

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/54 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년05월23일

(11) 등록번호 10-0581990

(24) 등록일자 2006년05월15일

(21) 출원번호 10-1999-7012595

(65) 공개번호 10-2001-0020601

(22) 출원일자 1999년12월30일

(43) 공개일자 2001년03월15일

번역문 제출일자 1999년12월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US1998/013835

(87) 국제공개번호 WO 1999/01560

국제출원일자 1998년07월01일

국제공개일자 1999년01월14일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 가나, 감비아, 인도네시아, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 기니 비사우,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장

60/051,410 1997년07월01일 미국(US)

60/053,018 1997년07월19일 미국(US)

60/053,329 1997년07월21일 미국(US)

60/054,642 1997년08월04일 미국(US)

60/058,287 1997년09월09일 미국(US)

(73) 특허권자

감비아 바이오시스템즈 엘엘씨

미국 워싱턴주 98039 벨뷰 사우스이스트 애비뉴 1150-114 번

피터 맥칼럼 캔서 인스티튜트

오스트레일리아 빅토리아주 멜버른 8006 아벡켓 스트리트 록우드 백1

(72) 발명자

킬리안앤드르제이

오스트레일리아에이써티2602캠버라캠벨스트리트42

보우텔데이비드
오스트레일리아브이아이씨3058코버그스트라테어른애비뉴22

(74) 대리인
홍동오
이병호
신현문
김영관
이범래
정상구

심사관 : 김지윤

(54) 척추 동물 텔로머라제 유전자 및 단백질과 이의 용도

요약

척추동물 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 텔로머라제를 발현시키는데 적합한 유전자 생성물, 발현 벡터 및 숙주 세포를 제공한다. 텔로머라제 활성의 억제제를 확인하는 방법 및 억제제 조성물을 제공한다.

대표도

도 1A

색인어

텔로머라제, 척추 동물, 핵산 분자, 하이브리드, 변이체, 상보체, 올리고뉴클레오타이드, 발현 벡터, 숙주 세포, 프로브, 억제제, 이펙터

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 텔로머라제에 관한 것이며, 특히 사람의 텔로머라제 유전자 및 단백질, 및 진단 및 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

비-환형 염색체는 각 세포 분열후 염색체 말단을 유지하기 위해 특별한 메카니즘을 필요로 하는데, 그 이유는 염색체 DNA 복제에 관여하는 폴리머라제가 완전히 선형 DNA 분자를 복제하지 못함으로 인해, "말단 복제 문제"가 발생하기 때문이다. 이런 문제를 극복하기 위하여, 진핵세포는 텔로머라제 효소를 이용하여, G가 풍부한 상대적으로 보존된 짧은 반복 서열을 염색체 말단에 부가한다. 이들 반복 구조는 말단소립(telomere)이라 한다.

말단소립의 존재는 세포 생존에 필수적이다. 단 하나의 말단소립이라도 부족하면 진핵생물인 효모에서 세포 주기가 중단된다[Sandell and Zakian, Cell 75:729, 1993]. 말단소립은 복제동안 짧아진다; 텔로머라제는 이 말단소립을 회복시킨다. 따라서, 예견되는 바와 같이, 텔로머라제 활성은 주로 활발히 분열하는 세포에서 검출된다. 이와 같이, 텔로머라제 활성은 단세포 생물체에 있어서 구성성(constitutive)이며, 좀더 복잡한 생물체에서는 조절되며, 배자계열(germline) 및 배(embryonic)의 조직 및 세포에서 뿐만 아니라 종양 세포에서 상대적으로 풍부하다. 반대로, 텔로머라제 활성은 정상적인 사람 체세포 조직에서는 검출하기가 힘들다. 또한, 텔로머라제의 감소를 초래하는 복제의 정지 보다는, 텔로머라제의 억제

가 이러한 변이과정에서 중요한 현상 중 하나인 것으로 보인다. 텔로머라제/복제 활성화의 가시적인 직접적 상관관계로 인해, 텔로머라제의 억제제는 "보편적인" 암 치료제로 모든 종양 형태에 실질적으로 효과적인 반면, 텔로머라제의 촉진제는 관찰된 정상세포의 자연 노화를 극복할 수 있다는 추측이 있다.

이런 모델에 의해 고무되어, 텔로머라제의 분리와 클로닝을 위한 텔로머라제의 특성화가 우선시되고 있다. 말단소립 신장 메카니즘은 말단소립 반복 서열의 G-풍부 쇄를 중심으로 하고 있는 것으로 보인다. 염색체의 3'말단에 뻗어있는 이런 G-풍부 쇄는 주형으로 작용하는 RNA 성분에서 얻은 리보뉴클레오타이드인 텔로머라제에 의해 연장된다. 이런 복합체의 다양한 성분이 분리되고 클로닝되었다. 이 복합체의 RNA 성분이 사람[Feng et al. Science 269: 1236, 1995], 마우스 및 다른 포유류 중, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 테트라히메나 (*Tetrahymena*), 유플로테스 (*Euplotes*), 및 옥시트리카(*Oxytricha*)[참조: Singer and Gottschling, Science, 266: 404, 1994; Lingner et al. Genes & Develop. 8: 1984, 1994; and Romero and Blackburn, Cell 67: 343, 1994]를 포함해 수 많은 다양한 생물체에서 분리되고 클로닝되었다. 단백질 성분은 상대적으로 분리하기 어렵다. 최근에, 몇 가지 단백질 성분의 뉴클레오타이드 서열이 결정되었다[테트라히메나에서 얻은 80 kD/95 kD 이량체 단백질, WO 제96/19580호; 및 사람에서 얻은 67 kD 단백질, WO 제97/08314호].

본 발명은 텔로머라제의 뉴클레오타이드와 아미노산 서열, 진단 및 치료에 있어서 이들 서열의 용도에 관한 것이며, 추가로 기타 관련된 이점을 제공한다.

발명의 요약

한가지 양태에서, 본 발명은 일반적으로 척추동물 텔로머라제(이의 변이체 포함)를 암호화하는 분리된 핵산 분자를 제공한다. 척추동물의 대표적인 예에는 새와 같은 비-포유류 생물을 비롯한 사람, 구대륙 원숭이(예, 머카크(macaques), 침팬지(chimps), 비비(baboon)), 개, 랫트 및 마우스와 같은 포유류가 있다. 바람직한 양태에서, 척추동물 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자가 제공되며, 이 핵산 분자는 도 1에 나타난 서열 또는 엄격한 조건하에서 도 1에 나타난 서열의 상보체와 하이브리드화되는 서열을 포함하며, 단, 이 핵산 분자는 EST AA281296은 아니다.

기타 바람직한 양태에서, 핵산 분자는 도 11에 나타난 서열을 포함하거나 도 11에 나타난 임의의 아미노산 서열을 암호화하거나, 통상적인 엄격한 조건하에서 이 서열의 상보체와 하이브리드화되며, 단, 핵산 분자는 EST AA281296이 아니다. 다른 양태에서, 핵산 분자는 도 10에 나타난 임의의 서열을 포함하거나 통상적인 엄격한 조건하에서 이 서열의 상보체와 하이브리드화된다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 도 1에 나타난 서열 또는 이의 상보체로부터 얻은 10 내지 100개의 연속적인 뉴클레오타이드, 또는 도 10에 나타난 서열 또는 이의 상보체에서 얻은 10 내지 100개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 당해 올리고뉴클레오타이드는 검출가능한 표지로 표지화될 수 있다.

또 다른 양태에서, 발현 벡터를 제공하며, 사람의 텔로머라제 핵산 분자에 작동가능하게 연결될 수 있는 이중 프로모터를 포함한다. 상기 벡터는 세균 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 효모 벡터로 이루어지는 그룹으로부터 선택될 수 있다. 이런 벡터를 함유한 숙주 세포가 또한 제공한다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 사람의 텔로머라제 단백질을 포함하는 분리된 단백질을 제공한다. 이 단백질은 도 1에서 나타난 아미노산 서열이나 이의 변이체, 또는 도 11에서 나타난 아미노산 서열이나 이의 변이체를 포함할 수 있다. 관련된 양태에서, 이 단백질은 사람의 텔로머라제 단백질의 일부분이며, 이는 도 1 또는 도 11에서 나타난 서열에서 유도될 수 있다. 바람직한 양태에서, 이 일부분은 10 내지 100개 아미노산 길이를 가진다.

다른 양태에서, 사람 텔로머라제 단백질이나 이의 일부분에 특이적으로 결합하는 항체가 제공된다.

바람직한 양태에서, 통상적인 엄격한 조건하에서 사람의 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자와 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 올리고뉴클레오타이드(예, 핵산 프로브 또는 프라이머)가 제공된다. 특정 양태에서, 핵산 분자는 검출가능한 표지를 지닌다. 특정 양태에서, 핵산 분자는 도 1에 나타난 1624 내지 2012번 뉴클레오타이드와 하이브리드화되지 않도록 선택된다. 본 발명의 특정 양태에서, 핵산 프로브나 프라이머는 야생형 텔로머라제 서열과는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 상이할 수 있다.

관련된 양태에서, 본 발명은 사람의 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자의 전체 또는 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 제공한다. 특정 양태에서, 핵산 분자는 도 1, 도 11에 나타난 서열, 또는 이의

상보체를 포함한다. 바람직한 양태에서, 한 쌍의 프라이머는 영역 1, 영역 α, 영역 β, 영역 2, 영역 3, 영역 X 또는 영역 Y의 전부 또는 일부를 포함하는 서열을 특이적으로 증폭할 수 있다. 관련된 양태에서, 본 발명은 영역 1, 영역 α, 영역 β, 영역 2, 영역 3, 영역 X 또는 영역 Y내 핵산 서열과 특이적으로 하이브리드화되는 올리고뉴클레오타이드를 제공한다.

환자에게서 암을 진단하는 방법을 또한 제공한다. 이러한 방법은 종양 cDNA를 제조하는 단계, 사람의 텔로머라제 핵산 서열을 특이적으로 증폭하는 프라이머를 이용해 종양 cDNA를 증폭시키는 단계를 포함하며, 이 방법에서, 텔로머라제 핵산 서열이 검출되는 것은 암 진단의 지표가 된다. 검출된 서열의 양은 대조군에 비해 증폭된 텔로머라제의 양과 비교될 수 있으며, 이때, 대조군에 비해 텔로머라제 핵산 서열이 증가한 것은 암 진단의 지표가 된다.

또 다른 양태에서, 세포내 텔로머라제 RNA 발현 패턴을 결정하는 방법이 제공되며, 이 방법은 세포에서 분리된 mRNA로부터 cDNA를 제조하고 이 cDNA를 청구항 제35항에 따른 프라이머를 이용해 증폭시키고, 이로부터 텔로머라제 RNA 발현 패턴을 결정하는 것을 포함한다. 바람직한 양태에서, 이 방법은 영역 1, 영역 α, 영역 β, 영역 2, 영역 3, 영역 X 또는 영역 Y 서열의 전부 또는 일부를 가진 올리고뉴클레오타이드와 하이브리드화시켜 증폭된 생성물을 검출하는 것을 포함한다. 이들 방법은 환자에게서 암을 진단하는데 사용될 수 있으며, 이 방법에서, 당해 패턴은 암 진단의 지표가 된다.

본 발명은 또한 유전자전이된(transgenic) 사람 이외의 동물을 제공하며, 이들의 세포는 유전자의 발현에 효과적인 프로모터에 작동가능하게 연결되는 사람의 텔로머라제 유전자를 함유한다. 바람직한 양태에서, 동물은 마우스이고 프로모터는 조직-특이적이다. 관련된 양태에서, 본 발명은, 세포가 비기능성 텔로머라제 유전자와 상동 재조합에 의해 분열된 내인성 텔로머라제 유전자를 갖는 마우스를 제공하며, 이 마우스는 내인성 텔로머라제를 발현할 수 없다.

본 발명은 또한 사람의 텔로머라제 활성의 억제제와 텔로머라제 활성의 억제제를 확인하는 분석법을 제공하며, 이 방법에서, 억제제는 텔로머라제와 결합하지만 뉴클레오사이드 유사체는 아니다. 억제제는 사람의 텔로머라제 mRNA에 상보적인 안티센스 핵산, 및 리보자임 등이다. 이런 억제제는 암 치료에 사용될 수 있다.

또한, 텔로머라제 활성의 이펙터(effector)를 확인하는 방법이 제공되며, 이 방법은 (a)후보 이펙터를 텔로머라제 단백질, RNA 성분 및 주형의 혼합물에 부가하고(이때, 텔로머라제 단백질은 전술된 것과 같은 분리된 핵산 분자에 의해 암호화된다); (b) 텔로머라제 활성을 검출하고; (c) (b) 단계의 활성량을 후보 이펙터가 없는 대조군 혼합물에서의 활성량과 비교하여, 이로부터 이펙터를 확인하는 일반적인 단계를 포함한다. 다른 양태에서, 이펙터는 억제제이다. 또 다른 양태에서, 핵산 분자는 사람의 텔로머라제를 암호화한다.

본 발명의 이들 또는 다른 양태는 다음의 상세한 설명과 첨부된 도면을 참고하여 명백해질 것이다. 또한, 보다 자세하게 특정 과정이나 조성물(예, 플라스미드 등)을 설명하는 다양한 참고문헌이 아래에 기술되어 있고 이의 전문이 참고문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

도 1A 내지 1E는 사람 텔로머라제의 DNA 서열(서열)과 예상 아미노산 서열(서열)을 나타낸다.

도 2A 내지 2B는 유플로테스 에어디쿨라투스(*Euplotes aediculatus*) p123(서열), 효모(EST2)(서열) 및 사람(HT1) 텔로머라제 단백질(아미노산 29 내지 1132번) 서열을 나타낸다. 역전사효소 모티프가 표시되어 있다. 세 단백질 모두에서 고 상동성 영역을 텔로머라제 영역으로 정의한다. 서열은 ClustalW 프로그램으로 정렬된다.

도 3은 텔로머라제 촉매 서브유니트가 LIM 1215 결장암 세포에서는 발현되나 CCD 1차 섬유아세포에서는 발현되지 않는다는 것을 보여주는 노던 분석의 스캐닝된 이미지이다. 대략 3.8 kb mRNA가 hT1 프로브와 하이브리드화된다. 고 분자량을 가진 추가의 교차-하이브리드화 mRNA는 위쪽에 화살표로 표시되어 있다. 폴리A⁺ RNA 조제물에 존재하는 리보솜 RNA에 대한 교차-하이브리드화가 표시되어 있다. 동일 블롯(blots)은 또한 로딩 대조군(아래쪽 패널)으로서 GAPDH 유전자에서 얻은 프로브와 하이브리드화된다. 마커(marker) 크기는 Kb 단위로 표시된다.

도 4는 텔로머라제 촉매 서브유니트가 단일 유전자에 의해 암호화되며 LIM 1215 세포에서는 증폭되지 않는다는 것을 보여주는 서던 분석의 스캐닝된 이미지이다. 사람 말초 혈액과 LIM 1215 세포주에서 분리된 게놈 DNA를 hT1 프로브로 프로빙한다. 이 블롯은 또한 검출 감응성을 조절하기 위하여 희석된 프로브 플라스미드를 함유한다. 상기 플라스미드는 대략 10, 5, 1 게놈 등량으로 희석된다. H, *Hind* III; E, *Eco* RI; P, *Pst* I; X, *Xba* I; B, *Bam* HI.

도 5는 다양한 조직으로부터 합성된 cDNA의 증폭 결과를 보여준다. 증폭은 hT1 유전자에서 인트론을 포함한 hT1 cDNA 서열에서 얻은 프라이머를 이용해 수행하고, 생성물은 hT1 서열에서 얻은 방사성 표지된 올리고뉴클레오타이드로 블롯팅하고 프로빙한다. 증폭은 또한 로딩 대조군으로서 β -액틴 유전자에서 얻은 한 쌍의 프라이머를 가지고 동일한 샘플에서 수행한다. a: hT1 cDNA 대조군; b: 사람 게놈 DNA 대조군; c: 주형 부재 대조군; d: 정상 결장 RNA; e: 정상 고환 RNA; f: 정상 림프구 RNA; g: 흑색종 RNA(뇌 전이); h: 흑색종 RNA(피하 발목 전이); i: 흑색종 RNA(간 전이); j: 흑색종 RNA(폐 전이); k: 흑색종 RNA(액와 림프절 전이); l: 흑색종 RNA(피부 전이); m: 유방암 RNA; n: 유방암 RNA; o: 유방암 RNA; p: 유방암 RNA.

도 6은 분열전(pre-crisis) 세포 및 분열후(post-crisis) 세포주에서 hT1 발현을 보여주는 결과를 나타낸다. 위쪽 패널: 고유 EST내 프라이머를 이용한 중첩(nested) 증폭, 아래쪽 패널: β -액틴 프라이머를 이용한 대조군 RT-PCR. a: BET-3K 계대(passage)(p) 7 (분열전); b: BET-3K p32 (분열후); c: BFT-3K p14 (분열전); d: BFT-3K p22 (분열후); e: BFT-3B p15 (분열전); f: BFT-3B p29 (분열후); g: GM897 (ALT); h: IIICF/c (ALT); i: IIICF-T/B1 (ALT); j: 주형 부재 대조군.

도 7A 내지 7C는 hT1 전사체의 선택적(alternative) 스플라이싱 패턴을 보여준다. A, 여섯 개의 스플라이싱 변이체의 도식. B, 몇 가지 확인된 RNA 변이체의 혼합물. C, RNA 변이체의 추정 엑손/인트론 접합부 서열. 변이체는 도 A 부분에서와 같이 표시되어 있다. 변이체 3의 전체 DNA 서열(단백질 해독과 함께)(서열)이 나타나 있다. 잠정적 c-Ab1/SH3 결합 부위에 해당하는 아미노산은 밑줄을 그었다. 추정 엑손/인트론 접합부는 |로 표시되고 서열 좌표는 도 1에서와 같다. 스플라이싱된 추정 엑손은 소문자로 표시하고 스플라이싱되지 않은 추정 인트론은 굵게 표시하였다.

도 8은 상이한 종양 샘플에서 hT1 전사체의 다양한 스플라이싱 패턴을 보여준다. 중첩 증폭(14 사이클)을 HT1875F와 HT2781R 프라이머로 발생된 1차 RT-PCR 생성물에서 HT2026F와 HT2482R 프라이머를 이용해 수행한다. a: 폐암; b: 림프종; c: 폐암; d: 수아세포종; e: 림프종; f: 림프종; g: T47D; h: 호르몬성세포종; i: 림프종; j: 신경교종; k: 림프종; l: 주형 부재 대조군.

도 9는 LIM 1215 cDNA로부터 합성된 cDNA에서 증폭의 결과를 보여준다. 보이는 바와 같이, 역전사효소 모티프 A가 α 서열을 함유하는 스플라이싱 변이체로부터 결실되어 있다. 프라이머 혼합물: HTM2028F + HT2356R; b, HT2026F + HT2482R; c, HTM2028F + HT2482R; d. HT2026F + HT2482R가 있다.

도 10A 및 10B는 텔로머라제 변이체 영역의 DNA 서열을 나타낸다.

도 11A 내지 11AN은 예시적인 변이체 텔로머라제 단백질의 DNA와 아미노산 서열을 나타낸다.

도 12는 텔로머라제 활성 분석의 스캐닝된 이미지다.

도 13A 내지 13D는 pAK128.4 플라스미드의 도식 및 이 플라스미드 DNA 서열을 나타낸다.

도 14A 내지 14D는 pAK128.7 플라스미드의 도식 및 이 플라스미드 DNA 서열을 나타낸다.

도 15A 내지 15D는 pAK128.14 플라스미드의 도식 및 이 플라스미드 DNA 서열을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명을 설명하기에 앞서, 본원에서 사용되는 용어를 정의하는 것이 이해를 도울 것이다.

"야생형 텔로머라제"는 일반적으로 염색체의 말단에 단순 반복 서열[예, CCCTAA, 참조 Zakian, Science 270: 1601, 1995]을 포함하는 핵산 서열을 효소적으로 합성하는 폴리펩타이드를 의미한다. 사람에서 나온 대표적인 야생형 텔로머라제의 아미노산 서열은 추론되었으며, 도 1(서열 번호...)에 나타내었다. 본 발명의 범주내에서, 본 발명의 텔로머라제는 야생형 단백질을 비롯해 야생형 단백질 서열의 변이체(대립 유전자 포함)를 포함한다. 이런 변이체가 반드시 효소 활성을 보이는 것은 아니다. 간단히 말하면, 이런 변이체는 유전자 재조합에 의해 발생하거나 또는 재조합 방법에 의해 합성된 RNA 스플라이싱 변이체를 포함한 자연발생적 다형성으로 인한 것일 수 있고, 또한 이런 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 결실, 재배열 등에 의해 야생형 단백질과는 상이할 수 있다. 전형적으로는, 합성의 결과로, 아미노산의 치환은 보존된다, 즉, 극성, 비극성, 방향성, 전하를 띤 아미노산등의 그룹내 아미노산 치환이다. 역전사효소 모티프 영역내 야생형 서열

의 상동성 영역에서 변이체는 바람직하게는 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가지며, 특정 양태에서는, 92%, 95%, 또는 97% 이상의 동일성을 가진다. 역전사효소 모티프 영역 외에서, 변이체는 바람직하게는 75%의 아미노산 동일성을 가지고 특정 양태에서는, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% 또는 97% 이상의 동일성을 가진다.

당업자들이 인지하는 바와 같이, 코돈 축퇴성, 뉴클레오타이드 다형성, 아미노산 차이로 인해 텔로머라제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 도면에서 나타난 야생형 서열과는 상이할 수 있다. 다른 양태에서, 변이체는 바람직하게는 통상적인 엄격한 조건에서 야생형 뉴클레오타이드 서열과 하이브리드화되며, 상기 조건은 천연 이중나선의 T_m 보다 대략 25-30°C가 낮다[예를 들면, 65°C에서 1M Na⁺; 5X SSPE, 0.5% SDS, 5X 덴하르트 용액, 65°C에서 또는 동등한 조건; 일반적 참조: Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, 1987; Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing, 1987]. 짧은 올리고뉴클레오타이드 이외의 뉴클레오타이드에 대한 T_m 은, $T_m = 81.5 + 0.41\% (G + C) - \log(Na^+)$ 공식을 이용해 계산할 수 있다. 낮은 엄격도의 하이브리드화는 T_m 보다 대략 40°C가 낮은 조건에서 수행되며, 높은 엄격도의 하이브리드화는 T_m 보다 대략 10°C가 낮은 조건에서 수행된다. 변이체는 바람직하게는 역전사효소 모티프 영역내 야생형 서열에 75% 이상의 뉴클레오타이드 동일성을 가지고, 보다 바람직하게는 80%, 85% 이상, 및 가장 바람직하게는 90% 이상의 뉴클레오타이드 동일성을 가진다.

본원에서 사용되는 바와 같이, "프로모터"는 연결된 유전자의 전사를 지시하는 요소를 함유하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 최소한, 프로모터는 RNA 폴리머라제 결합 부위를 함유한다. 보다 전형적으로는, 진핵생물에서 프로모터 서열은 유전자 발현의 속도와 시기를 조절하는 다른 전사 인자를 위한 결합 부위를 함유한다. 이런 부위에는 TATA 박스, CAAT 박스, POU 박스, AP1 결합 부위 등이 있다. 프로모터 영역은 또한 인핸서 요소를 함유한다. 프로모터가 유전자에 연결되어 유전자를 전사시킬 수 있을 때, 이것을 "작동가능하게 연결된" 것이라고 한다.

"분리된 핵산 분자"는, 적어도 이전에 실질적으로 순수한 형태로 공급원 세포(이것이 정상적으로 존재하고 있는 염색체를 포함)로부터 분리된 보다 큰 핵산 작제물의 개별 단편의 형태나 구성성분으로서의 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 핵산 분자는 DNA, RNA, 뉴클레오타이드 유사체, 또는 이의 혼합물을 포함하는 다양한 뉴클레오타이드로 이루어질 수 있다.

I. 텔로머라제, 텔로머라제 유전자 및 유전자 생성물

전술된 바와 같이, 본 발명은 척추동물 텔로머라제 유전자 및 유전자 생성물과 관련된 조성물, 그리고 유전자 및 유전자 생성물의 이용 방법을 제공한다. 본원에 나타난 기술 내용에서, 텔로머라제 유전자는 텔로머라제를 발현하는, 불멸화된 또는 형질전환된 세포를 포함한 다양한 세포 유형으로부터 분리될 수 있다. 본원에서 예증되는바와 같이, 사람 세포에서 얻은 텔로머라제를 암호화하는 cDNA와 변이체를 확인하고, 분리하고 특성화한다. 이후, 텔로머라제 단백질은 텔로머라제를 암호화하는 발현벡터로 형질감염된 숙주세포에 의해 용이하게 생산된다.

A. 텔로머라제 유전자의 분리

본원에서 기술된 바와 같이, 본 발명은 텔로머라제를 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 한가지 양태에서, 사람 텔로머라제를 암호화하는 유전자는 EST 서열에서 디자인된 프라이머 쌍을 이용한 cDNA 라이브러리 증폭으로 확인될 수 있다. EST 서열(GenBank 승인 번호 AA281296)은 유플로테스 에어디쿨라투스 텔로머라제 유전자[GenBank 승인 번호 U95964; Lingner et al., *Science* 276: 561, 1997]에 대한 서열 동일성과 유사성에 의해 확인된다. 유플로테스 텔로머라제 유전자와 EST 사이의 서열을 비교하면, 대략 38% 아미노산 동일성과 59% 아미노산 유사성이 있는 것으로 밝혀졌다.

텔로머라제 유전자는 게놈 DNA 또는 cDNA로부터 분리될 수 있다. 프로모터 영역이나 다른 인접 영역이 요구되는 경우에는 게놈 DNA가 바람직하다. YAC(효모 인공 염색체)와 같은 염색체 벡터, λ EMBL3 및 λ gt10와 같은 박테리오파아지 벡터, 코스미드 또는 플라스미드에서 작제된 게놈 DNA 라이브러리, 및 박테리오파아지 벡터(예, λ ZAPII), 플라스미드 또는 기타 벡터에서 작제된 게놈 cDNA 라이브러리가 스크리닝하는데 적합하다. 이런 라이브러리는 당해 분야에 공지된 방법과 기술[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989 참조]을 이용해 작제하거나 또는 상업적 공급원(예를 들면, Clontech, Palo Alto, CA)으로부터 구입할 수 있다. DNA는 사람 세포, 마우스 세포, 다른 설치류나 영장류 세포, 조류 세포 등과 같은 척추동물 세포로부터 분리될 수 있다.

한가지 양태에서, 텔로머라제 유전자는 주형으로 cDNA 라이브러리를 사용한 증폭으로 분리된다. 공지된 EST 서열을 이용해, 사람 텔로머라제를 분리할 수 있다. 간단히 말하면, EST 뉴클레오타이드 서열에 기초하여, 증폭 프라이머 세트가 디자인된다. 이런 프라이머의 예를 표 2에 나타낸다(실시예 1 참조). 높은 텔로머라제 활성을 지닌 세포로부터 제조된 cDNA

라이브러리를 증폭시키는 것이 바람직하다. 본원에서 기술된 프라이머는 LIM1215 cDNA 라이브러리로부터 얻은 EST 서열에서 예상되는 길이를 가진 단편을 증폭시킨다. LIM1215는 사람 결장암 세포주이다. DNA 서열 분석을 통해 단편의 특성을 확인한다.

추가 서열을 함유하는 DNA 단편은, 하나의 EST 프라이머와 함께, 벡터 서열과 하이브리드화되는 프라이머를 이용하는 반응에서 증폭된다. EST 프라이머와 함께, 클로닝 부위 양 측면의 벡터 프라이머를 이용해, hTEL(사람 텔로머라제)의 3' 영역에서 유래된 1.6 kb 단편 및 5' 영역에서 유래된 0.7 kb 단편을 분리한다. 이들 단편은, EST 서열에 내재한 한 쌍의 프라이머로 증폭함으로써 텔로머라제 암호화 서열을 함유하는 것으로 확인된다. 이들 두 단편을 pBluescript 내로 클로닝시켜 DNA 서열을 분석한다. 추가 DNA 서열은 cDNA의 5'말단을 얻기 위한 C-RACE 및 증폭 과정에 의해 수득될 뿐만 아니라 cDNA 라이브러리로부터 클론의 하이브리드화 및 분리에 의해 수득된다.

참조 사람 텔로머라제의 종합된 DNA 서열과 예상 아미노산 서열이 도 1에 제시되어 있다. 나타낸 바와 같이, 참조 텔로머라제의 암호화 영역은 3396개 염기 길이이고 대략 620개 염기 길이의 3' 비-해독 영역을 갖는다. 예상 아미노산 서열은 1132개 아미노산 길이이고, 네 개의 주요 도메인: N-말단, 기본, 역전사효소(RT), C-말단으로 나타낸다. 또한, 사람 텔로머라제는 다른 텔로머라제(예를 들면, 유플로테스 및 에스. 폼베 기원) 및 역전사효소와 상동성 영역을 함유한다. 이들 모티프는 본원과 문헌 [Kalian et al., Human Molecular Genetics, 12: 2011-2019, 1997]에서는 1, 2, A, B, C 및 D 도메인으로, 문헌[Nakamura et al., Science, 277: 955-959]에서는 1, 2, A, B', C, D 및 E 도메인으로, 및 문헌[Meyerson et al(Cell, 90: 785-795, 1997)]에서는 모티프 1 내지 6으로 확인되었다. 이름에 상관없이, 이들 모티프는 621 내지 626 번 (모티프 1) 및 631 내지 634번 (모티프 2), 708 내지 720번 (모티프 A), 827 내지 839번 (모티프 B), 863 내지 871번 (모티프 C), 및 895 내지 902번 (모티프 D) 아미노산을 포함한다. 이들 모티프의 경계가 다른 텔로머라제와 유사성 및 동일성에 기초하기 때문에, 각 모티프의 기능적 경계는 상이할 수 있다.

또한, 참조 텔로머라제 서열의 변이체는 본원에서 설명된 증폭에 의해 수득된다. 이들의 DNA와 예상 아미노산 서열이 도 11에 제시되어 있고 아래에서 상세히 논의할 것이다. 간단히 말하면, 이들 변이체의 일부는 말단 절단된(truncated) 단백질을 암호화하고 다른 것은 상이한 C-말단 서열을 갖는다. 이들 변이체는 아마도 선택적 RNA 스플라이싱으로 인해 기인하는 것으로 보이는데, 그 이유는 텔로머라제가 사람에서 단일 복사체 유전자인 것으로 보이기 때문이다(실시예 2 참조).

또는, 다른 방법이 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자를 수득하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자는 텔로머라제에 반응하는 항체(들)로 스크리닝하여 발현 라이브러리로부터 수득할 수 있다[Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1987; Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, NY, 1995]. 또 다른 양태에서, 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자는 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 하이브리드화 스크리닝에 의해 분리될 수 있다. 하이브리드화 스크리닝을 위한 올리고뉴클레오타이드는 본원에서 나타낸 사람의 텔로머라제의 DNA 서열에 기초하여 디자인된 것이다. 스크리닝을 위한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 11개 이상의 염기 길이이고, 보다 일반적으로는 20 또는 25개 이상의 염기 길이를 갖는다. 한가지 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 20 내지 30개 염기 길이이다. 이런 올리고뉴클레오타이드는 자동화된 방식으로 합성될 수 있다. 검출을 용이하게 하기 위하여, 올리고뉴클레오타이드를 일반적으로 5' 말단에 방사성 핵종(예, ^{32}P), 효소 표지, 단백질 표지, 형광 표지, 바이오틴과 같은 리포터 분자로 편리하게 표지할 수 있다. 라이브러리는 일반적으로 벡터에 따라 콜로니나 파아지로 플레이팅되며 재조합 DNA는 나일론이나 니트로셀룰로스 막에 전이된다. 하이브리드화 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 함량에 따라 조절된다. DNA의 변성, 중화, 막에의 고정 후, 막을 표지된 프로브와 하이브리드화한다. 적절한 하이브리드화 조건은 문헌 [Sambrook et al., 상기, Ausubel et al., 상기]에서 찾을 수 있고, 추가로 하이브리드화 용액은 하이브리드화 특이성을 높이기 위해 테트라메틸암모늄 클로라이드 또는 다른 카오토로픽(chaotropic) 시약 또는 히보트로픽(hybrotropic) 시약과 같은 부가제를 포함할 수 있다[예를 들면, 참조: PCT/US97/17413]. 하이브리드화 이후, 적절한 검출 방법을 통해 하이브리드화하는 콜로니와 파아지를 확인하고, 분리하여 증식시킨다. 후보 클론이나 증폭된 단편은 다양한 방법을 통해 텔로머라제 DNA가 포함되어있는지를 확인할 수 있다. 예를 들면, 후보 클론은 제2의 비-중복 프로브와 하이브리드화되거나 DNA 서열 분석될 수 있다. 이런 방식으로, 본 발명에서 사용하기 적절한 텔로머라제 유전자 또는 유전자 단편을 함유한 클론이 분리된다.

텔로머라제 DNA는 또한 cDNA나 게놈 DNA의 증폭을 통해 얻어진다. 전장 cDNA의 증폭을 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 바람직하게는 암호화 영역의 5'와 3' 말단 서열로부터 유도된다. 게놈 서열의 증폭에는 인트론 서열을 포함한 프라이머를 사용하고, 긴 증폭 생성물(Promega catalogue 참조)을 주로 생산하는 조건을 이용할 수 있다. 간단히 말하면, 증폭 프라이머로 사용되는 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 (프라이머-이량체 형성을 방지하기 위하여) 자기-상보성 서열 및 이의 3' 말단의 상보성 서열 그 어느 것도 갖지 않는다. 바람직하게는, 프라이머는 대략 50%의 GC 함량을 함유

하고 클로닝을 촉진하기 위한 제한 부위를 갖는다. 일반적으로, 프라이머는 15 내지 50개 뉴클레오타이드 길이이고, 보다 일반적으로는 20 내지 35개 뉴클레오타이드 길이이다. 프라이머가 cDNA 또는 게놈 DNA에 어닐링되어 충분한 증폭 사이클이 수행되면 검출가능한 생성물이 수득되는데, 이들은 바람직하게는 겔 전기영동 및 염색에 의해 용이하게 가시화되는 것이다. 증폭된 단편을 정제하여 벡터(예를 들면, λ gt10 또는 pBS(M13+))와 같은 바이러스성, 파아지성, 또는 플라스미스성 벡터)로 삽입시켜 증식시킨다.

다양한 종의 텔로머라제 유전자가 본원에 나타난 조성물을 이용하여 분리될 수 있다. 밀접히 관련된 종에 대해서, 사람 서열이나 이의 일부가 게놈이나 cDNA라이브러리에 대한 프로브로 사용될 수 있다. 예를 들면, 촉매 부위(도 1의 605 내지 915번 아미노산에 대략 해당함)를 포함하는 텔로머라제 유전자의 단편이 표지되어, 마우스, 영장류, 랫트, 개, 또는 다른 척추동물, 온혈동물이나 포유류 동물로부터 작제된 라이브러리에 대한 프로브로 사용될 수 있다. 통상적 엄격도의 초기 하이브리드화를 통해 텔로머라제를 암호화하는 클론이나 단편이 생산될 수 있다. 하이브리드화가 발견되지 않으면, 완화된(낮은) 엄격한 조건하에 하이브리드화를 시킨다. 하이브리드화의 엄격도를 변화시키기 위한 가이드라인은 문헌 [Sambrook et al., 상기] 또는 다른 공지된 공급원으로부터 얻을 수 있다. 이런 프로브는 초파리(*Drosophila*)와 같은 다양하게 진화된 종에서 얻은 라이브러리에도 사용될 수 있는데, 이때는 하이브리드화 조건이 전형적으로 보다 완화된다.

사람이 아닌 종의 텔로머라제 유전자를 분리하는데는 다른 방법이 사용될 수 있다. 이들 방법에는 보존된 영역(예를 들면, 역전사효소 모티프)에서 유도된 프라이머를 이용한 증폭, 역전사효소 영역을 비롯한 텔로머라제의 다양한 영역에서 얻은 축퇴성 프라이머를 이용한 증폭, 발현 라이브러리의 항체 프로빙, 발현 라이브러리의 텔로머라제 RNA 프로빙 등이 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 유전자 서열은 아미노산 유사성 및/또는 핵산 동일성 등으로 텔로머라제로 확인된다. 일반적으로, 보존성 차이를 허용하는 아미노산 유사성이, 텔로머라제를 확인하는 데에 바람직하다. 다양한 종으로부터, 아미노산 유사성은 일반적으로 30% 이상이고, 40% 또는 50% 이상이 바람직하다. 핵산 동일성은 더 낮아져 평가하기가 힘들 수도 있다. BLASTN 또는 BLASTP와 같은 몇몇 용이하게 이용가능한 컴퓨터 분석 프로그램이, 유전자와 유전자 생성물의 관계를 결정하는데 유용하다. 본원에 기술된 기능 분석법 또는 다른 동등한 분석법 중 하나에 의해 후보 텔로머라제 유전자의 효소 활성을 분석한다.

B. 변이체 텔로머라제 유전자

본원에 나타난 텔로머라제 핵산 또는 아미노산 서열의 변이체(대립 유전자 포함)는 천연 변이체(예, 다형성, 스플라이싱 변이체, 돌연변이체)로부터 분리되고, 합성되거나 작제될 수 있다. 의도한 용도에 따라, 돌연변이체는 변형되거나 결핍된 텔로머라제 기능을 나타내도록 작제될 수 있다. 특히 유용한 텔로머라제 유전자는 효소 활성이 결핍된 단백질을 암호화하지만, 우성 네가티브 표현형을 가진다. 또한 텔로머라제 변이체는 역전사효소 활성, 핵분해 활성, 말단소립 결합 활성, dNTP 결합 활성, 텔로머라제 RNA(hTR) 결합 활성을 비롯한 공지된 텔로머라제 활성중 하나 이상을 상실할 수 있다.

당업자가 인식하는 바와 같이, 돌연변이를 발생시키기 위하여, 많은 방법이 개발되었다[Sambrook et al., 상기; Ausubel et al., 상기]. 간단히 말하면, 몇 개의 뉴클레오타이드 치환을 야기시키는데 바람직한 방법에는 돌연변이될 염기(들)를 포함하고 돌연변이된 염기(들)를 함유하는 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 이 올리고뉴클레오타이드가 상보성 일본쇄 핵산과 하이브리드화되고 제2쇄 합성이 이 올리고뉴클레오타이드에서 시발된다. 유사하게, 결실체 및/또는 삽입체는 공지된 방법중 임의의 방법에 의해 작제될 수 있다. 예를 들면, 유전자는 삽입이나 대규모의 치환이 일어나도록 하기 위하여 점착성 말단을 갖는 분리된 단편과 일부 서열을 연결하거나 결실시키는 방식으로 연결시키거나 제한 효소에 의해 절단시킬 수 있다. 또 다른 양태에서, 변이체는 "엑손 셔플링(exon shuffling)" [미국 특허 제5,605,793호]에 의해 제조된다. 변이체 서열이 또한 "분자 진화(molecular evolution)" 기술[미국 특허 제5,723,323호]에 의해 제조된다. 변이체 서열을 제조하는 다른 방법이 문헌[Sambrook et al. (상기) 및 Ausubel et al. (상기)]에서도 발견된다. 변이체 서열의 확인은 전형적으로 제한 효소 맵핑(mapping), 서열 분석, 프로브 하이브리드화 방법에 의해 성취되는데, 다른 방법도 사용될 수 있다. 일본쇄 핵산이 숙주세포, 특히, 대장균(이. 콜라이)내로 형질전환되어 들어가는데, 숙주세포에는 다른 원핵생물, 효모 또는 더 큰 진핵생물이 사용될 수 있다. 핵산 하이브리드화, 증폭, DNA 서열 분석과 같은 표준 스크리닝 프로토콜을 통해 돌연변이체 서열을 확인한다.

바람직한 양태에서, 변이체 텔로머라제는 효소활성의 면에서 불활성이고 숙주세포에게 우성 네가티브 표현형을 부여한다. 실제 메카니즘과는 상관없이, 우성 네가티브 텔로머라제가 세포에서 발현될 때, 고유 활성 텔로머라제는 불활성화된다. 촉매 도메인에서, 역전사효소 모티프는 보존된 아스파르트산 잔기를 공유한다. 사람 텔로머라제는 또한 중요한 잔기: Asp 712, Asp 718, Asp 868 및 Asp 869를 함유한다. 이들 Asp 잔기 중 하나 이상이 비-보존성 아미노산(예, 알라닌)으로 돌연변이되면 아마도 효소 활성이 파괴되거나 말단소립 단축이 영향받을 것이다. 이들 각각의 돌연변이에 대해, 우성 네가티브 특성을 조사한다. 바람직한 돌연변이체는 우성 네가티브이고 특정 양태에서 노화 표현형을 유도한다. 다른 우성 네가티브

브 변이체는 하나 이상의 역전사효소 모티프의 결실에 의해 또는 DNA 프라이밍(priming)(예: 모티프 E의 경우), RNA 구성 성분을 위한 결합 부위, 주형 결합 부위, 금속이온 결합 부위(예: 모티프 C의 경우)등과 관련있는 영역의 변형에 의해 만들어 질 수 있다.

다른 양태에서, 텔로머라제를 암호화하는 핵산 분자가 또 다른 핵산 분자에 융합될 수 있다. 인지하는 바와 같이, 융합 파트너 유전자는 특정 양태에서 암호화 영역을 제공할 수 있다. 따라서, 텔로머라제의 촉매 부위(예를 들면, 609 내지 915번 아미노산), 개별 역전사효소 모티프(위에서 설명함), 본원에서 기술된 임의의 스플라이싱 변이체 텔로머라제, 텔로머라제 RNA 결합 부위 등만을 사용하는 것이 바람직하다. 융합 파트너의 결정은 원하는 용도에 따라 어느 정도 좌우된다. 융합 파트너는 텔로머라제의 특이성을 변경하거나, 리포터 기능을 제공하거나, 확인이나 정제 프로토콜을 위한 태그 서열을 제공하는 등에 사용될 수 있다. 리포터나 태그는 텔로머라제 기능을 방해하지 않으면서 간편하고 감응성있는 측정을 가능하게 하거나 유전자 생성물의 분리를 촉진할 수 있는 임의의 단백질이다. 리포터 기능을 위해, β -글루쿠로니다제[미국 특허 제 5,268,463호], 녹색 형광 단백질 및 β -갈락토시다제가 DNA 서열로서 용이하게 이용가능하다. 펩타이드 태그는 일반적으로 천연 단백질에서 유래된 짧은 서열로 항체나 다른 분자에 의해 인식된다. 펩타이드 태그에는 FLAG[®], Glu-Glu 태그(Chiron Corp., Emeryville, CA), KT3 태그(Chiron Corp.), T7 유전자 10태그(Invitrogen, La Jolla, CA), T7 메이저 캡시드 단백질 태그(Novagen, Madison, WI), His₆ (hexa-His) 및 HSV 태그(Novagen)등이 있다. 태그외에도, 글루타민산-S-트랜스퍼라제와 같은 다른 형태의 단백질이나 펩타이드가 사용될 수 있다.

C. 텔로머라제 유전자에서 유도된 단편과 올리고뉴클레오타이드

또한, 본 발명에 이용하기 위해, 텔로머라제 유전자의 일부나 단편을 분리하거나 작제한다. 예를 들면, 제한 단편은 주형 DNA(예를 들면, 플라스미드 DNA)로부터 공지된 기술에 의해 분리될 수 있고, 제한 단편을 포함한 DNA 단편을 증폭시켜 만들 수 있다. 또한, 재조합 DNA 분자로부터 올리고뉴클레오타이드를 합성하거나 분리할 수 있다. 당업자가 인식하는 바와 같이, 텔로머라제 서열의 적어도 일부를 가진 DNA나 RNA 분자를 수득하기 위해 다른 방법을 이용할 수 있다. 또한, 특별한 용도를 위해, 이들 핵산에 당 분야에 공지된 기술에 의해 방사성 표지(예, ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³H, ¹⁴C), 형광 표지(예, FITC, Cy5, RITC, Texas Red), 화학발광 표지, 효소, 바이오틴 등을 표지시킬 수 있다.

단편을 수득하는 방법은 당 분야에 공지되어 있다. 특히 본 발명에서 유용한 부분으로는 촉매 부위, 개별 역전사효소 모티프, 추정 인트론 서열(도 10 참조)등이다. 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 자동화된 방식에 의해 합성된다; 합성 장치 및 방법을 용이하게 이용할 수 있다(예를 들면, Applied Biosystems Inc, CA). 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체, 변형된 주쇄(backbone)(예를 들면, 펩타이드 주쇄), 뉴클레오타이드 유도체(예를 들면, 바이오틴화된 뉴클레오타이드)등과 같은 천연의 것이 아닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드는 약 7개 이상 내지 약 100개 이하의 길이의 뉴클레오타이드를 가진 핵산 서열을 의미한다. 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 약 10 내지 약 50개 염기 길이이고, 약 18 내지 약 35개 뉴클레오타이드 길이일 때가 더 많다. 올리고뉴클레오타이드는 일본쇄이거나 이본쇄일 경우도 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 핵산의 일부분은 전체 모 핵산 서열보다 적은 서열을 함유한 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 예를 들면, 텔로머라제 암호화 서열의 일부분은 전장 텔로머라제 서열보다 적은 서열을 함유한다. "일부분"은 일반적으로 약 7개 이상의 뉴클레오타이드이고 10, 20, 25개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 길이일 수도 있다. 단편은 임의 길이의 폴리뉴클레오타이드 분자를 의미하며, 올리고뉴클레오타이드를 포괄하는데, 보다 일반적으로는 이에 한정되지 않고, 용어 올리고뉴클레오타이드는 짧은 폴리뉴클레오타이드를 나타내는데 사용되고 용어 단편은 보다 긴 폴리뉴클레오타이드를 나타내기 위하여 사용된다.

증폭에 이용하는 프라이머와 하이브리드화 스크리닝을 위한 프로브로 사용하기 위한 올리고뉴클레오타이드는 본원에 나타낸 사람 텔로머라제의 DNA 서열에 기초하여 디자인된다. 전장 cDNA를 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 바람직하게는 5'와 3' 말단 서열에서 유도된다. 용이하게 검출할 수 있는 크기의 생성물을 만들기 위해 특정 영역을 증폭시키기 위한 프라이머를 선택한다. 바람직한 양태에서, 선택적 RNA 스플라이싱이 이루어지는 서열에 플랭킹하는 프라이머가 선택된다. 바람직한 양태에서, 스플라이싱-인(spliced-in)된 서열을 포함하는 생성물과 스플라이싱-아웃(spliced-out)된 서열을 포함한 생성물 모두가 동일한 반응 조건하에서 검출될 수 있는 적정 크기가 되도록 특정 프라이머 세트를 선택한다. 다른 양태에서, 두 세트의 프라이머가 선택적으로 스플라이싱된 RNA를 검출하기 위하여 사용된다. 예를 들면, 한 세트의 프라이머가 스플라이싱-아웃된 생성물을 검출하기 위하여 스플라이싱 접합부에 플랭킹한다. 두 번째 세트의 프라이머는 접합부에 매우 인접하여 유도되거나(스플라이싱-아웃된 증폭 생성물이 프라이머-이량체 길이와 동일하거나 거의 유사하도록 하기 위함) 또는 하나 이상의 세트를 스플라이싱-인된 서열에서 유도할 수 있다(스플라이싱-아웃된 RNA가 어떤 생성물도 생산하지 못하도록 하기 위함).

증폭 프라이머는 자가-상보성 서열 또는 3'말단에서 상보성 서열을 모두 갖지 않는 것이 바람직하다(프라이머-이량체 형성을 예방하기 위함). 바람직하게는, 프라이머는 대략 50%의 GC 함량을 가지고, 클로닝을 촉진하는 제한 부위를 함유한다. 증폭 프라이머는 일반적으로 15개 이상 내지 50개 이하의 염기 길이를 가지지만, 특정 상황과 조건하에서는 더 짧거나 또는 더 긴 길이가 사용될 수 있다. 보다 일반적으로는, 프라이머가 17 내지 40개, 17 내지 35개 또는 20 내지 30개 염기 길이를 가진다. 프라이머는 cDNA나 게놈 DNA에 어닐링되어, 충분한 증폭 사이클, 일반적으로는 20 내지 40회의 사이클이 수행되어 겔 전기영동 및 염색에 의해 또는 하이브리드화에 의해 용이하게 가시화되는 생성물이 수득된다. 증폭된 단편을 정제하여, λ gt10 또는 pBS (M13+)와 같은 벡터로 삽입시켜, 증식시킨 후에 분리하여 DNA 서열 분석과 하이브리드화를 수행한다.

게놈, cDNA 또는 다른 형태(예를 들면, 돌연변이 텔로머라제 서열)의 라이브러리를 스크리닝하는데 적합하고 서던, 노던, 노스웨스턴 블롯, 증폭 생성물 프로빙하는 올리고뉴클레오타이드 하이브리드화 프로브를 본원에 나타낸 서열에 기초하여 디자인된다. 하이브리드화를 위한 올리고뉴클레오타이드는 전형적으로 11개 이상의 염기, 일반적으로 100개 이하의 염기 길이이며, 바람직하게는 15개 염기 이상, 20개 염기 이상, 25개 염기 이상의 길이가 바람직하고, 20 내지 70개, 25 내지 50개, 30 내지 40개 염기 길이가 바람직하다. 용이한 검출을 위하여, 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 5'말단에서 방사성 핵종(예., ^{32} P), 효소표지, 단백질표지, 형광 표지 또는 바이오틴과 같은 리포터 분자로 간편하게 표지된다[참조: Ausubel et al., and Sambrook et al., 상기]. 라이브러리는 일반적으로 벡터에 따라 콜로니 또는 파아지로 플레이팅되고 재조합 DNA는 나일론이나 니트로셀룰로스 막에 전이된다. DNA의 변성, 중화, 막에의 고정 후, 막을 표지된 프로브와 하이브리드화시키고 세척한다. 적절한 검출 방법을 통해 하이브리드화된 콜로니와 파아지를 밝혀내고 분리 및 증식시킨다. 핵산을 막에 전이시키고 하이브리드화를 수행하는 방법은 공지되어 있다. 특정 양태에서, 카오토로프(예., 테트라메틸 암모늄 클로라이드) 또는 히보트로프[예, 암모늄 트리클로로아세테이트; 참조: PCT/US97/17413]와 같은 부가제가 하이브리드화 감응성 및 특이성을 증가시키기 위하여 하이브리드화 용액에 추가된다. 하이브리드화 조건과 동등한 조건(본원에서 T_m 보다 낮은 온도값으로 표현됨)하에서 세척한 후 검출가능한 어닐링된 상태로 계속 존재한다면, 프로브는 핵산과 특이적으로 하이브리드화된다.

D. 사람의 텔로머라제의 스플라이싱 변이체

도 1에 나타낸 참조 기준 텔로머라제 DNA와 단백질 서열에 부가하여, 몇 가지 RNA 스플라이싱 변이체가 관찰된다. 비록 이들 변이체 중 일부는 불완전하게 프로세싱된 mRNA를 반영하지만 폴리아데닐화된 mRNA를 예비-선택한 RNA 샘플(LIM1215)에 이런 변이체가 풍부하다는 점은 주목할 만하다. RT 도메인내 이러한 집단화와 함께 이러한 발견은 삽입 변이체가 hT1 단백질의 발현 조절을 보다 반영한다는 것을 암시한다. 예를 들면, 엑손이 결실된 변이체(α , β , 도 7)는 변이체 단백질을 암호화하는 또 다른 성숙체일 가능성이 높다. 또 다른 단백질을 뒷받침하는 부가적인 증거는, 참조 서열과 비교하여 결실과 삽입을 동시에 함유한 LIM1215 cDNA 라이브러리에서 확인된 cDNA 클론의 서열분석으로 부터 얻어진다.

적어도 일곱 개의 상이한 추정 인트론이 mRNA에 보유되어 있는 것으로 보인다(참조 도 7, 7개의 인트론 중 6개가 보임). 인트론은 독립적으로 보유될 수 있으며, 따라서, 특정 mRNA는 0개, 임의의 한 개, 두 개 등 최대 7개의 인트론을 가질 수 있다. 일곱 개의 독립적으로 스플라이싱된 인트론으로부터 생성되는 상이한 mRNA의 최대 갯수는 2^7 또는 128개의 상이한 mRNA들이다. 이들 인트론의 DNA 서열은 도 10에 나타나 있다. "X" 서열로 불리는 가장 5' 인트론(5' most intron)의 길이는 아직 밝혀지지 않았고, 부분 서열만을 나타내었다.

참조 텔로머라제 서열(도 1)에는 인트론 α 와 β 가 있다. 다음의 논의에서, 각 인트론의 유무 및 위치의 효과는 한가지 변형에만 기초하여 나타나 있다. 특정 인트론은 다른 인트론이 스플라이싱-인 또는 아웃되는지와 상관없이 해독된 생성물의 서열을 변화시킬 수 있다. 예를 들면, 인트론 1이 존재하면 α , β , 2 또는 3 인트론이 스플라이싱-인 또는 아웃되는지와 상관없이, 프레임 이동이 일어나 말단 절단된 단백질이 생성된다.

인트론 "X"가 존재하면, 대략 600개 N-말단 아미노산을 함유하고 역전사효소 모티프가 상실된 말단 절단된 단백질이 생성된다. 222번 염기에서 인트론 "Y"가 존재하면, 인트론 뒤 세 개의 코돈내에서 종결되는 프레임 이동된 단백질이 생성된다. 인트론 Y는 GC가 매우 풍부, 대략 78% 이기 때문에(이로 인해 서열 분석이 곤란하다), 인트론 Y는 대략 35개의 아미노산 삽입을 야기하지만 프레임 이동이 야기되지 못할 수도 있다.

1950번 뉴클레오타이드에서 인트론 1은 38bp로써, mRNA내의 이의 존재는 프레임 이동을 야기해, 궁극적으로 말단 절단된 단백질이 해독된다(nt 1973번에서 종결 코돈). 이 말단 절단된 단백질은 역전사효소 도메인 1과 2만을 함유한다.

2131 내지 2166번 염기에 위치한 인트론 α 는, 텔로머라제 mRNA에서 스플라이싱-아웃된 상태로 종종 관찰된다. 이런 RNA로부터 해독된 단백질은 12개의 아미노산이 결실되어, 역전사효소 모티프 A가 제거된다. 이 모티프는 RT 기능에 필수적인 것으로 보이며; 효모 EST2 단백질내 이 도메인에서 하나의 아미노산이라도 돌연변이되면, 우성 네가티브로서 역할을 하는 단백질이 생산되어 세포 노화와 말단소립 단축이 야기된다.

또 다른 변이체 서열로서, 2286 내지 2468번 염기에서의 β -엑손 결실에 의해 2287번 염기에서 판독 프레임 이동이 일어나고 이로 인해, 2469번 염기에 연결되고, 2605번 염기에서 종결된 절단된 단백질이 암호화된다. 이 변이체 단백질은 역전사효소 도메인 1, 2, A, B 및 C의 일부를 함유하지만 또 다른 모티프는 없으며; 역전사효소 도메인 모티프에 부가하여, hT1의 β 삽입체에서 확인되는 또 다른 서열 모티프(AVRIRGKS)가 P-루프(loop) 모티프 컨센서스 AXXXXGK(S)에 일치한다[Saraste et al., Trends Biochem. Sci. 15, 430-434, 1990]. 많은 키나제, 세균 dnaA, recA, recF, mutS, ATP-결합 헬리카제를 비롯한 수 많은 단백질에서 이 모티프가 발견된다[Devereaux et al., Nucleic Acids Res., 12, 387-395, 1984]. 따라서, P-루프는 대부분의 RNA 샘플내 h-TEL mRNA의 아집단내에만 존재하며, 몇 가지 종양 샘플에는 완전히 결여되어 있다(도8).

2843번 염기에서 인트론 2는 프레임내(in-frame) 종결 코돈을 함유하는데, 이로 인해 전체 역전사효소 도메인 영역을 갖지만 C-말단이 결실된 말단 절단된 단백질이 생산된다. C-말단이 조절역할을 하기 때문에 단백질 활성이 영향을 받게 될 가능성이 많다. 인트론 3이 계속 유지되면, 이 인트론이 프레임내 종결 코돈을 함유하기 때문에 보다 작아진 단백질이 생산된다. 따라서, 이 단백질은 변형된 C-말단 서열을 갖는다. 이런 단백질이 어떤 활성을 가지는 가는 현재까지 알려지지 않고 있다. HIV-1 역전사효소의 결정 구조에 따르면, RNase 도메인이 결핍된 단백질(p51)의 단축 형이 C-말단의 촉매 틸부분으로의 "연결" 폴딩에 의해 억제된다는 것이 입증되었다. 만약 hT1이 HIV-RT와 유사한 구조를 가진다면, 이때 C-말단 hT1 단백질 변이체는 유사한 조절메카니즘을 반영할 것이다.

참조 C-말단 도메인이 결핍된 변이체를 비롯해, 2157번 염기에서 인트론 3을 가진 변이체는 또 다른 C-말단 도메인을 발현한다. 또한, 인트론 3에 의해 제공되는 암호화 영역은 잠재적인 SH3 결합 부위인 SGQP~~EM~~EP~~RR~~PSGCVG를 함유하는데, 이 부위는 돌연변이된 모세관확장성 운동실조증(ataxia telangiectasia mutated, ATM)과 같은 단백질에서 발견되는 컨센서스 c-Ab1 SH3 결합 펩타이드(PXXXXPXXP)와 일치한다. 이 모티프의 두 번째 예는 hT1단백질의 N-말단내 HAGP~~P~~STSR~~PP~~RPWDTP 펩타이드에서 발견된다. 또 다른 C-말단 도메인이 텔로머라제 cDNA에서 발견되며; EST12462(GenBank 승인 번호 AA299878)는 2157번 염기까지 이르는 대략 50개의 동일 서열을 가지고, 인트론 3 및 참조 텔로머라제 서열과 상이하다. 이 신규한 서열은 50개 염기에 내재된 종결 코돈을 가지는데, 이로 인해 말단 절단된 C-말단이 생성된다.

ALT 세포주에서 검출되는 변이체(도 6, 라인 i)로 인해 hT1의 기본 도메인이 적어도 일부 ALT 세포주에서 ALT 메카니즘에 일조할 수 있는 가능성이 열렸다. 흥미롭게도, 이 ALT 세포주는 hTR 유전자를 발현한다. ALT의 한가지 가능한 메카니즘은, TRAP 분석에서 활성이 없는 비정상-조절된 텔로머라제 성분과 관련이 있다는 것이다.

다음의 표는 스플라이싱 변이체와 이로 인하여 생성된 단백질을 요약하여 보여준다. 간단하게, 각 생성 단백질에 대해 한 가지 변이체만 기재하였다. 또한, 전술한 바와 같이, Y 인트론의 존재로 인해 프레임 이동이 일어나, 말단 절단된 단백질이 생성되지만, 삽입이 일어날 수도 있다. 따라서, Y 인트론의 각 판독 프레임을 제시하였고 삽입으로 인하여 말단 절단된 단백질이 생성되지 않는 것처럼 표를 만들었다. 이들 공지된 인트론을 독립적으로 갖추어 128개의 상이한 mRNA 서열을 만들었다. 표1의 변이체에 대한 DNA와 아미노산 서열은 도 11에 제시되어 있다.

[표 1]

	삽입 서열					
단백질	Y	1	α	β	2	3
말단 절단된 #1	0	+	0	0	0	0
말단 절단된 #2	0	0	+	0	0	0
참조 단백질	0	0	+	+	0	0
말단 절단된 #3	0	0	+	+	+	0
변형된 C-말단	0	0	+	+	0	+
모티프 A 결핍	0	0	0	+	0	0
말단 절단된 #3; 모티프 A 결핍	0	0	0	+	+	0

모티프 A 결핍; 변형된 C-말단	0	0	0	+	0	+
말단 절단된 #1(ver 2)	+	+	0	0	0	0
말단 절단된 #2(ver 2)	+	0	+	0	0	0
참조 단백질(ver 2)	+	0	+	+	0	0
말단 절단된 #3(ver 2)	+	0	+	+	+	0
변형된 C-말단(ver 2)	+	0	+	+	0	+
모티프 A 결핍(ver 2)	+	0	0	+	0	0
말단 절단된 #3(ver 2)	+	0	0	+	+	0
모티프 A 결핍; 변형된 C-말단(ver 2)	+	0	0	+	0	+

E. 벡터, 숙주세포 및 단백질을 발현하고 생산하는 수단

텔로머라제 단백질은 다양한 숙주 생물에서 발현될 수 있다. 한가지 양태에서, 텔로머라제는 대장균(이. 콜라이)과 같은 세균에서 생산되는데, 이를 위해 많은 발현벡터가 개발되었고 용이하게 이용가능하다. 다른 적절한 숙주 생물에는 다른 세균 종, 및 효모(예를 들면, 사카로마이세스 세레비지애), 포유류 세포(예를 들면, CHO와 COS-7) 및 곤충세포(예를 들면, Sf9)와 같은 진핵세포 등이 있다.

텔로머라제, 이의 일부, 변이체 및 융합 단백질을 암호화하는 DNA 서열은 숙주에게 적합한 발현벡터를 통하여 도입된다. 특정 양태에서, 텔로머라제는 융합 단백질이 만들어지도록 벡터에 삽입된다. 텔로머라제 서열은 기존의 단편인 cDNA 클론에서 유도되거나 합성된다. 바람직한 합성 방법은 단백질의 암호화 영역이나 목적하는 일부분과 플랭킹하는 프라이머 세트를 이용해 cDNA로부터 유전자를 증폭시키는 것이다. 전술한 바와 같이, 텔로머라제 서열은 다중 코돈을 가지는 각 아미노산에 대해 또 다른 코돈을 함유할 수 있다. 숙주 종에 "최적"인 대안 코돈이 선택된다. 제한 부위는 전형적으로 프라이머 서열내에 도입되며, 벡터의 클로닝 부위를 고려하여 선택된다. 경우에 따라, 해독 개시 코돈 및 종결 코돈이 프라이머 서열에 포함되도록 조작될 수 있다.

최소한, 벡터는 프로모터 서열을 함유해야 한다. 다른 조절 서열이 포함될 수 있다. 이런 서열에는 전사 종결신호 서열, 분비 신호 서열, 복제 오리진, 선별 마커 등이 포함된다. 조절 서열은 서로 다른 것들과 작동가능하게 연결되어 전사나 해독을 가능하게 한다.

텔로머라제 발현을 위해 본원에서 사용되는 플라스미드에는 숙주 세포(예를 들면, 세균)에서 단백질의 발현을 위해 디자인된 프로모터가 포함된다. 적절한 프로모터는 당해 분야에 널리 이용되고 익히 공지되어 있다. 유도성 또는 구성성 프로모터가 바람직하다. 세균에서 발현시키는데 적합한 프로모터에는 T7 파아지; T3, T5 및 SP6과 같은 다른 파아지에서 얻은 프로모터; 및 *trp*, *lpp* 및 *lac* 오페론으로부터 얻은 프로모터가 있다. *tac*과 *trc*과 같은 하이브리드 프로모터[미국 특허 제 4,551,433호]도 사용된다. 진핵세포에서 발현시키는데 적합한 프로모터에는 배콜로바이러스/곤충 세포 발현계의 P10 또는 폴리헤드론 유전자 프로모터[미국 특허 제5,243,041호, 제5,242,687호, 제5,266,317호, 제4,745,051호, 제 5,169,784호], MMTV LTR, CMV IE 프로모터, RSV LTR, SV40, 메탈로티오네인 프로모터(예를 들면, 미국 특허 제 4,870,009호) 및 다른 유도성 프로모터가 있다. 단백질 발현을 위해, 프로모터는 텔로머라제 단백질의 암호화 영역에 작동가능하게 연결된 상태로 삽입된다.

텔로머라제의 전사를 조절하는 프로모터 그 자체는 억제인자에 의해 조절된다. 어떤 시스템에서 프로모터는 세포의 생리학적 상태를 변형함으로써, 예를 들면 경쟁적으로 억제 인자에 결합하는 분자를 부가하거나 성장 배지의 온도를 변경함으로써 억제될 수 있다. 바람직한 억제 인자 단백질에는 IPTG 유도에 반응하는 *이. 콜라이*/lacI 억제인자, 온도 감응성 λ C1857 억제 인자 등을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. *이. 콜라이*/lacI 억제인자가 바람직하다.

다른 바람직한 양태에서, 벡터는 또한 전사 종결인자 서열을 함유하는데, 이것은 선택된 프로모터를 인식하는 폴리머라제에 의해 전사를 종결하는 신호를 제공하는 서열 및/또는 폴리아데닐화를 위한 신호 서열을 갖는다.

바람직하게는, 벡터는 숙주 세포에서 복제를 할 수 있다. 따라서, 숙주 세포가 세균인 경우, 벡터는 바람직하게는 세균 복제 오리진을 함유한다. 세균에 적합한 복제 오리진에는 f1-ori와 col E1 복제 오리진, 특히 pUC 플라스미드에서 유래된 ori를 포함한다. 효모에서, ARS 또는 CEN 서열이 복제를 위해 사용될 수 있다. 포유류 세포에서 자주 사용되는 시스템은 SV40 ori이다.

플라스미드는 또한 바람직하게는 숙주에서 기능하는 하나 이상의 선택가능한 마커를 포함한다. 선별가능 마커 유전자는 숙주세포에 표현형을 전달하는 임의의 유전자를 포함하는데, 이것은 형질전환된 세포를 확인하고 선택적으로 성장시키는 것을 가능하도록 한다. 세균 숙주를 위한 적절한 선별가능 마커 유전자에는 암피실린 내성 유전자(Amp^r), 테트라사이클린 내성 유전자(Tc^r), 카나마이신 내성 유전자(Kan^r)가 있다. 카나마이신 내성 유전자가 현재 적절하다. 진핵생물에 적절한 마커는 숙주에서 보충적 결핍을 요구한다(예를 들면, tk- 숙주에서 티미딘 키나제 (tk)). 하지만, 약물 마커도 이용가능하다(예를 들면, G418 내성 및 하이그로마이신 내성).

텔로머라제를 암호화하는 뉴클레오타이드의 서열은 분비신호를 포함할 수 있는데, 본원에서 생성된 펩타이드는 전구체 단백질로 합성되고, 연속적으로 프로세싱되어 분비된다. 생성된 프로세싱된 단백질은 원형질막 주위공간 또는 발효 배지로부터 회수될 수 있다. 이용하기 적절한 분비 신호는 당해 분야에 공지되어 있다[von Heijne, J. Mol. Biol. 184:99-105, 1985]. 이. 콜라이 (또는 다른 숙주)에서 기능하는 원핵성 또는 진핵성 분비신호가 이용될 수 있다. 현재 적합한 분비신호에는 다음의 *이. 콜라이* 유전자: pelB [Lei et al., J. Bacteriol. 169:4379, 1987], PhoA, ompA, ompT, ompF, ompC, beta-락타마제, 및 알칼린 포스파타제에 의해 암호화되는 것들을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

당업자가 인식하는 바와 같이, 세균 세포에는 발현을 위해 적절한 다양한 벡터가 있고 용이하게 이용가능하다. pET 시리즈(Novagen, Madison, WI), tac 및 trc 시리즈(Pharmacia, Uppsala, Sweden), pTTQ18 (Amersham International plc, England), pACYC 177, pGEX 시리즈와 같은 벡터가 텔로머라제 발현을 위해 적절하다. pBlueBac[미국 특허 제 5,278,050호, 제5,244,805호, 제5,243,041호, 제5,242,687호, 제5,266,317호, 제4,745,051호, 및 제5,169,784호; Initrogen, San Diego에서 구매가능]와 같은 배컬로바이러스가 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) sf9 세포[미국 특허 제4,745,051호]와 같은 곤충세포에서 텔로머라제의 발현을 위해 사용될 수 있다. 텔로머라제 발현에 적합한 숙주는 벡터에 의해 어느정도 결정된다. 적절한 숙주에 맞는 벡터가 시판되고 있다.

진핵세포에서 발현시키는데 적합한 매우 다양한 발현벡터가 이용가능하다. 이런 벡터에는 pCMVLacI, pXT1 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); pCDNA 시리즈, pREP 시리즈, pEBVHis (Invitrogen, Carlsbad, CA)가 있다. 특정 양태에서, 텔로머라제 유전자는 pOG 시리즈 벡터(Stratagene) 중 하나인, pMC1neo와 같은 유전자 표적 벡터내로 클로닝된다.

텔로머라제 단백질은 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 금속 이온 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, HPLC 및 다른 공지된 단백질 분리 방법과 같은 표준 방법에 의해 분리된다[참조: Ausubel et al., 상기; Sambrook et al., 상기]. 분리 정제된 단백질은 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색하는 경우, SDS-PAGE상에서 단일 밴드를 형성한다.

한가지 양태에서, 텔로머라제 단백질은 헥사-his 융합 단백질로 발현되고 니켈-결합된 비드와 같은 금속-함유 크로마토그래피에 의해 분리된다. 간단히 말하면, His₆를 암호화하는 서열이 텔로머라제를 암호화하는 DNA 서열에 연결된다. 비록 His₆ 서열은 분자내 어느 부위이나 위치할 수 있지만, 바람직하게는 종결 코돈 바로 앞의 3'말단에 연결된다. His-hT1 융합체는 다양한 임의의 방법을 이용하여 작제할 수 있다. 편리한 방법은 His₆에 대한 코돈을 함유한 하류 프라이머를 이용해 TEL 유전자를 증폭하는 것이다.

F. 텔로머라제의 펩타이드와 단백질

본 발명의 한가지 양태에서, 텔로머라제 서열을 가진 펩타이드가 제공된다. 본원에서 설명된 분석법에서 펩타이드를 면역원으로 이용하여 텔로머라제 기능의 억제제 또는 인핸서 역할을 하는 항체를 생성시킨다. 펩타이드는 일반적으로 5 내지 100개 아미노산 길이이고, 보다 일반적으로는 10 내지 50개 아미노산 길이이다. 펩타이드는 자동화된 방식(PerkinElmer ABI Peptide Synthesizer)으로 화학적으로 합성되거나 시판되는 것을 구입할 수 있다. 고-성능 액체 크로마토그래피를 비롯한 다양한 방법을 이용하여 펩타이드를 추가 정제한다. 또한, 펩타이드와 단백질은 20개의 천연 아미노산 이외의 다른 아미노산을 함유할 수 있거나 아미노산의 유도체와 변이체를 함유할 수 있다.

본 발명 범주내의 특정 관심의 펩타이드들은 인트론 서열(도 10), 역전사효소 모티프등의 서열을 갖는다. 특정 양태에서, 텔로머라제 단백질은 도 1이나 도 11에서 나타난 아미노산 서열이나 이의 일부분을 갖는데, 이것은 8개 이상의 아미노산 길이를 가진다(그리고 10, 15, 20개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다). 다른 양태에서, 단백질은 하나 이상의 아미

노산 치환, 부가, 결실을 갖는다. 또 다른 양태에서, 단백질은 핵산서열에 의해 결정된 아미노산 서열을 갖는데, 이 핵산서열은 엄격한 통상적인 조건하에서 도 11에 나타난 임의의 서열의 상보체와 하이브리드화된다. 전술한 바와 같이, 텔로머라제의 변이체는 대립유전자성 변이체를 포함한다.

II. 텔로머라제 분석법

텔로머라제 활성과 발현을 결정하기 위해 다양한 분석법이 이용 가능하다. 이런 분석법에는 말단소립 DNA 기질, 핵분해 활성, 프라이머(말단소립)결합 활성, dNTP 결합 활성, 텔로머라제 RNA(hTR) 결합 활성, 생체내 기능-획득 분석, 생체내 기능-손실 분석, 원위치 하이브리드화, RNase 프로브 보호, 노던 분석, cDNA의 증폭, 항체 염색 등을 개선하는 텔로머라제의 능력을 측정하는 시험관내 분석법 등이 있다.

A. 촉매 활성의 분석법

촉매활성 분석법이 문헌[미국 특허 제5,629,154호; 제5,639,613호; 제5,645,986호]에 다양하게 기술되어 있다. 텔로머라제 활성에 대한 전통적인 분석법에서 숙주 말단소립의 서열을 가진 단일-가닥 DNA 프라이머(예를 들면, [TTAGGG]_n)와 텔로머라제 효소가 사용된다[Shay et al., Methods in Molecular Genetics 5:263, 1994; Greider and Blackburn, Cell 43:405, 1985; Morin, Cell 59:521, 1989; 미국 특허 제 5,629,154]. 바람직한 분석법은 세제를 이용한 추출과 증폭을 이용한 분석을 포함한다. TRAP(말단소립 반복 서열 증폭 프로토콜)로 불리는 이 분석법은 감응성을 증가시킨다[Kim et al., Science 266: 2011, 1994]. 간단히 말하면, TRAP에서, 텔로머라제는 신장 생성물을 합성하고, 이 생성물은 증폭을 위한 주형으로 사용된다. 이 텔로머라제 생성물은 올리고뉴클레오타이드의 비-말단소립 영역에서 유도된 프라이머와 말단소립 영역에서 유도된 프라이머로 증폭된다. 겔 전기영동과 같이 증폭생성물을 분석할 때, 텔로머라제 활성이 존재하면 사다리모양의 생성물이 관찰된다[Krupp et al., Nucl. Acids Res. 25: 919, 1997; Savovskiy et al., Nucl. Acids Res. 24: 1174, 1996]. 또한, 다른 텔로머라제 분석법이 이용가능하다[Faraoni et al., J. Chemother 8:394, 1996, describing an *in vitro* chemosensitivity assay; Tatamatsu et al., Oncogene 13: 2265, 1996, describing a "stretch PCR assay"; Lin and Zakian, Cell 81: 1127, 1995, describing an *in vitro* assay for Saccharomyces).

또한, 촉매 또는 다른 활성은 *시험관내* 재구성 시스템에 의해 측정할 수 있다(실시에 참조). 간단히 말하면, 본원에서 설명된 것과 같은 이런 분석법은 재조합체에 의해 생산되어 정제된 텔로머라제 단백질 및 텔로머라제 RNA 성분과 같은 다른 필수 성분, 문헌[WO 제98/14593호]에서 설명한 다른 단백질을 이용해 수행된다.

B. 다른 활성을 위한 분석법

핵분해 활성은 예를 들면, 문헌[Collins and Grieder, Genes and Development 7: 1364, 1993]에서 설명한 프로토콜에 의해 평가된다. 핵분해 활성은 DNA 주형의 5' 경계에 위치한 뉴클레오타이드 서열의 3' 말단으로 부터 하나의 뉴클레오타이드(말단소립 반복 서열 TTAGG의 G)를 자르는 것이다. 간단히 말하면, 핵분해 활성에 의해 제거되지 않는 한, 폴리머라제의 프라이머로 작용하지 못하는 차단된 3' 뉴클레오타이드를 가지는 핵산 주형을 이용하는 반응을 통해 측정될 수 있다.

말단소립 결합 활성과 분석법은 예를 들면, 문헌[Harrington et al., J. Biol. Chem. 270: 8893, 1995]에 설명되어 있다. 일반적으로, 단백질-핵산 상호작용을 검출하는 겔 이동 분석과 같은 임의의 분석법이 사용된다. DNTP와 RNA 결합 활성 분석법은 문헌[Morin, Eur. J. Cancer 33: 750]에 설명되어 있다.

C. 기능의 획득 및 상실

생체내 기능-획득 분석법은 텔로머라제를 암호화하는 발현백터를 세포에 형질감염시켜 수행되는데, 이들 세포는 검출가능한 어떠한 내인성 활성도 가지지 않는다. 활성은 본원에 기술된 바와 같은 생체내 분석법에 의해 결정된다. 또 다른 기능-획득 분석법이 텔로머라제나 역전사효소를 발현하는 종양 세포나 다른 세포에서 수행될 수 있다. 텔로머라제 유전자를 세포로 형질감염시켜 상당 수준으로 발현시켜, 이들 세포를 역전사효소의 억제제로 처리한다. 텔로머라제 활성은 이후 이런 억제제에 대한 감응성이 감소된 것으로 관찰된다. 또한, 효모 텔로머라제 돌연변이체 EST2에서 기능의 회복을 측정한다.

기능 상실은 LIM 1215 세포 또는 다른 종양 세포와 같은 고도한 수준의 텔로머라제 활성을 발현하는 세포에서 측정할 수 있다. 이런 분석법에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 분자가 세포내, 일반적으로 발현 백터내로 도입된다. 텔로머라제 유전자는 텔로머라제 활성이 감소됨으로써 입증된다. 또 다른 분석법에서, 기능을 억제하는 텔로머라제에 대한 항체를 이용하여 기능 분자를 입증할 수 있다.

D. 텔로머라제의 발현

다양한 세포에서 텔로머라제의 발현은 본원에 나타난 서열을 이용하는 표준 분석법에 의해 평가할 수 있다. 예를 들면, 조직 절편 또는 고정된 세포에 방사성 또는 형광-표지된 프로브(단편 또는 올리고뉴클레오타이드)와 원위치 하이브리드화를 사용한다. 다른 방법으로는, RNA를 세포에서 분리하여 노던, RNase 프로브 보호 분석 등에 사용된다. 특정 영역에 대한 프로브와 변이체 특이적인 프로브에 의해 다양한 텔로머라제 전사체의 발현 프로파일이 만들어진다.

바람직한 양태에서, 텔로머라제 발현은 증폭으로 분석한다. 특정 변이체에 대한 프라이머 쌍을 비롯해 텔로머라제에 대한 프라이머 쌍이 세포 RNA로부터 합성된 cDNA를 증폭하기 위하여 사용된다. 이 cDNA는 전체 RNA 또는 폴리(A)+ RNA로부터 합성될 수 있다. RNA 분리를 위한 방법과 프로토콜은 공지되어 있다. cDNA는 올리고(dT)프라이머, 랜덤 프라이머(예를 들면, dN₆), 텔로머라제 특이적 프라이머 등에 의해 개시된다. 프라이머의 선택은 적어도 부분적으로는 RNA의 양과 분석법의 목적에 따른다. 증폭 프라이머는 척추동물 세포에 존재하는 변이체의 특정 혼합물 중 임의 하나 또는 전부를 증폭하도록 디자인된 것이다. 증폭 조건은 프라이머 길이, 염기 함량, 증폭된 생성물의 길이 등을 고려하여 선택된다. 다양한 증폭제를 이용할 수 있다[Lee et al., Nucleic Acid Amplification Technologies, Biotechniques Books, Eaton Publishing, Natick, MA, 1997; Larrick, The PCR Technique: Quantitative PCR, BioTechniques Books, Eaton Publishing, Natick, MA, 1997].

발현을 정량적·정성적으로 평가하는 다른 분석법이 공지되어 있다. 텔로머라제 mRNA 양이 충분할 때는 RNase 프로브 보호와 노던 분석이 쉽게 이루어진다. 세포가 극히 희소할 때, 단일 세포 분석이 바람직하고 샘플내 텔로머라제 RNA의 분취물이 극히 적을 때, 증폭 프로토콜이 적합하다. RNase 프로브 보호는 특히 스플라이싱 변이체, 돌연변이를 검출하는데 뿐만 아니라 이들 RNA를 정량하는데 적절하다.

전술한 바와 같이, 바람직한 양태에서, 다양한 RNA 종의 발현이 모니터링된다. 서로 다른 종을 구별하는 임의 방법으로 중간차이를 분석한다. 따라서, 노던, RNase 프로브 보호, 클로닝 및 증폭에 의한 길이 결정이 이용가능한 방법들이다. 바람직한 양태에서, RNase 프로브 보호 및 증폭이 사용된다. RNase 프로브 보호를 위해, 프로브는 일반적으로 참조 서열이나 인트론 서열의 접합부에서 유도되거나, 인트론 삽입 부위 주변 서열에서 유도된 단편이다. 예를 들면, 1950 내지 1951번 뉴클레오타이드를 포함한 참조 텔로머라제의 단편(예, 1910 내지 1980번 뉴클레오타이드)은 71개 염기 단편으로 참조 서열을 보호하지만, 41과 30개 염기의 두 단편으로서 인트론 1로 텔로머라제를 보호할 것이다. 반대로, 뉴클레오타이드 1910-1950과 인트론 1의 30개 염기를 함유한 단편은 71개 염기 단편으로 인트론 1 변이체를 그리고 41개 염기 단편으로서 참조 텔로머라제를 보호할 것이다. RNase 프로브 보호를 위한 단편은 일반적으로 30 내지 400개 염기 범위내에서 선택되고 구별가능한 보호 생성물을 용이하게 생산하도록 배치된다.

변이체를 구별하는데 사용될 수 있는 또 다른 방법은 증폭이다. 증폭 프라이머 디자인과 전략은 위에서 설명하였다. 간단히 말하면, 개별적으로 각 스플라이싱-인 또는 스플라이싱-아웃된 변이체를 증폭하는 프라이머가 적합하다. 여러 반응을 수행하여 하나 이상의 스플라이싱-인 또는 스플라이싱-아웃된 변이체를 확인할 수 있다.

텔로머라제 단백질을 측정하는 방법도 본 발명의 범주내에서 유용하다. 예를 들면, 텔로머라제에 대한 항체는 조직 절편 또는 투과성 세포를 염색하기 위하여 사용된다. 항체는 면역침강, 웨스턴 블롯등에 의해 단백질을 검출하는데 사용된다. 또한, 텔로머라제와 이의 변이체의 세포내 위치가 본원에서 설명한 항체를 이용해 결정될 수 있다.

E. 텔로머라제에 대한 항체

본원에 기술된 텔로머라제 단백질, 단편, 펩타이드에 대한 항체를 용이하게 제조할 수 있다. 이런 항체는 특이적으로 야생형 텔로머라제 단백질을 인식하지만 돌연변이(또는 변이체)단백질, 돌연변이(또는 변이체) 텔로머라제 단백질을 인식하지 못하거나, 돌연변이(또는 변이체)와 야생형 모두를 동일한 것으로 인식한다. 단백질을 분리하고, 단백질의 활성을 억제하고 또는 단백질의 활성을 강화하기 위하여 항체를 사용한다. 또한, 텔로머라제와 상호작용하는 작은 분자를 위한 분석법이 항체의 개발에 의해 가능해질 것이다.

본 발명의 범주내에서, 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 항-이디오타입 항체, 항체 단편(예, Fab, F(ab')₂, F_V 가변 영역, 또는 상보성 결정영역)이 포함된다. 항체는 일반적으로 Kd가 10⁻⁷ M 이상, 바람직하게는 10⁻⁸ M 이상이면, 텔로머라제 단백질에 대해 특이적인 것으로 간주된다. 모노클로날 항체 또는 결합 파트너의 친화도는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다[Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672, 1949].

간단히 말하면, 폴리클로날 항체 조제물이 토끼, 마우스, 랫트와 같은 다양한 온혈-동물에서 만들어진다. 전형적으로, 동물은 텔로머라제 단백질이나 이의 펩타이드로 면역되는데, 이들은 바람직하게는 키홀 림페트 헤모시아닌과 같은 담체 단백질과 스플라이싱된다. 투여 경로는 일반적으로 애쥬번트(예를 들면, 프로인트(Freund)의 완전 또는 불완전 애쥬번트)형태로 복강내, 근육내, 또는 피하 주입을 포함한다. 특히 바람직한 폴리클로날 항체형은 한 분석에서 배경값 보다 세배나 높은 결합을 보인다.

모노클로날 항체 역시 통상적인 기술[미국 특허 제RE 32,011호, 제4,902,614호, 제4,543,439호 및 제4,411,993호; 참조: Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988]을 이용해 하이브리도마 세포주로부터 만들어진다. 간단히 말하면, 한가지 양태에서, 랫트나 마우스와 같은 개체 동물에게 텔로머라제나 이의 일부를 주사한다. 단백질이 면역 반응을 높이기 위해 프로인트의 완전 또는 불완전 애쥬번트와 같은 애쥬번트내 에멀전화제로 투여될 수 있다. 초기 면역화후 1 내지 3주 사이에 동물은 일반적으로 부스팅(boosting)되어 공지된 분석법을 이용해 단백질에 대한 반응성을 시험할 수 있다. 비장 및/또는 림프절을 수거하여 불멸화시킨다. 엡스테인-바르(Epstein-Barr) 바이러스에 의해 매개되거나 하이브리도마를 생산하기 위한 융합과 같은 다양한 불멸화 기술이 사용된다. 바람직한 양태에서, 불멸화는 적절한 골수종 세포주와 융합하여 하이브리도마를 만들면 이루어지는데, 이 하이브리도마는 모노클로날 항체를 분비한다. 적절한 골수종 세포주에는 NS-1 (ATCC 번호 TIB 18), 및 P3X63 - Ag 8.653 (ATCC 번호 CRL 1580)이 있다. 바람직한 융합 파트너는 내인성 항체 유전자를 발현하지 않는다. 융합 이후, 세포는 HAT(하이포크산틴, 아미노프테린, 및 티미딘)과 같은 시약을 함유한 배지에서 배양되는데, 이 시약은 융합된 비장 및 골수종 세포의 생장을 선택적으로 가능하게 한다. 대략 7일 후, 하이브리도마는 텔로머라제 단백질에 대해 반응하는 항체의 존재에 대해 스크리닝된다. 다양한 분석법이 사용되는데, 역류 면역-전기영동, 방사성면역분석, 방사성면역침강, 효소-결합된 면역-흡착 분석(ELISA), 도트 블롯 분석, 웨스턴 블롯, 면역침강, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석이 있다[미국 특허 제 4,376,110호 및 제4,486,530호; 참조: Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988].

모노클로날 항체를 작제하는데 다른 기술을 이용할 수도 있다[Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989; Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728-5732, 1989; Altling-Mees et al., Strategies in Molecular Biology 3:1-9, 1990; describing recombinant techniques]. 간단히 말하면, mRNA는 B세포 개체군에서 분리되어 λ ImmunoZap(H)와 λ ImmunoZap(L)와 같은 적절한 벡터내에 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 cDNA 발현 라이브러리를 만들기 위하여 사용된다. 이들 벡터는 개별적으로 스크리닝되거나 공동-발현하여 Fab 단편이나 항체를 만든다[Huse et al., 상기; Sastry et al., 상기]. 포지티브 플라크는 계속해서 비-용균성 플라스미드로 전환되는데, 이들 플라스미드는 이. 콜라이에서 얻은 모노클로날 항체 단편을 고도로 발현한다.

유사하게, Fab 또는 Fv 단편과 같은 항체의 일부분이나 단편이 통상의 효소 분해나 재조합 DNA 기술을 이용해 작제되어 항체의 가변 영역을 분리한다. 한 가지 양태에서, 목적하는 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마에서 가변 영역을 암호화하는 유전자는 가변 영역에 대한 뉴클레오타이드 프라이머를 이용해 증폭한다. 이들 프라이머는 당업자에 의해 합성되거나 또는 상업적으로 이용 가능한 공급원 (Stratagene, La Jolla, CA)으로부터 구매할 수 있다. 증폭 생성물은 ImmunoZAPTM H와 ImmunoZAPTM L (Stratagene)과 같은 벡터로 삽입되는데, 이 벡터들은 이후 이. 콜라이, 효모, 또는 포유류계 발현계로 도입된다. 이들 기술을 이용하여, V_H와 V_L 도메인의 융합체를 함유한 대량의 일본쇄 단백질이 생산된다[Bird et al., Science 242:423-426, 1988]. 또한, 항체의 결합 특이성을 변화시키지 않고 "쥐"항체를 "사람" 항체로 바꾸는 기술이 이용된다.

일단 적절한 항체가 수득되면, 이들은 당업자에게 공지된 다양한 기술에 따라 분리되거나 정제된다[Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988]. 적절한 기술에는 펩타이드나 단백질 친화도 칼럼, HPLC나 RP-HPLC, 단백질 A나 단백질 G 칼럼에서 정제, 또는 이들 기술을 임의 혼합하는 것이 있다.

F. 텔로머라제와 상호작용하는 단백질

텔로머라제와 직접적으로 상호작용하는 단백질은 효모 이중-하이브리드 결합계와 같은 분석법에 의해 검출될 수 있다. 간단히 말하면, 이중-하이브리드계에서, DNA-결합 도메인-텔로머라제 단백질의 융합체(예, GAL4-텔로머라제 융합체)가 작제되고 선별가능 마커 유전자에 연결된 GAL4 결합 부위를 함유한 세포로 형질감염되어 들어간다. 전체 텔로머라제 단백질 또는 텔로머라제의 하부영역이 사용된다. GAL4 활성화 도메인에 융합된 cDNA 라이브러리 역시 작제되어 공동-형

질감염된다. cDNA-GAL4 활성화 도메인 융합체내 cDNA가 텔로머라제와 상호작용하는 단백질을 암호화하는 경우, 선택 가능 마커가 발현된다. 이 cDNA를 함유한 세포는 이후 성장하고 작제물은 분리되고 특성화된다. 다른 분석법이 상호작용하는 단백질을 확인하기 위하여 사용된다. 이런 분석법에는 ELISA, 웨스턴 블롯팅, 공동-면역침강 등이 있다.

III. 텔로머라제 활성의 억제제 및 인핸서

후보 억제제 및 인핸서(본원에서는 "이펙터"로 총칭함)은 세균, 진균, 식물, 기생충, 화학물질 라이브러리(예를 들면, 복합 라이브러리), 랜덤 펩타이드 등의 다양한 공급원으로부터 분리하거나 만들 수 있다. 이펙터는 텔로머라제의 펩타이드 또는 펩타이드 변이체, 텔로머라제 변이체, 안티센스 핵산 및 텔로머라제에 대한 항체, 텔로머라제의 프로모터 활성의 억제제 등 일 수 있다. 억제제 및 인핸서는 X-선 결정학에서 결정된 단백질 구조를 기초로하여 이론적으로 디자인할 수 있다 [Livnah et al., Science 273:464, 1996]. 특정 양태에서, 억제제는 변이체와 같은 특이적인 텔로머라제를 표적으로 한다.

억제제는 결합된 단백질을 해리시키거나 다른 메커니즘을 이용하여 텔로머라제가 다른 리보핵산 단백질에 결합되는 것을 방지하거나 텔로머라제에 결합하는 것을 방해하는 작용을 한다. 억제제는 직,간접적으로 작용하는 것이다. 바람직한 양태에서, 억제제는 텔로머라제 RNA 또는 말단소립에 텔로머라제 단백질이 결합하는 것을 방해한다. 기타 바람직한 양태에서, 억제제는 작은 분자이다. 가장 바람직한 양태에서, 억제제는 세포가 증식하지 못하도록 한다. 억제제는 부작용을 최소한으로 해야하고, 바람직하게는 비-독성이어야 한다. 세포로 침투할 수 있는 억제제가 바람직하다.

다른 바람직한 양태에서, 이펙터는 우성 네가티브 방식으로 작용하는 텔로머라제 단백질 또는 펩타이드이다 [Ball et al., Current Biology 7:71, 1997; Current Biology 6:84, 1996]. 예를 들면, 텔로머라제가 말단소립에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제시키는 텔로머라제 펩타이드는 말단소립이 연장되는 것을 방해한다. 일반적으로 이와 같은 펩타이드는 고유 서열을 가지나, 변이체의 활성은 증가될 수 있다 [Ball et al., 상기]. 변이체는 본원에서 설명하는 방법으로 작제할 수 있다. 다른 펩타이드도 텔로머라제에 결합할 수 있고, 한가지 이상의 이들의 활성을 억제할 수 있으나 텔로머라제 아미노산 서열을 가지지 않는다. 이와 같은 펩타이드는 본원에서 설명하는 검사방법으로 확인할 수 있다. 단백질 또는 펩타이드는 텔로머라제 활성을 증가시킬 수도 있다. 효과적인 억제를 위해서는, 펩타이드 억제제는 숙주 세포에 형질감염 또는 감염된 벡터로부터 적절하게 발현되어야 하지만, 리포솜- 매개된 융합 등의 수단을 이용하여 도입될 수도 있다. 진핵생물 벡터는 이 분야에 공지되어 있고, 용이하게 이용할 수 있다. 벡터에는 플라스미드, 바이러스계 벡터 등이 포함된다.

또 다른 양태에서, 억제제는 리보자임이다. "리보자임"은 텔로머라제 핵산 서열을 절단할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 리보자임은 DNA, RNA, 핵산 유사체 또는 이들 혼합물(예를 들면, DNA/RNA 하이브리드)등으로 구성될 수 있다. "리보자임 유전자"는 RNA로 전사되었을 때, 리보자임을 생산하는 핵산 분자를 말하는 것이고, "리보자임 벡터"는 원하는 리보자임 유전자를 전사할 수 있는 어셈블리를 말하는 것이고, 이는 DNA 또는 RNA로 구성될 수 있다. 본 발명의 특정 양태내에서, 벡터는 한가지 이상의 제한효소 절단 부위 및 선별가능 마커를 포함한다. 또한, 선택되는 벡터 및 숙주 세포에 따라서, 복제 오리진, 폴리아데닐화 부위 및 인핸서 등과 같은 추가 요소가 본원에서 설명하는 벡터에 포함될 수도 있다.

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 텔로머라제 유전자의 발현을 억제할 수 있는 능력을 가지는 리보자임을 제공하는 것이다. 간략하게 설명하면, 다양한 리보자임을 본 발명에 이용하기 위해 만들 수 있는데, 예를 들면, 헤어린 리보자임 [Hampel et al., Nucl. Acids Res. 18:299-304, 1990, EPO 360,257, and 미국 특허 제 5,254,678호]; 해머헤드 리보자임 [Rossi, J.J. et al., Pharmac. Ther. 50:245-254, 1991; Forster and Symons, Cell 48:211-220, 1987; Haseloff and Gerlach, Nature 328:596-600, 1988; Walbot and Bruening, Nature 334:196, 1988; Haseloff and Gerlach, Nature 334:585, 1988; Haseloff et al., 미국 특허 제5,254,678호]; 간염 델타 바이러스 리보자임 [Perrotta and Been, Biochem. 31:16, 1992]; 테트라히메나(*Tetrahymena*) 리보자임성 RNA에 기초한 그룹 I 인트론 리보자임 [Cech et al., 미국 특허 제 4,987,071호]; RNase P 리보자임 [Takada et al., Cell 35:849, 1983]; 원하는 또는 선택된 표적 서열을 절단하는 능력이 있는 다른 다양한 핵산 구조 [WO 95/29241, WO 95/31551]. 본 발명의 특정 양태내에서, 리보자임은 안정성을 증가시키기 위해 테트라루프 또는 다른 구조를 포함하거나 [Anderson et al., Nucl. Acids Res. 22:1096-1100, 1994; Cheong et al., Nature 346:680-682, 1990] 또는 RNase 또는 엔도뉴클레아제 활성에 리보자임이 내성을 가지도록 [Rossi et al., Pharmac. Ther. 50:245-254, 1991], 이들의 전통적인 구조와 달리 변형될 수 있다.

본 발명의 한 양태 범위내에서, 헤어린 및 해머헤드 리보자임은 텔로머라제 핵산 서열을 절단할 수 있는 능력을 가진다. 간략하게 설명하면, 헤어린 리보자임은 이들이 표적 서열인 $N_3XN^*GUC(N_{>6})$ (여기서, N은 G, U, C 또는 A이고, X는 G, C, 또는 U이고, *는 절단 부위이다)를 인지하도록 제조된다. 유사하게, 해머헤드 리보자임은 서열 NUX(여기서, N은 G, U, C 또는 A이다)를 인지할 수 있도록 제조된다. 해머헤드 리보자임 또는 헤어린 리보자임의 추가 뉴클레오타이드는 표적 플랜

킹 뉴클레오타이드 및 해머헤드 콘센서스 서열에 의해 결정된다[Ruffner et al., Biochemistry 29:10695-10702, 1990]. 특정 리보자임을 제조하고 이를 이용하는 것에 대해서는 문헌[Cech et al., 미국 특허 제 4,987,071호]에서 설명하고 있다. 숙주 세포에 도입된 벡터로부터 리보자임이 적절하게 발현된다.

본 발명의 리보자임 및 이와 같은 리보자임을 암호화하는 DNA는 공지된 프로토콜을 이용하여 용이하게 제조할 있다 [Promega, Madison Wis., Heidenreich et al., J. FASEB 70:90-6, 1993; Sproat, Curr. Opin. Biotechnol. 4:20-28, 1993]. 또는, 리보자임은 리보자임을 암호화하고, RNA 폴리머라제 프로모터(예를 들면 SP6 또는 T7)에 작동가능하게 연결된 DNA 또는 cDNA로부터 제조될 수 있다. RNA 리보자임은 DNA 또는 cDNA 분자의 전사시에 제조된다.

다른 바람직한 양태에서, 억제제는 텔로머라제의 프로모터 활성을 감소시킨다. 진핵 프로모터는 RNA 폴리머라제 및 전사 단위 조절에 관여하는 다른 단백질에 의해 결합된 서열을 포함한다. 텔로머라제 전사는 고도로 조절되는 것으로 보이는데; 단백질은 주로 간(stem), 배아 및 암세포에서 발현되고, 대부분의 체세포에서 발현되더라도 매우 낮은 수준으로 발현된다. 따라서, 프로모터는 억제제에 대해 잠재적 표적이다. 억제제는 텔로머라제의 전사를 조절하는 한 가지 이상의 인자가 결합하는 것을 파괴하거나 방해하여 전사가 중단되거나 감소되도록 한다. 전사 수준은 적어도 한 개의 말단소립이 사라질 수 있는 충분히 낮은 수준으로 떨어져야 한다.

본 발명의 또 다른 억제제는 텔로머라제 암호화 또는 비-암호화 서열에 대한 안티센스 RNA 또는 DNA이다. 특정 mRNA 분자에 대한 안티센스 핵산은 암호화된 단백질의 단백질 발현을 억제하는 것으로 나타났다. 본원에서 제공하는 텔로머라제 서열에 기초하여, 안티센스 서열을 디자인하고, 바람직하게는 이를 적합한 벡터에 삽입하여 숙주 세포로 형질감염시켜, 안티센스를 발현시키는 것이다. 안티센스는 hTIRNA의 임의 부분에 결합할 수 있다. 특정 양태에서, 안티센스는 한 가지 이상의 변이체에 특이적으로 결합할 수 있도록 디자인된다. 생리학적 조건하에서, 특이적 결합이란 안티센스가 상보서열을 가지는 RNA에는 결합하나 다른 RNA에는 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 임의 특정 인트론 서열을 포함하는 텔로머라제 RNA는, 스플라이싱 변이체의 독립적인 구획으로 인해 이중 변이체 그룹일 수 있기 때문에, 한가지 이상의 RNA종이 결합되어 비활성화된다. 안티센스 폴리뉴클레오타이드는 적어도 길이가 7개 뉴클레오타이드이고, 일반적으로 100 내지 200개 염기를 넘지 않으며, 일반적으로는 적어도 10개 내지 50개 정도의 염기 길이를 가진다. 안티센스 분자의 디자인 및 세포로 도입하는 수단 등은 문헌[미국 특허 제5,681,747호; 제5,734,033호; 제5,767,102호; 제5,756,476호; 제5,749,847호; 제5,747,470호; 제5,744,362호; 제5,716,846호]에서 찾아 볼 수 있다.

또한, 특정 환경에서는 텔로머라제 활성 또는 발현의 인헨서가 바람직하다. 이때, 세포의 증식 가능성을 증가시키는 것이 치료학적 효과를 가질 수 있다. 예를 들면, 상해 또는 질병후에 기관 재생 또는 분화, 상해후에 신경 세포 또는 뇌 세포 생장, 골수 이식에 이용되는 조혈 간 세포 또는 다른 기관 간 세포의 증식 등은 제한적일 수 있으며, 따라서 텔로머라제 인헨서로부터 이득을 취할 수 있다. 인헨서는 내인성 단백질을 안정화시키고, 전사 또는 해독을 증가시키고 다른 메카니즘을 통하여 작용할 수 있다. 당업자에서 잘 알려진 바와 같이, 인헨서를 디자인하는데 적용할 수 있는 많은 지침서가 있다.

억제제 및 인헨서를 스크리닝하는 분석은 억제될 활성의 특징 및 억제제의 종류에 따라 다양하다. 검사에는 TRAP 검사 또는 변형, 또는 비-증식계 폴리머라제 검사, 효모 이중 하이브리드, 척추동물 텔로머라제로 형질감염된 효모에서 억제 해제 등이 포함된다. 텔로머라제의 프로모터와 상호작용하는 화합물을 스크리닝하기위해 리포터 유전자 이용 분석이 편리하다.

IV. 텔로머라제의 용도.

텔로머라제의 뉴클레오타이드 서열 및 텔로머라제 단백질은 본 발명의 다양한 곳에 이용된다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 조성물은 진단 시약 또는 치료제로 이용된다.

A. 진단

텔로머라제를 암호화하는 mRNA 발현 및/또는 단백질을 이용하여 분열 세포 특히 종양 세포 및 간 세포를 검출한다. 검출 방법에는 단백질 검출용 항체 염색 또는 태그를 붙인 텔로머라제 결합 화합물, mRNA에 대한 원위치 핵산 하이브리드화, DNA "칩"에서 하이브리드화, 노던 분석, RNase 프로브 보호, PCR 증폭 또는 다른 방법, 리가제-매개된 증폭 등이 포함된다. 또한, RNA 스플라이싱 변이체의 발현은 증폭, RNase 프로브 보호, 다른 공지된 방법을 이용하여 편리하게 검사할 수 있다. 특히, 본원에서 설명하는 프라이머(Htel 인트론 T, HT 2482R)와 같은 혼한 스플라이싱 변이체 부위 주변의 올리고 뉴클레오타이드 프라이머를 이용하여 다양한 세포 형태에서 스플라이싱 변이체를 검출한다. 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 다양한 종양 세포는 상이한 RNA 스플라이싱 변이를 나타낸다. 종양 단계, 전이 가능성 등과 스플라이싱 변이체 패턴과의 상관관계를 결정할 수 있다. 이와 같이, 특정 변이체에 대한 분석은 진단용으로 이용한다. 암 세포 또는 과다증식 세포와 같은 텔로머라제 활성이 증가된 세포는 본원에서 설명하는 임의의 분석법을 이용하여 정성적으로 또는 정량적으로

확인할 수 있다. 일반적으로, 텔로머라제 활성 또는 발현은 동일한 또는 상이한 개체에서 얻은 통상적인 대응 세포와 의심이 가는 세포를 서로 비교한다. 종양 또는 과다 증식을 암시하는 활성의 증가는 직접 비교 함으로써, 또는 텔로머라제 활성 또는 발현이 없는 것으로 알려진 세포에서 활성을 검출함으로써 이루어진다. 또한, 본원에서 설명하는 분석을 이용하고, 시간에 따른 활성 및 발현을 비교하여 종양의 진행 또는 치료법에 대한 반응을 모니터링할 수 있다.

텔로머라제를 발현하는 한 개의 ALT 세포주에서 검출되는 변이체는, hT1의 기본 도메인이 적어도 일부 ALT 세포주에서 ALT 메카니즘에 기여한다는 것을 제시한다. 한 가지 가능한 ALT 메카니즘은 TRAP 검사에서 비활성인 비정상-조절된 텔로머라제 성분이 관여한다는 것이다. 따라서, 변이체의 확인은 다음의 종양학에서 유용할 것이다.

선택적 mRNA 스플라이싱은 고등 진핵생물에서 유전자 발현을 조절하는 일상적인 메카니즘이고, 스플라이싱 과정은 조직-특이적이고, 발생-특이적이고, 성-특이적으로, 많은 예가 있다. 중요한 것은 포유류에서 질병과 연결된 돌연변이의 15%가 스플라이싱 패턴에 영향을 준다는 것이다[Horowitz and Krainer Trends Genet., 10, 100-106, 1994]. 세포 생리학에서 변화는 변화된 스플라이싱 패턴을 유도할 수 있다. 또한, 자체 종양발생도 선택적 스플라이싱 메카니즘을 손상시켜 mRNA 스플라이싱된 변이체의 발현을 강화시키는 것으로 나타났다. 다른 신규한 소수의 선택적으로 스플라이싱된 hT1 변이체가 종양 발생에 중요한 역할을 할 수도 있지만, 정상 세포와 비교하여, 다양한 종양에서 발견되는 주요 전사체의 변경된 상대적 발현 수준, 및 제한된 수명을 가지는 분열전 세포와 비교하여, 분열후 세포주에서 발견되는 주요 전사체의 변경된 상대적 발현 수준이, 암의 발생 및 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 또한, 고환 및 결장 음과 뿐만 아니라 종양 세포주에서 볼 수 있는 선택적으로 스플라이싱된 hT1 변이체가 존재한다는 것은 통상적인 발생에서 이 유전자의 복합 조절이 있다는 것을 나타낸다.

대부분의 종양 및 모든 텔로머라제-포지티브 불멸화된 세포주에서 주요 hT1 생성물의 발현이 발견된다. 따라서, 다른 기능에 추가하여, hT1의 전사 조절은 텔로머라제 활성을 조절하는 주요 양상일 것이다. 예를 들면, 텔로머라제는 배자계열에서 말단소립의 길이를 유지하는 역할에 추가하여, 파손된 염색체의 치료에 관여하는 것으로 보인다. 텔로머라제 조성물은 이들의 기능에 따라서 다양해진다.

따라서, 인트론 서열은 진단분야에 특히 유용하다. 예를 들면, 암, 노화, 상처 치유, 신경 재생, 재생 세포(예를 들면, 간 세포)의 검출 및 확인은 효과적인 치료법을 판정하기 위한 중요한 사전단계일 것이다. 이에 대해서, 상처 치료 검출로 개선된 화합물의 개발 및 확인할 수 있다. 현재, 상처 치료 분석은 상당히 비용이 많이 들고, 시간도 걸리지만, 증폭 또는 하이브리드화 분석은 신속하고, 비용 면에서도 효과적이다. 이와 같은 방법에서, 검출은 정량적으로 또는 정성적으로 이루어진다. 정성 검사에서, 변이체 서열(예를 들면, 다양하게 스플라이싱된 인트론)에 대한 하이브리드화 프로브 또는 특정 증폭 프라이머 쌍을 이용하여 변이체 서열의 존재 또는 부재를 검출한다.

본 발명의 내용에서 유용한 프로브에는 도 10에 나타난 서열 또는 이의 상보체에 하이브리드하는 핵산 분자를 포함한다. 하이브리드화를 위한 프로브는 24개 이상의 염기이나, 이 범위는 12개 내지 전체 길이 서열의 범위가 된다. 프로브는 hT1 DNA 또는 RNA에 하이브리드하지 않는 추가 서열을 포함할 수 있다. 프로브는 일반적으로 DNA이나, RNA, PNA 또는 이의 유도체가 될 수도 있다. 하이브리드화 조건은 프로브 길이 및 하이브리드화 방법(예를 들면, 나일론 지지체, 실리콘-칩)에 따라 적절하게 선택한다. 조건은 당분야에 잘 공지되어 있다. 도 10의 서열중 하나는 게놈 서열이고, 이는 텔로머라제 mRNA에서는 발견되지 않는 것이다. 이와 같은 서열에서 유도된 프로브를 이용하여, RNA 제조 및 증폭 반응에서 게놈 DNA를 검출한다. 하이브리드화 프로브는 방사능표지, 화학적 발광 표지 또는 다른 공지의 표지로 표지화할 수 있다.

하이브리드화는 용액 또는 원위치 조직에서 고정 지지체에 고정된 mRNA 제조물, cDNA 제조물등에서 실시한다. 한 가지 하이브리드화 분석은 기능을 갖춘 유리 슬라이드 또는 실리콘 칩과 같은 고체 기질에 고정된 올리고뉴클레오타이드에 어닐링하는 것이다. 이와 같은 칩은 시판되는 것을 구입하거나 문헌[PCT/US94/12282; 미국 특허 제5,405,783호; 미국 특허 제5,412,087호; 미국 특허 제5,424,186호; 미국 특허 제5,436,327호; 미국 특허 제5,429,807호; 미국 특허 제5,510,270호; WO 제95/35505호; 미국 특허 제5,474,796호]에서 설명하는 바와 같이 만들 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 정렬 형태를 하고 있고, 각 올리고뉴클레오타이드 서열의 위치를 정할 수 있다.

증폭 검사에서, 인트론에 플랭킹하거나, 증폭을 위해 인트론을 필요로 하는 프라이머 쌍이 바람직하다. 이와 같은 프라이머 쌍은 본원에서 많이 소개되어 있다. 본원에서 제공되는 서열로부터 다른 프라이머를 디자인할 수 있다. 일반적으로 프라이머 쌍은 한 개 인트론의 증폭만을 허용하도록 디자인하지만, 특정 환경에서는 동일한 RNA 제조물에서 다중 인트론을 검출하는 것이 바람직하다.

원위치 하이브리드화, RNase 보호 등과 같은 다른 진단 분석을 또 다르게 이용하거나 상기 설명한 검사에 추가하여 이용한다. 이와 같은 분석을 하는 원리는 본 발명에서 제공되지만, 기술적인 측면은 잘 알려진 것들이다.

유전자전이된 마우스 및 무표시(null) 돌연변이체인 마우스(예를 들면, "넉아웃(knockout) 마우스")를 만들어서 후보 억제제를 시험한다. 텔로머라제 유전자는 유전자전이된 마우스 백터 작제물용 조직-특이적인 프로모터의 조절하에 있는 것이 바람직하다. 텔로머라제를 과다 발현시키는 마우스를 억제제를 시험하는 모델 시스템으로 이용한다. 이와 같은 마우스에서, 텔로머라제를 과다발현시키는 세포는 연속적으로 증식하는 것으로 기대된다. 후보 억제제를 투여하여, 세포 성장을 관찰하고 측정한다. 성장을 느리게 하거나 감소시킨 억제제가 후보 치료제이다.

텔로머라제를 세포로 형질감염시켜, 다양한 세포를 불멸화시킬 수 있다. 텔로머라제를 포함하는 발현 벡터를 불안정하게 형질감염시켜 일시적인 불멸화를 얻을 수 있다. 또는, 유도성 프로모터의 제어하에 텔로머라제 유전자의 안정적인 형질전환체의 증식은 유도인자의 첨가 및 부재에 따라 개시 및 중단될 수 있다. 유사하게, 텔로머라제 활성의 억제제의 유무를 이용하여 선택적으로 세포를 불멸화시킨다. 효모에서 모든 단백질의 일부를 발현시키면, 사람의 많은 단백질이 효모에서 복합체 성분과 상호작용하기 때문에 우성 네가티브로 작용하나, 완전하지 못하기 때문에 생산적이지는 못하다. 이와 같이, 이들 유전자는 우성 네가티브로 작용한다. 따라서, 효모는 결국 노화된다. 이와 같은 세포를 억제 약물을 스크리닝하는데 이용하여 노쇠기를 지나 효모가 성장하도록 한다.

정제된 텔로머라제 단백질, 참조 변이체 단백질 또는 이의 단편을 이용하여 억제성 약물을 스크리닝하는 검사에 이용한다. 이와 같은 분석은 일반적으로 시험관내에서 실시되고, 상기에서 설명되거나 본 발명의 분야에 공지된 임의 방법을 이용한다. 단백질은 결정화시켜, X-선 분석을 하여, 이의 3-차원 구조를 결정한다.

B. 치료

상기에서 설명하는 조성물 및 방법을 세포에서 텔로머라제의 활성에 영향을 주는 질병 및 질환의 치료에 이용한다. 치료란 질환 또는 질병의 임의 개선, 질병의 징후의 경감, 종양 세포 물질의 감소 등이 포함되는 의미로 이용된 것이다. 예를 들면, 효소 활성 억제제를 이용하여 세포 증식을 제한할 수 있다.

많은 질병 및 질환이 증식 및 증식 가능성과 밀접한 관계를 하고 있다. 원하지 않는 증식과 관련된 가장 흔한 질병중에 하나는 암이다. 본원에서 설명하는 방법 및 조성물을 이용하여, 흑색종, 다른 피부 암, 신경아세포종, 유방암, 결장암, 백혈병, 임파종, 골수암 등의 암을 치료한다. 본 발명의 범위내에 치료할 수 있는 다른 질병 및 질환에는 평활근 세포 과형성증, 피부 성장 등과 같은 과도한 세포 증식(동일한 또는 상이한 개체로부터의 정상 대응 세포에 비해 증식 속도가 증가됨)등이 포함된다. 다른 질환 및 질병은 증가된 텔로머라제 활성으로부터 이득을 얻을 것이다. 텔로머라제 인핸서를 이용하여 간 세포 증식을 자극할 수도 있고, 분화도 자극할 수 있을 것이다. 이와 같이 골수 이식물에서 조혈 간 세포의 증대가 관리된다. 마찬가지로, 많은 조직이 간 세포를 가진다. 이들 세포의 증식은 상처 치유, 모발 성장, 빌름스(Wilm's) 종양과 같은 질병의 치료등에 유익하다.

특정 억제제 또는 인핸서는 발현 벡터를 통하여 투여될 수 있다. 세포로 핵산을 도입하는 대부분의 기술이 공지되어 있다. 이와 같은 방법에는 레트로바이러스성 벡터와 후속 레트로바이러스 감염, 아데노바이러스 또는 아데노-결합된 바이러스성 벡터 및 연속한 감염, 응축제(예를 들면, 폴리-리신)과 핵산의 복합체 등이 포함되는데, 이들 복합체 또는 바이러스성 벡터는 함유된 리간드에 의해 특정 세포형을 표적으로 한다. 종양 세포 및 다른 세포에 특이적인 리간드가 많이 공지되어 있다.

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 특정 범위내에서, 리보자임, 안티센스, 우성 네가티브 텔로머라제, 텔로머라제의 일부분을 암호화하는 핵산을 이용하여 텔로머라제 활성을 억제하는데, 이는 원하는 세포에 기능을 하는 유전자를 도입시키는 방법을 이용한다. 이는 세포로 합성된 유전자를 운반하거나, 또는 유전자 생성물을 생체내에서 전사할 수 있는 DNA 또는 cDNA를 운반하여 이루어진다. 보다 구체적으로는, 생체내에서 생성물을 만들기 위해서는, 생성물을 암호화하는 핵산을 진핵생물 프로모터(예를 들면, pol III 프로모터, CMV 또는 SV40 프로모터) 조절하에 둔다. 보다 특이적으로 전사를 조절하기를 원하는 경우에, 유전자는 조직 또는 세포 특이적인 프로모터(예를 들면, 간에서 표적 세포에 대해)의 조절하에 두거나 또는 유도성 프로모터의 조절하에 둔다.

본 발명의 범위내에서는 다양한 벡터를 이용할 수 있는데, 예를 들면, 플라스미드, 바이러스, 레트로트랜스포존, 코스미드 등이 포함된다. 대표적인 예를 들면, 아데노바이러스성 벡터[WO 제94/26914호, WO 제93/9191호; Yei et al., Gene Therapy 1:192-200, 1994; Kolls et al., PNAS 91(1):215-219, 1994; Kass-Eisler et al., PNAS 90(24):11498-502, 1993; Guzman et al., Circulation 88(6):2838-48, 1993; Guzman et al., Cir. Res. 73(6):1202-1207, 1993; Zabner et al., Cell 75(2):207-216, 1993; Li et al., Hum Gene Ther. 4(4):403-409, 1993; Caillaud et al., Eur. J. Neurosci. 5(10):1287-1291, 1993]; 아데노-연합된 타입 1 벡터("AAV-1") 또는 아데노-연합된 타입 2 벡터("AAV-2") [WO 제95/

13365호; Flotte et al., PNAS 90(22):10613-10617, 1993]; 간염 델타 바이러스, 살아있는 약독화된 델타 바이러스 및 헤르페스 바이러스성 벡터[미국 특허 제 5,288,641호] 뿐만 아니라 미국 특허 5,166,320에서 설명하는 벡터가 포함된다. 다른 대표적인 벡터에는 레트로바이러스성 벡터[예를 들면, EP 제0 415 731호; WO 제90/07936호; WO 제91/02805호; WO 제94/03622호; WO 제93/25698호; WO 제93/25234호; 미국 특허 제5,219,740호; WO 제93/11230호; WO 제93/10218호]등이 포함된다. 방법 및 다른 성분의 경우는 문헌[미국 특허 제5,756,264호; 제5,741,486호; 제5,733,761호; 제5,707,618호; 제5,702,384호; 제5,656,465호; 제5,547,932호; 제5,529,774호; 제5,672,510호; 제5,399,346호; 제5,712,378호를 참고로 한다.

본 발명의 특정 범위내에서, 핵산 분자는 운반체를 이용하여 또는 다양한 물리적인 방법을 이용하여 숙주 세포로 도입시킬 수 있다. 이와 같은 방법의 대표적인 예를 들면, 인산칼슘 침전을 이용하는 형질전환[Dubensky et al., PNAS 81:7529-7533, 1984]; 핵산을 고유 표적 세포에 직접 미세주입하는 방법[Acsadi et al., Nature 352:815-818, 1991]; 수행 용액에 현탁된 세포에 강력한 전기장을 받게 하여, 일시적으로 막이 극성을 띠도록 하여 핵산 분자가 들어갈 수 있게 하는 전기천공법 등이 포함된다. 다른 과정은, 비활성 아데노바이러스에 연결된 핵산 분자[Cotton et al., PNAS 89:6094, 1990]; 리포펙틴[Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989]; 마이크로발사 충격법[Williams et al., PNAS 88:2726-2730, 1991]; 폴리리신과 같은 다가양이온 화합물, 수용체 특이적인 리간드, 핵산 분자를 포집하고 있는 리포솜, 스페로플라스트 융합(이때, 핵산 분자를 포함하는 이. 콜라이를 이들의 외부 세포 벽을 벗겨내고, 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 동물 세포에 융합시킨다); 바이러스 형질도입[Cline et al., Pharmac. Ther. 29:69, 1985; and Friedmann et al., Science 244:1275, 1989]; DNA 리간드[Wu et al, J. of Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989] 및 프소라렌(psoralen) 비활성화된 바이러스 예를 들면, 센다이 바이러스 또는 아데노바이러스등을 이용한다. 한가지 양태에서, 핵산 분자는 리포솜을 이용하여 숙주 세포로 도입시킨다.

이펙터의 투여는 정립된 프로토콜에 따른다. 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하게 설명하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 본원에서 설명하는 바와 같이 한 가지 이상의 억제제 또는 인헨서를 포함하는데, 이들은 한 가지 이상의 약제학적 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 배합될 수 있다. 이와 같은 조성물은 중성 완충된 염수, 인산염 완충된 염수 등과 같은 완충액, 글루코즈, 만노즈, 슈크로즈 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 만니톨, 단백질, 폴리펩타이드 또는 글리신과 같은 아미노산, 항산화제, EDTA와 같은 킬레이트화제, 글루타티온, 애쉴버트(수산화알루미늄) 및 보존제 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 한가지 이상의 추가 활성 성분을 포함할 수 있다. 이펙터는 또한 증식 세포에 특이적인 세포 표면 수용체에 결합할 수 있는 표적화 잔기와 결합될 수 있다.

본 발명의 조성물은 경구, 비강, 정맥, 두개골내, 복막내, 피하내 또는 근육내 투여하는 등의 투여 방법에 맞도록 제형화될 수 있다. 본 발명의 다른 양태 범위내에서, 본원에서 설명하는 조성물은 서방성 이식물의 일부로 투여될 수 있다. 또 다른 양태의 범위내에서는, 본 발명의 조성물은 동결건조물에 안정성을 제공하는 적절한 부형제를 이용하여 동결건조물로 제형화한 후, 재수화할 수 있다.

상기에서 설명하는 바와 같이 약제학적 조성물은 본 발명의 방법에 의해 제공된다. 이와 같은 조성물에는 상기에서 설명하는 리보자임, DNA 분자, 단백질, 화합물질, 벡터 또는 숙주 세포와 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함한다. 일반적으로는 이와 같은 담체는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 독성이 없어야 한다. 정상적으로는 이와 같은 조성물은, 완충액, 아스코르브산과 같은 항산화제, 저분자량(10개 잔기 미만) 폴리펩타이드, 단백질, 아미노산, 글루코즈, 슈크로즈 또는 텍스트린을 포함하는 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트화제, 글루타티온, 다른 안정화제 및 부형제 등과 치료제를 배합하여 제조한다. 중성 완충된 염수 또는 비-특이적인 혈청 알부민과 혼합된 염수가 적절한 희석제로 예시된다.

또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 다양한 경로 예를 들면, 동맥내, 두개골내, 피부내, 간내, 근육내, 안구내, 복막내, 수막강내, 정맥내, 피하내 또는 중앙에 직접 투여하는 약물로 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 용기내에 넣을 수 있고, 용기에는 이와 같은 약제학적 조성물의 용도에 대한 지시사항을 제공하는 포장 물질이 포함된다. 일반적으로, 이와 같은 지시사항에는 시약 농도를 설명하는 실질적인 표시 및 특정 양태 범위내에서, 약제학적 조성물을 재구성하는데 필수적인 부형제 성분 또는 희석제(예를 들면, 물, 염 또는 PBS)의 상대적인 양이 기록되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 치료를 할 또는 예방할 질병에 적절한 방법으로 투여된다. 투여 빈도 및 투여량은 환자의 상태, 환자 질병의 유형 및 심각성과 같은 요인에 의해 결정된다. 투여량은 임상 실험동안에 가장 정확하게 결정된다. 환자는 임상 재발 징후, 이미지화 등을 포함하는 적절한 기술을 이용하여 치료 효과를 모니터링한다.

다음의 실시예는 본 발명을 설명하기 위함이고, 이에 한정시키고자 함은 아니다.

실시예

실시예 1

사람의 텔로머라제 유전자의 확인 및 분리.

사람의 텔로머라제 유전자는 암 세포주에서 작제된 cDNA 라이브러리에서 확인되었다. cDNA는 DNA 서열 분석을 한다 [Kilian et al., 상기].

EST 서열(GenBank 승인 번호 AA281296)은 유플로테스(*Euplotes*) 텔로머라제에 대한 BLAST 연구에 의해 부분적으로 텔로머라제 유전자 서열로 확인되었다(GenBank 승인 번호 U95964 ($p=3.2 \times 10^{-6}$)). 이들 두 서열간에 아미노산 서열 동일성은 약 38%이고, 아미노산 서열 유사성은 약 60%이다.

더 긴 hT1 클론을 얻기 위해, 종양 세포로부터 제조된 다수의 cDNA 라이브러리를 EST 서열내의 프라이머를 이용하여 증폭시켜 스크리닝하였다. EST 서열에 기초한 프라이머 HT1553F 및 HT1920R을 이용하여 다양한 cDNA 라이브러리에서 대략 350bp 단편을 증폭시켰다. 증폭 반응은 "고온 개시" 조건에서 수행하였다. 증폭 사이클은 95°C에서 4분; 80°C에서 1분; 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 과정을 30회; 및 72°C에서 5분으로 수행한다. 예상된 크기(~350 bp)의 증폭된 생성물은 스크리닝한 12개 라이브러리 중 3개에서만 검출되었다. 고환 cDNA 라이브러리, 체세포 라이브러리 및 다양한 암 cDNA 라이브러리에서는 단편이 검출되지 않았다. 그러나, 많은 350bp 단편이 LIM 1215 세포, 결장암 세포주의 cDNA 라이브러리에서 검출되었다. 이 라이브러리에서, 그리고 몇 가지 다른 라이브러리에서, 대략 170bp 단편이 증폭되었다.

두 가지 방법을 이용하여 LIM 1215 라이브러리에서 더 긴 클론을 수득한다: ^{32}P -표지된 EST 프로브를 사용한 플라크의 스크리닝 및 라이브러리 DNA에서 증폭. 53.2라고 지정한 1.9kb 삽입체를 가지는 단일 포지티브 플라크는 EST 프로브로 라이브러리를 하이브리드화하여 얻을 수 있다. 이 클론의 DNA 서열 분석에서는 이것이 EST 서열의 5' 및 3'서열 모두에 연장되어 있으나, 단일 개방 판독 프레임(ORF)을 포함하지는 않는다는 것을 설명한다. 라이브러리의 증폭 분석으로부터 수득된 단편은 서열의 크기에 있어서 53.2 단편과 유사하나 36bp 및 >300bp로 된 두 개의 추가 서열을 포함한다. 이와 같은 삽입으로 53.2 서열과 관련한 이들의 경계에서 수용체 서열 및 공여체 서열의 스플라이싱 특성을 설명하고, 스플라이싱되지 않은 인트론을 나타낸다. 프라이머 T7 및 HT1553F를 이용하여 증폭시키면, 약 1.6kb 단편이 만들어지고, 프라이머 T3 및 HT1893R를 이용하여 증폭시키면, 약 0.7kb 단편이 만들어진다. 이들 각 단편은 프라이머 HTEL1553F 및 HT1893R를 이용하여 320bp 단편의 증폭을 지원한다.

mRNA 샘플을 증폭시켜 더 긴 클론을 얻을 수 있다. LIM1215 mRNA에서 역전사효소 PCR(RT-PCR)에 의해 추가 PCR 생성물을 다수 확인하였는데, 본원에는 53.2에 대해 182bp 삽입체를 가지는 것이 포함되는데, 이로써 한 개의 개방 판독 프레임(ORF)을 가진다. 정상 조직 및 종양 조직으로부터 분리된 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 중첩 증폭 후에 RT-PCR은 Titan RT-PCR 시스템(Boehringer-Mannheim)을 이용하여 수행한다. 증폭 조건은 다음과 같다; 95°C에서 2분; 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 68°C에서 3분 사이클을 2회; 94°C에서 30초, 63°C에서 30초, 68°C에서 3분 사이클을 2회; 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 68°C에서 3분 사이클을 34회. RT-PCR 생성물은 100배 희석시키고, 1 μl 를 *Taq* 폴리머라제와 완충액 Q(Qiagen)를 이용한 중첩 증폭에 사용한다. 증폭 조건은 상기와 동일하나 단, 최종 단계는 14회 실시한다. 정상 조직 및 종양 조직의 경우에, 증폭 생성물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동에 의해 분해시키고, Zetaprobe 막으로 옮기고, 방사능 표지된 HT1691F로 프로빙시킨다.

DNA 서열은 LIM1215 mRNA에서 각각 cRACE 및 3'RACE 혼합물을 이용하여, 5' 및 3'을 연장시켜, hT1으로 지정된 3871bp 단편을 제공한다(도 1). 2회 cRACE를 수행하여, hT1 서열을 연장시키고, 전사 개시 부위의 지도를 작성한다. 500ng LIM1215 폴리A+ RNA를 주형으로 이용한다. 제1 가닥 cDNA 합성은 HT1576R 프라이머를 이용하여 개시한다. 결합 생성물(XL-PCR 시스템을 이용)에서 제1회 증폭에는 HT1157R 및 HT1262F 프라이머를 이용한다. 증폭 생성물은 Qiagen 컬럼을 이용하여 정제하고, 프라이머 HT1114R 및 HT1553F를 이용하여 증폭시킨다. 생성된 1.4kb 밴드를 DNA 서열분석하고, 이 서열에 기초하여 새로운 프라이머 세트를 디자인한다. 제 2회 cRACE를 위해서, 제1 가닥 cDNA는 HT220R 프라이머로 개시한다. 제1 회 증폭은 HT0142R 및 HT0141F 프라이머를 이용한다. 생성물은 상기와 같이 정제하고, HT0093 및 HT0163F 프라이머를 이용하여 증폭시킨다. 100bp 생성물이 관찰되면, 이를 두 개 별도의 실험에서 서열 분석을 하여, hT1 전사체의 5' 말단을 정의한다. LIM1215 RNA에서 프라이머 HtelFulcodT 5'-

AGGAGATCTCGCGATGCCGCGCGCTC-3' 및 HtelFulcodB 5'-TCCACGCGTCCTGCCCCGGGTG-3'를 이용하여 증폭하여, 전사체의 5' 말단을 얻는다. 만들어진 증폭된 생성물은 MluI 및 BglII로 절단하고, 남아있는 텔로머라제 cDNA 서열에 연결시킨다.

제1 라운드 증폭 및 제2 라운드 증폭 모두에서 EBHT18를 역방향 프라이머로 서 이용하고, 제1라운드 및 제2라운드에서 HT2761F 및 HT3114F를 각각 정방향 프라이머로서 이용하여, 증폭을 2 라운드(XL-PCR 시스템) 실시하여, 전사체의 3' 대부분 서열을 얻는다.

hT1의 크기는 LIM1215 RNA에서 가장 풍부한 노던 블롯에서 추정된(하기 참고) 크기와 잘 일치된다. 도 1에서는 대략 3.9kb DNA 서열을 나타내었다. EST에서 발견되는 서열은 1624 내지 2012번 뉴클레오타이드에 위치한 것이다. 가장 큰 개방 관독 프레임의 예상 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 단백질은 1132개 아미노산이다.

[표 2a]

명칭	올리고 서열
HT0028F	5'-GCTGGTGCAAGCGGGGACC
HT 5' Met	5'-CACAAAGCTTGAATTCACATCTCACCATGAAGGAGCTGGTGGCCCGAGT
HT0093R	5'-GGCACGCACACCAGGCACTG
HT0141F	5'-CCTGCCTGAAGGAGCTGGTG
HT0142R	5'-GGACACCTGGCGGAAGGAG
HT0163F	5'-CCGAGTGCTGCAGAGGCTGT
HT0220R	5'-GAAGCCGAAGGCCAGCACGTTCTT
HT1262F	5'-GTGCAGCTGCTCCGCCAGCACA
HT1114R	5'-GTTCCCAAGCAGCTCCAGAAACAG
HT1157R	5'-GGCAGTGCGTCTTGAGGAGCA
HT1553F	5'-CACTGGCTGATGAGTGTGTAC
HT1576R	5'-GACGTACACACTCATCAGCCAG
HT1590F	5'-GGTCTTTCTTTTATGTCACGGAG
HT1691F	5'-CACTTGAAGAGGGTGACGT
HT1875F	5'-GTCTCACCTCGAGGGTGAAG
HT1893R	5'-TTCACCCCTCGAGGTGAGACGCT
HT1920R	5'-TCGTAGTTGAGCACGCTGAAC
HT2026F	5'-GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA
HTM2028F	5'-CTGAGCTGTACTTTGTCAAGGACA
HT2230F	5'-GTACATGCGACAGTTTCGTGGCTCA
HT2356R	5'-CATGAAGCGTAGGAAGACGTCGAAGA
HT2482R	5'-CGCAAACAGCTTGTCTCCATGTC
HT2761F	5'-CTATGCCCGGACCTCCATCAGA
HT2781R	5'-CTGATGGAGGTCCGGGCATAG
HT3114F	5'-CCTCCGAGGCCGTGCAGT
HT3292B	5'-CACCTCAAGCTTTCTAGATCAGTCCAGGATGGTCTTGAAGTCA
HT3689R	5'-GGAAGGCAAAGGAGGGCAGGGCGA
EBHT 18	5'-CACGAATTCGGATCCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT
HT-RNA-F	5'-GGGTGCGGAGGGTGGGC
HT-RNA451R	5'-GCAGTGGTGAGCCGAGTCCTG
HT-RNA598F	5'-CGACTTTGGAGGTGCCTTCA

[표 2b]

명칭	올리고 서열
HTel 5'T	5'-GCTGGTGCAGCGCGGGACC
HTel979T	5'-GAGGTGCAGAGCGACTACTCCA
HTel1335T	5'-GTCTCACCTCGAGGGTGAAG
HTel71T	5'-GGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGA
HTel21B (Top)	5'-GCCAGAGATGGAGCCACCC
HTel21T (Bot)	5'-GGGTGGCTCCATCTCTGGC
HTel-7B	5'-CCGCACGCTCATCTTCCACGT
HTel+256B	5'-GCTTGGGATGAAGCGGTC
HTel인트론T	5'-CGCCTGAGCTGTACTTTGTCA
HTel 3'CODB	5'-CACCTCAAGCTTTCTAGATCAGCTAGCGGCCAGCCCAACTCCCCT
HTel 1210B	5'-GCAGCACACATGCGTCAAACCTGT
HTel 1274B	5'-GTGTCAGAGATGACGCGCAGGAA
HTel1624b	5'-ACCCACACTTGCCTGTCCTGAGT
hTR TAC	5'-ACTGGATCCTTGACAATTAATGCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAGGGTTCGGAGGG TGGGC
hTR 5'T7	5'-CTGTAATACGACTCACTATAGGGTTGCGGAGGGTGGGC
hTR 3' PstI	5'-CACCTGCAGACATGCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGCCAGCTGGCGACGCATGTG TGAGCCGAGTCCTG
BT-177	5'-GGATCCGCCGCAGAGACCGTCTG
BT-178	5'-CGAAGCTTTCAGTGGGCCGGCATCTGAAC
BT-179	5'-CGAAGCTTTCACAGGCCAGCCCAACTCC
BT-182	5'-GCGGATCCAGAGCCACGTCCTACGTC
BT-183	5'-GCGGATCCGTTTCAGATGCCGCCCCAC

실시예 2

hT1 서열 및 다른 텔로머라제와 배열

여러 서열을 배열하여, 예측되는 hT1 단백질이 이들의 전체 길이에 걸쳐 유플로테스 및 사카로마이세스 세레비지에 텔로머라제 촉매 서브유닛과 공동 선상에 있다는 것이 설명되었다(도 2). 세 가지 단백질간에 전체적인 상동성은 상대적으로 낮은 편이지만(모든 쌍 조합에서 대략 40%), 단백질의 전반적인 구조는 잘 보존된 것으로 보인다. 이들 세가지 단백질에는 4개 주요 도메인, 즉, N-말단, 기본, 역전사효소(RT), C-말단이 모두 존재한다. 서열 유사성이 가장 큰 지역은 RT 도메인이다. 분명한 것은 유플로테스 RT 도메인의 모든 모티프 특징이 존재하고, RT 촉매 반응에 연루된 모든 아미노산 잔기가 hT1 서열에서 보존된다[Lingner et al., Science 276:561-567, 1997].

최근에는, 사람 유방암 세포 추출물을 단백질 포스파타제 2A로 처리하면, 텔로머라제 활성이 억제되는 것으로 나타났다 [Li et al., J. Biol. Chem. 272:16729-16732, 1997]. 이 효과가 직접적인 것인지는 아직 밝혀지지는 않았지만, 단백질 인산화에 의해 텔로머라제 활성을 조절하는 것이 가능하다. 예측되는 hT1 단백질은 상당수의 잠재적 인산화 부위를 포함하는데, 예를 들면, 11SP 또는 TP 디헵타이드이며, 이는 세포 사이클 의존적인 키나제의 잠재적 부위이다.

실시예 3

텔로머라제 유전자의 특징

노던 분석 및 서던 분석을 수행하여 텔로머라제 전사체의 크기를 결정하고, 텔로머라제 유전자가 종양 세포에서 증폭되는지를 결정한다.

노던 분석을 위해서는, 폴리A mRNA는 LIM 1215 세포 및 CCD 섬유아세포에서 분리하였다. CCD는 1차 사람 섬유아세포주이다. 간략하게 설명하면, 세포는 세제(0.1% SDS) 및 200 μ g/ml 단백질분해효소 K를 포함하는 완충 용액(0.1M

NaCl, 10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA)에서 균질화반응에 의해 용해시킨다. SDS를 용해물질에 최종 농도가 0.5%가 되도록 부가하고, 용해물질은 60℃에서 1시간 그리고 37℃에서 20분간 항온 처리한다. 그 다음 용해물은 1시간동안 올리고 dT-셀룰로오즈 슬러리와 함께 항온 처리하는데, 이때 슬러리는 미리 0.1M NaOH로 순환을 시키고, 0.5M NaCl, 10mM Tris(pH7.4), 1mM EDTA, 및 0.1% SDS로 평형을 이룬 것이다. 수지는 원심분리에 의해 수집하고, 평형 완충액으로 배치를 세척하고, 컬럼에 로딩시킨다. mRNA는 따뜻한(37℃) 완충액(10mM Tris pH 7.4, 0.1mM EDTA)으로 용출시키고, 에탄올로 침전시킨다.

약 3 μ g 폴리아데닐화된 RNA는 0.85% 포르말데히드-아가로즈 겔에서 전기영동시키고[Sambrook et al., 상기], 하룻밤 동안 Genescreen plus 막(Bio-Rad, CA)에 전이시킨다. 당해 막을 ³²P-표지된 텔로머라제-특이적인 프로브(EST 서열에 상응하는 390bp 삽입체)로 하이브리드화시킨다. 매우 엄격한 상태에서 블롯을 세척한 후에, LIM 1215 mRNA에서 주요 ~3.8kb 밴드를 확인할 수 있으나, CCD 섬유아세포 mRNA에서는 관찰할 수 없다(도 3). 동일한 막을 글리세르알데히드 6-포스페이트 디하이드로게네이트에 대한 프로브와 연속하여 하이브리드화하면, 두 가지 mRNA에서 등가의 강력한 밴드가 나타나는데, 이는 각 레인에 유사한 양의 고품질 RNA를 포함한다는 것을 나타낸다. 더 큰 전사체(특히 ~8kb 이형분산된 밴드)가 LIM1215 RNA에만 존재한다는 것을 볼 수 있다(도 10, 상측 패널). 이와 같은 발견은 추가 hT1-특이적인 mRNA를 나타내고, hT1은 정상 세포보다는 종양 세포에서 우선적으로 발현된다는 것을 나타내는 것이다.

서던 분석에서, DNA는 사람의 말초 혈액 단핵 세포 및 LIM 1215에서 분리된다. 약 10 μ g DNA를 *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*로 절단시키고, 1% 아가로즈 겔에서 전기영동을 한 후에, 나일론 막으로 옮긴다. 대조군으로서, 사람 텔로머라제를 포함하는 플라스미드 DNA를 10 μ g 게놈 DNA당 10개 복사체, 5개 복사체 및 1개 복사체에 등가로 적정하고, 동일한 겔상에서 전기영동한다. 390bp 텔로머라제 유전자 단편(EST 서열을 포함)은 ³²P-표지하고, 통상적인 엄격한 조건 하에서 하이브리드화한다. 필터는 55℃에서 2X SSC, 0.1% SDS에서 세척한다. 스캐닝된 인광물질 상은 도 4에 나타내었다. 나타낸 바와 같이, 텔로머라제 유전자는 LIM1215에서 증폭되거나 재배열된 것으로 보이지 않는데, 이는 LIM 1215와 PBMC DNA를 비교하였을 때, 하이브리드화 패턴 또는 강도에서는 현저한 차이가 없다. 또한, 텔로머라제는 단일 복사체 유전자로 나타나는데, *PstI*을 제외한 모든 것은 단일 밴드를 생산한다.

실시예 4

hT1 발현 패턴

텔로머라제 활성이 종양 세포와 배자계열과 광범위하게 관련된 것이나, 특정 통상적인 포유류 조직은 매우 낮은 텔로머라제 활성을 발현시키는 것으로 최근에 확인되었다. 1차 섬유아세포 RNA에서는 hT1 발현이 검출되지 않았고, EST 부분에 대한 프라이머를 이용하여 폐, 심장, 간, 췌장, 해마, 태아 뇌, 고환으로 부터 수득된 시판되는 몇 가지 cDNA를 이용한 증폭에서는 어떠한 생성물도 나타나지 않았다.

그러나, 기존에 텔로머라제 활성을 가지는 것으로 나타난 정상 조직(결장, 고환, 말초 혈액 임파구)에서 hT1의 발현을 검사하고, 뿐만 아니라 흑색종 및 유방암 샘플에서도 hT1 발현을 감사하였다. RNA는 정상 사람 결장, 고환, 순환 임파구에서 분리하고, 종양 샘플의 조직 부분에서도 분리하였고, 이는 RT-PCR 분석을 한다. cDNA 증폭 생성물은 오염된 게놈 DNA로부터의 생성물과는 용이하게 구별되는데, ~300bp 생성물은 주형으로 cDNA를 이용하여 관찰되고, 2.7kb 생성물은 주형으로 게놈 DNA를 이용하여 관찰한다. hT1 전사체는 결장 및 고환, 및 대부분의 종양 샘플에서 검출되고, 임파세포 RNA에서는 매우 약하게 검출된다(도 5, 상측 패널). 흥미로운 것은, 두 개 유방암 샘플은 다른 샘플에 비해 필적할 정도의 양의 RNA를 포함하나 hT1 발현에 대해서는 네가티브인데, 이는 포지티브 대조군으로 β -액틴 증폭으로 판단할 수 있다(도 5, 하측 패널).

텔로머라제 활성을 수득하는 것은 불멸화 과정에 중요한 특징으로 보인다. RT-PCR 후 증폭된 프라이머로 증폭을 수행하여, 분열전 세포 배양물 및 분열후 세포주의 다수의 짝을 이룬 쌍에서 hT1의 발현을 결정한다(도 6, 상측 패널). 이와 같은 세포주는 각각 TRAP 분석을 이용하여, 텔로머라제 네가티브(분열전 세포주) 및 포지티브(분열후 세포주)가 된다 [Bryan et al., EMBO J. 14: 4240-4248, 1995]. 두 개의 짝을 이룬 쌍, BFT-3B 및 BET-3K에서, hT1은 분열후 세포주에서만 검출된다(레인 a, b와 레인 e, f). BFT-3K에서 분열후(레인 d, f)에서는 hT1 밴드가 풍부한 것으로 나타났는데, 동일한 크기의 단편이 분열전(레인 c, e) 배양물 샘플에 약하게 존재하는 것이다. 또한, 세 개의 분열후 세포주중에 두 개는 추가로 기대치 않은 320bp 단편이 존재하는 것으로 나타났고, 이와 같은 생성물은 고해상 겔에서 고환 및 결장 mRNA를 분석하였을 경우에 관찰되는 것이다.

세 가지 불멸화된 텔로머라제-네가티브(ALT) 세포주는 hT1 발현에 대해 분석하였다(도 6, 레인 g, h, i). 세포주 중 두 개는 hT1 발현에 대해 네가티브인 것으로 보이나, 한 개 세포주(IIICF-T/B1)에서는 약 320bp 생성물이 다시 증폭된 것으로 나타났는데(도 6, 레인 i), 이는 분열후 결장 및 고환 샘플의 것과 유사하다. IIICF-T/B1(ALT) 세포주에서 320bp 생성물의 DNA 분석에서는 예측 생성물에 대해 38bp 삽입체가 존재하는 것으로 나타났다. 동일한 프라이머를 이용하나 주형을 게놈 DNA를 이용한 증폭 실험을 수행하여, mRNA이외의 게놈 DNA에서 증폭될 가능성을 배제하였다. 이와 같은 조건하에서, 2.7kb 단편이 증폭되고, 이의 실체는 부분적인 서열 분석으로 확인하였다.

실시예 5

텔로머라제 mRNA의 선택적 스플라이싱 패턴의 확인

LIM1215 cDNA 라이브러리에서 취한 클론의 DNA 서열 분석, 분열전 및 분열후 배양물에 대해 상기에서 나타낸 RT-PCR 데이터를 보면, hT1 전사체내에 상이한 서열 변이체가 다수 존재한다는 것을 알 수 있다. 변이체에 대해 조직적으로 조사하기 위해, 전체 서열을 커버하는 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR을 수행한다. N-말단 및 기본 도메인에서는 변이체가 관찰되지 않았지만, RT 도메인 및 적어도 C-말단 도메인에서는 몇 가지 변이체가 확인되었다. 가장 주목할 만한 것은, RT 모티프 A 및 RT 모티프 B(도 7A)사이에 몇 가지 RNA 변이체가 있는 것이다.

mRNA 샘플은 통상적인 프로토콜을 이용하여 몇 가지 다른 종양으로부터 제조할 수 있다. 종양은 (1) SLL 폐암, (2) 임파종 C, (3) 폐암, (4) 수아세포종 A, (5) 임파종 B, (6) 임파종 E, (7) 종양 샘플 47D, (8) 호크롬성세포종, (9) 임파종 F, (10) 신경교종, (11) 임파종 G이다. 이들 샘플의 mRNA를 우선 cDNA로 역전사시키고, 프라이머 HT1875F 및 HT2781R를 이용하여 증폭시키고, 증폭된 프라이머 HT2026F 및 HT2482R를 이용하여 증폭시킨다. 네 가지 다른 증폭된 생성물은 도 8에서 관찰할 수 있다; 220bp(밴드 1); 250bp(밴드 2); 400bp(밴드 3); 430bp(밴드 4). 놀라운 것은, 증폭된 생성물의 총수와 생성물 사이에 정량적인 분포에서 테스트된 종양 샘플사이에 상당한 변화가 있었다.

이들 생성물중 세 가지를 여러 종양 조직에서 분리하여, DNA 서열 분석을 한다. 이들중에 하나인 220bp 단편은 LIM1215 라이브러리의 53.2 cDNA와 동등하다. ~250bp(밴드 2) 단편에는 36bp 프레임내 삽입체를 포함하는데, 이는 LIM1215 cDNA 라이브러리에서 증폭된 생성물에서 확인된 것과 동일한 삽입체이다. RT-PCR 생성물은 cDNA 라이브러리의 생성물과 동일한 서열을 가지기 때문에, 이는 36bp 삽입체가 라이브러리 작제동안에 발생하는 인공적인 것이 아니라는 것이다. 가장 큰 생성물(밴드 4)에는 250bp 앰플리콘(amplicon)과 비교하였을 때 182bp 삽입체(LIM1215 RNA로부터 초기에 증폭된 더 큰 생성물과 동일한)를 포함한다. 400bp 밴드(밴드 3)에 대한 명백한 서열을 구할 수는 없다. 크기에 기초하여, 본원에는 182bp 삽입체를 포함할 수는 있으나 밴드 2와 4에는 존재하나 밴드 1에는 없는 36bp 삽입체가 빠져 있다.

이와 같은 전사체가 존재한다는 가설을 시험하기 위해, 프라이머 HTM2028F는 36bp 단편이 상실되었을 때에만 증폭이 일어나도록 디자인하였다. HT2356R과 함께, HTM2028F 및 HT2026F 프라이머를 이용하는 증폭에서는 182bp 단편을 포함하나 36bp 단편을 상실한 전사체가 LIM1215 RNA에 존재한다는 것을 설명한다(도 9, 레인 a, b). HT2482R 프라이머와 함께, 동일한 상측 가닥 프라이머(HTM2028F 및 HT2026F)는 LIM1215 RNA로부터 수 많은 생성물을 증폭시키는 데(도 9, 레인 c, d), 이들 대부분은 PCR 생성물을 직접적인 서열 분석으로 확인하였을 때, 밴드 1 내지 4를 나타낸다. HTM2028F 및 HT2482R 프라이머를 이용한 증폭된 650bp 단편은 RT-모티프 A/RT 모티프 B 영역에서 아직 충분하게 특징이 조사되지 않은 선택적 방식으로 스플라이싱된 텔로머라제 변이체를 나타낸다. 명확하게 보여주기 위해, 참조 서열로써 유폴로테스 및 사카라마이세스 세레비지애와 가장 잘 일치하는 단백질 서열을 도 1에 나타내었다.

구체적으로는, 텔로머라제 RNA에 존재하는(또는 없는) 적어도 7개의 삽입체 또는 인트론이 존재한다. (1) 가장 5'-서열(Y)은 222 및 223번 염기에 위치한다; (2) 삽입체(X)는 1766 및 1767번 염기에 위치한다. 부분적인 서열이 결정되었고, 이는 도 10에 나타내었다. 종결 코돈은 모든 세 가지 판독 프레임에 존재한다. 따라서, 임의 RTase 모티프가 없는 말단 절단된 단백질이 생산될 수 있다. (2) 도 7에서 "1"로 지정된 서열은 1950 및 1951번 염기 사이에 위치한다. 이와 같은 인트론성 서열은 38bp이고(도 10), ALT 및 대부분의 종양 세포주에 존재하는 것으로 보인다. 이와 같은 서열의 존재로 13개 아미노산이 추가되어, 판독 프레임이 이동되고, 종결 코돈(TGA)은 1973번 뉴클레오타이드에서 프레임내에 위치한다. (3) 도 7에서 "α"로 지정된 서열은 2130 내지 2167번 염기에 위치한다. 이 서열은 36bp이고(도 10), 이것이 없는 경우에 RTase 모티프 "A"를 제거하나 판독 프레임을 변경시키지는 않는다. (4) 도 7에서 "β"로 지정된 서열은 2286 내지 2469번 염기 사이에 위치한다. 삽입체는 182 염기이고(도 10), 이것이 없는 경우에는 판독 프레임이 이동되고, RTase 모티프 5(뉴클레오타이드 2604)에 종결 코돈이 오게된다. (5) 도 7에서 "2"로 지정된 서열은 2843 및 2844번 염기에 위치한다. 이의 길이는 결정되지 않았지만, 부분적인 서열은 도 10에서 나타내었다. 이 삽입체가 존재함으로써, 삽입체의 제1 코돈이

중결 코돈이기 때문에 말단 절단된 텔로머라제 단백질이 된다. (6) 서열 "3"은 3157 및 3158번 염기 사이의 159bp 삽입체 (도 10)이다. 이것이 존재함으로써 변경된 COOH-말단을 가지는 텔로머라제 단백질을 만든다. 삽입체에는 중결 코돈을 포함한다. 또한, 서열 "3"에는 *c-abl*의 SH3 도메인에 대한 추정 결합 부위(PXXXXPXXP; PEMEPPRRP)를 가진다.

아미노산 유사성에 의해 유폴로테스 및 효모 텔로머라제와 가장 근접하게 배열되는 전사체는 서열 A와 B를 포함하는데, 서열 C는 포함되지 않는다. 서열 A, B, 및 C 조합을 포함하는 mRNA로부터 만들어진 8개 변이체의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열은 도 8에 제시하였다.

실시예 6

사람 텔로머라제의 재조합 발현

사람 텔로머라제는 세균성 발현 벡터에 클로닝한다. 도 1에서 나타내는 서열은 LIM 1215 mRNA로부터 두 조각으로 증폭되어, 함께 연결한다.

증폭을 위해, 제1 가닥 cDNA를 합성하고, 이를 증폭 반응에 이용하는데(Titan system, Boehringer, IN), DNA 폴리머라제 혼합물을 함께 사용하고, 열에 안정한 교정용 효소(예를 들면, *rTth*)는 *Taq* DNA 폴리머라제와 함께 이용한다. LIM 1215에서 mRNA는 서열 B가 부족한 만큼(도 9), 증폭 프라이머는 각 쌍의 한개 프라이머가 서열 B내에 뉴클레오타이드 2271에서 *SacI* 부위의 한 측면에 있도록 디자인한다(도 1). 5' 부분은 HT2356R 및 HT0028F 프라이머를 이용하여 cDNA로부터 우선 증폭시킨다(70°C, 2분; 그 다음 50°C에서 평형을 이룬 프라이머 서열 부가; 50°C에서 30분; 95°C에서 2분; 94°C, 30초; 65°C, 30초 사이클을 2회; 94°C, 30초; 63°C, 30초; 68°C에서 3분 사이클을 3회; 94°C, 30초; 60°C, 30초; 68°C, 3분 사이클을 32회). 텔로머라제 유전자의 5' 최말단 부분은 그 다음 *EcoRI/SacI*으로 처리된 pTTQ18(Amersham International plc, Buckinghamshire, England) 및 pBluescriptII KS+ 에 연결시키고, 서열을 검증한다.

3'말단을 얻기 위해, LIM 1215 cDNA는 텔로머라제의 용이하게 C-말단을 암호화하는 서열에 상보적인 HT2230F 및 HT3292B 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 증폭 생성물은 *HindIII* 및 *SacI*으로 처리하고, pTTQ18 및 pBluescriptII KS+ 에 삽입한다. 5' 및 3' 말단은 pTTQ18의 고유 *SacI* 부위에서 클로닝시켜 결합하면 헥사-His 융합 및 비-융합 단백질이 된다.

플라스미드 pTTQ18-Htel을 세균 세포(예를 들면, BL21(DE3))에 형질감염시킨다. IPTG 유도시에는 단백질이 과다 발현된다. 세균은 원심분리로 수득하고, 용해 완충액(20mM NaPO₄, pH 7.0, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 1mM DTT, 0.5μg/ml 루펩신, 1μg/ml 아프로토닌, 0.7μg/ml 펩스타틴)으로 용해시킨다. 이와 같은 혼합물은 폴리트론 균질화기를 통하여 고르게 현탁시키고, 유리 비드로 교반시키거나 마이크로유동화기에 통과시켜, 세포를 깬다. 생성된 용해물은 45분간 50,000rpm에서 원심분리한다. 상청액은 20mM NaPO₄, 1mM EDTA, pH 7.0(완충액 A)으로 희석한다. 희석된 용해물 상청액은 SP-세파로오즈 또는 등가 컬럼에 로딩시키고, 완충액 A에서 0 내지 30% SP 완충액 B(1M NaCl, 20mM NaPO₄, 1mM EDTA, pH 7.0) 농도 구배를 가지는 용액을 총 6개 컬럼 용적으로 제공한다. 텔로머라제를 포함하는 분취물을 혼합시킨다. 추가 정제를 수행할 수 있다.

헥사-His 융합 단백질의 경우에, 용해물은 원심분리를 이용하여 맑게하고 Ni-IDA-세파로오즈 컬럼에서 배치를 흡수시킨다. 매트릭스를 컬럼에 붙고, 일반적으로 50mM Tris pH 7.6, 1mM DTT; 50mM MES pH7.0, 또는 IMAC 완충액(헥사-his 융합용)으로 세척한다. 매트릭스에 결합된 텔로머라제 단백질은 NaCl을 포함하는 완충액으로 용출시킨다.

실시예 7

사람 텔로머라제 RNA 성분의 재조합 발현

게놈 DNA로부터 증폭시켜 우선 사람 텔로머라제 RNA 성분을 분리한다. 증폭 프라이머는 telRNA T 및 telRNA 598B이다(도 5). 증폭 조건은 다음과 같다; 95°C, 3분; 폴리머라제 추가; 80°C 2분; 94°C, 30초; 68°C, 2분 사이클을 35회.

증폭된 생성물은 hTR TAC 프라이머(tac 프로모터 서열을 가짐) 및 hTR 3'Pst 프라이머(cis-작용 리보자임 서열을 가짐)를 이용하여 또 다른 증폭후에 pBluescript에 삽입한다. pBluescript 삽입체를 분리하고, pACYC177에 연결시킨다.

실시예 8

사람 텔로머라제 하부 영역의 발현

몰로니(Moloney) MuLV 역전사효소와 서열을 비교하여 사람의 텔로머라제 RTase 도메인을 결정한다. 몰로니 MuLV 역전사효소의 핑거/바닥 부분은 결정화를 위한 안정된 단위를 형성한다[Georgiadis et al., Structure 3: 879, 1995]. 상당수의 잔기 및 모티프가 이들 두 개 단백질 활성 부분에서 보존된다. 프라이머는 RTase 도메인을 증폭시키고, 발현 벡터에 삽입하고, 연속하여 단백질 분리를 위한 핑거/바닥 도메인을 증폭시키도록 디자인하였다.

[표 3]

단편 ID	프라이머	아미노산
I	BT-177/BT-178	AAEH...→...VQMPAH
II	BT-177/BT-179	AAEH...→...VGLGL
III	BT-182/BT-179	RATS...→...VGLGL
IV	BT-183/BT-179	VQMPAH...→...VGLGL

단편 I는 MoMuLV에 상응하는 "핑거 및 바닥(finger and palm)" 도메인을 암호화한다. C-말단의 "엄지(thumb)" 및 "연결부(connection)"[Kohlstaedt et al., Science 256: 1783, 1992]는 결실되었다. 단편 II는 텔로머라제 역전사효소 도메인 뿐만 아니라 C-말단 "연결" 도메인을 암호화한다. N-말단은 MoMuLV RTase 구조와 크기를 비교하여 선택한다. 단편 III은 단백질의 C-말단을 암호화한다. RATS 서열은 단백질의 RTase 도메인(바닥 부분)내에 위치한다. 단편 IV는 "엄지" 및 "연결" 도메인을 포함하는 C-말단 부분을 암호화하고, 조절 인자로써 기능을 한다. HIV-1에서 연결 도메인은 RNase 도메인 없이 HIV RTase의 촉매 부분을 차단할 수 있는 능력을 가진다[Kohlstaedt et al, 상기]. 유사한 방식으로, C-말단 부분은 조절(억제성) 단편으로 유용하다. 또한, 서열 C는 *c-abl*의 SH3에 대한 추정 결합 부위(PXXXXPXXP; PEMEPPRRP, 도 8의 변이체 2의 서열)를 가진다. *c-abl* 단백질은 ATM(ataxia telangiectasia) 단백질과 직접적으로 상호작용하는데[Shafman et al., Nature 389: 520, 1997], 이 단백질은 세포-주기 조절, 감수분열 재조합, 말단소립 길이 모니터링 및 DNA 손상 반응에 관여하는 것으로 보인다. 표준 단백질 상호작용 방법으로 *c-abl* 단백질 결합을 평가한다. 이와 같이 텔로머라제와 *c-abl* 또는 다른 SH3-도메인을 포함하는 단백질(예를 들면, *erb2*)과의 상호작용 및 촉매 부위 안팎으로 텔로머라제 C-말단의 이동으로 인한 제어 등은 본원에서 설명하는 작제물 및 생성물을 이용하여 조절할 수 있다. 한 경우에, 인산화 반응/탈인산화 반응으로 조절을 매개할 수 있다.

모든 프라이머는 *Hind*III 또는 *Bam*HI 부위를 가진다. 증폭 반응은 1X *Pfu* 완충액, 250μM dNTP, 100ng 각 프라이머, 클론 53.2 주형 DNA에서 다음의 순환 조건을 이용하여 수행한다; 94℃에서 2분; 55℃, 60℃ 또는 65℃에서 2분, 72℃에서 2분, 94℃에서 1분 사이클을 25회; 72℃에서 10분. 예측한 크기의 생성물을 얻을 수 있다(BT-177/BT-178의 경우는 966bp; BT-177/BT-179의 경우는 1479bp; BT-182/BT-179의 경우는 824bp; BT-183/BT-179의 경우는 529bp). 증폭된 생성물은 페놀:CHCl₃로 추출하고, 에탄올로 침전시킨다. 생성물은 재현탁시키고, 프라이머 서열을 절단할 수 있는 적절한 효소로 절단한다.

절단된 생성물은 적절한 말단을 남겨두는 효소로 처리된 pBluescript에 연결시킨다. 삽입체는 *Hind*III로 처리하고, 부분적으로 *Bam*HI로 처리하여, pGEX에 연결시킨다. 플라스미드는 BL21(DE3) 세포에 형질감염시키고, 암피실린 플레이트에서 선택한다. 콜로니를 찍어내어, 액상 브로쓰에서 하룻밤동안 생장시킨다. 배지 한 방울을 100μg/ml 암피실린을 포함하는 Terrific 브로쓰로 희석한다. 세포는 37℃에서 생장시키고, 약 O.D. 0.8일 때 0.5mM IPTG로 유도한다. 생장은 5시간동안 지속시킨다. 세포는 원심분리로 수집하여, 즉시 가공하거나 사용할 때까지 냉동시킨다.

용해된 세포로부터 단백질을 정제한다. 세포 펠렛은 50mM Tris pH 8.0, 10mM 2-ME, 1mg/ml 리소자임, 0.5% Triton X-100, 1μg/ml 웨스타틴, 10μg/ml 루펩틴, 10μg/ml 아프로티닌, 0.5mM PMSF, 2mM EDTA에서 와동시키고, 냉동/해동 과정을 반복하여 용해시킨다. 용해물은 원심분리하여 정제한다. 상청액을 GSH-세파로오즈 50% 슬러리에 부가하고, 4℃에서 2시간 동안 회전시킨다. 매트릭스는 용해 완충액으로 2회 세척한 다음, 50mM Tris, pH 8.0, 10mM 2-ME로 세척한다. SDS-PAGE 겔 전기영동 분석을 하기 위해, 150mM 2-ME가 포함된 샘플 완충액을 부가하고, 샘플을 가열한다.

실시예 9

쥐 텔로머라제 유전자의 분리

쥐 텔로머라제는 게놈 또는 cDNA 라이브러리로부터 분리하였다. 마우스 게놈 라이브러리는 균주 129DNA로부터 λFIX II 벡터에서 작제하였다. 라이브러리를 플레이팅하고, 플라크는 나일론 막에 옮긴다. 막은 통상적인 엄격한 조건하에서 클론 53.1(1.9 kb)의 삽입체와 하이브리드한다. 추가 분석을 위해 6개 하이브리드 플라크를 선택하였다.

실시예 10

hT-1 및 텔로머라제 변이체를 이용하여 텔로머라제 활성 입증

전장 hT-1 서열을 발현 벡터에 클로닝시키고, 텔로머라제 활성에 대해 생성된 단백질을 분석하였다. 벡터 pRc/CMV2 (Invitrogen, Carlsbad, CA)는 프로모터, RSV LTR, 폴리아데닐화 반응 시그널, 및 소 성장 호르몬 유전자의 전사 종결 서열 사이에 많은 클로닝 부위를 가지는 진핵세포 발현 벡터이다. Leu49 코돈이 Met 코돈으로 전환된 텔로머라제 서열을 pRc/CMV2에 삽입하였다. 추가 연구를 위해 한 개 클론, phTC51을 선택하였다. 5' 접합부의 DNA 서열을 결정하고, 삽입체의 방향을 확인하였다. 연속하여, 3' 접합부의 서열을 결정하였고, 폴리A 시그널이 결실되었으나 텔로머라제 암호화 서열이 결실되지는 않았다는 것을 알 수 있다.

클론은 HeLa GM847 세포에 44 및 68회 계대 시점에서 형질감염시키고, SUSM-1 세포에는 18회 계대 시점에서 형질감염시키고, RKF-T/A6세포에는 40회 계대 시점에서 형질감염시켰다. 세포 추출물은 본원에서 설명하는 TRAP 검사로 텔로머라제 활성을 검사하였다. 도 12에서 볼 수 있는 바와 같이, 텔로머라제 활성을 나타내는 사다리모양의 생성물은 SUSM-1 세포 추출물 1:100 희석물에서는 볼 수 있지만, 대조군 세포에서는 볼 수 없었다. 사다리모양은 농도가 높은 추출물에서는 잘 검출되지 않는데, 이는 추출물에 나타난 뉴클레아제 활성 때문이다.

세가지 텔로머라제 변이체를 작제하였는데; pAKI.4는 베타 부분이 스플라이싱 아웃된 텔로머라제(도 13)이고; pAKI.7는 또 다른 C-말단 삽입체 3을 가지는 텔로머라제이고(도 14); pAKI.14는 알파 부분이 스플라이싱 아웃된 텔로머라제이다(도 15). 텔로머라제 유전자의 5' 말단은 이들 각 세 개 벡터에 삽입하였고, 삽입체는 pCIneo 발현 벡터로 이동되었다. pCIneo에 나타난 참조 텔로머라제와 함께 변이체를 일시적으로 GM847 세포에 형질감염시켰고, 이때 이 세포는 검출할 정도의 텔로머라제 활성을 가지지 않으나 RNA 서브유니트를 발현시키는 ALT 세포이다. 세포 추출물은 RNA 검사에서 테스트하였다. 참조 텔로머라제 및 삽입체 3을 가지는 텔로머라제(pAKI.7 삽입체)는 활성을 나타내었으나, 다른 변이체는 활성을 나타내지 않았다.

전술한 것으로부터, 본 발명은 설명을 목적으로 특정 양태를 통하여 설명하였으나, 본 발명의 범위를 벗어나지 않고, 다양한 변화가 가능하다는 것을 인지할 것이다. 따라서, 본 발명은 청구범위에 한정한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

도 1의 참조 사람 텔로머라제를 암호화하도록 스플라이싱될 수 있는 유전자 서열의 스플라이스 변이체로서,

(b) 도 1A - 1E의 1950번 뉴클레오타이드 이후에 선택적 인트론/엑손 1(도 10에 제시된 서열 1의 아미노산 서열)을 암호화하는 핵산 서열의 삽입;

(c) 도 1A - 1E의 2131번 뉴클레오타이드 부터 2166번 뉴클레오타이드 까지의 결실;

(d) 도 1A - 1E의 2287번 뉴클레오타이드 부터 2468번 뉴클레오타이드 까지의 결실;

(e) 도 1A - 1E의 2843번 뉴클레오타이드 이후 5'말단에 도 10에 제시된 서열 2의 뉴클레오타이드 1번 내지 226번으로 이루어진 핵산 서열의 삽입; 및

(f) 도 1A - 1E의 3157번 뉴클레오타이드 이후 선택적 인트론/엑손 3(도 10에 제시된 서열 3의 아미노산 서열)을 암호화하는 핵산 서열의 삽입

중 1 내지 5개의 삽입 또는 결실을 가지며, 도 1A - 1E에 제시된 아미노산 서열을 암호화하지 않는 스플라이스 변이체를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 2.

제1항에 있어서, 도 11A, 11B-C, 11D-E, 11J-K, 11L-M, 11N-O, 11P-Q, 11R-S 또는 11T-U에 나타낸 아미노산 서열 중 하나를 암호화하는 핵산 분자.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

제1항에 따른 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 벡터.

청구항 13.

제12항에 있어서, 세균 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 및 효모 벡터로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 발현 벡터.

청구항 14.

제12항에 따른 벡터를 함유하는 숙주 세포.

청구항 15.

제14항에 있어서, 사람 세포, 원숭이 세포, 마우스 세포, 랫트 세포, 효모 세포 및 세균 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 숙주 세포.

청구항 16.

제1항 또는 제2항에 따른 핵산 분자에 의해 암호화되는 단백질.

청구항 17.

사람 텔로머라제 단백질을 생산하기 위해 제14항에 따른 숙주 세포를 배양함을 포함하는, 사람 텔로머라제 단백질의 제조 방법.

청구항 18.

도 1에 나타낸 사람 텔로머라제 또는 제1항에 언급된 이의 스플라이스 변이체의 서열 또는 이들의 상보적인 서열로 이루어진 15개 내지 3396개 뉴클레오타이드 길이의 분리된 핵산 분자.

청구항 19.

도 1에 나타낸 사람 텔로머라제 또는 제1항에 언급된 이의 스플라이스 변이체의 서열 또는 이의 상보적인 서열로 이루어진 표지된 분리된 핵산 분자.

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

제19항에 있어서, 표지가 방사성 표지, 화학발광성 표지, 효소 표지, 형광 표지 또는 바이오틴인 분리된 핵산 분자.

청구항 24.

제18항 또는 제19항에 있어서, 20, 25, 30, 40 또는 50개 내지 3396개 뉴클레오타이드 길이인 분리된 핵산 분자.

청구항 25.

삭제

청구항 26.

삭제

청구항 27.

삭제

청구항 28.

삭제

청구항 29.

삭제

청구항 30.

도 1에 제시된 핵산 분자에 의해 암호화되는 사람 텔로머라제 단백질 또는 제1항의 핵산 분자에 의해 암호화되는 이의 스플라이스 변이체에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 31.

제30항에 있어서, 도 10A 및 10B에 나타난 바와 같은 영역 1, 영역 α , 영역 β 또는 영역 3으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 항체.

청구항 32.

제31항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 33.

제32항에 따른 항체를 생산하는 하이브리도마.

청구항 34.

도 11에 제시된 사람 텔로머라제 단백질과 반응하는 항-사람 텔로머라제 항체 또는 태그된 텔로머라제 결합 화합물을 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 35.

제19항에 따른 핵산 분자를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 36.

환자 세포의 RNA로부터 합성된 cDNA로부터 텔로머라제 핵산을 증폭시킬 수 있는 증폭 프라이머쌍 및 도 10A 및 10B에 나타낸 바와 같은 영역 1, 영역 α , 영역 β , 영역 2의 뉴클레오타이드 1번-226번 또는 영역 3의 서열중 15 내지 226개 뉴클레오타이드로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 37.

삭제

청구항 38.

삭제

청구항 39.

삭제

청구항 40.

도 10A 및 10B에 나타낸 바와 같은 영역 1, 영역 α , 영역 β , 영역 2의 뉴클레오타이드 1번-226번 또는 영역 3의 서열 중 15 내지 226개 뉴클레오타이드에 상보적인 안티센스 핵산 서열로 이루어진, 사람 텔로머라제 활성의 억제제.

청구항 41.

활성부위가 도 10A 및 10B에 나타낸 바와 같은 영역 1, 영역 α , 영역 β , 영역 2의 뉴클레오타이드 1번-226번 또는 영역 3의 서열 중 15 내지 226개 뉴클레오타이드에 상보적인 안티센스 핵산 서열로 이루어진 리보자임인, 사람 텔로머라제 활성의 억제제.

청구항 42.

삭제

청구항 43.

(a) 후보 이펙터를, 제1항 또는 제2항에 따른 분리된 핵산 분자에 의해 암호화되는 사람 텔로머라제 단백질, RNA 성분 및 주형의 혼합물에 부가하고;

(b) 텔로머라제 활성을 검출하며;

(c) 단계 (b)의 활성량을 후보 이펙터가 없는 대조군 혼합물에서의 활성량과 비교하여, 이로 부터 이펙터를 확인하는 단계를 포함하여, 사람 텔로머라제 활성의 이펙터를 확인하는 방법.

청구항 44.

삭제

청구항 45.

삭제

청구항 46.

삭제

청구항 47.

삭제

청구항 48.

삭제

청구항 49.

삭제

청구항 50.

삭제

청구항 51.

삭제

청구항 52.

삭제

청구항 53.

삭제

청구항 54.

삭제

청구항 55.

삭제

청구항 56.

삭제

청구항 57.

삭제

청구항 58.

삭제

청구항 59.

삭제

청구항 60.

삭제

청구항 61.

삭제

청구항 62.

삭제

청구항 63.

삭제

청구항 64.

삭제

도면

도면1A

사람 텔로머라제

ATGCCGCGCGCTCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAG	60
MetProArgAlaProArgCysArgAlaValArgSerLeuLeuArgSerHisTyrArgGlu	20
GTGCTGCCGCTGGCCACGTTCTGTGCGGCGCCTGGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGCAG	120
ValLeuProLeuAlaThrPheValArgArgLeuGlyProGlnGlyTrpArgLeuValGln	40
CGCGGGGACCCGGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGGCCAGTGCCTGGTGTGCGTCCCTGG	180
ArgGlyAspProAlaAlaPheArgAlaLeuValAlaGlnCysLeuValCysValProTrp	60
GAGGCACGGCCGCCCCCGCGCCCTCCTTCGCGCAGGTGTCTGCCTGAAGGAGCTG	240
AspAlaArgProProAlaAlaProSerPheArgGlnValSerCysLeuLysGluLeu	80
GTGGCCCGAGTGTGCAGAGGCTGTGCGAGCGCGGCGGAAGACGTGCTGGCCTTCGGC	300
ValAlaArgValLeuGlnArgLeuCysGluArgGlyAlaLysAsnValLeuAlaPheGly	100
TTGCGCTGCTGGACGGGGCCCGGGGGCCCCCGAGGCCTTACCACCAGCGTGC	360
PheAlaLeuLeuAspGlyAlaArgGlyGlyProProGluAlaPheThrThrSerValArg	120
AGCTACCTGCCCAACACGGTGACCGACGCACTGCGGGGAGCGGGGCGTGGGGCTGCTG	420
SerTyrLeuProAsnThrValThrAspAlaLeuArgGlySerGlyAlaTrpGlyLeuLeu	140
TTGCGCCGCGTGGGCGACGACGTGCTGGTTCACCTGCTGGCACGCTGCGCGCTTTTGTG	480
LeuArgArgValGlyAspAspValLeuValHisLeuLeuAlaArgCysAlaLeuPheVal	160
CTGGTGGCTCCCAGCTGCGCTACAGGTGTGCGGGCCGCGCTGTACCAGCTCGGCGCT	540
LeuValAlaProSerCysAlaTyrGlnValCysGlyProProLeuTyrGlnLeuGlyAla	180
GCCACTCAGGCCCGGGCCCCGCCACGCTAGTGGACCCGAAGCGTCTGGGATGCGAA	600
AlaThrGlnAlaArgProProHisAlaSerGlyProArgArgArgLeuGlyCysGlu	200
CGGGCCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGGCCGGGGTCCCCCTGGGCTGCCAGCCCCGGT	660
ArgAlaTrpAsnHisSerValArgGluAlaGlyValProLeuGlyLeuProAlaProGly	220
GCGAGGAGCGCGGGGCGAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTTGCCAAGAGGCCAGGCGT	720
AlaArgArgArgGlyGlySerAlaSerArgSerLeuProLeuProLysArgProArgArg	240

도면1B

GGCGCTGCCCCCTGAGCGGAGCGGACGCCCGTTGGGCAGGGGTCTGGGCCACCCGGGC	780
GlyAlaAlaProGluProGluArgThrProValGlyGlnGlySerTrpAlaHisProGly	260
AGGACGCGTGGACCGAGTGACCGTGGTTTCTGTGTGGTGTCACCTGCCAGACCCGGCGAA	840
ArgThrArgGlyProSerAspArgGlyPheCysValValSerProAlaArgProAlaGlu	280
GAAGCCACCTCTTTGGAGGTGCGCTCTCTGGCACGCGCCACTCCCACCATCCGTGGGC	900
GluAlaThrSerLeuGluGlyAlaLeuSerGlyThrArgHisSerHisProSerValGly	300
CGCCAGCACACGCGGGCCCCCATCCACATCGCGGCCACACGTCCTGGGACACGCCT	960
ArgGlnHisHisAlaGlyProProSerThrSerArgProProArgProTrpAspThrPro	320
TGTCGCCCGGTGTACGCCGAGACCAAGCACTTCTCTACTCCTCAGGCGACAAGGAGCAG	1020
CysProProValTyrAlaGluThrLysHisPheLeuTyrSerSerGlyAspLysGluGln	340
CTGCGGCCCTCCTTCTACTCAGCTCTCTGAGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC	1080
LeuArgProSerPheLeuLeuSerSerLeuArgProSerLeuThrGlyAlaArgArgLeu	360
GTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGGACTCCCGCAGGTTGCC	1140
ValGluThrIlePheLeuGlySerArgProTrpMetProGlyThrProArgArgLeuPro	380
CGCCTGCCAGCGCTACTGGCAAATGCGGCCCTGTTTCTGGAGCTGCTTGGGAACAC	1200
ArgLeuProGlnArgTyrTrpGlnMetArgProLeuPheLeuGluLeuLeuGlyAsnHis	400
GCGCAGTGCCCTACGGGGTGCTCCTCAAGACGCACTGCCCGCTGCGAGCTGCGGTCACC	1260
AlaGlnCysProTyrGlyValLeuLeuLysThrHisCysProLeuArgAlaAlaValThr	420
CCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCGGGAGAAGCCCCAGGGCTCTGTGGCGGCCCCGAGGAG	1320
ProAlaAlaGlyValCysAlaArgGluLysProGlnGlySerValAlaAlaProGluGlu	440
GAGGACACAGACCCCGTCGCCTGGTGCAGCTGCTCCGCCAGCACAGACCCCTGGCAG	1380
GluAspThrAspProArgArgLeuValGlnLeuLeuArgGlnHisSerSerProTrpGln	460
GTGTACGGCTTCGTGCGGGCTGCCTGCGCCGGCTGGTGCCCCAGGCCTCTGGGGCTCC	1440
ValTyrGlyPheValArgAlaCysLeuArgArgLeuValProProGlyLeuTrpGlySer	480
AGGCACAACGAACGCCCTTCCTCAGGAACCAAGAAGTTTCATCTCCCTGGGGAAGCAT	1500
ArgHisAsnGluArgArgPheLeuArgAsnThrLysLysPheIleSerLeuGlyLysHis	500

도면1C

GCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCTGACGTGGAAGATGAGCGTGCAGGGGCTGCGCTTGGCTG	1560
AlaLeuSerLeuGlnGluLeuThrTrpLysMetSerValArgAspCysAlaTrpLeu	520
CGCAGGAGCCAGGGGTTGGCTGTGTTCCGGCCGAGAGCACCCTGCGTGAGGAGATC	1620
ArgArgSerProGlyValGlyCysValProAlaAlaGluHisArgLeuArgGluGluIle	540
CTGGCCAAGTTCCTGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTGCGAGCTGCTCAGGTCTTTC	1680
LeuAlaLysPheLeuHisTrpLeuMetSerValTyrValValGluLeuLeuArgSerPhe	560
TTTTATGTACGGAGACCACGTTTCAAAGAACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTC	1740
PheTyrValThrGluThrThrPheGlnLysAsnArgLeuPhePheTyrArgLysSerVal	580
TGGAGCAAGTTGCAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGACGTGCGGGAG	1800
TrpSerLysLeuGlnSerIleGlyIleArgGlnHisLeuLysArgValGlnLeuArgGlu	600
CTGTCGGAAGCAGAGGTGAGGAGCATCGGGAAGCCAGGCCGCCCTGCTGACGTCCAGA	1860
LeuSerGluAlaGluValArgGlnHisArgGluAlaArgProAlaLeuLeuThrSerArg	620
CTCCGCTTCATCCCAAGCCTGACGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTGCTG	1920
LeuArgPheIleProLysProAspGlyLeuArgProIleValAsnMetAspTyrValVal	640
GGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGAGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAAGCA	1980
GlyAlaArgThrPheArgArgGluLysArgAlaGluArgLeuThrSerArgValLysAla	660
CTGTTGAGCGTGCTCAACTACGAGCGGGCGCGGCCCGGCCCTCTGGGCGCCTCTGTG	2040
LeuPheSerValLeuAsnTyrGluArgAlaArgArgProGlyLeuLeuGlyAlaSerVal	680
CTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCTGGCGCACCTTCGTGCTGCGTGCGGGCCAG	2100
LeuGlyLeuAspAspIleHisArgAlaTrpArgThrPheValLeuArgValArgAlaGln	700
GACCCGCCGCTGAGCTGTACTTTGTCAAGGTGGATGTGACGGGCGGTACGACACCATC	2160
AspProProProGluLeuTyrPheValLysValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIle	720
CCCCAGGACAGGCTACGGAGGTATCGCCAGCATCATCAACCCAGAACACGTAAGTGC	2220
ProGlnAspArgLeuThrGluValIleAlaSerIleIleLysProGlnAsnThrTyrCys	740
GTGCGTCGGTATGCCGTGGTCCAGAAGGCCGCCATGGGCACGTCCGCAAGGCCTTCAAG	2280
ValArgArgTyrAlaValValGlnLysAlaAlaHisGlyHisValArgLysAlaPheLys	760

도면1D

AGCCACGCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCTGGCTCACCTG SerHisValSerThrLeuThrAspLeuGlnProTyrMetArgGlnPheValAlaHisLeu	2340 780
CAGGAGACCAGCCCGCTGAGGGATGCCGTCGTATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAG GlnGluThrSerProLeuArgAspAlaValValIleGluGlnSerSerSerLeuAsnGlu	2400 800
GCCAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTCATGTGCCACCGCCGTGCCATC AlaSerSerGlyLeuPheAspValPheLeuArgPheMetCysHisHisAlaValArgIle	2460 820
AGGGGCAAGTCTACGTCCAGTGCCAGGGGATCCCGCAGGGCTCCATCCTCTCCACGCTG ArgGlyLysSerTyrValGlnCysGlnGlyIleProGlnGlySerIleLeuSerThrLeu	2520 840
CTCTGCAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAGCTGTTTGGCGGGATTGGCGGGAC LeuCysSerLeuCysTyrGlyAspMetGluAsnLysLeuPheAlaGlyIleArgArgAsp	2580 860
GGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGATGATTTCTTGTGGTGACACCTCACCTCACCCACGCG GlyLeuLeuLeuArgLeuValAspAspPheLeuLeuValThrProHisLeuThrHisAla	2640 880
AAAACCTTCCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTG LysThrPheLeuArgThrLeuValArgGlyValProGluTyrGlyCysValValAsnLeu	2700 900
CGGAAGACAGTGGTGAACCTCCCTGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCACGGCTTTTGT ArgLysThrValValAsnPheProValGluAspGluAlaLeuGlyGlyThrAlaPheVal	2760 920
CAGATGCCGGCCACGGCCTATTCCCTGGTGGCGCTGCTGCTGGATACCGGACCCCTG GlnMetProAlaHisGlyLeuPheProTrpCysGlyLeuLeuLeuAspThrArgThrLeu	2820 940
GAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCAGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTC GluValGlnSerAspTyrSerSerTyrAlaArgThrSerIleArgAlaSerLeuThrPhe	2880 960
AACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGCTTTGCGGCTG AsnArgGlyPheLysAlaGlyArgAsnMetArgArgLysLeuPheGlyValLeuArgLeu	2940 980
AAGTGTACAGCCTGTTTCTGGATTGTCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAAC LysCysHisSerLeuPheLeuAspLeuGlnValAsnSerLeuGlnThrValCysThrAsn	3000 1000
ATCTACAAGATCCTCCTGCTGCAGGCGTACAGGTTTCACGCATGTGTGCTGCAGCTCCCA IleTyrLysIleLeuLeuLeuGlnAlaTyrArgPheHisAlaCysValLeuGlnLeuPro	3060 1020

도면1E

TTTCATCAGCAAGTTTGAAGAACCCACATTTTCTGCGCGTCATCTCTGACACGGCC	3120
PheHisGlnGlnValTrpLysAsnProThrPhePheLeuArgValIleSerAspThrAla	1040
TCCTCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCAGGGATGTCGCTGGGGGCCAAGGGC	3180
SerLeuCysTyrSerIleLeuLysAlaLysAsnAlaGlyMetSerLeuGlyAlaLysGly	1060
GGCGCCGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCCGTGCAGTGGCTGTGCCACCAAGCATTCTGCTC	3240
AlaAlaGlyProLeuProSerGluAlaValGlnTrpLeuCysHisGlnAlaPheLeuLeu	1080
AAGTCTGCTGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGACAGCCAG	3300
LysLeuThrArgHisArgValThrTyrValProLeuLeuGlySerLeuArgThrAlaGln	1100
ACGCAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGACGACGCTGACTGCCCTGGAGGCCGACGCCAAC	3360
ThrGlnLeuSerArgLysLeuProGlyThrThrLeuThrAlaLeuGluAlaAlaAlaAsn	1120
CCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGACTgatggccacccgcccacagccag	3420
ProAlaLeuProSerAspPheLysThrIleLeuAsp	1132
Gccgagagcagacaccagcagccctgtcacgcccgggtcttacgtcccagggaggaggagg	3480
Cggccacacccagggccgcaccgctgggagctctgaggcctgagtgagtgttggccgag	3540
gcctgcatgtccggctgaaggctgagtgccggctgaggcctgagcgagtgccagccaa	3600
gggctgagtgccagcacacctgcccgtcttcacttcccacaggctggcgctcggctcca	3660
ccccagggccagcttttccctaccaggagcccggttccactccccacataggaatagtc	3720
catccccagattcgccattgttcacccctcgccctgccttcttgccttccacccccac	3780
catccaggtggagaccctgagaaggaccctgggagctctgggaatttgagtgaccaaag	3840
gtgtgccctgtacacaggcgaggaccctgcacctggatgggggtccctgtgggtcaaat	3900
ggggggagggtgctgtgggagtaaaatactgaatatatgagttttcagttttgaaaaaa	3960
aaaa	3964

도면2A

유플로테스 1 -----MEVDVNDQADNHGHSALKTCEEIKEAKTLYSWIQKVICR--NQSQSHYKDLEDIK
 HT1 1 RRLGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCYPWDAR-PPAAPSFQVQVCLKELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGA
 EST2 1 -----MKILFEFIQDKLDD--LQTNSTYKENLKCG

유플로테스 56 IFAQTNIIVATPRDYNEEDFKVIARK-----EVFSTGLMIELIDKCLVELLSSDVSQRQKLCQCFGQKGMQ-LAK
 HT1 80 RGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDVVLVHLLARCALFVLVAPSCAY--QVCGPPLYQLGAATQA
 EST2 30 HFNGLDEILTT-CFALPNSRKIALP-----CLPGDLSHKAVIDHCIIYLLTGELYNN--VLTFGYKIARNEDVNN

유플로테스 26 THLLTALSTQKQYFFQDEWNVQVRAMIGNELFRHYTKYLIFQRTSEGLVQFCGNVDFHLKVNDFKQKQKGAADMNE
 HT1 157 RPPPHASGPRRLGGERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSLPLKPRPRGAPEPERTPVQGSWAHPGRTRG
 EST2 97 SLFCHSANVNVTLKGAAMKMFHSLVGTAFVDLLINYTVIQFNGQ-FFTQIVGNRCNEPHLPKXWQVRSSSS-----

유플로테스 206 PRCCSTCKYNVKNKDHFLNNI-----NVPNNWNMKSRTIRFYCTHFARNNQFF
 HT1 237 PSDRGFCVVSAPPAEEATSLEGALSGTRHSPSVGRQHAGPPSTRPRPWPOTPCPPVYAEKHFLYSSGDK--EQLR
 EST2 169 ----SATAAQIKQLTEPVTN-----KQFLHKLNN--SSSFF

유플로테스 255 KKHEFVSNKNNISAM-DRAQTIFTNI-----FRFNRIKKLKDVKIEIAYMLEKVKDFNFNYLTKSCPLPENWRE
 HT1 315 PSFLLSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRY-WQMRPLFELLGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTP
 EST2 200 PYSKILPSSSSIKKLTDLREAIFF-----TNLVKIPQRLKVRINLTQKLLKRAKRLNYSILNSICPLEGT--

텔로머라제 도메인

유플로테스 326 RK----QKIENLINKTREEKS--KYEEELFSYTTDNKCVTQFINEFFYNILPKDFLTGR-NRKNFQKKVKKYVELNKHE
 HT1 394 AAGVCAREKPGGSVAAPPEEEDTPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLWGSRHWRERFLRNTKKFISLGKHA
 EST2 268 -----VLDSLHLSRQ-----SPKERVLFITIVILQKLLPQEMFGSKKWKGIKLNLLLSLPLNG

유플로테스 398 LIHKNLLEKINTREISWMQVET-SAKHFYFDHENIYVLWKLRLWIFEDLVVSLIRCFYVTEQQKSYSKTYYYRKNIW
 HT1 474 KLSLQELTWKMSVRDCAWLRSPGVGCVPAAEHRLREEILAKFLHWMVYVVELLRSSFFVYVTEFTQKNRLFYRKSVM
 EST2 324 YLPFDSLLKKRLKDFRWLFISD-IFWTKHNFENLN-QLAICFISWLFRLIPKIIQTFYCYTEIS-STVTIVYFRHDTW

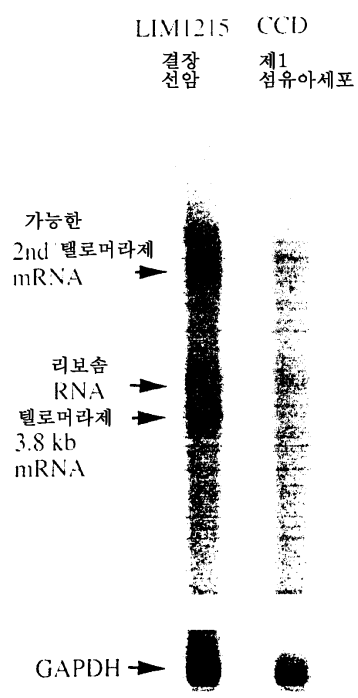
모티프1 모티프2

유플로테스 477 DVIMKMSIADLKK-ETLAEVQKEVEEWNKSL-GFAPGKLRLIPKKT--FRPIMTFNKKIVNSDRK--TTKLTNTKLL
 HT1 554 SKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG--LRPIVNMVYVVGARTFRREKRAERLTSRVK
 EST2 401 NKLITPFIVEYFK-TYLVENNVCRNHSYTLS-NFNHSMRIIPKKSNEFRIIAIPCRGADEEFT--IYKENHKNAIQ

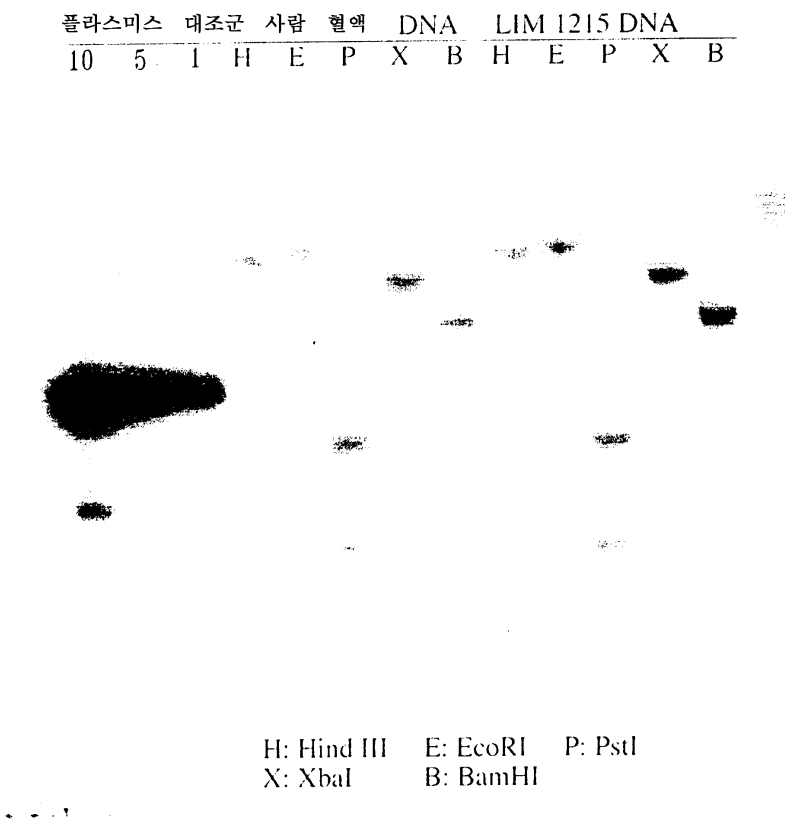
도면2B

		모티프 A	
유플로테스	551	NSHLMLKTLKN-RMFKDPFGFAVFNYYDDVMKKYEEFVCKWKVQGP-KLFFATMDIEKCYDSVNREKLSTFLKTTKLLSS	
HT1	632	ALFSLVNIYERARR--PGLLGASVLGLDDIHRWRTFVLRVRAQDPPELYFVKVDVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPN	
EST2	477	PTQKILEYLRNKRPTSFTKIYSPQIADRIKEFKQRLKKFNNVLP-ELYFMKFDVKSCYDSIPRMECMRIKDALKNEN	
		모티프 B	
유플로테스	629	DFWIMTAQILKRKNIVIDSKWFRKKEMKDYFRQKFQKIALEGGQYPTLFSVLENEQNDLNAKKTIVEAK-QRNYFKKD	
HT1	710	TYCVRRYAVVQKAAGHVRKAFKSHVS-----TLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVIEQSSSLWEASSG	
EST2	556	GFFVRSQYFFN-TNTGVLKLFNVN-----A--SRVPKPYELYIDNVRTVHLSNQDVINVV-EMEIFKT-	
		모티프 C	
유플로테스	708	NLLQPVINICQYNYINFNGKFYKQTKGIPQGLCVSSILSSFYYATLEESSLGLRDESMNPENPNVNLMLRLTDDYLLIT	
HT1	777	LFDVFLRFMCHAVRIR-GKSYVQCQGIQGSILSTLLCSLCYGMEN--KLFAGIRRD-----GLLLRLVDDFLVIT	
EST2	616	--ALWVEDKCYIR-----EDGLFQGSLSAPIVDLVYDLEFYSEFKASPSQD-----TLILKLADDFLIIS	
		모티프 D	모티프 E
유플로테스	788	TQENNAVLFIEKLINVSRENGFKFMKKLQTSFPLSPSKFAKYGMDSVEEQNIQDYCDWIGISIDMKTLALMPNIALRI	
HT1	847	PHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLKRTVVNFPVEDEALGG-TAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYAR--	
EST2	677	TDQQ-QVINIKKLAMG----GFOKYNANRDKILAVS-----SQSDDDTVIQFCAMHIFVKELEVWKHSTMN---	
		모티프 F	
유플로테스	868	EGZLCTLNLNMQTKKASMLKKLKSFLMNNITHYFRKTITTEDFANKTLNKLFISSGGYKYMCAKEY--KDHFKKNLAM	
HT1	924	TSIRASLTFRNGFKAGRNMRKLFVGLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTF	
EST2	741	-----NFHIRSKSS----KGIFRSLIALFNTRISYKTIIDTNLSTNTVLMQIDHVVKNISECYKSA--FKDLSINVTQ	
		모티프 G	
유플로테스	946	SSMIDLEVSKIYISVTRAFFKYLVCNIKDTIFGEEHYPDFLSTLKHFIIEFSTKKYIFNRVCMILKAKEAKLKSDQCQS	
HT1	1004	FLRVISDTASLCYSTILKAKNAGMSLGAKGAAGLPSEAVQWLC-HQAFLKLTRHRVTYVPLLGSRLTAQTQLSRKLPGT	
EST2	808	NMQFHSFLQRIZIEMTVSG---CPITKCDPLIEYEVRR--FTI--LNGFLESLSNTSKF-KDNIILLRKEIQHLQAYIYI	
		모티프 H	
유플로테스	1026	LIZYDA-----	
HT1	1083	TLTALEAAANPALPSDFKTILD	
EST2	879	YIHVN-----	

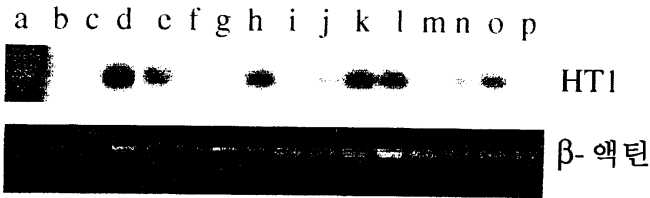
도면3



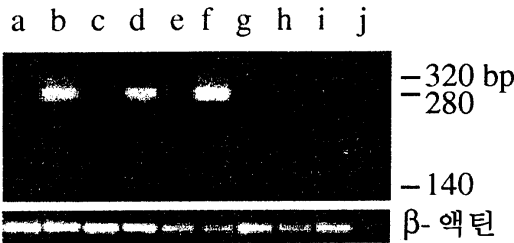
도면4



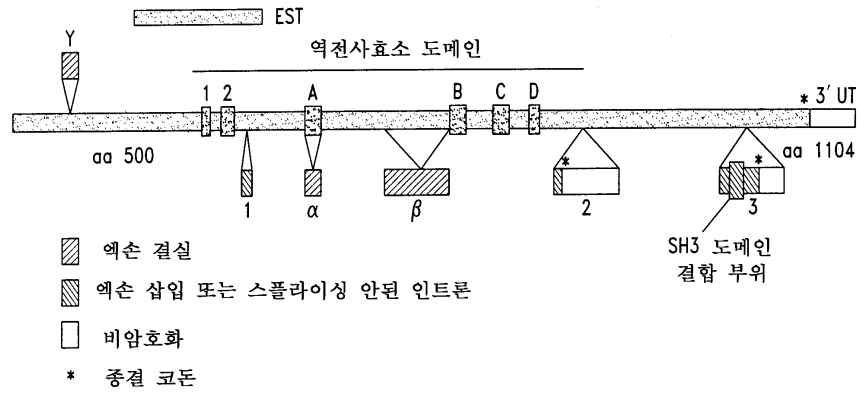
도면5



도면6



도면7A



도면7B

변이체 :	1	α	β	2	3
RT-PCR 생성물	NO	+	+	NO	+ & -
LIM1215 라이브러리로부터 PCR	-	+	-	+	NO
RT-PCR 생성물	NO	-	+	NO	+
53.2 cDNA	-	-	-	-	NO

도면7C

222

Y 5'-CCAGGTG|ggcctc

223

gcaggtg|TCCTGCC-3'

1950

1 5'-AAAGAGG|GTGGCTG.....AACAGAA|GCCGAGC-3'

2130

α 5'-TGTCAG|gtggatg.....ccccag|GACAGGC-3'

2167

2286

β 5'-GAGCCAC|gtctcta.....ggggcaa|GTCCTAC-3'

2468

2843

2 5'-ACTCCAG|GTGAGCG.....XXXXXX|CTATGCC-3'

2844

3157

3 5'-AACGCAG|CCGAAGAAAACATTTCTGTCGTGACTCCTGCGGTGCTTGGGTCGGGACGCCAGAGATGG

T A A E E N I L V V T P A V L G S G Q P E M E

AGCCACCCCGCAGACCGTCGGGTGTGGGCAGCTTTCGGTGTCTCCTGGGAGGGGAGTTG

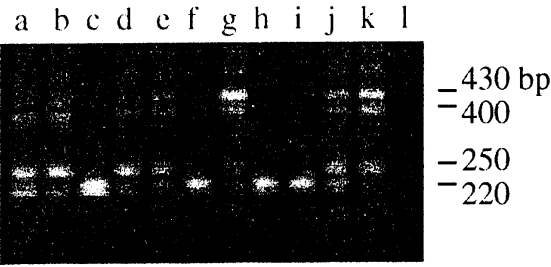
P P R R P S G V G S F P V S P G R G V G

3158

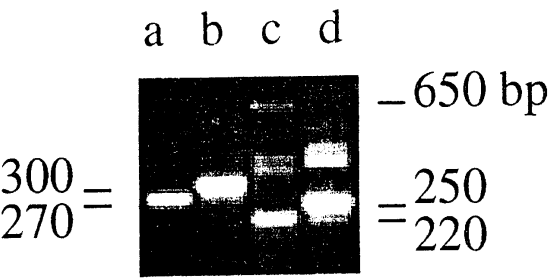
GGCTGGGCTGTGACTCCTCAGCCTCTGTTTTCCCCAG|GGATGTC-3'

L G L *

도면8



도면9



도면10A

서열 "Y" 104-105 염기

GGCCTCCCCGGGTCGGCGTCCGGCTGGGTTGAGGGCGGCCGGGGGAACAG
GlyLeuProGlyValGlyValArgLeuGlyLeuArgAlaAlaGlyGlyAsnGln
AlaSerProGlySerAlaSerGlyTrpGly * GlyArgProGlyGlyThrSer
ProProArgGlyArgArgProAlaGlyValGluGlyGlyArgGlyGluProAla

CGACATGCGGAGAGCAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCCGCGAGGTG
ArgHisAlaGluSerSerAlaGlyAspSerGlyArgPheProArgArg
AspMetArgArgAlaAlaGlnAlaThrGlnGlyAlaSerProAlaGly
ThrCysGlyGluGlnArgArgArgLeuArgAlaLeuProProGlnVal

서열 "1" 38 염기

GTGGCTGTGCTTTGGTTAACTTCCTTTTAAACCAGAA
ValAlaValLeuTrpPheAsnPheLeuPheAsnGlnLys

서열 "α" 36 염기

GTGGATGTGACGGGCGCGTACGACCATCCCCAG
ValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIleProGln

서열 "β" 182 염기

GTCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTGTTGGCTCACCTG
ValSerThrLeuThrAspLeuGlnProTyrMetArgGlnPheValAlaHisLeu

CAGGAGACCAGCCCGCTGAGGGATGCCGTGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTG
GlnGluThrSerProLeuArgAspAlaValValIleGluGlnSerSerSerLeu

AATGAGGCCAGCAGTGGCCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTCATGTGCCACCAC
AsnGluAlaSerSerGlyLeuPheAspValPheLeuArgPheMetCysHisHis

GCCGTGCGCATCAGGGCAA
AlaValArgIleArgGlyLys

부분 서열 "2" 미확인된 길이

GTGAGCGCACCTGGCCGGAAGTGGAGCCTGTGCCGGCTGGGGCAGGTGCTGTCAG
Ter

GGCCGTTGCGTCCACCTCTGCTTCGTTGGGGCAGGCGACTGCCAATCCCAAAGGT
CAGATGCCACAGGGTGCCCTCGTCCCATCTGGGGCTGAGCACAATGCATCTTTCTG
TGGGAGTGAGGGTGCCACACGGGAGCAGTTTTCTGTGCTATTTGGTAA..

도면10B

서열 "3" 159 염기
 CCGAAGAAAACATTTCTGTCGTGACTCCTGCGGTGCTTGGGTCGGGACAGCCAGAG
 AlaGluGluAsnIleSerValValThrProAlaValLeuGlySerGlyGlnProGlu
 .
 ATGGAGCCACCCCGCAGACCGTCGGGTGTGGGCAGCTTTCGGGTGTCTCCTGGGAGG
 MetGluProProArgArgProSerGlyValGlySerPheProValSerProGlyArg
 .
 GGAGTTGGGCTGGGCCTGTGACTCCTCAGCCTCTGTTTTCCCCAG
 GlyValGlyLeuGlyLeu *

서열 "X" 미확인된 길이
 ...GACAGTCACCAGGGGGTTGACCGCCGACTGGGCGTCCCAGGGTTGACTATAGGA
 CCAGGTGTCCAGGTGCCCTGCAAGTAGAGGGGCTCTCAGAGGCGTCTGGCTGGCATGG
 GTGGACGTGGCCCCGGGCATGGCCTTCTGCGTGTCTGCCGTGGGTGCCCTGAGCCCT
 CACTGAGTCGGTGGGGGCTTGTGGCTTCCCGTGAGCTTCCCCCTAGTCTGTTGTCTGG
 CTGAGCAAGCCTCCTGAGGGGCTCTCTATTG

게놈성 인트론의 부분 서열 (약 2.7 kb)
 GTGGCTGTGCTTTGGTTTAACTTCCTTTTTAACCAGAAAGTGGTTTGAGCCCCACATT
 TGGTATCAGCTTAGATGAAGGGCCCGAGGAGGGGCCACGGGACACAGCCAGGGCCAT
 GGCACGGCGCCACCCATTTGTGCGCACAGTGAGGTGGCCGAGGTGCCGGTGCCTCCA
 GAAAGCAGCGTGGGGGTGTAGGGGGAGCTCCTGGGGCAGGGAC....

도면11B

말단 절단된 단백질 1

```

ATGCCGCGGCTCCCGCTGCCGAGCGGTGCGCTCCCTGCTGCCAGCCACTACCGGAGGTGCTGCCGCTGCCGCTTGGT
M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V

CGCGGCTTGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGACGCGGGGACCCGCGGCTTTCCGCGGCTGGTGGCCAGTGCTGGTGGTGGCTTGGGACGACGCGCCGCCCCGCGC
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A

CCCGTCTTCCGCGAGGTGCTCGCTGAAGAGCTGGTGGCCGAGTGTGACAGGCTGTGCGAGCGCGCGGAGAAAGTGTGCGCTTCCGCTTCCGCGCTGCTGGAGCGGCGCG
P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R

CGGGGCCCCCGAGGCTTACACACAGCGTGCAGCTACCTGCCAACACGCTGACCGACGACTGCGGGGAGCGGGGCTGGGGGCTGCTGCTGCGCGCGTGGGCGACGAGCT
G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V

GCTGGTTACCTGCTGCCAGCGTGGCGGCTCTTTGTGCTGGTCCAGCTGCCGCTACAGGTGTGCGGCGCGCGCTGTACAGCTCGCGCTGCCACTCAGGCGCGCGCGCGC
L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P

ACACGCTAGTGAGCCCCGAGGCTCTGGGATGCGAACGGGCTGGAACATAGCTCAGGAGCGCGGCTCCCCCTGGGCTGCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGCGCGGGGAGTG
H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A

CAGCCGAGTGTGCGTTGCCAAGAGGCGGAGGCTGGCGCTGCCCTGAGCGGAGCGGAGCGCGCTTGGCAGGGTCTGGGCGCACCGGGCAGGAGCGGTGAGCGAGTGC
S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R

TGGTTTCTGTGTGTGCTGCTGCCAGACCGCGGAGAACGCTCTTTGGAGGCTGCGCTCTGCGACGCGGCTGCCACCATCGTGGGCGCGGAGCAGCGCGGCGCGCGC
G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P

ATCCACATCGCGGCCACGCTCCCTGGGACACGCTTGTCCCCGGTGTACGCGGAGCAGCAAGCACTTCTCTACTCCTCAGGCGACAGGAGCAGCTGCGGCGCTCTCTCTACTCAG
S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S

CTCTGAGGCCAGGCTGCTGCGGCTCGGAGGCTGCGGAGCATCTTTGGGTTCCAGGCGCTGATGCCAGGAGTCCCGCAGGTTGGCCGCGCTGCCAGGCTACTGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATCGGCGCGCTGTTCTGAGCTGCTTGGGAACACGCGAGTGGCCCTACGGGGTGTCTCTCAAGACGACTGCGCGCTGCGAGCTACCGGTCACCGCAGCGCGGTGTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAGCCCCAGGCTGCTGGCGGCGCGGAGGAGGACAGACCGCGCTGCGCTGGTGCAGCTGCTCGCGCAGCAGCAGCGCGCTGGGAGGTGTACGCGCTTCTGCGGCGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

CCTGCGCGGCTGGTGGCCCGAGGCTCTGGGCTCCAGGACACGACGACGCGCTTCTCAGGAACCAAGAAGTTCTCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTGCTGAGGAGCT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

GAGTGGAGATGAGCTGCGGAGTGGCTTGGCTGCGCAGGAGCCAGGGGTTGGCTGTGTTCCGCGCGCAGCAGCGCTGCGTGGAGGATCTGGCCAAGTCTCTGCACTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCTGAGCTGCTCAGGCTTTCTTTTATGTACGAGACGACGTTTCAAAAGAACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTGTCAAAGCATGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

```

도면11C

```

AATCAGACAGCACTTGAAGAGGTGACAGCTGGGAGAGCTGTGCGAAGCAGAGGTGAGGAGCATCGGGAAGCCAGGCGCGCGCTGCTGAGCTCCAGACTCCGCTTCAATCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

```

```

GTGGCTGTGCTTTGGTTAACTTCCTTTTAAQCAGAA
V A V L W F T F L F N Q K

```

```

CGGCTGCGGCGGATTGTGAACATGAGTCTGTTGGAGCCAGAACGTTCCGCGAGAGAAAAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTCAAGGTGCTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R E K R P S V S F R G *

```


도면11E

```

CTCTGTGAGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTCGTGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGACTCCCGCAGGTTGCCCGGCTGCCCGAGCGCTACTGGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATGCGGCCCCGTTTCTGGAGCTGCTTGGGAACACGCGCAGTGCCCCCTACGGGGTCTCTCAAGACGCACTGCCCGCTGCGAGCTGCGGTCAACCCAGCAGCGGCTGCTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAAGCCCGAGGCTCTGTGGCGGCCCGGAGGAGGACACAGACCCCGCTGCGCTGGTGAGCTGCTCCGCGACACAGCAGCCCGTGGCAGGTGTACGGCTTCTGTGCGGGGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

CCTGCGCGGCTGGTGCGCCCGAGGCTCTGGGGCTCCAGGACACAGAACCGCGCTTCTCAGGAACACCAAGAAGTTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGTGCGAGGCT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

GAGTGGAAGATGAGCGTGGCGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCAGGGGTTGGCTGTGTTCCGGCGCAGAGCACCGTCTGCGTGAGGAGATCCTGGCCAAGTTCTGCACTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCGAGGCTGCTCAGGTCTTTCTTTATGTCACGAGACCATGTTCAAAGAACAGGCTCTTTTTCTACCGAAGAGTGTCTGAGCAAGTTGCAAGCATTGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCATTTGAAGAGGTCAGCTGCGGGAGCTGTGCGAAGCAGAGGTCAGGCAGCATCGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGACGCTCCAGACTCCGCTTTCATCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

CGGCTGCGGCGGATTGTGAACATGAGTACGTGCGGAGCCAGACGTTCCGAGAGAAAAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGTTGAAGGCACTGTTACGCGTGTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGCGCGGCGCCCGGCTCTCTGGCGCTCTGTGCTGGGCTGAGCATATCCACAGGGCTGGCGCACCTTCTGCTGCGGTGCGGGCCAGGACCCCGGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAGGTGTGATGTACGGCGGCTACGACACCATCCCCAGGACAGGCTCACGAGGTCATGCCAGCATCATCAACCCAGAACAGTACTGCGTGCGTATGCCGTGCTCA
V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCCGCCCATGGGACGTCCGCAAGGCTTCAAGAGCCAC
K A A H G H V R K A F K S

GTCTACGTCCAGTG
V L R P V

CCAGGGGATCCGCGAGGCTCCATCCTCTCCAGGCTGCTGCGAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAGCTGTTGCGGGGATTGCGCGGACGGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGA
P G D P A G L H P L H A A L Q P V L R R H G E Q A V C G D S A G R A A P A F V G

TGATTTCTGTGTGGTGACACCTCACCTCACCCACGCGAAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTGCGGAAGACAGTGGTGAACCTCCC
*

```

도면11F

참조 단백질

ATGCCGCGCGCTCCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAG	60
MetProArgAlaProArgCysArgAlaValArgSerLeuLeuArgSerHisTyrArgGlu	20
GTGCTGCCGCTGGCCACGTTTCGTGCGGCGCTGGGCCCCAGGGCTGGCGCTGGTGCGAG	120
ValLeuProLeuAlaThrPheValArgArgLeuGlyProGlnGlyTrpArgLeuValGln	40
CGGGGGACCCGGGGCTTCCGCGCGCTGGTGCCCCAGTGCGCTGGTGCGCTGG	180
ArgGlyAspProAlaAlaPheArgAlaLeuValAlaGlnCysLeuValCysValProTrp	60
GACGCGCGCGCCCCCGCGCGCCCCCTCTCCGCGCAGGTGTCTGCTGAAGGAGCTG	240
AspAlaArgProProAlaAlaProSerPheArgGlnValSerCysLeuLysGluLeu	80
GTGGCCCGAGTGCTGCAGAGCGTGTGCGAGCGCGCGCAAGACGTGCTGGCTTCGGC	300
ValAlaArgValLeuGlnArgLeuCysGluArgGlyAlaLysAsnValLeuAlaPheGly	100
TTGCGCTGCTGGACGGGCCCCGGGGCCCCCGAGGCCCTTACCACCGCTGCGC	360
PheAlaLeuLeuAspGlyAlaArgGlyGlyProProGluAlaPheThrThrSerValArg	120
AGCTACCTGCCCAACGCGTGACCGACGCACTGCGGGGAGCGGGGCGTGGGGCTGCTG	420
SerTyrLeuProAsnThrValThrAspAlaLeuArgGlySerGlyAlaTrpGlyLeuLeu	140
TTGCGCGCGTGGGCGACGCTGCTGGTTACCTGCTGGCAGCGCTGCGCGCTCTTTGTG	480
LeuArgArgValGlyAspAspValLeuValHisLeuLeuAlaArgCysAlaLeuPheVal	160
CTGGTGCTCCAGCTGCGCTACAGGTGTGCGGGCGCGCGCTGTACAGCTCGCGCT	540
LeuValAlaProSerCysAlaTyrGlnValCysGlyProProLeuTyrGlnLeuGlyAla	180
GCCACTCAGGCCCGGCCCCGCCACACGCTAGTGAGCCCCAGGGCTCTGGGATGCGAA	600
AlaThrGlnAlaArgProProHisAlaSerGlyProArgArgArgLeuGlyCysGlu	200
CGGGCTGGAACCATAGCGTCAGGAGGCGGGGTCCCCCTGGGCTGCCAGCCCCGGGT	660
ArgAlaTrpAsnHisSerValArgGluAlaGlyValProLeuGlyLeuProAlaProGly	220
GCGAGGAGGGCGGGGGCAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTTGCCCAAGAGGCCAGGGCT	720
AlaArgArgArgGlyGlySerAlaSerArgSerLeuProLeuProLysArgProArgArg	240
GGCGCTGCCCTGAGCCGGAGCGGACGCGCTTGGGACGGGGTCTGGGCCACCGGGGC	780
GlyAlaAlaProGluProGluArgThrProValGlyGlnGlySerTrpAlaHisProGly	260
AGGACGCGTGACCGAGTGACCGTGGTTTCTGTGTGTGTGCACCTGCCAGACCGCGAA	840
ArgThrArgGlyProSerAspArgGlyPheCysValValSerProAlaArgProAlaGlu	280
GAAGCCACCTCTTTGAGGGTGCGCTCTCTGGCACGCGCCACTCCACCATCCGTGGGC	900
GluAlaThrSerLeuGluGlyAlaLeuSerGlyThrArgHisSerHisProSerValGly	300
CGCCAGCACACGCGGGCCCCCATCCACATCGCGGCCACACGTCCTGGGACACGCT	960
ArgGlnHisHisAlaGlyProProSerThrSerArgProProArgProTrpAspThrPro	320

도면11G

TGTCCTCCCGGTGTACGCCGAGACCAAGCACTTCCTCTACTCCTCAGGCGACAAGGAGCAG	1020
CysProProValTyrAlaGluThrLysHisPheLeuTyrSerSerGlyAspLysGluGln	340
CTGGGGCCCTCCTCTACTCAGCTCTCTGAGGCCAGCCTGACTGGCGCTCGGAGGCTC	1080
LeuArgProSerPheLeuLeuSerSerLeuArgProSerLeuThrGlyAlaArgArgLeu	360
GTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGACTCCCCGAGGTTGCC	1140
ValGluThrIlePheLeuGlySerArgProTrpMetProGlyThrProArgArgLeuPro	380
CGCTGCCCCAGCGCTACTGGCAATGCGGCCCTGTTTCTGGAGCTGCTGGGAACAC	1200
ArgLeuProGlnArgTyrTrpGlnMetArgProLeuPheLeuGluLeuLeuGlyAsnHis	400
GCGCAGTGCCCCCTACGGGTGCTCCTCAAGACGCACTGCCGCTGCGAGCTGCGGTAC	1260
AlaGlnCysProTyrGlyValLeuLeuLysThrHisCysProLeuArgAlaAlaValThr	420
CCAGCAGCCGGTGTCTGTGCCGGGAGAAGCCCCAGGCTCTGTGGCGCCCCGAGGAG	1320
ProAlaAlaGlyValCysAlaArgGluLysProGlnGlySerValAlaAlaProGluGlu	440
GAGGACACAGACCCCCGCTGCGCTGGTGCAGCTGCTCCGACGACAGACCCCTGGCAG	1380
GluAspThrAspProArgArgLeuValGlnLeuLeuArgGlnHisSerSerProTrpGln	460
GTGTACGGCTTCTGTGCGGCTGCTGCGCGGCTGGTGGCCCCAGGCTCTGGGGCTCC	1440
ValTyrGlyPheValArgAlaCysLeuArgArgLeuValProProGlyLeuTrpGlySer	480
AGGCACAACGAACGCCGCTTCCTCAGGAACACCAAGAAGTTTCCTCCCTGGGGAAGCAT	1500
ArgHisAsnGluArgArgPheLeuArgAsnThrLysLysPheIleSerLeuGlyLysHis	500
GCCAAGCTCTGCTGCAGGAGCTGACGTGGAAGATGAGCGTGCGGGGCTGCGCTTGGCTG	1560
AlaLysLeuSerLeuGlnGluLeuThrTrpLysMetSerValArgAspCysAlaTrpLeu	520
CGCAGGAGCCAGGGTTGGCTGTGTTCGGGCCGAGACCGCTCTGCGTGAGGAGATC	1620
ArgArgSerProGlyValGlyCysValProAlaAlaGluHisArgLeuArgGluGluIle	540
CTGGCCAAGTTCTGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTGTCGAGCTGCTCAGGTCTTTC	1680
LeuAlaLysPheLeuHisTrpLeuMetSerValTyrValValGluLeuLeuArgSerPhe	560
TTTTATGTCAGGAGACACGTTTCAAAAGACAGGCTCTTTTCTACCGAAGAGTGTG	1740
PheTyrValThrGluThrThrPheGlnLysAsnArgLeuPhePheTyrArgLysSerVal	580
TGGAGCAAGTTGCAAGCATTGGAATCAGACGACTTGAAGAGGTCAGCTGCGGGAG	1800
TrpSerLysLeuGlnSerIleGlyIleArgGlnHisLeuLysArgValGlnLeuArgGlu	600
CTGTCGGAAGCAGAGGTCAGGACGATCGGGAAGCCAGGCCCGCTGCTGACGTCCAGA	1860
LeuSerGluAlaGluValArgGlnHisArgGluAlaArgProAlaLeuLeuThrSerArg	620
CTCCGCTTCATCCCCAAGCTGACGGGCTGCGGCGATTGTGAACATGGACTACGCTG	1920
LeuArgPheIleProLysProAspGlyLeuArgProIleValAsnMetAspTyrValVal	640

도면11H

```

GGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCA 1980
GlyAlaArgThrPheArgArgGluLysArgAlaGluArgLeuThrSerArgValLysAla 660

CTGTTACAGCGTCTCAACTACGAGCGGGCGGGCGCCCGGCTCTGGGCGCTCTGTG 2040
LeuPheSerValLeuAsnTyrGluArgAlaArgArgProGlyLeuLeuGlyAlaSerVal 680

CTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCTGGCGACCTTCGTGCTGTGTGGGGCCAG 2100
LeuGlyLeuAspAspIleHisArgAlaTrpArgThrPheValLeuArgValArgAlaGln 700

GACCCGCGCTGAGCTGTACTTTGTCAAGGTGGATGTGACGGGCGGTACGACCATC 2160
AspProProProGluLeuTyrPheValLysValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIle 720

CCCCAGGACAGGCTCACGGAGGTCTCGCCAGCATCATCAACCCCAACACGTAAGTGC 2220
ProGlnAspArgLeuThrGluValIleAlaSerIleIleLysProGlnAsnThrTyrCys 740

GTGGTCGGTATGCGGTGGTCCAGAAGGCCGCCCATGGGCACGTCCGCAAGGCTTCAAG 2280
ValArgArgTyrAlaValValGlnLysAlaAlaHisGlyHisValArgLysAlaPheLys 760

AGCCACGCTCTCACTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTG 2340
SerHisValSerThrLeuThrAspLeuGlnProTyrMetArgGlnPheValAlaHisLeu 780

CAGGAGACGAGCCGCTGAGGGATGCCGTGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAG 2400
GlnGluThrSerProLeuArgAspAlaValValIleGluGlnSerSerSerLeuAsnGlu 800

GCCAGCAGTGGCTCTTCGACGTCTTCTACGCTTCATGTGCCACACGCCGTGGGCATC 2460
AlaSerSerGlyLeuPheAspValPheLeuArgPheMetCysHisHisAlaValArgIle 820

AGGGGCAAGTCTACGTCCAGTCCAGGGGATCCCGAGGGCTCCATCCTCTCCACGCTG 2520
ArgGlyLysSerTyrValGlnCysGlnGlyIleProGlnGlySerIleLeuSerThrLeu 840

CTCTGACGCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAGCTGTTTGGGGGATTGGCGGGAC 2580
LeuCysSerLeuCysTyrGlyAspMetGluAsnLysLeuPheAlaGlyIleArgArgAsp 860

GGGCTGCTCCTGCGTTTGGTGGATGTTTCTTGTGTGACACCTCACCTCACCCAGCG 2640
GlyLeuLeuLeuArgLeuValAspAspPheLeuLeuValThrProHisLeuThrHisAla 880

AAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTCGTGGTGAACCTG 2700
LysThrPheLeuArgThrLeuValArgGlyValProGluTyrGlyCysValValAsnLeu 900

CGGAAGACAGTGGTGAACCTCCCTGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCAGCGCTTTTGT 2760
ArgLysThrValValAsnPheProValGluAspGluAlaLeuGlyGlyThrAlaPheVal 920

CAGATGCCGGCCACGGCTATTCCCTGGTGGCGCTGCTGCTGATACCCGGACCTG 2820
GlnMetProAlaHisGlyLeuPheProTrpCysGlyLeuLeuLeuAspThrArgThrLeu 940

GAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCGGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTC 2880
GluValGlnSerAspTyrSerSerTyrAlaArgThrSerIleArgAlaSerLeuThrPhe 960

```

도면 111

AACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGTCTTGGCGCTG	2940
AsnArgGlyPheLysAlaGlyArgAsnMetArgArgLysLeuPheGlyValLeuArgLeu	980
AAGTGTACAGCGCTGTTTCTGGATTTCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAAC	3000
LysCysHisSerLeuPheLeuAspLeuGlnValAsnSerLeuGlnThrValCysThrAsn	1000
ATCTACAGATCCTCTGCTGCAGGCGTACAGGTTTCACGCATGTGTGCTGCAGCTCCCA	3060
IleTyrLysIleLeuLeuGlnAlaTyrArgPheHisAlaCysValLeuGlnLeuPro	1020
TTTCATCAGCAAGTTTGAAGAAGCCACATTTTCTGCGCGTCATCTCTGACACGGCC	3120
PheHisGlnGlnValTrpLysAsnProThrPhePheLeuArgValIleSerAspThrAla	1040
TCCCTCTGCTACTCCTCCTGAAAGCAAGAACGCGAGGATGTCGCTGGGGGCCAAGGGC	3180
SerLeuCysTyrSerIleLeuLysAlaLysAsnAlaGlyMetSerLeuGlyAlaLysGly	1060
GCCGCGGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCGGTGCAGTGGCTGTGCCACCAAGCATTCCTGCTC	3240
AlaAlaGlyProLeuProSerGluAlaValGlnTrpLeuCysHisGlnAlaPheLeuLeu	1080
AAGCTGACTCGACACCGGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGACAGCCAG	3300
LysLeuThrArgHisArgValThrTyrValProLeuLeuGlySerLeuArgThrAlaGln	1100
ACGCAGCTGAGTCGGAAGCTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTGGAGGCCGACGCCAAC	3360
ThrGlnLeuSerArgLysLeuProGlyThrLeuThrAlaLeuGluAlaAlaAlaAsn	1120
CCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGAC	3420
ProAlaLeuProSerAspPheLysThrIleLeuAsp	1132

도면11K

AATCAGACAGCACTTGAAGAGGTGCAGCTGCGGGAGCTGTGGAAGCAGAGGTCAGGCAGCATCGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGACGTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

CGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGACTACGTGCTGGGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGAGGCCAGCGCTTCACCTCGAGGTGAAGGCAGTGTTCAGCGTCTCACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCGCGGCCCGCCCGCTCTCTGGGCGCTCTGTGCTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCTGCGGCACCTTGTGTGCTGTGCGGGCCAGGACCCGCGCGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAAGGTGGATGTGACGGGCGCTACGACACCATCCCCAGGACAGGCTCACGGAGGTTCATCGCCAGCATCAAAACCCAGAACAGTACTGCGTGGGTATGCGGTGGTCCA
V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCCGCCATGGGCAGTCCGCAAGGCTTCAAGAGCCAGCTCTCTACCTTGACAGCCTCCAGCGTACATGCGACAGTTGCTGGCTCACGTGAGGAGACGAGCCCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGGTGCTCATGAGCAGAGCTCCTCCGATGAGGCCAGCAGTGGCTCTTCGAGCTCTTCTACGCTTCATGTGCCACCGCGGTGGCATCAGGGGCAAGTCTACGTCCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCCGCAGGGCTCCATCCTCTCCAGCTGCTCTGACGCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAGCTGTTTGGGGGATTGCGGGGACGGGCTGCTCCTGCTTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTTGTGTGACACCTCACCTCACCCACGCGAAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTTGGGAAGACAGTGGTGAACCTCCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCAGGCTTTTGTTCAGATGCCGGCCACGGCCTATTCCCTGGTGGGCTGCTGCTGATACCCGACCTGGAGGTGCAGAGGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S R

GTGAGCGCACCTGGCCGGAAGTGGAGCTGTGCCCGCTGGGGCAGGTGCTGCTGCAGGGCCGTTGGGTCCACCTCTGCTTCCGTGGGGCAGGCGACTGCCAATCCCAAAGGTCAGA
*

TGCCACAGGGTGGCCCTGCTCCCATCTGGGGCTGAGCACAATGCATCTTCTGTGGGAGTGAGGGTGCCTCACAAAGGAGCAGTTTTCTGTGCTATTTTGGTAA...

도면11L

변형된 C-말단 단백질

```

ATGCCGCGCGCTCCCGCTGCCGAGCGGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCCACGTTGCTG
M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V

CGGCGCTGGGGCCCGAGGCTGGCGGCTGGTGCAGCGCGGGGACCCGGCGGCTTTCCGGCGCGTGGTGGCCAGTGCCTGGTGTGCGTGGCCCTGGGACGACAGGCGCGCCCGCGCGC
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A

CCCTCCTTCGCGAGGTGTCTGCTGAAGGAGCTGGTGGCCGAGTGTGCGAGGCTGTGCGAGCGCGCGCGAAGAAGTGTGGCTTCGGCTTCGCGCTGTGACGGGGCCG
P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R

CGGGGGCCCCCGAGGCTTCACCAACAGCGTGGCGAGTACCTGCCCAACAGGTGACCGAGCACTGCGGGGAGCGGGGCGTGGGGCTGCTGCTGCGCGCGTGGCGAGCGAGT
G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V

GCTGTTACCTGCTGCGACGCTGCGCGCTCTTTGCTGGTGGCTCCAGCTGCGGCTACAGGTGTGCGGGCGCGCGCTGTACAGCTGCGCGCTGCCACTCAGGCGCGCGCGCGC
L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P

ACACGCTAGTGAGCCCGAAGGCTGTGGATGCGAAGCGGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGCGCGGGTCCCTCGGGCTGCCAGCGCGCGGTGCGAGGAGCGCGGGGCGAGTGC
H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A

CAGCCGAAGTGTGCGTTGCCAAGAGCGCCAGGCTGGCGCTGCCCTGAGCGGAGCGGACGCGCGTTGGCAGGGTCTCGGGCCACCGGGGAGGACGCGTGGACCGAGTGACCG
S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R

TGGTTTCTGTGGTGTACCTGCCAGCCCGCGGAAGAGCCACCTCTTTGAGGGTGGCTCTCTGCGACGCGCACTCCACCCATCGTGGGCGCGCAGCAGCAGCGGGCGCGC
G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P

ATCCACATCGCGGCCACCACTCCCTGGGACAGCGCTGTGCCCGGGTGTACGCCGAGACCAAGCACTTCCTCTACTCCTCAGCGGACAGGAGCAGTGGCGGCTCTCTCTACTCAG
S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S

CTCTCTGAGGCGCGCTGACTGGCGCTCGGAGGCTGTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCGCTGGATGCCAGGACTCCCGCAGGTTGCCCGGCTGCCCGCAGCGCTACTGGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATGCGGCGCTGTCTGGAGCTGCTGGGAACCAAGCGAGTGGCCCTACGGGGTGTCTCTCAAGACGCACTGCCGCTGGAGCTGGGTCACCCGAGCAGCGCGGTGTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAAGCCCGAGGCTGTGTGCGCGCGCGGAGGAGGACAGACCCCGTGGCTGTGCGAGTGTCTCCGCGAGCAGCAGCGCGCTGGCAGGTGTACGGCTTGTGTGCGCGCGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

CCTGCGCGGCTGGTGGCCCGAGGCTCTGGGGCTCCAGGCACACGAAGCGCGCTTCTCAGGAACACCAAGAAGTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTGCTGCGAGGAGT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

GACGTGAAGATGAGCTGCGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCAGGGGTTGGCTGTGTTCCGGCGCAGAGCAGCGCTGTGCTGAGGAGATCTGGCCAAAGTTCCTGCACTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCTGAGCTGCTCAGGTCTTCTTTTATGTACGGAGACACGTTTCAAAAGACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGAGCAAGTTCGAAAGCATTGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCACTTGAAGAGGTGAGCTGCGGAGCTGTGGAAGCAGAGGTGAGGAGCATCGGGAAGCCAGGCGCGCGCTGCTGACGTCAGACTCCGCTTCATCCCAAGCGCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

```

도면11M

```

CGGCGTCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTGCGGGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACGTGTCAGCGTGCTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GGGGGGGGGGCCCGGCTCTCGGGCGCTCTGTGCTGGGCTGGAGATATCCACAGGGCTGGCGACCTTCGTGCTGCGTGTGCGGGCCAGGACCCGCGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAGGTGATGTGACGGGCGCTACGACCATCCCCAGGACAGGCTCAAGAGGTTCATCGCCAGCATCATCAACCCAGAACACGTACTGCGTGCCTGCTATGCCGTGCTCA
V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCGCCCATGGGACGTCCGCAAGGCTTCAAGAGCCACGCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTCGTGCTCACCTGCGAGGACCCAGCCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGGTGCTATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGCCAGCAGTGGCTCTTCCAGCTCTTCTCAAGCTTCATGCGCACCGCGCTGCGCATCAGGGGCAAGTCTACGTCCAGT
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCGCGAGGCTCCATCCTCTCCAGCTGCTGCGAGCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAGCTGTTTGGGGGATTGCGGGGACGGGCTGCTCCTGCTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTGTTGTGACACCTCACCTCACCCAGCGGAAACCTTCCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGCTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTGCGGAAGACAGTGGTGAACCTCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAAGAGCAGGCGCTGGGTGGCAGGCTTTTGTTCAGATGCGGGCCACGGCTATTCCCTGGTGGGCTGCTGCTGATACCCGAGCCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S

CTATGCGCGGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGTCTTGGGCTGAAGTGTACAGCGCTGTTTCTGGA
Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D

TTTGAGGTGAACAGCTCCAGACGGTGTGACCAACATCTACAGATCCTCCTGCTGCGAGGCGTACAGGTTTCAAGCATGTGTGCTGCGAGCTCCCATTTTCATCAGCAAGTTTGAAGAA
L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N

CCCCACATTTTCTGCGGTCATCTGTGACAGGCTCCTCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGCGAGGGATGTGCTGGGGGCAAGGGCGCCGCGGCTCTGCGCTCCGA
P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A E
|
CCGAAGAAAACATTTCTGTGCTGACTCCTGCGGTGCTTGGGTC
E E N I L V V T P A V L G S

GGGACAGCCAGAGATGGAGCCACCCCGCAGACCGTGGGCTGGGAGGCTTTCCGGTGTCTCCTGGGAGGGGAGTTGGGCTGGGCTGTGACTCCTCAGCCTCTGTTTTCCCCCAG
G Q P E M E P P R R P S G V G S F P V S P G R G V G L G L *

```


도면110

CGGGCTGCGGCGGATTGTGAACATGGAAGTACGTGCTGGGAGCCAGAAGCTTCCGACAGAAAAGAGGCCGAGCGTCTACCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTACAGCGTCTCACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCGCGGCGCCCGGCGCTCTGGGCGCTCTGTGCTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCTGGCGACCTTGTGCTGGTGTGGGCGCCAGGACCCGCGCGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAGG GACAGGCTCACGGAGGTATCGGCGAGCATCATCAACCCAGAACAGCTACTGGGTGCGTGGTATGCGGTGCTCA
V K D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCGCGCCATGGGCAAGTCCGCAAGGCTTCAAGAGCCAGCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCGTACATGGGACAGTTGCTGGCTCACCTGCAGGAGACGAGCCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGGTGCTATCGAGCAGAGCTCTCCCTGAATGAGGCGAGCAGTGGCTCTTCGAGCTCTTCTACGCTTCATGTGCCACACGCGGTGCGCATCAGGGGCAAGTCTACGTCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCGCGAGGCTCCATCCTCTCCACGCTGTGCTACGGGACATGGAGAAGCTGTTTGGGGGATTCCGGGGACGGGCTGCTCCTGCTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTGTTGGTGACACTCACCTCACCCAGCGAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTGCGGAAGCAGGTGTGAACCTCCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAGAAGCAGAGGCGCTGGGTGGCAGCGCTTTTGTGAGTCCGCGCCACGGCTATTCCCTGGTGGGCTGCTGCTGATACCCGAGCCCTGGAGTGACAGGCACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S

CTATGCCCGGATCCATCAGAGCAGTCTCACCTTCAACCGCGCTTCAAGGCTGGGAGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGCTCTTGGGCTGAAGTGTACAGCTGTTTGTGGA
Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D

TTTGAGGTGAACAGCTCCAGAGGTGTGCACCAACATCTACAAGATCCTCTGCTGAGGCGTACAGTTTACGCGATGTGTGCTGACAGTCCCATTTTCATCAGCAAGTTTGAAGAA
L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N

CCCCACATTTTCTGCGCGTCTCTGTGACAGGCTCCCTCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAAGAACGAGGATGTGCTGGGGGCAAGGGGCGCGCGGCTCTGCGCTCCGA
P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A G M S L G A K G A A G P L P S E

GGCGGTGAGTGGGTGTGCCAACGATTCTGCTCAAGCTGACTGACACCGGTGTACCTACGTGGCACTCCTGGGCTCACTCAGGACAGCCGAGCAGCTGAGTGGAAGCTCCC
A V Q W L C H Q A F L L K L T R H R V T Y V P L L G S L R T A Q T Q L S R K L P

GGGACGACGCTGACTGCGCTGGAGGCGGAGCCAAACCGGCTGCGCTCAGACTTCAAGACCATCCTGAGCTGATGGCCACCCGCGCCACAGCCAGGCGGAGAGCAGACACAGCAGCC
G T T L T A L E A A A N P A L P S D F K T I L D

CTGTACGCGCGGCTCTACGTCCGAGGAGGGAGGGCGGCGCCACACCCAGGCGCGCACCGCTGGGAGTCTGAGGCTGAGTGAGTGTGGCCGAGGCTGCTATGTCGCGCTGAAGGCT
GAGTGTCCGCTGAGGCTGAGCGAGTGTCCAGCCAAAGGCTGAGTGTCCAGCACACCTGCGGTCTTCACTTCCCCAGGCTGGGCTGCGCTCCACCCAGGCGCAGCTTTTCTCTCAC
CAGGAGCCCGGCTCCACTCCCCACATAGGAATAGTCCATCCCGAGATTGCGCATTTGTTACCCCTGCGCTGCGCTCTTTGCTTCCACCCCAACCATCCAGGTGGAGACCTGAGAA
GGACCTGGGAGCTTGGGAATTGGAGTGACCAAGGTGTGCCGTGTACACAGGCGAGGACCTGCACCTGGATGGGGTCCCTGTGGGTCAAAATTGGGGGAGGTGCTGTGGGAGTAA
AATACTGAATATATGAGTTTTTCAGTTTTGA

도면11Q

```

CGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTGCTGGGAGCCAGAAGCTTCCGCAGAGAAAAGAGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACGTGTTACGCGTGTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GGGGCGCGCGCCCGGGCTCTGCGGCGCTCTGTGCTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCTGGCGCACCTTCTGCTGCGGTGTGCGGGCCAGGACCGCGCGCTGAGGTGACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAGG          GACAGGCTCAGGAGGTGATCGCCAGCATCATCAAAACCCAGAACAGTACTGCGTGGGTGCGGTATGCCGTGGTCCA
V K              D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCCGCCCATGGSCACGTCCGCAAGGCCCTTCAAGAGCCACGTCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCGGTACATGCGACAGTTGCTGGCTCACCTGCAGGAGACCAAGCCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGGTGCTCATGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAGGCCACGAGTGGCTCTTGACGCTTCTCTACGCTTCATGTGCCACCAAGCCGTGCGCATCAGGGGCAAGTCTACGTCCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCGCGAGGGCTCATCCTCTCCACGCTGCTCTGACGCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAGCTGTTTGGCGGGATTGCGCGGACGAGGCTGCTCCTGCTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTTGTGTGACACCTCACCTCACCCACGCGAAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTTGGGAAGACAGTGGTGAACCTCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAAGAGACAGGCCCTGGGTGGCACGGCTTTTGTTCAGATGCCGCGCCACGGCTATTCCCTGGTGGCGCTGCTGCTGATACCCGGACCTGGAGGTGACAGCGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S R

GTGAGCGCACCTGCGCGGAAGTGAGGCTGTGCCCGGCTGGGGCAGGTGCTGCTGCAGGGCCGTTGGCTCCACCTCTGCTTCCGTGTGGGGCAGGCGACTGCCAATCCCAAAGGGTCAGA
*

TGCCACAGGGTGCCCTGCTCCATCTGGGGCTGAGCACAAATGCATCTTCTGTGGGAGTGAGGGTGCCTCACACGGGAGCAGTTTCTGTGCTATTTTGGTAA...

```

도면11R

모티프 A 결핍 및 변형된 C-말단

ATGCCGCGCGCTCCCGCTGCCGAGCGGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGGAGGTGCTGCGCGTGGCCAGCTTCGTG
M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V

CGCGCGCTGGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGACGCGGGGACCGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGCCAGTGCTGGTGCGTGCCCTGGGACGACAGGGCGCCCCCGCGCG
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A

CCCCCTTCGCGCAGGTGTCTGCTGAAGGAGCTGGTGCGCGAGTGCTGCGAGGCTGTGCGAGCGCGCGGAGAAAGCTGGCTTCGGCTTCGCGCTGCTGACGGGGCCG
P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R

CGGGGGCCCCCGAGGCTTCACCAACGCGTGCGGAGTACCTGCCAACACGGTGACCGAGCACTGCGGGGAGCGGGGCTGGGGGCTGCTGCTGCGCGCGCTGGGCGAGGAGCT
G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V

GCTGGTTCACCTGCTGCGACGCTGCGGCTCTTTGCTGGTGCTCCAGCTGCGCTACAGGTGTGCGGGCGCGCTGTACAGCTCGCGCTGCCACTCAGGCGCGCGCGCG
L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P

ACACCGTAGTGACCCCGAAGCGCTGGGATGCGAACGGGCTGGAACATAGCGTCAGGGAGCGCGGGTCCCCCTGGGCTGCCAGCGCGCGGTGCGAGGAGCGCGGGGAGTGC
H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A

CAGCGGAAGTGTCCGTTGCCAAGAGCGCGGGCTGCGGCTGAGCGGAGCGGACGCGCTTGGCGAGGGTCTTGGGCGCGCGCGGAGCGAGGAGTGCAGGAGCGG
S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R

TGGTTCTGTGTGTGCTGCTGCCAGCGCGCGGAGGAGGCTCTTTGGAGGCTGCGCTCTGCGCAGCGCGCACTCCACCCATCCGTTGGGCGCGCGAGCAGCGCGGGCGCGCG
G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P

ATCCACATCGCGCGCACGCTCCCGGAGACGCGCTTGTCCCGCGGTGACGCGGAGACCAAGCACTTCCTCTACTCTCAGGCGGAGAGGAGAGCTGCGCGCTCTCTCTACTCAG
S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S

CTCTCTGAGGGCGCGCTGACTGCGCTGCGAGGCTGCGGAGGAGGCTCTTTGCGGTTCCAGGCGCTGATGCCAGGAGTCCCGCAGGTTGCCCGCGCTGCCCGAGGCTACTGGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATGCGGCGCTGTTGCTGGAGCTGCTTGGGAGCAACGCGAGTGGCGCTACGGGGTGTCTCAAGAGCACTGCGCGCTGCGAGCTGCGGTCACCCAGCAGCGGTTGCTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAAGCGCGAGGCTGTGTGCGCGCGCGGAGGAGGAGACAGACCGCGCTGCGCTGCTGCGGAGCTGCTGCGGAGCAGCAGCGCGCTGGCAGGTGTACGGCTTCTGCGGCGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

CCTGCGCGGCTGGTGCGCGCGCGCTGCGGCTCCAGGACACAGAACCGCGCTTCTCAGGAACACCAAGATTCTCTCCCTGGGGAAGCATGCCAGCTCTGCTGCGAGGAGCT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

GACGTGGAAGATGAGCGTGCGGAGTGGCTGCGTGGCGAGGAGCCAGGGTTGGCTGTGTTCCGGCGGAGAGCAGCGCTGCGGTGAGGAGATCTGGCGCAAGTTCTGCACTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCTGAGCTGCTCAGGTCTTTCTTTATGTGACGGAGACCGTTTCAAAGAACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAGCATTTGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCACTTGAAGAGGCTGAGCTGCGGAGGCTGTGGAAGCAGAGGTGAGGAGCATCGGAAGCGCGCGCGCTGCTGAGCTCCAGACTCCGCTTATCCCAAGCGTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

FIG. 11R

도면11S

```

CGGGCTGCGGGCGATTGTGAACATGGACTACGTGCTGGGAGCCAGAACGTTCCGCGAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACCCTCGAGGGTGAAGGCACGTTCAGCGTGTCTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCGCGGGCGCCCGGGCTCTGTGCTGGGCGCTGAGAGATCCACAGGGCTGCGCGACCTTCGTGCTGCGGTGTGCGGGCCAGGACCCGCGGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAGG          GACAGGCTCAGGAGGTGATCGCCAGCATCATCAAAACCCAGAACACGTAAGTGGTGGTGGTATGCCGTGGTCCA
V K              D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCCGCCCATGGGCACGTCCGCAAGGCTTCAAGAGCCACGTCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTGCGTGGCTCACCTGCGAGAGACCGCCGCTGAGGSA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGGTGCTCATGAGCAGAGCTCCTCCTGAATGAGGCGAGCAGTGGCTCTTCGAGCTCTTCCTACGCTTACATGTGCCACACCGCGTGCATCAGGGGCAAGTCTCAGTCCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCCGAGGGCTCCATCCTCTCCACGCTGCTGTGAGCGTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAAGCTGTTTGGGGGATTCGGCGGGACGGGCTGCTCTGGGTTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTCTTGTGTGTCACCTCACCTCACCCACGGAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCTGAGTATGGCTGGTGGTGAACCTTGGGGAAGACAGTGGTGAACCTTCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGAGAGAGCAGGGCCCTGGGTGGCAGGGCTTTTGTTCAGATGCGGGCCACGGCCTATTCCCTGGTGGGCGCTGCTGCTGATACCCGAGCCCTGGAGGTGCAGAGCAGTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S

CTATGCCCCGACCTCCATCAGAGCAGTCTCACCTTCAACCGCGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGTCTTGGGGCTGAAGGTGCACAGCCTGTTTCTGGA
Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D

TTTGAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGACCAACATCTACAAGATCCTCCTGCTGAGGGGTACAGGTTTACGCGATGTGTGCTGACGCTCCCATTTATCAGCAAGTTTGAAGAA
L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N

CCCCACATTTTCTGCGGTCATCTGTGACAGGGCTCCCTCTGCTACTCCATCCTGAAAGCCAAGAACGAGGATGTGCTGGGGGCCAAGGGCGCCGCGGGCCCTCTGCCCTCCGA
P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A E

|
CCGAGAAAAACATTTCTGTGCTGACTCCTGCGGTGCTGGGTC
E E N I L V V T P A V L G S

GGGACAGCCAGAGATGGAGCCACCCGCGAGACGGTGGGTGGGAGCTTTCCGGTGTCTCCTGGGAGGGAGTTGGGCTGGGCTGTGACTCCTCAGCCTCTGTTTCCCCCAG
G Q P E M E P P R R P S G V G S F P V S P G R G V G L G L *

```


도면11Y

GACGTGGAGATGAGCGTGCGGGACTCGCCTTGCGTCGCGAGGAGCCAGGGGTTGCGTGTGTTCCGGCCGACAGCACCGCTGCGTGGAGGAGATCGTGGCCAAAGTCTCGCACTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGCTCGTCAGGCTGCTCAGGCTTTCTTTATGTACGAGAGCCAGCTTTCAAAAGAACAGGCTCTTTTCTACGGAAAGAGTGTCTGGAGCAAGTGTGCAAAAGCATGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCACTGTGAAGAGGTGCAGCTGCGGGAGGCTGTGCGGAAGCAGAGGTGAGGCAGCATGCGGAAGCCAGGCCCGGCCCTGCTGACGCTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

CGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTGCTGGGAGCCAGAACGTTCCGCAGAGAAAAAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTACGCGTGCTCAACTAGCA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

CGCGGCGCGCGCCCGCGCCTCTGGCGCCTCTGTGCTGGGCTGAGCATATCCACAGGCGCTGGCGCACTTGTGCTGCGTGTGCGGGCCGACAGCCGCGCGCTGAGTGACTCT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAAGGTGGATGTGACGGGCGCGTACGACACCATCCCCAGGACAGGCTCACGGAGGTTCATCGCCAGCATCATCAAAACCCAGAACAGTACTGCGTGGCTGGGTATGCCGTGGTCCA
V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAAGGCCGCCATGGGACGTCGCGAAGGCTTCAAGAGCCAC
K A A H G H V R K A F K S H

GTCTACGTCCAGTG
V L R P V

CCAGGGGATCCCGAGGGCTCATCTCTCCACGCTGCTCTGCAGCCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAAGCTGTTTGCGGGGATTGCGGGGACGGGCTGCTCTGCGTTTGGTGA
P G D P A G L H P L H A A L Q P V L R R H G E Q A V C G D S A G R A A P A F V G

TGATTTCTTGTGTGACACCTCACCTCACCCACGGAAAAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTGTCCCTGAGTATGCGTGCGTGGTGAACCTTGGGGAAGACAGTGGTGAACCTCCC

도면11Z

참조 단백질 (ver. 2)

ATGCCGCGCTCCCGCTGCCGAGCGCTGCCCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGCGAG	60
MetProArgAlaProArgCysArgAlaValArgSerLeuLeuArgSerHisTyrArgGlu	20
GTGCTGCGCTGCCACGTTCTGCGGCGCTGGGCCCCAGGGCTGGCGCTGGTGAG	120
ValLeuProLeuAlaThrPheValArgArgLeuGlyProGlnGlyTrpArgLeuValGln	40
CGCGGGACCCGCGCTTTCCGCGCGCTGGTGCCCACTGCTGGTGCGTGCCCTGG	180
ArgGlyAspProAlaAlaPheArgAlaLeuValAlaGlnCysLeuValCysValProTrp	60
GACGCACGGCGCCCGCGCGCGCGCTCTCTCCGCGCAGGTG	
AspAlaArgProProAlaAlaProSerPheArgGlnVal	
GGCTCCCGCGGGTCCGGCTCCGGCTGGGGTTGAGGGCGCGCGGGGAACAGCGACATGCGAGAGCAGCGCAGCGACTCAGGGCGCTTCCCCGCGAGGTG	
G L P G V G V R L G L R A A G G N Q R H A E S S A G D S G R F P R R	
A S P G S A S G W G * G R P G G T S D M R R A A Q A T Q G A S P A G	
P P R G R R P A G V E G G R G E P A T C G E Q R R R L R A L P P Q V	
TCCTGCTGAAGGAGCTG	240
SerCysLeuLysGluLeu	80
GTGGCCCGAGTGCTGCAGAGGCTGTGCGAGCGCGCGCGAAGAACGCTGCTGGCTTCGGC	300
ValAlaArgValLeuGlnArgLeuCysGluArgGlyAlaLysAsnValLeuAlaPheGly	100
TTGCGCGCTGCTGGACGGGGCCCGCGGGGCCCCCGAGGCTTCACACCGAGCTGCGC	360
PheAlaLeuLeuAspGlyAlaArgGlyGlyProProGluAlaPheThrSerValArg	120
AGCTACCTGCCCAACAGGTGACCGAGCACTGCGGGGAGCGGGGCTGGGGCTGCTG	420
SerTyrLeuProAsnThrValThrAspAlaLeuArgGlySerGlyAlaTrpGlyLeuLeu	140
TTGCGCGCGCTGGGCGACAGCTGCTGGTTACCTGCTGCGCACGCTGCGCGCTCTTTGTG	480
LeuArgArgValGlyAspValLeuValHisLeuLeuAlaArgCysAlaLeuPheVal	160
CTGCTGCTCCAGCTGCGCTACAGGTGTGCGGGCGCGCTGTACAGCTCGGGCT	540
LeuValAlaProSerCysAlaTyrGlnValCysGlyProProLeuTyrGlnLeuGlyAla	180
GCCACTCAGGCGCGCGCGCGCACAGCTAGTGGACCCCGAAGGCTCTGGATGCGAA	600
AlaThrGlnAlaArgProProProHisAlaSerGlyProArgArgLeuGlyCysGlu	200
CGGGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGCGGGGTCCCCCTGGGCTGCCAGCCCGGGT	660
ArgAlaTrpAsnHisSerValArgGluAlaGlyValProLeuGlyLeuProAlaProGly	220
GCGAGGAGCGCGGGGAGTGCCAGCCGAAGTCTGCCGTTGCCAAGAGGCCAGGGCT	720
AlaArgArgArgGlyGlySerAlaSerArgSerLeuProLeuProLysArgProArgArg	240
GGCGCTGCCCCTGAGCCGAGCGGACGCCCGTTGGCAGGGCTCCTGGGCCACCCGGGC	780
GlyAlaAlaProGluProGluArgThrProValGlyGlnGlySerTrpAlaHisProGly	260

Fio

도면11AA

```

AGGACGCGTGGACCGAGTGACCGTGGTTTCTGTGTGGTGCACCTGCCAGACCCGCCGAA 840
ArgThrArgGlyProSerAspArgGlyPheCysValValSerProAlaArgProAlaGlu 280

GAAGCCACCTCTTTGGAGGTGCGCTCTCTGGCAGCGGCCACTCCACCCATCGTGGGC 900
GluAlaThrSerLeuGluGlyAlaLeuSerGlyThrArgHisSerHisProSerValGly 300

CGCCAGCACCGCGGGCCCCCATCCACATCGCGGCCACCGTCCCTGGGACACGCCT 960
ArgGlnHisHisAlaGlyProProSerThrSerArgProProArgProTrpAspThrPro 320

TGTCCCCCGGTGTACGCCGAGACCAAGCACTTCTCTACTCTCCTCAGGCGACAAGGAGCAG 1020
CysProProValTyrAlaGluThrLysHisPheLeuTyrSerSerGlyAspLysGluGln 340

CTGCGGGCCTCCTCTACTCAGCTCTCTGAGGCCAGCGCTGAGTGGCGCTCGGAGGCTC 1080
LeuArgProSerPheLeuLeuSerSerLeuArgProSerLeuThrGlyAlaArgArgLeu 360

GTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGGAATCCCGCAGGTTGCC 1140
ValGluThrIlePheLeuGlySerArgProTrpMetProGlyThrProArgArgLeuPro 380

CGCCTGCCCCAGCGCTACTGGCAATGCGGCCCTGTTTCTGGAGCTGCTGGGAACAC 1200
ArgLeuProGlnArgTyrTrpGlnMetArgProLeuPheLeuGluLeuGlyAsnHis 400

GGCAGTGGCCCTACGGGGTGTCTCTCAAGACGCACTGCCGCTGCGAGCTGGGTCACC 1260
AlaGlnCysProTyrGlyValLeuLeuLysThrHisCysProLeuArgAlaAlaValThr 420

CCAGCAGCGGTGTCTGTGCCGGGAGAAGCCCGAGGCTCTGTGGCGGCCCGGAGGAG 1320
ProAlaAlaGlyValCysAlaArgGluLysProGlnGlySerValAlaAlaProGluGlu 440

GAGGACACAGACCCCCGCTGCTGTGTGAGCTGCTCCGCCAGCAGCAGCCCCGTGGCAG 1380
GluAspThrAspProArgArgLeuValGlnLeuLeuArgGlnHisSerSerProTrpGln 460

GTGTACGGCTTCGTGCGGGCTGCTGCGCGGCTGGTGGCCCGAGGCTCTGGGGCTCC 1440
ValTyrGlyPheValArgAlaCysLeuArgArgLeuValProProGlyLeuTrpGlySer 480

AGGCACAACGAACGCCGCTTCTCAGGAACACCAAGATTCTCTCCCTGGGAAGCAT 1500
ArgHisAsnGluArgArgPheLeuArgAsnThrLysLysPheIleSerLeuGlyLysHis 500

GCCAAGCTCTGCTGCAGGAGCTGACGTGGAAGATGAGCGTGGGGGCTGCGTTGGCTG 1560
AlaLysLeuSerLeuGlnGluLeuThrTrpLysMetSerValArgAspCysAlaTrpLeu 520

CGCAGGAGCCCCAGGGTTGGCTGTGTTCGGGCCGAGACCGTCTGCGTGAGGAGATC 1620
ArgArgSerProGlyValGlyCysValProAlaAlaGluHisArgLeuArgGluGluIle 540

CTGGCCAAGTTCTGCACTGGCTGATGAGTGTGTACGTGCTCGAGCTGCTCAGGTCTTTC 1680
LeuAlaLysPheLeuHisTrpLeuMetSerValTyrValValGluLeuLeuArgSerPhe 560

TTTTATGTCAGGAGACACGTTTCAAAAGACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTG 1740
PheTyrValThrGluThrThrPheGlnLysAsnArgLeuPhePheTyrArgLysSerVal 580

```

도면11AB

```

TGGAGCAAGTTGCAAGCATTGGAATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGAG 1800
TrpSerLysLeuGlnSerIleGlyIleArgGlnHisLeuLysArgValGlnLeuArgGlu 600

CTGTGGGAAGCAGAGGTACGGCAGCATCGGGAAAGCCAGGGCCCGCCTGCTGAGCTCCAGA 1860
LeuSerGluAlaGluValArgGlnHisArgGluAlaArgProAlaLeuLeuThrSerArg 620

CTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGACGGGGTGGGGCCGATTGTGAACATGGACTACGTCGTG 1920
LeuArgPheIleProLysProAspGlyLeuArgProIleValAsnMetAspTyrValVal 640

GGAGCCAGAAGCTTCCGCAGAGAAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCA 1980
GlyAlaArgThrPheArgArgGluLysArgAlaGluArgLeuThrSerArgValLysAla 660

CTGTTACGCGTGTCAACTACGAGCGGGCGGGCGCCCGGCCCTCTGGGCGCCTCTGTG 2040
LeuPheSerValLeuAsnTyrGluArgAlaArgArgProGlyLeuLeuGlyAlaSerVal 680

CTGGGCTGGACGATATCCACAGGGCCTGGCGCACCTTCGTGCTGCGTGTGCGGGCCAG 2100
LeuGlyLeuAspAspIleHisArgAlaTrpArgThrPheValLeuArgValArgAlaGln 700

GACCCGCGCGCTGAGCTGTACTTTGTCAAGGTGGATGTACGGCGCGTACGACACCATC 2160
AspProProProGluLeuTyrPheValLysValAspValThrGlyAlaTyrAspThrIle 720

CCCCAGGACAGGCTCAGGAGGTATCGCCAGCATCATCAACCCAGAACACGTAAGTGC 2220
ProGlnAspArgLeuThrGluValIleAlaSerIleIleLysProGlnAsnThrTyrCys 740

GTGCGTCGGTATGCCGTGTCAGAAAGGCCGCCATGGGCACGTCGCAAGGCCCTCAAG 2280
ValArgArgTyrAlaValValGlnLysAlaAlaHisGlyHisValArgLysAlaPheLys 760

AGCCACGCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCGGTACATGCGACAGTTCGTGGCTCACCTG 2340
SerHisValSerThrLeuThrAspLeuGlnProTyrMetArgGlnPheValAlaHisLeu 780

CAGGAGACAGCCCGCTGAGGGATGCCGTGTCATCGAGCAGAGCTCCTCCCTGAATGAG 2400
GlnGluThrSerProLeuArgAspAlaValValIleGluGlnSerSerSerLeuAsnGlu 800

GCCAGCAGTGGCTCTTCGACGCTTCTCTACGCTTCATGTGCCACCAGCGCGTGGCGATC 2460
AlaSerSerGlyLeuPheAspValPheLeuArgPheMetCysHisHisAlaValArgIle 820

AGGGGCAAGTCTACGTCCAGTGCCAGGGGATCCCGAGGGCTCCATCCTCTCCACGCTG 2520
ArgGlyLysSerTyrValGlnCysGlnGlyIleProGlnGlySerIleLeuSerThrLeu 840

CTCTGACGCTGTGCTACGGCGACATGGAGAACAGCTGTTTGGGGGATTGCGGGGAC 2580
LeuCysSerLeuCysTyrGlyAspMetGluAsnLysLeuPheAlaGlyIleArgArgAsp 860

GGGCTGCTCCTGCGTTGGTGGATGATTTCTTGTGGTGACACCTCACCTCACCCAGCG 2640
GlyLeuLeuLeuArgValAspAspPheLeuLeuValThrProHisLeuThrHisAla 880

AAAACCTTCCTCAGGACCTGGTCCAGGTGCTCCCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAACCTG 2700
LysThrPheLeuArgThrLeuValArgGlyValProGluTyrGlyCysValValAsnLeu 900

```

도면11AC

CGGAAGACAGTGGTGAACCTCCCTGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCAGGGCTTTTGT	2760
ArgLysThrValValAsnPheProValGluAspGluAlaLeuGlyGlyThrAlaPheVal	920
CAGATGCCGGCCACGGCCATTCCCTGGTGGGCCCTGCTGTGGATACCGGACCCCTG	2820
GlnMetProAlaHisGlyLeuPheProTrpCysGlyLeuLeuAspThrArgThrLeu	940
GAGGTGCAGAGCGACTACTCCAGCTATGCCCGACCTCCATCAGAGCCAGTCTCACCTTC	2880
GluValGlnSerAspTyrSerSerTyrAlaArgThrSerIleArgAlaSerLeuThrPhe	960
AACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGTCTTGGCGCTG	2940
AsnArgGlyPheLysAlaGlyArgAsnMetArgArgLysLeuPheGlyValLeuArgLeu	980
AAGTGTACAGCCTTTCTGGATTGCAAGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGACCAAC	3000
LysCysHisSerLeuPheLeuAspLeuGlnValAsnSerLeuGlnThrValCysThrAsn	1000
ATCTACAAGATCCTCCTGCTGAGGCGTACAGTTTCACGCATGTGTCTGCAGCTCCCA	3060
IleTyrLysIleLeuLeuGlnAlaTyrArgPheHisAlaCysValLeuGlnLeuPro	1020
TTTCATCAGCAAGTTTGAAGAAGCCACATTTTCTGCGGTCATCTCTGACACGGCC	3120
PheHisGlnGlnValTrpLysAsnProThrPheLeuArgValIleSerAspThrAla	1040
TCCCTCTGCTACTCCATCCTGAAGCCAAAGAACGACGGGATGTCGCTGGGGGCAAGGGC	3180
SerLeuCysTyrSerIleLeuLysAlaLysAsnAlaGlyMetSerLeuGlyAlaLysGly	1060
GCCGCGGCCCTCTGCCCTCCGAGGCCGTGCACTGGCTGTGCCACCAAGCATTCTGCTC	3240
AlaAlaGlyProLeuProSerGluAlaValGlnTrpLeuCysHisGlnAlaPheLeuLeu	1080
AAGCTGACTCGACACCGTGTACCTACGTGCCACTCCTGGGGTCACTCAGGACAGCCAG	3300
LysLeuThrArgHisArgValThrTyrValProLeuLeuGlySerLeuArgThrAlaGln	1100
ACGCAGCTGAGTCGGAGCTCCCGGGGACGACGCTGACTGCCCTGGAGGCCGACGCCAAC	3360
ThrGlnLeuSerArgLysLeuProGlyThrThrLeuThrAlaLeuGluAlaAlaAlaAsn	1120
CCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCCTGGAC	3420
ProAlaLeuProSerAspPheLysThrIleLeuAsp	1132

도면11AF

변형된 C-말단 단백질 (ver. 2)

```

      . . . . .
      ATGCCGCGCGCTCCCGCGTGGCGAGCGCTGCGCTCCCTGCTGCGAGCGCACTACCGCGAGGTGCTGCCGCTGGCAGCTTCGTG
      M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V
      . . . . .
CGGGCGCTGGGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGACGCGGGGACCCGGCGGCTTTCCGGCGCTGGTGCGCCAGTGCTGGTGCGCTGGGACGCGCGCGCGCGCGCG
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A
      . . . . .
      GGCCTCCCGGGGTGCGCTCCGCGTGGGTTGAGGGCGGCGGGGGGAACAGCGACATCGGAGAGCAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCGCGAGGTG
      G L P G V G V R L G L R A A G G N Q R H A E S S A G D S G R F P R R
      A S P G S A S G W G * G R P G G T S D M R R A A Q A T Q G A S P A G
      P P R G R R P A G V E G G R G E P A T C G E Q R R R L R A L P P Q V
      . . . . .
      CCCCTCTTCCGCGAGGTGCTGCTGCTGAAGGAGCTGGTGCGCGAGTGCTGCGAGGCTGTGCGAGCGCGCGCGAAGAACGTGCTGGCTTCGCGCTGCGCTGCGCGGGCGCG
      P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R
      . . . . .
      CGGGGGCCCCCGAGGGCTTCACCAACAGCGTGCGCAGCTACCTGCCCAACAGCGTGACCGAGCACTGCGGGGAGCGGGCGTGGGGGCTGCTGCTGCGCGCGTGCGCGAGCAGCT
      G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V
      . . . . .
      GCTGTTACCTGCTGCGCAGCTGCGCGCTCTTTGCTGGTGCTCCAGCTGCGGCTACCAGGTGTGCGGGCGCGCGCTGTACAGCTCGGGCTGCGCACTCAGGCCCGGGCGCGCG
      L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P
      . . . . .
      ACACGCTAGTGAGCCCCGAGGGCTGTGGATGCGAACCGGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGCGGGGTCCCGCTGGGCTGCGAGCCCCGGGTGCGAGGAGCGCGGGGAGTG
      H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A
      . . . . .
      CAGCCGAAGTGTCCGTTGCCAAGAGGCCAGGGCTGCGGCTGCCCTGAGCGGAGCGGACGCGCGTTGGGCGAGGGTCTGTTGGGCCCAACCGGGCAGGACGCTGACCGAGTGACCG
      S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R
      . . . . .
      TGGTTTCTGTGTGTCACTGCCAGACCCGCGAAGAGCCACCTCTTTGAGGGTGCGCTCTGCGCAGCGCCACTCCACCCACTCGTGGGCGCGCAGCACACGCGGGCGCGCG
      G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P
      . . . . .
      ATCCACATGCGCGGCCACAGCTCCCTGGGACACGCTTGTCCCGCGGTGACGCGGAGACCAAGCACTTCTCTACTCTCAGGCGACAGGAGCAGTGCGGGCCCTCTCTACTCAG
      S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S
      . . . . .
      CTCTGTGAGGCCAGGCTGACTGGCGCTCGGAGGCTGTTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCGCTGGATGCCAGGCACTCCCGCAGGTTGCCCGGCTGCCCGAGGCTACTGGCA
      S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q
      . . . . .
      AATGCGGCGCTGTTCTGAGCTGCTTGGGAACACGCGAGTGCGGCTACGCGGCTGCTCTCAAGACGCACTGCCGCTGCGAGCTGCGGTACCCCGAGCGCGGTGCTGTGCCCG
      M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R
      . . . . .
      GGAGAAGCCCCAGGCTCTGTGGCGGCCCCGAGGAGGAGACACAGACCCCGTGGCTGGTGAGCTGCTCCGCGCAGCAGCAGCCCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCGTGGCGGCTG
      E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C
      . . . . .
      CCTGCGCGGCTGGTGCCCCAGGCTCTGGGGCTCCAGGCACACGAACCGGCTTCTCAGGAACACCAAGAAGTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTGCTGCGAGGAGCT
      L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L
      . . . . .
      GACGTGAAGATGAGCGTGCGGGACTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCCAGGGGTTGGCTGTGTTCCGGCGCAGAGCACCTCTGCGTGAGGAGATCCTGCCAAGTTCCTGCACTGGCT
      T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L
  
```

Fig. 11AF

도면11AG

GACGTGGAAGATGAGCGTGCAGGACTGCGCTTGCGTCGCGAGGAGCCAGGGTTGCGTGTGTTCCGGCCGCGAGGACCGCTGCGTGAGGAGATCCTGGCCAAGTTCTGCACCTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCTGAGCTGCTCAGGCTTTCTTTATGTACCGGAGACCAGCTTTCAAAGAAGAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAAGCATTGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCACTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGAGCTGTGGAAGCAGAGGTGAGCAGCATCGGGAAGCCAGGCGCGCTGCTGACGTCCAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

CGGGCTGCGCGCGATTGTGAACATGAGCTACGTGCGGAGCCAGAACGTTCCGAGAGAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACCTCGAGGGTGAAGGCACTGTTACAGCGCTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCGCGCGCGCGCGCTCTGCGGCGCTCTGTGCTGCGGCTGACGATATCCACAGGCGCTGCGGCGCTTCTGCTGCGGTGCGGGCCGAGGACCGCGCGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

TGTCAAGTGTGTGAGCGGCGCTACGACACCATCCCCAGGACAGGCTCAGGAGGTGATCGCCAGCATCAAAACCCAGAACACGTAAGTGTGCGTGTGCGGTATGCGGTGCGTCA
V K V D V T G A Y D T I P Q D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCGCGCGCGCGCGCTTCAAGAGCAGCTCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCGCTACATGCGACAGTTGCGGCTCACCTGCGAGGACGAGCGCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGCTGCTCATGAGCAGAGCTCTCCCTGAATGAGGCGCAGTGGCTCTTGAGCTCTTCTACGCTTCATGTGCCACACGCGGTGCGCATCAGGGGCAAGTCTACGTCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCCGAGGCTCCATCTCTCCAGCTGCTCTGCGAGCTGTGCTACGGCGACATGGAACAAGCTTTTGGGGGATTGCGGGGACGCGCTGCTCTGCGTTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTGTTGGTGACACCTCACCTCACCCAGCGAAACCTTCTCAGGACCGCTGCTCGAGGTGCTCCCTGAGTATGCGTGGGTGAAGTTCGCGAAGACAGTGTGTAATCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAGAAGACGAGGCGCTGGGTGGCACGCGCTTTTGTTCAGATGCCGCGCCACGCGCTATTCCCTGGTGGCGCTGCTGCTGGATACCGGACCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S

CTATGCCCGGACCTCCATCAGAGCGAGTCTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGGAACATGCGTCGCAAACTCTTTGGGGCTTTCGCGCTGAAGTGTACAGCGCTGTTCTGGA
Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D

TTTGAGGTGAACAGGCTCCAGAGGTTGTGACCAACATCTACAAGATCTCCTGCTGCGAGCGGTACAGGTTTCACGCATGTGTGCTGAGCTCCCATTTATCAGCAAGTTTGAAGAA
L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N

CCCCACATTTTCTGCGGCTCATCTCTGACAGGCGCTCCCTCTGCTACTCCATCTGAAAGCCAAAGAACGCAAGGATGTGCTGGGGGCAAGGGCGCGCGCGCTCTGCGCTCCGA
P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A E

CCGAAGAAAACATTTCTGTGCTGACTCTGCGGTGCTGGGTC
E E N I L V V T P A V L G S

GGGACAGCCAGAGATGAGCCACCCGAGACCGTGGGTGTGGCAGCTTTCCGGTGTCTCTCTGGAGGGGAGTTGGGCTGGGCGCTGTGACTCTCAGCGCTCTGTTTTCCCCAG
G Q P E M E P P R R P S G V G S F P V S P G R G V G L G L *

도면11AH

모티프 A 결핍 단백질 A (ver. 2)

49/68

```

ATGCCGCGCGCTCCCGCTGCCGAGCGGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGGAGGTGCTGCCGCTGGCAGCGTGTG
M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V

CGGCGCTGGGCCCCAGGCTGGCGCTGGTGCAGCGCGGGGACCCGGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGGCCAGTGGCTGGTGGTGGCCCTGGGACGACGCGCGCGCGCG
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A

GGCCTCCCGGGGTGCGCTCCGCTGGGTTGAGGGCGGCGGGGGGAACGCGACATGCGGAGGAGCGCAGGCGACTCAGGGCGCTTCCCGCGAGGTG
G L P G V G V R L G L R A A G G N Q R H A E S S A G D S G R F P R R
A S P G S A S G W G * G R P G G T S D M R R A A Q A T Q G A S P A G
P P R G R R P A G V E G G R G E P A T C G E Q R R R L R A L P P Q V

CCCTCTTCGCGAGGTGCTGCTGAAGGAGTGGTGGCCGAGTGTGCAGAGGCTGTGCGAGCGCGGCGGAGAACGTGCTGGCTTCGCGCTTGGCAGCGGCGCG
P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R

CGGGGGCCCCCGAGGCTTCCACCCAGCGTGGCGAGTACCTGCCAACACGCTGACCGACGCACTGCGGGGAGCGGGGCTGGGGCTGCTGCTGCGCGCGTGGCGAGCAGT
G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V

GCTGGTTCACCTGCTGCGACGCTGCGCGCTTTGTGCTGGTGGCTCCAGCTGCGCTACCAAGGTGTGCGGGCGCGCGTGTACAGCTGCGCGCTGCCACTCAGGCCCGCGCGCGC
L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P

ACACGCTAGTGAGCCCCGAGCGTCTGGATGCGAACCGGCTGGAACCATAGCGTCAGGGAGCGCGGGTCCCGCTGGGCTGCCAGCCCCGGGTGCGAGGAGCGCGGGGAGTGC
H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A

CAGCGGAAGTGTGCGTGGCCAGAGGCCAGCGTGGCGCTGCCCTGAGCCGAGCGGACGCCGTTGGCAGGGGTCTTGGGCCACCCGGGACGAGCAGCGTGGACCGAGTGAACG
S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R

TGGTTTCTGTGTGTACCTGCCAGACCCGCGAAGAGCCACCTCTTTGGAGGTGCGCTCTCTGCGCAGCGCCACTCCACCCATCCGTGGGCGCGCAGCACCACGCGGGCCCCC
G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P

ATCCACATCGCGGCCACCGCTCCCTGGGACAGCCTTGTCCCCGGGTGACGCCGAGACCAAGCACTTCCTCTACTCTCCTCAGGCGACAGGAGCAGCTGCGGCGCTCCTTCTACTCAG
S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S

CTCTCTGAGGCCAGCCTGACTGCGCTCGGAGGCTCGTGGAGACCATCTTTCTGGGTTCCAGGCCCTGGATGCCAGGAGCTCCCGCAGGTTGCCCGGCTGCCCGCAGCGCTACTGGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATGCGGCGCTGTTCTGGAGCTGCTTGGGAACGAGCGAGTGGCCCTAGCGGGTGTCTCTCAAGACGCACTGCCGCTGCGAGCTGGGTACCCCGAGCGCGGTGTGTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAAGCCCGAGGCTCTGTGGCGGCCCCGAGGAGGAGACAGACCCCGCTGCGCTGTGTCAGCTGCTCCGCCAGCAGCAGCCCTGGCAGGTGTACGGCTTCTGTGCGGGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

CCTGCGCGCGTGGTGGCCCCAGGCTCTGGGCTCCAGGCACACGAACCGCTTCTCAGGAACCAAGAAGTTCATCTCCCTGGGGAAGCATGCCAAGCTCTCGCTGCAGGAGCT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

```

도면11AI

GACGTGGAAAGTAGAGCGTGGCGGACTGCGCTTTGGCTGGCAGAGAGCCACGGGGTTGGCTGTGTTCCGGCCCGAGAGACACCGCTGTGCGTGAGGAGATCTGGCCAAAGTCTCGCATGCGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

GATGAGTGTGTACGTGCTCGAGCTGCTCAGGTCTTTCTTTATGTACGGAGACCCAGTTTCAAAAGAACAGCGTCTTTTCTACCGAAGAGTGTCTGGAGCAAGTTGCAAAGCATTGG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACGACGCTTTGAAGAGGGTGCAGCTGCGGGAGCTGTGCGAAGCAGAGGTGACGGCAGCATGCGGAAGCCAGCGCCGCCCTGCTGACGTCGAGACTCCGCTTCATCCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P I

CGGGCTGCGGCCGATTGTGAACATGACTACGTCGTGGAGCCAGAAAGTTCGCGAGAGAAAGAGGGCCGAGCGTCTCACTCGAGGGTGAAGGACACTGTTACGCGTCTCAACTACGA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCGCGGCCCGCCCTGCTGGCGCCTCTGTGCTGGGCTGAGCATATCCACAGGGGCTGGCGCCACTTGTGCTGCGTGTGCGGGCCAGGACCCGCGCCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

GTGCAAG
V K

GACAGGGCTACGAGGTCATCGCCAGCATCAAAACCCAGAACACGCTACTGGTGGCTGGTATGCGGTGGTCCA
D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCCGCCCATGGGACGTCGCGCAAGGCTTCAAGAGCCACGTCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCCGTACATGCGACAGTTGCTGGCTCACTCGCAGGAGACCAGCCCGCTGAAGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGGCGTGTGTATCGAGCAGAGCTCCTCCTGAATGAGGCCACGAGCTGGCGCTCTTGCAGCTCTTCTACGCTTTCATGTCACCAACCGCGTGGCATGAGGGCAAGCTCTACGTCAGTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCCGCAGGGCTTCATCCTCTCCACGCTGCTCTGACGCTGTGCTACGGCAGCATGGAGAACAGCTGTTTGGGGGATTGGCGGGAGCGGCTGCTCTGCGTTTGGTGA
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTGTGTGGTACACCTCACCTACCCACGGGAAACCTTCTCAGGACGCTGCTCGAGGTGTCCCTGAGTATGGCTGGTGGTGAAGTTCGCGAAGACAGCTGGTGAACCTCCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAGAAGACGAGGCCCTGGGTGGCAGGCTTTTGTTCAGATGCCGGCCACGGCTATTCCCTGGTGGCGGCTGCTGCTGGATACCCGAGCCCTGGAGGTGCAGAGCGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S S

CTATGCCCGGACCTCCATCAGAGCGCACTCACCTTCAACCGCGGCTTCAAGGCTGGGAGAACATGCTGCGCAAACTCTTGGGGTCTTCGGGCTGAAGTGTACACGCTCTTTCGGA
Y A R T S I R A S L T F N R G F K A G R N M R R K L F G V L R L K C H S L F L D

TTTGCAGGTGAACAGCCTCCAGACGGTGTGCACCAACACTCTACAAGATCTCCTGCTGACAGCGTACAGGTTTCAACGATGTGTGCTGACGCTCCCATTTATCAGCAAGTTTGAAGAA
L Q V N S L Q T V C T N I Y K I L L L Q A Y R F H A C V L Q L P F H Q Q V W K N

CCCCACATTTTCTGCGGCTCATCTGTACACGGCTCCCTCTGCTACTCATCTGAAAGCCAGAACGACGAGGTGTGCTGCGGGCCAGAGGCGCGCGGCGCTCTGCCCTCCGA
P T F F L R V I S D T A S L C Y S I L K A K N A G M S L G A K G A A G P L P S E

GGCGGTGAGTGGTGTGCCCAACGAGATCTCTGCTCAAGGTGACTGACACCGGTGTGCTACTGCTGCCACTCTCGGGGTCACCTAGGACAGCGCCAGCAGCAGTGTGGGAAGCTCC
A V Q W L C H Q A F L L K L T R H R V T Y V P L L G S L R T A Q T Q L S R K L P

도면11AJ

GGGAGCAGACGCTGACTGCCCTGGAGGCGCAGGCCAACCCGGCACTGCCCTCAGACTTCAAGACCATCTTGGACTGATGGCCACCCGCCACAGGCCAGGCCGAGAGCAGACACCGACGCC
G T T L T A L E A A A N P A L P S D F K T I L D
CTGTCAACGCCGGGCTCTACGTCCAGGAGGGGAGGGCGGCCACACCCAGGCCCGACCGCTGGGAGTCTGAGGCCCTGAGTGAGTGTTTGGCCGAGGCCCTGCATGTCCGGCTGAAGCT
GAGTGTCCGGCTGAGGCCCTGAGCGAGTGTCCAGCCAAAGGCTGAGTGTCCACACACTGCGGCTTCACTTCCCCACAGGCTGGCGCTCGGCTCCACCCAGGGCCAGCTTTCTCCAC
CAGGAGCCGGGCTTCCACTCCCAACATAGGAATAGTCCATCCCGAGATTGCGCATGTGACCCCTCGCCCTGCCCTCCTTTGCCCTCCACCCCCACCATCCAGGTGGAGACCGCTGAGAA
GGACCCCTGGGAGCTCGGAATTTGGAGTGACCAAAGGTGTGCCCTGTACACAGGCGAGGACCCCTGCACCTGAGTGGGGTCCCTGTGGGTCAAATTTGGGGGAGGTGCTGTGGGAGTAA
AATACTGAATATAGAGTTTTCACTGTTTGA

도면11AL

GATGAGTGTGTACGTCGTCGAGCTGCTCAGGCTTTCTTTTATGTACGAGACCAAGCTTTTCAAAGAACAGGCTCTTTTCTACCGGAAGAGTGTCTGCGAGCAAGTGTCAAAGCATGTG
M S V Y V V E L L R S F F Y V T E T T F Q K N R L F F Y R K S V W S K L Q S I G

AATCAGACAGCATTTGAAGAGGGTCAGCTGCGGGAGCTGTGCGAAGCAGAGGTCAGGAGCATCGGAAGCCAGGCCCGCCCTGCTGACGTCCAGACTCCGCTTCATCCCAAGCCTGA
I R Q H L K R V Q L R E L S E A E V R Q H R E A R P A L L T S R L R F I P K P D

CGGGCTGCGGCGATTGTGAACATGACTACGTCGTGGGAGCCGAGAAGCTTCGCGAGAGAAAAGGGCCGAGGCTGCACCTCGAGGGTGAAGGCATGTTTCAGCGTGTCTCAACTAGCA
G L R P I V N M D Y V V G A R T F R R E K R A E R L T S R V K A L F S V L N Y E

GCGGGCTGCGGCGCCCGGCTCTCTGGGCGCTCTGTGCTGGGCTGGACGATATCCACGGGCTGGCGCACTTCTGCTGCGTGTGCGGGCCGACGACCCGCGGCTGAGCTGTACTT
R A R R P G L L G A S V L G L D D I H R A W R T F V L R V R A Q D P P P E L Y F

GTGCAAG
V K

GACAGGCTCAGGAGGTCATCGCCAGCATCATCAACCCGACAGACAGTACTGCGTGCGTGTGCGGATGCGGTGGTCCA
D R L T E V I A S I I K P Q N T Y C V R R Y A V V Q

GAAGGCGGCGCATGGGACGTCGCCAAGGCTTCAAGAGCCAGCTCTCTACCTTGACAGACCTCCAGCGGTACATGGACAGTTCGTGGCTCACCTGCAGGAGACCAGGCCGCTGAGGGA
K A A H G H V R K A F K S H V S T L T D L Q P Y M R Q F V A H L Q E T S P L R D

TGCGTGTGTCATCGAGCAGAGCTCTCCCTGAATGAGGCGAGCATGGGCTCTTGCAGCTCTCTTACGCTTCATGTGCCACACGCGCTGCGCATCAGGGGCAAGTCTCATCGCACTG
A V V I E Q S S S L N E A S S G L F D V F L R F M C H H A V R I R G K S Y V Q C

CCAGGGGATCCGCGAGGCTCCATCTCTCCAGCTGCTCTGACGCTGTGCTACGCGACATGGAGAACAGCTGTTTGGGGGATTCGGCGGGACGGGCTGCTCTCGCTTTGGTGG
Q G I P Q G S I L S T L L C S L C Y G D M E N K L F A G I R R D G L L L R L V D

TGATTTCTGTGTGTGACACCTCACCTCACCGACGGAACCTTCTCAGGACCTGGTCCGAGGTCCTCTGAGTATGGCTGCGTGGTGAATCTGCGGAAGACAGTGGTGAATCTCC
D F L L V T P H L T H A K T F L R L T L V R G V P E Y G C V V N L R K T V V N F P

TGTAGAAGACGAGGCCCTGGTGGACGCGCTTTGTTGAGATGCCGCCACGGCTATTCCCTGCTGGCGGCTGCTGCTGATACCGGACCCCTGGAGGTGCAGAGGACTACTCCAG
V E D E A L G G T A F V Q M P A H G L F P W C G L L L D T R T L E V Q S D Y S R

GTGAGCGCACTGGCGGGAAGTGGAGGCTGTGCCCGGCTGGGCGAGGTGCTGCTGACGGGCGTGTGGCTCCACCTCTGCTTCGCTGTGGGCGAGGCGACTGCCAATCCCAAGGGTCAGA
*

TGCCACAGGGTGGCCCTGTCCTCATCTGGGCTGAGCAAAATGCATCTTTCTGTGGAGTGAGGGTGCTCACAAACGGGAGCAGTTTCTGTGCTATTTGGTAA__

도면11AM

모티프 A 결핍 및 변형된 C-말단 (ver. 2)

```

ATGCCCGCGCTCCCGCTGCCGAGCCGTGCGCTCCCTGCTGCGCAGCCACTACCGGAGGTGCTGCGGCTGGCCACGTTCGTG
M P R A P R C R A V R S L L R S H T R E V L P L A T F V

CGGCGCTGCGGCCCCAGGGCTGGCGGCTGGTGACGCGCGGGACCCGCGGCTTTCCGCGCGCTGGTGCGCCAGTGCTGGCCCTGGGACGACGCGCCGCCCCCGCGCG
R R L G P Q G W R L V Q R G D P A A F R A L V A Q C L V C V P W D A R P P P A A

GGCTCCCGGGGTGCGGCTCCGCTGGGTTGAGGGCGGCGGGGGGAACAGCGACATGCGGAGAGCAGCGACGCGACTCAGGGCGCTTCCCGCGAGGTG
G L P G V G V R L G L R A A G G N Q R H A E S S A G D S G R F P R R
A S P G S A S G W G * G R P G G T S D M R R A A Q A T Q G A S P A G
P P R G R R P A G V E G G R G E P A T C G E Q R R R L R A L P P Q V

CCCTCCCTCCGCCAGGTGCTGCTGAAGGAGCTGGTGGCCGAGTGCTGCAGAGGCTGTGCGAGCGCGCGCGAAGACGTGCTGGCTTCGCGCTTCGCGCTGCTGACGCGGCGCG
P S F R Q V S C L K E L V A R V L Q R L C E R G A K N V L A F G F A L L D G A R

CGGGGCCCCCGGAGGCTTACACACGCGTGCGGAGCTACCTGCCAACACGCGTACCGACGCGACTGCGGGGAGCGGGGCTGGGGCTGCTGCTGCCGCGCTGGCGACGACGT
G G P P E A F T T S V R S Y L P N T V T D A L R G S G A W G L L L R R V G D D V

GCTGGTTACCTGCTGCGACGCTGCGCGCTTTGTGCTGGTGGCTCCGAGCTGCGGCTACAGGTGTGCGGCGCGCGGCTGTACAGCTCGGGCTGCGACTCAGGCGCGCGCGCG
L V H L L A R C A L F V L V A P S C A Y Q V C G P P L Y Q L G A A T Q A R P P P

ACACGCTAGTGACCCCGAAGGCTGCTGGATGCGAACGCGGCTGGAACATAGCGTCAGGGAGGCGGGGCTCCCGCTGGGCTGCGAGCGCGCGGGTGCGAGGAGCGCGGGGCGAGTG
H A S G P R R R L G C E R A W N H S V R E A G V P L G L P A P G A R R R G G S A

CAGCGAGCTGCGGCTTGCCTCAGAGGCGCGAGGCTGGCGCTGCCCTGAGCGGAGCGGACGCGGTTGGCGAGGGGCTCTGGGCGCGCGCGGGGCGAGGCGCGCTGGACG
S R S L P L P K R P R R G A A P E P E R T P V G Q G S W A H P G R T R G P S D R

TGGTTTCTGTGTGTGTGCTGCTGCGAGCGCGCGAAGAACACCTCTTTGAGGGGTGGGCTCTCTGCGACGCGGCGCTCCGCGCGCGCTCCGCGCGCGCTGGGCGCGCGCGCGCG
G F C V V S P A R P A E E A T S L E G A L S G T R H S H P S V G R Q H H A G P P

ATCCACATCGCGGCGACCGCTCCCTGGGACACGCTTGTCCCGCGGTACGCGGAGACCAAGCACTTCTCTACTCTCAGGCGACAAGGAGCAGCTGCGGCGCTCCCTCTACTCAG
S T S R P P R P W D T P C P P V Y A E T K H F L Y S S G D K E Q L R P S F L L S

CTCTGAGGCGCGGCTGACTGGGCTGCGAGGCTGCTGGAGACCATTTCTGGGTTCCAGGCGCTGATGCCAGGAGCTCCCGCGAGGTTGCCCGCGCTGCCCGAGCGCTACTGCA
S L R P S L T G A R R L V E T I F L G S R P W M P G T P R R L P R L P Q R Y W Q

AATGCGGCGCTGTTTCTGAGCTGCTTGGGAACACGCGAGTGCGGCTACGCGGCTGCTCCTCAAGACGCACTGCGCGCTGCGAGCTGCGGTCACCGGAGCGCGGTGCTGTGCGCG
M R P L F L E L L G N H A Q C P Y G V L L K T H C P L R A A V T P A A G V C A R

GGAGAAGCGCGGCTGCTGCGGCGCGCGGAGGAGGACACAGACCGCGCGCTGCGCTGCTGCGAGCTGCTCCGCGAGCAGCAGCGCGCTGGCAGGTGTACGCGCTTCTGCGGCGCTG
E K P Q G S V A A P E E E D T D P R R L V Q L L R Q H S S P W Q V Y G F V R A C

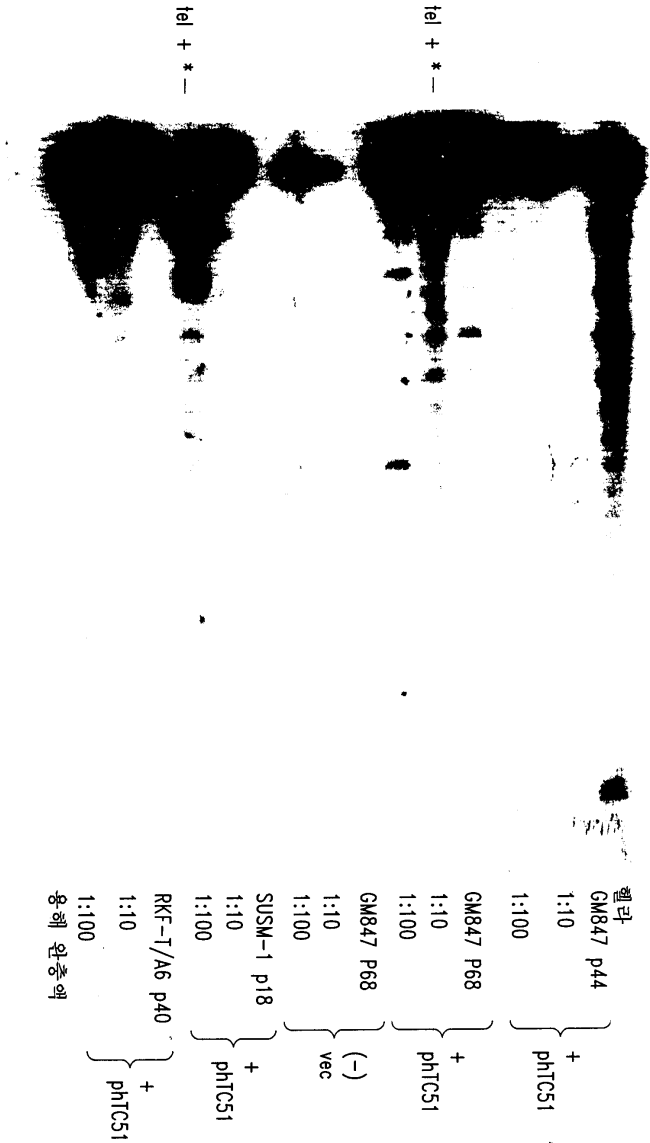
CCTGCGCGGCTGCTGCGCGCGCGCTGCGGCTCCAGGACACAGGAGCGCGCTTCTCAGGAACACCAAGAGTTCTATCTCCCTGGGAGAGCATGCCAGCTCTGCTGCGAGGCT
L R R L V P P G L W G S R H N E R R F L R N T K K F I S L G K H A K L S L Q E L

GACGTGAAGATGAGCTGCGGCTGCGCTTGGCTGCGCAGGAGCGCGGCTTGGCTGTGTTCCGCGCGCAGAGCAGCGCTGCTGCTGAGGAGATCTGGCCAAGTTCTGCGAGTGGCT
T W K M S V R D C A W L R R S P G V G C V P A A E H R L R E E I L A K F L H W L

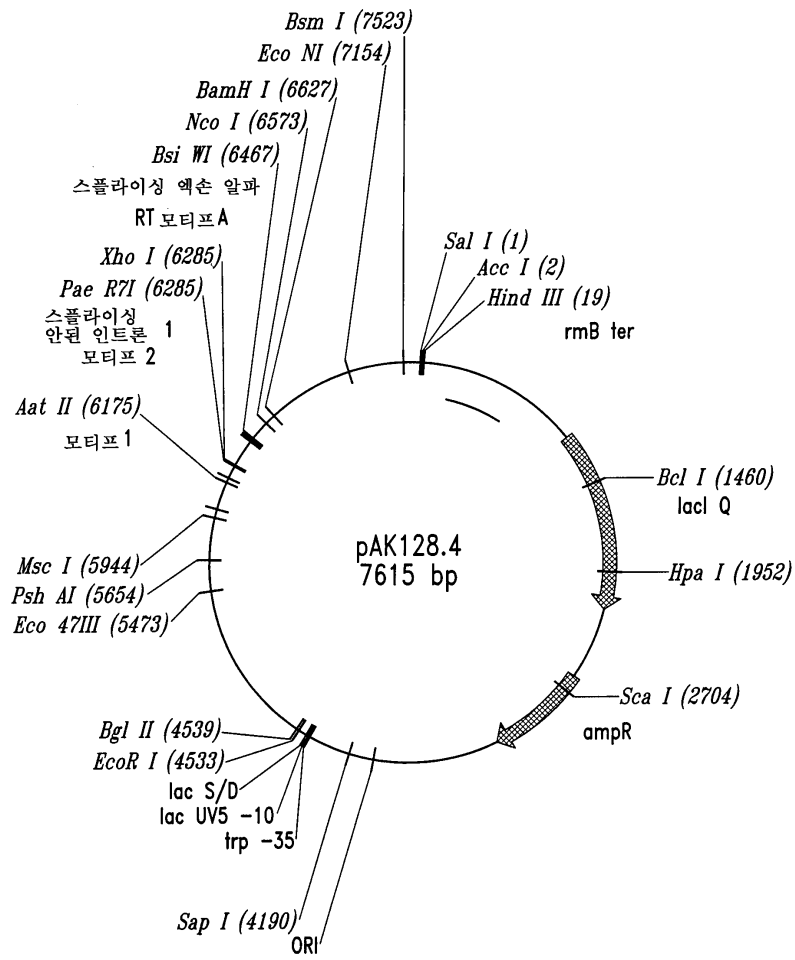
```


도면12

23/10/97
5 day exposure
2:6



도면13A



도면13B

좌위 pAKI28.4 7615 bp dsDNA 환형

정의 엑손 베타가 스플라이싱된 사람 텔로머라제 클론

```

1  tcgacctgca ggcatgcaag cttggcactg gccgtcgttt tacaacgtcg tgactgggaa
61  aaccttgccg ttacccaact taatcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt
121 aatagcgaag aggcccgcac cgatcgccct tccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa
181 tggcgccctga tgcggtatit tctccttac catctgtgcg gtatttcaca ccgcataaat
241 tcctgttttt ggcggtatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag
301 aagcggtctg ataaaacaga atttgcctgg cggcagtagc ggggtgggtcc cactgaccc
361 catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt agtgtggggt ctccccatgc
421 gagagtaggg aactgccagg catcaataa aacgaaagcg tcagtcgaaa gactgggcct
481 ttctgtttat ctgtgtttt tgggtgaacg ctctcctgag taggacaaat ccgccgggag
541 cggatttgaa cgttgcgaag caacggcccg gaggtgtggc ggaggagcgc ccgcataaaa
601 ctgccaggca tcaaatatag cagaaggcca tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac
661 aaactcttcc tgtcgtcata tctacaagcc atccccccac agatacggta aactagcctc
721 gtttttcat caggaaagca ggaatttat ggtgcactct cagtacaatc tgcctgtatg
781 ccgcatagtt aagccagccc cgacaccgcg caacaccgcg tgacgcgccc tgacgggctt
841 gtcgtctccc ggcattccgt tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc
901 agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg ataccgctat
961 ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagag gtgaggttct gtacccgaca
1021 ccacgaatg gtgcaaaacc ttctcggtta tggcatgata gcgcccgaa gagagtcaat
1081 tcagggtggt gaattgtgaa ccagtaacgt tatacagatg cgcagagtat gccggtgtct
1141 cttatcagac cgtttcccg cgtgtgaacc aggcagcca cgtttctgcg aaaaacgggg
1201 aaaaagtggg agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacaacaac
1261 tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc
1321 cgtcgcaaat tgcgcggcg attaatctc gcgcgatca actgggtgcc agcgtgtgtg
1381 tgcgtatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaacg ggcgtgcac aatcttctcg
1441 cgcaacgcgt cagtggcgct atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg
1501 tggaaagctg ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacaccca
1561 tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcggtggag catctggtcg
1621 cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt aagtctgtc tcggcgcgctc
1681 tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctgcgaatca aattcagccg atagcggaa
1741 ggaagggcga ctggagtgc atgtccggtt ttcaacaacac catgcaaatg ctgaatgagg
1801 gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg
1861 ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata
1921 ccgaagacag ctcatgttat atcccgcgt taaccaccat caaacaggat ttctgcctgc
1981 tggggcaaac cagcgtggac cgttgcctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca
2041 atcagctgtt gccgctctca ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa
2101 ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac
2161 tggaaagcgg gcagtgaagc caacgcaatt aatgtaagtt agctcactca ttaggcaccc
2221 caggctttac actttatgct tccgacctgc aagaacctca cgtcaggtgg cacttttcgg
2281 ggaatgtgc gcggaacccc tattgttta ttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg
2341 ctcatgagac aataaccctg ataatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt
2401 attcaacatt tccgtgtcgc cttatttccc tttttgcgg cattttgcct tcctgttttt
2461 gctcaccacg aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg
2521 ggttacatcg agaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggcccgaag
2581 aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgctatg tggcgcggtg tttatccgta
2641 ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg

```

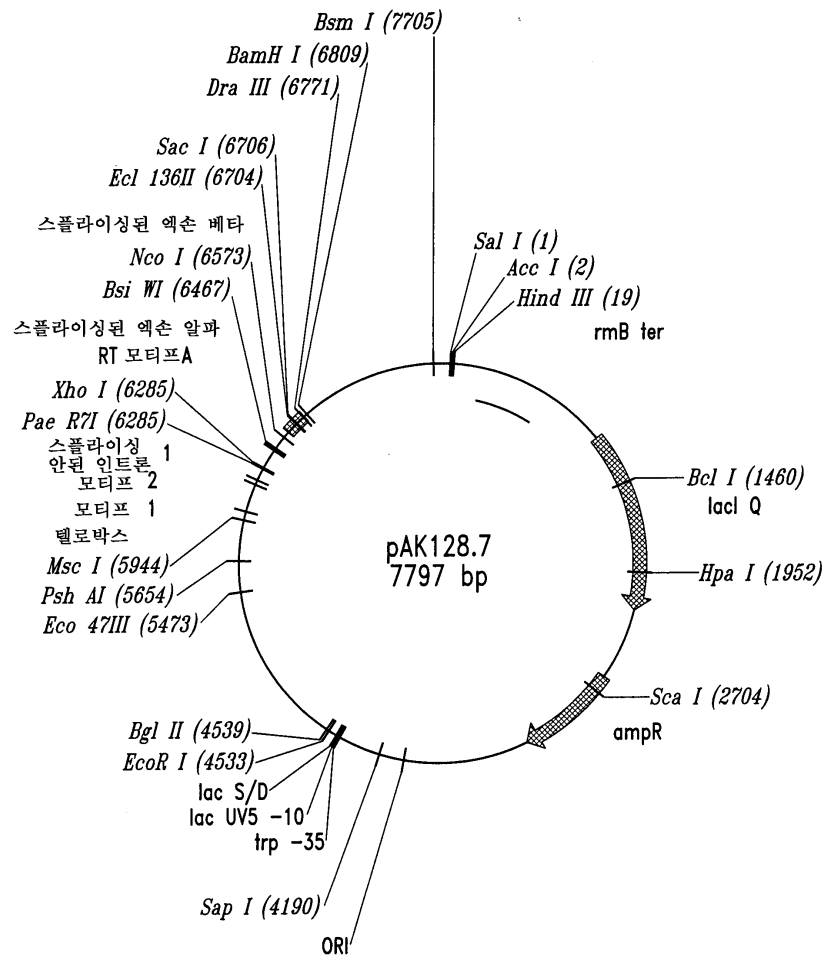
도면13C

2701 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca
 2761 gtgctgccat aacctagagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag
 2821 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc
 2881 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg
 2941 tagcaatggc aacaacgttg cgcaaacat taactggcga actacttact ctgacttccc
 3001 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg
 3061 cccttccggc tggctgggtt attgctgata aatctggagc cggtagagct gggctcgcg
 3121 gtatcattgc agcactgggg ccagatggtg agccctccc tatcgtagt atctacacga
 3181 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtcgagata ggtgcctcac
 3241 tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa
 3301 aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca
 3361 aaatccctta acgtgagttt tcttccact gagcgtcaga cccgtagaa aagatcaaaag
 3421 gatcttctgt agatcctttt tttctgcgct taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac
 3481 cgctaccagc ggtggttgtt ttgcccgcgc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa
 3541 ctggcttcag cagagcgagc ataccaaata ctgtccttct agttagaccg tagttaggcc
 3601 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaata ctgttaccag
 3661 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgct ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac
 3721 cggataaggg gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc
 3781 gaacgacctc caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc
 3841 ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca
 3901 cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg ttcgcgcc
 3961 tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg cgggagccta tggaaaaacg
 4021 ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttctg cacatgttct
 4081 ttctgctgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata
 4141 ccgctcgcgc cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc
 4201 gcccaatacg caaacgcctc ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agaattaatt
 4261 ctcatgtttg acagcttata atcgactgca cgtgcacca atgcttctgg cgtcaggcag
 4321 ccacggaagc ctgtggtatg gctgtgcagg tcgtaaatca ctgcataatt cgtgtcgtc
 4381 aaggcgactc cccgttctgg ataattgttt ttgcgccgac atcataacgg tttcggcaaa
 4441 tattctgaaa tgagctgttg acaattaatc atcggctcgt ataattgtgtg gaattgtgag
 4501 cggataacaa tttcacacag gaaacagcga tgaattcaga tctaccatg aaggagctgg
 4561 tggcccgagt gctgcagagg ctgtgcgagc gggcgcgaa gaacgtgctg gccttcggct
 4621 tcgctgctgt ggacggggcc cgcggggggc ccccgaggc cttaccacc agcgtgcgca
 4681 gctacctgcc caacacgggt accgacgcac tgcgggggag cggggcgtgg gggctgctgc
 4741 tgcgccgctg gggcgacgac gtgctggttc acctgtggc acgtgctgc ctctttgtgc
 4801 tgggtgctcc cagctgcgcc taccagggtg cggggccgcc gctgtaccag ctccggcgtg
 4861 ccactcaggg ccggcccccg ccacacgcta gtggaccctg aaggcgtctg ggtgcgaa
 4921 gggcctggaa ccatagcgtc agggaggcgg ggtccccct gggcctgcca gcccgggtg
 4981 cgaggaggcg cgggggcagt gccagccgaa gctgtccgtt gcccaaggag cccaggcgtg
 5041 gcgctgcccc tgagccggag cggacgcccg ttggcagggt gtcctggggc caccggggca
 5101 ggacgcgtgg accgagtgac cgtggtttct gtgtggtgac acctgccaga cccgccgaag
 5161 aagccacctc tttggagggt gcgctctctg gcacgcgcca ctcccacca tccgtggggc
 5221 gccagcacca cgcggggccc ccatccacat cgcggccacc acgtccctgg gacacgcctt
 5281 gtcccccggt gtacgccgag accaagcact tctctactc ctcaggcgac aaggagcagc
 5341 tgcggccctc ctctctactc agctctctga ggccagcct gactggcgct cggaggctcg
 5401 tggagaccat ctttctgggt tccaggccct ggatgccagg gactccccgc aggttgcccc
 5461 gcctgccccg gcgtactgga caaatgcggc cctgtttct ggagctgctt gggaaaccag
 5521 cgcagtgccc ctacgggggt ctctcaaga cgcactgccg gctgcgagct gcggtcacc

도면13D

5581 cagcagccgg tgtctgtgcc cgggagaagc cccagggctc tgtggcggcc cccgaggagg
 5641 aggacacaga ccccgctcgc ctgggtgcagc tgctccgcca gcacagcagc ccctggcagg
 5701 tgtacggctt cgtgcgggcc tgctgcgcc ggctgggtgcc cccaggcctc tggggctcca
 5761 ggcacaacga acgccccttc ctcaggaaca ccaagaagtt catctccctg gggaagcatg
 5821 ccaagctctc gctgcaggag ctgacgtgga agatgagcgt gcgggactgc gcttggtgc
 5881 gcaggagccc aggggttggc tgtgttccgg ccgcagagca ccgtctgctg gaggagatcc
 5941 tggccaagtt cctgactggt ctgatgagtg tgtacgtcgt cgagctgctc aggtctttct
 6001 tttatgtcac ggagaccacg tttcaaaaga acaggctctt tttctaccgg aagagtgtct
 6061 ggagcaagtt gcaaacgatt ggaatcagac agcacttgaa gaggggtgcag ctgcccggagc
 6121 tgtcgggaag agagggtcagg cagcatcggg aagccaggcc cgccctgctg acgtccagac
 6181 tccgcttcat cccaagcct gacgggctgc ggcgattgt gaacatggac tacgtcgtgg
 6241 gagccagaac gttccgcaga gaaaagaggg ccgagcgtct cacctcgagg gtgaaggcac
 6301 tgttcagcgt gctcaactac gagcgggcgc ggcgccccgg cctcctgggc gcctctgtgc
 6361 tgggcttgga cgatatccac agggcctggc gcaccttctg gctgcgtgtg cgggcccagg
 6421 accgcgcgac tgagctgtac ttgtcaagg tggatgtgac gggcgcgtac gacaccatcc
 6481 cccaggacag gctcacggag gtcatcgcca gcatcatcaa accccagaac acgtactcgg
 6541 tgcgtcggtg tgccgtggtc cagaaggccg cccatgggca cgtccgcaag gccttcaaga
 6601 gccacgtcct acgtccagtg ccaggggatc ccgcagggct ccacctcttc cagctgtctc
 6661 tgcagcctgt gctacggcga catggagaac aagctgtttg cggggattcg gcgggacggg
 6721 ctgctcctgc gtttggtgga tgatttcttg ttggtgacac ctcacctcac ccacgcgaaa
 6781 acttcctcag gacctggtcc gaagtgtcct gagtatggct gcgtggtgaa cttgcgggag
 6841 acagtgtgta acttccctgt agaagacgaa gccctgggtg gcacggcttt tggtcagatg
 6901 ccgcccacag gcctattccc ctggtgcggc ctgctgctgg ataccggac cctggagggtg
 6961 cagagcgact actccagcta tgcccggacc tccatcagag ccagttctac cttcaaccgc
 7021 ggcttcaagg ctgggaggaa catgcgtcgc aaactctttg gggctcttgc gctgaagtgt
 7081 cacagcctgt ttctggattt gcaggtgaac agcctccaga cgggtgtcac caacatctac
 7141 aagatcctcc tgcgtcaggc gtacagggtt cagcatgtg tgctgcagct cccatttcat
 7201 cagcaagttt ggaagaacc cactttttc ctgcgcgtca tctctgacac ggctccctc
 7261 tgctactcca tcctgaaagc caagaacgca gccgaagaaa acatttctgt cgtgactcct
 7321 gcggtgcttg ggtcgggaca gccagagatg gagccacccc gcagaccgtc ggggtgtggg
 7381 agctttccgg tgtctcctgg gaggggagtt gggctgggac tgtgactcct cagcctctgt
 7441 tttcccccag ggatgtcgtt gggggccaag ggcgcccgcg gccctctgcc ctccgaggcc
 7501 gtgcagtgcc tgtgccacca agcattcctg ctcaagctga ctcgacaccg tgcacctac
 7561 gtgccactcc tggggtcact caggacaggc aagtgtgggt ggaggccagt gcggg

도면14A



도면14B

좌위 pAKI28.7 7797 bp dsDNA 환형

정의 다른 C-말단을 가진 사람 텔로머라제 클론

```

1  tcgacctgca ggcattgcaag cttggcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactgggaa
61  aaccctggcg ttacccaact taatgcgctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcggt
121 aatagcggaag aggcccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaattggcgaa
181 tggcgctga tgcggtatit tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcataaat
241 tccctgtttt ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag
301 aagcggcttg ataaaacaga atttgccctg cggcagtagc cgggtgggtc cacctgacct
361 catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgcgatggt agtgtgggtt ctccccatgc
421 gagagtaggg aactgccagg catcaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct
481 ttcgttttat ctgtgtttg tcggtagaac ctctcctgag taggacaaat ccgcccggag
541 cggatttgaa cgttgcgaag caacggcccg gaggtggcg ggcaggacgc ccgccataaa
601 ctgccaggca tcaaatgaag cagaaggcca tcctgacgga tggccttttt gcgtttctac
661 aaactcttcc tgcgtcata tctacaagcc atccccccac agatacggtt aactagcctc
721 gtttttgcat caggaaagca gggaatttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg
781 cgcatagtt aagccagccc cgacaccgac caacaccgac tgacgcgccc tgacgggctt
841 gtctgtccc ggcacccgtt tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc
901 agagggtttt accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctctgt ataccgctat
961 ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtgaggttct gtaccgcaga
1021 ccattcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggtt tggcatgata gcgccgggaa gagagtcaat
1081 tcagggtggt gaattgtgaa ccagtaacgt tatagcatgt cgcagagtat gccggtgtct
1141 cttatcagac cgtttccgac gtggtgaacc aggccagcca cgtttctgcg aaaacgcggg
1201 aaaaagtga agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacacaaac
1261 tggcgggcaa acagctgttg ctgattggcg ttgccacctc cagctctggc ctgcacgcgc
1321 cgtcgcaaat tgcgcggcg attaaatctc gcgcgatca actgggtgcc agcgtgtggt
1381 tgtcgatggt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg
1441 cgcaacgcgt cagtggcgct atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg
1501 tggaagctgc ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca
1561 tcaacagtat tattttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcggtggg catctggtcg
1621 cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cgggcccatt aagtctgtc tcggcgcgctc
1681 tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctcgcaatca aattcagccg atagcggaac
1741 gggaaggcga ctggagtgcc atgtccggtt ttcaacaac catgcaaatg ctgaatgagg
1801 gcacgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg
1861 ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata
1921 ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt taaccaccat caaacaggat tttcgcctgc
1981 tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaaggcca
2041 atcagctgtt gcccgctctc ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatagcaaaa
2101 ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac
2161 tggaagcggc gcagtgcgag caacgcaatt aatgtaagtt agctcactca ttaggcacc
2221 caggctttac actttatgct tccgacctgc aagaacctca cgtcaggtgg cacttttcgg
2281 ggaaatgtgc cgggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg
2341 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt
2401 attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcg cattttgcct tcctgttttt
2461 gctcaccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcaccgagt
2521 ggttacatcg agaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggcccgaag
2581 aacgttttcc aatgatgagc acttttaag ttctgtatg tggcgcggtt ttatcccgtt
2641 ttgacgcggc gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg

```

도면14C

```

2701 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca
2761 gtgtgccat aacctagagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag
2821 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgcttgatc
2881 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga cgtgacacc acgatgcctg
2941 tagcaatggc aacaacgttg cgaaactat taactggcga actacttact ctagcttccc
3001 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg
3061 cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg
3121 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagt atctacacga
3181 cggggagtcg ggaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac
3241 tgattaagca ttgtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa
3301 aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca
3361 aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaa
3421 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac
3481 cgctaccagc ggtggtttgt ttgcccagtc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa
3541 ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc
3601 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaact ctgttaccag
3661 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac
3721 cggataagcg gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc
3781 gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaagc gccacgcttc
3841 ccgaagggag aaaggcggag aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca
3901 cgaggagctc tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc
3961 tctgacttga cgtcgtattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg
4021 ccagcaacgc ggccttttta cggttccttg ccttttctg cccttttctg cacatgttct
4081 ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata
4141 ccgctcgccg cagccgaacg accgagcgca cgcagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc
4201 gcccaatacg caaacgcctc ctcccgcgc gtggccgat tcattaatgc agaattaatt
4261 ctcatgtttg acagcttata atcgactgca cgggtcacca atgcttctgg cgtcagggcag
4321 ccatcggaag ctgtggtatg gctgtgcagg tcgtaaatca ctgcataatt cgtgtcgtc
4381 aaggcgccact ccggttctg ataagtgtt ttgcccagc atcataacgg ttctggcaaa
4441 tattctgaaa tgagctgttg acaattaatc atcggtcgtg ataagtgtg gaattgtgag
4501 cggataacaa tttcacacag gaaacagcga tgaattcaga tctcaccatg aaggagctgg
4561 tggcccgagt gctgcagagg ctgtgcgagc gcggcgcgaa gaacgtgctg gccttcgct
4621 tcgcgtgct ggacggggcc cgcgggggccc ccccagaggc cttaccacc agcgtgcgca
4681 gctacctgcc caacacggtg accgacgcac tgccggggag cggggcggtg gggctgctgc
4741 tgcgcccgct gggcgagcag gtgctggttc acctgctgac acgctgcgcg ctctttgtgc
4801 tgggtgctcc cagctgcgcc taccaggtgt gcgggcgcgc gctgtaccag ctccgctg
4861 ccaactcagg ccggcccccg ccacacgcta gtggaccccg aaggcgctg ggatgcgaac
4921 gggcctgaaa ccatagcgtc agggaggccg ggggtcccct gggcctgcca ccccgggtg
4981 cgaggaggcg cgggggcagt gccagccgaa gcttgccgtt gcccaaggag ccaggcggtg
5041 gcgctgcccc tgagccggag cggacgcccg ttgggcaggg gtccctggcc caccgggca
5101 ggacgcgtgg accgagtgac cgtggtttct gttggtgtc acctgccaga ccgcgcgaag
5161 aagccacctc tttggagggt gcgtctctg gcacgcgcca ctcccacca tccgtgggc
5221 gccagacca cgcgggcccc ccatccacat cgcggccacc acgtccctgg gacacgctt
5281 gtccccggt gtacgccgag accaagcact tcctctactc ctacggcgac aaggagcagc
5341 tgcggccctc cttctactc agctctctga ggcccagcct gactggcgct cggaggtctg
5401 tggagaccat cttctgggt tccaggccct ggatgccagg gactccccgc aggttgcgcc
5461 gcctgcccc gcgtactg ccaatgcggc ccctgttct ggagctgctt gggaaaccag
5521 cgcagtgccc ctacggggtg ctctcaaga cgcactgccc gctgcgagct gcggtcacc

```

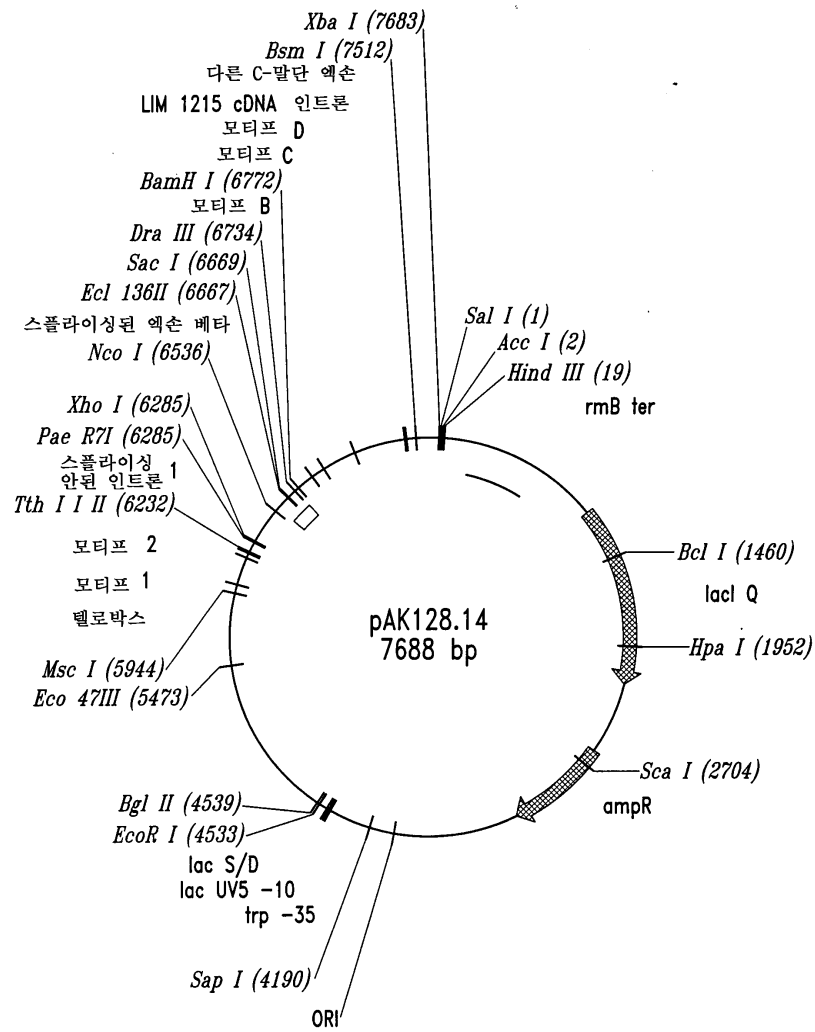
도면14D

```

5581 cagcagccgg tgtctgtgcc cgggagaagc cccagggctc tgtggcggcc cccgaggagg
5641 aggacacaga ccccgctgc ctggtgcagc tgctccgcca gcacagcagc ccctggcagg
5701 tgtacggctt cgtgcgggcc tgcctgcgcc ggctggtgcc cccagggctc tggggctcca
5761 ggcacaacga acgccgcttc ctcaggaaca ccaagaagtt catctccctg gggagacatg
5821 ccaagctctc gctgcaggag ctgacgtgga agatgagcgt gcgggactgc gcttggtgc
5881 gcaggagccc aggggttggc tgtgttcgg ccgcagagca ccgtctgcgt gaggagatcc
5941 tggccaagtt cctgcactgg ctgatgagtg tgtacgtcgt cgagctgctc aggtctttct
6001 tttatgtcac ggagaccacg tttcaaaaga acaggctctt tttctaccgg aagagtgtct
6061 ggagcaagtt gcaaagcatt ggaatcagac agcacttgaa gaggggtgcag ctgcccggagc
6121 tgtcggaagc agaggtcagg cagcatcggg aagccaggcc cgccctgctg acgtccagac
6181 tccgcttcat ccccaagcct gacgggctgc ggccgattgt gaacatggac tacgtcgtgg
6241 gagccagaac gttccgcaga gaaaagaggg ccgagcgtct cacctcagg gtgaaggcac
6301 tggtcagcgt gctcaactac gagcgggcgc ggcccccgg cctcctgggc gcctctgtgc
6361 tgggcttggc cgtatccac agggcctggc gcacctctgt gctgcgtgtg cgggcccagg
6421 acccgccgcc tgagctgtac ttgtcaagg tggatgtgac gggcgcgtag gacaccatcc
6481 cccaggacag gctcacggag gtcacgcga gcatcatcaa accccagaac acgtactcgc
6541 tgcgtcggta tgcctgtgtc cagaaggccg cccatgggca cgtccgcaag gccttcaaga
6601 gccacgtctc taccttgaca gacctccagc cgtacatgcg acagttcgtg gctcacctgc
6661 aggagaccag cccgctgagg gatgccgtgc tcacgcagca gagctcctcc ctgaatgagg
6721 ccagcagtg gctcttcgac gtcttctac gcttcatgtg ccaccacgcc gtgcgcata
6781 ggggcaagtc ctacgtccag tgccagggga tcccgcagg ctccatcctc tccacgctgc
6841 tctgcagcct gtgctacggc gacatggaga acaagctgtt tgcggggatt cggcgggacg
6901 ggctgtctct gcgtttgtg gatgatttct tgttggtag acctcacctc acccagcga
6961 aaacttctc aggacctggt ccgaagtgtc ctgagtattg ctgctgtgtg aacttgcgga
7021 agacagtggt gaacttccct gtagaagacg aagccctggg tggcacggct tttgttcaga
7081 tgccggccca cggcctattc ccctggtgcg gcctgtgtgt ggatacccg accctggagg
7141 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagctct accctcaacc
7201 gcgggttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaaactct tggggtcttg cggtgaagt
7261 gtcacagcct gtttctggat ttgcagtgta acagcctcca gacggtgtgc accaactct
7321 acaagatcct cctgtgcag gcgtacaggt ttcacgcagc tgtgtgcag ctccatttc
7381 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgcgctg catctctgac acggcctccc
7441 tctgtactc catcctgaaa gccaagaacg cagccgaaga aaacatttct gtcgtgactc
7501 ctgctgtgct tgggtcggga cagccagaga tggagccacc ccgcagaccg tcgggtgtgg
7561 gcagctttcc ggtgtctcct gggaggggag ttgggtgtgg cctgtgactc ctacgctct
7621 gttttcccc agggatgtcg ctgggggcca agggcgccgc cggccctctg cctccgagg
7681 ccgtgcagtg gctgtgccac caagcattcc tgctcaagct gactcgacac cgtgtcacct
7741 acgtgccact cctggggtca ctcaggacag gcaagtgtgg gtggaggcca gtgcggg

```

도면15A



도면15B

좌위 pAKI28.14 7688 bp dsDNA 환형
정의 스플라이싱된 엑손 알파를 가진 사람 텔로머라제 클론

```

1  tcgacctgca ggcattgcaag ctggcactg gccgtcggtt tacaacgtcg tgactgggaa
61  aaccctggcg ttaccctaact taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt
121 aatagcgaag agggccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa
181 tggcgctga tgcggtatit tctccttac catctgtcgc gtatttcaca ccgcataaat
241 tccctgtttt ggcggatgag agaagatttt cagcctgata cagattaaat cagaacgcag
301 aagcggctcg ataaaacaga atttgccctg cggcagtagc ggggtggtcc cacctgaccc
361 catgccgaac tcagaagtga aacgccgtag cgccgatggt agtgtggggt ctccccatgc
421 gagagtaggg aactgccagg catcaataa aacgaaaggc tcagtcgaaa gactgggcct
481 ttcgttttat ctgtgtttg tcggtgaacg ctctcctgag taggacaaa ccgccgggag
541 cggatttgaa cgttgcaag caacggcccg gaggttgccg ggcaggacgc ccgccataaa
601 ctgccaggca tcaaatatag cagaaggcca tctgacgga tggccttttt gcgtttctac
661 aaactcttcc tgcgtcata tctacaagc atccccccac agatacggta aactagcctc
721 gtttttgcat caggaaagca ggaatttat ggtgcactct cagtacaatc tgcctgtatg
781 ccgcatagtt aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt
841 gtctgtccc gccatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc
901 agaggttttc accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctctgt ataccctat
961 ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtgaggttct gtacccgaca
1021 ccatcgaatg gtgcaaaacc tttcgcggtg tggcatgata gcgccgggaa gagagtcagt
1081 tcagggtggt gaattgtgaa ccagtaacgt tatacgtatg cgcagagtat gccggtgtct
1141 ctatcagac cgtttccgcg gtggtgaacc aggcagacca cgtttctgcg aaaaacgggg
1201 aaaaagtggg agcggcgatg gcggagctga attacattcc caaccgcgtg gcacacaac
1261 tggcgggcaa acagtcgttg ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc
1321 cgtcgcaaat tgcgcggcg attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg
1381 tgcgatggtt agaacgaagc ggcgtcgaag cctgtaaaag ggcggtgcac aatcttctcg
1441 cgcaacgcgt cagtgggctg atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgtctg
1501 tggaaagctg ctgcactaat gttccggcgt tatttcttga tgcctctgac cagacaccca
1561 tcaacagtat tttttctcc catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg
1621 cattgggtca ccagcaaatc gcgctgttag cggggccatt aagttctgtc tcggcgcgctc
1681 tgcgtctggc tggctggcat aaatatctca ctgcgaatca aattcagccg atagcggaac
1741 ggaagggcga ctggagtgcc atgtccgggt ttcaacaaac catgcaaatg ctgaatgagg
1801 gcatcgttcc cactgcgatg ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg
1861 ccattaccga gtccgggctg cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata
1921 ccgaagacag ctcatgttat atcccgccgt taaccaccat caaacaggat tttgcctgc
1981 tggggcaaac cagcgtggac cgcttgctgc aactctctca gggccaggcg gtgaagggca
2041 atcagctgtt gcccgctcga ctggtgaaaa gaaaaaccac cctggcgccc aatacgcaaa
2101 ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac
2161 tggaaagcgg cgagtgaagc caacgcaatt aatgtaagtt agctcactca ttaggacccc
2221 caggctttac actttatgct tccgacctgc aagaacctca cgtcagggtg cacttttcgg
2281 ggaatgtgct gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg
2341 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt
2401 attcaacatt tccgtgtcgc cttattccc tttttgcgg cattttgcct tctgttttt
2461 gctcaccag aaacgctggt gaaagtataa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg
2521 ggttacatcg agaactgagt ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cggcccggaag
2581 aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggtg tttatccgta
2641 ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg

```

도면15C

2701 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca
 2761 gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag
 2821 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgcttgatc
 2881 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga cgtgacacc acgatgcctg
 2941 tagcaatggc aacaacgttg cgcaactat taactggcga actacttact ctgcttccc
 3001 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgctcgcg
 3061 cccttcggc tggtggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggtctcgcg
 3121 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctccc tatcgtagt atctacacga
 3181 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgtgagata ggtgcctcac
 3241 tgattaagca ttggttaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa
 3301 aacttcattt ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca
 3361 aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga cccgtagaa aagatcaaaag
 3421 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac
 3481 cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa
 3541 ctggtctcag cagagcgagc ataccaaata ctgctctct agtgtagccg tagttaggcc
 3601 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctgcg tctgctaata ctgttaccag
 3661 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac
 3721 cggataagcg gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc
 3781 gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagca ttgagaaagc gccacgcttc
 3841 ccgaaggagc aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgca
 3901 cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc
 3961 tctgacttga cgtcgtattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg
 4021 ccagcaacgc ggcttttta cgttccctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgtct
 4081 ttctgcgtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgctttgag tgagctgata
 4141 ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcagggaa gcggaagagc
 4201 gcccaatacg caaacgcct ctcccgcgc gttggcgtat tcattaatcg agaattaatt
 4261 ctcatgtttg acagcttacc atcgactgca cgtgcacca atgcttctg cgtcaggcag
 4321 ccacggaag ctgtgtgatg gctgtgcagg tcgtaaatca ctgcataatt cgtgtcgtc
 4381 aaggcgact ccggttctgg ataattgttt ttgcgcgcac atcataacgg tttcgcaaaa
 4441 tattctgaaa tgagctgttg acaattaatc atcggtcgtg ataattgtg gaattgtgag
 4501 cggataacaa tttcacacag gaaacagcga tgaattcaga tctcaccatg aaggagctgg
 4561 tggcccgagt gctgcagagg ctgtgcgagc gcggcgcgaa gaacgtgctg gccttcggct
 4621 tcgcgtgct ggacggggcc cgcgggggccc ccccgaggc cttcaccacc agcgtgcgca
 4681 gctacctgcc caacacggtg accgacgcac tgcgggggag cggggcggtg gggctgctgc
 4741 tgcgcgcgt gggcgacgac gtgtgtgtt accgtgtgac acgctgcgcg ctctttgtgc
 4801 tgggtgctcc cagctgcgcc taccaggtgt gcggggcgcc gctgtaccag ctggcgctg
 4861 ccactcaggc cgggccccgc ccacacgcta gtggacccc aaggcgtctg ggatgcgaac
 4921 gggcctgaa ccatagctc agggaggcgg ggggtccccc gggcctgcca gcccgggtg
 4981 cgaggaggcg cgggggcagt gccagccgaa gtctgccgtt gcccaagagg ccagggcgtg
 5041 gcgctgcccc tgagccggag cggacgccc ttgggcagg gtcctggggc caccgggca
 5101 ggacgcgtg accgagtgac cgtggtttct gtgtggtgtc acctgccaga cccgccgaag
 5161 aagccacctt tttggagggt gcgctctctg gcacgcgcca ctcccacca tccgtgggccc
 5221 gccagcacca cgcgggcccc ccatccacat cgcggccacc acgtccctgg gacacgcctt
 5281 gtcccccggt gtacgccgag accaagcact tccttactc ctacggcgac aaggagcagc
 5341 tgcggccctc cttctactc agctctctga ggcccagcct gactggcgct cggaggctcg
 5401 tggagaccat ctttctgggt tccagggcct ggatgccagg gactccccgc aggttgcccc
 5461 gcctgccccg gcgctactgg caaatgcggc ccctgtttct ggagctgctt ggaaccacg
 5521 cgcagtgccc ctacgggggtg ctctcaaga cgcactgccc gctgcgagct gcggtcacc

도면15D

5581 cagcagccgg tgtctgtgcc cgggagaagc cccagggctc tgtggcggcc cccgaggagg
 5641 aggacacaga cccccgtcgc ctgggtgcagc tgctccgcca gcacagcagc ccctggcagg
 5701 tgtacggctt cgtgcgggcc tgcctgcgcc ggctgtgtcc cccagggctc tggggctcca
 5761 ggcacaacga acgccgttc ctcaggaaca ccaagaagtt catctccctg gggaagcatg
 5821 ccaagctctc gctgcaggag ctgacgtgga agatgagcgt gcgggactgc gcttggctgc
 5881 gcaggagccc aggggttggc tgtgttccgg ccgcagagca ccgtctgctg gaggagatcc
 5941 tggccaagtt cctgcactgg ctgatgagtg tgtacgtcgt cgagctgctc aggtctttct
 6001 tttatgtcac ggagaccacg tttcaaaaga acaggctctt tttctaccgg aagagtgtct
 6061 ggagcaagtt gcaaagcatt ggaatcagac agcacttgaa gaggggtgcag ctgcgggagc
 6121 tgtcgggaagc agaggtcagg cagcatcggg aagccaggcc cgcctgtctg acgtccagac
 6181 tccgcttcat cccaagcct gacgggctgc ggccgattgt gaacatggac tacgtcgtgg
 6241 gagccagaac gttccgcaga gaaaagaggg ccgagcgtct cacctcaggg gtgaaggcac
 6301 tggtcagcgt gctcaactac gagcggggcg gcgccccgg cctcctgggc gcctctgtgc
 6361 tgggcctgga cgaatccac agggccttgc gcacctcgt gctgcgtgtg cgggcccagg
 6421 accgcgccgc tgagctgtac tttgtcaagg acaggctcac ggaggtcatc gccagcatca
 6481 tcaaacccag aacacgtact gcgtgcgtcg gtatgccgtg gtccagaagg ccgcccattg
 6541 gcacgtccgc aaggccttca agagccacgt ctctaccttg acagacctcc agccgtacat
 6601 gcgacagttc gtggtcacc tgcaggagac cagcccgtg agggatgccg tcgtcatcga
 6661 gcagagctcc tccctgaatg aggccagcag tggcctcttc gacgtcttcc tacgttcat
 6721 gtgccaccac gccgtgcgca tcaggggcaa gtcctacgtc cagtgccagg ggaaccgca
 6781 gggctccatc ctctccacgc tgcctcgcag cctgtgtctac ggcgacatgg agaacaagct
 6841 gtttgcgggg attcggcggg acgggtgtct cctgcgtttg gtggatgatt tcttgttgg
 6901 gacacctcac ctacccacg cgaaaacctt cctcaggacc ctggtccgag gtgtccctga
 6961 gtatggctgc gtggtgaact tgcggaagac agtgggtgaac ttccctgtag aagacgaggg
 7021 cctgggtggc acggcttttg ttcagatgcc ggcccacggc ctattccctt ggtgcggcct
 7081 gctgtggat acccggaacc tggaggtgca gacgactac tccagctatg cccggacctc
 7141 catcagagcc agtctcacct tcaaccgagg cttcaaggct gggaggaaca tgcgtcgcaa
 7201 actctttggg gtcctgcggc tgaagtgtca cagcctgttt ctggatttgc aggtgaacag
 7261 cctccagacg gtgtgcacca acatctacaa gatcctcctg ctgcaggcgt acaggtttca
 7321 cgcagtgtgt ctgcagctcc catttcatca gcaagtttgg aagaacccca ctttttccct
 7381 gcgcgtcatc tctgacacgg cctccctctg ctactccatc ctgaaagcca agaacgcagg
 7441 gatgtcgtg ggggccaagg gcgcccggcg ccctctgccc tccgaggccg tgcagtggct
 7501 gtgccaccaa gcattcctgc tcaagctgac tcgacaccgt gtcacctacg tgccactcct
 7561 ggggtcactc aggcagccc agacgcagct gagtccggaag ctcccgggga cgacgtgac
 7621 tgccttgagg gccgcagcca acccggaact gccctcagac ttcaagacca tcctggactg
 7681 atctagag