(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월21일
(11) 등록번호 10-1780897
(24) 등록일자 2017년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C12Q 1/66* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12Q 1/66 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0101226
(22) 출원일자 2016년08월09일
심사청구일자 2016년08월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150044534 A

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
권택규
대구광역시 달서구 송현로7길 41, 103동 1002호 (상인동, 월촌화성타운)
민경진
경상북도 칠곡군 왜관읍 평장3길 47, 202동 1201호 (대동다숲아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

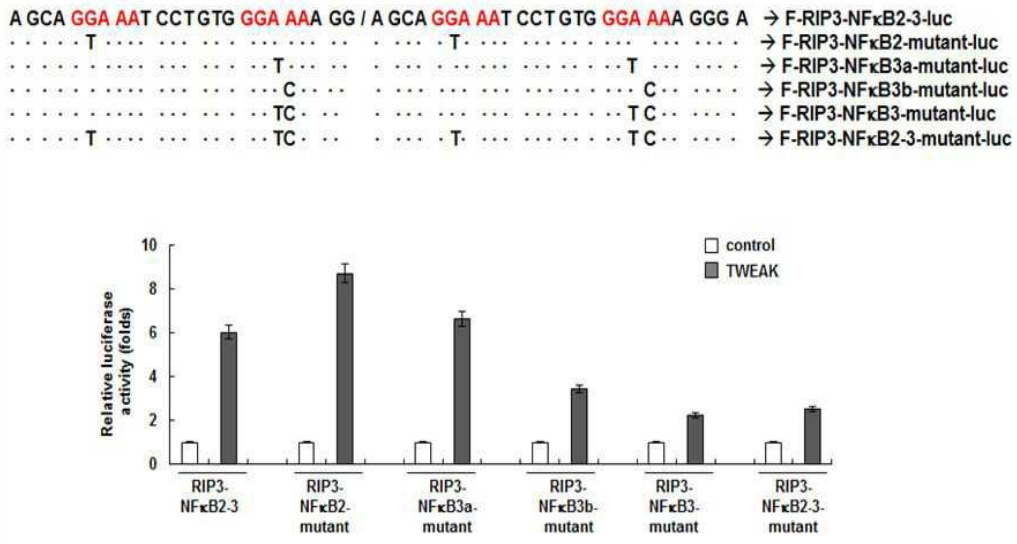
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 활성화 인자의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 활성화 인자(non-canonical NF-κB factor)의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 기존의 NF-κB-루시퍼라제(luciferase) 활성은 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)에 의하여 모두 활성화가 증가하여, 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)를 구분하지 못한다는 문제점이 있었으나, 본 발명의 RIP3 프로모터 활성은 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)에 의해서만 증가하므로 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 인자의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 인간 RIP3 프로모터 영역 유전자 및 루시퍼라제(luciferase) 리포터 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 미생물은 T98G 세포인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 4

(1) 제2항 또는 제3항에 따른 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(2) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계를 포함하는 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 신호 모니터링 방법.

청구항 5

(1) 제2항 또는 제3항에 따른 재조합 미생물에 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자를 처리하는 단계;

(2) 상기 처리된 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계;

(3) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계; 및

(4) 대조구 시료와 비교하여 상기 루시퍼라제 리포터의 신호 세기가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자는 TWEAK, NF-κB-유도 키나제(NF-κB-inducing kinase; NIK) 또는 p52인 것을 특징으로 하는 항암제 스크리닝 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 시험물질은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 인간 RIP3 프로모터 영역과 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자의 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 활성화 인자(non-canonical NF-κB factor)의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] nuclear factor kappa B (NF-κB)는 처음에는 B 림프구 특이인자로 생각되었으나, 추후의 연구에 의하여 극소수의 세포를 제외하고 각종 조직에서 거의 어디에나 발현되며 염증, 면역(immunity), 세포자연사(apoptosis), 발암(carcinogenesis), 조직재생 등 다양한 기능을 수행함이 알려지게 되었다. NF-κB는 5개의 유전자로 구성되어 NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), c-Rel, RelB로 구분할 수 있고, 자극이 없는 상태에서

대부분의 NF-κB는 억제 단백(inhibitory κB, IκB)에 의해 세포질에 존재한다. 포유동물에서는 2종류의 NF-κB 활성화 경로가 존재하는데 하나는 정규(canonical) 경로이고 다른 하나는 비정규(non-canonical) 경로이다. 자극인자로는 정규(canonical) 경로의 경우 lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor-α(TNF-α), IL-1 α/β이고 비정규(non-canonical) 경로의 경우 B-cell activating factor, which belong to the TNF family (BAFF), CD40 리간드, lymphotoxin β (LTβ)이다. 이러한 자극에 의해 NF-κB의 활성화가 이루어지고, 이를 조절하는 것이 IKK (IκB kinase)이다. NF-κB의 상위 kinase인 IKK 복합체는 α, β, γ 3개의 성분으로 구성되어 있고, 이중 2개의 촉매 아단위(catalytic subunit)는 α, β이고, 비촉매 아단위 (noncatalytic subunit)로는 IKKγ (NEMO)가 있다. IKKβ는 정규(canonical) 경로 활성화에, IKKα는 비정규(non-canonical) 경로의 활성화에 관여하고 IKKγ는 조절역할을 한다.

[0003] 정규(canonical) 경로는 자극에 의해 IKKβ가 활성화되면 인산화된 IκB는 유비퀴틴화(ubiquitination, 대표적인 단백질의 분해 기전)에 의해 분해되어, p50/p65 이합체가 세포질에서 핵으로 이동한 후, 핵 안에서 전사인자로 작용하여 면역조절, 세포증식, 세포 생존 및 염증발생에 관여한다. 비정규(non-canonical) 경로는 자극에 의해 IKKα가 활성화되어 p100을 인산화, 분해시켜 p52로 변환시키고, 그 결과로서 만들어진 p52/RelB 이합체가 핵 안으로 이동하여 B 세포 성숙, 이차 림프 기관발생에 관여한다.

[0004] 기존의 NF-κB-luciferase activity는 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)에 의하여 모두 활성화가 증가하여, 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)를 구분하지 못한다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) PCT공개특허 WO2008-080195(2008.07.10 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 활성화 인자(non-canonical NF-κB factor)의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 인간 RIP3 프로모터 영역 유전자 및 루시퍼라제(luciferase) 리포터 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 (1) 상기 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및 (2) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계를 포함하는 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 신호 모니터링 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (1) 상기 재조합 미생물에 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자를 처리하는 단계; (2) 상기 처리된 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계; (3) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계; 및 (4) 대조구 시료와 비교하여 상기 루시퍼라제 리포터의 신호 세기가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 활성화 인자(non-canonical NF-κB factor)의 결합을 이용한 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 기존의 NF-κB-루시퍼라제(luciferase) 활성은 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)에 의하여 모두 활성화가 증가하여, 정규(canonical; p65) 및 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)를 구분하지 못한다는 문제점이 있었으나, 본 발명의 RIP3 프로모터 활성은 비정규(non-canonical) NF-κB 인자(NIK)에 의해서만 증가하므로 RIP3 프로모터와 비정규 NF-κB 인자의 결합을 이용

한 항암제 스크리닝 방법에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 RIP3의 프로모터에 존재하는 NF-κB의 활성은 비정규(non-canonical) NF-κB 활성에 관여하는 NIK과 p52에 의해서만 증가하는 것을 확인한 결과이다.

도 2a는 RIP3의 프로모터에 NF-κB 전사인자가 결합할 수 있는 3가지 사이트를 나타낸다.

도 2b는 -604/RIP3 NF-κB2-3에 존재하는 NF-κB 결합 사이트가 TWEAK에 의한 RIP3 프로모터 활성화에 중요하게 관여함을 확인한 결과이다.

도 3은 -604/RIP3 NF-κB2-3에 존재하는 NF-κB 결합 사이트 중 중요한 시퀀스를 확인하기 위하여 point 돌연변이를 합성하여 확인한 결과이다.

도 4는 RIP3의 프로모터에 존재하는 NF-κB 결합 사이트는 비정규(non-canonical) NF-κB 신호전달체계에 의해서만 반응하는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 인간 RIP3 프로모터 영역 유전자 및 루시퍼라제(luciferase) 리포터 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 상기 인간 RIP3 프로모터 영역 유전자(NC_000014.9, NG_046975)는 서열번호 2의 염기서열로 표시될 수 있으며, 서열번호 2는 인간 RIP3의 시작 코돈에서 -1 내지 -724의 염기서열을 나타낸다.

[0015] 본 발명에 있어서, "벡터"는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA 분자를 의미한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 미생물은 T98G 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 또한, 본 발명은 (1) 상기 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및 (2) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계를 포함하는 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 신호 모니터링 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 (1) 상기 재조합 미생물에 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자를 처리하는 단계; (2) 상기 처리된 재조합 미생물에 시험물질을 접촉시키는 단계; (3) 상기 시험물질을 접촉한 재조합 미생물에서 루시퍼라제 리포터의 신호 세기를 측정하는 단계; 및 (4) 대조구 시료와 비교하여 상기 루시퍼라제 리포터의 신호 세기가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 상세하게는, 상기 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자는 TWEAK, NF-κB-유도 키나제(NF-κB-inducing kinase; NIK) 또는 p52일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상세하게는, 상기 시험물질은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 인간 RIP3 프로모터 영역과 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화 인자의 결합을 억제할 수 있다.

[0021] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화합물, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0023] **<실험예>**

[0024] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0025] **1. 세포배양 및 물질**

[0026] T98G 세포를 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 상기 세포는 10% 태아소혈청(fetal bovine serum; FBS), 20mM HEPES 버퍼 및 100㎍/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.

[0027] TWEAK는 R&D system (MN, USA)에서 구입하였다.

[0028] **2. 플라스미드 제작**

[0029] 인간 RIP3 (NC_000014)의 프로모터 지역 (약 0.7 kb)을 프라이머 5'-ctatagaaaggtaccaaaagcagt (forward/KpnI) 및 5'-gacttctgaagcttggtcctttc (reverse/HindIII)를 이용하여 합성하고, KpnI과 HindIII를 이용하여 pGL2-Basic 벡터에 루시퍼레이즈 유전자 앞에 넣었다. RIP3 프로모터에 존재하는 NF-κB의 중요성을 확인하기 위하여 NF-κB 사이트에 존재하는 시퀀스를 바꾸는 point 돌연변이를 만들기 위하여 mNF-κB1 (forward: 5'-tgatcttagagcatctgtgaga-3' 와 reverese 5'-tctcacagatgctctaagatca-3'); mNF-κB2-3 (forward: 5'-agcagtaaatcctgtggtcaaagg-3' 와 reverese 5'-cctttgaccacaggatttactgct-3') 프라이머를 이용하여 two-step PCR을 통하여 만들었고 이를 KpnI과 HindIII를 이용하여 pGL2-Basic 벡터에 루시퍼레이즈 유전자 앞에 넣었다. NF-κB 시퀀스 중 중요한 시퀀스를 확인하기 위하여 다음과 같이 oligonucleotide를 다음과 같이 합성하여 사용하였다(표 1). 합성된 oligonucleotide를 annealing한 후 SmaI 및 HindIII로 pGL2-Basic 벡터에 루시퍼레이즈 유전자 앞에 넣었다.

표 1

[0030]

RIP3-NF-κB2-3-luc	gggcaggaaatcctgtgggaaaagg agcaggaaatcctgtgggaaaagga	agcttccttttcccacaggatttcctgct cctttcccacaggatttcctgccc
RIP3-NF-κB2-3 mutant-luc	gggcagtaaatcctgtggtcaaagg agcagtaaatcctgtggtcaaagga	agcttcctttgaccacaggatttactgct cctttgaccacaggatttactgccc
RIP3-NF-κB2-mutant-luc	gggcagtaaatcctgtgggaaaagg agcagtaaatcctgtgggaaaagga	agcttccttttcccacaggatttactgct cctttcccacaggatttactgccc
RIP3-NF-κB3a-mutant-luc	gggcaggaaatcctgtggtaaaagg agcaggaaatcctgtggtaaaagga	agcttccttttaccacaggatttcctgct cctttaccacaggatttcctgccc
RIP3-NF-κB3b-mutant-luc	gggcaggaaatcctgtgggcaaagg agcaggaaatcctgtgggcaaagga	agcttcctttgcccacaggatttcctgct cctttgcccacaggatttcctgccc
RIP3-NF-κB3-mutant-luc	gggcaggaaatcctgtggtcaaagg agcaggaaatcctgtggtcaaagga	agcttcctttgaccacaggatttcctgct cctttgaccacaggatttcctgccc

[0031] **3. 루시퍼라제 분석(Luciferase assays)**

[0032] 루시퍼라제 분석은 RIP3 프로모터 리포터 및 NF-κB (clontec) 시스템을 사용하여 수행하였다. 리포펙타민 2000을 이용하여 T98G 세포에 TWEAK를 처리하거나, p65, NIK, 혹은 p52를 동시 형질 감염 혹은 단독 형질 감염시켰다. 형질감염 후, 세포들을 수확하였고, luciferase assay system (Promega)을 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[0033] **<실시예 1> NF-κB에 의한 RIP3 프로모터 활성 조절 확인**

[0034] 본 발명자들은 RIP3의 프로모터에 NF-κB가 결합할 수 있는 시퀀스가 존재한다는 것을 확인하고, NF-κB에 의한 RIP3 프로모터 활성 조절을 확인하기 위하여 정규(canonical) NF-κB와 비정규(non-canonical) NF-κB에 의한 조절을 확인하고자 하였다. Clontec에서 구입한 NF-κB 루시퍼라아제는 비정규(non-canonical) NF-κB를 활성화시키는 NF-κB-inducing kinase (NIK)과 p52, 그리고 정규(canonical) NF-κB를 활성화시키는 p65에 의해 루시퍼라아제 활성화가 증가되었으나, RIP3의 프로모터에 존재하는 NF-κB 결합 사이트의 활성은 비정규(non-canonical) NF-κB 활성에 관여하는 NIK과 p52에 의해서만 증가하였다(도 1).

[0035] **<실시예 2> NF-κB 전사인자가 결합할 수 있는 사이트의 돌연변이**

[0036] 도 2a에서 볼 수 있듯이 RIP3의 프로모터에는 NF-κB 전사인자가 결합할 수 있는 3가지 사이트가 존재한다. 따라서 3개의 NF-κB 가 결합할 수 있는 사이트 중 중요한 부분을 확인하기 위하여 NF-κB1과 NF-κB2-3에 돌연변이를 만들어서 확인하였다. 그 결과 비정규(non-canonical) NF-κB를 활성화시킨다고 알려진 TWEAK 200 ng/ml을 처리하여 확인하였을 때 RIP3의 프로모터 활성화가 증가하였고, -604/RIP3 NF-κB1의 돌연변이 역시 TWEAK에 의

하여 프로모터 활성화가 증가하였다. 반면에, -604/RIP3 NF-κB2-3 돌연변이의 경우 프로모터 활성화가 유의적으로 감소하였으며, 세 가지 사이트를 모두 돌연변이 시킨 604/RIP3 NF-κB1-3 역시 TWEAK에 의한 RIP3 프로모터 활성화가 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 -604/RIP3 NF-κB2-3에 존재하는 NF-κB 사이트가 TWEAK에 의한 RIP3 프로모터 활성화에 중요하게 관여함을 확인할 수 있었다.

[0037] **<실시예 3> -604/RIP3 NF-κB2-3에 존재하는 NF-κB 전사인자가 결합할 수 있는 사이트의 돌연변이**

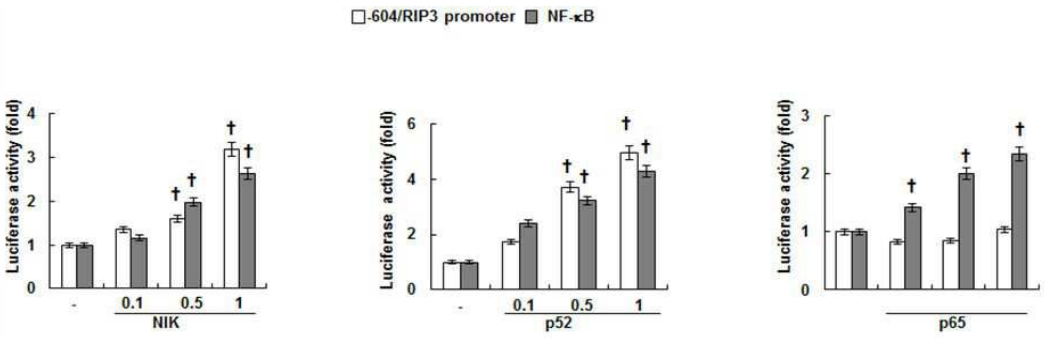
[0038] 도 3에서는 -604/RIP3 NF-κB2-3에 존재하는 NF-κB 결합 사이트 중 중요한 시퀀스를 확인하기 위하여 point 돌연변이를 합성하여 확인하였다. -604/RIP3 NF-κB2-3은 TWEAK에 기존 결과와 동일하게 프로모터 활성화가 증가하는 것을 확인하였다. 또한 -604/RIP3 NF-κB2 돌연변이와 -604/RIP3 NF-κB3a의 돌연변이 역시 TWEAK에 의하여 -604/RIP3 NF-κB2-3에서 증가한 프로모터 활성화만큼 활성화가 증가하는 반면, -604/RIP3 NF-κBb의 경우 TWEAK에 의한 프로모터 활성화가 덜 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 비정규(non-canonical NF-κB)에 의한 RIP3 프로모터 활성화는 3번째 존재하는 NF-κB 결합 사이트의 4번째 'A'가 가장 중요한 역할을 한다.

[0039] **<실시예 4> -604/RIP3 NF-κB2-3의 프로모터 활성화가 비정규(non-canonical) NF-κB에 의해서만 증가하는지 확인**

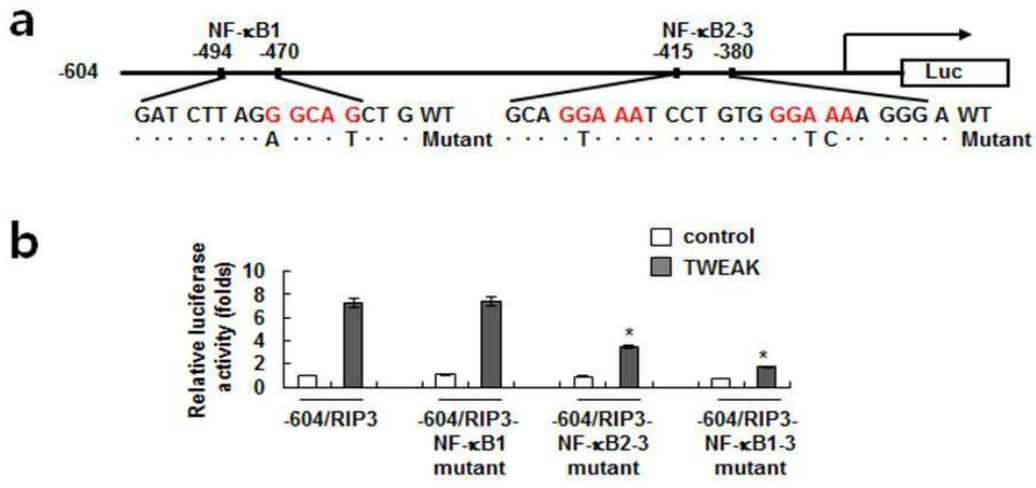
[0040] -604/RIP3 NF-κB2-3의 프로모터 활성화가 비정규(non-canonical) NF-κB에 의해서만 증가하는지를 확인하기 위하여 비정규(non-canonical) NF-κB 활성화에 중요한 p52와 NIK, 정규(canonical) NF-κB 활성화에 중요한 p65를 함께 과발현시켜 프로모터 활성화를 확인하였다. 도 4에서 보듯이, Clontec에서 구입한 NF-κB 활성화는 p52, p65, 그리고 NIK에 의해서 모두 프로모터 활성화가 증가하는 반면 -604/RIP3 NF-κB2-3 프로모터의 활성화는 p52 혹은 NIK에 의해서만 증가하고 p65에 의해서는 반응성이 없었다. 따라서 RIP3의 프로모터에 존재하는 NF-κB 결합 사이트는 비정규(non-canonical) NF-κB 신호전달체계에 의해서만 반응하는 것을 확인하였다.

도면

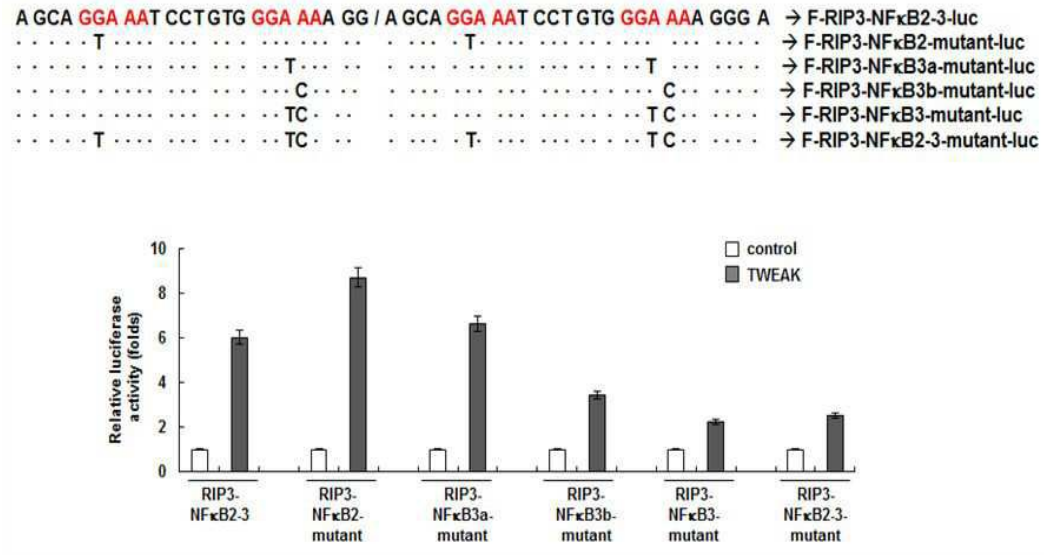
도면1



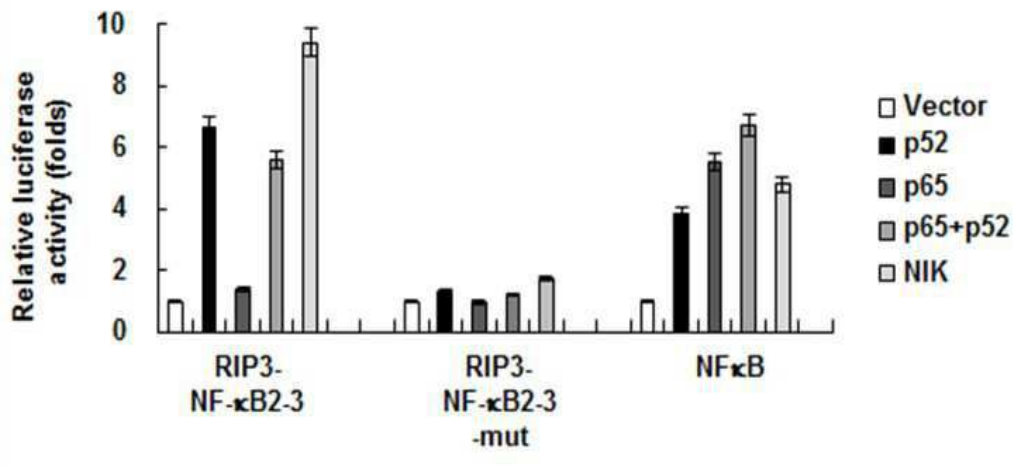
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Method for screening anticancer agents by interaction RIP3 promoter with non-canonical NF-kB factor

<130> ADP-2016-0264

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agcaggaaat cctgtgggaa aagg 24

<210> 2

<211> 724

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cagctgagtg gtacagccct gaagcctatg tgaaaacagg ataacttgat ggttcagagc 60

cattatttcc atatgggctt aggcaaggta cttaaactct cagtgtctca gtttcctcac 120

ctatagaaag gtaataaaag cagtacctat ccccttaggg ttcgtgtgag aattaaataa 180

gctaatatat atacctggtg catgataagt tttatatacg tgttggctat gatcttaggg 240

cagctgtgag agagctgagc cctagaacca taaaaccctc ctaagcacca tctccactca 300

tggcctggca ggtcgtggag caggaaatcc tgtgggaaaa gggaaggctt tgactgtagg 360

agtgggttga ttgtgggttc ctggaaggtg aggactcctt ccctaacatc ctcaatgccc 420

agcaacacct aatctggctg cggcaggtgc tcaggaaacg ctagtcaagg agaaaggcac 480

tagctttcgc tctgcccccc gccccacccc aggggcggga ctgtagaggc gcctataagg 540

gaagttgttc agtcaactcg gaaaaagggt aacaacccgg aaagtagact caccgtcttg 600

gtctagagac tgacccctgc acagacagac cccttcccct ctctgcgaaa ggaccaagcc 660

ccagaagtca ctccatctcc tacggctcgc aatttccaga ggcccccctgg caccttccag 720

cctg 724