



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 37 364 T2** 2008.07.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 123 387 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 37 364.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/24879**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 955 151.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/024913**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.10.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.05.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.08.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **17.10.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/88** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

177776	23.10.1998	US
178115	23.10.1998	US

(73) Patentinhaber:

Institute of Virology, Bratislava, SK

(74) Vertreter:

**PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR,
80801 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ZAVADA, Jan, 160 00 Prague 6, CZ;
PASTOREKOVA, Silvia, 841 07 Bratislava, SK;
PASTOREK, Jaromir, 841 07 Bratislava, SK**

(54) Bezeichnung: **MN GEN UND PROTEIN**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt im allgemeinen Bereich medizinischer Genetik und in den Bereichen des biochemischen Engineering, der Immunchemie und der Onkologie. Sie betrifft insbesondere das MN-Gen – ein zelluläres Gen, das als Onkogen angesehen wird und das für das Onkoprotein kodiert, das nun alternativ als das MN-Protein, das MN/CA IX-Isoenzym oder das MN/G250-Protein bekannt ist.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Zavada et al., Internationale Veröffentlichungsnummer WO 93/18125 (veröffentlicht am 16. September 1993) und das U.S. Patent Nr. 5,387,676 (ausgegeben am 7. Februar 1996) beschreiben die Erläuterung der biologischen und molekularen Natur von MaTu, die zu der Entdeckung des MN-Gens und -Proteins führte. Es wurde festgestellt, dass das MN-Gen in der chromosomalen DNA aller getesteten Vertebraten vorhanden ist und dessen Expression stark mit der Tumorigenität in Verbindung steht.

[0003] Das MN-Protein wurde zuerst in HeLa-Zellen identifiziert, die aus einem humanen Karzinom der Cervix uteri stammten. In vielen Typen humaner Karzinome (unter anderem insbesondere Gebärmutterhals-, Eierstock-, Endometriums-, Nieren-, Blasen-, Brust-, kolorektalen, Lungen-, Speiseröhren und Prostatakarzinomen). Es wurde festgestellt, dass nur sehr wenige normale Gewebe das MN-Protein in signifikanten Mengen exprimieren. Solche MN-exprimierenden, normalen Gewebe schließen die humane Magenschleimhaut und das Gallenblasenepithel und einige andere normale Gewebe des Verdauungskanal ein. Paradoxiertweise wurde festgestellt, dass die Expression des MN-Gens in Karzinomen und anderen preneoplastischen/neoplastischen Erkrankungen in manchen Geweben, die normalerweise MN exprimieren, z. B. die Magenschleimhaut, verloren gegangen oder verringert ist.

[0004] Allgemein kann Onkogenese durch die abnormale Expression des MN-Proteins gekennzeichnet werden. Die Onkogenese kann zum Beispiel bezeichnet werden: (1) wenn das MN-Protein in einem Gewebe vorhanden ist, dass das MN-Protein normalerweise bis zu keinem signifikanten Grad exprimiert; (2) wenn das MN-Protein in einem Gewebe nicht vorhanden ist, in dem es normalerweise exprimiert wird; (3) wenn die Expression des MN-Gens gegenüber dem normalerweise in einem Gewebe exprimierten Niveau in einem signifikant erhöhten oder signifikant verringerten Niveau vorliegt; oder (4) wenn das MN-Protein an einem abnormalen Ort innerhalb der Zelle exprimiert wird.

[0005] Zavada et al., WO 93/18152 und Zavada et al., WO 95/34650 (veröffentlicht am 21. Dezember 1995) offenbaren, wie die Entdeckung des MN-Gens und -Proteins und die starke Assoziation der Expression und Tumorigenität des MN-Gens zu der Erzeugung von Verfahren, die sowohl diagnostisch/prognostisch als auch therapeutisch für Krebs und präkanzeröse Zustände sind. In diesen wurden Verfahren und Zusammensetzungen zum Identifizieren des Ausbruchs und des Vorliegens einer neoplastischen Erkrankung durch Nachweisen oder Nachweisen und Quantifizieren einer abnormalen Expression des MN-Gens in Vertebraten bereitgestellt. Die abnormale Expression des MN-Gens kann mit einer Vielfalt herkömmlicher Assays in Vertebratenproben, zum Beispiel durch Immunoassays unter Verwenden von MN-spezifischen Antikörpern zum Nachweisen oder Nachweisen und Quantifizieren von MN-Antigenen, durch Hybridisierungsassays oder durch PCR-Assays, wie beispielsweise RT-PCR unter Verwenden von MN-Nukleinsäuren, wie beispielsweise MN-cDNA, zum Nachweisen oder Nachweisen und Quantifizieren von MN-Nukleinsäure, wie beispielsweise MN-mRNA, nachgewiesen oder nachgewiesen und quantifiziert werden.

[0006] Zavada et al., WO 93/18152 und WO 95/34650 beschreiben die Erzeugung MN-spezifischer Antikörper. Ein charakteristischer und bevorzugter, MN-spezifischer Antikörper, der monoklonale Antikörper M75 (MAK M75), wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC) in Manassus, VA (USA) unter der ATCC-Nummer HB 11128 hinterlegt. Der M75-Antikörper wurde zum Entdecken und Identifizieren des MN-Proteins verwendet und kann zum leichten Identifizieren des MN-Antigens in Western Blots, in Radioimmunoassays und immunhistochemisch in, zum Beispiel Gewebeprobe, die frisch, gefroren oder mit Formalin, Alkohol, Aceton oder anderweitig fixiert und/oder in Paraffin eingebettet und entparaffiniert sind, verwendet werden. Ein weiterer charakteristischer und bevorzugter MN-spezifischer Antikörper, MAK MN12, wird durch das Hybridom MN 12.2.2 sekretiert, das bei der ATCC unter der Bezeichnung HB 11647 hinterlegt wurde. Beispiel 1 aus Zavada et al., WO 95/34650 stellt charakteristische Ergebnisse aus dem immunhistochemischen Anfärben von Geweben unter Verwenden des MAK M75 bereit, wobei die Ergebnisse die Bezeichnung des MN-Gens als Onkogen belegen.

[0007] Viele Studien haben die diagnostische/prognostische Nützlichkeit von MN bestätigt. Die folgenden Artikel erörtern die Verwendung des MN-spezifischen MAK M75 beim Diagnostizieren/Prognostizieren präkanzeröser und kanzeröser zervikaler Läsionen: Leff, D. N., „Half a Century of HeLa Cells: Transatlantic Antigen Enhances Reliability of Cervical Cancer Pap Test, Clinical Trials Pending“, *BioWorld® Today: The Daily Biotechnology Newspaper*, 9(55) (24. März 1998); Stanbridge, E. J., „Cervical marker can help resolve ambiguous Pap smears“, *Diagnostics Intelligence*, 10(5): 11 (1998) Liao und Stanbridge, „Expression of the MN Antigen in Cervical Papanicolaou Smears Is an Early Diagnostic Biomarker of Cervical Dysplasia“, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5: 549–557 (1996); Brewer et al., „A Study of Biomarkers in Cervical Carcinoma and Clinical Correlation of the Novel Biomarkers MN“, *Gynecologic Oncology*, 63: 337–344 (1996); und Liao et al., „Identification of the MN Antigen as a Diagnostic Biomarker of Cervical Intraepithelial Squamous and Glandular Neoplasia and Cervical Carcinomas“, *American Journal of Pathology*, 145(3): 598–609 (1994).

[0008] Prämaligene und maligne kolorektale Läsionen. MN wurde in normaler Magen-, Darm- und biliärer Schleimhaut nachgewiesen [Pastorekova et al., *Gastroenterology*, 112: 398–409 (1997)]. Eine immunhistochemische Analyse des normalen Dickdarms zeigte eine mäßige Färbung in dem proximalen Kolon, wobei die Reaktion distal schwächer wird. Das Anfärben wurde auf die basolateralen Oberflächen der kryptalen Epithelzellen, die Fläche mit dem höchsten proliferativen Vermögen, beschränkt. Da MN in dem proliferierenden kryptalen Epithel viel stärker im Überfluss vorhanden ist als in dem oberen Teil der Schleimhaut, kann es eine Rolle bei der Steuerung der Proliferation und Differenzierung der Darmepithelzellen spielen. In prämaligen und malignen Läsionen des kolorektalen Epithels steigt die Zellproliferation abnormal an und wird daher als Indikator für das Fortschreiten eines kolorektalen Tumors angesehen [Risio, M., *J. Cell Biochem.*, 16G: 79–87 (1992); und Moss et al., *Gastroenterology*, 111: 1425–1432 (1996)].

[0009] Das MN-Protein wird nun als erstes mit Tumoren assoziiertem Carboanhydratase-(CA-)Isoenzym, das beschrieben wurde, betrachtet. Carbonanhydratase (CAs) bilden eine große Familie von Genen, die für Zinkmetalloenzyme von großer physiologischer Wichtigkeit kodieren. Als Katalysatoren der reversiblen Hydrierung von Kohlenstoffdioxid nehmen diese Enzyme an einer Vielzahl biologischer Prozesse, einschließlich Atmung, Kalzifizierung, Säure-Base-Gleichgewicht, Knochenresorption, Bildung wässriger Körperflüssigkeiten, von Zerebrospinalflüssigkeit, Speichel und Magensäure, teil [rückblickend zusammengefasst in Dodgson et al., *The Carbonic Anhydrases*, Plenum Press, New York-London, S. 398 (1991)]. CAs sind in verschiedenen lebenden Organismen weit verbreitet.

[0010] In Säugetieren wurden mindestens sieben Isoenzyme (CA I–VII) und ein paar mit CA verwandte Proteine (CARP/CA VIII, RPTP- β , RPTP-) identifiziert [Hewett-Emmett und Tashian, *Mol. Phyl. Evol.*, 5: 50–77 (1996)], wenn eine Analyse der von MN stammenden Aminosäuresequenz eine markante Homologie zwischen dem mittleren Teil des MN-Proteins und Carboanhydratase, mit der konservierten Zink-bindenden Stelle und dem aktiven Zentrum des Enzyms, zeigte. Es wurde festgestellt, dass das MN-Protein an Zink bindet und CA-Aktivität besitzt. Auf Basis dieser Daten wird das MN-Protein nun als das neunte Carboanhydratase-Isoenzym – MN/CA IX – betrachtet [Opavsky et al., *Genomics*, 33: 480–487 (Mai 1996)]. [Siehe auch Hewett-Emmett, supra, worin CA IX als Nomenklaturbezeichnung vorgeschlagen wird.]

[0011] CAs und die mit CA verwandten Proteine zeigen sowohl bezüglich ihrer Verteilung als auch ihrer putativen oder etablierten biologischen Funktionen eine erhebliche Vielfalt [Tashian, R. E., *Adv. in Genetics*, 30: 321–356 (1992)]. Einige der CAs werden in nahezu allen Geweben (CA II) exprimiert, wohingegen die Expression anderer mehr beschränkt zu sein scheint (CA VI und CA VII in den Speicheldrüsen). In Zellen können sie sich im Zytoplasma (CA I, CA II, CA III und CA VII), in den Mitochondrien (CA V) in sekretorischen Granula (CA VI) befinden oder mit der Membran assoziiert sein (CA IV). Gelegentlich wurde eine nukleäre Positionierung mancher Isoenzyme festgestellt [Parkkila et al., *Gut*, 35: 646–650 (1994); Parkkila et al., *Histochem. I.*, 27: 133–138 (1995); Mori et al., *Gastroenterol.*, 105: 820–826 (1993)].

[0012] Die CAs und die mit CA verwandten Proteine unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer kinetischen Eigenschaften und ihrer Empfänglichkeit gegenüber Inhibitoren [Sly und Hu, *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 375–401 (1995)]. Im Verdauungstrakt ist die Aktivität der Carboanhydratase an vielen wichtigen Funktionen, wie beispielsweise der Sekretion von Speichel, der Produktion von Magensäure, Pankreassaft und Gallenflüssigkeit, Darmwasser und Ionentransport, die Aufnahme von Fettsäuren und Biogenese in der Leber, beteiligt. Es wurden wenigstens sieben CA-Isoenzyme in verschiedenen Bereichen des Verdauungstrakts gezeigt. Biochemische, histochemische und immunocytochemische Studien offenbarten jedoch hinsichtlich der Mengen und der Verteilung derselben eine beachtliche Heterogenität [Swensen, E. R., „Distribution and functions of carbonic anhydrase in the gastrointestinal tract“, In: *The Carbonic Anhydrases. Cellular Physiology and Molecular Genetics*, (Dodgson et al., Hrsg.) Plenum Press, New York, S. 265–287 (1991); und Parkkila, *Scan J. Gastro-*

enterol., 31: 305–317 (1996)]. Während CA II entlang des gesamten Verdauungskanals gefunden wird, ist CA IV mit dem unteren Verdauungstrakt verknüpft, CA I, II und V sind in nur wenigen Geweben vorhanden und die Expression von CA VI und VII ist auf die Speicheldrüsen beschränkt [Parkkila et al., Gut 35: 646–650 (1994); Fleming et al., J. Clin. Invest., 96: 2907–2913; Parkkila et al., Hepatology, 24: 104 (1996)].

[0013] MN/CA IX weist einige Eigenschaften auf, die es von andere bekannten CA-Isoenzymen unterscheidet und seine Relevanz bezüglich Onkogenese erkennen lassen. Solche Eigenschaften schließen dessen dichte-abhängige Expression in einer Zellkultur (z. B. HeLa-Zellen), dessen Beziehung zu dem tumorigenen Phänotyp somatischer Zellhybride zwischen HeLa und normalen humanen Fibroblasten, dessen enge Assoziation mit verschiedenen humanen Karzinomen und dessen Nicht-Vorhandensein in den entsprechenden normalen Geweben [z. B. Zavada et al., Int. J. Cancer, 54: 268–274 (1993); Pastorekova et al., Virology, 187: 620–626 (1992); Liao et al., Am. J. Pathol., 145: 598–609 (1994); Pastorek et al., Oncogene, 9: 2788–2888 (1994) Cote, Women's Health Weekly: News Section, S. 7 (30. März 1998); Liao et al., Cancer Res., 57: 2827 (1997); Vermylen et al., „Expression of the MN antigen as a biomarker of lung carcinoma and associated precancerous conditions“, Proceedings AACR, 39: 334 (1998); McKiernan et al., Cancer Res., 57: 2362 (1997); und Turner et al., Hum. Pathol., 28(6): 740 (1997)]. Daneben wurde das Transformationspotential von cDNA der MN/CA IX in vitro in NIH3T3-Fibroblasten gezeigt [Pastorek et al., id.].

[0014] Das MN-Protein wurde auch mit dem G250-Antigen identifiziert. Uemura et al., „Expression of Tumor-Associated Antigen MN/G250 in Urologic Carcinoma: Potential Therapeutic Target, J. Urol., 157 (4. Beiheft): 377 (Zusammenfassung 1475; 1997) geben an: "Die Sequenzanalyse und das Durchsuchen der Datenbank offenbarten, dass das G250-Antigen mit MN, einem humanen, mit Tumoren assoziierten Antigen, das in zervikalen Karzinomen identifiziert wurde, identisch ist (Pastorek et al., 1994)".

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] In einer ersten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Polypeptid bereit, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es aus den SEQ ID NO: 137 und 138 ausgewählt ist.

[0016] Es wird auch ein Polypeptid zur Verwendung in der Medizin sowie die Verwendung eines solches Polypeptids zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer preneoplastischen und/oder neoplastischen Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch die abnormale Expression des MN-Proteins, durch Inhibierung des Wachstums der preneoplastischen und/oder neoplastischen Vertebratenzellen, die das MN-Protein abnormal exprimieren, bereitgestellt.

[0017] In einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung einen Peptidkomplex bereit, der dadurch gekennzeichnet ist, dass er ein Polypeptid umfasst, das kovalent an Polylysin geknüpft ist, an das eine Nukleinsäure gebunden ist, die für ein cytotoxisches Protein oder ein cytotoxisches Polypeptid kodiert, welches funktionsfähig mit dem MN-Genpromotor verknüpft ist, wobei der Peptidkomplex, wenn er an eine preneoplastische und/oder neoplastische Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, verabreicht wird, das Wachstum dieser Zelle inhibiert.

[0018] Ein solcher Peptidkomplex ist bevorzugt, wobei das cytotoxische Protein die HSV-Thymidinkinase ist. Besonders bevorzugt umfasst die Nukleinsäure weiterhin eine Nukleinsäure, die für ein Cytokin kodiert, welches in funktionsfähiger Weise mit dem MN-Genpromotor verknüpft ist.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren eines organischen oder anorganischen Moleküls bereit, welches spezifisch an eine Stelle auf einem MN-Protein bindet, an das Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay anhaften, wobei diese Stelle aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus den SEQ ID NOS: 10 und 97 bis 106, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass es das Testen organischer und anorganischer Moleküle im Zell-Adhäsionsassay und das Identifizieren der Moleküle, die die Adhäsion der Vertebratenzellen an das MN-Protein inhibieren, da sie spezifisch an diese Stelle binden, umfasst und das Molekül bei der Behandlung einer preneoplastischen und/oder neoplastischen Erkrankung einsetzbar ist, welche durch eine abnormale Expression des MN-Proteins gekennzeichnet ist, wobei der Zell-Adhäsionsassay folgendes umfasst:

- a) Bindenlassen des MN-Proteins an ein Substrat, an welches die Vertebratenzellen nicht binden;
- b) Abspülen ungebundenen MN-Proteins von dem Substrat;
- c) Inkubieren des gebundenen MN-Proteins mit dem Molekül und mit den Vertebratenzellen;
- d) Abspülen ungebundener Vertebratenzellen vom MN-Protein; und
- e) Bestimmen, ob das Molekül die Adhäsion der Vertebratenzellen an das MN-Protein inhibiert.

[0020] Das Molekül ist vorzugsweise anorganisch oder organisch oder ist ein Protein oder ein Polypeptid. Ein solches Protein oder Polypeptid kann eine Aminosäuresequenz umfassen, die ausgewählt ist aus den SEQ ID NOS: 137 und 138. Besonders bevorzugt ist das Polypeptid aus den SEQ ID NOS: 137 und 138 ausgewählt.

[0021] Ein solches Verfahren wird bevorzugt, wobei das organische oder anorganische Molekül, wenn es mit einer preneoplastischen und/oder neoplastischen Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, in Kontakt ist, das Wachstum dieser Zelle inhibiert. Bei einem solchen Verfahren liegt die Stelle auf dem MN-Protein, an der die Vertebratenzellen in dem Zell-Adhäsionsassay anhaften, vorzugsweise innerhalb der proteoglycan-ähnlichen Domäne des MN-Proteins. Allgemein sind die Vertebratenzellen Säugerzellen, vorzugsweise Humanzellen.

[0022] Nach Angaben des Umfangs der vorliegenden Erfindung wird sie nun im Folgenden ausführlicher beschrieben und zusammen mit allgemeineren Begriffen veranschaulicht werden.

[0023] Hierin wird die Position der MN-Proteinbindungsstelle identifiziert. Von besonderer Wichtigkeit ist der Bereich innerhalb der proteoglycan-ähnlichen Domäne, AS 61 bis 96 (SEQ ID NO: 97), die eine 6-fache Tandem-Wiederholung aus 6 Aminosäuren enthält und in der sich das Epitop für den M75-MAK in wenigstens zwei Kopien befindet und in der vermutlich MN-Bindungsstelle angeordnet ist. Eine alternative MN-Bindungsstelle kann in der CA-Domäne angeordnet sein.

[0024] Es werden auch MN-Proteine und MN-Polypeptide identifiziert, die mit einem immobilisierten MN-Protein um die Anhaftung an Zellen konkurrieren. Solche MN-Proteine/Polypeptide beugen einer Zell-Zell-Adhäsion und der Bildung interzellulärer Kontakte vor.

[0025] Hierin werden Zell-Adhäsionsassay-Verfahren offenbart, die zum Identifizieren von (einer) Bindungsstelle(n) auf dem MN-Protein, an das Vertebratenzellen, vorzugsweise Säugerzellen, besonders bevorzugt Humanzellen, binden, verwendet werden. Eine solche MN-Bindungsstelle wird dann als therapeutisches Ziel identifiziert, das mit MN-spezifischen Antikörpern oder anorganischen oder organischen Molekülen, vorzugsweise organischen Molekülen, besonders bevorzugt Proteinen/Polypeptide, die spezifisch an diese Stelle binden, blockiert werden kann.

[0026] Ferner werden therapeutische Verfahren zum Behandeln von Patienten mit einer preneoplastischen/neoplastischen Erkrankung, die mit einer abnormalen Expression von MN assoziiert oder durch diese gekennzeichnet ist, offenbart, wobei die Verfahren auf dem Blockieren der MN-Bindungsstelle mit anorganischen oder organischen Molekülen, bevorzugt jedoch organischen Molekülen, besonders bevorzugt Proteinen/Polypeptiden, die spezifisch an diese Bindungsstelle binden, basieren. Das Wachstum einer preneoplastischen/neoplastischen Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, kann durch Verabreichen solcher organischen oder anorganischen Moleküle, bevorzugt organischer Moleküle, besonders bevorzugt Proteinen/Polypeptiden, in einer therapeutisch wirksamen Menge in einer physiologisch annehmbaren Formulierung inhibiert werden. Ein solches bevorzugtes therapeutisches Protein/Polypeptid umfasst vermutlich eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 107 bis 109. Es wird angenommen, dass (ein) MN-Proteinpartner aus solchen Heptapeptiden besteht. Es wird erwartet, dass das Blockieren der Wechselwirkung zwischen dem MN-Protein und dessen Bindungspartner(n) zu einer Verringerung des Tumorwachstums führt.

[0027] Des Weiteren werden andere therapeutische Verfahren bereitgestellt, bei denen das Wachstum einer preneoplastischen oder neoplastischen Vertebraten-, vorzugsweise einer Säuger-, besonders bevorzugt einer Human-, Zelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, inhibiert wird. Solche Verfahren umfassen das Transfizieren der Zelle mit einem Vektor, der eine Expressionssteuersequenz umfasst, die in funktionsfähiger Weise mit einer Nukleinsäure verknüpft ist, die für die variablen Domänen eines MN-spezifischen Antikörpers kodiert, wobei die Domänen durch ein flexibles Linker-Peptid, bevorzugt die SEQ ID NO: 116, voneinander getrennt sind. Die Expressionssteuersequenz umfasst bevorzugt den MN-Genpromotor.

[0028] Noch weitere therapeutische Verfahren umfassen das Transfizieren der Zelle mit einem Vektor, der ein Nukleinsäure umfasst, die für ein cytotoxisches Protein/Polypeptid, wie beispielsweise HSVtk, kodiert, das funktionsfähig mit dem MN-Genpromotor verknüpft ist. Ein solcher therapeutischer Vektor kann auch eine Nukleinsäure umfassen, die für ein Cytokin, wie beispielsweise IL2- oder IFN, kodiert.

[0029] Nachstehend werden hierin offenbarte Aspekte der vorliegenden Erfindung ausführlich beschrieben. Es wird die therapeutische Verwendung organischer oder anorganischer Moleküle, vorzugsweise organischer

Moleküle, offenbart. Solche bevorzugten Moleküle binden spezifisch an eine Stelle auf einem MN-Protein, an die Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay anhaften, wobei das Molekül, wenn es in vitro getestet wird, die Adhäsion von Zellen an das MN-Protein inhibiert. Weiter werden solche Moleküle bevorzugt, die, wenn sie mit einer preneoplastischen oder neoplastischen Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, in Kontakt sind, das Wachstum der Zelle inhibieren. Die Vertebratenzellen sind vorzugsweise Säuger- und besonders bevorzugt Humanzellen.

[0030] Ein solches Molekül ist vorzugsweise organisch und besonders bevorzugt ist ein solches organisches Molekül ein Protein oder ein Polypeptid. Noch weiter bevorzugt umfasst das Protein oder Polypeptid eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 107, 108, 109, 137 und 138. Noch weiter bevorzugt ist das Polypeptid ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 107, 108, 109, 137 und 138.

[0031] Die Stelle auf den MN-Proteinen, an die Vertebratenzellen im Zell-Adhäsionsassay anhaften, befindet sich bevorzugt innerhalb der proteoglycan-ähnlichen Domäne [SEQ ID NO: 50] oder innerhalb der Carboanhydratase-Domäne [SEQ ID NO: 51] des MN-Proteins. Die Stelle umfasst bevorzugt eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 19 und 97 bis 106. Noch weiter bevorzugt besitzt die Stelle eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 10 und 97 bis 106.

[0032] Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft MN-Proteine und MN-Polypeptide, die das Anhaften von Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay vermitteln, wobei das MN-Protein oder MN-Polypeptid, wenn es in die extrazelluläre, flüssige Umgebung von Vertebratenzellen eingebracht wird, der Bildung interzellulärer Kontakte und der Adhäsion der Vertebratenzellen untereinander vorbeugt. Solche MN-Proteine und MN-Polypeptide können dabei von Nutzen sein, das Wachstum von preneoplastischen oder neoplastischen Vertebratenzellen, die das MN-Protein abnormal exprimieren, zu inhibieren, wenn solche MN-Proteine oder MN-Polypeptide in die extrazelluläre, flüssige Umgebung solcher Vertebratenzellen eingebracht werden. Die Vertebratenzellen sind vorzugsweise Säuger- und besonders bevorzugt Humanzellen.

[0033] Die MN-Proteine oder MN-Polypeptide, die das Anhaften der Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay vermitteln, weisen vorzugsweise Aminosäuresequenzen aus der SEQ ID NO: 97, der SEQ ID NO: 50 oder der SEQ ID NO: 51, besonders bevorzugt aus der SEQ ID NO: 50, auf. Noch weiter bevorzugt umfassen solche MN-Proteine oder MN-Polypeptide Aminosäuresequenzen, die ausgewählt sind aus den SEQ ID NOS: 10 und 97 bis 106. Alternativ dazu sind die MN-Polypeptide ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den SEQ ID NOS: 10 und 97 bis 106.

[0034] Charakteristische MN-Proteine und MN-Polypeptide, die das Anhaften von Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay vermitteln, werden entweder von dem monoklonalen Antikörper M75, der aus dem Hybridom VU-M75, das bei der American Type Culture Collection unter der ATCC-Nr. HB 11128 hinterlegt ist, sekretiert wird, oder von dem monoklonalen Antikörper MN12, der aus dem Hybridom MN 12.2.2, das bei der American Type Culture Collection unter der ATCC-Nr. HB 11647 hinterlegt ist, sekretiert wird, oder von den beiden monoklonalen Antikörpern spezifisch gebunden.

[0035] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Identifizieren einer Stelle auf einem MN-Protein, an die Vertebratenzellen anhaften, durch Testen einer Reihe von sich überlappenden Polypeptiden von dem MN-Protein bei einem Zell-Adhäsionstest mit Vertebratenzellen und Bestimmen, dass, wenn die Zellen an ein Polypeptid aus dieser Reihe anhaften, das Polypeptid eine Stelle auf dem MN-Protein umfasst, an die Vertebratenzellen anhaften.

[0036] Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der eine Expressionssteuersequenz umfasst, die in funktionsfähiger Weise mit einer Nukleinsäure verknüpft ist, die für die variablen Domänen eines MN-spezifischen Antikörpers kodiert, wobei diese Domänen durch ein flexibles Linker-Polypeptid voneinander getrennt sind und wobei dieser Vektor, wenn er in eine preneoplastische oder neoplastische Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, transfiziert wird, das Wachstum der Zelle inhibiert. Diese Expressionssteuersequenz umfasst bevorzugt den MN-Genpromotor, der funktionsfähig mit der Nukleinsäure verknüpft ist. Weiter bevorzugt besitzt das flexible Linker-Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 116 und noch weiter bevorzugt besitzt der MN-Genpromotor die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 27.

[0037] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, der eine Nukleinsäure umfasst, die für ein cytotoxisches Protein oder ein cytotoxisches Polypeptid kodiert, welches funktionsfähig mit dem

MN-Genpromotor verknüpft ist, wobei der Vektor, wenn er in eine preneoplastische oder neoplastische Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, transfiziert wird, das Wachstum der Zelle inhibiert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das cytoxische Protein HSV-Thymidinkinase. Der Vektor umfasst vorzugsweise eine Nukleinsäure, die für ein Cytokin kodiert, das funktionsfähig mit dem MN-Genpromotor verknüpft ist. In alternativen und bevorzugten Ausführungsformen ist das Cytokin Interferon oder Interleukin-2.

[0038] Der MN-Genpromotor wird hierin charakterisiert. Es wird die Identifizierung der Bindungsstelle für einen Repressor der Transkription von MN offenbart. Eine Mutationsanalyse zeigte, dass die direkte Wiederholung AGGGCacAGGGC [SEQ ID NO: 43] für eine effiziente Bindung des Repressors erforderlich ist.

[0039] Die Identifizierung des Proteins, das an den Repressor bindet, und eine Modifizierung der Bindungseigenschaften desselben ist ein weiterer Weg, um die Expression von MN zu modulieren, was zu Krebstherapien führt. Es wird erwartet, dass die Unterdrückung der MN-Expression in Tumorzellen durch Überexpression eines negativen Regulators zu einer Abnahme des Tumorwachstums führt. Ein Repressorkomplex, der durch UV-Vernetzung in direktem Kontakt mit der SEQ ID NO: 115 gefunden wurde, umfasste zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von entsprechend 35 und 42 Kilodalton.

Abkürzungen

[0040] Es werden hierin die folgenden Abkürzungen verwendet:

AS	– Aminosäure
ATCC	– American Type Culture Collection
bp	– Basenpaare
BLV	– Rinderleukämievirus
BSA	– Rinderserumalbumin
BRL	– Bethesda Research Laboratories
CA	– Carboanhydratase
CAM	– Zell-Adhäsionsmolekül
CARP	– mit Carboanhydratase verwandtes Protein
CAT	– Chloramphenicolacetyltransferase
Ci	– Curie
cm	– Zentimeter
CMV	– Cytomegalievirus
cpm	– counts per minute, Zerfälle pro Minute
C-Terminus	– Carboxy-Terminus
CTL	– cytotoxische T-Lymphozyten
°C	– Grad Celsius
DEAE	– Diethylaminoethyl
DMEM	– Dulbeccos Modifiziertes Eagle-Medium
ds	– doppelsträngig
EDTA	– Ethylendiamintetraacetat
EGF	– epidermaler Wachstumsfaktor
EIA	– Enzymimmunoassay
ELISA	– enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
EMSA	– electrophoretic mobility shift assay
F	– Fibroblasten
FACS	– cytofluorometrische Studie
FKS	– Fötale Kälberserum
FITC	– Fluoresceinisothiocyanat
FTP	– DNase 1-Footprinting-Analyse
GST-MN	– Fusionsprotein MN-Glutathion-S-Transferase
GVC	– Ganciclovir
H	– HeLa-Zellen
H-E	– Hämatoxylin-Eosin
HEF	– humane Embryofibroblasten
HeLa K	– Standardtyp von HeLa-Zellen
HeLa S	– Stanbridges mutante HeLa D98/AH.2
H/F-T	– Hybrid-HeLa-Fibroblastenzellen, die tumorigen sind; aus HeLa D98/AH.2 stammend
H/F-N	– Hybrid-HeLa-Fibroblastenzellen, die nicht tumorigen sind; aus HeLa D98/AH.2 stammend

HPV	– humaner Papillomvirus
HRP	– Meerrettich-Peroxidase
HSV	– Herpes-Simplexvirus
IC	– intrazellulär
IFN	– Interferon
IL-2	– Interleukin-2
Inr	– Initiator
IPTG	– Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	– Kilobase
kbp	– Kilobasenpaare
kd oder kDa	– Kilodalton
KS	– Keratansulfat
LCMV	– lymphozytischer Choriomeningitis-Virus
LTR	– lange, terminale Wiederholung
M	– molar
mA	– Milliampere
MAK	– monoklonaler Antikörper
MCSF	– Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
ME	– Mercaptoethanol
MEM	– minimales, essentielles Medium
min	– Minute(n)
mg	– Milligramm
ml	– Milliliter
mM	– millimolar
MMC	– Mitomycin C
mmol	– Millimol
MLV	– muriner Leukämievirus
N	– normale Konzentration
NEG	– negativ
ng	– Nanogramm
nm	– Nanometer
nt	– Nukleotid
N-Terminus	– Amino-Terminus
ODN	– Oligodesoxynukleotid
ORF	– offener Leserahmen (open reading frame)
PA	– Protein A
PBS	– phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	– Polymerasekettenreaktion
PEST	– Kombination aus einbuchstabigen Abkürzungen für Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin
PG	– Proteoglycan
IEP	– isoelektrischer Punkt
PMA	– Phorbol-12-myristat-13-acetat
POS	– positiv
Py	– Pyrimidin
RACE	– schnelle Amplifikation der cDNA-Enden
RCC	– Nierenzellkarzinom
RIA	– Radioimmunassay
RIP	– Radioimmunpräzipitation
RIPA	– Radioimmunpräzipitationsassay
RNP	– RNase-Protektionsassay
RT-PCR	– Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SAC	– Staphylococcus aureus-Zellen
S. aureus	– Staphylococcus aureus
sc	– subcutan
SDRE	– für die Dosis des Serums responsives Element (serum dose response element)
SDS	– Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	– Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SINE	– short interspersed repeated sequence
SP	– Signalpeptid
SP-RIA	– Festphasen-Radioimmunassay

SSDS	– synthetische Splicing-Donorstelle
SSH	– subtraktive suppressive PCR
SSPE	– NaCl (0,18 M), Natriumphosphat (0,01 M), EDTA (0,001 M)
TBE	– Tris-Borat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TC	– Gewebekultur
TCA	– Trichloressigsäure
TC-Medium	– Gewebekulturmedium
TC	– Gewebekultur
tk	– Thymidinkinase
TM	– Transmembran
TMB	– Tetramethylbenzidin
Tris	– Tris(hydroxymethyl)aminomethan
μCi	– Mikrocurie
μg	– Mikrogramm
μl	– Mikroliter
μM	– mikromolar
VSV	– vesikulärer Stomatitis-Virus
VV	– Vacciniavirus
X-MLV	– xenotroper, muriner Leukämievirus

Zelllinien

AGS	– Zelllinie, die von einem primären Magen-Adenokarzinom stammt [Barranco und Townsend, Cancer Res., 43: 1703 (1983) und Invest. New Drugs, 1: 117 (1983)]; unter CRL-1739 bei der ATCC erhältlich;
BL-3	– Rinder-B-Lymphozyten [ATCC CRL-8037; Leukämiezellsuspension; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 40: 737 (1968)];
C33	– eine Zelllinie, die aus der Biopsie eines humanen zervikalen Karzinoms stammt [Auersperg, N., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda), 32: 135–148 (1964)]; unter HTB-31 bei der ATCC erhältlich;
C33A	– humane zervikale Karzinomzellen [ATCC HTB-31; J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 32: 135 (1964)];
COS	– Affenzelllinie [Gluzman, Y., Cell, 23: 175 (1981)];
HeLa K	– Standardtyp von HeLa-Zellen; aneuploid, epithel-ähnliche Zelllinie, die aus einem humanen zervikalen Adenokarzinom isoliert wurde [Gey et al., Cancer Res., 12: 264 (1952); Jones et al., Obstet. Gynecol., 38: 945–949 (1971)], erhalten von Professor B. Korych, [Institute of Medical Microbiology and Immunologie, Charles University, Prag, Tschechische Republik];
HeLa D98/AH.2 (auch HeLa s)	– Mutanter HeLa-Klon, der einen Mangel an Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase aufweist (HGPRT ⁻), freundlicher Weise von Eric J. Stanbridge [Department of Microbiology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA (USA)] zur Verfügung gestellt und berichtet in Stanbridge et al., Science, 215: 252–259 (15. Jan. 1982); Vorgänger der Hybridzellen H/F-N und H/F-T, ebenso von E. J. Stanbridge erhalten;
KATO III	– Zelllinie, die aus einer metastatischen Form eines Magenkarzinoms erzeugt wurde [Sekiguichi et al., Japan J. Exp. Med., 48: 62 (1978)]; unter HTB-103 bei der ATCC erhältlich;
NIH-3T3	– murine Fibroblastenzelllinie, die in Aaronson, Science, 237: 178 (1978) berichtet wurde;
QT35	– Wachtel-Fibrosarkomzellen [ECACC: 93120832; Cell, 11: 95 (1977)];
Raj	– humane Burkitts Lymphomzelllinie [ATCC CCL-86; Lancet, 1: 238 (1964)];

Rat2TK	– Zelllinie (Rattenembryo, Thymidinkinase-Mutante) stammte aus einem Subklon eines 5'-Bromdesoxyuridin-resistenten Stamms der Rattenfibroblasten 3T3-ähnlichen Zelllinie Rat1 von Fischer; die Zellen weisen einen Mangel an annehmbaren Mengen nukleärer Thymidinkinase auf [Ahrens, B., <i>Virology</i> , 113: 408 (1981)];
SiHa	– humane, zervikale, schuppenartige Karzinomzelllinie [ATCC HTB-35; Friedl et al., <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 135: 543 (1990)];
XC	– Zellen, die aus einem Rhabdomyosarkom stammen, das mit einem mit Rous-Sarkom-Virus induzierten Rattensarkom induziert wurde [Svoboda, J., <i>Natl. Cancer Center Institute Monograph No. 17</i> , IN: „International Conference on Avian Tumor Viruses" (J. W. Beard Hrsg.), S. 277–298 (1964)], freundlicher Weise von Jan Svoboda [Institute of Molecular Genetics, Czechoslovak Academy of Sciences; Prag, Tschechische Republik] zur Verfügung gestellt; und
CGL1	– H/F-N-Hybridzellen (HeLa D98/AH.2-Derivat);
CGL2	– H/F-N-Hybridzellen (HeLa D98/AH.2-Derivat);
CGL3	– H/F-T-Hybridzellen (HeLa D98/AH.2-Derivat);
CGL4	– H/F-T-Hybridzellen (HeLa D98/AH.2-Derivat).

Symbole der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

[0041] Die folgenden Symbole werden hierin zum Darstellen der Nukleotide verwendet:

Base Symbol	Bedeutung
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
I	Inosin
M	A oder C
R	A oder G
W	A oder T/U
S	C oder G
Y	C oder T/U
K	G oder T/U
V	A oder C oder G
H	A oder C oder T/U
D	A oder G oder T/U
B	C oder G oder T/U
N/X	A oder C oder G oder T/U

[0042] Es gibt zwanzig Aminosäuren, wobei jede durch eine andere Anordnung drei benachbarter Nukleotide (Triplett-Code oder Codon) definiert ist und zum Bilden eines bestimmten Proteins miteinander in einer bestimmten Reihenfolge verknüpft ist. Hierin wird ein aus drei oder einem Buchstaben bestehendes Übereinkommen dazu verwendet, Aminosäuren, wie zum Beispiel in [Fig. 1](#), folgendermaßen zu identifizieren:

Name der Aminosäure	3 Buchstaben Abkürzung	1 Buchstabe Abkürzung
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
unbekannt oder andere		X

Kurze Beschreibung der Figuren

[0043] [Fig. 1A](#) bis C stellt die Nukleotidsequenz für einen MN-cDNA-[SEQ ID NO: 1]Klon, der so, wie hierin beschrieben ist, isoliert wurde, bereit. [Fig. 1A](#) bis C gibt die vorhergesagte Aminosäuresequenz [SEQ ID NO: 2], die von der cDNA kodiert wird, an.

[0044] [Fig. 2A](#) bis F stellt eine 10.898 bp große, vollständige genomische Sequenz von MN [SEQ ID NO: 3] bereit. Die Basenzählung war folgendermaßen: 2654 A; 2739 C; 2645 G und 2859 T. Die 11 Exons sind allgemein in Großbuchstaben gezeigt, es wird jedoch in Betracht gezogen, dass Exon 1 an der Position 3507 beginnt, wie mit einem RNase-Protektionsassay bestimmt wurde.

[0045] [Fig. 3](#) ist eine Restriktionskarte der vollständig langen MN-cDNA. Der offene Leserahmen ist als leeres Kästchen gezeigt. Die dicken Linien unterhalb der Restriktionskarte veranschaulichen die Größen und Positionen der beiden sich überlappenden cDNA-Klone. Die horizontalen Pfeile geben die Positionen der Primer R1 [SEQ ID NO: 7] und R2 [SEQ ID NO: 8], die für die RACE am 5'-Ende verwendet werden, an. Die relevanten Restriktionsschnittstellen sind BamHI (B), EcoRV (V), EcoRI (E), PstI (Ps), PvuII (Pv).

[0046] [Fig. 4](#) stellt schematisch den 5'-Bereich des MN-Genoms eines genomischen Klons von MN dar, wobei die Nummerierung den mit RACE abgeschätzten Transkriptionsinitiationsstellen entspricht.

[0047] [Fig. 5](#) stellt eine Exon-Intron-Karte des humanen MN/CA IX-Gens bereit. Die Positionen und Größen der Exons (nummerierte, querschraffierte Kästchen), der Alu-Wiederholungselemente (leere Kästchen) und einer mit LTR verwandten Sequenz (erstes, nicht-nummeriertes, getüpfeltes Kästchen) sind an den angegebenen Maßstab angepasst. Die Exons, die den einzelnen MN/CA IX-Proteindomänen entsprechen, sind in gestrichelten Rahmen, die als PG (proteoglycan-ähnliche Domäne), CA (Carboanhydratase-Domäne), TM (Transmembrananker) und IC (intrazytoplasmatischer Schwanz) bezeichnet werden, eingeschlossen. Unterhalb der Karte veranschaulicht das Alignment von Aminosäuresequenzen das Ausmaß der Homologie zwischen dem PG-Bereich des MN/CA IX-Proteins (AS 53–111) [SEQ ID NO: 50] und dem humanen Aggrecan (AS 781–839) [SEQ ID NO: 54].

[0048] [Fig. 6](#) ist eine Nukleotidsequenz für den vorgeschlagenen Promotor des humanen MN-Gens [SEQ ID NO: 27]. Die Nukleotide sind von der Transkriptionsinitiationsstelle entsprechend dem RNase-Protektionsassay nummeriert. Potentielle regulatorische Elemente sind überstrichen. Die Transkriptionsstartstellen sind mit Sternchen (RNase-Protektion) und Punkten (RACE) oberhalb der entsprechenden Nukleotide angegeben. Die Sequenz des 1. Exons beginnt unter den Sternchen. Eine FTP-Analyse des MN4-Promotorfragments offenbarte 5 Bereiche (I–V), die sowohl an dem kodierenden als auch an dem nicht-kodierenden Strang geschützt sind, und zwei Bereiche (VI und VII), die an dem kodierenden Strang, jedoch nicht an dem nicht-kodierenden Strang

geschützt sind.

[0049] [Fig. 7](#) stellt ein Schema des Alignment genomischer Klone von MN entsprechend ihrer Position in Bezug auf die Transkriptionsinitiationsstelle bereit. Alle genomischen Fragmente außer Bd3 wurden aus einer lambda FIX II-Genbank isoliert, die von HeLa-Zellen stammte. Der Klon Bd3 stammte aus einer humanen, fötalen Hirn-Genbank.

[0050] [Fig. 8](#) stellt schematisch die Struktur des MN-Proteins wieder. Die Abkürzungen entsprechen den in [Fig. 5](#) verwendeten. Die Skala gibt die Anzahl an Aminosäuren an.

Ausführliche Beschreibung

[0051] Die Begriffe „MN/CA IX“ und „MN/CA 9“ werden hierin als Synonyme für MN betrachtet. Auch das G250-Antigen wird als Bezeichnung für das MN-Protein/-Polypeptid betrachtet [Uemura et al., J. Urol., 157 (4. Beiheft): 377 (Zusammenfassung 1475; 1997)].

[0052] MN/CA IX wurde zuerst in HeLa-Zellen, die aus einem humanen Karzinom der Cervix uteri stammten, sowohl als Plasmamembran- als auch als nukleares Protein mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von 58 und 54 Kilodalton (kDa), wie mit Hilfe eines Western Blots bestimmt wurde, identifiziert. Es ist N-glycosyliert und weist eine einzelne, 3 kDa große Kohlenwasserstoffkette auf und bildet unter nicht-reduzierenden Bedingungen S-S-verknüpfte Oligomere [Pastorekova et al., Virology, 187: 620–626 (1992); Pastorek et al., Oncogene, 9: 2788–2888 (1994)]. MN/CA IX ist ein Transmembranprotein, das an der Zelloberfläche positioniert ist, obwohl es in manchen Fällen im Nukleus nachgewiesen wurde [Zavada et al., Int. J. Cancer, 54: 268–274 (1993); Pastorekova et al., supra].

[0053] MN ist durch ein Doppelprotein, p54/58N in HeLa-Zellen manifestiert. Immunoblots unter Verwenden eines monoklonalen Antikörpers, der mit p54/58N (MAK M75) reagiert, offenbarte zwei Banden bei 54 kd und 58 kd. Diese beiden Banden entsprechen einem Typ eines Proteins, das sich am wahrscheinlichsten anhand seiner post-translationalen Verarbeitung unterscheidet. Die Bezeichnung „Doppelprotein“ gibt hier p54/58N an.

[0054] Zavada et al., WO 93/18152 und/oder WO 95/34650 offenbaren die cDNA-Sequenz von MN (SEQ ID NO: 1), die hierin in [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1C](#) gezeigt ist, die Aminosäuresequenz von MN (SEQ ID NO: 2), die auch in der [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1C](#) gezeigt ist und die genomische Sequenz von MN (SEQ ID NO: 5), die hierin in [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2F](#) gezeigt ist. Das MN-Gen ist in 11 Exons und 10 Introns aufgegliedert.

[0055] Die ersten siebenunddreißig Aminosäuren des in [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1C](#) gezeigten MN-Proteins sind das putative MN-Signalpeptid [SEQ ID NO: 6]. Das MN-Protein besitzt eine extrazelluläre Domäne [Aminosäuren (AS) 38–414 der [Fig. 1A](#) bis [Fig. 1C](#) (SEQ ID NO: 87)], eine Transmembrandomäne [AS 415–434 (SEQ ID NO: 52)] und eine intrazelluläre Domäne [AS 435–459 (SEQ ID NO: 53)]. Die extrazelluläre Domäne enthält die proteoglycan-ähnliche Domäne [AS 53–111 (SEQ ID NO: 50)] und die Carboanhydratase-(CA-)Domäne [AS 135–391 (SEQ ID NO: 51)].

Antikrebs-Medikamente und Antikörper, die die Wechselwirkung des MN-Proteins mit den Rezeptormolekülen blockieren

[0056] Es wird angenommen, dass das MN-Protein aus mehreren Gründen ein in einzigartiger Weise geeignetes Ziel für eine Krebstherapie ist. (1) Es ist an der Zelloberfläche positioniert, wodurch es zugänglich ist. (2) Es wird in einem hohen Prozentsatz humaner Karzinome (unter anderem z. B. Gebärmutterzervix-, Nieren-, Kolon-, Brust-, Speiseröhren-, Lungen-, Kopf- und Halskarzinomen) exprimiert, wird jedoch in keinem signifikanten Ausmaß in den normalen Geweben exprimiert, aus denen solche Karzinome entstehen.

(3) Normal wird es nur in der Magenschleimhaut und in manchen Epithelen des Verdauungstrakts (Gallenblasenepithel und Dünndarm) exprimiert. Daher besteht eine anatomische Barriere zwischen den MN exprimierenden, preneoplastischen/neoplastischen und den MN-exprimierenden, normalen Geweben. Es können daher Medikamente, einschließlich Antikörpern, verabreicht werden, die Tumore erreichen können, ohne die MN-exprimierenden, normalen Gewebe zu beeinträchtigen.

(4) Der MAK M75 weist eine hohe Affinität und Spezifität zu dem MN-Protein auf. (5) Es wurden die MN-cDNA und die genomischen Klone von MN, die die Protein-kodierenden und genregulatorischen Sequenzen umfassen, isoliert. (6) Es wurde gezeigt, dass MN-spezifische Antikörper mit die höchste Aufnahme in Tumoren besitzt, die in klinischen Studien mit Antikörpern in festen Tumoren berichtet wurden, wie es für den MN-spezifischen, chimären Antikörper G250 in Tierstudien und in klinischen Versuchen der Phase I mit Pa-

tienten mit Nierenkarzinom gezeigt wurde [Steffens et al., J. Clin. Oncol., 15: 1529 (1997)]. MN-spezifische Antikörper weisen auch eine geringe Aufnahme in normalen Geweben auf.

[0057] Daten, wie sie z. B. hierin angegeben sind, stimmen mit der folgenden Theorie überein, die davon handelt, wie das MN-Protein in normalen Geweben und in preneoplastischen/neoplastischen Geweben wirkt. In normalen Geweben (z. B. in der Magenschleimhaut) wird das MN-Protein als Differenzierungsfaktor betrachtet. Es bindet mit seinem normalen Rezeptor S (für Magen). Es wurde gezeigt, dass Magenkarzinome kein MN-Protein enthalten.

[0058] Die ektopische Expression eines MN-Proteins in anderen Geweben verursacht eine maligne Umwandlung der Zellen. Es wird angenommen, dass eine solche ektopische Expression durch das Binden des MN-Proteins an einen alternativen Rezeptor H (für HeLa-Zellen), der an einen Signalübertragungsweg gekoppelt ist, verursacht wird, was zu bösartigen Tumoren führt. Medikamente oder Antikörper, die die Bindungsstelle des MN-Proteins für den Rezeptor H blockieren, würden erwartungsgemäß eine Umkehrung der preneoplastischen/neoplastischen Zellen in normale Zellen bewirken oder deren Tod induzieren.

Konstruktion und Entwicklung MN-blockierender Medikamente oder Antikörper

[0059] Ein Verfahren zum Konstruieren und Entwickeln MN-blockierender Medikamente, z. B. von Peptiden mit hoher Affinität zum MN-Protein, oder von Antikörpern, weist mehrere Schritte auf. Als erstes muss auf Basis des Zell-Adhäsionsassays, der infra beschrieben ist, die Bindung des MN-Proteins an die Rezeptoren getestet werden. Die gleiche Vorgehensweise würden auch dazu verwendet werden, Medikamente, die die MN-Proteinbindungsstelle blockieren, zu testen. In Anbetracht der alternativen Rezeptoren S und H würden Magenepithelzellen oder Revertanten (die vorzugsweise S-Rezeptoren enthalten), HeLa-Zellen (die des H-Rezeptor enthalten und denen der S-Rezeptor fehlt) in dem Zell-Adhäsionstest verwendet werden.

[0060] Um die Rezeptorbindungsstelle des MN-Proteins zu identifizieren, können Deletionsvarianten des MN-Proteins, denen verschiedene Domänen fehlen, zum Identifizierenden von (einem) Bereich(en), die für die Wechselwirkung des MN-Proteins mit einem Rezeptor verantwortlich sind, verwendet werden. Beispiel 2 identifiziert und veranschaulicht, wie andere Bindungsstellen auf dem MN-Protein nachgewiesen werden können. Es wird angenommen, dass eine bevorzugte MN-Bindungsstelle nahe verwandt oder identisch mit dem Epitop für den MAK M75 ist, der in wenigstens 2 Kopien innerhalb der 6-fachen Tandem-Wiederholung aus 6 Aminosäuren [AS 61–96 (SEQ ID NO: 97)] in der proteoglycan-ähnlichen Domäne auf dem MN-Protein angeordnet ist. Innerhalb dieser relevanten Domäne können kleinere Deletionsvarianten, z. B. Fusionsproteine mit nur kleinen Abschnitten des MN-Proteins, erzeugt werden. Es kann auch ein gesteuerter Verdau des MN-Proteins mit spezifischen Proteasen, gefolgt von einer Auftrennung der Produkte, durchgeführt werden.

[0061] Ferner können Peptide, die die erwartete Bindungsstelle umfassen, synthetisiert werden. Alle diese Produkte können in Zell-Adhäsionstests getestet werden, wie nachstehend veranschaulicht ist. [Siehe z. B. Pierschbacher und Ruoslahti, PNAS, 81: 5985 (1984); Ruoslahti und Pierschbacher, Science, 238: 491].

[0062] Es können Moleküle zum Blockieren der MN-Rezeptorbindungsstelle konstruiert werden. Zum Beispiel kann die Verwendung eines Phage-Display-Peptid-Genbank-Kits [wie des Ph. D[®]-7 Peptide 7-Mer Library Kit von New England Biolabs; Beverly, MA (USA)], wie in den Beispielen 2 und 3 veranschaulicht ist, dazu verwendet werden, Peptide mit einer hohen Affinität zu den Target-Molekülen zu finden. Die biologische Aktivität der identifizierten Peptide wird in vitro durch die Hemmung der Zelladhäsion an das MN-Protein, durch Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen und die Wachstumseigenschaften der mit MN verwandten Tumorzellen (HeLa) und der Kontrollzellen, getestet [Symington, J. Biol. Chem., 267: 25744 (1992)]. Ein in vivo-Screening wird in Nacktmäusen durchgeführt werden, denen HeLa-Zellen injiziert wurden.

[0063] Es werden Peptide erzeugt, die die Bindungsstelle des MN-Proteins enthalten [z. B. MAPs (multiple Antigen-Peptide); Tam, J. P., PNAS (USA) 85: 5409 (1988); Butz et al., Peptide Res., 7: 20 (1994)]. Die MAPs werden zum Immunisieren der Tiere zum Erhalten von (polyklonalen und/oder monoklonalen) Antikörpern, die die Bindungsstelle erkennen und blockieren, verwendet werden [Siehe z. B. Brooks et al., Cell, 79: 1157 (1994)]. Dann würde eine „Impfung“ dazu verwendet werden, einen Schutz der Tiere zu testen. Antikörper gegen die Bindungsstelle von MN könnten potentiell dazu verwendet werden, die Wechselwirkung(en) des MN-Proteins mit anderen Molekülen zu blockieren.

[0064] Zum Konstruieren von Molekülen mit spezifischer Affinität zum MN-Protein, das eine sterische Inhibition zwischen dem MN-Protein und dessen Rezeptor vermitteln würde, kann auch eine computergenerierte

Modellbildung verwendet werden. Ein Computermodell der MN-Bindungsstelle für den Rezeptor wird räumliche, elektrostatische, hydrophobe und andere Eigenschaften dieser Struktur enthalten. Es werden organische Moleküle, die zu der Struktur, die am besten mit der Bindungsstelle übereinstimmt, komplementär sind, konstruiert werden. In ähnlicher Weise können auch anorganische Moleküle, die die MN-Bindungsstelle blockieren könnten, getestet werden.

[0065] Von Fachleuten wird üblicherweise die Verwendung von Onkoproteinen als Targets bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika in Betracht gezogen [Siehe z. B. Mendelsohn und Lippman, „Growth Factors“, S. 114–133, in: DeVita et al. (Hrsg.) Cancer: Principles and Practice of Oncology (4. Ausg.; Lippincott; Philadelphia, 1993)]. Im weitesten Sinn kann die Konstruktion blockierender Wirkstoffe auf Versuchen einer kompetitiven Inhibierung basieren. Seit der Entdeckung von Sulfonamiden (kompetitive Inhibitoren von para-Aminobenzoessäure, einem Vorläufer der Folsäure) wurden solche Versuche dazu verwendet, Medikamente zu erfinden. Ebenso sind manche Cytostatika kompetitive Inhibitoren (unter anderem z. B. halogenierte Pyrimidine).

[0066] Die Anwendung solcher Ansätze bei MN ist jedoch neu. Im Vergleich zu anderen mit Tumoren in Verbindung stehenden Molekülen (z. B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren) besitzt MN die einzigartige Eigenschaft, in preneoplastischen/neoplastischen und normalen Geweben, die durch eine anatomische Barriere voneinander getrennt sind, verschieden exprimiert zu werden.

MN-Gen – Klonierung und Sequenzierung

[0067] [Fig. 1A](#) bis C stellt die Nukleotidsequenz für einen vollständig langen MN-cDNA-Klon bereit, der so, wie unten beschrieben ist, isoliert wurde [SEQ ID NO: 1]. [Fig. 2A](#) bis F stellt eine vollständige Sequenz des MN-Genoms [SEQ ID NO: 5] bereit. [Fig. 6](#) zeigt die Nukleotidsequenz für einen vorgeschlagenen MN-Promotor [SEQ ID NO: 27].

[0068] Es sollte verstanden werden, dass aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes, das heißt, dass mehr als ein Codon für eine Aminosäure kodieren wird [zum Beispiel kodieren die Codons TTA, TTG, CTT, CTC, CTA und CTG jeweils für die Aminosäure Leucin (Leu)], Variationen der Nukleotidsequenz, zum Beispiel die SEQ ID NOS: 1 und 5, in denen ein Codon gegen ein anderes ausgetauscht ist, ein im Wesentlichen äquivalentes Protein oder Polypeptid gemäß dieser Erfindung erzeugen würden. Alle Variationen in den Nukleotidsequenzen der MN-cDNA und komplementären Nukleinsäuresequenzen sind im Umfang dieser Erfindung eingeschlossen.

[0069] Es sollte weiter verstanden werden, dass die hierin beschriebenen und in den [Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und [Fig. 6](#) gezeigten Nukleotidsequenzen nur die genauen Strukturen der isolierten und hierin beschriebenen cDNA, der genomischen Sequenz und der Nukleotidsequenz des Promotors wiedergeben. Erwartungsgemäß werden leicht modifizierte Nukleotidsequenzen gefunden werden oder können mit Hilfe im Stand der Technik bekannten Techniken zum Kodieren im Wesentlichen gleicher oder homologer MN-Proteine und -Polypeptide, zum Beispiel solchen, die ähnliche Epitope aufweisen, modifiziert werden und diese Nukleotidsequenzen und Proteine/Peptide werden für den Zweck dieser Erfindung als äquivalent angesehen. DNA oder RNA mit äquivalenten Codons sowie synthetische Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine/Polypeptide kodieren, die homolog oder im Wesentlichen homolog zu den MN-Proteinen/-Polypeptiden sind, sowie solche Nukleinsäuresequenzen, die unter stringenten Bedingungen mit diesen beispielhaften Sequenzen [SEQ ID NOS: 1, 5 und 27] hybridisieren würden oder die trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit diesen cDNA-Nukleotidsequenzen hybridisieren würden, werden als im Umfang der Erfindung enthalten angesehen. Es wird angenommen, dass Modifikationen und Variationen von Nukleinsäuresequenzen, wie sie hierin angegeben sind, zu Sequenzen führen, die im Wesentlichen den beispielhaften MN-Sequenzen und deren Fragmenten gleichen.

[0070] Stringente Hybridisierungsbedingungen werden hierin so betrachtet, dass sie mit den standardmäßigen Hybridisierungsbedingungen, die in der Wissenschaft als stringent angesehen werden, übereinstimmen. Zum Beispiel wird allgemein verstanden, dass stringente Bedingungen eine relativ kleine Salz- und/oder hohe Temperaturbedingung umfassen, wie es beispielsweise mit 0,02 M bis 0,15 M NaCl bei Temperaturen von 50°C bis 70°C gegeben ist. Weniger stringente Bedingungen, wie beispielsweise 0,15 M bis 0,9 M Salz bei Temperaturen zwischen 20°C und 55°C können durch Zugabe zunehmender Mengen an Formamid, das zum Destabilisieren der Hybrid-Duplexes dient, sowie durch erhöhte Temperaturen, stringenter gemacht werden.

[0071] Beispielhafte stringente Hybridisierungsbedingungen sind bei Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, S. 1.91 und 9.47–9.51 (Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold

Spring Harbor, NY; 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, S. 387–389 (Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor NY; 1982); Tsuchiya et al., *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 71(6): 721–725 (Juni 1991) beschrieben.

[0072] Zavada et al., WO 95/34650 beschrieben, wie ein partielle MN-cDNA-Klon, ein vollständig langer MN-cDNA-Klon und genomische Klone von MN isoliert und sequenziert wurden. Zavada et al., *Int. J. Cancer*, 54: 268 (1993) beschreiben die Isolierung und Sequenzierung einer partiellen MN-cDNA mit 1397 bp Länge. Kurz gesagt schlugen Versuche, einen vollständig langen Klon aus einer ursprünglichen cDNA-Genbank zu isolieren, fehl. Die Erfinder führten daher eine schnelle Amplifizierung der cDNA-Enden (RACE) unter Verwenden MN-spezifischer Primer, R1 und R2 [SEQ ID NOS: 7 und 8], die aus dem 5'-Bereich des ursprünglichen cDNA-Klons stammten, durch. Das RACE-Produkt wurde in pBluescript insertiert und die gesamte Population der rekombinanten Plasmide wurde mit einem MN-spezifischen Primer ODN1 [SEQ ID NO: 3] sequenziert. Auf diese Weise wurde eine zuverlässige Sequenz an dem äußersten 5'-Ende der MN-cDNA, wie in [Fig. 1](#) [SEQ ID NO: 1] gezeigt ist, erhalten.

[0073] Insbesondere wurde RACE unter Verwenden des 5' RACE-Systems [GIBCO BRL; Gaithersburg, MD (USA)] wie folgt durchgeführt. 1 µg mRNA (die gleiche wie oben) wurde als Templat für die Synthese des ersten cDNA-Strangs verwendet, bei der als Primer das MN-spezifische antisense-Oligonukleotid R1 (5'-TGGGGTTCTTGAGGATCTCCAGGAG-3') [SEQ ID NO: 7] verwendet wurde. Das erste Strangprodukt wurde zweimal in Gegenwart von Ammoniumacetat präzipitiert und mit TdT wurde ein homopolymerer C-Schwanz an dessen 3'-Ende angehängt. Die mit einem Schwanz versehene cDNA wurde dann mittels PCR unter Verwenden eines Nested-Primers (verschachtelten Primers) R2 (5'-CTCTAACTTCAGGGAGC-CCTCTTCTT-3') [SEQ ID NO: 8] und eines Ankerprimers, der sich an den homopolymeren Schwanz anlagert, (5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTGACTAGTACGGI IGGGIIGGGIIG-3') [SEQ ID N: 9] amplifiziert. Das amplifizierte Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und SalI verdaut und in das Plasmid pBluescriptII KS kloniert. Nach der Transformation wurde die Plasmid-DNA aus der gesamten Population der transformierten Zellen gereinigt und als Templat für die Sequenzierung mit dem MN-spezifischen Primer ODN1 [SEQ ID NO: 3, ein 29-mer 5'-CGCCAGTGGGTCATCTTCCCCAGAAGAG-3'] verwendet.

[0074] Um die Regulierung von MN zu untersuchen, wurden genomische Klone von MN isoliert. Ein genomischer Klon von MN (Bd3) wurde aus einer humanen Cosmid-Genbank, die aus fötalem Hirn erzeugt worden war, unter Verwenden von sowohl der MN-cDNA als Sonde als auch der MN-spezifischen Primer, die von dem 5'-Ende der cDNA ODN1 [SEQ ID NO: 3, supra] und ODN2 [SEQ ID NO: 4, ein 19-mer (5'-GGAATCCTCCTG-CATCCGG-3')] stammten, isoliert. Eine Sequenzanalyse offenbarte, dass der genomische Klon einen Bereich stromaufwärts von einer MN-Transkriptionsstartstelle und an der im Innern der MN-cDNA angeordneten BamHI-Restriktionsschnittstelle enden, abdeckte. Andere genomische Klone von MN können in ähnlicher Weise isoliert werden.

[0075] [Fig. 7](#) stellt ein Schema für das Alignment genomischer Klone von MN entsprechend der Transkriptionsinitiationsstelle bereit. Die Plasmide, die den A4a-Klon und die XE1- und XE3-Subklone enthielten, wurden am 6. Juni 1995 entsprechend unter den ATCC-Hinterlegungsnummern 97199, 97200 und 97198 bei der American Type Culture Collection (ATCC) hinterlegt.

Exon-Intron-Struktur des vollständigen genomischen Bereichs von MN

[0076] Die vollständige Sequenz der sich überlappenden Klone enthält 10.898 bp (SEQ ID NO: 5). [Fig. 5](#) zeigt den Aufbau des humanen MN-Gens, in dem die Position aller 11 Exons sowie die 2 stromaufwärts gelegenen und der 6 Alu-Wiederholungselemente auf den Introns gezeigt sind. Außer dem ersten Exon mit 445 bp sind alle Exons klein und liegen zwischen 27 und 191 bp. Die Größen der Introns liegen zwischen 89 und 1400 bp. Die CA-Domäne wird von den Exons 2 bis 8 kodiert, während die Exons 1, 10 und 11 jeweils der proteoglycanähnlichen Domäne, dem Transmembrananker und dem cytoplasmatischen Schwanz des MN/CA IX-Proteins entsprechen. Tabelle 1 unten listet die Splicing-Donor- und -Akzeptorsequenzen auf, die mit Consensus-Splicing-Sequenzen, einschließlich dem AG-GT-Motiv, übereinstimmen [Mount, *Nucleic Acids Res.*, 10: 459–472 (1982)].

Tabelle 1

Exon-Intron-Struktur des humanen MN-Gens

Exon	Größe	Position im Genom**	SEQ ID NO	5'-Splicing-Donor	SEQ ID NO
1	445	*3507–3951	28	AGAAG gtaagt	67
2	30	5126–5155	29	TGGAG gtgaga	68
3	171	5349–5519	30	CAGTC gtgagg	69
4	143	5651–5793	31	CCGAG gtgagc	70
5	93	5883–5975	32	TGGAG gtacca	71
6	67	7376–7442	33	GGAAG gtcagt	72
7	158	8777–8934	34	AGCAG gtgggc	73
8	145	9447–9591	35	GCCAG gtacag	74
9	27	9706–9732	36	TGCTG gtgagt	75
10	82	10350–10431	37	CACAG gtatta	76
11	191	10562–10752	38	ATAAT Ende	
Intron	Größe	Position im Genom**	SEQ ID NO	5'-Splicing-Donor	SEQ ID NO
1	1174	3952–5125	39	atacag GGGAT	77
2	193	5156–5348	40	ccccag GC-GAC	78
3	131	5520–5650	41	acgcag TG-CAA	79
4	89	5794–5882	42	tttcag ATCCA	80
5	1400	5976–7375	43	ccccag GAGGG	81
6	1334	7443–8776	44	tcacag GCTCA	82
7	512	8935–9446	45	ccctag CTCCA	83
8	114	9592–9705	46	ctccag TCCAG	84
9	617	9733–10349	47	tcgcag GT-GACA	85
10	130	10432–10561	48	acacag AAGGG	86

**Die Positionen beziehen sich auf die Nummerierung der nt in der gesamten genomischen Sequenz, einschließlich dem 5'-flankieren Bereich [Fig. 2A bis F]

*Die Anzahl entspricht der Transkriptionsstelle, die unten mit Hilfe des RNase-Protektionsassays bestimmt wurde.

Kartierung der Transkriptionsinitiations- und -terminierungsstellen des MN-Gens

[0077] Zavada et al., WO 95/34650 beschreiben des Prozess des Kartierens der Transkriptionsinitiations- und -terminierungsstellen des MN-Gens. Für eine Feinkartierung des 5'-Endes des MN-Gens wurde ein RNase-Protektionsassay verwendet. Die Sonde wurde einheitlich mit einer 470 Nukleotide umfassenden Kopie-RNA (nt –205 bis +265) [SEQ ID NO: 55] markiert, die an die gesamte RNA der MN exprimierenden HeLa- und GGL3-Zellen hybridisiert und auf einem Sequenzierungsgel analysiert wurde. Die Analyse hat gezeigt, dass die Transkription des MN-Gens an mehreren Stellen startet, wobei das 5'-Ende des längsten MN-Trans-

kripts 30 nt länger ist als das vorher mittels RACE charakterisierte.

Charakterisierung des 5'-flankierenden Bereichs

[0078] Es wurde festgestellt, dass der genomische Klon Bd3, der aus einer Cosmid-Genbank von humanem, fötalen Hirn isoliert wurde, einen Bereich von 3,5 kb stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle des MN-Gens abdeckt. Er enthält keinen signifikanten, kodierenden Bereich. An den Positionen –2587 bis –2296 [SEQ ID NO: 56] und –1138 bis –877 [SEQ ID NO: 57] (in Bezug auf den mittels RNP bestimmten Transkriptionsbeginn) sind zwei Alu-Wiederholungen angeordnet.

[0079] Eine Analyse der Nukleotidsequenz der DNA 5' von dem Transkriptionsbeginn (von nt –507) offenbarte keine erkennbare TATA-Box innerhalb des erwarteten Abstands von dem Beginn des ersten Exons an. Das Vorhandensein potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lässt jedoch vermuten, dass dieser Bereich einen Promotor für das MN-Gen enthalten könnte. Es gibt mehrere Consensus-Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren AP1 und AP2 sowie für andere regulatorische Elemente, einschließlich einer Bindungsstelle für p53 [Locker und Buzard, J., DNA Sequencing and Mapping, 1: 3–11 (1990); Imagawa et al., Cell, 51: 251–260 (1987); El Deiry et al., Nat. Genet., 1: 44–49 (1992)]. Obwohl der putative Promotorbereich 59,3% C + G enthält, weist er keine weiteren Merkmale CpG-reicher Inseln auf, die für TATA-lose Promotoren von Haushaltsgenen („housekeeping genes“) typisch sind [Bird, Nature, 321: 209–213 (1986)]. Eine weitere Klasse von Genen, denen eine TATA-Box fehlt, verwendet das Initiator-(Inr-)Element als Promotor. Viele dieser Gene sind nicht konstitutiv aktiv, sondern werden stattdessen während der Differenzierung oder Entwicklung reguliert. Das Inr weist eine Consensus-Sequenz aus PyPyPyCAPyPyPyPyPy [SEQ ID NO: 23] auf und umfasst die Transkriptionsstartstelle [Smale und Baltimore, Cell, 57: 103–113 (1989)]. In dem putativen Promotor von MN gibt es zwei solcher Consensus-Sequenzen; diese überlappen jedoch nicht den Transkriptionsbeginn ([Fig. 6](#)).

[0080] In der Mitte des MN-Gens wurde ein interessanter Bereich gefunden. Der Bereich ist ungefähr 1,4 kb lang [nt 4.600–6.000 der genomischen Sequenz; SEQ ID NO: 49] und erstreckt sich von dem 3'-Teil des 1. Introns bis zum Ende des 5. Exons. Der Bereich weist mit 62,8% C + G und 82 CpG : 131 GpC-Dinukleotiden den Charakter einer typischen CpG-reichen Insel auf. Zudem sind mehrere putative Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP2 und Sp1 vorhanden [Locker und Buzard, supra; Briggs et al., Science, 234: 47–52 (1986)], die in der Mitte dieses Bereichs konzentriert sind. Insbesondere das 3. Intron mit 131 bp Länge enthält drei Sp1- und drei AP2-Consensus-Sequenzen. Diese Daten zeigen die mögliche Beteiligung des Bereichs an der Regulierung der Expression des MN-Gens. Die Funktionalität dieses Bereichs sowie andere regulatorische Elemente, die in dem vorgeschlagenen 5'-MN-Promotor gefunden wurden, blieb jedoch unbestimmt.

MN-Promotor

[0081] Eine Untersuchung des MN-Promotors hat gezeigt, dass er TATA-los ist und regulatorische Sequenzen für AP-1, AP-2 sowie auch zwei p53-Bindungsstellen enthält. Die Sequenz des 5'-Endes des 3,5 kb großen, flankierenden Bereichs stromaufwärts von dem MN-Gen hat eine erhebliche Homologie zu der LTE endogener HEV-K-Retroviren gezeigt. Die basale Transkriptionsaktivität des Promotors ist sehr schwach, wie mit Hilfe von Analysen unter Verwenden von CAT und neo-Reportergenen bestätigt wurde. Die Expression der Reportergene ist jedoch um ein vielfaches erhöht, wenn sie von dem 3,5 kb großen, flankierenden Bereich gesteuert wird, was eine Beteiligung putativer Enhancer anzeigt.

[0082] Die Charakterisierung der Funktionen des 3,5 kb großen 5' stromaufwärtigen Bereichs von MN mittels Deletionsanalyse führte zu der Identifizierung des [–173, +31]-Fragments [SEQ ID NO: 21] (auch alternativ, aber weniger bevorzugt des nahezu identischen –172, +31-Fragments [SEQ ID NO: 91]) als MN-Promotor. Ein in vitro-DNase I-Footprinting offenbarte das Vorhandensein fünf geschützter Bereiche (protected regions, PR) innerhalb des MN-Promotors. Eine ausführliche Deletionsanalyse des Promotors identifizierte PR 1 und 2 (vom Transkriptionsbeginn aus nummeriert) als die wichtigsten für eine transkriptionale Aktivität. PR4 [SEQ ID NO: 115] beeinflusste die Transkription negativ, da dessen Deletion zu einer erhöhten Promotoraktivität führte und bestätigt wurde, dass es als ein vom Promotor, von der Position und von der Orientierung unabhängiges Silencer-Element fungiert. Eine Analyse der Mutationen zeigte an, dass die direkte Wiederholung AGGGGCacAGGGC [SEQ ID NO: 143] für eine effiziente Bindung des Repressors erforderlich ist. Mittels UV-Vernetzung wurde festgestellt, dass zwei Komponenten des Repressorkomplexes (35 und 42 kDa) in direktem Kontakt mit PR4 stehen. Eine erhöhte Zelldichte, die bekanntermaßen die MN-Expression induziert, beeinflusste nicht das Ausmaß der Bindung von PR4 in HeLa-Zellen. Im Vergleich zu nicht-tumorigenen, normalen CGL1-HeLa × Fibroblasten-Hybrid-Zellen scheint eine signifikant verringerte Repressormenge für die Hochregulierung von MN in dem Fall tumorigener CGL3 verantwortlich zu sein.

Verwendbarkeit des MN-Promotors als tumor-spezifischer Promotor in der Gentherapie

[0083] Es wird untersucht, ob der MN-Genpromotor als tumor-spezifischer Promotor zum Steuern der Expression eines Suizidgens [Thymidinkinase (tk) von HSV] verwendet werden kann und das direkte und als „Zuschauer“ unbeteiligte Töten von Tumorzellen vermitteln kann. Das auf Tumorzellen übertragene HSVtk-Gen wandelt das Nukleosidanalogon Ganciclovir (GCV) in toxische Triphosphate um und vermittelt den Tod transduzierter und auch benachbarter Tumorzellen. Die Steuerung von HSVtk mit Hilfe des MN-Genpromotors würde auch dessen alleinige Expression in Tumorzellen, die für die Biosynthese des MN-Proteins tolerant sind, ermöglichen und selektiv Tumorzellen, jedoch keine normalen Zellen, in denen die Expression von MN unterdrückt wird, töten.

[0084] Es wurde ein Plasmidkonstrukt erzeugt, in dem HSVtk stromabwärtig von dem MN-Promotorbereich Bd3, der sowohl proximale als auch entfernte regulatorische Elemente von MN enthielt, kloniert wurde. Das Plasmid pMN-HSVtk wurde unter Verwenden von Calciumphosphat-Präzipitation und Lipofektion jeweils in Rat2TK-Zellen und humane CC3-CZervixkarzinomzellen transfiziert. Die Transfektanten wurden auf eine Expression von HSVtk und eine GVC-Sensitivität geprüft. Eine Analyse der Transfektanten zeigte den beachtlichen, sogar in geringen Konzentrationen cytotoxischen in vitro-Effekt von GVC (bis zu 95% aller Zellen wurden getötet).

[0085] Es wurde ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen HSVtk unter Verwenden des Fusionsproteins mit GST in pGEX-3X erzeugt, um die in transfizierten Zellen synthetisierte HSVtk immunnachzuweisen. Dieses Modellsystem wird untersucht, um den Effekt des „unbeteiligten Zuschauers“, die Inhibierung der Klonierungseffizienz und die Bereitschaft zum Eindringen transduzierter und mit GVC behandelter Zellen in Collagenmatrizen abzuschätzen. Es soll ein rekombinanter, retroviraler Vektor mit der von dem MN-Promotor gesteuerten HSVtk erzeugt werden, um dessen in vivo-Wirksamkeit unter Verwenden eines Tiermodells (z. B. SCID-Maus) zu testen.

Analyse des MN-Promotors

[0086] Da der MN-Promotor schwach ist, wäre ein klassischer Ansatz der Untersuchung aufgrund der relativ geringen Wirksamkeit transienter Transfektionen (bis zu 10%) beschränkt. Daher wurden stabile, klonale Zelllinien, die Konstrukte exprimieren, die den mit dem CAT-Gen fusionierten MN-Promotorenthalten, hergestellt. In solchen klonalen Linien exprimieren 100% der Zellen das von dem MN-Promotor gesteuerte CAT-Gen und die Aktivität des Promotors ist daher leichter nachweisbar als bei transienten Versuchen. Die Promotoraktivität kann auch wiederholt in den gleichen Zellen bei verschiedenen Bedingungen oder behandelt mit verschiedenen Faktoren und Wirkstoffen analysiert werden. Dieser Ansatz folgt der Untersuchung der Mechanismen, die der MN-Regulierung auf der Ebene des Transkriptionsbeginns zu Grunde liegen.

[0087] Es gibt mehrere Arten von Transfektionen mit Promotor-Konstrukten, die mit einem Reporter-CAT-Gen verknüpft sind (Calcium-Präzipitation, DEAE-Dextran, kombiniert mit einem DMSO-Schock und/oder Chlorochin sowie Elektroporation), verschiedene Verfahren für einen CAT-Aktivitätsassay (Szintillationsverfahren, Dünnschichtchromatographie) und mehrere Empfänger-Zelllinien, die sich in ihrem Ausmaß der MN-Expression und in der Wirksamkeit der Transfektion unterscheiden (HeLa-, SiHa-, CGL3-, KATO III-, Rat2TK- und C33-Zellen). Die Aktivität des MN-Promotors wurde vorzugsweise mittels Elektroporation von CGL3-Zellen und Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Weiter bevorzugt wurden C33-Zellen, die mit MN-Promotor-CAT-Konstrukten und pSV2neo co-transfiziert worden waren, verwendet.

1. Zum Nachweisen der basalen Aktivität des MN-Promotors und zum Abschätzen der Position des Kernpromotors wurde die Expression des CAT-Gens aus den Konstrukten pMN1 bis pMN7 nach der Transfektion in CGL3-Zellen analysiert. Plasmide mit fortschreitenden 5'-Deletionen wurden in CGL3-Zellen transfiziert und die Aktivität wurde mit Hilfe eines CAT-Assays analysiert. [Außer bei pBLV-LTR (2 µg) wurden in allen Fällen 8 µg DNA für die Transfektion verwendet.]

[0088] In Zellen, die mit pMN1 und pMN2 (die entsprechend 933 bp und 600 bp der Promotorsequenz enthielten) transfiziert worden waren, wurde eine nur sehr schwache CAT-Aktivität nachgewiesen.

[0089] Eine etwas höhere Aktivität wurde mit den Konstrukten pMN3, pMN4 und pMN6 (die entsprechend 446 bp, 243 bp und 58 bp des Promotors enthalten) gefunden. Ein leichtes Aktivitätsmaximum wurde mit pMN5 (beginnend bei der Position -172 in Bezug auf den Transkriptionsbeginn) erhalten. Die Funktion des MN-Kernpromotors kann daher einem Bereich von annähernd 500 bp unmittelbar stromaufwärts von der MN-Transkriptionsinitiationsstelle zugeschrieben werden.

[0090] Interessanter Weise war die Aktivität des großen Bd3-Bereichs (der 3,5 kbp stromaufwärts von dem Transkriptionsstart abdeckt) um ein Vielfaches höher als die Aktivität des Kernpromotors. Dessen Ausmaß war jedoch immer noch kleiner als dasjenige, das bei einer positiven Kontrolle, d. h. der BLV-LTR, die mittels Tax transaktiviert wurde, gefunden wurde und immer noch kleiner als die Aktivität der BLV-LTR ohne Transaktivierung. Dass die Aktivität von Bd3 im Vergleich zu dem Kernpromotor erhöht war, lässt das Vorhandensein einiger regulatorischer Elemente vermuten. Solche Elemente befinden sich am wahrscheinlichsten in der Sequenz zwischen pMN1 und Bd3 (d. h. von -1 kbp bis -3,5 kbp) [SEQ ID NO. 58]. Die Klonierung und Transfektion mehrerer Deletionsversionen von Bd3, die den angegebenen Bereich abdecken, können zum Bestimmen der Position der putativen regulatorischen Elemente verwendet werden.

[0091] Ähnliche Ergebnisse wurden aus dem Transfizieren von KATO III-Zellen mit Bd3 und pMN4 erhalten. Die transfizierten Zellen exprimierten eine geringere Menge an MN als die CGL3-Zellen. Entsprechend wurde gefunden, dass die Aktivität des MN-Promotors kleiner als in den CGL3-Zellen ist.

2. In einem parallelen Ansatz zum Untersuchen des MN-Promotors wurde auf Basis der G418-Selektion von Zellen, die mit Plasmiden transfiziert worden waren, die den Promotor von Interesse enthalten, welcher stromaufwärts von dem neo-Gen kloniert worden war, eine Analyse durchgeführt. Dieser Ansatz ist dazu geeignet, schwache Promotoren zu untersuchen, da er viel empfindlicher als ein standardmäßiger CAT-Assay ist. Das Prinzip, das dem Verfahren zu Grunde liegt, ist folgendes: ein aktiver Promotor steuert die Expression des neo-Gens, das die transfizierten Zellen vor der toxischen Wirkung von G418 schützt, wohingegen ein inaktiver Promotor nicht in der Erzeugung eines neo-Produkts resultiert und die Zellen, die auf diese Weise transfiziert wurden, durch die Wirkung von G418 sterben. Die Aktivität des Promotors kann entsprechend der Anzahl an Zellkolonien, die nach zwei Wochen einer Selektion mit G418 erhalten wurden, abgeschätzt werden. In den anfänglichen Versuchen wurden drei Konstrukte verwendet – pMN1neo, pMN4neo und pMN7neo. Da pMN7neo nur 30 bp stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle enthält, wurde es als Negativkontrolle betrachtet. Als Positivkontrolle wurde pSV2neo mit einem Promotor, der von SV40 stammte, verwendet. Als Empfängerzellen wurden Rat2TK-Zellen verwendet, die mit Hilfe des Calcium-Präzipitationsverfahrens mit hoher Wirksamkeit transfiziert werden können.

[0092] Nach der Transfektion wurden die Zellen einer zweiwöchigen Selektion unterzogen. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gespült und die Kolonien mit Hilfe einer Färbung mit Methylenblau sichtbar gemacht. Die aus drei voneinander unabhängigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Daten aus den CAT-Assays. Das Promotor-Konstrukt pMN4neo zeigte eine höhere transkriptionale Aktivität als pMN1neo. Der Unterschied zwischen der Positivkontrolle und pMN4neo war jedoch nicht so markant wie bei CAT-Assay. Das kann sich aufgrund von sowohl der geringeren Promotoraktivität von pSV2neo im Vergleich zu dem mit Tax transaktivierten pBLV-LTR als auch der verschiedenen Bedingungen für das Wachstum der Zellen nach der Transfektion ergeben. Nach diesem Gesichtspunkt ist eine stabile Transfektion für die MN-Expression wahrscheinlich vorteilhafter, da die Zellen in Kolonien mit engem Kontakt zwischen den Zellen wachsen und der Versuch länger dauert, was eine bessere Möglichkeit zum Nachweisen der Promotoraktivität bereitstellt.

3. Es wurden stabile Transfektanten, die chimäre MN-Promotor-CAT-Gene exprimieren, mit Hilfe einer Co-Transfektion relevanter Plasmide mit pSV2neo erzeugt. Als Empfängerzellen wurden zunächst HeLa-Zellen verwendet. Es wurden jedoch keine Klone, die die Promotor-CAT-Konstrukte exprimieren, erhalten. Dieses negative Ergebnis ergab sich wahrscheinlich aus einer homologen Rekombination des transfizierten genomischen Bereichs von MN (z. B. des Promotors) mit der entsprechenden endogenen Sequenz. Auf der Basis dieses Versuchs wurden C33-Zellen, die aus einem HPV-negativen Zervixkarzinom stammten, verwendet. Die C33-Zellen exprimieren kein MN, da sie während des Prozesses der Tumorgenese ihr genetisches Material, einschließlich des chromosomalen Bereichs 9p, der das MN-Gen enthält, verloren haben. In diesen Versuchen kann das Nicht-Vorhandensein des MN-Gens einen Vorteil darstellen, da die Wahrscheinlichkeit homologer Rekombinationen ausgeschlossen wird.

Mit MN-Promotor-CAT-Konstrukten transfizierte C33-Zellen

[0093] C33-Zellen, die das CAT-Gen unter den MN-Promotorbereichen Bd3 (-3500/+31) [SEQ ID NO: 90] und MN5 (-172/+31) [SEQ ID NO: 91] exprimieren, wurden für anfängliche Versuche zum Analysieren des Einflusses der Zelldichte auf die transkriptionale Aktivität des MN-Promotors verwendet. Die Ergebnisse gaben an, dass Signale, die erzeugt worden waren, nachdem die Zellen in engen Kontakt zueinander kamen, die Transkription des CAT-Proteins aus dem MN-Promotor proportional zu der Dichte der Zellkultur aktivieren. Interessanter Weise gaben die Daten an, dass das MN-Protein nicht für diese Phase der Signalübertragung erforderlich ist, da der Einfluss der Dichte in den MN-negativen C33-Zellen klar gezeigt wurde. Es scheint eher, dass das MN-Protein als in dichten Zellen erzeugtes Effektmolekül wirkt, um als solches eine bestimmte bi-

ologische Funktion auszuüben (d. h. die Kontaktinhibierung zu stören). Interessanter Weise ist die Aktivität des MN-Promotors sogar in sehr spärlichen Zellkulturen nachweisbar, was nahe legt, dass MN in einer spärlichen, subkonfluenten Kultur in einer sehr geringen Menge exprimiert wird.

[0094] Deletionsvarianten: Dann wurden Deletionsvarianten des Bd3-CAT-Promotorkonstrukts erzeugt. Diese Konstrukte wurden mit pSV2neo in C33-Zervixzellen co-transfiziert. Nach der Selektion mit G418 wurde die gesamte Population stabil transfizierter Zellen einer CAT-ELISA-Analyse unterzogen. Die Expression der Deletionskonstrukte führte zu der Synthese ähnlicher Mengen des CAT-Proteins, wie sie mit dem Bd3-CAT-Konstrukt erhalten wurden. Ausgehend von den vorhergehenden Daten schlugen die Erfinder vor, dass Sequenzen, die die Transkription von MN stimulieren, zwischen -3506 und -3375 [SEQ ID NO: 92] stromaufwärts von dem Transkriptionsbeginn angeordnet sind. Das ist die Sequenz, die eine Homologie zur HERV-K-LTR zeigt.

[0095] Die transienten Transfektionsstudien in CGL3-Zellen offenbarten jedoch wiederholt, dass der LTR-Bereich nicht für eine Verstärkung der basalen Aktivität des MN-Promotors erforderlich ist. Ferner geben die in CGL3-Zellen erhaltenen Ergebnisse an, dass das aktivierende Element in dem Bereich von -933 bis -2179 [SEQ ID NO: 110] in Bezug auf die Transkriptionsinitiationsstrecke (die Position des Bereichs wurde aus den sich überlappenden Sequenzen in den Bd3-Deletionsmutanten abgeleitet) angeordnet ist.

Wechselwirkung nukleärer Proteine mit MN-Promotorsequenzen

[0096] Um die Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die an den MN-Promotor binden und potentiell dessen Aktivität regulieren, wurde eine Reihe von Analysen unter Verwenden eines Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) und einer DNase I-Footprinting-Analyse (FTP) durchgeführt.

EMSA

[0097] Bei dem EMSA wurden die gereinigten Promotorfragmente MN4 (-243/+31) [SEQ ID NO: 93], MN5 (-172/+31) [SEQ ID NO: 91], MN6 (-58/+31) [SEQ ID NO: 94] und pMN7 (-30/+31) [SEQ ID NO: 95], die an den 3'-Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms markiert worden waren, in nukleären Extrakten, die aus CGL1- und CGL3-Zellen hergestellt worden waren, mit Proteinen Wechselwirken gelassen. [40 µg der nukleären Proteine wurden mit am 30.000 cpm Ende markierten DNA-Fragmenten in Gegenwart von 2 µg Poly(dIdC) inkubiert]. Die DNA-Protein-Komplexe wurden mittels PAGE (nativ 6%) analysiert, wobei die Komplexe zusätzliche Banden erzeugten, die aufgrund der Verschiebung ihrer Mobilität, die von dem Rest des gebundenen Proteins abhängt, langsamer wanderten als die freien DNA-Fragmente. Der EMSA der MN4- und MN5-Promotorfragmente offenbarte verschiedene DNA-Protein-Komplexe; die entsprechend mit den nukleären Extrakten von CGL1 und CGL3 erhaltenen Bindungsmuster waren jedoch nicht identisch. Es gibt einen einzigen CGL1-spezifischen Komplex.

[0098] Der EMSA des MN6-Promotorfragments führte mit nukleären Extrakten von sowohl CGL1 als auch CGL3 zur Bildung drei identischer Komplexe, wohingegen das MN7-Promotorfragment keine nukleären Proteine band.

[0099] Die EMSA-Ergebnisse geben an, dass der nukleäre Extrakt von CGL1 einen spezifischen Faktor enthält, der an der negativen Regulierung der MN-Expression in CGL1-Zellen beteiligt sein könnte. Da der spezifische DNA-Protein-Komplex mit MN4(-243/+31)[SEQ ID NO: 93] und MN5(-172/+31)[SEQ ID NO: 91] Promotorfragmenten, jedoch nicht mit MN6 (-58/+31) [SEQ ID NO: 94] gebildet wird, scheint es, dass die Bindungsstelle des Proteinbestandteils dieses spezifischen Komplexes zwischen -173 und -58 bp [SEQ ID NO: 96] in Bezug auf die Transkriptionsinitiation angeordnet ist.

[0100] Der nächste Schritt war eine Reihe von EMSA-Analysen unter Verwenden von doppelsträngigen (ds) Oligonukleotiden, die gemäß den geschützten Bereichen in der FTP-Analyse bezeichnet wurden. Ein ds Oligonukleotid, das aus dem geschützten Bereich PR2 [der sie Sequenz von -72 bis -56 bp abdeckt (SEQ ID NO: 111)] des MN-Promotors stammte, ergab eine Bestätigung der Bindung des AP-1-Transkriptionsfaktors in kompetitiven EMSA unter Verwenden kommerzieller ds Oligonukleotide, was die Bindungsstelle für AP-1 darstellt.

[0101] EMSA von ds Oligonukleotiden, die aus den geschützten Bereichen von PR1 [-46 bis -24 bp (SEQ ID NO: 112)], PR2 [-72 bis -56 bp (SEQ ID NO: 111)], PR3 [-102 bis -85 bp (SEQ ID NO: 113)] und PR5 [-163 bis -144 (SEQ ID NO: 114)] stammten, zeigten keine Unterschiede in den Bindungsmustern nukleärer Proteine, die aus CGL1- und CGL3-Zellen extrahiert wurden, was anzeigt, dass solche Bereiche keine entscheidenden Transkriptionsfaktoren binden, die die Aktivierung des MN-Gens in CGL3 oder dessen negative Regulie-

rung in CGL1 steuern. EMSA von ds Oligonukleotiden aus dem geschützten Bereich von PR4 [-133 bis -108 bp (SEQ ID NO: 115)] zeigte jedoch wiederholt erhebliche quantitative Unterschiede zwischen der Bindung der nukleären Proteine aus CGL1 und CGL3. Die nukleären Proteine von CGL1 bildeten eine im Wesentlichen größere Menge an DNA-Protein-Komplexen, was angibt, dass der PR4-Bereich eine Bindungsstelle für (einen) spezifische(n) Transkriptionsfaktor(en) enthält, der (die) einen negativen Regulator der Transkription des MN-Gens in CHL1-Zellen darstellen kann (können). Diese Feststellung stimmt mit den vorherigen EMSA-Daten überein, die einen CGL1-spezifischen DNA-Protein-Komplex mit den Promotorfragmenten pMN4 (-243/+31; SEQ ID NO: 93) und pMN5 (-172/+31; SEQ ID NO: 91), jedoch nicht mit pMN6 (-58/+31; SEQ ID NO: 94) zeigten.

[0102] Um das beteiligte Protein oder die Bildung eines spezifischen Komplexes mit dem MN-Promotor in dem PR4-Bereich zu identifizieren, werden relevante ds Oligonukleotide, die kovalent an magnetische Kügelchen gebunden sind, zum Reinigen des entsprechenden Transkriptionsfaktors verwendet werden. Alternativ dazu wird das ONE Hybrid System® [Clontech (Palo Alto, CA (USA))] zum Suchen nach und Klonieren von Transkriptionsfaktoren, die an der Regulierung des analysierten Promotorbereichs beteiligt sind, verwendet werden. Für diese Untersuchung wird eine cDNA-Genbank aus HeLa-Zellen verwendet werden.

FTP

[0103] Um die genaue Position der cis-regulatorischen Elemente, die an der transkriptionalen Regulierung des MN-Gens beteiligt sind, zu bestimmen, wurde FTP verwendet. Proteine in nukleären Extrakten, die entsprechend aus CGL1- und CGL3-Zellen hergestellt worden waren, wurden mit einem gereinigten ds DNA-Fragment des MN-Promotors (MN4, -243/+31) [SEQ ID NO: 93], das am 5'-Ende eines Strangs markiert war, Wechselwirkungen gelassen. [Die MN4-Fragmente waren entweder an der XhoI-Schnittstelle (-243/+31*) oder an der XbaI-Schnittstelle (*-243/+31) markiert]. Der DNA-Protein-Komplex wurde dann einem Angriff der Dnase I unterzogen, was ein Aufbrechen der DNA-Kette an bestimmten Basen, wenn sie nicht mit den Proteinen in Kontakt stehen, verursacht. [Eine Kontrolle verwendete BSA anstelle von Dnase]. Die Untersuchung des Bandenmusters der denaturierten DNA nach einer Gelelektrophorese [8% denaturierendes Gel] zeigt an, welche der Basen auf dem markierten Strang durch das Protein geschützt war. Die FTP-Analyse des MN4-Promotorfragments offenbarte 5 Bereiche (I bis V), die sowohl an dem kodierenden als auch an dem nicht-kodierenden Strang geschützt waren, sowie zwei Bereiche (VI und VII), die an dem kodierenden Strang, nicht jedoch an dem nicht-kodierenden Strang geschützt waren. [Fig. 6](#) zeigt die allgemeinen Bereiche auf dem MN-Promotor, die geschützt waren.

[0104] Die Sequenzen der identifizierten, geschützten Bereiche (PR) wurden einer Computeranalyse unter Verwenden des SIGNALSCAN-Programms unterzogen, um zu sehen, ob sie den bekannten Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren entsprachen. Die mit dieser Computeranalyse erhaltenen Daten sind wie folgt:

- PR I – kodierender Strang – für AP-2, p53, GAL4 nicht kodierender Strang – JCV wiederholt
- PR II – kodierender Strang – für AP-2, CGN4 nicht kodierender Strang – TCF-, dFRA, CGN4
- PR III – kodierender Strang – keine bekannte Consensus-Sequenz, nur teilweise Überlappung mit dem für AP-1 nicht kodierenden Strang – 2 TCF-1-Stellen
- PR IV – kodierender Strang – für TCF-1, ADR-1 nicht kodierender Strang – CTCF, LF-A1, LBP-1
- PR V – kodierender Strang – für kein bekanntes Consensus-Motiv nicht kodierender Strang – JCV wiederholt
- PR VI – kodierender Strang – für kein bekanntes Consensus-Motiv nicht kodierender Strang – T-Antigen von SV 40, GAL4
- PR VII – kodierender Strang – für NF-uE4, U2snRNA.2 nicht kodierender Strang, AP-2, IgHC.12, MyoD.

[0105] Im Gegensatz zu EMSA stellte die FTP-Analyse keine Unterschiede zwischen nukleären Extrakten von CGL1 und CGL3 fest. Das Vorhandensein spezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen, die in den nukleären Extrakten von CGL1 mittels EMSA nachgewiesen wurden, könnten sich jedoch aus der Bindung eines weiteren Proteins unter Bilden eines DNA-Protein-Protein-Komplex ergeben haben. Wenn das spezifische Protein nicht direkt mit der DNA-Sequenz in Kontakt trat, wäre seine Gegenwart mittels FTP nicht nachweisbar.

EMSA Supershift-Analyse

[0106] Die Ergebnisse der FTP lassen vermuten, dass die Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 sowie das Tumorsuppressorprotein p53 potentiell an der Regulierung der MN-Expression beteiligt sind. Um die Bindung die-

ser bestimmten Proteine an den MN-Promotor zu bestätigen, wurde eine Supershift-Analyse unter Verwenden von Antikörpern, die für diese Proteine spezifisch sind, durchgeführt. Für diese Analyse wurden DNA-Protein-Komplexe, die so, wie für EMSA beschrieben ist, hergestellt wurden, mit MAKs oder polyklonalen Antikörpern, die für potentiell in dem Komplex eingeschlossene Proteine spezifisch sind, Wechselwirkungen gelassen. Die Bindung des Antikörpers an das entsprechende Protein führt zu einer weiteren Verschiebung (Supershift) in der Mobilität des DNA-Protein-Antikörper-Komplexes, die mit Hilfe einer PAGE als weitere, langsamer wandernde Bande sichtbar gemacht wird.

[0107] Mit diesem Verfahren wurde die Bindung von AP-2 an den MN-Promotor bestätigt. Dieses Verfahren bewies jedoch nicht die Bindung des AP1-Transkriptionsfaktors. Es ist möglich, dass das MN-Protein an ein mit AP-1 verwandtes Protein bindet, das sich antigenisch von AP-1, der von den in diesem Assay verwendeten Antikörpern erkannt wird, unterscheidet.

[0108] Von ebenso hohem Interesse ist die mögliche Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 an den MN-Promotor. Es ist allgemein bekannt, dass wt p53 als Transkriptionsfaktor fungiert, der die Expression wachstumsbeschränkender Gene aktiviert und direkt oder indirekt die Expression von Genen, die für das Weitergehen der Zellproliferation erforderlich sind, nach unten moduliert. Versuche einer transienten Co-Transfektion unter Verwenden eines pMN4-CAT-Promotorkonstrukts in Kombination mit entsprechend wt p53-cDNA und mut p53-cDNA lässt vermuten, dass wt p53, jedoch nicht mut p53 die Expression von MN negativ reguliert. Daneben ist eine der beiden p53-Bindungsstellen in dem MN-Promotor in der FTP-Analyse geschützt ([Fig. 6](#)), was angibt, dass er an das entsprechende Protein bindet. Daher muss mit geeigneten, nukleären Extrakten, z. B. aus MCF-7-Brustkarzinomzellen, die wt p53 in ausreichender Menge exprimieren, eine Supershift-Analyse durchgeführt werden, um zu belegen, dass p53 mit zwei p53-spezifischen Antikörpern, z. B. den MAKs 421 und DO-1 [letzterer wurde freundlicher Weise von Dr. Vojtesek vom Masaryk Memorial Center Institute in Brno, Tschechische Republik bereitgestellt] an den MN-Promotor bindet.

Regulation der MN-Expression und des MN-Promotors

[0109] MN scheint ein neues, regulatorisches Protein zu sein, das direkt an der Steuerung der Zellproliferation und der zellulären Transformation beteiligt ist. In HeLa-Zellen wird die Expression von MN positiv durch die Zelldichte reguliert. Seine Menge wird durch eine bleibende Infektion mit LCMV erhöht. In Hybridzellen zwischen HeLa und normalen Fibroblasten korreliert die Expression von MN mit der Tumorigenität. Die Tatsache, dass MN in nicht-tumorigenen Hybridzellen (CGL1) vorhanden ist, jedoch in einer tumorigenen Segregante, der das Chromosom 11 fehlt, exprimiert wird, gibt an, dass MN durch einen putativen Suppressor in Chromosom 11 negativ reguliert wird.

[0110] Beweise, die die regulatorische Rolle des MN-Proteins belegen, wurden bei der Erzeugung stabiler Transfektanten von NIH3T3-Zellen gefunden, die das MN-Protein konstitutiv exprimieren. Als Folge der Expression von MN erlangten die NIH 3R3-Zellen Eigenschaften, die mit einem transformierten Phänotyp assoziiert sind: veränderte Morphologie, erhöhte Sättigungsdichte, proliferativer Vorteil in serum-reduzierten Medien, erhöhte DNA-Synthese und Vermögen zu einem von der Anhaftung unabhängigen Wachstum. Ferner gab eine Durchfluszytometrie-Analyse einer asynchronen Zellpopulation an, dass die Expression des MN-Proteins zu einem beschleunigten Fortschreiten der Zellen durch die G1-Phase, einer Verringerung der Zellgröße und dem Verlust des Vermögens zu einer Wachstumspause unter ungeeigneten Bedingungen führt. Auch zeigen die MN exprimierenden Zellen eine verringerte Sensitivität gegenüber dem DNA schädigenden Wirkstoff Mitomycin C.

[0111] Nicht-tumorigene Zellen, CGL1-Zellen, wurden auch mit der vollständig langen MN-cDNA transfiziert. Es wurde das gleiche pSG5C-MN-Konstrukt in Kombination mit dem pSV2neo-Plasmid verwendet, das zum Transfizieren der NIH3T3-Zellen verwendet wurde. Von den 15MN-positiven Klonen (getestet mittels SP-RIA und Western Blotting) wurde 3 für eine weitere Analyse ausgewählt. Als Kontrolle wurden zwei negative Klone, die aus mit einem leeren Plasmid transfizierten CGL1-Zellen isoliert wurden, dazugegeben. Eine anfängliche Analyse gibt an, dass die Morphologie und die Wachstumsgewohnheiten der mit MN transfizierten CGL1-Zellen nicht drastisch verändert sind, ihre Proliferationsgeschwindigkeit und die Plattierungseffizienz sind jedoch erhöht.

MN-Promotor – sense-/antisense-Konstrukte

[0112] Wenn der Promotorbereich aus dem genomischen Klon von MN, der so, wie oben beschrieben ist, isoliert wurde, mit der MN-cDNA verknüpft wurde und in CGL1-Hybridzellen hybridisiert wurde, war die Expressi-

on des MN-Proteins unmittelbar nach der Selektion nachweisbar. Dann hörte sie jedoch schrittweise auf, was die Wirkung eines Feedback-Regulators anzeigt. Das putative regulatorische Element schien über den MN-Promotor zu wirken, da kein ähnlicher Effekt beobachtet wurde, wenn die vollständig lange cDNA (die nicht den Promotor enthielt) verwendet wurde.

[0113] Ein „antisense“ MN-cDNA/MN-Promotorkonstrukt wurde zum Transfizieren der CGL3-Zellen verwendet. Die Wirkung war das Gegenteil derjenigen der CGL1-Zellen, die mit dem „sense“-Konstrukt transfiziert worden waren. Während die transfizierten CGL1-Zellen Kolonien bildeten, die um ein Vielfaches größer als die Kontroll-CGL1 waren, bildeten die transfizierten CGL3-Zellen Kolonien, die viel kleiner als die Kontroll-CGL3-Zellen waren. Das gleiche Ergebnis wurde mit einer antisense-MN-cDNA-Transfektion in SiHa- und HeLa-Zellen erhalten.

[0114] Bei solchen Versuchen stammte der Teil des Promotorbereichs, der durch eine BamHI-Schnittstelle mit der MN-cDNA verknüpft war, von einem NcoI- BamHI-Fragmnt des genomischen Klons von MN [Bd3] und stellt einen Bereich ein paar hundert bp stromaufwärts von der Transkriptionsinitiationsstelle dar. Nach der Ligation wurde die verbindende DNA in einen pBK-CMV-Expressionsvektor [Strategen] inseriert. Die erforderliche Orientierung der inserierten Sequenz wurde durch gerichtetes Klonieren gewährleistet und anschließend mit Hilfe einer Restriktionsanalyse überprüft. Das Transfektionsverfahren war das gleiche, das beim Transfizieren der NIH3T3-Zellen verwendet wurde; eine Co-Transfektion mit dem pSV2neo-Plasmid war jedoch nicht erforderlich, da der neo-Selektionsmarker bereits in dem pBK-CMV-Vektor enthalten war.

[0115] Nach zweiwöchiger Selektion in einem Medium, das G418 enthielt, waren die merklichen Unterschiede zwischen den Anzahlen und Größen der angezüchteten Kolonien so, wie oben angegeben ist, offensichtlich. Unmittelbar nach der Selektion und dem Klonen wurden die mit MN transfizierten CGL1- und CGL3-Zellen mittels SP-RIA entsprechend auf eine Expression und Unterdrückung von MN getestet. Die isolierten, transfizierten CGL1-Klone waren MN-positiv (obwohl die Menge kleiner war als diejenige, die mit der vollständig langen cDNA erhalten wurde), obwohl das MN-Protein in nahezu keinem transfizierten CGL3-Klon vorhanden war. In nachfolgenden Passagierungen begann die Expression von MN in transfizierten CGL1-Zellen aufzuhören und wurde dann blockiert, was vielleicht einen Steuer-Feedback-Mechanismus bewies.

[0116] Infolge der sehr stark verringerten Proliferation der transfizierten CGL3-Zellen war es schwierig, die Mehrheit der klonierten Zellen (gemäß SP-RIA, diejenigen mit den kleinsten Mengen an MN) zu expandieren und sie gingen während der Passagierung verloren. Einige Klone behoben jedoch das Problem und exprimierten wieder MN. Es ist möglich, dass, wenn diese Zellen eine höhere Menge erreichten, die Menge der endogen erzeugten MN-mRNA auf mehr als die Menge der ektopisch exprimierten antisense-mRNA zunahm.

Identifizierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die an der Steuerung der MN-Expression beteiligt sind

[0117] Eine Steuerung der MN-Expression auf der Transkriptionsebene beinhaltet die regulatorischen Elemente des MN-Promotors. Solche Elemente binden an Transkriptionsfaktoren, die für die Aktivierung von MN in Tumorzellen und/oder die Expression in normalen Zellen verantwortlich sind. Die Identifizierung und Isolierung dieser spezifischen Transkriptionsfaktoren und das Verständnis, wie sie die MN-Expression regulieren, könnte zu ihrer therapeutischen Verwendbarkeit zum Modulieren der MN-Expression führen.

[0118] EMSA-Versuche zeigen das Vorhandensein eines MN-Genrepressors an. Verwenden des One Hybrid Systems® (Clontech (Palo Alto, CA); eines in vivo-Hefegentests zum Isolieren von Genen, die für Proteine kodieren, die an ein Target, ein cis-agierendes, regulatorisches Element oder irgendeine andere kurze, DNA bindende Sequenz binden; Fields und Song, Nature, 340: 245 (1989); Wu et al., EMBO J., 13: 4823 (1994)] und subtraktive suppressive PCR (SSH). SSH ermöglicht das Klonieren von Genen, die unter Bedingungen, von denen bekannt ist, dass sie die MN-Expression hoch- oder herunterregulieren, unterschiedlich exprimiert werden, wie beispielsweise Dichte gegenüber spärlicher Verteilung von HeLa-Zellen und Suspension gegenüber adhärennten HeLa-Zellen.

[0119] In Versuchen mit mit HPV immobilisierten, zervikalen Zellen (HCE 16/3) wurde festgestellt, dass sich die Regulierung der MN-Expression von derjenigen vollständig transformierter Karzinomzellen unterscheidet. Zum Beispiel regulieren Glucocorticoidhormone, die die Transkription von HPV aktivieren, die Expression von MN in HCE negativ, stimulieren jedoch MN in HeLa und SiHa. Zudem stimulieren Keratinocyten-Wachstumsfaktoren, die die Transkription von HPV-Onkogenen herunterregulieren, die MN-Expression in Suspensions-HCE, jedoch nicht in adhärennten Zellen.

[0120] EGF und Insulin sind an der Aktivierung der MN-Expression in sowohl immortalisierten als auch Karzinomzellen beteiligt. Alle angegebenen Erkenntnisse können bei der Suche nach MN-spezifischen Transkriptionsfaktoren und bei der Modulation der MN-Expression für therapeutische Zwecke verwendet werden.

Abgeleitete Aminosäuresequenz

[0121] Der ORF der in [Fig. 1](#) gezeigten MN-cDNA weist das Kodierungsvermögen für ein 459 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 49,7 kDa auf. Die insgesamt Aminosäurezusammensetzung des MN/CA IX-Proteins ist eher sauer und es wird vorhergesagt, dass sie einen IEP von 4,3 aufweist. Die Analyse des nativen MN/CA IX-Proteins aus CGL3-Zellen mittels zweidimensionaler Elektrophorese, gefolgt von einem Immunoblotting hat gezeigt, dass das MN/CA IX, in Übereinstimmung mit der Computervorhersage, ein saures Protein ist, das in verschiedenen isoelektrischen Formen mit IEP zwischen 4,7 und 6,3 vorhanden ist.

[0122] Wie mit einer Analyse der Aminosäuresequenzen beurteilt wurde, kann die abgeleitete Primärstruktur des MN-Proteins in vier verschiedene Bereiche unterteilt werden. Der anfängliche hydrophobe Bereich aus 37 Aminosäuren (AS) entspricht einem Signalpeptid. Das reife Protein weist einen N-Terminus oder extrazellulären Teil aus 337 Aminosäuren [AS 38–414 (SEQ ID NO: 87)], einen hydrophoben Transmembranabschnitt aus 20 Aminosäuren [AS 415–434 (SEQ ID NO: 52)] und einen C-terminalen Bereich aus 25 Aminosäuren [AS 435–459 (SEQ ID NO: 53)] auf.

[0123] Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei verschiedenen Domänen: (1) einer proteoglycan-ähnlichen Domäne [AS 53–111 (SEQ ID NO: 50)]; und (2) einer CA-Domäne, die in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert ist [AS 135–391 (SEQ ID NO: 51)]. [Die Nummern der Aminosäuren sind an diejenigen der [Fig. 1](#) angepasst].

[0124] Eine detailliertere Kenntnis der Primärstruktur des MN-Proteins offenbarte das Vorhandensein mehrerer Consensus-Sequenzen. Eine potentielle N-Glykosylierungsstelle wurde an der Position 346 der [Fig. 1](#) gefunden. Dieses Merkmal stimmt, zusammen mit einem vorhergesagten Membran umspannenden Bereich, mit den Ergebnissen überein, in denen gezeigt wurde, dass MN ein N-glycosyliertes Protein ist, das in der Plasmamembran angeordnet ist. Es wurde auch festgestellt, dass die aus der cDNA abgeleitete MN-Proteinsequenz sieben S/TPXX-Sequenzelemente [SEQ ID NOS: 25 UND 26] enthält (eines der beiden liegt in dem Signalpeptid), die von Suzuki, J. Mol. Biol., 207: 61–84 (1989) als Motive definiert sind, die häufig in den regulatorischen Proteinen gefunden werden. Es bestehen jedoch nur zwei von diesen aus der vorgeschlagenen Consensus-Aminosäuren.

[0125] Versuche haben gezeigt, dass das MN-Protein an Zink-Kationen binden kann, wie mit Hilfe von Affinitätschromatographie unter Verwenden von Zn-geladener, chelatbildender Sepharose gezeigt ist. Es wurde festgestellt, dass das aus HeLa-Zellen mit Hilfe des MAK M75 immunpräzipitierte MN-Protein eine schwache katalytische Aktivität von CA besitzt. Die CA-ähnliche Domäne von MN weist eine strukturelle Disposition auf, um als Bindungsstelle für kleine lösliche Domänen zu dienen. Das MN-Protein könnte daher eine bestimmte Art und Weise der Signalübertragung vermitteln.

[0126] Unter Verwenden der DNA-Celluloseaffinitätschromatographie wurde gezeigt, dass das MN-Protein aus den mit LCMV infizierten HeLa-Zellen an immobilisierte, doppelsträngige Lachssperma-DNA bindet. Die Bindungsaktivität erforderte sowohl die Anwesenheit von Zink-Kationen als auch die Abwesenheit eines Reduktionsmittels in dem Bindungspuffer.

CA-Domäne, die für die Anhaftungsunabhängigkeit jedoch für die erhöhte Proliferation transfizierter NIH 3T3-Fibroblasten erforderlich ist

[0127] In transfizierten NIH3T3-Fibroblasten induziert das MN-Protein eine morphologische Transformation, eine erhöhte Proliferation und eine Anhaftungsunabhängigkeit. Es wurden die Folgen der konstitutiven Expression von zwei MN-trunkierten Varianten in NIH3T3-Zellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass der proteoglycan-ähnliche Bereich für die morphologische Änderung transfizierter Zellen ausreicht und die wachstumsfördernde Aktivität zeigt, die vermutlich mit der Störung einer Kontaktinhibierung verbunden ist.

[0128] Die CA-Domäne ist für die Induktion einer Anhaftungsunabhängigkeit wesentlich, wohingegen der TM-Anker und der IC-Schwanz für die biologische Wirkung unwichtig sind. Das MN-Protein ist auch in der Lage, ein Kräuseln der Plasmamembran in den transfizierten Zellen zu bewirken und scheint an deren Verknüpfung

mit dem festen Träger beteiligt zu sein. Die Daten zeigen die Beteiligung von MN an der Regulierung der Zellproliferation, -adhäsion und interzellulärer Kommunikation.

Sequenzähnlichkeiten

[0129] Eine Computeranalyse der MN-cDNA-Sequenz wurde unter Verwenden von DNASIS und PROSIS (Software-Pakete von Pharmacia) durchgeführt. GenBank, EMBL, Protein Identification Resource und SWISS-PROT-Datenbanken wurde auf alle möglichen Sequenzähnlichkeiten durchsucht. Daneben wurde eine Suche nach Proteinen, die Sequenzähnlichkeiten mit MN gemeinsam haben, in der MIPS-Datenbank mit dem FastA-Programm [Pearson und Lipman, PNAS (USA), 85: 2444 (1988)] durchgeführt.

[0130] Die proteoglycan-ähnliche Domäne [AS 53–111 (SEQ ID NO: 50)], die zwischen dem Signalpeptid und der CA-Domäne liegt, zeigt eine signifikante Homologie (38% Identität und 44% Positivität) mit einer Keratan-sulfat-Verknüpfungsdomäne eines humanen, großen, aggregierenden Proteoglycanaggregats [Doege et al., J. Biol. Chem., 266: 894–902 (1991)].

[0131] Die CA-Domäne [AS 135–391 (SEQ D NO: 51)] ist über 265 AS verteilt und zeigt 38,9% Aminosäureidentität mit dem humanen CA VI-Isoenzym [Aldred et al., Biochemistry, 30: 569–575 (1991)]. Die Homologie zwischen MN/CA IX und anderen Isoenzymen ist wie folgt: 35,2% mit CA II in einer 261 AS umfassenden Überlappung [Montgomery et al., Nucl. Acids Res., 15: 4687 (1987)], 31,8% mit CA I in einer 261 AS umfassenden Überlappung [Barlow et al., Nucl. Acids Res., 15: 2386 (1987)], 31,6% mit CA IV in einer 266 AS umfassenden Überlappung [Okuyama et al., PNAS (USA) 89: 1315–1319 (1992)] und 30,5% mit CA III in einer 259AS umfassenden Überlappung [Lloyd et al., Genes Dev., 1: 594–602 (1987)].

[0132] Neben der CA-Domäne hat MN/CA IX sowohl N-terminale als auch C-terminale Extensionen erlangt, die nicht mit anderen CA-Isoenzymen verwandt sind. Die Aminosäuresequenz des C-terminalen Teils, der aus dem Transmembran-Anker und dem intrazytoplasmatischen Schwanz besteht, zeigt keine signifikante Homologie mit irgendeiner bekannten Proteinsequenz.

[0133] Es wurde klar festgestellt, dass das MN-Gen eine neue Sequenz besitzt, die aus dem humanen Genom stammt. Die insgesamt Sequenzhomologie zwischen der cDNA-Sequenz von MN und den cDNA-Sequenzen, die für verschiedene CA-Isoenzyme kodieren, liegt innerhalb eines Homologiebereichs von 48–50%, das von Fachleuten als niedrig eingestuft wird. Die MN-cDNA-Sequenz ist daher nicht eng mit irgendeiner CA-cDNA-Sequenz verwandt.

[0134] Nur sehr eng miteinander verwandte nt-Sequenzen mit einer Homologie von wenigstens 80–90% würden miteinander unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Ein Sequenzvergleich der in [Fig. 1](#) gezeigten MN-cDNA-Sequenz und einer entsprechenden cDNA der humanen Carboanhydratase II (CA II) zeigte, dass es keine Ausdehnungen („stretches“) der Identität zwischen den beiden Sequenzen gibt, die lang genug wären, ein Hybridisieren eines Abschnitts der CA II-cDNA-Sequenz mit 25 oder mehr Nukleotiden unter stringenten Hybridisierungsbedingungen mit der MN-cDNA oder umgekehrt zuzulassen.

[0135] Eine Suche nach nt-Sequenzen, die mit dem MN-Gen in der EMBL-Datenbank verwandt sind, zeigten keine spezifische Homologie, außer 6 vollständige und 2 partielle Alu-artige Wiederholungen mit einer Homologie zu Alu-Sequenzen, die zwischen 69,8% und 91% liegt [Jurka und Milosavljevic, J. Mol. Evol., 32: 105–121 (1991)]. Es wird auch gezeigt, dass eine 222 bp große Sequenz, die in der Nähe des 5'-Endes des genomischen Bereichs liegt, eine enge Homologie mit einem Bereich der NERV-K-LTR zeigt.

[0136] Allgemein können Nukleotidsequenzen, die nicht in den Alu- oder LTR-ähnlichen Bereichen aus ungefähr 25 Basen oder mehr, weiter bevorzugt 50 Basen oder mehr, liegen, routinemäßig getestet und gescreent werden und es wird festgestellt, dass sie unter stringenten Bedingungen nur mit MN-Nukleotidsequenzen hybridisieren. Des Weiteren sind nicht alle Homologien innerhalb der Alu-ähnlichen, genomischen Sequenzen von MN so nahe an den Alu-Wiederholungen, dass sie unter stringenten Hybridisierungsbedingungen ein Hybridisierungssignal ergeben. Der Prozentsatz der Homologie zwischen den Alu-ähnlichen Bereichen von MN und standardmäßigen Alu-J-Sequenzen sind wie folgt angegeben:

Homologiebereich innerhalb der genomischen Sequenz von MN [SEQ ID NO: 5; Figur 2A bis F]	SEQ ID NOS:	% Homologie mit der gesamten Alu-J-Sequenz
921–1212	59	89,1%
2370–2631	60	78,6%
4587–4880	61	90,1%
6463–6738	62	85,4%
7651–7939	63	91,0%
9020–9317	64	69,8%
		Homologie mit einer Hälfte der Alu-J-Sequenz
8301–8405	65	88,8%
10040–10122	66	73,2%

MN-Proteine und/oder -Polypeptide

[0137] Der Begriff „MN-Proteine und/oder -Polypeptide“ (MN-Proteine/-Polypeptide ist hierin so definiert, dass er Proteine und/oder Polypeptide bezeichnet, die von einem MN-Gen oder Fragmenten davon kodiert wird. Ein beispielhaftes und bevorzugtes MN-Protein gemäß dieser Erfindung weist die in [Fig. 1](#) gezeigte, abgeleitete Aminosäuresequenz auf. Bevorzugte MN-Proteine/-Polypeptide sind solche Proteine und/oder Polypeptide, die eine wesentliche Homologie mit dem in [Fig. 1](#) gezeigten MN-Protein besitzen. Zum Beispiel sind solche im Wesentlichen homologen MN-Proteine/-Polypeptide jene, die mit den MN-spezifischen Antikörpern dieser Erfindung, bevorzugt den MAKs M75, MN12, MN9 und MN7 oder deren Äquivalenten, reagieren.

[0138] Ein „Polypeptid“ oder „Peptid“ ist eine Kette von Aminosäuren, die kovalent durch Peptidbindungen aneinander gebunden sind, und soll hierin aus 50 oder weniger Aminosäuren bestehen. Ein „Protein“ ist hierin als Polypeptid definiert, das aus mehr als 50 Aminosäuren besteht. Der Begriff Polypeptid umfasst die Begriffe Peptid und Oligopeptid.

[0139] N-Proteine zeigen verschiedene interessante Merkmale: Anordnung der Zellmembran, von der Zelldichte abhängige Expression in HeLa-Zellen, Korrelation mit dem tumorigenen Phänotyp von somatischen HeLa x-Fibroblasten-Zellhybriden und Expression in mehreren humanen Karzinomen neben anderen Geweben. Das MN-Protein kann direkt in Tumorgewebeabschnitten, jedoch nicht allgemein in dem Gegenstück normaler Gewebe gefunden werden (Ausnahmen sind infra angegeben, wie in normaler Magenschleimhaut und Gallenblasengewebe). Manchmal wird MN auch in morphologisch normal erscheinenden Bereichen von Gewebeproben, die Dysplasie und/oder bösartige Tumore zeigen, exprimiert. Insgesamt lassen diese Merkmale eine mögliche Beteiligung von MN in der Regulierung der Zellproliferation, -differenzierung und/oder -transformation vermuten.

[0140] Es kann geschätzt werden, dass ein Protein oder Polypeptid, das mit Hilfe einer neoplastischen Zelle in vivo erzeugt wurde, in seiner Sequenz gegenüber derjenigen, die mit Hilfe einer Tumorzelle in einer Zellkultur oder mit Hilfe einer transformierten Zelle erzeugt wurde, verändert werden könnte. Die MN-Proteine und/oder -Polypeptide, die verschiedene Aminosäuresequenzen, einschließlich und ohne Einschränkung Aminosäuresubstitutionen, -extensionen, -deletionen, -trunkationen und Kombinationen daraus aufweisen, sind daher im Umfang dieser Erfindung enthalten. Es kann auch geschätzt werden, dass eine Proteinverlängerung in Körperflüssigkeiten degenerativen Prozessen, wie beispielsweise proteolytischen Prozessen unterzogen wird; somit können MN-Proteine, die wesentlich trunziert sind und MN-Polypeptide in Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Seren, gefunden werden. Der Begriff „MN-Antigen“ wird hierin verwendet, um MN-Proteine und/oder -Polypeptide einzuschließen.

[0141] Ferner wird geschätzt, dass die Aminosäuresequenz der MN-Proteine und -Polypeptide mit Hilfe genetischer Techniken modifiziert werden kann. Es können eine oder mehrere Aminosäuren deletiert oder substituiert sein. Solche Aminosäureänderungen müssen keine messbare Änderung der biologischen Aktivität des Proteins oder Polypeptids bewirken und führen zu Proteinen oder Polypeptiden, die innerhalb des Umfangs dieser Erfindung liegen, sowie zu MN-Muteinen.

[0142] Die MN-Proteine und -Polypeptide dieser Erfindung können gemäß dieser Erfindung auf vielerlei Wegen, zum Beispiel rekombinant, synthetisch oder auf andere Weise biologisch, das heißt durch enzymatisches und/oder chemisches Spalten längerer Proteine und Polypeptide, hergestellt werden. Ein bevorzugtes Verfahren zum Herstellen von MN-Proteinen erfolgt mit Hilfe rekombinanter Mittel. Besonders bevorzugte Verfahren

zum rekombinanten Herstellen von MN-Proteinen sind nachstehend für die GST-MN-, MN-20-19-, MN-Fc- und MN-PA-Proteine beschrieben.

Rekombinante Herstellung von MN-Proteinen und -Polypeptiden

[0143] Ein charakteristisches Verfahren zum Herstellen der in [Fig. 1](#) gezeigten MN-Proteine oder von deren Fragmenten wäre, das vollständig lange oder ein geeignetes Fragment der MN-cDNA in einen geeigneten Expressionsvektor, wie er unten beispielhaft angegeben ist, zu insertieren. Bei Zavada et al., WO 93/18152, supra, ist die Herstellung eines Fusionsproteins GEX-3X-MN (nun als GST-MN bezeichnet) unter Verwenden des partiellen cDNA-Klons (oben beschrieben) in dem Vektor pGEX-3X (Pharmacia) beschrieben. Nicht-glycosyliertes GST-MN (das MN-Fusionsprotein MN-Glutathion-S-Transfersase) aus XL1-Blue-Zellen.

[0144] Zavada et al., WO 95/34650 beschreiben die rekombinante Herstellung von sowohl einem glycosyliertem MN-Protein, das von Insektenzellen exprimiert wird, als auch eines nicht-glycosylierten MN-Proteins, das von E. coli exprimiert wird, unter Verwenden des Expressionsplasmids pEt-22b [Novagen Inc.; Madison, WI (USA)]. Zum Infizieren der Insektenzellen wurden rekombinante Baculovirus-Expressionsvektoren verwendet. Das glycosylierte MN-20-19-Protein wurde rekombinant in mit Baculovirus infizierten sf9-Zellen [Clontech; Palo Alto, CA (USA)] hergestellt. Dem MN-20-19-Protein fehlt das putative Signalpeptid (AS 1-37) der SEQ ID NO: 6 ([Fig. 1](#)), es weist ein Methionin (Met) an dem N-Terminus für die Expression und ein Leu-Glu-His-His-His-His-His [SEQ ID NO: 22], das zur Reinigung an den C-Terminus angefügt wurde, auf.

[0145] Um den Abschnitt der für MN kodierenden Sequenz für das GST-MN-Fusionsprotein in andere Expressionssysteme zu insertieren, wurde ein Primerset für eine PCR konstruiert. Die Primer wurden konstruiert, um an jedem Ende der kodierenden Sequenz Restriktionsschnittstellen, sowie in frame Start- und Stopp-Codons bereitzustellen. Die Sequenzen der Primer, die Spaltungsstellen der Restriktionsenzyme und Expressionsstellen angeben, sind unten gezeigt.

Primer Nr. 20: N-Terminus ↳ **Translationsstart**

5'GTCGCTAGCTCCATGGGTCATATGCAGAGGTTGCCCCGGATGCAG 3'

NheI NcoI NdeI ↳ MN-cDNA Nr. 1 [SEQ ID NO: 17]

Primer Nr. 19: C-Terminus

↳ **Translationsstopp**

5'GAAGATCTCTTACTCGAGCATTCTCCAAGATCCAGCCTCTAGG 3'

BglII XhoI ↳ MN-cDNA [SEQ ID NO: 18]

[0146] Die Primer mit den SEQ ID NOS: 17 und 18 wurden zum Amplifizieren der für MN kodierenden Sequenz, die in dem GEX-3X-MN-Vektor vorhanden ist, unter Verwenden standardmäßiger PCR-Techniken verwendet. Mit dem resultierenden PCR-Produkt (mit MN-20-19) bezeichnet wurde auf einem 0,5%-igen Agarose/1X TBE-Gel eine Elektrophorese durchgeführt; die 1,3 kb große Bande wurde herausgeschnitten; und die DNA unter Verwenden des Gene Clean II-Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers [Bio101; Lajolla, CA (USA)] rückgewonnen.

Identifizierung von (einem) Partner(n) des MN-Proteins

[0147] Unter Verwenden von Expressionsklonieren der entsprechenden cDNA(s) und eines MN-Fc-Fusionsproteins als Sonde wurde eine Suche nach (einem) Protein(en), das (die) mit MN wechselwirken, begonnen. Die chimäre MN-Fc-cDNA wurde durch Substitution der MN-cDNA-Sequenzen, die sowohl für den Transmembrananker als auch den intrazellulären Schwanz des MN-Proteins kodieren, mit der cDNA die für das Fc-Fragment des murinen IgG kodiert, in dem Vektor pSG5C konstruiert. Die cDNA des Fc-Fragments wurde mittels RT-PCR aus dem Maushybridom, das einen IgG2a-Antikörper erzeugt, hergestellt.

[0148] Die chimäre MN-Fc-cDNA wurde mittels transients Transfektion in COS-Zellen exprimiert. Die COS-Zellen wurden unter Verwenden von Leptofektion transfiziert. Das rekombinante MN-Fc-Protein wurde

(aufgrund des fehlenden Transmembranbereichs) in das TC-Medium der transfizierten Zellen freigesetzt, mittels Affinitätschromatographie auf einer Protein A-Sepharose gereinigt und für weitere Versuche verwendet.

[0149] Proteinextrakte aus mit mock transfizierten Zellen und die Zellen, die mit pSG5C-MN-Fc transfiziert worden waren, wurden mittels Immunoblotting unter Verwenden des M75-MAK, SwaM-Px und ECL detection® [ECL® – verbessertes chemolumineszentes System zum Nachweisen phosphorylierter Tyrosinreste; Amersham; Arlington, Hts., IL (USA)] analysiert. Die Größe des MN-Fc-Proteins, das von dem pSG5C-Vektor exprimiert wurde, entspricht dem mit Hilfe eines Computers vorhergesagten Molekulargewicht.

[0150] Das ³⁵S-markierte MN-Fc-Protein wurde in einem Zelloberflächenbindungsassay verwendet. Es wurde gefunden, dass es an verschiedene Säugerzellen, z. B. HeLa, Raji, COS, QT35, BL3 bindet. Ähnliche Ergebnisse wurden in einem Zell-Adhäsionstest unter Verwenden des MN-Fc-Proteins, das auf bakterielle Petrischalen fallen gelassen wurde, erhalten. Diese Assays offenbarten, dass der humanen Magen-Adenkarzinom-Zelllinie KATO III die Fähigkeit fehlt, mit dem MN-Fc-Protein wechselzuwirken. Diese Erkenntnis ermöglichte uns die Verwendung von KATO III-Zellen für Expressionsklonieren und Screenen der cDNA, die für das Mn bindende Protein kodiert.

[0151] Die cDNA-Expressions-Genbank in dem pBK-CMV-Vektor wurde aus dichten HeLa-Zellen erzeugt und für die Transfektion der KATO III-Zellen verwendet. Für die erste Runde des Screenens wurden KATO III-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Liganden exprimierenden Zellen an das MN-Fc-Protein binden gelassen, dann wurde Protein A mit Biotin konjugiert und schließlich durch Herunterziehen mit Streptavidin-beschichteten, magnetischen Kügelchen selektiert. Die Plasmid-DNA wurde aus den selektierten Zellen extrahiert und in E. coli transformiert. Einzelne E. coli-Kolonien wurden gepickt und Pools aus 8 bis 10 Kolonien erzeugt. Die Plasmid-DNA aus den Pools wurde isoliert und in der zweiten Runde des Screenens verwendet.

[0152] In der zweiten Runde des Screenens wurden KATO III-Zellen mit Hilfe des DEAE-Dextran-Verfahrens transfiziert. Um den Pool, der die cDNA für das MN bindende Protein enthielt, zu identifizieren, wurden ein auf der Bindung von MN-Fc an die transfizierten Zellen basierender ELISA und der Nachweis unter Verwenden von mit Peroxidase markiertem Protein A verwendet. Die Pools werden über ihre Fähigkeit, an MN-Fc zu binden, selektiert.

[0153] In der dritten Runde des Screenens werden Plasmid-DNAs, die aus einzelnen Bakterienklonen der selektierten Pools isoliert wurden, in KATO III-Zellen transfiziert. Die transfizierten Zellen werden einer Bindung mit MN-Fc und einem Nachweis mit Protein A, wie oben, unterzogen. Ein solches beispielhaftes Screening identifiziert erwartungsgemäß einen Klon, der die cDNA enthält, die für den putativen Partner des MN-Proteins kodiert. Dieser Klon würde dann sequenziert werden und das Expressionsprodukt mit Hilfe eines Zell-Adhäsionsassays als an das MN-Protein bindend bestätigt werden. (Far-Western Blotting, Co-Präzipitation usw.) Hybridome, die MAK zu dem Expressionsprodukt erzeugen und die Analyse der biologischen Eigenschaften des Proteinpartners von MN erlauben, würden dann hergestellt werden.

Herstellung von MN-spezifischen Antikörpern

[0154] Der Begriff „Antikörper“ ist hierin so definiert, dass er nicht nur vollständige Antikörper, sondern auch biologisch aktive Fragmente von Antikörpern, vorzugsweise Fragmente, die die Antigen bindenden Bereiche enthalten, einschließt. In der Definition der Antikörper sind ferner bispezifische Antikörper eingeschlossen, die für das MN-Protein und ein anderes gewebespezifisches Antigen spezifisch sind.

[0155] Zavada et al., WO 93/18152 und WO 95/34650 beschreiben ausführlich Verfahren zum Herstellen von MN-spezifischen Antikörpern und ausführliche Schritte zum Herstellen charakteristischer, MN-spezifischer Antikörper, wie den monoklonalen M75-, MN7-, MN9- und MN12-Antikörpern. Bevorzugte MN-Antigenepitope umfassen: AS 62–67 (SEQ ID NO: 19); AS 61–66, AS 79–84, AS 85–90 und AS 91–96 (SEQ ID NO: 98); AS 62–65, AS 80–83, AS 86–89 und AS 92–95 (SEQ ID NO: 99); AS 62–66, AS 80–84, AS 86–90 und AS 92–96 (SEQ ID NO: 100); AS 63–68 (SEQ ID NO: 101); AS 62–68 (SEQ ID NO: 102); AS 82–87 und AS 88–93 (SEQ ID NO: 103); AS 55–60 (SEQ ID NO: 11); AS 127–147 (SEQ ID NO: 12); AS 36–51 (SEQ ID NO: 13); AS 68–91 (SEQ ID NO: 14); AS 279–291 (SEQ ID NO: 15); und AS 435–450 (SEQ ID NO: 16). Beispiel stellt eine weitere Beschreibung bereit, die bevorzugte MN-Antigenepitope betrifft.

[0156] Bispezifische Antikörper. Bispezifische Antikörper können durch chemisches Koppeln von zwei Antikörpern mit der gewünschten Spezifität hergestellt werden. Bispezifische MAK können bevorzugt durch soma-

tische Hybridisierung von 2 Hybridomen entwickelt werden. Bispezifische MK zum Verwenden des MN-Proteins und eines anderen Antigens als Target können durch Fusionieren eines Hybridoms, das MN-spezifische MAKs erzeugt, mit einem Hybridom, das MAKs erzeugt, die für ein anderes Antigen spezifisch sind, erzeugt werden. Zum Beispiel wird eine Zelle (ein Quadrom), die durch Fusion eines Hybridoms, das einen MN-spezifischen MAK erzeugt, und eines Hybridoms, das einen Antikörper gegen eine cytotoxische Zelle erzeugt, gebildet wurde, einen Hybridantikörper mit einer Spezifität für die Vorgänger-Antikörper erzeugen. [Siehe z. B. Immunol. Rev. (1979); Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol., 41: 793 (1977); van Dijk et al., Int. J. Cancer, 43: 344–349 (1989)]. Daher kann ein Hybridom, das einen MN-spezifischen MAK erzeugt, mit einem Hybridom, das zum Beispiel einen Anti-T3-Antikörper erzeugt, fusioniert werden, um eine Zelllinie zu erhalten, die einen für MN/T3 bispezifischen Antikörper erzeugt, der cytotoxische T-Zellen zu MN exprimierenden Tumorzellen als Target verwenden kann.

[0157] Für eine therapeutische und/oder bildgebende Verwendung kann bevorzugt sein, dass die Antikörper vorzugsweise biologisch aktive Antikörper-Fragmente, vorzugsweise gentechnisch veränderte Fragmente, besonders bevorzugt gentechnisch veränderte Fragmente der V_H - und/oder V_L -Bereiche, und noch weiter bevorzugt solche, die die hypervariablen Bereiche derselben umfassen, sind. Bei manchen therapeutischen Verwendungen wären jedoch bispezifische Antikörper, die das MN-Protein und cytotoxische Zellen als Target verwenden, bevorzugt.

Epitope

[0158] Die Affinität eines MAK gegenüber einem Epitop enthaltenden Peptiden hängt von dem Zusammenhang, d. h. ob das Peptid eine kurze Sequenz ist (4–6 SD) oder ob ein solches kurzes Peptid auf einer oder beiden Seiten von längeren AS-Sequenzen flankiert ist oder ob die Peptide während des Testens auf ein Epitop in Lösung oder auf einer Oberfläche immobilisiert sind. Fachleute würden daher erwarten, dass die hierin für die MN-spezifischen MAK beschriebenen, charakteristischen Epitope zusammen mit der Verwendung solcher MAK variieren würden.

[0159] Der Begriff „entspricht einem Epitop eines MN-Proteins/-Polypeptids“ wird so verstanden werden, dass er die praktische Möglichkeit einschließt, dass die Variationen von Aminosäuresequenzen eines natürlich vorkommenden Proteins oder Polypeptids in manchen Fällen antigen sein kann und eine schützende Immunität gegen eine neoplastische Erkrankung und/oder antitumorgene Wirkungen verleihen kann. Mögliche Sequenzvariationen schließen ohne Einschränkung Aminosäuresubstitutionen, -extensionen, -deletionen, -trunkationen, -interpolationen und Kombinationen daraus ein. Solche Variationen fallen in den genannten Bereich der Erfindung, vorausgesetzt, dass das Protein oder Polypeptid, das diese enthält, immunogen ist und dass Antikörper, die gegen ein solches Polypeptid oder Protein ausgelöst werden, in ausreichendem Umfang mit natürlich vorkommenden MN-Proteinen und -Polypeptiden kreuzreagieren, um eine schützende Immunität und/oder antitumorgene Aktivität bereitzustellen, wenn es als Impfstoff verabreicht wird.

Epitop für den MAK M75

[0160] Es wird angenommen, dass das M75-Epitop in wenigstens zwei Kopien innerhalb der 6×-Tandem-Wiederholung aus 6 Aminosäuren [AS 61–96 (SEQ ID NO: 97)] in der Proteoglycan-Domäne des MN-Proteins vorhanden sind. Beispielhafte Peptide, die dieses Epitop, das von dem Zusammenhang abhängt, darstellen, können die folgenden Peptide aus dieser Tandem-Wiederholung einschließen: EEDLPS (SEQ ID NO: 10; AS 62–67); GEEDLP (SEQ ID NO: 98; AS 61–66; AS 79–84; AS 85–90; AS 91–96); EEDL (SEQ ID NO: 99; AS 62–65; AS 80–83; AS 86–89; AS 92–95); EEDLP (SEQ ID NO: 100; AS 62–66; AS 80–84; AS 86–90; AS 92–96); EDLPSE (SEQ ID NO: 101; AS 63–68); EEDLPSE (SEQ ID NO: 102; AS 62–68); und DLPGEE (SEQ ID NO: 103; AS 82–87; AS 88–93).

[0161] Es wurden drei synthetische Peptide aus der abgeleiteten AS-Sequenz für die EC-Domäne des in [Fig. 1](#) gezeigten MN-Proteins hergestellt. Solche synthetischen Peptide sind durch AS 51–72 (SEQ ID NO: 104), AS 61–85 (SEQ ID NO: 105) und AS 75–98 (SEQ ID NO: 106) wiedergegeben. Jedes dieser synthetischen Peptide enthält das Motiv EEDLP (SEQ ID NO: 100) und es wurde gezeigt, dass sie mit dem MAK M75 reagieren.

Andere Epitope

[0162] MAK MN9. Der monoklonale Antikörper MN9 (MAK MN9) reagiert mit dem gleichen Epitop wie der MAK M75, wie oben beschrieben ist. Wie der MAK M75 erkennt der MAK MN9 sowohl das GST-MN-Fusions-

protein als auch das native MN-Protein gleich gut.

[0163] Die MAKs, die dem MAK MN9 entsprechen, können durch Screenen einer Reihe von MAKs gegen ein MN-Protein/-Polypeptid, wie beispielsweise das GST-MN-Fusionsprotein, gegen die Peptide, die das Epitop für die MAKs M75 und MN9 darstellen, reproduzierbar hergestellt werden. Alternativ dazu könnte das Novatope-System [Novagen] oder ein Wettbewerb mit dem hinterlegten MAK M75 zum Selektieren von MAKs, die mit den MAKs M75 und MN9 vergleichbar sind, verwendet werden.

[0164] MAK MN12. Der monoklonale Antikörper MN12 (MAK MN 12) wird mit dem murinen lymphozytischen Hybridom MN 12.2.2, das unter der ATCC HB 11647 hinterlegt worden war, hergestellt. Antikörper, die dem MAK MN12 entsprechen, können ebenso, analog zu dem Verfahren, das für den MAK MN9 angegeben ist, hergestellt werden, indem eine Reihe von Antikörpern, die gegen ein MN-Protein/-Polypeptid, gegen das Peptid, das das Epitop für den MAK MN 12 wiedergibt, gescreent werden. Das Peptid entspricht der AS 55 bis AS 60 der [Fig. 1](#) [SEQ ID NO: 11]. Ebenso könnte das Novatope-System dazu verwendet werden, Antikörper zu finden, die für dieses Epitop spezifisch sind.

[0165] MAK MN7. Der monoklonale Antikörper MN7 (MAK MN7) wurde aus MAK ausgewählt, die so, wie oben beschrieben ist, gegen nicht-glycosyliertes GST-MN erzeugt wurden. Er erkennt das Epitop, das durch die Aminosäuresequenz von der AS 127 bis zur AS 147 [SEQ ID NO: 12] des MN-Proteins aus [Fig. 1](#) wiedergegeben ist. Analog zu den oben für die MAKs MN9 und MN12 Verfahren können MAKs, die dem MAK MN7 entsprechen, durch Selektieren von MAKs, die gegen ein MN-Protein/-Polypeptid hergestellt wurden, der mit dem Peptid mit der SEQ ID NO: 12 reagiert, oder durch die angegebenen alternativen Möglichkeiten hergestellt werden.

MN-spezifische Intrakörper – Gezieltes Abtöten von Tumoren mit Hilfe der intrazellulären Expression MN-spezifischer Antikörper zum Blockieren des Transports des MN-Proteins an die Zelloberfläche

[0166] Das Gen, das für die Antikörper kodiert, kann so manipuliert werden, dass die Antigen bindende Domäne intrazellulär exprimiert werden kann. Solche „Intrakörper“, die gegen den Lumen des endoplasmatischen Retikulums gerichtet sind, stellen einen einfachen und wirksamen Mechanismus zum Inhibieren des Transports von Plasmamembranproteinen an die Zelloberfläche bereit. [Marasco, W. A., „Review – Intrabodies: turning the humoral immune system outside in or intracellular immunization“, *Gene Therapy*, 4: 11–15 (1997); Chen et al., "Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy", *Hum. Gene Ther.*, 5(5): 595–601 (1994); Mhashilkar et al., *EMBO J.*, 14: 1542–1551 (1995); Mhashilkar et al., *J. Virol.*, 71: 6486–6494 (1997); Marasca (Hersg.), *Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications*, (Springer Life Sciences 1998; ISBN 3-540-64151-3) (fasst präklinische Studien aus Laboren weltweit zusammen, die Intrakörper verwendet haben); Zanetti und Capra (Hersg.), "Intrabodies: From Antibody Genes to Intracellular Communication", *The Antibodies: Volumen 4*, [Harwood Academic Publishers; ISBN 90-5702-559-0 (Dez. 1997)]; Jones und Marasco, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31 (1–2): 153–170 (1998); Pumphrey und Marasco, *Biodrug*, 9(3): 179–185 (1998); Dachs et al., *Oncology Res.*, 9(6–7): 313–325; Rondon und Marasco, *Ann. Rev Microbiol.*, 51: 257–283 (1997); Marasco, W. A., *Immunotechnology*, 1(1): 1–19 (1995); und Richardson und Marasco, *Trends in Biotechnology*, 13(8): 306–310 (1995)].

[0167] MN-spezifische Intrakörper können die Reifung und den Transport eines MN-Proteins an die Zelloberfläche verhindern und somit dem Funktionieren des MN-Proteins in einem onkogenen Prozess vorbeugen. Antikörper, die gegen die EC-, TM- oder IC-Domänen von MN gerichtet sind, können in dieser Hinsicht nützlich sein. Es wird angenommen, dass das MN-Protein durch Übertragen von Signalen von der EC-Domäne zu dem IC-Schwanz und dann Assoziieren mit anderen intrazellulären Proteinen im Innern der Zellen eine Signalübertragung vermittelt. MN-spezifische Intrakörper könnten diese Assoziierung unterbrechen und die MN-Funktion stören.

[0168] Das Inaktivieren der Funktion des MN-Proteins könnte zu einer Umwandlung von Tumorzellen in einen nicht-transformierten Phänotyp führen [Marasco et al., (1997), supra]. Die antisense-Expression der MN-cDNA in Zervixkarzinomzellen hat, wie hierin veranschaulicht ist, gezeigt dass der Verlust des MN-Proteins zu einer Unterdrückung des Wachstums transfizierter Zellen geführt hat. In ähnlicher Weise wird erwartet, dass die Hemmung des MN-Proteintransports zu der Zelloberfläche ähnliche Effekte haben würde. Das Klonieren und die intrazelluläre Expression des variablen Bereichs des MAK M75 sollen untersucht werden, um diese Erwartung zu bestätigen.

[0169] Vorzugsweise sind die intrazellulär erzeugten MN-spezifischen Antikörper Einzelketten-Antikörper,

insbesondere Fragmente des Einzelketten-variablen Bereichs oder sFv, in denen die schwere- und leichte-Kette-variablen Domänen als einzelnes Polypeptid synthetisiert und durch ein flexibles Linkerpeptid, bevorzugt (Gly₄-Ser)₃ [SEQ ID NO: 116] voneinander getrennt.

[0170] MN-spezifische, intrazellulär erzeugte Antikörper können therapeutisch zum Behandeln einer preneoplastischen/neoplastischen Erkrankung verwendet werden, indem die preneoplastischen/neoplastischen Zellen, die das MN-Protein abnormal exprimieren, mit einem Vektor, der eine Nukleinsäure umfasst, die für Fragmente des variablen Bereichs eines MN-spezifischen Antikörpers kodiert und der funktionsfähig mit einer Expressionssteuersequenz verknüpft ist, transfiziert wird. Eine solche Expressionssteuersequenz würde vorzugsweise den MN-Genpromotor umfassen.

Über Antikörper vermittelter Gentransfer unter Verwendung MN-spezifischer Antikörper oder Peptide gegen MN-exprimierende Tumorzellen als Targets

[0171] Ein MN-spezifischer Antikörper oder ein Peptid, das kovalent mit Polylysin, einem Polykation, das in der Lage ist, DNA zu verdichten und deren negative Ladungen zu neutralisieren, verknüpft ist, würde erwartungsgemäß eine biologisch aktive DNA in effizienter Weise in eine MN-exprimierende Tumorzelle übertragen. Wenn die gepackte DNA das HSVtk-Gen unter der Steuerung des MN-Promotors enthält, würde das System eine doppelte Spezifität für die Erkennung und die Expression in nur MN-exprimierenden Tumorzellen aufweisen. Die gepackte DNA könnte auch für Cytokine, um eine CTL-Aktivität zu induzieren, oder für andere biologisch aktive Moleküle kodieren. Der MAK M75 (oder zum Beispiel als ein Einzelketten-Antikörper oder als dessen variabler Bereich) ist ein Beispiel für einen solchen MN-spezifischen Antikörper.

[0172] Die folgenden Beispiele dienen lediglich zum Zwecke der Veranschaulichung und sollen die Erfindung in keiner Weise einschränken.

Beispiel 1

Transiente Transformation von Säugerzellen mit dem MN-Protein

[0173] Dieses Beispiel (1) untersucht die biologischen Folgen des Transfizierens humaner oder muriner Zellen mit MN-cDNA, die in Expressionsvektoren inseriert wurde, hauptsächlich hinsichtlich des Gesichtspunktes der Beteiligung des MN-Proteins an der Onkogenese; (2) bestimmt, ob das MN-Protein eine Carboanhydratase-Aktivität ausübt und ob eine solche Aktivität für die morphologische Transformation der Zellen relevant ist; und (3) testet, ob das MN-Protein ein Zell-Adhäsionsmolekül (CAM) ist.

Zusammenfassung

[0174] Verfahren: Die MN-cDNA wurde in 3 Expressionsvektoren inseriert und wurde zum Transfizieren humaner oder muriner Zellen verwendet. Das MN-Protein wurde mittels Western Blotting, Radioimmunoassay oder Immunoperoxidase-Färbung nachgewiesen; in allen Tests wurde der MN-spezifische, monoklonale Antikörper M75 (MAK M75) verwendet. Die Carboanhydrataseaktivität wurde durch die Ansäuerungsgeschwindigkeit eines Carbonatpuffers in CO₂-Atmosphäre bestimmt.

[0175] Ergebnisse: (1) Die mit der MN-cDNA transfizierten Zellen (humane CGL1- und murine NIH3T3-Zellen) zeigten eine morphologische Transformation, kehrten jedoch nach 4 bis 5 Wochen zu dem normalen Phänotyp zurück. (2) Diese Umwandlung war nicht die Folge des Verlusts, Silencing oder einer Mutation des MN-Inserts. (3) Das MN-Protein besitzt die Enzymaktivität der Carboanhydratase, die mit Acetazolamid inhibiert werden kann; die Inhibierung der Aktivität des Carboanhydratase-Enzyms beeinflusste jedoch nicht die Transformation. (4) Das MN-Protein ist ein Adhäsionsprotein, das an den Zell-zu-Zell-Kontakten beteiligt ist.

Hintergrund

[0176] Dieses Beispiel betrifft die Transformation von Säugerzellen mit Hilfe einer MN-cDNA, die in die von Retroviren stammenden Expressionsvektoren inseriert wurde. Solche Vektoren sind für einen effizienten und stabilen Einbau in zelluläre DNA und für eine kontinuierliche Expression des MN-Proteins geeignet. Zellen, die mit diesen Konstrukten transfiziert wurden, zeigten eine morphologische Transformation. Nach einer bestimmten Zeit, kehrten sie jedoch zu dem normalen Phänotyp zurück.

[0177] Sulfonamide, einschließlich Acetazolamid, sind sehr starke Inhibitoren der bekannten Carboanhydratase.

tasen [Maren und Ellison, *Mol. Pharmacol.*, 3: 503–508 (1967)]. Acetazolamid wurde getestet, um zu bestimmen, ob es auch die MN-Carboanhydratase inhibierte und, wenn dies der Fall war, ob die Inhibierung des Enzyms die Zelltransformation beeinflusste.

[0178] Es gibt Gründe dafür zu glauben dass das MN-Protein an direkten Zell-zu-Zell-Wechselwirkungen beteiligt sein könnte: A) vorhergehende Beobachtungen zeigten eine funktionelle Ähnlichkeit des MN-Proteins mit Glycoproteinen an der Oberfläche umhüllter Viren, die eine Adsorption der Viren an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche vermitteln, und MN war an der Bildung phänotypisch vermischter Virionen des vesikulären Stomatitis-Virus beteiligt. B) Die Induzierbarkeit der Expression des MN-Proteins durch Wachsenlassen der HeLa-Zellen in dicht gepackten Monoschichten lässt vermuten, dass es an direkten Wechselwirkungen zwischen Zellen beteiligt ist. C) Schließlich besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem MN-Protein und dem Rezeptor Tyrosinphosphatase β , der ebenso Proteoglycan- und Carboanhydratase-Domänen aufweist; diese Domänen vermitteln direkte Kontakte zwischen Zellen des sich entwickelnden Nervensystems [Peleset al., *Cell*, 82: 251–260 (1995)]. Das MN-Protein wurde daher getestet, um zu sehen, ob es an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden wurde; das Ergebnis, dass dies der Fall ist, war eindeutig positiv.

Materialien und Methoden

Zelllinien

[0179] Die Zellen, die in diesem Beispiel verwendet wurden, waren: CGL1 und CGL3 – beziehungsweise nicht-tumorgene und tumorgene HeLa x-Fibroblastenhybride [Stanbridge et al., *Somat. Cell Genet.*, 7: 699–712 (1981)], die Mauszelllinie NIH3T3, HeLa-Zellen und Affen-Vero-Zellen. Die NIH3T3-Zellen wurden mit sehr geringer Dichte ausgesät, um Kolonien zu erhalten, die von einer einzelnen Zelle aus starteten. Die am meisten normal scheinende Kolonie, die als Subklon 2 bezeichnet wurde, wurde für eine Verwendung in den Versuchen, die in diesem Beispiel berichtet werden, gepickt.

Expressionsvektoren

[0180] Die vollständig lange MN-cDNA wurde aus einem pBluescript-Subklon erhalten [Pastorek et al., *Oncogene*, 9: 2877–2888 (1994)]. Um die 5' und 3' nicht-kodierenden Sequenzen zu entfernen, die eine spätere Genexpression verringern könnten, wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Der 5'-Primer TAGACAGATCTACGATGGCTCCCCTGTGCCCCAG [SEQ ID NO: 88] umfasst eine Translationsstartstelle und eine BglII-Klonierungsstelle und der 3'-Primer ATTCTCTAGACAGTTACCGGCTCCCCTCAGAT [SEQ ID NO: 89] umfasst einen Stopp-Codon und eine XbaI-Klonierungsstelle. In der Reaktion wurde die vollständig lange MN-cDNA als Templat und Pfu-DNA-Polymerase [Stratagene; LaJolla, CA (USA)] verwendet.

[0181] Das PCR-Produkt wurde sequenziert und es wurde festgestellt, dass es mit dem Templat identisch ist; es trug keine Mutationen. Das PCR-Produkt, das nur die für MN kodierende Sequenz trägt, wurde in drei Vektoren inseriert: 1. Das pMAMneo-[Clontech; Palo Alto, CA (USA)]Plasmid, das eine durch den langen, terminalen Wiederholungs-(LTR)Promotor MMTV gesteuerte, durch Dexamethason induzierbare Expression ermöglicht und ein neo-Gen für die Selektion von Transformanten in Medien, die mit Geneticin-(G418-)Antibiotika ergänzt worden sind, enthält. 2. Der retrovirale Expressionsvektor pGD [Daley et al., *Science*, 247: 824–829 (1990); der freundlicherweise von Prof. David Baltimore New York-Cambridge zur Verfügung gestellt wurde], der den MLV-LTR-Promotor und das neo-Gen für eine G418-Antibiotika-Selektion enthält. 3. Vacciniavirus-Expressionsvektor pSC11 [Chakrabarti et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 3403–3409 (1985)]. Die Transfektion wurde durch ein Calciumphosphat-Präzipitat gemäß Sambrook et al. (Hrsg.), *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) durchgeführt.

[0182] Der Vacciniavirusstamm Praha-Klon 13 wurde als Vorgänger-Virus verwendet [Kutinova et al., *Vaccine*, 13: 487–493 (1995)]. Die Vacciniavirus-Rekombinante wurde mit einem Standardverfahren hergestellt [Perkus et al., *Virology*, 152: 285–297 (1986)]. Die rekombinanten Viren wurden selektiert und zweimal in Thyridinkonase-losen RAT2-Zellen [Topp, W. C., *Virology*, 113: 408–411 (1981)] in Gegenwart von 5'-Bromdesoxyuridin (100 $\mu\text{g/ml}$) plaque-gereinigt. Blaue Plaques wurden durch Überziehen mit Agar, der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) (200 $\mu\text{g/ml}$) identifiziert.

CA-Assay

[0183] Die Carboanhydratase-Aktivität wurde mit einem Mikro-Verfahren gemessen [Brion et al., *Anal. Biochem.*, 175: 289–297 (1988)]. Im Prinzip wird die Geschwindigkeit der Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ über die

Zeit, die für die Ansäuerung des Carbonatpuffers erforderlich ist, gemessen und mit Phenolrot als pH-Indikator nachgewiesen. Diese Reaktion läuft sogar in Abwesenheit des Enzyms ab, wobei t_0 = Kontrollzeit (diese wurde auf 60 Sekunden eingestellt). Die Carboanhydratase verringert die Zeit der Ansäuerung auf t ; eine Einheit der Enzymaktivität verringert die Zeit auf die Hälfte der Kontrollzeit: $t/t_0 = 1/2$.

[0184] Für den Versuch wurde das MN-Protein mit dem MAN M75 aus dem RIPA-Puffer-(1% Triton X-100, 0,1% Desoxycholat, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 200 Trysin-inhibierenden Einheiten/ml Trasylol in PBS, pH 7,2) Extrakt von Vero-Zellen, die mit dem Vaccinia-MN-Konstrukt infiziert worden waren, nachdem die Zellen eine zytopathische Wirkung entwickelten, oder mit „leerem“ Vaccinia als Kontrolle immunopräzipitiert. Der MN + Antikörper-Komplex wurde anschließend an Protein A – Staphylococcus aureus-Zellen adsorbiert [Kessler, S. W., J. Immunol., 115: 1617–1624 (1975)] und 2× mit PBS und 2× mit 1 mM Carbonatpuffer, pH 8,0 gespült. Das Präzipitat wurde in dem gleichen Puffer resuspendiert und zu der Reaktionsmischung gegeben. Acetazolamid (Sigma) wurde auf die Inhibierung der Carboanhydratase getestet [Maren und Ellison, supra]. In Extrakten infizierter Zellen, die für die Immunpräzipitation verwendet wurden, wurde die Konzentration aller Proteine mit dem Lowry-Verfahren [Lowry et al., J. Biol. Chem., 193: 265–275 (1951)] und diejenige des MN-Proteins durch einen Kompetitions-Radioimmunoassay, der bei Zavada et al., Int. J. Cancer, 54: 268–274 (1993) beschrieben wurde, bestimmt.

Western Blots

[0185] Western Blotting und die Entwicklung der Blots unter Verwenden von ^{125}I -markierten M75 und Autoradiographie wurden so wie vorher durchgeführt [Pastorekova et al., Virology, 187: 620–626 (1992); und Zavada (1993), supra].

Adhäsionsassay

[0186] Für den Adhäsionsassay [Hoffman S., „Assays of cell adhesion“, in: Cell-cell Interactions, (Stevenson et al., Hrsg.) S. 1–30 (IRL Press at Oxford University Press; Oxford, N.Y., Tokio; 1992) wurden 25 µl Aliquots des MN-Proteins (affinitätsgereinigtes pGEX-3X-MN) [Zavada et al., (1993), supra] oder der Kontrollproteine auf bakteriologische Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm gespottet und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur binden gelassen. Dies erzielte zirkuläre, mit Proteinen beschichtete Bereiche mit einem Durchmesser von 4 bis 5 mm. Das MN-Protein wurde in 50 mM Carbonatpuffer, pH 9,2 auf 10 µg/ml verdünnt. Stellen mit adsorbierten Kontrollproteinen wurden auf ähnliche Weise hergestellt. Diese schlossen die Collagene Typ I und IV, Fibronectin, Laminin und Gelatine (Produkte von Sigma) ein, die entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verdünnt und adsorbiert worden waren; FKS und BSA waren ebenso eingeschlossen. Nach Ansaugen der Tropfen wurden die Schalen 2× mit PBS gespült und 1 Stunde lang mit MEM, das mit 5% FKS ergänzt worden war, gesättigt. Die Platten wurden mit 5×10^5 Zellen in 5 ml DMEM + 5% FKS angesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit PBS gespült und die angehafteten Zellen wurden mit Formaldehyd fixiert, mit Methanol nachfixiert und mit Giemsa angefärbt.

Ergebnisse

1. Transformation und Umkehr von CGL1-Zellen, die mit MN-cDNA transfiziert worden waren

[0187] Da die Expression des MN-Proteins, das mit der Tumorigenität der HeLa x-Fibroblastenhybride korrelierte [Zavada et al., (1993), supra] wurden die nicht-tumorigenen CGL1-Hybridzellen zuerst getestet. Diese Zellen, die nach der Selektion mit Geneticin mit dem pMAM.MN-Konstrukt transfiziert worden waren, bildeten Kolonien mit verschiedenen Transformationsgraden; einige dieser schienen normal. Während der Kontakt normaler CGL1-Zellen inhibiert ist, wodurch die in einer parallelen Orientierung anwachsen, bildeten die transformierten Zellen sehr dichte Kolonien, was den Verlust der Kontakthinibierung zeigt. Solche Kolonien wuchsen langsamer als die ursprünglichen CGL1.

[0188] Nach dem Subklonieren segregierten die aus transformierten Kolonien isolierten Zellen in Revertanten. Die Umkehr war ein gradueller, schrittweiser Prozess; es gab Kolonien mit verschiedenen Graden der Umkehr. Nach 2 Passagierungen werden alle Zellpopulationen morphologisch nicht von normalen CGL1 unterscheidbar. Dies ergab sich aus der Umkehr mancher Zellen und aus dem selektiven Vorteil der Revertanten, die schneller wuchsen als die transformierten Zellen. Trotz wiederholter Versuche wurde kein einziger stabil transformierter Zellklon erhalten. In CGL1-Zellen, die mit einem „leeren“ pMAM-Kontrollplasmid transfiziert worden waren, wurden keine transformierten Kolonien gefunden.

[0189] Das Wachstum der CGL1 + pMAM.MN-Revertanten in Medien, die für 7 Tage mit 5 µg/ml Dexamethason ergänzt worden waren, verstärkte die Erzeugung des MN-Proteins, die Morphologie der Zellen kehrte jedoch nicht zu der transformierten zurück.

2. Rückgewinn von transformierendem MN aus den Revertanten

[0190] Die Umkehr mit MN transformierter Zellen zu dem normalen Phänotyp könnte wenigstens 4 Ursachen haben: A) Verlust des MN-Inserts; B) Silencing des MN-Inserts durch z. B. Methylierung; C) Mutation des MN-Inserts; D) Aktivierung des Suppressorgens, das für ein Produkt kodiert, das die transformierende Aktivität des MN-Proteins neutralisiert; E) Verlust eines MN bindenden Proteins. Um aus diesen Alternativen zu entscheiden, wurde der folgende Versuch konstruiert.

[0191] Die MN-cDNA wurde in pGD, einen Vektor, der aus dem murinen Leukämievirus – MLV stammte, inseriert. Dadurch wurde ein defekter Virus erzeugt, der das MN-Gen und den selektiven Marker neo anstelle der Gene, die für virale, strukturelle Proteine kodieren, enthielt. Mit diesem Konstrukt wurden murine NIH3T3-Zellen transfiziert. In Medien, die mit Geneticin ergänzt worden waren, bildeten die Zellen Kolonien mit Phänotypen, die von stark transformierten bis hin zu augenscheinlich normalen variierten. Alle transformierten Kolonien und ungefähr 50% der normalen Kolonien exprimierten das MN-Protein. Im Gegensatz zu normalen NIH3T3-Zellen waren die Transformanten auch in der Lage, Kolonien in weichem Agar zu bilden, was den Verlust der Anhaftungsabhängigkeit widerspiegelt, die für die Zelltransformation charakteristisch ist. Während des Passagierens kehrten die Zellen, die aus den transformierten Kolonien isoliert worden waren, zu der normalen Morphologie zurückkehrten und sie gleichzeitig das Vermögen zum Bilden von Kolonien in weichem Agar verloren, dabei jedoch noch das MN-Protein exprimieren. Diese dauerhafte Anwesenheit des MN-Proteins in Revertanten schloss die Alternativen A) und B) supra, das heißt den Verlust oder das Silencing des MN-Gens als Ursache für die Umkehr aus.

[0192] Um aus den anderen 3 Alternativen zu entscheiden, wurden die Revertanten mit lebenden, replikationskompetenten MLV superinfiziert. Dieser Virus wächst ohne irgendwelche morphologischen Erscheinungsformen in NIH3T3-Zellen und es fungiert als „Helfer“ für das pGD.MN-Konstrukt. Die virale Nachkommenschaft aus den mit MLV infizierten Revertanten stellt einen künstlichen Viruskomplex [pGD.MN + MLV] dar. Dieser besteht aus 2 Arten von Virionen: MLV-Partikeln des Standardtyps und Virionen, die das pGD.MN-Genom enthalten, das in strukturellen Proteinen, die von dem „Helfer“-Virus bereitgestellt wurden, umhüllt war. Der Viruskomplex war für frische NIH3T3-Zellen infektiös; diese induzierten in ihnen erneut eine morphologische Transformation und das Vermögen, Agarkolonien zu bilden.

[0193] Im Gegensatz zu NIH3T3, die mit pGD.MN transfiziert worden waren, waren alle Kolonien der Zellen, die mit dem [pGD.MN + MLV]-Komplex infiziert worden waren und in Gegenwart von Geneticin wuchsen, einheitlich transformiert und enthielten MN-Proteine. Die Transformanten kehrten einmal mehr zu dem normalen Phänotyp zurück, obwohl sie weiter den infektiösen [pGD.MN + MLV]-Komplex produzierten, der die Transformation in frischen NIH3T3-Zellen induzierte. Dieser Zyklus aus Infektion-Transformation-Umkehr wurde 3-mal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. Dies schloss die Alternative C) – Mutation der MN-cDNA als Ursache für die Umkehr – aus.

[0194] Normale NIH3T3-Zellen bildeten eine kontakthinhibierte Monoschicht aus flachen Zellen, die sich mit dem MAK M75 und der Immunperoxidase färbte. Zellen, die mit dem [pGD.MN + MLV]-Komplex infiziert worden waren, wurden eindeutig transformiert: sie wuchsen in einem chaotischen Muster und zeigten einen Verlust der Kontakthinhibierung. Einige der Zellen zeigten Anzeichen von Apoptose. Zwei Passagierungen später kehrte die Zellpopulation infolge eines häufigen Hervortretens von Revertanten und ihrer selektiven Vorteile (schnelleres Wachstum und eine höhere Effizienz beim Ausplattieren) vollständig zu dem ursprünglichen Phänotyp zurück. Tatsächlich schienen die Revertanten mit einer etwas geringeren Sättigungsdichte als die ursprünglichen NIH3T3-Zellen zu wachsen, was einen höheren Grad der Kontakthinhibierung zeigt.

[0195] Die Kontroll-NIH3T3-Zellen enthielten kein MN-Protein (Western Blot); während beide transformierten Zellen und Revertanten die gleiche Menge und den gleichen Anteil von 54 und 58 kDa großen Banden des MN-Proteins enthielten. In einem nicht-reduzierenden Gel war das MN-Protein in Form von Oligomeren mit 153 kDa vorhanden. Entsprechend wurden mit einem Kompetitions-RIA annähernd 40 ng MN/mg Gesamtprotein sowohl in den transformierten Zellen als auch den Revertanten gefunden.

Carboanhydratase-Aktivität und deren Inhibierung

[0196] Da die Carboanhydratase-Domäne einen beachtlichen Teil des MN-Proteins wiedergibt (siehe [Fig. 8](#)), wurden Tests durchgeführt, um zu bestimmen, ob es sie in der Tat enzymatisch aktiv ist. Vero-Zellen, die mit dem Vaccinia.MN-Konstrukt, das mehr von dem MN-Protein als andere, in den vorliegenden Versuchen verwendete Zellen enthielt, infiziert worden waren, dienten als Quelle für das MN-Protein. Die Zellen wurden mit RIPA-Puffer extrahiert und das MN-Protein wurde aufkonzentriert und durch Präzipitation mit dem MAK M75 und SAC partiell gereinigt. Das Immunpräzipitat wurde auf CA-Aktivität getestet. 78 µl des Präzipitats enthielten 1 Einheit des Enzyms. Aus dem Extrakt wurde die Konzentration der gesamten Proteine und des MN-Proteins bestimmt; 1 Einheit Enzym entsprach 145 ng MN-Protein oder 0,83 mg Gesamtprotein. Das Immunpräzipitat aus den mit Kontrollvirus infizierten Vero-Zellen zeigte keine Enzymaktivität. Die Aktivität der MN-Carboanhydratase wurde durch Acetazolamid inhibiert; $1,53 \times 10^{-8}$ M Konzentration des Wirkstoffs verringerten die Enzymaktivität auf 50%.

[0197] Vorherige Tests zeigten, dass konfluente Kulturen von HeLa- oder NIH3T3-Zellen 10^{-5} bis 10^{-3} M Konzentration von Acetazolamid 3 Tage lang ohne irgendwelche Anzeichen von Toxizität und irgendeine Wirkung auf die Zellmorphologie tolerierten. In spärlichen Kulturen inhibierten 10^{-5} M Acetazolamid nicht das Wachstum, 10^{-4} M verursachten jedoch bereits eine partielle Inhibierung. Daher wurden 10^{-5} M Acetazolamid zu den NIH3T3-Zellen, die frisch mit dem [pGD.MN + MLV]-Komplex transformiert worden waren, zugegeben. Nach 4-tägiger Inkubation wurden die Kolonien fixiert und angefärbt. Es war kein Unterschied zwischen den Zellen, die in Gegenwart oder Abwesenheit von NIH3T3-Zellen wuchsen; beide waren von korrekt transformierten NIH3T3-Zellen nicht unterscheidbar. Die enzymatische Aktivität der Carboanhydratase ist daher für die transformierende Aktivität des MN-Proteins nicht relevant.

4. Zell-Adhäsionsassay

[0198] Um zu bestimmen, ob das MN-Protein ein Zell-Adhäsionsmolekül (CAM) ist oder nicht, wurden Adhäsionsassays in bakteriologischen Petrischalen aus Kunststoff (die für eine Verwendung mit Gewebekulturen nicht behandelt wurden) durchgeführt. Die Zellen hafteten nicht an den Oberflächen solcher Platten an, solange die Schalen mit einem Bindungsprotein beschichtet waren. Die NIH3T3-Zellen hafteten an, verteilten sich und wuchsen an Stellen mit dem adsorbierten MN-Protein. Nur sehr wenige Zellen hafteten außerhalb der mit dem MN-Protein beschichteten Bereiche an.

[0199] Andere Varianten des Versuchs zeigten, dass die NIH3T3-Zellen an Stellen mit dem adsorbierten Collagen I und IV, Fibronectin und Laminin anhafteten und sich verteilten. NIH3T3-Zellen hafteten nicht an Dots mit adsorbierter Gelatine, FKS oder BSA an.

[0200] CGL1-, HeLa- und Vero-Zellen hafteten auch an das MN-Protein an, 3 Leukämiezelllinien zeigten jedoch keine Adhärenz. CGL3-Zellen, die das MN-Protein stark exprimierten, hafteten weniger effizient an die Dots mit dem MN-Protein an als CGL1. Die Gegenwart von 10^{-4} M Acetazolamid in den Medien beeinflusste nicht die Zell-Adhäsion.

[0201] Um die Spezifität der Adhäsion zu bestätigen, wurde das MN-Protein mit SAC, das mit dem MAK M75 (der gegen MN gerichtet war) oder mit dem MAK M67, der gegen ein nicht verwandtes Antigen (Pastorevka et al., supra) gerichtet war, beladen war, adsorbiert, bevor es auf die Oberfläche der Petrischalen aufgebracht wurde. Die Adsorption mit dem SAC-M75-Komplex hob die Aktivität der Zellbindung vollständig auf, wohingegen die Adsorption mit SAC-M67 ohne Wirkung war.

Weitere Ergebnisse der Zell-Adhäsion

[0202] Ein verkürztes MN, dem die TM- und IC-Abschnitte fehlen, wird durch 5ET1-Zellen (einem HeLa x-Fibroblastenhybrid, das zu CGL3-Zellen, die das MN-Protein im Übermaß exprimieren, analog ist) oder durch Vero-Zellen, die mit der VV tragenden MN-cDNA mit deletierten ZM- und IC-Sequenzen infiziert wurden, in das Medium eingebracht. Das eingebrachte MN-Protein wurde aus dem Medium gereinigt und in Zell-Adhäsionstests getestet. Die Zellen hafteten an, verteilten sich und wuchsen nur an den Stellen, die mit dem adsorbierten, vollständigen MN-Protein bedeckt waren, jedoch nicht an den Dots mit MN, dem die TM- und IC-Bereiche fehlten. Analoge Ergebnisse wurden auch für einige andere Adhäsionsmoleküle beschrieben. Eine Vielfalt von Zellen (NIH3T3, CGL1, CGL3, HeLa, XC), die an die Dots mit MN-Protein anhafteten, lässt vermuten, dass der (die) MN-Rezeptor(en) auf der Oberfläche von Vertebratenzellen üblich ist.

[0203] Es wurden auch Tests mit extrazellulären Matrixproteinen oder Kontrollproteinen, die einem Dot mit Nitrocellulose unterzogen wurden, durchgeführt. Die Dot-Blots wurden mit einer MN-Proteinlösung behandelt. Das gebundene MN-Protein wurde mit dem MAK M75 nachgewiesen. Das MN-Protein absorbierte die Dots mit Collagen I und IV, jedoch nicht die mit Fibroectin, Laminin, Gelatine oder BSA.

[0204] Aussichten für eine Therapie. Es gibt viele neue Grundlagen für eine Krebstherapie, die Onkoproteine oder Moleküle verwenden, die mit diesen als Targets Wechselwirken [Mendelsohn und Lippman, „Principles of molecular cell biology of cancer: growth factors“, in: DeVita et al., Hrsg., Cancer: Principles and practice of oncology, S. 114–133, 4. Ausg., Philadelphia: Lippincott (1995). Das MN-Protein und wenigstens manche seiner Liganden (oder Rezeptoren) scheinen für solche Zwecke besonders geeignet zu sein.

Beispiel 2

Identifizierung der Bindungsstelle von MN

[0205] Das MN-Protein ist ein tumorassoziiertes Zell-Adhäsionsmolekül (CAM). Um dessen Bindungsstelle zu identifizieren wurde eine Reihe sich überlappender Oligopeptide, die die N-terminale Domäne des MN-Proteins umspannen, synthetisiert. Die N-terminale Domäne ist mit derjenigen von Proteoglycanen homolog und enthält eine Tandem-Wiederholung aus sechs Aminosäuren.

[0206] Die Reihe von Oligopeptiden wurde mit Hilfe der Vorgehensweise eines Zell-Adhäsionstests getestet, der im Wesentlichen so war, wie er oben in Beispiel 1 beschrieben wurde. Die synthetischen Oligopeptide wurden auf hydrophoben Kunststoffoberflächen immobilisiert, um zu sehen, ob sie die Anhaftung, das Verteilen und das Wachstum der Zellen vermitteln würden. Es wurde auch untersucht, ob die Oligopeptide oder Antikörper die Anhaftung der Zellen (NIH3T3, HeLa und CGL1) an das gereinigte MN-Protein, das auf solchen Kunststoffoberflächen aufgetragen worden war, inhibierten. Das MN-Protein war auf Agarose, die kovalent mit Sulfonamid verknüpft worden war, affinitätsgereinigt, da das MN-Protein eine CA-Domäne umfasste.

[0207] Es wurde gefunden, dass mehrere der Oligopeptide biologisch aktiv sind: (i) wenn sie auf dem Kunststoff immobilisiert sind, vermitteln sie die Anhaftung von Zellen (NIH3T3, HeLa und CGL1); (ii) wenn sie zu dem Medium gegeben werden, konkurrieren sie mit dem immobilisierten MN-Protein um die Anhaftung an Zellen; (iii) diese Oligopeptide, die in den Medien vorhanden sind, hemmen nicht die Anhaftung von Zellen an TC-Kunststoff, sie verhinderten jedoch eine Zell-Zell-Anhaftung und die Bildung interzellulärer Kontakte; (iv) eine Behandlung des immobilisierten MN-Proteins und der aktiven Peptide mit dem MAK M75 hebt ihre Affinität für die Zellen auf; und (v) es wurde bestimmt, dass die Bindungsstelle von MN eng verwandt oder identisch mit dem Epitop für den MAK M75 ist, wobei wenigstens zwei Kopien desselben in der 6-fachen Tandem-Wiederholung aus 6 Aminosäuren [AS 61–96 (SEQ ID NO: 97)] in der proteoglycan-ähnlichen Domäne des MN-Proteins ist.

[0208] Es wurde geschlossen, dass ektopisch exprimiertes MN-Protein durch Eingreifen in normale Zell-Zell-Kontakte sehr wahrscheinlich an der Onkogenese beteiligt ist. Die Bindungsstelle von MN stellt ein potentiell Target dar, für das therapeutische Mittel konstruiert werden können.

Materialien und Methoden

[0209] Affinitätschromatographie von MN/CA IX. MN/CA IX wurde mit Hilfe eines einzigen Zyklus aus Adsorption-Flution auf Sulfonamid-Agarose gereinigt, wie für andere CAs beschrieben wurde [Falkbring et al., FEBS Letters, 24: 229 (1972)]. Wir verwendeten Säulen aus p-Aminoethylbenzolsulfonamid-Agarose (Sigma). Die Säulen mit adsorbiertem MN/CA IX wurden ausgiebig mit PBS (NaCl 8,0 g/l, KCl 0,2 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,15 g/l, pH = 7,2) gewaschen und mit 0,1 mM Acetazolamid (Sigma) eluiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 0 bis 5°C, pH 7,2, bei einer physiologischen Konzentration der Salze durchgeführt. Die vollständige MN/CA IX+ wurde mit 1% Triton X-100 in PBS aus Vero-Zellen, die mit Vaccinivirus, der ein Insert aus einem vollständigen kodierenden Bereich von MN/CA IX enthält, infiziert worden war, so, wie bei Zavada et al., Int. J. Oncol., 10: 857 (1997) beschrieben wurde, extrahiert. Vor der Chromatographie wurde der Extrakt 1:6 mit PBS verdünnt und 1 Stunde lang bei 1500 x g zentrifugiert. Aus einem analogen Konstrukt wurde trunkiertes MN/CA IX ΔTM ΔIC erzeugt, außer, dass der 3' stromaufwärtige Primer für die PCR: 5'-CGT CTA GAA GGA ATT CAG CTA GAC TGG CTC AGC A-3' [SEQ ID NO: 117] war. MN/CA IX Δ wurde in das Medium eingebracht, aus dem es, wie oben, nach der Zentrifugation affinitätsgereinigt wurde. Alle Reinigungsschritte wurden mittels Dot-Blots überwacht.

[0210] Zellen und Medien. Es wurden die folgenden Zelllinien verwendet: HeLa, CGL1 = nicht-tumorigene Hy-

brid-HeLa x-Fibroblasten, CGL3 = tumorgene Segregante aus diesem Hybrid, NIH3T3-Zellen = murine Fibroblasten. Der Ursprung der Zellen und die Wachstumsmedium sind bei Zavada et al., *Int. J. Cancer*, 54: 268 (1993) und Zavada et al., *Int. J. Incol.*, 10: 857 (1997) beschrieben. Daneben verwendeten wir auch HT29, eine Zelllinie, die aus einem kolorektalen Karzinom (ATCC Nr. HBT-38) stammte.

[0211] Zell-Adhäsionsassay. Die Bedingungen des Assays sind im Grunde so, wie die in Beispiel 1 beschrieben wurden. In Kürze: 1 µg/ml gereinigtes MN/CA IX in 50 mM Mono-Bicarbonatpuffer, pH 9,2, wurden in 30 µl Tropfen auf dem Boden der bakteriologischen 5 cm-Petrischalen 1,5 Stunden lang adsorbiert. Dann wurden die Tropfen mittels Ansaugen entfernt und die Schalen 3× mit PBS gespült und 30 Minuten lang mit 50% FKS in Kulturmedium blockiert. Es gab zwei Varianten des Tests. In der ersten wurde der gesamte Boden der Petrischale mit 50% FKS blockiert und die Schalen wurden mit 5 ml Zellsuspension (10^5 Zellen/ml) angesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Kulturen mit PBS gespült, fixiert und angefärbt. In der anderen Variante wurde nur der Bereich mit adsorbiertem MN/CA IX blockiert und auf die MN/CA IX-Dots wurden oben 30 µl Tropfen der Zellsuspension in Wachstumsmedium, das die zugegebenen Oligopeptide enthielt (oder die Kontrolle ohne Peptide war) gegeben. Nach Inkubation, Spülen und Fixierung wurden die Kulturen 1 Stunde lang mit 0,5 % Trypan-Blau in 50 mM Tris-Puffer, pH 8,5 angefärbt, mit Wasser gespült und getrocknet. Die angefärbten Bereiche der angehafteten Zellen wurden mit 10% Essigsäure extrahiert, die Extrakte auf Platten mit 96 Vertiefungen übertragen und die optische Dichte bei 630 nm auf einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen.

[0212] ELISA. Gereinigtes GST-MN [Zavada et al. (1993), supra] mit einer Konzentration von 10 ng/ml in Carbonatpuffer, pH 9,2, wurde 3 Stunden lang in Maxisorb-Streifen (NUNC) adsorbiert. Nach dem Waschen und Blockieren (1 Stunde) mit 0,05 % Tween 20 in PBS, wurden 50 µl/Vertiefung der Antikörper + Antigen-Mischungen zugegeben. Die Endverdünnung der MAK 75-Aszitesflüssigkeit betrug 10^{-6} ; die Konzentration der Peptide variierte entsprechend ihrer Affinität für M75, um so eine Bestimmung des 50%-igen Endpunkts zu erlauben. Diese Mischungen wurden 1,5 Stunden lang adsorbiert, worauf ein Waschen mit Tween-PBS erfolgte. Gebundener Antikörper wurde mit Hilfe eines Antimaus-IgG-Konjugats mit Peroxidase (SwAM-Px, SEVAC, Prag=, das 1:1000 verdünnt worden war, nachgewiesen. In der Farbreaktion wurde OPD (o-Phenylendiamindihydrochlorid, Sigma) 1 mg/ml in 0,1 M Citratpuffer, pH 5,0, verwendet. Dazu wurde H_2O_2 bis zu einer Endkonzentration von 0,03% gegeben. Dieses System ist ausgeglichen, um so einen Assay für ein Konkurrieren des Antigens um M75 sowie um Peptide, die an das Epitop von immobilisiertem GST-MN binden, zu ermöglichen.

[0213] Peptide. Die in der Studie verwendeten Peptide wurden mit Hilfe des Festphasen-Verfahrens hergestellt [Merrifield et al., in: Gutte, B. (Hrsg.), *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*, S. 93–169 (San Diego; Academic Press; 1995)] unter Verwenden der Boc/Bzl-Strategie. Die Peptidsäuren wurden auf einem PAM-Harz und die Peptidamide auf einem MeBHA-Harz hergestellt. Das Entfernen der Schutzgruppen und das Abspalten von dem Harz wurde durch flüssiges Wasserstofffluorid vorgenommen. Die Peptide wurden mittels C18-RP-HPLC gereinigt und mit Hilfe von Aminosäureanalyse und FAB-MS-Spektroskopie charakterisiert.

[0214] Western Blots. Die MN/CA IX-Proteine aus den PAGE-Gelen wurden auf PVDF-Membrane (Immobilon P, Millipore) übertragen und mit M75 entwickelt, worauf AwAM-Px (siehe oben) und Diaminobenzidin (Sigma) mit H_2O_2 folgten. Für die Dot-Blots wurden Nitrocellulose-Membranen verwendet.

[0215] Phage-Display. Für das Screenen wurde das Ph. D.-7 Phage Display Peptide-Library-Kit nach den Empfehlungen des Herstellers (New England Biolabs) verwendet. Eine Platte mit 96 Vertiefungen wurde mit Peptid (SEQ ID NO: 106) beschichtet. Durch 1-stündiges Inkubieren von 2×10^{11} Phage mit der beschichteten Platte als Target wurde Biopanning durchgeführt. Ungebundene Phagen wurden mit TEST (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) gewaschen und spezifisch gebundene Phagen wurden mit M75-Antikörper (2 µg in 100 µl TBS/Vertiefung) eluiert. Eluierte Phagen wurden amplifiziert und für weitere Bindungs- und Amplifikationszyklen dazu verwendet, den Pool für die Bindungssequenz anzureichern. Nach 5 Runden wurden einzelne Klone gepickt, amplifiziert und unter Verwenden des T7-Sequenzierungskits (Pharmacia) sequenziert.

Ergebnisse

[0216] Affinitätschromatographie des MN/CA IX-Proteins. Für die Reinigung des MN/CA IX-Proteins entschieden wir, eine Affinitätschromatographie auf einer Sulfonamid-Agarose-Säule, wie sie vorher für andere CAs beschrieben wurde [Falkbring et al., supra] zu verwenden. Die Vorteile dieses Verfahrens sind seine Einfachheit und die Tatsache, dass das gesamte Verfahren unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt wird. Ein Vacciniavirus-Vektor mit einem Insert der vollständigen MN/CA9-cDNA, oder mit trunkierter cDNA (der die Transmembran- und intrazellulären Domänen fehlten) wurde als Quelle für das MN/CA IX-Pro-

tein verwendet.

[0217] Ein einzelner Zyklus aus Adsorption – Elution erzielte relativ reine Proteine: MN/CA IX+ ergab 2 Banden mit 54 und 58 kDa, MN/CA IX Δ von 54,5 und 56 kDa. Diese Proteine reagierten stark mit dem MAK M75 auf Western Blots. In Extrakten aus HeLa, CGL3 und HT29 offenbarte der Blot 2 Banden mit der gleichen Größe wie MN/CA IX+, das aus dem Vacciniaviruskonstrukt gereinigt worden war.

[0218] Adhäsion von Zellen an das MN/CA IX-Protein. MN/CA IX, das auf hydrophoben Kunststoff immobilisiert worden war, ermöglichte eine Anhaftung, Verteilung und Wachstum der Zellen. Äußerst geringe Konzentrationen von MN (CA IX, das 1 μ g/ml des gereinigten Proteins in Adsorptionspuffer entspricht, waren ausreichend, um diesen Effekt zu bewirken; andere Zell-Adhäsionsmoleküle werden mit 10–50-fach höheren Konzentrationen verwendet. In dem Zell-Adhäsionstest war nur das vollständige MN/CA IX-Protein aktiv, trunkiertes MN/CA IX unterstützte überhaupt nicht die Adhäsion von Zellen oder zeigte eine nur geringe Adhäsionsaktivität und fungierte in manchen Fällen sogar als Zell-„Vertreiber“.

[0219] Die Behandlung der Dots mit immobilisierter MN/CA IX mit dem MAK M75 stellte dessen Vermögen, an die Zellen anzuhafte, ein, der Kontroll-MAK M16, der für MN/CA IX irrelevant war, zeigte jedoch keine Wirkung. Das Blockieren der Anhaftung der Zellen mit M75 zeigt, dass das Epitop mit der Bindungsstelle von MN/CA IX für die Zellrezeptoren identisch ist oder mit dieser überlappt.

[0220] Identifizierung des von dem MAK M75 erkannten Epitops. Eine vorhergehende Kartierung des M75-Epitops, das partielle Sequenzen der extrazellulären Teile der MN/CA9-cDNA, die aus Bakterienvektoren exprimiert und auf Western Blots getestet worden war, verwendete, lokalisierte es in dem PG-Bereich. Für eine exakte Kartierung war unsere Strategie, die sich partiell überlappenden Oligopeptide von 15–25 AS, die die PG-Domäne abdecken, zu synthetisieren und sie in einem Kompetitions-ELISA mit M75 zu testen. Entsprechend den Ergebnissen folgte darauf eine Reihe von 6–12 AS Oligopeptiden. Ein Hauptteil der PG-Domäne bestand aus einer 6-fachen Tandem-Wiederholung aus 6 AS (AS 61–96) [SEQ ID NO: 97]; wobei 4 Wiederholungen identisch sind (GEEDLP) [SEQ ID NO: 98] und 2 einen Austausch von 2 AS enthalten (SEEDSP [SEQ ID NO: 141] und REEDPP [SEQ ID NO: 142]).

[0221] Nachstehend sind die Ergebnisse des Kompetitions-ELISA mit rekombinantem MN/CA IX und Oligopeptiden, die entsprechend den partiellen Sequenzen des PG-Bereichs synthetisiert wurden, angegeben. MN/CA IX+ und Δ , die in Säugerzellen hergestellt wurden, besaßen eine höhere serologische Aktivität als irgendein anderes Protein oder Peptid, das in diesem Versuch eingeschlossen war; das in Bakterien synthetisierte Fusionsprotein GST-MN war weniger aktiv. Die folgenden Peptide umspannen den PG-Bereich: GGSSGEDDPLGEEDLPSEEDSPC (AS 51–72) [SEQ ID NO: 104]; GEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEC (AS 61–85) [SEQ ID NO: 105]; EDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVC (AS 75–98) [SEQ ID NO: 106]; und EVKPKSEEEGSLKLE (AS 97–111) [SEQ ID NO: 118]. Die SEQ ID NOS: 104 und 106 verursachten eine 50%-ige Hemmung mit 1 ng/ml. Diese 2 Oligopeptide überlappen sich gegenseitig nicht, wodurch das Epitop in beiden wiederholt wird. Die SEQ ID NO: 105 war, wahrscheinlich aufgrund einer anderen Konformation, 1000 \times weniger aktiv. Die SEQ ID NO: 118 war inaktiv; sie enthält daher nicht das M75-Epitop.

[0222] Der nächste Schritt zum Identifizieren des Epitops war, Oligopeptide zu synthetisieren, die alle zirkulären Permutationen des zweimal wiederholten Motivs GEEDLP [SEQ ID NO: 98] enthielten. Alle sechs folgenden Dodecapeptide [SEQ ID NOS: 119 bis 124] waren serologisch aktiv (2 mehr und 4 weniger). GEEDLPGEEDLP [SEQ ID NO: 119]; EEDLPGEEDLP [SEQ ID NO: 120]; EDLPGEEDLP [SEQ ID NO: 121]; DLPGEEDLP [SEQ ID NO: 122]; LPGEEDLP [SEQ ID NO: 123]; und PGEEDLP [SEQ ID NO: 124]. Die folgende Reihe aus Sequenzen mit 7 AS, die an beiden Enden mit Alanin flankiert waren, wurde getestet: APGEEDLPA [SEQ ID NO: 125]; AGEEDLPGA [SEQ ID NO: 126]; AEEDLPGEA [SEQ ID NO: 127]; AEDLPGEAA [SEQ ID NO: 128]; ADLPGEEDA [SEQ ID NO: 129]; und ALPGEEDLA [SEQ ID NO: 130]. Die Ergebnisse zeigten dass die minimal serologisch aktive Sequenz das Oligopeptid APGEEDLPA [SEQ ID NO: 125] ist. Die SEQ ID NOS: 127 bis 130 haben sich mit 100 μ g/ml als im Wettbewerb negativ herausgestellt. Ferner konkurrierte keines der noch kürzeren Oligopeptide (6 + 2 AS) in dem ELISA um M75: AGEEDLPA [SEQ ID NO: 131]; AEEDLPGA [SEQ ID NO: 132]; AEDLPGEA [SEQ ID NO: 133]; ADLPGEAA [SEQ ID NO: 134]; ALPGEEDA [SEQ ID NO: 135]; und APGEEDLA [SEQ ID NO: 136].

[0223] In den Oligopeptiden mit den SEQ ID NOS: 104, 105, 106 und 118 lag die C-terminale Aminosäure als Säure vor, während die C-terminale Aminosäure in allen anderen Oligopeptiden als Amid vorlag. Es ist klar, dass die Affinität zwischen diesen Oligopeptiden und dem MAK M75 stark mit der Größe des Peptidmoleküls

zunimmt.

Versuche, die Adhäsion von Zellen an immobilisierte Oligopeptide zu zeigen.

[0224] Unser anfänglicher Plan war, der Pionierarbeit von Piersbacher und Ruoslahti, PNAS, 81: 5985 (1984) zu folgen. Mit Hilfe des Vernetzungsmittels SPDP (N-Succinimidyl-3-[pyridylhydro]propionat) verknüpften sie getestete Oligopeptide mit adsorbiertem Rinderserumalbumin. Aus diesem Grund fügten wir an das C-Ende der Oligopeptide SEQ ID NOS: 104 bis 106 Cystein an, das eine gerichtete Verknüpfung mit adsorbiertem Albumin ermöglichen würde. Durch eine Immunoperoxidase-Färbung mit M75 zeigten wir das direkte Verknüpfen der Peptide in Petrischalen. Unglücklicherweise hafteten die CGL1- oder CGL3-Zellen an das mit SPDP behandelte Albumin an und blockierten mit Ethanolamin (anstelle der Oligopeptide) ebenso stark wie es bei BSA-Dots mit verknüpften Oligopeptiden der Fall ist. Wir waren nicht in der Lage, die unspezifische Adhäsion einzustellen. Die Oligopeptide SEQ ID NOS: 104 bis 106 adsorbieren nur sehr schwach an bakteriologische Petrischalen, wodurch sie das Durchführen des Zell-Adhäsionsassays nicht zulassen.

[0225] Alternativ dazu testeten wir die Inhibierung der Zell-Adhäsion an MN/CA IX-Dots durch Oligopeptide, die zusammen mit der Zellsuspension zu den Medien gegeben wurden, wie bei Piersbacher und Ruoslahti, supra beschrieben ist. Alle Peptide SEQ ID NOS: 104 bis 106 und 118 bis 136 wurden mit Konzentrationen von 100 und 10 µg/ml getestet. Keines von diesen inhibierte reproduzierbar die Adhäsion von CGL1-Zellen.

[0226] Oligopeptide mit Affinität zu dem M75-Epitop, die die Adhäsion von Zellen an MN/CA IX inhibieren. Als Alternative zu den monoklonalen Antikörpern begannen wir, Oligopeptide, die eine Affinität zum M75-Epitop sowie zu der MN/CA IX-Rezeptorbindungsstelle aufweisen, aus einer Phage Display-Genbank zufälliger Heptapeptide – Ph. D.-7 – zu selektieren. Unser Ziel war, durch Panning auf dem immobilisierten Peptid SEQ ID NO: 106 und anschließender Elution mit M75 Phagen zu selektieren, die die gewünschten Heptapeptide enthielten. Der eluierte Phage wurde in geeigneten Bakterien vervielfacht und vier weiteren Zyklen aus Panning und Elution unterzogen. Aus der ausgewählten Phagenpopulation wurden 10 Plaques gepickt, amplifiziert und der für Heptapeptide kodierende Bereich wurde sequenziert. Es sind nur 3 Heptapeptide dargestellt. Diese drei Heptapeptide sind, nach Anfügen von Alanin auf beiden Seiten, die folgenden Nonapeptide: AKKMKRRKA [SEQ ID NO: 137]; AITFNAQYA [SEQ ID NO: 138]; und ASASAPVSA [SEQ ID NO: 139]. Das letzte Heptapeptid, das wiederum mit angefügten, terminalen Alaninen als Nonapeptid AGQTRSPLA [SEQ ID NO: 140] synthetisiert wurde, wurde mittels Panning auf GST-MN identifiziert und mit Acetazolamid eluiert. Das letzte Peptid weist eine Affinität zu dem aktiven Zentrum der MN/CA IX-Carboanhydratase auf. Wir synthetisierten diese Peptide aus 7 + 2 AS und testeten sie in einem Kompetitions-ELISA und einer Inhibierung der Zell-Adhäsion. Beide Tests ergaben im Wesentlichen übereinstimmende Ergebnisse: das Peptid SEQ ID NO: 138 zeigte die höchste Aktivität; das Peptid SEQ ID NO: 137 war weniger aktiv; das Peptid SEQ ID NO: 139 war nur in ELISA geringfügig positiv und das Peptid SEQ ID NO: 140 war inaktiv. In allen 4 Nonapeptiden lag das C-terminale Amid als Amid vor.

Erörterung

[0227] Die Reinigung von Transmembranproteinen, wie beispielsweise MN/CA IX, stellt oftmals technische Probleme bereit, da sie aufgrund ihrer hydrophoben TM-Abschnitt zum Bilden von Aggregaten mit anderen Membranproteinen neigen. Um dies zu vermeiden, konstruierten wir trunkiertes MN/CA IX ΔICΔTM, das in das Medium sekretiert wurde. Tatsächlich wurde das trunkierte MN/CA IX mit einer höheren Reinheit als MN/CA IX+ erhalten. Unglücklicherweise war dieses Protein für unsere Zwecke von geringem Nutzen, da es in dem Zell-Adhäsionsassays inaktiv war. Eine solche Situation wurde auch für andere Zell-Adhäsionsmoleküle beschrieben: ihre eingebrachte, verkürzte Form setzt entweder eine inaktive Konformation voraus oder es adsorbiert „von oben nach unten“ an hydrophoben Kunststoff, wohingegen vollständige Proteine durch hydrophobe TM-Abschnitte in der „richtigen“ Position adsorbieren.

[0228] Das MN/CA IX-Protein bildet Oligomere mit 150 kDa, die über Disulfidbrücken verknüpft sind. Es war nicht bekannt, ob dies Homo- oder Heterooligomere sind, PAGE und eine Western Blot-Analyse lassen jedoch vermuten, dass sie wahrscheinlich Homooligomere, aller Wahrscheinlichkeit nach Trimere, sind, da auf dem mit Coomassie Blue angefärbten Gel keine weiteren Banden mit einer Intensität, die mit den 2 für MN/CA IX spezifischen Banden, vergleichbar war, erschienen. Es ist auch unwahrscheinlich, dass ein weiteres Protein vorhanden sein könnte, das mit einer der 2 Hauptbanden von MN/CA IX mitwanderte, da die Intensität ihrer Färbung auf dem Gel und des Western Blots gut vergleichbar ist.

[0229] Es kann kein Zweifel an der Spezifität der Anhaftung der Zellen an gereinigtes MN/CA IX+ bestehen.

Sie wird durch den spezifischen MAK M75, in einer Verdünnung von 1:1000 Aszitesflüssigkeit eingestellt. Dies ist eine Berichtigung unseres früheren Berichts in Zavada et al., *Int. J. Oncol.*, 10: 857 (1997), in dem wir bemerkten, dass MN/CA IX, das mit einem Vaccinia-Virus-Vektor hergestellt wurde, und das Fusionsprotein GST-MN die Zell-Adhäsion unterstützen, wir realisierten jedoch nicht, dass der GST-Anker selbst eine weitere Bindungsstelle enthält, die nicht von M75 blockiert wird.

[0230] Der MAK M75 reagiert bei jeder Bedingung – mit nativem Antigen auf der Oberfläche lebender Zellen, mit denaturiertem Protein auf Western Blots und mit einem Antigen in Paraffinsegmenten von Biopsien, die mit Formaldehyd fixiert worden waren – hervorragend mit MN/CA IX, was nahe legt, dass das Epitop klein und zusammenhängend ist. Bei einem Kompetitions-ELISA war die kleinste Sequenz, die mit M75 reagierte 7 + 2 AS, die Affinität zwischen M75 und den getesteten Peptiden hing jedoch stark von ihrem Molekulargewicht ab. In Bezug auf Gewicht/Volumen-Konzentration war die vollständige MN/CA IX 100.000× aktiver als das kleinste, serologisch aktive Peptid. In molaren Konzentrationen ausgedrückt wäre der Unterschied 150.000.000×. Oligopeptide mit mittlerer Größe zeigten auch mittlere Aktivitäten. Es bleibt zu klären, ob sich solche Aktivitätsunterschiede aus der Konformation, die von der Größe des Moleküls abhängt oder aus der Tatsache, dass MN/CA IX mehrere Kopien des Epitops, das kleinste Molekül jedoch nur eine Kopie enthält, ergeben.

[0231] Unter Beachtung der Möglichkeit, dass das Epitop mit der Struktur der Zell-Adhäsion in MN/CA IX identisch ist, können wir verstehen, warum bei uns die Inhibierung der Zell-Adhäsion durch die Oligopeptide fehlschlug. Diese Bindungsstelle ist nicht so einfach wie das Prototyp-Polypeptid, RGD [Winter, J., in: Cleland und Craik (Hrsg.), *Protein Engineering. Principles and Practice*, S. 349–369 (N.Y.; Wiley-Liss; 1996)].

[0232] Natürlich kann argumentiert werden, dass die Größe von MN/CA IX ungefähr derjenigen des Immunglobulin-Moleküls entspricht, und dass das Binden von M75 an dessen Epitop eine andere Sequenz der Zell-Anhaftungsstelle sterisch hindern kann. Dieser Einwand wurde durch das Blockieren von sowohl dem M75-Epitop als auch der Zellbindungsstelle durch Nonapeptide 7 + 2 AS unwahrscheinlich gemacht werden. Dieses Ergebnis lässt stark vermuten, dass das Epitop und die Bindungsstelle tatsächlich identisch sind.

[0233] MN/CA IX und dessen PG-Bereich scheinen insbesondere aus den folgenden Gründen ein potentielles Target-Molekül für eine Therapie zu sein: (i) es wird auf der Zelloberfläche exprimiert; (ii) es ist in einem hohen Prozentsatz bestimmter humaner Karzinome vorhanden; (iii) es ist normal in der Schleimhaut des Verdauungstrakts, der für zirkulierende Antikörper, im Gegensatz zu Tumoren, nicht zugänglich ist, exprimiertes MN/CA IX; (iv) es wird nicht (oder nur minimal) in die Körperflüssigkeiten eingebracht; (v) das Motiv GEEDLP [SEQ ID NO: 98] wird auf der Oberfläche jedes MN/CA IX-Moleküls 18× wiederholt. In den ersten Schritten der Entwicklung neuer Medikamente werden Oligopeptid-Display-Genbanken verwendet [Winter, J., supra]. Selektierte Oligopeptide können als führende Verbindungen für die computergestützte Konstruktion neuer Moleküle, mit weiteren Eigenschaften, die bei einem Medikament erforderlich sind, dienen [DeCamp et al., in: Cleland und Craik (Hrsg.), supra auf S. 467–505].

Beispiel 3

Identifizierung von Peptiden, die an das MN-Protein binden, unter Verwenden von Phage-Display

(a) Zum Identifizieren von Peptiden, die von dem MN-Protein erkannt werden, wurde eine Heptapeptid-Phage-Display-Genbank [Ph. D.[®] -7 Peptide 7-mer Library Kit (Phage-Display-Peptid-Genbank-Kit); New England Biolabs; Beverly, MA (USA)] gescreent. Beim Screenen der Genbank wurde ein Selektionsverfahren, d. h. Biopanning [Parmley und Smith, *Gene*, 73: 308 (1988); Noren, C. J., *NEB Transcript*, 8(1): 1 (1996)] durch Inkubieren der Phagen, die für die Peptide kodieren, mit einer Platte, die mit dem MN-Protein beschichtet ist, Wegwaschen des ungebundenen Phagen, Eluieren und Amplifizieren des spezifisch gebundenen Phagen durchgeführt.

[0234] Das Target-MN-Protein in diesem Verfahren war ein Glutathion-S-Transferase-(GST)-MN-Fusionsprotein (GST-MN). GST-MN ist ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein, das aus pGEX-3X-MN exprimiert wurde, das die cDNA für das MN-Protein ohne das Signalpeptid enthielt. GST-MN wurde unter modifizierten Kultivierungsbedingungen (verringerte optische Dichte, verringerte Temperatur) in Bakterien erzeugt. Eine solche Kultivierung verhinderte die frühreife Terminierung der Translation und führte zu der Synthese der Proteinmoleküle, die in großer Mehrheit mit vollständiger Länge vorhanden waren. Das GST-MN-Protein wurde zum Beschichten der Vertiefungen und Binden der relevanten Phagen verwendet. Die gebundenen Phagen wurden dann mit Acetazolamid eluiert, amplifiziert und für zwei weitere Screeningrunden verwendet.

[0235] Nach dem Sequenzieren mehrerer unabhängiger Phagenklone, die nach der dritten Screeningrunde erhalten wurden, wurden die folgenden Heptapeptide erhalten:

- (1) GETRAPL (SEQ ID NO: 107)
- (2) GETREPL (SEQ ID NO: 108)
- (3) GQTRSPL (SEQ ID NO: 109)
- (4) GQTRSPL (SEQ ID NO: 109)
- (5) GQTRSPL (SEQ ID NO: 109)
- (6) GQTRSPL (SEQ ID NO: 109)
- (7) GQTRSPL (SEQ ID NO: 109)

[0236] Die Heptapeptide zeigen sehr ähnliche oder identische Sequenzen, was anzeigt, dass die Bindung spezifisch ist. Die Tatsache, dass die Phagen, die diese Heptapeptide tragen, mit Acetazolamid, einem Inhibitor der Carboanhydrataseaktivität, eluieren, gibt an, dass die Peptide an die CA-Domäne des MN-Proteins binden.

(b) Analoges Screenen der Heptapeptid-Phage-Display-Genbank wird unter Verwenden von Collagen I, von dem gezeigt wurde, dass es an das MN-Protein bindet, für die Elution der Phagen durchgeführt. Verschiedene(s) Peptid(e), die an (einen) andere(n) Teil(e) des MN-Proteinmoleküls binden, werden erwartungsgemäß identifiziert. Nach dem Identifizieren solcher MN bindenden Peptide sollen die entsprechenden, synthetischen Peptide dann auf ihre biologischen Wirkungen analysiert werden.

Beispiel 4

Zugänglichkeit des in Tumorzellen und im Magen exprimierten MN-Proteins in vivo

[0237] Lewis-Ratten (384 g), die einen subcutanen BP6-Tumor (ungefähr 1 cm Durchmesser), der das MN-Protein von Ratten exprimierte, trugen, wurden intraperitoneal (i. p.) mit ^{125}I -M75-MAK ($2,5 \times 10^6$ cpm) injiziert. Fünf Tage später wurden 0,5–1 g-Stücke des Tumors und der Organe gewogen und ihre Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Gamma-Zählers gemessen.

[0238] Tabelle 2 fasst die Ergebnisse zusammen. Die höchste Radioaktivität war in dem Tumor vorhanden. Eine relativ hohe Radioaktivität wurde in der Leber und in der Niere gefunden, was augenscheinlich die Clearance von murinem IgG aus dem Blut widerspiegelt. Der Magen behielt eine relativ geringe Höhe an Radioaktivität bei, was anzeigt, dass der M75-MAK nur einen begrenzten Zugang zu dem MN-Protein besaß, das der Magenschleimhaut ausgesetzt wurde.

Tabelle 2

Verteilung der Radioaktivität von ^{125}I -M75 in Ratten-Organen und in dem Tumor

Organ	cpm/g				
Niere	2153	2184			
Milz	653	555			
Leber	1993	1880			
Lunge	1183	1025			
Blut	1449				
Herz	568	477			
Magen	1184	1170			
Hoden	812	779			
Schwanz	647				
Tumor	3646	4058	3333	8653	3839

Beispiel 5

FACS-Analyse der Expression des MN-Proteins in CGL3-Zellen – Apoptose

[0239] Es wurde eine FACS-Untersuchung konstruiert, um die Bedingungen zu bestimmen, die die Synthese des MN-Proteins beeinflussen und um die Verteilung der Zellzyklen der MN-positiven gegenüber den MN-negativen Zellen in einer zur Apoptose stimulierten CGL3-Population zu analysieren. In vorhergehenden Western Blotting-Analyse wurde gezeigt, dass CGL3-Zellen eine relativ hohe Menge des MN-Proteins unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen exprimieren. Die CGL3-Zellen werden als konstitutiver Erzeuger von

MN-Proteinen betrachtet. Ein Western Blotting erkennt jedoch keine kleinen Unterschiede auf der Ebene des Proteins. Im Gegensatz dazu ermöglicht FACS den Nachweis einzelner, MN-positiver Zellen, eine Berechnung ihres Prozentsatzes in der analysierten Population, eine Abschätzung der Menge des MN-Proteins in den Zellen und eine Bestimmung der Verteilung der Zellzyklen.

[0240] Um die Wirkung der Kultivierungsbedingungen auf die Expression von MN in CGL3-Zellen zu untersuchen, wurden die CGL3-Zellen mit unterschiedlichen relativen Dichten und Serumkonzentrationen ausplattiert. Drei Tage nach dem Ausplattieren wurden die Zellen gesammelt, an der Oberfläche mit dem MAK M75, gefolgt von FITC-konjugiertem Anti-Maus-IgG markiert und unmittelbar mittels FACS analysiert.

[0241] Die Analyse zeigte, dass die MN-Expression in adhärennten Zellen wie in HeLa-Zellen von der Zelldichte abhängig ist. Kulturen mit geringer Dichte erzeugten jedoch nachweisbare Menge des MN-Proteins. In Kulturen mit geringer Dichte scheint die Serumkonzentration keine Rolle zu spielen. In Kulturen mit relativ hoher Dichte führte eine Abnahme der Serumkonzentration, wahrscheinlich aufgrund einer geringeren Dichte, die die Zellen während der drei Kultivierungstagen erlangen konnten, zu einer leicht verringerten MN-Expression.

[0242] Die Wirkung der aktuellen Zelldichte ist bemerkenswert und die Expression von MN (in 15–90% der Zellen nachweisbar) stellt einen sehr empfindlichen Monitoringfaktor dar. In allen Versuchen gab es im Vergleich zu dem MN-negativen Teil, in dem MN-positiven Teil der Populationen einen ungefähr 5% höheren Prozentsatz an Zellen im Zyklus. Diese Tatsache gab Anlass zu der Analyse der Verteilung der Zellzyklen der MN-positiven CGL3-Zellen unter ungünstigen Wachstumsbedingungen nach der Induktion der Apoptose.

Apoptose

[0243] Die CGL3-Zellen wurden mit verschiedenen Wirkstoffen einschließlich Cycloheximid, Actinomycin D und Dexamethason zu einem apoptotischen Tod stimuliert.

[0244] Die FACS-Studie zeigte, dass der Ausbruch der Apoptose in MN-positiven Zellen verzögert ist, was eine schützende Rolle von MN in diesem Prozess nahe legt. Es wurde auch beobachtet, dass die Induktion von Apoptose zu der Herunterregulierung der MN-Expression auf zeitabhängige Weise führte. Das gleiche Phänomen wurde für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 beschrieben und es besteht die Meinung, dass die Herunterregulierung bestimmter Gene während der Apoptose die Zellen dafür sensitiviert, einen apoptotischen Tod zu durchlaufen. Um die Rolle von MN in der Apoptose zu belegen, wurde eine ähnliche Studie mit Zellen, die mit MN-cDNA transfiziert worden waren, durchgeführt.

[0245] Die vorhergehenden Ergebnisse geben die wahrscheinliche Beteiligung von MN bei der Unterdrückung der Apoptose an. Die neuerliche Ansicht, dass Tumore sowohl als Folge einer erhöhten Proliferation als auch aus einer Abnahme des Zelltds entstehen, scheint mit der Verbindung zwischen dem MN-Protein und den Tumoren in vivo übereinzustimmen.

ATCC-Hinterlegungen

[0246] Die unten angegebenen Materialien wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC), nun im 10810 University Blvd., Manassus, Virginia 20110-2209 (USA), hinterlegt. Die Hinterlegungen wurden entsprechend den Vorgaben des Budapester Vertrags über die Internationale Anerkennung hinterlegter Mikroorganismen zum Zwecke von Patentverfahren und Regulierungen desselben (Budapester Vertrag) vorgenommen. Das Aufrechterhalten einer lebensfähigen Kultur wird vom Tag der Hinterlegung an dreißig Jahre lang gewährleistet. Die Hybridome und Plasmide werden durch die ATCC gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags zugänglich gemacht und sind Gegenstand einer Übereinkunft zwischen den Anmeldern und der ATCC, die die uneingeschränkte Zugänglichkeit der hinterlegten Hybridome und Plasmide für die Öffentlichkeit und gleichzeitig das Erteilen des Patents aus der vorliegenden Anmeldung gewährleistet. Die Verfügbarkeit des hinterlegten Stamms soll nicht als Erlaubnis zum Ausführen der Erfindung in Zuwiderhandlung der Rechte, die unter der Autorität jeder Regierung entsprechend den geltenden Patentgesetzen erteilt werden, angesehen werden.

Hybridome	Hinterlegungsdatum	ATCC Nr.
VU-M75	17. September 1992	HB 11128
MN 12.2.2	9. Juni 1994	HB 11647
Plasmide	Hinterlegungsdatum	ATCC Nr.
A4a	6. Juni 1995	97199
XE1	6. Juni 1995	97200
XE3	6. Juni 1995	97198

[0247] Die Beschreibung der vorhergehenden Ausführungsformen der Erfindung wurde zum Zweck der Veranschaulichung und Beschreibung angegeben. Sie soll nicht vollständig sein oder die Erfindung auf eine exakt offenbarte Form einschränken und es ist offensichtlich, dass in Anbetracht der obigen Lehren viele Modifikationen und Variationen möglich sind. Die Ausführungsformen wurde dazu ausgewählt und beschrieben, um die Prinzipien der Erfindung und ihre praktische Anwendung zu erläutern, um so anderen Fachleuten zu ermöglichen, die Erfindung in verschiedenen Ausführungsformen und mit verschiedenen Modifikationen, wie sie für den bestimmten Zweck in Betracht gezogen werden, zu verwenden.

[0248] Auf alle hierin zitierten Druckschriften wird vollinhaltlich Bezug genommen.

Sequenzprotokoll

<110> Zavada, Jan
 Pastorekova, Silvia
 Pastorek, Jaromir

<120> MN-Gen und -Protein

<130> D-0021.5 PCT

<140>

<141>

<150> 09/177,776

<151> 1998-10-23

<150> 09/178,115

<151> 1998-10-23

<160> 143

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1522

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> CDS

<222> (13)..(1389)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (124)..(1389)

<400> 1

acagtcagcc gc atg gct ccc ctg tgc ccc agc ccc tgg ctc cct ctg ttg 51
 Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu
 -35 -30 -25

atc ccg gcc cct gct cca ggc ctc act gtg caa ctg ctg ctg tca ctg 99
 Ile Pro Ala Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu
 -20 -15 -10

ctg ctt ctg atg cct gtc cat ccc cag agg ttg ccc cgg atg cag gag 147
 Leu Leu Leu Met Pro Val His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu
 -5 -1 1 5

gat tcc ccc ttg gga gga ggc tct tct ggg gaa gat gac cca ctg ggc 195
Asp Ser Pro Leu Gly Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly
10 15 20

gag gag gat ctg ccc agt gaa gag gat tca ccc aga gag gag gat cca 243
Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro
25 30 35 40

ccc gga gag gag gat cta cct gga gag gag gat cta cct gga gag gag 291
Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu
45 50 55

gat cta cct gaa gtt aag cct aaa tca gaa gaa gag ggc tcc ctg aag 339
Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys
60 65 70

tta gag gat cta cct act gtt gag gct cct gga gat cct caa gaa ccc 387
Leu Glu Asp Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro
75 80 85

cag aat aat gcc cac agg gac aaa gaa ggg gat gac cag agt cat tgg 435
Gln Asn Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp
90 95 100

cgc tat gga ggc gac ccg ccc tgg ccc cgg gtg tcc cca gcc tgc gcg 483
Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala
105 110 115 120

ggc cgc ttc cag tcc ccg gtg gat atc cgc ccc cag ctc gcc gcc ttc 531
Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe
125 130 135

tgc ccg gcc ctg cgc ccc ctg gaa ctc ctg ggc ttc cag ctc ccg ccg 579
Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro
140 145 150

ctc cca gaa ctg cgc ctg cgc aac aat ggc cac agt gtg caa ctg acc 627
Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr
155 160 165

ctg cct cct ggg cta gag atg gct ctg ggt ccc ggg cgg gag tac cgg 675
Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg
170 175 180

gct ctg cag ctg cat ctg cac tgg ggg gct gca ggt cgt ccg ggc tcg 723
Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser
185 190 195 200

gag cac act gtg gaa ggc cac cgt ttc cct gcc gag atc cac gtg gtt	771
Glu His Thr Val Glu Gly His Arg Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val	
205 210 215	
cac ctc agc acc gcc ttt gcc aga gtt gac gag gcc ttg ggg cgc ccg	819
His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro	
220 225 230	
gga ggc ctg gcc gtg ttg gcc gcc ttt ctg gag gag ggc ccg gaa gaa	867
Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu	
235 240 245	
aac agt gcc tat gag cag ttg ctg tct cgc ttg gaa gaa atc gct gag	915
Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu	
250 255 260	
gaa ggc tca gag act cag gtc cca gga ctg gac ata tct gca ctc ctg	963
Glu Gly Ser Glu Thr Gln Val Pro Gly Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu	
265 270 275 280	
ccc tct gac ttc agc cgc tac ttc caa tat gag ggg tct ctg act aca	1011
Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Phe Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr	
285 290 295	
ccg ecc tgt gcc cag ggt gtc atc tgg act gtg ttt aac cag aca gtg	1059
Pro Pro Cys Ala Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val	
300 305 310	
atg ctg agt gct aag cag ctc cac acc ctc tct gac acc ctg tgg gga	1107
Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly	
315 320 325	
atg ctg agt gct aag cag ctc cac acc ctc tct gac acc ctg tgg gga	1107
Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly	
315 320 325	
cct ggt gac tct cgg cta cag ctg aac ttc cga gcg acg cag cct ttg	1155
Pro Gly Asp Ser Arg Leu Gln Leu Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu	
330 335 340	
aat ggg cga gtg att gag gcc tcc ttc cct gct gga gtg gac agc agt	1203
Asn Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser	
345 350 355 360	
cct cgg gct gct gag cca gtc cag ctg aat tcc tgc ctg gct gct ggt	1251
Pro Arg Ala Ala Glu Pro Val Gln Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala Gly	
365 370 375	
gac atc cta gcc ctg gtt ttt ggc ctc ctt ttt gct gtc acc agc gtc	1299
Asp Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val	
380 385 390	

gcg ttc ctt gtg cag atg aga agg cag cac aga agg gga acc aaa ggg 1347
 Ala Phe Leu Val Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly
 395 400 405

ggt gtg agc tac cgc cca gca gag gta gcc gag act gga gcc 1389
 Gly Val Ser Tyr Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
 410 415 420

tagaggctgg atcttgaga atgtgagaag ccagccagag gcacttgagg gggagccggt 1449

aactgtcctg tctgtctcat tatgccactt ccttttaact gccagaanaat tttttaaaat 1509

aatatttat aat 1522

<210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 2
 Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala
 -35 -30 -25

Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 -20 -15 -10

Met Pro Val His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro
 -5 -1 1 5 10

Leu Gly Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp
 15 20 25

Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu
 30 35 40

Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 45 50 55

Glu Val Lys Pro Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp
 60 65 70 75

Leu Pro Thr Val Glu Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn Asn
 80 85 90

Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly
 95 100 105

Gly Asp Pro Pro Trp Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe
 110 115 120

Gln Ser Pro Val Asp Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala
 125 130 135

Leu Arg Pro Leu Glu Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu
 140 145 150 155

Leu Arg Leu Arg Asn Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro
 160 165 170

Gly Leu Glu Met Ala Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln
 175 180 185

Leu His Leu His Trp Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr
 190 195 200

Val Glu Gly His Arg Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser
 205 210 215

Thr Ala Phe Ala Arg Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu
 220 225 230 235

Ala Val Leu Ala Ala Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala
 240 245 250

Tyr Glu Gln Leu Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser
 255 260 265

Glu Thr Gln Val Pro Gly Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp
 270 275 280

Phe Ser Arg Tyr Phe Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys
 285 290 295

Ala Gln Gly Val Ile Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser
 300 305 310 315

Ala Lys Gln Leu His Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp
 320 325 330

Ser Arg Leu Gln Leu Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg
 335 340 345

Val Ile Glu Ala Ser Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser Pro Arg Ala
 350 355 360

Ala Glu Pro Val Gln Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala Gly Asp Ile Leu
 365 370 375

Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala Phe Leu
 380 385 390 395

Val Gln Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser
 400 405 410

Tyr Arg Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
 415 420

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 3
 cgcccagtggt gtcattcttc ccagaagag 29

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 4
 ggaatcctcc tgcattcgg 19

<210> 5
 <211> 10898
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Gen
 <222> (1)..(10898)

<400> 5
 ggatcctggt gactcgtgac cttaccccca accctgtgct ctctgaacca tgagctgtgt 60
 ccactcggg ttaaattgat taaggcgggt gcaagatgtg ctttggttaa cagatgcttg 120
 aaggcagcat gtcgtttaag agtcatcacc aatccctant ctcaagtaat cagggacaca 180

aacactgegg aaggccgcag ggtcctctgc ctaggaaaac cagagacctt tgttcacttg 240
tttatctgac cttccctcca ctattgtcca tgacctgcc aaatccccct ctgtgagaaa 300
cacccaagaa ttatcaataa aaaaataaat ttaaaaaaaaa aatacaaaaa aaaaaaaaaa 360
aaaaaaaaaa gacttacgaa tagttattga taatgaata gctattggta aagccaagta 420
aatgatcata ttcaaaacca gacggccatc atcacagctc aagtctacct gatttgatct 480
ctttatcatt gtcattcttt ggattcaeta gattagtcac catcctcaa attctcccc 540
aagttctaatac tacgttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttgaacct actaccttct 600
ttgcttttga gccatgagtt gtaggaatga tgagtttaca ccttacatgc tggggattaa 660
tttaaacttt acctctaagt cagttgggta gcctttggct ttttttga gctaattttg 720
tagttaatgg atgcactgtg aatcttgcta tgatagtttt cctccacact ttgccactag 780
gggtaggtag gtactcagtt ttcagtaatt gcttacctaa gaccctaage cctatttctc 840
ttgtactggc ctttatctgt aataggggca tatttaatac aatataattt ttggagtttt 900
tttgtttggt tgtttggttg ttttttgag acggagtett gcactctgca tgeccaggct 960
ggagtagcag tgggtccatc teggetcact gcaagctcca cctccccagt tcacgccatt 1020
ttcctgcctc agcctcccga gtagctggga ctacagggc cggccaccat gccgggctaa 1080
ttttttgtat ttttggtaga gacgggggtt caccgtgta gccagaatgg tctcgatctc 1140
ctgacttcgt gatccaccog cctcggcctc ccaaagttct gggattacag gtgtgagcca 1200
ccgcacctgg ccaatttttt gactctttta aagtaaaaat atgtcttgta agctggtaac 1260
tatggtacat ttccttttat taatgtggtg ctgacggtea tatagttct tttgagtttg 1320
gcctgcatac gctacttttt gcagtccttt cattacattt ttctctcttc atttgaagag 1380
catgttatat cttttagctt cacttggctt aaaagttct ctcattagcc taacacagtg 1440
tcattgttgg taccacttgg atcataagtg gaaaaacagt caagaaattg cacagtaata 1500
cttgtttgta agagggatga ttcaggtgaa tctgacacta agaaactccc ctacctgagg 1560
tctgagatte ctctgacatt gctgtatata ggcttttctt ttgacagcct gtgactgcgg 1620

actatcttcc ttaagcaaga tatgctaaag tttgtgagc cttttccag agagaggtct 1680
 catatctgca tcaagtgaga acatataatg tctgcatggt tccatatttc aggaatgttt 1740
 gcttgtgttt tatgctttta tatagacagg gaaacttggt cctcagtgac ccaaaagagg 1800
 tgggaattgt tattggatat catcattggc ccacgctttc tgaccttggg aacaattaag 1860
 ggttcataat ctoaattctg tcagaattgg tacaagaaat agctgctatg tttcttgaca 1920
 ttccacttgg taggaaataa gaatgtgaaa ctcttcagtt ggtgtgtgtc cctngttttt 1980
 ttgcaatttc cttcttactg tgtaaaaaa agtatgatc ttgctctgag aggtgaggca 2040
 ttcttaatac tgatctttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgtctttatt 2100
 ataataaga taatttgtct ttaacagaat caataatata atcccttaa ggattatctc 2160
 tttgctgggc gcagtggctc acacctgta tcccagcact ttgggtggcc aaggtggaag 2220
 gatcaaattt gctacttct atattatctt ctaaagcaga attcatctct ctccctcaa 2280
 tatgatgata ttgacagggg ttgccctcac tcaactagatt gtgagctect gtcagggca 2340
 ggtagcgttt tttgttttg tttttgttt tctttttga gacaggtctc tgetctgtca 2400
 cccaggccag agtgcaatgg tacagtctca gctcactgca gcctcaaccg cctcggctca 2460
 aacctcatc ccatttcagc ctctgagta gctgggacta caggcacatg ccattacacc 2520
 tggctaattt tttgtattt ctatagaga cagggtttg ccattgtgcc cgggctggtc 2580
 tgaactctt ggactcaagc aatccacca cctcagctc ccaaatgag ggaccgtgtc 2640
 ttattcattt ccattgcctt agtccatagc ccagtgtgtg acctatggtg gtactaata 2700
 aatatttgtt gaatgcaata gtaaatagca tttcagggag caagaactag attaacaaag 2760
 gtggtaaaag gtttgagaaa aaaaataata gtttaatttg gctagagtat gagggagagt 2820
 agtaggagac aagatggaaa ggtctcttgg gcaaggtttt gaaggaagt ggaagtcaga 2880
 agtacacaat gtcatatcg tggcaggcag tggggagcca atgaaggctt ttgagcagga 2940
 gagtaatgtg ttgaaaaata aatataagtt aaacctatca gagccctct gacacatata 3000
 cttgcttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc cattaactaa ctcacctcag 3060

ggctccccta gcagcctgcc ctacctcttt acctgcttcc tggaggagtc agggatgtat 3120
 acatgagctg ctttccctct cagccagagg acatgggggg ccccagctcc cctgccttcc 3180
 cccttctgtg cctggagctg ggaagcaggc cagggttagc tgaggctggc tggcaagcag 3240
 ctgggtgggt ccagggagag cctgcatagt gccaggtggt gccttggggt ccaagctagt 3300
 ccatggcccc gataaccttc tgctgtgca cacacctgcc cctcactcca cccccatcct 3360
 agctttggta tgggggagag ggcacagggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 3420
 tctgcaaaag ggcgctctgt gagtcagcct gctcccctcc aggcttctc cccccacc 3480
 cagctctcgt ttccaatgca cgtacagccc gtacacaccg tgtgctggga cccccacag 3540
 tcagccgat ggctcccctg tgccccagcc cctggctccc tctgttgatc cggccccctg 3600
 ctccaggcct cactgtgcaa ctgctgctgt cactgctgct tctggtgect gtccatcccc 3660
 agaggttgcc ccgatgcag gaggattccc cctggggagg aggctcttct ggggaagatg 3720
 acccactggg cgaggaggat ctgcccagtg aagaggattc acccagagag gaggatccac 3780
 ccggagagga ggatctacct ggagaggagg atctacctgg agaggaggat ctacctgaag 3840
 ttaagcctaa atcagaagaa gagggtccc tgaagttaga ggatctacct actggtgagg 3900
 ctctggaga tcctcaagaa cccagaata atgcccacag ggacaaagaa ggtaagtggg 3960
 catcaatctc caaatccagg ttccaggagg ttcatgactc ccctcccata ccccagccta 4020
 ggctctgttc actcagggaa ggaggggaga ctgtactccc cacagaagcc cttccagagg 4080
 tcccatacca atatccccat cccactctc ggaggtagaa agggacagat gtggagagaa 4140
 aataaaagg gtgcaaaagg agagaggtga gctggatgag atgggagaga agggggaggc 4200
 tggagaagag aaaggatga gaactgcaga tgagagaaaa aatgtgcaga cagaggaaaa 4260
 aataggtgg agaaggagag tcagagagtt tgaggggaag agaaaaggaa agcttgggag 4320
 gtgaagtggg taccagagac aagcaagaag agctggtaga agtcatctca tcttaggcta 4380
 caatgaggaa ttgagacctt ggaagaaggg acacagcagg tagagaaacg tggcttcttg 4440
 actccaagc caggaatttg gggaaagggg ttggagacca tacaaggcag agggatgagt 4500

ggggagaaga aagaagggag aaaggaaga tgggtgtactc actcatttgg gactcaggac 4560
tgaagtgecc actcactttt tttttttttt tttttgagac aaactttcac ttttgttgcc 4620
caggctggag tgcaatggcg cgatctcggc tcaactgcaac ctccacctcc cggggtcaag 4680
tgattctect gcctcagcct ctagccaagt agctgcgatt acaggcatgc gccaccacgc 4740
cgggtaatt tttgtatttt tagtagagac ggggtttcgc catggtggtc aggctggctc 4800
cgaactcctg atctcaggtg atccaaccac cctggcctcc caaagtgctg ggattatagg 4860
cgtgagccac agcgcctggc ctgaagcagc cactcacttt tacagaccct aagacaatga 4920
ttgcaagctg gtaggattgc tgtttggccc acccagctgc ggtggtgagt ttgggtgcgg 4980
tctcctgtgc tttgcacctg gcccgcttaa ggcatttgtt acccgtaatg ctctgtgaag 5040
gcactctgct tttgtacatc gttttggctc ccaggaaggg attggggctc taagcttgag 5100
cggttcatcc ttttcattta tacaggggat gaccagagtc attggcgcta tggaggtgag 5160
acaccacccc gctgcacaga cccaatctgg gaaccagct ctgtggatct cccctacagc 5220
cgteectgaa cactggtecc gggcgtccca cccgcgccc accgtccac cccctcacct 5280
tttctaccg ggttccctaa gttcctgacc taggcgtcag acttctcac tatactctcc 5340
caccacagc gaccgcctt ggccccgggt gtccccagc tgcgcgggccc gcttccagtc 5400
cccggtgat atccgcccc agctcgccc cttctgccc gccctgcgcc ccctggaact 5460
cctgggcttc cagctcccc cgctcccaga actgcgctg cgcaacaatg gccacagtgg 5520
tgagggggtc tccccccga gacttgggga tggggcgggg cgcaggggaag ggaaccgtcg 5580
cgcagtgcct gcccgggggt tgggtggcc ctaccggcg gggcggctc acttgcctct 5640
ccctacgcag tgcaactgac cctgcctect gggctagaga tggctctggg tcccgggccc 5700
gagtaccggg ctctgcagct gcactgcac tggggggctg caggtcgtcc gggctcggag 5760
cacactgtgg aaggccaccg tttccctgcc gaggtgagcg cggactggcc gagaaggggc 5820
aaaggagcgg ggcggacggg ggccagagac gtggccctct cctaccctcg tgccttttc 5880
agatccacgt ggttcacctc agcaecgct ttgccagagt tgacgagccc ttggggcgcc 5940

ggggaggcct ggccgtggtg gccgcctttc tggaggtacc agatcctgga caccccctac 6000
tccccgcttt cccatcccat gtcctccccg gactctatcg tggagccaga gaccccatcc 6060
cagcaagctc actcaggccc ctggctgaca aactcattca cgcactgttt gttcatttaa 6120
cacccactgt gaaccaggca ccagccccca acaaggattc tgaagctgta ggtccttgcc 6180
tctaaggagc ccacagccag tgggggagc tgacatgaca gacacatagg aaggacatag 6240
taaagatggt ggtcacagag gaggtgacac ttaaagcctt cactggtaga aaagaaaagg 6300
agggtttcat tgcagaggaa acagaatgtg caaagactca gaatatggcc tatttaggga 6360
atggctacat acaccatgat tagaggagc ccagtaaagg gaagggatgg tgagatgcct 6420
gctaggttca ctcaactcact tttatttatt tatttatttt ttgacagtc tctctgtcgc 6480
ccaggctgga gtgcagtggg gtgatcttgg gtcactgcaa cttccgcctc ccgggttcaa 6540
gggattctcc tgcctcagct tcttgagtag ctggggttac aggtgtgtgc caccatgcc 6600
agctaatttt tttttgtatt tttagtagac agggtttcac catgttggtc aggctggtct 6660
caaaactctg gctcaagtg atccgctga ctccagctac caaagtgtg attacaagtg 6720
tgagccaccg tgcccagcca cactcactga ttctttaatg ccagccacac agcacaagt 6780
tcagagaaat gcctccatca tagcatgtca atatgttcat actcttaggt tcatgatgtt 6840
cttaacatta ggttcataag caaaataaga aaaaagaata ataaataaaa gaagtggcat 6900
gtcaggacct cacctgaaaa gccaaacaca gaatcatgaa ggtgaatgca gaggtgacac 6960
caacacaaag gtgtatatat ggtttctctgt ggggagtatg tacggaggca gcagtgagtg 7020
agactgcaa cgtcagaagg gcacgggtca ctgagagcct agtatcctag taaagtggc 7080
tctctccctc tctctccagc ttgtcattga aaaccagtcc accaagcttg ttggttcgca 7140
cagcaagagt acatagagtt tgaantaata cataggattt taagagggag aactgtctc 7200
taaaaaaaaa aacaacagca acaacaaaaa gcaacaacca ttacaatttt atgttccctc 7260
agcattctca gagctgagga atgggagagg actatgggaa ccccttcat gttccggcct 7320
tcagccatgg ccctggatac atgcactcat ctgtcttaca atgtcattcc cccaggagg 7380

cccggaagaa aacagtgcct atgagcagtt gctgtctcgc ttggaagaaa tcgctgagga 7440
 aggtcagttt gttggtctgg ccactaatct ctgtggccta gttcataaag aatcaccctt 7500
 tggagcttca ggtctgaggg tggagatggg ctccctccag tgcaggaggg attgaagcat 7560
 gagccagcgc tcctcttgat aataaccatg aagctgarag acacagttac ccgcaaacgg 7620
 ctgcctacag attgaaaacc aagcaaaaac cgccgggcac ggtggetcac gcctgtaate 7680
 ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg 7740
 gccaacatgg tgaaacccca tctctactaa aaatacgaaa aaatagccag gcgtggtggc 7800
 gggtgctgt aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaattggcat gaacccggga 7860
 ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc cactgcactc cagcctgggc aacagagcga 7920
 gactcttgtc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaaccaag caaaaaccaa aatgagacaa 7980
 aaaaaacaag accaaaaaat ggtgtttgga aattgtcaag gtcaagtctg gagagctaaa 8040
 ctttttctga gaactgttta tctttaataa gcatacaata ttttaacttt gtaaatactt 8100
 ttgttgaaa tcgttctctt cttagtcaact cttgggtcat tttaaatctc acttactcta 8160
 ctagaccttt taggtttctg ctagactagg tagaactctg cctttgcatt tcttgtgtct 8220
 gttttgtata gttatcaata ttcataatta tttacaagtt attcagatca ttttttcttt 8280
 tctttttttt tttttttttt ttttttacct ctttagtaga gacagggttt caccatattg 8340
 gccaggetgc tctcaactc ctgacctgt gatccaccag cctcggcctc ccaaagtgt 8400
 gggattcatt ttttcttttt aatttgctct gggttaaac ttgtggccca gcactttatg 8460
 atggtacaca gagttaagag tgtagactca gacggtcttt cttcttctct tctcttctt 8520
 cctcccttcc ctcccactt cccttctctc ctctcttctt ttcttctctt ctgcttctt 8580
 caggctctt ccagttgctc caaagccctg tacttttttt tgagttaacg tcttatggga 8640
 agggcctgca cttagtgaag aagtggctc agagttgagt taccttggct tctgggaggt 8700
 gaaactgtat ccctatacc tgaagcttta agggggtgca atgtagatga gacccaaca 8760
 tagatctct tcacaggctc agagactcag gtcccaggac tggacatate tgcactcctg 8820

ccctctgact tcagccgcta cttccaatat gaggggtctc tgactacacc gccctgtgcc 8880
 caggtgtca tctggactgt gtttaaccag acagtgatgc tgagtgctaa gcaggtgggc 8940
 ctgggggtgtg tgtggacaca gtgggtgcgg gggaaagagg atgtaagatg agatgagaaa 9000
 caggagaaga aagaaatcaa ggctgggctc tgtggcttac gcctataatc ccaccacgtt 9060
 gggaggctga ggtgggagaa tggtttgagc ccaggagttc aagacaaggc ggggcaacat 9120
 agtgtgacct catctctacc aaaaaaaccc caacaaaacc aaaaatagcc gggcatggtg 9180
 gtatcgggcc tagtcccagc tactcaagga ggctgaggtg ggaagatgc ttgattccag 9240
 gagtttgaga ctgcagtgag ctatgatccc accactgcct accatcttta ggatacattt 9300
 atttatztat aaaagaaatc aagaggctgg atggggaata caggagctgg aggggtggagc 9360
 cctgaggtgc tggttgtgag ctggcctggg acccttgttt cctgtcatgc catgaaccca 9420
 cccacactgt ccactgacct ccctagctcc acacctctc tgacacctg tggggacctg 9480
 gtgactctcg gctacagctg aacttccgag cgacgcagcc tttgaatggg cgagtgattg 9540
 aggcctcctt ccctgctgga gtggacagca gtccctgggc tgctgagcca ggtacagctt 9600
 tgtctggtt cccccagcc agtagtccct tatectccca tgtgtgtgcc agtgtctgtc 9660
 attggtggtc acagcccgcc tctcacatct cctttttctc tccagtcag ctgaattcct 9720
 gcctggctgc tggtagtct gccctctc tgggtctga tgccaggaga ctctcagca 9780
 ccatteagcc ccagggtgc tcaggaccgc ctctgtccc tctccttttc tgcagaacag 9840
 accccaaccc caatattaga gaggcagatc atggtgggga ttccccatt gtccccagag 9900
 gctaattgat tagaatgaag cttgagaaat ctcccagcat cctctcgcga aaagaatccc 9960
 cccccctttt tttaaagata gggctctact ctgtttgcc caggctgggg tgttgtggca 10020
 cgatcatagc tcaactgcagc ctogaactcc taggctcagg caatccttc accttagctt 10080
 ctcaaagcac tgggactgta ggcattgagc actgtgcctg gcccmaacg gcccttttac 10140
 ttggctttta ggaagcaaaa acggtgctta tcttaccctc tctctgtgat ccacctcat 10200
 cccttggtg gcctctctc gagactgagg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca 10260

ggggtggtgg agtgcactga ggcaggtgtt gaggaactct gcagaccctt cttccttccc 10320
 aaagcagccc tctctgctct ccategcagg tgacatccta gccctggttt ttggcctcct 10380
 ttttgctgtc accagcgtcg cgttccttgt gcagatgaga aggcagcaca ggtattacac 10440
 tgaccctttc ttcaggcaca agcttcccc acccttgtgg agtcacttca tgcaaagcgc 10500
 atgcaamtga gctgctcctg ggcagtttt ctgattagcc tttcctgttg tgtacacaca 10560
 gaaggggaac caaagggggg gtgagctacc gccagcaga ggtagccgag actggagcct 10620
 agaggctgga tcttgagaaa tgtgagaagc cagccagagg catctgaggg ggagccggtg 10680
 actgtcctgt cctgctcatt atgccaette cttttaactg ccaagaaatt ttttaaata 10740
 aatatttata ataaaatag tgttagtcac ctttgttccc caaatcagaa ggaggtattt 10800
 gaatttcta ttactgttat tagcaccaat ttagtggtaa tgcatttatt ctattacagt 10860
 tcggcctcct tccacacatc actccaatgt gttgctcc 10898

<210> 6
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 6
 Met Ala Pro Leu Cys Pro Ser Pro Trp Leu Pro Leu Leu Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Gly Leu Thr Val Gln Leu Leu Ser Leu Leu Leu Leu
 20 25 30

Met Pro Val His Pro
 35

<210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 7
 tggggttctt gaggatctcc aggag 25

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 8
 ctctaacttc agggagccct cttctt 26

<210> 9
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Primer_Bind
 <222> (1)..(48)

<400> 9
 cuacuacuac uaggccacgc gtcgactagt acgggnnggg nngggngg 48

<210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 10
 Glu Glu Asp Leu Pro Ser
 1 5

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 11
 Gly Glu Asp Asp Pro Leu
 1 5

<210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 12

Asn Asn Ala His Arg Asp Lys Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg
 1 5 10 15

Tyr Gly Gly Asp Pro
 20

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 13
 His Pro Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro Leu Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 14
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 14
 Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly
 20

<210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 15
 Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln
 1 5 10

<210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 16
 Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser Tyr Arg
 1 5 10 15

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 17

gtcgctagct ccatgggtca tatgcagagg ttgccccgga tgcag 45

<210> 18

<211> 43

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 18

gaagatctct tactcgagca ttctccaaga tccagcctct agg 43

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 19

ctccatctct 10

<210> 20

<211> 10

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 20

ccacccccat 10

<210> 21

<211> 205

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 21

acctgccct cactccaccc ccctcctagc ttgggtatgg gggagagggc acagggccag 60

acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaagggc gctctgtgag tcagcctgct 120

ccctccagg cttgctcctc ccccacccag ctctcgtttc caatgcacgt acagcccgta 180

cacaccgtgt gctgggacac cccac 205

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 22
Leu Glu His His His His His His
1 5

<210> 23
<211> 10
<212> DNA
<213> HUMAN

<220>
<221> versch_Eigenschaften
<222> (1)..(10)

<400> 23
yyycayyyyy 10

<210> 24
<211> 10
<212> DNA
<213> HUMAN

<300>
<301> Locker und Buzard,
<303> DNA-Sequenzierung und Kartierung
<304> 1
<306> 3-11
<307> 1990

<400> 24
tgtgagactt 10

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> HUMAN

<220>
<221> Stelle
<222> (1)..(4)

<400> 25
Ser Pro Xaa Xaa
1

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> HUMAN

<220>
<221> Stelle
<222> (1)..(4)

<400> 26
Thr Pro Xaa Xaa
1

<210> 27
<211> 540
<212> DNA
<213> HUMAN

<220>
<221> Promotor
<222> (1)..(540)

<400> 27
cttgcttttc attcaagctc aagtttgtct cccacatacc cattacttaa ctcaccctcg 60
ggctccccta gcagcctgcc ctacctcttt acctgcttcc tggaggagtc agggatgtat 120
acatgagctg ctttccctct cagccagagg acatgggggg ccccagctcc cctgccttcc 180
cccttctgtg cctggagctg ggaagcaggc cagggttagc tgaggetggc tggcaagcag 240
ctgggtggtg ccaggagag cctgcatagt gccagggtgt gccttgggtt ccaagctagt 300
ccatggcccc gataaccttc tgccctgtgca cacacctgcc cctcactcca cccccatcct 360
agctttggta tgggggagag ggcacagggc cagacaaacc tgtgagactt tggctccatc 420

tctgcaaaag ggegctctgt gagtcagcct gctccccctcc aggcttgctc ctccccacc 480

cagctctcgt ttccaatgca cgtacagccc gtacacaccg tgtgctggga caccaccag 540

<210> 28

<211> 445

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Exon

<222> (1)

<223> 1. Exon von MN

<400> 28

gccccacac accgtgtgct gggacacccc acagtcagcc gcctggctcc 50

cctgtgcccc agccccctggt tccctctggt gatccccggcc cctgetccag 100

gcctcactgt gcaactgctg ctgtcactgc tgcttctggt gcctgtccat 150

ccccagaggt tgccccggat gcaggaggat tcccccttgg gaggaggtc 200

ttctggggaa gatgaccac tgggcgagga ggatctgccc agtgaagagg 250

attcaccag agaggaggat ccaccggag aggaggatct acctggagag 300

gaggatctac ctggagagga ggatctacct gaagttaagc ctaaaccaga 350

agaagagggc tccctgaagt tagaggatct acctactgtt gaggctcctg 400

gagatcctca agaaccccag aataatgccc acagggacaa agaag 445

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Exon

<222> (1)

<223> 2. Exon von MN

<400> 29

gggatgacca gagtcattgg cgctatggag 30

<210> 30
 <211> 171
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon
 <222> (1)
 <223> 3. Exon von MN

<400> 30
 gcgaccgcc ctggccccgg gtgtccccag cctgcggggg ccgcttcag 50
 tccccggtgg ataccgcc ccagctgcc gcctctgcc cggccctgag 100
 cccctggaa ctctgggct tccagctccc gccctccca gaactggcc 150
 tgcgcaacaa tggccacagt g 171

<210> 31
 <211> 143
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon
 <222> (1)
 <223> 4. Exon von MN

<400> 31
 tgcaactgac cctgcctect gggctagaga tggctctygg tcccgggagg 50
 gactaccggg ctctgcagct gcactctgac tggggggctg caggctgtec 100
 gggctcggag cacactgtgg aaggccaccg ttccctgcc gag 143

<210> 32
 <211> 93
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon
 <222> (1)
 <223> 5. Exon von MN

<400> 32
 atccacgtgg ttcacctcag caccgccttt gccagagttg acgaggectt 50
 ggggcgcccg ggaggcctgg ccgtgttggc cgcctttctg gag 93

<210> 33
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon
 <222> (1)
 <223> 6. Exon von MN

<400> 33
 gagggcccgg aagaaaacag tgcctatgag cagttgctgt ctgccttgga 50
 agaaatcgct gaggaag 67

<210> 34
 <211> 158
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon
 <222> (1)
 <223> 7. Exon von MN

<400> 34
 gctcagagac tcaggtecca ggactggaca tatctgeact cctgccctct 50
 gacttcagcc gctacttcca atatgagggg tctctgacta caccgcctg 100
 tgcccagggt gtcactctgga ctgtgtttaa ccagacagtg atgctgagtg ctaagcag 158

<210> 35
 <211> 145
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Exon

<222> (1)

<223> 8. Exon von MN

<400> 35

ctccacaccc tctctgacac cctgtgggga cctggtgact ctcggctaca 50

gctgaacttc cgagcgacgc agcctttgaa tgggcgagtg attgaggcct 100

ccttcctgc tggagtggac agcagtcctc gggctgctga gccag 145

<210> 36

<211> 27

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Exon

<222> (1)

<223> 9. Exon von MN

<400> 36

tcacagtgaa ttctgcctg gctgctg 27

<210> 37

<211> 82

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Exon

<222> (1)

<223> 10. Exon von MN

<400> 37

gtgacatect agccctgggt tttggcctcc tttttgctgt caccagcgtc 50

gcgttccttg tgcagatgag aaggcagcac ag 82

<210> 38

<211> 191

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Exon

<222> (1)

<223> 11. Exon von MN

<400> 38

aaggggaacc aaagggggtg tgagctaccg cccagcagag gtagccgaga 50
ctggagccta gaggctggat cttggagaat gtgagaagcc agccagaggc 100
atctgagggg gagccggtaa ctgtcctgtc ctgtcatta tgccacttcc 150
ttttaactgc caagaaatth tttaaaataa atatttataa t 191

<210> 39

<211> 1174

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(1174)

<223> 1. Intron von MN

<400> 39

gtaagtggtc atcaatctcc aatccaggt tccaggaggt tcatgactcc cctcccatac 60
cccagcctag gctctgttca ctccaggaag gaggggagac tgtactcccc acagaagccc 120
ttccagaggt cccataccia tatccccatc cccactctcg gaggtagaaa gggacagatg 180
tggagagaaa ataaaaaggg tgcaaaagga gagaggtgag ctggatgaga tgggagagaa 240
gggggaggct ggagaagaga aagggatgag aactgcagat gagagaaaaa atgtgcagac 300
agaggaaaaa aataggtgga gaaggagagt cagagagttt gagggaaga gaaaaggaaa 360
gcttgggagg tgaagtgggt accagagaca agcaagaaga gctggtagaa gtcattctcat 420
cttaggctac aatgaggaat tgagacctag gaagaagga cacagcaggt agagaaacgt 480
ggcttcttga ctccaagcc aggaatttgg gaaaggggt tggagaccat acaaggcaga 540
gggatgagtg gggagaagaa agaagggaga aaggaaagat ggtgtactca ctcatttggg 600
actcaggact gaagtgcccc ctacttttt ttttttttt ttttgagaca aactttcact 660
tttgttccc aggctggagt gcaatggcgc gatctggct cactgcaacc tccacctccc 720

gggttcaagt gattctcctg cctcagcctc tagccaagta gctgcgatta caggcctgcg 780
 ccaccacgcc cggetaattt ttgtattttt agtagagacg gggtttegcc atggttggtca 840
 ggctggctct gaactcctga tctcaggtga tccaaccacc ctggcctccc aaagtgctgg 900
 gattatagggc gtgagccaca ggcctggcc tgaagcagcc actcactttt acagacccta 960
 agacaatgat tgcaagctgg taggattgct gtttgGCCca cccagctgcg gtggttagtt 1020
 tgggtgCGgt ctctgtgct ttgcacctgg cccgcttaag gcatttgta cccgtaatgc 1080
 tcctgtaagg catctgCGtt tgtgacatcg ttttggtcgc caggaaggga ttggggctct 1140
 aagctlgagc ggttcatcct tttcatttat acag 1174

<210> 40
 <211> 193
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Intron
 <222> (1)..(193)
 <223> 2. Intron von MN

<400> 40
 gtgagacacc caccCGctgc acagacccaa tctgggaacc cagctctgtg gatctccct 60
 acagcCGtcc ctgaacactg gtccCGggcg tcccaccgc cgcccacCGt cccaccct 120
 caactttct accCGggtc cctaagttcc tgacctagc gtcagactt ctcactatac 180
 tctcccacc cag 193

<210> 41
 <211> 131
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Intron
 <222> (1)..(131)
 <223> 3. Intron von MN

<400> 41

gtgaggggggt ctccccgccg agacttgggg atggggcggg gcgcagggaa gggaaaccgtc 60
 gcgcagtgcc tgcceggggg ttgggtggc cctaccgggc ggggccggct cacttgctc 120
 tccctacgca g 131

<210> 42
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Intron
 <222> (1)..(89)
 <223> 4. Intron von MN

<400> 42
 gtgagcgcgg actggccgag aaggggcaaa ggagcggggc ggacgggggc cagagacgtg 60
 gccctctcct accctcgtgt ccttttcag 89

<210> 43
 <211> 1400
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <221> Intron
 <222> (1)..(1400)
 <223> 5. Intron von MN

<400> 43
 gtaccagatc ctggacaccc cctactcccc gctttcccat cccatgctcc tcccggactc 60
 tatcgtggag ccagagaccc catcccagca agtcactca ggccctggc tgacaaaactc 120
 attcacgcac tgtttgttca tttaacaccc actgtgacc aggcaccagc ccccaacaag 180
 gattctgaag ctgtagggtc ttgcctctaa ggagcccaca gccagtgggg gaggctgaca 240
 tgacagacac ataggaagga catagtaaag atggtgggtca cagaggaggt gacacttaa 300
 gccttcactg gtagaaaaga aaaggaggtg ttcattgcag aggaaacaga atgtgcaaa 360
 actcagaata tgccctattt agggaatggc tacatacacc atgattagag gaggccag 420

aaaggggaagg gatggtgaga tgcttctag gttcactcac tcaacttttat ttattttatt 480
 atttttttga cagtctctct gtcgcccagg ctggagtgca gtggtgtgat cttgggtcac 540
 tgcaacttcc gcttcccggg ttcaagggat tctctgcct cagcttctctg agtagctggg 600
 gttacaggtg tgtgccacca tgcccagcta attttttttt gtatttttag tagacaggtg 660
 ttcaccatgt tggtcaggct ggtctcaaac tcttggcctc aagtgatccg cctgactcag 720
 cctaccaaaag tgctgattac aagtgtgagc caccgtgcc cagccacactc actgattctt 780
 taatgccagc cacacagcac aaagttcaga gaaatgcctc catcatagca tgtcaatatg 840
 ttcatactct taggttcatg atgttcttaa cattaggttc ataagcaaaa taagaaaaaa 900
 gaataataaa taaaagaagt ggcattgtcag gacctcacct gaaaagccaa acacagaatc 960
 atgaaggtga atgcagaggt gacaccaaca caaaggtgta tatatggttt cctgtgggga 1020
 gtatgtacgg aggcagcagt gagtgagact gcaaacgtca gaagggcacg ggtcactgag 1080
 agcctagtat cctagtaaag tgggctctct ccctctctct ccagcttgtc attgaaaacc 1140
 agtccaccaa gcttgttggg tgcacagca agagtacata gagtttgaaa taatacatag 1200
 gattttaaga gggagacact gtctctaaaa aaaaaaaca cagcaacaac aaaaagcaac 1260
 aaccattaca atttatgtt ccctcagcat tctcagagct gaggaatggg agaggactat 1320
 gggaaacccc ttcattgtcc ggccttcagc catggccctg gatacatgca ctcatctgtc 1380
 ttacaatgtc attccccag 1400
 <210> 44
 <211> 1334
 <212> DNA
 <213> HUMAN

 <220>
 <221> Intron
 <222> (1)..(1334)
 <223> 6. Intron von MN

 <400> 44
 gtcagtttgt tggctggcc actaatctct gtggcctagt tcataaagaa tcaccctttg 60

gagcttcagg tctgaggctg gagatgggct cctccagtg caggagggat tgaagcatga 120
 gccagcgctc atcttgataa taaccatgaa gctgacagac acagttaccg gcaaacggct 180
 gcttacagat tgaaaaccaa gcaaaaaccg ccgggcacgg tggctcacgc ctgtaatecc 240
 agcactttgg gaggccaagg cagggtggatc acgagggtcaa gagatcaaga ccatcctggc 300
 caacatggtg aaaccccatc tctactaaaa atacgaaaa atagccaggc gtggtggcgg 360
 gtgectgtaa tcccagctac tggggaggct gaggcaggag aatggcatga acccgggagg 420
 cagaagttgc agtgagccga gatcgtgcca ctgcaactcca gcctgggcaa cagagcgaga 480
 ctcttgctc aaaaaaaaaa aaaaaaaga aaaccaagca aaaacaaaa tgagacaaaa 540
 aaaacaagac caaaaaatgg tgtttgaaa ttgtcaaggt caagtctgga gagctaaact 600
 tttctgaga actgtttatc ttaataagc atcaaatatt ttaactttgt aaatactttt 660
 gttgaaatc gttctcttct tagtcaactc tgggtcattt taaatctcac ttactctact 720
 agacctttta ggttctgct agactaggta gaactctgcc tttgcatttc ttgtgtctgt 780
 tttgtatagt tatcaatatt catatttatt tacaagttat tcagatcatt tttcttttc 840
 tttttttttt tttttttttt ttttacatct ttagtagaga cagggtttca ccatattggc 900
 caggctgctc tcaaaactct gaccttgta tccaccagcc tggcctccc aaagtgctgg 960
 gattcatttt ttctttttta tttgctctgg gcttaactt gtggcccagc actttatgat 1020
 ggtacacaga gttaagagtg tagactcaga cggctttctt tcttctcttc tcttctctcc 1080
 tcccttccct cccactctcc ctctctctct tctttctttt ctctctctct tgcttctca 1140
 ggctcttcc agttgctcca aagccctgta cttttttttg agttaacgtc ttatgggaag 1200
 ggctgcact tagtgaagaa gtggtctcag agttgagtta ccttggcttc tgggaggtga 1260
 aactgtatcc ctataccctg aagctttaag ggggtgcaat gtagatgaga cccaacata 1320
 gatcctcttc acag 1334

<210> 45

<211> 512

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(512)

<223> 7. Intron von MN

<400> 45

gtgggcctgg ggtgtgtgtg gacacagtgg gtgcggggga aagaggatgt aagatgagat 60
gagaaacagg agaagaaaga aatcaaggct gggctctgtg gcttacgct ataatccac 120
cacgttggga ggctgaggtg ggagaatggt ttgagcccag gagttcaaga caaggcgggg 180
caacatagtg tgaccccatc tctaccaaaa aaacccaac aaaacaaaa atagccgggc 240
atggtggtat ggggcctagt cccagctact caaggaggct gaggtgggaa gatcgcttga 300
ttccaggagt ttgagactgc agtgagctat gatcccacca ctgcctacca tctttaggat 360
acatttattt atttataaaa gaaatcaaga ggctggatgg ggaatacagg agctggaggg 420
tggagccctg aggtgctggt tgtgagctgg cctgggacc ttgtttcctg tcatgccatg 480
aaccacacca cactgtccac tgacctcct ag 512

<210> 46

<211> 114

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(114)

<223> 8. Intron von MN

<400> 46

gtacagcttt gtctggttcc cccccagcca gtagtccctt atcctcccat gtgtgtgcca 60
gtgtctgtca ttggtggtca cagcccgcct ctcacatctc ctttttctct ccag 114

<210> 47

<211> 617

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(617)

<223> 9. Intron von MN

<400> 47

gtgagtctgc cctcctctct ggtcctgatg ccaggagact cctcagcacc attcagcccc 60
 agggctgctc aggaccgctt ctgctccttc tcctttttctg cagaacagac cccaacceca 120
 atattagaga ggcagatcat ggtggggatt cccccattgt cccagagggc taattgatta 180
 gaatgaagct tgagaaatct cccagcatcc ctctcgcaaa agaatcccc cccctttttt 240
 taaagatagg gtctcactct gtttgcccca ggetgggggtg ttgtggcagc atcatagctc 300
 actgcagcct cgaactccta ggctcaggca atcctttcac cttagcttct caaagcactg 360
 ggactgtagg catgagccac tgtgcctggc cccaaaaggc ccttttactt ggcttttagg 420
 aagcaaaaac ggtgcttate ttacccttct tcgtgtatcc accctcatcc cttggctggc 480
 ctctctgga gactgaggca ctatggggct gcctgagaac tcggggcagg ggtgggtggag 540
 tgcactgagg caggtgttga ggaactctgc agaccctctt tccttcccaa agcagccctc 600
 tetgctctcc atcgag 617

<210> 48

<211> 130

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> Intron

<222> (1)..(130)

<223> 10. Intron von MN

<400> 48

gtattacact gaccctttct tcaggcacia gettecccca cccttgtgga gtcacttcat 60
 gcaaagcgca tgcaaatgag ctgctcctgg gccagtttct tgattagcct ttctgttgt 120
 gtacacacag 130

<210> 49

<211> 1401

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 49

caaactttca cttttgttgc ccaggctgga gtgcaatggc gegatctcgg ctcaactgcaa 60
 cctccacctc cegggttcaa gtgattctcc tgccctcagcc tctagccaag tagctgcat 120
 tacaggcatg cgccaccacg cccggctaata tttgtattt ttagtagaga cggggtttcg 180
 ccatgttggc caggctggc tcgaactcct gatctcaggt gatccaacca ccctggcctc 240
 ccaaagtgtc gggattatag gcgtgagcca cagcgcctgg cctgaagcag ccactcactt 300
 ttacagacc ctaagacaatg attgcaagct ggtaggattg ctgtttggcc caccagctg 360
 cgggtgtgag tttgggtgcg gtctcctgtg ctttgcaact ggcccgtta aggcatttgt 420
 taccctaat gctcctgtaa ggcactctgcg tttgtgacat cgttttggc gccaggaagg 480
 gattggggct ctaagcttga cgggttcac ctttccattt atacagggga tgaccagagt 540
 cattggcgtc atggaggtga gacaccacc cgctgcacag acccaatctg ggaaccacg 600
 tctgtggatc tcccctacag ccgtccctga acactggctc cgggcgtccc acccgccgc 660
 caccgtcca ccccctacc tttctacc gggttcccta agttcctgac ctaggcgtca 720
 gacttctca ctatactctc ccaccccagg cgaccgcgc tggccccggg tgtcccacg 780
 ctgcggggc cgcttccagt ccccggtgga taccgccc cagctcgcg cttctgccc 840
 ggccctgcy cccctggaac tcctgggctt ccagctccc cgcctcccag aactgcgct 900
 gcgcaacaat ggccacagtg gtgagggggc ctcccgcgc agacttgggg atggggcggg 960
 gcgcagggaa gggaacctc gcgcagtgc tgcgggggg ttgggtggc cctaccggg 1020
 gggccggct cacttgcctc tccctacgca gtgcaactga cctgcctcc tgggctagag 1080
 atggctctgg gtcccggcg ggagtaccg gctctgcagc tgcacttca ctggggggct 1140
 gcaggctgc cgggtcggg gcacactgtg gaagccacc gtttccctgc cgaggtgagc 1200
 gcggactggc cgagaagggg caaaggagcg gggcggacgg gggccagaga cgtggccctc 1260
 tctaccctc gtgtcctttt cagatccacg tgggtcact cagcaccgc tttgccagag 1320

ttgacgagge cttggggcgc ccgggaggec tggccgtggt ggccgccttt ctggaggtac 1380

cagatcctgg acacccccta c

1401

<210> 50

<211> 59

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 50

Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu
1 5 10 15

Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
20 25 30

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro
35 40 45

Lys Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu
50 55

<210> 51

<211> 257

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 51

Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp Pro
1 5 10 15

Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp Ile
20 25 30

Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu Leu
35 40 45

Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn Asn
50 55 60

Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala Leu
65 70 75 80

Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp Gly
85 90 95

Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val Glu Gly His Arg Phe
 100 105 110

Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg Val
 115 120 125

Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala Phe
 130 135 140

Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu Ser
 145 150 155 160

Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu Thr Gln Val Pro Gly
 165 170 175

Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Phe Gln
 180 185 190

Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala Gln Gly Val Ile Trp
 195 200 205

Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His Thr
 210 215 220

Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp Ser Arg Leu Gln Leu Asn
 225 230 235 240

Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser Phe
 245 250 255

Pro

<210> 52

<211> 20

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 52

Ile Leu Ala Leu Val Phe Gly Leu Leu Phe Ala Val Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15

Phe Leu Val Gln
 20

<210> 53
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 53
 Met Arg Arg Gln His Arg Arg Gly Thr Lys Gly Gly Val Ser Tyr Arg
 1 5 10 15
 Pro Ala Glu Val Ala Glu Thr Gly Ala
 20 25

<210> 54
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 54
 Ser Ala Ser Glu Glu Pro Ser Pro Ser Glu Val Pro Phe Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Glu Pro Ser Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Val Arg Pro Phe Pro
 20 25 30
 Ser Val Val Leu Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Lys Glu Pro
 35 40 45
 Ser Pro Ser Glu Glu Pro Ser Ala Ser Glu Glu
 50 55

<210> 55
 <211> 470
 <212> RNA
 <213> HUMAN

<400> 55
 cauggccccg auaaccuncu gccugugcac acaccugccc cucacuccac ccccauccua 60
 gcunugguau gggggagagg gcacagggcc agacaaaccu gngagacuuu ggcuccaucu 120
 cugcaaaagg ggcucucugug agucagccug cucccccucca ggcuugcucc uccccaccc 180
 agencucguu uccaaugcac guacagcccc uacacaccgu gugcugggac accccacagu 240
 cagccgcaug gcucuccugu gccccagccc cuggcucccu cuguugaucc cggccccugc 300

uccaggccuc acugugcaac ugcugcuguc acugcugcuu cuggugccug uccaucceca 360
gagguugccc cggaugcagg aggauuccecc cuugggagga ggcucuucug gggagauga 420
cccacugggc gaggaggauc ugcccaguga agaggauuca cccagagagg 470

<210> 56
<211> 292
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 56
gtttttttga gacggagtct tgcattctgtc atgccaggc tggagtagca gtggtgccaat 60
ctcggctcac tgcaagctcc acctcccag ttcacgccat tttcctgcct cagcctcccg 120
agtagctggg actacaggcg cccgccacca tgcccggcta attttttcta tttttggtag 180
agaegggggtt tcaccgtgtt agccagaatg gtctcgatct cctgacttcg tgatccacc 240
gcctcggcct cccaaagttc tgggattaca ggtgtgagcc accgcacctg gc 292

<210> 57
<211> 262
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 57
tttttttttt gagacagggt cttgctctgt caccagccc agagtgcaat ggtacagtct 60
cagctcactg cagcctcaac cgctcggct caaacatca tccatttca gcctcctgag 120
tagctgggac tacaggcaca tgccattaca cctggcta at tttttgtat ttctagtaga 180
gacagggttt ggccatggtg cccgggtggt tctcgaactc ctggactcaa gcaatccacc 240
cacctcagcc tcccanaatg ag 262

<210> 58
<211> 2501
<212> DNA
<213> HUMAN

<220>
<221> versch_Merkmale

<222> (1)..(2501)

<400> 58

tgttgactcg tgacctacc cccaacctg tgctctctga aacatgagct gtgtccactc 60
 agggttaaat ggattaaggg cggtgcaaga tgtgctttgt taaacagatg cttgaaggca 120
 gcatgctcgt taagagtcac caccaatccc taatctcaag taatcaggga cacaaacct 180
 gcggaaggcc gcagggtcct ctgcctagga aaaccagaga cctttgttca cttgtttatc 240
 tgacctccc tccactattg tccatgacct tgccaatcc ccctctgtga gaaacaccca 300
 agaattatca ataaaaaaaaa aaatttaaaa aaaaaataca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360
 aaaagactta cgaatagtta ttgataaatg aatagctatt ggtaaagcca agtaaatgat 420
 catattcaaa accagacggc catcatcaca gctcaagtct acctgattg atctctttat 480
 cattgtcatt ctttggattc actagattag tcatcatcct caaaattctc cccaagttc 540
 taattacgtt ccaaacattt aggggttaca tgaagcttga acctactacc ttctttgctt 600
 ttgagccatg agttgtagga atgatgagtt tacaccttac atgctgggga ttaatttaaa 660
 ctttacctct aagtcagttg ggtagcctt ggcttatttt tgtagctaat tttgtagtta 720
 atggatgcac tgtgaatctt gctatgatag ttttctcca cactttgcca ctaggggtag 780
 gtaggtactc agttttcagt aattgcttac ctaagacct aagccctatt tctctgtac 840
 tggcctttat ctgtaatatg ggcataatta atacaatata atttttggag tttttttggt 900
 tgtttgtttg tttgtttttt tgagacggag tcttgcctc gtcctgccc ggctggagta 960
 gcagtggtgc catctggct cactgcaagc tccacctcc gagttcacgc cttttctctg 1020
 cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcgcccgcca ccctgcccgg ctaatttttt 1080
 gtatttttgg tagagacggg gtttcaccgt gttagccaga atggtctcga tctctgact 1140
 tcgtgatcca ccgcctcgg cctcccagg ttctgggatt acaggtgtga gccaccgcac 1200
 ctggccaatt ttttgagtct tttaaagtaa aaatagtct tgtaagctgg taactatggt 1260
 acatttctt ttattaatgt ggtgctgac gtcatatagg ttcttttgag ttggcatgc 1320
 atatgctact ttttgacgtc ctttcattac attttctct cttcatttga agagcatggt 1380

atatctttta gcttcacttg gcttaaaagg ttctctcatt agcctaacac agtgtcattg 1440
 ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aatacttgtt 1500
 tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaac tcccctacct gaggtctgag 1560
 attcctctga cattgctgta tataggcttt tcttttga ca gctgtgact gggactatt 1620
 tttcttaagc aagatatgct aaagttttgt gagccttttt ccagagagag gtctcatatc 1680
 tgcacaaagt gagaacatat aatgtctgca tgtttccata tttcaggaat gtttgcttgt 1740
 gttttatgct tttatataga cagggaaact tgttctcag tgaccnaaa gaggtgggaa 1800
 ttgttattgg atatcatcat tgcccacgc tttctgacct tggaaacaat taagggttca 1860
 taatctcaat tctgtcagaa ttggtacaag aatagctgc tatgtttctt gacattccac 1920
 ttggtaggaa ataagaatgt gaaactcttc agttggtgtg tgccctngt ttttttgcaa 1980
 tttccttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttctc tgagaggtga ggcattctta 2040
 atcatgatct ttaaagatca ataataat cctttcaagg attatgtctt tattataata 2100
 aagataattt gtctttaaca gaatcaataa tataatcct taaaggatta tatctttgct 2160
 gggcgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttgggt ggccaagggt gaaggatcaa 2220
 atttgctac ttctatatta tcttctaaag cagaattcat ctctcttccc tcaatatgat 2280
 gatattgaca gggtttgecc tcaactacta gattgtgagc tctgtctcag ggcaggtagc 2340
 gttttttgtt ttgtttttg tttttctttt ttgagacagg gtcttgcctt gtcaccagg 2400
 ccagagtga atggtacagt ctcaagctca tgcagctca accgctcgg ctcaaaccat 2460
 catccattt cagcctctg agtagctggg actacaggca c 2501

<210> 59

<211> 292

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> versch_Merkmale

<222> (1)

<400> 59

tttttttgag acggagtctt gcatctgtca tgcccaggct ggagtagcag tggtgccatc 60
 tcggetcaact gcaagctcca cctcccagagt tcacgccatt ttcttgccctc agcctcccga 120
 gtagctggga ctacaggcgc cegccaccat gcccggetaa ttttttgat ttttggtaga 180
 gaegggggtt caccgtgta gccagaatgg tctcgatrtc ctgacttcgt gatccaccg 240
 cctcggcctc ccaaagttct gggattacag gtgtgagcca cgcacactgg cc 292

<210> 60

<211> 262

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 60

ttcttttttg agacagggtc ttgctctgtc acccaggcca gaggcaatg gtacagtctc 60
 agctcaactgc agcctcaacc gcctcggctc aaaccatcat cccatttcag cctcctgagt 120
 agctgggact acaggcacat gccattacac ctggctactt tttttgtatt tctagtagag 180
 acagggtttg gccatgttgc ccgggctggt ctggaactcc tggactcaag caatccacc 240
 acctcagcct cccaaaatga gg 262

<210> 61

<211> 294

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 61

tttttttttg agacaaactt tcacttttgt tgcccaggct ggagtgcaat ggcgcatct 60
 cggctcactg caacctccac ctcccgggtt caagtgatc tctgctcca gctctagcc 120
 aagtagctgc gattacaggc atgcgccacc acgcccggct aatttttgta ttttagtag 180
 agacgggggtt tcgcatggtt ggtcaggctg gtctcgaact cctgatctca ggtgatccaa 240
 ccaccctggc ctcccagggt gctgggatta taggcgtgag ccacagcgc tgge 294

<210> 62

<211> 276
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 62

tgacagtctc tctgtcgccc aggctggagt gcagtgggtg gatcttgggt cactgcaact 60
 tccgcctccc gggttcaagg gattctctctg cctcagcttc ctgagtagct ggggttacag 120
 gtgtgtgccca ccatgccag ctaatttttt tttgtatttt tagtagacag ggtttcacca 180
 tgttggtcag gctgggtctca aactcctggc ctcaagtgat ccgcctgact cagcctacca 240
 aagtgetgat tacaagtgtg agccaccgtg cccage 276

<210> 63
 <211> 289
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 63

cgccgggac ggtggctcac gcctgtaatc ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga 60
 tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg gccaacatgg tgaaacccca tctctactaa 120
 aaatacgaaa aaatagccag gcgtgggtggc ggggtgcctgt aatcccagct actcgggagg 180
 ctgaggcagg agaatggcat gaaccggga ggcagaagtt gcagtgagcc gagatcgtgc 240
 cactgcactc cagcctgggc aacagagcga gactcttgtc tcaaaaaaa 289

<210> 64
 <211> 298
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 64

aggetgggct ctgtggctta cgcctataat cccaccagct tgggaggctg aggtgggaga 60
 atggtttgag cccaggagtt caagacaagg cggggcaaca tagtgtgacc ccatctctac 120
 caaaaaaacc ccaacaaaac caaaaatagc cgggcatggt ggtatgcggc ctagtcccag 180
 ctactcaagg aggetgaggt ggggaagatcg cttgattcca ggagtttgag actgcagtga 240
 gctatgatcc caccactgcc taccatcttt aggatacatt tatttattta taaaagaa 298

<210> 65
<211> 105
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 65
ttttttacat ctttagtaga gacaggggtt caccatattg gccaggctgc tctcaaactc 60

ctgaccttgt gatccaccag cctcggcctc ccaaagtgt gggat 105

<210> 66
<211> 83
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 66
cctcgaactc ctaggctcag gcaatccttt caccttagct tctcaaagca ctgggactgt 60

aggcatgagc cactgtgcct ggc 83

<210> 67
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 67
agaaggtaag t 11

<210> 68
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 68
tggaggtgag a 11

<210> 69
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 69

cagtcgtgag g 11

<210> 70
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 70
ccgaggtgag c 11

<210> 71
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 71
tggaggtacc a 11

<210> 72
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 72
ggaaggtcag t 11

<210> 73
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 73
agcaggtggg c 11

<210> 74
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 74
gccaggtaca g 11

<210> 75
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 75
tgctggtgag t 11

<210> 76
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 76
cacaggtatt a 11

<210> 77
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 77
atacagggga t 11

<210> 78
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 78
ccccaggcga c 11

<210> 79
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 79
acgcagtgca a 11

<210> 80
<211> 11
<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 80
tttcagatcc a 11

<210> 81
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 81
ccccaggagg g 11

<210> 82
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 82
tcacaggetc a 11

<210> 83
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 83
ccctagctcc a 11

<210> 84
<211> 11
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 84
ctccagtcca g 11

<210> 85
<211> 12
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 85

tcgcaggtga ca

12

<210> 86

<211> 11

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 86

acacagaagg g

11

<210> 87

<211> 377

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 87

Gln Arg Leu Pro Arg Met Gln Glu Asp Ser Pro Leu Gly Gly Gly Ser

1

5

10

15

Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu

20

25

30

Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly

35

40

45

Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val Lys Pro Lys

50

55

60

Ser Glu Glu Glu Gly Ser Leu Lys Leu Glu Asp Leu Pro Thr Val Glu

65

70

75

80

Ala Pro Gly Asp Pro Gln Glu Pro Gln Asn Asn Ala His Arg Asp Lys

85

90

95

Glu Gly Asp Asp Gln Ser His Trp Arg Tyr Gly Gly Asp Pro Pro Trp

100

105

110

Pro Arg Val Ser Pro Ala Cys Ala Gly Arg Phe Gln Ser Pro Val Asp

115

120

125

Ile Arg Pro Gln Leu Ala Ala Phe Cys Pro Ala Leu Arg Pro Leu Glu

130

135

140

Leu Leu Gly Phe Gln Leu Pro Pro Leu Pro Glu Leu Arg Leu Arg Asn

145

150

155

160

Asn Gly His Ser Val Gln Leu Thr Leu Pro Pro Gly Leu Glu Met Ala
 165 170 175
 Leu Gly Pro Gly Arg Glu Tyr Arg Ala Leu Gln Leu His Leu His Trp
 180 185 190
 Gly Ala Ala Gly Arg Pro Gly Ser Glu His Thr Val Glu Gly His Arg
 195 200 205
 Phe Pro Ala Glu Ile His Val Val His Leu Ser Thr Ala Phe Ala Arg
 210 215 220
 Val Asp Glu Ala Leu Gly Arg Pro Gly Gly Leu Ala Val Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 Phe Leu Glu Glu Gly Pro Glu Glu Asn Ser Ala Tyr Glu Gln Leu Leu
 245 250 255
 Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala Glu Glu Gly Ser Glu Thr Gln Val Pro
 260 265 270
 Gly Leu Asp Ile Ser Ala Leu Leu Pro Ser Asp Phe Ser Arg Tyr Phe
 275 280 285
 Gln Tyr Glu Gly Ser Leu Thr Thr Pro Pro Cys Ala Gln Gly Val Ile
 290 295 300
 Trp Thr Val Phe Asn Gln Thr Val Met Leu Ser Ala Lys Gln Leu His
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Asp Thr Leu Trp Gly Pro Gly Asp Ser Arg Leu Gln Leu
 325 330 335
 Asn Phe Arg Ala Thr Gln Pro Leu Asn Gly Arg Val Ile Glu Ala Ser
 340 345 350
 Phe Pro Ala Gly Val Asp Ser Ser Pro Arg Ala Ala Glu Pro Val Gln
 355 360 365
 Leu Asn Ser Cys Leu Ala Ala Gly Asp
 370 375

<210> 88

<211> 34

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 88

tagacagatc tacgatggct cccctgtgcc ccag

34

<210> 89

<211> 34

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 89

attcctctag acagttaccg gctccccctc agat

34

<210> 90

<211> 3532

<212> DNA

<213> HUMAN

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3532)

<400> 90

tgttgactcg tgaccttacc cccaacctg tgctctctga aacatgagct gtgtccactc 60

agggttaaat ggattaaggc cgggtgcaaga tgtgctttgt taacagatg cttgaaggca 120

gcatgctcgt taagatcat caccaatccc taatctcaag taatcagga cacaaact 180

gcggaaggcc gcagggtcct ctgcctagga aaaccagaga ctttgttca cttgtttatc 240

tgacctccc tccactattg tccatgccc tgccaaatcc cctctgtga gaaacacca 300

agattatca ataaaaaat aaatttaaa aaaaaatca aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 360

aaaagactta cgaatagtta ttgataaatg aatagctatt ggtaaagcca agtaaatgat 420

catattcaaa accagacggc catcatcaca gctcaagtct acctgatttg atctctttat 480

cattgtcatt ctttgattc actagattag tcatcatcct caaattctc cccaagttc 540

taattacgtt ccaaacattt aggggttaca tgaagctga acctactacc ttctttgctt 600

ttgagccatg agttgtagga atgatgagtt tacaccttac atgetgggga ttaatttaaa 660

ctttacctct aagtcagttg ggtagcctt ggcttatttt thtagetaat tttgtagtta 720

atggatgcac tgtgaatctt gctatgatag ttttctcca cctttgcca ctagggttag 780

gtaggtactc agttttcagt aattgettac ctaagaccct aagccctatt tctcttgtac 840
 tggcctttat ctgtaatatg ggcataatata atacaatata atttttggag tttttttggt 900
 tgtttgtttg tttgtttttt tgagacggag tcttgcacct gtcacgecca ggctggagta 960
 gcagtgggtgc catctcggtc cactgcaagc tccacctccc gagttcacgc cattttectg 1020
 cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcgcccgeca ccatgcccgg ctaatttttt 1080
 gtatttttgg tagagacggg gtttcaccgt gttagccaga atgggtctcga tctcctgact 1140
 tcgtgatcca cccgcctcgg cctcccgaag ttctgggatt acaggtgtga gccaccgcac 1200
 ctggccaatt ttttgagtct tttaaagtaa aaatatgtct tgtaagctgg taactatggt 1260
 acatttcctt ttattaatgt ggtgctgacg gtcatatagg ttcttttgag tttggcatgc 1320
 atatgtaect ttttgcagtc ctttcattac atttttctct cttcatttga agagcatggt 1380
 atatctttta gcttcacttg gcttaaaagg ttctctcatt agcctaacac agtgtcattg 1440
 ttggtaccac ttggatcata agtggaaaaa cagtcaagaa attgcacagt aatacttgtt 1500
 tgtaagaggg atgattcagg tgaatctgac actaagaaac tcccctacct gaggtctgag 1560
 attcctctga cattgctgta tataggtttt tcccttgaca gcctgtgact gcggactatt 1620
 tttcttaagc aagatatgct aaagttttgt gagccttttt ccagagagag gtctcatatc 1680
 tgcacaaagt gagaacatat aatgtctgca tgttccata tttcaggaat gtttgcttgt 1740
 gttttatgct tttatataga cagggaaact tgttcctcag tgacccaaa gaggtgggaa 1800
 ttgttattgg atatcactat tggcccacgc tttctgacct tggaaacaat taagggttca 1860
 taatctcaat tctgtcagaa ttggtacaag aaatagctgc tatgtttctt gacattccac 1920
 ttggtaggaa ataagaatgt gaaactcttc agttggtgtg tgtccctngt ttttttgcaa 1980
 tttccttctt actgtgttaa aaaaaagtat gatcttgcct tgagaggtga ggcattctta 2040
 atcatgatct ttaaagatca ataataat cctttcaagg attatgtctt tattataata 2100
 aagataattt gtctttaaca gaatcaataa tataatccct taaggatta tatctttgct 2160
 gggcgcagtg gctcacacct gtaatcccag cactttgggt ggccaagggt gaaggatcaa 2220

attgectac ttctatatta tcttctaaag cagaatteat ctctctccc tcaatatgat 2280
 gatattgaca gggtttgccc tcaactacta gattgtgagc tctgtctcag ggcaggtagc 2340
 gttttttggt tttgtttttg tttttctttt ttgagacagg gtcttgtctt gtcaccagg 2400
 ccagagtgca atggtacagt ctcaactcac tgcagcctca accgcctcgg ctcaaaccat 2460
 catcccattt cagcctcctg agtagctggg actacaggca catgccatta cacctggcta 2520
 atttttttgt atttctagta gagacagggt ttggccatgt tgeccgggct ggtctcgaac 2580
 tcttgactc aagcaatcca cccacctcag cctcccacaaa tgagggaccg tgtcttattc 2640
 atttccatgt cctagtgcca tagcccagtg ctggacctat ggtagtacta aataaatatt 2700
 tgttgaatgc aatagtaaat agcatttcag ggagcaagaa ctagattaac aaagggtggt 2760
 aaaggtttgg agaaaaaaaaat aatagtttaa tttggctaga gtatgagggg gagtagtagg 2820
 agacaagatg gaaaggctctc ttgggcaagg ttttgaagga agttggaagt cagaagtaca 2880
 caatgtgcat atcgtggcag gcagtgggga gccaatgaag gcttttgagc aggagagtaa 2940
 tgtgttgaaa aataaatata ggttaaacct atcagagccc ctctgacaca tacacttget 3000
 tttcattcaa gctcaagttt gtctcccaca taccattac ttaactcacc ctggggetcc 3060
 cctagcagcc tgcctacct ctttacctgc ttcttggtgg agtcagggat gtatacatga 3120
 gctgctttcc ctctcagcca gaggacatgg ggggccccag ctcccctgcc ttteccctc 3180
 tgtgcctgga gctgggaagc aggccagggt tagctgaggc tggctggcaa gcagctgggt 3240
 ggtgccaggg agagcctgca tagtgccagg tgggtgccttg ggtccaagc tagtccatgg 3300
 ccccgataac cttctgcctg tgcacacacc tgcccctcac tccacccccca tcttagcttt 3360
 ggtatggggg agagggcaca gggccagaca aacctgtgag actttggctc catctctgca 3420
 aaagggeget ctgtgagtea gctgtctccc ctccaggctt gctctcccc caccagctc 3480
 tcgtttccaa tgcacgtaca gcccgctcac accgtgtgct gggacacccc ac 3532

<210> 91

<211> 204

<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 91
cctgccctc actccacccc catcctagct ttggtatggg ggagagggca cagggccaga 60
caaacctgtg agactttggc tccatctctg caaaagggcg ctctgtgagt cagcctgctc 120
ccctccaggc ttgctectcc cccaccagc tctcgtttc aatgcacgta cagcccgta 180
acaccgtgtg ctgggacacc ccac 204

<210> 92
<211> 132
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 92
ggatcctgtt gactcgtgac cttaccccca accctgtgct ctctgaaaca tgagctgtgt 60
ccactcaggg ttaaattgat taagggcggg gcaagatgtg ctttgttaaa cagatgcttg 120
aaggcagcat gc 132

<210> 93
<211> 275
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 93
gcatagtgcc aggtggtgcc ttgggtcca agctagtcca tggccccgat aaccttctgc 60
ctgtgcacac acctgcccct cactccacc ccacccctagc ttggtatgg gggagagggc 120
acagggccag aaaaacctgt gagactttgg ctccatctct gaaaagggc gctctgtgag 180
tcagctgct cccctccagg cttgctctc cccaccag ctctcgtttc caatgcacgt 240
acagccgta cacaccgtgt gctgggacac ccac 275

<210> 94
<211> 89
<212> DNA
<213> HUMAN

<400> 94

ctgctccct ccaggcttgc tcctcccca cccagctctc gttccaatg cacgtacagc 60
ccgtacacac cgtgtgctgg gacacccca 89

<210> 95

<211> 61

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 95

caccagctc tcgtttccaa tgcacgtaca gccgtacac accgtgtgct gggacacccc 60
a 61

<210> 96

<211> 116

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 96

acctgccct cactccacc ccaccttagc tttggtatgg gggagagggc acagggccag 60
acaaacctgt gagactttgg ctccatctct gcaaaagggc gctctgtgag tcagcc 116

<210> 97

<211> 36

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 97

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
1 5 10 15
Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu
20 25 30
Glu Asp Leu Pro
35

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 98

Gly Glu Glu Asp Leu Pro

1 5

<210> 99

<211> 4

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 99

Glu Glu Asp Leu

1

<210> 100

<211> 5

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 100

Glu Glu Asp Leu Pro

1 5

<210> 101

<211> 6

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 101

Glu Asp Leu Pro Ser Glu

1 5

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 102

Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu

1 5

<210> 103

<211> 6

<212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 103
 Asp Leu Pro Gly Glu Glu
 1 5

<210> 104
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 104
 Gly Gly Ser Ser Gly Glu Asp Asp Pro Leu Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Glu Glu Asp Ser Pro
 20

<210> 105
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 105
 Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ser Glu Glu Asp Ser Pro Arg Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly
 20 25

<210> 106
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 106
 Glu Asp Pro Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro
 1 5 10 15

Gly Glu Glu Asp Leu Pro Glu Val
 20

<210> 107

<211> 7
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 107
Gly Glu Thr Arg Ala Pro Leu
1 5

<210> 108
<211> 7
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 108
Gly Glu Thr Arg Glu Pro Leu
1 5

<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 109
Gly Gln Thr Arg Ser Pro Leu
1 5

<210> 110
<211> 1247
<212> DNA
<213> HUMAN

<220>
<221> versch_Merkmale
<222> (1)..(1247)

<400> 110
tatgctactt ttgcagtc tttcattaca tttttctctc ttcatttgaa gagcatgtta 60
tatcttttag cttcacttgg cttaaaagg tctctcatta gctaacaca gtgtcattgt 120
tggtagcact tggatcataa gtggaaaaac agtcaagaaa ttgcacagta atacttgttt 180
gtaagagggg tgattcagg gaatctgaca ctaagaaact ccctacctg aggtctgaga 240
ttctctgac attgctgtat ataggctttt cctttgacag cctgtgactg cggactattt 300

ttcttaagca agatatgcta aagttttgtg agccttttcc cagagagagg tctcatatct 360
 gcatcaagtg agaacatata atgtctgcat gtttccatat ttcaggaatg tttgcttgtg 420
 ttttatgctt ttatatagac agggaaactt gttcctcagt gacccaaaag aggtgggaat 480
 tgttattgga tatcatcatt ggcccacgct ttctgacctt ggaaacaatt aagggttcat 540
 aatctcaatt ctgtcagaat tggtaacaaga aatagctgct atgtttcttg acattccact 600
 tggtaggaaa taagaatgtg aaactcttca gttgggtgtg gtccctngtt tttttgcaat 660
 ttctttctta ctgtgttaaa aaaaagtatg atcttgctct gagaggtgag gcattcttaa 720
 tcatgatctt taaagatcaa taatataatc ctttcaagga ttatgtcttt attataataa 780
 agataatttg tctttaacag aatcaataat ataatccctt aaaggattat atctttgctg 840
 ggcgcagtggt ctacacctg taatcccagc actttgggtg gcccaaggtgg aaggatcaaa 900
 tttgctact tctatattat cttctaaagc agaattcacc tcttttcctt caatatgatg 960
 atattgacag ggtttgcctt cactcactag attgtgagct cctgctcagg gcaggtagcg 1020
 ttttttgttt ttgtttttgt tttctttttt tgagacaggg tcttgctctg tcaccagggc 1080
 cagagtgcaa tggtaacagtc tcagctcact gcagcctcaa ccgctcggc tcaaaccatc 1140
 atcccatttc agcctcctga gtagctggga ctacaggcac atgccattac acctggctaa 1200
 tttttttgta tttctagtag agacagggtt tggccatggt gcccggg 1247

<210> 111

<211> 17

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 111

ctctgtgagt cagcctg

17

<210> 112

<211> 23

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 112
 aggettgtctc ctccccacc cag 23

<210> 113
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 113
 agactttggc tccatctc 18

<210> 114
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 114
 cactccaccc ccatacctagc 20

<210> 115
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 115
 gggagagggc acagggccag acaaac 26

<210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HUMAN

<400> 116
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 117
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 117

cgtctagaag gaattcagct agactggctc agca

34

<210> 118

<211> 15

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 118

Glu	Val	Lys	Pro	Lys	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Glu
1				5					10					15

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 119

Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro
1				5					10		

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 120

Glu	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro	Gly
1				5					10		

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 121

Glu	Asp	Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Pro
1				5				10	

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 122

Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu
1 5 10

<210> 123

<211> 12

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 123

Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp
1 5 10

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 124

Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 125

Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ala
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 126

Ala Gly Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 127

Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Glu Ala

1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 128

Ala Glu Asp Leu Pro Gly Glu Glu Ala

1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 129

Ala Asp Leu Pro Gly Glu Glu Asp Ala

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 130

Ala Leu Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala

1 5

<210> 131

<211> 8

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 131

Ala Gly Glu Glu Asp Leu Pro Ala

1 5

<210> 132
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 132
Ala Glu Glu Asp Leu Pro Gly Ala
1 5

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 133
Ala Glu Asp Leu Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 134
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 134
Ala Asp Leu Pro Gly Glu Glu Ala
1 5

<210> 135
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 135
Ala Leu Pro Gly Glu Glu Asp Ala
1 5

<210> 136
<211> 8
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 136
Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Ala

1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 137
Ala Lys Lys Met Lys Arg Arg Lys Ala
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 138
Ala Ile Thr Phe Asn Ala Gln Tyr Ala
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 139
Ala Ser Ala Ser Ala Pro Val Ser Ala
1 5

<400> 139
Ala Ser Ala Ser Ala Pro Val Ser Ala
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 140
Ala Gly Gln Thr Arg Ser Pro Leu Ala
1 5

<210> 141
<211> 6
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 141

Ser Glu Glu Asp Ser Pro

1

5

<210> 142

<211> 6

<212> PRT

<213> HUMAN

<400> 142

Arg Glu Glu Asp Pro Pro

1

5

<210> 143

<211> 12

<212> DMA

<213> HUMAN

<400> 143

agggcacagg gc

12

Patentansprüche

1. Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass es ausgewählt ist aus SEQ ID NOS: 137 und 138.
2. Polypeptid nach Anspruch 1 zur Verwendung in der Medizin.
3. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung einer preneoplastischen und/oder neoplastischen Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch die abnormale Expression des MN-Proteins, durch Inhibition des Wachstums der preneoplastischen und/oder neoplastischen Vertebratenzellen, die das MN-Protein abnormal exprimieren.
4. Peptidkomplex, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Polypeptid nach Anspruch 1 umfasst, kovalent verknüpft an Polylysin, an das eine Nukleinsäure gebunden ist, die für ein cytotoxisches Protein oder ein cytotoxisches Polypeptid kodiert, welches funktionsfähig verknüpft ist mit dem MN-Gen-Promotor, wobei der Peptidkomplex, wenn er an eine preneoplastische und/oder neoplastische Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, verabreicht wird, das Wachstum dieser Zelle inhibiert.
5. Peptidkomplex nach Anspruch 4, wobei das cytotoxische Protein die HSV-Tyminidinkinase ist.
6. Peptidkomplex nach Anspruch 5, wobei die Nukleinsäure weiterhin eine Nukleinsäure umfasst, die für ein Cytokin kodiert, welches in funktionsfähiger Weise an den MN-Genpromotor verknüpft ist.
7. Verfahren zur Identifizierung eines organischen oder eines anorganischen Moleküls, welches spezifisch an eine Stelle auf einem MN-Protein bindet, an die Vertebratenzellen in einem Zell-Adhäsionsassay anhaften, wobei diese Stelle aus einer Aminosäuresequenz besteht, ausgewählt aus SEQ ID NOS: 10 und 97 bis 106, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass es das Testen organischer und anorganischer Moleküle im Zell-Adhäsionsassay und das Identifizieren der Moleküle, die die Adhäsion der Vertebratenzellen an das MN-Protein inhibieren, als an diese Stelle spezifisch bindend umfasst, und das Molekül bei der Behandlung einer preneoplastischen und/oder neoplastischen Erkrankung einsetzbar ist, welche durch abnormale Expression des MN-Proteins gekennzeichnet ist, wobei der Zell-Adhäsionsassay folgendes umfasst:
 - (a) Bindenlassen des MN-Proteins an ein Substrat, an welches die Vertebratenzellen nicht binden;
 - (b) Abspülen ungebundenen MN-Proteins vom Substrat;
 - (c) Inkubieren des gebundenen MN-Proteins mit dem Molekül und mit den Vertebratenzellen;

- (d) Abspülen ungebundener Vertebratenzellen vom MN-Protein; und
(e) Bestimmen, ob das Molekül die Adhäsion der Vertebratenzellen an das MN-Protein inhibiert.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Molekül ein anorganisches Molekül ist.
 9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Molekül ein organisches Molekül ist.
 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Molekül ein Protein oder ein Polypeptid ist.
 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Protein oder Polypeptid eine Aminosäuresequenz umfasst, ausgewählt aus SEQ ID NOS: 137 und 138.
 12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Polypeptid ausgewählt ist aus SEQ ID NOS: 137 und 138.
 13. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das organische oder anorganische Molekül, wenn es mit einer pre-neoplastischen und/oder neoplastischen Vertebratenzelle, die das MN-Protein abnormal exprimiert, in Kontakt ist, das Wachstum dieser Zelle inhibiert.
 14. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Stelle auf dem MN-Protein, an der die Vertebratenzellen in dem Zell-Adhäsionsassay anhaften, innerhalb der proteoglycanähnlichen Domäne des MN-Proteins ist.
 15. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Vertebratenzellen Säugerzellen sind.
 16. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Vertebratenzellen Humanzellen sind.

Es folgen 13 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

1		M	A	P	L	C	P	S	P	W	L	P	L	12			
1	ACA	GTC	AGC	CGC	ATG	GCT	CCC	CTG	TGC	CCC	AGC	CCC	TGG	CTC	CCT	CTG	48
13	L	I	P	A	P	A	P	G	L	T	V	Q	L	L	L	S	28
49	TTG	ATC	CCG	GCC	CCT	GCT	CCA	GGC	CTC	ACT	GTG	CAA	CTG	CTG	CTG	TCA	96
29	L	L	L	L	M	P	V	H	P	Q	R	L	P	R	M	Q	44
97	CTG	CTG	CTT	CTG	ATG	CCT	GTC	CAT	CCC	CAG	AGG	TTG	CCC	CGG	ATG	CAG	144
45	E	D	S	P	L	G	G	G	S	S	G	E	D	D	P	L	60
145	GAG	GAT	TCC	CCC	TTG	GGA	GGA	GGC	TCT	TCT	GGG	GAA	GAT	GAC	CCA	CTG	192
61	G	E	E	D	L	P	S	E	E	D	S	P	R	E	E	D	76
193	GGC	GAG	GAG	GAT	CTG	CCC	AGT	GAA	GAG	GAT	TCA	CCC	AGA	GAG	GAG	GAT	240
77	P	P	G	E	E	D	L	P	G	E	E	D	L	P	G	E	92
241	CCA	CCC	GGA	GAG	GAG	GAT	CTA	CCT	GGA	GAG	GAG	GAT	CTA	CCT	GGA	GAG	288
93	E	D	L	P	E	V	K	P	K	S	E	E	E	G	S	L	108
289	GAG	GAT	CTA	CCT	GAA	GTT	AAG	CCT	AAA	TCA	GAA	GAA	GAG	GGC	TCC	CTG	336
109	K	L	E	D	L	P	T	V	E	A	P	G	D	P	Q	E	124
337	AAG	TTA	GAG	GAT	CTA	CCT	ACT	GTT	GAG	GCT	CCT	GGA	GAT	CCT	CAA	GAA	384
125	P	Q	N	N	A	H	R	D	K	E	G	D	D	Q	S	H	140
385	CCC	CAG	AAT	AAT	GCC	CAC	AGG	GAC	AAA	GAA	GGG	GAT	GAC	CAG	AGT	CAT	432
141	W	R	Y	G	G	D	P	P	W	P	R	V	S	P	A	C	156
433	TGG	CGC	TAT	GGA	GGC	GAC	CCG	CCC	TGG	CCC	CGG	GTG	TCC	CCA	GCC	TGC	480
157	A	G	R	F	Q	S	P	V	D	I	R	P	Q	L	A	A	172
481	GCG	GGC	CGC	TTC	CAG	TCC	CCG	GTG	GAT	ATC	CGC	CCC	CAG	CTC	GCC	GCC	528

Fig. 1A

173 F C P A L R P L E L L L G F Q L P 188
 529 TTC TGC CCG GCC CTG CTG CGC CCC CTG GAA CTC CTG GGC TTC CAG CTC CCG 576

 189 P L P E L R L R N G H S V Q L 204
 577 CCG CTC CCA GAA CTG CGC CTG CGC AAC AAT GGC CAC AGT GTG CAA CTG 624

 205 T L P P G L E M A L G P G R E Y 220
 625 ACC CTG CCT CCT GGG CTA GAG ATG GCT CTG GGT CCC GGG CCG GAG TAC 672

 221 R A L Q L H L H W G A A G R P G 236
 673 CGG GCT CTG CAG CTG CAT CTG CAC TGG GGG GCT GCA GGT CGT CCG GGC 720

 237 S E H T V E G H R F P A E I H V 252
 721 TCG GAG CAC ACT GTG GAA GGC CAC CGT TTC CCT GCC GAG ATC CAC GTG 768

 253 V H L S T A F A R V D E A L G R 268
 769 GTT CAC CTC AGC ACC GCC TTT GCC AGA GTT GAC GAG GCC TTTG GGG CGC 816

 269 P G G L A V L A A F L E E G P E 284
 817 CCG GGA GGC CTG GCC GTG TTG GCC TTT CTG GAG GAG GGC CCG GAA 864

 285 E N S A Y E Q L L S R L E E I A 300
 865 GAA AAC AGT GCC TAT GAG CAG TTG CTG TCT CGC TTG GAA GAA ATC GCT 912

 301 E E G S E T Q V P G L D I S A L 316
 913 GAG GAA GGC TCA GAG ACT CAG GTC CCA GGA CTG GAC ATA TCT GCA CTC 960

 317 L P S D F S R Y F Q Y E G S L T 332
 961 CTG CCC TCT GAC TTC AGC CGC TAC TTC CAA TAT GAG GGG TCT CTG ACT 1008

 333 T P P C A Q G V I W T V F N Q T 348
 1009 ACA CCG CCC TGT GCC CAG GGT GTC ATC TGG ACT GTG TTT AAC CAG ACA 1056

Fig. 1B

349 V M L S A K Q L H T L S D T L W 364
 1057 GTG ATG CTG AGT GCT AAG CAG CTC CAC ACC CTC TCT GAC ACC CTG TGG 1104

 365 G P G D S R L Q L N F R A T Q P 380
 1105 GGA CCT GGT GAC TCT CGG CTA CAG CTG AAC TTC CGA GCG ACG CAG CCT 1152

 381 L N G R V I E A S F P A G V D S 396
 1153 TTG AAT GGG CGA GTG ATT GAG GCC TCC TTC CCT GCT GGA GTG GAC AGC 1200

 397 S P R A A E P V Q L N S C L A A 412
 1201 AGT CCT CGG GCT GCT GAG CCA GTC CAG CTG AAT TCC TGC CTG GCT GCT 1248

 413 G D I L A L V F G L L F A V T S 428
 1249 GGT GAC ATC CTA GCC CTG GTT TTT GGC CTC CTT TTT GCT GTC ACC AGC 1296

 429 V A F L V Q M R R Q H R R G T K 444
 1297 GTC GCG TTC CTT GTG CAG ATG AGA AGG CAG CAC AGA AGG GGA ACC AAA 1344

 445 G G V S Y R P A E V A E T G A * 460
 1345 GGG GGT GTG AGC TAC CGC CCA GCA GAG GTA GCC GAG ACT GGA GCC TAG 1392

 1393 AGG CTG GAT CTT GGA GAA TGT GAG AAG CCA GCC AGA GGC ATC TGA GGG 1440

 1441 GGA GCC GGT AAC TGT CCT GTC CTG ATT ATG CCA CTT CCT TTT AAC 1488

 1489 TGC CAA GAA ATT TTT TAA AAT AAA TAT TTA TAA T 1522

FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1C

Fig. 1

Fig. 1C

```

1  ggatcctgtt gactcgtgac ctaaccccc taagggcggg gcaagatgtg ctctgaaaca tgagctgtgt
61  ccactcaggg ttaaatggat taagggcggg gcaagatgtg ctctgaaaca tgagctgtgt
121  aaggcagcat gctcgttaag agtcatcacc aatccctaata ctcaagtaata caagacactt tgttcacttg
181  aacactgagg aaggccgcag ggtcctctgc ctattgtcca taaagaaata aatacaaaaa aaaaaaaa
241  ttatctgac ctccctcca aaaaataaat tagttattga taaatgaata gctattggta aagccaagta
301  caccaaaaa gacttacgaa gacggccatc atcacagctc aagctacctt gatctgatct
361  aatgatcata ttcaaaacca gatttacta gattagtcac catcctcaaa attctcccc
421  cttatcatt gtcattcttt gatttacta gattagtcac catcctcaaa attctcccc
481  aagttctaata tacgttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttgaacct actacctct
541  aagttctaata tacgttccaa acatttaggg gttacatgaa gcttgaacct actacctct
601  ttgcttttga gccatgagtt gtaggaatga tgagtttaca ccttacctgc tggggattaa
661  tttaaaacttt acctctaagt cagttgggta gcctttggct tatttttcta gctaaattttg
721  tagttaatgg atgcactgtg aatccttgcta tgatagtttt cctccacct tggccactag
781  ggtaggtag gtactcagtt ttcaagtaatt gcttacctaa gacctaaagc cctatttctc
841  ttgtactggc ctttatctgt aatatgggca tatttaatac aatataattt ttggagtttt
901  ttgtttgtt tgtttgtttg tttttttgag acggagtctt gcatctgtca tggccaggct
961  ggagtagcag tggtgccatc tcggctcact gcaagctcca cctcccgagt tcacgccatt
1021  ttcctgcctc agcctcccga gtagctggga ctacaggcgc ccgccaccat gcccggtcaa
1081  ttttttgtat ttttggtaga gacggggttt caccgtgtta gccagaatgg tctcgatctc
1141  ctgacttcgt gatccaccg cctcggcctc ccaagttct ccaagttctt ggtattacag tgttgagcca
1201  ccgcacctgg ccaattttt gagtctttta aagtaaaaa atgtcttcta atgtcttcta
1261  tatggtacat tcccttttat taatgtggtg ctgacgggtca tataagttct tttgagtttg
1321  gatgcatat gctacttttt gcagtccttt cattaacttt tctctctctc atttgaagag
1381  catgttata cttttagctt cacttggctt aaaaagttct ctcattagcc taacacagt9
1441  tcattgttgg taccacttgg atcataagt9 gaaaaacagt caagaatt9 cacagtaata
1501  cttgtttgta agaggatga ttcagggtgaa tctgacacta agaaactccc ctacctgagg
1561  tctgagattc ctctgacatt gctgtataata ggcttttctt ttgacagcct gtgactgagg
1621  actatttttc ttaagcaaga tatgctaaag ttttgtgagc ctttttccag agagaggtct
1681  catatctgca tcaagt9aga acatataat9 tctgcatgtt tccatatttc aggaatgttt
1741  gcttgtgttt tatgctttta tatagacagg gaaactt9tt cctcagtgac ccaaaagagg
1801  tgggaattgt tattggatat catcat9ggc ccacgctttc tgacctt9ga aacaattaa9
1861  gttcataat ctcaattctg tcagaatt9g tacaagaat9 agctgctat9 tttcttgaca
1921  tcccactt9g taggaataa gaat9tgaa ctcttcagtt ggtgtgt9tc cct?gtttt

```

Fig. 2A

1981 ttgcaatttc cttcttactg tgtaaaaa aagtatgac ttgctctgag aggtgaggca
2041 ttcttaatca tgatctttaa agatcaataa tataatcctt tcaaggatta tgtctttatt
2101 ataataaaga taatttgtct ttaacagaat caataatata atcccttaaa ggattatatac
2161 ttgtctggc gcagtggtc acacctgtaa tcccagcact ttgggtggcc aaggtggaag
2221 gatcaaat tgcctactct atattatctt cttaagcaga attcatctct ctccctcaa
2281 tatgatgata ttgacagggc ttgcccctcac tcaactagatt gtgagctcct gctcagggca
2341 ggtagcgttt ttgtttttg ttttggttt tacagtctca gctcactgca gcctcaaccg cctcggctca
2401 ccaggccag agtgcaatgg ctcctgagta gctgggacta caggcacatg ccattacacc
2461 aaccatcatc ccatttcagc ctagtagaga cagggtttgg ccatgttggc cgggctggtc
2521 tggctaattt ttttgtattt ctagttaga aatccaccca cctcagcctc ccaaatgag ggaccgtgtc
2581 tcgaaactcct ggactcaagc agtccatagc gtaaatagca tttcagggag caagaactag attaacaaga
2641 ttattcatct ccattgtccct gtaaatagca aaaaataata gtttaattg gctagagtat gaggagagt
2701 aatatattgt gaatgcaata aaaaataata gtaaggtttt gaaggaagt ggaagtcaga
2761 gtggtaaaag gtttggagaa ggtcctcttg ttggcaggcag tggggagcca atgaaagctt ttgagcagga
2821 agtaggagac aagatggaaa ttgcaatctg aatataggtt aaacctatca gagcccctc gcacacataca
2881 agtacacaat gtgcaatctg ttgaaaaata aagtttgtct ccacacatcc cactactaa ctcacccctc
2941 gagtaatgtg ttgaaaaata aagtttgtct ccacacatcc cactactaa ctcacccctc
3001 ctgtctttc attcaagctc ctacctctt ctacctctt acctgcttcc tgggtgagtc agggatgtat
3061 ggtccccca gcagcctgcc cagccagagg acatgggggg cccagctcc cctgcccctc
3121 acatgagctg cttcccctc ggaagcaggg cagggttagc ttgagctggc tggcaagcag
3181 cccttctgtg cctggagctg cctgcatagt gccaggtggc gccttgggtt ccaagctagt
3241 ctgggtggg ccaggagag cctgcatagt gccaggtggc gccttgggtt ccaagctagt
3301 ccatggccc gataaccctc tgcctgtgca cacacctgcc cctcactcca ccccactcct
3361 agctttggt tgggggagag ggcacagggc cagacaaacc tgtgagact ttggctccatc
3421 tctgcaaaag ggcgctctgt gactcagcct gctcccctcc aggcctgctc ctccccacc
3481 cagctctctg tccaatgca cgtacagccc gtacacaccg tgtgctggga caccacacag
3541 TCAGCCGCAT GGCTCCCTG TGCCCCAGCC CCTGGCTCCC TCTGTTGATC CCGGCCCTG
3601 CTCCAGGCCT CACTGTGCAA CTGCTGCTGT CACTGTGCT TCTGGTGCCT GTCCATCCCC
3661 AGAGGTTGCC CCGGATGCAG GAGGATTCCT CCTTGGGAGG AGGCTCTTCT GGGGAAGATG
3721 ACCCACTGG CGAGGAGGAT CTGCCCAGTG AAGAGGATC ACCCAGAGG GAGGATCCAC
3781 CCGGAGAGGA GGATCTACCT GGAGAGGAGG ATCTACCTGG AGAGGAGGAT CTACCTGAAG
3841 TTAAGCCTAA ATCAGAAGAA GAGGGCTCCC TGAAGTTAGA GGATCTACCT ACTGTTGAGG
3901 CTCCTGGAGA TCCTCAAGAA CCCCAGAATA ATGCCACACAG GGACAAAGAA Ggtaagtggc

Fig. 2B

3961 catcaatctc caaatccagg ttccaggagg ttcatgactc ccctcccata cccagccta
 4021 ggctctgttc actcaggga gagggggaga ctgtactccc cacagaagcc cttccagagg
 4081 tccatacca atatcccat cccactctc ggaggtagaa agggacagat gtggagagaa
 4141 aataaaaagg gtcaaaagg agagaggtga gctggatgag atgggagaga agggggaggc
 4201 tggagaagag aaagggatga gaactgcaga tgagagaaa aatgtgcaga cagaggaaaa
 4261 aaataggtgg agaaggagag tcaagagatt tgaggggaag agaaaaggaa agcttgggag
 4321 gtgaagtggg taccagagac aagcaagaag agctggtaga agtcatctca tcttaggcta
 4381 caatgaggaa ttgagacctt ggaagaaggg acacagcagg tagagaaaacg tggcttcttg
 4441 actccaagc caggaatttg ggaagaaggg ttggagacca tacaaggcag agggatgagt
 4501 ggggagaaga agaaggag tgaagagggg tgggtgactc actcatttgg gactcaggac
 4561 tgaagtgcc actcactttt aaaggaaaaga ttttttgagac aaactttcac ttttggttgcc
 4621 caggctggag tgcaatggcg cgatctcggc tcaactgcaac ctccacctcc cgggttcaag
 4681 tgattctcct gcctcagcct ctagccaagt agctgcgatt acagggcatgc gccaccacgc
 4741 ccggctaatt tttgtattt tagtagagac ggggtttcgc catgttggtc aggttggttct
 4801 cgaactcctg atctcaggtg atccaaccac cctggcctcc caaagtgctg ggattatagg
 4861 cgtgagccac agcgcctggc ctgaagcagc cactcacttt tacagaccct aagacaatga
 4921 ttgcaagctg gtaggatgac tgtttggccc acccagctgc ggtgtgagt ttgggtgagg
 4981 tctcctgtgc ttbgcacctg gccgccttaa ggcatttgtt acccgtaatg ctccctgtaag
 5041 gcatctgctg ttgtgacatc gttttggctg ccaggaaggg attggggctc taagcttgag
 5101 cggttcatcc ttttcattt tacaggggat gaccagatc ATTGGCGCTA TGGAGgtgag
 5161 acacccaccg gctgcacaga cccaatctgg gaaccagct ctgtggatct cccctacagc
 5221 cgtccctgaa cactggtccc gggcgtccca cccgcccgc accgtcccac cccctcacct
 5281 tttctaccg ggttccctaa gttcctgacc taggcgtcag acttcctcac tatactctcc
 5341 caccaccagc GACCCGCCCT GCCCCCGGT GTCCCCAGCC TGCGGGGCC CCTCCAGTC
 5401 CCCGGTGGAT ATCCGCCCCC AGTCGCCGC CTTCGCCCC GCCCTGCCCC CCTGGAAC T
 5461 CCTGGCTTC CAGCTCCCCG CGTCCCAGA ACTGCGCCTG CGCAACAATG GCCACAGTGg
 5521 tgagggggtc tcccggcga gacttgggga tggggcgggg cgcagggaa ggaaccgtcg
 5581 cgcagtgctt gcccggggtt tgggctggcc ctaccgggag gggccggctc acttgcctct
 5641 ccctacgca gTGCACACTGAC CCTGCCCTCT GGGCTAGAGA TGGCTCTGGG TCCCGGGCGG
 5701 GAGTACCGGG CTCTGCAGCT GCATCTGCAC TGGGGGGCTG CAGGTCGTCC GGGCTCGGAG
 5761 CACACTGTGG AAGGCCACCg TTTCCTGCC GAGgtgagcg cggactggcc gagaaggggc
 5821 aaaggagcgg ggcggacggg ggtggcctct ctaccctct cctaccctcg tgtccttttc
 5881 agATCCACGT GGTTCACCTC AGCACCCGCT TTGCCAGAGT TGACGAGGCC TTGGGGCGCC

Fig. 2C

5941 CGGGAGGCCCT GGCCGTGTG GCCGCCTTTC TGGAGgtacc agatcctgga cacccttac
6001 tccccgctt cccatcccat gctcctccc gactctatcg tggagccaga gaccctatcc
6061 cagcaagctc actcaggccc ctggctgaca aactcattca cgcactgttt gttcatttaa
6121 caccactgt gaaccaggca ccagccccc tgaagctgta tgaagctgta ggtccttgcc
6181 tctaaggagc ccacaggcag tgggggaggg tgacatgaca gacacatagg aaggacatag
6241 taaagatggt ggtcacagag gaggtgacac ttaaagcctt cactggtaga aaagaaaaag
6301 aggtgttcat tgcagaggaa acagaatgtg caaagactca gaatatggcc tatttaggga
6361 atggctacat acaccatgat tagaggaggc ccagtaaagg gaaggatgg tgagatgccc
6421 gctaggttca ctcaactcact ttattattt tattatttt ttgacagtc tctctgtcgc
6481 ccaggctgga gtgcagtgg gtgatcttgg gtcactgcaa ctccgcctc cgggttcaa
6541 gggattctcc tgcctcagct tcctgagtag ctggggttac aggtgtgtgc caccatgccc
6601 agctaatttt tttttgtatt tttagtagac agggtttcac catgttggc agctggctt
6661 caaactcctg gcctcaagtg atccgcctga ctcagcctac caaagtgctg attacaagtg
6721 tgagccaccg tgcccagcca cactcactga ttctttaatg ccagccacac agcacaagt
6781 tcagagaaat gcctccatca tagcatgtca atatgttcat actcttaggt tcatyatgtt
6841 chtaacatta ggttcataag caaataaga aaaaagaata ataaataaa gaagtggcat
6901 gtcaggacct cacctgaaaa gccaaacaca gaatcatgaa ggtgaatgca gaggtgacac
6961 caacacaaag gtgtatatat ggtttcctgt ggggagtag tacggaggca gcagtgagtg
7021 agactgcaaa cgtcagaagg gcacgggtca ctgagagcct agtatccctag taaagtgggc
7081 tctctccctc tctctccagc ttgtcattga aaaccagtcc accaagcttg ttggttcgca
7141 cagcaagagt acatagagtt tgaataata cataggattt taagagggag acactgtctc
7201 taaaaaaaa aacaacagca acaacaaaa gcaacaacca ttacaattt atgttcccctc
7261 agcattctca gagctgagga atgggagag actatgggaa ccccttcat gttccggcct
7321 tcagccatgg ccctggatac atgcactcat ctgtcttaca atgtcattcc ccagGAGGG
7381 CCCGGAAGAA AACAGTGCCCT ATGAGCAGTT GCTGTCTCGC TTGGAAGAAA TCGCTGAGGA
7441 AGgtcagttt gttggtctgg ccactaatct ctgtggccta gttcataaag aatcacctt
7501 tggagcttca ggtctgaggc tggagatggg ctccctccag tgcagggagg attgaagcat
7561 gagccagcgc tcatcttgat aataaccatg aagctgacag acacagttac ccgcaaacgg
7621 ctgcctacag attgaaaacc aagcaaaaac gcctggcctc ggtggctcac gcctgtaatc
7681 ccagcacttt gggaggccaa ggcaggtgga tcacgaggtc aagagatcaa gaccatcctg
7741 gccaacatgg tgaaccccca tcttactaa aaatacga aaatagccag gcgtggtggc
7801 ggggtcctgt aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggcat gaaccggga
7861 gccagaagt gcagtgagcc gagatcgtgc cactgcactc cagcctgggc aacagagcga

Fig. 2D

7921 gactcttgct tcaaaaaaa aaaaaaaa gaaaccaag caaaaccaa aatgagacaa
7981 aaaaaaag accaaaaaat ggtgtttgga aatgttcaag gtcaagctctg gagagctaaa
8041 ctttttctga gaactgttta tctttaataa gcatcaata ttttaacttt gtaataactt
8101 ttgttgaaa tcggttctctt cttagtcaact cttgggtcat ttaaatctc acttactcta
8161 ctgaccttt taggtttctg ctgactagg tagaactctg ctttgcat tcttggtct
8221 gttttgtata gttatcaata ttcataatta tttacaagt attcagatca ttttttctt
8281 tcttttttt ttttttttt ctgtacctat ctttagtaga gacagggttt caccatattg
8341 gccaggctgc tctcaaacct ctgacctgt gatccaccag cctcggcctc ccaagtgtc
8401 gggattcatt ttttcttttt aatttgctct gggcttaaac ttgtggccca gcactttatg
8461 atggtacaca gaggtaagag tgtagactca gacggctctt ctcttctct tctcttctt
8521 cctccctcc ctcccactt cccttctct caaagcctg tactttttt tgagttaacg tcttatggga
8581 caggcctct ccagttgctc caaagcctg tactttttt taccttggct tctgggaggt
8641 agggcctgca cttagtgaag aagtggctc tgaagcttta agggggtgca atgtagatga gacccaaca
8701 gaaactgtat ccctataccc tgaagcttta agggggtgca atgtagatga gacccaaca
8761 tagatcctct tcacagGCTC AGAGACTCAG GTCCAGGAC TGGACATATC TGCACCTCTG
8821 CCTCTGACT TCAGCCGCTA CTTCCAATAT GAGGGTCTC TGACTACACC GCCCTGTGCC
8881 CAGGGTGTCA TCTGGACTGT GTTTAACAG ACAGTGATGC TGAGTGCTAA GCAGgtggg
8941 ctggggtg tggtggacaca gttgggtcgg gggaagagg atgtagatg agatgagaaa
9001 caggagaaga aaaaaatcaa ggctgggctc tbtggcttac gcctataatc ccaccacgtt
9061 gggaggctga ggtgggagaa tggtttgagc ccaggagttc aagacaaggc ggggcaacat
9121 agtgtgacc catctctacc aaaaaacc caacaaacc aaaaatagcc gggcatgggtg
9181 gtatgcggcc tagtcccagc tactcaagga ggctgaggtg ggaagatcgc tggattccag
9241 ggtttgaga ctgcagttag ctatgatccc accactgcct accatctta ggatacattt
9301 atttattat aaaagaatc aagaggctgg atggggaata caggagctgg aggtgggagc
9361 cctgaggtgc tggttgtgag ctggcctggg acccttgttt cctgtcatgc catgaaccca
9421 cccacactgt ccaactgacct ccctagCTCC ACACCTCTC TGACACCTTG TGGGACCTG
9481 GTGACTCTG GCTACAGCTG AACTTCCGAG CGACGCAGCC TTTGAATGGG CGAGTGATTG
9541 AGGCTCCTT CCTGTGGA GTGGACAGCA GTCCTGGGG TGCTGAGCCA Ggtacagctt
9601 tgtctggttt cccccagcc agtagtccct tctcctcca tgtgtgtgcc agtgtctgtc
9661 attggtggtc acagcccgcc tctcacatct ccttttctc tccagTCCAG CTGAATTCTT
9721 GCCTGGCTG TGgtgagctc gcccctctc ttggtcctga tggcaggaga ctcctcagca
9781 ccattcagcc ccagggtctc tcaggaccgc ctctgctccc tctcctttc tgcagaacag
9841 accccaacc caatattaga gaggcagatc atggtgggga tccccatt gtccccagag

Fig. 2E

9901 gctaattgat tagaatgaag cttgagaaat ctccagcat ccctctcgca aaagaatccc
 9961 cccccctttt ttaaaagata gggctcact ctgtttgccc caggctggg tgttgtggca
 10021 cgatcatagc tcaactgagc ctcgaaactcc taggctcagg caatcctttc accttagctt
 10081 ctcaaaagcac tgggactgta ggcactgagcc actgtgcctg gccccaaacg gcccttttac
 10141 ttggctttta ggaagcaaaa acggtgctta tcttaccctt tctcgtgtat ccaccctcat
 10201 cccttggctg gcctcttctg gagactgagg cactatgggg ctgcctgaga actcggggca
 10261 ggggtggtgg agtgcactga ggcaggtggt gaggaactct gcagaccctt ctcccttccc
 10321 aaagcagccc tctctgctct ccatcgcagg TGACATCCTA GCCCTGGTTT TTGGCCCTCCT
 10381 TTTTGCTGTC ACCAGCGTGG CGTTCCTTGT GCAGATGAGA AGGCAGCACA Ggtattacac
 10441 tgaccctttc ttcaggcaca agcttcccc acccttgtgg agtcaactca tgc aaaagcgc
 10501 atgcaaatga gctgctcctg ggccagtttt ctgattagcc ttcctgttg tgtacacaca
 10561 GAAGGGGAAC CAAAGGGGGT GTGAGCTACC GCCCAGCAGA GGTAGCCGAG ACTGGAGCCT
 10621 AGAGGCTGGA TCTTGGAGAA TGTGAGAAGC CAGCCAGAGG CATCTGAGGG GGAGCCGGTA
 10681 ACTGTCCTGT CCTGCTCATT ATGCCACTTC CTTTAACTG CCAAGAAATT TTTAAAATA
 10741 AATATTATA ATaaaatag tgttagtcac ctttgttccc caaatcagaa ggaggatatt
 10801 gaatttccta ttactgttat tagcaccaat ttagtggtaa tgcatttatt ctattacagt
 10861 tcggcctcct tccacacatc actccaatgt gttgctcc

Fig. 2F

Fig. 2

FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D

FIG. 2E

FIG. 2F

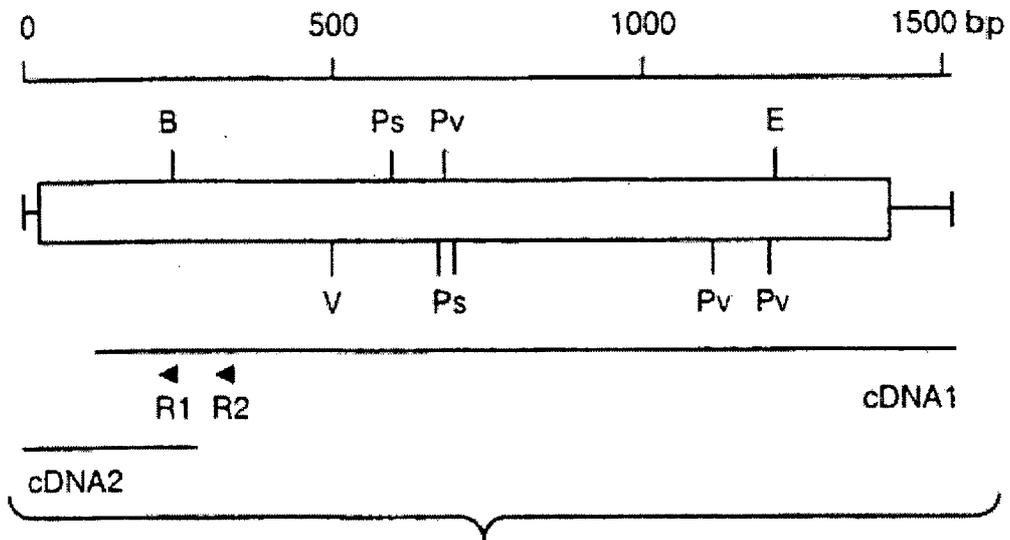


Fig. 3

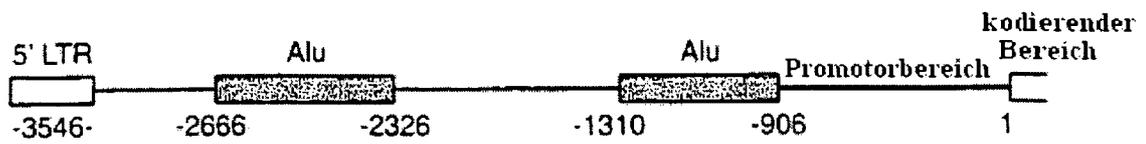


Fig. 4

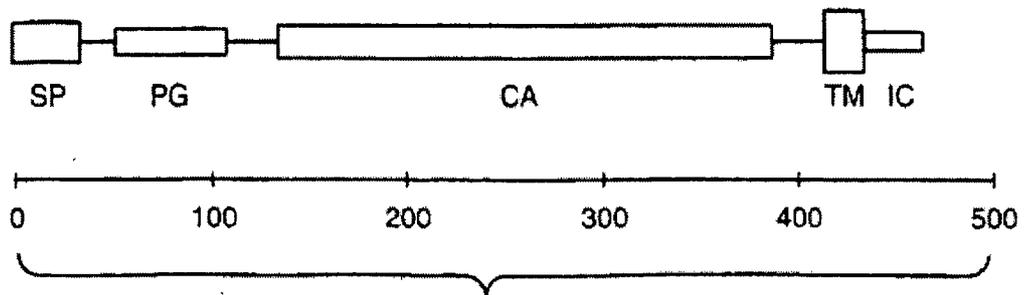


Fig. 8

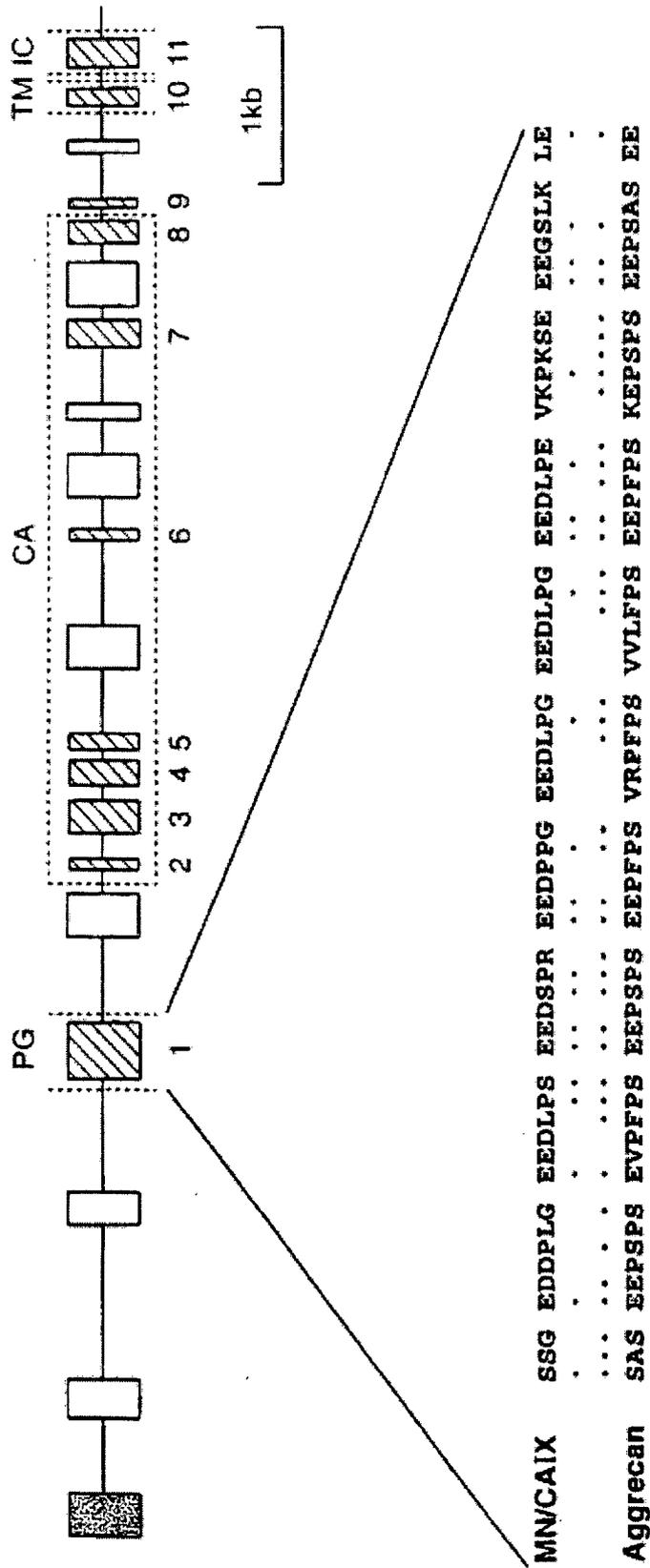


Fig. 5

-506 CTTGCTTTTC ATTCAAGCTC AAGTTGTCT CCCACATACC CATTACTTAA CTCACCCCTCG
 -446 GGCTCCCCTA GCAGCCCTGCC CTACCCTCTT ACCTGCTTCC TGGTGGAGTC AGGGATGTAT
 AP2
 -386 ACATGAGCTG CTTCCCTCT CAGCCAGAGG ACATGGGGGG CCCCAGCTCC CCTGCCCTTC
 -326 CCCTTCTGTG CCTGGAGCTG GGAAGCAGGC CAGGGTTAGC TGAGGCTGGC TGGCAAGCAG
 -266 CTGGGTGGTG CCAGGGAGAG CCTGCATAGT GCCAGGTGGT GCCTTGGGTT CCAAGCTAGT
 VII
 p53
 -206 CCATGGCCCC GATAACCCTC TGCCTGTGCA CACACCCTGCC CCTCACTCCA CCCCCATCCT
 VI
 Inr V
 -146 AGCTTTGGTA TGGGGGAGAG GGCACAGGGC CAGACAAACC TGTGAGACTT TGGCTCCATC
 IV
 AP1 III Inr
 -86 TCTGCAAAG GGCGCTCTGT GAGTCAGCCT GCTCCCCCTCC AGGCTTGCTC CTCCCCCACC
 II
 AP1 I AP2

 -26 CAGCTCTCGT TTCCAATGCA CGTACAGCCC GTACACACCG TGTGCTGGGA CACCCCACAG
 ...

Fig. 6

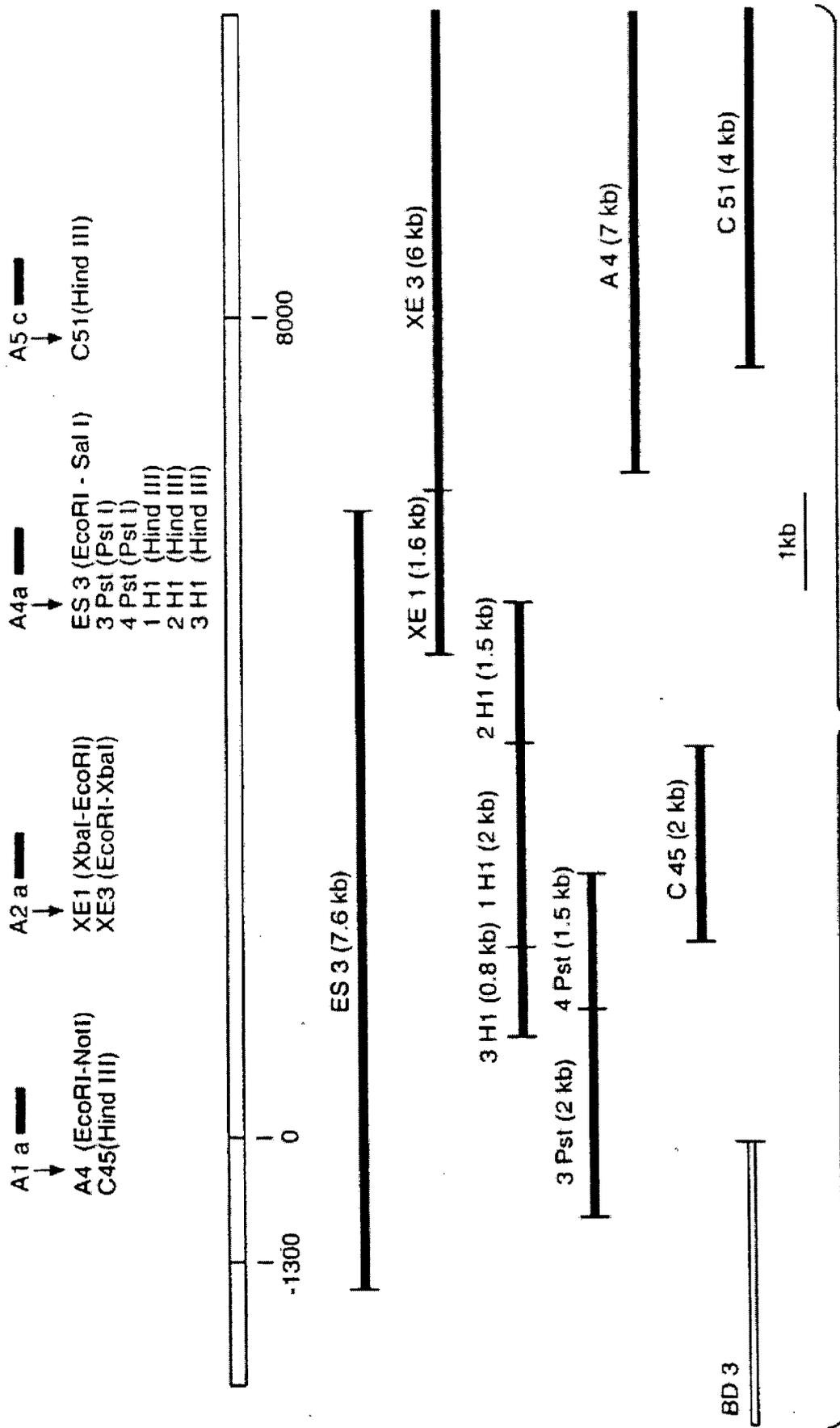


Fig. 7