



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 18 843 T2 2007.07.12**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 397 681 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/573 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 18 843.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE02/01268**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 739 056.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/103361**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.06.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.12.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.03.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.07.2007**

(30) Unionspriorität:
0102147 18.06.2001 SE

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

(73) Patentinhaber:
Biovitrum AB, Stockholm, SE

(72) Erfinder:
**BENDZ, Christina, S-178 38 EKERÖ, SE; LAKE,
Staffan, S-181 35 Lidingö, SE**

(74) Vertreter:
**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MITTELEN ZUR BEHANDLUNG VON DIABETES**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von humanen "MAP-Kinase interagierenden Kinasen" Mnk2a und Mnk2b in Verfahren für die Identifizierung von pharmazeutisch brauchbaren Mitteln, im speziellen Mittel, die für die Behandlung von Typ-II-Diabetes brauchbar sind.

STAND DER TECHNIK

[0002] Eines der bedeutendsten Hormone, die den Metabolismus beeinflussen, ist Insulin, welches in den Beta-Zellen von den Langerhansschen Inseln des Pankreas hergestellt wird. Insulin reguliert primär die Richtung des Metabolismus, indem es viele Vorgänge zur Speicherung von Substraten hin und weg von ihrem Abbau verlagert (für Überblickartikel siehe z.B. Shepherd, P.R., et al. (1998) *Biochem. J.* 333: 471-490; Alessi, D. R., & Downes, C.P. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 151-164). Insulin bewirkt eine Steigerung des Transports von Glucose und Aminosäuren, sowie von Schlüsselmineralien wie Natrium, Magnesium und Phosphat aus dem Blut in die Zellen hinein. Es reguliert ebenfalls eine Vielzahl an enzymatischen Reaktionen innerhalb der Zellen, welche allesamt eine gemeinsame Gesamtrichtung besitzen, nämlich die Synthese von großen Molekülen aus kleinen Einheiten. Ein Defizit in der Insulinfunktion (Diabetes mellitus) verursacht eine massive Beeinträchtigung bzgl. (i) der Speicherung von Glucose in der Form von Glykogen und der Oxidation von Glukose für Energie; (ii) der Synthese und Speicherung von Fett aus Fettsäuren und deren Vorläufern und der Vervollständigung der Fettsäureoxidation; und (iii) der Synthese von Proteinen aus Aminosäuren.

[0003] Es gibt zwei Arten von Diabetes. Typ-I ist der insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM; ehemals als Jugenddiabetes bezeichnet), für welchen Insulin-Injektion benötigt wird. Bei diesem Typ wird Insulin nicht vom Pankreas ausgeschieden und muss deshalb mittels Injektion genommen werden. Typ-II-Diabetes, nichtinsulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM), ist klinisch charakterisiert durch Hyperglykämie und Insulinresistenz und ist für gewöhnlich mit Adipositas assoziiert. Typ-II-Diabetes ist eine heterogene Gruppe von Fehlfunktionen, in welcher Hyperglykämie resultiert sowohl aus einer beeinträchtigten Insulinsekretionsantwort auf Glukose als auch einer verminderten Insulinwirksamkeit bei der Stimulierung von Glukoseaufnahme durch die Skelettmuskulatur und bei der Beschränkung der hepatischen Glukoseproduktion (Insulin-Resistenz). Bevor sich Diabetes entwickelt, verlieren die Patienten im Allgemeinen die frühe Insulinsekretionsantwort auf Glukose und könnten relativ große Mengen an Proinsulin sezernieren. Bei etabliertem Diabetes, obwohl Fasten-Plasmainsulinwerte normal sein können oder sogar erhöht bei Typ-II-Diabetes-Patienten, ist die durch Glukose stimulierte Insulinsekretion deutlich vermindert. Die verminderten Insulinwerte reduzieren die von Insulin vermittelte Glukoseaufnahme und sind nicht im Stande, die hepatische Glukoseproduktion zu beschränken.

[0004] Die Glukosehomöostase hängt von einem Gleichgewicht zwischen der Glukoseproduktion von der Leber und der Glukoseverwertung von Insulin-abhängigen Geweben, wie Fett und Muskel, und Insulin-unabhängigen Geweben, wie Gehirn und Niere, ab. In Typ-II-Diabetes ist der Zugang von Glukose in Fett und Muskel reduziert, und die Glukoseproduktion in der Leber ist aufgrund der Insulinresistenz in den Geweben verstärkt.

[0005] Die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) sind ein Haupttyp von Zelloberflächen-Rezeptoren. Die Liganden für RTKs sind Peptid/Protein-Hormone, einschließlich Nervenwachstumsfaktor (NGF), Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Insulin. Das Binden eines Liganden an eine RTK stimuliert die intrinsische Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors, welche anschließend eine Signal-Transduktions-Kaskade stimuliert, welche zu Änderungen in der zellulären Physiologie und Mustern der Genexpression führt. RTK-Signalwege besitzen ein breites Spektrum an Funktionen, welche die Regulation der Zellproliferation und Differenzierung, die Förderung des Zellüberlebens und die Modulation des zellulären Metabolismus einschließen.

[0006] Ras ist ein GTP-bindendes Schalterprotein, welches sich wie ein Schlüssel-Signalleitungsmolekül in Wegen, die durch die Aktivierung von RTKs ausgelöst werden, verhält. Alle Ras-gekoppelten RTKs in Säugerzellen scheinen einen hoch konservierten Signal-Transduktions-Weg zu verwenden, in welchem aktiviertes Ras eine Kinasekaskade induziert, welche ihren Höhepunkt in der Aktivierung von MAP-Kinase erreicht (Mitogen-aktivierte Proteinkinase). Diese Serin/Threoninkinase, welche in den Nukleus translozieren kann, phosphoryliert zahlreiche unterschiedliche Proteine, einschließlich Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von wichtigen zellzyklus- und differenzierungsspezifischen Proteinen reguliert.

[0007] Die Maus-Genprodukte Mnk1 und Mnk2 ("MAP-Kinase-interagierende Kinase" oder "MAP-Kinase-Si-

gnal integrierende Kinase" 1 und 2) sind Einzeldomänen-Serin/Threoninkinasen, welche 72% Sequenzidentität gemeinsam haben (Waskiewicz A.J. et al (1997) EMBO J. 16: 1909-1920; GenBank Zugangs-Nr. Y11091 und Y11092). Humanes Mnk1 ist ebenfalls beschrieben worden (Fukunaga, R. et al (1999) EMBO J. 16: 1921-1933; GenBank Zugangs-Nr. AB000409). All diese drei Proteine wurden anhand ihres Vermögens, fest an MAP-Kinasen zu binden, identifiziert. Mnk1 und Mnk2 binden beide die extrazellulären signalregulierten Kinasen ERK1 und ERK2, und Mnk1 bindet ebenfalls die Stress-aktivierte Kinase p38. Der eukaryontische Initiationsfaktor 4E (eIF4E) ist als eines der physiologischen Substrate von Mnk1 und Mnk2 identifiziert worden (Scheper, G.C., et al. (2001) Mol. Cell. Bio. 21: 743-754).

[0008] Das humane Mnk2-Gen ist durch ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifiziert und charakterisiert worden, bei welchem das Mnk2-Protein mit der Liganden-Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors θ (ER β) interagiert (Slentz-Kesler, K., et al (2000) Genomics 69: 63-71). Es wurde gezeigt, dass das humane Mnk2-Gen zwei C-terminale Spleissvarianten besitzt, bezeichnet als Mnk2a (die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Mnk2a wurden als SEQ ID-Nr. 1 beziehungsweise 2 bezeichnet; GenBank Zugangs-Nr. AF237775) und Mnk2b (die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Mnk2b wurden als SEQ ID-Nr. 3 beziehungsweise 4 bezeichnet; GenBank Zugangs-Nr. AF237776). Die zwei Isoformen sind über die ersten 385 Aminosäuren der codierenden Sequenz identisch und unterschieden sich nur im letzten Exon, welches zusätzliche 80 Reste für Mnk2a und 29 Reste für Mnk2b codiert. Es wurde weiter gezeigt, dass die Mnk2-Interaktion für den Östrogenrezeptor (ER) θ selektiv war, im Gegensatz zu ER α , und dass die Interaktion zu Mnk2b im Gegensatz zu Mnk2a und Mnk1 spezifisch war.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0009] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, welches den Effekt von Mnk2b-Überexpression in Adipozyten 3T3-L1, transfiziert mit GLU-REx3, CRE, IRE oder SREBP-RE, darstellt. Kontrollzellen wurden mit einem leeren Plasmidvektor transfiziert, und der Kontrollexpressionswert wurde auf 1,00 festgelegt.

[0010] Die [Fig. 2](#) ist ein Diagramm, welches den Effekt von Mnk2b auf die Glukoseaufnahme zeigt, wenn dieses in (2A) differenzierten Adipozyten 3T3-T1 und (2B) humaner neuronaler Zelllinie SHSY überexprimiert wird. Kontrollzellen (Ktrl.) wurden mit einem leeren Plasmidvektor transfiziert. Graue Balken zeigen nicht-stimulierte Zellen, weiße Balken zeigen Insulin-stimulierte Zellen.

[0011] Die [Fig. 3](#) ist ein Diagramm, welches den Effekt von Mnk2b-Überexpression und RNAi-Knockdown von Mnk2b-Expression auf die Glukoseaufnahme in humane Zellen darstellt.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0012] Es wurde überraschenderweise herausgefunden, dass Mnk2 im Insulin-Signalweg involviert ist.

[0013] In einem Aspekt zeichnet die Erfindung ein Verfahren für die Identifizierung eines Mittels aus, welches das Vermögen eines Mnk2-Polypeptids moduliert (erhöht oder erniedrigt), die Glukoseaufnahme in einer Zelle zu modulieren, wobei das Verfahren folgendes beinhaltet: das Kontaktieren eines Mnk2-Polypeptids mit einem Kandidatenmittel; und die Bestimmung des Effektes des Kandidatenmittels auf das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Glukoseaufnahme in einer Zelle zu modulieren. In einem Beispiel verringert das Kandidatenmittel das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Glukoseaufnahme in der Zelle zu vermindern.

[0014] In einem anderen Aspekt zeichnet sich die Erfindung durch ein Verfahren zur Identifizierung eines Mittels aus, welches das Vermögen eines Mnk2-Polypeptids, die Aktivität eines Glukose-Response-Elementes in einer Zelle zu modulieren, moduliert, wobei das Verfahren folgendes umfasst: Kontaktieren eines Mnk2-Polypeptids mit einem Kandidatenmittel; und die Bestimmung des Effektes des Kandidatenmittels auf das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Aktivität eines Glukose-Response-Elementes in einer Zelle zu modulieren. In einem Beispiel erniedrigt das Kandidatenmittel das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Aktivität eines Glukose-Response-Elementes (z.B. ein hier beschriebenes Response-Element) in der Zelle zu vermindern.

[0015] In einem anderen Aspekt zeichnet sich die Erfindung durch ein Verfahren für die Identifizierung eines Modulators der Glukoseaufnahme aus, wobei das Verfahren folgendes umfasst: Bereitstellen einer Zelle, die ein rekombinantes Mnk2-Polypeptid exprimiert; Exponieren der Zelle an ein Kandidatenmittel; und Messen der Glukoseaufnahme in der Zelle in Gegenwart des Kandidatenmittels, wobei eine veränderte Glukoseaufnahme in der Zelle in Gegenwart des Kandidatenmittels, im Vergleich zur Abwesenheit des Kandidatenmittels, zeigt, dass das Kandidatenmittel ein Modulator der Glukoseaufnahme ist. In einem Beispiel verursacht das Kandida-

tenmittel eine Erhöhung der Glukoseaufnahme.

[0016] Ein Kandidatenmittel kann zum Beispiel eine) Peptid, Peptidomimetikum, Aminosäure, Aminosäure-Analogon, Polynukleotid, Polynukleotid-Analogon, Nukleotid, Nukleotid-Analogon oder anderes kleines Molekül beinhalten. In einem Beispiel inhibiert das Kandidatenmittel eine biologische Mnk2-Aktivität, wie die Serin/Threonin-Kinaseaktivität, das Vermögen, die Glukoseaufnahme in einer Zelle zu reduzieren, das Vermögen, die Aktivität eines Glukose-Response-Elementes zu vermindern (z.B. ein hier beschriebenes Element), und/oder das Vermögen, einen hierin beschriebenen Mnk2-Liganden zu binden. In einer Ausführungsform bindet das Kandidatenmittel an ein Mnk2-Polypeptid oder eine Nukleinsäure (RNA oder DNA), welche ein Mnk2-Polypeptid codiert.

[0017] Die hier beschriebenen Screening-Methoden können optional einen Schritt der Einführung einer Nukleinsäure, codierend ein Mnk2-Polypeptid, in eine Zelle einschließen. Die Auswirkung eines Kandidatenmittels auf eine biologische Aktivität, hier beschrieben, kann in Gegenwart und/oder Abwesenheit eines Mnk2-Polypeptids oder einer Nukleinsäure, codierend ein Mnk2-Polypeptid, evaluiert werden. Die hier beschriebenen Verfahren können in vitro oder in vivo unter Anwendung eines zellbasierenden Systems, eines zellfreien Systems oder einer Kombination von zellbasierenden und zellfreien Systemen durchgeführt werden.

[0018] In einem anderen Aspekt zeichnet die Erfindung ein Verfahren zur Modulierung der Glukoseaufnahme in vitro in einer Zelle aus, wobei das Verfahren das Kontaktieren einer Zelle mit einer Menge einer Verbindung, die zur Modulierung der Expression oder Aktivität eines Mnk2-Polypeptids und somit zur Modulierung der Glukoseaufnahme in der Zelle wirksam ist, umfasst.

[0019] Das in den hier beschriebenen Verfahren verwendete Mnk2-Polypeptid kann ein Säuger-Mnk2-Polypeptid sein, z.B. ein humanes Mnk2-Polypeptid. Zum Beispiel kann das Mnk2-Polypeptid ein humanes Mnk2a- oder Mnk2b-Polypeptid sein.

[0020] Das Mnk2-Polypeptid kann eine Sequenz, ausgewiesen als SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4, besitzen. Ein Mnk2-Polypeptid kann sich auch von der korrespondierenden Sequenz, ausgewiesen als SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4, unterscheiden. Die Unterschiede sind vorzugsweise Unterschiede oder Änderungen an einem nicht essentiellen Rest oder eine konservative Substitution. In einer Ausführungsform beinhaltet das Mnk2-Polypeptid eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu etwa 60% identisch zu einer Sequenz ist, welche als SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4 gezeigt ist, oder einem Fragment davon. Bevorzugt ist die Aminosäuresequenz mindestens zu 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% oder mehr identisch zu SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4 und besitzt eine hier beschriebene biologische Mnk2-Aktivität. Die Aminosäuresequenz kann zum Beispiel identisch zu SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4 sein.

[0021] Bevorzugte Mnk2-Polypeptide weisen zumindest 10%, vorzugsweise zumindest 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% und mehr von der Länge der Sequenz auf, die als SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4 gezeigt ist, und besitzen eine hierin beschriebene biologische Mnk2-Aktivität. Ein Mnk2-Polypeptid kann zum Beispiel eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität besitzen, die Glukoseaufnahme in einer Zelle reduzieren, die Aktivität eines Glukose-Response-Elements senken (z.B. eines hierin beschriebenen Elementes) und/oder einen hierin beschriebenen Mnk2-Liganden binden.

[0022] Ein Mnk2-Polypeptid schließt ferner ein Polypeptid ein, das eine funktionelle Domäne des Polypeptids der hier beschriebenen SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4, z.B. eine Kinasedomäne, umfasst. In einer Ausführungsform besitzt das Mnk2-Polypeptid Kinaseaktivität.

[0023] Ein Mnk2-Polypeptid schließt auch ein Polypeptid ein, das mindestens 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 oder mehr fortlaufende Aminosäurereste der SEQ ID Nr.: 2 oder SEQ ID Nr.: 4, umfasst. Vorzugsweise hat das Polypeptid eine biologische Mnk2-Aktivität, die hierin beschrieben wird.

[0024] Das Mnk2-Polypeptid kann in einigen Aspekten der Erfindung im Wesentlichen ein reines Polypeptid sein. Der Ausdruck "im Wesentlichen rein", wie er hierin in Bezug auf ein gegebenes Polypeptid verwendet, bedeutet, dass das Polypeptid im Wesentlichen frei von anderen biologischen Makromolekülen ist. Zum Beispiel ist das im Wesentlichen reine Polypeptid zu mindestens 75%, 80%, 85%, 95% oder 99% bezüglich des Trockengewichtes rein. Reinheit kann durch jedes angemessene im Fachbereich bekannte Standardverfahren gemessen werden, zum Beispiel durch Säulenchromatographie, Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder HPLC-Analyse.

[0025] Durchgehend in dieser Beschreibung sollen die Ausdrücke "Standardprotokolle" und "Standardprozeduren", wenn im Zusammenhang mit molekularbiologischen Techniken benutzt, als Protokolle und Prozeduren verstanden werden, die in einem gewöhnlichen Laborhandbuch gefunden werden, wie etwa: Current Protocols in Molecular Biology, Herausgeber: F. Ausubel et al., John Wiley and Sons, Inc. 1994, oder Sambrook, J., Fritsch, E.E., und Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2te Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.

[0026] Falls nicht anderweitig definiert, haben alle hier benutzten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke dieselbe Bedeutung, wie allgemein verstanden von einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet, zu welchem diese Erfindung gehört. Angemessene Verfahren und Materialien sind nachstehend beschrieben, obwohl ähnliche und gleichwertige Verfahren und Materialien zu den hierin beschriebenen auch in der Praxis oder Prüfung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können. Alle Veröffentlichungen, Patentanmeldungen, Patente und andere hier erwähnte Referenzen sind durch den Bezug darauf in ihrer Gesamtheit einbezogen. Im Fall eines Konfliktes wird die vorliegende Beschreibung, einschließlich Definitionen, bestimmen. Zusätzlich sind die Materialien, Verfahren und Beispiele nur veranschaulichend und nicht einschränkend gemeint.

[0027] Nachstehend ist die Erfindung in den angehängten Beispielen beschrieben, welche zur Veranschaulichung der Erfindung beabsichtigt sind, ohne den Umfang der Erfindung einzuschränken.

BEISPIELE

BEISPIEL 1: Identifizierung von LK6 und Mnk

[0028] P-Element-vermittelte Mutagenese ist eine weit verbreitete Technologie in der Drosophila-Genetik (Cooley, L. et al. (1988) Science 239: 1121-1128, Robertson, H. M. et al. (1988) Genetics 118: 461-470). Das P-Element ist ein gut charakterisiertes transponierbares Element, welches erbliche Funktionsverlustmutationen in ein breites Spektrum von Genen einbringen kann. Gekoppelt mit genomischer Annotation der P-Element-Insertions-Stelle bieten P-Element-Bibliotheken ein wertvolles Instrument der reversen Genetik. Genetische Screens unter Verwendung von Bibliotheken von P-Insertionsmutanten in bekannten Genen ermöglichen ein zügiges Durchsuchen des Genoms für die Identifizierung potentieller Modifikator-Gene.

[0029] Verschlechterte Insulinrezeptor-Signalleitung besitzt eine phänotypische Erscheinungsform in kleinerer Zellgröße (Huang, H., et al. (1999) PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during Drosophila eye development. Development 126: 5365-5372.) Es wurde ein genetischer Screen durchgeführt, um Modifikatoren der Insulinrezeptor-Signalleitung zu identifizieren, unter Verwendung einer Bibliothek von P-Insertions-mutagenisierten Drosophila-Linien. In diesem Screen, wurde die phänotypische Erscheinungsform von kleinen Augen als Ablesung verwendet. Das D. melanogaster-Gen LK6 (GenBank Zugangs-Nr. U76378) wurde als ein schwacher, aber beständiger Verstärker des D. N.-Insulinrezeptor-Phänotyps identifiziert.

[0030] Das Drosophila melanogaster-L6K-Protein wurde in einer TBLASTN-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/education/blasttutorial.html>) in den öffentlichen Nukleotid-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) verwendet. Die humanen Treffer waren MNK1 (AB000409; e-Wert von e-113), MNK2a (AF237775; e-Wert von e-114) und MNK2b (AF237776; e-Wert von e-110). Somit wurde durch Bioinformatik-Analyse gefolgert, dass das D. melanogaster-Gen LK6 zwei humane Homologe, Mnk1 und Mnk2, besitzt.

BEISPIEL 2: Klonierung von MNK2b

[0031] Das 3'-Ende der Mnk2b-cDNA wurde aus dem Incyte-Klon Nr. 1309709 isoliert. Dieser Klon beinhaltet eine Sequenz entsprechend der letzten 570 bp von Mnk2b. Das cDNA-Insert des Incyte-Klons wurde durch Sequenzierung überprüft, ausgeführt durch das ABI PrismBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, und zwar mit dem Applied Biosystems Model ABI 377 XL/96 DNA Sequenzierungs-System.

[0032] Um einen cDNA-Klon, codierend das 5'-Ende von Mnk2b (670 bp), zu isolieren, wurde die öffentliche Mnk2b-Sequenz (GenBank Zugangs-Nr. AF237776 verwendet, um PCR-Primer für die PCR-Amplifikation zu konstruieren.

[0033] Als Matrize für das Klonieren wurde aus humaner Leber hergestellte cDNA verwendet. Eine Erststrang-cDNA-Synthese, unter Nutzung des SUPERScript Choice Systems (Life Technologies; Kat. # 18090-019), wurde unter Verwendung von 1 µg humaner Leber-mRNA (Clontech; Kat. # 6510-1) mit statistischen Hexameren gemäß den Instruktionen des Herstellers ausgeführt.

[0034] Die 100 µl PCR wurde, unter Verwendung des "Nativen-Pfu-DNA-Polymerase"-Kits (Stratagene; Kat. # 600135) und 5 µl von jedem der genspezifischen Primer LAKQ166 (SEQ ID Nr.: 5) und LAKQ168 (SEQ ID Nr.: 6), durchgeführt. Der Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 wurde mit dem Programm verwendet: 1 Zyklus bei 94°C, 2 min; 60°C, 1 min; 74°C, 2 min; 25 Zyklen bei 94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 74°C, 2 min und schließlich 72°C, 7 min, gefolgt von einer Abkühlung auf 4°C. Zusätzliche fünf Runden der Amplifikation wurden wie oben durchgeführt, mit der Ausnahme jedoch, dass die Annealing-Temperatur auf 55°C gesenkt wurde.

[0035] Ein 15 µl-Aliquot der PCR wurde auf ein 1%iges Gel aus NuSieve GTG-Agarose von niedriger Schmelztemperatur geladen (FMC BioProduct; Kat. # 50082), und das Fragment von etwa 670 bp wurde aus dem Gel herausgeschnitten. 3 µl des isolierten Fragments wurden in 1 µl Plasmid pCR2.1-TOPO kloniert unter Verwendung des TOPO TA-Klonierungs-Kits (Invitrogen; Kat. # K4500-01). 3 µl der Ligations-Mischung wurden in chemisch kompetente E. coli One-Shot-Zellen TOP 10 (Invitrogen; Kat. # C4040-03) transformiert.

[0036] Plasmid-DNA aus drei Klonen (3 ml Übernachtskultur) wurden durch die Verwendung des QIAprep Spin Miniprep-Kits (QIAGEN, Kat. # 27104) erhalten, und die anschließende Sequenzierung (# A0452) wurde wie oben durchgeführt. Das Plasmid mit korrekter Sequenz wurde als pMB 1500 bezeichnet.

[0037] Die zwei Teile von Mnk2b, das 3'-Ende von Incyte 1309709 und das 5'-Ende von pMB1500 wurden durch eine Drei-Fragment-Ligation in pCR2.1-TOPO zusammengesetzt, wodurch man pBV 1556 erhielt.

[0038] 2,4 µl pBM1500 wurden mit EcoRI und SacI verdaut, und 1,8 µg des selben Plasmids wurden mit EcoRI und BglII verdaut. Die Hälfte der Verdauung wurden auf ein 1,2% E-Gel, Invitrogen, geladen und eine Bande von in etwa 3800 bp (Fragment a) wurde aus dem EcoRI-SacI-Verdau herausgeschnitten, und eine Bande von ungefähr 680 bp (Fragment b) wurde aus dem EcoRI-BglII Verdau herausgeschnitten. 2,7 µg des Plasmids Incyte 1309709 wurde mit SacI und BglII verdaut. Die Hälfte des Verdauung wurde auf ein E-Gel geladen und eine Bande von ungefähr 700 bp (Fragment c) wurde aus dem Gel herausgeschnitten. Die Fragmente wurden durch das QIAquick Gel-Extraktionskit (Qiagen; Kat. # 28704) und nachfolgende Elution in 50 µl H₂O aufgereinigt.

[0039] Die Ligation wurde unter Verwendung von Ready-To-Go T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia Biotech; Kat. # 27-0361-01) durchgeführt. 6 µl von Fragment A wurde mit 7 µl der Fragmente B bzw. C gemischt. Die Ligations-Mischung wurde in chemisch kompetente Top10 E. coli One-Shot-Zellen transformiert, und die Plasmid-DNA wurde wie oben erhalten. Kontrollverdauung unter Verwendung der für das Klonieren verwendeten Restriktionsenzyme EcoRI, SacI und BglII bestätigten das Insert.

[0040] Mnk2b zur Säuger-Expression wurde durch Anwendung von "Gateway™ Cloning Technology" von Life Technologies hergestellt. Gateway-kompatible Primer wurden entworfen (SEQ ID Nr.: 7 und 8), und die PCR wurde unter Verwendung von pBV 1556 als Matrize durchgeführt. Die PCR wurde in 50 µl unter Verwendung von Taq-DNA-Polymerase, Roche (Kat. # 1 435 094) und 1 µl von jedem der Primer BEKA 248 und BEKA 247 durchgeführt. Das Perkin Elmer "Gene Amp" PCR-System 2400 wurde mit folgendem Programm verwendet: 95°C, 5 min; (95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 2 min) × 25; und 72°C, 7 min; gefolgt von Abkühlen auf 4°C. 10 µl der Reaktion wurde auf ein 1,2% E-Gel geladen, und ein Fragment von ungefähr 1400 bp wurde aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick-Gelextraktions-Kits aufgereinigt.

[0041] Das PCR-Fragment wurde in pDONR201 (Life Technologies; Kat. # 11798-014) gemäß der Instruktionen des Herstellers kloniert. Der resultierende Eingangsklon wurde als pBV27 bezeichnet, und das Insert wurde durch Sequenzierung bestätigt. Ein Säuger-Expressionsklon mit einer 5'-GST-Fusion, bezeichnet als pBV44 (SEQ ID Nr.: 9), wurde (gemäß den Instruktionen des Herstellers) unter Verwendung des Destinationsvektors pDEST27 (Life Technologies; Kat. # 11812-013) konstruiert. In der SEQ ID Nr.: 9 repräsentieren die Aminosäuren 1 bis 226 die GST-Domäne, während die Aminosäuren 237 bis 649 das humane Mnk2b repräsentieren.

BEISPIEL 3: Expressionsprofil

[0042] Um die relativen Expressions-Spiegel von MNK2b in unterschiedlichen Geweben zu bestimmen, wurde ein Mehrfachgewebe-Expressions-Feld bzw. "Multiple Tissue Expression Array" (CLONTECH; Kat. # 775) in einem Hybridisierungsexperiment mit einer 106 bp langen Genspezifischen Sonde verwendet.

[0043] Der MNK2b-cDNA-Klon pBV27 wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und PpuMI verdaut. Die Fragmente wurden auf einem 1,2%-Agarosegel (Invitrogen; Kat. # G5018-01) aufgetrennt. Das 106 bp große Fragment wurde aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gelextraktions-Kits (QI-

AGEN; Kat. # 28704) gereinigt.

[0044] 25 ng des gereinigten Fragmentes wurde in einer ³²P-Markierungsreaktion verwendet, durchgeführt mit Reagenzien, wie im "Strip-EZ DNA-Sonden-Synthese"-Instruktionshandbuch (Ambion; Kat. # 1470) empfohlen. Das in der Reaktion verwendete [α -³²P] dATP wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Kat. # AA0004) erworben.

[0045] Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurden, wie im CLONTECH-Handbuch PT3307-1 empfohlen, ausgeführt. Der MTE-Array wurde in einer STORM860 Phosphor Screen während 70 Stunden exponiert. ImageQuant wurde verwendet, um das Hybridisierungssignal zu analysieren.

[0046] Die Ergebnisse zeigten die höchsten Expressionsspiegel für MNK2b im Skelettmuskel. Dies war unerwartet, weil veröffentlichte Ergebnisse bei adultem Mäusegewebe Expression von Mnk2-mRNA in allen untersuchten Geweben, außer dem Gehirn, zeigten (Waskiewicz, A. J., et al. (1997) EMBO J. 16: 1909-1920).

BEISPIEL 4: Überexpression von Mnk2b beeinflusst das Glukose-Ansprechverhalten und den Lipidmetabolismus in Adipozyten der Maus

[0047] Induzierbare Reportervektoren, welche das Photinus pyralis (Leuchtkäfer) Luciferase-Reportergen beinhalten, gesteuert durch ein basales Promotorelement (TATA-Box), sowie auch induzierbare cis-Enhancer-Elemente (direkte Wiederholungseinheiten bzw. Repeats aus der Promotorregionen von verschiedenen Genen) wurden hergestellt oder gekauft. Die Reportervektoren sind für die in vivo-Ablesung von Signal-Transduktionswegen entworfen, weil die Enhancer Konvergenzpunkte von vielen Signal-Transduktionswegen sind. Wenn ein Plasmid, welches das Gen von Interesse exprimiert, in Säugerzellen mit einem cis-Reporter-Plasmid cotransfiziert wird, zeigt die erhöhte Luciferase-Expression entweder direkt oder indirekt transkriptionelle Aktivierung an.

[0048] Ein Vektor, bezeichnet als pGluREx3-Luciferase ((gtgCACGTGtgaCAGCTGcaa)x3), wurde unter Verwendung des pTAL-Promotor-Vektors (Clontech; Kat. # 6252) hergestellt. Der pGluREx3-Vektor wurde entworfen, um Effekte bzgl. der Glukoseantwort (Portois, L., et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 8181-8190) zu überwachen bzw. zu verfolgen.

[0049] Ein Vektor, bezeichnet als pSREBP-Luciferase (aTCACcCCAC), wurde durch Klonierung zweier Sterol-regulatorisches-Element-Bindungsprotein(SREBP)-Response-Elemente in den pGLE2-Promotor-Vektor (Promega; Kat. # E1631) hergestellt. Der pSREBP-Vektor wurde entworfen, um Effekte bzgl. des Steroid-Response-Elementes zu verfolgen (Yokoyama, C., et al. (1993) Cell 75: 187-197).

[0050] Der Vektor pCRE-Luciferase, entworfen, um die Aktivierung von cAMP-Bindeprotein (CREB) und cAMP-vermittelter Signal-Transduktionwege zu verfolgen, wurde von Stratagene gekauft (Kat. # 219075).

[0051] Ein Vektor, bezeichnet als pIRE-Luciferase ((tagCAAACAaactTATTTTgaaca)x3), wurde unter Verwendung des pGL2-Promotor-Vektors (Promega; Kat. # E1631), hergestellt. Der pIRE-Vektor wurde entworfen, um Insulin-Rezeptor-vermittelte-Signalgebung durch das Insulinähnliche-Wachstumsfaktor-Bindeprotein (IGFBP-1) zu verfolgen.

[0052] Mäuse-Adipozyten (differenzierte 3T3-L1-Zellen) wurden transient mit dem Response-Element-Konstrukt von Interesse infiziert, in Kombination mit Mnk2b oder einem Grundgerüst(Kontroll)-Plasmid-Konstrukt, unter Verwendung von LipofectAmineTM2000 (Life Technologies). Nach 48 Std. wurden die Zellen unter Verwendung eines Lyse-Puffers (Tris-EDTA + 0,25% Triton-X100) während 10 min bei Raumtemperatur lysiert, und die Luciferase-Aktivität wurde unter Verwendung eines Luciferase-Aktivitäts-Assays (BioThema) gemessen.

[0053] Die Ergebnisse ([Fig. 1](#)) zeigen, dass Mnk2b-Überexpression in Mäuse-Adipozyten zu einer 70%-Verminderung der Aktivität des GLUx3-Luciferase-Reporters führte, was eine Verminderung des Glukose-Ansprechverhaltens in den Zellen anzeigt. Nach dem Wissen der Erfinder, gibt es keine zuvor offenbarten Ergebnisse, welche eine Verbindung zwischen Mnk2b und Glukoseaufnahme zeigen.

[0054] Die in [Fig. 1](#) gezeigten Ergebnisse zeigen weiter, dass Mnk2b-Überexpression in Mäuse-Adipozyten zu einer verminderten Aktivität des SREBP-Response-Elementes führt. Unsere Schlussfolgerung ist, dass Mnk2b den Lipidmetabolismus beeinflusst, weil gezeigt wurde, dass das SREBP-Response-Element die Tran-

skription vom z.B. Niedrig-Dichte-Lipoprotein-Rezeptor-Gen steuert (Yokoyama, C., et al. (1993) Cell 75: 187-197), und den Cholesterin-Metabolismus reguliert (Brown, M. S., und Goldstein, J. L. (1997) Cell 83: 331-340).

[0055] Die Überexpression von Mnk2b in Mäuse-Adipozyten führt ebenfalls zu verminderter Aktivität von den pCRE- und pIRE-Reportern. Diese Ergebnisse bestätigen veröffentlichte Daten über Mnk2b als Teil des MAP-Kinase-Signalgebungsweges (Waskiewicz, A., et al. (1997) EMBO J. 16: 1909-1920; Fukunaga, R., und Hunter, T. (1997) EMBO J. 16: 1921-1933).

BEISPIEL 5: Mnk2b-Überexpression moduliert die Glukoslaufnahme in Adipozyten

[0056] Die Glukoseaufnahme wurde gemäß dem Verfahren von Hundal et al. (1994) Biochem. J. 297: 289-295 bestimmt. Kurz gesagt, wurden nach der Inkubation mit Hormonen während 45 Minuten, wenn nicht anderweitig angegeben, Zell-Monoschichten mit Glukose-freiem PBS gespült. Die Glukoseaufnahme wurde durch Inkubation der Zellen in Anwesenheit von 1 µCi/ml ³H-2-Desoxyglukose in PBS während 8 min quantifiziert. Die nicht-spezifische Aufnahme wurde durch Quantifizieren der Zell-assoziierten Radioaktivität in Anwesenheit von 10 µM Cytochalasin B bestimmt. Die 2-Desoxyglukose-Aufnahme wurde beendet, indem das Medium schnell abgesaugt wurde, gefolgt von drei aufeinander folgenden Waschungen von Zell-Monoschichten mit eiskaltem PBS. Die Zellen wurden in 0,5 M NaOH lysiert, gefolgt von Flüssigszintillationszählung. Die Transportraten wurden in jeder Vertiefung auf den Proteingehalt normiert.

[0057] Die Ergebnisse (**Fig. 2**) zeigen, dass die Mnk2b-Überexpression in Adipozyten (differenzierte 3T3-L1-Zellen) und einer humanen Zelllinie (SHSY) die Rate der Glukoseaufnahme in einer Insulin-abhängigen Weise vermindert. Die Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse aus dem Reporter-Assay (Beispiel 4) und zeigen weiter, dass ein Effekt der Mnk2b-Expression eine Reduzierung der Glukoseaufnahme ist.

BEISPIEL 6: Strukturmodelle von Mnk-Proteinen

[0058] Dreidimensionale Strukturmodelle von Mnk1, Mnk2a und Mnk2b wurden aus Homologie-Daten erstellt. Die Struktur der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase der Ratte (Proteindatenbank-Eintrag 1A06) wurde als Vorlage für alle drei Modelle verwendet. (Die Protein-Datenbank ist erhältlich unter <http://www.rcsb.org/pdb>; siehe auch Berman et al. (2000) Nucleic Acid Research 28: 235-242). Die Strukturmodelle wurden unter Verwendung der ICM-Software von MolSoft Inc. (<http://www.molsoft.com>) hergestellt.

[0059] Die Modelle von Mnk1, Mnk2a und Mnk2b waren sehr ähnlich, aber einige strukturelle Unterschiede wurden identifiziert, welche zur Anwendung kommen könnten, um Bindungselektivität zu erreichen. Eine Anzahl von 87 nicht-identischen Resten wurde identifiziert, als Mnk2b mit Mnk1 verglichen wurde. Viele von diesen sind von der aktiven Stelle entfernt lokalisiert, aber zwei interessante Unterschiede zwischen Mnk1 und Mnk2 sind Y→H in der aktiven Stelle (siehe Position 95 in SEQ ID Nr.: 4) und T→L in einer Schleife, welcher an der Substraterkennung beteiligt sein könnte (siehe Position 248 in SEQ ID Nr.: 4)

[0060] Ein Vergleich zwischen Mnk2a und Mnk2b zeigte, dass der C-Terminus, welcher der einzige unterschiedliche Abschnitt zwischen den beiden Spleissvarianten ist, sich gegen die aktive Stelle in den Modellen faltet. Dies weist auf die Möglichkeit der Identifizierung von Agenzien hin, welche Spezifität zwischen Mnk2a und Mnk2b besitzen.

BEISPIEL 7: Knock-Down von Mnk2 moduliert die Glukoseantwort in humanen Neuroblastom-Zellen

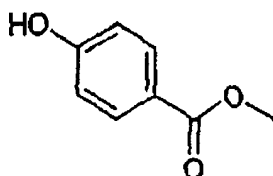
[0061] RNAi (RNA-Interferenz) bezieht sich auf die Einführung von homologer doppelsträngiger RNA (dsRNA), um auf ein Produkt eines Gens spezifisch abzielen, was zu Null- oder hypomorphen Phänotypen führt. Die RNAi-Technik wurde verwendet, um die Effekte auf die Glukose-Antwort in kultivierten Zellen nach dem Knock-Down der Mnk2-Proteinexpression zu untersuchen. Humane Neuroblastom-Zellen (SH-SY5y) wurden transient transkribiert mit einem Glukose-Response-Element, gekoppelt an ein Luciferase-Reporter (GluREx3-Luciferase), Mnk2b oder Grundgerüst-Plasmid und [RNAi-Mnk2], und zwar unter Verwendung von LipofectAmine2000 (LifeTechnologies). Für jede Vertiefung in einer 96-Vertiefungs-Platte wurden 0,2 µg GluREx3-Luciferase, 0,07 µg Mnk2b/Grundgerüst und 0,13 µg [RNAi-Mnk2] vermischt mit 1,8 µl LA2000/µg DNA, das in 50 µl Opti-MEM (Gibco) verdünnt war. Nach 48 h wurden die Zellen unter Verwendung von 15 µl/Vertiefung an Lyse-Puffer (Tris-EDTA mit 0,25% Triton × 100) lysiert, und die Luciferase-Aktivität wurde gemessen (Luciferase-Aktivitäts-Assaykit, BioTherma).

[0062] Die Ergebnisse (Fig. 3) zeigen, dass das Knock-Down der Mnk2-Protein-Expression in humanen Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5y) durch die Verwendung von RNAi zu einer Erhöhung der Aktivität des Glukose-Response-Elementes führt. Die Überexpression von Mnk2b-Protein in den selben Zellen vermindert die Aktivität des Glukose-Response-Elementes. Diese Verminderung wird durch den Knock-Down des überexprimierten Mnk2b-Proteins neutralisiert, das heißt kombinierte Transfektion von Expressionsplasmid und RNAi in den selben Zellen.

BEISPIEL 8: NMR-Screening für Mnk2b-bindende Verbindungen

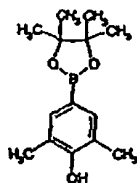
[0063] Eine Diversitäts-Bibliothek, bestehend aus relativ kleinen und hoch-wasserlöslichen Verbindungen, wurde verwendet, um natives MNK-2B hinsichtlich Bindemitteln durch NMR (kernmagnetische Resonanz) zu durchsuchen. Die verwendete NMR-Technik, um Bindemittel zu identifizieren, war die Sättigungstransferdifferenz (STD): die Protein-¹H-Resonanzen werden mittels eines schwachen Radiofrequenz-Feldes, das auf einen schmalen spektralen Bereich angelegt wird, gesättigt. Die Sättigung wird durch Spin-Diffusion auf den Rest des Proteins transferiert und anschließend weiter auf Verbindungen, welche an das Protein binden, was ihre Signale im NMR-Spektrum abschwächt. Das Spektrum wird dann von einem unter nicht-sättigenden Bedingungen erhaltenen Spektrum subtrahiert, um ein STD-Spektrum zu erhalten, das nur die Signale von mit dem Protein interagierenden Verbindungen zeigt. In der Praxis wird die Puls-Sequenz in solcher Weise geschrieben, dass die Subtraktion automatisch in jedem anderen Scan vorgenommen wird, d.h. die individuellen Spektren werden nie beobachtet (Mayer & Meyer, Angew. Chem. Int. Ed., 38, 1784-1788, 1999).

[0064] Die Verbindungen in der Bibliothek sind in Mischungen, bestehend aus je 4-8 Verbindungen, unterteilt. Jede Probe enthielt 1 µM natives MNK-2B, 200 µM Verbindungsmischung, 50 mM Natriumphosphat-Puffer, 1 mM DTT, pH 7,5 in ca. 98% D₂O/2% H₂O. Eine Probe enthielt keine Verbindungen und fungierte als eine Negativ-Kontrolle. Das Volumen war 600 µl und Standard-NMR-Röhrchen wurden verwendet. Experimente wurden auf einem 600 MHz Varian Unity NMR-Spektrometer bei 20°C durchgeführt. Als Referenz wurden bei jeder Probe ein ¹H-1D-Experiment und ein STD-Experiment aufgenommen. Die aus dem Screen identifizierten Bindemittel wurden zur Bestätigung als Einzel-Verbindung erneut eingesetzt. Für diese Nachfolge-Experimente wurden Proben, die 2 µM natives Mnk2B und 250 µM der individuellen Verbindung enthielten, verwendet. Mehrere Verbindungen, zum Beispiel 4-Hydroxybenzoesäuremethylester, wurden als Mnk2b-Liganden identifiziert.



4-Hydroxybenzoesäuremethylester

[0065] Ein Kinase-Aktivitäts-Assay gemäß Standard-Methoden zeigte, dass die identifizierten Verbindungen Mnk2-Kinaseaktivität in einer Dosis-abhängigen-Weise inhibierten. Folglich wurde gezeigt, dass es möglich ist, kleine Verbindungen als Mnk2b-Liganden zu identifizieren.



SEQUENZAUFLISTUNG

<110> Biovitrum AB
 <120> Neue Methoden

<130> 00572

<160> 9

<170> Version 3.0 der Patentinhaberin

<210> 1

<211> 1444

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (37) .. (1434)

<300>

<308> GenBank / AF237775

<309> 26-10-2000

<400> 1

```

cggtccectc ccccgctggc ggggcccgga cagaag atg gtg cag aag aaa cca      54
                               Met Val Gln Lys Lys Pro
                               1                               5

gcc gaa ctt cag ggt ttc cac cgt tcg ttc aag ggg cag aac ccc ttc      102
Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe Lys Gly Gln Asn Pro Phe
                               10                               20

gag ctg gcc ttc tcc cta gac cag ccc gac cac gga gac tct gac ttt      150
Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp His Gly Asp Ser Asp Phe
                               25                               35

ggc ctg cag tgc tca gcc cgc cct gac atg ccc gcc agc cag ccc att      198
Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met Pro Ala Ser Gln Pro Ile
                               40                               50

gac atc ccg gac gcc aag aag agg ggc aag aag aag aag cgc ggc cgg      246
Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys Lys Lys Lys Arg Gly Arg
55                               60                               65                               70

gcc acc gac agc ttc tcg ggc agg ttt gaa gac gtc tac cag ctg cag      294
Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg phe Glu Asp Val Tyr Gln Leu Gln
                               75                               80                               85

gaa gat gtg ctg ggg gag ggc gct cat gcc cga gtg cag acc tgc atc      342
Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala Arg Val Gln Thr Cys Ile
                               90                               95                               100

aac ctg atc acc agc cag gag tac gcc gtc aag atc att gag aag cag      390
Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val Lys Ile Ile Glu Lys Gln
                               105                               110                               115

```

cca ggc cac att cgg agc agg gtt ttc agg gag gtg gag atg ctg tac Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg Glu Val Glu Met Leu Tyr 120 125 130	438
cag tgc cag gga cac agg aac gtc cta gag ctg att gag ttc ttc gag Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu Leu Ile Glu Phe Phe Glu 135 140 145 150	486
gag gag gac cgc ttc tac ctg gtg ttt gag aag atg cgg gga ggc tcc Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu Lys Met Arg Gly Gly Ser 155 160 165	534
atc ctg agc cac atc cac aag cgc cgg cac ttc aac gag ctg gag gcc Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His Phe Asn Glu Leu Glu Ala 170 175 180	582
agc gtg gtg gtg cag gac gtg gcc agc gcc ttg gac ttt ctg cat aac Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala Leu Asp phe Leu His Asn 185 190 195	630
aaa ggc atc gcc cac agg gac cta aag ccg gaa aac atc ctc tgt gag Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Glu 200 205 210	678
cac ccc aac cag gtc tcc ccc gtg aag atc tgt gac ttc gac ctg ggc His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile Cys Asp Phe Asp Leu Gly 215 220 225 230	726
agc ggc atc aaa ctc aac ggg gac tgc tcc cct atc tcc acc ccg gag Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro Glu 235 240 245	774
ctg ctc act ccg tgc ggc tcg gcg gag tac atg gcc ccg gag gta gtg Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val Val 250 255 260	822
gag gcc ttc agc gag gag gct agc atc tac gac aag cgc tgc gac ctg Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp Leu 265 270 275	870
tgg agc ctg ggc gtc atc ttg tat atc cta ctc agc ggc tac ccg ccc Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Pro 280 285 290	918
ttc gtg ggc cgc tgt ggc agc gac tgc ggc tgg gac cgc ggc gag gcc Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu Ala 295 300 305 310	966
tgc cct gcc tgc cag aac atg ctg ttt gag agc atc cag gag ggc aag Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly Lys 315 320 325	1014
tac gag ttc ccc gac aag gac tgg gcc cac atc tcc tgc gct gcc aaa Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala Lys 330 335 340	1062
gac ctc atc tcc aag ctg ctg gtc cgt gac gcc aag cag agg ctg agt Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu Ser 345 350 355	1110

gcc gcc caa gtc ctg cag cac ccc tgg gtt cag ggg tgc gcc ccg gag 1158
 Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro Glu
 360 365 370

aac acc ttg ccc act ecc atg gtc ctg cag agg aac agc tgt gcc aaa 1206
 Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Asn Ser Cys Ala Lys
 375 380 385 390

gac ctc acg tcc ttc gcg gct gag gcc att gcc atg aac cgg cag ctg 1254
 Asp Leu Thr Ser Phe Ala Ala Glu Ala Ile Ala Met Asn Arg Gln Leu
 395 400 405

gcc cag cac gac gag gac ctg gct gag gag gag gcc gcg ggg cag gcc 1302
 Ala Gln His Asp Glu Asp Leu Ala Glu Glu Glu Ala Ala Gly Gln Gly
 410 415 420

cag ccc gtc ctg gtc cga gct acc tca cgc tgc ctg cag ctg tct cca 1350
 Gln Pro Val Leu Val Arg Ala Thr Ser Arg Cys Leu Gln Leu Ser Pro
 425 430 435

ccc tcc cag tcc aag ctg gcg cag cgg cgg caa agg gcc agt ctg tcc 1398
 Pro Ser Gln Ser Lys Leu Ala Gln Arg Arg Gln Arg Ala Ser Leu Ser
 440 445 450

tgc gcc cca gtc gtc ctg gtc gga gac cac gcc tga ccctccatc 1444
 Ser Ala Pro Val Val Leu Val Gly Asp His Ala
 455 460 465

<210> 2

<211> 465

<212> PRT

<213> Human

<400> 2

Met Val Gln Lys Lys Pro Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe
 1 5 10 15

Lys Gly Gln Asn Pro Phe Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp
 20 25 30

His Gly Asp Ser Asp Phe Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met
 35 40 45

Pro Ala Ser Gln Pro Ile Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys
 50 55 60

Lys Lys Lys Arg Gly Arg Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu
 65 70 75 80

Asp Val Tyr Gln Leu Gln Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala
 85 90 95

Arg Val Gln Thr Cys Ile Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val
 100 105 110

Lys Ile Ile Glu Lys Gln Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg
 115 120 125

Glu Val Glu Met Leu Tyr Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu
 130 135 140

Leu Ile Glu Phe Phe Glu Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu
 145 150 155 160

Lys Met Arg Gly Gly Ser Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His
 165 170 175

Phe Asn Glu Leu Glu Ala Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala
 180 185 190

Leu Asp Phe Leu His Asn Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro
 195 200 205

Glu Asn Ile Leu Cys Glu His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile
 210 215 220

Cys Asp Phe Asp Leu Gly Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser
 225 230 235 240

Pro Ile Ser Thr Pro Glu Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr
 245 250 255

Met Ala Pro Glu Val Val Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr
 260 265 270

Asp Lys Arg Cys Asp Leu Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu
 275 280 285

Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly
 290 295 300

Trp Asp Arg Gly Glu Ala Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Ser Ile Gln Glu Gly Lys Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His
 325 330 335

Ile Ser Cys Ala Ala Lys Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp
 340 345 350

Ala Lys Gln Arg Leu Ser Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val
 355 360 365

Gln Gly Cys Ala Pro Glu Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln
 370 375 380

Arg Asn Ser Cys Ala Lys Asp Leu Thr Ser Phe Ala Ala Glu Ala Ile
 385 390 395 400

Ala Met Asn Arg Gln Leu Ala Gln His Asp Glu Asp Leu Ala Glu Glu
 405 410 415

Glu Ala Ala Gly Gln Gly Gln Pro Val Leu Val Arg Ala Thr Ser Arg
 420 425 430

Cys Leu Gln Leu Ser Pro Pro Ser Gln Ser Lys Leu Ala Gln Arg Arg
 435 440 445

Gln Arg Ala Ser Leu Ser Ser Ala Pro Val Val Leu Val Gly Asp His
 450 455 460

Ala
 465

<210> 3

<211> 1564

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (37) .. (1281)

<300>

<308> GenBank / AF237776

<309> 26-10-2000

<400> 3

```

cggtccccc ccccgctggc gggggcccgga cagaag atg gtg cag aag aaa cca      54
                               Met Val Gln Lys Lys Pro
                               1           5

gcc gaa ctt cag ggt ttc cac cgt tcg ttc aag ggg cag aac ccc ttc      102
Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe Lys Gly Gln Asn Pro Phe
          10           15           20

gag ctg gcc ttc tcc cta gac cag ccc gac cac gga gac tct gac ttt      150
Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp His Gly Asp Ser Asp Phe
          25           30           35

ggc ctg cag tgc tca gcc cgc cct gac atg ccc gcc agc cag ccc att      198
Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met Pro Ala Ser Gln Pro Ile
          40           45           50

gac atc ccg gac gcc aag aag agg ggc aag aag aag aag cgc ggc cgg      246
Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys Lys Lys Lys Arg Gly Arg
          55           60           65           70

gcc acc gac agc ttc tcg ggc agg ttt gaa gac gtc tac cag ctg cag      294
Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu Asp Val Tyr Gln Leu Gln
          75           80           85

gaa gat gtg ctg ggg gag ggc gct cat gcc cga gtg cag acc tgc atc      342
Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala Arg Val Gln Thr Cys Ile
          90           95           100

aac ctg atc acc agc cag gag tac gcc gtc aag atc att gag aag cag      390
Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val Lys Ile Ile Glu Lys Gln
          105           110           115

cca ggc cac att cgg agc agg gtt ttc agg gag gtg gag atg ctg tac      438
Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg Glu Val Glu Met Leu Tyr
          120           125           130

cag tgc cag gga cac agg aac gtc cta gag ctg att gag ttc ttc gag      486
Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu Leu Ile Glu Phe Phe Glu
          135           140           145           150

```

gag gag gac cgc ttc tac ctg gtg ttt gag aag atg cgg gga ggc tcc Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu Lys Met Arg Gly Gly Ser 155 160 165	534
atc ctg agc cac atc cac aag cgc cgg cac ttc aac gag ctg gag gcc Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His Phe Asn Glu Leu Glu Ala 170 175 180	582
agc gtg gtg gtg cag gac gtg gcc agc gcc ttg gac ttt ctg cat aac Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala Leu Asp Phe Leu His Asn 185 190 195	630
aaa ggc atc gcc cac agg gac cta aag ccg gaa aac atc ctc tgt gag Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys Glu 200 205 210	678
cac ccc aac cag gtc tcc ccc gtg aag atc tgt gac ttc gac ctg ggc His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile Cys Asp Phe Asp Leu Gly 215 220 225 230	726
agc ggc atc aaa ctc aac ggg gac tgc tcc cct atc tcc acc ccg gag Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro Glu 235 240 245	774
ctg ctc act ccg tgc ggc tcg gcg gag tac atg gcc ccg gag gta gtg Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val Val 250 255 260	822
gag gcc ttc agc gag gag gct agc atc tac gac aag cgc tgc gac ctg Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp Leu 265 270 275	870
tgg agc ctg ggc gtc atc ttg tat atc cta ctc agc ggc tac ccg ccc Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Pro 280 285 290	918
ttc gtg ggc cgc tgt ggc agc gac tgc ggc tgg gac cgc ggc gag gcc Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu Ala 295 300 305 310	966
tgc cct gcc tgc cag aac atg ctg ttt gag agc atc cag gag ggc aag Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly Lys 315 320 325	1014
tac gag ttc ccc gac aag gac tgg gcc cac atc tcc tgc gct gcc aaa Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala Lys 330 335 340	1062
gac ctc atc tcc aag ctg ctg gtc cgt gac gcc aag cag agg ctg agt Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu Ser 345 350 355	1110
gcc gcc caa gtc ctg cag cac ccc tgg gtt cag ggg tgc gcc ccg gag Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro Glu 360 365 370	1158
aac acc ttg ccc act ccc atg gtc ctg cag agg tgg gac agt cac ttc Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Trp Asp Ser His Phe 375 380 385 390	1206

```

ctc etc cct ccc cac ccc tgt cgc atc cac gtg cga cct gga gga ctg      1254
Leu Leu Pro Pro His Pro Cys Arg Ile His Val Arg Pro Gly Gly Leu
          395                      400                      405

gtc aga acc gtt act gtg aat gag tga agatcctgga ggaccctggg      1301
Val Arg Thr Val Thr Val Asn Glu
          410

ccccaggcca gctcccatcg ctgggggacg gtgaacggcc atgtgttaat gttacgatgt  1361

ttttaaaaga caaaaaaaaaa aaaaaaacct caaaagtttt tttaaagtgg gggaaaaaca  1421

tccaagcact ttaattccaa tgtaccaggt gaactgacgg agctcagaag ttttccttta  1481

caccaactgt caatgccgga attttgtatt ctgttttcta aagatttaataaaaagtcaaa  1541

aaacttgcaa aaaaaaaaaa aaa      1564

```

<210> 4

<211> 414

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

```

Met Val Gln Lys Lys Pro Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe
1          5          10          15

Lys Gly Gln Asn Pro Phe Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp
20          25          30

His Gly Asp Ser Asp Phe Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met
35          40          45

Pro Ala Ser Gln Pro Ile Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys
50          55          60

Lys Lys Lys Arg Gly Arg Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu
65          70          75          80

Asp Val Tyr Gln Leu Gln Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala
85          90          95

Arg Val Gln Thr Cys Ile Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val
100         105         110

Lys Ile Ile Glu Lys Gln Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg
115         120         125

Glu Val Glu Met Leu Tyr Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu
130         135         140

Leu Ile Glu Phe Phe Glu Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu
145         150         155         160

Lys Met Arg Gly Gly Ser Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His
165         170         175

Phe Asn Glu Leu Glu Ala Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala
180         185         190

```


Leu Asp Phe Leu His Asn Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro
 195 200 205

Glu Asn Ile Leu Cys Glu His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile
 210 215 220

Cys Asp Phe Asp Leu Gly Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser
 225 230 235 240

Pro Ile Ser Thr Pro Glu Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr
 245 250 255

Met Ala Pro Glu Val Val Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr
 260 265 270

Asp Lys Arg Cys Asp Leu Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu
 275 280 285

Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly
 290 295 300

Trp Asp Arg Gly Glu Ala Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu
 305 310 315 320

Ser Ile Gln Glu Gly Lys Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His
 325 330 335

Ile Ser Cys Ala Ala Lys Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp
 340 345 350

Ala Lys Gln Arg Leu Ser Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val
 355 360 365

Gln Gly Cys Ala Pro Glu Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln
 370 375 380

Arg Trp Asp Ser His Phe Leu Leu Pro Pro His Pro Cys Arg Ile His
 385 390 395 400

Val Arg Pro Gly Gly Leu Val Arg Thr Val Thr Val Asn Glu
 405 410

<210> 5
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atggtgcaga agaaaccagc cgaacttc

28

<210> 5
 <211> 287
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gccaggtcg aagtcacaga tcttcac

27

<210> 7
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgtgcagaag aaaccagcc

49

<

<210> 8
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctactcattc acagtaacgg ttct

54

<210> 9
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> DOMAINE
 <222> (1) .. (226)

<220>

<221> DOMAINE
 <222> (237) .. (649)

<400> 9

Met	Ala	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
1				5					10					15	
Thr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Glu	His	Leu
		20					25						30		
Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Trp	Arg	Asn	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu
		35					40					45			
Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Lys
		50				55					60				
Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Lys	His	Asn
65					70					75					80
Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu
				85					90					95	
Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser
			100					105						110	
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu
		115					120					125			
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
						135						140			

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
 145 150 155 160
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
 165 170 175
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
 195 200 205
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg
 210 215 220
 Ser Arg Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ala Gly Phe Val Gln Lys Lys
 225 230 235 240
 Pro Ala Glu Leu Gln Gly Phe His Arg Ser Phe Lys Gly Gln Asn Pro
 245 250 255
 Phe Glu Leu Ala Phe Ser Leu Asp Gln Pro Asp His Gly Asp Ser Asp
 260 265 270
 Phe Gly Leu Gln Cys Ser Ala Arg Pro Asp Met Pro Ala Ser Gln Pro
 275 280 285
 Ile Asp Ile Pro Asp Ala Lys Lys Arg Gly Lys Lys Lys Lys Arg Gly
 290 295 300
 Arg Ala Thr Asp Ser Phe Ser Gly Arg Phe Glu Asp Val Tyr Gln Leu
 305 310 315 320
 Gln Glu Asp Val Leu Gly Glu Gly Ala His Ala Arg Val Gln Thr Cys
 325 330 335
 Ile Asn Leu Ile Thr Ser Gln Glu Tyr Ala Val Lys Ile Ile Glu Lys
 340 345 350
 Gln Pro Gly His Ile Arg Ser Arg Val Phe Arg Glu Val Glu Met Leu
 355 360 365
 Tyr Gln Cys Gln Gly His Arg Asn Val Leu Glu Leu Ile Glu Phe Phe
 370 375 380
 Glu Glu Glu Asp Arg Phe Tyr Leu Val Phe Glu Lys Met Arg Gly Gly
 385 390 395 400
 Ser Ile Leu Ser His Ile His Lys Arg Arg His Phe Asn Glu Leu Glu
 405 410 415
 Ala Ser Val Val Val Gln Asp Val Ala Ser Ala Leu Asp Phe Leu His
 420 425 430
 Asn Lys Gly Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Cys
 435 440 445
 Glu His Pro Asn Gln Val Ser Pro Val Lys Ile Cys Asp Phe Asp Leu
 450 455 460

Gly Ser Gly Ile Lys Leu Asn Gly Asp Cys Ser Pro Ile Ser Thr Pro
 465 470 475 480
 Glu Leu Leu Thr Pro Cys Gly Ser Ala Glu Tyr Met Ala Pro Glu Val
 485 490 495
 Val Glu Ala Phe Ser Glu Glu Ala Ser Ile Tyr Asp Lys Arg Cys Asp
 500 505 510
 Leu Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Tyr Pro
 515 520 525
 Pro Phe Val Gly Arg Cys Gly Ser Asp Cys Gly Trp Asp Arg Gly Glu
 530 535 540
 Ala Cys Pro Ala Cys Gln Asn Met Leu Phe Glu Ser Ile Gln Glu Gly
 545 550 555 560
 Lys Tyr Glu Phe Pro Asp Lys Asp Trp Ala His Ile Ser Cys Ala Ala
 565 570 575
 Lys Asp Leu Ile Ser Lys Leu Leu Val Arg Asp Ala Lys Gln Arg Leu
 580 585 590
 Ser Ala Ala Gln Val Leu Gln His Pro Trp Val Gln Gly Cys Ala Pro
 595 600 605
 Glu Asn Thr Leu Pro Thr Pro Met Val Leu Gln Arg Trp Asp Ser His
 610 615 620
 Phe Leu Leu Pro Pro His Pro Cys Arg Ile His Val Arg Pro Gly Gly
 625 630 635 640
 Leu Val Arg Thr Val Thr Val Asn Glu
 645

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, welches die Fähigkeit eines Mnk2-Polypeptids moduliert, die Glucoseaufnahme in einer Zelle zu modulieren, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
Kontaktieren eines Mnk2 (MAP-Kinase-interagierende Kinase 2)-Polypeptids mit einem Kandidatenmittel; und Bestimmen des Effektes des Kandidatenmittels auf das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Glucoseaufnahme in einer Zelle zu modulieren.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei das Mnk2-Polypeptid ein Säuger-Mnk2-Polypeptid ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid ein humanes Mnk2-Polypeptid ist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid Mnk2a ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei das Mnk2a-Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.: 2 umfasst.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid Mnk2b ist
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei das Mnk2b-Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.: 4 umfasst.
8. Verfahren zum Identifizieren eines Mittels, welches die Fähigkeit eines Mnk2-Polypeptids moduliert, die Aktivität eines Glucose-Response-Elementes in einer Zelle zu modulieren, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
Kontaktieren eines Mnk2-Polypeptids mit einem Kandidatenmittel; und Bestimmen des Effektes des Kandidatenmittels auf das Vermögen des Mnk2-Polypeptids, die Aktivität eines Glucose-Response-Elementes in einer Zelle zu modulieren.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei das Mnk2-Polypeptid ein Säuger-Mnk2-Polypeptid ist.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid ein humanes Mnk2-Polypeptid ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid Mnk2a ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei das Mnk2a-Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.: 2 umfasst.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Säuger-Mnk2-Polypeptid Mnk2b ist
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, wobei das Mnk2b-Polypeptid die Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.: 4 umfasst.
15. Verfahren zum Identifizieren eines Modulators der Glucoseaufnahme, wobei das Verfahren folgendes umfasst:
Bereitstellen einer Zelle, die ein rekombinantes Mnk2-Polypeptid exprimiert;
Exponieren der Zelle an ein Kandidatenmittel; und
Messen der Glucoseaufnahme in der Zelle in Gegenwart des Kandidatenmittels, wobei die veränderte Glucoseaufnahme in der Zelle in Gegenwart des Kandidatenmittels im Vergleich zur Abwesenheit des Kandidatenmittels angibt, dass das Kandidatenmittel ein Modulator der Glucoseaufnahme ist.
16. In vitro-Verfahren zur Modulierung der Glucoseaufnahme in einer Zelle, wobei das Verfahren das Kontaktieren einer Zelle mit einer Menge an einer Verbindung, die zur Modulierung der Expression oder Aktivität eines Mnk2-Polypeptids wirksam ist und somit die Glucoseaufnahme in der Zelle moduliert, umfasst.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei die Verbindung die Expression oder Aktivität des Mnk2-Polypeptids senkt und dadurch die Glucoseaufnahme in der Zelle erhöht.
18. Verfahren gemäß Anspruch 17, wobei die Verbindung die Kinaseaktivität des Mnk2-Polypeptids verringert.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

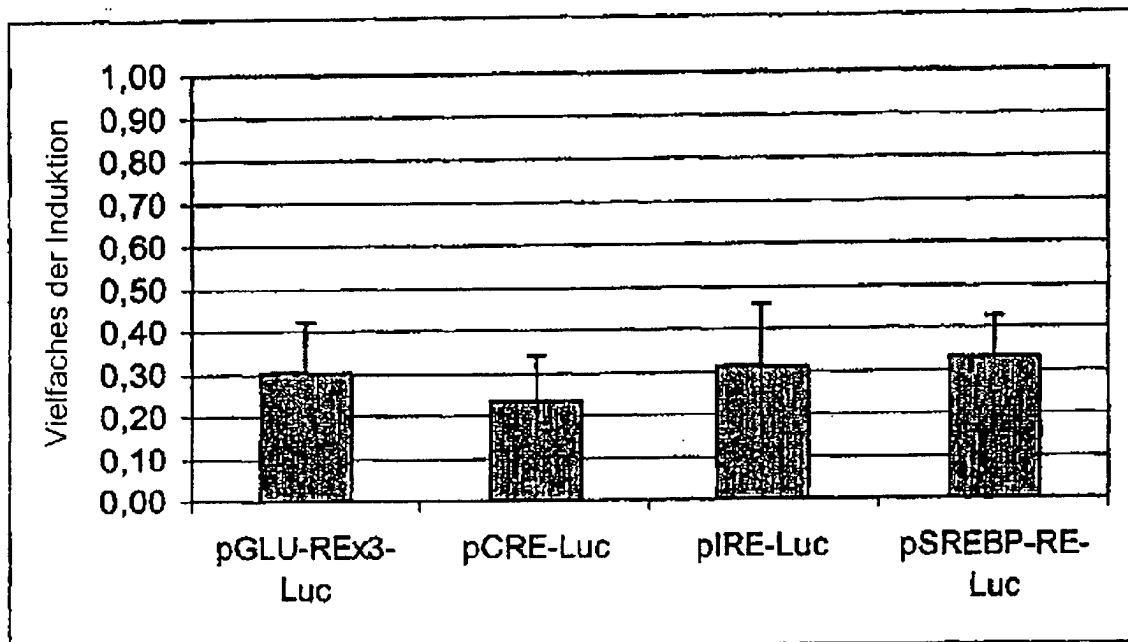


Fig. 2A

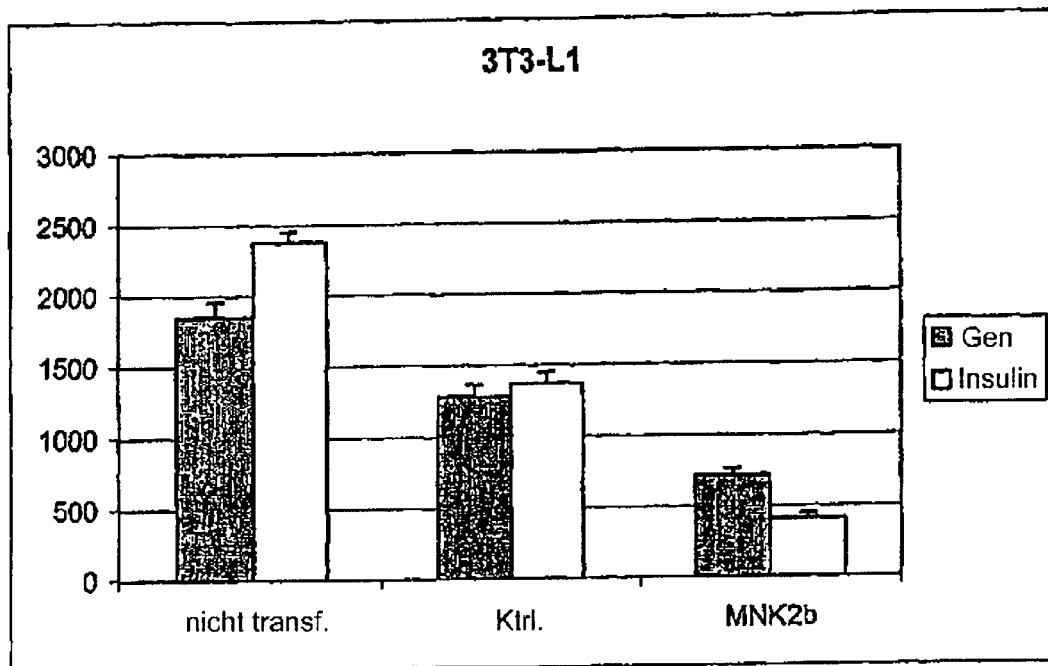


Fig. 2B

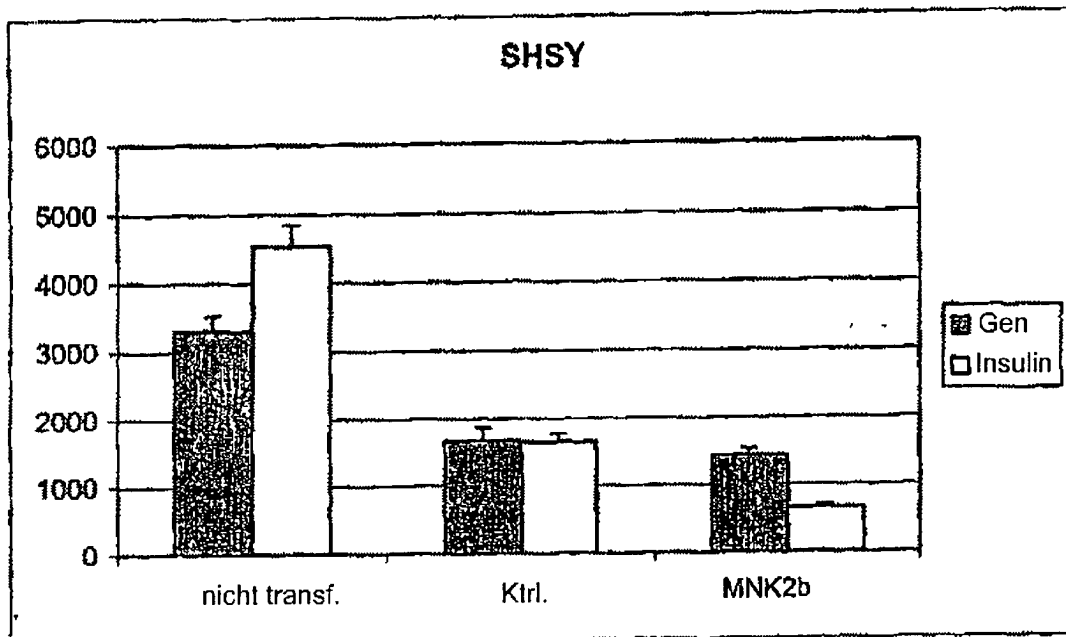


Fig. 3

