, 56, 60 oder 63°C, 72°C für 2 Minuten], gefolgt von einer letzten Verlängerung von 5 Minuten bei 72°C.

[0262] Die Vorwärts-Primer besitzen eine Bam HI-Stelle, und die Rückwärts-Primer besitzen eine Hind III-Restriktionsstelle. Die PCR-Produkte, die mit Bam HI und Hind III digeriert wurden, wurden subkloniert in diese Stellen in pRK5. DNA aus einem jeden dieser Konstrukte wurde über Nacht in 293 Zellen unter Verwendung der CaPO₄-Methode transfiziert. Serum-enthaltende Medien wurden 24 Stunden lang konditioniert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden ebenso geerntet und in zwei Teile aufgeteilt; 1/4 einer jeden Platte für RT-PCR und die restlichen 3/4 einer jeden Platte für die Immunopräzipitation.

[0263] Die Analyse der exprimierten Proteine wurde durch Immunopräzipitation durchgeführt. Das Zell-Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, Aprotinin, Leupeptin, PMSF, 1 mM NaF und 1 mM Natriumvanadat) 20 Minuten lang bei 4°C lysiert. Das Extrakt wurde 10 Minuten bei 10K U/Min. gedreht/zentrifugiert, und anschließend wurde der Überstand in ein neues Rohr überführt und mit 20 µl Protein-A-Sepharose eine Stunde lang vorgeklärt. Von dort wurde 1 ml des konditionierten Mediums parallel verarbeitet. Die Protein-A-Sepharose wurde abzentrifugiert, und 1 µl Anti-Flag-Antikörper (3,6 µg) wurde zu jedem Rohr zugegeben. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht, wurden 30 µl Protein-G-Sepharose zugesetzt, und die Rohre wurden bei 4°C 1 Stunde lang inkubiert. Die Protein-G-Kügelchen wurden anschließend 1 Minute zentrifugiert, 3x mit Lysis-Puffer gewaschen, in 20 µl Laemli-Puffer resuspendiert in Anwesenheit von β-Mercapto-Ethanol. Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 100°C denaturiert und anschließend auf ein 16%-Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden anschließend auf Nitrozellulose überführt und durch Westernblot unter Verwendung derselben Anti-Flag-Antikörper über Nacht bei 1 µg/ml in Blockpuffer (PBS +

0,5% Tween + 5% fettfreier Trockenmilch + 3% Ziegenserum) analysiert. Anschließend wurde ein Anti-Maus-HRP.ECL für die Detektion verwendet, und die Membran wurde 90 Sekunden einem Röntgenfilm ausgesetzt.

[0264] Eine spezifische Bande von 16 kDa wurde detektiert in dem Zellenpellet von Zellen, welche mit dem Konstrukt transfiziert wurden, startend bei ATG 193 des Rahmens +1 und mit dem Flag eingesetzt in den Rahmen +2, und ein spezifisches Band von ungefähr 10 kDa konnte in dem entsprechenden Überstand detektiert werden. Kein Flag-Tagged-Protein konnte in irgendeiner anderen Transfizierung oder in einer vorgetäuscht transfizierten Zelle detektiert werden.

[0265] Die korrekt gespleißte mRNA wurde durch RT-PCR wie folgt identifiziert. Die Gesamt-RNA wurde aus den transfizierten Zellen (1/4 eines jeden Pellets) unter Verwendung von RNAzol B (Tel-Test Inc.) extrahiert und 40 Minuten lang bei 37°C mit DNase behandelt. RNA wurde anschließend auf einer RNAasy-Säule (Promega) gereinigt und in einem finalen Volumen von 50 µl gesammelt. Der erste Strang der cDNA wurde synthetisiert auf 4 µl RNA unter Verwendung von Superscript RT (GIBCO-BRL) für 1 Stunde bei 37°C, anschließend 5' bei 95°C zur Inaktivierung.

[0266] Zwei µl einer jeden RT-Reaktion wurden anschließend als Templat für die Amplifizierung durch PCR in Anwesenheit der folgenden zwei Primer (SEQ ID NOS: 236 und 239) verwendet:

hPSP2ndMet.F	5'-CGCGGATCCATTGGCCGTAGGGAAGTTCCTGC 3'	REF:B-127S
hPSP.stop.R	TCAGCCACCACAGCCGCAGGCAGCC	REF:D-103N

auf einem Stratagene Robocycler Gradient Cycler 96. Die PCR-Bedingungen betrugen 98°C für 1,5', 28 Zyklen von [98°C für 30", Kühlen 1' zwischen 60°C und 76°C, 72°C für 1,5'], gefolgt von einer letzten Verlängerung für 5 Minuten bei 72°C.

[0267] Die Analyse des PCR-Produkts auf Agarosegel gibt an, dass die PCR unter Verwendung des pRK5.hPSP-FLAG.2-Plasmids als Templat das erwartete Produkt von ungefähr 570 bp ergab, während das RT-PCR-Produkt, welches RNA aus mit diesem Konstrukt als Templat transfizierten Zellen verwendet, kleiner als 500 bp war. Das PCR-Produkt aus der letzteren Reaktion wurde in den pCR 2.1-Vektor unter Verwendung des In Vitrogen TA Kloning Kit (cat #K2000-01) subkloniert und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass das vorhergesagte 84 bp-Intron aus dem Transkript herausgespleißt wurde.

[0268] Zusammenfassend besitzt die Human-Persephin-cDNA einen offenen 471-bp-Leserahmen, welcher für eine 156 Aminosäuren langes Protein kodiert (vorhergesagt Mr 16,6 kDa). Die Spaltung des 23 Aminosäuren langen vorhergesagten Signalpeptids führt zu einem 133 Aminosäure-Pro-Persephin-Molekül (Mr 14,2 kDa); die proteolytische Spaltung des Pro-Persephins an der übereinstimmenden RXXR-Sequenz sollte ein reifes 96 Aminosäure-Protein mit einem Molekulargewicht von 10,3 kDa liefern. Diese vorhergesagte Größe entspricht der Größe des Flag-Tagged-Proteins, welches aus dem konditionierten Medium der transfizierten 293 Zellen immunopräzipitiert wurde. Darüber hinaus bestätigte die Amino-terminale Sequenzierung des Flag-Tagged-Persephins, gereinigt aus dem konditionierten Medium von 293 transfizierten Zellen, dass der erste Rest der reifen Form Ala 61 darstellt. Der Abgleich zwischen Human-Persephin und Human-Neurturin gibt eine 38%-Ähnlichkeit zwischen den zwei Molekülen an (50% für die reife Region) und dass das Human-Persephin zu 30% ähnlich ist zu Human-GDNF (40% in der reifen Region).

Beispiel 16

[0269] Dieses Beispiel verdeutlicht die Herstellung von Chimären- oder Hybrid-Polypeptid-Molekülen, welche von Persephin abgeleitete Abschnitte (PSP) und von Neurturin abgeleitete Abschnitte (NTN) enthalten.

[0270] Als eng verwandte Mitglieder der TGF-β-Familie wird vorausgesagt, dass sowohl Persephin als auch Neurturin eine äußerst ähnliche Gesamtstruktur aufweisen, auch wenn Neurturin das Überleben von sympathischen Neuronen fördert, während das eng verwandte Persephin dieses nicht tut. Zwei Chimären wurden durch im Wesentlichen Ersetzen der Abschnitte von Persephin durch Neurturin hergestellt, wobei der Kreuzpunkt zwischen den zwei benachbarten hochbewahrten dritten und vierten Cystein-Resten lag. Die erste Chimäre, genannt PSP/NTN (SEQ ID NO: 141, **Fig. 3**), enthält die ersten 63 Reste des reifen Murin-Persephins, kombiniert mit den Resten 68 bis 100 des reifen Murin-Neurturins (unter Verwendung von E. Coli-bevorzugten Kodons). Um dieses Molekül zu bilden, wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt:

- 1) unter Verwendung des Vorwärts-Primers M2012 (5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAA, SEQ ID NO: 142) und des Rückwärts-Primers M2188 (5'-TCGTCTTCGTAAGCAGTCGGACGGCAGCAGGGTCGG-

CAATGGGCTCGAC, SEQ ID NO: 143) und dem pET30a-Murin-Persephin-Plasmid als Templat (siehe Beispiel 13); und

2) unter Verwendung des Vorwärts-Primers M2190 (5'-TGCTGCCGTCGACTGCTTACGAAGACGA, SEQ ID NO: 144) und des Rückwärts-Primers 2186 (5'-GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT, SEQ ID NO: 145) und dem pET30a-Murin- (E. Coli-bevorzugte Kodons) Neurturin-Plasmid als Templat (siehe Beispiel 6). Beide PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung der folgenden Parameter durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden × 25 Zyklen. Die Produkte dieser zwei PCR-Reaktionen wurden gelgereinigt, zusammen vermischt, und eine PCR-Reaktion wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 20 Minuten, 68°C für 5 Minuten. Nach 8 Zyklen wurde ein Aliquot dieser Reaktion als Templat in einer dritten PCR-Reaktion unter Verwendung des Vorwärts-Primers M2012 und des Rückwärts-Primers M2186 unter den folgenden Bedingungen verwendet: 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden × 25 Zyklen. Das resultierende Produkt wurde einer T4-Polynucleotid-Kinase unterzogen, die Enden wurden mit E. Coli-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) geblunted und in BSKS-Plasmid kloniert. Ein Nucleotid-Sequenzieren wurde durchgeführt, um zu verifizieren, dass der korrekte Klon erhalten wurde. Das PSP/NTN-Fragment wurde unter Verwendung von Nde I und Bam H1 ausgeschnitten und in die korrespondierenden Stellen des Bakterien-Expressionsvektors pET30a kloniert.

[0271] Das zweite Chimäre, genannt NTN/PSP (SEQ ID NO: 146, **Fig. 3**), kodiert das entgegengesetzte Molekül. Es enthält die ersten 67 Reste des reifen Murin-Neurturins (unter Verwendung von E. Coli-bevorzugten Kodons), kombiniert mit den Resten 64 bis 96 von reifem Murin-Persephin. Um dieses Molekül herzustellen, wurden die folgenden PCR-Reaktionen durchgeführt: 1) unter Verwendung des Vorwärts-Primers M2012 und des Rückwärts-Primers M2183 (5'-CACTCAGCATAGCTGGTGGGCTGGCAGCACGGGTGAGCACGAGCACGTT, SEQ ID NO: 147) und des pET30a-Murin- (E. Coli-bevorzugte Kodons) Neurturin-Plasmids als Templat; und 2) unter Verwendung des Vorwärts-Primers M2187 (5'-TGCTGCCAGCCCACCAGCTATGCTG, SEQ ID NO: 148) und des Rückwärts-Primers M2186 (5'-GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGGT, SEQ ID NO: 145) und des pET30a-Murin-Persephin-Plasmids als Templat. Beide PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung der folgenden Parameter durchgeführt: 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden × 25 Zyklen. Die Produkte dieser zwei PCR-Reaktionen wurden zum Aufbau des finalen NTN/PSP-pET30a-Plasmids, wie oben im Detail für PSP/NTN beschrieben, verwendet, außer dass Bgl II anstelle von Bam H1 verwendet wurde. Diese chimären Proteine wurden in E. Coli hergestellt und durch Ni-NTA-Chromatographie gereinigt, wie es oben beschrieben wurde (Beispiel 13).

[0272] Die gereinigten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, dass Überleben in dem SCG-Assay sympathischer Neuronen zu fördern. Das NTN/PSP-Protein förderte nicht das Überleben, wohingegen das PSP/NTN-Protein das Überleben von sympathischen Neuronen ähnlich dem, welches für Neurturin selbst beobachtet wurde, förderte. Diese Ergebnisse zeigen, dass Neurturin-Reste, welche unterhalb der zwei benachbarten hochkonservierten Cystein-Reste liegen, für die Wirksamkeit in der Förderung des Überlebens in SCG-sympathischen Neuronen kritisch sind. Im Gegensatz dazu sind die entsprechenden Reste von Persephin nicht ausreichend zur Förderung des Überlebens in sympathischen Neuronen.

Beispiel 17

[0273] Dieses Beispiel verdeutlicht die neuronale überlebensfördernde Wirkung von Persephin in Mittelhirnzellen.

[0274] Das Profil der überlebensfördernden Wirkung von Persephin unterscheidet sich von dem von Neurturin und GDNF. Im Gegensatz zur durch Neurturin und GDNF in sympathischen und Sensoneuronen gebildeten überlebensfördernden Wirkung zeigte Persephin keine überlebensfördernde Wirkung in diesen Geweben. Wir haben weiterhin die neuronale überlebensfördernde Wirkung von Persephin in Mittelhirnzellen untersucht.

[0275] Getimed-schwangere Sprague-Dawley-Ratten wurden von Harlan Sprague-Dawley gekauft. Das Mittelhirn wurde den Ratten entnommen und maß 1,2 bis 1,4 cm in der Länge, wobei als Zeit der embryonale Tag 14 datiert wurde. Die Schädeldecke wurde entfernt, und das gesamte Mittelhirn wurde in kalte L15 gegeben. Das gepoolte Mittelhirngewebe wurde in einem serumfreien Medium, bestehend aus DME/Hams F12 (#11330-032, Life Technologies), 1 mg/ml BSA, Fraktion V (A-6793, Sigma Chemical Co.), 5 µM Insulin (I-5500, Sigma), 10 nM Progesteron (P0130, Sigma), 100 µM Putrescin, (p7505, Sigma), 30 nM Selen (507150, Pflatz & Bauer), 10 ng/ml Ratten-Transferrin (012-000-050, Jackson Chrompure), 100 U/M1 Penizillin und 100 U/ml Streptomycin, resuspendiert. Die gepoolten Mittelhirngewebe wurden ungefähr 80 mal unter Verwendung einer Pipette mit gebogener Spitze (Bent-Tip) trituriert, und die Zellen wurden auf eine

24-Well-Platte (Costar) in einer Dichte von 15.000 Zellen in einem 100 µl Tropfen plattiert. Diese Platten wurden mit 125 ng/ml Poly-d-Lysin (p-7280, Sigma) und 25 ng/ml Laminin (#40232, Collaborative Biomedical Products) beschichtet. Diese dissoziierten bzw. getrennten Zellen ließ man 2 Stunden bei 37°C in 5% CO₂ anhaften und fütterte sie anschließend mit weiteren 500 µl des obengenannten serumfreien Mediums mit oder ohne ungefähr 100 ng/ml rekombinantes Persephin. Diese Zellen wurden nach 3 Tagen Kultivierung fotografiert.

[0276] Die Inspizierung der Zellen über den Verlauf von 3 Tagen der Kultivierung zeigte eine graduelle Abnahme der Zellanzahl. In der Abwesenheit jeglichen Wachstumsfaktors waren annähernd alle Zellen tot ([Fig. 4A](#)). In Anwesenheit von Persephin war ein starker Anstieg des Überlebens von Mittelhirn-Neuronalzellen ersichtlicht ([Fig. 4B](#)).

[0277] Diese Studie wurde wiederholt, um Vergleichseffekte gegenüber Mittelhirnzellen für Persephin und verwandte Wachstumsfaktoren, Neurturin und GDNF zu erhalten. Mittelhirngewebe wurde aus E 14 par pps entnommen, gepoolt und 30 Minuten lang in Dispase dissoziiert. Die Zellen wurden anschließend trituriert und in supplementiertes N2-Medium plattiert und bei einer Dichte von 20.000 Zellen pro Well in einen 8-Well-Kammer-Slike plattiert. Die Zellen wurde in einem gegebenen Well entweder unbehandelt oder mit einem Wachstumsfaktor bei 50 ng/ml innerhalb von vier Tagen behandelt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd 30 Minuten lang fixiert und mit Tyrosinhydroxylase-Antikörper (TOH) (Chemicon, ABC-Vectastain kit) behandelt und gezählt. Die TOH-Behandlung diente als ein Marker für dopaminerge Zellen, insoweit als TOH ein synthetisches Enzym für Dopamin darstellt. Die [Fig. 5](#) zeigt die mittlere Zellanzahl für unbehandelte und behandelte Zellen. Persephin (PSP), Neurturin (NTN) und GDNF förderten das Überleben von Mittelhirnneuronalzellen in einem vergleichbaren Ausmaß.

Stamm	Hinterlegungsdatum	ATCC Nr.
DG44CHO-pHSP-NGFI-B	25. August 1995	CRL 11977

Beispiel 18

[0278] Dieses Beispiel verdeutlicht die Expression von Persephin in verschiedenen Geweben.

[0279] Eine Studie zur Persephin-Expression wurde in erwachsenen Mausgeweben unter Verwendung von semiquantitativer RT/PCR (siehe Beispiel 9) durchgeführt. Poly-A-RNA wurde aus dem Hirn, dem Kleinhirn, der Niere, der Lunge, dem Herz, den Eierstöcken, dem Ischiasnerv, den Rückenwirbelganglien, dem Blut und der Milz isoliert. Diese wurde anschließend unter Bildung von cDNA revers transkribiert (siehe Kotzbauer et al., Nature 384: 467–470, 1996, welche hierin durch Bezugnahme eingeschlossen ist). Die verwendeten PCR-Primer waren wie folgt: Vorwärts-Primer: 5'-CCTCGGAGGAGAAGGTCATCTTC (SEQ ID NO: 149) und Rückwärts-Primer: 5'-TCATCAAGGAAGGTCACATCAGCATA (SEQ ID NO: 101). Die PCR wurde 26 Zyklen lang mit einer Anneal-Temperatur von 60°C durchgeführt. Um die Anwesenheit von Genom-DNA zu regulieren bzw. kontrollieren, wurden RNA-Proben, welche nicht revers transkribiert wurden, für die PCR verwendet (beispielsweise wird die in [Fig. 22](#) gezeigte Gewebekontrolle "Kidney no RT" bezeichnet). Es wurde gefunden, dass sämtliche der Proben ohne Genom-DNA-Kontamination vorlagen.

[0280] Wie in [Fig. 5](#) gezeigt ist, wurde ein Band der richtigen Größe (160 bp) in der Nierenprobe entdeckt. Bei höheren Zyklenanzahlen wurde ebenso ein Persephinband in dem Gehirn beobachtet. Folglich unterscheidet sich die Verteilung der Expression von Persephin in verschiedenen Mausgeweben von denen von Neurturin in der Ratte (Beispiel 8).

Hinterlegung des Stamms.

[0281] Der folgende Stamm wird unter dem Budapester Abkommen bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD hinterlegt. Das angegebene Aktenzeichen wurde nach erfolgreichem Lebensfähigkeitstest zugeordnet, und die erforderlichen Gebühren wurden bezahlt. Sämtliche Begrenzungen hinsichtlich der Verfügbarkeit der Kulturen für die Öffentlichkeit werden unwiderruflich durch die Erteilung eines Patents auf der Basis der Anmeldung entfernt. Darüber hinaus werden die bestimmten Hinterlegungen für eine Dauer von dreißig (30) Jahren von dem Tag der Hinterlegung an oder für fünf (5) Jahre nach dem letzten Antrag für die Hinterlegung oder für die durchsetzbare Zeitdauer des US-Patents beibehalten, je nach dem was am längsten ist. Sollte eine Kultur nicht überlebensfähig werden oder unwiderruflich zerstört werden

oder, im Fall von Plasmid-enthaltenden Stämmen, bei Verlust des Plasmids, wird sie durch eine lebensfähige Kultur ersetzt werden. Die hinterlegten Materialien, welche hierin erwähnt sind, sollen lediglich der Annehmlichkeit dienen und sind für die Praxis der vorliegenden Erfindung im Hinblick auf die Beschreibung hierin nicht erforderlich. Zusätzlich sind diese Materialien hierin durch Bezugnahme eingeschlossen.

[0282] Im Hinblick auf das Obengenannte wird ersichtlich sein, dass die verschiedenen Vorteile der Erfindung erzielt werden und andere vorteilhafte Ergebnisse erreicht werden.

[0283] Sämtliche in der obengenannten Beschreibung enthaltene und in den angehängten Zeichnungen gezeigte Gegenstände sollen lediglich als verdeutlichend und keinesfalls in einer begrenzenden Weise interpretiert werden.

SEQUENZLISTE

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER: JOHNSON JR. EUGENE M
MILBRANDT, JEFFREY D
KOTZBAUER, PAUL T
LAMPE, PATRICIA A
KLEIN, ROBERT
DESAUVAGE, FRED
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: NEURITURIN UND VERWANDTE
WACHSTUMSFAKTOREN
- ANZAHL DER SEQUENZEN: 242
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: HOWELL & HAERKAMP, L.C.
(B) STRASSE: 7733 FORSYTH BOULEVARD, SUITE 1400
(C) STADT: ST. LOUIS
(D) STAAT: MO
(E) LAND: USA
(F) ZIP: 63105
- (v) COMPUTER-LESBARES FORMAT:
(A) MEDIUMTYP: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC Compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
- (vi) AKTUELLE ANMELDUNGSDATEN:
(A) ANMELDUNGSNUMMER:
(B) ANMELDUNGSDATUM:
(C) KLASSIFIZIERUNG:
- (viii) ANWALT/VERTRETER INFORMATION:
(A) NAME: HOLLAND, DONALD R
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 35.197
(C) REFERENZ/DOKUMENT NUMMER: 971486
- (xi) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:
(A) TELEFON: (314) 727-5188
(B) TELEFAX: (314) 727-6092

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:1:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:1:

Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Val	Arg
1				5					10					15	
Val	Ser	Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ser	Asp	Glu	Thr	Val	Leu	Phe
			20					25					30		
Arg	Tyr	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys	Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Val	Tyr	Asp	Leu
		35					40					45			

Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val
 50 55 60

Arg Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser
 65 70 75 80

Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala
 85 90 95

Arg Glu Cys Ala Cys Val
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:2:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 100 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:2:

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

Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Thr Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr
 20 25 30

Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ile Arg Ile Tyr Asp Leu Gly Leu
 35 40 45

Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Val Arg Arg Glu Arg Ala Arg Ala
 50 55 60

His Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu
 65 70 75 80

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

Cys Ala Cys Val
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:3:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 6
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note (Platzhalter)= "IRGENDEINE

AMINOSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:3:

Ser Gly Ala Arg Pro Xaa Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Ser Val Ser
 1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:4:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 1
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "IRGENDEINE AMINOSÄURE"
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 6
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER CYSTEIN"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:4:

Xaa Cys Ala Gly Ala Xaa Glu Ala Ala Val
 1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:5:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 1
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "IRGENDEINE AMINOSÄURE"
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 2
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "IRGENDEINE AMINOSÄURE"
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 17
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMIN ODER GLUTAMINSÄURE"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:5:

Xaa Xaa Val Glu Ala Lys Pro Cys Cys Gly Pro Thr Ala Tyr Glu Asp
 1 5 10 15

Xaa Val Ser Phe Leu Ser Val
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:6:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:6:

Tyr His Thr Leu Gln Glu Leu Ser Ala Arg
 1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:7:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 197 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:7:

Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
 1 5 10 15

Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg
 20 25 30

Leu Gly Pro Ala Leu Val Pro Leu His Arg Leu Pro Arg Thr Leu Asp
 35 40 45

Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
 50 55 60

Pro Asp Ala Met Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Pro
 65 70 75 80

Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg Ala
 85 90 95

Arg Leu Gly Ala Arg Pro Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val
 100 105 110

Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg
 115 120 125

Tyr Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly
 130 135 140

Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg
 145 150 155 160

Ala Gln Pro Cys Cys Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe
 165 170 175

Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg
 180 185 190

Glu Cys Ala Cys Val
195

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:8:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 195 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:8:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:9:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 306 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:9:

```

GCGCGGTTGG GGGCGCGGCC TTGCGGGCTG CGCGAGCTGG AGGTGCGCGT GAGCGAGCTG      60
GGCCTGGGCT ACGCGTCCGA CGAGACGGTG CTGTTCCGCT ACTGCGCAGG CGCCTGCGAG      120
GCTGCCGCGC GCGTCTACGA CCTCGGGCTG CGACGACTGC GCCAGCGGCG GCGCCTGCGG      180
CGGGAGCGGG TGC GCGCGCA GCCCTGCTGC CGCCCACGG CCTACGAGGA CGAGGTGTCC      240
TTCCTGGACG CGCACAGCCG CTACCACAGC GTGCACGAGC TGTCGGCGCG CGAGTGCGCC      300
TGCGTG                                           306

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:10:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 300 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:10:

```

CCGGGGGCTC GGCCTTGTGG GCTGCGGAG CTCGAGGTGC GCGTGAGCGA GCTGGGCCTG      60
GGCTACACGT CGGATGAGAC CGTGCTGTTC CGCTACTGCG CAGGCGCGTG CGAGGCGGCC      120
ATCCGCATCT ACGACCTGGG CCTTCGGCGC CTGCGCCAGC GGAGGCGCGT GCGCAGAGAG      180
CGGGCGCGGG CGCACCCGTG TTGTCGCCC ACGGCCTATG AGGACGAGGT GTCCTTCCTG      240
GACGTGCACA GCCGCTACCA CACGCTGCAA GAGCTGTCCG CGCGGGAGTG CGCGTGCGTG      300

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:11:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 591 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:11:

```

ATGCAGCGCT GGAAGGCGGC GGCCTTG GCC TCA GTGCTCT GCAGTCCGT GCTGTCCATC      60
TGGATGTGTC GAGAGGGCCT GCTTCTCAGC CACCGCCTCG GACCTGCGCT GGTCCCCCTG      120
CACCGCCTGC CTCGAACCCT GGACGCCCCG ATTGCCGCC TGGCCAGTA CCGTGCACTC      180
CTGCAGGGGG CCCCGGATGC GATGGAGCTG CGCGAGCTGA CGCCCTGGGC TGGGCGGCCC      240
CCAGGTCCGC GCCGTCGGGC GGGGCCCCGG CGGCGGCGCG CGCGTGCGCG GTTGGGGGCG      300
CGGCCTTGCG GGCTGCGCGA GCTGGAGGTG CGCGTGAGCG AGCTGGGCCT GGGCTACGCG      360
TCCGACGAGA CGGTGCTGTT CCGCTACTGC GCAGGCGCCT GCGAGGCTGC CGCGCGCGTC      420

```

TACGACCTCG GGCTGCGACG ACTGCGCCAG CGGCGGCGCC TCGGGCGGGA GCGGGTGCGC 480
 GCGCAGCCCT GCTGCCGCCC GACGGCCTAC GAGGACGAGG TGTCTTCCT GGACGCGCAC 540
 AGCCGCTACC ACACGGTGCA CGAGCTGTCG GCGCGCGAGT GCGCCTGCGT G 591

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:12:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 585 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:12:

ATGAGGCGCT GGAAGGCAGC GGCCCTGGTG TCGCTCATCT GCAGCTCCCT GCTATCTGTC 60
 TGGATGTGCC AGGAGGGTCT GCTCTTGGGC CACCGCCTGG GACCCGCGCT TGCCCCGCTA 120
 CGACGCCCTC CACGCACCCT GGACGCCCCG ATCGCCCCC TGGCCCAGTA TCGCGCTCTG 180
 CTCCAGGGCG CCCCCGACGC GGTGGAGCTT CGAGAACTTT CTCCCTGGGC TGCCCGCATC 240
 CCGGGACCGC GCCGTCGAGC GGGTCCCCGG CGTCGGCGGG CGCGGCCGGG GGCTCGGCCT 300
 TGTGGGCTGC GCGAGCTCGA GGTGCGCGTG AGCGAGCTGG GCCTGGGCTA CACGTCGGAT 360
 GAGACCGTGC TGTTCGCTA CTGCGCAGGC GCGTGCAGG CGGCCATCCG CATCTACGAC 420
 CTGGGCCTTC GGCGCCTGCG CCAGCGGAGG CGCGTGCGCA GAGAGCGGGC GCGGGCGCAC 480
 CCGTGTGTGTC GCCCGACGGC CTATGAGGAC GAGGTGTCCT TCCTGGACGT GCACAGCCGC 540
 TACCACACGC TGCAAGAGCT GTCGGCGCGG GAGTGC GCGT 585

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:13:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 348 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:13:

GGAGGGAGAG CGCGCGGTGG TTTCGTCCGT GTGCCCCGCG CCCGGCGCTC CTCGCGTGGC 60
 CCCGCGTCCT GAGCGCGCTC CAGCCTCCCA CGCGCGCCAC CCCGGGGTTC ACTGAGCCCG 120
 GCGAGCCCGG GGAAGACAGA GAAAGAGAGG CCAGGGGGGG AACCCCATGG CCCGGCCCGT 180
 GTCCCGCACC CTGTGCGGTG GCCTCCTCCG GCACGGGGTC CCCGGGTCGC CTCCGGTCCC 240
 CGCGATCCGG ATGGCGCACG CAGTGGCTGG GGCCGGGCCG GGCTCGGGTG GTCGAGGAG 300
 TCACCACTGA CCGGGTCATC TGGAGCCCGT GGCAGGCCGA GGCCAGG 348

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:14:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 87 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:14:

TGCTACCTCA CGCCCCCGA CCTGCGAAAG GGCCCTCCCT GCCGACCCTC GCTGAGAACT 60

GACTTCACAT AAAGTGTGGG AACTCCC 87

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:15:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:15:

Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
 1 5 10 15

Val Leu Ser

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:16:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:16:

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

Leu Leu Ser

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:17:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:17:

ATGCAGCGCT GGAAGGCGGC GGCCTTGCC TCAGTGCTCT GCAGCTCCGT GCTGTCC 57

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:18:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:18:

ATGAGGCGCT GGAAGGCAGC GGCCCTGGTG TCGCTCATCT GCAGCTCCCT GCTATCT 57

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:19:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 76 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:19:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:20:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 228 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:20:

ATCTGGATGT GTCGAGAGGG CCTGCTTCTC AGCCACCGCC TCGGACCTGC GCTGGTCCCC 60

CTGCACCGCC TGCCTCGAAC CCTGGACGCC CGGATTGCCC GCCTGGCCCA GTACCGTGCA 120

CTCCTGCAGG GGGCCCCGGA TGCGATGGAG CTGCGCGAGC TGACGCCCTG GGCTGGGCGG 180
 CCCCCAGGTC CGCGCCGTCG GGCGGGGCCC CGGCGGCGGC GCGCGCGT 228

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:21:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 228 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:21:

GTCTGGATGT GCCAGGAGGG TCTGCTCTTG GGCCACCGCC TGGGACCCGC GCTTGCCCCG 60
 CTACGACGCC CTCCACGCAC CCTGGACGCC CGCATCGCCC GCCTGGCCCA GTATCGCGCT 120
 CTGCTCCAGG GCGCCCCCGA CGCGGTGGAG CTTGAGAAC TTTCTCCCTG GGCTGCCCCG 180
 ATCCCGGGAC CGCGCCGTCG AGCGGGTCCC CGGCGTCGGC GGGCGCGG 228

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:22:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 76 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:22:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:23:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 95 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:23:

Met Gln Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ser Val Leu Cys Ser Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Ile Trp Met Cys Arg Glu Gly Leu Leu Leu Ser His Arg
 20 25 30
 Leu Gly Pro Ala Leu Val Pro Leu His Arg Leu Pro Arg Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
 50 55 60
 Pro Asp Ala Met Glu Leu Arg Glu Leu Thr Pro Trp Ala Gly Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg
 85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:24:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 95 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:24:

Met Arg Arg Trp Lys Ala Ala Ala Leu Val Ser Leu Ile Cys Ser Ser
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Val Trp Met Cys Gln Glu Gly Leu Leu Leu Gly His Arg
 20 25 30
 Leu Gly Pro Ala Leu Ala Pro Leu Arg Arg Pro Pro Arg Thr Leu Asp
 35 40 45
 Ala Arg Ile Ala Arg Leu Ala Gln Tyr Arg Ala Leu Leu Gln Gly Ala
 50 55 60
 Pro Asp Ala Val Glu Leu Arg Glu Leu Ser Pro Trp Ala Ala Arg Ile
 65 70 75 80
 Pro Gly Pro Arg Arg Arg Ala Gly Pro Arg Arg Arg Arg Ala Arg
 85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:25:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 285 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:25:

ATGCAGCGCT GGAAGGCGGC GGCCTTGGCC TCAGTGCTCT GCAGCTCCGT GCTGTCCATC 60
 TGGATGTGTC GAGAGGGCCT GCTTCTCAGC CACCGCCTCG GACCTGCGCT GGTCCCCCTG 120
 CACCGCCTGC CTCGAACCCT GGACGCCCCG ATTGCCCCGC TGGCCCAGTA CCGTGCACTC 180
 CTGCAGGGGG CCCC GGATGC GATGGAGCTG CGCGAGCTGA CGCCCTGGGC TGGGCGGCCC 240
 CCAGGTCCGC GCCGTCGGGC GGGGCCCCGG CGGCGGCGCG CGCGT 285

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:26:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 285 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:26:

ATGAGGCGCT GGAAGGCAGC GGCCCTGGTG TCGCTCATCT GCAGCTCCCT GCTATCTGTC 60
 TGGATGTGCC AGGAGGGTCT GCTCTTGGGC CACCGCCTGG GACCCGCGCT TGCCCCGCTA 120
 CGACGCCCTC CACGCACCCT GGACGCCCCG ATCGCCCCGC TGGCCCAGTA TCGCGCTCTG 180
 CTCCAGGGCG CCCCCGACGC GGTGGAGCTT CGAGAACTTT CTCCCTGGGC TGCCCGCATC 240
 CCGGGACCGC GCCGTCGAGC GGGTCCCCGG CGTCGGCGGG CGCGG 285

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:27:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 169 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:27:

ATGCAGCGCT GGAAGGCGGC GGCCTTGGCC TCAGTGCTCT GCAGCTCCGT GCTGTCCATC 60
 TGGATGTGTC GAGAGGGCCT GCTTCTCAGC CACCGCCTCG GACCTGCGCT GGTCCCCCTG 120
 CACCGCCTGC CTCGAACCCT GGACGCCCCG ATTGCCCCGC TGGCCCAGT 169

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:28:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 425 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:28:


```

ACCGTGCACT CCTGCAGGGG GCCCCGGATG CGATGGAGCT GCGCGAGCTG ACGCCCTGGG      60
CTGGGCGGCC CCCAGGTCCG CGCCGTCGGG CGGGGCCCCG GCGGCGGCGC GCGCGTGCGC      120
GGTTGGGGGC GCGGCCTTGC GGGCTGCGCG AGCTGGAGGT GCGCGTGAGC GAGCTGGGCC      180
TGGGCTACGC GTCCGACGAG ACGGTGCTGT TCCGCTACTG CGCAGGCGCC TGCAGAGCTG      240
CCGCGCGCGT CTACGACCTC GGGCTGCGAC GACTGCGCCA GCGGCGGCGC CTGCGGCGGG      300
AGCGGGTGCG CGCGCAGCCC TGCTGCCGCC CGACGGCCTA CGAGGACGAG GTGTCCTTCC      360
TGGACGCGCA CAGCCGCTAC CACACGGTGC ACGAGCTGTC GGCGCGCGAG TGCGCCTGCG      420
TGTGA                                          425

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:29:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 169 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:29:

```

ATGAGGCGCT GGAAGGCAGC GGCCCTGGTG TCGCTCATCT GCAGCTCCCT GCTATCTGTC      60
TGGATGTGCC AGGAGGGTCT GCTCTTGGGC CACCGCCTGG GACCCGCGCT TGCCCCGCTA      120
CGACGCCCTC CACGCACCCT GGACGCCCGC ATCGCCCGCC TGGCCCAGT                    169

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:30:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 419 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:30:

```

ATCGCGCTCT GCTCCAGGGC GCCCCGACG CGGTGGAGCT TCGAGAACTT TCTCCCTGGG      60
CTGCCCCGAT CCCGGGACCG CGCCGTCGAG CGGGTCCCCG GCGTCGGCGG GCGCGGCCGG      120
GGGCTCGGCC TTGTGGGCTG CGCGAGCTCG AGGTGCGCGT GAGCGAGCTG GGCCTGGGCT      180
ACACGTCGGA TGAGACCGTG CTGTTCCGCT ACTGCGCAGG CGCGTGCGAG GCGGCCATCC      240
GCATCTACGA CCTGGGCCTT CGGCGCCTGC GCCAGCGGAG GCGCGTGCGC AGAGAGCGGG      300
CGCGGGCGCA CCCGTGTTGT CGCCCGACGG CCTATGAGGA CGAGGTGTCC TTCCTGGACG      360
TGCACAGCCG CTACCACACG CTGCAAGAGC TGTCGGCGCG GGAGTGCGCG TGC GTGTGA      419

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:31:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 94 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:31:

```

Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly
1           5           10           15

Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys
          20           25           30

Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln
          35           40           45

Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg Ala Gln Pro Cys Cys Arg
          50           55           60

Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Ala His Ser Arg
65           70           75           80

Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys
          85           90

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:32:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 94 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:32:

```

Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly
1           5           10           15

Tyr Thr Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys
          20           25           30

Glu Ala Ala Ile Arg Ile Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln
          35           40           45

Arg Arg Arg Val Arg Arg Glu Arg Ala Arg Ala His Pro Cys Cys Arg
          50           55           60

Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Val His Ser Arg
65           70           75           80

Tyr His Thr Leu Gln Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys
          85           90

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:33:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure

- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 2
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER THREONIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 3
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:33:

Val Xaa Xaa Leu Gly Leu Gly Tyr
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:34:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 2
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN ODER GLUTAMINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 3
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 4
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "LEUCIN ODER ISOLEUCIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 9
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 11
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 13
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

- (B) ORT: 14
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:34:

Glu	Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Arg	Tyr	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Ala
1				5					10					15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:35:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 5
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN ODER VALIN ODER

ISOLEUCIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 7
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "TYROSIN ODER PHENYLALANIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 10
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 11
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:35:

Cys	Cys	Arg	Pro	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Asp	Xaa	Xaa	Ser	Phe	Leu	Asp
1				5				10						15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:36:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

- (B) ORT: 5
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 7
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 9
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 10
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:36:

Phe	Arg	Tyr	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Ala
1				5					10	

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:37:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 5
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 7
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 9
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 10
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:37:

Phe	Arg	Tyr	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Ala
1				5					10	

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:38:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 5
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ISOLEUCIN ODER THREONIN ODER

VALIN"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 7
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "TYROSIN ODER PHENYLALANIN"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 8
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 10
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:38:

Cys	Cys	Arg	Pro	Xaa	Ala	Xaa	Xaa	Asp	Xaa
1				5				10	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:39:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 2
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "TYROSIN ODER PHENYLALANIN"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 3
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 5
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 6

(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:39:

Ala Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Ser Phe Leu Asp
1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:40:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER THREONIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 3
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "LEUCIN ODER VALIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ISOLEUCIN ODER LEUCIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:40:

Glu Xaa Xaa Xaa Phe Arg Tyr Cys
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:41:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER THREONIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 3
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "LEUCIN ODER VALIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ISOLEUCIN ODER LEUCIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 9
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 11
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 13
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:41:

Glu Xaa Xaa Xaa Phe Arg Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
 1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:42:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:42:

GTNWSNGANY TNGGNYTNGG NTA

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:43:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:43:

TTYMGNTAYT GYDSNGGNDS NTGYGANKCN GC

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:44:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:44:

GCNGMNTCRC ANSHNCCNSH RCARTANCKR AA

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:45:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:45:

TCRTCNTCRW ANGCMRYNGG NCKRCARCA

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:46:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:46:

TCNARRAANS WNAVNTCRTC NTCRWANGC

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:47:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:47:

GARRMNBTHN TTTYMGNTA YTG

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:48:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:48:

GARRMNBTHN TTTYMGNTA YTGYSNGGN DSNTGHGA

38

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:49:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:49:

Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Xaa	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Val	Ser	Val	Ser
1				5				10					15		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:50:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:50:

CCNACNGCNT AYGARGA

17

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:51:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:51:

Ala	Arg	Ala	His	Pro	Cys	Cys	Arg	Pro	Thr	Ala	Tyr	Glu	Asp	Glu	Val
1				5				10						15	

Ser	Phe	Leu	Asp
			20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:52:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:52:

ARYTCYTGNA RNGTHRTGRTA

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:53:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:53:

GACGAGGTGT CCTTCCTGGA CGTACACA

28

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:54:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:54:

TAGCGGCTGT GTACGTCCAG GAAGGACACC TCGT

34

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:55:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:55:

CAGCGACGAC GCGTGCGCAA AGAGCG

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:56:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 47 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:56:

TAYGARGACG AGGTGTCCTT CCTGGACGTA CACAGCCGCT AYCAYAC

47

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:57:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:57:

GCGGCCATCC GCATCTACGA CCTGGG

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:58:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:58:

CRTAGGCCGT CGGGCGRCAR CACGGGT

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:59:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:59:

GCGCCGAAGG CCCAGGTCGT AGATGCG

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:60:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:60:

CGCTACTGCG CAGGCGCGTG CGARGCGGC

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:61:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:61:

CGCCGACAGC TCTTGACGCG TRTGGA

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:62:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:62:

GAGCTGGGCC TGGGCTACGC GTCCGACGAG

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:63:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:63:

GCGACGCGTA CCATGAGGCG CTGGAAGGCA GCGGCCCTG

39

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:64:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:64:

GACGGATCCG CATCACACGC ACGCGCACTC

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:65:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:65:

GACCATATGC CGGGGGCTCG GCCTTGTGG

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:66:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:66:

GACGGATCCG CATCACACGC ACGGCGACTC

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:67:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:67:

CAGCGACGAC GCGTGCGCAA AGAGCG

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:68:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:68:

TAGCGGCTGT GTACGTCCAG GAAGGACACC TCGT

34

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:69:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:69:

AAAAATCGGG GGTGYGTCTT A

21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:70:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:70:

CATGCCTGGC CTACYTTGTC A

21

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:71:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:71:

CTGGCGTCCC AMCAAGGGTC TTCG

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:72:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:72:

GCCAGTGGTG CCGTCGAGGC GGG

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:73:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:73:

GGCCCAGGAT GAGGCGCTGG AAGG

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:74:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:74:

CCACTCCACT GCCTGAWATT CWACCCC

27

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:75:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:75:

CCATGTGATT ATCGACCATT CGGC

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:76:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 134 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:76:

Ser	Pro	Asp	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Leu	Pro	Arg	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Lys	Gly	Arg	Arg
			20					25					30		
Gly	Gln	Arg	Gly	Lys	Asn	Arg	Gly	Cys	Val	Leu	Thr	Ala	Ile	His	Leu
			35				40					45			
Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Glu	Thr	Lys	Glu	Glu	Leu	Ile
			50			55					60				
Phe	Arg	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ser	Cys	Asp	Ala	Ala	Glu	Thr	Thr	Tyr	Asp
65				70					75					80	
Lys	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Asn	Arg	Arg	Leu	Val	Ser	Asp	Lys
				85				90						95	

Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
 100 105 110

Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
 115 120 125

Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 130

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:77:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 134 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:77:

Ser Pro Asp Lys Gln Ala Ala Ala Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Ala Ala Ser Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
 20 25 30

Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu
 35 40 45

Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
 50 55 60

Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Glu Ser Ala Glu Thr Met Tyr Asp
 65 70 75 80

Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ser Arg Arg Leu Thr Ser Asp Lys
 85 90 95

Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Val Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
 100 105 110

Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
 115 120 125

Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 130

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:78:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 134 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:78:

Ser Pro Asp Lys Gln Ala Ala Ala Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Ala Ala Ser Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg
 20 25 30
 Gly Gln Arg Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu
 35 40 45
 Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile
 50 55 60
 Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys Glu Ala Ala Glu Thr Met Tyr Asp
 65 70 75 80
 Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Ser Arg Arg Leu Thr Ser Asp Lys
 85 90 95
 Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro Val Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser
 100 105 110
 Phe Leu Asp Asp Ser Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala
 115 120 125
 Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 130

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:79:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 89 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:79:

Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30
 Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg
 35 40 45
 Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys
 85

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:80:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:80:

Ala Leu Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr
 20 25 30
 Cys Ala Gly Ser Cys Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val
 35 40 45
 Leu Ala Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys
 50 55 60
 Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His
 65 70 75 80
 Trp Gln Gln Leu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:81:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 134 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:81:

Val Arg Ile Pro Gly Gly Leu Pro Thr Pro Gln Phe Leu Leu Ser Lys
 1 5 10 15
 Pro Ser Leu Cys Leu Thr Ile Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Gly Asn Asn
 20 25 30
 His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ser
 35 40 45
 Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu
 50 55 60
 Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys Pro Gln Glu Ala Arg
 65 70 75 80
 Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Ala
 85 90 95
 His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp Val Thr Phe
 100 105 110
 Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu Pro Gln Leu Ser Ala Ala
 115 120 125
 Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 130

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:82:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 89 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:82:

Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30
 Pro Gln Glu Val Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg
 35 40 45
 Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp His His His Trp Gln Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys
 85

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:83:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 91 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:83:

Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30
 Pro Gln Glu Val Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg
 35 40 45
 Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp His His His Trp Gln Gln Leu Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:84:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 267 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:84:

```
TGCCGACTGT GGAGCCTGAC CCTACCAGTG GCTGAGCTGG GCCTGGGCTA TGCCTCGGAG      60
GAGAAGGTCA TCTTCCGATA CTGTGCTGGC AGCTGTCCCC AAGAGGCCCG TACCCAGCAC      120
AGTCTGGTAC TGGCCCGGCT TCGAGGGCGG GGTCGAGCCC ATGGCCGACC CTGCTGCCAG      180
CCCACCAGCT ATGCTGATGT GACCTTCCTT GATGATCAGC ACCATTGGCA GCAGCTGCCT      240
CAGCTCTCAG CTGCAGCTTG TGGCTGT                                           267
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:85:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 267 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:85:

```
TGCCGGCTGT GGAGCCTGAC CCTACCAGTG GCTGAGCTTG GCCTGGGCTA TGCCTCAGAG      60
GAGAAGATTA TCTTCCGATA CTGTGCTGGC AGCTGTCCCC AAGAGGTCCG TACCCAGCAC      120
AGTCTGGTGC TGGCCCGTCT TCGAGGGCAG GGTCGAGCTC ATGGCAGACC TTGCTGCCAG      180
CCCACCAGCT ATGCTGATGT GACCTTCCTT GATGACCACC ACCATTGGCA GCAGCTGCCT      240
CAGCTCTCAG CCGCAGCTTG TGGCTGT                                           267
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:86:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 273 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:86:

```
TGCCGGCTGT GGAGCCTGAC CCTACCAGTG GCTGAGCTTG GCCTGGGCTA TGCCTCAGAG      60
GAGAAGATTA TCTTCCGATA CTGTGCTGGC AGCTGTCCCC AAGAGGTCCG TACCCAGCAC      120
```

AGTCTGGTGC TGGCCCGTCT TCGAGGGCAG GGTGAGCTC ATGGCAGACC TTGCTGCCAG 180
 CCCACCAGCT ATGCTGATGT GACCTTCCTT GATGACCACC ACCATTGGCA GCAGCTGCCT 240
 CAGCTCTCAG CCGCAGCTTG TGGCTGTGGT GGC 273

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:87:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 94 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:87:

Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys
 20 25 30
 Glu Ser Ala Glu Thr Met Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg
 35 40 45
 Ser Arg Arg Leu Thr Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro
 50 55 60
 Val Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
 65 70 75 80
 His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:88:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 95 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:88:

Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Thr Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys
 20 25 30
 Glu Ala Ala Ile Arg Ile Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln
 35 40 45
 Arg Arg Arg Val Arg Arg Glu Arg Ala Arg Ala His Pro Cys Cys Arg
 50 55 60

Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Val His Ser Arg
 65 70 75 80

Tyr His Thr Leu Gln Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys Val
 85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:89:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 91 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:89:

Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15

Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30

Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg
 35 40 45

Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr
 50 55 60

Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu Pro
 65 70 75 80

Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:90:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:90:

TGCCTCAGAG GAGAAGATTA TC

22

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:91:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:91:

Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:92:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:92:

Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:93:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:93:

Leu Gly Leu Gly Tyr Thr Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:94:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:94:

Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr Cys
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:95:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:95:

AGTCGGGGTT GGGGTATGCC TCA

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:96:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:96:

TATGCCTCAG AGGAGAAGAT TATCTT

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:97:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:97:

CCTCAGAGGA GAAGATTATC TTCCGATACT GTGCTGGCAG CTGTCCCCAA GAGGTCCGTA 60

CCCAGCACAG TCTGGTGCTG GCCCGTCTTC GAGGGCAGGG TCGAGCTCAT GGCAGACCTT 120

GCTGCCAGCC CACCAGCTAT GCTGATGTGA CCTTCCTTGA TGACCACCAC CATTGGCAGC 180

AGCTGCCTCA GCTCTCAGCC GCAGCTTGTG GCTGTGGTGG CTGAAGGCGG CCAGCCTGGT 240

CTCTCAGAAT CACAAGCAAG AGGCAGCCTT TGAAAGGCTC AGGTGACGTT ATTAGAAACT 300

TGCATAGGAG AAGATTAAGA AGAGAAAGGG GACCTG 336

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:98:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 17 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:98:

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

Asp

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:99:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:99:

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

Val

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:100:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:100:

Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:101:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:101:

TCATCAAGGA AGGTCACATC AGCATA

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:102:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:102:

CCACCACAGC CACAAGCTGC GGSTGAGAGC TG

32

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:103:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:103:

Ala Leu Ala Gly Ser
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:104:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 43 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:104:

Val Arg Ile Pro Gly Gly Leu Pro Thr Pro Gln Phe Leu Leu Ser Lys
 1 5 10 15

Pro Ser Leu Cys Leu Thr Ile Leu Leu Tyr Leu Ala Leu Gly Asn Asn
 20 25 30

His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu Ala Gly Ser
 35 40

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:105:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 544 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:105:

```

GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTCCTGGGG GCCTCCCGAC TCCCCAATTC      60
CTTCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTTACA ATCCTACTCT ACCTTGCACT AGGTAACAAC      120
CATGTCCGTC TICCAGAGC CTTGGCTGGT TCATGCCGAC TGTGGAGCCT GACCCTACCA      180
GTGGCTGAGC TGGGCCTGGG CTATGCCTCG GAGGAGAAGG TCATCTTCCG AACTGTGCT      240
GGCAGCTGTC CCCAAGAGGC CCGTACCCAG CACAGTCTGG TACTGGCCCG GCTTCGAGGG      300
CGGGGTCGAG CCCATGGCCG ACCCTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA TGTGACCTTC      360
CTTGATGATC ACCACCATTG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCTGCAGC TTGTGGCTGT      420
GGTGGCTGAA GCAGGCCAGT CTGGTGTCTC AGAATCACAA GCATGAGACA GGCTGGGCTT      480
TGAAAGGCTC AGGTGACATT ACTAGAAATT TGCATAGGTA AAGATAAGAA GGGAAAGGAC      540
CAGG                                                                    544

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:106:

```

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
    (A) LÄNGE: 336 Basenpaare
    (B) TYP: Nukleinsäure
    (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
    (D) TOPOLOGIE: linear

```

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:106:

```

CCTCAGAGGA GAAGATTATC TTCCGATACT GTGCTGGCAG CTGTCCCCAA GAGGTCCGTA      60
CCCAGCACAG TCTGGTGCTG GCCCGTCTTC GAGGGCAGGG TCGAGCTCAT GGCAGACCTT      120
GCTGCCAGCC CACCAGCTAT GCTGATGTGA CCTTCCTTGA TGACCACCAC CATTGGCAGC      180
AGCTGCCTCA GCTCTCAGCC GCAGCTTGTG GCTGTGGTGG CTGAAGGCGG CCAGCCTGGT      240
CTCTCAGAAT CACAAGCAAG AGGCAGCCTT TGAAAGGCTC AGGTGACGTT ATTAGAAACT      300
TGCATAGGAG AAGATTAAGA AGAGAAAGGG GACCTG                                336

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:107:

```

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
    (A) LÄNGE: 391 Basenpaare
    (B) TYP: Nukleinsäure
    (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
    (D) TOPOLOGIE: linear

```

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:107:

```
TGCCGGCTGT GGAGCCTGAC CCTACCACTG GCTGAGCTTG GCCTGGGCTA TGCCTCAGAG      60
GAGAAGATTA TCTTCCGATA CTGTGCTGGC AGCTGTCCCC AAGAGGTCCG TACCCAGCAC      120
AGTCTGGTGC TGGCCCGTCT TCGAGGGCAG GGTCGAGCTC ATGGCAGACC TTGCTGCCAG      180
CCCACCAGCT ATGCTGATGT GACCTTCCTT GATGACCACC ACCATTGGCA GCAGCTGCCT      240
CAGCTCTCAG CCGCAGCTTG TGGCTGTGGT GGCTGAAGGC GGCCAGCCTG GTCTCTCAGA      300
ATCACAAGCA AGAGGCAGCC TTTGAAAGGC TCAGGTGACG TTATTAGAAA CTTGCATAGG      360
AGAAGATTAA GAAGAGAAAG GGGACCTGAT T                                391
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:108:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN, THREONIN, ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 3
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER

ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:108:

```
Val Xaa Xaa Leu Gly Leu Gly Tyr
1          5
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:109:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 5
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 7
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:109:

Phe Arg Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:110:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
(B) ORT: 2
(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE, GLUTAMINSÄURE
ODER KEINE AMINOSÄURE"

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
(B) ORT: 3
(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
(B) ORT: 4
(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER THREONIN"

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
(B) ORT: 8
(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:110:

Asp Xaa Xaa Xaa Phe Leu Asp Xaa
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:111:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 142 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:111:

Glu Gly Pro Gly Arg Pro Ile Arg Val Arg Ile Pro Gly Gly Leu Pro
1 5 10 15

Thr Pro Gln Phe Leu Leu Ser Lys Pro Ser Leu Cys Leu Thr Ile Leu
20 25 30

Leu Tyr Leu Ala Leu Gly Asn Asn His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu

35	40	45
Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu		
50	55	60
Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala		
65	70	75
Gly Ser Cys Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala		
	85	90
Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro		
	100	105
Thr Ser Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln		
	115	120
Gln Leu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly		
	130	135
		140

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:112:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:112:

Ala Leu Pro Gly Leu
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:113:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN, GLUTAMINSÄURE ODER

LYSIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 3
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN, LEUCIN ODER ISOLEUCIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 4
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "LEUCIN ODER ISOLEUCIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 9
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 11
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:113:

Glu Xaa Xaa Xaa Phe Arg Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys
 1 5 10

- (2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:114:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: Protein

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 3
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ARGININ ODER GLUTAMIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 5
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN, VALIN ODER

ISOLEUCIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 6
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ALANIN ODER SERIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 7
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "TYROSIN ODER PHENYLALANIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 8
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE, ASPARAGINSÄURE

ODER ALANIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 10
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE, ASPARAGINSÄURE

ODER KEINE AMINOSÄURE"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 11
 - (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 - (B) ORT: 12

(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER THREONIN"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) ORT: 16

(D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE ODER VALIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:114:

Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Phe Leu Asp Xaa
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:115:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:115:

GTNDGNGANY TGGGNYTGGG NTA

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:116:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:116:

GANBTNWCNT TYYTNGANG

19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:117:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:117:

GANBTNWCNT TYYTNGANGW

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:118:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:118:

TTYMGNTAYT GYDSNGGND S NTG

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:119:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:119:

GTNDGNGANY TGGGNYTNGG

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:120:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:120:

GTNDGNGANY TGGGNYTGGG NTT

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:121:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:121:

WCNTCNARRA ANGWNAVNTC

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:122:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:122:

WCNTCNARRA ANGWNAVNT

19

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:123:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:123:

CANSHNCCNS HRCARTANCK RAA

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:124:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:124:

CANSHNCCNS HRCARTANCK RAANA

25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:125:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 2
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN, SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 3
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:125:

Val Xaa Xaa Leu Gly Leu Gly Tyr
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:126:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 1
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE ODER GLUTAMINSÄURE"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 2
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "VALIN ODER LEUCIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 3
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN ODER SERIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 6
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE ODER GLUTAMINSÄURE"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 7
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE ODER VALIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:126:

Xaa Xaa Xaa Phe Leu Xaa Xaa
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:127:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 5
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 7
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:127:

Phe Arg Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:128:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 2
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN, SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 3
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ASPARAGINSÄURE ODER
 GLUTAMINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:128:

Val Xaa Xaa Leu Gly Leu Gly
 1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:129:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 2
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "THREONIN, SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
 (B) ORT: 3
 (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "GLUTAMINSÄURE ODER
 ASPARAGINSÄURE"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:129:

Val Xaa Xaa Leu Gly Leu Gly Phe
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:130:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 1
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "ISOLEUCIN ODER LEUCIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 6
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle
- (B) ORT: 8
- (D) WEITERE INFORMATION: /Note= "SERIN ODER ALANIN"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:130:

Xaa Phe Arg Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:131:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 559 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:131:

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCTTGCA CCCGAGCCTC	60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAAGATG	120
GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTCCTGGGG GCCTCCCGAC	180
TCCCCAATTC CTTCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTTACA ATCCTACTCT ACCTTGCACT	240
AGGTAACAAC CATGTCCGTC TTCCAAGAGC CTTGGCTGGT TCATGCCGAC TGTGGAGCCT	300
GACCCTACCA GTGGCTGAGC TGGGCCTGGG CTATGCCTCG GAGGAGAAGG TCATCTCCG	360
ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGC CCGTACCCAG CACAGTCTGG TACTGGCCCG	420

GCTTCGAGGG CGGGGTCGAG CCCATGGCCG ACCCTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA 480
 TGTGACCTTC CTTGATGATC AGCACCATTG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCTGCAGC 540
 TTGTGGCTGT GGTGGCTGA 559

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:132:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:132:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:133:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 185 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: single
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:133:

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

Leu Ser Lys Pro Ser Leu Cys Leu Thr Ile Leu Leu Tyr Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 Gly Asn Asn His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu Ala Gly Ser Cys Arg
 85 90 95
 Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala
 100 105 110
 Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys Pro Gln
 115 120 125
 Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg Gly Arg
 130 135 140
 Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp
 145 150 155 160
 Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu Pro Gln Leu
 165 170 175
 Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 180 185

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:134:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 559 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:134:

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTT CTGCTGCTCC TGTCCTTGCA CCTGGGCCTT	60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAAATG	120
GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTCTTGGGG GCCTCCTAAC	180
TCTACAGTTC TTCCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTCACA ATCCTATTCT ACCTTGCACT	240
AGGTAACAAC AATGTCCGCC TTCCAAGAGC CTTACCTGGT TTGTGCCGGC TGTGGAGCCT	300
GACCCTACCA GTGGCTGAGC TTGGCCTGGG CTATGCCTCA GAGGAGAAGA TTATCTCCG	360
ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGT CCGTACCCAG CACAGTCTGG TGCTGGCCCG	420
TCTTCGAGGG CAGGGTCGAG CTCATGGCAG ACCTTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA	480
TGTGACCTTC CTTGATGACC ACCACCATG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCCGCAGC	540
TTGTGGCTGT GGTGGCTGA	559

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:135:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 81 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:135:

Met Ala Ala Gly Arg Leu Arg Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

His Leu Gly Leu Gly Trp Val Leu Asp Leu Gln Glu Ala Pro Ala Ala
 20 25 30

Asp Glu Leu Ser Ser Gly Lys Met Ala Glu Thr Gly Arg Thr Trp Lys
 35 40 45

Pro His Gln Gly Lys Asn Ser Trp Gly Pro Pro Asn Ser Thr Val Leu
 50 55 60

Pro Leu Lys Ala Leu Thr Leu Pro His Asn Pro Ile Leu Pro Cys Thr
 65 70 75 80

Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:136:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 185 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:136:

Trp Leu Gln Glu Asp Phe Gly Ser Cys Phe Cys Cys Ser Cys Pro Cys
 1 5 10 15

Thr Trp Ala Leu Ala Gly Ser Leu Ile Phe Lys Arg Leu Leu Arg Gln
 20 25 30

Met Ser Ser His Leu Gly Lys Trp Gln Arg Leu Glu Gly Pro Gly Ser
 35 40 45

Pro Ile Arg Val Arg Ile Leu Gly Gly Leu Leu Thr Leu Gln Phe Phe
 50 55 60

Leu Ser Lys Pro Ser Leu Cys Leu Thr Ile Leu Phe Tyr Leu Ala Leu
 65 70 75 80

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

Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala
 100 105 110

Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys Pro Gln
 115 120 125

Glu Val Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu Arg Gly Gln
 130 135 140

Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp
 145 150 155 160

Val Thr Phe Leu Asp Asp His His His Trp Gln Gln Leu Pro Gln Leu
 165 170 175

Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 180 185

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:137:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:137:

AATCCCAGG ACAGGCAGGG AAT

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:138:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:138:

CGGTACCCAG ATCTTCAGCC ACCACAGCCA CAAGC

35

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:139:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 76 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:139:

GGACTATCAT ATGGCCCACC ACCACCACCA CCACCACCAC GACGACGACG ACAAGGCCTT

60

GGCTGGTTCA TGCCGA

76

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:140:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:140:

CGGTACCCAG ATCTTCAGCC ACCACAGCCA CAAGC

35

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:141:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:141:

Ala Leu Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala
1 5 10 15

Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr
20 25 30

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

Leu Ala Arg Leu Arg Gly Arg Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys
50 55 60

Arg Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Val His Ser
65 70 75 80

Arg Tyr His Thr Leu Gln Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys Val
85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:142:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:142:

TAATACGACT CACTATAGGG GAA

23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:143:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 49 Basenpaare

- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:143:

TCGTCTTCGT AAGCAGTCGG ACGGCAGCAG GGTCGGCCAT GGGCTCGAC

49

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:144:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:144:

TGCTGCCGTC CGACTGCTTA CGAAGACGA

29

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:145:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:145:

GTTATGCTAG TTATTGCTCA GCGGT

25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:146:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 100 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:146:

Pro	Gly	Ala	Arg	Pro	Cys	Gly	Leu	Arg	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Val	Ser
1				5				10					15		
Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Asp	Glu	Thr	Val	Leu	Phe	Arg	Tyr
		20					25						30		

Cys Ala Gly Ala Cys Glu Ala Ala Ile Arg Ile Tyr Asp Leu Gly Leu
 35 40 45
 Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg Arg Val Arg Arg Glu Arg Ala Arg Ala
 50 55 60
 His Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp
 65 70 75 80
 Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys
 85 90 95
 Gly Cys Gly Gly
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:147:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 50 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:147:

CACATCAGCA TAGCTGGTGG GCTGGCAGCA CGGGTGAGCA CGAGCACGTT 50

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:148:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:148:

TGCTGCCAGC CCACCAGCTA TGCTG 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:149:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: andere Nukleinsäure

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:149:

CCTCGGAGGA GAAGTCATC TTC 23

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:150:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 98 Aminosäure
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:150:

Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp
 1 5 10 15
 Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly
 20 25 30
 Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu
 35 40 45
 Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys
 50 55 60
 Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg
 65 70 75 80
 Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys
 85 90 95
 Cys Ser

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:151:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 98 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:151:

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

Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys
 85 90 95

Cys Ser

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:152:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 98 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:152:

Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp
 1 5 10 15

Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly
 20 25 30

Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu
 35 40 45

Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys
 50 55 60

Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg
 65 70 75 80

Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys
 85 90 95

Cys Ser

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:153:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 106 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:153:

Cys Cys Lys Lys Gln Phe Phe Val Ser Phe Lys Asp Ile Gly Trp Asn
 1 5 10 15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Ser Gly Tyr His Ala Asn Tyr Cys Glu Gly
 20 25 30

Glu Cys Pro Ser His Ile Ala Gly Thr Ser Gly Ser Ser Leu Ser Phe
 35 40 45

His Ser Thr Val Ile Asn His Tyr Arg Met Arg Gly His Ser Pro Phe
 50 55 60

Ala Asn Leu Lys Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Arg Pro Met Ser
 65 70 75 80

Met Leu Tyr Tyr Asp Asp Gly Gln Asn Ile Ile Lys Lys Asp Ile Gln
 85 90 95

Asn Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ser
 100 105

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:154:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 105 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:154:

Cys Cys Arg Gln Gln Phe Phe Ile Asp Phe Arg Leu Ile Gly Trp Asn
 1 5 10 15

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

Ser Cys Pro Ala Tyr Leu Ala Gly Val Pro Gly Ser Ala Ser Ser Phe
 35 40 45

His Thr Ala Val Val Asn Gln Tyr Arg Met Arg Gly Leu Asn Pro Gly
 50 55 60

Thr Val Asn Ser Cys Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Thr Met Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Phe Asp Asp Glu Tyr Asn Ile Val Lys Arg Asp Val Pro Asn
 85 90 95

Met Ile Val Glu Glu Cys Gly Cys Ala
 100 105

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:155:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 101 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:155:

Cys Arg Arg Val Lys Phe Gln Val Asp Phe Asn Leu Ile Gly Trp Gly
 1 5 10 15


```

Ser Trp Ile Ile Tyr Pro Lys Gln Tyr Asn Ala Tyr Arg Cys Glu Gly
      20                      25                      30
Glu Cys Pro Asn Pro Val Gly Glu Glu Phe His Pro Thr Asn His Ala
      35                      40                      45
Tyr Ile Gln Ser Leu Leu Lys Arg Tyr Gln Pro His Arg Val Pro Ser
      50                      55                      60
Thr Cys Cys Ala Pro Val Lys Thr Lys Pro Leu Ser Met Leu Tyr Val
      65                      70                      75                      80
Asp Asn Gly Arg Val Leu Leu Glu His His Lys Asp Met Ile Val Glu
      85                      90                      95
Glu Cys Gly Cys Leu
      100

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:156:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 101 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:156:

```

Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn
1                      5                      10                      15
Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly
      20                      25                      30
Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala
      35                      40                      45
Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala
      50                      55                      60
Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp
      65                      70                      75                      80
Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu
      85                      90                      95
Gly Cys Gly Cys Arg
      100

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:157:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 101 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:157:

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly
 20 25 30
 Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala
 50 55 60
 Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp
 65 70 75 80
 Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu
 85 90 95
 Gly Cys Gly Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:158:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:158:

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asp
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asp Ala Tyr Tyr Cys His Gly
 20 25 30
 Lys Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Phe Asn Ser Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Val Val Gln Thr Leu Val Asn Asn Met Asn Pro Gly Lys Val Pro Lys
 50 55 60
 Ala Cys Cys Val Pro Thr Gln Leu Asp Ser Val Ala Met Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asn Asp Gln Ser Thr Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Thr Val
 85 90 95
 Val Gly Cys Gly Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:159:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:159:

Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Arg Ser Cys Gly Cys His
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:160:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:160:

Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Arg Ala Cys Gly Cys His
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:161:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:161:

Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	1	5	10	15
Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	20	25	30	
Glu	Cys	Ala	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	35	40	45	
Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	Pro	Lys	50	55	60	
Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	65	70	75	80
Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	85	90	95	
Arg	Ala	Cys	Gly	Cys	His	100													

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:162:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:162:

Cys	Arg	Arg	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Leu	1	5	10	15
Asp	Trp	Val	Ile	Ala	Pro	Gln	Gly	Tyr	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	20	25	30	
Glu	Cys	Ser	Phe	Pro	Leu	Asp	Ser	Cys	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	35	40	45	
Ile	Leu	Gln	Ser	Leu	Val	His	Leu	Met	Lys	Pro	Asn	Ala	Val	Pro	Lys	50	55	60	
Ala	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Thr	Ser	Val	Leu	Tyr	Tyr	65	70	75	80
Asp	Ser	Ser	Asn	Asn	Val	Ile	Leu	Arg	Lys	His	Arg	Asn	Met	Val	Val	85	90	95	

Lys Ala Cys Gly Cys His
100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:163:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:163:

Cys	Gln	Met	Gln	Thr	Leu	Tyr	Ile	Asp	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Trp	His
1				5					10					15	
Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Cys	Ser	Gly
			20					25					30		
Glu	Cys	Asn	Phe	Pro	Leu	Asn	Ala	His	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala
		35					40					45			
Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His	Leu	Leu	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Pro	Lys
	50					55					60				
Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Pro	Val	Leu	Tyr	His
65					70					75					80
Leu	Asn	Asp	Glu	Asn	Val	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Ile	Val
				85					90					95	
Lys	Ser	Cys	Gly	Cys	His										
				100											

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:164:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 103 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:164:

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

Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu Phe
 65 70 75 80
 Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met Thr
 85 90 95
 Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:165:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:165:

Cys Lys Lys Arg His Leu Tyr Val Glu Phe Lys Asp Val Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asn Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Met Ala Asn Tyr Cys Tyr Gly
 20 25 30
 Glu Cys Pro Tyr Pro Leu Thr Glu Ile Leu Asn Gly Ser Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Leu Gln Thr Leu Val His Ser Ile Glu Pro Glu Asp Ile Pro Leu
 50 55 60
 Pro Cys Cys Val Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Ser Met Leu Phe Tyr
 65 70 75 80
 Asp Asn Asn Asp Asn Val Val Leu Arg His Tyr Glu Asn Met Ala Val
 85 90 95
 Asp Glu Cys Gly Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:166:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 106 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:166:

Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His
 1 5 10 15
 Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly
 20 25 30

Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala
 35 40 45

Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly
 50 55 60

Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser
 65 70 75 80

Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu
 85 90 95

Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:167:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 101 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:167:

Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His
 1 5 10 15

Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly
 20 25 30

Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala
 35 40 45

Phe Met Gln Ala Leu Met His Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala
 50 55 60

Val Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp
 65 70 75 80

Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp
 85 90 95

Glu Cys Gly Cys Gly
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:168:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 103 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:168:

Cys Arg Arg Thr Ser Leu His Val Asn Phe Lys Glu Ile Gly Trp Asp
 1 5 10 15
 Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Asp Tyr Glu Ala Phe Glu Cys Lys Gly
 20 25 30
 Gly Cys Phe Phe Pro Leu Thr Asp Asn Val Thr Pro Thr Lys His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Gln Asn Pro Lys Lys Ala Ser Lys
 50 55 60
 Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Asp Ala Ile Ser Ile Leu Tyr Lys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Gly Val Pro Thr Leu Ile Tyr Asn Tyr Glu Gly Met Lys
 85 90 95
 Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:169:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 105 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:169:

Cys His Arg Val Ala Leu Asn Ile Ser Phe Gln Glu Leu Gly Trp Glu
 1 5 10 15
 Arg Trp Ile Val Tyr Pro Pro Ser Phe Ile Phe His Tyr Cys His Gly
 20 25 30
 Gly Cys Gly Leu His Ile Pro Pro Asn Leu Ser Leu Pro Val Pro Gly
 35 40 45
 Ala Pro Pro Thr Pro Ala Gln Pro Tyr Ser Leu Leu Pro Gly Ala Gln
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Ala Leu Pro Gly Thr Met Arg Pro Leu His Val Arg
 65 70 75 80
 Thr Thr Ser Asp Gly Gly Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Thr Val Pro Asn
 85 90 95
 Leu Leu Thr Gln His Cys Ala Cys Ile
 100 105

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:170:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 99 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:170:

Cys Ala Leu Arg Glu Leu Ser Val Asp Leu Arg Ala Glu Arg Ser Val
 1 5 10 15
 Leu Ile Pro Glu Thr Tyr Gln Ala Asn Asn Cys Gln Gly Ala Cys Gly
 20 25 30
 Trp Pro Gln Ser Asp Arg Asn Pro Arg Tyr Gly Asn His Val Val Leu
 35 40 45
 Leu Leu Lys Met Gln Ala Arg Gly Ala Thr Leu Ala Arg Pro Pro Cys
 50 55 60
 Cys Val Pro Thr Ala Tyr Thr Gly Lys Leu Leu Ile Ser Leu Ser Glu
 65 70 75 80
 Glu Arg Ile Ser Ala His His Val Pro Asn Met Val Ala Thr Glu Cys
 85 90 95
 Gly Cys Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:171:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 102 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:171:

Cys Glu Leu His Asp Phe Ser Leu Ser Phe Ser Gln Leu Lys Trp Asp
 1 5 10 15
 Asn Trp Ile Val Ala Pro His Ser Tyr Asn Pro Ser Tyr Cys Lys Gly
 20 25 30
 Asp Cys Pro Ser Ala Val Ser His Arg Tyr Gly Ser Pro Val His Thr
 35 40 45
 Met Val Gln Asn Met Ile Tyr Glu Lys Leu Asp Pro Ser Val Pro Ser
 50 55 60
 Pro Ser Cys Val Pro Gly Lys Tyr Ser Pro Leu Ser Val Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Glu Pro Asp Gly Ser Ile Ala Tyr Lys Glu Tyr Glu Asp Met Met Ala
 85 90 95
 Thr Ser Cys Thr Cys Arg
 100

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:172:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 94 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:172:

Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr Cys Ser Gly Ser Cys
 20 25 30
 Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg
 35 40 45
 Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln Ala Cys Cys Arg Pro
 50 55 60
 Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
 65 70 75 80
 His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys Gly Cys Ile
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:173:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 95 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:173:

Cys Gly Leu Arg Glu Leu Glu Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Asp Glu Thr Val Leu Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ala Cys
 20 25 30
 Glu Ala Ala Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln
 35 40 45
 Arg Arg Arg Leu Arg Arg Glu Arg Val Arg Ala Gln Pro Cys Cys Arg
 50 55 60
 Pro Thr Ala Tyr Glu Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Ala His Ser Arg
 65 70 75 80
 Tyr His Thr Val His Glu Leu Ser Ala Arg Glu Cys Ala Cys Val
 85 90 95

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:174:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 291 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:174:

```

GCCTTGGCTG GTTCATGCCG ACTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTGGGCCTG      60
GGCTATGCCT CGGAGGAGAA GGTATCTTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG      120
GCCCCGTACCC AGCACAGTCT GGTACTGGCC CGGCTTCGAG GGCGGGGTCG AGCCCATGGC      180
CGACCCTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA TCAGCACCAT      240
TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCTGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A                291

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:175:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 405 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:175:

```

GTAAGAATTC CTGGGGGCCT CCCGACTCCC CAATTCCTTC TCTCAAAGCC CTCACCTTGC      60
CTTACAATCC TACTCTACCT TGCACTAGGT AACAAACCATG TCCGTCTTCC AAGAGCCTTG      120
GCTGGTTCAT GCCGACTGTG GAGCCTGACC CTACCACTGG CTGAGCTGGG CCTGGGCTAT      180
GCCTCGGAGG AGAAGGTCAT CTTCCGATAC TGTGCTGGCA GCTGTCCCCA AGAGGCCCGT      240
ACCCAGCACA GTCTGGTACT GGCCCGGCTT CGAGGGCGGG GTCGAGCCCA TGGCCGACCC      300
TGCTGCCAGC CCACCAGCTA TGCTGATGTG ACCTTCCTTG ATGATCAGCA CCATTGGCAG      360
CAGCTGCCTC AGCTCTCAGC TGCAGCTTGT GGCTGTGGTG GCTGA                      405

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:176:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 291 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:176:

```

GCCTTACCTG GTTGTGCCG GCTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTTGGCCTG      60
GGCTATGCCT CAGAGGAGAA GATTATCTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG      120

```

GTCCGTACCC AGCACAGTCT GGTGCTGGCC CGTCTTCGAG GGCAGGGTCG AGCTCATGGC 180
 AGACCTTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA CCACCACCAT 240
 TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCCGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A 291

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:177:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 723 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:177:

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCTTGCA CCCGAGCCTC 60
 GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAAGATG 120
 GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTCCTGGGG GCCTCCCGAC 180
 TCCCCAATTC CTTCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTTACA ATCCTACTCT ACCTTGCACT 240
 AGGTAACAAC CATGTCCGTC TTCCAAGAGC CTTGGCTGGT TCATGCCGAC TGTGGAGCCT 300
 GACCTACCA GTGGCTGAGC TGGGCCTGGG CTATGCCTCG GAGGAGAAGG TCATCTTCCG 360
 ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGC CCGTACCCAG CACAGTCTGG TACTGGCCCCG 420
 GCTTCGAGGG CGGGGTCGAG CCCATGGCCG ACCCTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA 480
 TGTGACCTTC CTTGATGATC AGCACCATTG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCTGCAGC 540
 TTGTGGCTGT GGTGGCTGAA GGAGGCCAGT CTGGTGTCTC AGAATCACAA GCATGAGACA 600
 GGCTGGGCTT TGAAAGGCTC AGGTGACATT ACTAGAAATT TGCATAGGTA AAGATAAGAA 660
 GGGAAAGGAC CAGGGGTTTT TTGTTTCTTT CTTTGCTTGC TTGTTAGTTT TTTTTTTTTT 720
 TTT 723

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:178:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 723 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:178:

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGGACACA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGGCTCGGAG 60
 CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAAGA CACCGTCTAT TCGAGAGTAA ACCCTTCTAC 120
 CGTCTCTGAT CTCCCTGGAC CTGCGGGGTA GTCCCATTTCT TAAGGACCCC CGGAGGGCTG 180

DE 698 33 211 T2 2006.09.21

AGGGGTAAAG GAAGAGAGTT TCGGGAGTGA AACGGAATGT TAGGATGAGA TGGAACGTGA	240
TCCATTGTTG GTACAGGCAG AAGGTTCTCG GAACCGACCA AGTACGGCTG ACACCTCGGA	300
CTGGGATGGT CACCGACTCG ACCCGGACCC GATACGGAGC CTCCTCTTCC AGTAGAAGGC	360
TATGACACGA CCGTCGACAG GGGTTCTCCG GGCATGGGTC GTGTCAGACC ATGACCGGGC	420
CGAAGCTCCC GCCCCAGCTC GGGTACCGGC TGGGACGACG GTCGGGTGGT CGATACGACT	480
ACACTGGAAG GAACTACTAG TCGTGGTAAC CGTCGTCGAC GGAGTCGAGA GTCGACGTCG	540
AACACCGACA CCACCGACTT CCTCCGGTCA GACCACAGAG TCTTAGTGTT CGTACTCTGT	600
CCGACCCGAA ACTTTCCGAG TCCACTGTAA TGATCTTTAA ACGTATCCAT TTCTATTCTT	660
CCCTTTCCTG GTCCCCAAAA AACAAAGAAA GAAACGAACG AACAATCAAA AAAAAAAAAA	720
AAA	723

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:179:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:179:

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCTTGCA CCCGAGCCTC	60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAAGATG	120
GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAACA ACCATGTCCG TCTTCCAAGA	180
GCCTTGGCTG GTTCATGCCG ACTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTGGGCCTG	240
GGCTATGCCT CGGAGGAGAA GGTCACTTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG	300
GGCCGTACCC AGCACAGTCT GGTACTGGCC CGGCTTCGAG GGCGGGGTCG AGCCCATGGC	360
CGACCCTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA TCAGCACCAT	420
TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCTGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A	471

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:180:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:180:

```

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGGACACA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGGCTCGGAG      60
CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAAGA CACCGTCTAT TCGAGAGTAA ACCCTTCTAC      120
CGTCTCTGAT CTCCCTGGAC CTGCGGGGTA GTCCCATTTG TGGTACAGGC AGAAGGTTCT      180
CGGAACCGAC CAAGTACGGC TGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGACCCGGAC      240
CCGATACGGA GCCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCTC      300
CGGGCATGGG TCGTGTGAGA CCATGACCGG GCCGAAGCTC CCGCCCCAGC TCGGGTACCG      360
GCTGGGACGA CGGTCGGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT AGTCGTGGTA      420
ACCGTCGTCG ACGGAGTCGA GAGTCGACGT CGAACACCGA CACCACCGAC T              471

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:181:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:181:

```

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCTTGCA CCCGAGCCTC      60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAAGATG      120
GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAACA ACCATGTCCG TCTTCCAAGA      180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:182:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:182:

```

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGGACACA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGGCTCGGAG      60
CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAAGA CACCGTCTAT TCGAGAGTAA ACCCTTCTAC      120
CGTCTCTGAT CTCCCTGGAC CTGCGGGGTA GTCCCATTTG TGGTACAGGC AGAAGGTTCT      180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:183:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:183:

```

GCCTTGGCTG GTTCATGCCG ACTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTGGGCCTG      60
GGCTATGCCT CGGAGGAGAA GGTCATCTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG      120
GCCCCGTACCC AGCACAGTCT GGTACTGGCC CGGCTTCGAG GGCGGGGTCG AGCCCATGGC      180
CGACCCTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA TCAGCACCAT      240
TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCTGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A                291

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:184:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:184:

```

CGGAACCGAC CAAGTACGGC TGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGACCCGGAC      60
CCGATACGGA GCCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCCTC      120
CGGGCATGGG TCGTGTGAGA CCATGACCGG GCCGAAGCTC CCGCCCCAGC TCGGGTACCG      180
GCTGGGACGA CGGTCGGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT AGTCGTGGTA      240
ACCGTCGTCG ACGGAGTCGA GAGTCGACGT CGAACACCGA CACCACCGAC T                291

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:185:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:185:

```

Met Ala Ala Gly Arg Leu Arg Ile Leu Cys Leu Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15

His Pro Ser Leu Gly Trp Val Leu Asp Leu Gln Glu Ala Ser Val Ala
20          25          30

Asp Lys Leu Ser Phe Gly Lys Met Ala Glu Thr Arg Gly Thr Trp Thr
35          40          45

```

```

Pro His Gln Gly Asn Asn His Val Arg Leu Pro Arg Ala Leu Ala Gly
 50                      55                      60

Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu
65                      70                      75                      80

Gly Tyr Ala Ser Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser
                      85                      90                      95

Cys Pro Gln Glu Ala Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu
                      100                      105                      110

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

Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp Gln His His Trp Gln Gln Leu
130                      135                      140

Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
145                      150                      155

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:186:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 60 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:186:

```

Met Ala Ala Gly Arg Leu Arg Ile Leu Cys Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1                      5                      10                      15

His Pro Ser Leu Gly Trp Val Leu Asp Leu Gln Glu Ala Ser Val Ala
                20                      25                      30

Asp Lys Leu Ser Phe Gly Lys Met Ala Glu Thr Arg Gly Thr Trp Thr
35                      40                      45

Pro His Gln Gly Asn Asn His Val Arg Leu Pro Arg
50                      55                      60

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:187:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:187:

```

Ala Leu Ala Gly Ser Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala
 1                      5                      10                      15

```


DE 698 33 211 T2 2006.09.21

Glu	Leu	Gly	Leu	Gly	Tyr	Ala	Ser	Glu	Glu	Lys	Val	Ile	Phe	Arg	Tyr
		20						25					30		
Cys	Ala	Gly	Ser	Cys	Pro	Gln	Glu	Ala	Arg	Thr	Gln	His	Ser	Leu	Val
		35					40					45			
Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Ala	His	Gly	Arg	Pro	Cys	Cys
	50				55						60				
Gln	Pro	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Val	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Gln	His	His
65					70					75				80	
Trp	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Ser	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys	Gly	Gly	
			85					90					95		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:188:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 559 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:188:

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTT CTGCTGCTCC TGTCCCTTGCA CCTGGGCCTT	60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAAATG	120
GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTCTTGGGG GCCTCCTAAC	180
TCTACAGTTC TTCCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTCACA ATCCTATTCT ACCTTGCACT	240
AGGTAACAAC AATGTCCGCC TTCCAAGAGC CTTACCTGGT TTGTGCCGGC TGTGGAGCCT	300
GACCCACCA GTGGCTGAGC TTGGCCTGGG CTATGCCTCA GAGGAGAAGA TTATCTTCCG	360
ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGT CCGTACCCAG CACAGTCTGG TGCTGGCCCG	420
TCTTCGAGGG CAGGGTCGAG CTCATGGCAG ACCTTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA	480
TGTGACCTTC CTTGATGACC ACCACCATTG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCCGCAGC	540
TTGTGGCTGT GGTGGCTGA	559

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:189:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 559 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:189:

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGAACAAA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGACCCGGAA	60
---	----

DE 698 33 211 T2 2006.09.21

```

CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAGGA CGCCGTCTAC TCGAGAGTAG ACCCTTTTAC 120
CGTCTCTGAC CTTCTGGAC CTTGCGGGTA GTCCCATTTCT TAAGAACCCC CGGAGGATTG 180
AGATGTCAAG AAGGAGAGTT TCGGGAGTGA AACGGAGTGT TAGGATAAGA TGGAACGTGA 240
TCCATTGTTG TTACAGGCGG AAGGTTCTCG GAATGGACCA AACACGGCCG ACACCTCGGA 300
CTGGGATGGT CACCGACTCG AACCGGACCC GATACGGAGT CTCCTCTTCT AATAGAAGGC 360
TATGACACGA CCGTCGACAG GGGTTCTCCA GGCATGGGTC GTGTGAGACC ACGACCGGGC 420
AGAAGCTCCC GTCCCAGCTC GAGTACCGTC TGGAACGACG GTCGGGTGGT CGATACGACT 480
ACACTGGAAG GAACTACTGG TGGTGGTAAC CGTCGTCGAC GGAGTCGAGA GTCGGCGTCG 540
AACACCGACA CCACCGACT 559

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:190:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:190:

```

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTT CTGCTGCTCC TGTCCTTGCA CCTGGGCCTT 60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAAATG 120
GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGGGTAACA ACAATGTCCG CCTTCCAAGA 180
GCCTTACCTG GTTTGTGCCG GCTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTTGGCCTG 240
GGCTATGCCT CAGAGGAGAA GATTATCTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG 300
GTCCGTACCC AGCACAGTCT GGTGCTGGCC CGTCTTCGAG GGCAGGGTCG AGCTCATGGC 360
AGACCTTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA CCACCACCAT 420
TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCCGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A 471

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:191:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:191:

```

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGAACAAA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGACCCGGAA 60

```

```

CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAGGA CGCCGTCTAC TCGAGAGTAG ACCCTTTTAC 120
CGTCTCTGAC CTTCTGGAC CTTCTGGGTA GTCCCATTTGT TGTTACAGGC GGAAGGTTCT 180
CGGAATGGAC CAAACACGGC CGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGAACCGGAC 240
CCGATACGGA GTCTCCTCTT CTAATAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCTC 300
CAGGCATGGG TCGTGTGAGA CCACGACCGG GCAGAAGCTC CCGTCCCAGC TCGAGTACCG 360
TCTGGAACGA CGGTCTGGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT GGTGGTGGTA 420
ACCGTCGTCG ACGGAGTCGA GAGTCGGCGT CGAACACCGA CACCACCGAC T 471

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:192:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:192:

```

ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTT CTGCTGCTCC TGTCTTGCA CCTGGGCCTT 60
GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAAATG 120
GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGGGTAACA ACAATGTCCG CCTTCCAAGA 180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:193:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:193:

```

TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGAACAAA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGACCCGGAA 60
CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAGGA CGCCGTCTAC TCGAGAGTAG ACCCTTTTAC 120
CGTCTCTGAC CTTCTGGAC CTTCTGGGTA GTCCCATTTGT TGTTACAGGC GGAAGGTTCT 180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:194:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:194:

```

GCCTTACCTG GTTGTGCCG GCTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTTGGCCTG      60
GGCTATGCCT CAGAGGAGAA GATTATCTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG      120
GTCCGTACCC AGCACAGTCT GGTGCTGGCC CGTCTTCGAG GGCAGGGTCG AGCTCATGGC      180
AGACCTTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA CCACCACCAT      240
TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCCGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A                291

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:195:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:195:

```

CGGAATGGAC CAAACACGGC CGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGAACCGGAC      60
CCGATACGGA GTCTCCTCTT CTAATAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCTC      120
CAGGCATGGG TCGTGTGAGA CCACGACCGG GCAGAAGCTC CCGTCCCAGC TCGAGTACCG      180
TCTGGAACGA CGGTGCGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT GGTGGTGGTA      240
ACCGTCGTCG ACGGAGTCGA GAGTCGGCGT CGAACACCGA CACCACCGAC T                291

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:196:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:196:

```

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

```

Leu Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala Glu Leu Gly Leu
 65 70 75 80
 Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser
 85 90 95
 Cys Pro Gln Glu Val Arg Thr Gln His Ser Leu Val Leu Ala Arg Leu
 100 105 110
 Arg Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Arg Pro Cys Cys Gln Pro Thr Ser
 115 120 125
 Tyr Ala Asp Val Thr Phe Leu Asp Asp His His His Trp Gln Gln Leu
 130 135 140
 Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 145 150 155

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:197:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 60 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:197:

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

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:198:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:198:

Ala Leu Pro Gly Leu Cys Arg Leu Trp Ser Leu Thr Leu Pro Val Ala
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Ile Ile Phe Arg Tyr
 20 25 30

DE 698 33 211 T2 2006.09.21

Cys	Ala	Gly	Ser	Cys	Pro	Gln	Glu	Val	Arg	Thr	Gln	His	Ser	Leu	Val
	35					40					45				
Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Gly	Gln	Gly	Arg	Ala	His	Gly	Arg	Pro	Cys	Cys
	50				55					60					
Gln	Pro	Thr	Ser	Tyr	Ala	Asp	Val	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	His	His	His
65					70				75					80	
Trp	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Cys	Gly	Gly
			85					90						95	

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:199:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:199:

GCCCTGTCTG GTCCATGCCA GCTGTGGAGC CTGACCCTGT CCGTGGCAGA GCTAGGCCTG	60
GGCTACGCCT CAGAGGAGAA GGTCATCTTC CGCTACTGCG CCGGCAGCTG CCCCCGTGGT	120
GCCCGCACCC AGCATGGCCT GGCCTGGCC CGGCTGCAGG GCCAGGGCCG AGCCCACGGT	180
GGGCCCTGCT GCCGGCCCAC TCGCTACACC GACGTGGCCT TCCTCGATGA CCGCCACCGC	240
TGGCAGCGGC TGCCCCAGCT CTCGGCGGCT GCCTGCGGCT GTGGTGGCTG A	291

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:200:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:200:

CGGGACAGAC CAGGTACGGT CGACACCTCG GACTGGGACA GGCACCGTCT CGATCCGGAC	60
CCGATGCGGA GTCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCGATGACGC GGCCGTCGAC GGGGGCACCA	120
CGGGCGTGGG TCGTACCGGA CCGCGACCGG GCCGACGTCC CGGTCCCGGC TCGGGTGCCA	180
CCCGGGACGA CGGCCGGGTG AGCGATGTGG CTGCACCGGA AGGAGCTACT GGCGGTGGCG	240
ACCGTCGCCG ACGGGGTCGA GAGCCGCCGA CGGACGCCGA CACCACCGAC T	291

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:201:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 291 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:201:

```
GCCCTGTCTG GTCCATGCCA GCTGTGGAGC CTGACCCTGT CCGTGGCAGA GCTAGGCCTG      60
GGCTACGCCT CAGAGGAGAA GGTCATCTTC CGCTACTGCG CCGGCAGCTG CCCCCGTGGT      120
GCCCCGACCC AGCATGGCCT GCGCTGGCC CGGCTGCAGG GCCAGGGCCG AGCCCACGGC      180
GGGCCCTGCT GCCGGCCCAC TCGCTACACC GACGTGGCCT TCCTCGATGA CCGCCACCGC      240
TGGCAGCGGC TGCCCCAGCT CTCGGCGGCT GCCTGCGGCT GTGGTGGCTG A                291
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:202:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 291 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:202:

```
CGGGACAGAC CAGGTACGGT CGACACCTCG GACTGGGACA GGCACCGTCT CGATCCGGAC      60
CCGATGCGGA GTCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCGATGACGC GGCCGTGCGAC GGGGGCACCA      120
CGGGCGTGGG TCGTACCGGA CCGCGACCGG GCCGACGTCC CGGTCCCAGC TCGGGTGCCG      180
CCCGGGACGA CGGCCGGGTG AGCGATGTGG CTGCACCGGA AGGAGCTACT GGCGGTGGCG      240
ACCGTCGCCG ACGGGGTCGA GAGCCGCCGA CGGACGCCGA CACCACCGAC T                291
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:203:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:203:

```
ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCT CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG      60
GGCTGGGGCC CCGATGCCCC TGGGGTTCCC GTGGCCGATG GAGAGTTCTC GTCTGAACAG      120
GTGGCAAAGG CTGGAGGGAC CTGGCTGGGC ACCCACC GCCCCTTGCCCC CCTGCGCCGA      180
```

```

GCCCTGTCTG GTCCATGCCA GCTGTGGAGC CTGACCCTGT CCGTGGCAGA GCTAGGCCTG      240
GGCTACGCCT CAGAGGAGAA GGTCATCTTC CGCTACTGCG CCGGCAGCTG CCCCCGTGGT      300
GCCCCGACCC AGCATGGCCT GGCGCTGGCC CGGCTGCAGG GCCAGGGCCG AGCCCACGGT      360
GGGCCCTGCT GCCGGCCCAC TCGCTACACC GACGTGGCCT TCCTCGATGA CCGCCACCGC      420
TGGCAGCGGC TGCCCCAGCT CTCGGCGGCT GCCTGCGGCT GTGGTGGCTG A                471

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:204:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:204:

```

TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGA GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC      60
CCGACCCCGG GGCTACGGGC ACCCAAGGG CACCGGCTAC CTCTCAAGAG CAGACTTGTC      120
CACCGTTTCC GACCTCCCTG GACCGACCCG TGGGTGGCGG GGGAACGGGC GGACGCGGCT      180
CGGGACAGAC CAGGTACGGT CGACACCTCG GACTGGGACA GGCACCGTCT CGATCCGGAC      240
CCGATGCGGA GTCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCGATGACGC GGCCGTCGAC GGGGGCACCA      300
CGGGCGTGGG TCGTACCGGA CCGCGACCGG GCCGACGTCC CGGTCCCGGC TCGGGTGCCA      360
CCCGGGACGA CGGCCGGGTG AGCGATGTGG CTGCACCGGA AGGAGCTACT GGCGGTGGCG      420
ACCGTCGCCG ACGGGGTCGA GAGCCGCCGA CGGACGCCGA CACCACCGAC T                471

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:205:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:205:

```

ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCC CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG      60
GGCTGGGGCC CCGATGCCCG TGGGGTTCCC GTGGCCGATG GAGAGTTCTC GTCTGAACAG      120
GTGGCAAAGG CTGGAGGGAC CTGGCTGGGC ACCCACC GCCCCTTGCCCG CCTGCGCCGA      180
GCCCTGTCTG GTCCATGCCA GCTGTGGAGC CTGACCCTGT CCGTGGCAGA GCTAGGCCTG      240
GGCTACGCCT CAGAGGAGAA GGTCATCTTC CGCTACTGCG CCGGCAGCTG CCCCCGTGGT      300
GCCCCGACCC AGCATGGCCT GGCGCTGGCC CGGCTGCAGG GCCAGGGCCG AGCCCACGGC      360

```


GGGCCCTGCT GCCGGCCCAC TCGCTACACC GACGTGGCCT TCCTCGATGA CCGCCACCGC 420
 TGGCAGCGGC TGCCCCAGCT CTCGGCGGCT GCCTGCGGCT GTGGTGGCTG A 471

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:206:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 471 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:206:

TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGG GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC 60
 CCGACCCCGG GGCTACGGGC ACCCAAGGG CACCGGCTAC CTCTCAAGAG CAGACTTGTC 120
 CACCGTTTCC GACCTCCCTG GACCGACCCG TGGGTGGCGG GGGAACGGGC GGACGCGGCT 180
 CGGGACAGAC CAGGTACGGT CGACACCTCG GACTGGGACA GGCACCGTCT CGATCCGGAC 240
 CCGATGCGGA GTCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCGATGACGC GGCCGTCGAC GGGGGCACCA 300
 CGGGCGTGGG TCGTACCGGA CCGCGACCGG GCCGACGTCC CGGTCCCGGC TCGGGTGCCG 360
 CCCGGGACGA CGGCCGGGTG AGCGATGTGG CTGCACCGGA AGGAGCTACT GGCGGTGGCG 420
 ACCGTCGCCG ACGGGGTCGA GAGCCGCCGA CGGACGCCGA CACCACCGAC T 471

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:207:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:207:

ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCT CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG 60
 GGCTGGGGC 69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:208:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 69 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:208:

TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGA GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC 60
CCGACCCCG 69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:209:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 69 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:209:

ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCC CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG 60
GGCTGGGGC 69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:210:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 69 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:210:

TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGG GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC 60
CCGACCCCG 69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:211:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 111 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:211:

CCCGATGCCC GTGGGGTTCC CGTGGCCGAT GGAGAGTTCT CGTCTGAACA GGTGGCAAAG 60
GCTGGAGGGA CCTGGCTGGG CACCCACCGC CCCCTTGCCC GCCTGCGCCG A 111

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:212:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 111 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:212:

```
GGGCTACGGG CACCCAAGG GCACCGGCTA CCTCTCAAGA GCAGACTTGT CCACCGTTTC      60
CGACCTCCCT GGACCGACCC GTGGGTGGCG GGGGAACGGG CGGACGCGGC T              111
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:213:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:213:

```
ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCT CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG      60
GGCTGGGGCC CCGATGCCCC TGGGGTTCCC GTGGCCGATG GAGAGTTCTC GTCTGAACAG      120
GTGGCAAAGG CTGGAGGGAC CTGGCTGGGC ACCCACC GCCC CTCTGCGCCGA              180
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:214:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:214:

```
TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGA GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC      60
CCGACCCCGG GGCTACGGGC ACCCAAGGG CACCGGCTAC CTCTCAAGAG CAGACTTGTC      120
CACCGTTTCC GACCTCCCTG GACCGACCCG TGGGTGGCGG GGGAACGGGC GGACGCGGCT      180
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:215:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:215:

```

ATGGCCGTAG GGAAGTTCCT GCTGGGCTCC CTGCTGCTCC TGTCCCTGCA GCTGGGACAG      60
GGCTGGGGCC CCGATGCCCC TGGGGTCCCC GTGGCCGATG GAGAGTTCTC GTCTGAACAG      120
GTGGCAAAGG CTGGAGGGAC CTGGCTGGGC ACCCACC GCCC CCCTTGCCCG CCTGCGCCGA      180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:216:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 180 Basenpaare
 - (B) TYP: Nukleinsäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:216:

```

TACCGGCATC CCTTCAAGGA CGACCCGAGG GACGACGAGG ACAGGGACGT CGACCCTGTC      60
CCGACCCCGG GGCTACGGGC ACCCAAGGG CACCGGCTAC CTCTCAAGAG CAGACTTGTC      120
CACCGTTTCC GACCTCCCTG GACCGACCCG TGGGTGGCGG GGGAACGGGC GGACGCGGCT      180

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:217:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
- (A) LÄNGE: 156 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:217:

```

Met Ala Val Gly Lys Phe Leu Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15

Gln Leu Gly Gln Gly Trp Gly Pro Asp Ala Arg Gly Val Pro Val Ala
20           25           30

Asp Gly Glu Phe Ser Ser Glu Gln Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr Trp
35           40           45

Leu Gly Thr His Arg Pro Leu Ala Arg Leu Arg Arg Ala Leu Ser Gly
50           55           60

Pro Cys Gln Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ser Val Ala Glu Leu Gly Leu
65           70           75           80

```

Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser
 85 90 95

Cys Pro Arg Gly Ala Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu
 100 105 110

Gln Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg
 115 120 125

Tyr Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln Arg Leu
 130 135 140

Pro Gln Leu Ser Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 145 150 155

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:218:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 60 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:218:

Met Ala Val Gly Lys Phe Leu Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Gln Gly Trp Gly Pro Asp Ala Arg Gly Val Pro Val Ala
 20 25 30

Asp Gly Glu Phe Ser Ser Glu Gln Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr Trp
 35 40 45

Leu Gly Thr His Arg Pro Leu Ala Arg Leu Arg Arg
 50 55 60

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:219:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 23 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:219:

Met Ala Val Gly Lys Phe Leu Leu Gly Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Gln Gly Trp Gly
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:220:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 37 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:220:

```

Pro Asp Ala Arg Gly Val Pro Val Ala Asp Gly Glu Phe Ser Ser Glu
1          5          10          15

Gln Val Ala Lys Ala Gly Gly Thr Trp Leu Gly Thr His Arg Pro Leu
          20          25          30

Ala Arg Leu Arg Arg
          35

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:221:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:221:

```

Ala Leu Ser Gly Pro Cys Gln Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ser Val Ala
1          5          10          15

Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr
          20          25          30

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

Leu Ala Arg Leu Gln Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys
          50          55          60

Arg Pro Thr Arg Tyr Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg
          65          70          75          80

Trp Gln Arg Leu Pro Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
          85          90          95

```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:222:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 91 Aminosäuren
 - (B) TYP: Aminosäure
 - (C) STRÄNGIGKEIT:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:222:

Cys Gln Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ser Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30
 Pro Arg Gly Ala Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu Gln
 35 40 45
 Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln Arg Leu Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys Gly Gly
 85 90

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:223:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 89 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:223:

Cys Gln Leu Trp Ser Leu Thr Leu Ser Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Glu Glu Lys Val Ile Phe Arg Tyr Cys Ala Gly Ser Cys
 20 25 30
 Pro Arg Gly Ala Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu Gln
 35 40 45
 Gly Gln Gly Arg Ala His Gly Gly Pro Cys Cys Arg Pro Thr Arg Tyr
 50 55 60
 Thr Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln Arg Leu Pro
 65 70 75 80
 Gln Leu Ser Ala Ala Ala Cys Gly Cys
 85

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:224:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:224:

Ala Leu Ser Gly Pro
1 5

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:225:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:225:

Gly Thr Ser Ala Ser Tyr Gly Ala Ser Tyr Thr Gly Gly Gly Tyr Cys
1 5 10 15
 Thr Gly Gly Gly Cys Thr Ala Tyr
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:226:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:226:

Thr Thr Val Met Gly Ser Thr Ala Cys Thr Gly Cys Arg Ser Met Gly
1 5 10 15
 Gly Cys Lys Cys Tyr Thr Gly Cys
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:227:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:227:

Arg Trp Ala Gly Gly Cys Ser Arg Thr Ser Gly Gly Lys Cys Lys Gly
1 5 10 15
 Cys Ala Arg Cys Ala Lys Gly Ser
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:228:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
 (B) TYP: Aminosäure
 (C) STRÄNGIGKEIT:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptide

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:228:

Met Lys Cys Arg Thr Cys Tyr Ala Arg Arg Ala Ala Ser Gly Ala Cys
 1 5 10 15
 Ala Ser Ser Thr Cys
 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:229:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 168 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:229:

CGGCTTGTGA CCGAGCTGGG CCTGGGCTAC GCCTCAGAGG AGAAGGTCAT CTTCCGCTAC 60
 TCGCGCGGCA GCTGCCCCCG TGGTGCCCGC ACCCAGCATG GCCTGGCGCT GGCCCGGCTG 120
 CAGGGCCAGG GCCGAGCCCA CGGCGGGCCC TGCTGCCGCC CCATGGCC 168

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:230:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:230:

GAGGAGAAGG TCATCTTCCG 20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:231:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
 (B) TYP: Nukleinsäure
 (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:231:

GCCGTGGGCT CGGCCCTGGC

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:232:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:232:

AGAGGAGAAG GTCATCTTCC GCTA

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:233:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:233:

CTCGGCCCTG GCCCTGCAGC

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:234:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:234:

TGCAGCCGGG CCAGCGCCAG

20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:235:

- (i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:235:

CGCGGATCCA TGCCTGGATT CGAGGGTGCA G

31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:236:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:236:

CGCGGATCCA TGGCCGTAGG GAAGTTCCTG C

31

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:237:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:237:

CTCCCAAGCT TTTACTTGTC ATCGTCGTCC TTGTAGTCGC CACCACAGCC GCAGGCAGCC

60

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:238:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:238:

CTCCCAAGCT TTTACTTGTC ATCGTCGTCC TTGTAGTCTC GAGGAAGGCC ACGTCGGTG

59

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:239:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:239:

TCAGCCACCA CAGCCGCAGG CAGCC

25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:240:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 70 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:240:

CATAAAATAG GTGTGGAGTC GCAAAAAGTT TAAAGAAGAG AAAGGAACCA GAAAAAAAAA

60

TAGAAAGCGC

70

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:241:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 69 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:241:

CATAAAATAG GTGTGGAGTC GCGAAAAGTT TAAAGAGAGT AAGGAACCAG AAAAAAAAAAT

60

AGAAAGCGC

69

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR:242:

(i) SEQUENZ-CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 68 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR:242:

CATAAAATAG GTGTGGAGTC GCGAAGTTTA AAGAGAGTAA GGAACCAGAA AAAAAAATA

60

GAAAGCGC

68

Patentansprüche

1. Isolierter und gereinigter Wachstumsfaktor, umfassend die Polypeptid-Sequenz von SEQ ID NO: 217 oder SEQ ID NO: 223, worin der Wachstumsfaktor das Überleben in Mittelhirnzellen fördert.

2. Isolierter und gereinigter Wachstumsfaktor, umfassend eine Persephin-Sequenz, wie sie in SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 221 oder SEQ ID NO: 223 dargestellt ist.
3. Isoliertes und gereinigtes Polypeptid, umfassend:
 - (a) einen Pre-Pro-Abschnitt von Persephin, wie dargestellt in SEQ ID NO: 218;
 - (b) einen Pre-Abschnitt von Persephin, wie er in SEQ ID NO: 219 dargestellt ist; oder
 - (c) einen Pro-Abschnitt von Persephin, wie er in SEQ ID NO: 220 dargestellt ist.
4. Isoliertes und gereinigtes Nucleinsäure-Molekül oder dazu komplementäres Nucleinsäure-Molekül, umfassend eine Nucleotid-Sequenz, welche für einen Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder 2 kodiert, oder ein Fragment der Nucleotid-Sequenz, bestehend aus mindestens 15 zusammenhängenden Nucleotiden.
5. Vektor, umfassend Expressionsregulationselemente, ausführbar gebunden an ein Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4.
6. Wirtszelle, welche mit dem Vektor nach Anspruch 5 transformiert ist.
7. Isoliertes und gereinigtes Nucleinsäuremolekül, umfassend:
 - (a) eine Pre-Pro-Persephin-Nucleotid-Sequenz, wie sie in SEQ ID NO: 203 dargestellt ist, oder das Komplement davon;
 - (b) einen Pre-Pro-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie es in SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215 dargestellt ist, oder das Komplement von einem der beiden;
 - (c) einen Pre-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie es in SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 209 dargestellt ist, oder das Komplement von einem der beiden;
 - (d) einen Pro-Abschnitt eines Persephin-Polynucleotids, wie es in SEQ ID NO: 211 dargestellt ist, oder das Komplement davon; oder
 - (e) ein Fragment einer Sequenz, wie sie in irgendeinem von (a) bis (d) dargestellt ist, umfassend mindestens 15 zusammenhängende Nucleotide, worin das Fragment nicht in SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 190 oder dem Komplement von einem der beiden auftritt.
8. Rekombinationsverfahren, umfassend:
 - (a) Subklonieren eines Polynucleotids, welches für den Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert, in einen Expressionsvektor, umfassend Regulationselemente, ausführbar gebunden an das Polynucleotid;
 - (b) Transformieren einer Wirtszelle mit dem Expressionsvektor;
 - (c) Züchten der Wirtszelle in einer Wirtszellenkultur; und
 - (d) Ernten des Wachstumsfaktors und/oder des Polynucleotids aus der Wirtszellenkultur.
9. Isolierte und gereinigte Antikörper, welche zur spezifischen Reaktion mit einem Wachstumsfaktor, wie er in den Ansprüchen 1 oder 2 definiert ist, oder einem Epitop davon in der Lage sind.
10. Verfahren zur Detektierung der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe von einem Patienten, umfassend die Umsetzung von Antikörpern gemäß Anspruch 9 mit einem Wachstumsfaktor, welcher in der Probe vorliegt, und Detektieren der Bindung der Antikörper mit dem Wachstumsfaktor.
11. Kit zur Detektierung der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe von einem Patienten, umfassend die Antikörper nach Anspruch 9, welche zur detektierbaren Reaktion mit dem Wachstumsfaktor in der Lage sind, verpackt in einen Behälter.
12. Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder 2 oder ein Polynucleotid, welches für den in Anspruch 1 oder Anspruch 2 definierten Wachstumsfaktor kodiert, zur Verwendung in der Vorbeugung oder Behandlung von Zelldegeneration oder -insuffizienz in einem Individuum.
13. Verwendung eines Wachstumsfaktors nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 in der Herstellung eines Medikaments für die Verwendung in der Behandlung einer Zelldegeneration oder -insuffizienz, welche eine (a) neuronale Degeneration, resultierend aus peripherer Neuropathie, amyotropher Lateralsklerose, Alzheimer-Erkrankung, Parkinson-Erkrankung, Huntington-Erkrankung, Ischämischem Infarkt, akuter Hirnverletzung, akuter Rückenmarksverletzung, Tumoren des Nervensystems, Multipler Sklerose oder Infektion; (b) hämatopoetische Zelldegeneration oder -insuffizienz, resultierend aus Eosinopenie, Basopenie, Lymphopenie,

Monocytopenie, Neutropenie, Anämien, Thrombocytopenie oder diesbezüglichen Stammzellinsuffizienzen; oder (c) Herzmuskeldegeneration oder -insuffizienz, resultierend aus einer Kardiomyopathie oder einem kongestiven Herzversagen, darstellt.

14. Zelle, transformiert mit einem Vektor nach Anspruch 5, welche einen Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder 2 exprimiert, zur Verwendung in der Vorbeugung oder Behandlung von Zelldegeneration oder -insuffizienz in einem Individuum.

15. Verfahren zur Detektierung der Anwesenheit eines Wachstumsfaktors in einer Probe von einem Patienten, umfassend das Detektieren und/oder Quantifizieren der Anwesenheit in der Probe von mRNA, welche für einen Wachstumsfaktor nach Anspruch 1 oder 2 kodiert.

16. In-vitro-Verfahren zur Detektierung von Persephin-Gen-Veränderungen, umfassend das Detektieren der Anwesenheit eines nichtintakten Persephin-Gens in einer Zelle, worin die Anwesenheit des nichtintakten Gens die Anwesenheit von Genveränderungen anzeigt.

17. Verfahren zur Förderung des Wachstums und/oder der Differentiation einer Zelle in einem Kulturmedium, umfassend die Zugabe zu dem Kulturmedium des Wachstumsfaktors nach Anspruch 1 oder 2.

18. Isoliertes und gereinigtes Persephin-Antisense-Polynucleotid, umfassend eine zu einer Nucleinsäuresequenz nach Anspruch 4 komplementäre Sequenz, welche zur Hybridisierung an eine natürlich auftretende DNA- oder mRNA-Polynucleotid-Sequenz in der Lage ist, die für Persephin kodiert, zur Verhinderung der Transkription und/oder Translation eines kodierten Persephin-Polypeptids.

19. Antisense-Polynucleotid nach Anspruch 18 zur Verwendung in der Behandlung einer Erkrankung, welche durch die Exprimierung von Persephin durch eine Zellpopulation vermittelt ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

```

1  ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCCCTTGCA CCGAGCCTC
   TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGGACACA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGGCTCCGAG

61  GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAAGATG
   CCGACCCAGG AACTAGAAAT TCTCCGAAGA CACCGTCTAT TCGAGAGTAA ACCCTTCTAC

121 GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAAGA ATTECTGGGG GCCTCCCGAC
   CGTCTCTGAT CTCCCTGGAC CTGCGGGGTA GTCCCATTTCT TAAGGACCCC CGGAGGGCTG

181 TCCCCAATTC CTTCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTTACA ATCCTACTCT ACCTTGCACT
   AGGCGTTAAG GAACAGAGTT TCGGGAGTGA AACGGAATGT TAGGATGAGA TGGAACTGTA

241 AGGTAACAAC CATGTCCGTC TTCCAAGAGC CTTGGCTGGT TCATGCCGAC TGTGGAGCCT
   TCCATTGTTG GTACAGGCAG AAGTTCTCG GAACCGACCA AGTACGGCTG ACACCTCGGA

301 GACCCTACCA GTGGCTGAGC TGGGCTGGG CTATGCCTCG GAGGAGAAGG TCATCTTCCG
   CTGGGATGGT CACCGACTCG ACCCGGACCC GATACGGAGC CTCCTCTTCC AGTAGAAGGC

361 ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGC CCGTACCCAG CACAGTCTGG TACTGGCCCG
   TATGACACGA CCGTCGACAG GGGTTCTCCG GGCATGGGTC GTGTCAGACC ATGACCGGGC

421 GCTTCGAGGG CGGGGTCGAG CCCATGGCCG ACCCTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA
   CGAAGCTCCC GCCCCAGCTC GGGTACCGGC TGGGACGACG GTCGGGTGGT CGATACGACT

481 TGTGACCTTC CTTGATGATC AGCAACATTG GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCTGCAGC
   ACACTGGAAG GAACTACTAG TCGTGGAAC CGTCGTCGAC GGAGTCGAGA GTCCGCTCG

541 TTGTGGCTGT GGTGGCTGAA GGAGGCCAGT CTGGTGTCTC AGAATCACAA GCATGAGACA
   AACACCGACA CCACCGACTT CCTCCGGTCA GACCACAGAG TCTTAGTGTT CGTACTCTGT

651 GGCTGGGCTT TGAAGGCTC AGGTGACATT ACTAGAAATT TGCATAGGTA AAGATAAGAA
   CCGACCCGAA ACTTTCCGAG TCCACTGTAA TGATCTTTAA ACGTATCCAT TTCTATTCTT

661 GGGAAAGGAC CAGGGGTTTT TTGTTTCTTT CTTTGCTTGC TTGTTAGTTT TTTTTTTTTT
   CCTTTTCTTG GTCCCCAAA AACAAAGAAA GAACGAACG AACAAACAAA AAAAAAAAAA

721 TTT
   AAA

```

Figur 1A

```

1  ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCCTGTGT CTGCTGCTCC TGTCTTTCGA CCGAGCCCTC
   TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGGACACA GACGACGAGG ACAGGAACGT GCGCTCGGAG
1  M A A G R L R I L C L L L L S L H P S L
61  GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTTCT GTGGCAGATA AGCTCTCATT TGGGAGATG
   CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGALGA CACCGTCTAT TCGAGAGTAA ACCCTTCTAC
21  G W V L D L Q E A S V A D K L S F G K M
121  GCAGAGACTA GAGGGACCTG GACGCCCCAT CAGGGTAACA ACCATGTCCG TCTTCCAAGA
   CGTCTCTGAT CTCCCTGGAC CTGCGGGGTA GTCCCATTTG TGGTACAGGC AGAAGGTTCT
41  A E T R G T W T P H Q G N N H V R L P R
181  GCCTTGGCTG GTTCATGCCG ACTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTGGGCTTG
   CGGAACCGAC CAAGTACGGC TGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGACCCGGAC
61  A L A G S C R L W S L T L P V A E L G L
241  GGCTATGCCT CGGAGGAGAA GGTATCTTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG
   CCGATACGGA GCCTCCTCTT CCAGTAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCTC
81  G Y A S E E K V I F R Y C A G S C P Q E
301  GCGCGTACCC AGCACAGTCT GGTACTGGCC CGGCTTCGAG GCGGGGGTCC AGCCCATGCC
   CGGGCATGGG TCGTGTGAGA CCATGACCGG GCCGAAGCTC CCGCCCCAGC TCGGGTACCG
101  A R T Q H S L V L A R L R G R G R A H G
361  CGACCCTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA TCAGCACCAT
   GCTGGGACGA CCGTCGGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT AGTCGTGGTA
121  R P C C Q P T S Y A D V T F L D D Q H H
421  TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCTGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A
   ACCGTCGTCC ACGGAGTCGA GAGTCGACCT CGAACACCGA CACCACCGAC T
141  W Q Q L P Q L S A A A C G C G G

```

Figur 1B


```

1  ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTC CTGCTGCTCC TGTCTTTCGA CCTGGGCCTT
   TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGAACAAG GACGACGAGG ACAGGAACGT GGAACCCGAA

61  GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAATTC
   CCGACCCAGG AACTAGAAAT TCTCCGAGGA CGCTGTCTAC TCGAGAGTAG ACCCTTTTAC

121  GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGGCTAAGA ATTCTTGGGG GCCTCCTAAC
   CGTCTCTGAC CTTCTTGGAC CTTCCGGGTA GTCCCATTTCT TAGGAACCCC CGGAGGATTG

181  TCTACAGTTC TTCCTCTCAA AGCCCTCACT TTGCCTCACA ATCCTATTCT ACCTTGCACT
   AGATGTCAAG AAGGACAGTT TCGGGAGTGA AACGGAGTGT TAGGATAAGA TGGAACGTGA

241  AGGTAACAAC AATGTCCGCC TTCCAAGAGC CTTACCTGGT TTGTGCCGGC TGTGGAGCCT
   TCCATTGTTG TTACAGGCGG AAGGTTCTCG GAATGCACCA AACACGGCCG ACACCTCGGA

301  GACCCCTACCA GTGGCTGAGC TTGGCCTGGG CTATGCCTCA GAGGAGPAGA TTATCTTCCG
   CTGGGATGGT CACCGACTCG AACCAGACCC GATACGGAGT CTCCTCTTCT AATAGAAGGC

361  ATACTGTGCT GGCAGCTGTC CCCAAGAGGT CCGTACCCAG CACAGTCTGG TGCTGGCCCG
   TATGACACGA CCGTCGACAG GGGTTCTCCA GGCATGGGTC GTGTCAGACC ACGACCGGGC

421  TCTTCGAGGG CAGGGTCGAG CTCATGGCAG ACCTTGCTGC CAGCCCACCA GCTATGCTGA
   AGAAGCTCCC GTCCCAGCTC GAGTACCGTC TGGAACGACG GTCGGGTGGT CGATACGACT

481  TGTGACCTTC CTTGATGACC ACCACCATTC GCAGCAGCTG CCTCAGCTCT CAGCCGCAGC
   AACTTGGAAG GAACTACTGG TGGTGGTAAC CGTCGTCGAC GGAGTCGAGA GTCGGCGTCC

541  TTGTGGCTGT GGTGGCTGA
   AACACCGACA CCACCGACT

```

Figur 2A

```

1  ATGGCTGCAG GAAGACTTCG GATCTTGTTT CTGCTGCTCC TGTCTTTGCA CCTGGGCCTT
1  TACCGACGTC CTTCTGAAGC CTAGAACAAA GACGACGAGG ACAGGAACGT GGACCCCGAA
1  M A A G R L R I L F L L L L S L H L G L

61  GGCTGGGTCC TTGATCTTCA AGAGGCTCCT GCGGCAGATG AGCTCTCATC TGGGAAAAATG
21  CCGACCCAGG AACTAGAAGT TCTCCGAGGA CGCCGTCTAC TCGAGAGTAG ACCCTTTTAC
21  G W V L D L Q E A P A A D E L S S G K M

121  GCAGAGACTG GAAGGACCTG GAAGCCCCAT CAGCGTAACA ACAATGTCCG CCTTCCAAAG
41  CGTCTCTGAC CTTCTCTGGAC CTTCCGGGTA GTCCCATTTGT TGTACAGGC GGAAGGTTCT
41  A E T G R T W K P H Q G N N N V R L P R

181  GCCTTACCTG GTTTGTGCCG GCTGTGGAGC CTGACCCTAC CAGTGGCTGA GCTTGGCCTG
61  CCGAATGGAC CAAACACGGC CGACACCTCG GACTGGGATG GTCACCGACT CGAACCGGAC
61  A L P G L C R L W S L T L P V A E L G L

241  GGCTATGCCT CAGAGGAGAA GATTATCTTC CGATACTGTG CTGGCAGCTG TCCCCAAGAG
81  CCGATACGGA GTCTCCTCTT CTAATAGAAG GCTATGACAC GACCGTCGAC AGGGGTTCTC
81  G Y A S E E K I I F R Y C A G S C P Q E

301  GTCCGTACCC AGCACAGTCT GGTGCTGGCC CGTCTTCGAG GGCAGGGTCG AGCTCATGGC
101  CAGGCATGGG TCGTGTGAGA CCACGACCGG GCAGAAAGCTC CCGTCCCAGC TCGAGTACCG
101  V R T Q H S L V L A R L R G Q G R A H G

361  AGACCTTGCT GCCAGCCCAC CAGCTATGCT GATGTGACCT TCCTTGATGA CCACCACCAT
121  TCTGGAACGA CGGTGCGGTG GTCGATACGA CTACACTGGA AGGAACTACT GGTGCTGGTA
121  R P C C Q P T S Y A D V T F L D D H H H

421  TGGCAGCAGC TGCCTCAGCT CTCAGCCGCA GCTTGTGGCT GTGGTGGCTG A
ACCGTCGTCTG ACGGAGTCGA GAGTCGGCGT CGAACACCGA CACCACCGAC T
141  W Q Q L P Q L S A A A C G C G G

```

Figur 2B

Figur 3A

PSP/NTN (SEQ ID NR:141)

ALAGSCLWSLTLPVAELGLGYAEEKVIFRYCAGSCPQEARTQESLVLA	50
↓	
RLRCRGRAEGRPCCRPTAYEDEVSFLDVESRYETLQELSARECQCV	96

Figur 3B

NTN/PSP (SEQ ID NR:146)

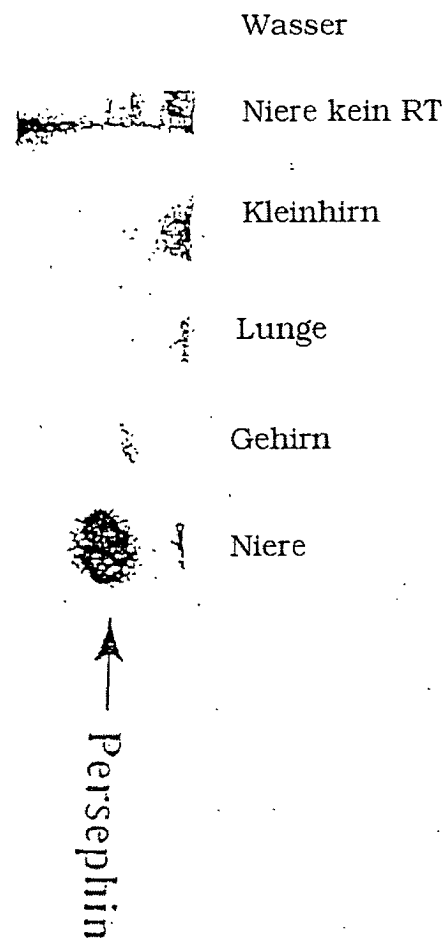
PGARPCGLRELEVVRVSELGLGYTSDETVLFRYCAGACEAAIRIYDLGLRR	50
↓	
LRQRRRVRRERARAHPCQPTSYADVTELDQHHWQLPQLSAAACGCGG	100



Figur 4A



Figur 4B



Figur 5