

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04509 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/47**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/07913

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Juli 2001 (10.07.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 33 633.7 11. Juli 2000 (11.07.2000) DE
100 53 879.7 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE
00128446.2 22. Dezember 2000 (22.12.2000) EP

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **ODENTHAL, Margarete** [DE/DE]; Blankenheimer Str. 39, 50937 Köln (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JUNG, Diana** [DE/CH]; Weststrasse 7, CH-8003 Zürich (CH).

(74) Anwälte: **HELBING, Jörg** usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: GENE EXPRESSION, GENOME ALTERATION AND REPORTER EXPRESSION IN MYOFIBROBLASTS AND MYOFIBROBLAST-LIKE CELLS

(54) Bezeichnung: GENEXPRESSION, GENOMALTERATION UND REPORTEREXPRESSION IN MYOFIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLAST-ÄHNLICHEN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to specific, regulatory sequence regions of the alpha smooth muscle actin gene (a-SMA gene), and fusion structures in which said regulatory sequence regions of the a-SMA gene are operationally linked to other functional nucleic acid sequences. The invention also relates to the use of said regulatory sequence regions for cell type specific and differentiation specific reporter expression, for cell type specific and differentiation specific gene changes (alteration, mutation) and for gene expression changes in cells and organisms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft spezifische, regulatorische Sequenzbereiche des alpha Smooth Muscle Aktin-Gens (a-SMA-Gens), Fusionskonstrukte, in denen solche regulatorische Sequenzbereiche des a-SMA-Gens mit weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenzen operativ verknüpft sind, sowie die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzbereiche zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression, zu zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderungen (Alteration, Mutation) und zu Genexpressionsveränderungen in Zellen und Organismen.



WO 02/04509 A2

Genexpression, Genomalteration und Reporterexpression in Myofibroblasten und myofibroblast-ähnlichen Zellen

5

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft spezifische, regulatorische Sequenzbereiche des alpha Smooth Muscle Aktin-Gens (α -SMA-Gens), Fusionskonstrukte, in denen solche regulatorische Sequenzbereiche des α -SMA-Gens mit weiteren
10 funktionellen Nukleinsäuresequenzen operativ verknüpft sind, sowie die Verwendung solcher regulatorischer Sequenzbereiche zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression (insbesondere in Myofibroblasten und myofibroblast-ähnlichen Zellen), zu zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderungen (Alteration, Mutation) und zu Gen-
15 expressionsveränderungen in Zellen und Organismen.

Im einzelnen betrifft die vorliegende Erfindung Fusionskonstrukte, in denen der genannte spezifische Sequenzbereich, der im wesentlichen aus Sequenzen besteht, die sich im 5'-terminalen Bereich des α -SMA-Gens
20 befinden, mit einer weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenz, vorzugsweise mit peptid- oder proteinkodierenden Nukleinsäuresequenzen, regulatorischen DNA-Sequenzen oder funktionellen RNA-kodierenden Sequenzen operativ verknüpft ist; ein Verfahren, in dem die oben genannten Fusionskonstrukte in einen Vektor operativ inseriert werden und das Vektorkonstrukt in eukaryontische Zellen eingebracht wird; ein Verfahren, in
25 dem die mit dem Vektorkonstrukt transient oder stabil transfizierten, transformierten oder infizierten Zellen, einen Reporter unter Kontrolle der genannten regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens exprimieren und die Reporterexpression zur Isolierung oder zur Sichtung embryonal oder
30 transient α -SMA-positiver Zellen, insbesondere von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus genutzt wird; sowie ein

Verfahren, bei dem mittels der genannten Fusionskonstrukte (die regulatorische Sequenzen des α -SMA-Gens und peptid- oder proteinkodierende bzw. RNA-kodierende Sequenzen enthalten) die Genexpression bzw. die Zellfunktion von α -SMA-positiven Zellen, insbesondere Myofibroblasten und myofibroblastähnlichen Zellen in Organismen bzw. in Organen unter Nutzung transgener oder knock-out/-in-Technologie oder gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation manipuliert werden.

Hintergrund der Erfindung

Das α -SMA-Gen ist ein Mitglied der Aktin-Multigenfamilie, die für verschiedene Isoformen der zytoskeletalen Aktine kodiert. Die Expression der verschiedenen Aktine ist in hohem Grade zelltypspezifisch und differenzierungsabhängig reguliert. So wird adult das skelettale α -Aktin in der Skelettmuskulatur, das cardiale α -Aktin in der Herzmuskulatur und das α -SMA in der glatten Muskulatur exprimiert. Die transkriptionelle Regulation des α -SMA-Gens wird durch ein Zusammenspiel von positiv und negativ wirkenden regulatorischen Elementen des 5'-Bereiches vermittelt (Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992); Carrol, S. L. et al., J. Biol. Chem. 261: 8955-8976 (1986); Carrol, S. L. et al., Mol. Cell. Biol. 8: 241-250 (1988); Nakano, Y. et al., Gene. 99: 275-289 (1991); Min et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990)). Der 5'-Bereich des α -SMA-Gens enthält verschiedene konservierte *cis*-Elemente wie zwei CArG-Elemente (CArG-A und B) (Carrol, S. L. et al., Mol. Cell. Biol. 8: 241-250 (1988) und Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992)). Die CArG-Motive bestehen aus einem A/T Repeat, das von CC/GG flankiert wird, und werden als maßgebliche Elemente der muskelspezifischen Genregulation diskutiert (Chow, K. L., Schwartz, R. J., Mol. Cell. Biol., 10, 528 - 538 (1990) und Sobuc, K. et al., Mol. Cell. Biochem. 190: 105-118 (1999)). Reporterstudien an transgenen Reportermäusen zeigten, daß eine weitere CArG-Box (0) im ersten Intron des α -SMA-Gens für eine *in vivo* Expression von α -SMA in glatten Muskelzellen notwendig ist (Mack, C. P., Owens, G. K., Circ. Res., 84: 852 - 861 (1999)).

Der 5'-Bereich des α -SMA-Gens enthält ebenfalls zwei E-Box Konsensussequenzen (CA NN TG), potentielle Bindestellen für basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren (Johnson, A. D., Owens, G. K., Am. J. Physiol., 276, C1420 - C1431 (1999)) und weitere Konsensussequenzen (Hautmann, M. B. et al., J. Biol. Chem., 272: 10948-10956 (1997) und McNamara, C. A. et al., Am. J. Physiol., 268: C1259-C1266 (1995)), deren Bedeutung im einzelnen nicht geklärt ist.

Das α -SMA-Gen wird zelltypspezifisch in glatten Muskelzellen (SMC) exprimiert (Vanderkerckhove J. and Weber K., Differentiation 14: 123-133 (1979) Skalli, O. et al., J. Cell. Biol., 103: 2787-2796 (1986) und idem, J. Histochem. Cytochem., 37: 315-321 (1989)). WO 00/24254 offenbart ein Verfahren, in dem die regulatorische Sequenzen des 5'-Bereichs und des ersten Introns des α -SMA für die Expression von heterologen Genen in SMC genutzt werden. Diese Druckschrift beschreibt ebenfalls die Verwendung dieser Sequenzen innerhalb von Vektoren für die Sichtung von Gewebeumstrukturierungen, die SMC involvieren, die mögliche Sichtung von Agonisten und Antagonisten der SMC assoziierte Gewebeumstrukturierungen sowie die Sichtung von therapeutischen Agenzien der SMC-assozierten Gewebeumstrukturierungen. Im einzelnen offenbart die WO 00/24254 eine allgemeine Sequenz des α -SMA-Gens (SEQ. ID. NO:1: von -2558 bp bis + 2784 bp des Ratten α -SMA-Gens, d. h. den -2558 bp 5-Bereich und den Bereich +1 bis +2784 bp des ersten Exons und des ersten Introns) und den Sequenzbereiche des ersten Introns (+ 773 bis +1098; siehe SEQ ID NO:2), die für eine *in vivo* -Expression in SMC notwendig ist.

Neben der zellspezifischen Expression bei SMC wird aber auch das α -SMA-Gen transient in der Embryogenese während der Differenzierung von skelettalen und cardialen Muskelzellen (Ruzicka, D. L. et al., J. Cell Biol., 107: 25775 - 25786 (1988); Woodcock-Mitchell, J., Mitchell, J. J., Differentiation 39: 161 - 166 (1988)), aber auch in Myofibroblasten während der

Wundheilung sowie nach myofibroblastischen Veränderungen verschiedener Zelltypen in Vernarbungs- und Gewebeumstrukturierungsprozessen nach chronischer Organschädigung exprimiert (Desmoulière A. et al., *Exp. Nephrol.* 3: 134-139 (1995); Gabbiani G., *Cardiovasc. Res.* 38: 545-548 (1998); idem, *Pathol. Res. Pract.* 190: 851-853 (1994); idem, *Am. J. Pathol.* 83: 457-474 (1976)).

Myofibroblasten sind Zelltypen mesodermalen Ursprungs, die sich durch eine ausgeprägte Matrixproduktion, ein heterogenes Intermediatfilamentmuster mit Desmin oder Vimentin auszeichnen und durch die α -SMA-Expression die Fähigkeit zur Kontraktilität besitzen (Desmoulière, A. et al., *Exp. Nephrol.* 3: 134-139 (1995); Gabbiani, G., *Cardiovasc. Res.* 38: 545-548 (1998); idem, *Pathol. Res. Pract.* 190: 851-853 (1994); idem, *Am. J. Pathol.* 83: 457-474 (1976)). Sie treten temporär bei der Wundheilung auf, während persistierende Myofibroblasten bei chronischen Vernarbungsprozessen an der Bindegewebs- und der Organumstrukturierung beteiligt sind. In verschiedenen Fibroseerkrankungen aufgrund chronischer Organschädigung wie z.B. der Hepatitis, der Glomerulonephritis, der Myelofibrose oder fibrosierenden Lungenerkrankungen sind Myofibroblasten die Hauptmatrixproduzenten (Friedman, S. L., *New. Engl. J. Med.* 328: 1828-35 (1993); Gressner, A. M., *Kidney Int.* 49: 39-45 (1996); MacPherson, B. R. et al., *Hum. Pathol.*, 24:710 - 716 (1993); Alpers, C. E. et al., *Kidney Int.* 41: 1134-1142 (1992); Thiele J. et al., *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23(1):109-21 (1991); Johnson, R. J. et al., *J. Clin. Invest.* 87: 847-858 (1991); Kapanci, Y. et al., *Mod. Pathol.* 10: 1134-42 (1997)). Daher wurden Myofibroblasten auch als modulierte Fibroblasten bezeichnet; ihre Vorläuferzelltypen sind jedoch abhängig vom Organtyp sehr unterschiedlich. Chronische Nierenschädigungen führen zu einer Transdifferenzierung von Mesangialzellen zu myofibroblastischen Zellen (Johnson R. J. et al., *J. Clin. Invest.* 87: 847-858 (1991); MacPherson B. R. et al., *Hum. Pathol.* 24: 710-716 (1993)). In der Leber kommt es nach chronischer Schädigung unabhängig, ob die Ursache chronischer Alkoholabusus, virale Hepa-

- titis B oder C-Infektionen oder andere chronische Schädigungen sind, zur Leberfibrose, in der Hepatische Sternzellen (HSC) zu Myofibroblasten transdifferenzieren (Friedman S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993); Gressner A.M., Kidney Int. 49: 39-45 (1996); Ramadori G. et al.,
5 Virch. Arch. [B] 59: 349-357 (1990)). Hepatische Sternzellen besitzen perizytäre Eigenschaften und speichern im ruhenden Zustand 80 % des körpereigenen Vitamin A (Friedman S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993)). Nach myofibroblastischer Transdifferenzierung, die neben der Matrixproduktion und der α -SMA-Expression vermittelten Kontraktilität
10 durch eine einsetzende Proliferation, Vitamin A-Verlust und ein verändertes Wachstumsfaktorenprofil gekennzeichnet ist, sind sie maßgeblich an der Aufrechterhaltung und dem Fortlauf der Leberfibrose beteiligt (Friedman, S. L., New. Engl. J. Med. 328: 1828-35 (1993); Gressner, A. M., Kidney Int. 49: 39-45 (1996)).
- 15 Bei bronchialen Asthma-Erkrankungen und fibrotischen Lungenerkrankungen sind Myofibroblasten die wesentliche Matrixproduzenten (Tremblay, G.M. et al., Can. Respir. J. 5(1):59-61 (1998); Gizycki, M.J. et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16(6):664-73 (1997); Gabbrielli, S. et al., Pathologica.86(2):157-60 (1994)).
- 20 Beim Übergang von *in situ* Karzinomen in invasive Karzinome treten ebenfalls Myofibroblasten mit den typischen Eigenschaften von induzierter extrazellulärer Matrixproduktion und Kontraktilität auf (Cintorino, M. et al., Int. J. Cancer 47: 832 - 836 (1984); Gabbiani, G. et al., Am. J. Pathol. 83:457 - 474 (1976)).
- 25 In einer Vielzahl von Karzinomen sind die Stromazellen Myofibroblasten (Terada, T. et al., J. Hepatol. 24: 706-12(1996); Faouzi, S. et al., J. Hepatol. 30(2): 275-84 (1999); Kosmehl, H. et al., Br. J. Cancer. 81(6): 1071-9 (1999); Pujuguet, P. et al., Am. J. Pathol. 148: 579-92 (1996); Chomette, G. et al., Pathol. Res. Pract. 186(1): 70-9 (1990); Ronnov-Jessen, L. et al., J. Clin. Invest. 95(2): 859-73 (1995)), die in parakriner Ab-
30 hängigkeit das Tumorstadium beeinflussen (Neaud, V. et al., Hepatology 26: 1458-66 (1997); Tomlinson J. et al., Clin. Cancer Res. 5(11): 3516-22

(1999). Aber die Tumorzellen können auch selber aus myofibroblastischen Abkömmlingen bestehen wie z.B. bei Myofibroblastomen und Myofibrosarcomen verschiedener Organe (Gocht, A. et al., Pathol. Res Pract. 195(1): 1-10 (1999); Unden, A.B. et al., J. Invest. Dermatol. 107 (2): 147-53 (1996); Auger, M. et al., Arch. Pathol. Lab. Med. 113(11): 1231-5 (1989)).

Gentherapeutische Ansätze für chronische Fibroseerkrankungen und Tumorerkrankungen: Da Myofibroblasten die zentralen Zelltypen in vielen sklerosierenden Erkrankungen und mancher Tumorerkrankungen sind, sind sie ideale Zielzellen der Therapie, auch der Gentherapie. Durch eine zelltypspezifische, differenzierungsabhängige Kontrolle der Expression

(a) von Genen kodierend für z.B. intrazellulären Signalmediatoren (Walther, W., Stein, U., Mol. Biotechnol. 13(1): 21 - 28 (1999)) oder

(b) RNA-kodierenden Sequenzbereiche, die durch Anlagerung die Transkription oder die Translation bestimmter Gene beeinflussen (Bai, J. et al., Mol. Ther. 1(3): 244 - 254 (2000)) oder

(c) eines Enzyms für eine zyklische Rekombination (CRE), das floxP-flankierte Genbereiche verändert (Sauer, B. Methods 14: 381 - 392 (1998)), wird eine Gentherapie bestimmter Zielzellen ermöglicht. Als Vektoren werden vielfach virale Vesikel wie z.B. adenovirale oder retrovirale Abkömmlinge (Miller, N. Whelan, J. Hum. Gene Ther. 8, 803 - 815; Mountain, A., Tibtech. 18: 119 - 128 (2000); Schiedner, G. et al., Nat. Genet. 18, 180 - 183 (1998); Parr, M. J., Nat. Med. 3, 1145 - 1149 (1997); Ory, D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:11400 - 11406 (1996); Feng, M. et al., Nat. Biotechnol. 15: 866 - 870 (1997)) benutzt. Aber auch die DNA eines Plasmidkonstruktes kann blank oder in Aggregaten mit Liposomen oder Polymerkörpern verabreicht werden (Hengge, U. et al., Nat. Genet. 10:161 - 166 (1995); Gottschalk, S. et al., Gene Ther. 3:3410 - 3414 (1990); Wagner, E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:3410 - 3414 (1990)). Für gentherapeutische Ansätze und Veränderungen der myofibroblastischen Zellfunktion sind geeignete regulatorische Sequenzen bzw. ein Promoter notwendig, die/der die entsprechenden Zellfunktionseingriffe und

Veränderungen in der Expression in Myofibroblasten dirigieren kann, voraussetzende Bedingung, die aber bislang nicht erfüllt ist. Denn erst durch den Einsatz regulatorischer Sequenzen innerhalb eines Promoters, die die Zellfunktionseigenschaften (a) durch eine veränderte Genexpression, (b) durch eine Einwirkung in die Proteinsynthese oder (c) durch Genomalteration myofibroblastensprechend dirigieren, können myofibroblastische Zellen gentherapeutisch angesprochen werden.

Zusammenfassung der Erfindung

Bei der Charakterisierung des regulierenden Sequenzbereichs des α -SMA-Gens (nachfolgend auch " α -SMA-5'-Sequenzbereich") wurde überraschenderweise gefunden, dass einzelne Bereiche hierin, nämlich innerhalb -698 bis +18 des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (Nummerierung, falls nicht anders angegeben, bezogen auf das in Fig. 7A gezeigte α -SMA-Gen aus *rattus norvegicus*) Aktivitäten aufweisen, die sich von der Aktivität des Gesamtbereiches unterscheiden. So wurde gefunden, dass der Bereich -189 bis +18 des α -SMA-Gens transkriptionsaktivierend ist, wohingegen der Bereich -698 bis -190 zelltypspezifische und differenzierungsabhängige regulative Eigenschaften aufweist, d. h. in Verbindung mit dem Core-Bereich (-189 bis +18) für die zelltypspezifische Kontrolle zuständig ist. Aufbauend auf den Befund, dass die Genexpression und/oder Zellfunktion in Myofibroblasten, myofibroblastähnlichen Zellen oder auch embryonal, transient oder induziert SMA-exprimierenden Zellen steuern können, würde ein System für eine myofibroblastischen Steuerung erarbeitet. Die vorliegende Erfindung betrifft demgemäß

- (1) eine Nukleinsäuresequenz, umfassend
 - (i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens) und
 - (ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist, wobei vorzugsweise der regulatorische Sequenzbereich aus den Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht (wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Se-

quenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist), und wobei die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz nicht für das natürliche α -SMA kodiert;

(2) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Ratte stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus der in Fig. 5A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:1), insbesondere aus der in Fig. 7A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:5), umfasst;

(3) eine bevorzugte Ausführungsform der in (2) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -189 bis +18 der Fig. 7A (d.h. aus der Sequenz der Fig. 7C; SEQ ID NO:7) stammt;

(4) eine bevorzugte Ausführungsform der in (2) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -698 bis -190, besonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215, der Fig. 7A stammt;

(5) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Maus stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5B gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:2) insbesondere aus der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz aufweist;

(6) eine bevorzugte Ausführungsform der in (5) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 490 bis 697 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 489 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt;

(7) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Menschen stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle

nelle Bereiche der in Fig. 5C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:3) insbesondere aus der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz aufweist;

(8) eine bevorzugte Ausführungsform der in (7) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

5 (a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 513 bis 715 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 512 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz
10 stammt;

(9) eine bevorzugte Ausführungsform der in (1) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Huhn stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5D gezeigten Sequenz insbesondere aus der in SEQ ID
15 NO:20 gezeigten Sequenz aufweist;

(10) eine bevorzugte Ausführungsform der in (9) definierten Nukleinsäuresequenz, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 497 bis 699 der in SEQ ID NO:20 gezeigten
20 Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 496 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt;

(11) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz, wie in (3), (6),
25 (8) oder (10) definiert;

(12) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz, wie in (4), (6), (8) oder (10) definiert;

(13) einen Vektor, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in (11) und/oder (12) definiert;

30 (14) einen Vektor, in dem eine Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10) definiert, inseriert ist;

(15) eukaryontische Zellen oder Organismen, die mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10) definiert oder einem Vektor, wie in (13) oder

(14) definiert, transient oder stabil transfiziert transformiert oder infiziert sind;

(16) ein Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen Zellen, wie in (15) definiert, umfassend das Transfizieren, Transformieren oder Infizieren von Ausgangszellen mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder mit Vektoren, wie in (13) oder (14) definiert;

(17) ein Verfahren zur Herstellung der Organismen, wie in (15) definiert, umfassend das Injizieren von ES-Zellen, die mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder mit Vektoren, wie in (13) oder (14) definiert, transfiziert sind, in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter;

(18) ein Verfahren zur Isolierung oder zur Sichtung von Glatten Muskelzellen, Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus, umfassend die Expression eines Reportergens in einer eukaryontischen Zelle oder einen Organismus, wie in (15) definiert;

(19) ein Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen, umfassend Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in (1) bis (10) definiert oder einem Vektor, wie in (14) definiert, in die Organismen oder Organe;

(20) ein Arzneimittel, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in (1) bis (10), (11) oder (12) definiert, oder einen Vektor, wie in (13) oder (14) definiert und

(21) die Verwendung eines funktionellen Bereichs aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens, wie vorstehend unter (1) bis (12) definiert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Reporterexpression, zur zelltyp- und differenzierungsspezifischen Genveränderung und zur Manipulation der Genexpression und/oder Zellfunktion, insbesondere in transient embryonal SMA-positiven Zellen, in Myofibroblasten und myofibroblastähnlichen Zellen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der beigefügten Figuren und Beispiele näher erläutert.

Figurenbeschreibung

5 Fig 1: Messung der Luziferasereporteraktivität in ruhenden und myofibroblastisch-aktivierten Hepatischen Sternzellen (HSC) unter Kontrolle des PRL-700-Reporterkonstruktes.

10 Fig 2a: Immuncytologie nach Einzelzelldissoziation von differenzierten EB und Kultivierung der vom Verband gelösten Zellen. In pSMA-GFP-190 transfizierten Zellen zeigten auch α -SMA-negative Zellen (1C) eine GFP-Expression (1B). In pSMA-GFP-700 transfizierten Zellen war die GFP-Expression (2B) auf α -SMA-exprimierenden Zellen begrenzt (2C).

15 Fig 2b: Aufbau des SMA-GFP-700 bzw. SMA-GFP-190 Reportervektor für stabile Transfektionen in embryonale Stammzellen oder transgene Reportermausmodelle. In die Konstrukte ist zwischen den GFP-Reporter (EGFP-Variante) und den 716bp (SEQ ID NO:5) bzw. 207bp (SEQ ID NO:7) aus der 5'-Region des α -SMA-Gen als heterologe regulatorische
20 Sequenz das erste Intron des chicken β -Actins kloniert. Zur Selektion von stabilen Transfektanten hat das Konstrukt, neben der Ampicillinresistenz eine weitere Resistenz gegen Neomycin, die in eukaryotischen Zellen eine G418 Selektion erlaubt.

25 Fig 3a: Luciferasereporteraktivitäten unterschiedlich langer SMA-Konstrukte (SMA-125 bis SMA-700; vergleiche auch Fig. 7) die nach transienter Transfektion in embryonalen Myotuben und Myoblasten der Zelllinie L6 ermittelt wurden. L6-Zellen, die nach Serumentzug in α -SMA-exprimierende Myotuben differenzieren, zeigten eine 4- bis 5fache Induktion aller
30 Konstrukte im Vergleich zu den Vorläufer L6-Myoblasten. Das SMA-190-Konstrukt besitzt einen stark transaktivierenden Einfluss. Das SMA-700-Konstrukt dirigiert dagegen eine differenzierungsabhängige Reporterex-

pression. Die Aktivitäten der SMA-Konstrukte wurden mit der Aktivität des SV40-Promoter (100%) in Relation gesetzt. Die Versuche wurden in drei unabhängigen Experimenten mit Doppelansätzen durchgeführt.

- 5 Fig 3b: Plasmidkonstrukt zur Expression eines Peptids oder Polypeptids von Interesse unter Kontrolle der 716 bp-5'-Sequenz (SEQ ID NO:5) des α -SMA-Gens. Zur Detektion der Expression kann in den Consensus des Leserasters (ORF) ein oder mehrere Erkennungssequenzen (Tags) eingebaut werden wie die kodierende Sequenz für Streptavidin (SEQ ID NO:34)
- 10 und/oder ein von einem Antikörper (9E10) erkanntes Epitop wie myc (SEQ ID:35), und/oder zur Aufreinigung auch eine für fünf Histidine kodierende Sequenz (SEQ ID NO:36) enthalten. Sowohl die Sequenz des Peptids von Interesse als auch die damit verknüpften TAG-Sequenzen unterliegen der zelltypspezifischen und differenzierungsabhängigen Kontrolle des regulativen Sequenzbereichs des α -SMA-Gens.
- 15

Fig 4: LoxP-vermittelte Cre-Rekombination unter Kontrolle des α -SMA-5'-Genbereichs:

- a.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-Gens (SEQ ID NO:32) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-Gens in Myofibroblasten (1), der Cre-vermittelten Excision des loxP-flankierten Neomycin-Gens (neo) (2) und der anschließenden Expression
- 20 des Gens von Interesse (3).
- b.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-Gens (SEQ ID NO:32) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-Gens in Myofibroblasten (1), der Cre-vermittelten Excision des loxP-flankierten Gens von Interesse (2), sodaß eine anschließende Expression
- 30 des Gens von Interesse unterbrochen wird (3).

c.: Aufgrund der transkriptionellen Kontrolle des Cre-ER-Fusionsgens (SEQ ID NO:32 +ERTM, Danielian PS et al., Mol. Endocrinol. 7: 232-240, 1993) durch den 5'-Bereich des α -SMA-5'-Sequenzbereichs (SEQ ID NO:5) in Kombination mit dem ersten Intron des β -Actins (SEQ ID NO:31) kommt es nach myofibroblastischer Differenzierung zur Expression des Cre-ER-Fusionsgens in Myofibroblasten (1). Nach Zusatz bzw. Injektion von 0,1 bis 2 mg 4-OHT kann im nächsten Schritt die Bindung des Liganden durch das ER-Peptid erfolgen und sich ein Cre-ER/4-OHT-Komplex bilden. Anschließend transloziert der Komplex in den Kern und es werden durch Cre die in Fig. 4a und b gezeigten genetischen Veränderungsschritte (2) und (3) durchgeführt.

In Fig. 4 bedeutet: nS: nukleäre Signalpeptidsequenz; schraffierte Fläche: Intronsequenz; LP: Linker Peptidsequenz; ERTM: Sequenz für alterierten Östrogenrezeptor mit hoher Affinität für den synthetischen Liganden, 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), der aber endogen produziertes 17 β -Estradiol nicht bindet; β -A: β -Aktin-Intron (SEQ ID NO:31); und 4-OHT: 4-Hydroxytamoxifen

Fig 5: 5'-upstream Region und Anfang Exon1 des α -SMA in verschiedenen

Spezien (Region -713 bis +52, Nummerierung bezogen auf Sequenz A)

A: Ratte (*Rattus norvegicus*; SEQ ID NO:1; Acc. No S76011 ; Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem . 267(2): 984 -989 (1992)).

B: Maus (*Mus musculus*; SEQ ID NO:2; Acc. Nos. M57409 M35194; Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990)).

C: Mensch (*Homo sapiens*; SEQ ID NO:3; Acc. No. J05193; Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265(3): 1683-1687 (1990)).

D: Huhn (*Gallus gallus*; SEQ ID NO:4; Acc. M13756 D00041 N00041; Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261(19): 8965-8976 (1986)).

Fig. 6: Alignment der in Fig. 5 gezeigten Sequenzen.

Fig. 7: zeigt die bevorzugte, aus Ratte (*Rattus norvegicus*) stammenden α -SMA Sequenzen der vorliegenden Erfindung (SEQ ID NO:)

- A: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -698 bis +18 (5)
- B: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -124 bis +18 (6)
- 5 C: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -189 bis +18 (7)
- D: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -214 bis +18 (8)
- E: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -244 bis +18 (9)
- F: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -484 bis +18 (10)
- G: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -521 bis +18 (11)
- 10 H: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -189 bis -125 (12)
- I: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -214 bis -190 (13)
- J: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -244 bis -215 (14)
- K: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -484 bis -245 (15)
- L: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -521 bis -485 (16)
- 15 M: 5' Genbereich des α -SMA-Gens: -698 bis -522 (17)

Fig. 8A: β -1-Globin-Gen von *Oryctolagus cuniculus*; Intron II /Exon III-Übergang; Acc.No: V00882; Sequenz 1250-1343 (SEQ ID NO:30)

- 20 Fig. 8B: Cytoplasmisches β -Actin-Gen von *Gallus gallus*; Acc. No: X00182, Intron I (544-1542); gezeigt ist die Sequenz von 550 bis 1503 (SEQ ID NO:31).

- 25 Fig. 8C: Skizze einer floxP-site: Die FloxP-Sequenz (siehe auch SEQ ID NO:33) besteht aus 13 bp invertierten Repeats (horizontale Pfeile), die eine 8 bp asymmetrische Core-Region flankieren, welche an zwei Stellen (vertikale Pfeile) durch Cre geschnitten wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

- 30 Die vorliegende Erfindung beruht auf den überraschenden Befund, dass durch spezifische regulatorische Sequenzen des α -SMA-Gens, insbesondere solche die eine oder mehrere der in Fig. A bis M von Fig. 7 (SEQ ID

NOs:5 bis 17) gezeigten Sequenzen enthalten, die Genexpression der hiermit operativ verknüpften funktionellen Nukleinsäuresequenz so z. B. eines Reportergens oder eines anderen funktionellen Gens in Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen gesteuert wird.

5

Die Nukleinsäuresequenz der Ausführungsform (1) der Erfindung enthält einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens. Dieser regulierende Sequenzbereich kann dabei von Säugern, insbesondere von Primaten oder Nagern oder Vögeln und besonders bevorzugt von Ratte, Maus, Mensch oder Huhn stammen (Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem. 267(2): 984-989 (1992); Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990); Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265 (3): 1683-1687 (1990); Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261 (19): 8965-8976 (1986)).

15

In der bevorzugten Ausführungsform (2) stammt der regulierende Sequenzbereich, wie vorstehend erwähnt, von der Ratte (Blank, R. S. et al., J. Biol. Chem. 267: 984-989 (1992)). Besonders bevorzugt ist dabei, dass der funktionelle Bereich eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz aufweist und besonders bevorzugt aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz stammt. Hierbei sind insbesondere solche transkriptionsaktivierende Sequenzen bevorzugt, die wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsekutive Basen aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz aufweisen und besonders bevorzugt die in Fig. 7B oder 7C gezeigten Sequenzen (SEQ ID NOs:6 oder 7) umfassen. Alternativ oder zusätzlich hierzu kann der funktionelle Bereich eine zelltypspezifisch oder differenzierungsabhängig regulierende Nukleinsäuresequenz sein, bevorzugt eine solche, die aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 509 von SEQ ID NO:5), besonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215 der Fig. 7A, stammt. Dabei sind solche zelltypspezifische Sequenzen bevorzugt, die wenigstens 25, vorzugsweise wenigstens 35, konsekutive Basen aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A

25

30

aufweisen und besonders bevorzugt die in Fig. 7I oder 7M gezeigten Sequenzen umfassen.

Gemäß der bevorzugten Ausführungsformen (5) - (10) stammt der regulierende Sequenzbereich alternativ von der Maus, dem Menschen oder dem Huhn (Min, B.H. et al., J. Biol. Chem. 265: 16667-16675 (1990); Reddy, S. et al., J. Biol. Chem. 265 (3): 1683-1687 (1990); Carroll, S.L. et al., J. Biol. Chem. 261 (19): 8965-8976 (1986)), wobei die funktionellen Bereich vorstehend unter (5) bis (10) definiert sind. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung ist auch hier, dass die transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz wenigstens 10, bevorzugt wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsekutive Basen aus der unter (6), (8) oder (10) definierten transkriptionsaktivierenden Sequenz aufweist bzw. wenigstens 25, vorzugsweise wenigstens 35, konsekutive Basen aus der vorstehend unter (6), (8) oder (10) definierten zellspezifischen Sequenz aufweist. Insbesondere sind solche Teilsequenzen aus in den SEQ ID NOs:18, 19 und 20 gezeigten Sequenzen bevorzugt, die den Sequenzen 7A - 7M der Sequenz aus Ratte entsprechen (gemäß dem Alignment in Fig. 6).

Die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz gemäß Ausführungsform (1) der Erfindung kann dabei eine peptid- oder proteinkodierende DNA-Sequenz (einschließlich jedoch nicht eingeschränkt auf Reportergene, Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren und regulatorische DNA-Sequenzen) oder eine funktionelle RNA-kodierende Sequenz (einschließlich jedoch nicht eingeschränkt auf ein Ribozym) sein.

Frühere Arbeiten haben die Verknüpfung von α -SMA-Gen-Fragmenten mit Reportergenen gezeigt (u.a. Nakano, Y. et al., Gene 99(2): 285-9 (1991); Blank, R.S. et al., J. Biol. Chem. 15, 267(2): 984-9 (1992); Johnson, A.D. und Owens, G.K., Am. J. Physiol. 276: C1420-31 (1999); Hautmann, M.B. et al., J Biol Chem. 272(16): 10948-56, (1997); Simonson, M.S. et al.,

Am. J. Physiol. 268(4 Pt 2): F760-9 (1995); Kim, J.H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190(3): 1115-21 (1993); McNamara, C.A. et al., Am. J. Physiol. 268: C1259-66 (1995) sowie WO 00/24254 und US-Patent 5,885,769). Geeignete Reportergene für eine myofibroblastische Steuerung sind z. B. die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführten Gene. Andere funktionelle Gene im Sinne der vorliegenden Erfindung sind z. B. Gene, die für pharmakologisch aktive Proteine oder Peptide kodieren, und regulatorische DNA- und RNA-Sequenzen.

10 **Tab. 1:** Beispiele möglicher Reporter, deren Expression durch die α -SMA-5'-Sequenz kontrolliert werden kann

Reporter	Detektion	Sequenz (SEQ ID NO)	Referenz
destabilisiertes EGFP	488-507 nm	21	EP-A-0892047
red fluorescent Protein	538-583 nm	22	
GFP und Varianten z.B. Blue Variant	380-440 nm	23	
Renilla Luziferase		24	
Luziferase Firefly	Lumineszenz	27	
SEAP ¹	BCIP ² , NBT ³	26	
CAT ⁴		28	
hGH ⁵		29	JP 1985234584
β -Galactosidase	x-Gal ⁷	25	
Horseradish Peroxidase	DAB ⁶ , AEC ⁷		EP-A-0234075

¹ SEAP: secreted alkaline phosphatase

² BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-Indolylphosphat

³ NBT: Nitroblue-Tetrazolium

15 ⁴ CAT: Chloramphenicol-Acetyltransferase

⁵ hGH: human growth hormone

⁶ DAB: 3,3'-Diaminobenzidin

⁷ AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol

Der Vektor gemäß Ausführungsform (13) umfasst konventionelle Transfektionsvektoren und für den Gentransfer geeignete Vektoren.

Die eukaryontischen Zellen oder Organismen gemäß Ausführungsform (15) der vorliegenden Erfindung können durch dem Fachmann wohlbekannte Transfektions-, Transformations- oder Infektionsverfahren von Ausgangszellen bzw. Infizieren von ES-Zellen in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter erhalten werden.

Bislang war es nicht möglich den Vorgang der myofibroblastischen Aktivierung durch einen Reporter zu sichten, da ein regulierender Sequenzbereich, der spezifisch auf den Aktivierungsübergang von ruhenden Zellen zu myofibroblastischen Zellen anspricht, nicht gefunden wurde. Durch die Fusion des Sequenzbereichs von -698 bis +18 (SEQ ID NO:5) mit einem Reporter gen (siehe Tabelle 1) und Insertion in einen Transfektor und anschließender Transfektion kann die myofibroblastische Aktivierung gesichtet werden (Fig. 1). In bisherigen Methoden wurde für eine Sichtung des myofibroblastischen Aktivierungsvorgangs immunzytologische oder immunhistologische Verfahren gewählt, die mehrere Arbeitsschritte wie Fixieren der Zellen, Antigenblocken, Antikörperinkubation und Detektion beinhalteten (F. Hofman, Current protocols in immunology, Chapt. 5.8: Immunohistochemistry; Eds. J.E. Coligan et al., National Institute of Health, USA (1996)). Zur immunzytologischen bzw. immunhistologischen Detektion von Myofibroblasten konzentrierten sich die Verfahren auf die immunochemische Anfärbung des α -SMA-Proteins. Quantitative Aussagen über die Aktivierung z.B. durch ein toxisches Reagenz waren allerdings auf diese Weise nicht möglich. In der vorgelegten Erfindung wurde als α -SMA-5'-Sequenz kontrollierter Reporter des myofibroblastischen Transformationsprozeß vorzugsweise lumineszierende Reporterproteine gewählt und die Aktivierung der Zellen quantitativ und sehr empfindlich durch ein Luminometer (MLX Microplate Luminometer der Fa. Dynex Technologies, Chantilly, USA) gemessen (Fig. 1). Durch eine quantitative

Reporterbestimmung ergibt sich durch das Verfahren erstmals die Möglichkeit toxikologische und pharmakologische Studien quantitativ durchzuführen, die dann Aussagen über das myofibroblastische Aktivierungspotential der Substanz ergeben und damit die Möglichkeit der Detektion des chronisch relevanten Organschädigungspotential.

Die Bestimmung des myofibroblastischen Übergangs an Zellen, die den Vektor mit dem α -SMA-5-Sequenz-Reporterfusionkonstrukt beinhalten, birgt auch die Möglichkeit, therapeutische Medikamentsichtungen durchzuführen; hier kann eine Verminderung der myofibroblastischen Aktivierung, z.B. induziert durch ein Toxin oder einen fibrogenen Wachstumsfaktor wie z.B. Transforming Growth Factor beta (TGF β), anhand des α -SMA-5'-Sequenz kontrollierten Reporters ausgelesen werden.

Das erfindungsgemäße vorgelegte Verfahren, in dem α -SMA-5'-Sequenzbereiche (-698 bis +18) zur Reportersteuerung genutzt werden, umfaßt neben der Sichtung der myofibroblastischen Aktivierung die Isolierung von bestimmten Zellen anhand der α -SMA-5'- gesteuerten Reporterexpression. Dies wird in dem vorgestellten Verfahren vorzugsweise durch operative Verknüpfung von α -SMA-5'-Sequenzbereichen mit einem fluoreszierenden Reporter (z.B. GFP siehe Tabelle 1) durchgeführt, so daß nach Einbringen des Vektorkonstruktes in einen Organismus oder einer Zellpopulation die Isolierung von transient embryonal SMA-positiver Zellen oder von myofibroblastisch induzierten Zellen aus einem Zellgemisch oder Verbandes aufgrund der Fluoreszenz mithilfe eines FACS-Gerätes (FACS: Fluorescence activated cell sorting) durchgeführt werden kann. Alternativ erlaubt die Verknüpfung des α -SMA-5'- Sequenzbereichs mit anderen Reportern die Isolierung von Myofibroblasten und Arealen mit myofibroblastähnlichen Zellen durch Mikrodissektion unter licht- oder fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle.

- Die vorgelegte Erfindung umfaßt ebenfalls die Rolle des Sequenzbereichs -698 bis +18 des α -SMA-Gens für die spezifische Genexpression in embryonalen Stammzellen (ES), die in Embryoid Bodies zu embryonalen Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen oder Skelettmuskelzellen differenzieren können (Evans, M. J., Kaufmann, M. H., Nature, 292, 154 - 156 (1981)). Der Vergleich verschiedener stabil in ES-transfekzierter Konstrukte mit unterschiedlichen Domänen des α -SMA-5'- gelegenen Sequenzbereichs zeigte, daß für eine Selektion von Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und Glatten Muskelzellen aus embryonalen Zellaggregaten eine Reportersteuerung durch den Sequenzbereich -189 bis +18 (Fig. 7C; SMA-190) nicht ausreicht, sondern zusätzliche 5-gelegene Domänen im Bereich -698 bis -190 des α -SMA-Gens (Seq. I, J, K, L und M der Fig. 7) notwendig sind (Fig. 2).
- Die Erfindung betrifft ebenfalls die operative Verknüpfung des α -SMA-5'- Sequenzbereichs oder Teilbereiche der Sequenzen (Seq. A bis M von Fig. 7) mit anderen die Expression beeinflussenden Nukleinsäuresequenzen. Beispiel sind Intronsequenzen wie die des β -Globin- (siehe Fig. 8a, SEQ ID NO:30) oder des Huhn- β -Aktin-Gens (siehe Fig. 8b, SEQ ID NO:31), aber auch andere Enhancersequenzen wie die des viralen CMV wie in dem Vektor von Fig. 3. Aber auch andere hier nicht genannte expressionsbeeinflussende Sequenzen können mit den α -SMA-5'- Sequenzen oder Domänen aus denen (Seq. A bis M von Fig. 7) operativ verknüpft werden.
- Wird nicht ein Reportergen, sondern ein anderer peptid- oder proteinkodierender Genbereich mit den α -SMA-5'- Sequenzbereichen (SEQ ID NOs:5 bis 17) verknüpft, kommt es zu einer α -SMA-5'-gesteuerten Expression des operativ verknüpften Genbereichs. In der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird Sequenz A von Fig. 7 für eine Steuerung der Expression des Genbereichs von Interesse benutzt. Fig. 1 oder Fig. 3 zeigt die differenzierungsabhängige Expression unter transkriptioneller Kontrolle der Sequenz A von Fig. 7: Die transkriptionelle Kontrolle durch

Sequenz A verhindert die Expression in Myoblasten oder ruhenden myofibroblastischen Vorläufer, während sie nach Myotubendifferenzierung oder nach myofibroblastischer Transdifferenzierung zur Expression des verknüpften Genbereichs führt. Wird Sequenz C von Fig. 7 mit dem Zielgen
5 verknüpft, kommt es auch zur Expression in vielen Zelltypen wie z.B. in Fibroblasten, bei Verknüpfung der Sequenzen A, F, G von Fig. 7 in myofibroblastischen Zellen oder SMC-Abkömmlingen. Der durch α -SMA-5'-Sequenzbereiche (Seq. A bis M von Fig. 7) transkriptionell gesteuerte Genbereich kann wiederum ebenfalls mit zusätzlichen Sequenzdomänen
10 verknüpft werden. Die Verknüpfung unter Berücksichtigung des Leserasters mit kodierenden Sequenzen für bestimmte Tags oder Reporterdomänen (Fig. 3b) ermöglicht die Verfolgung der Genexpression oder die Aufreinigung Proteins oder Peptids des durch α -SMA-Sequenzen transkriptionell gesteuerten Genbereichs.

15 Durch die operative Verknüpfung der α -SMA-5'-Sequenzbereiche (Seq. A bis M von Fig. 7) mit Sequenzen, die RNA kodierende DNA oder Genbereiche für Signalmediatoren enthalten, kann funktionell in den Phänotyp myofibroblastischer Zellen eingegriffen werden. Nach Insertion solcher
20 Konstrukte in einen Vektor, der sich zur Gentherapie eignet (wie z.B. verschiedene Generationen von adenoviralen, retroviralen oder lentiviralen Vektoren und deren Abkömmlinge (Ory, D. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 11400 - 11406 (1996); Feng, M. et al., Nat. Biotechnol. 15: 866 - 870 (1997)) bzw. nackte oder in Aggregaten mit geladenen Polymeren oder
25 Liposomen zusammengefaßte Plasmidvektoren) (Hengge, U. et al., Nat. Genet. 10: 161-166 (1995); Gottschalk, S. et al., Gene Ther. 3: 448 - 457 (1996)) wird die Voraussetzung für gentherapeutische Ansätze myofibroblastischer Zellen und myofibroblastähnlicher Zellen geschaffen, die bei sklerosierenden Erkrankungen (Desmouliere, A. et al., Exp. Nephrol.
30 3: 134-139 (1995); Gabbiani, G., Cardiovasc. Res. 38: 545-548 (1998); idem, Pathol. Res. Pract. 190: 851-853; idem Am. J. Pathol. 83: 457-474 (1976)) und Tumorerkrankungen (Terada, T et al., J. Hepatol. 24: 706-

12(1996); Faouzi, S. et al., J. Hepatol. 30(2): 275-84 (1999); Kosmehl, H. et al., Br. J. Cancer. 81(6): 1071-9 (1999); Pujuguet, P. et al., Am. J. Pathol. 148: 579-92 (1996); Chomette, G. et al., Pathol. Res. Pract. 186(1): 70-9 (1990); Ronnov-Jessen, L. et al., J. Clin. Invest. 95(2): 859-73 (1995); Gocht, A et al., Pathol. Res. Pract. 195(1): 1-10 (1999)) genutzt werden können.

Die operative Verknüpfung von Sequenzbereichen aus Sequenz A bis M aus Fig. 7, wobei in dieser Erfindung vorzugsweise die Sequenz A aus Fig. 7 benutzt wurde, mit dem Enzym für die zyklische Rekombination (Cre) (SEQ ID NO:32) ermöglicht es, in myofibroblastisch-differenzierten Zellen Genbereiche, die mit einer floxP-Sequenz (Fig. 8c, SEQ ID NO:33) flankiert wurden, neu zu rekombinieren. Hier kann nach Funktion des Cre-Enzyms und der Orientierung der floxP-Sequenzen eine Inversion, eine Excision, Integration oder Translokation des gefloxten Genbereichs unter Kontrolle der gewählten regulierenden α -SMA-5'-Sequenzbereiche erfolgen. In dieser Erfindung gewählte mögliche Konstruktionen des Vektors sind in Fig. 4 dargestellt.

In dem Verfahren (17) gemäß der vorliegenden Erfindung werden transfi-zierte ES-Zellen in Blastozysten eines Wirtsorganismus injiziert und in die Leihmutter eingesetzt (V. Papaioannou, R. Johnson, Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A.L: Joyner, Oxford UK (1993); T. Doetschman, Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press Inc. San Diego, USA (1994)). Nach Rückkreuzungen der geborenen und herangewachsenen transgenen Chimäre werden homozygote Tiere intoxi-ziert und auf ihre transgene Genexpression untersucht.

Alternativ können in dem Verfahren (17) die Konstrukte ohne Vektor-rückrad durch Mikroinjektion in den Vorkern eingebracht werden und zu transgenen Organismen führen (J.W. Gordon et al., Methods Enzymol. 101: 411-33 (1983); B. Hogan et al., Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, Gold Spring Harbor, NY (1994)).

Organismen gemäß der Ausführungsformen (15) und (17) der vorliegenden Erfindung umfasst Säuger einschließlich, aber nicht eingeschränkt auf Primaten, Nager und Huftiere (wobei es sich - falls humane Organismen unter den betreffenden nationalen oder regionalen Patentvoraussetzungen nicht schutzfähig sind - bei den Säugern um nicht-humane Säuger handelt). Die eukaryotischen Zellen gemäß Ausführungsform (15) umfassen alle möglichen Zellen und Zelllinien aus den obengenannten Säugern.

Die "Arzneimittel" gemäß Ausführungsformen (20) und (21) der vorliegenden Erfindung (je nach Aufgabenstellung, Anwendung, Art der weiteren funktionellen Nukleinsäuresequenz usw. kann es sich dabei auch um ein Diagnostikum handeln) können - in Abhängigkeit von der Applikationsform - neben den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen/Vektoren noch handelsübliche Zusatzstoffe, Verdünnungsmittel und dergleichen enthalten. Die Arzneimittel sind dabei zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Myofibroblaten oder myofibroblastähnlichen Zellen geeignet, d.h. sie sind für die Behandlung und Diagnose einer Vielzahl von Erkrankungen (wie in dem Abschnitt "Hintergrund der Erfindung" ausgeführt) einschließlich Fibroseerkrankungen aufgrund chronischer Organschädigung (wie z.B. der Hepatitis, der Glomerulonephritis, der Myelofibrose oder fibrosierenden Lungenerkrankungen) und Tumorerkrankungen einsetzbar.

Die Erfindung wird anhand der folgenden, nicht einschränkenden Beispiele näher erläutert.

Beispiele

Materialien Und Methoden

Tabelle 2: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (SEQ. ID. NO)	Bereich im α -SMA-Gen
SMA-710F	5'-GTC CTT AAG CTT GAT ATC AAG GGT CAG CG (37)	- 710 bis -682
SMA-30R	5'-GGC TTC TGA ATT CTG GGT GGG TGG TGT CT (38)	+1 bis +29

SMA-245F	5'-TGT TCT CAG GCT CAG GAT G (39)	-252 bis -235
SMA-190F	5'-CTG TTT CGA GAG AGC AAA GCT TAG G (40)	-203 bis -181
SMA-100	5'-GAG TGA ACG GCC AGC TTC (41)	um -100

Folgende kommerziell erhältliche Vektoren wurden im Verlauf der Arbeit benutzt:

- 5 Als allgemeine Klonierungsvektoren dienten pBluescript-SKII+ (Clontech, Heidelberg) und pGEM3Z (Promega, Mannheim). Bereiche des α -SMA-Promoter wurden anschließend in den promoterlosen Luciferase-Vektor pRL-null (Promega, Mannheim) kloniert. Um die Aktivität erzeugter Konstrukte zu vergleichen wurden aus der pRL-Familie zusätzlich pRL-SV40 und pRL-
- 10 CMV oder auch Vektoren der pGL3-Familie (Promega, Heidelberg) verwendet.

Beispiel 1: Herstellen der α -SMA-5'-Sequenz

- Aus isolierter Ratten-DNA wurde zunächst ein 736bp langes Fragment aus
- 15 dem 5'-Promoterbereich des α -SMA-Gens amplifiziert und kloniert. Dazu erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation des Bereichs von -708 bis +28 aus genomischer Ratten-DNA mit den Primer SMA-710F (HindIII) und SMA-30R (EcoRI), die die angegebenen Restriktionsschnittstellen in ihrer Sequenz beinhalten. Nach Restriktion wurde das Fragment (-698 bis +18)
- 20 in pRL-null durch Ligation inseriert und der resultierende Vektor pRL-SMA-700 für Untersuchungen an eukaryontischen Zellen in *E. coli* K12-Stämmen amplifiziert (siehe auch Sequenz von Fig. 7A).

Beispiel 2: Sichtung der myofibroblastischen Differenzierung durch Reporterexpression unter Kontrolle des 5'-Bereichs des α -SMA-Gens

25

- A. Herstellen von durch α -SMA-5'-Sequenzbereiche regulierten Reportervektoren: Für die Herstellung der α -SMA-5'-Genbereich-Reporterkonstrukte wurden in Reportervektoren unterschiedliche 5'-Genbereiche des α -SMA inseriert. Das mit den Primern SMA-710-F und SMA-30-R hergestellte
- 30 Amplifikat (s. o.) von genomischer Ratten-DNA wurde mit EcoRI und

HindIII geschnitten und in pBSSK + (Stratagene) kloniert und so pB-SMA-700 erzeugt. Unter Nutzung der vorhandenen Restriktionschnittstellen im 5'-Bereich des α -SMA-Gens wurden die Fragmente SMA-480 (PstI), SMA-215 (PvuII) und SMA-125 (DraII) erzeugt, indem sie mit EcoRI und dem spezifischen Restriktionsenzym aus pB-SMA-700 geschnitten wurden und zunächst in pGEM (Promega) oder pB-SK (Stratagene) kloniert wurden. Dabei entstanden folgende Plasmide: pGEM-SMA-480, pGEM-SMA-215 und pB-SMA-125. Mit den Primer SMA-245F (PstI) oder SMA-190F(HindIII) als sense Primer und SMA-30R als antisense Primer wurden spezifische Fragmente generiert, die anschließend über ihre primer-assoziierten Restriktionsschnittstellen kloniert wurden, dadurch entstanden pGEM-SMA-245 und pB-SMA 190.

Alle Promoterfragmente des α -SMA-Promoter wurden über EcoRI/HindIII oder EcoRI/SacI in pRL-null kloniert, wodurch 6 unterschiedliche lange Deletionsreporterkonstrukte SMA-700 bis SMA-125 erzeugt wurden.

B. Transiente Transfektion: Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGENETM6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Pro Ansatz wurde 1,5 μ g Plasmid-DNA verwendet, die sich aus 1,2 μ g pRL-700 und 0,3 μ g pGL3-Kontrollplasmid zusammensetzten, was einem DNA/Reagenz-Verhältnis von 1 : 3 entspricht. Für die Transfektionen wurden ruhende Hepatische Sternzellen (HSC), die durch enzymatische Leberperfusion und Dichtegradientenzentrifugation aus der Rattenleber isoliert wurden (Knock, D. S., de Leeuw, A. M., Exp. Cell. Res., 139, 468 471 (1982)) und nach Kultur auf Plastikschaalen (Falcon) in Myofibroblasten differenzierte HSC verwendet (Geerts, A. et al., J. Hepatology, 9, 59 - 68 (1989)).

C. Bestimmung der Reporteraktivität unter Kontrolle von Sequenz A in ruhenden HSC und in myofibroblastischen HSC: Eine Messung der Aktivitäten erfolgte mit dem Dualen-Luciferase Reporter-Assay-System (DLRTM, Promega, Mannheim). In den transienten Transfektionen zeigten nur my-

ofibroblastische Zellen eine deutliche Aktivität des pRL-700-Reporterkonstrukt. α -SMA-negative Zellen zeigen Reporteraktivitäten, die unterhalb von einem Prozent der relativen Aktivität lagen. In Myofibroblasten wurde der Reporter um den Faktor 14 induziert. Ruhende Zellen hatten keine
5 Aktivitäten ($>1\%$) (Fig. 1). Damit kann das Konstrukt nach Transfektion zur Sichtung der myofibroblastischen Differenzierung verwendet werden.

Beispiel 3: Reporter unter Kontrolle einer α -SMA 5'-Sequenz in stabil transfizierten Organismen und Zellen

10 A. Konstruktion eines Reporter-Vektors unter Kontrolle des α -SMA: Aus einem modifizierten GFP-Expressionvektor (pCAGGS) (Ikawa, M. et al., Develop. Growth Differ. 37: 455 - 459 (1995)) mit einem Fragment des Chicken- β -Actin-Promoter und dem ersten Intron des Chicken- β -Actins (SEQ ID NO:31) wurde das kardiale Promoterelement durch einen
15 Restriktionsverdau mit SnaBI und ApaI exzidiert und mit den jeweiligen α -SMA-5'-Sequenzbereichen (SEQ ID NO:5 oder SEQ ID NO:7) nach Verdau von pRL-700 oder pRL-190 mit XhoI und EcoRI ersetzt. Nach Aufreinigung der Banden über ein Agarosegel wurden die Enden aufgefüllt, um eine
`Blunt End'-Klonierung durchführen zu können. Um eine Religation des
20 Vektors zu verhindern, wurden bei diesem zusätzlich eine Dephosphorylierung der 5'-Enden durchgeführt. Nach einer Ligationsreaktion und Transformation in *E. coli* wurden positive Klone isoliert, deren Plasmid-DNA aufgereinigt und sequenziert und so der Einbau der α -SMA-5'-Sequenzbereiche in der richtigen Orientierung überprüft. Die Sequenzierung
25 wurde unter Verwendung des markierten Primers SMA-100 (TM=63°C), der im Bereich -100 des α -SMA-Promoter bindet, durchgeführt. Die Konstrukte sind in Fig. 2b dargestellt.

B. Sichtung und Isolierung von stabilen Transfektanten anhand der α -
30 SMA-5-Sequenz (Sequenzen von Fig. 7A und 7C) kontrollierten Reporteraktivität: Zur Erzeugung von stabilen ES-Transfektanten wurden die beiden GFP-Reporterkonstrukte pSMA-GFP-700 und -190 (Abb.2b) hergestellt

und in embryonale murine D3-Stammzellen transfiziert. Die stabil transfizierten Klone wurden mittels ihrer Neomycin (G418)-Resistenz, die im GFP-Konstrukt beinhaltet ist, selektioniert. Dazu wurde 24 Stunden nach der Transfektion zum erstenmal 50 µg/ml Neomycin (10 mg/ml, GibcoBRL, Eggenstein) zugesetzt.

Zur Differenzierung von Stammzellen wurden diese ohne Feederzellen und ohne Zugabe von LIF in DMEM (440 mg D-Glukose, 110 mg Natriumpyruvat, L-Glutamin, Sigma) mit 20 % FCS (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), 1x nicht-essentiellen Aminosäuren (GibcoBRL), 1x Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol (Sigma) kultiviert. Für den Ansatz von Embryoid Bodies (EB) wurden $2,25 \times 10^5$ bzw. $4,25 \times 10^5$ Zellen in 1 ml Kulturmedium verdünnt. Jeweils 20 µl der Zellsuspension (450 oder 800 Zellen) wurden als hängende Tropfen kultiviert (Drab, M. et al., FASEB, 11: 905-911 (1997) und Kolossov, E. et al., J. Cell. Biol., 143: 2045-2056 (1998)).

Die Immunhistologie an EB, die mit dem pSMA-GFP-190 Promoterfragment transfiziert wurden, zeigte, daß GFP-positive Zellareale nicht immer eine α-SMA-Expression hatten und nicht alle α-SMA-positiven Zellen GFP exprimierten. GFP-positive Zellen konnten Actinin-exprimierenden kardialen oder skelettalen Muskelzelltypen zugeordnet werden. Caldesmon-positive glatte Muskelzellen wiesen keine GFP-Expression auf.

Im Gegensatz dazu zeigte das pSMA-GFP-700 Konstrukt eine spezifische GFP-Expression, die GFP-Expression konnte dabei sowohl in kardialen und skelettalen Bereichen als auch in caldesmonpositiven glatten Muskelzellen gefunden werden. Das gesichtete Reportermuster unter Kontrolle der Sequenz A in Fig. 5 des α-SMA-Gens entspricht in differenzierten ES-Zellen demjenigen während der Embryogenese. Daher ist das SMA-700-Fragment (SEQ ID NO:5) eine funktionsfähige Steuerungssequenz für die embryonal und transient SMA-positiven Zellen.

Anhand der Reporteraktivität konnten Zellen durch Trypsinierung vereinzelzt werden (Fig. 2.a) und getrennt untersucht werden.

5 Beispiel 4: Herstellen von Mäusen mit transgener Genexpression in myofibroblastischen Zellen

A. Stabile Transfektion des in Fig. 2b/3 gezeigten Konstrukts in ES-Zellen:
Zur Herstellung von stabil transfizierten embryonalen Stammzellen wurden die α -SMA-Transgen-Vektoren zunächst durch einen Restriktionsverdau, dessen Schnittstelle im Ampicillingen liegt, linearisiert und nach einer
10 Aufreinigung in H₂O gelöst (1 μ g/ μ l). Anschließend wurde eine Elektroporation vorgenommen. Dazu wurden 5×10^6 ES-Zellen in 0,7 ml PBS aufgenommen, resuspendiert und in eine Küvette überführt. Pro Elektroporationen wurden 30 μ g linearisierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 100
15 μ l verwendet. Nach Zugabe der DNA in die Küvette erfolgte zunächst eine Inkubation für 10 min auf Eis, die der Bildung von Präkomplexen diene. Danach wurde mit einem Elektroporator der Firma Biorad (München) bei 500 μ F und 0,24 V ein Impuls erzeugt. Zur Regeneration wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend auf neomycinresistente Feederzellen plattiert.
20

Die ES- Zellen wurden in Blastozysten einer Wirtsmaus injiziert und in die Leihmutter eingesetzt (V. Papaioannou, R. Johnson, in Gene Targeting. A Practical Approach, ed. A.L: Joyner, Oxford UK (1993); T. Doetschman,
25 Transgenic Animal Technology. A Laboratory Handbook, Academic Press Inc San Diego, USA (1994)). Nach Rückkreuzungen der geborenen und herangewachsenen transgenen Chimäre wurden homozygote Tiere intoxiziert und auf ihre transgene Genexpression untersucht.

Alternativ können Konstrukte ohne Vektorrückrad (siehe Fig.2b) durch Mikroinjektion in den Vorkern eingebracht werden und zu transgenen Mäusen führen (J.W. Gordon et al., Methods Enzymol. 101: 411-33 (1983); B.
30

Hogan et al., in Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, Gold Spring Harbor, NY (1994)).

B: Chronische Leberschädigung durch Intoxikation und myofibroblastische
5 Sichtung

Zur Induktion einer chronischen Leberschädigung wurden zwei wöchentliche Gaben von 4 % igem Tetrachlorkohlenstoff in Mineralöl (6 ml/kg Körpergewicht) den Mäusen intraperitoneal 2, 4, 6 oder 8 Wochen lang verabreicht. Die Mäuse wurden auf eine Pulmonitis und Nephritis sowie auf
10 das Auftreten myofibroblastischer Zellen in der Lunge und der Niere untersucht. Da Tetrachlorkohlenstoff vor allem zu einer Hepatitis führt, wurde in den Lebern transgener GFP-Mäuse die Aktivierung von myofibroblastischen Zellen gesichtet.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend

(i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens), der aus Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht, wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Sequenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist, und

(ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die nicht für das natürliche α -SMA kodiert und die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von transient- oder nach Aktivierung SMA-positiver Zellen, von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei in der Nukleinsäuresequenz der regulierende Sequenzbereich des α -SMA-Gens

- wenigstens 10, vorzugsweise wenigstens 20 konsekutive Basen aus den Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens aufweist und/oder

- von Säugern, insbesondere von Primaten oder Nagern, oder Vögeln stammt und besonders bevorzugt von Ratte, Maus, Mensch oder Huhn stammt.

3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Ratte stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus der in Fig. 5A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:1), insbesondere aus der in Fig. 7A gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:5), umfasst.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der funktionelle Bereich

(i) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:7) stammt, und

wobei vorzugsweise die transkriptionsaktivierende Sequenz wenigstens 10, bevorzugt wenigstens 40 und besonders bevorzugt wenigstens 60 konsekutive Basen aus der in Fig. 7C gezeigten Sequenz aufweist und besonders bevorzugt die in Fig. 7B oder 7C gezeigte Sequenz (SEQ ID NOs:6 oder 7) umfasst; oder

(ii) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 509 von SEQ ID NO:5), besonders bevorzugt aus der Sequenz -698 bis -215 der Fig. 7A (Nukleotide 1 bis 484 von SEQ ID NO:5) oder aus der Sequenz der Fig. 7I (SEQ ID NO:13) stammt, und wobei vorzugsweise die zellspezifische Sequenz wenigstens 25, bevorzugt wenigstens 35 konsekutive Basen aus der Sequenz -698 bis -190 der Fig. 7A aufweist und besonders bevorzugt die in Fig. 7I oder 7M (SEQ ID NO:13 oder 17) gezeigte Sequenz umfasst.

5. Verwendung nach Anspruch 3 oder 4, wobei die Nukleinsäuresequenz sowohl eine transkriptionsaktivierende als auch eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz umfasst und/oder eine der in SEQ ID NOs:5 bis 17 gezeigten Sequenzen aufweist.

6. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich von der Maus stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5B gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:2) insbesondere aus der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz aufweist.

7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 490 bis 697 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 489 der in SEQ ID NO:18 gezeigten Sequenz stammt.

8. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Menschen stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5C gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:3) insbesondere aus der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz aufweist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 513 bis 715 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 512 der in SEQ ID NO:19 gezeigten Sequenz stammt.

10. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der regulierende Sequenzbereich vom Huhn stammt und die Nukleinsäuresequenz vorzugsweise einen oder mehrere funktionelle Bereiche der in Fig. 5D gezeigten Sequenz (SEQ ID NO:4) insbesondere aus der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz aufweist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei der funktionelle Bereich

(a) eine transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 497 bis 699 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt und/oder

(b) eine zelltypspezifische Nukleinsäuresequenz ist und insbesondere aus den Nukleotiden 1 bis 496 der in SEQ ID NO:20 gezeigten Sequenz stammt.

12. Verwendung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, wobei die weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz eine peptid- oder proteinkondierende DNA-Sequenz, insbesondere ausgewählt ist aus Reportergenen, Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren, und regulatorische DNA-Sequenzen, oder eine funktionelle RNA-kodierende Sequenz, insbesondere ein Ribozym, ist.

13. Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen in Organismen oder Organen, umfassend das Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in Ansprüchen 1 bis 12 definiert, oder von Vektoren, in die solche Nukleinsäuresequenzen inseriert sind, in die Organismen oder Organe.

14. Verfahren nach Anspruch 13, das ein *in vivo* oder *in vitro* Verfahren ist und wobei insbesondere

- (i) das Einbringen in die Organismen oder Organe unter Nutzung transgener oder knock-out /-in Technologie erfolgt, oder
- (ii) das Verfahren eine gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation ist.

15. Nukleinsäuresequenz, umfassend

- (i) einen oder mehrere funktionelle Bereiche aus dem regulierenden Sequenzbereich des alpha-Smooth-Muscle-Actin-Gens (α -SMA-Gens), der aus Nukleotiden -698 bis +18 des α -SMA-Gens besteht, wobei die Nummerierung auf die in Fig. 5A und 7A gezeigte Sequenz aus *rattus norvegicus* bezogen ist, und

- (ii) wenigstens eine weitere funktionelle Nukleinsäuresequenz, die mit der Sequenz (i) operativ verknüpft ist und die nicht für das natürliche α -SMA kodiert und ausgewählt ist aus DNA-Sequenzen, die für pharmakologisch aktive Proteine kodieren, regulatorische DNA-Sequenzen und funktionellen RNA-kodierenden Sequenzen.

16. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 15, die wie in den Ansprüchen 2 bis 11 definiert ist.

17. Transkriptionsaktivierende Nukleinsäuresequenzen oder zelltypische Nukleinsäuresequenzen, wie in Ansprüchen 4, 7, 9, oder 11 definiert.

18. Vektor, umfassend eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 17 definiert, oder in dem eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 15 oder 16 definiert, inseriert ist.

- 5 19. Eukaryontische Zellen oder Organismen, die mit einer Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder einem Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, transient oder stabil transfiziert, transformiert oder infiziert sind, und die vorzugsweise
- (i) einen Reporter unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens exprimieren; oder
- 10 (ii) ein pharmakologisch aktives Protein, eine regulatorische DNA-Sequenz oder eine funktionelle RNA-Sequenz unter Kontrolle des α -SMA-Gens exprimieren oder aufweisen.

- 15 20. Verfahren zur Herstellung der eukaryontischen Zellen, wie in Anspruch 19 definiert, umfassend das Transfizieren, Transformieren oder Infizieren von Ausgangszellen mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder mit Vektoren, wie in Anspruch 18 definiert.

- 20 21. Verfahren zur Herstellung der Organismen, wie in Anspruch 19 definiert, umfassend das Injizieren von ES-Zellen, die mit den Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder mit Vektoren, wie in Anspruch 18 definiert, transfiziert sind, in Blastozysten der Organismen und Einsetzen in die Leihmutter.

25

22. Verfahren zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von Glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen, umfassend das Einbringen von Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 15, 16 oder 17 definiert, oder Vektoren, wie in Anspruch 18
- 30 definiert, in die Organismen oder Organe,
- (i) wobei das Einbringen in die Organismen oder Organe vorzugsweise unter Nutzung transgener oder knock-out /-in Technologie erfolgt, oder

(ii) wobei das Verfahren vorzugsweise eine gentherapeutischer Fusionsvektorapplikation ist.

23. Arzneimittel, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, wie in Ansprüchen 1 bis 12, 15, 16 oder 17 definiert, oder einen Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, wobei das Arzneimittel vorzugsweise zur Manipulation der Genexpression und/oder der Zellfunktion von glatten Muskelzellen oder Myofibroblasten in Organismen oder Organen geeignet ist.

24. Verwendung eines funktionellen Bereichs aus dem regulierenden Sequenzbereich des α -SMA-Gens zur myofibroblastischen und differenzierungsabhängigen Reporterexpression und zur myofibroblastischen und differenzierungsabhängigen Genveränderung, wobei vorzugsweise der funktionelle Bereich des α -SMA-Gens

(i) eine Nukleinsäuresequenz, wie in Anspruch 17 definiert, ist;

(ii) eine Nukleinsäuresequenz, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert, ist und/oder

(iii) in einem Vektor, wie in Anspruch 18 definiert, vorliegt.

25. Verfahren zur Isolierung oder zur Sichtung von transienten oder nach Aktivierung SMA-positiven Zellen, von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus, umfassend

- die Expression eines Reportergens in einer eukaryontischen Zelle oder

ein Organismus, die/der einen Reporter unter Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert, exprimiert und

- die Detektion des Reporters.

26 Verwendung der regulatorischen Sequenzen des α -SMA-Gens, wie in Ansprüchen 1 bis 12 oder 15 bis 16 definiert zur Herstellung eines Diagnostikums zur Isolierung oder zur Sichtung von transienten oder nach

Aktivierung SMA-positiven Zellen, von Myofibroblasten oder myofibroblastähnlichen Zellen aus einem Zellgemisch, einer Zellpopulation, einem Zellaggregat oder einem Organismus

Fig. 1

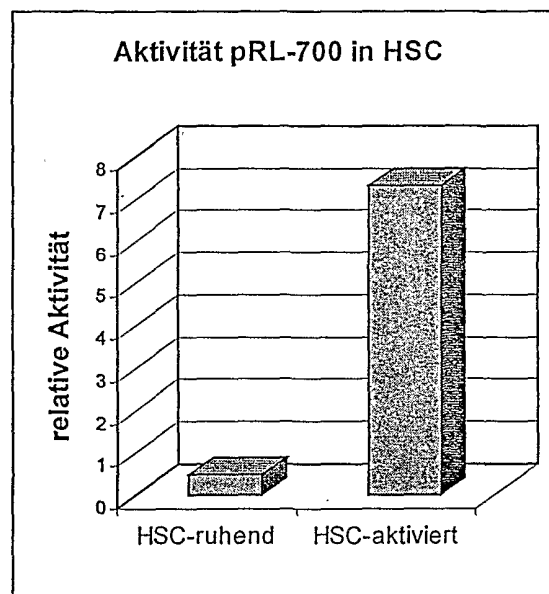


Fig. 2a

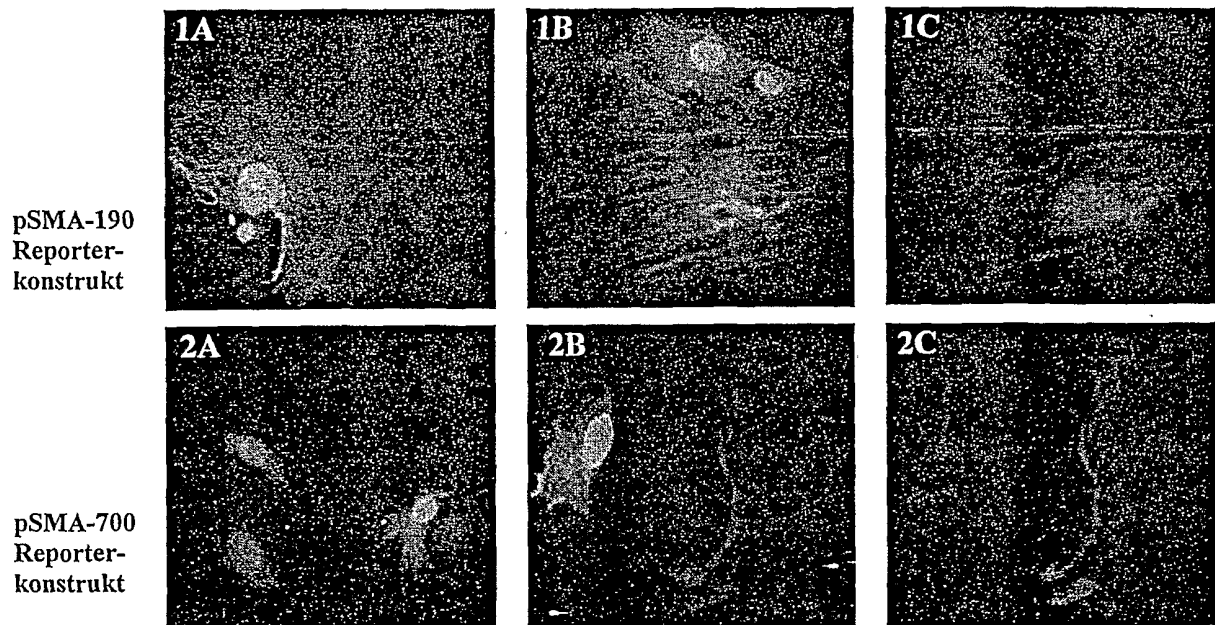


Fig. 2b

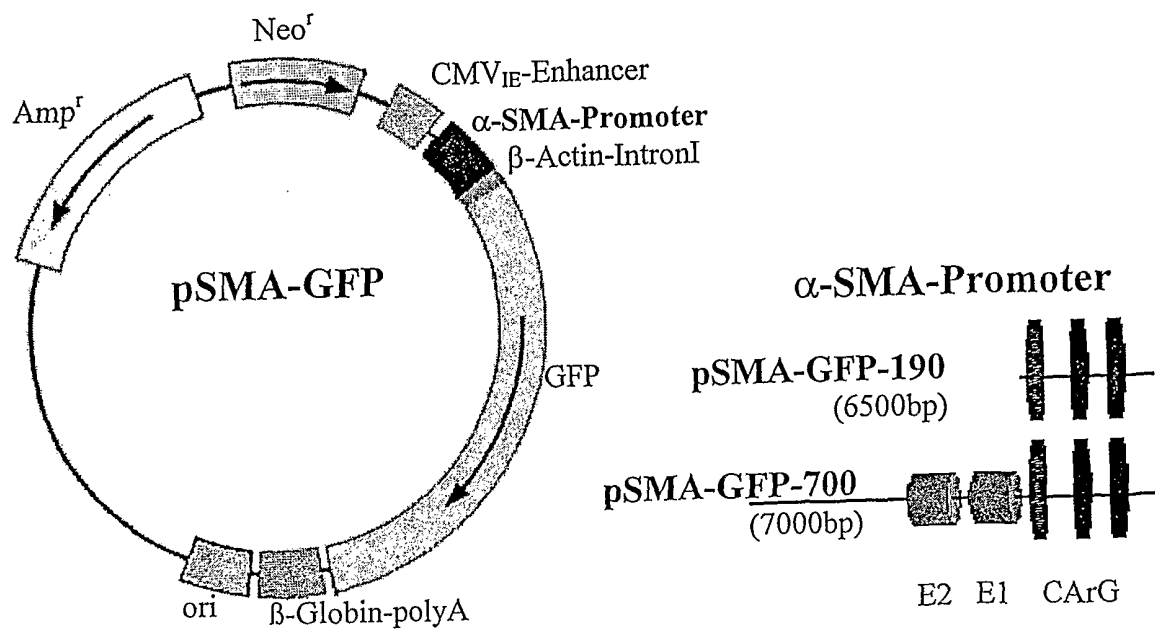


Fig. 3a

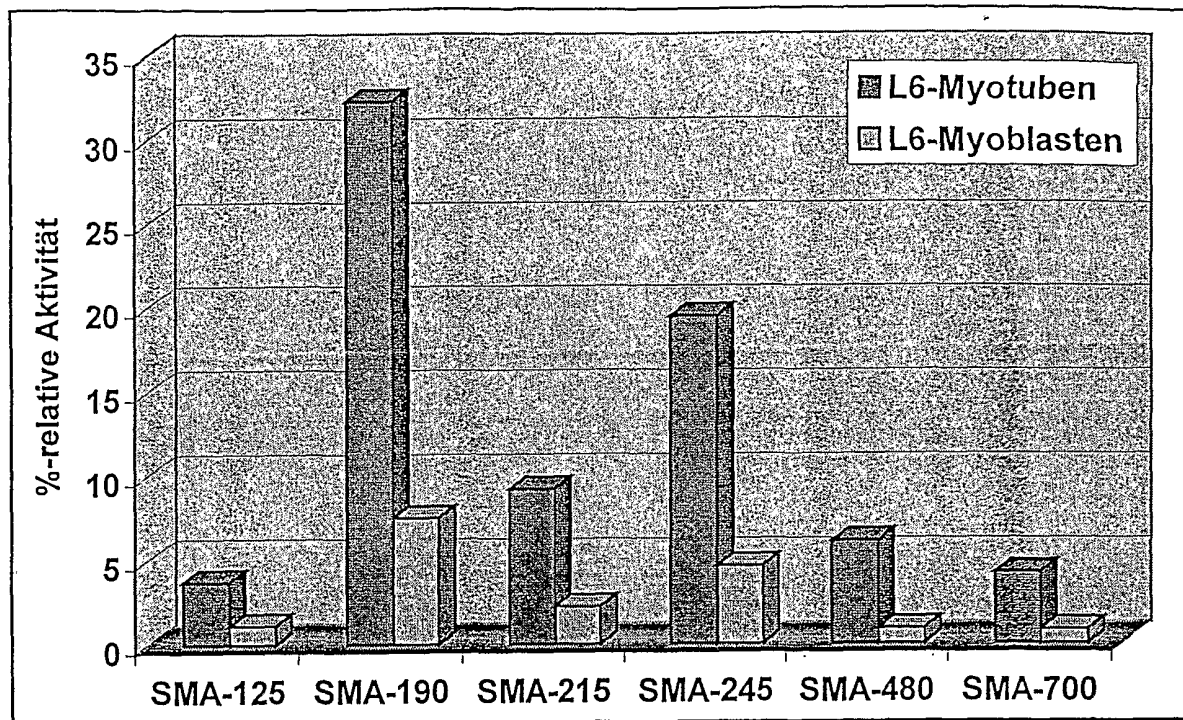
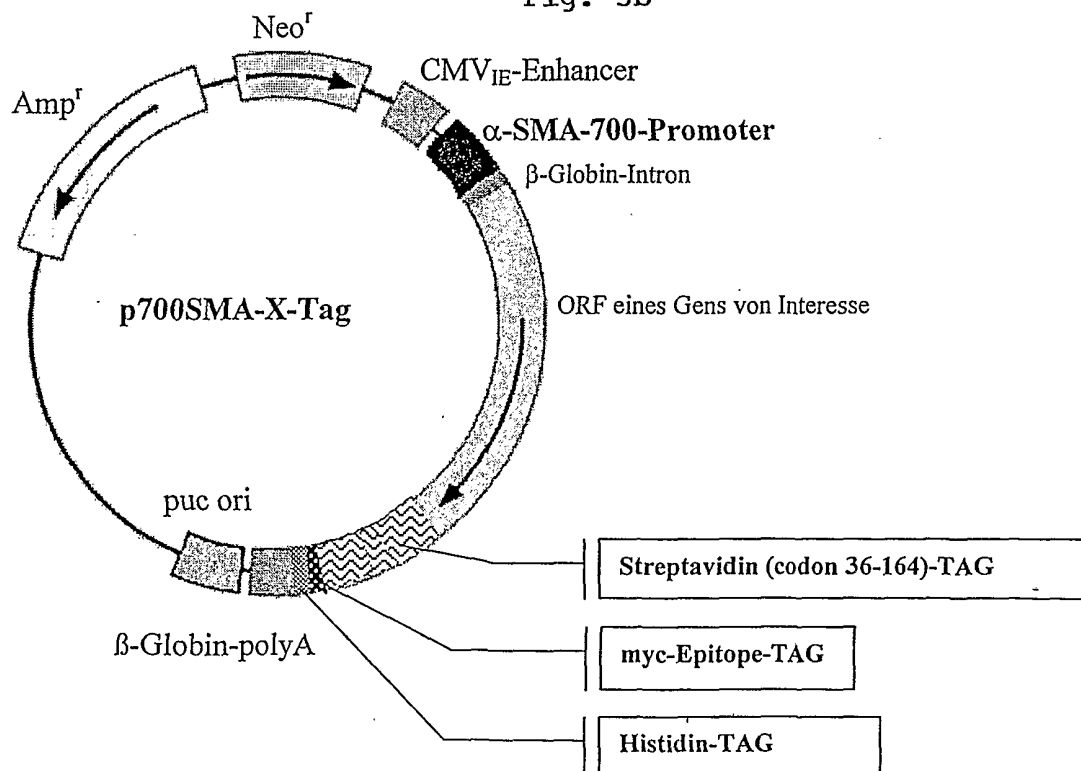


Fig. 3b



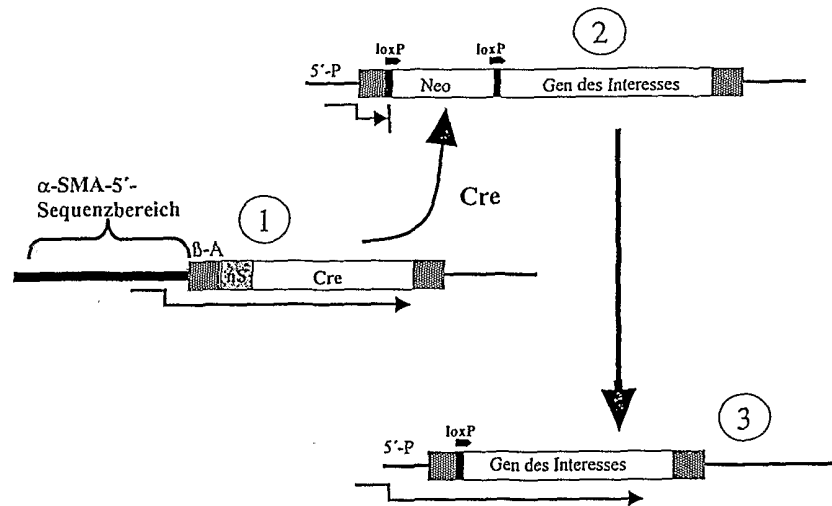


Fig. 4a

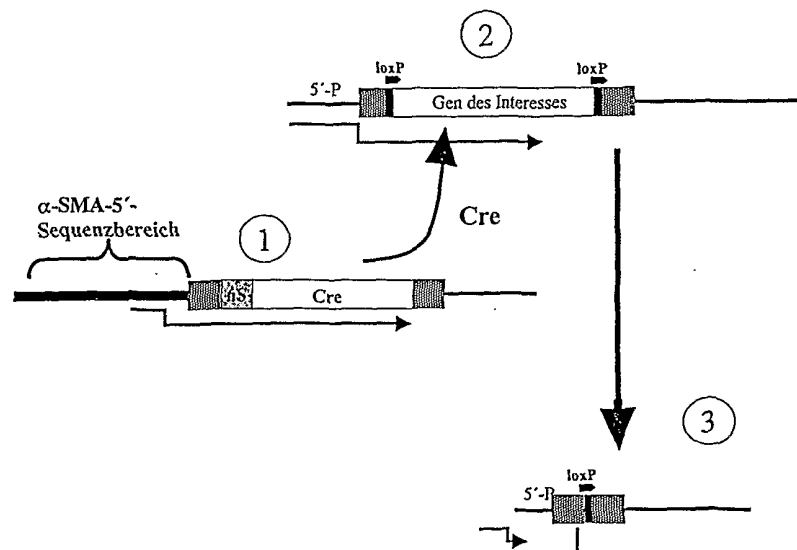


Fig. 4b

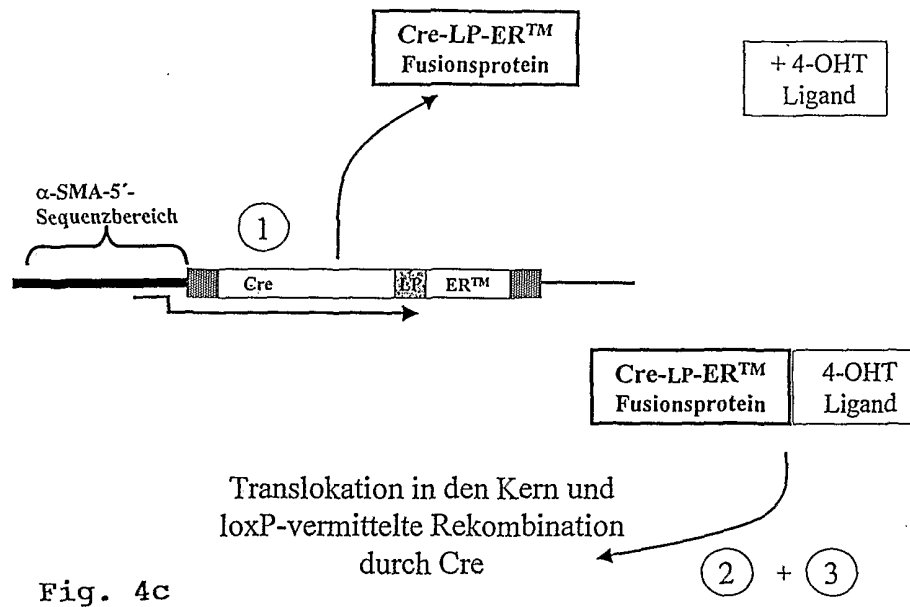


Fig. 4c

Fig. 5

A:

ACGGTCCTTAAGCATGATATCAAGGGTCAGCGATAAACCAACAACATGCACGTGGACTGTACCTAAGGGTTAAACG
CAGTTACAGTGATTCTGACTTCTAAGTTCTCTTAGGGTAACATAGGCTGGTGAATCCTGATTACATACTTCCAT
ATGTAATACATACAGACTTCATTGATACTACACACAGACTCCAGACTACATACAATGTGGCTTCCATAAAATGAT
CACTCCTCTGCAGATTTCGAGGTGACCCAAGCATCTTTTGTATAGGCTACCTTTTGCAACAGTGTTGCCTTAAA
GTCCAGCTAGTCAGAGACAGGCCCTTCCTCATCTCAAGCCCTTAGCTAATGGACCAAGGCTAGCCTGACAGG
AAGAGCTGGCATCTTCTGAGGAATGTGCAAACCATGCCTGCGTCTGCTTCATGACACTAGCCCAGTGTCTGGGCA
TTTGAGCAGTTGTTCTGAGGGCTCAGGATGTTTATCCCCATAAGCAGCTGAAGTGCCTCCTGTTTCGAGAGCAGA
GCAGAGGAATGCAGTGGAAGAGACCCACGCTCTGGCCACCCAGATTAGAGAGTTTGTGCTGAGGTCCCTATATG
GTTGTGTTAGAGTGAACGGCCAGCTTCAGCCTGTCTTTGCTCCTTGTTTGGGAAGCGAGTGGGAGGGGATCAGAC
CAGGGGGCTATATAACCCCTTCAGCATTACAGCTCCCCAGACACCACCCACCCAGAGTGGAGAAGCCCAGCCAGTC
GCCATCAGGGTAAG

B:

ATGGTCCTTAATCATGCTGTTAAGGGTCAGTAAAAAGCCAGCAACATGCTGGAATGTTAAGGGTTAAAGCAGTTA
CAGTGATTCTGACTTCTAAGTTACTCTTTGGGCAACACAGGCTGGTTAATCCTCACTACATACTTCAATTCTAT
TTCCACTCACCTCCCTCAAGAACTTGATTTATAAACAGTGTGCCTACCATAAAATCATGACTCCTCTGCATATTT
ATGGGTGACTCGAAGCATCTTTTGATCTAGGCTACCTTTTGCAACAGTGTTGCTTAAAAATCGCAGCTAGTCAGA
GACAGGCCCTTCCTTATCCAAGTCTCAGCTAATGGCCCAAAGACTAGCCTGACAGGGGCTGGCATCTTCTGAG
GAATGTGCAAACCGTGCCTGCGTCTGTCCCATGACACTAGCCCAGTGTCTGGGCATTTAAGCAGTTGTTCTGAGG
GCTTAGGATGTTTATCCCCATAACGAGCTGAGCTGCCTCCTGTTTCGGGAGCAGAACAGAGGAATGCAGTGGAAG
AGACCCACGCTCTGGCCACCCAGATTAGAGAGTTTTGTGCTGAGGTCCCTATATGGTTGTGTTAGAGTGAACGGC
CAGCTTCAGCCCGTCTTTGCTCCTTGTTTGGGAGGCGAGTGGGAGGGGATCAGAGCAAGGGGCTATATAACCCCTT
CAGCCTTCAGCCTCCCCGGGACACCACCCACCCAGAGTGGAGAAGCCCAGCCAGTCGCTGTCAGGGTAAG

C:

ATGGTCCCTACTTATGCTGCTAAATTGCTCGGTGACAAATTAGTAGACAAAGCTAATGCACAAAAAATGAATGT
AGTTATAGTAATGCAGAATTCCAAATTCCTCTTTGTAAGACATAGGCCGTGCAACCTTGTCTCCATACTTCAGTT
CCTGGTTTCATTGAACCAACACAAAGACACAATGTATAAGTACAATGTAGCTTCCATAAAAAACATCACTCCCTCT
ATGTATTTATAGACAGCTGAAGAAATATCTTTCTTCTTGCATCCTACCGTGGTAGAAGGGTTTTAAAGTCCGT
GCTAGGCAGAGGCAGCCCTTTCTGCCCCTTTCTGTTCTCAGTTTATAGGAAATGGCCTGAAATCCAGCATGAT
AGCAAGCTGGCATCCTCTGTGGAATGTCAATACCATGCCTGCATCTGCCCATTACCCTAGCTCAGTGTCTCTGGG
CATTTCTGCAGTTGTTCTGAAGGCTTGGCGTGTCTTCTCCACAAAGCGGCTGAAGTGCCTCCCGTTTCATGAGC
AGACCAGTGGAATGCAGTGGAAGAGACCCACGCTCCGGCCACCCAGATTAGAGAGTTTTGTGCTGAGGTCCCTAT
ATGGTTGTGTTAGACTGAACGACAGGCTCAAGTCTGTCTTTGCTCCTTGTTTGGGAAGCAAGTGGGAGGAGAGCA
GGCCAAGGGGCTATATAACCCCTTCAGCTTTTCAGCTTCCCTGAACACCACCCAGTGTGGAGCAGCCAGCCAAGCA
CTGTGTCAGGGTAAG

D:

ACACTAGGATGAAGCTTGTCCACAGTTTCTAGTGCTTTGGAAATAAACTGATGGAGACAGGATATTGATTGTCAC
CCATTACAGGCTAGGGACACCATAACAACCTGTTAGCAGAACGTTTACACAGCCTTCAAAGACCCCTACCATGAAC
CCTATGCAACAGCAGGTACTTCTTTTAGTATCCCCCAGTGACAGACCTTTTAAGTGAATTTGTGGCAAAATTCAG
TAGCTGTTTAGCTTGCCGAAAGTATTCTCATTTGCTTTGGTCCAAATCTTAACTAATGCAAAGTGTCTCCTTAAA
AACACTTTCCCTATTACAAATGACTGCTCTTTAGTTTTCACTCTGCCTCTTGATGTTCTGTGAAGGCCAGGG
CCTCTCTCTTGTGTTGAACGTGTGCTCTTCTGACAGAGGGTGTCTGTCCAGGCACGCTTTTCTTGCTGCATT
TTAGCAAGTTCTGCAGTGTGTTATCTTACACAGCTGAAAGTCTCCTCCTGTTTCATGAGCTCTGCGTTGGAATGCA
GTGGAAGGGACTGACGCCTGTGACCCAGATTAGAGGTTTTGTAAATAAGGTCCCTATATGGTTTTGTAGAGAC
TTCGGCTCTGTCTCTCATCTCTGCTCCTTGTTTGGGAGGCTGGTGGGAGGAGAAGAGCTGAAGGGGCTATATA
ACCCTGGTGCTTTTGGATACACAGTGCACCATCCAGAGCTGCTATCCCAGCCAAGCACTGTGTCAGGGTAAG

Fig. 6

```

RATTE 5'..ACGGTCCTTAAGCATGATATCAAGGGTCAGCGATAAACCAACAACATGCACGTGGACTGT
MAUS 5'..-T-----T-----C-G-T-----TA-A--G--G---G-----A---
MENSCH 5'..-T-----C--CTT---C-GCT--ATTG-TCG-TG-CAAATTAGTAGACA-AGCTAATGCA
HUHN... 5'..--AC-AGGATGAAGCTTGTC--CA-T--CTA-TGCTTTGG-AATA-ACTGATG-AGACAG

RATTE ACCTAAGGGTTAACGCAGTTACAGTGATTCTGACTTCTAAGTTCCTCTTAGGGTAACATA
MAUS -----A-----A-----T---C---C-
MENSCH C-AA--AAA-G--T-T-----T--A--G--A--A--C--A-----T-TAAG-----
HUHN GATATT-AT-GTCAC-CA-----GCTAGGG-CACCA---CAA---G---CAG---G-T

RATTE GGCTGGTGAATCCTGATTACATACTTCCATATGTAATACATACAGACTTCATTGATACTA
MAUS -----T-----C-C----- -AT-C-TATT-C--C-CACCTCC
MENSCH ---CT--C--C-T--TC-C----- -GT-C-T-GT-----AC---A-
HUHN TA-ACAGCCT--AAAGACC-TAC-ATGAACCCTATGC-ACAG---GTACTTC-TT--G--

RATTE CACACAGACTCCAGACTACA TACAATGTGGCTTCCATAAAATGATCACTCC TCTGCAG
MAUS -T--AGA--TTG-TTTATAA ---G---C--A-----C--G-----T
MENSCH ---A---A-A-TGTATA-G-----A-----AC-----C--ATGT
HUHN T -C-CC-AGTGCAGACCTTT--AGTGAATTTG-GGCA--T-C-GT-GCTGT-TA--TT

RATTE ATTCGCAGGTGAC CCAAGC ATCTTTTGTATAGGCTACCTTTTGCAACAGTGTGCCT
MAUS ---TATG-----T-G-----A-C-----
MENSCH ---TAT--AC---TGA-G-AAT-----CT-CT-T-CA-G-TACCGTGGTAGAA- G-TT-
HUHN GCCGAA--TATT-T-ATT--TTTGG-CCAAA-C-TTAAC-AA-GCAAAGTGTG-CCTAAA

RATTE T AAAGTCCCAGCTAGTCAGAGACAGGCCCTTCCTCATCTCAAGCCCTT A
MAUS -A--A--G-----T---T---C
MENSCH -A-----GT-----G-----G--- -T--GCC-CTTTCTGT-CTCAGTTTATT-
HUHN AACACT-T--CTA-TACA-AT---TGCT-T--AGTT-TCACTCTG-C-CTTGGATGTTG

RATTE GCTAATGGACCCAAAGGCTAGCCTGACAGGAAGAGCTGGCATCTTC TGAGGAATGTGCA
MAUS -----C--A---A-----G-----
MENSCH -GA-----C-TG--TT-C--A--T--C- -----C--T-----
HUHN CTGTGAA-G--AGGGCCTCTCT--CTTGTTTGA-CGTGTGC-----C---CAG-G-GTGT

RATTE AACCATGCCTGCGTCTGCTTCATGACACTAGCCCAGTGTG TGGGCATTTGAGCAGTTG
MAUS ---G-----TCC-----A-----
MENSCH -----A-----C--T--C-----T-----TC-----CT-----
HUHN CTGTCCCAGGCACG--TT-CTTGCTGCA-TT -A-CA-G--CT---

RATTE TTCTGAGGGCTCAGGATGTTTATC CCCATAAGCAGCTG AACT GCCTCCTGTTTCGAG
MAUS -----T-----CG-----G-----G-
MENSCH -----A---TG-CG-----T---C-G-G--- -C---AT-
HUHN -----T ---CA-----A-GTCT-----AT-

RATTE AGCAGAGCAGAGGAATGCAGTGAAGAGACCCAGGCCTCTGGCCACCCAGATTAGAGAGT
MAUS -----A-----
MENSCH -----C--T-----C-----
HUHN ---TCT-GTT-----G--TG--G- -T-G-----GT-

RATTE TTTGTGCTGAGGTCCCTATATGGTTGTGTTAGAGTGAACGGCCAGCTTCAGCCTGTCTTT
MAUS -----C-----A-AG--CA--T-----
MENSCH -----AA-A-----T-----ACTT---TCTC-CTCT-TCA--C-
HUHN

RATTE GCTCCTTGTGTTGGGAAGCGAGTGGGAGGGGATCAGACCAGGGGGCTATATAACCCCTTCAG
MAUS -----G-----G--A-----
MENSCH -----A-----A--G--G--A-----
HUHN -----G--TG-----A--AG--CTG-A-----GTT-

RATTE CATTTCAGCCTCCCC AGACACCACCCACCCAGAGTGGAGAAGCCAGCCAGTCGCCATCA
MAUS -C-----GG-----TG-----
MENSCH -T-----T---T GA----- -T-----C-----AG-A-TG--
HUHN -T--TG-ATA-A- AGTG----- T-----CT-CT-TC-----AG-A-TG--

RATTE GGGTAAG...3'
MAUS -----...3'
MENSCH -----3'
HUHN -----...3'

```

FIG. 7

A:

			TGATATCAA	GGGTCAGCGA	TAAACCAACA	ACATGCACGT	-660
GGACTGTACC	TAAGGGTTAA	CGCAGTTACA	GTGATTCTGA	CTTCTAAGTT	CCTCTTAGGG		-600
TAACATAGGC	TGGTGAATCC	TGATTACATA	CTTCCATATG	TAATACATAC	AGACTTCATT		-540
GATACTACAC	ACAGACTCCA	GA CTACATAC	AATGTGGCTT	CCATAAAATG	ATCACTCCTC		-480
TGCAGATTCTG	CAGGTGACCC	AAGCATCTTT	TGTTATAGGC	TACCTTTTGC	AACAGTGTTG		-420
CCTTAAAGTC	CCAGCTAGTC	AGAGACAGGC	CCTTCCTCAT	CTCAAGCCCT	TAGCTAATGG		-360
ACCCAAAGGC	TAGCCTGACA	GGAAGAGCTG	GCATCTTCTG	AGGAATGTGC	AAACCATGCC		-300
TGCGTCTGCT	CCATGGCACT	AGCCCAGTGT	CTGGGCATTT	GAGCAGTTGT	TCTGAGGGCT		-240
CAGGATGTTT	ATCCCCATAA	GCAGCTGAAC	TGCCTCCTGT	TTCGAGAGCA	GAGCAGAGGA		-180
ATGCAGTGGA	AGAGACCCAG	GCCTCTGGCA	CCCAGATTAG	AGAGTTTTGT	GCTGAGGTCC		-120
CTATATGGTT	GTGTTAGAGT	GAACGGCCAG	CTTCAGCCTG	TCTTTGCTCC	TTGTTTGGA		-60
AGCGAGTGGG	AGGGGATCAG	ACCAGGGGGC	TATATAACCC	TTCAGCATTC	AGCCTCCCCA		1
GACACCACCC	ACCCAGA						+18

B:

						GGTCC	-120
CTATATGGTT	GTGTTAGAGT	GAACGGCCAG	CTTCAGCCTG	TCTTTGCTCC	TTGTTTGGA		-60
AGCGAGTGGG	AGGGGATCAG	ACCAGGGGGC	TATATAACCC	TTCAGCATTC	AGCCTCCCCA		1
GACACCACCC	ACCCAGA						+18

C:

						GAGCAGAGGA	-180
ATGCAGTGGA	AGAGACCCAG	GCCTCTGGCA	CCCAGATTAG	AGAGTTTTGT	GCTGAGGTCC		-120
CTATATGGTT	GTGTTAGAGT	GAACGGCCAG	CTTCAGCCTG	TCTTTGCTCC	TTGTTTGGA		-60
AGCGAGTGGG	AGGGGATCAG	ACCAGGGGGC	TATATAACCC	TTCAGCATTC	AGCCTCCCCA		1
GACACCACCC	ACCCAGA						+18

D:

			TGAAC	TGCCTCCTGT	TTCGAGAGCA	GAGCAGAGGA	-180
ATGCAGTGGA	AGAGACCCAG	GCCTCTGGCA	CCCAGATTAG	AGAGTTTTGT	GCTGAGGTCC		-120
CTATATGGTT	GTGTTAGAGT	GAACGGCCAG	CTTCAGCCTG	TCTTTGCTCC	TTGTTTGGA		-60
AGCGAGTGGG	AGGGGATCAG	ACCAGGGGGC	TATATAACCC	TTCAGCATTC	AGCCTCCCCA		1
GACACCACCC	ACCCAGA						+18

E:

						GGGCT	-240
CAGGATGTTT	ATCCCCATAA	GCAGCTGAAC	TGCCTCCTGT	TTCGAGAGCA	GAGCAGAGGA		-180
ATGCAGTGGA	AGAGACCCAG	GCCTCTGGCA	CCCAGATTAG	AGAGTTTTGT	GCTGAGGTCC		-120
CTATATGGTT	GTGTTAGAGT	GAACGGCCAG	CTTCAGCCTG	TCTTTGCTCC	TTGTTTGGA		-60
AGCGAGTGGG	AGGGGATCAG	ACCAGGGGGC	TATATAACCC	TTCAGCATTC	AGCCTCCCCA		1
GACACCACCC	ACCCAGA						+18

FIG. 7 (Fortsetzung)

F:

```

                                TCCTC -480
TGCAGATTTCG CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTTG -420
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAAGCCCT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGCGTCTGCT CCATGGCACT AGCCCAGTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGAGGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCCATAA GCAGCTGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGA AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTTGT GCTGAGGTCC -120
CTATATGGTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTTCAGCCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA - 60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCACCC ACCCAGA +18

```

G:

```

                                CA GACTACATAC AATGTGGCTT CCATAAAATG ATCACTCCTC -480
TGCAGATTTCG CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTTG -420
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAAGCCCT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGCGTCTGCT CCATGGCACT AGCCCAGTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGAGGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCCATAA GCAGCTGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGA AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTTGT GCTGAGGTCC -120
CTATATGGTT GTGTTAGAGT GAACGGCCAG CTTCAGCCTG TCTTTGCTCC TTGTTTGGGA - 60
AGCGAGTGGG AGGGGATCAG ACCAGGGGGC TATATAACCC TTCAGCATTC AGCCTCCCCA 1
GACACCACCC ACCCAGA +18

```

H:

```

                                GAGCAGAGGA -180
ATGCAGTGGA AGAGACCCAG GCCTCTGGCA CCCAGATTAG AGAGTTTTGT GCTGA

```

I:

```

                                TGAAC TGCCTCCTGT TTCGAGAGCA -180

```

J:

```

                                GGGCT -240
CAGGATGTTT ATCCCCATAA GCAGC

```

K:

```

                                TCCTC -480
TGCAGATTTCG CAGGTGACCC AAGCATCTTT TGTTATAGGC TACCTTTTGC AACAGTGTTG -420
CCTTAAAGTC CCAGCTAGTC AGAGACAGGC CCTTCCTCAT CTCAAGCCCT TAGCTAATGG -360
ACCCAAAGGC TAGCCTGACA GGAAGAGCTG GCATCTTCTG AGGAATGTGC AAACCATGCC -300
TGCGTCTGCT CCATGGCACT AGCCCAGTGT CTGGGCATTT GAGCAGTTGT TCTGA

```

L:

```

                                CA GACTACATAC AATGTGGCTT CCATAAAATG ATCAC -480

```

M:

```

                                TGATATCAA GGGTCAGCGA TAAACCAACA ACATGCACGT -660
GGACTGTACC TAAGGGTTAA CGCAGTTACA GTGATTCTGA CTTCTAAGTT CCTCTTAGGG -600
TAACATAGGC TGGTGAATCC TGATTACATA CTTCCATATG TAATACATAC AGACTTCATT -540
GATACTACAC ACAGACTC

```

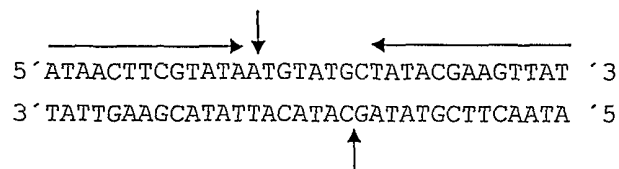
Fig. 8a

TATAAATAAACCGCTCTCTT AACCTCTTT ATGCTTTCTT CTTTTTATA CAGCTCTCG
 GCAACGTGCT GGTGTGTGG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA AGAATTC [ACTCCTCAGGTG

Fig. 8b

CCCTTT] G TCGGGGGGG AGCGGCTCG GGGTGCGTG
 CGTGTGTGTG TCGGTGGGG GCGCCGCGTG CCGCCGCGCG TCGCCGCGCG CTGTGAGCGC
 TCGCGGGCGG GCGCGGGGCT TTGTGCGCT CCGGTGTGCG CAGCGGAGC GCGCGCGGGG
 GCGGTGCGCG GCGGTGCGGG GGGGTGCGG GGGGAACAA GCGTGCGTGC GGGGTGTGTG
 CGTGGGGGGG TGAGCAGGGG GTGTGGGCG GCGGTGCGG CTGTAACCC CCGCTGCACC
 CCGCTCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGTCCGT GCGGGGCGTG
 GCGCGGGGCT CCGCTGCGG GCGGGGGGT GCGGGCAGGT GGGGTGCGG GCGGGGCGG
 GCGCGCGCTG GCGCGGGGAG GCGTCGGGG AGGGGCGCG GCGCCCGGA GCGCGGCGG
 CTGTGAGGG GCGCGGAGCC GCGCCATTG CCTTTTATG TAATCGTGC AGAGGGCGCA
 GGGACTTCCT TTGTCCCAA TCTGGCGGG CCGAATCTG GAGGGCGCG CCGACCCCC
 TCTAGCGGG GCGGGCGAG CCGTGCGGG CCGGCAGGA GGAATGGG GGGAGGGGC
 TTGTGCGTC GCGCGCGCG CGTCCCTTC TCCATCTCA GCGTCGGGG TCGCGCAGGG
 GGAAGGCTG CTTCGGGGG GACGGGGAG GCGGGGTG GCGTTCTGG GTGTGACCG
 CGG [GGTTTA TATCTCCCT TCTCTGTTC TCGCAGCCA GCC ATG....

Fig. 8c



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Odenthal, Margarete

5 <120> Genexpression, Genomalteration und Reporterexpression
in Myofibroblasten und Myofibroblasten-ähnlichen Zellen

<130> 011547wo/JH/ml

10 <140>

<141>

<160> 41

15 <170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 764

<212> DNA

20 <213> Rattus norvegicus

<400> 1

```

acggtcctta agcatgatat caaggggtcag cgataaacca acaacatgca cgtggactgt 60
acctaagggg taacgcagtt acagtgattc tgacttctaa gttcctctta gggtaacata 120
25 ggctgggtgaa tcctgattac atacttccat atgtaataca tacagacttc attgatacta 180
cacacagact ccagactaca tacaatgtgg cttccataaa atgatcactc ctctgcagat 240
tcgcagggtga cccaagcatc ttttggtata ggctaccttt tgcaacagtg ttgccttaaa 300
gtcccagcta gtcagagaca ggcccttcct catctcaagc ccttagctaa tggacccaaa 360
ggctagcctg acaggaagag ctggcatctt ctgaggaatg tgcaaacat gcctgcgtct 420
30 gcttcatgac actagcccag tgtctgggca tttgagcagt tgttctgagg gctcaggatg 480
tttatcccca taagcagctg aactgcctcc tgtttcgaga gcagagcaga ggaatgcagt 540
ggaagagacc cacgctctgg ccaccagat tagagagttt tgtgctgagg tccctatatg 600
gttgtgttag agtgaacggc cagcttcagc ctgtctttgc tccttgtttg ggaagcgagt 660
gggaggggat cagaccaggg ggctatataa cccttcagca ttcagcctcc ccagacacca 720
35 cccaccacaga gtggagaagc ccagccagtc gccatcaggg taag 764

```

<210> 2

<211> 745

40 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

```

atggtcctta atcatgctgt taaggggtcag taaaaagcca gcaacatgct ggaatgttaa 60
45 ggggttaaagc agttacagtg attctgactt ctaagttact ctttgggcaa cacaggctgg 120
ttaatcctca ctacatactt caattcctat ttccactcac ctccctcaag aacttgattt 180
ataaacagtg tgcctaccat aaaatcatga ctccctcgca tatttatggg tgactogaag 240
catcttttga tctaggctac cttttgcaac agtgttgctt aaaaatcgca gctagtcaga 300
gacaggccct tccttatcca agtcctcagc taatggccca aaagactagc ctgacagggg 360
50 ctggcatctt ctgaggaatg tgcaaacctg gcctgcgtct gtcccatgac actagcccag 420
tgtctgggca ttttaagcagt tgttctgagg gcttaggatg tttatcccca taacgagctg 480
agctgcctcc tgtttcgggg gcagaacaga ggaatgcagt ggaagagacc cacgctctgg 540
ccaccagat tagagagttt tgtgctgagg tccctatatg gttgtgttag agtgaacggc 600
cagcttcagc cgtcttttgc tccttgtttg ggaggcgagt gggaggggat cagagcaagg 660
55 ggctatataa cccttcagcc ttcagcctcc cggggacacc acccaccag agtggagaag 720
cccagccagt cgctgtcagg gtaag 745

```

<210> 3
 <211> 763
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3
 atggtcccta cttatgctgc taaattgctc ggtgacaaat tagtagacaa agctaatagca 60
 caaaaaaatg aatgtagtta tagtaatgca gaattccaaa ttctctcttg taagacatag 120
 gcctgtcaac cttgtctcca tacttcagtt cctggtttca ttgaaccaac acaaagacac 180
 10 aatgtataag tacaatgtag cttccataaa aacatcactc cctctatgta tttatagaca 240
 gctgaagaaa tatctttctt ctttgcattc taccgtggta gaagggtttt aaaagtccgt 300
 gctaggcaga ggcagccctt tctgcccctt tctgttctca gtttattagg aaatggcctg 360
 aaattccagc atgatagcaa gctggcatcc tctgtggaat gtcaatacca tgccctgcac 420
 tgcccattac cctagctcag tgtctctggg catttctgca gttgttctga aggcctggcg 480
 15 tgtttatctc ccacaagcgg ctgaactgcc tcccgtttca tgagcagacc agtgggaatgc 540
 agtgggaagag acccagctc cggccaccca gattagagag ttttgtgctg aggtccctat 600
 atggttgtgt tagactgaac gacaggctca agtctgtctt tgctccttgt ttgggaagca 660
 agtgggagga gagcaggcca aggggctata taacccttca gctttcagct tccctgaaca 720
 ccaccagtg tggagcagcc cagccaagca ctgtcagggt aag 763

20

<210> 4
 <211> 747
 <212> DNA
 25 <213> Gallus gallus

<400> 4
 acactaggat gaagcttgct cacagttcct agtgcttttg aaataaactg atggagacag 60
 gatattgatt gtcacccatt acaggctagg gacaccataa caacctgtta gcagaacgtt 120
 30 tacacagcct tcaaagaccc taccatgaac cctatgcaac agcaggtagt tcttttagta 180
 tccccccagt gcagaccttt taagtgaatt tgtggcaaaa ttcagtagct gtttagcttg 240
 ccgaaagtat tctcattgct ttgggtccaa tctttaacta atgcaaagtg tctccttaaa 300
 aacactttcc ctattacaaa tgactgctct ttcagttttc actctgcctc ttggatgttc 360
 ctgtgaaggc cagggcctct ctctcttggt tgaacgtgtg ctcttcctga cagaggggtg 420
 35 ctgtcccagg cacgcttttc ttgctgcatt ttagcaagtt ctgcagtgtt tatcttacac 480
 agctgaaagt ctctctctgt ttcattagct ctgcgttgga atgcagtgga agggactgac 540
 gcctgtcgac ccagattaga ggtttttgta ataaggtccc tatatgggtt tgttagagac 600
 ttcggtctct tctctctcat ctctgctcct tgtttgggag gctgggtggg ggagaagagc 660
 tgaaggggct atataaccct ggtgcttttg gatacacagt gcaccatccc agagctgcta 720
 40 tccccagcca agcactgtca gggtaag 747

<210> 5
 <211> 716
 45 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5
 tgatatcaag ggtcagcgt aaaccaacaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60
 50 gcagttacag tgattctgac ttctaagttc ctcttagggt aacatagggt ggtgaatcct 120
 gattacatac ttccatatgt aatacatata gacttcattg atactacaca cagactccag 180
 actacataca atgtggcttc cataaaatga tcaactctct gcagattcgc aggtgaccca 240
 agcatctttt gttataggct accttttgca acagtgttg cttaaagtcc cagctagtca 300
 gagacaggcc ctctctcatc tcaagccctt agctaattga ccaaaggct agcctgacag 360
 55 gaagagctgg catcttctga ggaatgtgca aaccatgcct gcgtctgctc catggcacta 420
 gccagtgctc tgggcatttg agcagttggt ctgagggctc aggatgttta tcccataag 480
 cagctgaact gcctcctgtt tcgagagcag agcagaggaa tgcagtggaa gagaccag 540
 cctctggcac ccagattaga gagttttgtg ctgaggtccc tatatgggtt tgttagagt 600
 aacggccagc ttcagcctgt ctttgctcct tgtttgggaa gcgagtggga ggggatcaga 660

ccaggggggct atataaccct tcagcattca gcctccccag acaccacca cccaga 716

<210> 6

5 <211> 142

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

10 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gcctgtcttt gctccttggt 60
 tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag ggggctatat aacccttcag cattcagcct 120
 cccagacac caccaccca ga 142

15 <210> 7

<211> 207

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

20 <400> 7

gagcagagga atgcagtgga agagaccag gcctctggca cccagattag agagttttgt 60
 gctgaggtcc ctatatggtt gtgttagagt gaacggccag cttcagcctg tctttgctcc 120
 ttgtttggga agcgagtggg aggggatcag accagggggc tatataacc cttcagcattc 180
 agcctcccca gacaccaccc acccaga 207

25

<210> 8

<211> 232

<212> DNA

30 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

35 tgaactgcct cctgtttcga gagcagagca gaggaatgca gtggaagaga cccaggcctc 60
 tggcaccag attagagagt tttgtgctga ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg 120
 gccagcttca gcctgtcttt gctccttggt tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag 180
 ggggctatat aacccttcag cattcagcct cccagacac caccaccca ga 232

<210> 9

40 <211> 262

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

45 gggctcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgcct cctgtttcga gagcagagca 60
 gaggaatgca gtggaagaga cccaggcctc tggcaccag attagagagt tttgtgctga 120
 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gcctgtcttt gctccttggt 180
 tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag ggggctatat aacccttcag cattcagcct 240
 cccagacac caccaccca ga 262

50

<210> 10

<211> 502

<212> DNA

55 <213> Rattus norvegicus

<400> 10

tcctctgcag attcgcaggt gacccaagca tcttttggtta taggctacct tttgcaacag 60
 tggtgcctta aagtccagc tagtcagaga caggcccttc ctcatctcaa gcccttagct 120

```

aatggaccca aaggctagcc tgacaggaag agctggcatc ttctgaggaa tgtgcaaacc 180
atgcctgCGT ctgctccatg gcactagccc agtgtctggg catttgagca gttgttctga 240
gggctcagga tgtttatccc cataagcagc tgaactgcct cctgtttcga gagcagagca 300
gaggaatgca gtggaagaga cccaggcctc tggcaccagc attagagagt tttgtgctga 360
5 ggtccctata tggttgtgtt agagtgaacg gccagcttca gcctgtcttt gctccttggt 420
tgggaagcga gtgggagggg atcagaccag ggggctatat aacccttcag cattcagcct 480
ccccagacac caccaccca ga 502

10 <210> 11
    <211> 539
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

15 <400> 11
    cagactacat acaatgtggc ttccataaaa tgatcactcc tctgcagatt cgcagggtgac 60
    ccaagcatct tttgttatag gctacctttt gcaacagtgt tgccttaaag tcccagctag 120
    tcagagacag gcccttcctc atctcaagcc cttagctaat ggacccaaag gctagcctga 180
    caggaagagc tggcatcttc tgaggaatgt gcaaaccatg cctgcgtctg ctccatggca 240
20 ctagcccagt gtctgggcat ttgagcagtt gttctgaggg ctcaggatgt ttatecccat 300
    aagcagctga actgcctcct gtttcgagag cagagcagag gaatgcagtg gaagagaccc 360
    aggctctgg caccagatt agagagtttt gtgctgaggt ccctatatgg ttgtgttaga 420
    gtgaacggcc agcttcagcc tgtctttgct ccttgtttgg gaagcgagtg ggaggggata 480
    agaccagggg gctatataac ccttcagcat tcagcctccc cagacaccac ccaccaga 539

25
    <210> 12
    <211> 65
    <212> DNA
30 <213> Rattus norvegicus

    <400> 12
    gagcagagga atgcagtgga agagaccag gcctctggca cccagattag agagttttgt 60
    gctga 65

35
    <210> 13
    <211> 25
    <212> DNA
40 <213> Rattus norvegicus

    <400> 13
    tgaactgcct cctgtttcga gagca 25

45
    <210> 14
    <211> 30
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

50
    <400> 14
    gggctcagga tgtttatccc cataagcagc 30

55
    <210> 15
    <211> 240
    <212> DNA
    <213> Rattus norvegicus

```

<400> 15
 tcctctgcag attcgcaggt gacccaagca tcttttggtta taggctacct tttgcaacag 60
 tgttgccctta aagtcccagc tagtcagaga caggcccttc ctcatctcaa gcccttagct 120
 aatggacca aaggctagcc tgacaggaag agctggcatc ttctgaggaa tgtgcaaacc 180
 5 atgcctgcgt ctgctccatg gcaactagccc agtgtctggg catttgagca gttgttctga 240

<210> 16
 <211> 37
 10 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<400> 16
 cagactacat acaatgtggc ttccataaaa tgatcac 37
 15

<210> 17
 <211> 177
 <212> DNA
 20 <213> Rattus norvegicus

<400> 17
 tgatatcaag ggtcagcgat aaaccaacaa catgcacgtg gactgtacct aagggttaac 60
 gcagttacag tgattctgac ttctaagttc ctcttagggg aacataggct ggtgaatcct 120
 25 gattacatac ttccatatgt aatacatata gacttcattg atactacaca cagactc 177

<210> 18
 <211> 697
 30 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 18
 tgctgttaag ggtcagtaaa aagccagcaa catgctggaa tgtaagggt taaagcagtt 60
 35 acagtgattc tgacttctaa gttactcttt gggcaacaca ggctgggtta tcctcactac 120
 atacttcaat tcctatttcc actcacctcc ctcaagaact tgatttataa acagtgtgcc 180
 taccataaaa tcatgactcc tctgcataatt tatgggtgac tcgaagcatc ttttgatcta 240
 ggctaccttt tgcaacagtg ttgcttaaaa atcgagcta gtcagagaca ggcccttcct 300
 tatccaagtc ctcagctaatt ggcccaaaag actagcctga caggggctgg catcttctga 360
 40 ggaatgtgca aaccgtgcct gcgtctgtcc catgacacta gccagtgctc tgggcattta 420
 agcagttggt ctgagggtct aggatgttta tccccataac gagctgagct gcctcctgtt 480
 tcgggagcag aacagaggaa tgcagtggaa gagaccacg ctctggccac ccagattaga 540
 gagttttgtg ctgagggtccc tataatggttg tgtttagagt aacggccagc ttcagcccgt 600
 ctttgctcct tgtttgggag gcgagtggga ggggatcaga gcaaggggct atataaccct 660
 45 tcagccttca gcctccccgg gacaccaccc acccaga 697

<210> 19
 <211> 715
 50 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 tgctgctaaa ttgctcgggt acaaattagt agacaaagct aatgcacaaa aaaatgaatg 60
 55 tagttatagt aatgcagaat tccaaattcc tctttgtaag acataggcct gtcaaccttg 120
 tctccatact tcagttcctg gtttcattga accaacacaa agacacaatg tataagtaca 180
 atgtagcttc cataaaaaaca tcaactccctc tatgtattta tagacagctg aagaaatata 240
 tttcttcttt gcactctacc gtggtagaag ggttttaaaa gtccgtgcta ggagaggca 300
 gccctttctg cccctttctg ttctcagttt attaggaat ggctgaaat tccagcatga 360

tagcaagctg gcatcctctg tggaatgtca ataccatgcc tgcattctgcc cattacccta 420
 gctcagtgct tctgggcatt tctgcagttg ttctgaaggc ttggcgtggt tatctccac 480
 aagcggctga actgcctccc gtttcatgag cagaccagtg gaatgcagtg gaagagacc 540
 acgctccggc caccagatt agagagttt gtgctgaggt ccctatatgg ttgtgttaga 600
 5 ctgaacgaca ggctcaagtc tgtctttgct ccttgtttgga gaagcaagt ggaggagagc 660
 aggccaagg gctatataac ccttcagctt tcagcttccc tgaacaccac ccagt 715

<210> 20
 10 <211> 699
 <212> DNA
 <213> Gallus gallus

<400> 20
 15 cttgtccaca gttcctagt gtttggaaat aaactgatgg agacaggata ttgattgtca 60
 ccattacag gctagggaca ccataacaac ctgttagcag aacgtttaca cagccttcaa 120
 agaccctacc atgaacccta tgcaacagca ggtacttctt ttagtatccc ccagtgcag 180
 accttttaag tgaatttggt gcaaaattca gtactgttt agcttgccga aagtattctc 240
 attgcttttg tccaaatctt taactaatgc aaagtgtctc cttaaaaaca ctttccctat 300
 20 tacaatgac tgctctttca gttttcactc tgctctttgg atgttcctgt gaaggccagg 360
 gcctctctct cttgtttgaa cgtgtgtctt tcctgacaga ggggtgtctgt ccaggcacg 420
 ctttctctgc tgcattttag caagtctgac agtgtttatc ttacacagct gaaagtctcc 480
 tcctgtttca tgagctctgc gttggaatgc agtggaagg actgacgcct gtcgaccag 540
 attagagggt tttgtaataa ggtccctata tggttttgtt agagacttcg gctctgtctc 600
 25 tctcatctct gctccttggt tgggagggtg gtgggaggag aagagctgaa ggggctatat 660
 aaccctggtg cttttggata cacagtgcac catcccaga 699

<210> 21
 30 <211> 845
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EGFP

<400> 21
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccattcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 40 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggccacc 180
 ctctgaccca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 45 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcattcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagaag 720
 50 cttagccatg gcttcccgc ggagggtgag gagcaggatg atggcacgct gccatgtct 780
 tgtgcccagg agagcgggat ggaccgtcac cctgcagcct gtgcttctgc taggatcaat 840
 gtgta 845

55 <210> 22
 <211> 666
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Red
Fluorescent Protein

5 <400> 22
aagaatgtta tcaaggagtt catgaggttt aaggttcgca tggaaggaac ggtcaatggg 60
cacgagtttg aaatagaagg cgaaggagag gggaggccat acgaaggcca caataccgta 120
aagcttaagg taaccaaggg gggacctttg ccatttgctt gggatatttt gtcaccacaa 180
tttcagtatg gaagcaagggt atatgtcaag caccctgccg acataccaga ctataaaaaag 240
10 ctgtcatttc ctgaaggatt taaatgggaa aggggtcatga actttgaaga cgggtggcgtc 300
gttactgtaa cccaggattc cagtttgca gattggctgtt tcactacaa ggtcaagttc 360
attggcgtga actttccttc cgatggacct gttatgcaaa agaagacaat gggctgggaa 420
gccagcactg agcgtttgta tcctcgtgat ggcgtgttga aaggagagat tcataaggct 480
ctgaagctga aagacgggtg tcattaccta gttgaattca aaagtattta catggcaaag 540
15 aagcctgtgc agctaccagg gtactactat gttgactcca aactggatat aacaagccac 600
aacgaagact atacaatcgt tgagcagtat gaaagaaccg agggacgcca ccactctgtt 660
ctttag 666

20 <210> 23

<211> 719

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

25 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: GFP

<400> 23
atgggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtgggtgc ccatcctggg cgagctggac 60
30 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca ccctgaccga cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccca ccacatgaag 240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
35 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaacttcaa cagccacaa gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagca ccagtcctgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatgggtc 660
40 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagta 719

<210> 24

<211> 937

45 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Renilla
Luciferase

<400> 24
atgacttcga aagtttatga tccagaacaa aggaacgga tgataactgg tccgcagtgg 60
tgggccagat gtaaacaaat gaatgttctt gattcattta ttaattatta tgattcagaa 120
55 aaacatgcag aaaatgctgt tattttttta catggtaacg cggcctcttc ttatttatgg 180
cgacatgttg tgccacatat tgagccagta gcgcggtgta ttataccaga cttatttggt 240
atgggcaaat caggcaaatc tggtaatggg tcttataggt tacttgatca ttacaaatat 300
cttactgcat ggtttgaact tcttaattta ccaaagaaga tcatttttgt cggccatgat 360
tgggggtgctt gtttggcatt tcattatagc tatgagcatc aagataagat caaagcaata 420

gttcacgctg aaagtgtagt agatgtgatt gaatcatggg atgaatggcc tgatattgaa 480
 gaagatattg cgttgatcaa atctgaagaa ggagaaaaaa tggtttttga gaataaacttc 540
 ttcgtgga aaacattcaa atcaaaaatc atgagaaagt tagaaccaga agaatttgca 600
 gcatatcttg aaccattcaa agagaaagggt gaagtctgct gtccaacatt atcatggcct 660
 5 cgtgaaatcc cgttagtaaa aggtggtaaa cctgacgttg taaaaattgt taggaattat 720
 aatgcttata tacgtgcaag tgatgattta ccaaaaatgt ttattgaatc ggaccagga 780
 ttcttttcca atgctattgt tgaagggtgcc aagaagtttc ctaataactga atttgtcaaa 840
 gtaaaagggtc ttcatTTTTTc gcaagaagat gcacctgatg aaatgggaaa atatatcaaa 900
 tcgttcgttg agcgagttct caaaaatgaa caataat 937
 10

<210> 25
 <211> 3144
 <212> DNA
 15 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: beta
 Galactosidase
 20

<400> 25
 atgtcgttta ctttgaccaa caagaacgtg attttctgtt cccgtctggg aggcattggg 60
 ctggacacca gcaaggagct gctcaagcgc gatcccgctg ttttacaacg tcgtgactgg 120
 gaaaaccctg gcgttaccga acttaatcgc cttgcagcac atcccccttt cgcagctgg 180
 25 cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc 240
 gaatggcgct ttgcctggtt tccggcacca gaagcgggtg cggaaagctg gctggagtgc 300
 gatcttctcg aggcggatc tgctgctgct ccctcaaaact ggagatgca cgtttacgat 360
 gcgcccctct acaccaacgt aacctatccc attacgggtc atccgcccgt ttgtccacg 420
 gagaatccga cgggttggtt ctgctcaca tttaatgttg atgaaagctg gctacaggaa 480
 30 ggccagacgc gaattatttt tgatggcggt aactcggcgt ttcatctgtg gtgcaacggg 540
 cgctgggtcg gttacggcca ggacagctgt ttgcctgtg aatttgacct gagcgatttt 600
 ttacgcgcgc gagaaaaccg cctcgcggtg atggtgctgc gttggagtga cggcagttat 660
 ctggaagatc aggatatgtg gcggatgagc ggcatTTTTc gtgacgtctc gttgctgcat 720
 aaaccgacta cacaatcag cgatttccat gttgccactc gctttaatga tgatttcagc 780
 35 cgcgctgtac tggaggctga agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta 840
 acagtttctt tatggcaggg tgaacgcag gtccgcagcg gcaccgcgc tttcggcggg 900
 gaaattatcg atgagcgtgg tgggtatgcc gatcgcgtca cactacgtct gaacgtcgaa 960
 aaccgaaaac tgtggagcgc cgaaatcccg aatctctatc gtgcgggtgg tgaactgcac 1020
 accgcccagc gcacgctgat tgaagcagaa gcctgcgatg tcggtttccg cgaggtgcgg 1080
 40 attgaaaatg gtctgctgct gctgaacggc aagccgttgc tgattcgagg cgtaaccgt 1140
 cagcagcatc atctctgca tggtcagggtc atggatgagc agacgatggt gcagcatatc 1200
 ctgctgatga agcagaacaa ctttaacgcc gtgcgtgtgt cgcattatcc gaaccatccg 1260
 ctgtgtgaca cgctgtgcga ccgctacggc ctgtatgttg tggatgaagc caatattgaa 1320
 acccagggca tggtgccaat gaatcgtctg accgatgatc cgcgtgggt accggcgatg 1380
 45 agcgaacgcg taacgcgaat ggtgcagcgc gatcgtaatc acccgagtgt gatcatctgg 1440
 tcgctgggga atgaatcagg ccacggcgct aatcacgacg cgctgtatcg ctggatcaaa 1500
 tctgtcgatc cttcccgccc ggtgcagtat gaaggcggcg gagccgacac cacggccacc 1560
 gatattattt gcccgatgta cgcgcgcgtg gatgaagacc agcccttccc ggctgtgccc 1620
 aatgggtcca tcaaaaaatg gctttcgcta cctggagaga cgcgcccgt gatcctttgc 1680
 50 gaatacggcc acgcgatggg taacagtctt ggcggtttctg ctaaatactg gcaggcgttt 1740
 cgctcagtatc cccgtttaca gggcggtctc gtctgggact ggggtggatca gtcgctgatt 1800
 aaatatgatg aaaacggcaa cccgtggtcg gcttacggcg gtgatttttg cgatacgccg 1860
 aacgatcgcc agttctgtat gaacgggtctg gtctttgccc accgcacgcc gcatccagcg 1920
 ctgacggaag caaaacacca gcagcagttt ttccagttcc gtttatcccg gcaaaccatc 1980
 55 gaagtgacca gcgaatacct gttccgtcat agcgataacg agctcctgca ctggatgggtg 2040
 gcgctggatg gtaagccgct ggcaagcggg gaagtgcctc tggatgtcgc tccacaagggt 2100
 aaacagttga ttgaactgcc tgaactaccg cagccggaga gcgccgggca actctggctc 2160
 acagtacgcg tagtgcaacc gaacgcgacc gcattggtcag aagccgggca catcagcgcc 2220
 tggcagcagt ggcgtctggc ggaaaacctc agtgtgacgc tccccgcgc gtcacacgcc 2280

```

atccccgcac tgaccaccag cgaaatggat ttttgcatcg agctgggtaa taagcgttgg 2340
caattttaacc gccagtcagg ctttctttca cagatgtgga ttggcgataa aaaacaactg 2400
ctgacgccgc tgccgatca gttcacccgt gcaccgctgg ataacgacat tggcgtaagt 2460
gaagcgaccc gcattgaccc taacgcctgg gtcgaacgct ggaaggcggc gggccattac 2520
5 caggccgaag cagcgttgtt gcagtgcacg gcagatacac ttgctgatgc ggtgctgatt 2580
acgaccgctc acgcgtggca gcatcagggg aaaaccttat ttatcagccg gaaaacctac 2640
cggattgatg gtagtgggtca aatggcgatt accgttgatg ttgaagtggc gagcgataca 2700
ccgcatccgg ccgggattgg cctgaactgc cagctggcgc aggtagcaga gcgggtaaac 2760
tggtctggat tagggccgca agaaaactat cccgaccgcc ttactgccgc ctgttttgac 2820
10 cgctgggatc tgccattgtc agacatgtat acccgtacg tcttcccag cgaaaacggt 2880
ctgcgctgcg ggacgcgcga attgaattat ggccacacc agtggcgcg cgacttccag 2940
ttcaacatca gccgctacag tcaacagcaa ctgatggaaa ccagccatcg ccatctgctg 3000
cacgcggaag aaggcacatg gctgaatata gacggtttcc atatggggat tggtggcgac 3060
gactcctgga gcccgtcagt atcggcgga ttacagctga gcgcgggtcg ctaccattac 3120
15 cagttggtct ggtgtcaaaa ataa 3144

```

<210> 26

<211> 1558

20 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: SEAP

25

<400> 26

```

atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg aggctacagc tctccctggg catcatccca 60
gttgaggagg agaaccgga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct gggtgccgcc 120
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttcct gggcgatggg 180
30 atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg 240
gggcctgaga taccctggc catggaccgc tcccatatg tggctctgtc caagacatac 300
aatgtagaca aacatgtgcc agacagtggg gccacagcca cggcctacct gtgcgggggtc 360
aagggaact tccagaccat tggcttgagt gcagccgcc gctttaacca gtgcaacacg 420
acacgcccga acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcatgt 480
35 ggagtggtaa ccaccacag agtgcagcac gcctcgccag ccggcaccta cccccacacg 540
gtgaaccgca actggtactc ggacgcgcac gtgcctgcct cggcccgcca ggagggtgc 600
caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacattg acgtgatcct aggtggaggc 660
cgaaagtaca tgtttcgcat gggaacccca gaccctgagt acccagatga ctacagccaa 720
gggaggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaat ggctggcgaa gcgccagggt 780
40 gcccggtatg tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt ccctggacct gtctgtgacc 840
catctcatgg gtctctttga gcctggagac atgaaatacg agatccaccg agactccaca 900
ctggaccctt ccctgatgga gatgacagag gctgccctgc gcctgctgag caggaaaccc 960
cgcggttct tctcttctgt ggagggtggc cgcacgcacc atggtcatca tgaaagcagg 1020
gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttcgacgacg ccattgagag ggccggccag 1080
45 ctaccagcg agaggacac gctgagcctc gtcactgccg accactcca cgtcttctcc 1140
ttcgagggt acccctgcg agggagctcc atcttcgggc tggccctgg caaggcccg 1200
gacaggaagg cctacacggt cctcctatac ggaaacggtc caggctatgt gctcaaggac 1260
ggcgcccgcc cgatgttac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagtc 1320
gcagtgcgcc tggacgaaga gacccacgca ggcgaggacg tggcggtgtt cgcgcgcggc 1380
50 ccgcaggcgc acctggttca cggcggtgcag gagcagacct tcatagcgca cgtcatggcc 1440
ttcgccgcct gcctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cggcccccgc cggcaccacc 1500
gacgcgcgcg acccggtta ctctagagtc gggcgggccg gccgcttcga gcagacat 1558

```

55 <210> 27

<211> 1651

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Luciferase
Firefly

5 <400> 27

```

catggaagac gccaaaaaca taaagaaagg cccggcgcca ttctatccgc tggaagatgg 60
aaccgctgga gagcaactgc ataaggctat gaagagatac gccctgggtc ctggaacaat 120
tgctttttaca gatgcacata tcgagggtga catcacttac gctgagtact tcgaaatgtc 180
cgttcgggttg gcagaagcta tgaaacgata tgggctgaat acaaatcaca gaatcgtcgt 240
10 atgcagtga aactctcttc aattctttat gccgggtgtt ggcgcggttat ttatcggagt 300
tgcagttgcg cccgcgaacg acatttataa tgaacgtgaa ttgctcaaca gtatgggcat 360
ttcgcagcct accgtgggtg tcgtttccaa aaaggggttg caaaaaattt tgaacgtgca 420
aaaaaagctc ccaatcatcc aaaaaattat tatcatggat tctaaaacgg attaccaggg 480
atctcagtcg atgtacacgt tcgtcacatc tcactctacc cccggtttta atgaatacga 540
15 ttttgtgcca gatccttctg atagggacaa gacaattgca ctgatcatga actcctctgg 600
atctactggg gtgcctaaag gtgtcgctct gcctcataga actgcctgcg tgagattctc 660
gcatgccaga gatcctatct ttggcaatca aatcattccg gatactgcga ttttaagtgt 720
tgttccattc catcacggtt ttggaatggt tactacactc ggatatttga tatgtggatt 780
tcgagtcgtc ttaatgtata gatttgaaga agagctgttt ctgaggagcc ttcaggatta 840
20 caagattcaa agtgcgctgc tggtgccaac cctattctcc ttcttcgcca aaagcactct 900
gattgacaaa tacgatttat ctaattttaca cgaaattgct tctggtggcg ctcccctctc 960
taaggaagtc ggggaagcgg ttgccaagag gttccatctg ccaggatatca ggcaaggata 1020
tgggctcact gagactacat cagctattct gattacaccg gagggggatg ataaaccggg 1080
cgcggtcggg aaagttgttc cattttttga agcgaagggt gtggatctgg ataccgggaa 1140
25 aacgctgggc gttaatcaaa gaggcgaact gtgtgtgaga ggtcctatga ttatgtccgg 1200
ttatgtaaac aatccggaag cgaccaacgc cttgattgac aaggatggat ggctacattc 1260
tgagacata gcttactggg acgaagacga acacttcttc atcgttgacc gcctgaagtc 1320
tctgattaag tacaaaggct atcagggtgg tcccgtgaa ttggaatcca tcttgctcca 1380
acaccccaac atcttcgacg cagggtgtcg aggtcttccc gacgatgacg ccggtgaact 1440
30 tcccgcgcgc gttgtgtgtt tggagcacgg aaagacgatg acgaaaaag agatcgtgga 1500
ttacgtcgcc agtcaagtaa caaccgcgaa aaagttgcgc ggaggagtgt tgtttgtgga 1560
cgaagtaccg aaaggtctta ccggaaaact cgacgcaaga aaaatcagag agatcctcat 1620
aaaggccaag aagggcggaa agatcgccgt g
1651

```

35

<210> 28

<211> 658

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CAT

<400> 28

```

45 atggagaaaa aaatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 60
catttttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 120
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcttttatt 180
cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaactcc gtatggcaat gaaagacggg 240
gagctgggtga tatgggtag tggtcaccct tggtacaccg ttttccatga gcaaaactgaa 300
50 acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 360
tcgcaagatg tggcgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tccctaaagg gtttatttag 420
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 480
gccaatatgg acaacttctt cgcccccggt ttacagatgg gcaaatatta tacgcaaggc 540
gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga tggcttccat 600
55 gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgt 658

```

<210> 29

<211> 582
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

5 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: hGH

<400> 29
 atgttcccaa ctattccact gagtcgcctg ttcgataacg cgatgctgcg tgcgcatcgt 60
 10 ctgcaccaac tggctttcga cacttaccag gagttcgaag aagcatacat cccgaaagaa 120
 cagaaataca gcttccttca gaaccacacag acctcggtgt gtttctctga aagtatcccg 180
 accccttcta accgcgaaga gaccacagcag aaatcgaacc ttgaactgct tcgtatctcg 240
 ctgcttctca ttcagtcgtg gctggagcca gtacagttcc tgcgttcggt tttcgcaaac 300
 tcaactggat acggtgcgtc tgacagtaac gtttacgacc tgctgaaaga ccttgaagaa 360
 15 gggatccaga ccctgatggg tgcgctggaa gatggttcac cacgcactgg tcagatcttc 420
 aaacagactt actccaaatt cgatactaac tctcataacg atgatgctct gctgaaaaac 480
 tacggcctgc tgtactgttt ccgtaaagat atggataaag ttgaaacttt cctgcgtatc 540
 gttcagtgct gttctgttga agggtcgtgt ggcttctaag ag 582

20
 <210> 30
 <211> 119
 <212> DNA
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25
 <400> 30
 tataaataaaa cccctctgct aaccatgttc atgccttctt ctttttccta cagctcctgg 60
 gcaacgtgct gggtgtgtg ctgtctcatc attttggaaga agaattcact cctcagggtg 119

30
 <210> 31
 <211> 802
 <212> DNA
 <213> *Gallus gallus*

35
 <400> 31
 ccctttgtgc ggggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtgggggagcg 60
 ccgcgtgcgc cccgcgctgc ccggcggtgc tgagcgctgc gggcgcgcg cggggctttg 120
 tgcgctccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg gccgggggcg gtgccccgcg gtgcgggggg 180
 40 gctgcgaggg gaacaaaggc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt gggggggtga gcaggggggtg 240
 tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc ctgcaccccc ctccccgagt tgctgagcac 300
 ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcggtggc cggggctcgc cgtgcggggc 360
 ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc cgcctcgggc cggggagggc 420
 tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcgc ccggcggtgc tcgaggcgcg gcgagccgca 480
 45 gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga gggcgagggg acttcctttg tcccaaatct 540
 ggcggagccg aaatctggga ggcgcgcgcg caccctctct agcgggcgcg ggcgaagcgc 600
 tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc gtgcgtcgcc gcgccgcgt 660
 ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc cgcaggggga cggctgcctt cgggggggac 720
 ggggcagggc ggggttcggc ttctggcggtg tgaccggcgc gggttatatc ttcccttctc 780
 50 tgttcctccg cagccagcca tg 802

<210> 32
 <211> 1032
 55 <212> DNA
 <213> Bacteriophage P1

<400> 32
 atgtccaatt tactgaccgt acacaaaaat ttgcctgcat taccggtcga tgcaacgagt 60

gatgaggttc gcaagaacct gatggacatg ttcagggatc gccaggcggtt ttctgagcat 120
 acctggaaaa tgcttctgtc cgtttgccgg tcgtggggcg catggtgcaa gttgaataac 180
 cggaaatggt ttcccgagaa acctgaagat gttcgcgatt atcttctata tcttcaggcg 240
 cgcggtcttg cagtaaaaac tatccagcaa catttggggc agctaaacat gcttcacgt 300
 5 cggtccgggc tgccacgacc aagtgcagc aatgctgtt cactgggtat gcggcggatc 360
 cgaaaagaaa acgttgatgc cgtggaacgt gcaaaacagg ctctagcgtt cgaacgcact 420
 gatttcgacc aggttcgttc actcatggaa aatagcgatc gctgccagga tatacgtaat 480
 ctggcatttc tggggattgc ttataacacc ctgttacgta tagccgaaat tgccaggatc 540
 aggggttaaag atatctcacg tactgacggt gggagaatgt taatccatat tggcagaacg 600
 10 aaaacgctgg ttagcaccgc aggtgtagag aaggcactta gcctgggggt aactaaactg 660
 gtcgagcgat ggatttcctg ctctgggtgta gctgatgatc cgaataacta cctgttttgc 720
 cgggtcagaa aaaatggtgt tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 780
 ctggaaggga tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggt 840
 cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccggtgtc gagccgcgcg agatatggcc 900
 15 cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctggtg gctggaccaa tgtaaataatt 960
 gtcatgaact atatccgtaa cctggatagt gaaacagggg caatggtgcg cctgctggaa 1020
 gatggcgatt ag 1032

20 <210> 33
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Bacteriophage P1

25 <400> 33
 ataacttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttat 34

30 <210> 34
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Streptomyces avidinii

35 <400> 34
 gctgctgaag caggtatcac cggcacctgg tacaaccagc tcggctcgac cttcatcgtg 60
 accgcggggc ccgacggcgc cctgaccgga acctacgagt cggccgtcgg caacgccgag 120
 agccgctacg tcttgaccgg tcgttacgac agcgccccgg ccaccgacgg cagcggccacc 180
 gccctcgggt ggacgggtggc ctggaagaat aactaccgca acgcccactc cgcgaccacg 240
 tggagcggcc agtacgtcgg cggcgccgag gcgaggatca acaccagtg gctgctgacc 300
 40 tccggcacaa ccgaggccaa cgcctggaag tccacgctgg tcggccacga caccttcacc 360
 aaggtgaagc cgtccgcccgc ctcc 384

45 <210> 35
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: myc epitop

<400> 35
 ggatccgaac aaaagctgat ctcagaagaa gatctatgca ta 42

55 <210> 36
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: 5xHis
Sequenz
5
<400> 36
catcaccatc atcattaa 18

10 <210> 37
<211> 29
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 37
gtccttaagc ttgatataaa gggtcagcg 29
20

<210> 38
<211> 29
<212> DNA
25 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
30 <400> 38
ggctttctgaa ttctgggtgg gtggtgtct 29

<210> 39
35 <211> 19
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
40 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 39
tggttctcagg ctcaggatg 19

45
<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
50

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 40
55 ctgttttcgag agagcaaagc ttagg 25

<210> 41

<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 41
gagtgaacgg ccagcttc

18

10