(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0045042
(43) 공개일자 2017년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0144948
(22) 출원일자 2015년10월16일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김은희
대전광역시 유성구 계룡로 92 유성 CJ나인파크 102동 1403호
박인원
대전광역시 유성구 장대로71번길 34, 장대푸르지오아파트 107동 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성대

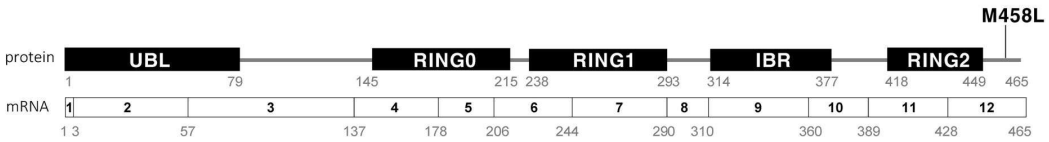
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **돌연변이 PARK2 유전자 및 이를 이용하여 파킨슨병을 진단하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 PARK2 돌연변이 유전자를 이용한 파킨슨병의 진단 방법에 관한 것이고, 구체적으로, PARK2 돌연변이는 AIMP2 및 SNCA 단백질의 분해를 억제하므로써, 파킨슨병을 유발하고 악화하게 된다. 따라서, 본 발명의 조성물을 이용하여 PARK2 돌연변이 여부 및 파킨슨병이 발생할 가능성을 사전에 확인함으로써, 치료 효과를 증가시킬 수 있다. 또한, PARK2 돌연변이를 활성을 변화시킬 수 있는 물질을 스크리닝함으로써, 파킨슨병 치료제를 개발할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/112 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)
(72) 발명자
박민영
대전광역시 서구 갈마중로16번길 7 한국도로공사조합아파트 306호
유창선
충청남도 아산시 배방읍 배방로 58-10 중앙하이츠아파트 105동 203호

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 PARK2에서 돌연변이를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돌연변이는 서열번호 1의 458번째 아미노산이 메티오닌이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 돌연변이는 서열번호 1의 458번째 메티오닌이 루이신으로 치환된 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PARK2의 돌연변이를 검출할 수 있는 조성물은 프로브, 앱타머 또는 프라이머인 것인, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

서열번호 5의 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호 6의 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 프라이머 세트; 또는

서열번호 1의 PARK2 돌연변이중 458번째 아미노산이 루이신으로 치환된 단백질과 결합할 수 있는 항체를 포함하는 파킨슨병 진단용 키트.

청구항 7

1) 개체로부터 유래된 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

2) 단계 1)에서 분리한 게놈 DNA에서 PARK2 유전자의 돌연변이 부위를 검출하는 단계; 및

3) 단계 2)에서 검출된 돌연변이 부위를 확인하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단 또는 발병 위험도 예측의 정보를 제공하기 위한 돌연변이 부위 확인방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 2) 단계는 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 돌연변이는 서열번호 1의 458번째 아미노산이 메티오닌 외의 다른 아미노산으로 치환된 것인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 돌연변이는 서열번호 1의 458번째 메티오닌이 루이신으로 치환된 것인, 방법.

청구항 11

1) PARK2 천연형 및 돌연변이를 세포내에서 과발현 시키는 단계;

2) 세포에 시료를 첨가시키는 단계; 및

3) PARK2 돌연변이의 활성이 증가된 시료를 선별하는 단계를 포함하는

파킨슨병 치료 및 개선용 물질을 선정하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 PAKR2 돌연변이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

PARK2 돌연변이 활성의 증가는

1) SNCA 또는 AIMP2 단백질의 분해가 억제되거나 및/또는

2) PARK2 돌연변이의 오토유비퀴틴화가 감소되는 것을 통해 확인하는 것인, 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 시료는 천연물 추출물, 화합물, 핵산, 단백질 또는 항체에서 선택되는 어느 하나인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파킨슨병을 진단하는 조성물 및 이를 이용하여 파킨슨병을 진단하는 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 파킨슨병은 신경 퇴행성 질환이며, 서동, 경직, 비자발적 떨림 및 자세불안 중 한 가지 이상의 증상을 동반한다. 파킨슨병은 흑색질 치밀부에서 도파민 뉴런의 현저한 손실로 특징지어진다. 또한, "파킨슨병의 발병 위험이 큰 사람"이란, 특히 아직은 파킨슨병의 어떠한 증상도 보이지 않지만 일정한 위험인자를 가지는 사람을 의미한다.

[0004] 위험인자의 예로는 유전적 돌연변이가 있다(Nussbaum NEJM 348, 2003, 25). 예를 들어, 염색체 6q25.2-27의 파킨유전자(PARK2)는 연소성 파킨슨증(juvenile Parkinsonism)과 관련이 있으며 상염색체 열성유전 파킨슨 유전형질(autosomal recessive Parkinson inheritance)을 가지는 가계에서 빈번하게 발견된다(Matsumine, Am. J. Hum. Genet., 60, 1997, 588,; Kitada, Nature 392, 1998, 605; Abbas, Hum. Mol. Genet. 8, 1999, 567; Tassin, Am, J, Hum. Genet., 63, 1998, 88 및 Lucking, N. Engl. J. Med. 342, 2000, 1560-7). PARK6 및 PARK7와 같은 다른 유전자좌 역시 연소성이며 상염색체의 열성유전 파킨슨 병력을 가지는 가계에서 발생빈도가 높은 것으로 확인되었다(Valente, Am. J. Hum. Genet. 68, 2001, 895; van Dujin, Am. J. Hum. Genet. 69, 2001, 629). 알파-시누클레인 유전자(PARK1)의 돌연변이 역시 연소성이며 상염색체의 열성유전 파킨슨병력을 가지는 가계에서 발견되었다(Polymeropoulos, Science 276, 1997, 2045). 유전적 소인 외에도, 예를 들어 살충제에 과다노출되는 등의(Vanacore, Neurol Sci., Sep; 23 Suppl 2, 2002, page 119) 환경적 요인 또한 대표적인 위험인자가 될 수 있다. 또한, 과도한 활성 산소종 생성, 산화 스트레스, 잘못 접힌(misfolded) 단백질 및 손상된 미토콘드리아 기능과 같은 다양한 자극들이 파킨슨병의 원인으로 알려져있다.

[0005] 그뿐 아니라, 파킨슨병 질환의 원인으로 PARK2(PARKIN/PAKN)의 돌연변이는 최근 보고된 바 있다. 그러나 어떠한 부위에 돌연변이가 있는지 및 이의 기작에 대하여는 명확하게 밝혀진 바 없었다. 파킨슨병을 정확하게 진단하기 위하여는 가능한 많은 유전자 돌연변이가 규명되어야 하며, 파킨슨병을 유발하는 메카니즘과 관련된 단백질의 기능 및 이를 조절하는 유전자 또한 규명되어야 한다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 PARK2 돌연변이의 종류 및 기작에 대하여 연구하던 중, 파킨슨병의 유발과 관련된 단백질을 조절하는 돌연변이 유전자를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 파킨슨병의 질환의 진단 및 진단을 위한 정보 제공에 이용할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병을 치료 또는 개선할 수 있는 약물을 스크리닝할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 PARK2에서 돌연변이를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 개체로부터 유래된 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계, 상기 단계에서 분리한 게놈 DNA에서 PARK2 유전자의 돌연변이 부위를 검출하는 단계, 및 검출된 돌연변이 부위를 확인하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 진단 또는 발병 위험도 예측의 정보를 제공하기 위한 돌연변이 부위 확인방법을 제공한다.

[0013] 또한, PARK2 천연형 및 돌연변이를 세포내에서 과발현 시키는 단계, 세포에 시료를 첨가시키는 단계, 및 PARK2 돌연변이의 활성이 증가된 시료를 선별하는 단계를 포함하는 파킨슨병 치료 및 개선용 물질을 선정하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 파킨슨병을 진단하거나 진단을 위한 정보를 제공하기 위하여 본 발명의 프라이머 세트를 사용할 경우, 파킨슨병을 유발하는데 관여하는 유전자를 용이하게 검출할 수 있다. 또한, 상기 유전자를 과발현시킨 후 돌연변이 PARK2 단백질의 SNCA 및 AIMP2 단백질의 분해를 촉진하는 물질을 스크리닝함으로써, 파킨슨병의 치료제를 스크리닝할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 이러한, 신속한 진단을 통하여 파킨슨병으로 진행될 수 있는 환자군을 사전에 발견하여 적절한 치료를 할 수 있는 정보를 제공할 수 있으며, 치료제 개발을 촉진할 수 있는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 PARK2 유전자의 개요도를 나타낸 것이다.

도 2는 M458L 세포내 과발현시, 기질단백질 AIMP2의 분해억제를 확인한 것으로서, PARK2 단백질의 기능손실을 확인한 것이다. 이때, lane 1번은 MYC-AIMP2 + Mock을, lane 2번은 MYC-AIMP2 + PARK2-WT을, lane 3번은 MYC-AIMP2 + PARK2-M458L을 의미한다.

도 3은 M458L 세포내 과발현시, 기질단백질 SNCA의 분해억제를 확인한 것으로서, PARK2 단백질의 기능손실을 확인한 것이다.

도 4는 PARK2 돌연변이 단백질의 자가 유비퀴틴화를 조사한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1의 PARK2에서 돌연변이를 검출할 수 있는 물질을 포함하는 파킨슨병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 명세서에서 사용한 용어 "파킨슨병(Morbus Parkinson 및 Parkinson's disease)"은 본 특허 출원에서 동의어로 사용되고, 특발성 및 유전적 파킨슨병을 포함한다. 본 명세서에서 사용한 용어 "PARK2"는 파킨슨병 단백질 2(Parkinson Disesase Protein 2)를 의미하며, 상기 PARK2는 세포내에서 E3 유비퀴틴 리가제 효소(E3 ubiquitin ligase enzyme)의 기능을 수행한다. 상기 효소는 기질 단백질을 분해시켜 세포의 항상성을 유지한다. PARK2의 기질로서 AIMP2(aminoacyl-tRNA complex interacting multifuncional protein-2)와 SNCA(α-synuclein)가 PARK2에 의해 분해된다. 상기 AIMP2 및 SNCA 단백질은 신경세포죽음 유도 기능을 수행하는 것으로 보고된 바 있다.

[0020] 상기 PARK2에서 돌연변이는 효소 기능을 상실한 돌연변이를 의미한다. 특히, 상기 돌연변이는 기질단백질인 AIMP2 및/또는 SNCA의 분해가 억제된 것을 의미한다. 또한, 상기 PARK2에서 돌연변이는 서열번호 1의 PARK2에서 458번의 아미노산이 천연형과 다른 아미노산을 갖는 것일 수 있다. 천연형의 PARK2는 458번의 아미노산이 메티오닌(Met, M)이나, 돌연변이 PARK2는 메티오닌 이외의 다른 아미노산 일 수 있다. 바람직하게, PARK2에서 돌연변이 서열번호 1의 458번째 아미노산이 메티오닌에서 루이신(Leu, L)일 수 있다. 바람직하게는 PARK2 돌연변이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0021] 천연형 PARK2는 E3 유비퀴딘을 통해 AIMP2 및/또는 SNCA의 분해를 촉진시켜, 세포내에 상기 단백질이 축적되지 않으며, 상기 단백질에 의한 파킨슨병이 유발되지 않는다. 그러나, 돌연변이 PARK2는 AIMP2 및/또는 SNCA의 분해가 억제되어, 세포내에 상기 단백질이 축적되게 된다. 그로인해, 상기 단백질에 의한 파킨슨병이 유발되게 된다.

[0023] 상기 조성물의 일 구체예로는 PARK2의 돌연변이를 검출할 수 있는 프로브, 앱타머 또는 프라이머를 포함할 수 있다.

[0024] 용어 “프로브”는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 라벨링된 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. PARK2 돌연변이 단백질을 코딩하는 핵산을 인식하기 위하여 돌연변이 부위를 인식하여 결합할 수 있는 프로브가 사용될 수 있다.

[0025] 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 PARK2 돌연변이 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이때, 상기 프라이머는 돌연변이된 유전자 부분을 포함할 수 있게 고안될 수 있으며, 또는 프라이머에 의해 증폭된 산물내에 돌연변이된 유전자 부분을 포함할 수 있도록 고안될 수 있다.

[0026] 일 구체예로서, 서열번호 5의 서열을 갖는 프라이머 및 서열번호 6의 서열을 갖는 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.

[0028] 본 발명의 또 다른 측면은, 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.

[0029] 상기 파킨슨병의 진단 또는 예후 예측용 키트에는 PAKR2 돌연변이 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 이외에 키트로 사용되기에 적합하도록 하기 위한 다른 성분들이 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예를들어, Thermus aquaticus(Taq), Thermus thermophilus(Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자, dNTPs 및 프라이머를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 PARK2 돌연변이를 측정할 수 있는 키트에 포함될 수 있는 물질은 PARK2 돌연변이에 대하여 특이적인 결합부위를 갖는 항체 또는 압타머일 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 PARK2 돌연변이 검출용 키트는 시료 내의 PARK2 돌연변이의 존재를 측정하기 위한 것이면 어떤 것이든 제한 없이 사용될 수 있다. 즉, 키트 내지 시료에 존재하는 PARK2 돌연변이의 검출은 당업계에 공지된 통상의 기술 내지 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법으로는 PARK2 돌연변이에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법 (ELISA), 웨스턴 블로팅 방법(Western Blotting) 등을 예로 들 수 있다. 또한, 96-웰 내부에 다수의 항체를 고정화하여 한꺼번에 많은 수의 시료를 분석하는 ELISA 변형법이 이용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 키트에는 항체를 이용하여 각종의 면역화학적 반응을 수행하기에 적합한 물질들, 예를 들어, 항체의 보존제, 완충액 등이 포함될 수 있다. 또한, 추가적인 시약을 포함할 수 있으며, 일 예로써는, 발색 효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드로 표지한 접합체(conjugate)로 2차 항체 등이 있다. 발색효소는 퍼록시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)(예: 양고추냉이 퍼록시다제(horseradishperoxidase))일 수 있고, 형광물질인 경우, 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸이 가능하다. 또한, 키트는 효소와 발색반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고, 결합된 복합체만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 키트에 있어서, 환자로부터 수득된 시료를 PARK2 돌연변이에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있고, 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그

이후의 단계를 용이하게 하기위해 고형상에 고정될 수 있다. 고형상은 유리나 플라스틱, 예를 들어 미세역가플레이트(microtiter plate), 막대, 비드(bead) 또는 미세비드(microbead) 등이 될 수 있다.

[0035] 본 발명에 사용된 용어 "항체" 또는 "그의 기능적 부분"은 당업계에 인지된 용어이고, 공지된 항원, 특히 이뮤노글로불린 분자 및 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 부분 (즉, 항원에 면역특이적으로 결합하는 결합 부위를 함유하는 분자)에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편을 지칭하는 것으로 이해된다. 본 발명에 따른 이뮤노글로불린은 임의의 유형 (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 및 IgY) 또는 클래스 (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브클래스의 이뮤노글로불린 분자일 수 있다. 상기 항체의 기능적인 부분에는 단일쇄 가변영역 단편 (scFv), (scFv)2, Fab, Fab' 및 F(ab')2 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 상기 단일쇄 가변영역(scFv)은 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 링커 펩타이드를 통해 연결되어 단일쇄 폴리펩티드 형태를 취하는 항체 단편을 의미한다.

[0036] "항체"는 모노클로날 항체, 폴리클로날, 키메라, 단일 쇄, 이중특이적, 유인원화, 인간 및 인간화 항체, 낙타류 항체, 디아바디 뿐만 아니라 그의 기능적 부분 또는 활성 단편을 포함하는 것을 의미한다. 공지된 항원에 결합하는 분자의 활성 단편의 예는 Fab 이뮤노글로불린 발현 라이브러리의 생성물 및 상기 언급된 임의의 항체 및 단편의 에피토프-결합 단편을 포함하여 Fab 및 F(ab')2 단편을 포함한다. 이러한 활성 단편은 다수의 기술에 의해 본 발명의 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 정제된 모노클로날 항체는 펩신과 같은 효소로 절단되고, HPLC 겔 여과에 적용될 수 있다. 이어서, Fab 단편을 함유하는 적절한 분획은 막 여과 등에 의해 수집되고 농축될 수 있다.

[0037] "인간화 항체"는 비인간 공여자 이뮤노글로불린으로부터 유래된 CDR을 갖고, 분자의 나머지 이뮤노글로불린-유래된 부분은 하나 (또는 하나 이상)의 인간 이뮤노글로불린(들)으로부터 유래한 것인 조작된 항체의 한 유형을 지칭한다. 인간화 항체는 추가로 그의 프레임워크 영역 중 하나 이상이 인간 또는 영장류 아미노산을 갖는 가변영역을 갖는 항체를 지칭할 수 있다. 또한, 프레임워크 지지 잔기는 결합 친화도를 보존하도록 변경될 수 있다.

[0038] 용어 "모노클로날 항체"는 또한 당업계에 널리 인지되어 있고, 단일 클론으로부터 실험실에서 대량 생산되고 오직 하나의 항원을 인식하는 항체를 지칭한다. 모노클로날 항체는 전형적으로 정상적으로 짧게 생존하는 항체-생산 B 세포를 빠른-성장 세포, 예컨대 암세포 (혹은 "불멸" 세포로 지칭됨)에 융합시켜 제조된다. 생성된 하이브리드 세포, 또는 하이브리도마는 빠르게 증식하여 대량의 항체를 생산하는 클론을 생성한다.

[0039] 상기 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 같은 다양한 분자와 결합하여 변형될 수 있다. 변형된 항체는 화학적으로 항체를 변형하여 수득할 수 있다. 이러한 변형 방법은 당업계에서 통상적으로 사용된다.

[0040] 또한, 상기 항체는 비인간 항체로부터 유래한 변형 부위(variable region)와 인간 항체로부터 유래한 불변 부위(constant region)가 결합된 키메라 항체(chimeric antibody)로 수득되거나, 또는 인간이 아닌 항체로부터 유도된 상보성 결정 부위를 포함하여 인간 항체로부터 유도된 구조 부위(frame work region, FR)와 불변부위가 결합된 인간화 항체(humanized antibody)로 수득될 수 있다. 이러한 항체는 당업계에 알려져 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 측면은, PARK2 돌연변이를 진단하거나, 또는 발병 위험도 예측의 정보를 제공하기 위한 돌연변이 부위 확인방법 제공한다. 구체적으로, 상기 방법은, 1) 개체로부터 유래된 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 2) 단계 1)에서 분리한 게놈 DNA에서 PARK2 유전자의 돌연변이 부위를 검출하는 단계; 및 3) 단계 2)에서 검출된 돌연변이 부위를 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0043] 이때, 상기 단계 1)의 시료는 혈액인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0044] 이때, 상기 2) 단계는 서열번호 5 및 6의 프라이머를 이용하여 수행할 수 있다. 또한, 상기 돌연변이는 서열번호 1의 458의 메티오닌이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있으며, 바람직하게는, 서열번호 1의 458번째 메티오닌이 루이신으로 치환된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] 상기 단계 2)에서 검출은 시퀀싱 분석, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적인 PCR(allele specific PCR), 다이나믹 대립유전자 혼성화 기법(dynamic allele-specific hybridization; DASH), PCR 연장 분석 또는 TaqMan 프로브 PCR 분석에 의하여 수행되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 상기 방법 중, 시퀀싱 분석은 염기서열 결정을 위한 통상적인 방법을 사용할 수 있으며, 자동화된 유전자분석기를 이용하여 수행될 수 있다(Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74(12), 5463-5467, 1977;

Maxam, A. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74(2), 560-564, 1997).

[0047] 대립유전자 특이적인 PCR 분석은 돌연변이가 위치하는 염기를 3' 말단으로 하여 고안한 프라이머를 포함한 프라이머 세트로 상기 돌연변이가 위치하는 DNA 단편을 증폭하는 PCR 방법을 의미한다. 상기 방법의 원리는, 예를들어, 특정 염기가 A에서 C로 치환된 경우, 상기 A를 3' 말단염기로 포함하는 프라이머 및 적당한 크기의 DNA 단편을 증폭할 수 있는 반대방향 프라이머를 고안하여 PCR 반응을 수행할 경우, 상기 돌연변이 위치의 염기가 "A"인 경우에는 증폭반응이 정상적으로 수행되어 원하는 위치의 밴드가 관찰되고, 염기가 "C"로 치환된 경우 상기 프라이머는 주형 DNA에 상보결합할 수 있으나, 3' 말단 쪽이 상보결합을 하지 못함으로써 증폭반응이 제대로 수행되지 않는 특징을 이용한 것이다(Newton, C. R. et al., Nucleic Acids Res., 17(1), 2503-2516, 1989).

[0048] TaqMan 프로브 PCR 분석은(Livak, K. J., Genet. Anal., 14, 143-149, 1999)은 1) 원하는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 프라이머 및 TaqMan 프로브를 설계 및 제작하는 단계; 2) 서로 다른 대립유전자의 프로브를 FAM 염료 및 VIC 염료로 표지(Applied Biosystems, USA)하는 단계; 3) 상기 DNA를 주형으로 하여 상기의 프라이머 및 프로브를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 4) 상기의 PCR 반응이 완성된 후, TaqMan 분석 플레이트를 염기서열 분석기로 분석 및 확인하는 단계; 및 5) 상기 분석결과로부터 단계 1의 폴리뉴클레오티들의 유전자형을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0049] 다이나믹 대립유전자 혼성화(DASH) 분석은 프린스 등에 의해 고안된 방법으로 수행할 수 있다(Prince, J. A. et al., Genome Res. 11(1), 152-162, 2001).

[0050] PCR 연장 분석은 먼저 돌연변이가 위치하는 염기를 포함하는 DNA 단편을 프라이머 쌍으로 증폭한 다음, 반응에 첨가된 모든 뉴클레오티드를 탈인산화시킴으로써 불활성화시키고, 여기에 돌연변이에 특이적인 연장 프라이머, dNTP 혼합물, 디디옥시뉴클레오티드, 반응 완충액 및 DNA 중합효소를 첨가하여 프라이머 연장반응을 수행함으로써 이루어진다. 이때, 연장 프라이머는 돌연변이가 위치하는 염기의 5' 방향의 바로 인접한 염기를 3' 말단으로 삼으며, dNTP 혼합물에는 디디옥시뉴클레오티드와 동일한 염기를 갖는 핵산이 제외되고, 상기 디디옥시뉴클레오티드는 돌연변이를 나타내는 염기 종류 중 하나에서 선택된다. 예를 들어, A에서 C로의 치환이 있는 경우, dGTP, dCTP 및 TTP 혼합물과 ddATP를 반응에 첨가할 경우, 상기 치환이 일어난 염기에서 프라이머는 DNA 중합효소에 의하여 연장되고, 몇 개의 염기를 지난 후 A 염기가 최초로 나타나는 위치에서 ddATP에 의하여 프라이머 연장반응이 종결된다. 만일 상기 치환이 일어나지 않았다면, 그 위치에서 연장반응이 종결되므로, 상기 연장된 프라이머의 길이를 비교함으로써 돌연변이를 나타내는 염기 종류를 판별할 수 있게 된다.

[0051] 이때, 검출방법으로는 연장 프라이머 또는 디디옥시뉴클레오티드를 형광 표지한 경우에는 일반적인 염기서열 결정에 사용되는 유전자 분석기(예를 들어, ABI사의 Model 3700 등)를 사용하여 형광을 검출함으로써 상기 돌연변이를 검출할 수 있으며(Chen, J., Genome Res., 10(4), 549-557, 2000), 표지되지 않은 연장 프라이머 및 디디옥시뉴클레오티드를 사용할 경우에는 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) 기법을 이용하여 분자량을 측정함으로써 상기 돌연변이를 검출할 수 있다(Ross, P. L., Anal. Chem, 69(20), 4197-4202, 1997).

[0053] 본 발명의 또 다른 측면은 PARK2 천연형 및 돌연변이를 세포내에서 과발현 시키는 단계; 세포에 시료를 첨가시키는 단계; 및 PARK2 돌연변이의 활성이 증가된 시료를 선별하는 단계를 포함하는 파킨슨병 치료 및 개선용 물질을 선정하는 방법을 제공한다.

[0054] 이때, 상기 PAKR2 돌연변이는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, PARK2 돌연변이 활성의 증가는 1) SNCA 또는 AIMP2 단백질의 분해가 억제되거나 및/또는 2) PARK2 돌연변이의 오토유비퀴틴화가 감소되는 것을 통해 확인할 수 있다. 또한, 상기 시료는 천연물 추출물, 화합물, 핵산, 단백질 또는 항체에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0058] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060] **실시예 1. 세포주 배양**

[0062] 인간 정상 신장세포주인 HEK293 (human embryonic kidney 293) 세포는 10% 소태아혈청 (FBS; fetal bovine serum, Atlas, 미국), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Welgene, 한국) 배지를 사용하여 배양하였다. 세포배양 조건 5% CO_2, 20% O_2, 37℃ 조건에서 수행하였다.

[0064] **실시예 2. 플라스미드**

[0066] pMS1-2-PARK2, pMS1-2-PARK2-M458L, pCMV-MYC-AIMP2 및 pcDNA3.1-synuclein을 클로닝하여 사용하였다(pMS1-2 s1 tag mammalian vector는 Abcam사에서 입수하였고, pCMV-MYC vector는 Clontech사에서, 그리고 pcDNA3.1 vector는 Thermo Fisher Scientific사에서 입수하였다).

[0068] **실시예 3. 형질도입**

[0070] HEK293 세포주에 목적 단백질들을 과발현시키기 위해, HEK293 세포를 2×10^5/60 ㎜에 분주하였다. 12시간 뒤, 혈청 및 항생제 결핍배지로 교체한 후, 형질도입 시약(PEI, polyethylenimide, Polysciences, 미국)을 이용하여 도 2 내지 4 에 표기된 대로 단일 또는 복합구성으로 플라스미드들을 형질도입시켰다. 이후, 48시간 동안 추가배양하였다.

[0072] **실시예 4. 항체**

[0074] 항-MYC (LF-MA0046, AbFrontier, 한국), 항-SNCA (#610737, BD biosciences, 미국), 항-PARK2 (sc-32282, Santa Cruz Biotechnology, 미국), 항-GAPDH (LF-PA0212, AbFrontier), g-Ubiquitin (sc-8017, Santa Cruz Biotechnology), 항-rabbit HRP (horseradish peroxidase) (#31463, Thermo Fisher Scientific, 미국), 그리고 항-mouse HRP (#31439, Thermo Fisher Scientific) 항체들을 사용하여 웨스턴블랏을 수행하였다.

[0076] **실시예 5. 웨스턴 블랏**

[0078] 각각의 세포를 수집한 뒤, 추출 버퍼(50 mM Tris-Cl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))을 첨가하여 파쇄시켰다. 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후, 세포 용해물에 존재하는 단백질의 농도를 브래드포드 방법(Bradford protein assay)으로 정량하였다. 각각 20 ug의 단백질 시료를 10% 또는 12% SDS-PAGE gel에 로딩하여 분리한 후, nitrocellulose 막(GE Healthcare life sciences, 미국)으로 전달시켰다. 이후, 트랜스퍼된 막을 스킴밀크로 30분간 블로킹 한 후, 1차 항체를 첨가하여 4℃에서 4시간 반응하였다. 이후, HRP-접합된 2차 항체들을 붙이고, ECL 용액 (AbFrontier)을 이용하여 X-ray film에 감광하여 확인하였다. 이때, 정량적 대조군으로서 항 GAPDH 항체를 이용하여 동일한 양의 단백질이 사용되었음을 확인하였다.

[0080] 도 2:

[0081] PARK2 효소의 분해타겟인 AIMP2 plasmid를 PARK2 WT 또는 -M458L plasmid와 함께 HEK293 세포에 형질도입하였다. 48시간 후, 세포를 수집하여 항-MYC, 항-PARK2, 항-GAPDH 항체로 웨스턴블랏을 수행하였다. 그 결과, AIMP2

는 PARK2 WT에 의해 분해되었으나, PARK2 M458L에 의한 분해는 관찰되지 않았다. 이것은 PARK2 M458L의 E3 ligase 기능이 손실되었음을 의미한다. GAPDH는 동일한 양의 단백질이 로딩되였음을 나타내는 정량대조군이다.

[0083] 도 3:

[0084] PARK2 효소의 분해타겟인 SNCA plasmid를 PARK2 WT 또는 M458L plasmid와 함께 HEK293 세포에 형질도입하였다. 48시간 후, 세포를 수집하여 항-SNCA, 항-PARK2, 항-GAPDH 항체로 웨스턴블랏을 수행하였다. 그 결과, SNCA는 PARK2 WT에 의해 분해되었으나, PARK2 M458L에 의한 분해는 관찰되지 않았다. 이것은 PARK2 M458L의 E3 ligase 기능이 손실되었음을 의미한다. GAPDH는 동일한 양의 단백질이 로딩되었음을 나타내는 정량대조군이다.

[0086] **실시예 6. 세포내 (*in cell*) 오토유비퀴틴화 (autoubiquitination) 조사**

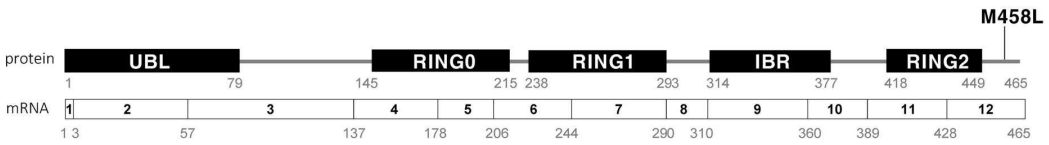
[0088] PARK2의 야생형 및 돌연변이형(M458L)을 HEK293 세포에 과발현 시킨 뒤, 48시간 뒤에 수집하여 lysis buffer를 첨가하여 파쇄하였다. 브래드포드 방법으로 정량한 뒤, 1 mg의 단백질 시료에 항-PARK 항체 1 ug를 첨가한 뒤, 4℃ 로테이터에서 12시간 반응시켰다. 이후 protein A/G bead (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) 10 μl를 첨가한 후, 4℃ 로테이터에서 4시간 반응시켰다. 면역침전물을 침전시키고, 추출버퍼로 3회 세척한 후, SDS 시표버퍼를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 시료는 웨스턴 블랏법을 수행하여 PARK2 자신의 오토유비퀴틴화 정도를 관찰하였다.

[0090] 도 4:

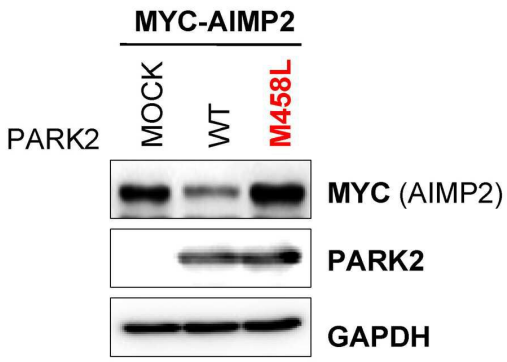
[0091] PARK2 효소는 자신의 유비퀴틴화를 촉진시킬 수 있으므로, 기능보유여부를 자가 유비퀴틴화 시험을 통해 확인하였다. 야생형과 M458L을 HEK293 세포에 형질도입한 후, 48시간 뒤에 세포를 수집하여 파쇄하였다. 면역침강법(immunoprecipitation)으로 PARK2 단백질을 수집한 후, 자가 유비퀴틴화 여부를 PARK2와 Ub 항체를 사용하여 확인하였다. (유비퀴틴화 되면 Ub와의 공유결합으로 인해 끌리는 밴드가 관찰됨). 그 결과, M458L은 자가 유비퀴틴화 기능이 손실되어 있음을 확인하였다. 화살표는 PARK2를 나타낸다.

도면

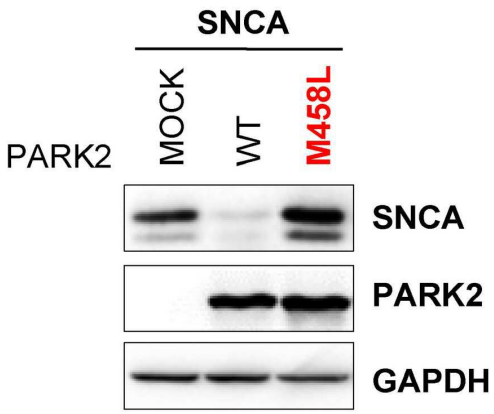
도면1



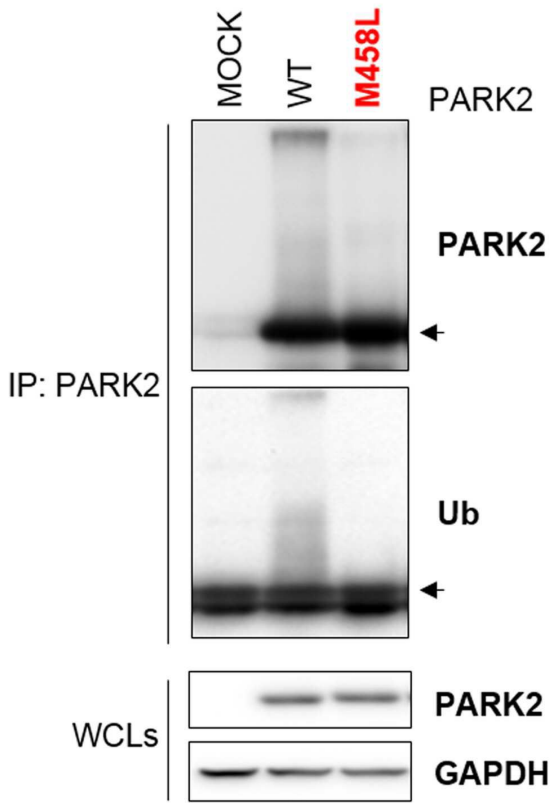
도면2


MYC-AIMP2
MOCK
WT
M458L
PARK2
MYC (AIMP2)
PARK2
GAPDH

도면3


SNCA
MOCK
WT
M458L
PARK2
SNCA
PARK2
GAPDH

도면4



서 열 목 록

<110> Chungnam National University

<120> Mutated PARK2 gene and Method for diagnosis of Parkinson's disease using the same

<130> CNU-20150901

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PARK2 protein

<400> 1

Met Ile Val Phe Val Arg Phe Asn Ser Ser His Gly Phe Pro Val Glu
1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Thr Ser Ile Phe Gln Leu Lys Glu Val Val Ala Lys
20 25 30

```
Arg Gln Gly Val Pro Ala Asp Gln Leu Arg Val Ile Phe Ala Gly Lys
         35                  40                  45
Glu Leu Arg Asn Asp Trp Thr Val Gln Asn Cys Asp Leu Asp Gln Gln
     50                  55                  60
Ser Ile Val His Ile Val Gln Arg Pro Trp Arg Lys Gly Gln Glu Met
 65                  70                  75                  80
Asn Ala Thr Gly Gly Asp Asp Pro Arg Asn Ala Ala Gly Gly Cys Glu
                 85                  90                  95

Arg Glu Pro Gln Ser Leu Thr Arg Val Asp Leu Ser Ser Ser Val Leu
            100                 105                 110
Pro Gly Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile Leu His Thr Asp Ser Arg
        115                 120                 125
Lys Asp Ser Pro Pro Ala Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr Asn
    130                 135                 140
Ser Phe Tyr Val Tyr Cys Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Gln Pro Gly
145                 150                 155                 160
Lys Leu Arg Val Gln Cys Ser Thr Cys Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu

                165                 170                 175
Thr Gln Gly Pro Ser Cys Trp Asp Asp Val Leu Ile Pro Asn Arg Met
            180                 185                 190
Ser Gly Glu Cys Gln Ser Pro His Cys Pro Gly Thr Ser Ala Glu Phe
        195                 200                 205
Phe Phe Lys Cys Gly Ala His Pro Thr Ser Asp Lys Glu Thr Ser Val
    210                 215                 220
Ala Leu His Leu Ile Ala Thr Asn Ser Arg Asn Ile Thr Cys Ile Thr
225                 230                 235                 240

Cys Thr Asp Val Arg Ser Pro Val Leu Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg
                245                 250                 255
His Val Ile Cys Leu Asp Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu
            260                 265                 270
Asn Asp Arg Gln Phe Val His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Pro
        275                 280                 285
```

Cys Val Ala Gly Cys Pro Asn Ser Leu Ile Lys Glu Leu His His Phe
290 295 300
Arg Ile Leu Gly Glu Glu Arg Tyr Asn Arg Tyr Gln Gln Tyr Gly Ala

305 310 315 320
Glu Glu Cys Val Leu Gln Met Gly Gly Val Leu Cys Pro Arg Pro Gly
325 330 335
Cys Gly Ala Gly Leu Leu Pro Glu Pro Asp Gln Arg Lys Val Thr Cys
340 345 350
Glu Gly Gly Asn Gly Leu Gly Cys Gly Phe Ala Phe Cys Arg Glu Cys
355 360 365
Lys Glu Thr Tyr His Glu Gly Glu Cys Ser Ala Val Phe Glu Ala Ser
370 375 380

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

450 455 460
Val
465
<210> 2
<211> 1398
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PARK2 protein coding sequence
<400> 2
atgatagtgt ttgtcaggtt caactccagc catggtttcc cagtggaggt cgattctgac 60
accagcatct tccagctcaa ggaggtggtt gctaagcgac agggggttcc ggctgaccag 120

ttgcgtgtga ttttcgcagg gaaggagctg aggaatgact ggactgtgca gaattgtgac 180

ctggatcagc agagcattgt tcacattgtg cagagaccgt ggagaaaagg tcaagaaatg 240

aatgcaactg gaggcgacga ccccagaaac gcggcgggag gctgtgagcg ggagccccag 300

agcttgactc gggtggacct cagcagctca gtcctcccag gagactctgt ggggctggct 360

gtcattctgc acactgacag caggaaggac tcaccaccag ctggaagtcc agcaggtaga 420

tcaatctata acagctttta tgtgtattgc aaaggcccct gtcaaagagt gcagccggga 480

aaactcaggg tacagtgcag cacctgcagg caagcaacgc tcaccttgac ccagggtcca 540

tcttgctggg atgatgtttt aattccaaac cggatgagtg gtgaatgcca atccccacac 600

tgccctggga ctagtgcaga atttttcttt aaatgtggag cacaccccac ctctgacaag 660

gaaacatcag tagctttgca cctgatcgca acaaatagtc ggaacatcac ttgcattacg 720

tgcacagacg tcaggagccc cgtcctggtt ttccagtgca actcccgcca cgtgatttgc 780

ttagactgtt tccacttata ctgtgtgaca agactcaatg atcggcagtt tgttcacgac 840

cctcaacttg gctactccct gccttgtgtg gctggctgtc ccaactcctt gattaaagag 900

ctccatcact tcaggattct gggagaagag cggtacaacc ggtaccagca gtatggtgca 960

gaggagtgtg tcctgcagat ggggggcgtg ttatgccccc gccctggctg tggagcgggg 1020

ctgctgccgg agcctgacca gaggaaagtc acctgcgaag ggggcaatgg cctgggctgt 1080

gggtttgcct tctgccggga atgtaaagaa acgtaccatg aaggggagtg cagtgccgta 1140

tttgaagcct caggaacaac tactcaggcc tacagagtcg atgaaagagc cgccgagcag 1200

gctcgttggg aagcagcctc caaagaaacc atcaagaaaa ccaccaagcc ctgtccccgc 1260

tgccatgtac cagtggaaaa aaatggaggc tgcatgcaca tgaagtgtcc gcagccccag 1320

tgcaggctcg agtggtgctg gaactgtggc tgcgagtgga accgcgtctg catgggggac 1380

cactggttcg acgtgtag 1398

<210> 3

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated PARK2 protein

<400> 3

Met Ile Val Phe Val Arg Phe Asn Ser Ser His Gly Phe Pro Val Glu
1 5 10 15

Val Asp Ser Asp Thr Ser Ile Phe Gln Leu Lys Glu Val Val Ala Lys

20 25 30

Arg Gln Gly Val Pro Ala Asp Gln Leu Arg Val Ile Phe Ala Gly Lys

35 40 45

Glu Leu Arg Asn Asp Trp Thr Val Gln Asn Cys Asp Leu Asp Gln Gln

50 55 60

Ser Ile Val His Ile Val Gln Arg Pro Trp Arg Lys Gly Gln Glu Met

65 70 75 80

Asn Ala Thr Gly Gly Asp Asp Pro Arg Asn Ala Ala Gly Gly Cys Glu

85 90 95

Arg Glu Pro Gln Ser Leu Thr Arg Val Asp Leu Ser Ser Ser Val Leu

100 105 110

Pro Gly Asp Ser Val Gly Leu Ala Val Ile Leu His Thr Asp Ser Arg

115 120 125

Lys Asp Ser Pro Pro Ala Gly Ser Pro Ala Gly Arg Ser Ile Tyr Asn

130 135 140

Ser Phe Tyr Val Tyr Cys Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Gln Pro Gly

145 150 155 160

Lys Leu Arg Val Gln Cys Ser Thr Cys Arg Gln Ala Thr Leu Thr Leu

165 170 175

Thr Gln Gly Pro Ser Cys Trp Asp Asp Val Leu Ile Pro Asn Arg Met

180 185 190

Ser Gly Glu Cys Gln Ser Pro His Cys Pro Gly Thr Ser Ala Glu Phe

195 200 205

Phe Phe Lys Cys Gly Ala His Pro Thr Ser Asp Lys Glu Thr Ser Val

210 215 220

Ala Leu His Leu Ile Ala Thr Asn Ser Arg Asn Ile Thr Cys Ile Thr

225 230 235 240

Cys Thr Asp Val Arg Ser Pro Val Leu Val Phe Gln Cys Asn Ser Arg

245 250 255

His Val Ile Cys Leu Asp Cys Phe His Leu Tyr Cys Val Thr Arg Leu

260 265 270

Asn Asp Arg Gln Phe Val His Asp Pro Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Pro

275 280 285

Cys Val Ala Gly Cys Pro Asn Ser Leu Ile Lys Glu Leu His His Phe
290 295 300
Arg Ile Leu Gly Glu Glu Arg Tyr Asn Arg Tyr Gln Gln Tyr Gly Ala
305 310 315 320
Glu Glu Cys Val Leu Gln Met Gly Gly Val Leu Cys Pro Arg Pro Gly
325 330 335
Cys Gly Ala Gly Leu Leu Pro Glu Pro Asp Gln Arg Lys Val Thr Cys
340 345 350
Glu Gly Gly Asn Gly Leu Gly Cys Gly Phe Ala Phe Cys Arg Glu Cys

355 360 365
Lys Glu Thr Tyr His Glu Gly Glu Cys Ser Ala Val Phe Glu Ala Ser
370 375 380
Gly Thr Thr Thr Gln Ala Tyr Arg Val Asp Glu Arg Ala Ala Glu Gln
385 390 395 400
Ala Arg Trp Glu Ala Ala Ser Lys Glu Thr Ile Lys Lys Thr Thr Lys
405 410 415
Pro Cys Pro Arg Cys His Val Pro Val Glu Lys Asn Gly Gly Cys Met
420 425 430

His Met Lys Cys Pro Gln Pro Gln Cys Arg Leu Glu Trp Cys Trp Asn
435 440 445
Cys Gly Cys Glu Trp Asn Arg Val Cys Leu Gly Asp His Trp Phe Asp
450 455 460
Val
465

<210> 4
<211> 1398
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> mutated PARK2 protein coding sequence
<400> 4
atgatagtgt ttgtcaggtt caactccagc catggtttcc cagtggaggt cgattctgac 60

accagcatct tccagctcaa ggaggtggtt gctaagcgac agggggttcc ggctgaccag 120

ttgcgtgtga ttttcgcagg gaaggagctg aggaatgact ggactgtgca gaattgtgac 180

ctggatcagc agagcattgt tcacattgtg cagagaccgt ggagaaaagg tcaagaaatg 240

aatgcaactg gaggcgacga ccccagaaac gcggcgggag gctgtgagcg ggagccccag 300

agcttgactc gggtggacct cagcagctca gtcctcccag gagactctgt ggggctggct 360

gtcattctgc acactgacag caggaaggac tcaccaccag ctggaagtcc agcaggtaga 420

tcaatctata acagctttta tgtgtattgc aaaggcccct gtcaaagagt gcagccggga 480

aaactcaggg tacagtgcag cacctgcagg caagcaacgc tcaccttgac ccagggtcca 540

tcttgctggg atgatgtttt aattccaaac cggatgagtg gtgaatgcca atccccacac 600

tgccctggga ctagtgcaga atttttcttt aaatgtggag cacaccccac ctctgacaag 660

gaaacatcag tagctttgca cctgatcgca acaaatagtc ggaacatcac ttgcattacg 720

tgcacagacg tcaggagccc cgtcctggtt ttccagtgca actcccgcca cgtgatttgc 780

ttagactgtt tccacttata ctgtgtgaca agactcaatg atcggcagtt tgttcacgac 840

cctcaacttg gctactccct gccttgtgtg gctggctgtc ccaactcctt gattaaagag 900

ctccatcact tcaggattct gggagaagag cggtacaacc ggtaccagca gtatggtgca 960

gaggagtgtg tcctgcagat ggggggcgtg ttatgccccc gccctggctg tggagcgggg 1020

ctgctgccgg agcctgacca gaggaaagtc acctgcgaag ggggcaatgg cctgggctgt 1080

gggtttgcct tctgccggga atgtaaagaa acgtaccatg aaggggagtg cagtgccgta 1140

tttgaagcct caggaacaac tactcaggcc tacagagtcg atgaaagagc cgccgagcag 1200

gctcgttggg aagcagcctc caaagaaacc atcaagaaaa ccaccaagcc ctgtccccgc 1260

tgccatgtac cagtggaaaa aaatggaggc tgcatgcaca tgaagtgtcc gcagccccag 1320

tgcaggctcg agtggtgctg gaactgtggc tgcgagtgga accgcgtctg cctgggggac 1380

cactggttcg acgtgtag 1398

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 5

tctaggctag cgtgctggtt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 6

tgcaatttgg ctgtagttgg 20