

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480007034.8

[51] Int. Cl.

A61K 31/55 (2006.01)
A61K 31/4355 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)
A61P 27/12 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 5 月 10 日

[11] 公开号 CN 1771039A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

[22] 申请日 2004.2.5

[21] 申请号 200480007034.8

[30] 优先权

[32] 2003.2.7 [33] DE [31] 10305212.7

[86] 国际申请 PCT/EP2004/001048 2004.2.5

[87] 国际公布 WO2004/069258 德 2004.8.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.15

[71] 申请人 弗洛里安·朗

地址 德国蒂宾根

[72] 发明人 弗洛里安·朗 安德拉斯·巴斯亚恩

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 16 页 序列表 14 页
附图 1 页

[54] 发明名称

sgk 基因家族用于诊断和治疗白内障和青光眼的用途

[57] 摘要

本发明涉及 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂在制备治疗和/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物中的用途。本发明的另一方面涉及包含 Acc No. NM_005627 的 hsgk1 序列或其片段、或者包含 Acc No. AF169035 的 hsgk3 序列或其片段的单链或双链核酸用于诊断形成白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向的用途，以及诊断形成白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变倾向的试剂盒，其中包含上述核酸。本发明还涉及从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的各种筛选方法，所述治疗活性物质用于治疗或/或预防选自白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的至少一种疾病。

1. hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂用于降低细胞肿胀的用途。
2. hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂用于制备治疗和/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物的用途。
3. 如权利要求 1 或 2 的用途，其特征在于 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂是星孢素或白屈菜赤碱。
4. 一种包含 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂的药物，其用于治疗 and/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物。
5. 包含根据 Acc No. NM-005627 的 hsgk1 序列或其一个片段的单链或双链核酸用于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向性的用途。
6. 如权利要求 5 的用途，其特征在于所述单链或双链核酸包含 hsgk1 基因的至少一个多态性核苷酸，尤其是 hsgk1 基因的“SNP”。
7. 如权利要求 6 的用途，其特征在于所述 hsgk1 基因的 SNP 选自下述 SNPs 组中：在 hsgk1 基因内含子 2 的 732/733 位置处的 G 插入，在 hsgk1 基因内含子 6 的 2071 位置处的 T/C 置换和在 hsgk1 基因外显子 8 中 2617 位置处的 T/C 置换。
8. 包含根据 Acc No. AF169035 的 hsgk3 序列或其一个片段的单链

或双链核酸用于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向性的用途。

9. 如权利要求 8 的用途,其特征在于所述单链或双链核酸包含 hsgk3 基因的至少一个多态性核苷酸,尤其是 hsgk3 基因的“SNP”。

10. 针对 sgk 家族人同系物的底物的抗体用于诊断发展白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中的至少一种疾病的倾向性的用途,该抗体针对的是含有磷酸化形式或未磷酸化形式的磷酸化位点的人同系物表位。

11. 如权利要求 10 的用途,其特征在于所述 sgk 家族人同系物的底物是 Acc No. BAA23711 的 Nedd4-2。

12. 一种用于诊断白内障、青光眼和糖尿病性神经病变之一的试剂盒,其中包含针对 hsgk1 或 hsgk3 的抗体,或者包含在严格条件下能够与根据 Acc No. NM-005627 的 hsgk1 基因或根据 Acc No. AF169035 的 hsgk3 基因相杂交的核酸,或者组合性地包含这些抗体和核酸。

13. 如权利要求 12 的试剂盒,其特征在于,在严格条件下,所述核酸能够与根据 Acc No. NM-005627 的 hsgk1 基因或根据 Acc No. AF169035 的 hsgk3 基因的 DNA 区域相杂交,所述 DNA 区域包含 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的多态性核苷酸,尤其是“SNPs”。

14. 一种从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的筛选方法,该治疗活性物质用于治疗和/或预防选自包括白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的组中的至少一种疾病,其中所述方法包括下列步骤:

- a) 在细胞中异源地共表达
- i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1 和

ii) hsgk1 和/或 hsgk3

b) 在每种情况下, 在存在至少一种测试物质的情形下, 培养 A_1 至 A_x 至少一种细胞等分试样, 其中每种情况下的所述至少一种测试物质依细胞等分试样的下标 1 至 x 而不同, 并在缺乏任何测试物质的情况下培养对照细胞等分试样 B,

c) 与对照细胞等分试样 B 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性相比较, 测定细胞等分试样 A_1 至 A_x 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性。

15. 一种从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的筛选方法, 该治疗活性物质用于治疗 and/或预防选自包括白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的组中的至少一种疾病, 所述方法包括下列步骤:

d) 在细胞的至少一个等分试样 A_1 至 A_x 中异源地共表达

i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1 和

ii) hsgk1 和/或 hsgk3, 和

在细胞的至少一个等分试样 B_1 至 B_x 中异源地共表达

i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1

e) 在每种情况下, 在存在至少一种测试物质的情形下培养 A_1 至 A_x 和 B_1 至 B_x 的细胞等分试样, 其中每种情况下的所述至少一种测试物质依细胞等分试样的下标 1 至 x 而不同,

f) 在细胞等分试样 A_1 至 A_x 和细胞等分试样 B_1 至 B_x 中进行葡萄糖转运蛋白 Glut1 活性的比较性测定。

sgk 基因家族用于诊断和治疗白内障和青光眼的用途

本发明涉及 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂用于制备治疗和/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物的用途。

在另一个方面,本发明涉及包含根据 Acc No. NM_005627 的 hsgk1 序列或其片段,或者包含根据登记号 AF169035 的 hsgk3 序列或其片段的单链或双链核酸用于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向的用途,以及诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向的试剂盒,该试剂盒包括上述核酸。

此外,本发明涉及从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的不同筛选方法,该治疗活性物质用于治疗 and/或预防选自白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中的至少一种疾病。

血清和糖皮质激素诱导型激酶 hsgk1 最初是以糖皮质激素敏感性基因形式克隆的 [Webster et al. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. Mol Cell Biol 1993; 13:2031-2040]。

后来的调查揭示 hsgk1 处于很多刺激物的影响之下 [Lang F, Cohen P Regulation and physiological roles of serum-and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. Science STKE. 2001 Nov 13; 2001(108):RE17], 例如,尤其是盐皮质激素的影响 [Chen et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-

induced protein sgk. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 2514-2519, N á ray-Fejes-T ó th et al. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. J Biol Chem 1999; 274: 16973-16978; Shigaev et al. Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na(+) channel. Am J Physiol 2000; 278: F613-F619; Brenan FE, Fuller PJ. Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo. Mol Cell Endocrinol. 2000; 30; 166: 129-36; Cowling RT, Birnboim HC. Expression of serum-and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) mRNA is up-regulated by GM-CSF and other proinflammatory mediators in human granulocytes. J Leukoc Biol. 2000; 67: 240-248]。

胰岛素样生长因子 IGF1、胰岛素和氧化应力通过磷酸肌醇-3-激酶 (PI3 激酶) 和磷酸肌醇依赖性激酶 PDK1, 经由信号级联来刺激 hsgk1 [Park et al. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway, EMBO J 1999; 18: 3024-3033; Kobayashi et al. Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum-and glucocorticoid-induced protein kinase. Biochem. J. 1999; 344: 189-197]。PDK1 对 hsgk1 的活化包括在 422 位丝氨酸处的磷酸化。这个丝氨酸向天冬氨酸的突变 (^{S422D}SGK1) 产生了具有组成型活性的激酶 [Kobayashi T, Cohen P: Activation of serum-and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositol 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. Biochem J. 1999; 339: 319-328]。

早期的研究显示, hsgk1 是肾上皮 Na^+ 通道的有力刺激物 [De la Rosa et al. The serum and glucocorticoid kinase sgk increases the abundance of epithelial sodium channels in the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. J Biol Chem 1999; 274: 37834-37839; Böhmer et al. The Shrinkage-activated Na^+ Conductance of Rat Hepatocytes and its Possible Correlation to rENaC. Cell Phys Biochem. 2000; 10: 187-194; Lang et al. Deranged transcriptional regulation of cell volume sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 8157-8162]. 由于在不表达上皮 Na^+ 通道 ENaC 的很多组织中发现了 hsgk1, 因此 hsgk1 的作用应该不只限于调节 Na^+ 通道 [Klingel et al. Expression of the cell volume regulated kinase h-sgk in pancreatic tissue. Am J Physiol (Gastroint. Liver-Physiol.) 2000; 279: G998-G1002; Waldegger et al. Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4440-4445; Waldegger et al. *h-sgk* Serine-Threonine protein kinase gene as early transcriptional target of TGF- β in human intestine. Gastroenterology 1999; 116: 1081-1088].

由于 hsgk1 很可能以还有待于阐明的方式调节很多其它信号转导途径或这些途径的组分这一事实, hsgk1 和它的人同系物应该具有诊断很多疾病的重要潜力。尤其是, 由 DE 197 08 173 A1 明显可知, hsgk1 可以用于诊断很多疾病, 如高钠血症、低钠血症、糖尿病、肾功能不全、分解代谢过度、肝性脑病和微生物或病毒感染, 其中细胞容积的改变起重要的病理生理作用。

WO 00/62781 报道了 hsgk1 活化内皮 Na^+ 通道, 导致肾 Na^+ 再吸收

增加。由于肾 Na^+ 再吸收的这种增加伴随有高血压，因此这个文件中推测 hsgk1 表达的增加将导致高血压，而 hsgk1 表达的降低将最终导致低血压。

DE 100 421 37 也报道了人同系物 hsgk2 和 hsgk3 的过表达或活动过强与 ENaC 过度活化、由此导致的肾 Na^+ 再吸收增加和由此发展的高血压之间的类似关系。此外，这个文件已经探讨了激酶 hsgk2 和 hsgk3 对于动脉高压的诊断潜力。

W002/074987 A2 公开了 hsgk1 基因中各个核苷酸的两个不同多态性(单核苷酸多态性(SNP))的存在和高血压的遗传决定的倾向性之间的关系。这些多态性是 hsgk1 基因中内含子 6 中的多态性(T→C)和外显子 8 中的多态性(C→T)。

因为 sgk1 在很多组织中表达，并且因为 sgk1 大概具有很多仍然未知的底物，所以人们预期 sgk 家族的人同系物、尤其是 hsgk1 基因(NM 005627)、hsgk2 基因和 hsgk3 基因(AF169035)的作用和其它疾病的发展之间将有进一步的相关性。牵涉 sgk1 的这些其它特殊疾病的揭露将可以产生含有 sgk 家族人同系物基因的多态性区域(该区域影响相应 sgk 蛋白的功能或表达)的核酸，该核酸用于诊断这些其它疾病的倾向。

因此本发明的目的是找到 sgk 家族人同系物的功能和新疾病之间的更多相关性，并因此提供含有 sgk 家族人同系物基因的多态性区域的核酸用于诊断用途的新可能性。

这个目的是通过 hsgk1 和 hsgk3 强烈刺激葡萄糖转运蛋白 Glut1 的惊奇发现而实现的(见图 1)。特别是，葡萄糖转运蛋白 Glut1 调节眼睛的各种细胞对葡萄糖的吸收，尤其是 [Busik et al.

Glucose-induced activation of glucose uptake in cells from the inner and outer blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2356-63; Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, Hirano H. Ultracytochemical localization of the erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in the ciliary body and iris of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:1659-66]。水跟随葡萄糖渗透，意思指 Glut1 活性增加将引起细胞肿胀。因此，Glut1 活性增加可以引起白内障的发展[Gong et al. Development of cataractous macrophthalmia in mice expressing an active MEK1 in the lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:539-48]。除此之外，已经表明 Glut1 的过表达会促进结缔组织蛋白的形成和沉积[Ayo et al. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol.* 1991;260:F185-191; Heilig et al. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest.* 1995;96:1802-1814]。这种结缔组织蛋白的沉积妨碍了眼部液体的流失，导致眼内压力增加，并因此导致视网膜的损害[Fingert et al. Evaluation of the myocilin (MYOC) glaucoma gene in monkey and human steroid-induced ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(1):145-52, Ueda et al. Distribution of myocilin and extracellular matrix components in the juxtacanalicular tissue of human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1068-76]。刺激 SGK1 表达的糖皮质激素(参见上面)确实同时引起青光眼的发展[Fingert et al. 2001]。然而，以前从未推测 hsgk1 是病因。

上述失调将在与 hsgk1 活性增加有关的任何情况下发生，也就是说在上述任何激素过量存在的情况下将发生。与血压增加有关的

hsgk1 基因的特殊多态性 [Busjahn et al. Serum-and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. Hypertension 40(3): 256-260, 2002] 可以同时引起白内障和青光眼发生率的增加。该基因的相同改变也应该与过早出现的白内障和/或青光眼有关。

本发现揭示了葡萄糖转运蛋白 Glut1 调节中的一种全新机制。因此 hsgk1 活性的增加应该会引起细胞对葡萄糖的摄入增加。血清 [Webster et al. 1993]、糖皮质激素 [Brenan & Fuller 2000, Webster et al. 1993]、盐皮质激素 [Chen et al. 1999, Naray-Fejes-Toth et al. 1999, Shigaev et al. 2000, Brennan and Fuller 2000, Cowling and Birnboim 2000]、促性腺激素 [Alliston et al. Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. Mol Endocrinol. 1997;11:1934-1949; Alliston et al. Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. Endocrinology. 2000;141:385-395; Gonzalez-Robayna et al. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. Mol Endocrinol. 2000;14:1283-1300, Richards et al. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. Recent Prog Horm Res. 1995;50:223-254]和很多细胞因子 [Lang & Cohen 2001], 尤其是 TGF- β [Fillon S. et al. Expression of the Serine/Threonine kinase hSGK1 in chronic viral hepatitis. Cell Physiol Biochem

2002; 12: 47-54; Lang et al. 2000, Waldegger et al. 1999, Wärntges S et al. Excessive transcription of the human serum and glucocorticoid dependent kinase hSGK1 in lung fibrosis. Cell Physiol Biochem 2002, 12: 135-142]会刺激 hsgk1 的转录。除此之外, 细胞皱缩也会增加 hsgk1 的转录, 如已经引用的 Waldegger et al. 1997 论文所示。葡萄糖浓度的增加, 如糖尿病中显示的, 会通过细胞皱缩和/或通过 TGF- β 形成的增加来刺激 hsgk1 的表达 [Lang et al. 2000]。所表达的 hsgk1 是通过胰岛素样生长因子 IGF1、胰岛素或氧化应力来活化的 [Kobayashi & Cohen 1999, Park et al. 1999, Kobayashi et al. 1999]。

根据本发明的发现, hsgk1 的表达增加会提高葡萄糖转运蛋白 Glut-1 的活性。结果, 更多葡萄糖被吸收进细胞中, 随后的通过渗透进入的水引起细胞肿胀。这样水渗入角膜和晶状体的程度增加, 这样, 由于透明度降低, 将引起白内障 [Gong et al.. 2001]。

此外, 青光眼也可以以类似方式发展, 此外也可由于结缔组织的渗入而发展 [Fingert et al. 2001]。

也怀疑细胞肿胀是糖尿病性神经病变的原因 [Burg et al., Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. J Clin Invest 1988; 81: 635-40]。然而, 不仅仅在糖尿病的情况下, 而且在糖皮质激素的影响下或在显示遗传决定的 hsgk1 活性过强的患者中, 预计 Glut1 活性增加 [Busjahn et al. , Serum-and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. Hypertension 40(3): 256-260, 2002]。糖皮质激素确实会引起青光眼 [Fingert et al. 2001]。以前并不清楚与糖皮质激素给药有关的青光眼发展的机制。尤其是, 以前并不清楚 hsgk1 在这个机制中起作用、因此适合用作诊断和治疗青光眼的靶蛋白。

因此,根据本发明的观察意外地证明了 hsgk1 和 hsgk3 会增加非上皮葡萄糖转运以及增加上皮 Na^+ 通道。结果, hsgk1 和 hsgk3 显示全新的病理生理性重要性,因而具有重要的诊断和治疗/预防效果。

因此本发明涉及 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂用于降低细胞肿胀的用途。

此外,本发明涉及 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂或者 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂用于制备治疗和/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物的用途。

hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂可以是抑制 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的正常生理活性的任何性质的化学物质。优选该 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂是低分子量化学物质(“小分子”)或蛋白质或肽。hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的功能抑制剂尤其可以是这些酶的拮抗剂,其阻断 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的底物结合位点,但同时不受 hsgk1 或 hsgk3 的任何催化转化影响。优选地,在这种情况下合适的拮抗剂是在结构上类似于 hsgk1 蛋白或 hsgk3 蛋白的天然底物的那些分子,也就是说,尤其是在结构上类似于可磷酸化的氨基酸丝氨酸和苏氨酸的那些分子。

星孢素和白屈菜赤碱是两种已知的 hsgk1 功能抑制剂。因此在特别优选的实施方案中,星孢素或白屈菜赤碱用作 hsgk1 或 hsgk3 的功能抑制剂,用于治疗和/或预防疾病白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中的至少一种疾病。

hsgk1 基因或 hsgk3 基因的负转录调节剂定义为在转录水平活化 hsgk1 基因或 hsgk3 基因表达的物质。

除实际的活性物质即 hsgk1 或 hsgk3 的功能抑制剂或者 hsgk1 或 hsgk3 的负转录调节剂之外, 根据本发明的用于治疗和/或预防白内障、青光眼或糖尿病性神经病变的药物还可以包含稳定剂和/或载体物质, 如淀粉、乳糖、硬脂酸、脂肪、蜡、醇类, 或其它添加剂, 如防腐剂、颜料或调味剂。

可以以任何方式施用药物, 特别是以片剂、粒剂或胶囊或作为溶液形式口服。其它特别合适的施用形式涉及以软膏、酊剂或喷雾直接施用(例如在皮肤或眼睛上)或任何注射类型形式(例如皮下或静脉内)或输注。

此外, 本发明涉及包含根据登记号 NM-005627 的 hsgk1 序列或其一个片段的单链或双链核酸用于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向性的用途。在这一点上, 该单链或双链核酸中可以包含的 hsgk1 片段的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对, 优选长度至少 15 个核苷酸/碱基对, 特别是长度至少 20 个核苷酸/碱基对。

在这一点上, 优选该单链或双链核酸包含 hsgk1 基因的至少一个多态性核苷酸, 尤其是 hsgk1 基因的单核苷酸多态性 (SNP)。

在特别优选的实施方案中, 所述单链或双链核酸包含 hsgk1 基因的下列 SNPs 中的至少一个:

- 在 hsgk1 基因内含子 2 中 732/733 位置处的 G 插入,
- 在 hsgk1 基因内含子 6 中 2071 位置处的 T/C 置换 (WO 02/074987 A2),
- 在 hsgk1 基因外显子 8 中 2617 位置处的 T/C 置换 (WO 02/074987 A2)。

优选地，可通过下列方法将上述单链或双链核酸用于检测患者基因组 DNA 或 cDNA 中 hsgk1 基因的上述 SNPs：

- 通过使用上述核酸对基因组 DNA 或 cDNA 直接测序，
- 通过将基因组 DNA 或 cDNA 与上述核酸特异性杂交，
- 通过 PCR 寡核苷酸延伸试验或通过连接试验。

在这一点上，优选患者的基因组 DNA 或 cDNA 是从取自患者的身体样品中分离的，尤其是从唾液、血液、组织或细胞中分离的。

推测表达的 hsgk1 基因的活性取决于患者的 hsgk1 基因中该多态性的形式，因此含有这些多态性中至少一种的核酸尤其很适于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向性。

此外，本发明涉及包含根据登记号 AF169035 的 hsgk3 序列或其一个片段的单链或双链核酸用于诊断发展白内障、青光眼和/或糖尿病性神经病变的倾向性的用途。在这一点上，所述单链或双链核酸可以包含的 hsgk3 片段的长度是至少 10 个核苷酸/碱基对，优选长度至少 15 个核苷酸/碱基对，特别是长度至少 20 个核苷酸/碱基对。

在这一点上，优选所述单链或双链核酸包含 hsgk3 基因的至少一个多态性核苷酸，尤其是 hsgk3 基因的单核苷酸多态性 (SNP)。

除上述的单链或双链核酸之外，针对 sgk 家族人同系物的底物，尤其是针对 hsgk1 和 hsgk3 的底物的抗体也适于诊断发展白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中的至少一种疾病的倾向性。优选这些诊断抗体针对的是 sgk 家族人同系物 (尤其是 hsgk1 和 hsgk3) 的表位，其中含有磷酸化形式或未磷酸化形式的底物磷酸化位点。

例如, 由于 hsgk1 基因的个体遗传组成造成的 hsgk1 蛋白过表达可以引起 hsgk 底物的转变增加, 即 hsgk1 对底物的酶促磷酸化增加。同时, hsgk1 蛋白的过表达将引起葡萄糖转运蛋白 Glut1 的刺激, 最终导致眼睛细胞内葡萄糖的高水平摄入, 继而通过渗透作用引起水的高水平摄入, 结果最终导致发展白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的倾向性。因此, 通过针对含有磷酸化形式或未磷酸化形式之 hsgk1 磷酸化位点的感兴趣底物区域的抗体而检测更频繁的 hsgk1 底物磷酸化可代表诊断发展白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的倾向性的方法。

在优选实施方案中, 泛素蛋白连接酶 Nedd4-2 (登记号 BAA23711) 被用作 sgk 家族人同系物的底物。这个泛素蛋白连接酶是被 sgk 家族的人同系物特异性磷酸化的蛋白 [Debonneville et al., Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. EMBO J., 2001; 20: 7052-7059; Snyder et al., Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na(+) channel. J. Biol. Chem., 2002, 277: 5-8]。hsgk1 的磷酸化位点具有共有序列 (R X R X X S/T), 其中 R 是精氨酸, S 是丝氨酸, T 是苏氨酸, X 是任何任意氨基酸。在 Nedd4-2 2 (登记号 BAA23711) 中, 存在上述共有序列匹配的两个 hsgk1 潜在磷酸化位点, 即在 382 位氨基酸处的丝氨酸和在 468 位氨基酸处的丝氨酸。

因此, 优选用于诊断发展白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中至少一种疾病的倾向性的上述抗体针对的是底物 Nedd4-2, 特别优选针对的是具有 hsgk1 潜在磷酸化位点序列、即共有序列 (R X R X X S/T) 的 Nedd4-2 蛋白的区域。特别是, 这些抗体针对的是 Nedd4-2 蛋白区域, 该区域包含两个潜在磷酸化位点中的至少一个, 即 382 位氨基酸

处的丝氨酸和/或 468 位氨基酸处的丝氨酸。

此外，本发明涉及诊断白内障、青光眼和糖尿病性神经病变之一的试剂盒，该试剂盒包含至少一种下列成分：

- 针对 hsgk1 或 hsgk3 的抗体，
- 能够在严格条件下与登记号 NM-005627 的 hsgk1 基因或登记号 AF169035 的 hsgk3 基因杂交的单链或双链核酸；尤其是包含 hsgk1 基因或 hsgk3 基因的多态性核苷酸、特别是“SNPs”的那些单链或双链核酸，
- 针对 sgk 家族人同系物的底物的抗体；优选针对磷酸化或未磷酸化形式的该底物的磷酸化位点的抗体；尤其是针对磷酸化或未磷酸化形式的 Nedd4 或 Nedd4-2 磷酸化位点的抗体。

本发明还涉及从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的筛选方法，该治疗活性物质用于治疗 and/或预防选自包括白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的组中的至少一种疾病，所述方法包括下列步骤：

- a) 在细胞中异源地共表达
 - i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1 和
 - ii) hsgk1 和/或 hsgk3

b) 在每种情况下，在至少一种测试物质存在的情形下，培养 A_1 至 A_x 至少一种细胞等分试样，其中每种情况下所述至少一种测试物质根据细胞等分试样的下标 1 至 X 而不同，并在缺乏任何测试物质的情况下培养对照细胞等分试样 B，

c) 与对照细胞等分试样 B 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性相比较, 测定细胞等分试样 A_1 至 A_x 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性。

物质文库, 优选小分子文库, 或蛋白文库等等, 均可以用作所述“多种测试物质”。

在 a) 步骤中, 使用标准方法, 如电穿孔法、 CaPO_4 沉淀法、脂质转染法等等, 用合适的表达载体转染合适的细胞, 优选哺乳动物细胞或细胞系, 尤其是人细胞或细胞系, 该表达载体含有表达 Glut1 和 hsgk1 和/或 hsgk3 的合适表达盒。该表达盒含有处于合适启动子控制下的相关靶基因 (Glut1、hsgk1 或 hsgk3) 的基因组 DNA 或 cDNA, 所述启动子在感兴趣的细胞类型中有活性, 并能够以合适的量表达靶基因。该表达载体可以另外含有选择标记。

然后, 在能够使靶基因 i) 和 ii) 被表达的条件下培养转染的细胞。

在 b) 步骤中, 来自 a) 的转染细胞被分成不同的细胞等分试样 A_1 至 A_x 以及对照细胞等分试样 B。在每种情况下, 在至少一种测试物质存在时培养细胞等分试样 A_1 至 A_x 。每种情况下添加到细胞等分试样 A_1 至 A_x 的测试物质彼此不同 (依各细胞等分试样 A_1 至 A_x 的下标 1 至 X 而定)。另一方面, 在缺乏任何测试物质的情形下培养对照细胞等分试样 B。

在 c) 步骤中, 与对照细胞等分试样 B 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性相比较, 定量测定细胞等分试样 A_1 至 A_x 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性。能够在功能上抑制 hsgk1 或 hsgk3 或者降低它们的表达的测试物质应该已被加入到其中 Glut1 的活性经测定比对照细胞等分试样

B 中测定的活性明显较低的细胞等分试样 A_1 至 A_x 中。这种物质可能适于治疗白内障、青光眼和糖尿病性神经病变中的至少一种疾病。

在可供选择的实施方案中,根据本发明的用于从许多测试物质中鉴定和表征治疗活性物质的筛选方法包括下列步骤,其中所述治疗活性物质可用于治疗和/或预防选自包括白内障、青光眼和糖尿病性神经病变的组中的至少一种疾病:

d) 在细胞的至少一个等分试样 A_1 至 A_x 中异源地共表达

i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1 和

ii) hsgk1 和/或 hsgk3, 并且

在细胞的至少一个等分试样 B_1 至 B_x 中异源地表达

i) 葡萄糖转运蛋白 Glut1,

e) 在每种情况下,在存在至少一种测试物质的情形下培养 A_1 至 A_x 和 B_1 至 B_x 细胞等分试样,其中每种情况下所述至少一种测试物质依细胞等分试样的下标 1 至 X 而不同,

f) 进行细胞等分试样 A_1 至 A_x 和细胞等分试样 B_1 至 B_x 中葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性的比较性测定。

上面关于 a) 至 c) 各个程序步骤给出的说明以相应方式适合于根据本发明的可供选择的筛选方法中的 d) 至 f) 程序步骤。

通过下图 1 更详细解释本发明。

图 1 的纵座标 A 上绘制了 2-脱氧葡萄糖的摄入(以 pmol/1/10 分钟/卵母细胞)(算术平均数 $\pm$ SEM)。给 *Xenopus laevis* 卵母细胞注射 Glut-1 cRNA (有或没有 SGK1、SGK2、SGK3 或蛋白激酶 B (PKB) cRNA)

(见实施例 1)。

图 1 显示了与自身表达 Glut1 的卵母细胞相比较, 除 Glut1 之外还表达 hsgk1 或 hsgk3 的卵母细胞中发生的 2-脱氧葡萄糖摄入的增加。因此, 这证明了 hsgk1 和 hsgk3 的功能有效地刺激了葡萄糖转运蛋白 Glut1 的活性。在表达 hsgk2 或 PKBmut 而不是 hsgk1 或 hsgk3 的卵母细胞的情况下, 没有看到类似结果。

通过下列实施例 1 更详细解释本发明。

实施例 1: 在 *Xenopus laevis* 卵母细胞中的表达和双电极电压钳

体外合成正常 SGK1 cRNA [Waldegger S, Barth P, Raber G, Lang F: Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 4440-4445]和组成型活性 SGK1 (^{S422D}SGK1) cRNA [Kobayashi & Cohen 1999], 以及正常 Glut1 cRNA [Iserovich P, Wang D, Ma L, Yang H, Zuniga FA, Pascual JM, Kuang K, De Vivo DC, Fischbarg J. Changes in glucose transport and water permeability resulting from the T310I pathogenic mutation in Glut1 are consistent with two transport channels per monomer. J Biol Chem. 2002; 277: 30991-7]。已经详细描述了 *Xenopus laevis* 卵巢的解剖和卵母细胞的收集与处理 [Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Bröer S: The use of *Xenopus laevis* oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. Cell Physiol Biochem 2000; 10: 1-12]。给卵母细胞注射 5 ng 人 Glut1、7.5 ng 人 ^{S422D}SGK1 和

/或 5 ng 蟾蜍 (*Xenopus*) Nedd4-2。给对照卵母细胞注射水。注射各个 cRNAs 后 2 天, 在室温下测定放射性标记的葡萄糖的摄入。对照溶液含有 96 mM NaCl、2 mM KCl、1.8 mM CaCl_2 、1 mM MgCl_2 和 5 mM HEPES, pH 7.4。所有物质以所给浓度使用。用 HCl 或 NaOH 使最终溶液滴定至 pH 7.4。

计算

以算术平均值 $\pm$ SEM 的形式给出数据; n 是被检测的卵母细胞数。对至少三个不同组的卵母细胞进行所有实验。使用 Student' s t 检验来检验结果的显著性差异。仅 $P < 0.05$ 的结果被认为有统计学显著性。

<110> Prof. Dr. Lang, Florian

<120> sgk 基因家族用于诊断和治疗白内障和青光眼的用途

<130> L62135

<140> DE 103 05 212.7

<141> 2003-02-07

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 5719

<212> DNA

<213> 人 hsgk1 基因, NM_005627

<220>

<221> 变异

<222> (732)..(733)

<223> 在内含子 2 中位置 732/733 处插入额外的 G (SNP)

<220>

<221> 变异

<222> (2071)..(2071)

<223> 在内含子 6 中位置 2071 处的 T/C 交换 (SNP)

<220>

<221> 变异

<222> (2617)..(2617)

<223> 在外显子 8 中位置 2617 处的 C/T 交换 (SNP)

<400> 1

ggccgagcgc gcggcctggc gcacgatacg ccgagccggt ctttgagcgc taacgtcttt 60

ctgtctcccc gcggtggtga tgacggtgaa aactgaggct gctaaggga ccctcactta 120

ctccaggatg aggggcatgg tggcaattct catcggtgag tgcaggaatc ttgcgggact 180

tctgctccag gagacgcaaa gtggaaattt tttgaaagtc ccggatcaga ttagtgtgtg	240
tggcgccggg acgttatgaa gccgtctaaa cgtttcttta tttctcctcc ttctatccac	300
agctttcatg aagcagagga ggatgggtct gaacgacttt attcagaaga ttgccaataa	360
ctcctatgca tgcaaacagt aagttcagac cggattgagg aaataactag tatagtttga	420
atttccagc ggtaaacatt ctcatcacgg cgtttatcgg gaaggcgaag acttctcttg	480
gggtggggat ctcatctctc cttaaattct aatatatttg acacatttta aacattaaag	540
ttaatttgct gatttggctt gaactggaga tgtaagataa atggttcgtg ttggccgaat	600
tcacgctttc tccatgagca acaatcctta tttctgtatt taatggggtt tattatcttc	660
tttaactgac taatgtattg gggatatctc agtttaaaca gtgaattatc gggtagaagt	720
cggtagagcc aggaaactca cttttgatgt tgggtgtccc cctagtggcg agctggattc	780
taaatcgtgc cctttattcc ctgcagccct gaagttcagt ccatcttgaa gatctccaa	840
cctcaggagc ctgagcttat gaatgccaac ccttctctc cagtaagttt ttgtatgtgc	900
cgtgcatctg tggagaactg taagggagtc agttagtatt cctacattaa tggattaaaa	960
tagcatttct agaaattagt atcaaggcag gaatgcttca ttatgcataa cagtgatata	1020
aatatttaag tattgagtca gagtattatt tttatctttt tcttgggcat attttacctc	1080
aagtggttat tttaaaaggc atatttcata aaaaggtttt atctgtctga aacaacatga	1140
ctgtgtgcag tttccatact catttgaaat gtgatgaaat gtagttttga atgtttatag	1200
atgtatggtc atttgcata gtcatttgta gatgtaacat tttctacatc gtttatgtta	1260
tagatgtctt cctttgaagc aatggtatta aaagaaattc ttttttttt tttctagcca	1320
agtccttctc agcaaatcaa ccttggcccg tcgtccaatc ctcatgctaa accatctgac	1380
tttcaattct tgaaagtgat cggaaagggc agttttggaa aggtaatctc aaatctgaag	1440
atcttttggg acatttcctt catgtcctct tttatattct ccctggatga ggatcgaaaa	1500

atgatttttt taaattgaaa tticaggttc ttctagcaag acacaaggca gaagaagtgt	1560
tctatgcagt caaagtttta cagaagaaag caatcctgaa aaagaaagag gtgagatgtg	1620
cttgatgggg ctggcattgg cggtagacac tccttgaata atcttgattc tggaatgttg	1680
gtgccagttg aacatgccac taaatctgaa tcgtcatttt cctaggagaa gcatattatg	1740
tccgagcggg atgttctgtt gaagaatgtg aagcaccctt tcctgggtggg ccttcacttc	1800
tctttccaga ctgctgacaa attgtacttt gtcctagact acattaatgg tggagaggtg	1860
agcagggggg atagaagtca actcttagtg tctctgcaca gcctgctttg ttttagtttg	1920
agaaaaaagt ttcaaagat ttttgggtggg gagaatgtta ccagaattag catttccttc	1980
aacctgtcag gttatagtta atagattact tggggccact tcctgcagtt gttcttttgc	2040
tgtgtatgtc aaaactaatt aaattacatt gtgcaacca gaatgacttt gttctgtctc	2100
ctgcagttgt tctaccatct ccagagggaa cgctgcttcc tggaaccacg ggctcgtttc	2160
tatgctgctg aaatagccag tgccttgggc tacctgcatt cactgaacat cgtttatagg	2220
taagcctgag agctcttcag gctaccagtt ttggtataaa ggagacgtag cactggctgt	2280
ttcatagggc cttaaaataa tttgtgttta ttgcaactt ggctcgctaa aaccagatcc	2340
cctagcacgt gagctggctt gacttaagt ccaaggggga acagccaagt aggattgtgc	2400
ctaaccaga atagatgagc agaacaaggg ctcccttttt cttcactaca caactacagt	2460
gaacctaaat gcctctaata ccttagcaat tatctttaag aggatatctt atgaagtga	2520
attaacttgt gcaactactt ttctattcac ttttttacag agacttaaaa ccagagaata	2580
ttttgctaga ttcacaggga cacattgtcc ttactgactt cggactctgc aaggagaaca	2640
ttgaacacaa cagcacaaca tccaccttct gtggcacgcc ggaggtaggc gctgtcttgg	2700
tttggcgctt ggtttacccc cgccttccaa gagagagatg tacaatcatg cacttaacta	2760
ccaaaaagag taaactcttc tcagagactt cttaatacag ttcagtgcaa ataaaataca	2820

tttgctgttt gatgtagcat gagaaatccc aagtccttct gttcctttac tgaaaagtag	2880
ctgtttgtaa gtaagatctg catcataaaa actttctaata cctaagtaag agatatcaag	2940
tgccagcagt ttcctaaatg tcagtacaca taggtagcca gtcaccctca aaaagtccag	3000
cagttttatc aggaaggaat ctaaagatat ctatcttcca agctggctct gggctctctca	3060
gctttttcaa actaaatgtg tggctgtggg attgcttgct ttcgcagggt ctaaacgctg	3120
tttcctgggt ctgtttttca gtatctcgca cctgaggtgc ttcataagca gccttatgac	3180
aggactgtgg actggtgggt cctgggagct gtcttgatg agatgctgta tggcctgggtg	3240
agtggcacat tgggaaccac tggaacactg cctgctccct acaatattgc cttcacacag	3300
caaaagcagc taagaggcat attggttatt ttatagttca taagaataat cacttacctg	3360
gttcttttgt gcatttcaca ttttactaga taggaccaca ttgaacctgt gtggtgggtga	3420
aaaactacca cttattaaca tetacccct accctccaca cacacacaca caaacacaca	3480
cacgggttgc aaagtagaca cttaaatagc aagggaaaag aaagcattga ggtggggaga	3540
gtttctcaaa tcgagcctaa tatttattgc cgtttatatc tttttctcta ctggtaatgt	3600
gtgccatatg aaacttccaa ttaagtctaa agtaattttc cccttctttc agccgccttt	3660
ttatagccga aacacagctg aaatgtacga caacattctg aacaagcctc tccagctgaa	3720
accaaattatt acaaattccg caagacacct cctggagggc ctctgcaga aggacaggac	3780
aaagcggctc ggggccaaagg atgacttcgt gattgatgtt ttctgtcct cctgggccgg	3840
ccgggacgtg cactagacct ccctgccctt attgaatgca cctgtctaaa ttaatcttgg	3900
gtttcttctc aacagatgga gattaagagt catgtcttct tctccttaat taactgggat	3960
gatctcatta ataagaagat tactccccct ttaacccaa atgtggtgag tatctgtctc	4020
tcttctaagt atagagaagc caagcgattt attttaattc agaattgtct gggggagggt	4080
tggaaggaat acattggcag atgttttctc cataaacctg ttattttacc tacatagaca	4140

catttatcaa ttcgaagcac caaaaggcaa caagtgaaca ttattcttat gtttaactgt	4200
gtgtagccit ttgagatitg gtgcttgaag tgggtgatta tggaagtga tataagactt	4260
aaacttggta tttaaagcct ggtcaagatt tccctgtcct gtgtctagt tgagttcttg	4320
acaagagtgt ttttcccttc ccgtcacaga gtgggcccaa cgagctacgg cactttgacc	4380
ccgagtttac cgaagagcct gtccccaact ccattggcaa gtcccctgac agcgtcctcg	4440
tcacagccag cgtcaaggaa gctgccgagg ctttctagg cttttcctat gcgcctccca	4500
cggactcttt cctctgaacc ctgttagggc ttggttttaa aggattttat gtgtgtttcc	4560
gaatgtttta gttagccitt tgggtggagcc gccagctgac aggacatctt acaagagaat	4620
ttgcacatct ctggaagcct agcaatctta ttgcacactg ttcgctggaa tttttgaag	4680
agcacattct cctcagttag ctcatgaggt ttcatTTTT attcttcctt ccaacgtggt	4740
gctatctctg aaacgagcgt tagagtgccg ccttagacgg aggcaggagt ttcgttagaa	4800
agcggacctg ttctaaaaaa ggtctcctgc agatctgtct gggctgtgat gacgaatatt	4860
atgaaatgtg ccttttctga agagattgtg ttagctccaa agcttttcct atcgcagtgt	4920
ttcagttctt tattttccct tgtggatatg ctgtgtgaac cgctgtgtga gtgtggtatg	4980
cctgatacaca gatggatitg gttataagca tcaatgtgac acttgcagga cactacaacg	5040
tgggacattg tttgtttctt ccatatttgg aagataaatt tatgtgtaga cttttttgta	5100
agatacggtt aataactaaa atttattgaa atggctctgc aatgactcgt attcagatgc	5160
ctaaagaaag cattgtctgt acaaataatt ctatttttag aaagggtttt tatggaccaa	5220
tgccccagtt gtcagtcaga gccgttggtg ttttccattg tttaaaatgt cacctgtaaa	5280
atgggcatta tttatgtttt ttttttgca ttctgataa ttgtatgtat tgtataaaga	5340
acgtctgtac attgggttat aacactagta tatttaaact tacaggctta tttgtaatgt	5400
aaaccacat tttaatgtac tgtaattaac atggttataa tacgtacaat ccttccctca	5460

tcccatcaca caactttttt tgtgtgtgat aaactgattt tggtttgcaa taaaaccttg 5520
 aaaaatattt acatatattg tgtcatgtgt tattttgtat attttggtta agggggtaat 5580
 catgggtag tttaaaattg aaaacatga aaatcctgct gtaatttcct gcttagtggt 5640
 ttgctccaac agcagtgggt tctgactcca gggagtatag gatggcttaa gccaccacgt 5700
 ccaggccttt agcagcatt 5719

<210> 2

<211> 2391

<212> DNA

<213> 人, hsgk3 mRNA, AF169035

<400> 2

ggtgtgctct tgagggatta aatgcaaaga gatcacacca tggactacaa ggaaagctgc 60
 ccaagtgtaa gcattcccag ctccgatgaa cacagagaga aaaagaagag gtttactgtt 120
 tataaagttc tggtttcagt gggaagaagt gaatggtttg tcttcaggag atatgcagag 180
 ttigataaac ttataacac tttaaaaaa cagtttcctg ctatggccct gaagattcct 240
 gccaaagaaa tatttggtga taattttgat ccagatttta ttaacaaaag acgagcagga 300
 ctaaacgaat tcattcagaa cctagttagg tatccagaac ttataacca tccagatgtc 360
 agagcattcc ttcaaatgga cagtccaaaa caccagtcag atccatctga agatgaggat 420
 gaaagaagtt ctcagaagct aactctacc tcacagaaca tcaacctggg accgtctgga 480
 aatcctcatg ccaaaccaac tgactttgat ttcttaaaag ttattggaaa aggcagcttt 540
 ggcaaggttc ttcttgcaaa acggaaactg gatggaaaat tttatgctgt caaagtgtta 600
 cagaaaaaaa tagttctcaa cagaaaagag caaaaacata ttatggctga acgtaatgtg 660
 ctcttgaaaa atgtgaaaca tccgtttttg gttggattgc attattcctt ccaaacaact 720
 gaaaagcttt atttgttct ggattttgtt aatggagggg agcttttttt ccacttcaa 780

agagaacggt cctttcctga gcacagagct aggttttacg ctgctgaaat tgctagtga	840
ttgggttact tacattccat caaaatagta tacagagact tgaaaccaga aaatattctt	900
ttggattcag taggacatgt tgtcttaaca gattttgggc ttgttaaaga aggaattgct	960
attcttgaca ccactaccac attttgtggg acaccagagt atcttgcacc tgaagtaatt	1020
agaaaacagc cctatgacaa tactgtagat tgggtgtgcc ttggggctgt tctgtatgaa	1080
atgctgtatg gattgcctcc tttttattgc cgagaigtig ctgaaatgta tgacaatata	1140
cttcacaaac ccctaagttt gaggccagga gtgagtccta cagcctggtc cattctggaa	1200
gaactcctag aaaaagacag gcaaaatcga cttggtgcc aggaagactt tcttgaaatt	1260
cagaatcctc ctttttttga atcactcagc tgggctgacc ttgtacaaaa gaagattcca	1320
ccaccattta atcctaagt gtgtggacca gatgatatca gaaactttga cacagcattt	1380
acagaagaaa cagttccata ttctgtgtgt gtatcttctg actattctat agtgaatgcc	1440
agtgtattgg aggcagatga tgcatctgtt ggtttctctt atgcacctcc ttcagaagac	1500
ttatttttgt gagcagtttg ccattcagaa accattgagc aaaataagtc tatagatggg	1560
actgaaactt ctatttgtgt gaatatattc aaatatgtat aactagtgcc tcatttttat	1620
atgtaatgat gaaaactatg aaaaaatgta tttcttcta tgtgcaagaa aaatagggca	1680
tttcaaagag ctgttttgat taaaatttat attcttgttt aataagctta tttttaaaca	1740
atttaaaagc tattattctt agcattaacc tatttttaaa gaaacctttt ttgctattga	1800
ctgttttttc cctctaagtt tacactaaca tctaccaag atagactgtt ttttaacagt	1860
caatttcagt tcagctaaca tatattaata ctttgtaac tctttgctat ggcttttgtt	1920
atcacaccaa aactatgcaa ttggtacatg gttgtttaag aagaaaccgt attttccat	1980
gataaatcac tgtttgaaat atttggttca tggatatgat gaaatgtaaa agcataatta	2040
acacattggc tgctagttaa caattggaat aactttattc tgcagatcat ttaagaagta	2100

acagccggg cgcggtggct cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc tgaggcgggc 2160
 agatcacctg aggtcaggag ttggagacca gcctgaccaa catggacaaa ccccgctctt 2220
 actaaaaata caaaattggc aggggtgtgt ggcacatgcc tataatccca gctacttggg 2280
 aggctaaggc aggagaatcg cttgaaccgg ggaggcggag gttgcagtga gccgagatcg 2340
 caccattgca ctctgcctg ggcaacaaga gtgaaactcc atctcaaaa a 2391

<210> 3

<211> 995

<212> PRT

<213> 人, Nedd 4-2 蛋白, BAA23711

<400> 3

Pro Gly Gly Trp Leu Arg Arg Ala Leu Pro Gly Arg Glu Arg Leu Gln
 1 5 10 15

Ser Pro Val His Ala Val Pro Pro Gln His Gly Thr Ser His Ser Arg
 20 25 30

Leu Leu Val Thr Trp Pro Gly Ala Gly Arg Asp Gln Asp Phe Ser Ser
 35 40 45

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Gly Glu Thr Asp His Leu His Leu Asp Leu
 50 55 60

Pro Leu Ser Pro Leu Pro Thr Ser Asp Glu Leu Phe Leu Pro Gly Ile
 65 70 75 80

Cys Asp Pro Tyr Val Lys Leu Ser Leu Tyr Val Ala Asp Glu Asn Arg
 85 90 95

Glu Leu Ala Leu Val Gln Thr Lys Thr Ile Lys Lys Thr Leu Asn Pro
 100 105 110

Lys Trp Asn Glu Glu Phe Tyr Phe Arg Val Asn Pro Ser Asn His Arg
115 120 125

Leu Leu Phe Glu Val Phe Asp Glu Asn Arg Leu Thr Arg Asp Asp Phe
130 135 140

Leu Gly Gln Val Asp Val Pro Leu Ser His Leu Pro Thr Glu Asp Pro
145 150 155 160

Thr Met Glu Arg Pro Tyr Thr Phe Lys Asp Phe Leu Leu Arg Pro Arg
165 170 175

Ser His Lys Ser Arg Val Lys Gly Phe Leu Arg Leu Lys Met Ala Tyr
180 185 190

Met Pro Lys Asn Gly Gly Gln Asp Glu Glu Asn Ser Asp Gln Arg Asp
195 200 205

Asp Met Glu His Gly Trp Glu Val Val Asp Ser Asn Asp Ser Ala Ser
210 215 220

Gln His Gln Glu Glu Leu Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu
225 230 235 240

Glu Lys Val Asp Asn Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Val Asn His Asn Asn
245 250 255

Arg Thr Thr Gln Trp His Arg Pro Ser Leu Met Asp Val Ser Ser Glu
260 265 270

Ser Asp Asn Asn Ile Arg Gln Ile Asn Gln Glu Ala Ala His Arg Arg
275 280 285

Phe Arg Ser Arg Arg His Ile Ser Glu Asp Leu Glu Pro Glu Pro Ser
290 295 300

Glu Gly Gly Asp Val Pro Glu Pro Trp Glu Thr Ile Ser Glu Glu Val
305 310 315 320

Asn Ile Ala Gly Asp Ser Leu Gly Leu Ala Leu Pro Pro Pro Pro Ala
325 330 335

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

Arg Arg Leu Gln Ile Thr Pro Asp Ser Asn Gly Glu Gln Phe Ser Ser
355 360 365

Leu Ile Gln Arg Glu Pro Ser Ser Arg Leu Arg Ser Cys Ser Val Thr
370 375 380

Asp Ala Val Ala Glu Gln Gly His Leu Pro Pro Pro Ser Val Ala Tyr
385 390 395 400

Val His Thr Thr Pro Gly Leu Pro Ser Gly Trp Glu Glu Arg Lys Asp
405 410 415

Ala Lys Gly Arg Thr Tyr Tyr Val Asn His Asn Asn Arg Thr Thr Thr
420 425 430

Trp Thr Arg Pro Ile Met Gln Leu Ala Glu Asp Gly Ala Ser Gly Ser
435 440 445

Ala Thr Asn Ser Asn Asn His Leu Ile Glu Pro Gln Ile Arg Arg Pro
450 455 460

Arg Ser Leu Ser Ser Pro Thr Val Thr Leu Ser Ala Pro Leu Glu Gly
465 470 475 480

Ala Lys Asp Ser Pro Val Arg Arg Ala Val Lys Asp Thr Leu Ser Asn
485 490 495

Pro Gln Ser Pro Gln Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Pro Lys Pro Gln His
500 505 510

Lys Val Thr Gln Ser Phe Leu Pro Pro Gly Trp Glu Met Arg Ile Ala
515 520 525

Pro Asn Gly Arg Pro Phe Phe Ile Asp His Asn Thr Lys Thr Thr Thr
530 535 540

Trp Glu Asp Pro Arg Leu Lys Phe Pro Val His Met Arg Ser Lys Thr
545 550 555 560

Ser Leu Asn Pro Asn Asp Leu Gly Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Glu
565 570 575

Arg Ile His Leu Asp Gly Arg Thr Phe Tyr Ile Asp His Asn Ser Lys
580 585 590

Ile Thr Gln Trp Glu Asp Pro Arg Leu Gln Asn Pro Ala Ile Thr Gly
595 600 605

Pro Ala Val Pro Tyr Ser Arg Glu Phe Lys Gln Lys Tyr Asp Tyr Phe
610 615 620

Arg Lys Lys Leu Lys Lys Pro Ala Asp Ile Pro Asn Arg Phe Glu Met
625 630 635 640

Lys Leu His Arg Asn Asn Ile Phe Glu Glu Ser Tyr Arg Arg Ile Met
645 650 655

Ser Val Lys Arg Pro Asp Val Leu Lys Ala Arg Leu Trp Ile Glu Phe
660 665 670

Glu Ser Glu Lys Gly Leu Asp Tyr Gly Gly Val Ala Arg Glu Trp Phe
675 680 685

Phe Leu Leu Ser Lys Glu Met Phe Asn Pro Tyr Tyr Gly Leu Phe Glu
690 695 700

Tyr Ser Ala Thr Asp Asn Tyr Thr Leu Gln Ile Asn Pro Asn Ser Gly
705 710 715 720

Leu Cys Asn Glu Asp His Leu Ser Tyr Phe Thr Phe Ile Gly Arg Val
725 730 735

Ala Gly Leu Ala Val Phe His Gly Lys Leu Leu Asp Gly Phe Phe Ile
740 745 750

Arg Pro Phe Tyr Lys Met Met Leu Gly Lys Gln Ile Thr Leu Asn Asp
755 760 765

Met Glu Ser Val Asp Ser Glu Tyr Tyr Asn Ser Leu Lys Trp Ile Leu
770 775 780

Glu Asn Asp Pro Thr Glu Leu Asp Leu Met Phe Cys Ile Asp Glu Glu
785 790 795 800

Asn Phe Gly Gln Thr Tyr Gln Val Asp Leu Lys Pro Asn Gly Ser Glu
805 810 815

Ile Met Val Thr Asn Glu Asn Lys Arg Glu Tyr Ile Asp Leu Val Ile
820 825 830

Gln Trp Arg Phe Val Asn Arg Val Gln Lys Gln Met Asn Ala Phe Leu
835 840 845

Glu Gly Phe Thr Glu Leu Leu Pro Ile Asp Leu Ile Lys Ile Phe Asp
850 855 860

Glu Asn Glu Leu Glu Leu Leu Met Cys Gly Leu Gly Asp Val Asp Val
865 870 875 880

Asn Asp Trp Arg Gln His Ser Ile Tyr Lys Asn Gly Tyr Cys Pro Asn
885 890 895

His Pro Val Ile Gln Trp Phe Trp Lys Ala Val Leu Leu Met Asp Ala
900 905 910

Glu Lys Arg Ile Arg Leu Leu Gln Phe Val Thr Gly Thr Ser Arg Val
915 920 925

Pro Met Asn Gly Phe Ala Glu Leu Tyr Gly Ser Asn Gly Pro Gln Leu
930 935 940

Phe Thr Ile Glu Gln Trp Gly Ser Pro Glu Lys Leu Pro Arg Ala His
945 950 955 960

Thr Cys Phe Asn Arg Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Glu Thr Phe Glu Asp
965 970 975

Leu Arg Glu Lys Leu Leu Met Ala Val Glu Asn Ala Gln Gly Phe Glu
980 985 990

Gly Val Asp
995

图1

