



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 38 450 T2** 2009.05.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 068 310 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 38 450.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/00376**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 903 787.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/042571**

(86) PCT-Anmeldetag: **19.02.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.08.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.05.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11** (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9802025 19.02.1998 FR

(73) Patentinhaber:
Novimmune SA, Genf/Genève, CH

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, FR, GB

(72) Erfinder:
MACH, Bernard, CH-1292 Chambesy, Genève, CH

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM AUFFINDEN VON VERBINDUNGEN, DIE DIE BINDUNG ZWISCHEN DEN TRAN-
SKRIPTIONSFAKTOREN STAT1 UND USF1 HEMMEN**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, das erlaubt, Verbindungen zu identifizieren, die dazu in der Lage sind, die Aktivierung der Expression des Gens CIITA durch Zytokine, insbesondere durch Interferon γ , zu inhibieren, welches selbst an der Kontrolle und Regulierung der Expression von Genen beteiligt ist, welche für MHC Typ II Moleküle kodieren.

[0002] Die Moleküle des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (nachfolgend bezeichnet als MHC) der Klasse II sind heterodimere Transmembran-Glycoproteine, die direkt an der Aktivierung von CD4⁺ T-Helfer-Lymphocyten im Verlauf einer Immunantwort beteiligt sind.

[0003] Beim Menschen wird der Klasse II-Komplex durch die Moleküle dargestellt, die zum HLA(Human Leucocyte Antigen)-System gehören. Die für die α - und β -Ketten kodierenden Gene bilden die Moleküle HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP, welche im Bereich der D-Region des Chromosoms 6 lokalisiert sind.

[0004] Die Expression dieser Gene ist hervorragend reguliert. Anders als Gene, die für die Moleküle des Typ I MHCs kodieren, welche in ubiquitärer Weise exprimiert sind, werden die Gene, die für die Moleküle des MHC Klasse II kodieren, nur konstitutiv auf einigen Zelltypen, wie den B-Lymphocyten, aktivierten T-Lymphocyten, Makrophagen, Thymusepithelzellen, dendritischen Zellen, wie beispielsweise Langerhans'schen Zellen, oder in induzierter Form nach Stimulierung, beispielsweise durch Zytokine, und insbesondere durch Interferon γ (INF γ) oder Interleukin 4 (IL 4), mehreren anderen Zelltypen, wie beispielsweise Zellen, die zur Makrophagen- oder Monocytenlinie gehören, Endothelzellen, Fibroblasten, Muskelzellen oder Krebszellen, wie beispielsweise Melanomzellen exprimiert.

[0005] Außerdem ist die Expression der Gene, die für die MHC Klasse II Moleküle kodieren, bei den B-Lymphocyten vorübergehend. So wird die Differenzierung von B-Zellen in Plasmocyten, welche Immunglobuline herstellen, von der Abschaltung bestimmter Gene, darunter denen, die für die MHC Klasse II kodieren, begleitet.

[0006] Es ist gleichermaßen gezeigt worden, dass die Expressionsstärke der MHC Klasse II Moleküle einen bestimmenden Faktor im Prozess der T-Zell-Aktivierung darstellt.

[0007] Infolgedessen scheint es klar, dass die molekularen Mechanismen der Expressionsregulierung dieser Gene ein Schlüsselement der Wirksamkeit der Immunantwort bilden. Jeder Fehler in diesem regulatorischen Prozess kann zu bedeutenden immunologischen Störungen oder Autoimmunerkrankungen führen. So ist in einigen Fällen eine anormale Expression der MHC Klasse II Gene auf der Oberfläche von Zellen beobachtet worden, die normalerweise nicht derartige Gene exprimieren sollten. Eine Überexpression dieser Gene kann gleichermaßen beobachtet werden, welche zu einer übermäßigen und nicht kontrollierten Aktivierung von CD⁺-Lymphocyten führt (Bottazzo et al., 1986, Immunol. Rev., 94, 137–169). Derartige Symptome könnten, zumindestens teilweise, für Bedingungen wie den insulinabhängigen Diabetes, die Multiple Sklerose, die rheumatoide Polyarthrit und den Lupus erythematosus verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu konnte bei einigen Patienten eine Immundefizienz nachgewiesen werden, welche zu Störungen auf dem Niveau der Expression von MHC Klasse II Genen führt.

[0008] Beispielsweise kann das BLS-Syndrom (Bare Lymphocytes Syndrome) genannt werden, welches eine autosomal rezessive Störung ist, bei der die Expression von MHC Klasse II Genen sehr eingeschränkt, beziehungsweise nicht vorhanden ist, was sich an der Abwesenheit von Immunantworten in zellulärer und humoraler Form zeigt, und von zahlreichen, teilweise fatalen Infektionen begleitet ist.

[0009] Zahlreiche wissenschaftliche Gruppen haben die regulatorischen Mechanismen der Expression von MHC Klasse II Genen untersucht und haben eine gewisse Anzahl an transaktivatorischen Molekülen identifiziert, die geeignet sind, direkt oder indirekt an spezifische Promotorsequenzen dieser Gene zu binden (für einen Übersichtsartikel siehe Mach et al., 1996, Annu. Rev. Immunol., 14, 301–331).

[0010] Die Anmelderin hat zuvor einen dieser Faktoren, den Faktor CIITA (Klasse II Transaktivator) (Steimle et al., 1993, Cell, 75, 135–146 und EP 648836) identifiziert und charakterisiert. Das Dokument WO 9606107 zeigt unter anderem, dass es zwei Domänen im Faktor CIITA gibt, die an der Aktivierung der Transkription von Genen der MHC Klasse II mehr beteiligt sind. Dennoch haben Steimle et al. in überraschender Weise und entgegen dem, was für andere Faktoren beobachtet wird, die an der Regulierung der Expression von MHC Klasse II Genen beteiligt sind (Cogswell et al., 1991, Crit. Rev. Immunol., 11, 87–112) gezeigt, dass die Expression

des Faktors CIITA eng mit der Expression von Genen der MHC Klasse II koinzidiert und eine absolute Notwendigkeit für die konstitutive Expression wie für die Induktion der MHC-Gene ist. Daneben haben Silacci et al. (1994, J. Exp. Med., 180, 1329–1336) gezeigt, dass das Abschalten der Gene der MHC Klasse II im Verlaufe der Differenzierung von Plasmacyten mit einer Abschaltung des Gens verbunden ist, welches für den Faktor CIITA kodiert.

[0011] Des Weiteren haben Lennon et al. (1997, Immunogenetics, 45, 266–273) die Promotorsequenz des CIITA-Gens identifiziert, welche für die differenzielle Expression dieses Faktors in B-Zellen verantwortlich ist. Dennoch erlaubt das Vorhandensein dieser Sequenz allein nicht zu erklären, warum man eine differenzielle Expression des Faktors CIITA in verschiedenen Zelltypen beobachtet. Unter anderem erklärt sie nicht die Induktion durch Zytokine.

[0012] In vorhergehenden Arbeiten hat die Anmelderin ausgehend von Proben, die aus verschiedenen Geweben menschlichen Ursprungs stammen, die komplexe Organisation von Sequenzen identifiziert, welche die Expressionskontrolle des Faktors CIITA sichern, mehrere Promotorregionen isoliert und charakterisiert und das Vorhandensein verschiedener Formen des Faktors CIITA, und gleichermaßen verschiedener CIITA-Gene bewiesen. Diese Arbeiten waren Gegenstand einer Veröffentlichung (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851–2860) und einer französischen Patentanmeldung Nr. 97/04954 (gefolgt von einer europäischen Anmeldung EP 0849049). So haben die Erfinder gezeigt, dass die verschiedenen identifizierten Promotoren in selektiver Form aktiviert werden können: zwei der Promotoren sind für die konstitutive Expression des Gens CIITA in dendritischen Zellen (Promotor I) und in B-Lymphocyten (Promotor III) verantwortlich, während der Promotor IV in die Expression des Gens CIITA nach Induzierung durch ein Zytokin eingreift, insbesondere durch Interferon γ .

[0013] Unter anderem haben Piskurich et al. (1998, J. of Immunobiology, 233–240) im Promotor von CIITA Fragmente aufgeklärt, die für die spezifische CIITA-Expression in B-Zellen, die supprimierende Wirkung von TGF-beta und die Induzierung der Expression durch Interferon γ verantwortlich sind. Die Rolle der Regulierung von STAT1 wird gleichermaßen für die induzierte Expression durch Interferon γ beleuchtet.

[0014] Insbesondere haben die Erfinder eine Sequenz identifiziert, die in der Lage ist, eine Aktivität als Transkriptionspromotor nach Induzierung durch ein Zytokin zu zeigen, wie beispielsweise durch Interferon γ oder Interleukin 4. Eine derartige Sequenz wird durch die Sequenz dargestellt, die alles oder einen Teil der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten Sequenz umfasst, oder durch deren komplementäre Sequenz. Die Analyse dieser Sequenz erlaubt, verschiedene Regionen zu identifizieren, die regulatorischen Bereichen der Expression in cis entsprechen, wie beispielsweise die NF-GMa-Stelle, das GAS-Element, die E-Box oder die Bindungsstelle des Faktors IRF-1 (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851–2860 und [Fig. 1](#)).

[0015] Unter anderem beschreibt das Dokument WO 95/28492 Mutationen in der Sequenz des GAS-Elements, welche erlauben, Agonisten und Antagonisten des Signalweges durch Interferon γ und dem Protein der damit verbundenen transkriptionellen Regulierung, STAT1, zu finden.

[0016] Kürzlich haben mehrere Arbeiten ermöglicht, die Abfolge an Vorgängen und der an der Aktivierung von Genen beteiligten Signale, welche als Reaktion auf eine Induzierung durch ein Zytokin exprimiert sind, insbesondere durch Interferon γ , besser zu verstehen. Ein Aktivierungsschema wurde von Darnel et al. (1997, Science 277, 1630–1635) vorgeschlagen. Nach diesem Modell bindet zunächst das aktivierende Zytokin, beispielsweise Interferon γ , zelluläre Rezeptoren an der Oberfläche, welche so die Aktivierung von Tyrosinkinasen JAK1 und JAK2 in der Zelle ermöglichen. In einem zweiten Schritt werden die Tyrosinreste des Transkriptionsfaktors STAT1, welcher im Zytoplasma von Zellen zu finden ist, durch die aktivierten JAK-Kinasen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung erlaubt in einem dritten Schritt, dem aktivierten STAT1-Faktor in den Kern zu migrieren, wo er sich an die GAS-Box von durch Zytokinen induzierbaren Promotoren bindet (z. B. Interferon γ), welches so eine Aktivierung der Expression von Genen, die sich unter Kontrolle derartiger Promotoren befinden, erlaubt.

[0017] Die Beteiligung des JAK/STAT1-Aktivierungssystems an der Kontrolle der Expression der CIITA-Gene, die durch Interferon γ induzierbar sind, waren Gegenstand von Studien, die ermöglichen festzustellen, dass wie im Fall anderer durch Interferon γ induzierbarer Gene, die Expression des Faktors CIITA nicht in Zelllinien induziert werden kann, denen JAK1 fehlt (Chang et al., 1994, J. Exp. Med., 180, 1367–1374).

[0018] Meraz et al. (1996, Cell, 84, 431–442) haben gleichermaßen gezeigt, dass die Expression des CIITA-Gens nicht durch Interferon γ in Makrophagen des Knochenmarks induzierbar ist, die von einer

STAT1—Maus stammen, was daher eine bestimmende Rolle von STAT1 an der Induktion der Genexpression von CIITA durch Interferon γ nahelegt.

[0019] Unter anderem haben Lee und Benveniste (1996, J. Immunol., 157, 1559–1568) durch Experimente, die spezifische Antisense-Oligonucleotide der Nucleinsäuresequenz benutzen, welche für den Proteinfaktor STAT1 kodiert, gezeigt, dass die Reduzierung der Expression des Proteins STAT1 von einer Reduzierung der Expression des Gens CIITA begleitet wird, welche nach einer Induktion durch Interferon γ beobachtet werden kann.

[0020] Schließlich ist es gezeigt worden, dass der STAT1-Faktor spezifisch eine besondere Nucleinsäuresequenz erkennt, die als „GAS-Element“ bezeichnet wird (Darnel et al., 1997, Science 277, 1630–1635). Die Analyse der Sequenz des Promotors IV des CIITA-Gens (induzierbar durch Zytokine; Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851–2860; und [Fig. 1](#)) hat das Vorliegen einer derartigen Sequenz gezeigt.

[0021] Wie weiter oben ausgeführt, umfasst der Promotor IV gleichermaßen die Sequenz CACGTG (E-Box, Gregor et al., 1990, Genes Dev., 4, 1730–1740, siehe [Fig. 1](#)). Dieses könnte darauf hindeuten, dass ein Transkriptionsfaktor, welcher zur Familie der Helix/Schlaufen/Helix/Leucin-Zipper gehört, dafür verantwortlich ist, an der Expressionsregulierung von Genen teilzuhaben, welche unter die Kontrolle des Promotors IV platziert sind. Mehrere Faktoren, welche zu dieser Familie gehören, wurden in der Literatur beschrieben, wobei insbesondere die Transkriptionsfaktoren, die in konstitutiver Weise exprimiert sind, wie beispielsweise die Faktoren TFE3 (Beckmann et al., 1990, Genes Dev., 4, 167–179), USF1 (Gregor et al., 1990, Genes Dev., 4, 1730–1740) und USF2 (Sirito et al., 1994, Nucleic Acid Res. 22, 427–433) oder Proteine, die am Myc-System beteiligt sind, wie beispielsweise Myc-Max oder Mad-Max (Ayer et al., 1993, Cell 72, 211–222) erwähnt werden können.

[0022] Insbesondere wird der Transkriptionsfaktor USF1 in ubiquitärer Form exprimiert und nimmt an der Regulierung der Expression verschiedener Gene teil, von denen einige in „gewebespezifischer“ oder in induzierbarer Weise exprimiert sind, wie beispielsweise das Gen, welches für das menschliche Wachstumshormon kodiert (Peritz et al., 1988, J. Biol. Chem., 263, 5005–5007), das Gen, welches für die $\lambda 2$ -Kette von Immunglobulinen kodiert (Chang et al., 1992, Nucleic Acid Res., 20, 287–293) oder das Gen, das für p53 (Reisman und Rotter, 1993, Nucleic Acid Res., 21, 345–350) kodiert.

[0023] Das Dokument WO 95/28482 beschreibt unter anderem Nucleotidsequenzen, die regulatorische DNA-Elemente umfassen, die sich in direkter oder indirekter Weise mit transkriptionellen regulatorischen Proteinen, wie STAT1 verbinden, nachdem die letztgenannten durch Zytokine aktiviert worden sind.

[0024] Das Dokument WO 97/02354 wiederum betrifft die Identifizierung eines Komplexes, welcher den Transkriptionsfaktor DP-1 und den Transkriptionsmodulator p53 umfasst.

[0025] Keines dieser Dokumente erwähnt den Transkriptionsfaktor USF1.

[0026] Die Anmelderin hat jetzt bewiesen, dass die Transkriptionsfaktoren STAT1 und USF1 jeweils an das GAS-Element und an die E-Box des Promotors IV binden. Gleichermäßen hat die Anmelderin in sehr überraschender Weise gezeigt, dass die Bindung des STAT1-Faktors an die GAS-Stelle durch den Faktor USF1 stark stabilisiert wird, und dass diese Faktoren sich in kooperativer Weise mit den im Promotor IV lokalisierten Bindungsstellen verbinden, wobei diese kooperative Interaktion eine bestimmende Rolle bei der Kontrolle der spezifischen Aktivierung des Promotors IV durch Zytokine spielt, insbesondere durch Interferon γ .

[0027] Unter der Bezeichnung „sich in kooperativer Weise verbindend“ wird verstanden, dass eine Interaktion zwischen den Proteinfaktoren vorhanden ist, die genannt wurden, welche vor oder nach der Fixierung an ihre jeweilige Stelle stattfinden kann, was insbesondere erlaubt, spezifische Interaktionsstellen zwischen diesen Proteinfaktoren zu definieren, und die sich in einer kooperativen Wirkung manifestiert. Diese kooperative Wirkung spiegelt sich in einem Ergebnis wieder, welches nur beobachtet werden kann, wenn während der Interaktion, von der die Rede ist, beispielsweise diese kooperative Wirkung aus einer Stabilisierung der Fixierung mindestens eines der Proteinfaktoren an seiner Bindungsstelle besteht (welche aufgrund der zwischen den Proteinfaktoren vorhandenen Interaktion unterschätzt wird). In einem besonderen Fall ist die kooperative Wirkung eine synergistische Wirkung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die beobachtete Wirkung durch die Proteinfaktoren stärker ist als die Wirkung, welche der erwarteten Wirkung entspricht, die aus der Summe der individuellen Wirkungen, die bei jedem der Faktoren beobachtet wird, abgeleitet wird.

[0028] Dieser Induktionsmechanismus der Genexpression, welches unter Kontrolle des Promotors IV plat-

ziert ist, unterscheidet sich von anderen zuvor beschriebenen Systemen durch Interferon γ induzierbarer Gene, da es den Faktor USF1 als wesentlichen Partner zur Bindung, und infolgedessen für die Aktivität des STAT1-Faktors benötigt. Die Entdeckung dieses Mechanismus impliziert insbesondere die Aktivierung der Expression des Gens CIITA durch Interferon γ , und infolgedessen der Induktion von MHC Klasse II Molekülen durch Interferon γ , was dazu geführt hat, dass die Anmelderin ein neues Identifikationsverfahren für Moleküle, die dazu befähigt sind, die Expression von Genen, die unter Kontrolle des Promotors platziert sind, dessen Aktivität durch eine kooperative Fixierung von STAT1 und USF1 induziert wird, und insbesondere des gesamten oder eines Teils des Promotors IV zu etablieren. In bevorzugter Weise ist dieses Gen das für CIITA kodierende Gen.

[0029] Unter der Bezeichnung „Nucleinsäuresequenz, die für das Polypeptid CIITA kodiert“ versteht man, dass die fragliche Sequenz alles oder einen Teil der Nucleinsäuresequenz umfasst, welche mRNAs entsprechen, die aus verschiedenen Geweben oder Zelllinien, die CIITA-Aktivität aufweisen, in konstitutive Weise oder nach Induzierung stammen. Es kann sich also genauso gut um mindestens teilweise kodierende Sequenzen handeln, wie beispielsweise Sequenzen, die an der Expressionskontrolle beteiligt sind, insbesondere Sequenzen, die eine Transkriptionspromotor-Aktivität haben.

[0030] Unter „Nucleidsäuresequenz“ versteht man eine DNA und/oder RNA-Fragment, doppelsträngig oder einzelsträngig, natürlich isoliert oder synthetisch, welche eine präzise Abfolge an Nucleotiden, modifiziert oder nicht, kennzeichnet, welche erlaubt, ein Fragment oder einen Bereich der Nucleinsäure zu definieren.

[0031] Unter „Polypeptid“ wird eine präzise Abfolge an Aminosäuren verstanden, unabhängig von deren Größe oder Funktion, natürlich isoliert oder synthetisch, modifiziert oder nicht.

[0032] Unter „Nucleinsäuresequenz, welche eine Aktivität als Transkriptionspromotor aufweist“ wird eine Nucleinsäuresequenz verstanden, welche erlaubt, die Transkription mindestens eines Gens, homolog oder heterolog, welches nach dieser Sequenz lokalisiert ist, zu kontrollieren, d. h. zu initiieren und/oder zu modulieren. Gleichmaßen spricht man hier von der Promotorfunktion dieser Sequenzen oder des Promotors.

[0033] Unter „Reportergen“ wird jede Nucleinsäuresequenz verstanden, die nach einer zweiten Nucleinsäuresequenz lokalisiert ist, welche ermöglicht, die Aktivität des Transkriptionspromotors dieser zweiten Sequenz zu analysieren. So spiegelt sich die Transkription dieses Reportergens in dem Auftreten eines Produktes (RNA oder Polypeptid) wieder, welches mit konventionellen gut bekannten Techniken leicht nachweisbar ist.

[0034] Unter „Transkriptionsfaktor oder STAT1-Polypeptid“ wird der Transkriptionsfaktor STAT1 verstanden, welcher in der Lage ist, an das GAS-Element von durch Interferon γ induzierbaren Promotoren zu binden (Darnell, 1997, Science 277, 1630–1635).

[0035] Unter „Transkriptionsfaktor oder USF1 Polypeptid“ wird der Transkriptionsfaktor USF1 verstanden, welcher in der Lage ist, sich an die E-Box von Promotoren zu binden, wie beispielsweise an den Promotor des Gens, welches für das menschliche Wachstumshormon kodiert (Peritz et al., 1988, J. Biol. Chem., 263, 5005–5007) des Gens, welches für die $\lambda 2$ -Kette von Immunglobulinen kodiert (Chang et al., 1992, Nucleic Acid Res., 20, 287–293) oder des Gens, welches für p53 kodiert (Reisman und Rotter, 1993, Nucleic Acid Res., 21, 345–350).

[0036] Es ist ebenfalls erwähnenswert, dass die STAT1- und USF1-Faktoren rekombinanten oder natürlichen Ursprungs sein können, und insbesondere aus Faktoren bestehen, die in zellulären, insbesondere in nukleären Extrakten vorhanden sind, welche aus einer Zelllinie hergestellt werden, welche gegebenenfalls mit einem Zytokin stimuliert wurde, insbesondere mit Interferon γ , und welche die Faktoren exprimiert. Was insbesondere den STAT1-Faktor angeht, kann dieser entweder in nicht aktiver Form (nicht phosphoryliert) oder in aktivierter Form (phosphoryliert, insbesondere durch Einwirkung des Enzyms JAK1) vorliegen. Für die Umsetzung der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise die aktivierte Form von SAT1 gewählt.

[0037] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1 zu inhibieren, welches die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Benutzen des gesamten oder eines Teils des STAT1-Polypeptids, welches die Eigenschaft aufweist, das Polypeptid USF1 zu binden,
- (b) Benutzen des gesamten oder eines Teils des Polypeptids USF1, welches die Eigenschaft aufweist, das Polypeptid STAT1 zu binden,

(c) Inkontaktbringen der Polypeptide, die in (a) und (b) definiert sind, mit einer Kandidatenverbindung unter Bedingungen, die die Bindung der Polypeptide STAT1 und USF1 ermöglichen,
 (d) Messen der Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1, und
 (e) Vergleichen dieses Messwerts mit einem Messwert der Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1, welche unter gleichen experimentellen Bedingungen in Abwesenheit dieser Kandidatenverbindung beobachtet wird, wobei eine Verringerung der Bindung den Schluss erlaubt, dass diese Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1 zu inhibieren.

[0038] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Polypeptide STAT1 und USF1 können entweder natürliche Polypeptide sein, welche beispielsweise aus Zelllinien extrahiert wurden, welche die entsprechenden Gene exprimieren, wie beispielsweise die Linie Me67.8, und insbesondere im Kernextrakt dieser Linien vorhanden ist, wobei diese Linien gegebenenfalls durch Interferon γ stimuliert sein können, oder rekombinante Proteine (Greenlund et al., 1995, Immunity, 2, 677–687 für STAT1, und Roy et al., 1991, Nature, 354, 245–248 für USF1). Die Herstellung von nukleären Extrakten aus Zellen ist eine Technik, die vom Fachmann gut beherrscht wird. Die Polypeptide STAT1 und USF1, welche im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können ihre aktivierende Funktion auf andere Gene, für die die kooperative Wirkung dieser beiden Polypeptide nicht beobachtet wird, bewahren oder nicht (die Polypeptide wirken daher getrennt). Insbesondere ist es möglich, nur einen Teil der Polypeptide STAT1 und/oder USF1 zu verwenden, vorausgesetzt, dass sie ihre Eigenschaften bewahrt haben, aneinander zu binden, und gegebenenfalls die Eigenschaft, ihre entsprechenden Stellen zu binden. Nach einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Polypeptid STAT1 in der Lage, an das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') zu binden, da es in aktivierter Form (phosphoryliert) vorliegt. Diese Phosphorylierung des Polypeptids STAT1 kann insbesondere erhalten werden durch a) natürlich, in einer Zelle, welche dieses durch ein Zytokin induzierte Polypeptid, vorzugsweise durch Interferon γ , exprimiert, b) durch Einwirkung einer Kinase, wie beispielsweise JAK1, oder c) chemisch, durch Synthese.

[0039] In einer ersten Variante besteht der Schritt (d) aus einer indirekten Messung, d. h. in diesem besonderen Fall bestimmt man die Bildung von Komplexen, welche STAT1 umfassen. USF1 und eine doppelsträngige Nucleinsäuresequenz, welche das GAS-Element umfassen (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3'). Diese Art von Methode wird in der Literatur umfassend beschrieben, und beruht im Allgemeinen auf Erfahrungen aus der elektrophoretischen Migration (retardierendes Gel oder, in Englisch, „band shift“), und wird in der vorliegenden Anmeldung beispielhaft verwendet.

[0040] Nach einer zweiten Variante besteht der Schritt (d) aus einer anderen indirekten Messung, d. h., dass in diesem Fall die Expression einer Nucleinsäuresequenz gemessen wird, welche für das gesamte oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, wobei die Expression unter der Kontrolle eines Promotors platziert ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3'), oder die komplementäre Sequenz einschließt.

[0041] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Promotorsequenz aus Sequenzen ausgewählt, die alles oder einen Teil des Promotors IV (SEQ ID Nr. 1), oder seiner komplementären Sequenz umfassen.

[0042] Erfindungsgemäß können die Nucleinsäuresequenzen, deren Expression in Schritt (d) gemessen wird 1) Reportergene sein, wie beispielsweise das β -Globin des Kaninchens, Luciferase oder β -Lactamase oder 2) für alles oder einen Teil von Polypeptiden kodieren, die eine Aminosäuresequenz des Faktors CIITA haben, welche in der französischen Patentanmeldung Nr. 97 04954 beschrieben ist und insbesondere wie in SEQ ID Nr. 2 beschrieben ist. In diesem letzten Fall kann behauptet werden, dass sie für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA kodieren.

[0043] Die Messung der Expression der Nucleinsäuresequenz kann insbesondere bestehen aus a) der Messung von Messenger-RNA, die spezifisch ausgehend von der Nucleinsäuresequenz exprimiert wird, oder b) aus der Messung des exprimierten Polypeptids. Beispiele dieser Verfahren sind in der Literatur umfassend ausgeführt, und ihre Durchführung liegt im Kenntnisbereich des Fachmanns. Beispielhaft können Techniken, wie beispielsweise solche, die auf einer Hybridisierung mit Oligonucleotidsonden beruhen, welche markiert sind, wobei die Sequenz spezifisch für RNA ist, die man nachweisen möchte, die Amplifikation, beispielsweise durch PCR mit Hilfe von Primern, deren Sequenz spezifisch für diese RNA ist, die Technik des Schutzes gegen eine Degradierung durch RNase, ... oder die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen alles oder einen Teil des synthetisierten Polypeptids, etc... genannt werden.

[0044] Nach einer bevorzugten Ausführungsform dieser zweiten Variante der Durchführung der Erfindung,

wird der Schritt der Expressionsmessung der Nucleinsäuresequenz unter Bedingungen durchgeführt, die eine Induktion dieser Expression durch ein Zytokin erlauben, und insbesondere durch Interferon γ .

[0045] Nach einer dritten Ausführungsform der Erfindung besteht der Schritt (d) aus einer direkten Messung der Ausbildung von Komplexen zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1, beispielsweise durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen diese Komplexe oder jedes andere geeignete Mittel.

[0046] Die vorgeschlagenen Messverfahren in den oben dargestellten Varianten sind gleichermaßen auf erfindungsgemäße Verfahren, die nachfolgend dargestellt werden, anwendbar.

[0047] Die Erfindung betrifft gleichermaßen ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Expression einer Nucleinsäuresequenz zu inhibieren, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, vorzugsweise für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA (SEQ ID Nr. 2), oder für alles oder einen Teil des Reportergens, welches unter Kontrolle des gesamten oder einem Teil des Promotors gesetzt ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') einschließt, und bevorzugt des Promotors IV (SEQ ID Nr. 1), oder einer entsprechenden komplementären Sequenz, welches die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Benutzen des gesamten STAT1-Polypeptids oder eines Teils davon, welches die Eigenschaft aufweist, an das USF1-Protein und an das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') zu binden,
- (b) Verwenden des gesamten Proteins USF1 oder eines Teils davon, welches die Eigenschaft aufweist, das STAT1-Protein und die E-Box (5'-CACGTG-3') zu binden,
- (c) Verwenden einer Nucleinsäuresequenz, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, vorzugsweise für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA (SEQ ID Nr. 2) oder für alles oder einen Teil eines Reportergens, dessen Expression unter Kontrolle des gesamten oder eines Teils eines Promotors gesetzt ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3'), und vorzugsweise den Promotor IV (SEQ ID Nr. 1) einschließt,
- (d) Inkontaktbringen dieser in (a) und (b) definierten Polypeptide, einer der besagten in (c) definierten Nucleinsäuresequenz und einer dieser Kandidatenverbindungen,
- (e) Messen der Expression dieser Nucleinsäuresequenz, und
- (f) Vergleichen dieser Messung mit der Messung der Expression dieser Nucleinsäuresequenz, welche unter gleichen experimentellen Bedingungen beobachtet wird, insbesondere durch Aktivierung der Expression, in Abwesenheit dieser Kandidatenverbindung, wobei eine Verminderung dieser Expression, erlaubt zu schließen, dass diese Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Expression einer Nucleinsäuresequenz zu inhibieren, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, insbesondere für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA, oder für alles oder einen Teil eines Reportergens, welches unter Kontrolle des gesamten Promotors oder eines Teils gesetzt ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') einschließt, und vorzugsweise des Promotors IV (SEQ ID Nr. 1).

[0048] Die Erfindung betrifft gleichermaßen ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Aktivierung durch ein Zytokin, insbesondere durch Interferon γ , der Expression einer Nucleinsäuresequenz, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, insbesondere für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA (SEQ ID Nr. 2) oder für alles oder einen Teil eines Reportergens zu inhibieren, welches unter Kontrolle von allem oder einem Teil eines Promotors gesetzt ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') einschließt, und bevorzugterweise des Promotors IV (SEQ ID Nr. 1), welches die folgenden Schritte umfasst:

- (a) Verwenden einer Zelllinie, welche die Polypeptide STAT1 und USF1 in natürlicher und funktioneller Form exprimiert, beispielsweise die Linie Me67.8,
- (b) Transfizieren dieser Zelllinie mit einem Expressionsvektor, welcher mindestens eine Nucleinsäuresequenz umfasst, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, insbesondere für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA (SEQ ID Nr. 2), oder für alles oder einen Teil eines Reportergens, welches unter Kontrolle des gesamten oder eines Teils eines Promotors gesetzt ist, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') einschließt, und bevorzugterweise des Promotors IV (SEQ ID Nr. 1),
- (c) Inkontaktbringen dieser Zellen mit einer der besagten Kandidatenverbindungen oder Transfizieren der Zellen mit einem Expressionsvektor, welcher die Expression der besagten Verbindung in den Zellen unter Bedingungen ermöglicht, welche die Aktivierung der Expression der Nucleinsäuresequenz durch ein Zytokin gestatten, vorzugsweise durch Interferon γ ,
- (d) Messen der Expression dieser Nucleinsäuresequenz, und
- (e) Vergleichen dieser Messung mit der Messung der Expression dieser Nucleinsäuresequenz, welche unter gleichen experimentellen Bedingungen beobachtet wird, und insbesondere die Aktivierung der Expres-

sion, in Abwesenheit dieser Kandidatenverbindung, wobei eine Verminderung der Expression erlaubt zu schließen, dass diese Kandidatenverbindung in der Lage ist, die Aktivierung durch ein Zytokin, insbesondere durch Interferon γ , der Expression einer Nucleinsäuresequenz, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids, insbesondere für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA (SEQ ID Nr. 2) oder für alles oder einen Teil eines Reportergens, welches unter Kontrolle von allem oder einem Teil des Promotors, welcher mindestens das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') und insbesondere den Promotor IV (SEQ ID Nr. 1) zu inhibieren.

[0049] Ein Expressionsvektor, welcher mindestens eine Sequenz aus Nucleinsäuren umfasst, welche für alles oder einen Teil eines Polypeptids kodiert, welches unter Kontrolle von allem oder einem Teil des Promotors IV gesetzt ist, welcher das GAS-Element (5'-TTCTGATAAA-3') und die E-Box (5'-CACGTG-3') einschließt, kann insbesondere aus einem Vektor bestehen, der in der französischen Patentanmeldung Nr. 97 04954 beschrieben ist.

[0050] Die Erfindung betrifft gleichermaßen Verfahren, wie oben beschrieben, welche ermöglichen, Kandidatenverbindungen zu identifizieren, die geeignet sind, die Expression von Genen zu inhibieren, welche für MHC Klasse II Moleküle kodieren, sofern dies gewünscht ist, insbesondere unter Bedingungen, unter denen man nach der Induktion durch ein Zytokin, und insbesondere durch Interferon γ eingreifen möchte.

[0051] Zahlreiche Beeinträchtigungen, direkter Form oder indirekter Form, welche mit einer Störung der Expression von Genen, die für MHC Klasse II Moleküle kodieren, sind in der Literatur beschrieben. Als Beispiel können Beeinträchtigungen, wie der insulinabhängige Diabetes, die Multiple Sklerose, die rheumatoide Polyarthrit oder der Lupus erythematosus genannt werden, wobei eine der Ursachen die Überexpression von Genen sein könnte, die für MHC Klasse II Moleküle kodieren.

[0052] Andere Eigenschaften und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden nach Lektüre der nachfolgenden Beispiele, welche in [Fig. 1](#) dargestellt sind, klar. Jedoch soll die Erfindung nicht auf den Inhalt dieser Beispiele beschränkt werden.

[0053] Die [Fig. 1](#) stellt verschiedene Elemente dar, die an der Regulierung der induzierten Expression von Genen, die unter Kontrolle des Promotors IV gesetzt sind, durch Zytokine beteiligt sind.

Beispiele

Material und Methoden

Zellen

[0054] Die Zelllinien Me67.8 (Melanoma) und THP1 (Monozyten) werden in RPMI-1640 Medium kultiviert. Die Linien 2FTGH (Fibrosarcoma) und U3A (2FTGH-Linie, die STAT1 nicht exprimiert) werden im modifizierten Dulbecco-Medium kultiviert. Die Medien werden mit 10% fötalem Kälberserum, mit 10 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin ergänzt. Die Inkubation wird bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt.

Reportergene.

[0055] Die Expression von Reportergenen wird mit quantitativer RT-PCR, wie in Sperisen et al., 1992, PCR Meth. Appl. 1, 164–170 beschrieben. Die Transfektionen, die Herstellung der RNAs und deren Analysen mittels RT-PCR werden wie zuvor beschrieben durchgeführt (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851–2860). Das Plasmid PIV-308 schließt das Fragment –308 bis +75 der flankierenden Region des Promotors IV des Gens CIITA ein, welches nach dem Gen, welches für beta-Globulin des Kaninchens des Plasmids pGßG(+) subkloniert worden ist. Die Promotoraktivität wird mit Hilfe eines Phosphorimagers gemessen.

RNase-Abbau Protektionstests.

[0056] Die Tests werden anhand von 10 µg RNA pro Reaktion nach der von Steimle et al. beschriebenen Technik durchgeführt, Cell 75, 135–146.

Verwendete Oligonucleotide.

NGE: 5' -GGCCAGGGATTGGGATGCGAGTTCTGATAAAGCAGGTGGTGGCCACAG-3' ;

E: 5' -gggAAAGCACGTCCTGGCC-3'

Analyse der elektrophoretischen Mobilität (EMSA)

[0057] Die hergestellten Zellen werden entweder durch Interferon γ (500 U/ml) über 30 Minuten vor der Herstellung von nucleären Extrakten nach dem Verfahren von Harroch et al., 1994, EMBO J., 13, 1942–1949, stimuliert oder nicht.

[0058] Die durch Addition von [γ -32P] ATP an einem ihrer Enden radioaktiv markierten Oligonucleotide werden mit ihrer komplementären Sequenz hybridisiert und mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigt, um markierte Sonden aus doppelsträngiger DNA zu gewinnen, die dem gesamten oder einem Teil des Promotors IV von CIITA entsprechen.

[0059] Für die Bindungsstudie der Proteinfaktoren an die Sonde NGE, werden 6 μ g der aus dem Kern der Zellen extrahierten Proteine mit 2×10^4 cpm der DNA-Sonde, 1,25 μ g poly-(dI) (dC) (Pharmacia), 0,5 μ g einzelsträngiger DNA aus E. coli, mit oder ohne Competitor in einem endgültigen Volumen von 20 μ l [20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerol, 5 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermin und 100 μ g BSA] gemischt. Die Bindungsbedingungen der Faktoren an die Sonde G sind identisch, außer: kein poly-(dI) (dC), keine DNA aus E. coli.

[0060] Das rekombinante STAT1-Protein, welches gereinigt und aktiviert ist, und das gereinigte und rekombinante Protein USF1 werden unter identischen Bedingungen verwendet.

[0061] Nach Zugabe der radioaktiv markierten Nucleinsäuresonde wird die Mischung für 30 Minuten bei 20°C inkubiert.

[0062] Für „Supershift“-Experimente werden die Antikörper hinzugegeben und das Gemisch wird für 20 Minuten bei 4°C stehen gelassen, bevor eine 5% Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt wird. Nach dem Trocknen wird das Gel autoradiographisch untersucht. Die Ergebnisse werden mit Hilfe eines Phosphorimagers bestimmt.

Beispiel 1: Nachweis von zwei Komplextypen, die sich im Bereich der GAS-/E-Box-Region bilden können.

[0063] Um die DNA-/Proteinkomplexe zu studieren, die sich im Bereich der Region bilden können, welche in cis die regulatorischen Elemente der GAS/E-Box des durch Interferon γ induzierbaren Promotors IV umfasst, welche die Anmelderin zuvor identifiziert hat (Muhlethaler-Mottet et al., 1997, EMBO J., 16, 2851–2860), wurden elektrophoretische Mobilitätstests mit DNA-Sonden, die diesen Bereich abdecken (NGE) und mit einem nucleären Extrakt von Me67.8-Zellen, nach oder ohne Induktion durch Interferon γ durchgeführt.

[0064] Mit dem Kernextrakt, der aus nicht stimulierten Zellen hergestellt worden ist, stellt man fest, dass ein Komplex, der als L für „lower“ bezeichnet wird, zwischen der DNA-Sonde und mindestens einem Protein gebildet wird, welches in dem Kernextrakt vorhanden ist.

[0065] Bei dem Kernextrakt, der ausgehend von mit Interferon γ stimulierten Zellen hergestellt worden ist, stellt man fest, dass ein anderer Komplex gebildet wird, welcher als U für „upper“ bezeichnet wird, welcher eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweist.

[0066] Um die Spezifität und die Bindungsstelle der DNA jedes der identifizierten Komplexe zu studieren, haben wir Konkurrenzexperimente in Gegenwart von spezifischen Sonden gegen das GAS-Element (G) und die E-Box (E) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Komplex L nur in Gegenwart einer Sonde destabilisiert wird, die in Konkurrenz mit E steht, sei es, dass der Nuclearextrakt aus stimulierten oder nicht durch Interferon γ stimulierten Zellen stammt. Im Gegensatz dazu wird die Bildung des Komplexes U durch Sonden zur Konkurrenz um G und E inhibiert. Diese Ergebnisse zeigen daher an, dass der Komplex L ein Protein intervenieren lässt, welches in der Lage ist, sich an die E-Box zu binden, welche in nicht stimulierten Zellen vorhanden ist, und dass sich nach der Stimulierung mit Interferon γ , ein neuer Komplex bilden kann. Wir haben unter anderem mit Hilfe von Mutageneseexperimenten, die sich gegen das GAS-Element und gegen die E-Box richten, gezeigt, dass die Bindung des Komplexes U an die DNA nicht in Gegenwart von Wildtyp-GAS und

E-Box-Sequenzen möglich ist.

[0067] Diese Experimente erlauben den Schluss, dass der Komplex U aus mindestens einem Faktor gebildet wird, der in der Lage ist, sich an die E-Box und an ein durch Interferon γ aktiviertes Protein zu binden, welches sich an das GAS-Element bindet. Ein für diesen zweiten Proteinfaktor möglicher Kandidat ist das Protein STAT1 (Decker et al., 1991, EMBO J., 10, 927–932).

Beispiel 2:

[0068] Um die Rolle von STAT1 bei der Regulierung der Expression des Gens CIITA nach der Aktivierung durch Interferon γ direkt zu untersuchen, wird die Fähigkeit zur Induktion des Gens CIITA in einer Zelllinie, der STAT1 (U3A) fehlt, und in einer Zelllinie, die STAT1 exprimiert (2FTGH) unter Aktivierungsbedingungen durch Interferon γ untersucht.

[0069] Im Gegensatz zu dem, was man in der Linie 2FTGH beobachtet, wird in der Linie U3A die Expression von Messenger-RNAs für CIITA oder eine Aktivierung des Promotors IV von CIITA nicht durch das Zytokin induziert, wie Experimente zum Schutz gegenüber RNase zeigen, und die Analyse der Promotorfunktion durch Konstruktion von Reportergenen, welche unter Kontrolle des zu analysierenden Promotors exprimiert werden.

[0070] Die Ergebnisse zeigen, dass STAT1 die Aktivierung durch Interferon γ durch den Promotor IV von CIITA kontrolliert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Arbeiten von Merraz et al., 1996, Cell, 84, 431–442, überein, welche zeigen, dass Messenger-RNAs für CIITA nicht durch Interferon γ in Makrophagen induziert werden können, die aus STAT^{−/−}-Mäusen stammen.

[0071] Um die Rolle von STAT1 auf dem Niveau des Promotors IV von CIITA und sein Vorhandensein auf dem Niveau des Komplexes U zu analysieren, ist dieser Proteinkomplex in Verbindung mit der markierten NGE-Sonde durch „Supershift“ mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen STAT1 analysiert worden. Während die monoklonalen Antikörper, die nicht spezifisch sind, keine Wirkung auf die elektrophoretische Migration von DNA-/Protein U-Komplexen haben, verzögern die anti-STAT1-monoklonalen Antikörper die Migration des U-Komplexes beträchtlich, selbst bei sehr starken Verdünnungen (1/2000), während die Migration des Komplexes L unverändert bleibt. Das bestätigt, dass das Protein STAT1 tatsächlich einer der Bestandteile des Komplexes U ist.

Beispiel 3:

[0072] Funktionelle Assays haben erlaubt, die überragende Rolle zu beweisen, die die E-Box durch die Induktion von Interferon γ spielt. Die Nucleinsäuresequenz der E-Box des Promotors IV von CIITA weist die Consensus-CACGTG-Sequenz auf, die zuvor als Bindungsstelle der DNA durch Helix/Schleife/Helix/Leucin-Zipper-Proteine beschrieben worden ist.

[0073] Die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen den USF1-Faktor hat erlaubt, das Vorliegen dieses Faktors innerhalb der Proteinkomplexe U und L zu zeigen. Um zu bestätigen, dass der Faktor USF1 in der Lage ist, sich an den Promotor IV von CIITA zu binden, sind EMSA-Experimente in Gegenwart von rekombinanten USF1-Proteinen durchgeführt worden. Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein USF1 in den Komplexen U und L tatsächlich vorhanden ist und sich an den Promotor IV von CIITA bindet.

Beispiel 4:

[0074] Wir haben anschließend analysiert, ob die STAT1- und USF1-Proteine den Komplex U in kooperativer Weise nach Induktion durch Interferon γ bilden. Hierbei haben EMSA-Analysen erlaubt zu zeigen, dass entgegen dem rekombinanten Faktor USF1, der sich alleine an die radioaktiv markierte NGE-Sonde binden kann, der Faktor STAT1 selbst nicht an die gleiche Sonde binden kann. Daneben hat die Zugabe von zunehmenden Mengen an aktiviertem STAT1 zu einer vorgegebenen Menge an USF1 in Gegenwart eines Überschusses der freien NGE-Sonde die Bildung von STAT1/USF1 befördert, statt die Fixierung von USF1 allein. Die Menge der mit den beiden Faktoren verbundenen Sonde zeigt, dass die Fixierung von STAT1 und von USF1 in kooperativer Weise stattfindet, da die Menge der an diesen Komplex gebundenen Sonde (17%) ungefähr zweimal höher ist als die Summe der Sonde, die an den Faktor USF1 allein (7,6%) und an den Faktor STAT1 allein (0%) bindet.

[0075] Diese kooperative Fixierung wird gleichermaßen bei Kernextrakten, die aus nicht stimulierten

Me67.8-Zellen stammen, und mit dem rekombinanten aktivierten STAT1-Faktor beobachtet. Die mit den rekombinanten Proteinen gebildeten Komplexe weisen die gleichen elektrophoretischen Migrationsprofile auf, wie die, die aus Nuklearextrakten von durch Interferon γ stimulierten Me67.8-Zellen gewonnen werden.

SEQUENZLISTE

<110> Transgene SA

<120> Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die in der Lage sind, die Bindung zwischen dem Transkriptionsfaktor STAT1 und dem Transkriptionsfaktor USF1 zu inhibieren.

<130> D17374

<140>

<141>

<150> FR 98 02025

<151> 1998-02-19

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 664

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggggagaagt cagaggtaac cttgccccct ccctcaattc cagatgagga aattcaggcc 60
tgaaaaggga aagtgaccac ctcaaagtct catgccttgg aggaccagc aggaatccaa 120
gacctctgaa aaggaccggc agggctcttg ccacggctgg ggggtgtggtc atggtaacac 180
aggttttcca tccatggaag gtacctgagg gattttctct tccctccctag ggccagcatc 240
agaggagtga atagctcagt tagctcatct caggggccat gtgccctcgg aggtggtttg 300
ccactttcac ggttggaactg agttggagag aaacagagac ccaccaggg gtggggacaa 360
gctccctgca actcaggact tgcagatcac ttgcccaagt ggctccctag ctcttggttc 420
ctggcccggg gcctgggact ctccccgaag tggggctggc cactgtgagg aaccgactgg 480
aggcagggac ctcttggaatg ccccaggcag ttgggatgcc actcttgata aagcacgttg 540
tggccacagt aggtgcttgg ttgctccaca gcctggcccg agctcagcgc tgcagaaaga 600
aagtgaaagg gaaaaaagac tgcggggagg cggggaggta ggatgaccag cggacgagct 660
gcca

```

<210> 2

<211> 4441

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

cagacttgcc gcggccccag agctggcggg agggagaggg caccagcagc gcgcgcggga 60
gccccgggaa cagcggcagc tcacagtgtg ccaccatgga gttggggccc ctagaagggtg 120
gctacctgga gcttcttaac agcgaatgtg accccctgtg cctctaccac ttctatgacc 180
agatggacct ggctggagaa gaagagattg agctctactc agaaccggac acagacacca 240
tcaactgcga ccagttcagc aggctgttgt gtgacatgga aggtgatgaa gagaccaggg 300
aggcttatgc caatatcgcg gaactggacc agtatgtctt ccaggactcc cagctggagg 360
gcctgagcaa ggacattttc aagcacatag gaccagatga agtgatcggg gagagtatgg 420
agatgccagc agaagttggg cagaaaagtc agaaaagacc cttcccagag gagcttccgg 480
cagacctgaa gcaactggaag ccagctgagc cccccactgt ggtgactggc agtctcctag 540
tgggaccagt gagcgactgc tccaccctgc cctgcctgcc actgcctgcg ctgttcaacc 600
aggagccagc ctccggccag atgcgcctgg agaaaaccga ccagattccc atgcctttct 660
ccagttcctc gttgagctgc ctgaatctcc ctgagggacc catccagttt gtcccaccca 720
tctccactct gccccatggg ctctggcaaa tctctgaggc tggaacaggg gtctccagta 780
tattcatcta ccatgggtgag gtgcccagg ccagccaagt acccctccc agtggattca 840
ctgtccacgg cctcccaaca tctccagacc ggccaggctc caccagcccc ttgctcccat 900
cagccactga cctgcccagc atgcctgaac ctgccctgac ctcccagca aacatcacag 960

```

```

agcacaagac gtcacccacc caatgcccgg cagctggaga ggtctccaac aagcttccaa 1020
aatggcctga gccgggtggag cagttctacc gctcactgca ggacacgtat ggtgcccagc 1080
ccgcaggccc ggatggcatc ctagtggagg tggatctggt gcaggccagg ctggagagga 1140
gcagcagcaa gagcctggag cgggaactgg ccaccccggg ctgggcagaa cggcagctgg 1200
cccaaggagg cctggctgag gtgctgttg gtcgcaagga gcaccggcgg ccgcgtgaga 1260
cacgagtgat tgctgtgctg ggcaaagctg gtcagggcaa gagctattgg gctggggcag 1320
tgagccgggc ctgggcttgt ggcgggcttc cccagtacga ctttgtcttc tctgtccccc 1380
gccattgctt gaaccgtccg ggggatgcct atggcctgca ggatctgctc ttctccctgg 1440
gccacagcc actcgtggcg gccgatgagg ttttcagcca catcttgaag agacctgacc 1500
gcgttctgct cactctagac gccttcgagg agctggaagc gcaagatggc ttctgcaca 1560
gcagtgccgg accggcaccg gcggagccct gctccctccg ggggctgctg gccggccttt 1620
tccagaagaa gctgctccga ggttgacccc ttctcctcac agcccggccc cggggccgcc 1680
tggtccagag cctgagcaag gccgacgccc tatttgagct gtccggcttc tccatggagc 1740
aggcccaggc atacgtgatg cgctactttg agagctcagg gatgacagag caccaagaca 1800
gagccctgac gctcctccgg gaccggccac ttcttctcag tcacagccac agccctactt 1860
tgtgccgggc agtgtgcccag ctctcagagg ccttgctgga gcttggggag gacgccaagc 1920
tgccctccac gctcacggga ctctatgtcg gcttgctggg ccgtgcagcc ctgcacagcc 1980
ccccggggc cctggcagag ctggccaagc tggcctggga gctgggccc agacatcaaa 2040
gtaccctaca ggaggaccag tcccatcccg cagacgtgag gacctgggcg atggccaaa 2100
gcttagtcca acaccaccg cgggcccgcg agtccgagct ggccctcccc agcttccctc 2160
tgcaatgctt cctggggggc ctgtggctgg ctctgagtgg cgaaatcaag gacaaggagc 2220
tcccgcagta cctagcattg accccaagga agaagaggcc ctatgacaac tggctggagg 2280
gcgtgccacg ctttctggct gggctgatct tccagcctcc cgcccgtgc ctgggagccc 2340
tactcgggccc atcggcggtt gcctcggtgg acaggaagca gaaggtgctt gcgaggtacc 2400
tgaagcggct gcagccgggg aactgcggg cgcggcagct gcttgagctg ctgcactgcg 2460
cccacgaggc cgaggaggct ggaatttggc agcacgtggt acaggagctc cccggccgcc 2520
tctcttttct gggcacccgc ctcacgcctc ctgatgcaca tgtactgggc aaggccttgg 2580
aggcggcggg ccaagacttc tccctggacc tccgagcac tggcatttgc cctctggat 2640
tggggagcct cgtgggactc agctgtgtca cccgttccag ggctgccttg agcgacacgg 2700
tggcgctgtg ggagtcctcg cggcagcatg gggagaccaa gctacttcag gcagcagagg 2760
agaagtccac catcgagcct ttcaaagcca agtccctgaa ggatgtggaa gacctgggaa 2820
agcttctgca gactcagagg acgagaagtt cctcggaaga cacagctggg gagctccctg 2880
ctgttcggga cctaaagaaa ctggagtttg cgctgggccc tgtctcaggc cccagggctt 2940
tccccaaact ggtgcggatc ctcacggcct ttctctccct gcagcatctg gacctggatg 3000
cgctgagtga gaacaagatc ggggacgagg gtgtctcgca gctctcagcc accttcccc 3060
agctgaagtc cttggaaacc ctcaatctgt cccagaacaa catcactgac ctgggtgccc 3120
acaaactcgc cgaggccctg ccttcgctcg ctgcatcccc gctcaggcta agcttgtaca 3180
ataactgcat ctgcgacgtg ggagccgaga gcttggtctg tgtgtctccg gacatgggtg 3240
ccctccgggt gatggacgca agttcacggc tgccggggcc cagcagctcg ctgccagcct 3300
tcggaggtgt cctcatgttg agacgctggc gatgtggacg cccaccatcc cattcagtgt 3360
ccaggaaacac ctgcaacaac aggatccag gatcagcctg agatgatccc agctgtgctc 3420
tggaacaggca tgttctctga ggacactaac cacgctggac cttgaactgg gtacttgttg 3480
acacagctct tctccaggct gtatcccatg aggcctcagc atcctggcac ccggcccttg 3540
ctggttcagg gttggccctt gcccggctgc ggaatgaacc acatcttgct ctgctgacag 3600
acacaggccc ggctccaggc tcctttagcg cccagttggg tggatgcctg gtggcagctg 3660
cggtccaccc aggagccccg aggccttctc tgaaggacat tgcggacagc cacggccagg 3720
ccagagggag tgacagaggc agccccattc tgcttgccta gggccctgcc accctgggga 3780
gaaagtactt cttttttttt attttttaga agagtctcac tgttgcccag gctggcgtgc 3840
agtgggtgca tctgggttca ctgcaacctc cgctcttggt gttcaagcga ttcttctgct 3900
tcagcctccc gagtagctgg gactacaggc acccaccatc atgtctggct aatttttcat 3960
ttttagtaga gacagggttt tgccatgttg gccaggctgg tctcaaaactc ttgacctcag 4020
gtgatccacc cactcagcc tcccaaagtg ctggggatta caagcgtgag cactgcacc 4080
gggcccacaga gaaagtactt ctccaccctg ctctccgacc agacaccttg acagggcaca 4140
ccgggcactc agaagacact gatgggcaac cccagcctg ctaattcccc agattgcaac 4200
aggctgggct tcagtggcag gctgcttttg tctatgggac tcaatgcact gacattgttg 4260
gccaaagcca aagctaggcc tggccagatg caccaggccc ttagcaggga aacagcta 4320
gggacactaa tggggcggtg agaggggaac agactggaag cacagcttca ttctctgtgt 4380
cttttttcac tacattataa atgtctcttt aatgtcacia aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4440
a

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung, ob eine Kandidatverbindung befähigt ist, die Bindung der Polypeptide STAT1 und USF1 zu inhibieren, welches die folgenden Stufen umfasst:

- (a) Vorlegen von allem oder einem Teil des Polypeptids STAT1, das die Eigenschaft aufweist, am Polypeptid USF1 gebunden zu werden,
- (b) Vorlegen von allem oder einem Teil des Polypeptids USF1, das die Eigenschaft aufweist, am Polypeptid STAT1 gebunden zu werden,
- (c) Inkontaktbringen der in (a) und (b) definierten genannten Polypeptide mit einer genannten Kandidatverbindung unter Bedingungen, die die Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1 ermöglichen,
- (d) Messen der Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1 und
- (e) Vergleichen dieser Messung mit der Messung der Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1, die unter den gleichen Versuchsbedingungen in Abwesenheit der genannten Kandidatverbindung zu beobachten ist, wobei die Schwächung der Bindung Rückschlüsse ermöglicht, ob die genannte Kandidatverbindung befähigt ist, die Bindung zwischen den Polypeptiden STAT1 und USF1 zu inhibieren.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Stufe (d) auf der Messung der Bindung von Komplexen beruht, die STAT1, USF1 und eine doppelsträngige Nucleinsäuresequenz umfasst, die das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte doppelsträngige Nucleinsäuresequenz alles oder einen Teil des Promotors IV, der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder ihrer komplementären Sequenz umfasst.

4. Verfahren zur Bestimmung der Befähigung einer Kandidatverbindung zur Inhibierung der Exprimierung einer Nucleinsäuresequenz, die für das ganze oder einen Teil eines Polypeptids unter der Steuerung von allem oder einem Teil eines Promotors codiert, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- (a) Vorlegen von allem oder einem Teil eines Polypeptids STAT1, das die Eigenschaft aufweist, an das Protein USF1 und auf dem Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' gebunden zu werden,
- (b) Vorlegen von allem oder einem Teil eines Polypeptids USF1, das die Eigenschaft aufweist, an das Protein STAT1 und auf der Box E: 5'-CACGTG-3' gebunden zu werden,
- (c) Vorlegen einer Nucleinsäuresequenz, die für alles oder einen Teil eines Polypeptids codiert, das unter der Steuerung von allem oder einem Teil eines Promotors exprimiert wird, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst,
- (d) Inkontaktbringen der in (a) und (b) definierten genannten Polypeptide, einer in (c) definierten genannten Nucleinsäuresequenz und einer genannten Kandidatverbindung,
- (e) Messen der Exprimierung der genannten Nucleinsäuresequenz und
- (f) Vergleichen dieser Messung mit der Messung der Exprimierung der genannten Nucleinsäuresequenz, die unter den gleichen Versuchsbedingungen, insbesondere der Aktivierung der Exprimierung, in Abwesenheit der genannten Kandidatverbindung beobachtet wird, wobei eine Verringerung der genannten Exprimierung Rückschlüsse auf die Befähigung der genannten Kandidatverbindung zur Inhibierung der Exprimierung einer Nucleinsäuresequenz ermöglicht, die für alles oder einen Teil eines Polypeptids unter der Steuerung von allem oder einem Teil eines Promotors codiert, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst.

5. Verfahren zur Bestimmung der Befähigung einer Kandidatverbindung zur Inhibierung der durch ein Zytokin bewirkten Aktivierung der Exprimierung einer Nucleinsäuresequenz, die für alles oder einen Teil eines Polypeptids unter Steuerung von allem oder einem Teil eines Promotors codiert, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- (a) Vorlegen einer Zelllinie, die die natürlichen und funktionellen Polypeptide STAT1 und USF1 exprimiert,
- (b) Transfizieren der genannten Zelllinie mit einem Expressionsvektor, der mindestens eine Nucleinsäuresequenz umfasst, die für alles oder einen Teil eines Polypeptids unter der Steuerung von allem oder einem Teil eines Promotors codiert, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst,
- (c) Inkontaktbringen der genannten Zellen mit einer Kandidatverbindung oder Transfizieren der Zellen mit einem Expressionsvektor, die die Exprimierung einer genannten Verbindung im Inneren der genannten Zellen unter Bedingungen ermöglichen, die eine Aktivierung der Exprimierung der Nucleinsäuresequenz durch ein Zytokin zulassen,
- (d) Messen der Exprimierung der genannten Nucleinsäuresequenz und
- (e) Vergleichen dieser Messung mit der Messung der Exprimierung der genannten Nucleinsäuresequenz, die unter den gleichen Versuchsbedingungen, insbesondere der Aktivierung der Exprimierung, in Abwesenheit der genannten Kandidatverbindung beobachtet wird, wobei eine Verringerung der genannten Exprimierung Rückschlüsse auf die Befähigung der genannten Kandidatverbindung zur Inhibierung der durch das Zytokin bewirkten Aktivierung der Exprimierung der Nucleinsäuresequenz zulässt, die für alles oder einen Teil

des Polypeptids unter der Steuerung von allem oder einem Teil des Promotors codiert, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Zytokin γ -Interferon ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelllinie die Linie Me67.8 ist.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Nucleinsäuresequenz für alles oder einen Teil des Polypeptids CIITA der Sequenz SEQ ID NO: 2 codiert.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die genannte Nucleinsäuresequenz für alles oder einen Teil eines Reportergens und insbesondere für alles oder einen Teil des Kanimchen- β -Globulins, der Luciferase oder der β -Lactamase codiert.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der genannte Promotor, der das Element GAS: 5'-TTCTGATAAA-3' und die Box E: 5'-CACGTG-3' umfasst, der Promotor IV der Sequenz SEQ ID NO: 1 ist.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung der Expression der genannten Nucleinsäuresequenz auf der Messung spezifischer Messenger-RNAs beruht, die ausgehend von der genannten Nucleinsäuresequenz exprimiert werden.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Messung der Expression der genannten Nucleinsäuresequenz auf der Messung des exprimierten Polypeptids beruht.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

GGGGAGAAGTCAGAGGTAACCTTGCCCCCTCCCTCAATTCCAGATGAGGAAATTCAGGCC
 TGAAAAGGGAAAGTGACCACCTCAAAGTCTCATGCCTTGGAGGACCCAGCAGGAATCCAA
 GACCTCTGAAAAGGACCGGCAGGGCTCTTGCCACGGCTGGGGGTGTGGTCATGGTAACAC
 AGGTTTTCCATCCATGGAAGGTACCTGAGGGATTTTCTCTTCCTCCCTAGGGCCAGCATC
 AGAGGAGTGAATAGCTCAGTTAGCTCATCTCAGGGGCCATGTGCCCTCGGAGGTGGTTTG
 CCACTTTACGGTTGGACTGAGTTGGAGAGAAACAGAGACCCACCCAGGGGTGGGGACAA
 GCTCCCTGCAACTCAGGACTTGCAGATCACTTGCCCAAGTGGCTCCCTAGCTCCTGGCTC

NfκB

CTGGCCCGGGGCCTGGGACTCTCCCGAAGTGGGGCTGGCCACTGTGAGGAACCGACTGG

NFGMa

GAS

Ebox

AGGCAGGGACCTCTTGGATGCCCCAGGCAGTTGGGATGCCACTTCTGATAAAGCACGTG

TGGCCACAGTAGGTGCTTGGTTGCTCCACAGCCTGGCCCGAGCTCAGCGCTGCAGAAAGA

IRF1/2

AAGTGAAAGGGAAAAAGAACTGCGGGAGGCGGGGAGGTAGGATGACCAGCGGACGAGCT

+1

GCCACAGACTTGCCGCGGCCCCAGAGCTGGCGGGAGGGAGAGGCCACCAGCAGCGCGCGC
 GGGAGCCCGGGGAACAGCGGCAGCTCACAGTGTGCCACCATG

Figur 1