



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월20일

(11) 등록번호 10-2101872

(24) 등록일자 2020년04월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6884 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0134955
- (22) 출원일자 2018년11월06일
심사청구일자 2018년11월06일
- (56) 선행기술조사문헌
Genomics & Informatics (2017) 15(4):156-161
PNAS (2014) 111:16219-16224
Journal of Epigenetics (2016) 11(10):730-739
Journal of Allergy and Clinical Immunology (2015) 136(6):1664-1672

- (73) 특허권자
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
오연목
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 울산의대 호
흡기내과(풍납동)
- 정인아
서울특별시 중구 을지로 245, 국립중앙의료원 호
흡기센터(을지로6가)
- 박진수
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88, 의생명연구
소(풍납동)
- (74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 폐 노화 판별용 바이오마커 조성물 및 이의 용도

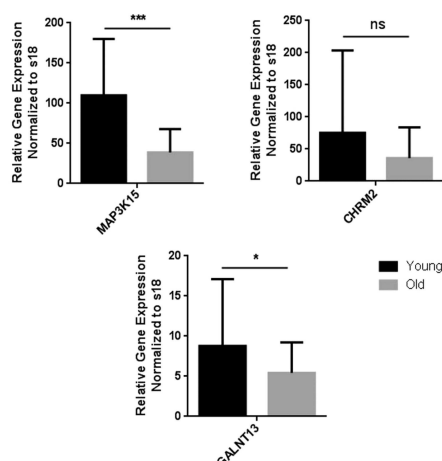
(57) 요약

본 발명은 폐 노화와 관련된 MAP3K15(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15), CHRM2(cholinergic receptor muscarinic 2) 또는 GALNT13(polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13) 유전자에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 상기 유전자들을 이용한 바이오마커 검출용 조성물, 진단키트 및 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법 등에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법, 바이오마커 검출용 조성물 또는 키트를 이용하면 폐 노화 및 노화로 인한 폐질환 발생 위험을 예측하거나 진단할 수 있어 매우 유용하다.

대표도 - 도6b

Real-time PCR



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
 G01N 2333/705 (2013.01)
 G01N 2333/91 (2013.01)
 G01N 2333/91102 (2013.01)
 G01N 2800/7042 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015K1A4A3046807
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	동북아RND허브기반구축사업
연구과제명	아산-미네소타 이식 이노베이션 센터
기 여 율	1/1
주관기관	서울아산병원
연구기간	2015.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 검출하기 위한 제제를 포함하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열, 이의 상보적 염기서열 및 이의 mRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열인 것을 특징으로 하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 염기서열은 인트론(intron)이 존재하지 않는 cDNA인 것을 특징으로 하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바이오마커는 폐 노화 개체에서 발현량이 감소되어 있는 것을 특징으로 하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물.

청구항 5

MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 바이오마커 유전자의 염기서열 또는 이의 상보적 염기서열이 기관상에 고정된, DNA 마이크로어레이 칩; 및 혼성화 용액을 포함하는 폐 노화 판별용 키트.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 키트는 바이오마커와 혼성화된 진단 개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 폐 노화 판별용 키트.

청구항 8

I) 진단 개체로부터 분리된 폐 조직 시료로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;

II) 진단 개체로부터 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 제5항 및 제7항 중 어느 한 항에 따른 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및

III) 상기 바이오마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

- I) 진단 개체로부터 분리된 폐 조직 시료로부터 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- II) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 방법은 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군에 비해 65% 이하인 경우 상기 시료는 폐 노화 시료인 것으로 결정하는 단계;를 더 포함하는 것인 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 폐 노화와 관련된 MAP3K15(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15), CHRM2(cholinergic receptor muscarinic 2) 또는 GALNT13(polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13) 유전자에 관한 것이며, 보다 구체적으로는 상기 유전자들을 이용한 진단키트 등에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 전 세계적으로 노령화가 빠르게 진행되면서, 복잡한 노화 과정에 대한 이해와 이를 지연시켜 건강한 기대 여명을 증가시키기 위한 연구가 여러 분야에서 진행되고 있다. 노화가 됨에 따라 다양한 만성 질환에 감수성이 커지는 것으로 알려져 있으며, 폐 질환 또한 예외는 아니다. 특히 만성 폐쇄성 폐질환과 특발성 폐 섬유화증, 그리고 급성 폐 손상과 같은 폐 질환은 나이 증가에 따라 증가하는 것으로 알려져 있으나 그 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.
- [0003] 특발성 폐 섬유증은 대표적인 노화와 연관된 폐질환으로써, 대부분 50세 이상에서 발생하는 것으로 알려져 있으며, 나이 증가에 따라 그 유병률도 증가하며, 가장 중요한 인구 통계학적 위험 요인으로 알려져 있다. 만성 폐쇄성 폐질환의 경우, 유병률은 60세 이상의 고령 인구에서 2 ~ 3 배 더 높다고 알려져 있으며, 전 세계적으로 인구의 점진적인 노령화가 질병의 증가에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 또한 노화는 급성 폐 질환의 결과에 영향을 미칠 수 있다. 노화에 따른 급격한 폐 기능 저하를 이해하기 위해서는 폐 노화의 분자 유전학적 기전을 알아야 할 필요가 있다. 최근 수십 년 간 노화의 병태생리에 대한 연구가 지속되고 있지만, 아직 이에 대한 이해는 충분하지 않은 상태이다.
- [0004] 결국, 이러한 폐 노화를 조절하는 유전자를 발견하고, 이 유전자들의 발현을 확인하여 폐의 노화를 진단하는 것이 가능한 바이오마커, 진단키트 등을 개발하기 위한 연구는 현재 많이 부족하다는 문제점이 있다.
- [0005] 한편, 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 미국 등록특허 제7,908,090호(특허문헌 1) 및 대한민국 공개특허 제10-2016-0078064호(특허문헌 2)가 있으며, 상기 특허문헌 1에는 신장 샘플의 노화 측정용 바이오마커에 관한 내용이 개시되어 있고, 상기 특허문헌 2에는 세포 노화 측정용 바이오마커에 관한 내용이 개시되어 있다.
- [0006] 한편, 폐의 노화를 판별하기 위한 바이오마커에 관한 내용이 개시된 선행문헌이 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) US 7908090 B

(특허문헌 0002) KR 10-2016-0078064 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자들은 정상인 환자와 비교하여, 폐 노화 환자의 시료에서는 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13의 수준이 특이적으로 감소한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명은 진단 개체로부터 얻어진 시료로부터 폐 노화에 따른 상기 유전자 발현량의 변화를 지표로 평가하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법 및 폐 노화 판별용 바이오마커 검출용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 검출하기 위한 제제를 포함하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 유전자는 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열, 이의 상보적 염기서열 또는 이의 mRNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 염기서열은 인트론(intron)이 존재하지 않는 cDNA일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바이오마커는 발현량의 감소에 의해 폐의 노화를 판별할 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한, MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 바이오마커 유전자의 염기서열 또는 이의 상보적 염기서열이 기관상에 고정된, DNA 마이크로어레이 칩; 및 혼성화 용액을 포함하는 폐 노화 판별용 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바이오마커는 용액 상에 분산된 형태로 존재하거나, 기관 상에 고정화된 마이크로어레이 형태로 존재하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 키트는 바이오마커와 혼성화된 진단 개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한, I) 진단 개체의 분리된 세포 혹은 조직으로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계; II) 진단 개체로부터 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 폐 노화 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및 III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, I) 진단 개체의 분리된 세포 혹은 조직으로부터 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 II) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 방법은 상기 발현 수준이 대조군에 비해 65% 이하인 경우 상기 시료는 폐 노화 시료인 것으로 결정하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, I) 진단 개체의 분리된 세포 혹은 조직으로부터 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 II) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함하는 노화로 인한 폐질환 발생 위험군의 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 폐질환은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 특발성 폐 섬유증일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 방법, 바이오마커 검출용 조성물 또는 키트를 이용하면 폐 노화 및 노화로 인한 폐질환 발생 위험을 예측하거나 진단할 수 있어 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1 및 도 2는 노년 환자군과 중장년 환자군 사이의 차별 발현하는 61 개의 유전자를 대상으로 계층형 군집 분석을 통해 각 샘플의 유전자별 발현 패턴의 유사성 정도를 이용하여 샘플 그룹별, 유전자별 그룹화된 정보를 시각화하여 나타낸 그림이다.

도 3은 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합별 fold change 및 p-value 기준으로 유의한 유전자의 개수를 나타내는 그래프이다.

도 4는 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합간 발현값을 산점도로 나타낸 것이다.

도 5는 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합간 발현값의 log2 fold change와 두 그룹간 평균 비교를 통해 도출된 p-value를 화산 도표(volcano plot)로 나타낸 그림(X축: log2 Fold change, Y축: $-\log_{10}$ p-value)이다.

도 6은 real-time PCR을 이용하여 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 "Old"그룹에서의 평균 유전자 발현값과 "Young" 그룹의 값을 비교한 결과를 나타내는 것이다.

도 7은 전사체 분석(transcriptome sequencing)을 이용하여 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 "Old"그룹에서의 평균 전사체 발현량과 "Young" 그룹의 값을 비교한 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 폐 노화에 관여하는 유전자를 발견하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 폐 노화에 관여하는 MAP3K15(mitogen-activated protein kinase kinase kinase 15; 미토젠-활성화 단백질 3 키나제 15), CHRM2(cholinergic receptor muscarinic 2; 콜린 수용체 무스카린 2) 및 GALNT13(polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13; 폴리펩티드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라제 13) 유전자를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0026] 본 발명은 인간 또는 인간을 제외한 포유류 또는 곤충의 폐 노화의 진행을 신속하면서 간단히 판별할 수 있는 바이오마커를 제공하려는 데 목적이 있다.

[0027] 본 발명의 일 측면은 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 검출하기 위한 재제를 포함하는, 폐 노화 판별을 위한 바이오마커 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 명세서에서, 상기 MAP3K15는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있고, 상기 CHRM2는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있으며, 상기 GALNT13은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 유전자일 수 있다.

[0029] 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 유전자, 이들의 상보적 염기서열 및 이들의 mRNA로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열은 진단 개체의 폐 노화가 진행됨에 따라 발현량이 감소한다.

[0030] 따라서, 이러한 특징을 이용하여 상기 염기서열은 진단개체와 동일 종에서의 염기서열의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 염기서열의 발현량을 비교하여 폐 노화 여부를 판별할 수 있는 바이오마커로 활용할 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 폐 노화 판별용 바이오마커란 폐 노화의 여부를 정성적으로 판별할 수 있는 바이오마커를 의미하는 것이다.

[0032] 상기 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 염기서열은 인트론이 존재하지 않는 cDNA이고, 이러한 cDNA는 게놈 DNA로부터 전사과정을 거쳐 생성된 mRNA를 이용하여 이에 상보적인 DNA로 제조된 것이다.

- [0033] 즉 상기 바이오마커를 이용하면 인간, 인간을 제외한 포유류 및 곤충의 폐 노화 여부를 판별할 수 있으므로, 이를 이용하면 진단개체의 폐 노화 여부를 판별하여 대응하는데 유용할 것으로 기대된다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 상기 바이오마커로는 상기 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 염기서열, 이들의 상보적 염기서열의 mRNA뿐만 아니라, 이로 표시되는 염기서열로 코딩되는 어느 하나 이상의 단백질일 수도 있다.
- [0035] 상기 단백질 역시, 정상 대조군(진단개체와 동일한 종의 표준 발현량)과 비교하여 단백질 양의 감소로 폐 노화 여부를 판별 및 진단할 수 있다.
- [0036] 상기 단백질을 이용한 키트는 ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay)용 키트를 포함할 수 있고, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 진단개체의 세포조직, 세포, 뇨, 혈액, 혈청 및 혈장 중에서 선택되는 생물학적 시료와 접촉시키는 단계를 통해, 항원-항체 복합체를 정량 검출할 수 있다.
- [0037] 상기 검출 결과를 진단개체에서의 표준 단백질 발현량과 비교하여 상기 진단개체의 폐 노화를 판별 및 진단할 수 있다.
- [0038] 위와 같은 분석방법을 통하여 진단개체에서의 표준 항원-항체 복합체의 형성량과 진단개체의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 상기 단백질의 유의한 발현량 증가 여부를 판단하여 폐 노화를 판별 또는 진단할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 바이오마커 및 혼성화 용액을 포함하는 폐 노화 판별용 키트에 관한 것이다.
- [0040] 상기 바이오마커는 전술한 바와 같고, 용액 상에 보관되어 있거나, 기관 상에 상기 바이오마커가 높은 밀도로 고정화되어 있을 수 있다. 다시 말해 상기 바이오마커는 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태일 수 있다. 상기 마이크로어레이는 당업계에서 잘 알려져 있다.
- [0041] 상기 키트는 용액 상에 분산되어 있거나, 상기 기관 상에 고정된 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA를 혼성화함으로써, 동일한 서열의 mRNA 또는 cDNA가 발현되고 있는지를 확인할 수 있다.
- [0042] 따라서 상기 키트에 사용되는 바이오마커는 이의 염기서열에서 한 가닥을 떼어내는 과정이 필요하다.
- [0043] 상기 바이오마커가 기관상에 고정된 마이크로어레이 형태일 경우, 상기 기관은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에서 바이오마커가 커플링될 수 있는 임의의 기관을 말한다. 통상적으로 상기 기관은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다.
- [0044] 막에 적용 또는 고정 전에, 상기 바이오마커를 변형시켜 고정화하거나 혼성화 효율을 개선할 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와 커플링 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [0045] 이때 "혼성화"란 핵산의 2 개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자(혼성체)를 형성하는 과정을 의미하는 것이다.
- [0046] 상기 혼성화 용액은 상기 바이오마커와 진단개체로부터 추출한 mRNA 또는 cDNA가 혼성화할 수 있게 하는 완충액으로서, 당업계에 공지된 용액을 이용할 수 있다.
- [0047] 상기 키트에는 상기 바이오마커와 혼성화한 진단개체의 핵산을 검출할 수 있는 검출기를 추가로 포함할 수 있다. 상기 검출기는 스캐너, 분광광도계(spectrophotometer), 액체섬광계수기(liquid scintillation counter) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 상기 키트는 진단개체의 바이오마커의 표준 발현량과 진단 개체에서의 측정된 바이오마커 발현량을 비교하여 폐 노화 여부를 정성적으로 검출할 수 있는데, 구체적으로 상기 키트를 통해 동일 종에서의 바이오마커의 표준 발현량과 진단개체에서 측정된 바이오마커 발현량을 비교하였을 때, 상기 진단개체에서의 발현량이 감소하였다면, 상기 진단개체는 동일 종에서의 평균 폐 노화보다 노화가 더 진행된 상태임을 정확하고 신속하게 판별할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

- [0050] I) 진단 개체로부터 분리된 시료로부터 RNA를 분리 및 추출하는 단계;
- [0051] II) 진단 개체로부터 분리된 RNA 또는 이로부터 합성된 cDNA와 상기 폐 노화 판별용 키트를 접촉시켜 상기 RNA 또는 cDNA와 바이오마커를 혼성화하는 단계; 및
- [0052] III) 상기 바이오 마커와 RNA 또는 cDNA 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계;를 포함한다.
- [0053] 본 명세서에서 용어 "진단 개체로부터 분리된 시료"란 진단 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 노와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 시료로부터 RNA를 분리하는 방법은 당업계에 주지된 방법을 이용할 수 있다. 구체적으로 상기 진단개체로부터 분리된 세포를 이용하여 생체 외에서 상기 분리된 진단개체의 세포로부터 RNA를 분리하는 단계일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 cDNA는, 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 합성된 제1 가닥 cDNA를 사용할 수도 있다. 상기 제1 가닥 cDNA를 합성하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면 역전사효소, RNase 블록 리보뉴클레아제 저해제 등을 이용하여 합성할 수 있다. 역전사 효소의 예는 다양한 소스로부터 기원한 역전사 효소, 예를 들면, 조류 골수아세포증바이러스-유래역전사 효소(avian myeloblastosis virus-derived virus reverse transcriptase(AMV RTase)), 마우스 백혈병 바이러스-유래된 역전사 효소(murine leukemia virus-derived virus reverse transcriptase(MMLV RTase) 및 라우스-관련 바이러스 2 역전사효소 (Rous-associated virus 2 reverse transcriptase(RAV-2 RTase))를 포함한다.
- [0056] 바람직하게는, 상기 cDNA는 검출가능한 표지물질로 표지될 수 있다. 상기 표지물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy5 또는 Cy3 이다. 제1가닥 cDNA 합성시 프라이머의 5'-말단에 Cy5 또는 Cy3를 표지하여 합성을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 제1가닥 cDNA 합성시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 반응액에 첨가하면 합성 산물이 합성되면서 방사성이 합성 산물에 혼입되어 합성 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.
- [0057] 상기 혼성화 정도를 검출하는 단계는 모세관 전기영동, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 상기 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법은 상기 검출 결과를 해당 진단개체의 표준과 비교하여 진단개체의 노화 진행 여부를 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0059]
- [0060] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 폐 노화 판별에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0061] I) 진단 개체로부터 분리된 시료로부터 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0062] II) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함한다.
- [0063] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RTPCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 방법은 상기 발현 수준이 대조군에 비해 65% 이하인 경우, 바람직하게는 50% 이하인 경우 상기 시료는 폐 노화 시료인 것으로 결정하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 측면은 하기 단계들을 포함하는 노화로 인한 폐질환 발생 위험군의 판별에 필요한 정보를 제

공하는 방법에 관한 것이다.

[0067] I) 진단 개체로부터 분리된 시료로부터 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0068] II) 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;를 포함한다.

[0069] 상기 노화로 인한 폐질환은 만성 폐쇄성 폐질환 또는 특발성 폐 섬유증일 수 있다.

[0070] 상기 방법을 이용하면 폐 노화 및 노화로 인한 폐질환 발생 위험을 미리 예측하거나 진단할 수 있어 매우 유용하다.

[0071] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명하겠으나, 다음 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0072] 실시예

[0073] 시료 준비

[0074] 서울아산병원 조직자원센터에서 보관 중인 폐조직 중에서 노년 환자 정상 폐조직 34개, 중장년 환자군(대조군) 정상 폐조직 34개, 총 68개의 폐 조직을 분양받아 이용하였다. 상기 폐 조직은 수술적 폐 절제를 시행한 환자로부터 조직학적 진단에 사용하고 남은 폐 조직 일부의 보관 및 향후 유전자 연구에 대한 서면 동의를 구한 것이다.

[0075] 상기 폐 조직에서 RNA sequencing을 시행하여 유전자 발현 차이를 보이는 유전자를 발굴하고자 하였다.

[0076] 상기 유전자 발현의 차이의 평균이 2.0, 표준편차가 1.0이고, 발현 정도가 2배의 차이를 보이는 유전자를 유효성 차이라고 정의할 때, 1종 오류를 0.05, 검정력 80%에서 확인시 각 군당 17명의 환자의 샘플이 필요함을 수학적으로 계산해 낼 수 있다. 하지만, 추후에 흡연력 및 성별 등의 보정을 고려했을 때 17명의 2배인 각군당 34명의 sample을 확보하는 것이 바람직할 것으로 보았다.

[0077] 연구 제외 기준

[0078] 1) 수술 전 폐활량 검사에서 이상 소견을 보이는 경우

[0079] 2) 임상적으로 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 간질성 폐질환, 결핵성 파괴 폐로 진단된 환자.

[0080] 3) 흉부방사선상 기관지 확장증, 결핵에 의한 심한 폐 파괴, 폐 섬유화 소견을 보이는 대상자

[0081] 4) 폐 종양의 병기가 2기 이상인 경우

[0082] 5) 수술 1개월 이내의 현흡연자

[0083] 연구결과 분석

[0084] 노년 환자군과 중장년 환자군의 정상 폐조직으로 RNA sequencing을 통하여 연령에 따른 발현의 차이를 보이는 유전자를 발굴한 후, 이러한 노화 관련 후보 유전자와 기존의 만성 폐쇄성 폐질환(COPD) 연구에서 알려진 유전자를 합한 약 100개의 유전자에 대해 혈액을 통해 genotyping을 시행하여 검증하였다.

[0085] RNA sequencing

[0086] 먼저, 폐 조직들로부터 Total RNA를 분리하였다. 그리고, DNase를 이용하여 DNA contamination을 제거하였다. library 제작 단계로 프로파일링할 RNA 종류에 따라 kit를 선택하였다. poly-A tail이 있는 mRNA를 대상으로 연구 할 경우 mRNA purification kit를, mRNA 뿐만 아니라 non-coding RNA(lincRNA 등)를 포함한 total RNA를 대상으로 연구 할 경우 ribo-zero rRNA removal kit를 이용하여 RNA를 정제하였다. 정제된 RNA를 short read로 시퀀싱을 하기 위해 random하게 fragmentation 시켰다. 그리고, 잘게 쪼개진 RNA fragment에 대해 reverse transcription 과정을 통해 cDNA로 만들었다. 만들어진 cDNA fragment 양 쪽 끝에 서로 다른 adapter를 붙이고 이를 ligation 하였다. sequencing이 가능한 정도의 양으로 PCR 증폭 시킨 후 size selection과정을 통해 200-400 bp의 insert size를 확보하였다. Paired-end sequencing일 경우, cDNA fragment의 양쪽 말단으로부터 read의 length만큼 sequencing이 된다.

[0087] 실시예 1. 레퍼런스 기반 맵핑 및 전사체 어셈블리 결과

[0088] 상기 시퀀싱을 통해 얻어진 raw reads로부터 분석 결과의 bias를 줄이기 위해 low-quality를 가지거나 adaptor

sequence, contaminant DNA, PCR duplicates와 같은 artifacts을 제거하는 전처리 과정을 수행하였다.

[0089]

전처리 과정을 거친 reads들을 대상으로 splice를 고려하여, Bowtie2 aligner를 통해 spliced read mapping 처리가 가능한 HISAT2 프로그램을 이용하여 레퍼런스 유전자(genomic DNA reference(UCSC hg19))에 mapping한 후, aligned reads를 생성하였다. 하기 표 1은 Bowtie2 aligner를 통하여 spliced read mapping 처리가 가능한 HISAT2 프로그램으로 mapping한 통계 결과이다. 각 샘플별 processed read 개수(Trimming 후 cleaned reads 수), mapped read 개수(Reference에 mapping된 read 수)를 확인할 수 있다.

표 1

[0090]

index	Sample id	processed reads 수	mapped reads 수	unmapped reads 수
1	120030	69,749,696	65,385,457(93.74%)	4,364,239(6.26%)
2	120091	67,155,160	61,513,423(91.6%)	5,641,737(8.4%)
3	120713	70,533,100	64,149,408(90.95%)	6,383,692(9.05%)
4	121130	72,877,608	65,524,312(89.91%)	7,353,296(10.09%)
5	121314	75,598,428	72,071,983(95.34%)	3,526,445(4.66%)
6	121391	74,047,724	69,316,591(93.61%)	4,731,133(6.39%)
7	122900	70,842,814	62,672,299(88.47%)	8,170,515(11.53%)
8	123007	76,304,242	70,571,628(92.49%)	5,732,614(7.51%)
9	123104	70,087,236	64,876,926(92.57%)	5,210,310(7.43%)
10	123261	74,347,656	68,986,560(92.57%)	5,210,310(7.43%)
11	123269	70,135,794	63,480,937(90.51%)	6,654,857(9.49%)
12	124095	67,101,508	60,737,335(90.52%)	6,364,173(9.48%)
13	125013	65,828,060	59,093,824(89.75%)	6,744,236(10.25%)
14	125127	71,091,222	65,741,293(92.47%)	5,349,929(7.53%)
15	125442	77,278,092	70,669,866(91.45%)	6,608,226(8.55%)
16	125669	76,417,688	67,955,443(88.93%)	8,462,245(11.07%)
17	130220	72,484,760	65,663,280(90.59%)	6,821,480(9.41%)
18	132535	67,905,280	57,843,301(85.18%)	10,061,979(14.82%)
19	133510	74,371,900	67,157,390(90.3%)	7,214,510(9.7%)
20	133989	73,209,830	67,472,779(92.16%)	5,737,051(7.84%)
21	135118	76,862,342	69,250,869(90.1%)	7,611,473(9.9%)
22	135298	68,160,608	60,277,383(88.43%)	7,883,225(11.57%)
23	135625	72,644,174	66,783,534(91.93%)	5,860,640(8.07%)
24	135639	61,691,148	54,737,572(88.73%)	6,953,576(11.27%)
25	135701	67,115,164	61,286,431(91.32%)	5,828,733(8.68%)
26	135871	59,123,974	51,088,071(86.41%)	8,035,903(13.59%)
27	136193	85,801,250	80,886,546(94.27%)	4,914,704(5.73%)
28	143565	67,252,210	62,909,677(93.54%)	4,342,533(6.46%)
29	145394	69,773,796	65,083,195(93.28%)	4,690,601(6.72%)
30	145747	62,539,346	57,202,392(91.47%)	5,336,954(8.53%)
31	150057	72,078,932	67,581,966(93.76%)	4,496,966(6.24%)
32	150608	67,139,248	60,407,464(89.97%)	6,731,784(10.03%)
33	150646	74,548,516	69,519,198(93.25%)	5,029,318(6.75%)
34	150715	79,391,380	72,863,239(91.78%)	6,528,141(8.22%)
35	151089	71,576,368	64,691,366(90.38%)	6,885,002(9.62%)
36	151276	76,576,368	66,947,061(87.08%)	9,930,209(12.92%)
37	152273	67,025,290	60,038,546(89.58%)	6,986,744(10.42%)
38	152702	69,779,136	64,273,389(92.11%)	5,505,747(7.89%)
39	152868	71,932,306	62,742,609(87.22%)	9,189,697(12.78%)
40	153011	66,931,454	60,461,262(90.33%)	6,470,192(9.67%)
41	153780	66,614,286	62,382,203(93.65%)	4,232,083(6.35%)
42	154235	68,155,488	61,355,577(90.02%)	6,799,911(9.98%)
43	154273	73,450,142	68,677,917(93.5%)	4,772,225(6.5%)
44	154367	79,733,964	73,163,467(91.76%)	6,570,497(8.24%)
45	154659	64,901,806	58,728,530(90.49%)	6,173,276(9.51%)
46	154765	68,317,474	61,264,734(89.68%)	7,052,740(10.32%)
47	155073	72,055,768	65,615,893(91.06%)	6,439,875(8.94%)
48	155085	71,953,726	65,406,093(90.9%)	6,547,633(9.1%)

49	155214	73,156,230	67,089,984(91.71%)	6,066,246(8.29%)
50	155475	70,715,096	65,440,302(92.54%)	5,274,794(7.46%)
51	155651	71,443,746	65,163,251(91.21%)	6,280,495(8.79%)
52	155952	84,562,228	75,031,616(88.73%)	9,530,612(11.27%)
53	156021	57,859,712	53,533,004(92.52%)	4,326,708(7.48%)
54	156826	73,542,730	63,624,048(86.51%)	9,918,682(13.49%)
55	157229	78,995,124	71,988,897(91.13%)	7,006,227(8.87%)
56	157354	71,662,616	64,297,617(89.72%)	7,364,999(10.28%)
57	157380	71,767,810	67,131,500(93.54%)	4,636,310(6.46%)
58	157484	72,532,446	66,992,310(92.36%)	5,540,136(7.64%)
59	161239	65,670,520	60,351,762(91.9%)	5,318,758(8.1%)
60	161635	69,271,190	63,660,363(91.9%)	5,610,827(8.1%)
61	161872	74,636,698	61,659,254(82.61%)	12,977,444(17.39%)
62	162750	70,329,332	59,571,518(84.7%)	10,757,814(15.3%)
63	163815	75,951,858	69,068,470(90.94%)	6,883,388(9.06%)
64	164374	76,341,550	67,306,111(88.16%)	9,035,439(11.84%)
65	165192	72,524,030	66,729,753(92.01%)	5,794,277(7.99%)
66	165399	78,759,138	71,978,094(91.39%)	6,781,044(8.61%)
67	166561	66,227,214	60,542,815(91.42%)	5,684,399(8.58%)
68	168263	69,491,750	65,035,259(93.59%)	4,456,491(6.41%)

[0091] 실시예 2. 발현값 추출

[0092] 상기 레퍼런스에 기반한 aligned reads의 paired 정보를 이용하여 StringTie 프로그램을 통한 전사(transcript) 어셈블리를 진행하였다. 즉, StringTie 프로그램을 통하여 reference gene model을 사용해 기존에 알려진 transcript 또는 novel transcript, alternative splicing transcripts를 어셈블리 할 수 있다.

[0093] 또한 어셈블리 후, 해당 transcripts의 abundance 양을 within sample normalized value값으로 나타내는데 paired-end sequencing인 경우, FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)값으로 추정할 수 있다.

[0094] 각 샘플의 transcript quantification을 통해 얻은 발현량을 transcript length 및 depth of coverage를 고려한 normalization 값으로 계산하였다.

[0095] FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) 값으로 within normalization을 진행하여 유전자 발현 프로파일을 추출하였다.

[0096]

[0097] 실시예 3. 차별 발현 유전자 분석

[0098] Original Raw Data 는 StringTie -e option통해 얻은 기존의 알려진 유전자에 대한 FPKM값을 대상으로 하였다.

[0099] 그리고, 각 유전자 별, 전체 68개 샘플에서 적어도 한 샘플 이상에서 0인 FPKM 값을 나타내는 유전자는 분석에서 제외하였다. 따라서, 총 27,685개의 유전자 중에서 12,910개를 제외한 14,775개 유전자를 대상으로 통계분석을 진행하였다.

[0100] 이와 같이 데이터 전처리 및 QC 과정에서 low quality를 가지는 유전자를 필터링 후, log(FPKM +1)을 진행하여 변위치 표준화(quantile normalization)를 진행하였다.

[0101] 구체적으로는, Raw signal(FPKM)+1을 취하여 로그리듬(logarithm)를 용이하게 하고, 이 값을 log2 기반의 변형(transformation)을 진행하였다. 그 이유는 raw signal은 넓은 범위에 걸쳐 분포해 있으면서 상대적으로 낮은 signal값에 분포가 치우쳐 있기 때문에, 로그리듬을 취하면 signal값의 범위를 축소하고, 전체적으로 데이터의 분산을 고르게 하여 데이터 확인을 더 용이하게 할 수 있는 장점이 있다. 로그리듬 후, 샘플간 비교에 있어 biological meaning에 영향을 줄 수 있는 systematic bias를 줄이기 위해 샘플간 표준화(normalization)방법인 변위치 표준화(quantile normalization) 방법을 사용하여 데이터를 보정하였다. ('preprocessCore' R library 이용).

[0102] 통계분석은 각 비교조합 별 Fold Change, Independent T-test를 이용하였다. 유의한 결과는 |fc|>=2 &

Independent T-test raw p-value<0.05 조건으로 선별하였다.

[0103] 실시예 3-1. 계층형 군집(Hierarchical clustering) 분석

[0104] 계층형 군집은 통계학에서 패턴인식(pattern recognition) 방법들로 특성이 비슷한 데이터들끼리 군집화하는 방법이다.

[0105] 먼저, 상기 비교조합(Old_vs_Young)에 대해 상기 FPKM 값을 이용하여 DEG(Differentially Expressed Genes) 분석을 진행하였고, 두 그룹간 차별 발현하는 유전자를 선별하기 위하여 $|fc| \geq 2$ & Independent T-test raw p-value<0.05 조건을 만족하는 유전자 61개를 추출하였다.

[0106] 그리고, 상기 61개의 유전자 리스트에 대해 계층형 군집 분석을 통해 각 샘플별, $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 값을 사용하여 각 유전자별로 샘플별 유사성 정도를 그룹화하였고, 이에 대해 heatmap 및 dendrogram으로 시각화하여 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0107] 도 1 및 도 2는 노년 환자군과 중장년 환자군 사이의 차별 발현하는 61 개의 유전자를 대상으로 계층형 군집(distance metric = Euclidean distance, linkage method = complete linkage) 분석을 통해 각 샘플의 유전자별 발현 패턴의 유사성 정도를 이용하여 샘플 그룹별, 유전자별 그룹화된 정보를 시각화하여 나타낸 그림이다.

[0108] 실시예 3-2. 차별 발현 유전자 선별 결과

[0109] fold change 및 p-value 기준 상향 또는 하향 조절되는 유전자의 개수

[0110] 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합별 fold change 및 p-value 기준으로 유의한 유전자의 개수를 도 3에 나타내었다.

[0111] 도 3을 살펴보면, 61개의 차별 발현 유전자 중에서 중장년 환자군에 비해 노년 환자군에서 상향 조절되는 유전자가 40개이고, 하향 조절되는 유전자가 21개인 것을 확인할 수 있다.

[0112] 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 경우, 하향 조절되는 유전자 그룹에 속한다.

[0113] 두 그룹간 발현값의 산점도(scatter plot)

[0114] 도 4는 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합간 발현값을 산점도로 나타낸 것이다. 상기 산점도에서 X축은 대조군 그룹(중장년 환자군; young), Y축은 테스트 그룹(노년 환자군; old)의 조정된 값(normalized value)의 평균을 나타낸다.

[0115] 도 4를 살펴보면, 대각선으로 표시된 선을 중심으로 X축에 가깝게 표시된 붉은색 또는 주황색의 산점은 대조군 그룹(중장년 환자군)에서 상대적으로 발현값이 높게 나타난 유전자를 나타내며, Y축에 가깝게 표시된 붉은색 또는 주황색의 산점은 테스트 그룹(노년 환자군)에서 상대적으로 발현값이 높게 나타난 유전자를 나타낸 것을 확인할 수 있다. 상기 도 4를 통해, 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 경우 대각선으로 표시된 선을 중심으로 X축에 가깝게 표시되어, 노년 환자군에서 발현값이 낮게 나타나는 유전자인 것을 확인할 수 있다.

[0116] 두 그룹간 발현값의 화산 도표(Volcano Plot)

[0117] 도 5는 노년 환자군 및 중장년 환자군의 비교조합간 발현값의 $\log_2$ fold change와 두 그룹간 평균 비교를 통해 도출된 p-value를 화산 도표(volcano plot)로 나타낸 그림(X축: $\log_2$ Fold change, Y축: $-\log_{10}$ p-value)이다.

[0118] 도 5를 살펴보면, 도표에 수직으로 표시된 선을 중심으로 우측에 표시된 황색의 점은 대조군 그룹(중장년 환자군)에서 상대적으로 발현값이 높게 나타난 유전자를 나타내며, 좌측에 표시된 청색의 점은 테스트 그룹(노년 환자군)에서 상대적으로 발현값이 높게 나타난 유전자를 나타낸 것을 확인할 수 있다. 상기 도 5를 통해, 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 경우 도표에 수직으로 표시된 선을 중심으로 우측에 황색의 점으로 표시되어, 노년 환자군에서 발현값이 낮게 나타나는 유전자인 것을 확인할 수 있다.

[0119] 실시예 4. 두 그룹에서의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자 발현값 비교

[0120] 하기 표 2는 34 명의 중장년 환자군 및 34 명의 노년 환자군의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자 발현값을 상기 FPKM 값으로 계산하여 나타낸 것이다.

표 2

[0121]

중장년 환자군				노년 환자군			
샘플 ID	MAPEK15	CHRM2	GALNT13	샘플 ID	MAPEK15	CHRM2	GALNT13
120030	0.436221	1.893787	0.804875	120091	0.047188	0.118266	0.263547
121314	0.704484	2.706227	1.409673	120713	0.214375	0.288819	0.496933
121391	0.665013	0.371997	1.237862	121130	0.187426	0.178153	0.346036
123104	1.336990	0.250952	1.485333	122900	1.036020	0.178411	0.683417
123261	1.133508	0.224255	0.879205	123007	0.903485	0.607848	0.849434
123269	0.450983	0.101944	1.192910	124095	0.534816	0.076177	0.474444
125127	0.632690	0.165901	0.777046	125013	0.882984	0.029831	0.516213
125669	0.955781	0.079187	0.446735	125442	0.484209	0.400218	0.664748
135625	0.576998	0.895366	0.970238	130220	0.366587	0.138215	0.648832
135639	1.184153	0.034761	0.238063	132535	0.125611	0.196524	0.133746
135701	0.547606	0.202844	0.437874	133510	0.125431	0.384788	0.282312
135871	0.709604	1.536518	1.379140	133989	0.231487	0.246384	0.233736
143565	0.873701	0.740167	1.409643	135118	0.374036	0.461867	0.284854
145394	0.633060	0.228334	0.617261	135298	0.452457	0.202241	0.533084
145747	0.756658	0.541723	1.269986	136193	0.264735	0.313715	0.260886
150057	0.783859	0.518698	1.063950	150608	0.242561	2.598083	0.593920
151089	0.773019	0.429728	0.981955	150646	0.020521	0.951761	0.276255
152273	1.757890	0.840127	1.319220	150715	0.164027	0.254295	0.635568
153780	0.732968	0.200364	0.912284	151276	0.272933	0.454284	0.892199
154273	0.171206	0.454141	0.549593	152702	0.123973	0.012516	0.223768
154367	0.691444	1.552795	1.148454	152868	0.659842	0.479618	0.587259
154659	0.033402	0.248180	0.131796	153011	1.061124	0.192000	0.758813
155214	0.584960	0.758136	1.124414	154235	0.028062	0.249790	0.051615
155475	0.992712	1.313181	1.882558	154765	0.142271	0.099067	0.262041
155651	0.372520	0.270624	0.761498	155073	0.226248	0.093808	0.461518
155952	0.773665	1.094517	1.835991	155085	0.354385	0.115696	0.579308
156021	0.783857	0.208976	0.803410	156826	0.373351	0.063304	0.798951
157380	0.991200	1.740557	1.098726	157229	0.028729	0.148862	0.084556
157484	1.074081	0.342831	0.571911	157354	0.744238	0.292312	1.004309
161239	0.437507	0.435103	0.575156	161872	0.071507	0.073405	0.195640
161635	0.986497	0.038997	0.361049	162750	0.069799	0.487616	0.259907
163815	0.561815	1.341984	1.356018	162399	0.059628	0.171964	0.110474
164374	0.229436	0.698030	1.213516	166561	0.776413	0.479108	0.704505
165192	1.522717	1.531225	2.189927	168263	0.596611	0.401031	0.954540
mean	0.760359	0.705652	1.012861	mean	0.360208	0.336470	0.473746
sd	0.357757	0.637958	0.465892	sd	0.301827	0.438256	0.261966
p value	6.55E-06	0.008132	4.07E-07				

[0122]

상기 표 2를 살펴 보면, 노년 환자군의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 평균 발현값이 중장년 환자군에 비해 0.5 배 미만으로 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0123]

실시예 5: Real-time PCR을 통한 검증

[0124]

노년 환자 정상 폐조직 34개, 중장년 환자군(대조군) 정상 폐조직 34개의 RNA 추출을 위해 Qiagen RNA kit 프로토콜에 의해 homogenizer를 사용하여 균질하여 RNA를 추출하고 정량하였다. cDNA합성을 위하여 정량된 RNA를 각 1ug씩 넣고 cDNA 합성 kit을 사용하여 합성을 진행하였다. 합성된 cDNA를 사용하여 아래와 같은 조건으로 real-time PCR을 진행하였다.

Program	Temperature/time
pre-incubation	95°C/5min
amplification	95°C/10s
	60°C/10s
	72°C/10s
melting curve	95°C/5s
	65°C/1min
	97°C/continuous
cooling	4°C/1s

[0125]

[0126]

하기 표 3 및 도 6은 real-time PCR을 이용하여 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 "Old" 그룹에서의 평균 유전자 발현값과 "Young" 그룹의 값을 비교한 결과를 나타내는 것이다.

표 3

[0127]

Gene	Young		Old	
	average	stdev	average	stdev
GALNT13	8.78	8.20	5.43	3.73
COL17A1	69.54	96.87	143.16	289.83
CHRM3	37.87	66.69	63.78	70.95
MUC16	81.75	149.23	71.98	72.57
ACER2	8.28	10.98	8.17	4.06
CHRM2	75.51	125.89	36.18	46.86
EDA2R	41.74	76.61	53.95	40.63
MAP3K15	109.69	69.26	38.74	28.56

[0128]

상기 표 3 및 도 6을 살펴보면, 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자는 "Old" 그룹에서의 평균 유전자 발현값이 "Young" 그룹(대조군)에 비해 65% 이하인 것을 확인할 수 있다.

[0129]

실시예 6: 전사체 분석(transcriptome sequencing)을 통한 검증

[0130]

노년 환자 정상 폐조직 34개, 중장년 환자군(대조군) 정상 폐조직 34개의 RNA 추출을 위해 Qiagen RNA kit 프로토콜에 의해 homogenizer를 사용하여 균질하여 RNA를 추출하고 정량하였다. transcriptome sequencing을 분석해주는 마이크로젠의 QC를 통과한 RNA 샘플에 대해서 TruSeq RNA Access Library Prep Kit로 cDNA 라이브러리를 구성하여 Illumina HiSeq2500으로 sequencing을 진행하였다.

[0131]

하기 표 4 및 도 7은 전사체 분석(transcriptome sequencing)을 이용하여 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자의 "Old" 그룹에서의 평균 전사체 발현량과 "Young" 그룹의 값을 비교한 결과를 나타내는 것이다.

표 4

[0132]

Gene	Young		Old	
	average	stdev	average	stdev
GALNT13	1.05	0.45	0.50	0.25
COL17A1	0.60	0.45	8.70	17.76
CHRM3	0.33	0.14	0.20	0.14
MUC16	0.60	0.67	5.17	7.97
ACER2	0.87	0.17	1.26	0.52
CHRM2	0.73	0.65	0.35	0.45
EDA2R	0.12	0.05	0.41	0.18
MAP3K15	0.79	0.34	0.38	0.30

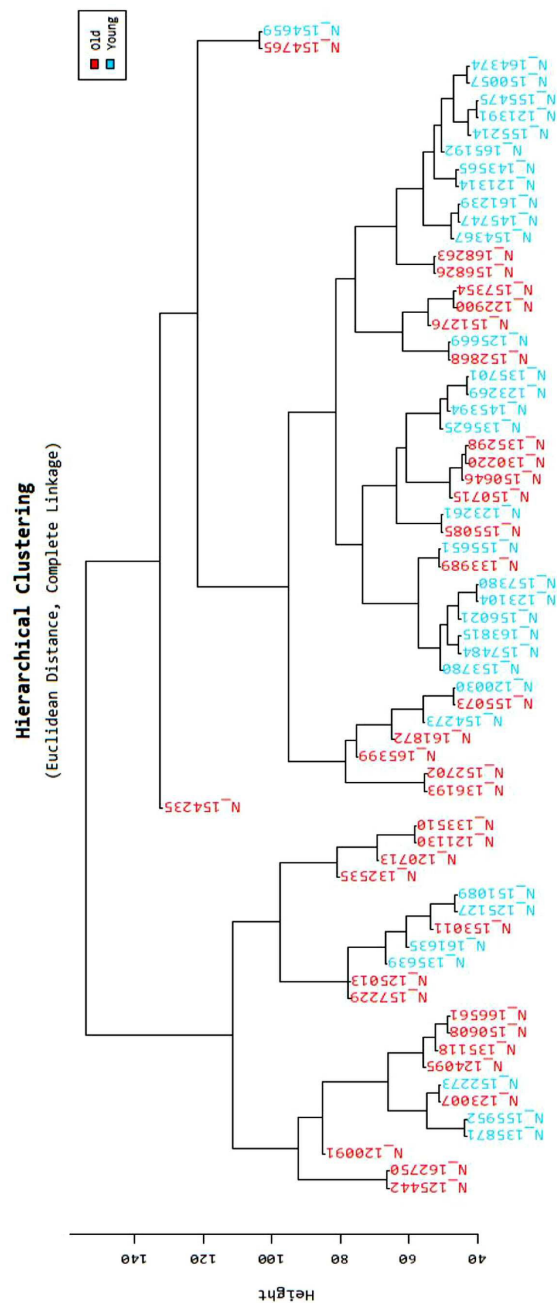
[0133]

상기 표 4 및 도 7을 살펴보면, 본 발명의 MAP3K15, CHRM2 및 GALNT13 유전자는 "Old" 그룹에서의 평균 전사체 발현량이 "Young" 그룹(대조군)에 비해 50% 이하인 것을 확인할 수 있다.

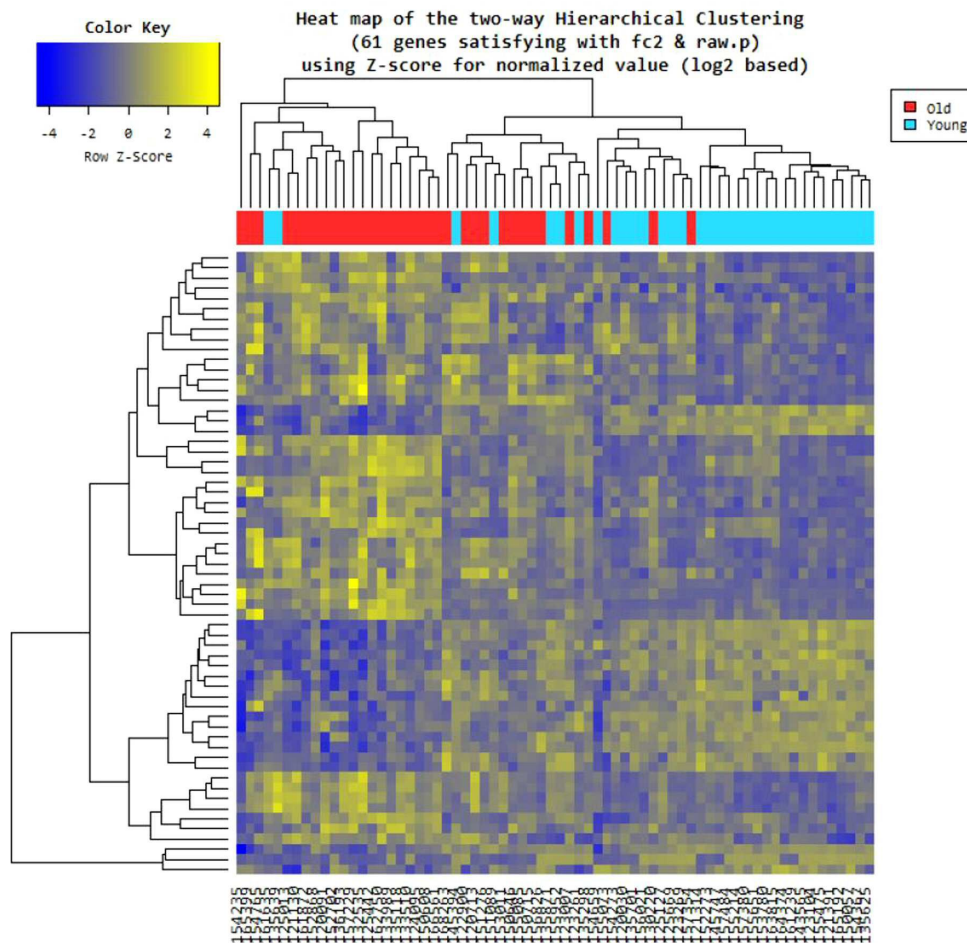
[0134] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한, 첨부된 특허청구범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

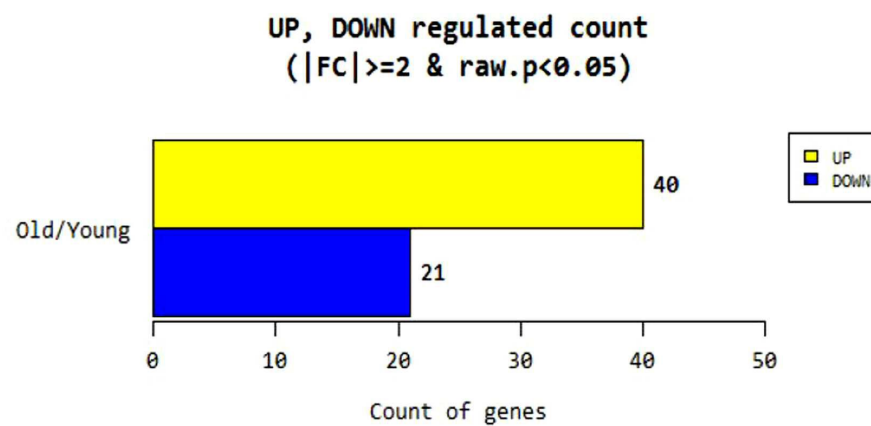
도면1



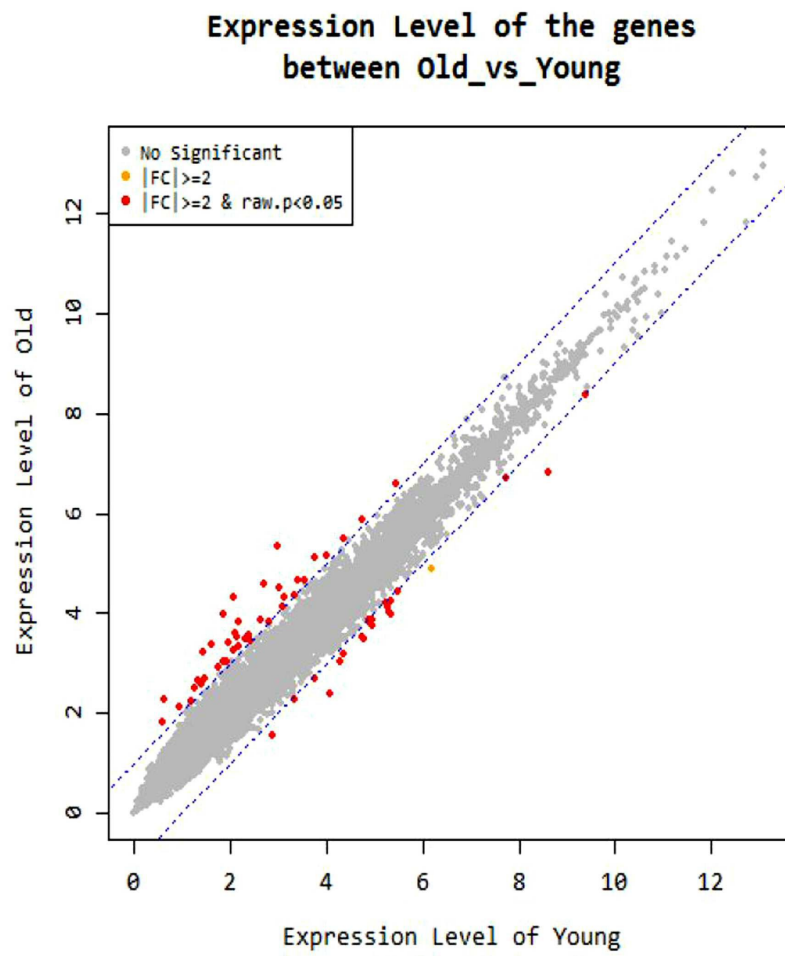
도면2



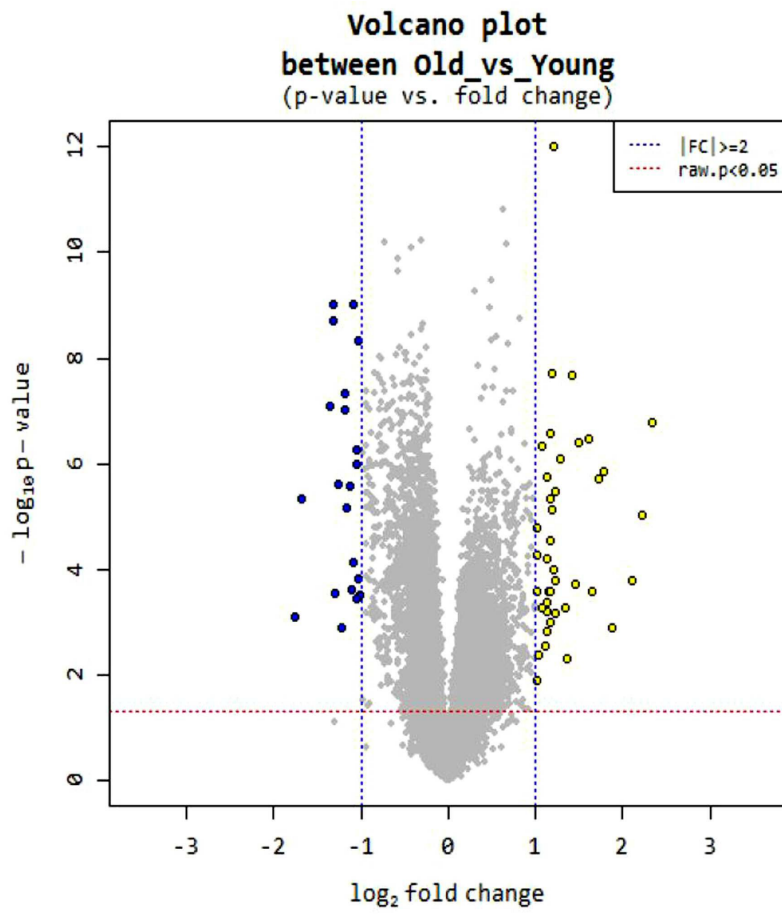
도면3



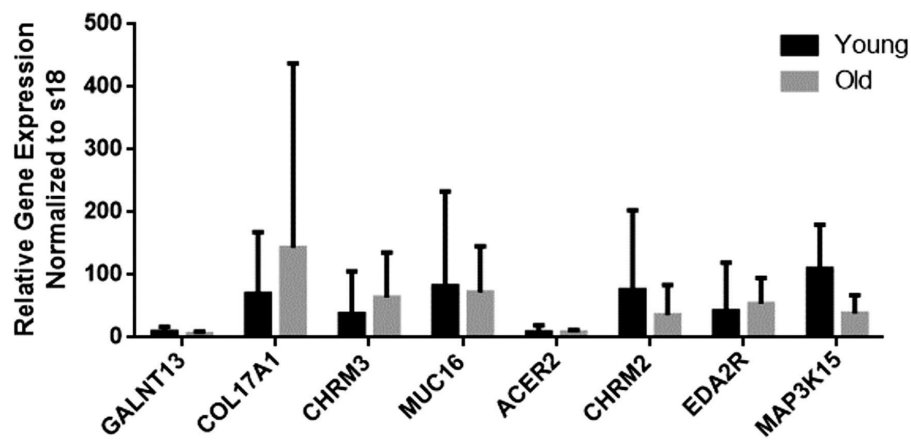
도면4



도면5

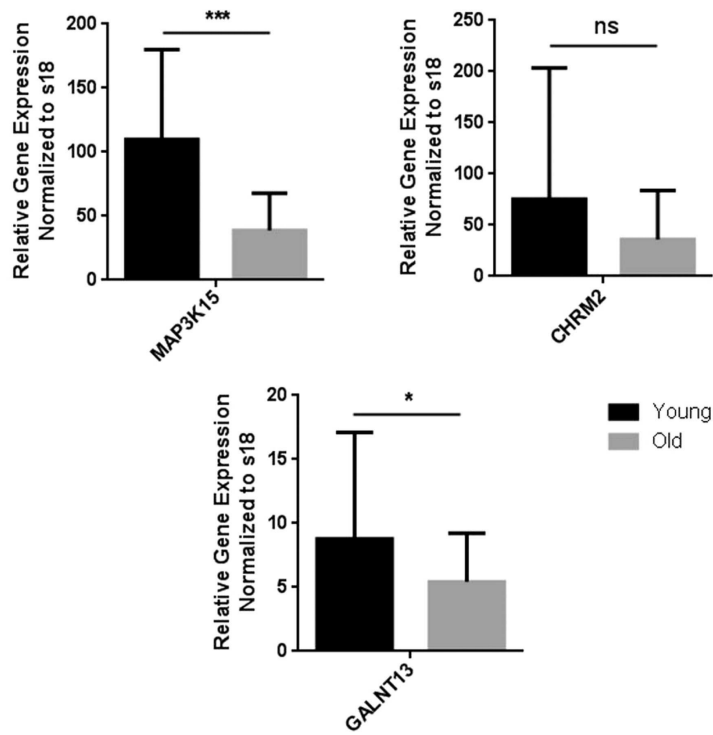


도면6a

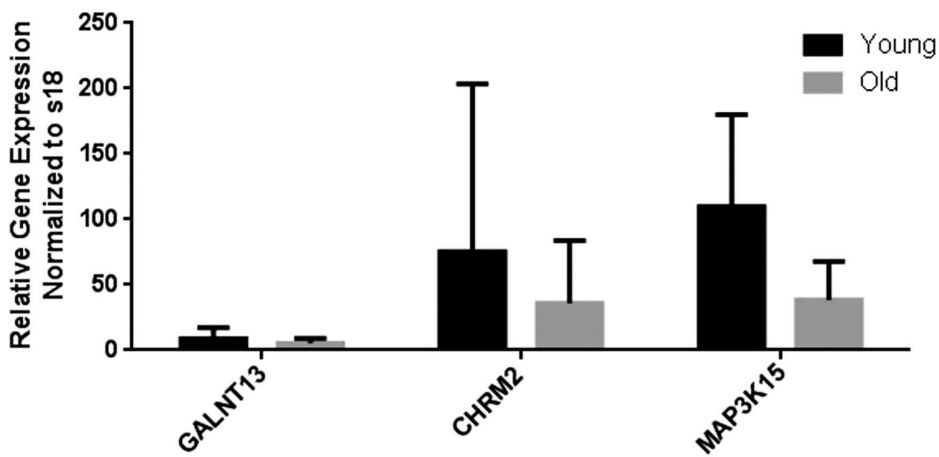


도면6b

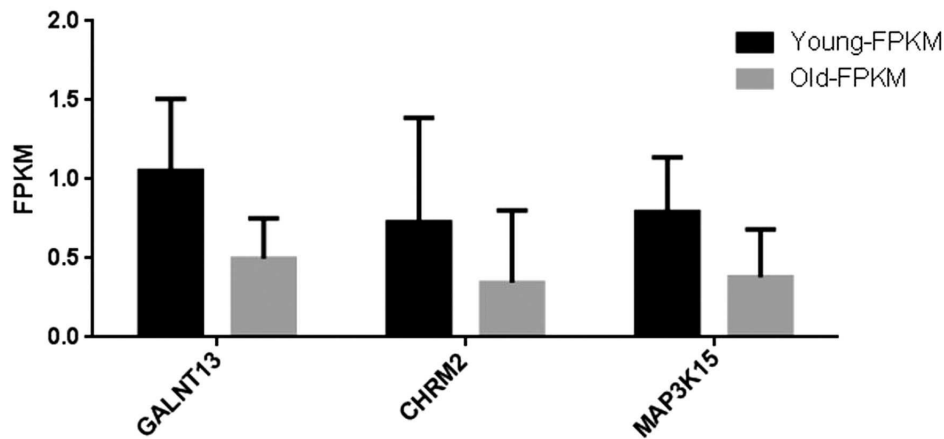
Real-time PCR



도면7a



도면7b



서열 목록

- <110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION
THE ASAN FOUNDATION
- <120> Biomarker composition for distinguishing of lung aging and
diagnosis kit using thereof
- <130> HPC-7952, PA-20180061
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 4633
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

atggagagcg gcggtgggaa tgctccggcc ggggccctcg gggcggcgag cgagtccct      60
cagtgccgc cgcgcgggg ggtggagggc gcggccgggc cggcggagcc cgacggggcg      120

gcggagggcg cggcaggcgg cagcggcgag ggcgagagtg gggcggggcc gcggcgggct      180
ctgcgggcag tatacgtgcg cagtgagagc tccagggcg gcgcggccgg cggcccggag      240
gctggggcgc ggcagtgcct gctgcgggcc tgcgaggcgg agggcgctca cctcacctcc      300
gtgcccttcg gggagctgga cttcggggag acggccgtgc tcgacgcctt ctacgacgca      360
gatgttgctg tggtagacat gagegatgtc tccagacagc cttccctctt ctaccatctt      420
ggagtccgag aaagctttga catggccaat aatgtgatct tgtaccatga caccgatgcc      480
gacactgctc tccttttgaa ggacatggta actcaaaaaa acacagcatc cagtggaaat      540

```


tattatttca tcccatatcat cgtgacaccg tgcgctgatt atttttgctg cgagagtgat	600
gcccagagac gagcctccga gtacatgcag cccaactggg acaacatcct gggcccgtg	660
tgcattgcctt tgggtggacag gttcattagc ctctttaagg acatccacgt gacctcatgt	720
gtttattaca aagaaacctt gttaaatgac atccggaaag ccagagagaa ataccaaggt	780
gaggaactgg cgaaggagct agctcggatc aagctccgca tggataatac tgaggttctg	840
acctcagaca tcatcattaa cttactcctg tcttaccgtg atatccagga ctatgatgcg	900
atggtgaagc tgggtggaac actggagatg ctgcctacgt gtgatttggc cgatcagcat	960
aacattaaat tccactatgc gtttgcactg aataggagaa acagcacagg tgacctgag	1020
aaggctctgc agatcatgct ccaggttctg cagagctgtg atcacccggg ccccgacatg	1080
ttctgcctgt gtgggaggat ctacaaggac atcttcttgg attcagactg caaagatgac	1140
accagccgag acagcgccat tgagtggat cgcaaagggt ttgaactcca gtcattccctc	1200
tattcgggaa ttaattctgc agttttgctg attgttctg gacaacaatt tgaaacttcc	1260
ttggaactaa ggaaaatagg tgtccggctg aacagtttgt tgggaagaaa agggagcttg	1320
gagaaaatga acaattactg ggatgtgggt cagttcttca gcgtcagcat gctggcccat	1380
gatgtcggga aagccgtcca ggcagcagag aggttgttca aactgaaacc tccagtctgg	1440
tacctgcgat cattagtcca gaacttgta ctaattcggc gcttcaagaa aaccattatt	1500
gaacactcgc ccaggcaaga gcggctgaac ttctggtag atataatttt tgaggcaaca	1560
aatgaagtca ctaatggact cagatttcca gttctggtca tagagccaac caaagtgtac	1620
cagccttctt atgtttccat aaacaatgaa gccgaggaga gaacagtttc tttatggcat	1680
gtctcaccca cagaaatgaa acagatgcac gaatggaatt ttacagctc ttccataaag	1740
ggaataagcc tatcaaagtt tgatgaaagg tgttgttttc tttatgtcca tgataattct	1800
gatgactttc aaatctactt ttccaccgaa gagcagtcca gtagattttt ctctttggtc	1860
aaagagatga taaccaatac agcaggcagc acggtggagc tggagggaga gaccgatgga	1920
gacaccttgg agtatgagta tgacctgat gcaaatggtg agagagttgt cttggggaaa	1980
ggcacgtatg ggatttgtta tgctggccga gatctgagca atcaagtgcg aatagccatc	2040
aaagaaatcc cggagagaga tagcaggtat tctcagctc tgcacgagga gatagccctg	2100
cacaagtacc ttaagcaccg caatatcgtt cagtacctgg gctctgttcc agagaacggc	2160
tacattaaga tatttatgga gcaggtgcct ggaggaagcc tttctgctct tctgcgatcc	2220
aaatgggggc cgaatgaagga accgacaatc aagttttaca ccaaacagat cctggagggc	2280
cttaagtatc ttcatgaaaa ccagatcgtg cacagagaca taaaggcgga taatgttctg	2340
gtgaacacct acagcggagt ggtgaaaatc tccgattttg gaacctcgaa acgtcttgcg	2400

ggtgtgaacc cctgcacaga gacttttact ggcacctgc agtacatggc acctgagata	2460
attgaccaag ggcctcgcgg atatggtgcc ccagccgata tctggtccct gggctgcacc	2520
atcattgaga tggccaccag caagcctccg ttccatgagc ttggtgagcc gcaggcagcc	2580
atgttcaaag tgggcatgtt taagatccac cctgagattc cagaagccct ttcagctgaa	2640
gccccagcct tcattttatc ctgtttcgag cctgaccccc acaaactgc caccactgct	2700
gagctactga gagagggttt cttaaggcag gtgaacaagg gcaagaagaa ccgaattgcc	2760
ttcaagccct cagaaggctc ccgcggtgtc gtcttgcccc tgccacaca gggagagccc	2820
atggccacca gcagcagcga gcacggctct gtctccccag actccgacgc ccagcctgac	2880
gcactctttg agaggaccgg ggcgcccagg caccaccttg gccacctcct cagtgttcca	2940
gacgagagct cagccttggg agaccggggc ttggcctcgt ccccgaggga cagggaccag	3000
ggcctcttcc tgctacgcaa ggacagttag cgcgtgcca tctgtacaa aatcctctgg	3060
gaggagcaga accaggtggc ttccaacctg caggagtgtg tggcccagag ttccgaagag	3120
ttgcatctct cagttggaca catcaagcaa atcattggga tctgaggga ctcatccgc	3180
tccccagagc accgggtgat ggcgaccaca atatcaaagc tcaaggtgga cctggacttt	3240
gacagctcgt ccatcagtca gattcacctg gtgctgttcg gatttcagga tgccgtaaat	3300
aaaattttga ggaaccactt aattaggccc cactggatgt tcgcgatgga caacatcatc	3360
cgccgagcgg tgcaggccgc ggtcaccatt ctcatcccag agtccgagc ccactttgag	3420
cctacctgtg agactgaagg ggtagataag gacatggatg aagcggaaga gggctatccc	3480
ccagccaccg gacctggcca ggaggcccag ccccaccagc agcacctgag cctccagctg	3540
ggtgagctca gacaggagac caacagactt ttggaacacc tagttgaaaa agagagagag	3600
taccagaatc ttctgcgcca aactctagaa cagaaaactc aagaattgta tcaccttcag	3660
ttaaaattaa aatcgaattg tattacagag aaccagcag gccctacgg gcagagaaca	3720
gataaagagc ttatagactg gttgcggctg caaggagctg atgcaaagac aattgaaaag	3780
attgttgaag agggttatac actttcggat attcttaatg agatcactaa ggaagatcta	3840
agataccttc gactacgggg tggctctctc tgcagactct ggagtgcggt ctcccagtac	3900
agaagggtc aggaggcctc agaaacaaa gacaaggctt gataccaatc agctaagctg	3960
tggcagagtg tcccaccag ctacatgttt tgttaaagct tctgttagtg tatacacgaa	4020
ttccgctgtg ttacatatt taaaaatgcc attgttcaat taatagtta agaacttgtt	4080
ttaaatactg tctgagttt cttttgaaac ctgttattta taaacataga actgtgtgta	4140
ttgtgaaaac agtgagcctt gggtttgacc tccgggaata ttaggaaatt cactttagt	4200
cccagctatg caggaggctg aggtgggagg attgcttgag ccaggaggt gtggaggctg	4260

cagtgcagcca tgatcacacc actgcactcc agcctgggca acagagcccg accctgtctc 4320

aaaaaaagta cacccttcag cacttgctgg aatggtgaaa caaacaagggt gtatttaaca 4380

aacatggaag ctgggacact gcctcagaac tggatatgga cttcaatttg agaaacacaa 4440

aactgatacg aatgtgcctt gtagttaatg tttgatatga acagaaaata gttcatatt 4500

tatactgaat gtgtaagtag agaaaactaa gttatgtggc ctttgaaatg attacaaat 4560

tggaatgatt acaaaagtct tattttaaaa tggaactgtc ctcttgccctg ataataaata 4620

ttgtatcttg tag 4633

<210> 2

<211> 2782

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

attgcagcta atcgaacaca cagcagcaga tacagacacg ctctcctgct gtactaaagg 60

cgccaggcgc caaagacctt gggagcgcgc gcgggcacac acacacacac acacacacac 120

acagacacac acacactcac acactccagg ctgcgggttg gccagagcct ggaaatcgca 180

gatttcacca ggaaatcgcc gaggtaccgc aataggtgtt gcctcccaaa actaattcct 240

acttcccaaa gcaatttggg gaagaaatga atccagccca gctcgccgag gcatccaggt 300

ctccattcta ttttggcttc caggctcttc gtgaaagcca gatcaaggga gaaagagaac 360

cggcagctgg cctcggactc taagcgggtgc gcagctccag cccgagcgga tcggccctga 420

accacaaaag gactcctcgc tccttcaagc ctccaccacc tcgcagccgg ggaggcaact 480

ggagcgaaac cagcagcagg ttgttagcga catgagtaca gggctctggat cttaccatt 540

caagagtgtg ttctcagcac ccaatgcctg gcatatagtt taaatgttta tttgctactt 600

ggctactgat tagagaacgc aaaatgaata actcaacaaa ctctctaac aatagcctgg 660

ctcttacaag tccttataag acatttgaag tgggtgttat tgtcctggtg gctggatccc 720

tcagtttggg gaccattatc gggaacatcc tagtcatggt ttccattaaa gtcaaccgcc 780

acctccagac cgtaacaat tactttttat tcagcttggc ctgtgctgac cttatcatag 840

gtgttttctc catgaacttg tacaccctct aactgtgat tggttactgg ctttgggac 900

ctgtggtgtg tgacctttgg ctagccctgg actatgtggt cagcaatgcc tcagttatga 960

atctgtcat catcagcttt gacaggtact tctgtgtcac aaaacctctg acctaccag 1020

tcaagcggac caaaaaatg gcaggtatga tgattgcagc tgccctgggtc ctctctttca 1080

tcctctgggc tccagccatt ctctctggc agttcattgt aggggtgaga actgtggagg 1140

atggggagtg ctacattcag tttttttcca atgctgctgt caccttttgt acggctattg	1200
cagccttcta ttgcccagtg atcatcatga ctgtgctata ttggcacata tcccagacca	1260
gcaagagcag gataaagaag gacaagaagg agcctgttgc caaccaagac cccgtttctc	1320
caagtcttgt acaaggaagg atagtgaagc caaacaataa caacatgccc agcagtgcag	1380
atggcctgga gcacaacaaa atccagaatg gcaaagcccc cagggatcct gtgactgaaa	1440
actgtgttca gggagaggag aaggagagct ccaatgactc cacctcagtc agtgctgttg	1500
cctctaatat gagagatgat gaaataacct aggatgaaaa cacagtttcc acttccctgg	1560
gccattccaa agatgagaac tctaagcaaa catgcatcag aattggcacc aagaccccaa	1620
aaagtgactc atgtacccca actaatacca ccgtggagggt agtggggtct tcaggtcaga	1680
atggagatga aaagcagaat attgtagccc gcaagattgt gaagatgact aagcagcctg	1740
caaaaaagaa gcctcctcct tcccgggaaa agaaagtcac caggacaatc ttggctattc	1800
tgttggcttt catcatcact tgggccccat acaatgtcat ggtgctcatt aacacctttt	1860
gtgcaccttg catcccaaac actgtgtgga caattggtta ctggctttgt tacatcaaca	1920
gcactatcaa cctgcctgc tatgcacttt gcaatgccac cttcaagaag acctttaaac	1980
accttctcat gtgtcattat aagaacatag gcgctacaag gtaaaatatc ttgaaaaag	2040
atagaagggtg ggcaagggga gcttgagaag aataaaaggg ataaacgagc tcctagtttt	2100
aaaatctctg ccattgcact ttatagtctg attacaaaac gtgcaattca ggagcccagc	2160
agtgacacac ttatcacgcc taggtccag ttgcaaaaa ttgcacctta taaactgtca	2220
gtattaggag caatgagaca atgaaagaaa catgttggga tcgtggattt aagaaactat	2280
acactgtttc tcataatctc ttgaagaagg gcttctgatt ctacaatttt atcagtcctt	2340
gcacaagagg aataaccttg ttcttttttt gttacttttg ttgttgttgt tctcatgtgt	2400
ccttaagaga aggaaatgcc acagttacaa ggtaaacatg gagacttaaa cataaagaaa	2460
taggcactat acaatgggga cataaaaaaa gaaaatcaaa gaaggatgca gaaattgtct	2520
ccggagtgtt aagcatattt tattcttttg ttacggtcct atttagagga ttggaatgta	2580
ataaatgctt attttttgcc tttctttttc ccacatgaa gagaaagcaa acaaacagaa	2640
acccaacta ggtcacacca tttttcttct tgttatgcca ctattttgta catccctgtt	2700
ctatatgttt tatagggaaa acctacagga ctttactaa agctagccag agacagccat	2760
gaaaatggac gtttcacccc tc	2782
<210> 3	
<211> 5689	
<212> DNA	

<213> Homo sapiens

<400> 3

ggggggcggg ggccggggag aagtgaccag gcggcggcgg ctctgctgag gtgacaacgt	60
gctagcagcc ctcgctcgct ctgggcgcct cctcggcctc agcgtccgct ctggccgcgc	120
tcgaggagcc cttcagcccg ccgctgcgct atgaaggccc ctctctgggg ctggccgagg	180
ctggagccgg ctccctctgc tcgcgggcaa gtgtgaagag agaggcgcgg gcgggagccg	240
gggctgcgcg cggcgcctgc gggccggcgc gggttccagg tgagcgcgga ctcggcgagc	300
cccgactcg gcgcgccgg ccggcgctg ctgggcttga tctgaggctg aatcccgtgt	360
gtggaccgcc gticcctctt cgcgggatcg ttggccagga tagcagatgc attttttag	420
aagcattttg aggatgaatg ttgcaaatc attttgaaat tgccaagtgc cacatacatg	480
gaatgtatcc tgctttcatc ttggagttca cctgtgtggc ttggatttat cacagtagca	540
tttgtcttca atctgttgt taactagaaa tcaaggaaag acatgaggag atttgtctac	600
tgcaagggtg ttctagccac ttcgtgatg tgggttcttg ttgatgtctt cttactgtg	660
tacttcagt aatgtaacaa atgtgatgac aagaaggaga gatctctgct gcctgcattg	720
agggtgttta tttaagaaa ccaagaagg ccaggagaaa tgggaaaagc tgtgttgatt	780
cctaaagatg accaggagaa aatgaaagag ctgtttaaaa tcaatcagtt taaccttatg	840
gccagtgatt tgattgccct taatagaagt ctgccagatg taagattaga aggatgtaag	900
acaaaagtct accctgatga acttccaaac acaagtgtag tcattgtgtt tcataatgaa	960
gcttggagca ctctccttag aactgtttac agtgtgataa atcgttcccc acactatcta	1020
ctctcagagg tcactttggt agatgatgcc agtgaaagag attttctcaa gttgacatta	1080
gagaattacg tgaaaaattt agaagtgcc gtaaaaatta ttaggatgga agaacgctct	1140
gggttaatac gtcccctct tcgaggagca gctgcttcaa aagggcaggt cataactttt	1200
cttgatgcac actgtgaatg cacgttagga tggctggagc ctttgctggc aagaataaag	1260
gaagacagga aaacggttgt ctgccctatc attgatgtga ttagtgatga tacttttgaa	1320
tatatggctg ggtcagacat gacttatggg ggttttaact ggaaactgaa tttccgctgg	1380
tatcctgttc ccaaagaga aatggacagg aggaaaggag acagaacatt acctgtcagg	1440
accttacta tggtgtgtgg cctattttct attgacagaa actactttga agagatagga	1500
acttacgatg caggaatgga tatctggggt ggagagaatc ttgaaatgtc ttttaggatt	1560
tggcaatgtg gaggtctctt ggagattgtt acttgctccc atgttggtca tgttttcgg	1620
aaggcaactc catacacttt tcctgggtggc actggtcatg tcatacaaa gaacaacagg	1680

agactggcag aagtttggat ggatgaattt aaagatttct tctacatcat atccccaggt	1740
gttgtcaaag tggattatgg agatgtgtca gtcagaaaaa cactaagaga aaatctgaag	1800
tgtgaagccct tttcttggta cctagaaaac atctatccgg actcccagat cccaagacgt	1860
tattactcac ttggtgagat aagaaatgtt gaaaccaatc agtgtttaga caacatgggc	1920
cgcaaggaaa atgaaaaagt gggatatatt aactgtcatg gtatgggagg aaatcaggta	1980
ttttcttaca ctgctgacaa agaaatccga accgatgact tgtgcttgga tgtttctaga	2040
ctcaatggac ctglaatcat gttaaaatgc caccatatga gaggaatca gttatgggaa	2100
tatgatgctg agagactcac gttgcgacat gttaacagta accaatgtct cgatgaacct	2160
tctgaagaag acaaaatggt gcctacaatg caggactgta gtggaagcag atcccaacag	2220
tggctgctaa ggaacatgac cttgggcaca tgaagatcat gtcctccaag ccatgaaagt	2280
gtctacgctt ttgtttttcc attatttcaa ttgggggaaa atattaactt tgctgaattg	2340
aaagttttaa aaatcctttt agtatcttaa aacacaattg tttctaattc gtttctagaa	2400
atgtttgctt atttccttac taaaatttgt atctgatcaa agcacataag aatataaata	2460
atagcaaact actattaaac aacagaacaa ctgtgaaaac aaattgtgtt tgctttaaga	2520
aaaatcttta ttgcactcat gtcatagggt taattggagg ttattttatt tttggttgtc	2580
atggtgattg aaagagataa tgtaaatgcc ttataaaatc ttcattatga aatattatca	2640
gttgctttat aaactcactc tttttatgga tccttcatgg aaacatgttt gatttctgtg	2700
tctacaacag ggccacatat taaattactt ctgaatggtg aattcatctt acaaaatgtt	2760
ccaagttttg gacaaggaaa aacattacat tggatatga attcatggag cctttacaga	2820
agcatcacat ttaaaccaat gtgaattcaa aaaagagaag gaaacttttt aaattcaatt	2880
tagagtacat aaaaaaagaa atccgcgaag cattgagggg aacaagatga gtctaaccg	2940
cagcacttcg atcactgtga gagaactcaa agtgggttgc aatcattcct aacacaggt	3000
gaaactaaac aatcttgctc ctagagttaa tgttggatac tcaattctta accaaaatct	3060
tggctctcac aaactctacc atcccttttc tcttactct atagacagtg gcatgccatt	3120
gatgctgtac agaattgcag gtgaaaggga gaattttaga cttaatTTTT aactctattg	3180
cacttaaaga ttttagttag gttaccactg tcattttcat tttctatgtt aaagaatacc	3240
tttcagtgtc gtgtccagt atctaaaaat tttatcacca ggggaataaa ctcaatacac	3300
attcattaaa cttttgttgt aattaaactg ctatatattg tttgcatat attatggccc	3360
aaggaatata gttataatca ggctacattc acattttctt ttctcatctt aaaacccttt	3420

atgttcaaaa tacattagca gaggccatga aagtgaaaaa aaatcagatt ttgctagta	3480
agtttttata ttgacatca ttttaaatgc tcaaagagtt gccctatata tgcattgtat	3540
ccattataaa tgcactcagc agctaagaga aatttgagag gaaaagtgga agaagtgttt	3600
tctggagcag aagattccac tcttttggtc ctcactctta cttaaaaagc tcttatagaa	3660
aggattaatc attttgactg catacaaaact atgtctctga catgcacata cactgcttta	3720
taatgaaaat gaggacactt tctgatggtc agtaaaatct taaatgattt ttgccactgg	3780
tattccttcc tcttttgact ttttatttgg tacaactgtag ggaagaatct acaacctgga	3840
gcatttcagg ttgctcttt aaatatagac acccctcacc atgagctctc tgtgaatccg	3900
tgaatttcct aaaattgtaa gcaaaatgtt gaatatcagg gcattttttt tcttgaggtg	3960
ggagtatgtc actcacagca aacttggaaa gaaggctatg actccaaga ggcagtgaac	4020
cattgcctta aattaatagc agcctctcaa gtccattgag gcctcatgta aaattcccat	4080
ttttcatctt tacactcctt tctccccctc atttctctt ctccttacta aggtaaaaag	4140
accctgcaca gcattattac ttaagttgaa aaagcttcaa ctctcaagga ctcatgtata	4200
ccatatgttc cacttattgc ttgtttagtc aaaatgcatg ttatgtagaa aatggccaat	4260
ggcaaatttt tataaataca gctaccccat caaagctgaa cttgaaacgt tttagcagaa	4320
ttttaaatat gtgaaagtc atttgtgtca tggtgagaaa actaaaacta catgagtttc	4380
atgttagaaa agaattttta aacaatcttc agatggcttg aacacgtgcc attatagtat	4440
ctaacaaaaa gtggcataaa atattacaaa acatccaaca ctgaaagca atgactaaca	4500
tttaatttgt ttacaaaaat gtttattgtc ttcagtacaa aaagttaaaa ccatgattgg	4560
attcataatg cacttgtctt atcccttatt tatggagcta gactgacata ttcaaacca	4620
atctcttctg tggctcttct catctcagtt aatgcaactt caaccttcca gatgctcagg	4680
tcaaaaactg aaagttgctt ttgactctc tatttctgtt tcaactctcg tetaatccaa	4740
cagcaaatcc ccttgatgct acccttgaaa tataactaga aaagaatgac ttgccaccat	4800
atccactagg tgcactacc tetaaccttt ttaatcgcaa tatgcttatt atttagttcc	4860
ctaatttccc agtccttgtc ttgaacaatc ttttctcagt acaacagcca tagtgattct	4920
gttaaccatg aatttgattg tgcacttcc ctgctcaca tcttccaatg acttctccct	4980
ccggtggcct tcaaggtcct ttatgagtgt taccctcta cagctccaca ccaactacca	5040
cacatacata cacatgcaca cacacacaca tgcaattcta ctttttcta acaccatctc	5100
ttatctctca ttattctgcc tcttacttac cctattatgg ctccaagaa agttcctgct	5160
ttagtgtttt gttccctctg cccagagag ctccccttag tgatctcagt tcaaatatta	5220
tcttatcagt aagacaaacc cttctcccat ctgccttccc tatccctgt acctgacaat	5280

ctatgagttt gcttctttat ttctgtctat acttccccct cccagccccc aaacatgccc	5340
atcacatgcc ctagaaggta agtcccatga aggcaggggc ttgtcagtt ttgttcattt	5400
ggtatttctg gcataatat tctctaaata ttctttgaat taatgaactg aaaaatgtgt	5460
gttaaagttg ctaagtgtaa ctgtatcata ctttttttgt attttaatt ttaaaataaa	5520
ggctaataata tttagacagg atttccaaaa actttgtctt caaatTTTaa ttttcttct	5580
aatattcttc acattaaact atggactcta attttctgga taaaatatcc tgccttatgg	5640
aaatgaaata tgaaatttta ttaaaatgct gctatattaa aaaaaaaaa	5689