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

(10) **DE 693 33 366 T2** 2004.09.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 672 131 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 366.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/10069**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 900 596.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/010300**
(86) PCT-Anmeldetag: **20.10.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **11.05.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **17.12.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/12**
C12N 15/10, C12N 15/62, C12N 15/81, C12N 9/16, C12N 1/19, C12Q 1/68, C07K 16/40

(30) Unionspriorität:
969038 **30.10.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
The General Hospital Corp., Boston, Mass., US

(72) Erfinder:
BRENT, Roger, Cambridge, US; GYURIS, Jeno, Arlington, US; GOLEMIS, Erica, Somerville, US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: **EIN NEUES ZELLZYKLUS KONTROLLPROTEIN**

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

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

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Diese Erfindung wurde mit Regierungsunterstützung verliehen durch das „National Institute of Health" gemacht. Die Regierung hat bestimmte Rechte an der Erfindung. Die Erfindung betrifft ein neues Protein. Diese Erfindung betrifft auch Krebsdiagnosemittel und -therapeutika.

[0002] In den meisten eukaryotischen Zellen wird der Zellzyklus durch Kontrollen gesteuert, die während G1 und G2 ausgeübt werden. Während G2 entscheiden sich die Zellen, ob sie als Antwort auf relativ wenig beschriebene intrazelluläre Signale, wie z. B. jene, die die Beendigung der DNA-Synthese anzeigen (Nurse, Nature 344: 503–508, 1990; Enoch und Nurse, Cell 65: 921–923, 1991), in M eintreten. Während G1 treten die Zellen entweder in S ein oder ziehen sich aus dem Zellzyklus zurück und treten in einen sich nicht teilenden Zustand ein, der als G0 bekannt ist (Pardee, Science 246: 603–608, 1989). Während die Kontrollmechanismen für diese Entscheidungen bisher noch nicht gut verstanden sind, ist ihre Funktion eindeutig zentral für die Prozesse einer normalen Metazoenentwicklung und für die Karzinogenese.

[0003] In der Hefe, und wahrscheinlich in allen Eukaryoten, hängen die G1/S- und G2/M-Übergänge von einer Familie von ~34 kd Proteinkinasen, den Cdc2-Proteinen, ab, die von den $cdc2^{+}$- (in S. pombe) und CDC28- (in S. cerevisiae) -Genen kodiert werden. Proteine aus der Cdc2-Familie aus Säugerzellen wurden ebenfalls identifiziert. Einige, einschließlich Cdc2 (Lee und Nurse, Nature 327: 31–35, 1987), Cdk2 (Elledge und Spotswood, EMBO J. 10: 2653–2659, 1991; Tsai et al., Nature 353: 174–177, 1991) und Cdk3 (Meyerson et al., EMBO J. 11: 2909–2917, 1992) können eine $cdc28^{-}$ S. cerevisiae für Wachstum komplementieren.

[0004] Die Aktivität der Cdc2-Proteine am G2/M-Übergangspunkt wird auf zwei Arten reguliert: positiv durch die Assoziation mit Cycline genannten regulatorischen Proteinen und negativ durch die Phosphorylierung eines Tyrosins in der Nähe ihrer ATP-Bindungsstelle. Mindestens einer dieser regulatorischen Mechanismen ist während G1 wirksam (siehe **Fig.** 1A). Zu dieser Zeit wird die Cdc2-Proteinaktivität durch fakultative Assoziation mit verschiedenen G1-spezifischen Cyclinen reguliert. In S. cerevisiae wurden in genetischen Screens mindestens fünf putative G1-Cycline identifizierte, einschließlich den Produkten der CLN1-, CLN2-, CLN3-, HSC26- und CLB5-Gene (Cross, Mol. Cell. Biol. 8: 4675–4684, 1988; Nash et al., EMBO J. 7: 4335–4346, 1988; Hadwiger et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6255–6259, 1989; und Ogas et al., Cell 66: 1015–1026, 1991). Die CLN1-, CLN2- und CLN3-Proteine (hier Cln1, Cln2 und Cln3 genannt) sind jedes für sich einzelen ausreichend, einer Zelle zu erlauben, den G1-zu-S-Übergang zu vollziehen (Richardson et al., Cell 59: 1127–1133, 1989), und mindestens eines von ihnen (Cln2) assoziiert mit Cdc28 zu einem Komplex, der als eine Proteinkinase aktiv ist (Wittenberg et al., Cell 62: 225–237, 1990). Kürzlich wurden putative G1-Cycline in Säugerzellen identifiziert: Cyclin C, Cyclin D (drei Formen) und Cyclin E (Koff et al., Cell 66: 1217–1228, 1991; Xiong et al., Cell 65: 691–699, 1991). Jedes dieser drei Säugercycline komplementiert eine in Cln1, Cln2 und Cln3 defiziente Hefe und jedes ist während G1 exprimiert.

[0005] In S. cerevisiae ist die Synthese und in einigen Fällen die Aktivität der G1-Cycline unter der Kontrolle eines Netzwerks von Genen, die helfen, Veränderungen in der extrazellulären Umgebung an G1-regulatorische Entscheidungen zu koppeln (**Fig.** 1A). Zum Beispiel regulieren die SWI4- und SWI6-Genprodukte die CLN1- und CLN2-Transkription positiv und können auch die Aktivität von Cln3 positiv modulieren (Nasmyth und Dirick, Cell 66: 995– 1013, 1991), das FAR1-Produkt reguliert sowohl die CLN2-Transkription als auch die Aktivität seines Produktes negativ (Chang und Herskowitz, Cell 62: 999–1011, 1990) und das FUS3-Produkt reguliert die Cln3-Aktivität negativ (Elion et al., Cell 60: 649–664, 1990).

[0006] Eine Reihe von Hinweisen legt die Vermutung nahe, dass der G1-zu-S-Übergang bei Säugern von ähnlichen Mechanismen reguliert wird: Regulatorische Moleküle (Cdc2-Kinasen und Cycline), die ähnlich zu den in Hefe gefundenen sind, wurden in Säuger-G1 beobachtet und wie S. cerevisiae-Zellen, so stoppen Säugerzellen in G1 bei Nahrungsentzug und als Antwort auf bestimmte negative regulatorische Signale, einschließlich Kontakt mit anderen Zellen oder Behandlung mit negativen Wachstumsfaktoren (z. B. TGF-β) (**Fig.** 1B). Allerdings legen einige Überlegungen die Vermutung nahe, dass die G1-regulatorische Maschinerie höherer Eukaryoten wahrscheinlich komplexer ist als die der Hefe. Erstens scheinen in Säugerzellen mehr Proteine in diesen Prozess involviert zu sein. Mindestens zehn verschiedene Proteine der Cdc2-Familie und verwandte Proteinkinasen (siehe Meyerson et al., EMBO J. 11: 2909–2917, 1992) und mindestens drei unterschiedliche Klassen von putativen G1-Cyclinen (Koff et al., Cell 66: 1217–1228, 1991; Matsushime et al., Cell 65: 701–713, 1991; Motokura et al., Nature 339: 512–518, 1991; Xiong et al., Cell 65: 691–699, 1991) wurden identifiziert. Zum zweiten hängt die Proliferation der meisten Säugerzellen im Gegensatz zur Hefe von extrazellulären Proteinfaktoren (insbesondere positiven Wachstums-regulatorischen Proteinen) ab, deren Entzug zu einem G1-Arrest führt. Drittens kann der Arrest vieler Zelltypen während G1 zu einem Zustand, G0, fortschreiten, der möglicherweise keiner Phase des Hefezellzyklus genau gleicht.

[0007] Da die Proteine, die in die Kontrolle normaler Zellteilungsentscheidungen in Säugern (z. B. Menschen) involviert sind, wahrscheinlich auch eine Schlüsselfunktion in malignem Zellwachstum haben, erleichtert die

Identifikation und Isolation solcher Proteine die Entwicklung von sowohl brauchbaren Krebsdiagnostika als auch Antikrebstherapeutika. Wir beschreiben jetzt ein Protein, genannt Cdi1, ein Zellzykluskontrollprotein, das ein brauchbares Werkzeug für die Krebsdiagnose und -behandlung zur Verfügung stellt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die Erfindung bietet eine im Wesentlichen reine Zubereitung eines Cdi1-Polypeptids. Vorzugsweise schließt das Cdi1-Polypeptid eine Aminosäuresequenz ein, die im Wesentlichen identisch mit der in **Fig.** 6 (SEQ ID NR: 1) gezeigten Aminosäuresequenz ist; und stammt von einem Säuger, zum Beispiel einem Menschen.

[0009] In einem verwandten Aspekt bietet die Erfindung eine gereinigte DNA (zum Beispiel cDNA), die eine Sequenz kodierend für ein Cdi1-Polypeptid, und vorzugsweise ein humanes Cdi1-Polypeptid, gemäß der Erfindung einschließt.

[0010] In einem weiteren verwandten Aspekt bietet die Erfindung einen Vektor und eine Zelle, die eine gereinigte erfindungsgemäße DNA einschließt; ein gereinigter Antikörper, der spezifisch ein erfindungsgemäßes Cdi1-Polypeptid bindet; und ein Verfahren zum Herstellen eines rekombinanten Cdi1-Polypeptids umfassend das Bereitstellen einer Zelle, die mit zur Expression in der Zelle positionierter DNA transformiert wurde, die ein Cdi1-Polypeptid kodiert; Kultivieren der transformierten Zelle unter Bedingungen zur Expression der DNA; und Isolieren des rekombinanten Cdi1-Polypeptids. Die Erfindung bietet weiterhin ein rekombinantes Cdi1-Polypeptid, das durch solche Expression einer gereinigten erfindungsgemäßen DNA hergestellt wurde.

[0011] In einem noch weiteren Aspekt bietet die Erfindung eine therapeutische Zusammensetzung, die als einen aktiven Bestandteil ein erfindungsgemäßes Cdi1-Polypeptid umfasst, wobei der aktive Bestandteil in einem physiologisch geeigneten Träger förmuliert ist. Solch eine therapeutische Zusammensetzung ist in einem Verfahren zum Inhibieren der Zellproliferation in einem Säuger verwendbar, welches das Verabreichen der therapeutischen Zusammensetzung an einen Säuger in einer Dosis, die zur Inhibition der Säugerzellteilung wirksam ist, umfasst.

[0012] In einem letzten Aspekt bietet die Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen einer malignen Zelle in einer biologischen Probe, umfassend das Messen der Cdi1-Genexpression in der Probe, wobei eine Veränderung der Cdi1-Expression im Vergleich zu einer Wildtypprobe auf das Vorhandensein einer malignen Zelle hinweist.

[0013] Mit „Reportergen", wie es hierin verwendet wird, ist ein Gen gemeint, dessen Expression untersucht werden kann; solche Gene schließen ohne Einschränkung ein lacZ, Aminosäurebiosynthesegene, z. B. die Hefe LEU2-, HIS3-, LYS2- oder URA3-Gene, Nukleinsäurebiosynthesegene, das Säugerchloramphenicoltransacetylase(CAT)-Gen oder irgendein Oberflächenartigen-Gen, für das spezifische Antikörper verfügbar sind.

[0014] Mit „funktionsfähig verknüpft" ist ein Gen und (eine) regulatorische Sequenzen) gemeint, die in einer solchen Weise verknüpft sind, dass die Genexpression ermöglicht ist, wenn geeignete Moleküle (z. B. transkriptionale Aktivatorproteine oder Proteine, die transkriptionalen Aktivierungsdomänen einschließen) an die regulatorische(n) Sequenzen) gebunden sind.

[0015] Mit einer „Bindungskomponente" ist ein Stück von Aminosäuren gemeint, das in der Lage ist, eine spezifische Polypeptidbindung an eine bestimmte DNA-Sequenz (d. h. eine „Proteinbindungsstelle") zu steuern.

[0016] Mit einer „schwachen Genaktivierungskomponente" ist ein Stück von Aminosäuren gemeint, das in der Lage ist, eine schwache Expressions eines Gens, an dessen Kontrollregion es gebunden ist, zu induzieren. „Schwach", wie es hierin verwendet wird, meint ein Aktivitätsniveau unter dem, das mit der GAL4-Aktivierungsregion II (Ma und Ptashne, Cell 48: 847, 1987) bewirkt wird und ist vorzugsweise auf oder unter dem Aktivierungsniveau, das durch die B42-Aktivierungsdomäne von Ma und Ptashne (Cell 51: 113, 1987) bewirkt wird. Die Expressionsniveaus können gemessen werden, indem irgendein abwärts gelegenes Reportergensystem verwendet wird und in Parallelversuchen das durch das GAL4-Region-II-Polypeptid stimulierte Expressionsniveau mit dem Expressionsniveau, das durch das zu testende Polypeptid stimuliert wurde, verglichen wird.

[0017] Mit „im Wesentlichen rein" ist eine Zubereitung gemeint, die mindestens 60 Gew.-% (Trockengewicht) der Verbindung des Interesses, z. B. ein Cdi1-Polypeptid, enthält. Vorzugsweise ist die Zubereitung zu mindestens 75%, mehr bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 99% des Gewichts die Verbindung des Interesses. Die Reinheit kann durch jedes geeignete Verfahren gemessen werden, z. B. Säulenchromatographie, Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder HPLC-Analyse.

[0018] Mit „gereinigter DNA" ist DNA gemeint, die nicht unmittelbar an die beiden kodierenden Sequenzen angrenzend ist, an welche sie in dem natürlich vorkommenden Genom des Organismus, aus dem sie stammt, angrenzt (eines an dem 5'-Ende und eines an dem 3'-Ende). Der Ausdruck schließt daher zum Beispiel ein eine rekombinante DNA, die in einen Vektor; in ein autonom replizierendes Plasmid oder Virus; oder in die genomische DNA eines Prokaryoten oder Eukaryoten aufgenommen ist oder die als ein separates Molekül unabhängig von anderen Sequenzen existiert (z. B. eine cDNA oder ein genomisches DNA-Fragment, hergestellt

durch PCR oder Restriktionsendonukleasebehandlung). Er schließt auch eine rekombinante DNA ein, die Teil eines Hybridgens ist, das eine zusätzliche Polypeptidsequenz kodiert.

[0019] Mit „im Wesentlichen identisch" ist eine Aminosäuresequenz gemeint, die nur durch konservative Aminosäureaustausche, zum Beispiel Substitutionen einer Aminosäure mit einer anderen der gleichen Klasse (z. B. Valin für Glycin, Arginin für Lysin, usw.) oder durch ein oder mehrere nicht konservative Substitutionen, Deletionen oder Insertionen, die sich an Positionen der Aminosäuresequenz befinden, die nicht die Funktion des Proteins zerstören (getestet, z. B. wie hierin beschrieben). Eine „im Wesentlichen identische" Nukleinsäuresequenz kodiert für eine im Wesentlichen identische Aminosäuresequenz, wie sie oben definiert wurde.

[0020] Mit einer „transformierten Zelle" ist eine Zelle gemeint, in welche (oder in deren Vorfahr) durch Mittel der rekombinanten DNA-Technik ein DNA-Molekül eingeführt wurde, das für ein (wie hierin verwendetes) Cdi1-Polypeptid kodiert.

[0021] Mit „positioniert zur Expression" ist gemeint, dass das DNA-Molekül angrenzend an eine DNA-Sequenz positioniert ist, die die Transkription und Translation der Sequenz steuert (d. h., die Produktion von z. B. einem Cdi1-Polypeptid erleichtert).

[0022] Mit einem „gereinigten Antikörper" ist ein Antikörper gemeint, der mindestens 60 Gew.-% frei von Proteinen und natürlich auftretenden organischen Molekülen ist, mit denen er natürlicherweise assoziiert ist. Vorzugsweise besteht die Zubereitung zu mindestens 75%, mehr bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt 99% des Gewichts aus Antikörper, z. B. dem Cdi1-spezifischen Antikörper. Ein gereinigter Cdi1-Antikörper kann zum Beispiel durch Affinitätschromatographie unter Verwendung rekombinant hergestellter Cdi1-Polypeptide und Standardtechniken erhalten werden.

[0023] Mit „spezifisch binden" ist ein Antikörper gemeint, der das Cdi1-Polypeptid erkennt und bindet, aber im Wesentlichen keine anderen Moleküle in der Probe, z. B. einer biologischen Probe, die natürlicherweise ein Cdi1-Polypeptid umfasst, erkennt und bindet.

[0024] Mit einer „malignen Zelle" ist eine Zelle gemeint, die keiner normalen Zellteilungskontrolle unterliegt. Eingeschlossen in diese Definition sind transformierte und immortalisierte Zellen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0025] Die Zeichnungen werden zuerst kurz beschrieben.

[0026] **Fig.** 1 veranschaulicht Zellzykluskontrollsysteme. **Fig.** 1A veranschaulicht die G1-Kontrolle in Hefe. **Fig.** 1B veranschaulicht die Zellzykluskontrolle in Hefe und Säugern.

[0027] **Fig.** 2 stellt Hefetests dar, die die Spezifität der Cdi1/Cdc2-Interaktion zeigen.

[0028] **Fig.** 3 zeigt die Ergebnisse eines Immunpräzipitationsexperiments, das zeigt, dass Cdi1 mit Cdc2 physikalisch interagiert.

[0029] **Fig.** 4 zeigt die Cdi1-kodierende Sequenz zusammen mit der vorhergesagten Aminosäuresequenz seines offenen Leserahmens (SEQ ID NR: 1).

[0030] In **Fig.** 5A sind die Wachstumsraten von Hefezellen dargestellt, die Cdi1 exprimieren; die offenen Quadrate sind Zellen, die nur mit Expressionsvektoren transformiert wurden; Ovale sind Cdc2 exprimierende Zellen; Dreiecke sind Cdi1 exprimierende Zellen; und die ausgefüllten Quadrate sind Cdi1 und Cdc2 exprimierende Zellen. In **Fig.** 5B wird ein Knospungsindex von Hefe, die Cdi1 exprimiert, gezeigt. In **Fig.** 5C ist eine FACS-Analyse von Hefe gezeigt, die Cdi1 exprimiert; die Fluoreszenz (auf der x-Achse) ist als Funktion der Zellzahl (auf der y-Achse) gezeigt.

[0031] **Fig.** 6A zeigt die Morphologie von Kontrollzellen; **Fig.** 6B zeigt die Morphologie von mit DAPI gefärbten Kontrollzellen; **Fig.** 6C zeigt die Morphologie von Cdi1 exprimierenden Zellen; und **Fig.** 6D zeigt die Morphologie von Cdi1 exprimierenden Zellen, die mit DAPI gefärbt wurden.

[0032] **Fig.** 7A zeigt den Zeitverlauf der Cdi1-Expression in Hela-Zellen; die Spuren stellen verschiedene Zeitpunkte dar: (1) 0 h, (2) 3 h, (3) 6 h, (4) 9 h, (5) 12 h, (6) 15 h, (7) 18 h, (8) 21 h, (9) 24 h und (10) 27 h nach Freisetzung. **Fig.** 7B zeigt die Wirkung der Cdi1-Überexpression.

[0033] **Fig.** 8 zeigt einen Sequenzvergleich von Cdc2-Proteinen und FUS3. Dargestellt ist ein Sequenzvergleich der hierin verwendeten Köderproteine. Die Aminosäuren sind wie im humanen Cdc2 nummeriert. Die Abkürzungen sind wie folgt: HsCdc2, humanes Cdc2; HsCdk2, humanes Cdk2; ScCdc28, S. cerevisiae Cdc28; DmCdc2 und DmCdc2c, die zwei Drosophila Cdc2-Isolate; und ScFus3, S. cerevisiae FUS3. Die in Fettschrift gezeigten Reste sind innerhalb der Mitglieder der Cdc2-Familie konserviert; die Reste, die in Fus3 vorhanden sind, sind ebenfalls fett gezeigt. Die Sterne indizieren potenzielle Cdi1-Kontaktpunkte, d. h. Aminosäuren, die in humanem Cdc2, Cdk2, S cerevisiae Cdc28 und Drosophila Cdc2 konserviert sind, aber in Drosophila Cdc2c und in Fus3 unterschiedlich sind.

[0034] Es folgt nun eine Beschreibung eines Beispiels eines „Interaction-Trap"-Systems und seiner Verwendung zur Isolierung eines bestimmten Zellteilungsproteins. Dieses Beispiel wurde konzipiert, um die Beschreibung zu illustrieren, aber nicht einzuschränken.

Ausführliche Beschreibung

Isolation und Charakterisierung von Cdi1

Isolation der Cdi1-cDNA

[0035] Um Proteine zu isolieren, die mit dem Zellteilungskontrollprotein Cdc2 interagieren, wurde der Hefestamm EGY48/p1840 verwendet. Dieser Stamm enthält sowohl den LexAop-LEU2- als auch den LexAop-lacZ-Reporter, wie auch ein Plasmid, das die Synthese eines LexA-Cdc2-Köderproteins steuert (siehe unten). Der LexAop-LEU2-Reporter ersetzte das chromosomale LEU2-Gen. Dieser Reporter trug 3 Kopien des Hochaffmitäts-colE1-Doppel-LexA-Operators (Ebina et al., J. Biol. Chem. 258: 13258–13261, 1983) 40 Nukleotide aufwärts des Haupt-Leu2-Transkriptionsstartpunkts. Der LexAop-lacZ-Reporter (p1840) wurde von einem $URA3^+$ 2 µ Plasmid getragen. Dieser Reporter trug einen einzelnen LexA-Operator 167 Nukleotide aufwärts des Haupt-GAL1-Transkriptionsstartpunkts.

[0036] Eine HeLa cDNA-Interaktionsbibliothek (unten beschrieben) wurde ebenfalls in diesen Stamm unter Verwendung des in **Fig.** 3C dargestellten Plasmids (genannt pJG4-5) eingeführt; dieser Bibliotheksvektor wurde entworfen, um die bedingte Expression von Proteinen unter der Kontrolle eines Derivats des GAL1-Promotors zu steuern. Dieses Plasmid trug einen 2 µ-Replikator und einen $TRP1^+$ selektierbaren Marker. Die cDNA wurde an EcoRI-XhoI-Fragmenten in dieses Plasmid insertiert. Abwärts der XhoI-Schnittstelle enthielt pJG4-5 den ADH1-Transkriptionsterminator. Die Sequenz einer unveränderlichen 107 Aminosäuren-Komponente, die von dem Plasmid kodiert und an den N-Terminus aller Bibliotheksproteine fusioniert war, ist unterhalb der Plasmidkarte der **Fig.** 3C gezeigt. Diese Komponente trägt von Amino- nach Carboxy-terminal ein ATG, die SV40 T nukleare Lokalisationssequenz (Kalderon et al., Cell 39: 499–509, 1984), die B42-Transkriptionsaktivierungsdomäne (Ma und Ptashne, Cell 51: 113– 119, 1987; Ruden et al., Nature 350: 426–430, 1991) und der 12CA5 Epitop-Tag des Influenzavirus Hämagglutininproteins (Green et al., Cell 28: 477–487, 1982).

[0037] Nach der Einführung des Beute-kodierenden Plasmids in EGY48/p1840 wurden über eine Million Transformanten isoliert, von denen 3–4 × 10^5 Fusionsproteine exprimierten (siehe Versuchsdurchführungen unten). Die Kolonien wurden gepoolt, verdünnt und für fünf Stunden in flüssigem Medium in Gegenwart von Galactose wachsen gelassen, um die Synthese von bibliothekskodierte Proteinen zu induzieren. Der Pool wurde dann wieder so verdünnt, dass jede Originaltransformante circa 20 Mal vertreten war, und auf Galactose enthaltendem Medium ohne Leucin ausplattiert. Aus circa 2 × 10^7 Zellen wurden 412 $LEU2^+$-Kolonien isoliert. 55 dieser Kolonien waren auf Galactose Xga1-Medium blau, vermutlich auf Grund der geringen Sensitivität des lacZ-Reporters.

[0038] In allen Zellen, in denen beide Reporter aktiv waren, waren beide Phänotypen Galactose-abhängig, was bestätigte, dass sie das bibliothekskodierte Protein benötigten. Die Bibliotheksplasmide wurden aus diesen Zellen befreit, einer der drei Klassen durch Restriktionsmapping zugewiesen und die Plasmide jeder Klasse identifiziert, die das längste cDNA-Insert enthielten. Die Synthese eines Fusionsproteins durch das Plasmid wurde in jedem Fall durch Western-Blot-Analysen unter Verwendung von Anti-Epitop-Antiserum verifiziert.

[0039] Weitere Analysen durch detailliertes Mapping und partielles DNA-Sequenzieren zeigten, dass zwei der wieder gewonnenen cDNA-Klassen identisch mit den zuvor identifizierten Genen waren, die für CKS1hs und CKS2hs kodierten (Richardson et al., Genes Dev. 4: 1332–1344, 1990), den humanen Homologen des S. pombe $suc1^+$-Produkts. Das Sequenzieren der dritten Restriktionskartenklasse zeigte, dass es sich um ein zuvor nicht identifiziertes Gen handelte. Dieses Gen wurde CDI1, für Cdc2 Interactor 1, genannt; sein Proteinprodukt wurde Cdi1 genannt.

[0040] Das CDI1-Gen wurde in eine Reihe von EGY48-abgeleiteten Stämmen (d. h. EGY48/1840 enthaltend verschiedene LexA-Fusionsköder) eingeführt, um die Reproduzierbarkeit und Spezifität der Interaktion zwischen Cdc2 und Cdi1 zu testen. Zellen aus 8 einzelnen, transformierten Zellen, die Cdi1 plus einen gegebenen Köder (horizontale Streifen) oder den gleichen Köder plus den Bibliotheksvektor als eine Kontrolle (angrenzende vertikale Streifen) enthielten, wurden mit Zahnstochern auf jeder von drei Platten ausgestrichen (**Fig.** 4). Die Platten, gezeigt in **Fig.** 4, enthielten eine „Kontroll"-Platte, eine Ura^- Trp^- His^- Glucoseplatte, die auf die Gegenwart des Köderplasmids, den LexAop-lacZ-Reporter, und das Cdi1-Expressionsplasmid selektionierte; eine „Glucose"-Platte, eine Ura^- Trp^- His^- Leu^- Glucoseplatte, die zusätzlich auf die Aktivierung des LexAop-LEU2-Reporters selektionierte; und eine „Galactose"-Platte, eine Ura^- Trp^- His^- Leu^- Galactoseplatte, die auf die Aktivierung des LexAop-LEU2-Reporters selektionierte und die Expression von Cdi1 induzierte. Die in diesem Test verwendeten Köder schließen ein: (1) LexA-Cdc2, (2) LexA-Bicoid, (3) LexA-Max, (4) LexA-Cln3, (5) LexA-Fus3 und (6) LexA-cMyc-Cterm (**Fig.** 4).

[0041] Wie durch die LEU2- und lacZ-Transkiptionsphänotypen beurteilt, interagierte Cdi1 spezifisch mit LexA-Cdc2 und nicht mit LexA-cMyc-Cterm, LexA-Max, LexA-Bicoid, LexA-Cln3 oder LexA-Fus2 (**Fig.** 4). Cdi1 interagierte auch mit anderen Proteinen der Cdc2-Familie, einschließlich LexA-Cdc28, wie unten diskutiert. Die Anmelder bemerken auch, dass der LexA-Cln3-Köder auf Glucose den LexAop-LEU2-Reporter schwach akti-

vierte, dass aber auf Galactose die Unterlegenheit der Kohlenstoffquelle und die erniedrigte Köderexpression durch den ADH1-Promoter diesen Hintergrund eliminierte.

[0042] Die Spezifität der Cdi1/Cdc2-Interaktion wurde dann durch physikalische Kriterien, insbesondere durch Immunpräzipitationsexperimente bestätigt. Extrakte wurden aus EGY48-Zellen hergestellt, die ein Bibliotheksplasmid enthielten, das die Synthese von mit Tag versehenem Cdi1 steuerte und das auch entweder einen LexA-Cdc2- oder einen LexA-Bicoid-Köder enthielt.

[0043] Insbesondere wurden 100 ml der Zellen in Glucose- oder Galactosemedium (in welchem die Cdi1-Expression induziert wurde) bis zu einer OD_{600} von 0,6–0,8 wachsen gelassen, durch Zentrifugation pelletiert und in 500 µl RIPA resuspendiert, durch Schlagen mit Glaskügelchen jeweils fünf Mal für zwei Minuten lysiert und zwei Mal für fünf Minuten in einer Mikrofuge (10,000 × G) bei 4°C herunter zentrifugiert, um die Kügelchen und die Zelldebris zu entfernen. 5 µl dieses Überstands wurden als eine Kontrolle abgenommen und 15 µl des Kaninchen-anti-LexA-Antiserums wurden zu dem Rest hinzugegeben, der bei 4°C für vier Stunden auf einer rotierenden Plattform inkubiert wurde. Die LexA enthaltenden Proteine wurden zuerst aus diesem Rest mit 50 µl Staph Abeschichteten Sepharosekügelchen (Pharmacia, Piscataway, NJ), wie in Wittenberg und Reed beschrieben (Cell 54: 1061–1072, 1988) präzipitiert. Das vollständige Pellet wurde dann in Laemmli-Probenpuffer gelöst, über ein 12,5% Proteingel (SDS/PAGE) laufen gelassen und auf Nitrocellulose geblottet. Mit Tag versehenen Cdi1-Fusionsproteine wurden durch Western-Analyse der geblotteten Proteine mit dem 12CA5-monoklonalen Antihämagglutinin-Antikörper im Wesentlichen wie in Samson et al. beschrieben (Cell 57: 1045–1052, 1989) identifiziert.

[0044] Die Ergebnisse sind in **Fig.** 5 gezeigt; die Spuren sind wie folgt: (1) Galactosemedium, LexA-Bicoid-Köder, Immunpräzipitation; (2) Glucosemedium, LexA-Bicoid-Köder, Immunpräzipitation; (3) Galactosemedium, LexA-Bicoid-, Köder, Zellextrakt; (4) Glucosemedium, LexA-Bicoid-Köder, Zellextrakt; (5) Galactosemedium, LexA-Cdc2-Köder, Immunpräzipitation; (6) Glucosemedium, LexA-Cdc2-Köder, Immunpräzipitation; (7) Galactosemedium, LexA-Cdc2-Köder, Zellextrakt; und (8) Glucosemedium, LexA-Cdc2-Köder, Zellextrakt. Wie in **Fig.** 5 gezeigt, präzipitierte das Anti-LexA-Antiserum Cdi1 aus einem Hefeextrakt, der LexA-Cdc2 und Cdi1 enthielt, aber nicht aus einem, der LexA-Bicoid und Cdi1 enthielt, was bestätigte, dass Cdi1 physikalisch nur mit dem Cdc2 enthaltenden Köderprotein interagierte.

Das Cdi1-Proteinprodukt

[0045] Um das Cdi1-Proteinprodukt zu analysieren, wurde Cdi1-cDNA aus 12 verschiedenen Bibliotheksplasmiden isoliert, die cDNAs 4 verschiedener Längen enthielten. Die Sequenzanalyse ergab, dass alle dieser cDNA-Inserts einen offenen Leserahmen enthielten, und die Betrachtung der Sequenz der längsten cDNAs (**Fig.** 6) ergab ein ATG mit einem perfekten Match zu der Kozak-Consensus-Translationsinitiationssequenz (PuCC/GATGG) (Kozak, Cell 44: 283– 292, 1986). Sorgfältige Analysen der Länge der Cdi1-mRNA in HeLa-Zellen ergab, dass dieses ATG zwischen 15 und 45 Nukleotiden vom 5'-Ende der Cdi1-Message auftrat, was die Vermutung nahe legte, dass die längsten cDNAs den gesamten offenen Leserahmen umfassten.

[0046] Von dem Cdi1-Gen wird vorhergesagt, dass es ein Protein von 212 Aminosäuren kodiert. Die Cdi1-Aminosäuresequenz offenbart keine zwingenden Ähnlichkeiten zu irgendwelchen zuvor identifizierten Proteinen (**Fig.** 6). Dennoch gibt es zwei Fakten betreffend die Proteinsequenz, die es Wert sind, erwähnt zu werden. Erstens sind 19 der amino-terminalen 35 Aminosäuren entweder Prolin, Glutaminsäure, Serin oder Threonin. Von Proteinen, die solche Stücke, genannt PEST-Sequenzen, enthalten, wird angenommen, dass sie schnell abgebaut werden (Rogers et al., Science 234: 364–368, 1986); tatsächlich ist dieses Stück von Cdi1 stärker mit diesen Aminosäuren angereichert als die C-Termini der Hefe-G1-Cycline, von welchen bekannt ist, dass ihre PEST-Sequenz funktional ist (Cross, Mol. Cell. Biol. 8: 4675–4684, 1988; Nash et al., EMBO J. 7: 4335–4346, 1988; Hadwiger et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6255–6259, 1989). Da zweitens die cDNA-Bibliothek, aus der die Plasmide, die Cdi1 kodierten, isoliert waren, mit Oligo dT geprimt war und da alle isolierten Cdi1-cDNAs per Definition Proteine kodierten, die mit Cdc2 interagierten, lokalisierte die Analyse der Größen der Cdi1-cDNA-Inserts, die in dem Screen erhalten wurden, notwendigerweise den Teil des Proteins, der für eine Interaktion mit Cdc2 den C-terminalen ~170 Aminosäuren von Cdi1 ausreichend war.

Analyse der Cdi1-Funktion in Hefe

[0047] In anfänglichen Bemühungen zum Verständnis der Cdi1-Funktion wurden die Wirkungen der Cdi1-Expression in Hefe untersucht. Insbesondere da Cdi1 mit Proteinen der Cdc2-Familie interagiert, einschließlich S. cerevisiae Cdc28, wurde eine Untersuchung vorgenommen, ob Cdi1 auf die Phänotypen wirkte, die von anderen bekannten Proteinen abhängen, die mit Cdc28 interagieren.

[0048] Hierzu wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die Expression der S. pombe $suc1^{+}$ oder S. cerevisiae Cks-Proteine vor der Temperatursensitivität von Stämmen, die bestimmte $cdc28^{ts}$-Allele tragen, bewahrt; von diesem Effekt wird vermutet, dass er auf der Fähigkeit dieser Proteine zur Bildung von Komplexen mit dem

labilen Cdc28^{ts}-Protein beruht, welches dieses vor thermischer Denaturierung schützt (Hadwiger et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 6255–6259, 1989). Es wurde gefunden, dass die Cdi1-Expression für keines der getesteten cdc28-Allele vor der Temperatursensitivität bewahrte, obwohl das human Cks2 dies tat.

[0049] Als nächstes wurde die Fähigkeit von Cdi1 untersucht, einen der beiden Phänotypen, die mit der Expression von S. cerevisiae oder höheren eukaryotischen Cyclinen assoziiert sind, auf Hefe zu übertragen; solche Phänotypen schließen die Resistenz gegen dem Arrest von MATα-Stämmen durch α-Faktor und die Bewahrung von dem Wachstumsarrest von einem in Cln1, Cln2 und Cln3 defizienten Stamm ein. Wiederum übertrug die Cdi1-Expression jedoch keinen dieser Phänotypen.

[0050] Während der anfänglichen Studien wurde bemerkt, dass die Expression von Cdi1 das Fortschreiten des Hefezellzyklus inhibierte. Kulturen von Zellen, die Cdi1 exprimierten, erhöhten ihre Zellzahl und optische Dichte langsamer als die Kontrollpopulationen (**Fig.** 7A).

[0051] Um weiter diesen Wachstumsretardierungsphänotyp zu untersuchen, wurde die Morphologie der Cdi1 exprimierenden Zellen untersucht. W303-Zellen wurden mit pJG4-4Cdi1, einem Galactose-induzierbaren Vektor, der die Synthese von Cdi1 steuert, transformiert. Die Morphologie der Zellen wurde mit Nomarski-Optik bei 1000-facher Vergrößerung untersucht. Wie in **Fig.** 8 gezeigt, zeigte eine solche mikroskopische Untersuchung der Zellen, dass im Vergleich zu den Kontrollen die Zellen, in denen Cdi1 exprimiert war, größer waren und eine Subpopulation zeigte anomale Morphologien: 5% der Zellen bildeten verlängerte Schmoos und 5% zeigten mehrfache Knospen. Die Immunfluoreszenzuntersuchung einer Probe dieser Zellen, die mit DAPI gefärbt waren (wie unten beschrieben), zeigte, dass die Nuklei einiger der größten Zellen nicht kondensiert waren.

[0052] Schließlich wurden die Zellen auf ihre Fähigkeit zum Knospen untersucht. Proben von 400 Zellen aus Kontrollpopulationen und aus Populationen, die Cdi1 exprimierten, wurden durch Phasenkontrastmikroskopie untersucht, und der Knospungsindex wurde als Prozent der Zellen mit Knospen in jeder Population, kalkuliert, wie in Wittenberg und Reed beschrieben (Mol. Cell. Biol. 9: 4064– 4068, 1989). Wie in **Fig.** 7B gezeigt, zeigten weniger als 10% der Zellen in der Cdi1-exprimierenden Population Knospen, im Gegensatz zu 30% der Zellen in der Kontrollpopulation, was die Vermutung nahe legte, dass weniger Zellen in der Population, die Cdi1 exprimierte, den G1-zu-S-Übergang passiert hatten. Dieser Befund ist stimmig mit der Idee, dass die erhöhte Zellgröße und Wachstumsretardierung auch auf einer Verlängerung von G1 beruhten.

[0053] Diese Hypothese wurde weiter durch FACS-Analyse der zellulären DNA getestet. Insbesondere wurden W303-Zellen, die Cdi1 enthielten, wie oben beschrieben wachsen gelassen und auf OD_{600} = 0,1 in 2% Glucose oder 1% Raffinose, 1% Galactose verdünnt und auf OD_{600} = 0,8–1,0 wachsen gelassen. An diesem Punkt wurden die Zellen gesammelt, Ultraschall-behandelt, in 70% Ethanol fixiert, mit Propidiumjodid gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen, um den DNA-Gehalt wie zuvor beschrieben zu bestimmen (Lew et al., Cell 63: 317–328, 1992). Circa 20.000 Ereignisse wurden analysiert. Diese Ergebnisse, abgebildet in **Fig.** 7C, zeigen, dass die Mehrzahl der Zellen in der Cdi1-exprimierenden Population erhöhte Mengen an zellulärer DNA aufwies. Dies kann anzeigen, dass eine erhöhte Zahl von Zellen in der S-Phase war; alternativ kann es einfach das Ergebnis der größeren Zellgröße und erhöhten Menge an mitochondrialer DNA sein.

[0054] Zusammenfassend zeigen diese Experimente also, dass eine verlängerte Cdi1-Expression in S. cerevisiae eine Retardierung in der Passage der Zellen durch den Zellzyklus verursachte, wahrscheinlich durch ein Wachsen des Anteils der Zellen in G1; sie zeigen daher auch, dass die Cdi1-Expression die normale Synchronisation zwischen diesen beiden Maße des Fortschreiten des Zellzyklus entkoppelte.

[0055] Da Cdi1 mit Proteinen der Cdc2-Familie interagiert, wurde postuliert, dass der Cdi1-Wachstumsretardierungsphänotyp in S. cerevisiae durch die Sequestration von Cdc28 in Proteinkomplexe, die nicht fähig waren, die Zellen zur Durchquerung von G1 zu veranlassen, erklärt werden könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde die Wirkung der Expression von nativem Cdi1 in Zellen enthaltend Cdc28 mit und ohne überexprimiertem nativem humanem Cdc2 verglichen. Genauer gesagt wurden W303-Zellen, die die angegebene Kombination von Galactose-induzierbarem Cdi1-Expressionvektor und/oder Cdc2-Expressionsvektor trugen, für 14 Stunden in komplettem Minimalmedium, das kein Tryptophan und Histidin enthielt, in Gegenwart von 2% Raffinose wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann gewaschen und auf OD_{600} = 0,1 in dem gleichen Medium, welches entweder 2% Glucose oder 1% Raffinose und 1% Galactose enthielt, verdünnt. Die optischen Dichten wurden für 12 Stunden in 2-stündigen Intervallen gemessen. Die Ergebnisse dieser Wachstumstestexperimente sind in **Fig.** 7A gezeigt.

[0056] Unerwarteter Weise wurde gefunden, dass die Gegenwart von zusätzlichem Cdc2 die Schwere der Cdi1-abhängigen Wachstumsinhibition erhöhte (**Fig.** 7A). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass Cdi1, zumindest in S cerevisiae, die Proteine der Cdc2-Familie mit einer neuen Funktion ausstattete, einer, die ihre Fähigkeit inhibierte zu bewirken, dass Zellen G1 und S durchqueren. Die Cdi1- und Cdc2-Expressionsplasmide verursachten zusammen auch eine gewisse Wachstumsinhibition, sogar in Glucosemedium; dieses Ergebnis wurde der Basisexpression (engl. leaky expression) durch den GAL1-Promotor auf dem Expressionsplasmid zugeschrieben.

Analyse der Cdi1-Funktion in Säugerzellen

[0057] Die obigen Ergebnisse in Hefe legen die Vermutung nahe, dass Cdi1 einen ähnlichen Effekt auf die Fähigkeit von Säugerzellen, G1 oder S zu durchqueren, haben könnte. Da Cdi1 aus HeLa-cDNA isoliert wurde, wurde zuerst der Punkt des Zellzyklus, an welchem die Cdi1-mRNA in diesen Zellen exprimiert war, gemessen.
[0058] Genauer wurden adhärente HeLa-Zellen in der späten G1 durch einen doppelten Thymidinblock (Rao und Johnson, Nature 225: 159–164, 1970), wie in Lew et al. (Cell 66: 1197–1206, 1991) beschrieben, synchronisiert. Aliquots der Zellen wurden alle drei Stunden nach Befreiung von dem Block gesammelt. Die befreiten Zellen traten 9 Stunden nach der Befreiung wieder in den Zellzyklus ein, was durch FACS-Analyse des DNA-Gehalts gemessen wurde. Die Gesamt-RNA wurde aus jedem Aliquot zu verschiedenen Zeitpunkten aufbereitet, über ein Formaldehydagarosegel laufen gelassen und auf Nylon (Nytran, Schleider und Schuell, Keene, NH) geblottet, wie in Ausubel et al. beschrieben (Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, 1987). Der Blot wurde mit zufällig geprimten DNA-Sonden sondiert (Feinberg und Vogelstein, Anal. Biochem. 132: 6–13, 1983), die aus einem 690 bp EcoRI-Fragment, das Cdi1 enthielt, einem 1389 bp PstI-Fragment aus humaner Cyclin-E-Sequenz (Lew et al., Cell 66: 1197–1206, 1991), einem 1228 bp NcoI-SphI-Fragment aus der kodierenden Sequenz des humanen Cyclin-B1-Gens (Pines und Hunder, Cell 58: 833–846, 1989) und einem 1268 bp PstI-Fragment, das das humane Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-(GAPD)-Gen in voller Länge (Tokunaga et al., Cancer Res. 47: 5616–5619, 1987) enthielt, welches als Normalierungskontrolle diente, hergestellt waren. Wie in **Fig.** 9A gezeigt, zeigt die Expression der Cdi1-mRNA am Ende von G1 unmittelbar vor dem G1-zu-S-Übergang parallel mit der Expression der Cyclin-E-Message eine Spitze. Dieses zeitliche Expressionsmuster war mit der Hypothese stimmig, dass die Cdi1-Expression auf den G1-zu-S-Übergang wirken könnte.
[0059] Um diese Idee weiter zu testen, wurden HeLa-Zellen entweder mit pBNCdi1, einer Konstruktion, die auf die Synthese von Cdi1 unter der Kontrolle des Moloney Murine Leukemia Virus LTR (siehe unten) gerichtet ist, oder mit dem Vektor alleine transfiziert. Individuell transformierte Klone wurden aufgrund ihrer Resistenz gegen G418 selektioniert und Zellen dieser Klone mit Propidiumjodid gefärbt und einer FACS-Analyse unterzogen, um den DNA-Gehalt (wie unten beschrieben) zu bestimmen. Der Mittelpunkt von G1 wurde definiert als die Verteilungsmaximum eines jeden Graphen; die Maxima auf den zwei Spuren waren von unterschiedlichen Höhen (272 Counts für mit Vektor transformiere Zellen, 101 Counts für Zellen, die Cdi1 enthielten); dieser verbreiterte Peak in den Cdi1-exprimierenden Zellen spiegelt den erhöhten Anteil der Population wider, der einen circa 1 × DNA-Gehalt beinhaltet. 4 unabhängige Transfektanten wurden analysiert; alle lieferten ähnliche Ergebnisse. Diese Ergebnisse, die in **Fig.** 9B gezeigt sind, zeigten, dass die Population der Zellen, in denen Cdi1 exprimiert war, einen erhöhten Anteil von Zellen in G1 im Vergleich zur Kontrollpopulation enthielten.

Cdc2-Cdi1-Interaktion

[0060] Um die Determinanten von Cdc2, die von Cdi1 erkannt werden, zu identifizieren, wurde Cdi1 auf seine Fähigkeit getestet, mit einer Reihe von verschiedenen Köderproteinen zu interagieren, einschließlich Cdc2-Proteinen aus Hefe, Menschen und Fliegen, wie auch der Hefe Fus3-Proteinkinase (einer Proteinkinase der ERK-Klasse, die Cln3 negativ reguliert und die im Hinblick auf Sequenzkriterien weniger verwandt mit den Cdc2-Proteinen ist als jene Proteine untereinander) (Elion et al., Cell 60: 649–664, 1990).
[0061] Um diese Experimente durchzuführen, wurde EGY48/JK103 (unten beschrieben) enthaltend ein Plasmid, das die Galactose-induzierbare Synthese des mit Tag versehenen Cdi1 steuerte, mit einer Reihe von verschiedenen transkriptional inerten Köderproteinen der LexA-Cdc2-Familie transformiert. Fünf individuelle Transformanten für jeden Köder wurden bis zu OD_{600} = 0,5–1,0 in Minimalmedium, das 2% Galactose, aber kein Uracil, Histidin und Tryptophan enthielt, wachsen gelassen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 gezeigt und sind in β-Galactosidase-Einheiten angegeben; die Variation zwischen den individuellen Transformanten lag bei weniger als 20%.

TABELLE 1

Köder	β-Galactosidase-Aktivität
LexA-Cdc2 (Hs)	1580
LexA-Cdk2 (Hs)	440
LexA-Cdc28 (Sc)	480
LexA-Cdc2 (Dm)	40
LexA-Cdc2c (Dm)	> 2
LexA-Fus3 (Sc)	> 2

[0062] Wie in Tabelle 1 gezeigt, stimulierte das mit Tag versehene Cdi1 die Transkription dieser Köder auf

unterschiedliche Niveaus; sie wurde stark in Stämmen aktiviert, die den humanen Cdc2-Köder enthielten, gegen den es selektioniert war, weniger stark in Stämmen, die S. cerevisiae Cdc28- oder humane Cdk2-Köder enthielten, und nur schwach in Stämmen, die DmCdc2-Köder, einen der zwei Drosophila Cdc2-Homologe (Jimenez et al., EMBO J. 9: 3565–3571, 1990; Lehner und O'Farrell, EMBO J. 9: 3573–3581, 1990) enthielten. In Stämmen, die den DMCdc2c-Köder oder Fus3 enthielten, aktivierte Cdi1 überhaupt nicht. Da die Köder in dieser Reihe sequenzverwandt waren, aus dem gleichen Vektor hergestellt waren, von einer Message translatiert waren, die die gleiche 5'-untranslatierte Sequenz und die gleiche LexA-kodierende Sequenz besaß, und in Hefe in der gleichen Menge exprimiert waren, spiegelten die Unterschiede in der Transkription zwischen den Köderstämmen sehr wahrscheinlich die Unterschiede in der Interaktion mit dem mit Tag versehenen Cdi1 wider.

[0063] Um die Reste auf den Cdc2-Proteinen zu identifizieren, die Cdi1 erkennen könnten, wurden die Transkriptionsinteraktionsdaten mit den Sequenzen der Köder verglichen. Eine Aufstellung der Ködersequenzen wurde auf Reste untersucht, die in den Proteinen konserviert waren, mit denen Cdi1 interagierte, aber die in den Proteinen anders waren, die Cdi1 nicht kontaktierte. Durch die Verwendung dieses Kriteriums wurden 7 Reste identifiziert, die durch Sterne in **Fig.** 10 angegeben sind. Von diesen Resten wurden zwei, Glu 57 und Gly 154 (in humanem Cdc2) in den nicht-interagierenden Ködern in Aminosäuren unterschiedlichen chemischen Typs abgeändert. In DmCdc2c ist Rest 57 von Glu zu Asn und Rest 154 von Gly zu Asn verändert; in Fus3 sind diese Reste zu His und Asp verändert. In humanem Cdc2 grenzen diese beiden Reste an Bereiche des Moleküls, die für die Interaktion mit Cyclinen notwendig sind (Ducommun et al., Mol. Cell. Biol. 11: 6177–6184, 1991). Die Projektion der humanen Cdc2-Primärsequenz auf die Kristallstruktur, die von Knighton et al. für die bovine cAMP-abhängige Proteinkinase (Science 153: 407–413, 1991) aufgelöst wurde, legt nahe, dass die Reste 57 und 154 tatsächlich wahrscheinlich nahe an diesen Cyclin-Kontaktpunkten in dem gefalteten Protein sind.

[0064] Diese Ergebnisse sind also mit der Idee konsistent, dass Cdi1 seine Wirkungen durch Veränderungen der Affinität des Cdc2-Proteins für bestimmte Cycline ausübt und so möglicherweise ihre Substratspezifität verändert.

[0065] Zusammenfassend ist Cdi1 ein Protein, das Proteine der Cdc2-Familie komplexiert. Es wird um den Zeitpunkt des G1-zu-S-Übergangs exprimiert und die obigen Ergebnisse lassen vermuten, dass es das Durchschreiten der Zellen durch diesen Teil des Zyklus negativ reguliert und so das regulatorische Netzwerk verknüpft, das extrazelluläre Signale mit den Hauptkontrollen des Zellzyklus verbindet. Wenn Cdi1 tatsächlich ein negativer Regulator ist, ist es interessant festzustellen, dass seine normale Funktion die Übertragung von Signalen sein könnte, die den Zellzyklus während G1 verzögern oder blockieren. Da sowohl die normale Differenzierung als auch Krebs als Konsequenz von Veränderungen in der G1-Regulation in Erwägung gezogen werden können, eröffnet diese Idee die Möglichkeiten, dass Cdi1 wirken könnte, indem es Zellen aus dem aktiven Zyklus entfernt, um die Differenzierung zu ermöglichen (Pardee, Science 246: 603–608, 1989); und dass es Krebsarten gibt, in denen Läsionen in der G1-regulatorischen Maschinerie Cdi1 daran hindern, seine volle Wirkung auszuüben.

Versuchsdurchführungen

Bakterien und Hefe

[0066] Die Manipulation von Bakterienstämmen und von DNAs erfolgte durch Standardverfahren (siehe z. B. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, 1987; und Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989), soweit nicht anders angegeben. E. coli „Sure" mcrA Δ(mrr, hsdRMS, mcrBC) endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(kan^R) uvrC/F' [proAB, lacI^{q}ZΔ$_{M15}$]::Tn10(tet^R) Strategene Inc., LaJolla, CA) und KC8 (pyrF::Tn5 hsdR leuB600 trpC9830 lacΔ74 strA galK hisB436) wurden durchgehend als bakterielle Wirte verwendet.

[0067] Um zu bestimmen, ob Cdi1 entweder die G1- oder G2-Funktionen von cdc28 komplementierte, wurden die folgenden Hefestämme verwendet: cdc28-1N (MATα ura3 ade1 trp1 cdc28-1N), welcher bei der restriktiven Temperatur hauptsächlich in G2 arretiert; und cdc28-13 (MATα leu2 trp1 his3 ura3 ade1 tyr1 cdc28-13) und cdc28-17 (MATα leu2 trp1 his3 ura3 met14 arg5 arg6 tyr1 cdc28-17, welcher bei der restriktiven Temperatur hauptsächlich während G1 arretiert.

[0068] In diese Stämme wurde pJG4-6Cdi1 (siehe unten), ein Hefeexpressionsplasmid, das die Synthese von Cdi1, das ein Hämagglutinin-Epitop-Tag an seinem Aminoterminus enthält, steuert, und pJG4-7Cks2 (hergestellt aus der gleichen Selektion) als eine positive Kontrolle eingeführt. Übernachtkulturen dieser Stämme wurden 20 : 1 in trp$^-$ komplettem Minimalmedium mit 2% Glucose und 2% Galactose verdünnt und für fünf Stunden bei 25°C wachsen gelassen. Die Verdünnungen dieser Kulturen wurden auf Duplikatplatten von festen Medien ausplattiert, die die gleichen Kohlenstoffquellen enthielten; eine Platte wurde in 25°C und die andere in 36°C

gestellt. Die Kolonien wurden nach fünf Tagen Inkubation gezählt.

[0069] Um zu bestimmen, ob Cdi1 einen in G1-Cyclinen defizienten Stamm komplementierte, wurde der Stamm 3c-1AX (MATα bar1 Δcln1 Δcln2 Δcln3 cyh2 trp1 leu2 ura2 ade1 his2 [pLEU2-CYH2(CYH^S)-$CLN3^+$]), in welchen pJG4-7Cdi1 oder ein GAL1-CLN3-Konstrukt als positive Kontrolle eingeführt war, verwendet. Übernachtkulturen wurden wie oben in Glucose- und Galactosemedium verdünnt und für fünf Stunden bei 30°C wachsen gelassen. Die Zellen wurden auf Glucose- und Galactose-enthaltendem Medium wie oben ausplattiert, außer, dass das Medium auch 10 µg/ml Cyclohexamid enthielt; die Zellen wurden für drei Tage wachsen gelassen und gezählt. Die Kolonien können nur auf diesem Medium entstehen, wenn das CYH^S-$CLN3^+$-Plasmid verloren wird, ein Ereignis, das selbst nur auftreten kann, wenn das andere Plasmid vor der Cln-Defizienz bewahrt.

[0070] Die Fähigkeit von Cdi1, eine Resistenz gegen den Arrest durch den α-Faktor zu verursachen, wurde unter Verwendung eines Derivats von W303 (MATα trp1 ura3 his3 leu2 can1 bar1::LEU2) getestet, in welches pJG4-4Cdi1, ein Plasmid, das die Synthese von nativem Cdi1 steuert, eingeführt worden war. Der Stamm W303 wurde auch mit einer Reihe von Säuger-cDNAs transformiert, die nach ihrer Fähigkeit isoliert worden waren, eine α-Faktorresistenz als eine positive Kontrolle zu übertragen. Übernachtkulturen wurden in Glucose und Galactose wie oben wachsen gelassen und dann auf Glucose- und Galactosemedium in Gegenwart und Abwesenheit von $10^{-}7$ M α-Faktor ausplattiert. Die Kolonien wurden nach 3 Tagen gezählt.

[0071] Für Wachstumsratenexperimente enthielt W303 entweder pJG4-4Cdi1 oder eine Vektorkontrolle, in Kombination mit entweder einem pJG14-2, einem $HIS3^+$-Plasmid, das die Synthese von nativem humanem Cdc2 unter der Kontrolle eines ADH1-Promotors in Hefe steuert, oder einem Kontrollvektor. Übernachtkulturen, die in einem His^- Trp^--Minimalmedium wachsen gelassen wurden, das 2% Raffinose enthielt, wurden gesammelt, gewaschen und auf OD_{600} = 0,1 mit frischem Medium verdünnt, das entweder 2% Glucose oder 1% Galactose + 1% Raffinose enthielt. Wachstumskinetiken wurden verfolgt, wobei die OD von Aliquots, die alle 2 Stunden genommen wurden, gemessen wurde.

Köder

[0072] Um die Operatorbesetzung zu optimieren, wurden Köder konstitutiv unter der Kontrolle des ADH1-Promotors (Ammerer, Meth. Enzym. 101: 192–210, 1983) hergestellt und enthielten die LexA C-terminale Oligomerisationsregion, die zur Operatorbesetzung durch LexA-enthaltende Proteine beiträgt, vielleicht weil es bei dem präzisen Anlagern der LexA-Aminotermini angrenzender Operator-Halbbindungsstellen hilft (Golemis und Brent, Mol. Cell. Biol. 12: 3006–3014, 1992). Es ist wert zu bemerken, dass alle LexA-Köderproteine, die bisher untersucht wurden, in den Hefekern in Konzentrationen eintreten, die ausreichen eine Operatorbindung zu ermöglichen, auch wenn LexA-Derivate nicht spezifisch im Kern lokalisiert sind, außer wenn sie andere nukleare Lokalisationssignale enthalten (siehe z. B. Silver et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4763–4766, 1986).

[0073] pL202pl ist beschrieben worden (Ruden et al., Nature 350: 426–430, 1991). Dieses Plasmid, ein naher Verwandter von pMA424 und pSH2-1 (Ma und Ptashne, Cell 51: 113–119, 1987; Hanes und Brent, Cell 57: 1275–1283, 1989) trägt den $HIS3^+$-Marker und den 2 µ Replikator und steuert in Hefe die Synthese von Fusionsproteinen, die das Wildtyp-LexA-Protein an ihrem Aminoterminus tragen. Die in dieser Studie verwendeten Köder wurden wie folgt hergestellt: humanes Cdc2- (Lee und Nurse, Nature 327: 31–35, 1987), Cdk2- (Tsai et al., Nature 353: 174–177, 1991) und die S. cerevisiae CDC28-Gene (Lorincz und Reed, Nature 307: 183–185, 1984) wurden mittels PCR unter Verwendung von Vent-Polymerase (New England Biolabs, Beverley, MA) amplifiziert und in pL202pl als EcoRI-BamHI-Fragmente kloniert. Diese Proteine enthielten zwei Aminosäuren (glu phe), die zwischen die letzte Aminosäure von LexA und den Köderproteinen insertiert wurden. Die Drosophila Cdc2-Köder (Jimenez et al., EMBO J. 9: 3565–3571, 1990; Lehner und O'Farrell, EMBO J. 9: 3573–3581, 1990) wurden als BamHI-SalI-Fragmente nach PCR-Amplifikation kloniert. LexA-Fus3 (Elion, Cell 60: 649–664, 1990) und LexA-Cln3 (Cross, Mol. Cell. Biol. 8: 4675–4684, 1988, Nash et al., EMBO J. 7: 4335–4346, 1988) wurden in ähnlicher Weise hergestellt, außer dass sie als BamHI-Fragmente kloniert wurden. Diese Plasmide enthielten fünf Aminosäuren (glu phe pro gly ile) (SEQ ID NR: 2), die zwischen LexA und den Ködern insertiert waren. Alle diese Fusionen enthielten die gesamte kodierende Region von der zweiten Aminosäure bis zum Stoppkodon. LexA-cMyc-Cterm enthielt die carboxy-terminalen 176 Aminosäuren des humanen cMyc und LexA-Max enthielt die gesamte humane Max-kodierende Sequenz. LexA-Bicoid (Aminosäure 2–160) wurde bereits beschrieben (Golemis und Brent, Mol. Cell. Biol. 12: 3006–3014, 1992).

Reporter

[0074] In der „Interaction-Trap" ersetzte ein Reporter, die LexAop-LEU2-Konstruktion, das chromosomale Leu2-Gen der Hefe. Der andere Reporter, eines einer Reihe von LexAop-GAL1-lacZ-Genen (Brent und Ptashne, Cell 43: 729–736, 1985; Kamens et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2840–2847, 1990) wurde auf einem 2 µ-Plasmid getragen. Die Reporter wurden so gestaltet, dass ihre basale Transkription extrem niedrig war, wahrscheinlich

sowohl auf Grund des Entfernens der Gesamtheit der UAS aus beiden Reportern als auch auf Grund der Tatsache (deren Ursache unbekannt ist), dass in Promotoren eingeführte LexA-Operatoren dazu tendieren, die Transkription zu erniedrigen (Brent und Ptashne, Nature 312: 612–615, 1984; Lech, Gene activation by DNA-bound Fos and Myc proteins. Doktorarbeit, Harvard University, 1990). Die Reporter wurden so ausgewählt, dass sie sich in ihrer Antwort auf die Aktivierung durch LexA-Fusionsproteine unterscheiden. In dieser Studie enthielt der LEU2-Reporter drei Kopien der Hochaffinitäts-LexA-Bindungsstelle, die aufwärts von E. coli colE1 (Ebina et al., J. Biol. Chem. 258: 13258–13261, 1983; Kamens et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2840–2847, 1990) gefunden wurde und daher wahrscheinlich insgesamt 6 Dimere des Köders bindet. Im Gegensatz dazu enthielt das lacZ-Gen, das in dem Primärscreen eingesetzt wurde, einen einzigen, Konsensus-Operator niederer Affinität (Brent und Ptashne, Nature 312: 612–615, 1984), welcher ein einzelnes Dimer des Köders bindet. Die LexA-Operatoren in dem LEU2-Reporter waren näher an dem Transkriptionsstartpunkt, als sie es in dem lacZ-Reporter waren. Diese Unterschiede in der Zahl, der Affinität und der Position der Operatoren trugen insgesamt dazu bei, das LEU2-Gen als Indikator sensitiver zu machen als das lacZ-Gen, eine Eigenschaft, die für dieses Verfahren nützlich ist.

[0075] p1840 und pJK103 wurden bereits beschrieben (Brent und Ptashne, Cell 43: 729– 736, 1985, Kamens et al., Mol. Cell. Biol. 10: 2840–2847, 1990). pHR33 (Ellerstrom et al., Plant Mol. Biol. 18: 557–566, 1992) wurde mit HindIII geschnitten und ein ~1166bp-Fragment, das das URA3$^+$-Gen aus yEP24M13-2, ein Derivat von yEP24, enthielt, wurde darin eingeführt, um pLEU2-0 zu schaffen. Dieses Plasmid enthält eine BglII-Schnittstelle 87 Nukleotide aufwärts des LEU2-Haupttranskriptionsstartpunkts. pLEU2-0 wurde mit BglII geschnitten und ein 42bp Doppelstrang-Oligomer mit BglII-Enden

5' GATCCTGCTGTATATAAAACCAGTGGTTATATGTACAGTACG 3' (SEQ ID NR:3)

3' GACGACATATATTTTGGTCACCAATATACATGTCATGCCTAG 5' (SEQ ID NR:4),

das die überlappenden LexA-Operatoren enthielt, die aufwärts des Colecin E1-Gens gefunden wurden (Ebina et al., J. Biol. Chem. 258: 13258–13261, 1983), und das wahrscheinlich 2 LexA-Dimere bindet, darin eingeführt. Ein Plasmid, pLEU2-LexAop6, das drei Kopien dieses Oligomers enthielt, wurde ausgesucht; es bindet wahrscheinlich 6 Dimere der LexA-Fusionsproteine.

Selektionsstämme

[0076] EGY12 (MATα trp1 ura2 LEU2::pLEU2-0 (ΔUASLEU2)) und EGY38 (wie oben, aber ::pLEU2-LexAop6) wurden wie folgt konstruiert. pLEU2-0 und pLEU2-LexAop6 wurden durch Verdau mit ClaI innerhalb des LEU2-Gens linearisiert und die DNA dann in U457 (MATα SUP53-α ade2-1 ean1-100 ura3-52 trp1-1 [phi+]) durch Lithiumacetat-Transformation (Ito et al., J. Bacter. 153: 163–168, 1983) eingeführt; die ura$^+$-Kolonien, die vermutlich die in LEU2 integrierte Plasmid-DNA enthielten, wurden ausgewählt. Einige dieser Transformanten wurden in YPD wachsen gelassen. Ura$^-$-Zellen wurden durch Ausplattieren dieser Kulturen auf einem Medium, das 5-FOA enthielt (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, 1987), ausgewählt. Beide Plasmide trugen ein TY1-Element. Für jede Integration waren einige der ura3$^-$-Revertanten auch trp1$^-$, was vermuten lasst, dass der URA3$^+$-Marker in einem homologen Rekombinationsereignis deletiert wurde, das die TY1-Sequenzen auf den LEU2-Plasmiden und dem chromosomalen TY1-Element aufwärts von SUP53-α (Oliver et al., Nature 357: 38–46, 1992) einbezog. Trp$^-$-Kolonien einer jeden Integration, EGY12 (keine LexA-Operatoren) und EGY38 (6 Operatoren) wurden aufbewahrt. Diese wurden mit GG100-14D (MATα his3 trp1 pho5) gepaart. Die resultierenden Diploide ließ man sporulieren und eine Anzahl von zufälligen (MATα leu2- ura3- trp1- his3- GAL+) Sporenprodukten wurde gewonnen. EGY40 und EGY48 sind Produkte dieser Kreuzung; EGY40 besitzt keine LexA-Operatoren, EGY48 besitzt 6. Um die Köderstämme herzustellen, wurde EGY48 mit p1840 oder pJK103 und mit den verschiedenen Köderplasmiden transformiert. Die Doppeltransformanten wurden auf Glucose Ura$^-$ His$^-$-Platten selektioniert und die Expression der Köderproteine durch Western-Blotting unter Verwendung eines Anti-LexA-Antikörpers und Standardtechniken bestätigt.

Bibliotheks-(„Beute")-epressionsvektoren

[0077] Bibliothekskodierte Proteine wurden durch pJG4-5 exprimiert, einem Mitglied einer Reihe von Expressionsplasmiden, die entwickelt wurden, um in der „Interaction-Trap" verwendet zu werden und um die Analyse von isolierten Proteinen zu erleichtern. Diese Plasmide tragen alle den 2 µ-Replikator, um eine hohe Kopienanzahl in Hefe sicherzustellen, und den TRP1-Marker. pJG4-5 wurde entwickelt, um die folgenden Eigenschaf-

ten aufzuweisen: einen Galactoseinduzierbaren Promotor, um eine bedingte Expression der Bibliotheksproteine zu erlauben, ein Epitop-Tag, um deren Detektion zu erleichtern, ein nukleares Lokalisationssignal, um ihr intranukleare Konzentration zu maximieren, um die Sensitivität der Selektion zu erhöhen, und eine schwache „acid blob"-Aktivierungsdomäne (Ma und Ptashne, Cell 51: 113–119, 1987). Diese Domäne wurde aus zwei Gründen ausgewählt: weil ihre Aktivität nicht Gegenstand bekannter Regulation durch Hefeproteine ist, wie es bei der Haupt-GAL4-Aktivierungsdomäne ist, und, noch wichtiger, weil sie ein schwacher Aktivator ist, der wahrscheinlich die Toxizität, die sehr wahrscheinlich die Zahl oder Art der gefundenen interagierenden Proteine begrenzt, auf Grund von Squelching oder anderen Mechanismen (Gill und Ptashne, Nature 334: 721–724, 1988, Berger et al., Cell 70: 251–265, 1992) verhindert.

[0078] pJG4-5 wurde wie folgt konstruiert. Eine „Expressionskassette" enthaltend den GAL1-Promotor und den ADH1-Terminator und ein 345 nt-Insert, das eine 107 Aminosäurenkomponente kodierte, wurde in pJG4-0 insertiert, einem Plasmid, das das TRP1-Gen, den 2 μ-Replikator, den pUC13-Replikationsursprung und das Ampicillinresistenzgen trägt. Die pJG4-5 Expressionscassette steuerte die Synthese von Fusionsproteinen, von denen jedes am Aminoterminus, von Aminonach Carboxy-terminal, ein ATG, eine SV40 nukleare Lokalisationssequenz (PPKKKRKVA) (SEQ ID NR: 5) (Kalderon et al., Cell 39: 499–509, 1984), die transkriptionale B42-„acid blob" Aktivierungsdomäne (Ma und Ptashne, Cell 51: 113–119, 1987) und das HA1-Epitop-Tag (YPYDVPDYA) (SEQ ID NR: 6) (Green et al., Cell 28: 477–487, 1980) (**Fig.** 3C) trug. Zusätzlich zu diesem Plasmid wurden in diesem Experiment zwei Cdi1-Expressionsplasmide verwendet. EcoRI-XhoI Cdi1-enthaltende Fragmente wurden in pJG4-4 eingeführt, um das Plasmid pJG4-4Cdi1 herzustellen; Cdi1 wurde von diesem Plasmid als ein natives, nicht fusioniertes Protein unter der Kontrolle des GAL1-Promotors transkribiert. EcoRI-XhoI Cdi1-enthaltende Fragmente wurden auch in pJG4-6 eingeführt, um das Plasmid pJG4-6Cdi1 herzustellen; in diesem Fall wurde Cdi1 als eine in-frame-Fusion enthaltend an seinem Aminoterminus ein ATG-Startkodon und das Hämagglutinin-Epitop-Tag exprimiert.

Bibliothekskonstruktion

[0079] Die mit Aktivierungs-Tag versehene cDNA-Expressionsbibliothek für die Hefe wurde aus RNA hergestellt, die aus in Gegenwart von Serum gewachsenen proliferierenden HeLa-Zellen isoliert wurde, die auf Platten bis zu 70%-iger Konfluenz wachsen gelassen wurden. Die Gesamt-RNA wurde wie bei Chomczynski und Sacchi (Anal. Biochem. 162: 156–159, 1987) beschrieben extrahiert und polyA$^+$ mRNA wurde auf einer Oligo-dT-Zellulosesäule gereinigt. Die cDNA-Synthese wurde gemäß Gubler und Hoffman (Gene 25: 263–269, 1983), modifiziert nach Huse und Hansen (Strategies 1: 1–3, 1988) unter Verwendung eines Linkerprimers durchgeführt, der von 5' nach 3' einen 18 nt polydT-Teil, eine XhoI-Schnittstelle und eine 25 nt lange GA-reiche Sequenz enthielt, um die XhoI-Schnittstelle zu schützen. Um jedwelche internen XhoI-Schnittstellen zu schützen, wurde der erste Strang in Gegenwart von 5'-Methyl-CTP (anstelle von CTP) mit einer RNAseH defizienten Version der Moloney-Virus-reversen-Transkriptase (Superscript, BRL, Grand Island, NY) synthetisiert. Für die Synthese des zweiten Strangs wurde das mRNA/cDNA-Hybrid mit RNAseH und E coli DNA-Polymerase I behandelt und die resultierenden Enden wurden durch sequenzielle Behandlung mit Klenow, Mungbohnen-Exonuklease und Klenow stumpfendig gemacht, woraufhin EcoRI-Adaptoren:

```
5' AATTCGGCACGAGGCG 3' (SEQ ID NR:7)
    3' GCCGTGCTCCGC 5' (SEQ ID NR:8)
```

ligiert wurden und die cDNA wurde mit XhoI verdaut wurde. Diese DNA wurde weiter über eine Sephacryl S-400 Zentrifugations-Säule gereinigt, um überschüssige Adaptersequenzen zu entfernen, und auf einem 5–20% KoAc-Gradienten fraktioniert. Die Fraktionen, die > 700 bp cDNAs enthielten, wurden gesammelt und circa 1/5 der cDNA in EcoRI- und XhoI-verdautes pJG4-5 ligiert. Dieses Ligationsgemisch wurde in E. coli SURE-Zellen durch Elektroporation (Gene-Pulser, Bio-Rad, Hercules, CA) gemäß den Angaben des Herstellers eingefülrt. 9,6 × 10^6 primäre Transformanten wurden durch Abkratzen von LB Ampicillin-Platten gesammelt. Die Kolonien wurden gepoolt und in 6 Liter LB-Medium über Nacht (ungefähr drei Generationen) wachsen gelassen und die Plasmid-DNA aufeinander folgend durch Standardtechniken über zwei CsC1-Gradienten gereinigt. Der Verdau der Transformanten der einzelnen Bibliotheksmitglieder mit EcoRI und XhoI ergab, dass > 90% der Bibliotheksmitglieder ein cDNA-Insert enthielten, dessen typische Größe zwischen 1 kb–2 kb betrug. Western Blots der einzelnen Hefetransformanten unter Verwendung des Anti-Hämagglutinin-monoklonalen Antikörpers ließen vermuten, dass zwischen 1/4 und 1/3 der Mitglieder Fusionsproteine exprimierte.

Selektion der Cdc2-Interaktoren

[0080] Die Transformation des oben beschriebenen Stammes mit der Bibliothek wurde gemäß den von Ito et al. (J. Bacter. 153: 163–168, 1983) beschriebenen Verfahrensschritten durchgeführt, außer dass die Zellen bis

zu einer höheren OD, wie in Schiestl und Gietz beschrieben (Curr. Genet. 16: 339–346, 1989), wachsen gelassen wurden und einzelsträngige Träger-DNA in das Transformationsgemisch eingeschlossen wurde, wie ebenfalls in Schiestl und Gietz (Curr. Genet. 16: 339– 346, 1989) beschrieben. Diese Verfahrensschritte ergaben $1,2 \times 10^6$ primäre Bibliothekstransformanten (10^4 Bibliothekstransformanten/µg DNA). Die Transformanten wurden auf Glucose Ura^- His^- Trp^--Platten selektioniert, abgekratzt und in ungefähr 20 ml 65% Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 7,5,10 mM $MgCl_2$ suspendiert und in 1 ml Aliquots bei –80°C gelagert. Die Plattierungseffizienz wurde auf Galactose Ura^- His^- Trp^- nach Wachsen von 50 µl einer Zellsuspension in 5 ml YP in Gegenwart von 2% Galactose bestimmt. Zum Screenen der Bibliothek wurden ungefähr 20 Kolonien-bildende Einheiten auf diesem Medium/Originaltransformant (circa 2×10^7 Zellen) auf 4 Standard-Galactose Ura^- His^- Trp^- Leu^- 10 cm-Rundplatten nach der YP/Galactose-Induktion wie oben beschrieben ausplattiert.

[0081] 412 Leu^+ Kolonien erschienen nach einer 4-tägigen Inkubation bei 30°C. Diese Kolonien wurden auf Glucose Ura^- His^- Trp^--Masterplatten gesammelt und auf Glucose Ura^- His^- Trp^- Leu^--, Galactose Ura^- His^- Trp^- Leu^--, Glucose Xga1 Ura^- His^- Trp^-- und Galactose Xga1 Ura^- His^- Trp^--Platten noch einmal getestet. 55 dieser Kolonien zeigten ein Galactose-abhängiges Wachstum auf den leu^--Medien und eine Galactose-abhängige blaue Farbe auf dem Xga1-Medium und wurden weiter analysiert.

[0082] Plasmid-DNAs aus diesen Kolonien wurden wie beschrieben aufbewahrt (Hoffman und Winstson, Gene 57: 267–272, 1987), in den Bakterienstamm KC8 eingeführt und die Transformanten wurden auf Trp^--Ampicillinplatten gesammelt. Die Plasmid-DNAs wurden analysiert und anhand des Musters der Restriktionsfragmente kategorisiert, das sie auf 1,8% Agarose 1/2 × TBE-Gelen nach dreifacher Verdauung mit EcoRI und XhoI und entweder AluI oder HaeIII abgaben. Charakteristische Plasmide aus verschiedenen Restriktionskartenklassen dieser cDNAs wurden in Derivate von EGY48 retransformiert, die eine Reihe verschiedener LexA-Fusionsproteine exprimierten. Die Plasmide, die cDNAs trugen, deren kodierte Proteine mit dem LexA-Cdc2-Köder, aber nicht mit anderen LexA-Fusionsproteinen, einschließlich LexA-Bicoid, LexA-Fus3, LexA-Cln3, LexA-cMyc-Cterm und LexA-Max interagierten, wurden weiter charakterisiert.

Mikroskopie

[0083] 5 ml Kulturen von Hefezellen wurden in dem geeigneten kompletten Minimalmedium bis zu einer OD_{600} = 0,8–1 wachsen gelassen und mit einem kurzen Stoß Ultraschall-behandelt, um die Klumpen zu sprengen (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, 1987). Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt, in 1 ml TE gewaschen, in 1 ml 70% Ethanol resuspendiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, um sie zu fixieren, dann gesammelt und in TE resuspendiert. Die fixierten Zellen wurden entweder direkt bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Zeiss-Axioscope-Mikroskop mit Nomarski-Optik oder durch Fluoreszenz nach Färbung mit 2,5 µg/ml DAPI, wie in Silver et al. beschrieben (Mol. Cell. Biol. 6: 4763– 4766, 1986), untersucht.

FACS-Analyse

[0084] Hefezellen wurden wachsen gelassen und wie oben beschrieben fixiert und für die FACS-Analyse des DNA-Gehalts im Wesentlichen wie in Lew et al. (Cell 63: 317– 328, 1992) vorbereitet. Nach Fixierung wurden die Zellen gesammelt und drei Mal in 0,8 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und dann wurden 200 µl 2 mg/ml RNaseA zugefügt und bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln für 5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden pellettiert, in 0,5 ml 5 mg/ml Pepsin (frisch gelöst in 55 mM HCl) resuspendiert und in einem 37°C Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden herunterzentrifugiert, mit 1 ml 200 mM Tris/HCl pH 7,5, 211 mM NaCl, 78 mM $MgCl_2$ gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert. 55 µl 500 µg/ml Propidiumjodids wurden dann zugefügt und die Zellen über Nacht bei 4°C gefärbt. Typischerweise wurden 10.000–20.000 Ereignisse abgelesen und in einem Becton Dickinson Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) mit einem CellFIT Zellzyklusanalyseprogramm Version 2.01.2. analysiert.

[0085] Für die FACS-Analyse des DNA-Gehalts wurden die HeLa-Zellen auf Platten wachsen gelassen und entweder mit pBNCdi1, einer DNA-Kopie eines retroviralen Klonierungsvektors (Morgenstern und Land, Nucl. Acids. Res. 18: 3587–3596, 1990), der die Expression von nativem Cdi1 unter der Kontrolle des MoMuLV-Promotors steuert, oder mit dem Vektor alleine transfiziert (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, John Wiley & Sons, 1987). Klone der transfizierten Zellen wurden durch Wachstum in Medium selektioniert, das 400 µg/ml G418 enthielt; die Cdi1-Expression erniedrigte nicht die Anzahl der gewonnenen G418-resistenten Zellen. Einzelne Klone jeder Transfektion (circa 20) wurden aufbewahrt und auf Platten in DMEM +10% Kälberserum wachsen gelassen, unter Verwendung von 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA gesammelt und ein Mal mit 1 × PBS gewaschen. Die Zellen von vier Klonen, die von der Cdi1-Transfektion stammten, und die von vier Kontrolltransfektionen wurden in 225 µl 30 µg/ml Trypsin, das in 3,4 mM Citrat, 0,1% NP40, 1,5 mM Spermin und 0,5 mM Tris gelöst war, suspendiert und auf einem Rotator für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 188 µl des 0,5 mg/ml Trypsininhibitors und 0,1 mg/ml RNAseA wurden dann zugefügt und die

Suspension gevortext. Nach Zugabe von 188 µl 0,4 mg/ml Propidiumjodid und 1 mg/ml Spermin wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die FACS-Analyse wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Cdi1-Polypeptide und Antikörper

Polypeptidexpression

[0086] Im Allgemeinen können erfindungsgemäße Polypeptide durch Transformation einer geeigneten Wirtszelle mit dem gesamten oder einem Teil eines Cdi1-kodierenden cDNA-Fragments (z. B. die wie oben beschriebene cDNA) in einem geeigneten Expressionsvektor hergestellt werden.

[0087] Der Fachmann auf dem Gebiet der Molekularbiologie wird verstehen, dass jedes einer großen Vielzahl von Expressionssystemen verwendet werden kann, um das rekombinante Protein bereitzustellen. Die genaue verwendete Wirtszelle ist für die Erfindung nicht kritisch. Das Cdi1-Polypeptid kann in einem prokaryotischen Wirt (z. B. E. coli) oder in einem eukaryotischen Wirt (z. B. Saccharomyces cerevisiae oder Säugerzellen, z. B. COS1, NIH3T3 oder HeLa-Zellen) hergestellt werden. Solche Zellen sind aus einer großen Vielzahl von Quellen erhältlich (z. B. der „American Type Culture Collection", Rockland, MD; siehe auch z. B. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biologiy, John Wiley & Sons, New York, 1989). Das Verfahren der Transformation oder Transfektion und die Wahl des Expressionsvehikels werden von dem ausgewählten Wirtssystem abhängen. Transformations- und Transfektionsverfahren sind beschrieben, z. B. in Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989); Expressionsvehikel können auch aus denen ausgewählt werden, die, z. B. in Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987) zur Verfügung gestellt werden.

[0088] Ein bevorzugtes Expressionssystem ist die Maus-3T3-Fibroblastenwirtszelle, die mit einem pMAMneo-Expressionsvektor (Clontech, Palo Alto, CA) transfiziert wurde. pMAMneo stellt bereit: einen an Dexamethason-induzierbaren MMTV-LTR-Promotor geknüpften RSV-LTR-Enhancer, einen SV40-Replikationsstart, der die Replikation in Säugersystemen erlaubt, ein selektierbares Neomycingen und SV40-Splice- und Polyadenylierungsstellen. DNA, die für ein Cdi1-Polypeptid kodiert, würde in den pMAMneo-Vektor in der Orientierung insertiert werden, die so entworfen wurde, dass die Expression ermöglicht wird. Das rekombinante Cdi1-Protein würde wie unten beschrieben isoliert werden. Andere bevorzugte Wirtszellen, die in Verbindung mit dem pMAMneo-Expressionsvehikel verwendet werden können, schließen COS-Zellen und CHO-Zellen (ATCC Zugangsnrn. CRL1650 bzw. CCL61) ein.

[0089] Alternativ wird ein Cdi1-Polypeptid durch eine stabil transfizierte Säugerzelllinie hergestellt. Eine Zahl von Vektoren, die für die stabile Transfektion von Säugerzellen geeignet sind, sind allgemein verfügbar, z. B. siehe Pouwels et al. (supra); Verfahren zum Konstruieren solcher Zelllinien sind ebenfalls allgemein verfügbar, z. B. in Ausubel et al. (supra). In einem Beispiel wird die für das Cdi1-Polypeptid kodierende cDNA in einen Expressionsvektor kloniert, der das Dihydrofolatreduktase-(DHFR)-Gen enthält. Auf die Integration des Plasmids und daher des Cdi1-kodierenden Gens in das Wirtszellchromosom wird durch Aufnahme von 0,01–300 µM Methotrexat in das Zellkulturmedium (wie beschrieben in Ausubel et al., supra) selektioniert. Diese dominante Selektion kann in den meisten Zelltypen ausgeführt werden. Die rekombinante Proteinexpression kann durch DHFR-mediierte Amplifikation des transfizierten Gens erhöht werden. Verfahren zum Selektionieren von Zelllinien, die Genamplifikationen tragen, sind in Ausubel et al. (supra) beschrieben; solche Verfahren beziehen im Allgemeinen eine ausgedehnte Kultivierung in Medium, das allmählich steigende Spiegel an Methotrexat enthält, ein. DHFR-enthaltende Expressionsvektoren, die gewöhnlich für diesen Zweck verwendet werden, schließen pCVSEII-DHRF und pAdD26SV(A) ein (beschrieben in Ausubel et al., supra). Jede der oben beschriebenen Wirtszellen oder vorzugsweise eine DHFR-defiziente CHO-Zelllinie (z. B. CHO DHFR$^-$ Zellen, ATCC Zugangsnr. CRL 9096) sind unter den Wirtszellen, die zur DHFR-Selektion einer stabil transfizierten Zelllinie oder DHFR-mediierten Genamplifikation bevorzugt werden.

[0090] Sobald das rekombinante Cdi1-Protein exprimiert wird, wird es z. B. unter Verwendung von Affinitätschromatographie isoliert. In einem Beispiel kann ein Anti-Cdi1-Antikörper (z. B. wie hierin beschrieben hergestellt) an eine Säule angebracht und zur Isolierung des Cdi1-Polypeptids verwendet werden. Lyse und Fraktionierung der Cdi1-beherbergenden Zellen vor der Affinitätschromatographie kann durch Standardverfahren durchgeführt werden (siehe z. B. Ausubel et al., supra). Alternativ kann ein Cdi1-Fusionsprotein, zum Beispiel ein Cdi1-Maltose-bindendes Protein, eine Cdi1-β-Galactosidase oder ein Cdi1-trpE-Fusionsprotein konstruiert und zur Isolierung des Cdi1-Protein verwendet werden (siehe z. B. Ausubel et al., supra; New England Biolabs, Beverly, MA).

[0091] Nach der Isolierung kann das rekombinante Protein, falls gewünscht, weiter gereinigt werden, z. B. durch Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (siehe z. B. Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, Hrsg., Work and Burdon, Elsevier, 1980).

[0092] Erfindungsgemäße Polypeptide, insbesondere kurze Cdi1-Fragmente, können auch durch chemische Synthese hergestellt werden (z. B. durch Verfahren, die in Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Aufl., 1984 The

Pierce Chemical Co., Rockford IL) beschrieben sind.

[0093] Diese allgemeinen Techniken der Polypeptidexpression und -reinigung können auch verwendet werden, um verwendbare Cdi1-Fragmente oder -Analoga (unten beschrieben) herzustellen und zu isolieren.

Anti-Cdi1-Antikörper

[0094] Humanes Cdi1 (oder immunogene Fragmente oder Analoga) können verwendet werden, um Antikörper zu züchten, die in der Erfindung verwendbar sind; solche Polypeptide können durch rekombinante oder Peptid-synthetische Techniken hergestellt werden (siehe z. B. Solid Phase Peptide Synthesis, supra; Ausubel et al., supra). Die Peptide können an ein Träger-Protein wie z. B. KLH, wie in Ausubel et al., supra, beschrieben, gekoppelt sein. Das KLH-Peptid wird mit Freund'schem Adjuvans gemischt und in Meerschweinchen, Ratten oder vorzugsweise Kaninchen injiziert. Die Antikörper können durch Peptidantigen-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

[0095] Monoklonale Antikörper können unter Verwendung der oben beschriebenen Cdi1-Polypeptide und Standard-Hybridomtechnologie hergestellt werden (siehe z. B. Kohler et al., Nature 256: 495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 511, 1976; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6: 292, 1976; Hammerling et al., In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Ausubel et al., supra).

[0096] Nach der Produktion werden polyklonale oder monoklonale Antikörper auf ihre spezifische Cdi1-Erkennung durch Western-Blot- oder Immunopräzipitationsanalyse (durch die in Ausubel et al., supra beschriebenenen Verfahren) getestet. Antikörper, die spezifisch ein Cdi1-Polypeptid erkennen, werden als nützlich für die Erfindung angesehen; solche Antikörper können verwendet werden, z. B. in einem Immunassay, um den Spiegel des durch einen Säuger produzierten Cdi1 zu beobachten.

Therapeutische und diagnostische Verwendungen für das Cdi1-Polypeptid

Therapie

[0097] Von dem erfindungsgemäßen Cdi1-Polypeptid wurde gezeigt, dass es mit einem Schlüsselregulator der humanen Zellteilung interagiert und dass es die in vivo-Proliferation von Hefe- und humanen Zellen inhibiert. Auf Grund seiner Rolle in der Kontrolle der Zellteilung ist Cdi1 ein ungewöhnlich guter Kandidat für ein Antikrebstherapeutikum. Vorzugsweise wird dieses Therapeutikum als ein Sense- oder Antisense-RNA-Produkt verabreicht, zum Beispiel durch Expression aus einem retroviralen Vektor, der zum Beispiel in das Knochenmark verabreicht wird. Die Behandlung kann mit traditionelleren Krebstherapien, wie z. B. Chirurgie, Bestrahlung oder anderen Formen der Chemotherapie, kombiniert werden.

[0098] Alternativ kann unter der Verwendung des hierin beschriebenen „Interaction-Trap"-Systems eine große Anzahl potenzieller Wirkstoffe, z. B. in Hefe, einfach auf solche gescreent werden, die die Interaktion zwischen Cdi1 und Cdc2 erhöhen oder erniedrigen. Wirkstoffe, die die Cdc2 : Cdi1-Interaktion erhöhen, würden die Reportergenexpression in dem vorliegenden System erhöhen, und umgekehrt würden Wirkstoffe, die die Cdc2 : Cdi1-Interaktion erniedrigen, die Reportergenexpression erniedrigen. Solche Wirkstoffe werden dann in Tiermodellen auf ihre Wirksamkeit getestet und, wenn dies erfolgreich ist, können sie als Antikrebstherapeutika entsprechend ihrer normalen Dosierung und ihrem üblichen Weg der Verabreichung verwendet werden.

Nachweis eines malignen Zustands

[0099] Cdi1-Polypeptide können auch diagnostische Verwendung in dem Nachweis oder der Beobachtung von krebsartigen Zuständen finden. Insbesondere, da Cdi1 in die Kontrolle der Zellteilung involviert ist, kann eine Veränderung in des Spiegels der Cdi1-Produktion einen malignen oder prämalignen Zustand anzeigen. Die Spiegel der Cdi1-Expression können durch jede beliebige Standardtechnik getestet werden. Zum Beispiel kann seine Expression in einer biologischen Probe (z. B. eine Biopsie) durch Standard-Northern-Blot-Analyse beobachtet werden oder durch PCR unterstützt werden (siehe z. B. Ausubel et al., supra; PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Hrsg. H. A. Ehrlich, Stockton Press, NY; und Yap und McGee, Nucl. Acids. Res. 19: 4294, 1991). Diese Techniken sind durch die Bereitstellung der Cdi1-Sequenz ausführbar.

[0100] Alternativ können Immunoassays verwendet werden, um das Cdi1-Protein in einer biologischen Probe nachzuweisen. Cdi1-spezifische, polyklonale, oder vorzugsweise monoklonale, Antikörper (hergestellt wie oben beschrieben) können in jedem beliebigen Immunoassay-Standardformat (z. B. ELISA, Western-Blot- oder RIA-Assay) verwendet werden, um Cdi1-Polypeptidspiegel zu messen; wiederum wäre der Vergleich mit den Wildtyp-Cdi1-Spiegel anzustellen und eine Veränderung in der Cdi1-Produktion würde auf einen malignen oder prämalignen Zustand hinweisen. Beispiele von Immunoassays sind z. B. in Ausubel et al., supra, beschrieben. Immunhistochemische Techniken können auch zum Cdi1-Nachweis eingesetzt werden. Zum Bei-

spiel kann eine Gewebeprobe von einem Patienten erhalten werden und ein Teil auf die Gegenwart von Cdi1 unter Verwendung eines Anti-Cdi1-Antikörpers und beliebiger Standard-Nachweissysteme (z. B. eines, das einen sekundären Antikörper einschließt, der an Meerrettichperoxidase konjugiert ist) gefärbt werden. Allgemeine Anweisungen hinsichtlich solcher Techniken können in z. B. Bancroft and Stevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 1982) und Ausubel et al. (supra) gefunden werden.

[0101] In einem besonderen Beispiel kann ein diagnostisches Verfahren auf den Nachweis gerichtet sein, ob das Cdi1-Gen eines Säugers die N-terminale PEST-Domäne-kodierende Sequenz einschließt. Da diese Sequenz sehr wahrscheinlich das Cdi1-Protein stabilisiert, kann seine Deletion in veränderten zellulären Spiegeln des Cdi1-Polypeptids resultieren und daher einen malignen oder prämalignen Zustand anzeigen. PEST-Deletionen können entweder durch Standard-Nukleinsäure- oder -Polypeptidanalysen identifiziert werden.

[0102] Das Cdi1-Polypeptid kann auch zur Identifizierung des Kompartments der Säugerzelle verwendet werden, in dem wichtige Zellteilungskontrollfunktionen auftreten. Spezifische Antikörper gegen Cdi1 können wie oben beschrieben hergestellt werden. Die normale subzelluläre Lokalisation des Proteins wird dann entweder in situ oder unter Verwendung fraktionierter Zellen durch immunologische oder immunhistologische Standardverfahren bestimmt (siehe z. B. Ausubel et al., supra; Bancroft und Stevens, Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 1982).

[0103] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können eingesetzt werden, um die hierin beschriebenen Störungen in einem jedem Säuger zu reduzieren oder diagnostizieren, zum Beispiel in Menschen, Haustieren oder Vieh. Wenn ein nicht-menschlicher Säuger behandelt wird, ist das eingesetzte Cdi1-Polypeptid oder der Antikörper vorzugsweise spezifisch für diese Spezies.

Andere Ausführungsformen

[0104] In anderen Ausführungsformen schließt die Erfindung jedes Protein ein, das im Wesentlichen zu dem humanen Cdi1 (**Fig.** 6, SEQ ID NR: 1) homolog ist; solche Homologe schließen andere im Wesentlichen reine, natürlich vorkommende Säuger-Cdi1-Proteine wie auch allelische Variationen; natürliche Mutanten; induzierte Mutanten; Proteine, die von DNA kodiert werden, die mit der Cdi1-Sequenz der **Fig.** 6 unter hoch stringenten Bedingungen oder niedrig stringenten Bedingungen (z. B. Waschen mit 2 × SSC bei 40°C mit einer Probenlänge von mindestens 40 Nukleotiden); und Polypeptide oder Proteine, die spezifisch von Antiseren gebunden werden, die gegen ein Cdi1-Polypeptid gerichtet sind, insbesondere durch Antiseren gegen das aktive Zentrum oder gegen die Cdc2-Bindungsdomäne von Cdi1, ein: Der Ausdruck schließt auch chimäre Polypeptide ein, die ein Cdi1-Fragment einschließen.

[0105] Die Erfindung schließt weiterhin Analoga eines jeden natürlich vorkommenden Cdi1-Polypeptids ein. Die Analoga können sich von dem natürlich auftretenden Cdi1-Protein durch Aminosäuresequenzunterschiede, durch post-translationale Modifikationen oder durch beides unterscheiden. Erfindungsgemäße Analoga werden im Allgemeinen mindestens 70%, mehr bevorzugt 80%, noch mehr bevorzugt 90% und am meisten bevorzugt 95% oder sogar 99% Homologie mit der gesamten oder einem Teil der natürlich vorkommenden Cdi1-Sequenz zeigen. Die Länge des Sequenzvergleichs wird mindestens 8 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 24 Aminosäurereste, und mehr bevorzugt mehr als 35 Aminosäurereste umfassen. Modifikationen schließen chemische Derivatisierung von Polypeptiden in vivo und in vitro, z. B. Acetylierung, Carboxylierung, Phosphorylierung oder Glycosylierung ein; solche Modifikationen können während der Polypeptidsynthese oder dem Prozessieren oder nach einer Behandlung mit isolierten modifizierenden Enzymen auftreten. Analoga können sich auch von dem natürlich auftretenden Cdi1-Polypeptid durch Veränderungen der Primärsequenz unterscheiden. Diese schließen genetische Varianten, sowohl natürliche als auch induzierte (zum Beispiel resultierend aus einer Zufallsmutagenese durch Bestrahlung oder Ethanmethylsulfatbehandlung oder durch ortspezifische Mutagenese, wie in Sambrook, Fritsch und Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Aufl.), CSH Press, 1989, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen; oder Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1989, hiermit durch Bezugnahme aufgenommen, beschrieben) ein. Auch eingeschlossen sind zyklisierte Peptidmoleküle und Analoga, die andere Reste als L-Aminosäuren enthalten, z. B. D-Aminosäuren oder nicht natürlich vorkommende oder synthetische Aminosäuren, z. B. β- oder γ-Aminosäuren.

[0106] Zusätzlich zu den Polypeptiden in voller Länge schließt die Erfindung auch Cdi1-Polypeptidfragmente ein. Der Begriff „Fragment", wie er hierin verwendet wird, meint mindestens 10 zusammenhängende Aminosäuren, vorzugsweise mindestens 30 zusammenhängende Aminosäuren, mehr bevorzugt mindestens 50 zusammenhängende Aminosäuren und am meisten bevorzugt mindestens 60 bis 80 oder mehr zusammenhängende Aminosäuren. Fragmente von Cdi1 können durch dem Fachmann bekannte Verfahren hergestellt werden oder können aus normalem Proteinprozessieren (z. B. Entfernen von Aminosäuren aus dem naszierenden Polypeptid, die für die biologische Aktivität nicht benötigt werden, oder Entfernen von Aminosäuren durch alternatives mRNA-Splicing oder alternative Proteinprozessierungsereignisse) resultieren.

[0107] Bevorzugte erfindungsgemäße Fragmente oder Analoga sind solche, die biologische Aktivität zeigen

(zum Beispiel die Fähigkeit, in die Säugerzellteilung einzugreifen, wie hierin untersucht). Vorzugsweise zeigt ein Cdi1-Polypeptid, -Fragment oder -Analogon mindestens 10%, mehr bevorzugt 30%, und am meisten bevorzugt 70% oder mehr der biologischen Aktivität des natürlich vorkommenden Cdi1-Polypeptids in voller Länge.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Brent, Roger
Gyuris, Jeno
Golemis, Erica

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: „Interaction Trap"-System zur Isolierung neuer Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 33

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:
(A) ADRESSAT: Fish & Richardson
(B) STRASSE: 225 Franklin Street
(C) STADT: Boston
(D) BUNDESSTAAT: Massachusetts
(E) LAND: U.S.A.
(F) PLZ: 02110-2804

(v) MASCHINENLESBARE FORM:
(A) ART DES MEDIUMS: 3,5" Diskette, 1,44 MB
(B) COMPUTER: IBM PS/2 Modell 50Z oder 55SX
(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS (Version 5.0)
(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.1)

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN PATENTANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER: 07/969,038
(B) ANMELDETAG: 10/30/92
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG:

(viii) ANGABEN ZUM ANWALT/VERTRETER:
(A) NAME: Clark, Paul T.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30,162
(C) REFERENZ-/LISTENNUMMER: 00786/143001

(ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFON: (617) 542-5070
(B) TELEFAX: (617) 542-8906
(C) TELEX: 200154

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 804
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
GGC ACT GGT CTC GAC GTG GGG CGG CCA GCG ATG GAG CCG CCC AGT TCA   48
Gly Thr Gly Leu Asp Val Gly Arg Pro Ala Met Glu Pro Pro Ser Ser
1               5                  10                  15

ATA CAA ACA AGT GAG TTT GAC TCA TCA GAT GAA GAG CCT ATT GAA GAT   96
Ile Gln Thr Ser Glu Phe Asp Ser Ser Asp Glu Glu Pro Ile Glu Asp
            20                  25                  30

GAA CAG ACT CCA ATT CAT ATA TCA TGG CTA TCT TTG TCA CGA GTG AAT  144
Glu Gln Thr Pro Ile His Ile Ser Trp Leu Ser Leu Ser Arg Val Asn
        35                  40                  45

TGT TCT CAG TTT CTC GGT TTA TGT GCT CTT CCA GGT TGT AAA TTT AAA  192
Cys Ser Gln Phe Leu Gly Leu Cys Ala Leu Pro Gly Cys Lys Phe Lys
    50                  55                  60

GAT GTT AGA AGA AAT GTC CAA AAA GAT ACA GAA GAA CTA AAG AGC TGT  240
Asp Val Arg Arg Asn Val Gln Lys Asp Thr Glu Glu Leu Lys Ser Cys
65                  70                  75                  80

GGT ATA CAA GAC ATA TTT GTT TTC TGC ACC AGA GGG GAA CTG TCA AAA  288
Gly Ile Gln Asp Ile Phe Val Phe Cys Thr Arg Gly Glu Leu Ser Lys
                85                  90                  95

TAT AGA GTC CCA AAC CTT CTG GAT CTC TAC CAG CAA TGT GGA ATT ATC  336
Tyr Arg Val Pro Asn Leu Leu Asp Leu Tyr Gln Gln Cys Gly Ile Ile
            100                 105                 110

ACC CAT CAT CAT CCA ATC GCA GAT GGA GGG ACT CCT GAC ATA GCC AGC  384
Thr His His His Pro Ile Ala Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ile Ala Ser
        115                 120                 125

TGC TGT GAA ATA ATG GAA GAG CTT ACA ACC TGC CTT AAA AAT TAC CGA  432
Cys Cys Glu Ile Met Glu Glu Leu Thr Thr Cys Leu Lys Asn Tyr Arg
    130                 135                 140

AAA ACC TTA ATA CAC TGC TAT GGA GGA CTT GGG AGA TCT TGT CTT GTA  480
Lys Thr Leu Ile His Cys Tyr Gly Gly Leu Gly Arg Ser Cys Leu Val
145                 150                 155                 160

GCT GCT TGT CTC CTA CTA TAC CTG TCT GAC ACA ATA TCA CCA GAG CAA  528
Ala Ala Cys Leu Leu Leu Tyr Leu Ser Asp Thr Ile Ser Pro Glu Gln
                165                 170                 175

GCC ATA GAC AGC CTG CGA GAC CTA AGA GGA TCC GGG GCA ATA CAG ACC  576
Ala Ile Asp Ser Leu Arg Asp Leu Arg Gly Ser Gly Ala Ile Gln Thr
            180                 185                 190

ATC AAG CAA TAC AAT TAT CTT CAT GAG TTT CGG GAC AAA TTA GCT GCA  624
Ile Lys Gln Tyr Asn Tyr Leu His Glu Phe Arg Asp Lys Leu Ala Ala
        195                 200                 205

CAT CTA TCA TCA AGA GAT TCA CAA TCA AGA TCT GTA TCA AGA          666
His Leu Ser Ser Arg Asp Ser Gln Ser Arg Ser Val Ser Arg
    210                 215                 220

TAAAGGAATT CAAATAGCAT ATATATGACC ATGTCTGAAA TGTCAGTTCT CTAGCATAAT 726

TTGTATTGAA ATGAAACCAC CAGTGTTATC AACTTGAATG TAAATGTACA TGTGCAGATA 786

TTCCTAAAGT TTTATTGA                                              804
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 5
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Glu Phe Pro Gly Ile
1 5

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GATCCTGCTG TATATAAAAC CAGTGGTTAT ATGTACAGTA CG **42**

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 42
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GACGACATAT ATTTTGGTCA CCAATATACA TGTCATGCCT AG **42**

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 9
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala
1 5

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 9
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 16
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AATTCGGCAC GAGGCG **16**

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 12
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GCCGTGCTCC GC **12**

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 73
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Glu Asp Tyr Thr Lys Ile Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Val Val Tyr Lys Gly Arg Lys Lys Thr Thr Gly Gln Val Val Ala Met
20 25 30

Lys Lys Ile Arg Leu Glu Ser Glu Glu Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala
35 40 45

Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys Glu Leu Arg His Pro Asn Ile Val
50 55 60

Ser Leu Gln Asp Val Leu Met Gln Asp

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 73
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Glu Asn Phe Gln Lys Val Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Val Val Tyr Lys Ala Arg Asn Lys Leu Thr Gly Glu Val Val Ala Leu
20 25 30

Lys Lys Ile Arg Leu Asp Thr Glu Thr Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala
35 40 45

Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys Glu Leu Asn His Pro Asn Ile Val
50 55 60

Lys Leu Leu Asp Val Ile His Thr Glu
65 70

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 82
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Ser Gly Glu Leu Ala Asn Tyr Lys Arg Leu Glu Lys Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Thr Tyr Gly Val Val Tyr Lys Ala Leu Asp Leu Arg Pro Gly Gln
20 25 30

Gly Gln Arg Val Val Ala Leu Leu Lys Lys Ile Arg Leu Glu Ser Glu
35 40 45

Asp Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys
50 55 60

Glu Leu Lys Asp Asp Asn Ile Val Arg Leu Tyr Asp Ile Val His Ser
65 70 75 80

Asp Ala

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 73
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Glu Asp Phe Glu Lys Ile Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly
1 5 10 15

Val Val Tyr Lys Gly Arg Asn Arg Leu Thr Gly Gln Ile Val Ala Met
20 25 30

Lys Lys Ile Arg Leu Glu Ser Asp Asp Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala
35 40 45

Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys Glu Leu Lys His Glu Asn Ile Val
50 55 60

Cys Leu Glu Asp Val Leu Met Glu Glu
65 70

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 77
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Thr Thr Ile Leu Asp Asn Phe Gln Arg Ala Glu Lys Ile Gly Glu
1 5 10 15

Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Lys Ala Arg Ser Asn Ser Thr Gly Gln
20 25 30

Asp Val Ala Leu Lys Lys Ile Arg Glu Leu Gly Glu Thr Glu Gly Val
35 40 45

Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys Asn Leu Lys His
50 55 60

Pro Asn Val Val Gln Leu Phe Asp Val Val Ile Ser Gly
65 70 75

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 86
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

```
Met Pro Lys Arg Ile Val Tyr Asn Ile Ser Ser Asp Phe Gln Leu Lys
 1               5                  10                  15

Ser Leu Leu Gly Glu Gly Ala Tyr Gly Val Val Cys Ser Ala Thr His
            20                  25                  30

Lys Pro Thr Gly Glu Ile Val Ala Ile Lys Lys Ile Glu Pro Phe Asp
        35                  40                  45

Lys Pro Leu Phe Ala Leu Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Ile Leu Lys
    50                  55                  60

His Phe Lys His Glu Asn Ile Ile Thr Ile Phe Asn Ile Gln Arg Pro
65                  70                  75                  80

Asp Ser Phe Glu Asn Phe
                85
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 84
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

```
Ser Arg Leu Tyr Leu Ile Phe Glu Phe Leu Ser Met Asp Leu Lys Lys
 1               5                  10                  15

Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Pro Gly Gln Tyr Met Asp Ser Ser Leu Val
            20                  25                  30

Lys Ser Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe Cys His Ser
        35                  40                  45

Arg Arg Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln Asn Leu Leu Ile Asp
    50                  55                  60

Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ala Phe
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Ile
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

```
Asn Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Phe Leu His Gln Asp Leu Lys Lys
 1               5                  10                  15

Phe Met Asp Ala Ser Ala Leu Thr Gly Ile Pro Leu Pro Leu Ile Lys
            20                  25                  30

Ser Tyr Leu Phe Gln Leu Leu Gln Gly Leu Ala Pro Cys His Ser His
        35                  40                  45

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

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

Val Pro Val
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 84
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

```
His Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Phe Leu Asp Leu Asp Leu Lys Arg
 1               5                  10                  15

Tyr Met Glu Gly Ile Pro Lys Asp Gln Pro Leu Gly Ala Asp Ile Val
            20                  25                  30

Lys Lys Phe Met Met Gln Leu Cys Lys Gly Ile Ala Tyr Cys His Ser
        35                  40                  45

His Arg Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln Asn Leu Leu Ile Asn
    50                  55                  60

Lys Asp Gly Asn Leu Lys Leu Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ala Phe
65                  70                  75                  80

Gly Val Pro Leu
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 84
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

```
Asn Arg Ile Tyr Leu Ile Phe Glu Phe Leu Ser Met Asp Leu Lys Lys
 1               5                  10                  15

Tyr Met Asp Ser Leu Pro Val Asp Lys His Met Glu Ser Glu Leu Val
            20                  25                  30

Arg Ser Tyr Leu Tyr Gln Ile Thr Ser Ala Ile Leu Phe Cys His Arg
        35                  40                  45

Arg Arg Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln Asn Leu Leu Ile Asp
    50                  55                  60

Lys Ser Gly Leu Ile Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Gly Arg Ser Phe
65                  70                  75                  80

Gly Ile Pro Val
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 82
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

```
Asn Asn Leu Tyr Met Ile Phe Glu Tyr Leu Asn Met Asp Leu Lys Lys
 1               5                  10                  15

Leu Met Asp Lys Lys Lys Asp Val Phe Thr Pro Gln Leu Ile Lys Ser
            20                  25                  30

Tyr Met His Gln Ile Leu Asp Ala Val Gly Phe Cys His Thr Asn Arg
        35                  40                  45

Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln Asn Leu Leu Val Asp Thr Ala
    50                  55                  60

Gly Lys Ile Lys Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Phe Asn Val
65                  70                  75                  80

Pro Met
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 86
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

```
Asn Glu Val Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Met Gln Thr Asp Leu His Arg
 1               5                  10                  15

Val Ile Ser Thr Gln Met Leu Ser Asp Asp His Ile Gln Tyr Phe Ile
            20                  25                  30

Tyr Gln Thr Leu Arg Ala Val Lys Val Leu Glu Gly Ser Asn Val Ile
        35                  40                  45

His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Ile Asn Ser Asn Cys Asp
    50                  55                  60

Leu Lys Val Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ile Ile Asp Glu Ser Ala
65                  70                  75                  80

Ala Asp Asn Ser Glu Pro
                85
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

```
Arg Val Tyr Thr His Glu Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Glu
 1               5                  10                  15

Val Leu Leu Gly Ser Ala Arg Tyr Ser Thr Pro Val Asp Ile Trp Ser
            20                  25                  30

Ile Gly Thr Ile Phe Ala Glu Leu Ala Thr Lys Lys Pro Leu Phe His
        35                  40                  45

Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Arg Ile Phe Arg Ala Leu Gly
    50                  55                  60

Thr Pro Asn Asn Glu Val Trp Pro Glu Val Glu Ser Leu Gln Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Asn Thr
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 22:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

```
Arg Thr Tyr Thr His Glu Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 1               5                  10                  15

Ile Leu Leu Gly Cys Lys Tyr Tyr Ser Thr Ala Val Asp Ile Trp Ser
            20                  25                  30

Leu Gly Cys Ile Phe Ala Glu Met Val Thr Arg Arg Ala Leu Phe Pro
        35                  40                  45

Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Arg Ile Phe Arg Thr Leu Gly
    50                  55                  60

Thr Pro Asp Glu Val Val Trp Pro Gly Val Thr Ser Met Pro Asp Tyr
65                  70                  75                  80

Lys Pro Ser
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 23:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

```
Arg Ala Tyr Thr His Glu Ile Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 1               5                  10                  15

Val Leu Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ser Thr Gly Val Asp Thr Trp Ser
            20                  25                  30

Ile Gly Cys Ile Phe Ala Glu Met Cys Asn Arg Lys Pro Ile Phe Ser
        35                  40                  45

Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Lys Ile Phe Arg Val Leu Gly
    50                  55                  60

Thr Pro Asn Glu Ala Ile Trp Pro Asp Ile Val Tyr Leu Pro Asp Phe
65                  70                  75                  80

Lys Pro Ser
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 24:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

```
Arg Ile Tyr Thr His Glu Ile Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 1               5                  10                  15

Val Leu Leu Gly Ser Pro Arg Tyr Ser Cys Pro Val Asp Ile Trp Ser
            20                  25                  30

Ile Gly Cys Ile Phe Ala Glu Met Ala Thr Arg Lys Pro Leu Phe Gln
        35                  40                  45

Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Lys Ile Phe Arg Val Leu Gly
    50                  55                  60

Thr Pro Asn Glu Ala Ile Trp Pro Asp Ile Val Tyr Leu Pro Asp Phe
65                  70                  75                  80
Lys Pro Ser
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 25:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 83
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

```
Arg Ala Tyr Thr His Glu Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 1               5                  10                  15

Ile Leu Leu Gly Thr Lys Phe Tyr Ser Thr Gly Val Asp Ile Trp Ser
            20                  25                  30

Leu Gly Cys Ile Phe Ser Glu Met Ile Met Arg Arg Ser Leu Phe Pro
        35                  40                  45

Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Tyr Arg Ile Phe Arg Thr Leu Ser
    50                  55                  60

Thr Pro Asp Glu Thr Asn Trp Pro Gly Val Thr Gln Leu Pro Asp Phe
65                  70                  75                  80
Lys Thr Lys
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 26:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 90
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

```
Thr Gly Gln Gln Ser Gly Met Thr Glu Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr
 1               5                  10                  15

Arg Ala Pro Glu Val Met Leu Thr Ser Ala Lys Tyr Ser Arg Ala Met
            20                  25                  30

Asp Val Trp Ser Cys Gly Cys Ile Leu Ala Glu Leu Phe Leu Arg Arg
        35                  40                  45

Pro Ile Phe Pro Gly Arg Asp Tyr Arg His Gln Leu Leu Leu Ile Phe
    50                  55                  60

Gly Ile Ile Gly Thr Pro His Ser Asp Asn Asp Leu Arg Cys Ile Glu
65                  70                  75                  80

Ser Pro Arg Ala Arg Glu Tyr Ile Lys Ser
                85                  90
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 27:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 57
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

```
Phe Pro Lys Trp Lys Pro Gly Ser Leu Ala Ser His Val Lys Asn Leu
 1               5                  10                  15

Asp Glu Asn Gly Leu Asp Leu Leu Ser Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Arg Ile Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn His Pro Tyr Phe Asn
        35                  40                  45

Asp Leu Asp Asn Gln Ile Lys Lys Met
    50                  55
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 28:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 59
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

```
Phe Pro Lys Trp Ala Arg Gln Asp Phe Ser Lys Val Val Pro Pro Leu
 1               5                  10                  15

Asp Glu Asp Gly Ile Asp Leu Leu Asp Lys Leu Leu Ala Tyr Asp Pro
            20                  25                  30
```

Asn Lys Arg Ile Ser Ala Lys Ala Ala Leu Ala His Pro Phe Thr Gln
35 40 45

Asp Val Thr Lys Pro Val Pro His Leu Arg Leu
50 55

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 57
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Phe Pro Gln Trp Arg Arg Lys Asp Leu Ser Asn Gln Leu Lys Asn Leu
1 5 10 15

Asp Ala Asn Gly Ile Asp Leu Ile Gln Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro
20 25 30

Val His Arg Ile Ser Ala Lys Asp Ile Leu Glu His Pro Tyr Phe Asn
35 40 45

Gly Phe Gln Ser Gly Leu Val Arg Asn
50 55

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 57
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Phe Pro Gln Trp Arg Arg Lys Asp Leu Ser Asn Gln Leu Lys Asn Leu
1 5 10 15

Asp Ala Asn Gly Ile Asp Leu Ile Gln Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro
20 25 30

Val His Arg Ile Ser Ala Lys Asp Ile Leu Glu His Pro Tyr Phe Asn
35 40 45

Gly Phe Gln Ser Gly Leu Val Arg Asn
50 55

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 72
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

```
Phe Pro Arg Trp Glu Gly Thr Asn Met Pro Gln Pro Ile Thr Glu His
 1               5                  10                  15

Glu Ala His Glu Leu Ile Met Ser Met Leu Cys Tyr Asp Pro Asn Leu
            20                  25                  30

Arg Ile Ser Ala Lys Asp Ala Leu Gln His Ala Tyr Phe Arg Asn Val
        35                  40                  45

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

Ala Ser Arg Leu Thr Arg Leu Val
65                  70
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 32:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 60
(B) ART: Aminosäure
(C) STRÄNGIGKEIT:
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

```
Leu Pro Met Tyr Pro Ala Ala Pro Leu Glu Lys Met Phe Pro Arg Val
 1               5                  10                  15

Asn Pro Lys Gly Ile Asp Leu Leu Gln Arg Met Leu Val Phe Asp Pro
            20                  25                  30

Ala Lys Arg Ile Thr Ala Lys Glu Ala Leu Glu His Pro Tyr Leu Gln
        35                  40                  45

Thr Tyr His Asp Pro Asn Asp Glu Pro Glu Gly Glu
    50                  55                  60
```

(2) ANGABEN ZUR SEQUENZIDENTIFIKATIONSNUMMER: 33:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 345
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRÄNGIGKEIT: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

```
AAG CTT ATG GGT GCT CCT CCA AAA AAG AAG AGA AAG GTA GCT GGT ATC    48
Lys Leu Met Gly Ala Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Gly Ile
1               5                  10                  15
```

```
AAT AAA GAT ATC GAG GAG TGC AAT GCC ATC ATT GAG CAG TTT ATC GAC    96
Asn Lys Asp Ile Glu Glu Cys Asn Ala Ile Ile Glu Gln Phe Ile Asp
            20                  25                  30

TAC CTG CGC ACC GGA CAG GAG ATG CCG ATG GAA ATG GCG GAT CAG GCG   144
Tyr Leu Arg Thr Gly Gln Glu Met Pro Met Glu Met Ala Asp Gln Ala
        35                  40                  45

ATT AAC GTG GTG CCG GGC ATG ACG CCG AAA ACC ATT CTT CAC GCC GGG   192
Ile Asn Val Val Pro Gly Met Thr Pro Lys Thr Ile Leu His Ala Gly
    50                  55                  60

CCG CCG ATC CAG CCT GAC TGG CTG AAA TCG AAT GGT TTT CAT GAA ATT   240
Pro Pro Ile Gln Pro Asp Trp Leu Lys Ser Asn Gly Phe His Glu Ile
65                  70                  75                  80

GAA GCG GAT GTT AAC GAT ACC AGC CTC TTG CTG AGT GGA GAT GCC TCC   288
Glu Ala Asp Val Asn Asp Thr Ser Leu Leu Leu Ser Gly Asp Ala Ser
                85                  90                  95

TAC CCT TAT GAT GTG CCA GAT TAT GCC TCT CCC GAA TTC GGC CGA CTC   336
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Pro Glu Phe Gly Arg Leu
            100                 105                 110

GAG AAG CTT                                                      345
Glu Lys Leu
        115
```

Patentansprüche

1. Polypeptid umfassend eine Aminosäuresequenz, die identisch mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 1 ist.

2. DNA bestehend aus einer Sequenz, die ein Polypeptid nach Anspruch 1 kodiert.

3. DNA nach Anspruch 2, wobei die DNA eine cDNA ist.

4. Vektor umfassend die DNA nach einem der Ansprüche 2 oder 3.

5. Isolierte Zelle enthaltend die gereinigte DNA nach einem der Ansprüche 2 oder 3 oder den Vektor nach Anspruch 4.

6. Verfahren zum Herstellen eines rekombinanten Polypeptids nach Anspruch 1 umfassend
(a) Bereitstellen einer Zelle, die mit einer DNA nach einem der Ansprüche 2 oder 3 transformiert wurde, die zur Expression in der Zelle positioniert ist;
(b) Kultivieren der transformierten Zelle unter Bedingungen zum Exprimieren der DNA; und
(c) Isolieren des rekombinanten Polypeptids.

7. Gereinigter Antikörper, der spezifisch an ein Polypeptid nach Anspruch 1 bindet.

8. Verfahren zum Nachweisen einer malignen Zelle in einer biologischen Probe, wobei das Verfahren das Messen der Expression des Polypeptids nach Anspruch 1 in der Probe umfasst, wobei die Veränderung der Expression im Verhältnis zu einer Wildtypprobe die Gegenwart der malignen Zelle anzeigt.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

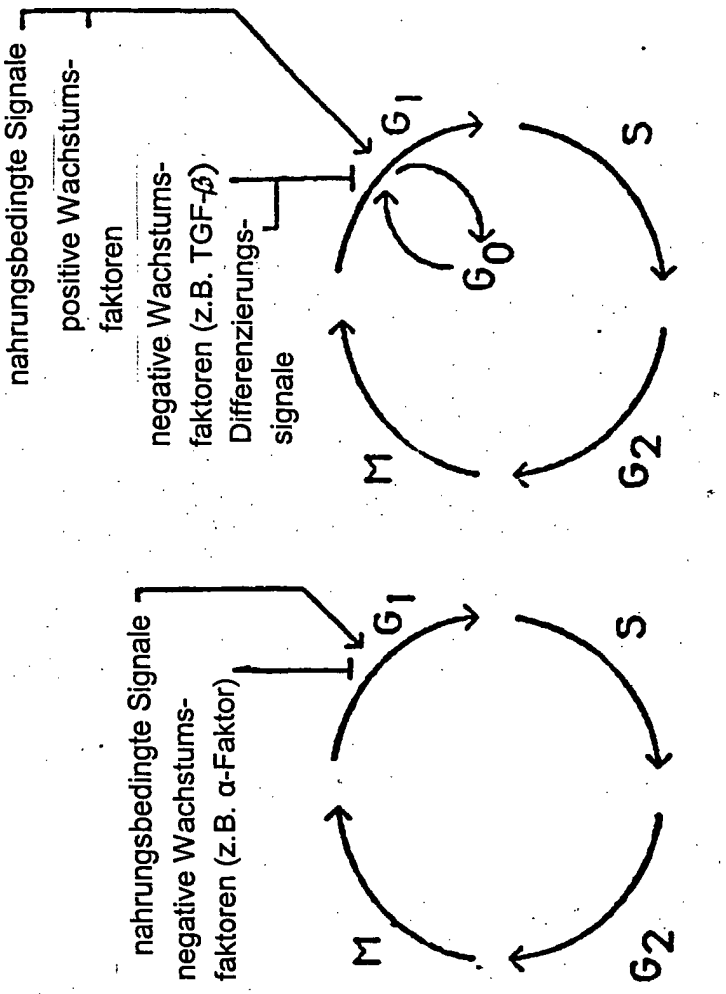

Fig. 1B

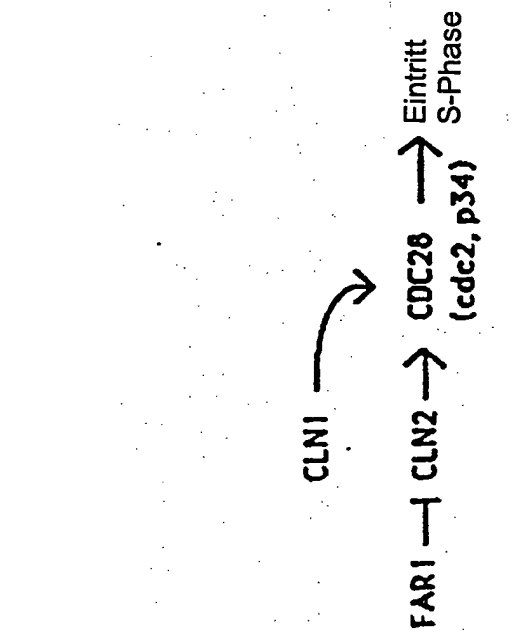

Fig. 1A

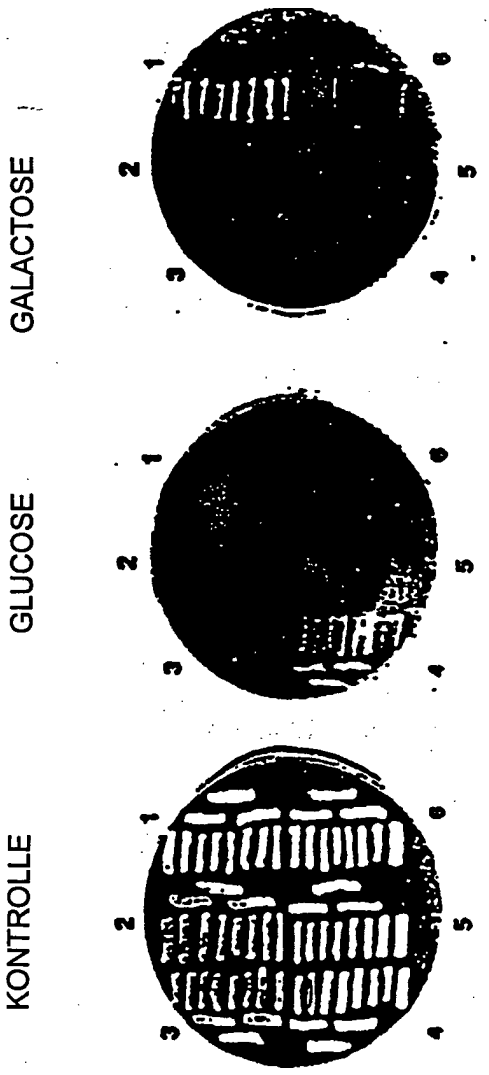

Fig. 2

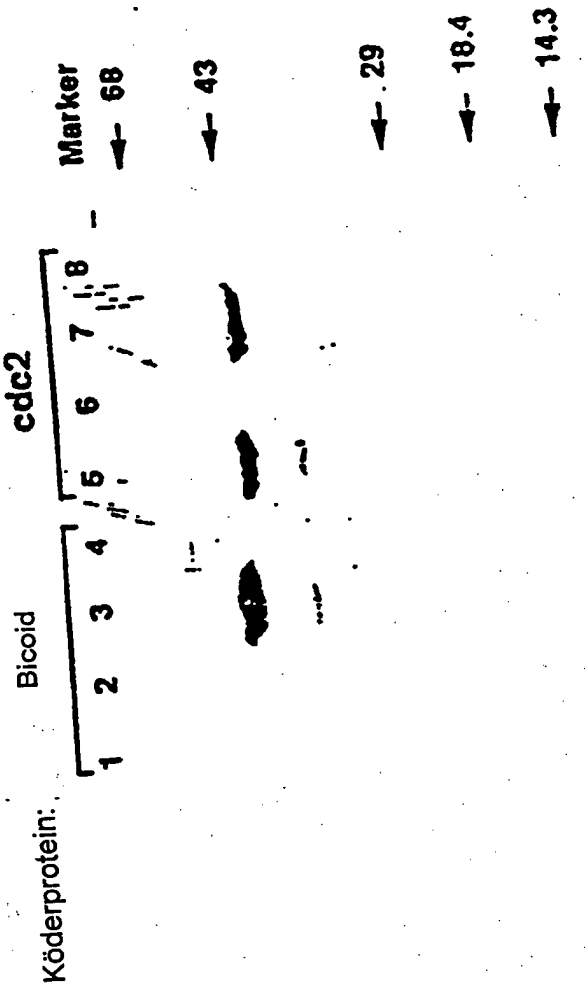

Fig. 3

```
                    -31  C GGC ACT GGT CTC GAC GTG GGG CGG CCA GCG

1       ATG GAG CCG CCC AGT TCA ATA CAA ACA AGT GAG TTT GAC TCA TCA GAT
1        M   E   P   P   S   S   I   Q   T   S   E   F   D   S   S   D

49      GAA GAG CCT ATT GAA GAT GAA CAG ACT CCA ATT CAT ATA TCA TGG CTA
17       E   E   P   I   E   D   E   Q   T   P   I   H   I   S   W   L

97      TCT TTG TCA CGA GTG AAT TGT TCT CAG TTT CTC GGT TTA TGT GCT CTT
33       S   L   S   R   V   N   C   S   Q   F   L   G   L   C   A   L

145     CCA GGT TGT AAA TTT AAA GAT GTT AGA AGA AAT GTC CAA AAA GAT ACA
49       P   G   C   K   F   K   D   V   R   R   N   V   Q   K   D   T

193     GAA GAA CTA AAG AGC TGT GGT ATA CAA GAC ATA TTT GTT TTC  TGC ACC
65       E   E   L   K   S   C   G   I   Q   D   I   F   V   F    C   T

241     AGA GGG GAA CTG TCA AAA TAT AGA GTC CCA AAC CTT CTG GAT CTC TAC
81       R   G   E   L   S   K   Y   R   V   P   N   L   L   D   L   Y

289     CAG CAA TGT GGA ATT ATC ACC CAT CAT CAT CCA ATC GCA GAT GGA GGG
97       Q   Q   C   G   I   I   T   H   H   H   P   I   A   D   G   G

337     ACT CCT GAC ATA GCC AGC TGC TGT GAA ATA ATG GAA GAG CTT ACA ACC
113      T   P   D   I   A   S   C   C   E   I   M   E   E   L   T   T

385     TGC CTT AAA AAT TAC CGA AAA ACC TTA ATA CAC TGC TAT GGA GGA CTT
129      C   L   K   N   Y   R   K   T   L   I   H   C   Y   G   G   L

432     GGG AGA TCT TGT CTT GTA GCT GCT TGT CTC CTA CTA TAC CTG TCT GAC
145      G   R   S   C   L   V   A   A   C   L   L   L   Y   L   S   D

481     ACA ATA TCA CCA GAG CAA GCC ATA GAC AGC CTG CGA GAC CTA AGA GGA
161      T   I   S   P   E   Q   A   I   D   S   L   R   D   L   R   G

529     TCC GGG GCA ATA CAG ACC ATC AAG  CAA TAC AAT TAT CTT CAT GAG TTT
177      S   G   A   I   Q   T   I   K    Q   Y   N   Y   L   H   E   F

577     CGG GAC AAA TTA GCT GCA CAT CTA TCA TCA AGA GAT TCA CAA TCA AGA
192      R   D   K   L   A   A   H   L   S   S   R   D   S   Q   S   R

625     TCT GTA TCA AGA TAA AGG AAT TCA AAT AGC ATA TAT ATG ACC ATG TCT
209      S   V   S   R   *

673     GAA ATG TCA GTT CTC TAG CAT AAT TTG TAT TGA AAT GAA ACC ACC AGT

721     GTT ATC AAC TTG AAT GTA AAT GTA CAT GTG CAG ATA TTC CTA AAG TTT

769     TAT TGA C
```

Fig. 4

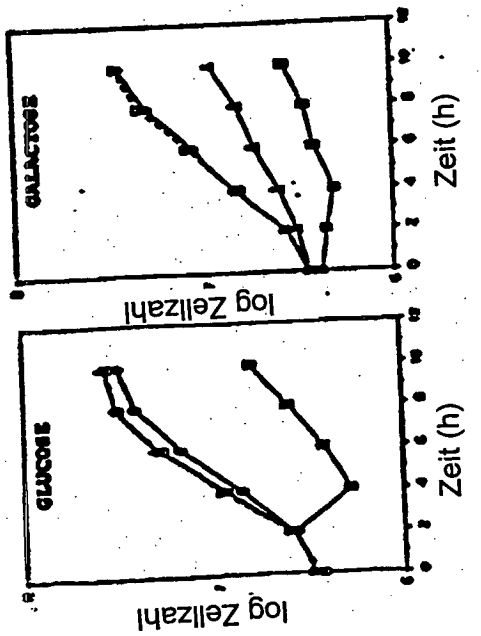

Fig. 5A

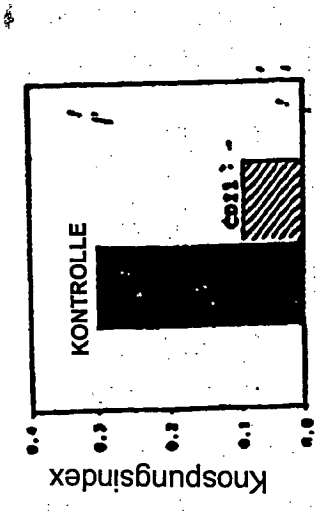

Fig. 5B

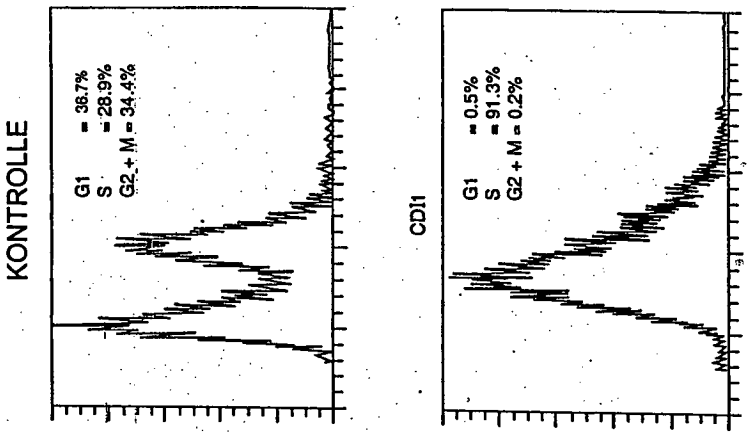

Fig. 5C



Fig. 6C



Fig. 6D



Fig. 6A



Fig. 6B

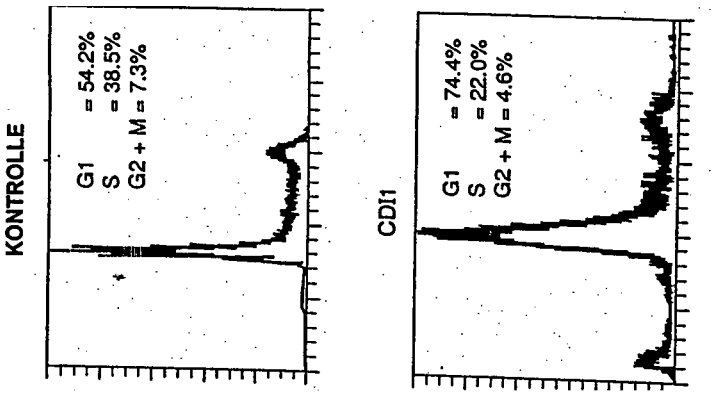
KONTROLLE
G1 = 54.2%
S = 38.5%
G2 + M = 7.3%
CDI1
G1 = 74.4%
S = 22.0%
G2 + M = 4.6%

Fig. 7B

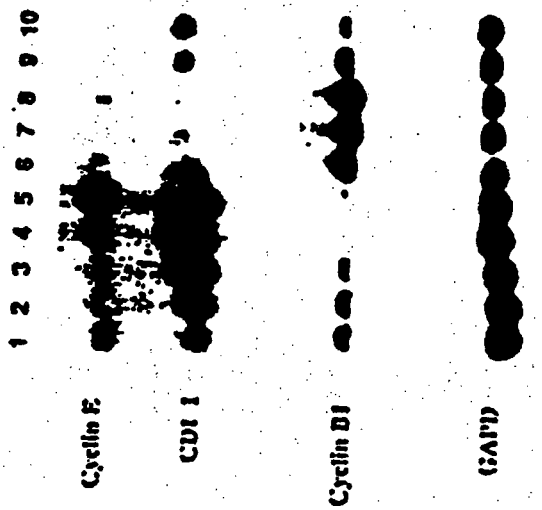
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Cyclin E
CDI 1
Cyclin D1
GAPD

Fig. 7A

DE 693 33 366 T2 2004.09.16

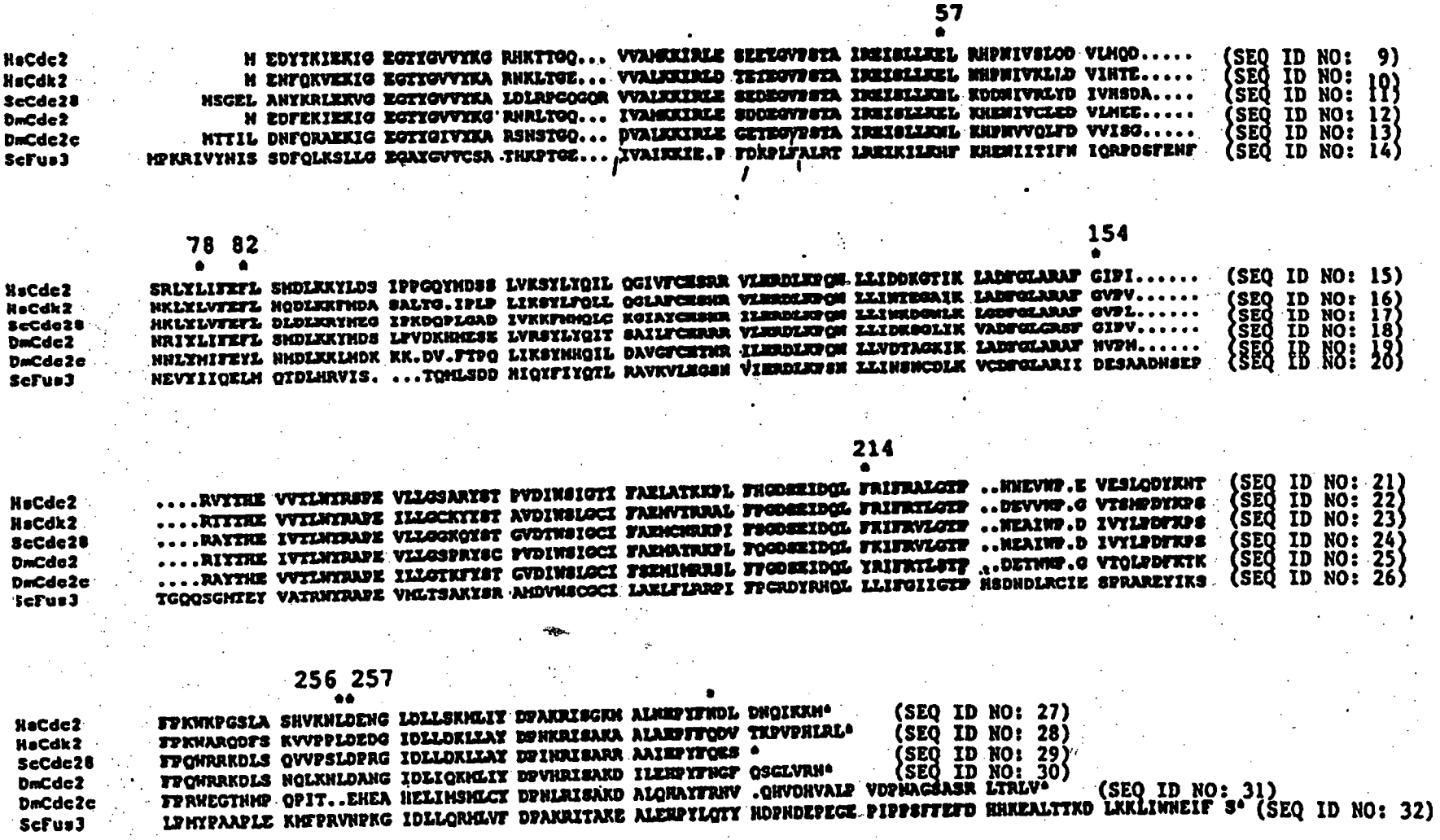

Fig. 8