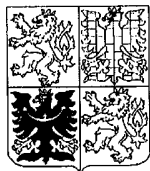


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 06.09.1996

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 06.09.1995

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1995/9518220

(33) Země priority: GB

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.01.2000
(Věstník č. 1/2000)

(86) PCT číslo: PCT/GB96/02197

(87) PCT číslo zveřejnění: WO97/09433

(21) Číslo dokumentu:

1998 - 656

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/54

C 12 N 9/12

C 12 N 15/11

C 12 Q 1/48

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/50

C 07 K 16/40

A 61 K 48/00

(71) Přihlašovatel:

ICOS CORPORATION, Bothell, WA, US;

(72) Původce:

Carr Anthony Michael, Falmer, GB;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Geny kontrolující buněčný cyklus

(57) Anotace:

Skupina kontrolních genů, které řídí průběh buněčného cyklu u eukaryotických buněk. Byl nalezen lidský analog rad3 pojmenován ATR /ataxia and rad related/ a tento gen byl sekvenován. Polynukleotidy schopné selektivní hybridizace s ATR nebo jeho komplementem a využití těchto polynukleotidů, polypeptidů kódovaných těmito polynukleotidy a případně protilátek proti těmto polypeptidům.

29.03.98

PU 656-98

~~20788~~

Geny kontrolující buněčný cyklus

Oblast techniky

Předkládaný vynález se vztahuje ke skupině kontrolních genů, které řídí průběh buněčného cyklu u eukaryotických buněk.

Dosavadní stav techniky

Řízení buněčného cyklu je základem pro růst a zachování eukaryotických organismů, od kvasinek po savce. Eukaryotické buňky si vyvinuly řídící dráhy nazývané „kontrolní body“ (checkpoints), které zajišťují, že jednotlivé individuální fáze buněčného cyklu jsou dokončené před tím, než je zahájena další fáze. Při poškození DNA je tak zvýšena šance na přežití buňky jednak přímo mechanismy opravujícími DNA a také pozastavením postupu v buněčném cyklu. V závislosti na pozici buňky v buněčném cyklu v době ozáření, poškození DNA v savčích buňkách může zabránit (a) přechodu z G1 do S fáze, (b) průběhu S fáze nebo (c) přechodu z G2 fáze do mitózy. Předpokládá se, že takováto kontrolní místa (checkpoints) zabrání zhoubným událostem, jako je replikace poškozené DNA a segregaci fragmentovaných chromozómů během mitózy.

Gen *rad3* z *Schizosaccharomyces pombe* je nezbytný pro kontrolní body, které odpovídají na poškození DNA a replikační bloky. Rad3 je členem lipid kinázové podtřídy kináz, která obsahuje oblasti vykazující sekvenční homologii s lipid kinázovou doménou subjednotky p110 fosfatidylinositol-3 kinázy (PI-3 kináza). Tato podtřída také zahrnuje protein ATM, který je defektní u pacientů s ataxií (ataxia-telangiectasia). Buňky z těchto pacientů (AT buňky) nevykazují zpoždění S fáze po ozáření a vykazují tak zvanou radio-resistentní DNA syntézu (Painter a Young, 1989). AT buňky ozářené v S-fázi akumulují v G2 letální poškození, pravděpodobně jako následek pokusu replikovat poškozenou DNA. AT buňky ozářené během G2 fáze vykazují odlišný fenotyp: nezastavují mitózu po poškození DNA a pokračují

v mitóze s poškozenou DNA (Beamish a Levin, 1994). Mutace v A-T lokusu, kde byl ATM gen lokalizován, má tedy za následek poškození několika kontrolních bodů nezbytných pro přiměřenou odpověď na ionizující ozáření. Mezi další členy této podtřídy lipidových kináz patří: Tellp (Greenwell et al. 1985), gen účastnící se při udržování správné délky telomer u *Sacharomyces cerevisiae*; Esrlp; Mec1p a produkt genu pro kontrolní bod mei-41 u *Drosophila melanogaster* (Hari et al. 1995).

Podstata vynálezu

Analýzovali jsme *rad3* gen *S. pombe* a zjistili jsme, že aminokyselinová sekvence je tvořena celkem 2386 aminokyselinami a ne 1070 aminokyselinami, jak uvedl Seaton et al. 1992. Určili jsme, že se jedná o přímý homolog *S. cerevisiae* Esrlp a že vykazuje shodnou celkovou strukturu jako ATM gen. Oblast C-konce *rad3* proteinu obsahuje lipidovou kinázovou doménu, která je pro činnost Rad3 nezbytná. Ukázali jsme, že Rad3 je sám o sobě schopný vzájemného spojování (self association). Také jsme určili protein kinázovou aktivitu spojenou s Rad3.

Dále jsme našli lidský analog *rad3*. Tento gen, který jsme pojmenovali ATR (ataxia and rad related), vykazuje značně vyšší homologii s *rad3* než s ATM genem.

Sekvence lidské ATR cDNA je uvedena jako Seq ID No. 1. Aminokyselinová sekvence ORF od nukleotidu 80 a 8011 je uvedena jako Seq. ID No. 2.

DNA sekvence otevřeného čtecího rámce (ORF - open reading frame) *rad3* je uvedena jako Seq. ID No. 3. Výsledek translace genu - 2386 aminokyselin dlouhá sekvence (nukleotidy 585 až 7742 seq ID No. 3) je uvedena jako Seq. ID No. 4.

Stejně tak je důležité to, že vynález poskytuje protein ATR podle Seq. ID 2, jeho homologa, jeho polypeptidové fragmenty a také protilátky schopné vázat protein ATR nebo jeho polypeptidové fragmenty. ATR protein, jeho homologa a fragmenty jsou dále uváděny jako polypeptidy vynálezu.

Dalším aspektem předkládaného vynálezu jsou polynukleotidy ve značně izolované formě schopné selektivní hybridizace k Seq ID No. 1 nebo k jeho komplementu (tj. opačnému prameni). Předkládány jsou také polynukleotidy kódující polypeptidy vynálezu. Takovéto polynukleotidy budou uváděny jako polynukleotidy vynálezu. Polynukleotidy vynálezu zahrnují DNA ze Seq. ID No. 1 a její fragmenty, schopné selektivní hybridizace k tomuto genu.

Další stránkou vynálezu jsou předkládané rekombinantní vektory nesoucí polynukleotid vynálezu, včetně expresních vektorů a metody kultivace těchto vektorů ve vhodných hostitelských buňkách, například za podmínek, ve kterých dochází k expresi proteinu nebo polypeptidu kódovaných sekvencí vynálezu.

Dále vynález poskytuje soupravy obsahující polynukleotidy, polypeptidy nebo protilátky vynálezu a metody použití takovýchto souprav při diagnóze přítomnosti nebo absence ATR a jeho homologů, nebo jeho variant včetně škodlivých mutantů ATR.

Vynález dále poskytuje metody testů pro vyhledávání potenciálních substancí využitelných pro inhibici nebo aktivaci ATR aktivity, nebo aktivity mutovaných forem ATR, které postrádají kontrolní aktivitu (checkpoint activity). Vynález také popisuje testovací metody pro vyhledávání vhodných substancí použitelných k inhibici interakcí mezi ATR a ostatními sloučeninami, které reagují s ATR, včetně samotného ATR.

V této souvislosti vynález také poskytuje polynukleotidovou sekvenci Seq ID No. 3 ve značně izolované formě a protein Seq ID No. 4 ve značně izolované formě a jejich nové fragmenty a varianty.

Detailní popis vynálezu

A. Polynukleotidy

Polynukleotidy vynálezu mohou zahrnovat DNA nebo RNA. Také se mohou vyskytnout polynukleotidy, které obsahují ve své struktuře syntetické nebo modifikované nukleotidy. Odborníci znají řadu různých typů modifikací oligonukleotidů. Patří mezi ně metylfosfonátová a fosforothioátová páteř (methylphosphonate and phosphorothioate backbone), přidání akridinového nebo polylysinového řetězce na 3' a/nebo 5' konec molekuly. Pro účely presentovaného

vynálezu je nutné pochopit, že polynukleotidy zde popsané mohou být modifikované jakoukoliv metodou známou odborníkům. Takovéto modifikace mohou být provedeny za účelem zvýšení aktivity *in vivo* nebo životnosti polynukleotidů vynálezu.

Polynukleotidy vynálezu schopné selektivní hybridizace k DNA Seq ID No. 1 budou obecně nejméně ze 70% (lépe ale nejméně z 80-90% a ještě lépe nejméně z 95%) homologní s odpovídající DNA Seq ID No. 1 v oblasti nejméně 20, nebo lépe nejméně 25-30 (například nejméně 40, 60 nebo 100 nebo i více) sousedících nukleotidů.

Je nutné uvědomit si, že odborně školené osoby můžou s použitím rutinních technik provést náhradu nukleotidů, které neovlivní polypeptidovou sekvenci kódovanou polynukleotidy vynálezu proto, aby se projevilo použití kodonů určitého hostitelského organismu, ve kterém mají být polypeptidy vynálezu exprimované.

Jakákoliv kombinace výše uvedených stupňů homologie a minimálních velikostí může být použita k definování polynukleotidů vynálezu, přičemž preferovaná je stringentnější kombinace (tj. větší homologie u delších úseků). Tak například polynukleotid s nejméně 80% homologií u 25, nebo lépe 30 nukleotidů představuje jeden aspekt vynálezu, stejně jako polynukleotid s nejméně 90% homologií u 40 nukleotidů.

Polynukleotidy vynálezu mohou posloužit k vytvoření primeru (např. PCR primeru, primeru pro jinou amplifikační reakci), jako sonda (tj. označené značkou detekovatelnou běžnými prostředky - např. použitím radioaktivní nebo neradioaktivní značky), nebo mohou být polynukleotidy klonovány do vektorů. Takovéto primery, sondy a ostatní fragmenty budou dlouhé nejméně 15 nukleotidů (lépe nejméně 20 a typicky nejméně 25, 30 nebo 40 nukleotidů dlouhé) a jsou také zahrnuty do zde používaného termínu polynukleotidy vynálezu.

Polynukleotidy jako DNA polynukleotid a primery podle tohoto vynálezu mohou být produkovány rekombinantě, synteticky nebo jakýmkoliv jiným způsobem známým odborníkům. Mohou také být klonovány standardními technikami.

Primery budou většinou produkovány synteticky, postupným přidáváním jednoho nukleotidu až k dosažení žádoucí nukleotidové sekvence. Tyto techniky využívají automatů a jsou běžně známé.

Delší polynukleotidy budou většinou produkovány s použitím rekombinantních technik, například využitím techniky PCR klonování (polymerázová řetězová reakce - polymerase chain reaction). Ta zahrnuje vytvoření páru primerů (např. 15-30 nukleotidů dlouhých) k oblasti ATR genu, který chceme klonovat, aplikaci těchto primerů na mRNA nebo cDNA získané z lidských buněk (např. z dělících se buněk jako jsou leukocyty z periferní krve), vlastní PCR reakci za podmínek vedoucích k amplifikaci žádoucí oblasti, izolaci amplifikovaného fragmentu (např. purifikací reakční směsi na agarosovém gelu) a získání amplifikované DNA. Primery mohou být navrženy tak, aby obsahovaly vhodné cílové místo pro restriční enzym, takže amplifikovaná DNA může být naklonována do vhodného klonovacího vektoru.

Tyto techniky mohou být použity k získání celé nebo některé části sekvence ATR, která je zde popsána. Genomové klony obsahující gen ATR a jeho introny a promotorové oblasti můžeme také získat analogickým způsobem, kdy jako výchozí materiál slouží genomová DNA z lidských buněk, např. jaterních buněk.

I když techniky zde zmíněné jsou obecně všeobecně známé, jejich popis je možné najít zejména v publikaci *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook et al., 1989).

Polynukleotidy, které nejsou 100% homologní k sekvenci předkládaného vynálezu, ale spadají do rámce tohoto vynálezu, mohou být získány různými způsoby.

Jiné zde popsané alelické varianty sekvence lidského ATR mohou být získány například testováním genomových DNA knihoven, připravených z řady jedinců, například jedinců z různých populací.

Dále mohou být získána homologa ATR např. ze zvířat, hlavně savců (např. myši, krys nebo králíků) a zejména primátů a tyto homologa a jejich fragmenty budou zpravidla schopné selektivně hybridizovat k Seq. ID No. 1. Takovéto sekvence mohou být získány testováním cDNA knihoven připravených z dělících se buněk nebo pletiv nebo genomových DNA knihoven z jiných živočišných druhů a testováním takovýchto knihoven sondami zahrnujícími celou nebo část Seq. ID. 1 za vysoce stringentních podmínek (např. 0,03 M chlorid sodný a 0,03 M citrát sodný při asi teplotách od 50 °C do 60 °C).

Alelické varianty a druhová homologa se mohou také získat s použitím „degenerované PCR“ (degenerate PCR), při které se použijí primery vytvořené tak, aby hybridizovaly s cílovými sekvencemi uvnitř variant a homologů kódujících konzervované aminokyselinové sekvence. Konzervované sekvence mohou být vytipovány porovnáním aminokyselinové sekvence ATR se sekvencí *rad3*. Primery budou obsahovat jednu nebo více degenerovaných pozic a budou použity za méně stringentních podmínek než jsou ty, které se použijí pro klonování sekvencí s jednosekvencovými primery proti známým sekvencím.

Takovéto polynukleotidy mohou být také získány místní řízenou mutagenezí sekvence ATR nebo příslušných alelických variant. To může být například užitečné tam, kde jsou nezbytné "tiché" změny kodónů pro optimalizaci vhodnosti kodónů pro určitou hostitelskou buňku, ve které má být polynukleotidová sekvence exprimována. Jiné změny sekvence mohou být žádoucí, chceme-li vnést nové místo pro restriční enzym nebo pro změnu vlastnosti nebo funkce polypeptidu kódovaného polynukleotidem. Žádoucí můžou být i další změny, představující částečné změny kódování nalezené u ATR (které vedou-li ke vzniku mutantních ATR genů, které ztratily kontrolní funkci). Sondy založené na takovýchto změnách mohou být použity jako diagnostické sondy k detekci takovýchto ATR mutantů.

Vynález dále poskytuje dvojpramenné polynukleotidy zahrnující polynukleotidy vynálezu a jejich doplňky.

Polynukleotidy nebo primery vynálezu mohou obsahovat detekční značku. Vhodné značky zahrnují radioisotopy jako ^{32}P nebo ^{35}S , enzymové značky, nebo jiné proteinové značky, jako např. biotin. Takovéto značky mohou být připojeny k polynukleotidům nebo primerům vynálezu a mohou být detekovány s použitím známých technik.

Značené nebo neznačené polynukleotidy nebo primery vynálezu nebo příslušné fragmenty mohou být použity osobami znalými technik detekce a sekvenování nukleových kyselin pro detekci či sekvenování ATR v lidském nebo zvířecím těle.

Takovéto detekční testy obecně zahrnují aplikaci sondy obsahující polynukleotid nebo primer vynálezu na vzorek z lidí nebo zvířat obsahující DNA nebo RNA za hybridizačních podmínek a detekci

jakýchkoliv duplexů vytvořených mezi sondou a nukleovou kyselinou vzorku. Detekci je možné provést s použitím technik jako je PCR nebo imobilizací sondy na pevný povrch, odstraněním nepřihibridizovaných nukleových kyselin a potom detekováním nukleových kyselin, které přihibridizovaly k sondě. Nebo můžou být nukleové kyseliny vzorku přichyceny na pevný povrch a pak se detekuje množství navázané sondy ke vzorku. Vhodné detekční metody pro tyto způsoby detekce jsou uvedené například v WO89/03891 a WO90/13667.

Při sekvenování ATR se aplikuje na cílový lidský nebo zvířecí tělní vzorek (obsahující DNA nebo RNA) sonda obsahující polynukleotid nebo primer vynálezu za hybridizačních podmínek a detekci sekvence například Sangerovou dideoxy terminační metodou (viz Sambrook *et al.*).

Takováto metoda zpravidla zahrnuje elongaci (za přítomnosti vhodných činidel) primeru syntézou komplementární cílové DNA nebo RNA a selektivní ukončení elongační reakce u jednoho nebo více A, C, G nebo T/U residuí. Dochází tedy k prodlužování pramene, které je ukončeno terminační reakcí; dále následuje vlastní určení sekvence nukleotidů separací podle velikosti "prodloužených" produktů (podle toho, kde došlo k selektivnímu ukončení prodlužování). Vhodná činidla zahrnují enzym DNA polymerázu, deoxynukleotidy dATP, dCTP, dGTP a dTTP, pufr a ATP. Pro selektivní terminaci se používají dideoxynukleotidy.

Testy pro detekci nebo sekvenování ATR v lidském nebo zvířecím organismu mohou být použity k určení sekvence ATR v buňkách individuálních organismů, které mají (nebo u kterých se předpokládá) pozměněnou genovou sekvenci ATR, například u rakovinných buněk včetně buněk leukemických nebo pevných tumorů, jako např. tumorů prsu, vaječníků, tračníku, pankreatu, varlat, jater, mozku, svalů a kostí.

Navíc, objevení ATR umožní nyní zkoumat vliv tohoto genu u dědičných poruch způsobem obdobným jako u genu ATM. Obecně to zahrnuje určení stavu ATR (např. použitím sekvenční analýzy pomocí PCR) v buňkách odvozených od pacientů nemocných chorobami, u kterých může docházet k poškození replikujících se buněk např. s rodinnou predispozicí k rakovině, chromozomálním změnám nebo nestabilitě

29.03.99

fenotypu nebo s fenotypem s citlivostí vůči poškození reparačních funkcí.

Sondy vynálezu můžou být vhodně dodávány ve formě testovací soupravy ve vhodném obalu. V takovéto soupravě (vyžaduje li to daný test) může být sonda navázána na pevný povrch. Souprava může také obsahovat vhodné reagenční činidla pro přípravu analyzovaného vzorku, hybridizaci sondy k nukleovým kyselinám vzorku, kontrolní činidla, instrukce a podobně.

Předkládaný vynález také poskytuje polynukleotidy kódující dále popsané polypeptidy vynálezu. Protože takovéto polynukleotidy budou užitečné jako sekvence pro rekombinantní produkci polypeptidů vynálezu, není nezbytně nutné, aby selektivně hybridizovaly se sekvencí Seq ID No. 1, i když by to obecně bylo žádoucí. Jinak takovéto polynukleotidy mohou být - je-li to potřeba - značené, použité a připravené tak, jak bylo uvedeno výše. Polypeptidy vynálezu jsou popsány dále.

Zvláště preferované polynukleotidy vynálezu jsou ty, které jsou odvozené od lipid kinázové domény ATR, jejích alelických variant a druhových homologů. Lipid kinázová doména je reprezentována nukleotidy 7054 až 8011 Seq. ID 1. Polynukleotidy vynálezu, které obsahují tuto doménu, jsou zejména preferovány. Termín „lipid kinázová doména“ se vztahuje k doméně, která má homologii s ostatními lipid kinásami, zejména s podjednotkou p110 PI-3 kinázy (stanoveno srovnáním sekvencí).

Ostatní preferované polynukleotidy vynálezu jsou ty, které obsahují nukleotidy kódující aminokyseliny 181-302 Seq.ID No. 2 (nukleotidy 620-985 Seq. ID No. 1) o kterých se předpokládá, že tvoří oblast leucinového zipu (leucine zipper region), místo předpokládané interakce protein-protein, a aminokyseliny 1358-1336 (nukleotidy 4151-4177), které jsou také konzervované.

Další stránka vynálezu - byly připraveny polynukleotidy vynálezu obsahující Seq. ID No. 3 a její fragmenty schopné selektivní hybridizace k této sekvenci (jiné než fragmenty obsahující nukleotidy 2482-6599) u kterých byly provedeny tyto změny: odstranění residuí 2499, 2501, 2507 a 2509 a vložení C mezi 5918/5919.

Zvlášť preferované fragmenty představují ty, které obsahují residua 6826-7334 (lipid kinázová doména) a oblast leucinového zipu (1476-1625 a 2310-2357). Dále jsou preferované fragmenty obsahující konzervovanou oblast nukleotidů 3891-3917. Tyto polypeptidy a fragmenty mohou být připraveny postupy popsány výše.

B. Polypeptidy

Polypeptidy vynálezu zahrnují polypeptidy ve značně izolované formě, které obsahují sekvenci uvedenou v Seq ID No. 2.

Polypeptidy dále zahrnují varianty těchto sekvencí, včetně přirozeně se vyskytujících alelických variant a syntetických variant, které jsou vysoce homologní k daným polypeptidům. V tomto kontextu je značná homologie chápána jako sekvence, která má alespoň 70%, (například 80% nebo 90%) homologii (shodnost) nukleových kyselin na úseku přes 30 aminokyselin se sekvencí Seq. ID No. 2 kromě lipid kinázové domény a C-koncové části (residua 2326-2644), kde podstatná homologie je chápána jako nejméně 80% homologie, ale lépe 90% homologie (identita) úseku přes 50 aminokyselin.

Mezi polypeptidy patří i jiné polypeptidy kódované homology ATR z jiných druhů včetně zvířat, jako jsou savci (např. myši, krysy nebo králíci) a zejména primáti, a jejich varianty definované výše.

Polypeptidy vynálezu také zahrnují fragmenty výše zmíněných kompletních polypeptidů a jejich variant, včetně fragmentů sekvence uvedené v Seq. ID No. 2.

Mezi preferované fragmenty patří zejména ty, které obsahují epitop, zejména epitop (which include an epitop, especially an epitop). Vhodné fragmenty budou mít velikost alespoň 5, např. 10, 12, 15 nebo 20 aminokyselin. Polypeptidové fragmenty proteinu ATR a jeho alelických a druhových variant mohou obsahovat jednu nebo více (např. 2, 3, 5 nebo 10) substitucí, delecí nebo insercí včetně konzervovaných substitucí.

Konzervované substituce se mohou provádět podle následující tabulky uvádějící konzervativní substituce, kde aminokyseliny ve stejném bloku ve druhém sloupci a je-li to možné i ve stejné řádce ve třetím sloupci mohou být nahrazeny jedna za druhou

29.03.99

ALIFATICKÉ	Nepolární	G A P
		I L V
	Polární	C S T M
		N Q
	Polární - nabité	D E
		K R
AROMATICKÉ		H F W Y
OSTATNÍ		N Q D E

Varianty polypeptidů vynálezu mohou také obsahovat polypeptidy, kde je jedna nebo více specifikovaných (tj. přirozeně kódovaných) aminokyselin odstraněna nebo nahrazena nebo kde je přidána jedna nebo více nespecifikovaných aminokyselin:

1) bez ztráty kinázové aktivity specifické pro polypeptidy vynálezu

nebo 2) se ztrátou kinázové aktivity specifické pro polypeptidy vynálezu

nebo 3) se ztrátou schopnosti interakce s jednotlivými členy nebo regulátory kontrolních bodů průběhu buněčného cyklu.

Epitopy mohou být například určeny technikami vyhledávání polypeptidů, které jsou popsány např. v publikaci Geysen et al. Mol. Immunol., 23:709-715 (1986).

Polypeptidy vynálezu mohou být ve značně izolované formě. Je nutné vysvětlit, že polypeptidy mohou být smíseny s nosiči nebo ředidly, které nebudou interferovat se zamýšleným účelem polypeptidů a stále budou považovány za značně izolované. Polypeptidy vynálezu mohou být také ve značně vyčištěné (purifikované) formě, kdy polypeptidy vynálezu představují zpravidla více než 90%, tedy např. 95%, 98% nebo 99% polypeptidů v přípravku. Polypeptidy vynálezu mohou být modifikovány například přidáním histidinových residuí s cílem usnadnit jejich purifikaci nebo přidáním signální sekvence s cílem usnadnit jejich sekreci z buněk.

Polypeptidy vynálezu mohou být označeny detekční značkou. Detekční značka může být vhodná značka, která umožní detekci proteinu. Mezi vhodné značky patří například radioisotopy, např.

^{125}I , enzymy, protilátky, polynukleotidy a další látky, jako například biotin. Značené polypeptidy vynálezu mohou být použity v diagnostických postupech jako jsou imunotesty s cílem určit množství polypeptidu vynálezu ve vzorku. Polypeptidy nebo značené polypeptidy vynálezu mohou být také použity v serologických nebo buněčných imunologických testech pro detekci imunní reakce k daným polypeptidům u zvířat a lidí s použitím standardních protokolů.

Polypeptidy nebo značené polypeptidy vynálezu nebo jejich fragmenty mohou být také přichyceny k pevné fázi, například k povrchu jamky pro imunotesty nebo na testovací proužky.

Takovéto značené a/nebo imobilizované polypeptidy mohou být dodávány ve formě souprav ve vhodném obalu společně s příslušnými činidly, kontrolami, instrukcemi atp.

Takovéto polypeptidy a soupravy mohou být použity v metodách pro imunodetekci protilátek proti ATR proteinu nebo jeho alelickým variantám nebo druhovým variantám.

Imunometody jsou odborníkům známe a obecně zahrnují:

- a) zajištění polypeptidu obsahujícím epitop zachytitelný protilátkou proti danému proteinu
- b) inkubaci biologického vzorku s daným polypeptidem za podmínek, které umožní tvorbu komplexu protilátka-antigena a
- c) určení, jestli došlo k tvorbě komplexu protilátka-antigen obsahující daný polypeptid

Polypeptidy vynálezu mohou být připraveny synteticky (např. podle Geysen et al.) nebo rekombinantně, jak je popsáno dále.

Mezi zvláště preferované polypeptidy vynálezu patří ty, které překlenují nebo jsou v lipid kinázové doméně, jmenovitě aminokyseliny 2326-2644 Seq. ID 2. nebo sekvence vykazující s ní podstatnou homologii. Výše definované fragmenty z těchto oblastí jsou zvláště preferované. Polypeptidy a jejich fragmenty mohou obsahovat změny aminokyselin jak je uvedeno výše, včetně substitucí na jedné nebo více pozicích z pozic 2475, 2480 2494, které odpovídají poloze *rad3* substitucí popsaných v následujících příkladech. Mezi preferované substituce patří D2475A, N2480K a D2494E.

29.03.99

Polypeptidy vynálezu mohou být použity v *in vitro* nebo *in vivo* systémech buněčných kultur pro studium role ATR jako kontrolního genu. Například zkrácené nebo modifikované (např. modifikované v oblasti lipid kinázové domény) polypeptidy ATR mohou být včleněny do buňky s cílem narušit normální kontrolní funkce, které jsou v buňce.

Polypeptidy vynálezu mohou být zavedeny do buněk *in situ* expresí polypeptidu z rekombinantního expresního vektoru (viz dále). Expresní vektor může obsahovat indukovatelný promotor pro řízení exprese polypeptidu.

Použití savčích hostitelských buněk je možné předpokládat tehdy, jestliže se chce dosáhnout různých post-translačních modifikací (např. myristoilace (myristolation), glykosylace, zkrácení, lapidace (lapidation) a fosforylace tyrosinu, serinu nebo threoninu) což může být nutné pro dosažení optimální biologické aktivity rekombinantních produktů exprese vynálezu.

Takovéto systémy buněčných kultur, ve kterých jsou exprimovány polypeptidy vynálezu, mohou být použity v testovacích systémech k identifikaci možných substancí, které interferují s nebo zesilují kontrolní funkce v buňce (viz dále).

V dalším pohledu polypeptidy vynálezu zahrnují protein Seq. ID No. 4 a jeho fragmenty z jiné oblasti než fragment složený z aminokyselin 713 až 1778. Mezi zvláště preferované fragmenty patří ty, které zahrnují residua 2082 až 2386 (lipid kinázová doména) a oblast leucinového zipu (leucine zipper) 298-347 a 576-591. Dále je preferován fragment obsahující konzervovanou oblast 1103-1111. Takovéto polypeptidy a fragmenty mohou být připraveny a použity jak je popsáno výše.

Vynález také poskytuje polypeptidy s významnou homologií k proteinu Seq. ID No. 4 a jeho fragmentům. V této souvislosti se za významnou (podstatnou) homologii pokládá sekvence s minimálně 70%, např. 80% nebo 90% aminokyselinovou homologií (identitou) úseku 30 aminokyselin se sekvencí Seq. ID No.4 kromě lipid kinázové domény a C-konce (residua 2082-2386), kde se za podstatnou homologii pokládá minimálně 80%, nebo lépe alespoň 90% homologie (identita) v úseku 50 aminokyselin.

C. Vektory

Polynukleotidy vynálezu mohou být včleněny do rekombinačních vektorů schopných replikovat se. Vektor se může použít pro replikaci nukleové kyseliny v kompatibilní hostitelské buňce. Vynález proto také poskytuje metodu pro tvorbu polynukleotidů vynálezu včleněním polynukleotidu vynálezu do replikačního vektoru, vpravením vektoru do kompatibilní hostitelské buňky a pěstováním hostitelské buňky za podmínek, které vyvolají replikaci vektoru. Vektor se může z hostitelských buněk znova získat. Vhodné hostitelské buňky jsou popsány dále v souvislosti s expresními vektory.

D. Expresní vektory

Je žádoucí, když polynukleotidy vynálezu ve vektoru jsou funkčně spojené (operably linked) s řídicí sekvencí, která je schopná zajistit expresi kódující sekvence hostitelskou buňkou, tj. když vektor je expresním vektorem.

Termín „funkčně spojený“ se vztahuje k vzájemné pozici, kde jsou popsány složky v takovém vztahu, který umožňuje jejich zamýšlenou funkci. Řídicí sekvence „funkčně spojená“ s kódující sekvencí je přiligována tak, že za podmínek vhodných pro řídicí sekvenci dojde k expresi kódující sekvence.

Takovýmto vektory může být transformována výše popsaná vhodná hostitelská buňka s cílem exprimovat polypeptid vynálezu. Vynález tedy dále poskytuje postup pro přípravu polypeptidů podle vynálezu, který zahrnuje kultivaci hostitelské buňky transformované nebo transfektované expresním vektorem jak je popsáno výše za podmínek, kdy dochází k expresi kódující sekvence vektora, která kóduje polypeptid a získání vytvořeného proteinu.

Vektory mohou být například plasmidy, virové nebo fágové vektory poskytnuté s počátkem replikace (origin of replication) a případně i promotorem pro expresi daných polynukleotidů a případně i regulátorem promotoru. Vektory mohou obsahovat jeden nebo více genů selekčních markerů například gen resistance na ampicilin v případě bakteriálních plasmidů nebo resistenci na neomycin v případě savčích vektorů. Vektory mohou být použity *in vitro*, například pro tvorbu

RNA nebo použity k transfekci nebo transformaci hostitelských buněk. Vektor také může být upraven pro použití *in vivo*, například v metodách využívaných při genové terapii.

Vynálezu dále poskytuje hostitelské buňky transformované nebo transfekované vektory pro replikaci a expresi polynukleotidů vynálezu. Buňky budou vybrány tak, aby byly kompatibilní s daným vektorem a mohou to být například buňky bakteriální, kvasniční, hmyzí nebo savčí.

Polynukleotidy vynálezu mohou být také včleněny do výše popsaných vektorů v opačném (antisense) směru s cílem získat antisense RNA. Antisense RNA nebo jiné „antisense“ polynukleotidy mohou být také připraveny synteticky. Takovéto antisense nukleotidy se mohou využít pro řízení hladiny ATR nebo jeho variant nebo druhových homologů.

Promotory a ostatní expresní regulační signály mohou být vybrány tak, aby byly slučitelné s hostitelskou buňkou, pro kterou byl expresní vektor navržen. Například kvasniční promotory zahrnují *S. cerevisiae* GAL4 a ADH promotory, *S. pombe* nmt1 a adh promotory. Savčí promotory zahrnují methalothioneinový promotor (metallothionein promoter), který reaguje na ionty těžkých kovů, například kadmia. Virové promotory jako např. „SV40 large T antigen“ promotor nebo promotory adenovirů mohou být také použity. Všechny tyto promotory jsou snadno dostupné.

E: Protilátky

Vynález také poskytuje monoklonální nebo polyklonální protilátky proti polypeptidům vynálezu nebo jejich fragmentům. Vynález také popisuje proces pro produkci monoklonálních nebo polyklonálních protilátek proti polypeptidům vynálezu. Monoklonální protilátky mohou být připraveny konvenční hybridomovou technologií s využitím polypeptidů vynálezu nebo jejich polypeptidových fragmentů jako imunogenů. Polyklonální protilátky mohou být také připraveny konvenčními způsoby, které zahrnují imunizaci hostitelského zvířete (například krysy nebo králíka) polynukleotidy vynálezu nebo jejich peptidovými fragmenty a získání imunního séra.

Aby mohly být takovéto protilátky připraveny poskytuje vynález polypeptidy vynálezu nebo jejich fragmenty připojené (haptened to) k jinému polypeptidu. Takovéto komplexy jsou použity jako imunogeny u savců nebo lidí.

Preferované protilátky vynálezu jsou schopné selektivní vazby proteinu lidského ATR, to jest s afinitou nejméně 10x ale lépe alespoň 100x větší než s *rad3* proteinem. Takovéto protilátky mohou být získány rutinními experimenty např. výběrem oblastí proteinu ATR se sekvencemi odlišnými od odpovídajících oblastí *rad3*, přípravou peptidů obsahujících takovéto sekvence a použitím takovýchto peptidů jako imunogenů. Po produkci daných protilátek se ověří jejich vazebné vlastnosti. Preferované protilátky vynálezu zahrnují ty, které mají schopnost selektivní vazby na lipid kinázovou doménu (definovanou výše) lidského ATR proteinu. Navíc protilátky, které jsou schopné vazby lidské a kvasniční (*S. pombe*) lipid kinázové domény s podobnou afinitou ale ne k doménám ATM rodiny proteinů, pak představují další stránku vynálezu. Takovéto protilátky mohou být připraveny proti peptidům z lipid kinázové domény, která odpovídá oblastem, které byly shledány shodnými nebo podstatně shodnými v lidských a kvasničních genech.

Pro účely tohoto vynálezu termín „protilátka“, pokud není uvedeno jinak, zahrnuje fragmenty celých protilátek, které si zachovávají svojí vazebnou aktivitu k cílovému tumorovému antigenu. Takovéto fragmenty zahrnují Fv, F(ab') a F(ab)₂ fragmenty a také jedno-řetězcové protilátky. Kromě toho protilátky a jejich fragmenty mohou být polidštěné protilátky (humanised antibodies) jak je to popsáno. v EP-A-239400.

Protilátky mohou být použity v metodách detekce polypeptidů vynálezu přítomných v biologických vzorcích metodami, které zahrnují:

- a) přípravu protilátek vynálezu
- b) inkubaci biologického vzorku s danou protilátkou za podmínek, které umožňují tvorbu komplexu protilátka-antigen; a
- c) určení, jestli došlo k tvorbě komplexu antigen-protilátka s danou protilátkou

Mezi vhodné vzorky patří extrakty z dělících se buněk, např. leukocytů nebo rakovinných buněk, zahrnující leukemické buňky a pevné nádory, jako například tumory prsu, vaječníku, plic, tračníku pankreatu, varlat, jater, mozku, svalů a kostí.

Protilátky vynálezu mohou být navázány na pevný povrch a/nebo připraveny ve formě soupravy ve vhodném obalu společně s příslušnými činidly, kontrolami, instrukcemi atd.

F. Zkoušky

Potenciální strategií pro návrh a vývoj léčiv pro protirakovinnou léčbu je narušení kontrolních bodů buněčného cyklu, ať už by se jednalo o nový postup nebo v kombinované terapii s cílem zvýšit specifickou toxicitu současných chemoterapeutických látek. Například alkylační látky (např. nitrogen mustard) se používají jako chemoterapeutické látky, které poškodí DNA v rychle se dělících buňkách, což vede k smrti buňky. Toxicita takovéto látky může být snížena mechanismy opravujícími DNA a cestami kontrolních bodů. Narušení takovýchto mechanismů zvýší tedy účinnost terapeutických sloučenin navržených pro poškození DNA. Narušení ATR kontrolních bodů bude zejména užitečné tehdy, když tumorové buňky již ztratily ostatní kontrolní body nebo na poškození reagující geny, protože tyto ostatní geny mohou být schopné doplnit ztrátu funkce ATR v netumorových buňkách, což vede k dalšímu zvýšení účinnosti chemoterapeutických látek.

Cílem při vývoji proti rakovinných sloučenin je lipid kinázová aktivita ATR, protože výsledky prezentované v následujících příkladech naznačují, že kinázová doména je nezbytná pro funkci ATR. Předkládaný vynález tedy poskytuje testovací metodu pro zjišťování možných látek pro proti-rakovinovou léčbu, která zahrnuje:

- a) přípravu polypeptidu vynálezu, který neztratil lipid kinázovou aktivitu a substrátu pro danou kinázu za podmínek a s takovými reagensy, za kterých bude kinázová aktivita působit na substrát
- b) smíchání daného polypeptidu a substrátu s testovanou látkou
- c) měření stupně poklesu kinázové aktivity daného polypeptidu a
- d) výběr vhodné látky, která snižuje aktivitu

Test může být proveden *in-vitro*, například v jamkách mikrotitrační desky. Takovýto formát může být snadno adaptován pro automatizaci, která umožňuje testování velkého množství potenciálních substancí.

Substrátem může být protein nebo lipidový substrát přírodního nebo syntetického původu, na který bude působit polypeptid vynálezu. Polypeptid vynálezu bude substrát obvykle fosforylovat.

Odborníci si mohou vybrat jakýkoliv vhodný formát výkonných testů. Typicky polypeptid vynálezu, který vykazuje lipid kinázovou aktivitu se zachytí k pevnému povrchu za přítomnosti substrátu a buněčných a dalších komponent, které jsou většinou nezbytné pro aktivitu. Značený fosfát a testovaná látka se přidají do směsi současně nebo po sobě v obojím pořadí. Po uplynutí příslušné reakční doby (většinou několik minut, ale v každém případě dostatečně dlouho pro to, aby došlo k fosforylaci substrátu za nepřítomnosti testované látky) se stanoví množství volného fosfátu, např. precipitací fosfátu. Testovaná látka, která inhibuje kinázovou aktivitu bude inhibovat inkorporaci volného fosfátu do substrátu a tak když je nalezen volný fosfát, naznačuje to přítomnost inhibice.

Odborníci mohou využít i jiné metody.

Testované látky mohou být při počátečním testování navzájem seskupené, takže je možné v jedné reakci otestovat třeba 10 vzorků a v případě pozitivního výsledku provést individuální testování.

Vhodné látky pro testování zahrnují peptidy, zejména o velikosti 5-20 aminokyselin, založené na sekvenci kinázové domény nebo variantách tohoto peptidu, kde je nahrazeno jedno nebo více residuí tak, jak je popsáno výše. Mohou být použity peptidy ze skupiny peptidů s náhodnými sekvencemi nebo sekvencemi, které byly upraveny v souladu s cílem získat maximálně rozsáhlý soubor peptidů. Další možné látky zahrnují inhibitory kináz, což jsou malé molekuly jako cyklosporinům a staurosporinům příbuzné látky (Cyklosporin-like and staurosporin-like compounds), nebo další komerčně dostupné látky ze skupiny malých molekul inhibitorů.

Testované látky, které vykazují aktivitu v *in vitro* pokusech popsaných výše mohou být následně testované v systémech *in vivo*,

jako například v kvasničných nebo savčích buňkách, které se vystaví působení inhibitorů a testují na aktivitu kontrolních bodů.

Ukazali jsme také, že Rad3 vykazuje protein kinázovou aktivitu. Cílové substráty Rad3 protein kinázové aktivity se můžou zjistit zahrnutím testovaných sloučenin do testů na kinázovou aktivitu. Rad3 protein je resuspendován v kinázovém pufru a inkubován buď za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované látky (např. kasein, histon H1 nebo příslušný substrátový peptid). Přenesené množství (v molech) fosfátu kinázami se zjišťuje autoradiografií nebo scintilačně. Přenos fosfátu na testovanou látku svědčí o tom, že testovaná látka je kinázou.

Látky pozměňující Rad3/ATR lipid kinázovou nebo Rad3 protein kinázovou aktivitu se můžou zjišťovat inkubací testované látky a

Rad3/ATR získaného imunitní purifikací z buněk přirozeně produkujících Rad3/ATR

s Rad3/ATR získaným z rekombinantních prokaryontních nebo eukaryontních buněk produkujících enzym

nebo s purifikovaným Rad3/ATR

a určením vlivu testované látky na aktivitu Rad3/ATR. Aktivita Rad3/ATR lipid kinázové nebo Rad3 protein kinázové domény může být měřena určením množství (v molech) ^{32}P -fosfátu přeneseného kinázami z gama- ^{32}P -ATP na sebe samu (autofosforylace) nebo na vnější substrát, jako např. lipid nebo protein. Množství fosfátu včleněného do substrátu se měří scintilačně nebo autoradiografií. Zvýšení množství přeneseného fosfátu (počtu molů) na substrát v přítomnosti testované látky v porovnání s množstvím přeneseného fosfátu (počtu molů) bez testované látky ukazuje, že testovaná látka působí jako aktivátor dané kinázové aktivity. A opačně snížení množství přeneseného fosfátu (počtu molů) na substrát v přítomnosti testované látky v porovnání s množstvím přeneseného fosfátu (počtu molů) bez testované látky ukazuje, že testovaná látka působí jako inhibitor dané kinázové aktivity.

V testu, který je nyní preferován, je protilátka proti Rad3/ATR připojená k agarosovému nosiči (agarose beads) inkubována s buněčným lyzátem připraveným z hostitelských buněk produkujících Rad3/ATR. Nosič se pak opláchne (aby se odstranily na nosič nespecificky

navázané proteiny) a nosič je potom resuspendován v kinázovém pufru (např. 25 mM K-HEPES pH 7.7, 50 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 0.1% Nonidet-P-40, 20% glycerol, 1mM DTT). Přidáním 100 μ M gama- ^{32} P-ATP (4 μ Ci/mM) a exogenního substrátu (např. lipidu nebo peptidu) se iniciuje reakce, která probíhá při 30 °C po dobu 10 minut. Aktivita kinázy je měřena určením množství (v molech) ^{32} P-fosfátu přeneseného buď na vlastní kinázu nebo na přidaný substrát. V preferovaném případě hostitelské buňky postrádají vnitřní Rad3/ATR aktivitu. Selektivita látky, která upravuje lipid kinázovou aktivitu Rad3/ATR, může být stanovena porovnáním aktivity na Rad3/ATR s její aktivitou na např. jiných známých fosfatidylinositol-3 (PI-3) příbuzných kinázách. Kombinace rekombinantních Rad3/ATR produktů vynálezu s jinými rekombinantními PI-3 příbuznými kinázovými produkty v řadě nezávislých pokusů poskytne systém pro vývoj selektivních modulátorů Rad3/ATR kinázové aktivity. Podobně, selektivita sloučeniny, která moduluje protein kinázovou aktivitu Rad3, může být určena ve vztahu k jiným proteinovým kinázám, např. DNA dependentním protein kinázám nebo ATM.

Důkaz, že *rad* mutant *rad.D2249E* (viz příklady) může působit jako dominantní negativní mutant navíc naznačuje účast v jednom nebo více proteinových komplexech, a takovéto komplex samy o sobě mohou být cílem pro terapeutické působení. Ukázali jsme, že např. že Rad3 se může jednak spojit sám se sebou nebo spojit s ATR. Je tedy pravděpodobné, že Rad/ATR působí jako multimerní (multimeric) molekuly. Mutantní kvasniční *rad* nebo lidské ATR geny nebo jejich odvozeniny (které také postrádají *rad*/ATR aktivitu) mohou být včleněny do buňky, aby působily jako dominantní negativní mutanty. Jestliže tedy například exprese dominantního negativního mutantu (např. ATR D2475A, N2480K nebo D2494E) v tumorových buňkách vede ke zvýšené citlivosti k ozáření, ukazuje to, že přírodní ATR je stále aktivní a tedy cílem pro terapeutické látky.

Vzájemně se ovlivňující proteiny včetně komponent multimerních proteinových komplexů zahrnujících Rad3 nebo ATR mohou být identifikovány v následujících experimentech.

První rozbor uvažovaný ve vynálezu je dvouhybridní test. Dvouhybridní systém byl vyvinut pro kvasnice (Chien et al., 1991) a

je založen na funkční *in vivo* rekonstituci transkripčního faktoru, který aktivuje reporterový gen. Konkrétně polynukleotid kódující protein, který vzájemně reaguje s Rad3/ATR je izolován:

- transformací nebo transfekcí vhodné hostitelské buňky konstruktem DNA, který obsahuje reporterový gen řízený promotorem regulovným transkripčním faktorem s DNA vazebnou doménou a aktivující doménou
- expresí první hybridní DNA sekvence v hostitelské buňce kódující první syntézu (fusion) části nebo celého Rad3/ATR a buď DNA vazebné oblasti nebo aktivující oblasti transkripčního faktoru
- expresí knihovny (v hostitelské buňce) druhé hybridní DNA sekvence kódující druhou syntézu části nebo celého domnělého Rad3/ATR vazebného proteinu a DNA vazebnou doménu nebo aktivační doménu transkripčního faktoru, který není inkorporován v první syntéze
- detekcí vazby proteinu reagujícího s Rad3/ATR k Rad3/ATR v dané hostitelské buňce detekcí produktu reporterového genu v hostitelské buňce
- izolací druhé hybridní DNA sekvence kódující interagující protein z dané hostitelské buňky

V současné době jsou při tomto postupu preferované: *lexA* promotor k řízení exprese reporterového genu, *lacZ* reporterový gen, transkripční faktor obsahující *lexA* DNA vazebnou oblast a GAL4 transaktivační doménu a kvasniční hostitelské buňky.

Další testy pro identifikaci proteinů, které reagují s Rad3 nebo ATR, mohou zahrnovat imobilizaci Rad3/ATR nebo testovaného proteinu, detekční značení nepřichyceného vazebného partnera, společnou inkubaci vazebných partnerů a určení množství navázané značky. Navázaná značka naznačuje, že testovaný protein reaguje s Rad3/ATR.

Jiný typ testu pro identifikaci proteinů reagujících s Rad3 nebo ATR může zahrnovat imobilizaci Rad3/ATR nebo jejich fragmentu na pevný povrch potažený (nebo nasycený) fluorescenční látkou, značení testovaného proteinu sloučeninou schopnou excitace fluorescenční látky, aplikaci značeného testovacího proteinu na imobilizovaný Rad3/ATR, detekci světelné emise produkované fluorescenční látkou a identifikaci vzájemně reagujících proteinů jako testovaných

proteinů, které vyvolaly emisi světla fluorescenční látkou. Případně může být testovaný protein imobilizovaný a v testu může být značený Rad3/ATR.

Sloučeniny, které mění vzájemné působení mezi Rad3/ATR a ostatními buněčnými komponenty mohou být použity při různých metodách léčení rakoviny. Jestliže například specifická forma rakoviny je výsledkem mutace jiného genu než genu ATR (např. p53 genu), látka, která inhibuje transkripci nebo enzymatickou aktivitu ATR a tedy kontrolní místo G₂ fáze buněčného cyklu, může být použita k zvýšení citlivosti rakovinových buněk k chemoterapii nebo ozařování. Terapeutická hodnota takovéto látky spočívá ve faktu, že současná radioterapie nebo chemoterapie nedělá ve většině případů nic pro překonání schopnosti p53 mutovaných rakovinných buněk opravit poškození DNA vyvolané jako výsledek léčby. Výsledkem je, že rakovinná buňka může jednoduše opravit poškození DNA. Modulující látky vynálezu mohou být tedy použity pro zesílení účinnosti chemoterapie a radioterapie, nebo se můžou použít přímo jako chemoterapeutika.

Testy pro identifikaci sloučenin, které ovlivňují interakci Rad3/ATR s jinými proteiny můžou zahrnovat:

- transformaci nebo transfekci vhodných hostitelských buněk konstruktem DNA, který obsahuje reporterový gen řízený promotorem regulovaným transkripčním faktorem s DNA vazebnou doménou a aktivující doménou
- exprese první hybridní DNA sekvence v hostitelských buňkách kódující první syntézu (fusion) části nebo celého Rad3/ATR a buď DNA vazebné oblasti nebo aktivující oblasti transkripčního faktoru
- exprese druhé hybridní DNA sekvence v hostitelských buňkách kódující část nebo celý protein, který intereaguje s Rad3/ATR a buď DNA vazebnou oblast nebo aktivující oblast transkripčního faktoru, který není inkorporován v první syntéze
- vyhodnocení vlivu testované látky na interakci mezi Rad3/ATR a interagujícím proteinem detekcí vazby interagujícího proteinu k Rad3/ATR v dané hostitelské buňce měřením tvorby produktu reporterového genu v hostitelské buňce za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované látky a

- identifikaci modulujících sloučenin jako těch testovaných sloučenin, které ovlivňují tvorbu produktu reporterového genu v porovnání s tvorbou produktu reporterového genu za nepřítomnosti modulující látky.

V současné době jsou při tomto postupu preferované :lexA promotor k řízení exprese reporterového genu, lacZ reporterový gen, transkripční faktor obsahující lexA DNA vazebnou oblast a GAL4 transaktivační doménu a kvasniční hostitelské buňky.

Další typy testů pro identifikaci sloučenin, které mění interakci mezi Rad3/ATR a ovlivňujícím proteinem zahrnuje imobilizaci Rad3/ATR nebo přirozeného proteinu reagujícího s Rad3/ATR, detekční značení neimobilizovaného vazebného partnera, společnou inkubaci vazebných partnerů a určení vlivu testované látky na množství navázané značky. Snížení množství značky navázané za přítomnosti testované látky v porovnání s množstvím navázané značky za nepřítomnosti testované látky ukazuje, že testovaná látka je inhibátorem interakce mezi Rad3/ATR a proteinem. Opačně, zvýšené množství navázané značky za přítomnosti testované látky v porovnání s množstvím značky navázané za nepřítomnosti testované látky ukazuje, že testovaná látka je aktivátorem interakce mezi Rad3/ATR a proteinem.

Další metoda používaná vynálezem pro identifikaci sloučenin, které ovlivňují vazbu mezi Rad3/ATR a interagujícím proteinem zahrnuje imobilizaci Rad3/ATR nebo jejich fragmentu na pevný povrch potažený (nebo nasycený) fluorescenční látkou, označení interagujícího proteinu sloučeninou schopnou excitace fluorescenční látky, inkubaci imobilizovaného Rad3/ATR se značeným interagujícím proteinem za přítomnosti nebo nepřítomnosti testované látky, detekci světelné emise produkované fluorescenční látkou a identifikaci modulující sloučeniny jako té testované látky, která ovlivní emisi světla fluorescenční látkou v porovnání s emisí světla fluorescenční látkou za nepřítomnosti testované látky. Případně může být s Rad3/ATR interagující protein imobilizovaný a v testu může být značený Rad3/ATR.

Ukázali jsme, že Rad3 vzájemně reaguje s ATR. Proto výše zmíněné metody mohou být také použity k identifikaci látek, které ovlivňují

interakci mezi Rad3 a ATR, kde interagující protein popsany v testovacích metodách je buď Rad3 nebo ATR.

Dále jsme ukázali, že Rad3 se může vázat mezi sebou, což by velmi pravděpodobně naznačovalo, že také ATR se mezi sebou může vázat. Proto výše zmíněné metody mohou být také použity k identifikaci látek, které ovlivňují interakci mezi Rad3-Rad3 a také interakce ATR-ATR.

Takovéto látky mohou být použity terapeuticky k rozrušení ATR-ATR interakcí a zvýšení citlivosti tumorových buněk k chemoterapii a/nebo radioterapii. Vynález tedy poskytuje také metodu pro vyhledávání vhodných substancí pro proti-rakovinovou terapii, která zahrnuje:

a) (i) inkubaci polypeptidu vynálezu s jiným polypeptidem vynálezu (který může být ten samý nebo jiný) za podmínek, které umožňují navázání prvního polypeptidu na druhý a tvorbu komplexu

(ii) inkubaci tohoto komplexu a testované látky
nebo

a) inkubaci polypeptidu vynálezu s jiným polypeptidem vynálezu (který může být ten samý nebo jiný) za podmínek, které umožní navázání prvního polypeptidů na druhý a tvorbu komplexu za přítomnosti testované látky

a

b) určení, jestli testovaná látka inhibuje vazbu prvního polypeptidu na druhý polypeptid a

c) výběr vhodné substance, která inhibuje vazbu prvního polypeptidu na druhý polypeptid

Je-li to možné, první a druhý polypeptid by měly být navzájem rozlišené. Například první polypeptid a druhý polypeptid mohou být oba ATR, nebo oba Rad3, nebo jeden může být ATR a jeden Rad3, nebo odvozeniny buď ATR nebo Rad3, které si uchovaly vazebnou aktivitu. Když jsou oba polypeptidy ATR nebo Rad3, měly by být v těchto testech použity pokud možno odlišitelné formy ATR/Rad3. Odlišeny mohou být například značením jednoho z polypeptidů. Jako značka se může použít radioaktivní značka, epitopové nebo jiná polypeptidové značky (tags), jako například glutathion-S-transferáza (glutathion-S-transferase). Například jedna forma Rad3 může mít jeden typ

epitopové značky a druhá forma by pak měla jiný typ, což by umožňovalo jejich imunologické rozlišení, takže navázání jednoho z nich k druhému může být zjištěné kvantitativně nebo kvalitativně. Preferovaná metoda zahrnuje imobilizaci prvního polypeptidu například na agarosový nosič (agarose beads) nebo na pevný povrch a druhý polypeptid může být volně v roztoku. Vazba je potom určena metodami popsány výše, které jsou odborníkům známé.

Vynález se také týká protilátek (např. monoklonálních a polyklonálních protilátek, jednořetězcových protilátek, chimerické protilátky, CDR-štěpové protilátky (CDR-grafted antibodies) a podobně) a jiných vazebných proteinů (jako jsou například ty identifikované pomocí testů popsanych výše), které jsou specifické pro Rad3 protein kinázovou doménu nebo Rad3/ATR lipid kinázovou doménu. Vazebné proteiny jsou užitečné zase pro purifikaci rekombinantních nebo přirozeně se vyskytujících enzymů a identifikaci buněk produkujících takovéto enzymy. Testy pro detekci a kvantifikaci proteinů v buňkách a v tekutinách mohou zahrnovat systémy s jednou protilátkou nebo více protilátkami v „sendvičovém“ formátu. Vazebné proteiny jsou také zřejmě účinné v ovlivňování (např. blokování, inhibice nebo stimulace) interakcí enzym/substrát nebo enzym/regulátor.

Modulátory Rad3/ATR mohou mít vliv na kinázovou aktivitu, její lokalizaci v buňkách a/nebo jejich interakci s členy kontrolních míst buněčného cyklu. Mezi selektivní modulátory mohou patřit například polypeptidy nebo peptidy, které se specificky váží k Rad3/ATR nebo nukleové kyselině Rad3/ATR a/nebo jiné nepeptidové sloučeniny (např. izolované nebo syntetické organické molekuly), které specificky reagují s Rad3/ATR nebo nukleovou kyselinou Rad3/ATR. Mutantní formy Rad3/ATR, které ovlivňují enzymatickou aktivitu nebo buněčnou lokalizaci nemutovaného Rad3/ATR, jsou také uvažovány v tomto vynálezu.

Kromě toho jako modulátory Rad3/ATR kinázové aktivity a Rad3/ATR interakcí mohou být testovány kombinační knihovny (combinatorial libraries), peptidy a kopie peptidů, definované chemické entity, oligonukleotidy, knihovny přírodních produktů (natural product libraries) s pomocí výše popsanych testů.

F. Terapeutické použití

Modulátory aktivity Rad3/ATR, včetně inhibitorů jejich lipid kinázové a protein kinázové aktivity, mohou být použity při protinádorové terapii. Zvláště mohou být tyto látky použity ke zvýšení citlivosti rakovinových buněk k chemoterapii a/nebo radioterapii na základě jejich schopnosti narušit regulační funkce Rad3/ATR v buněčném cyklu.

Vynález tedy zajišťuje použití sloučenin, které mění aktivitu Rad3/ATR a které jsou identifikovány na základě vyhledávacích pokusů popsaných výše, v metodách léčby rakoviny. V jednom případě jsou zmíněné látky schopné inhibice rad3/ATR lipid kinázové aktivity a/nebo Rad3 protein kinázové aktivity. V jiném případě jsou zmíněné látky schopné inhibovat interakci mezi samotným ATR a/nebo mezi ATR a jiným interagujícím proteinem, který může například tvořit část multimérického proteinového komplexu.

Je nutné uvědomit si, že termínem „sloučenina“ jsou v tomto kontextu myšleny také látky, které byly vybrány výše popsanými testy.

V typickém případě jsou sloučeniny upraveny pro klinickou aplikaci jejich smísením s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo rozpouštědlem. Vyvinuta mohou být například pro místní, mimostřevní (parenteral), intravenosní, nitrosvalový, podkožní, intraokulární nebo transdermální aplikaci. Přednostně je sloučenina používána ve formě vhodné pro injekční aplikaci. Je vhodná přímá injekce do pacientova tumoru, protože tak je možné koncentrovat terapeutický efekt na úrovni postižené tkáně. Sloučeniny proto mohou být kombinovány s jakýmkoliv nosičem, který je farmakologický akceptovatelný pro injekovatelnou formu, přednostně pro přímou injekci na místo ošetření. Farmaceutickým nosičem nebo ředící látkou mohou být například sterilní nebo isotonické roztoky.

Výše dávky sloučeniny může být upravena podle různých parametrů, zvláště podle použité sloučeniny, podle věku, váhy a stavu ošetřovaného pacienta, podle použitého způsobu aplikace, patologičnosti tumoru a požadovaného klinického režimu. Jako vodítko lze říci, že množství sloučeniny, použité k aplikaci injekčně je

přiměřené v dávce od 0,01 mg/kg do 30 mg/kg, přednostně pak od 0,1 mg/kg do 10 mg/kg.

Popsané stanovení způsobu aplikace a velikosti dávky je zamýšleno pouze jako vodítko, jelikož zručný praktik bude schopen stanovit snadno optimální způsob aplikace a dávku pro jakéhokoliv jednotlivého pacienta a jeho stav.

Aplikované sloučeniny mohou zahrnovat polypeptidy nebo nukleové kyseliny. Nukleové kyseliny mohou kódovat polypeptidy nebo mohou kódovat „antisense“ konstrukty, které inhibují expresi buněčných genů. Nukleové kyseliny mohou být například aplikovány lipofekcí (lipofection) nebo pomocí virových vektorů. Nukleová kyselina může tvořit například část virového vektoru jako je adenovirus. Pokud jsou použity virové vektory, je aplikovaná velikost dávky v zásadě mezi 10^4 a 10^{14} pfu/ml, přednostně 10^6 až 10^{10} pfu/ml. Termín pfu (z anglického plaque forming unit) odpovídá infekčnosti roztoku viru a je stanoven infekcí vhodné buněčné kultury a měřením (obecně po 48 hodinách) počtu skvrn infekčních buněk. Postupy pro stanovení titru pfu virového roztoku jsou dobře popsány v literatuře.

Těmito metodami může být ošetřen jakýkoliv typ rakoviny, například leukémie nebo pevné nádory jako jsou nádory prsu, vaječníků, plic, tračníku, pankreatu, varlat, jater, mozku, svalů a kostí. Přednostně pak nádorů, které mají normální funkci ATR.

Přehled obrázků na výkresech

Obr.1: Vztah mezi ATR, rad3, mei-41, MEC1, TEL1 a ATM

Celkové struktury ATR, Rad3, Mei-41, Mec1p, Tellp a ATM.

Legenda: otevřený čtvereček - doména Rad3, šrafovaná políčka - kinázová doména

Dendrogram založený na porovnání sekvencí (sequence alignments) vytvořený metodou Clustal (PAM250) s použitím softwaru DNASTar. Rad3/ESR1/mei-41/ATR jsou si vzájemně bližší než vůči ATM a TEL1. Sekvence rad3 a ATM jsou dostupné v databázi EMBL.

Příklady provedení vynálezu

Příklad1

Gen *rad3 S. pombe* je jeden ze šesti genů absolutně nezbytných pro strukturu kontrolních bodů (for the DNA structure checkpoints) u *S.pombe* (Al-Khodairy and Carr, 1992; Al-Khodairy et al., 1994). Sekvence reprezentující část genu *rad3* byla popsána Seatonem et al. (1992). Při pokusech objasnit strukturu tohoto genu z hlediska intronů a exonů jsme zjistili sekvenční anomálie na obou (5' a 3') koncích. Sekvenovali jsme celý gen (viz experimentální postupy) a zjistili, že *rad3* je schopný kódovat produkt dlouhý 2386 aminokyselin. C-koncová oblast obsahuje shodné sekvence (consensus sequences), typické pro podtřídu kináz známých jako lipidové kinázy, skupiny, jejíž zákládající člen (founder member) je p110 katalytická podjednotka PI3 kinázy (Hiles et al., 1992).

Bylo popsáno, že zkrácený klon *rad3*, postrádající amino-konec a kinázovou oblast, doplňuje (complement) genově narušený mutant *rad3* - mutant *rad3::pr3H1.0* (Jimenez et al., 1992). Takovýto poškozený mutant neodstraňuje potenciální kinázovou doménu. K objasnění role této domény jsme vytvořili neúčinného mutantu metodou záměny genu. Tento mutant má aminokyseliny 1477-2271 *rad3* včetně shodné kinázové domény nahrazeny *ura4⁺*. Tento kmen *rad3.d* má identické defekty kontrolního místa a citlivost k ozáření a hydroxymočovině jako mutant *rad3.136* (Nasim and Smmith, 1992) a také jako původní mutant *rad3::pr3H1.0* (Jimenez et al., 1992; Seaton et al., 1992) (data nejsou uvedena). Vytvořili jsme tři samostatné bodové mutanty s mutacemi v předpokládané kinázové doméně *rad3* a tyto mutanty jsme použili při experimentech se záměnou genů ke konstrukci kmenů s definovanými kinázovými neúčinnými (null) mutacemi. Všechny tři kmeny *rad3.D2230A*, *rad3.N2235K* a *rad3.D2249E* mají identické fenotypy jako neúčinný mutant *rad3.d* (data nejsou uvedena), což naznačuje, že je kinázová aktivita potřebná k funkci Rad3. Ve světle našich zjištění se nabízí jedno z vysvětlení výsledků Seaton et al. (1992) a Jimeneze et al. (1992) a to, že částečný klon může vykazovat intragenní komplementaci mezi zkráceným genem vytvořeným v plazmidu a částečnou genomickou delecí, která zachovává kinázovou funkci.

Takováto interpretace by byla v souladu s tím, že Rad3 působí jako dimer nebo multimer.

Jestliže byla neúčinná kinázová alela *rad3.D2249E* lehce „pře-exprimována“ v divokých typech buněk pod řízením modifikovaného promotoru *nmt1* (Maundrell, 1990), způsobilo to extrémní citlivost k ozáření, což bylo prokázáno proužkovým UV testem a působila jako dominantně negativní mutant (data nejsou uvedena). Jestliže byl stejný kinázový neúčinný konstrukt exprimován ve vyšších hladinách, inhiboval růst (data nejsou uvedena). Prohlídka buněk naznačila, že dělení probíhalo velmi pomalu a u menších buněk. Divoký typ buněk a buňky obsahující prázdný vektor se dělí při velikosti přibližně 15 mikronů, kdežto buňky s vyšší expresí *rad3* a *rad3.D2249E* se dělí při velikosti přibližně 11,2 mikronů (data nejsou uvedena). U *S. pombe* znamená toto většinou zrychlení mitózy.

Lidský homolog *rad3* - ATR

K identifikaci lidské formy *rad3* byla použita kombinace metod. Těmito metodami jsme naklonovali celou kódující oblast lidského genu (viz materiál a metody), který jsme nazvali ATR (z anglického *ataxia and rad related*). ATR kóduje protein skládající se z 2644 aminokyselin, který je o mnoho bližší produktu *rad3 S.pombe*, *ESR1 S.cerevisiae* (Kato and Ogawa, 1994) a genům *mei-41 D.melanogaster* (Hari et al., 1995) než lidskému proteinu ATM nebo proteinu Tell *S.cerevisiae* (Savitsky et al., 1995; Greenwell et al., 1995) a je pravděpodobné, že je to skutečný homolog *rad3*. *ESR1* je alelický k *mei-41/sad3* mutantům kontrolních bodů (Allen et al., 1994; Weinert et al., 1994), které mají ekvivalentní fenotyp jako *rad3*. ATR je méně příbuzný lidskému genu kontrolního bodu ATM, obsahujícímu na C konci pravděpodobně lipid kinázovou doménu a mající podobnou celkovou strukturu. Sekvenční porovnání jasně ukázala, že geny *rad3/ESR1 (MEC1/SAD3)/mei-41/ATR* jsou si vzájemně více příbuzné než jakýkoliv z nich s geny ATM či TEL1, a že ATM je více homologní s TEL1 (Obr.1).

Gen ATM je exprimován v široké škále tkání (Savitsky et al., 1995). U *S. cerevisiae* vykazuje *ESR1* v mitotických buňkách nízkou hladinu exprese, gen je však rychle indukován během meiózy I (Kato a

Ogawa, 1994). S použitím Northern blot analýz jsme ukázali, že ATR je také slabě exprimován v mnoha tkáních, ale že je daleko více exprimován ve varlatech (data nejsou uvedena). Jestliže platí, že proteiny ATR, Rad3 a Esrlp jsou si vzájemně více příbuzné než s proteinem ATM, pak vyšší exprese ATR ve varlatech je ve shodě s pozorováním, že Esrlp hraje roli při meiotické rekombinaci (Kato a Ogawa, 1994). S použitím FISH a PCR analýzy jsme lokalizovali ATR na chromozomu 3q22 - 3q25 (data nejsou uvedena). Tento region není asociován se známými syndromy se sklony k rakovině.

Pro další výzkum možnosti, že Rad3 působí jako multimer jsme vytvořili dva odlišné konstrukty se značkou (tag) plné délky rad3 v inducibilním vektoru založeném na pREP. V prvním z nich probíhá translace Rad3 se dvěma myc epitopovými značkami na N konci, kdežto ve druhém případě jsou tyto nahrazeny trojnásobnou HA epitopovou značkou. Jestliže jsou oba konstrukty exprimovány najednou v divokém typu buněk, je možné společně vysrážet Rad3 s HA značkami protilátkami specifickými proti myc a Rad3 s myc značkami protilátkami specifickými proti HA (data nejsou uvedena). To dokazuje že protein Rad3 je schopen *in vivo* asociace se sebou samým. Tyto výsledky jsou plně ve shodě s komplementačními daty Jimenez et al. (1992).

Ačkoliv gen ATR nemohl doplnit fenotyp mutantů rad3, zkoumali jsme schopnost ATR vytvářet proteinový komplex s Rad3 *S.pombe*, při expresi ATR a Rad3 *S.pombe* s myc značkou ve stejné kvasinkové buňce. S použitím protilátek proti ATR (které nesrážejí Rad3 *S.pombe*, viz materiál a metody) jsme byli schopni současně vysrážet kvasinkový protein. S pomocí specifických protilátek proti myc, které rozeznávají Rad3 *S.pombe*, jsme byli také schopni vysrážet lidský protein ATR (data nejsou uvedena). Tato data naznačují, že lidský a kvasinkový protein mohou tvořit heteromerní komplexy, což podporuje tvrzení založená na sekvenční podobnosti o blízkém funkčním vztahu mezi těmito homology.

Rad3 proteiny vykazují také kinázovou aktivitu

Zdá se, že kinázová aktivita proteinů Rad3 *in vivo* je nepostradatelná pro jejich funkci, což naznačovali mutační

experimenty. Tuto aktivitu jsme studovali detailněji. S použitím buněk *S.pombe rad3::ura4* exprimující *S.pombe* Rad3 s HA značkou jsme byli schopni detekovat významnou protein kinázovou aktivitu, která precipituje s HA specifickými protilátkami pouze v případě, že je Rad3 indukován a která není změněna následným ozářením (data nejsou uvedena). Tato aktivita, která je specifická pro Rad3 či kinázy precipituje společně s Rad3, zřejmě odráží fosforylaci samotného Rad3, jelikož významný proužek o molekulové hmotnosti okolo 200 kD, který je fosforylován, může být detekován pomocí HA protilátek technikou western blotu (data nejsou uvedena). Pokusy identifikovat vhodné *in vitro* substráty, jako např. základní protein myelinu (myelin basic protein), RP-A či několik purifikovaných proteinů kontrolních míst *S.pombe*, byly doposud neúspěšné. Jestliže je IP test na detekci kinázy *in vitro* prováděn s buňkami zvýšeně exprimujícími kinázově neúčinnou (kinase-null) D2249E verzi Rad3, je spojená kinázová aktivita, která precipituje s HA specifickými protilátkami, velmi snížena (data nejsou uvedena). Tento jev lze vysvětlit několika možnými způsoby. Měřená kinázová aktivita může odrážet přímo aktivitu Rad3. V tomto případě může zbytková aktivita pozorovaná i v případě nefunkčního Rad3 odrážet fakt, že nejsou neznámé případy, kdy ekvivalenty mutací D až E u jiných proteinových kináz produkovaly biologicky inertní proteiny se zbytkovou *in vitro* biochemickou aktivitou. Nebo může být kinázová aktivita, která fosforyluje Rad3 způsobena asociovanými proteiny a tyto proteiny mohou interagovat s D2249E mutantním proteinem s menší účinností.

Diskuze

Kontrolní místa drah kontrolujících postup buněčným cyklem, který následuje po poškození DNA nebo po zásahu v jednotlivých případech ze kterých se skládá buněčný cyklus, jsou značně důležité pro udržení genetické stability a mohou být považovány jako cesty, které potlačují vznik tumorů. Několik genů potlačujících vznik nádorů je těsně spjata s částí kontrolních cest (viz přehledná práce Hartwell a Kastan, 1994). Jsou to zvláště ty, které ovlivňují přechod z fáze G1 do fáze S a jsou tedy plně odpovědné za buněčný cyklus. Sbližování dvou kvasničných modelových systémů v otázce

kontrolních míst jasně naznačuje, že geny podílející se na těchto cestách jsou konzervované. Naše práce rozšířila tuto konzervaci na metazoické buňky a vysvětluje vztah mezi *rad3*, *ESR1* (*MEC1/SAD3*), *mei-41* a *ATM* genem.

V této práci jsme ukázali, že bezchybná sekvence genu *rad3* řadí jeho produkt do rodiny protein/lipid kináz vztahujících se k *ATM*. Zvýšená exprese u mutantu *rad3* (kinázově defektního) v *S.pombe* způsobí dominantně negativní fenotyp, což naznačuje, že Rad3 působí jako člen proteinového komplexu, jehož celistvost je nezbytná pro kontrolní funkci. To je v souladu se zjištěním, že všechny deleční mutanty *rad1*, *rad9*, *rad17*, *rad26* a *hus1* mají fenotypy nerozeznatelné od *rad3.d* (Sheldrick a Carr, 1993). Neočekávaný je fakt, že na rozdíl od zbylých kontrolních *rad* genů, vysoká úroveň zvýšené exprese divokých či mutantních *rad3* alel inhibuje buněčný růst a způsobuje, že dochází k mitóze buněk menší velikosti, což naznačuje předčasný vstup do mitózy. Tento drobný (*semi wee*) fenotyp není pozorován u neúčinných mutantů a může naznačovat interferenci s druhou cestou, jejíž funkce se překrývají s cestou Rad3 a působí inhibičně na mitózu. Kandidátem takové cesty je *ATM/TEL1* cesta, u které byly ukázány některé překrývající se funkce s *ESR1* (*MEC1/SAD1*) cestou (Morrow et al., 1995).

Struktura *ATM* je nejvíce příbuzná struktuře proteinu *Tellp*, který se podílí na údržbě délky telomery (Greenwell et al., 1995), ačkoliv se též zdá, že se funkce *ATM* vztahuje k produktům *Rad3/Esrlp/mei-41*. Po prvním objevu genu *ATM* a zjištění jeho sekvenční příbuznosti k *rad3/ESR1* genům a k *TEL1*, nebylo jasné, zdali se (jako je tomu v mnoha případech u kvasinek) gen duplikoval a oddělil v kvasinkách nebo zdali tyto dva kvasinkové proteiny popisují konzervované podrodiny těsně příbuzných genů. Důležitým objevem této práce je identifikace lidského genu *ATR*, který je úzce příbuzný genům *rad3/ESR1/mei-41*. To vymezuje dvě strukturně odlišné podrodiny protein/lipid kináz, vztahujících se ke kontrolním cestám, které jsou konzervovány v celé eukaryotické evoluci. Ačkoliv proteiny těchto dvou podrodin mohou mít některé vzájemně se překrývající funkce, kontrolují zřejmě rozdílné procesy. Tak například podrodina *rad3* kontroluje v kvasinkách všechna poškození

DNA v kontrolních bodech G1 a G2 a to jako odpověď na UV a radiační záření a dále také kontrolní bod S fáze, který zabraňuje mitóze následující po inhibici replikace (Al-Khodairy a Carr, 1992, Allen et al., 1994, Weinert et al., 1994). Naproti tomu A-T buňky vykazují nenormální reakce na úzce specifickou skupinu látek poškozujících DNA včetně ionizující radiace, bleomycinu a neocarzinostatinu. Tyto látky vyvolávají zlomy pramene DNA jako následek radikálního napadení. Reakce na UV a většinu chemických karcinogenů je normální, stejně jako reakce na inhibici syntézy DNA. Je možné, že některé či všechny zbývající kontrolní body poškození DNA a kontrolní body S fáze jsou kontrolovány ATR.

Experimentální postupy

Kmeny, plasmidy a media

V práci Gutz et al. (1974) jsou popsány standardní genetické techniky, růstové podmínky a media pro *S.pombe*. Kmeny sp011 *S.pombe* (ura4.D18, leu1.32, ade6.704 h) jsou popsány v práci Murray et al., 1992. Plasmid pSUB41 byl dar S.Subramani (Seaton et al., 1992).

Klonování *rad3 S.pombe*

Fragment *Kpn1* dlouhý 4.0 kb byl oddělen od pSUB41 a sekvenován v obou směrech tak, aby byla získána 5' sekvence *rad3*. Klon 3' byl identifikován v genomové knihovně hybridizací kolon (Babet et al., 1992) s použitím 3' sondy dlouhé 1 kb odvozené od publikované sekvence *rad3*. Poté byl tento klon sekvenován v obou směrech. Tímto způsobem byla určena úplná sekvence genu *rad3*.

"Null" (nulový) a "kinase dead" (kinázově mrtví) mutanti *rad3*

S použitím metodik popsaných v práci Barbet et al., (1992) byl vytvořen konstrukt *rad3*, v kterém bylo 794 aminokyselin mezi aminokyselinami 1477 a 2271 (zahrnující kinázovou doménu) nahrazeno genem *ura4+*. Lineární fragment tohoto konstruktu byl použit k transformaci sp011 k uracil prototropu (to uracil prototropy). Integrace jediné kopi na lokusu *rad3* byla v takto vytvořeném kontrolována Southernovým přenosem. K vytvoření místně (site)

specifických kinázových null mutací byl *Bam*HI-*Sal*I fragment *rad3* dlouhý 3,01 kb na C konci mutován: A:GTTTTCGCCATGGCGCGCTCCCAAACCCAA

B: TTCATCAAACAATATCTTTTCGCCATGGCG

C: CAAAAAGACAGTTGAATTCGACATGGATAG

s cílem vložit do kinasové domény mutace D2230A, N2235K nebo D2249E. Analogické změny byly již použity dříve při analýze PI3 kinázy *VPS34 S.cerevisiae* (Schu et al., 1993). Tyto fragmenty byly poté použity k transformaci *radf3.d* null mutanta a nahrazení genu selektované jejich schopností růst na mediích obsahujících FOA (Grimm et al., 1988). Všechny linie byly kontrolovány Southernovým přenosem. Expresní konstrukty plné délky *rad3.D2230A* byly vytvořeny v pREP1 a pREP41 (Maundrell, 1990) standardním subklonováním následujícím po vnesení *Nde*I místa na ATG a vyjmutí tří interních míst *Nde*I.

Proužkový test citlivosti k UV záření

Expres z REP1 (vysoká) a REP41 (střední) byla indukována nedostatkem thiaminu po 18 hodin před nanesením na misky. Misky byly ozářeny snižujícími se dávkami UV záření od 0 do 300 Jm⁻² podle nastavení na Stratagene Stratalinker.

Klonování a exprese ATR

K izolaci vhodné sondy pro identifikaci cDNA korespondující s lidským homologem *rad3* byly navrženy degenerované oligonukleotidy proti aminokyselinám LGLGDRH (5' oligo; oDH18) a HVDF[D/N]C (3' oligo; oDH-16) Rad3/Esrlp. Inosin byl inkorporován na pozici čtyřnásobné degenerace a primery byly zakončeny *Bam*HI (oDH18) a *Eco*RI (oDH16) pro usnadnění klonování. Sekvenční analýza DNA produktu PCR dlouhého přibližně 100 bp, získaného amplifikací cDNA z periférních krevních leukocytů, ukázala významné shody s *NEC/rad3*. Tato sekvence byla použita k syntéze nedegenerovaného primeru (oDH-23; GACGCAGAATTCACCGTCAAAGAATCAAAGAG) pro PCR s dalším degenerovaným primerem (oDH17) navrženým proti aminokyselinové sekvenci KFPP[I/V][L/F]Y[Q/E]WF Rad3/Esrlp. 174 párů bází dlouhý produkt této reakce byl použit přímo k prozkoumání cDNA knihovny

makrofága. Byly izolovány čtyři pozitivní klony (největší z nich byl cca 3 kb velký).

Souběžně byly prohledávány databáze pomocí genu *rad3 S.pombe* plné délky. Toto prohledávání získalo z databáze EMBL klon lidské cDNA - HSAAADPDG - potenciálního homologu *rad3* (jestliže byl povolen jeden posun čtecího rámce pro 233 bp sekvenci). Tato sekvence velká 233 bp je obsažena v klonu o velikosti 1,6 kb obdrženém od Dr.N.Affara, Human Molecular Genetics Group, Cambridge University, UK. Celý klon (1,6 kb) byl sekvenován a leží uvnitř cDNA klonů identifikovaných na základě degenerované PCR a zkoumání knihoven. Pro identifikaci celého genu byla provedena RACE PCR s cDNA odvozené z placentální a thymové mRNA s použitím instrukcí poskytovaných s Clontech Marathon Kit. Genově specifické markery byly odvozené z cDNA klonů. Z těchto experimentů byla sestavena sekvence cDNA o velikosti 8239 bp s interními ORF (2644 aminokyselin), 79 bp 5' nekódující oblasti, 194 bp 3' nekódujícím regionem a polyA⁻ koncem. Část této sekvence byla stanovena pouze pomocí PCR. K vyloučení chyb byly sekvenovány klony z minimálně třech nezávislých PCR reakcí v obou směrech.

233 párů bází dlouhá sekvence odpovídá sekvenci nukleotidů 6809 až 7042 (celkem 234 nukleotidů) Seq. ID No.1 s výjimkou delece jedné báze na pozici 6942. Tato sekvence kóduje aminokyseliny 2244 až 2320 Seq.ID No.2

Sekvence 1,6 kb dlouhého inzertu koresponduje s nukleotidy 5725 až 7104 (celkem 1353 nukleotidů) Seq. ID No.1 a kóduje aminokyseliny 1892 až 2340 Seq.ID No.2.

Northen blot hybridizace: 1,3 kb produkt PCR byl amplifikován v přítomnosti ³²P-dCTP s použitím primerů 279-3 (TGGATGATGACAGCTGTGTC) a 279-6 (TG TAGTCGCCTGCTCAATGTC). Nylonová membrána obsahující 2 µg polyA⁺ RNA (frakcionované dle velikosti) z kolekce zdrojů lidských tkání (Clontech Laboratories) byla hybridizována podle doporučení výrobce s výjimkou posledního promytí, které bylo provedeno při 55°C (a ne při 50°C) k minimalizaci možnosti křížové hybridizace s podobnou sekvencí.

Mapování ATR

Gen ATR jsme lokalizovali na chromozomu 3 kombinací metod založených na fluorescenční hybridizaci *in situ* a polymerázové řetězové reakci (PCR). FISH analýza s použitím cDNA klonu identifikovala gen ATR na chromozom 3, přibližně na pozici q22-23. PCR analýza rovněž identifikovala gen ATR na chromozomu 3. Dva primery (oATR23: GACGCAGAATTCACCAGCTAAAGAATCAAAGAG a oATR26: TGGTTTCTGAGAACATTCCTGA), které amplifikují fragment (257 bp) genu ATR, byly použity na DNA získané z hybridních somatických buněk (člověk/hlodavec) obsahujících různé skupiny lidských chromozomů dostupných v NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository (Drwina et al., 1993). K sublokalizaci ATR na specifickou oblast chromozomu 3 bylo použito PCR se stejnými primery. Templaty pro tyto amplifikace představovaly vzorky DNA pacientů se zkráceními na chromozomu 3 (Leach et al., 1994).

Imunoprecipitace (IP) a stanovení kinasové aktivity s Rad3

Ke komplementačním studiím byly geny *rad3 S.pombe* a lidského ATR klonovány do expresního vektoru pREP41. K označení proteinů byly použity verze vektoru obsahující uvnitř rámce N-koncové tag sekvenční - dvojitý myc nebo trojitý HA tag (Griffiths et al., 1995). Označené proteiny byly exprimovány pěstováním v růstových médiích neobsahujících thiamin (Maundrell, 1990). Buňky kvasinek lysovaly v lysovacím pufru (25mM Tris.Cl pH 7,5, 60mM B-glycerofosfát, 0,1mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 50mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM NaF, 1mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), 5µg/ml leupeptin, 5µg/ml aprotinin, 1 mM DTT) po přidavku skleněných kuliček a následně dvouminutové demembrací. Při imunoprecipitaci bylo 300µg celkového proteinového extraktu inkubováno při 4°C s vhodnou protilátkou po 30 minut. Imunokomplexy se srážely po smíchání s kuličkami s navázaným proteinem G po dalších 30 minut při 4°C. Při stanovení kinázové aktivity byly imunokomplexy promyty čtyřikrát lysovacím pufrem a jednou kinázovým pufrem (25 mM Hepes pH 7,7, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 2% glycerol, 1 mM DTT). Poté byly inkubovány v kinázovém pufru s 10 µM ATP (50 Ci/mmol) po dobu

15 minut při 30°C. Reakce byla zastavena přidavkem 20 μ l 2X SDS vzorkového pufru. Vzorky byly dále rozděleny na 6% polyakrylamidovém gelu. IP Rad3 obsahovaly několik fosforylovaných produktů, včetně jednoho, který postupoval společně se samotným proteinem Rad3 při westernové analýze.

Použitá literatura

- Al-Khodairy, and Carr, A.M. (1992). DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. 11, 1343-1350
- Al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J.F., Lehmann, A.R. and Carr, A.M. (1994). Identification and characterization of new elements involved in checkpoints and feedback controls in fission yeast. Mol. Biol. Cell 5, 147 - 160
- Allen, J.B., Zhou, Z., Siede, W., Friedberg, E.C. and Elledge, S.J. (1994). The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. Genes Dev. 8, 2416 - 2428
- Barbet, N.C., Muriel, W.J., and Carr, A.M. (1992) Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. Gene 144, 59 - 66
- Beamish, H. and Lavin, M.F. (1994). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. Int.J.Radiat. Biol. J. Radiat. Biol. 65, 175-184
- Carr, A.M. and Hoekstra, M.F. (1995) The Cellular Responses to DNA Damage. Trends in Cell Biology 5, 32 - 40.
- Chien et al., (1991) Proc. Natl. Acad Sci USA 88, 9578-9582
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P.J. (1995) Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. Cell, (in press).
- Drwinga, H.L., Tojia, L.H., Kim, C.H., Greene, A.E., and Mulivor, R.A. (1993). NIGMS Human/Rodent Somatic Cell Hybrid Mapping Panels 1 and 2. Genomics 16:311-314.

- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parson, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 75, 817-825
- Enoch, T., Carr, A.M. and Nurse, P. (1992). Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA-replication. *Genes Dev.* 6, 2035-2046.
- Greenwell, P.W., Kronmal, S.L., Porter, S.E., Gassenhuber, J., Obermaier, B. and Petes, T.D. (1995) TEL 1, a gene involved in controlling telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia (ATM) gene. *Cell* submitted
- Grinmm, C., Kholi, J. Murray, J.M. and Maundrell, K. (1988) Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe*: a system for gene disruption and replacement using the *ura4* gene as a selectable marker. *Mol. Gen. Genet.* 215, 81-86.
- Gutz, H., Heslot, H. Leupold, U. and Loprieno, N. (1974), In "Handbook of Genetics", King R. C., Ed., Plenum Press, New York, Vol. 1, 395-446.
- Hari, K.L., Santerre, A., Sekelsky, J.J., McKim, K.S., Boyd, J.B. and Hawley, R.S. (1995) The mei-4 1 gene of *Drosophila melanogaster* is functionally homologous to the human ataxia telangiect
- Harper, J.W., Adami, G., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The 21 kD Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Hartwell, L.H., and Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and Cancer. *Science* 266, 1821-1828.
- Hiles, LD., Otsu, M., Yolinia, S., Fry, M.J., Gout, L, Dhand, R, Panayotou, G., Ruin Larrea., F., Thompson, A., Totty, N.F., Hsuan, J.J., Courtneidge, S.A., Parker, P.J. and Waterfield M.D. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110kd catalytic subunit. *Cell* 70, 419-429.
- Jimenez, G., Yucel, J., Rowley, R and Subramani S. (1992) 'The rad3+ gene of *Schizosaccharomyces pombe* is involved in multiple

checkpoint functions and in DNA repair. Proc Natl. Acad. Sci. USA 87, 4952-4956

Kato, R. and Ogawa, H. (1994) An essential gene, *ESR1*, is required for mitotic cell growth, DNA repair and Meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 22, 3104-3112.

Lamb, J.R., Petit-Frere, C., Broughton, B.C., Leitmann, A.R and Green, M.H.L. (1989) Inhibition of DNA replication by ionizing radiation is mediated by a trans acting factor. Int. J. Radiat. Biol. 56, 125-130.

Leach, R.L., Chine, R., Reus, B.E., Hayes, S., Schantz, L., Dubois, B., Overhauser, J., Ballabio, A., Drabkin, H., Lewis, B.T., Mendgen, G., and Naylor, S.L. (1994) Regional Localisation of 188 Sequence Tagged Sites on a Somatic Cell Hybrid Mapping Panel for Human Chromosome 3 Genomics 24, 549-556

Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine: J. Biol. Chem. 265. 10857-10864.

Morrow, D.M., Tagle, D.A., Shiloh, Y., Collins F.S. and Hieter, P. (1995) *HAT1/TEL1*, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene *MEC1/ESR1*. Cell submitted.

Murray, J.M., Doe, C. Schenk, P. Carr, A.M., Lehmann, A.R and Watts, F.Z. (1992) Cloning and characterization of the *S. pombe rad15* gene, a homologue to the *S cerevisiae RAD3* and human *ERCC2* genes Nucleic Acids Res. 20, 2673-2678

Nasim, A. and Smith, B.P. (1975) Genetic control of radiation sensitivity in *Schizosaccharomyces pombe*. Genetics 79, 573-582.

Painter, R.B. and Young, B.R (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77, 7315-7317

Rowley, R, Subratnani, S. and Young, P.G. (1992). Checkpoint controls in *Schizosaccharomyces pombe*, *rad1*. EMBO J. 11. 1335-1342.

Savitsky, K., Bar-Shim, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R.,

- Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavine, M.F., Jaspers, N.G.J., Taylor, M.R, Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S. and Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 286, 1749-1753.
- Seaton, B.L., Yucel, J., Sunnerhagen P. and Subrannani, 5. (1992). Isolation and characterisation of the *Schizosaccharomyces pombe rad3* gene which is involved in the DNA damage and DNA synthesis checkpoints. *Gene* 119, 83-89.
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D. and Emr. S.D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88-91.
- Sheldrick, K.S. and Carr. A.M. (1993). Feedback controls and G2 checkpoints, fission yeast as a model system. *BioEssays* 15, 775-782.
- Walworth, N., Davey, S, and Beach, D. (1993). Fission yeast *chk1* protein kinase links the *rad* checkpoint pathway to *cdc2*. *Nature* 363, 368-371.
- Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241, 317-322.
- Weinert, T.A., Kiser, G.L. Hartwell, L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* 8, 652-665.

09.09.99

7V656-98

64480

S E Z N A M S E K V E N C Í

<110> Carr, Antony M.

<120> Geny kontrolující buněčný cyklus

<130> 27866/34132

<140> PCT/GB96/02197

<141> 1996-09-06

<150> GB 9518220.0

<151> 1995-09-06

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 8239

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (80)..(8011)

<400> 1

```

gcgctcttcc ggcagcggtta cgtttgagaga cgccgggaac ccgcgttggc gtggttgact 60
agtgccctcgc agcctcagc atg ggg gaa cat ggc ctg gag ctg gct tcc atg 112
      Met Gly Glu His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Met
              1              5              10

atc ccc gcc ctg cgg gag ctg ggc agt gcc aca cca gag gaa tat aat 160
Ile Pro Ala Leu Arg Glu Leu Gly Ser Ala Thr Pro Glu Glu Tyr Asn
              15              20              25

aca gtt gta cag aag cca aga caa att ctg tgt caa ttc att gac cgg 208
Thr Val Val Gln Lys Pro Arg Gln Ile Leu Cys Gln Phe Ile Asp Arg
              30              35              40

ata ctt aca gat gta aat gtt gtt gct gta gaa ctt gta aag aaa act 256
Ile Leu Thr Asp Val Asn Val Val Ala Val Glu Leu Val Lys Lys Thr
              45              50              55

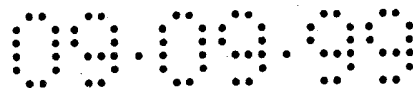
gac tct cag cca acc tcc gtg atg ttg ctt gat ttc atc cag cat atc 304
Asp Ser Gln Pro Thr Ser Val Met Leu Leu Asp Phe Ile Gln His Ile
              60              65              70              75

atg aaa tcc tcc cca ctt atg ttt gta aat gtg agt gga agc cat gag 352
Met Lys Ser Ser Pro Leu Met Phe Val Asn Val Ser Gly Ser His Glu
              80              85              90

cgc aaa ggc agt tgt att gaa ttc agt aat tgg atc ata acg aga ctt 400
Arg Lys Gly Ser Cys Ile Glu Phe Ser Asn Trp Ile Ile Thr Arg Leu
              95              100              105

```

ctg	cg	att	gca	gca	act	ccc	tcc	tgt	cat	ttg	tta	cac	aag	aaa	atc	448
Leu	Arg	Ile	Ala	Ala	Thr	Pro	Ser	Cys	His	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Ile	
		110					115					120				
tgt	gaa	gtc	atc	tgt	tca	tta	tta	ttt	ctt	ttt	aaa	agc	aag	agt	cct	496
Cys	Glu	Val	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Lys	Ser	Lys	Ser	Pro	
	125					130					135					
gct	att	ttt	ggg	gta	ctc	aca	aaa	gaa	tta	tta	caa	ctt	ttt	gaa	gac	544
Ala	Ile	Phe	Gly	Val	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	
140					145					150					155	
ttg	gtt	tac	ctc	cat	aga	aga	aat	gtg	atg	ggg	cat	gct	gtg	gaa	tgg	592
Leu	Val	Tyr	Leu	His	Arg	Arg	Asn	Val	Met	Gly	His	Ala	Val	Glu	Trp	
			160					165						170		
cca	gtg	gtc	atg	agc	cga	ttt	tta	agt	caa	tta	gat	gaa	cac	atg	gga	640
Pro	Val	Val	Met	Ser	Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Leu	Asp	Glu	His	Met	Gly	
			175					180					185			
tat	tta	caa	tca	gct	cct	ttg	cag	ttg	atg	agt	atg	caa	aat	tta	gaa	688
Tyr	Leu	Gln	Ser	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Met	Ser	Met	Gln	Asn	Leu	Glu	
	190					195						200				
ttt	att	gaa	gtc	act	tta	tta	atg	gtt	ctt	act	cgt	att	att	gca	att	736
Phe	Ile	Glu	Val	Thr	Leu	Leu	Met	Val	Leu	Thr	Arg	Ile	Ile	Ala	Ile	
	205				210						215					
gtg	ttt	ttt	aga	agg	caa	gaa	ctc	tta	ctt	tgg	cag	ata	ggg	tgt	gtt	784
Val	Phe	Phe	Arg	Arg	Gln	Glu	Leu	Leu	Leu	Trp	Gln	Ile	Gly	Cys	Val	
220					225					230					235	
ctg	cta	gag	tat	ggg	agt	cca	aaa	att	aaa	tcc	cta	gca	att	agc	ttt	832
Leu	Leu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Phe	
			240					245						250		
tta	aca	gaa	ctt	ttt	cag	ctt	gga	gga	cta	cca	gca	caa	cca	gct	agc	880
Leu	Thr	Glu	Leu	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	
			255				260						265			
act	ttt	ttc	agc	tca	ttt	ttg	gaa	tta	tta	aaa	cac	ctt	gta	gaa	atg	928
Thr	Phe	Phe	Ser	Ser	Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Leu	Val	Glu	Met	
		270				275						280				
gat	act	gac	caa	ttg	aaa	ctc	tat	gaa	gag	cca	tta	tca	aag	ctg	ata	976
Asp	Thr	Asp	Gln	Leu	Lys	Leu	Tyr	Glu	Glu	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	Ile	
	285					290					295					
aag	aca	cta	ttt	ccc	ttt	gaa	gca	gaa	gct	tat	aga	aat	att	gaa	cct	1024
Lys	Thr	Leu	Phe	Pro	Phe	Glu	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Ile	Glu	Pro	
300					305					310					315	
gtc	tat	tta	aat	atg	ctg	ctg	gaa	aaa	ctc	tgt	gtc	atg	ttt	gaa	gac	1072
Val	Tyr	Leu	Asn	Met	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Cys	Val	Met	Phe	Glu	Asp	
				320					325					330		



ggt gtg ctc atg cgg ctt aag tct gat ttg cta aaa gca gct ttg tgc	1120
Gly Val Leu Met Arg Leu Lys Ser Asp Leu Leu Lys Ala Ala Leu Cys	
335 340 345	
cat tta ctg cag tat ttc ctt aaa ttt gtg cca gct ggg tat gaa tct	1168
His Leu Leu Gln Tyr Phe Leu Lys Phe Val Pro Ala Gly Tyr Glu Ser	
350 355 360	
gct tta caa gtc agg aag gtc tat gtg aga aat att tgt aaa gct ctt	1216
Ala Leu Gln Val Arg Lys Val Tyr Val Arg Asn Ile Cys Lys Ala Leu	
365 370 375	
ttg gat gtg ctt gga att gag gta gat gca gag tac ttg ttg ggc cca	1264
Leu Asp Val Leu Gly Ile Glu Val Asp Ala Glu Tyr Leu Leu Gly Pro	
380 385 390 395	
ctt tat gca gct ttg aaa atg gaa agt atg gaa atc att gag gag att	1312
Leu Tyr Ala Ala Leu Lys Met Glu Ser Met Glu Ile Ile Glu Glu Ile	
400 405 410	
caa tgc caa act caa cag gaa aac ctc agc agt aat agt gat gga ata	1360
Gln Cys Gln Thr Gln Gln Glu Asn Leu Ser Ser Asn Ser Asp Gly Ile	
415 420 425	
tca ccc aaa agg cgt cgt ctc agc tcg tct cta aac cct tct aaa aga	1408
Ser Pro Lys Arg Arg Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asn Pro Ser Lys Arg	
430 435 440	
gca cca aaa cag act gag gaa att aaa cat gtg gac atg aac caa aag	1456
Ala Pro Lys Gln Thr Glu Glu Ile Lys His Val Asp Met Asn Gln Lys	
445 450 455	
agc ata tta tgg agt gca ctg aaa cag aaa gct gaa tcc ctt cag att	1504
Ser Ile Leu Trp Ser Ala Leu Lys Gln Lys Ala Glu Ser Leu Gln Ile	
460 465 470 475	
tcc ctt gaa tac agt ggc cta aag aat cct gtt att gag atg tta gaa	1552
Ser Leu Glu Tyr Ser Gly Leu Lys Asn Pro Val Ile Glu Met Leu Glu	
480 485 490	
gga att gct gtt gtc tta caa ctg act gct ctg tgt act gtt cat tgt	1600
Gly Ile Ala Val Val Leu Gln Leu Thr Ala Leu Cys Thr Val His Cys	
495 500 505	
tct cat caa aac atg aac tgc cgt act ttc aag gac tgt caa cat aaa	1648
Ser His Gln Asn Met Asn Cys Arg Thr Phe Lys Asp Cys Gln His Lys	
510 515 520	
tcc aag aag aaa cct tct gta gtg ata act tgg atg tca ttg gat ttt	1696
Ser Lys Lys Lys Pro Ser Val Val Ile Thr Trp Met Ser Leu Asp Phe	
525 530 535	
tac aca aaa gtg ctt aag agc tgt aga agt ttg tta gaa tct gtt cag	1744
Tyr Thr Lys Val Leu Lys Ser Cys Arg Ser Leu Leu Glu Ser Val Gln	
540 545 550 555	

aaa ctg gac ctg gag gca acc att gat aag gtg gtg aaa att tat gat	1792
Lys Leu Asp Leu Glu Ala Thr Ile Asp Lys Val Val Lys Ile Tyr Asp	
560 565 570	
gct ttg att tat atg caa gta aac agt tca ttt gaa gat cat atc ctg	1840
Ala Leu Ile Tyr Met Gln Val Asn Ser Ser Phe Glu Asp His Ile Leu	
575 580 585	
gaa gat tta tgt ggt atg ctc tca ctt cca tgg att tat tcc cat tct	1888
Glu Asp Leu Cys Gly Met Leu Ser Leu Pro Trp Ile Tyr Ser His Ser	
590 595 600	
gat gat ggc tgt tta aag ttg acc aca ttt gcc gct aat ctt cta aca	1936
Asp Asp Gly Cys Leu Lys Leu Thr Thr Phe Ala Ala Asn Leu Leu Thr	
605 610 615	
tta agc tgt agg att tca gat agc tat tca cca cag gca caa tca cga	1984
Leu Ser Cys Arg Ile Ser Asp Ser Tyr Ser Pro Gln Ala Gln Ser Arg	
620 625 630 635	
tgt gtg ttt ctt ctg act ctg ttt cca aga aga ata ttc ctt gag tgg	2032
Cys Val Phe Leu Leu Thr Leu Phe Pro Arg Arg Ile Phe Leu Glu Trp	
640 645 650	
aga aca gca gtt tac aac tgg gcc ctg cag agc tcc cat gaa gta atc	2080
Arg Thr Ala Val Tyr Asn Trp Ala Leu Gln Ser Ser His Glu Val Ile	
655 660 665	
cgg gct agt tgt gtt agt gga ttt ttt atc tta ttg cag cag cag aat	2128
Arg Ala Ser Cys Val Ser Gly Phe Phe Ile Leu Leu Gln Gln Gln Asn	
670 675 680	
tct tgt aac aga gtt ccc aag att ctt ata gat aaa gtc aaa gat gat	2176
Ser Cys Asn Arg Val Pro Lys Ile Leu Ile Asp Lys Val Lys Asp Asp	
685 690 695	
tct gac att gtc aag aaa gaa ttt gct tct ata ctt ggt caa ctt gtc	2224
Ser Asp Ile Val Lys Lys Glu Phe Ala Ser Ile Leu Gly Gln Leu Val	
700 705 710 715	
tgt act ctt cac ggc atg ttt tat ctg aca agt tct tta aca gaa cct	2272
Cys Thr Leu His Gly Met Phe Tyr Leu Thr Ser Ser Leu Thr Glu Pro	
720 725 730	
ttc tct gaa cac gga cat gtg gac ctc ttc tgt agg aac ttg aaa gcc	2320
Phe Ser Glu His Gly His Val Asp Leu Phe Cys Arg Asn Leu Lys Ala	
735 740 745	
act tct caa cat gaa tgt tca tct tct caa cta aaa gct tct gtc tgc	2368
Thr Ser Gln His Glu Cys Ser Ser Ser Gln Leu Lys Ala Ser Val Cys	
750 755 760	
aag cca ttc ctt ttc cta ctg aaa aaa aaa ata cct agt cca gta aaa	2416
Lys Pro Phe Leu Phe Leu Leu Lys Lys Lys Ile Pro Ser Pro Val Lys	
765 770 775	

ctt gct ttc ata gat aat cta cat cat ctt tgt aag cat ctt gat ttt	2464
Leu Ala Phe Ile Asp Asn Leu His His Leu Cys Lys His Leu Asp Phe	
780 785 790 795	
aga gaa gat gaa aca gat gta aaa gca gtt ctt gga act tta tta aat	2512
Arg Glu Asp Glu Thr Asp Val Lys Ala Val Leu Gly Thr Leu Leu Asn	
800 805 810	
tta atg gaa gat cca gac aaa gat gtt aga gtg gct ttt agt gga aat	2560
Leu Met Glu Asp Pro Asp Lys Asp Val Arg Val Ala Phe Ser Gly Asn	
815 820 825	
atc aag cac ata ttg gaa tcc ttg gac tct gaa gat gga ttt ata aag	2608
Ile Lys His Ile Leu Glu Ser Leu Asp Ser Glu Asp Gly Phe Ile Lys	
830 835 840	
gag ctt ttt gtc tta aga atg aag gaa gca tat aca cat gcc caa ata	2656
Glu Leu Phe Val Leu Arg Met Lys Glu Ala Tyr Thr His Ala Gln Ile	
845 850 855	
tca aga aat aat gag ctg aag gat acc ttg att ctt aca aca ggg gat	2704
Ser Arg Asn Asn Glu Leu Lys Asp Thr Leu Ile Leu Thr Thr Gly Asp	
860 865 870 875	
att gga agg gcc gca aaa gga gat ttg gta cca ttt gca ctc tta cac	2752
Ile Gly Arg Ala Ala Lys Gly Asp Leu Val Pro Phe Ala Leu Leu His	
880 885 890	
tta ttg cat tgt ttg tta tcc aag tca gca tct gtc tct gga gca gca	2800
Leu Leu His Cys Leu Leu Ser Lys Ser Ala Ser Val Ser Gly Ala Ala	
895 900 905	
tac aca gaa att aga gct ctg gtt gca gct aaa agt gtt aaa ctg caa	2848
Tyr Thr Glu Ile Arg Ala Leu Val Ala Ala Lys Ser Val Lys Leu Gln	
910 915 920	
agt ttt ttc agc cag tat aag aaa ccc atc tgt cag ttt ttg gta gaa	2896
Ser Phe Phe Ser Gln Tyr Lys Lys Pro Ile Cys Gln Phe Leu Val Glu	
925 930 935	
tcc ctt cac tct agt cag atg aca gca ctt ccg aat act cca tgc cag	2944
Ser Leu His Ser Ser Gln Met Thr Ala Leu Pro Asn Thr Pro Cys Gln	
940 945 950 955	
aat gct gac gtg cga aaa caa gat gtg gct cac cag aga gaa atg gct	2992
Asn Ala Asp Val Arg Lys Gln Asp Val Ala His Gln Arg Glu Met Ala	
960 965 970	
tta aat acg ttg tct gaa att gcc aac gtt ttc gac ttt cct gat ctt	3040
Leu Asn Thr Leu Ser Glu Ile Ala Asn Val Phe Asp Phe Pro Asp Leu	
975 980 985	
aat cgt ttt ctt act agg aca tta caa gtt cta cta cct gat ctt gct	3088
Asn Arg Phe Leu Thr Arg Thr Leu Gln Val Leu Leu Pro Asp Leu Ala	
990 995 1000	

gcc aaa gca agc cct gca gct tct gct ctc att cga act tta gga aaa 3136
Ala Lys Ala Ser Pro Ala Ala Ser Ala Leu Ile Arg Thr Leu Gly Lys
1005 1010 1015

caa tta aat gtc aat cgt aga gag att tta ata aac aac ttc aaa tat 3184
Gln Leu Asn Val Asn Arg Arg Glu Ile Leu Ile Asn Asn Phe Lys Tyr
1020 1025 1030 1035

att ttt tct cat ttg gtc tgt tct tgt tcc aaa gat gaa tta gaa cgt 3232
Ile Phe Ser His Leu Val Cys Ser Cys Ser Lys Asp Glu Leu Glu Arg
1040 1045 1050

gcc ctt cat tat ctg aag aat gaa aca gaa att gaa ctg ggg agc ctg 3280
Ala Leu His Tyr Leu Lys Asn Glu Thr Glu Ile Glu Leu Gly Ser Leu
1055 1060 1065

ttg aga caa gat ttc caa gga ttg cat aat gaa tta ttg ctg cgt att 3328
Leu Arg Gln Asp Phe Gln Gly Leu His Asn Glu Leu Leu Leu Arg Ile
1070 1075 1080

gga gaa cac tat caa cag gtt ttt aat ggt ttg tca ata ctt gcc tca 3376
Gly Glu His Tyr Gln Gln Val Phe Asn Gly Leu Ser Ile Leu Ala Ser
1085 1090 1095

ttt gca tcc agt gat gat cca tat cag ggc ccg aga gat atc ata tca 3424
Phe Ala Ser Ser Asp Asp Pro Tyr Gln Gly Pro Arg Asp Ile Ile Ser
1100 1105 1110 1115

cct gaa ctg atg gct gat tat tta caa ccc aaa ttg ttg ggc att ttg 3472
Pro Glu Leu Met Ala Asp Tyr Leu Gln Pro Lys Leu Leu Gly Ile Leu
1120 1125 1130

gct ttt ttt aac atg cag tta ctg agc tct agt gtt ggc att gaa gat 3520
Ala Phe Phe Asn Met Gln Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Glu Asp
1135 1140 1145

aag aaa atg gcc ttg aac agt ttg atg tct ttg atg aag tta atg gga 3568
Lys Lys Met Ala Leu Asn Ser Leu Met Ser Leu Met Lys Leu Met Gly
1150 1155 1160

ccc aaa cat gtc agt tct gtg agg gtg aag atg atg acc aca ctg aga 3616
Pro Lys His Val Ser Ser Val Arg Val Lys Met Met Thr Thr Leu Arg
1165 1170 1175

act ggc ctt cga ttc aag gat gat ttt cct gaa ttg tgt tgc aga gct 3664
Thr Gly Leu Arg Phe Lys Asp Asp Phe Pro Glu Leu Cys Cys Arg Ala
1180 1185 1190 1195

tggt gac tgc ttt gtt cgc tgc ctg gat cat gct tgt ctg ggc tcc ctt 3712
Trp Asp Cys Phe Val Arg Cys Leu Asp His Ala Cys Leu Gly Ser Leu
1200 1205 1210

ctc agt cat gta ata gta gct ttg tta cct ctt ata cac atc cag cct 3760
Leu Ser His Val Ile Val Ala Leu Leu Pro Leu Ile His Ile Gln Pro
1215 1220 1225

aaa gaa act gca gct atc ttc cac tac ctc ata att gaa aac agg gat Lys Glu Thr Ala Ala Ile Phe His Tyr Leu Ile Ile Glu Asn Arg Asp 1230 1235 1240	3808
gct gtg caa gat ttt ctt cat gaa ata tat ttt tta cct gat cat cca Ala Val Gln Asp Phe Leu His Glu Ile Tyr Phe Leu Pro Asp His Pro 1245 1250 1255	3856
gaa tta aaa aag ata aaa gcc gtt ctc cag gaa tac aga aag gag acc Glu Leu Lys Lys Ile Lys Ala Val Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Glu Thr 1260 1265 1270 1275	3904
tct gag agc act gat ctt cag aca act ctt cag ctc tct atg aag gcc Ser Glu Ser Thr Asp Leu Gln Thr Thr Leu Gln Leu Ser Met Lys Ala 1280 1285 1290	3952
att caa cat gaa aat gtc gat gtt cgt att cat gct ctt aca agc ttg Ile Gln His Glu Asn Val Asp Val Arg Ile His Ala Leu Thr Ser Leu 1295 1300 1305	4000
aag gaa acc ttg tat aaa aat cag gaa aaa ctg ata aag tat gca aca Lys Glu Thr Leu Tyr Lys Asn Gln Glu Lys Leu Ile Lys Tyr Ala Thr 1310 1315 1320	4048
gac agt gaa aca gta gaa cct att atc tca cag ttg gtg aca gtg ctt Asp Ser Glu Thr Val Glu Pro Ile Ile Ser Gln Leu Val Thr Val Leu 1325 1330 1335	4096
ttg aaa ggt tgc caa gat gca aac tct caa gct cgg ttg ctc tgt ggg Leu Lys Gly Cys Gln Asp Ala Asn Ser Gln Ala Arg Leu Leu Cys Gly 1340 1345 1350 1355	4144
gaa tgt tta ggg gaa ttg ggg gcg ata gat cca ggt cga tta gat ttc Glu Cys Leu Gly Glu Leu Gly Ala Ile Asp Pro Gly Arg Leu Asp Phe 1360 1365 1370	4192
tca aca act gaa act caa gga aaa gat ttt aca ttt gtg act gga gta Ser Thr Thr Glu Thr Gln Gly Lys Asp Phe Thr Phe Val Thr Gly Val 1375 1380 1385	4240
gaa gat tca agc ttt gcc tat gga tta ttg atg gag cta aca aga gct Glu Asp Ser Ser Phe Ala Tyr Gly Leu Leu Met Glu Leu Thr Arg Ala 1390 1395 1400	4288
tac ctt gcg tat gct gat aat agc cga gct caa gat tca gct gcc tat Tyr Leu Ala Tyr Ala Asp Asn Ser Arg Ala Gln Asp Ser Ala Ala Tyr 1405 1410 1415	4336
gcc att cag gag ttg ctt tct att tat gac tgt aga gag atg gag acc Ala Ile Gln Glu Leu Leu Ser Ile Tyr Asp Cys Arg Glu Met Glu Thr 1420 1425 1430 1435	4384
aac ggc cca ggt cac caa ttg tgg agg aga ttt cct gag cat gtt cgg Asn Gly Pro Gly His Gln Leu Trp Arg Arg Phe Pro Glu His Val Arg 1440 1445 1450	4432

09.09.99

gaa ata cta gaa cct cat cta aat acc aga tac aag agt tct cag aag Glu Ile Leu Glu Pro His Leu Asn Thr Arg Tyr Lys Ser Ser Gln Lys 1455 1460 1465	4480
tca acc gat tgg tct gga gta aag aag cca att tac tta agt aaa ttg Ser Thr Asp Trp Ser Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Leu Ser Lys Leu 1470 1475 1480	4528
ggt agt aac ttt gca gaa tgg tca gca tct tgg gca ggt tat ctt att Gly Ser Asn Phe Ala Glu Trp Ser Ala Ser Trp Ala Gly Tyr Leu Ile 1485 1490 1495	4576
aca aag gtt cga cat gat ctt gcc agt aaa att ttc acc tgc tgt agc Thr Lys Val Arg His Asp Leu Ala Ser Lys Ile Phe Thr Cys Cys Ser 1500 1505 1510 1515	4624
att atg atg aag cat gat ttc aaa gtg acc atc tat ctt ctt cca cat Ile Met Met Lys His Asp Phe Lys Val Thr Ile Tyr Leu Leu Pro His 1520 1525 1530	4672
att ctg gtg tat gtc tta ctg ggt tgt aat caa gaa gat cag cag gag Ile Leu Val Tyr Val Leu Leu Gly Cys Asn Gln Glu Asp Gln Gln Glu 1535 1540 1545	4720
gtt tat gca gaa att atg gca gtt cta aag cat gac gat cag cat acc Val Tyr Ala Glu Ile Met Ala Val Leu Lys His Asp Asp Gln His Thr 1550 1555 1560	4768
ata aat acc caa gac att gca tct gat ctg tgt caa ctc agt aca cag Ile Asn Thr Gln Asp Ile Ala Ser Asp Leu Cys Gln Leu Ser Thr Gln 1565 1570 1575	4816
act gtg ttc tcc atg ctt gac cat ctc aca cag tgg gca agg cac aaa Thr Val Phe Ser Met Leu Asp His Leu Thr Gln Trp Ala Arg His Lys 1580 1585 1590 1595	4864
ttt cag gca ctg aaa gct gag aaa tgt cca cac agc aaa tca aac aga Phe Gln Ala Leu Lys Ala Glu Lys Cys Pro His Ser Lys Ser Asn Arg 1600 1605 1610	4912
aat aag gta gac tca atg gta tct act gtg gat tat gaa gac tat cag Asn Lys Val Asp Ser Met Val Ser Thr Val Asp Tyr Glu Asp Tyr Gln 1615 1620 1625	4960
agt gta acc cgt ttt cta gac ctc ata ccc cag gat act ctg gca gta Ser Val Thr Arg Phe Leu Asp Leu Ile Pro Gln Asp Thr Leu Ala Val 1630 1635 1640	5008
gct tcc ttt cgc tcc aaa gca tac aca cga gct gta atg cac ttt gaa Ala Ser Phe Arg Ser Lys Ala Tyr Thr Arg Ala Val Met His Phe Glu 1645 1650 1655	5056
tca ttt att aca gaa aag aag caa aat att cag gaa cat ctt gga ttt Ser Phe Ile Thr Glu Lys Lys Gln Asn Ile Gln Glu His Leu Gly Phe 1660 1665 1670 1675	5104

tta cag aaa ttg tat gct gct atg cat gaa cct gat gga gtg gcc gga Leu Gln Lys Leu Tyr Ala Ala Met His Glu Pro Asp Gly Val Ala Gly 1680 1685 1690	5152
gtc agt gca att aga aag gca gaa cca tct cta aaa gaa cag atc ctt Val Ser Ala Ile Arg Lys Ala Glu Pro Ser Leu Lys Glu Gln Ile Leu 1695 1700 1705	5200
gaa cat gaa agc ctt ggc ttg ctg agg gat gcc act gct tgt tat gac Glu His Glu Ser Leu Gly Leu Leu Arg Asp Ala Thr Ala Cys Tyr Asp 1710 1715 1720	5248
agg gct att cag cta gaa cca gac cag atc att cat tat cat ggt gta Arg Ala Ile Gln Leu Glu Pro Asp Gln Ile Ile His Tyr His Gly Val 1725 1730 1735	5296
gta aag tcc atg tta ggt ctt ggt cag ctg tct act gtt atc act cag Val Lys Ser Met Leu Gly Leu Gly Gln Leu Ser Thr Val Ile Thr Gln 1740 1745 1750 1755	5344
gtg aat gga gtg cat gct aac agg tcc gag tgg aca gat gaa tta aac Val Asn Gly Val His Ala Asn Arg Ser Glu Trp Thr Asp Glu Leu Asn 1760 1765 1770	5392
acg tac aga gtg gaa gca gct tgg aaa ttg tca cag tgg gat ttg gtg Thr Tyr Arg Val Glu Ala Ala Trp Lys Leu Ser Gln Trp Asp Leu Val 1775 1780 1785	5440
gaa aac tat ttg gca gca gat gga aaa tct aca aca tgg agt gtc aga Glu Asn Tyr Leu Ala Ala Asp Gly Lys Ser Thr Thr Trp Ser Val Arg 1790 1795 1800	5488
ctg gga cag cta tta tta tca gcc aaa aaa aga gat atc aca gct ttt Leu Gly Gln Leu Leu Leu Ser Ala Lys Lys Arg Asp Ile Thr Ala Phe 1805 1810 1815	5536
tat gac tca ctg aaa cta gtg aga gca gaa caa att gta cct ctt tca Tyr Asp Ser Leu Lys Leu Val Arg Ala Glu Gln Ile Val Pro Leu Ser 1820 1825 1830 1835	5584
gct gca agc ttt gaa aga ggc tcc tac caa cga gga tat gaa tat att Ala Ala Ser Phe Glu Arg Gly Ser Tyr Gln Arg Gly Tyr Glu Tyr Ile 1840 1845 1850	5632
gtg aga ttg cac atg tta tgt gag ttg gag cat agc atc aaa cca ctt Val Arg Leu His Met Leu Cys Glu Leu Glu His Ser Ile Lys Pro Leu 1855 1860 1865	5680
ttc cag cat tct cca ggt gac agt tct caa gaa gat tct cta aac tgg Phe Gln His Ser Pro Gly Asp Ser Ser Gln Glu Asp Ser Leu Asn Trp 1870 1875 1880	5728
gta gct cga cta gaa atg acc cag aat tcc tac aga gcc aag gac cct Val Ala Arg Leu Glu Met Thr Gln Asn Ser Tyr Arg Ala Lys Asp Pro 1885 1890 1895	5776

atc ctg gct ctc cgg agg gct tta cta agc ctc aac aaa aga cca gat Ile Leu Ala Leu Arg Arg Ala Leu Leu Ser Leu Asn Lys Arg Pro Asp 1900 1905 1910 1915	5824
tac aat gaa atg gtt gga gaa tgc tgg ctg cag agt gcc agg gta gct Tyr Asn Glu Met Val Gly Glu Cys Trp Leu Gln Ser Ala Arg Val Ala 1920 1925 1930	5872
aga aag gct ggt cac cac cag aca gcc tac aat gct ctc ctt aat gca Arg Lys Ala Gly His His Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Leu Asn Ala 1935 1940 1945	5920
ggg gaa tca cga ctc gct gaa ctg tac gtg gaa agg gca aag tgg ctc Gly Glu Ser Arg Leu Ala Glu Leu Tyr Val Glu Arg Ala Lys Trp Leu 1950 1955 1960	5968
tgg tcc aag ggt gat gtt cac cag gca cta att gtt ctt caa aaa ggt Trp Ser Lys Gly Asp Val His Gln Ala Leu Ile Val Leu Gln Lys Gly 1965 1970 1975	6016
gtt gaa tta tgt ttt cct gaa aat gaa acc cca cct gag ggt aag aac Val Glu Leu Cys Phe Pro Glu Asn Glu Thr Pro Pro Glu Gly Lys Asn 1980 1985 1990 1995	6064
atg tta atc cat ggt cga gct atg cta cta gtg ggc cga ttt atg gaa Met Leu Ile His Gly Arg Ala Met Leu Leu Val Gly Arg Phe Met Glu 2000 2005 2010	6112
gaa aca gct aac ttt gaa agc aat gca att atg aaa aaa tat aag gat Glu Thr Ala Asn Phe Glu Ser Asn Ala Ile Met Lys Lys Tyr Lys Asp 2015 2020 2025	6160
gtg acc gcg tgc ctg cca gaa tgg gag gat ggg cat ttt tac ctt gcc Val Thr Ala Cys Leu Pro Glu Trp Glu Asp Gly His Phe Tyr Leu Ala 2030 2035 2040	6208
aag tac tat gac aaa ttg atg ccc atg gtc aca gac aac aaa atg gaa Lys Tyr Tyr Asp Lys Leu Met Pro Met Val Thr Asp Asn Lys Met Glu 2045 2050 2055	6256
aag caa ggt gat ctc atc cgg tat ata gtt ctt cat ttt ggc aga tct Lys Gln Gly Asp Leu Ile Arg Tyr Ile Val Leu His Phe Gly Arg Ser 2060 2065 2070 2075	6304
cta caa tat gga aat cag ttc ata tat cag tca atg cca cga atg tta Leu Gln Tyr Gly Asn Gln Phe Ile Tyr Gln Ser Met Pro Arg Met Leu 2080 2085 2090	6352
act cta tgg ctt gat tat ggt aca aag gca tat gaa tgg gaa aaa gct Thr Leu Trp Leu Asp Tyr Gly Thr Lys Ala Tyr Glu Trp Glu Lys Ala 2095 2100 2105	6400
ggc cgc tcc gat cgt gta caa atg agg aat gat ttg ggt aaa ata aac Gly Arg Ser Asp Arg Val Gln Met Arg Asn Asp Leu Gly Lys Ile Asn 2110 2115 2120	6448

aag gtt atc aca gag cat aca aac tat tta gct cca tat caa ttt ttg 6496
Lys Val Ile Thr Glu His Thr Asn Tyr Leu Ala Pro Tyr Gln Phe Leu
2125 2130 2135

act gct ttt tca caa ttg atc tct cga att tgt cat tct cac gat gaa 6544
Thr Ala Phe Ser Gln Leu Ile Ser Arg Ile Cys His Ser His Asp Glu
2140 2145 2150 2155

gtt ttt gtt gtc ttg atg gaa ata ata gcc aaa gta ttt cta gcc tat 6592
Val Phe Val Val Leu Met Glu Ile Ile Ala Lys Val Phe Leu Ala Tyr
2160 2165 2170

cct caa caa gca atg tgg atg atg aca gct gtg tca aag tca tct tat 6640
Pro Gln Gln Ala Met Trp Met Met Thr Ala Val Ser Lys Ser Ser Tyr
2175 2180 2185

ccc atg cgt gtg aac aga tgc aag gaa atc ctc aat aaa gct att cat 6688
Pro Met Arg Val Asn Arg Cys Lys Glu Ile Leu Asn Lys Ala Ile His
2190 2195 2200

atg aaa aaa tcc tta gag aag ttt gtt gga gat gca act cgc cta aca 6736
Met Lys Lys Ser Leu Glu Lys Phe Val Gly Asp Ala Thr Arg Leu Thr
2205 2210 2215

gat aag ctt cta gaa ttg tgc aat aaa ccg gtt gat gga agt agt tcc 6784
Asp Lys Leu Leu Glu Leu Cys Asn Lys Pro Val Asp Gly Ser Ser Ser
2220 2225 2230 2235

aca tta agc atg agc act cat ttt aaa atg ctt aaa aag ctg gta gaa 6832
Thr Leu Ser Met Ser Thr His Phe Lys Met Leu Lys Lys Leu Val Glu
2240 2245 2250

gaa gca aca ttt agt gaa atc ctc att cct cta caa tca gtc atg ata 6880
Glu Ala Thr Phe Ser Glu Ile Leu Ile Pro Leu Gln Ser Val Met Ile
2255 2260 2265

cct aca ctt cca tca att ctg ggt acc cat gct aac cat gct agc cat 6928
Pro Thr Leu Pro Ser Ile Leu Gly Thr His Ala Asn His Ala Ser His
2270 2275 2280

gaa cca ttt cct gga cat tgg gcc tat att gca ggg ttt gat gat atg 6976
Glu Pro Phe Pro Gly His Trp Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Asp Asp Met
2285 2290 2295

gtg gaa att ctt gct tct ctt cag aaa cca aag aag att tct tta aaa 7024
Val Glu Ile Leu Ala Ser Leu Gln Lys Pro Lys Lys Ile Ser Leu Lys
2300 2305 2310 2315

ggc tca gat gga aag ttc tac atc atg atg tgt aag cca aaa gat gac 7072
Gly Ser Asp Gly Lys Phe Tyr Ile Met Met Cys Lys Pro Lys Asp Asp
2320 2325 2330

ctg aga aag gat tgt aga cta atg gaa ttc aat tcc ttg att aat aag 7120
Leu Arg Lys Asp Cys Arg Leu Met Glu Phe Asn Ser Leu Ile Asn Lys
2335 2340 2345

09.09.99

tgc tta aga aaa gat gca gag tct cgt aga aga gaa ctt cat att cga Cys Leu Arg Lys Asp Ala Glu Ser Arg Arg Arg Glu Leu His Ile Arg 2350 2355 2360	7168
aca tat gca gtt att cca cta aat gat gaa tgt ggg att att gaa tgg Thr Tyr Ala Val Ile Pro Leu Asn Asp Glu Cys Gly Ile Ile Glu Trp 2365 2370 2375	7216
gtg aac aac act gct ggt ttg aga cct att ctg acc aaa cta tat aaa Val Asn Asn Thr Ala Gly Leu Arg Pro Ile Leu Thr Lys Leu Tyr Lys 2380 2385 2390 2395	7264
gaa aag gga gtg tat atg aca gga aaa gaa ctt cgc cag tgt atg cta Glu Lys Gly Val Tyr Met Thr Gly Lys Glu Leu Arg Gln Cys Met Leu 2400 2405 2410	7312
cca aag tca gca gct tta tct gaa aaa ctc aaa gta ttc cga gaa ttt Pro Lys Ser Ala Ala Leu Ser Glu Lys Leu Lys Val Phe Arg Glu Phe 2415 2420 2425	7360
ctc ctg ccc agg cat cct cct att ttt cat gag tgg ttt ctg aga aca Leu Leu Pro Arg His Pro Pro Ile Phe His Glu Trp Phe Leu Arg Thr 2430 2435 2440	7408
ttc cct gat cct aca tca tgg tac agt agt aga tca gct tac tgc cgt Phe Pro Asp Pro Thr Ser Trp Tyr Ser Ser Arg Ser Ala Tyr Cys Arg 2445 2450 2455	7456
tcc act gca gta atg tca atg gtt ggt tat att ctg ggg ctt gga gac Ser Thr Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp 2460 2465 2470 2475	7504
cgt cat ggt gaa aat att ctc ttt gat tct ttg act ggt gaa tgc gta Arg His Gly Glu Asn Ile Leu Phe Asp Ser Leu Thr Gly Glu Cys Val 2480 2485 2490	7552
cat gta gat ttc aat tgt ctt ttc aat aag gga gaa acc ttt gaa gtt His Val Asp Phe Asn Cys Leu Phe Asn Lys Gly Glu Thr Phe Glu Val 2495 2500 2505	7600
cca gaa att gtg cca ttt cgc ctg act cat aat atg gtt aat gga atg Pro Glu Ile Val Pro Phe Arg Leu Thr His Asn Met Val Asn Gly Met 2510 2515 2520	7648
ggt cct atg gga aca gag ggt ctt ttt cga aga gca tgt gaa gtt aca Gly Pro Met Gly Thr Glu Gly Leu Phe Arg Arg Ala Cys Glu Val Thr 2525 2530 2535	7696
atg agg ctg atg cgt gat cag cga gag cct tta atg agt gtc tta aag Met Arg Leu Met Arg Asp Gln Arg Glu Pro Leu Met Ser Val Leu Lys 2540 2545 2550 2555	7744
act ttt cta cat gat cct ctt gtg gaa tgg agt aaa cca gtg aaa ggg Thr Phe Leu His Asp Pro Leu Val Glu Trp Ser Lys Pro Val Lys Gly 2560 2565 2570	7792

09.09.99

cat tcc aaa gcg cca ctg aat gaa act gga gaa gtt gtc aat gaa aag 7840
His Ser Lys Ala Pro Leu Asn Glu Thr Gly Glu Val Val Asn Glu Lys
2575 2580 2585

gcc aag acc cat gtt ctt gac att gag cag cga cta caa ggt gta atc 7888
Ala Lys Thr His Val Leu Asp Ile Glu Gln Arg Leu Gln Gly Val Ile
2590 2595 2600

aag act cga aat aga gtg aca gga ctg ccg tta tct att gaa gga cat 7936
Lys Thr Arg Asn Arg Val Thr Gly Leu Pro Leu Ser Ile Glu Gly His
2605 2610 2615

gtg cat tac ctt ata caa gaa gct act gat gaa aac tta cta tgc cag 7984
Val His Tyr Leu Ile Gln Glu Ala Thr Asp Glu Asn Leu Leu Cys Gln
2620 2625 2630 2635

atg tat ctt ggt tgg act cca tat atg tgaaatgaaa ttatgtaaaa 8031
Met Tyr Leu Gly Trp Thr Pro Tyr Met
2640

gaatatgtta ataactctaaa agtaatgcat ttggtatgaa tctgtggttg tatctgttca 8091

attctaaagt acaacataaaa ttacgttct cagcaactgt tatttctctc tgatcattaa 8151

ttatatgtaa aataatatac attcagttat taagaaataa actgctttct taataaaaaa 8211

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8239

<210> 2
<211> 2644
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Gly Glu His Gly Leu Glu Leu Ala Ser Met Ile Pro Ala Leu Arg
1 5 10 15
Glu Leu Gly Ser Ala Thr Pro Glu Glu Tyr Asn Thr Val Val Gln Lys
20 25 30
Pro Arg Gln Ile Leu Cys Gln Phe Ile Asp Arg Ile Leu Thr Asp Val
35 40 45
Asn Val Val Ala Val Glu Leu Val Lys Lys Thr Asp Ser Gln Pro Thr
50 55 60
Ser Val Met Leu Leu Asp Phe Ile Gln His Ile Met Lys Ser Ser Pro
65 70 75 80
Leu Met Phe Val Asn Val Ser Gly Ser His Glu Arg Lys Gly Ser Cys
85 90 95
Ile Glu Phe Ser Asn Trp Ile Ile Thr Arg Leu Leu Arg Ile Ala Ala
100 105 110

09.09.99

Thr	Pro	Ser	Cys	His	Leu	Leu	His	Lys	Lys	Ile	Cys	Glu	Val	Ile	Cys		
		115					120					125					
Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Phe	Lys	Ser	Lys	Ser	Pro	Ala	Ile	Phe	Gly	Val		
	130					135					140						
Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Leu	Gln	Leu	Phe	Glu	Asp	Leu	Val	Tyr	Leu	His		
145					150					155					160		
Arg	Arg	Asn	Val	Met	Gly	His	Ala	Val	Glu	Trp	Pro	Val	Val	Met	Ser		
			165						170					175			
Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Leu	Asp	Glu	His	Met	Gly	Tyr	Leu	Gln	Ser	Ala		
		180						185					190				
Pro	Leu	Gln	Leu	Met	Ser	Met	Gln	Asn	Leu	Glu	Phe	Ile	Glu	Val	Thr		
	195						200					205					
Leu	Leu	Met	Val	Leu	Thr	Arg	Ile	Ile	Ala	Ile	Val	Phe	Phe	Arg	Arg		
	210					215					220						
Gln	Glu	Leu	Leu	Leu	Trp	Gln	Ile	Gly	Cys	Val	Leu	Leu	Glu	Tyr	Gly		
225					230					235					240		
Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	Phe		
				245					250					255			
Gln	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Ala	Gln	Pro	Ala	Ser	Thr	Phe	Phe	Ser	Ser		
			260				265						270				
Phe	Leu	Glu	Leu	Leu	Lys	His	Leu	Val	Glu	Met	Asp	Thr	Asp	Gln	Leu		
	275						280					285					
Lys	Leu	Tyr	Glu	Glu	Pro	Leu	Ser	Lys	Leu	Ile	Lys	Thr	Leu	Phe	Pro		
	290					295					300						
Phe	Glu	Ala	Glu	Ala	Tyr	Arg	Asn	Ile	Glu	Pro	Val	Tyr	Leu	Asn	Met		
305					310					315				320			
Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Cys	Val	Met	Phe	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Met	Arg		
				325					330					335			
Leu	Lys	Ser	Asp	Leu	Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	Cys	His	Leu	Leu	Gln	Tyr		
		340					345						350				
Phe	Leu	Lys	Phe	Val	Pro	Ala	Gly	Tyr	Glu	Ser	Ala	Leu	Gln	Val	Arg		
	355						360					365					
Lys	Val	Tyr	Val	Arg	Asn	Ile	Cys	Lys	Ala	Leu	Leu	Asp	Val	Leu	Gly		
	370				375						380						
Ile	Glu	Val	Asp	Ala	Glu	Tyr	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Tyr	Ala	Ala	Leu		
385					390					395					400		
Lys	Met	Glu	Ser	Met	Glu	Ile	Ile	Glu	Glu	Ile	Gln	Cys	Gln	Thr	Gln		
				405				410						415			

09.09.99

Gln Glu Asn Leu Ser Ser Asn Ser Asp Gly Ile Ser Pro Lys Arg Arg
420 425 430

Arg Leu Ser Ser Ser Leu Asn Pro Ser Lys Arg Ala Pro Lys Gln Thr
435 440 445

Glu Glu Ile Lys His Val Asp Met Asn Gln Lys Ser Ile Leu Trp Ser
450 455 460

Ala Leu Lys Gln Lys Ala Glu Ser Leu Gln Ile Ser Leu Glu Tyr Ser
465 470 475 480

Gly Leu Lys Asn Pro Val Ile Glu Met Leu Glu Gly Ile Ala Val Val
485 490 495

Leu Gln Leu Thr Ala Leu Cys Thr Val His Cys Ser His Gln Asn Met
500 505 510

Asn Cys Arg Thr Phe Lys Asp Cys Gln His Lys Ser Lys Lys Lys Pro
515 520 525

Ser Val Val Ile Thr Trp Met Ser Leu Asp Phe Tyr Thr Lys Val Leu
530 535 540

Lys Ser Cys Arg Ser Leu Leu Glu Ser Val Gln Lys Leu Asp Leu Glu
545 550 555 560

Ala Thr Ile Asp Lys Val Val Lys Ile Tyr Asp Ala Leu Ile Tyr Met
565 570 575

Gln Val Asn Ser Ser Phe Glu Asp His Ile Leu Glu Asp Leu Cys Gly
580 585 590

Met Leu Ser Leu Pro Trp Ile Tyr Ser His Ser Asp Asp Gly Cys Leu
595 600 605

Lys Leu Thr Thr Phe Ala Ala Asn Leu Leu Thr Leu Ser Cys Arg Ile
610 615 620

Ser Asp Ser Tyr Ser Pro Gln Ala Gln Ser Arg Cys Val Phe Leu Leu
625 630 635 640

Thr Leu Phe Pro Arg Arg Ile Phe Leu Glu Trp Arg Thr Ala Val Tyr
645 650 655

Asn Trp Ala Leu Gln Ser Ser His Glu Val Ile Arg Ala Ser Cys Val
660 665 670

Ser Gly Phe Phe Ile Leu Leu Gln Gln Gln Asn Ser Cys Asn Arg Val
675 680 685

Pro Lys Ile Leu Ile Asp Lys Val Lys Asp Asp Ser Asp Ile Val Lys
690 695 700

Lys Glu Phe Ala Ser Ile Leu Gly Gln Leu Val Cys Thr Leu His Gly
705 710 715 720

09.09.99

Met	Phe	Tyr	Leu	Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Pro	Phe	Ser	Glu	His	Gly	725	730	735
His	Val	Asp	Leu	Phe	Cys	Arg	Asn	Leu	Lys	Ala	Thr	Ser	Gln	His	Glu	740	745	750
Cys	Ser	Ser	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Ser	Val	Cys	Lys	Pro	Phe	Leu	Phe	755	760	765
Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Ile	Pro	Ser	Pro	Val	Lys	Leu	Ala	Phe	Ile	Asp	770	775	780
Asn	Leu	His	His	Leu	Cys	Lys	His	Leu	Asp	Phe	Arg	Glu	Asp	Glu	Thr	785	790	795
Asp	Val	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Asn	Leu	Met	Glu	Asp	Pro	805	810	815
Asp	Lys	Asp	Val	Arg	Val	Ala	Phe	Ser	Gly	Asn	Ile	Lys	His	Ile	Leu	820	825	830
Glu	Ser	Leu	Asp	Ser	Glu	Asp	Gly	Phe	Ile	Lys	Glu	Leu	Phe	Val	Leu	835	840	845
Arg	Met	Lys	Glu	Ala	Tyr	Thr	His	Ala	Gln	Ile	Ser	Arg	Asn	Asn	Glu	850	855	860
Leu	Lys	Asp	Thr	Leu	Ile	Leu	Thr	Thr	Gly	Asp	Ile	Gly	Arg	Ala	Ala	865	870	875
Lys	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Ala	Leu	Leu	His	Leu	Leu	His	Cys	Leu	885	890	895
Leu	Ser	Lys	Ser	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Ala	Tyr	Thr	Glu	Ile	Arg	900	905	910
Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Lys	Ser	Val	Lys	Leu	Gln	Ser	Phe	Phe	Ser	Gln	915	920	925
Tyr	Lys	Lys	Pro	Ile	Cys	Gln	Phe	Leu	Val	Glu	Ser	Leu	His	Ser	Ser	930	935	940
Gln	Met	Thr	Ala	Leu	Pro	Asn	Thr	Pro	Cys	Gln	Asn	Ala	Asp	Val	Arg	945	950	955
Lys	Gln	Asp	Val	Ala	His	Gln	Arg	Glu	Met	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	965	970	975
Glu	Ile	Ala	Asn	Val	Phe	Asp	Phe	Pro	Asp	Leu	Asn	Arg	Phe	Leu	Thr	980	985	990
Arg	Thr	Leu	Gln	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Leu	Ala	Ala	Lys	Ala	Ser	Pro	995	1000	1005
Ala	Ala	Ser	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Lys	Gln	Leu	Asn	Val	Asn	1010	1015	1020

09.09.99

Arg Arg Glu Ile Leu Ile Asn Asn Phe Lys Tyr Ile Phe Ser His Leu
025 1030 1035 1040

Val Cys Ser Cys Ser Lys Asp Glu Leu Glu Arg Ala Leu His Tyr Leu
1045 1050 1055

Lys Asn Glu Thr Glu Ile Glu Leu Gly Ser Leu Leu Arg Gln Asp Phe
1060 1065 1070

Gln Gly Leu His Asn Glu Leu Leu Leu Arg Ile Gly Glu His Tyr Gln
1075 1080 1085

Gln Val Phe Asn Gly Leu Ser Ile Leu Ala Ser Phe Ala Ser Ser Asp
1090 1095 1100

Asp Pro Tyr Gln Gly Pro Arg Asp Ile Ile Ser Pro Glu Leu Met Ala
1105 1110 1115 1120

Asp Tyr Leu Gln Pro Lys Leu Leu Gly Ile Leu Ala Phe Phe Asn Met
1125 1130 1135

Gln Leu Leu Ser Ser Ser Val Gly Ile Glu Asp Lys Lys Met Ala Leu
1140 1145 1150

Asn Ser Leu Met Ser Leu Met Lys Leu Met Gly Pro Lys His Val Ser
1155 1160 1165

Ser Val Arg Val Lys Met Met Thr Thr Leu Arg Thr Gly Leu Arg Phe
1170 1175 1180

Lys Asp Asp Phe Pro Glu Leu Cys Cys Arg Ala Trp Asp Cys Phe Val
1185 1190 1195 1200

Arg Cys Leu Asp His Ala Cys Leu Gly Ser Leu Leu Ser His Val Ile
1205 1210 1215

Val Ala Leu Leu Pro Leu Ile His Ile Gln Pro Lys Glu Thr Ala Ala
1220 1225 1230

Ile Phe His Tyr Leu Ile Ile Glu Asn Arg Asp Ala Val Gln Asp Phe
1235 1240 1245

Leu His Glu Ile Tyr Phe Leu Pro Asp His Pro Glu Leu Lys Lys Ile
1250 1255 1260

Lys Ala Val Leu Gln Glu Tyr Arg Lys Glu Thr Ser Glu Ser Thr Asp
1265 1270 1275 1280

Leu Gln Thr Thr Leu Gln Leu Ser Met Lys Ala Ile Gln His Glu Asn
1285 1290 1295

Val Asp Val Arg Ile His Ala Leu Thr Ser Leu Lys Glu Thr Leu Tyr
1300 1305 1310

Lys Asn Gln Glu Lys Leu Ile Lys Tyr Ala Thr Asp Ser Glu Thr Val
1315 1320 1325

09.09.99

Glu Pro Ile Ile Ser Gln Leu Val Thr Val Leu Leu Lys Gly Cys Gln
1330 1335 1340

Asp Ala Asn Ser Gln Ala Arg Leu Leu Cys Gly Glu Cys Leu Gly Glu
345 1350 1355 1360

Leu Gly Ala Ile Asp Pro Gly Arg Leu Asp Phe Ser Thr Thr Glu Thr
1365 1370 1375

Gln Gly Lys Asp Phe Thr Phe Val Thr Gly Val Glu Asp Ser Ser Phe
1380 1385 1390

Ala Tyr Gly Leu Leu Met Glu Leu Thr Arg Ala Tyr Leu Ala Tyr Ala
1395 1400 1405

Asp Asn Ser Arg Ala Gln Asp Ser Ala Ala Tyr Ala Ile Gln Glu Leu
1410 1415 1420

Leu Ser Ile Tyr Asp Cys Arg Glu Met Glu Thr Asn Gly Pro Gly His
425 1430 1435 1440

Gln Leu Trp Arg Arg Phe Pro Glu His Val Arg Glu Ile Leu Glu Pro
1445 1450 1455

His Leu Asn Thr Arg Tyr Lys Ser Ser Gln Lys Ser Thr Asp Trp Ser
1460 1465 1470

Gly Val Lys Lys Pro Ile Tyr Leu Ser Lys Leu Gly Ser Asn Phe Ala
1475 1480 1485

Glu Trp Ser Ala Ser Trp Ala Gly Tyr Leu Ile Thr Lys Val Arg His
1490 1495 1500

Asp Leu Ala Ser Lys Ile Phe Thr Cys Cys Ser Ile Met Met Lys His
505 1510 1515 1520

Asp Phe Lys Val Thr Ile Tyr Leu Leu Pro His Ile Leu Val Tyr Val
1525 1530 1535

Leu Leu Gly Cys Asn Gln Glu Asp Gln Gln Glu Val Tyr Ala Glu Ile
1540 1545 1550

Met Ala Val Leu Lys His Asp Asp Gln His Thr Ile Asn Thr Gln Asp
1555 1560 1565

Ile Ala Ser Asp Leu Cys Gln Leu Ser Thr Gln Thr Val Phe Ser Met
1570 1575 1580

Leu Asp His Leu Thr Gln Trp Ala Arg His Lys Phe Gln Ala Leu Lys
585 1590 1595 1600

Ala Glu Lys Cys Pro His Ser Lys Ser Asn Arg Asn Lys Val Asp Ser
1605 1610 1615

Met Val Ser Thr Val Asp Tyr Glu Asp Tyr Gln Ser Val Thr Arg Phe
1620 1625 1630

09.09.99

Leu Asp Leu Ile Pro Gln Asp Thr Leu Ala Val Ala Ser Phe Arg Ser
1635 1640 1645

Lys Ala Tyr Thr Arg Ala Val Met His Phe Glu Ser Phe Ile Thr Glu
1650 1655 1660

Lys Lys Gln Asn Ile Gln Glu His Leu Gly Phe Leu Gln Lys Leu Tyr
665 1670 1675 1680

Ala Ala Met His Glu Pro Asp Gly Val Ala Gly Val Ser Ala Ile Arg
1685 1690 1695

Lys Ala Glu Pro Ser Leu Lys Glu Gln Ile Leu Glu His Glu Ser Leu
1700 1705 1710

Gly Leu Leu Arg Asp Ala Thr Ala Cys Tyr Asp Arg Ala Ile Gln Leu
1715 1720 1725

Glu Pro Asp Gln Ile Ile His Tyr His Gly Val Val Lys Ser Met Leu
1730 1735 1740

Gly Leu Gly Gln Leu Ser Thr Val Ile Thr Gln Val Asn Gly Val His
745 1750 1755 1760

Ala Asn Arg Ser Glu Trp Thr Asp Glu Leu Asn Thr Tyr Arg Val Glu
1765 1770 1775

Ala Ala Trp Lys Leu Ser Gln Trp Asp Leu Val Glu Asn Tyr Leu Ala
1780 1785 1790

Ala Asp Gly Lys Ser Thr Thr Trp Ser Val Arg Leu Gly Gln Leu Leu
1795 1800 1805

Leu Ser Ala Lys Lys Arg Asp Ile Thr Ala Phe Tyr Asp Ser Leu Lys
1810 1815 1820

Leu Val Arg Ala Glu Gln Ile Val Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Glu
825 1830 1835 1840

Arg Gly Ser Tyr Gln Arg Gly Tyr Glu Tyr Ile Val Arg Leu His Met
1845 1850 1855

Leu Cys Glu Leu Glu His Ser Ile Lys Pro Leu Phe Gln His Ser Pro
1860 1865 1870

Gly Asp Ser Ser Gln Glu Asp Ser Leu Asn Trp Val Ala Arg Leu Glu
1875 1880 1885

Met Thr Gln Asn Ser Tyr Arg Ala Lys Asp Pro Ile Leu Ala Leu Arg
1890 1895 1900

Arg Ala Leu Leu Ser Leu Asn Lys Arg Pro Asp Tyr Asn Glu Met Val
905 1910 1915 1920

Gly Glu Cys Trp Leu Gln Ser Ala Arg Val Ala Arg Lys Ala Gly His
1925 1930 1935

09.09.99

His Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Leu Leu Asn Ala Gly Glu Ser Arg Leu
1940 1945 1950

Ala Glu Leu Tyr Val Glu Arg Ala Lys Trp Leu Trp Ser Lys Gly Asp
1955 1960 1965

Val His Gln Ala Leu Ile Val Leu Gln Lys Gly Val Glu Leu Cys Phe
1970 1975 1980

Pro Glu Asn Glu Thr Pro Pro Glu Gly Lys Asn Met Leu Ile His Gly
1985 1990 1995 2000

Arg Ala Met Leu Leu Val Gly Arg Phe Met Glu Glu Thr Ala Asn Phe
2005 2010 2015

Glu Ser Asn Ala Ile Met Lys Lys Tyr Lys Asp Val Thr Ala Cys Leu
2020 2025 2030

Pro Glu Trp Glu Asp Gly His Phe Tyr Leu Ala Lys Tyr Tyr Asp Lys
2035 2040 2045

Leu Met Pro Met Val Thr Asp Asn Lys Met Glu Lys Gln Gly Asp Leu
2050 2055 2060

Ile Arg Tyr Ile Val Leu His Phe Gly Arg Ser Leu Gln Tyr Gly Asn
065 2070 2075 2080

Gln Phe Ile Tyr Gln Ser Met Pro Arg Met Leu Thr Leu Trp Leu Asp
2085 2090 2095

Tyr Gly Thr Lys Ala Tyr Glu Trp Glu Lys Ala Gly Arg Ser Asp Arg
2100 2105 2110

Val Gln Met Arg Asn Asp Leu Gly Lys Ile Asn Lys Val Ile Thr Glu
2115 2120 2125

His Thr Asn Tyr Leu Ala Pro Tyr Gln Phe Leu Thr Ala Phe Ser Gln
2130 2135 2140

Leu Ile Ser Arg Ile Cys His Ser His Asp Glu Val Phe Val Val Leu
145 2150 2155 2160

Met Glu Ile Ile Ala Lys Val Phe Leu Ala Tyr Pro Gln Gln Ala Met
2165 2170 2175

Trp Met Met Thr Ala Val Ser Lys Ser Ser Tyr Pro Met Arg Val Asn
2180 2185 2190

Arg Cys Lys Glu Ile Leu Asn Lys Ala Ile His Met Lys Lys Ser Leu
2195 2200 2205

Glu Lys Phe Val Gly Asp Ala Thr Arg Leu Thr Asp Lys Leu Leu Glu
2210 2215 2220

Leu Cys Asn Lys Pro Val Asp Gly Ser Ser Ser Thr Leu Ser Met Ser
225 2230 2235 2240

Thr His Phe Lys Met Leu Lys Lys Leu Val Glu Glu Ala Thr Phe Ser
 2245 2250 2255
 Glu Ile Leu Ile Pro Leu Gln Ser Val Met Ile Pro Thr Leu Pro Ser
 2260 2265 2270
 Ile Leu Gly Thr His Ala Asn His Ala Ser His Glu Pro Phe Pro Gly
 2275 2280 2285
 His Trp Ala Tyr Ile Ala Gly Phe Asp Asp Met Val Glu Ile Leu Ala
 2290 2295 2300
 Ser Leu Gln Lys Pro Lys Lys Ile Ser Leu Lys Gly Ser Asp Gly Lys
 305 2310 2315 2320
 Phe Tyr Ile Met Met Cys Lys Pro Lys Asp Asp Leu Arg Lys Asp Cys
 2325 2330 2335
 Arg Leu Met Glu Phe Asn Ser Leu Ile Asn Lys Cys Leu Arg Lys Asp
 2340 2345 2350
 Ala Glu Ser Arg Arg Arg Glu Leu His Ile Arg Thr Tyr Ala Val Ile
 2355 2360 2365
 Pro Leu Asn Asp Glu Cys Gly Ile Ile Glu Trp Val Asn Asn Thr Ala
 2370 2375 2380
 Gly Leu Arg Pro Ile Leu Thr Lys Leu Tyr Lys Glu Lys Gly Val Tyr
 385 2390 2395 2400
 Met Thr Gly Lys Glu Leu Arg Gln Cys Met Leu Pro Lys Ser Ala Ala
 2405 2410 2415
 Leu Ser Glu Lys Leu Lys Val Phe Arg Glu Phe Leu Leu Pro Arg His
 2420 2425 2430
 Pro Pro Ile Phe His Glu Trp Phe Leu Arg Thr Phe Pro Asp Pro Thr
 2435 2440 2445
 Ser Trp Tyr Ser Ser Arg Ser Ala Tyr Cys Arg Ser Thr Ala Val Met
 2450 2455 2460
 Ser Met Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Gly Glu Asn
 465 2470 2475 2480
 Ile Leu Phe Asp Ser Leu Thr Gly Glu Cys Val His Val Asp Phe Asn
 2485 2490 2495
 Cys Leu Phe Asn Lys Gly Glu Thr Phe Glu Val Pro Glu Ile Val Pro
 2500 2505 2510
 Phe Arg Leu Thr His Asn Met Val Asn Gly Met Gly Pro Met Gly Thr
 2515 2520 2525
 Glu Gly Leu Phe Arg Arg Ala Cys Glu Val Thr Met Arg Leu Met Arg
 2530 2535 2540

Asp Gln Arg Glu Pro Leu Met Ser Val Leu Lys Thr Phe Leu His Asp
 545 2550 2555 2560

Pro Leu Val Glu Trp Ser Lys Pro Val Lys Gly His Ser Lys Ala Pro
 2565 2570 2575

Leu Asn Glu Thr Gly Glu Val Val Asn Glu Lys Ala Lys Thr His Val
 2580 2585 2590

Leu Asp Ile Glu Gln Arg Leu Gln Gly Val Ile Lys Thr Arg Asn Arg
 2595 2600 2605

Val Thr Gly Leu Pro Leu Ser Ile Glu Gly His Val His Tyr Leu Ile
 2610 2615 2620

Gln Glu Ala Thr Asp Glu Asn Leu Leu Cys Gln Met Tyr Leu Gly Trp
 625 2630 2635 2640

Thr Pro Tyr Met

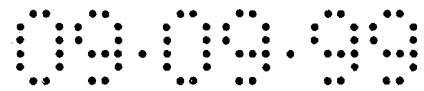
<210> 3
 <211> 8022
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (585)..(7742)

<400> 3
 ggtaccaagt aaaaactgct tagtaagtat aaaacacaga agaatccgcg atctagttaa 60
 ccaatgccct gcgtatgacg ctccactgac gctatagtca atgagaacta ggatgtgcga 120
 ttataactta tcttttcaat attttcttat tattttattta agaaataatt gaattaaaac 180
 tcattttcttc tttttattagc cgtaaaatag cttatttttct ctctactac ctttcaacaa 240
 taactttttt ttttgtttat tgaccattat aatcacatca aaagtcaaaa aattcaatca 300
 ttatcagaaa catccagcct aatattactt aaaagttagt ttctcttgaa aattcagtat 360
 cacaaaagct cgtaattag catcgctcga tacttagtgc accatgcac ttcctttacc 420
 tcgtgagtgg aaatcgattt gataatcgat tgccactttt cgcataattc tattgagata 480
 ttttattact tacaatcgtc ttttataaat gctcaagact ttgaacgcgc gtgttgcggt 540
 ttaaaaaggc ctttttttga attgaatcaa tggtttgata tagt atg agc caa cac 596
 Met Ser Gln His

1

gca aaa agg aaa gct ggg tca ctc gat ctt tca ccc aga ggc tta gat 644
 Ala Lys Arg Lys Ala Gly Ser Leu Asp Leu Ser Pro Arg Gly Leu Asp
 5 10 15 20



gac aga cag gct ttc gga cag ctt ttg aaa gaa gta tta gca tta gac 692
Asp Arg Gln Ala Phe Gly Gln Leu Leu Lys Glu Val Leu Ala Leu Asp
25 30 35

aaa gaa cat gag tta ggt aga agt aat tct tta cca tct atg acc tcc 740
Lys Glu His Glu Leu Gly Arg Ser Asn Ser Leu Pro Ser Met Thr Ser
40 45 50

gag ctt gtt gaa gtt tta att gaa gtt ggt ctt cta gct ttt aaa cat 788
Glu Leu Val Glu Val Leu Ile Glu Val Gly Leu Leu Ala Phe Lys His
55 60 65

gat gat tca aaa tct gaa ttt atc tct cct aag atg cta aaa gaa gcc 836
Asp Asp Ser Lys Ser Glu Phe Ile Ser Pro Lys Met Leu Lys Glu Ala
70 75 80

cat ctc tct cta caa gcg tta atg cta atc tta aaa agg tct ccg aca 884
His Leu Ser Leu Gln Ala Leu Met Leu Ile Leu Lys Arg Ser Pro Thr
85 90 95 100

gtt ttg cgg gag att aaa tca tct gtt act ctt ttg gat tgg att tta 932
Val Leu Arg Glu Ile Lys Ser Ser Val Thr Leu Leu Asp Trp Ile Leu
105 110 115

ccc agg act ata tca ttg ttt gct gat att cgt ttt att aag tta ttt 980
Pro Arg Thr Ile Ser Leu Phe Ala Asp Ile Arg Phe Ile Lys Leu Phe
120 125 130

gac tca tta aaa gag ttt cat aag cta att tat cag cta atc agt gaa 1028
Asp Ser Leu Lys Glu Phe His Lys Leu Ile Tyr Gln Leu Ile Ser Glu
135 140 145

aag tca ttc cta tgg gac tta tat gct tcg ttt atg cgt tat tgg aaa 1076
Lys Ser Phe Leu Trp Asp Leu Tyr Ala Ser Phe Met Arg Tyr Trp Lys
150 155 160

tat tat att aca aac gtt tct tct ata gtt ctc caa atc act aat gct 1124
Tyr Tyr Ile Thr Asn Val Ser Ser Ile Val Leu Gln Ile Thr Asn Ala
165 170 175 180

aca ttc cct tac aag atg ccc tca ccc aat tct caa cca ttg cag agt 1172
Thr Phe Pro Tyr Lys Met Pro Ser Pro Asn Ser Gln Pro Leu Gln Ser
185 190 195

atc tcc cca aat tat cca acc cat cga gag gac aaa ttt gat tta ctt 1220
Ile Ser Pro Asn Tyr Pro Thr His Arg Glu Asp Lys Phe Asp Leu Leu
200 205 210

atc att aat ata gag gag gct tgt aca ttt ttc ttt gaa agt gcc cat 1268
Ile Ile Asn Ile Glu Glu Ala Cys Thr Phe Phe Phe Glu Ser Ala His
215 220 225

ttt ttt gca caa tgc tca tat tta aag aaa tcc aat ttt cct agt cca 1316
Phe Phe Ala Gln Cys Ser Tyr Leu Lys Lys Ser Asn Phe Pro Ser Pro
230 235 240

cct ctc ttt aca gcg tgg act tgg atc aag cca tgt ttt ttt aat ttt	1364
Pro Leu Phe Thr Ala Trp Thr Trp Ile Lys Pro Cys Phe Phe Asn Phe	
245 250 255 260	
ggt att tta tta aaa cga atc agc atc gga gac tca cag ctc ttt cta	1412
Val Ile Leu Leu Lys Arg Ile Ser Ile Gly Asp Ser Gln Leu Phe Leu	
265 270 275	
cat ttg cat tca cgt ata gtc caa act tta tgc tgt ttt tcc ttg aat	1460
His Leu His Ser Arg Ile Val Gln Thr Leu Cys Cys Phe Ser Leu Asn	
280 285 290	
ttt ata tat cat ggc ctt ccc att tgt gaa aaa tct aaa cat att tta	1508
Phe Ile Tyr His Gly Leu Pro Ile Cys Glu Lys Ser Lys His Ile Leu	
295 300 305	
atg tcc tcc atc aac tta aca ttg gga tca ttg aag aaa act tat aca	1556
Met Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu Gly Ser Leu Lys Lys Thr Tyr Thr	
310 315 320	
ggt gct aat act gct ata tct ctt ttt ttt ctc tct tta ttt gtt tta	1604
Val Ala Asn Thr Ala Ile Ser Leu Phe Phe Leu Ser Leu Phe Val Leu	
325 330 335 340	
ccc aaa act gta gct ggt cta ttc tat cct ttt ggg gtt tcc tta ctt	1652
Pro Lys Thr Val Ala Gly Leu Phe Tyr Pro Phe Gly Val Ser Leu Leu	
345 350 355	
tct gac ttc aag gta tta gag caa ctt gaa cca gat tct gat ctc aaa	1700
Ser Asp Phe Lys Val Leu Glu Gln Leu Glu Pro Asp Ser Asp Leu Lys	
360 365 370	
aag gca ata ata tta ttt aag tgc aga tac caa agt tca gaa ata gat	1748
Lys Ala Ile Ile Leu Phe Lys Cys Arg Tyr Gln Ser Ser Glu Ile Asp	
375 380 385	
caa aca act ctc cgt gct ttt ggc gaa att tgt act ggt aaa ctt gaa	1796
Gln Thr Thr Leu Arg Ala Phe Gly Glu Ile Cys Thr Gly Lys Leu Glu	
390 395 400	
aac acg ttg ttt tct aac tct gaa tta aac ctt ttt ctt tta cat tat	1844
Asn Thr Leu Phe Ser Asn Ser Glu Leu Asn Leu Phe Leu Leu His Tyr	
405 410 415 420	
ctt tcc ttg gac aat gac ttg tca aat att ctt aaa gtg gat ttc cag	1892
Leu Ser Leu Asp Asn Asp Leu Ser Asn Ile Leu Lys Val Asp Phe Gln	
425 430 435	
aat ggt cat aac ata tgt aca ttt gca aaa tgg tgt ata aac aac aac	1940
Asn Gly His Asn Ile Cys Thr Phe Ala Lys Trp Cys Ile Asn Asn Asn	
440 445 450	
tta gat gaa ccg tct aat tta aag cac ttt cgt gaa atg tta gat tat	1988
Leu Asp Glu Pro Ser Asn Leu Lys His Phe Arg Glu Met Leu Asp Tyr	
455 460 465	

tat agc tct cat aat gtt aca ata agt gag gac gac ctg aag aac ttc	2036
Tyr Ser Ser His Asn Val Thr Ile Ser Glu Asp Asp Leu Lys Asn Phe	
470 475 480	
tct tta gtt ttg tgt act cat gtt gca aag gtg aat gag aaa aca aat	2084
Ser Leu Val Leu Cys Thr His Val Ala Lys Val Asn Glu Lys Thr Asn	
485 490 495 500	
agt att ttc cgc aca tat gaa gta cat ggt tgt gaa gtt tgt aac tca	2132
Ser Ile Phe Arg Thr Tyr Glu Val His Gly Cys Glu Val Cys Asn Ser	
505 510 515	
ttt tgt tta cta ttt gat gag cgg tcg cct ttt aaa att cct tat cac	2180
Phe Cys Leu Leu Phe Asp Glu Arg Ser Pro Phe Lys Ile Pro Tyr His	
520 525 530	
gaa ttg ttt tgt gca ttg cta aaa aat ccc gac ata att tcc tct tct	2228
Glu Leu Phe Cys Ala Leu Leu Lys Asn Pro Asp Ile Ile Ser Ser Ser	
535 540 545	
gtt aaa caa tca ttg ttg ctt gat ggc ttt ttt cgg tgg agc cag cat	2276
Val Lys Gln Ser Leu Leu Leu Asp Gly Phe Phe Arg Trp Ser Gln His	
550 555 560	
tgc tca aac ttt aat aaa gaa tca atg tta agt tta aga gaa ttt att	2324
Cys Ser Asn Phe Asn Lys Glu Ser Met Leu Ser Leu Arg Glu Phe Ile	
565 570 575 580	
atg aaa gca tta gcc agt act tca aga tgt tta cgt gtt gtt gct gca	2372
Met Lys Ala Leu Ala Ser Thr Ser Arg Cys Leu Arg Val Val Ala Ala	
585 590 595	
aaa gtt ttg ccc att ttc att aag gga cct aat aat ctt gat ata gtt	2420
Lys Val Leu Pro Ile Phe Ile Lys Gly Pro Asn Asn Leu Asp Ile Val	
600 605 610	
gaa ttt cac aag gaa agt aaa gcc ttg att ttt aat acg ttg aaa ata	2468
Glu Phe His Lys Glu Ser Lys Ala Leu Ile Phe Asn Thr Leu Lys Ile	
615 620 625	
ttg gcg gtg gaa aat aca gct att tta gaa acg gtc att ctt tcc tgg	2516
Leu Ala Val Glu Asn Thr Ala Ile Leu Glu Thr Val Ile Leu Ser Trp	
630 635 640	
atc tcc tta tct aga gtg gta gaa gaa gaa gaa tta cat ttt gta cta	2564
Ile Ser Leu Ser Arg Val Val Glu Glu Glu Glu Leu His Phe Val Leu	
645 650 655 660	
ttg gaa gtt ata tct tct gtg ata aac agc gga ata ttt tat caa ggc	2612
Leu Glu Val Ile Ser Ser Val Ile Asn Ser Gly Ile Phe Tyr Gln Gly	
665 670 675	
att ggt ctc agc gct ctg caa caa att gcc tcg acg cgt cat ata tcc	2660
Ile Gly Leu Ser Ala Leu Gln Gln Ile Ala Ser Thr Arg His Ile Ser	
680 685 690	

gtt tgg caa tta ctt tct cca tat tgg cca aca gtg tcc gtt gcg att	2708
Val Trp Gln Leu Leu Ser Pro Tyr Trp Pro Thr Val Ser Val Ala Ile	
695 700 705	
gtc caa ggt atg ggt aaa aaa ccg aac ata gcc agt tta ttt gct cag	2756
Val Gln Gly Met Gly Lys Lys Pro Asn Ile Ala Ser Leu Phe Ala Gln	
710 715 720	
ctt atg aat att tcc gag ggc gat ttt ctt att cga aca cag gcg tac	2804
Leu Met Asn Ile Ser Glu Gly Asp Phe Leu Ile Arg Thr Gln Ala Tyr	
725 730 735 740	
act tta cca ttc ctt gta ctt act aaa aac aaa gcg tta ata gta cgt	2852
Thr Leu Pro Phe Leu Val Leu Thr Lys Asn Lys Ala Leu Ile Val Arg	
745 750 755	
ata gct gaa ctt tca caa agt gat gtt gct act ttg tgc ctt acc aat	2900
Ile Ala Glu Leu Ser Gln Ser Asp Val Ala Thr Leu Cys Leu Thr Asn	
760 765 770	
atg cat aaa atc ctt gct tcg cta ctt act acg gat cat cct aat ttg	2948
Met His Lys Ile Leu Ala Ser Leu Leu Thr Thr Asp His Pro Asn Leu	
775 780 785	
gaa gag agt gtg atg ctt ctt ctt tca ctg gcc act tct gat ttt gaa	2996
Glu Glu Ser Val Met Leu Leu Leu Ser Leu Ala Thr Ser Asp Phe Glu	
790 795 800	
aaa gtt gat tta acg tct ttg tta cgc tct gat cct att tct att act	3044
Lys Val Asp Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ser Asp Pro Ile Ser Ile Thr	
805 810 815 820	
gtg gag ttg tta cag ctt tat cag aat gat gtt cct cat gaa aaa att	3092
Val Glu Leu Leu Gln Leu Tyr Gln Asn Asp Val Pro His Glu Lys Ile	
825 830 835	
gaa aat gct tta aga aag gta gca atg att gtc tct caa gtg gtt aat	3140
Glu Asn Ala Leu Arg Lys Val Ala Met Ile Val Ser Gln Val Val Asn	
840 845 850	
gac gaa gac ttg agc aat aag gaa tta ctt tat gat ttt ttt aat aat	3188
Asp Glu Asp Leu Ser Asn Lys Glu Leu Leu Tyr Asp Phe Phe Asn Asn	
855 860 865	
cac att ttg ggt atc tta gca gaa ttt tct aat atc ctt aac gac ctg	3236
His Ile Leu Gly Ile Leu Ala Glu Phe Ser Asn Ile Leu Asn Asp Leu	
870 875 880	
aaa gga aag act tca att aat gaa aag att aag aca att gtc ggc att	3284
Lys Gly Lys Thr Ser Ile Asn Glu Lys Ile Lys Thr Ile Val Gly Ile	
885 890 895 900	
gaa aaa atg tta tct tta tgt gga ggt gca gtc aaa ctt gga tta cca	3332
Glu Lys Met Leu Ser Leu Cys Gly Gly Ala Val Lys Leu Gly Leu Pro	
905 910 915	

cag ata ctt tct aat tta caa agt gct ttt caa aat gag cac tta agg	3380
Gln Ile Leu Ser Asn Leu Gln Ser Ala Phe Gln Asn Glu His Leu Arg	
920 925 930	
ttt tat gca atc aaa gct tgg ttc agt ttg ata tta gca acc aag gag	3428
Phe Tyr Ala Ile Lys Ala Trp Phe Ser Leu Ile Leu Ala Thr Lys Glu	
935 940 945	
ccc gag tat agt tca att gct ggt tta agt ctt gta att tta cct cct	3476
Pro Glu Tyr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Ser Leu Val Ile Leu Pro Pro	
950 955 960	
tta ttc cct tat tta gaa cca caa gaa gca gag cta gta att caa ata	3524
Leu Phe Pro Tyr Leu Glu Pro Gln Glu Ala Glu Leu Val Ile Gln Ile	
965 970 975 980	
ttt gat ttt att tct tct gac aca cac aag tgc cta caa gga tta aag	3572
Phe Asp Phe Ile Ser Ser Asp Thr His Lys Cys Leu Gln Gly Leu Lys	
985 990 995	
tgg gct atc ccc acc agt ctg gat tca gcg tgc ttt agc ctt aag gct	3620
Trp Ala Ile Pro Thr Ser Leu Asp Ser Ala Cys Phe Ser Leu Lys Ala	
1000 1005 1010	
aaa gaa ata ttc tgt tcg ctt caa aat gaa gat ttt tac tct gag ctt	3668
Lys Glu Ile Phe Cys Ser Leu Gln Asn Glu Asp Phe Tyr Ser Glu Leu	
1015 1020 1025	
caa agt ata att aag tgt tta act aac gaa aat gag cca gtt tgt tat	3716
Gln Ser Ile Ile Lys Cys Leu Thr Asn Glu Asn Glu Pro Val Cys Tyr	
1030 1035 1040	
tta ggt tta caa aaa tta gaa ctt ttt ttt caa gcc aag gtg gac gag	3764
Leu Gly Leu Gln Lys Leu Glu Leu Phe Phe Gln Ala Lys Val Asp Glu	
1045 1050 1055 1060	
tta cat gac aca cta aat ttg gac ata tcc aac gaa gtt ctg gac caa	3812
Leu His Asp Thr Leu Asn Leu Asp Ile Ser Asn Glu Val Leu Asp Gln	
1065 1070 1075	
tta cta aga tgc ctt tta gat tgt tgt gta aaa tat gct tca aca aat	3860
Leu Leu Arg Cys Leu Leu Asp Cys Cys Val Lys Tyr Ala Ser Thr Asn	
1080 1085 1090	
atg caa ata tca tat ctt gct gca aaa aat ctt ggt gaa ttg ggt gcg	3908
Met Gln Ile Ser Tyr Leu Ala Ala Lys Asn Leu Gly Glu Leu Gly Ala	
1095 1100 1105	
ata gat ccc agc cgc gcc aag gct caa cat att att aaa gaa aca gtt	3956
Ile Asp Pro Ser Arg Ala Lys Ala Gln His Ile Ile Lys Glu Thr Val	
1110 1115 1120	
gtt ctt gat aac ttt gaa aac gga gaa gaa agt ttg aag ttt att cta	4004
Val Leu Asp Asn Phe Glu Asn Gly Glu Glu Ser Leu Lys Phe Ile Leu	
1125 1130 1135 1140	

gat ttt atg caa tcg cag tta att cca gct ttc ctt gtt act act gat 4052
 Asp Phe Met Gln Ser Gln Leu Ile Pro Ala Phe Leu Val Thr Thr Asp
 1145 1150 1155

act aaa gca caa ggt ttt ctt gcc tat gct ctg caa gag ttt cta aag 4100
 Thr Lys Ala Gln Gly Phe Leu Ala Tyr Ala Leu Gln Glu Phe Leu Lys
 1160 1165 1170

ctt ggt gga ttc aag tcc gca gtg att aat aaa aaa aag gga cta act 4148
 Leu Gly Gly Phe Lys Ser Ala Val Ile Asn Lys Lys Lys Gly Leu Thr
 1175 1180 1185

gtg gta aca gaa cat tgg atg tct ttg cct gat tta tcc aaa cgt gtg 4196
 Val Val Thr Glu His Trp Met Ser Leu Pro Asp Leu Ser Lys Arg Val
 1190 1195 1200

ctt ata cca ttt tta act tcc aag tat cat tta aca cca atc ccc aaa 4244
 Leu Ile Pro Phe Leu Thr Ser Lys Tyr His Leu Thr Pro Ile Pro Lys
 1205 1210 1215 1220

att gac att cgg tac cct att tat aaa gaa aat gtt act att cat act 4292
 Ile Asp Ile Arg Tyr Pro Ile Tyr Lys Glu Asn Val Thr Ile His Thr
 1225 1230 1235

tgg atg cag ttg ttt tct ctt aaa ttg atg gag tac gcc cat tcg caa 4340
 Trp Met Gln Leu Phe Ser Leu Lys Leu Met Glu Tyr Ala His Ser Gln
 1240 1245 1250

aac gct gaa aaa ata ttt ggt att tgt tcg aaa gta gtg aaa gac caa 4388
 Asn Ala Glu Lys Ile Phe Gly Ile Cys Ser Lys Val Val Lys Asp Gln
 1255 1260 1265

gag gtt aac att ccc tgt ttt ctt ctt ccc ttt ctt gtt tta aat gtt 4436
 Glu Val Asn Ile Pro Cys Phe Leu Leu Pro Phe Leu Val Leu Asn Val
 1270 1275 1280

att tta acc gag tca gaa ctg gaa gtt aat aaa gtc att gaa gaa ttc 4484
 Ile Leu Thr Glu Ser Glu Leu Glu Val Asn Lys Val Ile Glu Glu Phe
 1285 1290 1295 1300

cag ctt gtt att aat caa ccg gga cct gat gga tta aat tcc gtg ggg 4532
 Gln Leu Val Ile Asn Gln Pro Gly Pro Asp Gly Leu Asn Ser Val Gly
 1305 1310 1315

caa caa aga tac acc tca ttt gta gat gta ttt ttt aag att gtg gat 4580
 Gln Gln Arg Tyr Thr Ser Phe Val Asp Val Phe Phe Lys Ile Val Asp
 1320 1325 1330

tac ctt aac aaa tgg ctt cgc atg cga aag aag agg aat tgg gat aga 4628
 Tyr Leu Asn Lys Trp Leu Arg Met Arg Lys Lys Arg Asn Trp Asp Arg
 1335 1340 1345

cgt tct gcc att gca agg aaa gag aac cgt tat atg tcg gtg gaa gat 4676
 Arg Ser Ala Ile Ala Arg Lys Glu Asn Arg Tyr Met Ser Val Glu Asp
 1350 1355 1360

gct acc tct cga gaa tca tcg atc tca aaa gtt gag tca ttt ctt tct 4724
 Ala Thr Ser Arg Glu Ser Ser Ile Ser Lys Val Glu Ser Phe Leu Ser
 1365 1370 1375 1380
 cga ttt cct tca aaa aca tta ggt att gtc tct tta aat tgt gga ttt 4772
 Arg Phe Pro Ser Lys Thr Leu Gly Ile Val Ser Leu Asn Cys Gly Phe
 1385 1390 1395
 cat gct cgt gca ttg ttt tat tgg gag caa cac ata cgt aat gct aca 4820
 His Ala Arg Ala Leu Phe Tyr Trp Glu Gln His Ile Arg Asn Ala Thr
 1400 1405 1410
 gct cca tat gca gct tta gag tcc gat tat aga gtt ttg cag gaa ata 4868
 Ala Pro Tyr Ala Ala Leu Glu Ser Asp Tyr Arg Val Leu Gln Glu Ile
 1415 1420 1425
 tat gct gga att gat gat cca gat gaa atc gaa gca gtg tct tta aat 4916
 Tyr Ala Gly Ile Asp Asp Pro Asp Glu Ile Glu Ala Val Ser Leu Asn
 1430 1435 1440
 ttc cat gat tac tcg ttt gat caa caa ctc ctt tta cat gaa aat tca 4964
 Phe His Asp Tyr Ser Phe Asp Gln Gln Leu Leu Leu His Glu Asn Ser
 1445 1450 1455 1460
 gga aca tgg gac tcg gct ttg agt tgt tac gaa att att att caa aag 5012
 Gly Thr Trp Asp Ser Ala Leu Ser Cys Tyr Glu Ile Ile Ile Gln Lys
 1465 1470 1475
 gat cct gaa aat aaa aag gcg aaa atc ggt ttg ctt aac agc atg ctg 5060
 Asp Pro Glu Asn Lys Lys Ala Lys Ile Gly Leu Leu Asn Ser Met Leu
 1480 1485 1490
 caa tcg ggg cat tat gaa tct ctt gtt ttg agt tta gat tct ttt ata 5108
 Gln Ser Gly His Tyr Glu Ser Leu Val Leu Ser Leu Asp Ser Phe Ile
 1495 1500 1505
 atc aat gac aac cac gag tat tcg aag atg tta aat ttg ggt att gaa 5156
 Ile Asn Asp Asn His Glu Tyr Ser Lys Met Leu Asn Leu Gly Ile Glu
 1510 1515 1520
 gct tca tgg cgt tcg cta tct att gat tcg tta aaa aag tgt ctt tca 5204
 Ala Ser Trp Arg Ser Leu Ser Ile Asp Ser Leu Lys Lys Cys Leu Ser
 1525 1530 1535 1540
 aaa agc aac ttg gaa tct ttc gaa gct aaa ttg ggt agc ata ttt tac 5252
 Lys Ser Asn Leu Glu Ser Phe Glu Ala Lys Leu Gly Ser Ile Phe Tyr
 1545 1550 1555
 caa tac cta cgg aag gat tct ttt gct gaa ttg acg gag cgg ctg caa 5300
 Gln Tyr Leu Arg Lys Asp Ser Phe Ala Glu Leu Thr Glu Arg Leu Gln
 1560 1565 1570
 ccc ttg tac gtt gat gct gct aca gca att gca aac aca ggc gcc cat 5348
 Pro Leu Tyr Val Asp Ala Ala Thr Ala Ile Ala Asn Thr Gly Ala His
 1575 1580 1585

tca gcc tat gat tgt tat gat att tta tct aag ctg cac gca att aat Ser Ala Tyr Asp Cys Tyr Asp Ile Leu Ser Lys Leu His Ala Ile Asn 1590 1595 1600	5396
gac ttt agt agg att gct gaa act gac gga att gtt tcc gac aat ctt Asp Phe Ser Arg Ile Ala Glu Thr Asp Gly Ile Val Ser Asp Asn Leu 1605 1610 1615 1620	5444
gat att gtt ctt cgc cgt cgg ctt agc caa gta gct ccg tac ggt aaa Asp Ile Val Leu Arg Arg Arg Leu Ser Gln Val Ala Pro Tyr Gly Lys 1625 1630 1635	5492
ttc aag cac caa atc ctg tcc act cac tta gtt ggc tat gaa aaa ttt Phe Lys His Gln Ile Leu Ser Thr His Leu Val Gly Tyr Glu Lys Phe 1640 1645 1650	5540
gaa aac acg aag aaa act gct gaa ata tat ctc gag att gca aga ata Glu Asn Thr Lys Lys Thr Ala Glu Ile Tyr Leu Glu Ile Ala Arg Ile 1655 1660 1665	5588
tct cga aaa aat ggt caa ttt caa aga gcc ttc aat gcc atc ctc aaa Ser Arg Lys Asn Gly Gln Phe Gln Arg Ala Phe Asn Ala Ile Leu Lys 1670 1675 1680	5636
gca atg gat tta gat aaa ccg cta gca aca ata gag cac gca caa tgg Ala Met Asp Leu Asp Lys Pro Leu Ala Thr Ile Glu His Ala Gln Trp 1685 1690 1695 1700	5684
tgg tgg cat caa ggg caa cat cgt aaa gct att tct gaa ttg aat ttt Trp Trp His Gln Gly Gln His Arg Lys Ala Ile Ser Glu Leu Asn Phe 1705 1710 1715	5732
tcg ctt aat aac aac atg ttt gat ttg gtt gat gag cat gaa gaa aga Ser Leu Asn Asn Asn Met Phe Asp Leu Val Asp Glu His Glu Glu Arg 1720 1725 1730	5780
cct aaa aat cgt aaa gaa act tta gga aat cca ctt aaa gga aaa gtg Pro Lys Asn Arg Lys Glu Thr Leu Gly Asn Pro Leu Lys Gly Lys Val 1735 1740 1745	5828
ttc ttg aaa ctt aca aaa tgg ctc gga aaa gct ggc caa ctg gga ttg Phe Leu Lys Leu Thr Lys Trp Leu Gly Lys Ala Gly Gln Leu Gly Leu 1750 1755 1760	5876
aag gat ttg gag acg tat tat cat aaa gcg gta gag att tac tca gaa Lys Asp Leu Glu Thr Tyr Tyr His Lys Ala Val Glu Ile Tyr Ser Glu 1765 1770 1775 1780	5924
tgt gag aat acg cat tat tat ctt ggc cat cat cga gtt tta atg tat Cys Glu Asn Thr His Tyr Tyr Leu Gly His His Arg Val Leu Met Tyr 1785 1790 1795	5972
gaa gaa gaa caa aag ctc cca gtt aat gaa cag agc gaa cga ttt tta Glu Glu Glu Gln Lys Leu Pro Val Asn Glu Gln Ser Glu Arg Phe Leu 1800 1805 1810	6020

agt ggt gag tta gta act cgc ata att aac gaa ttt ggt cga tct ttg Ser Gly Glu Leu Val Thr Arg Ile Ile Asn Glu Phe Gly Arg Ser Leu 1815 1820 1825	6068
tac tat ggt aca aat cat ata tat gaa agt atg cca aaa ttg ctc aca Tyr Tyr Gly Thr Asn His Ile Tyr Glu Ser Met Pro Lys Leu Leu Thr 1830 1835 1840	6116
ctg tgg ctt gat ttt ggg gcc gaa gaa ctt cgc tta tct aaa gat gac Leu Trp Leu Asp Phe Gly Ala Glu Glu Leu Arg Leu Ser Lys Asp Asp 1845 1850 1855 1860	6164
ggc gaa aag tac ttt cgt gaa cac att atc tct tcg aga aaa aaa tct Gly Glu Lys Tyr Phe Arg Glu His Ile Ile Ser Ser Arg Lys Lys Ser 1865 1870 1875	6212
ttg gaa ctt atg aat tcg aat gtt tgt cgc ctt tct atg aaa att cct Leu Glu Leu Met Asn Ser Asn Val Cys Arg Leu Ser Met Lys Ile Pro 1880 1885 1890	6260
caa tac ttt ttt ctg gtt gca tta tcc caa atg ata tcc aga gta tgc Gln Tyr Phe Phe Leu Val Ala Leu Ser Gln Met Ile Ser Arg Val Cys 1895 1900 1905	6308
cat cca aat aat aaa gtt tat aaa att ttg gaa cat ata att gca aac His Pro Asn Asn Lys Val Tyr Lys Ile Leu Glu His Ile Ile Ala Asn 1910 1915 1920	6356
gtt gta gca tct tat cct ggg gag acg cta tgg caa tta atg gca aca Val Val Ala Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Leu Trp Gln Leu Met Ala Thr 1925 1930 1935 1940	6404
ata aaa tcg act tct caa aag cgc tcg ctt cgt gga aaa agc att tta Ile Lys Ser Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Arg Gly Lys Ser Ile Leu 1945 1950 1955	6452
aat gtt tta cat tct agg aag ctt tct atg tct tcc aaa gtt gat ata Asn Val Leu His Ser Arg Lys Leu Ser Met Ser Ser Lys Val Asp Ile 1960 1965 1970	6500
aaa gca ctc agt caa tct gca att ctc att act gaa aag tta atc aat Lys Ala Leu Ser Gln Ser Ala Ile Leu Ile Thr Glu Lys Leu Ile Asn 1975 1980 1985	6548
ttg tgc aat aca agg att aac agt aaa tct gta aaa atg agc tta aag Leu Cys Asn Thr Arg Ile Asn Ser Lys Ser Val Lys Met Ser Leu Lys 1990 1995 2000	6596
gat cat ttt cgg ctt tct ttt gat gat ccg gta gat tta gtc att cct Asp His Phe Arg Leu Ser Phe Asp Asp Pro Val Asp Leu Val Ile Pro 2005 2010 2015 2020	6644
gct aaa tca ttt tta gac att act tta cca gct aaa gat gct aac aga Ala Lys Ser Phe Leu Asp Ile Thr Leu Pro Ala Lys Asp Ala Asn Arg 2025 2030 2035	6692

gct agt cat tat cca ttt cca aaa act cag cct act ctg ttg aaa ttt	6740
Ala Ser His Tyr Pro Phe Pro Lys Thr Gln Pro Thr Leu Leu Lys Phe	
2040 2045 2050	
gag gat gag gtg gat ata atg aac tct ctt caa aaa cca aga aaa gtg	6788
Glu Asp Glu Val Asp Ile Met Asn Ser Leu Gln Lys Pro Arg Lys Val	
2055 2060 2065	
tac gtt aga ggt acg gat ggc aac tta tac cca ttc ttg tgc aaa ccc	6836
Tyr Val Arg Gly Thr Asp Gly Asn Leu Tyr Pro Phe Leu Cys Lys Pro	
2070 2075 2080	
aaa gat gat ctt cgt aag gat gct aga ttg atg gaa ttt aat aat ctt	6884
Lys Asp Asp Leu Arg Lys Asp Ala Arg Leu Met Glu Phe Asn Asn Leu	
2085 2090 2095 2100	
att tgt aaa ata ttg agg aaa gat caa gaa gcg aac aga agg aac ttg	6932
Ile Cys Lys Ile Leu Arg Lys Asp Gln Glu Ala Asn Arg Arg Asn Leu	
2105 2110 2115	
tgt att aga act tat gtt gtt att cct tta aat gaa gaa tgc gga ttt	6980
Cys Ile Arg Thr Tyr Val Val Ile Pro Leu Asn Glu Glu Cys Gly Phe	
2120 2125 2130	
atc gaa tgg gta aat cat act cgt cca ttt aga gaa att ttg tta aaa	7028
Ile Glu Trp Val Asn His Thr Arg Pro Phe Arg Glu Ile Leu Leu Lys	
2135 2140 2145	
agc tat aga cag aaa aac att ccc ata tca tat caa gaa atc aaa gtt	7076
Ser Tyr Arg Gln Lys Asn Ile Pro Ile Ser Tyr Gln Glu Ile Lys Val	
2150 2155 2160	
gat tta gac ttt gca ctg cga agt cct aac cct ggt gat ata ttt gaa	7124
Asp Leu Asp Phe Ala Leu Arg Ser Pro Asn Pro Gly Asp Ile Phe Glu	
2165 2170 2175 2180	
aag aaa atc tta ccg aaa ttt cct cca gtt ttt tat gag tgg ttt gtt	7172
Lys Lys Ile Leu Pro Lys Phe Pro Pro Val Phe Tyr Glu Trp Phe Val	
2185 2190 2195	
gaa tct ttc cca gaa cca aat aat tgg gtt act agt aga caa aac tat	7220
Glu Ser Phe Pro Glu Pro Asn Asn Trp Val Thr Ser Arg Gln Asn Tyr	
2200 2205 2210	
tgc cga act tta gca gta atg tca ata gtt ggc tac gtt ttg ggt ttg	7268
Cys Arg Thr Leu Ala Val Met Ser Ile Val Gly Tyr Val Leu Gly Leu	
2215 2220 2225	
gga gat cgc cat ggc gaa aac ata ttg ttt gat gaa ttt aca ggt gaa	7316
Gly Asp Arg His Gly Glu Asn Ile Leu Phe Asp Glu Phe Thr Gly Glu	
2230 2235 2240	
gct atc cat gtc gat ttc aac tgt ctt ttt gat aaa ggt ctt act ttt	7364
Ala Ile His Val Asp Phe Asn Cys Leu Phe Asp Lys Gly Leu Thr Phe	
2245 2250 2255 2260	

gaa aaa cct gaa aag gtg ccg ttc aga tta act cat aat atg gta gat 7412
 Glu Lys Pro Glu Lys Val Pro Phe Arg Leu Thr His Asn Met Val Asp
 2265 2270 2275

gca atg ggt ccg aca ggt tat gaa ggg ggt ttc agg aaa gct agc gaa 7460
 Ala Met Gly Pro Thr Gly Tyr Glu Gly Gly Phe Arg Lys Ala Ser Glu
 2280 2285 2290

ata acg atg cgg ctt ctt cgc tca aac caa gat aca ttg atg agc gta 7508
 Ile Thr Met Arg Leu Leu Arg Ser Asn Gln Asp Thr Leu Met Ser Val
 2295 2300 2305

cta gag tct ttc cta cat gat cct tta gtc gag tgg aat aga aag aag 7556
 Leu Glu Ser Phe Leu His Asp Pro Leu Val Glu Trp Asn Arg Lys Lys
 2310 2315 2320

tcg tca agc aag tac ccg aat aat gaa gca aat gaa gtt ttg gat ata 7604
 Ser Ser Ser Lys Tyr Pro Asn Asn Glu Ala Asn Glu Val Leu Asp Ile
 2325 2330 2335 2340

att cgc aaa aaa ttt caa ggc ttt atg cca ggg gag acg ata cct tta 7652
 Ile Arg Lys Lys Phe Gln Gly Phe Met Pro Gly Glu Thr Ile Pro Leu
 2345 2350 2355

tct att gaa ggg caa att caa gaa ttg atc aaa tct gct gtc aac cca 7700
 Ser Ile Glu Gly Gln Ile Gln Glu Leu Ile Lys Ser Ala Val Asn Pro
 2360 2365 2370

aaa aac ctg gta gaa atg tac att ggt tgg gct gct tat ttc 7742
 Lys Asn Leu Val Glu Met Tyr Ile Gly Trp Ala Ala Tyr Phe
 2375 2380 2385

tagcatttta ctaacaaaaa tttcaatgaa caagctaccc attattaaac ttatgatttg 7802

aatcgaagat attttatttta ttaatccgat gaagaattct cgctgagttg ttcaatttct 7862

tgtaattttc cttccatttc taaatcgctcg attcgcttaa atagggcact ggctttttgt 7922

gcatttttct ctcgtaaagc agcttctgat tgaaaaaag ctatatctgt ttctgagtca 7982

tcattccgaat caacaatata ttttgcagat cgacctgcag 8022

<210> 4

<211> 2386

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Gln His Ala Lys Arg Lys Ala Gly Ser Leu Asp Leu Ser Pro
 1 5 10 15

Arg Gly Leu Asp Asp Arg Gln Ala Phe Gly Gln Leu Leu Lys Glu Val
 20 25 30

Leu Ala Leu Asp Lys Glu His Glu Leu Gly Arg Ser Asn Ser Leu Pro
 35 40 45

Ser Met Thr Ser Glu Leu Val Glu Val Leu Ile Glu Val Gly Leu Leu
 50 55 60
 Ala Phe Lys His Asp Asp Ser Lys Ser Glu Phe Ile Ser Pro Lys Met
 65 70 75 80
 Leu Lys Glu Ala His Leu Ser Leu Gln Ala Leu Met Leu Ile Leu Lys
 85 90 95
 Arg Ser Pro Thr Val Leu Arg Glu Ile Lys Ser Ser Val Thr Leu Leu
 100 105 110
 Asp Trp Ile Leu Pro Arg Thr Ile Ser Leu Phe Ala Asp Ile Arg Phe
 115 120 125
 Ile Lys Leu Phe Asp Ser Leu Lys Glu Phe His Lys Leu Ile Tyr Gln
 130 135 140
 Leu Ile Ser Glu Lys Ser Phe Leu Trp Asp Leu Tyr Ala Ser Phe Met
 145 150 155 160
 Arg Tyr Trp Lys Tyr Tyr Ile Thr Asn Val Ser Ser Ile Val Leu Gln
 165 170 175
 Ile Thr Asn Ala Thr Phe Pro Tyr Lys Met Pro Ser Pro Asn Ser Gln
 180 185 190
 Pro Leu Gln Ser Ile Ser Pro Asn Tyr Pro Thr His Arg Glu Asp Lys
 195 200 205
 Phe Asp Leu Leu Ile Ile Asn Ile Glu Glu Ala Cys Thr Phe Phe Phe
 210 215 220
 Glu Ser Ala His Phe Phe Ala Gln Cys Ser Tyr Leu Lys Lys Ser Asn
 225 230 235 240
 Phe Pro Ser Pro Pro Leu Phe Thr Ala Trp Thr Trp Ile Lys Pro Cys
 245 250 255
 Phe Phe Asn Phe Val Ile Leu Leu Lys Arg Ile Ser Ile Gly Asp Ser
 260 265 270
 Gln Leu Phe Leu His Leu His Ser Arg Ile Val Gln Thr Leu Cys Cys
 275 280 285
 Phe Ser Leu Asn Phe Ile Tyr His Gly Leu Pro Ile Cys Glu Lys Ser
 290 295 300
 Lys His Ile Leu Met Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu Gly Ser Leu Lys
 305 310 315 320
 Lys Thr Tyr Thr Val Ala Asn Thr Ala Ile Ser Leu Phe Phe Leu Ser
 325 330 335
 Leu Phe Val Leu Pro Lys Thr Val Ala Gly Leu Phe Tyr Pro Phe Gly
 340 345 350

Val Ser Leu Leu Ser Asp Phe Lys Val Leu Glu Gln Leu Glu Pro Asp
 355 360 365
 Ser Asp Leu Lys Lys Ala Ile Ile Leu Phe Lys Cys Arg Tyr Gln Ser
 370 375 380
 Ser Glu Ile Asp Gln Thr Thr Leu Arg Ala Phe Gly Glu Ile Cys Thr
 385 390 395 400
 Gly Lys Leu Glu Asn Thr Leu Phe Ser Asn Ser Glu Leu Asn Leu Phe
 405 410 415
 Leu Leu His Tyr Leu Ser Leu Asp Asn Asp Leu Ser Asn Ile Leu Lys
 420 425 430
 Val Asp Phe Gln Asn Gly His Asn Ile Cys Thr Phe Ala Lys Trp Cys
 435 440 445
 Ile Asn Asn Asn Leu Asp Glu Pro Ser Asn Leu Lys His Phe Arg Glu
 450 455 460
 Met Leu Asp Tyr Tyr Ser Ser His Asn Val Thr Ile Ser Glu Asp Asp
 465 470 475 480
 Leu Lys Asn Phe Ser Leu Val Leu Cys Thr His Val Ala Lys Val Asn
 485 490 495
 Glu Lys Thr Asn Ser Ile Phe Arg Thr Tyr Glu Val His Gly Cys Glu
 500 505 510
 Val Cys Asn Ser Phe Cys Leu Leu Phe Asp Glu Arg Ser Pro Phe Lys
 515 520 525
 Ile Pro Tyr His Glu Leu Phe Cys Ala Leu Leu Lys Asn Pro Asp Ile
 530 535 540
 Ile Ser Ser Ser Val Lys Gln Ser Leu Leu Leu Asp Gly Phe Phe Arg
 545 550 555 560
 Trp Ser Gln His Cys Ser Asn Phe Asn Lys Glu Ser Met Leu Ser Leu
 565 570 575
 Arg Glu Phe Ile Met Lys Ala Leu Ala Ser Thr Ser Arg Cys Leu Arg
 580 585 590
 Val Val Ala Ala Lys Val Leu Pro Ile Phe Ile Lys Gly Pro Asn Asn
 595 600 605
 Leu Asp Ile Val Glu Phe His Lys Glu Ser Lys Ala Leu Ile Phe Asn
 610 615 620
 Thr Leu Lys Ile Leu Ala Val Glu Asn Thr Ala Ile Leu Glu Thr Val
 625 630 635 640
 Ile Leu Ser Trp Ile Ser Leu Ser Arg Val Val Glu Glu Glu Glu Leu
 645 650 655

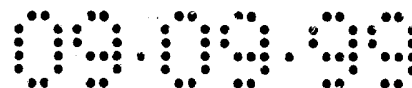
His Phe Val Leu Leu Glu Val Ile Ser Ser Val Ile Asn Ser Gly Ile
 660 665 670
 Phe Tyr Gln Gly Ile Gly Leu Ser Ala Leu Gln Gln Ile Ala Ser Thr
 675 680 685
 Arg His Ile Ser Val Trp Gln Leu Leu Ser Pro Tyr Trp Pro Thr Val
 690 695 700
 Ser Val Ala Ile Val Gln Gly Met Gly Lys Lys Pro Asn Ile Ala Ser
 705 710 715 720
 Leu Phe Ala Gln Leu Met Asn Ile Ser Glu Gly Asp Phe Leu Ile Arg
 725 730 735
 Thr Gln Ala Tyr Thr Leu Pro Phe Leu Val Leu Thr Lys Asn Lys Ala
 740 745 750
 Leu Ile Val Arg Ile Ala Glu Leu Ser Gln Ser Asp Val Ala Thr Leu
 755 760 765
 Cys Leu Thr Asn Met His Lys Ile Leu Ala Ser Leu Leu Thr Thr Asp
 770 775 780
 His Pro Asn Leu Glu Glu Ser Val Met Leu Leu Leu Ser Leu Ala Thr
 785 790 795 800
 Ser Asp Phe Glu Lys Val Asp Leu Thr Ser Leu Leu Arg Ser Asp Pro
 805 810 815
 Ile Ser Ile Thr Val Glu Leu Leu Gln Leu Tyr Gln Asn Asp Val Pro
 820 825 830
 His Glu Lys Ile Glu Asn Ala Leu Arg Lys Val Ala Met Ile Val Ser
 835 840 845
 Gln Val Val Asn Asp Glu Asp Leu Ser Asn Lys Glu Leu Leu Tyr Asp
 850 855 860
 Phe Phe Asn Asn His Ile Leu Gly Ile Leu Ala Glu Phe Ser Asn Ile
 865 870 875 880
 Leu Asn Asp Leu Lys Gly Lys Thr Ser Ile Asn Glu Lys Ile Lys Thr
 885 890 895
 Ile Val Gly Ile Glu Lys Met Leu Ser Leu Cys Gly Gly Ala Val Lys
 900 905 910
 Leu Gly Leu Pro Gln Ile Leu Ser Asn Leu Gln Ser Ala Phe Gln Asn
 915 920 925
 Glu His Leu Arg Phe Tyr Ala Ile Lys Ala Trp Phe Ser Leu Ile Leu
 930 935 940
 Ala Thr Lys Glu Pro Glu Tyr Ser Ser Ile Ala Gly Leu Ser Leu Val
 945 950 955 960

Ile Leu Pro Pro Leu Phe Pro Tyr Leu Glu Pro Gln Glu Ala Glu Leu
 965 970 975
 Val Ile Gln Ile Phe Asp Phe Ile Ser Ser Asp Thr His Lys Cys Leu
 980 985 990
 Gln Gly Leu Lys Trp Ala Ile Pro Thr Ser Leu Asp Ser Ala Cys Phe
 995 1000 1005
 Ser Leu Lys Ala Lys Glu Ile Phe Cys Ser Leu Gln Asn Glu Asp Phe
 1010 1015 1020
 Tyr Ser Glu Leu Gln Ser Ile Ile Lys Cys Leu Thr Asn Glu Asn Glu
 025 1030 1035 1040
 Pro Val Cys Tyr Leu Gly Leu Gln Lys Leu Glu Leu Phe Phe Gln Ala
 1045 1050 1055
 Lys Val Asp Glu Leu His Asp Thr Leu Asn Leu Asp Ile Ser Asn Glu
 1060 1065 1070
 Val Leu Asp Gln Leu Leu Arg Cys Leu Leu Asp Cys Cys Val Lys Tyr
 1075 1080 1085
 Ala Ser Thr Asn Met Gln Ile Ser Tyr Leu Ala Ala Lys Asn Leu Gly
 1090 1095 1100
 Glu Leu Gly Ala Ile Asp Pro Ser Arg Ala Lys Ala Gln His Ile Ile
 105 1110 1115 1120
 Lys Glu Thr Val Val Leu Asp Asn Phe Glu Asn Gly Glu Glu Ser Leu
 1125 1130 1135
 Lys Phe Ile Leu Asp Phe Met Gln Ser Gln Leu Ile Pro Ala Phe Leu
 1140 1145 1150
 Val Thr Thr Asp Thr Lys Ala Gln Gly Phe Leu Ala Tyr Ala Leu Gln
 1155 1160 1165
 Glu Phe Leu Lys Leu Gly Gly Phe Lys Ser Ala Val Ile Asn Lys Lys
 1170 1175 1180
 Lys Gly Leu Thr Val Val Thr Glu His Trp Met Ser Leu Pro Asp Leu
 185 1190 1195 1200
 Ser Lys Arg Val Leu Ile Pro Phe Leu Thr Ser Lys Tyr His Leu Thr
 1205 1210 1215
 Pro Ile Pro Lys Ile Asp Ile Arg Tyr Pro Ile Tyr Lys Glu Asn Val
 1220 1225 1230
 Thr Ile His Thr Trp Met Gln Leu Phe Ser Leu Lys Leu Met Glu Tyr
 1235 1240 1245
 Ala His Ser Gln Asn Ala Glu Lys Ile Phe Gly Ile Cys Ser Lys Val
 1250 1255 1260

Val Lys Asp Gln Glu Val Asn Ile Pro Cys Phe Leu Leu Pro Phe Leu
 265 1270 1275 1280
 Val Leu Asn Val Ile Leu Thr Glu Ser Glu Leu Glu Val Asn Lys Val
 1285 1290 1295
 Ile Glu Glu Phe Gln Leu Val Ile Asn Gln Pro Gly Pro Asp Gly Leu
 1300 1305 1310
 Asn Ser Val Gly Gln Gln Arg Tyr Thr Ser Phe Val Asp Val Phe Phe
 1315 1320 1325
 Lys Ile Val Asp Tyr Leu Asn Lys Trp Leu Arg Met Arg Lys Lys Arg
 1330 1335 1340
 Asn Trp Asp Arg Arg Ser Ala Ile Ala Arg Lys Glu Asn Arg Tyr Met
 345 1350 1355 1360
 Ser Val Glu Asp Ala Thr Ser Arg Glu Ser Ser Ile Ser Lys Val Glu
 1365 1370 1375
 Ser Phe Leu Ser Arg Phe Pro Ser Lys Thr Leu Gly Ile Val Ser Leu
 1380 1385 1390
 Asn Cys Gly Phe His Ala Arg Ala Leu Phe Tyr Trp Glu Gln His Ile
 1395 1400 1405
 Arg Asn Ala Thr Ala Pro Tyr Ala Ala Leu Glu Ser Asp Tyr Arg Val
 1410 1415 1420
 Leu Gln Glu Ile Tyr Ala Gly Ile Asp Asp Pro Asp Glu Ile Glu Ala
 425 1430 1435 1440
 Val Ser Leu Asn Phe His Asp Tyr Ser Phe Asp Gln Gln Leu Leu Leu
 1445 1450 1455
 His Glu Asn Ser Gly Thr Trp Asp Ser Ala Leu Ser Cys Tyr Glu Ile
 1460 1465 1470
 Ile Ile Gln Lys Asp Pro Glu Asn Lys Lys Ala Lys Ile Gly Leu Leu
 1475 1480 1485
 Asn Ser Met Leu Gln Ser Gly His Tyr Glu Ser Leu Val Leu Ser Leu
 1490 1495 1500
 Asp Ser Phe Ile Ile Asn Asp Asn His Glu Tyr Ser Lys Met Leu Asn
 505 1510 1515 1520
 Leu Gly Ile Glu Ala Ser Trp Arg Ser Leu Ser Ile Asp Ser Leu Lys
 1525 1530 1535
 Lys Cys Leu Ser Lys Ser Asn Leu Glu Ser Phe Glu Ala Lys Leu Gly
 1540 1545 1550
 Ser Ile Phe Tyr Gln Tyr Leu Arg Lys Asp Ser Phe Ala Glu Leu Thr
 1555 1560 1565

Glu Arg Leu Gln Pro Leu Tyr Val Asp Ala Ala Thr Ala Ile Ala Asn
 1570 1575 1580
 Thr Gly Ala His Ser Ala Tyr Asp Cys Tyr Asp Ile Leu Ser Lys Leu
 585 1590 1595 1600
 His Ala Ile Asn Asp Phe Ser Arg Ile Ala Glu Thr Asp Gly Ile Val
 1605 1610 1615
 Ser Asp Asn Leu Asp Ile Val Leu Arg Arg Arg Leu Ser Gln Val Ala
 1620 1625 1630
 Pro Tyr Gly Lys Phe Lys His Gln Ile Leu Ser Thr His Leu Val Gly
 1635 1640 1645
 Tyr Glu Lys Phe Glu Asn Thr Lys Lys Thr Ala Glu Ile Tyr Leu Glu
 1650 1655 1660
 Ile Ala Arg Ile Ser Arg Lys Asn Gly Gln Phe Gln Arg Ala Phe Asn
 665 1670 1675 1680
 Ala Ile Leu Lys Ala Met Asp Leu Asp Lys Pro Leu Ala Thr Ile Glu
 1685 1690 1695
 His Ala Gln Trp Trp Trp His Gln Gly Gln His Arg Lys Ala Ile Ser
 1700 1705 1710
 Glu Leu Asn Phe Ser Leu Asn Asn Asn Met Phe Asp Leu Val Asp Glu
 1715 1720 1725
 His Glu Glu Arg Pro Lys Asn Arg Lys Glu Thr Leu Gly Asn Pro Leu
 1730 1735 1740
 Lys Gly Lys Val Phe Leu Lys Leu Thr Lys Trp Leu Gly Lys Ala Gly
 745 1750 1755 1760
 Gln Leu Gly Leu Lys Asp Leu Glu Thr Tyr Tyr His Lys Ala Val Glu
 1765 1770 1775
 Ile Tyr Ser Glu Cys Glu Asn Thr His Tyr Tyr Leu Gly His His Arg
 1780 1785 1790
 Val Leu Met Tyr Glu Glu Glu Gln Lys Leu Pro Val Asn Glu Gln Ser
 1795 1800 1805
 Glu Arg Phe Leu Ser Gly Glu Leu Val Thr Arg Ile Ile Asn Glu Phe
 1810 1815 1820
 Gly Arg Ser Leu Tyr Tyr Gly Thr Asn His Ile Tyr Glu Ser Met Pro
 825 1830 1835 1840
 Lys Leu Leu Thr Leu Trp Leu Asp Phe Gly Ala Glu Glu Leu Arg Leu
 1845 1850 1855
 Ser Lys Asp Asp Gly Glu Lys Tyr Phe Arg Glu His Ile Ile Ser Ser
 1860 1865 1870

Arg Lys Lys Ser Leu Glu Leu Met Asn Ser Asn Val Cys Arg Leu Ser
 1875 1880 1885
 Met Lys Ile Pro Gln Tyr Phe Phe Leu Val Ala Leu Ser Gln Met Ile
 1890 1895 1900
 Ser Arg Val Cys His Pro Asn Asn Lys Val Tyr Lys Ile Leu Glu His
 905 1910 1915 1920
 Ile Ile Ala Asn Val Val Ala Ser Tyr Pro Gly Glu Thr Leu Trp Gln
 1925 1930 1935
 Leu Met Ala Thr Ile Lys Ser Thr Ser Gln Lys Arg Ser Leu Arg Gly
 1940 1945 1950
 Lys Ser Ile Leu Asn Val Leu His Ser Arg Lys Leu Ser Met Ser Ser
 1955 1960 1965
 Lys Val Asp Ile Lys Ala Leu Ser Gln Ser Ala Ile Leu Ile Thr Glu
 1970 1975 1980
 Lys Leu Ile Asn Leu Cys Asn Thr Arg Ile Asn Ser Lys Ser Val Lys
 985 1990 1995 2000
 Met Ser Leu Lys Asp His Phe Arg Leu Ser Phe Asp Asp Pro Val Asp
 2005 2010 2015
 Leu Val Ile Pro Ala Lys Ser Phe Leu Asp Ile Thr Leu Pro Ala Lys
 2020 2025 2030
 Asp Ala Asn Arg Ala Ser His Tyr Pro Phe Pro Lys Thr Gln Pro Thr
 2035 2040 2045
 Leu Leu Lys Phe Glu Asp Glu Val Asp Ile Met Asn Ser Leu Gln Lys
 2050 2055 2060
 Pro Arg Lys Val Tyr Val Arg Gly Thr Asp Gly Asn Leu Tyr Pro Phe
 065 2070 2075 2080
 Leu Cys Lys Pro Lys Asp Asp Leu Arg Lys Asp Ala Arg Leu Met Glu
 2085 2090 2095
 Phe Asn Asn Leu Ile Cys Lys Ile Leu Arg Lys Asp Gln Glu Ala Asn
 2100 2105 2110
 Arg Arg Asn Leu Cys Ile Arg Thr Tyr Val Val Ile Pro Leu Asn Glu
 2115 2120 2125
 Glu Cys Gly Phe Ile Glu Trp Val Asn His Thr Arg Pro Phe Arg Glu
 2130 2135 2140
 Ile Leu Leu Lys Ser Tyr Arg Gln Lys Asn Ile Pro Ile Ser Tyr Gln
 145 2150 2155 2160
 Glu Ile Lys Val Asp Leu Asp Phe Ala Leu Arg Ser Pro Asn Pro Gly
 2165 2170 2175



Asp Ile Phe Glu Lys Lys Ile Leu Pro Lys Phe Pro Pro Val Phe Tyr
2180 2185 2190

Glu Trp Phe Val Glu Ser Phe Pro Glu Pro Asn Asn Trp Val Thr Ser
2195 2200 2205

Arg Gln Asn Tyr Cys Arg Thr Leu Ala Val Met Ser Ile Val Gly Tyr
2210 2215 2220

Val Leu Gly Leu Gly Asp Arg His Gly Glu Asn Ile Leu Phe Asp Glu
2225 2230 2235 2240

Phe Thr Gly Glu Ala Ile His Val Asp Phe Asn Cys Leu Phe Asp Lys
2245 2250 2255

Gly Leu Thr Phe Glu Lys Pro Glu Lys Val Pro Phe Arg Leu Thr His
2260 2265 2270

Asn Met Val Asp Ala Met Gly Pro Thr Gly Tyr Glu Gly Gly Phe Arg
2275 2280 2285

Lys Ala Ser Glu Ile Thr Met Arg Leu Leu Arg Ser Asn Gln Asp Thr
2290 2295 2300

Leu Met Ser Val Leu Glu Ser Phe Leu His Asp Pro Leu Val Glu Trp
305 2310 2315 2320

Asn Arg Lys Lys Ser Ser Ser Lys Tyr Pro Asn Asn Glu Ala Asn Glu
2325 2330 2335

Val Leu Asp Ile Ile Arg Lys Lys Phe Gln Gly Phe Met Pro Gly Glu
2340 2345 2350

Thr Ile Pro Leu Ser Ile Glu Gly Gln Ile Gln Glu Leu Ile Lys Ser
2355 2360 2365

Ala Val Asn Pro Lys Asn Leu Val Glu Met Tyr Ile Gly Trp Ala Ala
2370 2375 2380

Tyr Phe
385

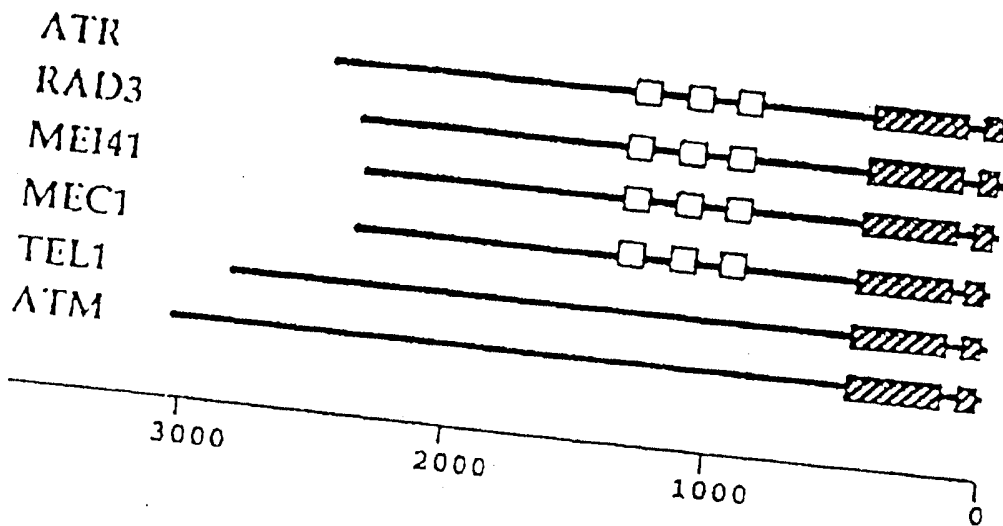
29.03.99

PV 656-98

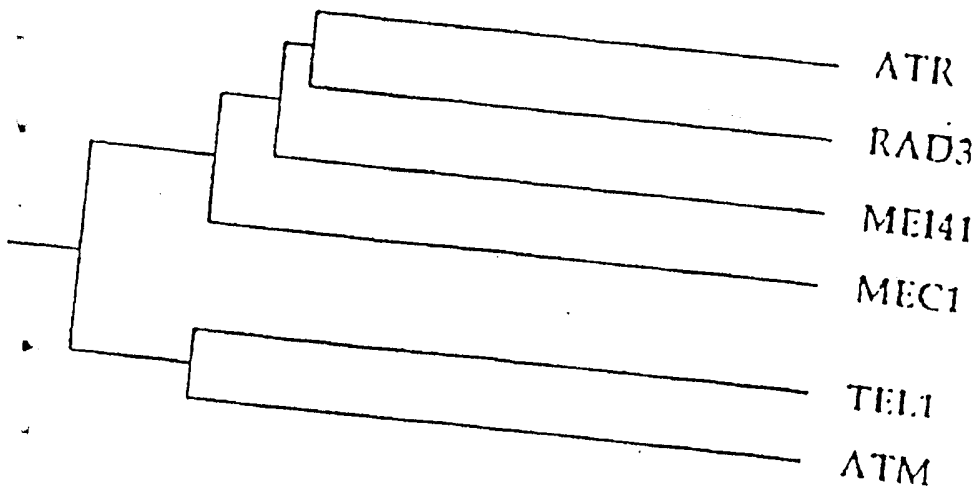
~~22488~~

A

Obr.1



B



1/1

29.03.99

PV 65b-98

2438

P A T E N O V É N Á R O K Y

1. Polynukleotid ve značně izolované formě, schopný selektivní hybridizace s Seq.ID No.1 nebo jejím komplementem.
2. Polynukleotid podle nároku 1, zahrnující Seq.ID No.1 nebo její část.
3. Polynukleotidová sonda, která zahrnuje část alespoň 15 nukleotidů polynukleotidu podle nároků 1 a 2.
4. Polynukleotid ve značně izolované formě, zahrnující Seq.ID No.3 nebo její komplement.
5. Polypeptid ve značně izolované formě, zahrnující buď sekvence popsané v Seq ID Nos.2 nebo 4, nebo polypeptid značně homologní k těmto sekvencím nebo část polypeptidu Seq. ID No.2.
6. Polynukleotid ve značně izolované formě kódující polypeptid podle nároku 5.
7. Vektor nesoucí polynukleotid definovaný v nárocích 1,2 nebo 6.
8. Protilátky schopné vázat polypeptid Seq.ID. No.2 nebo jeho část.
9. Metoda detekce přítomnosti či nepřítomnosti polynukleotidu podle nároku 1 ve vzorcích lidských nebo živočišných tkání. Metoda zahrnuje kontakt vzorků lidských nebo živočišných tkání obsahujících DNA nebo RNA se sondou obsahující polynukleotid nebo primer podle nároku 1 za hybridizačních podmínek a detekci jakéhokoliv duplexu vytvořeného mezi sondou a nukleovou kyselinou ve vzorku.
10. Metoda detekce polypeptidů podle nároku 6 přítomných v biologických vzorcích. Metoda zahrnuje:
 - a) zajištění protilátek podle nároku 7

29.03.99

- b) inkubaci biologických vzorků s výše zmíněnými protilátkami za podmínek, které dovolí tvorbu komplexu protilátka - antigen
- c) určení, zdali se komplex protilátka - antigen zahrnující výše zmíněné protilátky vytvořil.

11. Analytická metoda pro plošné určování potencionálně vhodných látek pro protirakovinovou terapii. Metoda zahrnuje:

- a) zajištění polypeptidu popsaného ve vynálezu, který si uchoval lipidkinázovou aktivitu a substrátu pro danou kinázu za podmínek a s takovými reagensii, že aktivita bude působit na daný substrát
- b) kontakt uvedených polypeptidů substrátu a slibných látek
- c) měření stupně snížení kinázové aktivity polypeptidu
- d) selekci vhodných látek, které způsobili snížení aktivity

12. Analytická metoda pro plošné určování potencionálně vhodných látek pro protirakovinovou terapii. Metoda zahrnuje:

- a) I. inkubaci polypeptidu popsaného ve vynálezu s dalším polypeptidem popsaným ve vynálezu, který může být stejný nebo odlišný od prvního polypeptidu za podmínek, které dovolují prvnímu polypeptidu navázat se na druhý polypeptid a vytvořit komplex

II. kontakt takto vzniklého komplexu s vhodnými látkami

nebo

- a) inkubaci polypeptidu popsaného ve vynálezu s dalším polypeptidem popsaným ve vynálezu, který může být stejný nebo odlišný od prvního polypeptidu za podmínek, které dovolují prvnímu polypeptidu navázat se na druhý polypeptid a vytvořit komplex za přítomnosti vhodné látky
- b) stanovení zdali vhodná látka inhibuje vazbu prvního polypeptidu na druhý polypeptid
- c) selekci vhodné látky, která inhibuje vazbu prvního polypeptidu na druhý polypeptid.

29.03.99

13. Metoda podle nároku 12, u které může být první zmíněný polypeptid odlišen od druhého zmíněného polypeptidu.
14. Metoda léčení rakoviny u pacientů, která zahrnuje aplikaci terapeuticky efektivních množství slibných látek selektovaných metodou podle jakéhokoliv z nároků 11 až 13 výše zmíněným pacientům.
15. Metoda zvýšení citlivosti rakovinných buněk pacienta k chemoterapii a/nebo radioterapii. Tato metoda zahrnuje aplikaci terapeuticky efektivních množství slibných látek selektovaných metodou podle jakéhokoliv z nároků 11 až 13 výše zmíněným pacientům.
16. Použití potencionálně vhodných látek selektovaných metodou podle jakéhokoliv z nároků 11 až 13 k léčení rakoviny.
17. Použití potencionálně vhodných látek selektovaných metodou podle jakéhokoliv z nároků 11 až 13 ke zvýšení citlivosti rakovinných buněk k chemoterapii a/nebo radioterapii.