(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 691 33 281 T2** 2004.05.06

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 538 404 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **691 33 281.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US91/04745**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **91 915 163.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 92/000999**
(86) PCT-Anmeldetag: **03.07.1991**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **23.01.1992**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.04.1993**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **18.06.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.05.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C07K 14/71, A61K 38/17, C12N 5/10, G01N 33/53

(30) Unionspriorität:
549587 06.07.1990 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

(73) Patentinhaber:
GENCELL S.A., Vitry-sur-Seine, FR

(74) Vertreter:
Zumstein & Klingseisen, 80331 München

(72) Erfinder:
DIONNE, A., Craig, Harleysville, US; CRUMLEY, Gregg, Philadelphia, US; JAYE, C., Michael, Glenside, US; SCHLESSINGER, Joseph, New York, US

(54) Bezeichnung: **REZEPTOREN DER WACHSTUMSFAKTOREN AUS FIBROBLASTEN**

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] Diese Erfindung betrifft eine einzigartige Klasse Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren, dafür kodierende Nukleinsäuren sowie die Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in rekombinanten Systemen. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von exprimierten Rezeptoren oder Fragmenten davon in Screening-Verfahren für mögliche Wirkstoffe, die als Rezeptorantagonisten wirken.

Berichtete Entwicklungen

[0002] Die Familie des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF) besteht aus sieben verwandten Heparin-bindenden Proteinen, welche saures FGF (aFGF), basisches FGF (bFGF), int-2, hst/kFGF, FGF-5, FGF-6 und KGF umfassen. Die Mitglieder der FGF-Familie besitzen etwa 30 bis 55% Aminosäuresequenzidentität, eine ähnliche Genstruktur und sind, wenn man sie in transfizierten Zellen überexprimiert, fähig, kultivierte Zellen zu transformieren. Die prototypischen FGFs, aFGF und bFGF, wurden als erste gereinigt, sequenziert und kloniert. Sie sind, in vitro, Mitogene für eine Vielzahl Zellen von mesenchymalem und neuroektodermem Ursprung. In vivo können FGFs die Bildung von Mesoderm in sich entwickelnden Xenopus-Embryos induzieren und besitzen eine potente angiogene Wirksamkeit (zusammengefasst von Burgess und Maciag, Ann. Rev. Biochem. 58:575–606 (1989)).

[0003] Die Antwort von Zellen auf FGFs wird durch die Bindung und Aktivierung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren mit einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität vermittelt. Rezeptoren sind, häufig glycosylierte, Proteine die als integrale Komponenten der Zellmembran dienen. Typischerweise besitzen Rezeptoren eine extrazelluläre Domäne auf der Zelloberfläche, die fähig ist, mit Substanzen, die als Liganden bekannt sind, eine spezifische Wechselwirkung einzugehen. Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind Beispiele für Liganden. Als eine Folge der Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne wird ein zweiter Bereich auf dem Rezeptor, der an der intrazellulären Oberfläche der Membran (d. h. dem zytoplasmatischen Bereich) angeordnet ist, aktiviert, so dass er eine Reaktion mit weiteren intrazellulären Molekülen zulässt. Die zytoplasmatische Domäne umfasst einen katalytischen Bereich, das heißt einen Bereich mit enzymatischer Aktivität. Mit besonderem Bezug auf den hierin beschriebenen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor ist die katalytische Domäne eine Proteintyrosinkinase. Das Substrat dieser Kinase kann der Rezeptor selbst sein (d. h. Autophosphorylierung) oder es können andere intrazelluläre Proteine, wie die Phospholipase C-γ, sein. Die Kinasedomäne bestimmter Rezeptoren kann durch Insertion von bis zu 100 hauptsächlich hydrophilen Aminosäureresten unterbrochen sein. Dieses Insert kann die Rezeptorwechselwirkung mit bestimmten zellulären Substraten und Effektorproteinen modulieren. Die zytoplasmatische Domäne endet mit einer COOH-terminalen Schwanzregion. Diese Sequenz ist die am meisten abweichende unter allen bekannten RTKs. Mehrere Autophosphorylierungsstellen wurden dieser Region zugeordnet und die Region kann durch Ausüben einer negativen Kontrolle auf eine Kinase-Signal-Funktion wirken. Die katalytische Region ist sauber durch eine Juxtamembrandomäne getrennt. Derzeitige Nachweise stützen die Annahme, dass diese Region an der Modulierung der Rezeptorfunktion durch heterologe Stimuli beteiligt ist, ein Vorgang, der als Rezeptortransmodulation bekannt ist. Die extrazelluläre und die zytoplasmatische Domäne werden von einer die Membran überspannenden Region verbunden, die richtig als Transmembrandomäne bekannt ist. Es wird angenommen, dass die Ligandenwechselwirkung die zytoplasmatische Domäne aktiviert, indem sie eine konformationelle Veränderung, wie durch Aggregation oder andere Mechanismen, induziert. Entsprechend wirkt ein Rezeptor als molekularer Übermittler, der ein extrazelluläres Ereignis (Ligandenbindung) in eine intrazelluläre Antwort (zytoplasmatische Enzymaktivität) übersetzt.

[0004] Wie oben erwähnt, ist das durch den Rezeptor gebundene Substanz als Ligand bekannt; ein Begriff, dessen Definition nur in Bezug auf seinen Gegenrezeptor Sinn macht. Entsprechend beinhaltet der Begriff „Ligand" nicht eine bestimmte Molekülgröße oder ein Struktur- oder Aufbaumerkmal, außer dass die Substanz fähig ist, mit dem Rezeptor in einer solchen Weise zu binden oder anderweitig zu interagieren, dass der Rezeptor die Information, dass der Ligand vorliegt, an ein intrazelluläres Zielmolekül weitergibt. Eine solche funktionale Definition schließt notwendigerweise Substanzen aus, die an eine extrazelluläre Domäne binden, die Rezeptoraktivierung jedoch nicht bewirken. Direkt gesagt sind nicht alle Substanzen, die fähig sind, Rezeptoren zu binden, Liganden, jedoch sind alle Liganden fähig an einen Rezeptor zu binden.

[0005] Wie oben erwähnt, wurde gefunden, dass Rezeptoren je nach Ligandenwechselwirkung eine nachweisbare biologische Aktivität besitzen. Die Aktivität ist allgemein eine enzymatische Aktivität und in der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert. Eine Gruppe Rezeptoren, die für diese Erfindung von Bedeutung sind, besitzen eine intrinsische Proteintyrosinkinase-(PTK-)Aktivität.

[0006] **Fig.** 1 zeigt eine schematische Darstellung mehrerer bekannter Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die eine PTK-Aktivität besitzen. Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit PTK-Aktivität oder Rezeptortyrosinkinasen (RT-

Ks) haben eine ähnliche molekulare Topologie. Alle besitzen eine große glycosylierte, extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine einzige hydrophobe Transmembranregion und eine zytoplasmatische Domäne, welche eine katalytische PTK-Domäne besitzt. Aufgrund ihrer Anordnung können RTKs als Membran-assoziierte allosterische Enzyme betrachtet werden. Anders als wasserlösliche allosterische Enzyme bestimmt die RTK-Topologie, dass die Ligandenbindungsdomäne und die PTK-Aktivität durch die Plasmamebran getrennt sind. Daher muss die Rezeptoraktivierung aufgrund der extrazellulären Ligandenbindung über die Membrangrenze übermittelt werden, um die intrazellulären Domänfunktionen zu aktivieren.

[0007] Auf Basis der Sequenzähnlichkeit und der deutlichen Struktureigenschaften ist es möglich, diese Rezeptoren in Unterklassen aufzuteilen (**Fig.** 1). Strukturelle Merkmalseigenschaften der vier Unterklassen umfassen zwei Cystein-reiche Wiederholungssequenzen in der extrazellulären Domäne der monomeren Rezeptoren der Unterklasse I, Disulfid-verknüpfte heterotetramere $\alpha_2\beta_2$-Strukturen mit ähnlichen Cystein-reichen Sequenzen in RTKs der Unterklasse II und fünf oder drei Immunoglobulin-ähnliche Wiederholungssequenzen in den extrazellulären Domänen der TRKs der Unterklasse III bzw. IV. Die Tyrosinkinasedomäne der zwei letzteren Unterklassen wird durch hydrophile Insertionssequenzen verschiedener Länge unterbrochen. Die Verfügbarkeit von RTK-cDNA-Klonen hat es ermöglicht, eine ausführliche Struktur/Funktions-Analyse der Wirkungsmechanismen der RTK-Familienmitglieder zu erstellen (zusammengefasst von Ullrich & Schlessinger, Cell 61:203–221 (1990)). Abschnitte und Beispiele, die auf flg Bezug nehmen, dienen nur der Veranschaulichung.

[0008] Diese Erfindung basiert auf der Entdeckung eines humanen Teil-cDNA-Klons eines fms-ähnlichen Gens (fms-like gene-flg), welches für eine Proteintyrosinkinase kodiert, deren Kinasedomäne an einer ähnlichen Stelle wie die Kinaseinserts der CSF-1- und PDGF-Rezeptortyrosinkinasen unterbrochen war (Ruta et al., Oncogene, 3:9–15 (1988)). Anschließend wurden Full-length-cDNAs vom Huhn-flg durch Klonieren mit flg-spezifischen Oligonukleotidproben (Lee et al., Science, 245:57–60 (1989)) sowie mit Hilfe von Antiphosphotyrosin-Antikörpern (Pasquale und Singer, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86:5449–5453 (1989)) isoliert. Flg ist ein FGF-Rezeptor, der auf vier Kriterien beruht: 1) der aus einem Hühnerembryoextrakt mittels Affinitätschromatographie auf immobilisiertem bFGF gereinigte Rezeptor ist das flg-Produkt aus Huhn, 2) flg-Anti-Peptid-Antiserum immunopräzipitiert [^{125}I]aFGF, welches mit Protein von 130 und 150 kDa in A204-Rhabdomyosarcomazellen vernetzt ist, 3) flg-Anti-Peptid-Antiserum immunopräzipitiert Proteine mit ähnlicher Größe, welche bei der Behandlung lebender Zellen mit aFGF oder bFGF am spezifisch am Tyrosin phosphoryliert werden, und 4) Proteine mit 130 und 150 kDa immunopräzipitierten mit flg-Anti-Peptid-Antiserum aus mit aFGF behandelten Zell-Lysaten, welche in vitro einer Tyrosinphosphorylierung unterliegen.

[0009] Ein putativer zweiter FGF-Rezeptor ist das bakteriell exprimierte Maus-Kinase- (bek) Genprodukt, von dem man einen Teilklon durch Screenen einer Maus-Leber-cDNA-Expressionsbank mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern gewonnen hat (Kornbluth et al., Mol. Cell. Biol., 8:5541–5544 (1988)). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des bek-Teilklons und der entsprechende Bereich von flg sind 85% identisch. Dennoch war es unklar, ob bek das Maushomolog des humanen flg-Gens darstellt oder ein anderes nah verwandtes Gen. Diese Erfindung stellt Full-length-cDNA-Klone für sowohl humanes bek als auch flg sowie deren vollständige abgeleitete Aminosäuresequenzen bereit und zeigt in transfizierten Zellen, dass sowohl bek als auch flg aFGF, bFGF und k-FGF spezifisch und mit hoher Affinität binden.

[0010] Die Rezeptorfunktion rückt zunehmend in den Mittelpunkt von Versuchen zur rationalen Gestaltung von Wirkstoffen. Moleküle, die die Rezeptor-Liganden-Bindung, die Rezeptor-Aktivierung und/oder die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor und dem intrazellulären Ziel beeinflussen, sind alles potentielle Kandidaten für therapeutische Mittel. Das Screening im großen Maßstab ist durch herkömmliche Verfahren, in denen Probewirkstoffe auf isolierten Zellen oder Gewebeexplanaten getestet werden, beschränkt. Gewebeproben oder isolierten Zellen, welche die Zielrezeptoren enthalten, sind teuer in der Beschaffung, liegen in begrenzter Menge vor und lassen sich schwierig in einem funktionsfähigen lebenden Zustand halten. Ferner ist es offen schwierig, die Wirkstoffkandidaten in verlässlicher und reproduzierbarer Weise an die Gewebeproben zuzugeben. Screening-Assays mit Primärexplantaten in Gewebekultur werden in größerem Maßstab einsetzen, als es bei Gewebeproben möglich ist. Dennoch ist es schwieriger, die physiologische Wirkung zu untersuchen, und die Assays unterliegen Schwankungen mit vielen Ursachen, z. B. den Kulturmedium- oder Kultivierungsbedingungen. Schließlich haben Assays mit aus natürlichen Materialien isolierten Rezeptoren den Nachteil, dass der Rezeptor der natürlichen Variabilität unterliegt und geeignete natürliche Quellen nicht immer erhältlich sind. Es ist hier eine Aufgabe, Rezeptormoleküle in einer Form bereitzustellen, die man für Großmaßstabs-Screening-Protokolle anpassen kann.

Zusammenfassung der Erfindung

[0011] Die Erfindung betrifft ein Rezeptorprotein oder Fragment davon in isolierter Form, das eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinaseinsert, eine Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen enthält, sowie aktive Äquivalente davon.

[0012] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine isolierte DNA-Sequenz, welche für ein Rezeptorprotein oder Fragmente davon kodiert, wobei das Protein eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinaseinsert, eine einzelne Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen enthält, sowie biologische Äquivalente davon.

[0013] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist ein Vektor, welcher eine für ein Rezeptorprotein kodierende cDNA enthält, wobei das Protein eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinaseinsert, eine einzige Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen umfasst.

[0014] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit dem oben beschriebenen Vektor transformiert ist.

[0015] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist eine therapeutische Zusammensetzung, welche die extrazelluläre Domäne eines humanen Rezeptorproteins oder Fragmente davon umfasst, die oder das eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinase-Insert, eine einzige Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen enthält, und zwar in einer wirksamen Menge, um ungewünschte, durch den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor vermittelte zelluläre Antworten zu hemmen, sowie ein pharmazeutisch annehmbarer Träger.

[0016] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine therapeutische Zusammensetzung, umfassend die extrazelluläre Domäne eines humanen Rezeptorproteins oder ein Fragment davon, die oder das eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinaseinsert, eine einzige Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulinähnlichen Wiederholungssequenzen in einer wirksamen Menge umfasst, um die Bindung eines opportunistischen Pathogens an humane Zellen, die dieses Rezeptorprotein aufweisen, zu hemmen, sowie ein pharmazeutisch annehmbarer Träger.

[0017] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einer Erkrankung, die durch eine ungewünschte, durch den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor vermittelte zelluläre Antwort gekennzeichnet ist, wobei einem solchen Patienten eine wirksame Menge der Zusammensetzung aus Anspruch 16 verabreicht wird.

[0018] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist ein Verfahren zur Behandlung eines unter einer Infektion eines opportunistischen Pathogens leidenden Patienten, wobei das Pathogen fähig ist, an einen Heparin-bindenden Wachstumsfaktor-Rezeptor zu binden, wobei man dem Patienten eine wirksame Menge der Zusammensetzung aus Anspruch 18 verabreicht.

[0019] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen, welche die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Bindung an zelluläre Rezeptoren hemmen, umfassend die Schritte:

(a) Inkubieren des Wirkstoffs mit Wirtszellen, die fähig sind, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Gegenwart eines Fibroblasten-Wachstumsfaktors zu überexprimieren, und

(b) Messen der Fähigkeit des Wirkstoffs die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Bindung zu hemmen.

[0020] Ein letzter Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen, welche die Bindung opportunistischer Pathogene an Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren hemmen, umfassend die Schritte:

(a) Inkubieren des Wirkstoffs mit Wirtszellen, die fähig sind, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Gegenwart des Pathogens zu überexprimieren, und

(b) Messen der Fähigkeit des Wirkstoffs die Pathogen-Bindung zu hemmen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0021] **Fig.** 1 zeigt eine schematische Darstellung der Rezeptortyrosinkinase-Unterklassen.

[0022] **Fig.** 2 zeigt die Aminosäuresequenzen und strukturellen Ähnlichkeiten von humanem und bek.

A) Die Aminosäuresequenzen von humanem flg und bek, wie von den cDNA-Klonen abgeleitet, sind gezeigt. Von der bek-Sequenz sind nur die Reste gezeigt, die sich von denen in flg unterscheiden. Die durchgezogenen Linien über den Buchstaben markieren das vermutete Signalpeptid und die Transmembransequenzen, während die gestrichelten Linien über den Buchstaben die Kinaseinsertregion markiert. Ein ausgefüllter Punkt wurde über konservierte Cysteinreste gesetzt, welche Ig-ähnliche Domänen definieren. Auf dem Kopf stehende Dreiecke wurden über potentielle Asn-verknüpfte Glycosylierungsstellen gesetzt. Die offenen Klammern umschließen die „saure Box" und die gegenüberstehenden Pfeile zeigen die Tyrosinkinasedomäne.

B) Das Ausmaß der Aminosäureidentität zwischen den verschiedenen Regionen der humanen bek- und flg-Proteine ist dargestellt. Die ausgefüllte blockartigen Kästchen zeigen die geteilten zytoplasmatische Kinasedomänen und die Schleifen zeigen die extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen. Die Nukleotidsequenzen wurden an die EMBL-Datenbank verschickt. Die Hinterlegungsnummern X52832 und X52833 wurden den humanen bek- bzw. flg-cDNAs zugeordnet.

[0023] **Fig.** 3 zeigt einen Nothern-Blot, der die Expression von flg- und bek-mRNA nachweist.

[0024] Vier µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Zell-Linien wurden im Northern-Blot auf die Expression von flg (Feld A) oder bek (Feld B) analysiert. Eine Darstellung eines Autoradiograms der erhaltenen Blots ist gezeigt. Die RNAs stammten von den Zell-Linien: A204 Rhabdomyosarcoma (Bahn 1); U563 Glioblastoma (Bahn 2); HUVEC (Bahn 3); NTERA-2 Teratocarcinoma (Bahn 4).

[0025] **Fig.** 4 zeigt die metabolische Markierung von flg- und bek-überexpremierenden Zell-Linien mit [^{35}S]-Methionin.

[0026] NFlg26-, NBek8- und NNeo4-Kontrollzellen wurden mit [^{35}S]-Methionin in Gegenwart (Bahn 2, 4, 6, 8) oder in Abwesenheit (Bahn 1, 3, 5, 7) von Tunicamycin, wie in Beispiel II beschrieben, markiert. Die Zell-Lysate wurden mit Anti-flg-1 (Bahn 1–4) oder Anti-bek-1 (Bahn 5–8) immunopräzipitiert und einer SDS-PAGE und Autoradiographie unterworfen. Eine Darstellung des erhaltenen Autoradiogramms ist gezeigt. Die Lysate stammten von: Neo-4-Kontrollzellen (Bahn 1, 2, 5, 6); Flg-26-Zellen (Bahn 3, 4); Bek-8-Zellen (Bahn 7, 8). Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind angezeigt. Nach Immunopräzipitation in Gegenwart des entsprechenden antigenen Peptids verschwand die Präzipitation der flg- und bek-spezifischen Proteine vollständig (Daten sind nicht gezeigt).

[0027] **Fig.** 5 zeigt die Vernetzung von [^{125}I]FGFs an flg- und bek-überexprimierende Zellen.

A) [^{125}I]aFGF (Bahn 1–3) und [^{125}I]bFGF (Bahn 4–6) wurden kovalent an Monoschichten von NFlg26- (Bahn 3, 6), NBek8- (Bahn 3, 6) und NNeo4-Kontroll(Bahn 1, 4) Zellen, wie in Beispiel III beschrieben, gebunden. Die Zellen wurden dann lysiert, einer SDS-PAGE unterworfen und das Gel wurde einem Röntgenfilm ausgesetzt. Eine Darstellung des erhaltenen Autoradiograms ist gezeigt.

B) [^{125}I]aFGF (Bahn 1–3) und [^{125}I]kFGF (Bahn 4–6) wurden kovalent an Einfachschichten von Nneo4 (Bahn 1, 4), NFlg26 (Bahn 2, 5) und Nbek13 (Bahn 3, 6) gebunden und wie in **Fig.** 5A analysiert.

[0028] **Fig.** 6 zeigt eine Scatchard-Analyse der FGF-Bindung an flg- und bek-überexprimierende Zell-Linien.

A) Eine Sättigungsbindungsanalyse von [^{125}I]aFGF (□–□) und [^{125}I]bFGF (o---o) an flg26- (Feld A) und bek8- (Feld B) Zellen wurde, wie in Beispiel III dargestellt, durchgeführt. Die Hintergrundwerte in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses einer der Liganden betrug an jedem Punkt weniger als 10 % der Gesamt-cpm. Der Maßstab der Scatchard-Analyse ist in beiden Feldern gleich.

B) Sättigungsbindungsanalyse von [^{125}I]kFGF an flg26 (Feld A) und bek13 (Feld B). Die Analyse erfolgte wie in **Fig.** 6A.

[0029] **Fig.** 7 zeigt die vollständige Nukleotid- und Aminosäuresequenz von

[0030] **Fig.** 8 zeigt die vollständige Nukleotid- und Aminosäureasequenz von bek.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0031] Wie hier verwendet, haben die folgenden Begriffe nachstehende Bedeutung:

[0032] Nukleotid – Eine monomere DNA- oder RNA-Einheit, bestehend aus einer Zuckereinheit (Pentose), einem Phosphat und einer stickstoffhaltigen heterocyclischen Base. Die Base ist über ein glycosidischen Kohlenstoff an die Zuckereinheit gebunden (1'-Kohlenstoff der Pentose) und die Kombination aus Base und Zucker wird Nukleosid genannt. Die Base kennzeichnet das Nukleosid. Die vier DNA-Basen sind Adenin („A"), Guanin („G"), Cytosin („C") und Thymin („T"). Die vier RNA-Basen sind A, G, C und Uracil („U").

[0033] DNA-Sequenz – Eine lineare Reihe miteinander über Phosphodiester-Bindungen zwischen den 3'- und 5'-Kohlenstoffen neben der Pentose verbundene Nukleotide.

[0034] Heterologe DNA ist DNA, welche man in einen Wirtsorganismus einführen kann, wobei die DNA aus einer Quelle stammt, die normalerweise keine DNA mit diesem Wirt austauscht; z. B. humane DNA wird zum Transformieren von E. coli verwendet.

[0035] Kodon – Eine DNA-Sequenz aus drei Nukleotiden (ein Triplet), welches mittels mRNA für eine Aminosäure, ein Translationsstartsignal oder ein Translationsterminationssignal kodiert. Die DNA-Nukleotid-Triplets TTA, TTG, CTT, CTC, CTA und CTG kodieren für die Aminosäure Leucin („Leu"), TAG, TAA und TGA sind Translationsstoppsignale und ATG ist ein Translationsstartsignal.

[0036] Leserahmen – Die Gruppierung von Kodons während der Translation von mRNA in Aminosäuresequenzen. Während der Translation muss der richtige Leserahmen beibehalten werden. Die DNA-Sequenz GCTGGTTGTAAG kann theoretisch in drei Leserahmen oder Phasen exprimiert werden, die jeweils zu einer anderen Aminosäuresequenz führen:

GCT GGT TGT AAG –Ala-Gly-Cys-Lys

G CTG GTT GTA AG-Leu-Val-Val

GC TGG TTG TAA G—Trp-Leu-(STOP)

[0037] Es kodiert jedoch nur einer der obigen Leserahmen für die richtige genetische Information. Das Trans-

lationsstartsignal wird vom Ribosom und von Initiationshilfsfaktoren erkannt, um den richtigen Leserahmen festzusetzen.

[0038] Polypeptid – Eine lineare Reihe miteinander über Peptidbindungen zwischen den α-Amino- und Carboxygruppen benachbarter Aminosäuren verbundener Aminosäuren.

[0039] Genom – Die gesamte DNA einer Zelle oder eines Virus. Es umfasst unter anderem die Strukturgene, welche für einzelne Polypeptide kodieren, sowie regulatorische Sequenzen, wie einen Operator, Promotor und Ribosomenbindungs- und Wechselwirkungssequenzen, einschließlich Sequenzen wie die Shine-Dalgarno-Sequenzen.

[0040] Strukturen – Eine DNA-Sequenz, welche mittels ihres Templats oder ihrer Messenger-RNA („mRNA") für eine Aminosäuresequenz kodiert, die für ein spezifisches Polypeptid charakteristisch ist. Strukturgene können auch RNAs als Primärprodukt besitzen, wie Transfer-RNAs (tRNAs) oder ribosomale RNAs (rRNAs).

[0041] Transkription – Das Verfahren zur Erzeugung von RNA aus einem Strukturgen.

[0042] Translation – Das Verfahren zur Erzeugung eines Polypeptids aus mRNA.

[0043] Expression – Das Verfahren, welches von einem Strukturgen durchlaufen wird, um ein Produkt zu erzeugen. Im Fall eines Proteinprodukts ist dies eine Kombination aus Transkription und Translation.

[0044] Plasmid – Eine nicht-chromosomale doppelsträngige DNA-Sequenz, welche ein intaktes „Replicon" enthält, so dass das Plasmid in einer Wirtszelle repliziert wird. Wird das Plasmid in einen einzelligen Organismus eingeführt, können die Eigenschaften des Organismus durch die DNA des Plasmids verändert oder transformiert werden. Ein Plasmid mit dem Gen für die Tetracyclinresistenz (Tet^R) transformiert beispielsweise eine zuvor gegenüber Tetracyclin empfindliche Zelle zu einer gegen Tetracyclin-resistenten Zelle. Eine Zelle, die durch ein Plasmid transformiert wurde, wird „Transformant" genannt.

[0045] Phage oder Bakteriophage – Bakterielle Viren, von denen viele aus DNA-Sequenzen bestehen, die in einem Proteinmantel oder einer Proteinhülle („Capsid") eingeschlossen sind.

[0046] Klonierungsvehikel – Ein Plasmid, Phagen-DNA oder andere DNA-Sequenzen, welche sich in einer Wirtszelle vervielfachen können, gekennzeichnet durch eine oder eine kleine Anzahl Endonuklease-Erkennungsstellen, an denen solche DNA-Sequenzen in bestimmter Weise für die Insertion heterologer DNA geschnitten werden können, ohne dass eine wesentliche biologische Funktion der DNA verloren geht, z. B. die Replikation, die Produktion von Hüllproteinen oder der Verlust der Expressionskontrollregionen, wie Promotoren oder Bindungsstellen, und welche einen selektierbaren Genmarker enthalten, der geeignet ist zum Nachweis transformierter Zellen, z. B. eine Tetracyclin- oder Ampicillinresistenz. Ein Klonierungsvektor wird häufig Vektor genannt.

[0047] Klonierung – Das Verfahren zur Gewinnung einer Population von Organismen oder DNA-Sequenzen, die von einem solchen Organismus oder einer solchen Sequenz stammen, durch die asexuelle Reproduktion oder DNA-Replikation.

[0048] Replikon – DNA, die zur Replikation eines bestimmten Organismus benötigt wird, einschließlich eines Replikationsursprungs.

[0049] Rekombinantes DNA-Molekül – Ein Molekül, welches aus DNA-Segmenten verschiedener Genome besteht, die jeweils mit den Enden aneinander gefügt wurden und die Fähigkeit besitzen, einige Wirtszellen zu infizieren und darin enthalten zu bleiben.

[0050] Expressions-Kontroll-Sequenz – Eine Sequenz aus Nukleotiden, welche die Expression von Strukturgenen kontrolliert und reguliert, wenn sie operativ an diese Gene geknüpft ist. Diese umfassen das lac-System, Hauptoperator- und Promotorbereiche des Phagen Lambda, die Kontrollregion viraler Hüllproteine und weitere Sequenzen, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen prokaryotischer und eukaryotischer Zellen und deren Viren kontrollieren.

[0051] Mutation – Eine vererbbare Veränderung der genetischen Information eines Organismus.

[0052] Mutant – Ein Organismus, der eine Mutation enthält. Im allgemeinen exprimiert dieser einen unterscheidbaren Phenotyp im Vergleich zu einem üblichen Bezugsstamm derart, zu dem der Organismus gehört, oder einer Wildtyp-Population dieses Organismus.

[0053] Wie hier verwendet stehen bek und für Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Fragmente davon, die von Zell- oder Zell-freie-Kultursysteme erzeugt wurden, und zwar in biologisch aktiver Form mit der Fähigkeit, das Zellwachstum, die Differenzierung und die in vitro-Antwort ebenso zu beeinflussen wie natives bek und flg.

[0054] Verschiedene Allele von bek und können in der Natur vorkommen. Diese Variationen lassen sich durch Unterschiede in der Nukleotidsequenz des für Proteine mit identischer biologischer Funktion kodierenden Strukturgens kennzeichnen. Es ist möglich, Analoge mit einzelnen oder mehreren Aminosäuresubstitutionen, -deletionen, -additionen oder -austauschen herzustellen.

[0055] Die hier verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Aminosäure-Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
B	Asx	Asp oder Asn, nicht unterschieden
Z	Glx	Glu oder Gln, nicht unterschieden
X	X	Unbestimmte oder atypische Aminosäure

[0056] Der Einfachheit halber lässt sich die Erfindung anhand dreier separater, jedoch miteinander verwandter Ausführungsformen betrachten. Eine erste Ausführungsform umfasst das Klonieren und Identifizieren der Full-length-cDNAs, welche für humanes bek-Rezeptorprotein kodieren. Eine zweite Ausführungsform betrifft die Expression humaner bek-Genprodukte in rekombinanten Wirtszellen und eine dritte Ausführungsform betrifft die Verwendung der auf rekombinante Weise gewonnenen Produkte, unter anderem zur bek-Rezeptoranalyse und zum Wirkstoff-Screenen.

Klonierung von humanem flg und bek

[0057] Rekombinante DNA-Techniken sind allgemein bekannt; (siehe: Methods in Enzymology, (Academic Press, New York, Band 65 und 68 (1979); 100 und 101 (1983)) und darin zitierte Referenzen. Eine ausführliche technische Erörterung der meisten üblicherweise verwendeten rekombinanten DNA-Verfahren findet man in Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982) sowie in Current Protocols in Molecular Biology, Band I und II, Ausubel et al., Herausgeber, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987). Für verschiedene Polypeptide kodierende Gene können durch Einbringen eines DNA-Fragments, welches für das Polypeptid kodiert, in ein rekombinantes DNA-Vehikel, z. B. bakterielle oder virale Vektoren, und Transformieren eines geeigneten Wirts kloniert werden. Dieser Wirt ist üblicherweise ein Escherichia coli-E. coli) Stamm, je nach gewünschtem Produkt können jedoch auch eukaryotische Wirte verwendet werden. Klone, welche die rekombinanten Vektoren enthalten, werden isoliert und können hochgezogen werden und zur Herstellung des gewünschten Polypeptids im Großmaßstab verwendet werden.

[0058] Mehrere Arbeitsgruppen haben Gemische aus Messenger-RNA (mRNA) aus eukaryotischen Zellen

isoliert und eine Reihe enzymatischer Reaktionen eingesetzt, um doppelsträngige DNA-Kopien zu synthetisieren, welche zu diesem mRNA-Gemisch komplementär sind; (Wewer et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 83:7137–7141 (1986)). In der ersten Reaktion wird mRNA durch eine RNA-gerichtete DNA-Polymerase, auch Reverse Transkriptase genannt, zu einer einzelsträngigen komplementären DNA (cDNA) transkribiert. Reverse Transkriptase synthetisiert DNA in 5'-3'-Richtung, wobei Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate als Vorläufer verwendet werden und sowohl ein Templat als auch ein Primerstrang benötigt wird; der letztere muss dabei ein freies 3'-Hydroxylende aufweisen. Reverse Transkriptase-Produkte, sowohl partielle als auch vollständige Kopien des mRNA-Templats, besitzen häufig kurze, teilweise doppelsträngige Haarnadeln („Schleifen") am 3'-Ende. In der zweiten Reaktion werden diese „Haarnadel-Schleifen" als Primer für DNA-Polymerasen verwendet. Vorgebildete DNA wird sowohl als Templat als auch als Primer für die Wirkung der DNA-Polymerase benötigt. Die DNA-Polymerase benötigt das Vorliegen eines DNA-Strangs mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe, an die neue Nukleotide angefügt werden können, um die Kette in 5'-3'-Richtung zu verlängern. Die Produkte solcher sequentiellen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-Reaktionen besitzen weiterhin eine Schleife an einem Ende. Der so gebildete Apex der Schleife oder der „Scheitelpunkt" der doppelsträngigen DNA ist im wesentlichen ein einzelsträngiges Segment. In der dritten Reaktion wird dieses einzelsträngige Segment mit der Einzelstrang-spezifischen Nuklease S1 geschnitten, um ein „stumpf-endiges", doppelsträngies DNA-Segment zu erzeugen. Dieses allgemeine Verfahren wird auf jedes mRNA-Gemisch angewendet und wurde beschrieben von Buell et al., J. Biol. Chem., 253:2483 (1978).

[0059] Das erhaltene doppelsträngige cDNA-Gemisch (ds-cDNA) wird durch eines der vielen bekannten Verfahren, zumindest teilweise abhängig von dem jeweils verwendeten Vehikel, in Klonierungsvehikel eingebracht. Verschiedene Insertionsverfahren sind in erheblicher Ausführlichkeit in Methods in Enzymologz, 68:16–18 (1980) und den darin zitierten Referenzen beschrieben.

[0060] Sobald die DNA-Segmente eingefügt sind, wird das Klonierungsvehikel zur Transformation eines geeigneten Wirts verwendet. Diese Klonierungsvehikel verleihen dem Wirt üblicherweise eine Antibiotikaresistenz. Solche Wirte sind allgemein prokaryotische Zellen. Zu diesem Zeitpunkt enthalten nur wenige der transformierten oder transfizierten Wirte die gewünschte cDNA. Die Summe aller transformierten oder transfizierten Wirte stellt eine Gen-„Bank" dar. Die Gesamt-ds-cDNA-Bank, die durch dieses Verfahren erzeugt wird, stellt eine repräsentative Probe der in dem als Ausgangsmaterial verwendeten mRNA-Gemisch vorliegenden kodierenden Information bereit.

[0061] Falls eine geeignete Oligonukleotidsequenz vorliegt, kann man sie wie folgt zur Identifizierung der gewünschten Klone verwenden. Einzelne transformierte oder transfizierte Zellen werden als Kolonien auf einem Nitrozellulosefilterpapier hochgezogen. Diese Kolonien werden lysiert; die freigesetzte DNA bindet beim Erwärmen fest an das Filterpapier. Das Filterpapier wird dann mit einer markierten Oligonukleotidsonde, welche komplementär zu dem gesuchten Strukturgen ist, inkubiert. Die Sonde hybridisiert mit der zu ihr komplementären cDNA und wird mittels Autoradiographie nachgewiesen. Die entsprechenden Klone werden charakterisiert, um einen oder eine Kombination aus Klonen, welche die gesamte strukturelle Information des gesuchten Proteins enthalten, zu identifizieren. Die für das gesuchte Protein kodierende Nukleinsäuresequenz wird isoliert und wieder in einen Expressionsvektor eingefügt. Der Expressionsvektor bringt das klonierte Gen unter die regulatorische Kontrolle spezifischer prokaryotischer oder eukaryotischer Kontrollelemente, welche die wirksame Expression (Transkription und Translation) der ds-cDNA ermöglichen. Daher ist dieses allgemeine Verfahren nur auf solche Proteine anwendbar, bei denen wenigstens ein Teil ihrer Aminosäure- oder DNA-Sequenz bekannt und eine Oligonukleotidsonde erhältlich ist; siehe allgemein Maniatis et al., wie oben.

[0062] Vor kurzem wurden Verfahren entwickelt, mit denen man spezifische Klone nachweisen kann, indem man bakterielle Kolonien der Phagenplaques mit für das kodierte gesuchte Protein spezifischen Antikörpersonden durchsucht. Dieses Verfahren kann nur mit „Expressionsvektor"-Klonierungsvehikeln verwendet werden, da das Proteinprodukt bearbeitet werden muss. Das Strukturgen wird im Vektor neben den regulatorischen Gensequenzen, die die Expression des Proteins kontrollieren, eingefügt. Die Zellen werden lysiert, entweder durch chemische Verfahren oder durch eine von der Wirtszelle oder dem Vektor bereitgestellte Funktion, und das Protein wird durch einen spezifischen Antikörper und ein Nachweissystem, wie ein Enzymimmunoassay, nachgewiesen. Ein Beispiel dafür ist das von Young and Davis, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 80:1194–1198 (1983) und Young and Davis, Science, 222:778 (1983) beschriebene λgt_{11}-System.

[0063] Wie oben erwähnt, war ein Teil des cDNA-Klons von humanem aus vorherigen Arbeiten des Erfinders bekannt. Die anschließende Nukleotidsequenzanalyse des ursprünglichen humanen flg-Teil-cDNA-Klons C51 sowie mehrerer weiterer unabhängiger Isolate zeigte, dass alle Teilklone die identische 5'-Sequenz aufwiesen, welche einer gespaltenen, natürlich vorkommenden EcoRI-Stelle entsprach. Dies spricht dafür, dass man bei der Konstruktion der cDNA-Bank diese EcoRI-Stelle vor dem Spalten mit EcoRI nicht durch EcoRI-Methylase geschützt hat. Es wurde daher argumentiert, dass das 5'-Ende der flg-cDNA auf einem unabhängig klonierten, nicht-überlappenden EcoRI-Fragment liegt. Das Träger-gebundene Polymerase-Kettenreaktions-(PCR)-Verfahren (Loh et al., Science, 243:217–220 (1989)) wurde verwendet, um dies zu bestätigen und um weitere 170 Basenpaare (bp) der stromaufwärts von der internen EcoRI-Stelle liegenden flg-Nukleotidsequenz zu erhalten.

Eine zweite Runde der PCR-Reaktionen mit den Primern in dieser neuen Sequenz zusammen mit λgt_{11}-Arm-spezifischen Oligonukleotidprimern amplifizierte das Insert eines 5'-flg-Klons aus der gleichen HUVEC-cDNA-Bank. Da PCR-erzeugte Sequenzmutationen gelegentlich auftreten, wurde dieses zweite PCR-Produkt radioaktiv markiert und als Sonde zum erneuten Screenen der HUVEC-cDNA-Bank in λgt_{11} verwendet. Ein 700-bp-Klon, der von der internen EcoRI-Stelle bis in die 5'-untranslatierte Region reichte, wurde gewonnen. Die vollständige abgeleitete Aminosäuresequenz von humanem flg ist in **Fig.** 2A gezeigt.

[0064] Die veröffentlichten Sequenzen des Maus-bek-cDNA-Klons und des humanen flg-cDNA-Klons (Kornbluth et al., 1988, siehe oben; Ruta et al., 1988, siehe oben) sind hoch homolog mit wesentlichen Abweichungen nur in dem Kinaseinsert (50% Identität) und dem COOH-Terminus. Obwohl man die kleinen Sequenzunterschiede den Abweichungen unter den Arten zuschreiben kann wurde beobachtet, dass die viel größeren Kinaseinserts der humanen und Maus-PDGF-Rezeptoren (B-Typ) 85% identisch waren (Yarden et al., Nature, 323:226–232 (1986); Claesson-Welsh et al., Mol. Cell. Biol., 8:3476–3486 (1988)), was dafür spricht, dass bek in der Tat ein anderes Genprodukt ist als flg. Um bek zu klonieren, wurde eine humane Hirnstamm-cDNA-Bank in λgt_{11} mit einem radioaktiv markierten, 33 Basen langen Oligonukleotid gescreent, welches den 11 COOH-terminalen Kodons von Maus-bek entsprach (Kornbluth et al., 1988, siehe oben). Dies entspricht dem längsten Abschnitt ohne Identität zwischen den veröffentlichten bek- und flg-Sequenzen. 32 Klone wurden nachgewiesen, wobei einer davon, bek5, welcher ein 3,2-kb-cDNA-Insert enthielt, sequenziert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte deutlich, dass er sehr ähnlich, jedoch verschieden von flg war und dass ihm etwa 25 bp der Signalpeptidsequenz, einschließlich dem Translations-initiierendem ATG, fehlten. Überlappende Klone wurden durch erneutes Screenen der Hirnstammbank mit einem 750-bp-cDNA-Fragment, welches dem 5'-Bereich von bek5 entsprach, gewonnen. Die vollständige abgeleitete Aminosäuresequenz von humanem bek ist in **Fig.** 2A gezeigt. Die spezifischen Einzelheiten der flg- und bek-Klonierung erscheinen in Beispiel I.

[0065] Flg und bek sind ähnliche, jedoch voneinander verschiedene Genprodukte (**Fig.** 2B) mit den gemeinsamen Strukturmerkmalen der PDGF/CSF-1/c-kit-Familie der Rezeptor-gekoppelten Tyrosinkinasen (Ullrich und Schlessinger, 1990, siehe oben). Ihre kodierenden Sequenzen bestehen aus einer hydrophoben Signalpeptidsequenz aus 21 Aminosäuren, einer extrazellulären Domäne aus 356 (bek) und 355 (flg) Aminosäuren, einer Transmembrandomäne aus 21 Aminosäuren und einer cytoplasmatischen Domäne aus 423 (bek) und 425 (flg) Aminosäuren. Die extrazellulären Domänen von flg und bek enthalten 3 „Immunoglobulin-ähnliche" (Ig) Domänen mit ähnlicher Größe und Lokalisierung. Interessanterweise ist die Aminosäuresequenzidentität in und um die ersten Ig-Domänen herum viel geringer (43%) als in und um die zweiten und dritten Ig-Domänen herum (74%). Acht potentielle N-gebundene Glycosylierungsstellen befinden sich an identischen Positionen in den extrazellulären Domänen von flg und bek. Flg enthält eine zusätzliche N-gebundene Glycosylierungsstelle bei Aminosäure 185. Lee et al. (1989) haben einen Bereich in der extrazellulären Domäne vom Huhn-flg mit acht benachbarten sauren Aminosäuren beobachtet. Diese „saure Box" kommt auch in humanem flg und humanem bek vor und besteht aus 8 bzw. 5 sauren Resten. Die zytoplasmatischen Domänen von bek und flg bestehen aus langen Membran-anliegenden Bereichen und daran anschließenden konservierten katalytischen Kinasedomänen, die durch 14 Aminosäure-Insertionen getrennt sind. Auf die Kinasedomänen folgen abweichende Carboxyendständige Schwänze. Die Gesamtidentität zwischen bek und flg beträgt 71%, wobei die Region mit der höchsten Identität (88%) die Kinasedomäne ist.

[0066] Die flg- und bek-mRNA-Expression in verschiedenen Zell-Linien wurde durch Northern-Blot-Analyse mit bek- und flg-cDNA-Sonden bestimmt, welche einem Teil ihrer nicht-homologen 3'-untranslantierten Bereiche entsprachen. In A204-Rhabdomyosarcomazellen wurden zwei flg-Transkripte mit etwa 4,3 und 4,2 kb beobachtet, bek-mRNA war jedoch nicht nachweisbar (**Fig.** 3). HUVEC- und humane Teratocarcinoma-NTERA2-Zellen exprimieren einzigartig die 4,2 bzw. 4,3-kb-flg-Transkripte. Die Signifikanz der bestimmten 4,3- und 4,2-kb-flg-Transkripte ist derzeit nicht bekannt. Sie können mit isolierten flg-Klonen verwandt sein, denen im Vergleich zu **Fig.** 2A und 2B die aminoterminale Cysteinschleife der extrazellulären Domäne fehlt. Ein 4,4-kb-bek-Transkript wurde nur in der Teratocarcinoma-Zell-Linie beobachtet. In weiteren Arbeiten wurde gezeigt, dass bek-mRNA in Leber, Lunge, Hirn und Niere adulter Mäuse exprimiert wird, nicht jedoch im Herz und der Milz (Kornbluth et al., 1988, siehe oben). Das flg-Protein aus Huhn wurde im embryonalen Darm, Gehirn, Muskelmagen, Herz, Skelettmuskel und Fibroblasten gefunden, jedoch nur im Gehirn adulter Hühner (Pasquale und Singer, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86:5449–5453 (1989)). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass bek und flg nicht in koordinierter Weise exprimiert werden.

Expression von flg und bek in rekombinanten Zellen

[0067] Die flg- und bek-ds-cDNAs können durch eines der vielen bekannten Verfahren in Expressionsvektoren eingefügt werden. Allgemein sind diese Verfahren zu finden in Maniatis et al. (1982), siehe oben und Ausubel, et al. (1987), siehe oben. Im allgemeinen wird der Vektor durch wenigstens eine Restriktionsendonuklease linearisiert, wodurch wenigstens zwei stumpfe oder klebrige Enden entstehen. Die ds-cDNA wird in die Vektorinsertionsstelle ligiert oder an diese angefügt.

[0068] Werden prokaryotische Zellen oder andere Zellen, die wesentliches Zellwandmaterial enthalten, verwendet, ist das häufigste Transformationsverfahren mit dem Expressionsvektor die Calciumchloridvorbehandlung, wie beschrieben von Cohen R. N. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 69:2110 (1972). Werden Zellen ohne Zellwandgrenzen als Wirtszellen verwendet, wird die Transfektion durch das von Graham und Van der Eb, Virology, 52:456 (1973) beschriebene Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren durchgeführt. Weitere Verfahren zur Einführung von DNA in Zellen, wie die Kerninjektion, virale Infektion, Elektroporation oder Protoplastenfusion, können erfolgreich verwendet werden. Die Zellen werden dann auf selektivem Medium kultiviert und Proteine, für die die Expressionsvektoren kodieren, werden erzeugt.

[0069] „Expressionsvektoren" bezieht sich auf Vektoren, welche fähig sind, darin enthaltene DNA-Sequenzen zu transkribieren und translatieren, wobei solche Sequenzen an weitere regulatorische Sequenzen geknüpft sind, die ihre Expression beeinflussen können. Diese Expressionsvektoren müssen in den Wirtsorganismen oder -systemen entweder als Episomen, Bakteriophagen oder als integraler Teil der chromosomalen DNA replizierbar sein. Eine Form von Expressionsvektoren sind Bakteriophagen, welches Viren sind, die normalerweise Bakterien enthalten und replizieren. Besonders gefragte Phagen für diesen Zweck sind die λgt_{10}- und λgt_{11}-Phagen, welche von Yound und Davis, siehe oben, beschrieben sind. λgt_{11} ist ein allgemeiner rekombinanter DNA-Expressionsvektor, der durch die eingefügte DNA fähig ist, spezifizierte Polypeptide zu erzeugen.

[0070] Um bei der Induktion mit einem synthetischen Analog von Lactose (IPTG) den Abbau zu minimieren, werden fremde Proteine oder Teile davon synthetisiert, die an die prokaryotische Protein-β-Galactosidase gebunden sind. Die Verwendung von Wirtszellen mit fehlerhaften Protein-Abbauwegen kann auch die Lebensdauer der neuen Proteine, die von den induzierten λgt_{11}-Klonen hergestellt werden, verlängern. Die richtige Expression fremder DNA in λgt_{11}-Klonen wird von der richtigen Orientierung und dem Leserahmen der eingefügten DNA in Bezug auf den β-Galactosidasepromotor und das Translations-Initiationskodon abhängen.

[0071] Eine weitere Form eines Expressionsvektors, der für rekombinante DNA-Verfahren geeignet ist, ist das Plasmid – eine kreisförmige, nicht-integrierte (extra-chromosomale) doppelsträngige DNA. Jede andere Form eines Expressionsvektors, die eine gleichwertige Funktion bereitstellt, eignet sich für die Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren. Hier beschriebene rekombinante Vektoren und Verfahren eignen sich zur Verwendung in Wirtszellen, die einen breiten Bereich prokaryotischer und eukaryotischer Organismen abdecken. Prokaryotische Zellen werden für die Klonierung von DNA-Sequenzen und zur Konstruktion von Vektoren bevorzugt. Der E. coli-K12-Stamm HB101 (ATCC Nr. 339694) ist beispielsweise besonders nützlich. Natürlich können weitere mikrobielle Stämme verwendet werden. Vektoren mit Replikations- und Kontrollsequenzen, die von mit der Wirtszelle oder dem Wirtssytem kompatiblen Arten abstammen, werden zusammen mit diesen Wirten verwendet. Der Vektor weist normalerweise einen Replikationsursprung sowie Merkmale auf, die eine phänotypische Selektion in transformierten Zellen ermöglichen. E. coli kann beispielsweise mit dem Vektor pBR322 transformiert werden, welcher Gene für eine Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz enthält (Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)).

[0072] Diese Antibiotikaresistenzgene stellen Mittel zum Nachweis transformierter Zellen bereit. Der Expressionsvektor kann auch Kontrollelemente enthalten, die für die Expression des gefragten Gens verwendet werden können. Übliche prokaryotische Kontrollelemente, die zur Expression fremder DNA-Sequenzen in E. coli verwendet werden, umfassen die Promotoren und Regulatorsequenzen, die von den β-Galactosidase- und Tryptophan-(trp) Operons aus E. coli abstammen, sowie die pR- und pL-Promotoren des Bakteriophagen λ Kombinationen dieser Elemente wurden auch verwendet (z. B. TAC, welches eine Fusion des trp-Promotors mit dem Lactose-Operator ist). Andere Promotoren wurden entdeckt und verwendet und Einzelheiten zu deren Nukleotidsequenzen wurden veröffentlicht, so dass der Fachmann diese verbinden und funktional ausschöpfen kann.

[0073] Neben Prokaryonten können auch eukaryotische Mikroben, wie Hefekulturen, verwendet werden. Saccharomyces cerevisiae, oder übliche Bäckerhefe, ist der am meisten verwendete eukaryotische Mikroorganismus, obwohl eine Anzahl anderer Stämme auch allgemein erhältlich sind. Hefepromotoren, die zur Expression fremder DNA-Sequenzen in Hefe geeignet sind, umfassen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase oder andere glycolytische Enzyme. Geeignete Expressionsvektoren können Terminationssignale enthalten, die die Polyadenylierung und Termination des mRNA-Transkripts des klonierten Gens ermöglichen. Jeder Vektor, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, einen Replikationsursprung und richtige Terminationssequenzen enthält, eignet sich zur Expression von bek oder flg.

[0074] Zell-Linien, die von mehrzelligen Organismen abstammen, können auch als Wirte verwendet werden. Im Prinzip kann man mit jeder solcher Zellkultur arbeiten, ob sie aus einer Vertebraten- oder Invertebratenquelle stammt. Das Interesse ist jedoch für Vertebratenzellen am größten und die Vermehrung von Vertebratenzellen in Kultur (Gewebekultur) hat sich in den vergangenen Jahren zu einem Routineverfahren entwickelt. Beispiele solcher geeigneter Wirte sind die VERO-, HeLa-, Maus C127- oder -3T3-, chinesische Hamsterovarien-(CHO), WI38-, BHK-, COS-7- und MDCK-Zell-Linien. Maus-3T3- und CHO-Zellen sind besonders bevorzugt. Expressionsvektoren für solche Zellen umfassen gewöhnlich einen Replikatinsursprung, einen Promotor vor dem zu exprimierenden Gen, RNA-Splice-Stellen (falls nötig) und transkriptionale Terminationssequenzen.

[0075] Für die Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen (Promotoren und Enhancer) auf den Expressionsvektoren häufig durch virales Material bereitgestellt. Gewöhnlich verwendete Promotoren stammen beispielsweise von Polyoma, Adenovirus 2 und am häufigsten von Simian Virus 40 (SV40). Eukaryotische Promotoren, wie der Promotor des Maus-Metallothionein-Gens (Paulakis und Hamer, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 80:397–401 (1983)), können auch verwendet werden. Ferner ist es auch möglich und oft wünschenswert den Promotor oder die Kontrollsequenzen zu verwenden, die natürlicherweise mit der gewünschten Gensequenz assoziiert sind, vorausgesetzt solche Kontrollsequenzen sind mit dem Wirtsystem kompatibel. Um die Transkriptionsrate zu erhöhen, können bei der Konstruktion auch eukaryotische Enhancersequenzen zugefügt werden. Diese Sequenzen können aus einer Vielzahl tierischer Zellen oder onkogener Retroviren, wie dem Maus-Sarcoma-Virus, gewonnen werden.

[0076] Ein Replikationsursprung kann entweder durch Konstruktion des Vektors bereitgestellt werden, indem man einen exogenen Ursprung wie den, der von SV40 oder anderen viralen Quellen bereitgestellt wird, einführt oder er kann durch den chromosomalen Replikationsmechanismus der Wirtszelle bereitgestellt werden. Wird der Vektor in das Chromosom der Wirtszelle integriert, ist letzteres häufig ausreichend.

[0077] Wirtszellen können bek oder liefern, die aus einer Vielfalt chemischer Zusammensetzungen sein können. Das Protein wird mit Methionin als erste Aminosäure hergestellt. Dieses Methionin geht auf das natürlicherweise am Anfang des Strukturgens vorkommende ATG-Startkodon zurück oder es wird vor einem Segment des Strukturgens eingefügt. Das Protein kann auch intrazellulär oder extrazellulär gespalten werden, wodurch die Aminosäure entsteht, die natürlicherweise am Aminoterminus des Proteins vorkommt. Das Protein kann entweder zusammen mit seinem eigenen oder einem heterologen Signalpeptid produziert werden, wobei das Signalpeptid spezifisch in einer intra- oder extrazellulären Umgebung spaltbar ist. Schließlich können bek oder flg durch direkte Expression in maturer Form hergestellt werden, ohne dass weitere fremde Polypeptide abgespalten werden müssen.

[0078] Rekombinante Wirtszellen bezieht sich auf Zellen, welche mit Vektoren transformiert wurden, die mit Hilfe rekombinanter DNA-Verfahren konstruiert wurden. Wie hier definiert, wird bek oder flg als Folge dieser Transformation hergestellt. Bek oder flg oder deren Fragmente, die von solchen Zellen produziert werden, werden als „rekombinantes bek oder flg" bezeichnet.

[0079] Die Einzelheiten zur Expression von flg und bek sind in Beispiel II gezeigt.

[0080] Verwendungen von flg- und bek-überproduzierenden Zell-Linien:

[0081] Die hier bereitgestellten überexprimierenden bek- und flg-Zell-Linien eignen sich für Untersuchung von Liganden/Rezeptorwechselwirkungen sowie Screeningprogramme für rational entworfene Wirkstoffe. Potentielle Wirkorte für Therapeutika umfassen, sind jedoch nicht beschränkt auf die Rezeptor/Liganden-Bindung, die Signaltransduktion und die Rezeptor/Zielort-Wechselwirkung.

[0082] Entsprechend können Wirkstoffe auf ihre Fähigkeit getestet werden, die natürliche Ligandenbindung durch kompetitive Inhibierung oder andere Mechanismen zu hemmen. Altenativ können die bek- und flg-überproduzierenden Zellen als Immunogenquelle zur Herstellung von Antikörpern, den monoklonalen Antikörpern, verwendet werden, die auch auf ihre Fähigkeit getestet werden können, die Ligandenbindung oder Rezeptoraggregation zu beeinflussen. Das System kann auch nützlich sein, um die Wirkstoffe, welche die Kinase/Ziel-Wechselwirkung beeinflussen, zu beurteilen. Diese Wirkstoffe, die als Tyrphostine bekannt sind, haben als Ort der Wirkung die Phosphorylierung der zellulären Ziele durch die Rezeptorkinasedomäne, einschließlich die Autophosphorylierung des Rezeptors selbst. Da die Ligandenbindung und Kinaseaktivität in getrennten Domänen vorliegen, ist es nicht notwendig, die gesamte Rezeptorsequenz zu exprimieren, um die Wirkungen der Wirkstoffe auf die oben beschriebenen Aktivitäten zu bewerten. Entsprechend betrifft diese Erfindung die Expression biologisch wirksamer Fragmente von flg und bek. Die Produkte aus der Klonierung und Expression von cDNA, welche für die ersten 377 Aminosäuren von bek oder die ersten 376 Aminosäuren von flg (d. h. die extrazelluläre und Transmembrandomäne) oder die COOH-terminalen 423 Aminosäuren von bek oder 425 Aminosäuren von flg kodieren, eignen sich für die Auswertung der Liganden bzw. Tryphostine. Beispiel III zeigt mehrere dieser Verwendungen.

[0083] In einer noch weiteren Ausführungsform kann die extrazelluläre Domäne alleine oder Subdomänen davon als Inhibitor für eine Infektion durch opportunistische Pathogene, wie das Herpes Simpex Virus Typ I, oder andere Pathogene, die endogenes bek oder als Mittel zum Infizieren der Zielzellen verwenden, eingesetzt werden. Es wurde berichtet, dass der HSV-1-Eintritt in Zellen dramatisch in Zell-Linien ansteigt, in denen flg auf der Oberfläche überexprimiert ist (R. J. Kaner et al., Science 248:1410–1413 (1990)). Entsprechend können überexprimierende Zell-Linien verwendet werden, um hemmende Wirkstoffe durch Messen der verminderten Virusbindung (Direktassay) oder anhand der verminderten Infektiösität oder Reduktion des Virus in Medien in Gegenwart oder Abwesenheit der zu untersuchenden Wirkstoffe, wie der Rezeptorfragmente selbst, zu screenen.

[0084] Diese Erfindung stellt die kompletten humanen cDNA-Sequenzen für zwei Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren bereit. Obwohl ein Teil der cDNA-Sequenz einer endständigen humanen Proteinkinase flg (Ruta et al., siehe oben (1988)) sowie eine Teilsequenz der Maus-Proteinkinase bek (Kornbluth et al., siehe

oben (1988)) bekannt waren, waren die vollständigen Sequenzen der humanen Formen dieser Gene nicht erhältlich. Ohne die vollständigen Sequenzen konnte das Ausmaß der funktionalen Ligandenbindungsstelle und der Homologiegrad zwischen flg und bek nicht richtig bewertet werden. Wie hier offenbart, sind flg und bek ähnliche, jedoch eigenständige Genprodukte mit einer hohen Affinität für aFGF, bFGF und k-FGF. Die bek- und flg-Gene befinden sich auf verschiedenen Chromosomen und werden in verschiedenen Zell-Linien und Geweben differenziell exprimiert.

[0085] Flg und bek zeigen gemeinsame Strukturmerkmale mit den PDGF- und CSF-1-Rezeptortyrosinkinasen, einschließlich einer gespaltenen Tyrosinkinasedomäne und einem extrazellulären Bereich, der aus mehreren Immunoglobulin-ähnlichen Domänen besteht. Dennoch unterscheiden sich die FGF-Rezeptoren strukturell von den PDGF- und CSF-1-Rezeptoren in mehrerlei Hinsicht: 1) die extrazellulären Domänen der FGF-Rezeptoren bestehen aus drei Immunoglobulin-(Ig)domänen, während diejenigen der PDGF- und CSF-1-Rezeptoren aus fünf Ig-Domänen bestehen. In dieser Hinsicht ähneln die FGF-Rezeptoren dem IL-1-Rezeptor, dessen extrazellulärer Bereich aus drei Ig-Domänen besteht (Sims et al., Science 241:585–589 (1988)); 2) der Membran-angrenzende Bereich der FGF-Rezeptoren, 87 (flg) und 89 (bek) Aminosäuren, ist wesentlich länger als der bei den PDGF- und CSF-1-Rezeptoren (49 bzw. 51 Aminosäuren); 3) die Kinaseinsert-Domäne der FGF-Rezeptoren besteht aus nur 14 Aminosäuren, während die PDGF- und CSF-1-Rezeptorkinaseinserts viel länger sind (104 bzw. 70 Aminosäuren) (Hanks et al., Science, 241:42–52 (1988)). Ein übereinstimmender Tyrosinrest und eine potentielle Autophosphorylierungsstelle in der Kinasedomäne des PDGF-Rezeptors ist in beiden FGF-Rezeptoren konserviert (flg-Rest 654, bek-Rest 657). Das Vorliegen eines gemeinsamen Motivs unter den Rezeptoren für eine Vielfalt biologisch verschiedener Liganden unterstützt das Argument, dass sie aufgrund der Struktur und/oder Funktion einer starken evolutionären Beschränkung unterlagen (Ullrich und Schlessinger, Cell 60:203–221 (1990)).

[0086] NIH 3T3-Zellen, welche mit Säugetier-Expressiosnvektoren transfiziert werden, die die kodierenden Sequenzen für entweder flg oder bek enthalten, steuern die Synthese von Glycoproteinen mit erkennbaren Molekulargewichten von 150.000 bzw. 135.000. Werden sie in Gegenwart von Tunicamycin synthetisiert, beträgt das Molekulargewicht des Haupt-flg-Proteins 110 kDa, während das von bek 90 kDa beträgt. Zwei flg-Proteine mit 90 und 110 kDa wurden zuvor in Immunopräzipitaten von mit Tunicamycin behandelten, metabolisch markierten humanen Rhabdomyosarcomazellen beobachtet (Ruta et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86:8722–8726 (1989)). Obwohl es unmöglich ist, einen Mechanismus mit einer Proteolyse vollständig auszuschließen, können die 90- und 110-kDa-flg-Proteine in Rhabdomyosarcomazellen echte primäre Translationsprodukte darstellen. Reid et al. (Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 87:1596–1600 (1990)) haben vor kurzem die Isolierung zweier verschiedener Maus-flg-cDNAs beschrieben, wobei eine offensichtlich das Homolog der hier beschriebenen humanen flg-cDNA ist und wobei bei einer zweiten kürzeren cDNA der Bereich, der für die erste Ig-ähnliche Domäne kodiert, durch alternatives Splicing deletiert ist. Neben den hier beschriebenen Full-Length-Klonen können andere cDNA-Klone, welche scheinbar für trunkierte Formen von flg und bek kodieren, aus HUVEC- und humanen Hirn-cDNA-Banken gewonnen werden. Eine Variante von flg, der die erste Ig-ähnliche Domäne fehlt, die jedoch ansonsten intakt ist, wurde isoliert. Andere cDNA-Varianten umfassen eine trunkierte Version von bek, die nur für eine einzige Sequenz, eine einzige „Ig-ähnliche" Domäne und ein Stoppkodon kodiert, sowie eine Variante von flg, die für zwei „Ig-ähnliche" Domänen kodiert. Diese zwei Klone können sekretierte Formen von bek oder flg darstellen. Vergleiche der Nukleotidsequenzen dieser Klone mit flg- und bek-cDNAs, die für Rezeptoren mit drei „Ig-ähnlichen" Domänen kodieren, sprechen dafür, dass sie von den Strukturgenen für flg und bek durch alternatives Splicing entstanden sind. Es ist daher möglich, dass die flg-Arten mit geringerem Molekulargewicht, die aus Lysaten von Rhabdomyosarcomazellen immunopräzipitierten, eine echte Form von flg darstellen, die durch alternatives Splicing entstanden ist. Interessanterweise exprimieren A204-Rhabdomyosarcomazellen zwei verschiedene flg-mRNAs, welche für die alternativ gespliceten Formen stehen können, wohingegen die NTERA-2- und Endothelzellen in die jeweiligen flg-mRNAs scheinbar differenziell exprimieren.

Hinterlegen von Stämmen, die zur Ausführung der Erfindung geeignet sind

[0087] Die Hinterlegung biologisch reiner Kulturen der folgenden Stämme erfolgte bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, die angegebenen Hinterlegungsnummern wurden nach erfolgreicher Lebensfähigkeitsuntersuchung zugeteilt und die Hinterlegungsgebühren wurden entrichtet. Der Zugang zu den Kulturen wird denjenigen während der Anhängigkeit der Patentanmeldung gestattet, die gemäß 37 C.F.R. §1.14 und 35 U.S.C. §122 von dem Beauftragten dazu bestimmt werden. Alle Beschränkungen zur Erhältlichkeit der Kultur für die Öffentlichkeit werden nach der Erteilung eines auf der Anmeldung basierenden Patents unwiderruflich augehoben und die Kultur wird dauerhaft für einen Zeitraum von wenigstens fünf Jahren nach der letzten Anfrage zur Bereitstellung einer Probe und in jedem Fall für einen Zeitraum von wenigstens 30 Jahren nach dem Datum der Hinterlegung erhältlich sein. Sollte die Kultur nicht mehr lebensfähig sein oder unwiderruflich zerstört werden, wird sie durch lebensfähige Kulturen der gleichen taxonomischen

Beschreibung ersetzt.

Stamm/Plasmid	ATCC-Nr.	Hinterlegungsdatum
E. coli/pGC37		
E.coli/pflgFL24		

[0088] Es sei erwähnt, dass die erfindungsgemäßen Vektoren zur einfacheren Lagerung in Form der transformierten Bakterienwirte hinterlegt wurden. Es ist jedoch eine Frage von routinemäßigem Können für den Empfänger, die Bakterienzellen zu kultivieren, die Vektoren zurückzugewinnen und diese zur Transformation weiterer Wirtszellen, wie Maus-3T3-Zellen, wie hier beschrieben, zu verwenden.
[0089] Nachstehende Beispiele dienen der Verdeutlichung der vorliegenden Erfindung. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht nur auf diese Beispiele beschränkt.

BEISPIEL I

[0090] Dieses Beispiel zeigt die Klonierung von Full-Length-flg- und bek-cDNAs. Wie oben erwähnt wurde ein Teilklon durch Screenen einer cDNA-Bank, die von humaner Endothel-mRNA abstammte, mit einer Probe, welche auf einem retroviralen Transformations-Genprodukt basierte, isoliert; (siehe Ruta et al., 1988, siehe oben, für Einzelheiten). Insbesondere wurde das V-fms-Onkogen (die aktivierte Form des CSF-1-Tyrosinkinaserezeptors) als Sonde zum Screenen von 10^6 Plaques unter geringer Stringenz verwendet. 15 positive λgt_{11}-Klone wurden nachgewiesen und fünf wurden aus den Plaques gereinigt und weiter untersucht. Ein Klon, C51, wurde fms-ähnliches Gen (fms-like gene-flg) genannt. Wie nachstehend beschrieben, wurde das fehlende 5'-Fragment durch eine Kombination aus PCR und herkömmlichen Klonierungsverfahren zurückgewonnen.

PCR-Amplifikation und Oligonukleotidprimer

[0091] Das Polymerase-Kettenreaktions-(PCR)Verfahren (Saiki et al., Science, 230:1350–1354 (1985)) wurde mit 100 pmol jedes Oligonukleotidprimers, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% Gelatine, 0,2 mM jedes dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 10 mM Tris HCl pH 8,3 (bei 25°C) und 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (Perkin-Elmer-Cetus) in einem Endvolumen von 0,1 ml durchgeführt. Alle Reaktionen erfolgten für 30 Zyklen mit Zykluszeiten von 1,5 Minuten bei 94°C, 1,5 Minuten bei 60°C und 4 Minuten bei 72°C, es sei denn es ist etwas anderes angegeben.
[0092] Alle Oligonukleotidprimer wurden auf einem 380A-DNA-Synthesegerät von Applied Biosystems mit Hilfe der gut bekannten, üblichen Cyanoethyl-Phosphoramidatchemie synthetisiert.
[0093] Die Oligonukleotide hatten folgende Sequenzen:

1	AN	GCATGCGCGCGGCCGCGGAGGCC
2	ANpolyC	GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG$(C)_{14}$
3	Flg-1	ACATCCAGCTGGTATGTGTG
4	Flg-2	TACGGTCGACCGTACTCATTCTCCACAATGCA
5	Flg-PE-165non	GCCATTTTTCAACCAGCGC
6	Flg-PE-141non	GGGGTTTGGGGTCCCACTGGAA
7	GT11-R1	TGACACCAGACCAACTGGTAATGG
8	GT11-R3	TAATGGTAGCGACCGGCGCTCAGC
9	3'mbek	TCATGTTTTAACACTGCCGTTTATGTGTGGATA
10	Bek4A	GGAATTCAAGCTTCTAGACCACCATGGTCAGCTG GGGTCGTTTCA
11	Bek1B	TCCTATTGTTGGGCCCCAAGTGCA

Isolierung von 5'-flg-Klonen

[0094] Flg-cDNA, 5' von der internen EcoRI-Stelle (5'-Ende von pC51, Ruta et al., 1988, siehe oben) wurde mittels verankerter PCR (Loh et al., 1989, siehe oben) mit Hilfe des Primers Flg-1, der als spezifische Primer für die Synthese des ersten cDNA-Strangs wirkt, aus 50 µg humaner Endothelzell-Gesamt-RNA gewonnen. Nach Anfügen eines dG-Schwanzes an den ersten Strang mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyltransfe-

rase erfolgte die PCR-Amplifikation (30 Zyklen) mit den Primern Flg-2, AN und 10 pmol ANpolyC und Zykluszeiten von 1,5 Minuten bei 94°C, 2 Minuten bei 50°C und 4 Minuten bei 72°C. Ein einziges PCR-Produkt, bei dem die C51-Sequenz in 5'-Richtung um 170 bp verlängert war, wurde gewonnen. Die neue Sequenz wurde verwendet, um die zwei Oligonukleotide zu entwerfen, die mit λgt_{11}-Arm-spezifischen Oligonukleotiden verwendet wurden, um mittels PCR in der Endothelzellbank enthaltene 5'-flg-Klone zu amplifizieren. Die zweite PCR-Reaktion wurde mit 2×10^6 Phagen und den Oligonukleotiden Flg-PE-165non und GT11-R1 durchgeführt. Bei der dritten Reaktion wurden 5 µl der vorherigen Reaktion als Templat für die Oligonukleotidprimer Flg-PE-141non und GT11-R3 verwendet. Bei dem 560-bp-Produkt aus der dritten Reaktion wurden die Enden durch Inkubation mit T4-DNA-Polymerase stumpf gemacht und das Produkt wurde in die SmaI-Stelle von sowohl pGem-1 (Stratagene) als auch M13mp19 kloniert und sequenziert. Das 5'-flg-PCR-Produkt aus pGem-1 wurde ausgeschnitten, durch statistisches Hexamer-Priming radioaktiv markiert (Feinberg & Vogelstein, Anal. Biochem., 137; 266 (1984)) und zum erneuten Screenen der HUVEC-cDNA-Bank verwendet, um einen cDNA-Klon zu gewinnen, der frei von möglichen PCR-erzeugten Artefakten ist. Es wurde nur ein Klon aus 2×10^6 gescreenten rekombinanten Phagen gefunden. Die Nukleotidsequenzanalyse des cDNA-Inserts dieses Klons zeigte, dass seine Sequenz identisch mit dem durch PCR erzeugten Produkt war und dass er an der EcoRI-Stelle, die er mit dem flg-Teilklon pC51 teilt, endet. Dieses cDNA wurde mit EcoRI und SacI, welches 50 bp 5' von der Translationsinitiationsstelle ATG abschneidet, verdaut und das 650-bp-EcoRI/SacI-Fragment wurde in ein auf ähnliche Weise geschnittenes pGem-1 kloniert. Eine Full-Length-flg-cDNA wurde durch Klonieren des 3'-EcoRI-flg-Inserts aus pC51 in die EcoRI-Stelle dieses 5'-flg-Klons konstruiert. Die Full-Length-cDNA wurde mit SmaI/ApaI ausgeschnitten, die Enden wurden mit T4-DNA-Polymerase stumpf gemacht und die cDNA wurde in die EcoRV-Stelle von pMJ30 kloniert. PMJ30 wurde dadurch gewonnen, dass man anstelle des aFGF-Inserts in p267 einen Linker setzte, der eine EcoRV-Klonierungsstelle aufwies (Jaye et al., EMBO J., 7:963–969 (1988)).

Isolierung überlappender humaner bek-cDNA-Klone

[0095] Eine Hirnstamm-cDNA-Bank eines ein-Tag-alten Menschen in λgt_{11} (Kamholz et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 83:4962–4966 (1986)) wurde mit einem 33 Basen langen Antisense-Oligonukleotid (3'mbek), das komplementär zum 3'-Ende der für Maus-bek kodierenden Teilsequenz war, gescreent (Kronbluth et al., 1988, siehe oben). 32 positive cDNA-Klone wurden bei einem Screen von $1,5 \times 10^6$ rekombinanten Plaques isoliert und der größte Klon, λbek5, wurde zur weiteren Analyse ausgewählt. λbek5 wurde mit EcoRI verdaut, und das 5'-2,2-kb- und das 3'-1,0-kb-EcoRI-Fragment wurden zur weiteren Manipulation getrennt in M13mp19- und pGem-1-Vektoren subkloniert.

[0096] cDNA-Klone des 5'-Endes von humanem bek wurden durch ein zweites Screenen der Hirnstamm-Bank mit einem 5'-proximalen 750-bp-Fragment von λbek5 isoliert. Das Fragment wurde durch Nick-Translation radioaktiv markiert und zum Screenen von $1,5 \times 10^6$ Plaques verwendet. 54 hybridisierende Plaques wurden nachgewiesen und einer, λbek78, überlappte mit dem ursprünglichen cDNA-Klon und erstreckte sich 218bp weiter in 5'-Richtung.

RNA-Isolierung und Northern-Analyse

[0097] A204- (humane Rhabdomyosarcoma), U563- (humane Glioblastoma) und NTERA-2cl.D1- (humane Teratocarcinoma) Zellen wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum hochgezogen. Humane Nabelvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden in Medium 199, welches 10% fötales Kälberserum, 10 U/ml Heparin (Upjohn) und 5 ng/ml rekombinantes aFGF enthielt, hochgezogen. Gesamt-RNA wurde mit Guanidin-HCl aus NTERA2cl.D1-Zellen (Wang et al., Dev. Biol. 107:75–86 (1985)) und mit Guanidinisothiocyanat aus A204-, HUVEC- und U563-Zellen isoliert (Chirgwin et al., Biochem. 18:5294–89 (1979)). Die RNA wurde durch ihre optische Absorption bei 260 nm quantifiziert. Beispiele mit 4 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1,25%-igen, Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und dann, im wesentlichen wie oben beschrieben, mit einer Sonde behandelt (Seed, in: Genetic Engineering, Setlow et al., Herausgeber, Band 4, Seiten 91–102, Plenum Press New York, 1982)), wobei Sonden verwendet wurden, die durch statistisches Hexamer-Primen erzeugt worden waren (Feinberg und Vogelstein, Anal. Biochem. 137:256 (1984)). Die flg-Probe war ein 550-bp-ApaI/EcoRI-Fragment, das vollständig in der 3'-nicht-kodierenden Region enthalten war. Die bek-Sonde war ein 850-bp-Tth111I/EcoRI-Fragment, welches vollständig in der nicht-kodierenden 3'-Region enthalten war.

BEISPIEL II

[0098] Dieses Beispiel zeigt die Expression von Full-Length-flg und -bek in einem Säugetier-Expressionsvektor.

[0099] Wie in dem vorherigen Beispiel erwähnt, wurde der Full-Length-flg-Klon mit SmaI/ApaI ausgeschnitten, die Enden wurden mit der T4-DNA-Polymerase stumpf gemacht und der Klon wurde in die EcoRV-Stelle des Expressionsplasmids pMJ30 kloniert. pMJ30 wurde gewonnen, indem man das aFGF-Insert in p267 durch einen Linker ersetzte (Jaye et al., EMBO J. 7:963–969 (1988)). Entsprechend wurde pMJ30, das die Full-Length-flg-Sequenz enthielt, als pflgFL24 bezeichnet.

[0100] Die humane bek-cDNA wurde zur Expression in Säugetierzellen durch Amplifizieren des 276-bp-Fragments von λBek78 mit den Oligonukleotidprimern Bek4A und Bek1B hergestellt. Nach dem Verdau mit HindIII und BclI wurde das 5'-liegende 222-bp-Fragment an den 2,2-kb-Subklon von λbek5 an einer einzigartigen BclI-Stelle in dem Bereich der Überlappung angefügt. Das mittels PCR amplifizierte Fragment fügte Restriktionsstellen und eine vorzuziehende Translationsinitiationssequenz direkt stromaufwärts des putativen Initiatorkodons ATG ein. Das 3'-1,0-kb- EcoRI-bek-cDNA-Fragment wurde anschließend eingefügt. Zur Einführung in NIH-3T3-Zellen wurde ein 2,5-kb-Fragment, welches den gesamten humanen kodierenden bek-Bereich enthielt, in pMJ30 subkloniert. Die Nukleotidsequenzen von beiden Strängen aller Klone wurde mittels Kettentermination Strängen bestimmt (Sauger et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 51:660–672 (1977)). Entsprechend wurde pMJ30, das die Full-Length-bek-Sequenz enthielt, als pGC37 bezeichnet.

[0101] NIH 3T3-Zellen wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagel's-Medium (DMEM) mit 10% Kälberserum aufgezogen. NIH 3T3-Zellen wurden mit Calciumphosphat-Copräzipitaten aus entweder 1 µg pSV2neo oder 1 µg pSV2neo mit 20 µg Expressionsvektor, der die vollständige kodierende Sequenz entweder der flg-cDNA oder der bek-cDNA enthielt, transfiziert. Es sei erwähnt, dass pSV2neo lediglich einen selektierbaren Marker bereitstellt und jedes andere äquivalente Cotransfektionssystem verwendet werden kann. Einzelne Klone wurden in 500 µg/ml Geneticin (Gibco) selektiert und in Medium mit 200 µg/ml Geneticin gehalten.

[0102] Die kodierenden Bereiche der cDNAs für bek und flg wurden getrennt in einen Säugetier-Expressionsvektor eingefügt, und zwar direkt stromabwärts vom SV40-Promotor und dem Cytomegalovirus-Enhancer. NIH 3T3-Zellen wurden mit einem 1 : 20-Gemisch aus pSV2neo (Southern und Berg, J. Mol. Appl. Gen., 1;327–341 (1982)) und entweder einem bek- oder einem flg-Expressionsvektor cotransfiziert, und Transfektanten wurden durch das Kultivieren in Gegenwart von 500 µg/ml Geneticin (Gibco) cotransfiziert. Jeweils etwa 50 Klone wurden auf die Überexpression von FGF-Rezeptoren durch Vernetzen an [^{125}I]aFGF gescreent. NIH 3T3-Zellen, die nur mit pSV2neo transfiziert wurden, dienten als Kontrollen. Klone aus sowohl bek- als auch flg-transfizierten Zellen mit einer erhöhten Bindung für aFGF wurden auf diese Weise identifiziert; dadurch wurde gezeigt, dass bek als auch flg beides aFGF-Rezeptoren sind. Ein bek-transfizierter Klon, Nbek8, und ein flg-transfizierter Klon, Nflg26, wurden zur weiteren Untersuchung aufgrund ihrer erhöhten Expression von aFGF-Rezeptoren ausgewählt.

[0103] Die Translationsprodukte der flg- und bek-Expressionsvektoren wurden durch metabolisches Markieren von Nbek8- und Nflg26-Zellen mit [^{35}S]Methionin, Herstellen von Zellextrakten und Immunopräzipitieren mit bek- und flg-spezifischen Anti-Peptid-Antiseren untersucht.

[0104] Peptide, die den 15 COOH-terminalen Aminosäuren von flg (Flg-1) oder den 17 COOH-terminalen Aminosäuren von bek (Bek-1) entsprachen, wurden synthetisiert und mit Hilfe des Vernetzungsreagens 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid an Keyhole-Limpet-Hemocyanin gekoppelt. Dann wurden Hasen mit diesen Reagenzien, emulgiert in komplettem Freudschem Adjuvans, immunisiert, so dass man die polyklonalen Antiseren Ani-Flg-1 und Anti-Bek-1 erhielt.

[0105] Zellen mit 90%-iger Konfluenz wurden in 10-cm-Gewebekulturschalen (Falcon) kultiviert und mit Methionin-freiem DME gewaschen und sechs Stunden in Methionin-freiem DME, enthaltend 10% Kälberserum und 100 µCi/ml [^{35}S]Methionin (Amersham) inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS (Gibco) gewaschen und in 0,5 ml Lysispuffer (20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1% Triton X-100, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) abgeschabt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden 15 Minuten in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. 3 mg Protein A-Sepharose pro Probe wurden quellen gelassen und mit 20 mM Hepes, pH 7,5, gewaschen und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Hase-Anti-Peptid-Antiserum (Anti-Flg-1 und Anti-Bek-1) gemischt und anschließend dreimal mit HNTG-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% Glycerol) gewaschen. Die Protein A-Sepharose/Antikörper-Komplexe wurden dann mit den entsprechenden geklärten Zell-Lysaten 60 Minuten bei 4°C in HNTG-Puffer inkubiert, zweimal mit 50 mM Hepes, pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,2% Triton X-100 und 5 mM EGTA, zweimal mit 50 mM Hepes, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 5 mM EGTA und 0,1% SDS und schließlich zweimal mit 10 mM Tris-HCl, pH 8 und 0,1% Triton X-100 gewaschen. Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, Nature 227; 680–685 (1970)) wurde zu den gewaschenen Immunopräzipitaten zugegeben, welche dann vier Minuten gekocht und auf einem SDS-(7%)-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. Autoradiogramme der getrockneten Gele wurden auf Kodak X-Omat-Filmen (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) hergestellt.

[0106] Die Immunopräzipitate wurden einer SDS-PAGE unterworfen und anschließend autoradiographiert (**Fig.** 4). Eine Bande von 150 kDa immunopräzipitierte spezifisch mit dem flg-Antipeptid-Antiserum aus flg-transfizierten Zellen (Bahn 3), während das bek-Antipeptid-Antiserum spezifisch eine Bande von 135 kDa

(Bahn 7) aus bek-transfizierten Zellen immunopräzipitierte. Die Immunopräzipitation in Gegenwart des entsprechenden Antigen-Peptids eliminierte die Präzipitation von flg- und bek-spezifischen Proteinen vollständig. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von flg und bek sprechen für reife Kernproteine mit 89.437 bzw. 89.750 Daltons; die Glycosylierung potentieller Stellen in den extrazellulären Domänen würde zu Formen mit höheren Molekulargewichten führen. Die Behandlung von NFlg26- und Bek8-Zellen mit Tunicamycin zur Blockierung der Glycosylierung führte zu bek- und flg-Produkten mit geringerem Molekulargewicht, was besser mit ihrer vorhergesagten Kernproteingröße übereinstimmt (Bahn 4 und 8). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl bek als auch flg Glycoproteine sind. Obwohl die größere Größe von flg im Vergleich zu bek jeweils mit der Anzahl potentieller N-verknüpfter Glycosylierungsstellen (9 gegenüber 8) übereinstimmt, läuft das aus mit Tunicamycin behandelten Zellen isolierte flg-Produkt langsamer als man aufgrund seiner Aminosäuresequenz erwarten würde. Der Grund für die langsamere Migration ist nicht bekannt, ist jedoch vermutlich auf die rekombinante flg-Konstruktion zurückzuführen, da flg aus NFlg26- und A204-Rhabdomyosarcomazellen identische sichtbare Molekulargewichte aufweisen, sowohl vor als auch nach der Tunicamycinbehandlung.

[0107] Kein bek- oder flg-Protein wurde in Immunopräzipitaten aus Kontrollzellen gefunden (Bahn 1, 2, 5 und 6). In vorherigen Versuchen wurde FGF-vernetztes flg-Protein aus NIH 3T3-2.2-Zellen (Ruta et al., 1989, siehe oben), welche deutlich endogenes flg exprimieren, immunopräzipitiert. Die Unfähigkeit, flg in Kontrollversuchen nachzuweisen, ist hauptsächlich auf die geringe Zahl untersuchter Zellen und die kurzen Autoradiographie-Expositionszeiten zurückzuführen, die bei der Verwendung der bek- und flg-überexprimierenden Zell-Linien möglich sind.

[0108] Die Grundmenge endogener Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren variiert von Zelltyp zu Zelltyp. 3T3-Zellen enthalten etwa 5–10.000 solcher Rezeptoren, manche 3T3-Subklone, wie 3T3-2.2-Zellen, können jedoch bis zu 30.000 Rezeptoren pro Zelle enthalten. Der Begriff „überexprimierende" Zellen, wie hier verwendet, meint Zellen mit etwa 50.000 Rezeptoren oder mehr. Die erste Transfektion von 3T3-Zellen mit dem oben beschriebenem Plasmid erzeugt Zellen mit etwa 50.000 Rezeptoren pro Zelle. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer können jedoch Klone ausgewählt werden, die 300.000 oder mehr Rezeptoren pro Zelle exprimieren. Transfiziert man CHO-Zellen mit einem DHFR-Mangel und amplifiziert man sie durch Methotrexat-Selektion, ist zu erwarten, dass sie bis zu einer Million oder mehr Rezeptoren pro Zelle erzeugen.

BEISPIEL III

Radioiodierung und Bindung von FGF

[0109] Vom Rind stammendes aFGF, wie zuvor beschrieben gereinigt (Burgess et al., J. Biol. Chem., 260: 11389–11392 (1985)), rekombinantes humanes bFGF (freundlicherweise ein Geschenk von Dr. Moscatelli) und rekombinantes humanes kFGF (freundlicherweise ein Geschenk von Dr. Claudio Basilico) wurden nach dem Protokoll für Enzymobeads (BioRad) radioiodiert. Die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten Liganden wurde durch Verdünnung des Radioisotops mit den entsprechenden nicht-markierten Kompetitoren bestimmt. Die Konzentrationen der nicht-markierten Liganden wurden durch Aminosäureanalyse bestimmt (Jaye et al., 1987, siehe oben). Die spezifische Aktivität der verschiedenen Präparate von [^{125}I]aFGF schwankte zwischen 130.000 und 760.000 cpm/ng und die spezifische Aktivität für [^{125}I]bFGF schwankte zwischen 50.000 und 500.000 cpm/ng. Die spezifische Aktivität von [^{125}I]kFGF schwankte zwischen 50.000 und 200.000 cpm/ng.

[0110] Der Bindungsassay wurde wie folgt durchgeführt:

[0111] Fibronectin-beschichtete 24-Well-Schalen mit 1×10^5 Zellen/Well wurden auf Bis gelegt und die Wells wurden zweimal mit kaltem Bindungspuffer (DMEM, 1 mg/ml BSA, 5 U/ml Heparin, 50 mM Hepes, pH 7,4) gespült. Die Schalen wurden 20 Minute 1 auf Eis mit 1 ml eiskaltem Bindungspuffer inkubiert und anschließend zwei Stunden bei 4°C mit Reihenverdünnungen von [^{125}I]FGF in kaltem Bindungspuffer ohne Heparin. Die nicht-spezifische Bindung wurde mit Hilfe der gleichen Reihenverdünnungen gewonnen, jedoch in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses an nicht-radioaktivem aFGF. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf Eis gegeben und zweimal mit eiskaltem Bindungspuffer ohne Heparin gespült und anschließend 15 Minuten bei 37°C in 0,3 N NaOH solubilisiert. Wurde [^{125}I]bFGF verwendet, wurden die Zellen nach der Inkubation auf Eis gegeben, dreimal mit PBS, zweimal mit 1 ml 2 M NaCl in 20 mM Hepes, pH 7,5 und zweimal mit 1 ml 2 M NaCl in 20 mM Natriumacetat, pH 4,0 gewaschen. Die durch das saure Waschen mit 2 M NaCl freigesetzte Radioaktivität zeigt die spezifische Bindung an hochaffinen Stellen (Moscatelli, J. Cell. Physiol. 131 123–130 (1987)).

Kovalente Vernetzung von saurem [^{125}I]FGF, basischem [^{125}I]FGF und [^{125}I]kFGF an intakte Zellen

[0112] NFlg26-, NBek8- und NNeo4-Zellen wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen, die mit humanem Fibronectin beschichtet waren, kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit Bindungs-

puffer (DMEM, enthaltend 0,2% BSA und 20 mM Hepes, pH 7,5) gewaschen und 90 Minuten bei 4°C mit Bindungspuffer, welcher 25 ng/ml [^{125}I]aFGF, [^{125}I]bFGF oder [^{125}I]kFGF enthielt, inkubiert. Nach einmal Waschen mit Bindungspuffer und einmal mit PBS wurden die Zellen weiter 20 Minuten bei 4°C mit PBS, welches 0,3 mM Disuccinimidylsuberat (Pierce) als Vernetzungsmittel (hergestellt als 30 mM Stammlösung in DMSO) enthielt, inkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit 10 mM Hepes, pH 7,5, 200 mM Glycin, 2 mM EDTA, einmal mit PBS gewaschen und dann in PBS abgeschabt und durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge gesammelt. Die Zellpellets wurden in 100 µl Lysepuffer (20 mM Hepes, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Leupeptin und 1 mM PMSF) lysiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. Etwa das gleiche Volumen jedes Probenüberstands wurde mit Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, Nature, 227: 680–685 (1970)), gemischt, vier Minuten gekocht und auf einem SDS-7% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt, um zu überprüfen, ob alle Proben etwa die gleiche Menge Protein enthielten. Autoradiogramme der getrockneten Gele wurden auf Kodak X-Omat-Film hergestellt.

[0113] Die Tatsache, dass man Klone mittels Affinitätsverknüpfung mit [^{125}I]aFGF auf die Überexpression von bek und flg screenen kann, spricht dafür, dass sowohl bek als auch aFGF mit hoher Affinität binden. Die Bindung von [^{125}I]aFGF, [^{125}I]bFGF und [^{125}I]kFGF wurde parallel in bek- und flg-überexprimierenden Zellen untersucht. Nach der Inkubation der Zellen mit [^{125}I]aFGF, [^{125}I]bFGF oder [^{125}I]kFGF wurden die Rezeptor-FGF-Komplexe kovalent mit Disuccinimidylsuberat vernetzt, solubilisiert und einer SDS-PAGE und Autoradiographie unterworfen (**Fig.** 5). Eine einzige Bande mit 165 kDa wurde sowohl mit aFGF als auch mit bFGF in flg-überexprimierenden Zell-Linien vernetzt (Bahn 2 und 5). Ähnlich wurde eine einzige Bande mit 150 kDa sowohl mit aFGF als auch mit bFGF in bek-überexprimierenden Zell-Linien vernetzt (Bahn 3 und 6). Nach Abzug des Molekulargewichts der Liganden (etwa 15 kDa) entsprach die Größe der vernetzten Banden in den flg- und bek-überexprimierenden Zell-Linien (150 bzw. 135 kDa) genau der Größe der immunopräzipitierten flg- und bek-Proteine (**Fig.** 4). Die sichtbare, leicht größeren Banden bei der Vernetzung mit [^{125}I]kFGF (**Fig.** 5B) im Vergleich zu denen bei der Vernetzung von aFGF oder bFGF (**Fig.** 5A) ist auf den Größenunterschied von kFGF (22 kDa) gegenüber aFGF oder bFGF (16 kDa) zurückzuführen. Kein vernetztes Produkt wurde in Kontrollzellen beobachtet, was wir wieder auf die kurze Autoradiographie-Expositionsdauer, die durch die Intensität der Signale bei überexprimierenden Zell-Linien bedingt ist, zurückführen.

Gleichgewichts-Bindungsanalyse von flg und bek radioaktiv mit saurem basischem und k-Fibroblasten-Wachstumsfaktor

[0114] Saures und basisches FGF wurde wie oben beschrieben radioiodiert und auf Heparin-Sepharose gereinigt. Die Dissoziationskonstanten von bek und flg- für aFGF und bFGF wurden durch Sättigungsbindungsuntersuchungen der überexprimierenden Zell-Linien mit iodierten Liganden bestimmt. Die Bindung von sowohl aFGF als auch bFGF an bek und flg war spezifisch und sättigbar (**Fig.** 6A, Einfügungen). Zudem wurde die Bindung von [^{125}I]aFGF und [^{125}I]bFGF bei der Sättigung in Gegenwart eines 100-fachen molaren Überschusses von entweder aFGF oder bFGF vollständig gehemmt, was zeigt, dass jeder Ligand wirksam mit dem anderen um die Bindung der gleichen Stellen konkurriert. Eine Scatchardanalyse (Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660–672 (1949)) der Bindungsdaten eines typischen Experiments (**Fig.** 6A) zeigt, dass die flg-überexprimierenden Zellen etwa 55.000 Rezeptoren pro Zelle aufweisen mit Affinitäten von 24 pM bzw. 47 pM für aFGF bzw. bFGF. Entsprechend weisen bek-überexprimierende Zellen etwa 64.000 Rezeptoren pro Zelle auf mit Affinitäten von 47 pM bzw. 82 pM für aFGF bzw. bFGF. kFGF bindet an flg und bek mit Affinitäten von 320 bzw. 80 pM (**Fig.** 6B). Auch bindet kFGF an bek mit einer ähnlichen Affinität wie bFGF, bindet jedoch flg mit einer vierfach geringeren Begierde als bFGF. Die Daten aus weiteren Versuchen liefern sichtbare Kds von aFGF für flg im Bereich von 20 bis 80 pM und für bek im Bereich von 40 bis 100 pM. Eine ähnliche Variation der Kds der bFGF-Bindung an flg (50 bis 150 pM) und bek (80 bis 150 pM) wurde beobachtet, innerhalb eines einzelnen Experiments zeigt bFGF jedoch immer eine etwa 2-fach geringere Affinität für flg oder bek im Vergleich zu aFGF. Die Bandbreite der Werte ist vermutlich auf die Bestimmungen der spezifischen Aktivität und der biologischen Integrität der verschiedenen Präparationen der iodierten Liganden zurückzuführen. Nichtsdestotrotz zeigen die Daten deutlich, dass bek und flg aFGF mit ähnlich hoher Affinität binden und bFGF mit einer etwa 2-fach geringeren Affinität binden als aFGF. Diese Schlussfolgerungen werden durch Kompetitions-(Isotopenverdünnungs)-Versuche gestützt, bei denen ansteigende Mengen nicht-radioaktives aFGF oder bFGF um die Bindung mit [^{125}I]aFGF und [^{125}I]bFGF an flg- und bek-überexprimierende Zellen konkurrierten.

WIRKSTOFFSCREENING

[0115] Die biologisch aktiven transformierten Zellen können zum Screenen von Verbindungen auf ihre Wirksamkeit, die Bindung von FGFs an ihre, sie erkennenden Rezeptoren zu hemmen, verwendet werden. Nachdem die Parameter der Liganden/Rezeptor-Wechselwirkung in Abwesenheit potentieller Inhibitoren festgestellt

wurde, ist es nur noch eine Routinehandlung, die Zellen mit einer Testprobe, welche eine zu untersuchende Verbindung enthält, vorzuinkubieren, markierters FGF zuzugeben und die Reduktion der FGF-Bindung, falls vorhanden, zu messen.

[0116] Alternative Assays sind möglich. Beispielsweise kann man anstelle des direkten Messens der FGF-Bindung die Auswirkung von FGF (d. h. ein intrazelluläres Ereignis) untersuchen. Ein solches Ereignis ist die Proteinphosphorylierung, entweder des Rezeptors selbst oder eines anderen intrazellulären Zielmoleküls, wie der Phospholipase C-γ. Das Auftreten eines phosphorylierten Proteins kann durch die Reaktivität solcher Proteine mit einem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper gemessen werden.

[0117] Diese Erfindung betrifft nützliche Zell-Linien zur Wirkstoffauswertung, nicht einen bestimmten verwendeten Assay. Wie zuvor erwähnt, ist es nicht erforderlich, das gesamte Rezeptormolekül zu exprimieren, um ein nützliches Screeningsystem bereitzustellen. Es wurde beispielsweise gefunden, dass eine extrazelluläre Domäne, in der die erste Ig-Domäne und die „saure Box" gelöscht wurden, weiterhin fähig ist, den FGF-Liganden zu binden. Wie oben erwähnt, können Wirtszellen, welche die zytoplasmatische Domäne exprimieren, als praktische Quelle für Proteinkinase zum Testen von möglichen Tryphostinen verwendet werden. E. coli, welches mit einem Plasmid, das nur die zytoplasmatische Domäne enthält, transformiert wurde, hat sich für diesen Zweck als nützlich erwiesen. Mit Hilfe der intakten Sequenz von flg und bek, wie sie von dieser Erfindung bereitgestellt wird, ist es eine Frage von routinemäßigem Können, Fragmente der verschiedenen Domänen mit Hilfe von PCR-Verfahren oder durch Festphasen-Peptidsynthese herzustellen und diese auf ihre Fähigkeit, den Liganden zu binden oder Proteine zu phosphorylieren, zu untersuchen.

[0118] Potentielle therapeutische Mittel umfassen kleine organische Moleküle, Rezeptorfragmente selbst oder Antikörper, welche die Bindung von Liganden an extrazelluläre Domänen hemmen oder eine Proteinkinaseaktivität zeigen, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0119] Verbindungen mit inhibitorischer Aktivität eignen sich potentiell als therapeutische Mittel zur Behandlung von Erkrankungszuständen, die durch ungewünschte, durch FGF vermittelte Zellantworten gekennzeichnet sind. Unter diesen durch solche Antworten gekennzeichneten Erkrankungszuständen sind Krebs, insbesondere bestimmte Formen von Brustkrebs, Psoriasis, Arthritis, Arteriosklerose und gutartige Prostatavergrößerung.

[0120] Die erfindungsgemäßen therapeutischen Mittel können alleine oder zusammen mit pharmazeutisch annehmbaren Trägern verabreicht werden, wobei das Verhältnis durch die Löslichkeit und chemische Beschaffenheit der Verbindung, dem gewählten Verabreichungsweg und der üblichen pharmazeutischen Praxis bestimmt wird. Sie können beispielsweise oral in Form von Tabletten oder Kapseln, welche Träger wie Stärke, Milchzucker, bestimmte Tontypen und so weiter enthalten, verabreicht werden. Sie können sublingual in Form von Tabletten oder Pastillen verabreicht werden, wobei der aktive Wirkstoff mit Zucker und Getreidesirups, Geschmacksstoffen und Farbstoffen gemischt wird und dann ausreichend dehydriert wird, um ihn zu einer festen Form zu pressen. Sie können oral in Form von Lösungen verabreicht werden, welche Farb- und Geschmacksstoffe enthalten können, oder sie können parenteral injiziert werden, das heißt intramuskulär, intravenös oder subkutan. Zur parenteralen Verabreichung können sie in Form einer sterilen Lösung sein, die weitere zu lösende Stoffe, beispielsweise ausreichend Kochsalzlösung oder Glucose enthält, um die Lösung isotonisch zu machen.

[0121] Der Arzt wird die am besten geeignete Dosierung der vorliegenden therapeutischen Mittel bestimmen und diese wird je nach Verabreichungsform und dem bestimmten ausgewählten Mittel und ferner dem jeweils behandelten Patienten verschieden sein. Allgemeinen wird der Arzt versuchen, die Behandlung mit einer kleinen Dosierung, die wesentlich unter der Höchstdosis der Verbindung liegt, zu beginnen und die Dosierung in kleinen Schritten zu erhöhen, bis die beste Wirkung unter den Bedingungen erreicht ist. Allgemein wird man beobachten, dass wenn man die Zusammensetzung oral verabreicht, größere Mengen des aktiven Wirkstoffs erforderlich sind, um die gleiche Wirkung wie mit geringeren parenteral verabreichten Mengen zu erzielen.

Patentansprüche

1. Isoliertes humanes bek-Rezeptorprotein, umfassend
eine zytoplasmatische Domäne mit Proteinkinaseaktivität, ein Kinase-Insert,
eine Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen,
mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz.

2. Proteinfragment des Rezeptors nach Anspruch 1 mit nur einer extrazellulären Domäne und einer Transmembrandomäne.

3. Proteinfragment des Rezeptors nach Anspruch 1 mit nur einer zytoplasmatischen Domäne.

4. Isolierte DNA- oder mRNA-Sequenz, welche für ein humanes bek-Rezeptorprotein kodiert, wobei das Protein eine zytoplasmatische Domäne mit einer Proteinkinaseaktivität, ein Kinase-Insert, eine Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit drei Immunoglobulin-ähnlichen Wiederholungssequenzen enthält und eine Aminosäuresequenz wie in **Fig.** 2A gezeigt hat.

5. DNA gemäß Anspruch 4 mit der Nukleotidsequenz aus **Fig.** B.

6. Isolierte DNA, die für das Fragment aus Anspruch 2 kodiert.

7. Isolierte DNA, die für das Fragment aus Anspruch 3 kodiert.

8. Vektor, umfassend die DNA einer der Ansprüche 4 bis 7.

9. Vektor gemäß Anspruch 8, wobei der Vektor ein Expressionsvektor ist.

10. Rekombinante Wirtszelle, die mit dem Vektor einer der Ansprüche 8 bis 9 transformiert ist.

11. Wirtszelle gemäß Anspruch 10, wobei die Wirtszelle prokaryotisch ist.

12. Wirtszelle gemäß Anspruch 10, wobei die Wirtszelle eukaryotisch ist.

13. Wirtszelle gemäß Anspruch 11, wobei der Wirt Escherichia, Bacillus oder Streptomyces ist.

14. Wirtszelle gemäß Anspruch 12, worin der Wirt kultivierte Hefe- oder Vertebratenzellen sind.

15. Wirtszelle gemäß Anspruch 14, worin die Wirtszellen kultivierte Mauszellen sind.

16. Therapeutische Zusammensetzung, umfassend die extrazelluläre Domäne eines humanen bek-Rezeptorproteins mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz in einer wirksamen Menge, um unerwünschte, durch den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor vermittelte Zellantworten zu hemmen, und einen pharmazeutischen annehmbaren Träger.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, worin die unerwünschte Antwort aus der Gruppe aus Wachstumsfaktor-stimulierter Angiogenese und Vaskularisierung von Tumoren, mitogenen Wirkungen bei Psoriasis, Arthritis, Atherosklerose und gutartiger Prostatahypertrophie ausgewählt ist.

18. Therapeutische Zusammensetzung, umfassend die extrazelluläre Domäne eines humanen bek-Rezeptorproteins mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz in einer wirksamen Menge, um das Binden eines opportunistischen Pathogens an humane Zellen, die dieses Rezeptorprotein tragen, zu inhibieren bzw. hemmen, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, worin das Pathogen ein Virus ist.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, worin das Virus Herpes simplex Virus ist.

21. Verwendung einer extrazellulären Domäne eines humanen bek-Rezeptorproteins mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz in einer wirksamen Menge, um unerwünschte, durch den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor vermittelte zelluläre Antworten zu hemmen, zur Herstellung einer therapeutischen Zusammensetzung für die Behandlung eines Patienten mit einer Krankheit, die durch eine unerwünschte, durch den Heparin-bindenden Wachstumsfaktor vermittelte zelluläre Antwort gekennzeichnet ist, wobei die unerwünschte Antwort aus der Gruppe aus Wachstumsfaktor-stimulierter Angiogenese und Vaskularisierung von Tumoren, mitogenen Wirkungen bei Psoriasis, Arthritis, Atherosklerose und gutartiger Prostatahypertrophie ausgewählt ist.

22. Verwendung einer extrazellulären Domäne eines humanen bek-Rezeptorproteins mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz in einer wirksamen Menge, um die Bindung eines opportunistischen Pathogens an humane Zellen, welche das Rezeptorprotein tragen, zu hemmen, zur Herstellung einer therapeutischen Zusammensetzung für die Behandlung eines Patienten, der unter der Infektion eines opportunistischen Pathogens leidet, wobei das Pathogen fähig ist, an einen Heparin-bindenden Wachstumsfaktor-Rezeptor zu binden.

23. In vitro-Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen, die den Fibroblasten-Wachstumsfaktor daran hindern, an zelluläre bek-Rezeptoren mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz zu binden, umfassend die Schritte:
a) Inkubieren des Wirkstoffs mit Wirtszellen, die fähig sind, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren in Gegenwart eines Fibroblasten-Wachstumsfaktors zu überexprimieren, und
b) Messen der Fähigkeit eines Wirkstoffs die Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Bindung zu hemmen.

24. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin die Fähigkeit zum Hemmen dadurch gemessen wird, dass man die verminderte Bindung von FGF, das mit einem analytisch nachweisbaren Reagens markiert ist, bestimmt.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das Reagens ein radioaktives Isotop ist.

26. Verfahren gemäß Anspruch 23, worin die Fähigkeit zum Hemmen dadurch gemessen wird, dass man die Verminderung der durch FGF vermittelten intrazellulären Antwort bestimmt.

27. In vitro-Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen, welche die Bindung opportunistischer Pathogene an zelluläre bek-Rezeptoren mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz hemmen, umfassend die Schritte:
a) Inkubieren des Wirkstoffs mit Wirtszellen, die fähig sind, bek-Rezeptoren mit der in **Fig.** 2A gezeigten Aminosäuresequenz in Gegenwart des Pathogens zu überexprimieren und
b) Messen der Fähigkeit des Wirkstoffs die Pathogenbindung zu hemmen.

28. Verfahren nach Anspruch 27, worin die Fähigkeit zum Hemmen dadurch gemessen wird, dass man die verminderte Bindung eines Pathogens, welches mit einem analytisch nachweisbaren Reagens markiert ist, bestimmt.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin das Reagens ein radioaktives Isotop ist.

30. Verfahren nach Anspruch 27, worin die Fähigkeit zum Hemmen dadurch gemessen wird, dass man die Verminderung der Pathogen-Infektiosität bestimmt.

31. Verfahren nach Anspruch 27, worin das Pathogen ein Virus ist.

32. Verfahren nach Anspruch 31, worin das Virus Herpes simplex Virus ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

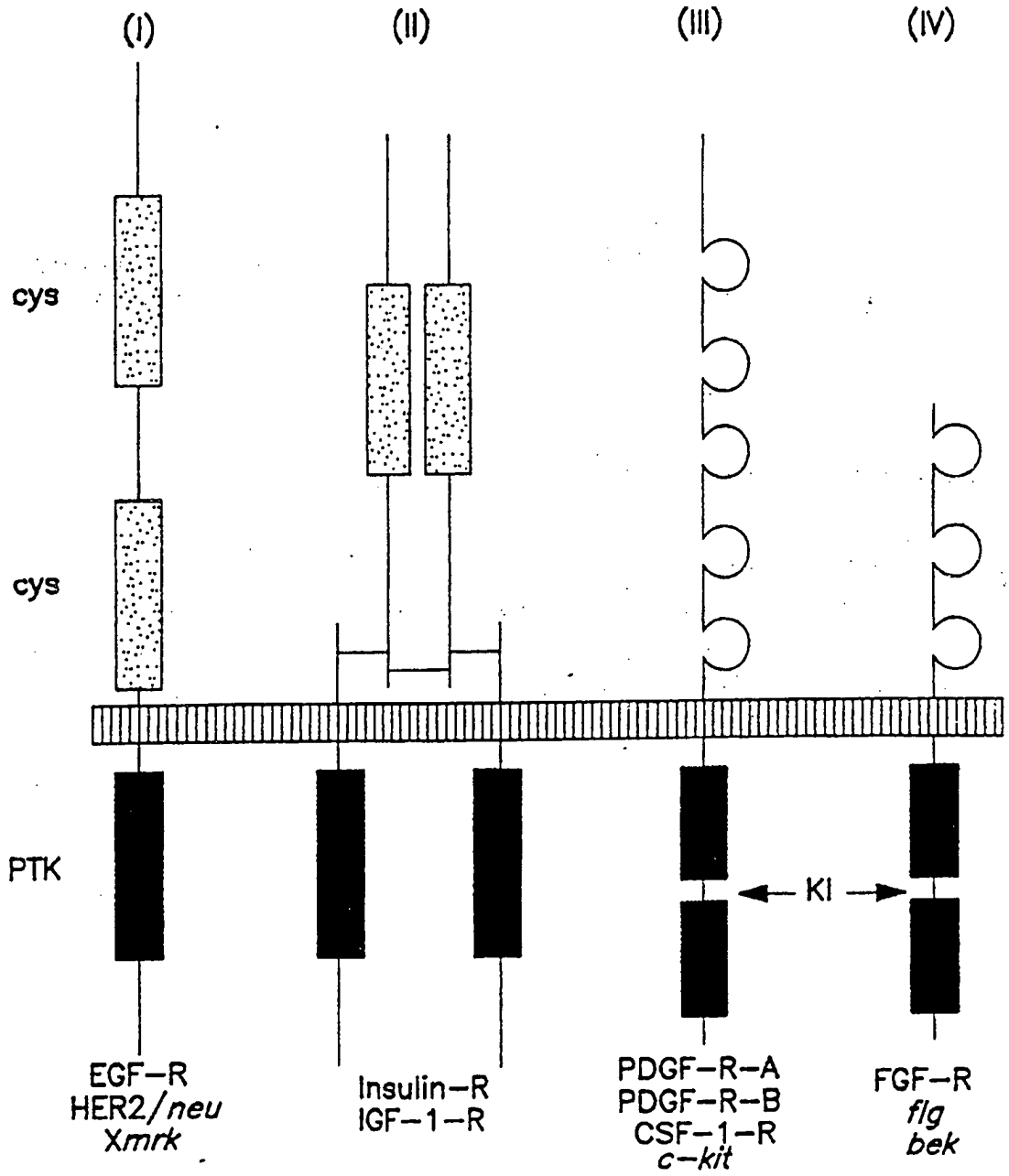
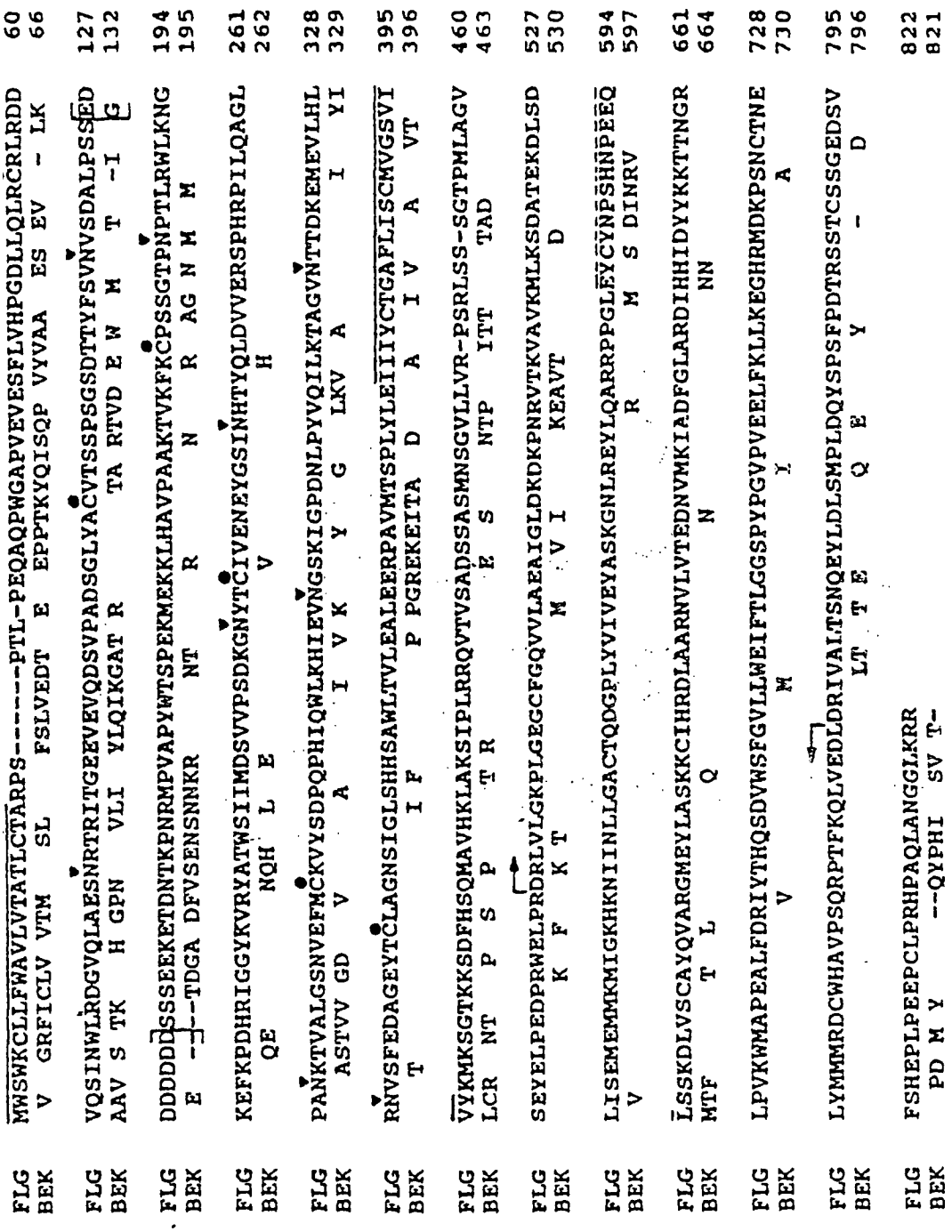
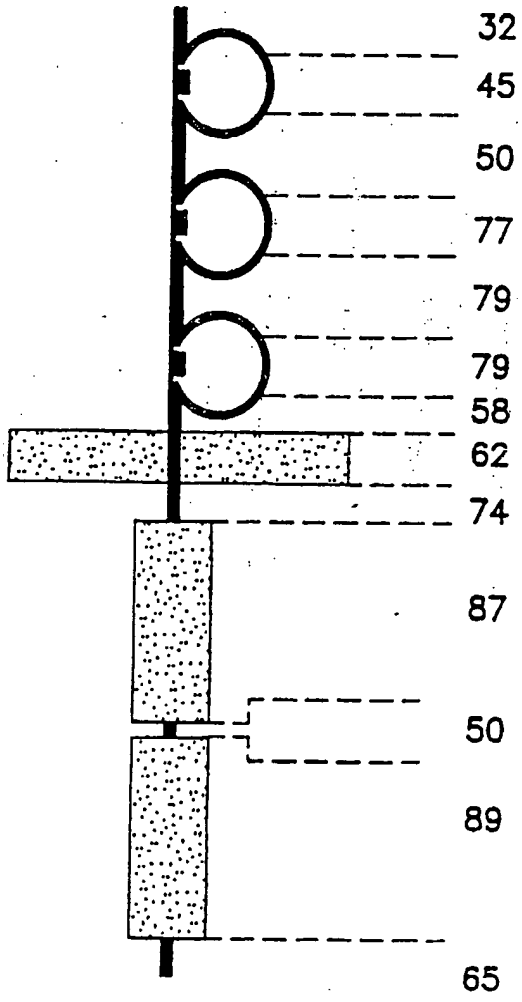


FIG. 1

FIG. 2a


FLG MWSWKCLLFWAVLVTATLCTARPS------PTL-PEQAQPWGAPVEVESFLVHPGDLLQLRCRLRDD 60
BEK V GRFICLV VTM SL FSLVEDT E EPPTKYQISQP VYVAA ES EV - LK 66
FLG VQSINWLRDGVQLAESNRTRITGEEVEVQDSVPADSGLYACVTSSPSGSDTTYFSVNVSDALPSSED 127
BEK AAV S TK H GPN VLI YLQIKGAT R TA RTVD E W M T -I G 132
FLG DDDDDDSSSEEKETDNTKPNRMPVAPYWTSPEKMEKKLHAVPAAKTVKFKCPSSGTPNPTLRWLKNG 194
BEK E --T--TDGA DFVSENSNNKR NT R N R AG N M M 195
FLG KEFKPDHRIGGYKVRYATWSIIMDSVVPSDKGNYTCIVENEYGSINHTYQLDVVERSPHRPILQAGL 261
BEK QE NQH L E V H 262
FLG PANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIGPDNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHL 328
BEK ASTVV GD V A I V K Y G LKV A I YI 329
FLG RNVSFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERPAVMTSPLYLEIIIYCTGAFLISCMVGSVI 395
BEK T I F P PGREKEITA D A I V A VT 396
FLG VVKMKSGTKKSDFHSQMAVHKLAKSIPLRRQVTVSADSSASMNSGVLLVR-PSRLSS-SGTPMLAGV 460
BEK LCR NT P S P T R E S NTP ITT TAD 463
FLG SEYELPEDPRWELPRDRLVLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLSD 527
BEK K F K T M V I KEAVT D 530
FLG LISEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLQARRPPGLEYCYNPSHNPEEQ 594
BEK V R M S DINRV 597
FLG LSSKDLVSCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLVTEDNVMKIADFGLARDIHHIDYYKKTTNGR 661
BEK MTF T L Q N NN 664
FLG LPVKWMAPEALFDRIYTHQSDVWSFGVLLWEIFTLGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNE 728
BEK V M Y A 730
FLG LYMMMRDCWHAVPSQRPTFKQLVEDLDRIVALTSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPDTRSSTCSSGEDSV 795
BEK LT T E Q E Y - D 796
FLG FSHEPLPEEPCLPRHPAQLANGGLKRR 822
BEK PD M Y --QYPHI SV T- 821



Gesamtidentität = 70 %

FIG. 2b

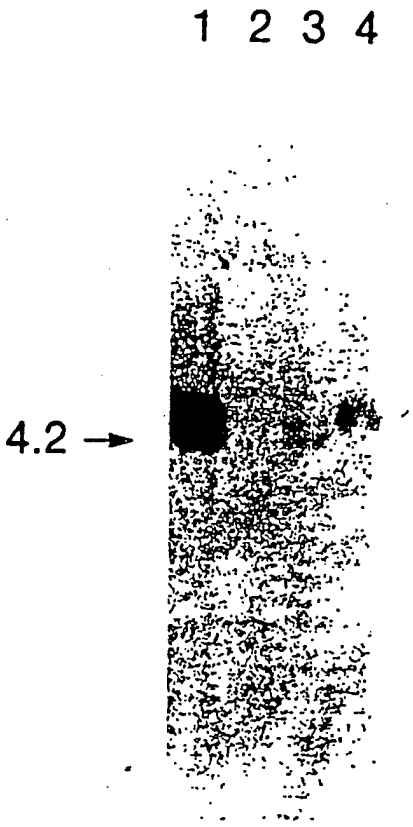


FIG. 3a

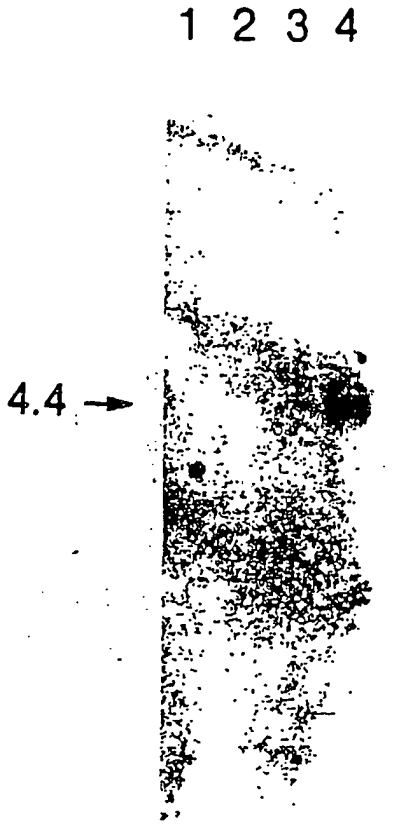


FIG. 3b

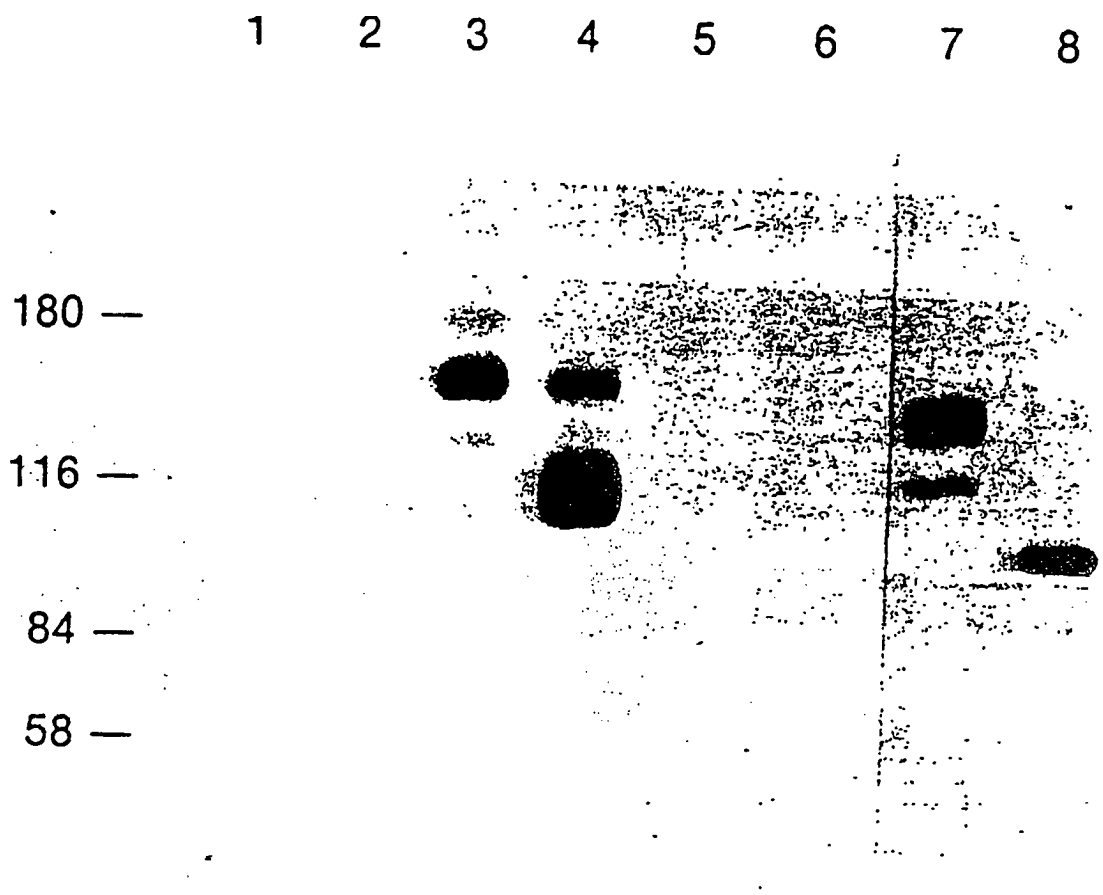


FIG. 4

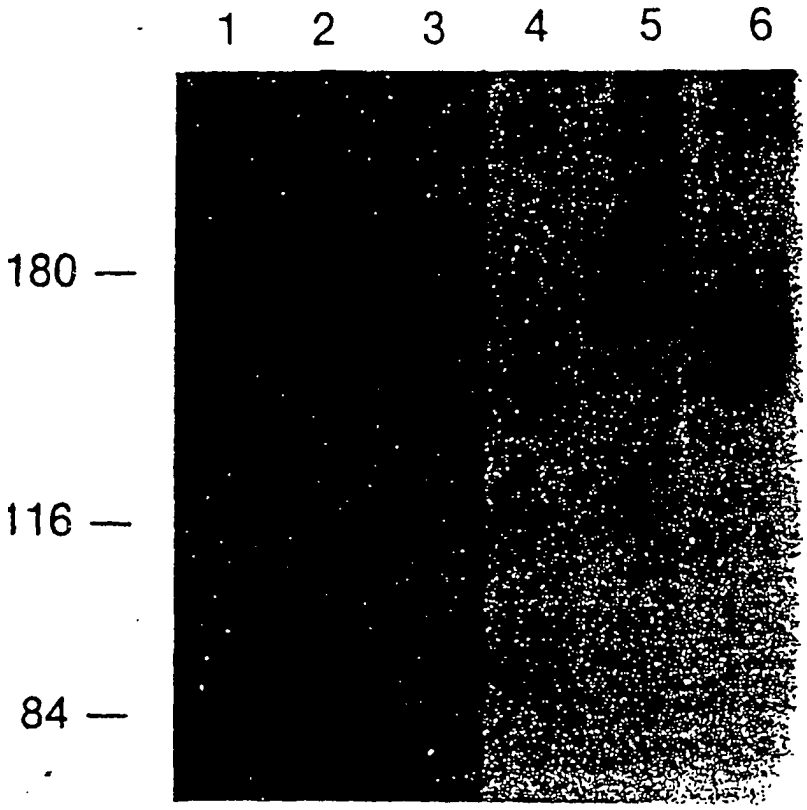


FIG. 5a

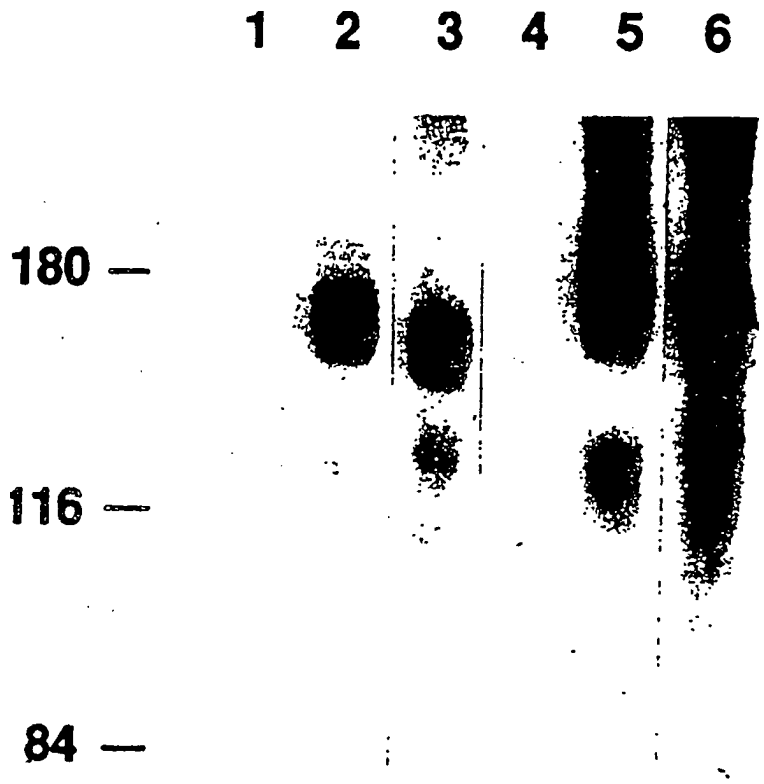


FIG. 5b

FIG. 6a

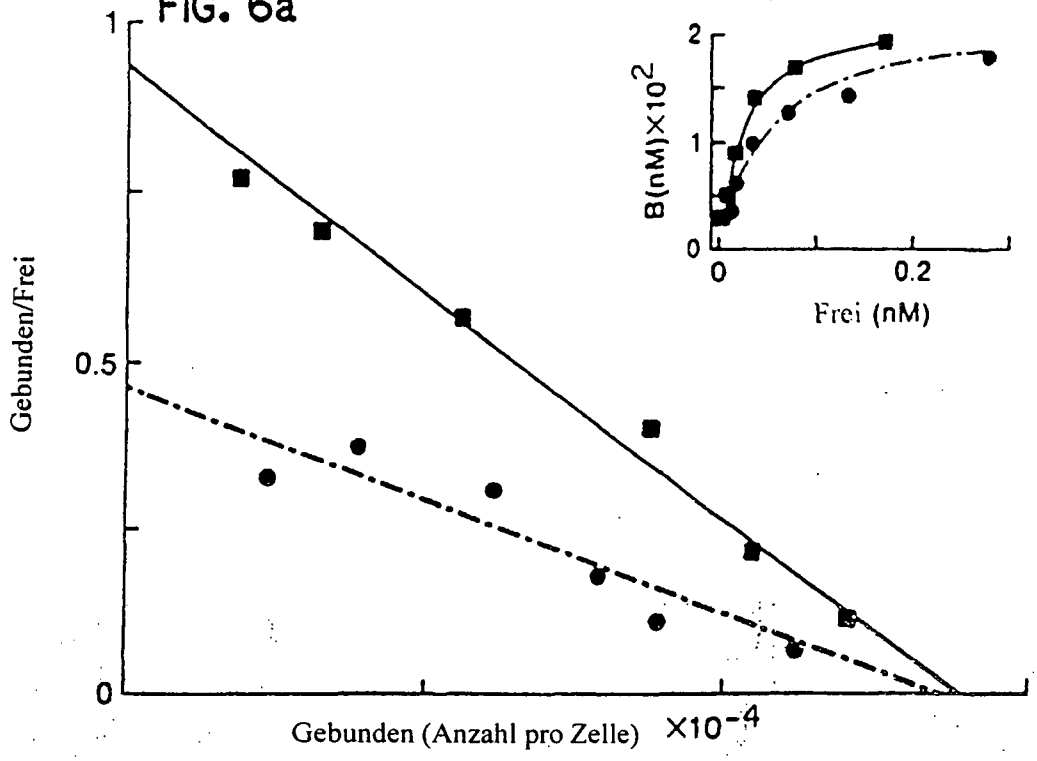


FIG. 6b

FIG. 6c

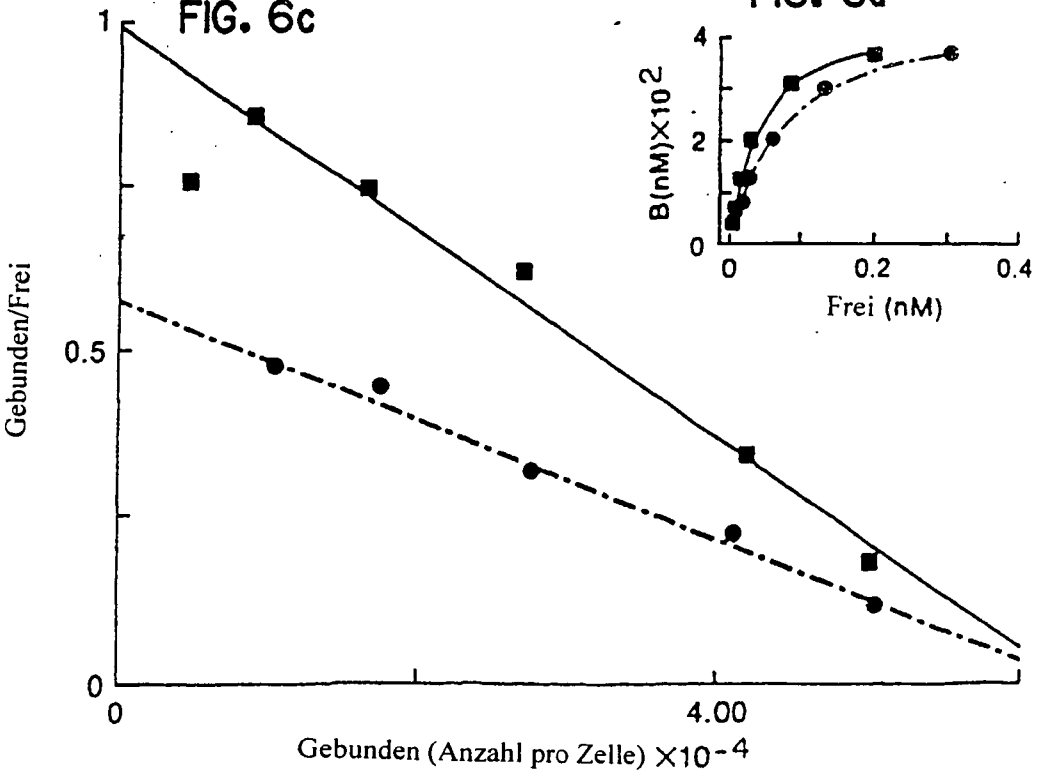


FIG. 6d

FIG.6e

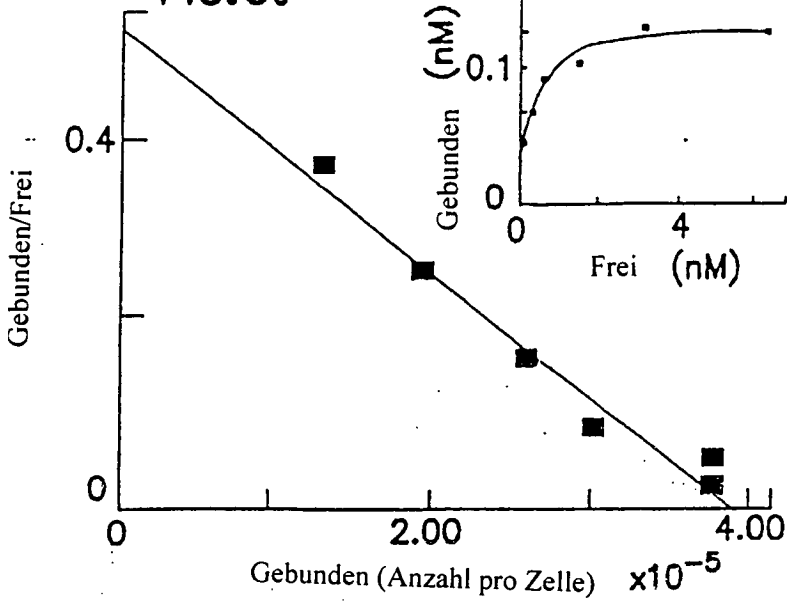


FIG.6f

FIG.6g

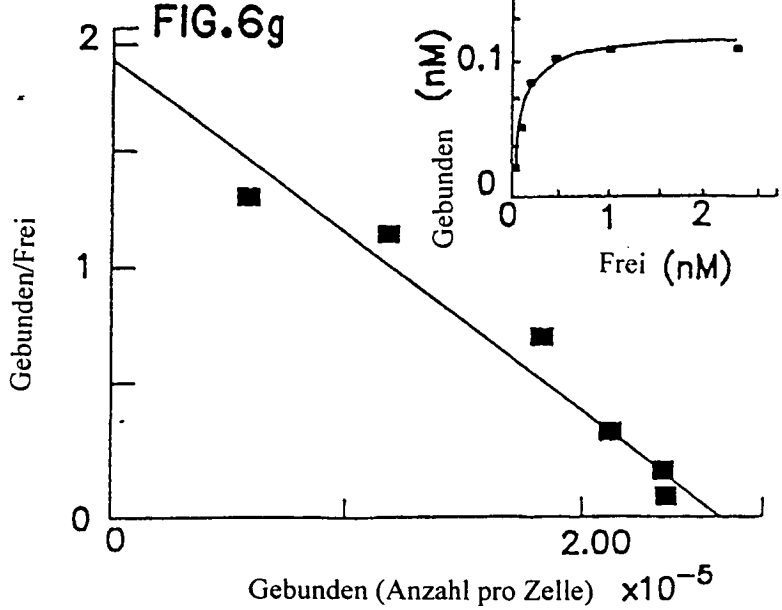


FIG.6h

```
1    TACGTTTGAAAAGGAGGATCGAGCTCACTCGTGGAGTATCCATGGAGATGTGGAGCCTTGTCACCAACC 6

70   TCTAACTGCAGAACTGGGATGTGGAGCTGGAAGTGCCTCCTCTTCTGGGCTGTGCTGGTCACAGCCACA 13
                          METTrpSerTrpLysCysLeuLeuPheTrpAlaValLeuValThrAlaThr

139  CTCTGCACCGCTAGGCCGTCCCCGACCTTGCCTGAACAAGCCCAGCCCTGGGGAGCCCCTGTGGAAGTG 20
     LeuCysThrAlaArgProSerProThrLeuProGluGlnAlaGlnProTrpGlyAlaProValGluVal

208  GAGTCCTTCCTGGTCCACCCCGGTGACCTGCTGCAGCTTCGCTGTCGGCTGCGGGACGATGTGCAGAGC 27
     GluSerPheLeuValHisProGlyAspLeuLeuGlnLeuArgCysArgLeuArgAspAspValGlnSer

277  ATCAACTGGCTGCGGGACGGGGTGCAGCTGGCGGAAAGCAACCGCACCCGCATCACAGGGGAGGAGGTG 34
     IleAsnTrpLeuArgAspGlyValGlnLeuAlaGluSerAsnArgThrArgIleThrGlyGluGluVal

346  GAGGTGCAGGACTCCGTGCCCGCAGACTCCGGCCTCTATGCTTGCGTAACCAGCAGCCCCTCGGGCAGT 41
     GluValGlnAspSerValProAlaAspSerGlyLeuTyrAlaCysValThrSerSerProSerGlySer

415  GACACCACCTACTTCTCCGTCAATGTTTCAGATGCTCTCCCCTCCTCGGAGGATGATGATGATGATGAT 48
     AspThrThrTyrPheSerValAsnValSerAspAlaLeuProSerSerGluAspAspAspAspAspAsp

484  GACTCCTCTTCAGAGGAGAAAGAAACAGATAACACCAAACCAAACCGTATGCCCGTAGCTCCATATTGG 55
     AspSerSerSerGluGluLysGluThrAspAsnThrLysProAsnArgMETProValAlaProTyrTrp
```

FIG. 7a

```
553  ACATCCCCAGAAAAGATGGAAAAGAAATTGCATGCAGTGCCGGCTGCCAAGACAGTGAAGTTCAAATGC  62
     ThrSerProGluLysMETGluLysLysLeuHisAlaValProAlaAlaLysThrValLysPheLysCys

622  CCTTCCAGTGGGACCCCAAACCCCACACTGCGCTGGTTGAAAAATGGCAAAGAATTCAAACCTGACCAC  69
     ProSerSerGlyThrProAsnProThrLeuArgTrpLeuLysAsnGlyLysGluPheLysProAspHis

691  AGAATTGGAGGCTACAAGGTCCGTTATGCCACCTGGAGCATCATAATGGACTCTGTGGTGCCCTCTGAC  75
     ArgIleGlyGlyTyrLysValArgTyrAlaThrTrpSerIleIleMETAspSerValValProSerAsp

760  AAGGGCAACTACACCTGCATTGTGGAGAATGAGTACGGCAGCATCAACCACACATACCAGCTGGATGTC  82
     LysGlyAsnTyrThrCysIleValGluAsnGluTyrGlySerIleAsnHisThrTyrGlnLeuAspVal

829  GTGGAGCGGTCCCCTCACCGCCCCATCCTGCAAGCAGGGTTGCCCGCCAACAAAACAGTGGCCCTGGGT  89
     ValGluArgSerProHisArgProIleLeuGlnAlaGlyLeuProAlaAsnLysThrValAlaLeuGly

898  AGCAACGTGGAGTTCATGTGTAAGGTGTACAGTGACCCGCAGCCGCACATCCAGTGGCTAAAGCACATC  96
     SerAsnValGluPheMETCysLysValTyrSerAspProGlnProHisIleGlnTrpLeuLysHisIle

967  GAGGTGAATGGGAGCAAGATTGGCCCAGACAACCTGCCTTATGTCCAGATCTTGAAGACTGCTGGAGTT 103
     GluValAsnGlySerLysIleGlyProAspAsnLeuProTyrValGlnIleLeuLysThrAlaGlyVal

1036 AATACCACCGACAAAGAGATGGAGGTGCTTCACTTAAGAAATGTCTCCTTTGAGGACGCAGGGGAGTAT 110
     AsnThrThrAspLysGluMETGluValLeuHisLeuArgAsnValSerPheGluAspAlaGlyGluTyr

1105 GACGTGCTTGGCGGGTAACTCTATCGGACTCTCCCATCACTCTGCATGGTTGACCGTTCTGGAAGCCCT 117
     ThrCysLeuAlaGlyAsnSerIleGlyLeuSerHisHisSerAlaTrpLeuThrValLeuGluAlaLeu
```

FIG. 7b

```
1174 GAAGAGAGGCCGGCAGTGATGACCTCGCCCCTGTACCTGGAGATCATCATCTATTGCACAGGGGCCTTC 124
     GluGluArgProAlaValMETThrSerProLeuTyrLeuGluIleIleIleTyrCysThrGlyAlaPhe

1243 CTCATCTCCTGCATGGTGGGGTCGGTCATCGTCTACAAGATGAAGAGTGGTACCAAGAAGAGTGACTTC 131
     LeuIleSerCysMETValGlySerValIleValTyrLysMETLysSerGlyThrLysLysSerAspPhe

1312 CACAGCCAGATGGCTGTGCACAAGCTGGCCAAGAGCATCCCTCTGCGCAGACAGGTAACAGTGTCTGCT 138
     HisSerGlnMETAlaValHisLysLeuAlaLysSerIleProLeuArgArgGlnValThrValSerAla

1381 GACTCCAGTGCATCCATGAACTCTGGGGTTCTTCTGGTTCGGCCATCACGGCTCTCCTCCAGTGGGACT 144
     AspSerSerAlaSerMETAsnSerGlyValLeuLeuValArgProSerArgLeuSerSerSerGlyThr

1450 CCCATGCTAGCAGGGGTCTCTGAGTATGAGCTTCCCGAAGACCCTCGCTGGGAGCTGCCTCGGGACAGA 151
     ProMETLeuAlaGlyValSerGluTyrGluLeuProGluAspProArgTrpGluLeuProArgAspArg

1519 CTGGTCTTAGGCAAACCCCTGGGAGAGGGCTGCTTTGGGCAGGTGGTGTTGGCAGAGGCTATCGGGCTG 158
     LeuValLeuGlyLysProLeuGlyGluGlyCysPheGlyGlnValValLeuAlaGluAlaIleGlyLeu

1588 GACAAGGACAAACCCAACCGTGTGACCAAAGTGGCTGTGAAGATGTTGAAGTCGGACGCAACAGAGAAA 165
     AspLysAspLysProAsnArgValThrLysValAlaValLysMETLeuLysSerAspAlaThrGluLys

1657 GACTTGTCAGACCTGATCTCAGAAATGGAGATGATGAAGATGATCGGGAAGCATAAGAATATCATCAAC 172
     AspLeuSerAspLeuIleSerGluMETGluMETMETLysMETIleGlyLysHisLysAsnIleIleAsn

1726 CTGCTGGGGGCCTGCACGCAGGATGGTCCCTTGTATGTCATCGTGGAGTATGCCTCCAAGGGCAACCTG 179
     LeuLeuGlyAlaCysThrGlnAspGlyProLeuTyrValIleValGluTyrAlaSerLysGlyAsnLeu
```

FIG. 7c

```
1795 CGGGAGTACCTGCAGGCCCGGAGGCCCCCAGGGCTGGAATACTGCTACAACCCCAGCCACAACCCAGAG 186
     ArgGluTyrLeuGlnAlaArgArgProProGlyLeuGluTyrCysTyrAsnProSerHisAsnProGlu

1864 GAGCAGCTCTCCTCCAAGGACCTGGTGTCCTGCGCCTACCAGGTGGCCCGAGGCATGGAGTATCTGGCC 193
     GluGlnLeuSerSerLysAspLeuValSerCysAlaTyrGlnValAlaArgGlyMETGluTyrLeuAla

1933 TCCAAGAAGTGCATACACCGAGACCTGGCAGCCAGGAATGTCCTGGTGACAGAGGACAATGTGATGAAG 200
     SerLysLysCysIleHisArgAspLeuAlaAlaArgAsnValLeuValThrGluAspAsnValMETLys

2002 ATAGCAGACTTTGGCCTCGCACGGGACATTCACCACATCGACTACTATAAAAAGACAACCAACGGCCGA 207
     IleAlaAspPheGlyLeuAlaArgAspIleHisHisIleAspTyrTyrLysLysThrThrAsnGlyArg

2071 CTGCCTGTGAAGTGGATGGCACCCGAGGCATTATTTGACCGGATCTACACCCACCAGAGTGATGTGTGG 213
     LeuProValLysTrpMETAlaProGluAlaLeuPheAspArgIleTyrThrHisGlnSerAspValTrp

2140 TCTTTCGGGGTGCTCCTGTGGGAGATCTTCACTCTGGGCGGCTCCCCATACCCCGGTGTGCCTGTGGAG 220
     SerPheGlyValLeuLeuTrpGluIlePheThrLeuGlyGlySerProTyrProGlyValProValGlu

2209 GAACTTTTCAAGCTGCTGAAGGAGGGTCACCGCATGGACAAGCCCAGTAACTGCACCAACGAGCTGTAC 227
     GluLeuPheLysLeuLeuLysGluGlyHisArgMETAspLysProSerAsnCysThrAsnGluLeuTyr

2278 ATGATGATGCGGGACTGCTGGCATGCAGTGCCCTCACAGAGACCCACCTTCAAGCAGCTGGTGGAAGAC 234
     METMETMETArgAspCysTrpHisAlaValProSerGlnArgProThrPheLysGlnLeuValGluAsp
```

FIG. 7d

```
2347 CTGGACCGCATCGTGGCCTTGACCTCCAACCAGGAGTACCTGGACCTGTCCATGCCCCTGGACCAGTAC 241
     LeuAspArgIleValAlaLeuThrSerAsnGlnGluTyrLeuAspLeuSerMETProLeuAspGlnTyr

2416 TCCCCCAGCTTTCCCGACACCCGGAGCTCTACGTGCTCCTCAGGGGAGGATTCCGTCTTCTCTCATGAG 248
     SerProSerPheProAspThrArgSerSerThrCysSerSerGlyGluAspSerValPheSerHisGlu

2485 CCGCTGCCCGAGGAGCCCTGCCTGCCCCGACACCCAGCCCAGCTTGCCAATGGCGGACTCAAACGCCGC 255
     ProLeuProGluGluProCysLeuProArgHisProAlaGlnLeuAlaAsnGlyGlyLeuLysArgArg

2544 TGACTGCCACCCACACGCCCTCCCCAGACTCCACCGTCAGCTGTAACCCTCACCCACAGCCCCTGCCTG 262

2623 GGCCCACCACCTGTCCGTCCCTGTCCCCTTTCCTGCTGGG 2662
```

FIG. 7e

```
1    cCCCAGGTCGCGGAGGAGCGTTGCCATTCAAGTGACTGCAGCAGCAGCGGCACCGCTCGGTTCCTGAGC   6

70   CCACCGCAGCTGAAGGCATTGCGCGTAGTCCATGCCCGTAGAGGAAGTGTGCAGATGGGATTAACGTCC  13

139  ACATGGAGATATGGAAGAGGACCGGGGATTGGTACCGTAACCATGGTCAGCTGGGGTCGTTTCATCTGC  20
                                                    METValSerTrpGlyArgPheIleCys

208  CTGGTCGTGGTCACCATGGCAACCTTGTCCCTGGCCCGGCCCTCCTTCAGTTTAGTTGAGGATACCACA  27
     LeuValValValThrMETAlaThrLeuSerLeuAlaArgProSerPheSerLeuValGluAspThrThr

277  TTAGAGCCAGAAGAGCCACCAACCAAATACCAAATCTCTCAACCAGAAGTGTACGTGGCTGCACCAGGG  34
     LeuGluProGluGluProProThrLysTyrGlnIleSerGlnProGluValTyrValAlaAlaProGly

346  GAGTCGCTAGAGGTGCGCTGCCTGTTGAAAGATGCCGCCGTGATCAGTTGGACTAAGGATGGGGTGCAC  41
     GluSerLeuGluValArgCysLeuLeuLysAspAlaAlaValIleSerTrpThrLysAspGlyValHis

415  TTGGGGCCCAACAATAGGACAGTGCTTATTGGGGAGTACTTGCAGATAAAGGGCGCCACGCCTAGAGAC  48
     LeuGlyProAsnAsnArgThrValLeuIleGlyGluTyrLeuGlnIleLysGlyAlaThrProArgAsp

484  TCCGGCCTCTATGCTTGTACTGCCAGTAGGACTGTAGACAGTGAAACTTGGTACTTCATGGTGAATGTC  55
     SerGlyLeuTyrAlaCysThrAlaSerArgThrValAspSerGluThrTrpTyrPheMETValAsnVal

553  ACAGATGCCATCTCATCCGGAGATGATGAGGATGACACCGATGGTGCGGAAGATTTTGTCAGTGAGAAC  62
     ThrAspAlaIleSerSerGlyAspAspGluAspAspThrAspGlyAlaGluAspPheValSerGluAsn
```

FIG. 8a

```
622  AGTAACAACAAGAGAGCACCATACTGGACCAACACAGAAAAGATGGAAAAGCGGCTCCATGCTGTGCCT  69
     SerAsnAsnLysArgAlaProTyrTrpThrAsnThrGluLysMETGluLysArgLeuHisAlaValPro

691  GCGGCCAACACTGTCAAGTTTCGCTGCCCAGCCGGGGGGAACCCAATGCCAACCATGCGGTGGCTGAAA  75
     AlaAlaAsnThrValLysPheArgCysProAlaGlyGlyAsnProMETProThrMETArgTrpLeuLys

760  AACGGGAAGGAGTTTAAGCAGGAGCATCGCATTGGAGGCTACAAGGTACGAAACCAGCACTGGAGCCTC  82
     AsnGlyLysGluPheLysGlnGluHisArgIleGlyGlyTyrLysValArgAsnGlnHisTrpSerLeu

829  ATTATGGAAAGTGTGGTCCCATCTGACAAGGGAAATTATACCTGTGTGGTGGAGAATGAATACGGGTCC  89
     IleMETGluSerValValProSerAspLysGlyAsnTyrThrCysValValGluAsnGluTyrGlySer

898  ATCAATCACACGTACCACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCCTCACCGGCCCATCCTCCAAGCCGGACTG  96
     IleAsnHisThrTyrHisLeuAspValValGluArgSerProHisArgProIleLeuGlnAlaGlyLeu

967  CCGGCAAATGCCTCCACAGTGGTCGGAGGAGACGTAGAGTTTGTCTGCAAGGTTTACAGTGATGCCCAG  103
     ProAlaAsnAlaSerThrValValGlyGlyAspValGluPheValCysLysValTyrSerAspAlaGln

1036 CCCCACATCCAGTGGATCAAGCACGTGGAAAAGAACGGCAGTAAATACGGGCCCCGACGGGCTGCCCTAC  110
     ProHisIleGlnTrpIleLysHisValGluLysAsnGlySerLysTyrGlyProAspGlyLeuProTyr

1105 CTCAAGGTTCTCAAGGCCGCCGGTGTTAACACCACGGACAAAGAGATTGAGGTTCTCTATATTCGGAAT  117
     LeuLysValLeuLysAlaAlaGlyValAsnThrThrAspLysGluIleGluValLeuTyrIleArgAsn
```

FIG 8b

```
1174 GTAACTTTTGAGGACGCTGGGGAATATACGTGCTTGGCGGGTAATTCTATTGGGATATCCTTTCACTCT 124
     ValThrPheGluAspAlaGlyGluTyrThrCysLeuAlaGlyAsnSerIleGlyIleSerPheHisSer

1243 GCATGGTTGACAGTTCTGCCAGCGCCTGGAAGAGAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTGGAG 131
     AlaTrpLeuThrValLeuProAlaProGlyArgGluLysGluIleThrAlaSerProAspTyrLeuGlu

1312 ATAGCCATTTACTGCATAGGGGTCTTCTTAATCGCCTGTATGGTGGTAACAGTCATCCTGTGCCGAATG 138
     IleAlaIleTyrCysIleGlyValPheLeuIleAlaCysMETValValThrValIleLeuCysArgMET

1381 AAGAACACGACCAAGAAGCCAGACTTCAGCAGCCGGCTGTGCACAAGCTGACCAAACGTATCCCCC 144
     LysAsnThrThrLysLysProAspPheSerSerGlnProAlaValHisLysLeuThrLysArgIlePro

1450 CTGCGGAGACAGGTAACAGTTTCGGCTGAGTCCAGCTCCTCCATGAACTCCAACACCCCGCTGGTGAGG 151
     LeuArgArgGlnValThrValSerAlaGluSerSerSerMETAsnSerAsnThrProLeuValArg

1519 ATAACAACACGCCTCTCTTCAACGGCAGACACCCCCATGCTGGCAGGGGTCTCCGAGTATGAACTTCCA 158
     IleThrThrArgLeuSerSerThrAlaAspThrProMETLeuAlaGlyValSerGluTyrGluLeuPro

1588 GAGGACCCAAAATGGGAGTTTCCAAGAGATAAGCTGACACTGGGCAAGCCCCTGGGAGAAGGTTGCTTT 165
     GluAspProLysTrpGluPheProArgAspLysLeuThrLeuGlyLysProLeuGlyGluGlyCysPhe

1657 GGGCAAGTGGTCATGGCGGAAGCAGTGGGAATTGACAAAGACAAGCCCAAGGCGGTCACCGTGGCC 172
     GlyGlnValValMETAlaGluAlaValGlyIleAspLysAspLysProLysGluAlaValThrValAla

1726 GTGAAGATGTTGAAAGATGATGCCACAGAGAAAGACCTTTCTGATCTGGTGTCAGAGATGGAGATGATG 179
     ValLysMETLeuLysAspAspAlaThrGluLysAspLeuSerAspLeuValSerGluMETGluMETMET
```

FIG. 5C

```
1795 AAGATGATTGGGAAACACAAGAATATCATAAATCTTCTTGGAGCCTGCACACAGGATGGGCCTCTCTAT 186
     LysMETIleGlyLysHisLysAsnIleIleAsnLeuLeuGlyAlaCysThrGlnAspGlyProLeuTyr

1864 GTCATAGTTGAGTATGCCTCTAAAGGCAACCTCCGAGAATACCTCCGAGCCCGGAGGCCACCCGGGATG 193
     ValIleValGluTyrAlaSerLysGlyAsnLeuArgGluTyrLeuArgAlaArgArgProProGlyMET

1933 GAGTACTCCTATGACATTAACCGTGTTCCTGAGGAGCAGATGACCTTCAAGGACTTGGTGTCATGCACC 200
     GluTyrSerTyrAspIleAsnArgValProGluGluGlnMETThrPheLysAspLeuValSerCysThr

2002 TACCAGCTGGCCAGAGGCATGGAGTACTTGGCTTCCCAAAAATGTATTCATCGAGATTTAGCAGCCAGA 207
     TyrGlnLeuAlaArgGlyMETGluTyrLeuAlaSerGlnLysCysIleHisArgAspLeuAlaAlaArg

2071 AATGTTTTGGTAACAGAAAACAATGTGATGAAAATAGCAGACTTTGGACTCGCCAGAGATATCAACAAT 213
     AsnValLeuValThrGluAsnAsnValMETLysIleAlaAspPheGlyLeuAlaArgAspIleAsnAsn

2140 ATAGACTATTACAAAAAGACCACCAATGGGCGGCTTCCAGTCAAGTGGATGGCTCCAGAAGCCCTGTTT 220
     IleAspTyrTyrLysLysThrThrAsnGlyArgLeuProValLysTrpMETAlaProGluAlaLeuPhe

2209 GATAGAGTATACACTCATCAGAGTGATGTCTGGTCCTTCGGGGTGTTAATGTGGGAGATCTTCACTTTA 227
     AspArgValTyrThrHisGlnSerAspValTrpSerPheGlyValLeuMETTrpGluIlePheThrLeu

2278 GGGGGCTCGCCCTACCCAGGGATTCCCGTGGAGGAACTTTTTAAGCTGCTGAAGGAAGGACACAGAATG 234
     GlyGlySerProTyrProGlyIleProValGluGluLeuPheLysLeuLeuLysGluGlyHisArgMET
```

FIG. 8d

```
2347 GATAAGCCAGCCAACTGCACCAACGAACTGTACATGATGATGAGGGACTGTTGGCATGCAGTGCCCTCC 241
     AspLysProAlaAsnCysThrAsnGluLeuTyrMETMETMETArgAspCysTrpHisAlaValProSer

2416 CAGAGACCAACGTTCAAGCAGTTGGTAGAAGACTTGGATCGAATTCTCACTCTCACAACCAATGAGGAA 248
     GlnArgProThrPheLysGlnLeuValGluAspLeuAspArgIleLeuThrLeuThrThrAsnGluGlu

2485 TACTTGGACCTCAGCCAACCTCTCGAACAGTATTCACCTAGTTACCCTGACACAAGAAGTTCTTGTTCT 255
     TyrLeuAspLeuSerGlnProLeuGluGlnTyrSerProSerTyrProAspThrArgSerSerCysSer

2554 TCAGGAGATGATTCTGTTTTTTCTCCAGACCCCATGCCTTACGAACCATGCCTTCCTCAGTATCCACAC 262
     SerGlyAspAspSerValPheSerProAspProMETProTyrGluProCysLeuProGlnTyrProHis

2623 ATAAACGGCAGTGTTAAAACATGAATGACTGTGTCTGCCTGTCCCCAAACAGGACAGCACTGGGAACCT 269

2692 AGCTACACTGAGCAGGGAGACCATGCCTCCCAGAGCTTGTTGTCTCCACTTGTATATATGGATCAGAGG 276

2761 AGTAAATAATTGGAAAAGTAATCAGCATATGTGTAAAGATTTATACAGTTGAAAACTTGTAATCTTCCC 282

2830 CAGGAGGAGAAGAAGGTTTCTGGAGCAGTGGACTGCCACAAGCCACCATGTAACCCCTCTCACCTGCCG 289

2899 tgcGTACTGGCTGTGGACCAGTAGGACTCAAGGTGGACGTGCGTTCTGCCTTCCTTGTTAATTTTGTAA 296

2968 TAATTGGAGAAGATTTATGTCAGCACACACTTACAGAGCACAAATGCAGTATATAGGTGCTGGATGTAT 303

3037 GTAAATATATTCAAATTATGTATAAATATATATTATATATTTACAAGGAGTTATTTTTTGTAYYGAttt 310

3106 taaatggatgtcccaatgcacctagaaaattggtCTCTCTTTTTTTAATAGCTATTTGCTAAATGCTGT 317

3175 TCTTACACATAATTTCTTAATTTTCACCGAGCAGAGGTGGAAAAATACTTTTGCTTTCAGGGAAAATGG 324

3244 TATAACGTTAATTTATTAATAAATTGGTAATATACAAAACAATTAATCATTTATAGTTTTTTTTGTAAT 331

3313 TTAAGTGGCATTTCTATGCAGGCAGCACAGCAGACTAGTTAATCTATTGCTTGGACTTAACTAGTTATC 338

3382 AGATCCTTTGAAAAGAGAATATTTACAATATATGA 3416
```

FIG. 8e