(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0032341
(43) 공개일자 2009년04월01일

(51) Int. Cl.
C12N 15/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0097493
(22) 출원일자 2007년09월27일
심사청구일자 2007년09월27일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
김윤기
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 (녹지)
송현규
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 (녹지)
오나라
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 (녹지)
(74) 대리인
김선애

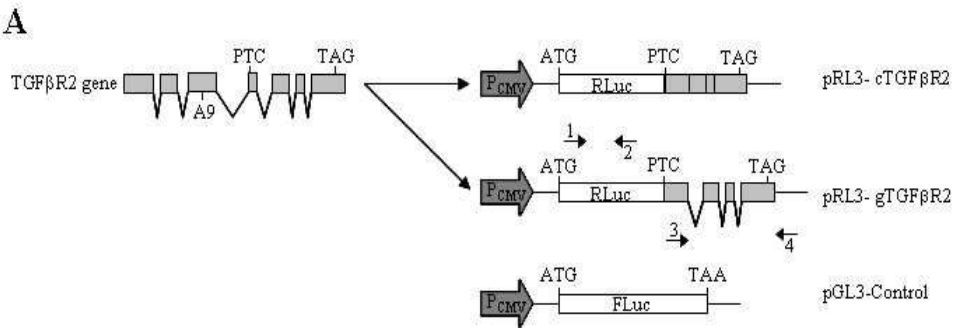
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) NMTR 효율의 정량적 측정법 및 eIF4AIII에 의한NMTR 조절 방법

(57) 요 약

본 발명은 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자에 작동가능하게 결합되는 루시페라아제 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드 및 루시페라아제를 이용한 NMTR 효율 측정 방법 그리고 NMTR에 중요한 기능을 하는 eIF4AIII를 표적으로 하는 NMTR 저해제 및 저해 방법을 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 비정상적인 단백질 종결코돈(premature termination codon;PTC)을 가지는 전사체가 NMTR의 표적이 되는 경우, NMTR의 효율을 정량화할 수 있고, eIF4AIII 유전자를 이용하여 NMTR의 효율을 인위적으로 조절을 할 수 있다. 본 발명은 NMTR에 기인하는 유전병 및 암에 대한 치료제, 항암제 및 항암 치료법 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및

상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)인 것을 특징으로 하는 NMTR 리포터 플라스미드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)를 포함하는 pRL3 벡터를 이용하는 것을 특징으로 하는 NMTR 리포터 플라스미드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NMTR 타켓 유전자는 TGFβR2(Gene Bank accession No. : NM_003242), hMSH3(Gene Bank accession No. : NM_002439) 또는 TAF1B(Gene Bank accession No. : NM_005680)인 것을 특징으로 하는 NMTR 리포터 플라스미드.

청구항 5

1) NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드를 제조하는 단계; 및

2) NMD 관련 단백질의 발현을 저해한 후 상기 NMTR 리포터 단백질의 발현정도를 측정하는 단계를 포함하는 NMTR 효율 측정 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)인 것을 특징으로 하는 NMTR 효율 측정 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)를 포함하는 pRL3 벡터를 이용하는 것을 특징으로 하는 NMTR 효율 측정 방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NMTR 타켓 유전자는 TGFβR2(Gene Bank accession No. : NM_003242), hMSH3(Gene Bank accession No. : NM_002439) 또는 TAF1B(Gene Bank accession No. : NM_005680)인 것을 특징으로 하는 NMTR 효율 측정 방법.

청구항 9

NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드를 포함하는 NMTR 효율 측정 킷트.

청구항 10

우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMD(nonsense-mediated mRNA decay) 저해제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)는 서열번호 2의 염기서

열을 포함하는 것을 특징으로 NMD 저해제.

청구항 12

우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 저해제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 NMTR 저해제.

청구항 14

eIF4AIII의 발현을 조절하여 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 을 조절하는 방법.

청구항 15

eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법.

청구항 16

eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 을 저해하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 리포터 플라스미드 및 eIF4AIII에 의한 NMTR 조절방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 NMTR 타켓 유전자에 작동 가능하게 결합되는 루시페라아제 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드 및 루시페라아제를 이용한 NMTR 효율 측정 방법 그리고 NMTR에 중요한 기능을 하는 eIF4AIII을 표적으로 하는 NMTR 저해제 및 저해 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 인간의 유전자 부위 중 암호화된 지역(coding region)에서 생성된 구조이동 돌연변이(frameshift mutation)는 종양발생과 밀접한 연관이 있음이 알려져 있고, 이렇게 변이된 유전자들의 불활성화(inactivation)는 종양의 성장과, 진행에 직접 및 간접적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다.

<3> 구조이동 돌연변이(frameshift mutation)의 가장 중요한 점 중의 하나가 mRNA상에서 비정상적인 단백질 종결코돈(premature termination codon;PTC)을 형성한다는 것이다. 포유동물 세포에서는 넌센스 돌연변이(nonsense mutation)나 구조이동 돌연변이(frameshift mutation) 등을 가지는 비정상적인 mRNA를 인식하고 이를 제거하는 넌센스-매개 mRNA 제거 (nonsense-mediated mRNA decay, 이하 NMD라고 함)라는 기전이 존재한다. 즉, NMD 기전은 세포에게 해를 줄 수 있는 비정상적인 짧은 단백질의 발현을 mRNA 상에서 미리 인식하고 이를 제거하는 일종의 품질검증 기전이라고 볼 수 있다.

<4> 보편적인 NMD는 마지막 엑손(exon)-엑손(exon) 접합점(junction)으로부터 50-55 뉴클레오타이드(nucleotides) 이상의 위쪽으로 떨어진 곳에 PTC가 생겼을 때 이루어진다. 반면, PTC의 위치가 마지막 엑손(exon)-엑손(exon) 접합점(junction)으로부터 50-55 뉴클레오타이드 안쪽 또는 아래쪽(downstream)에 존재하게 되면 NMD에 의해 인식되지 못하게 된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<5> 모든 세포는 필요한 유전정보를 적당한 시기에 적당한 양을 적당한 위치에 발현하기 위한 많은 유전자 발현조절 기전을 가지고 있다. 본 발명자들은 많은 종류의 유전자 발현조절 기전 중, 특히 mRNA의 양질조절(quality

control)에 관여하는 대표적인 기전인 NMD와 더불어, NMD를 탈출(escape)한 전사체의 단백질 번역 과정이 억제되는 NMTR이라는 새로운 메커니즘에 대한 연구를 계속하였다.

<6> 많은 종류의 사람 종양에서 NMD-민감성(sensitive) 또는 NMD-탈출(escape) PTC를 가지는 mRNA들이 보고되고 있다. 이전의 연구에서 대장암에서 발견된 유전자들 중, 비록 PTC를 가지고 있지만 NMD의 표적이 되지 않는 유전자들이 발견되었다. 이들 유전자들은 NMD 표적이 되지 않지만 이들 mRNA로부터 비정상적인 단백질이 만들어지지 않는다는 것이 관찰되었다(참고문헌: You et al. PLos Biolgy 2007, (5):e109). 대표적인 예로, TGFβR2가 밝혀졌는데 이 유전자는 세포내에서 일곱 개의 엑손(exon)과 여섯 개의 인트론(intron)으로 구성되어져 있다. 그런데 이 유전자의 세 번째 엑손에는 아데노신(adenosin)이라고 하는 DNA 염기서열이 10개가 반복되는 지역이 있다. 구조이동 돌연변이(frameshift mutation)에 의해 하나의 아데노신 뉴클레오타이드(adenosine nucleotide)가 빠지게 되면 이 유전자의 네 번째 엑손에 PTC가 생기게 된다. 그러면 이 mRNA는 NMD의 표적이 될 수가 있다. 그러나 실제로는 mRNA는 깨지지 않고 mRNA로부터 만들어지는 단백질의 발현이 저해됨이 규명되었다. 즉, PTC를 가지는 mRNA의 단백질 번역(translation) 과정이 억제되고, 이러한 세포내 작용 기전을 nonsense-mediated translational repression (NMTR) 이라고 명명되었다. 그러나 현재까지는 이러한 현상만 밝혀졌을 뿐 어떤 분자생물학적인 작용기전에 의해 NMTR 현상이 일어나는지는 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 NMTR의 분자생물학적인 작용기전의 규명하는 것을 목적으로 한다.

<7> 보다 구체적으로 본 발명은 NMTR의 효율을 정량화할 수 있는 시스템 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<8> 본 발명의 다른 목적은 NMTR에 중요한 기능을 하는 단백질을 밝혀내어 이를 표적으로 하는 NMTR 저해제 및 NMTR의 효율을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

<10> 본 발명자들은 NMTR 타겟 유전자인 TGFβR2 유전자를 이용하여 루시페라아제 에세이를 통해 NMTR 효율을 정량화할 수 있는 NMTR 리포터 시스템을 개발하고, 이 NMTR 리포터 시스템을 이용하여 eIF4AIII가 NMTR에 있어 중요한 단백질임을 최초로 규명하여 본 발명을 완성하게 되었다.

<11> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드 및 이를 포함하는 NMTR 효율 측정 킷트를 제공한다.

<12> 본 발명은 또한 1) NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드를 제조하는 단계; 및 2) NMD 관련 단백질의 발현을 저해한 후 상기 NMTR 리포터 단백질의 발현정도를 측정하는 단계를 포함하는 NMTR 효율 측정 방법을 제공한다.

<13> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 우성-음성 eIF4AIII (dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMD 저해제 및 우성-음성 eIF4AIII (dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMTR 저해제를 제공한다.

<14> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 eIF4AIII의 발현을 조절하여 NMTR을 조절하는 방법을 제공한다.

<15> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법 및 eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMTR을 저해하는 방법을 제공한다.

<16> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

<17> 본 발명은 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드 및 이를 포함하는 NMTR 효율 측정 킷트를 제공한다.

<18> 본 발명은 또한 1) NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자; 및 상기 타겟 유전자에 작동가능하게 결합되는 리포터 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드를 제조하는 단계; 및 2) NMD 관련 단백질의 발현을 저해한 후 상기 NMTR 리포터 단백질의 발현정도를 측정하는 단계를 포함하는 NMTR 효율 측정 방법을 제공한다.

<19> 상기 리포터 유전자는 NMTR(nonsense-mediated translational repression) 타켓 유전자에 의해 발현되도록 작동가능하게 연결될 수 있다면 다양한 공지의 리포터 유전자들이 이용가능하다. 예를 들어 형광단백질(green fluorescence protein; GFP), 루시페라제 (luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 또는 갈락토시다아제(galactosidase) 등이 있다. 바람직하게는 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)가 이용될 수 있으며, 이를 포함하는 pRL3 벡터를 이용할 수 있다. 즉, pRL3 벡터는 레닐라 루시페라아제라고 하는 유전자를 코딩하고 있어, NMTR 현상을 루시페라아제 에세이를 통해서 쉽게 관측할 수 있는 이점이 있다.

<20> 바람직하게는, 상기 NMTR 타켓 유전자는 TGFβR2(Gene Bank accession No. : NM_003242), hMSH3(Gene Bank accession No. : NM_002439) 또는 TAF1B(Gene Bank accession No. : NM_005680)이며, 더욱 바람직하게는 TGFβR2이다. 본 발명에 의한 바람직한 구현예에 따르면, TGFβR2 유전자 중에서 구조이동 돌연변이에 의해 PTC가 생기는 엑손 네번째 부분부터 일곱번째 부분을 제한효소를 이용하여 절단한 후 pRL3 벡터에 옮겨 놓아 NMTR 리포터 플라스미드를 제작한다(도 1a). 상기 제작된 본 발명의 NMTR 리포터 시스템은 전사체 (mRNA) 레벨에는 변화가 없고 스플라이싱 과정도 정상적으로 이루어지지만 단백질 번역 효율 변화를 정량적으로 감지할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 1b 내지 도 1e).

<21> 또한 본 발명은 우성-음성 eIF4AIII (dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMD 저해제 및 우성-음성 eIF4AIII (dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 포함하는 NMTR 저해제를 제공한다.

<22> NMD에 관여하는 중요 인자인 Upf1과 eIF4AIII(Gene bank accession number : NM_014740.2, Palacios IM, Gatfield D, St Johnston D, Izaurralde E. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay.Nature. 2004 Feb 19;427(6976):753-757.)를 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 기법을 통해 발현량을 저해한 후, NMTR의 변화를 본 발명에 의한 NMTR 리포터 시스템을 이용하여 관찰한 결과 Upf1는 NMTR에 기능을 하지 않는 반면, eIF4AIII는 NMTR에 있어 중요한 단백질임을 확인할 수 있었다 (도 2). 특히 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII)의 과발현은 NMTR 효율을 저해하고 NMD를 억제하는 것으로 나타났다(도 5).

<23> 바람직하게는, NMD 저해제 또는 NMTR 저해제에서 상기 우성-음성 eIF4AIII (dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)는 서열번호 2의 염기서열을 포함한다.

<24> 나아가 본 발명은 eIF4AIII의 발현을 조절하여 NMTR을 조절하는 방법, eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법 및 eIF4AIII의 발현을 억제하여 NMTR을 저해하는 방법을 제공한다. 상술한 바와 같이, eIF4AIII는 NMD 및 NMTR에 있어 중요한 단백질이므로 이의 발현을 조절함으로써 NMD 및 NMTR의 저해 등 조절이 가능하다. 이런 기능을 기초하여 본 발명은 항암제 및 항암 치료법 개발에 이용할 수 있다.

효 과

<25> 상술한 바와 같이, 본 발명은 NMTR 타켓 유전자에 작동가능하게 결합되는 루시페라아제 유전자를 포함하는 NMTR 리포터 플라스미드 및 루시페라아제를 이용한 NMTR 효율 측정 방법을 제공하여, NMD를 탈출(escape)하는 NMTR을 효율적으로 정량화할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

<26> 또한 본 발명은 NMTR에 중요한 기능을 하는 eIF4AIII을 표적으로 하는 NMTR 저해제 및 저해 방법을 제공하여, NMTR에 기인하는 유전병 및 암에 대한 치료제, 항암제 및 항암 치료법 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

<27> 따라서 본 발명은 NMTR의 분자생물학적인 작용기전의 규명하여 유전병 및 항암 치료 분야에 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<28> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<29> **실험 재료 및 방법**

<30> **리포터 플라스미드 제작**

<31> 제일 먼저 pRL3-cTGFβR2, pRL3-gTGFβR2의 골격이 되는 pRL3 벡터(pRL3 vector)를 먼저 제작하였다. pRL3 벡터(pRL3 vector)는 pRL-CMV 벡터(pRL-CMV vector, Promega)에 NheI 제한효소로 자른 후 필드인(filled-in)한

후 다시 XbaI을 처리하여 레닐라 루시페라아제 유전자(renilla luciferase gene)를 빼낸 후에 pGL3-컨트롤 벡터(pGL3-control vector, Promega)를 NcoI 처리, 필드인(filled-in) 한 후 XbaI으로 자른 다음 레닐라 루시페라아제 유전자(renilla luciferase gene)와 결합되었다 (실시예 1, 도 1a).

<32> pRL3-cTGFβR2와 pRL3-gTGFβR2 플라스미드 제작을 위해, 먼저 TGFβR2(-1)-irrelevant-F 플라스미드(참고문헌: You et al. PLos Biolgy 2007, (5):e109)와 TGFβR2(-1)-splicing 플라스미드 (참고문헌: You et al. PLos Biolgy 2007, (5):e109)로부터 TGFβR2의 엑손(exon) 4번의 PTC부터 3'UTR 끝부분까지 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 통해 각각 증폭시켰다. 인트론(Intron)을 가지지 않는 cTGFβR2 조각의 증폭은 두 종류의 프라이머 5'-GCTCTAGACATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTC-3'(서열번호 3)와 5'-GCTCTAGAGCCTGCCCCATAAGAGCTATTTGGTAG-3'(서열번호 4)를 사용하였다. 인트론(Intron)을 포함하는 gTGFβR2 조각의 증폭은 두 종류의 프라이머 5'-GCTCTAGACATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCTC-3'(서열번호 5) 5'-GCTCTAGAGCCTGCCCCATAAGAGCTATTTGGTAG-3'(서열번호 6)를 사용하였다. 각 프라이머는 끝쪽에 제한 효소 XbaI site를 가지고 있다 (밑줄 부분). PCR을 통해 증폭된 cTGFβR2, gTGFβR2 조각은 XbaI 제한효소를 처리한 다음, pRL3 벡터(pRL3 vector)의 XbaⅠ 제한 효소위치에 삽입되었다.

<33> **eIF4AIII-WT과 eIF4AIII-M 플라스미드 제작**

<34> pCMV-myc-eIF4AIII 컨스트럭트(construct)에 포워드 프라이머(forward primer) 5'-TCAGCAATCCAGCAACGCGCGATTAAGCAAATTATCAAAGGGAGAGATG-3'(서열번호 7), 백워드 프라이머(backward primer) 5'-CATCTCTCCCTTTGATAATTTGCTTAATCGCGCGTTGCTGGATTGCTGA-3' (서열번호 8) 와 *pfu* DNA 폴리머라제(*pfu* DNA polymerase, Stratagene) 효소를 이용하여 pCMV-myc-4AIII-WT 플라스미드를 제작하였다. 이 플라스미드는 eIF4AIII siRNA와의 결합을 방지하기 위해서 siRNA 결합 부위인 CGAGCAATCAAGCAGATCA(서열번호 9)를 CGCGCGATTAAGCAAATTA(서열번호 10)로 총 5개의 염기서열이 치환되어 있다 (밑줄 부분).

<35> pCMV-myc-eIF4AIII-M은 pCMV-myc-eIF4AIII-WT 플라스미드에 두 종류의 프라이머 5'-GCTTTGATCTTGGCTCCCAGGAGAGTTGCTGCTGTGCAGATCCAGAAG-3'(서열번호 11), 5'-CTTCTGGATCTGCACAGCAGCAACTCTCCTGGGAGCCAAGATCAAAGC-3'(서열번호 12)와 *pfu* DNA 폴리머라제(*pfu* DNA polymerase, Stratagene) 효소를 이용하여 제작하였다. pCMV-myc-eIF4AIII-M은 점돌연변이(point mutation)를 가지는 eIF4AIII 단백질을 발현하는 플라스미드로서, 정상 eIF4AIII의 아미노산 중 115, 117, 118 번째 아미노산이 R,V,A로 각각 치환된 것이다(Shibuya T, Tange TO, Stroupe ME, Moore MJ. Mutational analysis of human eIF4AIII identifies regions necessary for exon junction complex formation and nonsense-mediated mRNA decay. RNA. 2006 Mar;12(3):360-374.).

<36> **세포배양(Cell culture)과 트랜스펙션(Transfections)**

<37> 사람의 HeLa 세포를 DMEM(Lonza) 배지에 10% 농도의 우태혈청(fetal bovine serum, Lonza)과 1% 농도의 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) 항생제를 포함한 배지를 사용하여 키웠다. 이 사람의 HeLa 세포에 위 세 개의 플라스미드 1ug을 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000, Invitrogen) 시약을 사용하여 트랜스펙션(transfection) 한 후 24시간 후에 세포를 수거하여 RNA를 획득하였다 (실시예 1). 위와 동일한 시약을 사용하여 pRL3-cTbR2와 pRL3-gTbR2 플라스미드를 각 2ug, pGL3-control 플라스미드를 1 ug 코-트랜스펙션(co-transfection)하였다 (실시예 2, 5). Upf1-WT, Upf1-DN 플라스미드는 1 ug을 트랜스펙션(transfection)하였고 (실시예 3), eIF4AIII-WT와 eIF4AIII-M 플라스미드를 0.5 ug, 2 ug 트랜스펙션(transfection)하였다 (실시예 4, 5).

<38> **RNA 하향조절(RNA downregulation)**

<39> 올리고펙타민(Oligofectamine, Invitrogen) 시약을 사용하여 회사의 실시예에 따라 eIF4AIII와 Upf1 siRNA를 100nM 농도가 되게 처리하였다 (실시예 2). 위와 동일한 시약을 사용하여 eIF4AIII siRNA를 100 nM 농도로 처리하였다 (실시예 5).

<40> **웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

<41> 각 단백질들을 8% 폴리아크릴 아마이드 젤을 통해 크기별로 분리시킨 후, anti-Upf1 , anti-eIF4AIII, anti-myc, anti-β-actin, anti-GAPDH 항체를 각각 사용하여 검출하였다 (실시예 2,3,4,5).

<42> **루시페라아제 에세이(Lucifease assay)**

<43> 듀얼 루시페라아제 에세이(Dual luciferase assay, Promega)법을 회사의 실험방법서에 나와 있는 조건을 참고하

여 실시하였다.

<44> **RNA 분석**

<45> pRL3-cTGFβR2, pRL3-gTGFβR2, pGL3-control, pmCMV-Gl, pmCMV-GPx1, phMUP mRNA를 각각의 특정 프라이머와 a-[^{32}P]-dATP를 사용하여 정량적 RT-PCR을 수행한 후, 표식이 된 PCR 산물(PCR product)을 전기영동을 통해 분리하였고, 방사선 사진 촬영술(autoradiography)법으로 검출하였다 (실시예1,2,3,4,5). 사용한 RT-PCR 프라이머는 pRL3-cTGFβR2, pRL3-gTGFβR2 플라스미드로부터 발현되는 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)를 검출하기 위해서 5'-ATGACTTCGAAAGTTTATG-3'(서열번호 13)와 5'-TTCAGATTTGATCAACGCA-3'(서열번호 14)를 사용하였고 (도 1b), 스플라이싱(splicing) 여부를 알아보는 프라이머는 5'-GGCTAACAGTGGGCAGGTG-3'(서열번호 15)와 5'-GCCGCCCCGACTCTAGAGCC-3'(서열번호 16)를 사용하였다 (도 1c). pGL3-control 플라스미드에서 발현되는 Firefly luciferase (FLuc)을 검출하기 위해서 5'-CAACACCCCAACATCTTCG-3'(서열번호 17)와 5'-CTTTCCGCCCTTCTTGGCC-3'(서열번호 18)를 사용하였고, pmCMV-Gl에서 발현되는 Globin mRNA 검출을 위해서 5'-ACCACCGTAGAACGCAGATCG-3'(서열번호 19)와 5'-GGGTTTAGTGGTACTTGTGAGC-3'(서열번호 20)를 사용하였다. pmCMV-GPx1에서 발현되는 GPx1 mRNA를 검출하기 위해서 5'-ACCACCGTAGAACGCAGATCG-3'(서열번호 21)와 5'-CTTCTCACCATTCACCTCGCACTT-3'(서열번호 22)를, phCMV-MUP에서 발현되는 MUP mRNA의 검출을 위해서는 5'-CTGATGGGGCTCTATG-3'(서열번호 23)와 5'-TCCTGGTGAGAAGTCTCC-3'(서열번호 24)를 각각 사용하였다.

<46> **실시예 1. NMTR의 타켓 유전자인 TGFβR2 유전자를 이용하여, NMTR의 효율을 정량화할 수 있는 시스템의 개발**

<47> 기존에 보고된 연구 내용을 바탕으로 TGFβR2 유전자(참고문헌: You et al. PLos Biology 2007, (5):e109)중에서 구조이동 돌연변이(frameshift mutation)에 의해 PTC가 생기는 엑손 네 번째 부분부터 일곱 번째 부분을 제한 효소(Xba Ⅰ)를 이용하여 절단한 후 pRL3라고 하는 벡터에 옮겨 넣었다 (gTGFβR2 : NMTR의 표적이 되는 리포터(reporter), cTGFβR2 : NMTR의 표적이 되지 않는 리포터(reporter)).

<48> 보다 구체적인 제작방법은 TGFβR2 유전자 (참고문헌: You et al. PLos Biology 2007, (5):e109) 중에서 역전사(reverse transcription) 기법을 통해 얻어진 TGFβR2 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)기법을 통하여 엑손 네 번째 부분부터 일곱 번째 부분을 제한효소 Xba Ⅰ을 이용하여 절단한 후 pRL3라고 하는 벡터에 옮겨 넣었다.

<49> 한편, cTGFβR2의 경우, DNA상에 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째 인트론 (Intron=암호화하지 않는 유전자)이 존재하지 않기 때문에 mRNA로 전사가 일어난 후에 스플라이싱을 거치지 않으므로 엑손 결합부위에 존재하는 단백질들 중의 하나인 eIF4AIII가 이 mRNA에는 붙어 있을 수가 없다. 따라서 gTGFβR2의 대조군으로써의 역할을 하는 리포터이다. pRL3 vector는 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase)라고 하는 유전자를 코딩하고 있어 NMTR 현상을 루시페라아제 에세이(luciferase assay)를 통해서 쉽게 관측할 수 있는 장점을 가지고 있다 (도 1a).

<50> 위에서 제작된 NMTR 리포터가 실제로 NMTR의 표적이 잘 되는지를 조사하였다. 먼저 제작된 리포터 시스템(reporter system)이 기존의 NMTR 현상과 같이 mRNA 레벨(level)에는 변화가 없는지 RT-PCR 방법으로 확인한 결과, 세포내에서 합성되는 mRNA 레벨에는 변화가 없는 것을 확인하였고 (도 1b), 스플라이싱(splicing) 과정이 정상적으로 이루어지는 것을 확인하였다 (도 1c). 단백질 번역 효율을 조사한 결과, gTGFβR2 리포터의 경우, cTGFβR2에 비해 레닐라 루시페라아제(renilla luciferase) 값이 70~80% 정도 감소하는 것을 확인하였다 (도 1d 및 도 1e). 즉, 제작된 NMTR 리포터 플라스미드는 NMTR 현상을 정확히 재현하고 있으며, NMTR 정량 시스템으로 사용하기 충분하다.

<51> **실시예 2. eIF4AIII에 의한 NMTR의 저해(inhibition)**

<52> 실시예 1에서 제작된 NMTR 리포터 시스템이 제대로 작동한다는 것을 확인한 후, 어떠한 메카니즘(mechanism)에 의해 조절이 되는지를 밝히기 위해 NMD에 관여하는 중요 인자(factor)인 Upf1 (참고문헌: Kim et al. Cell. 2005, 120(2):195-208.)과 스플라이싱(splicing)이 일어난 후에 mRNA에 붙는 엑손-접합점 컴플렉스(exon-junction complex)에 핵심 인자인 eIF4AIII를 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 기법 (참고문헌 :You et al. PLos Biology 2007, (5):e109)을 통해 발현량을 저해한 후, NMTR의 변화를 관찰하였다.

<53> 먼저, Upf1과 eIF4AIII에 대한 siRNA가 잘 작동했는지 웨스턴 블럿팅 기법을 통해 확인하였다(도 2a). 이 상태에서 NMTR 리포터의 mRNA 변화를 RT-PCR 기법으로 확인한 결과, mRNA 레벨에는 변화가 없는 것을 확인하였다(도 2b).

<54> 그리고 루시페라아제 에세이(luciferase assay) 방법을 통해 NMTR 리포터의 단백질 발현 정도를 확인해본 결과, eIF4AIII의 단백질 발현을 저해했을 때, 대조군에 비해 2배 정도 증가한다는 것을 확인하였다 (도 2c). 그리고 상대적인 단백질의 발현 정도를 측정하기 위해 mRNA 당 루시페라아제 활성도(luciferase activity)를 비교한 결과, Upf1은 아무런 효과가 없는 반면, eIF4AIII를 저해했을 때, NMTR에 의한 단백질 발현저해가 2배 정도 감소하는 것으로 확인되었다(도 2d).

<55> 이들 결과는 NMD에 관련하는 단백질인 Upf1은 NMTR에 기능을 하지 않는 반면 eIF4AIII는 NMTR에 있어 중요한 단백질임을 보여준다.

<56> **실시예 3. Upf1 우성-음성 돌연변이(dominant-negative mutant)를 이용하여 NMTR에는 Upf1이 관련하지 않음을 재검증**

<57> 상기 도 2에서 Upf1을 siRNA로 발현을 저해했을 경우, NMTR에는 변화가 없다는 것을 좀 더 확실하게 확인하기 위해, Upf1의 야생형(wild-type) 유전자(Upf1-WT)와 우성-음성(dominant-negative) 유전자 (Upf1-R844C)를 과발현(overexpression)하였을 때, NMTR 변화를 관찰하였다. 이때 우성-음성(dominant-negative) 유전자 (Upf1-R844C) 제작은 문헌, Sun X et al. PNAS 1998,95(17):10009-14을 참조하였다.

<58> 도 3a는 Upf1 야생형(wild-type) 및 우성-음성(dominant-negative)이 과발현 되었다는 것을 웨스턴 블럿팅(western blotting) 방법으로 확인한 결과이다. Upf1의 야생형(wild-type) 및 우성-음성(dominant-negative) 유전자를 과발현(overexpression)시켰을 때, NMTR 리포터의 mRNA 레벨에 있어서는 대조군에 비해 약간 증가하거나 변화가 없는 것을 확인하였다 (도 3b). 루시페라아제 값을 조사한 결과, 야생형(wild-type) 및 우성-음성(dominant-negative) Upf1 모두 큰 영향을 주지 않았고, NMTR의 효율을 보여주는 mRNA 당 루시페라아제 활성도(luciferase activity) 값도 변화가 없다는 것을 확인하였다 (도 3c 및 도 3d).

<59> Upf1은 NMD의 중요 인자로 잘 알려져 있다. 동일한 상황에서 베타-글로빈(beta-globin)과 GPx1 mRNA를 이용하여 NMD 효율을 관찰한 결과, 대조군과 야생형 Upf1 과발현 시 NMD가 잘 일어나는 반면, 우성-음성(dominant-negative) Upf1을 과발현시켰을 경우 NMD가 3배 이상 저해됨을 알 수 있었다(도 3e 및 도 3f).

<60> **실시예 4. eIF4AIII 우성-음성 돌연변이(dominant-negative mutant)를 이용하여 NMTR에 eIF4AIII가 중요함을 검증**

<61> 실시예 2에서 eIF4AIII가 NMTR에 중요하다는 것을 확인하였으므로 이를 좀 더 확실하게 규명하기 위해서 야생형(wild-type; eIF4AIII-WT) 및 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 제작하였다(도 4). 각각의 유전자를 세포내에 과발현시켰을 때 NMTR 효율의 변화를 살펴보았다. 이때 eIF4AIII-M은 제작은 문헌, Shibuya et al., RNA. 2006 Mar;12(3):360-74.을 참조하였다. 특히 야생형(eIF4AIII-WT)은 서열번호 1의 염기서열을 이용하였고, 우성-음성 eIF4AIII(eIF4AIII-M)은 서열번호 2의 염기서열을 이용하였다.

<62> 각각의 eIF4AIII 유전자가 과발현되었다는 것을 도 5a에서 웨스턴 블럿팅(western blotting) 기법으로 확인하였는데, 역시 각각의 유전자가 과발현되었을 때 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없었다(도 5b). 루시페라아제 에세이 결과, 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 과발현시킨 경우, NMTR 효율이 저해됨을 알 수 있었다 (도 5c 및 도 5d).

<63> 기존에 eIF4AIII는 NMD에 있어 중요한 단백질로 보고되었다. 본 발명에서 제작한 우성-음성(dominant-negative) eIF4AIII를 이용하여 NMD 효율을 관찰한 결과, 우성-음성(dominant-negative) eIF4AIII의 과발현은 NMD를 억제하는 것을 알 수 있었다 (도 5e 및 도 5f).

<64> **실시예 5. 상보성(Complementation)을 통한 eIF4AIII와 NMTR 간의 관계를 재검증**

<65> eIF4AIII가 NMTR에 중요하다는 것을 확인하였으므로 상보성(complementation) 실험을 통해 재검증하였다. 먼저 eIF4AIII의 발현을 저해한 상태에서, 야생형(wild-type) 및 우성-음성(dominant-negative) eIF4AIII를 과발현시켰다.

<66> eIF4AIII의 발현 저해 및 각각의 eIF4AIII 유전자가 과발현되었다는 것을 도 6a에서 웨스턴 블럿팅(western blotting) 기법으로 확인하였고, 모든 경우 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없었다(도 6b). 루시페라아제 에세이(luciferase assay) 결과, eIF4AIII siRNA를 처리 시, NMTR 효율이 저해됨을 알 수 있었고, 이 상태에 야생형(wild-type) eIF4AIII를 과발현시키면 NMTR이 회복되는 반면, 우성-음성 eIF4AIII (eIF4AIII-M)를 과발현시켰을 때는 NMTR이 더 저해됨을 알 수 있었다 (도 6c 및 도 6d).

<67> 상술한 바와 같은 결과는, 엑손-접합점 콤플렉스(exon-junction complex) 중에 핵심이 되는 eIF4AIII가 NMTR에 직접적으로 관련하는 것으로 결론지을 수 있다.

<68> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<69> 도 1a는 본 발명에 의해 TGFβR2 유전자 중에서 구조이동 돌연변이에 의해 PTC가 생기는 엑손 네번째 부분부터 일곱 번째 부분을 제한효소를 이용하여 절단한 후 pRL3 벡터에 옮겨 놓은 것을 보여주는 개략도로서, gTGFβR2는 NMTR의 표적이 되는 리포터이고, cTGFβR2는 NMTR의 표적이 되지 않는 리포터이다.

<70> 도 1b는 본 발명에 의한 NMTR 리포터 시스템에서 기존의 NMTR 현상과 같이 세포내에서 합성되는 mRNA 레벨에는 변화가 없는 것을 RT-PCR 방법으로 확인한 결과를 보인 도면이다.

<71> 도 1c는 본 발명에 의한 NMTR 리포터 시스템에서 스플라이싱 과정이 정상적으로 이루어진 것을 보여주는 도면이다.

<72> 도 1d 및 도 1e는 본 발명에 의한 NMTR 리포터 시스템에서 단백질 번역 효율을 조사한 결과를 보여주는 도면이다.

<73> 도 2a는 NMD에 관여하는 중요 인자인 Upf1과 eIF4AIII에 대한 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)의 작동여부를 웨스턴 블럿팅 기법을 이용하여 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<74> 도 2b는 NMD에 관여하는 중요 인자인 Upf1과 eIF4AIII를 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 기법을 통해 발현양을 저해한 후, 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없음을 RT-PCR 기법을 통해 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<75> 도 2c 및 도 2d는 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 단백질 발현 정도를 루시페라아제 에세이를 통해 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<76> 도 3a는 Upf1 야생형 유전자(Upf1-WT)와 우성-음성(dominant-negative) 유전자(Upf1-R844C)가 과발현되었다는 것을 웨스턴 블럿팅 방법으로 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<77> 도 3b는 Upf1 야생형 유전자(Upf1-WT)와 우성-음성(dominant-negative) 유전자(Upf1-R844C)를 과발현시켰을 때, 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없음을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<78> 도 3c 및 도 3d는 Upf1 야생형 유전자(Upf1-WT)와 우성-음성(dominant-negative) 유전자(Upf1-R844C)를 과발현시켰을 때, 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 단백질 발현 정도에 모두 변화가 없음을 루시페라아제 에세이를 통해 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<79> 도 3e 및 도 3f는 Upf1 야생형 유전자(Upf1-WT)와 우성-음성(dominant-negative) 유전자(Upf1-R844C)를 과발현시켰을 때, 베타-글로빈과 GPx1 mRNA를 이용하여 NMD 효율에 차이가 있음을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<80> 도 4는 본 발명에 의한 NMTR 리포터 시스템에서 eIF4AIII가 중요함을 입증하기 위해, eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)을 제작한 것을 보여주는 개략도이다.

<81> 도 5a는 eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)가 과발현되었다는 것을 웨스턴 블럿팅 방법으로 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<82> 도 5b는 eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 과발현시켰을 때, 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없음을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<83> 도 5c 및 도 5d는 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 과발현시켰을 때, 본 발명에 의한 NMTR 효율이 저해됨을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<84> 도 5e 및 도 5f는 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)를 과발현시켰을 때, 베타-글로빈과 GPx1 mRNA를 이용하여 NMD가 억제되는 것을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

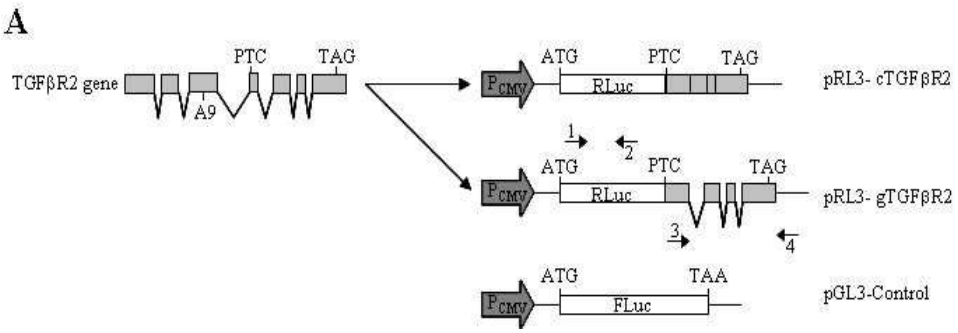
<85> 도 6a는 eIF4AIII에 대한 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)를 처리한 후에 다시 eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)가 과발현되었다는 것을 웨스턴 블럿팅 방법으로 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

<86> 도 6b는 eIF4AIII에 대한 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)를 처리한 후에 다시 eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; eIF4AIII-M)을 과발현 시켰을 때 본 발명에 의한 NMTR 리포터의 mRNA 레벨에는 변화가 없음을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

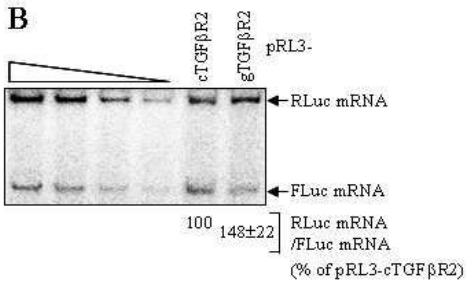
<87> 도 6c 및 도 6d는 eIF4AIII에 대한 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA)를 처리한 후에 다시 eIF4AIII 야생형(eIF4AIII-WT)과 우성-음성 eIF4AIII(dominant-negative eIF4AIII; efF4AIII-M)을 과발현 시켰을 때 본 발명에 의한 NMTR 효율이 대조군에 비해 다시 회복됨으로써 eIF4AIII 가 NMTR에 중요한 인자임을 보여주는 도면이다.

도면

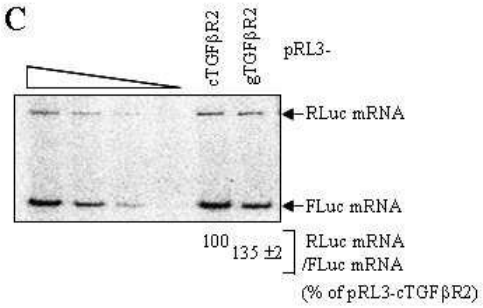
도면1a



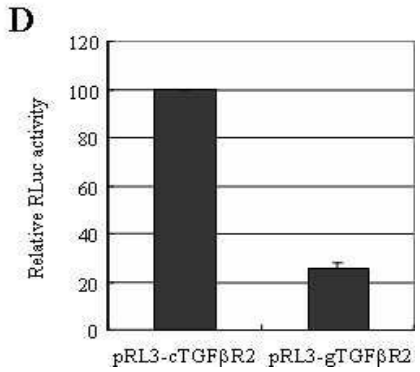
도면1b



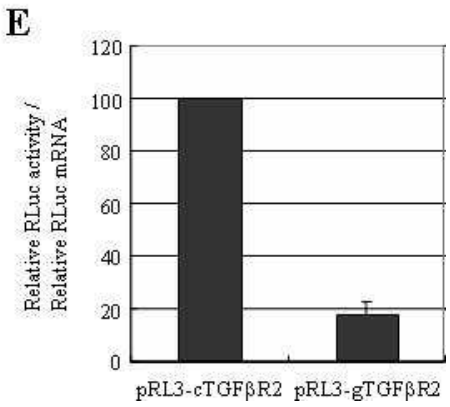
도면1c



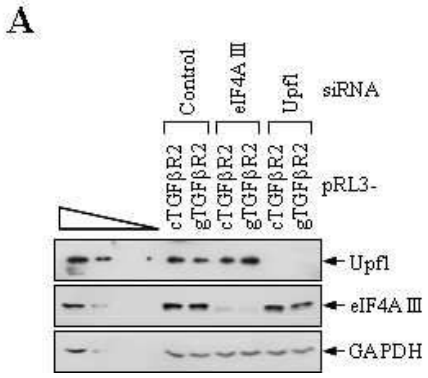
도면1d



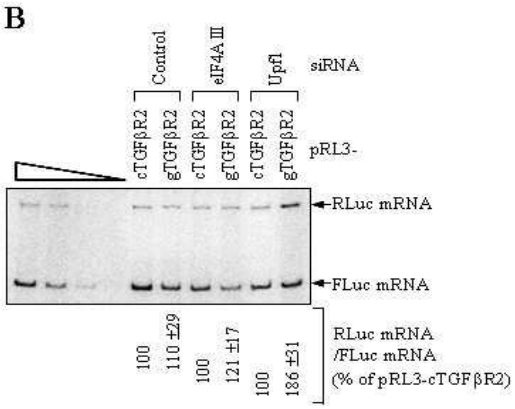
도면1e



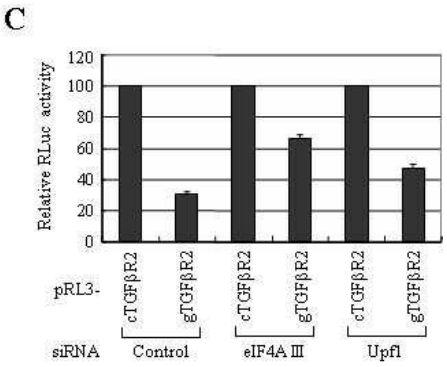
도면2a



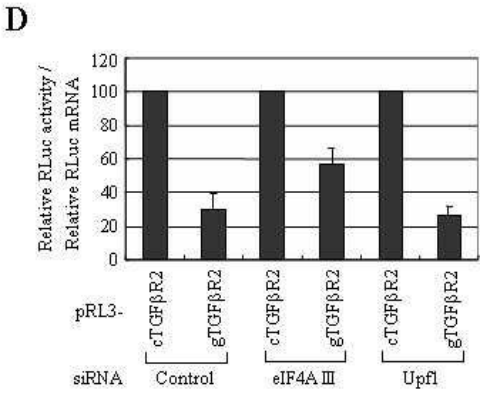
도면2b



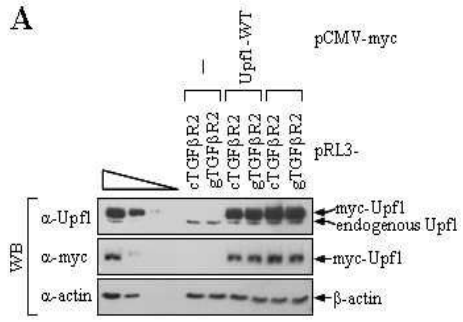
도면2c



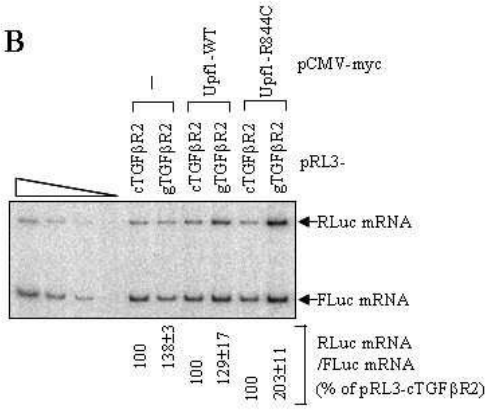
도면2d



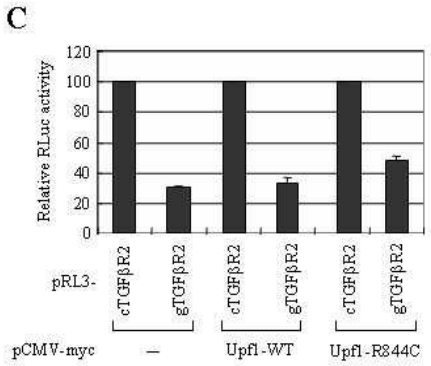
도면3a



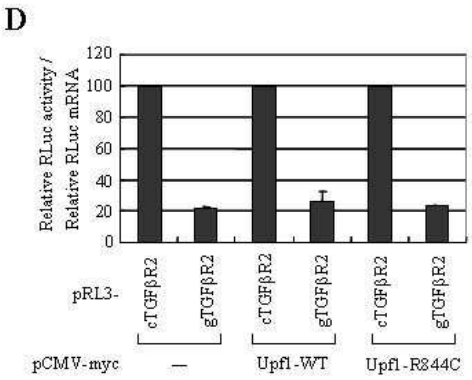
도면3b



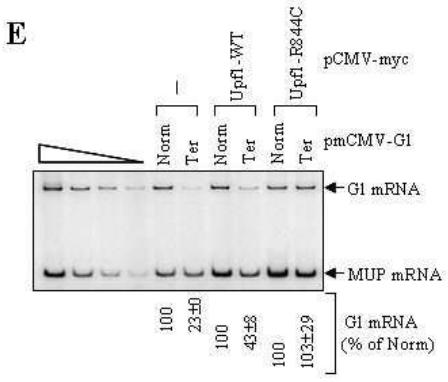
도면3c



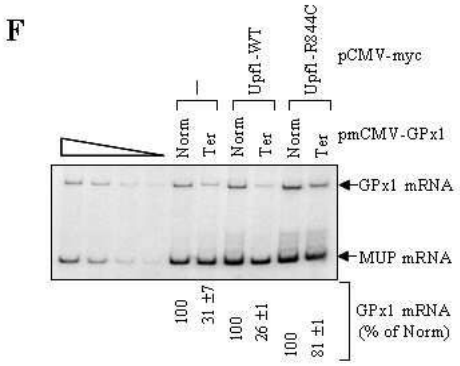
도면3d



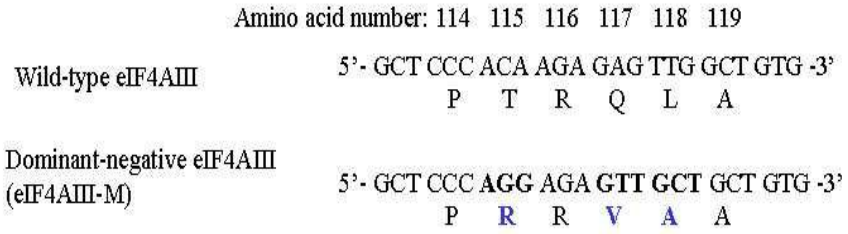
도면3e



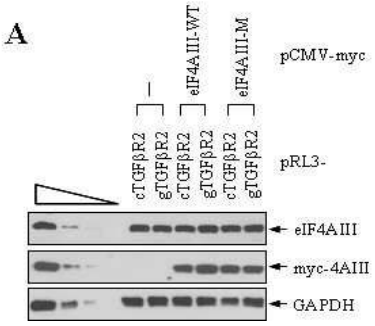
도면3f



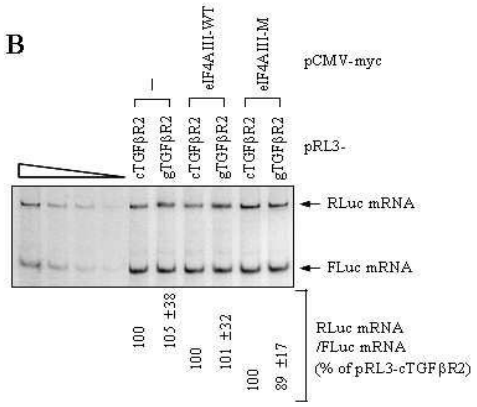
도면4



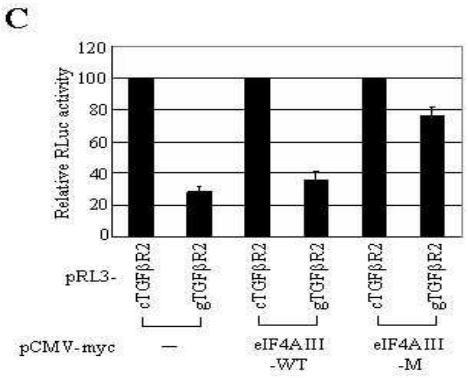
도면5a



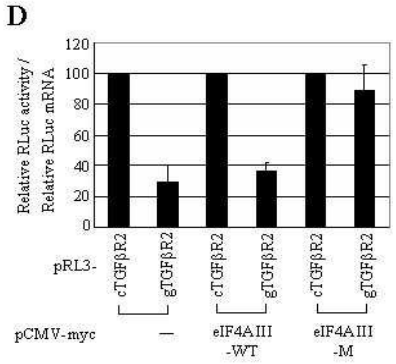
도면5b



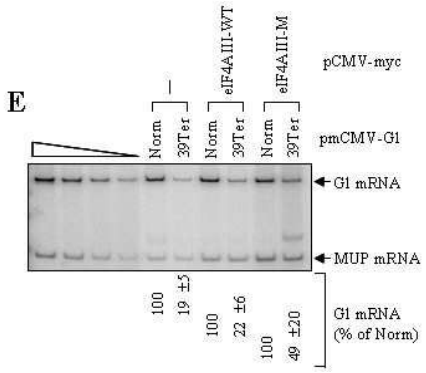
도면5c



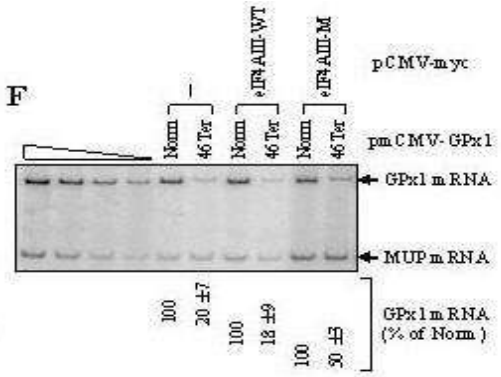
도면5d



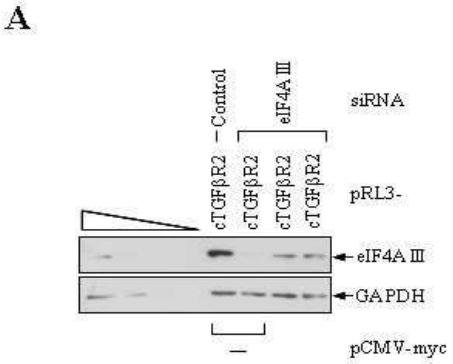
도면5e



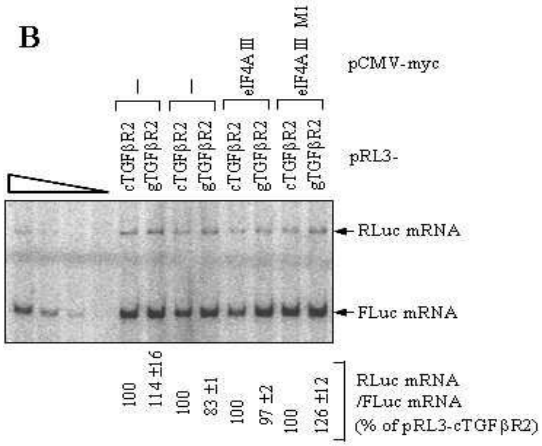
도면5f



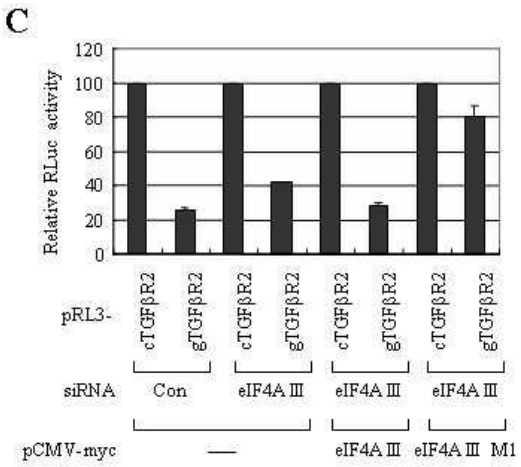
도면6a



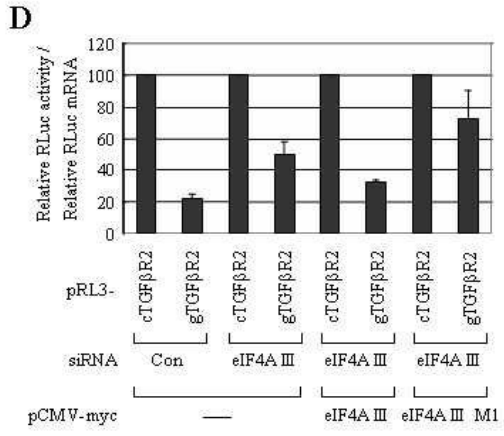
도면6b



도면6c



도면6d



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
<120> Assayable reporter system for nonsense-mediated translational repression and modulation method of nonsense-mediated translational repression by eIF4AIII

<130> P11-070820-01

<160> 24

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gctcccacaa gagagttggc tgtg 24

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
gctcccagga gagttgctgc tgtg 24

<210> 3
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 3
gctctagaca tatttcaagt gacaggcatc agcctc 36

<210> 4
<211> 35
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 4
gctctagagc ctgccccata agagctattt ggtag 35

<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 5
gctctagaca tatttcaagt gacaggcatc agcctc 36

<210> 6
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 6
gctctagagc ctgccccata agagctattt ggtag 35

<210> 7
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 7

tcagcaatcc agcaacgcgc gattaagcaa attatcaaag ggagagatg 49

<210> 8
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 8
catctctccc tttgataatt tgcttaatcg cgcgttgctg gattgctga 49

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cgagcaatca agcagatca 19

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
cgcgcgatta agcaaatta 19

<210> 11
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 11
gctttgatct tggctcccag gagagttgct gctgtgcaga tccagaag 48

<210> 12
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 12
cttctggatc tgcacagcag caactctcct gggagccaag atcaaagc 48

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 13
atgacttcga aagtttatg 19

<210> 14
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 14
ttcagatttg atcaacgca 19

<210> 15
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 15
ggctaacagt gggcaggtg 19

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 16
gccgccccga ctctagagcc 20

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 17
caacacccca acatcttcg 19

<210> 18
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 18
ctttccgccc ttcttggcc 19

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 19
accaccgtag aacgcagatc g 21

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 20
gggtttagtg gtacttgtga gc 22

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 21
accaccgtag aacgcagatc g 21

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR PRIMER

<400> 22
cttctcacca ttcacctcgc actt 24

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 23
ctgatggggc tctatg 16

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 24
tcctggtgag aagtctcc 18