(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 954894 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 954894

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/47
C07K 16/40
C12N 9/12
C12N 15/52

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.04.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **13.10.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.10.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **15.04.1994 PCT/US1994/004178**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

15.04.1993 US 049254

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • National Jewish Center for Immunology, 1400 Jackson Street, Denver CO 80206, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Johnson, Gary L., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä ja tuote solun reaktiokyvyn säätelemiseksi solunulkoisia sig naaleja kohtaan

Metod och produkt för reglering av cellens reaktionsförmåga emot yttre signaler

Menetelmä ja tuote solun reaktiokyvyn säätelemiseksi solunulkoisia signaaleja kohtaan - Metod och produkt för reglering av cellens reaktionsförmåga emot yttre signaler

Tämä keksintö koskee eristetyn MEK-kinaasin nukleiinihapposekvenssiä, olennaisesti puhtaita MEKK-proteiineja sekä menetelmiä, jotka liittyvät MEKK-, MEK- ja MAPK-entsyymien säätelyyn ja käyttöön.

Mitogeenin aktivoimat proteiinikinaasit (MAPK:t) (nimitetty myös solunulkoisen signaalin säätelemiksi kinaaseiksi eli ERK:eiksi) aktivoituvat nopeasti vasteena ligandin sitomiselle kasvuhormonitekijäreseptoreilla, jotka ovat tyrosiinikinaaseja (kuten esimerkiksi epidermaalinen kasvutekijäreseptori (EGF-reseptori)) ja sellaisilla reseptoreilla, jotka ovat kytketyt guaniininukleotidiä sitoviin, heterotrimeerisiin proteiineihin (G-proteiinien), kuten esimerkiksi tromibiinireseptoreit. MAPK:t näyttävät yhdistävän kokonaisuudeksi solunsisäisiä signaaleja, joita erilaiset toisiolähetit välittävät. MAPK:t fosforyloivat erilaisia entsyymeitä ja säätelevät niiden aktiivisuutta sekä transkriptiotekijöitä, joihin kuuluvat EGF-reseptori, Rsk 90, fosfolipaasi A_2, arakidonihapon metaboliitit, c-Myc sekä mahdollisesti c-Jun. Vaikka MAPK:iden nopea aktivoituminen reseptoreilla, jotka ovat tyrosiinikinaaseja, on riippuvaista Ras:stä, MAPK näyttää aktivoituvan G-proteiinin välityksellä pääasiallisesti sellaisia teitä, jotka eivät ole riippuvaisia Ras:stä.

Feromonin indusoiman signaalitien komplementaatioanalyysi hiivalla on määritellyt proteiinikinaasijärjestelmän, joka säätelee Spk1:n ja Fus3-Kss1:n, MAPK:n Schizosaccharomyces pombe ja Saccharomyces cerevisiae -homologien aktiivisuutta (katso esimerkiksi B.R. Cairns et al., Genes and Dev. 6, 1305 (1992); B.J. Stevenson et al., Genes and Dev. 6, 1293 (1992); S.A. Nadin-Davis et al., EMBO J. 7, 985 (1988); Y. Wang et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3554 (1991). S. cerevisiaessa pro-

teiinikinaasi Ste7 on Fus3-Kss1:n säätelijä viimeksimainitun yläpuolella. S. pombeen geenituotteet Byr1 ja Byr2 ovat vastaavasti homologisia Ste7:lle ja Ste11:lle. MEK- (MAPK- tai ERK-kinaasi) tai MKK- (MAP-kinaasikinaasi) entsyymit ovat sekvenssiltään samanlaiset kuin Ste7 ja Byr1. MEK:t fosforyloivat MAPK:t sekä tyrosiini- ja treoniinitähteissä, minkä tuloksena MAPK aktivoituu. Nisäkkään seriini-treoniiniproteiinikinaasi Raf fosforyloi ja aktivoi MEK:n, mikä johtaa MAPK:n aktivaatioon. Raf aktivoituu vasteena kasvutekijäreseptorin tyrosiinikinaasiaktiivisuudelle, ja sen tähden Raf voi aktivoida MAPK:n vasteena membraaniin liittyneiden tyrosiinikinaasien ärsytykselle. Raf ei ole sekvenssiltään Ste11:n ja Byr2:n kaltainen. Raf voi täten edustaa nisäkässoluissa divergenssiä eli eri suuntiin kehittymistä feromonille reagoivasta proteiinikinaasijärjestelmästä, joka määriteltiin hiivassa. Solu- ja reseptorispesifiset erot MAPK:iden säätelyssä viitaavat siihen, että on olemassa muita nisäkäs-MEK:iden säätelijöitä, jotka eivät ole riippuvaisia MAPK:eista.

Esillä oleva keksintö kohdistuu uuteen geeniin, jota nimitetään MEKK- tai nisäkkään MEK-kinaasiksi. MEKK:n säätely on käyttökelpoista erilaisissa terapeuttisissa sovelluksissa, joihin erilaistuminen ja mitogeneesi sisältyvät. Esillä oleva keksintö kohdistuu erityisesti mitogeenin aktivoimien proteiinikinaasien (MAPK:t) säätelyyn, joista keksinnön tekijä on havainnut, että MEKK aktivoi niitä. Koska MAPK:iden tiedetään fosforyloivan ja säätelevän entsyymien ja (tai) transkriptiotekijöiden aktiivisuutta, esillä oleva keksintö kohdistuu tällaisten aktiivisuuksien säätelyyn joko sellaisten nukleiinihapposekvenssien manipuloinnin kautta, joita MEKK koodittaa, ja (tai) siten että MEKK:ta annetaan haluttuun solupopulaatioon. Esillä oleva keksintö kohdistuu myös Raf:n ja MEKK:n kaksoisäätelyyn, jotta saadaan aikaan MAPK-aktiivisuuden halutut tasot sekä muutetaan tyypillisiä vasteita, joissa ligandi sitoutuu kasvutekijäreseptoreihin, kuten esimerkiksi tyrosiinikinaaseihin, sekä sellaisiin resptoreihin, jotka ovat kytketyt G-proteiineihin, kuten esimerkiksi trombiini-

reseptoriin. Esillä oleva keksintö kohdistuu sen tähden olennaisesti puhtaaseen MEKK:iin, sellaisiin eristettyihin nukleiinihapposekvensseihin, jotka koodittavat MEKK:ta, sellaisiin isäntäsoluihin, jotka on transformoitu MEKK-geenillä sekä vasta-aineisiin MEKK-proteiinia vastaan. Esillä oleva keksintö kohdistuu vielä geeniterapiaan, jossa käytetään MEKK-geeniä, jotta säädellään vasteita ligandin sitoutumiselle kasvutekijäreseptoreihin sekä G-proteiiniin kytkettyihin reseptoreihin.

Esillä olevan keksinnön erääseen näkökohtaan sisältyy MEKK:n inaktivointi etäpesäkkeiden, erilaisten syöpämuotojen, autoimmuunisairauksien, allergisten vasteiden ja tulehdusvasteiden inhiboimiseksi. Toiseen näkökohtaan sisältyy MEKK:n tuoton stimulointi haavaa parantavien aktiivisuuksien tehostamiseksi. Esillä oleva keksintö on sen tähden käyttökelpoinen, kun kontrolloidaan neutrofiili-, makrofaagi- ja basofiilisolujen aktiivisuutta tulehdusvasteissa keuhko- ja erilaisissa muissa kudoksissa. Esillä olevaa keksintöä voidaan sen tähden käyttää sairauden vaivaamissa sellaisissa teissä, joita verihiutaleita aktivoiva tekijä ja trombiinireseptorit säätelevät. Keksinnölle löytyy myös käyttöä angiogeneesin eli verisuonien uudismuodostuksen sekä tiettyjen kasvainlaatujen, erityisesti keuhkokarsinoomien inhibitiossa ja pehmeän lihaksen sekä valtimoon liittyvien kudosten käsittelyssä. Tämän lisäksi esillä olevaa keksintöä voidaan käyttää neutrofiilien ja makrofaagien kemotaktisten vasteiden inhibointiin sekä parantamaan allergisia vasteita.

Esillä oleva keksintö sulkee myös sisäänsä MEKK-geenin käytön geeniterapiassa, minkä avulla voidaan stimuloida erilaistumista ja mitogeeneesiä, jotta vähennetään esimerkiksi tiettyjen solutyyppien atrofiaa eli surkastumista, kuten Parkinsonin tai Alzheimerin taudissa, siten että MEKK toimii neurotrooppisena eli hermokudokseen etsiytyvänä kasvutekijänä.

Toisessa sovellusmuodossa MEKK:ta käytetään onkogeenien ja kasvainaineiden seulontaan, siten että valikoivalla määrityksellä määrittellään, aktivoiko MEKK tällaisia proteiineja. MEKK:n vasta-aineita voidaan käyttää määrittelemään MEKK:n ilmentymistasojen muutokset, jotka saattavat liittyä tiettyihin syöpiin ja autoimmuunisairauksiin.

Esillä oleva keksijä on tajunnut, että kun ligandit sidotaan B-solu- tai T-solupintareseptoreihin, MEKK on vallitseva fosforyloitu tuote, joka on tulos reseptoriin sitoutumisesta. Uskotaan, että MEKK sellaisenaan on pääasiallinen säätelyproteiini T- ja B-solujen signaalitiessä. Sen tähden uskotaan, että MEKK:n ilmentymisen säätely on käyttökelpoista, kun säädellään T- ja B-solujen kasvua ja erilaistumista.

MEKK:ta voidaan käyttää tuottamaan vasta-aineita, joita käytettään diagnostisiin ja terapeuttisiin sovelluksiin. MEKK:n vasta-aineita voidaan käyttää esimerkiksi sellaisten kasvainsolujen seulontaan, jotka ilmentävät onkoproteiineja, joita MEKK aktivoi.

Keksinnön toisessa sovelluksessa MEKK-proteiinia voidaan käyttää solun kasvun, mitogeneesin ja erilaistumisen stimulointiin <u>in vitro</u>. Esimerkiksi solujen minkä tahansa populaation leviäminen ja erilaistuminen, jota toivotaan, voidaan saavuttaa, siten että nämä solut asetetaan alttiiksi tehokkaille määrille MEKK:ta.

Keksinnön vielä eräässä sovellusmuodossa MEKK-proteiini voidaan saada aikaan sopivassa formulaatiossa sopiville soluille annettaviksi, jotta saadaan aikaan tulehduksenvastainen vaste.

Keksinnön eräässä toisessa sovellusmuodossa isäntäsolut transformoidaan MEKK-geenillä. Sen tähden MEKK-geeni on käyttökelpoinen työväline geeniterapiassa, kun hoidetaan erilaisia sairauksia, joihin kuuluvat syöpä, autoimmuunisairaudet,

hermosoluun liittyvät sairaudet, lihassairaudet, allergiset ja tulehdusvasteet. Tässä yhteydessä käytettynä "geeniterapia" tarkoittaa halutun geenin luovutusta tiettyyn solupopulaatioon, jotta saadaan aikaan tuon geenin ilmentyminen siinä.

Kuvio 1A on useiden solulinjojen ja hiiren kudosten yhden ainoan 7,8 kb:n suuruisen MEKK-mRNA:n Nothern-blottaus eli RNA:n tutkimus.

Kuvio 1B On MEKK-geenin Southern-blottaus eli DNA-tutkimus.

Kuvio 1C on immunoblottaus, joka ilmaisee MEKK:n 78 kd:n ja 50 kd:n suuruiset muodot jyrsijän solulinjoissa.

Kuvio 2A esittää MAPK:n aktivoitumista COS-soluissa, jotka on transfektoitu MEKK:lla.

Kuvio 2B on immunoblottaus, joka esittää MEKK:n ilmentymistä soluissa, jotka on transfektoitu vain vektorilla (kontrolli) tai sellaisella vektorilla, joka koodittaa MEKK:ta, jota oli käsitelty EGF:llä tai ilman sitä.

Kuvio 3 esittää MEK:n aktivointia ja fosforylointia sellaisissa COS-soluissa, jotka on transfektoitu MEKK:lla.

Kuvio 4A esittää MEK-1:n fosforylointia MEKK:lla.

Kuvio 4b esittää MEK-1:n fosforyloinnin ajan kulkua, kun fosforyloidaan sellaisella MEKK:lla, jota ilmennetään COS-soluissa.

Kuvio 4C on COS-soluissa yli-ilmennetyn MEKK:n immunoblottaus.

Kuvio 5A esittää MAPK:n fosforylointia aktivoidulla MEK-1:llä.

Kuvio 5B esittää MEK-1:n fosforylointia immuunisaostetulla MEKK:lla.

Kuvio 6A esittää MEK-1:n fosforylointia aktivoidulla Raf:llä.

Kuvio 6B esittää Raf:n aktiivisuutta COS-soluissa, jotka yli-ilmentävät MEKK:ta, jota on käsitelty EGF:llä.

Kuvio 7 esittää MEKK-proteiinin immuunisaostuksia, jotka on saatu MEKK-antiseerumilla.

Kuvio 8 esittää kinaasina inaktiivisen MEK-1:n fosforylointia immuunisaostetulla MEKK:lla tai Raf-B:llä.

Kuvio 9 esittää EGF:llä stimuloidun MEKK:n ja Raf-B:n aktivaation kulkua ajan funktiona.

Kuvio 10 esittää Raf-B:n immuunodepleetiota MEKK-immuunisaostuksista.

Kuvio 11 esittää Raf-B:n immunodepleetiota, joka vähentää Raf-B:n aktiivisuutta.

Kuvio 12 esittää MEKK- ja Raf-B-aktivaation inhibitiota dominantin, negatiivisen N^{17}RAS:n ilmentymisellä.

Kuvio 13 MEKK:n EGF-aktivaation inhibitio forskoliinilla.

Kuvio 14 on selkärankaisten ja hiivan signaaliteiden kaaviomainen esitys.

Kuvio 15 esittää typistettyjen MEKK-molekyylien parannettua MEKK-aktiivisuutta.

Esillä oleva keksintö koskee uutta MEKK-proteiinia, joka pystyy säätelemään signaalitransduktiota soluissa. Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiini voi sisältää täysimittaisen

MEKK-proteiinin tai sen osan. Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiini pystyy fosforyloimaan MEK-proteiinin ja (tai) inhiboimaan MEKK-kinaasiaktiivisuuden. Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiini sisältää mieluummin MEKK:n katalyyttisen domainin osan, joka on sellainen, että proteiini pystyy fosforyloimaan MEK-proteiinin, ja (tai) ainakin osan MEKK:n säätelydomainia, joka on sellainen, että proteiini pystyy inhiboimaan MEKK:n kinaasiaktiivisuuden.

Ste11- ja Byr2-nukleiinihapposekvenssejä käytettiin identifioimaan nisäkkään MEK-kinaasin (MEKK) cDNA. Suunniteltiin ainutlaatuisia, degeneroituneita inosiinioligonukleotidejä, jotka vastasivat sekvenssi-identtisyyden alueita Ste11- ja Byr2-geenien välillä. Sellaisten alukkeiden ja cDNA-templaattien avulla, jotka olivat peräisin NIH 3T3 -solujen polyadenyloidusta RNA:sta, eristettiin 320 emäsparin mittainen polymeraasiketjureaktion (PCR:n) monistustuote ja havaittiin, että sen sekvenssi oli samankaltainen sekä Ste11:n että Byr2:n kanssa. Tätä 320 emäsparin suuruista cDNA:ta käytettiin identifioitaessa MEKK:n cDNA:ta (tässä yhteydessä nimitetty MEKK 1:ksi), jonka suuruus oli 3260 emäsparia ja joka oli peräisin hiiren aivojen cDNA-kirjastosta. MEKK 1:n nukleotidisekvenssi määritettiin kaksisäikeisen DNA:n dideoksinukleotidisekvenssoinnilla. Nukleotidisekvenssi sekä siitä geneettisen translaation avulla MEKK 1:lle saatu aminohapposekvenssi esitetään taulukossa 1.

Taulukko 1

```
TACACTCCTT  GCCACAGTCT  GGCAGAAAGA  ATCAAACTTC  AGAGACTCCT
CCGGCCAGTT  GTAGACACTA  TCCTTGTCAA  GTGTGCAGAT  CCAACAGCCG
CACGAGTCAG  CTGTCCATAT  CTACAGTGCT  GGAACTCTGC  AAGGGCCAAG
CAGGAGAGCT  GGCGGTTGGG  AGAGAAATAC  TTAAAGCTGG  GTCCATCGGG
GTTGGTGGTG  TCGATTACGT  CTTAAGTTGT  ATCCTTGGAA  ACCAAGCTGA
ATCAAACAAC  TGGCAAGAAC  TGCTGGGTCG  CCTCTGTCTT  ATAGACAGGT
TGCTGTTGGA  ATTTCCTGCT  GAATTCTATC  CTCATATTGT  CAGTACTGAT
GTCTCACAAG  CTGAGCCTGT  TGAAATCAGG  TACAAGAAGC  TGCTCTCCCT
CTTAACCTTT  GCCTTGCAAT  CCATTGACAA  TTCCCACTCG  ATGGTTGGCA
AGCTCTCTCG GAGGATATAT CTGAGCTCTG CCAGG
     ATG GTG ACC GCA GTG CCC GCT GTG TTT TCC AAG CTG GTA
ACC                                                    527
     Met Val Thr Ala Val Pro Ala Val Phe Ser Lys Leu Val
Thr

ATG CTT AAT GCT TCT GGC TCC ACC CAC TTC ACC AGG ATG CGC CGG
CGT                                                    575
```

Met Leu Asn Ala Ser Gly Ser Thr His Phe Thr Arg Met Arg Arg Arg

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ACG TGG TAGTTAATTG TTCAGATCAG CTCTAATGGA GACAGGATAT CGAACCGGGA 2551
Thr Trp

GAGAGAAAAG AGAACTTGTG GGCGACCATG CCGCTAACCG CAGCCCTCAC
GCCACTGAAC AGCCAGAAAC GGGGCCAGCG GGGAACCGTA CCTAAGCATG
TGATTGACAA ATCATGACCT GTACCTAAGC TCGATATGCA GACATCTACA
GCTCGTGCAG GAACTGCACA CCGTGCCTTT CACAGGACTG GCTCTGGGGG
ACCAGGAAGG CGATGGAGTT TGCATGACTA AAGAACAGAA GCATAAATTT
ATTTTTGGAG CACTTTTTCA GCTAATCAGT ATTACCATGT ACATCAACAT
GCCCGCCACA TTTCAAACTC AGACTGTCCC AGATGTCAAG ATCCACTGTG
TTTGAGTTTG TTTGCAGTTC CCTCAGCTTG CTGGTAATTG TGGTGTTTTG
TTTTCGATGC AAATGTGATG TAATATTCTT ATTTTCTTTG GATCAAAGCT
GGACTGAAAA TTGTACTGTG TAATTATTTT TGTGTTTTTA ATGTTATTTG

GTACTCGAAT TGTAAATAAC GTCTACTGCT GTTTATTCCA GTTTCTACTA
CCTCAGGTGT CCTATAGATT TTTCTTCTAC CAAAGTTCAC TCTCAGAATG
AAATTCTACG TGCTGTGTGA CTATGACTCC TAAGACTTCC AGGGCTTAAG
GGCTAACTCC TATTAGCACC TTACTATGTA AGCAAATGCT ACAAAAAAAA
AAAAAAAAA

Uudet, ainutlaatuiset MEKK-proteiinit, MEKK 2, MEKK 3 ja MEKK 4 identifioitiin PCR:llä. MEKK 2:hta ja MEKK 3:a vastaavat aminohapposekvenssit, verrattuina MEKK 1:n aminohapposekvenssiin, esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2

MEKK
MVTAVPAVFSKLVTMLNASGSTHFTRMRRRLMAIADEVEIAEVIQLGVEDTVDGHQDSL 1
MDDQQALNSIMQDI---------- 2
MDEQEALDSIMKDLVALQMSRRTRL- 3

AVAPTSCLENSSLEHTVHREKTGKGLSATRLSASSEDISDRLAGVSVGLPSSTTTEQ
PKP 1
AVLHKPVGQHYLYKKPGKQNLHHQKNRMMFESNLNIEEEKRILQVTRPVKLEDLRSK
SKI 2
S--GYETMKNKDTGHPNRQSDVRIKFEHNGERRI-
IAFSRPVRYEDVEHKVTTVFGQPLD 3

A V Q T K G R P H S Q C L N S S -
PLSHAQLMFPAPSAPCSSAPSVPDISKHRPQAFVPCKIPSASP 1
AFGQSMDLHYTNNELVIPLTTQDDLDKAVELLDRSIHMKSL-KILLVVNGSTQA-
TNLEP 2
LHYMNNELSILLKNQDDLDKAIDILDRSSSMKSLRILLLSQDRNHTSSSPHSGVSRQ
VRI 3

Q T Q R K F S L Q F Q R N C S E H R D S D Q L S P V F T Q S -
RPPPSSNIHRPKPSRPVPGSTSKLGDATK 1
S P S P E D L N N T P L G A E R K K R L S V V G P P N R - -
DRSSPPPGYIPDILHQIARNGSFTSINSEG 2
KPSQSAGDINTIYQAPEPRSRHLSVSSQNPGRSSPPPGYVPERQQHIARQGSYTSIN
SEG 3

SSMTLDLGSASRCDDSFGGGGNSGNAVIPSDETVFTPVEDKCRLDVNTELNSSIEDL
LEA 1
E F I P E S M D Q -
MLDPLSLSSPENSGSGSCPSLDSPLDGESYPKSRMPRAQSYPDNHQEFTD 2
EFIPETSEQCMLDPLSSAENSLSGSCQSLDRSADSPSFRKSQMSRARSFPDNR---
ECSD 3

SMPSSDTTVTFKSEVAVLSPEKAENDDTYKDDVNHNQKCKEKMEAEEEEALAIAMAM
SAS 1
YDNPIFEKFGKGGTYPRRYHVSYHHQEYNDGRKTFPRARRTQGTSFRSPVSFSPTDH
SLS 2

K - - - -
RETQLYDKGVKGGTYPRRYHVSVHHKDYNDGRRTFPRIRRHQGNLFTLVPSSRSL
3

QDALPIVPQLQVENGEDIIIIQQDTPETLPGHTKAKQPYREDAEWLKGQQIGLGAFS
SCY
1
TSSGSSVFTPEYDDSRIRRRGSDIDNPTLTVTDISPPSRSPRAPTNWRLGKLLGQGA
FGR
2
STNGENMGVAVQYLDPRGRLRSADSENALTVQERNVPTKSPSAPINWRRGKLLGQGA
FGR
3

QAQDVGTGTLMAVKQVTYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMGHLNHPNIIRMLGATCE
KSN
1
VYLCYDVDTGRELAVKQVQFNPESPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLR
DPQ
2
VYLCYDVDTGRELASKQVQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLR
DRA
3

YNLFIEWMAGGSVAHLLSKYGAFKESVVINYTEQLLRGLSYLHEN--Q-
IIHRDVKGANL
1
EKTLSIFMELSPGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIVHRDIKG
ANI
2
EKILTIFMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIVHRDIKG
ANI
3

L I D S T G Q - R L R I A D F G A A A R L A S K -
GTGAGEFQGQLLGTIAFMAPEVLRGQQYGRSCDVW
1
L R D S T G N I K L G D F G A S K R L Q T I C L S G T G M K S V T G - P Y - - - -
WMSPEVISGEGYGRKADIW
2
L R D S A G N V K L G D F G A S K R L Q T I C M S G T G I R S V T G T P Y - - - -
WMSPEVISGEGYGRKADVW
3

SVGCAIIEMACAKPPWNAEKHSNHLALIFKIASATTAPSIPSHLSPGLRDVAVRCLE
LQP
1
S V A C T V V E M L T E K P P W - A E F E A - M A A -
IFKIATQPTNPKLPPHVSDYTRDFLKRIFVEAK
2
S L G C T V V E M L T E K P P W - A E Y E A - M A A -
IFKIATQPTNPQLPSHISEHGRDFLRRIFVEAR
3

QDRPPSRE-LLKHPVFRTTW
1
L-RP-SAEELLRHMFVHYH
2
Q-RP-SAEELLTHHFAQLVY
3

Puolilihavalla painettu aminopääte - Säätelydomaini

Alleviivattu sekvenssi - Säätelysaranasekvenssi

Puolilihavalla painetut vinokirjaimet - Katalyyttinen domaini

MEKK 4:n kinaasidomainin aminohapposekvenssi esitetään taulukossa 3 verrattuna MEKK 1:n, MEKK 2:n ja MEKK 3:n kinaasidomaineihin.

Taulukko 3.

..IRFQPNDHKTIKETADEELKIFEGIKHPNLVRYFGV..ELHREEM.YI
MEKK4
TYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMGHLNHPNIIRMLGATCEKSNYNLFIE
MEKK1
QVQFNPESPETSKEVNALECEIQLLKNLLHERIVQYYGCLRDPQEKTLSI
MEKK2
QVQFDPDSPETSKEVSALECEIQLLKNLQHERIVQYYGCLRDRAEKILTI
MEKK3

IFMEYCDEGTLEEVSRLGLQEHV.I.RLYTKQITVAINVLHEHGNV
MEKK4
.WMAGGSVAHLLSKYGAFKESVV.IN..YTEQLLRGLSYLHENQII
MEKK1
.FMELSPGGSIKDQLKAYGALTENVTRKYTRQILEGVHYLHSNMIV
MEKK2
.FMEYMPGGSVKDQLKAYGALTESVTRKYTRQILEGMSYLHSNMIV
MEKK3

Viitaten taulukkoon 1, aloituskodoneja koskevan Kozakin konsensussekvenssin perusteella voidaan ennustaa, että aloitusmetioniini sijaitsee nukleotidissa 486. Sellainen cDNA, jolla on alussa tämä metioniini, koodittaa 672 aminohapon mittaista proteiinia, joka molekyylikooltaan vastaa 73 kD:tä. Asemassa 441 on on toinen metioniini, joka on lukukehyksessä ja joka ei noudata Kozakin sääntöä mutta joka tuottaisi proteiinin, jossa on 687 aminohappotähdettä (74,6 kD). Tämä molekyylikoko korreloi MEKK:n näennäisen molekyylikoon kanssa, joka on 78 - 80 kD:tä ja määritetty SDS-polyakryyliamidigeelilelektroforeesilla (PAGE:llä) ja immunoblottauksella.

MEKK-proteiinin primaarinen sekvenssi viittaa kahteen toiminnalliseen domainiin, (i) NH_2-terminaaliseen osaan, jossa on runsaasti seriiniä ja treoniinia, joilla voi olla säätely-

rooli, sekä (ii) COOH-terminaaliseen, proteiinikinaasin katalyyttiseen domainiin. NH_2-terminaalisista 400 aminohaposta 20 prosenttia on seriinejä tai treoniineja, kun taas niissä on vain kaksi tyrosiinia. Useat mahdolliset sellaiset kohdat, jotka fosforyloituvat proteiinikinaasi C:llä, ovat selviä NH_2-terminaalisessa alueessa; MEKK-sekvenssissä ei kooditu yhtään SH2- tai SH3-domainia. Katalyyttinen domaini on paikannettu MEKK:n COOH-terminaaliseen puoliskoon.

MEKK:ta koodittaa 7,8 kb:n suuruinen mRNA, joka ilmentyy useissa solulinjoissa ja hiiren kudoksissa. Kuvio 1A esittää yhden ainoan 7,8 kb:n suuruisen MEKK-mRNA:n Nothern-blottausta (RNA) useissa solulinjoissa ja hiiren kudoksissa. Geelille pantiin yhtä suuret määrät (20 μg) täydellistä RNA:ta, kuten etidiumbromidivärjäys ilmaisi. Blotit tutkittiin joko 320 emäsparin mittaisella cDNA-fragmentilla, joka koodittaa MEKK-kinaasidomainin osaa, tai 858 emäsparin suuruisella fragmentilla, joka koodittaa MEKK:n NH_2-terminaalista osaa. MEKK-mRNA ilmentyy erittäin voimaakkasti hiiren sydämessä ja pernassa, kun taas maksassa sitä on vähäisiä määriä. Sellainen MEKK-mRNA, joka on 7,8 kiloemäksen suuruinen, identifioitiin koettimilla, jotka on johdettu MEKK-cDNA:n sekä 5'- että 3'-päistä.

Uskotaan, että MEKK on yhden ainoan geenin tuote. Kuvio 1B esittää MEKK-geenin Southern-blottausta (DNA). Hiiren genomista DNA:ta (10 μg) käsiteltiin joko Bam HI:llä, Hind III:-lla tai Eco RI:llä ja pantiin geeleille. Blotit tutkittiin, siten että koettimena oli MEKK-geenin fragmentti, joka oli 320 emäsparin mittainen. Yhden raidan ilmaantuminen viitaa siihen, että yksi geeni koodittaa MEKK:ta. Kahden vyöhykkeen ilmaantuminen Eco RI:llä pilkotussa tuotteessa ilmaisee Eco RI -kohdan todennäköisen läsnäolon sekvenssissä, jonka koetin kattaa. MEKK-mRNA ilmentyy voimaakkaasti hiiren sydämessä ja pernassa, kun taas sitä on vähäisiä määriä on maksassa. Suuruudeltaan 7,8 kb:n mittainen MEKK-mRNA identifioitiin koettimilla, jotka ovat peräisin MEKK-cDNA:n sekä 5'- että 3'-

päistä. Täten MEKK-cDNA:sta puuttuu sekvenssi, joka on noin 4 kb:n suuruinen ja jolle ei oletettavasti tapahdu translaatiota.

Solun hajoamistuotteiden immunoblottaukset tutkittiin affiniteetilla puhdistetuilla vasta-aineilla, jotka oli kehitetty 15 aminohapon mittaista peptidiä DRPPSRELLKHPVER:ää kohtaan, joka oli peräisin MEKK:n COOH-päätteestä, joka on määritelty vallitsevaksi raidaksi, joka vaeltaa 78 kD:n kohdalla.

Kuvio 1C esittää MEKK:n 78 ja 50 kD:n suuruisten muotojen ilmentymista jyrsijän solulinjoissa. Liukoista soluproteiinia (100 μg) tai yhdistelmä-MEKK-COOH-terminaalista fuusioproteiinia (30 ng) pantiin geelille immunoblottausta varten affiniteetilla puhdistetun MEKK-vasta-aineen kanssa (laimennus 1:300). Feokromosytoomasolut (PC12), Rat 1a ja NIH 3T3 -solut sisälsivät samaa 78 kD:n mittaista, immunoreaktiivista proteiinia, joka usein vaeltaa dublettina SDS-PAGE:lla. Vallitsevia, 50 kD:n suuruisia, immunoreaktiivisia lajeja oli myös tavallisesti läsnä, mutta niiden intensiteetti vaihteli valmisteesta valmisteeseen. Se on luultavasti 78 kD:n suuruisen proteiinin fragmentti, joka on saatu aikaan proteolyysillä. Sekä 78 että 50 kD:n suuruisten, immunoreaktiivisten raitojen visualisointi inhiboitiin, siten että 15 aminohapon mittaista peptidiantigeeniä inkuboitiin vasta-aineen kanssa. Immunoblottauksella ilmaistu MEKK-proteiini on molekyylikooltaan samankaltainen kuin ennustettiin MEKK-cDNA:n avoimesta lukukehyksestä.

MEKK-proteiini ilmennettiin COS-1-soluissa, jotta määriteltiin sen funktio sellaisen signaalijärjestelmän säätelyssä, johon MAPK sisältyy. Viitaten kuvioon 2A, kun MEKK yli-ilmennettiin COS-1-soluissa, MAPK-aktiivisuus oli neljästä viiteen kertaa suurempi kuin sen aktiivisuus kontrollisoluissa, jotka oli transfektoitu sellaisella plasmidilla, josta MEKK-cDNA-insertti puuttui. COS-solut transfektoitiin halkaisijaltaan 100 mm:n suuruisissa viljelymaljoissa joko pCVMV5-ilmentymis-

vektorilla yksinään (1 µg:kontrolli) tai pCVMV5-MEKK-rakenteella (1 µg: MEKK). 48 tunnin kuluttua solut asetettiin seerumittomaan alustaan, joka sisälsi häränseerumin albumiinia (0,1 prosenttia), 16 - 18 tunniksi, lepotilan indusoimiseksi. Sitten soluja käsiteltiin humaani EGF:llä (30 ng/ml) (+EGF) tai puskurilla (kontrolli) 10 minuutin ajan, ne pestiin kaksi kertaa kylmässä, fosfaatilla puskuroidussa keittosuolaliuoksessa (PBS) ja solut hajotettiin solunhajottamispuskurissa, joka oli 50-mmoolaarinen ß-glyserofosfaatin (pH 7,2), 100- µmolaarinen natriumvanadaatin, 2-mmolaarinen $MgCl_2$:n, 1-mmolaarinen EGTA:n suhteen ja sisälsi Triton X-100:aa (0,5 prosenttia), leupeptiiniä (2 µg/ml), aprotiniinia (2µg/ml) sekä 1-millimolaarista ditiotreitolia (600 µl). Sen jälkeen kun oli sentrifugoitu 10 minuutin ajan maksimi nopeudella mikrofuugissa, sellaiset COS-solujen hajoamistuotteet, jotka sisälsivät 0,5 - 1 milligramman liukoista proteiinia, pantiin FPLC:hen MONO Q -pylväässä ja eluoiduista jakeista määritettiin MAPK-aktiivisuus. MAPK aktivoitui COS-soluissa, jotka oli otettu pois seerumista ja joihin ei lisätty mitään kasvutekijää. MAPK:n aktiivisuus oli samankaltainen kuin kontrollisoluilla, sen jälkeen kun niitä oli stimuloitu EGF:llä. Sellaisten COS-solujen, jotka lyhytaikaisesti yli-ilmensivät MEKK:ta, stimulointi EGF:llä lisäsi vain vähän MAPK-aktiivisuutta verrattuna sellaiseen aktiivisuuteen, joka havaittiin MEKK:n ilmentyessä ilman stimulointia.

MEKK-proteiini ilmaistiin transfektoiduissa COS-soluissa immunoblottauksella. Kuvio 2B esittää immunoblottausta, joka ilmaisee MEKK:n ilmentymisen soluissa, jotka on transfektoitu vain vektorilla (kontrolli) tai sellaisella vektorilla, joka koodittaa MEKK:ta, jota oli käsitelty EGF:llä tai joka oli ilman käsittelyä. Immunoblottausta varten geelille pantiin yhtä suuret määrät (100 µg) hajotettuja COS-soluja. COS-kontrollisolujen hajoamistuotteissa ilmaistiin ainoastaan 50 kd:n suuruinen fragmentti, joka oli MEKK-immunoreaktiivinen. MEKK:n lyhytaikainen ilmentyminen COS-soluissa tuotti vallitsevan 82 kD:n raidan, joka oli vähän suurempi kuin raita,

joka havaittiin PC12-soluissa, Rat 1a tai NIH 3T3 -soluissa. Tämä johtuu ilmeisesti metioniinin käytöstä translaation aloitusta varten asemassa 441 pikemmin kuin asemassa 486. Sellaiset raidat, jotka sijaitsevat 82kD:n suuruisen MEKK:n raidan yläpuolella, näyttävät muodostuvan MEKK-proteiinin fosforylaatiosta. Sellaisen raitojen ryhmän, joka sijaitsee 82 kD:n MEKK-proteiinin alapuolella, uskotaan syntyvän proteolyysin tuloksena. Kun antiseerumiin lisättiin 15 aminohapon mittaista MEKK-peptidiantigeeniä immunoblottauksen aikana, estettiin kaikkien immunoreaktiivisten raitojen ilmaisu; näitä raitoja ei ilmaistu COS-kontrollisolujen uutteissa, mikä viitaa siihen, että ne olivat peräisin ilmennetystä MEKK-proteiinista.

Havaittiin, että MEKK:n ilmentyminen COS-soluissa aktivoi MEK:ta, sellaista kinaasia, joka fosforyloi ja aktivoi MAPK:-ta. Yhdistelmä-MAPK:ta käytettiin MEK-aktiivisuuden määrittämiseen COS-soluhajotteissa, jotka oli fraktioitu nopealla proteiiniliuoskromatografialla (FPLC) Mono S -pylväässä. Sellainen cDNA, joka koodittaa Xenopus laeviksesta saatua p42 MAPK:ta, kloonattiin pRSETB-ilmentymisvektoriin. Tätä rakennetta käytettiin, kun Escherichia coli BL21 (DE3):n LysS-kannassa ilmennettiin p42 MAPK -fuusioproteiinia, joka NH_2-päätteessä sisältää polyhistidiinisekvenssin. Sellaisia viljelmiä, jotka sisältävät ilmentymisplasmidin, kasvatettiin 37 °C:ssa optiseen tiheyteen, joka 600 nm:ssä oli 0,7 - 0,9. Lisättiin isopropyyli-ß-tiogalaktopyranosidia (0,5 mmoolia), jotta fuusioproteiinisynteesi indusoitiin, ja viljelmiä inkuboitiin kolmen tunnin ajan. Sitten solut koottiin ja hajotettiin jäädyttämällä, sulattamalla ja äänikäsittelyllä. Soluhajotetta sentrifugoitiin nopeudella 10 000 g 15 minuutin ajan 4 °C:ssa. Sitten supernatantin annettiin läpäistä Ni^{2+}:lla varattu Sepharose-hartsi ja liukoinen yhdistelmä-MAPK eluoitiin natriumfosfaattipuskurissa (pH 4,5). Puhdistettu yhdistelmä-MAPK oli enemmän kuin 80-prosenttisesti puhdas. Puhdistettua yhdistelmä-MAPK:ta käytettiin MEK:n substraattina, ja

se katalysoi sellaisen peptidin fosforylaation, joka koostuu EGF-reseptorin tähteistä 662 - 681 ($EGFR^{661-681}$).

Liukoiset soluhajotteet, jotka saatiin COS-soluista, transfektoitiin lyhytaikaisesti MEKK:lla, ne mock-transfektoitiin (kontrolli) tai mock-transfektoitiin ja niitä käsiteltiin EGF:llä (30 ng/ml) (+EGF), fraktioitiin FPLC:llä Mono S -pylväässä ja mitattiin MEK-aktiivisuus. Endogeeninen MAPK eluoitui jakeissa 2 - 4, kun taas MEK sisältyi jakeisiin 9 - 13. Endogeenisen MEK-aktiivisuuden määrittämistä varten solut pestiin kaksi kertaa kylmässä PBS:ssä ja ne hajotettiin 650 µl:ssa liuosta, joka sisälsi 50 mmoolia ß-glyserofosfaattia, 10 mmoolia 2-N-morfolinoetaanisulfonihappoa (pH 6,0), 100 µmoolia natriumvanadaattia, 2 mmoolia $MgCl_2$:hta, 1 mmoolia EGTA:ta, Triton X-100:aa (0,5 prosenttia), leupeptiinia (5 µg/ml), aprotiniinia (2 µg/ml) sekä 1 mmoolia ditiotreitolia. Sen jälkeen kun liuosta oli sentrifugoitu mikrofugissa maksiminopeudella 10 minuutin ajan, liukoiset soluhajotteet (1 - 2 mg proteiinia) pantiin Mono S -pylvääseen, joka oli tasapainotettu eluutiopuskurillaa (50-mmolaarinen ß-glyserofosfaatin, 10-mmolaarinen MES:n (pH 6,0), 100-µmolaarinen natriumvanadaatin, 2-mmolaarinen $MgCl_2$:n, 1-mmolaarinen EGTA:n ja 1-mmolaarinen ditiotreitolin suhteen. Pylväs pestiin puskurilla (2 millitraa) ja sidotut proteiinit eluoitiin 30 millitralla lineaarista gradienttia, jossa oli 0 - 350 mmoolia NaCl:a eluutiopuskurissa. Osasta (30 µl) kutakin jaetta määritettiin MEK-aktiivisuus, siten että jakeen osa sekoitettiin puskurin kanssa (25-mmoolia ß-glyserofosfaattia, 40-mmoolia N-(2-hydroksietyyli)piperatsiini-N'-(2-etanolisulfonihappoa) (pH 7,2), 50-mmoolia natriumvanadaattia, 10-mmoolia $MgCl_2$:a, 100 µmoolia τ-^{32}P-ATP:a (3000 - 4000 iskua minuutissa/pmooli), inihibiittoriproteiini-20:ntä (IP-20; TTYADFIASGRTGRRNAIHD; 25 µg/ml), 0,5 mmoolia EGTA:ta, yhdistelmä-MAP-kinaasia (7,5 µg/ml) sekä 200 µmoolia $EGFR^{662-681}$:ää) 40 µl:n lopullisessa tilavuudessa. Sen jälkeen kun seosta oli inkuboitu 30 °C:ssa 20 minuutin ajan, mitattiin τ-^{32}P-ATP:n liittyminen $EGFR^{662-681}$:ään. Tässä määrityksessä mitattiin kunkin pylväsjakeen

kyky aktivoida lisättyä yhdistelmä MAPK:ta τ-^{32}P-ATP:n liittymisenä MAPK-substraattiin, peptidiin, joka on peräisin EGF-reseptorista (EGFR). Viitataan kuvioon 3, jossa eluoituneen aktiivisuuden ensimmäinen huippu edustaa endogeenista, aktivoitua MAPK:ta, joka suoraan fosforyloi EGFR-peptidisubstraattia.

Aktiivisuuden toinen huippu edustaa COS-solujen endogeenista MEK:ta. Endogeenista MEK-aktiivisuutta luonnehdittiin Mono S FPLC -fraktioinnilla. Kuvio 4A ilmaisee, että endogeeninen MEK aktivoitui soluissa, jotka yli-ilmensivät MEKK:ta; MEK:n aktiivisuus oli lähimain puolet aktiivisuudesta, joka havaittiin EGF:llä stimuloiduissa soluissa. MEKK:n ilmentyminen täten näyttää aktivoivan MAPK:ta, siten että MEK aktivoidaan.

COS-solujen hajoamistuotteet fraktioitiin FPLC:llä Mono Q -pylväässä, jotta ilmennetty MEKK puhdistettiin osittain. Puhdistettua yhdistelmä MEK-1:htä käytettiin sitten MEKK:n substraattina τ-^{32}P-ATP:n läsnäollessa sen määrittämiseksi, fosforyloiko MEKK suoraan MEK-1:n.

Sellainen cDNA, joka koodittaa MEK-1:htä, saatiin hiiren B-solu-cDNA-templaateista polymeraasiketjureaktion avulla ja oligodeoksinukleotidialukkeilla, jotka vastaavat osia MEK-1:n 5'-koodausalueesta ja 3'-alueesta, jolle ei tapahdu translaatiota. Katalyyttisesti inaktiivinen MEK-1 tuotettiin saittiin kohdistetulla mutaatiolla, jossa Lys^{343} mutatoitiin Met:ksi. Tyypiltään luonnonmukainen MEK-1- ja katalyyttisesti inaktiivinen MEK-1-proteiini ilmentyivät pRSETA:ssa yhdistelmäfuusioproteiineina, jotka kumpikin sisälsivät polyhistidiinisekvenssin NH_2-päätteessään.

Sellaiset COS-soluhajotteet, jotka transfektoitiin MEKK:lla, mock-transfektoitiin (kontrolli), käytettiin FPLC:hen Mono Q -pylväässä, kuten edellä kuvattiin. Eriä (20 μl sellaisista jakeista, jotka sisälsivät MEKK:ta, sekoitettiin puskurin

kanssa, joka sisälsi 50 mmoolia ß-glyserofosfaattia (pH 7,2), 100 µmoolia natriumvanadaattia, 2 mmoolia $MgCl_2$:a, 1 mmoolin EGTA:ta, 50 µmoolia ATP:tä, IP-20:ntä (50 µg/ml) sekä 10 µl τ-^{32}P-ATP 40 µlitran reaktiotillavuudessa ja seosta inkuboitiin 40 minuutin ajan katalyyttisesti inaktiivisen yhdistelmä-MEK-1:n (150 ng) (kinaasi-MEK-1) kanssa (+) ja ilman sitä (-). Reaktiot pysäytettiin, siten että lisättiin 5 x SDS -näytepuskuria (10 µl), 1 x SDS -puskuria, joka sisälsi kaksi prosenttia SDS:ää, viisi prosenttia glyserolia, 62,5 mmoolia tris-HCl:a (pH 6,8), viisi prosenttia ß-merkaptoetanolia sekä 0,001 prosenttia bromifenolisinistä. Näytteitä keitettiin kolmen minuutin ajan ja niille suoritettiin SDS-PAGE ja autoradiografia. Autofosforyloitu, tyypiltään luonnonmukainen yhdistelmä-MEK-1 (WT MEK-1) vaelsi fosforyloidun, katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:hden kanssa. MEKK pystyi forforyloimaan MEK-1:hden. Kontrollisolujen hajotteiden vastaavat jakeet eivät kuitenkaan kyenneet fosforyloimaan MEK-1:htä. MEK-1:n muunnettua muotoa, joka on katalyyttisesti inaktiivinen, käytettiin fosforylaatiomäärityksessä varmistamaan, että se ei autofosforyloinut kuten tyypiltään luonnonmukainen MEK-1. Katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:n fosforylaatioon MEKK:lla vaikutti aika (kuvio 4B); myös MEKK fosforyloitui. Jaetta 22 FPLC:stä, johon käytettiin Mono Q -pylvästä (20 µl), inkuboitiin katalyyttisesti aktiivisen yhdistelmä-MEK-1:n kanssa (0,15 µg) ja ilman sitä esitetyt ajat. Kinaasi-MEK-1:n ja MEKK:n fosforylaatio oli nähtävissä viiden minuutin kuluttua, ja se oli suurimmillaan 20 minuutin kuluttua. Ajasta riippuvainen lisäys MEKK-proteiinin fosforylaatiossa korreloi MEKK-proteiinin liikkuvuuden vähenemisen kanssa SDS-PAGE:n aikana. Immunoblottaus havainnollisti, että MEKK-proteiini eluoitui yhdessä (FPLC:n jälkeen Mono Q -pylväässä) sellaisen aktiivisuuden huipun kanssa (jae 22), joka fosforyloi MEK:ta (kuvio 4C). Immunoblottauksessa havaittiin myös MEKK:n hitaasti vaeltavat lajit.

Sen määrittämiseen, tuottiko MEK:n fosforylointi yli-ilmenetyllä MEKK:lla MEK:n aktivaation, käytettiin yhteen kytketys-

sä määritysjärjestelmässä tyypiltään luonnonmukaista yhdistelmä-MEK-1:htä sekä MAPK:n muunnettua muotoa, joka on katalyyttisesti inaktiivinen. COS-soluhajotteet erotettiin Mono Q -FPLC:llä ja MEKK:ta sisältävät jakeet määritettiin niiden kyvyn suhteen aktivoida lisättyä, tyypiltään luonnonmukaista MEK-1:htä, siten että se fosforyloisi katalyyttisesti inaktiivista yhdistelmä MAPK:ta γ^{32}P-ATP:n läsnäollessa. COS-solujen hajotteet, jotka oli transfektoitu MEKK:lla tai mock-transfektoitu (kontrolli), fraktioitiin FPLC:llä Mono Q -pylväässä ja sellaisten jakeiden eriä (20 µl), jotka sisälsivät MEKK:ta, sekoitettiin puskurin kanssa. Kutakin jaetta inkuboitiin puhdistetun, tyypiltään luonnonmukaisen MEK-1:hden (150 ng) kanssa sekä puhdistetun, katalyyttisesti inaktiivisen (kinaasi$^-$) yhdistelmä-MAPK:n (300 ng) kanssa. Viitaten kuvaan 5A, COS-soluhajotteista jakeet 20 - 24 transfektoitiin MEKK:lla, joka oli aktivoitu MEK-1:hdellä. Täten MEKK fosforyloi ja aktivoi MEK-1:hden, mikä johti MAPK-fosforylaatioon.

Sen varmistamiseksi, aktivoiko MEKK MEK:n suoraan eikä yhden tai useamman muun kinaasin kautta, joita sisältyi pylväsjakeisiin, yli-ilmennetty MEKK immuunisaostettiin COS-soluhajotteista antiseerumilla, joka oli muodostettu MEKK-fuusioproteiinin COOH-päätettä kohtaan. MEKK-cDNA pilkottiin Pst I:llä ja Kpn 1:llä, millä tavalla luotiin 1670 bp:n suuruinen fragmentti, joka koodittaa MEKK:n katalyyttistä domainia. Tämä fragmentti ilmentyi pRSETC:ssä yhdistelmäfuusioproteiinina, joka NH_2-päätteessään sisälsi polyhistidiinisekvenssin. MEKK-fuusioproteiinin puhdistettua COOH-päätettä käytettiin polyklonaalisen antiseerumin tuottamiseen. Immuunisaostettu MEKK lietettiin uudelleen 10 - 15 µlitraan PAN:ia (joka oli 10 mmolaarinen piperatsiini-N,N'-bis-etaanisulfonihapon suhteen (Pipes) (pH 7,0), 100 millimolaarinen NaCl:n suhteen ja sisälsi aprotiniinia (20 µg/ml), ja sitä inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:yhden (150 ng) kanssa (+) tai ilman sitä (-) sekä 25 µCurien kanssa γ-^{32}P-ATP:a 20-millimolaarisessa Pipesissa (pH 7,0), joka oli 10 mmolaarinen

$MnCl_2$:n suhteen ja joka sisälsi aprotiniinia (20 µl/ml) 20 µl:n suuruisessa lopullisessa tilavuudessa, 15 minuutin ajan 30 °C. Reaktiot pysäytettiin, siten että lisättiin 5 x SDS -näytepuskuria (5 µl). Näytteitä keitettiin kolmen minuutin ajan ja niille tehtiin SDS-PAGE ja autoradiografia. Viitaten kuvioon 5 B, MEKK fosforyloi katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:n, joka SDS-PAGE:ssa vaeltaa yhdessä MEK-1:n kanssa, joka on tyypiltään luonnomukainen. Immuunisaostuksissa havaittiin useita yli-ilmennetyn MEKK:n fosforyloituja raitoja. Nämä raidat muodostuivat luultavasti MEKK:n autofosforylaatiossa ja ne vastasivat MEKK:n muotoja, jotka identifioitiin immunoblottauksessa, joka tehtiin MEKK:lla transfektoitujen COS-solujen hajotteille (kuvio 1C). Immuunisaostukset saatiin esi-immuuniseerumista, joka ei sisältänyt mitään MEKK:a eikä fosforyloinut MEK-1:htä. MEKK näyttää täten suoraan fosforyloivan MEK:n, vaikkakaan ei voida selvästi jättää ottamatta lukuun assosioitunutta kinaasia, joka saostuu mukana.

Tulokset ilmaisevat, että MEKK voi fosforyloida ja aktivoida MEK:n, joka vuorostaan fosforyloi ja aktivoi MAPK:n. Raf voi myös fosforyloida ja aktivoida MEK:n (kuvio 6). Sellaisia COS-soluja, jotka oli otettu seerumista, stimuloitiin EGF:llä, Raf immuunisaostettiin vasta-aineen kanssa, joka muodostettiin Raf-1:hden COOH-päätteelle. COS-solut transfektoitiin ohimenevästi yksinään vektorilla (kontrolli) tai PCV/M5-MEKK-rakenteella (MEKK). Lepotilassa olevia kontrollisoluja käsiteltiin humaani-EGF:llä (30 ng/ml) tai ilman sitä 10 minuutin ajan ja Raf immuunisaostettiin soluhajotteista vasta-aineella, joka oli muodostettu Raf:stä saadun peptidin COOH-päätettä kohtaan. Immuunisaostettua Raf:ää inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:hden (150 ng) ja 25 µlitran kanssa τ-^{32}P-ATP:tä. Immuunisaostettu Raf fosforyloi MEK-1:n τ-^{32}P-ATP:n läsnäollessa (kuvio 6A). MEK-1:hden fosforylaatiota Raf:llä havaittiin vähän tai ei ollenkaan Raf:n immuunisaostuksissa, jotka saatiin COS-soluista, jotka yli-ilmensivät MEKK:ta. Sellaisten COS-solujen käsittely EGF:llä, jotka yli-ilmensivät MEKK:a, antoi tulokseksi MEK-1:hden samanlaisen

fosforylaatioasteen immuunisaostetulla Raf:llä (kuvio 6B). Sellaiset solut, jotka oli transfektoitu MEKK:lla ja jotka oli poistettu seerumista, käsiteltiin EGF:llä ja Raf immuunisaostettiin ja inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisella MEK-1:hdellä. Kussakin näytteessä immuunisaostettiin yhtä suuret määrät Raf:ia, kuten havainnollistettiin immunoblottauksella Raf:n vasta-aineiden kanssa. Hitaimmin vaeltava raita edustaa immuunisaostettua fosfoproteiinia, joka ei ole sukua Raf:lle tai MEK-1:lle. Raf:n määrä immuunisaostuksissa, jotka saatiin kontrollisoluista ja sellaisista soluista, jotka oli transfektoitu MEKK:lla, oli samanlainen kuin esitetään myöhemmällä SDS-PAGE:lla ja immunoblottauksella Raf:n vasta-aineen kanssa. Täten sekä MEKK että Raf voi itsenäisesti aktivoida MEK:ta.

MEKK:n identifiointi hiirestä vahvistaa edelleen käsitystä säilyttämisestä MAPK-järjestelmän säätelyssä hiivan ja nisakkäiden välillä. Tulokset ilmaisevat, että nisäkkään säätelyverkosto, joka kontrolloi MAPK:ta, on monimutkaisempi kuin mainittu verkosto hiivassa. Sekä MEKK että Raf aktivoivat MEK:ta, konvergenssikohtaa, joka on välittömästi ylävirtaan MAPK:sta, sellaisten erilaisten signaalien suhteen, jotka ovat peräisin solun pinnasta. Raf säätelee MAPK-verkostoa ensisijaisesti vasteena reseptoreille, jotka ovat liittyneet tyrosinaasikinaasiaktiivisuuteen, kun taas MEKK saattaa ensijaisesti välittää signaaleja, jotka ovat peräisin sellaisista reseptoreista, jotka aktivoivat G-proteiineja ja proteiinikinaasi C:tä. Tätä mahdollisuutta tukevat sellaiset havainnot soluilla, että proteiinikinaasi C:tä estävä säätely ei inhiboi MAPK:n aktivaatiota vasteena kasvutekijöille, mutta se inhiboi MAPK:n aktivaatiota vasteena sellaisille aineille, jotka stimulovat muskariini M_1 -reseptoria. Tätä hypoteesia tukee vielä havainto, jonka mukaan Ste20, proteiinikinaasi S. cerevisiaessa, on ylävirtaan Ste11:hdestä tiellä, joka reagoi feromoniin. PC12-soluissa vallitsevan negatiivisen mutantin Ras:n ilmentyminen ei inhiboi MAPK:n aktivaatiota vasteena G-proteiiniin kytkettyjen reseptoreiden

stimulaatiolle tai proteiinikinaasi C:n aktivaatiolle, mutta se inhiboi MAPK:n aktivaatiota vasteena neuronaaliselle kasvutekijälle (NGF) tai fibroblastikasvutekijälle (FGF). Uskotaan kuitenkin, että on olemassa Raf:n ja MEKK:n monimutkaisempia, solutyypille spesifisiä rooleja, kun yhdistetään tyrosiinikinaasia ja G-proteiiniin kytkettyä viestitystä. MEKK:n ja Raf:n määrittäminen MAPK-verkoston divergenssinä, eli eri suuntiin kehittymisenä, tarjoaa mekanismin tämän systeemin erilaiselle säätelylle.

Esillä oleva keksintö sisältää myös vasta-aineita, jotka pystyvät selektiivisesti sitoutumaan esillä olevan keksinnön mukaiseen MEKK-proteiiniin. Sellaista vasta-ainetta nimitetään tässä yhteydessä anti-MEKK-vasta-aineeksi. MEKK-antiseerumeihin voi sisältyä anti-MEKK-vasta-aineiden polyklonaalisia polulaatioita. MEKK-antiseerumi voi tarkoittaa affiniteetin suhteen puhdistettuja polyklonaalisia vasta-aineita, ammoniumsulfaatilla saostettua antiseerumia tai koko antiseerumia. "Sitoutuu selektiivisesti" tarkoittaa tässä yhteydessä tällaisen vasta-aineen kykyä sitoutua ensisijaisesti MEKK-proteiineihin. Sitoutuminen voidaan mitata, siten että käytetään erilaisia menetelmiä, jotka ammattimies tuntee, immunoblottausmenetelmät, immuunisaostusmenetelmät, entsyymi-immuunimääritykset (esimerkiksi ELISA), radioimmunoanalyysit, immunofluoresenssivasta-ainemääritykset ja immunoelektronimikroskopia mukaan luettuina; katso esimerkiksi Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989.

Esillä olevan keksinnön vasta-aineet voivat olla joko polyklonaalisia tai monoklonaalisia vasta-aineita. Esillä olevan keksinnön vasta-aineisiin sisältyy toiminnallisesti samanarvoisia osia, kuten esimerkiksi vasta-ainefragmentteja ja geenitekniikalla valmistettuja vasta-aineita, joihin sisältyvät yksiketjuiset vasta-aineet, jotka selektiivisesti pystyvät sitomaan vasta-aineiden saantiin käytetyn proteiinin ainakin yhtä epitooppia. Vasta-aineet muodostetaan mieluummin

vasteena proteiineille, joita MEKK-nukleiinihappomolekyyli koodittaa ainakin osittain. Ne muodostetaan mieluummin vasteena ainakin osalle MEKK-proteiinia ja vielä mieluummin vasta-aineita muodostetaan vasteena MEKK-proteiinin joko amino- tai karboksyylipäätteelle.

Esillä olevan keksinnön edulliseen menetelmään vasta-aineiden tuottamiseksi sisältyy MEKK-proteiinin tehokkaan määrän anto eläimelle, jotta tuotetaan vasta-ainetta, ja vasta-aineiden talteenotto. Esillä olevan keksinnön vasta-aineilla on suuri määrä mahdollisia käyttöjä, jotka ovat keksinnön piirissä. Tällaisia vasta-aineita voidaan esimerkiksi käyttää ainutlaatuisten MEKK-proteiinien identifiointiin ja MEKK-proteiinien talteenottoon.

Esillä olevan keksinnön erääseen sovellusmuotoon sisältyy nukleiinihappomolekyyli, joka koodittaa MEKK 1:hden aminopäättettä, joka kloonattiin bakteeriperäiseen pRSET-vektoriin pMEKK-1-yhdistelmämolekyylin tuottamiseksi. pMEKK-1-yhdistelmämolekyyli ilmentyi E. colissa, ja yhdistelmämolekyylin koodittama proteiini otettiin talteen ja puhdistettiin tutkimustyössä tunnetuin standardi menetelmin. NZW-kaniinit immunisoitiin puhdistetulla yhdistelmä-MEKK 1 -aminopääteproteiinilla ja antiseerumi otettiin talteen tutkimustyössä tunnetuin standardimenetelmin. Edellä esitettyyn menettelytapaan käytettiin myös nukleiinihappomollekyyliä, joka koodittaa MEKK 1 -proteiinin karboksyylipäätettä. Sellaisten antiseerumeiden, jotka sisälsivät anti-MEKK-vasta-ainetta, annettiin läpäistä affiniteettipylväs, johon oli kiinnitetty MEKK 1 -proteiini, joka oli sidottu Sepharoseen. Affiniteetilla puhdistettu anti-MEKK-antiseerumi sisälsi vasta-aineita, jotka selektiivisesti sitoutuivat eri solutyyppien MEKK-proteiiniin mutta eivät sitoutuneet Raf-1-, B-Raf- tai N-Raf-proteiiniin.

EGF:llä stimuloidut tai stimuloimattomat solut hajotettiin ja analysoitiin SDS-PAGE:lla, kuten edellä kuvattiin. Soluhajot-

teisiin sisältyvät MEKK-proteiinit identifioitiin immunoblottauksella, siten että käytettiin MEKK-antiseerumia, joka on spesifistä MEKK 1:hden aminopäätealueelle, sekä sellaista antiseerumia, joka on spesifistä MEKK 1:hden karboksyylialueelle. Viitaten kuvioon 7, identifioitiin MEKK 1 sekä kaksi suurempimolekyylipainoista proteiinia, joilla oli MEKK-aktiivisuutta, MEKK-α ja MEKK-ß, siten että käytettiin MEKK-antiseerumia, joka on spesifistä aminopäätealuetta (NH_4) kohtaan. MEKK 1, eikä MEKK-α ja MEKK-ß, identifioitiin siten, että käytettiin MEKK-antiseerumia, joka on spesifistä MEKK 1:n karboksyylialuetta (COOH) kohtaan. Kaksi MEKK-immunoreaktiivista lajia, jotka olivat arviolta 95 kD:tä ja 82 kD:tä ja olivat PC12-soluhajotteissa, tunnistettiin MEKK-antiseerumilla, joka muodostettiin MEKK:n aminopäätteen osaa kohtaan. Näiden molempien proteiinien visualisointi estettiin inkuboimalla puhdistettua yhdistelmä-MEKK:n NH_2-päätteen fuusioproteiiniantigeenia vasta-aineen kanssa. MEKK-imuunisaosteissa oli läsnä yksi ainoa 95kD:n suuruinen MEKK-proteiini, mutta se ei ollut immuunisaostuksissa, joissa käytettiin esi-immuuniseerumia. Tämä 95 kD:n suuruinen MEKK vaelsi yhdessä 95 kD:n suuruisen MEKK-proteiinin kanssa, joka oli PC12-solujen soluhajotteissa sekä Rat1a-, NIH3T3- ja Swiss3T3-fibroblasteissa. PC12-soluissa ilmentyi 95 kD:n suuruista MEKK:ta enemmän kuin fibroblastisolulinjoissa. Sellainen immunoblottaus vasta-aineiden kanssa, jotka spesifisesti tunnistavat Raf-1:hden ja Raf-B:n, ilmaisi, että nämä entsyymit olivat MEKK-immuunisaosteissa kontaminantteina. MEKK-immuunisaostuksien 95 kD:n suuruinen MEKK ei kulkenut Raf-1:hden tai Raf-B:n kanssa PC12-soluhajotteissa, eikä havaittu mitään ristireaktiota MEKK- ja Raf-vasta-aineiden välillä.

Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiini voidaan aktivoida kasvutekijöillä vasteena sellaisten solujen stimulaatioon, jotka sisältävät MEKK-proteiinia. PC12-solut poistettiin seerumista, siten että niitä inkuboitiin nälkiinnyttämisalustoissa (DMEM, 0,1 prosenttia BSA:ta) 18 - 20 tunnin ajan ja MEKK immuunisaostettiin hajotteista, jotka sisälsivät yhtä

suuret määrät proteiinia, joka oli peräisin käsittelemättömistä kontrolleista tai soluista, joita oli käsitelty EGF:llä (30 ng/ml) tai NGF:llä (100 ng/ml) viiden minuutin ajan edellä kuvattujen anti-MEKK-vasta-aineiden kanssa, jotka olivat spesifisiä MEKK:n NH_4-terminaaliselle osalle. Imuunisaostettu MEKK lietettiin uudelleen kahdeksaan µlitraan PAN:ia [10-millimolaarinen piperatsiini-N,N'-bis-2-etaanisulfonihappo (Pipes) (pH 7,0), 100-millimolaarinen NaCl sekä aprotiniini (20 µg/ml)] ja sitä inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:n (150 ng) sekä 40 µCurien kanssa [τ-^{32}P]ATP:tä kinaasille soveltuvassa yleispuskurissa [20 mmolaarinen piperatsiini-N,N'-bis-2-etaanisulfonihapon (Pipes) (pH 7,0) suhteen, 10-millimolaarinen $MnCl_2$:n suhteen ja aprotiniinia 20 µg/ml] 20 µlitran suuruisessa, lopullisessa tilavuudessa 25 minuutin ajan 30 °C:ssa. Reaktiot pysäytettiin, siten että lisättiin 2 x SDS -näytepuskuria (20 µl). Näytteitä keitettiin kolmen minuutin ajan ja ne pantiin SDS-PAGE:en ja suoritettiin autoradiografia. Raf-B immuunisaostettiin samoista käsittelemättömistä ja käsitellyistä PC12-soluhajotteista kuin edellä, siten että käytettiin antiseerumia, joka oli muodostettu Raf-B:n COOH-terminaaliselle peptidille (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ja ne määritettiin samalla tavalla. Raf-1 immuunisaostettiin antiseerumilla, joka oli saatu aikaan Raf-1:n 12:hta COOH-terminaalista aminohappoa vastaan (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Kun sellaisia PC12-soluja, joita oli nälkiinnytetty seerumin suhteen, käsiteltiin epidermaalisella kasvutekijällä (EGF:llä), MEKK-aktiivisuus lisääntyi. Nämä tulokset saatiin, siten että mitattiin puhdistetun MEK-1:n (inaktiivinen kinaasimuoto) fosforylaatio MEKK:n immuunisaostuksella kinaasimäärityksissä in vitro (kuvio 8). NGF stimuloi MEKK-aktiivisuuden vähäisen lisäyksen verrattuna kontrolli-immuunisaostuksiin, jotka saatiin käsittelemättömistä soluista. MEKK-aktiivisuuden stimulaatio NGF:llä ja EGF:llä oli samankaltainen kuin Raf-B:n aktivaatio näillä agensseilla, vaikka Raf-B ilmaisi suurta perusaktiivisuutta. C-Raf-1:n aktivoituminen NGF:llä ja EGF:llä oli lähes kielteistä verrattuna MEKK:n aktivoitumiseen Raf-B:llä.

MEKK tai Raf-B immuunisaostettiin sellaisten PC12-solujen hajotteista, joita oli käsitelty EGF:llä (30 ng/ml) 0, 1, 3, 5, 10 tai 20 minuutin ajan, ja niitä inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:n (150 ng) ja [γ-^{32}P]ATP:n kanssa edellä kuvatulla tavalla. Tulokset esittävät vasteen suhteellista laajuutta kullekin ajankohdalle, kun ne kvantitoitiin tyypillisestä kokeesta saatujen radioaktiivisten geelien fosforyyli-imager-analyysillä. EGF-käsittelyn ajankulku ilmaisi, että aktivointi saavutti suurimmat tasot seuraavien viiden minuutin ajan ja kesti ainakin 30 minuutin ajan (kuvio 9). Raf-B:llä ajankulku oli samanlainen; huippuaktiivisuus ilmeni kolmessa - viidessä minuutissa EGF-käsittelyn jälkeen, ja se kesti aina 20 minuuttiin saakka.

EGF:llä stimuloidun MEKK-aktiivisuuden erottamiseksi Raf-B:n aktiivisuudesta, Raf-B poistettiin immunologisesti soluhajotteista ennen MEKK-immuunisaostusta. Raf-B esipuhdistettiin seerumin suhteen nälkiinnytettyjen, sellaisten PC12-solujen hajotteista, joita oli joko käsitelty viiden minuutin ajan EGF:llä (30 ng/ml) tai jotka olivat käsittelemättömiä. Raf-B esipuhdistettiin kaksi kertaa, siten että käytettiin Raf-B:n antiseerumia, tai käyttämällä esi-immuuni-IgG-antiseerumia kontrollina. Sitten esipuhdistettu supernatantti immuunisaostettiin joko MEKK- tai Raf-B-antiseerumilla ja sitä inkuboitiin katalyyttisesti inaktiivisen MEK-1:n ja [γ-^{32}P]ATP:n kanssa, kuten edellä yksityiskohtaisesti kuvattiin. EGF:llä stimuloidut ja stimuloimattomat PC12-soluhajotteet esipuhdistettiin joko IgG- tai Raf-B-antiseerumeilla ja sitten ne immuunisaostettiin MEKK-antiseerumilla tai Raf-B-vasta-aineilla. Kuviossa 10 esitetyt tulokset ilmaisevat, että esipuhdistus Raf-B:llä antoi 60 prosentin vähenemisen Raf-B-aktiivisuudessa, kun se mitattiin Raf-B:n fosforyyli-imager-analyysillä <u>in vitro</u> -kinaasimäärityksissä. Raf-B:n hävittäminen ei vaikuttanut EGF:llä stimuloituun MEKK-aktiivisuuteen, mikä viittaa siihen, että Raf-B ei ollut MEKK-immuunisaostuksien komponentti. Ainakin 40 prosenttia Raf-B-aktiivisuudesta on vastustuskykyistä esipuhdistukselle, johon

käytetään Raf-B-vasta-aineita. Tyypiltään luonnonmukainen yhdistelmä-MEKK, joka yli-ilmeni COS-soluissa, autofosforyloi helposti seriini- ja treoniinitähteissä, ja MEKK:n aminopäätteessä on erittäin runsaasti seriiniä ja treoniinia. Sellainen MEKK, joka sisältyi PC12-solujen immuunisaostuksiin, tutkittiin puhdistetun yhdistelmä-MEKK-aminopäätefuusioproteiinin selektiivisen fosforylaation suhteen kinaasimäärityksissä in vitro.

Seerumin suhteen nälkiinnytettyjä PC12-soluja käsiteltiin EGF:llä (30 ng/ml) viiden minuutin ajan ja yhtä suuret määrät proteiinia immuunisaostettiin samoista soluhajotteista joko MEKK-, Raf-B- tai esi-immuuniantiseerumilla, joka oli kontrollina. Immuunisaosteita inkuboitiin puhdistetun yhdistelmä-MEKK-NH_2-terminaalisen fuusioproteiinin (400 ng) ja [τ-^{32}P]-ATP:n kanssa, kuten edellä kuvattiin. Kuviossa 11 esitetyt tulokset ilmaisevat, että MEKK immuunisaostui hajotteista, joita oli stimuloitu EGF:llä, ja stimuloimattomat PC12-solut fosforyloivat selvästi inertin, 50 kD:n suuruisen MEKK-NH_2-fuusioproteiinin, kun taas Raf-B tai esi-immuuni-immuunisaostukset EGF:n stimuloimista tai stimuloimattomista soluista eivät käyttäneet MEKK-NH_2-fuusioproteiinia substraattina. Täten sellainen MEKK-aktiivisuus, jota EGF stimuloi ja joka sisältyi MEKK-immuunisaostuksiin, ei johtunut kontaminoivista Raf-kinaaseista.

Sen varmistamiseksi, että sekä MEK-1- ja MEKK-NH_2-terminaalisen fuusioproteiinin fosforylaatio ei johtunut 95 kD:n suuruisesta PC12-solun MEKK:n aktiivisuudesta, sellaiset soluhajotteet, jotka oli valmistettu EGF:llä stimuloiduista ja stimuloimattomista soluista, fraktioitiin FPLC:llä Mono-Q-pylväässä, jotta endogeeninen MEKK puhdistettiin osittain. Sellaiset hajotteet, jotka olivat stimuloimattomista PC12-kontrollisoluista tai soluista, joita käsiteltiin EGF:llä (30 ng/ml) viiden minuutin ajan, fraktioitiin FPLC:llä Mono Q -pylväässä, siten että käytettiin lineaarista gradienttia, jossa oli NaCl:a 0 - 525 millimoolia. Osa (30 μl) kustakin

parillisella numerolla varustetusta jakeesta sekoitettiin puskurin kanssa (20 millimolaarinen piperatsiini-N,N'-bis-2-etaanisulfonihapon suhteen (Pipes) (pH 7,0), 10 millimolaarinen $MnCl_2$:n suhteen ja aprotiniinia (20 µg/ml), 50-millimolaarinen ß-glyserofosfaatin (pH 7,2), 1-mmolaarinen EGTA:n, suhteen, sisälsi IP-20:ntä (50 µg/ml), 50-millimolaarinen NaF:n suhteen ja sisälsi 20 µCurieta [τ-^{32}P]ATP:a), joka sisälsi puhdistettua yhdistelmä-MEK-1:htä (150 ng) substraattina lopullisessa tilavuudessa, joka oli 40 µl, ja sitä inkuboitiin 30 °C:ssa 25 minuutin ajan. Reaktiot pysäytettiin, siten että lisättiin 2 x SDS -näytepuskuria (40 µl), keitettiin ja pantiin SDS-PAGE:een ja autoradiografoitiin. MEKK-aktiivisuuden huippu eluoitui jakeissa 10 - 12. Eriä (30 µl) kustakin parillisnumeroisesta jakeesta, joka oli saatu EGF:llä käsiteltyjen PC12-solujen hajotteista, sekoitettiin puskurin kanssa edellä kuvatulla tavalla, paitsi että ne sisälsivät puhdistettua yhdistelmä-MEKK-NH_2-terminaalista fuusioproteiinia (400 ng) substraattina MEK-1:n sijaan. Puhdistettua, inaktiivista yhdistelmäkinaasi-MEK-1:htä tai MEKK-NH_2-terminaalista fuusio-proteiinia käytettiin sitten [τ-^{32}P]-ATP:n läsnäollessa sen määrittämiseksi, fosforyloiko 95 kD:n suuruinen MEKK suoraan kumpaakaan substraattia. EGF:llä käsiteltyjen PC12-solujen hajotteen jakeet 10 - 14 fosforyloivat MEK-1:htä, kun taas MEK-1 fosforyloitui vähän kontrollijakeissa, joita ei oltu käsitelty. MEKK-NH_2-terminaalinen fuusioproteiini fosforyloitui myös samoissa jakeissa kuin MEK-1, vaikka aktiivisuuden huippu oli vähän laajempi (jakeet 8 - 16).

Pylväsjakeiden immunoblottaus havainnollisti, että 95 kD:n suuruinen MEKK-proteiini eluoitui yhdessä aktiivisuushuipun kanssa, joka fosforyloi joko exogeenisesti lisättyä inaktiivista MEK-1-kinaasia tai 50 kD:n suuruista MEKK-NH_2-terminaalista fuusioproteiinia. Erät (900 µl) kustakin parillisella numerolla varustetusta jakeesta väkevöitiin saostamalla trikloorietikkahapolla ja ne immunoblotattiin MEKK-vasta-aineen

kanssa. Immunoreaktiivisuuden huippu eluoitui jakeissa 10 - 12.

Jotta voitiin tutkia, vaativatko 95 kD:n suuruinen PC12-solun MEKK ja Raf-B toiminnallisia Ras-proteiineja kasvutekijän välittämään merkinantoon, PC12-soluissa ilmennettiin dominanttia, negatiivista Ha-ras:ia (Asn 17) (N^{17}Ras) ja MEKK:n tai Raf-B:n aktivaatio, jota EGF stimuloi, määritettiin immuunisaosteissa, siten että substraattina käytettiin kinaasina inaktiivista MEK-1:htä. Sellaisista PC12-soluista, jotka ilmensivät stabiilisti deksametasonilla indusoituvaa N^{17}Ras:ia, poistettiin seerumi nälkiinnyttämällä soluja alustassa, joka sisälsi 0,1 prosenttia BSA:ta yhden μg:n kanssa deksametasonia tai ilman sitä ja sitten niitä käsiteltiin EGF:llä (30 ng/ml) viiden minuutin ajan tai ne jätettiin käsittelemättä. Yhtä suuret määrät liukoista proteiinia, joka oli peräisin soluhajotteista, immuunisaostettiin joko MEKK- tai Raf-B-antiseerumilla ja inkuboitiin puhdistetun, katalyyttisesti inaktiivisen yhdistelmä-MEK-1:n ja [γ-^{32}P]ATP:n kanssa, kuten edellä kuvataan. N^{17}Ras:n ilmentyminen indusoitiin PC12-klooneissa, jotka oli stabiilisti transfektoitu N^{17}Ras-geenillä, siten että nälkiinnyttämisalustaan lisättiin deksametasonia. N^{17}Ras:n ilmentyminen inhiboi MEKK:n aktivaation EGF:llä, mikä mitattiin sen kykynä fosforyloida kinaasina inaktiivinen MEK-1 (katso kuvio 12). Sellainen Raf-B:n aktivaatio, jota EGF välitti, väheni myös voimakkaasti PC12-soluissa, jotka ilmensivät N^{17}Ras:ia, verrattuina indusoimattomiin N^{17}Ras-transfektantteihin. Deksametasonin lisäys tyypiltään normaaleihin PC12-soluihin ei vaikuttanut yhtään MEKK:n tai Raf-B:n sellaisen aktivaation laajuuteen, jonka EGF houkutteli esiin. N^{17}Ras-geenillä stabiilisti transfektoidut PC12-solukloonit ovat vähemmän herkkiä MEKK-aktiivisuuden EGF-välitteiselle aktivaatiolle kuin tyypiltään luonnonmukaiset PC12-solut. Nämä tulokset ilmaisevat, että toiminnallista Ras:ää tarvitaan sekä Raf-B:n että MEKK:n aktivaatioon, jota kasvutekijä stimuloi PC12-soluissa, mikä viittaa siihen, että Ras voi välittää vaikutuksensa solun kasvuun ja erilaistumi-

seen, siten että se aktivoi multippeleita proteiinikinaasi-efektoreita, jotka ovat peräisin sekä Raf- että MEKK-perheistä.

EGF stimuloi täten MEKK:n aktiivisuuden huipun viidessä minuutissa, ja aktivaatio säilyi ainakin 30 minuutin ajan käsittelyn jälkeen, ja se oli samankaltainen kuin Raf-B-aktivaation ajankulku. Hermokasvutekijä (NGF) ja forboliesteri TPA aktivoivat myös MEKK:ta vaikka vähemmän kuin EGF. Immuunisaostuksissa tai pylväsjakeissa MEKK-aktiivisuus erosi Raf-1- ja Raf-B-aktiivisuuksista, joita EGF stimuloi. Sekä MEKK:n ja Raf-B:n aktivoituminen EGF:llä, NGF:llä ja TPA:lla kumoutui forskoliiniesikäsittelyllä. Dominoivan, negatiivisen N^{17}Ras:n stabiili ilmentyminen inhiboi sekä MEKK:n että Raf-B:n aktivaation, joka tapahtui vasteena EGF:lle. Nämä havainnot edustavat ensimmäistä demonstraatiota, joka koskee Ras:-ista riippuvaista MEKK:n säätelyä kasvutekijöillä, ja se viittaa monimutkaisen, solunsisäisen kinaasiverkoston emergenssiin eli ilmaantumiseen, jossa Ras voi vaihtelevasti liittyä pariksi Raf- ja MEKK-perheiden jäsenten kanssa.

MEKK säätelee selektiivisesti JUN-kinaasiaktiivisuutta muutamissa solutyypeissä (T-solut, neuraalisolut ja fibroblastit). Jun-kinaasi on MAP-kinaasin etäinen sukulainen. MEKK:n kyky aktivoida JUN-kinaasia on suunnilleen 100 kertaa suurempi kuin Raf:n kyky aktivoida JUN-kinaasia. Viimeksimainittu kinaasi säätelee transkriptiotekijän JUN:in aktiivisuutta, joka sisältyy erilaisten solutyyppien kasvuun ja erilaistumiseen.

Tuumorinekroositekijä (TNF) säätelee solun kuolemaa ja muita toimintoja eri solutyypeissä sekä stimuloi MEKK-aktiivisuutta. MEKK:n TNF-vastetie menee limittäin signaalitransduktioteiden päälle, jotka solujen UV-vaurio panee alulle, ja se myös aktivoi MEKK:ta mutta ei Raf:ää. Sen tähden sekä TNF että UV stimuloivat MEKK-aktiivisuutta aktivoimatta Raf:ää.

MEKK:n sekä UV- että TNF-aktivaatio ovat Ras:ista riippuvaisia.

Ras:ista riippuvainen MEKK:n aktivaatio erilaisissa solutyypeissä täten osoittaa, että Ras kontrolloi MEKK-perheen aktivaation lisäksi Raf-perheen jäseniä.

Sen määrittämiseksi, inhiboiko PKA 95 kD:n suuruisen, PC12-soluista saadun MEKK:n aktivaatiota, käytettiin forskoliinia lisäämään solunsisäistä cAMP:tä sekä aktivoimaan PKA:ta. Sellaisia PC12-soluja, joista seerumi oli käytetty loppuun, esikäsiteltiin forskoliinilla (50 μmoolia) tai ilman sitä kolmen minuutin ajan, jotta proteiinikinaasi A aktivoituisi, ja sitten EGF:llä (30 ng/ml), NGF:llä (100 ng/ml) tai TPA:lla (200 nmoolia) viiden minuutin ajan ja MEKK immuunisaostettiin yhtä suurista määristä liukoista proteiinia, joka oli peräisin soluhajotteista, ja sitä inkuboitiin puhdistetun, katalyyttisesti inaktiivisen yhdistelmä-MEK-1:hden sekä [γ-^{32}P]ATP:n kanssa, kuten edellä kuvattiin. Myös Raf-B-aktiivisuus määritettiin samoista soluhajotteista sen määrittämiseksi, erosiko sen säätely MEKK:n säätelystä. Raf-B immuunisaostettiin samoista soluhajotteista, kuten edellä kuvattiin, ja määritettiin sen kyky fosforyloida MEK-1:htä edellä kuvatulla tavalla. Forskoliiniesikäsittely poisti sekä MEKK:n että Raf-B:n aktivoitumisen EGF:llä, NGF:llä ja TPA:lla, mitattuna niiden kykynä fosforyloida kinaasina inaktiivista MEK-1:htä (kuvio 13). Forskoliinikäsittelyllä yksinään ei ollut mitään tuntuvaa vaikutusta kumpaankaan kinaasiin. Nämä tulokset havainnollistavat, että Raf-1:n ja Raf-B:n lisäksi PKA-aktivaatio estää 95 kD:n suuruisen, PC12-soluperäisen MEKK:n aktivoitumisen kasvutekijällä, mikä viittaa siihen, että PKA:n toiminnalle on yhteinen säätelykontrollikohta, joka sijaitsee Ras:n välissä tai siitä alavirtaan ja ylävirtaan kustakin näistä kolmesta kinaasista tai niiden tasolla.

Sen määrittämiseksi, sisältyykö samanlaista tai erilaista MEK-aktiivisuutta MAPK:n aktivaatioon, vaikka G_i-proteiini

yhdisti reseptoreita, MEK-aktiivisuus tutkittiin hajotetuista soluista, jotka olivat peräisin trombiinin stimuloimista Rat 1a -soluista. Trombiinin stimuloimat solut osoittivat MEK-aktiivisuutta, joka fraktioitui suuren MEK-huipun mukana, joka havaittiin EGF:n stimuloimissa soluissa. Trombiinilla stimuloiduista soluista saadun MEK-aktiivisuuden määrä oli yleensä kahdesta kolmeen kertaa vähäisempi kuin aktiivisuus, joka havaittiin EGF-stimulaation yhteydessä, mikä korreloi vähäisemmän MAPK-vasteen kanssa, jonka esillä olevat keksijät ovat havainneet trombiinin aktivoimissa soluissa.

MEK:n erilainen säätely Rat 1a ja NIH3T3-soluissa, jotka ilmentävät gip2:hta, v-src:tä, v-ras:ia tai v-raf:ää, johti esillä olevat keksijät tutkimaan proteiinikinaaseja, jotka ovat MEK-1:hden luultuja säätelijöitä. Äskettäin osoitettiin, että Raf-1 voi fosforyloida ja aktivoida MEK:ta. Raf-aktivaatio määritettiin seuraavasti. Soluista poistettiin seerumi nälkiinnyttämällä niitä ja ne aktivoitiin sopivien kasvutekijöiden läsnäollessa tai puuttuessa, kuten edellä kuvattiin. Sellaisia Rat 1a -soluja, joista oli poistettu serumi nälkiinnyttämällä niitä, aktivoitiin yksinään puskurilla tai EGF:n kanssa ja Raf immuunisaostettiin, siten että käytettiin vasta-ainetta, joka tunnistaa Raf:n C-päätteen. Solut hajotettiin raapimalla niitä jääkylmässä RIP-puskurissa (50-millimolaarinen Trisin suhteen, pH 7,2, 150-millimolaarinen NaCl:n suhteen, 0,1 prosenttia SDS:ää, 0,5 prosenttia natriumdeoksikolaattia, 1,0 prosenttia Triton X 100:aa, 10 millimolaarinen natriumpyrofosfaatin suhteen, 25-millimolaarinen natriumglyserofosfaatin suhteen, 2-millimolaarinen natriumvanadaatin suhteen, 2,1 μg/ml aprotiniinia) ja niitä sentrifugoitiin mikrofugissa 10 minuutin ajan, jotta tumat poistettiin. Supernatantit normalisoitiin proteiinipitoisuuden suhteen ja esipuhdistettiin proteiini A Sepharosella, ennenkuin ne saostettiin kaniinin antiseerumilla, joka oli saatu aikaan Raf-1:n C-päätettä vastaan, sekä proteiini A Sepharosella 2-3 tunnin ajan 4 °C:ssa. Pallot pestiin kahdesti jääkylmällä RIPA:lla sekä kahdesti PAN:llä (10-millimolaarinen Pipes, pH

7,0, 100-millimolaarinen NaCl:n suhteen, 21 µg/ml aprotiniinia). Osa immuunisaostuksesta laimennettiin SDS-näytepuskurilla ja käytettiin immunoblottausanalyysiin. Jäljelle jäävä osa lietettiin uudelleen kinaasipuskuriin (20-millimolaarinen Pipes, pH 7,0, 10-millimolaarinen $MnCl_2$:n suhteen, 150 ng MEK-1:htä, jolla ei ollut kinaasiaktiivisuutta, 30 µCurieta τ-^{32}P-ATP:tä sekä 20 µg/ml aprotiniinia) lopullisessa 50 µl:n suuruisessa tilavuudessa, 30 minuutin ajan 30 °C:ssa. Tyypiltään luonnonmukainen yhdistelmä-MEK-1 autofosforyloitiin rinnan markkerin kanssa. Reaktiot päätettiin, siten että lisättiin 12,5 µl 5 x SDS -näytepuskuria, keitettiin viiden minuutin ajan ja reaktioseos käytettiin SDS-PAGE:een ja autoradiografoitiin.

Immuunisaostettu Raf pystyi τ-^{32}P-ATP:n läsnäollessa fosforyloimaan MEK-1:n. Tässä määrityksessä käytetty yhdistelmä-MEK-1 oli inaktiivinen kinaasina, jotta varmistuttiin siitä, että se ei autofosforyloinut, kuten havaittiin tyypiltään luonnonmukaisen MEK-1:hden tekevän. Sellaisissa immuunisaostuksissa, jotka olivat kontrollisoluista peräisin, havaittiin, että Raf fosforyloi MEK-1:htä vähän tai ei ollenkaan. EGF-heräte stimuloi selvästi MEK-1:hden fosforylaatiota, jota Raf katalysoi, vastakohtana Rat 1a -solujen trombiiniherätteelle, joka ei aktivoinut mitattavasti Raf:ää, vieläpä vaikka endogeeninen MEK aktivoitui selvästi. EGF stimuloi yhdistelmä-MEK-1:n Raf-fosforylaatiota likimain 2,6 kertaa perustasoa enemmän. Havaittiin, että Raf fosforyloi vähän MEK:ta Raf-immuunisaostuksissa, jotka saatiin Rat 1a -soluista, jotka ilmensivät Gip2:hta tai v-Src:tä. Näissä solulinjoissa EGF-stimulaatio pystyi vastaavasti 1,8- ja 1,4-kertaisesti aktivoimaan MEK-1:n fosforylaatiota, jota Raf katalysoi. EGF-vasteen heikentyminen sellaisissa soluissa, jotka ilmentävät Gip2:hta ja v-Src:tä, seuraa todennäköisesti siitä, että EGF-reseptorin herkkyys vähenee MAPK:n perusluonteisessa aktivaatiossa. Myöhemmällä SDS-PAGE:lla sekä immunoblottauksella, jossa käytettiin Raf-vasta-ainetta, osoitettiin, että Raf:n määrä immuunisaostuksissa oli samanlainen. Koska MEK:n trom-

biinistimulaatio on kahdesta kolmeen kertaan suurempi kuin perustaso, odotetaan ainakin 1,5-kertaista MEK-fosforylaation stimulaatiota, jos Raf merkittävästi myötävaikuttaa siihen, että tämä kasvutekijä aktivoi MEK:ta. Aktivaation tämä taso oli havaittavissa EGF:n stimuloimissa, Gip2:hta ja v-Src:tä ilmentävissä solulinjoissa. Täten on epätodennäköistä, että määrityksen epäherkkyydestä johtuu, ettei onnistuttu havaitsemaan Raf:n aktivaatiota trombiinilla. MAPK:n trombiinistimulaatio on suurimmillaan kolmen minuutin kuluttua. Raf-aktiivisuus ei lisääntynyt, kun Rat 1a -soluja stimuloitiin yhden tai viiden minuutin ajan trombiinilla.

Egf aktivoi Raf:ää NIH3T3-soluissa, kuten Rat 1a -soluissa, arviolta 2,7-kertaisesti, kun taas trombiini ei aktivoinut. Sellaisissa NIH3T3-soluissa, jotka ilmensivät V-Raf:ää, MEK-1:hden fosforylaatio ei lisääntynyt. Tämä tulos oli odottamaton, koska MEK selvästi aktivoi sellaisissa NIH3T3-soluissa, jotka ilmensivät v-Raf:ää. Viimeksi mainituista v-Raf-NIH3T3-soluista immuunisaostettiin antiseerumilla sekä p90- että p75 aga-raf -fuusioproteiineja. P75gag-raf:n on osoitettu ilmaisevan proteiinikinaasiaktiivisuutta, mutta on mahdollista, että NH_2-terminaalinen gag-fuusioproteiini estää yhdistelmä-MEK-1:hden Raf-fosforylaation <u>in vitro</u> -määritysjärjestelmässä. On tehtävä lisätutkimuksia v-Raf-kinaasiaktiivisuuden mittaamiseksi. Nämä tulokset todistavat, että Raf:n aktivaatio ei voi olla yksinomaan vastuussa MEK:n aktivaatiosta. MEK:ta varten täytyy olla olemassa muita säätelykinaaseja, jotka myötävaikuttavat MEK-aktivaatioon trombiinin stimuloimissa, G_i-proteiiniin kytketyissä teissä sekä gip2:lla ja c-src:llä transfektoiduissa soluissa.

MAPK:t ovat seriini- tai (ja) treoniinikinaaseja, joista ajateellaan, että ne ovat avainvälivaihemolekyylejä erilaisissa signaalitransduktioteissä. MEK:t vuorostaan fosforyloivat ja aktivoivat MAPK:ita.

MEK:n kostitutiivinen aktivaatio selittää enimmän joskaan ei kaikkea lisääntyneestä MAPK-aktiivisuudesta onkogeenillä transfektoiduissa soluissa. Gip2 ja v-Src aktivoivat MEK:ta, Rat 1a -soluissa, kun taas v-Raf aktivoi tehokkaimmin MEK:ta NIH3T3-soluissa. Nämä onkoproteiinit aktivoivat samanlaista MEK-aktiivisuutta kuin kasvutekijät. Mitään merkittävää MEK-stimulaation tasoa ei havaittu NIH3T3-soluissa, joita v-Ras transfektoi. Havainnot ilmaisevat, että MAPK- ja MEK-aktivaation välillä vallitsee jokseenkin luja sidonnaisuus. Sellaisissa kasvutekijän stimuloimissa soluissa, jotka ilmentävät onkoproteiinia, esillä oleva keksijä ei ole havainnut MAPK:n merkittävää aktivaatiota, joka ei ole riippuvaista MEK:n aktivaatiosta.

Sellaisten Raf-aktivaatiomääritysten herkkyys, jotka sisältävät kinaasina inaktiivisen MEK-1:n fosforylaation, viittaa siihen, että olisi helppoa ilmaista Raf:n aktiivisuus, joka on 20 - 25 prosenttia sellaisesta aktiivisuudesta, joka havaittiin, kun stimuloitiin EGF:llä sekä Rat 1a että NIH3T3-soluja. Ettei onnistuttu havaitsemaan Raf:n aktivaatiota vasteena trombiinille siellä, missä sekä MEK- että MAPK-aktiivisuus havaittiin helposti, viittaa siihen, että trombiini ei merkittävästi aktivoi Raf:ää Rat 1a ja NIH3T3-soluissa. Tämä antaa aiheen otaksua, että lisäksi tuleva proteiinikinaasi, muu kuin Raf, pystyy fosforyloimaan ja aktivoimaan MEK-1:n. Esillä oleva keksijä on viime aikoina kloonannut ja ilmentänyt hiiren MEK-kinaasin (MEKK), joka ei liity Raf:ään eikä ole siitä riippuvainen. Osoitettiin, että sekä MEKK että Raf fosforyloivat ja aktivoivat MEK-1:htä. MEKK on hiivan proteiinikinaasien Ste 11:n ja Byr2:n homologi hiirellä; MEK on hiivan proteiinikinaasien Ste 7:n ja Byr 1:n homologi hiirellä. Raf:n sekvenssi ei ole sukua Ste11:n ja Byr2:n sekvensseille, mikä viittaa siihen, että Raf edustaa nisäkässoluissa divergenssiä eli eri suuntiin kehittymistä sellaisesta proetiinikinaasijärjestelmästä, joka on herkkä feromonille ja määritelty hiivassa.

Kokeet ilmaisevat, että sekä Raf että MEKK molemmat aktivoivat MEK:ta, joka toimii konvergenssi- eli yhteensuuntautumiskohtana multippelien proteiinikinaasien suhteen, jotka liittyvät MAPK-aktivaatioon (katso kuvio 14). Raf ja MEKK ovat täten proteiinikinaaseja eri suuntiin kehittymisessä sellaisten signaalin sisääntulojen suhteen, joita solun eri pintareseptorit panevat alulle. Uskotaan, että MEKK on trombiinin säätelemä kinaasi, joka säätelee MEK:ta Rat 1a ja HIH3T3-soluissa. Arvellaan myös, että onkoproteiinit säätelevät Raf:ää ja MEKK:ta eri tavoilla.

Kun MEK sijoitetaan MAPK:n ja ylävirtaan sijaitsevien MAPK:n säätelijöiden väliin, saadaan aikaan, että kasvutekijän alkuunpanema signaaliverkosto integroituu mutta että se on myös itsenäinen. Esimerkiksi seriini- ja (tai) treoniinikinaasit Raf ja MEKK voivat fosforyloida MEK:n, mutta mitä todennäköisimmin ne fosforyloivat muita proteiineja yhtä hyvin. MEK on erikoistunut tyrosiini-treoniinikaksoiskinaasin MAPK:n selektiiviseen säätelyyn.

Esillä olevan keksinnön eräs näkökohta koskee sen havaitsemista, että MEKK aktivoi MAPK:ta. Esimerkiksi MAPK:n tiedetään sisältyvän erilaisiin soluteihin nisäkässysteemeissä. MAPK:n tiedetään liittyvän solun mitogeneesiin, DNA-synteesiin, solunjakaantumiseen ja erilaistumiseen. On havaittu, että AMPK sisältyy myös okogeenien, kuten esimerkiksi c-Jun:-in ja c-Myc:n aktivaatioon. Esillä oleva keksijä uskoo, että MAPK myös liittyy läheisesti erilaisiin epänormaalisuuksiin, joilla on geneettinen alkuperä, vaikkakaan keksijä ei sitoudu tähän teoriaan. Tiedetään, että MAPK läpäisee tumamembraanin, ja uskotaan, että se ainakin osittain on vastuussa erilaisten geenien ilmentymisen säätelystä. MAPK:n uskotaan sellaisenaan esittävän merkittävää roolia syövän alkuunpanossa ja etenemisessä, hermosoluun liittyvissä sairauksissa, autoimmuunisairauksissa, allergisissa reaktioissa, haavan paranemisessa ja tulehdusvasteissa. Esillä oleva keksijä on ensimmäinen, joka identifioi sellaiset nukleiinihapposekvenssit, jotka

koodittavat MEKK:ta ja joka havaitsi, että nyt on mahdollista säädellä MEKK:n ilmentymistä ja täten säädellä MAPK:n aktivaatiota.

On myös tunnettua, että MEKK:lla on muita erilaisia toiminta-ominaisuuksia MAPK:n aktivaation lisäksi. Tällaisena toiminta-ominaisuutena esillä olevan keksinnön piiriin kuuluu MEKK:n ilmentymisen säätely muiden sellaisten soluperäisten aktiivisuuksien säätelemiseksi, joita MEKK säätelee joko stimuloimalla tai inhiboimalla niitä.

Esillä olevan keksinnön eräs toinen näkökohta koskee sen havaitsemista, että sekä MEKK että Raf pystyvät aktivoimaan MAPK:n. Esillä olevat keksijät ovat havainneet, että vaikka MEKK rakenteellisesti eroaa Raf:stä, sekä Raf että MEKK liittyvät MAPK-aktiivisuuden säätelyyn. Sen tähden esillä olevan keksinnön piirissä on joko stimuloida tai inhiboida Raf:n ja MEKK:n ilmentyminen, jotta halutut säätelytulokset saavutetaan. Eräässä sovellusmuodossa voidaan täten inhiboida MEKK:n ilmentyminen esimerkiksi siten, että käytetään antisensenukleiinihapposekvenssejä, jotta MEKK:n aktiivisuus estetään. Vaihtoehtoisesti Raf:n ilmentymistä voidaan samalla tavalla säädellä samassa solussa, jotta saavutetaan MAPK-aktiivisuuden korkein mahdollinen inhibitio. MAPK-järjestelmän säätelyä voidaan sen tähden hienosäätää, siten että inhiboidaan joko Raf:n tai MEKK:n tai sekä Raf:n että MEKK:n ilmentyminen ja (tai) stimuloidaan sitä.

Esillä olevan keksinnön piirissä on säädellä MEKK:n ilmentymistä, siten että käytetään hyvin tunnettuja yhdistelmä-DNA-ilmentämistekniikoita. Sopivia isäntäsoluja voidaan esimerkiksi transformoida MEKK-sekvenssillä ja sopivia kontrollirakenneosia voidaan liittää toiminnallisesti MEKK-sekvenssin kanssa, jotta haluttu ilmentyminen saavutetaan.

Sellaista MEKK-entsyymin määrää, joka on läsnä solussa, voidaan lisätä monilla tavoin, joihin kuuluu, mutta ei rajoitu

niihin, entsyymin synteesin repression eli eston olennainen vähentäminen, entsyymiä koodittavan nukleiinihapposekvenssin kopioluvun monistaminen ja niiden yhdistelmät.

Tässä yhteydessä käytettynä "entsyymin synteesin repression olennainen vähentäminen" tarkoittaa suurempien entsyymimäärien tuottamista kuin tyypiltään luonnonmukaiset solut normaalisti tuottavat, siten että substraatista tuotteeksi muuttumisen määrä ja (tai) nopeus on suurempi kuin tyypiltään luonnonmukaisissa soluissa (se on, substraatin muuttuminen tuotteeksi on lisääntynyt). MEKK-entsyymisynteesin repression vähentäminen voidaan suorittaa eri tavoin, joihin kuuluu, että häiritään säätelykontrolleja, jotka normaalisti vaikuttavat sellaisen geenin transkriptioon ja (tai) translaatioon, joka koodittaa entsyymiä, ja lisätään entsyymiä vastaavan lähetti-RNA:n (mRNA:n) stabiiliutta. Esimerkiksi sellaisen entsyymin synteesiä, joka on repression kohteena, voidaan lisätä ainakin osittain, siten että inaktivoidaan vastaava repressori ja (tai) muunnetaan operaattorisekvenssiä, jotta repressorin kyky sitoutua siihen vähenee. Transkription (esimerkiksi promoottorin) ja (tai) translaation (esimerkiksi Shine Delgarno -sekvenssin) kontrollisignaalien (esimerkiksi aloitus-, pidennys- ja (tai) päätesignaalien) muuntaminen voi nopeuttaa entsyymituotantoa ja lisätä sitä. Ensyymisynteesin repression vähentämismenetelmiin sisältyy yhdistelmä-DNA-tekniikoita.

Kuten tässä yhteydessä, nukleiinihapposekvenssin kopiolukumäärää solussa voidaan monistaa joko lisäämällä nukleiinihapposekvenssin kopiolukua solun genomissa tai siten, että soluun viedään nukleiinihapposekvenssin lisäkopioita transformaation avulla. Kopioluku monistetaan sellaisella tavalla, että ensyymiä tuotetaan suurempia määriä, mikä johtaa siihen, että enemmän substraattia muuttuu tuotteeksi. Esimerkiksi sellaiset yhdistelmämolekyylit, jotka sisältävät esillä olevan keksinnön nukleiinihappoja, voidaan transformoida soluihin entsyymisynteesin lisäämiseksi. Voidaan transformoida

myös siten, että käytetään mitä tahansa tapahtumaa, jolla nukleiinihapposekvenssit insertoidaan soluun. Transformaatiotekniikoihin kuuluu, mutta ei rajoitu niihin, transfektio, elektroporaatio, mikroinjektio, lipofektio, adsorptio ja protoplastifuusio. Transformaation jälkeen solu voi tuottaa nukleiinihapposekvenssin multippeleita kopioita, jotka voivat joko jäädä ekstrakromosomaalisiksi vektoreiksi tai integroitua isännän genomiin. Ennen transformaatiota voidaan nukleiinihapposekvenssiä yhdistelmämolekyylissä manipuloida, jotta mainittu sekvenssi koodittaa entsyymiä, jolla on suurempi spesifinen aktiivisuus.

Esillä olevan keksinnön eräs sovellusmuoto on olennaisesti puhdas MEKK-proteiini. Esillä olevan keksinnön mukaan olennaisesti puhdas tai eristetty proteiini on sellainen proteiini, joka on poistettu luonnonmukaisesta ympäristöstään. Sellaisenaan "eristetty" ja "olennaisesti puhdas" eivät välttämättä heijasta sitä laajuutta, jolla proteiini on puhdistettu. Olennaisesti puhdas MEKK-proteiini voidaan saada luonnonmukaisista lähteistään. Olennaisesti puhdas MEKK-proteiini voidaan tuottaa myös siten, että käytetään yhdistelmä-DNA-tekniikkaa tai kemiallista synteesiä. Tässä yhteydessä käytettynä voi olennaisesti puhdas MEKK-proteiini olla täysimittainen MEKK-proteiini tai sellaisen proteiinin jokin homologi, kuten esimerkiksi MEKK-proteiini, jossa aminohappoja on deletoitu (esimerkiksi proteiinin typistetty versio, kuten esimerkiksi peptidi), insertoitu, invertoitu, substituoitu ja (tai) derivatisoitu (esimerkiksi glykosylaation, fosforylaation, asetylaation, myristylaation, prenylaation, palmitaation, amidaation ja (tai) glykosyylifosfatidyyli-inositolin lisäyksen avulla), siten että homologilla on kinaasin aktiivisuutta ja (tai) se sisältää ainakin yhden epitoopin, joka pystyy saamaan esiin immuunivasteen MEKK-proteiinia kohtaan (se on, kun homologia annetaan eläimelle immunogeeninä alan ammattimiehen tuntemaa tekniikkaa käyttäen, eläin tuottaa humoraalisen ja (tai) sellulaarisen soluvasteen ainakin yhtä MEKK-proteiinin epitooppia kohtaan. Kinaasiaktiivisuus, ki-

naasisäätelyaktiivisuus sekä proteiinin kyky saada aikaan immuunivaste voidaan mitata, siten että käytetään tekniikoita, jotka alan ammattimies tuntee.

Esillä oleva keksinnön MEKK-proteiinilla, täysimittaisen proteiinin homologi mukaan luettuna, on sellaisia lisäominaisuuksia, joiden mukaan sitä koodittaa nukleiinihappomolekyyli, joka pystyy hybridisoitumaan täsmällisyyttä vaativissa olosuhteissa sellaisen nukleiinihapon kanssa (se on sellaiseen nukleiinihappoon), joka koodittaa MEKK-proteiinia, joka julkistetaan esimerkiksi taulukossa 1. Tässä yhteydessä käytettynä ilmaisu "ainakin osa" kokonaisuudesta tarkoittaa kokonaisuuden määrää, joka vähintään on riittävä sisältämään tuon kokonaisuuden toiminnalliset näkökohdat. Esimerkiksi ainakin osa nukleiinihapposekvenssistä, tässä yhteydessä käytettynä, on sellainen osa nukleiinihapposekvenssiä, joka pystyy muodostamaan hybridin tiukoissa hybridisaatio-olosuhteissa. Nukleiinihapposekvenssi edustaa cDNA-nukleiinihapposekvenssin pääteltyä sekvenssiä (komplementaarista DNA:ta), jonka tuotanto julkistetaan alla. (Olisi huomattava, että koska nukleiinihapon sekvensointi ei ole aivan virheetöntä, taulukossa 1 esitetty nukleiinihapposekvenssi parhaimmillaan edustaa sellaisen nukleiinihappomolekyylin selvää nukleiinihapposekvenssiä, joka koodittaa ainakin MEKK-proteiinin osaa). Tässä yhteydessä käytettynä täsmälliset hybridisaatio-olosuhteet tarkoittavat standardi hybridisaation olosuhteita, joissa käytetään nukleiinihappomolekyylejä (tai sekvenssejä), oligonukleotidit mukaan luettuina, identifioimaan samanlaisia sekvenssejä. Tällaiset standardiolosuhteet julkistetaan esimerkiksi Sambrook et al.:n julkaisussa, joka edellä on mainittu. Esillä olevan keksinnön edullisia MEKK-proteiineja koodittavat nukleiinihapposekvenssit, joilla on ainakin 80-prosenttinen homologia (identtisyys vertailualueiden kanssa) nukleiinihapposekvenssin kanssa, joka esitetään taulukossa 1. Esillä olevan keksinnön edullisempia MEKK-proteiineja koodittavat nukleiinihapposekvenssit, joilla on ainakin 85-prosenttinen homologia taulukossa 1 esitetyn nukleiinihapposekvens-

sin kanssa, esillä olevan keksinnön vielä edullisempia MEKK-proteiineja koodittavat nukleiinihapposekvenssit, joilla on vähintään 90-prosenttinen homologia taulukossa 1 esitetyn nukleiinihapposekvenssin kanssa.

MEKK-proteiinihomologit voivat syntyä luonnonmukaisen alleelisen variaation tai luonnollisen mutaation tuloksena. MEKK-proteiinihomologeja voidaan myös tuottaa, siten että käytetään tekniikoita, jotka tekniikan tason mukaan ovat tunnettuja ja joihin sisältyy, mutta ei rajoitu niihin, suorat muunnokset, jotka kohdistuvat proteiiniin, tai sellaiset muunnokset, jotka kohdistuvat geeniin, joka koodittaa proteiinia, siten että käytetään esimerkiksi klassisia tai yhdistelmä-DNA-tekniikoita, jotta saadaan aikaan satunnainen tai kohdistettu mutageneei. Esillä olevan keksinnön eristetyt proteiinit, homologit mukaan lukien, voidaan identifioida mutkattomalla tavalla, proteiinien kyvyllä fosforyloida nisäkkään MEK-proteiinia ja (tai) saada esiin immuunivaste MEKK-proteiineja kohtaan. Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiinin muunnoksiin sisältyy täysimittaisen MEKK-proteiinin lyhentäminen. Esillä olevan keksinnön MEKK-proteiinin edullisiin muunnoksiin sisältyy esimerkiksi säätelydomainin ainakin osan poisto (kuvattu taulukossa 2), jotta tuotetaan rakenteellisesti aktiivinen MEKK-proteiini; katalyyttisen domainin ainakin osan poisto (kuvattu taulukossa 2), jotta tuotetaan sellainen inaktiivinen MEKK-proteiini, joka pystyy inhiboimaan proteiineja, jotka pystyvät säätelemään MEKK:n aktiivisuutta; MEKK-proteiinin säätelydomainin ainakin osan eristäminen sellaisen molekyylin tuottamiseksi, joka pystyy inhiboimaan MEKK-säätelyproteiineja; sekä lysiinitähteen substituointi metioniinitähteellä katalyyttisessä domainissa (se on, fosfotransferaasidomainissa), jotta katalyyttinen domaini inaktivoituu.

MEKK 1:hden kaksi lyhennettyä muotoa, jotka sisälsivät katalyyttisen domainin eikä säätelydomainia, tuotettiin standardi yhdistelmä-DNA-tekniikoilla. Viittaamalla taulukkoon 2, en-

simmäinen lyhennetty MEKK-molekyyli tuotettiin, siten että MEKK 1 lyhennettiin tähteestä yksi tähteeseen 215, jolloin poistettiin PPPSS-saranasekvenssi ja säätelydomaini, jotta muodostettiin typistetty MEKK-molekyyli eli typistetty PPPSS (PPPSS-trunc.). Toinen pienempi, typistetty MEKK-molekyyli tuotettiin, siten että MEKK 1 lyhennettiin tähteestä yksi tähteeseen yksi, jolloin poistettiin PPPSS-saranasekvenssi sekä säätelydomaini, jotta muodostui typistetty MEKK-molekyyli, typistetty Nco1. Typistetyn PPPSS:n ja Nco1:n kykyä aktivoida MAPK-aktiivisuutta (määrätty edellä kuvatulla tavalla) verrattiin täysimittaiseen MEKK-proteiiniin sekä negatiiviseen kontrolliproteiiniin. Kuviossa 15 esitetyt tulokset ilmaisevat, että lyhennetyt MEKK-molekyylit olivat aktiivisempia kuin täysimittainen MEKK. Typistetyt MEKK-molekyylit olivat itse asiassa ainakin noin 1,5 kertaa aktiivisempia kuin täysimittainen MEKK-proteiini. MEKK:n säätelydomainin poisto poistaa täten katalyyttisen domainin aktiivisuuden säätelyn, mikä johtaa parantuneeseen entsyymiaktiivisuuteen.

Esillä olevan keksinnön proteiinin vähimmäiskoko on riittävä muodostamaan epitoopin, sellainen koko, joka on tyypillisesti vähintään noin seitsemästä yhdeksään aminohappoa. Kuten alan ammattimies ymmärtää täysin, epitooppi voi sisältää aminohappoja, jotka luonnostaan ovat toisilleen vierekkäisiä, sekä sellaisia aminohappoja, jotka luonnomukaisen proteiinin tertiaarisen rakenteen vuoksi ovat riittävän tiiviisti lähekkäin, jotta ne muodostavat epitoopin.

Nukleiinihapposekvenssien toiminnallinen ekvivalentti voi sisältää muunnoksia, kuten esimerkiksi nukleotidideleetioita, -lisäyksiä, -inversioita ja (tai) -substituutioita, jotka olennaisesti eivät häiritse nukleiinihapposekvenssien kykyä koodittaa biologisesti aktiivista entsyymiä. Toisin sanoen, esillä olevan keksinnön toiminnallisesti samanarvoiset nukleiinihapposekvenssit koodittavat entsyymeitä, joilla biologinen aktiivisuus on samanlaista kuin niiden luonnonmukaisilla vastineilla. Toiminnallisesti samanarvoiset eukaryoottinuk-

leiinihapposekvenssit voivat sisältää myös väliin tulevia ja (tai) sellaisia sekvenssejä, joille ei tapahdu translaatiota ja jotka ympäröivät nukleiinihapposekvenssien koodittavia alueita ja (tai) ovat koodittavien alueiden sisällä.

Funktionaalisesti samanarvoinen nukleiinihapposekvenssi voidaan saada, siten että käytetään menetelmiä, jotka alan ammattimies tuntee (katso esimerkiksi Sambrook et al., edellä mainitussa julkaisussa). Nukleiinihapposekvenssejä voidaan esimerkiksi muuntaa, siten että käytetään erilaisia tekniikoita, joihin kuuluu, mutta ei rajoitu niihin, klassisia mutageneesi- ja yhdistelmä-DNA-tekniikoita, kuten esimerkiksi sattiin suunnattu mutageneesi, nukleiinihappofragmentin kemiallinen käsittely mutaatioiden aikaan saamiseksi, nukleiinihapon pilkkominen restriktioentsyymillä, nukleiinihappofragmenttien sidonta, monistaminen polymeraasiketjureaktiolla (PCR) ja (tai) nukleiinihapposekvenssin valittujen osien mutageneesi, oligonukleotidiseosten synteesi ja seosryhmien sidonta nukleiinihapposekvenssien seoksen "rakentamiseksi" sekä niiden yhdistelmät. Toiminnallisesti samanarvoiset nukleiinihapot voidaan valita muunnettujen nukleiinihapposekvenssien seoksesta, siten että ne valikoidaan proteiinin sellaisen toiminnan perusteella, jota nukleiinihapposekvenssi koodittaa. Alan ammattimies tuntee määrän valikointitekniikoita, joihin sisältyy, mutta ei niihin rajoitu, komplementaatio-, sitoutmis- ja entsyymimäärityksiä. Voidaan transformoida millä tahansa menetelmällä, jolla nukleiinihapposekvenssejä insertoidaan soluun. Transformaatiotekniikoihin sisältyy, mutta ei rajoitu niihin, transfektio, elektroporaatio, mikroinjektio, lipofektio, adsorptio ja protoplastifuusio. Yhdistelmäsolu voi säilyä yksisoluisena tai se voi kasvaa kudokseen tai monisoluiseen organismiin. Esillä olevan keksinnön transformoidut nukleiinihapposekvenssit voivat säilyä kromosomin ulkopuolella tai ne voivat liittyä yhteen tai useampaan saittiin isäntäsolun kromosomissa, sellaisella tavalla, että ne säilyttävät kykynsä ekressoitua eli ilmentyä. Sisään liitetyt nukleiinihapposekvenssit ovat usein

kestävämpiä kuin kromosomin ulkopuoliset sekvenssit. Täten esillä olevan keksinnön piirissä on, että sellaisten nukleiinihapposekvenssien ilmentyminen, jotka koodittavat esillä olevan keksinnön entsyymejä, voi johtua plasmidisekvenssien tai sellaisten sekvenssien ilmentymisestä, jotka on liitetty isäntägenomiin.

Yhdistelmäsolu tuotetaan mieluummin, siten että isäntäsolu transformoidaan yhdellä tai useammalla yhdistelmämolekyylillä, joista kukin sisältää yhden tai useampia esillä olevan keksinnön nukleiinihapposekvenssejä, jotka ovat toiminnallisesti liitetyt ekspressiovektoriin, joka sisältää yhden tai useampia transkription kontrollisekvenssejä. Solu voidaan transformoida yhdellä tai useammalla yhdistelmämolekyylillä.

Tässä yhteydessä käytettynä ilmaisu "toiminnallisesti liitetty" tarkoittaa nukleiinihapposekvenssin insertiota eli liittymistä ilmentymis- eli ekspressiovektoriin, kun sekvenssi transformoidaan isäntäsoluun. Tässä yhteydessä käytettynä ilmentymisvektori on DNA- tai RNA-vektori, joka pystyy transformoimaan isäntäsolun, replikoitumaan eli kahdentumaan kopioitumalla isäntäsolussa ja saamaan aikaan tarkoin määritellyn nukleiinihapposekvenssin ilmentymisen. Ilmentymisvektorit voivat olla peräisin joko esitumaisista tai aitotumaisista eliöistä eli prokaryooteista tai eukaryooteista, ja tyyppillisesti ne ovat viruksia tai plasmideja.

Esillä olevan keksinnön nukliinihapposekvenssit voidaan liittää toiminnallisesti ilmentymisvektoreihin, jotka sisältävät säätelysekvenssejä, kuten esimerkiksi promoottoreita, operaattoreita, repressoreita, enhansereita eli tehostajia, päätesekvenssejä, replikaation alkukohtia sekä muita säätelysekvenssejä, jotka sopivat yhteen isäntäsolun kanssa ja jotka kontrolloivat nukleiinihapposekvenssien ilmentymistä. Esillä olevan keksinnön ilmentymisvektoreihin kuuluu erityisesti transkription kontrollisekvenssejä. Nämä viimeksi mainitut sekvenssit ovat sellaisia sekvenssejä, jotka säätelevät

transkription aloitusta, pidentymistä ja päättymistä. Erityisen tärkeitä transkription kontrollisekvenssejä ovat sekvenssit, jotka säätelevät transkription aloitusta, kuten esimerkiksi promoottori-, enhanseri-, operaattori- ja repressorisekvenssit. Sopiviin transkription säätelysekvensseihin kuuluu jokainen transkription kontrollisekvenssi, joka toimii ainakin yhdessä esillä olevan keksinnön isäntäsoluista, ja se voi sisältää bakteeri-, hiiva-, sieni-, eläin- ja kasviperäisiä transkription kontrollisekvenssejä.

Esillä olevan keksinnön yhdistelmämolekyyli voi olla mikä tahansa tässä kuvattu nukleiinihapposekvenssi, joka on toiminnallisesti liitetty mihin tahansa transkription kontrollisekvenssiin, joka pystyy tehokkaasti säätelemään nukleiinihapposekvenssin ilmentymistä solussa, joka on transformoitava.

Esillä olevan keksinnön yhdistelmäsoluihin sisältyvät mitkä tahansa solut, jotka on transformoitu esillä olevan keksinnön millä tahansa nukleiinihpposekvensseillä.

Alan ammattimies ymmärtää täysin, että yhdistelmä-DNA-tekniikoiden käyttö voi parantaa transformoitujen nukleiinihapposekvenssien ilmentymistä, esimerkiksi siten että manipuloidaan nukleiinihapposekvenssien kopioiden lukumäärää isäntäsolun sisällä, sellaista tehokkuutta, jolla nämä nukleiinihapposekvenssit transkriboidaan, sellaista tehokkuutta, jolla saaduille transkripteille tapahtuu translaatio, sekä translaation jälkeisten muunnosten tehokkuutta. Sellaisiin yhdistelmätekniikoihin, jotka ovat käyttökelpoisia nukleiinihapposekvenssien ekspression lisäämisessä, sisältyy, mutta ei rajoitu niihin, nukleiinihapposekvenssien toiminnallinen kytkentä sellaisiin plasmideihin, jotka muodostavat suuren kopioluvun, nukleiinihapposekvenssien integraatio yhteen tai useampaan isäntäsolukromosomiin, vektoristabiiliussekvenssien lisääminen plasmideihin, transkriptiokontrollisignaalien substituutiot tai modifikaatiot (esimerkiksi

promoottorit, operaattorit, enhanserit), translaation kontrollisignaalien substituutiot tai muunnokset (esimerkiksi ribosomia sitovat kohdat, Shine-Delgarno-sekvenssit), entsyymejä koodittavien nukleiinihapposekvenssien muuntaminen vastaamaan isäntäsolun kodonin käyttötapaa, sellaisten sekvenssien deleetio, jotka tekevät transkriptit epästabiileiksi sekä sellaisten kontrollisignaalien käyttö, jotka ajallisesti erottavat yhdistelmäsolun kasvun yhdistelmäentsyymin tuotosta viljelyn aikana. Esillä olevan keksinnön yhdistelmäentsyymin aktiivisuutta voidaan parantaa fragmentoimalla tai muuntamalla sellaisia nukleiinihappoja, jotka koodittavat edellä kuvattuihin teihin liittyviä entsyymejä, tai valmistamalla niistä johdannaisia.

Esillä olevaan keksintöön sisältyy myös menetelmä sellaisten yhdisteiden identifioimiseksi, jotka pystyvät säätelemään signaaleita, jotka saavat alkunsa solun pinnan reseptorista. Tällainen menetelmä sisältää seuraavat vaiheet: (a) sellainen solu, joka sisältää MEKK-proteiinin, saatetaan kosketuksiin oletetun säätely-yhdisteen kanssa, (b) solu saatetaan kosketuksiin sellaisen ligandin kanssa, joka pystyy sitoutumaan reseptoriin, joka on solun pinnalla; ja (c) määritetään oletetun säätely-yhdisteen kyky säädellä solusignaaleja, siten että määritetään MEKK-proteiinin fosforylaatio. Vaihe (c) sisältää MEKK-proteiinin aktivaation määrittämisen, siten että mitataan MEKK-proteiinin kyky fosforyloida MEK-proteiinia.

Eräässä toisessa sovellusmuodossa menetelmä, jolla identifioidaan sellaisia yhdisteitä, jotka pystyvät säätelemään signaalitransduktiota solussa, sisältää vaiheet, joissa (a) oletettu inhiboiva yhdiste saatetaan kosketuksiin MEKK-proteiinin kanssa, jotta muodostuu reaktioseos; (b) reaktioseos saatetaan kosketuksiin MEK-proteiinin kanssa; ja (c) määritetään oletetun inhiboivan yhdisteen kyky estää se, että MEKK-proteiini foaforyloi MEK-proteiinin. Vaiheesta (c) saatuja tuloksia voidaan verrata oletetun, inhiboivan yhdisteen ky-

kyyn estää Raf-proteiinin kyky fosforyloida MEK-proteiini, sen määrittämiseksi, voiko yhdiste valikoivasti säädellä signaalitransduktiota, joka sisältää MEKK-proteiinin, joka ei ole riippuvainen Raf-proteiinista. Edellä esitetyissä menetelmissä käytetyt MEKK-, MEK ja Raf-proteiinit voivat olla yhdistelmä- tai luonnonmukaisesti polveutuvia proteiineja.

Esillä olevan keksinnön toinen näkökohta sisältää reagenssipakkauksen sellaisten yhdisteiden identifioimiseksi, jotka säätelevät niitä signaaleja, jotka alkavat reseptorista solun pinnalla. Sellaisiin reagenssipakkauksiin kuuluu: (a) ainakin yksi kammio, joka sisältää MEKK-proteiinia; (b) sellainen ligandi, joka pystyy sitoutumaan solun pinnan reseptoriin, ja (c) sellaiset keinot, joilla määritetään mahdollisen säätelyyhdisteen kyky muuttaa MEKK-proteiinin fosforylaatiota. Tällaisiin fosforylaation ilmaisukeinoihin sisältyy menetelmiä ja reagensseja, jotka alan ammattimies tuntee, esimerkiksi fosforylaatio voidaan ilmaista, siten että käytetään fosfoselluloosablottausreagensseja.

Toisessa sovellusmuodossa reagenssipakkaus, joka on esillä olevan keksinnön mukainen, sisältää: (a) MEKK-proteiinin; (b) MEK-proteiinin, ja (c) sellaiset keinot, joilla määritetään mahdollisen inhiboivan yhdisteen kyky estää MEK-proteiinin fosforylaatio MEKK-proteiinilla. Esillä olevan keksinnön mukainen reagenssipakkaus voi vielä sisältää Raf-proteiinin sekä keinot mahdollisen, sellaisen inhiboivan yhdisteen kyvyn ilmaisemiseksi, joka pystyy estämään Raf-proteiinin kyvyn fosforyloida MEK-proteiinia.

Esillä olevan keksinnön eräs sovellusmuoto on terapeuttinen koostumus, joka, silloin kun sitä annetaan tehokas määrä eläimelle, pystyy säätelemään signaalitranduktiota tämän eläimen soluissa. Tällainen terapeuttinen koostumus on erityisesti käyttökelpoinen annettavaksi eläimille lääketieteellisten häiriöiden, kuten esimerkiksi syövän, autoimmuunisairauksien, tulehdusvasteiden, allergisten vasteiden ja

hermostoon liittyvien häiriöiden, kuten Parkinsonin ja Alzheimerin taudin, hoitamiseksi. Terapeuttinen koostumus voi sisältää ainakin osan MEKK-proteiinista ja (tai) nukleiinihappomolekyylistä, joka koodittaa ainakin osaa esillä olevan keksinnön MEKK-proteiinista. Terapeuttinen koostumus voi sisältää MEKK-proteiinin, jolla on kinaasiaktiivisuutta ja (tai) kinaasia säätelevää aktiivisuutta. Terapeuttinen koostumus voi mieluummin sisältää kinaasidomainin ja (tai) kinaasin säätelydomainin.

Terapeuttinen koostumus voi sisältää myös sopivan kantaja-aineen. Tässä yhteydesä käytettynä "kantaja-aine" tarkoittaa mitä tahansa ainetta, joka soveltuu vehikkeliksi esillä olevan keksinnön yhdisteen antamiseksi sopivaan vaikutuskohtaan in vitro tai in vivo. Kantajat voivat sellaisenaan toimia terapeuttisen koostumuksen, joka sisältää esillä olevan keksinnön yhdistettä, täyte- tai formulaatioaineena.

Edellä esitetty keksinnön kuvaus on annettu valaisemaan ja kuvaamaan keksintöä. Kuvaus ei ole tämän lisäksi tarkoitettu rajoittamaan keksintöä sellaiseen muotoon, joka tässä yhteydessä julkistetaan. Niinpä sellaiset variaatiot ja muunnokset, jotka ovat oikeassa suhteessa edellä esitettyihin opetuksiin sekä asiaankuuluvan tutkimusalan taitoon ja tietoon, ovat esillä olevan keksinnön piirissä. Tässä yhteydessä kuvattu edullinen sovellusmuoto on lisäksi tarkoitettu selittämään keksinnön parhasta toteutusmuotoa ja tekemään muille alan ammattimiehille mahdolliseksi käyttää keksintöä hyväksi erilaisissa sovellusmuodoissa ja erilaisin muunnoksin, joita tarvitaan heidän erityissovelluksiinsa tai keksinnön käyttöihin. On tarkoitus, että liitteinä seuraavat patenttivaatimukset ovat konstruoidut, siten että ne sisältävät vaihtoehtoisia sovellusmuotoja sellaisessa laajuudessa, jonka tekniikan taso sallii.

Patenttivaatimukset

1. Olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aminohapposekvenssin, joka esitetään taulukossa 1.

2. Olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aminohapposekvenssin, joka esitetään taulukossa 2.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini ei sisällä Src homologi 2 tai Src homologi 3 -domaineja.

4. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sellaisen osan, jossa on runsaasti seriiniä ja treoniinia.

5. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että proteiini sisältää kinaasin katalyyttisen domainin.

6. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että se pystyy aktivoimaan MEK- tai MAKP-proteiinin.

7. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittua proteiinia koodittaa nukleiinihapposekvenssi, joka koodittaa sellaista proteiinia, joka pystyy fosforyloimaan nisäkkään MEK:n, joka ei ole Raf-proteiinista riippuvainen.

8. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittua proteiinia käytetään tuottamaan vasta-aineita, jotka pystyvät sitoutumaan MEKK-proteiiniin.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu vasta-aine on monoklonaalinen.

10. Olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että sitä koodittaa sellainen nukleiinihapposekvenssi, joka esitetään taulukossa 1.

11. Olennaisesti puhdas MEKK-proteiini, joka pystyy fosforyloimaan nisäkkään MEK-proteiinin, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini sisältää sellaisen osan, jossa on runsaasti seriiniä ja treoniinia, sekä kinaasin katalyyttisen domainin eikä se sisällä SH2- tai SH3-domaineja.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini pystyy aktivoimaan MEK- tai MAPK-proteiinin.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini sisältää ainakin 672 aminohappoa.

14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini toimii sellaisella tavalla kuin proteiini, joka sisältää taulukossa 2 esitetyn sekvenssin.

15. Patenttivaatimuksen 11 mukainen, olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että se pystyy fosforyloimaan MEK-proteiinia noin 40 minuutin kuluttua sellaisessa reaktioseoksessa, joka sisältää $MgCl_2$:a ja ATP:a, mainitun seoksen pH pidetään alueella, joka on noin pH 6,0 - 8,0, mainitulla proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka eroaa Raf-proteiinin aminohapposekvenssistä.

16. Patenttivaatimuksen 11 mukainen, olennaisesti puhdas MEKK-proteiini, t u n n e t t u siitä, että se pystyy säätelemään MAPK-proteiinin aktiivisuutta, joka ei ole Raf-prote-

iinista riippuvaista, mainitulla MEKK-proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka eroaa mainitun Raf-proteiinin aminohapposekvenssistä.

17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen, olennaisesti puhdas MEKK-proteiini, t u n n e t t u siitä, että se pystyy säätelemään signaaleja, jotka saavat alkunsa kasvutekijäreseptorista solun pinnalla, siten että se säätelee MAPK-proteiinin aktiivisuutta, mainittu säätelykyky poikkeaa Raf-proteiinin signaalisäätelystä.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu kasvutekijäreseptori kytketään heterotrimeerisiin, guaniininukleotidiä sitoviin proteiineihin.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen proteiini, t u n n e t t u siitä, että mainittu kasvutekijäreseptori valitaan ryhmästä, joka koostuu trombiini- ja muskariinireseptoreista.

20. Patenttivaatimuksen 11 mukainen, olennaisesti puhdas MEKK-proteiini, t u n n e t t u siitä, että se nisäkässoluissa edustaa divergenssiä eli eri suuntiin kehittymistä hiivan proteiinikinaasijärjestelmästä, joka on altis feromonille, mainittu proteiini pystyy säätelemään MAPK-proteiinia, joka ei ole riippuvaista Raf-proteiinista.

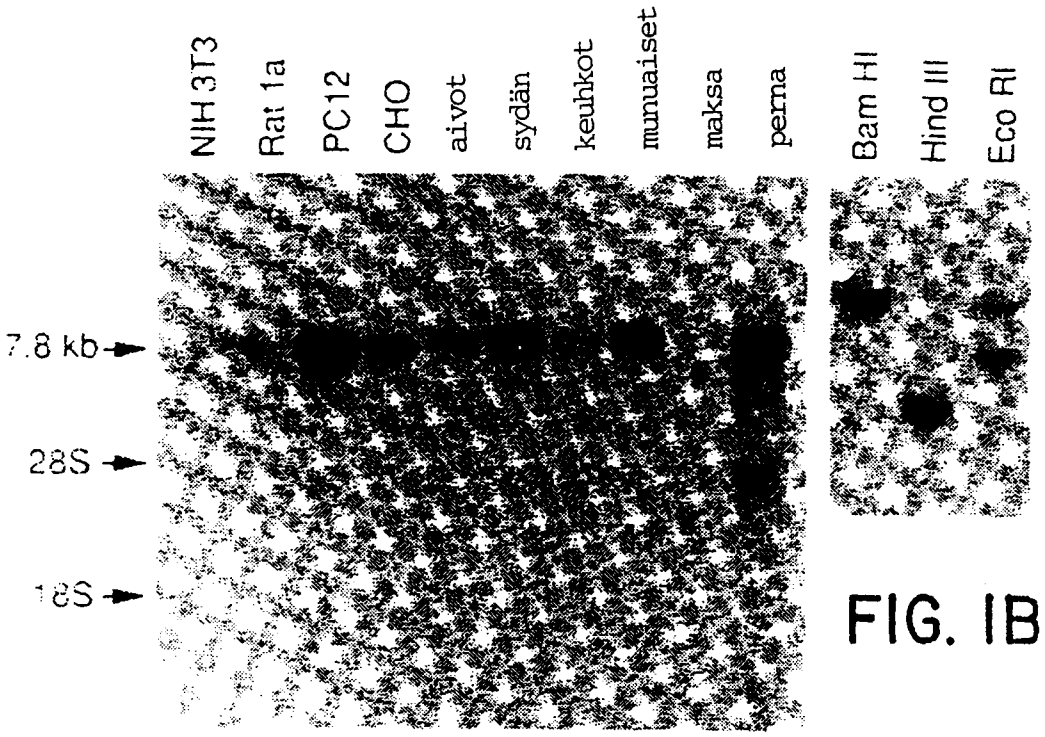

NIH 3T3
Rat 1a
PC12
CHO
aivot
sydän
keuhkot
munuaiset
maksa
perna
7.8 kb
28S
18S
Bam HI
Hind III
Eco RI

FIG. IB

FIG. IA

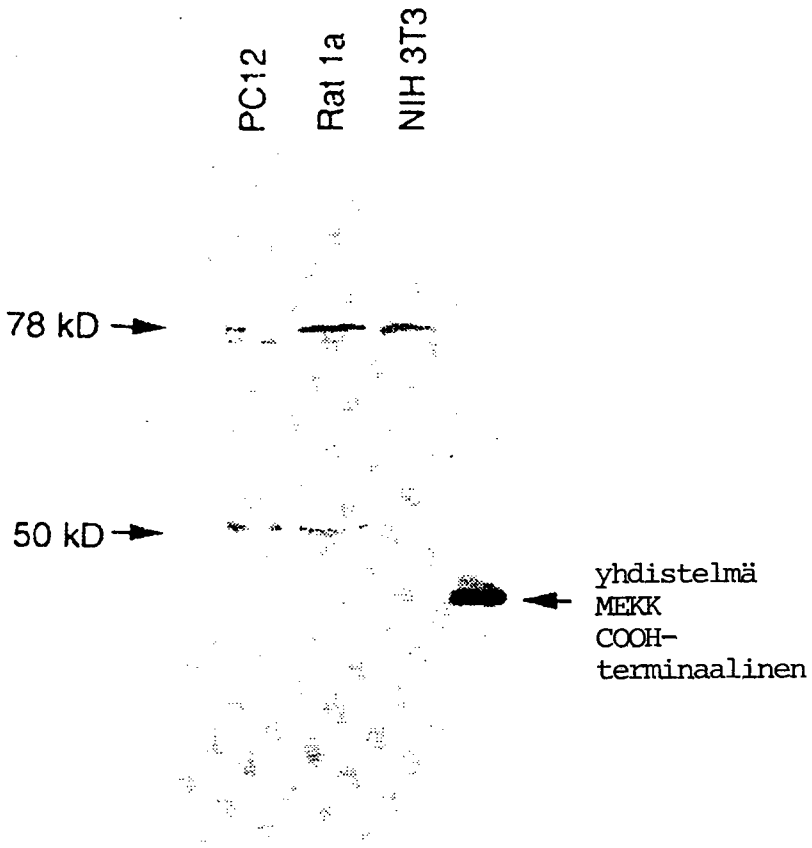

PC12
Rat 1a
NIH 3T3
78 kD
50 kD
yhdistelmä
MEKK
COOH-
terminaalinen

FIG. IC

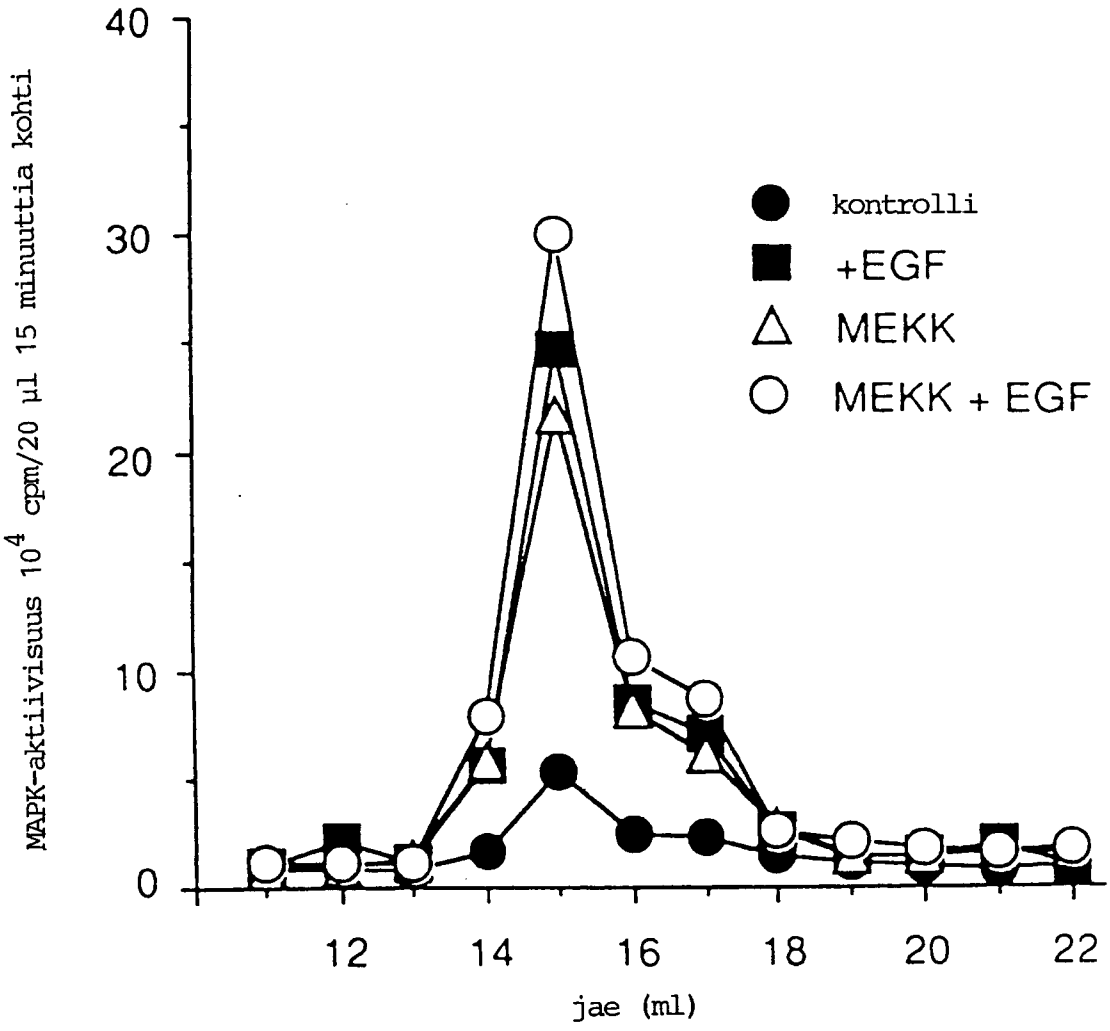

40
30
20
10
0
12
14
16
18
20
22
jae (ml)
MAPK-aktiivisuus 10^4 cpm/20 µl 15 minuuttia kohti
kontrolli
+EGF
MEKK
MEKK + EGF

FIG. 2A

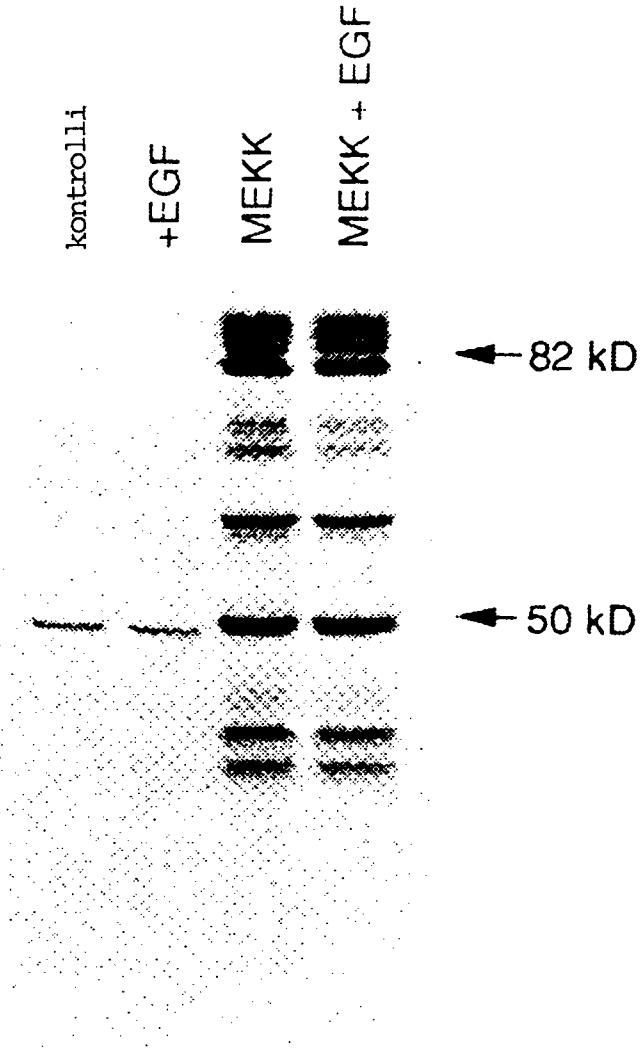


FIG. 2B

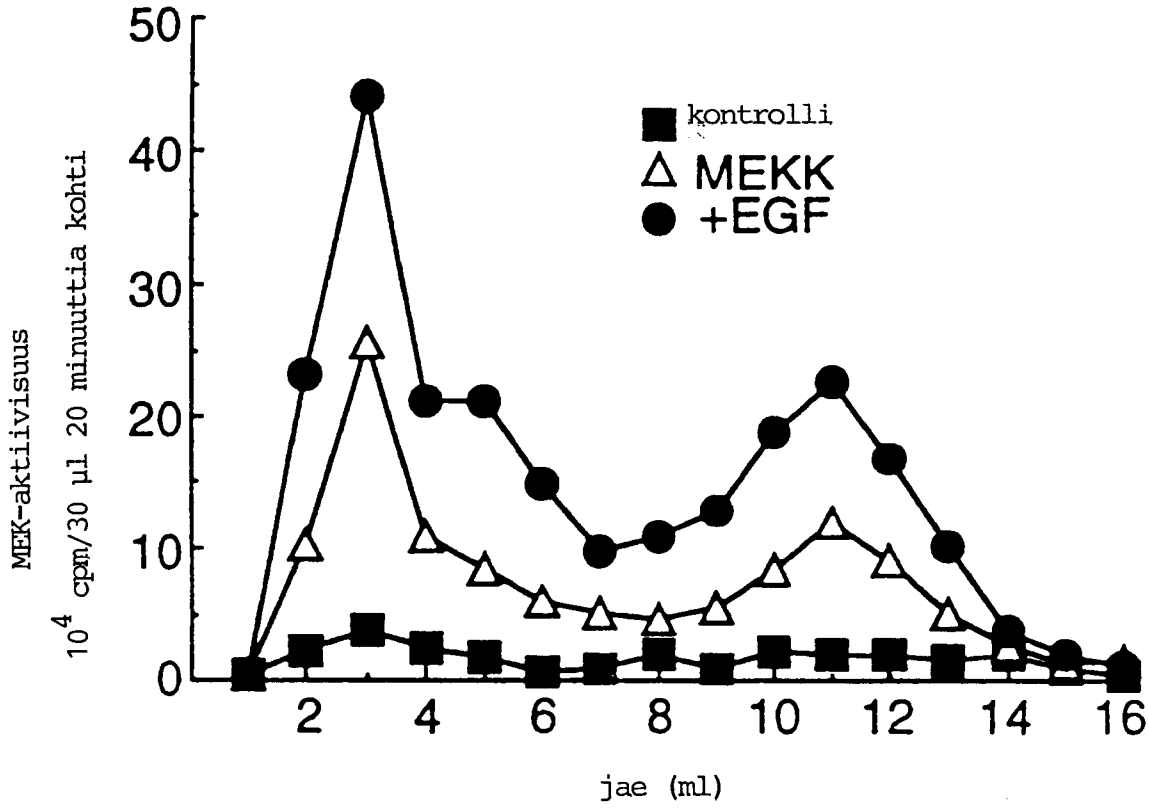

MEK-aktiivisuus
10^4 cpm/30 µl 20 minuuttia kohti
50
40
30
20
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
jae (ml)
kontrolli
MEKK
+EGF

FIG. 3

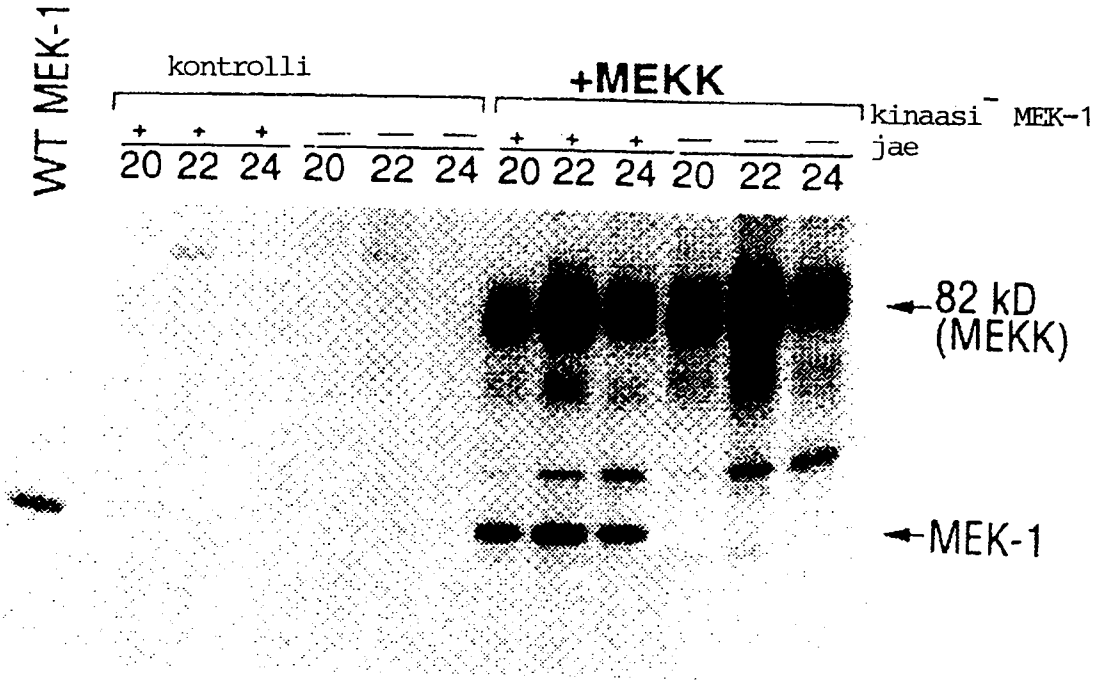


FIG. 4A

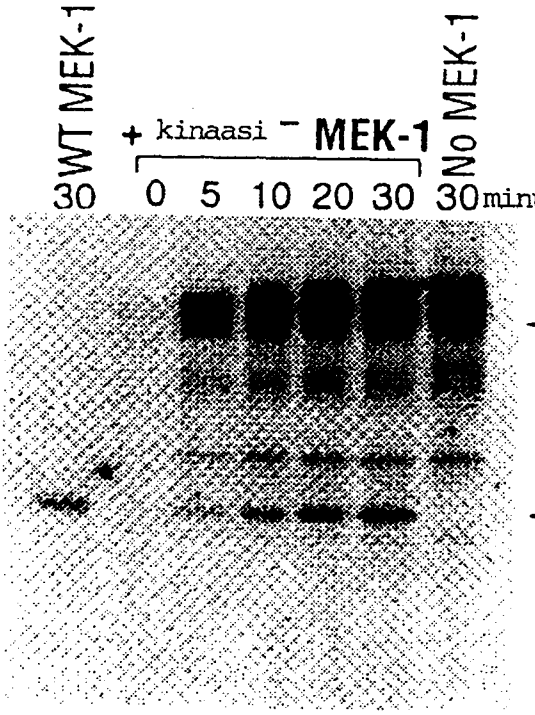


FIG. 4B

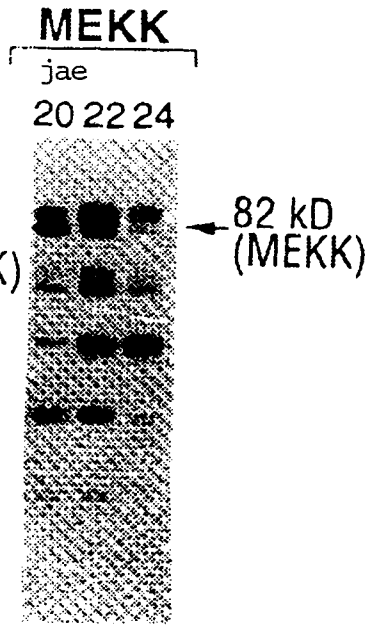


FIG. 4C

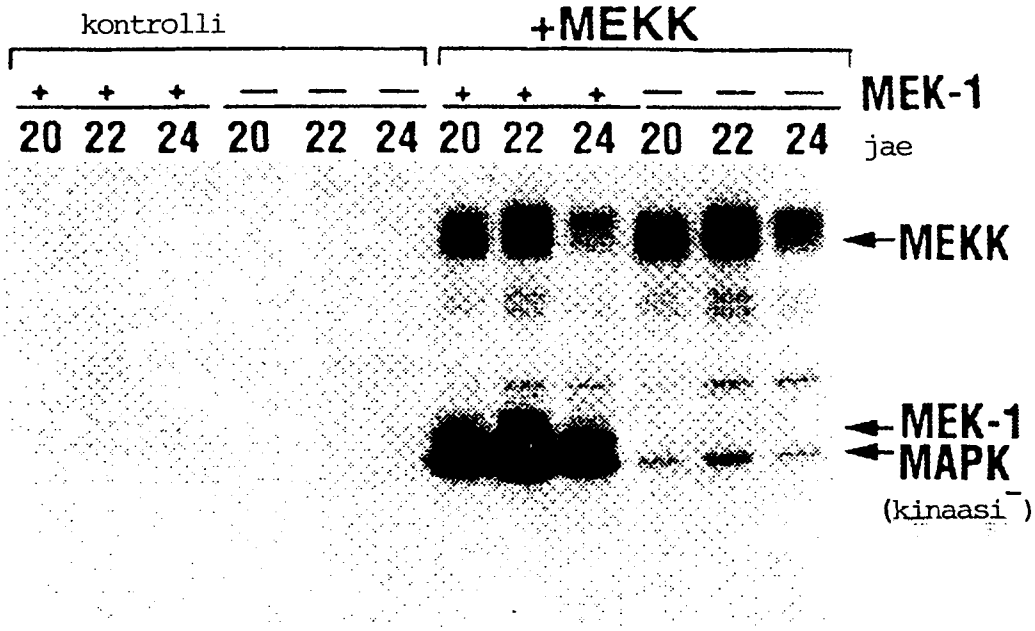

kontrolli
+MEKK
+ + + — — — + + + — — —
MEK-1
20 22 24 20 22 24 20 22 24 20 22 24
jae
MEKK
MEK-1
MAPK
(kinaasi⁻)

FIG. 5A

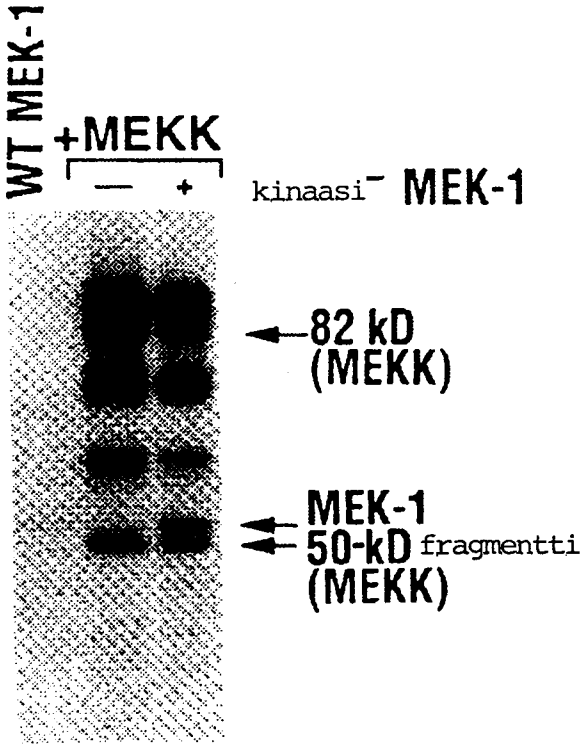

WT MEK-1
+MEKK
— +
kinaasi⁻ MEK-1
82 kD
(MEKK)
MEK-1
50-kD fragmentti
(MEKK)

FIG. 5B

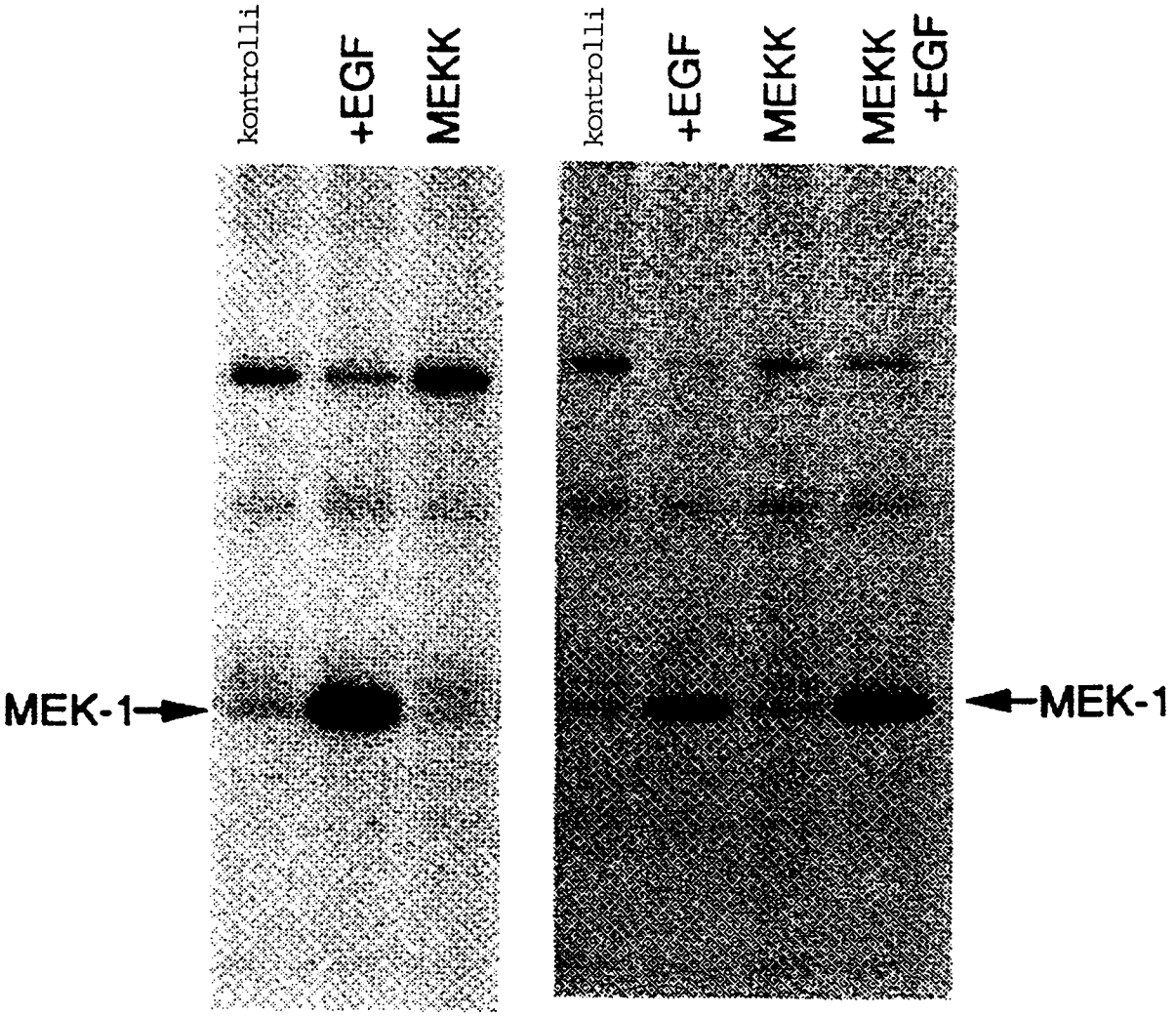


FIG. 6A FIG. 6B

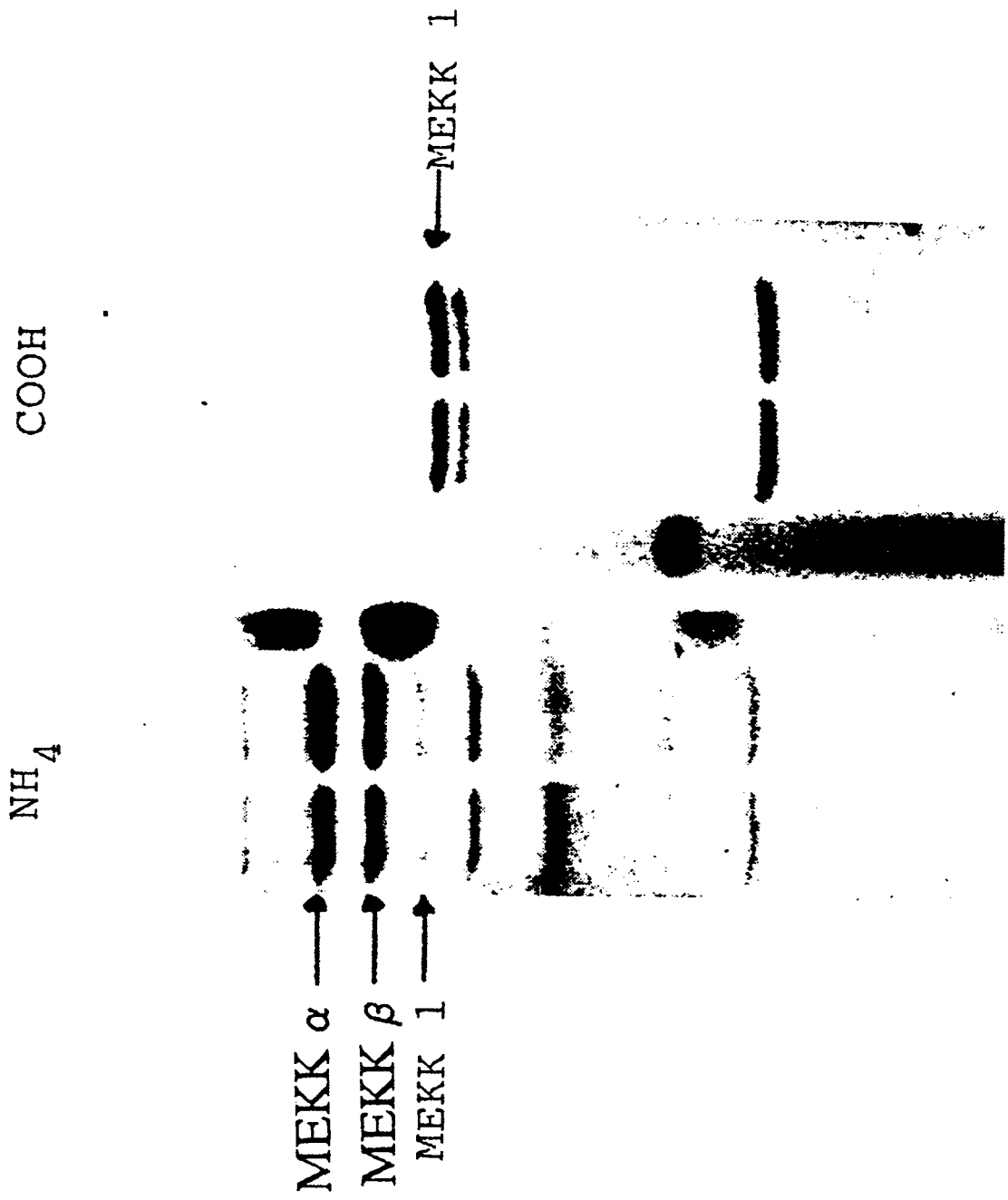


FIG. 7

EGF:llä, NGF:llä ja TPA:lla stimuloitu aktivaatio

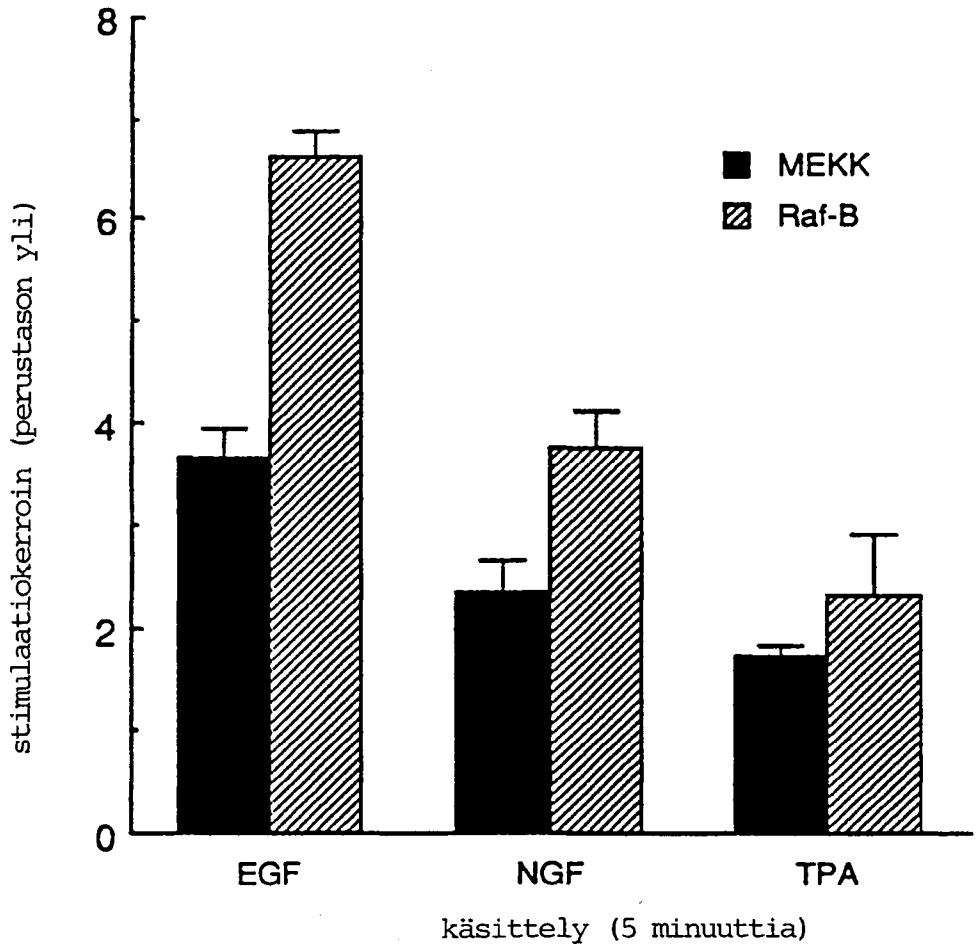


FIG. 8

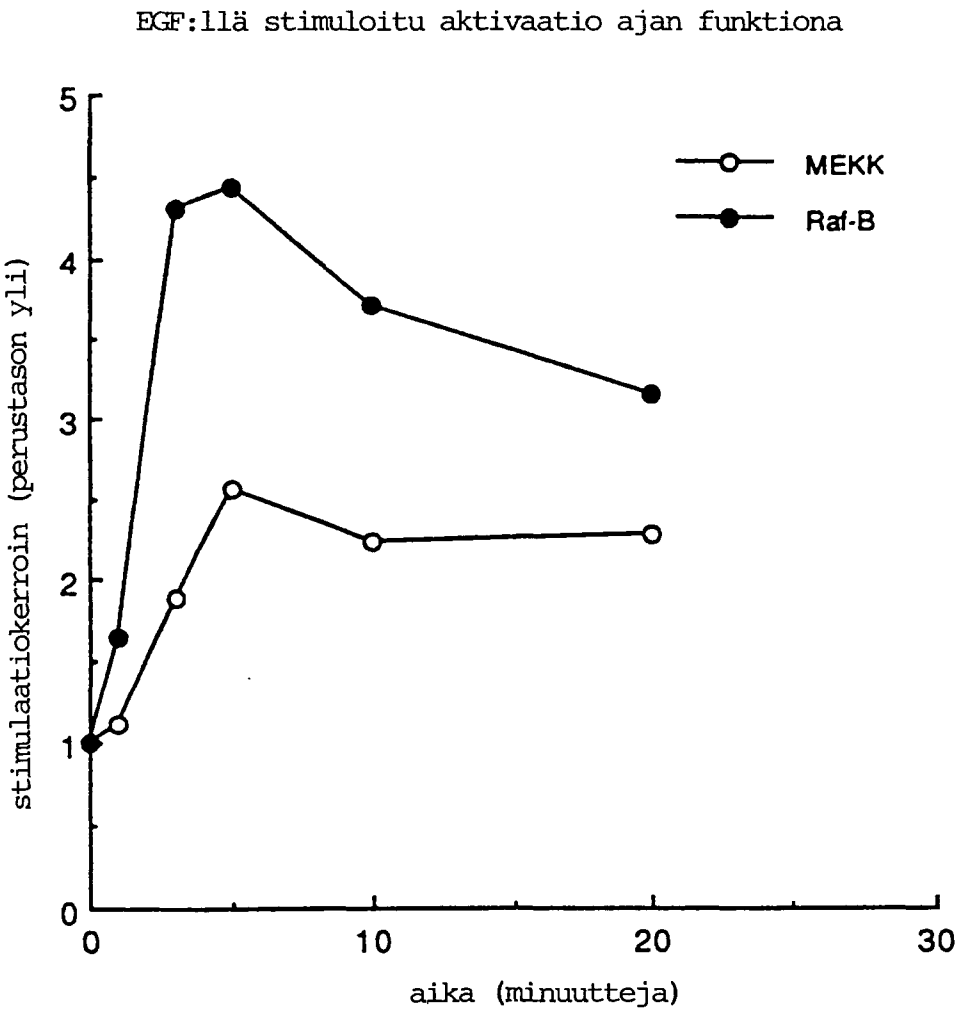

EGF:llä stimuloitu aktivaatio ajan funktiona
MEKK
Raf-B
stimulaatiokerroin (perustason yli)
aika (minuutteja)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30

FIG. 9

Raf-B:n immunodepleetiolla ei ole vaikutusta MEKK:n aktiivisuuteen

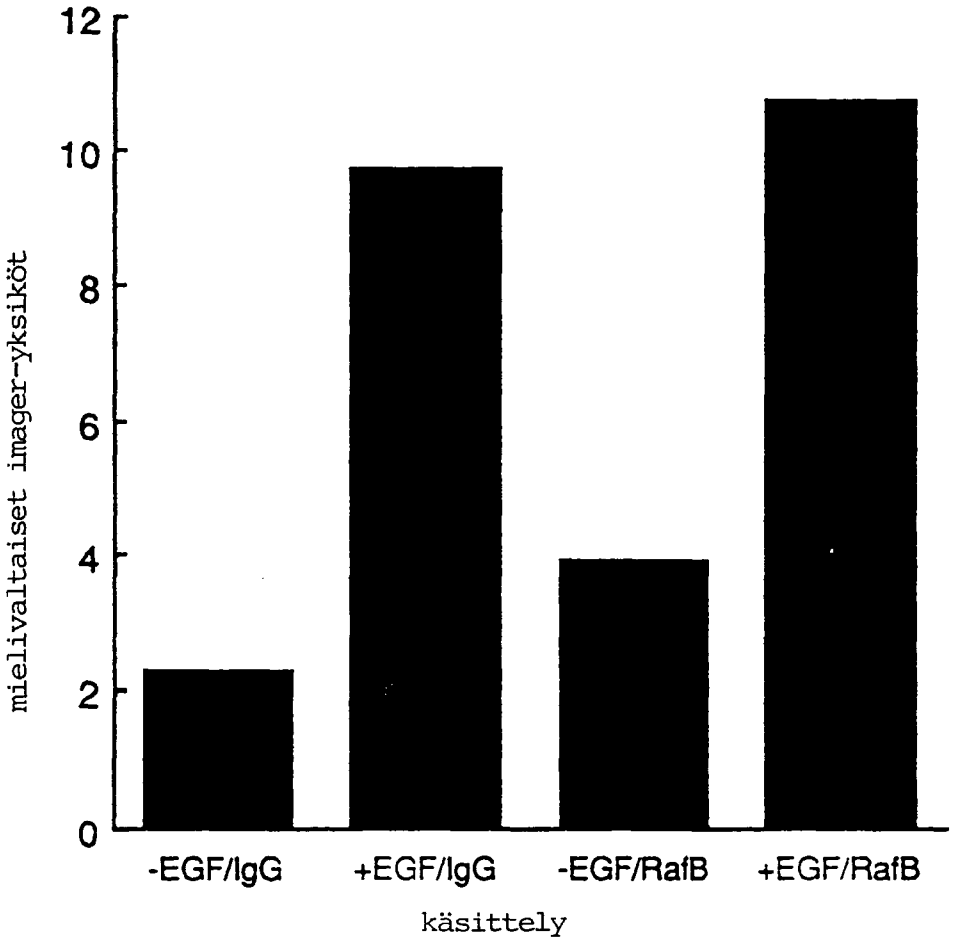


FIG. 10

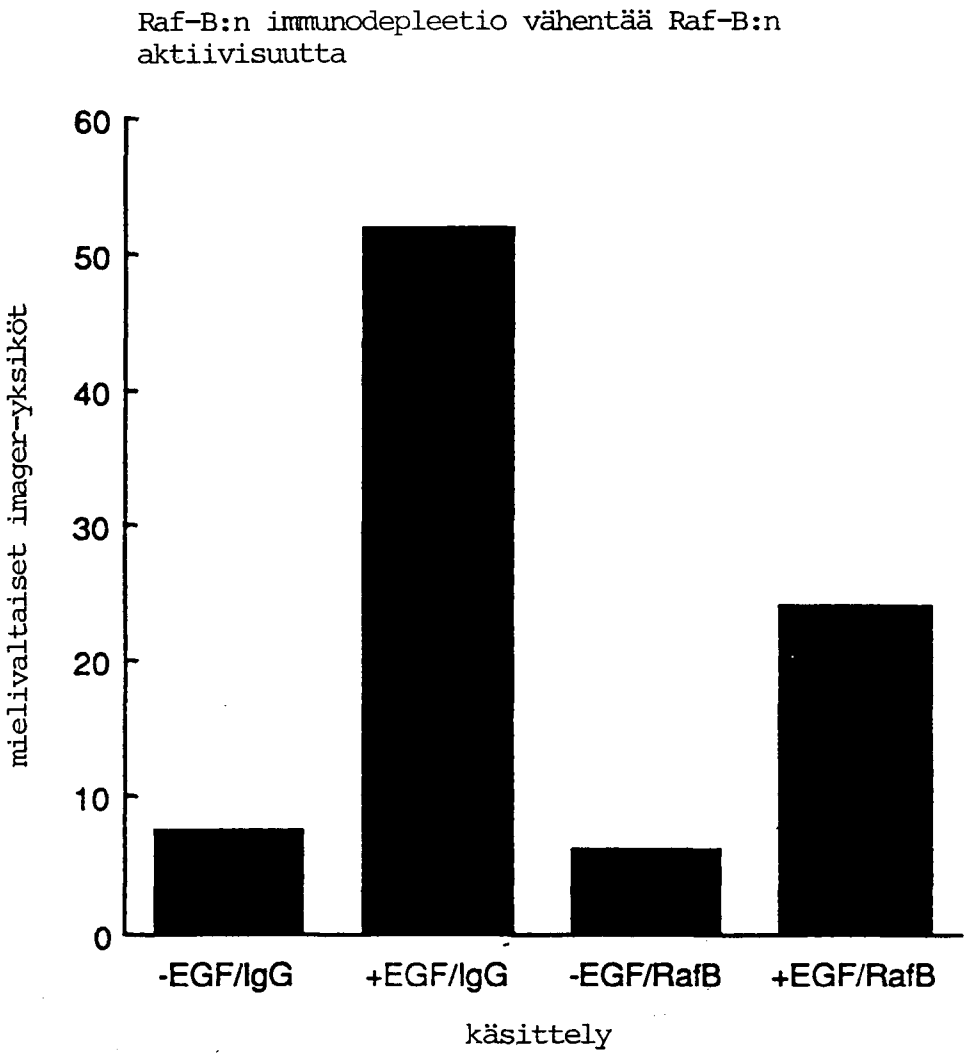

Raf-B:n immunodepleetio vähentää Raf-B:n aktiivisuutta
mielivaltaiset imager-yksiköt
60
50
40
30
20
10
0
-EGF/IgG
+EGF/IgG
-EGF/RafB
+EGF/RafB
käsittely

FIG. 11

Inhiboivan N17Ras:n ilmentyminen pitää MEKK:n aktivaation kasvutekijällä

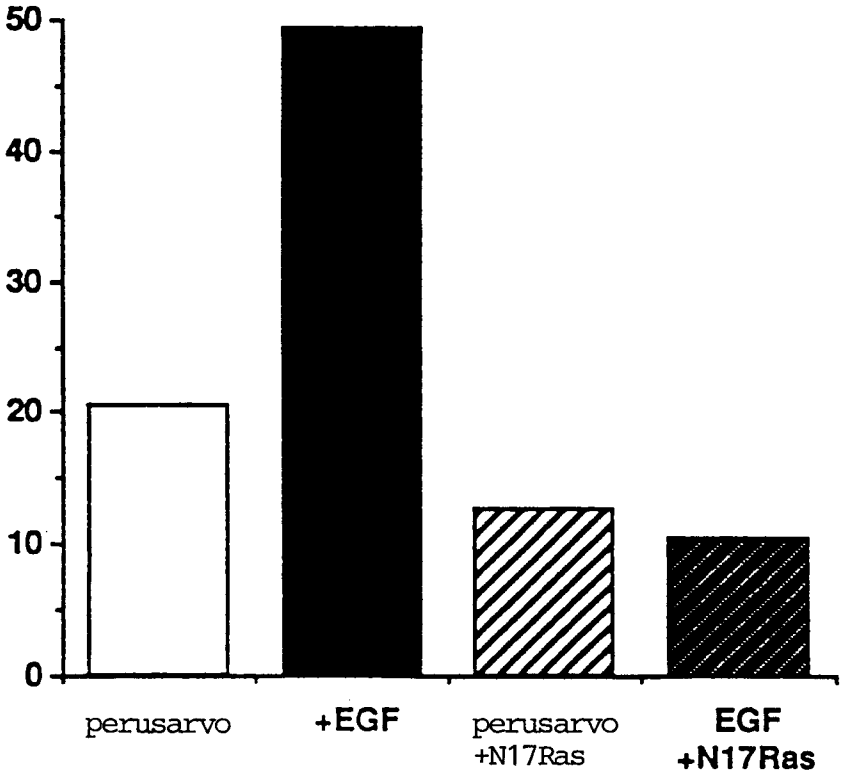


FIG. 12

EGF-aktivaation inhibitio fosfokoliinilla

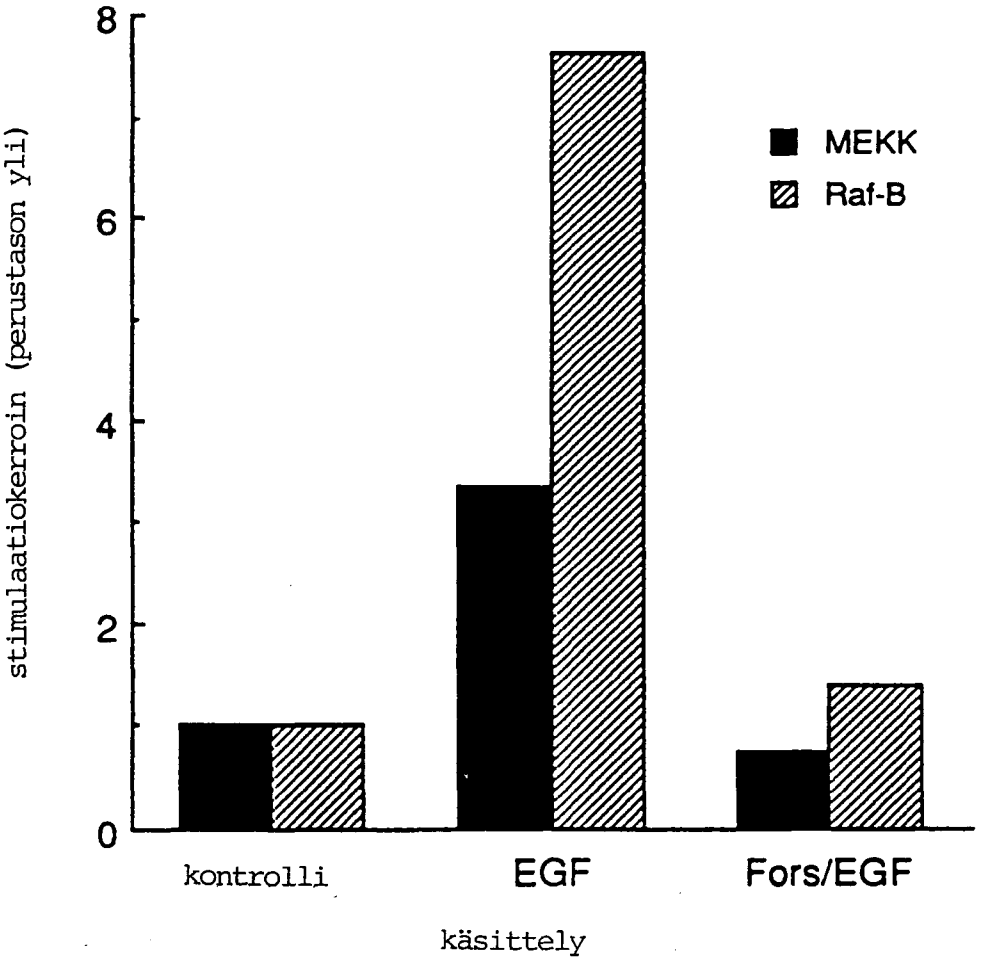


FIG. 13

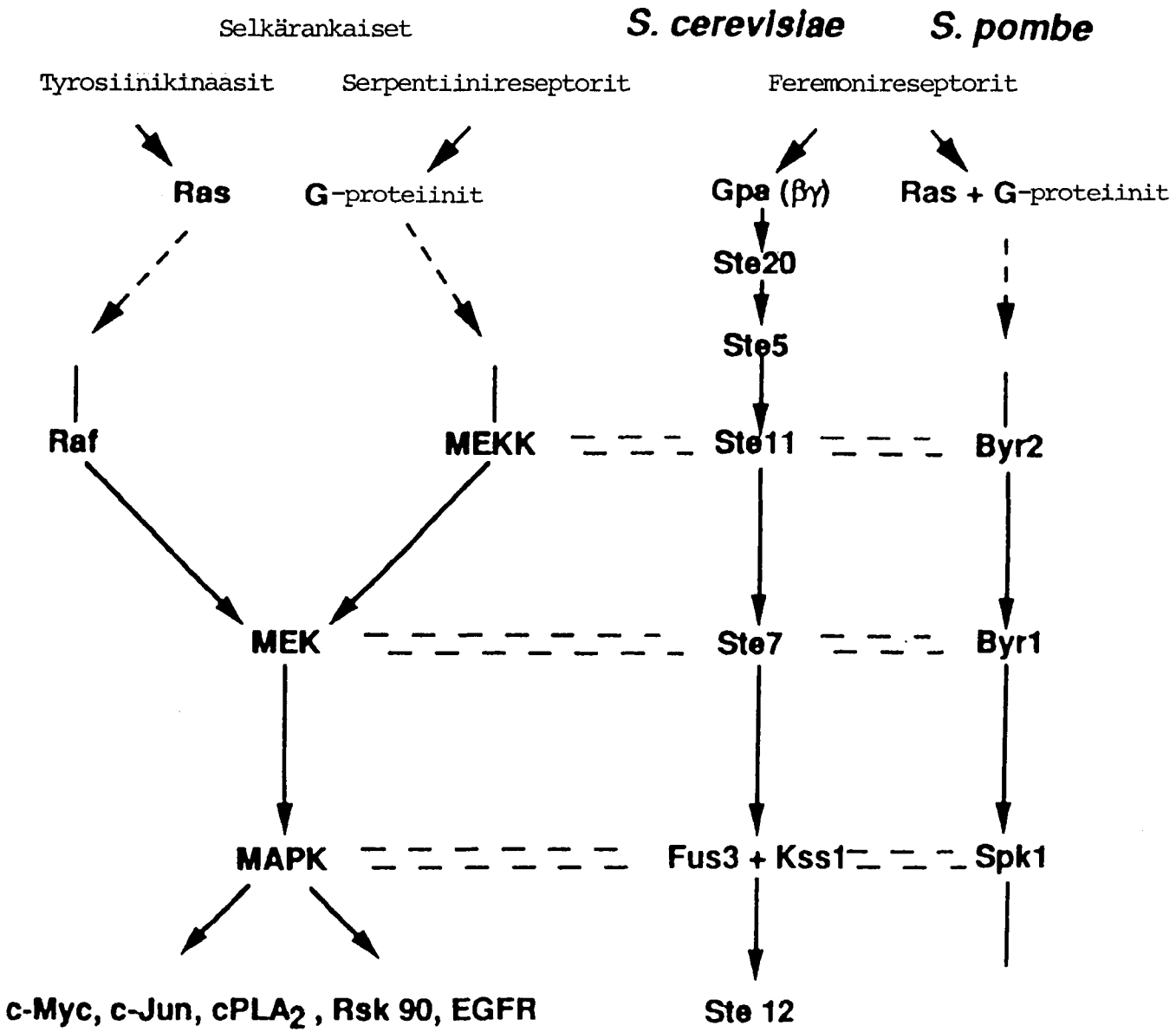

Selkärankaiset
S. cerevisiae
S. pombe
Tyrosiinikinaasit
Serpentiinireseptorit
Feremonireseptorit
Ras
G-proteiinit
Gpa (βγ)
Ras + G-proteiinit
Ste20
Ste5
Raf
MEKK
Ste11
Byr2
MEK
Ste7
Byr1
MAPK
Fus3 + Kss1
Spk1
c-Myc, c-Jun, cPLA2 , Rsk 90, EGFR
Ste 12

FIG. 14

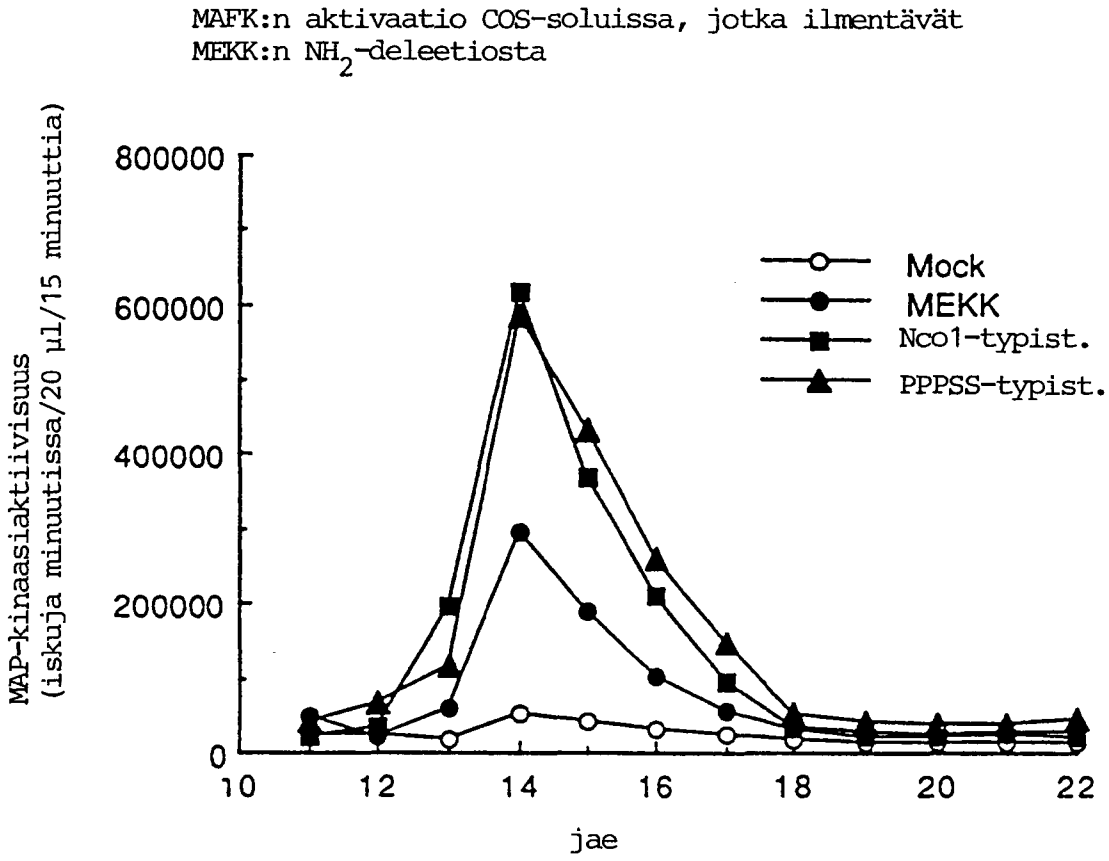

MAFK:n aktivaatio COS-soluissa, jotka ilmentävät
MEKK:n NH2-deleetiosta
MAP-kinaasiaktiivisuus
(iskuja minuutissa/20 µl/15 minuuttia)
800000
600000
400000
200000
0
10
12
14
16
18
20
22
jae
Mock
MEKK
Nco1-typist.
PPPSS-typist.

FIG. 15