

19



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

11 CH 693 031 A5

51 Int. Cl.⁷: C 07 K 014/705
C 12 N 015/12
C 07 K 016/28

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

12 PATENTSCHRIFT A5

21 Gesuchsnummer: 02305/98

22 Anmeldungsdatum: 17.11.1998

30 Priorität: 20.11.1997 US 60/066 225

24 Patent erteilt: 31.01.2003

45 Patentschrift
veröffentlicht: 31.01.2003

73 Inhaber:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG,
Grenzacherstrasse 124,
4070 Basel (CH)

72 Erfinder:
Linda Marie Fish, Star Route 2, Box 327-A,
94020 La Honda, CA (US)
Reena Khare, 575 East Remington Drive, Apt. 6B,
94087 Sunnyvale, CA (US)
Douglas Kenneth Rabert, 439 Rhone Court,
94043 Mt. View, CA (US)
Lakshmi Sangameswaran, 350 Avenida Arboles,
95123 San Jose, CA (US)
Dietrich, Paul Shartzter, 3949 Bibbits Drive,
Palo Alto CA 94303 (US)

54 Nucleinsäure, die einen Nervengewebe-Natriumkanal kodiert.

57 Eine neue Nucleinsäuresequenz, die ein spannungs-gesteuertes, bevorzugt TTX-resistentes, Natriumkanalprotein von Säugetieren codiert, wurde isoliert. Es werden auch Polypeptidprodukte der rekombinanten Expression dieser Sequenzen, Expressionsvektoren, die die DNA-Sequenz enthalten, und Wirtszellen, die mit diesen Expressionsvektoren transformiert sind, offenbart. Andere Aspekte der Erfindung sind Peptide, deren Sequenzen auf der Aminosäuresequenzen, die aus diesen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, basieren, Antikörper, die für diese Proteine und Peptide spezifisch sind, Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung solcher Proteine und damit verwandter Nucleinsäuren. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung dieser spannungs-gesteuerten, bevorzugt Tetrodotoxin-resistenten Calciumkanalproteine als therapeutische Mittel.



Beschreibung

Die Erfindung betrifft allgemein Natriumkanalproteine und genauer eine neue Nucleinsäuresequenz, die eine Säugetier- α -Untereinheit eines spannungsgesteuerten, bevorzugt Tetrodotoxin-resistenten, Nervengewebe-Natriumkanalproteins codiert. Die Erfindung betrifft weiterhin seine Herstellung mit Gentechnik.

Die Basiseinheit an Information, die von einem Teil des Nervensystems zu einem anderen übertragen wird, ist ein einzelnes Aktionspotenzial oder ein Nervenimpuls. Die «Übertragungsleitung» für diese Impulse ist das Axon oder die Nervenfasern. Es wurde gezeigt, dass die elektrische Erregbarkeit der Nervenmembran von dem spannungsempfindlichen ionischen Permeabilitätssystem der Membran abhängt, das es zulässt, Energie zu verwenden, die in ionischen Konzentrationsgradienten gespeichert wird. Die elektrische Aktivität des Nervs wird ausgelöst durch eine Depolarisierung der Membran, die Kanäle durch die Membran öffnet, die äusserst selektiv für Natriumionen sind, die dann durch den elektrochemischen Gradienten nach innen getrieben werden. Von den vielen Ionenkanälen ist der spannungsgesteuerte oder spannungsempfindliche Natriumkanal der am besten untersuchte. Es ist ein Transmembranprotein, das wesentlich ist zur Erzeugung von Aktionspotenzialen in erregbaren Zellen. Eine ausgezeichnete Übersicht über Natriumkanäle findet sich in Catterall, TINS 16 (12), 500 bis 506 (1993).

Die cDNA für mehrere Na^+ -Kanäle wurden kloniert und sequenziert. Numa et al., Annals of the New York Academy of Sciences 479, 338 bis 355 (1986) beschreiben cDNA aus dem elektrischen Organ des Aals und zwei verschiedene aus Rattengehirn. Rogart, U.S.-Patent Nr. 5 380 836 beschreibt cDNA aus dem Gewebe des Rattenherzens. Siehe auch Rogart et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 8170 bis 8174 (1989). Die Sequenz von PN1 und seinen Orthologen bei Menschen (hNE) und Kaninchen (Na^+ s) wurde veröffentlicht (siehe z.B. Klugbauer et al., EMBOJ 14, 1084 bis 1090 (1995) und Belcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 923, 11034 bis 11038 (1995)). Die Sequenz von Ratten-PN1, die aus DRG kloniert wurde, und ihre Funktionsexpression wurden beschrieben (siehe z.B. Sangameswaran et al., J. Biol. Chem. 272, 14805 bis 14809 (1997)). Andere klonierte Natriumkanäle schliessen die Typen I und II des Rattengehirns, Noda et al., Nature 320, 188 bis 192 (1986), IIa, Auld et al., Neuron 1, 449 bis 461 (1988) und III, Kayano et al., FEBS Lett. 228, 187 bis 194 (1988), Rattenskelettmuskel (SkM1), Trimmer et al., Neuron 3, 33 bis 49 (1989), Ratten-NaCh6, Schaller et al., J. Neurosci. 15, 3231 bis 3242 (1995), periphere Nervenatriumkanäle Typ 3 der Ratte (tPN3), Sangameswaran et al., J. Biol. Chem. 271, 5953 bis 5956 (1996), auch als SNS bezeichnet, Akopian et al., Nature 379, 257 bis 262 (1996), atypische Rattenkanäle, Felipe et al., J. Biol. Chem. 269, 30125 bis 30131 (1994) und den Glia-Natriumkanal der Ratte, Akopian et al., FEBS Lett. 400, 183 bis 187 (1997) ein.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aminosäuresequenz des Na^+ -Kanals über einen langen evolutionären Zeitraum konserviert ist. Diese Untersuchungen haben auch gezeigt, dass der Kanal ein einziges Polypeptid ist, das vier interne Sequenzwiederholungen oder homologe Domänen (Domänen I bis IV) mit ähnlichen Aminosäuresequenzen enthält. Jede Domäne faltet sich in sechs vorhersagbare und helikale Transmembransegmente: fünf sind hydrophobe Segmente und eins ist stark geladen mit vielen positiv geladenen Lysin- und Argininresten. Dieses stark geladene Segment ist das vierte Transmembransegment in jeder Domäne (S4-Segment) und ist wahrscheinlich an der Spannungssteuerung beteiligt. Die positiv geladenen Seitenketten an dem S4-Segment sind wahrscheinlich gepaart mit den negativ geladenen Seitenketten an den anderen fünf Segmenten, sodass die Membrandepolarisierung die Position einer Helix bezogen auf die andere verschieben könnte, wodurch der Kanal geöffnet wird. Zusätzliche Untereinheiten können die Funktion des Kanals modifizieren.

Der therapeutische Nutzen von rekombinanten Materialien, die aus der DNA zahlreicher Natriumkanäle stammen, wurde gefunden. Z.B. offenbart U.S.-Patent Nr. 5 132 296 von Cherksey gereinigte Na^+ -Kanäle, die sich als nützliche therapeutische und diagnostische Werkzeuge erwiesen haben.

Isoformen von Natriumkanälen werden in «Unterfamilien» unterteilt. Der Ausdruck «Isoform» wird hier verwendet, um distinkte aber nah verwandte Natriumkanalproteine zu bezeichnen, d.h. solche mit einer Aminosäurehomologie von ungefähr 60 bis 80%. Diese zeigen auch eine starke Homologie in den Funktionen. Der Ausdruck «Unterfamilie» wird verwendet, um distinkte Natriumkanäle zu bezeichnen, die eine Aminosäurehomologie von ungefähr 80 bis 95% haben. Kombinationen mehrerer Faktoren werden verwendet, um die Unterschiede innerhalb einer Unterfamilie zu bestimmen, z.B. die Geschwindigkeit eines Kanals, die chromosomale Anordnung, die Expressionsdaten, die Homologie mit anderen Kanälen innerhalb einer Art und die Homologie mit einem Kanal der gleichen Unterfamilie über die Arten hinweg. Eine andere Überlegung ist eine Affinität zu Tetrodotoxin («TTX»). TTX ist ein äusserst potentes Toxin aus dem «Puffer»- oder Fugufisch, das die Leitung von Nervenimpulsen entlang der Axone und in erregbaren Membranen von Nervenfasern, blockiert. TTX bindet an den Na^+ -Kanal und blockiert den Fluss der Natriumionen.

Untersuchungen unter Anwendungen von TTX als Sonde haben Licht auf den Mechanismus und die Struktur von Na^+ -Kanälen geworfen. Es gibt 3 Na^+ -Kanal-Unterarten, die durch die Affinität für TTX definiert werden, die durch IC_{50} -Werte gemessen werden kann: TTX-empfindliche Na^+ -Kanäle ($\text{IC}_{50} = 1$ bis 30 nM), TTX-unempfindliche Na^+ -Kanäle ($\text{IC}_{50} = 1$ bis $5 \mu\text{M}$) und TTX-resistente Na^+ -Kanäle ($\text{IC}_{50} \geq 50 \mu\text{M}$).

TTX-unempfindliche Aktionspotenziale wurden zuerst im Rattenskelettmuskel untersucht (Redfern et

al., Acta Physiol. Scand. 82, 70 bis 78 (1971)). Anschliessend wurden diese Aktionspotenziale für andere Säugetiergewebe beschrieben, einschliesslich dem Säugetierskelettmuskel bei Neugeborenen, Säugetierherzmuskel, Mausganglionzellen der Dorsalwurzel in vitro und in Kultur, gezüchtetem Säugetierskelettmuskel und L6-Zellen. Siehe Rogart, Arm. Rev. Physiol. 43, 711 bis 725 (1980).

Rattenganglien-neuronen der Dorsalwurzel besitzen sowohl TTX-empfindliche ($IC_{50} \sim 0,3 \text{ nM}$) als auch TTX-resistente ($IC_{50} \sim 100 \text{ }\mu\text{M}$) Natriumkanalströme, wie von Roy et al., J. Neurosci. 12, 2104 bis 2111 (1992) beschrieben. TTX-resistente Natriumströme wurden auch in Rattenknoten und Petrosal-Ganglien gemessen. Siehe Ikeda et al., J. Neurophysiol. 55, 527 bis 539 (1986) und Stea et al., Neurosci. 47, 727 bis 736 (1992). Elektrophysiologen nehmen an, dass andere TTX-resistente Natriumkanäle noch entdeckt werden müssen.

Obwohl cDNA aus Rattenskelettmuskel, Herz und Gehirn bekannt ist, wurde die Identifizierung und Isolierung von cDNA aus peripherem sensorischem Nervengewebe, wie den Ganglien der Dorsalwurzel, bisher durch die Schwierigkeit, mit solchem Gewebe zu arbeiten, behindert.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung liefert neue gereinigte und isolierte Nucleinsäuresequenzen, die Natriumkanalproteine des Nervengewebes von Säugetieren, insbesondere TTX-resistente, codieren, die stark exprimiert werden in ausgewachsenen DRG und Knotenganglien, weniger stark im Gehirn, Rückenmark und oberen Zervikalganglien exprimiert wird und nicht in Ischiasnerv, Herz oder Skelettmuskel exprimiert wird. In derzeit bevorzugten Formen umfassen neue DNA-Sequenzen cDNA-Sequenzen, die Natriumkanalprotein aus Rattennervengewebe codieren. Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die α -Untereinheit dieses Natriumkanalproteins.

Es wird DNA, cDNA und mRNA offenbart, die von den Nucleinsäuresequenzen der Erfindung abgeleitet ist, und cRNA, die von mRNA abgeleitet ist. Insbesondere codieren zwei cDNA-Sequenzen zusammen die gesamte Länge des Natriumkanals aus Rattennervengewebe.

Die Erfindung schliesst auch andere DNA-Formen, wie genomische DNA, DNA, die durch teilweise oder vollständige chemische Synthese aus Nucleotiden hergestellt wurde und DNA mit Deletionen oder Mutationen ein.

Weitere Aspekte der Erfindung sind das neue TTX-resistente Natriumkanalprotein und Fragmente davon, die von der erfindungsgemässen DNA codiert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind rekombinante Polynucleotide und Oligonucleotide, die eine Nucleinsäuresequenz umfassen, die aus der DNA-Sequenz der Erfindung abgeleitet ist.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Stabilisierung von cDNA der vollen Länge, das die Proteinsequenz der Erfindung codiert.

Weitere Aspekte der Erfindung schliessen Expressionsvektoren ein, die die DNA der Erfindung umfassen, Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind, und eine cDNA-Bibliothek dieser Wirtszellen.

Teil der Erfindung bildet auch ein Assay für Inhibitoren des Natriumkanalproteins, der umfasst, dass man eine Verbindung, von der angenommen wird, dass sie ein Inhibitor ist, in Kontakt bringt mit dem exprimierten Natriumkanal und die Aktivität des Natriumkanals misst.

Weiterhin wird ein Verfahren zur Hemmung der Aktivität des TTX-resistenten Natriumkanals bereitgestellt, das umfasst, dass man eine wirksame Menge einer Verbindung mit einem IC_{50} von $10 \text{ }\mu\text{M}$ oder weniger verabreicht.

Zusätzlich werden Methoden bereitgestellt zur Anwendung der DNA zur Bildung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern zur Verwendung als Zielmoleküle für das Auffinden von Arzneimitteln, als hochspezifische Marker für spezifische Antigene, Detektormoleküle, diagnostische Assays und für therapeutische Anwendungen, wie Schmerzlinderung, eine Sonde für den PN5-Kanal in anderem Säugetiergewebe, die Entwicklung von Therapeutika und das Screenen von Therapien.

Kurze Beschreibung der SEQ IDs und Figuren

Die Fig. 1A bis E zeigen die native cDNA-Sequenz mit 5908 Nucleotiden, die den Rattennatriumkanal Typ 5 («PN5») (SEQ ID Nr. 1) codiert, die aus zwei überlappenden cDNA-Klonen stammt, die mit 26.2 und 1.18 bezeichnet werden.

Die Fig. 2A bis F zeigen die abgeleitete Aminosäuresequenz von PN5 (SEQ ID Nr. 2, dargestellt in Drei-Buchstaben-Aminosäurecode). Die Fig. 2G bis H, die die abgeleitete Aminosäuresequenz von PN5 im Ein-Buchstaben-Aminosäurecode zeigen, zeigen auch die homologen Domänen (I bis IV), mögliche Transmembransegmente (S1 bis S6); die Aminosäure, die die Resistenz gegenüber TTX beiträgt ($\diamond$); N-Glycosylierungsstellen ($\bullet$); eine Phosphorylierungsstelle für eine cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), (O) und das Stopcodon (*).

Fig. 3A zeigt eine Sequenz für das menschliche PN5 mit 856 Basenpaaren (SEQ ID Nr. 3). Fig. 3B zeigt einen Aminosäuresequenzvergleich des hPN5-Fragments mit Ratten-PN5.

Fig. 4 zeigt die Sequenz der neuen Sonde für die Natriumkanal-Domäne IV (SEQ ID Nr. 4).

Die Fig. 5A bis E zeigen die Nucleinsäuresequenz mit 5334 Nucleotiden modifiziert für Stabilität und

Expression (SEQ ID Nr. 5). Die Nucleotide 24 bis 5518 bilden die 5295bp-Region, die ein Protein mit 1765 Aminosäuren codiert.

Fig. 6 zeigt die Klonierungskarte von PN5.

5 Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine gereinigte und isolierte Nucleinsäuresequenz, die ein neues Säugetier-Natriumkanalprotein, das bevorzugt TTX-resistent ist, codiert. Der Ausdruck «gereinigte und isolierte DNA» bezieht sich auf DNA, die im Wesentlichen frei ist, d.h. weniger als etwa 30%, bevorzugt weniger als etwa 10%, und noch bevorzugt weniger als etwa 1% der DNA enthält, mit der die interessierende DNA natürlicherweise assoziiert ist. Techniken, um diese Reinheit zu erreichen, sind im Stand der Technik wohlbekannt und schliessen z.B. Restriktionskartierung, Agarosegelelektrophorese und Zentrifugation mit CsCl-Gradient ein.

Der Ausdruck «DNA» soll «cDNA» oder komplementäre DNA einschliessen, die einzelsträngig oder doppelsträngig sein kann, DNA-Sequenzen, die durch reverse Transkription aus mRNA hergestellt wurden, die aus einer Donorzelle oder durch chemische Synthese isoliert wurde. Z.B. liefert die Behandlung von mRNA mit einer reversen Transkriptase, wie AMV-reverse-Transkriptase oder M-MuLV-reverse Transkriptase, in Gegenwart eines Oligonucleotidprimers ein RNA-DNA-Duplex, das mit RNase H, DNA-Polymerase und DNA-Ligase behandelt werden kann, um doppelsträngige cDNA zu erzeugen. Falls erwünscht, kann die doppelsträngige cDNA mit üblichen Techniken denaturiert werden, z.B. Erwärmen, um einzelsträngige cDNA zu erzeugen. Der Ausdruck «cDNA» schliesst cDNA ein, die eine komplementäre Kopie der natürlich vorkommenden RNA ist, ebenso wie komplementäre Kopien von Varianten der natürlich vorkommenden RNA, die die gleiche biologische Aktivität haben. Varianten schliessen z.B. Insertionen, Deletionen, Sequenzen mit degenerierten Codons und Allele ein.

«crRNA», die mRNA entspricht, die aus einer DNA-Sequenz transkribiert wurde, die die α -Untereinheit eines neuen, bevorzugt TTX-resistenten, Natriumkanalproteins codiert, wird erfindungsgemäss ebenfalls in Betracht gezogen. Der Ausdruck «crRNA» bezieht sich auf RNA, die eine Kopie der von der Zelle transkribierten mRNA ist.

Spezifisch umfasst die Erfindung DNA mit den nativen Versionen der Nucleotidsequenzen, die in den Fig. 1A bis E (SEQ ID Nr. 1) angegeben sind, die hier als Natriumkanal Typ 5 (PN5) bezeichnet werden. Die Fig. 1A bis E zeigen ein cDNA-Konstrukt mit 5908 Nucleotiden, das einen offenen Leserahmen mit 5298 Basen (wobei das Stop-Codon mitzählt) umfasst (SEQ ID Nr. 1). Der Nucleotidrest 79 stellt die Startstelle der Translation dar und der Rest 5376 stellt das Ende des Stop-Codons dar.

Die Erfindung umfasst auch technisch hergestellte Versionen von PN5 und spezifisch die Version, die in den Fig. 5A bis E angegeben ist (SEQ ID Nr. 5). Diesem Sall-XbaI-Klon mit 5334 Nucleotiden fehlt das meiste der untranslatierten Sequenzen, wobei der offene Leserahmen der 5298 Nucleotide bei Nucleotid 24 beginnt und bei Nucleotid 5321 endet. Die Start- und Stop-Codons sind unterstrichen, ebenso wie die bezüglich der Translation stillen Mutationen bei den Nucleotiden 3932, 3935, 3941, 3944 und 3947, die durch Blockumlagerung in diesem Bereich während des Wachstums von *E. coli* eingeführt wurden.

Die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 (Fig. 1A bis E) entspricht der cDNA der Ratte. Eine Homologiesuche zeigte, dass sich der am nächsten verwandte Natriumkanal im Rattenherzkanal findet, mit einer Homologie von 72,5%. Die am nächsten verwandten Kanäle sind rPN1 mit 72% und aus dem Rattengehirn die Typen I und III mit 71,8% bzw. 71,3%. Die Homologie von rPN3a, hPN3, rPN4, rPN4a, Rattengehirn Typ II und Rattenskelettmuskel ist jeweils ungefähr 70 bis 71%.

Ausserdem wurde ein Klon mit 856 Basenpaaren (SEQ ID Nr. 3), wie in Fig. 3A gezeigt, aus einer «cDNA-Bibliothek» von Humanganglien der Dorsalwurzel (DRG) isoliert, der eng verwandt ist mit der Aminosäuresequenz von Ratten-PN5 mit 79% Identität und 86% Homologie. Die humane PN5-Sequenz überspannt die Region zwischen IIIS1 und der Interdomäne III/IV, die die schnelle Inaktivierungssteuerung (d.h. IFM) einschliesst, die innerhalb der Interdomäne III/IV angeordnet ist.

Der Ausdruck «cDNA-Bibliothek» bezieht sich auf eine Ansammlung von Klonen, gewöhnlich in einem Bakteriophagen oder weniger häufig in bakteriellen Plasmiden, die cDNA-Kopien von mRNA-Sequenzen enthalten, die aus einer Donorzelle oder Gewebe stammen.

Es wird angenommen, dass weitere Homologe des neuen TTX-resistenten Rattennatriumkanals, der hier beschrieben wird, auch in anderen Säugetiergeweben exprimiert werden.

Eine Northern-Blot-Analyse (Beispiel 5) zeigt, dass PN5 von einem ~ 6,5 kb Transkript codiert wird. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von PN5, die in den Fig. 2A bis F (SEQ ID Nr. 2) gezeigt ist, hat die primären Strukturmerkmale einer α -Untereinheit eines spannungsgesteuerten, TTX-resistenten Natriumkanals. In den Fig. 2G bis H sind die homologen Domänen (I bis IV), die möglichen Transmembransegmente (S1 bis S6), die Aminosäure, die die Resistenz gegenüber TTX beiträgt ($\blacklozenge$), N-Glycosylierungsstellen ($\bullet$) und c-AMP-abhängige PKA-Phosphorylierungsstellen (O) gezeigt. DNA-Sequenzen, die die gleichen oder allelischen Varianten oder analoge Natriumkanalproteinpolypeptide des Nervensystems durch Verwendung, von zumindest teilweise degenerierten Codons, codieren, werden auch erfindungsgemäss in Betracht gezogen.

Ein interessantes Merkmal dieser abgeleiteten Aminosäuresequenz ist es, dass die Aminosäure, die

am verantwortlichsten für die TTX-Empfindlichkeit ist, an Position 355 angeordnet ist und nicht, aromatisch ist. In Natriumkanälen aus der Ratte und dem menschlichen Gehirn, Skelettmuskelkanälen und in PN1 und PN4 ist diese Aminosäure Tyrosin oder Phenylalanin und diese Kanäle sind alle TTX-empfindlich. In PN3 und PN5 ist die Aminosäure ein Serin. Da PN3 äusserst resistent gegenüber TTX ist, ist die Schlussfolgerung, dass PN5 auch ein TTX-resistenter Kanal ist. Der Herzkanal hat ein Cystein an dieser Stelle und ist «unempfindlich» für TTX.

Obwohl PN5 alle wichtigen Merkmale eines spannungsgesteuerten Natriumkanals enthält, hat es einzigartige strukturelle Merkmale, die ihn von anderen Natriumkanälen unterscheiden. Z.B. hat DIIS4 5 basische Aminosäuren, die in allen Natriumkanälen konserviert sind, die eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Spannungsempfindlichkeit der Kanalfunktion spielen könnten. In PN5 ist die erste basische Aminosäure durch ein Alanin ersetzt. In ähnlicher Weise hat in DIIS4 PN5 5 basische Aminosäuren statt 6, die in anderen Natriumkanalsequenzen vorhanden sind, wobei das letzte Arginin durch ein Glutamin ersetzt ist. In DIIS3 enthält das Transmembransegment nur 18 Aminosäuren im Gegensatz zu 22 Aminosäuren in anderen Kanälen. Auch die kurze Linkerschleife (4 Aminosäuren) zwischen S3 und S4 in DI11 ist noch kürzer durch eine «Deletion» von 3 Aminosäuren. Diese Verkürzung von S3 und der Linkerschleife wurde bestätigt, indem Primer im geeigneten Bereich der Sequenz für ein RT-PCR-Experiment aus Ratten-DRG entwickelt wurden und das amplifizierte DNA-Fragment sequenziert wurde. Ein solcher Versuch wurde durchgeführt, um die Sequenz einer anderen Region von PN5, in der DIVS5-S6-Schleife zu bestätigen, wo eine Deletion eines Peptids mit 8 Aminosäuren war.

Eine Gewebeverteilungsanalyse mit reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (durch Oligonucleotid geprimte RT-PCR) von RNA aus dem Rattenzentral- und Periphernervensystem, insbesondere aus Ratten-DRG, wurde durchgeführt. Acht Hauptgewebearten wurden gescreent auf die Expression der einzigartigen PN5-Gene, die den Positionen 5651 bis 5903 von SEQ ID Nr. 1 entsprechen (Fig. 1A bis E). mRNA von PN5 war in 5 der untersuchten Gewebe vorhanden: Gehirn, Rückenmark, DRG, Knotenganglien und obere Zervikalganglien. PN5 war nicht vorhanden in den verbleibenden untersuchten Geweben: Ischiasnervengewebe, Herz oder Skelettmuskulergewebe. Es wurde gefunden, dass PN5 am stärksten in DRG und Knotenganglien ist, was die Anmelder dazu bringt, anzunehmen, dass DRG mit PN5 angereichert ist. PN5 zeigt dramatische Unterschiede über einen Bereich von Geweben. PN5 hat einen Expressionsgradienten mit einer hohen Expression in DRG. PN5 hat einen Expressionsgradienten wie andere Kanäle, aber mit begrenzterer Verteilung.

Die Erfindung schliesst nicht nur das gesamte Protein ein, das von den cDNA-Sequenzen von SEQ ID Nr. 1, 2 und 3 exprimiert wird, sondern schliesst auch Proteinfragmente ein. Diese Fragmente können erhalten werden, indem die vollständigen Proteine gespalten werden oder durch Verwendung kleinerer DNA-Sequenzen oder «Polynucleotide», um das gewünschte Fragment zu exprimieren.

Der Ausdruck «Polynucleotid», wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf eine polymere Form von Polynucleotiden jeglicher Länge, sowohl Ribonucleotiden als auch Desoxyribonucleotiden. Dieser Ausdruck bezieht sich nur auf die primäre Struktur des Moleküls. Daher schliesst dieser Ausdruck doppel- und einzelsträngige DNA ebenso wie doppel- und einzelsträngige RNA ein. Er schliesst auch modifizierte, z.B. durch Methylierung modifizierte und/oder am 5'-Ende modifizierte, und unmodifizierte Formen des Polynucleotids ein.

Weiterhin soll der Ausdruck «Polynucleotid» ein rekombinantes Polynucleotid einschliessen, das genomischen Ursprungs, von cDNA, semisynthetischen oder synthetischen Ursprungs ist, das auf Grund seines Ursprungs oder durch Manipulation nicht mit allem oder einem Teil des Polynucleotids assoziiert ist, mit dem es in der Natur assoziiert ist und/oder einem Polynucleotid verbunden ist, ausser dem, mit dem es in der Natur verbunden ist.

Demzufolge schliesst die Erfindung auch Polynucleotide ein, die verwendet werden können, um Polypeptide mit einer Länge von etwa 10 bis 1500, bevorzugt 10 bis 100 Aminosäuren herzustellen. Die Isolierung und Reinigung solcher rekombinanten Polypeptide kann mit Techniken erreicht werden, die im Stand der Technik wohlbekannt sind, z.B. präparative chromatographische Trennung oder Affinitätschromatographie. Ausserdem können Polypeptide auch mit synthetischen Mitteln hergestellt werden, die im Stand der Technik wohlbekannt sind.

Die Erfindung ermöglicht die Manipulation von genetischem Material mit Gentechnik zur Erzeugung von Polypeptiden, die strukturelle und funktionelle Eigenschaften der spannungsgesteuerten, TTX-resistenten Natriumkanal- α -Untereinheit besitzen, die in sensorischen Nerven gefunden wird. Eine ortsgerichtete Mutagenese kann verwendet werden, um solche rekombinanten Polypeptide zu liefern. Z.B. können synthetische Oligonucleotide spezifisch in den Teil des interessierenden Gens eingesetzt oder substituiert werden, um Gene zu erzeugen, die eine spezifische Mutante codieren und diese exprimieren. Statistische degenerierte Oligonucleotide können auch eingesetzt werden und eine Phagendisplaytechnik kann verwendet werden, um Polypeptide, die eine funktionelle Eigenschaft, an der man interessiert ist, besitzen, zu identifizieren und zu isolieren.

Ausserdem werden für die vorliegende Erfindung rekombinante Polynucleotide mit einer Länge von etwa 15 bis 20 kb, bevorzugt 10 bis 15 kb, Nucleotiden in Betracht gezogen, die eine Nucleinsäuresequenz umfassen, die von der DNA der Erfindung «abgeleitet» ist.

Der Ausdruck «abgeleitet von» einer bezeichneten Sequenz bezieht sich auf eine Nucleinsäuresequenz, die aus einer Sequenz mit ungefähr mindestens 6 bis 8 Nucleotiden, bevorzugter mindestens 10

bis 12 Nucleotiden und noch bevorzugter mindestens 15 bis 20 Nucleotiden aufgebaut ist, die einem Bereich der bezeichneten Sequenz entsprechen, d.h. dazu homolog oder komplementär sind. Die abgeleitete Sequenz ist nicht notwendigerweise physikalisch von der gezeigten Nucleotidsequenz abgeleitet, kann aber in irgendeiner Weise abgeleitet sein, z.B. durch chemische Synthese oder DNA-Replikation oder reverse Transkription, die auf der Information basiert, die durch die Sequenzen von Basen in dem Bereich, aus dem das Polynucleotid abgeleitet ist, stammt.

Ein neonataler Expressionstest wurde mit F11 durchgeführt, einer Fusionszelllinie, die aus neonatalem Ratten-DRG fusioniert mit einer Mauszelllinie, N18TG von Massachusetts General Hospital, entwickelt wurde. F11 reagiert auf trophische Mittel, wie NGF, durch Verlängerung von Dendriten. Es wurde gefunden, dass PN5 sowohl in nativem F11 als auch in F11, das mit NGF behandelt worden war, vorhanden war, das die Anmelder zu der Annahme führt, dass der Natriumkanal nativ in F11 exprimiert wird.

Die in-situ-Hybridisierung von PN5-mRNA mit Ratten-DRG-Gewebe liefert eine Lokalisierung hauptsächlich in den kleineren und mittleren Neuronen ohne Nachweis in grossen Neuronen.

PN5 wurde auch bezüglich der cytogenetischen Lokalisierung auf Mausechromosomen-Präparaten kartiert. PN5 liegt auf dem gleichen Chromosom wie der Herzkanal und PN3.

Im Allgemeinen umfassen Natriumkanäle eine α - und zwei β -Untereinheiten. Die β -Untereinheiten können die Funktion des Kanals modulieren. Da jedoch die α -Untereinheit alles ist, was erforderlich ist, damit der Kanal vollständig funktionell ist, liefert die Expression der cDNA in SEQ ID Nr. 1 (Fig. 1A bis E) ein voll funktionsfähiges Protein. Das Gen, das die β_1 -Untereinheit in peripherem Nervengewebe codiert, hat sich als identisch erwiesen zu dem, das in Rattenherz, Gehirn und Skelettmuskel gefunden wird. Die cDNA der β_1 -Untereinheit wird hier nicht beschrieben, da sie im Stand der Technik wohlbekannt ist, siehe Isom et al., Neuron 12, 1183 bis 1194 (1994). Es versteht sich jedoch, dass man durch Kombinieren der bekannten Sequenz für die β_1 -Untereinheit mit der hier beschriebenen Sequenz der α -Untereinheit den vollständigen, spannungsgesteuerten, bevorzugt TTX-resistenten PN5-Natriumkanal erhalten kann.

Die vorliegende Erfindung schliesst auch «Expressionsvektoren» ein, die die oben beschriebene DNA oder cDNA umfassen, Wirtszellen, die mit diesen Expressionsvektoren transformiert sind, die den Natriumkanal der Erfindung erzeugen können und cDNA-Bibliotheken, die diese Wirtszellen umfassen.

Der Ausdruck «Expressionsvektor» bezieht sich auf irgendein genetisches Element, z.B. ein Plasmid, ein Chromosom, einen Virus, der sich entweder als autonome Einheit der Polynucleotidexpression innerhalb einer Zelle verhält oder zur Replikation fähig gemacht wird durch Insertion in ein Wirtszellchromosom, das an ein anderes Polynucleotidsegment gebunden wird, um die Replikation und/oder Expression des gebundenen Segmentes zu erreichen. Geeignete Vektoren schliessen Plasmide, Bakteriophagen und Cosmide ein, ohne darauf beschränkt zu sein. Die Vektoren enthalten Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Ligierung oder Insertion des Vektors in eine gewünschte Wirtszelle zu bewirken und die Expression des gebundenen Segmentes zu bewirken. Solche Sequenzen unterscheiden sich abhängig vom Wirtsorganismus und schliessen Promotorsequenzen ein, um die Transkription zu bewirken, Enhancersequenzen, um die Transkription zu erhöhen, ribosomale Bindungsstellensequenzen und Transkriptions- und Translationsterminationssequenzen.

Der Ausdruck «Wirtszelle» bezieht sich allgemein auf prokaryotische oder eukaryotische Organismen und schliesst irgendeinen transformierbaren oder transfizierbaren Organismus ein, der ein Protein exprimieren kann und als Empfänger für Expressionsvektoren oder andere transferierte DNA verwendet werden kann oder verwendet wurde. Wirtszellen können auch dazu gebracht werden, Protein zu exprimieren durch direkte Injektion von exogener cRNA, die in das interessierende Protein translatierbar ist. Eine bevorzugte Wirtszelle ist der *Xenopus*-Oocyt.

Der Ausdruck «transformiert» bezieht sich auf irgendeine bekannte Methode zur Insertion von fremden DNA- oder RNA-Sequenzen in eine prokaryotische Wirtszelle. Der Ausdruck «transfiziert» bezieht sich auf irgendeine bekannte Methode zur Insertion von fremden DNA- oder RNA-Sequenzen in eine eukaryotische Wirtszelle. Solche transformierten oder transfizierten Zellen schliessen stabil transformierte oder transfizierte Zellen ein, in denen die insertierte DNA zur Replikation in der Wirtszelle fähig gemacht worden ist. Sie schliessen auch vorübergehend exprimierende Zellen ein, die die insertierte DNA oder RNA nur für einen begrenzten Zeitraum exprimieren. Das Transformations- oder Transfektionsverfahren hängt von der zu transformierenden Wirtszelle ab. Es kann ein Verpacken des Polynucleotids in einen Virus ebenso einschliessen, wie die direkte Aufnahme des Polynucleotids, wie z.B. durch Lipofektion oder Mikroinjektion. Die Transformation, und Transfektion kann zu einem Einbau der insertierten DNA in das Genom der Wirtszelle führen oder zur Aufrechterhaltung der insertierten DNA innerhalb einer Wirtszelle in Plasmidform. Methoden zur Transformation sind im Stand der Technik wohlbekannt und schliessen virale Infektion, Elektroporation, Lipofektion und durch Calciumphosphat vermittelte direkte Aufnahme ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

Es versteht sich, dass die Erfindung andere Formen von Expressionsvektoren, Wirtszellen und Transformationstechniken einschliessen soll, die äquivalenten Funktionen dienen und im Stand der Technik bekannt sind.

Die Erfindung betrifft auch einen Assay für Inhibitoren des neuen TTX-resistenten Natriumkanalproteins, der umfasst, dass eine Verbindung, von der angenommen wird, dass sie ein Inhibitor ist, mit dem

exprimierten Natriumkanal in Kontakt gebracht wird und die Aktivität des Natriumkanals gemessen wird. Die Verbindung kann eine im Wesentlichen reine Verbindung synthetischen Ursprungs sein, die mit einem wässrigen Medium kombiniert ist, oder die Verbindung kann ein natürlich vorkommendes Material sein, sodass das Testmedium ein Extrakt biologischen Ursprungs ist, z.B. ein Pflanzen-, Tier- oder mikrobieller Zellextrakt.

Die PN5-Aktivität kann mit Methoden, wie Elektrophysiologie (Zwei-Elektroden-Spannungsklemme oder Einzel-Elektroden-Whole-Cell-Klemme), Guanidiniumionenfluss-Assays und Toxinbindungs-Assays gemessen werden. Ein «Inhibitor» wird allgemein definiert als die Menge, die zu einer mehr als 50%igen Abnahme, bevorzugt mehr als 70%igen Abnahme der PN5-Aktivität, noch bevorzugter mehr als 90%igen Abnahme der PN5-Aktivität der PN5-Aktivität führt.

Es gibt viele Verwendungen für die Erfindung, von denen wenige im Folgenden beschrieben sind:

1. Sonde für Säugetierkanäle

Wie oben erwähnt, wird angenommen, dass weitere Homologe des neuen TTX-resistenten Rattennatriumkanals, der hier beschrieben wird, auch in Säugetiergewebe exprimiert werden, insbesondere in menschlichem Gewebe. Die vollständigen cDNAs von PN5-Rattennatriumkanälen der vorliegenden Erfindung können als Sonde verwendet werden, um festzustellen, ob zusätzliche neue spannungsgesteuerte, bevorzugt TTX-resistente, PN5-Natriumkanäle im menschlichen Gewebe existieren und, falls ja, die Isolierung der cDNAs für das menschliche Protein zu fördern.

Die humanen Homologen der TTX-resistenten Ratten-PN5-Kanäle können kloniert werden unter Verwendung einer Human-DRG-cDNA-Bibliothek. Human-DRG wird bei einer Autopsie erhalten. Das gefrorene Gewebe wird homogenisiert und die RNA mit Guanidinisothiocyanat extrahiert (Chirgwin et al., Biochemistry 18, 5294 bis 5299, (1979)). Die RNA wird der Grösse nach fraktioniert auf einem Saccharosegradienten, um grosse mRNAs anzureichern, da die Natriumkanal- α -Untereinheiten von grossen (7 bis 11 kb) Transkripten codiert werden. Doppelsträngige cDNA wird hergestellt unter Verwendung des SuperScript Choice cDNA-Kits (GIBCO BRL) entweder mit Oligo (dT) oder statistischen Hexamerprimern. EcoRI-Adapter werden an die doppelsträngige cDNA ligiert, die dann phosphoryliert wird. Die cDNA-Bibliothek wird konstruiert, indem die doppelsträngige cDNA in den Bakteriophagen lambda-ZAPII-Vektor (Stratagene) ligiert wird und anschliessend in Phagenteilchen verpackt wird.

Phagen werden auf 150 mm-Platten auf einem Rasen von XLI-Blue MRF-Bakterien (Stratagene) ausplattiert und Plaque-Abdrücke werden auf Hybond N-Nylonmembranen (Amersham) erstellt. Die Filter werden mit Ratten-PN5-cDNA-Sonden mit Standardverfahren hybridisiert und durch Autoradiographie oder Chemilumineszenz nachgewiesen. Das von den Ratten-PN5-Sonden erzeugte Signal, das mit positiven humanen Klonen mit hoher Stringenz hybridisiert, sollte stärker sein, als das, das mit Natriumkanalsonden aus Rattengehirn erhalten wird, die mit diesen Klonen hybridisieren. Positive Plaques werden weiter gereinigt durch begrenzte Verdünnung und erneutes Screenen durch Hybridisierung oder PCR. Eine Restriktionskartierung und Polymerase-Kettenreaktion identifiziert überlappende Klone, die mit Standardtechniken zusammengesetzt werden können zu einem humanen Homolog von Ratten-PN5 mit voller Länge. Der Humanklon kann exprimiert werden, indem cRNA in vitro aus dem cDNA-Klon voller Länge in Xenopus-Oocyten indiziert wird oder indem eine Säugetierzelllinie mit einem Vektor transfiziert wird, der die cDNA, gebunden an einen geeigneten Promotor, enthält.

2. Antikörper gegen PN5

Die erfindungsgemässen Polypeptide sind sehr nützlich zur Entwicklung von Antikörpern gegen PN5. Solche Antikörper können in der Affinitätschromatographie verwendet werden, um rekombinante Natriumkanalproteine oder Polypeptide zu reinigen oder sie können verwendet werden als Forschungshilfsmittel. Z.B. können Antikörper, die an ein Reportermolekül gebunden sind, verwendet werden für histochemische Anfärbungstechniken, um andere Gewebe- und Zelltypen zu identifizieren, in denen PN5 vorhanden ist, oder sie können verwendet werden, um Epitop- oder funktionelle Regionen des erfindungsgemässen Natriumkanalproteins zu identifizieren.

Die Antikörper können monoklonal oder polyklonal sein und können mit Techniken hergestellt werden, die im Stand der Technik wohlbekannt sind. Polyklonale Antikörper werden wie folgt hergestellt: ein immunogenes Konjugat, das PN5 oder ein Fragment davon umfasst, gegebenenfalls gebunden an ein Trägerprotein, wird verwendet, um ein ausgewähltes Säugetier, z.B. eine Maus, ein Kaninchen, eine Ziege etc., zu immunisieren. Serum von dem immunisierten Säugetier wird gesammelt und mit bekannten Verfahren behandelt, um die Immunglobulinfraktion abzutrennen.

Monoklonale Antikörper werden mit Standardhybridomazelltechnologie hergestellt auf Basis des Artikels von Köhler und Milstein in Nature 256, 495 bis 497 (1975). Milzzellen werden von einem Wirtstier erhalten, das mit dem PN5-Protein oder einem Fragment davon immunisiert wurde, gegebenenfalls gebunden an einen Träger. Hybridzellen werden gebildet, indem diese Milzzellen mit einer geeigneten Myelomzelllinie fusioniert werden und gezüchtet werden. Die von den Hybridzellen erzeugten Antikörper werden auf ihre Fähigkeit, an exprimierte PN5-Proteine zu binden, gescreent.

Eine Anzahl von Screeningtechniken, die im Stand der Technik wohlbekannt sind, z.B. vorwärts oder

rückwärts gerichtete enzymgebundene Immunosorbent-Assay-Screeningmethoden können angewendet werden. Die Hybridzellen, die solche Antikörper erzeugen, werden dann einer erneuten Klonierung und hohen Verdünnungsbedingungen unterzogen, um eine Hybridzelle auszuwählen, die eine homogene Population von Antikörpern sezerniert, die für ein PN5-Protein spezifisch sind.

- 5 Ausserdem können Antikörper gezüchtet werden durch Klonieren und Exprimieren von Nucleotidsequenzen oder mutagenisierte Versionen davon, die mindestens die Aminosäuresequenzen codieren, die für die spezifische Bindung von natürlichen Antikörpern erforderlich sind und diese exprimierten Proteine können als Immunogen verwendet werden.

- 10 Antikörper können das vollständige Immunglobulin oder ein Fragment davon einschliessen. Antikörper können an eine Reportergruppe, z.B. wie oben für Polynucleotide beschrieben, gebunden sein.

Beispiel 10 erläutert ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers.

3. Therapeutische Ziele für Verbindungen, um Störungen zu behandeln, und Tests dafür

- 15 Die vorliegende Erfindung schliesst auch die Verwendung der neuen spannungsgesteuerten, bevorzugt TTX-resistenten, Natriumkanal- α -Untereinheit als therapeutisches Ziel für Verbindungen ein, um Störungen des Nervensystems auf Basis von RT-PCR-Lokalisierungsdaten zu behandeln. Die Störungen schliessen Epilepsie, Schäden durch Schlaganfall, Gehirnschäden, diabetische Neuropathie, traumatische Schäden, chronisch-neuropathische Schmerzen und mit AIDS assoziierte Neuropathie ein, ohne darauf beschränkt zu sein.

4. Entwicklung von Therapeutika, basierend auf der Hemmung von PN5 und Tests dafür

- 25 Die Erfindung ist auch darauf gerichtet, die Aktivität von PN5 in Gehirn, Rückenmark, DRG, Knotenganglien und oberen Zervikalgangliengeweben zu hemmen. Es versteht sich jedoch, dass weitere Untersuchungen ergeben können, dass PN5 in anderen Geweben vorhanden ist, und diese Gewebe können dann auch Zielbereiche sein. Z.B. deutet der Nachweis von PN5-mRNA in Knotenganglien darauf hin, dass PN5 TTX-resistente Natriumströme in diese und andere sensorische Ganglien des Nervensystems leiten könnte.

- 30 Ausserdem wurde gefunden, dass Proteine, die normalerweise nicht in bestimmten Geweben exprimiert werden, bei einem Krankheitszustand exprimiert werden. Daher soll die Erfindung die Hemmung von PN5 in Geweben und Zellarten, in denen das Protein normalerweise exprimiert wird, und in solchen Geweben und Zellarten, wo das Protein nur während eines Krankheitszustandes exprimiert wird, umfassen.

- 35 Es wird z.B. angenommen, dass TTX-resistente Natriumkanäle eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Nervenimpulsen spielen, die sich auf sensorische Inputs, wie Schmerz und Druck beziehen. Diese Information erleichtert die Entwicklung von Therapeutika, die spezifisch in Bereiche, wie das periphere Nervengewebe, geführt werden können.

- 40 Das rekombinante Protein der vorliegenden Erfindung kann verwendet werden, um potenzielle Therapeutika zu screenen, die die Fähigkeit haben, den interessierenden Natriumkanal zu hemmen. Insbesondere wäre es nützlich, selektiv die Funktion von Natriumkanälen in peripherem Nervengewebe zu hemmen, das für die Übermittlung von Schmerz- und Drucksignalen verantwortlich ist, ohne gleichzeitig die Funktion der Natriumkanäle in anderen Geweben wie Herz und Muskel, zu beeinflussen. Eine solche Selektivität würde die Behandlung von Schmerzen zulassen, ohne Nebenwirkungen zu verursachen auf Grund von Herz- oder neuromuskulären Komplikationen. Es wäre daher nützlich, DNA-Sequenzen zur Verfügung zu haben, die Natriumkanäle codieren, die selektiv in peripherem Nervengewebe exprimiert werden.

5. Schmerzlinderung

- 50 Natriumkanäle in peripherem Nervengewebe spielen eine grosse Rolle in der Übertragung von Nervenimpulsen und daher sind sie ein Instrument, um die neuropathische Schmerzübertragung zu verstehen. Neuropathischer Schmerz lässt sich in zwei Komponenten aufteilen: Allodynie, bei der ein normalerweise nicht schmerzlicher Stimulus schmerzzeugend wird und Hyperalgesie, wo ein gewöhnlicher normal schmerzzeugender Stimulus extrem schmerzvoll wird.

- 55 In Gewebelokalisierungsuntersuchungen kartiert PN5-mRNA kleine und mittlere Neurone von DRG. PN5-mRNA ist auch im Gehirn und Rückenmark vorhanden. Das Hemmen der Aktivitäten kann das Auftreten von Kopfschmerzen und Migräne verhüten helfen. Die Fähigkeit, die Aktivität dieser Natriumkanäle zu hemmen, d.h. die Übertragung von Nervenimpulsen zu vermindern, beeinflusst die Fähigkeit der Nerven, Schmerzimpulse zu übertragen. Die selektive Hemmung von Natriumkanälen in sensorischen Neuronen, wie DRG, lässt die Blockierung von Schmerzimpulsen zu, ohne Nebenwirkungen zu erzeugen, die durch die Hemmung von Natriumkanälen in anderen Geweben, wie Gehirn und Herz verursacht werden. Ausserdem werden bestimmte Krankheiten durch Natriumkanäle verursacht, die Impulse mit einer extrem hohen Frequenz erzeugen. Die Fähigkeit, die Aktivität des Kanals zu vermindern, kann dann die Krankheit eliminieren oder lindern. Somit können potenzielle therapeutische Verbindun-

gen mit Methoden, die im Stand der Technik wohlbekannt sind, gescreent werden, um festzustellen, ob sie die Aktivität des erfindungsgemässen rekombinanten Natriumkanals hemmen können. M. Barram et al., Naun-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 347, 125 bis 132 (1993) und E.T. McNeal et al., J. Med. Chem. 28, 381 bis 388 (1985). Für ähnliche Studien mit dem Acetylcholinrezeptor siehe Claudio et al., Science 238, 1688 bis 1694 (1987).

Z.B. können Schmerzen gelindert werden, indem die Aktivität des neuen, bevorzugt TTX-resistenten, Natriumkanals gehemmt wird, was umfasst, dass man eine therapeutisch wirksame Menge mit einem IC_{50} von ungefähr 10 μM oder weniger, bevorzugt $\leq 1 \mu M$, verabreicht. Potenzielle therapeutische Verbindungen werden identifiziert auf Basis ihrer Fähigkeit, die Aktivität von PN5 zu hemmen. Daher kann der vorher erwähnte Test verwendet werden, um Verbindungen mit einer therapeutisch wirksamen IC_{50} zu identifizieren.

Der Ausdruck « IC_{50} » bezieht sich auf die Konzentration einer Verbindung, die erforderlich ist, um die Aktivität von exprimiertem PN5 um 50% zu hemmen, wenn die Aktivität mit Elektrophysiologie, Strömungstests und Toxinbindungstests, wie oben erwähnt, gemessen wird.

6. Diagnostische Tests

Die Basistechniken der Molekularbiologie, die verwendet werden, um Merkmale der Erfindung zu erreichen, wie RNA-, DNA- und Plasmidisolierung, Restriktionsenzymverdau, Herstellung und Sondierung einer cDNA-Bibliothek, Sequenzierung von Klonen, Konstruktion von Expressionsvektoren, Transformation von Zellen, Aufrechterhaltung und Züchtung von Zellkulturen und andere allgemeine Techniken sind im Stand der Technik wohlbekannt und Beschreibungen dieser Techniken finden sich in üblichen Laborhandbüchern, wie Molecular Cloning: A Laboratory Manual von Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Ausgabe, 1989).

Z.B. können die Polynucleotide der Erfindung an ein «Reportermolekül» gebunden werden, um eine Polynucleotidsonde zu bilden, die für die Northern- und Southern-Blot-Analyse und für in-situ-Hybridisierungen nützlich ist.

Der Ausdruck «Reportermolekül» bezieht sich auf eine chemische Einheit, die mit einem geeigneten Nachweismittel nachgewiesen werden kann, einschliesslich von spektrophotometrischen, chemilumineszierenden, immunochemischen und radiochemischen Mitteln, ohne darauf beschränkt zu sein. Die erfindungsgemässen Polynucleotide können an ein Reportermolekül mit im Stand der Technik wohlbekannten Techniken konjugiert werden. Typischerweise enthält das Reportermolekül eine funktionelle Gruppe, die geeignet ist zur Bindung an oder zum Einbau in das Polynucleotid. Die funktionellen Gruppen, die zur Bindung der Reportergruppe geeignet sind, sind gewöhnlich aktivierte Ester oder Alkylierungsmittel. Details von Techniken, um Reportergruppen zu binden, sind im Stand der Technik wohlbekannt. Siehe z.B. J.A. Matthews, A. Batki, C. Hynds und L. J. Krickat, Anal. Biochem. 151, 205 bis 209 (1985) und Engelhardt et al., Europäische Patentanmeldung Nr. 0 302 175. Somit sind die folgenden Beispiele nur erläuternd für Techniken, mit denen die Erfindung durchgeführt werden kann.

Abkürzungen

Die folgenden Abkürzungen werden in den Beispielen verwendet und haben die jeweils unten definierten Bedeutungen:

BSA:	Rinderserumalbumin
Denhardt's	0,02% BSA, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Ficoll
Lösung:	(0,1 g BSA, 0,1 g Ficoll und 0,1 g Polyvinylpyrrolidon pro 500 ml)
DRG:	Ganglien der Dorsalwurzel
EDTA:	Tetranatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
MEN:	20 mM MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM Natriumacetat, pH 7,0
MOPS:	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (Sigma Chemical Company)
PN5:	Peripherer Nervennatriumkanal 5
PNS:	Peripheres Nervensystem
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SSC:	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0
SSPE:	80 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat, 1 mM Ethylendiamintetraacetat, pH 8,0
TEV:	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme
TTX:	Tetrodotoxin (Sigma Chemical Company)

Beispiele

Die folgenden Beispiele erläutern die Durchführung der Erfindung.

Materialien:

Das Plasmid pBK-CMV wurde von Stratagene (La Jolla, CA) erhalten; das Plasmid pBSTA wird von Goldin et al. in Methods in Enzymology (Rudy & Iverson, Herausgeber), 207, 279 bis 297 beschrieben; das Plasmid pCneo wurde von Promega (Madison, WI) erhalten und das Plasmid pCRII wurde von Invitrogen (Carlsbad, CA) erhalten.

Das Oocyten-Expressionsvektor-Plasmid pBSTAcIIr wurde aus pBSTA konstruiert durch Insertion eines synthetischen Oligonucleotidlinkers; Plasmid pKK232-8 wurde von Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) erhalten; Plasmid pCRII wurde von Invitrogen, San Diego, CA erhalten. Die kompetenten E. coli-Zelllinien STBL2™ und SURE® wurden von Gibco/BRL bzw. Stratagene erhalten.

Beispiel 1Gewinnung von RNA aus Ratten-DRG, Gehirn und Rückenmark

Lumbal-DRG Nr. 4 und Nr. 5 (L4 und L5), Gehirn und Rückenmark wurden aus anästhesierten männlichen ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten mit einem Präpariermikroskop entnommen. Die Gewebe wurden in Trockeneis eingefroren und mit einem Polytron-Homogenisator homogenisiert; die RNA wurde mit dem Guanidin-Isothiocyanat-Verfahren extrahiert (siehe Chomczynski et al., Anal. Biochemistry 162, 156 bis 159 (1987)). Die gesamte RNA (5 µg jeder Probe) wurde in MEN-Puffer gelöst, der 50% Formamid, 6,6% Formaldehyd enthielt und bei 65°C 5 bis 10 Minuten lang denaturiert. Die RNA wurde elektrophoretisch behandelt mit einem 0,8% Agarosegel, das 8,3% Formaldehyd in MEN-Puffer enthielt. Der Elektrodenpuffer war MEN-Puffer, der 3,7% Formaldehyd enthielt; das Gel wurde mit 50 Volt 12 bis 18 Stunden lang laufen gelassen.

Grössenmarker, einschliesslich ribosomale 18S- und 28S-RNA und RNA-Marker (GIBCO BRL) wurden in parallelen Bahnen des Gels laufen gelassen. Ihre Positionen wurden bestimmt, indem die ausgeschnittene Bahn mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefärbt wurde und anschliessend unter UV-Licht fotografiert wurde. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit 2 × SSC gespült und die ENA wurde auf eine Duralose-Membran (Stratagene) überführt mit 20 × SSC durch Kapillarwirkung; die Membran wurde im Vakuum bei 80°C 1 Stunde lang gebacken.

Beispiel 2Sonde aus Rattengehirn IIA

Eine mit ³²P-markierte cRNA-Sonde, die komplementär zu den Nucleotiden 4637 bis 5868 der Sequenz der Natriumkanal-α-Untereinheit von Rattengehirn IIA war, wurde in vitro mit T7-RNA-Polymerase (Pharmacia) synthetisiert unter Verwendung von pEAF8-Matrizen-DNA (Noda et al., Nature 320, 188 bis 192 (1986)), die mit BstEII linearisiert worden war.

Die Protokolle für jedes oben erwähnte Verfahren finden sich in Molecular Cloning: A Laboratory Manual von Sambrook et al. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2. Ausgabe, 1989).

Beispiel 3Hybridisierung von RNA mit der Sonde aus Rattengehirn IIA

Die Membran von Beispiel 1 wurde 16 Stunden bei 42°C mit 50% Formamid, 5 × SSC, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,1, 1 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS und hitzedenaturierter Lachssperma-DNA (1 mg/ml) prähybridisiert. Die Membran wurde in 50% Formamid, 5 × SSC, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,1, 1 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS und hitzedenaturierter Lachssperma-DNA (200 µg/ml) mit der ³²P-markierten cRNA-Sonde (ca. 1 bis 3 × 10⁶ cpm/ml), wie in Beispiel 2 beschrieben, 18 Stunden lang bei 42°C hybridisiert.

Die Membran wurde mit 2 × SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur 20 Minuten lang gespült und dann aufeinander folgend mit 2 × SSC, 0,1% SDS bei 55°C 30 Minuten lang, 0,2 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C 30 Minuten lang, 0,2 × SSC, 0,1% SDS bei 70°C 30 Minuten lang und 0,2 × SSC, 0,1% SDS, 0,1% Natriumpyrophosphat bei 70°C 20 Minuten lang gewaschen. Der Filter wurde einem Kodak X-omat AR Film bei -80°C mit verstärkenden Schirmen bis zu 2 Wochen lang ausgesetzt.

Die pEAF8-Sonde hybridisierte mit mRNAs in der DRG-Probe mit Grössen von 11 kb, 9,5 kb, 7,3 kb und 6,5 kb, abgeschätzt auf Basis der Position relativ zu den Standards.

Beispiel 4Neue Natriumkanal-Domäne-IV-Sonde

Die Sonde wurde wie folgt erhalten: eine RT-PCR wurde durchgeführt an RNA, die aus Ratten-DRG

isoliert wurde unter Verwendung von degenerierten Oligonucleotidprimern, die auf Basis der Homologie zwischen bekannten Natriumkanälen in Domäne IV entwickelt wurden. Die Produkte der Domäne IV wurden in einem Plasmidvektor kloniert in *E. coli* transformiert und einzelne Kolonien isoliert. Die für die Domäne IV spezifischen PCR-Produkte, die aus verschiedenen dieser Kolonien erhalten worden waren, wurden einzeln sequenziert. Die klonierte neue Sequenz der Domäne IV war wie folgt (SEQ ID Nr. 4):

```

1      CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
51     GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
10    101    GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTCACCAAC
      151    GGCTGGAACG TGTTCGACTT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
      201    GCTGTTTCT  GCAATCCTTA AGTCACTGGA AACTACTTTC TCCCCGACGC
15    251    TCTTCCGGGT CATCCGCTCG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
      301    CGAGCAGCCA AGGGGATTTC CACGCTGCTC TTCGCCCTCA TGATGTCCCT
      351    GCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCTCGTC ATGTTTCATCT
20    401    ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC
      451    ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
      501    GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
25    551    TCAACACGGG GCCTCCCTAC TGCACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
      601    TCCCGGGGGA ACTGCGGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTCACCAC
30    651    CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
      701    TC

```

Diese Sequenz wurde durch Random-Priming mit ^{32}P markiert.

Beispiel 5

Hybridisierung von RNA mit der neuen Natriumkanal-3'-UTR-Sonde

Ein Northern-Blot wurde vorbereitet mit 10 µg Gesamt-RNA aus Rattengehirn, Rückenmark und DRG. Der Blot wurde mit einer cRNA-Sonde aus der 3'-UTR hybridisiert. Die 3'-UTR wurde in einen pSP73-Vektor kloniert, die cRNA unter Verwendung eines Trans Probe T-Kits (Pharmacia Biotech) und von ^{32}P -UTP transkribiert. Der Blot wurde 2 Stunden lang bei 65°C in einer Lösung, die 5 × SSC, 1 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,1, Lachssperma-DNA (1 mg/ml) und 50% Formamid enthielt, vorhybridisiert. Die Hybridisierung wurde bei 45°C 18 Stunden lang in der obigen Lösung durchgeführt, ausser dass die Lachssperma-DNA in einer Konzentration von 20 µg/ml enthalten war, und die mit ^{32}P markierte Sonde wurde mit $7,5 \times 10^5$ cpm/ml Lösung zugegeben. Der Blot wurde anschliessend dreimal mit 2 × SSC und 0,1% SDS bei Raumtemperatur, einmal mit 0,2 × SSC und 0,1% SDS bei 65°C 20 Minuten lang, und einmal mit 0,2 × SSC, 0,1% SDS und 0,1% Natriumpyrophosphat bei 65°C 20 Minuten lang gewaschen. Der Blot wurde mit einem Phosphorimager (BioRad) nach 2-tägiger Belichtung analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass ein ~ 6,5 kb Bandensignal, in Gehirn vorhanden war, nur in der Bahn, die die RNA von DRG enthielt. Wegen der geringeren Menge von PN5-mRNA, die durch den RT-PCR-Versuch gezeigt wurde, war die 6,5-kb-Bande in Gehirn und Rückenmark nicht nachweisbar.

Beispiel 6

Konstruktion und Screenen einer cDNA-Bibliothek von Ratten-DRG

Eine an EcoR1 angepasste cDNA-Bibliothek wurde aus der Ratten-DRG-poly(A)+ -RNA von ausgewachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten erstellt unter Verwendung des SuperScript Choice Systems (GIBCO BRL). cDNA (> 4 kb) wurde mit einer Fraktionierung mit Saccharosegradient ausgewählt, wie von Kieffer, Gene 109, 115 bis 119 (1991) beschrieben. Die cDNA wurde dann in den Zap-Express-Vektor (Stratagene) ligiert und mit dem Gigapack-II-XL-lambda-Verpackungsextrakt (Stratagene) verpackt. In ähnlicher Weise wurde eine > 2 kb-DRG-cDNA-Bibliothek synthetisiert.

Der Phage ($3,5 \times 10^5$) wurde mit Filterhybridisierung mit einer mit ^{32}P -markierten Sonde (rBIIa, Basen 4637 bis 5868 gemäss Auld et al., Neuron 1, 449 bis 461 (1988)) gescreent. Die Filter wurden in 50% Formamid, 5 × SSPE, 5 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS, 250 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA und 50 mM Natriumphosphat bei 42°C hybridisiert und in 0,5 × SSC/0,1% SDS bei 50°C gewaschen.

Southern Blots von mit EcoRI verdauten Plasmiden wurden mit der mit ^{32}P markierten DNA-Sonde (SEQ ID Nr. 4) hybridisiert. Die Filter wurden dann in 50% Formamid, 6 × SSC, 5 × Denhardt's Lösung, 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierter Lachssperma-DNA bei 42°C hybridisiert und in 0,1 × SSC/0,1% SDS bei 65°C gewaschen.

Positive Klone wurden in vivo abgetrennt in pBK-CMV unter Verwendung des ExAssist/XLRLR-Systems (Stratagene).

Beispiel 7

Klone und Nucleotidanalyse

cDNA-Klone, 26.2 und 25.1, wurden aus der > 4 kb-DRG-cDNA-Bibliothek isoliert und der Klon 1.18 wurde aus der > 2 kb-DRG-cDNA-Bibliothek isoliert. Durch Sequenzanalyse schien 26.2 eine cDNA voller Länge zu sein, die einen neuen Natriumkanal codiert und 25.1 erstreckte sich von Domäne II zu der 3'-UTR. Jedoch hatte jeder eine Deletion, die die codierende Region trunkeerte. Klon 1.18 hatte die 3-untranslatierte Region zusätzlich zu dem C-Terminus der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PN5. Das Konstrukt in dem Expressionsvektor pBSTACIIr bestand aus den Sequenzen von 26.2 und 1.18.

Die PN5-Homologie mit anderen bekannten Natriumkanälen wurde erhalten unter Verwendung des GAP/Best Fit(GCG)Programms:

Kanal	% Ähnlichkeit	% Identität
PN3a	71	54
hPN3	71	55
PN4	71	53
PN4a	71	53
PN1	72	55
Rattengehirn Typ I	72	55
Rattengehirn Typ II	71	54
Rattengehirn Typ III	71	54
Rattenherzkanal	73	56
Rattenskelettmuskelkanal	71	53

Stabilisierung der PN5-cDNA voller Länge

A. Medien, E. coli-Zelllinien und Wachstumsbedingungen

Das Wachstum von Fragmenten von PN5 wurde unter den folgenden Standardbedingungen erreicht; das Wachstum von Plasmiden, die Konstrukte mit PN5 in voller Länge enthielten (in pCIneo, pBSTACIIr und anderen Vektoren) konnte nicht ohne Verwendung spezieller Wachstumsmedien, Bedingungen und E. coli-Stämme erreicht werden. Die folgenden Bedingungen erwiesen sich als optimal:

(1) Verwendung von E. coli-STBL2™ für die primäre Transformation nach Ligierungsreaktionen und für die Züchtung in grossem Massstab;

(2) feste Medien waren $1/2 \times \text{FM}$ (siehe unten) plus $1 \times \text{LB}$ (Trypton, 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl, 0,5%) plus 15 g/l Agar oder $1 \times \text{FM}$ plus $1/2 \times \text{LB}$;

(3) flüssige Medien waren optimalerweise $1 \times \text{FM}$ plus $1/2 \times \text{LB}$;

(4) Carbenicillin, 100 µg/ml wurde für alle Medien verwendet, da es weniger schnell als Ampicillin metabolisiert wird;

(5) die Temperatur für das Wachstum sollte nicht höher als 30°C sein, gewöhnlich 24 bis 26°C; dies erfordert längere Wachstumsperioden als normalerweise angewendet von 24 bis 72 Stunden.

2 × Friermedium (2 × FM):

	K ₂ HPO ₄	12,6 g
5	Na ₃ Citrat	0,9 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,18 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,8 g
10	KH ₂ PO ₄	3,6 g
	Glycerol	88 g
	H ₂ O	auf 1 l

15 2 × FM und die verbleibenden Medienkomponenten werden getrennt, vorbereitet, durch Autoklavieren sterilisiert, auf mindestens 60°C gekühlt und zusammengegeben, um das fertige Medium zu bilden. Carbenicillin wird hergestellt mit 25 mg/ml H₂O und durch Filtration sterilisiert. 2 × FM wurde zuerst beschrieben zur Herstellung von gefrorenen Vorräten von Bakterienzellen (Practical Methods in Molecular Biology, R.F. Schleif und P.C. Wensink, Springer Verlag, New York (1981), Seiten 201 bis 202).

B. Expressionsvektoren

Um der cDNA mit voller Länge eine erhöhte Stabilität zu verleihen, wurde der Oozyten-Expressionsvektor pBSTAcIIr modifiziert, um die Plasmidkopienzahl zu vermindern, wenn er in E. coli gezüchtet wurde, und um möglicherweise die Transkription von Vektorsequenzen, die zu der toxischen kryptischen Expression von PN5-Protein führen könnten, zu vermindern, J. Brosius, Gene 27, 151 bis 160 (1984). pBSTAcIIr wurde mit PvuII verdaut. Das 755 bp-Fragment, das den T7-Promotor, β-Globin-5'-UTR, die multiple Klonierungsstelle, β-Globin-3'-UTR und den T3-Promotor enthielt, wurde mit dem 3,6 kb-Fragment, das den Replikationsursprung, das Ampicillin-Resistenzgen, die rrnBT₁- und rrnBT₁T₂-Transkriptionsterminatoren von pKK232-8 enthielt, das vollständig mit SmaI und teilweise mit PvuII-Gemisch verdaut worden war, ligiert und mit intestinaler Phosphatase von Krabben behandelt, um die Selbstligierung zu verhindern. Das entstehende Plasmid, in dem die Orientierung des pBSTA-Fragmentes so ist, dass der T7-Promotor proximal zu dem rrnBT₁-Terminator ist, wurde identifiziert durch Restriktionskartierung und mit pHQ8 bezeichnet. Wie im Fall von pBSTA sind die Richtung der Transkription des Ampicillin-Resistenzgens und des Replikationsursprungs von pHQ8 entgegengesetzt der der Genexpressionskassette und die Gegenwart des rrnBT₁-Terminators sollte das Weiterlesen des Vektors in der von dem P7-Promotor gesteuerten Expressionskassette vermindern.

C. Zusammenfügung von cDNA voller Länge für die Expression

Da pBK-CMV.26.2 eine Deletion von 58 bp hatte (entsprechend dem bp 4346 bis 4403 von SEQ ID Nr. 1) und die Sequenz von pBK-CMV.1.18 bei bp 4180 von SEQ ID Nr. 1 beginnt, könnte pBK-CMV.1.18 verwendet werden, um pBK-CMV.26.2 zu «reparieren». Es wurde eine Strategie entwickelt, um eine cDNA voller Länge zusammenzusetzen aus den Klonen pBK-CMV.26.2 und pBK-CMV.1.18 in drei Sektionen, wobei die 5'- und 3'-UTRs trunziert wurden und eine einzige Restriktionsstelle an den 5'- und 3'-Enden in dem Verfahren eingeführt wurde. Das 5'-Ende wurde erzeugt durch PCR aus 26.2, Trunkieren des 5'-UTRs durch Einbau einer Sall-Stelle direkt stromaufwärts des Start-Codons. Der Zentralbereich war ein Restriktionsfragment von 26.2. Das 3'-Ende wurde hergestellt durch überlappende PCR sowohl aus 26.2 als auch 1.18 und Einbau einer XbaI-Stelle direkt stromabwärts des Stopcodons. Diese Bereiche wurden an den einzelnen Restriktionsstellen verdaut und in pBSTAcIIr eingesetzt. Obwohl dieses Konstrukt eine korrekte Sequenz zu haben schien, wurden beim erneuten Klonieren als Sall-XbaI-Fragment in pCneo zwei Arten von Isolaten gefunden, eines mit einer Deletion und eines mit einer 8 bp-Insertion. Die erneute Untersuchung des pBSTAcIIr-Klons zeigte, dass die Sequenz in diesem Bereich «gemischt» war, sodass der Klon sich umgelagert haben musste. Die 8 bp-Insertion erwies sich als Sequenzwiederholung eines Mitglieds einer 8 bp-Verdoppelung in der nativen Sequenz, was eine dreifache Sequenzwiederholung von 8 bp in dem umgelagerten Isolat bildete. Zahlreiche Klonierungsversuche führten unausweichlich zu dieser Umlagerung. Überlappende PCR wurde verwendet, um stille Mutationen in eine der 8 bp-Sequenzwiederholungen einzuführen und ein Fragment, das diese Region enthielt, war enthalten, als die PN5-codierende Region in HQ8 eingesetzt wurde, die Version mit niedriger Kopienzahl von pBSTAcIIr, was Plasmid HR-1 ergab. Diese Sequenz erwies sich als stabil (siehe Fig. 5A bis E, SEQ ID Nr. 5).

Das 5'-Ende des Fragmentes wurde mit PCR gebildet unter Verwendung von pBK-CMV.26.2-DNA als Matrize und der Primer 4999 (CTTGGTCTCGACTCTAGATCAGGGTGAAGATGGAGGAG Sall-Stelle unterstrichen, PN5-Homologie kursiv, entsprechend bp 58 bis 77 von SEQ ID Nr. 1, Initiati-

onscodon fett) und 4927 (GGGTTCAATGTGGTTTTATCT entsprechend bp 1067 bis 1047 von SEQ. ID Nr. 1), gefolgt von einer Gelreinigung, Verdau mit Sall und KpnI (KpnI-Stelle bei pb 1003 bis 1008, SEQ ID Nr. 1) und Gelreinigung.

Das zentrale 3.1 kb-Fragment wurde hergestellt durch Verdau von pBK-CMV.26.2-DNA mit KpnI und AatII (AatII-Stelle bei 4133 bis 4138) und anschliessende Gelreinigung.

Das 3'-Ende des Fragmentes wurde wie folgt hergestellt: PCR unter Verwendung der Primer 4837 (TCTGGGAAGTTTGGAAG entsprechend bp 3613 bis 3629 von SEQ. ID Nr. 1) und 4931

(GACCACGAAGGCTATGTTGAGG entsprechend bp 4239 bis 4218 von SEQ ID Nr. 1) auf pBK-CMV.26.2-DNA als Matrize lieferte ein Fragment mit 0,6 kb. Eine PCR unter Verwendung der Primer 4930 (CCTCAACATAGCCTTCGTGGTC. entsprechend bp 4218 bis 4239 von SEQ ID

Nr. 1) und 4929 (GTCTTCTAGATGAGGGTTCAGTCATTGTG XbaI-Stelle unterstrichen, PN5-Homologie kursiv, entsprechend pb 5386 bis 5365 von SEQ ID Nr. 1; Stop-Codon fett) auf pBK-CMV.1.18-DNA als Matrize lieferte ein Fragment mit 1,2 kb, das eine XbaI-Stelle 7 bp vom Stop-Codon entfernt einfuhrte. Somit ist das 3'-Ende des 4837 bis 4931-Fragmentes exakt komplementär zu dem 5'-Ende des 4930 bis 4929-Fragmentes. Diese zwei Fragmente wurden mit Gel gereinigt und eine Fraktion jeweils als Matrize in einer PCR-Reaktion vereinigt unter Verwendung der Primer 4928 (CAAGCCTTTGTGTTTCGAC. entsprechend bp 4084 bis 4101 von SEQ ID Nr. 1) und 4929, was ein Fragment mit 1,3 kb ergab. Dieses Fragment wurde mit Gel gereinigt, mit AatII und XbaI verdaut und das 1,2 kb-Fragment wurde mit Gel gereinigt.

Das Fragment des 3'-Endes wurde in mit AatII und XbaI verdautem pBSTAclI r kloniert. Ein Isolat wurde mit Sall und KpnI verdaut und mit dem 5'-Ende-Fragment ligiert. Das entstehende Plasmid wurde nach Bestätigung der Sequenz mit KpnI und AatII verdaut und mit dem zentralen 3,1 kb-Fragment ligiert unter Bildung von pBSTAclI r.PN5 (Klon 21). pBSTAclI r.PN5 (Klon 21) wurde mit Sall und XbaI verdaut, um das 5,3 kb-PN5-Fragment freizusetzen, das in mit Sall und XbaI verdautem pCneoII kloniert wurde. Multiple Isolate wurden gefunden, von denen GPII-1, das vollständig sequenziert wurde, typisch war und ein 8 bp-Insert enthielt. Dieses CAGAAGAA nach pb 3994 von SEQ ID Nr. 1 wandelte die direkte Wiederholung dieser Sequenz an diesem Ort in eine dreifache direkte Wiederholung um, was eine Verschiebung des Leserrahmens verursachte. In einem Versuch, diesen Mangel zu beheben, wurde pBSTAclI r.PN5 (Klon 21) mit NheI (bp 2538 bis 2543 SEQ ID Nr. 1) und XhoI (bp 4828 bis 4833, SEQ. ID Nr. 1) verdaut, was ein 6,2 kb-Fragment lieferte, und mit AatII und XhoI verdaut, was ein 0,7 kb-Fragment lieferte, das mit dem 1,6 kb-Fragment, das durch den Verdau von pBK-CMV.26.2 mit AatII und NheI entstand, ligiert wurde. Obwohl keine Isolate gefunden wurden, die vollständig korrekt waren, hatte ein Isolat, HA-4, nur eine einzige Basenveränderung, die Deletion von C an bp 4827 (SEQ ID Nr. 1), benachbart der XhoI-Stelle.

Um zu verhindern, dass die Umlagerung des 8 bp-Inserts auftrat, wurden drei stumme Mutationen eingeführt in die 5'-Sequenzwiederholung und zwei weitere Mutationen in einem Strang von Ts sollten auch eingeführt werden, wie unten gezeigt (bp 3982 bis 4014, SEQ. ID Nr. 1, Mutationsstellen unterstrichen, 8 bp-Sequenzwiederholungen in der nativen Sequenz kursiv):

45	GAC ATT TTT ATG ACA GAA GAA CAG AAG AAA TAT
	Nativ
	Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
50	GAC ATC TTC ATG ACT GAG GAG CAG AAG AAA TAT
	Mutante

Da Isolat HA-4 die native direkte Wiederholungssequenz aufwies (im Gegensatz z.B. zu pBSTAclI r.PN5 (Klon 21)) und der Bereich in der Nähe des XhoI-Defekts nicht betroffen war, wurde es als Matrizen-DNA für die folgenden PCR-Reaktionen verwendet. Der Primer P5-3716S

(CCGAAGCCAATGTAACATTAGTAATTACTCGTG entsprechend pb 3684 bis 3716, SEQ ID Nr. 1) wurde mit Primer P 5-3969AS

(GCTCCTCAGTCATGAAGATGTCTTGGCCACCTAAC entsprechend bp 4003 bis 3969, SEQ. ID Nr. 1, mutierte Basen unterstrichen) gepaart, was ein 320 bp-Produkt lieferte. Der Primer P5-4017S (GGCCAAGACATCTTCATGACTGAGGAGCAGAAGAAATATTAC

entsprechend bp 3976 bis 4017, SEQ ID Nr. 1, mutierte Basen sind unterstrichen) wurde mit Primer P5-4247AS (CTCAAAGCAAAGACTTTGATGAGACACTCTATGG entsprechend bp 4280

bis 4247, SEQ ID Nr. 1) gepaart, was ein 305 bp-Produkt lieferte. Das 3'-Ende des 320 bp-Fragmentes stimmte somit in 28 bp exakt mit dem 5'-Ende des 305 bp-Fragmentes überein. Die zwei Banden wurden mit Gel gereinigt und eine Fraktion jeweils in einer neuen PCR-Reaktion mit den Primern P5-3716S und P5-4247AS vereinigt, was ein 597 bp-Produkt lieferte, das T/A-kloniert wurde im Vektor pCRII. Es wurde gefunden, dass das Isolat HO-7 die gewünschte Sequenz hatte. Eine Vierwege-Ligierung wurde durchgeführt, um den modifizierten PN5 mit voller Länge zusammenzusetzen: Der Oozyten-Expressionsvektor HQ-8 wurde mit Sall und XbaI verdaut, was ein 4,4 kb-Vektorfragment lieferte; GPII-1 wurde mit Sall und MluI verdaut, was ein 3,8 kb-Fragment lieferte, das die 5'-Hälfte von PN5 enthielt; HO-7 wurde mit MluI (bp 3866 bis 3871, SEQ ID Nr. 1) und AatII verdaut, was ein 0,3 kb-Fragment lieferte, das die mutierte 8 bp-Repeatregion von PN5 enthielt; GPII-1 wurde mit AatII und XbaI verdaut, was den verbleibenden 1,3 kb-3'-Teil von PN5 lieferte. Ein Teil der Ligierungsreaktion wurde in E. coli Stable-2-Zellen transformiert. Von den 9,6 kb-Isolaten, die alle vier Fragmente enthielten, wurde HR-1 sequenziert und es wurde gefunden, dass es die gewünschte 5,4 kb-Sequenz hatte. Diese Isolate wuchsen gut und zeigten keine Tendenz zu einer Umlagerung. Die Sequenz dieser bearbeiteten Version von PN5 ist in den Fig. 5A bis E gezeigt (SEQ ID Nr. 5).

Beispiel 8

Menschliches PN5

Ein 856 bp-Klon (Fig. 3A, SEQ ID Nr. 3) wurde aus einer cDNA-Bibliothek der menschlichen Ganglien der Dorsalwurzel (DRG) isoliert, die am nächsten verwandt ist mit Ratten-PN5 mit 79% Identität der Aminosäuresequenz. Die menschliche PN5-Sequenz überspannt die Region zwischen IIS1 und der Interdomäne III/IV, die die schnelle Inaktivierungssteuerung (d.h. IFM) einschliesst, die innerhalb der Interdomäne III/IV angeordnet ist.

Die menschliche DRG-cDNA-Bibliothek wurde aus Lumbal4- und 5-DRG Gesamt-RNA konstruiert, die statistisch geprimert wurde. cDNA des ersten Strangs wurde mit SuperScriptII reverse Transkriptase (GIBCO BRL) synthetisiert und die Synthese des zweiten Strangs erfolgte mit T4-DNA-Polymerase. EcoRI-Adapter wurden an die Enden der doppelsträngigen cDNA ligiert und die Fragmente in dem ZAPII-Vektor (Stratagene) kloniert. Die Bibliothek wurde mit mit Digoxigenin markierten Ratten-PN3-, Ratten-PN1- und menschlichen Herz hH1-Sonden gescreent. Positive Klone wurden sequenziert und mit bekannten menschlichen und Rattennatriumkanalsequenzen verglichen. Nur der vorher erwähnte Klon wurde als menschliche PN5-Sequenz identifiziert.

Kanal	% Ähnlichkeit	% Identität
Menschliches Gehirn (HBA)	76	69
Menschliches Herz (hH1)	81	74
Menschliches atypisches Herz	60	52
Menschlicher Skelettmuskel	80	71
Menschliches Neuroendokrin	78	71
Menschliches PN3	77	70
Ratten-PN1	79	72
Ratten-PN3	78	71
Ratten-PN4	78	70
Ratten-PN5	86	79

Fig. 3B vergleicht die Aminosäuresequenz des hPN5-Fragmentes mit der Aminosäuresequenz von Ratten-PN5 in der geeigneten Region.

Beispiel 9

Gewebeverteilung mit RT-PCR

Gehirn-, Wirbelsäulen-, DRG-, Knotenganglien-, obere Zervikalganglien-, Ischiasnerv-, Herz- und Skelettmuskelgewebe wurden aus anästhesierten normalen ausgewachsenen männlichen Sprague-Dawley-Ratten isoliert und bei -80°C aufbewahrt. Die RNA wurde aus jedem Gewebe isoliert unter Verwendung von RNazol (Tel-Test, Inc.). Statistisch geprimerte cDNA wurde umgekehrt transkribiert aus 500 ng RNA aus jedem Gewebe. Der Vorwärtsprimer (CAGATTGTGTTCTCAGTACATTCC) und der

Rückwärtsprimer (CCAGGTGTCTAACGAATAAATAGG) wurden aus dem 3'-untranslatierten Bereich erzeugt, was ein 252-Basenpaar-Fragment lieferte. Die Zyklusparameter waren: 94°C/2 min (Denaturierung), 94°C/30 s, 65°C/30 s und 72°C/1 min (35 Zyklen) und 72°C/4 min. Die Reaktionsprodukte wurden auf einem 4% Agarosegel analysiert.

Eine positive Kontrolle und eine Kontrolle ohne Matrize waren auch enthalten. cDNA aus jedem Gewebe wurde auch mit PCR amplifiziert unter Verwendung von Primern, die spezifisch für Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase sind, um die Lebensfähigkeit der Matrize zu zeigen, wie von Tso et al., Nucleic Acid Res. 13, 2485 bis 2502 (1985) beschrieben.

Das Gewebeverteilungsprofil von rPN5 durch Analyse der RNA aus ausgewählten Rattengeweben mit RT-PCR war wie folgt:

Gewebe	RT-PCR (35 Zyklen)
Gehirn	+
Rückenmark	+
DRG	+++
Knotenganglien	+++
Obere Zervikalganglien	+
Ischiasnerv	—
Herz	—
Skelettmuskel	—
F11-unbehandelt	+
F11-behandelt	+

PN5 wurde auch nach nur 25 Zyklen (24 + 1) in den gleichen 5 Geweben, wie oben, in der gleichen relativen Häufigkeit nachgewiesen.

Beispiel 10

Antikörper

Ein synthetisches Peptid (26 Aminosäuren in der Interdomäne II und III, Reste 977 bis 1002) wurde mit KLH konjugiert und Antikörper in Kaninchen erzeugt. Das Antiserum wurde anschliessend durch Affinität gereinigt.

PN5 bildet eine Unterfamilie von neuen Natriumkanalgenen; diese Gene sind verschieden von solchen, die mit anderen Sonden nachweisbar sind (z.B. PEA8 und PN3-Sonden).

Obwohl die vorhergehende Erfindung im Detail durch Erläuterung und Beispiele zur besseren Klarheit und zum besseren Verständnis beschrieben wurde, ist es offensichtlich, dass Veränderungen und Modifikationen durchgeführt werden können innerhalb des Schutzbereichs der beigefügten Ansprüche.

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) 1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

10 (A) NAME: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
(B) STRASSE: Grenzacherstrasse 124
(C) ORT: Basel
(D) STAAT: BS
(E) LAND: Schweiz
(F) POSTLEITZAHL (ZIP): CH-4010
15 (G) TELEPHON: 061-6884256
(H) TELEFAX: 061-6881395
(I) TELEX: 962292/965542 hlr ch

20 (ii) ANMELDETITEL:
Nucleinsäure, die einen Nervengewebe-Natriumkanal
kodiert

25 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

30 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release # 1.0, Version # 1.30

35

40

45

50

55

60

65

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARACTERISTICA:
 (A) LÄNGE: 5908 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: Nein
- (iv) ANTI-SENSE: Nein
- (vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:
 (A) ORGANISMUS: Ratte
 (F) ART DES GEWEBES: Ganglien der Dorsalwurzel
 (G) ART DER ZELLE: peripherer Nerv
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

1 GAAGTCACAG GAGTGTCTGT CAGCGAGAGG AAGAAGGGAG AGTTTACTGA
 51 GTGTCTTCTG CCCCTCCTCA GGGTGAAGAT GGAGGAGAGG TACTACCCGG
 101 TGATCTTCCC GGACGAGCGG AATTTCCGCC CCTTCACTTC CGACTCTCTG
 151 GCTGCCATAG AGAAGCGGAT TGCTATCCAA AAGGAGAGGA AGAAGTCCAA
 201 AGACAAGGCG GCAGCTGAGC CCCAGCCTCG GCCTCAGCTT GACCTAAAGG
 251 CCTCCAGGAA GTTACCTAAG CTTTATGGTG ACATTCCCCC TGAGCTTGTA
 301 GCGAAGCCTC TGAAGACCT GGACCCATTC TACAAAGACC ATAAGACATT
 351 CATGGTGTG AACAAGAAGA GAACAATTTA TCGCTTCAGC GCCAAGCGGG
 401 CCTTGTTTAT TCTGGGGCCT TTTAATCCCC TCAGAAGCTT AATGATTTCG
 451 ATCTCTGTCC ATTCAGTCTT TAGCATGTTC ATCATCTGCA CGGTGATCAT
 501 CAACTGTATG TTCATGGCGA ATTCTATGGA GAGAAGTTTC GACAACGACA
 551 TTCCCGAATA CGTCTTCATT GGGATTATA TTTTAGAAGC TGTGATTAAA
 601 ATATTGGCAA GAGGCTTCAT TGTGGATGAG TTTTCCTTCC TCCGAGATCC
 651 GTGGAAGTGG CTGGACTTCA TTGTCATTGG AACAGCGATC GCAACTTGTT
 701 TTCCGGGCG CCAAGTCAAT CTTTCAGCTC TTCGTACCTT CCGAGTGTT
 751 AGAGCTCTGA AGGCGATTTT AGTTATCTCA GGTCTGAAGG TCATCGTAGG
 801 TGCCCTGCTG CGCTCGGTGA AGAAGCTGGT AGACGTGATG GTCCTCACTC

851 TCTTCTGCCT CAGCATCTTT GCCCTGGTCG GTCAGCAGCT GTTCATGGGA
 901 ATTCTGAACC AGAAGTGTAT TAAGCACAAC TGTGGCCCCA ACCCTGCATC
 5 951 CAACAAGGAT TGCTTTGAAA AGGAAAAAGA TAGCGAAGAC TTCATAATGT
 1001 GTGGTACCTG GCTCGGCAGC AGACCCTGTC CCAATGGTTC TACGTGCGAT
 10 1051 AAAACCACAT TGAACCCAGA CAATAATTAT ACAAAGTTTG ACAACTTTGG
 1101 CTGGTCCTTT CTCGCCATGT TCCGGGTAT GACTCAAGAC TCCTGGGAGA
 15 1151 GGCTTTACCG ACAGATCCTG CGGACCTCTG GGATCTACTT TGTCTTCTTC
 1201 TTCGTGGTGG TCATCTTCCT GGGCTCCTTC TACCTGCTTA ACCTAACCT
 20 1251 GGCTGTTGTC ACCATGGCTT ATGAAGAACA GAACAGAAAT GTAGCTGCTG
 1301 AGACAGAGGC CAAGGAGAAA ATGTTTCAGG AAGCCCAGCA GCTGTTAAGG
 25 1351 GAGGAGAAGG AGGCTCTGGT TGCCATGGGA ATTGACAGAA GTTCCCTTAA
 1401 TTCCCTTCAA GCTTCATCCT TTTCCCCGAA GAAGAGGAAG TTTTTCGGTA
 30 1451 GTAAGACAAG AAAGTCCTTC TTTATGAGAG GGTCCAAGAC GGCCCAAGCC
 1501 TCAGCGTCTG ATTCAGAGGA CGATGCCTCT AAAAATCCAC AGCTCCTTGA
 35 1551 GCAGACCAAA CGACTGTCCC AGAACTTGCC AGTGGATCTC TTTGATGAGC
 1601 ACGTGGACCC CCTCCACAGG CAGAGAGCGC TGAGCGCTGT CAGTATCTTA
 40 1651 ACCATCACCA TGCAGGAACA AGAAAAATTC CAGGAGCCTT GTTTCCCATG
 1701 TGGGAAAAAT TTGGCCTCTA AGTACCTGGT GTGGGACTGT AGCCCTCAGT
 1751 GGCTGTGCAT AAAGAAGGTC CTGCGGACCA TCATGACGGA TCCCTTTACT
 45 1801 GAGCTGGCCA TCACCATCTG CATCATCATC AATACCGTTT TCTTAGCCGT
 1851 GGAGCACCAC AACATGGATG ACAACTTAAA GACCATACTG AAAATAGGAA
 50 1901 ACTGGGTTTT CACGGGAATT TTCATAGCGG AAATGTGTCT CAAGATCATC
 1951 GCGCTCGACC CTTACCACTA CTTCCGGCAC GGCTGGAATG TTTTGTGACAG
 55 2001 CATCGTGGCC CTCCTGAGTC TCGCTGATGT GCTCTACAAC AACTGTCTG
 2051 ATAACAATAG GTCTTTCTTG GCTTCCCTCA GAGTGCTGAG GGTCTTCAAG
 60 2101 TTAGCCAAAT CCTGGCCCAC GTTAAACACT CTCATTAAGA TCATCGGCCA
 2151 CTCCGTGGGC GCGCTTGGA ACCTGACTGT GGTCTGACT ATCGTGGTCT

65

2201 TCATCTTTTC TGTGGTGGGC ATGCGGCTCT TCGGCACCAA GTTTAACAAG
 2251 ACCGCCTACG CCACCCAGGA GCGGCCCAGG CGGCGCTGGC ACATGGATAA
 5 2301 TTTCTACCAC TCCTTCCTGG TGGTGTTCGG CATCCTCTGT GGGGAATGGA
 2351 TCGAGAACAT GTGGGGCTGC ATGCAGGATA TGGACGGCTC CCCGTTGTGC
 10 2401 ATCATTGTCT TTGTCCTGAT AATGGTGATC GGGAAGCTTG TGGTGCTTAA
 2451 CCTCTTCATT GCCTTGCTGC TCAATTCCTT CAGCAATGAG GAGAAGGATG
 15 2501 GGAGCCTGGA AGGAGAGACC AGGAAAACCA AAGTGCAGCT AGCCCTGGAT
 2551 CGGTTCCGCC GGGCCTTCTC CTTCATGCTG CACGCTCTTC AGAGTTTTTG
 20 2601 TTGCAAGAAA TGCAGGAGGA AAAACTCGCC AAAGCCAAAA GAGACAACAG
 2651 AAAGCTTTGC TGGTGAGAAT AAAGACTCAA TCCTCCCGGA TGCAGGCCCC
 25 2701 TGGAAGGAGT ATGATACAGA CATGGCTTTG TACACTGGAC AGGCCGGGGC
 2751 TCCGCTGGCC CCACTCGCAG AGGTAGAGGA CGATGTGGAA TATTGTGGTG
 2801 AAGGCGGTGC CCTACCCACC TCACAACATA GTGCTGGAGT TCAGGCCGGT
 30 2851 GACCTCCCTC CAGAGACCAA GCAGCTCACT AGCCCGGATG ACCAAGGGGT
 2901 TGAAATGGAA GTATTTTCTG AAGAAGATCT GCATTTAAGC ATACAGAGTC
 35 2951 CTCGAAAGAA GTCTGACGCA GTGAGCATGC TCTCGGAATG CAGCACAATT
 3001 GACCTGAATG ATATCTTTAG AAATTTACAG AAAACAGTTT CCCCCAAAAA
 40 3051 GCAGCCAGAT AGATGCTTTC CCAAGGGCCT TAGTTGTCAC TTTCTATGCC
 3101 AAAAAACAGA CAAGAGAAAG TCCCCCTGGG TCCTGTGGTG GAACATTCCG
 45 3151 AAAACCTGCT ACCAAATCGT GAAGCACAGC TGGTTTGAGA GTTTCATAAT
 3201 CTTTGTTATT CTGCTGAGCA GTGGAGCGCT GATATTTGAA GATGTCAATC
 50 3251 TCCCCAGCCG GCCCCAAGTT GAGAAATTAC TAAGGTGTAC CGATAATATT
 3301 TTCACATTTA TTTTCCTCCT GGAAATGATC CTGAAGTGGG TGGCCTTTGG
 3351 ATTCCGGAGG TATTTACCA GTGCCTGGTG CTGGCTTGAT TTCCTCATTG
 55 3401 TGGTGGTGTC TGTGCTCAGT CTCATGAATC TACCAAGCTT GAAGTCCTTC
 3451 CGGACTCTGC GGGCCCTGAG ACCTCTGCGG GCGCTGTCCC AGTTTGAAGG
 60 3501 AATGAAGGTT GTCGTCTACG CCCTGATCAG CGCCATACCT GCCATTCTCA
 65

3551 ATGTCTTGCT GGTCTGCCTC ATTTTCTGGC TCGTATTTTG TATCTTGGGA
 3601 GTAAATTTAT TTTCTGGGAA GTTTGGAAGG TGCATTAACG GGACAGACAT
 5 3651 AAATATGTAT TTGGATTTTA CCGAAGTTCC GAACCGAAGC CAATGTAACA
 3701 TTAGTAATTA CTCGTGGAAG GTCCCGCAGG TCAACTTTGA CAACGTGGGG
 10 3751 AATGCCTATC TCGCCCTGCT GCAAGTGGCA ACCTATAAGG GCTGGCTGGA
 3801 AATCATGAAT GCTGCTGTCG ATTCCAGAGA GAAAGACGAG CAGCCGGACT
 15 3851 TTGAGGCGAA CCTCTACGCG TATCTCTACT TTGTGGTTTT TATCATCTTC
 3901 GGCTCCTTCT TTACCCTGAA CCTCTTTATC GGTGTTATTA TTGACAACTT
 20 3951 CAATCAGCAG CAGAAAAAGT TAGGTGGCCA AGACATTTTT ATGACAGAAG
 4001 AACAGAAGAA ATATTACAAT GCAATGAAAA AGTTAGGAAC CAAGAAACCT
 25 4051 CAAAAGCCCA TCCCAAGGCC CCTGAACAAA TGTCAAGCCT TTGTGTTCTGA
 4101 CCTGGTCACA AGCCAGGTCT TTGACGTCAT CATTCTGGGT CTTATTGTCT
 30 4151 TAAATATGAT TATCATGATG GCTGAATCTG CCGACCAGCC CAAAGATGTG
 4201 AAGAAAACCT TTGATATCCT CAACATAGCC TTCGTGGTCA TCTTTACCAT
 4251 AGAGTGTCTC ATCAAAGTCT TTGCTTTGAG GCAACACTAC TTCACCAATG
 35 4301 GCTGGAACCT ATTTGATTGT GTGGTCGTGG TTCTTTCTAT CATTAGTACC
 4351 CTGGTTTCCC GCTTGGAGGA CAGTGACATT TCTTTCCCGC CCACGCTCTT
 40 4401 CAGAGTCGTC CGCTTGGCTC GGATTGGTCG AATCCTCAGG CTGGTCCGGG
 4451 CTGCCCCGGG AATCAGGACC CTCCTCTTTG CTTTGATGAT GTCTCTCCCC
 45 4501 TCTCTCTTCA ACATCGGTCT GCTGCTCTTC CTGGTGATGT TCATTTACGC
 4551 CATCTTTGGG ATGAGCTGGT TTTCCAAAGT GAAGAAGGGC TCCGGGATCG
 50 4601 ACGACATCTT CAACTTCGAG ACCTTTACGG GCAGCATGCT GTGCCTCTTC
 4651 CAGATAACCA CTTCGGCTGG CTGGGATACC CTCCTCAACC CCATGCTGGA
 55 4701 GGCAAAAGAA CACTGCAACT CCTCCTCCCA AGACAGCTGT CAGCAGCCGC
 4751 AGATAGCCGT CGTCTACTTC GTCAGTTACA TCATCATCTC CTTCCTCATC
 4801 GTGGTCAACA TGTACATCGC TGTGATCCTC GAGAACTTCA ACACAGCCAC
 60 4851 GGAGGAGAGC GAGGACCCTC TGGGAGAGGA CGACTTTGAA ATCTTCTATG

65

4901 AGGTCTGGGA GAAGTTTGAC CCCGAGGCGT CGCAGTTCAT CCAGTATTCG
 4951 GCCCTCTCTG ACTTTGCGGA CGCCCTGCCG GAGCCGTTGC GTGTGGCCAA
 5 5001 GCCGAATAAG TTTCAGTTTC TAGTGATGGA CTTGCCCATG GTGATGGGCG
 5051 ACCGCCTCCA TTGCATGGAT GTTCTCTTTG CTTTCACTAC CAGGGTCCTC
 10 5101 GGGGACTCCA GCGGCTTGGA TACCATGAAA ACCATGATGG AGGAGAAGTT
 5151 TATGGAGGCC AACCCTTTTA AGAAGCTCTA CGAGCCCATA GTCACCACCA
 15 5201 CCAAGAGGAA GGAGGAGGAG CAAGGCGCCG CCGTCATCCA GAGGGCCTAC
 5251 CGGAAACACA TGGAGAAGAT GGTCAAACCTG AGGCTGAAGG ACAGGTCAAG
 20 5301 TTCATCGCAC CAGGTGTTTT GCAATGGAGA CTTGTCCAGC TTGGATGTGG
 5351 CCAAGGTCAA GGTTCACAAT GACTGAACCC TCATCTCCAC CCCTACCTCA
 25 5401 CTGCCTCACA GCTTAGCCTC CAGCCTCTGG CGAGCAGGCG GCAGACTCAC
 5451 TGAACACAGG CCGTTCGATC TGTGTTTTTG GCTGAACGAG GTGACAGGTT
 30 5501 GGCGTCCATT TTTAAATGAC TCTTGGAAG ATTTTCATGTA GAGAGATGTT
 5551 AGAAGGGACT GCAAAGGACA CCGACCATAA CGGAAGGCCT GGAGGACAGT
 5601 CCAACTTACA TAAAGATGAG AAACAAGAAG GAAAGATCCC AGGAAAACCTT
 35 5651 CAGATTGTGT TCTCAGTACA TCCCCCAATG TGTCTGTTCG GTGTTTTGAG
 5701 TATGTGACCT GCCACATGTA GCTCTTTTTT GCATGTACGT CAAAACCCTG
 40 5751 CAGTAAGTTG ATAGCTTGCT ACGGGTGTTT CTACCAGCAT CACAGAATTG
 5801 GGTGTATGAC TCAAACCTAA AAGCATGACT CTGACTTGTC AGTCAGCACC
 45 5851 CCGACTTTCA GACGCTCCAA TCTCTGTCCC AGGTGTCTAA CGAATAAATA
 5901 GGTAAGAAG

50

55

60

65

(3) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- 5 (A) LÄNGE: 1765 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: nicht relevant

10 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: Ja

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- 15 (A) ORGANISMUS: Ratte
 (F) ART DES GEWEBES: Ganglien der Dorsalwurzel
 (G) ART DER ZELLE: peripherer Nerv

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Glu Glu Arg Tyr Tyr Pro Val Ile Phe Pro Asp Glu Arg Asn Phe
 1 5 10 15
 25 Arg Pro Phe Thr Ser Asp Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Ile Ala
 20 25 30
 Ile Gln Lys Glu Arg Lys Lys Ser Lys Asp Lys Ala Ala Ala Glu Pro
 35 40 45
 Gln Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Lys Ala Ser Arg Lys Leu Pro Lys
 50 55 60
 30 Leu Tyr Gly Asp Ile Pro Pro Glu Leu Val Ala Lys Pro Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Leu Asp Pro Phe Tyr Lys Asp His Lys Thr Phe Met Val Leu Asn Lys
 85 90 95
 35 Lys Arg Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ala Lys Arg Ala Leu Phe Ile Leu
 100 105 110
 Gly Pro Phe Asn Pro Leu Arg Ser Leu Met Ile Arg Ile Ser Val His
 115 120 125
 40 Ser Val Phe Ser Met Phe Ile Ile Cys Thr Val Ile Ile Asn Cys Met
 130 135 140
 Phe Met Ala Asn Ser Met Glu Arg Ser Phe Asp Asn Asp Ile Pro Glu
 145 150 155 160
 45 Tyr Val Phe Ile Gly Ile Tyr Ile Leu Glu Ala Val Ile Lys Ile Leu
 165 170 175
 Ala Arg Gly Phe Ile Val Asp Glu Phe Ser Phe Leu Arg Asp Pro Trp
 180 185 190
 Asn Trp Leu Asp Phe Ile Val Ile Gly Thr Ala Ile Ala Thr Cys Phe
 195 200 205
 50 Pro Gly Ser Gln Val Asn Leu Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Phe
 210 215 220
 Arg Ala Leu Lys Ala Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Val Ile Val
 225 230 235 240
 55 Gly Ala Leu Leu Arg Ser Val Lys Lys Leu Val Asp Val Met Val Leu
 245 250 255
 Thr Leu Phe Cys Leu Ser Ile Phe Ala Leu Val Gly Gln Gln Leu Phe
 260 265 270

60

65

	Met	Gly	Ile	Leu	Asn	Gln	Lys	Cys	Ile	Lys	His	Asn	Cys	Gly	Pro	Asn	
			275					280					285				
	Pro	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Cys	Phe	Glu	Lys	Glu	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	
		290					295					300					
5	Phe	Ile	Met	Cys	Gly	Thr	Trp	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Cys	Pro	Asn	Gly	
	305					310					315					320	
	Ser	Thr	Cys	Asp	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Pro	Asp	Asn	Asn	Tyr	Thr	Lys	
					325					330							
10	Phe	Asp	Asn	Phe	Gly	Trp	Ser	Phe	Leu	Ala	Met	Phe	Arg	Val	Met	Thr	
				340					345					350			
	Gln	Asp	Ser	Trp	Glu	Arg	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ile	Leu	Arg	Thr	Ser	Gly	
			355					360					365				
15	Ile	Tyr	Phe	Val	Phe	Phe	Phe	Val	Val	Val	Ile	Phe	Leu	Gly	Ser	Phe	
	370						375					380					
	Tyr	Leu	Leu	Asn	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Met	Ala	Tyr	Glu	Glu	
	385					390					395					400	
20	Gln	Asn	Arg	Asn	Val	Ala	Ala	Glu	Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Lys	Met	Phe	
					405					410					415		
	Gln	Glu	Ala	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Glu	Glu	Lys	Glu	Ala	Leu	Val	Ala	
				420					425					430			
25	Met	Gly	Ile	Asp	Arg	Ser	Ser	Leu	Asn	Ser	Leu	Gln	Ala	Ser	Ser	Phe	
		435					440					445					
	Ser	Pro	Lys	Lys	Arg	Lys	Phe	Phe	Gly	Ser	Lys	Thr	Arg	Lys	Ser	Phe	
		450					455					460					
	Phe	Met	Arg	Gly	Ser	Lys	Thr	Ala	Gln	Ala	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Glu	
	465					470					475					480	
30	Asp	Asp	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Gln	Leu	Leu	Glu	Gln	Thr	Lys	Arg	Leu	
					485				490						495		
	Ser	Gln	Asn	Leu	Pro	Val	Asp	Leu	Phe	Asp	Glu	His	Val	Asp	Pro	Leu	
			500						505					510			
35	His	Arg	Gln	Arg	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Ser	Ile	Leu	Thr	Ile	Thr	Met	
			515					520					525				
	Gln	Glu	Gln	Glu	Lys	Phe	Gln	Glu	Pro	Cys	Phe	Pro	Cys	Gly	Lys	Asn	
		530					535					540					
40	Leu	Ala	Ser	Lys	Tyr	Leu	Val	Trp	Asp	Cys	Ser	Pro	Gln	Trp	Leu	Cys	
	545					550				555						560	
	Ile	Lys	Lys	Val	Leu	Arg	Thr	Ile	Met	Thr	Asp	Pro	Phe	Thr	Glu	Leu	
					565				570						575		
45	Ala	Ile	Thr	Ile	Cys	Ile	Ile	Ile	Asn	Thr	Val	Phe	Leu	Ala	Val	Glu	
			580						585					590			
	His	His	Asn	Met	Asp	Asp	Asn	Leu	Lys	Thr	Ile	Leu	Lys	Ile	Gly	Asn	
			595				600						605				
	Trp	Val	Phe	Thr	Gly	Ile	Phe	Ile	Ala	Glu	Met	Cys	Leu	Lys	Ile	Ile	
		610					615					620					
50	Ala	Leu	Asp	Pro	Tyr	His	Tyr	Phe	Arg	His	Gly	Trp	Asn	Val	Phe	Asp	
	625					630					635					640	
	Ser	Ile	Val	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Tyr	Asn	Thr	Leu	
					645				650						655		
55	Ser	Asp	Asn	Asn	Arg	Ser	Phe	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Arg	Val	
				660					665					670			
	Phe	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser	Trp	Pro	Thr	Leu	Asn	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	
			675				680					685					
60	Ile	Gly	His	Ser	Val	Gly	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Val	Leu	Thr	
	690						695					700					

	Ile	Val	Val	Phe	Ile	Phe	Ser	Val	Val	Gly	Met	Arg	Leu	Phe	Gly	Thr
	705					710					715					720
5	Lys	Phe	Asn	Lys	Thr	Ala	Tyr	Ala	Thr	Gln	Glu	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg
					725					730					735	
	Trp	His	Met	Asp	Asn	Phe	Tyr	His	Ser	Phe	Leu	Val	Val	Phe	Arg	Ile
				740					745					750		
	Leu	Cys	Gly	Glu	Trp	Ile	Glu	Asn	Met	Trp	Gly	Cys	Met	Gln	Asp	Met
			755					760					765			
10	Asp	Gly	Ser	Pro	Leu	Cys	Ile	Ile	Val	Phe	Val	Leu	Ile	Met	Val	Ile
	770						775					780				
	Gly	Lys	Leu	Val	Val	Leu	Asn	Leu	Phe	Ile	Ala	Leu	Leu	Leu	Asn	Ser
	785					790					795					800
15	Phe	Ser	Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Glu	Thr	Arg	Lys
				805						810					815	
	Thr	Lys	Val	Gln	Leu	Ala	Leu	Asp	Arg	Phe	Arg	Arg	Ala	Phe	Ser	Phe
				820					825					830		
20	Met	Leu	His	Ala	Leu	Gln	Ser	Phe	Cys	Cys	Lys	Lys	Cys	Arg	Arg	Lys
			835					840					845			
	Asn	Ser	Pro	Lys	Pro	Lys	Glu	Thr	Thr	Glu	Ser	Phe	Ala	Gly	Glu	Asn
	850						855					860				
	Lys	Asp	Ser	Ile	Leu	Pro	Asp	Ala	Arg	Pro	Trp	Lys	Glu	Tyr	Asp	Thr
	865					870					875					880
25	Asp	Met	Ala	Leu	Tyr	Thr	Gly	Gln	Ala	Gly	Ala	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu
				885						890					895	
	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asp	Val	Glu	Tyr	Cys	Gly	Glu	Gly	Gly	Ala	Leu
				900					905					910		
30	Pro	Thr	Ser	Gln	His	Ser	Ala	Gly	Val	Gln	Ala	Gly	Asp	Leu	Pro	Pro
			915					920					925			
	Glu	Thr	Lys	Gln	Leu	Thr	Ser	Pro	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Glu	Met	Glu
	930						935					940				
35	Val	Phe	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	Leu	Ser	Ile	Gln	Ser	Pro	Arg	Lys
	945					950					955					960
	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	Met	Leu	Ser	Glu	Cys	Ser	Thr	Ile	Asp	Leu
				965						970					975	
40	Asn	Asp	Ile	Phe	Arg	Asn	Leu	Gln	Lys	Thr	Val	Ser	Pro	Lys	Lys	Gln
				980					985					990		
	Pro	Asp	Arg	Cys	Phe	Pro	Lys	Gly	Leu	Ser	Cys	His	Phe	Leu	Cys	His
			995					1000					1005			
	Lys	Thr	Asp	Lys	Arg	Lys	Ser	Pro	Trp	Val	Leu	Trp	Trp	Asn	Ile	Arg
	1010						1015					1020				
45	Lys	Thr	Cys	Tyr	Gln	Ile	Val	Lys	His	Ser	Trp	Phe	Glu	Ser	Phe	Ile
	1025					1030					1035					1040
	Ile	Phe	Val	Ile	Leu	Ser	Ser	Gly	Ala	Leu	Ile	Phe	Glu	Asp	Val	
				1045					1050					1055		
50	Asn	Leu	Pro	Ser	Arg	Pro	Gln	Val	Glu	Lys	Leu	Leu	Arg	Cys	Thr	Asp
				1060					1065					1070		
	Asn	Ile	Phe	Thr	Phe	Ile	Phe	Leu	Leu	Glu	Met	Ile	Leu	Lys	Trp	Val
			1075					1080					1085			
55	Ala	Phe	Gly	Phe	Arg	Arg	Tyr	Phe	Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Trp	Leu	Asp
	1090						1095					1100				
	Phe	Leu	Ile	Val	Val	Val	Ser	Val	Leu	Ser	Leu	Met	Asn	Leu	Pro	Ser
	1105					1110					1115				1120	
60	Leu	Lys	Ser	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	Arg	Ala	Leu
				1125						1130					1135	

65

Ser Gln Phe Glu Gly Met Lys Val Val Val Tyr Ala Leu Ile Ser Ala
 1140 1145 1150
 Ile Pro Ala Ile Leu Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu
 1155 1160 1165
 5 Val Phe Cys Ile Leu Gly Val Asn Leu Phe Ser Gly Lys Phe Gly Arg
 1170 1175 1180
 Cys Ile Asn Gly Thr Asp Ile Asn Met Tyr Leu Asp Phe Thr Glu Val
 1185 1190 1195 1200
 10 Pro Asn Arg Ser Gln Cys Asn Ile Ser Asn Tyr Ser Trp Lys Val Pro
 1205 1210 1215
 Gln Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Leu Gln
 1220 1225 1230
 15 Val Ala Thr Tyr Lys Gly Trp Leu Glu Ile Met Asn Ala Ala Val Asp
 1235 1240 1245
 Ser Arg Glu Lys Asp Glu Gln Pro Asp Phe Glu Ala Asn Leu Tyr Ala
 1250 1255 1260
 20 Tyr Leu Tyr Phe Val Val Phe Ile Ile Phe Gly Ser Phe Phe Thr Leu
 1265 1270 1275 1280
 Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln Gln Lys
 1285 1290 1295
 Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
 1300 1305 1310
 25 Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Thr Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile
 1315 1320 1325
 Pro Arg Pro Leu Asn Lys Cys Gln Ala Phe Val Phe Asp Leu Val Thr
 1330 1335 1340
 30 Ser Gln Val Phe Asp Val Ile Ile Leu Gly Leu Ile Val Leu Asn Met
 1345 1350 1355 1360
 Ile Ile Met Met Ala Glu Ser Ala Asp Gln Pro Lys Asp Val Lys Lys
 1365 1370 1375
 35 Thr Phe Asp Ile Leu Asn Ile Ala Phe Val Val Ile Phe Thr Ile Glu
 1380 1385 1390
 Cys Leu Ile Lys Val Phe Ala Leu Arg Gln His Tyr Phe Thr Asn Gly
 1395 1400 1405
 Trp Asn Leu Phe Asp Cys Val Val Val Val Leu Ser Ile Ile Ser Thr
 1410 1415 1420
 40 Leu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ser Asp Ile Ser Phe Pro Pro Thr Leu
 1425 1430 1435 1440
 Phe Arg Val Val Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Val
 1445 1450 1455
 45 Arg Ala Ala Arg Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
 1460 1465 1470
 Leu Pro Ser Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met Phe
 1475 1480 1485
 50 Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Ser Trp Phe Ser Lys Val Lys Lys Gly
 1490 1495 1500
 Ser Gly Ile Asp Asp Ile Phe Asn Phe Glu Thr Phe Thr Gly Ser Met
 1505 1510 1515 1520
 Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Thr Leu Leu
 1525 1530 1535
 55 Asn Pro Met Leu Glu Ala Lys Glu His Cys Asn Ser Ser Ser Gln Asp
 1540 1545 1550
 Ser Cys Gln Gln Pro Gln Ile Ala Val Val Tyr Phe Val Ser Tyr Ile
 1555 1560 1565
 60

65

	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	Val	Asn	Met	Tyr	Ile	Ala	Val	Ile	Leu
	1570						1575					1580				
	Glu	Asn	Phe	Asn	Thr	Ala	Thr	Glu	Glu	Ser	Glu	Asp	Pro	Leu	Gly	Glu
5	1585					1590					1595				1600	
	Asp	Asp	Phe	Glu	Ile	Phe	Tyr	Glu	Val	Trp	Glu	Lys	Phe	Asp	Pro	Glu
					1605					1610					1615	
	Ala	Ser	Gln	Phe	Ile	Gln	Tyr	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Phe	Ala	Asp	Ala
				1620					1625					1630		
10	Leu	Pro	Glu	Pro	Leu	Arg	Val	Ala	Lys	Pro	Asn	Lys	Phe	Gln	Phe	Leu
		1635						1640					1645			
	Val	Met	Asp	Leu	Pro	Met	Val	Met	Gly	Asp	Arg	Leu	His	Cys	Met	Asp
	1650					1655						1660				
15	Val	Leu	Phe	Ala	Phe	Thr	Thr	Arg	Val	Leu	Gly	Asp	Ser	Ser	Gly	Leu
	1665					1670					1675				1680	
	Asp	Thr	Met	Lys	Thr	Met	Met	Glu	Glu	Lys	Phe	Met	Glu	Ala	Asn	Pro
					1685					1690					1695	
	Phe	Lys	Lys	Leu	Tyr	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	Thr	Thr	Lys	Arg	Lys	Glu
20				1700					1705					1710		
	Glu	Glu	Gln	Gly	Ala	Ala	Val	Ile	Gln	Arg	Ala	Tyr	Arg	Lys	His	Met
		1715					1720					1725				
	Glu	Lys	Met	Val	Lys	Leu	Arg	Leu	Lys	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	His
	1730					1735					1740					
25	Gln	Val	Phe	Cys	Asn	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Leu	Asp	Val	Ala	Lys	Val
	1745				1750						1755				1760	
	Lys	Val	His	Asn	Asp											
					1765											

30

35

40

45

50

55

60

65

(4) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 856 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

(A) ORGANISMUS: Mensch

(F) ART DES GEWEBES: Ganglien der Dorsalwurzel

(G) ART DER ZELLE: peripherer Nerv

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

1 GCTGAGCAGT GGGGCACTGA TATTTGAAGA TGTTACCTT GAGAACCAAC
 51 CCAAAATCCA AGAATTACTA AATTGTACTG ACATTATTTT TACACATATT
 101 TTTATCCTGG AGATGGTACT AAAATGGGTA GCCTTCGGAT TTGGAAAGTA
 151 TTTCACCAGT GCCTGGTGCT GCCTTGATTT CATCATTGTG ATTGTCTCTG
 201 TGACCACCCT CATTAACCTA ATGGAATTGA AGTCCTTCCG GACTCTACGA
 251 GCACTGAGGC CTCTTCGTGC GCTGTCCCAG TTTGAAGGAA TGAAGGTGGT
 301 GGTCAATGCT CTCATAGGTG CCATACCTGC CATTCTGAAT GTTTTGCTTG
 351 TCTGCCTCAT TTTCTGGCTC GTATTTTGTA TTCTGGGAGT ATACTTCTTT
 401 TCTGGAAAAT TTGGGAAATG CATTAATGGA ACAGACTCAG TTATAAATTA
 451 TACCATCATT ACAAATAAAA GTCAATGTGA AAGTGGCAAT TTCTCTTGGA
 501 TCAACCAGAA AGTCAACTTT GACAATGTGG GAAATGCTTA CCTCGCTCTG
 551 CTGCAAGTGG CAACATTTAA GGGCTGGATG GATATTATAT ATGCAGCTGT
 601 TGATTCCACA GAGAAAGAAC AACAGCCAGA GTTTGAGAGC AATTCACCTG
 651 GTTACATTTA CTTCTAGTCT TTTATCATCT TTGGCTCATT CTTCACCTCTG
 701 AATCTCTTCA TTGGCGTTAT CATTGACAAC TTCAACCAAC AGCAGAAAAA
 751 GTTAGGTGGC CAAGACATTT TTATGACAGA AGAACAGAAG AAATACTATA
 801 ATGCAATGAA AAAATTAGGA TCCAAAAAAC CTCAAAAACC CATTCCACGG
 851 CCCGTT

(5) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 702 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RT-PCR

- (A) BESCHREIBUNG: /desc =  DNA probe/domain IV"

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Ratte
 (F) ART DES GEWEBES: Ganglien der Dorsalwurzel
 (G) ART DER ZELLE: peripherer Nerv

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

1 CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
 51 GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
 101 GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTCACCAAC
 151 GGCTGGAACG TGTTCGACTT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
 201 GCTGTTTCT GCAATCCTTA AGTCACTGGA AAACACTTTC TCCCCGACGC
 251 TCTTCCGGGT CATCCGTCTG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
 301 CGAGCAGCCA AGGGGATTCG CACGCTGCTC TTCGCCCTCA TGATGTCCCT
 351 GCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCCTCGTC ATGTTCATCT
 401 ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC
 451 ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
 501 GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
 551 TCAACACGGG GCCTCCCTAC TCGGACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
 601 TCCCCGGGGGA ACTGCGGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTACCAC
 651 CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
 701 TC

(5) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5334 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: RT-PCR

- (A) BESCHREIBUNG: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: Nein

(iv) ANTI-SENSE: Nein

(vi) URSPRÜNGLICHE QUELLE:

- (A) ORGANISMUS:
 (F) ART DES GEWEBES:
 (G) ART DER ZELLE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```

1  GTCGACTCTA GATCAGGGTG AAGATGGAGG AGAGGTACTA CCCGGTGATC
51 TTCCCGGACG AGCGGAATTT CCGCCCCTTC ACTTCCGACT CTCTGGCTGC
101 CATAGAGAAG CGGATTGCTA TCCAAAAGGA GAGGAAGAAG TCCAAAGACA
151 AGGCGGCAGC TGAGCCCCAG CCTCGGCCTC AGCTTGACCT AAAGGCCTCC
201 AGGAAGTTAC CTAAGCTTTA TGGTGACATT CCCCCTGAGC TTGTAGCGAA
251 GCCTCTGGAA GACCTGGACC CATTCTACAA AGACCATAAG ACATTCATGG
301 TGTTGAACAA GAAGAGAACA ATTTATCGCT TCAGCGCCAA GCGGGCCTTG
351 TTCATTCTGG GGCCTTTTAA TCCCCTCAGA AGCTTAATGA TTCGTATCTC
401 TGTCCATTCA GTCTTTAGCA TGTTTCATCAT CTGCACGGTG ATCATCAACT
451 GTATGTTTCAT GGCGAATTCT ATGGAGAGAA GTTTCGACAA CGACATTCCC
501 GAATACGTCT TCATTGGGAT TTATATTTTA GAAGCTGTGA TTAAAATATT
551 GGCAAGAGGC TTCATTGTGG ATGAGTTTTC CTCCTCCGA GATCCGTGGA
601 ACTGGCTGGA CTTTCATTGTC ATTGGAACAG CGATCGCAAC TTGTTTTCCG
55 651 GGCAGCCAAG TCAATCTTTC AGCTCTTCGT ACCTTCCGAG TGTTTCAGAGC
701 TCTGAAGGCG ATTTTCAGTTA TCTCAGGTCT GAAGGTCATC GTAGGTGCCC
60 751 TGCTGCGCTC GGTGAAGAAG CTGGTAGACG TGATGGTCCT CACTCTCTTC
801 TGCCTCAGCA TCTTTGCCCT GGTGCGTCAG CAGCTGTTCA TGGGAATTCT

```

851 GAACCAGAAG TGTATTAAGC ACAACTGTGG CCCCACCCT GCATCCAACA
 901 AGGATTGCTT TGAAAAGGAA AAAGATAGCG AAGACTTCAT AATGTGTGGT
 5 951 ACCTGGCTCG GCAGCAGACC CTGTCCCAAT GGTTCACGT GCGATAAAAC
 1001 CACATTGAAC CCAGACAATA ATTATACAAA GTTTGACAAC TTTGGCTGGT
 10 1051 CCTTTCTCGC CATGTTCCGG GTTATGACTC AAGACTCCTG GGAGAGGCTT
 1101 TACCGACAGA TCCTGCGGAC CTCTGGGATC TACTTTGTCT TCTTCTTCGT
 15 1151 GGTGGTCATC TTCCTGGGCT CTTTCTACCT GCTTAACCTA ACCCTGGCTG
 1201 TTGTCACCAT GGCTTATGAA GAACAGAACA GAAATGTAGC TGCTGAGACA
 20 1251 GAGGCCAAGG AGAAAATGTT TCAGGAAGCC CAGCAGCTGT TAAGGGAGGA
 1301 GAAGGAGGCT CTGGTTGCCA TGGGAATTGA CAGAAGTTCC CTTAATTCCC
 25 1351 TTCAAGCTTC ATCCTTTTCC CCGAAGAAGA GGAAGTTTTT CGGTAGTAAG
 1401 ACAAGAAAGT CCTTCTTTAT GAGAGGGTCC AAGACGGCCC AAGCCTCAGC
 30 1451 GTCTGATTCA GAGGACGATG CCTCTAAAAA TCCACAGCTC CTTGAGCAGA
 1501 CCAAACGACT GTCCCAGAAC TTGCCAGTGG ATCTCTTTGA TGAGCACGTG
 35 1551 GACCCCTCC ACAGGCAGAG AGCGCTGAGC GCTGTCAGTA TCTTAACCAT
 1601 CACCATGCAG GAACAAGAAA AATTCCAGGA GCCTTGTTTC CCATGTGGGA
 40 1651 AAAATTTGGC CTCTAAGTAC CTGGTGTGGG ACTGTAGCCC TCAGTGGCTG
 1701 TGCATAAAGA AGGTCCTGCG GACCATCATG ACGGATCCCT TTAAGTGGCT
 1751 GGCCATCACC ATCTGCATCA TCATCAATAC CGTTTTCTTA GCCGTGGAGC
 45 1801 ACCACAACAT GGATGACAAC TTAAAGACCA TACTGAAAAT AGGAAACTGG
 1851 GTTTTTCACGG GAATTTTCAT AGCGGAAATG TGTCTCAAGA TCATCGCGCT
 50 1901 CGACCCCTAC CACTACTTCC GGCACGGCTG GAATGTTTTT GACAGCATCG
 1951 TGGCCCTCCT GAGTCTCGCT GATGTGCTCT ACAACACACT GTCTGATAAC
 55 2001 AATAGGTCTT TCTTGGCTTC CCTCAGAGTG CTGAGGGTCT TCAAGTTAGC
 2051 CAAATCCTGG CCCACGTAA AACTCTCAT TAAGATCATC GGCCACTCCG
 2101 TGGGCGCGCT TGGAAACCTG ACTGTGGTCC TGACTATCGT GGTCTTCATC
 60 2151 TTTTCTGTGG TGGGCATGCG GCTCTCGGC ACCAAGTTTA ACAAGACCGC

65

2201 CTACGCCACC CAGGAGCGGC CCAGGCGGCG CTGGCACATG GATAATTTCT
 2251 ACCACTCCTT CCTGGTGGTG TTCCGCATCC TCTGTGGGGA ATGGATCGAG
 5 2301 AACATGTGGG GCTGCATGCA GGATATGGAC GGCTCCCCGT TGTGCATCAT
 2351 TGTCTTTGTC CTGATAATGG TGATCGGGAA GCTTGTGGTG CTTAACCTCT
 10 2401 TCATTGCCTT GCTGCTCAAT TCCTTCAGCA ATGAGGAGAA GGATGGGAGC
 2451 CTGGAAGGAG AGACCAGGAA AACCAAAGTG CAGCTAGCCC TGGATCGGTT
 15 2501 CCGCCGGGCC TTCTCCTTCA TGCTGCACGC TCTTCAGAGT TTTTGTGCA
 2551 AGAAATGCAG GAGGAAAAAC TCGCCAAAGC CAAAAGAGAC AACAGAAAGC
 20 2601 TTTGCTGGTG AGAATAAAGA CTCAATCCTC CCGGATGCGA GGCCCTGGAA
 2651 GGAGTATGAT ACAGACATGG CTTTGTACAC TGGACAGGCC GGGGCTCCGC
 25 2701 TGGCCCCACT CGCAGAGGTA GAGGACGATG TGGAATATTG TGGTGAAGGC
 2751 GGTGCCCTAC CCACCTCACA ACATAGTGCT GGAGTTCAGG CCGGTGACCT
 2801 CCCTCCAGAG ACCAAGCAGC TCACTAGCCC GGATGACCAA GGGGTGAAA
 30 2851 TGGAAGTATT TTCTGAAGAA GATCTGCATT TAAGCATACA GAGTCCTCGA
 2901 AAGAAGTCTG ACGCAGTGAG CATGCTCTCG GAATGCAGCA CAATTGACCT
 35 2951 GAATGATATC TTTAGAAATT TACAGAAAAC AGTTTCCCCC AAAAAGCAGC
 3001 CAGATAGATG CTTTCCCAAG GGCCTTAGTT GTCACTTTCT ATGCCACAAA
 40 3051 ACAGACAAGA GAAAGTCCCC CTGGGTCTTG TGGTGGAACA TTCGGAAAAC
 3101 CTGCTACCAA ATCGTGAAGC ACAGCTGGTT TGAGAGTTTC ATAATCTTTG
 45 3151 TTATTCTGCT GAGCAGTGGA GCGCTGATAT TTGAAGATGT CAATCTCCCC
 3201 AGCCGGCCCC AAGTTGAGAA ATTACTAAGG TGTACCGATA ATATTTTCAC
 50 3251 ATTTATTTTC CTCCTGGAAA TGATCCTGAA GTGGGTGGCC TTTGGATTCC
 3301 GGAGGTATTT CACCAGTGCC TGGTGCTGGC TTGATTTTCT CATTGTGGTG
 55 2251 GTGTCTGTGC TCAGTCTCAT GAATCTACCA AGCTTGAAGT CCTTCCGGAC
 3401 TCTGCGGGCC CTGAGACCTC TGCGGGCGCT GTCCCAGTTT GAAGGAATGA
 3451 AGGTTGTCTG CTACGCCCTG ATCAGCGCCA TACCTGCCAT TCTCAATGTC
 60 3501 TTGCTGGTCT GCCTCATTTT CTGGCTCGTA TTTTGTATCT TGGGAGTAAA
 65

3551 TTTATTTTCT GGAAGTTTG GAAGGTGCAT TAACGGGACA GACATAAATA
 3601 TGTATTTTGA TTTTACCGAA GTTCCGAACC GAAGCCAATG TAACATTAGT
 5 3651 AATTACTCGT GGAAGGTCCC GCAGGTCAAC TTTGACAACG TGGGGAATGC
 3701 CTATCTCGCC CTGCTGCAAG TGGCAACCTA TAAGGGCTGG CTGGAAATCA
 10 3751 TGAATGCTGC TGTCGATTCC AGAGAGAAAG ACGAGCAGCC GGACTTTGAG
 3801 GCGAACCTCT ACGCGTATCT CTACTTTGTG GTTTTTATCA TCTTCGGCTC
 3851 CTTCTTTACC CTGAACCTCT TTATCGGTGT TATTATTGAC AACTTCAATC
 15 3901 AGCAGCAGAA AAAGTTAGGT GGCCAAGACA TCTTCATGAC TGAGGAGCAG
 3951 AAGAAATATT ACAATGCAAT GAAAAAGTTA GGAACCAAGA AACCTCAAAA
 20 4001 GCCCATCCCA AGGCCCTGA ACAAATGTCA AGCCTTTGTG TTCGACCTGG
 4051 TCACAAGCCA GGTCTTTGAC GTCATCATTC TGGGTCTTAT TGTCTTAAAT
 25 4101 ATGATTATCA TGATGGCTGA ATCTGCCGAC CAGCCCAAAG ATGTGAAGAA
 4151 AACCTTTGAT ATCCTCAACA TAGCCTTCGT GGTCATCTTT ACCATAGAGT
 30 4201 GTCTCATCAA AGTCTTTGCT TTGAGGCAAC ACTACTTCAC CAATGGCTGG
 4251 AACTTATTTG ATTGTGTGGT CGTGGTTCTT TCTATCATTA GTACCCTGGT
 35 4301 TTCCCGCTTG GAGGACAGTG ACATTTCTTT CCCGCCCACG CTCTTCAGAG
 4351 TCGTCCGCTT GGCTCGGATT GGTCGAATCC TCAGGCTGGT CCGGGCTGCC
 40 4401 CGGGGAATCA GGACCCTCCT CTTTGCTTTG ATGATGTCTC TCCCCTCTCT
 4451 CTTCAACATC GGTCTGCTGC TCTTCCTGGT GATGTTCAAT TACGCCATCT
 45 4501 TTGGGATGAG CTGGTTTTCC AAAGTGAAGA AGGGCTCCGG GATCGACGAC
 4551 ATCTTCAACT TCGAGACCTT TACGGGCAGC ATGCTGTGCC TCTTCCAGAT
 50 4601 AACCCTTCG GCTGGCTGGG ATACCCTCCT CAACCCCATG CTGGAGGCAA
 4651 AAGAACACTG CAACTCCTCC TCCCAAGACA GCTGTCAGCA GCCGCAGATA
 4701 GCCGTCGTCT ACTTCGTCAG TTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT
 55 4751 CAACATGTAC ATCGCTGTGA TCCTCGAGAA CTTCAACACA GCCACGGAGG
 4801 AGAGCGAGGA CCCTCTGGGA GAGGACGACT TTGAAATCTT CTATGAGGTC
 60 4851 TGGGAGAAGT TTGACCCCGA GGCGTCGCAG TTCATCCAGT ATTCGGCCCT
 65

4901 CTCTGACTTT GCGGACGCCC TGCCGGAGCC GTTGCCTGTG GCCAAGCCGA
 4951 ATAÁGTTTCA GTTCTAGTG ATGGACTTGC CCATGGTGAT GGGCGACCGC
 5001 CTCCATTGCA TGGATGTTCT CTTTGCTTTC ACTACCAGGG TCCTCGGGGA
 5051 CTCCAGCGGC TTGGATACCA TGAAAACCAT GATGGAGGAG AAGTTTATGG
 5101 AGGCCAACCC TTTTAAGAAG CTCTACGAGC CCATAGTCAC CACCACCAAG
 5151 AGGAAGGAGG AGGAGCAAGG CGCCGCGTC ATCCAGAGGG CCTACCGGAA
 5201 ACACATGGAG AAGATGGTCA AACTGAGGCT GAAGGACAGG TCAAGTTCAT
 5251 CGCACCAGGT GTTTTGCAAT GGAGACTTGT CCAGCTTGA TGTGGCCAAG
 5301 GTCAAGGTTT ACAATGACTG AACCTCATC TAGA

25 Patentansprüche

1. Isolierte DNA-Sequenz umfassend die Nucleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 3.
2. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA-Sequenz ein Natriumkanalprotein oder ein Fragment davon codiert.
- 30 3. DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Natriumkanalprotein die α -Untereinheit oder ein Fragment davon ist.
4. DNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Natriumkanalprotein Tetrodotoxin-resistent ist.
5. DNA nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Natriumkanalprotein in Säugetieren gefunden wird.
- 35 6. DNA nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Natriumkanalprotein in Ratten gefunden wird.
7. DNA nach Anspruch 3 oder Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Natriumkanalprotein in Menschen gefunden wird.
- 40 8. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA cDNA ist.
9. DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA synthetische DNA ist.
10. Expressionsvektor enthaltend die DNA von Anspruch 8.
11. Expressionsvektor enthaltend die synthetische DNA von Anspruch 9.
12. Wirtszelle transformiert mit dem Expressionsvektor von Anspruch 10.
- 45 13. Wirtszelle transformiert mit dem Expressionsvektor von Anspruch 11.
14. Rekombinantes Polynucleotid enthaltend eine Nucleinsäuresequenz, die aus der DNA-Sequenz von Anspruch 1 abgeleitet ist.
15. Natriumkanalprotein, das von einer DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder allelischen Varianten davon codiert wird.
- 50 16. Tetrodotoxin-resistentes Natriumkanalprotein, das von einer DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder allelischen Varianten davon codiert wird.
17. Protein nach Anspruch 16 mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 2.
18. Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren von Tetrodotoxin-resistentem Natriumkanalprotein umfassend, dass man eine Verbindung, von der angenommen wird, dass sie ein Inhibitor ist, mit Natriumkanalprotein nach Anspruch 16 in Kontakt bringt und die Aktivität des exprimierten Natriumkanals misst.
- 55 19. Poly- und/oder monoklonale Antikörper gegen ein Tetrodotoxin-resistentes Natriumkanalprotein, das von DNA nach einem der Ansprüche 1 bis 9 oder allelischen Varianten davon codiert wird.
20. Diagnosekit umfassend ein Polynucleotid nach Anspruch 14, das spezifisch mit einem Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanalprotein oder einem Fragment davon hybridisieren kann.
- 60 21. Verwendung einer isolierten DNA-Sequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 9, um eine Verbindung zu identifizieren, von der angenommen wird, dass sie ein Inhibitor von Tetrodotoxin-resistentem Natriumkanalprotein ist.

Figur 1A: SEQ ID NO:1

```

1  GAAGTCACAG GAGTGTCTGT CAGCGAGAGG AAGAAGGGAG AGTTTACTGA
51  GTGTCTTCTG CCCCTCCTCA GGGTGAAGAT GGAGGAGAGG TACTACCCGG
101 TGATCTTCCC GGACGAGCGG AATTTCGGCC CCTTCACTTC CGACTCTCTG
151 GCTGCCATAG AGAAGCGGAT TGCTATCCAA AAGGAGAGGA AGAAGTCCAA
201 AGACAAGGCG GCAGCTGAGC CCCAGCCTCG GCCTCAGCTT GACCTAAAGG
251 CCTCCAGGAA GTTACCTAAG CTTTATGGTG ACATTCCCCC TGAGCTTGTA
301 GCGAAGCCTC TGGAAGACCT GGACCCATTC TACAAAGACC ATAAGACATT
351 CATGGTGTTG AACAAGAAGA GAACAATTTA TCGCTTCAGC GCCAAGCGGG
401 CCTTGTTTAT TCTGGGGCCT TTTAATCCCC TCAGAAGCTT AATGATTCGT
451 ATCTCTGTCC ATTCAGTCTT TAGCATGTTC ATCATCTGCA CGGTGATCAT
501 CAACTGTATG TTCATGGCGA ATTCTATGGA GAGAAGTTTC GACAACGACA
551 TTCCCGAATA CGTCTTCATT GGGATTTATA TTTTAGAAGC TGTGATTAAA
601 ATATTGGCAA GAGGCTTCAT TGTGGATGAG TTTTCCTTCC TCCGAGATCC
651 GTGGAACCTG CTGGACTTCA TTGTCATTGG AACAGCGATC GCAACTTGTT
701 TTCCGGGCGAG CCAAGTCAAT CTTTCAGCTC TTCGTACCTT CCGASTGTTC
751 AGAGCTCTGA AGGCGATTTT AGTTATCTCA GGTCTGAAGG TCATCGTAGG
801 TGCCCTGCTG CGCTCGGTGA AGAAGCTGGT AGACGTGATG GTCCTCACTC
851 TCTTCTGCCT CAGCATCTTT GCCCTGGTCG GTCAGCAGCT GTTCATGGGA
901 ATTCTGAACC AGAAGTGTAT TAAGCACAAC TGTGGCCCCA ACCCTGCATC
951 CAACAAGGAT TGCTTTGAAA AGGAAAAGA TAGCGAAGAC TTCATAATGT
1001 GTGGTACCTG GCTCGGCAGC AGACCCTGTC CCAATGGTTC TACGTGCGAT
1051 AAAACACAT TGAACCCAGA CAATAATTAT ACAAAGTTTG ACAACTTTGG
1101 CTGGTCCTTT CTCGCCATGT TCCGGGTTAT GACTCAAGAC TCCTGGGAGA
1151 GGCTTTACCG ACAGATCCTG CGGACCTCTG GGATCTACTT TGTCTTCTTC
1201 TTCGTGGTGG TCATCTTCCT GGGCTCCTTC TACCTGCTTA ACCTAACCTT

```

Figur 1B: SEQ ID NO:1

```

1251 GGCTGTTGTC ACCATGGCTT ATGAAGAACA GAACAGAAAT GTAGCTGCTG
1301 AGACAGAGGC CAAGGAGAAA ATGTTTCAGG AAGCCCAGCA GCTGTTAAGG
1351 GAGGAGAAGG AGGCTCTGGT TGCCATGGGA ATTGACAGAA GTTCCCTTAA
1401 TTCCCTTCAA GCTTCATCCT TTTCCCCGAA GAAGAGGAAG TTTTTCGGTA
1451 GTAAGACAAG AAAGTCCTTC TTTATGAGAG GGTCCAAGAC GGCCCAAGCC
1501 TCAGCGTCTG ATTCAGAGGA CGATGCCTCT AAAAATCCAC AGCTCCTTGA
1551 GCAGACCAAA CGACTGTCCC AGAACTTGCC AGTGGATCTC TTTGATGAGC
1601 ACGTGGACCC CCTCCACAGG CAGAGAGCGC TGAGCGCTGT CAGTATCTTA
1651 ACCATCACCA TGCAGGAACA AGAAAAATTC CAGGAGCCTT GTTTCCCATG
1701 TGGGAAAAAT TTGGCCTCTA AGTACCTGGT GTGGGACTGT AGCCCTCAGT
1751 GGCTGTGCAT AAAGAAGGTC CTGCGGACCA TCATGACGGA TCCCTTTACT
1801 GAGCTGGCCA TCACCATCTG CATCATCATC AATACCGTTT TCTTAGCCGT
1851 GGAGCACCAC AACATGGATG ACAACTTAAA GACCATACTG AAAATAGGAA
1901 ACTGGGTTTT CACGGGAATT TTCATAGCGG AAATGTGTCT CAAGATCATC
1951 GCGCTCGACC CTTACCACTA CTTCCGGCAC GGCTGGAATG TTTTGTGACAG
2001 CATCGTGGCC CTCCTGAGTC TCGCTGATGT GCTCTACAAC AACTGTCTG
2051 ATAACAATAG GTCTTTCTTG GCTTCCCTCA GAGTGCTGAG GGTCTTCAAG
2101 TTAGCCAAAT CCTGGCCCAC GTTAAACACT CTCATTAAGA TCATCGGCCA
2151 CTCCGTGGGC GCGCTTGGAA ACCTGACTGT GGTCCCTGACT ATCGTGGTCT
2201 TCATCTTTTC TGTGGTGGGC ATGCGGCTCT TCGGCACCAA GTTTAACAAG
2251 ACCGCCTACG CCACCCAGGA GCGGCCCAGG CGGCGCTGGC ACATGGATAA
2301 TTTCTACCAC TCCTTCCTGG TGGTGTTCCG CATCCTCTGT GGGGAATGGA
2351 TCGAGAACAT GTGGGGCTGC ATGCAGGATA TGGACGGCTC CCCGTTGTGC
2401 ATCATTGTCT TTGTCCTGAT AATGGTGATC GGAAGCTTG TGGTGCTTAA

```

Figur 1C: SEQ ID NO:1

2451 CCTCTTCATT GCCTTGCTGC TCAATTCCTT CAGCAATGAG GAGAAGGATG
 2501 GGAGCCTGGA AGGAGAGACC AGGAAAACCA AAGTGCAGCT AGCCCTGGAT
 2551 CGGTTCCGCC GGGCCTTCTC CTTTCATGCTG CACGCTCTTC AGAGTTTTTG
 2601 TTGCAAGAAA TGCAGGAGGA AAAACTCGCC AAAGCCAAAA GAGACAACAG
 2651 AAAGCTTTGC TGGTGAGAAT AAAGACTCAA TCCTCCCGGA TGCAGGCCCC
 2701 TGGAAGGAGT ATGATACAGA CATGGCTTTG TACACTGGAC AGGCCGGGGC
 2751 TCCGCTGGCC CCACTCGCAG AGGTAGAGGA CGATGTGGAA TATTGTGGTG
 2801 AAGGCGGTGC CCTACCCACC TCACAACATA GTGCTGGAGT TCAGGCCGGT
 2851 GACCTCCCTC CAGAGACCAA GCAGCTCACT AGCCCGGATG ACCAAGGGGT
 2901 TGAAATGGAA GTATTTTCTG AAGAAGATCT GCATTTAAGC ATACAGAGTC
 2951 CTCGAAGAA GTCTGACGCA GTGAGCATGC TCTCGGAATG CAGCACAATT
 3001 GACCTGPAATG AATCTTTTAG AATTTTACAG AAPACAGTTT CCCCCAAAAA
 3051 GCAGCCAGAT AGATGCTTTC CCAAGGGCCT TAGTTGTCAC TTTCTATGCC
 3101 ACAAACAGA CAAGAGAAAG TCCCCCTGGG TCCTGTGGTG GAACATTCGG
 3151 AAAACCTGCT ACCAAATCGT GAAGCACAGC TGGTTTGAGA GTTTCATAAT
 3201 CTTTGTTATT CTGCTGAGCA GTGGAGCGCT GATATTTGAA GATGTCAATC
 3251 TCCCCAGCCG GCCCCAAGTT GAGAAATTAC TAAGGTGTAC CGATAATATT
 3301 TTCACATTTA TTTTCCTCCT GGAAATGATC CTGAAGTGGG TGGCCTTTGG
 3351 ATTCCGGAGG TATTTACCA GTGCCTGGTG CTGGCTTGAT TTCCTCATTG
 3401 TGGTGGTGTC TGTGCTCAGT CTCATGAATC TACCAAGCTT GAAGTCCTTC
 3451 CGGACTCTGC GGGCCCTGAG ACCTCTGCGG GCGCTGTCCC AGTTTGAAGG
 3501 AATGAAGGTT GTCGTCTACG CCCTGATCAG CGCCATACCT GCCATTCTCA
 3551 ATGTCTTGCT GGTCTGCCTC ATTTTCTGGC TCGTATTTTG TATCTTGGGA
 3601 GTAAATTTAT TTTCTGGGAA GTTTGGAAGG TGCATTAACG GGACAGACAT

Figur 1D: SEQ ID NO:1

3651 AAATATGTAT TTGGATTTTA CCGAAGTTCC GAACCGAAGC CAATGTAACA
 3701 TTAGTAATTA CTCGTGGAAG GTCCCGCAGG TCAACTTTGA CAACGTGGGG
 3751 AATGCCTATC TCGCCCTGCT GCAAGTGGCA ACCTATAAGG GCTGGCTGGA
 3801 AATCATGAAT GCTGCTGTCT ATTCCAGAGA GAAAGACGAG CAGCCGGACT
 3851 TTGAGGCGAA CCTCTACGCG TATCTCTACT TTGTGGTTTT TATCATCTTC
 3901 GGCTCCTTCT TTACCCTGAA CCTCTTTATC GGTGTTATTA TTGACAACTT
 3951 CAATCAGCAG CAGAAAAAGT TAGGTGGCCA AGACATTTTT ATGACAGAAG
 4001 AACAGAAGAA ATATTACAAT GCAATGAAAA AGTTAGGAAC CAAGAAACCT
 4051 CAAAAGCCCA TCCCAAGGCC CCTGAACAAA TGTCAAGCCT TTGTGTTCTGA
 4101 CCTGGTCACA AGCCAGGTCT TTGACGTCTT CATTCCTGGGT CTTATTGTCT
 4151 TAAATATGAT TATCATGATG GCTGAATCTG CCGACCAGCC CAAAGATGTG
 4201 AAGAAAACCT TTGATATCCT CAACATAGCC TTCGTGCTCA TCTTTACCAT
 4251 AGAGTGTCTC ATCAAAGTCT TTGCTTTGAG GCAACACTAC TTCACCAATG
 4301 GCTGGAACCT ATTTGATTGT GTGGTCGTGG TTCTTTCTAT CATTAGTACC
 4351 CTGGTTTCCC GCTTGAGGGA CAGTGACATT TCTTTCCCGC CCACGCTCTT
 4401 CAGAGTCGTC CGCTTGGCTC GGATTGGTCG AATCCTCAGG CTGGTCCGGG
 4451 CTGCCCCGGG AATCAGGACC CTCCTCTTTG CTTTGATGAT GTCTCTCCCC
 4501 TCTCTCTTCA ACATCGGTCT GCTGCTCTTC CTGGTGATGT TCATTTACGC
 4551 CATCTTTGGG ATGAGCTGGT TTTCCAAAGT GAAGAAGGGC TCCGGGATCG
 4601 ACGACATCTT CAACTTCGAG ACCTTTACGG GCAGCATGCT GTGCCCTCTC
 4651 CAGATAACCA CTTGCGCTGG CTGGGATACC CTCCTCAACC CCATGCTGGA
 4701 GGCAAAAGAA CACTGCAACT CCTCCTCCCA AGACAGCTGT CAGCAGCCGC
 4751 AGATAGCCGT CGTCTACTTC GTCAGTTACA TCATCATCTC CTTCTCATC
 4801 GTGGTCAACA TGTACATCGC TGTGATCCTC GAGAACTTCA ACACAGCCAC

Figur 1E: SEQ ID NO: 1

```

4851 GGAGGAGAGC GAGGACCCTC TGGGAGAGGA CGACTTTGAA ATCTTCTATG
4901 AGGTCTGGGA GAAGTTTGAC CCCGAGGCGT CGCAGTTCAT CCAGTATTCG
4951 GCCCTCTCTG ACTTTGCGGA CGCCCTGCCG GAGCCGTTGC GTGTGGCCAA
5001 GCCGAATAAG TTTCAGTTTC TAGTGATGGA CTTGCCCATG GTGATGGGCG
5051 ACCGCCTCCA TTGCATGGAT GTTCTCTTTG CTTTCACTAC CAGGGTCCTC
5101 GGGGACTCCA GCGGCTTGGA TACCATGAAA ACCATGATGG AGGAGAAGTT
5151 TATGGAGGCC AACCCTTTTA AGAAGCTCTA CGAGCCCATA GTCACCACCA
5201 CCAAGAGGAA GGAGGAGGAG CAAGGCGCCG CCGTCATCCA GAGGGCCTAC
5251 CGGAAACACA TGGAGAAGAT GGTCAAACCTG AGGCTGAAGG ACAGGTCAAG
5301 TTCATCGCAC CAGGTGTTTT GCAATGGAGA CTTGTCCAGC TTGGATGTGG
5351 CCAAGGTCAA GGTTCACAAT GACTGAACCC TCATCTCCAC CCCTACCTCA
5401 CTGCCTCACA GCTTAGCCTC CAGCCTCTGG CGAGCAGGCG GCAGACTCAC
5451 TGAACACAGG CCGTTCGATC TGTGTTTTTG GCTGAACGAG GTGACAGGTT
5501 GGCGTCCATT TTAAATGAC TCTTGAAAG ATTTTCATGTA GAGAGATGTT
5551 AGAAGGGACT GCAAAGGACA CCGACCATAA CGGAAGGCCT GGAGGACAGT
5601 CCAACTTACA TAAAGATGAG AAACAAGAAG GAAAGATCCC AGGAAAACCTT
5651 CAGATTGTGT TCTCAGTACA TCCCCAATG TGTCTGTTCC GTGTTTTGAG
5701 TATGTGACCT GCCACATGTA GCTCTTTTTT GCATGTACGT CAAAACCCTG
5751 CAGTAAGTTG ATAGCTTGCT ACGGGTGTTT CTACCAGCAT CACAGAATTG
5801 GGTGTATGAC TCAAACCTAA AAGCATGACT CTGACTTGTC AGTCAGCACC
5851 CCGACTTTCA GACGCTCCAA TCTCTGTCCC AGGTGTCTAA CGAATAAATA
5901 GGTAAAAG

```

Figur 2A: SEQ ID NO: 2

Met Glu Glu Arg Tyr Tyr Pro Val Ile Phe Pro Asp Glu Arg Asn Phe
 1 5 10 15
 Arg Pro Phe Thr Ser Asp Ser Leu Ala Ala Ile Glu Lys Arg Ile Ala
 20 25 30
 Ile Gln Lys Glu Arg Lys Lys Ser Lys Asp Lys Ala Ala Ala Glu Pro
 35 40 45
 Gln Pro Arg Pro Gln Leu Asp Leu Lys Ala Ser Arg Lys Leu Pro Lys
 50 55 60
 Leu Tyr Gly Asp Ile Pro Pro Glu Leu Val Ala Lys Pro Leu Glu Asp
 65 70 75 80
 Leu Asp Pro Phe Tyr Lys Asp His Lys Thr Phe Met Val Leu Asn Lys
 85 90 95
 Lys Arg Thr Ile Tyr Arg Phe Ser Ala Lys Arg Ala Leu Phe Ile Leu
 100 105 110
 Gly Pro Phe Asn Pro Leu Arg Ser Leu Met Ile Arg Ile Ser Val His
 115 120 125
 Ser Val Phe Ser Met Phe Ile Ile Cys Thr Val Ile Ile Asn Cys Met
 130 135 140
 Phe Met Ala Asn Ser Met Glu Arg Ser Phe Asp Asn Asp Ile Pro Glu
 145 150 155 160
 Tyr Val Phe Ile Gly Ile Tyr Ile Leu Glu Ala Val Ile Lys Ile Leu
 165 170 175
 Ala Arg Gly Phe Ile Val Asp Glu Phe Ser Phe Leu Arg Asp Pro Trp
 180 185 190
 Asn Trp Leu Asp Phe Ile Val Ile Gly Thr Ala Ile Ala Thr Cys Phe
 195 200 205
 Pro Gly Ser Gln Val Asn Leu Ser Ala Leu Arg Thr Phe Arg Val Phe
 210 215 220
 Arg Ala Leu Lys Ala Ile Ser Val Ile Ser Gly Leu Lys Val Ile Val
 225 230 235 240
 Gly Ala Leu Leu Arg Ser Val Lys Lys Leu Val Asp Val Met Val Leu
 245 250 255
 Thr Leu Phe Cys Leu Ser Ile Phe Ala Leu Val Gly Gln Gln Leu Phe
 260 265 270
 Met Gly Ile Leu Asn Gln Lys Cys Ile Lys His Asn Cys Gly Pro Asn
 275 280 285

CH 693 031 A5

Pro	Ala	Ser	Asn	Lys	Asp	Cys	Phe	Glu	Lys	Glu	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp
290						295						300			
Phe	Ile	Met	Cys	Gly	Thr	Trp	Leu	Gly	Ser	Arg	Pro	Cys	Pro	Asn	Gly
305					310					315				320	

Figur 2B: SEQ ID NO: 2

Ser Thr Cys Asp Lys Thr Thr Leu Asn Pro Asp Asn Asn Tyr Thr Lys			
	325	330	335
Phe Asp Asn Phe Gly Trp Ser Phe Leu Ala Met Phe Arg Val Met Thr			
	340	345	350
Gln Asp Ser Trp Glu Arg Leu Tyr Arg Gln Ile Leu Arg Thr Ser Gly			
	355	360	365
Ile Tyr Phe Val Phe Phe Phe Val Val Val Ile Phe Leu Gly Ser Phe			
	370	375	380
Tyr Leu Leu Asn Leu Thr Leu Ala Val Val Thr Met Ala Tyr Glu Glu			
	385	390	395
Gln Asn Arg Asn Val Ala Ala Glu Thr Glu Ala Lys Glu Lys Met Phe			
	405	410	415
Gln Glu Ala Gln Gln Leu Leu Arg Glu Glu Lys Glu Ala Leu Val Ala			
	420	425	430
Met Gly Ile Asp Arg Ser Ser Leu Asn Ser Leu Gln Ala Ser Ser Phe			
	435	440	445
Ser Pro Lys Lys Arg Lys Phe Phe Gly Ser Lys Thr Arg Lys Ser Phe			
	450	455	460
Phe Met Arg Gly Ser Lys Thr Ala Gln Ala Ser Ala Ser Asp Ser Glu			
	465	470	475
Asp Asp Ala Ser Lys Asn Pro Gln Leu Leu Glu Gln Thr Lys Arg Leu			
	485	490	495
Ser Gln Asn Leu Pro Val Asp Leu Phe Asp Glu His Val Asp Pro Leu			
	500	505	510
His Arg Gln Arg Ala Leu Ser Ala Val Ser Ile Leu Thr Ile Thr Met			
	515	520	525
Gln Glu Gln Glu Lys Phe Gln Glu Pro Cys Phe Pro Cys Gly Lys Asn			
	530	535	540
Leu Ala Ser Lys Tyr Leu Val Trp Asp Cys Ser Pro Gln Trp Leu Cys			
	545	550	555
Ile Lys Lys Val Leu Arg Thr Ile Met Thr Asp Pro Phe Thr Glu Leu			
	565	570	575
Ala Ile Thr Ile Cys Ile Ile Ile Asn Thr Val Phe Leu Ala Val Glu			
	580	585	590
His His Asn Met Asp Asp Asn Leu Lys Thr Ile Leu Lys Ile Gly Asn			

CH 693 031 A5

595	600	605
Trp Val Phe Thr Gly Ile Phe Ile Ala Glu Met Cys Leu Lys Ile Ile		
610	615	620

Figure 2C: SEQ ID NO: 2

Ala Leu Asp Pro Tyr His Tyr Phe Arg His Gly Trp Asn Val Phe Asp
 625 630 635 640
 Ser Ile Val Ala Leu Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Asn Thr Leu
 645 650 655
 Ser Asp Asn Asn Arg Ser Phe Leu Ala Ser Leu Arg Val Leu Arg Val
 660 665 670
 Phe Lys Leu Ala Lys Ser Trp Pro Thr Leu Asn Thr Leu Ile Lys Ile
 675 680 685
 Ile Gly His Ser Val Gly Ala Leu Gly Asn Leu Thr Val Val Leu Thr
 690 695 700
 Ile Val Val Phe Ile Phe Ser Val Val Gly Met Arg Leu Phe Gly Thr
 705 710 715 720
 Lys Phe Asn Lys Thr Ala Tyr Ala Thr Gln Glu Arg Pro Arg Arg Arg
 725 730 735
 Trp His Met Asp Asn Phe Tyr His Ser Phe Leu Val Val Phe Arg Ile
 740 745 750
 Leu Cys Gly Glu Trp Ile Glu Asn Met Trp Gly Cys Met Gln Asp Met
 755 760 765
 Asp Gly Ser Pro Leu Cys Ile Ile Val Phe Val Leu Ile Met Val Ile
 770 775 780
 Gly Lys Leu Val Val Leu Asn Leu Phe Ile Ala Leu Leu Leu Asn Ser
 785 790 795 800
 Phe Ser Asn Glu Glu Lys Asp Gly Ser Leu Glu Gly Glu Thr Arg Lys
 805 810 815
 Thr Lys Val Gln Leu Ala Leu Asp Arg Phe Arg Arg Ala Phe Ser Phe
 820 825 830
 Met Leu His Ala Leu Gln Ser Phe Cys Cys Lys Lys Cys Arg Arg Lys
 835 840 845
 Asn Ser Pro Lys Pro Lys Glu Thr Thr Glu Ser Phe Ala Gly Glu Asn
 850 855 860
 Lys Asp Ser Ile Leu Pro Asp Ala Arg Pro Trp Lys Glu Tyr Asp Thr
 865 870 875 880
 Asp Met Ala Leu Tyr Thr Gly Gln Ala Gly Ala Pro Leu Ala Pro Leu
 885 890 895

CH 693 031 A5

Ala Glu Val Glu Asp Asp Val Glu Tyr Cys Gly Glu Gly Gly Ala Leu
900 905 910

Figur 2D: SEQ ID NO: 2

Pro Thr Ser Gln His Ser Ala Gly Val Gln Ala Gly Asp Leu Pro Pro
 915 920 925
 Glu Thr Lys Gln Leu Thr Ser Pro Asp Asp Gln Gly Val Glu met Glu
 930 935 940
 Val Phe Ser Glu Glu Asp Leu His Leu Ser Ile Gln Ser Pro Arg Lys
 945 950 955 960
 Lys Ser Asp Ala Val Ser Met Leu Ser Glu Cys Ser Thr Ile Asp Leu
 965 970 975
 Asn Asp Ile Phe Arg Asn Leu Gln Lys Thr Val Ser Pro Lys Lys Gln
 980 985 990
 Pro Asp Arg Cys Phe Pro Lys Gly Leu Ser Cys His Phe Leu Cys His
 995 1000 1005
 Lys Thr Asp Lys Arg Lys Ser Pro Trp Val Leu Trp Trp Asn Ile Arg
 1010 1015 1020
 Lys Thr Cys Tyr Gln Ile Val Lys His Ser Trp Phe Glu Ser Phe Ile
 1025 1030 1035 1040
 Ile Phe Val Ile Leu Leu Ser Ser Gly Ala Leu Ile Phe Glu Asp Val
 1045 1050 1055
 Asn Leu Pro Ser Arg Pro Gln Val Glu Lys Leu Leu Arg Cys Thr Asp
 1060 1065 1070
 Asn Ile Phe Thr Phe Ile Phe Leu Leu Glu Met Ile Leu Lys Trp Val
 1075 1080 - 1085
 Ala Phe Gly Phe Arg Arg Tyr Phe Thr Ser Ala Trp Cys Trp Leu Asp
 1090 1095 1100
 Phe Leu Ile Val Val Val Ser Val Leu Ser Leu Met Asn Leu Pro Ser
 1105 1110 1115 1120
 Leu Lys Ser Phe Arg Thr Leu Arg Ala Leu Arg Pro Leu Arg Ala Leu
 1125 1130 1135
 Ser Gln Phe Glu Gly Met Lys Val Val Val Tyr Ala Leu Ile Ser Ala
 1140 1145 1150
 Ile Pro Ala Ile Leu Asn Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Phe Trp Leu
 1155 1160 1165
 Val Phe Cys Ile Leu Gly Val Asn Leu Phe Ser Gly Lys Phe Gly Arg
 1170 1175 1180
 Cys Ile Asn Gly Thr Asp Ile Asn Met Tyr Leu Asp Phe Thr Glu Val

CH 693 031 A5

1185					1190					1195					1200
Pro	Asn	Arg	Ser	Gln	Cys	Asn	Ile	Ser	Asn	Tyr	Ser	Trp	Lys	Val	Pro
					1205					1210					1215

Figure 2E: SEQ ID NO: 2

Gln Val Asn Phe Asp Asn Val Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Leu Gln
 1220 1225 1230
 Val Ala Thr Tyr Lys Gly Trp Leu Glu Ile Met Asn Ala Ala Val Asp
 1235 1240 1245
 Ser Arg Glu Lys Asp Glu Gln Pro Asp Phe Glu Ala Asn Leu Tyr Ala
 1250 1255 1260
 Tyr Leu Tyr Phe Val Val Phe Ile Ile Phe Gly Ser Phe Phe Thr Leu
 1265 1270 1275 1280
 Asn Leu Phe Ile Gly Val Ile Ile Asp Asn Phe Asn Gln Gln Gln Lys
 1285 1290 1295
 Lys Leu Gly Gly Gln Asp Ile Phe Met Thr Glu Glu Gln Lys Lys Tyr
 1300 1305 1310
 Tyr Asn Ala Met Lys Lys Leu Gly Thr Lys Lys Pro Gln Lys Pro Ile
 1315 1320 1325
 Pro Arg Pro Leu Asn Lys Cys Gln Ala Phe Val Phe Asp Leu Val Thr
 1330 1335 1340
 Ser Gln Val Phe Asp Val Ile Ile Leu Gly Leu Ile Val Leu Asn Met
 1345 1350 1355 1360
 Ile Ile Met Met Ala Glu Ser Ala Asp Gln Pro Lys Asp Val Lys Lys
 1365 1370 1375
 Thr Phe Asp Ile Leu Asn Ile Ala Phe Val Val Ile Phe Thr Ile Glu
 1380 1385 1390
 Cys Leu Ile Lys Val Phe Ala Leu Arg Gln His Tyr Phe Thr Asn Gly
 1395 1400 1405
 Trp Asn Leu Phe Asp Cys Val Val Val Val Leu Ser Ile Ile Ser Thr
 1410 1415 1420
 Leu Val Ser Arg Leu Glu Asp Ser Asp Ile Ser Phe Pro Pro Thr Leu
 1425 1430 1435 1440
 Phe Arg Val Val Arg Leu Ala Arg Ile Gly Arg Ile Leu Arg Leu Val
 1445 1450 1455
 Arg Ala Ala Arg Gly Ile Arg Thr Leu Leu Phe Ala Leu Met Met Ser
 1460 1465 1470
 Leu Pro Ser Leu Phe Asn Ile Gly Leu Leu Leu Phe Leu Val Met Phe
 1475 1480 1485
 Ile Tyr Ala Ile Phe Gly Met Ser Trp Phe Ser Lys Val Lys Lys Gly

CH 693 031 A5

1490	1495	1500	
Ser Gly Ile Asp Asp Ile Phe Asn Phe Glu Thr Phe Thr Gly Ser Met			
1505	1510	1515	1520

Figure 2F: SEQ ID NO: 2

Leu Cys Leu Phe Gln Ile Thr Thr Ser Ala Gly Trp Asp Thr Leu Leu
 1525 1530 1535
 Asn Pro Met Leu Glu Ala Lys Glu His Cys Asn Ser Ser Ser Gln Asp
 1540 1545 1550
 Ser Cys Gln Gln Pro Gln Ile Ala Val Val Tyr Phe Val Ser Tyr Ile
 1555 1560 1565
 Ile Ile Ser Phe Leu Ile Val Val Asn Met Tyr Ile Ala Val Ile Leu
 1570 1575 1580
 Glu Asn Phe Asn Thr Ala Thr Glu Glu Ser Glu Asp Pro Leu Gly Glu
 1585 1590 1595 1600
 Asp Asp Phe Glu Ile Phe Tyr Glu Val Trp Glu Lys Phe Asp Pro Glu
 1605 1610 1615
 Ala Ser Gln Phe Ile Gln Tyr Ser Ala Leu Ser Asp Phe Ala Asp Ala
 1620 1625 1630
 Leu Pro Glu Pro Leu Arg Val Ala Lys Pro Asn Lys Phe Gln Phe Leu
 1635 1640 1645
 Val Met Asp Leu Pro Met Val Met Gly Asp Arg Leu His Cys Met Asp
 1650 1655 1660
 Val Leu Phe Ala Phe Thr Thr Arg Val Leu Gly Asp Ser Ser Gly Leu
 1665 1670 1675 1680
 Asp Thr Met Lys Thr Met Met Glu Glu Lys Phe Met Glu Ala Asn Pro
 1685 1690 - 1695
 Phe Lys Lys Leu Tyr Glu Pro Ile Val Thr Thr Thr Lys Arg Lys Glu
 1700 1705 1710
 Glu Glu Gln Gly Ala Ala Val Ile Gln Arg Ala Tyr Arg Lys His Met
 1715 1720 1725
 Glu Lys Met Val Lys Leu Arg Leu Lys Asp Arg Ser Ser Ser Ser His
 1730 1735 1740
 Gln Val Phe Cys Asn Gly Asp Leu Ser Ser Leu Asp Val Ala Lys Val
 1745 1750 1755 1760
 Lys Val His Asn Asp
 1765

Figur 2G: SEQ ID NO:2

```

1  MEERYYPVIF PDERNFRPFT SDSLAAIEKR IAIQKERKKS KDKAAAEPQP
51  RPQLDLKASR KLPKLYGDIP PELVAKPLED LDPFYKDHKT FMVLNKKRTI
101 YRFSAKRALF ILGPFNPLRS LMIRISVHSV FSMFIICTVI INCMFMANSM
    |-----IS1-----|
151 ERSFDNDIPE YVFIGIYILE AVIKILARGF IVDEFSFLRD PWNWLDFFVI
    |-----IS2-----| |-----IS3-----|
201 GTAIATCFPG SQVNLSALRT FRVFRALKAI SVISGLKVIV GALLRSVKKL
    |-----| • |-----IS4-----|
251 VDMVLTLCF LSIFALVGQQ LFMGILNQKC IKHNCGPNPA SNKDCFEKEK
    |-----IS5-----|
301 DSEDFIMCGT WLGSRPCPNG STCDKTTLNP DNNYTKFDNF GWSFLAMFRV
    •
351 MTQDSWERLY RQILRTSGIY FVFFVVFVIF LGSFYLLNLT LAVVTMAYEE
    • |-----IS6-----|
401 QNRNVAAETE AKEKMFQEAQ QLLREEKEAL VAMGIDRSSL NSLQASSFSP
451 KKRKFFGSKT RKSFFMRGSK TAQASASDSE DDASKNPQLL EQTKRLSQNL
    O
501 PVDLFDEHVD PLHRQRALSA VSILTITMQE QEKFQEPCCP CGKNLASKYL
551 VWDCSPQWLC IKKVLRTIMT DPFTELAITI CIIINTVFLA VEHNMDDNL
    |-----IIS1-----|
601 KTIKIGNWV FTGIFIAEMC LKIIALDPYH YFRHGWNVFD SIVALLSLAD
    |-----IIS2-----| |-----IIS3-----|
651 VLYNTLSNN RSFLASLVL RVFKLAKSWP TLNTLIKIIG HSVGALGNLT
    ----| • |-----IIS4-----| •|
701 VVLTIVVFIF SVVGMRLPGT KFNKTAYATQ ERPRRRWHMD NPYHSFLVVF
    -----IIS5-----| •
751 RILCGEWIEN MWGCMQDMDG SPLCIIVFVL IMVIGKLVVL NLFIALLLNS
    |-----IIS6-----|
801 FSNEEKDGS L EGETRKTQVQ LALDRFRRF SFMLHALQSF CCKKCRKNS
    O
851 PKPKETTESF AGENKDSILP DARPWKEYDT DMALYTGQAG APLAPLAEVE
901 DDVEYCGEGG ALPTSQHSAG VQAGDLPPET KQLTSPDDQG VEMEVSSEED
951 LHLSIQSPRK KSDAVSMLSE CSTIDLNDIF RNLQKTVSPK KQPDRCFPKG
    O
1001 LSCHFLCHKT DKRKSPWVLW WNIRKTCYQI VKHSWFESFI IFVILLSSGA
    |-----IIS1-----|
1051 LIFEDVNLP S RPQVEKLLRC TDNIPTFIPL LEMILKWVAF GFRRYFTSAW
    --| |-----IIS2-----| |
1101 CWLDFLIVVV SVLSLMNLP S LKSFRTRLAL RPLRALSQFE GMKVVVYALI
    ----IIS3-----| |-----IIS4-----|
1151 SAIPAILNVL LVCLIFWLVF CILGVNLFSG KFGRCINGTD INMYLDFTEV
    |-----IIS5-----| •
1201 PNRSQCNI S YSWKVPQVNF DNVGNAYLAL LQVATYKGWL EIMNAAVDSR
    • • •
1251 EKDEQPDFEA NLAYLYFVV FIIFGSFFTL NLFIVGIIDN FNQQQKLLGG
    |-----IIS6-----|

```

Figur 2H: SEQ ID NO: 2

```

1301 QDIFMTEEQK KYYNAMKKLG TKKPQKPIPR PLNKCQAFVF DLVTSQVFDV
                                     |-----
1351 IILGLIVLNM IIMMAESADQ PKDVKKTFDI LNIAFVVIFT IECLIKVFAL
IVS1-----| |-----IVS2-----|
1401 RQHYFTNGWN LFDCVVVVL S IISTLVSRLE DSDISFPPTL FRVVLARIG
      |-----IVS3-----| |-----
1451 RILRLVRAAR GIRTLLFALM MSLPSLFNIG LLLFLVMFIY AIFGMSWFSK
IVS4-----| |-----IVS5-----
1501 VKKGS GIDDI FNFETFTGSM LCLFQITTS A GWDTLNPM L EAKEHCNSSS
      | O
1551 QDSCQQPQIA VVYFVSYIII SFLIVVNM YI AVILENFNTA TEESEDPLGE
      |-----IVS6-----|
1601 DDFEIFYEVW EKFDPEASQF IQYSALSDFA DALPEPLRVA KPNKFQFLVM
1651 DLPMVMGDRL HCMDVLFAFT TRVLGDSSGL DTMKTMMEEK FMEANPFKKL
1701 YEPIVTTTKR KEEEQGA AVI QRAYRKHMEX MVKLRLKDRS SSSHQVFCNG
1751 DLSSLDVAKV KVHND*

```

Figur 3A: SEQ ID NO:3

```

1  GCTGAGCAGT GGGGCACTGA TATTTGAAGA TGTTCACCTT GAGAACCAAC
51  CCAAAATCCA AGAATTACTA AATTGTACTG ACATTATTTT TACACATATT
101 TTTATCCTGG AGATGGTACT AAAATGGGTA GCCTTCGGAT TTGGAAAGTA
151 TTTCAACCAGT GCCTGGTGCT GCCTTGATTT CATCATTGTG ATTGTCTCTG
201 TGACCACCCCT CATTAACCTA ATGGAATTGA AGTCCTTCCG GACTCTACGA
251 GCACTGAGGC CTCTTCGTGC GCTGTCCCAG TTTGAAGGAA TGAAGGTGGT
301 GGTCAATGCT CTCATAGGTG CCATACCTGC CATTCTGAAT GTTTTGCTTG
351 TCTGCCTCAT TTTCTGGCTC GTATTTTGTA TTCTGGGAGT ATACTTCTTT
401 TCTGGAAAAT TTGGGAAATG CATTAAATGA ACAGACTCAG TTATAAATTA
451 TACCATCATT ACAAATAAAA GTCAATGTGA AAGTGGCAAT TTCTCTTGGA
501 TCAACCGAA AGTCAACTTT GACAATGTGG GAAATGCTTA CCTCGCTCTG
551 CTGCAAGTGG CAACATTTAA GGGCTGGATG GATATTATAT ATGCAGCTGT
601 TGATTCCACA GAGAAAGAAC AACAGCCAGA GTTTGAGAGC AATTCACTCG
651 GTTACATTTA CTTCGTAGTC TTTATCATCT TTGGCTCATT CTTCACTCTG
701 AATCTCTTCA TTGGCGTTAT CATTGACAC TTCAACCAAC AGCAGAAAAA
751 GTTAGGTGGC CAAGACATTT TTATGACAGA AGAACAGAAG AAATACTATA
801 ATGCAATGAA AAAATTAGGA TCCAAAAAC CTCAAAACC CATTCCACGG
851 CCCGTT

```

(Ratten-PN5 ist die untere Zeile)

[illegible]

Figui 4: SEQ ID NO:4

```

1   CTCAACATGG TTACGATGAT GGTGGAGACC GACGAGCAGG GCGAGGAGAA
51  GACGAAGGTT CTGGGCAGAA TCAACCAGTT CTTTGTGGCC GTCTTCACGG
101 GCGAGTGTGT GATGAAGATG TTCGCCCTGC GACAGTACTA TTTGACCAAC
151 GGCTGGAACG TGTTCGAATT CATAGTGGTG ATCCTGTCCA TTGGGAGTCT
201 GCTGTTTCTT GCAATCCTTA AGTCACTGGA AAACACTTTC TCCCCGACGC
251 TCTTCCGGGT CATCCGTCTG GCCAGGATCG GCCGCATCCT CAGGCTGATC
301 CGAGCAGCCA AGGGGATTCT CACGCTGCTC TTCGCCCTCA TGATGTCCCT
351 GCCCGCCCTC TTCAACATCG GCCTCCTCCT CTTCTCTGTC ATGTTTCATCT
401 ACTCCATCTT CGGCATGGCC AGCTTCGCTA ACGTCGTGGA CGAGGCCGGC
451 ATCGACGACA TGTTCAACTT CAAGACCTTT GGCAACAGCA TGCTGTGCCT
501 GTTCCAGATC ACCACCTCGG CCGGCTGGGA CGGCCTCCTC AGCCCCATCC
551 TCAACACGGG GCCTCCCTAC TCGACCCCA ACCTGCCCAA CAGCAACGGC
601 TCCCGGGGGA ACTGCGGGAG CCCGGCGGTG GGCATCATCT TCTTCACCAC
651 CTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT CAACATGTAT ATCGCAGTCA
701 TC

```

Figur 5A: SEQ ID NO: 5

```

1  GTCGACTCTA GATCAGGGTG AAGATGGAGG AGAGGTACTA CCCGGTGATC
51  TTCCCGGACG AGCGGAATTT CCGCCCCTTC ACTTCCGACT CTCTGGCTGC
101 CATAGAGAAG CGGATTGCTA TCCAAAAGGA GAGGAAGAAG TCCAAAGACA
151 AGGCGGCAGC TGAGCCCCAG CCTCGGCCTC AGCTTGACCT AAAGGCCTCC
201 AGGAAGTTAC CTAAGCTTTA TGGTGACATT CCCCCTGAGC TTGTAGCGAA
251 GCCTCTGGAA GACCTGGACC CATTCTACAA AGACCATAAG ACATTCATGG
301 TGTGTAACAA GAAGAGAACA ATTTATCGCT TCAGCGCCAA GCGGGCCTTG
351 TTCATTCTGG GGCCTTTTAA TCCCCTCAGA AGCTTAATGA TTCGTATCTC
401 TGTCCATTCA GTCTTTAGCA TGTTCATCAT CTGCACGGTG ATCATCAACT
451 GTATGTTTCA GCGGAATTCT ATGGAGAGAA GTTTCGACAA CGACATTCCC
501 GAATACGTCT TCATTGGGAT TTATATTTTA GAAGCTGTGA TTAAAATATT
551 GGCAAGAGGC TTCATTGTGG ATGAGTTTTC CTTCTCCGA GATCCGTGGA
601 ACTGGCTGGA CTTCAATTGTC ATTGGAACAG CGATCGCAAC TTGTTTTCCG
651 GGCAGCCAAG TCAATCTTTC AGCTCTTCGT ACCTTCCGAG TGTTTCAGAGC
701 TCTGAAGGCG ATTTCAGTTA TCTCAGGTCT GAAGGTCATC GTAGGTGCCC
751 TGCTGCGCTC GGTGAAGAAG CTGGTAGACG TGATGGTCCT CACTCTCTTC
801 TGCCTCAGCA TCTTTGCCCT GGTCGGTCAG CAGCTGTTCA TGGGAATTCT
851 GAACCAGAAG TGTATTAAGC ACAACTGTGG CCCCACCCT GCATCCAACA
901 AGGATTGCTT TGAAAAGGAA AAAGATAGCG AAGACTTCAT AATGTGTGGT
951 ACCTGGCTCG GCAGCAGACC CTGTCCCAAT GGTTCACGT GCGATAAAAC
1001 CACATTGAAC CCAGACAATA ATTATACAAA GTTTGACAA TTTGGCTGGT
1051 CCTTTCTCGC CATGTTCCGG GTTATGACTC AAGACTCCTG GGAGAGGCTT
1101 TACCGACAGA TCCTGCGGAC CTCTGGGATC TACTTTGTCT TCTTCTTCGT

```

Figur 5B: SEQ ID NO: 5

```

1151 GGTGGTCATC TTCCTGGGCT CTTTCTACCT GCTTAACCTA ACCCTGGCTG
1201 TTGTCACCAT GGCTTATGAA GAACAGAACA GAAATGTAGC TGCTGAGACA
1251 GAGGCCPAGG AGAAAATGTT TCAGGAAGCC CACCAGCTGT TAAGGGAGGA
1301 GAAGGAGGCT CTGGTTGCCA TGGGAATTGA CAGAAGTTCC CTTAATTCCC
1351 TTCAAGCTTC ATCCTTTTCC CCGAAGAAGA GGAAGTTTTT CGGTAGTAAG
1401 ACAAGAAAGT CCTTCTTTAT GAGAGGGTCC AAGACGGCCC AAGCCTCAGC
1451 GTCTGATTCA GAGGACGATG CCTCTAAAAA TCCACAGCTC CTTGAGCAGA
1501 CCAAACGACT GTCCCAGAAC TTGCCAGTGG ATCTCTTTGA TGAGCACGTG
1551 GACCCCCTCC ACAGGCAGAG AGCGCTGAGC GCTGTCAGTA TCTTAACCAT
1601 CACCATGCAG GAACAAGAAA AATTCAGGA GCCTTGTTTC CCATGTGGGA
1651 AAAATTTGGC CTCTAAGTAC CTGGTGTGGG ACTGTAGCCC TCAGTGGCTG
1701 TGCATAAAGA AGGTCCTGCG GACCATCATG ACGGATCCCT TTACTGAGCT
1751 GGCCATCACC ATCTGCATCA TCATCAATAC CGTTTTCTTA GCCGTGGAGC
1801 ACCACACAT GGATGACAAC TTAAAGACCA TACTGAAAAT AGGAAACTGG
1851 GTTTTCACGG GAATTTTCAT AGCGGAAATG TGTCTCAAGA TCATCGCGCT
1901 CGACCCTTAC CACTACTTCC GGCACGGCTG GAATGTTTTT GACAGCATCG
1951 TGGCCCTCCT GAGTCTCGCT GATGTGCTCT ACAACACACT GTCTGATAAC
2001 AATAGGTCTT TCTTGGCTTC CCTCAGAGTG CTGAGGGTCT TCAAGTTAGC
2051 CAAATCCTGG CCCACGTTAA AACTCTCAT TAAGATCATC GGCCACTCCG
2101 TGGGCGCGCT TGGAAACCTG ACTGTGGTCC TGACTATCGT GGTCTTCATC
2151 TTTTCTGTGG TGGGCATGCG GCTCTTCGGC ACCAAGTTTA ACAAGACCGC
2201 CTACGCCACC CAGGAGCGGC CCAGGCGGCG CTGGCACATG GATAATTTCT
2251 ACCACTCCTT CCTGGTGGTG TTCCGCATCC TCTGTGGGGA ATGGATCGAG
2301 AACATGTGGG GCTGCATGCA GGATATGGAC GGCTCCCCGT TGTGCATCAT

```

Figur 5C: SEQ ID NO: 5

2351 TGTCTTTGTC CTGATAATGG TGATCGGGAA GCTTGTGGTG CTTAACCTCT
 2401 TCATTGCCTT GCTGCTCAAT TCCTTCAGCA ATGAGGAGAA GGATGGGAGC
 2451 CTGGAAGGAG AGACCAGGAA AACCAAAGTG CAGCTAGCCC TGGATCGGTT
 2501 CCGCCGGGCC TTCTCCTTCA TGCTGCACGC TCTTCAGAGT TTTTGTTGCA
 2551 AGAAATGCAG GAGGAAAAAC TCGCCAAAGC CAAAAGAGAC AACAGAAAGC
 2601 TTTGCTGGTG AGAATAAAGA CTCAATCCTC CCGGATGCGA GGCCCTGGAA
 2651 GGAGTATGAT ACAGACATGG CTTTGTACAC TGGACAGGCC GGGGCTCCGC
 2701 TGGCCCCACT CGCAGAGGTA GAGGACGATG TGGAAATATTG TGGTGAAGGC
 2751 GGTGCCCTAC CCACCTCACA ACATAGTGCT GGAGTTCAGG CCGGTGACCT
 2801 CCCTCCAGAG ACCAAGCAGC TCACTAGCCC GGATGACCAA GGGGTTGAAA
 2851 TGGAAGTATT TTCTGAAGAA GATCTGCATT TAAGCATACA GAGTCCTCGA
 2901 AAGAAGTCTG ACGCAGTGAG CATGCTCTCG GAATGCAGCA CAATTGACCT
 2951 GAATGATATC TTTAGAAATT TACAGAAAC AGTTTCCCCC AAAAGCAGC
 3001 CAGATAGATG CTTTCCCAAG GGCCTTAGTT GTCACTTTCT ATGCCACAAA
 3051 ACAGACAAGA GAAAGTCCCC CTGGGTCCTG TGGTGGAAAC TTCGGAAAAAC
 3101 CTGCTACCAA ATCGTGAAGC ACAGCTGGTT TGAGAGTTTC ATAATCTTTG
 3151 TTATTCTGCT GAGCAGTGGA GCGCTGATAT TTGAAGATGT CAATCTCCCC
 3201 AGCCGGCCCC AAGTTGAGAA ATTACTAAGG TGTACCGATA ATATTTTCAC
 3251 ATTTATTTTC CTCCTGGAAA TGATCCTGAA GTGGGTGGCC TTTGGATTCC
 3301 GGAGGTATTT CACCAGTGCC TGGTGCTGGC TTGATTTCCCT CATTGTGGTG
 2251 GTGTCTGTGC TCAGTCTCAT GAATCTACCA AGCTTGAAGT CCTTCCGGAC
 3401 TCTGCGGGCC CTGAGACCTC TGCGGGCGCT GTCCCAAGTTT GAAGGAATGA
 3451 AGGTTGTCGT CTACGCCCTG ATCAGCGCCA TACCTGCCAT TCTCAATGTC
 3501 TTGCTGGTCT GCCTCATTTT CTGGCTCGTA TTTTGTATCT TGGGAGTAAA

Figur 5D: SEQ ID NO: 5

```

3551 TTTATTTTCT GGAAGTTTG GAAGGTGCAT TAACGGGACA GACATAAATA
3601 TGTATTTGGA TTTTACCGAA GTTCCGAACC GAAGCCAATG TAACATTAGT
3651 AATTAACGCT GGAAGGTCCC GCAGGTCAAC TTTGACAACG TGGGGAATGC
3701 CTATCTCGCC CTGCTGCAAG TGGCAACCTA TAAGGGCTGG CTGGAAATCA
3751 TGAATGCTGC TGTGATTCC AGAGAGAAAG ACGAGCAGCC GGAAGTTGAG
3801 GCGAACCTCT ACGCGTATCT CTACTTTGTG GTTTTTATCA TCTTCGGCTC
3851 CTTCTTTACC CTGAACCTCT TTATCGGTGT TATTATTGAC AACTTCAATC
3901 AGCAGCAGAA AAAGTTAGGT GGCCAAGACA TCTTCATGAC TGAGGAGCAG
3951 AAGAAATATT ACAATGCAAT GAAAAAGTTA GGAACCAAGA AACCTCAAAA
4001 GCCCATCCCA AGGCCCCTGA ACAAATGTCA AGCCTTTGTG TTCGACCTGG
4051 TCACAAGCCA GGTCTTTGAC GTCATCATTC TGGGTCTTAT TGTCTTAAAT
4101 ATGATTATCA TGATGGCTGA ATCTGCCGAC CAGCCCAAAG ATGTGAAGAA
4151 AACCTTTGAT ATCCTCAACA TAGCCTTCGT GGTTCATCTTT ACCATAGAGT
4201 GTCTCATCAA AGTCTTTGCT TTGAGGCAAC ACTACTTCAC CAATGGCTGG
4251 AACTTATTTG ATTGTGTGGT CGTGGTTCTT TCTATCATTA GTACCCCTGGT
4301 TTCCCGCTTG GAGGACAGTG ACATTTCTTT CCCGCCACG CTCTTCAGAG
4351 TCGTCCGCTT GGCTCGGATT GGTCGAATCC TCAGGCTGGT CCGGGCTGCC
4401 CGGGGAATCA GGACCCTCCT CTTTGCTTTG ATGATGTCTC TCCCCTCTCT
4451 CTTCAACATC GGTCTGCTGC TCTTCCTGGT GATGTTCAAT TACGCCATCT
4501 TTGGGATGAG CTGGTTTTCC AAAGTGAAGA AGGGCTCCGG GATCGACGAC
4551 ATCTTCAACT TCGAGACCTT TACGGGCAGC ATGCTGTGCC TCTTCCAGAT
4601 AACCACCTCG GCTGGCTGGG ATACCCTCCT CAACCCCATG CTGGAGGCAA
4651 AAGAACACTG CAACTCCTCC TCCCAAGACA GCTGTCAGCA GCCGCAGATA
4701 GCCGTCGTCT ACTTCGTCAG TTACATCATC ATCTCCTTCC TCATCGTGGT

```

Figur 5E: SEQ ID NO: 5

4751 CAACATGTAC ATCGCTGTGA TCCTCGAGAA CTTCAACACA GCCACGGAGG
4801 AGAGCGAGGA CCTCTGGGA GAGGACGACT TTGAAATCTT CTATGAGGTC
4851 TGGGAGAAGT TTGACCCCGA GGCGTCGCAG TTCATCCAGT ATTCGGCCCT
4901 CTCTGACTTT GCGGACGCCC TGCCGGAGCC GTTGCCTGTG GCCAAGCCGA
4951 ATAAGTTTCA GTTCTAGTG ATGGACTTGC CCATGGTGAT GGGCGACCGC
5001 CTCCATTGCA TGGATGTTCT CTTTGCTTTC ACTACCAGGG TCCTCGGGGA
5051 CTCCAGCGGC TTGGATACCA TGAAAACCAT GATGGAGGAG AAGTTTATGG
5101 AGGCCAACCC TTTTAAGAAG CTCTACGAGC CCATAGTCAC CACCACCAAG
5151 AGGAAGGAGG AGGAGCAAGG CGCCGCCGTC ATCCAGAGGG CCTACCGGAA
5201 ACACATGGAG AAGATGGTCA AACTGAGGCT GAAGGACAGG TCAAGTTCAT
5251 CGCACCAGGT GTTTTGCAAT GGAGACTTGT CCAGCTTCCA TGTGGCCPAG
5301 GTCAAGGTTC ACAATGACTG AACCCTCATC TAGA

Figur 6

