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

(10) **DE 694 34 670 T2** 2007.01.18

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 694 044 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 670.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/04178**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 915 385.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/024159**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.04.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **27.10.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.01.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **22.03.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.01.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/12*** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
49254 **15.04.1993** **US**

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

(73) Patentinhaber:
National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, Col., US

(72) Erfinder:
JOHNSON, Gary L., Boulder, CO 80304, US

(74) Vertreter:
Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189 Wiesbaden

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND PRODUKT FÜR DIE REGULATION DES REAKTIONSVERMÖGENS VON ZELLEN AUF ÄUSSERE SIGNALE**

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 isolierte Nucleinsäuresequenzen für MEK-Kinase, im Wesentlichen reine MEKK-Proteine und Verfahren, die bei der Regulation und dem Einsatz von MEKK-, MEK- und MAPK-Enzymen eine Rolle spielen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) (die auch als extrazelluläre Signal-regulierte Kinsasen oder ERKs bezeichnet werden) werden als Antwort auf die Anbindung eines Liganden von beiden Wachstumsfaktor-Rezeptoren schnell aktiviert, welche Tyrosinkinasen (wie z.B. der Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und Rezeptoren darstellen, die an die Bindungsproteine (G-Proteine) eines heterotrimeren Guaninnucleotids wie z.B. den Thrombinrezeptor, binden. Die MAPKs scheinen von verschiedenen Second-Messengern übermittelte intrazelluläre Merhrfachsignale zu integrieren. MAPKs phosphorylieren und regulieren die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren, einschließlich den EGF-Rezeptor, Rsk 90, Phospholipase A_2, Arachidonsäuremetaboliten, c-Myc und möglicherweise c-Jun. Obwohl die schnelle Aktivierung von MAPKs durch Rezeptoren, welche Tyrosinkinasen sind, von Ras abhängt, scheint die G-Protein-vermittelte Aktivierung der MAPK über Übertragungswege zu erfolgen, die von Ras abhängig und unabhängig sind.

[0003] Eine Komplementationsanalyse der Pheromon-induzierten Signalkaskade in der Hefe wies auf ein Proteinkinase-System hin, welches die Aktivität von Spk1 und Fus3-Kss1 kontrolliert, die MAPK-Homologen von Schizosaccharomyces pombe und Saccharomyces cerevisiae (siehe z.B. B.R. Cairns et al., Genes and Dev. 6, 1395 (1992); B.J. Stevenson et al., Genes and Dev. 6, 1293 (1992); S.A. Nadin-Davis et al., EMBO J. 7, 985 (1988); Y. Wang et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3554 (1991)). In S. cerevisiae ist die Proteinkinase Ste7 der upstream-Regulator für die Aktivität von Fus3-Kss1; die Proteinkinase Ste11 reguliert Ste7. Die Genprodukte Byr1 und Byr2 von S. pombe sind homolog zu Ste7 bzw. Ste11. Das MEK-Enzym (MAPK-Kinase oder ERK-Kinase) oder das MKK-Enzym (MAP-Kinase-Kinase) haben eine ähnliche Sequenz wie Ste7 und Byr1. Die MEKs phosphorylieren MAPKs sowohl an Tyrosin- als auch an Threoninresten, was zu einer Aktivierung der MAPK führt. Die Serin-Threonin-Proteinkinase Raf von Säugern phosphoryliert und aktiviert die MEK, was zu einer Aktivierung der MAPK führt. Die Raf wird als Reaktion auf die Tyrosinkinase-Aktivität des Wachstumsfaktor-Rezeptors aktiviert und daher kann Raf die MAPK als Reaktion auf die Stimulation von Membran-assoziierten Tyrosinkinasen aktivieren. Die Raf ist in ihrer Sequenz nicht mit Ste11 und Byr2 verwandt. Somit kann Raf in Säugerzellen eine Abweichung von dem Pheromon-abhängigen Proteinkinase-System in der Hefe darstellen. Zell- und Rezeptor-spezifische Unterschiede bei der Regulation von MAPKs legen nahe, dass es andere von Raf unabhängige Regulatoren der MEKs von Säugern gibt.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein im Wesentlichen reines Protein, das ausgewählt ist aus der Gruppe, welche (a) die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine katalytische Kinase-Domäne oder eine regulatorische Domäne derselben umfasst; oder (b) die in SEQ ID NO 5 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine katalytische Kinase-Domäne oder eine regulatorische Domäne derselben umfasst.

[0005] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein im Wesentlichen reines Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die zu mindestens 80% identisch mit einer in den SEQ ID NO 4 oder SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz ist.

[0006] Bevorzugte Aspekte des Proteins sind in den Ansprüchen 3 und 4 definiert.

[0007] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein im Wesentlichen reines Protein, das eine Aminosäuresequenz für eine Kinase-Domäne umfasst, welche zu mindestens 80% identisch mit einer in den SEQ ID NO 8 oder SEQ ID NO 9 dargestellten Aminosäuresequenz für eine Kinase-Domäne.

[0008] Bevorzugte Aspekte des Proteins sind in den Ansprüchen 6 und 7 definiert.

[0009] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung einen Antikörper, der sich spezifisch an diese Proteine bindet.

[0010] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, von einem Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle ausgelöste Signale zu regulieren, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

(a) in Kontakt bringen einer ein Protein der Erfindung enthaltenden Zelle mit einer mutmaßlichen reagulatorischen Verbindung;

(b) in Kontakt bringen einer Zelle mit einem Liganden, der in der Lage ist, sich an diesen Rezeptor zu binden und

(c) Bestimmung der Fähigkeit dieser mutmaßlich regulatorischen Verbindung, die Signale zu regulieren, indem die Aktivität dieses Proteins ermittelt wird.

[0011] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, die Signaltransduktion in einer Zelle zu regulieren, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

(a) in Kontakt bringen einer mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung mit dem Protein der Erfindung, um ein Reaktionsgemisch zu bilden;

(b) in Kontakt bringen des Reaktionsgemischs mit einem MEKK-Protein und

(c) Bestimmung der Fähigkeit dieser mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung, die Aktivität dieses MEKK-Proteins zu hemmen.

[0012] Die vorliegende Erfindung ist auf ein neues als MEKK- oder Säuger-MEK-Kinase-Gen bezeichnetes Gen gerichtet. Die Regulation der MEKK ist in verschiedenen therapeutischen Anwendungen von Nutzen, welche bei der Differnzierung und Mitogenese eine Rolle spielen. Insbesondere ist die vorliegende Erfindung auf die Regulation von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAKPs) gerichtet, von denen der Erfinder der vorliegenden Erfindung entdeckt hat, dass sie von der MEKK aktiviert werden. Weil von den MAPKs bekannt ist, dass sie die Aktivität von Enzymen und/oder Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und regulieren, zielt die vorliegende Erfindung auf die Regulation solcher Aktivitäten entweder durch Manipulation der die MEKK codierenden Nucleinsäuresequenzen und/oder durch Verabreichung der MEKK an gewünschte Zellpopulationen. Die vorliegende Erfindung ist auch auf eine duale Regulation durch Raf und MEKK gerichtet, um gewünschte Niveus an MAPK-Aktivität zu bewirken und um typische Reaktionen auf eine Ligandenbindung durch sowohl Wachstumsfaktorrezeptoren, wie z.B. Tyrosinkinasen, als auch durch an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. der Thrombin-Rezeptor, zu verändern. Die vorliegende Erfindung ist daher auf im Wesentlichen reine MEKK, auf die MEKK codierende isolierte Nucleinsäuresequenzen, auf mit dem MEKK-Gen transformierte Wirtszellen und auf Antikörper gegen das MEKK-Protein gerichtet. Die vorliegende Erfindung ist ferner auf eine Gentherapie gerichtet, in welcher das MEKK-Gen eingesetzt wird, um die Reaktionen auf eine Ligandenbindung durch die Wachstumsfaktoren und die G-Protein gebundenen Rezeptoren zu regulieren.

[0013] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung spielt die Inaktivierung der MEKK eine Rolle, um eine Metastase, verschiedene Formen von Krebs, Autoimmunkrankheiten, allergische Reaktionen und Entzündungsreaktionen zu hemmen. In einem anderen Aspekt spielt die Stimulation der MEKK-Produktion eine Rolle, um Aktivitäten bei der Wundheilung zu erleichtern. Die vorliegende Erfindung ist daher bei der Kontrolle der Aktivität von neutrophilen Zellen, Makrophagen unjd basophilen Zellen bei Entzündungsreaktionen in der Lunge und verschieden anderen Geweben von Nutzen. Die vorliegende Erfindung ist bei der Beeinflussung von Stoffwechselwegen von Nutzen, die von Thrombozyten aktivierenden Faktoren und Thrombin-Rezeptoren reguliert werden. Sie kommt auch bei der Hemmung der Blutgefäßbildung und gewissen Arten von Tumoren, insbesondere Lungenkarzinomen und anderen Carcinomen des Epithels sowie bei der Behandlung von glatter Muskulatur und arteriellen Geweben zur Anwendung. Darüber hinaus kann die vorliegende Erfindung genutzt werden, um sowohl chemotaktische Reaktionen von neutrophilen Zellen und Makrophagen zu hemmen als auch, um allergische Reaktionen zu verbessern.

[0014] Die vorliegende Erfindung umfasst auch den Einsatz des MEKK-Gens in der Gentherapie, wodurch eine Stimulierung der Differenzierung und Mitogenese erreicht werden kann, um z.B. eine Atrophie bestimmter Zelltypen, wie z.B. beim Parkinson-Syndrom oder bei der Alzheimer-Krankheit, zu mindern, indem sie als neurotroper Wachstumsfaktor wirken.

[0015] In einer anderen Ausführungsform wird die MEKK als Screen für Onkogene und Krebsmittel eingesetzt, indem ein Screening-Assay verwendet wird, um zu bestimmen, ob solche Proteine durch die MEKK aktiviert werden. Gegen MEKK hergestellte Antikörper können dafür benutzt werden, um die Änderungen im Ausmaß der MEKK-Expression zu ermitteln, die bei bestimmten Krebsarten und Autoimmunkrankeiten eine Rolle spielen könnten.

[0016] Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat erkannt, dass, wenn Liganden an die Oberflächenrezep-

toren von B-Zellen und T-Zellen gebunden werden, die MEKK als Ergebnis der Bindung an den Rezeptoren ein überwiegend phosphoryliertes Produkt darstellt. Es wird angenommen, dass die MEKK als solche ein Hauptregulationsprotein auf dem Signal-Übertragungsweg der T- und B-Zellen ist. Man nimmt daher an, dass die Regulation der MEKK-Expression bei der Regulation des Wachstums und der Differenzierung der T- und B-Zellen von Nutzen ist.

[0017] MEKK kann dazu verwendet werden, Antikörper zum Einsatz in diagnostischen und therapeutischen Anwendungen zu produzieren. Beispielsweise lassen sich Antikörper gegen die MEKK verwenden, um ein Screening nach Tumorzellen durchzuführen, welche Krebsproteine exprimieren, die durch die MEKK aktiviert werden.

[0018] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann das MEKK-Protein zur Stimulierung des Zellwachstums, der Mitogenese und Differenzierung in vitro eingesetzt werden. Beispielsweise lässt sich jede besondere Population von Zellen erhalten, von der man wünscht, dass sie expandiert und sich differenziert, indem solche Zellen einer wirksamen Menge von MEKK ausgesetzt werden.

[0019] In noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die MEKK in einer geeigneten Formulierung zur Verabreichung an gewünschte Zellen zur Verfügung gestellt werden, um eine antünflammatorische Reaktion zu bewirken.

[0020] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden Wirtszellen mit dem MEKK-Gen transformiert. Das MEKK-Gen ist daher als Werkzeug in der Gentherapie zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten einschließlich Krebs, Autoimmunkrankheiten, Nervenkrankheiten, Muskelerkrankungen, allergische Reaktionen und Entzündungsreaktionen von Nutzen. Der hier verwendete Begriff "Gentherapie" bezieht sich auf die Einschleusung eines gewünschten Gens in eine besondere Population von Zellen, um in einer solchen Zellpopulation die Expression dieses Gens zu bewirken.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0021] Fig. 1A ist ein Northern (RNA)-Blot einer einzelnen MEKK-mRNA von 7,8 kb in verschiedenen Zelllinien und Mausgeweben.

[0022] Fig. 1B zeigt einen Southern (DNA)-Blot des MEKK-Gens.

[0023] Fig. 1C ist ein Immunoblot, der die Expression der 78-kd- und 50-kd-Formen der MEKK in Zellinien von Nagern zeigt.

[0024] Fig. 2A zeigt die Aktivierung der MAPK in mit MEKK transfizierten COS-Zellen.

[0025] Fig. 2B ist ein Immunoblot, der die Expression der MEKK in Zellen zeigt, die mit einem Vektor allein (Kontrolle) oder mit einem MEKK codierenden Vektor transfiziert worden waren, welche mit oder ohne EGF behandelt wurden.

[0026] Fig. 3 zeigt die Aktivierung und Phosphorylierung der MEK in mit MEKK transfizierten COS-Zellen.

[0027] Fig. 4A zeigt die Phosphorylierung der MEK-1 durch MEKK.

[0028] Fig. 4B zeigt den zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung der MEK-1 durch in COS-Zellen exprimierte MEKK.

[0029] Fig. 4C ist ein Immunoblot von in COS-Zellen überexprimierter MEKK.

[0030] Fig. 5A zeigt die Phosphorylierung der MAPK durch aktivierte MEK-1.

[0031] Fig. 5B zeigt die Phosphorylierung der MEK-1 durch immunopräzipitierte MEKK.

[0032] Fig. 6A zeigt die Phosphorylierung der MEK-1 durch aktivierte Raf.

[0033] Fig. 6B zeigt die Aktivität der Raf in MEKK überexprimierenden mit EGF behandelten COS-Zellen.

[0034] Fig. 7 zeigt Immunopräzipitate des MEKK-Proteins bei Einsatz von MEKK-Antiserum.

[0035] Fig. 8 zeigt die Phosporylierung der kinaseinaktiven MEK-1 durch immunopräzipitierte MEKK oder Raf-B.

[0036] Fig. 9 zeigt den zeitlichen Verlauf einer Aktivierung von EGF-stimulierter MEKK und Raf-B.

[0037] Fig. 10 zeigt die Immunodepletion von Raf-B aus MEKK-Immunopräzipitaten.

[0038] Fig. 11 zeigt, dass eine Immunodepletion von Raf-B die Aktivität der Raf-B senkt.

[0039] Fig. 12 zeigt die Hemmung der Aktivierung der MEKK und Raf-B durch eine dominante negative N^{17}Ras-Expression.

[0040] Fig. 13 zeigt die Hemmung der EGF-Aktivierung von MEKK durch Forskolin.

[0041] Fig. 14 ist eine schematische Darstellung des Signalübertragungsweges von Vertebraten und Hefe.

[0042] Fig. 15 veranschaulicht die verbesserte MEKK-Aktivität durch eingekürzte MEKK-Moleküle.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0043] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues MEKK-Protein, das in der Lage ist, die Signaltransduktion in Zellen zu regulieren. Ein MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung kann ein MEKK-Protein mit voller Länge oder einen Abschnitt eines MEKK-Proteins umfassen. Ein MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung ist in der Lage, das MEK-Protein zu phosphorylieren und/oder die MEKK-Kinsae-Aktivität zu hemmen. Vorzugsweise umfasst ein MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung mindestens einen Teil einer katalytischen MEKK-Domäne so, dass das Protein in der Lage ist, das MEK-Protein zu phosphorylieren und/oder einen Teil einer regulatorischen MEKK-Domäne so, dass das Protein in der Lage ist, die MEKK-Kinase-Aktivität zu hemmen.

[0044] Die Nucleinsäuresequenzen von Ste11 und Byr2 wurden eingesetzt, um die MEK-Kinase (MEKK)-cDNA von Säugern zu identifizieren. Es wurden einzige degenerierte Inosin-Oligodesoxynucleotide entworfen, um den Abschnitten mit Sequenzidentität zwischen den Genen der Hefen Ste11 und Byr2 zu entsprechen. Mit Primern und cDNA-Matrizen, die aus polyadenylierter RNA aus NIH 3T3-Zellen stammen, wurde ein mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) gewonnenes Amplifikationsprodukt aus 320 Basenpaaren (bp) isoliert. Diese 320 bp cDNA wurde als Sonde eingesetzt, um eine MEKK-cDNA (im Folgenden als MEKK 1 bezeichnet) von 3260 bp aus einer cDNA-Biliothek aus Mäusehirn zu identifizieren. Die Nucleotidsequenz von MEKK 1 wurde mittels Didesoxynucleotid-Sequenzierung von doppelsträngiger DNA ermittelt. Die Nucleinsäuresequenz und die translatierte Aminosäuresequenz für MEKK 1 werden in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1.

```
TACACTCCTT GCCACAGTCT GGCAGAAAGA ATCAAACTTC AGAGACTCCT CCGGCCAGTT
GTAGACACTA TCCTTGTCAA GTGTGCAGAT CCAACAGCCG CACGAGTCAG CTGTCCATAT
CTACAGTGCT GGAACTCTGC AAGGGCCAAG CACGAGAGCT GGCGGTTGGG AGAGAAATAC
TTAAAGCTGG GTCCATCGGG CTTGGTGGTG TCGATTACGT CTTAAGTTGT ATCCTTGGAA
ACCAAGCTGA ATCAAACAAC TGGCAAGAAC TGCTGGGTCG CCTCTGTCTT ATAGACAGGT
TGCTGTTGGA ATTTCCTGCT GAATTCTATC CTCATATTGT CAGTACTGAT GTCTCACAAG
CTGAGCCTGT TGAAATCAGG TACAAGAACC TGCTCTCCCT CTTAACCTTT GCCTTGCAAT
CCATTGACAA TTCCCACTCG ATGGTTGGCA AGCTCTCTCG GAGGATATAT CTGAGCTCTG

CCAGG ATG GTG ACC GCA GTG CCC GCT GTG TTT TCC AAG CTG GTA ACC          527
      Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr
        1               5                  10

ATG CTT AAT GCT TCT GGC TCC ACC CAC TTC ACC AGG ATG CGC CGG CGT        575
Met Leu Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg
```

```
15                  20                  25                  30

CTG ATG GCT ATC GCG GAT GAG GTA CAA ATT GCC GAG GTC ATC CAG CTG        623
Leu Met Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu
                35                  40                  45

GGT GTG GAG GAC ACT GTG GAT GGG CAT CAG GAC AGC TTA CAG GCC GTG        671
Gly Val Glu Asp Thr Val Asp-Gly His Gln Asp Ser Leu Gln Ala Val
            50                  55                  60

GCC CCC ACC AGC TGT CTA GAA AAC AGC TCC CTT GAG CAC ACA GTC CAT        719
Ala Pro Thr Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His
        65                  70                  75

AGA GAG AAA ACT GGA AAA GGA CTA AGT GCT ACG AGA CTG AGT GCC AGC        767
Arg Glu Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser
    80                  85                  90

TCG GAG GAC ATT TCT GAC AGA CTG GCC GGC GTC TCT GTA GGA CTT CCC        815
Ser Glu Asp Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro
 95                 100                 105                 110

AGC TCA ACA ACA ACA GAA CAA CCA AAG CCA GCG GTT CAA ACA AAA GGC        863
Ser Ser Thr Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly
                115                 120                 125

AGA CCC CAC AGT CAG TGT TTG AAC TCC TCC CCT TTG TCT CAT GCT CAA        911
Arg Pro His Ser Gln Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala Gln
            130                 135                 140

TTA ATG TTC CCA GCA CCA TCA GCC CCT TGT TCC TCT GCC CCG TCT GTC        959
Leu Met Phe Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val
        145                 150                 155

CCA GAT ATT TCT AAG CAC AGA CCC CAG GCA TTT GTT CCC TGC AAA ATA       1007
Pro Asp Ile Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile
    460                 165                 170

CCT TCC GCA TCT CCT CAG ACA CAG CGC AAG TTC TCT CTA CAA TTC CAG       1055
Pro Ser Ala Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln
175                 180                 185                 190

AGG AAC TGC TCT GAA CAC CGA GAC TCA GAC CAG CTC TCC CCA GTC TTC       1103
Arg Asn Cys Ser Glu His Arg Asp S«r Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe
                195                 200                 205

ACT CAG TCA AGA CCC CCA CCC TCC AGT AAC ATA CAC AGG CCA AAG CCA       1151
Thr Gln Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro
            210                 215                 220

TCC CGA CCC GTT CCG GGC AGT ACA AGC AAA CTA GGG GAC GCC ACA AAA       1199
Ser Arg Pro Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys
        225                 230                 235

AGT AGC ATG ACA CTT GAT CTG GGC AGT GCT TCC AGG TGT GAC GAC AGC       1247
Ser Ser Met Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser
    240                 245                 250

TTT GGC GGC GGC GGC AAC AGT GGC AAC CCC GTC ATA CCC AGC GAC GAG       1295
Phe Gly Gly Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu
255                 260                 265                 270

ACA GTG TTC ACG CCG GTG GAG GAC AAG TGC AGG TTA GAT GTG AAC ACC       1343
```

```
Thr Val Phe Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr
                275                 280                 285

GAG CTC AAC TCC AGC ATC GAG GAC CTT CTT GAA GCA TCC ATG CCT TCA      1391
Glu Leu Asn Ser Ser Ile Glu Asp Leu Glu Glu Ala Ser Met Pro Ser
            290                 295                 300

AGT GAC ACG ACA GTC ACT TTC AAG TCC GAA GTC GCC GTC CTC TCT CCG      1439
Ser Asp Thr Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro
        305                 310                 315

GAA AAG GCC GAA AAT GAC GAC ACC TAC AAA GAC GAC GTC AAT CAT AAT      1487
Glu Lys Ala Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn
    320                 325                 330

CAA AAG TGC AAA GAA AAG ATG GAA GCT GAA GAG GAG GAG GCT TTA GCC      1535
Gln Lys Cys Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Leu Ala
335                 340                 345                 350

ATC GCC ATG GCG ATG TCA GCG TCT CAG GAT GCC CTC CCC ATC GTC CCT      1583
Ile Ala Met Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro
                355                 360                 365

CAG CTG CAG GTG GAA AAT GGA GAA GAT ATT ATC ATC ATT CAG CAG GAC      1131
Gln Leu Gln Val glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp
            370                 375                 380

ACA CCA GAA ACT CTT CCA GGA CAT ACC AAA GCG AAA CAG CCT TAC AGA      1679
Thr Pro Glu Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg
        385                 390                 395

GAA GAC GCT GAG TGG CTG AAA GGC CAG CAG ATA GGC CTC GGA GCA TTT      1727
Glu Asp Ala Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe
    400                 405                 410

TCT TCC TGT TAC CAA GCA CAG GAT GTG GGG ACT GGG ACT TTA ATG GCT      1775
Ser Ser Cys Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala
415                 420                 425                 430

GTG AAA CAG GTG ACG TAC GTC AGA AAC ACA TCC TCC GAG CAG GAG GAG      1823
Val Lys Cln Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu
                435                 440                 445

GTG GTG GAA GCG TTG AGG GAA GAG ATC CGG ATG ATG GGT CAC CTC AAC      1871
Val Val Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn
            450                 455                 460

CAT CCA AAC ATC ATC CGG ATG CTG GGG GCC ACG TGC GAG AAG AGC AAC      1919
His Pro Asn Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn
        465                 470                 475

TAC AAC CTC TTC ATT GAG TGG ATG GCG GGA GGA TCT GTG GCT CAC CTC      1967
Tyr Asn Leu Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu
    480                 485                 490

TTG AGT AAA TAC GGA GCT TTC AAG GAG TCA GTC GTC ATT AAC TAC ACT      2015
Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr
495                 500                 505                 510

GAG CAG TTA CTG CGT GGC CTT TCC TAT CTC CAC GAG AAC CAG ATC ATT      2063
Clu Gln Leu Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile
                515                 520                 525
```

```
CAC AGA GAC GTC AAA GGT GCC AAC CTG CTC ATT GAC AGC ACC GGT CAG        2111
His Arg Asp Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln
            530                 535                 540

AGG CTG AGA ATT GCA GAC TTT GGA GCT GCT GCC AGG TTG GCA TCA AAA        2159
Arg Leu Arg Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala ArG Leu Ala Ser Lys
        545                 550                 555

GGA ACC GGT GCA GGA GAG TTC CAG GGA CAG TTA CTG GGG ACA ATT GCA        2207
Gly Thr Gly Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala
    560                 565                 570

TTC ATG GCG CCT GAG GTC CTA AGA GGT CAG CAG TAT GGT AGG AGC TGT        2255
Phe Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg S«e Cys
575                 580                 585                 590

GAT GTA TGG AGT GTT GGC TGC GCC ATT ATA GAA ATG GCT TGT GCA AAA        2303
Asp Val Trp Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys
                595                 600                 605

CCA CCT TGG AAT GCA GAA AAA CAC TCC AAT CAT CTC GCC TTG ATA TTT        2351
Pro Pro Trp Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe
            610                 615                 620

AAG ATT GCT AGC GCA ACT ACT GCA CGG TCC ATC CCG TCA CAC CTG TCC        2399
Lys Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser
        625                 630                 635

CCG GGT CTG CGC GAC GTG GCC GTG CGC TGC TTA GAA CTT CAG CCT CAG        2447
Pro Gly Leu Arg Asp Val Ala Val Arg Cys Leu Glu Leu Gln Pro Gln
    640                 645                 650

GAC CGG CCT CCG TCC AGA GAG CTG CTG AAA CAT CCG GTC TTC CGT ACC        2495
Asp Arg Pro Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr
655                 660                 665                 670

ACG TGG TAGTTAATTG TTCAGATCAG CTCTAATGGA GACAGGATAT CGAACCGGGA         2551
Thr Trp


GAGAGAAAAG AGAACTTGTG GGCGACCATG CCGCTAACCG CAGCCCTCAC
GCCACTGAAC AGCCAGAAAC GGGGCCAGCG GGGAACCGTA CCTAAGCATG
TGATTGACAA ATCATGACCT GTACCTAAGC TCGATATGCA GACATCTACA
GCTCGTGCAG GAACTGCACA CCGTGCCTTT CACAGGACTG GCTCTGGGGG
ACCAGGAAGG CGATGGAGTT TGCATGACTA AAGAACAGAA GCATAAATTT
ATTTTTGGAG CACTTTTTCA GCTAATCAGT ATTACCATGT ACATCAACAT
GCCCGCCACA TTTCAAACTC AGACTGTCCC AGATGTCAAG ATCCACTGTG
TTTGAGTTTG TTTGCAGTTC CCTCAGCTTG CTGGTAATTG TGGTGTTTTG
TTTTCGATGC AAATGTGATG TAATATTCTT ATTTTCTTTG GATCAAAGCT
GGACTGAAAA TTGTACTGTG TAATTATTTT TGTGTTTTTA ATGTTATTTG
GTACTCGAAT TGTAAATAAC GTCTACTGCT GTTTATTCCA GTTTCTACTA
CCTCAGGTGT CCTATAGATT TTTCTTCTAC CAAAGTTCAC TCTCAGAATG
AAATTCTACG TGCTGTGTGA CTATGACTCC TAAGACTTCC AGGGCTTAAG
GGCTAACTCC TATTAGCACC TTACTATGTA AGCAAATGCT ACAAAAAAAA
AAAAAAAAA
```

[0045] Es wurden zusätzliche einzige MEKK-Proteine, MEKK2, MEKK3 und MEKK4 mittels PCR identifiziert. Die Aminosäuresequenzen für MEKK 2 und MEKK 3 im Vergleich mit der Aminosäuresequenz von MEKK 1 sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2.

```
MVTAVPAVFSKLVTMLNASGSTHFTRMRRRLMAIADEVEIAEVIQLGVEDTVDGHQDSLQ MEKK 1
                                    MDDQQALNSIMQDL------------      2
                                    MDEQEALDSIMKDLVALQMSRRTRL-      3

AVAPTSCLENSSLEHTVHREKTGKGLSATRLSASSEDISDRLAGVSVGLPSSTTTEQPKP      1
AVLHKPVGQHYLYKKPGKQNLHHQKNRMMFESMLMIEEEKRILQVTRPVKLEDLRSKSKI      2
S--GYETMKMKDTGHPNRQSDVRIKFEHNGERRI-IAFSRPVRYEDVEHKVTTVFGQPLD      3

AVQTKGRPHSQCLNSS-PLSHAQLMFPAPSAPCSSAPSVPDISKHRPQAFVPCKIPSASP      1
AFGQSMDLHYTNNELVIPLTTQDDLDKAVELLDRSIHNKSL-KILLVVNGSTQA-TNLEP      2
LHYMNMELSILLKNQDDLDKAIDILDRSSSMKSLRILLLSQDRNHTSSSPHSGVSRQVRI      3

QTQRKFSLQFQRNCSEHRDSDQLSPVFTQS-RPPPSSNIHRPKPSRPVPGSTSKLDDATK      1
SPSPEDLNNTPLGAERKKRLSVVGPPKR--DRSSPPPGYIPDILHQIARNGSFTSINSEG      2
KPSQSAGDIMTIYQAPEPRSRHLSVSSQNPGRSSPPPGYVPERQQHIARQGSYTSINSEG      3

SSNTLDLGSASRCDDSFGGGGNSGNAVIPSDETVFTPVEDKCRLDVNTELNSSIEDLLEA      1
EFIPESMDQ-MLDPLSLSSPENSGSGSCPSLDSPLDGESYPKSRMPRAQSYPDNHQEFYD      2
EFIPETSEQCHLDPLSSAENSLSGSCQSLDRSADSPSFRKKQMSRARSFPDNR---ECSD      3

SMPSSDTTVTFKSEVAVLSPEKAENDDTYKDDVNHNQKCKEKMEAEEEEALAIAMAMSAS      1
YDNPIFEKFGKGGTYPRRYHVSYHHQEYNDGRKTFPRARRTQGTSFRSPVSFSPTDHSLS      2
K----RETQLYDKGVKGGTYPRRYHVSVHHKDYNDGRRTFPRIRRHQGNLFTLVPSSRSL      3

QDALPIVPQLQVWNGEDIIIIQQDTPETLPGHTKAKQPYRE***DAEWLKGQQIGLGAFSSCY***  1
TSSGSSVFTPEYDDSRIRRRGSDIDNPTLTVTDISPPSRSP***RAPTNWRLGKLLGQGAFGR***  2
STNGENMGVAVQYLDPRGRLRSADSENALTVQERMVPTKSP***SAPINWRRGKLLGQGAFGR***  3

***QAQDVGTGTLMAVKQVTTVRNTSSEQEEVVEALREEIRIQGHLNHPNIIRMLGATCEKSN***  1
***VYLCYDVDTGRELAVKQVQFNPESPETSKEVNALECEIQLLKMLLNERIVQYYGCLRDPQ***  2
***YYLCYDVDTGRELASKQVQFDPDSPETSKEYSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRA***  3

***YMLFIEWMAGGSVAHLLSKYGAFKESVVINYTEQLLRGLSYLHEN--Q-IIHRDVKGANL***  1
***EKTLSIFMELSPGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIVHRDIKGANI***  2
***EKILTIFMEYMPGGSVKDQLKAYCALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIVHRDIKGANI***  3

***LIDSTGQ RLRIADFGAAARLASK-GTGAGEFQGQLLGTIAFMAPEVLRGQQYGRSCDVW***  1
***LRDSTGNIKLGDFGASKRLQTICLSGTGMKSVTG-PY----WMSPEVISGEGYGRKADIW***  2
***LRDSAGMVKLGDFGASKRLQTICMSSTGIRSVTGTPY----WMSPEVISGEGYGRKADVW***  3

***SVGCAIIEMACAKPPWMAEKHSMHLALIFKIASATTAPSIPSHLSSPLRDVAVRCLELQP***  1
***SCACTVVEMLTEKPPW-AEFEA-MAA-IFKIATQPZNPKLPPHVSDYYRDFLKRIFVEAK***  2
***SLGCTVVEMLTEKPPW-AEYEA-MAA-IFKIATQPTMPQLPSHUSEHGRDFLRRIFVEAR***  3

***QDRPPSRE LLKHPVFRTTW***                                          1
***L-RP-SAEELLRHMFVHYH***                                           2
***Q-RP-SAEELLYHHFAQLVY***                                          3
```

Fettes Amino-Ende – Regulatorische Domäne
Unterstrichene Sequenz – regulatorische Gelenksequenz
Fett, kursiv – Katalytische Domäne

[0046] Die Aminosäuresequenz der Kinase-Domäne von MEKK 4 wird in Tabelle 3 im Vergleich mit den Kinase-Domänen von MEKK 1, MEKK 2 und MEKK 3 gezeigt.

Tabelle 3.

```
..IRFQPMDHKTIKETADEELKIFEGIKHPNLVRYFGV..ELHREEM.YI
HEKK 4
TYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMGHLNHPNIIRMLGATCEKSNYNLFIE
MEKK 1
QVQFMPESPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQEKTLSI
MEKK 2
QVQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
MEKK 3

IFKEYCDEGTLEEVSRLGLQEHV.I.RLYTKQITVAIMVLHEHGNV
MEKK 4
.WMAGGSVAHLLSKYGAFKESVV.IN..TTEQLLRGLSYLHENQII
MEKK 1
.FMELSOGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIV
MEKK 2
.FMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSMMIV
MEKK 3
```

[0047] Auf Grundlage der Kozak-Konsensussequenz für Initiationscodons lässt sich von dem Starter-Methionin voraussagen, dass es an der Nucleotid-Position 486 erscheint (siehe Tabelle 1). Mit diesem Methionin am Start codiert die cDNA ein Protein aus 672 Aminosäuren, was einer Molekülgröße von 73 kD entspricht. Es gibt noch ein anderes im Leseraster liegendes Methionin an Position 441, das der Kozak-Regel nicht folgt, aber ein Protein aus 687 Aminosäureresten (74,6 kD) ergeben würde. Dieser Größenbereich steht mit der mittels SDS-Polyacrylamidgelelktrophorese (PAGE) und Immunoblotting ermittelten offensichtlichen Molekülgröße von 78 bis 80 kD im Einklang.

[0048] Die Primärsequenz des MEKK-Proteins legt zwei funktionelle Domänen nahe, (i) einen an Serin und Threonin reichen NH_2-terminalen Abschnitt, der eine regulatrorische Rolle spielen könnte und (ii) eine CO-OH-terminale katalytische Proteinkinase-Domäne. Zwanzig Prozent der NH_2-terminalen 400 Aminosäuren sind Serin oder Threonin, während es nur zwei Tyrosinreste gibt; in der MEKK-Sequenz werden keine SH2- oder SH3-Domänen kodiert. Die katylytische Domäne sitzt in der COOH-terminalen Hälfte der MEKK.

[0049] MEKK wird wird von einer mRNA von 7,8 kb codiert, welche in einigen Zelllinien und in Geweben der Maus exprimiert wird. Es wurden gleiche Mengen (20µg) Gesamt-RNA auf das Gel gepackt, wie dies durch die Färbung mit Ethidiumbromid angezeigt wird. Die Blots wurden entweder mit einer einen Abschnitt der MEKK-Kinasedomäne codierenden cDNA mit 320 bp oder mit einem einen Abschnitt des NH_2-terminalen Bereichs der MEKK codierenden Fragment von 858 bp sondiert. Die MEKK-mRNA wurde im Herz und in der Milz der Maus stark exprimiert während in der Leber geringere Mengen vorkommen. Die MEKK-mRNA von 7,8 kb wurde mit Sonden identifiziert, die sowohl von den 5'-Enden als auch den 3'-Enden der MEKK-cDNA stammen. Somit fehlt der MEKK-cDNA eine vermeintliche nicht übersetzte Sequenz von etwa 4 kb.

[0050] Es wird angenommen, dass MEKK das Produkt eines einzigen Gens ist. **Fig. 1B** zeigt einen Southern (DNA)-Blot des MEKK-Gens. Genomische DNA (10 µg) der Maus wurde entweder mit BamH I, Hind III oder EcoR I verdaut und auf Gele aufgetragen. Die Blots wurden mit einem 320 bp Fragmernt des MEKK-Gens sondiert. Das Auftreten einer Bande in dem Verdau mit BamH I und Hind III lässt darauf schließen, dass die MEKK von einem Gen codiert wird. Das Auftreten von zwei Banden im EcoR I-Verdau weist auf die wahrscheinliche Gegenwart einer EcoR I-Stelle innerhalb einer von der Sonde überspannten Intronsequenz hin. Die MEKK-mRNA wurde im Herz und in der Milz der Maus stark exprimiert während in der Leber geringere Mengen vorkommen. Die MEKK-mRNA von 7,8 kb wurde mit Sonden identifiziert, die sowohl von den 5'-Enden als auch den 3'-Enden der MEKK-cDNA stammen. Somit fehlt der MEKK-cDNA eine vermeintliche nicht übersetzte Sequenz von etwa 4 kb.

[0051] Immunoblots von Zelllysaten, die mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen das die 15 Aminosäuren DRPPSRELLKHPVER umfassende Peptid sondiert wurden, das aus dem COOH-Terminus von MEKK stammt, zeigten eine hervorstechende Bande, die bei 78 kD wanderte.

[0052] In Fig. 1C wird eine Immunoblot für die Expression der 78-kD- und 50-kD-Formen von MEKK in Zelllinien von Nagern gezeigt. Es wurden lösliches Zellprotein (100 µg) oder ein rekombinantes COOH-terminales MEKK-Fusionsprotein (30 ng) auf das Gel zum Immunoblotting mit affinitätsgereinigtem MEKK-Antikörper (Verdünnung 1:300) gepackt. Pheochromocytoma-(PC12)-, Rat 1a- und NIH 3T3-Zellen enthielten das gleiche immunoreaktive Protein von 78 kD, welches auf der SDS-PAGE oft als Dublette wanderte. Gewöhnlich trat auch eine immunoreaktive Spezies von 50 kD auf, sie variierte jedoch von Präparat zu Präparat in ihrer Intensität. Man glaubt, dass sie ein proteolytisches Fragment des Proteins von 78 kD ist. Die Sichtbarmachung von sowohl der immunoreaktiven Bande von 78 kD als auch der immunoreaktiven Bande von 50 kD auf Immunoblots wurde durch Inkubation des Antigens von 15 Aminosäuren mit dem Antikörper inhibiert. Das durch das Immunoblotting nachgewiesene MEKK-Protein hat Ähnlichkeit mit der aus dem offenen Leseraster der MEKK-cDNA vorausgesagten Molekülgröße.

[0053] Das MEKK-Protein wurde in COS-1-Zellen exprimiert, um seine Funktion bei der Regulation des MAPK-enthaltenden Signalübertragungssystems zu bestimmen. Wenn die MEKK in COS-1-Zellen überexprimiert wurde, war die MAPK-Aktivität vier- bis fünfmal größer als die in Kontrollzellen, welche mit einem Plasmid ohne ein MEKK-cDNA-Insert transfiziert worden waren. Die COS-Zellen wurden in 100 mm Kulturschalen entweder mit dem pCVMVS-Expressionsvektor allein (1 µg: Kontrolle) oder dem pCVMVS-MEKK-Konstrukt (1 µg: MEKK) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen 16 bis 18 Stunden lang in ein Rinderserumalbumin (0,1 Prozent) enthaltendes serumfreies Medium gegeben, um einen Ruhezustand zu induzieren. Die Zellen wurden sodann mit humanem EGF (30 ng/ml) (+EGF) oder mit Puffer (Kontrolle) 10 Minuten lang behandelt, zweimal in kalter phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen und in einem Zelllyse-Puffer, der 50 mM β-Glycerophosphat (pH 7,2), 100 mM Natriumvanadat, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA Triton-100 (0,5 Prozent), Leupeptin (2 µg/ml), Aprotinin (2 µg/ml) und 1 mM Dithiothreitol (600 µl) enthielt, lysiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge wurden die 0,5 bis 1 mg lösliches Protein enthaltenden COS-Zelllysate auf einer Mono Q-Säule einer FPLC unterzogen und die eluierten Fraktionen auf ihre MAPK-Aktivität hin untersucht. Die Aktivierung der MAPK erfolgte in serumfreien COS-Zellen und in Abwesenheit von jedem zugegebenen Wachstumsfaktor. Die Aktivität der MAPK war ähnlich der, die nach der Stimulierung der Kontrollzellen mit EGF beobachtet wurde. Die Stimulierung von vorübergehend die MEKK überexprimierenden COS-Zellen mit EGF führte nur zu einem leichten Anstieg der MAPK-Aktivität im Vergleich mit der, die mit der MEKK-Expression allein beobachtet wurde.

[0054] Das MEKK-Protein wurde in transfizierten COS-Zellen mittels Immunoblotting nachgewiesen. In **Fig.** 2 wird ein Immunoblot gezeigt, der die Expression der MEKK in Zellen wiedergibt, die nur mit einem Vektor (Kontrolle) oder mit einem Vektor transfiziert worden waren, der mit oder ohne EGF behandelt wurde. Gleiche Mengen (100 µg) des löslichen Proteinlysats aus den COS-Zellen wurden zum Immunoblotting auf das Gel aufgetragen. In den Lysaten aus den COS-Kontrollzellen wurde nur das immunoreaktive MEKK-Fragment von 50 kD nachgewiesen. Eine vorübergehende Expression der MEKK in COS-Zellen ergab eine hervorstechende Bande von 82 kD, die geringfügig größer war als die bei PC12-, Rat 1a- oder NIH 3T3-Zellen beobachtete. Dies ist offensichtlich eher auf die Verwendung von Methionin in Position 441 als in Position 486 zur Initiation der Translation zurückzuführen. Die Bande über der 82 kD-MEKK-Bande scheinen von der Phosphorylierung des MEKK-Proteins herzurühren. Es wird angenommen, dass die Gruppe von Banden unterhalb des 82 kD-MEKK-Proteins aus einer Proteolyse stammen. Ein Zusatz des MEKK-Peptidantigens aus 15 Aminosäuren zu dem Antiserum während des Immunoblotting verhinderte den Nachweis von allen immunoreaktiven Banden; diese Bande wurden in Extrakten von COS-Kontrollzellen nicht nachgewiesen, was darauf hinweist, dass sie von dem exprimierten MEKK-Protein herrührten.

[0055] Es wurde gefunden, dass die Expression der MEKK in COS-Zellen die MEK aktiviert, die Kinase, welche die MAPK phosphoryliert und aktiviert. Es wurde rekombinante MAPK eingesetzt, um die MEK-Aktivität in COS-Zelllysaten zu untersuchen, die mit Hilfe der Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) auf einer Mono S Säule fraktioniert worden waren. Eine cDNA, die p42 MAPK aus Xenopus laevis codiert, wurde in den Expressionsvektor pRSETB kloniert. Dieses Konstrukt wurde zur Expression eines eine Polyhistidinsequenz am NH_2-terminalen-Terminus enthaltenden p42 MAPK-Fusionsproteins im LysS-Stamm von Escherichia coli BL21 (DE3) verwendet. Die das Expressionsplasmid enthaltenden Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,7 bis 0,9 bei 600 nM gezüchtet. Es wurde Isopropyl-β-thiogalctopyranosid (0,5 mM) zugesetzt, um die Synthese des Fusionsproteins zu induzieren und die Kulturen wurden 3 Stunden lang inkubiert. Die Zellen wurden sodann gesammelt und durch Einfrieren, Auftauen und Beschallen lysiert. Das Lysat wurde bei 10.000 g 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann über eine geladene Ni^{2+}-Sepharosesäule geschickt und die lösliche rekombinante MAPK in Natrimphosphat-Puffer (pH 4,5) eluiert. Die gereinigte rekombinante MAPK war zu mehr als 80% rein. Die gereinigte rekombinante MAPK diente als Substrat für die MEK und katalysierte die Phosphorylierung eines Peptids, das aus den Resten 662 bis 681 des

EGF-Rezeptors ($EGFR^{662\ bis\ 681}$) bestand.

[0056] Die löslichen Zelllysate aus vorübergehend mit MEKK transfizierten, mock-transfizierten (Kontrolle) oder mock-transfizierten und mit EGF (30 ng/ml) (+EGF) behandelten COS-Zellen wurden mit Hilfe der FPLC auf einer Mono S Säule fraktioniert und die endogene MEK-Aktivität gemessen. Die endogene MAPK eluierte in den Fraktionen 2 bis 4, währen die MEK in den Fraktionen 9 bis 13 enthalten war. Zur Untersuchung der endogenen MEK-Aktivität wurden die Zellen zweimal in kalter PBS gewaschen und in 650 µl einer Lösung lysiert, die 50 mM β-Glycerophosphat, 10 mM 2-N-Morpholinoethansulfonsäure (pH 6,0), 100 µM Natriumvanadat, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, Triton X-100 (0,5 Prozent), Leupeptin (5 µg/ml), Aprotinin (2 µg/ml) und 1 mM Dithiothreitol enthielt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge wurden die löslichen Zelllysate (1 bis 2 mg Protein) auf eine Mono S Säule aufgetragen, die im Elutionspuffer (50 mM β-Glycerophosphat, 10 mM MES (pH 6,0), 100 µM Natriumvanadat, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA und 1 mM Dithiothreitol) äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit Puffer (2 ml) gewaschen und die gebundenen Proteine mit 30 ml eines linearen Gradienten von 0 bis 350 mM NaCl im Elutionspuffer eluiert. Durch Mischen mit einem Puffer (25 mM β-Glycerophosphat, 40 mM N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethanolsulfonsäure) (pH 7,2), 500 mM Natriumvanadat, 10 mM $MgCl_2$, 100 µM ⇳-^{32}P-ATP (3000 bis 4000 Cpm/pMol), Inhibitorprotein-20 (IP-20; TTYADFIASGRTGRRNAIHD; 25 µg/ml), 0,5 mM EGTA, rekombinante MAP-Kinase (7,5 µg/ml) und 200 µM $EGFR^{662–681}$) bis zu einem Endvolumen von 40 µl wurde ein Teil (30 µl) jeder Fraktion auf seine MEK-Aktivität hin untersucht. Nach der Inkubation bei 30°C über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde der Einbau von ⇳-^{32}P-ATP in das $EGFR^{662–681}$ gemessen. In diesem Assay wurde durch den Einbau von ⇳-^{32}P-ATP in das MEK-Substrat, einem vom EGF-Rezeptor (EGFR) stammenden Peptid, die Fähigkeit von jeder Säulenfraktion gemessen, die zugesetzte rekombinante MAPK zu aktivieren. Der erste eluierte Aktivitätspeak in **Fig. 3** zeigt die endogene aktivierte MAPK, welche das EGFR-Peptidsubstrat direkt phosphoryliert.

[0057] Der zweite Aktivitäts-Peak stellt die endogene MEK in COS-Zellen dar. Die endogene MEK-Aktivität wurde mittels Fraktionierung mit Mono S-FPLC charakterisiert. In **Fig. 4A** wird gezeigt, dass endogene MEK in Zellen aktiviert wurde, die MEKK überexprimieren; die Aktivität der MEK war annähernd halb so groß wie die bei Kontrollzellen beobachtete, die mit EGF stimuliert worden waren. Somit scheint die Expression der MEKK die MAPK über die Aktivierung der MEK zu aktivieren.

[0058] Die COS-Zelllysate wurden mittels FPLC auf einer Mono Q Säule fraktioniert, um die exprimierte MEKK teilweise zu reinigen. Die gereinigte rekombinante MEK-1 wurde sodann in Gegenwart von ⇳-^{32}P-ATP als Substrat für die MEKK eingesetzt, um zu ermitteln, ob die MEKK die MEK-1 direkt phosphoryliert.

[0059] Aus cDNA-Matrizen aus B-Zellen der Maus wurde mit der Polymerasekettenreaktion und Oligonucleotid-Primern, welche Abschnitten der codierenden 5'-Region und der nicht translatierten 3'-Region der MEK-1 entsprechen, eine cDNA erhalten, welche die MEK-1 codiert. Die katalytisch inaktive MEK-1 wurde durch die zielgerichtete Mutagenese von Lys^{343} zu Met erzeugt. Das Wiltyp-MEK-1-Protein und das katalytisch inaktive MEK-1-Protein wurden als rekombinante Fusionsproteine mit einer Polyhistidin-Sequenz an ihren NH_2-terminalen Enden in pRSETA exprimiert.

[0060] Die Lysate von mit MEKK transfizierten oder mock-transfizierten (Kontrolle) COS-Zellen wurden wie oben beschrieben auf einer Mono Q Säule einer FPLC unterzogen. Teile (20 µl) der MEKK enthaltenden Fraktionen wurden mit einem Puffer gemischt, der 50 β-Glycerophosphat (pH 7,2), 100 µM Natriumvanadat, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 50 µM ATP, IP-20 (50 µg/ml) und 10 µl ⇳-^{32}P-ATP in einem Reaktionsvolumen von 40 µl enthielt und 40 Minuten lang in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (–) von rekombinanter katalytisch inaktiver MEK-1 (150 ng) (Kinase-MEK-1) inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 × SDS-Probenpuffer (10 µl) gestoppt; 1 × SDS-Puffer enthält 2 Prozent SDS, 5 Prozent Glycerin, 62,6 mM Tris-HCl (pH 6,8), 5 Prozent Mercaptoethanol und 0,001 Prozent Bromphenol-Blau. Die Proben wurden 3 Minuten lang gekocht und einer SDS-PAGE und einer Autoradiographie unterzogen. Autophosphorylierte rekombinante Wildtyp-MEK 1 (WT-MEK-1) wanderte genau so weit wie phosphorylierte katalytisch inaktive MEK-1. MEKK war in der Lage, MEK-1 zu phosphorylieren. Entsprechende Fraktionen von Lysaten aus Kontrollzellen waren jedoch nicht in der Lage, MEK-1 zu phosphorylieren. Eine modifizierte Form der MEK-1, die katalytisch inaktiv ist, wurde in dem Phosphorylierungsversuch eingesetzt, um sicher zu gehen, dass sie nicht autophosphoryliert wie dies die Wildtyp-MEK-1 tut. Die Phosphorylierung von katalytisch inaktiver MEK-1 war zeitabhängig (**Fig. 4B**); MEKK wurde ebenfalls phosphoryliert. Die Fraktion 22 aus der FPLC auf einer Mono Q Säule (20 µl) wurde mit oder ohne rekombinante katalytisch inaktive MEK-1 (0,15 µg) über den angezeigten Zeitraum inkubiert. Die Phosphorylierung der Kinase MEK-1 und MEKK wurde nach 5 Minuten und höchstens nach ca. 20 Minuten sichtbar. Die zeitabhängige Zunahme bei der Phosphorylierung von MEKK korrelierte mit einer abhnehmenden Mobilität des MEKK-Proteins während der SDS-PAGE. Das Immunoblotting zeigte, dass das MEKK-Protein zusammen

mit dem Aktivitätspeak (nach einer FPLC auf einer Mono Q Säule) eluierte (Fraktion 22), der die MEK phosphorylierte (**Fig. 4C**). Die langsam wandernde Spezies der MEKK wurde auch durch Immunoblotting nachgewiesen.

[0061] Um zu bestimmen, ob die Phosphorylierung der MEK durch überexprimierte MEKK zu einer Aktivierung der MEK führte, wurden in einem gekoppelten Versuchssystem rekombinante Wildtyp-MEK-1 und eine modifizierte Form der MAPK, die katalytisch inaktiv ist, eingesetzt COS-Zelllysate wurden mittels einer Mono Q-FPLC aufgetrennt und die MEKK enthaltenden Fraktionen wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die zugesetzte Wildtyp-MEK-1 so zu aktivieren, dass sie phosphorylierte katalytisch inaktive rekombinante MAPK in Gegenwart von ⇳-^{32}P-ATP phosphorylieren würde. Die Lysate aus mit MEKK transfizierten oder mocktransfizierten (Kontrolle) COS-Zellen wurden mit Hilfe einer FPLC auf einer Mono Q Säule fraktioniert und Teile(20 µl) der MEKK enthaltenden Fraktionen wurden mit Puffer vermischt. Jede Fraktion wurde in Gegenwart (+) oder in Abwesenheit (–) von gereinigter rekombinanter Wildtyp-MEK-1 (150 ng) und in Gegenwart von gereinigter rekombinanter katalytisch inaktiver (Kinase-) MAPK) (300 ng) inkubiert. Die Fraktionen 20 bis 24 aus den Lysaten der mit MEKK transfizierten COS-Zellen inaktivierten die MEK-1 (**Fig. 5A**). Somit phosphorylierte und aktivierte die MEKK die MEK-1, was zu einer Phosphorylierung der MAPK führte.

[0062] Um sicher zu gehen, dass MEKK die MEK direkt aktivierte, und nicht über die Aktivierung einer oder mehrerer anderer in den Säulenfraktionen enthaltener Kinasen, wurde MEKK aus COS-Zelllysaten mit einem Antiserum gegen die COOH-terminalen MEKK-Fusionsproteine immunopräzipitiert. Die MEKK-cDNA wurde mit Pst I und Kpn 1 verdaut, wodurch ein 1670 bp-Fragment gewonnen wurde, das die katalytische Domäne der MEKK codiert. Dieses Fragment wurde in pRSETC als ein rekombinantes Fusionsprotein mit einer Polyhistidin-Sequenz an seinem HH_2-Treminus exprimiert. Das gereinigte COOH-terminale MEKK-Fusionsprotein wurde eingesetzt, um polyklonale Antiseren herzustellen. Die immunopräzipitierte MEKK wurde in 10 bis 15 µl PAN (10 mM Piperazin-N,N'-Bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) (pH 7,0), 10 mM NaCl und Aprotinin (20 µg/ml)) resuspendiert und mit (+) oder ohne (–) katalytisch inaktiver MEK-1 (150 ng) und 25 mCi ⇳-^{32}P-ATP in 20 mM Pipes (pH 7,0) und Aprotinin (20, mg/ml) in einem Endvolumen von 20 µl 15 Minuten lang bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 × SDS Probenpuffer (5 µl) wurden die Reaktionen gestoppt. Die Proben wurden 3 Minuten lang gekocht und einer SDS-PAGE und Autoradiographie unterzogen. MEKK phosphorylierte katalytisch inaktive MEK-1, die auf der SDS-PAGE gleich weit wie die Wildtyp-MEK-1 wanderte (**Fig. 5B**). In den Immunopräzipitaten wurden einige phosphorylierte Banden von überexprimierter MEKK nachgewiesen. Diese Banden rühren wahrscheinlich von einer Autophosphorylierung der MEKK her und entsprechen den Formen der MEKK, die durch Immunoblotting von Lysaten aus MEKK transfizierten COS-Zellen identifiziert wurden. Mit Präimmunserum erhaltene Immunopräzipitate enthielten keine MEKK und phosphorylierten MEK-1 nicht. Es scheint somit, dass die MEK direkt von der MEKK phosphoryliert wird, obwohl eine assoziierte Kinase, die zusammen mit der MEKK immunopräzipitiert, nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann.

[0063] Die Ergebnisse zeigen, dass die MEKK eine aktive MEK phosphorylieren kann, die ihrerseits eine MAPK phosphoryliert und aktiviert. Raf kann eine MEK ebenfalls phosphorylieren und aktivieren (**Fig.** 6). Serumfreie COS-Zellen wurden mit EGF stimuliert und Raf mit einem Antikörper gegen den COOH-Terminus von Raf-1 einer Immunpräzipitation unterzogen. COS-Zellen wurden vorübergehend mit einem Vektor allein (Kontrolle) oder mit dem Konstrukt PCV/M5-MEKK (MEKK) transfiziert. COS-Zellen wurden im Ruhezustand 10 Minuten lang mit und ohne humanem EGF (30 ng/ml) behandelt und Raf aus den Zelllysaten mit einem Antikörper gegen das COOH-terminale Peptid aus Raf immunopräzipitiert. Die immunopräzipitierte Raf wurde mit katalytisch inaktiver MEK-1 (150 ng) und 25 µl ⇳-^{32}P-ATP inkubiert. Die immunopräzipitierte Raf phosphorylierte die MEK-1 in Gegenwart von ⇳-^{32}P-ATP (**Fig. 6A**). In Immunopräzipitaten von Raf aus MEKK überexprimierenden COS-Zellen wurde nur eine geringe oder keine Phosphorylierung der MEK-1 beobachtet. Die Behandlung von MEKK überexprimierenden COS-Zellen mit EGF ergab einen ähnlichen Grad der Phosphorylierung bei der MEK-1 durch immunopräzipitierte Raf (**Fig. 6B**). Mit MEKK transfizierte und serumfreie Zellen wurden mit EGF behandelt, die Raf einer Immunopräzipitation unterzogen und mit katalytisch inaktiver MEK-1 inkubiert. Wie durch Immunoblotting mit Antikörpern gegen Raf gezeigt, wurden in jeder Probe gleiche Mengen Raf immunopräzipitiert. Die am langsamsten wandernde Bande gibt ein immunopräzipitiertes Phosphoprotein wieder, das mit Raf oder MEK-1 nicht verwandt ist. Wie durch nachfolgende SDS-PAGE und Immunoblotting mit dem Antikörper gegen Raf gezeigt, war die Menge Raf in den Immunpräzipitaten von Kontrollzellen und von mit MEKK transfizierten Zellen ähnlich. Somit können sowohl die MEKK als auch die Raf unabhängig die MEK aktivieren.

[0064] Die Identifizierung der MEKK aus der Maus beweist ferner die Konservierung bei der Regulation des MAPK-Systems zwischen Hefe und Säugern. Die Ergebnisse zeigen, dass das die MAPK kontrollierende regulatorische Netzwerk bei Säugern komplizierter ist als das bei der Hefe. Sowohl die MEKK als auch die Raf aktivieren die MEK, ein Konvergenzpunkt unmittelbar upstram von der MAPK für verschiedene von der Zello-

berfläche kommende Signale. Die Raf reguliert das MAPK-Netzwerk in erster Linie in Reaktion auf Rezeptoren mit assoziierter Tyrosinkinase-Aktivität, während die MEKK in erster Linie Signale vermitteln könnte, die von Rezeptoren stammen, welche G-Proteine und die Proteinkinase C aktivieren. Diese Möglichkeit wird von den Befunden bei spezifischen Zelltypen gestützt, dass eine Down-Regulation der Proteinkinase C die Aktivierung der MAPK in Reaktion auf Wachstumsfaktoren nicht hemmt, die Aktivierung der MAPK in Reaktion auf den Muscarin M_1-Rezeptor stimulierende Mittel jedoch hemmt. Ferner stützt der Nachweis, dass Ste20, eine Proteinkinase in S. cerevisiae, im Übertragungsweg der Pheromon-Antwort upstream zu Ste11 liegt, diese Hypothese. In PC12-Zellen hemmt die Expression der dominant negativen Mutante Ras die Aktivierung der MAPK in Reaktion auf die Stimulierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren oder die Aktivierung der Proteinkinase C nicht, sie hemmt jedoch die Aktivierung der MAPK in Reaktion auf den Nervenwachstumsfaktor (NGF) oder den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). Man nimmt jedoch an, dass es komplexere, Zelltypspezifischere Rollen der Raf und der MEKK beim Zusammenschluss der Signalübertragung der Tyrosinkinase und dem G Protein-Paar gibt. Die Festlegung der MEKK und Raf als eine Verzweigung im MAPK-Netzwerk sorgt für einen Mechanismus mit unterschiedlicher Regulation in diesem System.

[0065] Die vorliegende Erfindung umfasst auch Antikörper, die in der Lage sind, sich selektiv an ein MEKK-Protein zu binden. Ein solcher Antikörper wird hier als ein Anti-MEKK-Antikörper bezeichnet. In einem MEKK-Antiserum können polyklonale Populationen von Anti-MEKK-Antikörpern enthalten sein. Ein MEKK-Antiserum kann affinitätsgereinigte polyklonale Antikörper, ein mit Ammoniumsulfat gewonnenes Antiserum oder das ganze Antiserun bezeichnen. Der hier benutzte Ausdruck "sich selektiv binden an" bezieht sich auf die Fähigkeit eines derartigen Antikörpers, sich bevorzugt an MEKK-Proteine zu binden. Die Bindung kann gemessen werden, indem verschiedene im Stand der Technik bekannte Verfahren eingesetzt werden, einschließlich Immunoblot-Assays, Immunopräzipitations-Assays, Enzym-Immunoassays (z.B. ELISA), Radioimmunoassays, Immunofluoreszenz-Antikörper-Assays und Immunoelektronenmikroskopie; siehe z.B. Sambrook rt al., Molecular Cloning: A laboratory Manaual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989.

[0066] Die Antikörper der vorliegenden Erfindung können entweder polyklonale oder monoklonale Antikörper sein und lassen sich mittels im Stand der Technik bekannter Standardtechniken gewinnen. Antikörper der vorliegenden Erfindung umfassen funktionelle Äquivalente, wie z.B. Fragmente von Antikörpern und gentechnisch erzeugte Antikörper, einschließlich Antikörper aus einzelnen Ketten, die in der Lage sind, sich selektiv an mindestens eines der Epitope des Proteins zu binden, das eingesetzt wird, um die Antikörper zu erhalten. Die Antikörper werden vorzugsweise in Reaktion auf Proteine erzeugt, die zumindest teilweise von MEKK-Nucleinsäuremolekülen codiert werden. Mehr bevorzugt werden die Antikörper in Reaktion auf einen Abschnitt eines MEKK-Proteins erzeugt und noch mehr bevorzugt werden die Antikörper entweder in Reaktion auf den Aminoterminus oder den Carboxylterminus eines MEKK-Proteins erzeugt.

[0067] Ein bevorzugtes Verfahren zur Erzeugung von Antikörpern der vorliegenden Erfindung umfasst die Verabreichung einer wirksamen Menge eines MEKK-Proteins an ein Tier, um den Antikörper zu erzeugen und die Antikörper zu gewinnen. Die Antikörper der vorliegenden Erfindung haben verschiedene potentielle Verwendungen, die mit im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung liegen. Beispielweise lassen sich derartige Antikörper einsetzen, um einige MEKK-Proteine zu identifizieren und die MEKK-Proteine zu gewinnen.

[0068] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst ein Nucleinsäuremolekül, welches das Aminoende der MEKK codiert. MEKK 1 wurde in den Bakterienvektor pRSET cloniert, um ein rekombinantes Molekül pMEKK-1 zu gewinnen. Das rekombinante Molekül pMEKK-1 wurde in E. coli exprimiert und das von dem rekombinanten Molekül codierte Protein wurde unter Einsatz von im Stand der Technik bekannten Verfahren gewonnen und gereinigt. Mit dem gereinigten rekombinanten aminoendständigen MEKK 1-Protein wurden NZW-Kaninchen immunisiert und unter Einsatz von im Stand der Technik bekannten Verfahren ein Antiserum gewonnen. Das vorstehende Verfahren wurde auch unter Einsatz eines das Carboxylende des MEKK 1-Proteins codierenden Nucleinsäuremoleküls durchgeführt. Das Anti-MEKK-Antikörper enthaltende Antiserum wurde über eine Affinitätssäule mit immobilisiertem an Sepharose gebundenem MEKK-1-Protein laufen gelassen. Das affinitätsgereinigte Anti-MEKK-Antiserum enthielt Antikörper, die sich selektiv an ein MEKK-Protein aus unterschiedlichen Zelltypen binden, sich jedoch nicht an das Raf-1-, das B-Raf- oder das N-Raf-Protein banden.

[0069] Mit EGF stimulierte oder nicht stimulierte Zellen wurden lysiert und wie oben beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die in den Zelllysaten enthaltenen MEKK-Proteine wurden mittels Immunoblotting identifiziert, indem ein spezifisch auf den aminoendständigen Abschnitt der MEKK 1 reagierendes MEKK-Antiserum und ein spezifisch auf den carboxylendständigen Abschnitt der MEKK 1 reagierendes MEKK-Antiserum eingesetzt wurden. Unter Einsatz des spezifisch auf den aminoendständigen Abschnitt der MEKK 1 rea-

gierenden Antiserums wurden MEKK 1 und zwei Proteine von höherem Molekulargewicht mit MEKK-Aktivität, MEKK α und MEKK β, identifiziert (siehe Fig. 7). Unter Einsatz des spezifisch auf den carboxylendständigen Abschnitt der MEKK 1 reagierenden MEKK-Antiserums wurde MEKK 1, und nicht MEKK α und MEKK β, identifiziert. Zwei in PC 12-Zelllysaten vorkommende immunoreaktive MEKK-Spezies von annähernd 95 kD und 82 kD wurden mit Hilfe eines gegen einen Abschnitt des Aminoendes der MEKK gerichteten MEKK-Antiserums erkannt. Durch Inkubation des gereinigten, aus rekombinantem NH_2-terminalem MEKK-Fusionsprotein bestehenden Antigens mit dem Antikörper wurde die Sichtbarmachung von beiden dieser Proteine gehemmt. In den MEKK-Immunopräzipitaten kam nur ein einziges 95 kD MEKK-Protein vor, nicht jedoch in den Immunopräzipitaten bei Einsatz des Präimmunserums. Dieses 95 kD MEKK wanderte gleich weit wie das in den Zelllysaten von PC12-Zellen und in Rat1a- NIH3T3- und Swuss3T3-Fibroblasten vorkommende 95 kD MEKK-Protein. In PC12-Zellen wurde im Verhältnis zu den Fibroblasten-Zelllinien mehr 95 kD MEKK exprimiert. Ein Immunoblotting mit Antikörpern, die Raf-1 oder Raf-B spezifisch erkennen zeigte, dass keines dieser Enzyme als Verunreinigungen der MEKK-Immunopräzipitate vorkam. Das 95 kD MEKK in den MEKK-Immunopräzipitaten wanderte nicht gleich weit wie Raf-1 und Raf-B in PC12-Zelllysaten und es wurde keine Kreuzreaktivität zwischen der MEKK- und Raf-Antikörpern beobachtet.

[0070] Das MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung kann in Reaktion auf die Stimulierung von das MEKK-Protein enthaltenden Zellen durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Durch Inkubation in einem Hungermedium (DMEM, 0,1% BSA) über einen Zeitraum von 18 bis 20 Stunden wurden PC12-Zellen von Serum befreit und die MEKK aus Lysaten immunopräzipitiert, welche gleiche Mengen des Proteins aus den unbehandelten Kontrollen oder Zellen enthielten, die mit EGF (30 ng/ml) oder NGF (100 ng/ml) 5 Minuten lang mit den oben beschriebenen spezifisch auf den NH_2-terminalen-terminalen Abschnitt der MEKK reagierenden Anti-MEKK-Antikörpern behandelt worden waren. Die immunopräzipitierte MEKK wurde in 8 µl PAN (10 mM Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) (pH 7,0), 100 mM NaCl und Aprotinin (20 µg/ml)) resuspendiert und mit katalytisch inaktiver MEK-1 (150 ng) und 40 µCi ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP in Universal-Kinasepuffer (20 mM Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) (pH 7,0), 10 mM $MnCl_2$ und Aprotinin (20 µg/ml)) in einem Endvolumen von 20 µl 25 Minuten lang bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 × SDS-Probenpuffer (20 µl) wurden die Reaktionen gestoppt. Die Proben wurden 3 Minuten lang gekocht und einer SDS-PAGE und einer Autoradiographie unterzogen. Raf-B wurde aus den gleichen unbehandelten und behandelten PC12-Zelllysaten wie oben mit einem Antiserum gegen das COOH-terminale Peptid der Raf-B (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) immunopräzipitiert und ähnlich untersucht. Die Raf-1 wurde mit einem Antiserum gegen die 12 COOH-terminalen Aminosäuren der Raf-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) immunopräzipitiert. Eine Behandlung der ohne Serum gehaltenen PC12-Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ergab eine erhöhte MEKK-Aktivität. Diese Ergebnisse wurden durch Messung der Phosphorylierung einer gereinigten MEK-1 (einer kinaseinaktiven Form) mit Hilfe von Immunopräzipitaten der MEKK in in vitro- Kinaseassays erhalten (Fig. 8). Im Vergleich zu Kontroll-Immunopräzipitaten aus unbehandelten Zellen stimulierte NGF ein leichtes Anwachsen der MEKK-Aktivität. Die Stimulierung der MEKK-Aktivität durch NGF und EGF war ähnlich der Aktivierung der Raf-B durch diese Wirkstoffe, obwohl die Raf-B eine hohe Grundaktivität zeigte. Die Aktivierung von c-Raf-1 durch NGF und EGF im Vergleich mit der von MEKK oder Raf-B war fast vernachlässigbar.

[0071] MEKK oder Raf-B wurden aus Lysaten von mit EGF (30 ng/ml) 0, 1, 3, 5, 10 oder 20 Minuten lang behandelten PC12-Zellen immunopräzipitiert und wie oben beschrieben mit katalytisch inaktiver MEK-1 (150 ng) und ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP inkubiert. Die Daten geben für jeden Zeitpunkt die relative Höhe der Antwort wieder, wie sie in einem typischen Versuch mittels Phosphorimager-Analyse der radioaktiven Gele quantitativ ermittelt wurden. Der zeitliche Verlauf der EGF-Behandlung zeigte, dass die MEKK-Aktivierung nach fünf Minuten das maximale Niveau erreichte und mindestens 30 Minuten lang anhielt (Fig. 9). Die Raf-B zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf; eine Peak-Aktivität trat binnen 3 bis 5 Minuten nach der EGF-Behandlung auf und hielt bis zu 20 Minuten an.

[0072] Um eine EGF-stimulierte MEKK-Aktivität weiter von der für Raf-B zu trennen, wurde die Raf-B vor der Immunopräzipitation der MEKK aus den Zelllysaten immunodepletiert. Die Raf-B wurde aus den Lysaten von ohne Serum gehaltenen PC12-Zellen, die entweder 5 Minuten lang mit EGF (30 ng/ml) behandelt oder nicht behandelt worden waren, vorentfernt. Die Raf-B wurde zweimal unter Verwendung von Antiseren gegen die Raf-B oder unter Einsatz eines Präimmun-IgG-Antiserums als Kontrolle vorentfernt. Der zuvor von Raf-B befreite Überstand wurde sodann entweder mit einem MEKK- oder Raf-B-Aniserum einer Immunopräzipitation unterzogen und, wie oben genau beschrieben, mit katalytisch inaktiver MEK-1 und ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP inkubiert. Die EGF-stimulierten oder nicht stimulierten PC12-Zelllysate wurden entweder mit einem IgG- oder Raf-B-Antiserum vorgereinigt und sodann einer Immunfällung mit einem MEKK-Antiserum oder Raf-B-Antikörpern unterzogen. Die in Fig. 10 gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass das vorherige Entfernen der Raf-B zu einer 60% Verminderung der Raf-B-Aktivität führte, wie dies mit einer Phosphorimager-Analyse der Raf-B in in vit-

ro-Kinaseassays gemessen wurde. Die EGF-stimulierte MEKK-Aktivität blieb von der Depletion der Raf-B unbeeinflusst, was darauf schließen lässt, dass die Raf-B keine Komponente der MEKK-Immunopräzipitate ist. Mindestens 40% der Raf-B-Aktivität sind resistent gegen eine vorherige Entfernung der Raf-B mit Raf-B-Antikörpern. In COS-Zellen überexprimierte Wildtyp-MEKK autophosphoryliert leicht an Serin- und Threoninresten und das Aminoende der MEKK ist sehr reich an Serin und Threonin. In den Immunopräzipitaten der PC12-Zellen enthaltene MEKK wurde in in vitro-Kinaseassays auf die selektive Phosphorylierung von aminoterminalen Fusionsproteinen von gereinigter rekombinanter MEKK hin untersucht.

[0073] Ohne Serum gehaltene PC12-Zellen wurden 5 Minuten lang mit EGF (30 ng/ml) behandelt und gleiche Mengen Protein aus den Zelllysaten wurden entweder mit MEKK, Raf-B oder einem Präimmunserum als Kontrolle immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden wie oben beschrieben mit dem NH_2-terminalen Fusionsprotein der gereinigten rekombinanten MEKK (400 ng) und ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP inkubiert. Die in Fig. 11 gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die aus Lysaten von EGF-stimulierten und nicht stimulierten PC12-Zellen immunopräzipitierte MEKK das inerte MEKK-NH_2-Fusionsprotein von 50 kD stark phosphorylierte, während die Raf-B- oder Präimmun-Immunopräzipitate aus EGF-stimulierten oder nicht stimulierten Zellen das MEKK-NH_2-terminalen-Fusionsprotein nicht als Substrat verwendeten. Somit ist die in den MEKK-Immunopräzipitaten enthaltene EGF-stimulierte MEKK-Aktivität nicht auf verunreinigende Raf-Kinasen zurückzuführen.

[0074] Um sicher zu gehen, dass die Phosphorylierung von sowohl der MEK-1 als auch dem NH_2-terminalen MEKK-Fusionsprotein auf die Aktivität der 95 kD MEKK aus PC12-Zellen zurückzuführen war, wurden aus EGF-stimulierten und nicht stimulierten Zellen gewonnene Zelllysate mit Hilfe der FPLC auf einer Mono Q-Säule fraktioniert, um die endogene MEKK teilweise zu reinigen. Die Lysate von unstimulierten PC 12-Kontrollzellen oder von Zellen, die 5 Minuten lang mit EGF (30 ng/ml) behandelt worden waren, wurden mittels FPLC auf einer Mono Q-Säule unter Einsatz eines linearen Gradienten von 0 bis 525 mM NaCl fraktioniert. Ein Teil (30 µl) von jeder geradzahligen Fraktion wurde mit Puffer (10 mM Piperazin-N,N'-Bis-2-ethansulfonsäure (PIPES) (pH 7,0), 10 mM $MnCl_2$, Aprotinin (20 µg/ml), 50 mM β-Glycerophosphat (pH 7,2), 1 mM EGTA, IP-20 50 µg/ml), 50 mM NaF und 30 µCi ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP) gemischt, der gereinigte rekombinante MEK-1 (150 ng) als Substrat in einem Endvolumen von 40 µl enthielt, und bei 30°C 25 Minuten lang inkubiert. Durch Zugabe von 2 × SDS-Probenpuffer (40 µl) wurden die Reaktionen gestoppt, gekocht und einer SDS-PAGE und einer Autoradiographie unterzogen. Der Peak der MEKK-Aktivität wurde in den Fraktionen 10 bis 12 eluiert. Teile (30 µl) von jeder geradzahligen Fraktion aus Lysaten von EGF-behandelten PC12-Zellen wurden wie oben beschrieben mit Puffer gemischt, mit der Ausnahme, dass er an Stelle von MEK-1 das NH_2-terminale Fusionsprotein (400 ng) der gereinigten rekombinanten MEKK enthielt. Die gereinigte, rekombinante, kinaseinaktive MEK-1 oder das NH_2-terminale Fusionsprotein der MEKK wurden sodann in Gegenwart von ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP) als Substrate eingesetzt, um zu ermitteln, ob die MEKK von 95 kD die beiden Substrate direkt phosphoryliert. Die Fraktionen 10 bis 14 des Lysats aus EGF-behandelten PC12-Zellen phosphorylierten die MEK-1, während bei den unbehandelten Kontrollfraktionen nur eine geringe Phosphorylierung der MEK-1 auftrat. Das NH2-terminale Fusionsprotein wurde auch in denselben Fraktionen wie die MEK-1 phosphoryliert, obwohl der Aktivitätspeak geringfügig breiter war (Fraktionen 8 bis 16).

[0075] Das Immunoblotting der Säulenfraktionen zeigte, dass das MEKK-Protein von 95 kD zusammen mit dem Aktivitätspeak eluiert wurde, der entweder exogen zugegebene kinaseinaktive MEK-1 oder das NH_2-terminale Fusionsprotein der MEKK von 50 kD phosphorylierte. Teile (900 µl der geradzahligen Säulenfraktionen wurden durch Fällung mit Chloressigsäure aufkonzentriert und mit einem MEKK-Antikörper einem Immunoblotting unterzogen. Der Immunoreaktivitätspeak wurde in den Fraktionen 10 bis 22 eluiert.

[0076] Um zu prüfen, ob die 95 kD MEKK aus PC12-Zellen und die Raf-B für die Wachstumsfaktervermittelte Signalübertragung funktionelle Ras-Proteine benötigen, wurde in PC 12-Zellen ein dominantes negatives Ha-ras (Asn 17) (N^{17}-Ras) exprimiert und in Immunopräzipitaten die EGF-stimulierte MEKK oder die Aktivierung von Raf-B-untersucht, indem kinaseinaktive MEK-1 als Substrat eingesetzt wurde. PC 12-Zellen, die mit Dexamethason induzierbares N^{17}-Ras exprimierten, wurden 18 bis 20 Stunden lang in Medien, die 0,1 % BSA mit oder ohne 1 µM Dexamethason enthielten von Serum befreit und sodann 5 Minuten lang mit EGF (30 ng/ml) behandelt oder nicht damit behandelt. Gleiche Mengen von löslichem Protein aus den Zelllysaten wurden entweder mit MEKK- oder Raf-B-Antiserum immunopräzipitiert und, wie oben beschrieben, mit gereinigter, rekombinanter, katalytisch inaktiver MRK-1 und ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP) inkubiert. Die Expression von N^{17}-Ras wurde in stabil mit dem N^{17}-Ras-Gen transfizierten PC12-Klonen induziert, indem Dexamethason zu dem Hungermedium gegeben wurde. Die Expression von N^{17}-Ras hemmte die Aktivierung der MEKK durch EGF, wie dies durch deren Fähigkeit, eine kinaseinaktive MEK zu phosphorylieren, gemessen wurde. Die EGF-vermittelte Aktivierung der Raf-B in N^{17}-Ras exprimierenden PC12-Zellen war im Vergleich mit nicht induzierten N^{17}-Ras-Transfektanten weitgehend reduziert. Die Zugabe von Dexamethason zu PC12-Wildtypzellen hatte auf das Ausmaß der durch

EGF hervorgerufenen MEKK- oder Raf-B-Aktivierung keine Auswirkung. Die stabil mit dem N^{17}-Ras-Gen transfizierten PC 12-Zellklone reagieren weniger auf die EGF-vermittelte Aktivierung der MEKK-Aktivität als die PC12-Wilttypzellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass für die durch einen Wachstumsfaktorstimulierte Aktivierung von sowohl Raf-B als auch MEKK in PC12-Zellen ein funktionelles Ras erforderlich ist, was darauf hinweist, dass Ras seine Wirkungen auf das Zellwachstum und die Differenzierung über die Aktivierung von multiplen Protein. Kinase-Effektoren aus sowohl den Raf- als auch den MEKK-Familien vermitteln kann.

[0077] Somit stimulierte EGF binnen 5 Minuten einen MEKK-Aktivitätspeak, der mindestens 30 Minuten nach der Behandlung anhielt und ähnlich dem Zeitverlauf der Aktivierung bei Raf-B war. Der Nervenwachstumfaktor (NGF) und der Phorbolester TPA aktivierten die MEKK ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß als EGF. Die MEKK-Aktivität in den Immunopräzipitaten oder Säulenfraktionen war ganz anders als die Aktivitäten von EGF-stimulierter cRaf-1 und Raf-B. Eine Vorbehandlung mit Forskolin hob sowohl die MEKK- als auch die Raf-B-Aktivierung durch EGF, NGF und TPA auf. Sowohl die MEKK- als auch die Raf-B-Aktivierung in Reaktion auf EGF wurde durch eine stabile Expression von dominantem negativem N^{17}-Ras gehemmt. Diese Befunde stellen die erste Demonstration der Ras-abhängigen MEKK-Regulation durch Wachstumsfaktoren dar und weisen auf das Auftauchen eines komplexen intrazellulären Kinase-Netzwerks hin, in welchem sich Ras abwechselnd an Vertreter der Raf- und MEKK-Familien ankoppeln kann.

[0078] Die MEKK reguliert selektiv die JUN-Kinaseaktivität in einer Anzahl von Zelltypen (T-Zellen, Nervenzellen und Fibrblasten). Die JUN-Kinase ist eine weitläufige Verwandte der MAP-Kinase. Die Fähigkeit der MEKK, die JUN-Kinaseakrivität zu aktivieren ist ungefähr 100 Mal größer als die von Raf, die JUN-Kinase zu aktivieren. Die JUN-Kinase reguliert die Aktivität des JUN-Transkriptionsfaktors, der bei der Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung von unterschiedlichen Zelltypen eine Rolle spielt.

[0079] Der Tumor-Nekrosefaktor (TNF), der den Zelltod und andere Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen reguliert, stimuliert die MEKK-Aktivität. Die TNF-Stimulierung der MEKK ist Raf-abhängig. Die durch einen UV-Schaden der Zellen in Gang gesetzten Signalübertragungswege überlappen mit den TNF-Reaktionswegen und aktivieren ebenfalls die MEKK, jedoch nicht die Raf. Daher stimulieren sowohl TNF als auch UV-Strahlung die MEKK-Aktivität ohne die Raf zu aktivieren. Sowohl die UV- als auch die TNF-Aktivierung der MEKK sind Raf-abhängig.

[0080] Somit zeigt die Ras-abhängige Regulation der MEKK-Aktivität in verschiedenen Zelltypen, dass Ras zusätzlich zu Vertretern der Raf-Familie die Aktivierung der MEKK-Familie kontrolliert.

[0081] Um zu ermitteln, ob die durch Wachstumsfaktoren vermittelte Aktivierung der MEKK von 95 kD aus PC12-Zellen durch PKA gehemmt wird, wurde Forskolin eingesetzt, um den intrazellulären cAMP-Spiegel anzuheben und PKA zu aktivieren. Ohne Serum gehaltene PC12-Zellen wurden zur Aktivierung der Proteinkinase A 3 Minuten lang mit Forskolin (50 µM) oder ohne Forskolin und dann mit EGF (30 ng/ml), NGF (100 ng/ml) oder TPA 200 nM) 5 Minuten lang vorbehandelt, und dann die MEKK aus gleichen Mengen eines löslichen Proteins aus Zelllysaten immunopräzipitiert und mit gereinigter, rekombinanter, katalytisch inaktiver MEK-1 und ($\Updownarrow$-^{32}P)-ATP wie oben beschrieben inkubiert. Aus den gleichen Zelllysaten wurde auch die Raf-B-Aktivität untersucht, um zu testen, ob deren Regulation sich von derjenigen der MEKK unterschied. Aus den gleichen Zelllysaten wie oben beschrieben wurde Raf-B immunopräzipitiert und auf seine Fähigkeit hin untersucht, die MEK-1 wie oben beschrieben zu phosphorylieren. Eine Vorbehandlung mit Forskolin hob die Aktivierung von sowohl der MEKK als auch der Raf-B durch EGF, NGF und TPA auf, wie dies durch deren Fähigkeit, kinaseinaktive MEK-1 zu phosphorylieren, gemessen wurde (**Fig.** 18). Eine Behandlung mit Forskolin allein hatte keine nennenswerte Wirkung auf die beiden Kinasen. Diese Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zu Raf-1 und Raf-B, eine PKA-Aktivierung die Wachstumsfaktor-Stimulation der MEKK von 95kD aus P12-Zellen hemmt, was nahe legt, dass es einen gemeinsamen regulatorischen Kontrollpunkt für die PKA-Wirkung gibt, der zwischen oder downstream zu Ras und upstream oder auf gleicher Höhe mit jeder dieser drei Kinasen liegt.

[0082] Um zu ermitteln, ob eine ähnliche oder unterschiedliche MEK-Aktivität bei der Aktivierung der MAPK durch das an Rezeptoren gebundene G_i-Protein eine Rolle spielt, wurde die MEK-Aktivität in Zelllysaten von mit Thrombin stimulierten Rat 1a-Zellen untersucht. Mit Thrombin stimulierte Zellen wiesen eine MEK-Aktivität auf, die zusammen mit dem in EGF-stimulierten Zellen nachgewiesenen MEK-Hauptpeak eine Fraktion bildete. Die Größe der MEK-Aktivität aus mit Thrombin behandelten Zellen war im Allgemeinen zwei- bis dreifach geringer als die, welche bei EGF-Stimulierung beobachtet wurde, was mit der geringeren MAPK-Reaktion in Einklang steht, welche die Erfinder der vorliegenden Erfindung bei mit Thrombin stimulierten Zellen fanden.

[0083] Eine unterschiedliche Regulation der MEK in Rat 1a- und NIH3T3-Zellen, welche gip2, v-src, v-ras

oder v-raf exprimieren, brachten die Erfinder der vorliegenden Erfindung dazu, die Proteinkinasen zu untersuchen, die mutmaßliche Regulatoren der MEK-1 sind. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Raf-1 die MEK phosphorylieren und aktivieren kann. Die Raf-Aktivierung wurde auf die folgende Weise untersucht.

[0084] Zellen wurden ohne Serum gehalten und, wie oben beschrieben, mit oder ohne die geeigneten Wachstumsfaktoren stimuliert. Ohne Serum gehaltene Rat 1a-Zellen wurden mit Puffer allein oder mit EGF stimuliert und die Raf unter Einsatz eines Antikörpers, welcher den C-Terminus der Raf erkennt, einer Immunfällung unterzogen. Durch Eintragen in eiskalten RIPA-Puffer (50 mM Tris, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Natriumdesoxycholat, 1,0% Triton X-100, 10 mM Natriumpyrophosphat, 25 mM Natriumglycerophosphat, 2 mM Natriumvanadat, 2,1 µg/ml Aprotinin) wurden die Zellen lysiert und zur Entfernung der Kerne 10 Minuten lang in eine Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden auf ihren Proteingehalt normiert und vor der Immunfällung mit Kaninchen-Antiserum gegen den C-Terminus der Raf-1 und mit Protein A-Sepharose 2 bis 3 Stunden lang bei 4°C vorbehandelt. Die Kügelchen wurden zweimal mit eiskaltem RIPA und zweimal mit PAN (10 mM PIPES, pH 7,0, 100 mM NaCl, 21 µg/ml Aprotinin) gewaschen. Ein Teil des Immunopräzipitats wurde mit SDS-Probenpuffer verdünnt und für eine Immunoblot-Analyse verwendet. Der Rest wurde in Kinasepuffer (20 mM PIPES pH 7,0, 10 mM $MnCl_2$, 150 ng kinaseinaktive MEK-1, 30 µCi ⇳-^{32}P-ATP und 20 µg/ml Aprotinin) in einem Endvolumen von 50 µl 30 Minuten lang bei 30°C resuspendiert. Daneben wurde als Marker rekombinante Wildtyp-MEK-1 autophosphoryliert. Durch Zugabe von 12,5 µl 5 × SDS-Probenpuffer wurden die Reaktionen gestoppt, 5 Minuten lang gekocht und einer SDS-PAGE und Audioradiographie unterzogen.

[0085] Die in Gegenwart von ⇳-^{32}P-ATP immunopräzipitierte Raf war in der Lage, die MEK-1 zu phosphorylieren. Die in diesem Versuch eingesetzte rekombinante MEK-1 war kinaseinaktiv, um sicher zu gehen, dass sie nicht autophosphorylierte, wie dies bei einer Wildtyp-MEK-1 beobachtet wurde. In Immunopräzipitaten aus Kontrollzellen wurde nur einer geringe oder gar keine Phosphorylierung der MEK-1 beobachtet. Eine Behandlung mit EGF stimulierte klar die Raf-katalysierte Phosphorylierung der MEK-1; im Gegensatz dazu aktivierte eine Behandlung von Rat 1a-Zellen mit Thrombin die Raf nicht messbar, obwohl endogene MEK deutlich aktiviert wurde. EGF stimulierte die Raf-Phosphorylierung von rekombinanter MEK-1 um annähernd das 2,6-fache über dem Basiswert. In Raf-Immunopräzipitaten aus Gip2 oder v-Src exprimierenden Rat 1a-Zellen wurde nur eine geringe Phosphorylierung der MEK beobachtet. Eine EGF-Stimulation war noch in der Lage, in diesen Zelllinien die Raf-katalysierte Phosphorylierung der MEK-1 um das 1,8- bzw. 1,4-fache zu aktivieren. Die Unempfindlichkeit der EFG-Reaktion in Gip2 und v-Src exprimierenden Zellen ist wahrscheinlich das Ergebnis der Desensibilisierung des EFG-Rezeptors auf die grundlegende Aktivierung der MAPK. Durch nachfolgende SDS-PAGE und Immunoblotting mit Hilfe eines Raf-Antikörpers wurde gezeigt, dass die Menge an Raf in den Immunopräzipitaten ähnlich war. Da die Thrombin-Stimulierung der MEK um das zwei- bis dreifache über dem Basiswert liegt, wird zumindest eine 1,5-fache Stimulierung der MEK-Phosphorylierung erwartet, falls die Raf durch diesen Wachstumsfaktor deutlich zur MEK-Aktivierung beitrug. Dieses Aktivierungsniveau konnte in den EGF-stimulierten Gip2 und v-Src exprimierenden Zelllinien nachgewiesen werden. Es ist somit unwahrscheinlich, dass der fehlende Nachweis einer Thrombin-Aktivierung der Raf auf die Empfindlichkeit des Assays zurück zu führen ist. Die Thrombin-Stimulierung der MAPK erreicht nach 3 Minuten ein Maximum. Eine Stimulierung von Rat 1a-Zellen mit Thrombin über 1 oder 5 Minuten erhöhte die Raf-Aktivität nicht.

[0086] Wie bei Rat 1a-Zellen aktiviert EGF die Raf in NIH3T3-Zellen annähernd um das 2,7-fache, während Thrombin dies nicht tut. V-Raf exprimierende NIH3T3-Zellen zeigten keinen Anstieg der Phosphorylierung von MEK-1. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die MEK in V-Raf exprimierenden NIH3T3-Zellen klar aktiviert wurde. Durch die Antiseren wurden aus v-Raf-NIH3T3-Zellen zusätzlich zu c-Raf-1 sowohl das p90 als auch das p75 gag-raf-Fusionsprotein immunopräzipitiert. Es ist gezeigt worden, dass das p75 gag-raf eine Protein-Kinaseaktivität zeigt, es ist jedoch möglich, dass in dem in vitro-Assaysystem das NH_2-terminalenterminale gag-Fusionsprotein die Raf-Phosphorylierung der rekombinanten MEK-1 sterisch hindert. Es müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Kinaseaktivität der v-Raf zu messen. Aus den Ergebnissen folgt, dass sich die Aktivierung der MEK nicht ausschließlich mit der Aktivierung der Raf begründen lässt. Es muss noch zusätzliche regulatorische Kinasen für die MEK geben, welche in mit Thombin stimulierten, an das G_i-Protein gekoppelten Übertragungswegen sowie in mit gip2 und v-src transfizierten Zellen zur Aktivierung der MEK beitragen.

[0087] MAPKs sind Serin-/Threonin-Kinasen, von denen man annimmt, dass sie in verschiedenen Signalübertragungswegen dazwischen liegende Schlüsselmoleküle darstellen. MAPKs werden ihrerseits von MEKs phosphoryliert und aktiviert.

[0088] Die grundlegende Aktivierung der MEK ist für die meiste, wenn nicht gar alle erhöhte MAPK-Aktivität in mit Krebsgenen transfizierten Zellen verantwortlich. Gip2 und v-Src aktivierte die MEK in Rat 1a-Zellen, wäh-

rend v-Raf dieMEK am wirksamsten in NIH 3T3-Zellen aktivierte. Diese Krebsproteine aktivierten eine ähnliche MEK-Aktivität wie Wachstumsfaktoren. In mit v-Ras transfizierten NIH 3T3-Zellen wurde kein signifikantes Niveau einer MEK-Stimulierung nachgewiesen. Die Befunde weisen auf eine eher enge Verbindung zwischen MAPK- und MEK-Aktivierung hin. Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat keine signifikante Aktivierug der MAPK unabhängig von einer MEK-Aktivierung in Wachstumsfaktor-stimulierten Zellen beobachtet, die ein Onkogen exprimieren.

[0089] Die Empfindlichkeit von Raf-Aktivierungsassays, bei denen die Phosphorylierung von kinaseinaktiver MEK-1 eine Rolle spielt legt nahe, dass man leicht eine Raf-Aktivität nachweisen könnte, die bei 20–25% der bei einer EGF-Stimulation von sowohl Rat 1a- als auch NIH 3T3-Zellen beobachteten Aktivität liegt. Das Ausbleiben eines Nachweises der Raf-Aktivierung in Reaktion auf Thrombin, wo sowohl eine MEK- als auch MAPK-Aktivierung leicht nachgewiesen wird, legt nahe, dass in Rat 1a- und NIH 3T3-Zellen die Raf durch Thrombin nicht signifikant aktiviert wird. Dieser Befund legt nahe, dass eine zusätzliche andere Proteinkinase als Raf in der Lage ist, die MEK-1 zu phosphorylieren und zu aktivieren. Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat kürzlich eine MEK-Kinase (MEKK) der Maus kloniert und exprimiert, die mit der Raf nicht verwandt und von dieser unabhängig ist. Es wurde gezeigt, dass sowohl die MEKK als auch die Raf die MEK-1 phosphorylieren und aktivieren. Die MEKK ist das Mäusehomologe der Proteinkinasen Ste11 und Byr2 der Hefe; MEK ist das Mäusehomologe der Proteinkinasen Ste7 und Byr1 der Hefe. Raf ist mit seiner Sequenz nicht mit Ste11 und Byr2 verwandt, was nahe legt, dass die Raf in Säugerzellen eine Abweichung des in Hefe definierten auf Pheromone reagierenden Proteinkinasesystems darstellt.

[0090] Untersuchungen weisen darauf hin, dass sowohl die Raf als auch die MEKK die MEK aktivieren, die als Konvergenzpunkt für mehrfache Proteinkinasen fungiert, die bei der MAPK-Aktivierung eine Rolle spielen (siehe **Fig. 14**). Somit sind die Raf und die MEKK Proteinkinasen an der Abzweigung für Signal-Inputs, die von verschiedenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Man nimmt an, dass die MEKK eine von Thrombin regulierte Kinase ist, die in Rat 1a- und NIH 3T3-Zellen die MEK reguliert. Man nimmt auch an, dass die Raf und die MEKK von Krebsproteinen unterschiedlich reguliert werden.

[0091] Die Stellung der MEKK zwischen der MAPK und den upstream gelegenen Regulatoren der MAPK sorgt für eine Integration aber auch Unabhängigkeit von Signalnetzwerken, die von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren initiiert werden. Beispielsweise können die Serin/Threonin-Kinasen Raf und MEKK die MEK phosphorylieren, sie phosphorylieren aber höchstwahrscheinlich auch andere Proteine. MEK ist eine spezialisierte duale Tyrosin/Threonin-Kinase für die selektive Regulation der MAPK.

[0092] Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Erkenntnis, dass die MEKK die MAPK aktiviert. Von der MAPK ist beispielsweise bekannt, dass sie in Säugersystemen bei verschiedenen Übertragungswegen der Zelle eine Rolle spielt. Von der MAPK ist bekannt, dass sie bei der Mitogenese der Zelle, der DNA-Synthese, der Zellteilung und -differenzierung eine Rolle spielt. Es ist auch erkannt worden, dass die MAPK bei der Aktivierung von Onkogenen eine Rolle spielt, wie z.B. von c-Jun und c-Myc. Obwohl nicht an eine Theorie gebunden, glaubt der Erfinder der vorliegenden Erfindung, dass die MAPK auch bei verschiedenen Anomalitäten genetischen Ursprungs eine entscheidende Rolle spielt. Von der MAPK ist bekannt, dass sie die Zellmembran durchdringt und man glaubt, dass sie zumindest teilweise für die Regulation der Expression von verschiedenen Genen verantwortlich ist. Von der MAPK wird angenommen, dass sie als solche eine bedeutende Rolle bei der Auslösung und Ausbreitung von Krebs, Nervenkrankheiten, Autoimmun-Erkrankungen, allergischen Reaktionen, Wundheilung und Entzündungsreaktionen spielt. Indem der Erfinder der vorliegenden Erfindung der erste war, der die MEKK codieren Nucleinsäuresequenzen identifizierte, erkannte er, dass es nun möglich ist, die Expression der MEKK und somit die Aktivierung der MAPK zu regulieren.

[0093] Es ist auch bekannt, dass die MEKK außer der Aktivierung der MAPK noch verschiedene andere Fähigkeiten aufweist. Es liegt daher im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung, die Expression der MEKK zu regulieren, um die Regulation anderer Zellaktivitäten zu bewirken, die entweder durch Stimulierung oder Hemmung durch die MEKK reguliert werden.

[0094] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Erkenntnis, dass sowohl die MEKK als auch die Raf in der Lage sind, die MAPK zu aktivieren. Der Erfinder der vorliegenden Erfindung hat entdeckt, dass, während die MEKK sich strukturell von der Raf unterscheidet, sowohl die Raf als auch die MEKK bei der Regulation der MAPK-Aktivität eine Rolle spielen. Es liegt daher im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung, die Expression der Raf und der MEKK entweder zu stimulieren oder zu hemmen, um die gewünschten Regulationsergebnisse zu erzielen. Somit kann in einer Ausführungsform die MEKK-Expression gehemmt werden, indem beispielsweise Antisense-Nucleinsäuresequenzen eingesetzt werden, um die MEKK-Aktivität zu blo-

ckieren. Alternativ kann in der gleichen Zelle die Expression der Raf auf ähnliche Weise reguliert werden, um eine maximale Hemmung der MAPK-Aktivität zu erreichen. Die Regulation des MAPK-Systems lässt sich daher durch eine Hemmung und/oder Stimulation von entweder der Raf oder der MEKK-Expression oder von beiden fein einstellen.

[0095] Es liegt im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung, über die Verwendung von im Stand der Technik gut bekannten Expressionstechniken für rekombinante DNA die Expression der MEKK zu regulieren. Beispielsweise können geeignete Wirtszellen mit der MEKK-Sequenz transformiert und geeignete Kontrollelemente operativ mit der MEKK-Sequenz verbunden werden, um die gewünschte Expression zu erzielen.

[0096] Die Menge des in der Zelle vorkommenden MEKK-Enzyms lässt sich auf verschiedene Weisen erhöhen, einschließlich, aber nicht ausschließlich, im Wesentlichen über eine Derepression der Synthese des Enzyms, über die Amplifikation der Kopienzahl einer das Enzym codierenden Nucleinsäuresequenz sowie durch Kombinationen derselben.

[0097] Der hier verwendete Ausdruck "im Wesentlichen über eine Derepression der Synthese des Enzyms" betrifft die Produktion größerer Enzymmengen als normalerweise von Wildtyp-Zellen produziert werden, do dass die Menge und/oder die Geschwindigkeit der Überführung des Substrats in das Produkt größer ist als in Wildtyp-Zellen (d.h. es gibt eine beschleunigte Umwandlung des Substrats in das Produkt). Eine Derepression der Synthese des MEKK-Enzymslässt sich auf verschiedenen Wegen erzielen, einschließlich dem Eingriff in die Kontrollen der Regulation, die normalerweise über die Transkription und/oder Translation des das Enzym codierenden Gens erfolgt sowie der Erhöhung der Stabilität der dem Enzym entsprechenden Messenger-RNA (mRNA). Beispielsweise lässt sich die Synthese eines Enzyms, die normalerweise einer Repression unterliegt, steigern, indem der entsprechende Repressor zumindest teilweise inaktiviert wird und/oder die Operatorsequenz modifiziert wird, um die Fähigkeit des Repressors zu verringern, sich daran zu binden. Eine Modifikation der Transkription (z.B. Promotor) und/oder Translation (z.B. Shine Delgarno-Sequenz) sowie der Kontrollsignale (z.B. Initiations-, Elongations- und/oder Terminationssignale) kann ebenfalls sowohl die Geschwindigkeit als auch die Menge der Enzymproduktion erhöhen. Verfahren zur Derepression der Enzymsynthese sind rekombinante DNA-Techniken.

[0098] Das hier eingesetzte Amplifizieren der Kopienzahl einer Nucleinsäuresequenz in einer Zelle lässt sich entweder durch eine Erhöhung der Kopienzahl der Nucleinsäuresequenz im Genom der Zelle oder durch das Einführen zusätzlicher Kopien der Nucleinsäuresequenz in die Zelle mittels Transformation verwirklichen. Die Amplifikation der Kopienzahl erfolgt so, dass größere Mengen eines Enzyms produziert werden, was zu einer besseren Umwandlung des Substrats in das Produkt führt. Beispielsweise können Nucleinsäuren enthaltende rekombinante Moleküle in Zellen transformiert werden, um die Synthese von Enzymen zu steigern. Eine Transformation kann unter Einsatz eines jeden Verfahrens erfolgen, mit welchem Nucleinsäuresequenzen in eine Zelle invertiert werden. Die Transformationstechniken umfassen, jedoch nicht ausschließlich, die Transfektion, die Elektroporation, die Mikroinjektion, die Lipofektion, die Adsorption und die Protoplasten-Fusion. Nach der Transformation kann die Zelle Mehrfachkopien der Nucleinsäuresequenz produzieren, die entweder auf extrachromosomalen Vektoren bleiben oder in das Wirtsgenom eingebaut werden können. Vor der Transformation kann die Nucleinsäuresequenz auf dem rekombinanten Molekül manipuliert werden, um ein Enzym mit höherer spezifischer Aktivität zu codieren.

[0099] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein im Wesentlichen reines MEKK-Protein. Nach der vorliegenden Erfindung ist ein im Wesentlichen reines oder isoliertes Protein ein Protein, das aus seiner natürlichen Umgebung entfernt worden ist. Als solches geben "isoliert" und "im Wesentlichen rein" nicht unbedingt das Ausmaß wieder, mit welchem das Protein gereinigt worden ist. Ein im Wesentlichen reines MEKK-Protein kann z.B. aus seiner nätürlichen Quelle erhalten werden. Ein im Wesentlichen reines MEKK-Protein kann auch unter Einsatz der rekombinanten DNA-Technologie gewonnen oder chemisch synthetisiert werden. Der hier verwendete Begriff "ein im Wesentlichen reines MEKK-Protein" kann ein MEKK-Protein mit vollständiger Länge oder jedes Homologe eines solchen Proteins sein, wie z.B. ein MEKK-Protein, in welchem Aminosäuren deletiert (z.B. eine eingekürzte Version des Proteins (wie z.B. ein Peptid), invertiert, invertiert, substituiert und/oder derivatisiert worden sind (z.B. durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Myristoylierung, Prenylierung, Palmitoylierung, Amidierung und/oder Addition von Glycosylphoyphatidyl-innosit), so dass das Homologe über eine Kinaseaktivität verfügt und/oder mindestens ein Epitop aufweist, das in der Lage ist, eine Immunantwort gegen das MEKK-Protein auszulösen (d.h. wenn das Homologe unter Einsatz von im Stand der Technik bekannten Techniken als ein Immunogen einem Tier verabreicht wird, produziert das Tier eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort gegen mindestens ein Epitop des MEKK-Proteins). Die Kinaseaktivität, die regulatorische Kinaseaktivität sowie die Fähigkeit eines Proteins, eine Immu-

nantwort zu bewirken, lassen sich unter Einsatz von dem Fachmann bekannten Techniken messen.

[0100] Ein MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung, einschließlich einem Homologen des Proteins von voller Länge, weist die weitere Eigenschaft auf, dass es von einem Nucleinsäuremolekül codiert wird, das in der Lage ist, unter stringenten Bedingungen mit (d.h. an) eine Nucleisäure zu hybridisieren, welche zumindest einen Abschnitt der ein MEKK-Protein codierenden Nucleinsäuresequenz umfasst, so wie die in Tabelle 1 wiedergegebene. Der hier benutzte Ausdruck "mindestens einen Abschnitt von" einem Ganzen bezieht sich auf eine Menge des Ganzen, die mindestens ausreicht, dass sie die funktionellen Aspekte des Ganzen aufweist. Beispielsweise bedeutet der hier verwendete Ausdruck "mindestens ein Abschnitt einer Nucleinsäuresequenz" eine Menge einer Nucleinsäuresequenz, die in der Lage ist, unter stringenten Hybridisierungsbedingungen ein stabiles Hybrid zu bilden. Die Nucleinsäuresequenz repräsentiert die abgeleitete Sequenz eines cDNA (komplementäre DNA)-Nucleinsäuremoleküls, dessen Gewinnung weiter unten beschrieben wird. (Es sollte beachtet werden, dass die Sequenzierungstechnologie von Nucleinsäuren nicht völlig frei von Fehlern ist, so dass die in Tabelle 1 gezeigte Sequenz bestenfalls eine scheinbare Nucleinsäuresequenz des zumindest einen Teil des MEKK-Proteins codierenden Nucleinsäuremoleküls darstellt). Der hier verwendete Ausdruck "stringente Hybridisierungsbedingungen" bezieht sich auf standartisierte Hybridisierungsbedingungen, unter denen Nucleinsäuremoleküle (oder Sequenzen), einschließlich Oligonucleotide; eingestzt werden, um ähnliche Sequenzen zu identifizieren. Solche Standard-Bedingungen werden z.B. in Sambrook et al., ib. beschrieben. Bevorzugte MEKK-Proteine der vorliegenden Erfindung werden von Nucleinsäuresequenzen mit mindestens 80% Homologie (Identität innerhalb vergleichbarer Abschnitte) mit der in Tabelle 1 gezeigten Nucleinsäuresequenz codiert. Mehr bevorzugte MEKK-Proteine der vorliegenden Erfindung werden von Nucleinsäuresequenzen mit mindestens 85% Homologie mit der in Tabelle 1 gezeigten Nucleinsäuresequenz und noch mehr bevorzugte MEKK-Proteine der vorliegenden Erfindung werden von Nucleinsäuresequenzen mit mindestens 90% Homologie mit der in Tabelle 1 gezeigten Nucleinsäuresequenz codiert.

[0101] Homologe eines MEKK-Proteins können das Ergebnis einer allelen Variation oder einer natürlichen Mutation sein. Homologe der MEKK-Proteine lassen sich unter Einsatz von im Stand der Technik bekannten Techniken herstellen, einschließlich, aber nicht ausschließlich, von direkten Modifikationen am Protein oder Modifikationen an dem das Protein codierenden Gen unter Einsatz von z.B. klassischen oder rekombinanten DNA-Techniken, um eine zufällige oder zielgerichtete Mutagenese zu bewirken. Isolierte Proteine der vorliegenden Erfindung, einschließlich der Homologen, lassen sich über die Fähigkeit des Proteins, das MEK-Protein von Säugern zu phosphorylieren und/oder eine Immunantwort gegen MEKK-Proteinse auszulösen, direkt identifizieren. Die Modifikationen für ein MEKK-Protein umfassen die Einkürzung des in voller Länge vorliegenden Nucleinsäuremoleküls. Bevorzugte Modifikationen für ein MEKK-Protein der vorliegenden Erfindung umfassen z.B. die Deletion von zumindest einem Abschnitt einer regulatorischen Domäne (in Tabelle 2 dargestellt), um ein konstitutiv aktives MEKK-Protein zu erzeugen; die Deletion von zumindest einem Abschnitt einer katalytischen Domäne (in Tabelle 2 dargestellt), um ein inaktives MEKK-Protein zu erzeugen, das in der Lage ist, als Inhibitor für Proteine aufzutreten, welche die MEKK-Aktivität regulieren können; die Isolierung von mindestens einem Abschnitt einer regulatorischen Domäne eines MEKK-Proteins, um ein Molekül zu erzeugen, das in der Lage ist, die regulatorischen MEKK-Proteine zu hemmen; und die Substitution eines Lysinrests in der katalytischen Domäne (d.h. der Phosphotransferase-Domäne) durch einen Methioninrest, um die katalytische Domäne zu inaktivieren.

[0102] Zwei eingekürzte Formen der MEKK 1 mit der katalytischen Domäne und nicht der regulatorischen Domäne wurden unter Einsatz von Standardtechniken für rekombinante DNA produziert. Ein erstes eingekürztes MEKK-Molekül wurde durck Kürzung der MEKK 1 von Rest 1 bis Rest 215 produziert, wodurch die PPPSS-Gelenksequenz und die regulatorische Domäne deletiert wurden, um das eingekürzte MEKK-Molekül PPPSS-Trunc zu bilden. Ein zweites kleineres eingekürztes MEEK-Molekül wurde produziert, indem die MEKK 1 von Rest 1 bis Rest 1 eingekürzt wurde, wodurch die PPPSS-Gelenksequenz und die regulatorische Domäne deletiert wurden, um das eingekürzte MEKK-Molekül Ncol-Trunc zu bilden. Die Fähigkeit von PPPSS-Trunc und Ncol-Trunc, die MAPK-Aktivität (ermittelt wie oben beschrieben) zu aktivieren wurde mit einem MEKK-Protein mit voller Länge und einem negativen Kontrollprotein verglichen. Die in **Fig. 15** wiedergegebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die eingekürzten MEKK-Moleküle aktiver waren als die MEKK mit voller Länge. Die eingekürzten MEKK-Moleküle waren in der Tat um mindestens etwa das 1,5-fache aktiver als das MEKK-Protein mit voller Länge. Somit dereguliert die Entfernung der regulatorischen Domäne der MEKK die Aktivität der katalytischen Domäne, was zu einer verbesserten Enzymaktivität führt.

[0103] Die Mindestgröße eines isolierten Proteins der vorliegenden Erfindung reicht aus, um ein Epitop zu bilden, eine Größe, die typischerweise von etwa 7 bis etwa 9 Aminosäuren reicht. Wie für einen Fachmann ersichtlich, kann ein Epitop Aminosäuren umfassen, die natürlicherweise nebeneinander liegen als auch Amino-

säuren, die wegen der Tertiärstruktur des natürlichen Proteins genügend nahe beieinander liegen, um ein Epitop zu bilden.

[0104] Funktionell gleichwertige Nucleinsäuresequenzen können Nucleinsäuresequenzen mit Modifikationen umfassen, wie z.B. Nucleotiddeletionen, -additionen, -inversionen und/oder substitutionen, die im Wesentlichen die Fähigkeit der Nucleinsäuresequenz, ein biologisch aktives Enzym zu codieren, nicht beeinträchtigen. Das bedeutet, dass funktionell gleichwertige Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung Enzyme codieren, welche über eine ähnliche biologische Aktivität verfügen wie ihre natürlichen Entsprechungen. Funktionell gleichwertige eukaryotische Nucleinsäuresequenzen können auch eingreifende und/oder nicht translatierte Sequenzen umfassen, welche die codierenden Abschnitte der Nucleinsäuresequenzen umgeben und/oder innerhalb von ihnen liegen.

[0105] Eine funktionell gleichwertige Nucleinsäuresequenz lässt sich unter Einsatz von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten (siehe z.B. Sambrook et al., ib.). Nucleinsäuresequenzen lassen sich z.B. unter Einsatz verschiedener Techniken modifizieren, einschließlich, aber nicht ausschließlich, den klassischen Mutagenese-Techniken und den rekombinanten DNA-Techniken wie z.B. der zielgerichteten Mutagenese, der chemischen Behandlung eines Nucleinsäuremoleküls zur Induktion von Mutationen, der Spaltung eines Nucleinsäurefragments mit Restriktionsenzymen, der Ligation von Nucleinsäurefragmenten, der Amplifikation mittels der Polymerase-Kettenreaktion und/oder der Mutagenese ausgesuchter Regionen einer Nucleinsäuresequenz, der Synthese von Mischungen von Oligonucleotiden und der Ligation von Mischungsgruppen, um eine Mischung von Nucleinsäuremolekülen und Kombinationen derselben zusammen zu zustellen. Funktionell gleichwertige Nucleinsäuresequenzen können aus einer Mischung von modifizierten Nucleinsäuren ausgesucht werden, indem nach der Funktion des von der Nucleinsäure codierten Proteins gescreent wird. Im Stand der Technik sind eine Anzahl von Screeningtechniken bekannt, einschließlich, aber nicht ausschließlich, Komplementierungsassays, Bindungsassays und Enzymassays. Eine Transformation lässt sich mit jedem Verfahren durchführen, mit welchem Nucleinsäuresequenzen in eine Zelle insertiert werden. Transformationstechniken umfassen, jedoch nicht ausschließlich, eine Transfektion, eine Elektroporation, eine Mikroinjektion, eine Lipofektion, eine Adsorption und eine Fusion von Protoplasten. Eine rekombinante Zelle kann einzellig bleiben oder sich zu einem Gewebe, einem Organ oder einem vielzelligen Organismus auswachsen. Transformierte Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung können extrachromosomal bleiben oder sie können an einer oder mehreren Stellen in ein Chromosom einer Wirtszelle so eingebaut werden, dass ihre Fähigkeit, exprimiert zu werden, erhalten bleibt. Integrierte Nucleinsäuresequenzen sind oft stabiler als extrachromosomale Sequenzen. Als solches liegt es im Geltungsbereich der vorliegenden Erfindung, dass die Expression von Nucleinsäuresequenzen, welche die Enzyme der vorliegenden Erfindung codieren, auf die Expression von Plasmidsequenzen oder von in das Wirtsgenom integrierten Sequenzen zurückzuführen ist.

[0106] Eine rekombinante Zelle wird vorzugsweise gewonnen, indem eine Wirtszelle mit einem oder mehreren rekombinanten Molekülen transformiert wird, von denen jedes eine oder mehrere Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung enthält, die operativ mit einem Expressionsvektor verbunden sind, der eine oder mehrere Kontrollsequenzen für die Transkription enthält. Eine Zelle kann mit einem oder mehreren rekombinanten Molekülen transformiert sein.

[0107] Der hier verwendete Ausdruck "operativ verbunden" bezieht sich auf die Insertion einer Nucleinsäuresequenz in einen Expressionsvektor derart, dass die Sequenz in der Lage ist, exprimiert zu werden, wenn sie in eine Wirtszelle transformiert worden ist. Der hier verwendete Ausdruck "Expressionsvektor" bezeichnet einen DNA- oder RNA-Vektor, der in der Lage ist, eine Wirtszelle zu transformieren, in der Zelle zu replizieren und die Expression einer spezifischen Nucleinsäuresequenz zu bewirken. Expressionsvektoren können entweder prokaryotisch oder eukaryotisch sein und sind typischerweise Viren oder Plasmide.

[0108] Die Nucleinsäuresequenzen der vorliegenden Erfindung können operativ mit Expressionsvektoren mit regulatorischen Sequenzen verbunden sein, wie z.B. Promotoren, Operatoren, Repressoren, Enhancern, Terminationssequenzen, Ursprüngen der Replikation und anderen regulatorischen Sequenzen, die mit der Wirtszelle kompatibel sind und die Expression der Nucleinsäuresequenzen kontrollieren. Die Expressionsvektoren der vorliegenden Erfindung umfassen insbesondere Kontrollsequenzen der Transkription. Kontrollsequenzen der Transkription sind Sequenzen, welche die Initiation, Elongation und Termination der Transkription kontrollieren. Besonders bedeutende Kontrollsequenzen für die Transkription sind solche, welche die Initiation der Transkription kontrollieren, wie z.B. ein Promotor, ein Enhancer, ein Operator sowie Repressorsequenzen. Geeignete Kontrollsequenzen für die Transkription umfassen jede Kontrollsequenz für die Transkription, die in mindestens einer Wirtszelle der vorliegenden Erfindung funktionieren kann und Kontrollsequenzen für die Transkription aus Bakterien, Hefe und Säugern enthalten kann.

[0109] Ein rekombinantes Molekül der vorliegenden Erfindung kann eine Kombination von jeder hier beschriebenen Nucleisäuresequenz sein, welche operativ mit jeder Kontrollsequenz für die Transkription verbunden sein kann, die in der Lage ist, effektiv die Nucleinsäuresequenz in der zu transformierenden Zelle zu regulieren.

[0110] Rekombinante Zellen der vorliegenden Erfindung umfassen alle Zellen, die mit irgendeiner Nucleinsäuresequenz der vorliegenden Erfindung transformiert worden sind.

[0111] Der Fachmann weiß zu würdigen, dass der Einsatz von rekombinanten DNA-Technologien die Expression transformierter Nucleinsäuremoleküle verbessern kann, indem z.B. die Anzahl der Kopien der Nucleinsäuremoleküle innerhalb einer Wirtszelle, die Effizienz, mit welcher derartige Nucleinsäuremoleküle transkribiert werden, die Effizienz, mit welcher die erhaltenen Transkripte translatiert werden und die Effizienz der Modifikationen nach der Translation gesteuert werden. Rekombinante Techniken, die für eine Steigerung der Expression der hier beschriebenen Nucleinsäuresequenzen von Nutzen sind, umfassen, jedoch nicht ausschließlich, das operative Verbinden von Nucleinsäuresequenzen zu Plasmiden mit hoher Kopienzahl, das Integrieren der Nucleinsäuresequenzen in eines oder mehrere Chromosomen der Wirtszelle, die Zugabe von Sequenzen zu den Plasmiden für eine Vektorstabilität, Substitutionen oder Modifikationen der Kontrollsignale für die Transkription (z.B. Promotoren, Operatoren, Enhancer), Substitutionen oder Modifikationen der Kontrollsignale für die Translation (z.B. Rbosomen-Bindungsstellen, Shine-Delgarno-Sequenzen), die Modifikation von Nucleinsäuresequenzen, um dem Codonraster der Wirtszelle zu entsprechen, die Deletion von Sequenzen, welche Transkripte destabilisieren, sowie der Einsatz von Kontrollsignalen, die während der Kultivierung das Wachstum der rekombinanten Zellen von der Produktion rekombinanter Enzyme vorübergehend trennen.

[0112] Die Aktivität eines exprimierten rekombinanten Enzyms der vorliegenden Erfindung lässt sich erhöhen, indem die Nucleinsäuresequenzen, die das Enzym codieren, welches bei den oben beschriebenen Übertragungswegen eine Rolle spielt, fragmentiert, modifiziert oder derivatisiert werden.

[0113] Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, von einem Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle ausgelöste Signale zu regulieren. Ein derartiges Verfahren umfasst die Schritte: (a) in Kontakt bringen einer Zelle mit einem MEKK-Protein mit einer mutmaßlichen regulatorischen Verbindung; (b) in Kontakt bringen der Zelle mit einem Liganden, der in der Lage ist, sich an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle zu binden und (c) Bewertung der Fähigkeit der mutmaßlichen regulatorischen Verbindung, Zellsignale zu regulieren, indem die Phosphorylierung des MEKK-Proteins ermittelt wird. Schritt (c) umfasst die Ermittlung der Aktivierung des MEKK-Proteins, indem die Fähigkeit des MEKK-Proteins zur Phosphorylierung des MEK-Proteins gemessen wird.

[0114] In einer anderen Ausführungsform kann ein anderes Verfahren zu Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, die Transduktion von Signalen in eine Zelle zu regulieren die Schritte umfassen: (a) in Kontakt bringen einer mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung mit einem MEKK-Protein, um eine Reaktionsmischung zu bilden; (b) in Kontakt bringen der Reaktionsmischung mit einem MEK-Protein und (c) Bewertung der Fähigkeit der mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung, die Phosphorylierung des MEK-Proteins durch das MEKK-Protein zu hemmen. Die aus Schritt (c) erhaltenen Ergebnisse können mit der Fähigkeit einer mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung zur Hemmung der Fähigkeit eines Raf-Proteins, das MEK-Protein zu phosphorylieren, verglichen werden, um zu bestimmen, ob die Verbindung die Transduktion von Signalen, bei der das MEKK-Protein unabhängig vom Raf-Protein eine Rolle spielt, selektiv regulieren kann. Die in den vorstehenden Verfahren eingesetzten MEKK-, MEK- und Raf-Proteine können rekombinante Proteine oder Proteine von natürlicher Herkunft sein.

[0115] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst ein Kit zur Identifizierung von Verbindungen, dievon einem Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle ausgelöste Signale regulieren. Derartige Kits umfassen: (a) mindestens eine Zelle mit einem MEKK-Protein; (b) einen Liganden, der in der Lage ist, sich an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle zu binden und (c) ein Mittel zur Bewertung der Fähigkeit einer mutmaßlichen regulatorischen Verbindung, die Phosphorylierung des MEKK-Proteins zu verändern. Ein solches Mittel zum Nachweis der Phosphorylierung umfasst Verfahren und Reagenzien, die dem Fachmann bekannt sind, z.B. lässt sich eine Phosphorylierung nachweisen, indem Blottingreagenzien aus Phosphocellulose eingesetzt werden.

[0116] In einer anderen Ausführungsform kann ein Kit der vorliegenden Erfindung (a) ein MEKK-Protein, (b) ein MEK-Protein und (c) ein Mittel zur Bewertung der Fähigkeit einer mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung, die Phosphorylierung des MEK-Proteins durch das MEKK-Protein zu hemmen, umfassen. Ein Kit der vorlie-

genden Erfindung kann ferner ein Raf-Protein und ein Mittel zum Nachweis der Fähigkeit einer mutmaßlichen inhibitorischen Verbindung, die Fähigkeit eines Raf-Proteins zur Phosphorylierung des MEK-Proteins zu hemmen, umfassen.

[0117] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine therapeutische Zusammensetzung, die, wenn sie einem Tier auf wirksame Weise verabreicht wird, in der Lage ist, die Signaltransduktion in den Zellen dieses Tieres zu regulieren. Insbesondere ist eine derartige therapeutische Zusammensetzung für die Verabreichung an Tiere von Nutzen, um Krankheiten wie Krebs, Autoimmunkrankheiten, Entzündungsreaktionen, allergische Reaktionen und Nervenkrankheiten wie z.B. das Parkinson-Syndrom und die Alzheimer-Krankheit zu behandeln. Eine therapeutische Zusammensetzung kann zumindest einen Abschnitt eines MEKK-Proteins un/oder ein mindestens einen Abschnitt eines MEKK-Proteins der vorliegenden Erfindung codierendes Nucleisäuremoleküls umfassen. Eine therapeutische Zusammensetzung kann ein MEKK-Protein mit Kinaseaktivität und/oder regulatorischer Kinaseaktivität umfassen. Vorzugsweise kann eine therapeutische Zusammensetzung ein MEKK-Protein mit einer Kinase-Domäne und/oder einer regulatorischer Kinase-Domäne umfassen.

[0118] Eine therapeutische Zusammensetzung kann einen geeigneten Träger aufweisen. Der hier verwendete Begriff "Träger" bezieht sich auf jede Substanz, die als Vehikel zum Transport einer Verbindung der vorliegenden Erfindung an einen geeignete in vitro- oder in vivo-Funktionsort geeignet ist. Als solche können Träger als Vehikel oder Formulierung einer therapeutischen Zusammensetzung wirken, die eine Verbindung der vorliegenden Erfindung enthält.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION

(i) ANMELDER: NATIONAL JEWISH CENTER FOR IMMUNOLOGY
AND RESPIRATORY MEDICINE

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN UND PRODUKT ZUR REGULATION DER ANSPRECHBARKEIT EINER ZELLE AUF EXTERNE SIGNALE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSE: GRAHAM WATT & CO.
(B) STRASSE: Riverhead
(C) STADT: SEVENOAKS
(D) STAAT: Kent
(E) LAND: GB
(F) POSTLEITZAHL (ZIP): TN13 2BN

(v) COMPUTER LESBARE FORM
(A) ART DES INFORMATIONSSPEICHERS: FLOPPY DISK
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0 Version #1.25

(vi) DATEN FÜR LAUFENDE ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: 94 91 5385.2
(B) DATUM DER EINREICHUNG: 15-APRIL-1994
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN FÜR FRÜHERE PATENTANMELDUNGEN:
(A) ANMELDENUMMER: PCT/US94/04178
(B) DATUM DER EINREICHUNG: 15-APRIL-1994

(viii) PATENTANWALT:
(A) NAME: HARVEY, David Gareth
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER:
(C) AKTENZEICHEN:11478

(ix) INFORMATION ÜBER TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFON: Int + 44 1732 450055
(B) TELEFAX: Int + 44 1732 450113

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 3260 Basenpaare
(B) ART: Nucleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 486...2502

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```
TACACTCCTT GCCACAGTCT GGCAGAAAGA ATCAAACTTC AGAGACTCCT CCGGCCAGTT        60

GTAGACACTA TCCTTGTCAA GTGTGCAGAT CCAACAGCCG CACGAGTCAG CTGTCCATAT       120

CTACAGTGCT GGAACTCTGC AAGGGCCAAG CAGGAGAGCT GGCGGTTGGG AGAGAAATAC       180

TTAAAGCTGG GTCCATCGGG GTTGGTGGTG TCGATTACGT CTTAAGTTGT ATCCTTGGAA       240

ACCAAGCTGA ATCAAACAAC TGGCAAGAAC TGCTGGGTCG CCTCTGTCTT ATAGACAGGT       300

TGCTGTTGGA ATTTCCTGCT GAATTCTATC CTCATATTGT CAGTACTGAT GTCTCACAAG       360

CTGAGCCTGT TGAAATCAGG TACAAGAAGC TGCTCTCCCT CTTAACCTTT GCCTTGCAAT       420

CCATTGACAA TTCCCACTCG ATGGTTGGCA AGCTCTCTCG GAGGATATAT CTGAGCTCTG       480

CCAGG ATG GTG ACC GCA GTG CCC GCT GTG TTT TCC AAG CTG GTA ACC            527
      Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr
        1               5                  10

ATG CTT AAT GCT TCT GGC TCC ACC CAC TTC ACC AGG ATG CGC CGG CGT         575
Met Leu Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg
 15                  20                  25                  30

CTG ATG GCT ATC GCG GAT GAG GTA GAA ATT GCC GAG GTC ATC CAG CTG         623
Leu Met Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu
                35                  40                  45

GGT GTG GAG GAC ACT GTG GAT GGG CAT CAG GAC AGC TTA CAG GCC GTG         671
Gly Val Glu Asp Thr Val Asp Gly His Gln Asp Ser Leu Gln Ala Val
             50                  55                  60

-GCC CCC ACC AG€ TGT CTA GAA AAC AGC TCC CTT GAG CAC ACA GTC CAT        719
Ala Pro Thr Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His
         65                  70                  75

AGA GAG AAA ACT GGA AAA GGA CTA ACT GCT AC GAGA CTG AGT GCC AGC         767
Arg Glu Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser
     80                  85                  90

TCG GAG GAC ATT TCT GAC AGA CTG GCC GGC GTC TCT GTA GGA CTT CCC         815
Ser Glu Asp Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro
 95                 100                 105                 110

AGC TCA ACA ACA ACA GAA CAA CCA AAG CCA GCG GTT CAA ACA AAA GGC         863
Ser Ser Thr Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly
                115                 120                 125

AGA CCC CAC ACT CAG TGT TTG AAC TCC TCC CCT TTG TCT CAT GCT CAA         911
Arg Pro His Ser GLn Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala GLn
            130                 135                 140

TTA ATG TTC CCA GCA CCA TCA GCC CCT TGT TCC TCT GCC CCG TCT GTC         959
Leu Met Phe Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val
        145                 150                 155


CCA GAT ATT TCT AAG CAC AGA CCC CAG GCA TTT GTT CCC TGC AAA ATA        1007
Pro Asp Ile Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile
    160                 165                 170
```

```
CCT TCC GCA TCT CCT CAG ACA CAG CGC AAG TTC TCT CTA CAA TTC CAG        1055
Pro Ser Ala Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln
175                 180                 185                 190

AGG AAC TGC TCT GAA CAC CGA GAC TCA GAC CAG CTC TCC CCA GTC TTC        1103
Arg Asn Cys Ser Glu His Arg Asp Ser Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe
                195                 200                 205

ACT CAG TCA AGA CCC CCA CCC TCC ACT AAC ATA CAC AGG CCA AAG CCA        1151
Thr Gln Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro
            210                 215                 220

TCC CGA CCC GTT CCG GGC ACT ACA AGC AAA CTA GGG GAC GCC ACA AAA        1199
Ser Arg Pro Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys
        225                 230                 235

ACT AGC ATG ACA CTT GAT CTG GGC AGT GCT TCC AGG TGT GAC GAC AGC        1247
Ser Ser Met Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser
    240                 245                 250

TTT GGC GGC GGC GGC AAC ACT GGC AAC GCC GTC ATA CCC AGC GAC GAG        1295
Phe Gly Gly Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu
255                 260                 265                 270

ACA GTG TTC ACG CCG GTG GAG GAC AAG TGC AGG TTA GAT GTG AAC ACC        1343
Thr Val Phe Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr
                275                 280                 285

GAG CTC AAC TCC AGC ATC GAG GAC CTT CTT GAA GCA TCC ATG CCT TCA        1391
Glu Leu Asn Ser Ser Ile Glu Asp Leu Leu Glu Ala Ser Met Pro Ser
            290                 295                 300

ACT GAC ACG ACA GTC ACT TTC AAG TCC GAA GTC GCC GTC CTC TCT CCG        1439
Ser Asp Thr Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro
        305                 310                 315

GAA AAG GCC GAA AAT GAC GAC ACC TAG AAA GAC GAC GTC AAT CAT AAT        1487
Glu Lys Ala Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn
    320                 325                 330

CAA AAG TGC AAA GAA AAG ATG GAA GCT GAA GAG GAG GAG GCT TTA GCG        1535
Gln Lys Cys Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Leu Ala
335                 340                 345                 350

ATC GCC ATG GCG ATG TCA GCG TCT CAG GAT GCC CTC CCC ATC GTC CCT        1583
Ile Ala Met Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro
                355                 360                 365

CAG CTG CAG GTG GAA AAT GGA GAA GAT ATT ATC ATC ATT CAG CAG GAC        1631
Gln Leu Gln Val Glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp
            370                 375                 380

ACA CCA GAA ACT CTT CCA GGA CAT ACC AAA GCG AAA CAG CCT TAC AGA        1679
Thr Pro Glu Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg
        385                 390                 395

GAA GAC GCT GAG TGG CTG AAA GGC CAG CAG ATA GGC CTC GGA GCA TTT        172?
Glu Asp Ala Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe
    400                 405                 410

TCT TCC TGT TAG CAA GCA CAG GAT GTG GGG ACT GGG ACT TTA ATG GCT        1775
Ser Ser Cys Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala
```

```
415                 420                 425                 430

GTG AAA CAG GTG ACG TAG GTC AGA AAC ACA TCC TCC GAG CAG GAG GAG        1823
Val Lys Gln Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu
                435                 440                 445

GTG GTG GAA GCG TTG AGG GAA GAG ATC CGG ATG ATG GGT CAC CTC AAC        1871
Val Val Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn
            450                 455                 460

CAT CCA AAC ATC ATC CGG ATG CTG GGG GCC ACG TGC GAG AAG AGC AAC        1919
His Pro Asn Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn
        465                 470                 475

TAG AAC CTC TTC ATT GAG TGG ATG GCG GGA GGA TCT GTG GCT CAC CTC        1967
Tyr Asn Leu Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu
    480                 485                 490

TTG ACT AAA TAG GGA GCT TTC AAG GAG TCA GTC GTC ATT AAC TAG ACT        2015
Leu Ser Lys Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr
495                 500                 505                 510

GAG CAG TTA CTG CGT GGC CTT TCC TAT CTC CAC GAG AAC CAG ATC ATT        2062
Glu Gln Leu Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile
                515                 520                 525

CAC AGA GAC GTC AAA GGT -GCC AAC CTG CWC ATT GAC AGC ACC GGT CAG       2111
His Arg Asp Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln
            530                 535                 540

AGG CTG AGA ATT GCA GAC TTT GGA GCT GCT GCC AGG TTG GCA TCA AAA        2159
Arg Leu Arg Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ser Lys
        545                 550                 555

GGA ACC GGT GCA GGA GAG TTC CAG GGA CAG TTA CTG GGG ACA ATT GCA        2207
Gly Thr Gly Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala
    560                 565                 570

TTC ATG GCG CCT GAG GTC CTA AGA GGT CAG CAG TAT GGT AGG AGC TGT        2255
Phe Met Ala Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Cys
575                 580                 585                 590

GAT GTA TGG ACT GTT GGC TGC GCC ATT ATA GAA ATG GCT TGT GCA AAA        2303
Asp Val Trp Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys
                595                 600                 605

CCA CCT TGG AAT GCA GAA AAA CAC TCC AAT CAT CTC GCC TTG ATA TTT        2351
Pro Pro Trp Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe
            610                 615                 620

AAG ATT GCT AGC GCA ACTA CT GCA CCG TCC ATC CCG TCA CAC CTG TCC        2399
Lys Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser


CCG GGT CTG CGC GAC GTG GCC GTG CGC TGC TTA GAA CTT CAG CCT CAG        2447
Lys Ile Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser


GAC CGG CCT CCG TCC AGA GAG CTG CTG AAA CAT CCG GTC TTC CGT ACC        2495
Asp Arg Pro Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr
```

ACG TGG TAGTTAATTGT TCAGATCAGC TCTAATGGAG ACAGGATATC GAACCGGGAG 2552
Thr Trp

AGAGAAAAGA GAACTTGTGG GCGACCATGC CGCTAACCGC AGCCCTCACG CCACTGAACA 2612

GCCAGAAACG GGGCCAGCGG GGAACCGTAC CTAAGCATGT GATTGACAAA TCATGACCTG 2672

TACCTAAGCT CGATATGCAG ACATCTACAG CTCGTGCAGG AACTGCACAC CGTGCCTTTC 2732

ACAGGACTGG CTCTGGGGGA CCAGGAAGGC GATGGAGTTT GCATGACTAA AGAACAGAAG 2792

CATAAATTTA TTTTTGGAGC ACTTTTTCAG CTAATCAGTA TTACCATGTA CATCAACATG 2852

CCCGCCACAT TTCAAACTCA GACTGTCCCA GATGTCAAGA TCCACTGTGT TTGAGTTTGT 2912

TTGCAGTTCC CTCAGCTTGC TGGTAA1TGT GGTGTTTTGT TTTCGATGCA AATGTGATGT 2972

AATATTCTTA TTTTCTTTGG ATCAAAGCTG GACTGAAAAT TGTACTGTGT AATTATTTTT 3032

GTGTTTTTAA TGTTATTTGG TACTCGAATT GTAAATAACG TCTACTGCTG TTTATTCCAG 3092

TTTCTACTAC CTCAGGTGTC CTATAGATTT TTCTTCTAGG AAAGTTCACT CTCAGAATGA 3152

AATTCTACGT GCTGTGTGAC TATGACTCCT AAGACTTCCA GGGCTTAAGG GCTAACTCCT 3212

ATTAGCACCT TACTATGTAA GCAAATGCTA CAAAAAAAAA AAAAAAAA 3260

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 672 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr Met Leu
1 5 10 15

Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg Leu Met
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu Gly Val
35 40 45

Glu Asp Thr Val Asp Gly His Gln Asp Ser Leu Gln Ala Val Ala Pro
50 55 60

Thr Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His Arg Glu
65 70 75 80

Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser Ser Glu
85 90 95

Asp Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

Thr Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly Arg Pro

```
        115                 120                 125

His Ser Gln Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala Gln Leu Met
    130                 135                 140

Phe Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val Pro Asp
145                 150                 155                 160

Ile Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile Pro Ser
                165                 170                 175

Ala Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln Arg Asn
            180                 185                 190

Cys Ser Glu His Arg Asp Ser Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe Thr Gln
        195                 200                 205

Ser Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro Ser Arg
    210                 215                 220

Pro Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys Ser Ser
225                 230                 235                 240

Met Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser Phe Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu Thr Val
            260                 265                 270

Phe Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr Glu Leu
        275                 280                 285

Asn Ser Ser Ile Glu Asp Leu Leu Glu Ala Ser Met Pro Ser Ser Asp
    290                 295                 300

Thr Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro Glu Lys
305                 310                 315                 320

Ala Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn Gln Lys
                325                 330                 335

Cys Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Leu Ala Ile Ala
            340                 345                 350

Met Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro Gln Leu
        355                 360                 365

Gln Val Glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp Thr Pro
    370                 375                 380

Glu Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg Glu Asp
385                 390                 395                 400

Ala Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe Ser Ser
                405                 410                 415

Cys Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala Val Lys
            420                 425                 430

Gln Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu Val Val
        435                 440                 445
```

```
Glu Ala Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn His Pro
    450                 455                 460

Asn Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn Tyr Asn
465                 470                 475                 480

Leu Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu Leu Ser
                485                 490                 495

Lys Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr Glu Gln
            500                 505                 510

Leu Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile His Arg
        515                 520                 525

Asp Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln Arg Leu
    530                 535                 540

Arg Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ser Lys Gly Thr
545                 550                 555                 560

Gly Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala Phe Met
                565                 570                 575

Ala Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Cys Asp Val
            580                 585                 590

Trp Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys Pro Pro
        595                 600                 605

Trp Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe Lys Ile
    610                 615                 620

Ala Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser Pro Gly
625                 630                 635                 640

Leu Arg Asp Val Ala Val Arg Cys Leu Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg
                645                 650                 655

Pro Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr Thr Trp
            660                 665                 670
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:3:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 671 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

```
Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val Thr Met Leu
1               5                   10                  15

Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg Leu Met
            20                  25                  30

Ala Ile Ala Asp Glu Val Glu Ile Ala Glu Val Ile Gln Leu Gly Val
        35                  40                  45
```

```
Glu Asp Thr Val Asp Gly His Gln Asp Ser Leu Ala Val Ala Pro Thr
    50                  55                  60

Ser Cys Leu Glu Asn Ser Ser Leu Glu His Thr Val His Arg Glu Lys
65                  70                  75                  80

Thr Gly Lys Gly Leu Ser Ala Thr Arg Leu Ser Ala Ser Ser Glu Asp.
                85                  90                  95

Ile Ser Asp Arg Leu Ala Gly Val Ser Val Gly Leu Pro Ser Ser Thr
            100                 105                 110

Thr Thr Glu Gln Pro Lys Pro Ala Val Gln Thr Lys Gly Arg Pro His
        115                 120                 125

Ser Gln Cys Leu Asn Ser Ser Pro Leu Ser His Ala Gln Leu Met Phe
    130                 135                 140

Pro Ala Pro Ser Ala Pro Cys Ser Ser Ala Pro Ser Val Pro Asp Ile
145                 150                 155                 160

Ser Lys His Arg Pro Gln Ala Phe Val Pro Cys Lys Ile Pro Ser Ala
                165                 170                 175

Ser Pro Gln Thr Gln Arg Lys Phe Ser Leu Gln Phe Gln Arg Asn Cys
            180                 185                 190

Ser Glu His Arg Asp Ser Asp Gln Leu Ser Pro Val Phe Thr Gln Ser
        195                 200                 205

Arg Pro Pro Pro Ser Ser Asn Ile His Arg Pro Lys Pro Ser Arg Pro
    210                 215                 220

Val Pro Gly Ser Thr Ser Lys Leu Gly Asp Ala Thr Lys Ser Ser Met
225                 230                 235                 240

Thr Leu Asp Leu Gly Ser Ala Ser Arg Cys Asp Asp Ser Phe Gly Gly
                245                 250                 255

Gly Gly Asn Ser Gly Asn Ala Val Ile Pro Ser Asp Glu Thr Val Phe
            260                 265                 270

Thr Pro Val Glu Asp Lys Cys Arg Leu Asp Val Asn Thr Glu Leu Asn
        275                 280                 285

Ser Ser Ile Glu Asp Leu Leu Glu Ala Ser Met Pro Ser Ser Asp Thr
    290                 295                 300

Thr Val Thr Phe Lys Ser Glu Val Ala Val Leu Ser Pro Glu Lys Ala
305                 310                 315                 320

Glu Asn Asp Asp Thr Tyr Lys Asp Asp Val Asn His Asn Gln Lys Cys
                325                 330                 335

Lys Glu Lys Met Glu Ala Glu Glu Glu Glu Ala Leu Ala Ile Ala Met
            340                 345                 350

Ala Met Ser Ala Ser Gln Asp Ala Leu Pro Ile Val Pro Gln Leu Gln
        355                 360                 365

Val Glu Asn Gly Glu Asp Ile Ile Ile Ile Gln Gln Asp Thr Pro Glu
    370                 375                 380
```

```
Thr Leu Pro Gly His Thr Lys Ala Lys Gln Pro Tyr Arg Glu Asp Ala
385                 390                 395                 400

Glu Trp Leu Lys Gly Gln Gln Ile Gly Leu Gly Ala Phe Ser Ser Cys
                405                 410                 415

Tyr Gln Ala Gln Asp Val Gly Thr Gly Thr Leu Met Ala Val Lys Gln
            420                 425                 430

Val Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu Val Val Glu
        435                 440                 445

Ala .Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn His Pro Asn
     450                 455                 560

Ile Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn Tyr Asn Leu
465                 470                 475                 480

Phe Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu Leu Ser Lys
                485                 490                 495

Tyr Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr Glu Gln Leu
            500                 505                 510

Leu Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile His Arg Asp
        515                 520                 525

Val Lys Gly Ala Asn Leu Leu Ile Asp Ser Thr Gly Gln Arg Leu Arg
    530                 535                 540

Ile Ala Asp Phe Gly Ala Ala Ala Arg Leu Ala Ser Lys Gly Thr Gly
545                 550                 555                 560

Ala Gly Glu Phe Gln Gly Gln Leu Leu Gly Thr Ile Ala Phe Met Ala
                565                 570                 575

Pro Glu Val Leu Arg Gly Gln Gln Tyr Gly Arg Ser Cys Asp Val Trp
            580                 585                 590

Ser Val Gly Cys Ala Ile Ile Glu Met Ala Cys Ala Lys Pro Pro Trp
        595                 600                 605

Asn Ala Glu Lys His Ser Asn His Leu Ala Leu Ile Phe Lys Ile Ala
    610                 615                 620

Ser Ala Thr Thr Ala Pro Ser Ile Pro Ser His Leu Ser Pro Gly Leu
625                 630                 635                 640

Arg Asp Val Ala Val Arg Cys Leu Glu Leu Gln Pro Gln Asp Arg Pro
                645                 650                 655

Pro Ser Arg Glu Leu Leu Lys His Pro Val Phe Arg Thr Thr Trp
            660                 665                 670
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:4:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 618 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

```
Met Asp Asp Gln Gln Ala Leu Asn Ser Ile Met Gln Asp Ile Ala Val
1               5                  10                  15

Leu His Lys Pro Val Gly Gln His Tyr Leu Tyr Lys Lys Pro Gly Lys
            20                  25                  30

Gln Asn Leu His His Gln Lys Asn Arg Met Met Phe Glu Ser Asn Leu
        35                  40                  45

Asn Ile Glu Glu Glu Lys Arg Ile Leu Gln Val Thr Arg Pro Val Lys
    50                  55                  60

Leu Glu Asp Leu Arg Ser Lys Ser Lys Ile Ala Phe Gly Gln Ser Met
65                  70                  75                  80

Asp Leu His Tyr Thr Asn Asn Glu Leu Val Ile Pro Leu Thr Thr Gln
                85                  90                  95

Asp Asp Leu Asp Lys Ala Val Glu Leu Leu Asp Arg Ser Ile His Met
            100                 105                 110

Lys Ser Leu Lys Ile Leu Leu Val Val Asn Gly Ser Thr Gln Ala Thr
        115                 120                 125

Asn Leu Glu Pro Ser Pro Ser Pro Glu Asp Leu Asn Asn Thr Pro Leu
    130                 135                 140

Gly Ala Glu Aig Lys Lys Arg Leu Ser Val Val Gly Pro Pro Asn Arg
145                 150                 155                 160

Asp Arg Ser Ser Pro Pro Pro Gly Tyr Ile Pro Asp Ile Leu His Gln
                165                 170                 175

Ile Ala Arg Asn Gly Ser Phe Thr Ser Ile Asn Ser Glu Gly Glu Phe
            180                 185                 190

Ile Pro Glu Ser Met Asp Gln Met Leu Asp Pro Leu Ser Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Pro Glu Asn Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Ser Leu Asp Ser Pro Leu
    210                 215                 220

Asp Gly Glu Ser Tyr Pro Lys Ser Arg Met Pro Arg Ala Gln Ser Tyr
225                 230                 235                 240

Pro Asp Asn His Gln Glu Phe Thr Asp Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Glu
                245                 250                 255

Lys Phe Gly Lys Gly Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr His Val Ser Tyr
            260                 265                 270

His His Gln Glu Tyr Asn Asp Gly Arg Lys Thr Phe Pro Arg Ala Arg
        275                 280                 285

Arg Thr Gln Gly Thr Ser Phe Arg Ser Pro Val Ser Phe Ser Pro Thr
    290                 295                 300

Asp His Ser Leu Ser Thr Ser Ser Gly Ser Ser Val Phe Thr Pro Glu
305                 310                 315                 320
```

```
Tyr Asp Asp Ser Arg Ile Arg Arg Arg Gly Ser Asp Ile Asp Asn Pro
                325                 330                 335

Thr Leu Thr Val Thr Asp Ile Ser Pro Pro Ser Arg Ser Pro Arg Ala
            340                 345                 350

Pro Thr Asn Trp Arg Leu Gly Lys Leu Leu Gly Gln Gly Ala Phe Gly
        355                 360                 365

Arg Val Tyr Leu Cys Tyr Asp Val Asp Thr Gly Arg Glu Leu Ala Val
    370                 375                 380

Lys Gln Val Gln Phe Asn Pro Glu Ser Pro Glu Thr Ser Lys Glu Val
385                 390                 395                 400

Asn Ala Leu Glu Cys Glu Ile Gln Leu Leu Lys Asn Leu Leu His Glu
                405                 410                 415

Arg Ile Val Gln Tyr Tyr Gly Cys Leu Arg Asp Pro Gln Glu Lys Thr
            420                 425                 430

Leu Ser Ile Phe Met Glu Leu Ser Pro Gly Gly Ser Ile Lys Asp Gln
        435                 440                 445

Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Leu Thr Glu Asn Val Thr Arg Lys Tyr Thr
    450                 455                 460

Arg Gln Ile Leu Glu Gly Val His Tyr Leu His Ser Asn Met Ile Val
465                 470                 475                 480

His Arg Asp Ile Lys Gly Ala Asn Ile Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asn
                485                 490                 495

Ile Lys Leu Gly Asp Phe Gly Ala Ser Lys Arg Leu Gln Thr Ile Cys
            500                 505                 510

Leu Ser Gly Thr Gly Met Lys Ser Val Thr Gly Pro Tyr Trp Met Ser
        515                 520                 525

Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Gly Tyr Gly Arg Lys Ala Asp Ile Trp
    530                 535                 540

Ser Val Ala Cys Thr Val Val Glu Met Leu Thr Glu Lys Pro Pro Trp
545                 550                 555                 560

Ala Glu Phe Glu Ala Met Ala Ala Ile Phe Lys Ile Ala Thr Gln Pro
                565                 570                 575

Thr Asn Pro Lys Leu Pro Pro His Val Ser Asp Tyr Thr Arg Asp Phe
            580                 585                 590

Leu Lys Arg Ile Phe Val Glu Ala Lys Leu Arg Pro Ser Ala Glu Glu
        595                 600                 605

Leu Leu Arg His Met Phe Val His Tyr His
    610                 615
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:5:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 626 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

```
Met Asp Glu Gln Glu Ala Leu Asp Ser Ile Met Lys Asp Leu Val Ala
1               5                  10                  15

Leu Gln Met Ser Arg Arg Thr Arg Leu Ser Gly Tyr Glu Thr Met Lys
            20                  25                  30

Asn Lys Asp Thr Gly His Pro Asn Arg Gln Ser Asp Val Arg Ile Lys
        35                  40                  45

Phe Glu His Asn Gly Glu Arg Arg Ile Ile Ala Phe Ser Arg Pro Val
    50                  55                  60

Arg Tyr Glu Asp Val Glu His Lys Val Thr Thr Val Phe Gly Gln Pro
65                  70                  75                  80

Leu Asp Leu His Tyr Met Asn Asn Glu Leu Ser Ile Leu Leu Lys Asn
                85                  90                  95

Gln Asp Asp Leu Asp Lys Ala Ile Asp Ile Leu Asp Arg Ser Ser Ser
            100                 105                 110

Met Lys Ser Leu Arg Ile Leu Leu Leu Ser Gln Asp Arg Asn His Thr
        115                 120                 125

Ser Ser Ser Pro His Ser Gly Val Ser Arg Gln Val Arg Ile Lys Pro
    130                 135                 140

Ser Gln Ser Ala Gly Asp Ile Asn Thr Ile Tyr Gln Ala Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Arg Ser Arg His Leu Ser Val Ser Ser Gln Asn Pro Gly Arg Ser Ser
                165                 170                 175

Pro Pro Pro Gly Tyr Val Pro Glu Arg Gln Gln His Ile Ala Arg Gln
            180                 185                 190

Gly Ser Tyr Thr Ser Ile Asn Ser Glu Gly Glu Phe Ile Pro Glu Thr
        195                 200                 205

Ser Glu Gln Cys Met Leu Asp Pro Leu Ser Ser Ala Glu Asn Ser Leu
    210                 215                 220

Ser Gly Ser Cys Gln Ser Leu Asp Arg Ser Ala Asp Ser Pro Ser Phe
225                 230                 235                 240

Arg Lys Ser Gln Met Ser Arg Ala Arg Ser Phe Pro Asp Asn Arg Glu
                245                 250                 255

Cys Ser Asp Lys Arg Glu Thr Gln Leu Tyr Asp Lys Gly Val Lys Gly
            260                 265                 270

Gly Thr Tyr Pro Arg Arg Tyr His Val Ser Val His His Lys Asp Tyr
        275                 280                 285

Asn Asp Gly Arg Arg Thr Phe Pro Arg Ile Arg Arg His Gln Gly Asn
    290                 295                 300
```

```
Leu Phe Thr Leu Val Pro Ser Ser Arg Ser Leu Ser Thr Asn Gly Glu
305                 310                 315                 320

Asn Met Gly Val Ala Val Gln Tyr Leu Asp Pro Arg Gly Arg Leu Arg
                325                 330                 335

Ser Ala Asp Ser Glu Asn Ala Leu Thr Val Gln Glu Arg Asn Val Pro
            340                 345                 350

Thr Lys Ser Pro Ser Ala Pro Ile Asn Trp Arg Arg Gly Lys Leu Leu
        355                 360                 365

Gly Gln Gly Ala Phe Gly Arg Val Tyr Leu Cys Tyr Asp Val Asp Thr
    370                 375                 380

Gly Arg Glu Leu Ala Ser Lys Gln Val Gln Phe Asp Pro Asp Ser Pro
385                 390                 395                 400

Glu Thr Ser Lys Glu Val Ser Ala Leu Glu Cys Glu Ile Gln Leu Leu
                405                 410                 415

Lys Asn Leu Gln His Glu Arg Ile Val Gln Tyr Tyr Gly Cys Leu Arg
            420                 425                 430

Asp Arg Ala Glu Lys Ile Leu Thr Ile Phe Met Glu Tyr Met Pro Gly
        435                 440                 445

Gly Ser Val Lys Asp Gln Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Leu Thr Glu Ser
    450                 455                 460

Val Thr Arg Lys Tyr Thr Arg Gln Ile Leu Glu Gly Met Ser Tyr Leu
465                 470                 475                 480

His Ser Asn Met Ile Val His Arg Asp Ile Lys Gly Ala Asn Ile Leu
                485                 490                 495

Arg Asp Ser Ala Gly Asn Val Lys Leu Gly Asp Phe Gly Ala Ser Lys
            500                 505                 510

Arg Leu Gln Thr Ile Cys Met Ser Gly Thr Gly Ile Arg Ser Val Thr
        515                 520                 525

Gly Thr Pro Tyr Trp Met Ser Pro Glu Val Ile Ser Gly Glu Gly Tyr
    530                 535                 540

Gly Arg Lys Ala Asp Val Trp Ser Leu Gly Cys Thr Val Val Glu Met
545                 550                 555                 560

Leu Thr Glu Lys Pro Pro Trp Ala Glu Tyr Glu Ala Met Ala Ala Ile
                565                 570                 575

Phe Lys Ile Ala Thr Gln Pro Thr Asn Pro Gln Leu Pro Ser His Ile
            580                 585                 590

Ser Glu His Gly Arg Asp Phe Leu Arg Arg Ile Phe Val Glu Ala Arg
        595                 600                 605

Gln Arg Pro Ser Ala Glu Glu Leu Leu Thr His His Phe Ala Gln Leu
    610                 615                 620

Val Tyr
625
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:6:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 89 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

```
Ile Arg Phe Gln Pro Asn Asp His Lys Thr Ile Lys Glu Thr Ala Asp
1               5                  10                  15

Glu Glu Leu Lys Ile Phe Glu Gly Ile Lys His Pro Asn Leu Val Arg
            20                  25                  30

Tyr Phe Gly Val Glu Leu His Arg Glu Glu Met Tyr Ile Ile Phe Met
        35                  40                  45

Glu Tyr Cys Asp Glu Gly Thr Leu Glu Glu Val Ser Arg Leu Gly Leu
    50                  55                  60

Gln Glu His Val Ile Arg Leu Tyr Thr Lys Gln Ile Thr Val Ala Ile
65                  70                  75                  80

Asn Val Leu His Glu His Gly Asn Val
                85
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:7:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 92 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

```
Thr Tyr Val Arg Asn Thr Ser Ser Glu Gln Glu Glu Val Val Glu Ala
1               5                  10                  15

Leu Arg Glu Glu Ile Arg Met Met Gly His Leu Asn His Pro Asn Ile
            20                  25                  30

Ile Arg Met Leu Gly Ala Thr Cys Glu Lys Ser Asn Tyr Asn Leu Phe
        35                  40                  45

Ile Glu Trp Met Ala Gly Gly Ser Val Ala His Leu Leu Ser Lys Tyr
    50                  55                  60

Gly Ala Phe Lys Glu Ser Val Val Ile Asn Tyr Thr Glu Gln Leu Leu
65                  70                  75                  80

Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asn Gln Ile Ile
```

85 90

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:8:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 95 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

Gln Val Gln Phe Asn Pro Glu Ser Pro Glu Thr Ser Lys Glu Val Asn
1 5 10 15

Ala Leu Glu Cys Glu Ile Gln Leu Leu Lys Asn Leu Leu His Glu Arg
20 25 30

Ile Val Gln Tyr Tyr Gly Cys Leu Arg Asp Pro Gln Glu Lys Thr Leu
35 40 45

Ser Ile Phe Met Glu Leu Ser Pro Gly Gly Ser Ile Lys Asp Gln Leu
50 55 60

Lys Ala Tyr Gly Ala Leu Thr Glu Asn Val Thr Arg Lys Tyr Thr Arg
65 70 75 80

Gln Ile Leu Glu Gly Val His Tyr Leu His Ser Asn Met Ile Val
86 90 95

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:9:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 95 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

Gln Val Gln Phe Asp Pro Asp Ser Pro Glu Thr Ser Lys Glu Val Ser
1 5 10 15

Ala Leu Glu Cys Glu Ile Gln Leu Ley Lys Asn Leu Gln His Glu Arg
20 25 30

Ile Val Gln Tyr Tyr Gly Cys Leu Arg Asp Arg Ala Glu Lys Ile Leu
35 40 45

Thr Ile Phe Met Glu Tyr Met Pro Gly Gly Ser Val Lys Asp Gln Leu
50 55 60

Lys Ala Tyr Gly Ala Leu Thr Glu Ser Val Thr Arg Lys Tyr Thr Arg
65 70 75 80

```
Gln Ile Leu Glu Gly Met Ser Tyr Leu His Ser Asn Met Ile Val
                85                  90                  95
```

Patentansprüche

1. Im Wesentlichen reines Protein, das aus der Gruppe ausgewählt wird, bestehend aus (a) umfassend die Aminosäuresequenz

MDDQQALNSIMQDIAVLHKPVGQHYLYKKPGKQNLHHQKNRMMFESNLN
IEEEKRILQVTRPVKLEDLRSKSKIAFGQSMDLHYTNNELVIPLTTQDD
LDKAVELLDRSIHMKSLKILLVVNGSTQATNLEPSPSPEDLNNTPLGAE
RKKRLSVVGPPNRDRSSPPPGYIPDILHQIARNGSFTSINSEGEFIPES
MDQMLDPLSLSSPENSGSGSCPSLDSPLDGESYPKSRMPRAQSYPDNHQ
EFTDYDNPIFEKFGKGGTYPRRYHVSYHHQEYNDGRKTFPRARRTQGTS
FRSPVSFSPTDHSLSTSSGSSVFTPEYDDSRIRRRGSDIDNPTLTVTDI
SPPSRSPRAPTNWRLGKLLGQGAFGRVYLCYDVDTGRELAVKQVQFNPE
SPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQEKTLSIFMELSP
GGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIVHRDIKGANIL
RDSTGNIKLGDFGASKRLQTICLSGTGMKSVTGPYWMSPEVISGEGYGR
KADIWSVACTVVEMLTEKPPWAEFEAMAAIFKIATQPTNPKLPPHVSDY
TRDFLKRIFVEAKLRPSAEELLRHMFVHYH

oder eine kinase-katalytische Domäne oder regulatorische Domäne davon; oder
(b) umfassend die Aminosäuresequenz

MDEQEALDSIMKDLVALQMSRRTRLSGYETMKNKDTGHPNRQSDVRIKF
EHNGERRIIAFSRPVRYEDVEHKVTTVFGQPLDLHYMNNELSILLKNQD
DLDKAIDILDRSSSMKSLRILLLSQDRNHTSSSPHSGVSRQVRIKPSQS
AGDINTIYQAPEPRSRHLSVSSQNPGRSSPPPGYVPERQQHIARQGSYT
SINSEGEFIPETSEQCMLDPLSSAENSLSGSCQSLDRSADSPSFRKSQM
SRARSFPDNRECSDKRETQLYDKGVKGGTYPRRYHVSVHHKDYNDGRRT
FPRIRRHQGNLFTLVPSSRSLSTNGENMGVAVQYLDPRGRLRSADSENA
LTVQERNVPTKSPSAPINWRRGKLLGQGAFGRVYLCYDVDTGRELASKQ
VQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
FMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIVHRDI
KGANILRDSAGNVKLGDFGASKRLQTICMSGTGIRSVTGTPYWMSPEVI
SGEGYGRKADVWSLGCTVVEMLTEKPPWAEYEAMAAIFKIATQPTNPQL
PSHISEHGRDFLRRIFVEARQRPSAEELLTHHFAQLVY

oder eine kinase-katalytische Domäne oder regulatorische Domäne davon.

2. Im Wesentlichen reines Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die wenigstens zu 80% identisch ist mit der Aminosäuresequenz

MDDQQALNSIMQDIAVLHKPVGQHYLYKKPGKQNLHHQKNRMMFESNLN
IEEEKRILQVTRPVKLEDLRSKSKIAFGQSMDLHYTNNELVIPLTTQDD
LDKAVELLDRSIHMKSLKILLVVNGSTQATNLEPSPSPEDLNNTPLGAE
RKKRLSVVGPPNRDRSSPPPGYIPDILHQIARNGSFTSINSEGEFIPES
MDQMLDPLSLSSPENSGSGSCPSLDSPLDGESYPKSRMPRAQSYPDNHQ
EFTDYDNPIFEKFGKGGTYPRRYHVSYHHQEYNDGRKTFPRARRTQGTS
FRSPVSFSPTDHSLSTSSGSSVFTPEYDDSRIRRRGSDIDNPTLTVTDI
SPPSRSPRAPTNWRLGKLLGQGAFGRVYLCYDVDTGRELAVKQVQFNPE
SPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQEKTLSIFMELSP
GGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIVHRDIKGANIL
RDSTGNIKLGDFGASKRLQTICLSGTGMKSVTGPYWMSPEVISGEGYGR
KADIWSVACTVVEMLTEKPPWAEFEAMAAIFKIATQPTNPKLPPHVSDY
TRDFLKRIFVEAKLRPSAEELLRHMFVHYH

oder der Aminosäuresequenz

MDEQEALDSIMKDLVALQMSRRTRLSGYETMKNKDTGHPNRQSDVRIKF
EHNGERRIIAFSRPVRYEDVEHKVTTVFGQPLDLHYMNNELSILLKNQD
DLDKAIDILDRSSSMKSLRILLLSQDRNHTSSSPHSGVSRQVRIKPSQS
AGDINTIYQAPEPRSRHLSVSSQNPGRSSPPPGYVPERQQHIARQGSYT
SINSEGEFIPETSEQCMLDPLSSAENSLSGSCQSLDRSADSPSFRKSQM
SRARSFPDNRECSDKRETQLYDKGVKGGTYPRRYHVSVHHKDYNDGRRT
FPRIRRHQGNLFTLVPSSRSLSTNGENMGVAVQYLDPRGRLRSADSENA
LTVQERNVPTKSPSAPINWRRGKLLGQGAFGRVYLCYDVDTGRELASKQ
VQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
FMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIVHRDI
KGANILRDSAGNVKLGDFGASKRLQTICMSGTGIRSVTGTPYWMSPEVI
SGEGYGRKADVWSLGCTVVEMLTEKPPWAEYEAMAAIFKIATQPTNPQL
PSHISEHGRDFLRRIFVEARQRPSAEELLTHHFAQLVY

3. Im Wesentlichen reines Protein nach Anspruch 2, wobei das Protein wenigstens 85% Identität zu dieser Aminosäuresequenz aufweist.

4. Im Wesentlichen reines Protein nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, wobei das Protein wenigstens 90% Identität zu dieser Aminosäuresequenz aufweist.

5. Im Wesentlichen reines Protein, das eine Kinase-Domäne-Aminosäuresequenz umfasst, die zu wenigstens 80% identisch ist mit der Kinase-Domäne-Aminosäuresequenz
QYQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
oder der Kinase-Domäne-Aminosäuresequenz
IFMEYCDEGTLEEVSRLGLQEHV.LRLYTKQITVAINVLHEHGNV

6. Im Wesentlichen reines Protein nach Anspruch 5, wobei das Protein wenigstens 85% Identität zu dieser Kinase-Domäne-Aminosäuresequenz aufweist.

7. Im Wesentlichen reines Protein nach Anspruch 5 oder Anspruch 6, wobei das Protein wenigstens 90% Identität zu dieser Kinase-Domäne-Aminosäuresequenz aufweist.

8. Isolierter Antikörper, der spezifisch an ein Protein bindet, das in einem der Ansprüche 1 bis 7 beansprucht wird.

9. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, Signale, die von einem Rezeptor an der Oberfläche einer Zelle ausgehen, zu regulieren, wobei man:
(a) eine Zelle, die ein in den Ansprüchen 1 bis 4 definiertes MEKK-Protein enthält, mit einer putativen regulatorischen Verbindung in Kontakt bringt;
(b) diese Zelle mit einem Liganden in Kontakt bringt, der in der Lage ist, an diesen Rezeptor zu binden; und
(c) die Fähigkeit dieser putativen regulatorischen Verbindung, diese Signale zu regulieren, durch Bestimmung der Aktivität dieses MEKK-Proteins feststellt.

10. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die in der Lage sind, Signal-Transduktion in einer Zelle zu regulieren, wobei man:
(a) eine putative inhibitorische Verbindung mit einem in den Ansprüchen 1 bis 4 definierten MEKK-Protein unter Bildung einer Reaktionsmischung in Kontakt bringt;
(b) die Reaktionsmischung mit MEK-Protein in Kontakt bringt; und
(c) die Fähigkeit dieser putativen inhibitorischen Verbindung, die Phosphorylierung dieses MEK-Proteins durch dieses MEKK-Protein zu inhibieren, feststellt.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

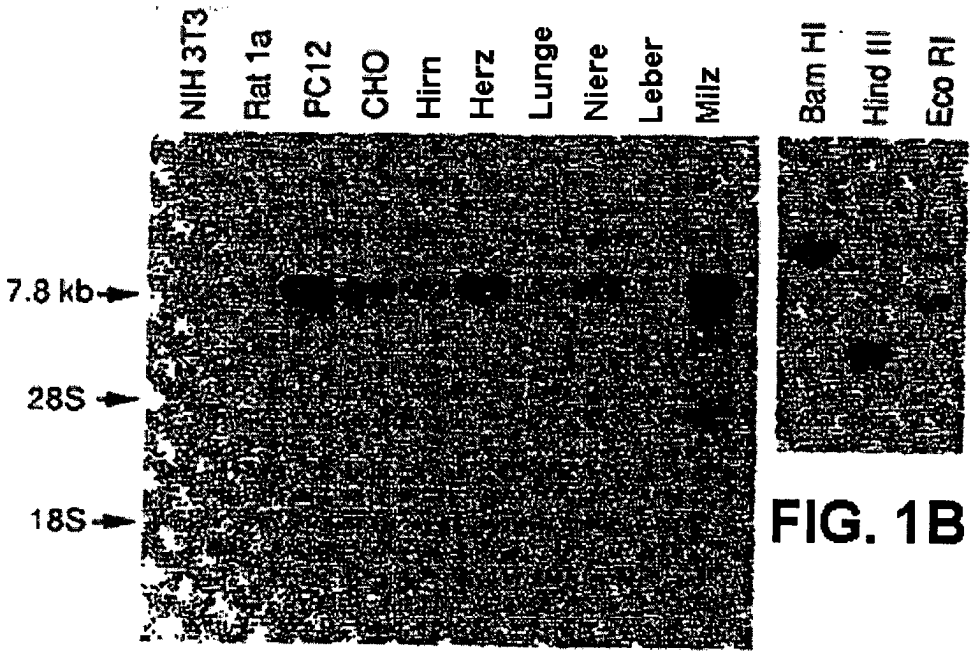


FIG. 1B

FIG. 1A

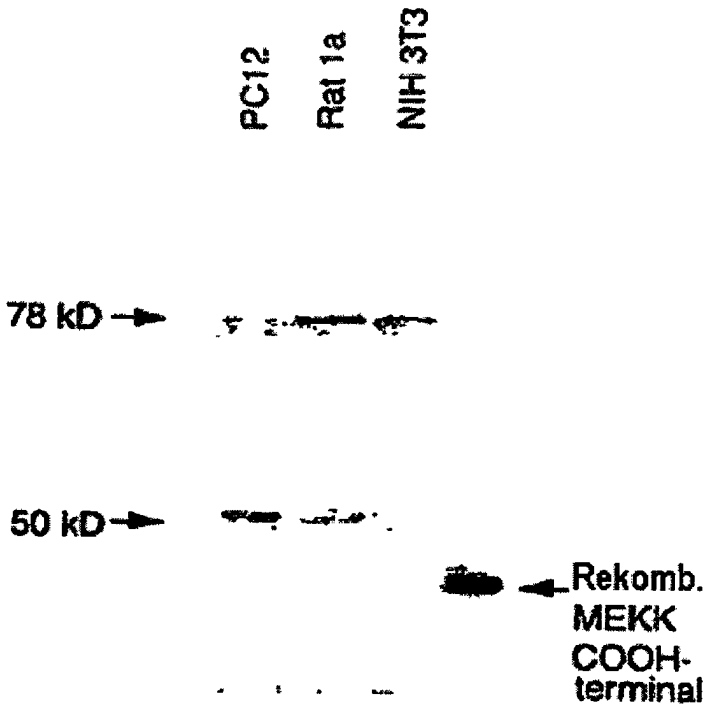


FIG. 1C

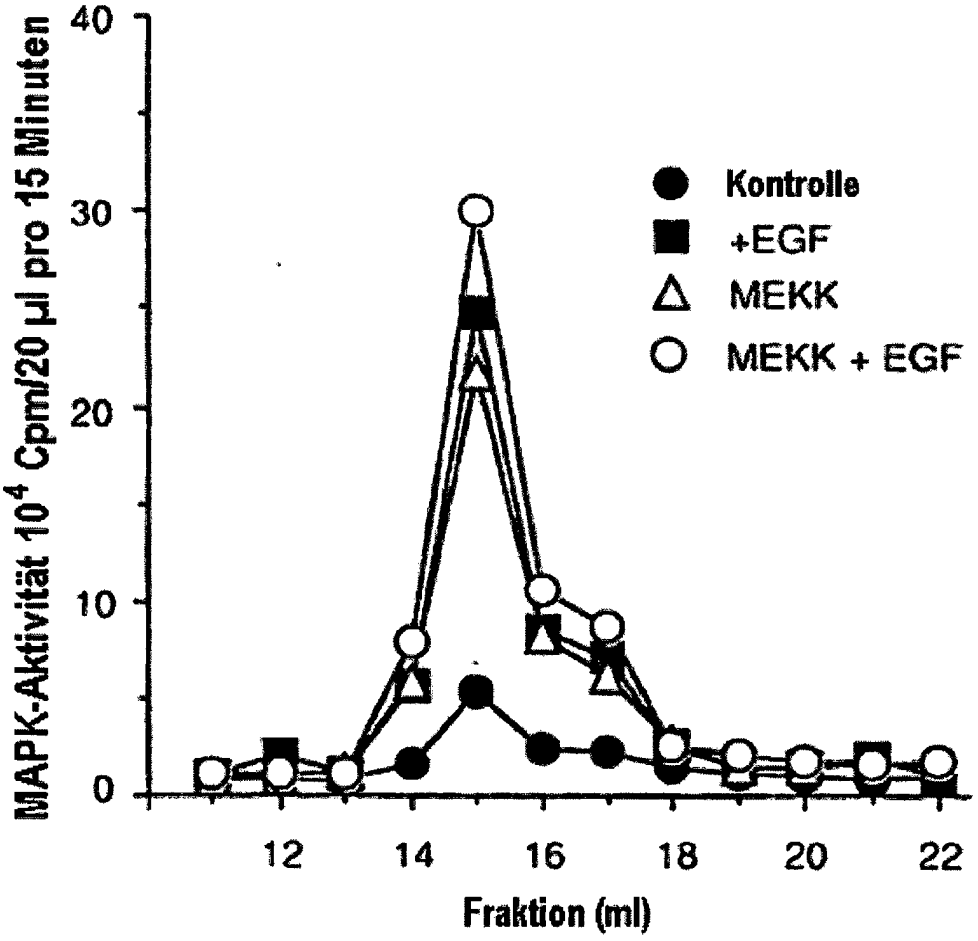

MAPK-Aktivität 10^4 Cpm/20 µl pro 15 Minuten
40
30
20
10
0
12
14
16
18
20
22
Fraktion (ml)
Kontrolle
+EGF
MEKK
MEKK + EGF

FIG. 2A

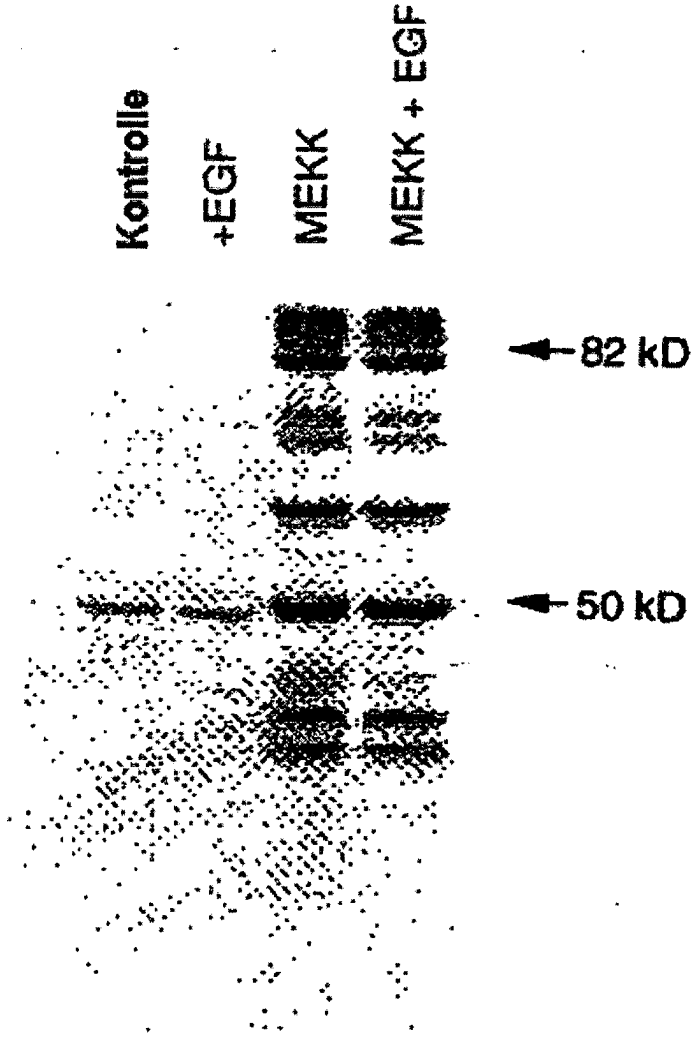


FIG. 2B

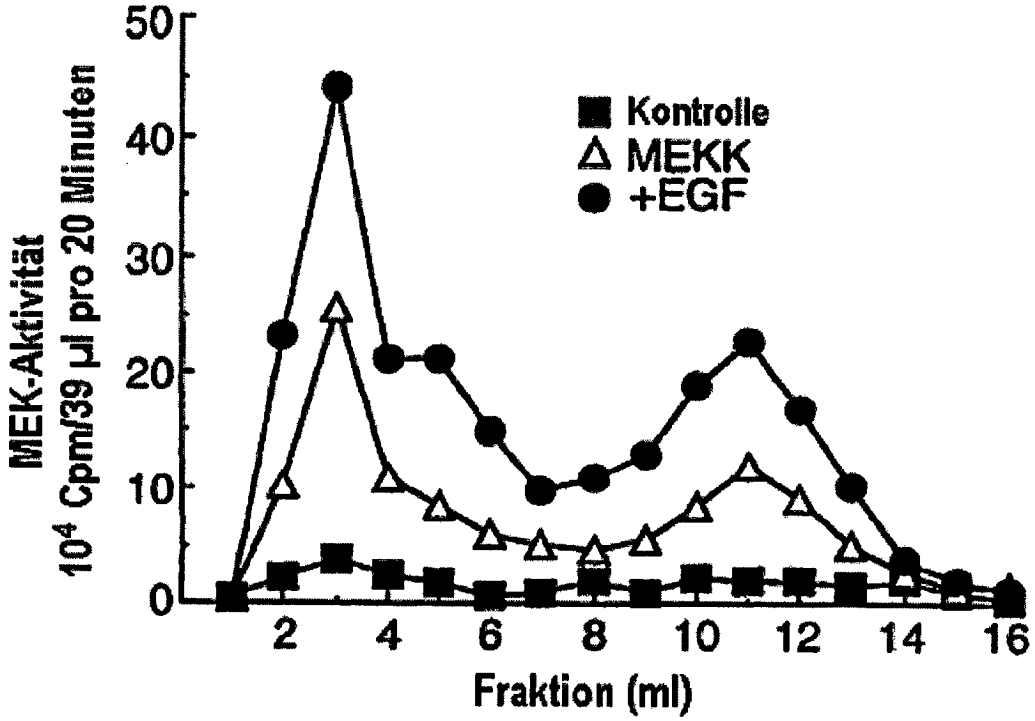

MEK-Aktivität
10^4 Cpm/39 µl pro 20 Minuten
50
40
30
20
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Fraktion (ml)
Kontrolle
MEKK
+EGF

FIG. 3

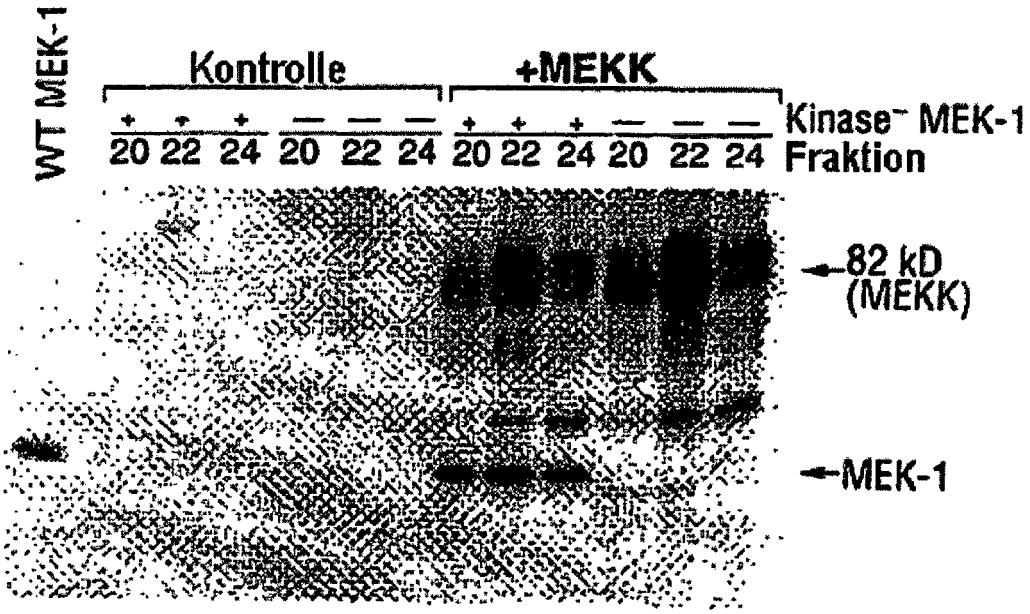


FIG. 4A

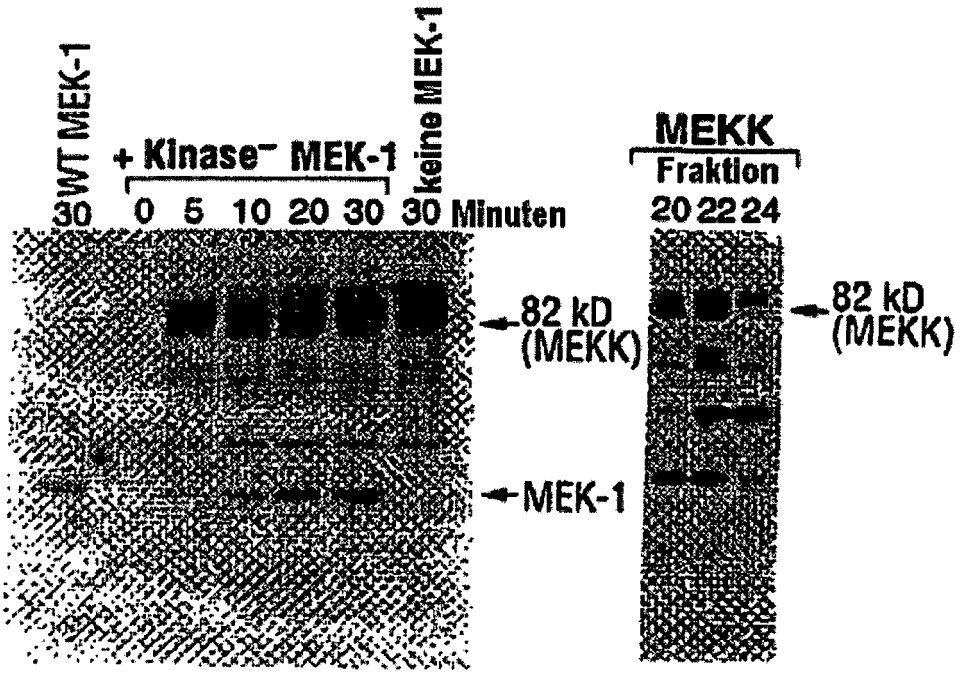


FIG. 4B

FIG. 4C

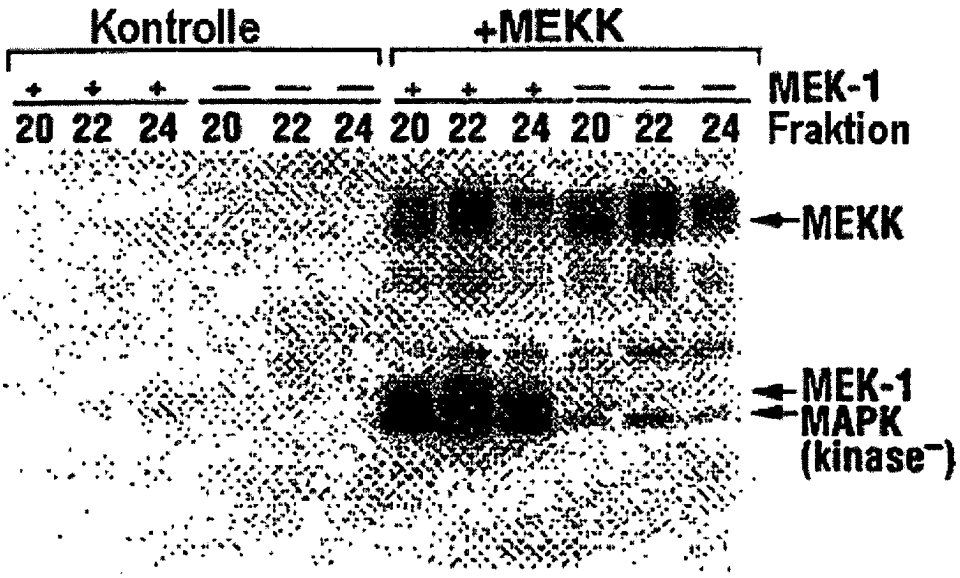

Kontrolle
+MEKK
+ + + — — — + + + — — —
20 22 24 20 22 24 20 22 24 20 22 24
MEK-1
Fraktion
MEKK
MEK-1
MAPK
(kinase⁻)

FIG. 5A

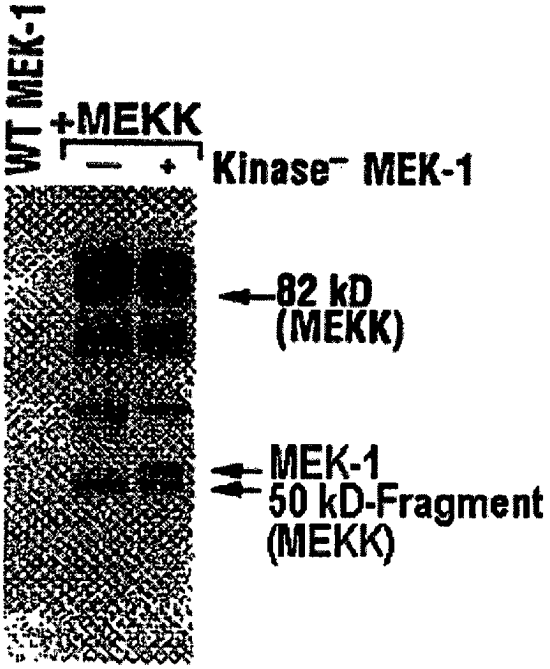

WT MEK-1
+MEKK
— +
Kinase⁻ MEK-1
82 kD
(MEKK)
MEK-1
50 kD-Fragment
(MEKK)

FIG. 5B

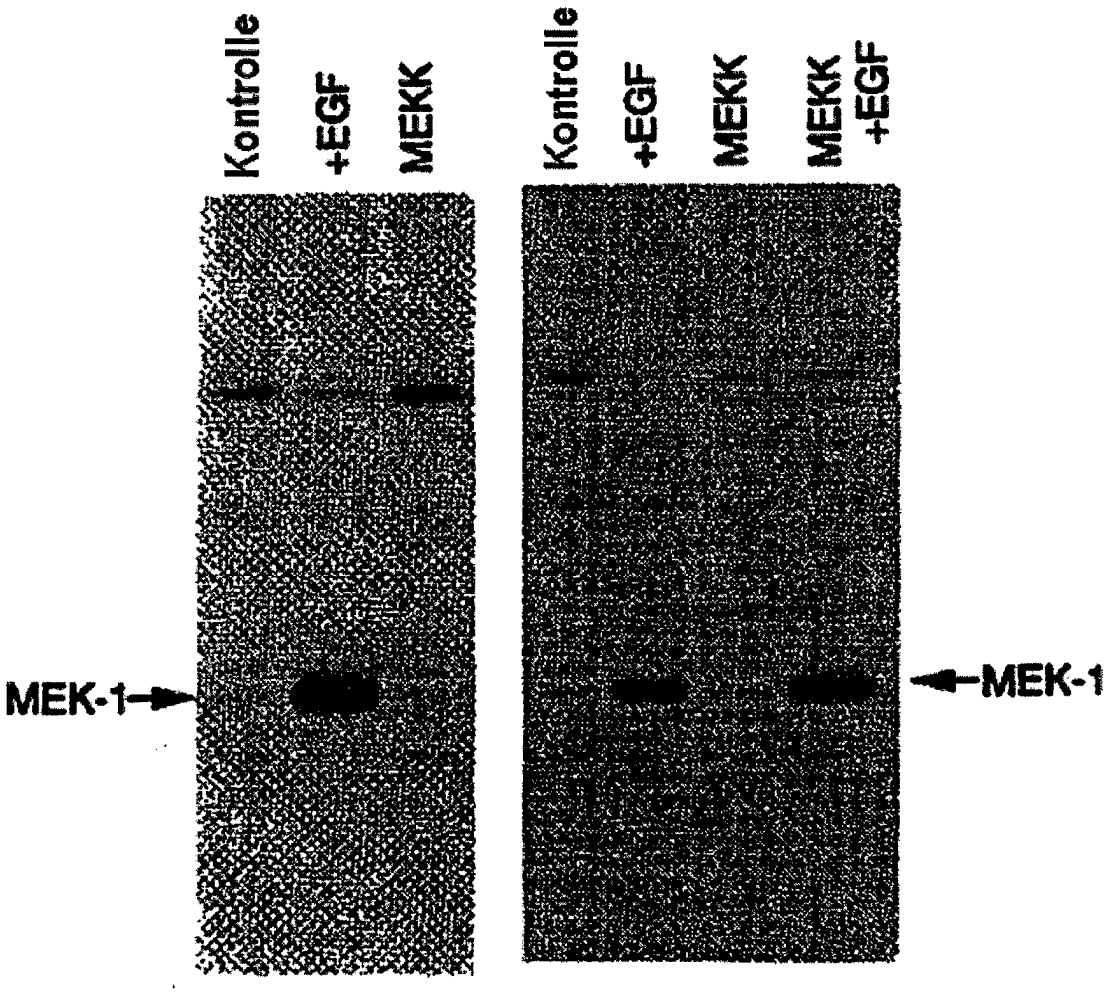


FIG. 6A FIG. 6B



FIG. 7

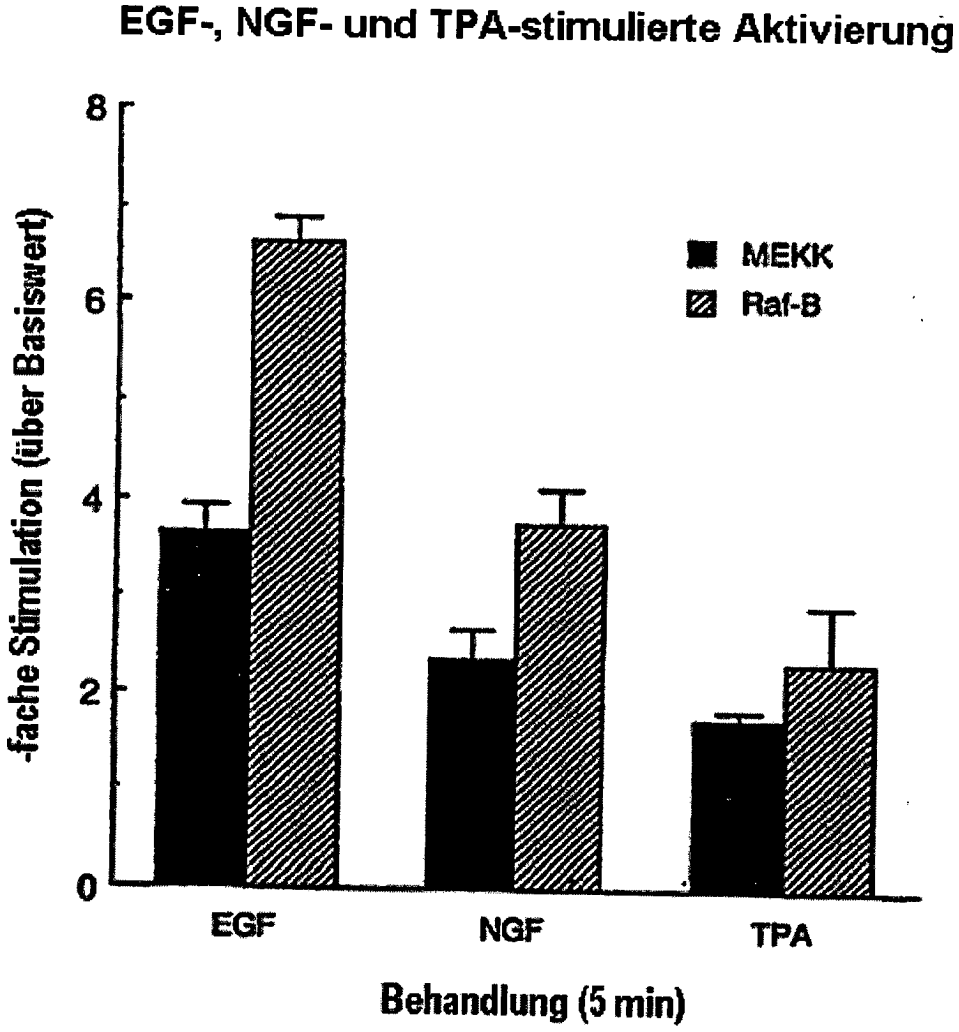

EGF-, NGF- und TPA-stimulierte Aktivierung
-fache Stimulation (über Basiswert)
8
6
4
2
0
MEKK
Raf-B
EGF
NGF
TPA
Behandlung (5 min)

FIG. 8

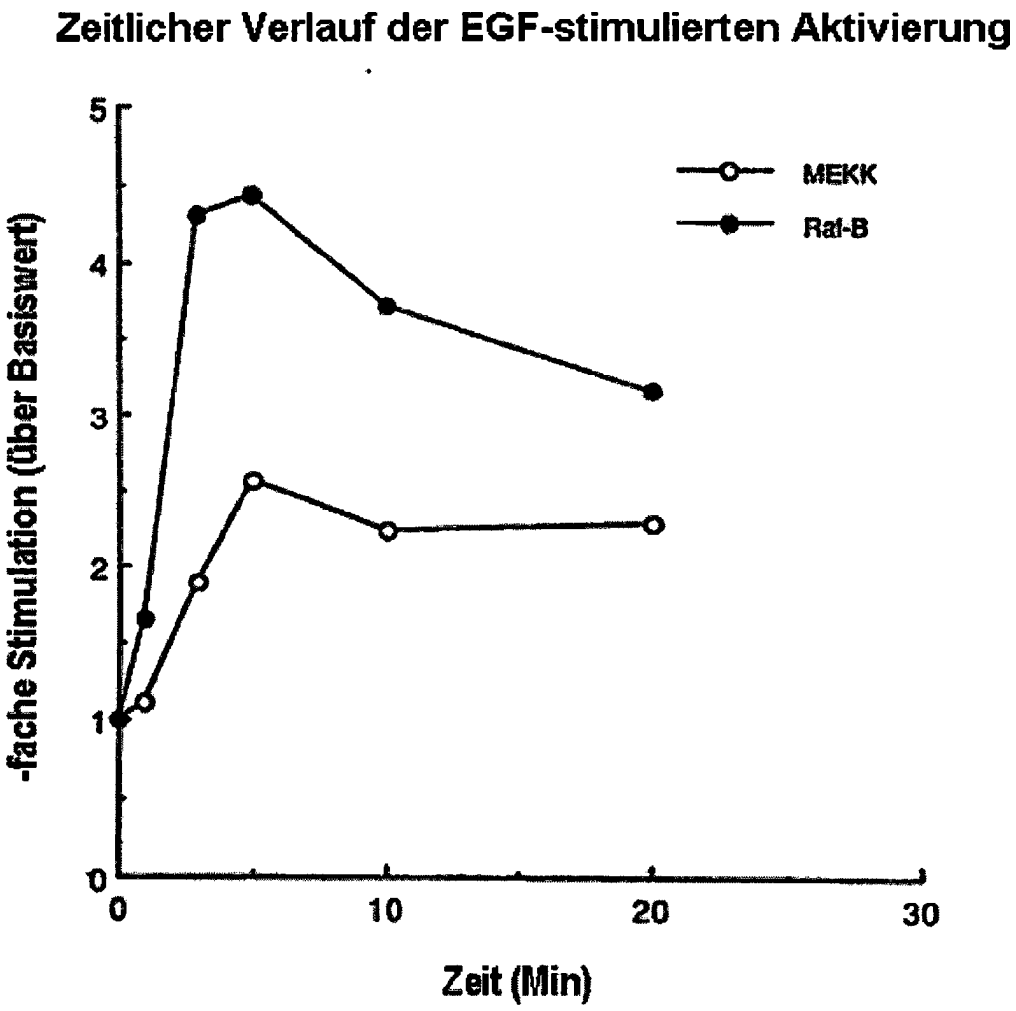

Zeitlicher Verlauf der EGF-stimulierten Aktivierung
MEKK
Raf-B
-fache Stimulation (über Basiswert)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
Zeit (Min)

FIG. 9

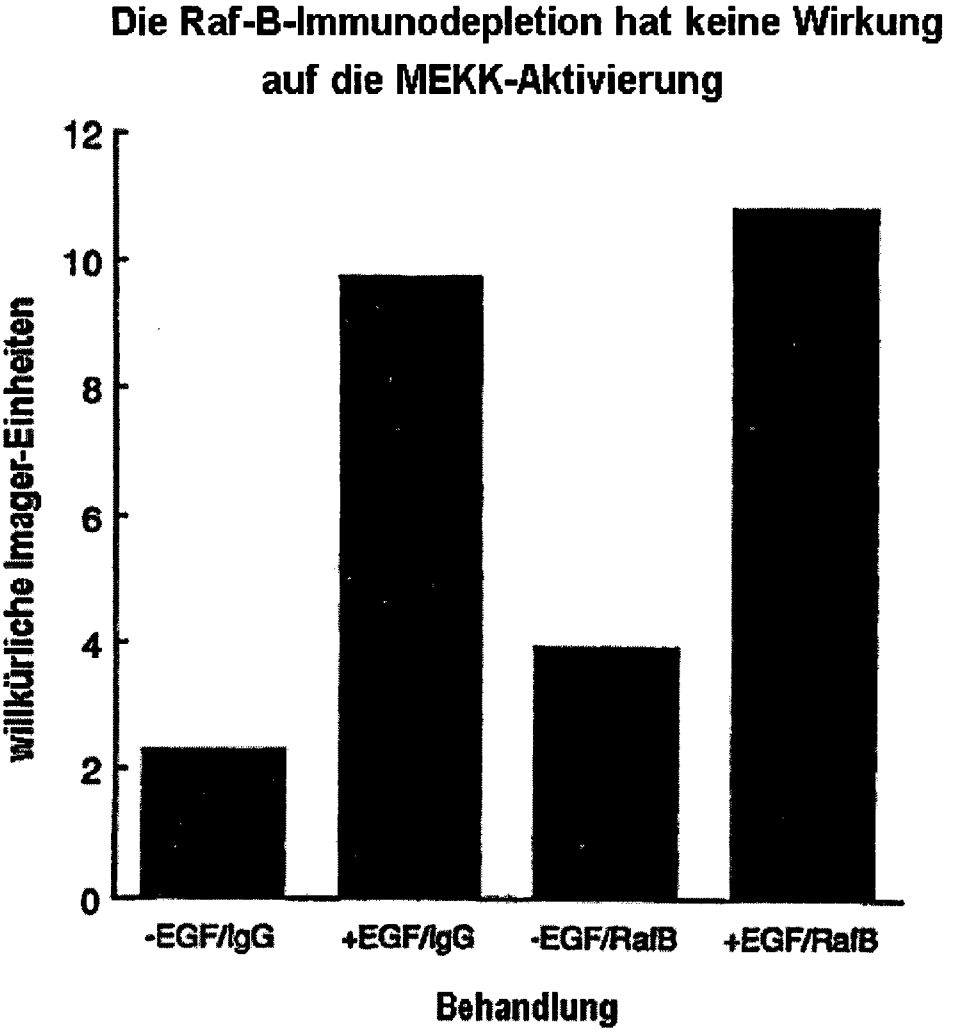

Die Raf-B-Immunodepletion hat keine Wirkung auf die MEKK-Aktivierung
willkürliche Imager-Einheiten
12
10
8
6
4
2
0
-EGF/IgG
+EGF/IgG
-EGF/RafB
+EGF/RafB
Behandlung

FIG. 10

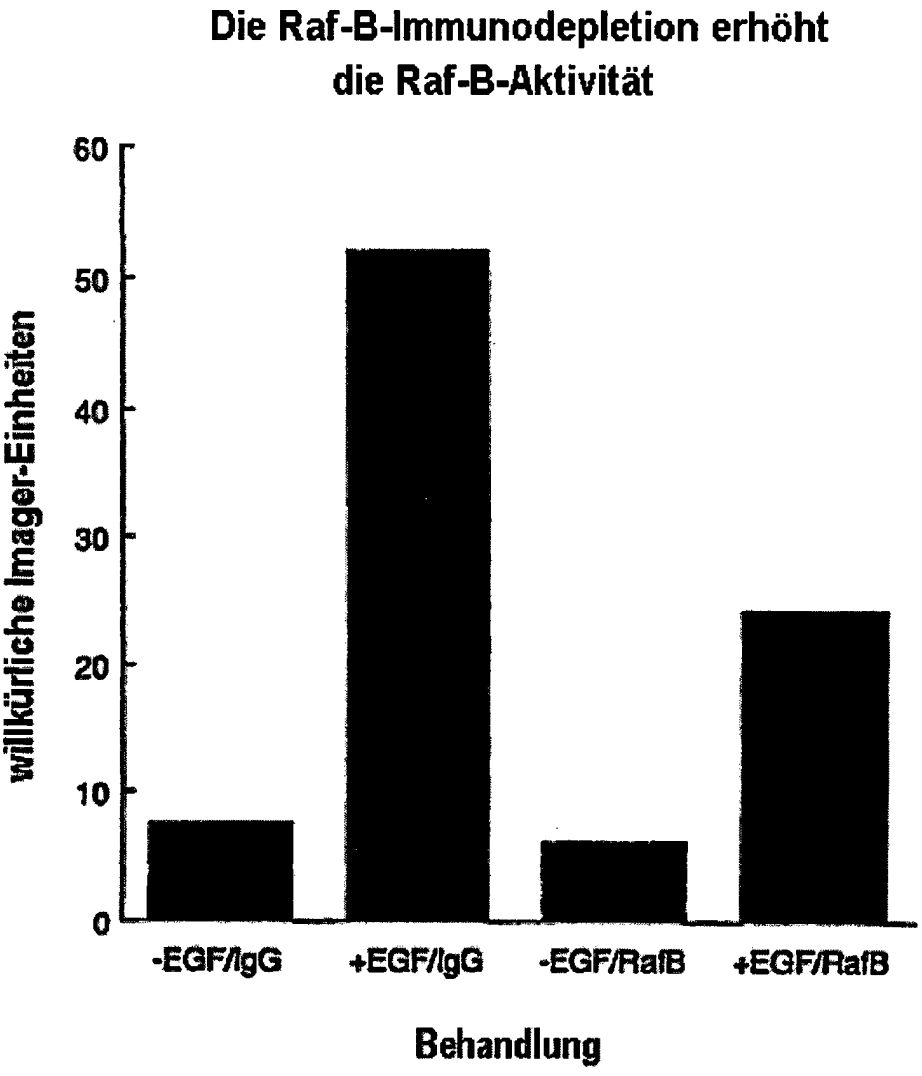

Die Raf-B-Immunodepletion erhöht
die Raf-B-Aktivität
willkürliche Imager-Einheiten
60
50
40
30
20
10
0
-EGF/IgG
+EGF/IgG
-EGF/RafB
+EGF/RafB
Behandlung

FIG. 11

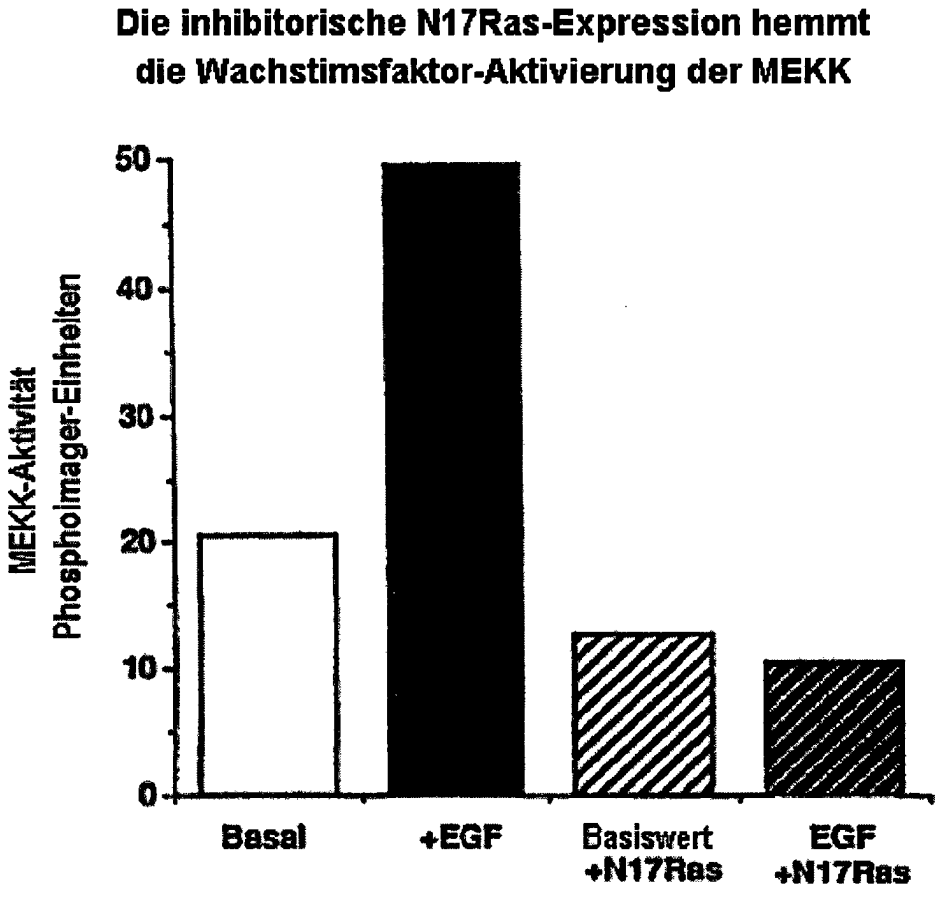

Die inhibitorische N17Ras-Expression hemmt
die Wachstimsfaktor-Aktivierung der MEKK
MEKK-Aktivität
Phospholmager-Einhelten
50
40
30
20
10
0
Basal
+EGF
Basiswert
+N17Ras
EGF
+N17Ras

FIG. 12

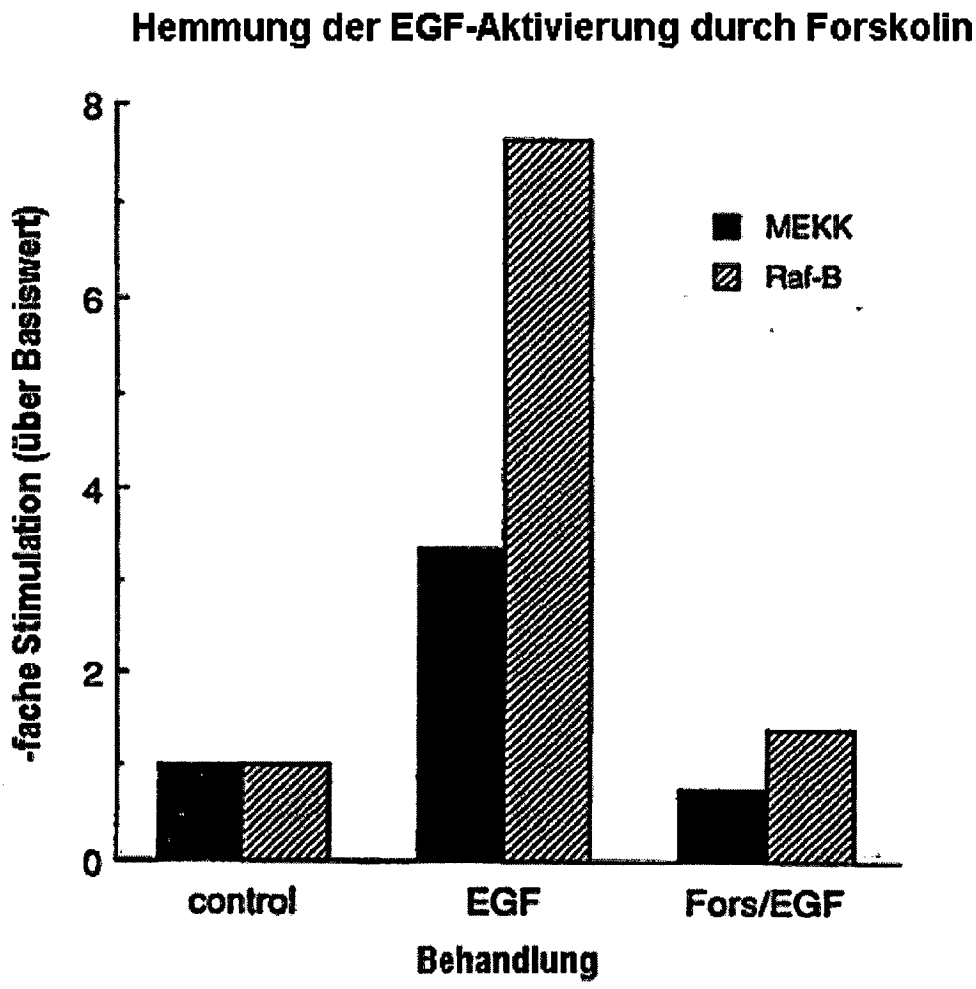

Hemmung der EGF-Aktivierung durch Forskolin
-fache Stimulation (über Basiswert)
8
6
4
2
0
MEKK
Raf-B
control
EGF
Fors/EGF
Behandlung

FIG. 13

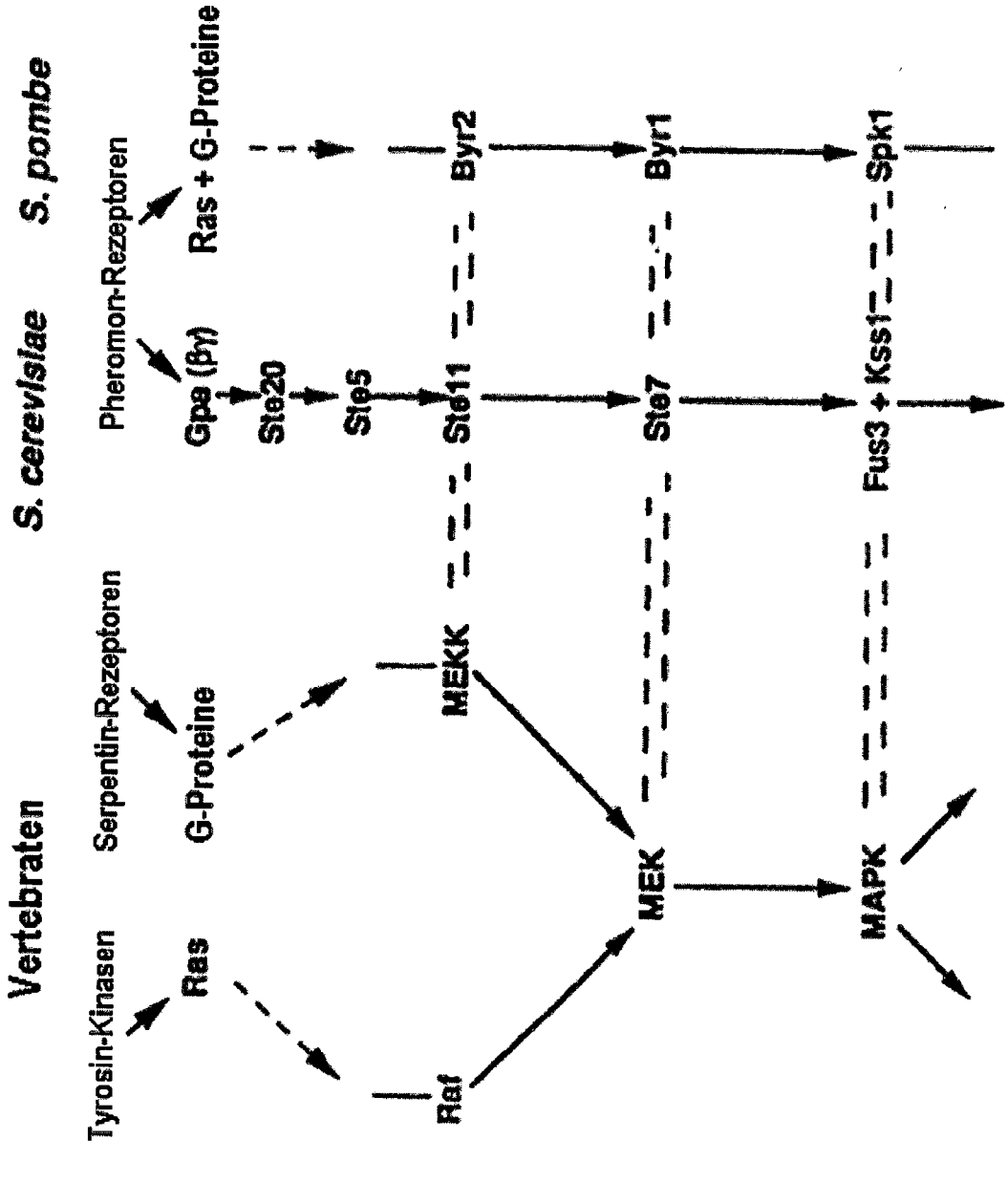

Vertebraten
S. cerevisiae
S. pombe
Tyrosin-Kinasen
Ras
Serpentin-Rezeptoren
G-Proteine
Pheromon-Rezeptoren
Gpa (βγ)
Ras + G-Proteine
Ste20
Ste5
Ste11
Byr2
Byr1
Spk1
MEKK
Ste7
Fus3 + Kss1
Ste 12
Raf
MEK
MAPK
c-Myc, c-Jun, cPLA2, Rsk 90, EGFR

FIG. 14

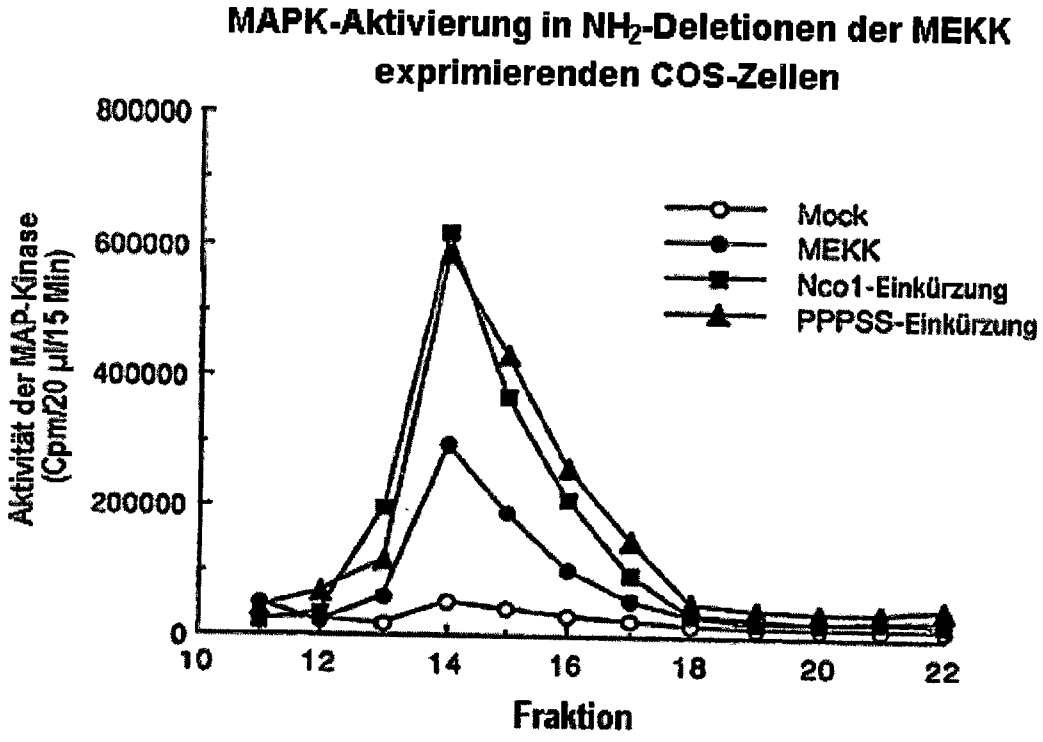

MAPK-Aktivierung in NH2-Deletionen der MEKK exprimierenden COS-Zellen
Aktivität der MAP-Kinase (Cpm/20 µl/15 Min)
800000
600000
400000
200000
0
10
12
14
16
18
20
22
Fraktion
Mock
MEKK
Nco1-Einkürzung
PPPSS-Einkürzung

FIG. 15