



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년02월25일  
(11) 등록번호 10-0944636  
(24) 등록일자 2010년02월19일

(51) Int. Cl.

*C12N 5/07* (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0025460

(22) 출원일자 2009년03월25일

심사청구일자 2009년03월25일

(56) 선행기술조사문헌

Neurobiology of Disease, Vol. 27,  
pp.141-150.\*

PNAS, Vol. 102, pp.5215-5220.

Arch. Neurol. Vol. 57, pp.369-372.

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

손형진

서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여대

심정희

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 55동 50  
5호

윤승희

서울특별시 마포구 신수동 88-19번지 영승 아트빌  
104호

(74) 대리인

노재철

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 김경미

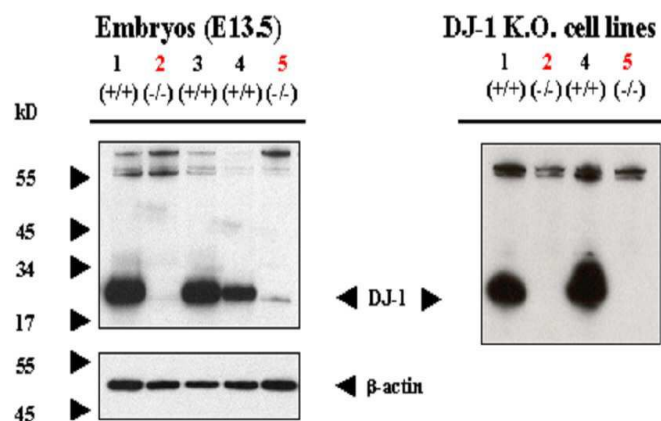
(54) 파킨슨병의 진단에 적용될 수 있는 병리유전학적 마커 확보를 위한 디제이-1 상실 세포주

(57) 요약

본 발명은 파킨슨병 병리유전자 마커를 탐색할 수 있는 신규한 디제이-1(DJ-1) 상실 변이세포주, 이를 이용하여 탐색된 병리유전자 마커로부터 파킨슨병의 치료, 예방 및 병의 진행완화를 위한 치료약물 탐색과 임상진단에 사용될 수 있는 진단키트 및 파킨슨병 병리유전학적 마커를 이용한 파킨슨병 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 유전자 마커들은 디제이-1(DJ-1) 상실 변이세포주에 의해 발현이 증감되는 경우 흑질의 기능이 저하될 수 있어 그 기능저하를 초래시키는 표적 유전자 마커로서 임상진단에 사용될 수 있으며, 이들을 대상으로 파킨슨병의 임상진단을 적용할 수 있고, 또한 파킨슨병의 치료, 예방 그리고 증세완화를 위하여 퇴행성 만성뇌질환의 맞춤형 신경보호용 치료제 탐색함에 있어 세포-기반 측정법 도구로서 사용될 수 있으므로 매우 유용하다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|        |                              |
|--------|------------------------------|
| 과제고유번호 | A08-0663-A21724-08N1-00010A  |
| 부처명    | 보건산업진흥원                      |
| 연구사업명  | 중개연구                         |
| 연구과제명  | 파킨슨병 조기 진단 및 치료제 개발          |
| 주관기관   | 이화여자대학교 산학협력단                |
| 연구기간   | 2008년 05월 01일 ~ 2010년 3월 31일 |

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

삭제

### 청구항 2

DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KTC 11472BP에 의해 탐색된 파킨슨병 특이적 발현 유전자인 팩스8(Pax8), 글루타르레독신(glutaredoxin: Glr), 아크리-코엠퍼자임 탈수소효소(acyl-Coenzyme A dehydrogenase: Acadsb) 및 Nedd9 유전자(developmentally down-regulated gene 9) 중에서 선택되는 것을 포함함을 특징으로 하는 파킨슨병 진단키트.

### 청구항 3

DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KTC 11472BP에 의해 탐색된 파킨슨병 특이적 발현 유전자인 팩스8(Pax8), 글루타르레독신(glutaredoxin: Glr), 아크리-코엠퍼자임 탈수소효소(acyl-Coenzyme A dehydrogenase: Acadsb) 및 Nedd9 유전자(developmentally down-regulated gene 9)로 구성되는 군 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 의하여 코드되는 단백질에 시험 화합물을 결합시키고, 시험 화합물이 상기 단백질의 작용을 촉진 또는 억제하는지를 확인하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 억제제의 스크리닝 방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 병리유전자 마커를 탐색할 수 있는 신규한 디제이-1(DJ-1) 상실 변이주, 이를 이용하여 탐색된 병리유전자 마커로부터 파킨슨병의 치료, 예방 및 병의 진행완화를 위한 치료약물 탐색과 임상진단에 사용될 수 있는 진단키트 및 파킨슨병 병리유전학적 마커를 이용한 파킨슨병 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 1817년 James Parkinson에 의해 최초로 보고된 질병으로 나이가 들면서 노화로 인해 근육을 조절하는 신경전달물질인 도파민 분비가 이루어지는 흑색질(substantia nigra, SN)의 신경세포의 손실과 선조체의 도파민 결핍으로 인해 운동능력을 상실하는 대표적인 퇴행성 뇌질환의 일종이다.

[0003] 이 파킨슨병은 65세 이상 인구의 1%, 85세 이상 인구에서는 5%정도가 발병한다(Twelves 등. Mov Disord 18, 19-31). 특징적인 임상적 증상으로는 떨림(resting tremor), 서행(bradykinesia), 강직(rigidity) 및 자세 불안정(postural instability)을 수반하며 흑색질(substantia nigra, SN)내 도파민 신경(dopaminergic neuron)의 선택적 소실(selective loss)에 의해 유발되며, 루이체(Lewy body)로 알려진 신경세포간 단백질응집체(intraneuronal proteinous inclusion)의 존재가 대표적인 병리학적 특성이다(Olanow 등. Annu Rev Neurosci 22, 123-44).

[0004] 파킨슨병의 발병 원인은 정확히 밝혀지지 않고 있다. 대부분의 파킨슨병인 산발형(sporadic form)의 경우 그 원인은 특발성(idiopathic)으로 거의 알려져 있지 않지만 환경적 요인(environmental factor)들과 아직 완전히 규명되지 않은 유전적 감수성(genetic susceptibility)간의 복잡한 상호작용이 중요한 원인으로 추정되고 있다(Langston 등. Ann Neurol 44(3 Suppl 1): S45-52).

[0005] 파킨슨병은 병리학적으로 중뇌의 흑색질(substantia nigra)에 존재하는 멜라닌 색소를 포함한 도파민성 신경세포와 신경 섬유(neurite fiber)의 특이적으로 손실과 선조체(striatum)의 도파민 결핍으로 인해 행동학적 이상 증세를 나타내게 된다. 또한 파킨슨병 환자의 신경 세포에서는 단백질 응집체인 루이체(Lewy body)가 질병의 표지 인자로 관찰된다.

[0006] 파킨슨병의 대표적인 발병 기전으로는 산화적 스트레스(oxidative stress), 미토콘드리아 기능이상(mitochondrial dysfunction), 유비퀴틴-프로테아좀 기능이상(ubiquitin-proteasome dysfunction) 및 이상 단

백질 축적(accumulation of misfolded proteins)이 있다.

- [0007] 파킨슨병은 위와 같은 환경적인 발병기전 뿐만 아니라 유전적 인자에 의해서도 발병되어지는데, 지금까지 파킨슨병과 관련된 유전자로는 Polymeropoulos등에 의해서  $\alpha$ -synuclein(Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, Science 276 (1997), p2045-2047), C. Paisan-Ruiz등에 의해서 LRRK2(Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease, Neuron 44 (2004), pp. 595-600), Kitada등에 의해서 AR-JP를 나타내는 일본 가계의 유전적 결함에 대한 positional cloning(Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, Nature, 392 (1998), pp.605-608)에 의해서 처음 보고되었다. 또한 Valente등에 의해서 PINK1(Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase, Nat. Genet. 38 (2006), pp. 1184-1191), Bonifati등에 의해서 DJ-1(Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, Science 299 (2003), pp. 256-259), 그리고 Ramirez등에 의해서 ATP13A2(Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase, Nat. Genet. 38 (2006), pp. 1184-1191)이 보고되어 있다.
- [0008] 현재 유전성 파킨슨병(familial Parkinson's disease)을 일으키는 유전자 돌연변이인 DJ-1, Parkin, PINK1 등이 발견되어 연구되어지고 있으나, 이들 유전자는 거의 대부분의 세포에서 발현됨에도 불구하고, 유전성 파킨슨병(familial Parkinson's disease) 환자의 중뇌(midbrain) 흑질(substantia nigra) 내 도파민성 신경(dopaminergic neurons) 만을 특이적으로 사멸시킨다고 알려져 있다.
- [0009] 최근에는 파킨슨병 중 유전성 파킨슨병(familial Parkinson's disease)을 일으키는 유전자들의 돌연변이들이 발견되고 있으며, 특히 열성 유전자인 DJ-1의 유전자 상실로 인해 발생하는 사립체 기능 이상과 산화적 스트레스 등이 연구되어 지고 있다. 또한 이 유전자들의 기능 상실시 나타나는 변화들을 통해 신경 보호를 위한 치료제 및 바이오 마커를 발굴하고자 하는 연구들이 시도되어지고 있다.
- [0010] 이러한 도파민성 신경 세포에서의 변화되는 바이오 마커와 신경 보호 타겟을 찾기 위해 현재 보편적으로 사용되어지고 있는 도파민성 신경 세포는 MES23.5 세포, MN9D 세포, PC12 세포, SHSY5Y 세포와 CATH.a 세포 등이 있다. 하지만 이들 세포 모델들은 도파민 신경 세포만의 세포내 환경이 유지되지 못하고 있으며 세포의 기원이 전혀 다르거나 또는 융합된 세포의 유전적 특성을 함께 보유하고 있다.
- [0011] 또한 특정 유전자 적중된 세포 모델을 통해 연구되어지고 있는데 이들 대부분은 유전자 상실이 아닌 siRNA와 같은 유전자 부분 상실을 일으킨 세포 모델로써 완벽한 유전자 기능 소실시 나타날 수 있는 변화에 대한 타겟 발굴에는 미흡한 점이 있다.
- [0012] 세포 모델과 더불어 파킨슨병 동물 모델로 제작, 연구에 사용되어 지고 있는 것으로 DJ-1 유전자 상실(knockout) 동물 모델이 있다. 인간의 DJ-1 돌연변이가 발견되어 진 후(Science, 299:256-259,2003) 이것을 토대로 한 DJ-1 유전자 형질전환 마우스가 제작되어 졌다(Journal of biology and chemistry, 180:21418-21426, 2005).
- [0013] 이 동물 모델은 DJ-1의 프로모터 부분과 처음의 엑손 부분이 결실된 모델이었다. 비슷한 시기에 또 다른 연구진들에 의해 DJ-1의 2번째 엑손 부분을 파손시킨 마우스 모델이 만들어 졌으며(Neurons, 45:489-496), 이 두 그룹의 모델 모두 흑색질 내의 도파민성 신경 세포의 숫자는 감소하지 않음을 보였다. 또한 DJ-1의 2번째 엑손과 1번째 엑손을 모두 결실시킨 동물 모델이 제작되었다(Proceedings of the National Academy of Sciences, 102:5215-5220,2005).
- [0014] 앞서 말한 이들 동물 모델들은 사람에게 있어서, DJ-1 유전자가 결손 되었을 때 생기는 파킨슨병에서 유전자 치료의 선행 실험을 하는데 굉장히 효과적인 동물 모델이지만 이들 동물 모델 또한 그들에게서 분자, 생화학적 연구를 진행하기에 충분한 순수 도파민성 세포를 얻기란 여전히 어려운 실정이다. 이런 문제점들은 실제 파킨슨병을 앓고 있는 환자에서도 마찬가지이다. 실제로 DJ-1의 기능 이상에 의한 환자를 선별하기란 굉장히 어려우며 실험용 샘플의 확보는 더더욱 어렵다.
- [0015] 대한민국 특허출원 제2007-110102호에는 단백질 응집체 형성에 일부 관여한다는 것이 개시되어 있으며, 국제특허 PCT/EP2004/008609호에는 관절염에 관여한다는 내용이 공지되어 있으나, 파킨슨 발병에 대한 병인유전자로서의 DJ-1에 관한 상세한 기작에 대해서는 전혀 밝혀지지 않아 DJ-1 유전자상의 변이에 의해 단백질이 정상적으로 생산되지 않는 경우 파킨슨병이 유발된다는 사실은 아직 불명확하다.
- [0016] DJ-1의 기능과 특히 도파민성 신경 세포의 퇴행에 관여하는 역할은 확실히 알려지지 않는 것이다. DJ-1은 1997년

암유발 유전자(oncogene)로 처음 보고되었다 (Biochemical and Biophysical Research Communications, 231:509-513, 1997). DJ-1은 뇌의 대부분의 부분에서 발현되며, 신경 세포의 세포질(cytoplasm) 뿐만 아니라 세포 내 소기관인 사립체(mitochondria)의 막 사이 공간(inter membrane space)과 기질(matrix)에도 위치하고 있다(Human Molecular Genetics, 14:1063-2073, 2005). DJ-1은 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의해서 사립체(mitochondria)로 이동하게 되고, 이 사립체 내의 DJ-1은 세포 보호 역할을 한다고 알려졌다.

[0017] 파킨슨병은 위에 언급된 DJ-1과 같은 유전자 이상과 환경적 요인들이 복잡하게 얽혀 발병하게 되지만, 현재 파킨슨병 치료법은 매우 제한적이며 발병 이전에 따른 세부적인 치료법이 발견되어지는 않는 실정이다. 최근까지 가장 효율적인 치료법이라고 알려져 있는 방법은 도파민 전구체인 L-dopa를 투여하여 부족한 도파민으로 전환시키는 방법이다. 하지만 이 치료법은 많은 부작용을 초래하기도 한다.

[0018] 이러한 이유로 파킨슨 발병원인과 세포 사멸 기전을 좀 더 특이적으로 연구해야 할 필요성이 대두되었으며, 본 발명자는 상염색체성 열성 유전자인 DJ-1 손실에 따른 유전적, 환경적 복합 기작의 연구를 위하여 DJ-1 유전자를 상실시킨 신규한 변이 세포주를 제작함으로써, 이를 이용하여 탐색된 병리유전자 마커들은 파킨슨병의 치료, 예방 및 병의 진행완화를 위한 치료약물 탐색과 임상진단에 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

[0019] 본 발명은 파킨슨병의 치료, 예방 및 진단을 위해한 DJ-1 유전자 상실시 또 다른 유전적 발현 양상의 변화를 스크리닝하기 위한 보다 효율적인 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 모델을 이용한 파킨슨 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP를 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0023] 본 발명은 파킨슨병의 치료, 예방 및 진단을 위한 DJ-1 유전자가 상실시 또 다른 유전적 발현 양상의 변화를 스크리닝하기 위한 보다 효율적인 모델로서, DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP를 제공한다.

[0024] 본 발명은 DJ-1 유전자가 상실됨으로써 생기는 파킨슨병의 다른 유전적 변이를 스크리닝을 통해 분석해 보고 이 분석과 비교, 관찰하여 파킨슨병의 임상진단, 치료, 예방, 예후평가에 적용될 수 있도록 한다.

[0025] 현재 다량의 유전자 발현의 변화를 알아보고자 많은 실험 방법을 통해 분석되어지고 있다. 대표적인 것이 다량의 유전자들이 혼성화 되어 있는 DNA chip이 있다. 이러한 유전적 변화를 분석하기 위해서 현재 대부분 파킨슨병 동물들의 실재 뇌조직으로부터 추출한 알엔에이와 단백질을 통해 이루어지지만 이들은 도파민 신경이라는 특이성을 극히 일부분 가지고 있다. 때문에 본 발명은 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP를 통해 분자 생물학적 변이를 다량으로 신속하게 분석할 수 있게 제공해 준다.

[0026] 구체적으로, 본 발명은 세포골격(cytoskeleton) 관련 유전자들, 에너지 대사(energy metabolism) 관련 유전자들, 신호전달(signal transduction) 관련 유전자들, 스트레스 해독(stress/detoxification) 관련 유전자들, 단백질 폴딩(protein folding) 관련 유전자들, 단백질 분해(protein degradation) 관련 유전자들, 및 신경전달물질 대사(neurotransmitter metabolism) 관련 유전자들이 DJ-1의 선택적 상실에 의해 변화를 일으키는 현상을 관찰 할 수 있었다.

[0027] 특히, 배발생의 조직과 기관형성에 중요한 팩스8(Pax8, 염기서열은 서열목록 1에 나타내었다), 글루타르레독신(glutaredoxin: Glrx, 염기서열은 서열목록 2에 나타내었다), 미토콘드리아의 지방 베타-산화과정에 촉매하는 아크리-코엔자임 탈수소효소(acyl-Coenzyme A dehydrogenase: Acadsb, 염기서열은 서열목록 3에 나타내었다), 발생 하위과정에 관련된 유전자(developmentally down-regulated gene 9: Nedd9, 염기서열은 서열목록 4에 나타내었다)로 이루어진 파킨슨병(Parkinson's disease)의 임상진단에 적용될 수 있는 병리유전학적 바이오마커가 파킨슨병의 임상진단에 적용될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 확인된 파킨슨 병 마커 유전자의 서열정보는 다음 표에 나타낸 바와 같다.

[0029] [표]

| 유전자     | 길이   | CDS(단백질 영역) | 위치       |
|---------|------|-------------|----------|
| Pax8    | 2527 | 166,1539    | 2q12-q14 |
| Glr3    | 1335 | 84,407      | 5q14     |
| Acadslb | 3243 | 46,1344     | 10q26.13 |
| Nedd9   | 4563 | 317,1828    | 6p25-p24 |

[0030]

[0031] 본 발명의 4종의 파킨슨병 마커유전자는 단독 또는 조합하여 파킨슨병 진단키트에 사용될 수 있다.

[0032] 또한, 4종의 파킨슨병 마커유전자는 파킨슨병 관련 유전일 가능성이 높으므로, 이러한 표적 유전자가 코딩하는 단백질에 결합하는 작은 분자의 화합물은 표적 단백질을 저해 또는 촉진하는 화합물의 후보가 될 수 있으며, 이는 파킨슨병 치료제 등의 의약품으로 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서 퇴행성 뇌질환의 맞춤형 신경보호물질을 세포-기반 치료제 탐색 방법을 통해 개발할 수도 있고 개발되어진 치료제는 해당용도에 따라 약학적으로 허용 가능한 나노담체 또는 부형제와 함께 독립적으로 또는 약품 첨가제로 사용되거나 사람에게 투여하기 적합한 기타 모든 제형, 제제로 사용될 수 있는 맞춤형 신경보호 약물 치료제로 사용될 수 있다. 본 발명의 퇴행성 뇌질환 치료제에 함유될 수 있는 담체로는 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 섬유, 중량제, 고섬유 첨가제, 키토산 중량제, 리포지질체, 캡슐화제 및 지질등의 포함될 수 있으며, 이러한 담체들의 예는 상업적으로 공지되어 있다.

[0034] 이런 화합물을 스크리닝하는 방법으로 상기 4종의 파킨슨병 마커 유전자가 코딩하는 단백질을 어피니티컬럼에 고정시키고 이를 피검시료와 접촉시켜 정제하는 방법[Pandya 등, Virus Res 87:135-13,2002], 투하이브리드법을 이용하는 방법[Fields, S and Song, O., Nature 340:245-246,1989], 웨스턴 블로팅법[“Molecular Cloning-A Laboratory Manual” Cold Spring Habor Laboratory, NY, Maniatis, T. et al.(1982) section 18.30-18.74], 하이스루풋스크리닝법[Aviezer 등, J Biomol Screen 6:171-7,2001] 등 다수의 공지방법을 사용할 수 있다.

## 효 과

[0035] 본 발명은 병리유전학적 바이오마커 탐색을 위한 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP를 제공하며, 파킨슨병의 원인인 DJ-1유전자의 변이로 인해 유전자 발현이 증감되는 유전자 마커들을 제공함으로써, 이들 마커를 퇴행성 뇌질환의 예방, 완화, 치료에 이용되는 표적유전자로 사용되는 임상진단의 용도로 사용될 수 있으며, DJ-1 변이체 유래 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP로부터 퇴행성 뇌질환의 맞춤형 신경보호물질을 세포-기반 치료제 탐색 방법을 통해 개발할 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0037] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### [0038] <실시예 1> 병리유전학적 바이오마커 탐색을 위한 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 제작

#### [0039] 1) DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 제작

[0040] TH-TagA58 형질 전환 마우스와 DJ-1 유전자 적중 마우스를 교배하여 이중 유전자 적중 마우스를 제작 후, 이 마우스 후질부의 조직으로부터 획득한 세포를 특이적 항생제로 선별하는 과정을 통하여 순수 DJ-1 유전자 상실 신경세포주를 수립한다. 이 세포주는 하기 [표 1]에 기재된 조성의 배지 내(pH7.0)에서 약 10일 이상의 선별, 배양한 후 반영구적으로 자기증식하는 세포주인 신규한 DJ-1 적중 도파민성 신경세포 세포주 KCTC 11472BP를 제작하였다. 상기 병리유전학적 바이오마커 탐색을 위한 신규한 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 제작과정을 도 1에 나타내었다. 본 발명자들은 상기 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주를 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 유전자은행에 2009. 3. 6. 기탁하였으며, 그로부터 기탁번호 KCTC 11472BP를 부여받았다.

**표 1**

배양배지 조성

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| DMEM                    | 426.5 ml |
| FBS                     | 50 ml    |
| Penicillin Streptomycin | 5 ml     |
| L-glutamine             | 3.5 ml   |
| 20% Glucose             | 15 ml    |
|                         | 500 ml   |

[0041]

[0042]

상기와 같이 확보된 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP는 온도 감수성 세포주로 기존의 37℃ 배양 세포주들과 달리 배양온도가 33℃이고, 5% CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하여야 하고 장기 보관을 위해 표1과 같은 디엠에(DMEM)배지의 100mm 배양접시에서 배양한 세포주를 트립신-이디티에이(Trypsin-EDTA)으로 처리하여 세포를 떼어내어 이를 1000rpm에서 3분간 원심분리 하여 상등액을 버리고 농축된 세포수를 2X10<sup>6</sup>가 되게 하여 DMSO 0.1 ML, 10%의 소혈청이 함유한 DMEM 배지 0.5 ML 그리고 FBS 0.4 ML을 넣어 냉동보관용 바이알에 분주하여 처음 영하 20℃에서 3시간 보관 뒤 영하 80℃에서 하룻밤 보관 후 영하 280℃의 액체질소가 들어 있는 질소탱크에 장기간 보관한다.

[0043]

2) 유전자 수준과 단백질 수준에서의 DJ-1 유전자 상실 확인

[0044]

본 실험은 유전자 타이핑(gene typing)과 웨스턴 블롯으로 단백질 분리를 수행하여 상기 실시예 1에서 제작된 신규한 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP는 야생 세포주, 배아, DJ-1 변이체들과 비교하여 차이가 있는지 확인하기 위한 것이다.

[0045]

DJ-1의 유전자와 단백질의 양적 증감을 확인하기 위해 마커 단백질을 분리하여 유전자 상실 마우스의 배아와 DJ-1 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP에서 정확히 DJ-1 상실을 단백질 수준에서 확인하기 위해 DJ-1 항체 (Chemicon, USA)를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였는데, 배아 13.5일 시점의 조직과 DJ-1 상실시킨 생쥐의 조직으로부터 단백질 용해액을 첨가하여 단백질 변화는 Western blot으로 수행하기 위해 조직을 차가운 용해 완충액(lysis buffer)[20 mM 헤페스(Hepes), pH 7.9, 150 mM( NaCl;소듐 나트레이트), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1% 노디에트(Nonidet P-40), 0.5% 소듐 디옥시크로레이트(sodium deoxycholate), 0.1% SDS, 50 mM NaF, 5 mM 소듐 오소마나드레이트(sodium orthovanadate)]으로 20분간 처리하고 단백질만을 회수하여 단백질 함량을 측정하기 위해 바이오-레드 단백질 정량시약 키트(Bio-Rad Dc protein assay kit, Bio-Rad)로 측정하여 정량화하였다.

[0046]

50μg의 용해물은 에스디에스-폴리아크리아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel)에 전기영동을 수행하였다. 이후 PVDF 막으로 옮겨서 특이적 항체인 DJ-1 일차항체와 일차 β-actin 항체를 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후 2차 항체인 호오스 라디시 페로옥시다제 항체(anti rabbit HRP(horse radish peroxidase)를 이시엘 화학발광법(ECL chemiluminescence method, Amersham Corp.)으로 분석하여 도 2에 나타내었다.

[0047]

3) 유전자 발현 양상 변화와 마커 유전자들의 기능적 분류 동정

[0048]

대조군인 SN4741 세포주와 실험군인 DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 유전자 발현정도를 비교해 본 결과 이들 세포주에서 획득한 알엔에이(RNA)를 Illumina bead array와 혼성화 과정 후 그 발현 세기를 Illumina bead array reader로 읽은 array상 유전자 발현 신호는 Benjamini-Hochberg FDR p-value 통해 비교·분석되었으며, Arravassist®(Stratagene)의 Support Vector Machine Program을 통해 분류화 작업이 이루어졌다. 생물학적 경로와 대사 및 분자적 기능별의 분류는 Panther database(<http://www.pantherdb.org>)에 기초하여 이루어졌으며, 그 발현 양에 있어서 현저한 변화가 있는 것은 DJ-1이며, 약 151배 정도가 감소하였다(표 2). 이것을 통해 본 발명에 따른 DJ-1 상실 세포주 KCTC 11472BP에서의 DJ-1 유전자가 완벽히 손실되었음을 확인할 수 있다.

표 2

DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 DJ-1 유전자 손실 확인

| 정의                                                           | 명칭           | 고유번호        | 배수      |
|--------------------------------------------------------------|--------------|-------------|---------|
| Parkinson disease(autosomal recessive, early onset) 7, mRNA. | DJ-1 (Park7) | NM_020569.1 | -151.75 |

[0049]

[0050]

먼저, 유전자 칩 상에 존재하는 24,000 여개의 유전자 중 실험군인 DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서 변화를 보이는 9,500여개의 유전자들을 분석 후 Panther database(<http://www.pantherdb.org>)의 웹사이트 database를 기초로 분자생물학적 기능별로 분류하여 도 3에 나타내었다.

[0051]

DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 유전자 발현정도에서 발현양이 20배 이상 증가된 유전자들을 표 3에 나타내었으며, DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 유전자 발현정도에서 20배 이하로 감소된 유전자들을 표 4에 나타내었다.

표 3

DJ-1 적중 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 유전자 발현정도에서 증가된 유전자들

| 정의                                                                                               | 명칭        | 고유번호        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------|
| insulin-like growth factor binding protein 2 (Igfbp2), mRNA.                                     | Igfbp2    | NM_008342.2 |
| spondin 2, extracellular matrix protein (Spon2), mRNA.                                           | Spon2     | NM_133903.2 |
| O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (Mgmt), mRNA.                                            | Mgmt      | NM_008598.1 |
| lactate dehydrogenase 2, B chain (Ldh2), mRNA.                                                   | Ldh2      | NM_008492.2 |
| wingless-related MMTV integration site 5A (Wnt5a), mRNA.                                         | Wnt5a     | NM_009524.2 |
| interferon induced transmembrane protein 3 (Ifitm3), mRNA.                                       | Ifitm3    | NM_025378.1 |
| potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1 (Kcnab1), mRNA.         | Kcnab1    | NM_010597.2 |
| small nuclear ribonucleoprotein N (Snrpn), mRNA.                                                 | Snrpn     | NM_013670.2 |
| dicckopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3), mRNA.                                                | Dkk3      | NM_015814.2 |
| coactosin-like 1 (Dictyostelium) (Cotl1), mRNA.                                                  | Cotl1     | XM_150115.1 |
| RAS guanyl releasing protein 3 (Rasgrp3), mRNA.                                                  | Rasgrp3   | NM_207246.2 |
| eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked (Eif2s3y), mRNA. | Eif2s3y   | NM_012011.1 |
| tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) (Tnfrsf11b), mRNA.      | Tnfrsf11b | NM_008764.2 |
| engrailed 2 (En2), mRNA.                                                                         | En2       | NM_010134.1 |
| DNA segment, human D4S114 (D0H4S114), mRNA.                                                      | D0H4S114  | NM_053078.3 |
| lysyl oxidase-like 1 (Loxl1), mRNA.                                                              | Loxl1     | NM_010729.2 |
| cytochrome b-245, alpha polypeptide (Cyba), mRNA.                                                | Cyba      | NM_007806.1 |

[0052]

표 4

DJ-1 적중 도파민성 신경세포주 KCTC 11472BP에서의 유전자 발현정도에서 감소된 유전자들

| 정의                                                                                  | 명칭      | 고유번호        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|
| Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7 (Park7), mRNA.               | Park7   | NM_020569.1 |
| alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide (Adh7), mRNA.           | Adh7    | NM_009626.2 |
|                                                                                     | Rarres1 | XM_130987.3 |
| proteoglycan 2, bone marrow (Prg2), mRNA.                                           | Prg2    | NM_008920.2 |
| transmembrane 4 superfamily member 3 (Tm4sf3), mRNA.                                | Tm4sf3  | NM_146010.1 |
| forkhead box C2 (Foxc2), mRNA.                                                      | Foxc2   | NM_013519.1 |
| F-box and WD-40 domain protein 5 (Fbxw5), mRNA.                                     | Fbxw5   | NM_013908.1 |
| processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae) (Pop4), mRNA. | Pop4    | NM_025390.2 |

[0053]

- [0054] 4) 병리유전학적 바이오마커 유전자들의 비교 동정
- [0055] 실험군인 DJ-1 적중 도파민성 신경세포주 KTC 11472BP와 대조군인 SN4741 세포주에서의 유전자 발현정도를 병리유전학적 측면에서 비교하였다.
- [0056] 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 실험결과 배발생의 조직과 기관형성에 중요한 팩스8(Pax8), 글루타르데독신 (glutaredoxin: Glrx), 미토콘드리아의 지방 베타-산화과정에 촉매하는 아크리-코엠프자임 탈수소효소(acyl-Coenzyme A dehydrogenase: Acadsb), 발생 하위과정에 관련된 유전자(developmentally down-regulated gene 9: Nedd9)로 이루어진 파킨슨병(Parkinson's disease)의 임상진단에 적용될 수 있는 병리유전학적 바이오마커로 상기 유전자가 발현 수준에서 소실내지 증폭된 것을 확인하였다.
- [0057] 또한 상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 DJ-1 적중 도파민성 세포주 KTC 11472BP와 대조군인 과거 수립되어진 야생 도파민성 신경세포인 SN4741의 RNA를 각각 추출하여 유전자 칩 상에서 혼성화 후 분석 결과 대조군에 비해(fold 값 ; DJ-1 적중 도파민성 세포주에서의 발현 정도(실험군) / 야생 도파민성 신경 세포 SN4741에서의 발현 정도(대조군)) 현저하게 발현이 감소하는 것을 알 수 있다.
- [0058] 따라서, DJ-1과 같은 기능상실에 의한 파킨슨병의 발병에 있어서 배발생의 조직과 기관형성에 중요한 팩스8 (Pax8), 글루타르데독신 (glutaredoxin: Glrx), 미토콘드리아의 지방 베타-산화과정에 촉매하는 아크리-코엠프자임 탈수소효소 (acyl-Coenzyme A dehydrogenase: Acadsb) 및 발생 하위과정에 관련된 유전자 (developmentally down-regulated gene 9: Nedd9)는 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KTC 11472BP에 의해 탐색된 파킨슨병 특이적 발현 유전자로서 파킨슨병(Parkinson's disease)의 임상진단에 적용될 수 있는 병리유전학적 바이오 마커임을 알 수 있다.
- [0059] **<실시예 2> 파킨슨 유전자인 DJ-1 유전자 상실에 따른 마우스 유전자들의 발현 변화 관찰을 위한 스크리닝 실험**
- [0060] 본 실험은 파킨슨병의 원인 유전자 중 하나인 DJ-1이 상실(knockout) 되었을 경우 유전자의 발현에 어떠한 변화가 생기는지 조사하기 위한 선행 실험이다.
- [0061] 상기 실험은 DJ-1 유전자 상실 도파민성 신경세포 세포주 KTC 11472BP와 대조군인 SN4741 세포주를 미리 100 mm(직경)의 배양접시에 배양한 것을 인산완충액으로 2번 세척한 후 Trizol(invitrogen, USA)을 0.5ml를 넣고 스크래퍼를 이용하여 세포를 떼어 내어 추출한 다음 RNeasy columns (Qaigen, USA)을 이용하여 정제한 후 UV spectrophotometer(Molecular designer)로 파장대(260/280 nm)에서 측정함으로써 DJ-1 유전자 상실 도파민성 신경세포 세포주 KTC 11472BP와 대조 세포주에서 순도 높은 RNA가 추출되었는지 확인 후 본 실험을 수행한 것이다.
- [0062] 실험군인 DJ-1 상실 도파민성 신경세포주 KTC 11472BP와 대조군으로 SN4741 세포주의 mRNA를 RNA 분리 키트 (RNeasy kit, QIAGEN, USA)로 분리하여 RNA용액(10 내지 100 µg양의 mRNA 8마이크로리터, 50 피코몰의 랜덤프라이머 (random primer) 4 µl, 40 unit RNase저해제 2 µl, 멸균수 34 µl가 포함된 총 48µl를 1.5ml 에펜드로프 튜브에 넣고 70°C에서 10분간 항온조에서 반응을 시키고 난 다음 5분간 얼음에 방치하였다. 여기에 미리 역전사 반응액인 RTase 용액(슈퍼스크리트 RTase 4 unit, 5x RT 완충액 16µl, DTT(dithiothreitol) 8µl, 25 미리몰 디엔티피 4µl) 32 µl가 포함된 것을 혼합하여 37°C에서 1시간동안 반응하고 70°C 항온조에서 배양하여 역전사 반응을 정지시킨 다음 멸균한 디이피시(DEPC; DiethylenePyrocarbonate) 320 µl를 첨가하여 이를 mRNA로 사용하여 UV spectrophotometer(Molecular designer)로 파장대(260/280 nm)에서 측정시 흡광도가 1.8이상의 농도로 10 내지 100 µg 된 것을 주형으로 cDNA를 합성하였다. 특히 mRNA순도를 높이기 위해 Ambion Illumina RNA amplification kit (Ambio, USA)를 이용하여 증폭한 후 550 ngRNA를 T7 oligo(dT) primer를 이용하여 cDNA로 역전사 시켰다. cDNA를 합성하고 biotin NTP로 표지한 cDNA를 정제 후 정량하였다.
- [0063] 수득한 cDNA를 주형으로 PerkinElmer PCR 기기(PerkinElmer Life Sciences, USA)에 의해 95° C에서 5분간, 변성단계를 95° C, 30초, annealing단계를 55° C, 1.0분, 신장단계 68° C, 2분으로 하고 최종 68° C, 2분으로 해서 합성하여 이를 실험군과 대조군의 게놈 DNA 각각 10 마이크로그램을 랜덤 프라이밍법으로 형광염료 Cy3(실험군 시료)와 Cy5(표본군 시료)로 각각 표지하였다. 표지된 cRNA 750ng을 expression bead array와 58°C에서 16 시간에서 18시간 정도 hybridization 후 amersham fluorolink streptavidin-Cy3를 이용하여 발현 신호를 감지하였다. 상기 표지된 DNA를 흡윤 챔버 37°C에서 24시간 Illumina Expression Chip/ MouseRef-8, 24K (Illumina, USA)상에서 혼성화 반응을 수행하였다(Marcrogen, KOREA).
- [0064] 상기 어레이 슬라이드를 세척 완충액으로 세척하고 완전히 건조시킨 후 어레이 슬라이드를 Illumina bead array

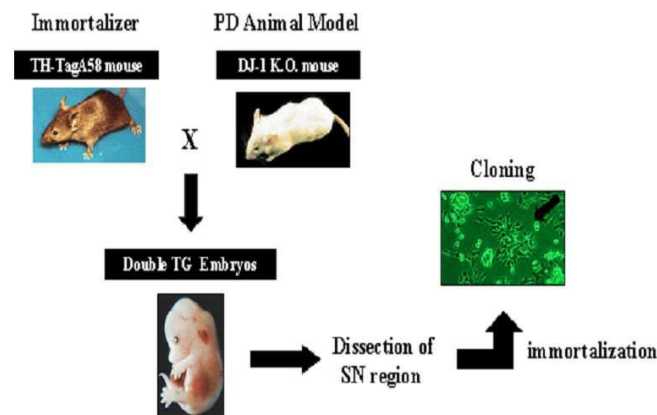
reader로 스캔하여 Illumina beadStudio v3.1.3.을 이용하여 분석하였다. 상기에서 얻어진 형광 이미지를 상기 어레이 분석에 최적화된 MAC Viewer™ software(Macrogen Inc.)을 사용하여 분석하였다. 자동 격자기능을 사용하여 형광 스팟 위치를 결정하고 수동으로 조정하였다. 모든 스팟의 형광세기 비율을 평균비율이 “0” 과 통계학적으로 유의한 정도의 큰 편차를 갖는 것은 비정상적인 것으로 간주하였다.

### 도면의 간단한 설명

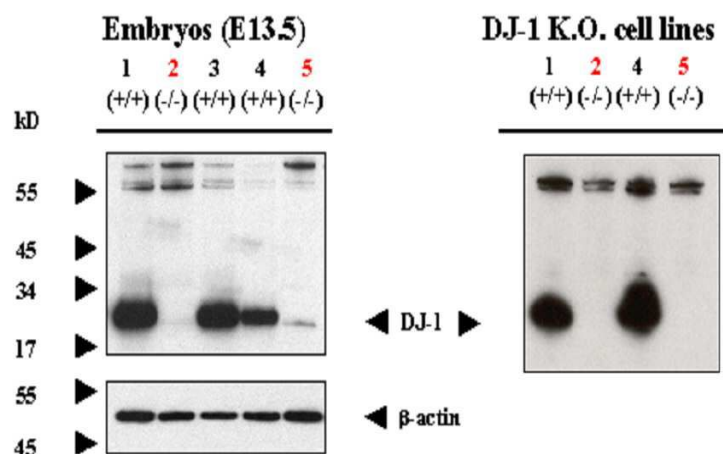
- [0065] 도 1은 병리유전학적 바이오마커 탐색을 위한 DJ-1 유전자 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP 제작과정을 도식한 그림이다.
- [0066] 도 2은 DJ-1 유전자 상실 마우스의 배와 DJ-1 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP의 DJ-1 상실을 단백질 수준에서 확인하기 위해 Western blot한 그림이다.
- [0067] 도 3은 DNA칩 위에서 마우스의 배와 DJ-1 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP의 DJ-1 상실로 인한 유전자 변화를 확인하기 위한 생물학적 분류별 유전자 종류를 나타낸 것이다.
- [0068] 도 4은 DNA칩 위에서 마우스의 배와 DJ-1 상실 도파민성 세포주 KCTC 11472BP의 DJ-1 상실로 인한 유전자 변화를 확인하기 위한 대사경로별 유전자 종류를 나타낸 것이다.

### 도면

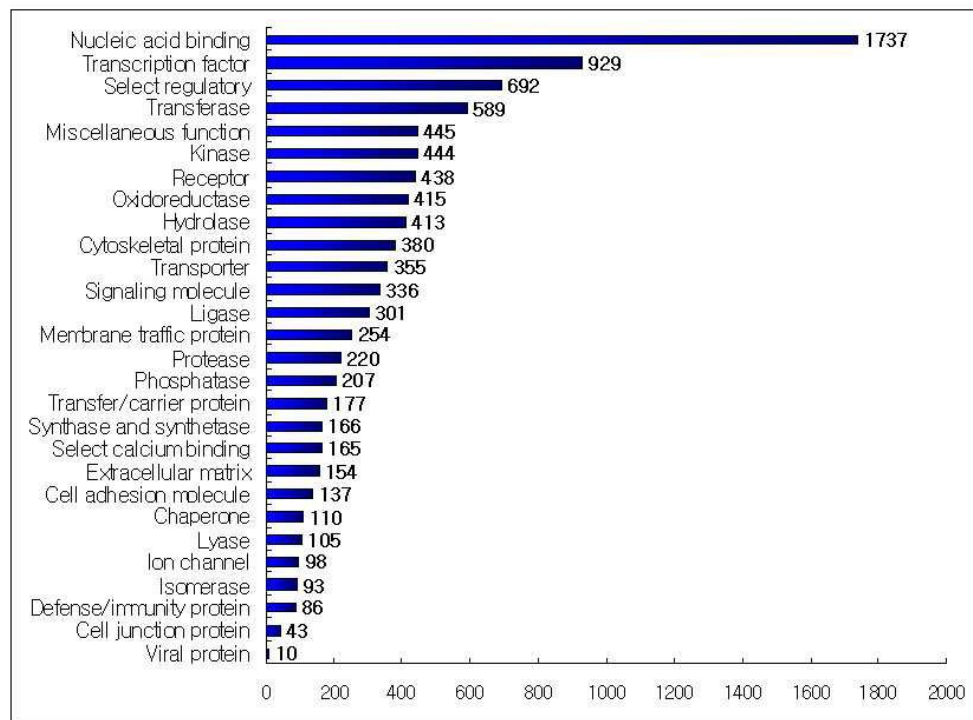
도면1



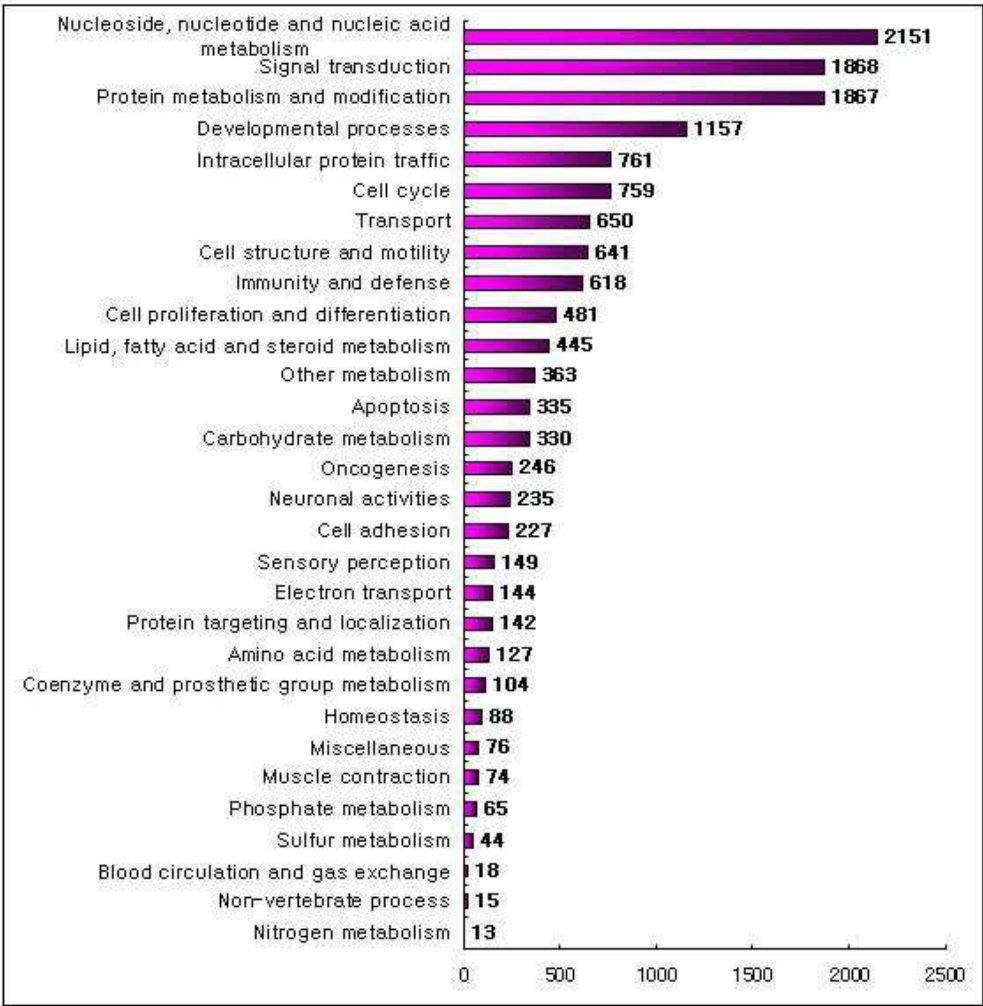
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> A novel dopaminergic neuronal DJ-1 mutant cell lines for screening of neuroprotective agent
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 2527
- <212> DNA
- <213> Mus musculus

<400> 1  
acttcagaag gaagagacgc ctgggccttg ggcacctca ggggcagacc caggcagaaa

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gggcctgagg ccagccggcc agggtagctg cgtggcagcc agagctgcca ggacctgcgt | 120  |
| aggaaagctg cgagtgtccc tcagtctgtg agcgactccc cggcgatgcc tcacaactcg | 180  |
| atcagatccg gccatggagg gctgaatcaa ctaggagggg cctttgtgaa tggcaggcct | 240  |
| ctgccagaag ttgtacgtca acgcattgtg gacttggccc accagggcgt gaggcctgt  | 300  |
| gatatcttc gccagctccg tgtcagccat ggtgtgttaa gcaagatcct tggcaggtag  | 360  |
| tacgagactg gcagcatccg gcctggagtg atagggggct ccaagcccaa ggtggccacc | 420  |
| ccaaggtgg tggagaagat aggagactac aagcggcaga accctacat gtttgcttgg   | 480  |
| gagatccggg accggctcct ggcagaaggc gtttgtgaca atgacactgt cccagtgtc  | 540  |
| agctccatca acagaatcat ccggaccaa gtgcagcagc cattcaacct cccatggat   | 600  |
| agctgtgtgg ccaccaagtc tctgagccca ggacacacac tgatccccag ctcagctgta | 660  |
| acacccccag agtcaccca gtcggattcc ttgggtctta cctactctat caacgggctc  | 720  |
| ctaggaattg ctcagcctgg caatgacaac aagagaaaga tggatgatag tgaccaggac | 780  |
| agctgtcggc taagcatcga ctcacagagc agcagcagtg gtctctgaaa gcaccttcgt | 840  |
| acggacacct tcagccagca ccatctcgag gcccttgagt gccgtttga gcggcagcat  | 900  |
| taccggagg cctatgcctc cccagccac accaaagggg agcaggggct gtaccactg    | 960  |
| cccttactca acagtgcctt ggatgatggg aaggccacc tgacatcttc caataacct   | 1020 |
| ctgggacgca acctctcgac tcaccagacc tacctgtgg tggcagatcc tcattcacc   | 1080 |
| ttcgccataa agcaggaaac cccagagctc tccagttcta gctccacccc ttctcttta  | 1140 |
| tctagctccg cctttttgga tctgcagcaa gtcggctctg ggggcccagc aggtgcctcg | 1200 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| gtccaccct tcaatgcctt tcccatgct gcctccgtgt atgggcagtt cacgggccag   | 1260 |
| gccctcctct caggcgaga gatggtggg cccacgtgc ctggatacc accccacatc     | 1320 |
| cccaccagt gacaggcgag ctatgcctct tctgctatcg caggcatggt ggcaggaagt  | 1380 |
| gaatattctg gcaatgccta cagccacacc ccgtattcct cctacagtga ggcctggcgc | 1440 |
| ttccccaact ccagcctgct gaggttctca tattattaca gctctacatc aaggccaagc | 1500 |
| gcaccacca cctctgccac agcctttgac catctgtagt tgtcatggg acagtgggaa   | 1560 |
| gaaccaggca agaatcagga ggacttggc tgagacaggc cccagagagt cacacaaagg  | 1620 |
| aatctttatt tattacatga aaaataacca caattccagc attgccgctc actccctgtg | 1680 |
| tggtaatta aatgaacat gaaagtcagg atgaccttg agaaggcaa actgtcctcc     | 1740 |
| aggattcatt ttgtgagtga caggagtcc aggaacaag aaccacccat ttcaaaagag   | 1800 |
| acacagagga gaaatgtacc gaagctggc cccaccaaag gagagaaaag gggttcacga  | 1860 |
| agaacttaga gggagatgag tctgagggtg tacaggcca cctgtttggt ctatcatag   | 1920 |
| acaactccag caattatgaa cagtatgaa gtccttctgg cctacaatca cagcctaggg  | 1980 |
| ccaaggctct acgtgtcagt catcctagca gttaccacct tgagcctcta ctacctgat  | 2040 |
| ctttctggg attcagctga ccttctattt ccagttgctg tgcatttaca agcaccctt   | 2100 |
| agcctctcaa ccagtggcta cccctttggc agcagcgaac ctgtcccctg gaaagttcag | 2160 |
| tgaggctcta cgtagaacat aggaagacac aacagatggg accagccatg tcctctctc  | 2220 |
| aacagccttg ccaattcaag tgtgtttct gcagttccag cccgcgcagc cactgaagag  | 2280 |
| accccaagg ccagcaaca gattccctct ctggtctctc agctctttcc ccacatacaa   | 2340 |
| cctcactgta aataccgtaa atgaaactct gtttcggtca agctttctc ttccatccc   | 2400 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ccagtctttg gtctctgaaa tatctcccta ctatgttggg gttttctcct tcatactttt  | 2460 |
| ttttttttaa aaaaaaaaaa aagacaaccc accattacca catgactcaa taaaccatta  | 2520 |
| ctcttgg                                                            | 2527 |
|                                                                    |      |
| <210> 2                                                            |      |
| <211> 1335                                                         |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Mus musculus                                                 |      |
|                                                                    |      |
| <400> 2                                                            |      |
| agctgctggc taagcgccgc tgcattaccg gaccattact ttcaactgca cgttcctccc  | 60   |
| tggagaagct gcagcctgtc agcatggctc aggagtttgt gaactgcaag atccagtctg  | 120  |
| ggaaggtggc cgtgttcac cagccacact gccctactg cagaaagacc caagaaatcc    | 180  |
| tcagtcaact gcctttcaaa caaggctctc tggagtttgt ggacatcaca gccactaaca  | 240  |
| acaccagtgc gattcaagat tatttiacaac agctcaccgg agcgagaaca gtccctcggg | 300  |
| tcttcatagg taaagactgc ataggcggat gcagtgatct aatctccatg caacagactg  | 360  |
| gggagctgat gactcggctg aagcagattg gagctctgca gttataaaag ggggtggcagg | 420  |
| cagagtcct gctgacacag ctgtctaacc atgctgatgg ccagtgcctc tgagagttga   | 480  |
| tgtgcatcgc agaggatgtc agtatctcct ggtgactggg atttttcaac aaggcggcct  | 540  |
| ttattcttct tttcctcagt gctaaaaact gttgcaattt gccctaacc atggggccga   | 600  |
| gaagcttaac agaccacact ggtttgatta tccattcttc atgtgccaac atgtctctac  | 660  |
| ctctaagccc aggttttcca aatccagttg ctctaaatct ccagtggatc tgttgctggc  | 720  |
| tttctgctac tgttcgtcag ctgaagtcac ttgacagaag tccactttct aaagaattat  | 780  |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| tgaatcaatg gatategaaa atttgtttcc tgagtcatgc atcggtcctt ctctccctcg   | 840  |
| tgcacgcacc ctcccactc ctgcattcac tgccttact tagccagtgt tctcagcctc     | 900  |
| aacctcctac aacccgcaga cgtccacact ggtgtgagga tgctgtttga aaaatcagat   | 960  |
| gaactttagc atagtgtggtc ctacaggagg ccacgttaac ttaggcggca gagcagatgg  | 1020 |
| tgcattgcagc tccctctgta aagggtgatta attgtccaga aaatcccaag cagctgtgtg | 1080 |
| ttgatccgag ttagagggcc agaaaaatca aatgtgaaat acaaaattgc aaaattctcc   | 1140 |
| ttccaagaat tttgtgaaa gacgttggtt ctgaaacatt gtcctaaaca gtttcttcca    | 1200 |
| tccaaacttt gacattttgc tttgatgtct tgctatgctg tttaattctc atggatctgt   | 1260 |
| agatcacttc tctggtctcc agtgaggagg attcattact attaaagatg tatctataga   | 1320 |
| taactaaaaa aaaaa                                                    | 1335 |
|                                                                     |      |
| <210> 3                                                             |      |
| <211> 3243                                                          |      |
| <212> DNA                                                           |      |
| <213> Mus musculus                                                  |      |
|                                                                     |      |
| <400> 3                                                             |      |
| ggaaagcctt gcgagcttaa cagggccacc ctgccgaag cgaggatggc ggtctctgcg    | 60   |
| ctccagctgt ggcgtatggg cgggctgctg agaagacgtt tccaacctg cttgtctcct    | 120  |
| tggaagattc ctctctgtgt cctcaaatcc tcacaaccgg aagctctagt cagtctgaca   | 180  |
| aacaatgcag tagcctttgc acctctgcag acatttactg atagggaat tatgatgaag    | 240  |
| cagacagtca aaaaatttgc acaggagcac gttgtctctc tggtttctc tatggatgag    | 300  |
| aactcaaaaa tggagaaatc ggtgatccag ggattgttcc agcaagggt gatgggcatt    | 360  |
| gaagttgaag cacaatatgg agggacagaa gcttctttt tctgtctgt cctagtata      | 420  |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaggaactag ctaaggtgga tgcttcggtg gctctcctgt gtgacatcca gaacacaata  | 480  |
| attaacaacc tgtttagaaa acacgcttca gaagaacaga aggccaccta ttgccaag    | 540  |
| ctggttacag aaaaattagg gagcttttgc ctctctgaag ctggagccgg tagcgactct  | 600  |
| ttcgctatga aaacaagagc tgataaaagt ggaaattact acgtcctcaa tgggtcgaag  | 660  |
| atgtggatca gccatgccga gcatgcagag ctcttcctgg tcttcgcaa tgtggacccc   | 720  |
| agctctggct acagaggcat cacctgcttc ttagtagacc gagatacaga aggtttccag  | 780  |
| atagggaaac gagaaaataa aatgggcatc agagcttcat ccacctgtca gttaacattt  | 840  |
| gaaaatgtta aggttccaga gactaatatt ttggggaaaa ttgggcatgg ttataagtat  | 900  |
| gccataggaa gtcttaatga aggtagaatc ggaattgctg cacagatgct aggactggcc  | 960  |
| caaggatgtt ttgactacac tattccatac attaaagaaa ggatgcagtt tggcaaacga  | 1020 |
| atatttgatt ttcaggggct ccaacaccaa gtggctcagg tggccacca gctggaagcc   | 1080 |
| acacggttgc taacatacaa cgctgctagg ctctgtagaag ccggaaggcc atttataaaa | 1140 |
| gaagcatcta tggccaaata ttatgcatct gaggtcgtg ggctaacaac aagcaagtgc   | 1200 |
| atcgagtgga tgggaggggt cggctacacc aaagattacc ctgtggagaa attcttcga   | 1260 |
| gatgccaaga tcggtacaat atatgaagga gcttccaaca tccagctgaa caccatcgcc  | 1320 |
| aagcacatcg atgcagagta ctgatgactg tgggatgggc cctctgcgtc actgacaaac  | 1380 |
| catttccagc tgctgtgcct tattgagcag ggtctagagc agtgcagggc ttccttggac  | 1440 |
| ttcccttgtc ctggtctcag gcctggattt tgttctgtc ttttccaat ctactctaag    | 1500 |
| tctatttcta agcttctgaa cgcatatttc tcatcctagt tgcagagtat acaaaagttt  | 1560 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cactctagca gcatttggga agaagaaacc atttgaggta ttggtattgc tgacagaaat | 1620 |
| agtcacttta tattcctact aaatctttgt actgtggat gagccagagg agcgtttgtt  | 1680 |
| acacttggca atttttattc aatactttat agattcagtg gtaagtggct aaacaaggt  | 1740 |
| gaagctgata aaattttatt ggaaaaatct agaatcttag ttctaaatat caaaaatagt | 1800 |
| agaaaataaa aagtgtagct ttagggccat ataattgaca ataacaaaa gtcccaaatg  | 1860 |
| ttattttaac caacaaaagg agtatgtttg gctgctataa ttgaactata tgaaagatgt | 1920 |
| attatgttgt ggcttttagc agcccattta aaaaacatgt ccctgtatta gttttcaact | 1980 |
| ataaagttta agtaatttgg cctaatacgc tgaataaat ttattagatc atgcactatt  | 2040 |
| ttttgtagt atgatttatt tctgtatttt aattgagtat tttccctcaa acttggttat  | 2100 |
| tggactttat cctaaatagt aattaattga gaaattcaat tttggttttc aaaattgatt | 2160 |
| cttaagagaa atataccccc ataagaaaat aatcacaca tctcataagg atagggaatg  | 2220 |
| gagacttggt agtcgaaaa catacattca gtataaatat atgtagtcac ttatatagta  | 2280 |
| tattagataa ttttatattt gtgaagacaa agatctatgt tttacaatgt aaatgaaaa  | 2340 |
| caggcaaagc ctaatcagat atccagctgg tgaagccatt gatcagtggt agggatttac | 2400 |
| agtcgggaga agacgctcta gttgcagacc ctgagtcacc tggagagaga agtagacagt | 2460 |
| agacaaacga gtcgcacatt tccagaggaa acatcacaa ttagatgtga aaaatgcccc  | 2520 |
| aggctcacgc agttgctgga aataatcgtt acttctagat agaaagtatt ttggtgcttt | 2580 |
| tgcaaaagga taatgtttat taagaaactt gacattttct aggtaatatt gctttgcaca | 2640 |
| gttaatgttt attgagctaa attaatctcc acaatgcaa tcatagttaa atatgcaagg  | 2700 |
| ttgtataaat acagttgaaa taggaattac attaaaacag taggaagaaa taaaacaaat | 2760 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| ttagaccttg aatccaaaga gataaggtct acttgacttt caaatggggg aatgatgaa  | 2820 |
| aggcctcacc cagtctcaga acagacagat gagtgtgata agaaaggaag gggtagatgc | 2880 |
| agacctgac agggcagaca cttccactc ctgtaataat gggaaagagc agggcttaga   | 2940 |
| gatgatgcag ccgcgggagt caggatgagt aacagcctg ccttccttc ctagactcat   | 3000 |
| ggcaatcctc ctgcttcagt tgtaacctgg gctggccgca gattcatggc aatcctgctt | 3060 |
| tcaggcttcc agtgctgaga ttttatgtct gcacccagc tccatttct gacttgtga    | 3120 |
| ttttgaagtc atgccacga ttacagcttt gtcaattatt ctcatattt tctatttgtt   | 3180 |
| ttgctctatg tagttccag ttatgttttt aggggtaata aagttcatgg ctgttggatc  | 3240 |
| atc                                                               | 3243 |

<210> 4  
 <211> 4384  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

|                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <400> 4<br>tcagagactc cgcagtgcgc gggaggcgaa ggcttctcat ttccatccag cccagcgctc | 60  |
| aatggagggg cggactctgc agtgcctcac tcactgtgtg attcgatagg accagggctc            | 120 |
| atcagatcac cgccgagatg aagtacaaga atcttatggc aaggccttg tatgacaacg             | 180 |
| tccctgagtg tgctgaggag ctggccttcc gcaagggaga catcttaact gtcatagagc            | 240 |
| agaacacagg agggcttgag ggatggtggc tgtgttcct ccacggtcgc caaggcattg             | 300 |
| tcccaggga cgggtgaag cttctgattg gtccagtga agagacccc ggtcatgagc                | 360 |
| agcctactcc tggacctatg catcagacct ttggccaaca gaaactctat caagtgcca             | 420 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| attcccaggc agcatctcgg gataccatct accaagtgcc accctctac cagaatcagg   | 480  |
| gaatttacca agtaccact ggccatggca ctccagaaca agatgtatat caagtaccac   | 540  |
| catcagttca gaggaacatt ggcggcacta atggaccct tctaagcaaa aaggatgatca  | 600  |
| ccccagttag gacgggcat ggctatgtgt acgagtaccc atccagatac caaaaggatg   | 660  |
| tctacgatgt cctccttcc cacagcactc aaggggtata tgacatccct ctttctcag    | 720  |
| taaaaggccc tigtttttca gttccagtgg gagagataaa acctcaaggg gtatatgaca  | 780  |
| ttccccccac ccaaggggtc tatgccattc caccatcggc ttgccgagat gaggcagggc  | 840  |
| tcagggaaaa ggaatatgat ttccctctc caatgaagca agatggaaaa ccagacacca   | 900  |
| gacctgaggg ggtttatgac atccctccaa ccagcaccaa gacagcaggc aaggaccttc  | 960  |
| acatcaaatt cccctgtgat gtcaccaggag gtgtcgaacc aatggcacga agacaccaga | 1020 |
| gcttttccct gcacatgca ccctctcagc tgggacagtc tggggacact cagagtgatg   | 1080 |
| cctatgatgt cccccggga gttcagtttc tggaggtagc aacagaaacc agtgaaaagg   | 1140 |
| caaatccgga ggaaagagac ggtgtctacg atgtccctct gcacaacca gcagatgcca   | 1200 |
| aaggctctcg ggacgtggta gatgggatca acagactgtc tttctccagc actggcagta  | 1260 |
| ccaggagtaa catgtccacc tcttcacct cctcaaagga gtcttactg tcagcctccc    | 1320 |
| cgtctcaaga caaaaggctc cgactggacc cagacacagc catagagaag ctctatcggc  | 1380 |
| tccagcagac cctggagatg ggtgtgtgca gcctcatgtc actggtcacc acagactgga  | 1440 |
| ggtgtctacg atacatggaa aggcacatca atgagatccg caccgcggtg gacaaagtag  | 1500 |
| agctgttctt acgagaatac ctccattttg ccaaggagc tttagccaat gcctcctgcc   | 1560 |
| tcccagaact ggtcctccac aacaaaatga agcgggaact ccaaagagta gaagattccc  | 1620 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| accagattct aagccaaacc agccatgact tgaatgaatg cagctggtcc ctgaatattt | 1680 |
| tagctatcaa taagcccaaa aataagtgtg atgacctaga ccggtttgtg atggtcgcca | 1740 |
| agacagtgcc agacgacgcc aaacaactga ccaccacat cagcacctac gcggagaccc  | 1800 |
| tctttagagc agatcctgcc aattcccatc tgaagaatgg gcccaacagc atcatgaact | 1860 |
| caagcgagta cacacatccg ggctcccaga tgcagccact gcatcctggt gactacaaag | 1920 |
| cccaggtcca cagtaagccg ttgcctccta gtctaagcaa ggaccagcca ccagactgcg | 1980 |
| gtagcagtga cgtttctgag cggagttgga tggatgatta tgattatgtt cacctacagg | 2040 |
| gcaaggagga gtttgagcga cagcagaagg agctcttga aaaggagaac atcatgaagc  | 2100 |
| agagtaaggc gcagctggag catcaccagc tgagtcagtt ccagctgttg gaacaagaga | 2160 |
| tcaccaagcc tgtggagaat gacatctcta aatggaagcc ctctcagagc ctcccaacca | 2220 |
| ccaacaacag tgtgggtgct caggatagcc agttgctttg cttctactat gaccagtgcg | 2280 |
| agaccattt catttccta ctcaacgcca tcgacgccct cttcagctgc gtcagctcag   | 2340 |
| cccaaccccc acggatcttt gtggcgaca gcaagtttgt cattcttagt gcgcacaaac  | 2400 |
| tgggtgtcat tggagacact ctgacaaggc aggtggctgc ccaggacatt cgcaacaaag | 2460 |
| tcaggaactc cagcaaccag ctctgcgaac agtcaagac gatagtgatg gcgacaaaa   | 2520 |
| tggccgccct cactacccc agtaccaccg ccttcagga aatggtgcac caggtgacag   | 2580 |
| acctgtccag aaatgctcag ctgtttaagc gttccttgcg ggagatggcc accttttgag | 2640 |
| aagacaaaga agtgaagga actgggtgaa taattactaa ggaaaactgg aaatactatc  | 2700 |
| tagttttgt aaatgctatc tatttttgta gatattttat atgaaattga aatatttcga  | 2760 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tgtttttgtg agttagtga ttttcatcaa ttcaggagc tgaagcttgg atttattttg    | 2820 |
| tttccctgt gtggttctga tataaacata taagtatcta agacataagt tgtacagaac   | 2880 |
| tgtgtccacg ttigtgtatg cctacataac catatttgtt tatctgtgtg tctgatacag  | 2940 |
| ccattaaaa acatgaattg agaagcacct tagtgagcac cttctaagtc tgcattgttt   | 3000 |
| gggttttcta gaaaattata ccacttagtt gtaatatgc tcttcatgta gtagtagtcg   | 3060 |
| tctgagccca gcacacccaa ctttctgtc tgaacctct tcaaacctg acttgtcttt     | 3120 |
| aacacggtgg taaatctgac caacttctgg ttgaaggggg gcagggaag aaagaaagat   | 3180 |
| tcaaaaaata tattaacctg aggtttcagg tgctagagag aggcaaaaca tgtgtgctgt  | 3240 |
| actaagaggc catgtctaca gtagttattg tgttatttca attctgaaag gaactacaat  | 3300 |
| aaagagagaa cacttgttc cctggggcta catgtgtgag tgattcagtc atggttttct   | 3360 |
| gaaggatgtt ttagagttg aattttttt taaaaaaat tgcaacagga attcatgaag     | 3420 |
| atacatcaga actgtgattg tgggcaaaaa gaagggtgtt ttccaacagg cagtagttaa  | 3480 |
| atcaagacct ctctaccctc attctctaag ggaaatggcc agttccttag tcaactgaact | 3540 |
| gtggaaccac cgggccctgt cctgtctctg cattgcttga tggatcctac accagtctaa  | 3600 |
| aaacttacat aagcagacca acactcaaaa cagctgcaa gagctgacct tcacgtccca   | 3660 |
| ctgtggctat ggaccttgtg gatgtcagct agtcacagcc atgatcgtgt ggtctgtccc  | 3720 |
| ttcacaccgg ctgtgtggat acagcccagg caccagattc atcgtgggca gataaactac  | 3780 |
| ttccctcttc ctttatgacc aactcaagaa atatagtagt ctctgatcta ttctattcca  | 3840 |
| gcctacttgg aaatgtgttt ttatttgta ttgatgtctt gactgagtta atgttatttg   | 3900 |
| ttttaaaca ccaattaca aaggcaagga ggggtttaag aaggacatgt gatctcaatg    | 3960 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tgattttttt ttaataaatg gaagatatca aaggaaaggt gcttttcaa acaaactata   | 4020 |
| attgtaattc tcaaagttct acatcgccag aagatgaaca gctgagctat tggagagcaa  | 4080 |
| ttcactgtgt ctggcgtgtg gaagaagagg gtcctgaagc atcagtacca ttgcaggaag  | 4140 |
| tcaggaaggg tatgcttgta gatcttacta cacaatgtgt atatgttatg tgatggctgc  | 4200 |
| ctgttcctaa ccgatattgat gacattccac attgtaaaaa ccaaactatt caatttctac | 4260 |
| tgtttattgc catcttgat atttaagcca ttaaatgttt ggatatttct ctttatagcc   | 4320 |
| actgggtttc ttttcttgt gtctctctta tcacagaatt aaatattgac ccatctgagt   | 4380 |
| ataa                                                               | 4384 |