



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 29 958 T2** 2006.11.23

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 062 336 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 29 958.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IL99/00158**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 910 646.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/047672**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **22.02.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

12375898 **19.03.1998** **IL**

12602498 **01.09.1998** **IL**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Yeda Research and Development Co., Ltd.,
Rehovot, IL; Albert Einstein College of Medicine of
Yeshiva University, New York, N.Y., US**

(72) Erfinder:

**WALLACH, David, 76406 Rehovot, IL;
KOVALENKO, AndreiBeit Clore, 76100 Rehovot,
IL; HORWITZ, S., Marshall, Larchmont, NY 10538,
US; LI, Yongan, Apex, NC 27502, US**

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **MODULATOREN DER FUNKTION VON REZEPTOREN DER TNF/NGF REZEPTORENFAMILIE**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Rezeptoren, die zu der TNF/NGF-Rezeptoren-Superfamilie gehören, und die Kontrolle ihrer biologischen Funktionen. Die TNF/NGF-Rezeptoren-Superfamilie umfasst Rezeptoren wie z. B. den p55- und den p75-Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-Rs, die hierin nachstehend als p55-R und p75-R bezeichnet werden) und den FAS-Liganden-Rezeptor (auch als FAS/APO1 oder als FAS-R bezeichnet, und hierin nachstehend als FAS-R bezeichnet) und andere. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Protein, das hierin als RAP-2 (für RIP-assoziiertes Protein-2) bezeichnet wird, und seine Isoformen, Fragmente und Derivate.

[0002] RAP-2 bindet an RIP („receptor interacting protein“ – „mit dem Rezeptor in Wechselwirkung tretendes Protein“) und ist in der Lage, die Funktion von RIP zu modulieren oder zu vermitteln, und ist dadurch auch in der Lage, die Funktion anderer Proteine, die an RIP direkt oder indirekt binden, direkt oder indirekt zu modulieren oder zu vermitteln. An RAP-2 bindende Proteine sind Modulatoren oder Vermittler der Funktion von RAP-2.

Fachgebiet

[0003] Der Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Lymphotoxin (TNF- β) (TNF bezieht sich hierin nachstehend sowohl auf TNF- α als auch auf TNF- β) sind multifunktionelle vorentzündliche Cytokine, die vorwiegend durch mononucleäre Phagocyten gebildet werden, und die viele Wirkungen auf Zellen haben (Wallach, D. (1986), in: Interferon 7 (Ion Gresser, Hrsg.), S. 83-122, Academic Press, London; und Beutler und Cerami (1987). Sowohl TNF- α als TNF- β initiieren ihre Wirkungen durch die Bindung an spezifische Zelloberflächenrezeptoren. Einige der Wirkungen sind wahrscheinlich vorteilhaft für den Organismus: sie können zum Beispiel Tumorzellen oder mit Viren infizierte Zellen zerstören und die antibakteriellen Aktivitäten der Granulocyten steigern. Auf diese Weise trägt der TNF zur Abwehr des Organismus gegen Tumoren und gegen infektiöse Erreger mit bei und wirkt bei der Genesung von einer Verletzung mit. Daher kann der TNF als ein Anti-Tumor-Mittel verwendet werden, bei dessen Anwendung er an seine Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen bindet und dadurch die Ereignisse initiiert, die zum Tod der Tumorzellen führen. Der TNF kann auch als ein anti-infektiöses Mittel verwendet werden.

[0004] Sowohl TNF- α als auch TNF- β haben jedoch auch schädliche Wirkung. Es gibt Hinweise, dass die Überproduktion von TNF- α eine wichtige pathogene Rolle bei einigen Erkrankungen spielt. Zum Beispiel ist bekannt, dass die Wirkungen des TNF- α , hauptsächlich auf die Gefäßversorgung, eine Hauptursache für die Symptome des septischen Schocks sind (Tracey et al., 1986). Bei einigen Krankheiten kann der TNF einen übermäßigen Gewichtsverlust (Kachexie) durch die Unterdrückung der Aktivitäten der Adipocyten (Fettzellen) und durch die Verursachung einer Anorexie (Appetitlosigkeit) verursachen, und deshalb wurde der TNF- α auch Cachetin genannt. Er wurde auch als ein Vermittler der Schädigung von Geweben bei rheumatischen Erkrankungen beschrieben (Beutler und Cerami, 1987), sowie als ein Hauptvermittler der Schädigung, die bei Transplantat-Abstoßungsreaktionen beobachtet wird (Piquet et al., 1987). Darüber hinaus ist der TNF dafür bekannt, dass er an Entzündungsvorgängen und an vielen anderen Krankheiten beteiligt ist.

[0005] Zwei unterschiedliche, voneinander unabhängig exprimierte Rezeptoren, der p55-TNF-R und der p75-TNF-R, die sowohl TNF- α als auch TNF- β spezifisch binden, initiieren und/oder vermitteln die vorstehend erwähnten biologischen Wirkungen des TNF. Diese beiden Rezeptoren besitzen strukturell unähnliche intrazelluläre Domänen, was vermuten lässt, dass sie eine unterschiedliche Signalübertragungsaktivität besitzen (vergleiche mit Hohmann et al., 1989; Engelmann et al., 1990; Brockhaus et al., 1990; Leotscher et al., 1990; Schall et al., 1990; Nophar et al., 1990; Smith et al., 1990 und Heller et al., 1990). Die zellulären Mechanismen, wie zum Beispiel die verschiedenen Proteine und möglicherweise andere Faktoren, die an der intrazellulären Signalübertragung des p55- und des p75-TNF-R beteiligt sind, müssen jedoch noch aufgeklärt werden. Es ist diese intrazelluläre Signalübertragung, die in der Regel nach der Bindung des Liganden, d. h. des TNF (α oder β), an den Rezeptor stattfindet, die für den Beginn der Kaskade an Reaktionen verantwortlich ist, die schließlich zu der beobachteten Antwortreaktion der Zelle auf den TNF führt.

[0006] Was die vorstehend erwähnten zellenzerstörenden Wirkungen des TNF betrifft, wird diese Wirkung in den meisten bisher untersuchten Zellen hauptsächlich durch den p55-TNF-R ausgelöst. Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne (Liganden-Bindedomäne) des p55-TNF-R können selbst (ebenfalls) die zellenzerstörende Wirkung auslösen (vergleiche mit EP 412486), die mit der Wirksamkeit der Kreuzvernetzung des Rezep-

tors durch die Antikörper korreliert, und von der man annimmt, dass sie den ersten Schritt bei der Erzeugung des intrazellulären Signalübertragungsvorgangs darstellt. Des Weiteren haben Mutagenesestudien (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993) gezeigt, dass die biologische Funktion des p55-TNF-R von der Integrität seiner intrazellulären Domäne abhängt. Dementsprechend wurde vorgeschlagen, dass der Beginn der intrazellulären Signalübertragung, die zu der zellenzerstörenden Wirkung des TNF führt, als Folge der Assoziation von zwei oder mehreren intrazellulären Domänen des p55-TNF-R auftritt. Darüber hinaus liegt der TNF (α oder β) als Homotrimer vor, und daher wurde vorgeschlagen, dass er die intrazelluläre Signalübertragung über den p55-TNF-R mittels seiner Fähigkeit an die Rezeptormoleküle zu binden und sie zu vernetzen, d. h. eine Zusammenlagerung der Rezeptoren zu verursachen, induziert.

[0007] Ein weiteres Mitglied der TNF/NGF-Rezeptoren-Superfamilie ist der FAS-Rezeptor (FAS-R), der auch als FAS-Antigen bezeichnet wird, ein Protein der Zelloberfläche, das in verschiedenen Geweben exprimiert wird, und das zu einer Reihe von Zelloberflächen-Rezeptoren, einschließlich des TNF-R und des NGF-R, eine Homologie aufweist. Der FAS-R vermittelt den Zelltod in Form der Apoptose (Itoh et al., 1991) und scheint als ein negativer Selektor für autoreaktive T-Zellen zu dienen, d. h., während der Reifung der T-Zellen vermittelt der FAS-R den apoptotischen Tod von T-Zellen, die Autoantigene erkennen. Es wurde auch herausgefunden, dass Mutationen im FAS-R-Gen (lpr) eine Störung der Lymphocyten-Proliferation in Mäusen verursachen, die der menschlichen Autoimmunerkrankung systemischer Lupus erythematosus (SLE) ähnelt (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Der Ligand des FAS-R scheint ein mit der Zelloberfläche assoziiertes Molekül zu sein, das unter anderen T-Killerzellen (oder cytotoxische T-Lymphocyten – CTLs) tragen, und wenn solche CTLs mit Zellen in Kontakt treten, die den FAS-R tragen, sind sie daher in der Lage, den apoptotischen Zelltod der Zellen zu induzieren, die den FAS-R tragen. Des Weiteren wurden monoclonale Antikörper hergestellt, die für den FAS-R spezifisch sind, wobei diese monoclonalen Antikörper in der Lage sind, den apoptotischen Zelltod von Zellen zu induzieren, die den FAS-R tragen, einschließlich Mauszellen, die mit einer cDNA transformiert wurden, welche den menschlichen FAS-R codiert (Itoh et al., 1991).

[0008] Die Anmelder haben eine Reihe von Versuchen unternommen (vergleiche zum Beispiel mit den europäischen Anmeldungen Nrn. EP 186833, EP 308378, EP 398327 und EP 412486), um die schädlichen Wirkungen des TNF durch die Hemmung der Bindung des TNF an seine Rezeptoren zu regulieren, und zwar unter Verwendung von Anti-TNF-Antikörpern oder durch die Verwendung von löslichen TNF-Rezeptoren, die mit der Bindung des TNF an die TNF-Rs, die an der Zelloberfläche gebunden sind, kompetitieren. Da die Bindung des TNF an seine Rezeptoren für die durch den TNF induzierten zellulären Wirkungen erforderlich ist, wurden durch die Anmelder weiterhin Versuche unternommen (vergleiche zum Beispiel mit EP 568925), die Wirkung des TNF durch die Modulierung der Aktivität der TNF-Rs zu modulieren.

[0009] Kurzgefasst betrifft EP 568925 ein Verfahren zur Modulierung der Signalübertragung und/oder der Spaltung von TNF-Rs, wobei Peptide oder andere Moleküle entweder mit dem Rezeptor selbst oder mit Effektorproteinen, die mit dem Rezeptor wechselwirken, in Wechselwirkung treten, wodurch die normale Funktion der TNF-Rs moduliert wird. In EP 568925 wird die Konstruktion und die Charakterisierung verschiedener mutierter p55-TNF-Rs beschrieben, die Mutationen in der extrazellulären, der transmembranen und der intrazellulären Domäne des p55-TNF-R aufweisen. Auf diese Weise wurden Bereiche innerhalb der vorstehenden Domänen des p55-TNF-R identifiziert, die für die Funktion des Rezeptors essentiell sind, d. h. für die Bindung des Liganden (TNF) und für die anschließende Signalübertragung, sowie für die intrazelluläre Signalübertragung, die schließlich zu der beobachteten Wirkung des TNF auf die Zellen führt. Des Weiteren wird eine Reihe von Ansätzen zur Isolierung und Identifizierung von Proteinen, Peptiden oder anderen Faktoren beschrieben, die in der Lage sind, an die verschiedenen Bereiche in den vorstehend erwähnten Domänen des TNF-R zu binden, wobei diese Proteine, Peptide oder die anderen Faktoren an der Regulation oder der Modulation der Aktivität des TNF-R beteiligt sein können. Eine Reihe von Versuchen für die Isolierung und die Clonierung der DNA-Sequenzen, die solche Proteine und Peptide codieren; für die Konstruktion von Expressionsvektoren zur Herstellung dieser Proteine und Peptide und für die Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon, die mit dem TNF-R oder mit den vorstehend erwähnten Proteinen und Peptiden, die an verschiedene Bereiche des TNF-R binden, in Wechselwirkung treten, werden ebenfalls in EP 568925 angeführt. EP 568925 spezifiziert jedoch weder die eigentlichen Proteine und Peptide, die an die intrazellulären Domänen der TNF-Rs (z. B. des p55-TNF-R) binden, noch beschreibt sie den Hefe-Zwei-Hybrid-Ansatz zur Isolierung und Identifizierung solcher Proteine oder Peptide, die an die intrazellulären Domänen der TNF-Rs binden. Ebenfalls erfolgt in EP 568925 keine Offenbarung von Proteinen oder Peptiden, die in der Lage sind, an die intrazelluläre Domäne des FAS-R zu binden.

[0010] Obwohl es bekannt ist, dass die Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptoren und der strukturell verwandte Rezeptor FAS-R nach der Stimulierung durch die von Leukocyten produzierten Liganden in den Zellen zerstö-

rerische Aktivitäten auslösen, die zu ihrer eigenen Vernichtung führen, sind die Mechanismen dieser Auslösung immer noch wenig verstanden. Mutagenesestudien deuten an, dass bei der Signalübertragung für Cyto-toxizität durch den FAS-R und den p55-TNF-Rezeptor (p55-R) unterschiedliche Bereiche innerhalb ihrer intrazellulären Domänen beteiligt sind (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh und Nagata, 1993). Diese Bereiche („die Todesdomänen“) besitzen eine Sequenzähnlichkeit. Die „Todesdomänen“ sowohl des FAS-R als auch des p55-R tendieren zur Selbstassoziation. Ihre Selbstassoziation fördert offenbar die Rezeptor-Zusammenlagerung, die für die Initiation der Signalübertragung nötig ist (vergleiche mit Song et al., 1994; Wallach et al., 1994; Boldin et al., 1995), und hohe Expressionsspiegel des Rezeptors können zur Auslösung einer vom Liganden unabhängigen Signalübertragung führen (Boldin et al., 1995).

[0011] Wie andere durch Rezeptoren induzierte Wirkungen, erfolgt die Induktion des Zelltodes durch die TNF-Rezeptoren und durch den FAS-R über eine Reihe von Protein-Protein-Wechselwirkungen, die von der Liganden-Rezeptor-Bindung bis schließlich zu der Aktivierung von enzymatischen Effektor-Funktionen führen, wobei diese Fallstudien zur Aufklärung nicht-enzymatischer Protein-Protein-Wechselwirkungen geführt haben, welche die Signalübertragung für den Zelltod initiieren: die Bindung des trimeren TNF oder der FAS-R-Liganden-Moleküle an die Rezeptoren, und die daraus resultierenden Wechselwirkungen ihrer intrazellulären Domänen (Brakebusch et al., 1992; Tartaglia et al., 1993; Itoh und Nagata, 1993), die durch eine Neigung der Todesdomänen-Motive zur Selbst-Assoziation verstärkt wird (Boldin et al., 1995a), sowie die induzierte Bindung von zwei cytoplasmatischen Proteinen (die auch aneinander binden können) an die intrazellulären Domänen der Rezeptoren – von MORT-1 (oder FADD) an den FAS-R (Boldin et al., 1995b; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995) und von TRADD an den p55-R (Hsu et al., 1995; Hsu et al., 1996). Drei Proteine, die an die intrazelluläre Domäne des FAS-R und des p55-R in der „Todesdomänen“-Region binden, die an der Induktion des Zelltods durch die Rezeptoren über eine Hetero-Assoziation homologer Regionen beteiligt sind, und die unabhängig davon auch in der Lage sind, den Zelltod auszulösen, wurden durch das Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterungsverfahren identifiziert. Eines dieser Proteine ist das Protein MORT-1 (Boldin et al., 1995b), das auch als FADD bekannt ist (Chinnaiyan et al., 1995), und das spezifisch an den FAS-R bindet. Das zweite, TRADD (vergleiche auch mit Hsu et al., 1995, 1996), bindet an den p55-R, und das dritte, RIP (vergleiche auch mit Stanger et al., 1995), bindet sowohl an den FAS-R als auch an den p55-R. Neben ihrer Bindung an den FAS-R und an den p55-R sind diese Proteine auch in der Lage aneinander zu binden, wodurch ein gegenseitiger funktioneller Austausch zwischen dem FAS-R und dem p55-R möglich ist. Diese Bindungen finden über ein konserviertes Sequenzmotiv statt, das „Todesdomänen-Modul“, das den Rezeptoren und den mit ihnen assoziierten Proteinen gemein ist. Des Weiteren gilt, dass, obwohl in dem Hefe-Zwei-Hybrid-Test gezeigt wurde, dass MORT-1 spontan an den FAS-R bindet, in Säugerzellen diese Bindung nur nach der Stimulierung des Rezeptors stattfindet, was vermuten lässt, dass MORT-1 an den initiierten Ereignissen der FAS-R-Signalübertragung beteiligt ist. MORT-1 enthält keinerlei Sequenzmotive, die für eine enzymatische Aktivität charakteristisch sind, und daher scheint an seiner Fähigkeit, den Zelltod auslösen zu können, keine intrinsische Aktivität von MORT-1 selbst beteiligt zu sein, sondern eher die Aktivierung eines anderen Proteins oder anderer Proteine, die an MORT-1 binden und die weiter stromabwärts in der Signalkaskade wirken. Es wurde gezeigt, dass die zelluläre Expression von MORT-1-Mutanten, denen der N-terminale Teil des Moleküls fehlt, die Induktion der Cytotoxizität durch FAS/APO1 (FAS-R) oder durch den p55-R blockiert (Hsu et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1996), was zeigt, dass dieser N-terminale Bereich das Signal für die zellenzerstörende Wirkung der beiden Rezeptoren durch Protein-Protein-Wechselwirkungen überträgt.

[0012] Daher scheinen die „Todesdomänen“-Motive der Rezeptoren p55-R und FAS-R sowie ihre drei assoziierten Proteine MORT-1, RIP und TRADD die Orte der Protein-Protein-Wechselwirkungen zu sein. Die drei Proteine MORT-1, RIP und TRADD treten mit den intrazellulären Domänen des p55-R und des FAS-R durch die Bindung ihrer Todesdomänen an diejenigen der Rezeptoren in Wechselwirkung, und sowohl für RIP als auch für TRADD gilt, dass ihre Todesdomänen auch mit sich selbst assoziieren können (obwohl MORT-1 sich in dieser Hinsicht unterscheidet, indem seine Todesdomänen nicht mit sich selbst assoziieren kann). Des Weiteren binden MORT-1 und TRADD in unterschiedlicher Weise an den FAS-R und an den p55-R, und sie binden auch aneinander. Darüber hinaus binden sowohl MORT-1 als auch TRADD effektiv an RIP. Dementsprechend scheint es so zu sein, dass die Wechselwirkung zwischen den drei Proteinen MORT-1, RIP und TRADD einen wichtigen Bestandteil der gesamten Modulierung der intrazellulären Signalübertragung darstellt, die durch diese Proteine vermittelt wird. Eine Beeinträchtigung der Wechselwirkung zwischen diesen drei intrazellulären Proteinen wird zu einer Modulierung der Wirkungen führen, die durch diese Wechselwirkung verursacht wird. Zum Beispiel kann die Hemmung der Bindung von TRADD an MORT-1 die FAS-R-p55-R-Wechselwirkung modulieren. Ebenso kann die Hemmung von RIP, neben der vorstehend erwähnten Hemmung der Bindung von TRADD an MORT-1, ebenfalls die FAS-R-p55-R-Wechselwirkung modulieren.

[0013] Monoklonale Antikörper, die gegen die „Todesdomänen“ des p55-R erzeugt wurden, d. h. spezifisch

gegen die Bindestellen von TRADD und RIP, können ebenfalls dazu verwendet werden, die Bindung dieser Proteine zu hemmen oder zu verhindern, und somit eine Modulation der Wechselwirkung zwischen dem FAS-R und dem p55-R verursachen.

[0014] Vor Kurzem wurde auch herausgefunden, dass neben den vorstehend erwähnten cytotoxischen Aktivitäten und ihrer Modulation, die durch die verschiedenen Rezeptoren und ihre Bindeproteine, einschließlich des FAS-R, p55-R, MORT-1, TRADD, RIP, MACH, Mch4 und G1, vermittelt wird, eine Reihe dieser Rezeptoren und ihrer Bindeproteine auch an der Modulation der Aktivität des nucleären Transkriptionsfaktors NF- κ B beteiligt sind, der einen Schlüsselvermittler des Zellüberlebens oder der Zellebensfähigkeit darstellt, welcher für die Kontrolle der Expression vieler Gene verantwortlich ist, die an Immun- und Entzündungs-Antwortreaktionen beteiligt sind. Es wurde zum Beispiel herausgefunden, dass TNF- α die Aktivierung von NF- κ B tatsächlich stimulieren kann, und daher ist TNF- α in der Lage, zwei Arten von Signalen in Zellen zu induzieren, eines ruft den Zelltod hervor und das andere schützt die Zellen gegen die Induktion des Todes durch eine Induktion der Genexpression über NF- κ B (vergleiche mit Beg und Baltimore 1996; Wang et al., 1996; Van Antwerp et al., 1996). Eine ähnliche duale Wirkung wurde auch für den FAS-R berichtet (vergleiche mit dem Bezug auf diese Wirkung, wie er in Van Antwerp et al., 1996, vorstehend, dargelegt wird). Daher scheint es so zu sein, dass ein empfindliches Gleichgewicht zwischen dem Zelltod und dem Zellüberleben nach der Stimulierung der verschiedenen Zelltypen durch den TNF- α und/oder durch den FAS-R-Liganden besteht, wobei das endgültige Ergebnis der Stimulierung davon abhängt, welcher intrazelluläre Signalweg in stärkerem Maße stimuliert wird, und wobei der eine Weg zum Zelltod (gewöhnlich durch Apoptose) und der andere Weg zum Überleben der Zelle über die Aktivierung von NF- κ B führt.

[0015] Darüber hinaus haben die gegenwärtigen Erfinder kürzlich auch einen möglichen Signalweg aufgeklärt, über den die Mitglieder der TNF/NGF-Rezeptorenfamilie NF- κ B aktivieren (vergleiche mit Malinin et al., 1997 und den verschiedenen relevanten Referenzen, die darin angeführt sind; und die ebenfalls im Besitz der Erfinder befindlichen, ebenfalls anhängigen israelischen Patentanmeldungen mit den Nummern IL 117800 und IL 119133). Kurzgefasst scheint es so zu sein, dass einige Mitglieder der TNF/NGF-Rezeptorenfamilie in der Lage sind, NF- κ B über ein gemeinsames Adaptorprotein, TRAF2, aktivieren zu können. Eine neu gefundene Proteinkinase, die als NIK bezeichnet wird (vergleiche mit Malinin et al., 1997, vorstehend, und mit IL 117800 und IL 119133) ist in der Lage, an TRAF2 zu binden und die Aktivität von NF- κ B zu stimulieren. Tatsächlich wurde gezeigt (vergleiche mit Malinin et al., vorstehend, und mit den IL-Anmeldungen), dass die Expression in Zellen von Kinase-defizienten NIK-Mutanten zu Zellen führt, die nicht in der Lage sind, NF- κ B auf normalem endogenem Wege stimulieren zu können, und auch zu Zellen führt, die eine Blockade bei der Induktion der Aktivität von NF- κ B durch den TNF aufweisen, oder auch durch den FAS-R, und die eine Blockade bei der Induktion von NF- κ B durch TRADD, RIP und MORT-1 aufweisen (die Adaptorproteine sind, welche an den p55-R und/oder den FAS-R binden). Alle Rezeptoren, der p55-R, der p75-R und der FAS-R sowie ihre Adaptorproteine MORT-1, TRADD und RIP binden direkt oder indirekt an TRAF2, das aufgrund seiner Fähigkeit zur Bindung an NIK offenbar die Induktion von NF- κ B moduliert.

[0016] Unter den vorstehenden Modulatorproteinen, die an dem empfindlichen Gleichgewicht zwischen dem Zelltod und dem Zellüberleben nach einer Stimulierung des FAS-R und/oder des p55-R beteiligt sind, scheint das Protein RIP eine wichtige Rolle zu spielen. RIP (vergleiche mit Stanger et al., 1995 und auch mit Malinin et al., 1997) besitzt eine „Todesdomänen“ in seiner C-terminalen Region, die es ihm ermöglicht, die Cytotoxizität in einer unabhängigen Weise zu induzieren, sowie auch durch eine Assoziation mit den Todesdomänen von MORT-1, dem p55-R, dem FAS-R und TRADD. RIP besitzt ebenfalls eine Proteinkinase-Domäne in seiner N-terminalen Region sowie eine intermediäre Domäne, von der man annimmt, dass sie Überschneidung (Bindung) mit TRAF2 ermöglicht und dadurch seine Beteiligung an der Induktion von NF- κ B. Dementsprechend werden die Einzelheiten, die die Eigenschaften und die Sequenzen (DNA und Aminosäure) von RIP betreffen, in den vorstehend erwähnten Veröffentlichungen angeführt (insbesondere in Stanger et al., 1995), die hierin durch Bezugnahme vollständig enthalten sind.

[0017] Der TNF ist ebenfalls eines der Cytokine, die an der Initiation und der Modulation der antiviralen Abwehr eines Wirtes beteiligt sind. Aufgrund dessen haben sich Viren so entwickelt, dass sie Gene exprimieren, deren Proteine die Aktivität der Cytokine regulieren können, und von diesen Cytokine-regulierenden viralen Proteinen nimmt man an, dass sie die Persistenz eines Virus innerhalb des tierischen Wirts fördern. Eines der am besten untersuchten Beispiele eines solchen Proteins ist E3-14.7K aus der Gruppe C der menschlichen Adenoviren (Ad) der Typen 2 und 5, das als ein starker Antagonist der durch den TNF vermittelten Cytolyse wirkt.

[0018] Mit dem Ziel, die molekularen Komponenten der TNF-Signalübertragungs-Kaskade zu isolieren, die

nach einer Virusinfektion zu Angriffszielen für E3-14.7K werden, wurde vor kurzem ein menschliches E3-14.7K-Bindeprotein durch Zwei-Hybrid-Durchmusterung isoliert (FIP-2 für Fourteen-K Interacting Protein, Li, Y. et al., 1998). Es wurde herausgefunden, dass FIP-2 selbst nicht toxisch ist, und dass es die schützende Wirkung von E3-14.7K auf die Cytotoxizität umkehrt, die durch eine Überexpression von TNFR-1 oder durch RIP induziert wird, ohne dass es an eines dieser beiden vorstehend genannten Proteine bindet. Es wurde herausgefunden, dass FIP-2 eine gewisse Homologie mit RAP-2 aufweist, dem Protein der vorliegenden Erfindung. Der Gesamtgrad an Ähnlichkeit zwischen RAP-2 und FIP-2 ist jedoch relativ gering, wie man bei einem Vergleich der beiden vollständigen Aminosäuresequenzen sehen kann (**Fig. 3**). Die Homologie ist jedoch in spezifischen Regionen in Richtung der C-Termini der Proteine signifikant und kulminiert fast bis zur Identität der C-terminalen 30 Aminosäuren. Es ist erwähnenswert, dass neben der vorstehend erwähnten C-terminalen Domäne, ein mögliches Leucin-Zipper-Motiv (Leucin-Reißverschluss-Motiv) zwischen FIP-2 und RAP-2 weitgehend konserviert ist (mit Ausnahme eines Ile- zu Ala-Austausches).

[0019] Eine ähnliche, als HYPL bezeichnete Sequenz, die ein Protein codiert, das mit der Huntington-Krankheit in Beziehung steht, und die eine relativ weit entfernte homologe Sequenz zu RAP-2 zu sein scheint, wurde vor kurzem in GenBank unter dem Titel „Huntingtin interacting protein, HYPL“ hinterlegt (Hinterlegungsnummer AF049614). Eine Veröffentlichung, die die Funktion des Proteins beschreibt, wurde jedoch noch nicht veröffentlicht.

[0020] Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Yamaoka S. et al. (1998) berichtet über die Identifizierung eines murinen Homologs von RAP-2. Das murine Homolog NEMO (für NF- κ B Essential Modulator, essentieller Modulator von NF- κ B) wurde bei einer Suche nach den Schlüsselmolekülen identifiziert, die die Aktivierung der NF- κ B-Signalübertragung regulieren. Es wurde eine flach wachsende zelluläre Variante von mit HTLV-1 Tax-transformierten Ratten-Fibroblasten charakterisiert, die als 5R bezeichnet wurde, und die auf alle untersuchten NF- κ B aktivierenden Reize (LPS, PMA, IL-1, TNF) nicht reagierte, und es wurde ihre genetische Komplementierung durchgeführt. Als Ergebnis dieses Verfahrens wurde eine cDNA gewonnen, die das 48 kD große NEMO-Protein codierte. Aufgrund dieser Daten wurde konstatiert, dass dieses Protein den 5R-Zellen fehlte, es Teil des hochmolekularen I κ B-Kinase-Komplexes ist und es für seine Bildung erforderlich ist. In vitro kann NEMO Homodimere bilden und direkt mit IKK β in Wechselwirkung treten.

[0021] Die israelische Patentanmeldung Nr. 120485 offenbart ein mit RIP assoziiertes Protein, das als RAP bezeichnet wird, und das spezifisch an RIP bindet und die Induktion von NF- κ B hemmt.

[0022] Die israelische Patentanmeldung Nr. 123758 und diese Anmeldung betreffen ein anderes mit RIP assoziiertes Protein, das als RAP-2 bezeichnet wird, und das die gleiche oder eine ähnliche Aktivität besitzt.

[0023] Gemäß der Erfindung wird RAP-2 auch als 303 oder als RAP-303 oder als RAT-303 bezeichnet. Aus Gründen der Einheitlichkeit wird es hierin als RAP-2 bezeichnet.

Zusammenfassung der Erfindung

[0024] Ein Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung eines neuen Proteins, RAP-2, einschließlich aller seiner Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate, das in der Lage ist, an das RIP-Protein zu binden (hierin nachstehend als „RIP“ bezeichnet), und das durch eine DNA-Sequenz codiert wird, die nachstehend beschrieben wird. Da RIP in der Lage ist, direkt oder indirekt mit den intrazellulären Vermittlern von Entzündungen, der Zell-Cytotoxizität oder dem Zelltod, wie z. B. dem p55-R und dem FAS-R und ihren assoziierten Adaptor- oder Modulator-Proteinen, wie z. B. MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1 und anderen in Wechselwirkung zu treten, sind die neuen Proteine der vorliegenden Erfindung durch eine Bindung an RIP daher in der Lage, den intrazellulären Signalübertragungsvorgang zu beeinflussen, der durch die Bindung des FAS-Liganden an seinen Rezeptor und des TNF an seinen Rezeptor (p55-R) initiiert wird, und als solche stellen die neuen Proteine der vorliegenden Erfindung Modulatoren der durch den p55-R und den FAS-R vermittelten Wirkungen auf die Zellen dar. RIP ist auch in der Lage, mit TRAF2 in Wechselwirkung zu treten, und dadurch ist es in der Lage, direkt oder indirekt mit NIK in Wechselwirkung zu treten, und als solches wirkt RIP als ein Modulator von Entzündungen und von Zellüberlebenssignalwegen, an denen eine Induktion von NF- κ B beteiligt ist, daher sind die neuen Proteine der vorliegenden Erfindung Modulatoren einer mit RIP in Beziehung stehenden Entzündungs- und Zellüberlebensaktivität. Da der FAS-R, der p55-R und ihre Modulatorproteine MORT-1 und TRADD in der Lage sind, NF- κ B und das Überleben der Zelle zu induzieren, was entweder direkt oder indirekt durch Bindung an RIP oder durch Bindung an TRAF2, an das RIP bindet, erfolgt, können die Proteine der vorliegenden Erfindung ebenfalls auch Vermittler von Zellüberlebens-Vorgängen sein, und zwar, indem sie über gemeinsame oder über mit einander in Beziehung stehende, intrazelluläre Signalübertragungswege wirken, in denen die ver-

schiedenen vorstehend erwähnten Proteine wirken, um das Überleben der Zelle zu induzieren. Da der p75-R an TRAF2 bindet, an das wiederum RIP bindet, können die neuen Proteine der Erfindung auch Modulatoren der mit RIP in Beziehung stehenden Vermittlung der durch den p75-R vermittelten Aktivität sein.

[0025] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Antikörpern gegen das vorstehend erwähnte neue RAP-2-Protein sowie seine Isoformen, Analoga, Fragmente und Derivate, die dazu verwendet werden können, den Signalübertragungsvorgang zu hemmen oder, noch spezifischer, die Entzündungs-, die Zell-Cytotoxizitäts- oder die Zellüberlebensvorgänge, wenn dies gewünscht wird.

[0026] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung des vorstehenden neuen RAP-2-Proteins sowie seiner Isoformen, Analoga, Fragmente und Derivate zur Isolierung und Charakterisierung weiterer Proteine oder Faktoren, die an der Regulation der Rezeptoraktivität beteiligt sein können, wie z. B. andere Proteine, die an das RAP-2-Protein binden und seine Aktivität beeinflussen, und/oder zur Isolierung und zur Identifizierung anderer Rezeptoren, die weiter stromaufwärts oder stromabwärts an dem Signalübertragungsvorgang oder -vorgängen beteiligt sind, und an die die neuen Proteine, Analoga, Fragmente oder Derivate binden, und an deren Funktion sie somit ebenfalls beteiligt sind.

[0027] Ein noch weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Antikörpern, die in Zellen eingebracht werden können, um an RAP-2 und an mögliche Isoformen von RAP-2 zu binden oder mit ihm/ihnen in Wechselwirkung zu treten, wobei die Antikörper so wirken, dass sie die mit RIP assoziierten cytotoxischen Vorgänge hemmen und somit, wenn gewünscht, das Überleben der Zelle steigern, oder die so wirken können, dass sie die mit RIP assoziierte Aktivität bei Zellüberlebensvorgängen hemmen und somit, wenn gewünscht, die Cytotoxizität steigern.

[0028] Darüber hinaus ist es ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, das vorstehend erwähnte neue RAP-2-Protein, seine Isoformen und Analoga, Fragmente und Derivate als Antigene für die Herstellung polyclonaler und/oder monoclonaler Antikörper gegen diese zu verwenden. Die Antikörper wiederum können zum Beispiel für die Reinigung der neuen Proteine aus unterschiedlichen Quellen verwendet werden, wie z. B. aus Zellextrakten oder aus transformierten Zelllinien.

[0029] Des Weiteren können diese Antikörper für diagnostische Zwecke verwendet werden, wie z. B. für die Identifizierung von Erkrankungen, die mit einer abnormalen Funktion der zellulären Effekte in Bezug stehen, die durch den p55-R, den FAS-R oder durch andere verwandte Rezeptoren vermittelt werden.

[0030] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Arzneimitteln, welche das vorstehende neue RAP-2-Protein, seine Isoformen oder Analoga, Fragmente oder Derivate umfassen, sowie von Arzneimitteln, welche die vorstehend erwähnten Antikörper oder andere Antagonisten enthalten.

[0031] Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde ein neues Protein, RAP-2, isoliert. RAP-2 ist in der Lage an RIP zu binden oder mit ihm in Wechselwirkung zu treten und ist somit ein Modulator oder Vermittler der intrazellulären Aktivität von RIP. RIP ist an der Modulierung oder der Vermittlung intrazellulärer Signalübertragungswege beteiligt, wie z. B. der Zell-Cytotoxizität oder dem mit dem Zelltod assoziierten Signalweg, in dem RIP eine cytotoxische Aktivität durch sich selbst und in Verbindung, direkt oder indirekt, mit einer Reihe von anderen, mit dem Zelltod assoziierten Proteinen, besitzt, wie z. B. mit MORT-1, TRADD, MACH, Mch4, G1, dem p55-R und dem FAS-R, mit denen RIP assoziieren oder an die es binden kann, und zwar in einer direkten oder einer indirekten Weise mittels des „Todesdomänen“-Motivs/Moduls, das in RIP und in allen der vorstehend erwähnten Proteine vorhanden ist; ein weiterer Signalweg ist der Entzündungs-, Zellüberlebens- oder Lebensfähigkeits-Signalweg, in dem RIP eine aktivierende Rolle spielen kann, und zwar direkt oder indirekt aufgrund des Vorliegens eines Kinase-Motivs oder -Domäne, die in RIP vorhanden ist, sowie der Fähigkeit von RIP, an TRAF2 binden zu können, welches an NIK binden kann, welches wiederum direkt an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt ist, das eine zentrale Rolle bei Entzündungen und dem Überleben der Zelle spielt. Des Weiteren ist der p55-R auch in der Lage, mit TRADD und TRAF2 (über TRADD) in Wechselwirkung zu treten, und ist ebenfalls an der Aktivierung von NF- κ B und somit an dem Zellüberlebens-Signalweg beteiligt, und daher kann RIP, dadurch dass es an den FAS-R, an TRADD und an den p55-R (über TRADD) binden kann oder mit ihnen in Wechselwirkung treten kann, sowie auch mit TRAF2, ebenfalls an der Modulation von Entzündungen und der Aktivierung des Überlebens der Zelle durch diese Proteine beteiligt sein. Dementsprechend ist RIP ein Modulator oder ein Vermittler dieser Signalwege, und in ähnlicher Weise ist das neue RAP-2 der vorliegenden Erfindung durch die Bindung an RIP ein Modulator oder Vermittler dieser intrazellulären Signalwege.

[0032] RAP-2 wurde unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems isoliert und cloniert, und sequenziert

und charakterisiert, wie es in Einzelheiten hierin nachstehend beschrieben wird; RAP-2 scheint ein hoch-spezifisches an RIP bindendes Protein zu sein und damit einen spezifischen Modulator oder Vermittler von RIP darzustellen. RAP-2 bindet nicht an TRADD, MORT-1, den p55-R, den p75-R und MACH. Weiterhin scheint es so zu sein, dass RAP-2 kein charakteristisches Todesdomänen-Modul oder -Motiv besitzt, dies steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass RAP-2 die Cytotoxizität von sich aus nicht induziert.

[0033] Wie hierin durchgängig verwendet, ist der Begriff „RIP-Aktivität“ so gemeint, dass er die Aktivität von RIP bei der Modulierung oder der Vermittlung in den Entzündungs- und in den Zelltod- oder Zellüberlebens-Signalwegen mit einschließt. Diese Aktivitäten werden hierin vorstehend und nachstehend sowie in allen vorstehend erwähnten Veröffentlichungen und Patentanmeldungen angegeben, deren vollständige Inhalte hierin durch Bezugnahme mit eingeschlossen sind. Gleichfalls ist, wie hierin durchgängig verwendet, eine „RAP-2-Aktivität“ so gemeint, dass sie seine Modulierung und Vermittlung der RIP-Aktivität aufgrund seiner spezifischen Bindung an RIP mit einschließt, wobei diese Modulierung oder Vermittlung von RIP durch RAP-2 die Modulierung oder Vermittlung der Entzündungs-, der Zelltod- und der Zellüberlebens-Signalwege umfasst, an denen RIP direkt oder indirekt beteiligt ist, und als solches kann RAP-2 als ein indirekter Modulator oder Vermittler aller der vorstehend erwähnten Proteine angesehen werden, sowie möglicherweise einer Reihe weiterer Proteine, die an Entzündungen, am Zelltod oder am Überleben der Zelle beteiligt sind, und an die RIP bindet oder mit denen RIP auf direkte oder auf indirekte Weise in Wechselwirkung tritt.

[0034] Es scheint somit so zu sein, dass RAP-2 ein spezifisches, an RIP bindendes Protein und somit einen Modulator oder Vermittler der intrazellulären Aktivität von RIP darstellt. Ein an RAP-2 bindendes Protein besitzt aufgrund seiner Fähigkeit an RAP-2 zu binden, einen indirekten Einfluss auf RIP und ist somit ebenfalls ein Modulator oder Vermittler der intrazellulären Aktivität von RIP.

[0035] Somit besitzt RAP-2 offensichtlich eine Rolle bei der Modulierung oder der Vermittlung von Entzündungen, Zellüberlebens- und/oder Zelltod-Aktivitäten an denen RIP direkt oder indirekt beteiligt ist, insbesondere an solchen, die mit der Cytotoxizität und mit Entzündungen in Beziehung stehen, die durch verschiedene Reize verursacht oder induziert werden, einschließlich solcher, die über Rezeptoren der TNF/NGF-Rezeptorenfamilie und möglicherweise auch andere übertragen werden. (Für ein Schema der Beteiligung von RIP an diesen intrazellulären Ereignissen und somit an der Beteiligung von RAP-2 vergleiche mit **Fig. 1** in Malinin et al., 1997).

[0036] RAP-2 kann ebenfalls als ein Inhibitor der Zell-Cytotoxizität und der Entzündung dienen, und zwar aufgrund seiner Anwesenheit als Teil eines Komplexes mit anderen Proteinen, wie z. B. mit RIP und mit Proteinen, die an RIP gebunden haben, und als solches kann es die Cytotoxizität oder die entzündlichen Wirkungen dieser anderen Proteine (z. B. dem p55-R, dem FAS-R, MACH, Mch4, G1 und MORT-1) beeinflussen, was letztendlich zu einer Hemmung ihrer cytotoxischen Aktivität oder ihrer Aktivität bei Entzündungen führt.

[0037] RAP-2 kann jedoch auch als ein Verstärker oder Vermehrer der Zell-Cytotoxizität und von Entzündungen dienen, und dies kann durch die Verstärkung der Aktivität anderer Proteine erfolgen, wie z. B. von RIP und von anderen Proteinen, die an RIP gebunden haben, wie vorstehend erwähnt, und bei der Rekrutierung dieser Proteine durch RIP helfen, wobei die Rekrutierung dazu dient, die cytotoxische Aktivität der verschiedenen Proteine zu erhöhen oder ihre entzündlichen Wirkungen zu verstärken.

[0038] Ebenso kann RAP-2 auf analoge Weise als ein Inhibitor oder als ein Verstärker des Zellüberlebens-Signalweges dienen, wie vorstehend erwähnt, und zwar aufgrund der Beteiligung von RIP an diesem Signalweg.

[0039] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung eine DNA-Sequenz bereit, die ein mit RIP assoziiertes Protein codiert (RAP-2), sowie seine Isoformen, Analoga oder Fragmente, das in der Lage ist, an RIP zu binden und die intrazelluläre Aktivität von RIP zu modulieren oder zu vermitteln, wobei diese intrazelluläre Aktivität eine Modulation oder eine Vermittlung von Entzündungen und/oder des Zelltods und/oder des Zellüberlebens darstellt.

[0040] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung eine DNA-Sequenz bereit, die ein mit RIP assoziiertes Protein (RAP-2), sowie Isoformen, Analoga oder Fragmente davon codiert, das/die in der Lage ist/sind, an RIP zu binden und die intrazelluläre Aktivität von RIP zu modulieren oder zu vermitteln, wobei die DNA-Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einer DNA-Sequenz, die ein RAP-2-Protein codiert, wie es in **Fig. 3** dargestellt ist;
- (b) einer DNA-Sequenz, wie sie in der SEQ ID NO: 1 oder 2 dargestellt ist;
- (c) einer DNA-Sequenz, die in der Lage ist, mit einer Sequenz nach (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren und die ein biologisch aktives RAP-2-Protein codiert;

- (d) einer DNA-Sequenz, die aufgrund des genetischen Codes zu der in (a) oder in (b) definierten DNA-Sequenz degeneriert ist und die ein biologisch aktives RAP-2-Protein codiert; und
- (e) einer DNA-Sequenz nach (b), die ein RAP-2-Protein, eine Isoform, ein Analog oder ein Fragment codiert, das mindestens einen Teil der in **Fig. 3** dargestellten Sequenz besitzt.

[0041] Die vorliegende Erfindung stellt RAP-2-Proteine und Analoga, Fragmente oder Derivate davon bereit, die durch irgendeine der vorstehenden Sequenzen der Erfindung codiert werden, wobei diese Proteine, Analoga, Fragmente und Derivate in der Lage sind, an RIP zu binden und seine biologische Aktivität in Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwegen intrazellulär zu modulieren oder zu vermitteln.

[0042] Durch die vorliegende Erfindung werden ebenfalls replizierbare Expressionsvehikel bereitgestellt, welche die vorstehende DNA umfassen, wobei diese replizierbaren Expressionsvehikel in der Lage sind, in geeigneten eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszellen exprimiert zu werden; transformierte eukaryontische oder prokaryontische Wirtszellen, die solche replizierbaren Expressionsvehikel enthalten, und ein Verfahren zur Herstellung des RAP-2-Proteins, oder der Analoga, Fragmente oder Derivate der Erfindung durch das Züchten solcher transformierter Wirtszellen unter Bedingungen, die für die Expression des Proteins, der Analoga, Fragmente oder Derivate geeignet sind, dem Bewirken posttranslationeller Modifikationen an dem Protein, sofern diese für den Erhalt des Proteins notwendig sind, und dem Extrahieren des exprimierten Proteins, der Analoga, Fragmente oder Derivate aus dem Kulturmedium der transformierten Zellen oder aus Zellextrakten der transformierten Zellen. Es ist beabsichtigt, dass die vorstehenden Definitionen alle Isoformen des RAP-2-Proteins umfassen.

[0043] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung auch Antikörper oder aktive Derivate oder Fragmente dieser bereit, die mit dem biologisch aktiven RAP-2-Protein, mit Teilen des RAP-2-Proteins und mit Analoga, Fragmenten und Derivaten davon gemäß der Erfindung reagieren.

[0044] Durch noch einen anderen Aspekt der Erfindung werden verschiedene Verwendungen der vorstehenden DNA-Sequenzen oder der Proteine, die sie codieren, gemäß der Erfindung bereitgestellt, wobei die Verwendungen unter anderem umfassen:

- (i) Modulierung der intrazellulären Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch das Protein RIP moduliert oder vermittelt werden, umfassend die Behandlung der Zellen mit einem oder mit mehreren RAP-2-Proteinen, Isoformen, Analoga, Fragmenten oder Derivaten davon, die in der Lage sind, an RIP zu binden, wobei die Behandlung der Zellen das Einbringen eines oder mehrerer Proteine, Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate davon in die Zellen umfasst, in einer Form, die für ihre intrazelluläre Einbringung geeignet ist, oder das Einbringen einer DNA-Sequenz in die Zellen, die eines oder mehrere Proteine, Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate codiert, in Form eines geeigneten Vektors, der die Sequenz enthält, wobei dieser Vektor in der Lage ist, die Insertion der Sequenz in die Zellen in einer Weise zu bewirken, dass die Sequenz in den Zellen exprimiert wird.
- (ii) Modulierung der Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch Liganden der TNF-Familie über Wirkungen auf die Zellen durch die Aktivität des RIP-Proteins gemäß (i) vorstehend vermittelt wird, wobei die Behandlung der Zellen das Einbringen des RAP-2-Proteins oder seiner Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate in die Zellen umfasst, in einer Form, die für eine intrazelluläre Einbringung geeignet ist, oder das Einbringen einer DNA-Sequenz in die Zellen, die ein G1-Protein oder Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate davon codiert, in Form eines geeigneten Vektors, der die Sequenz enthält, wobei dieser Vektor in der Lage ist, die Insertion der Sequenz in die Zellen in einer Weise zu bewirken, so dass die Sequenz in den Zellen exprimiert wird.
- (iii) Verwendung wie in (ii) vorstehend, wobei die Behandlung der Zellen durch Transfektion der Zellen mit einem rekombinanten Tiervirusvektor erfolgt, umfassend die Schritte:
 - (a) Konstruktion eines rekombinanten Tiervirusvektors, der eine Sequenz enthält, die ein Virusoberflächenprotein (Ligand) codiert, das in der Lage ist, an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor auf der Oberfläche einer Zelle zu binden, die den FAS-R oder den p55-R trägt, und einer zweiten Sequenz, die ein Protein codiert, das ausgewählt wurde aus dem RAP-2-Protein und seinen Isoformen, Analoga, Fragmenten und Derivaten, und das, wenn es in den Zellen exprimiert wird, in der Lage ist, die intrazellulären Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege zu modulieren oder zu vermitteln; und
 - (b) Infektion der Zellen mit einem Vektor nach (a).
- (iv) Modulierung der Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch Liganden der TNF-Familie über Wirkungen auf die Zellen durch die Aktivität des RIP-Proteins vermittelt wird, umfassend die Behandlung der Zellen mit Antikörpern oder mit aktiven Fragmenten oder Derivaten davon gemäß der Erfindung, und wobei die Behandlung durch die Anwendung einer geeigneten Zusammensetzung in die Zellen erfolgt, die die Antikörper, aktiven Fragmente oder Derivate davon enthält, wobei, wenn mindestens

ein Teil des RAP-2-Proteins an der extrazellulären Oberfläche exponiert wird, diese Zusammensetzung für die extrazelluläre Anwendung formuliert wird, und wobei, wenn die RAP-2-Proteine vollständig intrazellulär vorliegen, die Zusammensetzung für die intrazelluläre Anwendung formuliert wird.

(v) Modulierung der Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch Liganden der TNF-Familie über Wirkungen auf die Zellen durch die Aktivität des RIP-Proteins vermittelt wird, umfassend die Behandlung der Zellen mit einer Oligonucleotidsequenz, die eine Antisense-Sequenz aus mindestens einem Teil der RAP-2-Proteinsequenz der Erfindung codiert, wobei die Oligonucleotidsequenz in der Lage ist, die Expression des RAP-2-Proteins zu blockieren.

(vi) Verwendung wie in (ii) vorstehend für die Behandlung von Tumorzellen oder von mit HIV infizierten Zellen oder von anderen erkrankten Zellen, umfassend:

(a) Konstruktion eines rekombinanten Tiervirusvektors, der eine Sequenz enthält, die ein Virusoberflächenprotein codiert, das in der Lage ist, an einen spezifischen Tumorzellen-Oberflächenrezeptor oder an einen Zelloberflächenrezeptor einer mit HIV infizierten Zelle oder an einen Rezeptor, den andere erkrankte Zellen tragen, zu binden, und eine Sequenz, die ein Protein codiert, das ausgewählt wurde aus dem RAP-2-Protein, der Analoga, Fragmente und Derivate der Erfindung, das/die, wenn es/sie in dem Tumor, den mit HIV infizierten Zellen oder den anderen erkrankten Zellen exprimiert wird/werden, in der Lage ist/sind, die Zellen durch die Aktivität des RIP-Proteins abzutöten; und

(b) Infektion der Tumor- oder der mit HIV infizierten Zellen oder anderer erkrankter Zellen mit dem Vektor nach (a).

(vii) Modulierung der Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch Liganden der TNF-Familie über Wirkungen auf die Zellen durch die Aktivität des RIP-Proteins vermittelt wird, umfassend die Anwendung des Ribozym-Verfahrens, bei dem ein Vektor, der eine Ribozymsequenz trägt, die in der Lage ist, mit der zellulären mRNA-Sequenz, die ein RAP-2-Protein gemäß der Erfindung codiert, in Wechselwirkung zu treten, in die Zellen in einer Form eingebracht wird, welche die Expression der Ribozymsequenz in den Zellen erlaubt, und wobei die Ribozymsequenz, wenn sie in den Zellen exprimiert wird, mit der zellulären mRNA-Sequenz in Wechselwirkung tritt und die mRNA-Sequenz spaltet, was zur Hemmung der Expression des RAP-2-Proteins in den Zellen führt.

(viii) Verwendung, die aus den vorstehenden Verwendungen gemäß der Erfindung ausgewählt wird, wobei die das RAP-2-Protein codierende Sequenz mindestens eine der RAP-2-Isoformen oder eines seiner Analoga, Fragmente oder Derivate gemäß der Erfindung umfasst, die/das in der Lage ist/sind, an RIP zu binden.

(ix) Verfahren für die Isolierung und Identifizierung von Proteinen gemäß der Erfindung, die in der Lage sind, an das RIP-Protein zu binden, umfassend die Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahrens, bei dem eine Sequenz, die das RIP-Protein codiert, in einem Hybridvektor enthalten ist, und eine Sequenz aus einer cDNA- oder einer genomischen DNA-Genbank in einem zweiten Hybridvektor enthalten ist; die Vektoren werden dann dazu verwendet, Hefe-Wirtszellen zu transformieren, und die positiv transformierten Zellen werden isoliert, darauf hin erfolgt die Extraktion des zweiten Hybridvektors, um die Sequenz zu erhalten, die ein Protein codiert, das an das RIP-Protein bindet.

(x) Eine Verwendung oder ein Verfahren nach (i) – (ix) vorstehend, wobei das RAP-2-Protein eine beliebige Isoform, Analog, Fragment und Derivat von RAP-2 darstellt.

(xi) Eine Verwendung oder ein Verfahren nach (i) – (ix) vorstehend, wobei das RAP-2-Protein oder eine beliebige seiner Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate an der Modulierung der zellulären Wirkung beteiligt ist, die durch irgendwelche anderen Vermittler oder Induktoren vermittelt oder moduliert wird, an die das RAP-2-Protein, seine Isoformen, Analoga, Fragmente oder Derivate direkt oder indirekt binden kann.

[0045] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Arzneimittel für die Modulierung von Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwegen bereit, die durch die Wirkung von Mitgliedern der TNF-Familie auf die Zellen vermittelt wird, und zwar durch die Aktivität des RIP-Proteins oder durch die Wirkung irgendwelcher anderer Vermittler oder Induktoren auf die Zellen, wie vorstehend erwähnt wurde, umfassend als aktiven Bestandteil irgendeinen der Folgenden:

(i) ein RAP-2-Protein gemäß der Erfindung und biologisch aktive Fragmente, Analoga und Derivate von Mischungen davon;

(ii) einen rekombinanten Tiervirusvektor, der ein Protein codiert, das in der Lage ist, an einen Zelloberflächenrezeptor zu binden, und der ein RAP-2-Protein oder biologisch aktive Fragmente oder Analoga gemäß der Erfindung codiert;

(iii) eine Oligonucleotidsequenz, die eine Antisense-Sequenz der RAP-2-Proteinsequenz gemäß der Erfindung codiert, wobei das Oligonucleotid die zweite Sequenz des rekombinanten Tiervirusvektors nach (ii) vorstehend sein kann.

[0046] Die vorliegende Erfindung stellt auch die folgenden Verwendungen bereit:

I. Modulierung der Entzündungs-, Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwege, die durch das RIP-Protein oder durch die Wirkung irgendeines anderen Vermittlers oder Induktors oder durch irgendeinen anderen Induktor oder Inhibitor von NF- κ B auf die Zellen moduliert oder vermittelt werden, umfassend die Behandlung der Zellen mit einem Verfahren gemäß irgendeinem der vorstehenden Punkte (i) bis (x) mit RAP-2-Proteinen, Isoformen, Analoga, Fragmenten oder Derivaten davon oder mit Sequenzen, die RAP-2-Proteine, Isoformen, Analoga, oder Fragmente davon codieren, wobei die Behandlung zur Steigerung oder zur Hemmung der durch RIP vermittelten Wirkung führt, und dadurch ebenfalls auch zur Steigerung oder zur Hemmung der durch den FAS-R oder durch den p55-R vermittelten Wirkung, oder eines anderen Vermittlers oder Induktors oder anderer Induktoren oder Inhibitoren von NF- κ B.

II. Verwendung wie vorstehend, wobei das RAP-2-Protein, sein Analog, Fragment oder Derivat, derjenige Teil des RAP-2-Proteins ist, der spezifisch an der Bindung an RIP beteiligt ist, oder wobei ein anderer Vermittler oder Induktor oder ein anderer Induktor oder Inhibitor von NF- κ B oder die RAP-2-Proteinsequenz denjenigen Teil des RAP-2-Proteins codiert, der spezifisch an der Bindung an RIP oder an den anderen Vermittler oder Induktor oder an den anderen Induktor oder Inhibitor von NF- κ B beteiligt ist.

III. Verwendung wie vorstehend, wobei das RAP-2-Protein irgendeine der Isoformen von RAP-2 ist, wobei die Isoformen in der Lage sind, die mit RIP assoziierte Wirkung zu verstärken.

IV. Verwendung wie vorstehend, wobei das RAP-2-Protein irgendeine der Isoformen von RAP-2 ist, wobei die Isoformen in der Lage sind, die mit RIP assoziierte Wirkung oder andere mit einem Vermittler oder Induktor assoziierten Wirkungen auf Zellen zu hemmen, und dadurch ebenfalls die mit dem FAS-R oder dem p55-R assoziierte Wirkung auf die Zellen oder die anderen cytotoxischen Wirkungen des Vermittlers oder des Induktors auf die Zellen zu hemmen.

V. Verwendung wie vorstehend, wobei das RAP-2-Protein, eine Isoform, ein Analog, ein Fragment oder ein Derivat in der Lage ist, die mit RIP assoziierte Wirkung auf die Entzündungs- und Zellüberlebens-Signalwege zu steigern oder zu hemmen, und zwar durch eine direkte oder indirekte Hemmung von NF- κ B oder durch eine direkte oder eine indirekte Aktivierung der JNK oder der p38-Kinase.

[0047] Die Isolierung der RAP-2-Proteine, ihre Identifizierung und Charakterisierung kann durch irgendeines der Standard-Durchmusterungsverfahren durchgeführt werden, die für die Isolierung und Identifizierung von Proteinen verwendet werden, wie zum Beispiel durch das Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren, durch Affinitätschromatographie-Verfahren und durch irgendeines der anderen wohlbekannten Standardverfahren, die für diesen Zweck verwendet werden.

[0048] In einem noch anderen Aspekt der Erfindung wird das RAP-2-Protein selbst oder eine Isoform, ein Fragment oder ein Derivat davon als Köder bei der Hefe-Zwei-Hybrid-Durchmusterung auf Proteine, die daran binden, verwendet.

[0049] Andere Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, wie sie sich aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung der Erfindung ergeben, werden ebenfalls bereitgestellt.

[0050] Es sollte angemerkt werden, dass, wie durchgängig verwendet, die folgenden Begriffe: „Modulierung/Vermittlung der Wirkung von RIP oder des FAS-Liganden oder des TNF auf die Zellen“ und irgendwelche anderen Begriffe, wie z. B. „Modulierung/Vermittlung“, die in der Spezifikation erwähnt werden, so verstanden werden sollen, dass sie die Behandlung in vitro sowie in vivo mit einschließen, und dass sie darüber hinaus auch die Hemmung oder die Steigerung/Verstärkung mit einschließen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0051] **Fig. 1** (A, B) (SEQ ID NO: 1) zeigt die Nucleotidsequenz von RAP-2, das Start- und das Stopp-Codon sind unterstrichen. Der Pfeil zeigt den Start des 1,5 kB großen Clons an, der durch eine Zwei-Hybrid-Durchmusterung erhalten wurde;

[0052] **Fig. 2** (A, B) (SEQ ID NO: 2) zeigt die Nucleotidsequenz des Clons # 41072 (vergleiche mit Beispiel 1), das Start- und das Stopp-Codon sind unterstrichen;

[0053] **Fig. 3** A (/1, /2) zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz der menschlichen (20.4 vollständig und Mensch shrif) und der murinen (NEMO vollständig und Maus part) Spleißvarianten von RAP-2 und B (/1, /2) zeigt die veröffentlichte Sequenz von FIP-2, die unter Verwendung des Software-Pakets, das von dem BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine, Houston, TX) erhältlich ist, aligned wurde. Homologe Aminosäuren befinden sich in Kästchen, identische Aminosäuren sind grau schattiert. Das Sternchen in (B) bezeichnet ein mögliches Leucin-Reißverschluss (LZ)-ähnliches Motiv in FIP-2.

[0054] Fig. 4 beschreibt die molekulare Charakterisierung von RAP-2. In A wird eine Northern-Blot-Hybridisierung des menschlichen MTN-Blots I (Clontech) mit einem DNA-Fragment von RAP-2 gezeigt. In B wird die Bindung von RAP-2 an RIP untersucht, wie sie in Beispiel 3 beschrieben wird. In C wurde eine NIK-RAP-2-Wechselwirkung wie in (B) nachgewiesen, mit der Ausnahme, dass Anti-FLAG-Antikörper für die Western-Blot-Analyse im Anschluss an eine Immunpräzipitation mit Anti-His6 verwendet wurden. Ein Pfeil markiert die Position der immunpräzipitierten Proteine.

[0055] Fig. 5 ist eine graphische Darstellung der massiven Herunterregulierung der Aktivierung von NF- κ B und c-Jun durch verschiedene Reize bei der ectopischen Expression von RAP-2, wie sie in Beispiel 4 beschrieben wird. HEK-293T-Zellen wurden mit einem Reporterplasmid (HIVLTR-Luc oder CMV-Luc für NF- κ B- (A) und mit GAL4-Luc für c-Jun- (B) Aktivierungs-Testansätze) sowie mit einem Expressionsvektor für den angegebenen Induktor und entweder mit dem leeren Vehikel (pcDNA3 – das in der Figur mit „Allein“ bezeichnet wird) oder mit einem Plasmid, welches das Volllängen-RAP-2 (pcRAP-2 – das in der Figur mit „Plus“ bezeichnet wird) codierte, transient transfiziert. Die Aktivierung des Reportergens, d. h. die Luciferase-Aktivität, wird in relativen Luciferase-Einheiten (R.L.U.) angegeben.

[0056] Fig. 6 zeigt, dass RAP-2 ein ähnlich repressives Verhalten gegenüber NF- κ B und c-Jun über einen breiten Konzentrationsbereich zeigt. TRAF2 wurde in HEK-293T-Zellen zusammen mit den verschiedenen angegebenen Mengen entweder von pcRAP-2 (Sense-) oder pcRAP-2-a/s (Antisense-) Konstrukten transient exprimiert. Für die Bestimmung der Aktivierung von NF- κ B (A) und c-Jun (B) wurden das pHIVLTR-Luc-, beziehungsweise das pGAL4-Luc-Reporterplasmid mit einbezogen (kotransformiert). Der Luciferase-Testansatz wurde wie für Fig. 5 in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

[0057] Fig. 7 zeigt, dass RAP-2 die signalinduzierte Phosphorylierung von c-Jun ohne Beeinträchtigung des Aktivitätsspiegels von JNK1/2 stark potenziert.

(A) Gesamt-Zellysate von HEK-293T-Zellen, die mit den angegebenen Expressionskonstrukten zusammen mit entweder dem pcDNA3-Träger, der in der Figur durch ein Minuszeichen (-) angezeigt ist, oder mit pcRAP-2, das in der Figur durch ein Pluszeichen (+) angezeigt ist, transfiziert worden waren, wurden durch Western-Blot-Analyse mit Anti-Phospho-Jun-Antikörpern wie in Beispiel 5 beschrieben identifiziert. Die Kontrollmembran, die in der unteren Teilabbildung gezeigt wird, wurde mit Anti-Gesamt-c-Jun-Antikörpern (NEB) nochmals ausgetestet;

(B) Aktivierte JNK1/2 aus HEK-293T-Zellen, die entweder mit pcDNA3 oder mit pcRAP-2 transfiziert und mit hrTNF α über zunehmende Zeiträume behandelt worden waren, wurden durch Western-Blot-Analyse der Gesamtylysate mit Antikörpern gegen Phospho-JNK wie in Beispiel 5 beschrieben nachgewiesen.

(C) HEK-293T-Zellen, die mit dem leeren Vektor, mit pcRAP-2 und mit pcRIP in verschiedenen Kombinationen zusammen mit einem HA-JNK1-Expressionsplasmid cotransfiziert wurden. Die JNK1 wurde anschließend über ihre N-terminale HA-Markierungssequenz immunpräzipitiert, und ihre Fähigkeit, in Bakterien hergestelltes und gereinigtes GST-Jun zu phosphorylieren, wurde mit einem in vitro-Kinase-Testansatz bestimmt. Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE analysiert. GST-Jun ist mit einer Pfeilspitze markiert.

[0058] Fig. 8 zeigt, dass RAP-2 nicht mit NF- κ B und AP-1 um die Bindung an die DNA kompetitiert. HEK-293T-Zellen wurden mit den angegebenen Proteinen entweder alleine (-) oder zusammen mit pcRAP-2 (+) transfiziert. Kernextrakte, die aus den Zellen hergestellt wurden, wurden zusammen mit 32P-markierten Oligonucleotiden inkubiert, die die klassischen Erkennungssequenzen von AP-1 (A) oder von NF- κ B (B) enthielten. Die Reaktionsprodukte wurden mit einer nicht-denaturierenden PAGE analysiert.

[0059] Fig. 9 zeigt, dass RAP-2 den Grundspiegel von NF- κ B in HEK-293T- und in HeLa-Zellen beeinflusst, die mit unterschiedlichen Mengen entweder des RAP-2 (Sense-) oder des RAP-2-Antisense (a/s)-(Konstrukts) transient transfiziert worden waren. Alle Manipulationen wurden wie für Fig. 6 in Beispiel 4 beschrieben durchgeführt.

[0060] Fig. 10 zeigt die funktionellen Eigenschaften serieller Deletionen von RAP-2. In A ist eine schematische Darstellung der fortlaufenden C-terminalen Deletionen von RAP-2 dargestellt. Alle Verkürzungen besitzen den intakten N-Terminus von RAP-2, während ihre C-terminalen Enden durch Pfeilspitzen angezeigt sind. Die Binderegion von RIP, NIK, IKK β und TIP60 ist unterstrichen. Die drei schraffierten Kästchen entsprechen den möglichen Leucin-Reißverschluß-ähnlichen-Motiven. B zeigt die Wirkung einer Überexpression der in A beschriebenen Deletionskonstrukte auf die Aktivierung von NF- κ B in HEK-293T-Zellen durch RelA, TRAF2, TNF und NIK unter Verwendung des HIV-LTR-Luciferase-Reporterplasmids für NF- κ B. Die Aktivierung des Reportergens, d. h. die Luciferase-Aktivität, wird in relativen Luciferase-Einheiten (R.L.U.) angegeben.

[0061] Fig. 11 zeigt die Kartierung der funktionellen und der Binderegionen von RAP-2.

(A) Verschiedene Deletionen von RAP-2 wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, an die angegebenen Proteine innerhalb transfizierter Hefezellen (ungradzahlige Spalten) und HEK-293T-Säugerzellen (gradzahlige Spalten) zu binden. Die beiden Spalten rechts außen zeigen die Fähigkeit der gleichen Deletionen, die wie in Beispiel 9 beschrieben in großen Mengen in HEK-293T-Zellen transfiziert worden waren, die Aktivierung von NF- κ B zu hemmen und die Hyperphosphorylierung von c-Jun als Antwortreaktion auf eine Behandlung mit TNF- α zu potenzieren. Der Fettdruck der Kreuze ist zu der Intensität einer bestimmten Wirkung proportional. Sternchen zeigen an, dass die beobachteten Wirkungen der markierten Konstrukte hinsichtlich der Stimulierung von Rel-A unterschiedlich sind (vergleiche mit Fig. 10).

(B) Zusammenfassung in einer Karte, die die Lage der Binde- (oberer Teil) und der funktionellen (unterer Teil) Regionen von RAP-2 darstellt, wie sie aus der in (A) gezeigten Deletionsanalyse abgeleitet wurde, entlang dem Protein-Grundgerüst angeordnet. Die schraffierten Teile zeigen die möglichen Stellen von Grenzen der entsprechenden minimalen Regionen an.

[0062] Fig. 12 zeigt, dass Ser-148 in RAP-2 für seine Fähigkeit die Hyperphosphorylierung von c-Jun an Ser-63 zu induzieren, essentiell ist.

[0063] Es wird ein Westen-Blot gezeigt, in dem „wt“ Wildtyp bedeutet, S148A bedeutet, dass das Ser an Position 148 durch ein Ala ausgetauscht wurde, und „Vektor“ ist der leere Kontrollvektor.

Genaue Beschreibung der Erfindung

[0064] Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt ein neues RAP-2-Protein, das durch eine DNA-Sequenz codiert wird, die nachstehend beschrieben wird, und das in der Lage ist, an das RIP-Protein zu binden und dadurch die intrazelluläre Aktivität von RIP zu vermitteln oder zu modulieren, insbesondere dort, wo RIP an der Modulierung oder der Vermittlung von Entzündungen und den Zelltod- und/oder Zellüberlebens-Signalwegen beteiligt ist, wie hierin vorstehend beschrieben wurde. Somit kann RAP-2 die Aktivität von RIP in dem Zelltod/Entzündungs-Überlebens-Signalweg hemmen, RAP-2 kann die Aktivität von RIP in dem Entzündungs- oder dem Zelltod-Überlebens-Signalweg steigern, oder es kann die Aktivität von RIP in einem dieser Signalwege steigern, während es sie in dem anderen hemmt.

[0065] RAP-2 wurde sequenziert und charakterisiert, und es wurde herausgefunden, dass RAP-2 ein RIP-bindendes Protein darstellt, das eine hohe Spezifität für RIP besitzt, das aber keine Bindung hinsichtlich einer Reihe anderer Proteine zeigt, von denen bekannt ist, dass sie an den intrazellulären Signalübertragungswegen beteiligt sind, die zu Entzündungen, zum Zelltod oder zum Überleben der Zelle führen. RAP-2 besitzt offenbar keine der Domänen, die Proteinen gemein sind, welche in irgendeinem dieser Signalwege aktiv sind, d. h. RAP-2 besitzt kein „Todesdomänen“-Motiv oder -Modul, es besitzt kein Kinase-Motiv oder -Domäne und es besitzt keine Protease-Domäne oder -Motiv. Die für RAP-2 bestimmte Sequenz ist darüber hinaus eine einzigartige Sequenz, wie sich aus einem Vergleich mit den Sequenzen in einer Reihe von Datenbanken ergibt, einschließlich der Genbank-, der Human Genome level 1- und der „dbest“-Datenbank. Wie vorstehend in Einzelheiten beschrieben (und auch unter Bezugnahme auf alle Veröffentlichungen und Patentanmeldungen, wie sie angeführt sind), ist RIP an den Entzündungs-, Zelltod- und Zellüberlebens-Signalwegen intrazellulär beteiligt. Daher kann die Regulierung oder die Kontrolle der Aktivität von RIP entweder einen oder alle dieser Signalwege regulieren, wenn solche Signalwege initiiert werden, wie zum Beispiel durch die Bindung des TNF oder des Fas-Liganden an ihre Rezeptoren (bei TNF, insbesondere p55-R). RIP kann eine Schlüsselrolle bei der Festlegung spielen, welcher Signalweg in einem größeren Ausmaß aktiviert wird, und dies aufgrund seiner Fähigkeit, an eine Reihe von cytotoxischen Proteinen zu binden, die Todesdomänen besitzen, und ebenfalls an eine Reihe von Proteinen, die eine Kinaseaktivität besitzen. Dementsprechend können Proteine, wie zum Beispiel das RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung, die spezifisch an RIP binden können, eine wichtige Rolle bei der Modulierung der Aktivität von RIP spielen und dadurch das Ausmaß der Induktion des einen Signalweges relativ zu den anderen modulieren. Somit stellt das RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung einen wichtigen intrazellulären Signal-Modulator oder -Vermittler dar.

[0066] Zusätzlich zu dem Volllängen-RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung wurde eine kürzere cDNA cloniert, von der herausgefunden wurde, dass sie aus Sequenz-„Blöcken“ zusammengesetzt ist, die aus mehreren voneinander entfernt liegenden Regionen der „vollständigen“ cDNA stammten, und die offenbar aus einem alternativen Spleißen des gleichen Gens herrührte. Das murine Gegenstück des menschlichen RAP-2-Proteins wurde durch eine Ähnlichkeitssuche in der Maus-EST-Sammlung identifiziert. Es wurde herausgefunden, dass eine Teilsequenz der murinen cDNA über die codierende Region mit ihrem menschlichen Gegenstück praktisch identisch ist.

[0067] Die physiologische Bedeutung der RIP-RAP-2-Wechselwirkung wurde mit transfizierten HEK-293T- und HeLa-Zellen weiter bestätigt. Die Bildung eines solchen Komplexes führte jedoch nicht zu einer enzymatischen Aktivität von RIP, wie dadurch bewiesen wird, dass die Überexpression von RIP nicht zu einer Phosphorylierung von RAP-2 führte.

[0068] Die Transfektionsexperimente mit HEK-293T-Säugerzellen führten ebenfalls zu einer stabilen Bildung eines RAP-2-NIK-Komplexes.

[0069] RAP-2 scheint ein entscheidendes Element des NF- κ B- und des c-Jun-Signalübertragungsweges zu sein, da es an NIK, IKK β und an TIP60 (eine Histon-Acetyltransferase) bindet und die von NF- κ B und c-Jun abhängige Transkription moduliert. Tatsächlich führt eine ectopische Expression von RAP-2 zur Hemmung der NF- κ B-Antwortreaktion, während seine Verminderung in der Zelle mittels eines Antisense-Konstrukts zu einer erhöhten NF- κ B- und c-Jun-Transaktivierung führt.

[0070] Es wurde auch herausgefunden, dass RAP-2 die Hyperphosphorylierung von c-Jun potenziert, die nicht durch eine Aktivität der JNK vermittelt worden war. RAP-2 hemmt nicht die Bindung von c-Jun und von RelA an die DNA. Die Binde- und die funktionellen Domänen von RAP-2 wurden durch sequentielle Deletionsanalysen identifiziert. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Binderegionen für RIP, NIK und TIP60 überlappen und sich innerhalb der Aminosäuren 95-264 von RAP-2 befinden. Es wurde jedoch herausgefunden, dass die weiter stromabwärts liegenden funktionellen Wirkungen, die durch RAP-2 vermittelt werden, in der N-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert sind, welche die Aminosäuren 1-264 umfasst.

[0071] Im Hinblick auf das Vorstehende erscheint RAP-2 ein entscheidendes Element eines Signal-Dämpfungs-Zirkels des Stressreaktionsnetzwerks zu sein: eine ectopische Expression des die Sensesequenz codierenden Konstrukts hemmt die Antwortreaktion, während die Expression eines die Antisensesequenz codierenden Konstrukts die Antwortreaktion verstärkt. Tatsächlich ist RAP-2 in dem Labor der Erfinder auch als RAT (RIP's attenuator, RIP-Dämpfer) bekannt, und kann daher hierin auch als RAT und/oder RAT-303 und/oder Clon 303 bezeichnet sein.

[0072] Die Existenz multipler Spleiß-Varianten zeigt an, dass zumindest zum Teil, der Nettoeffekt von RAP-2 unter bestimmten Bedingungen wahrscheinlich von der Anwesenheit bestimmter Sequenzblöcke abhängt, die für die Proteinbindung, Zielrichtung, Translokation und Modifizierung in einer vorherrschenden Isoform nötig sind. Wenn zum Beispiel die Bindung von RAP-2 an TIP60 die Lokalisierung des Ersten (d. h. RAP-2) im Kern erlaubt, könnte man die Hypothese aufstellen, dass Varianten von RAP-2, die Kern-Lokalisierungs-Signale (NLS) durch Spleißen entfernt haben, defekt werden, oder umgekehrt bei der Unterdrückung von NF- κ B/AP-1 übermäßig aktiv werden. Die Sequenzanalyse zeigt, dass RAP-2 mehrere Cluster von positiv geladenen Aminosäuren (E, K und R) enthält, die für die meisten der bekannten NLSs charakteristisch sind.

[0073] Die Bindung von RAP-2 an RIP wurde in einer Region des RAP-2-Proteins kartiert, die zwischen den Aminosäuren 177-218 beginnt und bei der Aminosäure 264 endet. Die RIP-Bindedomäne innerhalb von RAP-2 überlappt weder mit der IKK β - noch mit der NIK-Bindestelle.

[0074] Die Bindung an TIP60, ein Mitglied einer Familie von Kernproteinen, die als Histon-Acetyltransferasen bezeichnet werden, sind offenbar innerhalb der Region kartiert, die die Aminosäuren 95-264 überspannt. Die Region, die an der Homo-Dimerisierung beteiligt ist, wurde zwischen den Aminosäuren 217-264 lokalisiert.

[0075] Die akkumulierten Daten legen nahe, dass alle funktionellen Wirkungen von RAP-2 (namentlich die Hemmung von NF- κ B und die Induktion der Hyperphosphorylierung von c-Jun) in der gleichen Region kartiert sind.

[0076] Des Weiteren ist es möglich, dass die Region, die für eine wirksame Modulierung der Signalübertragung durch alle Induktoren ausreicht, sich in dem N-terminalen Segment des Proteins befindet.

[0077] Die Region, die durch die Aminosäuren 95-416 umschlossen wird, besitzt eine Wirkung, obwohl diese signifikant schwächer ist, verglichen mit derjenigen, die durch das Volllängen-Protein verursacht wird, und daher könnte sie aus einer erzwungenen Aggregation des endogenen RAP-2 herrühren.

[0078] Mit der Ausnahme von RelA, können darüber hinaus alle Wirkungen, die in unseren Experimenten induziert wurden, nur durch die wenigen, etwa 100 N-terminalen Aminosäuren von RAP-2 vermittelt werden. Tatsächlich vermittelt sogar das Fragment, das die Aminosäuren 1-102 umfasst eine bestimmte Wirkung, obwohl

nur in moderater Stärke.

[0079] Andererseits erfordert die Unterdrückung der durch RelA vermittelten Wirkung einen viel längeren Teil von RAP-2. Bislang konnten wir die Grenzen dieser Region innerhalb der Aminosäuren 1-264 definieren, wobei offenbar die Region zwischen den Aminosäuren 157 und 264 mit einigen spezifischen, mit RelA assoziierten Bindungseigenschaften ausgestattet ist.

[0080] Im Hinblick auf die vorstehenden Beobachtungen, scheint es so zu sein, dass:

- a. Mit der Ausnahme von RelA ist die Bindung von RAP-2 an RIP und sehr wahrscheinlich auch an NIK und an TIP60 nicht für die Funktion des Proteins als Inhibitor des durch Überexpression induzierten NF- κ B erforderlich.
- b. Die Wirkung von RAP-2 auf die durch eine Überexpression von RelA induzierte Aktivierung wird offensichtlich zumindest zum Teil durch unterschiedliche Bindungsereignisse vermittelt. Es kann im Wesentlichen von allen der vorstehend erwähnten Proteine herausgefunden werden, dass sie zu einer bestimmten Aktivität mit beitragen, wie aus den bislang durchgeführten Experimenten abgeleitet werden kann.

[0081] Aufgrund der einzigartigen Fähigkeit des FAS-R und der TNF-Rezeptoren, den Zelltod zu verursachen, sowie der Fähigkeit der TNF-Rezeptoren, verschiedene andere gewebsschädigende Aktivitäten auslösen zu können, kann eine Abweichung von der Funktion dieser Rezeptoren für den Organismus besonders schädlich sein. Tatsächlich wurde sowohl von einer übermäßigen als auch von einer unzureichenden Funktion dieser Rezeptoren gezeigt, dass sie zu den pathologischen Manifestationen verschiedener Krankheiten mit beitragen. Die Identifizierung von Molekülen, die an der Signalübertragungsaktivität dieser Rezeptoren beteiligt sind, und das Auffinden von Wegen, um die Funktion dieser Moleküle zu modulieren, bildet einen möglichen Hinweis für neue therapeutische Ansätze gegen diese Krankheiten. Im Hinblick auf die vermutete wichtige Rolle von RIP bei der Toxizität des FAS-R und des p55-R und somit auf die vermutete wichtige regulatorische Rolle von RAP-2 für den FAS-R und den TNF über die Modulierung von RIP, erscheint es besonders wichtig, Arzneimittel zu entwerfen, die die cytotoxische Funktion von RIP blockieren können, möglicherweise auf dem Weg einer Blockierung der Bindung von RAP-2 an RIP oder durch eine andersartige Hemmung der Wechselwirkung zwischen RAP-2 und RIP unter solchen Bedingungen, in denen RAP-2 dazu dient, die durch RIP vermittelte Cytotoxizität zu steigern (wie vorstehend bemerkt ist RIP selbst cytotoxisch, sowie in Verbindung mit anderen Proteinen, die Todesdomänen-Regionen besitzen).

[0082] Ebenso ist auch bekannt (vergleiche mit dem Vorstehenden), dass der FAS-R und der p55-R an der Aktivierung von NF- κ B und dadurch am Überleben der Zelle beteiligt sind. Wenn dementsprechend gewünscht wird, Zellen abzutöten, wie zum Beispiel Krebszellen, mit HIV infizierte Zellen und ähnliche, wäre es wünschenswert, die cytotoxischen Wirkungen des FAS-R und des p55-R (sowie ihrer assoziierten Proteine, wie zum Beispiel MORT-1, MACH, Mch4, G1, TRADD) zu steigern, während gleichzeitig ihre Fähigkeit NF- κ B induzieren zu können, gehemmt wird. Wenn daher die Wechselwirkung oder die Bindung von RAP-2 mit bzw. an RIP zu einer Steigerung der möglichen Rolle von RIP bei der Steigerung der Induktion von NF- κ B führt (möglicherweise über TRAF2 und möglicherweise über die Kinasedomäne und/oder die intermediäre Domäne von RIP), dann wäre es wünschenswert, diese Wechselwirkung zwischen RAP-2 und RIP zu hemmen oder zumindest die Steigerung der Aktivierung von NF- κ B zu verhindern und dadurch das Gleichgewicht der durch den TNF oder durch den FAS-Liganden induzierten Wirkungen auf die Seite der Zell-Cytotoxizität zu verschieben, um schließlich einen vermehrten Zelltod herbeizuführen.

[0083] Gleichfalls gilt in der entgegen gesetzten Situation (zu der vorstehend beschriebenen), dass, wenn die Bindung von RAP-2 an RIP tatsächlich die Hemmung der entzündlichen oder der cytotoxischen Wirkungen des FAS-R und des p55-R verursacht, und es gewünscht wird, diese cytotoxischen Wirkungen zu blockieren, wie z. B. bei Entzündungen oder verschiedenen Autoimmunerkrankungen und ähnlichen, bei denen versucht wird, ein vermehrtes Überleben der Zellen zu erreichen, es wichtig ist, Arzneimittel zu entwerfen, die die Wechselwirkung zwischen RAP-2 und RIP steigern, um die Gesamthemmung des Zelltodes zu steigern und das Gleichgewicht in Richtung auf das Zellüberleben hin zu verschieben. Aus Sicht des Vorstehenden folgt ebenfalls, dass in dem Falle, in dem die Wechselwirkung von RAP-2 mit RIP eine Hemmung der Funktion von RIP bei der Steigerung der Aktivierung von NF- κ B verursacht, und wenn das Überleben der Zelle gewünscht wird, es nötig ist, diese Wechselwirkung zwischen RAP-2 und RIP zu blockieren, wodurch die Aktivität von RIP bei der Steigerung der Aktivierung von NF- κ B erhöht wird.

[0084] Im Hinblick auf alles Vorstehende ergibt sich, dass RIP eine Schlüsselrolle bei dem Gleichgewicht zwischen der Induktion oder der Vermittlung von Entzündungs-, Zelltod- oder Zellüberlebens-Signalwegen besitzt, und daher besitzt RAP-2 eine gleich wichtige Rolle, in dem es ein Modulator von RIP ist. Die Beeinflussung der

RAP-2-RIP-Wechselwirkung/Bindung unter Verwendung verschiedener Arzneimittel oder Behandlungen, wie vorstehend und nachstehend erwähnt, wird möglicherweise eine Verschiebung der intrazellulären Signalübertragungswege vom Zelltod hin zum Zellüberleben oder umgekehrt erlauben, je nachdem wie es gewünscht wird.

[0085] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die DNA-Sequenzen, die nachstehend beschrieben werden, und die ein RAP-2-Protein codieren, sowie die RAP-2-Proteine, die durch die DNA-Sequenzen codiert werden.

[0086] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung weiterhin die DNA-Sequenzen, die biologisch aktive Analoga, Fragmente und Derivate des RAP-2-Proteins codieren, und die Analoga, Fragmente und Derivate, die durch sie codiert werden. Die Herstellung solcher Analoga, Fragmente und Derivate erfolgt durch Standardverfahren (vergleiche zum Beispiel mit Sambrook et al., 1989), bei denen in den DNA-Sequenzen, die das RAP-2-Protein codieren, eines oder mehrere Codons deletiert, hinzugefügt oder durch andere substituiert sein können, um Analoga bereitzustellen, die mindestens eine Aminosäurerestveränderung in Bezug auf das native Protein aufweisen.

[0087] Neben den vorstehenden DNA-Sequenzen der Erfindung, die ein RAP-2-Protein, eine Isoform, ein Analog, ein Fragment oder ein Derivat codieren, sind ebenfalls als eine Ausführungsform der Erfindung DNA-Sequenzen eingeschlossen, die in der Lage sind, unter stringenten Bedingungen mit einer cDNA-Sequenz zu hybridisieren, die aus der codierenden Region des nativen RAP-2-Proteins abgeleitet wurde, wobei die zur Hybridisierung fähigen DNA-Sequenzen ein biologisch aktives RAP-2-Protein codieren. Diese zur Hybridisierung fähigen DNA-Sequenzen schließen daher DNA-Sequenzen, die eine relativ hohe Homologie zu der nativen RAP-2-cDNA-Sequenz aufweisen, ein und als solche stellen sie RAP-2-ähnliche Sequenzen dar, bei denen es sich zum Beispiel um aus der Natur stammende Sequenzen handeln kann, die die verschiedenen RAP-2-Isoformen codieren, oder um natürlich vorkommende Sequenzen, die Proteine codieren, die einer Gruppe von RAP-2-ähnlichen Sequenzen angehören, und die ein Protein codieren, das die Aktivität von RAP-2 besitzt. Des Weiteren können diese Sequenzen zum Beispiel ebenfalls nicht natürlich vorkommende, synthetisch hergestellte Sequenzen einschließen, die zu der nativen RAP-2-cDNA-Sequenz ähnlich sind, aber eine Reihe von gewünschten Modifikationen enthalten. Solche synthetischen Sequenzen schließen daher alle die möglichen Sequenzen, die Analoga, Fragmente und Derivate von RAP-2 codieren, und die alle die Aktivität von RAP-2 besitzen, ein.

[0088] Um die verschiedenen, vorstehend erwähnten, natürlich vorkommenden RAP-2-ähnlichen Sequenzen zu erhalten, können Standardverfahren zur Durchmusterung und Isolierung von aus der Natur stammenden DNA- oder RNA-Proben aus verschiedenen Geweben unter Verwendung der natürlichen RAP-2-cDNA oder eines Teils davon als Sonde angewendet werden (vergleiche zum Beispiel mit den Standardverfahren, die in Sambrook et al., 1989 angeführt sind).

[0089] Um die vorstehend erwähnten, verschiedenen synthetischen RAP-2-ähnlichen Sequenzen herzustellen, die Analoga, Fragmente oder Derivate von RAP-2 codieren, kann ebenso eine Reihe von Standardverfahren angewendet werden, wie sie hierin nachstehend in Bezug auf die Herstellung solcher Analoga, Fragmente und Derivate in Einzelheiten beschrieben werden.

[0090] Ein Polypeptid oder ein Protein, das „im Wesentlichen“ dem RAP-2-Protein „entspricht“, schließt nicht nur das RAP-2-Protein ein, sondern auch Polypeptide oder Proteine, die Analoga von RAP-2 darstellen.

[0091] Analoga, die im Wesentlichen dem RAP-2-Protein entsprechen, sind diejenigen Polypeptide, in denen eine oder mehrere Aminosäure(n) der Aminosäuresequenz des RAP-2-Proteins durch (eine) andere Aminosäure(n) ersetzt, deletiert und/oder inseriert worden ist/sind, vorausgesetzt, dass das so erhaltene Protein im Wesentlichen die gleiche oder eine höhere biologische Aktivität wie das RAP-2-Protein aufweist, dem es entspricht.

[0092] Um im Wesentlichen einem RAP-2-Protein zu entsprechen, sind die Veränderungen in den Sequenzen der RAP-2-Proteine, wie z. B. in Isoformen, im Allgemeinen relativ geringfügig. Obwohl die Zahl an Veränderungen mehr als zehn betragen kann, gibt es bevorzugt nicht mehr als 10 Veränderungen, noch bevorzugter nicht mehr als fünf und am stärksten bevorzugt nicht mehr als drei solcher Veränderungen. Obwohl jedes beliebige Verfahren angewendet werden kann, um potenziell biologisch aktive Proteine zu finden, die im Wesentlichen den RAP-2-Proteinen entsprechen, besteht ein solches Verfahren in der Verwendung von herkömmlichen Mutagenese-Verfahren, die an der DNA durchgeführt werden, die das Protein codiert, und die zu einigen wenigen Modifikationen führen. Die Proteine, die durch solche Clone exprimiert werden, können dann auf ihre

Fähigkeit hin untersucht werden, an RIP zu binden und die Aktivität von RIP bei der Modulierung oder der Vermittlung der vorstehend erwähnten intrazellulären Signalwege zu modulieren.

[0093] „Konservative“ Veränderungen sind solche Veränderungen, von denen man nicht erwartet, dass sie die Aktivität des Proteins verändern, und sie sind gewöhnlich die ersten, auf die hin durchmustert wird, da man von ihnen nicht erwartet, dass sie die Größe, die Ladung oder die Konfiguration des Proteins wesentlich verändern, und man somit von ihnen nicht erwartet, dass sie dessen biologische Eigenschaften verändern.

[0094] Konservative Austausche in RAP-2-Proteinen schließen ein Analog ein, in dem mindestens ein Aminosäurerest in dem Polypeptid durch eine andere Aminosäure konservativ ausgetauscht wurde. Solche Austausche erfolgen bevorzugt entsprechend der folgenden Liste, wie sie in Tabelle IA dargestellt ist, wobei die Austausche durch Routineexperimente bestimmt werden können, um modifizierte strukturelle und funktionelle Eigenschaften eines synthetisierten Polypeptidmoleküls bereitzustellen, während die für ein RAP-2-Protein charakteristische biologische Aktivität beibehalten wird.

Tabelle IA

Ursprünglicher Rest	Beispielhafte Substitution
Ala	Gly; Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala; Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Tyr; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0095] Alternativ bilden eine andere Gruppe von Substitutionen in dem RAP-2-Protein solche, in denen mindestens ein Aminosäurerest aus dem Polypeptid entfernt worden ist, und ein unterschiedlicher Rest gemäß der nachfolgenden Tabelle IB an seiner Stelle inseriert worden ist. Die Arten der Substitutionen, die in dem Polypeptid vorgenommen werden können, können auf der Analyse der Häufigkeiten von Aminosäureaustauschen zwischen einem homologen Protein aus unterschiedlichen Arten basieren, wie z. B. diejenigen, die in der Tabelle I-2 von Schulz et al., G.E., Principles of Protein Structure, Springer Verlag, New York, NY, 1978, und in den **Fig.** 3-9 in Creighton, T.E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1983 dargestellt werden. Aufgrund einer solchen Analyse werden hierin alternative konservative Substitutionen als Substitutionen innerhalb einer der folgenden fünf Gruppen definiert:

TABELLE IB

1. Kleine aliphatische, unpolare oder schwach polare Reste: Ala, Ser, Thr, (Pro, Gly);
2. Polare, negativ geladene Reste und ihre Amide: Asp, Asn, Glu, Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg, Lys;
4. Große aliphatische, unpolare Reste: Met, Leu, Ile, Val (Cys) und
5. Große aromatische Reste: Phe, Tyr, Trp.

[0096] Die vorstehenden drei Aminosäurereste in Klammern haben spezielle Funktionen bei der Proteinarchitektur. Gly ist der einzige Rest, dem eine Seitenkette fehlt, und der daher der Kette Flexibilität verleiht. Dies führt jedoch dazu, dass die Bildung einer anderen Sekundärstruktur als der α -Helix gefördert wird. Aufgrund

seiner unüblichen Geometrie schränkt Pro die Kette eng ein und tendiert im Allgemeinen dazu β -Schleifen-ähnliche Strukturen zu fördern, obwohl in einigen Fällen Cys in der Lage sein kann, an der Bildung von Disulfidbindungen teilzunehmen, was für die Proteinfaltung von Bedeutung ist. Man beachte, dass Schulz et al., vorstehend, die obigen Gruppen 1 und 2 miteinander verschmilzt. Man bemerke ebenfalls, dass Tyr aufgrund seines Potentials zur Wasserstoffbrückenbindung, eine signifikante Verwandtschaft mit Ser und Thr usw. aufweist.

[0097] Konservative Aminosäureaustausche gemäß der vorliegenden Erfindung, z. B. wie vorstehend dargestellt, sind im Fachgebiet bekannt, und man erwartet von ihnen, dass sie die biologischen und strukturellen Eigenschaften des Polypeptids nach einem Aminosäureaustausch erhalten. Bei den meisten Deletionen und Substitutionen gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich um solche, die keine radikalen Veränderungen der Charakteristika des Proteins oder des Polypeptid-Moleküls hervorrufen. „Charakteristika“ wird auf eine nicht umfassende Weise definiert, um sowohl Veränderungen der Sekundärstruktur, wie z. B. einer α -Helix oder eines β -Faltblatts, als auch Veränderungen der biologischen Aktivität zu definieren, wie z. B. die Bindung an RIP und/oder die Vermittlung der Wirkung von RIP auf den Zelltod.

[0098] Beispiele für die Herstellung von Aminosäuresubstitutionen in Proteinen, die dazu verwendet werden können, Analoga von RAP-2-Proteinen zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung zu erhalten, schließen alle bekannten Verfahrensschritte ein, wie sie z. B. in den US-Patenten RE 33,653, 4,959,314, 4,588,585 und 4,737,462 an Mark et al.; 5,116,943 an Kothe et al.; 4,965,195 an Namen et al.; 4,879,111 an Chong et al. und 5,017,691 an Lee et al. dargestellt sind, sowie mit Lysin ausgetauschte Proteine, die in der US-Patent Nr. 4,904,584 (Shaw et al.) vorgestellt werden.

[0099] Neben den vorstehend diskutierten konservativen Substitutionen, die die Aktivität des RAP-2-Proteins nicht signifikant verändern würden, wird auch entweder von konservativen Substitutionen oder von weniger konservativen Substitutionen und von eher zufälligen Veränderungen, die zu einer Steigerung der biologischen Aktivität der Analoga der RAP-2-Proteine führen, beabsichtigt, sie in den Rahmen der Erfindung mit einzuschließen.

[0100] Wenn die genaue Wirkung einer Substitution oder einer Deletion bestätigt werden soll, werden Fachleute zu schätzen wissen, dass die Wirkung des/der Austausch(es), Deletion(en) usw. über Routine-Bindungs- und Zelltod-Testansätze bestimmt werden kann. Eine Durchmusterung unter Verwendung solcher Standarduntersuchungen umfasst keine übertriebenen Experimente.

[0101] Akzeptierbare RAP-2-Analoga sind diejenigen, die zumindest die Fähigkeit zur Bindung an RIP beibehalten haben, und dadurch, wie vorstehend erwähnt, die Aktivität von RIP in den intrazellulären Signalwegen wie vorstehend erwähnt vermitteln. Auf diese Weise können Analoga hergestellt werden, die eine sogenannte dominant negative Wirkung besitzen, nämlich z. B. ein Analog, das entweder in der Bindung an RIP defekt ist, oder in der nachfolgenden Signalübertragung oder in einer anderen Aktivität, die einer solchen Bindung folgt. Solche Analoga können zum Beispiel verwendet werden, um die Wirkung von RIP zu hemmen, oder, um die NF- κ B induzierende Wirkung von RIP (direkt oder indirekt) zu hemmen, in Abhängigkeit davon, welche dieser Aktivitäten die Hauptaktivität darstellt, die durch die Wechselwirkung von RAP-2 und RIP moduliert wird (vergleiche mit dem Vorstehenden), und dies durch solche Analoga, die mit dem natürlichen RAP-2 um die Bindung an RIP konkurrieren.

[0102] Auf genetischer Ebene werden diese Analoga im Allgemeinen durch ortsgerichtete Mutagenese von Nucleotiden in der DNA hergestellt, die das RAP-2-Protein codiert, wodurch eine DNA hergestellt wird, die das Analog codiert, und danach wird die DNA synthetisiert und das Polypeptid in einer rekombinanten Zellkultur exprimiert. Die Analoga weisen typischerweise die gleiche oder eine erhöhte qualitative biologische Aktivität wie das natürlich vorkommende Protein auf, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications und Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

[0103] Die Herstellung eines RAP-2-Proteins, die hiermit in Übereinstimmung steht, oder einer alternativen Nucleotidsequenz, die das gleiche Polypeptid codiert, sich aber von der natürlichen Sequenz durch von Veränderungen unterscheidet, die aufgrund der bekannten Degeneriertheit des genetischen Codes erlaubt sind, kann durch ortsspezifische Mutagenese der DNA erreicht werden, die ein zuvor hergestelltes Analog oder eine native Version eines RAP-2-Proteins codiert. Die ortsspezifische Mutagenese erlaubt die Herstellung von Analoga durch die Verwendung spezifischer Oligonucleotid-Sequenzen, die die DNA-Sequenz mit der gewünschten Mutation sowie eine ausreichende Anzahl an benachbarten Nucleotiden codieren, um eine Primersequenz

mit ausreichender Länge und Sequenzkomplexität bereitzustellen, so dass ein stabiles Duplexmolekül auf beiden Seiten der Deletions-Verbindung gebildet werden kann, die überbrückt werden soll. Typischerweise wird ein Primer mit einer Länge von etwa 20 bis 25 Nucleotiden bevorzugt, mit etwa 5 bis 10 komplementären Nucleotiden auf jeder Seite der Sequenz, die verändert werden soll. Im Allgemeinen ist das Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese im Fachgebiet wohlbekannt, wie in Veröffentlichungen beispielhaft dargestellt wurde, wie z. B. in Adelman et al., DNA 2:183 (1983), deren Offenlegung hierin durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist.

[0104] Wie daraus deutlich wird, verwendet das Verfahren der ortsspezifischen Mutagenese typischerweise einen Phagenvektor, der sowohl in einer einzelsträngigen als auch in einer doppelsträngigen Form vorliegen kann. Typische Vektoren, die zur ortsgerechten Mutagenese nützlich sind, schließen Vektoren, wie zum Beispiel den M13-Phagen, der durch Messing et al., Third Cleveland Symposium on Macromolecules and Recombinant DNA, Herausgeber A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981) offenbart wurde, ein, dessen Offenlegung hierin durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist. Diese Phagen sind kommerziell leicht erhältlich und ihre Verwendung ist im Allgemeinen den Fachleuten wohlbekannt. Alternativ können Plasmidvektoren, die einen Einzelstrang-Phagen-Replikationsursprung enthalten (Vieira et al., Meth. Enzymol. 153:3, 1987), verwendet werden, um einzelsträngige DNA zu erhalten.

[0105] Im Allgemeinen wird die ortsgerechte Mutagenese in Übereinstimmung hiermit zuerst durch die Herstellung eines einzelsträngigen Vektors durchgeführt, der innerhalb seiner Sequenz eine DNA-Sequenz enthält, die das relevante Polypeptid codiert. Durch automatisierte DNA/Oligonucleotid-Synthese wird ein Oligonucleotid-Primer synthetisch hergestellt, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt. Dieser Primer wird dann an den einzelsträngigen, die Proteinsequenz enthaltenden Vektor angelagert und DNA polymerisierenden Enzymen ausgesetzt, wie z. B. dem Klenow-Fragment der Polymerase I aus *E. coli*, um die Synthese des Stranges zu vervollständigen, der die Mutation trägt. Auf diese Weise wird eine mutierte Sequenz erhalten, und der zweite Strang trägt die gewünschte Mutation. Dieser Heteroduplex-Vektor wird dann dazu verwendet, geeignete Zellen zu transformieren, wie z. B. *E. coli*-JM101-Zellen, und es werden diejenigen Clone ausgewählt, die rekombinante Vektoren enthalten, welche die mutierte Sequenzanordnung tragen.

[0106] Nachdem ein solcher Clon ausgewählt wurde, kann die mutierte RAP-2-Proteinsequenz entfernt werden und in einen geeigneten Vektor platziert werden, wobei es sich im Allgemeinen um einen Transfer- oder einen Expressionsvektor eines Typs handelt, der zur Transfektion eines geeigneten Wirts verwendet werden kann.

[0107] Demgemäß kann ein Gen oder eine Nucleinsäure, die ein RAP-2-Protein codiert, ebenfalls *in vitro*, *in situ* und/oder *in vivo* nachgewiesen, erhalten und/oder modifiziert werden, und zwar durch die Verwendung bekannter DNA- oder RNA-Amplifikationsverfahren wie z. B. der PCR und der chemischen Oligonucleotid-Synthese. Die PCR erlaubt die Amplifikation (Erhöhung der Anzahl) spezifischer DNA-Sequenzen durch wiederholte DNA-Polymerase-Reaktionen. Diese Reaktion kann als ein Ersatz für das Clonieren verwendet werden; alles, was erforderlich ist, ist die Kenntnis der Nucleinsäuresequenz. Um eine PCR durchzuführen, werden Primer entworfen, die zu der Sequenz von Interesse komplementär sind. Die Primer werden dann durch automatisierte DNA-Synthese erzeugt. Da Primer so entworfen werden können, dass sie mit beliebigen Teilen des Gens hybridisieren können, können solche Bedingungen erzeugt werden, dass Fehlpaarungen bei der komplementären Basenpaarung toleriert werden. Die Amplifikation dieser fehlgepaarten Bereiche kann zur Synthese eines mutagenisierten Produkts führen, was zur Erzeugung eines Peptids mit neuen Eigenschaften führt (d. h. ortsgerechte Mutagenese). Vergleiche auch z. B. mit Ausubel, vorstehend, Kap. 16. Durch Kopplung einer komplementären DNA (cDNA)-Synthese unter Verwendung der reversen Transkriptase mit einer PCR kann ebenfalls RNA als Startmaterial zur Synthese der extrazellulären Domäne eines Prolactin-Rezeptors ohne Clonierung verwendet werden.

[0108] Des weiteren können die PCR-Primer so entworfen werden, dass neue Restriktionsschnittstellen oder andere Eigenschaften wie z. B. Terminations-Codons an den Enden des Gensegments, das amplifiziert werden soll, mit eingebaut werden. Das Platzieren von Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende der amplifizierten Gensequenz erlaubt es Gensegmente, die das RAP-2-Protein oder ein Fragment davon codieren, für eine Ligierung mit anderen Sequenzen und/oder Clonierungsstellen in Vektoren nach Maß zu entwerfen.

[0109] Die PCR und andere Verfahren zur Amplifikation von RNA und/oder DNA sind im Fachgebiet wohlbekannt und können gemäß der vorliegenden Erfindung auf Grundlage der hierin dargelegten Lehre und Anleitung ohne übertriebene Experimente verwendet werden. Die bekannten Verfahren zur Amplifikation von DNA und RNA umfassen die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und verwandte Amplifikationsverfahren, sind aber

nicht auf diese beschränkt (vergleiche z. B. mit den US-Patent Nrn. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188 an Mullis et al.; 4,795,699 und 4,921,794 an Tabor et al.; 5,142,033 an Innis; 5,122,464 an Wilson et al.; 5,091,310 an Innis; 5,066,584 an Gyllensten et al.; 4,889,818 an Gelfand et al.; 4,994,370 an Silver et al.; 4,766,067 an Biswas; 4,656,134 an Ringold; und Innis et al., Hrsg., PCR Protocols: A Guide to Method and Applications), sowie die durch RNA vermittelte Amplifikation, die Antisense-RNA der Zielsequenz als Matrize zur Doppelstrang-DNA-Synthese verwendet (US-Patent Nr. 5,130,238 an Malek et al., mit dem Handelsnamen NASBA); und die Immuno-PCR, die die Verwendung der DNA-Amplifikation mit einer Markierung durch Antikörper kombiniert (Ruzicka et al., Science 260:487 (1993); Sano et al., Science 258:120 (1992); Sano et al., Biotechniques 9:1378 (1991)); die vollständigen Inhalte dieser Patente und der Referenzen sind hierin vollständig durch Bezugnahme mit eingeschlossen.

[0110] Auf analoge Weise können biologisch aktive Fragmente der RAP-2-Proteine (z. B. solche eines beliebigen RAP-2-Proteins oder seiner Isoformen) hergestellt werden, wie bezüglich der Analoga der RAP-2-Proteine vorstehend erwähnt wurde. Geeignete Fragmente der RAP-2-Proteine sind solche, die die Fähigkeit von RAP-2 beibehalten, und die die biologische Aktivität von RIP oder von anderen Proteinen, die direkt oder indirekt mit RIP assoziiert sind, modulieren oder vermitteln können. Demgemäß können RAP-2-Proteinfragmente hergestellt werden, die eine dominant-negative oder eine dominant-positive Wirkung aufweisen, wie bezüglich der Analoga vorstehend erwähnt wurde. Es sollte angemerkt werden, dass diese Fragmente eine spezielle Klasse der Analoga der Erfindung darstellen, sie sind nämlich definierte Teile von RAP-2-Proteinen, die aus der vollständigen RAP-2-Proteinsequenz abgeleitet wurden (z. B. aus der einer beliebigen der RAP-2-Proteine oder seiner Isoformen), wobei ein jeder solcher Teil oder ein jedes solches Fragment irgendeine der vorstehend erwähnten gewünschten Aktivitäten aufweist. Bei einem solchen Fragment kann es sich z. B. um ein Peptid handeln.

[0111] Ebenso können Derivate durch Standardmodifikationen der Seitengruppen eines oder mehrerer Aminosäurereste des RAP-2-Proteins, seiner Analoga oder Fragmente hergestellt werden, oder durch Konjugation des RAP-2-Proteins, seiner Analoga oder Fragmente mit einem anderen Molekül wie z. B. einem Antikörper, einem Enzym, einem Rezeptor usw., wie im Fachgebiet wohlbekannt ist. Dementsprechend umfassen „Derivate“, wie sie hierin verwendet werden, Derivate, die aus den funktionellen Gruppen, die als Seitenketten an den Resten oder an den N- oder C-terminalen Gruppen auftreten, durch Mittel hergestellt werden können, die im Fachgebiet bekannt sind, und sind daher in die Erfindung mit eingeschlossen. Derivate können chemische Reste, wie z. B. Kohlenwasserstoff- oder Phosphat-Gruppen, besitzen, vorausgesetzt, dass eine solche Fraktion die gleiche oder eine höhere biologische Aktivität als die RAP-2-Proteine besitzt.

[0112] Derivate können zum Beispiel aliphatische Ester der Carboxylgruppen umfassen, sowie Amide der Carboxylgruppen, die durch Reaktion mit Ammoniak oder mit primären oder sekundären Aminen erzeugt werden, N-Acyl-Derivate oder freie Aminogruppen der Aminosäurereste, die mit Acyl-Resten (z. B. Alkanoyl- oder carbocyclischen Aroyl-Gruppen) gebildet werden, oder O-Acyl-Derivate freier Hydroxylgruppen (zum Beispiel diejenigen der Seryl- oder der Threonyl-Reste), die mit Acyl-Resten gebildet werden.

[0113] Es ist beabsichtigt, dass der Begriff „Derivate“ nur diejenigen Derivate umfasst, die eine Aminosäure nicht in eine andere der 20 üblicherweise vorkommenden, natürlichen Aminosäuren verändert.

[0114] RAP-2 ist ein Protein oder ein Polypeptid, d.h. eine Sequenz von Aminosäuren. Von einem Polypeptid, das aus einer längeren Sequenz besteht, die die vollständige Sequenz eines RAP-2-Proteins mit einschließt, wird in Übereinstimmung mit den hierin angeführten Definitionen beabsichtigt, dass es so lange in den Rahmen eines solchen Polypeptids mit eingeschlossen ist, so lange das Hinzufügen die grundlegenden und die neuen Charakteristika der Erfindung nicht beeinflussen, d. h. wenn sie die biologische Aktivität des RAP-2-Proteins entweder beibehalten oder erhöhen oder so abgespalten werden können, dass sie ein Protein oder ein Polypeptid hinterlassen, das die biologische Aktivität des RAP-2-Proteins besitzt. Auf diese Weise wird zum Beispiel beabsichtigt, dass die vorliegende Erfindung Fusionsproteine des RAP-2-Proteins mit anderen Aminosäuren oder mit Peptiden mit einschließt.

[0115] Das neue RAP-2-Protein, sowie seine Analoga, Fragmente und Derivate, besitzen eine Reihe möglicher Verwendungen, wie zum Beispiel:

- (i) Das RAP-2-Protein, sowie seine Analoga, Fragmente und Derivate, können verwendet werden, um die Funktion von RIP entweder in den Entzündungs-, den Zelltod- oder den Zellüberlebens-Signalwegen wie vorstehend erwähnt zu modulieren. Wenn zum Beispiel RAP-2 die Wirkung von RIP auf die Aktivierung von NF- κ B, der JNK (Jun-Kinase) oder der p38-Kinase modulieren kann, können solche Wirkungen von RAP-2 zur Steigerung einer solchen RAP-2-RIP-Wirkung führen, wenn dies bei Anti-Tumor, anti- oder proinflamm-

atorischen, oder Anti-HIV-Anwendungen usw. wünschenswert ist. In diesem Fall kann das RAP-2-Protein, seine Analoga, Fragmente oder Derivate, die die Entzündung modulieren, die cytotoxische Wirkung erhöhen oder die Zellüberlebenswirkung blockieren, in die Zellen durch Standardverfahren eingebracht werden, die als solche bekannt sind. Wenn zum Beispiel das RAP-2-Protein vollständig intrazellulär vorliegt (wie vermutet) und nur in diejenigen Zellen eingebracht werden soll, in denen der FAS-R-Ligand oder der TNF oder eine andere cytotoxische Proteinwirkung, die durch RIP vermittelt wird, gewünscht wird, wird ein System für eine spezifische Einbringung dieses Proteins in die Zellen benötigt. Ein Weg, auf dem dies erfolgen kann, ist durch die Erzeugung eines rekombinanten Tiervirus, wie z. B. eines, das von Vaccinia abgeleitet wurde, in dessen DNA die folgenden beiden Gene eingebaut werden: das Gen, das einen Liganden codiert, der an die Zelloberflächenproteine bindet, die durch die Zellen spezifisch exprimiert werden, wie z. B. das gp120-Protein des AIDS (HIV)-Virus, das spezifisch an einige Zellen bindet (CD4-Lymphocyten und verwandte Leukämien), oder das irgendeinen anderen Liganden codiert, der spezifisch an die Zellen bindet, die den FAS-R oder den p55-R tragen, so dass der rekombinante virale Vektor in die Lage versetzt wird, an solche, den FAS-R oder den p55-R tragenden Zellen zu binden; und das Gen, das das RAP-2-Protein codiert. Dadurch wird die Expression des an die Zelloberfläche bindenden Proteins auf der Oberfläche des Virus das Virus spezifisch an die Tumorzelle oder an eine andere den FAS-R oder den p55-R tragende Zelle zielgerichtet anliefern, worauf hin die das RAP-2-Protein codierende Sequenz in die Zellen über das Virus eingebracht wird, und nachdem es in den Zellen exprimiert worden ist, wird es zur Steigerung der RIP-Vermittlung des FAS-R-Liganden oder der TNF-Wirkung führen oder zu unabhängigem RIP. Die Konstruktion solcher rekombinanter Tierviren erfolgt über Standardverfahren (vergleiche zum Beispiel mit Sambrook et al., 1989). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Sequenzen des RAP-2-Proteins (z. B. eines beliebigen RAP-2-Proteins oder seiner Isoformen) in Form von Oligonucleotiden einzubringen, die durch die Zellen absorbiert und in ihnen exprimiert werden können.

(ii) Sie können verwendet werden, um den FAS-R-Liganden oder den TNF oder eine verwandte Proteinwirkung zu hemmen, die durch RIP oder durch eine unabhängige RIP-Wirkung vermittelt wird, wie z. B. in Fällen wie Gewebsschädigung bei septischem Schock, Transplantatabstoßung oder akuter Hepatitis, in denen es gewünscht wird, die durch den FAS-R-Liganden oder durch den TNF induzierte intrazelluläre Signalübertragung durch den FAS-R oder den p55-R zu blockieren, oder um die unabhängige Wirkung von RIP oder um eine andere, durch Proteine vermittelte, Signalübertragung zu blockieren, und gleichzeitig den Zellüberlebens-Signalweg zu steigern. In dieser Situation ist es zum Beispiel möglich, in die Zellen durch Standardverfahren Oligonucleotide einzubringen, die die Antisense codierende Sequenz des RAP-2-Proteins enthalten, welche die Translation der mRNAs wirksam blockieren, die das RAP-2-Protein codieren, und dadurch seine Expression blockieren und zur Hemmung der Wirkung des FAS-R-Liganden oder des TNF oder des RIP oder eines anderen Proteins führen. Solche Oligonucleotide können in die Zellen unter Verwendung des vorstehend angeführten Ansatzes mit einem rekombinanten Virus eingebracht werden, wobei die zweite Sequenz, die das Virus trägt, die Oligonucleotidsequenz ist.

[0116] In ähnlicher Weise, wie vorstehend erwähnt, kann es in Abhängigkeit von der Natur der RAP-2-RIP-Wechselwirkung möglich sein, auf den vorstehenden Wegen (i) und (ii) die Entzündungs- und die Überlebens-Signalwege der Zelle zu steigern oder zu hemmen, wenn dies gewünscht wird.

[0117] Eine andere Möglichkeit besteht darin, Antikörper zu verwenden, die für das RAP-2-Protein spezifisch sind, um seine intrazelluläre Signalübertragungsaktivität zu hemmen.

[0118] Ein noch weiterer Weg, um die durch RIP vermittelten Wirkungen oder die von RIP unabhängige Wirkung zu hemmen, erfolgt über den vor kurzem entwickelten Ribozym-Ansatz. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle, die RNAs spezifisch spalten. Ribozyme können so konstruiert werden, dass sie ausgewählte Ziel-RNAs spalten wie z. B. die mRNAs, die das RAP-2-Protein der Erfindung codieren. Solche Ribozyme besitzen eine Sequenz, die für die mRNA des RAP-2-Proteins spezifisch ist, und sind in der Lage, mit ihr in Wechselwirkung zu treten (komplementäre Bindung), darauf hin erfolgt die Spaltung der mRNA, was zu einer Abnahme (oder dem vollständigen Verlust) der Expression des RAP-2-Proteins führt, wobei das Ausmaß der verminderten Expression von dem Grad der Expression des Ribozyms in der Zielzelle abhängig ist. Um Ribozyme in Zellen der Wahl einzubringen (wie z. B. in solche, die den FAS-R oder den p55-R enthalten), kann jeder beliebige Vektor verwendet werden, wie z. B. Plasmid oder Tiervirus- (Retrovirus-) Vektoren, die üblicherweise für diesen Zweck verwendet werden (vergleiche auch mit (i) vorstehend, wobei das Virus als zweite Sequenz eine cDNA enthält, welche die Ribozym-Sequenz der Wahl codiert). (Für Übersichtsartikel, Verfahren usw., die Ribozyme betreffen, vergleiche mit Chen et al., 1992; Zhao und Pick, 1993; Shore et al., 1993; Joseph und Burke 1993; Shimayama et al., 1993; Cantor et al., 1993; Baringa, 1993; Crisell et al., 1993 und Koizumi et al., 1993). Dieser Ansatz ist geeignet, wenn die RAP-2-RIP-Wechselwirkung die Zell-Cytotoxizität in Situationen steigert, in denen es gewünscht wird, diese Cytotoxizität zu blockieren, oder wenn die RAP-2-RIP- Wechsel-

wirkung die Aktivierung von NF- κ B in der gleichen Situation hemmt, und wenn gewünscht wird, diese Hemmung zu blockieren, um eine solche NF- κ B-Aktivierung zu steigern, d. h. in beiden Fällen wird gewünscht, das Überleben der Zelle wie in (ii) vorstehend zu erhöhen.

(iii) Das RAP-2-Protein, seine Analoga, Fragmente oder Derivate können auch verwendet werden, um andere Proteine der gleichen Klasse zu isolieren, zu identifizieren und zu klonieren, d. h. solche, die an RIP oder an funktionell verwandte Rezeptoren oder Proteine binden, welche an den intrazellulären Signalübertragungsprozessen beteiligt sind. Bei dieser Anwendung kann das vorstehend erwähnte Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet werden, oder es kann ein vor kurzem entwickeltes System verwendet werden, das eine nicht stringente Southern-Hybridisierung, gefolgt von einer PCR-Clonierung, verwendet (Wilks et al., 1989). In der Veröffentlichung von Wilks et al. wird die Identifizierung und Clonierung zweier potentieller Protein-Tyrosinkinasen beschrieben, dies erfolgt durch die Anwendung einer nicht stringenten Southern-Hybridisierung gefolgt von einer Clonierung durch eine PCR, die auf der bekannten Sequenz des Kinasemotivs, d. h. einer ausgedachten Kinasesequenz, basiert. Dieser Ansatz kann in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung unter Verwendung der Sequenz des RAP-2-Proteins verwendet werden, um verwandte RIP-Bindeproteine zu identifizieren und zu klonieren.

(iv) Ein noch weiterer Ansatz, um das RAP-2-Protein oder seine Analoga, Fragmente oder Derivate der Erfindung zu verwenden, besteht darin, sie bei Affinitätschromatographie-Verfahren zu verwenden, um andere Proteine oder Faktoren zu isolieren und zu identifizieren, an die sie zur Bindung in der Lage sind, wie z. B. andere Proteine oder Faktoren, die an dem intrazellulären Signalübertragungsprozess beteiligt sind. Bei dieser Anwendung kann das RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung, sowie seine Analoga, Fragmente oder Derivate individuell an Affinitätschromatographie-Matrizen angelagert werden und dann mit Zellextrakten oder mit isolierten Proteinen oder Faktoren in Kontakt gebracht werden, die im Verdacht stehen, an dem intrazellulären Signalübertragungsprozess beteiligt zu sein. Nach dem Affinitätschromatographie-Verfahren können die anderen Proteine oder die Faktoren, die an das RAP-2-Protein der Erfindung oder an seine Analoga, Fragmente oder Derivate gebunden haben, eluiert, isoliert und charakterisiert werden.

(v) Wie vorstehend erwähnt, können das RAP-2-Protein der Erfindung, oder seine Analoga, Fragmente oder Derivate auch als Immunogene (Antigene) verwendet werden, um spezifische Antikörper gegen sie herzustellen. Diese Antikörper können ebenfalls zum Zweck der Reinigung des RAP-2-Proteins (z. B. RAP-2 oder irgendeine seiner Isoformen) verwendet werden, entweder aus Zellextrakten oder aus transformierten Zelllinien, die das RAP-2-Protein oder seine Analoga oder Fragmente herstellen. Des Weiteren können diese Antikörper für diagnostische Zwecke zur Identifizierung von Erkrankungen verwendet werden, die mit einer abnormalen Funktion des durch RIP vermittelten FAS-R-Liganden- oder TNF-Systems oder mit unabhängigen Aktivitäten von RIP in Beziehung stehen, wie z. B. überaktive oder zu schwach aktive durch den FAS-R-Liganden oder den TNF induzierte zelluläre Wirkungen, die durch RIP vermittelt oder durch die eigenständigen spezifischen zellulären Wirkungen von RIP verursacht werden. Sollten daher solche Erkrankungen mit einer Funktionsstörung eines intrazellulären Signalübertragungssystems in Beziehung stehen, an dem das RIP-Protein oder verschiedene andere, vorstehend erwähnte, an RIP bindende, Proteine oder das RAP-2-Protein selbst beteiligt sind, können solche Antikörper als ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel dienen.

[0119] Es sollte auch angemerkt werden, dass die Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung des RAP-2-Proteins der Erfindung über irgendeines der wohlbekannten Standard-Durchmusterungsverfahren durchgeführt werden kann. Zum Beispiel wurde eines dieser Durchmusterungsverfahren, das Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren, wie hierin nachstehend angeführt wird, dazu verwendet, das RIP-Protein (vergleiche mit Stanger et al., 1995) und anschließend das RAP-2-Protein der Erfindung zu identifizieren (neben verschiedenen anderen neuen Proteinen der vorstehend und nachstehend erwähnten, ebenfalls im Besitz der Erfinder befindlichen und gleichzeitig anhängigen Patentanmeldungen). In ähnlicher Weise können, wie vorstehend und nachstehend erwähnt, andere Verfahren verwendet werden, wie z. B. die Affinitäts-Chromatographie oder DNA-Hybridisierungsverfahren usw., wie sie im Fachgebiet wohlbekannt sind, um das RAP-2-Protein der Erfindung zu isolieren, zu identifizieren und zu charakterisieren oder um weitere Proteine, Faktoren, Rezeptoren usw. zu isolieren, identifizieren und charakterisieren, die in der Lage sind, an das RAP-2-Protein der Erfindung zu binden.

[0120] Wie hierin vorstehend angeführt, kann das RAP-2-Protein verwendet werden, um Antikörper zu erzeugen, die mit dem biologisch aktiven RAP-2-Protein, einem Teil des RAP-2-Proteins oder mit seinen Isoformen spezifisch reagieren. Diese Antikörper oder Fragmente davon können verwendet werden, wie sie hierin nachstehend in Einzelheiten beschrieben wird, wobei vorausgesetzt wird, dass es sich bei diesen Anwendungen um Antikörper oder Fragmente davon handelt, die die vorstehende Spezifität besitzen.

[0121] Auf Grundlage der Ergebnisse gemäß der vorliegenden Erfindung, d. h., dass RAP-2 spezifisch an RIP bindet und als solches einen Vermittler oder Modulator von RIP darstellt und somit die Aktivität von RIP bei

Entzündungen, Zelltod- oder Zellüberlebens-Signalwegen in einer solchen Weise vermitteln oder modulieren kann, dass RIP unabhängig oder in Verbindung mit anderen Proteinen (z. B. FAS-R, p55-R, MORT-1, MACH, Mch4, GI und TRADD in Zelltod-Signalwegen, oder mit TRAF2 in Zellüberlebens-Signalwegen) wirkt, ist es von Bedeutung, Arzneimittel zu entwerfen, die die RAP-2-RIP-Wechselwirkung verstärken oder hemmen können, je nachdem wie dies gewünscht wird und in Abhängigkeit davon, welcher dieser Signalwege durch die RAP-2-RIP-Wechselwirkung verstärkt oder gehemmt werden soll. Es gibt viele Krankheiten, bei denen solche Arzneimittel eine große Hilfe sein können. Darunter befinden sich unter anderen die akute Hepatitis, bei der die akute Schädigung der Leber den durch den FAS-R-Liganden vermittelten Zelltod der Leberzellen widerzuspiegeln scheint; der durch Autoimmunität induzierte Zelltod, wie z. B. der Tod der β -Langerhans-Zellen der Bauchspeicheldrüse, der zu Diabetes führt; der Tod von Zellen bei der Transplantatabstoßung (z. B. Niere, Herz und Leber); der Tod von Oligodendrocyten im Gehirn bei multipler Sklerose und der durch AIDS gehemmte Suizid von T-Zellen, der die Vermehrung des AIDS-Virus und damit die AIDS-Erkrankung verursacht.

[0122] Es ist möglich, dass RAP-2 oder eine oder mehrere seiner möglichen Isoformen als „natürliche“ Inhibitoren von RIP in einem oder in mehreren der vorstehenden Signalwege dienen kann, und daher können diese als die vorstehend erwähnten spezifischen Inhibitoren von RIP angewendet werden. Ebenso kann auf Antikörper hin durchmustert werden, um spezifische Arzneimittel zu erhalten, die in der Lage sind, die RAP-2-RIP-Wechselwirkung zu hemmen.

[0123] Im Hinblick auf die Antikörper, die hierin durchgängig erwähnt werden, beabsichtigt der Begriff „Antikörper“ mit einzuschließen: polyclonale Antikörper, monoclonale Antikörper (mAbs), chimäre Antikörper, anti-idiotypische (anti-Id) Antikörper bis zu Antikörpern, die in löslicher oder in gebundener Form markiert werden können, sowie Fragmente davon, die durch ein beliebiges bekanntes Verfahren bereit gestellt werden, wie z. B., aber nicht beschränkt auf, enzymatische Spaltung, Peptidsynthese oder rekombinante Verfahren.

[0124] Polyclonale Antikörper sind heterogene Populationen von Antikörpermolekülen, die aus den Seren von Tieren stammen, die mit einem Antigen immunisiert wurden. Ein monoclonaler Antikörper enthält im Wesentlichen eine homogene Population an Antikörpern, die für Antigene spezifisch sind, wobei die Populationen im Wesentlichen ähnliche Epitop-Bindestellen enthalten. MAb's können durch Verfahren erhalten werden, die den Fachleuten bekannt sind. Vergleiche zum Beispiel mit Köhler und Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); US-Patent Nr. 4,376,110; Ausubel et al., Hrsg., Harlow und Lane: *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) und Colligan et al., Hrsg., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. und Wiley Interscience, N.Y. (1992-1996), wobei der Inhalt dieser Dokumente hierin vollständig durch Bezugnahme enthalten ist. Solche Antikörper können jeder beliebigen Immunglobulinklasse angehören, einschließlich IgG, IgM, IgE, IgA, GILD und jeder Unterklasse davon. Ein Hybridom, das einen mAb der vorliegenden Erfindung produziert, kann in vitro, in situ oder in vivo kultiviert werden. Die Möglichkeit der Herstellung hoher Titer von mAbs in vivo oder in situ macht dies zum derzeit bevorzugten Verfahren der Herstellung.

[0125] Chimäre Antikörper sind Moleküle, deren unterschiedliche Anteile aus unterschiedlichen Tierarten stammen, wie z. B. solche, die eine variable Region besitzen, die aus einem murinen mAb stammt, und eine menschliche konstante Immunglobulin-Region. Chimäre Antikörper werden vorwiegend verwendet, um die Immunogenität bei der Anwendung zu vermindern und um die Ausbeute bei der Herstellung zu erhöhen, wie zum Beispiel, wenn murine mAbs höhere Ausbeuten aus Hybridomen, aber eine höhere Immunogenität im Menschen aufweisen, so dass chimäre Mensch/murine mAbs verwendet werden. Chimäre Antikörper und Verfahren zu ihrer Herstellung sind im Fachgebiet bekannt (Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3273-3277 (1984); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312:643-646 (1984); Cabilly et al., Europäische Patentanmeldung 125023 (veröffentlicht am 14. November 1984); Neuberger et al., *Nature* 314:268-270 (1985); Taniguchi et al., Europäische Patentanmeldung 171496 (veröffentlicht am 19. Februar 1985); Morrison et al., Europäische Patentanmeldung 173494 (veröffentlicht am 5. März 1986); Neuberger et al., PCT-Anmeldung WO 8601533 (veröffentlicht am 13. März 1986); Kudo et al., Europäische Patentanmeldung 184187 (veröffentlicht am 11. Juni 1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074 (1986); Robinson et al., Internationale Patentanmeldung Nr. WO 8702671 (veröffentlicht am 7. Mai 1987); Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443 (1987); Sun et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218 (1987); Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) und Harlow und Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, vorstehend. Diese Referenzen sind hierin vollständig durch Bezugnahme mit eingeschlossen.

[0126] Ein anti-idiotypischer (anti-Id) Antikörper ist ein Antikörper, der die einzigartigen Determinanten erkennt, die im Allgemeinen mit der Antigen-Bindungsstelle eines Antikörpers assoziiert sind. Ein Id-Antikörper kann durch die Immunisierung eines Tieres der gleichen Art und des gleichen genetischen Typs (z. B. eines bestimmten Mausstammes) als Quelle des mAbs hergestellt werden, gegen den ein Anti-Id hergestellt wird.

Das immunisierte Tier wird die idiotypischen Determinanten des zur Immunisierung eingesetzten Antikörpers erkennen und darauf hin mit der Herstellung eines Antikörpers reagieren, der gegen diese idiotypischen Determinanten gerichtet ist (d. h. des Anti-Id-Antikörpers). Vergleiche zum Beispiel mit dem US-Patent Nr. 4,699,880, das hierin vollständig durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist.

[0127] Der Anti-Id-Antikörper kann ebenfalls als „Immunogen“ verwendet werden, um eine Immunantwort in noch einem weiteren Tier hervorzurufen, wodurch ein so genannter Anti-anti-Id-Antikörper hergestellt werden kann. Der Anti-anti-Id-Antikörper kann mit dem ursprünglichen mAb, der den Anti-Id-Antikörper induzierte, hinsichtlich des Epitops identisch sein. Somit ist es durch die Verwendung von Antikörpern gegen die idiotypischen Determinanten eines mAbs möglich, andere Clone zu identifizieren, die Antikörper mit identischer Spezifität exprimieren.

[0128] Dementsprechend können mAbs, die gegen die RAP-2-Proteine der vorliegenden Erfindung sowie gegen Analoga, Fragmente oder Derivate davon erzeugt wurden, verwendet werden, um Anti-Id-Antikörper in geeigneten Tieren wie z. B. in BALB/c-Mäusen zu erzeugen. Die Milzzellen solcher immunisierten Mäuse werden verwendet, um Anti-Id-Hybridome herzustellen, die Anti-Id-mAbs sekretieren. Des Weiteren können die Anti-Id-mAbs an einen Träger gebunden werden, wie z. B. an KLH („keyhole limpet hemocyanin“) und dazu verwendet werden, weitere BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Die Seren aus diesen Mäusen werden Anti-anti-Id-Antikörper enthalten, die die Bindungseigenschaften der ursprünglichen mAbs aufweisen, die für ein Epitop des vorstehenden RAP-2-Proteins oder seiner Analoga, Fragmente und Derivate spezifisch sind.

[0129] Die Anti-Id-mAbs besitzen somit ihre eigenen idiotypischen Epitope oder „Idiotope“, die zu dem Epitop, das untersucht wird, strukturell ähnlich sind, wie z. B. zu dem GRB-Protein a.

[0130] Es wird auch beabsichtigt, dass der Begriff „Antikörper“ sowohl intakte Moleküle als auch Fragmente davon mit einschließt, wie zum Beispiel Fab und F(ab')₂, die in der Lage sind, an das Antigen zu binden. Fab- und F(ab')₂-Fragmenten fehlt das Fc-Fragment eines intakten Antikörpers, sie werden rascher aus dem Kreislauf ausgeschieden, und sie können eine geringere unspezifische Gewebsbindung als ein intakter Antikörper aufweisen (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983)).

[0131] Es wird ersichtlich, dass Fab und F(ab')₂ sowie andere Fragmente der Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, zum Nachweis und zur Quantifizierung des RAP-2-Proteins gemäß den Verfahren verwendet werden können, die hierin für intakte Antikörpermoleküle offenbart wurden. Solche Fragmente werden typischerweise durch proteolytische Spaltung hergestellt, und zwar unter Verwendung von Enzymen wie z. B. Papain (um Fab-Fragmente herzustellen) oder Pepsin (um F(ab')₂-Fragmente herzustellen).

[0132] Von einem Antikörper wird gesagt, dass er „in der Lage zur Bindung“ an ein Molekül ist, wenn er in der Lage ist, mit dem Molekül spezifisch zu reagieren und dadurch das Molekül an den Antikörper zu binden. Der Begriff „Epitop“ bedeutet eine Bezugnahme auf denjenigen Teil eines beliebigen Moleküls, der in der Lage ist, an einen Antikörper gebunden zu werden, und der ebenfalls durch diesen Antikörper erkannt werden kann. Epitope oder „antigene Determinanten“ bestehen üblicherweise aus chemisch aktiven Oberflächengruppierungen von Molekülen wie z. B. von Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten und besitzen spezifische dreidimensionale strukturelle Eigenschaften sowie spezifische Ladungseigenschaften.

[0133] Ein „Antigen“ ist ein Molekül oder ein Teil eines Moleküls, das in der Lage ist, durch einen Antikörper gebunden zu werden, und das darüber hinaus in der Lage ist, ein Tier zur Herstellung eines Antikörpers zu induzieren, der in der Lage ist, an ein Epitop dieses Antigens zu binden. Ein Antigen kann ein oder mehr als ein Epitop besitzen. Die spezifische Reaktion, auf die vorstehend Bezug genommen wurde, bedeutet, dass das Antigen in einer hoch selektiven Weise mit seinem entsprechenden Antikörper reagieren wird und nicht mit der Vielzahl anderer Antikörper, die durch andere Antigene hervorgerufen werden können.

[0134] Die Antikörper, einschließlich der Fragmente der Antikörper, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können verwendet werden, um das RAP-2-Protein in einer Probe quantitativ oder qualitativ nachzuweisen oder um die Anwesenheit von Zellen nachzuweisen, die das RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung exprimieren. Dies kann durch Immunfluoreszenz-Verfahren erfolgen, die einen Fluoreszenz-markierten Antikörper (vergleiche nachstehend) verwenden, verbunden mit einem lichtmikroskopischen, durchflußcytometrischen oder fluorometrischen Nachweis.

[0135] Die Antikörper (oder Fragmente davon), die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, können histologisch wie z. B. bei der Immunfluoreszenz oder der Immunelektronen-Mikroskopie zum in situ-Nachweis des

RAP-2-Proteins der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Der in situ-Nachweis kann durch die Entfernung einer histologischen Probe aus einem Patienten und dem Bereitstellen des markierten Antikörpers der vorliegenden Erfindung für eine solche Probe durchgeführt werden. Der Antikörper (oder das Fragment) wird bevorzugt durch Anliefern oder Übersichten des markierten Antikörpers (oder des Fragments) an eine biologische Probe bereitgestellt. Durch die Verwendung eines solchen Verfahrens ist es nicht nur möglich, die Anwesenheit des RAP-2-Proteins zu bestimmen, sondern auch seine Verteilung in dem untersuchten Gewebe. Bei der Anwendung der vorliegenden Erfindung werden Fachleute rasch erkennen, dass ein beliebiges aus einer Vielzahl histologischer Verfahren (wie z. B. Färbeverfahren) modifiziert werden kann, um einen solchen in situ-Nachweis zu erreichen.

[0136] Solche Testansätze für das RAP-2-Protein der vorliegenden Erfindung umfassen typischerweise die Inkubation einer biologischen Probe wie z. B. einer biologischen Flüssigkeit, eines Gewebeextrakts, frisch geernteter Zellen wie z. B. Lymphocyten oder Leukocyten oder Zellen, die in Gewebekultur angezogen wurden, in Gegenwart eines nachweisbaren, markierten Antikörpers, der in der Lage ist, das RAP-2-Protein zu identifizieren, und den Nachweis des Antikörpers durch ein beliebiges aus einer Reihe von Verfahren, die im Fachgebiet wohlbekannt sind.

[0137] Die biologische Probe kann mit einer Festphasen-Unterlage oder mit einem Träger behandelt werden, wie z. B. mit Nitrocellulose, oder mit einer anderen festen Unterlage oder einem Träger, die/der in der Lage ist, Zellen, Zellpartikel oder lösliche Proteine zu immobilisieren. Die Unterlage oder der Träger kann dann mit geeigneten Puffern gewaschen werden, darauf hin erfolgt die Behandlung mit einem nachweisbaren markierten Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung, wie vorstehend erwähnt. Die Festphasen-Unterlage oder der Träger kann dann mit dem Puffer ein zweites Mal gewaschen werden, um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Menge der gebundenen Markierung auf der festen Unterlage oder dem Träger kann dann durch herkömmliche Mittel nachgewiesen werden.

[0138] Mit „Festphasen-Unterlage“, „Festphasen-Träger“, „feste Unterlage“, „fester Träger“, „Unterlage“ oder „Träger“ ist jede beliebige Unterlage oder jeder beliebige Träger gemeint, die/der in der Lage ist, ein Antigen oder einen Antikörper zu binden. Wohlbekannte Unterlagen oder Träger umfassen Glas, Polystyrol, Polypropylen, Polyethylen, Dextran, Nylon-Amylasen, natürliche und modifizierte Cellulosen, Polyacrylamide, Gabbros und Magnetit. Die Natur des Trägers kann für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bis zu einem gewissen Grad entweder löslich oder auch unlöslich sein. Das Material der Unterlage kann praktisch jede beliebige mögliche strukturelle Konfiguration aufweisen, so lange das daran angeheftete Molekül zur Bindung an ein Antigen oder an einen Antikörper in der Lage ist. Daher kann die Konfiguration der Unterlage oder des Trägers sphärisch sein, wie z. B. bei einem Kügelchen, oder zylindrisch sein, wie z. B. bei der inneren Oberfläche eines Teströhrchens oder der äußeren Oberfläche eines Stäbchens. Alternativ kann die Oberfläche flach sein, wie z. B. bei einem Blatt, einem Test-Streifen usw. Bevorzugte Unterlagen oder Träger umfassen Polystyrol-Kügelchen. Fachleuten werden andere geeignete Träger für die Bindung eines Antikörpers oder eines Antigens bekannt sein, oder sie werden in der Lage sein, diese durch die Anwendung von Routineexperimenten zu ermitteln.

[0139] Die Bindungsaktivität einer bestimmten Charge eines Antikörpers der Erfindung, wie vorstehend erwähnt, kann gemäß bekannter Verfahren bestimmt werden. Fachleute werden in der Lage sein, operative und optimale Testbedingungen für jeden Nachweis durch Routineexperimente zu bestimmen.

[0140] Es können weitere Schritte wie z. B. Waschen, Rühren, Schütteln, Filtrieren und ähnliche den Testanätzen hinzugefügt werden, je nachdem wie es üblich oder für die spezielle Situation notwendig ist.

[0141] Einer der Wege, auf dem ein Antikörper gemäß der Erfindung zum Nachweis markiert werden kann, erfolgt durch die Verknüpfung desselben mit einem Enzym und der Verwendung in einem Enzym-Immun-Test (EIA). Das Enzym wiederum wird, wenn es später einem geeigneten Substrat ausgesetzt wird, mit dem Substrat in einer solchen Weise reagieren, dass eine chemische Einheit produziert wird, die nachgewiesen werden kann, zum Beispiel durch spektrophotometrische, fluorometrische oder durch visuelle Mittel. Enzyme, die verwendet werden können, um den Antikörper für den Nachweis zu markieren, umfassen Malat-Dehydrogenase, Staphylococcus-Nuclease, Delta-5-Steroid-Isomerase, Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe, Alpha-Glycerophosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase, Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase, Asparaginase, Glucose-Oxidase, Beta-Galactosidase, Ribonuclease, Urease, Katalase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Glucoamylase und Acetylcholin-Esterase, sind aber nicht auf diese beschränkt. Der Nachweis kann durch colorimetrische Verfahren erfolgen, die ein chromogenes Substrat für das Enzym verwenden. Der Nachweis kann ebenfalls durch einen visuellen Vergleich des Ausmaßes der enzymatischen Re-

aktion eines Substrats im Vergleich zu auf ähnliche Weise hergestellten Standards erfolgen.

[0142] Der Nachweis kann unter Verwendung eines beliebigen aus einer Reihe anderer Immuntests durchgeführt werden. Zum Beispiel ist es durch radioaktive Markierung der Antikörper oder der Antikörper-Fragmente möglich, R-PTPase über die Verwendung eines Radioimmuntests (RIA) nachzuweisen. Eine gute Beschreibung des RIA findet sich in „Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology“ von Work, T.S. et al., North Holland Publishing Company, NY (1978), mit besonderem Bezug auf das Kapitel mit dem Titel „An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques“ von Chard, T., das hierin durch Bezugnahme mit eingeschlossen ist. Das radioaktive Isotop kann durch solche Mittel wie z. B. der Verwendung eines Gamma-Zählers oder eines Szintillationszählers oder durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

[0143] Es ist auch möglich, einen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung mit einer fluoreszierenden Verbindung zu markieren. Wenn der Fluoreszenz-markierte Antikörper Licht der geeigneten Wellenlänge ausgesetzt wird, kann seine Anwesenheit aufgrund der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Unter den üblicherweise am meisten verwendeten Verbindungen zur Fluoreszenzmarkierung befinden sich Fluorescein-Isothiocyanat, Rhodamin, Phycoerythrin, Pycocyanin, Allophycocyanin, o-Phthaldehyd und Fluorescamin.

[0144] Der Antikörper kann zum Nachweis ebenfalls unter Verwendung von Fluoreszenz abstrahlenden Metallen wie z. B. ^{152}E oder anderen der Lanthaniden-Reihe markiert werden. Diese Metalle können an den Antikörper durch Verwendung von Metallchelat bildenden Gruppen wie z. B. Diethylentriaminpentaessigsäure (ET-PA) angeheftet werden.

[0145] Der Antikörper kann zum Nachweis ebenfalls durch seine Kopplung an eine chemilumineszente Verbindung markiert werden. Die Anwesenheit des Chemilumineszenz-markierten Antikörpers wird dann durch den Nachweis der Anwesenheit von Lumineszenz bestimmt, die im Verlauf einer chemischen Reaktion entsteht. Beispiele für besonders nützliche chemilumineszente Verbindungen zur Markierung sind Luminol, Isoluminol, theromatische Acridin-Ester, Imidazol, Acridinium-Salze und Oxalat-Ester.

[0146] In ähnlicher Weise kann eine biolumineszente Verbindung verwendet werden, um den Antikörper der vorliegenden Erfindung zu markieren. Biolumineszenz ist eine Art der Chemilumineszenz, die sich in biologischen Systemen findet, bei der ein katalytisches Protein die Wirksamkeit der chemilumineszenten Reaktion erhöht. Die Anwesenheit eines biolumineszenten Proteins wird durch den Nachweis der Anwesenheit der Lumineszenz bestimmt. Wichtige biolumineszente Verbindungen zum Zwecke der Markierung sind Luziferin, Luziferase und Aequorin.

[0147] Ein Antikörpermolekül der vorliegenden Erfindung kann zum Gebrauch bei einem immunometrischen Test angepasst werden, der auch als „Zwei-Seiten“ oder als „Sandwich-Assay“ bekannt ist. Bei einem typischen immunometrischen Testansatz wird eine Menge eines unmarkierten Antikörpers (oder eines Fragments eines Antikörpers) an eine feste Unterlage oder an einen Träger gebunden, und eine Menge eines zum Nachweis markierten löslichen Antikörpers wird zugegeben, um den Nachweis und/oder die Quantifizierung des ternären Komplexes zu erlauben, der sich zwischen dem Festphasen-Antikörper, dem Antigen und dem markierten Antikörper gebildet hat.

[0148] Typischerweise und bevorzugt umfassen immunometrische Testansätze „Vorwärts“-Testansätze, bei denen der an die Festphase gebundene Antikörper zuerst mit der zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht wird, um das Antigen aus der Probe durch die Bildung eines binären an der Festphase gebunden Antikörper-Antigen-Komplexes zu extrahieren. Nach einem geeigneten Inkubationszeitraum wird die feste Unterlage oder der Träger gewaschen, um Reste der flüssigen Probe, einschließlich des Antigens, das nicht reagiert hat, wenn überhaupt noch vorhanden, zu entfernen, und dann mit einer Lösung in Kontakt gebracht, die eine unbekannte Menge eines markierten Antikörpers enthält (der als „Reportermolekül“ fungiert). Nach einem zweiten Inkubationszeitraum, in dem es dem markierten Antikörper erlaubt wird, einen Komplex mit dem Antigen zu bilden, das an die feste Unterlage oder den Träger über den unmarkierten Antikörper gebunden ist, wird die feste Unterlage oder der Träger ein zweites Mal gewaschen, um den markierten Antikörper, der nicht reagiert hat, zu entfernen.

[0149] Bei einem anderen Typ eines „Sandwich-Assays“, der für die Antigene der vorliegenden Erfindung ebenfalls nützlich sein kann, werden die so genannten „simultanen“ und „reversen“ Testansätze verwendet. Ein simultaner Testansatz umfasst einen einzigen Inkubationsschritt, da sowohl der Antikörper, der an die feste Unterlage oder an den Träger gebunden wird, als auch der markierte Antikörper der Probe, die untersucht wird, zur gleichen Zeit zugegeben werden. Nachdem die Inkubation beendet ist, wird die feste Unterlage oder der

Träger gewaschen, um Reste der flüssigen Probe und des nicht komplexierten markierten Antikörpers zu entfernen. Die Anwesenheit des markierten Antikörpers, der mit der festen Unterlage oder dem Träger verbunden ist, wird dann wie in einem konventionellen „Vorwärts-Sandwich-Assay“ bestimmt.

[0150] Bei dem „reversen“ Testansatz wird zuerst die schrittweise Zugabe einer Lösung des markierten Antikörpers zu der flüssigen Probe verwendet, gefolgt von der Zugabe des unmarkierten Antikörpers nach einem geeigneten Inkubationszeitraum, der eine feste Unterlage oder an den Träger gebunden ist. Nach einer zweiten Inkubation wird die Festphase in üblicher Weise gewaschen, um sie von den Resten der Probe, die untersucht wird, und der Lösung des markierten Antikörpers, der nicht reagiert hat, zu befreien. Die Bestimmung des markierten Antikörpers, der mit der festen Unterlage oder dem Träger assoziiert ist, wird dann wie bei dem „simultanen“ und dem „Vorwärts“-Testansatz bestimmt.

[0151] Das RAP-2-Protein der Erfindung kann durch beliebige rekombinante Standard-DNA-Verfahren hergestellt werden (vergleiche zum Beispiel mit Sambrook et al., 1989 und Ausubel et al., 1987-1995, vorstehend), bei denen geeignete eukaryontische oder prokaryontische Wirtszellen, die im Fachgebiet wohlbekannt sind, mit den geeigneten eukaryontischen oder prokaryontischen Vektoren transformiert werden, welche die Sequenzen enthalten, die die Proteine codieren. Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch solche Expressionsvektoren und transformierte Wirtszellen zur Herstellung der Proteine der Erfindung. Wie vorstehend erwähnt, umfassen diese Proteine auch ihre biologisch aktiven Analoga, Fragmente und Derivate, und daher umfassen die Vektoren, die diese codieren, ebenfalls Vektoren, die Analoga und Fragmente dieser Proteine codieren, und die transformierten Wirte umfassen diejenigen, die solche Analoga und Fragmente herstellen. Bei den Derivaten dieser Proteine, die durch die transformierten Wirte hergestellt werden, handelt es sich um Derivate, die durch Standard-Modifikationen der Proteine oder ihrer Analoga oder Fragmente hergestellt werden.

[0152] Wie vorstehend erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung auch Arzneimittel, die rekombinante Tiervirus-Vektoren umfassen, welche das RAP-2-Protein codieren, wobei der Vektor zugleich ein virales Oberflächenprotein codiert, das in der Lage ist, an die Oberflächenproteine spezifischer Zielzellen (z. B. Krebszellen) zu binden, um die Insertion der RAP-2-Proteinsequenzen in die Zellen zu steuern. Weitere Arzneimittel der Erfindung umfassen als aktiven Bestandteil eine Oligonucleotid-Sequenz, die eine Antisense-Sequenz der RAP-2-Proteinsequenz codiert.

[0153] Arzneimittel gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen eine ausreichende Menge des aktiven Bestandteils, um dessen beabsichtigten Zweck zu erfüllen. Zusätzlich können die Arzneimittel geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger enthalten, die Excipienten und Zusatzstoffe umfassen, welche die Verarbeitung der aktiven Bestandteile zu Präparaten erleichtern, die pharmazeutisch verwendet werden können, und die solche Präparate zur Verabreichung an das Individuum, das ihrer bedarf, stabilisieren können, wie sie den Fachleuten wohlbekannt sind.

[0154] Von dem RAP-2-Protein und seinen Isoformen oder Isotypen wird erwartet, dass sie in unterschiedlichen Geweben zu deutlich unterschiedlichen Spiegeln und offenbar auch in unterschiedlichen Mustern der Isoformen exprimiert werden, dies würde in analoger Weise zu der Expression verschiedener anderer Proteine erfolgen, die an den intrazellulären Signalübertragungswegen beteiligt sind, wie in den vorstehend angeführten, gleichzeitig im Besitz der Erfinder befindlichen und gleichzeitig anhängigen Patentanmeldungen angezeigt wurde. Diese Unterschiede können möglicherweise zu den gewebsspezifischen Eigenschaften der Antwortreaktionen gegenüber dem Fas/APO1-Liganden und dem TNF mit beitragen. Wie im Falle anderer CED3/ICE-Homologe (Wang et al., 1994; Alnemri et al., 1995) haben die genannten Erfinder bereits gezeigt (in den vorstehend erwähnten Patentanmeldungen), dass von MACH-Isoformen, die unvollständige CED3/ICE-Regionen enthalten (z. B. MACH α 3), herausgefunden wurde, dass sie eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der gleichzeitig exprimierten MACH α 1- oder MACH α 2-Moleküle besitzen; von diesen wurde ebenfalls herausgefunden, dass sie die Induktion des Zelltodes durch Fas/APO1 und den p55-R blockieren. Die Expression solcher hemmenden Isoformen in den Zellen kann einen Mechanismus des zellulären Selbstschutzes gegen die durch Fas/APO1 und den TNF vermittelte Cytotoxizität bilden. Eine ähnliche hemmende Wirkung mindestens einer der Isoformen von G1 wird ebenfalls vermutet (G1 ist ein vor kurzem isoliertes an Mch4 und möglicherweise auch an MACH bindendes Protein, und auch ein an MORT-1 bindendes Protein, das MORT-MODULE und eine Protease-Domäne besitzt – vergleiche mit der ebenfalls im Besitz der Erfinder befindlichen, und ebenfalls anhängigen Patentanmeldung IL 120367). Die große Heterogenität der MACH-Isoformen und die gleichfalls erwartete analoge Heterogenität der G1-Isoformen, die diejenige, die für andere Proteasen der CED3/ICE-Familie beobachtet wird, bei weitem übertrifft, sollte eine besonders feine Regulierung der Funktion der aktiven MACH-Isoformen und in analoger Weise auch der aktiven G1-Isoformen erlauben.

Daher können, wie vorstehend erwähnt, die RAP-2-Proteine oder mögliche Isoformen variierende Wirkungen in unterschiedlichen Geweben aufweisen, was ihre Wechselwirkung mit RIP und damit ihren Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen der Aktivierung der Zelltod- oder der Zellüberlebens-Signalwege betrifft, wie vorstehend beschrieben wurde.

[0155] Es ist auch möglich, dass einige der möglichen Isoformen des RAP-2-Proteins anderen Funktionen dienen. Zum Beispiel könnten RAP-2, oder einige RAP-2-Isoformen auch als Andockstellen für Moleküle fungieren, die an anderen, nicht cytotoxischen Wirkungen des Fas/APO1- und des TNF-Rezeptors über eine Wechselwirkung mit RIP oder sogar unabhängig von RIP beteiligt sind.

[0156] Aufgrund der einzigartigen Fähigkeit des Fas/APO1- und des TNF-Rezeptors, Entzündungen und den Zelltod verursachen zu können, sowie der Fähigkeit der TNF-Rezeptoren, andere gewebsschädigende Aktivitäten auslösen zu können, können Abweichungen von der Funktion dieser Rezeptoren für den Organismus besonders schädlich sein. Es wurde tatsächlich gezeigt, dass sowohl das übermäßige als auch das unzureichende Funktionieren dieser Rezeptoren zu pathologischen Manifestationen verschiedener Krankheiten mit beiträgt (Vassalli, 1992; Nagata und Golstein, 1995). Die Identifizierung der Moleküle, die an der Signalübertragungsaktivität dieser Rezeptoren teilnehmen, und das Auffinden von Wegen, um die Aktivität dieser Moleküle zu modulieren, können neue therapeutischen Ansätzen lenken. Andere Aspekte der Erfindung werden aus den folgenden Beispielen deutlich werden.

[0157] Die Erfindung wird nun in mehr Einzelheiten in den folgenden nicht einschränkenden Beispielen und in den begleitenden Abbildungen beschrieben:

Es sollte auch angemerkt werden, dass die Verfahren:

(i) der Zwei-Hybrid-Durchmusterung und des Zwei-Hybrid- β -Galactosidase-Expressionstests; (ii) die induzierte Expression, die metabolische Markierung und die Immunpräzipitation von Proteinen; (iii) die in vitro-Bindung; (iv) die Bestimmung der Cytotoxizität und (v) die Northern- und die Sequenz-Analysen (vergleiche auch mit Boldin et al., 1995b) 2, 3 (vergleiche auch mit Boldin et al., 1996) und 4, nachstehend, im Hinblick auf MORT-1 und ein an MORT-1 bindendes Protein (z. B. MACH) sowie das neue isolierte Protein G1 (vergleiche mit IL 120367) für die entsprechende Isolierung, Clonierung und Charakterisierung von RAP-2 der vorliegenden Erfindung und seiner möglichen Isoformen in gleicher Weise (mit einigen Modifikationen) angewendet werden können. Diese Verfahren sind daher als die vollständige Offenbarung der gleichen Verfahren auszulegen, die für die Isolierung, Clonierung und Charakterisierung von RAP-2 gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, und wie sie in Einzelheiten z. B. in der gleichen oder in einer äquivalenten Form in den ebenfalls im Besitz der Anmelder befindlichen und gleichzeitig anhängigen israelischen Patentanmeldung Nrn. 114,615, 114,986, 115,319, 116588, 117,932 und 120367 sowie in der entsprechenden PCT-Patentanmeldung Nr. PCT/US96/10521 genau beschrieben werden. Was das NIK-Protein und seine Rolle bei der Aktivierung von NF- κ B und somit das Zellüberleben betrifft, sowie die Rolle, die TRAF2 bei diesem Zellüberlebens-Signalweg spielt, wie zum Beispiel die Wechselwirkung zwischen TRAF2 und RIP und anderen Proteinen, wurden diese in Einzelheiten durch die hier genannten Erfinder in den ebenfalls im Besitz der Anmelder befindlichen und gleichzeitig anhängigen Patentanmeldungen IL 117800, IL 119133 sowie in Malinin et al., 1997 beschrieben.

Beispiel 1: Clonierung und Isolierung des RAP-2-Proteins, das an das RIP-Protein bindet

Zwei-Hybrid-Durchmusterung, Sequenzierung und vorläufige Analyse

[0158] Unter Verwendung einer Zwei-Hybrid-Durchmusterung mit RIP als Köder (vergleiche z. B. mit Fields und Song, 1989, WO/96/18641) wurde aus einer B-Zellen-Genbank ein Clon von etwa 1,5 kB Länge isoliert. Dieser 1,5 kB lange Clon (vergleiche mit dem Pfeil in **Fig. 1** und 2) wurde für die Durchmusterung einer Phagen-cDNA-Genbank verwendet, wodurch ein Clon von etwa 2,0 kB erhalten wurde, dessen Sequenz in **Fig. 1** gezeigt wird.

[0159] Unter Anwendung eines EST-Sequenzvergleichs mit der Sequenz des 1,5 kB großen Clons wurde ein EST-Fragment erhalten, das das 3'-Ende des Clons #41072 des I.M.A.G.E.-Konsortiums (Research Genetics Institute) umfasste. Aus diesem Clon, der aus einer Genbank des fötalen Hirns stammte, wurden nur zwei kleine Sequenzfragmente seines 3'- und 5'-Endes veröffentlicht. Nachdem der Clon vorlag, wurde er sequenziert, und es stellte sich heraus, dass sogar diese veröffentlichten Sequenzfragmente Fehler enthielten. Es wurde herausgefunden, dass der sequenzierte Clon (**Fig. 2**) mit dem Clon der **Fig. 1** in der codierenden Region identisch war, aber Unterschiede in der nicht codierenden 5'-Region aufwies. Daher nehmen wir an, dass beide cDNAs alternativ gespleißte Formen des gleichen Gens sind.

[0160] Die Analyse der Sequenz zeigt, dass das RAP-2-Protein wie RAP offenbar keine „Todesdomänen“ besitzt, es besitzt kein MORT-MODUL, es besitzt keine Proteasedomäne wie in der ICE-Familie, es besitzt keine Kinasedomäne, und es enthält auch keine TRAF-Domänen (vergleiche mit den ebenfalls anhängigen und ebenfalls im Besitz der Erfinder befindlichen Patentanmeldungen und den verschiedenen Referenzen, insbesondere mit Malinin et al., 1997 im Hinblick auf alle die verschiedenen Domänen, die in den intrazellulären Signalübertragungswegen vorkommen). Es wurden auch keine anderen bemerkenswerten Motive in der vorliegenden Sequenz gefunden, mit der Ausnahme von drei Leucin-Zipper- (LZ) ähnlichen Blöcken, die gleichmäßig über die proteincodierende Region verteilt sind.

[0161] Diese wurden als „ähnlich“ bezeichnet, da zwei von ihnen Leu-zu-Val-, -Met- oder -Ile-Austausche enthalten. Obwohl sie normalerweise als konserviert angesehen werden, ist es nicht klar, ob solche Veränderungen innerhalb der Leucin-Zipper-Domäne es dem Protein erlauben, seine funktionelle Aktivität beizubehalten, d. h. die Bindung an andere LZs. Bindungsstudien offenbarten, dass RAP-2 im Wesentlichen an RIP bindet, während RAP-2 nicht in der Lage war, an TRADD, MORT-1, den p55-R, den p75-R und MACH zu binden (bei den Untersuchungen, die bis heute durchgeführt wurden). Diese Ergebnisse stützen die Tatsache/den Befund, dass RAP-2 offenbar „Todesdomänen“ und MORT-MODULE fehlen.

[0162] Daher scheint es so zu sein, dass RAP-2 ein spezifisches an RIP bindendes Protein darstellt, das mit RIP in einer sehr spezifischen Weise in Wechselwirkung tritt oder an es bindet. Somit scheint RAP-2 ein spezifischer Modulator oder Vermittler der intrazellulären Aktivität von RIP zu sein, der eine wichtige Rolle bei der Modulierung oder der Vermittlung der Entzündungs- und der Zelltod- oder Zellüberlebens-Signalwege durch RIP spielt.

[0163] Kurzgefasst wurde ein Clon von RAP-2 durch eine Zwei-Hybrid-Durchmusterung einer menschlichen B-Zellen-cDNA-Genbank unter Verwendung des Volllängen-RIP-Proteins als „Köder“ erhalten. Die Sequenz von RIP war aus vorherigen Veröffentlichungen verfügbar (z. B. Stanger et al., 1995) und lag in der GenBank-Datenbank unter der Zugangs-Nr. U 25994 vor, wobei es sich um die menschliche RIP-Sequenz handelt (die RIP-Sequenz der Maus liegt unter der Zugangs-Nr. U 25995 ebenfalls vor). Unter Verwendung dieser Sequenzinformation wurden geeignete PCR-Primer durch die OLIGO4™-Software entworfen, und das DNA-Fragment, das dem codierenden Teil von RIP entsprach, wurde durch eine PCR unter Verwendung einer cDNA-Genbank als Matrize erhalten, die e (unter Verwendung von Standardverfahren) aus der Gesamt-RNA menschlicher Fibroblastenzellen hergestellt worden war. Dieser codierende Teil von RP wurde dann in den Vektor pGBT-9 (Clontech) cloniert und wie vorstehend dargelegt als Köder in dem Zwei-Hybrid-Durchmusterungsverfahren verwendet. Bei dieser Zwei-Hybrid-Durchmusterung wurde ein Clon erhalten, der ein RIP-Bindprotein codiert, das mit RIP in Wechselwirkung tritt.

[0164] Dieser Clon wurde, wie vorstehend erwähnt, verwendet, um eine Phagen-cDNA-Genbank und eine EST-Datenbank zu durchmustern. Den **Fig. 1** und **2** kann man entnehmen, dass die codierenden Sequenzen der beiden Clone identisch sind, während sich die nicht codierenden 5'-Regionen unterscheiden. Daher haben wir es wahrscheinlich mit alternativ gespleißten Formen zu tun. Die Clone haben eine Länge von etwa 2,0 kB ein ORF (offenes Leseraster) von etwa 1,5 kB, das ein Molekulargewicht des Proteins von etwa 50 kD ergeben würde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von RAP-2 wird in **Fig. 3** gezeigt.

[0165] Die Analyse der vorstehenden Sequenzen des RAP-2-Clons und der Sequenzen in der „dbest“-Datenbank, Human Genome Database level 1, und der GenBank-Datenbank offenbarten, dass die Sequenz von RAP-2 eine einzigartige (neuartige) Sequenz ist, da keine bekannte Sequenz irgendeine signifikante Homologie mit dieser RAP-2-Sequenz aufwies. Nach der Anmeldung IL 123758, aus dem diese Anmeldung die Priorität beansprucht, berichteten Yamaoka, S. et al. (1998) die Charakterisierung einer murinen cDNA, die ein Protein von 48 kD codiert, welches als NEMO (für NF-κB Essential Modulator, essentieller Modulator von NF-κB) bezeichnet wurde (vergleiche mit dem Abschnitt Fachgebiet).

[0166] Die weitere Suche in Datenbanken (in silico) identifizierte FIP-2 – ein Protein mit unbekannter Funktion, das ursprünglich von Li, Y. et al. (1998) cloniert wurde (vergleiche mit dem Abschnitt Hintergrund).

[0167] Wie man aus dem Sequenzvergleich der vollständigen RAP-2- und der FIP-2-Sequenz (**Fig. 3B**) erkennt, ist der Gesamtgrad an Ähnlichkeit relativ gering (daher ist es nicht überraschend, dass die Sequenz unter Verwendung von Sequenzvergleichen, die auf globalen Algorithmen basierten, nicht identifiziert werden konnte). Die Homologie zwischen RAP-2 und FIP-2 nimmt in Richtung des C-Terminus der Proteine hin zu und kulminiert bis zur (praktischen!) Identität der C-terminalen 30 Aminosäuren. Neben dieser Endregion ist erwähnenswert, dass das potenzielle LZ-Motiv von FIP-2 zum größten Teil in RAP-2 konserviert ist (mit Ausnahme

eines Ile/Ala-Substitution.

[0168] Es wurde ebenfalls eine kürzere RAP-2-cDNA mit einer Länge von etwa 0,5 kB identifiziert (ID: 1469996), die hierin nachstehend als Human shrt bezeichnet wird. Diese Variante umfasst codierende Sequenz-„Blöcke“, die aus mehreren (relativ weit) voneinander entfernten Regionen der 1,5 kB langen „vollständigen“ cDNA stammen, und die wahrscheinlich von einem alternativen Spleißen des gleichen Gens herrühren.

[0169] Eine Northern-Hybridisierungs-Analyse eines Multiple Tissue Northern blots (Northern-Blot mit RNA aus mehreren Geweben, Clontech) mit einem 0,9 kB großen BglII-Fragment der RAP-2-cDNA ergab ein komplexes Muster der RAP-2-mRNA. Es wurden mindestens 5 unterschiedliche mRNAs nachgewiesen, die in der Größe von <1 kB bis zu >7 kB reichten, wobei die 2,5 kB- und die 6 kB-Variante mehr oder weniger ubiquitär überwiegen ([Fig. 4A](#)).

Beispiel 2: Identifizierung des murinen RAP-2

[0170] Eine Ähnlichkeitssuche in der Maus-ESTs-Kollektion, die am TIGR erstellt wurde, offenbarte eine Teil-cDNA von 1,6 kB Länge (Mouse part., ID 761011, **Fig. 3**), die wahrscheinlich dem RAP-2-Protein aus der Maus entspricht, da sie mit ihrem menschlichen Gegenstück durchgängig durch die codierende Region praktisch identisch ist (95 %) (vergleiche mit **Fig. 3**).

[0171] Dennoch reichen die Unterschiede zwischen der menschlichen und der murinen RAP-2- und der NEMO-Sequenz über das hinaus, was eindeutig einem regulären Unterschied zwischen den Arten zugeschrieben werden kann. Ein fehlender Block von 7 Aminosäuren (Position 249 in 20.4) in dem murinen RAP-2 und in der NEMO-Sequenz und die Insertion von 3 Aminosäuren (KLE an Position 111) in dem offenen Leseraster von NEMO im Vergleich zu der menschlichen Vollängen-Variante und zu der partiellen murinen Sequenz sind tatsächlich nur die am meisten hervorzuhebenden Beispiele (**Fig. 3**). Diese könnten jedoch funktionelle Auswirkungen auf die Aktivität des Proteins haben. Die funktionellen Eigenschaften, die für NEMO berichtet wurden, scheinen tatsächlich denjenigen, die für das menschliche RAP-2 gefunden wurden, entgegengesetzt zu sein, obwohl die Fraktionierungsanalyse, die für NEMO berichtet wurde, bestätigt, dass es im Signalosom lokalisiert ist.

Beispiel 3: Die Bindung von RIP an RAP-2 in Säugerzellen

[0172] Ein weiterer Beweis für die physiologische Bedeutung der RAP-2-RIP-Wechselwirkung wurde in transfizierten HEK-293T- und in HeLa-Zellen erhalten. Diese beiden Proteine konnten tatsächlich leicht aus Zellysaten von HEK-293-Zellen (ATCC-Nr. CRL 1573) copräzipitiert werden, die wie nachstehend in jeder Zeile in [Fig. 4B](#) angegeben, transfiziert worden waren, und mit Anti-FLAG-mABs (Kodak) immunpräzipitiert werden. Die Immunkomplexe wurden anschließend auf die Anwesenheit von HIS-RAP-2 durch ein herkömmliches Western-Blot-Verfahren mit Anti-His6-mABs (Sigma) analysiert ([Fig. 4B](#) und nicht gezeigte Daten). Die Bildung eines solchen Komplexes führte jedoch nicht zu einer enzymatischen Aktivität von RIP: überexprimiertes RIP phosphorylierte RAP-2 nicht in einem Ausmaße, wie es mit einem Immunkomplex-Kinase-Testansatz in vitro hätten nachweisen können (Daten nicht gezeigt).

[0173] Es wurden Bindungs-Testansätze durchgeführt, um zu bestimmen, ob RAP-2 an irgendeines der anderen bekannten intrazellulären signalübertragenden Proteine bindet. Bei diesen Untersuchungen wurden die Proteine TRADD, MORT-1, der p55-R, der p75-R und MACH auf ihre Fähigkeit an RAP-2 zu binden hin untersucht. Es wurde jedoch herausgefunden, dass RAP-2 nicht in der Lage war, an irgendeines dieser Proteine zu binden. RAP-2 band ebenfalls an keines der Kontrollproteine, wie z. B. an Lamin oder an Cyclin D.

[0174] Alle der vorstehenden Ergebnisse zeigen daher an, dass das neue RAP-2-Protein möglicherweise mit RIP in einer sehr spezifischen Weise in Wechselwirkung tritt und als solches stellt es einen spezifischen Modulator oder Vermittler von RIP dar.

Beispiel 4: RAP-2 tritt mit NIK in Wechselwirkung und moduliert die von NF- κ B und c-Jun abhängige Transkription.

[0175] Obwohl keine Wechselwirkung von RAP-2 mit NIK bei den Zwei-Hybrid-Untersuchungen in der Hefe nachgewiesen konnte (vergleiche mit dem Vorstehenden), deuteten die Transfektionsexperimente in HEK-293T-Säugerzellen auf eine stabile Bildung dieses Komplexes hin. Die NIK-RAP-2-Wechselwirkung wurde wie in Beispiel 3 beschrieben nachgewiesen, mit der Ausnahme, das Anti-FLAG-Antikörper für die Wes-

ten-Blot-Analyse verwendet wurden, die nach einer Immunpräzipitation mit Anti-His6-(Antikörpern) erfolgte ([Fig. 4C](#)). Eine solche Diskrepanz in der Bindung zwischen Hefe und Säugerzellen kam nicht überraschend, da das Volllängen-NIK-Protein dazu tendiert, seine Bindungseigenschaften zu verlieren, wenn es in Hefe exprimiert wird.

[0176] Im Hinblick auf die Tatsache, dass man annimmt, dass in vivo sowohl RIP als auch NIK unverzichtbare Vermittler der durch den TNF induzierten Aktivierung von NF- κ B darstellen, untersuchten wir, ob die Überexpression von RAP-2 in einer Zellkultur in der Lage ist, diesen besonderen Signalübertragungsweg zu stören. Eine anfängliche Reihe von Experimenten wurde in HEK-293T-Zellen durchgeführt, die mit Reporterplasmiden transient transformiert wurden, welche aus dem Luciferase-Gen unter der Kontrolle des HIV-LTR-Minimal-Promotors bestanden. Mit einem ähnlichen Experimentaufbau war anfänglich herausgefunden worden, dass RAP-2 die Aktivierung des Reporters bis fast auf den Grundspiegel herunter reguliert, die sowohl durch eine Überexpression der verschiedenen bekannten NF- κ B-Induktoren, die an der TNF-Signalübertragung beteiligt sind (NIK, TRAF2, RIP, usw.), als auch durch eine Behandlung der Zellen mit externen Reizen (TNF und PMA, [Fig. 5A](#)) verursacht worden war. Die HEK-293T-Zellen wurden mit dem Reporterplasmid (HIVLTR-Luc oder CMV-Luc für NF- κ B- (5A) und GAL4-Luc für c-Jun- (5B) – Aktivierungstestansätze) und mit einem Expressionsvektor für den angegebenen Induktor, sowie entweder mit dem leeren Vehikel (pcDNA3) oder mit einem Plasmid, das das Volllängen-RAP-2-Protein codierte (pcRAP-2), transient transformiert. Es ist bemerkenswert, dass die Tatsache, dass RAP-2 in der Lage ist, seine Wirkungen so weit hinten/unten in dem Signalübertragungsweg, wie an der Stelle wo RelA liegt, ausüben zu können, beinhaltet, dass ein Teil dieser Proteinwirkung verschiedenen und ansonsten divergierender Signalübertragungswegen gemein sein könnte (vergleiche mit dem Nachstehenden). Gleichzeitig wurde die von κ B unabhängige (vom frühen CMV-Promotor angetriebene) Transkription der Luciferase nicht beeinträchtigt ([Fig. 5A](#)), und daher glauben wir, dass eine mögliche allgemeine Unordnung der basalen Transkriptions-/Translations-Maschinerie durch RAP-2 ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse wurden anschließend in HeLa-Zellen vollständig bestätigt (nicht gezeigt).

[0177] Wie jedoch weitere Titrations-Testansätze offenbarten, war das tatsächliche Phänomen weitaus komplexer. Wenn TRAF2 in HEK-293T-Zellen zusammen mit den verschiedenen Mengen an pcRAP-2, die in [Fig. 6](#) angegeben sind, transient transformiert wurde, veränderte RAP-2 sein Verhalten bei niedrigen Konzentrationen (etwa bei 20 ng/10⁶ Zellen) drastisch, in dem es die durch TRAF2(-)NF- κ B induzierte Transkription steigerte (vergleiche mit [Fig. 6A](#)). Darüber hinaus wurde durch einen Austausch der ursprünglichen Insertion mit einer in der umgekehrten Orientierung, ein wirksames, die RAP-2-Antisense-RNA exprimierendes Vehikel entworfen, und TRAF2 wurde in HEK-293T-Zellen zusammen mit den verschiedenen angegebenen Mengen des pcRAP-2-a/s- (Antisense) -Konstrukts transient exprimiert, und es wurde die Wirkung einer fortschreitenden Verarmung an RAP-2 analysiert, was zur Erstellung eines konzentrationsabhängigen Diagramms führte. Der Gesamttrend der Kurvendarstellung deutet an, dass die Reaktionsfähigkeit der Zelle mit der Menge der transfizierten RAP-2-DNA in Großem und Ganzem invers korreliert, mit der Ausnahme einer charakteristischen Region, die in etwa an dem „Null“-Punkt stattfindet, der dem nominalen, endogenen Spiegel des Proteins entspricht ([Fig. 6](#)). Es sollte angemerkt werden, dass die Herunterregulierung der Expression eines bestimmten Gens durch die Einbringung einer Antisense-RNA gegenüber einer Überexpression der Sense-RNA vermutlich genauer und feiner erfolgt. Ein Antisense-(RNA-Testansatz) beinhaltet nämlich nicht die artifizielle Produktion eines fremden Proteins innerhalb der Zelle, und er unterbewertet daher die Bedeutung der hemmenden Kapazität von RAP-2. Dennoch sollte angemerkt werden, dass der vorstehend erwähnte Sprung bei niedrigen Konzentrationen in der Antisense-Hälfte der Darstellung widergespiegelt und nicht umgekehrt wird ([Fig. 6](#)).

[0178] Um die Diversität des Transkriptionssystems, an dem RAP-2 beteiligt sein könnte, zu untersuchen, wechselten wir zur Untersuchung von c-Jun, einem nucleären Faktor, von dessen Rolle bei dem Aufbau und der Aufrechterhaltung einer angemessenen Stressantwort bewiesen ist, dass sie fast so bedeutend wie die von NF- κ B ist. Unter Verwendung von Komponenten des kommerziell erhältlichen „Path Detect“-Systems (Stratagene), konnten wir ein ähnliches biphasisches Verhalten von RAP-2 in Bezug auf mehrere bekannte Aktivatoren von AP-1 in HEK-293T- und in HeLa-Zellen bestätigen (vergleiche mit den [Fig. 5B](#) und [Fig. 6B](#)).

Beispiel 5: RAP-2 potenziert die Hyperphosphorylierung von c-Jun ohne die Aktivität der JNK zu verändern.

[0179] Um den Mechanismus zu untersuchen, der einer solchen tiefgehenden Wirkung auf die Transkription zu Grunde liegt, war es wichtig, den genauen Spiegel zu bestimmen, an dem das Signal unter normalen Bedingungen zusammenbricht. Es ist bekannt, dass das Potenzial von c-Jun zur Transaktivierung durch eine, durch extrazelluläre Signale induzierte, Phosphorylierung von zwei Serinresten (⁶³Ser und ⁷³Ser) seiner aminoterminalen Aktivierungsdomäne reguliert wird. Die JNK/SAPK-Proteinkinasen, die für diese vorstehend erwähnte Phosphorylierung verantwortlich sind, bilden eine relativ weit entfernte Untergruppe der MAP-Kinase-

familie und werden selber über eine Phosphorylierung an ¹⁸³Thr und an ¹⁸⁵Tyr aktiviert, die durch weiter stromaufwärts liegende, doppelt-spezifische Kinasen vermittelt wird. Daher kann der Phosphorylierungszustand der entsprechenden Stellen, sowohl bei c-Jun als auch bei den JNKs, als ein Marker verwendet werden, der den Aktivierungszustand des Proteins widerspiegelt. Eine Western-Blot-Analyse mit Lysaten von transient transformierten HEK-293T-Zellen offenbarte, dass trotz einer Beeinträchtigung der durch c-Jun vermittelten Transkription, RAP-2 die Phosphorylierung des endogenen c-Jun an ⁶³Ser, die durch eine Reihe von Reizen induziert wurde, deutlich potenzierte (vergleiche mit der [Fig. 7A](#)). Die Gesamt-Zelllysate von HEK-293T-Zellen, die mit den angegebenen Expressionskonstrukten zusammen mit entweder der pcDNA3-Träger-DNA, die in [Fig. 7](#) durch ein Minuszeichen (-) angezeigt ist, oder mit pcRAP-2, das in der gleichen Figur durch ein Pluszeichen (+) angezeigt ist, transient transformiert worden waren, wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf ECL-Membranen übertragen und mit Anti-Phospho-⁶³Ser-c-Jun-Antikörpern (NEB) getestet. Die in der unteren Teilabbildung von [Fig. 7A](#) gezeigte Membran wurde zur Kontrolle mit dem Anti-Gesamt-c-Jun-Antikörper (NEB) erneut ausgetestet.

[0180] Die Gesamtmenge an c-Jun blieb jedoch unverändert, was eine Erhöhung des c-Jun-Spiegels als eine mögliche Quelle der Modifizierung ausschließt. Antikörper, die gegen die phosphorylierte Form der JNK1/2 spezifisch waren, entdeckten keinerlei wesentliche Erhöhung der Menge dieser aktivierten Kinasen als Antwortreaktion auf die Überexpression von RAP-2, was anzeigt, dass die zusätzliche Phosphorylierung von c-Jun nicht von einer von RAP-2 unabhängigen Steigerung der Aktivität der JNKs herrührte ([Fig. 7B](#)). Die aktivierte JNK1/2 aus HEK-293T-Zellen, die entweder mit pcDNA3 oder mit pcRAP-2 transfiziert und mit hrTNFα über zunehmende Zeiträume behandelt worden waren, wurde durch Western-Blot-Analyse der Gesamt-Lysate mit Phospho-(¹⁸³Thr/¹⁸⁵Thr)-JNK-Antikörpern (NEB) wie in [Fig. 7](#) gezeigt nachgewiesen.

[0181] Zur weiteren Unterstützung dieses letzten Befundes, lieferte ein in-vitro-Kinase-Test mit immunpräzipitierter JNK1 und mit gereinigtem GST-cJun als Substrat im Wesentlichen das gleiche Ergebnis ([Fig. 7C](#)). HEK-293T-Zellen wurden mit dem leeren Vektor, mit pcRAP-2 und mit pcRIP in verschiedenen Kombinationen zusammen mit einem HA-JNK1 exprimierenden Plasmid kotransfiziert. Dann wurde die JNK1 mittels ihrer N-terminalen HA-Markierung immunpräzipitiert, und ihre Fähigkeit, mit Hilfe von Bakterien hergestelltes und gereinigtes GST-Jun zu phosphorylieren, wurde durch den Einbau von ³²P in einem in-vitro-Kinase-Testansatz bestimmt. Die Reaktionsprodukte wurden durch SDS-PAGE wie in [Fig. 7](#) gezeigt analysiert.

[0182] RAP-2 wird phosphoryliert, wenn der RAP-2-IKK1-Komplex, der aus transfizierten HEK193-Zellen immunpräzipitiert werden kann, unter phosphorylierenden Bedingungen in vitro inkubiert wird. Eine Suche nach der funktionellen Rolle der Phosphorylierung von RAP-2 offenbarte, dass die Mutation eines bestimmten Serin-Restes in diesem Protein (an Position 148) die Aktivierung der c-Jun-Phosphorylierung durch das RAP-2-Protein vollständig aufhebt. Wie in [Fig. 13](#) dargestellt, beeinflusste die Überexpression von RAP-2 (S148A) die Phosphorylierung von Jun überhaupt nicht, während die Überexpression der Wildtypform des RAP-2-Proteins zu einer massiven Steigerung der Phosphorylierung von c-Jun führte. Die Wirkung von RAP-2 auf NF-κB wurde jedoch von dieser Mutation überhaupt nicht beeinflusst. Diese Befunde deuten an, dass die Phosphorylierung des Serins 148 von RAP-2 in ihrer Wirkung spezifisch an der Phosphorylierung von Jun beteiligt ist.

Beispiel 6: RAP-2 hemmt die Bindung von c-Jun und RelA an die DNA nicht.

[0183] Im Hinblick auf die Tatsache, dass die in Beispiel 5 dargestellten Experimente das im Cytosol vorliegende, modulierende Angriffsziel des überexprimierten RAP-2 auf die NF-κB- und die AP1-Signalübertragungskaskade nicht offenbarten, untersuchten wir die Integrität der nucleären Prozesse, die für die Transkription erforderlich sind. Elektromobilitäts-Verzögerungs-Testansätze (EMSA), die mit Kernextrakten aus transfizierten HEK-293T-Zellen durchgeführt wurden, zeigten eindeutig, dass RAP-2 nicht die Bindung von c-Jun und RelA an die Oligonucleotide beeinträchtigte, die ihren klassischen Erkennungssequenzen entsprachen ([Fig. 8](#)). Tatsächlich wurde eine mehrfache Steigerung der Wirksamkeit der Bildung des DNA/AP-1-Komplexes in mit RAP-2 transfizierten Zellen beobachtet. Des Weiteren wurde keine Wechselwirkung zwischen RAP-2 und c-Jun/RelA beobachtet, die zu einer sterischen Behinderung der Aktivierungsdomänen der Letzteren (d. h. von c-Jun und RelA) hätte führen können. Wir schlagen vor, dass wenn überhaupt, die Wirkung des Eintritts von RAP-2 in den Kern, an irgendeinem Punkt weiter stromabwärts der Enhancer-Bindungsereignisse angreift.

Beispiel 7: RAP-2 tritt in vivo mit der Histon-Acetyltransferase TIP60 in Wechselwirkung.

[0184] TIP60 (GeneBank U 74667) gehört zu einer vor kurzem beschriebenen Familie von Kernproteinen, die als Histon-Acetyltransferasen (HATs) bezeichnet werden. Die enzymatische Aktivität dieser Proteine ist mit

dem Zustand der Chromatinstruktur in den Nucleosomen-Komplexen assoziiert. HATs sind häufig mit bestimmten Elementen des Transkriptionsapparates assoziiert und sind in der Lage, die Transkriptionsrate zu modulieren. HATs wirken durch die Entspannung der Chromatinpackung in der Nähe von Initiationsstellen durch die Übertragung von Acetylgruppen auf spezifische Lysin-Reste von Histonen, wodurch sie den Zugang verschiedener bestimmter Faktoren zur DNA fördern. Sie ist offensichtlich eines dieser nucleären Hilfsproteine, deren Bedeutung darin liegt, dass sie die Wechselwirkung zwischen den an einen Enhancer bindenden Faktoren und der RNA-Polymerase II erleichtern. Daher untersuchten wir, ob TIP60 mit RAP-2 einen Komplex bilden konnte. Eine Immunpräzipitation aus HeLa-Zellen und anschließende Zwei-Hybrid-Untersuchungen zeigten überzeugend, dass RAP-2 mit TIP60 in beiden Systemen stark in Wechselwirkung tritt. Dennoch waren wir nicht in der Lage, irgendeine bedeutende Veränderung der durch RAP-2 vermittelten Wirkung auf NF- κ B und auf c-Jun nach der Koexpression mit TIP60 in HEK-293T-Zellen zu beobachten (nicht gezeigt). Das gleiche Fehlen von Veränderungen wurde bei dem Kontrollexperiment beobachtet, d. h. bei der Stimulierung $\pm$ TIP60 (mit oder ohne RAP-2), was zu dem Schluss führte, dass der kurze Beobachtungszeitraum (20-30 Stunden nach der Transfektion) wahrscheinlich die Veränderung/Umwandlung der Reporter-DNA in eine Chromatinstruktur ausschließt, wodurch für HAT-ähnliche Enzyme keine ausreichende Zeit zur Wirkung übrig bleibt.

Beispiel 8: Struktur-Funktions-Beziehungen in RAP-2

A. Binderegionen

[0185] Durch die Durchführung einer fortlaufenden Deletionsanalyse wurden die Binderegionen innerhalb von RAP-2 kartiert, und es wurden RIP-, NIK- und TIP60-Bindedomänen sowie eine Selbstassoziiierungs-Domäne identifiziert (**Fig. 10**).

[0186] Die Bindestelle für RIP wurde in einer Region des RAP-2-Proteins kartiert, die zwischen den Aminosäuren 177-218 beginnt und an der Aminosäure 264 endet.

[0187] Bislang wurde weder von der IKK β - noch von der NIK-Bindestelle (Aminosäuren 95-264, beziehungsweise Aminosäuren 1-264) herausgefunden, dass sie mit der Bindestelle von RIP innerhalb von RAP-2 überlappen (**Fig. 10**).

[0188] Die Bindestelle von TIP60 kartiert offenbar innerhalb der Region, die die Aminosäuren 95-264 überspannt. Das Fehlen einer Wechselwirkung mit dem Deletionsfragment, das die Aminosäuren 95-309 überspannt, könnte am wahrscheinlichsten das Ergebnis einer spezifischen behindernden Konformation sein, die dieser bestimmten Deletion eigen ist.

[0189] Eine ähnliche Diskrepanz bei der Bindung an die Deletionsfragmente kann für die Bindung des Clons #10 und für die Selbstassoziiierung von RAP-2 beobachtet werden. Im Gegensatz zu TIP60 beinhaltet die Tatsache, dass das Volllängen-RAP-2 an das Deletionsfragment bindet, das die Aminosäuren 218-416 enthält, sowie an das Deletionsfragment bindet, das die Aminosäuren 1-264 enthält, jedoch, dass die Region, die an der Bildung des Homodimers beteiligt ist, zwischen den Aminosäuren 217-264 lokalisiert ist.

[0190] Das durch den Clon #10 codierte Protein, mit der vorstehend beschriebenen Ausnahme, bindet offenbar innerhalb einer Region, die zwischen den Aminosäuren 218-309 beginnt und an der Aminosäure 416 endet, und daher könnte seine Bindestelle überlappende Regionen mit den Bindestellen für RIP, NIK, IKK β und TIP60 umfassen (**Fig. 10**).

B. Funktionelle Regionen

[0191] Nach unserem bisherigen Kenntnisstand kartieren alle funktionellen Wirkungen von RAP-2 (nämlich die Hemmung von NF- κ B und die Hyperphosphorylierung von c-Jun) in der gleichen Region (**Fig. 10**).

[0192] Darüber hinaus ist es möglich, dass die Region, die für eine wirksame Modulierung der Signalübertragung durch alle Induktoren, die in diesen Experimenten verwendet wurden, im N-terminalen Segment des Proteins lokalisiert ist.

[0193] Die Region, welche die Aminosäuren 95-416 umfasst, hatte auch eine Wirkung, obwohl diese signifikant schwächer war, verglichen mit derjenigen, die durch das Volllängen-Protein verursacht wurde, und daher könnte die Wirkung aus einer erzwungenen Aggregation des endogenen RAP-2 herrühren.

[0194] Darüber hinaus kann, mit der Ausnahme von RelA, die Wirkung aller Induktoren, die in unseren Experimenten verwendet wurden, durch die geringe Zahl von etwa 100 N-terminalen Aminosäuren von RAP-2 vermittelt werden. Tatsächlich vermittelt sogar das Fragment, welches die Aminosäuren 1-102 umfasst, eine distinkte Wirkung, obwohl nur in mittlerer Stärke (**Fig. 11**).

[0195] Andererseits erfordert die erfolgreiche Induktion von RelA einen viel längeren Teil des RAP-2-Proteins. Bislang konnten wir die Grenzen dieser Region zwischen den Aminosäuren 1 bis 264 definieren, was offenbar die Region zwischen den Aminosäuren 157 und 264 mit einigen spezifischen, mit RelA assoziierten Bindungseigenschaften ausstattet.

C. Bindungs-Funktions-Beziehungen

[0196] Nach den in den **Fig. 10** und **11** gezeigten Ergebnissen scheint es so zu sein, dass:

- a) Mit der Ausnahme von RelA, die Bindung von RAP-2 an RIP und sehr wahrscheinlich auch an NIK und TIP60 nicht für die Funktion des Proteins als Inhibitor des durch Überexpression induzierten NF- κ B erforderlich ist.
- b) Die Wirkung von RAP-2 auf die durch eine Überexpression von RelA induzierte Aktivierung wird offensichtlich zumindest teilweise durch unterschiedliche Bindungsereignisse vermittelt. Es wurde herausgefunden, dass alle der vorstehend erwähnten Proteine zu der bestimmten Aktivität mit beitragen, wie aus den bis heute durchgeführten Experimenten geschlossen werden kann.

[0197] Die genaue Stelle der Wechselwirkung zwischen RAP-2 und RIP muss noch bestimmt werden, aber es scheint so zu sein, dass es sich bei dieser Stelle um eine handelt, die für RIP und RAP-2 spezifisch ist, und die anderen Proteinen nicht gemein ist, von denen bekannt ist, dass sie mit RIP in Wechselwirkung treten, wie z. B. MORT-1, TRADD, dem FAS-R und möglicherweise auch TRAF2 (vergleiche mit Malinin et al., 1997). Es ergibt sich auch (aus der Sequenzanalyse und dem Vergleich mit den Sequenzen in den verschiedenen Datenbanken, wie vorstehend angemerkt), dass RAP-2 keine „Todesdomänen“, kein MORT-MODUL, keine Protease-Domäne (z. B. ICE/CED3-Motiv), keine Kinase-Domäne/Motiv noch TRAF-Domänen besitzt. Im Einklang damit, offenbarte die Analyse der biologischen Aktivität, dass RAP-2 offenbar die folgenden Eigenschaften aufweist:

- (i) wenn es überexprimiert wird, hemmt RAP-2 die Aktivierung von NF- κ B, die durch den TNF oder durch die Überexpression von TRADD, RIP, TRAF-2, NIK oder der p65-NF- κ B-Untereinheit verursacht wird, stark;
- (ii) RAP-2 potenziert/ermöglicht die Hyperphosphorylierung von c-Jun, ohne dass es die Aktivität der JNK verändert;
- (iii) RAP-2 benötigt für die Bindung an RIP, wie durch Deletionsanalyse gezeigt wurde, weder die Todesdomänen von RIP noch die Kinaseaktivität von RIP;
- (iv) aufgrund der vorstehenden Deletionsanalyse wurde die Binderegion von RAP-2 an RIP auf eine N-terminale Region von etwa 200 Aminosäuren eingegrenzt;
- (v) RAP-2 bindet an NIK in transfizierten Säugerzellen, aber nicht in der Hefe.

[0198] Aus Sicht des Vorstehenden scheint RAP-2 daher ein hoch spezifisches RIP-Bindeprotein darzustellen und somit einen Modulator oder Vermittler von RIP, der wahrscheinlich an den durch RIP vermittelten intrazellulären Signalübertragungswegen beteiligt ist.

[0199] Aus Sicht des Vorstehenden scheint es so zu sein, dass RAP-2 an der Modulierung oder der Vermittlung der Aktivitäten von RIP beteiligt ist. Intrazellulär handelt es sich bei diesen um die Beteiligung von RIP an dem Zellüberlebens-Signalweg (Aktivierung von NF- κ B, möglicherweise über eine Wechselwirkung mit TRAF2) und seine Beteiligung an dem Entzündungs- und dem Zelltod-Signalweg (unabhängig über seine „Todesdomänen“ oder über eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen, wie z. B. mit MORT-1, TRADD, dem p55-R, dem FAS-R und assoziierten Proteasen, wie z. B. MACH, Mch4, G1 und ähnlichen). Die möglichen Wege, auf denen RAP-2 die Aktivität von RIP moduliert oder vermittelt, wurden hierin vorstehend in Einzelheiten beschrieben. Zum Beispiel kann die RAP-2-RIP-Wechselwirkung zur Steigerung entweder des Zelltod- oder des Zellüberlebensweges führen, oder sie kann zur Hemmung entweder des Zelltod- oder des Zellüberlebensweges führen, wobei diese Steigerung oder Hemmung möglicherweise von den relativen Aktivitäten der anderen Mitglieder dieser beiden entgegengesetzten intrazellulären Signalwege abhängig ist. RAP-2 könnte auch als ein Andockprotein fungieren, um eine Aggregation einer Reihe von RIP-Molekülen und anderen an RIP- oder an RAP-2 bindenden Proteinen zu ermöglichen, wobei das Aggregat dann entweder in Richtung des Zelltodes oder des Zellüberlebens (oder sogar in beiden Richtungen) fungiert, und zwar in Abhängigkeit von den relativen Aktivitäten oder Mengen der anderen Mitglieder dieser Signalwege in der Zelle.

Beispiel 9: Die Herstellung polyclonaler Antikörper gegen RAP-2.

[0200] Den Kaninchen wurden zu Beginn subcutan 5 µg eines reinen Präparats von RAP-2 injiziert, das in komplettem Freundschem Adjuvanz emulgiert war. Drei Wochen später wurden ihnen erneut subcutan 5 µg des reinen Präparats von RAP-2 in inkomplettem Freundschem Adjuvanz injiziert. Dann wurden zwei weitere Injektionen von RAP-2 als Lösung in PBS in 10-tägigen Intervallen verabreicht. Die Kaninchen wurden 10 Tage nach der letzten Immunisierung entblutet. Die Entwicklung des Antikörperspiegels wurde durch einen Radioimmuntest verfolgt. Mit ¹²⁵I markiertes RAP-2 wurde mit verschiedenen Verdünnungen (1:50, 1:500, 1:5.000 und 1:50.000) des Kaninchenserums gemischt. Dann wurde eine Suspension von Protein G-Agarose-Kügelchen (20 µl, Pharmacia) zugegeben, das Gesamtvolumen betrug 200 µl. Das Gemisch wurde 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann wurden die Kügelchen 3-mal gewaschen und die gebundene Menge radioaktiven Materials gezählt. Ein Kaninchen-Antiserum gegen menschliches Leptin wurde als negative Kontrolle verwendet. Der Titer des RAP-2-Antiserums wurde im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle gemessen.

Beispiel 10: Die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen RAP-2.

[0201] Weibliche Balb/C-Mäuse (3 Monate alt) wurden zu Beginn 2 µg gereinigtes RAP-2 in einer Emulsion mit komplettem Freundschem Adjuvanz und drei Wochen später mit inkomplettem Freundschem Adjuvanz subcutan injiziert. Dann wurden drei weitere Injektionen in 10-tägigen Intervallen subcutan in PBS verabreicht. Die abschließenden Booster-Injektionen wurden 4 und 3 Tage vor der Fusion der Zellen der Maus intraperitoneal verabreicht, die den höchsten Bindungs-Titer aufwies, wie durch IRIA (vergleiche mit dem Nachstehenden) bestimmt wurde. Die Fusion wurde unter Verwendung der NSO/1-Myelom-Zelllinie und Lymphocyten, die sowohl aus der Milz als auch aus den Lymphknoten des Tieres präpariert wurden, als Fusionspartnern durchgeführt. Die fusionierten Zellen wurden in Mikrokulturplatten verteilt, und die Hybridome wurden in DMEM selektiert, das mit HAT und mit 15 % Pferdeserum ergänzt worden war. Hybridome, von denen herausgefunden wurde, dass sie Antikörper gegen RAP-2 herstellen, wurden durch ein begrenztes Verdünnungsverfahren subcloniert und Balb/C-Mäusen injiziert, die mit Pristan für die Bildung von Asciten vorbehandelt worden waren. Die Isotypen der Antikörper wurden unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Amersham, UK) definiert.

[0202] Die Durchmusterung der Hybridome, die monoklonale Anti-RAP-2-Antikörper herstellten, wurde wie folgt durchgeführt: die Überstände der Hybridome wurden auf die Anwesenheit von Anti-RAP-2-Antikörpern durch einen inversen Festphasen-Radioimmun-Testansatz (IRIA) untersucht. ELISA-Platten (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) wurden mit durch Talon gereinigtem IL-18BP_a-His₆ (10 µg/ml, 100 µl/Vertiefung) beschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten zweimal mit PBS, das BSA (0,5 %) und Tween 20 (0,05 %) enthielt, gewaschen, und in der Waschlösung mindestens 2 Stunden bei 37 °C blockiert. Dann wurden die Hybridom-Kulturüberstände (100 µl/Vertiefung) zugegeben, und die Platten wurden 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden 3-mal gewaschen, und es wurde ein Konjugat aus Anti-Maus-Ziegen-(Antikörpern) und Meerrettich-Peroxidase (HRP, Jackson Labs, 1:10.000, 100 µl/Vertiefung) für 2 Stunden bei Zimmertemperatur zugegeben. Die Platten wurden 4-mal gewaschen, und die Farbe wurde durch ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure, Sigma) mit H₂O₂ als Substrat entwickelt. Die Platten wurden mit einem automatischen ELISA-Lesegerät ausgewertet. Proben, die eine OD ergaben, die mindestens 5-mal höher als der Wert der Negativ-Kontrolle lag, wurden als positiv angesehen.

[0203] Die RAP-2-Antikörper können für die Reinigung von RAP-2 durch Affinitäts-Chromatographie verwendet werden.

Beispiel 11: ELISA-Test

[0204] Mikrotiterplatten (Dynatech oder Maxisorb, von Nunc) wurden mit dem monoklonalen Anti-RAP-2-Antikörper (serumfreier Hybridom-Überstand oder Immunglobuline aus der Ascites-Flüssigkeit) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden mit PBS gewaschen, das BSA (0,5 %) und Tween 20 (0,05 %) enthielt, und in der gleichen Lösung mindestens 2 Stunden bei 37 °C blockiert. Die zu untersuchenden Proben wurden in der Blockierungslösung verdünnt und dann den Vertiefungen (100 µl/Vertiefung) 4 Stunden bei 37 °C zugegeben. Dann wurden die Platten 3-mal mit PBS, das Tween 20 (0,05%) enthielt, gewaschen, darauf hin erfolgte die Zugabe des Kaninchen-Anti-RAP-2-Serums (1:1.000, 100 µl/Vertiefung) und eine weitere Inkubation über Nacht bei 4 °C. Die Platten wurden 3-mal gewaschen, und es wurde ein Konjugat aus Anti-Kaninchen-Ziegen-Antikörpern und Meerrettich-Peroxidase (HRP, Jackson Labs, 1:10.000, 100 µl/Vertiefung) für 2 Stunden bei Zimmertemperatur zugegeben. Die Platten wurden 4-mal gewaschen, und die Farbe wurde durch ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure, Sigma) mit H₂O₂ als Substrat entwickelt. Die Platten wur-

den mit einem automatischen ELISA-Lesegerät gelesen.

[0205] Alle Referenzen, die hierin zitiert wurden, einschließlich der Artikel von Zeitschriften oder Zusammenfassungen, veröffentlichte oder entsprechende U.S.- oder ausländische Patentanmeldungen, bewilligte U.S.- oder ausländische Patente oder irgendwelche anderen Referenzen, sind hierin vollständig durch Bezugnahme mit eingeschlossen, einschließlich aller Daten, Tabellen, Figuren und dem Text, die in den zitierten Referenzen vorgelegt werden. Des Weiteren sind die vollständigen Inhalte der Referenzen, die innerhalb der Referenzen zitiert werden, und die hierin zitiert wurden, ebenfalls durch Bezugnahme mit eingeschlossen.

[0206] Ein Bezug auf methodische Schritte, übliche methodische Schritte, bekannte Verfahren oder herkömmliche Verfahren stellt keinesfalls ein Eingeständnis dar, dass irgendein Aspekt, eine Beschreibung oder eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung im relevanten Fachgebiet offenbart, gelehrt oder angedeutet ist.

[0207] Die vorstehende Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen wird daher die allgemeine Natur der Erfindung offenbaren, so dass Andere durch Anwendung der Kenntnisse, die innerhalb des Fachgebiets liegen (einschließlich der Inhalte der hierin zitierten Referenzen), leicht verschiedene Anwendungen solcher spezifischen Ausführungsformen ohne übermäßige Experimente modifizieren und/oder anpassen können, ohne dabei von dem allgemeinen Konzept der vorliegenden Erfindung abzuweichen. Daher wird von solchen Anpassungen und Modifizierungen beabsichtigt, dass sie innerhalb der Bedeutung und des Rahmes von Äquivalenten der offenbarten Ausführungsformen liegen, die auf den Lehren und der Leitung, die hierin vorgestellt wurden, basieren. Es sollte so verstanden werden, dass die Ausdrucksweise oder die Terminologie hierin zum Zwecke der Beschreibung und nicht zur Einschränkung erfolgte, so dass die Terminologie oder die Ausdrucksweise der vorliegenden Spezifizierung durch Fachleute im Sinne der Lehren und der Anleitung, die hierin vorgestellt wurden, in Kombination mit den Kenntnissen der Fachleute interpretiert werden sollte.

Literaturreferenzen

- Alnemri, E.S. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:4312-4317.
 Barinaga, M. (1993) Science 262:1512-1514.
 Beg, A.A. und Baltimore, D. Science 274:782-784.
 Beidler, J. et al., (1995) J. Biol. Chem. 270:16526-16528.
 Berger, J. et al., (1988) Gene 66:1-10.
 Beutler, B. und Cerami, C. (1987) NEJM: 316:379-385.
 Bigda, J. et al. (1994) J. Exp. Med. 180:445-460.
 Boldin, M.P. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:337-341.
 Boldin, M.P. et al. (1995b) J. Biol. Chem. 270:7795-7798.
 Boldin, M.P. et al. (1996) Cell 85:803-815.
 Brakebusch, C. et al. (1992) EMBO J., 11:943-950.
 Brockhaus, M. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3127-3131.
 Cantor, G.H. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10932-6.
 Cerreti, D.P. et al. (1992) Science 256:97-100.
 Chen, C.J. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:271-3.
 Chinnaiyan et al. (1995) Cell 81:505-512.
 Chinnaiyan et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:4961-4965.
 Cifone, M.G. et al. (1995) EMBO J. 14:5859-5868.
 Clement, M.V. et al. (1994) J. Exp. Med. 180:557-567.
 Crisell, P. et al., (1993) Nucleic Acids Res. (England) 21 (22):5251-5.
 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Strahl, K., Albright, L.M., Coen, D.M. & Varki, A., Hrsg.), (1994) s. 8.1.1-8.1.6 und 16.7-16.7.8, Greene Publishing Associates, Inc. und Wiley & Sons, Inc., New York.
 Dirks, W., et al., (1993) Gene 128:247-249.
 Durfee, T. et al. (1993) Genes Dev. 7:555-569.
 Eischen, C.M. et al. (1994) J. Immunol. 153:1947-1954.
 Ellis, H.M. et al. (1986) Cell 44:817-829.
 Enari, M. et al. (1995) Nature 375:78-81.
 Engelmann, H. et al. (1990) J. Biol. Chem., 265:1531-1536.
 Faucheu, C. et al. (1995) EMBO J. 14:1914-1922.
 Fernandes-Alnemri, T. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:30761-30764.
 Fernandes-Alnemri, T. et al. (1995) Cancer Res. 55:2737-2742.

- Fernandes-Alnemri, T. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7464-7469.
- Field, J. et al. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:2159-2165.
- Fields, S. und Song, O. (1989) *Nature*, 340:245-246.
- Frangioni, J.V. und Neel, B.G. (1993) *Anal. Biochem.* 210:179-187.
- Geysen, H.M. (1985) *Immunol. Today* 6:364-369.
- Geysen, H.M. et al. (1987) *J. Immunol. Meth.* 102:259-274.
- Gossen, M. und Boujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551.
- Grell, M. et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2563-2566.
- Heller, R.A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6151-6155.
- Henkart, P.A. (1996) *Immunity* 4:195-201.
- Hohmann, H.-P. et al. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934.
- Howard, A.D. et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2964-2969.
- Hsu, H. et al. (1995) *Cell* 81:495-504.
- Hsu, H. et al. (1996) *Cell* 84:299-308.
- Itoh, N. et al. (1991) *Cell* 66:233.
- Itoh, N. und Nagata, S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:10932-7.
- Joseph, S. und Burke, J.M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:24515-8.
- Kamens, J. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15250-15256.
- Kaufmann, S.H. (1989) *Cancer Res.* 49:5870-5818.
- Kaufmann, S.H. (1993) *Cancer Res.* 53:3976-3985.
- Kischkel, F.C. et al. (1995) *EMBO J.* 14:5579-5588.
- Koizumi, M. et al. (1993) *Biol. Pharm. Bull (Japan)* 16 (9):879-83.
- Kumar, S. et al. (1994) *Genes Dev.* 8:1613-1626.
- Kumar, S. (1995) *Trends Biochem Sci.* 20:198-202.
- Lazebnik, Y.A. et al. (1994) *Nature* 371:346-347.
- Leithauser, F. et al. (1993) *Lab Invest.* 69:415-429.
- Li, Y. et al. (1998) *Mol Cell Biol* 18:1601-1610
- Loetscher, H. et al. (1990) *Cell*, 61:351-359.
- Los, M. et al. (1995) *Nature* 375:81-83.
- Madden, S.L. et al. (1996) *Cancer Res* 56:5384-5390.
- Malinin, N.L. et al. (1997) *Nature* 385:540-544.
- Martin, S.J. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:6425-6428.
- Mashima, T. et al. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:907-915.
- Miller, B.E. et al. (1995) *J. Immunol.* 154:1331-1338.
- Milligan, C.E. et al. (1995) *Neuron* 15:385-393.
- Miura, M. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8318-8322.
- Munday, N.A. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:15870-15876.
- Muranishi, S. et al. (1991) *Pharm. Research* 8:649.
- Musti AM. et al. (1997) *Science* 197 275:400-402
- Nagata, S. und Golstein, P. (1995) *Science* 267, 1449-1456.
- Natoli, G. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 26079-26082
- Nicholson, D.W. et al. (1995) *Nature* 376:37-43.
- Nophar, Y. et al. (1990) *EMBO J.*, 9:3269-3278.
- Piquet, P.F. et al. (1987) *J. Exp. Med.*, 166:1280-89.
- Ray et al. (1992) *Cell* 69:597-604.
- Ruggiero, V. et al. (1987) *Cell Immunol.* 107:317-325.
- Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schall, T.J. et al. (1990) *Cell*, 61:361-370.
- Schlegel, et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:1841-1844.
- Schulze-Osthoff, K. et al. (1994) *EMBO J.* 13:4587-4596.
- Shimayama, T. et al., (1993) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 29:177-8
- Shore, S.K. et al. (1993) *Oncogene* 8:3183-8.
- Sleath, P.R. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:14526-14528.
- Smith, C.A. et al. (1990) *Science*, 248:1019-1023.
- Song, H.Y. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22492-22495.
- Srinivasula, S.M. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14486-14491.
- Stanger, B.Z. et al. (1995) *Cell* 81:513-523.
- Tartaglia, L. A. et al. (1993) *Cell*, 74:845-853.
- Tewari, M. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:3255-3260.

- Tewari, M. et al. (1995a) J. Biol. Chem. 270:18738-18741.
Tewari, M. et al. (1995b) Cell 81:1-20.
Thornberry, N.A. et al. (1992) Nature 356:768-774.
Thornberry, N.A. et al. (1994) Biochemistry 33:3934-3940.
Tracey, J.T. et al. (1987) Nature, 330:662-664.
Van Antwerp, D.J. et al. (1996) Science 274:787-789.
Vandenabeele, P. et al. (1995) Trends Cell Biol. 5:392-400.
Vassalli, P. (1992) Ann. Rev. Immunol. 10:411-452.
Wallach, D. (1984) J. Immunol. 132:2464-9.
Wallach, D. (1986) In: Interferon 7 (Ion Gresser, Hrsg.), S. 83-122, Academic Press, London.
Wallach, D. et al. (1994) Cytokine 6:556.
Wang, L. et al. (1994) Cell 78:739-750.
Wang, C.-Y et al., (1996) Science 274:784-787.
Watanabe-Fukunaga, R. et al. (1992) Nature, 356:314-317.
Watanabe, F.R. et al. (1992) J. Immunol. 148:1274-1279.
Weitzen, M. et al. (1980) J. Immunol. 125:719-724.
Wilks, A.F. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 1603-1607.
Wong et al. (1994) J. Immunol. 152:1751-1755.
Xue, D. et al. (1995) Nature 377:248-251.
Yamaoka S, et al. (1998) Cell 93:1231-1240.
Yonehara, S. et al. (1989) J. Exp. Med. 169:1747-1756.
Yuan, J. et al. (1993) Cell 75:641-652.
Zaccharia, S. et al. (1991) Eur. J. Pharmacol. 203:353-357.
Zhao, J.J. und Pick, L. (1993) Nature (England) 365:448-51.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> WALLACH, David
 KOVALENKO, Andrei
 Yeda Research and Development Co. Ltd.

<120> Modulatoren der Funktion von Rezeptoren der TNF/NGF-Rezeptorenfamilie

<130> TNF/NGF-Rezeptoren

<140>

<141>

<150> 123758

<151> 19.03.1998

<150> 126024

<151> 01.09.1998

<160> 3

<170> PatentIn, Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2009

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gaagattcca ttgtgggcct gsgaggccta gcaagggcgg accgcgaaac tgggactttt 60
tteggagcgc cggggcccta ccagcgttca cagtccgccg ctcccaccct tctcacgtct 120
gacggactct gctgacagcc cttgccctgt tggatgaata ggcacctctg gaagagccaa 180
ctgtgtgaga tgggtgcagcc cagtgggtggc ccggcagcag atcaggacgt actgggcgaa 240
gagtctcctc tggggaagcc agccatgctg cacctgcctt cagaacaggg cgctcctgag 300
accctccagc gctgcctgga ggagaatcaa gagctccgag atgccatccg gcagagcaac 360
cagattctgc gggagcgtg cgaggagctt ctgcatttcc aagccagcca gagggaggag 420
aaggagtcc tcatgtgcaa gttccaggag gccaggaaac tgggtggagag actcggcctg 480
gagaagctcg atctgaagag gcagaaggag caggctctgc gggagggtga gcacctgaag 540
agatgccagc agcagatggc tgaggacaag gcctctgtga aagcccaggt gacgtccttg 600
ctcgggggagc tgcaggagag ccagagtcgc ttggagggtg cactaagga atgccaggct 660
ctggagggtc gggcccgggc ggccagcgag caggcgcggc agctggagag tgagcgcgag 720
gcgctgcagc agcagcacag cgtgcagggt gaccagctgc gcatgcaggg ccagagcgtg 780
gaggccgcgc tccgcatgga gcgccaggcc gcctcggagg agaagaggaa gctggcccag 840
ttgcagggtg cctatcacca gctcttccaa gaatacgaca accacatcaa gagcagcgtg 900
gtgggcagtg agcggaaagc aggaatgcag ctggaagatc tcaaacagca gctccagcag 960
gccgaggagg ccctggtggc caaacaggag gtgatcgata agctgaagga ggaggccgag 1020
cagcacaaga ttgtgatgga gaccgttccg gtgctgaagg cccaggcgga tatctacaag 1080

```

```

gcggacttcc aggctgagag gcaggcccgg gagaagctgg ccgagaagaa ggagctcctg 1140
caggagcagc tggagcagct gcagagggag tacagcaaac tgaaggccag ctgtcaggag 1200
tcggccagga tcgaggacat gaggaagcgg catgtcgagg tctcccaggc ccccttgccc 1260
cccgccctg cctacctctc ctctcccctg gccctgcccga gccagaggag gagccccccc 1320
gaggagccac ctgacttctg ctgtcccaag tgccagtatc aggcccctga tatggacacc 1380
ctgcagatac atgtcatgga gtgcattgag tagggccggc cagtgcagg ccactgcctg 1440
ccgaggacgt gcccgggacc gtgcagtctg cgctttcctc tcccgcctgc ctagcccagg 1500
atgaagggtt ggggtggccac aactgggatg ccacctggag cccaccccag gagctggccg 1560
cggcacctta cgcttcagct gttgattccg ctggtcccct cttttggggg agatgcggcc 1620
ccgatcaggc ctgactcgct gctctttttg ttccttctg tctgctcgaa ccacttgctt 1680
cggtctaata cctccctctt cctccaccgg gcaactggga agtcaagaat ggggcctggg 1740
gctctcaggg agaactgctt cccctggcag agctgggtgg cagctcttcc tcccaccgga 1800
caccgaccgg cccgctgctg tgcccgggga gtgctgcctt cttaccatgc acacgggtgc 1860
tctccttttg ggctgcatgc tattccattt tgcagccaga ccgatgtgta ttaaccagt 1920
cactattgat ggacatttgg gttgtttccc atctttttgt taccatmaat artggcmtag 1980
akaaaaatcc ttgtgcatta aaaaaaaaaa 2009

```

<210> 2

<211> 2034

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

ttctactcct cctcctcct cactgcgggg tctgacccta ctcttctgtt gaggactcct 60
ctagttcaga gacatatctt gttcaccaaa cttgactgcg ctctatcgag gtcgttaaatt 120
tcttcggaaa tgccctcacat atagtctggc agctagccct tgccctgttg gatgaatagg 180
cacctctgga agagccaact gtgtgagatg gtgcagccca gtggtggccc ggcagcagat 240
caggacgtac tgggcgaaga gtctcctctg gggagccag ccatgctgca cctgccttca 300
gaacagggcg ctcttgagac cctccagcgc tgccctggag gagaatcaag agctccgaga 360
tgccatccgg cagtagcaac cagattcttg cgggagctgc cgaagggagc tttctgcatt 420
ttccaagcca gccagaggga ggagaaggag ttctcatgt gcaagttcca ggaggccagg 480
aaactggttg agagactcgg cctggagaag ctcgatctga agaggcagaa ggagcaggct 540
ctgccccagg tggagcacct gaagagatgc cagcagcaga tggctgagga caaggcctct 600
gtgaaagccc aggtgacgtc cttgctcggg gagctgcagg agagccagag tcgcttgagg 660
gctgccacta aggaatgcca ggctctggag ggtcggggcc gggcgggccag cgagcaggcg 720
cggcagctgg agagtgagcg cgaggcgctg cagcagcagc acagcgtgca ggtggaccag 780
ctgcgcatgc agggccagag cgtggaggcc gcgctccgca tggagcgcca ggccgcctcg 840
gaggagaaga ggaagctggc ccagttgcag gtggcctatc accagctctt ccaagaatac 900
gacaaccaca tcaagagcag cgtggtgggc agtgagcggg agcgagggaat gcagctggaa 960
gatctcaaac agcagctcca gcaggccgag gaggccctgg tggccaaaca ggaggtgatc 1020
gataagctga aggaggaggc cgagcagcac aagattgtga tggagaccgt tccggtgctg 1080
aaggcccagg cgatatctta caaggcggac ttccaggctg agaggcaggc ccgggagaag 1140
ctggccgaga agaaggagct cctgcaggag cagctggagc agctgcagag ggagtacagc 1200
aaactgaagg ccagctgtca ggagtggcc aggatcgagg acatgaggaa gcggcatgtc 1260
gaggtctccc aggcccccctt gcccccgcc cctgectacc tctcctctcc cctggccctg 1320
cccagccaga ggaggagccc ccccaggag ccacctgact tctgctgtcc caagtgccag 1380
tatcaggccc ctgatatgga caccctgcag atacatgtca tggagtgcag tgagtgggc 1440
cccagctgc aaggccactg cctgccagg acgtgcccgg gaccgtgcag tctgcgctt 1500

```

```

cctctcccg c ctgcctagcc caggatgaag ggctgggtgg ccacaactgg gatgccacct 1560
ggagccccac ccaggagctg gccgcggcac cttacgcttc agctgttgat tccgctggtc 1620
ccctcttttg gggtagatgc ggccccgac aggcctgaact cgtgtctctt tttgttcctt 1680
tctgtctgct cgaaccactt gcctcgggct aatccctccc tcttctcca cccggcactg 1740
gggaagtcaa gaatggggcc tggggctctc agggagaact gcttcccctg gcagagctgg 1800
gtggcagctc ttctccccc cggacaccga cccgcccgt gctgtgccct gggagtgtg 1860
ccctcttacc atgcacacgg gtgctctcct tttgggtgc atgtattcc attttgcagc 1920
cagaccgatg tgtatttaac cagtcactat tgatggacat ttgggtgtgt tcccatcttt 1980
ttgttaccat maatartggc mtagakaaaa atccttgtgc attaaaaaaa aaaa 2034

```

<210> 3

<211> 2116

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

gccacgaagg cccagacttt gaccgttctt caccaccact ccagcctcct cctgtgaact 60
cactgaccac cgagaacaga ttccactctt taccattcag tctaccaag atgcccata 120
ccaatggaag tattggccac agtccacttt ctctgtcagc ccagtctgta atggaagagc 180
taaacactgc acccgctcaa gagagtccac ccttggccat gcctcctggg aactcacatg 240
gtctagaagt gggctcattg gctgaagtta aggagaacc tcttttctat ggggtaatcc 300
gttggaatcg tcagccacca ggactgaatg aagtgtctgc tggactggaa ctggaagatg 360
agtgtgcagg ctgtacggat ggaaccttca gaggcactcg gtatttcacc tgtgccctga 420
agaaggcgct gtttgtgaaa ctgaagagct gcaggcctga ctctagggtt gcatcattgc 480
agccggtttc caatcaagat tgagcgctgt aactctttag catttgagg ctacttaagt 540
gaagtagtga agaaaatact ccacaaaaa tggaaaaaga argcttgag ataatgattg 600
gggaaagaag aaaggcatcc aagggtcatt acaattcttg ktacttagac tcaaccttat 660
tctkgcttat ttkgctttta gttctgttct nggacactgg tgttacttta gaccccaaag 720
aaaaagaaac gatgttagaa tattwtkwg mmacccaaga gctactgagg acagaaattg 780
ttaatcctct gagaatatat ggatatgtgt gtgccacaaa aattatgaaa ctgaggaaaa 840
tacttgaaaa ggtggagggt gcatcaggat ttacctctga agaaaaagat cctgagggaat 900
tcttgaatat tctgtttcat catattttta gggtagaacc tttgctaaaa ataagatcag 960
caggtcaaaa ggtacaagat tgttacttct atcaaatttt tatggaaaaa aatgagaaag 1020
ttggcgttcc cacaattcag cagttgttag aatgggtctt tatcaacagt aacctgaaat 1080
ttgcagaggc accatcatgt ctgattatc agatgcctcg atttgaaaa gactttaaac 1140
tatttaaaaa attttctct ctctggaatt agatataaca gatttacttg aagacacccc 1200
agacagtgcc ggatatgtgg agggcttgca atgtatgagt gtaagaatgc tacgacgatc 1260
cggacaccag ctggaaaaac aagcagtttt gtaaaacctg caacactcaa gtccaccttc 1320
atccgaagag gctgaatcat aaatataacc cagtgtcact tcccaaagac ttacctcgac 1380
tgggagattg gagacacggc tgcattcctt gccagaatat ggagtatttt gctgttctct 1440
gcatagaaac aagccactat gttgcttttg tgaagtatgg gaaggacgat tctgcctggc 1500
tcttcttttg acagcatggc cgatccggga tgggtgtcag aatgggtcaa cattccccca 1560
agtcmtccmt gscacagaag taggagagta cttggaagat gtctcctgga agacctgsa 1620
wtcccttgga ctcccaggag aatcccaagg ctgtgcacga agactgcttt gtgatgccat 1680
atatgtgcca tgtaccaga gtccaacaat gagtttgtac aaataactgg gggtcacatg 1740
gaaaggcaaa gaaactggaa ggcagagtcc ctaacgttgc atcttattcg gagctggcag 1800
ttctgttcac ggtccattgc cggcaatgga tgtctttgtg gtgatgatcc ttcagaaaag 1860
gatgcctctg tttaaaaaca aattgctttt gtgtccctga agtatttaat aagaagcatt 1920

ttgcactcta gaaagtatgt ttgtgttggt tttttaagaa gtctaaatga agttattaat 1980
acctgaagct ttaagttaag tgcattgatc atatgatatt tttggaagca tacaatttta 2040
attgtggaag tttaaagcct ctttttagtcc attgagaatg taaataaatg tgtcttcttt 2100
atggaaaaaa aaaaaa 2116

```

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die ein RIP-assoziiertes Protein (RAP-2), Isoformen, Analoge oder Fragmente davon codiert, das/die in der Lage ist/sind, an das RIP zu binden und die intrazelluläre Aktivität des RIP zu modulieren oder zu vermitteln, wobei die DNA-Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
 - (a) einer DNA-Sequenz, die ein wie in **Fig. 3** dargestelltes RAP-2-Protein codiert;
 - (b) einer DNA-Sequenz, wie in SEQ ID NO: 1 oder 2 dargestellt;
 - (c) einer DNA-Sequenz, die in der Lage ist mit einer Sequenz von (a) oder (b) unter stringenten Bedingungen zu hybridisieren und die ein biologisch aktives RAP-2-Protein codiert;
 - (d) einer DNA-Sequenz, die aufgrund des genetischen Codes zu der in (a) oder (b) definierten DNA-Sequenz degeneriert ist und die ein biologisch aktives RAP-2-Protein codiert;
 - (e) einer DNA-Sequenz nach (b), die ein RAP-2-Protein, eine Isoform, ein Analog oder Fragment codiert, das/die mindestens einen Teil der in **Fig. 3** dargestellten Sequenz hat.
2. Replizierbares Expressionsvehikel, das eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 umfasst, gegebenenfalls funktionell verknüpft mit Kontrollsequenzen, Promotoren oder anderen DNA-Sequenzen, die eine Expression mit der korrekten Orientierung erlauben.
3. Replizierbares Expressionsvehikel nach Anspruch 2, das in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszelle exprimiert werden kann.
4. Transformierte eukaryontische oder prokaryontische Wirtszellen, die ein replizierbares Expressionsvehikel nach Anspruch 2 oder 3 enthalten.
5. RAP-2-Protein, Isoform, Fragment, funktionelle Analoge oder Derivate davon, das/die von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird/werden.
6. Verfahren zur Herstellung des RAP-2-Proteins, einer Isoform, eines Fragments, von Analogen oder Derivaten davon nach Anspruch 5, umfassend das Züchten der transformierten Wirtszellen nach Anspruch 4 unter Bedingungen, die für die Expression des Proteins, der Analoge, der Isoformen, der Fragmente oder Derivate geeignet sind, und das Bewirken post-translationaler Modifikationen, wie für das Erhalten des Proteins, der Fragmente, der Analoge oder Derivate benötigt, und Isolieren der exprimierten Proteinfragmente, Analoge oder Derivate.
7. Antikörper oder aktive Fragmente oder Derivate davon, die mit dem biologisch aktiven RAP-2-Proteinteil eines RAP-2-Proteins, einer Isoform, eines Fragments, eines Analogs, Derivats nach Anspruch 5, oder nach dem Verfahren von Anspruch 6 hergestellt, spezifisch reagieren.
8. Arzneimittel, umfassend mindestens ein RAP-2-Protein nach Anspruch 5 oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6, seine biologisch aktiven Fragmente, Analoge, Derivate nach Anspruch 5 oder Gemische davon, ein replizierbares Expressionsvehikel nach Anspruch 2 oder 3, eine Oligonucleotidsequenz, die eine Antisense-Sequenz der RAP-2-Protein-DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert oder die Antikörper nach Anspruch 7, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
9. Verwendung von mindestens einem RAP-2-Protein nach Anspruch 5 oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6, seiner biologisch aktiven Fragmente, Analoge, Derivate nach Anspruch 5 oder Gemische davon, eines replizierbaren Expressionsvehikels nach Anspruch 2 oder 3, einer Oligonucleotidsequenz, die eine Antisense-Sequenz der RAP-2-Protein-DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert oder der Antikörper nach Anspruch 7, für die Herstellung eines Arzneimittels zum Modulieren von Entzündungen, Zelltod und/oder Überleben von Zellen.
10. Verwendung von Antikörpern oder aktiven Fragmenten oder Derivaten davon nach Anspruch 7 für die Herstellung eines Arzneimittels zum Modulieren von Entzündungen, Zelltod und/oder Überleben von Zellen, wobei das Mittel, wenn das RAP-2-Protein oder Teile davon der Zellen auf der extrazellulären Oberfläche exponiert sind, für die extrazelluläre Anwendung formuliert wird, und, wenn die RAP-2-Proteine intrazellulär sind, das Mittel für die intrazelluläre Anwendung formuliert wird.
11. Verwendung eines rekombinanten Tiervirusvektors, der eine Sequenz trägt, die ein Virusoberflächenprotein codiert, das in der Lage ist, an einen spezifischen Tumorzelloberflächenrezeptor oder einen Oberflächenrezeptor einer HIV-infizierten Zelle zu binden, und wobei die Sequenz ein Protein codiert, das aus dem

RAP-2-Protein, der Isoform, dem Analog, dem Fragment und Derivat nach Anspruch 5 oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6 ausgewählt ist, so dass sie, wenn sie in dem Tumor oder in der HIV-infizierten Zelle exprimiert wird, in der Lage ist, das RIP-modulierte/vermittelte direkte oder indirekte Abtöten der Zelle zu verstärken, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumorzellen oder HIV-infizierten Zellen, wobei der Tumor oder die HIV-infizierten Zellen mit dem Vektor zu infizieren sind.

12. Verwendung eines Vektors, der eine Ribozymsequenz codiert, die in der Lage ist, mit einer zellulären mRNA-Sequenz wechselzuwirken, die ein RAP-2-Protein nach Anspruch 5, oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6, codiert, für die Herstellung eines Arzneimittels zum Modulieren von Entzündungen, Zelltod und/oder Überleben von Zellen, wobei der Vektor in einer Form vorliegt, die die Expression der Ribozymsequenz in den Zellen erlaubt, und wobei die Ribozymsequenz, wenn sie in den Zellen exprimiert wird, mit der zellulären mRNA-Sequenz in Wechselwirkung tritt und die mRNA-Sequenz spaltet, was zur Inhibierung der Expression des RAP-2-Proteins in den Zellen führt.

13. Verwendung eines oder mehrerer RAP-2-Proteine, Isoformen, Analoge, Fragmente oder Derivate nach Anspruch 5, oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6, oder einer DNA-Sequenz, die eine oder mehrere Proteine, Isoformen, Analoge, Fragmente oder Derivate codiert in Form eines geeigneten Vektors, der die Sequenz trägt, wobei der Vektor in der Lage ist, die Insertion der Sequenz in die Zellen auf eine Weise zu bewirken, dass die Sequenz in den Zellen exprimiert wird, für die Herstellung eines Arzneimittels, das in die Zellen eingeführt werden soll, zur Behandlung von Entzündungen, einer Autoimmunerkrankung, septischen Schock, Transplantat-gegen-Wirt-Abstoßung oder Hepatitis.

14. Fragment nach Anspruch 5, oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 6, das ein Peptid ist.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

	10	20	30	40	50	60
1	GAAGATTCCA	TTGTGGCCCT	GGAGGCCCTA	GCAAGGCGGG	ACCGGAAAC	TGGACTTTT
61	TTTCGGAGCGC	CGGGCCCTA	CCAGCGTTCA	CAGTCCGCGG	CTCCCACCTT	TCTCAGTCT
121	GACGGACTCT	GCTGACAGCC	CTTGCCCTGT	TGGATGAATA	GGCACCTCTG	GAAGAGCCAA
181	CTGTGTGA	TGGTCAGCC	CAGTGGTGGC	CCGGCAGCAG	ATCAGGACGT	ACTGGGCGAA
241	GAGTCTCCTC	TGGGAAGCC	AGCCATGCTG	CACCTGCCCT	CAGAACAGGG	CGCTCCTGAG
301	ACCTCCAGC	GCTGCCCTGA	GGAGAAATCAA	GAGCTCCGAG	ATGCCATCCG	GCAGAGCAAC
361	CAGATTCTGC	GGAGCGCTG	CGAGAGCTT	CTGCATTTC	AAGCCAGCCA	GAGGGAGGAG
421	AAGGAGTTCC	TCAATGTC	GTTCCAGGAG	GCCAGGAAAC	TGGTGAGAG	ACTCGGCCCTG
481	GAGAAAGCTCG	ATCTGAAGAG	GCAGAAGGAG	CAGGCTCTGC	GGAGGTGGA	GCACCTGAAG
541	AGATGCCAGC	AGCAGATGGC	TGAGGACAAAG	GCCTCTGTGA	AAGCCCAGGT	GACGTCCTTG
601	CTCGGGGAGC	TGCAGGAGAG	CCAGAGTCGC	TTGGAGGCTG	CCACTAAGGA	ATGCCAGGCT
661	CTGGAGGGTC	GGCCCCGGC	GGCCAGCGAG	CAGGCGCGGC	AGCTGGAGAG	TGAGCGCGAG
721	GCGCTGCAGC	AGCAGCACAG	CGTGCAGGTG	GACCAGCTGC	GCATGCAGGG	CCAGAGCGTG
781	GAGGCCGCGC	TCCGCATGGA	GCGCCAGGCC	GCCTCGGAGG	AGAAGAGGAA	GCTGGCCCCAG
841	TTGCAGGTGG	CCTATCACCA	GCTCTTCCAA	GAATACGACA	ACCACATCAA	GAGCAGCGTG
901	GTGGGCAGTG	AGCGGAAGCG	AGGAATGCCAG	CTGGAAGATC	TCAAACAGCA	GCTCCAGCAG
961	GCCGAGGAGG	CCCTGGTGGC	CAAACAGGAG	GTGATCGATA	AGCTGAAGGA	GGAGGCCGAG
1021	CAGCACAAAG	TTGTGATGGA	GACCGTTCCG	GTGCTGAAGG	CCCAGGCGGA	TATCTACAAG
1081	GCGGACTTCC	AGGCTGAGAG	GCAGGCCCGG	GAGAACTGG	CCGAGAAGAA	GGAGCTCCTG
1140						

Fig. 1 (A)

1141	CAGGAGCAGC	TGGAGCAGCT	GCAGAGGGAG	TACAGCAAC	TGAAGGCCAG	CTGTCAGGAG	1200
1201	TCGGCCAGGA	TCGAGGACAT	GAGGAAGCGG	CATGTCGAGG	TCTCCAGGC	CCCCTTGCCC	1260
1261	CCCGCCCCCTG	CCTACCTCTC	CTCTCCCCCTG	GCCCTGCCCCA	GCCAGAGGAG	GAGCCCCCCC	1320
1321	GAGGAGCCAC	CTGACTTCTG	CTGTCCCCAAG	TGCCAGTATC	AGGCCCCCTGA	TATGGACACC	1380
1381	CTGCAGATAC	ATGTCATGGA	GTGCATTGAG	TAGGGCCGGC	CAGTGCAAGG	CCACTGCCCTG	1440
1441	CCGAGGACGT	GCCCGGACC	GTGCAGTCTG	CGCTTTCCCTC	TCCCGCCCTGC	CTAGCCCCAGG	1500
1501	ATGAAGGGCT	GGTGGCCAC	AACTGGGATG	CCACCTGGAG	CCCCACCCAG	GAGCTGGCCG	1560
1561	CGGCACCTTA	CGCTTCAGCT	GTTGATTCCG	CTGGTCCCTT	CTTTTGGGGT	AGATGGGCC	1620
1621	CCGATCAGGC	CTGACTCGCT	GCTCTTTTGT	TTCCCTTCTG	TCTGCTCGAA	CCACTTGCCT	1680
1681	CGGGCTAATC	CCTCCCCTCTT	CCTCCACCCG	GCACTGGGA	AGTCAAGAAT	GGGGCCTGGG	1740
1741	GCTCTCAGGG	AGAACTGCTT	CCCCTGGCAG	AGCTGGGTGG	CAGCTCTTCC	TCCCACCGGA	1800
1801	CACCGACCCG	CCCGCTGCTG	TGCCCTGGGA	GTGCTGCCCT	CTTACCATGC	ACACGGGTGC	1860
1861	TCTCCTTTTG	GGCTGCATGC	TATTCCATT	TGCAGCCAGA	CCGATGTGA	TTTAACCAGT	1920
1921	CACTATTGAT	GGACATTGG	GTTGTTTCCC	ATCTTTTGT	TACCATMAAT	ARTGGCMTAG	1980
1981	AKAAAAATCC	TTGTGCATTA	AAAAAAAAA				2009
	10	20	30	40	50	60	

Fig. 1 (B)

Fig. 2 (A)

1141	CTGGCCGAGA	AGAAGGAGCT	CCTGCAGGAG	CAGCTGGAGC	AGCTGCAGAG	GGAGTACAGC	1200
1201	AAACTGAAGG	CCAGCTGTCA	GGAGTCGGCC	AGGATCGAGG	ACATGAGGAA	GCGGCATGTC	1260
1261	GAGGTCTCCC	AGGCCCCCTT	GCCCCCCGCC	CCTGCCCTACC	TCTCCTCTCC	CCTGGCCCTG	1320
1321	CCCAGCCAGA	GGAGGAGCCC	CCCCGAGGAG	CCACCTGACT	TCTGCTGTCC	CAAGTGCCAG	1380
1381	TATCAGGCC	CTGATATGGA	CACCCTGCAG	ATACATGTCA	TGGAGTGCCAT	TGAGTAGGGC	1440
1441	CGGCCAGTGC	AAGCCACTG	CCTGCCGAGG	ACGTGCCCGG	GACCGTGCAG	TCTGCGCTTT	1500
1501	CCTCTCCCGC	CTGCCTAGCC	CAGGATGAAG	GGCTGGGTGG	CCACAACCTG	GATGCCACCT	1560
1561	GGAGCCCCAC	CCAGGAGCTG	GCCGCCGCAC	CTTACGCTTC	AGCTGTTGAT	TCCGCTGGTC	1620
1621	CCCTCTTTTG	GGTAGATGC	GGCCCCGATC	AGGCCTGACT	CGCTGCTCTT	TTTGTTCCTT	1680
1681	TCTGTCTGCT	CGAACCACTT	GCCTCGGGCT	AATCCCCTCCC	TCTTCCCTCCA	CCCGGCACTG	1740
1741	GGGAAGTCAA	GAATGGGGCC	TGGGCTCTC	AGGGAGAACT	GCTTCCCCCTG	GCAGAGCTGG	1800
1801	GTGGCAGCTC	TTCTCTCCAC	CGGACACCGA	CCCCGCCGCT	GCTGTGCCCCT	GGGAGTGCTG	1860
1861	CCCTCTTACC	ATGCACACGG	GTGCTCTCCT	TTTGGGCTGC	ATGCTATTCC	ATTMTGCAGC	1920
1921	CAGACCGATG	TGTATTTAAC	CAGTCACTAT	TGATGGACAT	TTGGGTTGTT	TCCCATCTTT	1980
1981	TTGTTACCAT	MAATARTGGC	MTAGAKAAAA	ATCCTTGTGC	ATTAAAAAAA	AAAA	2034
	10	20	30	40	50	60	

Fig. 2 (B)

A		20.4 full = 20.4 vollständige Sequenz	
		NEMO full = NEMO vollständige Sequenz	
		Mouse part. = Maus Teilsequenz	
		Human shrt = Mensch kurze Sequenz	
20.4 full	1	MNRRHLWKSOLCEMVOPSGGPAADODVLGEEESPLGK	
NEMO full	1	MNKHLPWK[N]QLSETVO[ESGGPAEDODMLGEESSLGK	
Mouse part.	1		
Human shrt	1	MNRRHLWKSOLCEMVOPSGGPAADODVLGEEESPLG-	
20.4 full	36	PAMLHLPSEQGAPE TLQRCLEENQELRDAIROSNQ	
NEMO full	36	PAMLHLPSEQGTPE TLQRCLEEMQELRDAIROSNQ	
Mouse part.	1		
Human shrt	35		
20.4 full	71	ILRERCEEELHFOASOREEKEFLMCKFOEARKLVE	
NEMO full	71	MLRERCEEELHFOVSORW[KEEFLMCKFOEARKLVE	
Mouse part.	4		
Human shrt	35		
20.4 full	106	RLGL[E] - - - - - KLDLKR[OKEOALREVEH LKRCOOOMAE	
NEMO full	105	RLSLE[KLE] - - - - - KLDLRS[OREOALKELBO LKRCOOOMAE	
Mouse part.	39		
Human shrt	35		
20.4 full	138	DKASVKAOVTSLLGEL[OESOSRL[AATKE[C]OAL[BG	
NEMO full	140	DKASVKAOVTSLLGEL[OESOSRL[AATKDR[OALEG	
Mouse part.	71		
Human shrt	36		
20.4 full	173	RARAS[EOAROLESE]RE[ALOOOHS]VOVDOLRMOGO	
NEMO full	175	RI[RAVS]EOVROLESERE[VLOOOHS]VOVDOLRMONQ	
Mouse part.	106		
Human shrt	60		

Fig. 3 (A/1)

20.4 full	208	SVEAALRMEROAAS	EEKRKL	AOL	O	VAYHOLFOEYD	
NEMO full	210	SVEAALRMEROAAS	EEKRKL	AOL	O	AAYHOLFOEYD	
Mouse part.	141	AWRLPCEWSGRLL	ORRS	GT	G	LQLOAAAYHOLFOEYD	
Human shrt	60						
20.4 full	243	NHKKSS	VVGSE	RK	RG	MOL	EDL
NEMO full	245	NHKKSS				K	G
Mouse part.	176	SHKKSS				K	G
Human shrt	60						
20.4 full	278	QEV	DKL	KEE	A	E	O
NEMO full	273	QEL	DKL	KEE	A	E	O
Mouse part.	204	QEL	DKL	KEE	A	E	O
Human shrt	60						
20.4 full	313	QAE	RQ	ARE	K	L	A
NEMO full	308	QAE	RQ	ARE	K	L	A
Mouse part.	0						
Human shrt	60						
20.4 full	348	QES	AR	I	E	D	M
NEMO full	343	QES	AR	I	E	D	M
Mouse part.	0						
Human shrt	60						
20.4 full	383	S	Q	R	R	S	P
NEMO full	377	N	Q	R	R	S	P
Mouse part.	0						
Human shrt	60						
20.4 full	417	-	-	-	-	-	-
NEMO full	411	-	-	-	-	-	-
Mouse part.	0						
Human shrt	82	R	P	M	C	I	.

Fig. 3 (A/2)

B		20.4 full = 20.4 vollständige Sequenz
		FIP-2 full = FIP-2 vollständige Sequenz
20.4 full	1	MNRHLWKSQLCENV-QPSGGPAADQDVLGRESPLQ
FIP-2 full	1	MSHOPLSCLTEKEDSPSSTGNG
20.4 full	35	KPAMLLPSEQQGARRTT- - -QRCEENQEBURDAI
FIP-2 full	24	PRHLLAHPLNLDTETRRELQQMKELLTENNIQKEAM
20.4 full	68	RQSNQILRERCERELLIIFQASQREERKEELMCKFQBA
FIP-2 full	59	KLNNIGAMKGRFRRLSAMTEKOKERRQEEIQSKRA
20.4 full	101	RKLVERIFGLEKLDCKRQKEQALREVEHKKRCQQQM
FIP-2 full	94	K- - -KRL- - -NALSHENKELKELGKLGKKSERS
20.4 full	136	ARDKA- - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
FIP-2 full	122	SDPTDDSRLPRAEAEQEKDQLRTQVVRLQAEKAD
20.4 full	141	- -
FIP-2 full	157	LLGIVSEIQLKLNSSGSSIEDSFVEIRMAEGEAEGS
20.4 full	141	- -
FIP-2 full	182	VKEIKHSPGSTRTVSTGTALSHYRRRSADGAKNYF
20.4 full	141	- -
FIP-2 full	227	EEELTVSQILLCLREGNQKVERLEVALKEANERV
20.4 full	141	- -
FIP-2 full	262	SDFEKKTSNRSEIETQTEGSTTEKENDEEKGPETVG

Fig. 3 (B/1)

20.4 full FIP-2 full	141 297	- - - - S V K A Q V T S L G E L Q E S Q S R E A A T - - - - - S E V E A L N L O V T S L F K R L O E A H T K L S E A E L M K K R L Q
20.4 full FIP-2 full	165 332	K E Q Q A L E G R A R A A S E Q A R Q L E S E R E A L Q Q Q I S V Q V E K C Q A L E - - - R K N S A I P S E L N E K Q R L Y Y P N K - - - -
20.4 full FIP-2 full	200 360	D Q L R M Q G Q S V E A A L R M E R Q A A S E R K R K L A Q L Q V A Y - K L E L O V E S M L S E L K M E Q A K T E D E K S K L T V L Q M T H
20.4 full FIP-2 full	235 394	H Q L F O R Y D N H I K S - - - S V V G S E R K R G M Q L E D L K Q N K L L O E I N N A L K T I E E L T R K E S E K V D R A V L K E L S E
20.4 full FIP-2 full	266 429	Q L Q Q A R E A L V A K Q E V I D K L K E E A E Q I K I V M H T V P V K L E L A E K A L A S K O L Q M D E M K Q T I A K Q E E D L E T M T I
20.4 full FIP-2 full	301 464	L K A Q A D I Y K A D E Q A E R Q A R E K L A R K K L L Q E Q L E Q L R A O M E Y Y C S D E H A E R A A R E K I H E R E K E Q L A L O L A V
20.4 full FIP-2 full	336 499	L Q R R Y S K L K A S C Q E S A R I E D M R K R H - V E V S Q A P L P L L K E N D A F E D G R Q S - - L M E M Q S R H G A R T S D S - - -
20.4 full FIP-2 full	370 529	P A P A Y L S S P L A L P S Q R R S P P E E P R D F C Q R K C Q Y Q A D Q Q A Y L V Q R G A E D R D W R Q Q - R N I R I H S C P K C G E V L
20.4 full FIP-2 full	405 563	R P M D T L Q T H V M E G I F R E I D T L Q T H V M D G I I

20.4 full = 20.4 vollständige Sequenz
FIP-2 full = FIP-2 vollständige Sequenz

Fig. 3 (B/2)

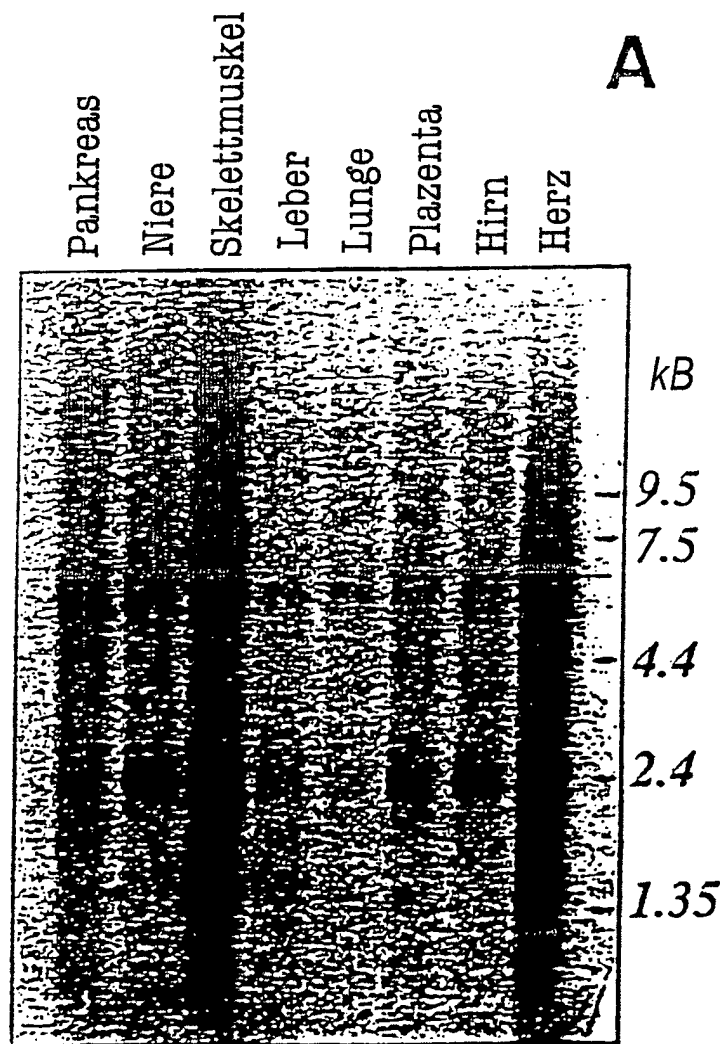


Fig. 4A

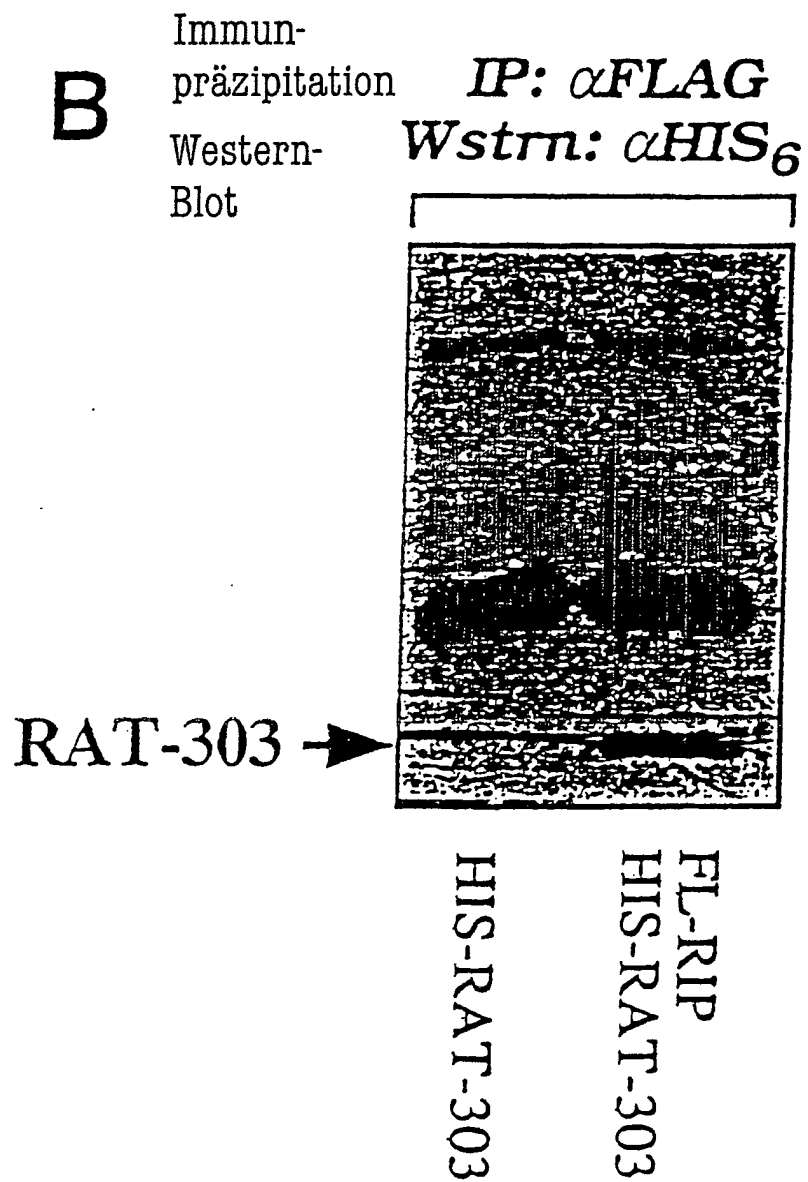


Fig. 4B

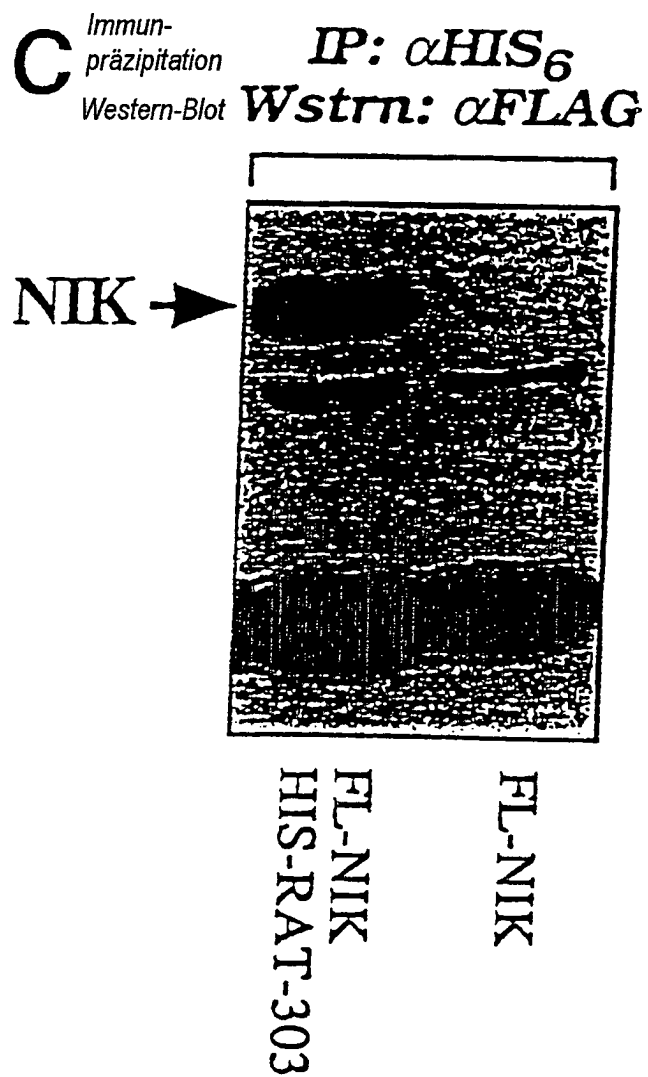


Fig. 4C

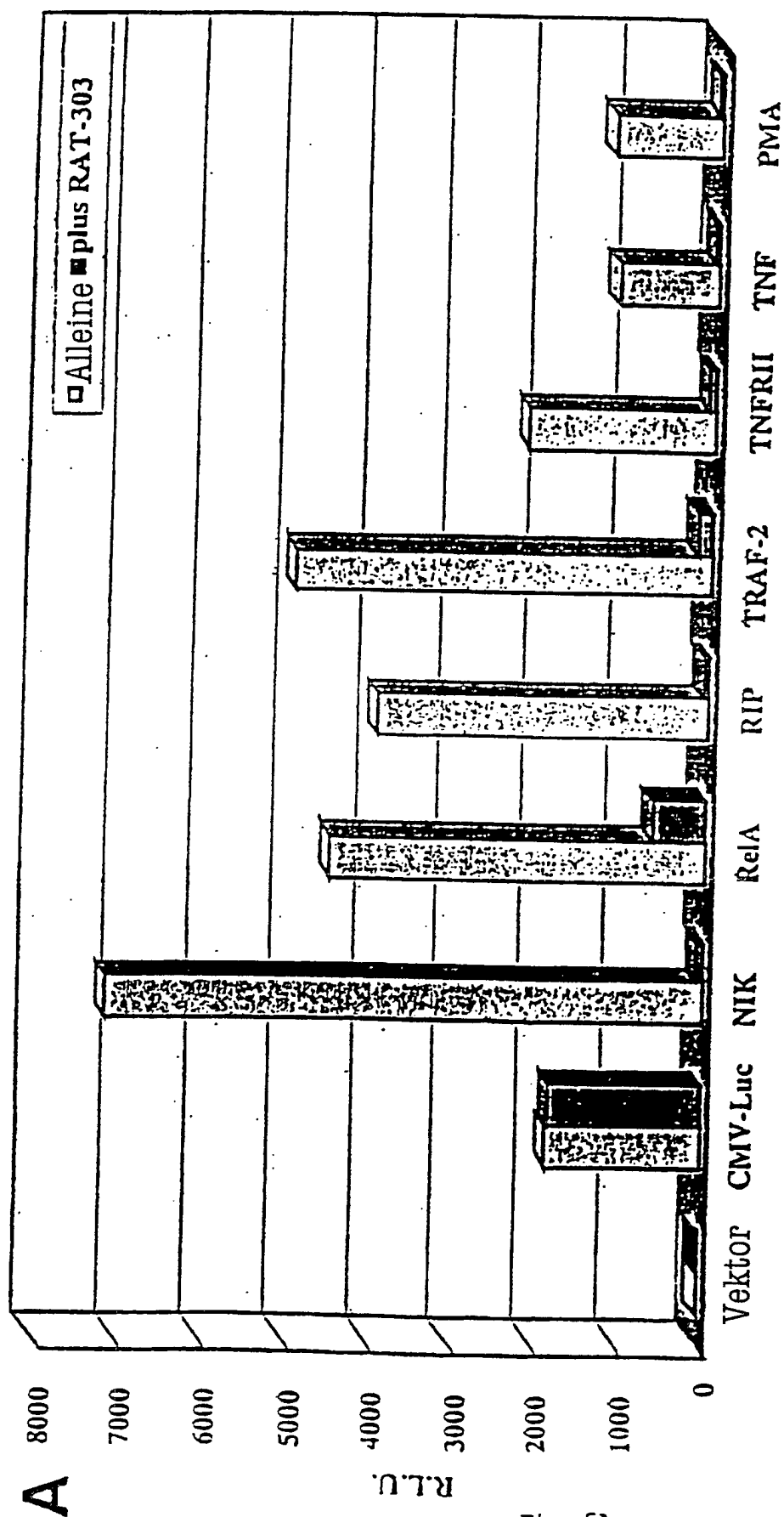


Fig. 5A

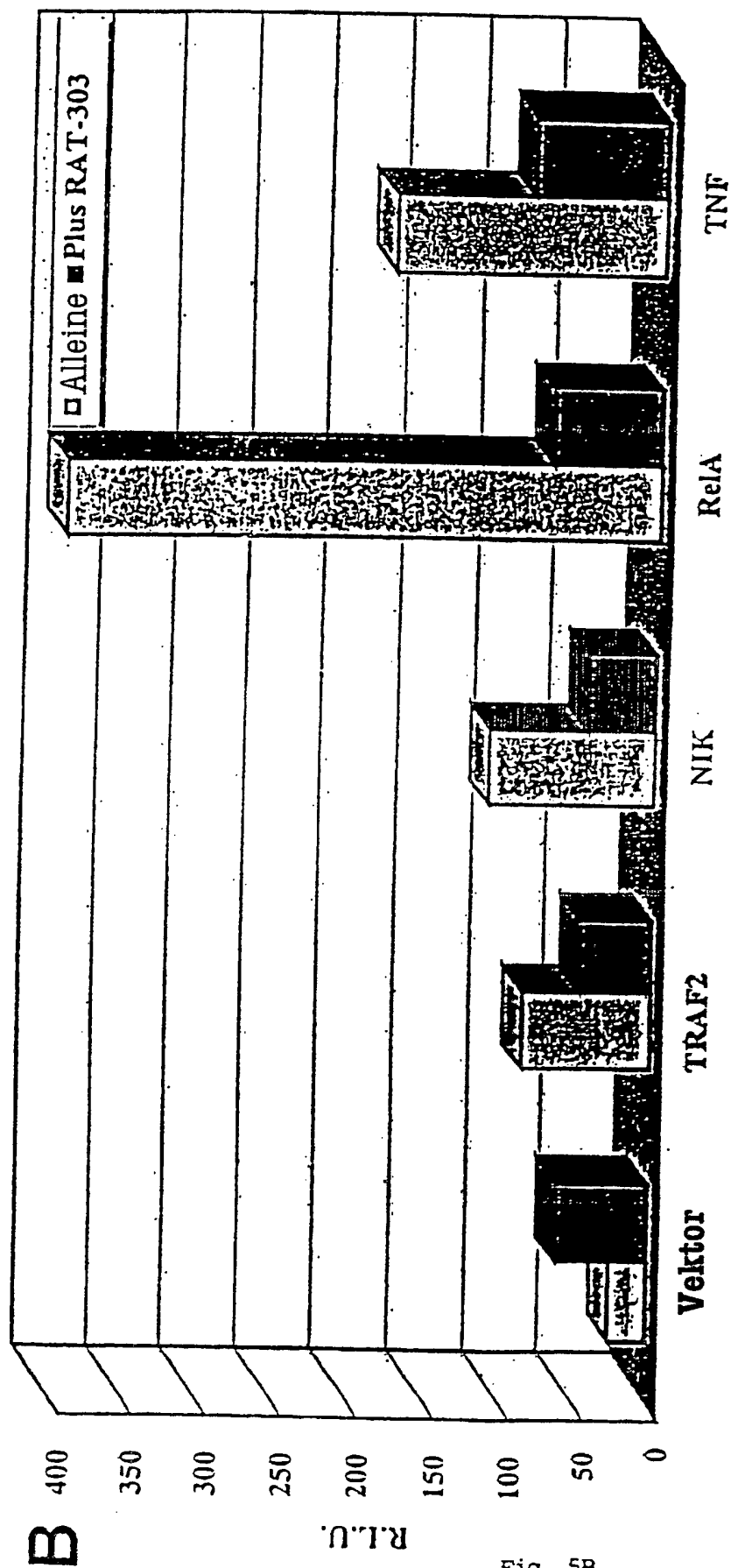


Fig. 5B

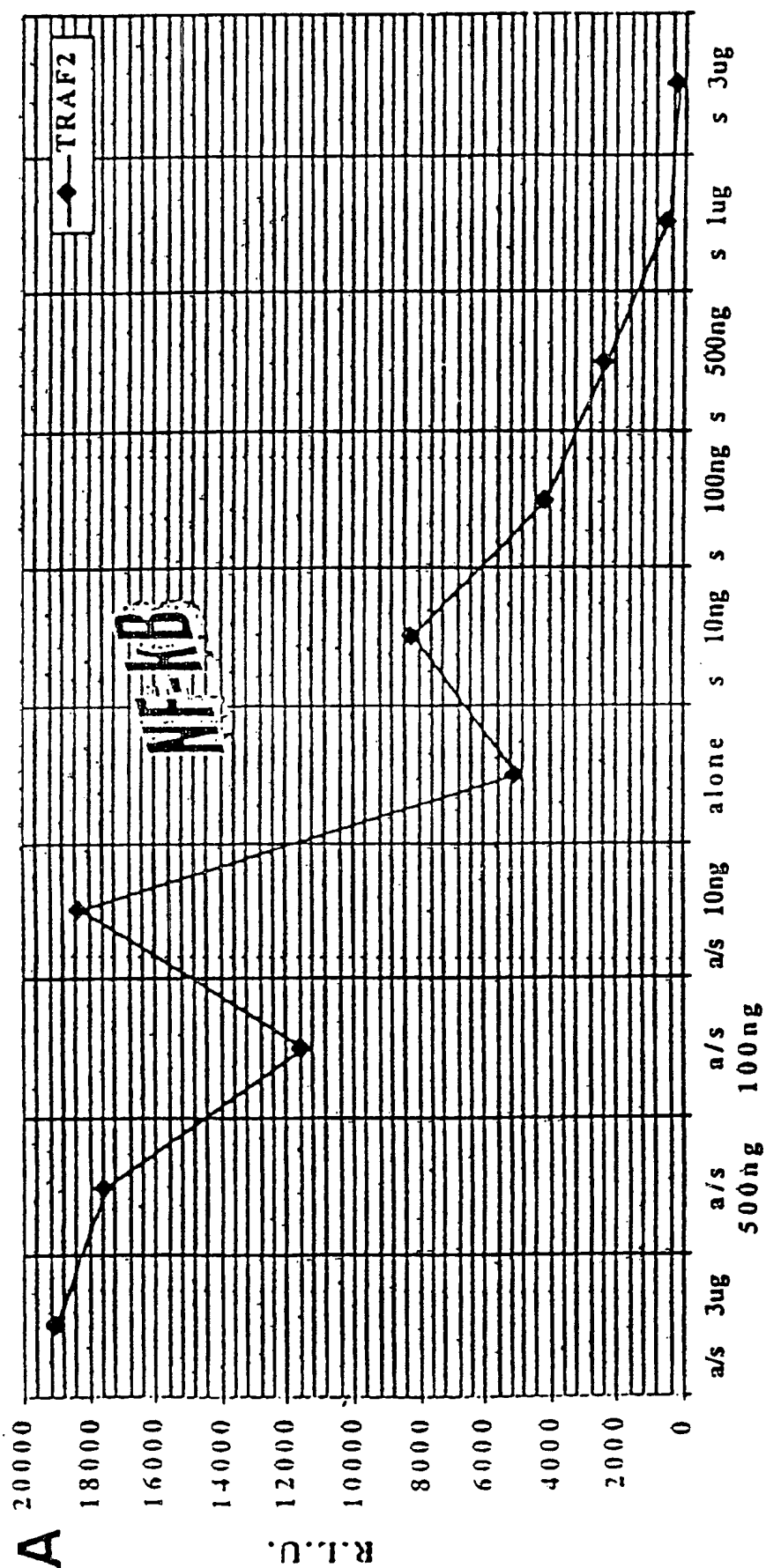


Fig. 6A

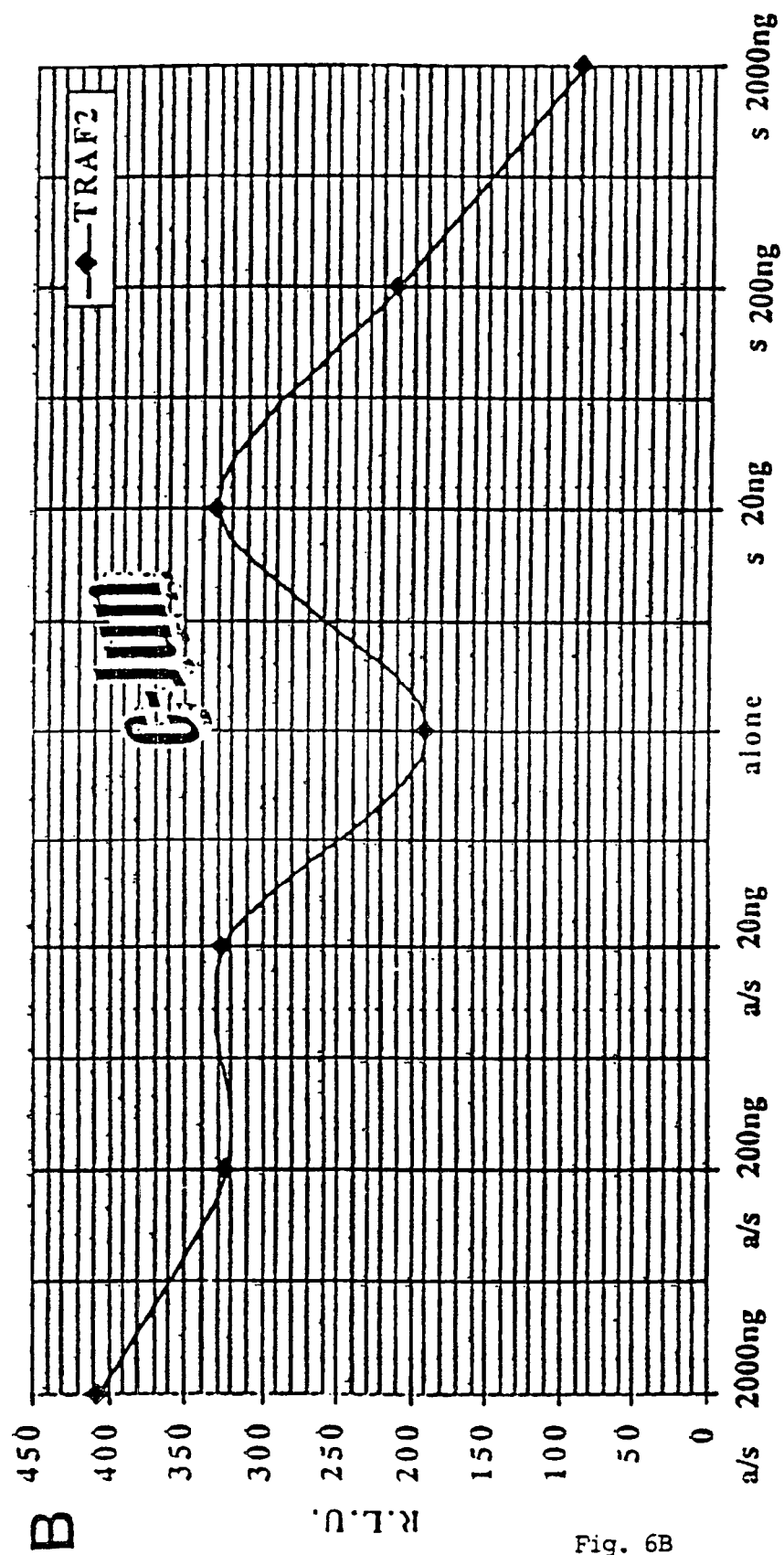


Fig. 6B

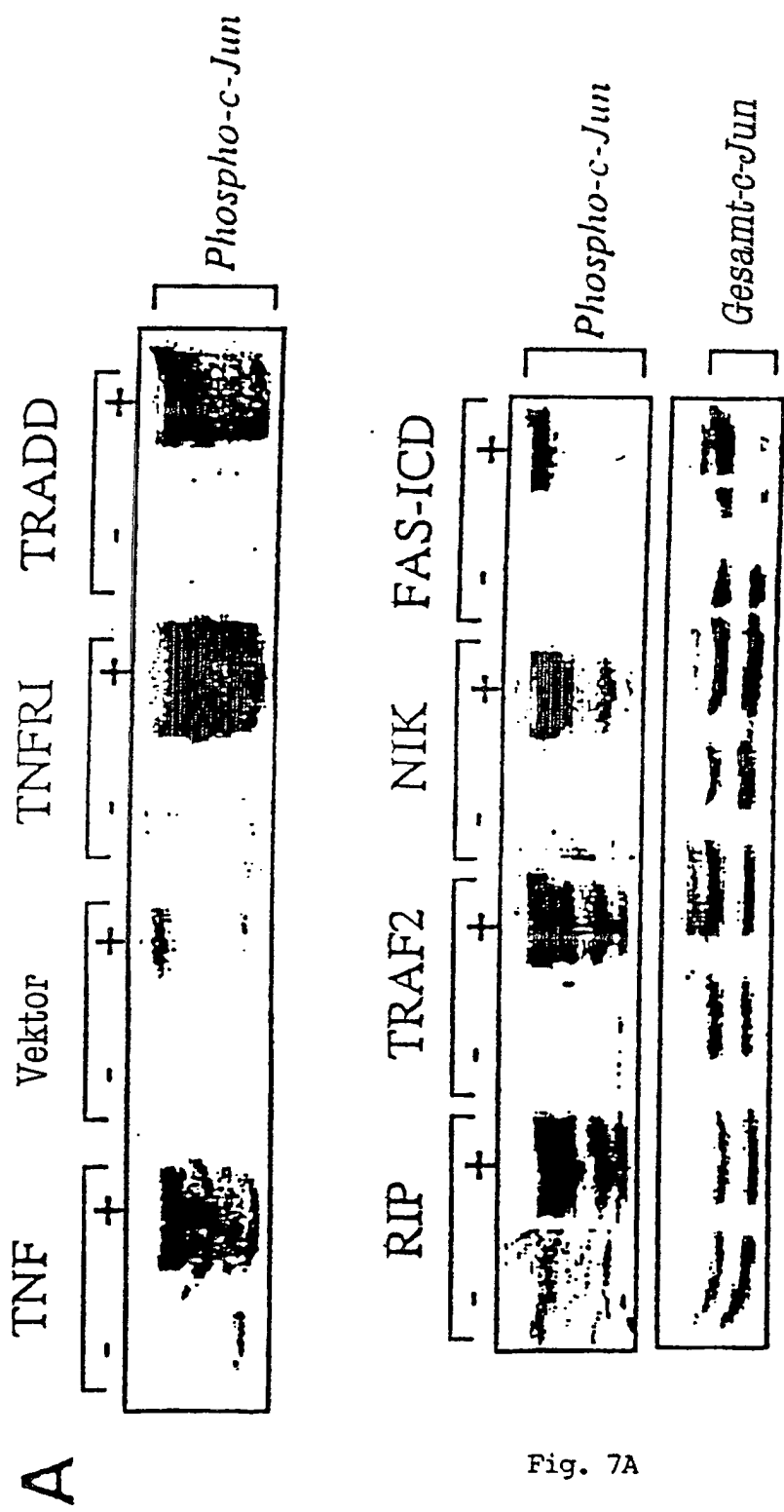
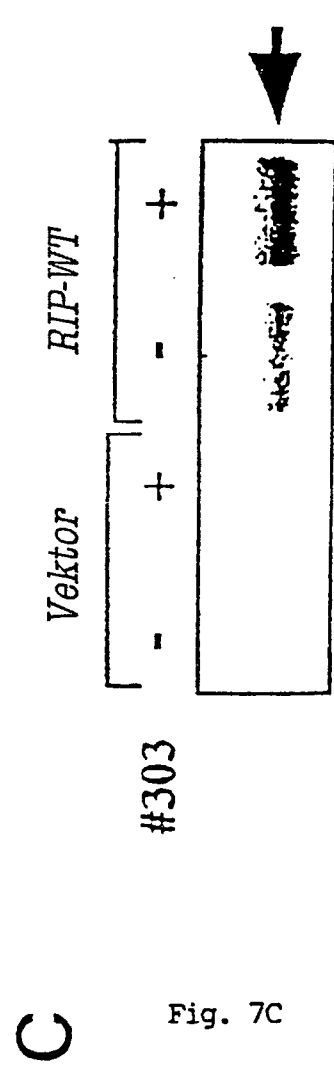
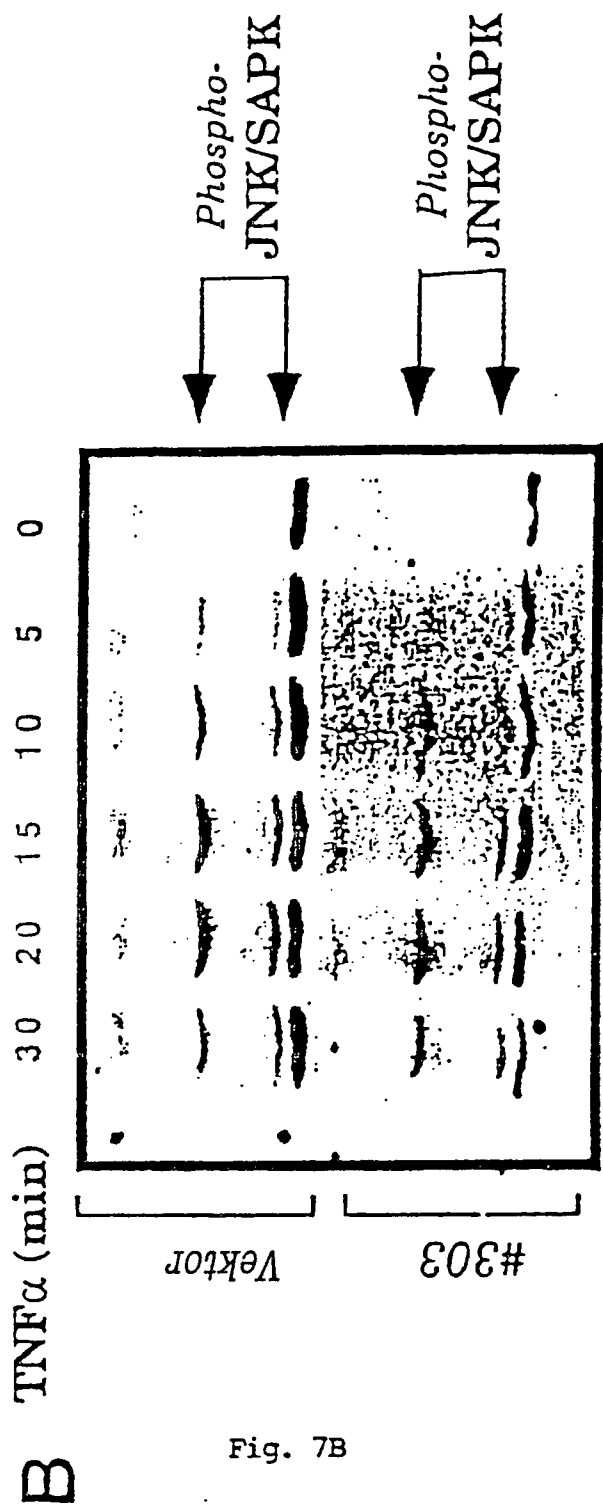


Fig. 7A



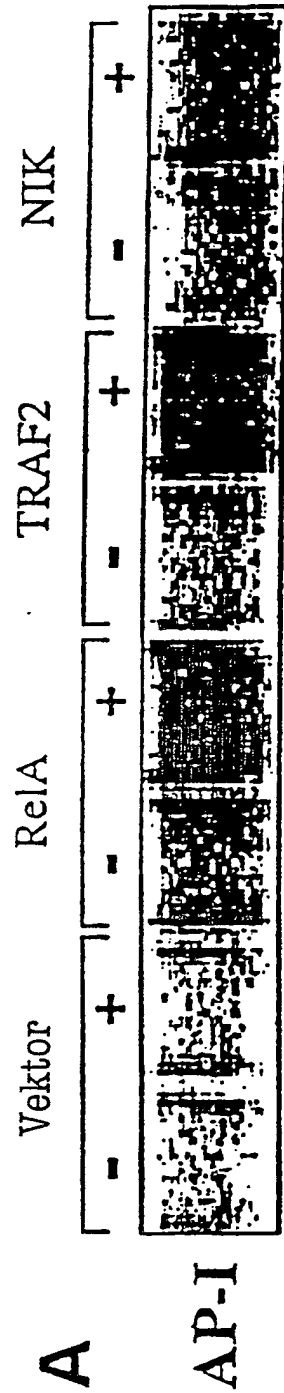


Fig. 8A

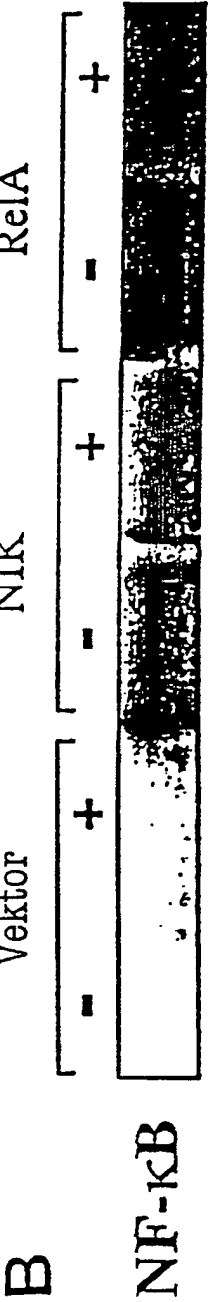


Fig. 8B

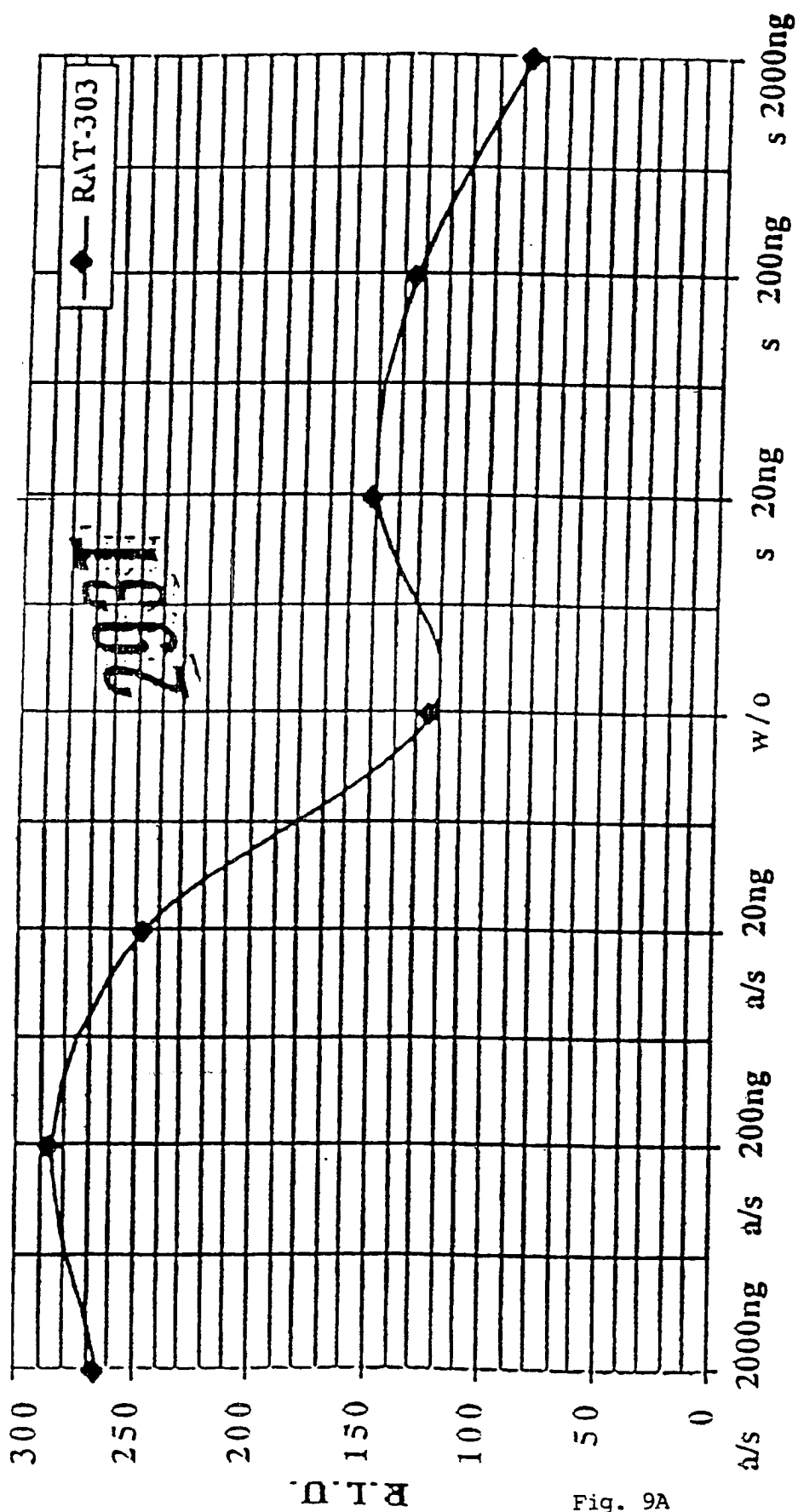
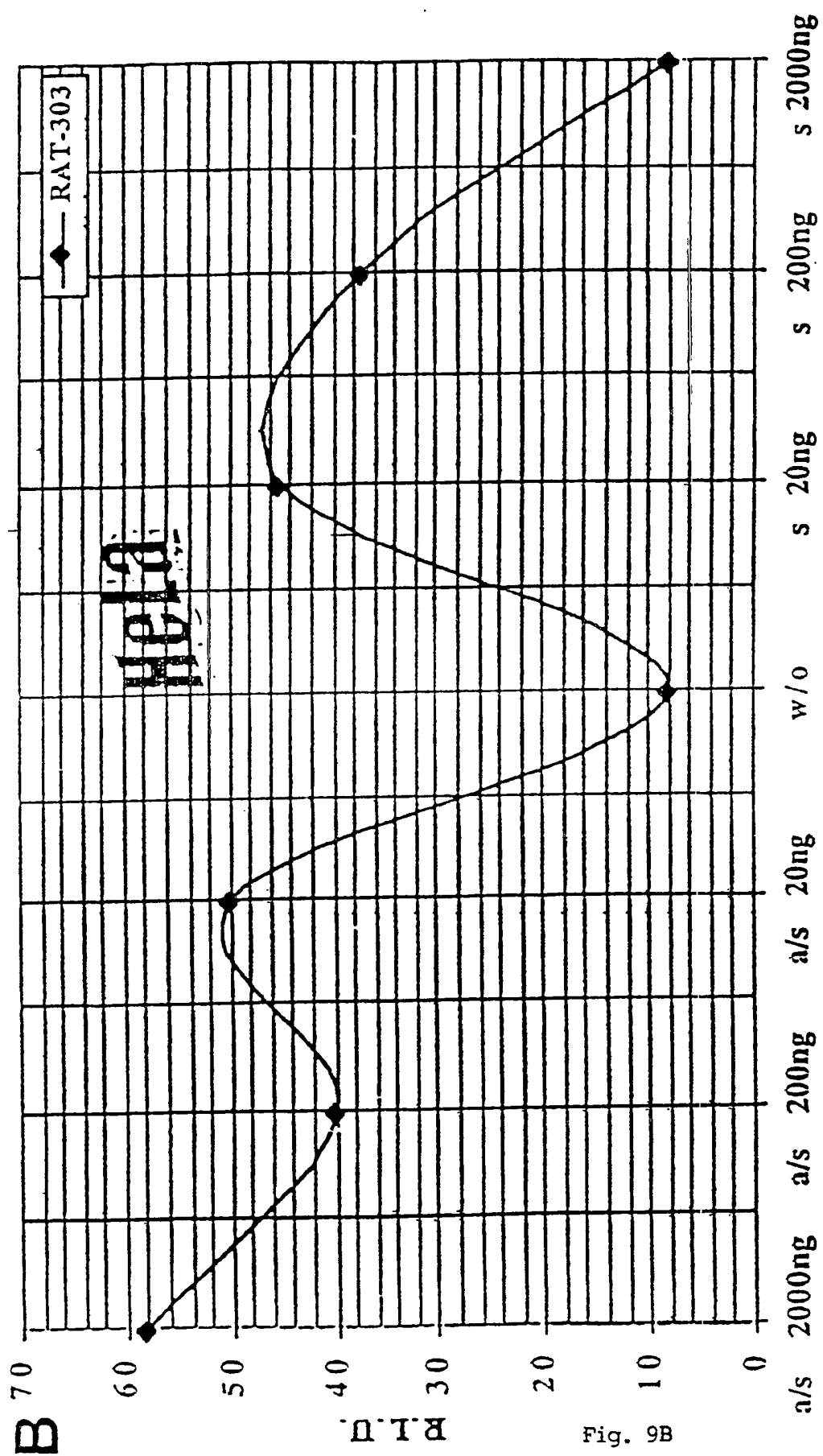


Fig. 9A



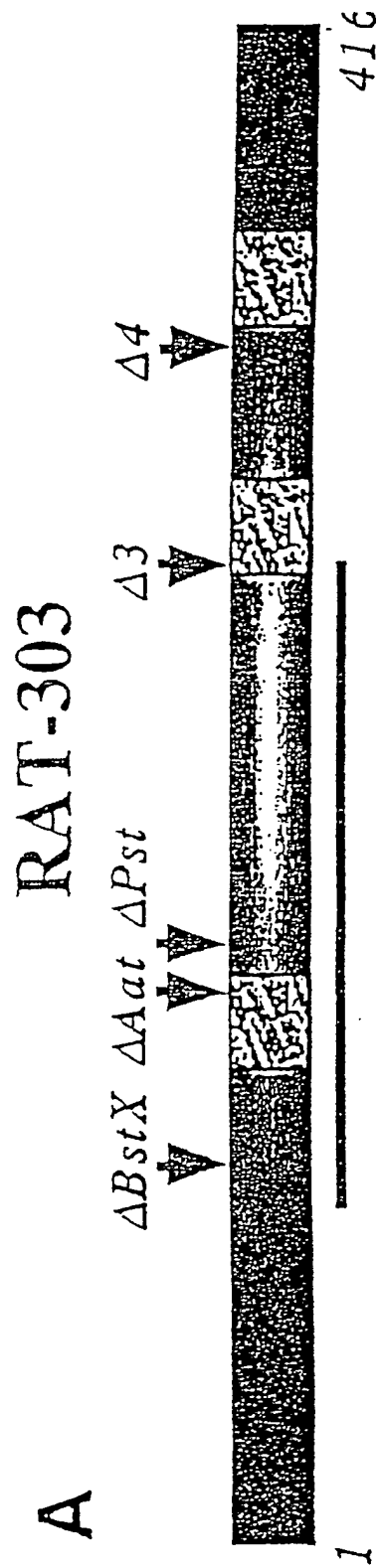


Fig. 10A

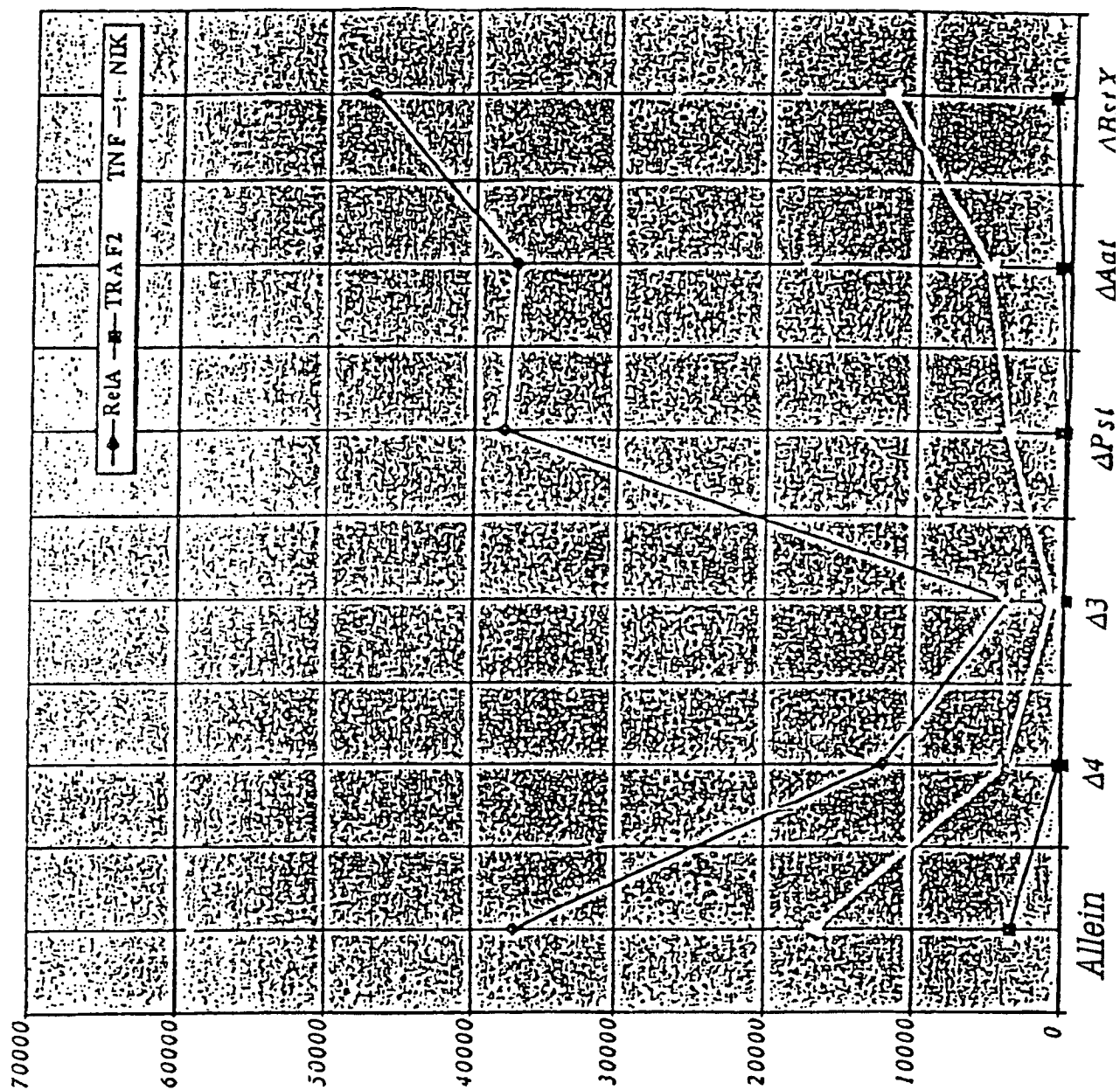
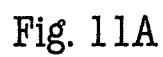


Fig. 10B



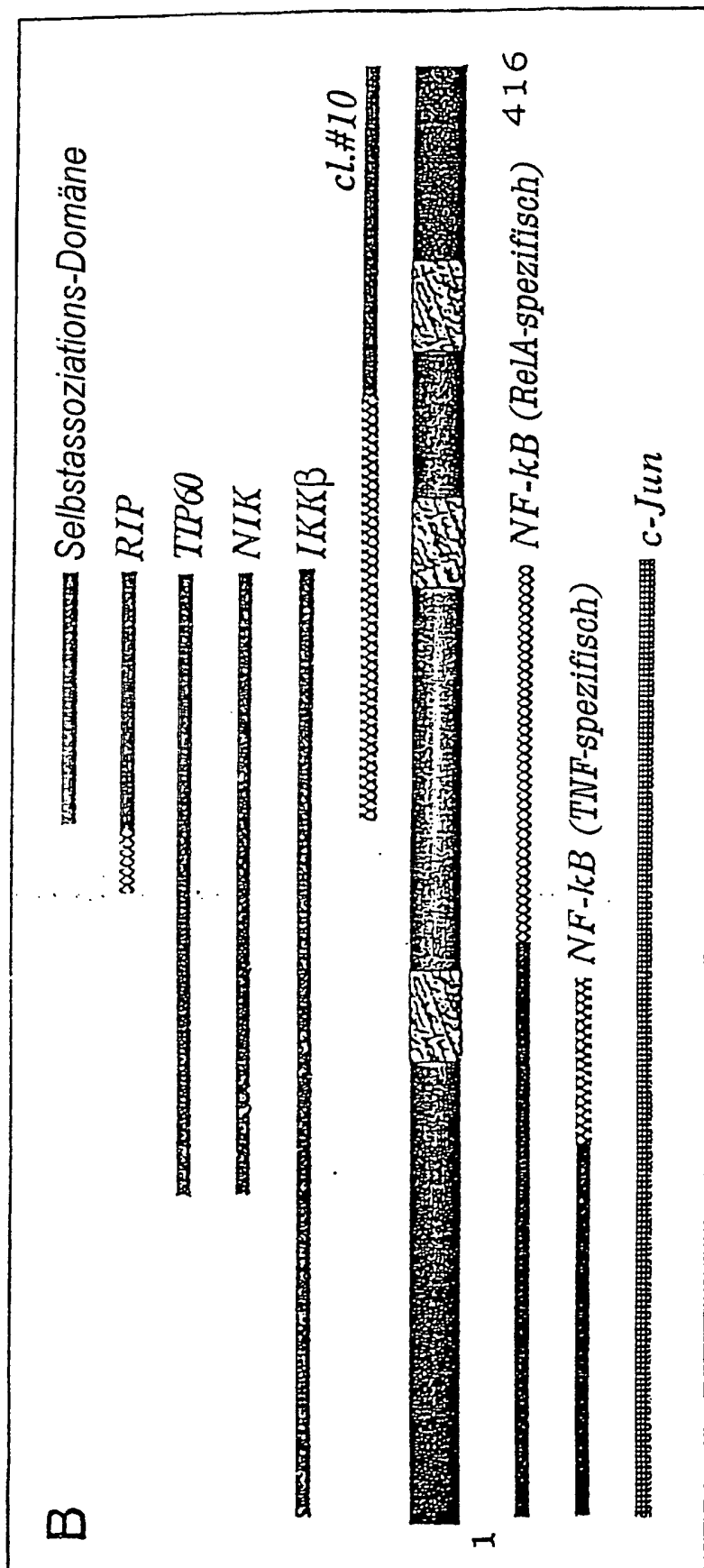


Fig. 11B

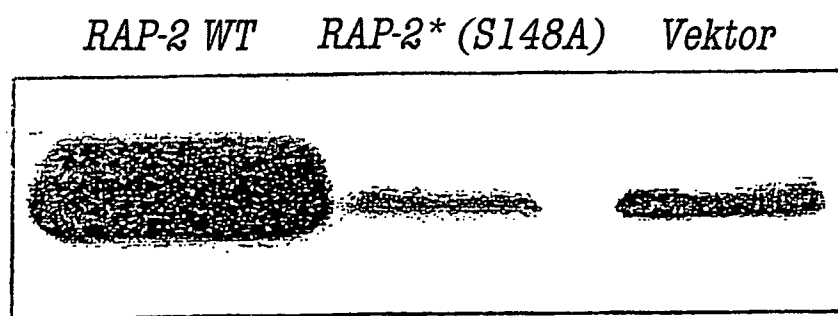


Fig. 12