(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월09일
(11) 등록번호 10-0835565
(24) 등록일자 2008년05월30일

(51) Int. Cl.
C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0126012
(22) 출원일자 2006년12월12일
심사청구일자 2006년12월12일
(56) 선행기술조사문헌
XP001166059 (NCBI 검색결과, 2006.09.15)*
CAC80028 (NCBI 검색결과, 2001.11.01)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
전태훈
서울시 송파구 방이동 89 올림픽 아파트 236동 1802호
변현정
서울시 중랑구 면목6동 109-41호
(74) 대리인
양부현, 윤여강, 이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김정희

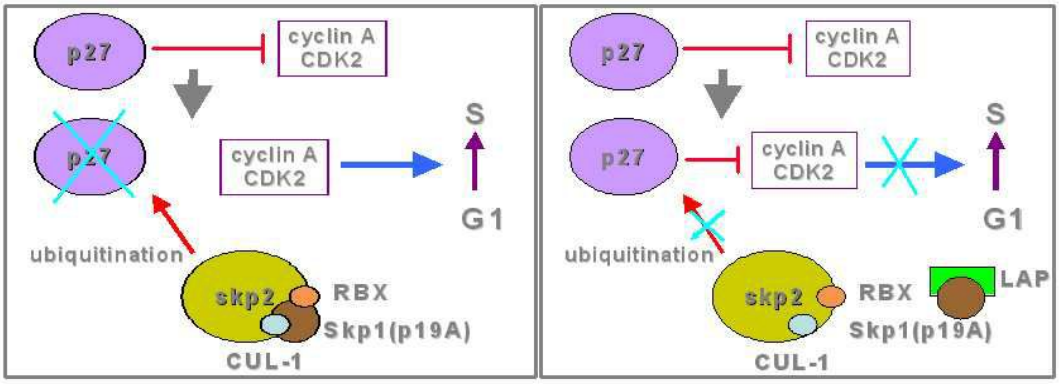
(54) LAP와 P19A를 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 LAP와 P19A를 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열은 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자 또는 그들의 발현 단백질을 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명은 LAG-3-associated protein (LAP)과 P19A (Skp1)와의 작용을 yeast two-hybrid system을 통하여 밝혔고, 형광현미경을 이용하여 발현양상을 알아보았으며, LAP과 skp1의 상호작용에 의해 P27의 증가와 세포 분열에 필수적인 Cyclin-Cdk의 감소를 통해 세포분열과 증식이 억제되는 것을 밝혔다. 따라서, LAP과 skp1의 상호작용을 이용한 T 림프구의 활성을 저해함으로서 자가면역 질환이나 장기이식과 같은 면역세포의 증식을 억제해야하는 질병 치료에 적용할 수 있다.

대표도 - 도10



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열은 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP (LAG-3-associated protein) 유전자 또는 그들의 발현 단백질을 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 P19A 유전자와 LAG 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 T 림프구 증식 억제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 삽입된 발현벡터는 도 6b의 개열지도와 도 6c의 개열지도를 각각 갖는 것을 특징으로 하는 T 림프구 증식 억제용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP 유전자를 함께 숙주세포에 과발현시키는 것을 포함하는 시험관내(in vitro) T 림프구 증식 억제 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 P19A 유전자와 LAP 유전자를 각각 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환시키는 것을 특징으로 하는 시험관내(in vitro) T 림프구 증식 억제 방법.

청구항 11

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 P19A 단백질과 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LAP 단백질을 함께 숙주세포에 투여하는 것을 포함하는 시험관내(in vitro) T 림프구의 증식 억제 방법.

청구항 12

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 LAP와 P19A를 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열은 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자 또는 그들의 발현 단백질을 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물에 관한 것이다.

<12> LAG-3는 CD4와 구조적으로 매우 유사하며 MHC class II에 binding하고, 활성화 된 NK 림프구와 conventional T cell에서 발현된다. 또한, CD4와 같이 하나의 V-type과 세 개의 C-type immunoglobulin (Ig)-like domain을 가지고 있다 (Tribel et al., 1990). LAG-3는 MHC class II에 대한 binding affinity가 상대적으로 높기 때문에 MHC class II와 T cell receptor의 상호 작용을 차단 할 수 있으며, CD3/TCR 활성 진행을 억제한다 (Iouzalen et al., 2001). 이러한 LAG-3의 negative signal은 기존에 잘 알려져 있는 immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)가 아닌 LAG-3-associated protein (LAP)와 LAG-3 intracellular region (IC)의 EP (Glu-Pro) motif와 상호작용하여 일어난다 (louzalen et al., 2001).

<13> 세포의 분열을 위해서는 세포주기를 조절하는 cyclin-Cdk 복합체와 같은 단백질이 필요하다. Cyclin-Cdk 복합체의 활성은 인산화, 탈인산화의 조절기작에 의해서 일어나는데, ubiquitination은 Cyclin을 비가역적으로 분해해 주어서 확실한 조절을 할 수 있게 한다 (Glotzer et al., 1991). ubiquitination에서 기질을 실질적으로 인식하는데 필요한 ubiquitin ligases 중에서 잘 알려져 있는 것 이 APC (Anaphase-promoting complex), SCF (Skp1(P19A)/Cullin/F-box) 단백질 (Koepp et al.,1999)이며, 이들은 Cyclin-Cdk 복합체에 결합하여 CDK 4/6/2 kinase의 활성을 저해함으로서 세포분열을 억제하는 P27 (cyclin-dependent kinase inhibitor)의 분해를 조절한다 (Amati and Vlach., 1999).

<14> LAG-3는 CD4와 구조적으로 매우 유사하며 MHC class II에 binding하고, 활성화 된 NK 림프구와 conventional T cell에서 발현된다. 또한, CD4와 같이 하나의 V-type과 세 개의 C-type immunoglobulin (Ig)-like domain을 가지고 있다 (Tribel et al., 1990). LAG-3는 MHC class II에 대한 binding affinity가 상대적으로 높기 때문에 MHC class II와 T cell receptor의 상호 작용을 차단 할 수 있으며, CD3/TCR 활성 진행을 억제한다 (Iouzalen et al., 2001). 이러한 LAG-3의 negative signal은 기존에 잘 알려져 있는 immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)가 아닌 LAG-3-associated protein (LAP)와 LAG-3 intracellular region (IC)의 EP (Glu-Pro) motif와 상호작용하여 일어난다 (louzalen et al., 2001).

<15> 세포의 분열을 위해서는 세포주기를 조절하는 cyclin-Cdk 복합체와 같은 단백질이 필요하다. Cyclin-Cdk 복합체의 활성은 인산화, 탈인산화의 조절기작에 의해서 일어나는데, ubiquitination은 Cyclin을 비가역적으로 분해해 주어서 확실한 조절을 할 수 있게 한다 (Glotzer et al., 1991). ubiquitination에서 기질을 실질적으로 인식하는데 필요한 ubiquitin ligases 중에서 잘 알려져 있는 것 이 APC (Anaphase-promoting complex), SCF (Skp1(P19A)/Cullin/F-box) 단백질 (Koepp et al.,1999)이며, 이들은 Cyclin-Cdk 복합체에 결합하여 CDK 4/6/2 kinase의 활성을 저해함으로서 세포분열을 억제하는 P27 (cyclin-dependent kinase inhibitor)의 분해를 조절한다 (Amati and Vlach., 1999).

<16> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, P19A 유전자와 LAP 유전자 또는 그들의 발현 단백질을 이용하는 경우, T 림프구의 증식을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<17> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 자가면역질환이나 장기이식과 같은 면역세포의 증식을 억제해야하는 질병 치료에 적용할 수 있는 P19A와 LAP를 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

<18> 본 발명의 다른 목적은 상기 P19A와 LAP를 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물을 이용한 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<19> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열은 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP (LAG-3-associated protein) 유전자 또는 그들

의 발현 단백질을 포함하는 T 림프구 증식 억제용 조성물을 제공한다.

<20> 본 발명의 T 림프구 증식 억제용 조성물에서, 상기 P19A 유전자와 LAP 유전자는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 어떤 염기서열도 가질 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1과 3의 염기서열을 각각 갖는 것을 특징으로 한다.

<21> 본 발명에 있어서, 세포의 분열을 위해서는 세포주기를 조절하는 cyclin-Cdk 복합체와 같은 단백질이 필요하다. Cyclin-Cdk 복합체의 활성은 인산화, 탈인산화의 조절기작에 의해서 일어나는데, ubiquitination은 Cyclin을 비가역적으로 분해해주어서 확실한 조절을 할 수 있게 한다. ubiquitination에서 기질을 실질적으로 인식하는데 필요한 ubiquitin ligases중에서 잘 알려져 있는 것이 APC (Anaphase-promoting complex), SCF (Skp1(P19A)/Cullin/F-box) 단백질이며, 이들은 Cyclin-Cdk 복합체에 결합하여 CDK 4/6/2 kinase의 활성을 저해함으로서 세포분열을 억제하는 P27 (cyclin-dependent kinase inhibitor)의 분해를 조절한다.

<22> 본 발명의 T 림프구 증식 억제용 조성물에서, 상기 P19A 유전자와 LAP 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다.

<23> 본 발명에 있어서, 상기 삽입된 발현벡터는 도 6b의 개열지도와 도 6c의 개열지도를 각각 갖는 것을 특징으로 한다.

<24> 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 상기 삽입된 발현벡터를 293GPG 세포와 같은 레트로바이러스 패키징 세포에 형질전환 시켜서 생산된 레트로바이러스 입자도 포함된다.

<25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 5 및 6의 염기서열을 가지며 P19A 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 제공한다.

<26> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 7 및 8의 염기서열을 가지며 LAP 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 제공한다.

<27> 본 발명의 다른 양태에 따르면, P19A 유전자를 포함하는 도 6b의 개열지도 를 갖는 재조합 발현벡터를 제공한다.

<28> 본 발명의 다른 양태에 따르면, LAP 유전자를 포함하는 도 6c의 개열지도를 갖는 재조합 발현벡터를 제공한다.

<29> 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 P19A 유전자와 LAP 유전자를 각각 발현시킬 수 있는 복제가능한 어떤 발현벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 상기 재조합 벡터는 각각 도 6b와 도 6c의 개열지도를 갖는 P19A/pLNCX2와 LAP/pLNCX2인 것을 특징으로 한다.

<30> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 P19A와 LAP 유전자는 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 발현벡터들은 상기 P19A와 LAP 유전자를 동물세포에서 발현할 수 있는 어떤 발현벡터도 가능하나, 예컨대 pJM17 (Microbix 사 제품, 캐나다) 같은 아데노바이러스 벡터 또는 pLNCX2 (CLONTECH)와 같은 레트로바이러스 벡터 또는 pAAVCMV와 같은 아데노부속바이러스 벡터가 바람직하며, 각각 도 6b와 도 6c의 개열지도를 갖는 레트로바이러스 발현벡터 P19A/pLNCX2와 LAP/pLNCX2인 것을 특징으로 하는 것이 더욱 바람직하다. 또한, 상기 발현벡터들은 상기 발현벡터를 패키징 세포에서 증식하여 얻은 레트로바이러스 클론의 형태일 수도 있다.

<31> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

<32> 본 발명에 있어서, 상기 재조합 벡터는 당업자에게 잘 알려진 레트로바이러스 트랜스펙션 등의 방법을 이용하여 숙주세포에 형질도입될 수 있다. 상기 숙주세포는 상업적으로 이용할 수 있는 어떤 세포주도 가능하며, 예컨대 레트로바이러스 패키징 세포인 293GPG 세포 등을 포함하나 이에 국한시키지는 않는 원핵 및 진핵 세포가 될 수 있다.

<33> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 P19A 유전자와 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 갖는 LAP 유전자를 함께 숙주세포에 과발현시키는 것을 포함하는 T 림프구의 증식 억제 방법을 제공한다.

<34> 본 발명에서는, 상기 P19A와 LAP 유전자를 숙주세포에서 함께 과발현시킬 경우, P19A의 67aa-163aa (아미노산) 부분과 LAP의 1aa-98aa (아미노산)부분이 서로의 상호작용함으로써, T 림프구의 세포분열과 증식을 저해함을 밝혔다.

<35> 본 발명의 T 림프구의 증식 억제 방법에 있어서, 상기 P19A 유전자와 LAP 유전자를 각각 포함하는 재조합 발현

벡터로 형질전환시키는 것을 특징으로 한다.

<36> 본 발명의 T 림프구 증식 억제 방법은 상기 숙주세포가 P19A와 LAP 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환 되거나 P19A와 LAP 유전자의 전사를 당업계에 공지된 방법으로 up-regulate하는 방법인 것이 바람직하다.

<37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 P19A 단백질과 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 LAP 단백질을 함께 숙주세포에 투여하는 T 림프구의 증식 억제 방법을 제공한다.

<38> 본 발명의 도 10에서 보여지는 바와 같이 LAG-3에 의한 signal이 세포내에 들어오면 LAP이 skp1 (P19A)과 결합하여, skp1과 skp2의 결합을 방지하며, 따라서 p27의 ubiquitination을 방해한다는 것이 되며, 이러한 결과는 결국 cyclin A와 CDK2의 활성 억제를 하는 p27의 분해를 저해하여, 세포주기에서 S phase 진입에 필수적인 CDK2와 cyclin A의 활동을 방해함으로 S phase의 진입을 방해한다.

<39> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 T 림프구 증식 억제용 조성물을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

<40> 본 발명에 있어서, 상기 T 림프구 증식 억제용 조성물은 T 림프구의 증식을 억제를 필요로 하는 어떤 질환에도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 T 림프구의 증식 억제에 의한 자가면역질환 치료 또는 예방용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.

<41> 본 발명에서 상기 자가면역질환 치료 또는 예방용 조성물은 P19A와 LAP를 포함하며, 이러한 P19A와 LAP의 상호작용이 면역세포인 T 림프구의 세포분열에 필수적인 Cyclin-Cdk 복합체의 활성을 억제하여 T 림프구의 세포분열을 억제한다 (도 10 참조). 따라서, 본 발명의 조성물은 T 림프구의 과잉 작용으로 발생하는 자가면역질환 또는 이식거부반응에서 치료 또는 예방용으로 사용될 수 있다. 이러한 T 림프구의 활성화를 억제하여 자가면역질환 또는 이식거부반응의 치료에 적용할 수 있음이 보고되어 있다 (Vincenti FG, Luggen M. Expected online publication date for the Annual Review of Medicine Volume 58 is January 7, 2007; Tang and Blustone. Immunol Rev. 2006 Aug ;212:217-37)

<42> 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 조성물은 본 발명의 유효성분인 P19A와 LAP 유전자를 포함하는 바이러스 클론 또는 그 발현 단백질 외에 생물제제에 통상 사용되는 안정화제 및 담체, 보조 활성성분 등을 더 포함할 수 있으며, 면역활성 억제를 위해 주사제 형태로 인체에 투여될 수 있다. 이 때 환자에게 투여될 바이러스 클론 입자의 적정 수는 환자의 중한 상태에 따라 다르나 바람직하게는 체중 kg당 100 ~ 2000 MOI 정도이고, 발현 단백질의 경우는 성인 기준 일당 100 μg ~ 1000 mg 정도이다.

<43> 이하, 본 발명을 단계별로 구체적으로 설명한다.

<44> 본 발명의 P19A는 약 19 킬로달톤이며, LAP은 약 45 킬로달톤이다. 또한 본 발명은 인간 P19A와 LAP을 생성할 수 있는 발현 플라스미드 및 이를 숙주세포에 전환시킨 형질전환체를 제공한다. 본 발명에서는 다음과 같은 구성으로 숙주세포에서 P19A와 LAP을 과발현 시 세포분열 억제를 수행하였다.

<45> 1. P19A와 LAP의 yeast two-hybrid와 이를 위한 벡터 유전자 클로닝

<46> 2. RT-PCR 방법에 의한 형광발현 벡터 유전자 클로닝, 형광 현미경 사용

<47> 3. 단백질 발현 벡터 유전자 클로닝

<48> 4. 단백질 발현 후 세포분열 억제 측정

<49> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<50> 실시예 1. P19A와 LAP의 yeast two-hybrid

<51> (가) Jurkat cell (ATCC 구입 CAT.TIB-152)(인간 T 림프구)을 트리졸 (Trizol, Invitrogen) 1㎖당 200㎕의 chloroform (Sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리 하였고 추출한 2 μg의 mRNA를 주형으로 역전사 연쇄중합반응에 의해 cDNA를 복제 하였다. P19A와 LAP의 cDNA와 restriction enzyme site는 도 1과 같다 (P19A는 도 1a와 1b참조, LAP는 도 1c ~ 1e 참조). 이들 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 염기 서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄중합반응을 하여 pJG4-5 벡터와 pGILDA 벡터에 ligation(promega)하여 각각 클로닝하였다 (도 2a, b).

<52> 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII (Invitrogen)이다.

<53> 사용한 중합효소는 Taq polymerase (Gene craft)이다.

<54> 사용한 프라이머는 5개의 정방향 상용 프라이머 (Cosmo) 역방향 상용 프라이머 5개이다.

<55> 정방향 프라이머(P19A, EcoRI site 포함)

<56> 5'-CGA ATT CAT GCC TTC AAT TAA GTT G-3' (1aa-)

<57> 5'-CGA ATT CGA TGA CCC TCC TCC TCC T-3' (67aa-)

<58> 역방향 프라이머(P19A, XhoI site 포함)

<59> 5'-CCT CGA GCT TGT GGT GGG TGC ACC A-3' (-66aa)

<60> 5'-CCT CGA GTC AGG CAC AAC ATT TCA C-3' (-163aa)

<61> 정방향 프라이머(LAP, SalI site 포함)

<62> 5'-GCG TCG ACA TGA GGA AGC TAC AAA AG-3' (1aa-)

<63> 5'-GCG TCG ACG TGG AGA AGA AGG ACA AG-3' (99aa-)

<64> 5'-GCG TCG ACG GAG AAA TCG GTC ATC CT-3' (185aa-)

<65> 역방향 프라이머(LAP, SalI site 포함)

<66> 5'-GCG TCG ACC TCG GGG CTG CTC TCT AT-3' (-98aa)

<67> 5'-GCG TCG ACC TGT ATG TCT TGG TCT TC-3' (-184aa)

<68> 5'-GCG TCG ACT CAC AGC TCC GTG TCC AT-3' (-372aa)

<69> P19A와 LAP 유전자로부터 yeast two-hybrid activating 벡터인 pJG4-5 (도 2a, CLONTECH)와 binding 벡터인 pGILDA벡터 (도 2c, CLONTECH)에 클로닝하였다. 먼저, P19A는 두 부분으로 나누어 각각 5' 말단에 제한효소 EcoRI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들고 3' 말단에는 제한효소 XhoI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 또한, LAP은 세 부분으로 나누어 각각 5' 와 3' 말단에 각각 제한효소 SalI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만든 후 각각의 제한효소로 절단하고 elution (Quagen)하고 ligation (promega)하여 P19A는 pJG4-5 벡터에 LAP은 pGILDA벡터에 각각 클로닝하였다 (도 2b와 2d).

<70> (나) 상호 작용이 가능한 두 단백질인 인간 P19A와 인간 LAP을 각각의 DNA binding domain의 유전자와 activation domain의 유전자에 결합시킨 형질 전환을 위한 DNA 벡터들 (도 2b와 2d 참조, 각각의 유전자를 벡터에 넣은 그림) 및 LiAc/TE buffer를 효모 (EGY48)에 넣고 vortex를 이용하여 잘 섞은 후 30℃ 진탕 배양기에서 30분간 배양한다. 배양한 반응물에 DMSO를 넣고 42℃ 진탕 배양기에서 30분간 heat shock한다. 형질전환체를 uracil, histidine, tryptophan, leucine이 없는 선택배지 (SD/-Ura/-His/-Trp/-leu)에 도말 후 30℃ 배양기에서 3~4일간 배양하였다. 분리되었던 두 단백질의 상호작용에 의해 전사와 관련된 기능을 하게 됨으로써 효모 내에서 lacZ와 LEU2 두 개의 reporter 유전자가 발현되었다. 세포에 Z-buffer (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)를 넣은 후 잘 섞은 후 액체질소에 30초간 넣었다가 37℃로 옮겨서 세포를 깬다. 여기에 4 mg/mℓ o-nitrophenyl β-D -galactopyranoside (ONPG)와 X-gal을 섞은 후 30℃ 배양기에 배양하면서 색깔변화를 확인한다. β-galactosidase activity assay를 통해 푸른색으로 변한 결과로 lacZ 유전자가 발현 된 것을 확인할 수 있었고, leucine 유전자 발현 확인은 leucine이 없는 배지에서 형질 전환된 콜로니를 형성하는 것으로 알 수 있었다. LAP FULL과 P19A의 FULL, 67aa-163aa부분 (H4-H8,SKP2와 bind하는 부분)에서 반응하였고 (도 3a 참조), LAP FULL, 1aa-98aa과 P19A의 FULL, 67aa-163aa부분에서 반응한 것으로 보아 LAP의 1aa-98aa부분과 P19A의 67aa-163aa부분이 서로의 상호작용에 중요한 것으로 확인되었다 (도 3b 참조).

<71> 실시예 2. RT-PCR 방법에 의한 형광 벡터 유전자 클로닝, 형광 현미경 사용

<72> 실시예 1에서 얻은 cDNA를 주형으로 하고, 유전자 염기 서열에 따라 아래와 같이 프라이머를 제작한 다음 연쇄

중합반응을 하여 형광물질 발현 벡터인 pDsRed1-c1 (도 4c 참조)과 pEGFP-N3 (도 4f 참조)에 클로닝하였다.

<73> 사용한 역전사 효소는 SuperscriptIII (Invitrogen)이다.

<74> 사용한 중합효소는 Taq polymerase (Gene craft)이다.

<75> 사용한 프라이머는 2개의 정방향 상용 프라이머(Cosmo) 역방향 상용 프라이머 2개이다.

<76> 정방향 프라이머 (P19A, XhoI site 포함)

<77> 5'-CCG CTC GAG ATG CCT TCA ATT AAG TTG-3' (서열번호 5)

<78> 역방향 프라이머 (P19A, BamHI site 포함)

<79> 5'-CGG GAT CCT CAG GCA CAA CAT TTC AC-3' (서열번호 6)

<80> 정방향 프라이머 (LAP, EcoRI site 포함)

<81> 5'-CGG AAT TCA TGA GGA AGC TAC AAA AG-3' (서열번호 7)

<82> 역방향 프라이머 (LAP, BamHI site 포함)

<83> 5'-CGG GAT CCC AGC TCC GTG TCC ATT AG-3' (서열번호 8)

<84> P19A와 LAP 유전자로부터 형광을 발현시키기 위해서 먼저, P19A는 5 ' 말단에 제한효소 XhoI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들고 3' 말단에는 제한효소 BamHI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 또한, LAP은 5 ' 말단에 제한효소 EcoRI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들고 3' 말단에는 제한효소 BamHI의 절단 부위 서열을 만드는 프라이머를 합성하여 중합효소연쇄반응으로 제한효소 절단부위를 만들었다. 그 후 PCR 산물을 pGEM TA 클로닝 벡터 (Promega)에 삽입한 후 (도 4a, 4b 참조), P19A는 XhoI과 BamHI 제한효소로 pDsRed1-C1벡터 (도 4c)에 삽입하고, LAP은 EcoRI과 BamHI 제한효소로 pEGFP-N3 (도 4f)에 삽입하여 P19A/pDsRed1-C1 벡터 (도 4d)와 LAP/pEGFP-N3 벡터 (도 4g)를 각각 완성하였다 (도 4c ~ 4h 참조).

<85> 그 후 P19A와 LAP의 construct (도 4d와 4g)를 CHO cell (Chinese hamster ovary cell)에 LIPOFECTAMINE PLUS (Invitrogen)로 transfection 한 후 형광현미경으로 관찰하였다. DAPI는 모든 세포의 핵을 염색하여 대조군으로 사용하였고, P19A는 붉은색으로 보이며, LAP은 초록색으로 보였다. P19A와 LAP이 동시에 발현하였을 때, P19A는 핵에서 LAP은 핵 밖에서 동시에 발현됨으로 보아 두개의 유전자가 동시에 발현됨을 알 수 있었다 (도 5).

<86> 실시예 3. 단백질 발현 벡터 유전자 클로닝과 플라스미드 제조

<87> 실시예 2에서 pGEM TA 클로닝 벡터 (Promega)에 삽입한 P19A 및 LAP를 NOTI 제한효소를 사용하여 단백질 발현 pLNCX2 벡터 (도 6a, CLONTECH)에 클로닝하였으며, P19A와 LAP를 포함하는 재조합 발현벡터는 각각 P19A/pLNCX2와 LAP/pLNCX2이다 (도 6b와 도 6c).

<88> 293GPG 세포를 6-well 조직 배양 플레이트에 well 당 1×10^5 세포가 되도록 접종하고 10% 송아지 혈청을 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포가 24시간 후 well 표면의 70 ~ 80% 정도를 덮을 정도로 자라면, 무혈청 DMEM 배지에서 1 ~ 2 μg의 인간 P19A, LAP 발현 벡터 DNA (각각 도 6b와 6c)와 대조군 벡터를 6 ~ 8 ㎕의 LIPOFECTAMINE PLUS (Invitrogen)를 사용하여 293G 세포에 감염시켰다. 감염시킨 293GPG 세포를 24시간 배양하여 virus (Retro viurs) (각각 P19A와 LAP가 삽입된 레트로바이러스, P19A/pLNCX2, LAP/pLNCX2)를 포함하는 배양 상청액을 이용 Jurkat (T 림프구) 세포에 4 ~ 5시간 배양 후 혈청이 10% 함유된 배지로 바꿔서 24시간 배양하였으며 이 과정을 3회 반복하였다.

<89> 실시예 4. 단백질 발현 후 세포분열 억제 측정

<90> (가) 세포 증식 검사

<91> 96Well plate에서 P19A 또는 LAP을 형질도입시킨 Jurkat (T 림프구) 세포와 벡터만 있는 대조 세포를 3일간 배양 후 thymidine 1 μCi/Well을 첨가하여 12시간 후 TopCount NXT microplate scintillation과 TopCount NXT 소프트웨어를 사용하여 분석한 결과 P19A 또는 LAP 형질도입한 숙주세포의 세포증식이 감소되는 것을 알 수 있었다 (도 7).

<92> (나) Western blot을 이용한 단백질 발현 검사

<93> 대조군을 포함한 각각의 숙주세포는 세포 용해 완충용액 (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1 % TritonX-100)으로 용해시키고 Bradford protein assay (Bio-Rad)를 이용하여 단백질 양을 정량 (30 μg)하였다. 용출된 시료로 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시한 다음 PVDF nitrocellulose membrane (Bio-Rad)에 전기이동 시킨 후 anti-mouse CDK2, CyclinA, CDK4, CyclinE (Santa Cruz)와 대조군 anti-mouse β-actin (Sigma)에서 2시간 반응 후 HRP-conjugated anti-rat IgG (Amersham) 항체로 실온에서 1시간 반응하고 ECL kit (GE Healthcare)를 이용하여 X-ray film (Fuji)로 검사하여 단백질을 확인하였을 때, P19와 LAP을 발현시킨 세포에서 세포주기에 관련된 단백질 CDK2, CyclinA, CDK4, CyclinE 이 감소 되는 것을 알 수 있었다 (도 8).

<94> 또한 P19A와 LAP을 발현시킨 숙주세포에 단백질 합성 저해제인 Cycloheximide를 처리하고 시간별로 세포를 걷어 완충용액으로 용해시킨후 상기 실시예 4의 (나)와 같은 방법으로 단백질을 정량하여 anti-mouse P27에서 2시간 반응 후 HRP-conjugated anti-rat IgG 항체로 실온에서 1시간 반응하고 ECL kit (GE Healthcare)를 이용하여 X-ray film (Fuji)로 검사하여 단백질을 확인하였을 때 세포 분열 억제 작용을 하는 P27 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다 (도 9).

<95> 이러한 결과는 결국 도 10과 같이 LAG-3에 의한 signal이 세포내에 들어오면 LAP이 skp1 (p19A)과 결합하여, skp1과 skp2의 결합을 방지하며, 따라서 p27의 ubiquitination을 방해한다는 것이 되며, 이러한 결과는 결국 cyclin A와 CDK2의 활성 억제를 하는 p27의 분해를 저해하여, 세포주기에서 S phase 진입에 필수적인 CDK2와 cyclin A의 활동을 방해함으로 S phase의 진입을 방해한다.

발명의 효과

<96> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 LAG-3-associated protein (LAP)과 P19A (Skp1)의 상호작용이 T 림프구의 세포분열과 증식을 저해한다는 것을 증명하였다.

<97> 본 발명에 따르면, P19A 유전자와 LAP 유전자 또는 그 발현 단백질들을 이용하여, 면역반응시 T 림프구의 증식을 억제함으로써 자가면역질환이나 장기이식과 같은 T 림프구의 증식을 억제해야하는 질병에 효과적인 유전자 치료 방법으로 활용될 것이다.

<98> [참고문헌]

Amati B, Vlach J. 1999. Kip1 meets SKP2:new links in cell-cycle control. Nat Cell Biol 1:E91-E93

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. Science 268:863-865.

Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. J Exp Med 191:1895-1903.

Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. 1999. Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. J Immunol 163:4647-4650.

Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. 2002. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. Infect Immun 70:6302-6309.

Drozina G, Kohoutek J, Jabrane-Ferrat N, Peterlin BM. 2005. Expression of MHC II genes. Curr Top Microbiol Immunol 290:147-170.

Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. 1999. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. J Immunol 162:6410-6419.

Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW. 1991. Cyclin is degraded by the ubiqutin pathway. Nature 349:132-138

Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, Van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M. 2000. alpha-galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 97:8461-8496.

Hannier S, Tournier M, Bismuth G, Triebel F. 1998. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. J Immunol 161:4058-4065.

Harada M, Seino K, Wakao H, Sakata S, Ishizuka Y, Ito T, Kojo S, Nakayama T, Taniguchi M. 2004. Down-regulation of the invariant Valpha14 antigen receptor in NKT cells upon activation. Int Immunol 16:241-247.

Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. Nat Med 7:1052-1056.

Huard B, Tournier M, Triebel F. 1998. LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. Immunol Lett 61:109-112.

Iouzalen N, Andreae S, Hannier S, Triebel F. 2001. LAP, a lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-associated protein that binds to a repeated EP motif in the intracellular region of LAG-3, may participate in the down-regulation of the CD3/TCR activation pathway. Eur J Immunol 31(10):2885-2891.

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. 1997. CD1d-restricted and TCR-alpha mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. Science 278:1626-1629.

<99>

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M. 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95:5690-5693.

Kim S, Lee T, Jung S, Kim D. 2004. Practical synthesis of KRN7000 form phytosphingosine. Synthesis 22:84750.

Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, Yahata T, Meng H, Koda T, Nishimura S, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T. 2000. alpha-galactosylceramide induces early B-cell activation through IL-4 production by NKT cells. Cell Immunol 199:37-42.

Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. 1999. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle Cell 97:431-434

Kronenberg M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. Annu Rev Immunol 23:877-900.

Li N, Workman CJ, Martin SM, Vignali DA. 2004. Biochemical analysis of the regulatory T cell protein lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223). J Immunol 173:6806-6812.

Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11400-11406.

Schulman BA, Carrano AC, Jeffrey PD, Bowen Z, Kinnucan ER, Finnin MS, Elledge SJ, Harper JW, Pagano M, Pavletich NP. 2000. Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. Nature 408:381-386.

Takahashi M, Ogasawara K, Takeda K, Hashimoto W, Sakihara H, Kumagai K, Anzai R, Satoh M, Seki S. 1996. LPS induces NK1.1+ ab T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. J Immunol 156:2436-2442.

Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J Exp Med 171:1393-4105.

Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L.2003. Theresponse of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10913-10918.

Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DA. 2002. Phenotypic analysis of themurine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). Eur J Immunol 32:2255-2263.

Workman CJ, Vignali DA. 2003. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. Eur J Immunol 33:970-979.

Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DA. 2004. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. J Immunol 172:5450-5455.

<100>

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 P19A(Skp1) 및 LAP 유전자의 제한효소 부위를 나타낸다.

<2> 도 2는 P19A와 LAP의 Yeast two-hybrid 하기 위한 유전자 구축 모식도이다.

<3> 도 3은 P19A와 LAP의 domain을 각각 분리하여 Yeast two-hybrid 방법을 이용하여 단백질의 상호작용을 알아본 사진이다.

<4> 도 4는 P19A와 LAP의 형광발현을 위한 유전자 구축 모식도이다.

<5> 도 5는 P19A와 LAP을 형광형미경을 이용하여 발현양상을 확인한 사진이다.

<6> 도 6은 P19A와 LAP의 단백질 발현을 위한 유전자 구축 모식도이다.

<7> 도 7도은 숙주세포에 P19A와 LAP을 발현시킨 후 thymidine을 이용하여 세포의 증식을 나타낸 그래프이다.

<8> 도 8은 숙주세포에 P19A와 LAP을 발현시킨 후 세포 분열주기에 관련된 단백질 발현정도를 Western-blot을 이용하여 확인한 사진이다.

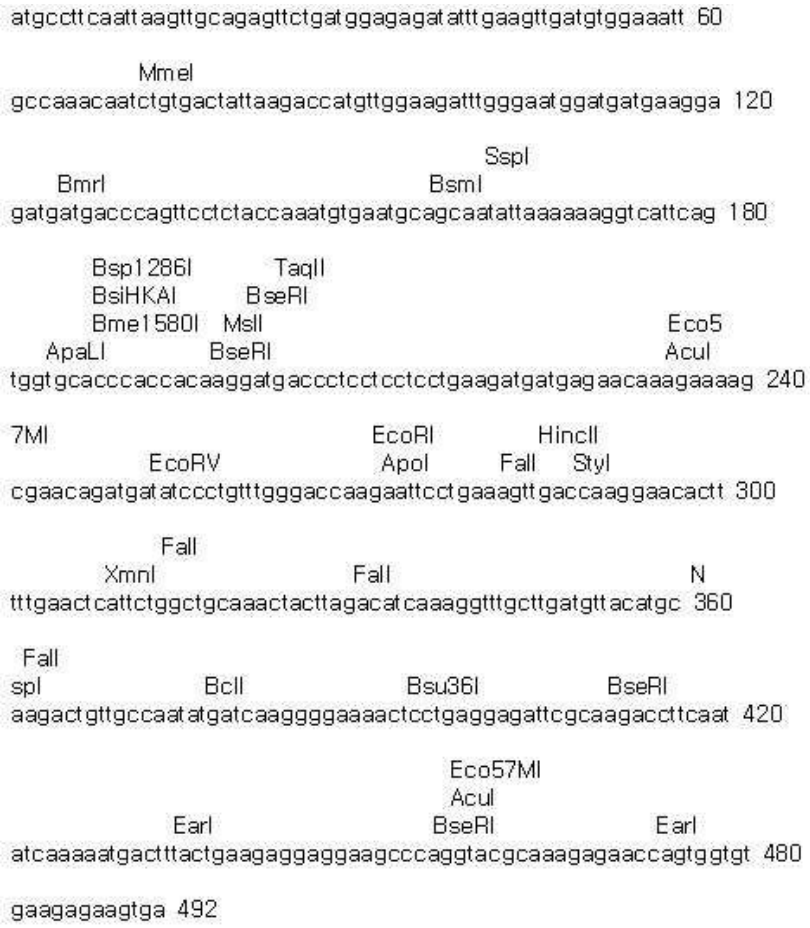
<9> 도 9는 P19A와 LAP을 발현시킨 숙주세포에 단백질 합성 저해제인 Cycloheximide를 처리한 후 Western-blot을

이용하여 세포 분열 억제 작용을 하는 P27의 발현을 확인한 사진이다.

<10> 도 10은 P19A와 LAP의 상호작용과 세포분열주기와의 연관성을 나타낸 모식도이다.

도면

도면1a

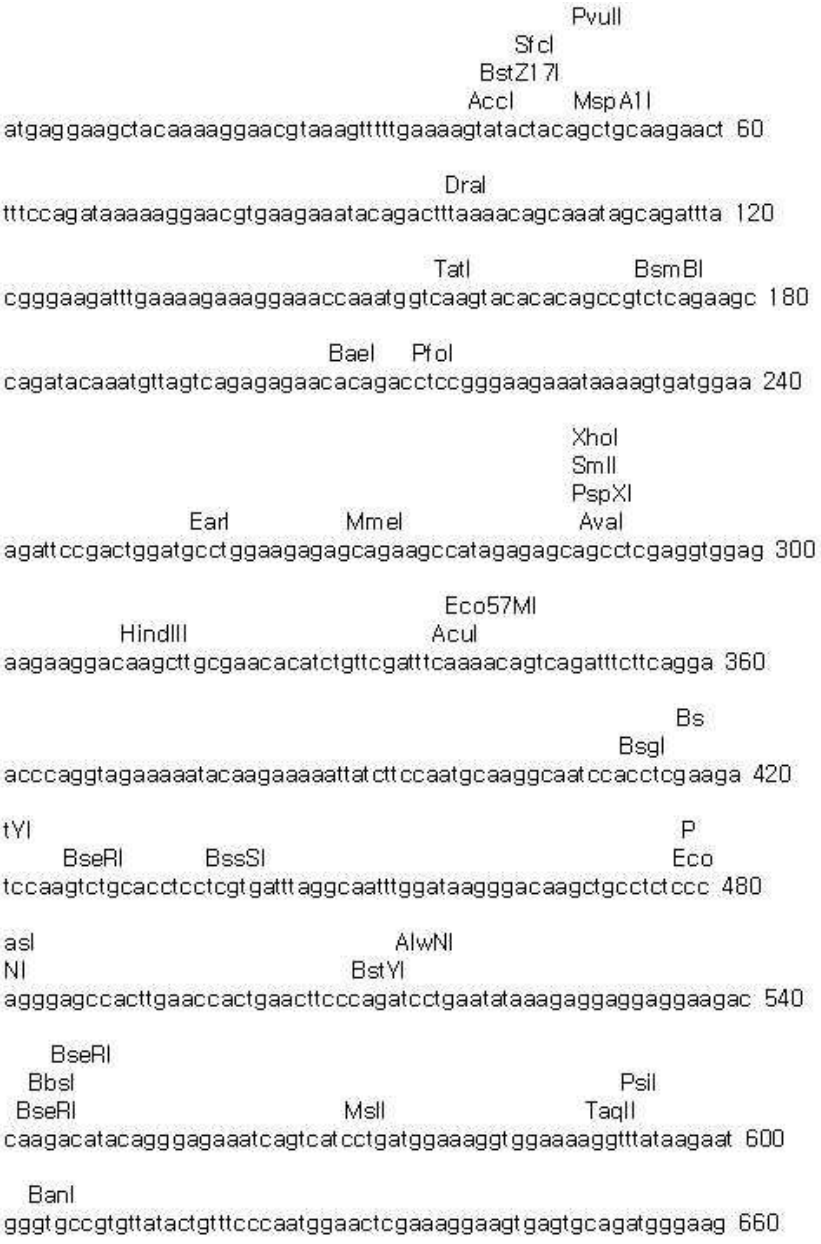


도면1b

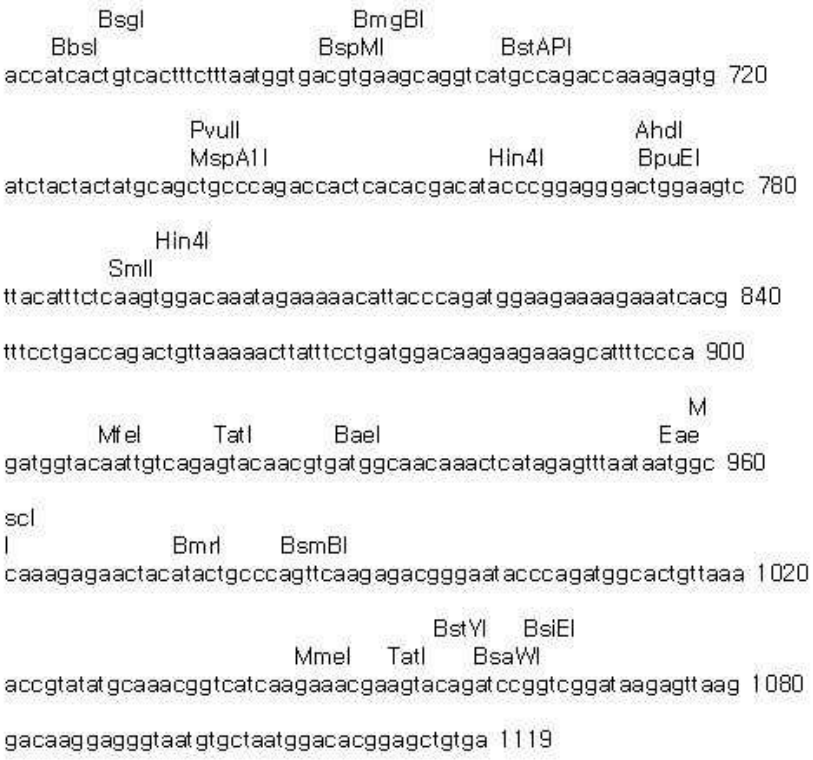
Enzyme Site Table

AcuI	2	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnn_nn/ 237 459
ApaLI	1	G/TGCAC 184
ApoI	1	r/AATTy 272
BclI	1	T/GATCA 378
Bme1580I	1	GkGCm/C 188
BmrI	1	ACTGGGnnnn_n/ 125
BseRI	4	GAGGAGnnnnnnnn_nn/ 413 458 201 198
BsiHKAI	1	GwGCw/C 188
BsmI	1	GAATG_Cn/ 157
Bsp1286I	1	GdGCh/C 188
Bsu36I	1	CC/TnAGG 396
EarI	2	CTCTTCn/nnn_ 477 435
Eco57MI	2	CTGrAGnnnnnnnnnnnnnn_nn/ 237 459
EcoRI	1	G/AATTC 272
EcoRV	1	GAT/ATC 253
FalI	4	AAGnnnnnCTTnnnnnnnn_nnnnn/ 314 362 330 282
HincII	1	GTy/rAC 286
MmeI	1	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn/ 72
MslI	1	CAynn/nnrTG 198
NspI	1	rCATG/y 360
SspI	1	AAT/ATT 162
StyI	1	C/CwwGG 289
TaqII	1	CACCCAnnnnnnnnn_nn/ 203
XmnI	1	GAAnn/nnTTC 309

도면1c


PvuII
SfcI
BstZ17I
AccI
MspA1I
atgaggaagctacaaaaggaacgtaaagtttttgaaaagtatactacagctgcaagaact 60
DraI
tttccagataaaaaggaacgtgaagaaatacagactttaaaacagcaaatagcagattta 120
TatI
BsmBI
cgggaagatttgaaaagaaaggaaaccaaatggtcaagtacacacagccgtctcagaagc 180
BaeI
PfoI
cagatacaaatgttagtcagagagaacacagacctccgggaagaaataaaagtgatggaa 240
XhoI
SmlI
PspXI
EarI
MmeI
AvaI
agattccgactggatgcctggaagagagcagaagccatagagagcagcctcgaggtggag 300
Eco57MI
HindIII
AcuI
aagaaggacaagcttgcgaacacatctgttcgatttcaaaacagtcagatttcttcagga 360
Bs
BsgI
acccaggtagaaaaatacaagaaaaattatcttccaatgcaaggcaatccacctcgaaga 420
tYI
P
BseRI
BssSI
Eco
tccaagtctgcacctcctcgtgatttaggcaatttggataagggacaagctgcctctccc 480
asI
AlwNI
NI
BstYI
agggagccacttgaaccactgaacttcccagatcctgaatataaagaggaggaggaagac 540
BseRI
BbsI
PsiI
BseRI
MslI
TaqII
caagacatacagggagaaatcagtcatcctgatggaaaggtggaaaaggtttataagaat 600
BanI
gggtgccgtgttatactgtttcccaatggaactcgaaaggaagtgagtgcagatgggaag 660

도면1d

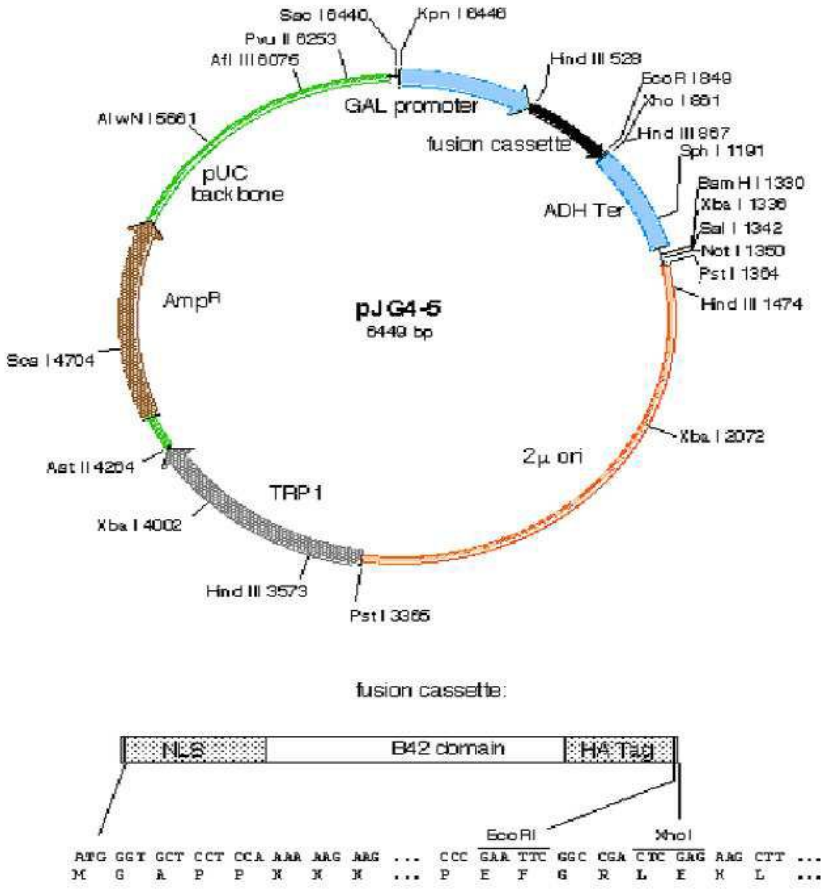

BsgI
BmgBI
BbsI
BspMI
BstAPI
accatcactgtcactttctttaatggtgacgtgaagcaggtcatgccagaccaaagagtg 720
PvuII
AhdI
MspA1I
Hin4I
BpuEI
atctactactatgcagctgcccagaccactcacacgacatacccggagggactggaagtc 780
Hin4I
SmlI
ttacatttctcaagtggacaaatagaaaaacattacccagatggaagaaaagaaatcacg 840
tttcctgaccagactgttaaaaacttatttcctgatggacaagaagaaagcattttccca 900
M
MfeI
TatI
BaeI
EaeI
gatggtacaattgtcagagtacaacgtgatggcaacaaactcatagagtttaataatggc 960
scI
I
BmrI
BsmBI
caaagagaactacatactgcccagttcaagagacgggaatacccagatggcactgttaaa 1020
BstYI
BsiEI
MmeI
TatI
BsaWI
accgtatatgcaaacggtcatcaagaaacgaagtacagatccggtcggataagagttaag 1080
gacaaggagggtaatgtgctaatggacacggagctgtga 1119

도면1e

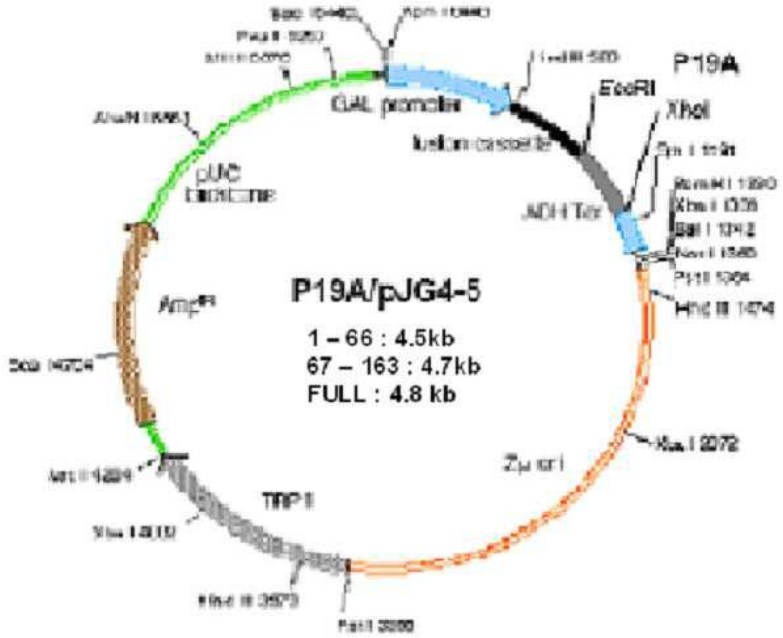
Enzyme Site Table

AccI	1	GT/mkAC	41
AcuI	1	CTGAAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn/	339
AhdI	1	GACnnn/nnGTC	776
AlwNI	1	CAGnnn/CTG	515
AvaI	1	C/yCGrG	290
BaeI	2	GrTACnnnnGTnnnnnnnnnnn_nnnnn/	209 930
BanI	1	G/GyrCC	603
BbsI	2	GAAGACnn/nnnn_	543 665
BmgBI	1	CAC/_GTC	691
BmrI	1	ACTGGGnnnnn_n/	976
BpuEI	1	CTTGAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn/	775
BsaWI	1	w/CCGGw	1061
BseRI	3	GAGGAGnnnnnnnnn_nn/	542 545 426
BsgI	2	GTGCAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn/	669 414
BsiEI	1	CGry/CG	1066
BsmBI	2	CGTCTCn/nnnn_	176 985
BspMI	1	ACCTGCnnnn/nnnn_	688
BssSI	1	C/ACGA_G	438
BstAPI	1	GCAnnnn/nTGC	703
BstYI	3	r/GATCy	419 511 1058
BstZ17I	1	GTA/TAC	42
DraI	1	TTT/AAA	99
EaeI	1	y/GGCCr	958
EarI	1	CTCTTCn/nnn_	257
Eco57MI	1	CTGrAGnnnnnnnnnnnnnnn_nn/	339
EcoNI	1	CCTnn/nnnAGG	478
Hin4I	2	GAbnnnnnnrTCnnnnnnnnn_nnnnn/	794 762
HindIII	1	A/AGCTT	311
MfeI	1	C/AATTG	909
MmeI	2	TCCrACnnnnnnnnnnnnnnnnnnn_nn/	271 1046
MscI	1	TGG/CCA	960
MslI	1	CAynn/nnrTG	570
MspA1I	2	CmG/CkG	50 737
PasI	1	CC/CwGGG	480
PfoI	1	T/CCnGGA	216
PsiI	1	TTA/TAA	594
PspXI	1	vC/TCGAGb	290
PvuII	2	CAG/CTG	50 737
SfcI	1	C/TryAG	45
SmlI	2	C/TyrAG	290 790
TaqII	1	CACCCAnnnnnnnnn_nn/	591
TatI	3	w/GTACw	158 919 1053
XhoI	1	C/TCGAG	290

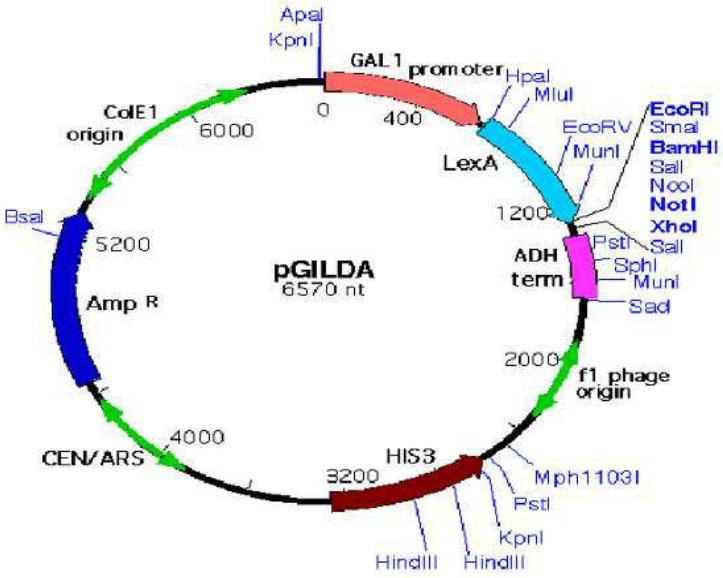
도면2a


Sac I 6440
Kpn I 6446
Pvu II 6253
Afl III 6076
Hind III 528
EcoR I 849
Xho I 861
Hind III 867
Sph I 1191
BamH I 1380
Xba I 1336
Sal I 1342
Not I 1350
Pst I 1364
Hind III 1474
AlwN I 5661
GAL promoter
fusion cassette
ADH Ter
pUC backbone
AmpR
pJG4-5
6449 bp
Sca I 4704
Xba I 2072
2μ ori
Ast II 4264
TRP1
Xba I 4002
Hind III 3573
Pst I 3365
fusion cassette:
NLS
B42 domain
HA Tag
EcoRI
XhoI
ATG GGT GCT CCT CCA AAA AAG AAG ... CCC GAA TTC GGC CGA CTC GAG AAG CTT ...
M G A P P K K K ... P E F G R L E K L ...

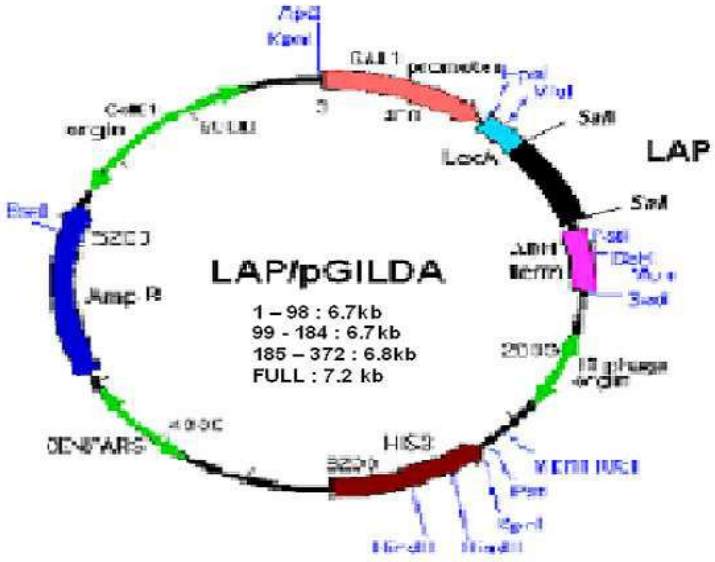
도면2b


P19A
EcoRI
XhoI
GAL promoter
pUC backbone
ADH Ter
P19A/pJG4-5
1 – 66 : 4.5kb
67 – 163 : 4.7kb
FULL : 4.8 kb
TRP1
2μ ori

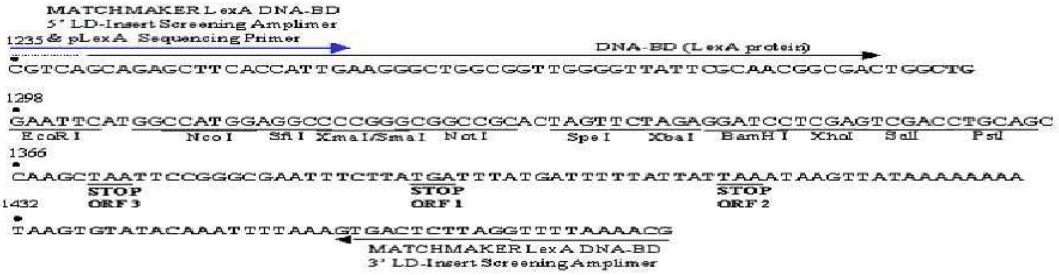
도면2c



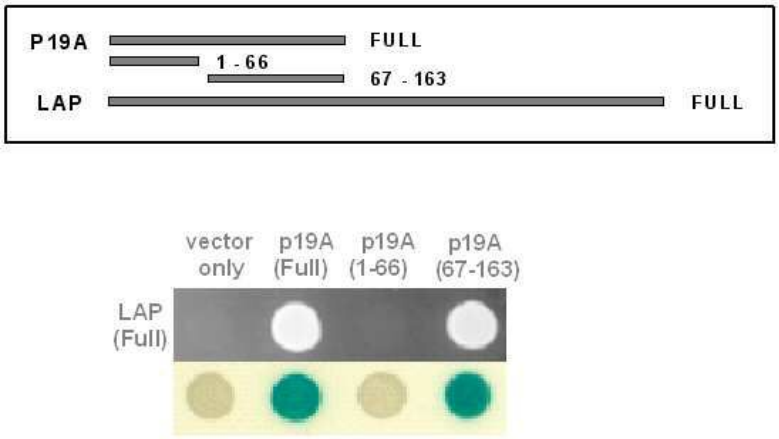
도면2d



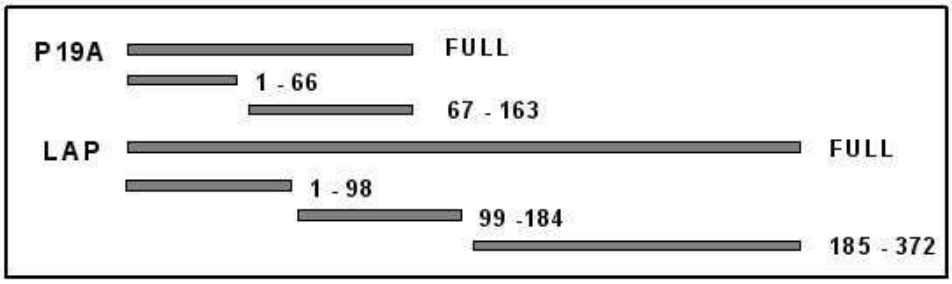
도면2e

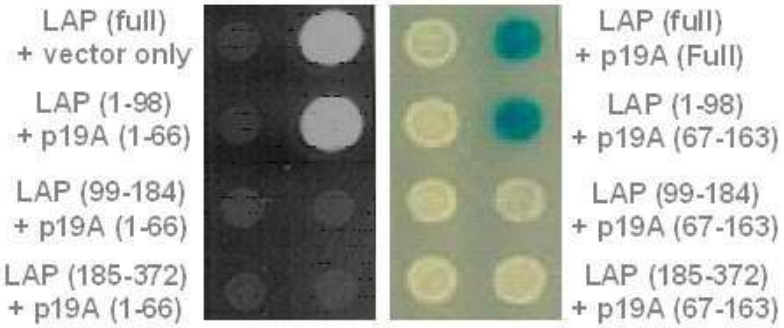


도면3a

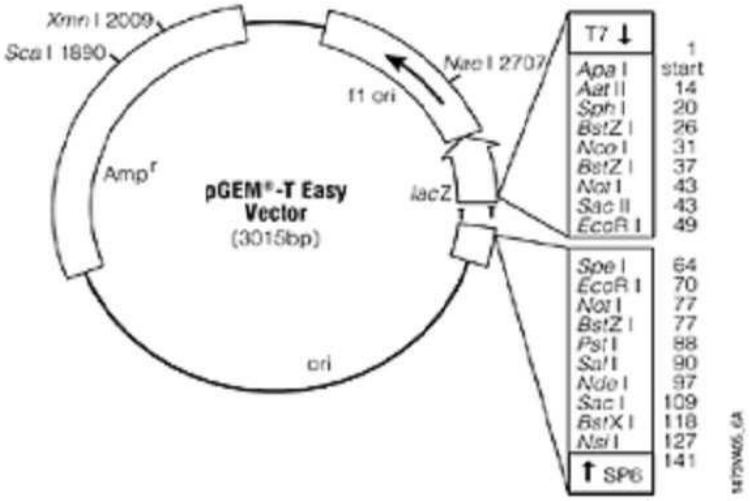

P19A
FULL
1 - 66
67 - 163
LAP
FULL
vector only
p19A (Full)
p19A (1-66)
p19A (67-163)
LAP (Full)

도면3b

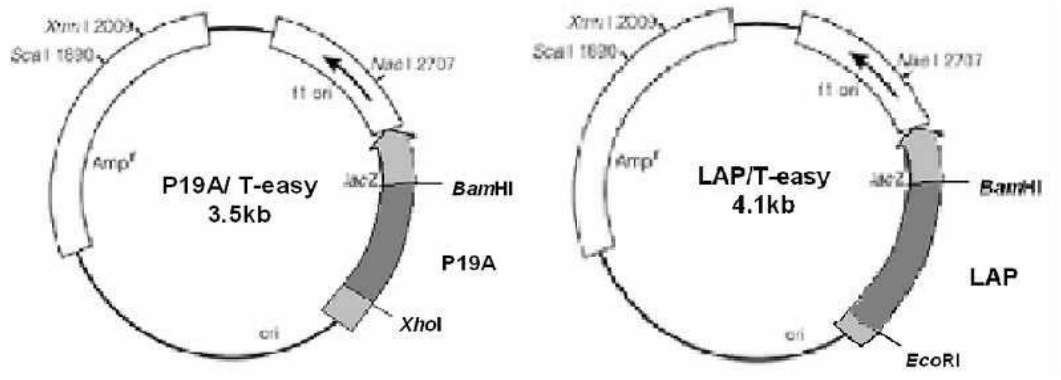

P19A
FULL
1 - 66
67 - 163
LAP
FULL
1 - 98
99 -184
185 - 372


LAP (full) + vector only
LAP (1-98) + p19A (1-66)
LAP (99-184) + p19A (1-66)
LAP (185-372) + p19A (1-66)
LAP (full) + p19A (Full)
LAP (1-98) + p19A (67-163)
LAP (99-184) + p19A (67-163)
LAP (185-372) + p19A (67-163)

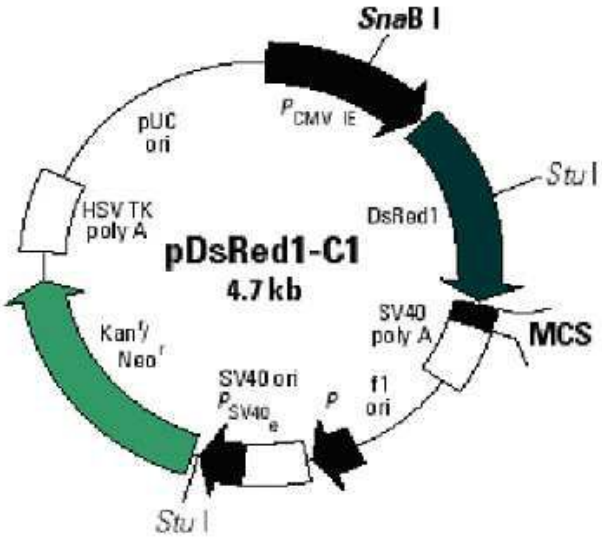
도면4a



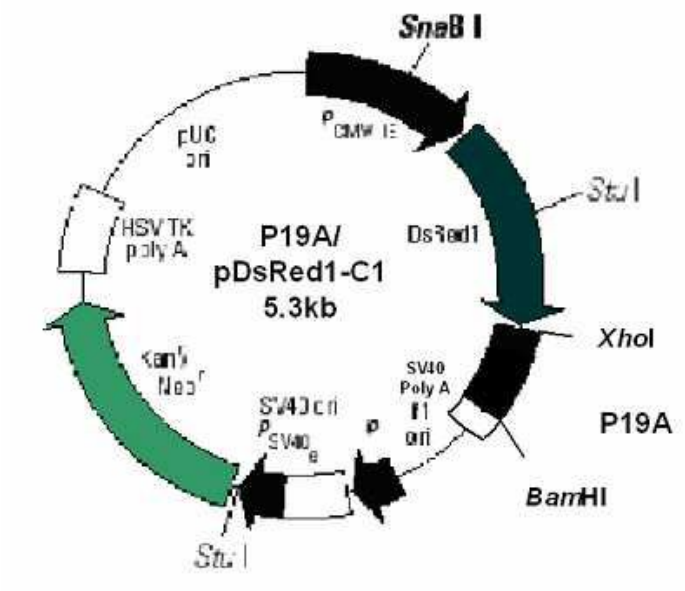
도면4b



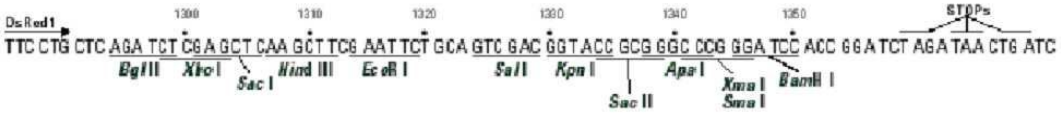
도면4c



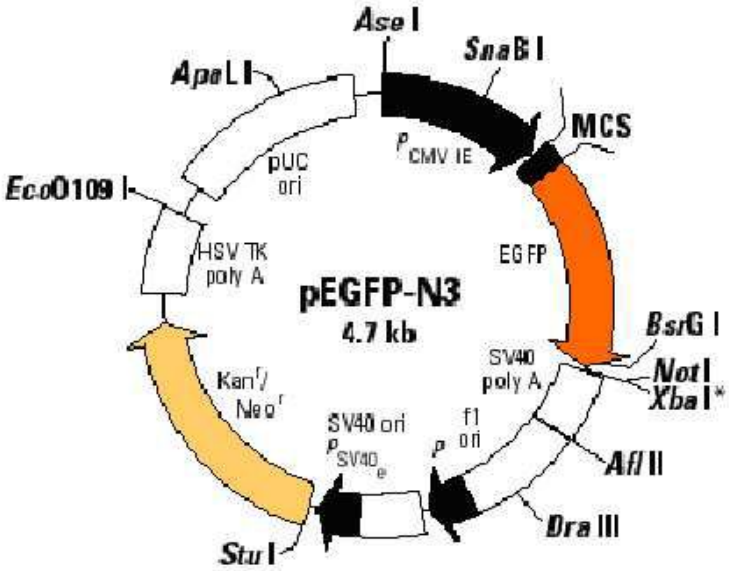
도면4d



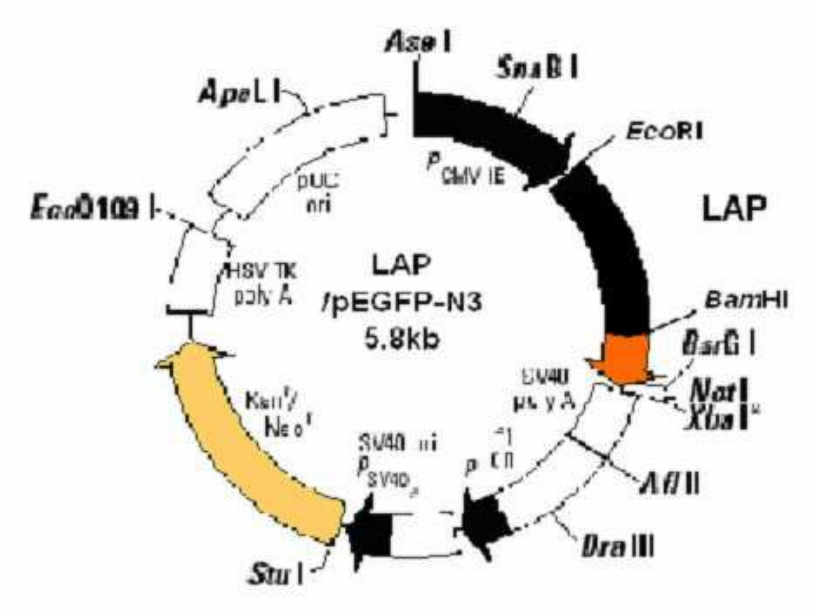
도면4e



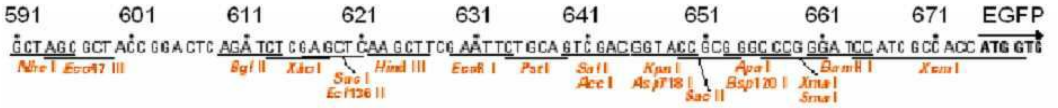
도면4f



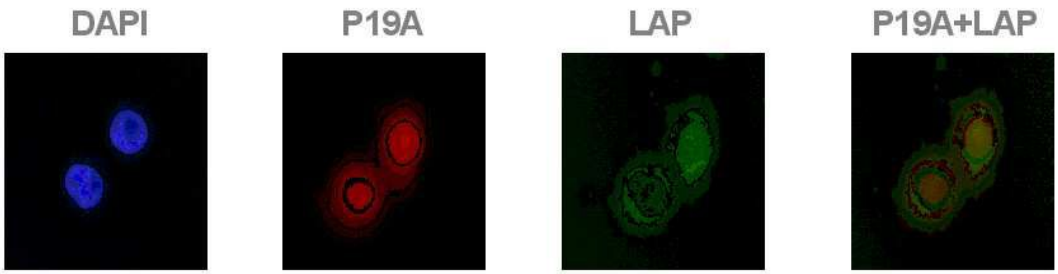
도면4g



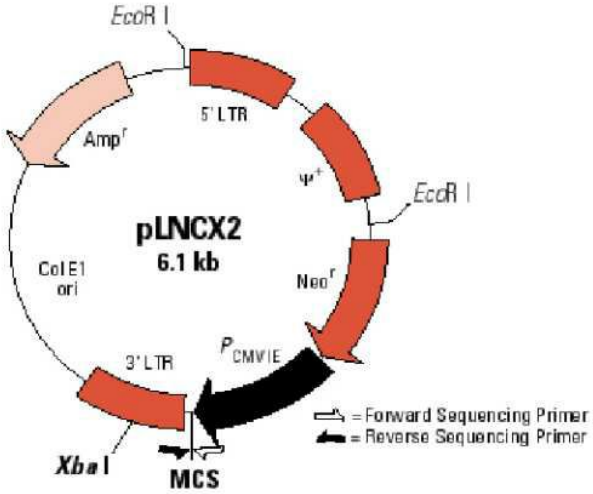
도면4h



도면5



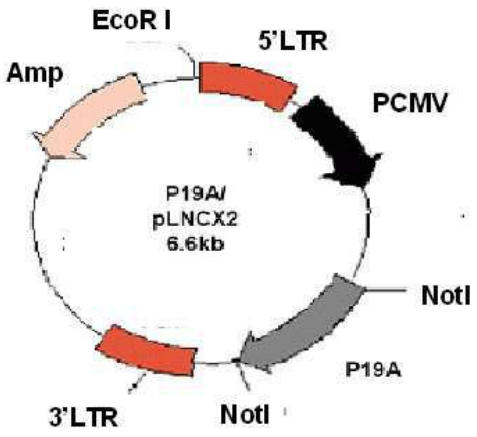
도면6a



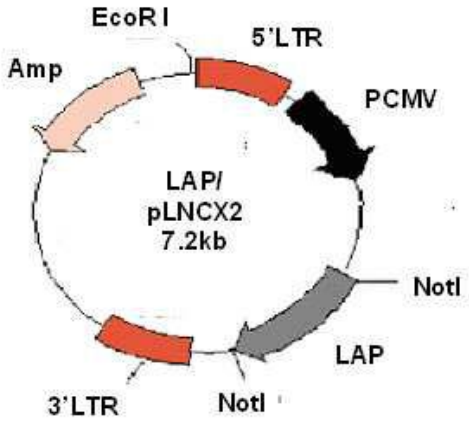
MCS (multi cloning site)의 제한효소 부위



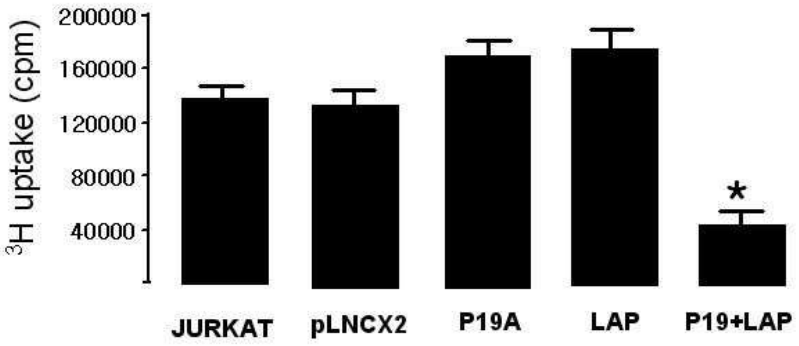
도면6b



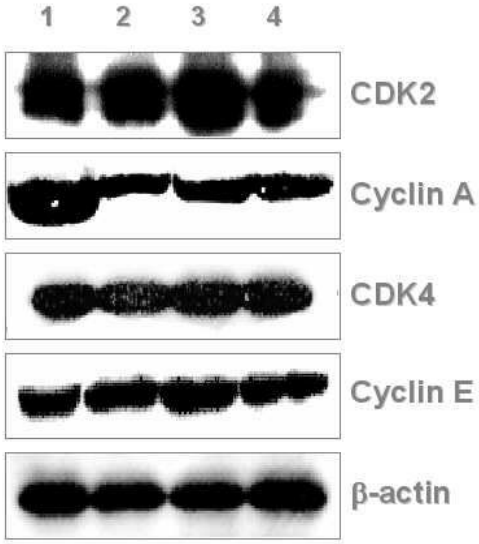
도면6c


EcoR I
5'LTR
Amp
PCMV
LAP/
pLNCX2
7.2kb
NotI
LAP
3'LTR
NotI

도면7

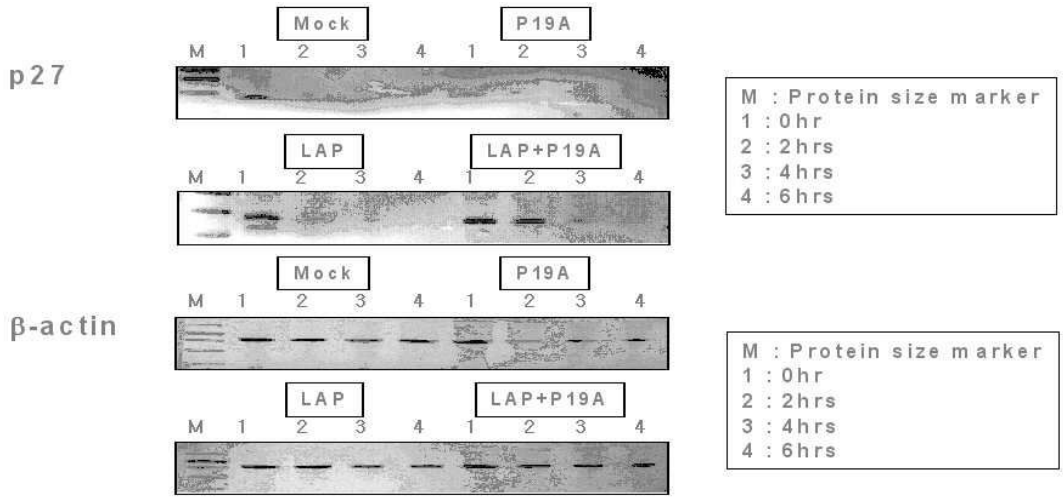

200000
160000
120000
80000
40000
^{3}H uptake (cpm)
*
JURKAT
pLNCX2
P19A
LAP
P19+LAP

도면8

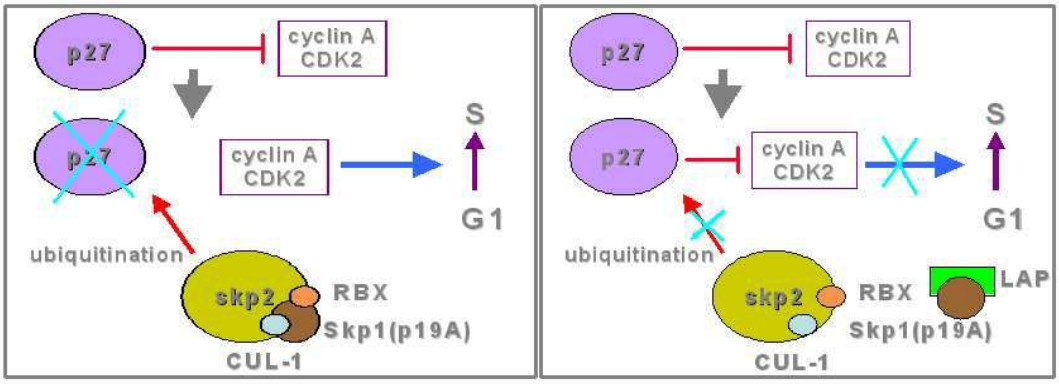


1. Mock
2. P19A
3. LAP
4. P19A+LAP

도면9



도면10



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부