 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0026228 (43) 공개일자 2013년03월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0089720 (22) 출원일자 2011년09월05일 심사청구일자 2011년09월05일	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동) (72) 발명자 이한웅 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동) 노재일 경기도 안산시 단원구 와동 신유연립 7차 103동 303호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인 남앤드남

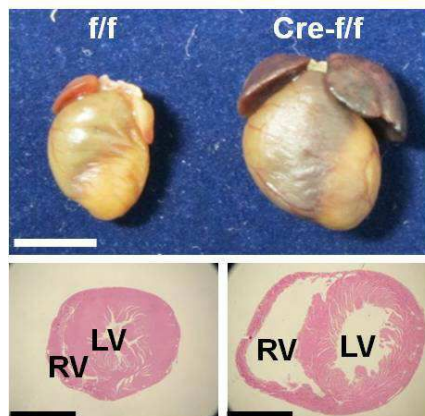
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 심장질환 치료 진단 키트 및 심장질환 진단을 위한 정보제공방법

(57) 요약

본 발명은 ASC-2 유전자에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트 및 심장질환 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 심장질환 진단용 키트 및 심장질환 치료 제제를 스크리닝하는 방법을 이용하면 심장질환, 특히 확장성 심근병증을 치료하는 제제를 제공할 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

성영훈

서울특별시 강북구 술매로41길 6-3, 2층 (미아동)

최정민

서울특별시 서대문구 연희로14길 63-36, 202호 (연희동, 엘림하우스)

강석민

서울특별시 양천구 목동동로 257, 101동 1602호 (목동, 현대 하이페리온)

김덕경

서울특별시 송파구 올림픽로 212, A동 3902호 (잠실동, 갤러리아팰리스)

이중은

경기도 고양시 일산서구 강선로 164, 1403동 1403호 (일산동, 후곡마을)

정철호

경상남도 진주시 비봉로24번길 6-1 (중안동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100020878

부처명 교육과학기술부

연구사업명 Gene-targeting 기반 유전자변형마우스 제작 및 분석 기반구축

연구과제명 Gene-targeting 기반 유전자변형마우스 제작 및 분석 기반구축

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.06.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100000856

부처명 교육과학기술부

연구사업명 생체 내 염증반응 조절에 관여하는 암억제 경로에 관한 연구

연구과제명 생체 내 염증반응 조절에 관여하는 암억제 경로에 관한 연구

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

ASC-2 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 진단용 키트.

청구항 3

(a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 ASC-2 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단백질 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

(a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 ASC-2 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 ASC-2 유전자의 mRNA 수준을 정상 대조군 시료의 ASC-2 유전자의 mRNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 7

ASC-2의 G703E 또는 M766L 변이 유전자에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 진단용 키트.

청구항 9

ASC-2 유전자의 G703E 또는 M766L 변이를 확인하여 심장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

(a) 서열번호 1로 표시되는 ASC-2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 증가조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 심장질환을 치료하는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 심장질환 치료 제제는 PPAR 신호전달을 통해 확장성 심근병증의 발병을 억제하는 것을 특징으로 하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 14

(a) 서열번호 1로 표시되는 ASC-2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 유전자의 발현량이 증가조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 심장질환을 치료하는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 ASC-2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서,

상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 심장질환 치료 제제는 PPAR 신호전달을 통해 확장성 심근병증의 발병을 억제하는 것을 특징으로 하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 ASC-2 유전자에 상보적인 서열을 갖는 프로브 및 프라이머 세트, 유전자 서열의 시퀀싱을 포함하는 심장질환 진단용 키트 및 심장질환 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 심장병은 미국에서 사망률 1위를 차지하며(Arialdi et al., 2004), 국내 급발성 사망률 1위를 차지하는 질병이다. 심장병의 주된 원인인 확장성 심근병증은 좌심실의 불활성, 심장 비대증, 심근 이상 등을 나타내는 질병으로, 5년 내 생존율이 30%이하로 매우 치명적이다(Diane et al., 2002). PPAR(Peroxisome proliferator-activated receptor)는 핵 호르몬 수용체(nuclear hormone receptor)의 한 종류로 3가지의 아파로 이루어져 있고, 지질대사를 주로 조절한다(Forman et al., 1997). PPAR의 녹아웃(KO)과 과발현 연구를 통해 이들이 심장 발생과 심장 질환, 특히 확장성 심근병증에 연관이 있음을 알 수 있다(Cheng et al., 2004; Net al., 2003; smeets et al., 2008; Son et al., 2007).

- [0003] 한편, ASC-2는 PPAR 등과 같은 여러 종류의 핵 호르몬 수용체와 결합하는 250KDa의 단백질로, NCoA6, PRIP 또는 TRBP 등으로도 불린다. 마우스를 이용한 ASC-2의 녹아웃 연구를 통해 ASC-2가 태아 발생, 특히 태줄과 심장 발생 등에 필수적인 요소임을 알 수 있었지만(Lee et al., 1999; Caira et al., 2000; Ko et al., 2000; Mahajan and Samuels, 2000; Zhu et al., 2000; Kuang et al., 2002; Antonson et al., 2003; Zhu et al., 2003), 이러한 마우스는 태어나기 전에 죽기 때문에 성체에서의 연구가 불가능한 한계가 있었다.

- [0004] 이에 본 발명자들은 ASC-2 유전자의 활성을 일부만 억제하는 DN1마우스와 심장 특이적 ASC-2 녹아웃 마우스를 통해 ASC-2 유전자의 발현을 증가시키면 심장질환, 특히 확장성 심근병증을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 ASC-2 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트 및 환자의 ASC-2 단백질 또는 유전자의 수준을 정상 대조군 시료의 수준과 비교하여 심장질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여, ASC-2 유전자에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트를 제공한다.

- [0007] 본 발명은 다른 구체예에서, (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 ASC-2 단백질 수준을 측정하는 단계;

및 (b) 상기 단백질 수준을 정상 대조군 시료의 단백질 수준과 비교하는 단계를 포함하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 ASC-2 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 ASC-2 유전자의 mRNA 수준을 정상 대조군 시료의 ASC-2 유전자의 mRNA 수준과 비교하는 단계를 포함하는 심장질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또 다른 구체예에서, ASC-2의 G703E 또는 M766L 변이 유전자에 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함하는 심장질환 진단용 키트 및 그 변이를 확인하여 심장질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 1로 표시되는 ASC-2 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단백질의 양 또는 활성이 증가 조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 심장질환을 치료하는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 서열번호 1로 표시되는 ASC-2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 유전자의 발현량이 증가조절되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 심장질환을 치료하는 물질임을 판별하는 단계를 포함하는 심장질환 치료 제제의 스크리닝 방법을 제공하며, 상기 ASC-2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 심장질환은 확장성 심근병증인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 심장질환 치료 제제는 PPAR 신호전달을 통해 확장성 심근병증의 발병을 억제하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0013] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시료"는 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 양 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRCpress), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 situ 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.

[0015] RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 단일가닥 cDNA를 제조한다. 이어, 단일가닥 cDNA를 주형으로 이용하고, 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 실시한다. 유전자-특이적 프라이머 세트는 하기 표 2에서 열거되어 있다. 그런 다음, PCR 증폭 산물을 전기영동하고, 형성된 밴드를 분석하여 유전자의 발현량 변화를 측정한다.

[0016] 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 단백질-특이 항체가 이용될 수 있다. 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 시료가 처리된 세포로부터 추출물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계 (ii) 단백질-특이 항체와 상기 세포 추출물을 반응시키는 단계 (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는

젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 o-페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다. 상기 ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명에 따른 심장질환 진단용 키트 및 심장질환 치료 제제를 스크리닝하는 방법을 이용하면 심장질환, 특히 확장성 심근병증을 치료하는 제제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1b는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스의 심장에서 ASC-2의 단백질 발현량이 감소한 결과를 나타낸 것이다.
 도 1c는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스의 다른 장기들에서의 ASC-2의 발현량을 나타낸 것이다.
 도 1d는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스가 4달 뒤 사망한 결과를 나타낸 것이다.
 도 2a는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스의 심장 크기 증가를 나타낸 것이다.
 도 2b는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스의 심장 무게의 증가를 나타낸 것이다.
 도 2c 및 도 2d는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스 심장의 조직학적 변화를 나타낸 것이다.
 도 3a는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스에서 심근병증 관련 유전자들의 발현 정도를 나타낸 것이다.
 도 3b는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스에서 연령 의존적인 심근병증 관련 유전자들의 발현 변화를 나타낸 것이다.
 도 3c는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스에서 비정상적 심장박동과 혈액 공급 장애를 나타낸 것이다.
 도 4a는 PPRE를 이용한 루시페라아제 실험을 통해 ASC-2가 PPAR의 전사활성을 증가시키는 결과를 나타낸 것이다.
 도 4b 및 도 4c는 PPRE를 이용한 루시페라아제 실험을 통해 ASC-2를 억제시키면 PPAR 전사활성이 감소하는 결과를 나타낸 것이다.
 도 4d는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스에서 PPAR 타겟들이 비정상적으로 발현하는 결과를 나타낸 것이다.
 도 4e는 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스에서 PPAR의 타겟인 AKT 인산화 및 이것의 신호가 증가한 것을 확인한 것이다.
 도 5a는 확장성 심근병증 환자의 ASC-2 내 유전자 변이 및 2차 구조의 변화를 나타낸 것이다.
 도 5b는 ASC-2의 유전자 변이에 의한 확장성 심근병증 유발 결과를 나타낸 것이다.

도 6a는 DN1과발현에 의해 태아에서 intraventricular septal defect가 유발되며, 비정상적으로 빠르게 죽음이 야기됨을 나타낸 것이다.

도 6b는 DN1과발현에 의한 심장의 비대와 비정상적인 심장세포구조를 나타낸 것이다.

도 6c는 DN1과발현에 의한 비정상적인 심장박동과 혈액 공급 장애를 나타낸 것이다.

도 6d는 DN1과발현에 의한 망가진 PPAR 신호계를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0021] **1-1: 심장 특이적 ASC-2 녹아웃 마우스 제작**

[0022] 이 전에 ASC-2 KO에 의한 태생 치사를 피하기 위해 ASC-2의 dominant negative form을 과발현하는 DN1 마우스를 5 종류 만들었다(Kim et al., 2002). 이 중 3 종류가 심장에서 DN1을 발현하였고, DN1 과발현은 ASC-2의 발현에는 영향을 주지 않았다(Kim et al., 2002). 이들 마우스는 태아기 13.5이 될 때 intraventricular septal defect를 보였고, 성체들은 자주 호흡곤란을 보였으며, 4달째 되는 날 대부분 발작을 일으키며 갑작스럽게 죽었다.

[0023] 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스를 제작하기 위해 Cre-Lox 시스템을 이용하였고, 이를 위해 Shneider 박사(Agah, R. et al., Targeted expresseion of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo. J. Clin. Invest, 1997(21))와 Reddy 박사(Zhu, Y.-J. et al., Coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor-interacting protein, is a modulator of placental, cardiac, hepatic, and embryonic development. J. Biol. Chem. 2003(278))로부터 α MHC-Cre 과발현 마우스와 ASC-2 floxed 마우스를 받았다. 이 두 가지 마우스를 교배하여 α MHC-Cre;Asc-2^{f/f}를 얻은 뒤 이를 이용하여 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스(α MHC-Cre;Asc-2^{f/f})를 생산하였다(도 1a). 이 때, 마우스의 background는 FVB로 유지되었고, generation은 5번 이상인 마우스만 사용하였다. 각 마우스의 유전형질은 마우스의 꼬리 끝부분에서 얻어진 유전체를 이용한 PCR을 통해 확인하였다.

[0024] ASC-2가 심장에서 특이적으로 제거가 되었는지 확인하기 위해 3달된 마우스의 심장, 폐, 간, 뇌, 비장 등을 적출하였다. 장기들을 반으로 나눈 뒤 한 조각에서 Trizol을 이용하여 전체 RNA를 얻었고, 이를 Superscript III를 이용한 reverse-transcriptase PCR을 통해 cDNA를 얻었다. ASC-2에 대한 프라이머를 이용하여 real-time PCR을 수행하였고, GAPDH로 값이 보정되었다. 심장의 절반을 protein lysis buffer에 넣고 균질기(homogenizer)로 갈은 후 원심분리 및 정량을 하여 5 μ g/ μ l로 만들었다. 그 후 웨스턴블롯을 통해 ASC-2의 발현을 확인하였고, GAPDH로 값을 로딩 컨트롤로 사용하였다. 그 결과 ASC-2 KO 마우스에서 잡히지 않았다.

[0025] 그 결과, 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스들은 심장 내에서만 ASC-2가 줄어든 결과를 보였으며, 다른 장기들 내의 ASC-2는 그대로임을 확인하였다(도 1b 및 도 1c). DN1 마우스와 동일하게 심장 특이적 ASC-2 KO 마우스들 역시 대부분 4달째 되는 날 호흡곤란을 겪은 뒤 발작을 동반하며 갑작스럽게 죽었다(도 1d).

실시예 2

[0026] **ASC-2 제거에 의한 심장질환의 발병**

[0027] ASC-2 KO 마우스를 Specific Pathogene free (SPF) 마우스 룸에서 20주간 사육한 후, 심장 특이적 KO 마우스를 해부하여 심장을 관찰하였다. 얻어진 심장의 피를 PBS로 최대한 제거한 뒤 물기를 제거한 다음 무게를 측정하고, 10% 포름알데히드로 고정하였다. 24-48시간 뒤 포름알데히드를 물로 제거하고, 에탄올을 이용한 탈수를 거쳐 파라핀을 먹였다. 이러한 심장을 파라핀 블록으로 만든 뒤, 섹션을 통해 슬라이드 글라스에 붙였다. Hematoxyline & Eosin으로 염색을 하기 위해 파라핀 제거와 수화를 통해 샘플에 물을 먹이고, hematoxyline으로

먼저 염색을 한 뒤, 에오신으로 세포질 부분을 염색하였다. 콜라겐의 관찰을 위해 트리크롬 염색(Trichrome staining)을 하였고, 이를 위해 파라핀 제거, 수화 등으로 물을 먹인 뒤, 염색을 하였다. 근절의 구조를 관찰하기 위해 주상전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0028] 그 결과, 심장이 대조군에 비해 약 2배 정도 커져 있었고, 무게 또한 약 2배 늘어 있었다(도 2a, b). 하지만 ASC-2에 의한 몸무게의 차이는 크게 보이지 않았다(도 2b 오른쪽). 또한, 조직학적 실험을 통해 ASC-2가 없으면 심장벽이 얇아지고, 심근세포의 두께가 얇아지고, 심근이 갈라지며, 섬유증이 생기는 것을 확인하였다(도 2c). 심장벽이 걸리면 근절의 모양이 변하고, 미토콘드리아가 비정상적으로 작동하는데, 이를 확인하기 위해 주사광학현미경 실험을 수행하여 근 섬유의 초미세구조를 관찰한 결과, ASC-2가 없으면 근절의 구조가 망가지고, Z-disc가 두꺼워지며, 근절 간의 거리가 짧아지고, 미토콘드리아의 배열이 무너지는 것을 확인할 수 있었다(도 2d).

[0029] 이를 통해 ASC-2가 심장 내 근절 구조결정에 중요하며, 따라서 심장 기능 조절에 필수적임을 알 수 있다. 이와 동일하게 DN1 과발현 마우스도 약 2배 정도 커진 심장을 가지고, 비정상적인 근절과 미토콘드리아를 가지고 있다(도 6a).

실시예 3

[0030] **ASC-2 제거에 의한 확장성 심근병증의 발병**

[0031] 확장성 심근병증 마커 유전자인 Anf와 α - 및 β -myosin heavy chain의 값을 측정하기 위해 20주 된 마우스를 해부하여 심장을 얻어낸 뒤 Trizol과 믹서를 이용하여 심장을 갈아 단백질과 지노믹 DNA를 제거하였다. 그 다음, Invitrogen의 실험방법을 따라 RNA를 얻었고, Superscript III를 이용한 PCR을 통해 cDNA를 얻었다. 이것을 이용해 RT-PCR을 수행하여 Anf, α MHC, 그리고 β MHC의 값을 측정하였고, GAPDH로 값을 보정하였다.

[0032] 그 결과, ANP, α MHC 및 β MHC 등 심근병증 관련 유전자들이 ASC-2가 없는 마우스에서 변함을 확인하였고(도 3a), 이들의 변화는 어릴 때는 안 보이지만 나이가 들면서 차차 생기는 의령 의존적인 성격을 지닌 것을 확인하였다(도 3b).

[0033] 더 정확한 확인을 위해 초음파 심전도 실험을 수행하였다. 30주, 50주 된 마우스를 Ifran을 이용하여 마취시킨 후 가슴 부위의 털을 제거하였다. 그 뒤 심장 초음파 기계를 이용하여 심장의 모양과 박동 등을 확인하였고, 이를 토대로 percent blood ejection fraction 값을 계산하였다.

[0034] 그 결과, ASC-2 KO 마우스는 심실의 크기가 커져 있고, 심장 수축을 잘 못하며, 따라서 혈액을 충분히 못 전달함을 알 수 있었다(도 3c). DN1 과발현 마우스 또한 초음파 심장검진법 방법을 통해 심장을 관찰한 결과, 좌심실이 비대해져 있으며, 적절한 박동을 하지 못하여 혈액공급이 효율적이지 못하였다(도 6c).

[0035] 이러한 결과로부터 본 발명자들은 ASC-2 KO 마우스가 확장성 심근병증 표현형을 나타낸다는 결론을 내렸으며, 따라서 ASC-2가 확장성 심근병증을 억제하는데 중요하다는 결과를 얻을 수 있었다.

실시예 4

[0036] **ASC-2에 의한 확장성 심근병증 발병 메커니즘의 확인**

[0037] **in vitro 실험**

[0038] 사람의 심장세포인 AC-16에 ASC-2를 100 혹은 300 ng정도 PEI를 이용하여 트랜스펙션하였다. 24시간 뒤 PPAR의 아고니스트인 Troglitazone을 처리하거나 안 한 조건에서 PPAR-Responsive-Element (PPRE)에 대한 루시페라아제 실험을 수행하였다(12웰에서 세포를 배양하고, 24시간 뒤 트랜스펙션을 한 다음, 24시간 뒤 호르몬을 24시간 동안 처리하여 총 72시간 동안 배양을 하였다. 세포를 lysis buffer로 15분간 켜 뒤 용해물과 루시페라아제 기질과 섞은 뒤 기계를 이용하여 활성도를 측정하였다). 호르몬 처리 전 미디어는 혈청이 없는 것을 사용하였다. 이 때 ASC-2의 활성도를 용량 의존적 방법(dose-dependent manner)으로 측정하였고, Troglitazone을 24시간 동안 처리하여 한 번 더 활성도를 측정하였다. ASC-2에 대한 shRNA를 Sigma회사에서 구입한 뒤 이것을 293T에 렌티바이러스 컴파트먼트와 함께 PEI를 이용하여 트랜스펙션하여 shASC-2에 대한 렌티바이러스를 만들었다. 세포를 키운 미디어를 얻고, 원심분리를 돌려 미디어 내 잔해를 제거한 뒤 e-tube에 1mℓ씩 앨리콧트(aliquot)하여

70℃ 이하에서 보관하였다. 이 바이러스를 녹여 AC-16에 인팩션한 뒤 3달간 퓨로마이신을 이용한 선별 과정을 통해 ASC-2가 줄어든 AC-16세포주를 만들었다(shASC#3과 shASC#5). 이 세포주와 대조군 세포에서 단백질을 얻은 뒤 웨스턴 블랏을 통해 ASC-2의 레벨을 측정하였다. 또한 같은 세포주에서 mRNA를 얻어 revers-transcriptase PCR을 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 RT-Q-PCR을 통해 ASC-2의 레벨을 특정하고, GAPDH로 값을 보정하였다. 이 세포주에서 PPRE를 이용한 루시페라아제 실험을 통해 PPAR 활성도를 측정하였다. 같은 세포주를 이용하여 mRNA를 얻은 뒤 cDNA를 합성하였고, PPAR의 타깃인 CRBP1과 COX-2의 레벨을 RT-Q-PCR을 통해 측정하였다.

[0039] 그 결과, ASC-2가 PPAR의 전사활성을 증가시키며, 호르몬이 있을 때 그 강도를 더욱 증가시킴을 알 수 있었다(도 4a). 또한, ASC-2에 대한 shRNA를 사용한 ASC-2의 발현을 억제한 심장세포를 이용하여 확인하였다. 그 결과, ASC-2의 발현이 적을 때 PPAR-response-element (PPRE)의 활성이 줄어드는 것을 확인하였고(도 4b 및 도 4c).

[0040] in vivo 실험

[0041] 앞의 실험을 in vivo에서 확인하기 위해 마우스를 이용하였다. 태어난 지 하루가 되기 전의 DN1 TG와 WT 새끼 마우스에서 심장을 적출한 뒤, 콜라게나제 II(collagenase II)가 포함된 버퍼를 이용하여 primary cardiomyocyte를 심장에서부터 분리해냈다. 세포를 배양하고, 여기에 PPAR α와 PPAR γ의 아고니스트인 Wy14643 또는 로시글리타존을 처리한 후 mRNA를 얻어 cDNA를 합성하였다. RT-Q-PCR을 통해 PPAR 타깃 유전자를 확인해보았다. 새끼의 다른 장기를 이용하여 유전자형을 검사하였다. 결과의 재확인을 위해 5달 정도 된 ASC-2 KO마우스의 심장을 적출한 뒤 mRNA동정 및 cDNA합성, 그리고 PPAR가 억제한다고 알려진 Mmp-2, Cox-2, Crbp1 등에 대한 RT-Q-PCR을 수행하였다. 또한 10주와 25주 된 마우스의 심장을 적출한 뒤 protein lysis buffer를 이용하여 5 μg/μl의 단백질 샘플을 만들었다. 이들을 이용하여 웨스턴 블랏 실험을 수행하였고, pAKT, GSK3β, pGSK3β, p53, 그리고 GAPDH에 대한 항체를 이용하여 발현양을 확인하였다.

[0042] 그 결과, PPAR의 타깃들이 ASC-2 KO 마우스 심장에서 비정상적으로 발현을 함을 알 수 있었다(도 4d). 따라서 ASC-2가 PPAR 신호전달을 통해 확장성 심근병증을 유도할 것임을 예측할 수 있다. 더욱 확실한 결과를 도출하기 위해 DN1 과발현 마우스의 새끼에서 심장을 얻어 배양을 하였고, 호르몬을 투여했을 때 어떤 반응을 나타내는지 관찰한 결과, DN1 과발현으로 인해 ASC-2가 작동을 못 할 때 PPAR의 아고니스트가 있어도 PPAR의 활성이 증가하지 않음을 확인하였다(도 6d). 따라서 심장에서 ASC-2가 PPAR 신호전달을 조절한다는 것이 명백해졌다.

[0043] PPAR 신호전달은 AKT를 억제한다고 알려져 있고, 지속적인 AKT의 활성화는 확장성 심근병증을 야기한다고 알려져 있다. 따라서 ASC-2가 없을 때 PPAR 신호전달이 억제되었으므로 AKT가 지속적으로 활성화되어 확장성 심근병증이 유발되었다고 예상할 수 있다. 이것을 증명하기 위해 10주 된 마우스의 심장을 얻어 웨스턴 블랏을 수행하였고, 그 결과 ASC-2 KO 마우스에서 AKT의 인산화가 늘어있는 것을 확인하였다(도 4e). 이러한 현상은 확장성 심근병증이 일어난 마우스에서도 마찬가지였다. 따라서 ASC-2가 PPAR 신호전달을 통해 AKT의 활성을 조절하여 확장성 심근병증의 발병을 억제한다는 결과를 얻을 수 있었다.

실시예 5

[0044] 확장성 심근병증 환자의 ASC-2 내 유전자 변이 확인

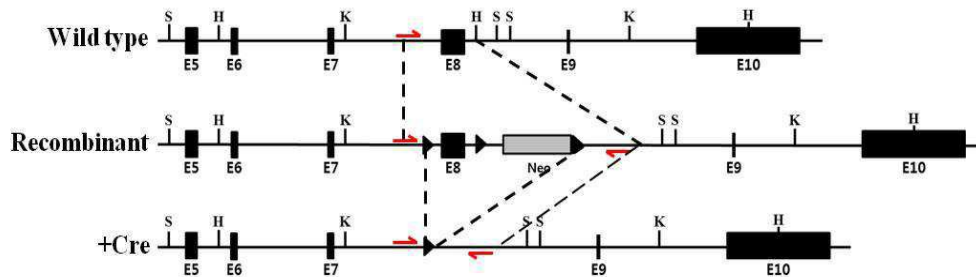
[0045] 사람에서 ASC-2가 확장성 심근병증에 관련이 있는지 확인하기 위해 50명의 확장성 심근병증 환자에서 혈액을 얻어 ASC-2 유전자검사를 수행하였고, 이 중 2명의 환자에서 ASC-2에 변이가 확인되었다(도 5a). 한 명은 703번 아미노산이 G에서 E로 바뀌었고, 다른 한 명은 766번 M이 L로 바뀐 것을 포함한 여러 변이가 관찰되었다. 그리고 G703E의 경우 코일 구조에서 헬릭스 구조로 변화하였고, M766L의 경우 코일 구조에서 베타-시트 구조를 바꾸었다(도 5a). 이러한 변이에 대한 ASC-2 변이 구조를 제작하기 위해 특정 프라이머쌍(G703E_F: 5'-GGGGCCTCAGGAGCAGGTTTTC-3', R: 5'-GCAAAACCTGCTCCTGAGGCC-3', M766L_F: 5'-TGTCAGGACAGTTGCTGCCCCAGC-3', R: 5'-GCTGGGCGCAACTGCTGAC-3')을 구입하여, PCR을 이용한 point mutagenesis(95℃ 5분 melting, 95℃ 30초-55℃ 30초-70℃ 25분, 72℃ 30분)를 통해 ASC-2에 대한 G703E와 M766L 구조를 만들었다. ASC-2의 703번과 766번 아미노산이 중요한지 판단하기 위해 PPRE-Luciferase assay를 수행한 결과 703번은 PPAR의 활성을 증가시키는 것을 확인하였다(도 5b). 따라서 ASC-2의 변이로 인해 확장성 심근병증이 유발되었음을 유추할 수 있다.

[0046]

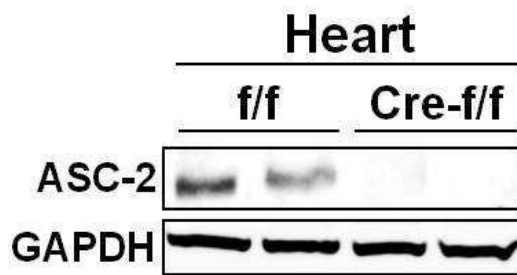
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

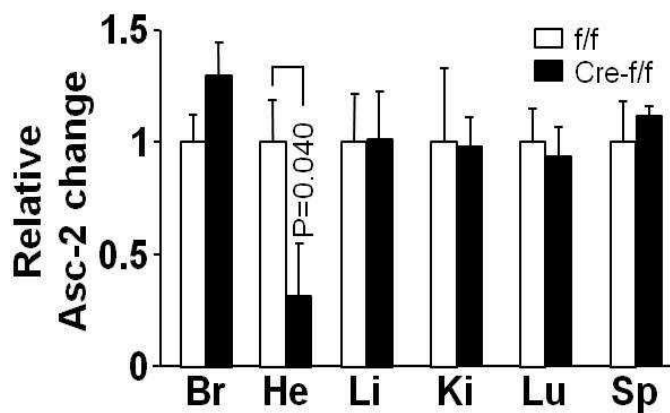
도면1a



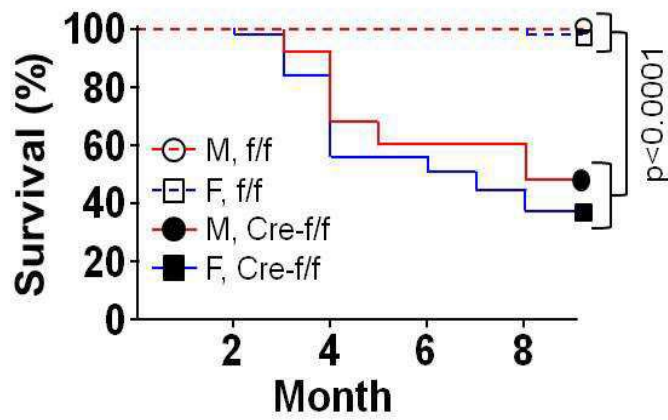
도면1b



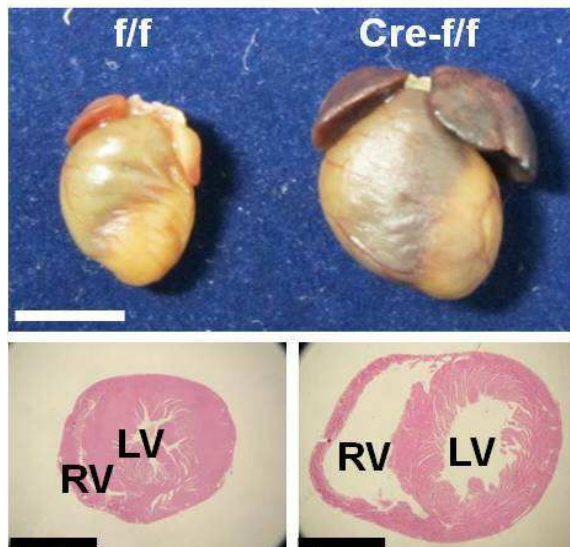
도면1c



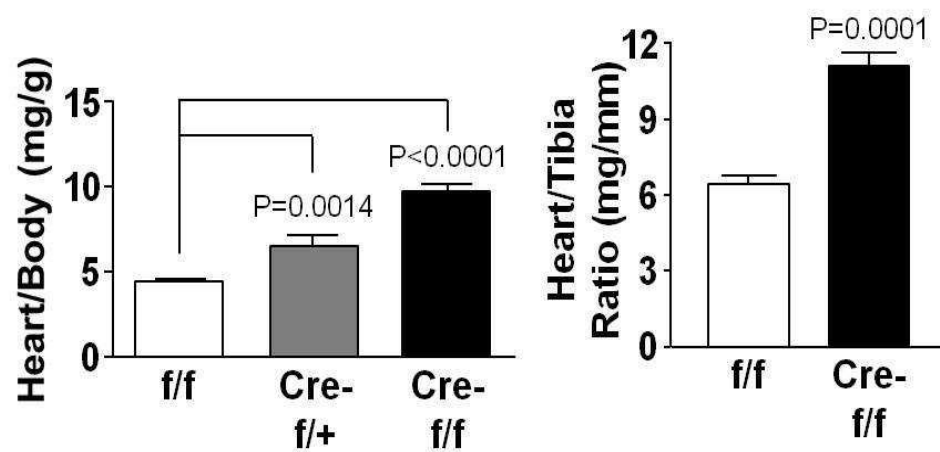
도면1d



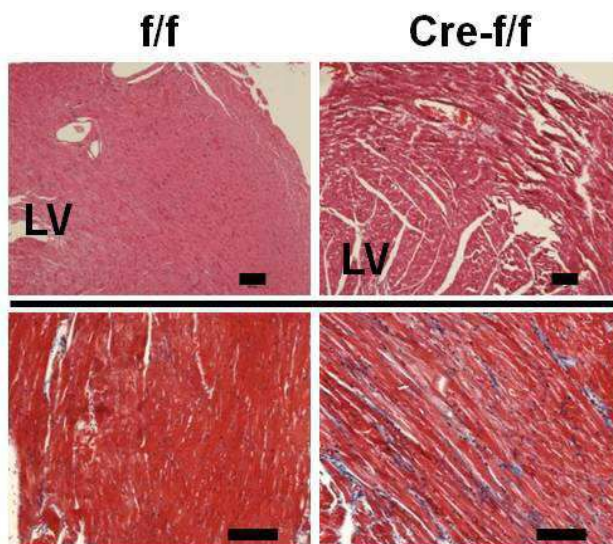
도면2a



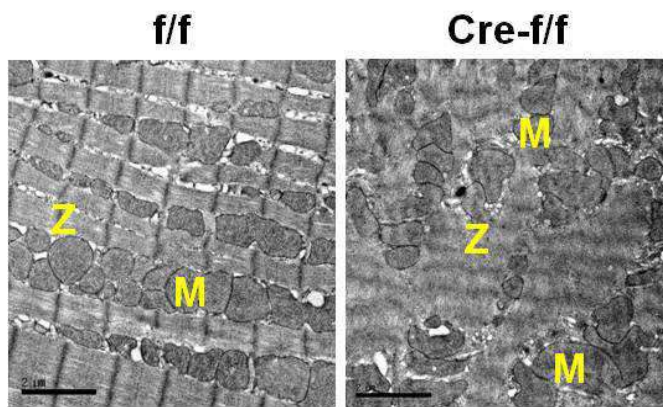
도면2b



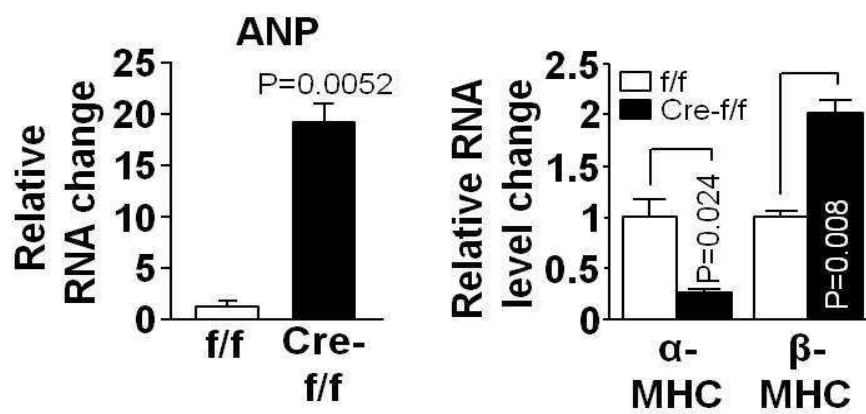
도면2c



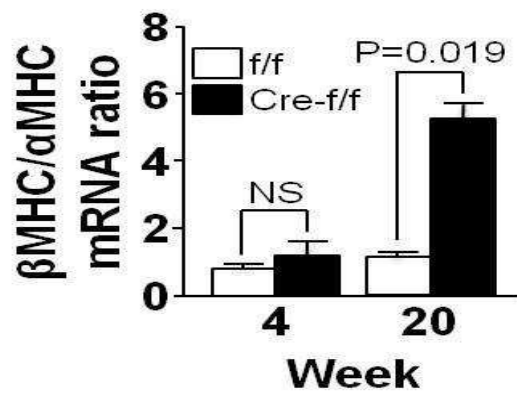
도면2d



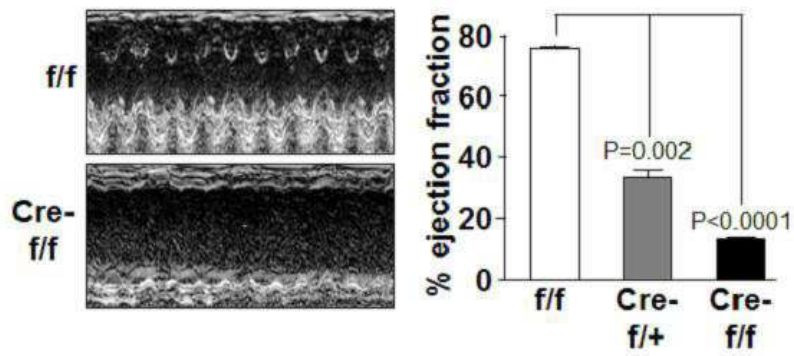
도면3a



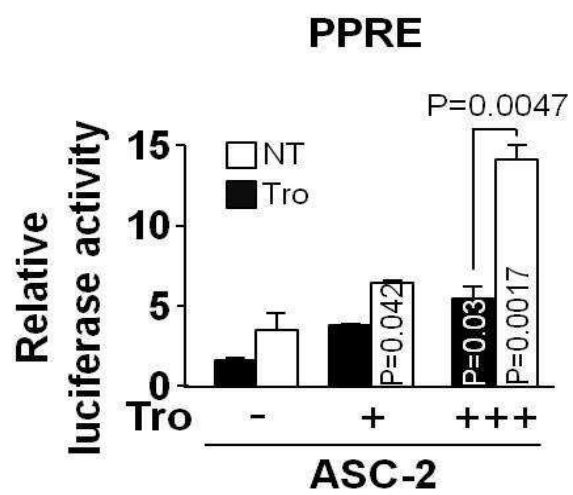
도면3b



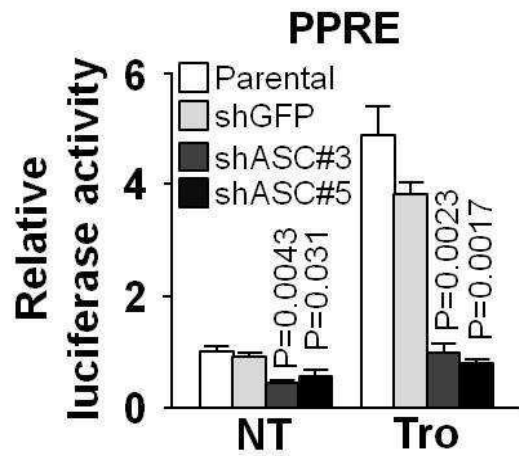
도면3c



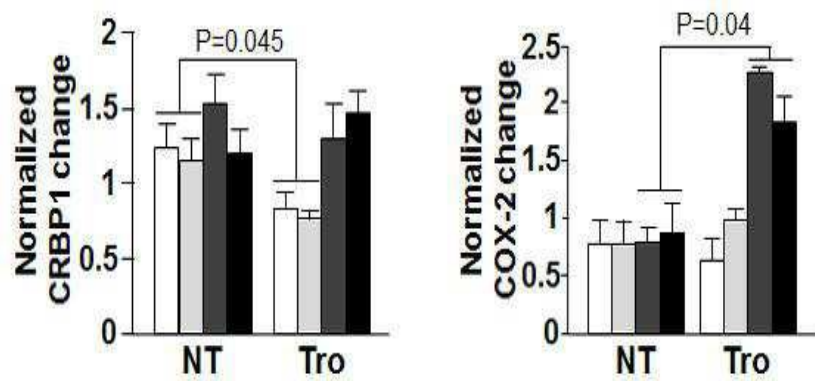
도면4a



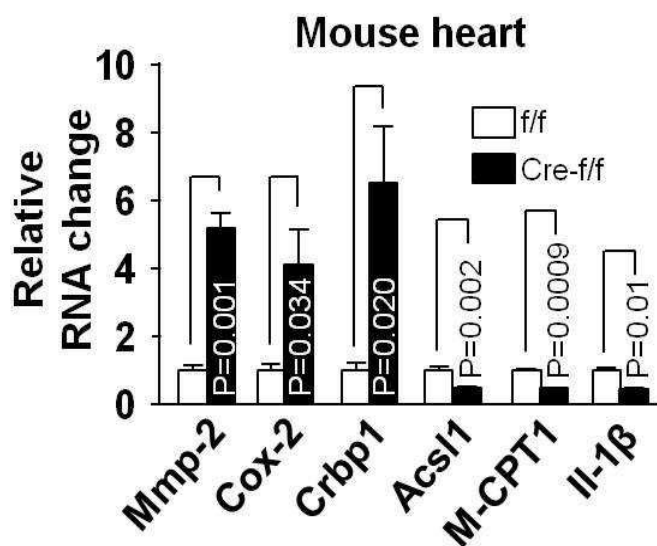
도면4b



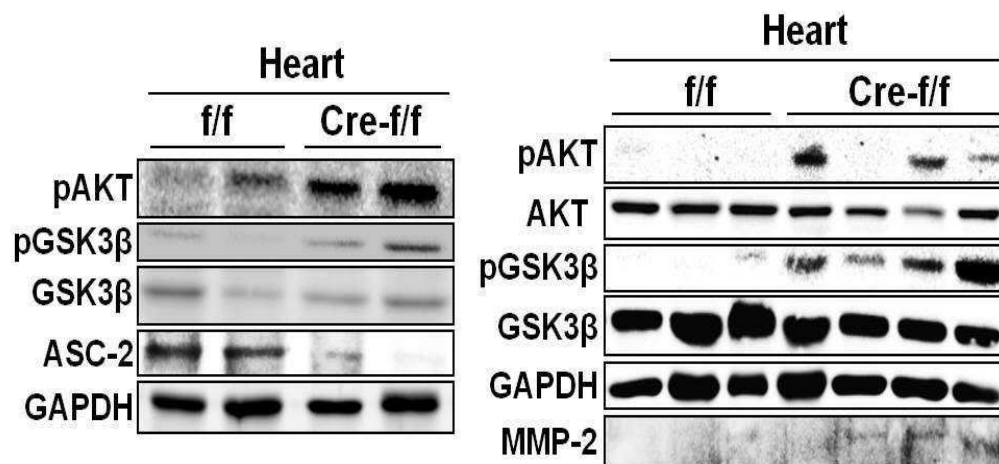
도면4c



도면4d



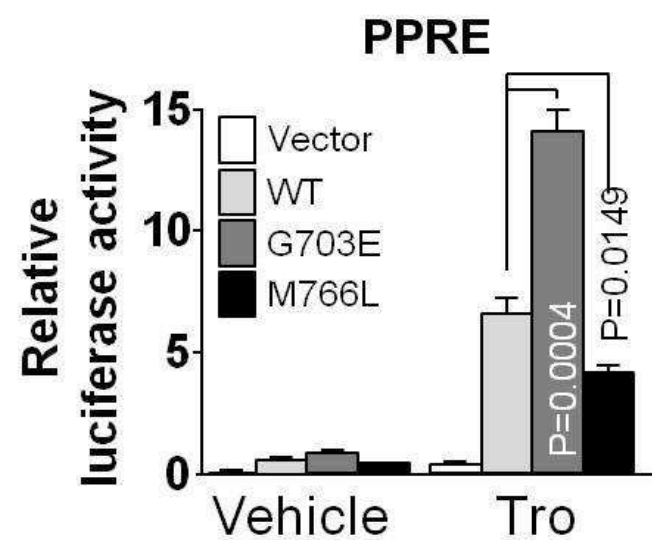
도면4e



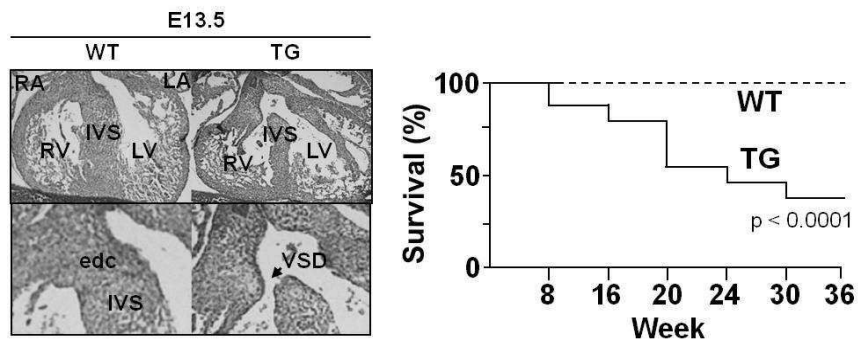
도면5a

WT	QMMAPHNQMMGPQ G QVLLQQNPMIEQIM
	CEEEEECCCCCCCC CE EEEECCCCCHHHHH
	CEEEEEHHHHCCC HHHHHHHH CCCCCHHHHH
G703E	QMMAPHNQMMGPQ E QVLLQQNPMIEQIM
WT	MQGNMVQFTGQ M SGQMLPQQGPVNNSPS
	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
	CCCC EEEE CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
M766L	MQGNMVQFTGQ L SGQMLPQQGPVNNSPS

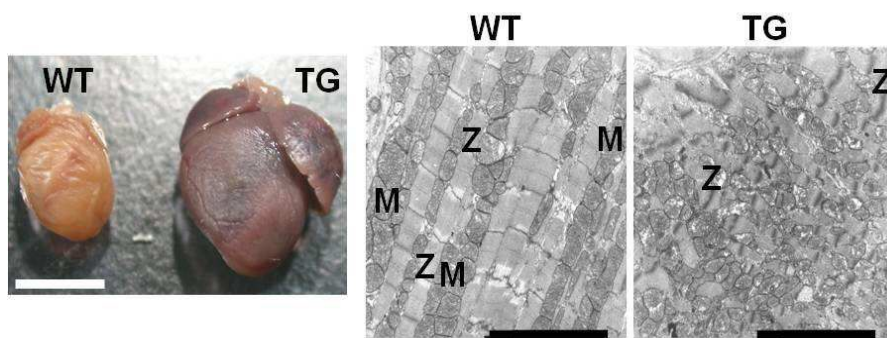
도면5b



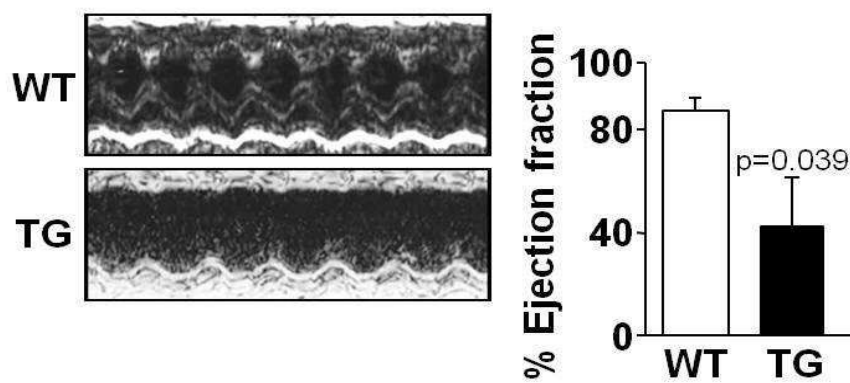
도면6a



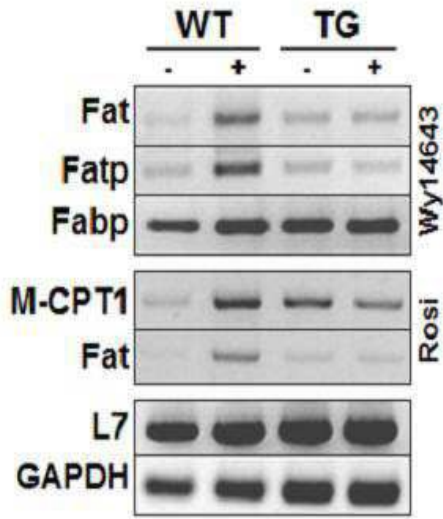
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Diagnostic kit for cardiovascular disease and method of providing the information for diagnosis of cardiovascular disease
- <130> IPDB44546
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 2063
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Val Leu Asp Asp Leu Pro Asn Leu Glu Asp Ile Tyr Thr Ser Leu

1 5 10 15

Cys Ser Ser Thr Met Glu Asp Ser Glu Met Asp Phe Asp Ser Gly Leu

20 25 30

Glu Asp Asp Asp Thr Lys Ser Asp Ser Ile Leu Glu Asp Ser Thr Ile

35 40 45

Phe Val Ala Phe Lys Gly Asn Ile Asp Asp Lys Asp Phe Lys Trp Lys

50 55 60

Leu Asp Ala Ile Leu Lys Asn Val Pro Asn Leu Leu His Met Glu Ser

65 70 75 80

Ser Lys Leu Lys Val Gln Lys Val Glu Pro Trp Asn Ser Val Arg Val
85 90 95

Thr Phe Asn Ile Pro Arg Glu Ala Ala Glu Arg Leu Arg Ile Leu Ala
100 105 110

Gln Ser Asn Asn Gln Gln Leu Arg Asp Leu Gly Ile Leu Ser Val Gln
115 120 125

Ile Glu Gly Glu Gly Ala Ile Asn Leu Ala Leu Ala Gln Asn Arg Ser
130 135 140

Gln Asp Val Arg Met Asn Gly Pro Met Gly Ala Gly Asn Ser Val Arg
145 150 155 160

Met Glu Ala Gly Phe Pro Met Ala Ser Gly Pro Gly Ile Ile Arg Met
165 170 175

Asn Asn Pro Ala Thr Val Met Ile Pro Pro Gly Gly Asn Val Ser Ser
180 185 190

Ser Met Met Ala Pro Gly Pro Asn Pro Glu Leu Gln Pro Arg Thr Pro
195 200 205

Arg Pro Ala Ser Gln Ser Asp Ala Met Asp Pro Leu Leu Ser Gly Leu
210 215 220

His Ile Gln Gln Gln Ser His Pro Ser Gly Ser Leu Ala Pro Pro His
225 230 235 240

His Pro Met Gln Pro Val Ser Val Asn Arg Gln Met Asn Pro Ala Asn
245 250 255

Phe Pro Gln Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
260 265 270

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gln Ala
275 280 285

Arg Pro Pro Gln Gln His Gln Gln Gln Gln Pro Gln Gly Ile Arg Pro
290 295 300

Gln Phe Thr Ala Pro Thr Gln Val Pro Val Pro Pro Gly Trp Asn Gln
305 310 315 320

Leu Pro Ser Gly Ala Leu Gln Pro Pro Pro Ala Gln Gly Ser Leu Gly

325 330 335
 Thr Met Thr Ala Asn Gln Gly Trp Lys Lys Ala Pro Leu Pro Gly Pro
 340 345 350
 Met Gln Gln Gln Leu Gln Ala Arg Pro Ser Leu Ala Thr Val Gln Thr
 355 360 365
 Pro Ser His Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Phe Gly Ser Gln Gln Ala Ser
 370 375 380

 Gln Ala His Thr Asn Phe Pro Gln Met Ser Asn Pro Gly Gln Phe Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Gln Met Lys Ser Leu Gln Gly Gly Pro Ser Arg Val Pro Thr
 405 410 415
 Pro Leu Gln Gln Pro His Leu Thr Asn Lys Ser Pro Ala Ser Ser Pro
 420 425 430
 Ser Ser Phe Gln Gln Gly Ser Pro Ala Ser Ser Pro Thr Val Asn Gln
 435 440 445
 Thr Gln Gln Gln Met Gly Pro Arg Pro Pro Gln Asn Asn Pro Leu Pro

 450 455 460
 Gln Gly Phe Gln Gln Pro Val Ser Ser Pro Gly Arg Asn Pro Met Val
 465 470 475 480
 Gln Gln Gly Asn Val Pro Pro Asn Phe Met Val Met Gln Gln Gln Pro
 485 490 495
 Pro Asn Gln Gly Pro Gln Ser Leu His Pro Gly Leu Gly Gly Met Pro
 500 505 510
 Lys Arg Leu Pro Pro Gly Phe Ser Ala Gly Gln Ala Asn Pro Asn Phe
 515 520 525

 Met Gln Gly Gln Val Pro Ser Thr Thr Ala Thr Thr Pro Gly Asn Ser
 530 535 540
 Gly Ala Pro Gln Leu Gln Ala Asn Gln Asn Val Gln His Ala Gly Gly
 545 550 555 560
 Gln Gly Ala Gly Pro Pro Gln Asn Gln Met Gln Val Ser His Gly Pro
 565 570 575
 Pro Asn Met Met Gln Pro Ser Leu Met Gly Ile His Gly Asn Met Asn

580 585 590
 Asn Gln Gln Ala Gly Thr Ser Gly Val Pro Gln Val Asn Leu Ser Asn

 595 600 605
 Met Gln Gly Gln Pro Gln Gln Gly Pro Pro Ser Gln Leu Met Gly Met
 610 615 620
 His Gln Gln Ile Val Pro Ser Gln Gly Gln Met Val Gln Gln Gln Gly
 625 630 635 640
 Thr Leu Asn Pro Gln Asn Pro Met Ile Leu Ser Arg Ala Gln Leu Met
 645 650 655
 Pro Gln Gly Gln Met Met Val Asn Pro Pro Ser Gln Asn Leu Gly Pro
 660 665 670

 Ser Pro Gln Arg Met Thr Pro Pro Lys Gln Met Leu Ser Gln Gln Gly
 675 680 685
 Pro Gln Met Met Ala Pro His Asn Gln Met Met Gly Pro Gln Gly Gln
 690 695 700
 Val Leu Leu Gln Gln Asn Pro Met Ile Glu Gln Ile Met Thr Asn Gln
 705 710 715 720
 Met Gln Gly Asn Lys Gln Gln Phe Asn Thr Gln Asn Gln Ser Asn Val
 725 730 735
 Met Pro Gly Pro Ala Gln Ile Met Arg Gly Pro Thr Pro Asn Met Gln

 740 745 750
 Gly Asn Met Val Gln Phe Thr Gly Gln Met Ser Gly Gln Met Leu Pro
 755 760 765
 Gln Gln Gly Pro Val Asn Asn Ser Pro Ser Gln Val Met Gly Ile Gln
 770 775 780
 Gly Gln Val Leu Arg Pro Pro Gly Pro Ser Pro His Met Ala Gln Gln
 785 790 795 800
 His Gly Asp Pro Ala Thr Thr Ala Asn Asn Asp Val Ser Leu Ser Gln
 805 810 815

 Met Met Pro Asp Val Ser Ile Gln Gln Thr Asn Met Val Pro Pro His
 820 825 830

Val Gln Ala Met Gln Gly Asn Ser Ala Ser Gly Asn His Phe Ser Gly
835 840 845

His Gly Met Ser Phe Asn Ala Pro Phe Ser Gly Ala Pro Asn Gly Asn
850 855 860

Gln Met Ser Cys Gly Gln Asn Pro Gly Phe Pro Val Asn Lys Asp Val
865 870 875 880

Thr Leu Thr Ser Pro Leu Leu Val Asn Leu Leu Gln Ser Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Gly His Phe Gly Val Asn Asn Lys Gln Asn Asn Thr Asn Ala Asn
900 905 910

Lys Pro Lys Lys Lys Lys Pro Pro Arg Lys Lys Lys Asn Ser Gln Gln
915 920 925

Asp Leu Asn Thr Pro Asp Thr Arg Pro Ala Gly Leu Glu Glu Ala Asp
930 935 940

Gln Pro Pro Leu Pro Gly Glu Gln Gly Ile Asn Leu Asp Asn Ser Gly
945 950 955 960

Pro Lys Leu Pro Glu Phe Ser Asn Arg Pro Pro Gly Tyr Pro Ser Gln
965 970 975

Pro Val Glu Gln Arg Pro Leu Gln Gln Met Pro Pro Gln Leu Met Gln
980 985 990

His Val Ala Pro Pro Pro Gln Pro Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Gln
995 1000 1005

Leu Pro Gln Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Ser Gln Pro Gln Ser Gln
1010 1015 1020

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Met Met Met Met Leu Met Met Gln
1025 1030 1035 1040

Gln Asp Pro Lys Ser Val Arg Leu Pro Val Ser Gln Asn Val His Pro
1045 1050 1055

Pro Arg Gly Pro Leu Asn Pro Asp Ser Gln Arg Met Pro Met Gln Gln
1060 1065 1070

Ser Gly Ser Val Pro Val Met Val Ser Leu Gln Gly Pro Ala Ser Val
1075 1080 1085

Pro Pro Ser Pro Asp Lys Gln Arg Met Pro Met Pro Val Asn Thr Pro
1090 1095 1100

Leu Gly Ser Asn Ser Arg Lys Met Val Tyr Gln Glu Ser Pro Gln Asn
1105 1110 1115 1120

Pro Ser Ser Ser Pro Leu Ala Glu Met Ala Ser Leu Pro Glu Ala Ser
1125 1130 1135

Gly Ser Glu Ala Pro Ser Val Pro Gly Gly Pro Asn Asn Met Pro Ser
1140 1145 1150

His Val Val Leu Pro Gln Asn Gln Leu Met Met Thr Gly Pro Lys Pro
1155 1160 1165

Gly Pro Ser Pro Leu Ser Ala Thr Gln Gly Ala Thr Pro Gln Gln Pro
1170 1175 1180

Pro Val Asn Ser Leu Pro Ser Ser His Gly His His Phe Pro Asn Val
1185 1190 1195 1200

Ala Ala Pro Thr Gln Thr Ser Arg Pro Lys Thr Pro Asn Arg Ala Ser
1205 1210 1215

Pro Arg Pro Tyr Tyr Pro Gln Thr Pro Asn Asn Arg Pro Pro Ser Thr
1220 1225 1230

Glu Pro Ser Glu Ile Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Asn Ala Ser Ile
1235 1240 1245

Ala Gly Leu Phe Pro Pro Gln Ile Asn Ile Pro Leu Pro Pro Arg Pro
1250 1255 1260

Asn Leu Asn Arg Gly Phe Asp Gln Gln Gly Leu Asn Pro Thr Thr Leu
1265 1270 1275 1280

Lys Ala Ile Gly Gln Ala Pro Ser Asn Leu Thr Met Asn Pro Ser Asn
1285 1290 1295

Phe Ala Thr Pro Gln Thr His Lys Leu Asp Ser Val Val Val Asn Ser
1300 1305 1310

Gly Lys Gln Ser Asn Ser Gly Ala Thr Lys Arg Ala Ser Pro Ser Asn
1315 1320 1325

Ser Arg Arg Ser Ser Pro Gly Ser Ser Arg Lys Thr Thr Pro Ser Pro

1330 1335 1340
 Gly Arg Gln Asn Ser Lys Ala Pro Lys Leu Thr Leu Ala Ser Gln Thr
 1345 1350 1355 1360
 Asn Ala Ala Leu Leu Gln Asn Val Glu Leu Pro Arg Asn Val Leu Val
 1365 1370 1375
 Ser Pro Thr Pro Leu Ala Asn Pro Pro Val Pro Gly Ser Phe Pro Asn
 1380 1385 1390

 Asn Ser Gly Leu Asn Pro Gln Asn Ser Thr Val Ser Val Ala Ala Val
 1395 1400 1405
 Gly Gly Val Val Glu Asp Asn Lys Glu Ser Leu Asn Val Pro Gln Asp
 1410 1415 1420
 Ser Asp Cys Gln Asn Ser Gln Ser Arg Lys Glu Gln Val Asn Ile Glu
 1425 1430 1435 1440
 Leu Lys Ala Val Pro Ala Gln Glu Val Lys Met Val Val Pro Glu Asp
 1445 1450 1455
 Gln Ser Lys Lys Asp Gly Gln Pro Ser Asp Pro Asn Lys Leu Pro Ser

 1460 1465 1470
 Val Glu Glu Asn Lys Asn Leu Val Ser Pro Ala Met Arg Glu Ala Pro
 1475 1480 1485
 Thr Ser Leu Ser Gln Leu Leu Asp Asn Ser Gly Ala Pro Asn Val Thr
 1490 1495 1500
 Ile Lys Pro Pro Gly Leu Thr Asp Leu Glu Val Thr Pro Pro Val Val
 1505 1510 1515 1520
 Ser Gly Glu Asp Leu Lys Lys Ala Ser Val Ile Pro Thr Leu Gln Asp
 1525 1530 1535

 Leu Ser Ser Ser Lys Glu Pro Ser Asn Ser Leu Asn Leu Pro His Ser
 1540 1545 1550
 Asn Glu Leu Cys Ser Ser Leu Val His Pro Glu Leu Ser Glu Val Ser
 1555 1560 1565
 Ser Asn Val Ala Pro Ser Ile Pro Pro Val Met Ser Arg Pro Val Ser
 1570 1575 1580
 Ser Ser Ser Ile Ser Thr Pro Leu Pro Pro Asn Gln Ile Thr Val Phe

1585 1590 1595 1600
 Val Thr Ser Asn Pro Ile Thr Thr Ser Ala Asn Thr Ser Ala Ala Leu

 1605 1610 1615
 Pro Thr His Leu Gln Ser Ala Leu Met Ser Thr Val Val Thr Met Pro
 1620 1625 1630
 Asn Ala Gly Ser Lys Val Met Val Ser Glu Gly Gln Ser Ala Ala Gln
 1635 1640 1645
 Ser Asn Ala Arg Pro Gln Phe Ile Thr Pro Val Phe Ile Asn Ser Ser
 1650 1655 1660
 Ser Ile Ile Gln Val Met Lys Gly Ser Gln Pro Ser Thr Ile Pro Ala
 1665 1670 1675 1680

 Ala Pro Leu Thr Thr Asn Ser Gly Leu Met Pro Pro Ser Val Ala Val
 1685 1690 1695
 Val Gly Pro Leu His Ile Pro Gln Asn Ile Lys Phe Ser Ser Ala Pro
 1700 1705 1710
 Val Pro Pro Asn Ala Leu Ser Ser Ser Pro Ala Pro Asn Ile Gln Thr
 1715 1720 1725
 Gly Arg Pro Leu Val Leu Ser Ser Arg Ala Thr Pro Val Gln Leu Pro
 1730 1735 1740
 Ser Pro Pro Cys Thr Ser Ser Pro Val Val Pro Ser His Pro Pro Val

 1745 1750 1755 1760
 Gln Gln Val Lys Glu Leu Asn Pro Asp Glu Ala Ser Pro Gln Val Asn
 1765 1770 1775
 Thr Ser Ala Asp Gln Asn Thr Leu Pro Ser Ser Gln Ser Thr Thr Met
 1780 1785 1790
 Val Ser Pro Leu Leu Thr Asn Ser Pro Gly Ser Ser Gly Asn Arg Arg
 1795 1800 1805
 Ser Pro Val Ser Ser Ser Lys Gly Lys Gly Lys Val Asp Lys Ile Gly
 1810 1815 1820

 Gln Ile Leu Leu Thr Lys Ala Cys Lys Lys Val Thr Gly Ser Leu Glu
 1825 1830 1835 1840

Lys Gly Glu Glu Gln Tyr Gly Ala Asp Gly Glu Thr Glu Gly Gln Gly
 1845 1850 1855
 Leu Asp Thr Thr Ala Pro Gly Leu Met Gly Thr Glu Gln Leu Ser Thr
 1860 1865 1870
 Glu Leu Asp Ser Lys Thr Pro Thr Pro Pro Ala Pro Thr Leu Leu Lys
 1875 1880 1885
 Met Thr Ser Ser Pro Val Gly Pro Gly Thr Ala Ser Ala Gly Pro Ser
 1890 1895 1900
 Leu Pro Gly Gly Ala Leu Pro Thr Ser Val Arg Ser Ile Val Thr Thr
 1905 1910 1915 1920
 Leu Val Pro Ser Glu Leu Ile Ser Ala Val Pro Thr Thr Lys Ser Asn
 1925 1930 1935
 His Gly Gly Ile Ala Ser Glu Ser Leu Ala Gly Gly Leu Val Glu Glu
 1940 1945 1950
 Lys Val Gly Ser His Pro Glu Leu Leu Pro Ser Ile Ala Pro Ser Gln
 1955 1960 1965
 Asn Leu Val Ser Lys Glu Thr Ser Thr Thr Ala Leu Gln Ala Ser Val
 1970 1975 1980
 Ala Arg Pro Glu Leu Glu Val Asn Ala Ala Ile Val Ser Gly Gln Ser
 1985 1990 1995 2000
 Ser Glu Pro Lys Glu Ile Val Glu Lys Ser Lys Ile Pro Gly Arg Arg
 2005 2010 2015
 Asn Ser Arg Thr Glu Glu Pro Thr Val Ala Ser Glu Ser Val Glu Asn
 2020 2025 2030
 Gly His Arg Lys Arg Ser Ser Arg Pro Ala Ser Ala Ser Ser Ser Thr
 2035 2040 2045
 Lys Asp Ile Thr Ser Ala Val Gln Ser Lys Arg Arg Lys Ser Lys
 2050 2055 2060
 <210> 2
 <211> 7071
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2

gtgaggccct gccgggtcgg gctgcgggcg gccgggcgcg ggcggcggga cagacgggcg	60
cacgcgagga ctgacggacg gacgcaccga gggcggcggg cacgcacggc ccgggccggc	120
gtccaaggc ccgcccggga gggccggggc cgcgctcaga attttgattt ggctgctggg	180
ctgctacctt gaaatccaag ccctaaaaat gccagcttct ttggacttag aagatgacct	240
ggataaatga taaaaattaa gaaagagatt ttgaagtttt cttatgtgcc tcttggcata	300
tgcttctgga ataataatca ccatggtttt ggatgacctt ccaaacttag aagacatcta	360
tacttccctg tgttcatcaa caatggaaga ctgagatg gattttgact ctggactaga	420
agatgatgac aaaaaagtg atagtatttt ggaggattcc acaattttg tggccttcaa	480
aggaaatata gatgataaag acttcaaatg gaaattagat gcaatattga aaacgtgcc	540
caatttgta cacatggagt ccagcaagct aaaagtacag aaggtggagc cctggaacag	600
cgtgcgtgtg acattcaaca tccccggga agcagcggag cggctacgga tccttgctca	660
gagcaacaac cagcagcttc gggatttagg gattctctcc gttcagattg aaggggaagg	720
tgctattaac ctggctttgg ctgagaaccg aagccaagat gtgagaatga atggacccat	780
gggagctgga aattcagtta ggatggaggc gggatttctt atggcaagtg gtccaggaat	840
aataaggatg aacaaccctg ccaactgttat gatacccccg ggtggaaatg tgtcatcttc	900
catgatggca ccaggcccca atccagagct gcagcccagg actcctcgcc ctgcttctca	960
gtcagatgca atggatccac tctctctgg gctccatata cagcagcaa gtcatccctc	1020
aggatcttta gtcccccac atcacccaat gcagcctgtc tctgtgaaca gacaaatgaa	1080
cccagctaat ttccccagc tgcagcagca gcagcaaca caacaacagc agcagcagca	1140
gcagcagcag caacaacagc aacagcagca acaacagttg caggcaagac ccccacagca	1200
acatcagcag caacagccac aggggaattcg acccagttt actgccccaa ctgaggtgcc	1260
tgttctcca ggctggaacc agctgccttc tggagccctt caacctcctc cagcccaggg	1320
ttctctgggc acaatgactg caaaccaagg gtggaagaag gctcccttgc ccggcccaat	1380
gcaacagcaa ctccaggcaa gaccatcctt agccacggta cagacgcctt cccacctcc	1440
ccctccatat ccttttgga gccagcaagc ctcaagcc cacacaaact ttcctcagat	1500
gagcaacca ggccagtta cagtcctca gatgaagagt ttgcaggag ggccctctag	1560
ggtcccaact ccttgcagc agccccacct caccaacaag tctctgcct cctcacctc	1620
ctcttccag cagggatccc ctgcatctc cccaacggtt aacaaactc agcagcagat	1680
gggaccaagg ccacctcaaa ataaccact tccccagga tttcagcagc ctgtcagctc	1740
tccgggtcgg aatcctatgg ttcaacaggg aaatgtcca cctaacttca tggatgca	1800

gcagcaacca ccaaaccagg ggccacagag ttacatcca ggcctaggag gaatgcctaa	1860
acgcctccca cctggcttct cagcaggaca ggccaatccg aactttatgc aaggtcaggt	1920
gccttcgacc acagcaacca cccctgggaa ttcaggagcc cctcagctgc aagcaaatca	1980
aaatgtccag catgcagggtg gtcaaggagc tggtcctcct caaaaccaga tgcagggtgc	2040
ccacgggccc ccaaatatga tgcagcccag cctcatggga attcatggca acatgaacaa	2100
tcagcaggct ggtacttctg gggttcctca agtgaacctc agcaacatgc aaggccagcc	2160
ccagcagggc ccaccatctc agctgatggg catgcaccag caaatcgtgc cctcccagg	2220
ccagatggtc cagcaacaag gaaccttgaa ccctcagaac cctatgatcc tttcaagggc	2280
ccagcttatg ccacagggcc agatgatggt gaacccccg agccaaaatc ttgggcctc	2340
gccccaaagg atgacccac ccaagcagat gctttcccag cagggccac aaatgatggc	2400
gccacataac cagatgatgg ggcctcaggg gcaggttttg ctccaacaga acccaatgat	2460
agagcagatt atgaccaatc aaatgcaggg gaataagcag cagttaaca ctcagaacca	2520
gtccaatgtc atgccgggac cagcccagat aatgagggga ccaactcaa acatgcaagg	2580
aaatatgggt cagtttacgg gacagatgtc aggacagatg ctgccccagc aagggcctgt	2640
gaacaacagt ccatctcagg ttatgggcat tcagggacag gtcctgcggc caccagggcc	2700
cagccacac atggcccagc agcatggtga tctgtctact acagcaaata acgatgtcag	2760
tttatctcag atgatgcctg atgttagcat tcaacaacc aacatggtcc cccctcatgt	2820
gcaggccatg cagggaacaa gtgcctcggg aaaccacttc tcaggccatg ggatgtcttt	2880
caatgcacct ttcagtggag ctccaatgg aaatcagatg tctgtggtc aaaatccagg	2940
cttcccagtc aataaggatg tcacgctaac gagccattg ttggtcaact tattgcagag	3000
tgacatatct gcaggccatt ttggggtaaa caataagcaa aataatacca acgcaaataa	3060
accgaagaag aagaaacccc ctcggaagaa gaaaaatagt cagcaagatc taaacacccc	3120
agatactcgc ccagctggtc tggaagaggc tgatcagcca ccgttgcctg gagaacaagg	3180
aattaacttg gataactcag gccctaaact gccagaattt tcaaaccggc caccaggtta	3240
tcctttctaa ccagtgaac agaggccact tcagcagatg cctcctcaac tcatgcagca	3300
tgtggcacc ccaccacagc caccacagca gcagccacag ccacaactgc ctcagcagca	3360
gcagccacca cctcccagtc agccacagtc tcagcagcag cagcagcagc agcaacaaat	3420
gatgatgatg ctcatgatgc agcaggatcc caaatcagtt aggcttcag tctctcaaaa	3480
tgtccatcct ccaaggggcc ccctgaacct cgactcccag agaatgccca tgcaacagag	3540

tggcagtgtg cctgtcatgg tcagtctgca aggacctgcc tccgtgccac catcacctga	3600
taaacaaaga atgccaatgc ctgtgaatac tcccttggga agcaattcaa ggaaaatggt	3660
ctatcaggag agcccgcaaga atccttccag ctgccactg gcggagatgg cctcactccc	3720
tgaagcaagt ggcagtgaag caccatctgt cccaggaggc ccaacaaca tgccttcaca	3780
tgtagtactt cccagaatc agttaatgat gacagggccca aaacctggac catcgccctt	3840
ttcagcaact caaggtgcaa ctccccagca acccctgta aattccctgc ccagctctca	3900
cggccaccac ttcccaaatg tggctgcgcc aaccagaca tctaggccca aaacacaaaa	3960
cagagccagc ccagaccct attatctca gacaccaac aaccgcctc ccagcacaga	4020
accttcagaa atcagtctgt caccagaaag actcaatgcc tccatagcag gactcttccc	4080
tccacagatt aatattcctt tacctcctag gccaaattta aacaggggct ttgatcaaca	4140
aggcctaaat ccaacaactt tgaaggccat cgggcaagca ccttcaaac ttacatgaa	4200
tccttccaat ttigtctacc cacaactca caaattagat tctgtggtag tgaattctgg	4260
aaagcagtct aattctggag caacaaaacg ggcaagtcca agcaacagtc gcaggtctag	4320
tcctgggtcc agtaggaaaa ccactccaag cctggggagg caaaattcaa aagcccctaa	4380
acttactctg gcctctcaga caaatgcagc cctattgcag aatgtggagt tgccgagaaa	4440
tgtattggtc agtcccactc ctctggccaa tccccctgta cctgggagct ttcctaacaa	4500
cagtgggctg aatcctcaga attctactgt gtctgtggct gcagttgggg gtgttgtga	4560
ggataacaag gagagcttga atgtgcctca ggacagtgat tgccagaatt ccagagtag	4620
gaaggaacag gtaaacattg aactaaaagc agtccctgcc caagaagtta aaatggttgt	4680
ccctgaagat cagtccaaaa aggatgggca gccttcggat cctaacaaac ttcacagtgt	4740
cgaagagaac aaaaatttgg tgtctcctgc tatgaggga gcaccaacat cgttaagtca	4800
acttcttgac aactctggag ctccaatgt gacaattaaa cccctgggc ttacagatct	4860
ggaagtaaca cctccagtag tttctgggga ggacctcaaa aaagcatctg tcattccac	4920
actgcaggat ctgtcttctt ctaaaagaacc ttctaattcc ctaaaattac ctacagtaa	4980
tgagctgtgt tcatcccttg tgcatcccga attgagttag gtcagttcta acgttgacc	5040
aagcatccct ccagtaatgt caagacctgt tagctcttcc tccatttcca ctcccttgc	5100
cccaaatcaa ataactgat ttgtcacttc caatcccatc acaacttcag ctaacacatc	5160
agcagctttg ccaactcact tgcagtctgc attgatgtca acagttgtca caatgcccaa	5220
tgcgggtagc aaggttatgg tttctgaggg acagtcagct gctcagtcta atgccggcc	5280

tcagttcatt acacctgtct ttatcaattc atcctcaata attcaggtta tgaaaggatc	5340
acagccaagc acaattcctg cagcccccact gacaaccaac tctggcctga tgcctccctc	5400
tgttgagtt gttggccctt tacacatacc tcagaacata aaattttctt ctgctcctgt	5460
accgcctaat gccctctcca gtagtcctgc tccaaacatc cagacaggtc gacctttggt	5520
ccttagctca cgagccacc ctgttcagct tccttccct ccttgtagct cttctccagt	5580
tgtcccttct catccccctg tgcagcaagt gaaagaattg aatccagatg aggctagccc	5640
tcaggtgaac acctcagcag atcagaacac tcttccctct tcacagtcaa ccacaatggt	5700
ttctccctt ttgaccaata gtccagggtc ctctggcaac cggcgaagcc cagtctcgtc	5760
tagtaagggc aaaggaaaag tggacaaaat tggccaaatt ttgttgacca aggcatgtaa	5820
gaaagttaca ggctctcttg agaaagggga agaacaatat ggtgcagatg gagagactga	5880
aggccaaggg ctagacacca cagctccggg gctcatggga acagagcagt tatccacaga	5940
gctggacagt aaaaccccaa cgccccagc acccactctg ctaaaaatga cctctagccc	6000
tgtgggccc ggactgcct cagcaggacc cagcttacct ggcggtgctc tccccaccag	6060
tgtacgctcg atagtaacca ctctggtacc ctccgagctc atctccgccg taccgaccac	6120
aaaaagcaat catggtggca tagcatctga gtcacttgcg ggtggcctag tggaggagaa	6180
ggtgggatcc catccagaac ttctaccag catagccccg tcgcagaatt tagtctcaaa	6240
ggaaacttca accacagcac tgcaggcctc tgttgccaga ccagagctgg aggtaaatgc	6300
tgccatagtc tctggacaaa gcagtggacc caaagagata gttgaaaagt ccaaaatccc	6360
aggccgaaga aactcccgaa ctgaagagcc aactgtggcc tctgaaagtg tggaaaatgg	6420
acatcgtaaa cgatcttctc gacctgcttc agcctccagc tctactaaag acataaccag	6480
tgcggtgcaa tccaagcgaa gaaaatccaa gtaaacaagc aggactgcga cttgatactt	6540
ggaaatgtgt gtgactttta caaagagcaa ttttagctg tgactttttt aaatcaattt	6600
ctgtacagtt agtaatttta ataattggc ctttttcta gtccctgcaa cctgtttcat	6660
aaagtgcaat ggggaaagca ggactgttg gcccttttgg tgttcgagt tgaagttcaa	6720
ggtttctaaa atgttgtctt gtattgaaag gagctaagc cattataaat gttactagtt	6780
ttcacatttc ctaagcagcc tagagtacag ggtgagcatt tttagatctc ctaatgatgt	6840
attgtccgt ggaagtactg tgtgtgaata gcagtagtgg gggcaaaagc aatcttctca	6900
tttgaaatg ttgtaataa ttttattata tagtgttttg gatgtatttg ttgtagaaat	6960
ggaccagtga ataaagagaa tctaaggatt tgtacaatgt gaaataacgt gttaataaaa	7020
tgtcattgtc atagaacata aagttatgtt attggtagg gaaaaaaaa a	7071