

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
19. August 2004 (19.08.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/070057 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/001051

(22) Internationales Anmeldedatum:  
5. Februar 2004 (05.02.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
103 05 213.5 7. Februar 2003 (07.02.2003) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): LANG, Florian [DE/DE]; Im Rotbad 52, 72076 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSJAHN, Andreas [DE/DE]; Heine-Str. 18, 16341 Panketal (DE).

(74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, Theodor-Heuss-Anlage 12 68165 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF A NOVEL POLYMORPHISM IN THE HSGK1 GENE IN THE DIAGNOSIS OF HYPERTONIA AND USE OF THE SGK GENE FAMILY IN THE DIAGNOSIS AND THERAPY OF THE LONG QT SYNDROME

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES NEUEN POLYMORPHISMUS IM HSGK1-GEN ZUR DIAGNOSE DER HYPERTONIE UND VERWENDUNG DER SGK-GENFAMILIE ZUR DIAGNOSE UND THERAPIE DES LONG-Q/T-SYNDROMS

(57) Abstract: The invention relates to the use of single- or double-stranded nucleic acids that contain a fragment of the hsgk in the diagnosis of hypertension. The said fragment has a minimum length of 10 nucleotides/base pairs and the said fragment further comprises a polymorphism which is the result of the presence or absence of an insert of the nucleotide G in position 732/733 in intron 2 of the hsgk1 gene. The invention also relates to the use of the direct correlation between overexpression or the functional molecular modification of human homologues of the sgk family and the length of the Q/T time in the diagnosis of the Long QT syndrome, and to the use of the nucleic acid of a human homologue of the sgk gene family or of one of its fragments in the diagnosis of the Long QT syndrome. Polymorphisms of single nucleotides (single nucleotide polymorphisms = SNP) in the human homologues of the sgk gene family are especially useful in the diagnosis of a congenital predisposition for the Long QT syndrome. In another aspect, the invention relates to the use of a functional activator or a transcriptional factor which boosts expression of the genes of the sgk family for producing a drug for use in the therapy and/or the prophylaxis of the Long QT syndrome.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung einer einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure enthaltend ein Fragment der hsgk zur Diagnose von Hypertonie, wobei das besagte Fragment mindestens 10 Nukleotide/Basenpaare lang ist und wobei das besagte Fragment weiterhin einen Polymorphismus umfasst, welcher sich aus der Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk 1 Gens ergibt. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Länge der Q/T-Zeit zur Diagnose des Long-Q/T-Syndroms, sowie die Verwendung der Nukleinsäure eines humanen Homologen der sgk-Genfamilie oder eines ihrer Fragmente zur Diagnose des Long-Q/T-Syndroms. Insbesondere lassen sich auch hier Polymorphismen einzelner Nukleotide (single nucleotide polymorphisms = SNP) in den humanen Homologen der sgk-Genfamilie zur Diagnose einer genetisch bedingten Prädisposition zum Long-Q/T-Syndrom einsetzen. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines funktionalen Aktivators oder eines Transkriptionsfaktors, der die Expression der Gene der sgk-Familie steigert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-Q/T-Syndroms.

**WO 2004/070057 A2**

---

**Verwendung eines neuen Polymorphismus im hsgk1-Gen zur Diagnose der  
Hypertonie und Verwendung der sgk-Genfamilie zur Diagnose und Therapie des  
5 Long-Q/T-Syndroms**

---

10 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure enthaltend ein Fragment der hsgk zur Diagnose von Hypertonie, wobei das besagte Fragment mindestens 10 Nukleotide/Basenpaare lang ist und wobei das besagte Fragment weiterhin einen Polymorphismus umfasst, welcher sich aus der Anwesenheit bzw. Abwesenheit einer Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 in Intron 2 des 15 hsgk1-Gens ergibt.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Länge der Q/T-Zeit zur Diagnose des Long- 20 Q/T-Syndroms, sowie die Verwendung der Nukleinsäure eines humanen Homologen der sgk-Genfamilie oder eines ihrer Fragmente zur Diagnose des Long-Q/T-Syndroms. Insbesondere lassen sich auch hier Polymorphismen einzelner Nukleotide (single nucleotide polymorphisms = SNP) in den humanen Homologen der sgk-Genfamilie zur Diagnose einer genetisch bedingten Prädisposition zum Long-Q/T-Syndrom einsetzen.

25 In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines funktionalen Aktivators oder eines Transkriptionsfaktors, der die Expression der Gene der sgk-Familie steigert, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-Q/T-Syndroms.

30 Zahlreiche extrazelluläre Signale führen zu intrazellulären Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungskaskaden, um eine schnelle Übertragung dieser Signale von der Plasmamembran und ihren Rezeptoren in das Zytosol und den Zellkern zu gewährleisten. Die Spezifität dieser reversiblen Signaltransduktionskaskaden wird durch 35 eine Vielzahl von einzelnen Proteinen, insbesondere von Kinasen, die eine Phosphatgruppe auf individuelle Substrate übertragen, ermöglicht.

Die Serum- und Glucocorticoid-abhängige Kinase (sgk), eine Serin/Threonin-Kinase, deren Expression durch Serum und Glucocorticoide gesteigert wird, wurde zunächst aus Rattenmammakarzinomzellen kloniert (Webster et al., 1993). Die humane Version der sgk, die hsgk1, wurde aus Leberzellen kloniert (Waldegg et al., 1997). Es zeigte sich, daß die Expression der hsgk1 durch die Regulation des Zellvolumens beeinflusst wird. Für die Expression der Ratten-sgk konnte eine solche Abhängigkeit vom Zellvolumen bisher nicht nachgewiesen werden. Weiterhin ergab sich, daß die Ratten-Kinase den epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal (ENaC) stimuliert (Chen et al., 1999; Naray-Pejes-Toth et al., 1999). Der ENaC spielt wiederum eine entscheidende Rolle bei der renalen  $\text{Na}^+$ -Ausscheidung. Eine gesteigerte Aktivität des ENaC führt zu einer verstärkten renalen Retention von Natrium-Ionen, und auf diese Weise zur Entwicklung von Hypertonie, wie WO02/074987 A2 zeigt.

Schließlich wurden zwei weitere Mitglieder der humanen sgk-Genfamilie kloniert, die hsgk2 und hsgk3 (Kobayashi et al., 1999), die beide - wie auch die hsgk1 - durch Insulin und IGF1 über den PI3 Kinase-Weg aktiviert werden. Elektrophysiologische Experimente zeigten, daß eine Coexpression der hsgk2 und hsgk3 ebenfalls eine signifikante Zunahme der Aktivität des ENaC zur Folge hat.

Aus der DE 197 08 173 A1 geht hervor, daß die hsgk1 bei vielen Krankheiten, bei denen Zellvolumenänderungen eine entscheidende pathophysiologische Rolle spielen, wie beispielsweise Hypernatriämie, Hyponatriämie, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, Hyperkatabolismus, hepatische Encephalopathie und mikrobielle oder virale Infektionen, ein beträchtliches diagnostisches Potential besitzt.

In der WO 00/62781 wurde beschrieben, daß die hsgk1 den endothelialen  $\text{Na}^+$ -Kanal aktiviert, wodurch die renale  $\text{Na}^+$ -Resorption erhöht wird. Da diese gesteigerte renale  $\text{Na}^+$ -Resorption mit Hypertonie einhergeht, wurde hier vermutet, daß eine gesteigerte Expression der hsgk1 zur Hypertonie, eine verminderte Expression der hsgk1 letztlich zur Hypotonie führen sollte.

Auch in DE 100 421 37 wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Überexpression bzw. Überaktivität der humanen Homologen hsgk2 und hsgk3 mit der Überaktivierung des ENaCs, der daraus resultierenden verstärkten renalen  $\text{Na}^+$ -Resorption und der sich daraus entwickelnden Hypertonie beschrieben. Weiterhin wurde bereits das diagnostische Potential der Kinasen hsgk2 und hsgk3 bezüglich der arteriellen Hypertonie diskutiert.

In WO02/074987 A2 wird der Zusammenhang zwischen dem Auftreten zweier verschiedener Polymorphismen (single nucleotide polymorphism (SNP)) einzelner Nukleotide im hsgk1-Gen mit einer genetisch bedingten Prädisposition zur Hypertonie offenbart. Hierbei handelt es sich um einen Polymorphismus in Intron 6 (T→C) und um einen Polymorphismus in Exon 8 (C→T) im hsgk1-Gen. Aus Tabelle 5 aus WO02/074987 A2 geht insbesondere hervor, daß ein starkes Korrelationsungleichgewicht zwischen den beiden analysierten SNPs besteht: Die meisten CC-Träger des SNPs in Exon 8 sind auch Intron 6 TT-Träger (nämlich 64%), während nur wenige Exon 8 TT-Träger auch gleichzeitig Intron 6 CC-Träger sind (lediglich 2%). Diese beobachteten Korrelationen zwischen dem Auftreten der Polymorphismen in Intron 6 und Exon 8 begründen die Notwendigkeit, den Genotyp für beide Polymorphismen (Intron 6 und Exon 8) zu analysieren, um eine Prädisposition zur Hypertonie nachzuweisen, was zu einem hohen technischen und zeitlichen Aufwand führt.

15

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen weiteren Polymorphismus im hsgk1-Gen bereitzustellen, dessen Auftreten in der einen oder anderen Version eventuell noch besser mit dem phänotypischen Auftreten der Hypertonie im Patienten korreliert als die beiden bekannten Polymorphismen in Exon 8 und Intron 6. Insbesondere wäre das Bereitstellen eines einzigen SNPs, der mit der Prädisposition zur Hypertonie korreliert und dessen Gegenwart in der einen oder anderen Version sogar Folgen für eine funktionale molekulare Modifikation des hsgk1-Proteins hat, von großem Vorteil.

20

Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Bereitstellung eines neuen Polymorphismus im hsgk1-Gen, der aus der Insertion des Nukleotids G an der Position 732/733 besteht. Es hat sich gezeigt, daß Individuen, die eine solche Insertion des Nukleotids G an der Position 732/733 besitzen (InsG/InsG), häufiger vorkommen und eine geringere Prädisposition zur Ausbildung der Hypertonie besitzen. Individuen, die hingegen eine solche Insertion an der Position 732/733 nicht besitzen (WT/WT), kommen seltener vor und haben eine deutlich erhöhte Prädisposition zur Ausbildung der Hypertonie. Nach den bisherigen Ergebnissen scheint diese Korrelation zwischem dem Genotyp bezüglich des Polymorphismus an Position 732/733 in Intron 2 und der Prädisposition zur Ausbildung der Hypertonie eine deutlich höhere Signifikanz zu besitzen als die entsprechenden Korrelationen bezüglich der Polymorphismen in Exon 8 und Intron 6 (siehe Tabelle 1).

30

35

Weiterhin ist aufgrund der Voraussage von bekannten Prädiktionsprogrammen anzunehmen, daß von der An- bzw. Abwesenheit der G-Insertion an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens die Expression einer spezifischen Spleiß-Variante des hsgk1-Gens abhängt. Die Expression einer solchen spezifischen Spleiß-Variante des hsgk1-Gens 5 könnte eine funktionale molekulare Modifikation des hsgk1-Proteins zur Folge haben, die zu einer modifizierten Aktivität der hsgk1, insbesondere zu einer gesteigerten Aktivität der hsgk1 führt. Die physiologischen Folgen dieser molekularen Modifikation des hsgk1-Proteins, insbesondere eine gesteigerte Aktivität der hsgk1, könnten dann letztlich die Ausbildung der Symptome der Hypertonie zur Folge haben.

10

In einem ersten Aspekt, betrifft die Erfindung die Verwendung einer isolierten einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure, welche ein Fragment der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID No. 1 oder nach SEQ ID No. 2 umfasst, zur Diagnose von Hypertonie, wobei das besagte Fragment mindestens 10 Nukleotide/Basenpaare, vorzugsweise mindestens 15 15 Nukleotide/Basenpaare, insbesondere mindestens 20 Nukleotide/Basenpaare lang ist und wobei das besagte Fragment den Polymorphismus in Intron 2 des hsgk1-Gens entweder mit oder ohne die Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 umfaßt.

SEQ ID No. 1 beschreibt die genomische DNA-Sequenz der hsgk1 ohne die Insertion des 20 Nukleotids G (bzw. GTP) an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens, die sogenannte „Wildtyp (WT)“-Sequenz und SEQ ID No. 2 beschreibt die genomische DNA-Sequenz der hsgk1 mit der Insertion des Nukleotids G (bzw. GTP) an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens, die sogenannte „Insertion G (InsG)“-Sequenz.

25 In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Kit zur Diagnose der Hypertonie, enthaltend mindestens eine isolierte einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure, die ein Fragment der Sequenz nach SEQ ID No. 1 oder 2 umfasst. Das besagte Fragment aus SEQ ID No. 1 oder 2 ist hierbei mindestens 10 Nukleotide/Basenpaare, vorzugsweise mindestens 15 Nukleotide/Basenpaare, insbesondere 30 mindestens 20 Nukleotide/Basenpaare lang. Weiterhin soll das besagte Fragment aus SEQ ID No. 1 oder 2 den Polymorphismus in Intron 2 des hsgk1-Gens entweder mit oder ohne die Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 umfassen.

Alternativ kann der Kit zur Diagnose der Hypertonie –zusätzlich oder anstelle der oben 35 genannten einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure- auch mindestens einen Antikörper enthalten, der gegen eine solche Region des hsgk-Proteins gerichtet ist, deren Präsenz im

hsgk1-Protein von der Gegenwart der Insertion des Nukleotids G an der Position 732/733 in Intron 2 des entsprechenden kodierenden hsgk-Gens abhängig ist. Würde beispielsweise durch die Anwesenheit der G-Insertion an der Position 732/733 im hsgk1-Gen das Herausspleißen eines Exons induziert werden, so könnte ein Antikörper, der gegen genau 5 diese herausgespleißte Proteinregion gerichtet ist, zur Detektion der Polymorphismus-Version des Individuums verwendet werden. Mit einem solchen Antikörper könnte daher eine Prädisposition zur Ausbildung der Hypertonie diagnostiziert werden.

In einem dritten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der Hypertonie, 10 welches die folgenden Verfahrensschritte umfaßt:

- 15 a) Entnahme einer Körperprobe aus einem Individuum,
- b) gegebenenfalls Isolierung und/oder Amplifizierung von genomischer DNA, cDNA oder mRNA aus der Körperprobe nach a),
- c) Quantifizierung der Allele, die eine Insertion des Nukleotides G an der Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens besitzen.

In Schritt a) wird einem Test-Individuum, welches vorzugsweise ein Säugetier, insbesondere ein Mensch ist, eine Körperprobe entnommen. Bei diesem erfindungsgemäßen Diagnose-Verfahren werden als Körperproben des Patienten 20 vorzugsweise Blutproben oder auch Speichelproben verwendet, die zelluläres Material umfassen und relativ wenig aufwendig vom Patienten gewonnen werden können. Andere Körperproben, die ebenfalls Zellen umfassen, wie beispielsweise Gewebe- oder Zellproben u.ä., können jedoch auch verwendet werden.

25 In Schritt b) wird aus der Körperprobe aus a) gegebenenfalls entweder genomische DNA oder cDNA oder auch mRNA nach Standardmethoden (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) präpariert und/oder gegebenenfalls amplifiziert. Hierbei können alle geeigneten Methoden verwendet werden, die dem Fachmann geläufig sind. Auf diesen DNA-Isolationsschritt bzw. DNA-Amplifikationsschritt kann gegebenenfalls auch verzichtet werden, insbesondere wenn in 30 Schritt c) Nachweismethoden eingesetzt werden, die selbst einen PCR-Amplifikationsschritt beinhalten.

In Schritt c) wird schließlich die Anzahl der Allele quantifiziert, die eine Insertion des 35 Nukleotides G an der Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens besitzen. Hierbei dürften solche Individuen, die zwei WT-Allele haben, eine Prädisposition zur Ausbildung

- 6 -

der Hypertonie besitzen. Die Quantifizierung/Identifizierung der Allele bezüglich des Polymorphismus an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens kann durch die Anwendung verschiedener Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, erfolgen. Einige bevorzugte Verfahren werden nachfolgend näher erläutert. Die Quantifizierung der Anzahl der Allele, die eine Insertion des Nukleotides G an der Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens besitzen, ist jedoch nicht auf die nachfolgenden bevorzugten Verfahren beschränkt.

Vorzugsweise kann der Genotyp (bzw. die Anzahl der Allele) bezüglich des Polymorphismus an Position 732/733 durch direkte Sequenzierung der DNA, vorzugsweise der genomischen DNA, aus der Körperprobe an der besagten Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens identifiziert werden. Hierzu müssen nach bekannten Sequenzierungsmethoden kurze Oligonukleotide mit Sequenzen aus der näheren Umgebung der Position 732/733 des hsgk1-Gens als Sequenzierprimer zur Verfügung gestellt werden.

Ein weiteres, ebenfalls bevorzugtes Verfahren zur Identifizierung des Genotyps (bzw. zur Quantifizierung der Anzahl der Allele) bezüglich des Polymorphismus an Position 732/733 sind alle bekannten Verfahren, die auf der Hybridisierung der genomischen DNA aus der Körperprobe mit spezifischen Hybridisierungssonden beruhen.

Ein Beispiel für ein solches Hybridisierungsverfahren ist z.B. der Southern Blot. Sollte beispielsweise durch die Anwesenheit der G-Insertion an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease zerstört oder auch gebildet werden, könnten mit Hilfe spezifischer Hybridisierungssonden Nukleinsäurefragmente mit solchen Längen detektiert werden, die von den entsprechenden Fragmentlängen im WT-Allel abweichen. Damit könnte ein spezifischer Genotyp bezüglich des fraglichen Polymorphismus an Position 732/733 detektiert werden.

Sollte durch die An- oder Abwesenheit der G-Insertion an Position 732/733 eine alternative Spleißvariante exprimiert werden, der ein bestimmtes Exon fehlt, könnte der Genotyp bezüglich des fraglichen Polymorphismus an Position 732/733 auch mit Hilfe einer spezifischen Hybridisierungssonde aus dem in der Spleiß-Variante fehlenden Exon detektiert werden.

Ein anderes Beispiel für ein Hybridisierungsverfahren ist die Hybridisierung der 5 genomischen DNA aus der Körperprobe mit einem markierten, einzelsträngigen Oligonukleotid von vorzugsweise 15- 25 Nukleotiden Länge, das entweder eine G-Insertion an Position 732/733 besitzt oder nicht besitzt. Unter sehr spezifischen

Hybridisierungsbedingungen, die für jedes individuelle Oligonukleotid nach bekannten Methoden experimentell ausgetestet werden können, kann dann ein vollständig hybridisierendes Oligonukleotid von einem Oligonukleotid mit einer einzigen Basen-Fehlpaarung unterschieden werden.

10 Weitere bevorzugte Verfahren zur Identifizierung des Genotyps (bzw. zur Quantifizierung der Anzahl der Allele) bezüglich des Polymorphismus an Position 732/733 stellen insbesondere der PCR-Oligonukleotid-Elongations-Assay oder der Ligations-Assay dar.

Bei dem PCR-Oligonukleotid-Elongations-Assay könnte beispielsweise ein Oligonukleotid 15 bereitgestellt werden, welches die Sequenz eines Fragments aus SEQ ID No. 2 und an seinem 3'-Ende das G an der Polymorphismus-Position 732/733 besitzt. Bei Hybridisierung dieses Oligonukleotids mit einem Proben-Fragment des WT-Allels (ohne G-Insertion) könnte dieses bei einer nachfolgenden PCR-Reaktion aufgrund der Fehlpaarung am 3'-Ende nicht verlängert und letztlich amplifiziert werden. Bei 20 Hybridisierung dieses Oligonukleotids mit einem InsG-Allel könnte es hingegen aufgrund der perfekten Basenpaarung am 3'-Ende des Oligonukleotids zur Elongation und letztlich zu einem PCR-Amplifikationsprodukt kommen.

Ein Ligations-Assay basiert letztlich auf demselben Prinzip wie der PCR-Oligonukleotid-Elongations-Assay: nur solche doppelsträngigen Nukleinsäurefragmente können mit einem 25 anderen doppelsträngigen Nukleinsäurefragment ligiert werden, die an ihrem Ende eine exakte Basenpaarung besitzen. Das Auftreten eines spezifischen Ligationsproduktes kann daher abhängig gemacht werden von der An- bzw. Abwesenheit der G-Insertion an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens.

30 Neben der Korrelation des erfindungsgemäßen Polymorphismus zur Prädisposition der Hypertonie zeigte sich überraschenderweise noch eine zweite Korrelation des erfindungsgemäßen Polymorphismus zu der Länge der sogenannten Q/T-Zeit. Bei Individuen, die einen WT/WT-Genotyp bezüglich der Position 732/733 in Intron 2 des 35 hsgk1-Gens besitzen, zeigen sich deutlich kürzere Q/T-Zeiten als für Individuen, die einen InsG/InsG-Genotyp besitzen. Heterozygote Individuen (WT/InsG) besitzen mittlere Q/T-

Zeiten (siehe Tabelle 3). Eine signifikant verlängerte Q/T-Zeit führt zur Ausbildung des sogenannten Long-Q/T-Syndroms, welches sich in Herz-Rhythmus-Störungen, über Kammerflimmern bis hin zum plötzlichen Herztod äußern kann. Individuen mit dem Genotyp InsG/InsG dürften daher eine Prädisposition zur Entwicklung des Long-Q/T-Syndroms besitzen.

Aufgrund der nachgewiesenen direkten Korrelation zwischen der Länge der Q/T-Zeit und der genetischen Ausstattung des hsgk1-Gens, insbesondere zwischen der Länge der Q/T-Zeit und dem Polymorphismus an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens, ist anzunehmen, daß sich Nukleinsäuren eines anderen humanen Homologen der sgk-Familie ebenfalls zur Diagnose des Long-QT-Syndroms eignen.

Die mit dem EKG-Messgerät detektierbaren Q-, R- und S-Wellen stellen Meßwerte zur Beurteilung der Erregungsausbreitung dar. Die sogenannte Q/T-Zeit ist als die Zeit definiert, die mit Hilfe eines EKG-Messgerätes vom Beginn der Ausbreitung der T-Welle (dem Auftreten des Q-Ausschlags) bis zum Ende der Erregungsausbreitung, die durch das Ende der T-Welle charakterisiert ist, zu detektieren ist. Damit stellt die Q/T-Zeit die Zeit dar, die zwischen dem Beginn eines neuen Erregungszustandes des Herzens und der Rückkehr in den Ruhezustand vergeht. Eine deutlich verlängerte Q/T-Zeit führt demnach zu Herz-Rhythmus-Störungen und letztlich zu dem bereits genannten Long-Q/T-Syndrom.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere des hsgk1-Gens, und der Länge der Q/T-Zeit zur Diagnose des Long-QT-Syndroms.

Unter einem humanen Homologen der sgk-Familie, welches im obigen Sinne eine funktionale molekulare Modifikation umfaßt, versteht man in diesem Zusammenhang ein Homologes der sgk-Familie, das auf eine solche Art und Weise mutiert ist, daß die Eigenschaften, insbesondere die katalytischen Eigenschaften oder auch die Substratsspezifität des entsprechenden Proteins verändert werden.

Die erfindungsgemäße direkte Korrelation zwischen der Q/T-Zeit und der genetischen Ausstattung der humanen Homologen der sgk-Familie impliziert, daß bei einzelnen Patienten individuelle Mutationen in den Genen hsgk1, hsgk2 oder hsgk3 auftreten könnten, die die Expressionshöhe oder die funktionellen Eigenschaften der Kinasen hsgk1,

hsgk2 oder hsgk3 modifizieren, und so zu einer genetisch verursachten Verlängerung der Q/T-Zeit und letztlich zu einer Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndrom führen. Solche Mutationen könnten beispielsweise in den regulatorischen Genregionen oder auch in Intron-Sequenzen des sgk-Genlocus auftreten. Andererseits könnten 5 individuelle Unterschiede in der genetischen Ausstattung des sgk-Locus auch den kodierenden Genbereich betreffen. Mutationen im kodierenden Bereich könnten dann gegebenenfalls zu einer funktionalen Veränderung der entsprechenden Kinase, so z.B. zu modifizierten katalytischen Eigenschaften der Kinase, die letztlich auch die Q/T-Zeit beeinflussen, führen. Demnach könnten beide oben beschriebenen Mutationsarten eine 10 Verlängerung der Q/T-Zeit und damit letztlich die Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms bewirken.

Die oben beschriebenen Mutationen in den humanen Homologen der sgk-Familie, die die 15 Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms beim Patienten bewirken, sind in der Regel sogenannte "single nucleotide polymorphisms" (SNP) entweder im Exon- oder im Intron-Bereich dieser Homologen. SNPs im Exon-Bereich der hsgk-Gene können in ihrer weniger häufig auftretenden Version - im folgenden die mutierte Version genannt - gegebenenfalls zu Aminosäureaustauschen im entsprechenden hsgk-Protein und somit zur 20 einer funktionalen Modifikation der Kinase führen. SNPs im Intron-Bereich oder in regulatorischen Sequenzen der hsgk-Gene können in ihrer mutierten Version gegebenenfalls zu einer veränderten Expressionshöhe der entsprechenden Kinase führen. SNPs im Intron-Bereich könnten jedoch auch dann zu einer funktionalen Modifikation der Kinase führen, sofern sie das alternative Spleißen der unreifen mRNA beeinflussen.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure, welche die Sequenz eines humanen Homologen der sgk-Familie oder eines seiner Fragmente, insbesondere das hsgk1-Gen selbst oder eines seiner Fragmente umfaßt, zur Diagnose einer Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms. Die einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure besitzt hierbei vorzugsweise 30 eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden/Basenpaaren.

Neben den oben genannten einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren eignen sich auch 35 bestimmte Antikörper, die gegen Substrate der humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere gegen Substrate der hsgk1, gerichtet sind, zur Diagnose einer Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms und der Hypertonie. Diese diagnostischen

Antikörper sind vorzugsweise gegen ein solches Epitop der humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere der hsgk1, gerichtet, welches die Phosphorylierungsstelle des Substrates entweder in phosphorylierter Form oder in nicht phosphorylierter Form enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird als Substrat des humanen Homologen der sgk-Familie die Ubiquitin-Protein-Ligase Nedd4-2 (Acc No. BAA23711) eingesetzt. Diese Ubiquitin-Protein-Ligase stellt ein Protein dar, welches von den humanen Homologen der sgk-Familie spezifisch phosphoryliert wird [Debonneville et al., Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. EMBO J., 2001; 20: 7052-7059; Snyder et al., Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na(+) channel. J. Biol. Chem., 2002, 277: 5-8]. Phosphorylierungsstellen für die hsgk1 besitzen die Konsensus-Sequenz (R X R X X S/T), wobei R für Arginin, S für Serin, T für Threonin und X für eine beliebige Aminosäure steht. In Nedd4-2 (Acc No. BAA23711) gibt es zwei potentielle Phosphorylierungsstellen für die hsgk1, auf die die oben genannte Konsensus-Sequenz paßt: das Serin an Aminosäure-Position 382 und das Serin an Aminosäure-Position 468.

Die oben genannten Antikörper zur Diagnose einer Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms sind daher vorzugsweise gegen das Substrat Nedd4-2 gerichtet und besonders bevorzugt gegen eine Proteinregion von Nedd4-2 mit der Sequenz der potentiellen Phosphorylierungsstelle für die hsgk1, der Konsensus-Sequenz (R X R X X S/T), gerichtet. Insbesondere sind diese Antikörper gegen solche Nedd4-2-Protein-Regionen gerichtet, die mindestens eine der beiden potentiellen Phosphorylierungsstellen Serin an Aminosäure-Position 382 und/oder Serin an Aminosäure-Position 468 umfassen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur Diagnose des Long-QT-Syndroms oder anderer Erkrankungen, die sich in einer Verlängerung der Q/T-Zeit äußern. Dieser Kit zur Diagnose des Long-QT-Syndroms enthält vorzugsweise Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, oder insbesondere Nukleinsäuren, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren können. Der Kit kann auch Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, und Nukleinsäuren, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren, gemeinsam enthalten. Besonders bevorzugt kann der erfindungsgemäße Kit zur Diagnose des Long-Q/T-Syndroms auch Antikörper, die gegen das hsgk1-Protein gerichtet sind, oder Nukleinsäuren, die mit dem hsgk1-Gen unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, enthalten.

Unter einer Hybridisierung unter stringenten Bedingungen wird in diesem Zusammenhang eine Hybridisierung unter solchen Hybridisierungsbedingungen bezüglich 5 Hybridisierungstemperatur und Formamid-Gehalt der Hybridisierungslösung verstanden, wie sie in einschlägiger Fachliteratur (Sambrook-J and Russell-DW (2001) Cold Spring Harbor, NY, CSHL Press) beschrieben wurde.

Insbesondere kann der Diagnose-Kit solche einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäuren 10 als Hybridisierungssonden enthalten, die eine Sequenz nach SEQ ID No. 1 oder 2 besitzen, die mindestens 10 Nukleotiden/Basenpaaren lang sind und die den Polymorphismus an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens entweder mit oder ohne die Insertion des Nukleotids G umfassen.

Bei dem erfindungsgemäßen diagnostischen Kit werden insbesondere solche Antikörper 15 bereitgestellt, die spezifisch gegen solche Regionen des hsgk1-Proteins gerichtet sind, deren Präsens im hsgk1-Protein von der Gegenwart der G-Insertion an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens abhängt. Inbesondere solche Regionen, die aufgrund der An- oder Abwesenheit dieser G-Insertion in der unreifen mRNA alternativ herausgespleißt werden 20 und daher nicht in der reifen mRNA und in dem daraus hervorgehenden Protein vorhanden sind, eignen sich als immunogene Epitope, gegen die diagnostische Antikörper gerichtet sein können. Entsprechend eignen sich auch gerade solche Nukleinsäure-Regionen des hsgk1-Gens als diagnostische Hybridisierungssonden, die mit einer solchen in Abhängigkeit von der G-Insertion an Position 732/733 herausgespleißten Gen-Region 25 hybridisieren können.

Der Kit zur Diagnose des Long-Q/T-Syndroms kann vorzugsweise auch solche 30 Nukleinsäurefragmente als spezifische Hybridisierungssonden enthalten, die die bekannten SNPs im hsgk1-Gen, insbesondere den SNP in Exon 8 (C2617T, D240D), den SNP in Intron 6 (T2071C) und/oder den SNP in Intron 2 an Position 732/733 (Insertion von G), umfassen.

Die im Rahmen der Erfindung nachgewiesene Korrelation zwischen der genetischen 35 Ausstattung der Gene der hsgk1-Genfamilie und der Länge der Q/T-Zeit ermöglicht auch eine therapeutische Nutzung von funktionalen Aktivatoren oder positiven

Transkriptionsregulatoren der sgk-Familie zur Behandlung des Long-Q/T-Syndroms und ähnlicher Erkrankungen, die ebenfalls mit einer verlängerten Q/T-Zeit einhergehen. Hierbei ist unter einem „funktionalen Aktivator“ eine Substanz zu verstehen, die die physiologische Funktion der entsprechenden Kinase der sgk-Familie aktiviert. Unter einem 5 „positiven Transkriptionsregulator“ ist eine Substanz zu verstehen, die die Expression der entsprechenden Kinase der sgk-Familie aktiviert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft somit die Verwendung eines funktionalen Aktivators oder eines positiven Transkriptionsregulators eines humanen Homologen der 10 sgk-Familie, insbesondere der hsgk1, zur Erniedrigung der Q/T-Zeit und insbesondere zur Therapie und/oder Prophylaxe des Long-QT-Syndroms. Bekannte funktionale Aktivatoren und/oder positive Transkriptionsregulatoren der humanen humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere der hsgk1, stellen Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Aldosteron, Gonadotropine, sowie eine Reihe von Cytokinen, insbesondere TGF- $\beta$ , dar.

15 Die Erfindung betrifft daher weiterhin die Verwendung von Substanzen ausgewählt aus der Gruppe von Substanzen bestehend aus Glucocorticoiden, Mineralcorticoiden, Aldosteron, Gonadotropinen und Cytokinen, insbesondere TGF- $\beta$ , zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-QT-Syndroms. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Arzneimittel enthaltend eine Substanz ausgewählt aus der oben genannten 20 Gruppe von Substanzen zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-Q/T-Syndroms.

Durch die nachfolgenden Beispiele wird die vorliegende Erfindung im Detail erläutert.

25

### **Beispiel 1**

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine Korrelationsstudie durchgeführt, in der 30 der Genotyp des hsgk1-Gens verschiedener Patienten (Zwillinge) mit den an ihnen gemessenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten verglichen und statistisch ausgewertet wurde.

Es wurden 75 zweieigige Zwillingsspärchen zur Korrelationsanalyse herangezogen 35 (Busjahn et al., J Hypertens 1996, 14: 1195-1199; Busjahn et al., Hypertension 1997, 29: 165-170). Die Versuchspersonen waren alle Angehörige der deutsch-kaukasischen Rasse

und stammten aus verschiedenen Teilen Deutschlands. Zur Verifikation der Zweieigigkeit und für weitere molekulargenetische Analysen wurde den Zwillingspärchen, sowie deren Eltern Blut entnommen. Jede teilnehmende Versuchsperson wurde zuvor ärztlich untersucht. Für keine der Versuchspersonen war eine chronisch-medizinische Erkrankung 5 bekannt. Nach 5 min wurde der Blutdruck des Probanden in sitzender Position von einen ausgebildeten Arzt mit einem standardisierten Quecksilber-Sphygmomanometer gemessen (2 Messungen mit einem zeitlichen Intervall von 1 min). Der Mittelwert aus den beiden Messungen wurde als Blutdruckwert verwendet.

10 Der Vorteil von zweieigigen Zwillingen für Korrelationsstudien liegt darin, daß sie im Alter übereinstimmen und daß die äußeren Einflüsse auf ihre Phenotypen als minimal einzuschätzen sind (Martin et al., Nat Genet 1997, 17: 387-392).

Die Bedeutung von Zwillingsstudien bei der Aufklärung komplexer genetischer Krankheiten wurde kürzlich von Martin et al., 1997 beschrieben.

15 Die Zweieigigkeit der Zwillingspärchen wurde durch die Amplifikation von fünf Mikrosatelliten-Markern mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) bestätigt. Bei dieser Analyse von Mikrosatelliten-Markern werden Desoxyribonucleinsäure (DNA) - 20 Fragmente mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide durch PCR amplifiziert, die bei verschiedenen menschlichen Individuen hochvariable Regionen beinhalten. Die hohe Variabilität in diesen Regionen des Genoms kann durch geringfügige Größenunterschiede der amplifizierten Fragmente detektiert werden, wodurch sich bei einer Diversität am entsprechenden Genort Doppelbanden, sogenannte Mikrosatelliten-Banden, nach gelelektrophoretischer Auf trennung der PCR-Produkte bilden (Becker et al., J. Reproductive Med 1997, 42: 260-266).

25 Für die molekulargenetische Analyse des Zielgens, hier des hsgk1-Gens, wurden drei weitere Mikrosatelliten-Marker Regionen (d6s472, d6s1038, d6s270) in unmittelbarer Nähe des hsgk1-Locus durch PCR amplifiziert und anschließend mit den entsprechenden Proben des anderen Zwillings und der Eltern verglichen. Auf diese Weise konnte entschieden werden, ob die Zwillinge von ihren Eltern identische oder unterschiedliche Allele bezüglich des untersuchten Allels geerbt hatten. Die Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des sogenannten "structural equation modeling" (SEM) Modells durchgeführt (Eaves et al., Behav Genet 1996, 26: 519-525; Neale, 1997: Mx: Statistical modeling. Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Department of Psychiatry. 4<sup>th</sup> edition). Dieses Modell basiert auf Varianz-Kovarianz Matrizen der Test-Paare, die durch die Wahrscheinlichkeit, daß sie

entweder keines, eines oder zwei identische Allele besitzen, charakterisiert sind. Die Varianz bezüglich des Phänotyps wurde aufgeteilt in eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund aller Gene (A), eine Varianz, die auf dem genetischen Hintergrund des Zielgens (Q), hier des hsgk1-Gens, und der Varianz aufgrund äußerer 5 Einflüsse (E) beruht.

$$\text{VAR} = A^2 + Q^2 + E^2$$

Für die drei möglichen Allelkombinationen  $\text{IBD}_0$ ,  $\text{IBD}_1$ ,  $\text{IBD}_2$  ( $\text{IBD}$  = "identical by descent"; 0, 1 oder 2 identische Allele) wurde die Kovarianz eines Test-Paars wie folgt 10 definiert:

$$\text{COV}(\text{IBD}_0) = 0,5 A^2 \quad \text{COV}(\text{IBD}_1) = 0,5 A^2 + 0,5 Q^2 \quad \text{COV}(\text{IBD}_2) = 0,5 A^2 + Q^2$$

15 Um die Korrelation zwischen der genetischen Ausstattung des hsgk1-Locus und dem Blutdruck des Probanden abzuschätzen, wurden die Differenzen zwischen Modellen, die die genetische Varianz bezüglich des Zielgens hsgk1 berücksichtigen bzw. nicht berücksichtigen, als  $\chi^2$ -Statistik berechnet. Für jedes Paar und jeden Genlocus wurden die Allelenverhältnisse durch das sogenannte "multipoint" Modell (MAPMAKER/SIBS; 20 Kruglyak et al., Am J Hum Genet 1995, 57: 439-454) basierend auf den elterlichen Genotypen errechnet.

25 Die höhere Aussagekraft der Analysemethode, die auf einer Varianz-Kovarianz Abschätzung beruht, im Vergleich zur oben beschriebenen  $\chi^2$ -Statistik (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Department of Epidemiology and Biostatistics, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 1996) wurde kürzlich in einer Simulationsstudie bestätigt (Fulker et al., Behav Gen 1996, 26: 527-532). Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$  akzeptiert, um eine 30 signifikante Korrelation bezüglich der Kriterien von Lander und Kruglyak zu gewährleisten (Lander et al., Nat Genet 1995, 11: 241-246).

Die Ergebnisse dieser Korrelationsstudie zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1:**

Phenotyp	max $\chi^2$	p
systolischer Blutdruckwert (liegend)	4,44	0,04

diastolischer Blutdruckwert (liegend)	14,36	0,0002
systolischer Blutdruckwert (sitzend)	5,55	0,019
diastolischer Blutdruckwert (sitzend)	4,92	0,027
systolischer Blutdruckwert (stehend)	1,91	0,17
diastolischer Blutdruckwert (stehend)	4,83	0,028

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, beweisen die niedrigen Werte für die ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p$ , die die akzeptierte Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  nicht oder nur geringfügig überschreiten, die direkte Korrelation zwischen der genetischen 5 Varianz bezüglich des hsgk1-Genorts und der phenotypisch ermittelten Varianz des gemessenen Blutdrucks.

### Beispiel 2

10

Die genomische Organisation des hsgk 1-Gens wurde bereits beschrieben (Waldegger et al, Genomics, 51, 299 [1998]), [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515)).

15

Zur Identifizierung von SNPs, deren Auftreten für eine Prädisposition zur Ausbildung einer Hypertonie relevant sind, wurden zunächst die in Datenbanken publizierten SNPs im hsgk1-Gen danach untersucht, ob es sich um echte SNPs - und nicht um reine Sequenzierfehler - handelt und ob die SNPs ausreichend polymorph sind, um die Basis für einen diagnostischen Nachweis einer Prädisposition zur Hypertonie zu stellen. Auf diese 20 Art waren bereits der SNP rs 1057293 in Exon 8, der einen Austausch eines C in ein T betrifft, ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/snpview?snp=1057293](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293); [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?type=rs&rs=1057293](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293)) und ein zweiter SNP, der im hsgk1-Gen exakt 551 bp vom ersten SNP entfernt in der Donor-Spleißstelle des Introns 6 zu Exon 7 lokalisiert ist und der den Austausch eines T in ein C betrifft, lokalisiert worden.

25

### Beispiel 3

30

Von einer Stichprobe der 75 Zwillingspärchen wurden Blutproben entnommen. Nach einer Amplifikation der genomischen DNA des hsgk1-Gens aus den Blutproben mittels PCR

wurden die Exons und Introns (nicht jedoch der Promotor-Bereich) des hsgk1-Gens direkt und vollständig mit Hilfe geeigneter Sequenzierprimer durchsequenziert. Bei einem Sequenzvergleich der hsgk1-Gene, die aus verschiedenen Probanden stammten, fiel ein weiterer Polymorphismus in Intron 2 auf, bestehend aus der Insertion eines zusätzlichen Nukleotids G in der Position 732/733. Die An- bzw. Abwesenheit dieser G-Insertion an Position 732/733 in den hsgk1-Genen der einzelnen Probanden zeigte zudem eine signifikante Korrelation zu dem Blutdruck, der bei den einzelnen Probanden gemessen wurde: InsG/InsG-Genotypen zeigten im Mittel signifikant niedrigere systolische und diastolische Blutdruckwerte als die selteneren WT/WT-Genotypen und auch als heterozygote WT/InsG-Genotypen (siehe Tabelle 3). Im Gegensatz dazu zeigten andere Polymorphismus im hsgk1-Gen eine weniger signifikante Korrelation zum gemessenen Blutdruck (z.B. Intron 6 (C2071T) und Exon 8 (T2617C, D240D)) bzw. keinerlei Korrelation zum gemessenen Blutdruck (z.B. Intron 3 Position Ins 13+xT, T1300-1312 und Intron 4 (C1451T) und Intron 7 Position 2544delA), wie Tabelle 2 zeigt.

Auch die an den Probanden ebenfalls gemessenen EKG-Meßwerte zeigten eine deutliche Korrelation der für die einzelnen Probanden bestimmten Q/T-Zeiten mit dem Genotyp der Probanden bezüglich des Polymorphismus in Intron 2 an Position 732/733 des hsgk1-Gens: hierbei zeigten Probanden mit dem selteneren WT/WT-Genotyp deutlich kürzere Q/T-Zeiten als heterozygote WT/InsG-Probanden und diese wiederum signifikant kürzere Q/T-Zeiten als Probanden mit dem häufigeren InsG/InsG-Genotyp (siehe Tabelle 3). Längere Q/T-Zeiten erhöhen die Gefahr, an Herz-Rhythmus-Störungen, wie insbesondere dem Long-Q/T-Syndrom, zu erkranken. Somit ergeben sich umgekehrte Korrelationen zwischen dem Genotyp des Polymorphismus in Intron 2 an Position 732/733 des hsgk1-Gens mit einer Prädisposition für das Long-Q/T-Syndrom auf der einen Seite und mit einer Prädisposition für die Hypertonie auf der anderen Seite. Diese Korrelationen können jeweils für die Diagnose, Therapie und Prophylaxe der Hypertonie und des Long-Q/T-Syndroms genutzt werden.

**Tabelle 2:**

SNP/ DNA Nr.	Intron 2 Position InsG	Intron 3 Position Ins13+xT	Intron 4 C1451T	Intron 6 C2071T	Intron 7 Position delA 2544delA	Exon 8 T2617C, D240D
-----------------	------------------------------	----------------------------------	--------------------	--------------------	---------------------------------------	----------------------------

- 17 -

	732^733	T1300^1312				
1899	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2022	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	C/C
2094	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	T/T
1902	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2041	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	C/C
2108	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
1921	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	delA/wt	C/C
2048	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2115	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
1934	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2049	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2133	InsG/InsG	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
1944	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2072	InsG/InsG	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2159	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
1983	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2076	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2166	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2011	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	T/C
2084	InsG/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	C/C
2278	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/C	wt/wt	T/T
2020	InsG/InsG	Ins13+xC	C/C	T/T	wt/wt	C/C
2085	wt/wt	Ins13+xC	C/C	C/T	wt/wt	T/C
2338	InsG/InsG	Ins13+xC	C/T	T/T	wt/wt	C/C

5 Tabelle 3:

Messwert \ Genotyp	wt/wt	wt/ins	ins/ins	Signifikanz
(Mittel±Standardabweichung)	n=7	n=14	n=7	

- 18 -

systolischer Blutdruck	123±17	116±10	117±15	<0,05
diastolischer Blutdruck	73±14	70±9	72±9	n.s.
Q/T-Zeit	403±13	411±17	428±10	<0,05

**Patentansprüche**

1. Verwendung einer isolierten einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure enthaltend ein Fragment der Nukleinsäuresequenz nach SEQ ID No. 1 oder nach SEQ ID No. 5 zur Diagnose von Hypertonie, dadurch gekennzeichnet, daß das besagte Fragment mindestens 10 Nukleotide/Basenpaare lang ist und daß das besagte Fragment den Polymorphismus in Intron 2 des hsgk1-Gens entweder mit oder ohne die Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 umfaßt.
- 10 2. Kit zur quantitativen Diagnose von Hypertonie, enthaltend mindestens eine isolierte einzel- oder doppelsträngige Nukleinsäure wie in Anspruch 1 definiert.
- 15 3. Kit zur quantitativen Diagnose von Hypertonie, enthaltend mindestens einen Antikörper gegen eine Region des hsgk-Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß die Präsens besagter Region im hsgk1-Protein von der Gegenwart einer Insertion des Nukleotids G an Position 732/733 in Intron 2 des kodierenden hsgk-Gens abhängig ist.
- 20 4. Verfahren zur Diagnose der Hypertonie umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
  - a) Entnahme einer Körperprobe,
  - b) gegebenenfalls Isolierung und/oder Amplifizierung von genomischer DNA, cDNA oder mRNA aus der Körperprobe nach a),
  - c) Quantifizierung der Allele, die eine Insertion des Nukleotides G an der Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens besitzen.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperprobe aus Schritt a) ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Blut, Speichel, Gewebe, Zellen.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung der Allele nach Schritt c) durch direkte Sequenzierung der genomischen DNA oder der cDNA, die aus der Körperprobe isoliert wurde, erfolgt.

- 20 -

7. Verfahren nach Anspruch 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung der Allele nach Schritt c) durch spezifische Hybridisierung der genomischen DNA oder der cDNA, die aus der Körperprobe isoliert wurde, erfolgt.

5 8. Verfahren nach Anspruch 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung der Allele nach Schritt c) durch einen PCR-Oligo-Elongations-Assay oder einen Ligations-Assay erfolgt.

10 9. Verwendung der direkten Korrelation zwischen der Überexpression oder der funktionalen molekularen Modifikation von humanen Homologen der sgk-Familie und der Länge der Q/T-Zeit zur Diagnose des Long-QT-Syndroms.

15 10. Verwendung der einzel- oder doppelsträngigen Nukleinsäure umfassend die Sequenz eines humanen Homologen der sgk-Familie oder eines seiner Fragmente mit einer Länge von mindestens 10 Nukleotiden/Basenpaaren zur Diagnose des Long-QT-Syndroms.

20 11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.

25 12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure das hsgk1-Gen oder eines seiner Fragmente eine Länge von mindestens 10 Nukleotiden/Basenpaaren besitzt und daß besagte Nukleinsäure den Polymorphismus an Position 732/733 in Intron 2 des hsgk1-Gens entweder mit oder ohne die Insertion des Nukleotids G umfaßt.

30 13. Verwendung eines Antikörpers gegen ein Substrat eines humanen Homologen der sgk-Familie zur Diagnose einer Prädisposition zur Ausbildung des Long-Q/T-Syndroms, wobei der Antikörper gegen ein solches Epitop des humanen Homologen gerichtet ist, welches die Phosphorylierungsstelle entweder in phosphorylierter Form oder in nicht phosphorylierter Form enthält.

35 14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat des humanen Homologen der sgk-Familie Nedd4-2 mit der Acc No. BAA23711 ist.

15. Kit zur Diagnose des Long-QT-Syndroms, enthaltend Antikörper, die gegen die humanen Homologen der sgk-Protein-Familie gerichtet sind, oder Nukleinsäuren, die mit den humanen Homologen der sgk-Gen-Familie unter stringenten Bedingungen hybridisieren können, oder diese Antikörper und Nukleinsäuren gemeinsam.  
5
16. Kit nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das humane Homologe der sgk-Familie das hsgk1-Gen ist.
- 10 17. Verwendung eines funktionalen Aktivators oder positiven Transkriptionsregulators eines humanen Homologen der sgk-Familie, insbesondere der hsgk1, zur Erniedrigung der Q/T-Zeit.
- 15 18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der funktionale Aktivator oder positive Transkriptionsregulator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glucocorticoiden, Mineralcorticoiden, Aldosteron, Gonadotropinen und Cytokinen, insbesondere TGF- $\beta$ .
- 20 19. Verwendung von Substanzen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glucocorticoiden, Mineralcorticoiden, Aldosteron, Gonadotropinen und Cytokinen, insbesondere TGF- $\beta$ , zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-QT-Syndroms.
- 25 20. Arzneimittel enthaltend mindestens eine Substanz aus der Gruppe von Substanzen bestehend aus Glucocorticoiden, Mineralcorticoiden, Aldosteron, Gonadotropinen und Cytokinen, insbesondere TGF- $\beta$ , zur Therapie und/oder zur Prophylaxe des Long-QT-Syndroms.

<110> Lang, Florian

<120> Verwendung eines neuen Polymorphismus im hsgk1-Gen zur Diagnose der Hypertonie und Verwendung der sgk-Genfamilie zur Diagnose und Therapie des Long-Q/T-Syndroms

<130> L62136

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5704

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (36) .. (155)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (303) .. (378)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (806) .. (881)

<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1317) .. (1421)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1526) .. (1609)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1725) .. (1856)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (2106) .. (2218)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (2560) .. (2683)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (3141) .. (3236)  
<223>

<220>

<221> exon

<222> (3652) .. (3807)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (3915) .. (4004)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (4349) .. (5526)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (156) .. (302)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (379) .. (805)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (882) .. (1316)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (1422) .. (1525)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (1610) .. (1724)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (1857) .. (2105)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (2219) .. (2559)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (2684) .. (3140)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (3237) .. (3651)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (3808) .. (3914)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (4005) .. (4348)

<223>

<220>

<221> mutation

<222> (732) .. (733)

<223> Insertion of G at the position 732/733 in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (1299) .. (1300)

<223> Homopolymer insertion of 13 x T in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (1451) .. (1451)

<223> C/T-exchange at the position 1451 in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (2071) .. (2071)

<223> C/T-exchange at the position 2071 in Intron 6 in certain genotype

s

<220>  
<221> mutation  
<222> (2543)..(2544)  
<223> Insertion of A at the position 2543/2544 in Intron 7 in certain genotypes

<220>  
<221> mutation  
<222> (2617)..(2617)  
<223> T/C-exchange at the position 2617 in Exon 8 in certain genotypes  
(resulting in no amino acid exchange, D240D)

<400> 1  
ggccgagcgc gcggcctggc gcacgatacg ccgag ccg gtc ttt gag cgc taa 53

cgt ctt tct gtc tcc ccg cgg tgg tga tga cgg tga aaa ctg agg ctg 101

cta agg gca ccc tca ctt act cca gga tga ggg gca tgg tgg caa ttc 149

tca tcg gtgagtgcag gaatcttgcg ggacttctgc tccaggagac gcaaagtgga 205

aatttttga aagtcccgga tcagattagt gtgtgtggcg ccgggacgtt atgaagccgt 265

ctaaacgttt ctttatttct cctccttcta tccacag ctt tca tga agc aga gga 320

gga tgg gtc tga acg act tta ttc aga aga ttg cca ata act cct atg 368

cat gca aac a gtaagttcag accggattga gcaaataact agtatagttt 418

gaatttgcca gcggtaaaca ttctcatcac ggcgttatac gggaaaggcga agacttcttc 478

tgggtgggg atctcatttc tccttaaatt ctaatatatt tgacacattt taaacattaa 538

agttaatttgc tgatttggc ttgaactgga gatgtaagat aaatggttcg tggggccgaa 598

attcacgctt tctccatgag caacaatcct tatttctgta tttaatgggg tttatttattt 658

tcttaactg actaatgtat tgggttattt tcagttaaa cagtgaatta tcgggttagaa 718

gtcggttagag ccagaaactc acttttgcattt ttgggtgtgcc ccctagtggc gagctggatt 778

ctaaatcgtg ccctttattt cctgcag cc ctg aag ttc agt cca tct tga aga 831

tct ccc aac ctc agg agc ctg agc tta tga atg cca acc ctt ctc ctc 879

ca gtaagttttt gtagtgcgg tgcattctgtg gagaactgta agggagtcag 931

ttagtattcc tacattaatg gattaaaata gcatttcttag aaatttagtat caaggcagga 991

atgcttcatt atgcataaca gtgatataaa tatttaagta ttgagtcaga gtattttttt 1051

tatTTTTTC ctgggcataat tttacctcaa gtggttatTT taaaaggcat atttcataaa 1111

aaggTTTTat ctgtctgaaa caacatgact gtgtgcagtt tccatactca tttgaaatgt 1171

gatgaaatgt agttttgaat gtttatagat gtatggtcat ttgcatacgt catttgtaga 1231

tgtaacatTT tctacatcgt ttatgttata gatgtcttcc tttgaagcaa tggtatTTaa 1291

aagaaattcct agccaagtcc ttctc a gca aat caa cct tgg ccc gtc gtc caa 1344

tcc tca tgc taa acc atc tga ctt tca ctt ctt gaa agt gat cgg aaa 1392

ggg cag ttt tgg aaa ggt aat ttc aaa tc tgaagatctt ttggtaacact 1441

tccttcatgt cctttttat attctccctg gatgaggatc gaaaaatgtat ttTTTTaaat 1501

tgaaatttca ggTTCTTcta gcaa g aca caa ggc aga aga agt gtt cta tgc 1553

agt caa agt ttt aca gaa gaa agc aat cct gaa aaa gaa aga ggt gag 1601

atg tgc tt gatggggctg gcattggcgg tagacactcc ttgaataatc 1649

ttgattctgg aatgttggtg ccagttgaac atgccactaa atctgaatcg tcattttcct 1709

aggagaagca tatta t gtc gga gcg gaa tgt tct gtt gaa gaa tgt gaa 1758

gca ccc ttt cct ggt ggg cct tca ctt ctc ttt cca gac tgc tga caa 1806

att gta ctt tgt cct aga cta cat taa tgg tgg aga ggt gag cag ggg 1854

gg atagaagtca actcttagtg tctctgcaca gcctgcatttgc tttagtttgc 1906

agaaaaaaagt ttccaaagat tttggtgaa gagaatgtta ccagaattag catttcatttc 1966

aacctgtcag gttatagtttta atagattact tggggccact tcctgcagtt gttctttgc 2026

tgtgtatgtc aaaactaatt aaattacatt gcgcaccca gaatgacttt gttctgtctc 2086

ctgcagttgt tctaccatc t cca gag gga acg ctg ctt cct gga acc acg 2136

ggc tcg ttt cta tgc tgc tga aat agc cag tgc ctt ggg cta cct gca 2184

ttc act gaa cat cgt tta tag gta agc ctg aga g ctcttcaggc 2228

taccagtttt ggtataaagg agacgttagca ctggctgttt catagggcct taaaataatt 2288

tgtgtttatt tgcaacttgg ttcgctaaaa ccagatcccc tagcacgtga gctggcttga 2348

cttaagtgcc aagggggaac agccaagtag gattgtgcct aatccagaat agatgagcag 2408

aacaagggct cctttttct tcactacaca actacagtga acctaaatgc ctctaatacc 2468

ttagcaatta tcttaagag gataatcttat gaagtgaaat taacttgtgc aactacttt 2528

cttcacttt tttacagaga cttaaaacca g ag aat att ttg cta gat tca 2579

cag gga cac att gtc ctt act gat ttc gga ctc tgc aag gag aac att 2627

gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg ccg gag gta ggc 2675

gct gtc tt ggtttgggtgc ctgggttacc cccgccttcc aagagagaga 2723

tgtacaatca tgcacttaac tacaaaaag agtaaactcc ttcagagac ttcttaatac 2783

agttcagtgc aaataaaaata catttgctgt ttgatgtgc atgagaaatc ccaagtcctt 2843

ctgttccttt actgaaaagt agctgttgt aagtaagatc tgcatacataa aaactttcta 2903

atcctaagta agagatatac agtgccagca gtttcctaaa tgtcagtaca cataggtgc 2963

cagtcaccct caaaaagtcc agcagttta tcaggaagga atctaaagat atctatctc 3023

caagctggct ctgggtctct cagcttttc aaactaaatg tgtggtcgtg ggattgctt 3083

cttcgcagg ttctaaacgc tgttccctg gtctgtttt cagtatctcg cacctga g 3141

gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg act gtg gac tgg tgg tgc ctg 3189

gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat ggc ctg gtg agt ggc aca tt 3236

ggaaaccact ggaacactgc ctgctcccta caatattgcc ttcacacagc aaaagcagct 3296

aagaggcata ttggttatcc tatagttcat aagaataatc acttacctgg ttctttgtg 3356

catttcacat tttactagat aggaccacat tgaacctgtg tgggggtgaa aaactaccac 3416

ttatataacat ctaccccta ccctccacac acacacacac aaacacacac acgggttgca 3476

aagtagacac tttaaatagca agggaaaaga aagcattgag gtggggagag tttctaaat 3536

cgagcctaatttatttgcc gtttatatct tttctctac tggtaatgtg tgccatatga 3596

aacttccaat taagtctaaa gtaattttcc ctttcttca gcccctttt tatag c 3652

cga aac aca gct gaa atg tac gac aac att ctg aac aag cct ctc cag 3700

ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca aga cac ctc ctg gag ggc ctc 3748

ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc ggg gcc aag gat gac ttc gtg 3796

agt gat gtt tt cctgtcctcc tgggcccccc gggacgtgca ctagacacctcc 3847

ctgccccttat tgaatgcacc tgtctaaatt aatcttgggt ttcttatcaa cagatggaga 3907

ttaagag t cat gtc ttc ttc tcc tta att aac tgg gat gat ctc att aat 3957

aag aag att act ccc cct ttt aac cca aat gtg gtg agt atc tgt ct 4004

ctcttctaag tatagagaag ccaagcgatt tatttttaatt cagaattgtc tgggggaggg 4064

ttggaaggaa tacattggca gatgtttctt ccataaacctt gttttttac ctacatagac 4124

acatttatca attcgaagca ccaaaaggca acaagtgaac attattctta tgtttaactg 4184

tgtgttagct tttgagattt tgtgcttgaa gtgggtgatt atggaagttt atataagact 4244

taaacttgggt atttaaagcc tggtcaagat ttccctgtcc tgtgtcttagt gtgagttctt 4304

gacaagagtg ttttccctt cccgtcacag agtgggccccca acga g cta cg g cac 4358

ttt gac ccc gag ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag 4406

tcc cct gac agc gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag 4454

gct ttc cta ggc ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tga 4502

acc ctg tta ggg ctt ggt ttt aaa gga ttt tat gtg tgt ttc cga atg 4550

ttt tag tta gcc ttt tgg tgg agc cgc cag ctg aca gga cat ctt aca 4598

aga gaa ttt gca cat ctc tgg aag ctt agc aat ctt att gca cac tgt 4646

tcg ctg gaa ttt ttt gaa gag cac att ctc ctc agt gag ctc atg agg 4694

ttt tca ttt tta ttc ttc ctt cca acg tgg tgc tat ctc tga aac gag 4742

cgt tag agt gcc gcc tta gac gga ggc agg agt ttc gtt aga aag cgg 4790

acc tgt tct aaa aaa ggt ctc ctg cag atc tgt ctg ggc tgt gat gac 4838

gaa tat tat gaa atg tgc ctt ttc tga aga gat tgt gtt agc tcc aaa 4886

gct ttt cct atc gca gtg ttt cag ttc ttt att ttc cct tgt gga tat 4934

gct gtg tga acc gtc gtg tga gtg tgg tat gcc tga tca cag atg gat 4982

ttt gtt ata agc atc aat gtg aca ctt gca gga cac tac aac gtg gga 5030

cat tgt ttg ttt ctt cca tat ttg gaa gat aaa ttt atg tgt aga ctt 5078

ttt tgt aag ata cgg tta ata act aaa att tat tga aat ggt ctt gca 5126

atg act cgt att cag atg cct aaa gaa agc att gct gct aca aat att 5174

tct att ttt aga aag ggt tt tat gga cca atg ccc cag ttg tca gtc 5222

aga gcc gtt ggt gtt ttt cat tgt tta aaa tgt cac ctg taa aat ggg 5270

cat tat tta tgt ttt ttt tgc att cct gat aat tgt atg tat tgt 5318

ata aag aac gtc tgt aca ttg ggt tat aac act agt ata ttt aaa ctt 5366

aca ggc tta ttt gta atg taa acc acc att tta atg tac tgt aat taa 5414

cat ggt tat aat acg tac aat cct tcc ctc atc cca tca cac aac ttt 5462

ttt tgt gtg tga taa act gat ttt ggt ttg caa taa aac ctt gaa aaa 5510

tat tta cat ata ttg t gtcatgtgtt attttgtata ttttggtaaa gggggtaatc 5566

atgggttagt taaaaattga aaaccatgaa aatcctgctg taatttcctg cttagtggtt 5626

tgctccaaca gcagtggttt ctgactccag ggagtatagg atggcttaag ccaccacgtc 5686

caggccttta gcagcatt 5704

<210> 2

<211> 5701

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (36) .. (155)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (303) .. (378)

<223>

<220>

<221> exon

<222> (807) .. (882)

<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1318) .. (1422)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1527) .. (1610)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (1726) .. (1857)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (2107) .. (2219)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (2561) .. (2684)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (3142) .. (3237)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (3653) .. (3808)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (3916) .. (4005)  
<223>

<220>  
<221> exon  
<222> (4350) .. (5527)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (156) .. (302)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (379) .. (806)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (883) .. (1317)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (1423) .. (1526)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (1611) .. (1725)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (1858) .. (2106)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (2220) .. (2560)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (2685) .. (3141)  
<223>

<220>  
<221> Intron  
<222> (3238) .. (3652)  
<223>

<220>

<221> Intron

<222> (3809) .. (3915)

<223>

<220>

<221> Intron

<222> (4006) .. (4349)

<223>

<220>

<221> mutation

<222> (733) .. (733)

<223> Deletion of the nucleotide G at the position 733 in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (1300) .. (1301)

<223> Homopolymorph insertion of 13 x T in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (1452) .. (1452)

<223> C/T-exchange at the position 1452 in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (2072) .. (2072)

<223> C/T-exchange at the position 2072 in Intron 6 in certain genotype

s

<220>

<221> mutation

<222> (2544) .. (2545)

<223> Insertion of A at the position 2544/2545 in Intron 7 in certain genotypes

<220>

<221> mutation

<222> (2618) .. (2618)

<223> T/C-exchange at the position 2618 in Exon 8 in certain genotypes  
(resulting in no amino acid exchange, D240D)

<400> 2

ggccgagcgc gcggcctggc gcacgatacg ccgag ccg gtc ttt gag cgc taa 53

cgt ctt tct gtc tcc ccg cgg tgg tga tga cgg tga aaa ctg agg ctg 101

cta agg gca ccc tca ctt act cca gga tga ggg gca tgg tgg caa ttc 149

tca tcg gtgagtgca gatatctgcg ggacttctgc tccaggagac gcaaagtgga 205

aatttttga aagtcccgga tcagattagt gtgtgtggcg ccgggacgtt atgaagccgt 265

ctaaacgtt ctttatttct cctcattcta tccacag ctt tca tga agc aga gga 320

gga tgg gtc tga acg act tta ttc aga aga ttg cca ata act cct atg 368

cat gca aac a gtaagttcag accggattga ggaaataact agtatagttt 418

gaatttgcca gcggtaaaca ttctcatcac ggcgtttatc ggaaaggcga agacttcttc 478

tgggtgggg atctcatttc tccttaaatt ctaatatatt tgacacattt taaacattaa 538

agttaaatttgc tgatttggc ttgaactgga gatgtaagat aaatggttcg tggggccga 598

attcacgctt tctccatgag caacaatcct tatttctgta ttaatgggg tttatttattt 658

tcttaactg actaatgtat tgggttattt tcagttaaa cagtgaatta tcggtagaa 718

gtcggtagag ccagggaaact cactttgat gttgggtgc cccctagttt cgagctggat 778

tctaaatcgt gcccatttatt ccctgcag cc ctg aag ttc agt cca tct tga 829

aga tct ccc aac ctc agg agc ctg agc tta tga atg cca acc ctt ctc 877

ctc ca gtaagttttt gtatgtgccg tgcattctgtg gagaactgta agggagtcag 932

tttagtattcc tacattaatg gattaaaata gcatttcttag aaatttagtat caaggcagga 992

atgcttcatt atgcataaca gtgatataaa tatttaagta ttgagtcaga gtattatttt 1052

tatttttttc ctgggcataat ttacactcaa gtggttatTT taaaaggcat atttcataaaa 1112

aaggtttat ctgtctgaaa caacatgact gtgtgcagtt tccatactca tttgaaatgt 1172

gatgaaatgt agttttgaat gtttatacat gatggcattt ttgcattcattt cattttaga 1232

tgtaacattt tctacatcgt ttatgttata gatgtcttcc tttgaagcaa tggattttaaa 1292

agaaaattcct agccaagtc ttctc a gca aat caa cct tgg ccc gtc gtc caa 1345

tcc tca tgc taa acc atc tga ctt tca ctt ctt gaa agt gat cgg aaa 1393

ggg cag ttt tgg aaa ggt aat ttc aaa tc tgaagatctt ttggtagact 1442

tccttcatgt cctttttat attctccctg gatgaggatc gaaaaatgtat ttttttaat 1502

tgaaatttca ggttcttcta gcaa g aca caa ggc aga aga agt gtt cta tgc 1554

agt caa agt ttt aca gaa gaa agc aat cct gaa aaa gaa aga ggt gag 1602

atg tgc tt gatggggctg gcattggcgg tagacactcc ttgaataatc 1650

ttgattctgg aatgttggtg ccagttgaac atgccactaa atctgaatcg tcatttcct 1710

aggagaagca tatta t gtc gga gcg gaa tgt tct gtt gaa gaa tgt gaa 1759

gca ccc ttt cct ggt ggg cct tca ctt ctc ttt cca gac tgc tga caa 1807

att gta ctt tgt cct aga cta cat taa tgg tgg aga ggt gag cag ggg 1855

gg atagaagtca actcttagtg tctctgcaca gcctgcttg ttttagttg 1907

agaaaaaaagt tttcaaagat ttttgtgg gagaatgtta ccagaattag catttccttc 1967

aacctgtcag gttatagtttta atagattact tggggccact tcctgcagtt gttctttgc 2027

tgtgtatgtc aaaactaatt aaattacatt gcgcaaccca gaatgacttt gttctgtctc 2087

ctgcagttgt tctaccatc t cca gag gga acg ctg ctt cct gga acc acg 2137

ggc tca ttt cta tgc tgc tga aat agc cag tgc ctt ggg cta cct gca 2185

ttc act gaa cat cgt tta tag gta agc ctg aga g ctcttcaggc 2229

taccagtttt ggtataaagg agacgttagca ctggctgttt catagggcct taaaataatt 2289

tgtgtttatt tgcaacttgg ttgcgtaaaa ccagatcccc tagcacgtga gctggcttga 2349

cttaagtgcc aagggggaac agccaagtag gattgtgcct aatccagaat agatgagcag 2409

aacaagggct ccttttttct tcactacaca actacagtga acctaaatgc ctctaataacc 2469

ttagcaatta tctttaagag gatatcttat gaagtgaaat taacttgc aactactttt 2529

cttcacttt tttacagaga cttaaaacca g ag aat att ttg cta gat tca 2580

cag gga cac att gtc ctt act gat ttc gga ctc tgc aag gag aac att 2628

gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg ccg gag gta ggc 2676

gct gtc tt ggtttggtgc ctggtttacc cccgccttcc aagagagaga 2724

tgtacaatca tgcacttaac taccaaaaag agtaaactcc tctcagagac ttcttaatac 2784

agttcagtgc aaataaaaata catttgctgt ttgatgtgc atgagaaatc ccaagtcctt 2844

ctgttccttt actgaaaagt agctgtttgt aagtaagatc tgcatacataa aaactttcta 2904

atcctaagta agagatatac agtgccagca gtttcctaaa tgtcagtaca cataggtgc 2964

cagtcaccct caaaaagtcc agcagttta tcaggaagga atctaaagat atctatctc 3024

caagctggct ctgggtctct cagttttc aaactaaatg tgtggtcgtg ggattgcttg 3084

ctttcgcagg ttctaaacgc tggccctg gtctgtttt cagtatctcg cacctga g 3142

gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg act gtg gac tgg tgg tgc ctg 3190

gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat ggc ctg gtg agt ggc aca tt 3237

ggaaaccact ggaacactgc ctgctcccta caatattgcc ttcacacagc aaaaggcagct 3297

aagaggcata ttggttattt tatagttcat aagaataatc acttacctgg ttctttgtg 3357

catttcacat tttactagat aggaccacat tgaacctgtg tggtggtgaa aaactaccac 3417

ttattaacat ctaccccta ccctccacac acacacacac aaacacacac acgggttgca 3477

aagtagacac ttaaatagca agggaaaaga aagcattgag gtggggagag tttctcaaat 3537

cgagcctaatttatttgcc gtttatatct tttctctac tggtaatgtg tgccatatga 3597

aacttccaat taagtctaaa gtaatttcc cttttttca gcccctttt tatac c 3653

cga aac aca gct gaa atg tac gac aac att ctg aac aag cct ctc cag 3701

ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca aga cac ctc ctg gag ggc ctc 3749

ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc ggg gcc aag gat gac ttc gtg 3797

agt gat gtt tt cctgtcctcc tgggccggcc gggacgtgca ctagacctcc 3848

ctgcccttat tgaatgcacc tgtctaaatt aatcttgggt ttcttatcaa cagatggaga 3908

ttaagag t cat gtc ttc ttc tcc tta att aac tgg gat gat ctc att aat 3958

aag aag att act ccc cct ttt aac cca aat gtg gtg agt atc tgt ct 4005

ctcttctaaag tatagagaag ccaagcgatt tatttaatt cagaattgtc tgggggaggg 4065

ttggaaggaa tacattggca gatgtttct ccataaacct gttatttac ctacatagac 4125

acatttatca attcgaagca ccaaaaggca acaagtgaac attattctta tgtttaactg 4185

tgtgtagcct tttgagattt tgtgcttgaa gtgggtgatt atggaagttg atataagact 4245

taaacttgggt atttaaagcc tggtaagat ttccctgtcc tgtgtctagt gtgagttctt 4305

gacaagagtg tttttccctt cccgtcacag agtgggcccc acga g cta cg<sup>g</sup> cac 4359

ttt gac ccc gag ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag 4407

tcc cct gac agc gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag 4455

gct ttc cta ggc ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tga 4503

acc ctg tta ggg ctt ggt ttt aaa gga ttt tat gtg tgt ttc cga atg 4551

ttt tag tta gcc ttt tgg tgg agc cgc cag ctg aca gga cat ctt aca 4599

aga gaa ttt gca cat ctc tgg aag ctt agc aat ctt att gca cac tgt 4647

tgg ctg gaa ttt ttt gaa gag cac att ctc ctc agt gag ctc atg agg 4695

ttt tca ttt tta ttc ttc ctt cca acg tgg tgc tat ctc tga aac gag 4743

cgt tag agt gcc gcc tta gac gga ggc agg agt ttc gtt aga aag cgg 4791

acc tgt tct aaa aaa ggt ctc ctg cag atc tgt ctg ggc tgt gat gac 4839

gaa tat tat gaa atg tgc ctt ttc tga aga gat tgt gtt agc tcc aaa 4887

gct ttt cct atc gca gtg ttt cag ttc ttt att ttc cct tgt gga tat 4935

gct gtg tga acc gtc gtg tga gtg tgg tat gcc tga tca cag atg gat 4983

ttt gtt ata agc atc aat gtg aca ctt gca gga cac tac aac gtg gga 5031

cat tgt ttg ttt ctt cca tat ttg gaa gat aaa ttt atg tgt aga ctt 5079

ttt tgt aag ata cgg tta ata act aaa att tat tga aat ggt ctt gca 5127

atg act cgt att cag atg cct aaa gaa agc att gct gct aca aat att 5175

tct att ttt aga aag ggt ttt tat gga cca atg ccc cag ttg tca gtc 5223

aga gcc gtt ggt gtt ttt cat tgt tta aaa tgt cac ctg taa aat ggg 5271

cat tat tta tgt ttt ttt tgc att cct gat aat tgt atg tat tgt 5319

ata aag aac gtc tgt aca ttg ggt tat aac act agt ata ttt aaa ctt 5367

aca ggc tta ttt gta atg taa acc acc att tta atg tac tgt aat taa 5415

cat ggt tat aat acg tac aat cct tcc ctc atc cca tca cac aac ttt 5463

ttt tgt gtg tga taa act gat ttt ggt ttg caa taa aac ctt gaa aaa . . . 5511

tat tta cat ata ttg t gtcatgtgtt attttgtata ttttggtaaa gggggtaatc . . . 5567

atgggttagt ttaaaattga aaaccatgaa aatcctgctg taatttcctg cttagtggtt . . . 5627

tgctccaaca gcagtggttt ctgactccag ggagtatagg atggcttaag ccaccacgtc . . . 5687

caggccttta gcag . . . 5701