



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0097304
(43) 공개일자 2012년09월03일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2011-0063871</p> <p>(22) 출원일자 2011년06월29일
심사청구일자 2011년06월29일</p> <p>(30) 우선권주장
1020110016760 2011년02월24일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)</p> <p>공주대학교 산학협력단
충청남도 공주시 공주대학로 56 (신관동)</p> <p>(72) 발명자
최병욱
서울특별시 양천구 안양천로 1071, 이화여대 목동병원 (목동)</p> <p>정기화
충청남도 공주시 공주대학로 56, 공주대학교 (신관동)</p> <p>(74) 대리인
손민</p> |
|---|--|

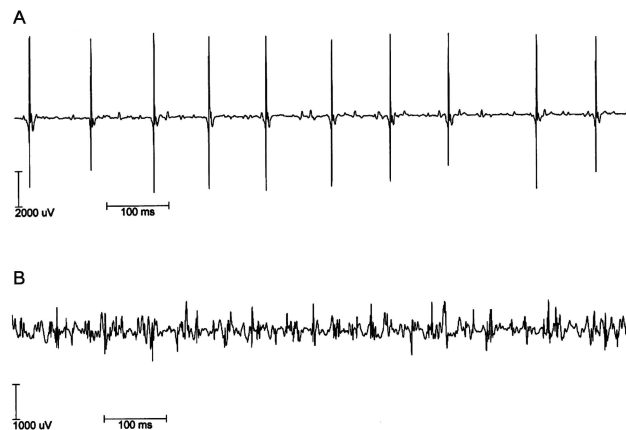
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상의 원인 유전자로서 MYH14 및 이를 이용한 상기 복합 증상의 진단방법 및 진단키트

(57) 요약

본 발명은 MYH14 유전자에서 동정된 신규 미스센스 돌연변이가 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 질환의 원인이 되는 유전자 돌연변이임을 규명하고, 상기 MYH14 돌연변이 유전자 또는 이로부터 코딩되는 단백질의 검출을 통해 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 위한 진단키트를 제공한다. 본 발명에 따르면 유전성이 강하면서도 단일 유전자 결함에 의해 발병하는 한국인 특이적인 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환에 대하여 간단한 유전자 검사를 통해 정확한 조기 진단이 가능하며, 정확한 진단에 따라 정확한 병인에 따른 맞춤치료를 가능케 한다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090500

부처명 보건복지가족부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 핵-미토콘드리아 유전체의 공조적 결합에 의한 PEO 발병기전 규명 및 분자진단법 개발

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로서 서열번호: 1의 염기서열에서 2822번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 MYH14 돌연변이 유전자.

청구항 2

제1항에 따른 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로서 Myh14 돌연변이 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호: 2로 기재되는 아미노산 서열에서 941번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 구아닌으로 치환된 서열을 포함하는 것인 Myh14 돌연변이 단백질.

청구항 4

개체 시료로부터 제1항에 따른 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 발현이 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 개체군에서만 특이적으로 검출되는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, mRNA 발현을 검출할 수 있는 제제가 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브인 것인, 유전성 신경질환의 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍이 서열번호: 51 및 52로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제가 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체인 것인, 유전성 신경질환의 진단용 조성물.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서, 키트가 RT-PCR 키트, 마이크로어레이 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, RT-PCR 키트가 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍이 서열번호: 51 및 52로 기재되는 염기서열을 갖는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 13

제9항에 있어서, 마이크로레이 칩 키트가 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 14

제9항에 있어서, 단백질 칩 키트가 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인, 유전성 신경질환의 진단용 키트.

청구항 15

하기 단계를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법:

- 1) 개체 시료로부터 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 발현을 측정하는 단계; 및
- 2) 개체 시료에서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현이 검출된 경우, 이 개체가 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환이 발병할 가능성이 높은 것으로 판정하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 단계 1)에서 mRNA 발현이 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍 또는 프로브를 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, MYH14 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍이 서열번호: 51 및 52로 기재되는 염기서열을 갖는 것인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 단계 1)에서 mRNA 발현이 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법(RPA), 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 분석법에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 단계 1)에서 단백질 발현이 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 측정되는 것인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 단계 1)에서 단백질 발현이 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선 면역분석법, 방사선 면역확산법, 오우크레오니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 분석법에 의해 측정되는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 원인 유전자로서 MYH14 돌연변이 유전자 및 이를 이용한 상기 유전성 신경질환의 진단방법 및 진단키트에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 비근육 미오신 중쇄 14(nonmuscle myosin heavy chain 14) 단백질을 코딩하는 MYH14

유전자에서의 신규 미스센스(missense) 돌연변이가 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 원인이 되는 돌연변이임을 규명하고, 상기 MYH14 돌연변이 유전자의 검출을 통해 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법 및 이를 위한 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT)으로도 불리는 유전운동감각신경병(hereditary motor and sensory neuropathy)은 유전적 및 임상적으로 매우 이질적인 말초신경질환군으로서, 원위성 근육 약화 및 위축, 요족(pes caus), 감각 손상 등의 임상 증상을 나타낸다(Reilly MM, et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 80: 1304-1314, 2009). 상염색체 우성 CMT는 임상적으로 말이집탈락형(CMT1) 및 축삭형(CMT2)의 2가지 유형으로 구분된다(Pareyson D, et al., Lancet Neurol 8: 654-667, 2002). CMT1은 심각하게 감소된 정중 운동 신경 전도속도(NCVs)(< 38 m/sec)를 나타내는 반면, CMT2는 감소된 진폭을 갖는 약간 감소되거나 정상 수준의 NCVs를 나타낸다(Harding AE, et al., Brain 103: 259-280, 1980). 현재, 40개 이상의 원인 유전자 또는 유전자좌가 CMT와 연관된 것으로 유전 말초신경병 돌연변이 데이터베이스(Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database, IPNMD)에 보고되어 있다(<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations/>).
- [0003] 원위성 근육병(distal myopathy) 또한 임상적 및 유전적 이질장애로서, 이와 관련되어 10개 이상의 유전자 및 염색체 유전자좌가 동정되었다(Udd B, Neuromusc Disord 19: 429-438, 2009). 원위성 근육병의 주된 증상으로는 심근육병 및 성대 기능장애를 수반하는 다리 하부 및 손에서의 골격근 약화가 알려져 있다(Malicdan MC, et al., Neurol India 56: 314-324, 2008]. 상염색체 우성 원위성 근육병에는 TTN(MIM# 188849)에서의 돌연변이에 기인하는 정강이 근육퇴행위축(TMD, MIM# 600334)(Hackman P, et al., Am J Hum Genet 71: 492-500, 2002), MYH7(MIM# 160760)에서의 돌연변이에 기인하는 라잉(Laing) 원위성 근육병(Meredith C, et al., Am J Hum Genet 75: 703-708, 2004), CAV3(MIM# 6012530) 돌연변이와 관련된 원위성 LGMD1C(caveolinopathy)(Minetti C, et al., Nat Genet 18: 365-368, 1998), 및 CRYAB(MIM# 123590), MYOT(MIM# 6041030) 및 LDB3/ZASP(MIM# 605906) 돌연변이에 의해 야기되는 근육원섬유 근육병(MFM)(Vicart P, et al., Nat Genet 20: 92-95, 1998; Selcen D, et al., Ann Neurol 57: 269-276, 2005)이 포함된다. 최근에 MATR3(MIM# 164015)이 우성 원위성 근육병의 내재적 원인으로 보고되었다(Senderek J, et al., Am J Hum Genet 84: 511-518, 2009). 데스민 관련 근육병(desminopathy) 및 다른 유형의 근육원섬유 근육병은 상염색체 우성 및 열성 유전 모두를 갖는 DES(MIM# 125660) 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된다(Goldfarb LG, et al., Brain 127: 723-734, 2004; Arias M, et al., Neuromuscul Disord 16: 498-503, 2006).
- [0004] 몇몇 환자는 근육긴장퇴행위축, 베커 근육퇴행위축(MIM# 300376) 및 안면견갑상완 근육퇴행위축과 같은, CMT 및 근육병의 2종의 신경근육병의 비정상적인 우발적 조합을 갖는 것으로 보고되었다(BCM, et al., Muscle Nerve 21: 788-791, 1998; Bergmann C, et al., Muscle Nerve 23: 818-823, 2000; Hodapp JA, et al., Arch Neurol 63: 112-117, 2006; Kim HS, et al., Neurogenetics 11: 425-433, 2010). 최근에, 근육긴장퇴행위축, 뇌병증성 발작 및 청각장애의 복합증상을 나타내는 네덜란드 CMT 가족이 DM1 유전자좌(MIM# 160900)에서 비정상 복합 돌연변이를 나타내었다(Spaans F, et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 80: 1029-1035, 2009; Braida C, et al., Hum Mol Genet 19: 1399-1412, 2010). 이처럼 많은 원인 유전자들이 CMT 또는 원위성 근육병과 관련이 있는 것으로 보고되었지만, 아직도 대부분의 환자들은 그들의 유전적 원인이 규명되기를 기다리고 있는 실정이다. 특히, 상염색체 우성 말초신경병, 원위성 근육병, 선목소리 및 청각장애를 유발하는 복합증상을 보이는 질환과 관련된 돌연변이는 아직까지 보고된 바 없다.
- [0005] 이에 본 발명자들은 상기 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 원인을 규명하고자 예의 연구 노력한 결과, 비근육 미오신 중쇄 14(nonmuscle myosin heavy chain 14, MYH14) 유전자에서 2822번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 돌연변이가 말초신경병, 원위성 근육병, 선목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 원인 유전자 돌연변이임을 규명하고, 상기 MYH14 돌연변이 유전자가 이러한 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단에 유용하게 이용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로서 서열번호: 1의 염기서열에서 2822번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 MYH14 돌연변이 유전자를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 개체 시료로부터 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질의 발현을 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 아울러, 본 발명의 목적은 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질의 발현을 검출하는 단계를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 하나의 양태로서, 본 발명은 비근육 중쇄 미오신 14 단백질을 코딩하는 MYH14 유전자에서의 특정 미스센스 돌연변이를 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 원인이 되는 유전자 돌연변이로 제공한다.
- [0012] 본 발명에서는 말초신경병, 원위성 근육병, 권목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 상염색체 우성 가족을 대상으로 상기 복합 증상에 대한 새로운 염색체 유전자좌를 19q13.3에 지도화하였다(도 1 및 3b 참고). 이로부터 34개 후보 유전자들에 대한 서열분석을 통해 상기 복합 증상을 나타내는 환자군에서만 특이적으로 검출되는 비근육 미오신 중쇄 14 단백질을 코딩하는 MYH14 유전자에서의 신규한 미스센스 돌연변이를 확인하였다(도 3d 참고).
- [0013] MYH14 유전자(NM_001077186.1)는 108 kbp의 게놈 서열을 포함하는 41개의 엑손(40 코딩)으로 구성되고 서열번호: 1로 기재되는 염기서열을 갖는다. 상기 유전자로부터 2003개 아미노산으로 이루어진 서열번호: 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Myh14 단백질이 코딩된다. MYH14 유전자는 아미노-말단 미오신 도메인, 미오신 두부(head), 2개의 IQ 도메인 및 미오신 꼬리(tail)로 이루어지는 4개의 기능적 도메인을 코딩한다. 골격근, 소장, 결장 및 와우에서 MYH14 유전자에 대한 7 kbp 전사체의 강력한 발현이 확인되었고, 뇌 및 말초신경을 포함하는 광범위한 조직에서도 이의 발현이 확인되었다(Leal A, et al., Gene 312: 165-171, 2003; Donaudy F, et al., Am J Hum Genet 74: 770-776, 2004; Golomb E, et al., J Biol Chem 279: 2800-2808, 2004). 본 발명에서는 비복근에서 MYH14 유전자의 발현을 최초로 확인하였다(도 5 참고).
- [0014] 본 발명에 따르면, 말초신경병, 원위성 근육병, 권목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 환자군 특이적으로 서열번호: 1의 염기서열을 갖는 MYH14 유전자에서 2822번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 미스센스 돌연변이(2822G>T)가 확인되었다. 상기 돌연변이를 포함하는 MYH14 유전자로부터 코딩되는 Myh14 단백질은 서열번호: 2로 기재되는 아미노산 서열에서 941번째 아미노산인 아르기닌이 류신으로 치환된 돌연변이(Arg941Leu)를 포함한다.
- [0015] 본 발명은 MYH14 유전자에서 2822G>T 돌연변이가 다음과 같은 이유로 말초신경병, 근육병, 권목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환에 대한 원인 유전자임을 제안한다: (1) 가족 내 이환된 일원에서 상기 돌연변이의 동시-분리, (2) 566명의 인종적으로 짝 지워진 대조군 염색체에서 상기 돌연변이의 비 검출, (3) 이종간 돌연변이 부위 아미노산의 높은 보존성, (4) 비-중후군적 청각장애에서 MYH14의 사전 발병, 및 (5) 공지의 CMT 또는 원위성 근육병 유전자에서 대안적인 원인 돌연변이의 부재.
- [0016] 더욱이, 복제수 변이(CNV) 검사는 연관 부위 내 유의미한 중복 또는 결실을 나타내지 않았다(도 4a 참고). 핵형분석은 또한 어떠한 염색체 이상도 나타내지 않았다(도 4b 참고). 최근에 DMPK 유전자 내 복합 돌연변이가 근육긴장도행위측, 뇌병증성 발작 및 청각장애를 갖는 감각운동 신경병 가족의 유전적 원인으로 보고된 바

있었다(Spaans F, et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry 80: 1029-1035, 2009; Braida C, et al., Hum Mol Genet 19: 1399-1412, 2010). 그러나, 본 발명은 염색체 19q13.3 근처에 위치하는 DMPK 내 돌연변이를 배제하였고, PRX(CMT4F), MED25(CMT2B2), MAG, 및 EMP3을 비롯한 부가적인 후보 유전자들의 서열을 분석하였지만, 어떠한 유전적 원인이 될 돌연변이를 발견하지 못하였다. 네덜란드 가족의 복합 증상은 어느 정도는 본 발명에 따른 한국 가족의 복합 증상과 유사하지만, 본 발명의 가족에서는 근육긴장 방전(myotonic discharge) 소견이 전혀 발견되지 않았다.

[0017] 전기생리학적 연구 결과, 이환된 환자에게서 만성 신경병성 및 근육병성 특징이 모두 나타났다(표 4 참고). 근전도검사(EMG) 결과, 이환된 환자에게서 작은 진폭 단기 근육병성 운동단위 활동전위(MUAP)와 함께 신경병성 MUAP가 확인되었다(도 6 참고). 또한, MRI 분석에서 질환 기간과 관련된 근육 발병 개시의 순차적 양상이 관찰되었다(도 7 참고).

[0018] 조직병리학적 소견으로 근육병에서 일반적으로 관찰되는 다수의 작고 둥글거나 모난 섬유를 갖는 섬유 크기의 상당한 변화, 퇴행 섬유 및 근내막 섬유화가 진단되었고, 또한 골격근의 신경성 변화에서 공지된 특징 중 하나인 조직화학적 근섬유 유형의 분류를 나타내었다(도 8 참고). 부가적으로, 다양한 크기의 직각 또는 신장된 마름모의 준결정체 봉입이 전자현미경 사진에서 빈번하게 관찰되었다. 조직병리학적 이상은 미토콘드리아 질환과 관련된 원인을 연상시키기 때문에, 본 발명에서는 2명의 환자 생검(Ⅲ-6 및 Ⅲ-13)으로부터 얻은 미토콘드리아 DNA의 서열을 완전히 분석하였지만, 원인 돌연변이를 발견하지 못하였다(표 2 참고). 병리학적 연구는 상기 유전성 신경질환의 발병 기작이 미토콘드리아의 비정상적 전위 및 기능이상과 관련될 수 있음을 제시하였다.

[0019] 미오신은 ATP의 가수분해 하에서 운동 에너지를 생산하기 위해 액틴과 상호작용하는 도메인을 갖는 슈퍼패밀리이다. 3종의 공지된 비근육 미오신은 각각 염색체 22q11.2, 17p13.3 및 19q13.3에 위치하는 MYH9(MIM# 160775), MYH10(MIM# 160776) 및 MYH14 유전자에 의해 코딩된다(Simons M, et al., Circulation Res 69: 530-539, 1991; Leal A, et al., Gene 312: 165-171, 2003). 미오신 중쇄 유전자는 다양한 형태의 유전적 청각장애의 원인이 된다. 청각장애의 원인 유전자좌인 DFN2(MIM# 600060) 및 DFNA17(MIM# 600652)은 각각 MYH7A(MIM# 160760)(Astuto LM, et al., Am J Med Genet 109: 291-297, 2002) 및 MYH9 돌연변이(Lalwani AK, et al., Am J Hum Genet 67: 1121-1128, 2000)와 관련되어 있다. 청각장애의 비증후군적 상염색체 우성 형태인 DFNA4(MIM# 600652)는 MYH14 내 돌연변이에 의해 야기된다(Mirghomizadeh F, et al., Eur J Hum Genet 10: 95-99, 2002; Donaudy F, et al., Am J Hum Genet 74: 770-776, 2004). 반면, 본 발명에서 연구된 한국 가족은 말초신경병, 근육병, 원목소리 및 청각장애를 특징으로 하는 복합적인 증상의 표현형을 나타내었다. 따라서, 본 발명은 MYH14 돌연변이와 관련하여 알려진 증상 표현형을 유의미하게 확장시킨 것임을 제안한다.

[0020] 결론적으로, 본 발명에서 새롭게 동정된 말초신경병, 근육병, 원목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 원인이 되는 유전자 돌연변이는 다음과 같다:

[0021] MYH14 c.2282G>T: MYH14 유전자의 서열번호: 1로 기재되는 염기서열에서 2282번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환되어 서열번호: 2로 기재되는 아미노산 서열에서 941번째 아미노산인 아르기닌이 류신으로 대체되는 돌연변이.

[0022] 따라서, 본 발명은 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 원목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로서 서열번호: 1의 염기서열에서 2822번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 MYH14 돌연변이 유전자 및 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질을 제공한다. 본 발명에 따른 Myh14 돌연변이 단백질은 서열번호: 2로 기재되는 아미노산 서열에서 941번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 류신으로 치환된 것이다.

[0023] 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자 및/또는 이로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질은 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 원목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 여부를 진단하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 원목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0025] 본 발명에서 용어, "진단 마커(diagnosis marker)"는 상기 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 여부를 진단할 수 있는 물질로, 본 발명의 목적상, 진단 마커는 정상인과는 달리 상기 복합 증상을 나타내는 환

자군에서만 특이적으로 검출되는 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자이다.

- [0026] 유의성 있는 진단 마커의 선택과 적용은 진단 결과의 신뢰도를 결정짓는다. 유의성 있는 진단 마커란, 진단 하여 얻은 결과가 정확하여 타당도(validity)가 높고 반복 측정 시에도 일관된 결과를 나타내도록 신뢰도(reliability)가 높은 마커를 의미한다. 본 발명에 따른 진단 마커로서 MYH14 돌연변이 유전자는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 환자군에서만 검출되고 정상 대조군에서는 검출될 확률이 거의 없는 신뢰도가 높은 마커이다. 따라서 본 발명의 유의성 있는 진단 마커로서 MYH14 돌연변이 유전자의 존재 여부를 검출하여 얻은 결과를 토대로 진단된 결과는 타당하게 신뢰할 수 있다.
- [0027] 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 개체 시료로부터 MYH14 돌연변이 유전자 또는 그로부터 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질의 존재 여부를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에 따른 진단용 조성물에서, MYH14 돌연변이 유전자의 존재 여부를 검출하기 위한 제제는 서열번호: 1의 MYH14 유전자의 2282번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 것을 검출할 수 있도록 고안된 프라이머 또는 프로브일 수 있다. MYH14 유전자의 염기서열을 바탕으로 상기 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 또는 프로브를 고안할 수 있다. MYH14 유전자의 염기서열이 이미 유전자뱅크(GenBank)에 등록되어 당해 분야에 공지된 상태이고, 상기 염기서열에서 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로 사용되는 돌연변이 부위가 본 발명에 의해 규명되었으므로, 당업자는 상기 염기서열을 바탕으로 MYH14 돌연변이 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 용이하게 고안할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기를 갖는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 개시점으로 작용하는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 프라이머는 적절한 완충액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적절한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30개 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서 더 낮은 온도를 요구한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 본 발명에서는 MYH14 돌연변이 유전자에 대한 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행한 후 PCR 생성물의 증폭 여부를 통해 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 적합한 프라이머는 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적인, 즉 서열번호: 1의 MYH14 유전자에서 2282번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 것을 검출할 수 있도록 고안된 프라이머로, 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 형성할 수 있는 짧게는 수개 염기 내지 길게는 수백 개 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단일가닥 DNA 프로브, 이중가닥 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 MYH14 돌연변이 유전자에 대해 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시한 후, 혼성화 여부를 통해 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 분야에 공지된 것을 기초로 적절히 변형할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법을 비롯한 당해 분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡핑, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 진단용 조성물은 MYH14 유전자의 엑손 3에 특이적으로 혼성화할 수 있고, 서열번호: 1의 염기 서열에서 2282번째 염기인 구아닌이 티민으로 치환된 것을 검출할 수 있도록 고안된 서열번호: 51 및 52로 기재되는 프라이머 쌍을 포함한다.

- [0034] 개체 시료에서 MYH14 돌연변이 유전자의 존재는 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 여부를 측정함으로써 확인할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 "mRNA 발현 측정"이란 개체 시료에서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서 "단백질 발현 측정"이란 개체 시료에서 MYH14 돌연변이 유전자로부터 발현된 Myh14 돌연변이 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 웨스턴 블랏팅, 효소면역흡착법(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선 면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 방사선 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석(Immunoprecipitation Assay), 보체고정분석(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서 용어, "항체"는 당해 분야에 공지된 용어로서, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩된 Myh14 돌연변이 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 MYH14 돌연변이 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻은 후, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 펩티드 단편도 포함되며, 본 발명의 펩티드 단편으로는, 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체는 그 형태가 특별히 제한되지 않으며, 다중클론 항체, 단일클론 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다.
- [0038] 본 발명에 의해 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 진단 마커로서 MYH14 유전자 및 그의 특정 돌연변이 부위가 규명되었으므로, 이를 이용하여 항체를 제조하는 것은 당해 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 수행할 수 있다.
- [0039] 다중클론 항체는 상기한 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다중클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.
- [0040] 단일클론 항체는 당해 분야에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein, European Journal of Immunology 6: 511-519, 1976), 또는 파지 항체 라이브러리(Claackson et al, Nature 352: 624-628, 1991; Marks et al, J Mol Biol 222(58): 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.
- [0041] 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 재조합 항체도 포함된다. 본 발명에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 있다.
- [0042] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 진단용 조성물을 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병을 진단하기 위한 키트를 제공한다.
- [0043] 본 발명의 키트는 검사 대상에게서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현 또는 상기 유전자로부터 코딩된 Myh14 돌연변이 단백질의 발현을 확인하여 MYH14 유전자에서 c.2282G>T 돌연변이 또는 Myh14 단백질에서 p.Arg941Leu 돌연변이를 확인함으로써 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 권목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.

- [0044] 본 발명의 키트에는 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현을 검출할 수 있는 프라이머 또는 프로브와, 상기 유전자로부터 코딩된 Myh14 돌연변이 단백질을 선택적으로 인지하는 항체가 포함되고, 이에 추가로 분석에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0045] 구체적인 일례로서, 본 발명에서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하는데 요구되는 필수요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 키트는 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자를 포함하는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자의 염기서열에 특이적인 프로브를 포함하는 것을 제외하고는 통상적인 마이크로어레이의 구성을 포함한다. 본 발명의 마이크로어레이는 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자의 존재 여부를 검출하여 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단하는데 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자에 대한 프로브를 기관 상에 고정화하여 마이크로어레이를 제조하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예컨대, DNA 마이크로어레이는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, 파이즈로일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting) 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법에 의해 본 발명에 따른 진단 마커에 대한 프로브를 기관 상에 고정화시킬 수 있다. 본 발명의 마이크로어레이의 기관은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기관은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 또한, 마이크로어레이 상에서의 핵산의 혼성화 및 혼성화 결과의 검출은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 상기 검출은 핵산 시료를 형광물질, 예를 들면, Cy3 및 Cy5와 같은 물질을 포함하는 검출 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 표지물질로 표지한 다음, 마이크로어레이 상에 혼성화하고 상기 표지물질로부터 발생하는 신호를 검출함으로써 혼성화 결과를 검출할 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명에서 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩된 단백질의 발현수준을 측정하기 위한 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충용액, 발색효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기재로는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96-웰 플레이트, 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 이용될 수 있고, 발색효소로는 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있다. 또한, 형광물질로는 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색기질로는 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘) 등이 사용될 수 있다.
- [0050] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 검사 대상에게서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 Myh14 돌연변이 단백질의 발현을 측정하는 단계를 포함하는, 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명에 따른 정보 제공방법은,
- [0052] 1) 개체 시료로부터 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 측정하는 단계; 및
- [0053] 2) 개체 시료에서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 발현이 검출된 경우, 이 개체가 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환이 발병할 가능성이 높은 것으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어, "개체 시료"란 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성

신경질환의 발병 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0055] mRNA 발현을 측정하기 위한 분석방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 마이크로어레이 칩 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0056] 상기 분석방법을 통하여 대상 질환의 발병이 의심되는 개체에서 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA 발현을 측정할 수 있고, mRNA 발현의 검출 여부를 판단하여 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다. mRNA 발현은, 바람직하게는 진단 마커로 사용되는 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하는 역전사효소 중합반응 또는 상기 유전자에 특이적인 프로브를 사용하는 DNA 마이크로어레이 칩을 이용하여 측정할 수 있다.

[0057] 구체적인 일례로서, 진단 마커로 사용되는 MYH14 돌연변이 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 역전사효소 중합반응을 수행한 후 생성물을 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인함으로써 상기 돌연변이 유전자의 mRNA 발현을 측정하고, 그로부터 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 간편하게 진단할 수 있다.

[0058] 한편, DNA 마이크로어레이 칩은 상기 MYH14 돌연변이 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 개체 시료로부터 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부에 형광물질이 표지된 cDNA 프로브를 조제하여 DNA 칩에 혼성화시킴으로써 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.

[0059] 구체적으로, DNA 마이크로어레이 칩을 이용한 분석방법은 하기의 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 1) 개체의 시료로부터 MYH14 돌연변이 유전자의 mRNA를 분리하는 단계;

[0061] 2) 상기 개체의 시료에서 분리한 mRNA를 cDNA로 합성하면서 형광물질로 표지하는 단계;

[0062] 3) 상기에서 형광물질로 표지된 cDNA를 MYH14 돌연변이 유전자에 대한 프로브가 고정된 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화하는 단계; 및

[0063] 4) 상기 혼성화된 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하여 개체 시료에서의 MYH14 돌연변이 유전자의 발현을 검출하는 단계.

[0064] 상기 분석방법에 적합한 형광물질로 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate), 로다민(rhodamine) 등을 사용할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 또한, DNA 마이크로어레이 칩은 36 k Human V4.0 OpArray 올리고마이크로어레이(Operon, Germany) 또는 전체 인간 게놈 올리고마이크로어레이(Whole human genome oligo microarray, Agilent, USA) 등을 사용할 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0065] 단백질 발현을 측정하기 위한 분석방법으로는, 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선 면역분석법, 방사선 면역확산법, 오우크레로니 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0066] 상기 분석방법을 통하여 대상 질환의 발병이 의심되는 개체에서 항원-항체 복합체의 형성량을 검출할 수 있고, MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질의 발현 여부를 판단하여 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 여부를 진단할 수 있다.

[0067] 본 발명에서 용어, "항원-항체 복합체"란 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질과 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 표지(detection label)의 시그널의 강도를 통해서 정량적으로 측정 가능하다.

[0068] 단백질 발현은, 예컨대 ELISA를 이용하여 측정할 수 있다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 표지된 항체를 이용하는 직접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항원을 인지하는 항체의 복합체에서 포획 항체를 인지하는 표지된 항체를 이용하는 간접적 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적

샌드위치 ELISA 등 다양한 ELISA 방법을 포함한다.

[0069] 또한, 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏팅을 이용할 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인함으로써 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.

[0070] 또한, 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 면역조직화학염색을 실시할 수 있다. 개체로부터 채취한 조직을 고정된 후 당해 분야에 널리 공지된 방법으로 파라핀 포매블록을 제조한다. 이들을 수 μm 두께의 절편으로 만들어 유리 슬라이드에 붙여 조직 절편 슬라이드를 제작한 후, 여기에 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 특이적인 항체를 공지의 방법에 따라 반응시킨다. 이후, 반응하지 못한 항체는 세척하여 제거하고, 면역반응을 관찰하기 위한 발색시약으로 반응시켜 상기 단백질의 발현을 현미경 하에서 관찰함으로써 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.

[0071] 또한, 상기 MYH14 돌연변이 유전자로부터 코딩되는 단백질에 대한 하나 이상의 항체가 기관 위의 정해진 위치에 배열되어 고밀도로 고정화되어 있는 단백질 칩을 이용할 수 있다. 단백질 칩을 이용하여 시료를 분석하는 방법은, 시료에서 단백질을 분리하고, 분리한 단백질을 단백질 칩과 혼성화하여 항원-항체 복합체를 형성하고, 이를 관독하여 단백질의 존재 또는 발현수준을 확인함으로써 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환의 발병 가능성을 진단할 수 있다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 MYH14 돌연변이 유전자는 한국인 환자에서 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 가진 이제까지 보고되지 않았던 새로운 유전성 신경질환의 병인으로 규명된 것이다. 따라서, 상기 MYH14 돌연변이 유전자를 이용한 진단은 유전성이 강하면서도 단일 유전자 결함에 의해 발병하는 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 유전성 신경질환에 대하여 유전자 검사를 통한 정확한 조기진단을 가능케 하며, 그에 따라 최근 개발되고 있는 치료방법을 조기에 적용하여 치료효과를 극대화할 수 있고, 나아가 정확한 병인에 따른 맞춤치료를 가능케 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0073] 도 1은 본 발명의 연구 대상인 말초신경병, 근육병, 청각장애 및 선목소리의 복합 증상을 나타내는 가족 FC317의 가계도이다. 염색체 19q13.3에 대한 마이크로세틀라이트(microsatellite) 마커의 유전자형(괄호 내 추론된 유전자형이 표기됨)을 사용하여 일배체형(haplotype)(각 가족 일원 아래에 표시됨)을 결정하였다. *는 그의 DNA가 연관 분석에 사용된 개인을 나타낸다. 흑색은 임상 검사에 의해 확인된 환자를 나타내고, 회색은 문진을 근거로 추정된 환자를 나타낸다. ^는 계보발단자를 나타낸다.

도 2는 원위성 다리 근육 위축을 나타내는 환자의 사진으로, 진행성 다리 근육 위축이 질환 기간(DD)과 관련되어 있음을 나타낸다. A: DD = 4년(F/11, IV-14); B: DD = 28년(F/41, III-13); C: DD = 38년(M/48, III-8); D: DD = 41년(M/52, III-6).

도 3a 내지 3e는 본 발명에 따른 가족 FC317을 대상으로 연관 분석 및 MYH14 유전자 내 미스센스 돌연변이를 확인한 결과이다. 구체적으로, 도 3a는 염색체 19의 2-점 LOD 점수를 나타내는 것이고, 도 3b는 19q13.2-3 부위의 염색체 미세 지도화 결과로, 29개 마이크로세틀라이트의 유전자형 분석은 마커 D19S902 및 D19S246의 측면에 위치하는 ~13 Mb 연관 부위를 나타내었다. 도 3c는 염색체 19q13.2-3의 모식도로, 환자들로부터 동시에 분리된 마커는 굵게 표시하였다. 도 3d는 MYH14 유전자 내 c.2822G>T(Arg941Leu) 돌연변이의 서열분석 크로마토그램으로, 상기 돌연변이가 FC317 가족 내 모든 환자에서 동시에 분리되었다. 도 3e는 상이한 종(H. sapiens Myh14-NP_001070654.1; M. musculus Myh14-NP_082297.1; R. norvegicus Myh14-NP_001094160.1; B. Taurus Myh14-XM_882711.4) 유래의 Myh14 단백질 패밀리의 아미노산 서열을 클러스탈엑스 프로그램(ClustalX program, ver. 1.83)을 이용한 정렬을 통해 941번째 아르기닌 잔기의 높은 보존성을 확인한 것이다.

도 4a는 CGH 마이크로어레이 분석에 의해 수득된 Log₂ 비 플롯을 나타내는 것으로, 2명의 환자, 1명의 비환자 및 각각 대조군으로서 CMT1A 및 HNPP 환자를 대상으로 분석을 수행하였다. CGH 마이크로어레이 분석 결과는 연관 불균형 부위(36.6-60.2 Mb, hg18) 내 어떠한 원인적 CNV도 관찰되지 않음을 나타낸다.

도 4b는 남성 및 여성 환자에 대한 핵형분석 결과로, 이들에게서 아무런 염색체 이상도 검출되지 않음을 나타낸다(상부: 남성 환자 III-16, 하부: 여성 환자 III-13).

도 5는 골격근에서 MYH14 유전자의 발현을 확인한 결과로, 생검 조직에서의 발현 수준을 정량적 실시간 PCR로 조사하였다. GAPDH 발현을 대조군으로 사용하였고 CTL-V1의 발현수준을 1.0으로 지정하였다(CTL-V1: 건강한 남성의 외측광근, CTL-Ga: 건강한 남성의 비복근, 및 III-16-Ga: III-16 남성 환자의 비복근).

도 6은 운동단위 활동전위(MUAP)를 나타낸 것으로, A는 환자 III-8에서 우측 외측광근에 대한 간섭 양상을, B는 제1 등쪽뼈사이근에 대한 간섭 양상을 기록한 것이다. 환자는 임상적 및 전기생리학적으로 신경병 및 근육병 모두에 대한 소견을 나타내었다. 전기생리학적 연구는 장기간의 큰 진폭(신경병성, A) 및 단기간의 다상성 운동 단위를 갖는 소 진폭(근육병성, B) 모두를 나타내었다.

도 7은 T1-가중 축 MRI에서 질환 기간(DD)과 관련된 근육 발병의 순차적 양상을 나타낸 것으로, A는 16세의 남성 환자(IV-10, DD=4년)로 다리의 전방 구획 근육의 줄무늬 지방 침윤을 나타내었다. B는 15세의 남성 환자(IV-13, DD=5년)로 전방 및 후방 구획을 포함하는, 더욱 심각한 지방 침윤을 나타내었다. C는 33세의 남성 환자(III-16, DD=24년)로 후방 구획의 경미한 발병을 갖는 다리 근육의 전방 및 가측 구획의 뚜렷한 발병을 나타내었다. D는 41세의 여성 환자(III-13, DD=28년)로 장딴지 근육 위축을 포함하는 모든 근육 구획의 심각한 지방 발병을 나타내었다(전방 구획: 빈 화살촉, 가측 구획: 화살촉, 후방 구획: 화살).

도 8은 환자 III-16에서 가측 비복근의 조직병리학적 소견을 나타낸 것으로, A는 다수의 작고 둥근 섬유를 갖는 섬유 크기 및 모양의 상당한 변이와 퇴행 섬유를 나타내었고, 염증세포 없이 퇴행 근섬유의 배경에 근내막 섬유화가 우세하였다(배율: ×200). B는 조직화학적 섬유 유형의 분류를 나타내는데, 상이한 pH 사전-인큐베이션을 이용한 ATPase 반응 및 미오신 중쇄(fast), 미오신 중쇄(slow) 및 미오신 IIa를 이용한 면역염색을 통해 조직화학적 섬유 유형을 분류하였다(배율: ×40). C는 비정상적 미토콘드리아의 황문근형질막하 축적을 나타낸 것으로, 전자현미경 사진은 다양한 크기의 직각 또는 신장된 마름모의 준결정체 봉입을 포함하는 빈번한 비정상적 미토콘드리아의 황문근형질막하 축적을 나타내었다(배율: ×30,000).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0075] 실시예 1: 임상 분석

[0076] 본 발명에 따른 연구에는 말초신경병, 원위성 근육병, 권목소리 및 청각장애의 복합 증상을 나타내는 한국 상 염색체 우성 가족의 총 33명(15명의 환자 및 18명의 비환자)(가족 ID: FC317, 도 1), 및 아무런 임상적 특징이 없고 신경근육장애 및 청각장애의 가족 병력이 없는 283명의 건강한 대조군이 포함되었다. 쿼아엠프 혈액 DNA 미니키트(QIAamp Blood DNA mini kit, Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 말초 혈액 시료로부터 총 DNA를 추출하였다. 이화여자대학교 목동병원의 생명윤리위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라서 모든 참가자 및 18세 미만의 어린 환자의 부모들로부터 사전 동의를 받았다.

[0077] 이들을 대상으로 문진, 신체검사, 증상 관찰 및 전기생리학적 검사를 통해 임상 정보를 입수하였다. 증상 관찰에는 근육 약화, 감각 손상, 청력 소실, 권목소리 및 반사 평가를 포함하는 자세한 신경계 검사가 포함되었다. 심전도(ECG) 및 심장초음파와, 크레아틴 키나아제(CK), 젖산 및 피르브산을 포함하는 혈액 화학분석을 수행하였다. 유연 굴곡후두경을 이용하여 4명의 환자(III-6, 11, 13 및 IV-10)에 대해 후두(laryngeal) 연구를 수행하였다. 청각장애를 결정하기 위해, AC40 청력검사기(Interacoustic, Denmark)를 이용한 이경 검사 후 공기 및 골 전도를 이용한 순음 청력검사를 17명의 개인(11명의 환자 및 6명의 비환자)에게 수행하였다.

[0078] 본 발명에 따른 가족 FC317에서 15명의 환자들에 대한 임상 분석 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Patient	III-4	III-6	III-8	III-11	III-13	III-16	IV-3	IV-5	IV-7	IV-8	IV-9	IV-10	IV-11	IV-13	IV-14
Sex/current age (yrs)	M/52	M/52	M/48	F/45	F/41	M/33	M/31	F/18	M/15	F/11	F/18	M/16	F/15	M/15	F/11
Age of onset (yrs) ^a	12	11	10	12	13	9	10	12	10	9	13	12	14	5	7
Disease duration (yrs)	40	41	38	33	28	24	21	6	5	2	5	4	1	10	4
Muscle weakness	D>P	D>P	D>P	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal	Distal
Distal muscle atrophy	Severe (L>U)	Severe (L>U)	Severe (L>U)	Severe (L>U)	Moderate (L>U)	Moderate (L>U)	Severe (L>U)	Mild (L>U)	Mild (L>U)	Absent (L>U)	Mild (L>U)	Mild (L=U)	Absent (L>U)	Mild (L>U)	Mild (L=U)
Sensory loss	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hearing loss	NA	+	+	+	+	-	NA	NA	-	-	-	-	-	+	NA
Hoarseness	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Cardiac involvement	NA	-	-	-	-	-	NA	NA	-	-	-	-	-	-	-
Foot deformity	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-
Knee jerk reflex	Areflex	Areflex	Areflex	Areflex	Areflex	Areflex	Areflex	Normal	Normal	Normal	Normal	Hyporeflex	Normal	Hyporeflex	Normal
Additional symptom	-	Seizure	Tremor	-	-	Tremor	Tremor	Arthritis	-	-	-	Seizure	-	-	-
Creatine kinase (IU/L) ^b	NA	WNL	2.5 fold	WNL	WNL	1.4 fold	NA	NA	WNL	WNL	WNL	1.3 fold	WNL	2.1 fold	NA
Lactic acid (mg/dl) ^c	NA	13.0	NA	19.0	9.0	11.0	NA	NA	NA	NA	10.0	13.0	7.0	12.0	NA
Pyruvic acid (mg/dl) ^d	NA	0.5	NA	1.0	0.7	0.7	NA	NA	NA	NA	0.7	1.1	0.6	0.7	NA
MRI of lower limb ^e	NA	3.9±0.3	3.6±0.5	3.4±0.8	3.5±0.6	2.5±0.9	NA	NA	0.2±0.4	0.1±0.3	0.3±0.5	0.2±0.4	0.1±0.3	0.8±1.0	0.3±0.5
Leg	NA	1.4±0.7	1.1±0.6	0.4±0.5	0.3±0.4	0	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0
Thigh	NA	NA	NA	NA	NA	Grouping ^g	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Muscle biopsy ^f	NA	Grouping ^g	NA	NA	NA	Grouping ^g	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

약어: D = 원위근; L = 하지; NA = 이용가능하지 않음; P = 근위근; U = 상지; WNL = 정상 한계 내; +/- = 양성 또는 음성 소견; ± = 부정(equivocal) 소견.

^a 원위근 약화가 발병한 연령.

^b 크레아틴 키나아제 값은 정상인의 상지에 대하여 기술됨.

^{c,d} 참조 범위: 각각 4.5-14.4 mg/dl 및 0.3-0.9 mg/dl.

^e 지방 침윤 정도는 5-점 등급으로 매겨짐(평균±S.D.).

[0085] ^f외측광근(Ⅲ-6) 및 비복근(Ⅲ-16)에서 근육 생검을 수행함.

[0086] ^g근섬유 유형 및 준결정체 봉입의 분류

[0087] 표 1에 나타난 바와 같이, 다리의 원위성 부위로부터 시작된 근육 약화 및 위축은 우세적인 반면, 상지에서는 원위성으로 덜한 수준인 것으로 나타났다. 하지의 원위성 근육 약화는 무증상 내지 중증으로 다양하였고, 진행성 다리 근육 위축은 질환 기간과 관련되어 있음을 확인하였다(도 2). 원위성 약화 개시의 평균 연령은 10.6 ± 2.4 세(5-14세 범위)이고 질환 기간은 17.5 ± 15.3 년(1-41년 범위)이었다. 15명의 환자들 모두는 원위성 다리 근육 약화를 나타내었고, 이중 3명의 환자들(Ⅲ-4, 6 및 8)은 경증의 근위 대퇴근 약화를 나타내었다. 발 변형의 빈도는 67%로 높았고, 감소된 무릎 반사가 대부분의 환자에게서 발견되었다. 혈청 내 크레아틴 키나아제(CK) 수준은 정상 내지 약간 증가하였는데, 이는 다른 상염색체 우성 원위성 근육병과 일치하였다(Saperstein DS, et al., Muscle Nerve 24: 1440-1450, 2001). ECG 또는 심장초음파 검사는 정상이었다.

[0088] 또한, 원목소리가 15명의 환자들 중 8명에게서 나타났고(53%), 일부 이환자들은 발성부전 목소리만을 나타내었다. 6명의 환자들(Ⅲ-4, 6, 8, 11, 13 및 IV-3)은 20대에 원목소리를 경험하였고, 환자 IV-10 및 IV-13은 각각 15세 및 10세에 원목소리가 관찰되었다. 그러나, 삼키기, 흡인, 호흡곤란 또는 안구 운동과 관련된 장애는 발견되지 않았고, 유연 후두경검사에서 성대의 불완전마비는 나타나지 않았다.

[0089] 12명의 환자들을 대상으로 신경전도속도(NCV)를 측정한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Patient	Sex/Age(yr)	Hearing loss in dB							
		Right ear (kHz)				Left ear (kHz)			
		0.5	1	2	4	0.5	1	2	4
III-6	M/52	20	25	40	60	25	30	50	60
III-8	M/48	30	30	45	70	25	25	40	65
III-11	F/45	25	30	40	70	15	15	30	45
III-13	F/41	25	25	30	35	20	25	25	55
III-16	M/33	20	15	15	30	20	15	20	25
IV-7	M/15	15	20	15	10	15	15	15	10
IV-8	F/11	15	10	10	10	10	10	10	20
IV-9	F/18	15	20	15	10	15	20	20	10
IV-10	M/16	20	30	10	45	15	25	15	35
IV-11	F/15	5	5	5	5	5	5	0	5
IV-13	M/15	20	25	30	50	25	25	25	50

[0090]

[0091] 표 2에 나타난 바와 같이, 청각 검사에서 12명의 환자 중 5명에게서 양측성 감각신경성 청각장애가 나타났다(45%). 환자 Ⅲ-6은 약 25세부터, 환자 Ⅲ-8, Ⅲ-11 및 Ⅲ-13은 30대에서 청각장애가 나타났다. 일반적인 신체검사 도중에 환자 IV-13은 12세에 고-빈도 소실이 관찰되었다. 비환자 가족 일원은 청각장애의 아무런 증상도 나타내지 않았다.

[0092] 실시예 2: 신규 CMT 유전자좌의 지도화

[0093] <2-1> 게놈와이드 SNP 연관 스캔

[0094] 인피니움 II 인간 연관-12 패널(Infinium II human linkage-12 panel, Illumina, San Diego, CA)을 적용하여 가족 FC317의 28명에 대해 게놈와이드 SNP 연관 스캔을 수행하였다. 상기 칩은 441 kbp 및 0.58 cM의 평균 갭을 갖고 모든 염색체에 대해 균일하게 분포된 6,090개 SNP 마커를 포함하고 있다. 일루미나 비드스테이션 500G 어레이 스캐너(Illumina BeadStation 500G array scanner)를 이용하여 유전형 데이터를 스캔하고 상염색체 우성 매개변수 모델을 이용하는 메틀린-1.1.2 소프트웨어로 분석하였다.

[0095] 게놈와이드 SNP 연관 스캔 결과, 상염색체 우성 유전 모델 하에서 SNP 마커 rs1058511이 3.79의 최대 LOD 점수를 나타내었다(0.0001, 0.1, 0.9, 0.99). 염색체 19q13.2-3(NCBI Build 36.1) 상에서 대략 75-110 Mbp(rs2041975 내지 rs1051500)의 부위에 이르는 일배체형이 이환자들 사이에서 동시-분리되었다(도 3a). 어떠한 부가적인 염색체 부위도 상염색체 우성 모델 하에서 2보다 큰 LOD 점수를 나타내지 않았다.

[0096]

[0097] <2-2> 염색체 미세 지도화(Chromosomal Fine Mapping)

[0098] 29개 형광-표지 미세위성을 이용한 유전형 분석을 통해 염색체 19q13 부위의 미세 지도화를 수행하였다. PCR 생성물을 자동화 유전 분석기 ABI3100(automated genetic analyzer) 상에서 해석하고, 그 결과를 유전형 프로그램(Genotype program, Applied Biosystems, Foster city, CA)을 이용해 분석하였다. 엠링크 소프트웨어(Mlink software)를 적용하여, 상염색체 우성 모델 하에서 2-점 LOD 점수를 얻었다.

[0099] 염색체 연관 부위의 미세 지도화는 상염색체 우성 모델 하에서 6.360의 2-점 최대 LOD 점수를 나타내었다(Theta: 0.00). 일배체형 분석은 19q13.3에서 염색체 부위를 대략 13 cM(D19S412 내지 D19S601)로 좁혔다(도 1 및 3b). DMPK 유전자가 이 부위와 가깝지만, 일배체형 분석에 근거하여 배제되었다(도 3c). 연관 연구에서 또한 주요 상염색체 우성 CMT 유전자좌, 예컨대 1p36.2(MFN2; MIM# 608507), 1q23.3(MPZ; MIM# 159440), 7p15(GARS; MIM# 600287), 7q11.23(HSPB1; MIM# 602195), 8p21.2(NEFL; MIM# 162280) 8q21.1(GDAP1; MIM# 606598), 9q34.13(ALS4; MIM# 602433), 10q21.2(EGR2; MIM# 129010), 12q24(HSPB8; MIM# 608014), 16p13.13(LITAF; MIM# 603795), 17p12(PMP22; MIM# 601097) 및 19p13.2(DNM2; MIM# 602378)가 배제되었다.

[0100]

[0101] 실시예 3: MYH14에서 미스센스 돌연변이의 확인

[0102] <3-1> 돌연변이 스크리닝

[0103] 19q13.3에서 연관 부위 내 34개 후보 유전자들에 대해 모든 코딩 엑손 및 인접 인트론의 서열을 분석하였다(도 3c). 또한, 상염색체 우성 CMT 또는 원위성 근육병을 갖는 것으로 이전에 보고된 몇몇 유전자들에 대해 돌연변이 스크리닝을 수행하였다. 구체적으로, DM1 유전자좌 내 DMPK(MIM# 605377) 및 DM2 유전자좌 내 CNBP1(ZNF9)(MIM# 116955) 내에서 삼뉴클레오티드 연장을 조사하였다. 전체 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 증폭한 후 이의 서열을 미토콘드리아 서열분석 시스템(mitoSEQr resequencing system, Applied Biosystems)을 이용하여 분석하였다. PCR 생성물의 서열을 빅다이 터미네이터 사이클 서열분석 키트(BigDye terminator cycle sequencing kit, Applied Biosystems)를 이용하는 자동화 유전 분석기 ABI3100 상에서 분석하였다. 이때, MYH14 유전자의 모든 엑손 및 프로모터 부위를 증폭하기 위해 하기 표 3에 나타난 바와 같은 서열번호: 3 내지 9로 기재되는 프라이머 쌍을 고안하였다. DNA 두 가닥 모두를 분석함으로써 서열 내 돌연변이 유무를 확인하였다. ATG 개시 코돈의 A를 +1로 하는 cDNA 번호매김(numbering)에 의해 뉴클레오티드를 계수하였다.

표 3

[0104]

표적 부위	명칭	서열(5'→3')	서열번호	PCR 크기(bp)
프로모터	P AF	AGAGTAGACTGTAGGGAGACAAAGG	3	499
	P AR	AGAGGGTGTTAATTGCAGAAAGTC	4	
모로모터	P BF	CTTCCAACCTTGGGAAGTCTTT	5	525
	P BR	ATGAATGGGGCCCTTTGTAAG	6	
프로모터	P CF	GTACATGGTCTACGTTTCGACAAAAG	7	423
	P CR	AGAGAGCAGCAGAGGCCAAT	8	
엑손 1	N1F	ATTGGCCTCTGCTGCTCTCT	9	239

	N1R	AAGGTGAGTGTCGCGTCA	10	
엑손 2	2F	GAATGAAATGAGTAAGCTGGGTCT	11	684
	2R	GGATACAGATGATAAACAGCCTCAA	12	
엑손 3	3F	GTTATGGTGTAGACATACCATGTGC	13	391
	3R	AAGTCTACAAGCTGTCATTTGACCT	14	
엑손 4 & 5	4-5F	GTTACACATCAAGACCCAAGCTTTT	15	499
	4-5R	ACCTCCATGAGGGGAAGAGA	16	
엑손 6	6F	ATCACTGGTTCACCTGTGTGTCT	17	187
	6R	CCTGTCTACCAAGAAGATCATGC	18	
엑손 7	7F	ATACTCAGTCAGCTGGAGACACAG	19	296
	7R	CCCCCTCCTCCCTAACAG	20	
엑손 8	8F	GGGTTGGGCTGTTGTTTCC	21	222
	8R	AGTGGGAGGTGCTTTCCATAC	22	
엑손 9	9F	ACTCCACTACACCACAGGAGAGA	23	300
	9R	TCTTGCTTCTCCCCAGAAG	24	
엑손 10	10F	GATGAATCCAGGATGAGTCTGA	25	292
	10R	AAAGAGATCGGGGCATGAAT	26	
엑손 11	11F	AGGGGTGGTGATATAATTTGCCTTA	27	299
	11R	ATGCTCTCTACGTGGGACAGG	28	
엑손 12	12F	AAACGGTACCCTCTCCCTTG	29	284
	12R	GGTGGGAAAAACAGCATACACT	30	
엑손 13	13F	GCATTGTTCTTGATGGTACTTACAC	31	348
	13R	AGGACCGGAGTGAGGAAGTT	32	
엑손 14	N14F	CTCTCCCTTCTCCCTGGTC	33	845
	N14R	GTGAGAGCTCTGATTAACCGATTG	34	
엑손 15	15F	TAGAGTCGGGGTTTCACTGT	35	474
	15R	CCATCTGTAGCCAGTGGAGAT	36	
엑손 16	16F	GAAGGCTCCTTAGGAAATCCAG	37	299
	16R	CAGAAAACCTCAGGTTTACACCTC	38	
엑손 17	17F	GATATCTACCTTACAGGCTGTGTGA	39	476
	17R	CTGAGCCTAGGAATAGAAGCAATTT	40	
엑손 18	18F	GAAACAGGAAATTGCCAAGC	41	299
	18R	AGAGTGGGTGGAGACCTGAAT	42	
엑손 19	19F	CTGTATTGTCTACTGTTGTTCTTG	43	454
	19R	AGGTAATGAGGAAGGTCAATGAAG	44	
엑손 20	N20F3	CCCATTACTCCCCCTCCTACC	45	318
	20R	ACACCTAGAGCCATCTGGTCAAC	46	
엑손 21	21F	AGCTTGGCTCTCTTGTAAGG	47	230
	21R	AAGGCCCTATCCTCTCCCTACT	48	
엑손 22	22F	CAGCTAATAGGTGGAGGAGAAGG	49	400
	22R	GCCTCAGTACACCTTAGCTTTGC	50	
엑손 23	23F	GAACCTAAAGGCCAAAGCAAGTTAC	51	390
	23R	ACACACGGTTTGTAGAAGCAAAG	52	
엑손 24	24F	TTCCCCATCACACTCCATCT	53	300
	24R	GAGAACCGCAGTGTGGTAAC	54	
엑손 25	25F	AGATGAGAACAACACCAGAAGC	55	300
	25R	ACTGAGGCCCTGTAGCACAT	56	
엑손 26	26F	TGAGCTTAGCCTTATATGTGACTGG	57	397
	26R	CTGTCTGTGGCTGGTGAGTG	58	
엑손 27	27F	AGAGAGAGGATTCTAACCTGGGACT	59	470
	27R	ACCTAGAGCCGGTGGTTCAT	60	
엑손 28	28F	GAGGCCCTCATATTTTAAGGAAAC	61	360
	28R	GGAGATGAGCTAGCCTAGAACCAG	62	
엑손 29	N29F	GAGTGAGGGGTGAGCTATTTGTT	63	494
	N29R	CTGTGCCAGACTTGTACATGATTA	64	
엑손 30 & 31	30-31F	GTGTGGTAGAGAGTTGAGGCAGA	65	573
	30-31R	GTAAGGGGGAGTCAGAGATGAGA	66	
엑손 32	32F	CAGCTTACACCTTGGTCACTCAT	67	392

	32R	GATTACTGGTTCCTCACAACGAC	68	
엑손 33	33F	CTTGTGTCCTGCGCTTTGTCTG	69	398
	33R	CATGTACGTGTCTCCCCCTCAC	70	
엑손 34	N34F	ACTAGGATGGGCACACTGACTT	71	400
	N34R	CCTGTACACACCATGGCATAAC	72	
엑손 35	35F	GACCAAGTAAAGAGAGTCAGGGAGT	73	388
	35R	AGCTAGCCTTAGACCCTGGAGT	74	
엑손 36	36F	GAGAGTTCCTGCTTGTTCAC	75	490
	36R	ACATGGTAAGACACACCCACCT	76	
엑손 37	37F	TTACCCAGGGACAGCATGAG	77	400
	37R	CCTTGCCTCACACTACAGGAC	78	
엑손 38	38F	ACAGGGTCTGTAGTGTGAGG	79	327
	38R	CTATTCAACCTTCAAAACCCAATC	80	
엑손 39	39F	CAGTGCACCTAATTCTCAGAGGTG	81	391
	39R	CTAAACCACGTGTTTGTACACAGC	82	
엑손 40	40F	ATGAGTCTATGGGGACAAAATCCTA	83	241
	40R	CTGTGCAATTTCTCAGCCAGT	84	
엑손 41	41F	GATGGGGCAGAGAGAGTCAG	85	393
	41R	ATCCCATTTCCCCCTGTGT	86	
엑손 42	42F	CCCTTATTTTGTCTCTCTCTCC	87	390
	42R	ATTCCAAAGGGCAAGAAGTC	88	
3'-UTR	3UTR AF	CCAGGTCTTCCGACTAGAGGAG	89	592
	3UTR AR	TCCTAAAAAGATGCACAGAGAGAC	90	
3'-UTR	3UTR BF	CATTCCCTCTGCTTCTCTCTC	91	500
	3UTR BR	CAGGTGTCATTCTAACCAGCAG	92	

[0105] CMT4F(PRX; MIM# 605725) 및 CMT2B2(MED25; MIM# 610197) 유전자좌는 불균형 부위 근처 또는 그 내부에 위치하기 때문에(Berghoff C, et al., Neuromuscul Disord 5: 301-306, 2004; Kabzinska D, et al., Neurology 66: 745-747, 2006; Leal A, et al., Neurogenetics 10: 275-287, 2009), 이 두 유전자 모두를 세심하게 조사하였지만, 유의미한 뉴클레오티드 변화는 확인되지 않았다. 유사하게, 연관 부위 내에 위치하고 PMP22 수초 유전자(CMT1A)와 높은 보존 상동성을 나타내는 EMP3(MIM# 602335)에서 역시 어떠한 원인 돌연변이도 발견되지 않았다. DM1 유전자좌에서 DMPK 유전자가 일배체형 분석에 의해 이미 배제되었지만, DMPK의 먼밀한 검사에서 코딩 부위 내 어떠한 비정상적 CTG 반복이나 원인적 돌연변이도 검출되지 않음을 확인하였다.

[0106] <3-2> 복제수 변이의 결정

[0107] 염색체 19q13 부위 내 복제수 변이(CNV)를 고객 주문형 고-밀도 비교 유전체 혼성화(high-density comparative genomic hybridization, CGH) 135K 마이크로어레이(Roche-NimbleGen, Madison, WI)를 사용하여 결정하였다. 이 어레이는 36606560-60238000 bp(UCSC hg18, NCBI Build 36.1) 사이의 염색체 19 부위를 포함하고 있다. 어레이의 평균 탐침 크기 및 간격 길이는 각각 60-머 및 215 bp였다. CGH 데이터를 님블스캔(NimbleScan, ver. 2.4) 및 시그널맵(SignalMap, ver. 1.9) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 본 연구에 사용된 손익 문턱값은 각각 $\log_2$ 비 >0.3 및 <-0.3이었다.

[0108] 상기 과정에 따라 FC317 가족에서 3명의 개인(2명의 환자 및 1명의 비환자)에게 고개-주문형 고밀도 CGH 어레이를 적용함으로써 19q13 부위 내 염색체 중복 및 결실을 배제하였다(도 4a).

[0109] <3-3> 핵형분석 및 근육에서 MYH14 발현

[0110] 계보발단자(III-13) 및 그녀의 형제자매(III-16)로부터 입수된 배양된 중기 백혈구 세포에 대해 핵형분석을 수행하였다. 중기 염색체를 검사(Gimsa) 염색으로 시각화하였다. 정량적 실시간 PCR(QuantiTect Primer Assay, QT00080248, Qiagen)을 이용해 환자(III-16)로부터의 장만지근 생검 내 MYH14 발현을 결정하였다.

- [0111] 각각의 남성 및 여성 환자에서의 핵형분석은 어떠한 염색체 이상도 나타내지 않았다(도 4a).
- [0112] 상기 실시예 3의 결과를 종합하면, 34개 후보 유전자의 스크리닝에서 확인된 유일하게 기능적으로 유의미한 변이는 비근육 미오신 중쇄 14(Myh14) 단백질을 코딩하는 MYH14에서의 미스센스 돌연변이였다. 상기 돌연변이는 MYH14 유전자(NM_001077186.1)의 23번 엑손 내에서 2281번째 염기인 구아닌(G)이 티민(T)로 치환된 것(c.2282G>T)으로, 이는 대응하는 아미노산 잔기에서 941번째 아르기닌의 류신으로의 치환(p.Arg941Leu)을 초래한다(도 3d). 지금까지 MYH14 유전자에서 c.2282G>T 돌연변이는 dbSNP 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)에 보고된 바 없다. 상기 돌연변이는 가족 내 모든 환자에게서 완벽하게 동시-분리되었다. 서열분석을 통해 가족의 비환자 일원 및 566명의 건강한 대조군 염색체에게서 상기 돌연변이의 부재를 확인하였다. 돌연변이는 Myh14의 꼬리 도메인 내에 위치하고 다른 중간에 매우 보존적이었다(도 3e).
- [0113] 지금까지 골격근, 와우, 뇌 및 말초신경에서 MYH14 발현이 보고되었는데(Leal A, et al., Gene 312: 165-171, 2003; Donaudy F, et al., Am J Hum Genet 74: 770-776, 2004; Golomb E, et al., J Biol Chem 279: 2800-2808, 2004), 본 발명에서는 정량적 실시간 PCR로 비복근 생검에서 MYH14 발현을 최초로 확인하였다. 환자(Ⅲ-16)의 비복근 내 발현 수준은 정상 남성에 비해 약간 감소하였다(도 5).
- [0114] **실시예 4: 전기생리학적 소견**
- [0115] 12명의 환자(6명의 남성 및 6명의 여성)를 대상으로 전기생리학적 연구를 수행하였다. 정중, 척골, 비골 및 경골 신경의 운동 NCVs를 결정하였다. 양성 피크 값에서 음성 피크 값으로의 복합근 활동전위(CMAP)의 진폭을 측정하였다. 정중, 척골 및 비복 신경으로부터 정방향 스코어링(orthodromic scoring)에 의해 감각 NCVs를 결정하였다. 양성 피크 값에서 음성 피크 값으로의 감각신경 활동전위(SNAP)의 진폭을 측정하였다. 제1등쪽뼈사이근, 상완이두근, 앞전강근, 안쪽 장딴지근 및 외측광근에 대해 근전도검사(EMG)를 수행하였다.
- [0116] 12명의 환자들(6명의 남성 및 6명의 여성)에서 29개 신경에 대한 전기생리학적 소견을 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Patient	Age (yrs)	R/L	Median motor		Ulnar motor		Peroneal motor		Tibial motor		Median sensory		Ulnar sensory		Sural sensory	
			Amp	CV	Amp	CV	Amp	CV	Amp	CV	Amp	CV	Amp	CV	Amp	CV
III-6	50	R	4.2	56.4	7.9	58.3	A	A	0.6	41.1	37.3	42.3	22.6	38.7	31.4	38.5
	50	L	6.3	57.4	6.4	70.0	A	A	0.6	49.3	24.2	44.1	22.3	39.1	20.4	38.7
	52	R	4.8	56.5	5.9	56.4	A	A	0.7	45.6	33.5	44.1	24.9	40.4	22.2	39.3
III-8	52	L	6.0	52.8	6.6	54.3	A	A	0.5	44.3	36.7	45.5	24.6	39.2	30.8	39.5
	48	R	2.9	53.5	6.1	54.1	A	A	12.5	36.1	39.8	35.7	31.7	34.2	23.4	30.3
	48	L	5.4	59.8	5.1	55.3	A	A	7.7	37.5	32.2	38.3	18.6	34.5	28.2	28.1
III-11	45	L	7.9	58.8	5.2	69.0	1.5	49.3	7.3	47.7	41.0	46.9	32.0	41.7	30.3	42.3
	40	R	10.3	56.1	9.9	56.4	A	A	16.5	45.6	47.8	42.3	23.6	41.7	24.4	39.5
	40	L	6.9	59.5	7.7	63.9	A	A	14.7	43.8	59.1	42.9	28.7	39.1	24.0	34.1
III-13	41	R	11.0	53.5	11.0	55.7	A	A	17.0	46.8	57.1	41.1	26.2	40.3	24.1	35.7
	41	L	7.3	53.7	7.3	57.5	A	A	16.8	43.3	49.0	41.7	22.6	39.1	22.3	36.1
	33	R	7.1	59.0	7.0	64.7	A	A	10.6	48.1	43.7	48.4	26.0	40.3	27.1	41.2
III-16	33	L	8.2	57.3	4.8	64.7	A	A	7.5	48.6	57.8	46.9	33.9	43.8	29.4	42.2
	14	R	6.2	53.4	18.1	54.8	4.6	43.9	15.1	42.2	22.3	40.1	14.6	43.9	10.2	33.1
	14	L	7.3	54.5	16.2	60.5	5.9	37.7	12.1	38.6	22.0	43.4	15.9	37.7	12.9	34.8
IV-7	15	R	7.0	52.2	17.8	52.4	3.7	41.5	13.2	44.7	26.1	41.7	8.4	37.9	11.4	35.3
	15	L	8.4	55.3	17.8	53.7	5.1	37.5	14.1	38.4	19.2	40.5	13.4	38.6	11.9	38.2
	11	R	6.5	57.2	6.3	54.7	0.3	44.2	14.7	49.3	31.8	41.7	34.6	38.8	27.2	40.5
IV-8	11	L	8.1	56.1	4.5	58.1	0.2	46.9	10.8	48.0	45.1	41.7	32.4	41.7	28.6	41.7
	18	R	15.4	63.2	10.0	60.8	3.4	47.8	8.2	47.3	55.0	40.4	35.3	39.5	29.4	36.6
	18	L	11.5	58.3	14.0	63.6	4.6	45.1	8.0	47.9	53.7	43.0	26.1	40.3	31.6	33.4
IV-10	16	R	12.3	60.8	11.6	66.2	0.2	47.6	7.0	48.6	27.0	42.3	15.7	43.1	27.6	45.5
	16	L	14.7	64.7	10.6	67.5	0.6	48.6	7.1	47.2	41.2	43.5	32.4	41.7	30.5	47.8
	15	R	10.6	56.3	14.5	62.1	2.9	49.2	14.6	47.8	30.9	40.4	19.7	39.5	18.1	35.5
IV-11	15	L	10.5	64.3	13.9	62.9	3.3	45.7	12.7	45.7	30.0	41.7	20.7	39.5	21.5	37.2
	15	R	7.8	53.0	5.4	53.7	A	A	14.7	45.1	31.9	37.8	18.0	33.1	24.1	38.5
	15	L	5.2	55.3	4.1	57.9	A	A	10.5	46.2	35.0	36.9	17.9	35.7	26.7	38.2
IV-14	11	R	9.1	52.9	11.4	56.1	2.1	42.9	12.5	43.8	31.5	40.4	22.4	39.4	14.3	36.0
	11	L	10.6	56.1	6.9	57.3	1.6	42.8	15.0	43.4	31.5	41.7	20.4	40.3	17.2	36.8

굵게 표시된 부분은 비정상적 값을 나타냄. A = 반응 부재; Age = 조사 연령; Amp = 진폭(운동: mV; 감각: 전도속도(m/s)); R/L = 우측/좌측. 정상 CVs: 운동 정중 ≥ 50.5 , 척골 ≥ 51.1 , 비골 ≥ 41.2 , 경골 ≥ 41.1 , 감각 정중 ≥ 39.3 , 척골 ≥ 37.5 , 및 비복 ≥ 32.1 . 정상 진폭: 운동 정중 ≥ 6 ; 척골 ≥ 8 , 비골 ≥ 6 , 경골 ≥ 6 , 감각 정중 ≥ 8 , 척골 ≥ 7.9 , 및 비복 ≥ 6.0 .

표 4에 나타난 바와 같이, 신경전도 연구를 통해 약간 감소되거나 정상인 정중, 척골 및 비골 감각 신경전도속도(NCVs), 및 감소된 정중 및 척골 복합근 활동전위(CMAPs)가 정상 NCVs와 항상 관련되어 있음을 입증하였다. 주목할 만한 것은, 상당히 감소된 CMAPs가 양측비골신경에서 관찰되었다는 것이다.

또한, 12명의 환자에게 EMG를 수행한 결과, 이들은 섬유자발전위(fibrillation potential)를 나타내었지만, 근육긴장 방전은 발견되지 않았다. 2명의 환자들(IV-8 및 -11)은 원위성 근육 위축 및 전경골근에서의 섬유자발전위를 나타내지 않았다. 동일한 환자들에서, 일반적으로 말초신경병에서 나타나는 장기 운동단위 활동전위(MUAP)를 갖는 큰 진폭(도 6의 A), 및 근육병에서 나타나는 단기 다상성 MUAP를 갖는 작은 진폭(도 6의 B)이 모두 관찰되었다. 이러한 발견은 환자들에서 말초 신경병 및 근육병 모두를 가짐에 대한 증거를 제시하는

것이다.

[0121] 실시예 5: 원위성 근육 내 순차적 지방 침윤

[0122] 14명의 개인들(12명의 환자 및 2명의 비환자)에 대해 1.5-T 시스템(Siemens Vision, Siemens, Germany)을 이용한 하지 MRI를 수행하였다. 하기 프로토콜에 따라서 축상면 및 관상면으로 하지 영상화를 수행하였다: T1-가중 스핀에코(T1-weighted spinecho, SE)(TR/TE 570-650/14-20, 512 매트릭스), T2-가중 SE(TR/TE 2800-4000/96-99, 512 매트릭스), 및 지방-억제(fat-suppressed) T2-가중 SE(TR/TE 3090-4900/85-99, 512 매트릭스). 근육을 하기와 같이 5-점 등급으로 구분하였다: 0 = 근육 내 지방 신호 없음, 1 = 약간의 지방 줄무늬, 2 = 더 적은 부위의 근육을 점유하는 지방, 3 = 비슷한 양의 지방 및 근육 조직, 및 4 = 더 많은 부위의 근육을 점유하는 지방.

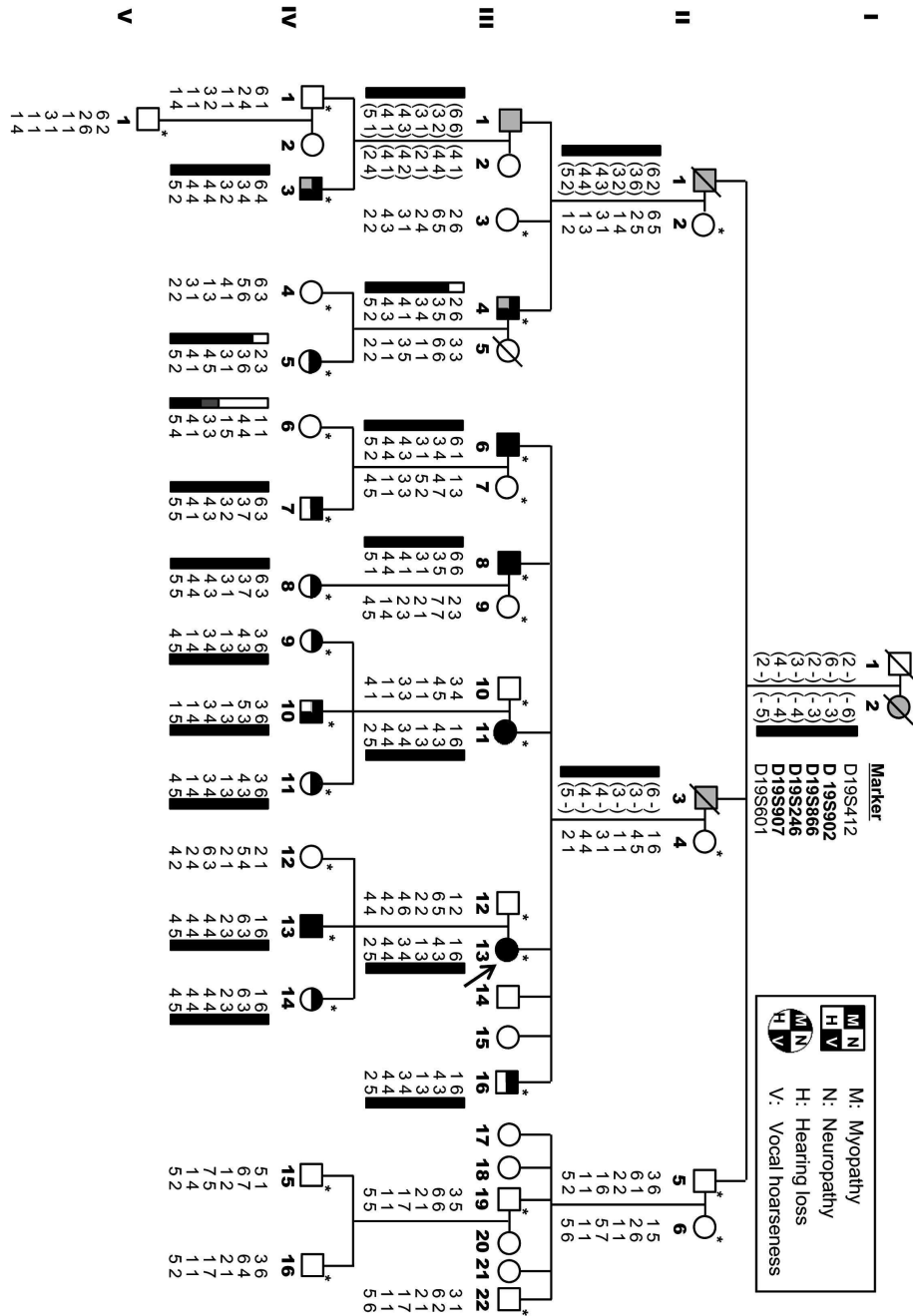
[0123] 모든 검사된 환자들은 MRI 상에서 비정상적 지방 침윤을 나타내었다(표 1). 12명 중 8명의 환자는 다리에서만 근육 조직의 지방 대치를 나타내었고, 이들 모두는 전방 구획 발병을 나타내었다. 4명의 환자(III-6, 8, 11, 및 13)는 다리 및 넓적다리 근육 발병을 나타내었고, 이들 환자 모두에게서 넓적다리의 후방 구획이 발병되었으며, 2명에게서 전방 및 정중 구획이 발병되었다. 또한, 질환 기간과 관련된 근육 발병 개시의 순차적 양상이 관찰되었다. 질환 초기 단계에서는 지방 침윤이 다리의 전방 및 후방 구획에서 나타났고(도 7의 A 및 B), 후기 단계에서는 다리 근육의 후방 구획이 또한 침윤되었으며, 근육 위축이 관찰되었다(도 7의 C 및 D).

[0124] 실시예 6: 조직병리학적 소견

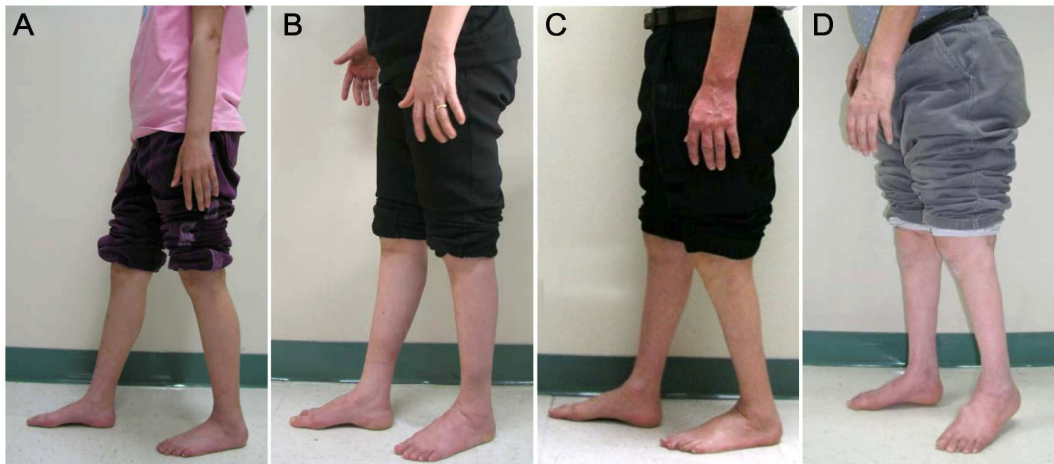
[0125] 환자 III-6 및 III-16에 대해 각각 좌외측광근 및 우외측비복근의 근육 생검을 수행하였다. 연속 냉동 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H-E), NADH-테트라졸륨 리덕타아제(NADH-TR), 석시네이트 디하이드로게나제(SDH), 변형된 고모리 트라이크롬(modified Gomori trichrome, mGT), 과요오드산-쉬프(periodic acid-Schiff, PAS), 오일-레드-오(Oil-red-O)로 염색하고, 다양한 pH 사전-인큐베이션에 의한 ATPase 반응을 수행하였다. 미오신 중쇄(fast)(NCL-MHCf, 단일클론, 1:20) 및 미오신 중쇄(slow)(NCL-MHCs, 단일클론, 1:40: Vision Biosystems, Newcastle, UK), 디스트로핀, 사르코글리칸(sarcoglycan), 디스펠린(dysferlin) 및 티틴(titin)을 이용한 면역염색을 수행하였다. 전자현미경 관찰을 위해, 표본을 25 mM 카코딜산염 완충액(pH 7.4) 내 2% 글루타르알데히드로 고정하고, 세미틴(semithin) 및 울트라틴(ultrathin) 연구에 사용하였다.

[0126] 2명의 환자(III-6 및 III-16)에 대한 근육 생검 결과, 유사한 조직병리학적 특징이 확인되었다. 근섬유는 섬유 크기 및 모양에서 경미하거나 현저한 변화를 나타내었다(도 8의 A). 디스트로핀, 사르코글리칸, 디스펠린 및 티틴을 이용한 면역염색에서 비정상적 소견은 나타나지 않았고, 염증성 침윤 또한 나타나지 않았다. pH 9.4 사전-인큐베이션에 의한 ATPase 반응 및 미오신 중쇄(fast), 미오신 중쇄(slow), 및 미오신 IIa로의 면역염색에 의해 조직화학적 근섬유 유형의 분류를 관찰하였다(도 8의 B). mGT 염색이 불균일 적색 근섬유 또는 테두리 공포(rimmed vacuoles)를 나타내지 않는다고 하더라도, NADH-TR 및 SDH 염색은 미토콘드리아의 다초점 황문근형질막하(subsarcolemmal) 축적을 나타내었다. 주목할 만하게도, 전자현미경 사진에서 다양한 크기의 직각 또는 신장된 마름모의 준결정체 봉입을 갖는 비대 미토콘드리아의 황문근형질막하 축적이 빈번하게 나타났다(도 8의 C).

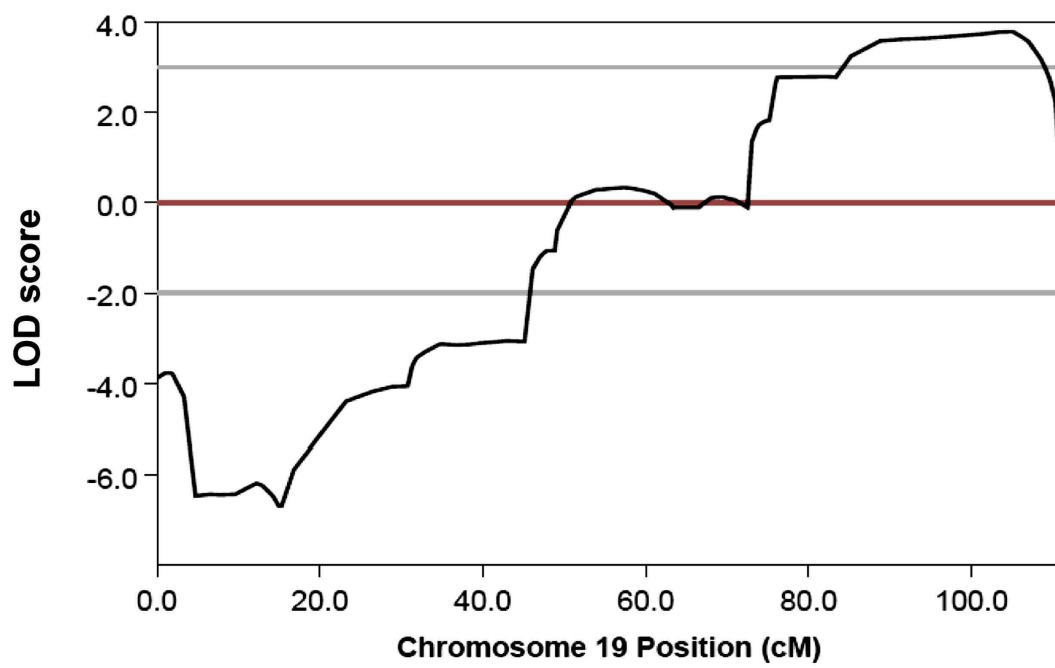
도면
도면1



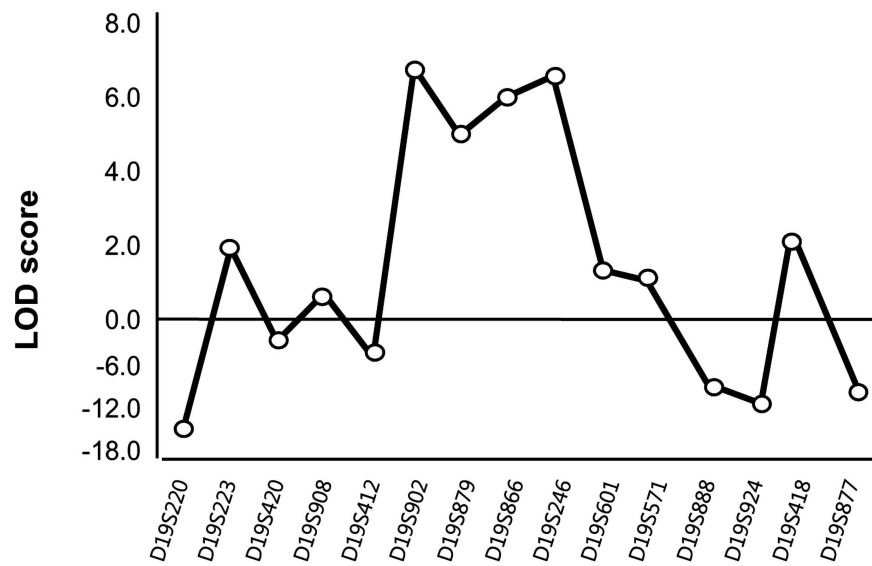
도면2



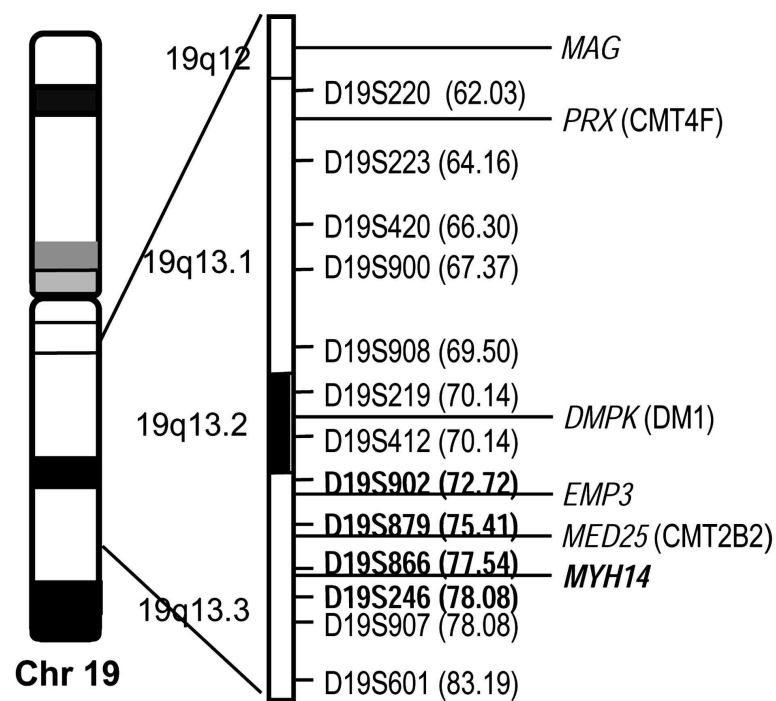
도면3a



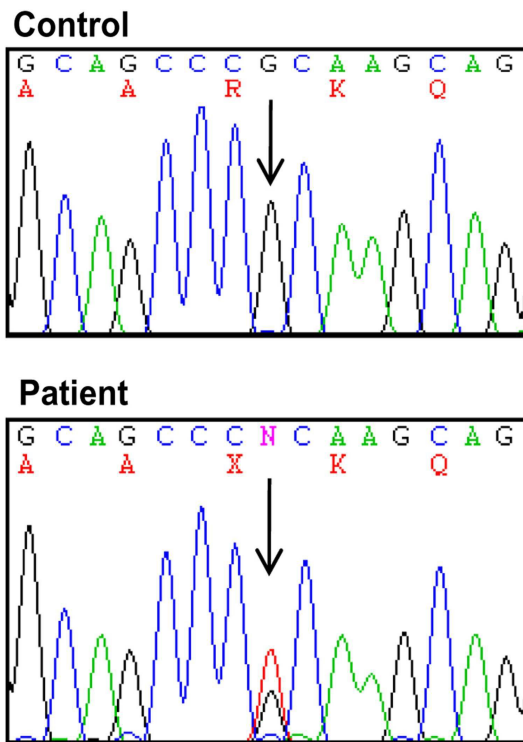
도면3b



도면3c



도면3d

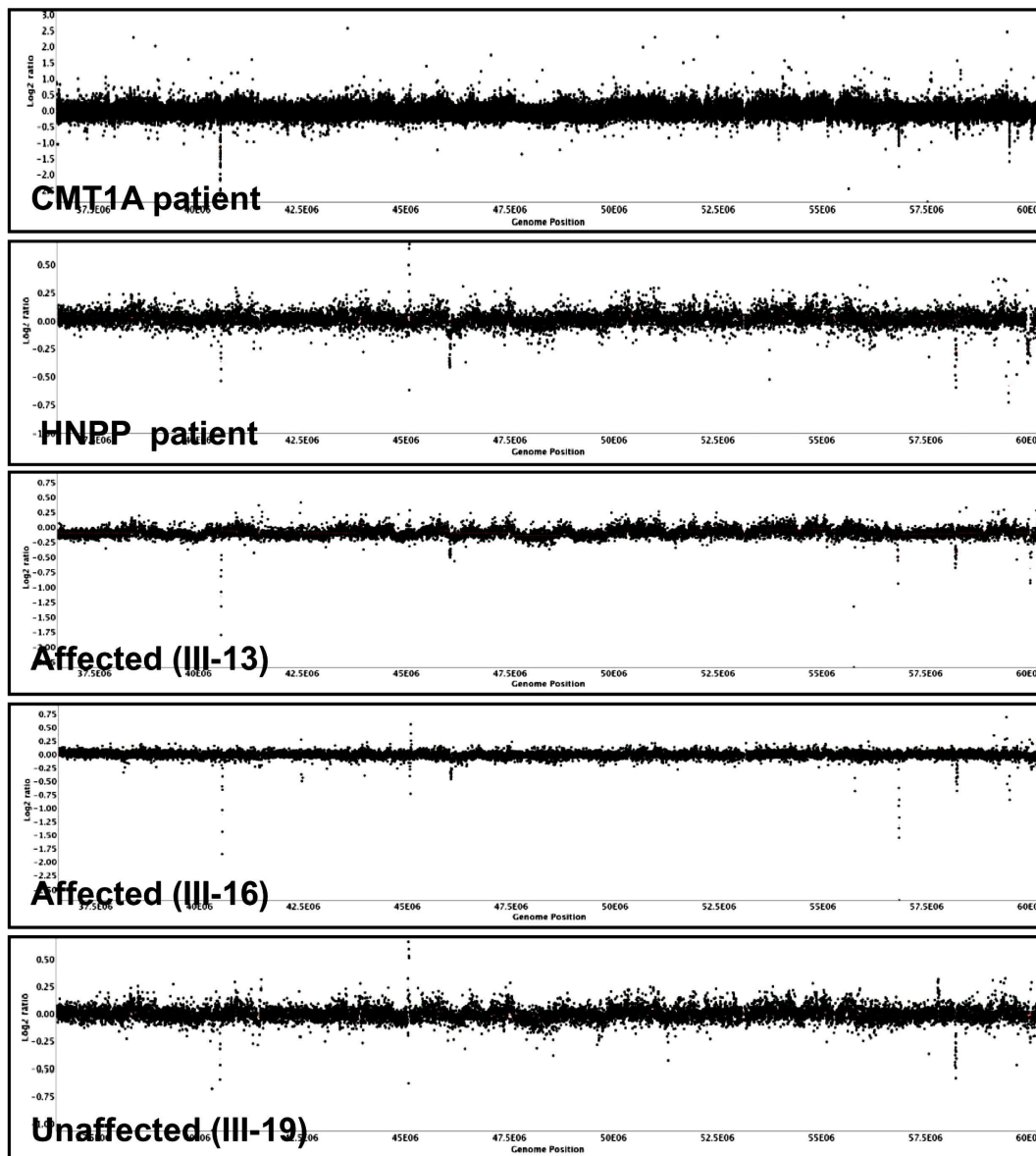


도면3e

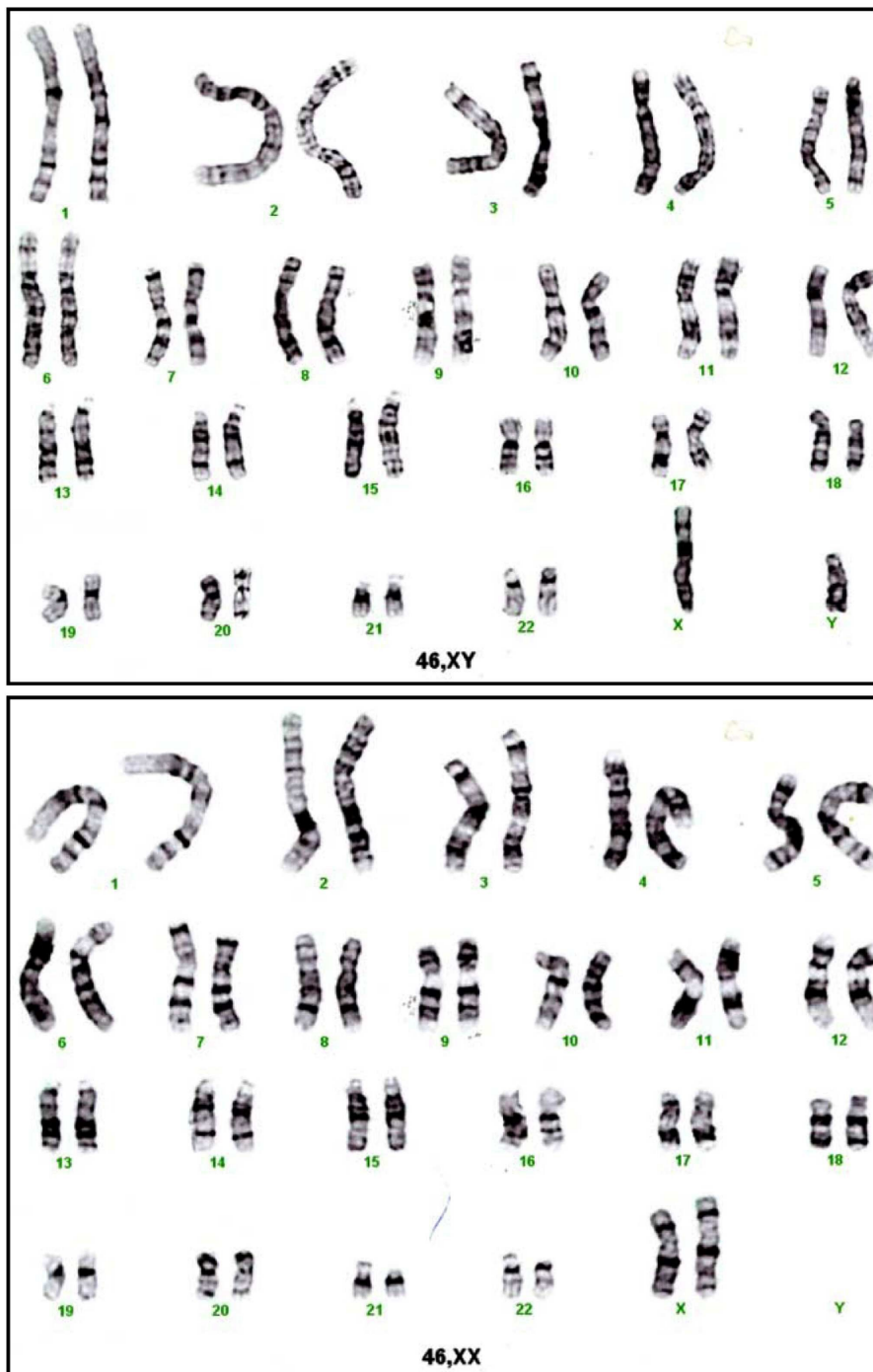
Myh14

<i>H.sapiens</i>	EETRGRLAAR <u>K</u> QELELVVS
<i>M.musculus</i>	EETRARLAAR <u>K</u> QELELVVT
<i>R.norvegicus</i>	EETRARLAAR <u>K</u> QELELVVT
<i>B.taurus</i>	EETRGRLAAR <u>K</u> QELELVVS

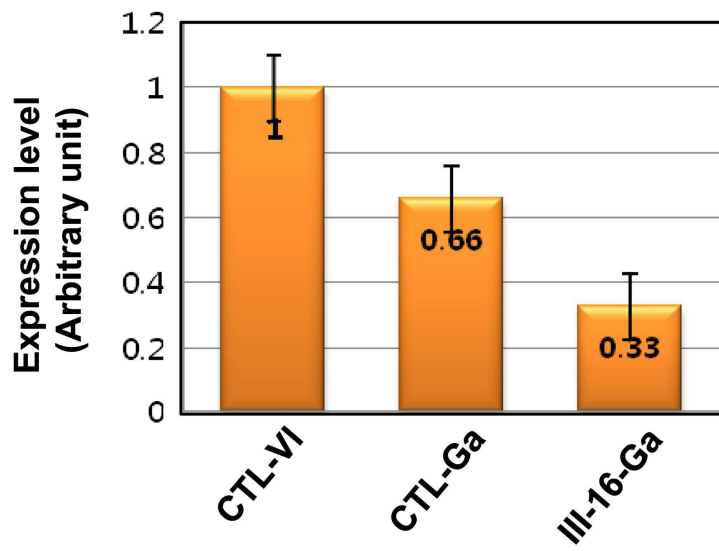
도면4a



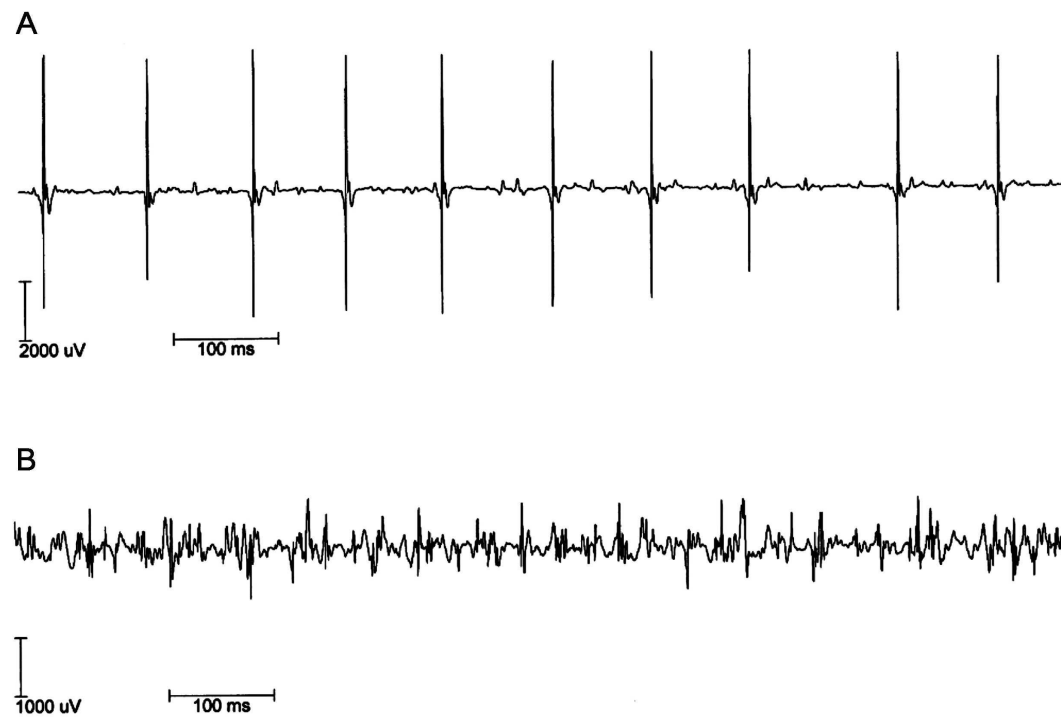
도면4b



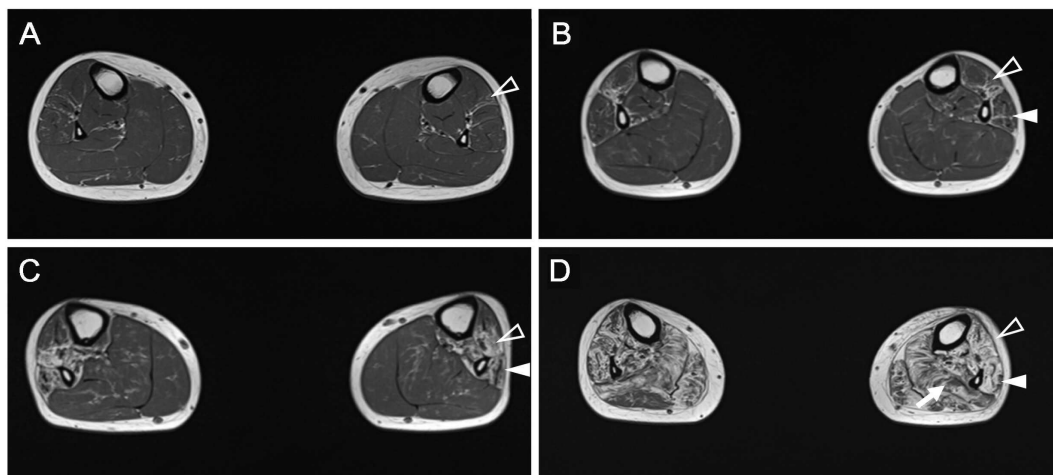
도면5



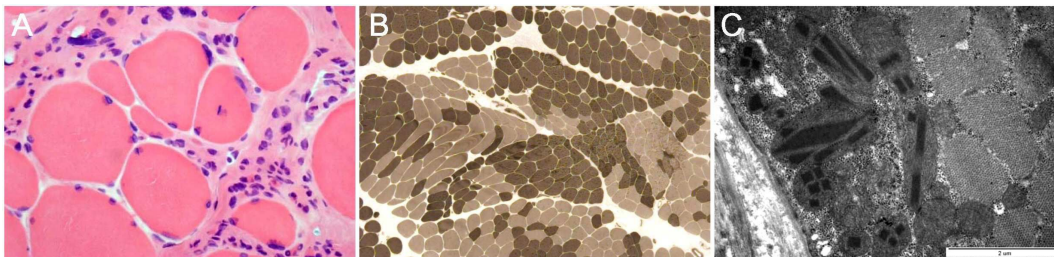
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION
KONGJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION
- <120> MYH14 as a causative gene responsible for a complex phenotype of
peripheral neuropathy, myopathy, hearing loss and hoarseness and
diagnosis method and kit for the complex phenotype by using the
same
- <130> PA110471
- <150> KR10-2011-0016760
- <151> 2011-02-24
- <160> 92
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <
- 211> 6831
- <212> DNA
- <213> Human MYH14 gene
- <400> 1

ctcttttctcc ccaggccgaa gcctcgggac ggccctggaa gccgacatg gcagccgtga	60
ccatgtcggg gcccgggcgg aaggcgcccc ccaggccggg ccagtgccc gaggcggccc	120
agccgttccct gttcacgccc cgcgggccca ggcgggtgg cgggcctggc tcgggcacct	180
ccccgagggt ggagtggacg gcccggcgtc tcgtgtgggt gccttcggag cttcacgggt	240
tcgaggcggc ggcgctgcgg gacgaaggcg aggaggaggc ggaggtggag ctggcggaga	300
gcgggaggcg gctgcgactg ccgcgggacc agatccagcg catgaaccg cccaagtcca	360
gcaaggccga ggacatggcc gagctgacct gcctcaacga ggccctcggtc ctgcacaacc	420
tccgggagcg gtactactcc ggccctcatct acacgtactc cggccttttc tgtgtggcca	480
tcaaccgta caagcagctt cccatctaca cagaagccat tgtggagatg taccggggca	540
agaagcgcca cgaggtgcca cccacgtgt acgcagtgc cgagggggcc tatcgagca	600
tgctgcagga tcgtgaggac cagtccattc tctgcactgg agagtctgga gctgggaaga	660
cggaaaacac caagaagtc atccagtacc tcgccacgt ggcgtcgtct ccaaaggcca	720
ggaaggagcc ggggtgtccc gcctccgtca gcaccgtgtc ttatggtgag ctggagcggc	780
agctgcttca ggccaacccc atcctagagg cctttggcaa tgccaagaca gtgaagaatg	840
acaactctc ccgattcgcc aaattcatcc gcatcaactt tgatgttgcc gggtagatcg	900
tgggcgcaa cattgagacc tacctgctgg agaagtcgcg ggccatccgc caggccaagg	960
acgagtgcag cttccacatc ttctaccagc tgctgggggg cgctggagag cagctcaaag	1020
ccgacctct cctcgagccc tgctccact accggttctt gaccaacggg ccgtcatct	1080
ctcccgcca ggagcgggaa ctcttcagg agacgctgga gtcgctgcgg gtcctgggat	1140
tcagccacga ggaatcatc tccatgctgc gcatggctc agcagttctc cagtttggca	1200
acattgcctt gaagagagaa cggaacaccg atcaagccac catgcctgac aacacagctg	1260
cacagaagct ctgccctc ttgggactgg gggtagcgga tttctcccga gccttgctca	1320
cccctcgcat caaagtggc cgagactatg tgcagaaagc ccagactaag gaacaggctg	1380
acttcgcgt ggaggccctg gccaaaggca cctacgagcg cctcttcgc tggtgtgttc	1440
tgcgctcaa ccgggcttg gaccgcagcc ccgccaagg cgctcttc ctgggcatcc	1500
tggacatgc gggctttgag atcttcagc tgaactcctt cgagcagtc tgcataact	1560
acaccaacga gaagctgcag cagctcttca accacacat gttcgtgctg gagcaggagg	1620
agtaccagcg tgagggcac ccctggacct tctcgactt tggcctgac ctgcagccct	1680
gcatgacct catcgagcgg ccggccaacc ccctggact cctggccctg ctggatgagg	1740
agtgtgtgtt cccgaaggcc acagacaagt cgtttgtgga gaaggtagcc caggagcagg	1800
gcggccacc caagtccag cggccgaggc acctgcggga tcaggccgac ttcagtgttc	1860

tccactacgc gggcaaggct gactacaagg ccaacgagtg gctgatgaaa aacatggacc	1920
ctctgaatga caacgtcgca gccttgctcc accagagcac agaccggctg acggcagaga	1980
tctggaaga cgtggagggc atcgtggggc tggaacaggt gagcagcctg ggcgacggcc	2040
caccaggtgg ccgccccctg cggggtatgt tccggacagt gggacagctc tacaaggagt	2100
ccctgagccg cctcatggcc aactcagca acaccaaccc cagttttgtc cgctgcattg	2160
tcccaacca cgagaaggagg gccgggaagc tggagccacg gctggtgctg gaccagcttc	2220
gctgcaacgg ggtcctggag ggcatccgca tctgtcgcca gggcttcccc aaccgcatcc	2280
tcttccagga gttccggcag cgatacgaga tctgacacc caatgccatc cccaagggt	2340
tcatggatgg gaagcaggcc tgtgaaaaga tgatccaggc gctggaactg gacccaacc	2400
tctaccgctg gggacagagc aagatcttct tccgggctgg ggtcctggcc cagctggaag	2460
aggagcgaga cctgaaggct accgacatca tcgtctcctt ccaggcagct gcccggggat	2520
acctggctcg cagggccttc cagaagcgcc agcagcagca gagcgccctg aggggtgatgc	2580
agcggaaactg cgcggcctac ctcaagctga gacactggca gtggtggcgg ctgtttacca	2640
aggtgaagcc actgctgcag gtgacgcggc aggatgaggt gctgcaggca cggggccagg	2700
agctgcagaa agtgcaggag ctacagcagc agagcgcccg cgaagtggg gagctccagg	2760
gccgagtggc acagctggaa gaggagcgcg cccgcctggc agagcaattg cgagcagagg	2820
cagaactgtg tgcagaggcc gaggagacgc gggggaggct ggcagcccgc aagcaggagc	2880
tgagctggtt gggtcagag ctggaggctc gcgtgggcga ggaggaggag tgcagccgtc	2940
aatgcaaac cgagaagaag aggtgcagc agcacatata ggagctagag gccaccttg	3000
aggtgagga ggggtgcgcg cagaagctgc agctggagaa ggtgacgaca gaggcaaaaa	3060
tgaagaaatt tgaaggagc ctgctgctcc tggaagacca gaattccaag ctgagcaagg	3120
agcggaaact gctggaagat cgtctggcgg agttctcatc ccaggcagct gaggaggagg	3180
agaaggtcaa gagcctcaat aagctacggc tcaaatatga ggccacaatc gcagacatgg	3240
aggaccgctt acggaaggag gagaagggtc gccaggagct ggagaagctg aagcggaggc	3300
tggtgggga gagctcagag ctgcaggagc agatggtgga gcagcaacag cgggcagagg	3360
agctgcgggc ccagctgggc cggaaggagg aggagctgca ggctgccctg gccagggcag	3420
aagacgaggg tggggcccg gccagctgc tgaatccct gcgggaggct caagcagccc	3480
tggccgaggc ccaggaggac ctggagtctg agcgtgtggc caggaccaag gcggagaagc	3540
agcgcgggga cctgggcgag gagctggagg cgctgcgggg cgagctggag gacacgtgg	3600
actccaccaa cgcacagcag gagctccggt ccaagaggga acaggagggt acggagctga	3660
agaagactct ggaggaggag actcgcatcc acgaggcggc agtgcaggag ctgaggcagc	3720

gccacggcca ggccctgggg gagctggcgg agcagctgga gcaggcccgg aggggcaaag	3780
gtgcatggga gaagacccgg ctggccctgg aggccgaggt gtccgagctg cgggcagaac	3840
tgagcagcct gcagactgca cgtcaggagg gtgagcagcg gaggcgccgc ctggagt tac	3900
agctgcagga ggtgcagggc cgggctggtg atggggagag ggcacgagcg gaggctgctg	3960
agaagctgca gcgagcccag gctgaactgg agaattgttc tggggcgctg aacgaggctg	4020
agtccaaaac catccgtctt agcaaggagc tgagcagcac agaagcccag ctgcacgatg	4080
cccaggagct gctgcaggag gagaccaggg cgaaattggc cttggggtcc cgggtgcgag	4140
ccatggaggc ttaggcagcc gggctgctg agcagctgga ggaggaggca gctgccaggg	4200
aacggggcgg ccgtgaactg cagactgccc aggccagct ttccgagtgg cggcgccgc	4260
aggaggagga ggcaggggca ctggaggcag gggaggaggc acggcgccgg gcagcccggg	4320
aggccgaggc cctgaccag cgcctggcag aaaagacaga gaccgtggat cggctggagc	4380
ggggccggcc cggctgcag caggagctgg acgacgccac catggacctg gagcagcagc	4440
ggcagcttgt gagcacctg gagaagaagc agcgcaagtt tgaccagctt ctggcagagg	4500
agaaggcagc tgtacttcgg gcagtggagg aacgtgagcg ggccgaggca gagggccggg	4560
agcgtgaggc tcgggcctg tcactgacac gggcactgga ggaggagcag gaggcacgtg	4620
aggagctgga gcgcgagaac cgggccctgc gggctgagct ggaggcactg ctgagcagca	4680
aggatgacgt cggcaagagc gtgcatgagc tggaacgagc ctgccgggta gcagaacagg	4740
cagccaatga tctgcgagca caggtagacag aactggagga tgagctgaca gcggccgagg	4800
atgccaagct gcgtctggag gtgactgtgc aggtctctaa gactcagcat gagcgtgacc	4860
tgcagggccg tgatgaggct ggtgaagaga ggcggaggca gctggccaag cagctgagag	4920
atgcagaggt ggagcgggat gaggagcggg agcagcgcac tctggccgtg gctgcccgca	4980
agaagctgga gggagagctg gaggagctga aggtcagat ggcctctgcc ggccagggca	5040
aggaggaggc ggtgaagcag cttcgaaga tgcaggcca gatgaaggag ctatggcggg	5100
aggtggagga gacacgcacc tcccgggagg agatcttctc ccagaatcgg gaaagtgaaa	5160
agcgctcaa gggcctggag gctgaggtgc tgcggctgca ggaggaactg gccgcctcgg	5220
accgtgctcg gcggcaggcc cagcaggacc gggatgagat ggcatagtag gtggccaatg	5280
gtaaccttag caaggcagcc attctggagg agaagcgtca gctggagggg cgcctggggc	5340
agttggagga agagctggag gaggagcaga gcaactcgga gctgctcaat gaccgctacc	5400
gcaagctgct cctgcaggta gactcactga ccacagagct gtcagctgag cgcagtttct	5460
cagccaaggc agagagcggg cggcagcagc tggaacggca gatccaggag ctacggggac	5520

gcctgggtga ggaggatgct ggggcccgtg cccgccacaa gatgaccatt gctgcccttg 5580
 agtctaagtt ggcccaggct gaggagcagc tagagcaaga gaccagagag cgcatacctt 5640
 ctggaaagct ggtgcgcaga gctgagaagc ggcttaaaga ggtggtgctc caggtggagg 5700
 aggagcggag ggtggctgac cagctccggg accagctgga gaagggaac cttcgagtca 5760
 agcagctgaa gcggcagctg gaggaggccg aggaggaggc atcccgggct caggccggcc 5820

gccggaggct gcagcgtgag ctggaagatg tcacagagtc ggccgagtcc atgaaccgtg 5880
 aagtgaccac actgaggaac cggcttcgac gcggccccct caccttcacc acccgcacgg 5940
 tgcgccaggt cttccgacta gaggagggcg tggcatccga cgaggaggca gaggaagcac 6000
 agcctgggtc tgggccatcc ccggagcctg aggggtcccc accagccac cccagtgac 6060
 cctaccctgt cccagatgc actaacagat ggggccccagc ccccttctc cctggacccc 6120
 acgggccccct gtcccaggaa ccccgccctc tgacttcttg ccttttgaa atggtgcagc 6180
 actctggcat ttatcacccc cactgggtc cctgcaacc tccatcaaa ggatgacccc 6240

taaacacaga ggagcggggc aggcaggag gcaatgactg gagctacctt gcttgttggg 6300
 ggactgggta cagttggcaa gctgtgtttc catcagctcc ctgtcctcct ttcttcctc 6360
 gttattgac tatagacatt aggaaggag tgagacggct cctccacat cctcagccag 6420
 tgcaacccat tcctctgct tctctctctc tctctctctc tccctccctc tccttccta 6480
 ccctctcacc atctttcttg gcctctctga ggtctctct gtgcatttt ttaggaatct 6540
 cgctctcact ctctacgtg ccactctct tccccatct ctgcgtccac cctgaactc 6600
 ctgagcgaca gaagccccag gcctccacca gccttgaacc cttgcaaagg ggcaggacaa 6660

ggggaccct ctactcctg ctgctgcca tgetctgccc tccctcttg ttgctctgag 6720
 ggttcggagc ttccctctgg gactaaagga gtgtccttta cctcccagc ctccaggctc 6780
 tggcagaaat aaactccaac ccgactggac cataaaaaaa aaaaaaaaaa a 6831

<210> 2

<211> 2003

<212> PRT

<213> Human Myh14 protein

<400> 2

Met Ala Ala Val Thr Met Ser Val Pro Gly Arg Lys Ala Pro Pro Arg

1 5 10 15

Pro Gly Pro Val Pro Glu Ala Ala Gln Pro Phe Leu Phe Thr Pro Arg

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

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

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

 Glu Leu Glu Arg Gln Leu Leu Gln Ala Asn Pro Ile Leu Glu Ala Phe
 245 250 255
 Gly Asn Ala Lys Thr Val Lys Asn Asp Asn Ser Ser Arg Phe Gly Lys
 260 265 270
 Phe Ile Arg Ile Asn Phe Asp Val Ala Gly Tyr Ile Val Gly Ala Asn
 275 280 285

Ile Glu Thr Tyr Leu Leu Glu Lys Ser Arg Ala Ile Arg Gln Ala Lys
290 295 300

Asp Glu Cys Ser Phe His Ile Phe Tyr Gln Leu Leu Gly Gly Ala Gly

305 310 315 320

Glu Gln Leu Lys Ala Asp Leu Leu Leu Glu Pro Cys Ser His Tyr Arg
325 330 335

Phe Leu Thr Asn Gly Pro Ser Ser Ser Pro Gly Gln Glu Arg Glu Leu
340 345 350

Phe Gln Glu Thr Leu Glu Ser Leu Arg Val Leu Gly Phe Ser His Glu
355 360 365

Glu Ile Ile Ser Met Leu Arg Met Val Ser Ala Val Leu Gln Phe Gly
370 375 380

Asn Ile Ala Leu Lys Arg Glu Arg Asn Thr Asp Gln Ala Thr Met Pro
385 390 395 400

Asp Asn Thr Ala Ala Gln Lys Leu Cys Arg Leu Leu Gly Leu Gly Val
405 410 415

Thr Asp Phe Ser Arg Ala Leu Leu Thr Pro Arg Ile Lys Val Gly Arg
420 425 430

Asp Tyr Val Gln Lys Ala Gln Thr Lys Glu Gln Ala Asp Phe Ala Leu
435 440 445

Glu Ala Leu Ala Lys Ala Thr Tyr Glu Arg Leu Phe Arg Trp Leu Val

450 455 460

Leu Arg Leu Asn Arg Ala Leu Asp Arg Ser Pro Arg Gln Gly Ala Ser
465 470 475 480

Phe Leu Gly Ile Leu Asp Ile Ala Gly Phe Glu Ile Phe Gln Leu Asn
485 490 495

Ser Phe Glu Gln Leu Cys Ile Asn Tyr Thr Asn Glu Lys Leu Gln Gln
500 505 510

Leu Phe Asn His Thr Met Phe Val Leu Glu Gln Glu Glu Tyr Gln Arg
515 520 525

Glu Gly Ile Pro Trp Thr Phe Leu Asp Phe Gly Leu Asp Leu Gln Pro

530 535 540
 Cys Ile Asp Leu Ile Glu Arg Pro Ala Asn Pro Pro Gly Leu Leu Ala
 545 550 555 560
 Leu Leu Asp Glu Glu Cys Trp Phe Pro Lys Ala Thr Asp Lys Ser Phe
 565 570 575
 Val Glu Lys Val Ala Gln Glu Gln Gly Gly His Pro Lys Phe Gln Arg
 580 585 590
 Pro Arg His Leu Arg Asp Gln Ala Asp Phe Ser Val Leu His Tyr Ala

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

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

 740 745 750
 Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Ala Ile Pro Lys Gly Phe Met Asp Gly
 755 760 765
 Lys Gln Ala Cys Glu Lys Met Ile Gln Ala Leu Glu Leu Asp Pro Asn
 770 775 780
 Leu Tyr Arg Val Gly Gln Ser Lys Ile Phe Phe Arg Ala Gly Val Leu

785	790							795							800		
Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Thr	Asp	Ile	Ile	Val		
805								810				815					
Ser	Phe	Gln	Ala	Ala	Ala	Arg	Gly	Tyr	Leu	Ala	Arg	Arg	Ala	Phe	Gln		
820								825				830					
Lys	Arg	Gln	Gln	Gln	Gln	Ser	Ala	Leu	Arg	Val	Met	Gln	Arg	Asn	Cys		
835								840				845					
Ala	Ala	Tyr	Leu	Lys	Leu	Arg	His	Trp	Gln	Trp	Trp	Arg	Leu	Phe	Thr		
850								855				860					
Lys	Val	Lys	Pro	Leu	Leu	Gln	Val	Thr	Arg	Gln	Asp	Glu	Val	Leu	Gln		
865				870				875				880					
Ala	Arg	Ala	Gln	Glu	Leu	Gln	Lys	Val	Gln	Glu	Leu	Gln	Gln	Gln	Ser		
885								890				895					
Ala	Arg	Glu	Val	Gly	Glu	Leu	Gln	Gly	Arg	Val	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu		
900								905				910					
Glu	Arg	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Ala	Glu	Ala	Glu	Leu	Cys		
915								920				925					
Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	Thr	Arg	Gly	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Lys	Gln	Glu		
930								935				940					
Leu	Glu	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Leu	Glu	Ala	Arg	Val	Gly	Glu	Glu	Glu		
945				950				955				960					
Glu	Cys	Ser	Arg	Gln	Met	Gln	Thr	Glu	Lys	Lys	Arg	Leu	Gln	Gln	His		
965								970				975					
Ile	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln		
980								985				990					
Lys	Leu	Gln	Leu	Glu	Lys	Val	Thr	Thr	Glu	Ala	Lys	Met	Lys	Lys	Phe		
995								1000				1005					
Glu	Glu	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gln	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser	Lys		
1010								1015				1020					
Glu	Arg	Lys	Leu	Leu	Glu	Asp	Arg	Leu	Ala	Glu	Phe	Ser	Ser	Gln	Ala		
1025				1030				1035				1040					

Ala Glu Glu Glu Glu Lys Val Lys Ser Leu Asn Lys Leu Arg Leu Lys
1045 1050 1055

Tyr Glu Ala Thr Ile Ala Asp Met Glu Asp Arg Leu Arg Lys Glu Glu
1060 1065 1070

Lys Gly Arg Gln Glu Leu Glu Lys Leu Lys Arg Arg Leu Asp Gly Glu
1075 1080 1085

Ser Ser Glu Leu Gln Glu Gln Met Val Glu Gln Gln Gln Arg Ala Glu
1090 1095 1100

Glu Leu Arg Ala Gln Leu Gly Arg Lys Glu Glu Glu Leu Gln Ala Ala
1105 1110 1115 1120

Leu Ala Arg Ala Glu Asp Glu Gly Gly Ala Arg Ala Gln Leu Leu Lys
1125 1130 1135

Ser Leu Arg Glu Ala Gln Ala Ala Leu Ala Glu Ala Gln Glu Asp Leu
1140 1145 1150

Glu Ser Glu Arg Val Ala Arg Thr Lys Ala Glu Lys Gln Arg Arg Asp
1155 1160 1165

Leu Gly Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Gly Glu Leu Glu Asp Thr Leu
1170 1175 1180

Asp Ser Thr Asn Ala Gln Gln Glu Leu Arg Ser Lys Arg Glu Gln Glu
1185 1190 1195 1200

Val Thr Glu Leu Lys Lys Thr Leu Glu Glu Glu Thr Arg Ile His Glu
1205 1210 1215

Ala Ala Val Gln Glu Leu Arg Gln Arg His Gly Gln Ala Leu Gly Glu
1220 1225 1230

Leu Ala Glu Gln Leu Glu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Gly Ala Trp Glu
1235 1240 1245

Lys Thr Arg Leu Ala Leu Glu Ala Glu Val Ser Glu Leu Arg Ala Glu
1250 1255 1260

Leu Ser Ser Leu Gln Thr Ala Arg Gln Glu Gly Glu Gln Arg Arg Arg
1265 1270 1275 1280

Arg Leu Glu Leu Gln Leu Gln Glu Val Gln Gly Arg Ala Gly Asp Gly
1285 1290 1295

Glu Arg Ala Arg Ala Glu Ala Ala Glu Lys Leu Gln Arg Ala Gln Ala
1300 1305 1310

Glu Leu Glu Asn Val Ser Gly Ala Leu Asn Glu Ala Glu Ser Lys Thr
1315 1320 1325

Ile Arg Leu Ser Lys Glu Leu Ser Ser Thr Glu Ala Gln Leu His Asp
1330 1335 1340

Ala Gln Glu Leu Leu Gln Glu Glu Thr Arg Ala Lys Leu Ala Leu Gly
1345 1350 1355 1360

Ser Arg Val Arg Ala Met Glu Ala Glu Ala Ala Gly Leu Arg Glu Gln
1365 1370 1375

Leu Glu Glu Glu Ala Ala Ala Arg Glu Arg Ala Gly Arg Glu Leu Gln
1380 1385 1390

Thr Ala Gln Ala Gln Leu Ser Glu Trp Arg Arg Arg Gln Glu Glu Glu
1395 1400 1405

Ala Gly Ala Leu Glu Ala Gly Glu Glu Ala Arg Arg Arg Ala Ala Arg
1410 1415 1420

Glu Ala Glu Ala Leu Thr Gln Arg Leu Ala Glu Lys Thr Glu Thr Val
1425 1430 1435 1440

Asp Arg Leu Glu Arg Gly Arg Arg Arg Leu Gln Gln Glu Leu Asp Asp
1445 1450 1455

Ala Thr Met Asp Leu Glu Gln Gln Arg Gln Leu Val Ser Thr Leu Glu
1460 1465 1470

Lys Lys Gln Arg Lys Phe Asp Gln Leu Leu Ala Glu Glu Lys Ala Ala
1475 1480 1485

Val Leu Arg Ala Val Glu Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Glu Gly Arg
1490 1495 1500

Glu Arg Glu Ala Arg Ala Leu Ser Leu Thr Arg Ala Leu Glu Glu Glu
1505 1510 1515 1520

Gln Glu Ala Arg Glu Glu Leu Glu Arg Gln Asn Arg Ala Leu Arg Ala
1525 1530 1535

Glu Leu Glu Ala Leu Leu Ser Ser Lys Asp Asp Val Gly Lys Ser Val

1540	1545	1550	
His Glu Leu Glu Arg Ala Cys Arg Val Ala Glu Gln Ala Ala Asn Asp			
1555	1560	1565	
Leu Arg Ala Gln Val Thr Glu Leu Glu Asp Glu Leu Thr Ala Ala Glu			
1570	1575	1580	
Asp Ala Lys Leu Arg Leu Glu Val Thr Val Gln Ala Leu Lys Thr Gln			
1585	1590	1595	1600
His Glu Arg Asp Leu Gln Gly Arg Asp Glu Ala Gly Glu Glu Arg Arg			
1605	1610	1615	
Arg Gln Leu Ala Lys Gln Leu Arg Asp Ala Glu Val Glu Arg Asp Glu			
1620	1625	1630	
Glu Arg Lys Gln Arg Thr Leu Ala Val Ala Ala Arg Lys Lys Leu Glu			
1635	1640	1645	
Gly Glu Leu Glu Glu Leu Lys Ala Gln Met Ala Ser Ala Gly Gln Gly			
1650	1655	1660	
Lys Glu Glu Ala Val Lys Gln Leu Arg Lys Met Gln Ala Gln Met Lys			
1665	1670	1675	1680
Glu Leu Trp Arg Glu Val Glu Glu Thr Arg Thr Ser Arg Glu Glu Ile			
1685	1690	1695	
Phe Ser Gln Asn Arg Glu Ser Glu Lys Arg Leu Lys Gly Leu Glu Ala			
1700	1705	1710	
Glu Val Leu Arg Leu Gln Glu Glu Leu Ala Ala Ser Asp Arg Ala Arg			
1715	1720	1725	
Arg Gln Ala Gln Gln Asp Arg Asp Glu Met Ala Asp Glu Val Ala Asn			
1730	1735	1740	
Gly Asn Leu Ser Lys Ala Ala Ile Leu Glu Glu Lys Arg Gln Leu Glu			
1745	1750	1755	1760
Gly Arg Leu Gly Gln Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Gln Ser Asn			
1765	1770	1775	
Ser Glu Leu Leu Asn Asp Arg Tyr Arg Lys Leu Leu Leu Gln Val Glu			
1780	1785	1790	
Ser Leu Thr Thr Glu Leu Ser Ala Glu Arg Ser Phe Ser Ala Lys Ala			

1795 1800 1805
 Glu Ser Gly Arg Gln Gln Leu Glu Arg Gln Ile Gln Glu Leu Arg Gly
 1810 1815 1820

 Arg Leu Gly Glu Glu Asp Ala Gly Ala Arg Ala Arg His Lys Met Thr
 1825 1830 1835 1840
 Ile Ala Ala Leu Glu Ser Lys Leu Ala Gln Ala Glu Glu Gln Leu Glu
 1845 1850 1855
 Gln Glu Thr Arg Glu Arg Ile Leu Ser Gly Lys Leu Val Arg Arg Ala
 1860 1865 1870
 Glu Lys Arg Leu Lys Glu Val Val Leu Gln Val Glu Glu Glu Arg Arg
 1875 1880 1885
 Val Ala Asp Gln Leu Arg Asp Gln Leu Glu Lys Gly Asn Leu Arg Val

 1890 1895 1900
 Lys Gln Leu Lys Arg Gln Leu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Ser Arg
 1905 1910 1915 1920
 Ala Gln Ala Gly Arg Arg Arg Leu Gln Arg Glu Leu Glu Asp Val Thr
 1925 1930 1935
 Glu Ser Ala Glu Ser Met Asn Arg Glu Val Thr Thr Leu Arg Asn Arg
 1940 1945 1950
 Leu Arg Arg Gly Pro Leu Thr Phe Thr Thr Arg Thr Val Arg Gln Val
 1955 1960 1965

 Phe Arg Leu Glu Glu Gly Val Ala Ser Asp Glu Glu Ala Glu Glu Ala
 1970 1975 1980
 Gln Pro Gly Ser Gly Pro Ser Pro Glu Pro Glu Gly Ser Pro Pro Ala
 1985 1990 1995 2000
 His Pro Gln

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P AF primer

<400> 3
agagtagact gtagggagag caagg 25

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<220><223> P AR primer
<400> 4
agagggtgtt aattgcagaa agtc 24

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P BF primer
<400> 5
cttccaacct tgggaagtct tt 22

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P BR primer
<400> 6
atgaatgggg gcctttgtaa g 21

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P CF primer
<400> 7
gtacatgggtc tacgttcgac aaaag 25

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223>	P CR primer	
<400>	8	
agagagcagc	agaggccaat	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N1F primer	
<400>	9	
attggcctct	gctgctctct	20
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N1R primer	
<400>	10	
aaggtgagt	tccgcgtca	19
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	2F primer	
<400>	11	
gaatgaaatg	agtaagctgg gtct	24
<210>	12	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	2R primer	
<400>	12	
ggatacagat	gataaacagc ctcaa	25
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3F primer	
<400>	13	
	gttatggtgt agacatacca tgtgc	25
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3R primer	
<400>	14	
	aagtctacaa gctgtcattt gacct	25
<210>	15	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	4-5F primer	
<400>	15	
	gttacacatc aagaccaag ctttt	25
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	4-5R primer	
<400>	16	
	acctccatga ggggaagaga	20
<210>	17	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	6F primer	
<400>	17	
	atcactgggtt cacctgtgtg tct	23
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> 6R primer

<400> 18

cctgtctacc aagaagatca tgc

23

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7F primer

<400> 19

atactcagtc agctggagac acag

24

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7R primer

<400> 20

ccctctctcc ctcaacag

18

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8F primer

<400> 21

gggtttgggc tgtgttcac

20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 8R primer

<400> 22

agtgggaggt gctttcata c

21

<210> 23

<211> 23

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	9F primer	
<400>	23	
	actccactac accacaggag aga	23
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	9R primer	
<400>	24	
	tcttgcttcc tccccagaag	20
<210>	25	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	10F primer	
<400>	25	
	gatgaatcca ggatgagtct ga	22
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	10R primer	
<400>	26	
	aaagagatcg gggcatgaat	20
<210>	27	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	11F primer	
<400>	27	
	aggggtggtg atataatttg cctta	25
<210>	28	

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	11R primer	
<400>	28	
	atgctctcta cgtgggacag g	21
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	12F primer	
<400>	29	
	aaacggtagc ctctcccttg	20
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	12R primer	
<400>	30	
	ggtgggaaaa acagcatata ct	22
<210>	31	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	13F primer	
<400>	31	
	gcattgttct tgatgttact tacac	25
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	13R primer	
<400>	32	
	aggaccggag tgaggaagtt	20
<210>	33	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N14F primer
 <400> 33
 ctctccctt ctcctgggc 20

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N14R primer
 <400> 34
 gtgagagctc tgattaaccg attg 24

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 15F primer
 <400> 35
 tagagtcggg ggtttcactg t 21

<210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 15R primer
 <400> 36
 ccatctgtag ccagtggaga t 21

<210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 16F primer
 <400> 37
 gaaggctcct taggaaatcc ag 22

<210>	38	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	16R primer	
<400>	38	
	cagaaaactc aggttcagac ctc	23
<210>	39	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	17F primer	
<400>	39	
	gatatctacc ttacaggctg tgtga	25
<210>	40	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	17R primer	
<400>	40	
	ctgagcctag gaatagaagc aattt	25
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	18F primer	
<400>	41	
	gaaacaggaa attgccaagc	20
<210>	42	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	18R primer	
<400>	42	
	agagtgggtg gagacctgaa t	21

<210> 43
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 19F primer
 <400> 43
 cttgttattg tcactgttgt tcctg 25
 <210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 19R primer
 <400> 44
 aggtaatgag gaaggtcaat gaag 24
 <210> 45
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> N20F3 primer
 <400> 45
 cccattactc cccctectca cc 22

 <210> 46
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 20R primer
 <400> 46
 acacctagag ccatctggtc aac 23
 <210> 47
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 21F primer
 <400> 47

agcttggtc tcttgctaag g	21
<210> 48	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 21R primer	
<400> 48	
aaggccctat cctctccta ct	22
<210> 49	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 22F primer	
<400> 49	
cagctaataag gtggaggaga agg	23
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 22R primer	
<400> 50	
gcctcagtag accttagctt tgc	23
<210> 51	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 23F primer	
<400> 51	
gaacttaaag gccaaagcaa gttac	25
<210> 52	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 23R primer	

<400>	52	
acacacggtt tgtagaagca aag		23
<210>	53	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	24F primer	
<400>	53	
ttcccatca cactccatct		20
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	24R primer	
<400>	54	
gagaaccgca gtgtggtaac		20
<210>	55	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	25F primer	
<400>	55	
agatgagaac aacaccagaa gc		22
<210>	56	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	25R primer	
<400>	56	
actgaggccc ttagcacat		20
<210>	57	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	26F primer	

<400>	57	
tgagcttagc cttatatgtg actgg		25
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	26R primer	
<400>	58	
ctgtctgtgg ctggtgagtg		20
<210>	59	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27F primer	
<400>	59	
agagagagga ttctaactg ggact		25
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	27R primer	
<400>	60	
acctagagcc ggtggttcat		20
<210>	61	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	28F primer	
<400>	61	
gaggccctca tattttaagg aaac		24
<210>	62	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	28R primer	
<400>	62	
ggagatgagc tagcctagaa ccag		24
<210>	63	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N29F primer	
<400>	63	
gagtgagggg tgagctattt gtt		23
<210>	64	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	N29R primer	
<400>	64	
ctgtgcccag acttgtacat gatta		25
<210>	65	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	30-31F primer	
<400>	65	
gtgtggtaga gagttgaggc aga		23
<210>	66	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	30-31R primer	
<400>	66	
gtaaggggga gtcagagatg aga		23
<210>	67	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> 32F primer

<400> 67

cagcttacac ctggtcact cat 23

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 32R primer

<400> 68

gattactggg tctcacaac gac 23

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 33F primer

<400> 69

cttgtgtctc tgcctttgtc tg 22

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 33R primer

<400> 70

catgtacgtg tctccctca c 21

<210> 71

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N34F primer

<400> 71

actaggatgg gcacactgac tt 22

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N34R primer

<400> 72

cctgtacaca ccatggcata c

21

<210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35F primer

<400> 73

gaccaagtaa agagagtcag ggagt

25

<210> 74

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 35R primer

<400> 74

agctagcctt agaccctgga gt

22

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 36F primer

<400> 75

gagagttccc tgcttggtca c

21

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 36R primer

<400> 76

acatggtaag acacaccac ct

22

<210> 77

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 37F primer
 <400> 77
 ttaccacagg acagcatgag 20
 <210> 78
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 37R primer
 <400> 78
 ccttgctca cactacagga c 21
 <210> 79
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 38F primer
 <400> 79
 acagggtcct gtagtgtgag g 21
 <210> 80
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 38R primer
 <400> 80
 ctattcaacc ttcaaaaccc aactc 25
 <210> 81
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 39F primer
 <400> 81
 cagtgcactt aattctcaga ggtg 24
 <210> 82

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 39R primer
 <400> 82
 ctaaaccacg tgtttgtaac acagc 25
 <210> 83
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 40F primer
 <400> 83
 atgagtctat ggggacaaaa tccta 25
 <210> 84
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 40R primer
 <400> 84
 ctgtgcaatt tctcagccag t 21

 <210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 41F primer
 <400> 85
 gatggggcag agagagtcag 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 41R primer
 <400> 86
 atcccatttc cccctgttgt 20
 <210> 87

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 42F primer
 <400> 87
 cccttatattt gttctctctc ttcc 24

<210> 88
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 42R primer
 <400> 88
 atttccaaag ggcaagaagt c 21

<210> 89
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3UTR AF primer
 <400> 89
 ccaggtcttc cgactagagg ag 22

<210> 90
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3UTR AR primer
 <400> 90
 tcctaaaaag atgcacagag agac 24

<210> 91
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3UTR BF primer
 <400> 91
 cattcctct gcttctctct c 21

<210> 92
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 3UTR BR primer
<400> 92
caggtgtcat tctaaccagc ag

22