

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
 C12Q 1/68
 C12N 5/06
 A61K 48/00

(11) 공개번호 10-2005-0046015
 (43) 공개일자 2005년05월17일

(21) 출원번호	10-2005-7006733
(22) 출원일자	2005년04월19일
번역문 제출일자	2005년04월19일
(86) 국제출원번호	PCT/US2003/033463
국제출원출원일자	2003년10월22일
	(87) 국제공개번호 WO 2004/037984
	국제공개일자 2004년05월06일

(30) 우선권주장 10/277,969 2002년10월23일 미국(US)

(71) 출원인 세네스코 테크놀로지스 인코포레이티드
 미국 뉴저지주 뉴 브룬스윅 조지 스트리트 303 스위트 420
 (72) 발명자 톰슨, 존, 이
 캐나다 온타리오 엔2케이 4엔1 워터루 유니버시티 애비뉴 이 901
 테일러, 캐서린
 캐나다 온타리오 엔2케이 3엔1 워터루 폭스턴트 로드 122
 클리쉐, 도미니크
 캐나다 온타리오 엔2에이 2쥐4 키체너 유니트 #52 올드 치코피 드라이
 브 52-75
 디나렐로 찰스
 미국 콜로라도주 80302 불더 15 스트리트 333
 레즈니코브 레오니드
 미국 콜로라도주 80014 오로라 세이블 썬클 4098 에스
 포메란츠 벤자민
 미국 미주리주 63130 유니버시티 시티 코넬 애비뉴 7143

(74) 대리인 김동완

심사청구 : 없음

(54) 핵산, 폴리펩타이드 및 아폽토시스 조절방법

명세서

기술분야

관련 출원

본 출원은 2001년 7월 23일 출원된 미국 특허출원 제9/909,796호의 부분연속출원인 2002년 5월 7일 출원된 미국 특허 출원 제10/141,647호의 부분연속출원인 2002년 7월 23일 출원된 미국 특허출원 제10/200,148호의 부분연속출원이다.

본 발명은 아폽토시스(apoptosis)-특이적 진핵세포성 개시 인자-5A(eIF-5A) 및 디옥시하이푸신 신타제(deoxyhypusin synthase, DHS) 핵산 및 폴리펩타이드 및 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS를 이용한 세포내 아폽토시스 조절방법에 관한 것이다.

배경기술

아폽토시스(apoptosis)는 세포 수축, 염색질 응축, 핵 무사분열(fragmentation) 및 뱀브레인 수포(blebbing)와 같은 잘-정의된 형태학적 현상에 의해 특정 지워진 유전적으로 프로그램화된 세포 이벤트이다. Kerr et al.(1972) Br. J. Cancer, 26:239-257; Wyllie et al., (1980) Int. Rev. Cytol., 68:251-306. 이는 정상 조직 발달 및 항상성에 중요한 역할을 하고, 아폽토시스 프로그램 내 결함은 신경퇴행성 및 자가면역성 장애에서부터 종양(neoplasm)까지의 광범위한 인간 장애에 영

향을 미치는 것으로 여겨진다. Thompson(1995) *Science*, 267:1456-1462; Mullauer et al.(2001) *Mutat. Res.*, 488:211-231. 아폽토시스성 세포의 형태학적 특성이 잘 특징 지워졌더라도 이러한 과정을 조절하는 분자적 경로는 단지 해명되기 시작했다.

아폽토시스에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지는 단백질 중의 하나의 그룹은 아폽토시스의 대부분의 경로에 필요한 것으로 보이는 시스테인 프로테아제 패밀리, 카스페이즈(caspase)이다. Creagh & Martin(2001) *Biochem. Soc. Trans.*, 29:696-701; Dales et al.(2001) *Leuk. Lymphoma*, 41:247-253. 카스페이즈는 다양한 세포 단백질을 분열시킴으로서 아폽토시스 자극에 반응하여 아폽토시스를 시작시키고 이는 세포 수축, 멤브레인 수포 및 DNA 무사분열을 포함한 전형적인 아폽토시스의 징후를 초래한다. Chang & Yang(2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:821-846.

또한 Bax 또는 Bak와 같은 프로-아폽토시스 단백질은 미토콘드리아 시토크롬 c와 같은 카스페이즈-활성화 분자를 방출하여 아폽토시스를 통한 세포 사멸을 증가시킴으로서 아폽토시스 경로에 중요한 역할을 한다. Martinou & Green(2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2:63-67; Zou et al.(1997) *Cell*, 90:405-413. Bcl-2와 같은 항-아폽토시스 단백질은 프로-아폽토시스 단백질, Bax 및 Bak의 활성을 상쇄시킴으로서 세포 생존을 증가시킨다. Tsujimoto(1998) *Genes Cells*, 3:697-707; Kroemer(1997) *Nature Med.*, 3:614-620. Bax : Bcl-2의 비율은 세포 운명이 결정되는 하나의 방법으로 여겨진다; Bax의 과잉은 아폽토시스를 증가시키고 Bcl-2의 과잉은 세포 생존을 증가시킨다. Salomons et al.(1997) *Int. J. Cancer*, 71:959-965; Wallace-Brodeur & Lowe(1999) *Cell Mol. Life Sci.*, 55:64-75.

아폽토시스에서 중요한 또 다른 단백질은 종양 억제자 p53에 의해 인코드된다. 본 단백질은 세포 생장을 조절하고 아마도 Bax의 상향-조절을 통해 손상되고 유전적으로 불안정한 세포 내에서 아폽토시스를 유도하는 조절인자이다. Bold et al.(1997) *Surgical Oncology*, 6:133-142; Ronen et al.(1996); Schuler & Gree(2001) *Biochem. Soc. Trans.*, 29:684-688; Ryan et al.(2001) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13:332-337; Zorning et al.(2001) *Biochem. Biophys. Acta*, 1551, F1-F37.

아폽토시스를 겪는 세포를 특성화하는 뚜렷한 형태학적 특징들은 아폽토시스의 개시 및 진행을 평가하는 많은 방법을 제공한다. 검출에 이용될 수 있는 아폽토시스 세포의 특징의 하나는 플라스마 멤브레인의 내부 리플렛(leaflet)에 일반적으로 위치한 인지질인 포스파티딜세린(phosphatidylserin)의 외부화(externalization)를 초래하는 플리페이즈(flipase)의 활성화이다. Fadok et al.(1992) *J. Immunol.*, 149:4029-4035. 외부화된 포스파티딜세린을 품은 아폽토시스 세포는 형광 염료와 커뮤게이트된 포스파티딜 세린-결합 단백질, 아넥신(Annexin) V로 염색함으로서 검출될 수 있다. 아폽토시스 과정 동안 발생한 특징적 DNA 무사분열은 형광-표지된 디옥시뉴클레오타이드로 DNA 단편의 노출된 3'-OH 말단을 표지함으로서 검출될 수 있다. Hoescht 33258과 같은 핵산에 결합하는 형광 염료는 아폽토시스 세포 내 염색질 응축 및 핵 무사분열을 검출하는데 사용될 수 있다. 또한 세포군 내 아폽토시스의 정도는 세포 추출물 내에 존재하는 카스페이즈 단백질 분해 성 활성 정도로부터 추측될 수 있다.

유전적으로 정의된 과정으로서 다른 발달 프로그램과 같이 아폽토시스는 돌연변이에 의해 분열될 수 있다. 아폽토시스 경로의 변경은 암을 포함한 많은 질병 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. Wyllie et al.(1980) *Int. Rev. Cytol.*, 68:251-306; Thompson(1995) *Science*, 267:1456-1462; Sen & D'Incalci(1992) *FEBS Letters*, 307:122-127; McDonnell et al.(1995) *Seminars in Cancer and Biology*, 6:53-60. 암 발달 및 진행의 조사는 통상적으로 세포 증식에 초점이 맞춰졌다. 그러나 종양발생에 아폽토시스 미치는 중요한 역할이 최근 명백해졌다. 사실상 아폽토시스의 조절이 종양 세포 내에서 어떤 방법으로 일정하게 변화되기 때문에 아폽토시스에 대해 알려진 많은 것은 종양 모델을 이용하여 알려졌다. Bold et al.(1997) *Surgical Oncology*, 6:133-142.

아폽토시스는 다양한 시그널에 의해 종양 발달 동안 시작될 수 있다. 세포외 신호는 생장 또는 생존 인자 고갈, 저산소 및 이온화 조사(radiation)를 포함한다. 아폽토시스를 시작시킬 수 있는 내부 신호는 DNA 손상, 말단 소립 축소 및 부적당한 증식 신호를 생성하는 종양유전자 돌연변이를 포함한다. Lowe & Lin(2000) *Carcinogenesis*, 21:485-495. 이온화 조사 및 말리그년시를 치료하는데 사용되는 거의 모든 화학치료제는 내생적 아폽토시스 메카니즘을 시작시킴으로서 세포 사멸을 유도시키는 작용을 하는 것으로 여겨진다. Rowan & Fisher(1997) *Leukemia*, 11:457-465; Kerr et al.(1994) *Cancer*, 73:2013-2026; Martin & Schwartz(1997) *Oncology Research*, 9:1-5.

증거는 암 초기 진행에서 종양 세포가 약제(이온화 조사 또는 화학치료 약물과 같은)에 민감하여 아폽토시스를 유도함을 제안한다. 그러나 종양 진행에 따라 세포는 아폽토시스 자극에 대한 저항성을 발달시킨다. Naik et al.(1996) *Genes and Development*, 10:2105-2116. 이는 왜 초기 암이 더욱 진행된 손상보다 치료에 더 잘 반응하는지를 설명한다. 화학치료 및 조사 치료에 대한 저항성을 발달시키는 후기 암의 능력은 아폽토시스 자극에 대해 반응하는 종양 세포의 능력을 제한하는 아폽토시스 경로의 변경에 관련된 것으로 보인다. Reed et al.(1996) *Journal of Cellular Biology*, 60:23-32; Meyn et al.(1996) *Cancer Metastasis Reviews*, 15:119-131; Hannun(1997) *Blood*, 89:1845-1853; Reed(1995) *Toxicology Letters*, 82-83:155-158; Hickman(1996) *European Journal of Cancer*, 32A:921-926. 화학치료에 대한 저항성은 각각 만성 립프구 백혈병 및 콜론(colon) 암에서 항-아폽토시스 유전자 bcl-2의 과발현 및 프로-아폽토시스 bax 유전자의 고갈 및 돌연변이에 연관되었다.

또한 분포된 전이를 성립할 수 있는 종양 세포의 능력은 아폽토시스 경로의 변경을 포함하는 것으로 보인다. Bold et al.(1997) *Surgical Oncology*, 6:133-142. 예를 들어 종양 억제자 유전자 p53의 돌연변이는 70%의 종양에서 발생하는 것으로 여겨진다. Evan et al.(1995) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:825-834. p53을 불활성화시키는 돌연변이는 DNA 손상에 반응하여 아폽토시스를 유도하는 세포의 능력을 제한하여 세포가 더욱 돌연변이되기 쉽게 한다. Ko & Prives(1996) *Genes and Development*, 10:1054-1072.

따라서 아폽토시스는 상세하게는 종양 형질전환 및 전이의 발달 및 진행에 관련되고, 관련된 아폽토시스 경로의 더 좋은 이해는 유전자 치료 접근을 통한 아폽토시스 경로 조절에 의해 암의 치료에 대한 신규한 잠재적 타겟을 이끈다. Bold et al.(1997) *Surgical Oncology*, 6:133-142.

디옥시하이푸신 신타제(DHS) 및 하이푸신-함유 진핵세포성 번역 개시 인자-5A(eIF-5A)는 세포 생장 및 분화를 포함한 많은 세포 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 독특한 아미노산인 하이푸신은 모든 진핵세포 및 일부 알게오박테리아(archeobacteria)(진핵세포와 관련된 것으로 보임)에서 발견되나 유박테리아(eubacteria)는 그렇지 않고, eIF-5A는 하이푸신-함유 단백질 내에서만 알려져 있다. Park(1988) *J. Biol. Chem.*, 263:7447-7449; Schumann & Klink(1989) *System. Appl. Microbiol.*, 11:103-107; Bartig et al.(1990) *System. Appl. Microbiol.*, 13:112-116; Gordon et al.(1987a) *J. Biol. Chem.*, 262:16585-16589. 활성 eIF-5A는 2가지 후-번역 단계에서 형성된다: 첫 번째 단계는 스퍼미딘의 4-아미노부틸 모이어티(moiet)의 디옥시하이푸신 신타제에 의해 촉매된 전구체 eIF-5A의 특정 리신의 α -아미노 그룹으로의 이동에 의한 디옥시하이푸신 잔기의 형성이고; 두 번째 단계는 하이푸신 형성을 위해 디옥시하이푸신 하이드록실라제에 의한 본 4-아미노부틸 모이어티의 하이드록실레이션을 포함한다.

eIF-5A의 아미노산 서열은 종 간에 잘 보존되어 있고 eIF-5A 내 하이푸신 잔기 주변 아미노산 서열의 염격한 보존이 있고 이는 이러한 변형이 생존에 중요함을 나타낸다. Park et al.(1993) *Biofactors* 4:95-104. 이러한 가정은 eIF-5A의 이소폼 모두의 불활성화가 효모 내 데이터에서 관찰되고 또는 그의 활성화 내 첫 번째 단계를 촉매하는 DHS 유전자의 불활성화가 세포 분열을 차단한다는 관찰에 의해 더욱 지지된다. Schnier et al.(1991) *Mol. Cell. Biol.*, 11:3105-3114; Sasaki et al.(1996) *FEBS Lett.*, 384:151-154; Park et al.(1998) *J. Biol. Chem.*, 273:1677-1683. 그러나 효모 내 eIF-5A 단백질의 고갈은 총 단백질 합성 내 작은 감소만을 초래하였고 이는 eIF-5A가 단백질 전체 합성보다는 mRNA의 특정 서브세트의 번역에 필요함을 나타내었다. Kang et al.(1993), "Effect of initiation factor eIF-5A depletion on cell proliferation and protein synthesis" in Tuite, M.(ed.), *Protein Synthesis and Targeting in Yeast*, NATO Series H. 또한 eIF-5A에 결합하는 리간드가 매우 보존된 모티프를 공유한다는 최근의 발견은 eIF-5A의 중요성을 지지한다. Xu & Chen(2001) *J. Biol. Chem.*, 276:2555-2561. 더욱이 변형된 eIF-5A의 하이푸신 잔기는 RNA로의 서열-특이적 결합에 필수적인 것으로 나타났고, 결합은 리보뉴클레아제로부터 보호를 제공하지 않았다.

eIF-5A의 첫 번째 cDNA는 Smit-McBrid et al.에 의해 1989년 인간으로부터 클론되었고, 그 이후로 eIF-5A의 cDNA 또는 유전자가 효모, 래트, 병아리 배아, 알팔파(alalfa) 및 토마토를 포함한 다양한 진핵세포로부터 클론되었다. Smit-McBrid et al.(1989a) *J. Biol. Chem.*, 264:1578-1583; Schnier et al.(1991)(효모); Sano, A.(1995) Imahori, M. et al.(eds), *Polyamines, Basic and Clinical Aspects*, VNU Science Press, The Netherlands 81-88(래트); Rinaudo & Park(1992) *FASEB J.*, 6:A453(병아리 배아); Pay et al.(1991) *Plant Mol. Biol.*, 17:927-929(알팔파); Wang et al.(2001) *J. Biol. Chem.*, 276:17541-17549(토마토).

더욱이 eIF-5A의 세포내 고갈은 핵인 내 특정 mRNA의 유의적인 촉적을 초래하고 이는 eIF-5A이 핵인으로부터 세포질로의 특정 종류의 mRNA를 수송하는데 중요함을 나타내었다. Liu & Tartakoff(1997) *Supplement to Molecular Biology of the Cell*, 8:426a. Abstract No. 2476, 37th American Society for Cell Biology Annual Meeting. 핵공-결합 세포내 필라멘트에서의 eIF-5A의 촉적 및 그의 일반적 핵 유출 수용체와의 상호작용은 eIF-5A이 폴리솜의 구성성분이기 보다는 핵세포질성 수송 단백질임을 더욱 나타낸다. Rosorius et al.(1999) *J. Cell Science*, 112:2369-2380.

eIF-5A mRNA의 발현은 다양한 인간 조직 및 포유류 세포주에서 조사되었다. 예를 들어 eIF-5A 발현의 변화가 혈청 손실에 이어 혈청 첨가후 인간 섬유아세포 내에서 관찰되었다. Pang & Chen(1994) *J. Cell Physiol.*, 160:531-538. 디옥시하이푸신 신타제 활성의 연령-관련 감소 및 전구체 eIF-5A의 풍부화는 이소폼의 분화적 변화의 평균을 반영한다는 가능성이 결정되지 않았어도 노화 섬유아세포에서 관찰되었다. Chen & Chen(1997b) *J. Cell Physiol.*, 170:248-254.

연구는 eIF-5A가 인간 면역결핍 바이러스 타입 1 Rev 단백질 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1 Rex 단백질과 같은 다양한 단백질의 세포 타겟팅을 나타내었다. Ruhl et al.(1993) *J. Cell Biol.*, 123:1309-1320; Katahira et al.(1995) *J. Virol.*, 69:3125-3133. 예비 연구는 Rev와 같은 다른 RNA-결합 단백질과의 상호작용에 의해 RAN를 타겟하여 이들 바이러스성 단백질이 바이러스성 RNA 처리를 위해 eIF-5A를 모집함을 나타낸다. Liu et al.(1997) *Biol. Signals*, 6:166-174.

디옥시하이푸신 신타제 및 eIF-5A는 세포 생장 및 노화를 포함한 세포 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 식물 내 디옥시하이푸신 신타제 발현의 억제는 생체 내에서 하이푸신의 형성을 억제할 뿐만 아니라 시험관 내에서 디옥시하이푸신 신타제를 억제하는 성공적으로 사용되었다. Jakus et al.(1993) *J. Biol. Chem.*, 268:13151-13159; Park et al.(1994) *J. Biol. Chem.*, 269:27827-27832. 폴리아민 그 자체 특히 퓨트레신(putrescine) 및 스퍼미딘은 또한 세포 증식 및 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. Tabor & Tabor(1984) *Annu. Rev. Biochem.*, 53:749-790; Pegg(1988) *Cancer Res.*, 48:759-774. 예를 들어 폴리아민 생합성 경로가 차단된 효모 돌연변이는 외생적 폴리아민이 제공되지 않는 한 생장할 수 없다. Cohn et al.(1980) *J. Bacteriol.*, 134:208-213.

또한 폴리아민은 아폽토시스 유도로부터 세포를 보호하는 것으로 나타났다. 예를 들어 티모사이트(thymocyte)의 아폽토시스는 스퍼미딘 및 스퍼민으로의 노출에 의해 차단되었고 그의 메카니즘은 엔도뉴클레아제 활성을 방지하는 것으로 보였다. Desiderio et al.(1995) *Cell Growth Differ.*, 6:505-513; Brune et al.(1991) *Exp. Cell Res.*, 195:323-329. 더욱이 외생적 폴리아민은 단세포성 기생충, 트리파노소마 크루지 내에서의 아폽토시스 뿐만 아니라 B 세포 수용체-매개 아폽토시스를 억제하는 것으로 나타났다. Nitta et al.(2001) *Exptl. Cell Res.*, 265:174-183; Piacenza et al.(2001) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98:7301-7306. 스퍼민 및 스퍼미딘의 낮은 농도는 또한 대뇌 이소케미아(isochemia) 동안 신경 손상으로부터 뇌를 보호할 뿐만 아니라 신생 래트의 정상 발달 동안 많은 신경 세포 손실을 감소시키는 것으로 관찰되었다. Gilad et al.(1985) *Brain Res.*, 348:363-366; Gilad & Gilad(1991) *Exp. Neurol.*, 111:349-355. 또한 폴리아민은

식물 조직의 노화, 프로그램된 세포 사멸 형태를 억제한다. 스퍼미딘 및 퓨트레신은 카네이션 꽃 및 탈착된 무 잎의 후-수화 노화를 지연시키는 것으로 나타났다. Wang & Baker(1980) HortScience, 15:805-806(카테이션 꽃); Altman(1982) Physiol. Plant., 54:189-193(탈착된 무 잎).

그러나 다른 연구에서 아폽토시스 유도가 외생적 폴리아민에 반응하여 관찰되었다. 예를 들어 인간 유방암 세포주는 아폽토시스를 유도함으로서 폴리아민 아날로그에 반응하였고, 과도한 퓨트레신은 DH23A 세포 내 아폽토시스를 유도하는 것으로 나타났다. McCloskey et al.(1995) Cancer Res., 55:3233-3236; Tome et al.(1997) Biochem. J., 328:847-854.

폴리아민으로의 실험으로부터의 결과는 eIF-5A의 특정 이소폼의 존재가 아폽토시스 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 나타낸다. 특히, 본 테이터는 DHS에 의해 활성화되는 eIF-5A의 아폽토시스-특이적 이소폼이 있다는 관점과 일치한다. 이러한 DHS 반응이 스퍼미딘을 필요로 한다는 사실은 폴리아민이 아폽토시스-관련 단백질분해의 중요한 관리자인 카스페이즈의 활성화를 도출해내는 것으로 나타난 관찰과 일치한다. Stefanelli et al.(2000) Biochem. J., 347:875-880; Stefanelli et al.(1999) FEBS Lett., 451:95-98. 유사한 견지에서 폴리아민 합성의 억제자는 아폽토시스를 지연시킬 수 있다. Das et al.(1997) Oncol. Res., 9:565-572; Monti et al.(1998) Life Sci., 72:799-806; Ray et al.(2000) Am. J. Physiol., 278:C480-C489; Packham & Cleveland(1994) Mol. Cell Biol., 14:5741-5747.

외생적 폴리아민이 아폽토시스를 억제하기도 하고 증진시키기도 한다는 관찰은 적용된 레벨에 따라 다르게 eIF-5A 활성화를 이끄는 DHS 반응을 억제하여 아폽토시스를 방해할 수 있거나 또는 독성적인 원인에 의해 아폽토시스를 유도할 수 있다는 사실에 의해 설명될 수 있다. 낮은 농도의 외생적 폴리아민이 식물 및 동물 시스템 내에서 아폽토시스를 차단한다는 관찰은 낮은 농도의 폴리아민과 그의 아날로그가 DHS 반응의 경쟁적 억제자로서 작용한다는 사실과 일치한다. 사실상 DHS 반응에 대한 기질인 외생적 스퍼미딘은 기질 억제를 통해 반응을 방해할 것이다. Jakus et al.(1993) J. Biol. Chem., 268:13153-13159.

그러나 모든 폴리아민 및 그의 아날로그는 높은 농도에서는 독성적이고 아폽토시스를 유도할 수 있다. 이는 2가지 이유로 eIF-5A의 추정 아폽토시스-특이적 이소폼의 활성화를 억제할 수 있는 능력에도 불구하고 발생한다. 첫 번째로 불활성화된 eIF-5A는 긴 반감기를 지닌다. Torrelia et al.(1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 145:1335-1341; Dou & Chem(1990) Biochem. Biophys. Acta., 1036:128-137. 따라서 디옥시하이푸신 신타제 활성화의 억제로부터 발생한 활성화된 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 고갈은 스퍼미딘의 독성 효과에 의해 유발된 아폽토시스를 차단하는 때에 발생하지 않는다. 두 번째로 폴리아민은 디옥시하이푸신 반응의 경쟁적 억제자이고 따라서 독성적인 농도에서 조차 반응을 완전하게 차단하지 못한다.

본 발명은 아폽토시스 유도 직전에 상향 조절된 eIF-5A cDNA의 클로닝에 관한 것이다. 본 아폽토시스-특이적 eIF-5A은 아폽토시스 경로에 관련된 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 후-전사 조절의 수준에서 작용하는 것으로 보이기 때문에 아폽토시스-유발 질병 상태에서의 중재에 대한 적당한 타겟이 되기 쉽다. 특히, 아폽토시스-특이적 eIF-5A는 아폽토시스의 mRNA 인코딩 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 핵인으로부터 이후에 변역되는 세포질로의 이동을 선택적으로 촉진시키는 것으로 보인다. 아폽토시스를 개시하는 최후의 결정은 내부 및 외부 프로- 미 항-아폽토시스 시그널 사이의 복잡한 상호작용으로부터 유래되는 것으로 보인다. Lowe & Lin(2000) Carcinogenesis, 21:485-495. 다운스트림 아폽토시스 이펙터 및 전사 인자의 변역을 촉진하는 이러한 능력을 통해 아폽토시스-관련 eIF-5A은 아폽토시스에 따라 이를 신호 사이의 균형을 전복시키는 것으로 보인다.

앞서 기술된 바와 같이 항암제가 아폽토시스를 유도하고 아폽토시스 경로 내 변화가 약물-유도된 세포 사멸을 약화시킬 수 있음을 잘 성립되어 있다. Schmitt & Lowe(1999) J. Pathol., 187:127-137. 예를 들어 많은 항암제는 p53을 상향조절하고, p53을 순실한 종양 세포는 이를 약물에 대한 저항성을 발달시킨다. 그러나 거의 모든 화학치료제는 투여량이 충분한 경우 p53과 독립적으로 아폽토시스를 유도할 수 있고, 이는 약물-저항적 종양에서도 아폽토시스의 경로가 완전하게 차단되지 않는다. Wallace-Brodeur & Lowe(1999) Cell Mol. Life Sci., 55:64-75. 이는 돌연변이된 유전자를 교정하지 않더라도 아폽토시스 eIF-5A의 유도가 p53-의존적 경로를 우회하고 대안적인 경로를 증가시킴으로서 아폽토시스를 유도시킬 수 있음을 나타낸다.

아폽토시스-관련 eIF-5A의 유도는 정상적인 이웃 세포상에 거의 또는 전혀 효과가 없고 암 세포를 선택적으로 타겟하는 포텐셜을 지닌다. 이는 종양 세포 내에서 발현된 유사분열성 종양유전자가 정상 세포 내에 존재하는 mRNA에 특이적인 종의 형태로 아폽토시스 시그널을 제공하기 때문에 발생한다. Lowe et al.(1993) Cell, 74:954-967; Lowe & Lin(2000) Carcinogenesis, 21:485-495. 예를 들어 p53-돌연변이 종양 세포 내에서 야생형 p53의 복구는 종양 세포주 및 제노그래프(xenograph)에서의 약물 민감도를 증가시킬 뿐만 아니라 아폽토시스를 직접 유도할 수 있다(Spitz et al., 1996; Badie et al., 1998).

아폽토시스-eIF-5A의 선택성은 핵인으로부터 세포질로의 이동을 매개함으로서 다운스트림 아폽토시스 이펙터 및 전사 인자에 대한 mRNA 변역을 선택적으로 촉진시킨다는 사실로부터 기인한다. 따라서 효과를 지닌 아폽토시스 eIF-5A에 있어서 이들 이펙터 및 전사 인자에 대한 mRNA가 전사되어야 한다. 이들 mRNA가 이웃 정상 세포가 아닌 암 세포 내에서 전사되는 만큼 아폽토시스 eIF-5A가 암 세포 내에서 아폽토시스를 증가시키고 정상세포에서는 있더라도 최소한의 효과를 지닐 것으로 예측된다. 따라서 아폽토시스-관련 eIF-5A를 지닌 종양 세포 내에서 아폽토시스 포텐셜의 복구는 종양 세포의 선택적 타겟팅에 기인하여 암 환자에 의해 경험된 독성 및 부작용을 감소시킨다. 아폽토시스 eIF-5A의 유도는 또한 항암 약물에 대한 종양 세포의 반응을 증가시키는 포텐셜을 지녀서 약물-저항성 종양에 대한 이들 억제의 효율성을 증가시킨다. 이는 결국 환자에게 효능있고 감소된 독성을 지닌 낮은 투여량의 항-암 약물을 초래할 수 있다.

발명의 요약

본 발명은 분리되고/또는 정제된 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS 핵산 및 폴리펩타이드 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS의 발현 벡터를 제공한다. 또한 본 발명은 분리되고/또는 정제된 아

아프토시스-특이적 eIF-5A(또한 여기서 인간 eIF-5A1 또는 eIF-5a로 표기됨)를 제공한다. 또한 본 발명은 분리되고/또는 정제된 인간 eIF-5A2(또한 여기서 중식 eIF-5A 또는 eIF-5b로 표기됨)를 제공한다. 또한 본 발명은 아프토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS를 이용하여 아프토시스를 조절하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 포유류 조직, 특히 포유류 심장 조직 내에서의 허혈 발병률을 확인하는 방법을 제공한다. 또한 포유류 조직, 특히 심장 조직 내에서의 아프토시스를 감소시키는 방법이 제공된다. 이들 방법은 아프토시스-특이적 eIF-5A와 중식 eIF-5A 둘 모두의 유전자 발현 수준을 측정하고 비교하고 아프토시스-특이적 eIF-5a의 발현 수준이 중식 eIF-5A 보다 높은 경우 허혈의 발병률을 상호관련시키는 것을 포함한다. 포유류 조직 내 아프토시스를 감소시키는 방법에서 아프토시스-특이적 eIF-5A의 발현을 억제하는 약제가 제공된다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 부분적으로는 아프토시스에 관련된(아프토시스-특이적인) 래트 황체로부터 분리된 eIF-5A를 인코드하는 전체-길이 cDNA의 발견 및 특성화에 기초한다. 따라서 하나의 실시태양에서 본 발명은 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 분리된 핵산을 제공한다. 또한 본 발명에 의해 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드의 아미노산 서열로 구성된 정제된 폴리펩타이드가 제공된다. 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드는 아프토시스하는 세포 내에서 차별적으로 발현되고, 스파미딘의 4-아미노부틸 모이어티의 디옥시하이푸신 신타제에 의해 촉매된 전구체 eIF-5A의 특정 보존된 리신의 α -아미노 그룹으로의 이동에 의한 디옥시하이푸신 잔기의 형성 및 하이푸신을 형성하기 위해 디옥시하이푸신 하이드록실라제에 의한 본 4-아미노부틸 모이어티의 하이드록실레이션으로 eIF-5A의 활성화를 초래하는 래트에 특이적인 어떠한 폴리펩타이드도 의미한다.

더욱이 본 발명의 핵산 및 폴리펩타이드 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 서열은 여기서 제공된 지시 및 당 분야에 잘 알려진 기술을 이용하여 다른 세포, 조직, 기관 또는 동물로부터 아프토시스-특이적 핵산 및 폴리펩타이드를 분리하는데 사용될 수 있다. 또한 본 발명은 본 발명의 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드를 인코드하는 핵산의 검출을 위한 프라이머 또는 하이브리디제이션 프로브로서 적당한 핵산 분자를 제공한다.

본 발명의 핵산은 DNA, RNA, DNA/RNA 이중나선(duplex), 단백질-핵산(PNA) 또는 그의 유도체가 될 수 있다. 여기서 사용된 바와 같이 핵산 또는 폴리펩타이드는 실질적으로 세포 물질이 없거나 화학적 전구물질 또는 다른 화학물질이 없을 때 "분리된" 또는 "정제된"이라고 한다. 분리된 또는 정제된이라는 용어는 무수한 다른 서열 단편을 함유한 라이브러리-타입 제조를 나타내지 않음이 주지되어야 한다. 본 발명의 핵산 또는 폴리펩타이드는 상동성 또는 다른 정제 정도로 정제될 수 있다. 정제의 수준은 의도된 사용에 기초될 것이다. 중요한 특징은 제조가 다른 성분이 상당한 양으로 존재하더라도 핵산 또는 폴리펩타이드의 원하는 기능을 가능하게 함이다.

분리된 폴리펩타이드는 자연적으로 이를 발현하는 세포, 이를 발현하도록 변경된 세포(재조합)로부터 정제되거나 알려진 단백질 합성 방법을 이용하여 합성될 수 있다. 예를 들어 단백질의 재조합 생성은 아프토시스 유도 eIF-5A 또는 DHS를 인코드하는 핵산 분자를 발현 벡터 내로 클론하는 것을 포함한다. 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되고 단백질은 숙주 세포 내에서 발현된다. 단백질은 표준 단백질 정제 기술을 이용하여 적당한 정제법에 의해 세포로부터 분리될 수 있다.

바람직하게는, 본 발명의 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드를 인코드하는 분리된 핵산은 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 지니고, 본 발명의 정제된 폴리펩타이드는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지닌다. 또한 본 발명의 래트 아프토시스-특이적 eIF-5A 핵산 및 폴리펩타이드는 각각 서열번호: 1 및 서열번호: 2 뿐만 아니라 그의 기능적 유도체 및 변이체에 실질적인 서열 동일성 또는 상동성을 지닌 서열을 포함한다.

여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 다른 서열과 실질적인 구조적 또는 기능적 동의성을 보임을 나타내는데 사용된다. 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열간의 어떠한 구조적 또는 기능적 차이점은 미소마진(*de minimus*)일 것이다; 즉, 원하는 적용에서 나타난 바와 같은 기능을 하는 서열의 능력에 영향을 미치지 않을 것이다. 차이점은 예를 들어 다른 종간의 코돈 용법(usage)의 유전적 변이에 기인한다. 구조적 차이점은 2 이상의 다른 서열간에 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 또는 다른 서열들이 길이 또는 구조에서 다르더라도 유사한 생리적 특성을 나타내는 경우 미소마진으로 간주된다. 예를 들어 이러한 특성은 정의된 조건 하에서 하이브리다이즈하는 능력 또는 단백질의 경우 면역적 교차반응성, 유사한 효소 활성 등을 포함한다. 숙련된 기술자는 알려진 방법에 의해 이들 특성의 각각을 용이하게 결정할 수 있다.

더욱이 2가지 뉴클레오타이드 서열은 서열이 적어도 약 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상 서열 유사성을 지닌 경우 "실질적으로 상보적"이다. 2가지 아미노산 서열은 폴리펩타이드의 활성 또는 기능적으로 관련된 부분 사이에 적어도 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 유사성을 지닌 경우 실질적으로 상동적이다.

2가지 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위해 서열은 최적 비교 목적으로 정렬된다(즉, 캡이 최적 정렬을 위해 첫 번째 및 두 번째 아미노산 또는 핵산 서열의 하나 또는 둘 모두 내에 도입될 수 있고, 비-상동적 서열은 비교 목적으로 무시될 수 있다). 바람직한 실시태양에서 참조 서열 길이의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상이 비교 목적으로 정렬된다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 비교된다. 첫 번째 서열에서의 위치가 두 번째 서열 내 상응하는 위치로서 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때 분자는 그 위치에서 동일하다(여기서 사용된 바와 같이 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동등하다). 2가지 서열 사이의 동일성 백분율은 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 기능이고 2가지 서열의 최적 정렬을 위해 도입되는 데 필요한 각각의 캡의 수, 캡의 길이를 고려한다.

2가지 서열 사이의 서열 비교 및 동일성 및 유사성 백분율의 측정은 수학적 알고리즘을 이용하여 달성될 수 있다 (Computational Molecular Biology, LeNa, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informations and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of

Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

본 발명의 핵산 및 단백질 서열은 예를 들어 다른 패밀리 멤버 또는 관련된 서열을 확인하기 위해 서열 데이터베이스에 대한 검색을 실행하는 "질문 서열"로서 더욱 이용될 수 있다. 이러한 검색은 Altschul, et al.(1990) *J. Mol Biol.* 215:403-10의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(2.0 버전)을 이용하여 실행될 수 있다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은 NBLAST 프로그램으로 실행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 본 발명의 단백질에 상동적인 아미노산 서열을 수득하기 위해 XBLAST 프로그램으로 실행될 수 있다. 비교 목적으로 캡된(gapped) 정렬을 수득하기 위해 캡된 BLAST가 Altschul, et al.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 캡된 BLAST 프로그램을 사용할 때 각각의 프로그램의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(즉, XBLAST 및 NBLAST).

핵산의 "기능적 유도체"라는 용어는 여기서 유전자 또는 뉴클레오타이드 서열의 상동체 또는 아날로그를 의미하는데 사용된다. 기능적 유도체는 본 발명에 따라 그의 유용성을 가능하게 하는 주어진 유전자의 기능의 적어도 일부를 보유한다. 여기에 기술된 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드의 "기능적 유도체"는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 활성 또는 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 특이적인 항체와의 면역적 교차반응성의 적어도 일부를 보유한 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 단편, 변이체, 아날로그 또는 화학적 유도체이다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드의 단편은 분자의 서브세트를 나타낸다.

또한 기능적 변이체는 기능에 있어서 변화가 없거나 무의미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 기능에 필수적인 아미노산은 자리-지정 돌연변이 또는 알라닌-스캔닝 돌연변이와 같은 당분야에 알려진 방법에 의해 확인될 수 있다(Cunningham et al.(1989) *Science* 244:1081-1985). 후자 방법은 분자 내 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 수득된 돌연변이 분자는 키나제 활성과 같은 생물학적 활성 또는 시험관 내 종식 활성과 같은 에세이로 시험된다. 또한 결합 파트너/기질 결합에 중요한 자리는 결정화, 핵 자기공명 또는 포토어피니티 표지와 같은 구조적 분석에 의해 측정될 수 있다(Smith et al.(1992) *J. Mol. Biol.* 224:899-904; de Vos et al.(1992) *Science* 255:306-312).

"변이체"는 하나 이상의 치환된 뉴클레오타이드를 지닌 뉴클레오타이드 치환과 같이 전체 유전자 또는 그의 단편에 실질적으로 유사하나 특정한 유전자와 하이브리다이즈하거나 본래의 DNA와 하이브리다이즈하는 mRNA 전사체를 인코드하는 능력을 유지하는 분자를 나타낸다. "상동체"는 다른 동물 속 또는 종으로부터의 단편 또는 변이체 서열을 나타낸다. "아날로그"는 전체 분자, 그의 변이체 또는 단편과 유사하거나 이에 관련된 기능을 하는 비-천연 분자이다.

변이체 펩타이드는 자연발생될 뿐만 아니라 당분야에 잘 알려진 방법에 의해 제조된 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 분자 기술 및 여기에 개시된 서열 정보를 이용하여 용이하게 확인/제조될 수 있다. 또한 이러한 변이체는 본 발명의 eIF-5A 또는 DHS 단백질 서열 및/또는 구조적 상동체에 기초하여 다른 단백질로부터 용이하게 구별될 수 있다. 존재하는 상동성/동일성의 정도는 단백질이 기능적 변이체인지 비-기능적 변이체인지에 따라, 패밀리 내 존재하는 차이의 양 및 오르솔로그(ortholog) 사이의 진화 거리에 기초할 것이다.

본 발명의 eIF-5A 또는 DHS 단백질의 비-자연발생 변이체는 재조합 기술을 이용하여 용이하게 생성될 수 있다. 이러한 변이체는 단백질의 아미노산 서열 내 삭제, 첨가 및 치환을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다. 예를 들어 치환의 하나의 종류는 보존된 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 단백질의 주어진 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 일반적으로 보존적 치환은 지방성 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile의 서로 대치; 하이드록실 잔기 Ser과 Thr의 상호교환; 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환; 아미이드 잔기 Asn 및 Gln 사이의 치환; 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환; 방향성 잔기 Phe 및 Tyr 사이의 대치이다. 어떤 아미노산 변화가 표현형적으로 침묵(silent)이 되기 쉬운지에 관한 안내가 Bowie et al., *Science* 247:1306-1310(1990)에 나타나 있다.

대안으로, 그러나 바람직하게는, 본 발명의 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드를 인코드하는 핵산은 서열번호: 1과 상보적인 뉴클레오타이드 서열과 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이즈한다. 여기서 사용된 "하이브리디제이션"이라는 용어는 일반적으로 프로브 서열 및 타겟 서열의 성질에 따라 다르게 당업자에게 용이하게 명백한 적당한 스트린전시 조건에서의 핵산의 하이브리디제이션을 의미하는데 사용된다. 하이브리디제이션 및 세척의 조건은 당분야에 잘 알려져 있고 다양한 인큐베이션 시간, 온도 및/또는 용액의 이온 강도의 변화에 의한 원하는 스트린전시에 따라 다른 조건의 조정이 용이하게 달성된다. Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989.

조건의 선택은 하이브리다이즈하는 서열의 길이 특히, 프로브 서열의 길이, 핵산의 상태 G-C 함량 및 허용된 미스매치의 양에 의해 규정된다. 낮은 스트린전시 조건은 더 낮은 정도의 상보성을 지닌 스트랜드 사이에서의 부분적인 하이브리디제이션을 원할 때 바람직하다. 완전하거나 거의 완전한 상보성을 원할 때는 높은 스트린전시 조건이 바람직하다. 일반적인 높은 스트린전시 조건에 있어서 하이브리디제이션 용액은 6X S.S.C., 0.01 M EDTA, 1X Denhardt's 용액 및 0.5% SDS를 포함한다. 하이브리디제이션은 클론된 DNA의 단편의 경우 약 3~4시간 동안 총 진핵세포성 DNA의 경우 약 12~16시간 동안 68°C에서 수행되었다. 낮은 스트린전시에 있어서, 하이브리디제이션의 온도는 이중나선의 녹는점(Tm) 이하의 약 42°C로 감소된다. Tm은 G-C 함량 및 이중나선의 길이 뿐만 아니라 용액의 이온 강도의 기능으로 알려진다.

여기서 사용된 DNA 또는 RNA 분자의 "상응하는 부분에 하이브리다이즈"라는 어구는 하이브리다이즈하는 분자 즉, 올리고뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 어떤 뉴클레오타이드 서열(센스 또는 앤티센스 방향으로)이 거의 동일한 크기이고 충분한 서열 유사성을 지녀서 적당한 조건 하에서 하이브리디제이션 효과를 나타내는 또 다른 핵산 분자를 인식하고 하이브리다이즈하는 것을 의미한다. 예를 들어 100 뉴클레오타이드 길이 센스 분자는 2개의 서열 사이에 70% 이상의 서열 유사성이 있는 한 뉴클레오타이드 서열의 거의 100 뉴클레오타이드 부분을 인식하고 하이브리다이즈할 것이다. "상응하는 부분"의 크기는 하이브리디제이션 내에서 어느 정도 미스매치를 가능하게 하여 "상응하는 부분"이 하이브리다이즈하는 분자 보다 예를 들어 20~30% 더 크거나 더 작거나, 바람직하게는 최대한 12~15% 더 크거나 더 작을 수 있음이 이해된다.

더욱이 폴리펩타이드의 기능적 변이체는 또한 기능에 있어서 어떤 변화도 없거나 무의미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산 치환을 포함한다. 기능에 필수적인 아미노산은 자리-지정 돌연변이 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이와 같은 당분야에 알려진 방법에 의해 확인될 수 있다(Cunningham et al., *Science* 244:1081-1085(1989)). 후자 방법은 분자 내 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 수득된 돌연변이 분자는 생물학적 활성 또는 에세이로 시험된다.

예를 들어, 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 아날로그는 전체 단백질 또는 그의 단편에 실질적으로 유사한 비-천연 단백질 또는 웨타이도미메틱을 나타낸다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 화학적 유도체는 일반적으로 웨타이드 또는 웨타이드 단편의 일부가 아닌 부가적인 화학 모이어티를 포함한다. 변형은 선택된 사이드 체인 또는 말단 잔기와 반응하는 것이 가능한 유기 유도체와 타겟된 아미노산 잔기를 반응시킴으로서 웨타이드 또는 그의 단편에 도입될 수 있다.

래트 황체로부터 분리된 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 인코드하는 전체-길이 cDNA의 초기 발견 및 특성화는 역시 래트 황체로부터 분리되고 아폽토시스에 관련된 DHS를 인코드하는 일부-길이 cDNA 클론의 발견 및 특성화를 이끌었다. 따라서 추가 실시태양에서 본 발명은 래트 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열로 구성된 분리된 핵산을 제공한다. 또한 래트 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드의 아미노산 서열로 구성된 정제된 폴리펩타이드가 제공된다. 래트 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드는 아폽토시스하는 세포 내에서 차별적으로 발현되고, 디옥시하이푸신을 형성하기 위해 스퍼미딘의 4-아미노부틸 모이어티의 불활성 eIF-5A의 특정 보존된 리신의 α-아미노 그룹으로의 이동에 의한 디옥시하이푸신의 형성을 촉매하여 eIF-5A를 활성화시키는 래트에 특이적인 어떠한 적당한 폴리펩타이드도 의미한다.

바람직하게는, 본 발명의 래트 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 분리된 핵산은 서열번호: 6의 뉴클레오타이드 서열을 지니고, 본 발명의 폴리펩타이드는 서열번호: 7을 지닌다. 또한 본 발명의 래트 아폽토시스-특이적 DHS 핵산 및 폴리펩타이드는 각각 서열번호: 6 및 서열번호: 7에 실질적인 서열 동일성 또는 상동성을 지닌 서열뿐만 아니라 앞서 기술된 기능적 유도체 및 그의 변이체를 포함한다. 대안으로, 그리고 바람직하게는, 본 발명의 분리된 핵산은 앞서 기술된 서열번호: 6의 상보 서열과 매우 높은 스트린전트 조건 하에서 하이브리다이즈하는 뉴클레오타이드 서열을 지닌다.

여기서 기술된 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 서열의 핵산 및 폴리펩타이드의 경우와 같이 본 발명의 래트 아폽토시스-특이적 DHS 서열의 핵산 및 폴리펩타이드는 인간을 포함한 다른 동물로부터 아폽토시스-특이적 DHS 핵산 및 폴리펩타이드를 분리하는데 사용될 수 있다. 동물 및 인간으로부터의 이러한 DHS 서열의 분리는 적어도 80% 이상의 교차 종의 서열 유사성을 기초로 당분야에 알려진 방법 및 여기서 제공된 지시를 이용하여 달성될 수 있다. 또한 본 발명은 본 발명의 래트 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 핵산의 검출을 위한 적당한 프라이머 또는 하이브리디제이션 프로브로서의 핵산 분자를 제공한다.

아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS는 아폽토시스 경로에 관련된 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 후-전사 조절에서 작용하기 쉽기 때문에 질병 과정을 지연시키는 아폽토시스를 포함한 아폽토시스 조절의 적당한 타겟이 된다. 따라서 본 발명은 또한 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS 기능을 조절하는 약제를 세포에 투여함으로서 세포 내 아폽토시스를 조절하는 방법을 제공한다. 약제는 단지 아폽토시스-특이적인 eIF-5A 기능, 아폽토시스-특이적 DHS 기능 단독만, 또는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS 기능 모두를 조절하는 것이 될 수 있음이 당분야의 숙련자에게 주지되어야 한다.

아폽토시스는 세포 내 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 기능의 정상 수준의 적당한 변경에 의해 조절될 수 있다. 여기서 의도된 바와 같이 변형 또는 변경은 완전하거나 일부일 수 있고, 세포 내 전사적 또는 번역적 조절의 변화 또는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 기능을 변경시키는 다른 변화를 포함할 수 있다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A 또는 DHS 기능은 스퍼미딘의 4-아미노부틸 모이어티의 DHS에 의해 촉매된 전구체 eIF-5A의 특정 보존된 리신의 α-아미노 그룹으로의 이동에 의한 디옥시하이푸신 잔기의 형성 및 하이푸신을 형성하기 위해 디옥시하이푸신 하이드록실레이션에 의한 본 4-아미노부틸 모이어티의 하이드록실레이션으로 eIF-5A의 활성화 초래에 관련된 활성을 의미한다.

본 발명의 하나의 실시태양에서 약제는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 기능을 억제하여 아폽토시스를 억제할 수 있다. 아폽토시스 억제는 예를 들어 세포 수축, 염색질 응축, 핵 무사분열 및 멤브레인 수포와 같은 잘-정의된 아폽토시스의 형태학적 특징의 강도 및/또는 수의 감소 및/또는 차수의 지연을 의미한다.

아폽토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 기능을 억제할 수 있는 하나의 약제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 바람직하게는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드의 일부를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열을 지닌다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 많은 적당한 핵산 서열은 당분야에 알려져 있다. 예를 들어, 서열번호: 1, 3, 4, 5, 11, 15, 19, 20 및 21(아폽토시스-특이적 eIF-5A 핵산 서열), 서열번호: 6 및 8(아폽토시스-특이적 DHS 핵산 서열), 서열번호: 12 및 16 eIF-5A(아폽토시스-특이적 폴리펩타이드 서열) 및 서열번호: 7(아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드 서열) 또는 그의 일부가 적당한 서열을 제공한다. 다른 적당한 서열은 여기서 기술된 방법에 따라 프로브로서 알려진 서열을 이용함으로서 발견될 수 있다.

따라서 본 발명은 또한 아폽토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 아폽토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드 또는 그의 상보서열의 일부를 인코드하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 RNA 또는 DNA 즉, cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 RNA 또는 cDNA의 형태가 될 수 있다. DNA는 이중나선이 될 수 있고, 단일나선인 경우 단일나선은 코딩 나선 또는 비-코딩 나선이 될 수 있다. 핵산의 정상 기능의 방해를 초래하는 올리고머 화합물의 그의 타겟 핵산과의 하이브리디제이션은 일반적으로 "안티센스"로 표기된다. 방해되는 DNA의 기능은 복제 및 전사를 포함한다. 방해되는 RNA의 기능은 예를 들어 단백질 번역 사이트로의 RNA의 이동, RNA로부터의 단백질 번역, 하나 이상의 mRNA 종을 산출하는 RNA의 스플라이싱 및 RNA에 의해 착수되거나 촉진될 수 있는 촉매 활성과 같은 모든 기능을 포함한다. 이러한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 전체 효과는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS의 발현 및/또는 생성된 활성화된 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 양을 억제한다.

대안으로 아폽토시스-특이적 DHS에 의한 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 활성화는 DHS 효소 반응을 억제하는 화학 약제를 투여함으로서 억제될 수 있다. 예를 들어 아폽토시스를 반영하는 DNA 캐더링의 착수는 동물이 PGF-2 α 의 주입에 의한 아폽토시스의 유도 후 DHS 반응의 억제자인 스퍼미딘으로 처리되면 래트 황체에서 지연된다(도 18-19). Jakus et al.,(1993) J. Biol. Chem., 268:13151-13159.

또한 아폽토시스는 아폽토시스-특이적 eIF-5A DNA, RNA 또는 단백질을 분해하거나 아폽토시스-특이적 DHS DNA, RNA 또는 단백질을 분해하는 약제를 첨가하여 아폽토시스-특이적 DHS에 의한 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 방지함으로서 억제되거나 실질적으로 감소된다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서 내생적 포유류 아폽토시스-특이적 DHS, 아폽토시스-특이적 eIF-5A 또는 이 둘 모두의 발현 억제는 리보자임의 이용을 통해 영향을 받는다. 적당한 약물의 예는 아폽토시스-특이적 DHS에 의해 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 억제하는 것, 디옥시하이포신 하이드록실라제에 의해 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 억제하는 것, 아폽토시스-특이적 DHS의 전사 및/또는 번역을 억제하는 것, 아폽토시스-특이적 디옥시하이포신 하이드록실라제의 전사 및/또는 번역을 억제하는 것, 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 전사 및/또는 번역을 억제하는 것을 포함한다. 아ປ토시스-특이적 DHS에 의한 eIF-5A의 활성화를 억제하는 약물의 예는 스퍼미딘, 1,3-디아미노-프로판, 1,4-디아미노-부탄(푸트레신), 1,7-디아미노-헵탄 또는 1,8-디아미노-옥탄이다.

또한 세포내 아ປ토시스-특이적 eIF-5A를 코드하는 유전자를 불활성화함으로서 아ປ토시스-특이적 eIF-5A를 억제하는 것이 가능하다. 이러한 불활성화는 세포 내에서 유전자를 삭제하거나 삭제 또는 돌연변이를 유전자 내로 삽입시켜 유전자를 불활성화함으로서 발생할 수 있다. 또한 내생적 아ປ토시스-특이적 eIF-5A 단백질의 발현이 발생하지 않도록 또 다른 DNA 단편을 유전자 내로 삽입함으로서 유전자가 불활성화될 수 있다. 마찬가지로 세포 내에서 아ປ토시스-특이적 DHS를 코드하는 유전자를 불활성화함으로서 아ປ토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 억제하는 것이 가능하다. 진핵 세포의 유전자 내로의 삭제 및 삽입과 같은 돌연변이 도입방법은 당분야에 알려져 있다 즉, 미국 특허 제5,464,764호. 세포 내 유전자 돌연변이에 유용한 올리고뉴클레오타이드 및 발현 벡터는 당분야에 알려진 방법 및 여기서 제공된 지시에 따라 제조될 수 있다; 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 제조하고 발현하는 유용한 방법이 세포 내 유전자를 돌연변이시키는데 유용한 올리고뉴클레오타이드 및 발현 벡터를 제조하는데 이용될 수 있다.

또한 세포 내 아ປ토시스-특이적 eIF-5A를 코드하는 유전자의 발현을 억제함으로서 아ປ토시스-특이적 eIF-5A의 발현을 억제하는 것이 가능하다. 이러한 불활성화는 동시억제(co-suppression)를 통해 즉, 아ປ토시스-특이적 eIF-5A를 코드하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 세포내로 도입하여 동시억제가 발생하도록 함으로서 달성될 수 있다. 마찬가지로 동시억제를 통해 세포 내 아ປ토시스-특이적 DHS를 코드하는 유전자의 발현을 억제함으로서 아ປ토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 억제하는 것이 가능하다. 동시억제에 유용한 올리고뉴클레오타이드 및 발현 벡터는 당분야에 알려진 방법 및 여기서 제공된 지시에 따라 제조될 수 있다; 예를 들어 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 발현 벡터를 제조하는데 이용될 수 있다. 동시억제의 방법은 당분야에 알려져 있다 즉, 미국 특허 제5,686,649호.

억제 결과의 하나는(즉, 안티센스, 돌연변이 또는 동시억제를 통한) 내생적 번역가능한 아ປ토시스-특이적 eIF-5A 또는 DHS-인코딩 mRNA의 양의 감소이다. 따라서 생성된 아ປ토시스-특이적 DHS 단백질의 양이 감소되어 활성화된 eIF-5A의 양을 감소시키고 이는 결국 아ປ토시스-특이적 단백질의 번역을 감소시킨다. 따라서 디노보(de novo) 단백질 합성이 아ປ토시스의 착수에 필요하기 때문에 아ປ토시스는 억제되거나 지연된다.

본 발명의 또 다른 실시태양에서 약제는 아ປ토시스-특이적 eIF-5A 또는 DHS 기능을 유도하여 아ປ토시스를 유도할 수 있다. 아ປ토시스 유도는 예를 들어 세포 수축, 염색질 응축, 핵 무사분열 및 멤브레인 수포와 같은 잘-정의된 아ປ토시스의 형태학적 특징의 강도 및/또는 수의 증가 및/또는 착수의 가속화를 의미한다.

아ປ토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 기능을 유도하는 어떠한 적당한 약제도 사용될 수 있다. 아ປ토시스-특이적 eIF-5A의 불활성 및 활성 형태 모두 투여될 수 있음이 당분야의 숙련자에 의해 주지된다. 불활성 형태 또는 하이포신-비변형된 형태가 투여되는 경우 고유의 아ປ토시스-특이적 DHS가 eIF-5A를 활성화할 것이다. 아ປ토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 많은 적당한 핵산 서열은 당분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 서열번호: 1, 3, 4, 5, 11, 15, 19, 20 및 21(아ປ토시스-특이적 eIF-5A 핵산 서열), 서열번호: 6 및 8(아ປ토시스-특이적 DHS 핵산 서열), 서열번호: 12 및 16 eIF-5A(아ປ토시스-특이적 폴리펩타이드 서열) 및 서열번호: 7(아ປ토시스-특이적 DHS 폴리펩타이드 서열) 또는 그의 일부가 적당한 서열을 제공한다. 다른 적당한 서열은 여기서 기술된 방법에 따라 프로브로서 알려진 서열을 이용함으로서 발견될 수 있다.

예를 들어 네이키드(naked) 핵산(올리고뉴클레오타이드 또는 플라스미드와 같은 네이키드 DNA 벡터) 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩타이드를 포함한 폴리펩타이드가 세포 내로 투여될 수 있다. 재조합적으로 생성된 폴리펩타이드는 eIF-5A 또는 DHS 단백질을 인코드하는 DNA 서열이 하기에 상세하게 기술된 적당한 발현 벡터 내에 놓임을 의미한다. 숙주는 발현 벡터로 트랜스페션되고 이후 원하는 폴리펩타이드를 생성한다. 폴리펩타이드는 이후 숙주 세포로부터 분리된다. 재조합 아ປ토시스-유도 eIF-5A 단백질은 당업자에 의해 예를 들어 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 내에서 제조되고 재조합 DHS에 의해 활성화될 수 있다. Wang et al.(2001) J. Biol. Chem., 276:17541-17549; Eriksson et al.,(2001) Semin. Hematol., 38:24-31. 폴리펩타이드 또한 알려진 단백질 합성 방법을 이용하여 합성될 수 있다.

폴리펩타이드 업테이크(uptake)는 리간드 예를 들어 광범위한 세포 내로의 업테이크를 매개하는 안트라스(anthrax)로부터 유도된 리간드를 이용하여 촉진될 수 있다. Liu et al.,(2001) J. Biol. Chem., 276:46326-46332. 또한 재조합 단백질은 리포솜을 이용하여 포유류의 타겟 세포, 조직 및 기관으로 투여될 수 있다. 단백질을 흡장하는 리포솜은 정맥 내로 투여된다. 타겟팅은 세포 수용체에 특이적인 리간드를 리포솜 내로 통합시킴으로서 달성될 수 있다. Kaneda, Adv Drug Delivery Rev 43:197-205(2000).

아ປ토시스-특이적 eIF-5A 또는 DHS 기능을 유도할 수 있는 하나의 바람직한 약제는 발현 벡터이다. 따라서 본 발명은 아ປ토시스-특이적 eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 핵산에 실시가능하게 결합된 프로모터를 지닌 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 발현 벡터는 RNA 또는 DNA 즉, cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 RNA 또는 DNA

의 형태가 될 수 있다. DNA는 이중나선이 될 수 있고, 단일나선인 경우 단일나선은 코딩 나선 또는 비-코딩 나선이 될 수 있다. 적당한 발현 벡터(즉, Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual(Elsevier, N.Y.: 1985) 참조)가 사용될 수 있다. 바람직하게는 발현 벡터는 아프토시스-특이적(관련된) eIF-5A 폴리펩타이드 및/또는 아프토시스-특이적(관련된) DHS 폴리펩타이드를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열에 실시가능하게 결합된 프로모터 서열을 지닌다.

발현 벡터 내에 프로모터가 핵산의 발현을 끌어낼 수 있도록 원하는 핵산 및 프로모터가 실시가능하게 결합된다. 핵산이 발현되는 어떠한 적당한 프로모터도 사용될 수 있다. 이러한 적당한 프로모터의 예는 다양한 바이러스 프로모터, 진핵세포성 프로모터 및 구성적으로 활성인 프로모터를 포함한다. 이러한 실시가능한 결합이 유지되는 한 발현 벡터는 하나 이상의 핵산을 포함할 수 있다(즉, 아프토시스-특이적 eIF-5A 및/또는 DHS 모두를 인코드하는 핵산). 발현 벡터는 폴리아데닐레이션 서열, 리보솜 진입 사이트, 전사 조절 요소(즉, 인핸서, 사일런서 등), 세포 내 벡터 또는 전사체 또는 원하는 전사체의 변역 또는 처리의 안정성을 증가시키는 다른 서열(즉, 분비 신호, 리더 등)과 같은 다른 요소를 선택적으로 포함할 수 있다.

발현 벡터는 아데노바이러스, 아데노-결합 바이러스, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 바이러스로부터 유도될 수 있다. 본 발명의 발현 벡터는 바클로바이러스 시스템을 포함하여 박테리아 종, 포유류 또는 곤충 숙주 세포 시스템을 포함하나 이에 한정적이지 않은 숙주 세포내로 트랜스펙션될 수 있고(Luckow et al., Bio/Technology, 6, 47(1988) 참조), 293, COS-7, C127, 3T3, CHO, BHK 등과 같은 세포주에 수립될 수 있다.

플라스미드 및 다른 바이러스 벡터(즉, 헤르페스 심플렉스 바이러스)와 달리 아데노바이러스 벡터는 심근, 혈관 내피 및 골격 근육과 같은 심장혈관 관련 사이트 내에서 높은 수준의 단백질 발현으로 유전자 전이를 달성하기 때문에 아데노바이러스 벡터가 바람직하다. 더욱이 아데노바이러스 벡터에 의해 전이된 유전자는 에피크로모솜(epichromosome) 위치 내에서 기능하여 전이된 유전자를 숙주 세포의 중요한 사이트에 부적당하게 삽입하는 위험을 거의 수행하지 않는다. 또한 아데노바이러스 벡터는 바이러스 복제에 필요한 적어도 하나 이상의 유전자 기능에 결합이 있다. 바람직하게는 아데노바이러스 벡터는 아데노바이러스 세포의 E1, E2 및/또는 E4 구역의 적어도 하나 이상의 필수적 유전자 기능에 결합이 있다. 더욱 바람직하게는 부가적으로 벡터는 아데노바이러스 세포의 E3 구역의 적어도 일부에 결합이 있다(즉, E3 구역의 XbaI 삭제).

재조합 아데노바이러스는 바이러스를 배양 배지 내로 단순히 첨가함으로서 배양된 세포 내로 전달될 수 있다. 숙주 동물/인간의 감염은 바이러스 입자를 혈관 내로 또는 원하는 조직 내로 직접 주사함으로서 달성될 수 있다. 혈청 내 바이러스의 반감기는 리포솜(즉, 리포펙틴, Life Technologies) 또는 폴리에틸렌 글리콜과 바이러스를 혼합시킴으로서 연장될 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 일반적으로 바이러스 섬유 단백질의 knob 도메인과 콕스사키에바이러스(coxsackievirus) 및 아데노바이러스 수용체, CAR 사이의 상호작용을 통해 세포 내로 진입한다. 바이러스 벡터는 특정한 세포 수용체에 특이적인 리간드를 발현하도록 바이러스를 유전적으로 설계함으로서 특정한 세포 또는 CAR을 발현하지 않는 세포로 지시될 수 있다.

대안적 실시태양에서 화학물질로 또는 아프토시스-특이적 eIF-5A의 활성화를 화학적으로 증가시킴으로서 내생적 아프토시스-특이적 eIF-5A 또는 아프토시스-특이적 DHS 또는 이들 모두의 전사를 화학적으로 상향조절함으로서 아프토시스가 개시되거나 증가될 수 있다. 하나의 실시태양에서 PGF-2 α 가 DHS 및 eIF-5A의 전사를 상향조절하기 위해 동물/인간의 암세포 또는 종양에 투여된다.

아프토시스-특이적 eIF-5A는 아프토시스 경로에 관련된 다운스트림 이펙터 및 전사 인자의 후-전사 조절에서 작용하기 쉽기 때문에 질병 과정을 지연시키는 아프토시스를 포함한 아프토시스의 조절의 적당한 타겟이 된다. 아프토시스의 유도 또는 강화를 초래하고 아프토시스를 겪는 세포의 불활성화 및 관련된 원인론을 유발하거나 이를 지님으로서 유발된 질병을 치료 및 예방하기 위한 신규한 방법 및 조성물을 제공하는 본 발명의 아프토시스-특이적 eIF-5A 및 아프토시스-특이적 DHS 단독 또는 조합을 조절하는 방법이 동물의 세포 내에서 달성될 수 있다.

많은 중요한 인간 질병은 아프토시스 조절의 비정상에 의해 유발된다. 이들 비정상은 세포 수의 병리학적 증가(즉, 암) 또는 세포의 손상 손실(즉, 퇴행성 질환)을 초래할 수 있다. 비-제한 예로서 본 발명의 방법 및 조성물이 하기 아프토시스-관련된 질병 및 장애를 예방하거나 치료하는데 사용될 수 있다: 신경학적/신경퇴행성 장애(즉, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 경화증(류게릭병), 자가면역 장애(즉, 류마티스관절염, 천신성홍반선루페스(SLE), 다발성경화증), 근위영양증(DMD), 모터뉴런 장애, 국소빈혈, 만성심장질환, 발작, 유아척추근육위축증, 심장마비, 신장질환, 아토피피부염, 패혈증 및 패혈성쇼크, AIDS, 간염, 녹내장, 당뇨병(타입 1 및 타입 2), 천식, 색소성 망막염, 골다공증, 이식거부, 화상).

본 발명의 방법은 각각 암세포를 지니거나 종양으로 손상된 동물을 암세포를 죽이거나 종양의 진행을 억제하는데 충분한 양으로 동물을 치료하는데 사용될 수 있다. 이를 달성하는데 적당한 양은 치료적으로 효과적인 투여량으로 한정된다. 이러한 사용에 효과적인 양은 질병의 민감도 및 동물 자체 면역 시스템의 일반적인 상태에 따라 달라진다.

종양 생장의 억제는 종양의 진행 즉, 생장, 침략성, 전이 및/또는 종양의 재발의 예방 및 감소를 의미한다. 본 발명의 방법은 예를 들어 유방, 심장, 폐, 소장, 콜론, 비장, 신장, 방광, 머리, 목, 난소, 전립선, 뇌, 췌장, 피부, 뼈, 골수, 혈액, 흉선, 자궁, 고환, 경부 또는 간의 종양을 포함한 어떠한 적당한 종양의 치료에도 사용될 수 있다. 동물, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간이 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 치료될 수 있다. 본 발명의 방법은 시험관 내에서, 생체 외에서 또는 생체 내에서 수행될 수 있다.

투여 스케줄은 질병 상태 및 동물의 상태에 따라 바뀔 것이고, 단일 환약 투여량 또는 하루 당 멀티플 투여의 연속적인 주입되거나(매 4-6시간) 치료 및 동물 조건에 나타난 것에 따른 것이다. 그러나 본 발명은 어떠한 특정 투여량에 한정적이지 않다는 것이 주지되어야 한다.

본 발명에서 적당한 방법 또는 루트가 예를 들어 경부, 정맥, 복막, 피하, 도는 근육내 투여와 같은 투여에 이용될 수 있다. 투여된 길항자의 투여량은 예를 들어 투여된 분자의 타입, 치료 중인 종양의 타입 및 엄경성 및 투여의 루트와 같은 많은 인자에 따라 달라진다. 그러나 본 발명이 어떤 특정한 투여 방법 또는 루트에 한정적이지 않음이 강조되어야 한다.

하나의 대안적 실시태양에서 본 발명의 방법은 하나 이상의 통상적 치료와 조합하여 이용될 수 있다. 예를 들어 화학치료제 또는 조사(radiation)와 같은 적당한 항종양제가 사용될 수 있다. 또 다른 대안적 실시태양에서 본 발명의 방법은 예를 들어 시토킨(IL-10 및 IL-13) 또는 다른 면역 자극제와 같은 하나 이상의 적당한 보조제와 조합하여 이용될 수 있다.

또 다른 대안적 실시태양에서 아폽토시스-관련되거나 연관된 장애(심장 조직의 허혈과 같은)의 진단은 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준을 측정함으로서 이루어질 수 있다. 증식 eIF-5A(eIF-5b) 및 아폽토시스-특이적 eIF-5A는 다른 프로모터에 의해 다른 위치로부터 전사된다는 점에서 다르다; 2가지는 구조적으로 상동적이나 카르복시 말단에 있어서 차별성을 지님. 본 발명의 진단방법은 목적 세포 내 존재하는 증식 eIF-5A의 양을 동일한 세포 내 존재하는 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 양과 비교하는 것을 포함한다. 유전자 발현 수준은 증식 eIF-5A 및 아폽토시스-특이적 eIF-5A 둘 모두에 대해 측정되고 서로 비교된다. 정상 기능 중에는 세포는 아폽토시스-특이적 eIF-5A과 동일하거나 더 많은 양의 증식 eIF-5A(또한 여기서 eIF-5A2로 표기됨)를 지닐 것이다. 그러나 사멸 또는 허혈과 같은 스트레스를 겪는 세포에서는 아폽토시스-특이적 eIF-5A가 증식 eIF-5A보다 더 높은 수준에서 발현된다. 따라서 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현의 증가 수준의 검출은 아폽토시스-관련 또는 연관된 장애(허혈과 같은)를 확인하거나 진단하는 방법을 제공한다.

도 46은 아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 수준이 심장 조직 내 허혈이 유도되기 전후에 측정된 실현 결과를 나타낸다. 실시예 6 참조. 허혈 전에 아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준은 개략적으로 유사하였고 낮은 수준이었다. 허혈이 유도된 후 아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a)의 수준은 증식 eIF-5A(eIF5b)의 수준보다 훨씬 더 증가되었다.

아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 정상 조직에서 비교적 낮은 수준이고 서로에 대해 상대적 균형을 이룬다는 것을 알고, 아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a)의 유전자 발현 수준의 증가를 모니터하고 검출하는 것은 허혈과 같은 스트레스에 세포 또는 조직을 놓는 다양한 질병 또는 이상을 진단하는 방법을 제공한다.

또한 유전자 발현 수준을 측정함으로서 이들 이상을 검출할 수 있음으로서 이러한 이상을 치료하는 방법이 제공된다. 예를 들어 당분야에 알려진 방법에 의해 또는 아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a)의 유전자 발현 수준을 검출함으로서 심장 내 허혈이 검출되면 유전자 발현 수준을 억제하거나 감소시키는 약제가 제공되고 세포 사멸의 발생률을 감소시킨다.

아폽토시스-특이적 eIF-5a(eIF5a)의 유전자 발현 수준을 억제하거나 감소시키는 약제는 올리고뉴클레오타이드에 대한 암티센스 올리고뉴클레오타이드의 이용을 포함하여 상기 논의되었다. 바람직한 암티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호: 3 또는 4에 나타나 있는 뉴클레오타이드와 같으나 이에 한정적인 것은 아닌 아폽토시스-특이적 eIF-5a를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열의 코딩 스트랜드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

일부 암 세포에서는 정상 조절적 메카니즘이 사라지고 증식 eIF-5A의 양에 대한 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 양이 변화된다(아폽토시스-특이적 eIF-5A의 수준이 증가되어 증식 eIF-5A보다 더 커진다). 이는 세포 내 표현형적 변화 이전에 임으로서의 세포의 진단을 잠재적으로 가능하게 한다.

더욱이 허혈성 심장 조직 내에서 증식 eIF-5A의 양에 대한 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 양이 변화되어 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 수준이 증식 eIF-5A의 양에 비해 증가된다.

또 다른 실시태양에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 증식 eIF-5A의 비율은 약물 스크리닝에 이용될 수 있다. 이러한 방법도 목적 세포 내 존재하는 증식 eIF-5A의 양을 동일한 세포 내에 존재하는 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 양을 비교하는 것을 포함한다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 증식 eIF-5A의 정상 비율이 약물 후보를 세포에 접촉시킨 후 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 증식 eIF-5A의 비율과 비교할 수 있다. 접촉 후 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 증식 eIF-5A의 비율 내 변화는 아폽토시스-조절 활성을 지닌 이를 후보들의 확인을 가능하게 한다. 아폽토시스-조절 활성을 지닌 후보들은 아폽토시스의 억제 또는 유도를 통해 아폽토시스와 관련된 질병을 치료하는데 유용할 수 있다. 더욱이 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 증식 eIF-5A의 비율 내 변화는 아폽토시스를 조절하는데 이용될 수 있고, 또한 이는 비정상적 아폽토시스와 관련하여 여기에 기술된 어떠한 조건도 치료하는데 유용하다.

이러한 방법을 이용하여 많은 잠재적 후보들 즉, 라이브러리가 아폽토시스를 조절하는 라이브러리의 멤버를 확인하는데 효과적으로 스크린될 수 있다. 후보 또는 후보들의 라이브러리는 이러한 방법을 이용하여 스크린될 수 있다. 예를 들어 시그날 전달 경로를 변화시키는 단일클론 항체, TRAIL(Apo2 리간드)와 같은 시토킨, 레티노이드/스테로이드 패밀리 핵 수용체에 대한 리간드를 포함한 아폽토시스 조절자로서의 가능성을 나타낸 생물학적 반응 변형자(modifier)가 본 발명을 이용하여 한정된 아폽토시스-조절 활성을 대해 스크린될 수 있다.

적당한 후보의 하나는 항-종양 활성을 지닌 단백질 키나제 C-알파 안티센스 올리고뉴클레오타이드, ISIS 3521(ISIS Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA)이다. 다른 특정 후부는 암 및 신경퇴행성 질병을 이끄는 다양한 세포 타입에서 아폽토시스의 개시 및 실행에 중요한 역할을 하는 것을 알려진 카스페이즈(Idun Pharmaceuticals, San Diego, CA); Bcl-2의 생성을 차단하는 암티센스 약물인 GENASENSE™(Genta, Inc., Berkeley Heights, NJ); P53을 치료하는 유전자 치료인 INGN 241(Introgen Therapeutics, Inc., Houston, TX); 항-CD20 단일클론 항체인 리툭시맙(rituximab)(IDEC Corporation, Osaka, Japan); 및 심장혈관질환 및 암에 대한 일반 아폽토시스 치료(Aegera Therapeutics Inc., Quebec, Canada)를 포함한다.

예방 또는 치료 목적으로 동물에 사용되는 본 발명의 핵산 및 폴리펩타이드는 약제적으로 수용가능한 담체로 부가적으로 구성된 조성물의 형태로 투여될 것으로 이해된다. 적당한 약제적으로 수용가능한 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 약제적으로 수용가능한 담체는 결

합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 더욱 구성될 수 있다. 당 분야에 알려진 바와 같이 주사 조성물은 포유류 내로의 투여 후 활성 성분의 빠르고, 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 포뮬레이트될 수 있다.

본 발명의 조성물은 다양한 형태가 될 수 있다. 이들은 예를 들어 정제, 환약, 분말, 액상 용액, 분산액 또는 혼탁액, 리포솜, 좌약, 주사 및 주입 용액과 같은 고형, 반-고형 및 액체 투여 형태를 포함한다. 바람직한 형태는 투여 및 치료 적용의 의도된 방식에 따라 달라진다.

이러한 조성물은 제약 분야에서 잘 알려진 방식으로 제조될 수 있다. 조성물 제조시 활성 성분은 일반적으로 담체와 혼합되거나 담체에 의해 희석되거나 또는 예를 들어 캡슐, 봉지, 종이 또는 다른 용기의 형태가 될 수 있는 담체 내에 봉합될 것이다. 담체가 희석제로서 작용할 때 이는 부형약, 첨가제 또는 활성 성분에 대한 매질로서 작용하는 고형, 반-고형 또는 액상 물질이 될 수 있다. 따라서 조성물은 정제, 마름모형 정제, 봉지, 교감, 일릭서(elixir), 혼탁액, 연무제(고형 또는 액상 매질), 예를 들어 10 중량%까지의 활성 화합물을 함유한 연고, 연질 및 경질 캡슐, 좌약, 주사 용액, 혼탁액, 멸균 포장된 분말 및 국소 패취의 형태가 될 수 있다.

일반적으로 본 발명에서 기술된 것은 하기 예증의 방법으로 제공된 실시예를 통해 더욱 용이하게 이해될 것이다. 실시예는 본 발명을 이해하도록 설명되나 본 범위를 한정하도록 의도되지는 않는다. 실시예는 통상적인 방법의 상세한 설명을 포함하지 않는다. 이러한 방법은 당 분야의 일반적인 숙련자에게 잘 알려져 있고 많은 간행물에 기술된다. 벡터 및 플라스미드의 구조, 플라스미드의 숙주 세포로의 도입 및 유전자 및 유전자 생성물의 발현 및 측정에서 사용된 바와 같은 통상적인 방법의 상세한 설명은 Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press을 포함한 많은 간행물에서 얻을 수 있다. 여기에 언급된 모든 참고문헌이 모두 포함된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 3' 말단의 뉴클레오타이드 서열 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 2는 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 5' 말단의 뉴클레오타이드 서열 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 3은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A 전체 길이 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다.

도 4는 래트 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 3' 말단의 뉴클레오타이드 서열 및 추론된 아미노산 서열을 나타낸다.

도 5는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드과 인간 eIF-5A의 뉴클레오타이드 서열의 정렬이다(접근번호 BC000751 또는 NM_001970, 서열번호: 3).

도 6은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드과 인간 eIF-5A의 뉴클레오타이드 서열의 정렬이다(접근번호 NM_020390, 서열번호: 4).

도 7은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 전체-길이 뉴클레오타이드과 마우스 eIF-5A의 뉴클레오타이드의 정렬이다(접근번호 BC003889). 마우스 뉴클레오타이드 서열(접근번호 BC003889)은 서열번호: 5이다.

도 8은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열과 인간 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열의 정렬이다(접근번호 BC000751 또는 NM_001970).

도 9는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열과 인간 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열의 정렬이다(접근번호 NM_020390).

도 10은 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 추론된 전체-길이 아미노산 서열과 마우스 eIF-5A의 추론된 아미노산 서열의 정렬이다(접근번호 BC003889).

도 11은 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 일부-길이 뉴클레오타이드 서열과 인간 DHS의 뉴클레오타이드 서열의 정렬이다(접근번호 BC000333, 서열번호: 8).

도 12는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 제한 지도이다.

도 13은 일부-길이 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 제한 지도이다.

도 14는 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA의 ^{32}P -dCTP-표지된 3'-말단으로 프로브된 총 RNA의 노던 블럿(도 14a) 및 에티듐 브로마이드 염색된 겔(도 14b)이다.

도 15는 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 ^{32}P -dCTP-표지된 3'-말단으로 프로브된 총 RNA의 노던 블럿(도 15a) 및 에티듐 브로마이드 염색된 겔(도 15b)이다.

도 16은 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스 정도가 PGF-2 α 로 주입된 후 조사된 DNA 래더링(laddering) 실험을 나타낸다.

도 17은 PGF-2 α 로의 래트 처리 후 DNA 래더링을 나타내는 아폽토시스 래트 황체로부터 분리된 게놈 DNA의 아가로스 젤이다.

도 18은 과잉배란된 래트 황체의 분산된 세포 내 아폽토시스 정도가 프로스타글라딘 F-2 α (PGF-2 α)에 노출되기 전에 스퍼미딘으로 처리된 래트 내에서 조사된 DNA 래더링 실험을 나타낸다.

도 19는 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스 정도가 스퍼미딘 및/또는 PGF-2 α 로 처리된 래트 내에서 조사된 DNA 래더링 실험을 나타낸다.

도 20은 32 P-dCTP-표지된 일부-길이 래트 황체 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA로 프로브된 래트 게놈 DNA의 서던 블럿이다.

도 21은 pHM6, 포유류 에피토프 태그 발현 벡터(Roche Molecular Biochemicals)를 나타낸다.

도 22는 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 32 P-dCTP-표지된 3'-비번역된 구역으로 프로브된 혈청의 철회에 의한 아폽토시스 유도 후 COS-7 세포로부터 분리된 총 RNA의 노던 블럿(도 22a) 및 에티듐 브로마이드 염색된 젤(도 22b)이다.

도 23은 COS-7 세포의 순간적 트랜스펙션의 절차를 나타내는 흐름도이다.

도 24는 pHM6로의 트랜스펙션 후 COS-7 세포 내 외부 단백질의 순간적 발현의 웨스턴 블럿이다.

도 25는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 카스페이즈 활성에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 26은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 DNA 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 27은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 아폽토시스 검출을 나타낸다.

도 28은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 29는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 포스파티딜세린 노출에 의해 반영된 아폽토시스 검출을 나타낸다.

도 30은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 포스파티딜세린 노출에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 31은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 핵 무사분열에 의해 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 32는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 증가된 아폽토시스를 나타낸다.

도 33은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션되었을 때 Bcl-2의 하향-조절을 나타낸다. 도 33a는 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿이고; 도 33b는 상응하는 웨스턴 블럿이다.

도 34는 프로브로서 Bcl-2를 이용하여 안티센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿 및 상응하는 웨스턴 블럿이다.

도 35는 프로브로서 c-Myc를 이용하여 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿 및 상응하는 웨스턴 블럿이다.

도 36은 프로브로서 p53이 사용될 때 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 함유한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙션된 COS-7의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿 및 상응하는 웨스턴 블럿이다.

도 37은 항-[HA]-페옥시다제 프로브를 이용한 COS-7 세포 내 pHM6-전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿 및 상응하는 웨스턴 블럿 및 p53 프로브가 사용될 때 COS-7 세포 내 pHM6-전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현의 쿠마시-블루-염색된 단백질 블럿 및 상응하는 웨스턴 블럿이다.

도 38은 RKO 세포로부터 분리된 인간 eIF5A2의 인간 eIF5A2(유전자은행 접근번호 XM_113401)와의 정렬이다.

도 39는 순간적 트랜스펙션 후 RKO 및 RKO-E6 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타내는 그래프이다. RKO 및 RKO-E6 세포는 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1으로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 악티노마이신 D로 처리되고 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 RKO 세포는 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 세포에 비해 아폽토시스의 240% 증가를 나타내었다. 악티노마이신 D로 처리되고 pHM6-eIF5A1로 트랜스펙션된 RKO-E6 세포는 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 세포에 비해 아폽토시스의 105% 증가를 나타내었다.

도 40은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타낸 그래프이다. RKO 및 RKO-E6 세포는 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. pHM6-eIF5A1로 트랜스펙션된 세포는 pHM6-LacZ로 트랜스펙션된 대조군 세포에 비해 아폽토시스의 25% 증가를 나타내었다. 이러한 증가는 pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포에서는 분명하지 않았다.

도 41은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타낸 그래프이다. RKO 세포는 트랜스펙션되지 않거나 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 효율에 대한 보정 후 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포의 60%가 아폽토시스되었다.

도 42는 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 아폽토시스의 플로우 시토메트리(flow cytometry) 분석 결과를 제공한다. RKO 세포는 트랜스펙션되지 않거나 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙션되었다. 표는 각 케이트의 최대 점 하의 구역을 기초로 계산된 아폽토시스를 겪는 세포의 백분율을 나타낸다. 트랜스펙션되지 않은 세포 내 백그라운드 아폽토시스 및 트랜스펙션 효율의 보정 후 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙션된 세포의 80%가 아폽토시스를 나타내었다. pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 트랜스펙션된 세포는 단지 백그라운드 수준의 아폽토시스를 나타내었다.

도 43은 0, 3, 37, 24 및 48시간 동안 0.25 μ g/ml의 악티노마이신 D로 처리된 RKO 세포로부터 추출된 단백질의 웨스턴 블러트를 제공한다. 상위 패널은 1차 항체로서 항-p53을 이용한 웨스턴 블러트를 나타낸다. 중앙 패널은 1차 항체로서 항-eIF5A1을 이용한 웨스턴 블러트를 나타낸다. 하위 패널은 동일한 로딩을 나타내는 화학발광 검출 후 쿠마시 블루로 염색된 항-eIF5A1 블러트에 사용된 멤브레인을 나타낸다. p53 및 eIF5A1은 모두 악티노마이신 D 처리에 의해 상향조절된다.

도 44는 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a)와 증식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두가 심장 조직 내에서 발현됨을 나타내는 바 그래프이다. 심장 조직은 관상동맥 우회로 이식술(CABG)을 받은 환자로부터 취해졌다. eIF5a(밝은 회색 바)의 유전자 발현 수준은 eIF5b(어두운 회색 바)와 비교되었다. X-축은 환자 식별자 수이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 45는 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a)와 증식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두가 심장 조직 내에서 발현됨을 나타내는 바 그래프이다. 심장 조직은 판막 대치술을 받은 환자로부터 취해졌다. eIF5a(밝은 회색 바)의 유전자 발현 수준은 eIF5b(어두운 회색 바)와 비교되었다. X-축은 환자 식별자 수이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 46은 허혈-전 심장 조직 및 허혈-후 심장 조직 내에서의 증식 eIF-5A 대비 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a)의 실시간 PCR에 의해 측정된 유전자 발현 수준을 나타낸 바 그래프이다. Y-축은 pg/18s의 ng이다(리보솜 RNA 18S의 나노그램 중의 메신저 RNA의 피코그램).

도 47은 심장 조직 상에서 수행된 실험을 개략적으로 나타낸다. 심장 조직은 정상 산소 수준에 노출되었고 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 측정되었다. 이후, 심장 조직에 전달된 산소량이 저하되었고, 따라서 저산소증 및 허혈을 유도하였고, 결국 심장 조직 내 심장마비를 유도하였다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF5a) 및 증식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 측정되었고, 허혈에 의해 손상되기 전 심장 조직의 발현 수준과 비교되었다.

도 48은 허혈이 유도되기 전후의 심장 조직의 EKGs를 나타낸다.

도 49는 도 47에 나타난 실험으로 셋업된 랩 벤치를 나타낸다.

실시예

(실시예 1)

본 실시예는 아폽토시스-특이적 발현을 나타내는 래트 eIF-5A 핵산을 인코드하는 전체-길이 cDNA의 분리 및 특성화를 설명한다.

래트 황체 내 과잉배란 및 아폽토시스 유도

미성숙(21-30일령) 암컷 래트가 50 IU의 PMSG(Pregnant Mare Serum Gonadotropin) 및 60~65시간 후 50 IU의 HCG(Human Chorionic Gonadotropin)의 피하 주사에 의해 과잉배란되었다. HCH 처리 7일 후 황체 아폽토시스가 500 mg의 PGF-2 α 로의 피하 주사에 의해 유도되었다. 래트는 PGF-2 α 처리 후 다양한 시간(즉, 1, 8 및 24시간)에서 희생되었고, 황체가 제거되고 액체 질소 내에 놓였다. 대조군 황체 조직이 PGF-2 α 처리 직전에 래트를 희생함으로서 수득되었다.

래트 난소 황체 세포의 분산

과잉배란 6~9일 후 래트는 500 mg의 PGF-2a의 멀티사이트 피하 주사에 의해 처리되었다. 15~30분 후 과잉배란된 래트로부터 난소가 제거되었고 얼음 위 EBSS(Gibco) 내에 놓였고 블렛시키고 무게를 재었다. 결합 조직은 정돈되었고 난소는 면도날로 미세하게 분해되었고 EBSS 2X로 2회 세척되었다. 콜라게나제 용액은 5 ml의 EBSS 내에 6.5 mg의 콜라게나제(Sigma, Catalogue #C 5138)를 블렉스함으로서 준비되었다. 8개의 난소로부터 분해된 조직은 50 ml의 Erlenmeyer 플라스크 내 EBSS 내 5 ml의 콜라게나제에 첨가되었고 Diamed 피펫으로 수차례 철회시킴으로서 천천히 휘저었다. 분해된 조직을 지닌 플라스크는 95% 공기, 5% CO₂의 조건 하에서 완만한 진탕(GFL 인큐베이터 상의 Position 45)으로 20분간 37°C에서 워터 배쓰 내에 놓였다.

본 인큐베이션 후 플라스크는 얼음위에 놓였고 세포 혼탁액은 Swiss Nitex Nylon Monofilament(75 m)에 피트된 Nitex 필터 위에 플라스틱 이동 피펫으로 이동되었다. 여과액은 15 ml의 Falcon 시험관으로 수집되었다. 콜라게나제 용액(6.5 mg 콜라게나제/5 ml EBSS)의 두 번째 알리퀴트(2.5 ml)가 50 ml Erlenmeyer 플라스크 내 남아있는 분해된 조직으로 첨가되어 피펫을 이용하여 섞이고 10분간 인큐베이트되고 상기와 같이 여과되었다. 2개의 여고액이 혼합되었고 상온에서 5분간 임상 원심분리기(~200g)에서 원심분리되었다. ~2 ml를 제외한 모든 상청액이 피펫으로 제거되었고 버려졌고 침전된 세포가 잔여 세포는 잔여 2 ml의 상청액 내에 재현탁되었다.

세포는 5 ml의 MEM을 첨가함으로서 2회 세척되었고 상기와 같이 원심분리되었고 재현탁되었다. 세척된 세포는 50 ml Erlenmeyer 플라스크 내 10 mM 글루타민을 함유한 30 ml의 MEM 내에 재현탁되었고 95% 공기, 5% CO₂의 조건하에서 37°C로 진탕없이 1시간 동안 인큐베이트되었다. 이후 세포는 상기와 같은 원심분리에 의해 침전되었고 10 mM 글루타민을 함유한 MEM 내에 재현탁되었다.

분산된 세포의 농도는 혜모시토미터(hemocytometer)를 이용하여 측정되었고, 생존력은 트리판 블루 염료를 이용하여 평가되었다. 2~5 × 10⁵ 세포의 알리퀴트는 12 × 75 mm 시험관 내에 놓였고 95% 공기, 5% CO₂의 조건하에서 37°C로 진탕없이 2~5시간 동안 인큐베이트되었다. 이 기간 동안 아폽토시스의 진행은 DNA 래더링의 정도를 평가함으로서 모니터되었다.

DNA 래더링에 의한 래트 황체 내 아폽토시스의 시각화

아폽토시스의 정도는 DNA 래더링에 의해 측정되었다. 계놈 DNA는 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen)을 이용하여 분산된 황체 세포 및 결제된 황체 조직으로부터 분리되었다. 황체 조직은 PGF-2a로의 처리에 의한 아폽토시스의 유도 전, 아폽토시스의 유도 처리 1 및 24시간 후 결제되었다. 분리된 DNA는 30분간 상온에서 500 ng의 DNA를 0.2 μCi[α-³²P]dCTP, 1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3 유니트의 Klenow 효소 및 각각 0.2 pM의 dATP, dGTP 및 dTTP와 함께 인큐베이트함으로서 말단-표지되었다. 통합되지 않은 뉴클레오타이드는 Sambrook et al.에 따라 표본을 1 ml의 Sepadex G-50 컬럼을 통해 통과시킴으로서 제거되었다. 이후 표본은 Tris-아세테이트-EDTA(1.8%) 젤 전기영동에 의해 해상되었다. 젤은 상온에서 진공상태로 30분간 건조되었고 24시간 동안 -80°C에서 x-선 필름에 노출되었다.

하나의 실시태양에서 과잉배란된 래트 황체 내 아폽토시스의 정도는 PGF-2a로의 주사 0, 1 또는 24시간 후에 조사되었다. 0시간의 대조군에서 난소는 PGF-2a 주사없이 제거되었다. 아폽토시스에 관련된 뉴클레아제 활성을 반영하는 낫은 분자량의 DNA 단편의 래더링은 PGF-2a로의 처리 전 결제된 대조군 황체 조직 내에서는 뚜렷하지 않으나 아폽토시스 유도 1시간 후에서는 식별할 수 있고 도 16에 나타난 아폽토시스 유도 24시간 후에서 판명된다. 본 도면에서 상위 패널은 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA의 ³²P-dCTP-표지된 3'-비번역 구역으로 프로부된 노던 블렛의 방사능사진이다. 하위 패널은 총 RNA의 에티듐 브로마이드 염색된 젤이다. 각 레인은 10 μg의 RNA를 포함한다. 데이터는 혈청 철회 후 eIF-5A 전사체의 하향조절이 있음을 나타낸다.

또다른 실시태양에서 상응하는 대조군 동물은 PGF-2a 대신 식염수로 처리되었다. 식염수 또는 PGF-2a로의 처리 15분 후 황체는 동물로부터 제거되었다. 계놈 DNA는 동물로부터의 조직의 제거 3시간 및 6시간 후 황체로부터 분리되었다. 계놈 DNA의 DNA 래더링 및 증가된 말단 표지는 PGF-2a-처리된 동물로부터의 조직 제거 6시간 후에서 뚜렷하나 조직 제거 3시간 후에는 그렇지 않다. 도 17 참조, 아폽토시스를 반영하는 DNA 래더링도 황체가 PGF-2a로의 처리 15분 후 처리될 때 뚜렷하고 EBSS(Gibco) 내 시험관 내 조건 하에서 6시간 동안 유지된다. 아폽토시스와 관련된 뉴클레아제 활성도 계놈 DNA의 더욱 광범위한 말단 표지로부터 뚜렷하다.

또다른 실시태양에서 과잉배란은 500 μg의 PGF-2a으로의 피하 주사에 의해 유도되었다. 대조군 래트는 등량의 식염수로 처리되었다. 15~30분 후 난소가 제거되었고 콜라게나제로 분해되었다. PGF-2a로 처리된 래트로부터의 분산된 세포는 10 mM 글루타민 + 10 mM 스퍼미딘 내에서 1시간 동안, 스퍼미딘 없이 10 mM 글루타민 내에서 5시간 더(레인 2) 또는 10 mM 글루타민 + 10 mM 스퍼미딘 내에서 1시간 동안, 10 mM 글루타민 + 1 mM 스퍼미딘 내에서 5시간 더(레인 3) 인큐베이트되었다. 식염수로 처리된 래트로부터의 대조군 세포는 콜라게나제로 분산되었고 글루타민만으로 1시간 및 5시간 더 인큐베이트되었다(레인 1). 각 표본으로부터의 DNA의 500 ng이 Klenow 효소를 이용하여 [α -³²P]-dCTP로 표지되었고, 1.8%의 아가로스 젤 상에서 분리되었고 24시간 동안 필름에 노출되었다. 결과는 도 18에 나타나 있다.

또다른 실시태양에서 과잉배란된 래트는 1 mg 스퍼미딘/100 g 체중으로 피하 주사되었고 500 μg의 PGF-2a으로의 피하 주사 24, 12 및 2시간 전에 0.333 mg/100 g 체중의 3 동일 투여량으로 전달되었다. 대조군 래트는 3 세트로 분리되었다 : 주사 없음; PGF-2a 없이 스퍼미딘의 3회 주사; 및 PGF-2a 처리 전 동일한 부피의 식염수 3회 주사. 난소는 프로스타글란딘 처리 1시간 35분 또는 3시간 45분 후 래트로부터 제거되었고 DNA 분리에 사용되었다. 각 표본으로부터의 500 ng의 DNA는 Klenow 효소를 이용하여 [α -³²P]-dCTP로 표지되었고, 1.8%의 아가로스 젤 상에서 분리되었고 24시간 동안 필름에 노출되었다 : 레인 1, 주사 없음(동물은 레인 3-5와 동일한 시간에 희생되었음); 레인 2, 스퍼미딘 3회 주사(동물은 레인 3-5와 동일한 시간에 희생되었음); 레인 3, 식염수 3회 주사 후 PGF-2a 주사(동물은 PGF-2a 처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 4, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2a 주사(동물은 PGF-2a 처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 5, 스퍼미-

던 3회 주사 후 PGF-2 α 주사(동물은 PGF-2 α 처리 1시간 35분 후 희생되었음); 레인 6, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2 α 주사(동물은 PGF-2 α 처리 3시간 45분 후 희생되었음); 레인 7, 스퍼미딘 3회 주사 후 PGF-2 α 주사(동물은 PGF-2 α 처리 3시간 45분 후 희생되었음). 결과는 도 19에 나타나 있다.

RNA 분리

총 RNA는 아폽토시스의 PGF-2 α 유도 후 다양한 시간에 래트로부터의 황체 조직으로부터 분리되었다. 간단하게는, 조직(5 g)은 액체 질소 내에서 연마되었다. 연마된 분말은 30 ml의 구아니디늄 완충액(4 M 구아니디늄 이소티오시아네이트, 2.5 mM NaOAc pH 8.5, 0.8% β -멀캅토에탄올)과 혼합되었다. 혼합물은 4겹의 Miracloth를 통해 여과되었고 30분간 4°C에서 10,000g로 원심분리되었다. 상청액은 20시간 동안 11,200g로 염화세슘 밀도 변화(gradient) 원심분리되었다. 펠렛된 RNA는 75% 에탄올로 세척되었고 600 ml의 DEPC-처리된 물에 재현탁되었고 RNA는 -70°C에서 1.5 ml의 95% 에탄올 및 60 ml의 3M NaOAc로 침전되었다.

게놈 DNA 분리 및 래더링

게놈 DNA는 제조사의 지시에 따라 QIAamp DNA Blood Kit(Qiagen)를 이용하여 추출된 황체 조직 또는 분산된 황체 조직으로부터 분리되었다. DNA는 30분간 상온에서 500 ng의 DNA를 0.2 μ Ci [α -³²P]dCTP, 1 mM Tris, 0.5 mM EDTA, 3 유니트의 Klenow 효소 및 각각 0.2 pM의 dATP, dGTP 및 dTTP와 함께 인큐베이트함으로서 말단-표지되었다. 통합되지 않은 뉴클레오파이드는 Maniatis et al.에 따라 표본을 1 ml의 Sepadex G-50 컬럼을 통해 통과시킴으로서 제거되었다. 이후 표본은 Tris-아세테이트-EDTA(2%) 젤 전기영동에 의해 해상되었다. 젤은 상온에서 진공상태로 30분간 건조되었고 24시간 동안 -80°C에서 x-선 필름에 노출되었다.

플라스미드 DNA 분리, DNA 시퀀싱

Sambrook et al., 상동에서 기술된 알칼리성 용해 방법이 플라스미드 DNA를 분리하는데 사용되었다. 전체-길이 양성 cDNA 클론은 다이디옥시 시퀀싱 방법을 이용하여 시퀀스되었다. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467. 오픈 리딩 프레임은 BLAST 검색(유전자은행, Bethesda, MD)을 이용하여 실행되었고 서열 정렬은 BCM Search Launcher를 이용하여 달성되었다 : Multiple Sequence Alignment Pattern-Induced Multiple Alignment Method(F. Corpet, Nuc. Acids Res., 16:10881-10890, (1987) 참조). 서열 및 서열 정렬이 도 5~11에 나타난다.

래트 황체 RNA의 노던 블럿 하이브리디제이션

아폽토시스의 다양한 단계에 래트 황체로부터 분리된 20 mg의 총 RNA가 1%의 변성된 포름알데히드 아가로스 젤 상에서 분리되었고 나일론 멤브레인 상에 고정되었다. 무작위 프라이머 키트(Boehringer)를 이용하여 ³²P-dCTP로 표지된 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A cDNA(서열번호: 1)가 멤브레인 7×10^7 을 프로브하는데 사용되었다. 대안으로, 무작위 프라이머 키트(Boehringer)를 이용하여 ³²P-dCTP로 표지된 전체-길이 래트 아폽토시스-특이적 DHS cDNA(서열번호: 6)가 멤브레인(7×10^7 cpm)을 프로브하는데 사용되었다. 멤브레인은 상온에서 1x SSC, 0.1% SDS로 1회 세척되었고, 65°C에서 0.2x SSC, 0.1% SDS로 3회 세척되었다. 멤브레인은 건조되었고 -70°C에서 밤새 x-선에 노출되었다.

나타난 바와 같이 eIF-5A 및 DHS는 모두 아폽토시스하는 황체 조직에서 상향조절되었다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현은 PGF-2 α 로의 처리에 의한 아폽토시스 유도 후 유의적으로 증가된다 -0시간에는 낮으나 처리 1시간 내에 실질적으로 증가되고, 처리 8시간 내에 훨씬 더 증가되고, 처리 24시간 내에 약간 더 증가된다(도 14). DHS의 발현은 0시간에 낮고, 처리 1시간 내에 실질적으로 증가되고 처리 8시간 내에 훨씬 더 증가되고 처리 24시간 내에 약간 더 증가된다(도 15).

효모, 진균, 인간 eIF-5A 서열에 기초한 프라이머를 이용한 아폽토시스하는 래트 황체 RT-PCR 생성물의 생성

유전자의 3'-말단에 상응하는 일부-길이 아폽토시스-특이적 eIF-5A 서열(서열번호: 11)은 효모, 진균 및 인간 eIF-5A 서열로부터 고안된 올리고뉴클레오파이드 프라이머 쌍을 이용한 RT-PCR에 의해 아폽토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 래트 eIF-5A 유전자의 3'-말단을 분리하는데 사용된 업스트림 프라이머는 20 뉴클레오파이드 퇴화 프라이머이다 : S는 C 및 G로부터 선택되고; R은 A 및 G로부터 선택되고; H는 A, T 및 C로부터 선택되고; Y는 C 및 T로부터 선택되고; N은 어떤 핵산도 되는 5' TCSAARACHGGNAAGCAYGG 3'(서열번호: 9). 래트 eIF-5A 유전자의 3'말단을 분리하는데 사용되는 다운스트림 프라이머는 42 뉴클레오파이드를 포함한다 : 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTT 3'(서열번호: 10). 역전사효소 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 젤 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 900 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 블런트 말단 라이게이션을 이용하여 pBluescriptTM(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 11). 3' 말단의 cDNA 서열은 서열번호: 11이고 3'말단의 아미노산 서열은 서열번호: 12이다. 도 1-2 참조.

유전자의 5'말단에 상응하고 3'말단과 중복되는 일부-길이 아폽토시스-특이적 eIF-5A 서열(서열번호: 15)은 RT-PCR에 의해 아폽토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 5' 프라이머는 인간 eIF-5A 서열로 지정된 서열, 5' CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAACG 3'(서열번호: 13)을 지닌 24-머(mer)이다. 3' 프라이머는 3' 말단 RT-PCR 단편에 따라 고안된, 서열, 5' ATATCTCGAGCCTTGATTGC AACAGCTGCC 3'(서열번호: 14)를 지닌 30-머이다. 역전사효

소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 겔 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 500 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 각각 업스트림 및 다운스트림 프라이머 내에 존재하는 *Xba*I 및 *Xho*I 클로닝 사이트를 이용하여 pBluescriptTM(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 15). 5'말단의 cDNA 서열은 서열번호: 15이고 5'말단의 아미노산 서열은 서열번호: 16이다. 도 2 참조.

래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 3' 및 5' 말단의 서열(각각 서열번호: 11 및 서열번호: 15)은 전체-길이 cDNA 서열(서열번호: 1)과 중복되었고 전체-길이 cDNA 서열(서열번호: 1)을 제공하였다. 본 전체-길이 서열은 유전자은행 데이터베이스 내 서열과 정렬되었고 비교되었다. 도 1-3 참조. cDNA 클론은 16.8 kDa의 계산된 분자량을 지닌 154 아미노산 폴리펩타이드(서열번호: 2)를 인코드한다. RT-PCR에 의해 수득된 래트 아폽토시스-특이적 황체 eIF-5A 유전자의 전체-길이 cDNA에 대한 뉴클레오타이드 서열, 서열번호: 1은 도 3에 나타나 있고, 상응하는 추론된 아미노산 서열은 서열번호: 9이다. eIF-5A의 유도된 전체-길이 아미노산 서열은 인간 및 마우스 eIF-5A 서열과 정렬되었다. 도 8-10 참조.

인간 DHS 서열에 기초한 프라이머를 이용한 아폽토시스하는 래트 황체 RT-PCR 생성물의 생성

유전자의 3'말단에 상응하는 일부-길이 아폽토시스-특이적 DHS 서열(서열번호: 6)은 인간 DHS 서열로 지정된 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 이용한 RT-PCR에 의해 아폽토시스하는 래트 황체 RNA 주형으로부터 생성되었다. 5' 프라이머는 서열, 5' GTCTGTGATTATTGGGCC 3'(서열번호: 17)을 지닌 20-머이고; 3' 프라이머는 서열, 5' GCGAAGCTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTT 3'(서열번호: 18)을 지닌 42-머이다. 역전사효소-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)이 수행되었다. 간단하게, 5 mg의 다운스트림 프라이머를 이용하여 cDNA의 첫 번째 스트랜드가 합성되었다. 첫 번째 스트랜드는 이후 업스트림 및 다운스트림 프라이머 모두를 이용하여 RT-PCR 내에서 주형으로 사용되었다.

아가로스 겔 상에서의 RT-PCR 생성물의 분리는 606 bp 단편의 존재를 나타내었고 이는 블런트 말단 라이제이션을 이용하여 pBluescriptTM(Stratagene Cloning Systems, LaJolla, CA) 내로 서브클론되었고 시퀀스되었다(서열번호: 6). RT-PCR에 의해 수득된 래트 아폽토시스-특이적 황체 DHS 유전자의 일부 길이 cDNA에 대한 뉴클레오타이드 서열(서열번호: 6)은 도 4에 나타나 있고, 상응하는 추론된 아미노산 서열은 서열번호: 7이다.

계놈 DNA의 분리 및 서던 분석

서던 블럿을 위해 계놈 DNA가 절제된 래트 난소로부터 분리되었다. 약 100 mg의 난소 조직은 작은 조각으로 분리되었고 15 ml 투브에 놓였다. 조직은 조직 혼탁액을 천천히 진탕함으로서 1 ml의 PBS로 2회 세척하였고 이후 피펫을 이용하여 PBS를 제거하였다. 조직은 2.06 ml의 DNA-완충액(0.2 M Tris-HCl pH 8.0 및 0.1 mM EDTA) 내에 재현탁되었고 240 μ l의 10% SDS 및 100 μ l의 단백질 가수분해효소 K(Boehringer Manheim; 10 mg/ml)가 첨가되었다. 조직은 45°C에서 밤새 진탕 워터 배쓰 내에 놓였다. 다음날 100 μ l의 단백질 가수분해효소 K(10 mg/ml)이 첨가되었고 조직 혼탁액은 추가 4시간 동안 45°C에서 워터 배쓰 내에 인큐베이트되었다. 인큐베이션 후 조직 혼탁액은 페놀:클로로포름:이소-아밀알코올(25:24:1)의 동일한 부피로 1회, 클로로포름:이소-아밀알코올(24:1)의 동일한 부피로 1회 추출되었다. 추출 후 3 M 아세트산나트륨의 1/10th 부피(pH 5.2) 및 에탄올 2 부피가 첨가되었다. 밀봉되고 Bunsen 버너를 이용하여 후크내로 형성된 유리 피펫이 용액으로부터 DNA 실을 끌어당기고 DNA를 청결한 마이크로원심분리 투브 내로 옮기는데 사용되었다. DNA는 70% 에탄올로 1회 세척되었고 10분간 공기-건조되었다. DNA 펠렛은 500 μ l의 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 용해되었고, 10 μ l의 RNase A(10 mg/ml)가 첨가되었고, DNA는 37°C에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. DNA는 페놀:클로로포름:이소-아밀알코올(25:24:1)로 1회 추출되었고 DNA는 3 M 아세트산나트륨의 1/10th 부피(pH 5.2) 및 에탄올 2 부피를 첨가함으로서 침전되었다. DNA는 4°C에서 13,000 x g로 10분간 원심분리에 의해 펠렛되었다. DNA 펠렛은 70% 에탄올로 1회 세척되었고 4°C에서 밤새 DNA를 회전시킴으로서 200 μ l의 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)내에 용해되었다.

서던 블럿 분석을 위해 래트 난소로부터 분리된 계놈 DNA가 내생적 유전자 내에서 절단되지 않거나 한번만 절단된 다양한 제한효소로 분해되었다. 이를 달성하기 위해 10 μ g의 계놈 DNA, 20 μ l의 10X 반응 완충액 및 100 U 제한효소가 200 μ l의 총 반응 부피로 5~6시간 동안 반응되었다. 분해된 DNA는 0.7% 아가로스 겔 상에 로드되었고, 40 볼트에서 6시간 동안 또는 15 볼트에서 밤새 전기영동되었다. 전기영동 후 겔은 0.2 N HCl 내에서 10분간 정화된 후 변성 용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) 내에서 2회 15-분 세척되었고 중성화 완충액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.4)으로 2회 15분 세척되었다. DNA는 나일론 멤브레인으로 옮겨졌고 멤브레인은 하이브리디제이션 용액(40% 포름아미드, 6 X SSC, 5 X Denhart's 용액(1 X Denhart's 용액은 0.02% Ficoll, 0.02% PVP 및 0.02% BSA임), 0.5% SDS 및 1.5 mg의 변성된 염색체 DNA) 내에서 미리 하이브리다이즈되었다. 래트 eIF-5A cDNA의 3' UTR의 700 bp PCR 단편(3' UTR의 650 bp 및 코딩의 50 bp)은 무작위 프라이밍에 의해 [α -³²P]-dCTP로 표지되었고 1 X 106 cpm/ml에서 멤브레인에 첨가되었다.

유사하게, 래트 DHS cDNA의 606 bp PCR 단편(450 bp 코딩 및 156 bp 3' UTR)은 [α -³²P]-dCTP로 무작위 프라이밍 표지되었고 두 번째 동일한 멤브레인으로 1 X 106 cpm/ml에서 첨가되었다. 블럿은 42°C에서 밤새 하이브리다이즈되었고 이후 42°C에서 2 X SSC 및 0.1% SDS로 2회, 42°C에서 1 X SSC 및 0.1% SDS로 2회 세척되었다. 블럿은 3~10일간 필름에 노출되었다.

래트 황체 계놈 DNA는 도 20에 나타난 바와 같이 제한효소로 절단되었고 ³²P-dCTP-표지된 전체-길이 eIF-5A cDNA로 프로브되었다. 높은 스트립전시 조건 하에서의 하이브리디제이션은 각각의 제한효소 분해된 DNA 표본에 대한 일부 제한 단편으로의 전체-길이 cDNA 프로브의 하이브리디제이션을 나타내었고 이는 eIF-5A 일부 이소폼의 존재를 나타내었다. 특히 래트 계놈 DNA가 아폽토시스-특이적 eIF-5A이 오픈 리딩 프레임 내 제한 사이트를 지닌 EcoRV로 분해되었을 때 eIF-5A의 아폽토시스-특이적 이소폼의 제한 단편이 서던 블럿 내에서 검출가능하였다. 2개의 단편은 도 20의 이중화

실험으로 나타나 있다. eIF-5A의 아프토시스-특이적 이소폼에 상응하는 제한 단편은 오픈 리딩 프레임 내에서 절단 사이트가 없는 제한 효소인 EcoR1 및 BamH1로 표지된 레인에서 단일 화살표로 나타나 있다. 이들 결과는 아프토시스-특이적 eIF-5A가 래트에서 단일 카피(copy)임을 나타낸다. 도 5~13에 나타난 바와 같이 eIF-5A 유전자는 종간에 매우 보존되어 있고 어떠한 종 내에서도 이소폼 간의 유의적인 양의 보존이 있음이 예측된다.

도 21은 ^{32}P -dCTP-표지된 일부-길이 래트 황체 아폽토시스-특이적 DHS cDNA로 프로브된 개트 게놈 DNA의 서던 블렛을 나타낸다. 게놈 DNA는 프로브로 사용된 일부-길이 cDNA를 절단하지 않는 제한 효소인 EcoRV로 절단되었다. 2개의 제한 단편은 유전자의 2개 카피가 있다거나 또는 유전자가 EcoRV 사이트를 지닌 인트론을 포함함을 나타내는 것이 뚜렷하다.

(실시예 2)

본 실시예에는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS로의 아폽토시스 조절을 설명한다.

COS-7 세포의 배양 및 RNA의 분리

야생형 T 항원을 코드하는 SV40의 돌연변이로 형질전환된 아프리카 그린 원숭이 신장 세포(세포주인 COS-7)이 모든 형질전환-기초 실험에 사용되었다. COS-7 세포는 리터 당 0.584 g의 L-글루타민, 4.5 g의 글루코스, 0.37%의 중탄산나트륨을 지닌 Dulbecco's Modified Eagle's 배지(DMEM) 내에서 배양되었다. 배양 배지는 10%의胎아 소 혈청(FBS) 및 100 유니트의 페니실린/스트렙토마이신으로 보충되었다. 세포는 37°C의 5% CO₂ 및 95% 공기의 습한 환경에서 생장되었다. 세포는 0.25%의 트립신 및 1 mM EDTA의 용액으로 점착성 세포를 탈착시킴으로서 3~4일마다 이차배양되었다. 탈착된 세포는 신선한 배지의 새로운 배양 접시 내에서 1:10의 분할 비율로 분산되었다.

RNA의 분리에 사용되는 COS-7 세포는 150-mm 조직 배양 처리된 접시(Corning) 내에서 생장되었다. 세포는 트립신-EDTA의 용액으로 이들을 털착시킴으로서 배양되었다. 털착된 세포는 원심분리 투브에 수집되었고 3000 rmp으로 5분간 원심분리함으로서 펠렛되었다. 상청액은 제거되었고 세포 펠렛은 액체 질소 내에서 순간-동결되었다. RNA는 제조사의 지시에 따라 GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit(Sigma)를 이용하여 동결된 세포로부터 분리되었다.

재조합 플라스미드의 건조 및 COS-7 세포의 트랜스펙션

센스 방향으로 래트 아폽토시스 eIF-5A의 전체-길이 코딩 서열 및 안티센스 방향으로 래트 아폽토시스 eIF-5A의 3' 번역된 구역(UTR)을 운반하는 재조합 플라스미드가 도 21에 나타난 포유류 에피토프 태그 발현 벡터, pHM6(Rowhe Molecular Biochemicals)을 이용하여 건조되었다. 벡터는 하기를 포함한다: CMV 프로모터 - 인간 시토메갈로바이러스 매개-초기 프로모터/인핸서; HA - 인플루엔자 혼마그글루타닌으로부터의 노나펩타이드 에피토프 태그; BGH pA - 소 생장 호르몬 폴리아데닐레이션 시그널; f1 ori - f1 오리진; SV40 ori - SV40 초기 프로모터 및 오리진; 네오마이신 - 네오마이신 저항성(G418) 유전자; SV40 pA - SV40 폴리아데닐레이션 시그널; Co1 E1 - Co1E1 오리진; 암피실린 - 암피실린 저항성 유전자. 래트 아폽토시스 eIF-5A의 전체-길이 코딩 서열 및 래트 아폽토시스 eIF-5A의 3' UTR은 pBluescript 내 본래의 틱트 eIF-5A 5A RT-PCR 단편(서열번호: 1)으로부터 PCR에 의해 증폭되었다. 전체-길이 eIF-5A는 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 하기와 같았다: 전방 5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGG 3'(Hind3)(서열번호: 22) 및 역 5' CTGAATTCCAGT TATTTGCCATGG 3'(EcoRI)(서열번호: 23). 3' UTR 래트 eIF-5A를 증폭하기 위해 사용된 프라이머는 하기와 같았다: 전방 5' AATGAATTCCGCCATGACAGAGGAGGC 3'(EcoRI)(서열번호: 24) 및 역 5' GCGAAGCTTCCATGGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'(Hind3)(서열번호: 10).

아가로스 겔 전기영동 후 분리된 전체-길이 래트 eIF-5A PRC 생성물은 430 bp 길이인 반면 3' UTR 래트 eIF-5A PCR 생성물은 697 bp 길이였다. pHM6-전체-길이 eIF-5A 및 pHM6-안티센스 3' UTR eIF-5A를 생성하기 위해 PCR 생성물 모두는 pHM6의 Hind3 및 EcoR1 사이트 내로 서브클론되었다. 전체-길이 래트 eIF-5A PCR 생성물은 멀티풀 클로닝 사이트의 업스트림에 존재하는 인플루엔자 헤마그글루티닌(HA)로부터의 노나펩타이드에 피토프 태그와 인 프레임으로 서브클론되어 항-[HA]-페옥시다제 항체를 이용한 재조합 단백질의 검출을 가능하게 하였다. 발현은 인간 시토메갈로바이러스 매개-초기 프로모터/인핸서에 의해 시작되어 포유류 세포주 내 높은 수준의 발현을 확보한다. 또한 플라스미드는 안정한 트랜스펙턴트(transfector)의 선택을 가능하게 하는 네오마이신-저항성(G418) 및 COS-7과 같은 SV40 큰 T 항원을 발현하는 세포 내에서 에피寐 복제를 가능하게 하는 SV40 초기 프로모터 및 오리진을 특징으로 한다.

트랜스펙션 실험에 사용되는 COS-7 세포는 단백질 추출에 사용되는 세포용 24 웰 세포 배양 플레이트(Corning) 또는 염색에 사용되는 세포용 4 챔버 배양 슬라이드(Falcon) 내에서 배양되었다. 세포는 10% FBS로 보충되었으나 페니실린/스트렙토마이신이 없는 DMEM 배지 내에서 50~70% 컨플루언시(confluency)가 되도록 생장되었다. 24-웰 플레이트의 하나의 웰 또는 배양 슬라이드에 충분한 트랜스펙션 배지는 42.5 μ l의 무혈청 DMEM 내에 0.32 μ g의 플라스미드 DNA를 희석시키고 상온에서 15분간 혼합물을 인큐베이트시킴으로서 준비되었다. 1.6 μ l의 트랜스펙션 시약, LipofectAMINE(Gibco, BRL)은 42.5 μ l의 무혈청 DMEM 내에 희석되었고 상온에서 5분간 인큐베이트되었다. 5분 후 LipofectAMINE 혼합물은 DNA 혼합물에 첨가되었고 상온에서 30~60분간 함께 인큐베이트되었다. 트랜스펙트되는 세포는 트랜스펙션 배지와 중복시키기 전에 무혈청 DMEM으로 1회 세척되었고 세포는 4시간 동안 그로쓰 챔버 내에 다시 놓였다.

인큐베이션 후 0.17 ml DMED + 20% FBS가 세포에 첨가되었다. 세포는 염색전 아폽토시스를 겪도록 유도되거나 웨스턴 블릿을 위해 채취되기 전에 40시간 더 배양되었다. 대조군으로서 플라스미드 DNA가 트랜스펙션 배지로부터 생략된 모의 트랜스펙션이 수행되었다.

단백질 추출 및 웨스턴 븍터팅

세포를 PBS(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 및 0.24 g/L KH₂PO₄) 내에서 2회 세척하고 150 μ l의 뜨거운 SDS 젤-로딩 완충액(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 디티오토레이톨, 2% SDS, 0.1% 브로모페놀 블루 및 10% 글리세롤)을 첨가함으로서 트랜스펙트된 세로부터 웨스턴 블러팅을 위해 단백질이 분리되었다. 세포 용해질이 마이크로원심분리관 내에 수집되었고 10분간 95°C에서 가열된 후 10분간 13,000 x g로 원심분리되었다. 상청액은 신선한 마이크로원심분리관으로 옮겨졌고 사용 전까지 -20°C에서 보관되었다.

웨스턴 블러팅을 위해 2.5 또는 5 μ g의 총 단백질이 12% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 다이플로라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 차단 용액(PBS 내 5% 스kim 우유 분말, 0.02% 아지드화나트륨)에서 1시간 동안 인큐베이트되었고 PBS-T(PBS + 0.05% Tween-20)로 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 밤새 4°C PBS-T 내에서 보관되었다. 다음날 상온으로 대워진 후 멤브레인은 1 μ g/ml의 폴리비닐 알코올 내에서 30초간 차단되었다. 멤브레인은 탈이온수로 5회 세척된 후 PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 차단되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션 전에 PBS 내 5% 우유 용액에서 30분간 미리 인큐베이트되었다.

일부 1차 항체가 사용되었다. 항-[HA]-페옥시다제 항체(Roche Molecular Biochemicals)가 재조합 단백질의 발현을 검출하기 위해 1 : 5000로 희석되어 사용되었다. 이러한 항체는 페옥시다제에 컨쥬게이트되기 때문에 어떠한 2차 항체도 필요하지 않았고, 블렛은 세척되었고 화학발광에 의해 발달되었다. 사용된 다른 1차 항체는 p53(Ab-6), Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)를 인식하는 Oncogene으로부터의 단일클론 항체이다. p53에 대한 단일클론 항체는 0.1 μ g/ml로 희석되어 사용되었고 Bcl-2 및 c-Myc에 대한 단일클론 항체는 모두 0.83 μ g/ml로 희석되어 사용되었다. 1차 항체와의 60~90분간의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T 내에서 15분간 3회 세척되었다. 이후 2차 항체가 PBS 내 1% 우유에서 희석되었고 60~90분간 멤브레인과 인큐베이트되었다. p53(Ab-6)가 1차 항체로 사용된 경우 사용된 2차 항체는 1 : 1000으로 희석된 알칼리성 포스파타제(Rockland)에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG이다. Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)가 1차 항체로 사용된 경우 페옥시다제(Sigma)에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 1 : 5000으로 희석되어 사용되었다. 2차 항체와의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T로 3회 세척되었다.

표색 방법 및 화학발광 방법의 2가지 검출 방법이 블렛을 발달시키는데 사용되었다. 표색 방법은 p53(Ab-6)이 알칼리성 포스파타제-컨쥬게이트된 2차 항체와 컨쥬게이션된 1차 항체로서 사용된 경우에만 사용되었다. 결합된 항체는 0.33 mg/ml 니트로 블루 테트라졸륨, 0.165 mg/ml 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 및 100 mM Tris-HCl(pH 9.5)의 용액 내에서 암조건으로 블렛을 인큐베이트함으로서 시각화되었다. 발색 반응은 PBS 내 2 mM의 EDTA에서 블렛을 인큐베이트함으로서 정지되었다. 화학발광 검출 방법은 항-[HA]-페옥시다제, Bcl-2(Ab-1) 및 c-Myc(Ab-2)를 포함한 다른 모든 1차 항체에 사용되었다. ECL Plus 웨스턴 블러팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)가 페옥시다제-컨쥬게이트된 결합 항체를 검출하는데 사용되었다. 간단히, 멤브레인은 가볍게 블렛드 드라이된 후 시약 A와 시약 B의 40 : 1 혼합으로 5분간 암조건으로 인큐베이트되었다. 멤브레인은 블렛드 드라이되었고 아세테이트 시트(sheet) 사이에 놓였고 10초에서 10분까지 다양한 기간 동안 x-선 필름에 노출되었다.

COS-7 세포 내 아폽토시스의 유도

혈청 결핍 및 악티노마이신 D, 스트렙토마이세스 sp.(Calbiochem)로의 처리의 2가지 방법이 트랜스펙트된 COS-7 세포 내 아폽토시스를 유도하는데 사용되었다. 두 가지 처리 모두에 있어서 배지는 후-트랜스펙션 40시간에 제거되었다. 혈청 결핍 실험에서 배지는 무혈청- 및 무항생제- DMEM으로 대치되었다. 10% FBS로 보충된 무항생제-DMEM 내에서 생장된 세포가 대조군으로 사용되었다. 아폽토시스의 악티도마이신 유도에서 배지는 10% FBS 및 1 μ g/ml의 메탄올 내에 용해된 악티노마이신 D로 보충된 무항생제-DMEM로 대치되었다. 대조군 세포는 10% FBS 및 동일한 부피의 메탄올로 보충된 무항생제-DMEM 내에서 생장되었다. 두 가지 방법 모두에 있어서, 아폽토시스 세포의 백분율이 Hoescht 또는 Annexin V-Cy3으로 염색함으로서 48시간 후 측정되었다. 아폽토시스의 유도는 도 22에 나타난 바와 같이 노던 블렛 분석에 의해 확인되었다.

Hoesht 염색

핵 무사분열 및 응축과 같은 형태학적 특징에 기초하여 아폽토시스 세포를 확인하기 위해 핵 염색제, Hoesht이 트랜스펙트된 COS-7 세포의 핵을 표지하는데 사용되었다. 순수 메탄올과 빙초산의 혼합물 3 : 1로 구성된 고정제는 사용 직전에 준비되었다. 동일한 부피의 고정제가 배양 슬라이드 상에서 생장하는 COS-7 세포에 배지에 첨가되었고 2분간 인큐베이트되었다. 배지/고정제 혼합물이 세포로부터 제거되었고 폐기되었고 1 ml의 고정제가 세포에 첨가되었다. 5분 후 고정제가 제거되었고 1 ml의 신선한 고정제가 세포에 첨가되었고 5분간 인큐베이트되었다. 고정제가 제거되었고 세포는 1 ml의 Hoesht 염색제(PBS 내 0.5 μ g/ml Hoescht 33258)를 첨가하기 전에 4분간 공기-건조되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션한 후 염색 용액이 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분간 3회 세척되었다. 세척 후 1 ml의 McIlvaine's 완충액(0.021 M 구연산, 0.058 M Na₂HPO₄·7H₂O; pH 5.6)이 세포에 첨가되었고 20분간 암조건에서 인큐베이트되었다. 완충액은 제거되었고 세포는 암조건에서 5분간 공기-건조되었고 배양 슬라이드의 웰을 분리하는 챔버가 제거되었다. 형광용 Vectashield 마운팅 배지(Vector Laboratories) 몇 방울이 슬라이드에 첨가되었고 커버슬립으로 덮였다. 염색된 세포는 UV 필터를 이용한 형광 현미경하에서 관찰되었다. 밝게 염색된 세포 또는 무사분열된 핵이 아폽토시스로서 특징되었다.

아넥신 V-Cy3 염색

아넥신 V-Cy3 아폽토시스 검출 키트(Sigma)가 아폽토시스 세포 상에 외부화된 포스파티딜세린을 형광 표지하는데 사용되었다. 키트는 하기 변형과 함께 제조사의 프로토콜에 따라 사용되었다. 간단히, 4개의 챔버 배양 슬라이드 상에서 생장하는 트랜스펙트된 COS-7 세포가 PBS로 2회 세척되었고 1 X 결합 완충액으로 3회 세척되었다. 150 μ l의 염색 용액(1 X 결합 완충액 내 1 μ g/ml AnnCy3)이 첨가되었고 세포는 10분간 암조건에서 인큐베이트되었다. 염색 용액이 제거되었고 세포는 1 X 결합 완충액으로 5회 세척되었다. 챔버 벽이 배양 슬라이드에서 제거되었고 1 X 결합 완충액 몇 방울이 세포에 놓였고 커버슬립으로 덮였다. 염색된 세포는 양성으로 염색된(아폽토시스) 세포의 적색 형광을 가지화하기 위해 녹색 필터를 이용하여 형광 현미경으로 분석되었다. 총 세포군은 가지광선하에서 세포수를 셈으로서 측정되었다.

(실시예 3)

본 실시예는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS의 아폽토시스 조절을 설명한다.

상기 실시예에 기술된 일반적인 절차 및 방법을 이용하여 도 23은 무혈청 배지 내에서 세포가 LipofectAMINE 내 플라스미드 DNA 내에서 4시간 동안 인큐베이트되었고, 혈청이 첨가되었고, 세포가 40시간 더 인큐베이트된 COS-7 세포의 순간적 트랜스펙션의 절차를 나타내는 흐름도이다. 이후 세포는 분석전 48시간 더 혈청 함유 일반 배지 내에서 인큐베이트되고(즉, 부가 처리 없음) 분석 전 아폽토시스를 유도하도록 48시간 동안 혈청 제거되거나 분석 전 아폽토시스를 유도하도록 48시간 동안 악티노마이신 D로 처리된다.

도 22는 pHM6로의 트랜스펙션 후 COS-7 내 외부 단백질의 일시적 발현을 나타내는 웨스턴 블럿이다. 단백질은 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-LacZ, pHM6-Antisense 3' rF5A(pHM6-Antisense 3' UTR 래트 아폽토시스 eIF-5A) 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체길이 래트 아폽토시스 eIF-5A)로의 트랜스펙션 후 COS-7 세포로부터 분리되었다. 각 표본으로부터의 5 μ g의 단백질이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 항-[HA]-페옥시다제로 웨스턴 블럿되었다. 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었고 30초간 x-선 필름에 노출되었다. LacZ(레인 2) 및 센스 래트 아폽토시스 eIF-5A(레인 4)의 발현은 분명히 볼 수 있다.

상기에 기술된 바와 같이 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 48시간 동안 혈청의 철회에 의해 아폽토시스를 겪도록 유도되었다. 트랜스펙트된 세포 추출물 내 카스페이즈 단백질가수분해 활성은 형광 상동성 카스페이즈 애세이 키트(Roche Diagnostics)를 이용하여 측정되었다. DNA 무사분열도 형광-표지된 디옥시뉴클레오타이드로 DNA 단편의 3'-OH 말단을 표지하는 FragEL DNA 분열 아폽토시스 검출 키트(Oncogene)를 이용하여 측정되었다.

부가적 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 혈청 함유 일반 배지(추가 처리 없음) 내에 48시간 더 생장되고, 48시간 동안 혈청의 철회에 의해 아폽토시스를 겪도록 유도되거나 48시간 동안 0.5 μ g/ml의 악티노마이신 D으로의 처리에 의해 아폽토시스를 겪도록 유도되었다. 세포는 아폽토시스를 수반하는 핵 무사분열을 나타내는 Hoescht 33258로 염색되거나 아폽토시스를 수반하는 포스파티딜세린 노출을 나타내는 아넥신 V-Cy3으로 염색되었다. 염색된 세포는 녹색 필터를 이용하여 형광 현미경으로 관찰되었고 아폽토시스를 겪는 세포의 백분율을 측정하기 위해 카운트되었다. 총 세포군은 가시광선하에서 카운트되었다.

도 25는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 카스페이즈 활성이 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 60% 증가된 카스페이즈 활성을 나타내었다.

도 26은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 DNA 무사분열이 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 273% 증가된 DNA 무사분열을 나타내었다. 도 27은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 발현하는 세포에서 무사분열된 핵의 더 큰 발생률이 있다. 도 28은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아폽토시스를 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비-혈청 결핍된 표본 및 혈청 결핍된 표본 보다 27% 및 63%로 핵 무사분열이 증가되었다.

도 29는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 포스파티딜세린 노출이 반영된 아폽토시스 검출을 나타낸다. 도 30은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 포스파티딜세린 노출이 반영된 증가된 아폽토시스 검출을 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비-혈청 결핍된 표본 보다 140% 및 198%로 포스파티딜세린 노출이 증가되었다.

도 31은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 증가된 핵 무사분열이 반영된 증가된 아폽토시스 검출을 나타낸다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현은 각각 비처리 및 처리 표본 보다 115% 및 62%로 핵 무사분열이 증가되었다. 도 32는 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트된 COS-7 세포가 더 이상의 처리가 없거나 아폽토시스를 유도하는 처리가 있는 조건 하에서 증가된 아폽토시스의 비교를 나타낸다.

(실시예 4)

본 실시예는 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 DHS의 투여 후 아폽토시스 활성 조절을 설명한다.

더욱이 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙트되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5 μ g이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 Bcl-2를 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블럿되었다. 페옥시다제에 커뮤게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광 및 x-선 필름으로의 노출에 의해 검출되었다. 결과는 도 32에 나타나 있다. pHM6-LacZ으로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 덜 검출되었고; 따라서 Bcl-2는 하향-조절된다.

추가 COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-Antisense 3' rF5A(래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 pHM6-안티센스 3' UTR)로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A)로 트랜스펙션되었다. 트랜스펙션 40시간 후 세포는 48시간 동안 혈청의 철회에 의해 아폽토시스를 겪도록 유도되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5 µg이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 Bcl-2를 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블러팅되었다. 페옥시다제에 컨쥬게이트된 토끼 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광 및 x-선 필름으로의 노출에 의해 검출되었다.

또한 부가적으로, COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙션되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5 µg이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 p53을 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블러팅되었다. 알칼리성 포스파타제에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 표색적으로 검출되었다.

마지막으로, COS-7 세포는 모의 트랜스펙션, pHM6-LacZ으로 트랜스펙션 또는 pHM6-Sense rF5A(pHM6-전체 길이 래트 eIF-5A)로 트랜스펙션되고 40시간 동안 인큐베이트되었다. 각 표본으로부터의 단백질 추출물 5 µg이 SDS-PAGE에 의해 분획화되었고 PVDF 멤브레인에 옮겨졌고 p53을 인식하는 단일클론 항체로 웨스턴 블러팅되었다. 래트 아폽토시스-특이적 eIF-5A 발현을 측정하기 위해 상응하는 단백질 블릿이 항-[HA]-페옥시다제로 프로브되었다. 알칼리성 포스파타제에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG가 2차 항체로 사용되었고 결합된 항체는 화학발광에 의해 검출되었다.

도 33은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 Bcl-2의 하향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블릿을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 덜 검출되었다.

도 34는 COS-7 세포가 안티센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 Bcl-2의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블릿을 나타낸다. 모의 트랜스펙트된 것 또는 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 것보다 pHM6-antisense 3' rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 Bcl-2가 더 많이 검출되었다.

도 35는 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 c-Myc의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블릿을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 c-Myc가 더 많이 검출되었다.

도 36은 COS-7 세포가 센스 방향으로 전체-길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A를 포함한 pHM6로 순간적으로 트랜스펙트될 때 p53의 상향조절을 나타낸다. 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고; 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블릿을 나타낸다. pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 p53이 더 많이 검출되었다.

도 37은 COS-7 세포 내 pHM6-전체 길이 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현에 대한 p53 상향조절의 의존도를 나타낸다. 항-[HA]-페옥시다제로 프로브된 웨스턴 블릿에서 상위 패널은 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고 하위 패널은 상응하는 웨스턴 블릿을 나타낸다. 두 번째 트랜스펙션보다 첫 번째 트랜스펙션에서 더 많은 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A가 검출될 수 있다. 항-p53으로 프로브된 웨스턴 블릿에서 A의 상위 패널은 상응하는 쿠마시 블루-염색된 단백질 블릿을 나타내고 하위 패널은 p53으로의 웨스턴 블릿을 나타낸다. 첫 번째 트랜스펙션에 있어서 더 많은 p53이 pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 것 또는 모의 대조군 보다 pHM6-Sense rF5A로 트랜스펙트된 세포에서 검출될 수 있다. 래트 아폽토시스-유도된 eIF-5A의 발현이 거의 없는 두 번째 트랜스펙션에 있어서, pHM6-Sense rF5A, pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 세포 또는 모의 대조군 사이의 어떠한 검출가능한 차별적 수준의 p53이 없었다.

(실시예 5)

본 실시예는 아폽토시스-특이적 eIF-5A이 활성 p53을 지닌 세포(RKO 세포) 및 활성 p53을 지니지 않은 세포(RO-E6 세포) 내에서 아폽토시스를 유도할 수 있고 이는 아폽토시스-특이적 eIF-5A이 p53 경로 이외의 경로(들)를 통해 아폽토시스를 개시할 수 있음을 나타내는 것을 설명한다. 이는 또한 업스트림에서 작용하고 암의 광범위한 다른 타입을 사멸시킬 것이라는 우리의 주장을 지지한다.

또한 본 실시예는 eIF-5A1의 활성 사이트가 대부분 RNA 결합 도메인을 포함하는 단백질의 카르복시 말단(즉, 절제된 eIF-5A1으로의 실험 참조)임을 나타낸다.

또한 본 실시예는 인간 eIF-5A2가 아폽토시스를 유도할 수 없기 때문에 대부분 중식 eIF-5A임을 설명한다. 따라서 인간 데이터 뱅크 내 2가지 eIF-5A 유전자 중 아폽토시스-특이적 eIF-5A1은 아폽토시스 유전자이고 eIF-5A2는 중식 유전자인 것으로 여겨진다.

RKO 및 RKO-E6 세포의 배양

RKO(American Type Culture Collection CRL-2577), 야생형 p53을 발현하는 인간 콜론 암종 세포주 및 RKO-E6(American Type Culture Collection CRL-2578), 정상 p53 레벨 및 기능의 감소를 유발하는 안정적으로 통합된 파필로마 바이러스 E6 종양유전자를 포함한 RKO로부터 유도된 세포주가 트랜스펙션-기초 실험에 사용되었다. RKO 및 RKO-E6 세포는 비-필수 아미노산, Eagle's 염 및 L-글루타민을 지닌 Minimum Essential Medium Eagle(MEM) 내에서 배양되었다. 배양 배지는 10% 태아 소 혈청(FBS) 및 100 유니트 페니실린/스트렙토마이신으로 보충되었다. 세포는 5%

CO₂ 및 95% 공기의 습한 환경으로 37°C에서 생장되었다. 세포는 0.25% 트립판 및 1 mM EDTA의 용액으로 점착성 세포를 탈착시킴으로서 3~4일 마다 이차배양되었다. 탈착된 세포는 1:10 내지 1:12의 분할 비율로 신선한 배지의 새로운 배양 접시로 분산되었다.

인간 eIF5A2의 클로닝

인간 eIF5A는 유전자은행(접근번호 XM_113401)에서 사용되는 인간 eIF-5A2의 서열에 대해 고안된 프라이머를 이용하여 RKO 세포로부터 분리된 RNA로부터 RT-PCR에 의해 분리되었다. 도 38은 RKO 세포로부터 분리된 인간 eIF-5A의 인간 eIF-5A2의 서열과의 정렬을 제공한다. RNA는 GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit(Sigma)를 이용하여 RKO 세포로부터 분리되었다. eIF-5A2를 증폭하는데 사용된 전방 프라이머는 서열 5' AAACTACCATCTCCCTGCC 3'(서열번호: 25)을 지녔고 역 프라이머는 서열 5' TGCCCTACACAGGCTGAAAG 3'(서열번호: 26)을 지녔다. 수득된 936 bp PCR 생성물은 pGEM-T Easy Vector(Promega) 내로 서브클론되었고 스퀸스되었다.

pGEM-T Easy-eIF-5A2 컨스트럭트는 포유류 밸현 벡터 pHM6(Roche) 내로 프레임으로 서브클론되는 eIF-5A2 PCR 단편을 생성하는데 주형으로 사용되었다. 인간 eIF-5A2를 증폭시키는데 사용된 전방 프라이머는 서열 5' ATCAAGCTTGGCCACCATGGCAGACG 3'(서열번호: 27)을 지냈고 역 프라이머는 서열 5' AACGAATTCCATGCCTGATGTTCCG 3'(서열번호: 28)을 지냈다. 수득된 505 bp PCR 생성물은 Hind 3 및 EcoR1으로 분해되었고 pHM6의 Hind3 및 EcoR1 사이트 내로 서브클론되었다.

pHM6-절제된 eIF5A1의 건조

eIF5A1의 카르복시-말단 구역이 아폽토시스-유도 활성에 중요한지 여부를 결정하기 위해 카르복시-말단 삭제된 eIF5A1이 건조되었다. 아미노산 1~127을 코드하는 절제된 eIF5A1이 주형으로서 pBS-래트 eIF5A1을 이용한 PCR에 의해 생성되었다. 전방 PCR 프라이머는 5' GCCAAGCTTAATGGCAGATGATTGG 3'(서열번호: 22)이었고 역 프라이머는 5' TCCGAATTCTGACTTCTGCTCAATC 3'(서열번호: 29)이었다. 수득된 390 bp PCR 생성물은 Hind 3 및 EcoR1으로 분해되었고 pHM6의 Hind3 및 EcoR1 사이트 내로 서브클론되었다.

트랜스펙션

트랜스펙션 실험에 사용되는 RKO 또는 RKO-E6 세포가 Hoescht 염색에 사용되는 세포의 경우 8 웨л 챔버 배양 슬라이드(Falcon) 또는 플로우 시토메트리에 의해 분석되는 세포의 경우 6 웨플레이트 내에서 배양되었다. 세포는 페니실린/스트렙토마이신 없이 10% FBS로 보충된 MEM 배지 내에서 70~80% 컨플루언시가 되도록 생장되었다. 8 웨л 배양 슬라이드의 하나의 웨에 충분한 트랜스펙션 배지가 0.425 μ g의 플라스미드 DNA를 22 μ l의 무혈청 MEM 내에서 희석시키고 혼합물을 상온에서 15분간 인큐베이트함으로서 준비되었다. 0.85 μ l의 트랜스펙션 시약, LipofectAMINE(Gibco, BRL)이 22 μ l의 무혈청 MEM 내에서 희석되었고 상온에서 5분간 인큐베이트되었다. 5분 후 LipofectAMINE 혼합물이 DNA 혼합물에 첨가되었고 30~60분간 상온에서 인큐베이트되었다. 트랜스펙트되는 세포는 44 μ l의 MEM을 트랜스펙션 배지에 첨가하고 세포 위에 이를 덮기 전에 무혈청 MEM으로 1회 세척되었다. 세포는 4시간 동안 그로쓰 챔버 내로 다시 놓였다. 인큐베이션 후 88 μ l MEM + 20% FBS가 세포에 첨가되었다. 세포는 44시간 더 배양된 후 앞서 기술된 바와 같이 Hoescht 33258로 염색되었다. 실험의 또 다른 세트에서 8-웨л 배양 슬라이드 내 RKO 또는 RKO-E6 세포는 트랜스펙션 후 0.25 μ g/ml의 악티노마이신 D로 24시간 동안 처리되었고 Hoescht로 20시간 후 염색되었다. 6-웨플레이트 내에서 수행된 트랜스펙션은 모든 시약이 4,81 배까지 증가된 것을 제외하고는 동일한 방식으로 수행되었다. 6 웨플레이트 내에서 트랜스펙트된 RKO 세포는 트랜스펙션 48시간 후 채취되었고 하기에 기술된 바와 같이 플로우 시토메트리에 의한 분석을 위해 고정되었다.

트랜스펙션 효율의 측정

트랜스펙션의 효율은 pHM6-LacZ-트랜스펙트된 세포를 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-베타-D-갈락토파라노이드(X-GAL)로 염색함으로서 측정되었다. 청색-염색된 세포는 LacZ-밸현 트랜스펙트된 세포이고, 트랜스펙션 효율은 청색 염색된 세포의 수를 총 세포수로 나눔으로서 계산되었다. 트랜스펙트된 세포는 트랜스펙션 48시간 후 염색되었다. 세포는 PBS로 2회 세척된 후 상온에서 0.5% 글루테르알데히드/PBS로 10분간 고정되었다. 세포는 1 mM MgCl₂/PBS로 3회 세척되었고, 청색-염색된 세포가 나타날 때까지 염색 용액[PBS 내 5 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 5 mM K₃Fe(CN)₆, 1 mM MgCl₂, 0.1% X-GAL]으로 인큐베이트되었다.

Hoescht 염색

핵 무사분열 및 응축에 기초하여 아폽토시스 세포를 확인하기 위해 핵 염색제, Hoescht가 트랜스펙트된 RKO 및 RKO-E6 세포의 핵을 표지하는데 사용되었다. 순수 메탄올과 빙초산의 혼합물 3:1로 구성된 고정제는 사용 직전에 준비되었다. 동일한 부피의 고정제가 배양 슬라이드 상에서 생장하는 COS-7 세포의 배지에 첨가되었고 2분간 인큐베이트되었다. 배지/고정제 혼합물이 세포로부터 제거되었고 폐기되었고 1 ml의 고정제가 세포에 첨가되었다. 5분 후 고정제가 제거되었고 1 ml의 신선한 고정제가 세포에 첨가되었고 5분간 인큐베이트되었다. 고정제가 제거되었고 세포는 1 ml의 Hoescht 염색제(PBS 내 0.5 μ g/ml Hoescht 33258)를 첨가하기 전에 4분간 공기-건조되었다. 암조건에서 10분간 인큐베이션한 후 염색 용액이 제거되었고 슬라이드는 탈이온수로 1분간 3회 세척되었다. 세척 후 1 ml의 McIlvaine's 완충액(0.021 M 구연산, 0.058 M Na₂HPO₄·7H₂O; pH 5.6)이 세포에 첨가되었고 20분간 암조건에서 인큐베이트되었다. 완충액은 제거되었고 세포는 암조건에서 5분간 공기-건조되었고 배양 슬라이드의 웨를 분리하는 챔버가 제거되었다. 형광용 Vectashield 마운팅 배지(Vector Laboratories) 몇 방울이 슬라이드에 첨가되었고 커버슬립으로 덮였다. 염색된 세포는 UV 필터를 이용한 형광 현미경하에서 관찰되었다. 밝게 염색된 세포 또는 무사분열된 핵이 아폽토시스로서 드러났다.

플로우 시토메트리에 의한 DNA 무사분열의 검출

아폽토시스 동안 생성된 DNA 단편은 Fluorescein-FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit(Oncogene Research Products)를 이용하여 플루오레세인-표지된 디옥시뉴클레오타이드로 표지되었다. 6 웰 배양 플레이트 내 다양한 컨스트럭트로 트랜스펙트된 세포는 트랜스펙션 48시간 후 트립시니제이션(trypsinization)에 의해 채취되었고 제조사의 지시에 따라 고정되었고 표지되었다. 간단히, 세포는 4°C에서 5분간 1000 x g로 펠렛되었고 PBS(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na₂HPO₄, 및 0.24 g/L KH₂PO₄)로 1회 세척되었다. 세포는 4%의 포름알데히드/PBS 내에서 재현탁되었고 상온에서 10분간 인큐베이트되었다. 세포는 다시 펠렛되었고 1 ml의 80% 에탄올에 재현탁되었고 4°C에서 보관되었다. 분석시 1 ml의 고정된 세포(1×10^6 세포/ml)가 마이크로원심분리관으로 옮겨졌고 세포는 5분간 1000 x g로의 원심분리에 의해 펠렛되었다. 펠렛된 세포는 200 μ l의 1 X TBS(20 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl) 내에 재현탁되었고 상온에서 10~15분간 인큐베이트되었다. 세포는 다시 펠렛되었고 100 μ l의 20 μ g/ml 단백질가수분해효소 K 내에 재현탁되었고 상온에서 5분간 인큐베이트되었다. 세포는 펠렛되었고 100 μ l의 1 X TdT 평형 완충액 내에 재현탁되었고 상온에서 10~30분간 인큐베이트되었다. 세포는 원심분리에 의해 펠렛되었고 60 μ l의 TdT 표지 반응 혼합물 내에 재현탁되었고 암조건에서 1~1.5 시간 동안 인큐베이트되었다. 인큐베이션 후 세포는 원심분리에 의해 펠렛되었고 200 μ l의 1 X TBS로 2회 세척되었다. 세포는 최종 부피 0.5 ml의 1 X TBS 내에 재현탁되었고 488 nm 아르곤 이온 레이저 소스가 장착된 플로우 시토미터 상에서 분석되었다.

단백질 추출 및 웨스턴 블로팅

세포를 PBS로 2회 세척한 후 150 μ l의 Em거운 SDS 젤-로딩 완충액(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 100 mM 디티오트레이톨, 2% SDS, 0.1% 브로모페놀 블루 및 10% 글리세롤)을 첨가함으로서 트랜스펙트된 세로부터 웨스턴 블로팅을 위해 단백질이 분리되었다. 세포 용해질이 마이크로원심분리관 내에 수집되었고 10분간 95°C에서 가열된 후 10분간 13,000 x g로 원심분리되었다. 상청액은 신선한 마이크로원심분리관으로 옮겨졌고 사용전까지 -20°C에서 보관되었다.

웨스턴 블로팅을 위해 5 μ g 또는 10 μ g의 총 단백질이 12% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리되었다. 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 다이플로라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 멤브레인은 차단 용액(PBS 내 5% 스kim 우유 분말, 0.02% 아지드화나트륨)에서 1시간 동안 인큐베이트되었고 PBS-T(PBS + 0.05% Tween-20)로 15분간 3회 세척되었다. 멤브레인은 밤새 4°C PBS-T내에서 보관되었다. 다음날 상온으로 테워진 후 멤브레인은 1 μ g/ml의 폴리비닐 알코올 내에서 30초간 차단되었다. 멤브레인은 텔아온수로 5회 세척된 후 PBS 내 5% 우유 용액 내에서 30분간 차단되었다. 1차 항체는 멤브레인과의 인큐베이션 전에 PBS/0.025% Tween-20 내 5% 우유 용액에서 30분간 미리 인큐베이트되었다.

멤브레인은 p53(Ab-6)를 인식하는 Oncogene으로부터의 단일클론 항체 또는 닦에서 유도된 인간 eIF-5A1의 c-말단에 상동적인 합성 펩타이드(아미노-CRLPEGDLGKEQKYD-카르복시)(서열번호: 30)에 대해 지시된 폴리클론 항체로 블로팅되었다. p53에 대한 모노클론 항체는 0.1 μ g/ml로 희석되어 사용되었고 eIF-5A1에 대한 항체는 1 : 1000으로 희석되어 사용되었다. 1차 항체로의 60~90분간의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T로 15분간 3회 세척되었다. 2차 항체는 PBS/0.25% Tween-20 내의 1% 우유로 희석되었고 60~90분간 멤브레인과 인큐베이트되었다. p53(Ab-6)이 1차 항체로 사용된 경우 2차 항체는 알칼리성 포스파타제(Rockland)에 컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 1 : 1000으로 희석되어 사용되었다. 항-eIF-5A1이 1차 항체로 사용된 경우 페옥시다제에 컨쥬게이트된 토끼 항-닭 IgY(Gallus Immunotech)가 1 : 10000으로 희석되어 사용되었다. 2차 항체와의 인큐베이션 후 멤브레인은 PBS-T로 3회 세척되었다.

표색 방법 및 화학발광 방법의 2가지 검출 방법이 블로팅을 발달시키는데 사용되었다. 표색 방법은 p53(Ab-6)이 알칼리성 포스파타제-컨쥬게이트된 2차 항체와 컨쥬게이션된 1차 항체로서 사용된 경우에만 사용되었다. 결합된 항체는 0.33 mg/ml 니트로 블루 테트라졸룸, 0.165 mg/ml 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 및 100 mM Tris-HCl(pH 9.5)의 용액 내에서 암조건으로 블로팅을 인큐베이트함으로서 시각화되었다. 발색 반응은 PBS 내 2 mM의 EDTA에서 블로팅을 인큐베이트함으로서 정지되었다. 화학발광 검출 방법은 항-[HA]-페옥시다제, 항-eIF-5A1을 포함한 다른 모든 1차 항체에 사용되었다. ECL Plus 웨스턴 블로팅 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech)가 페옥시다제-컨쥬게이트된 결합 항체를 검출하는데 사용되었다. 간단히, 멤브레인은 가볍게 블로팅드 드라이된 후 시약 A와 시약 B의 40 : 1 혼합으로 5분간 암조건으로 인큐베이트되었다. 멤브레인은 블로팅드 드라이되었고 아세테이트 시트(sheet) 사이에 놓였고 10초에서 30분까지 다양한 기간 동안 x-선 필름에 노출되었다.

도 39는 순간적 트랜스펙션 후 RKO 및 RKO-E6 세포 내에서 발생하는 아폽토시스의 백분율을 나타내는 그래프이다. RKO 및 RKO-E6 세포는 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1으로 순간적으로 트랜스펙트되었다. 24시간 후 세포는 0.25 μ g/ml의 악티노마이신 D 또는 동일한 부피의 메탄올(대조군)로 처리되었다. 세포는 20시간 후 Hoescht으로 염색되었고 UV 필터를 이용하여 형광 현미경 하에서 관찰되었다. 응축된 염색질에 의해 밝게 염색된 세포가 아폽토시스로 드롭되었다. 상기 실험은 악티노마이신 D로 처리되고, pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙트된 RKO 세포가 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 세포에 비해 240% 증가된 아폽토시스를 나타냈다. 악티노마이신 D로 처리되고 pHM6-eIF5A1으로 트랜스펙트된 RKO-E6 세포는 악티노마이신 D로 처리되지 않고 pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 세포에 비해 105% 증가된 아폽토시스를 나타냈다.

도 40은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타내는 그래프이다. RKO 세포는 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1으로 순간적으로 트랜스펙트되었다. 세포는 44시간 후 Hoescht로 염색되었고 UV 필터를 이용한 형광 현미경 하에서 관찰되었다. 응축된 염색질에 의해 밝게 염색된 세포가 아폽토시스로 드롭되었다. pHM6-eIF5A1로 트랜스펙트된 세포는 pHM6-LacZ로 트랜스펙트된 대조군 세포에 비해 25% 증가된 아폽토시스를 나타냈다. 이러한 증가는 pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF-5A1로 트랜스펙트된 세포에서는 뚜렷하지 않았다.

도 41은 순간적 트랜스펙션 후 RKO 세포 내에서 발생한 아폽토시스의 백분율을 나타내는 그래프를 제공한다. RKO 세포는 트랜스펙트되지 않거나 pHM6-LacZ 또는 pHM6-eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙트되지 않았다. 세포는 44시간 후 Hoescht로 염색되었고 UV 필터를 이용하여 형광 현미경 하에서 관찰되었다. 응축된 염색질에 의해 밝게 염색된 세포가 아폽토시스로 드롭되었다. 트랜스펙션 효율에 대한 보정 후 pHM6-eIF5A1로 트랜스펙트된 세포의 60%가 아폽토시스였다.

도 42는 순각적 트랜스펙션 후 RKO 세포 아폽토시스의 플로우 시토메트리 분석을 제공한다. RKO 세포는 트랜스펙트되지 않거나 pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A1, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 순간적으로 트랜스펙트되었다. 48시간 후 세포가 채취되었고 고정되었다. 아폽토시스를 반영하는 무사분열된 DNA가 형광-컨쥬게이트된 디옥시뉴클레오타이드로 표지되었고 488 nm 아르곤 이온 레이저 소스로 장착된 플로우 시토메트리 상에서 분석되었다. 게이트 E에서 발생한 형광은 비-아폽토시스성 세포로부터의 것이고 게이트 F에서 발생한 형광은 아폽토시스를 겪는 세포로부터의 것이다. 표는 각 게이트의 최대점 구역을 기초로 계산된 아폽토시스를 겪는 세포의 백분율을 나타낸다. 트랜스펙트되지 않은 세포 내 백그라운드 아폽토시스 및 트랜스펙션 효율에 대한 보정 후 pHM6-eIF5A1로 트랜스펙트된 세포의 80%가 아폽토시스를 나타내었다. pHM6-LacZ, pHM6-eIF5A2 또는 pHM6-절제된 eIF5A1로 트랜스펙트된 세포는 단지 아폽토시스의 백그라운드 수준을 나타내었다.

도 43은 0.25 μ g/ml 악티도마이신 D로 0, 3, 7, 24 또는 48시간 동안 처리된 RKO 세포로부터 추출된 단백질의 웨스틴 블랏을 나타낸다. 총 단백질의 5 μ g(항-eIF-5A1의 경우) 또는 10 μ g(항-p53의 경우)이 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리되었고 폴리비닐리덴 다이플로라이드 멤브레인으로 옮겨졌다. 상위 패널은 1차 항체로서 항-p53을 이용한 웨스틴 블랏을 나타낸다. 하위 패널은 동일한 로딩을 나타내기 위해 화학발광 검출 후 쿠마시 블루로 염색된 항-eIF-5A1에 이용된 멤브레인을 나타낸다. p53 및 eIF-5A1 모두 악티도마이신 D로의 처리에 의해 상향조절된다.

(실시예 6)

도 47은 인간 심장의 박동을 모방하는 심장 조직 상에서 수행되고 뒤이어 심장마비를 유도하는 실험을 나타낸다. 도 49는 셋업된 실험설 벤치를 나타낸다. 판막 대치 시술동안 제거된 인간 심장 조직의 슬라이스가 전극에 후크로 채워졌다. 심장 박동의 강도 측정을 용이하게 하기 위해 심장 조직에 작은 중량이 부착되었다. 전극은 조직이 박동을 시작하게 하는 전기적 자극을 제공하였다. 아폽토시스-특이적 eIF-5A(eIF-5a)와 중식 eIF-5A(eIF5b) 둘 모두의 유전자 발현 수준이 허혈이 유도되기 전에 심장 조직 내에서 측정되었다. 도 46 참조. 허혈-전 심장 조직 내에서 낮은 수준의 eIF-5a와 eIF5b가 생성되었고, 그의 수준은 상대적으로 균형을 이루었다. 이때 산소 및 이산화탄소는 각각 92.5% 및 7.5%로 완충액 내에서 심장으로 전달되었다. 이후, 산소 수준은 감소되었고 질소 수준은 증가되어 허혈을 유도하였고 결국 "심장마비"를 유도하였다. 심장 조직은 박동을 중지하였다. 이후 산소 수준은 정상으로 복귀되었고, 심장 조직은 전기 자극으로 다시 펄스되어 심장 박동을 다시 시작하였다. "심장마비" 후 아폽토시스-특이적 eIF-5A와 중식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준이 다시 측정되었다. 이때 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준 내에 유의적인 증가가 있는 반면, 중식 eIF-5A(eIF5b)의 발현 수준 내의 증가는 두드러지게 적었다. 도 46 참조.

"심장마비" 후 심장은 부착된 중량의 더욱 적은 압박/이동에 의해 나타난 바와 같이 강하게 박동하지 않았고, 따라서 심장 조직 세포가 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 존재에 기인하여 빠르게 사멸되고 있음을 나타내었다.

EKG는 도 48에 나타나 있다. 패널의 좌측에서 정상 심장 박동이 나타나 있다(허혈-전 심장 조직). "심장마비"(직선) 및 심장 박동의 재-개시 후 EKG는 근육 세포 사멸에 기인하여 감소된 활성을 나타낸다. EKG는 심장 박동 강도의 상대적 손실을 나타낸다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- 조직 내에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 중식 eIF-5A의 유전자 발현 수준을 측정하고;
- 조직 내에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준을 중식 eIF-5A의 발현 수준과 비교하고;
- 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준이 중식 eIF-5A의 발현 수준보다 높은 경우 조직 내의 허혈 발병률과 상호관련시키는 것을 포함한 포유류 조직 내에서 허혈 발병률을 확인하는 방법

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 조직은 심장 조직임을 특징으로 하는 방법

청구항 3.

- 포유류 조직 내에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A 및 중식 eIF-5A의 유전자 발현 수준을 측정하고;
- 포유류 조직 내에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준을 중식 eIF-5A의 발현 수준과 비교하고;
- 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현 수준이 중식 eIF-5A의 발현 수준보다 높은 경우 허혈 발병률과 상호관련시키고;
- 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현을 억제하는 약제를 포유류 심장 조직에 제공하는 것을 포함한 포유류 조직 내에서 아폽토시스를 감소시키는 방법

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 포유류 조직은 심장 조직임을 특징으로 하는 방법

청구항 5.

제 4항에 있어서, 상기 약제는 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함한 안티센스 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 방법

청구항 6.

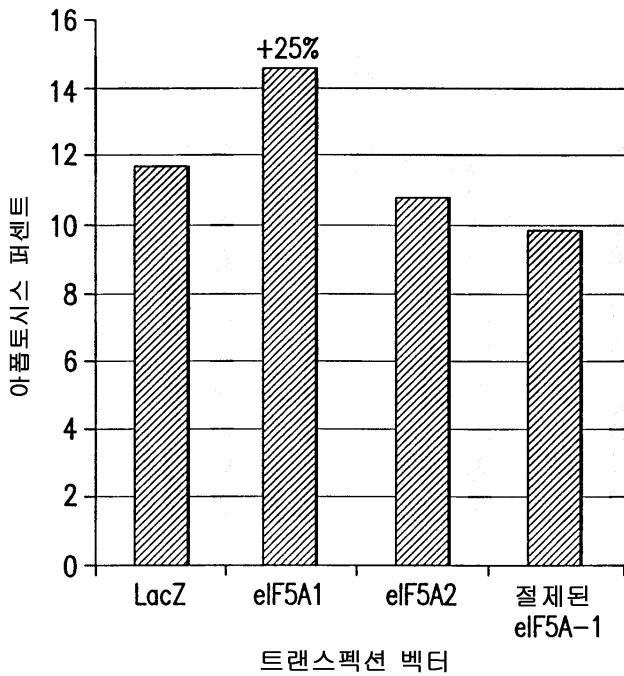
제 5항에 있어서, 상기 아폽토시스-특이적 eIF-5A를 인코드하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호: 3 또는 4로 구성된 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 방법

요약

본 발명은 포유류 조직, 특히 포유류 심장 조직 내에서의 허혈 발병률을 확인하는 방법을 제공한다. 또한 포유류 조직, 특히 심장 조직 내에서의 아폽토시스를 감소시키는 방법이 제공된다. 이들 방법은 아폽토시스-특이적 eIF-5A와 중식 eIF-5A 둘 모두의 유전자 발현 수준을 측정하고 비교하고 아폽토시스-특이적 eIF-5a의 발현 수준이 중식 eIF-5A 보다 높은 경우 허혈의 발병률을 상호관련시키는 것을 포함한다. 포유류 조직 내 아폽토시스를 감소시키는 방법에서 아폽토시스-특이적 eIF-5A의 발현을 억제하는 약제가 제공된다. 바람직한 약제는 인간 아폽토시스-특이적 eIF-5A에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

대표도

순간적으로 트랜스펙트된 RK0 세포의
아폽토시스 퍼센트

**색인어**

포유류 조직, 심장 조직, 허혈, 발병률, 아폽토시스, eIF-5A, 중식

도면

도면1

TCGAAGACCGGTAAGCACGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTGGTATTGATATTTACTGGGAAGAAATAT
 S K T G K H G H A K V H L V G I D I F T G K K Y
 GAAGATATCTGCCCGTCACTCATAACATGGATGCCAACATCAAAAGGAATGATTCAGCTGATTGGC
 E D I C P S T H N M D V P N I K R N D F Q L I G
 ATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTCGTCTGCCTGAGGG
 I Q D G Y L S L L Q D S G E V R E D L R L P E G
 GACCTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGTGCTCCGCATG
 D L G K E I E Q K Y D C G E E I L I T V L S A M
 ACAGAGGAGGCAGCTGCAATCAAGGCAATGGCAAATAACTGGCTTCCAGGGTGGCGGTGGCAGCA
 T E E A V A I K A M A K
 GTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCCCAGCTCTGGCTGGCCCTGGACTCCTATCCAATT
 TTTGACCTTTATTTGGTTTCTCACCCCTCAAACCTGTCGGGAGACCCCTGCCCTCACCTAGCTCCCT
 TGGCCAGGCATGAGGGAGCATGGCCTGGTGAAGCTACCTGCCTCTCTCGAGCCCTGATGGGGAAA
 GGGAGTGGGACTGCGCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTCTTTAATTCAATTGGAATCAGAAAG
 CTGTGGATTCTGGCAAATGGCTTGTCTTATCCACTCAACCCATCTGGTCCCTGTTCTCCATAGT
 CCTTCACCCCAAGCACCAGTACAGACTGGGACCAAGCCCTCCCTGCCTGTCTCTCCAAACCC
 TCTATAGGGGTGACAAGAAGAGGAGGGGGAGGGACACGATCCCTCCTCAGGCATCTGGGAAGGCCTTGC
 CCCCATGGGCTTACCTTCTGTGGCTTCTCCCTGACACATTGTTAAAATCAAACCTGAATAAAC
 TACAAGTTAATATGAAAAA
 (972 NT, 109 aa)

도면2

CAGGTCTAGAGTTGGAATCGAAGCCTTAAATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGG
 M A D D L D F E T G D A G
 CCTCAGGCCACCTTCCAAATGCACTGTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTGTCAAGGGCCGGCCAT
 A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P
 GTAAGATCGAGATGTCTACTCGAAGACTGGCAAGCATGGCATGCCAAGGTCCATCTGGTGGTATTG
 C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I
 ATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGACTCATAACATGGATGTCCCCAACATCAAAA
 D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K
 GGAATGATTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGAGGTACGAG
 R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R
 AGGACCTTCGTCGCTGAGGGAGACCTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC
 E D L R L P E G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
 TGATCACAGTGTGTCGCGCATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCTCGAG
 L I T V L S A M T E E A A V A I K A

(488 NT, 151 aa)

도면3

CAGGTCTAGAGTGGAAATCGAAGCCTCTAAATGGCAGATGATTTGGACTTCGAGACAGGGAGATCGAGGGG
 M A D D L D F E T G D A G 13
 CCTCAGCCACCTTCCAAATGCACTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTGGTCTCAAGGCCGGCCAT
 A S A T F P M Q C S A L R K N G F V V L K G R P 144
 GTAAGATCGTCACTGGAAAGACTGGCAAGCATGCCATGCCAAGGTCTCTGGTTATTG
 C K I V E M S T S K T G K H G H A K V H L V G I 61
 ATATTTTACTGGAAAGAAATATGAAGATATCTGCCCTGCACTCATACATGGATGTCCCCAACATCAAA
 D I F T G K K Y E D I C P S T H N M D V P N I K 288
 GGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCCCTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAG
 R N D F Q L I G I Q D G Y L S L L Q D S G E V R 109
 AGGACCTTCGCTGCGCTGAGGGAGACCTGGCAAGGAGATTGAGCAGAAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCC 432
 E D L R L P F G D L G K E I E Q K Y D C G E E I
 TGATCACAGTGTGTCGCCCATGACAGAGGGCAGCTGTCGAATCAAGGCCATGGCAAAATACTGGCTT
 L I T V L S A M T E E A A V A I K A M A K * 154
 CCAGGGTGGGGTGGTGGCAGCAGTGTGATCCATGAGCCTACAGAGGCCCTCCGGAGCTGGCTGGGCCCT 576
 TGGCTGACTCTATCCAATTATTGACGTTTATTGGTTCTCACCCCTCAAACTGTGGGGAGA
 CCCTGCCCTCACCTGAGCTCCCTGGCCAGGAGTGGGGAGCCATGGCTGGTGAAGCTACCTGCTCTC 720
 TCTCGCAGCCCTGATGGGGAAAGGGAGTGGGACTGCTGTGGTTAGGTTCCCTCTCCCTTTCTTT
 TAATTCAATTGGAAATCAGAAAGCTGAGCTGGATTCTGCAAATGGCTTGTGTCCTTATCCACTCAAACCCA 864
 TCTGGTCCCCGTGTCATGCTCTCACCCCAAGCACCAGTACAGACTGGGGACAGGCCCTTCCCT
 GCCTGTTCTTCCAAACCCCTATAGGGTGAACAAGAAGAGGGGGGGGGGGGACAGCATCCCTCC 1008
 TCAGGCATCTGGAAAGGCCCTGGCCCCATGGCTTACCTTCTGTGGCTTCTCCCTGACACATTGT
 TAAAAATCAACCTGAATAAAACTACAAGTTAATATGAAAAA 1139

(1139 NT. 154 aa)

도면4

GCTGTGTATTATTGGGCCATAAGAACACATACCTGTGCTGAGTCCTGCACTCACAGACGGCTCACTGGGT
A V Y Y W A H K N H I P V L S P A L T D G S L G
GACATGATCTTTTCCATTCTATAAAACCCAGGCTGGCTCTGGACATCGTTGAAGACCTGCGGCTCATC
D M I F F H S Y K N P G L V L D I V E D L R L I
AACATGCAGGCCATTTCGCCAAGCGCACTGGGATGATCATCCTGGGGAGGCGTGGTCAAGCACCACATC
N M Q A I F A K R T G M I I L G G G V V K H H I
GCCAATGCTAACCTCATGCGGAATGGAGCTGACTACGCTGTTATATCAACACAGGCCAGGAGTTGATGGC
A N A N L M R N G A D Y A V Y I N T A Q E F D G
TCAGACTCAGGAGCCGGCCAGATGAGGCTGTCTCCCTGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG
S D S G A R P D E A V S W G K I R M D A Q P V K
GTCTATGCTGATGCATCTGGTTTCCCTGCTGGTGGCTGAGACATTGCCAAAAGGCAGATGCCCTC
V Y A D A S L V F P L L V A E T F A Q K A D A F
AGAGCTGAGAAGAATGAGGACTGAGCAGATGGTAAAGACGGAGGCTCTGCCACACCTTATTATTATT
R A E K N E D
GCATACCAACCCCTCTGGGCCCTCTCCCTGGTCAAGCAGCATCTTGAGAATAATGCCCTTTGTGGTT
CTGTAAGGAAAGGACTTTAAAAAAAAAAAAAA

(606 NT, 151 aa)

도면5

래트 vs. 인간 (BC000751 or NM_001970) 96.5% 동일성 (코딩)

래트	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGCCTCAGCCACCTTCCAATG	10	20	30	40	50	60
인간	ATGGCAGATGACTTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGCCTCAGCCACCTTCCAATG	10	20	30	40	50	60
.							
래트	CAGTGCTCAGCATTACGTAAAGAATGGTTTGTTGCTCAAGGGCCGGCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
인간	CAGTGCTCAGCATTACGTAAAGAATGGCTTGTTGCTCAAAGGGCCGGCATGTAAGATC	70	80	90	100	110	120
.							
래트	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT	130	140	150	160	170	180
인간	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCACGGCACGCCACGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT	130	140	150	160	170	180
.							
래트	ATTGATATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTGACTCATAACATGGAT	190	200	210	220	230	240
인간	ATTGACATTTTACTGGGAAGAAATATGAAGATATCTGCCGTCAACTCATAATATGGAT	190	200	210	220	230	240
.							
래트	GTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	250	260	270	280	290	300
인간	GTCCCCAACATCAAAGGAATGACTTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCA	250	260	270	280	290	300
.							
래트	CTGCTCCAGGACAGTGAGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCGCTGAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
인간	CTGCTCCAGGACAGCGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCGCTCCCTGAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350	360
.							
래트	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCCGCC	370	380	390	400	410	420
인간	AAGGAGATTGAGCAGAAGTACGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACGGTGCTGTCTGCC	370	380	390	400	410	420
.							
래트	ATGACAGAGGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCATGGCAAAA	430	440	450	460		
인간	ATGACAGAGGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCATGGCAAAA	430	440	450	460		

도면6

래트 vs. 인간 (NM_020390) 72.5% 동일성 (코딩)

래트	10	20	30	40	50	60	
	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGGCTCAGCCACCTTCCAATG	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	ATGGCAGACGAAATTGATTCACTACTGGAGATGCCGGGCTTCAGCACTTACCTATG	10	20	30	40	50	60
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	70	80	90	100	110	120	
	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTTGCTCAAGGGCCGCGATGTAAGATC	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	CAGTGCTCGGCCTTGCGCAAAAACGGCTTCGTGGTGCCTAAAGGACGACCATGCAAAATA	70	80	90	100	110	120
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	130	140	150	160	170	180	
	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	GTGGAGATGTCAACTTCCAAAAGTGGAAAGCATGGTCTGGTCAAGGTTCACCTTGTGGA	130	140	150	160	170	180
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	190	200	210	220	230	240	
	ATTGATATTTTACTGGAGAAATATGAAGATATCTGCCCCTGACTCATAACATGGAT	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	ATTGATATTTCACGGGCAAAAATATGAAGATATTTGCTTCTACTCACAACATGGAT	190	200	210	220	230	240
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	250	260	270	280	290	300	
	GTCCCCAACATCAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGGTACCTATCC	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	GTTCCAAATATTAAAGAGAAATGATTCAACTGATATGCAAGATGGTTACCTTCC	250	260	270	280	290	300
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	310	320	330	340	350	360	
	CTGCTCCAGGACAGTGGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCCTGCCTGAGGGAGACCTTGGC	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	CTGCTGACAGAAACTGGTGAAGTTCGTGAGGATCTTAAACTGCCAGAAGGTGAACTAGGC	310	320	330	340	350	360
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	370	380	390	400	410	420	
	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCGCC	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	AAAGAAATAGAGGGAAAATACAATGCAAGGTGAAGATGTACAGGTGTCATGTGTGCA	370	380	390	400	410	420
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						
래트	430	440	450	460			
	ATGACAGAGGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::					
인간	ATGAGTGAAGAATATGCTGTAGCCATAAAACCT--GCAAAT	430	440	450	460		
	::::::::::::::::::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: :::: ::::						

도면7

래트 vs. 마우스 (BC003889) 98.3% 동일성 (코딩)

래트	10	20	30	40	50	60
	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGCCTCAGCCACCTTCCAATG	::::::::::::::::::				
마우스	ATGGCAGATGATTGGACTTCGAGACAGGAGATGCAGGGCCTCAGCCACCTTCCAATG	10	20	30	40	50
	10	20	30	40	50	60
래트	70	80	90	100	110	120
	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTTGCTCAAAGGCCGATGTAAGATC	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::
마우스	CAGTGCTCAGCATTACGTAAGAATGGTTTGTTGCTCAAAGGCCGATGTAAGATC	70	80	90	100	110
	70	80	90	100	110	120
래트	130	140	150	160	170	180
	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGT	::::::::::::::::::				
마우스	GTCGAGATGTCTACTTCGAAGACTGGCAAGCATGGCCATGCCAAGGTCCATCTGGTTGGC	130	140	150	160	170
	130	140	150	160	170	180
래트	190	200	210	220	230	240
	ATTGATATTTTACTGGAGAAATATGAAGATATCTGCCGTCGACTCATAACATGGAT	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::
마우스	ATTGACATTTTACTGGAGAAATATGAAGATATCTGCCGTCGACTCATAATATGGAT	190	200	210	220	230
	190	200	210	220	230	240
래트	250	260	270	280	290	300
	GTCCTAACATCAAAGGAATGATTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGTACCTATCC	::::::::::::::::::				
마우스	GTCCTAACATCAAACGGAATGACTTCCAGCTGATTGGCATCCAGGATGGTACCTATCC	250	260	270	280	290
	250	260	270	280	290	300
래트	310	320	330	340	350	360
	CTGCTCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCGCTGAGGGAGACCTTGGC	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::
마우스	CTGCTCAGGACAGTGGGAGGTACGAGAGGACCTTCGTCGCTGAGGGAGACCTTGGC	310	320	330	340	350
	310	320	330	340	350	360
래트	370	380	390	400	410	420
	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCGCC	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	::::::::::::::::::	:::
마우스	AAGGAGATTGAGCAGAAGTATGACTGTGAGAAGAGATCCTGATCACAGTGCTGTCGCC	370	380	390	400	410
	370	380	390	400	410	420
래트	430	440	450	460		
	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA	::::::::::::::::::				
마우스	ATGACAGAGGAGGCAGCTGTTGCAATCAAGGCCATGGCAAAA	430	440	450	460	
	430	440	450	460		

도면8

래트 vs. 인간 (BC000751 or NM_001970) 100.0% 동일성

	10	20	30	40	50	60
래트	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	::					
인간	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
래트	IDIFTGKKYEDICPSTHNMVDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	::					
인간	IDIFTGKKYEDICPSTHNMVDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
래트	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAIKAMAK					
	::					
인간	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAIKAMAK					
	130	140	150			

도면9

래트 vs. 인간 (NM_020390) 82.5% 동일성

	10	20	30	40	50	60
래트	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	:::::::::: ::					
인간	MADEIDFTTGDAGASSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
래트	IDIFTGKKYEDICPSTHNMVDVPNIKRNDFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	::					
인간	IDIFTGKKYEDICPSTHNMVDVPNIKRNDYQLICIQDGYLSLLTETGEVREDLKLPEGELG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
래트	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAIKAMAK					
	:::: ::. ::. ..:: ::. :::: :::: :					
인간	KEIEGKYNAGEDVQVSVMCAMSEEEYAVAICP-CK					
	130	140	150			

도면10

래트 vs. 마우스 (BC003889) 100.0% 동일성

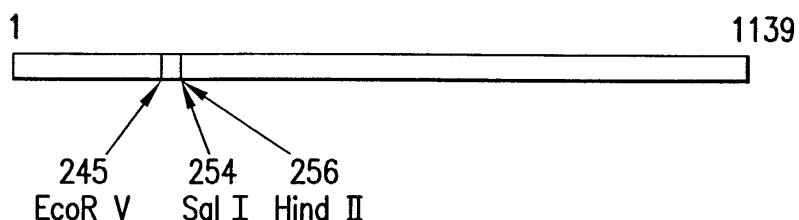
	10	20	30	40	50	60
래트	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHAKVHLVG					
	::					
마우스	MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHAKVHLVG					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
래트	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDfqLIGIQDGylSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	::					
마우스	IDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDfqLIGIQDGylSLLQDSGEVREDLRLPEGDLG					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150			
래트	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAIKAMAK					
	::					
마우스	KEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEAAVAIKAMAK					
	130	140	150			

도면11

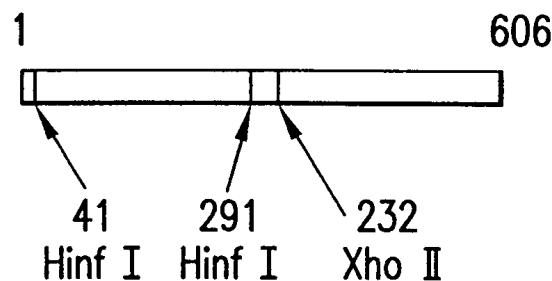
래트 vs. 인간 (BC000333) 87.4% 동일성 (코딩)

래트	10	20	30	40	50	60
	GCTGTGTATTATTGGGCCATAAGAACACATACCTGTGCTGAGTCCTGCACTCACAGAC					
인간	10	20	30	40	50	60
	TCCGTGTATTACTGGGCCAGAAGAACACATCCCTGTGTTAGTCCGCACTTACAGAC					
래트	70	80	90	100	110	120
	GGCTCACTGGGTGACATGATCTTTCCATTCCATAAAACCCAGGCTGGTCCTGGAC					
인간	70	80	90	100	110	120
	GGCTCGCTGGGCACATGATCTTCCATTCCATAAGAACCCGGGCTGGTCCTGGAC					
래트	130	140	150	160	170	180
	ATCGTTGAAGACCTGCGGCTCATCAACATGCAGGCCATTTCGCCAAGCGCACTGGGATG					
인간	130	140	150	160	170	180
	ATCGTTGAGGACCTGAGGCTCATCAACACACAGGCCATTTGCCAAGTGCAGTGGGATG					
래트	190	200	210	220	230	240
	ATCATCTGGGTGGAGGCGTGGTCAAGCACACATGCCAATGCTAACCTCATGCGGAAT					
인간	190	200	210	220	230	240
	ATCATTCTGGCGGGGGCTGGTCAAGCACACATTGCCAATGCCAACCTCATGCGGAAC					
래트	250	260	270	280	290	300
	GGAGCTGACTACGCTGTTATATCAACACAGGCCAGGAGTTGATGGCTCAGACTCAGGA					
인간	250	260	270	280	290	300
	GGGGCCGACTACGCTGTTACATCAACACAGGCCAGGAGTTGATGGCTCTGACTCAGGT					
래트	310	320	330	340	350	360
	GCCCGGCCAGATGAGGCTGTCTCTGGGGCAAGATCCGGATGGATGCACAGCCAGTAAAG					
인간	310	320	330	340	350	360
	GCCCGACAGACGAGGCTGTCTCTGGGGCAAGATCCGGGTGGATGCACAGCCGTCAAG					
래트	370	380	390	400	410	420
	GTCTATGCTGATGCATCTCTGGTTTCCCCTGCTGGTGGCTGAGACATTGCCAAAG					
인간	370	380	390	400	410	420
	GTCTATGCTGACGCCCTGGCTTCCCCTGCTTGTTGGCTGAAACCTTGCCAGAAG					
래트	430	440	450			
	GCAGATGCCCTCAGAGCTGAGAACATGGGAC					
인간	430	440	450			
	ATGGATGCCCTCATGCATGAGAACAGGAGAC					

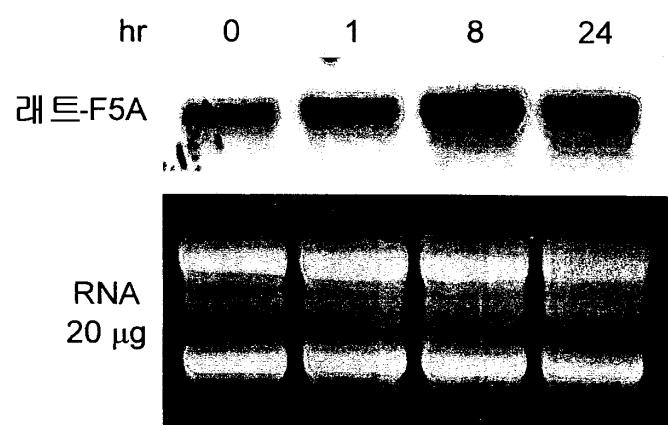
도면12



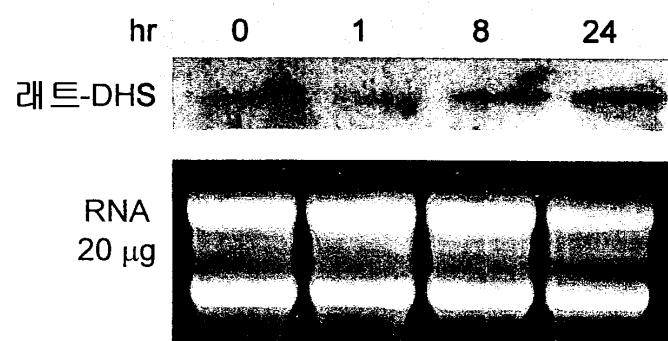
도면13



도면14



도면15



도면16

PGF-2 α 처리후 시간

0 1 24

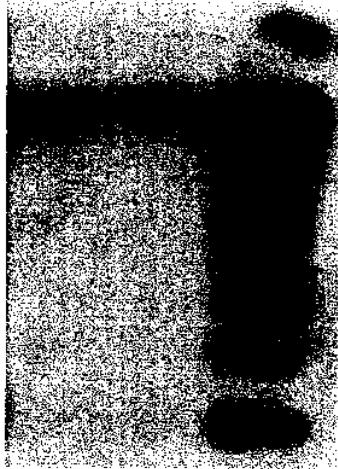


도면17

식염수 - 시험관 내 3시간

PGF-2 α - 시험관 내 3시간

PGF-2 α - 시험관 내 6시간

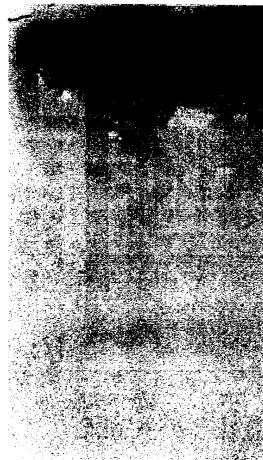


도면18

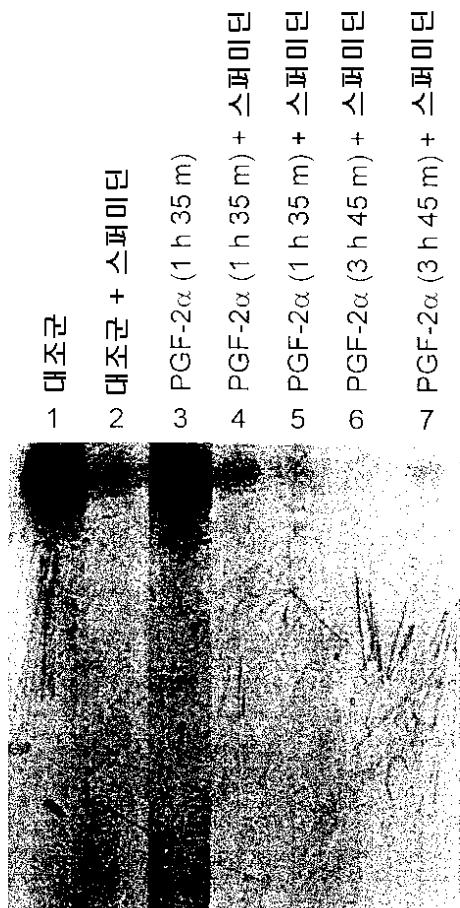
1 식염수 대조군

2 PGF-2 α – 1 hr 10 mM sperm.

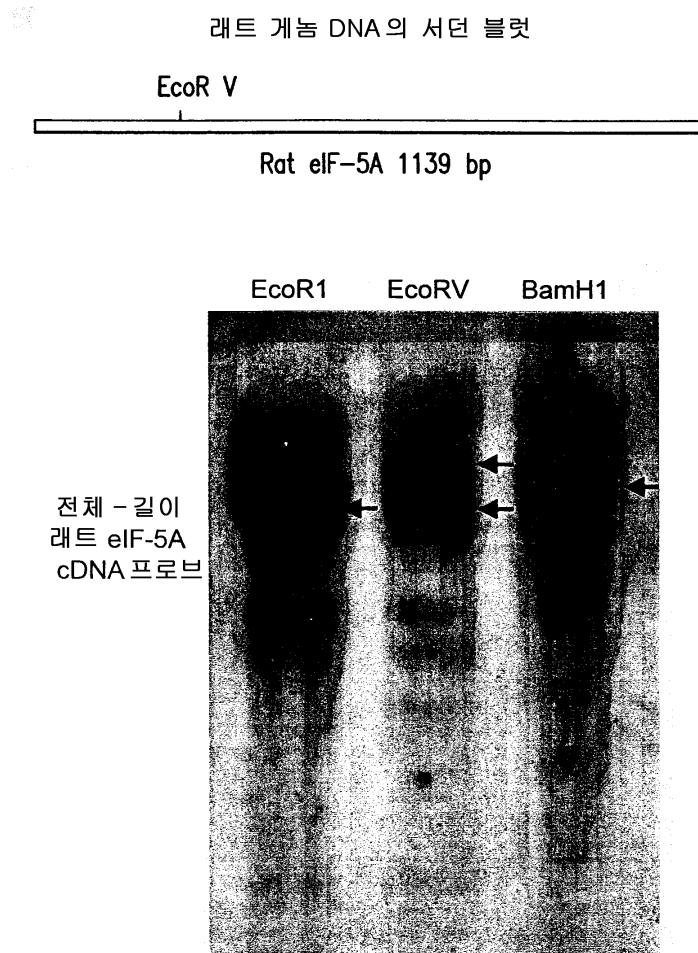
3 PGF-2 α – 1 hr 10 mM sperm. + 5 hr 1 mM sperm.



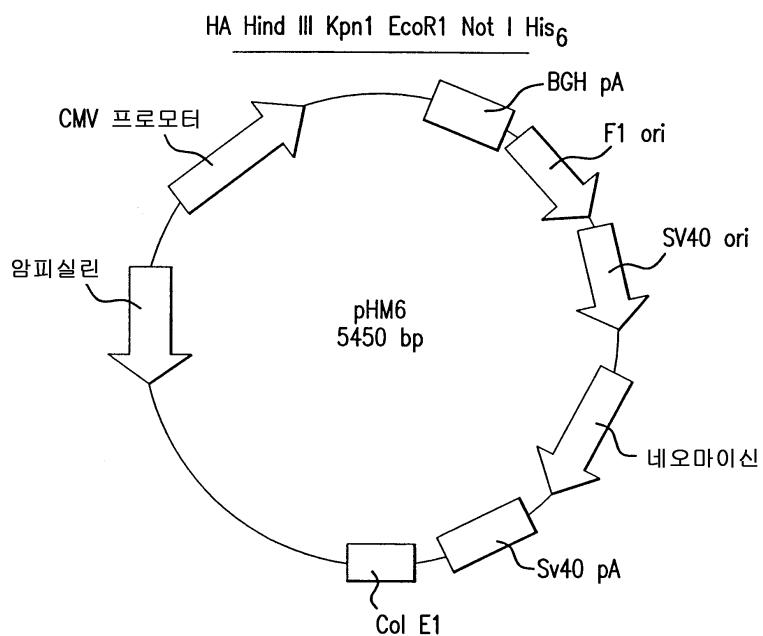
도면19



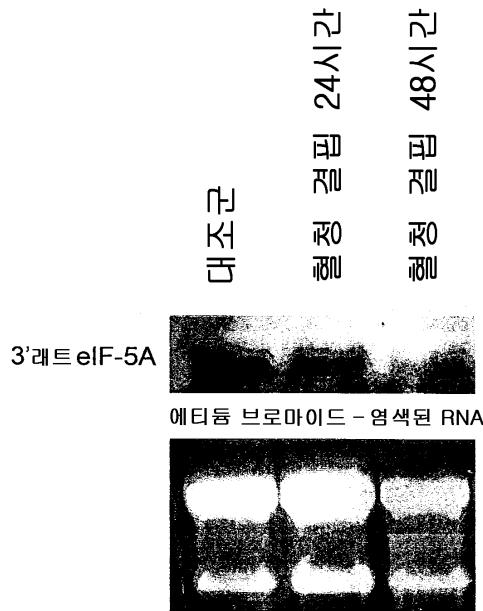
도면20



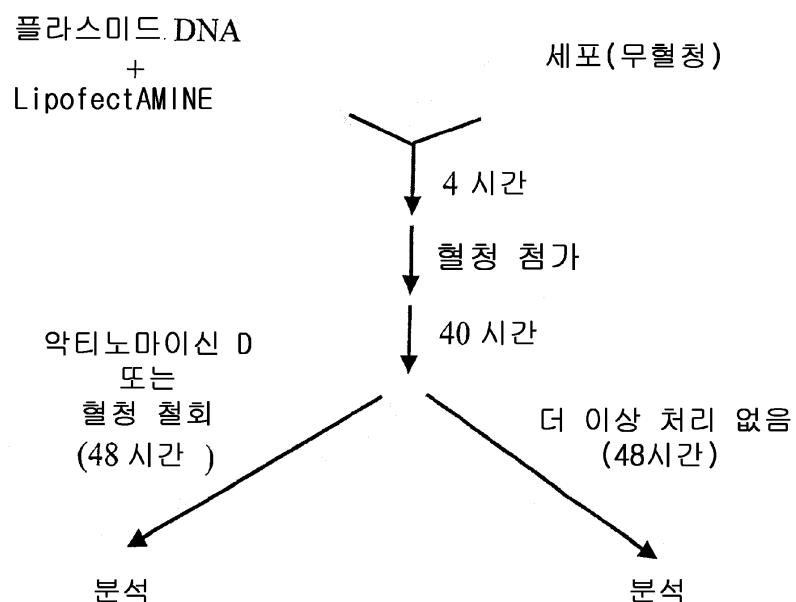
도면21



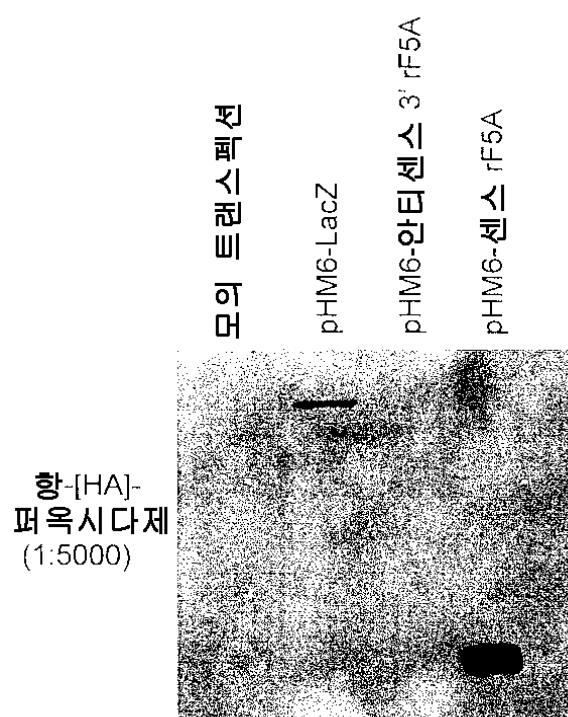
도면22



도면23

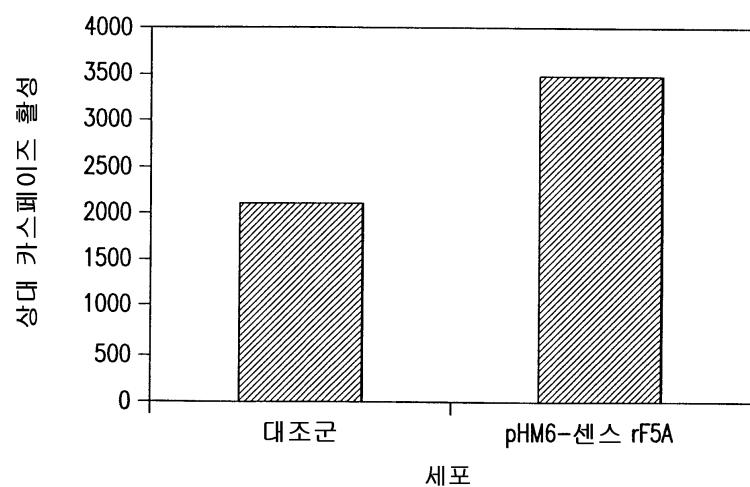
순간적 트랜스펙션

도면24

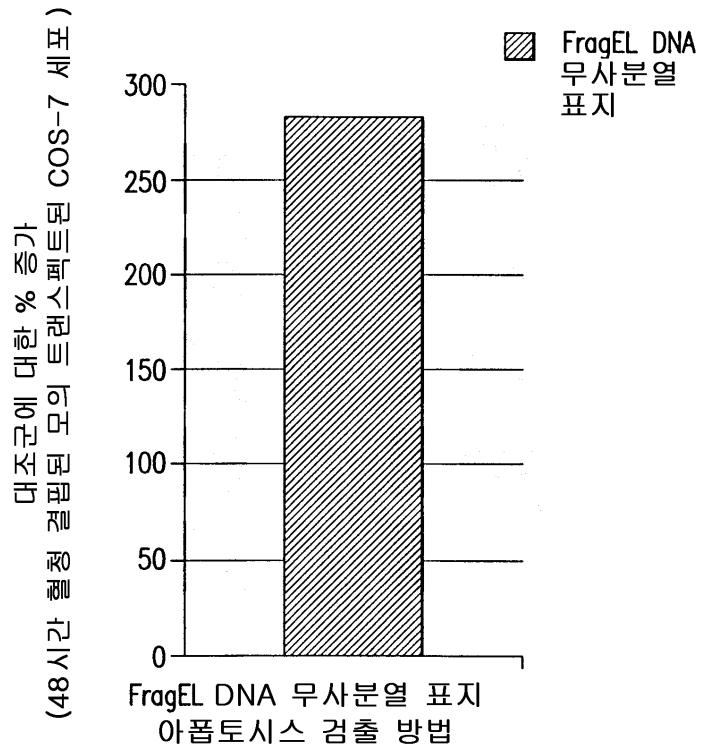


도면25

센스 래트 eIF-5A를 발현하는
COS-7 세포 내 아톱시스의 증가
(카스페이즈 활성)

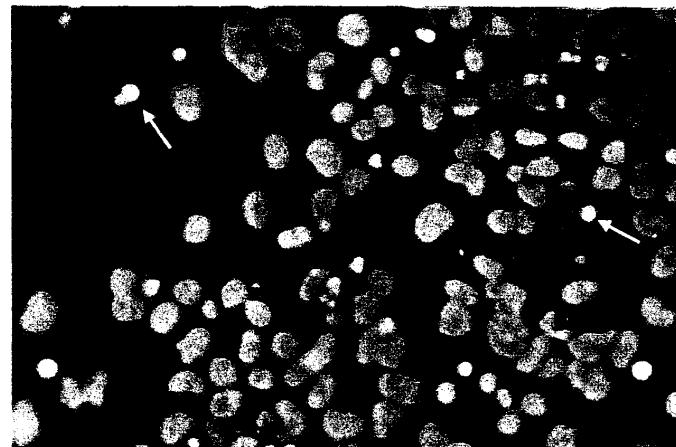


도면26

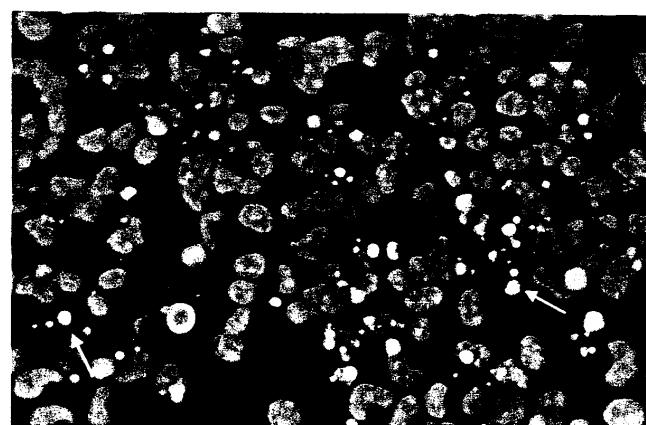
트랜스펙트된 COS-7 세포 혈청의
아포토시스 세포 수의 증가 퍼센트

도면27

혈청 결핍된 형질전환 COS-7
세포의 Hoescht 염색

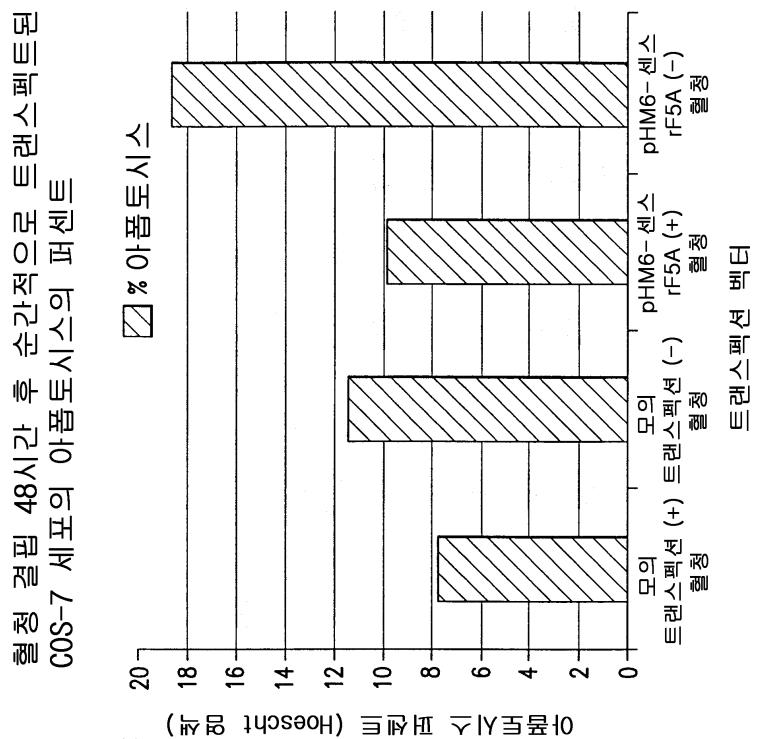


모의 형질전환

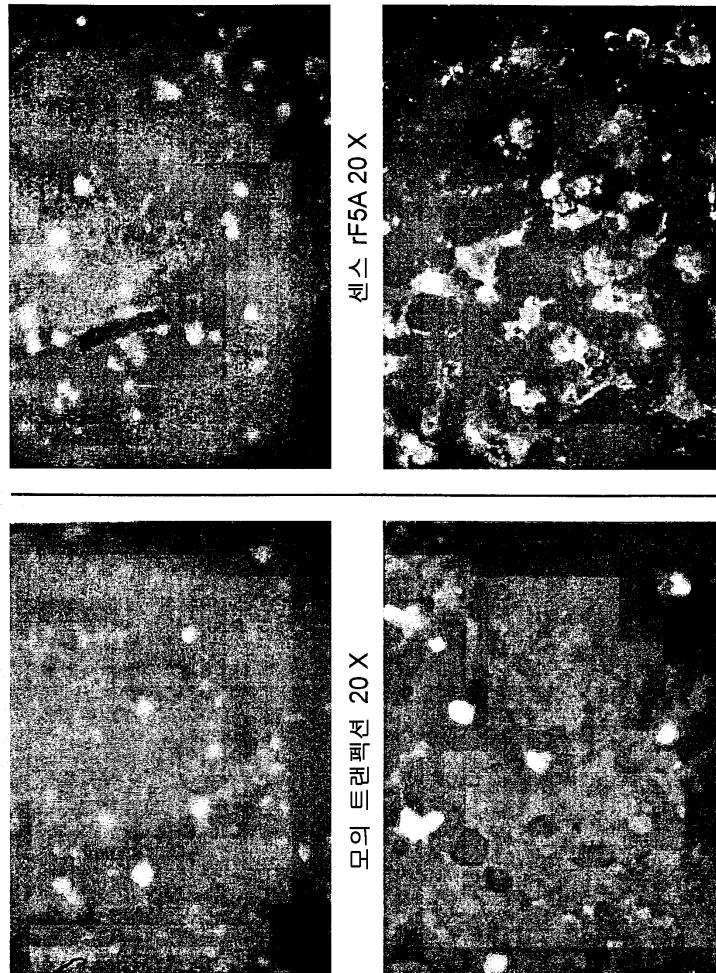


pHm6-센스 래트 F5A

도면28

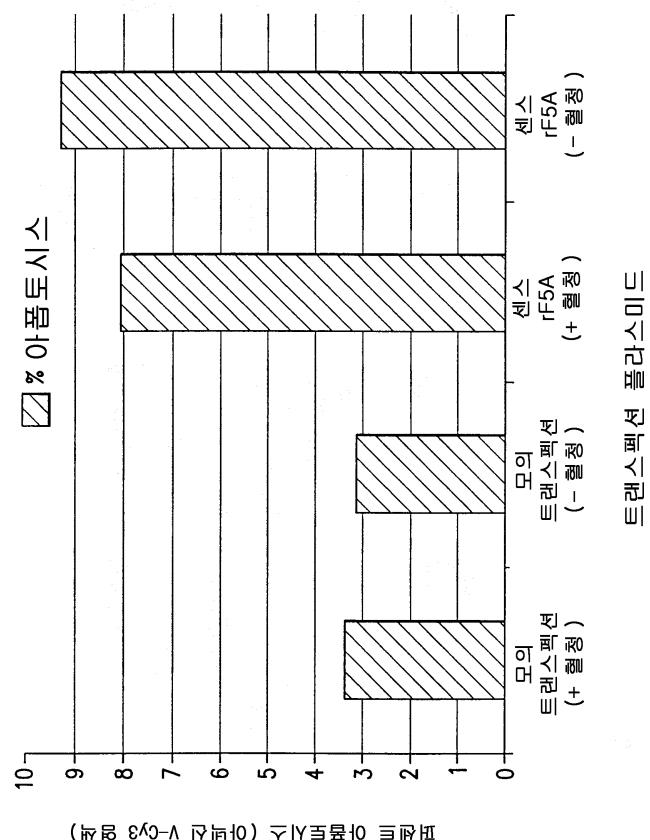


도면29



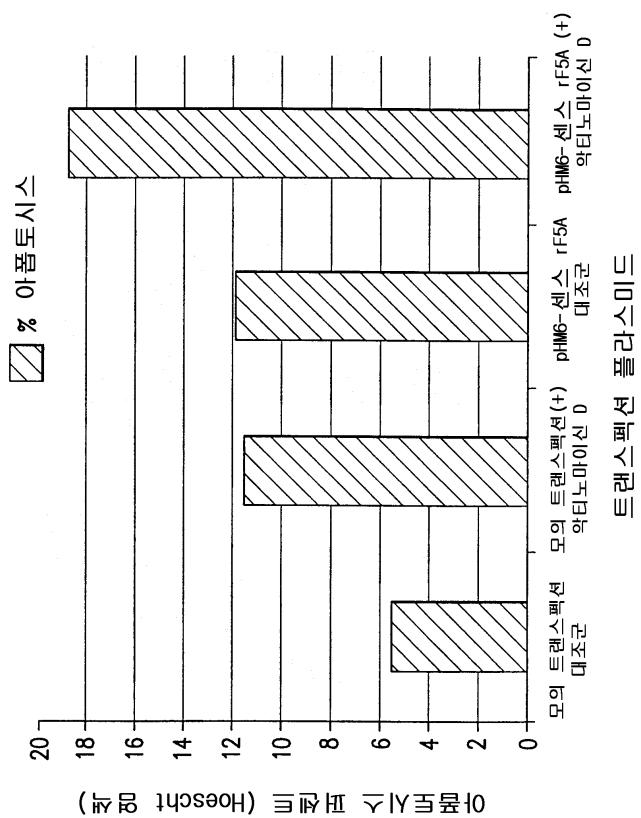
도면30

48시간 후 순간적으로 트랜스펙트된
COS-7 세포의 아폽토시스의 퍼센트
율청 결핍 COS-7 세포의 아폽토시스 퍼센트

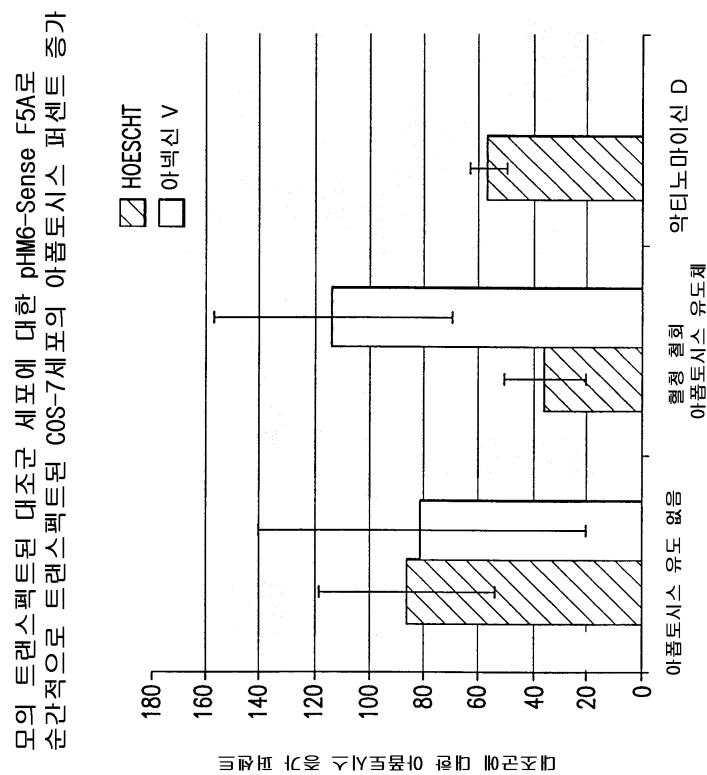


도면31

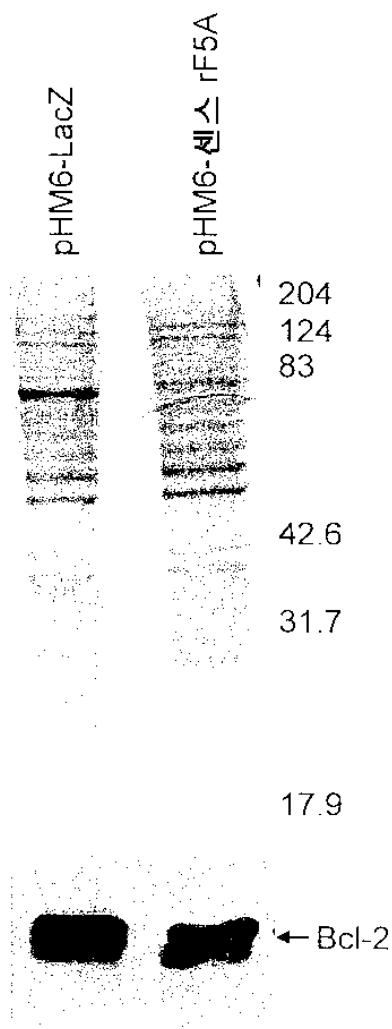
48시간 후 순간적으로 트랜스펙트된
COS-7 세포의 아폽토시스 퍼센트
율청 결핍 COS-7 세포의 아폽토시스 퍼센트



도면32

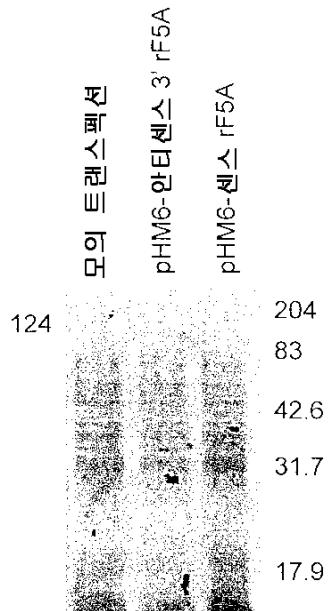


도면33



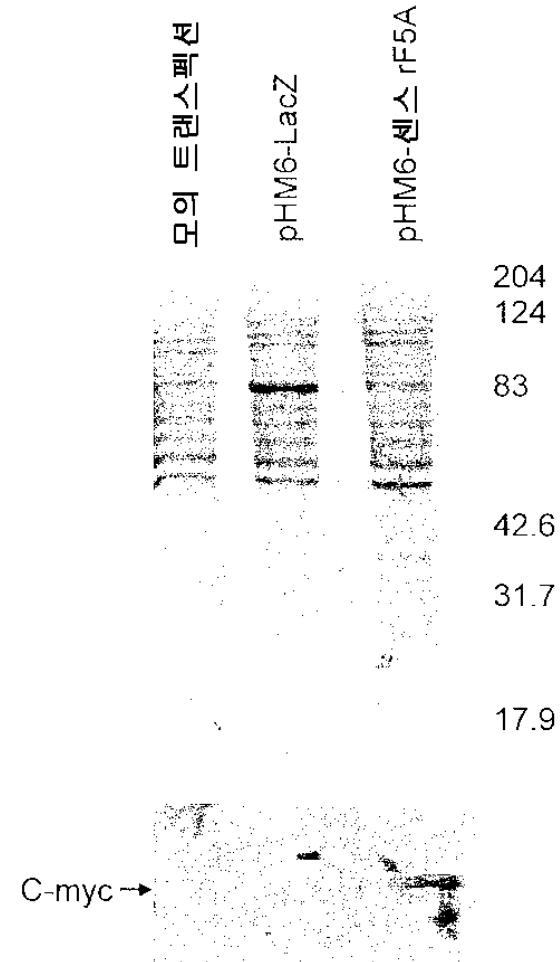
도면34

48시간 훈정-결핍된 순각적으로 트랜스펙트된
COS-7 세포 내 Bcl-2 발현 수준

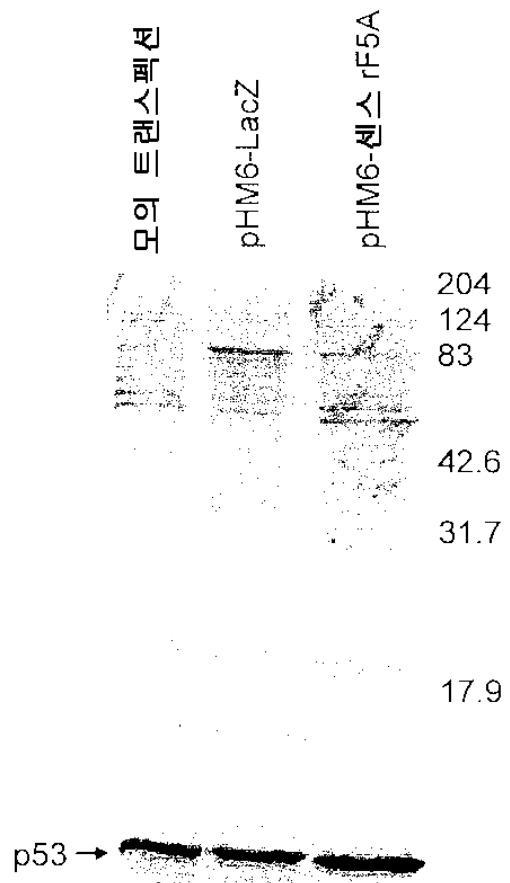


Bcl-2
(0.5 µg/ul)

도면35

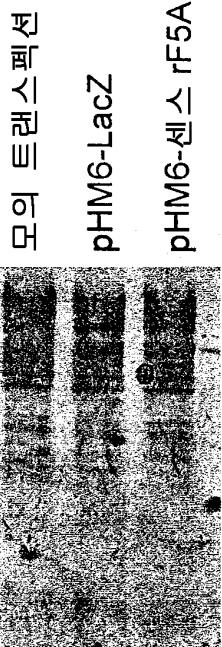


도면36



도면37a

트랜스펙션 #1

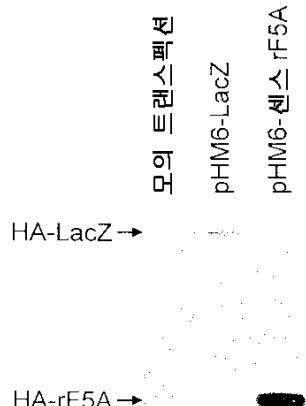


트랜스펙션 #2



도면37b

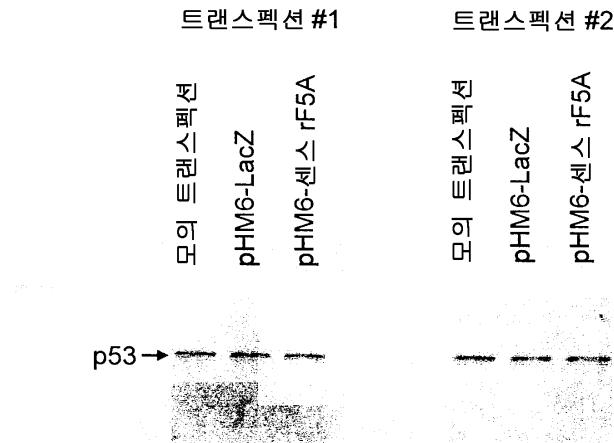
트랜스펙션 #1



트랜스펙션 #2



도면37c



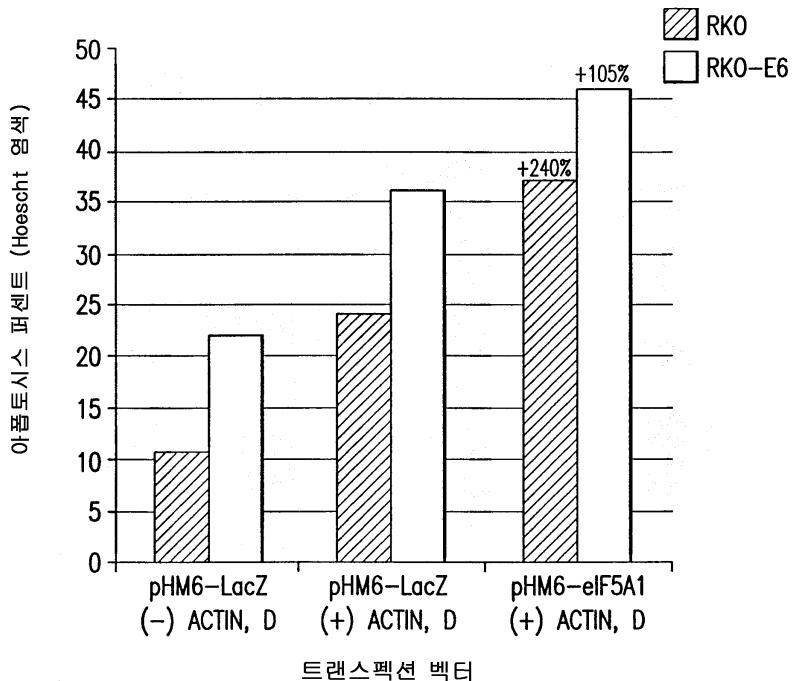
도면38

RKO 세포로부터 분리된 인간 eIF5A2 서열과
유전자 은행 내 인간 eIF5A2 서열(접근번호 XM_113401)의 정렬

XM_113401	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGRPCKI VEMSTSKTGK	
PCR	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGRPCKI VEMSTSKTGK	
Consensus	MADEIDFTTG DAGASSTYPM QCSALRKNGF VVLKGRPCKI VEMSTSKTGK	
51		
XM_113401	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGYLS	100
PCR	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGCLS	
Consensus	HGHAKVHLVG IDIFTGKKYE DICPSTHNMD VPNIKRNDYQ LICIQDGCLS	
101		
XM_113401	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK	150
PCR	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK	
Consensus	LLTETGEVRE DLKLPEGELG KEIEGKYNAG EDVQVSVMCA MSEYYAVAIIK	
151		
XM_113401	PCK	
PCR	PCK	
Consensus	PCK	

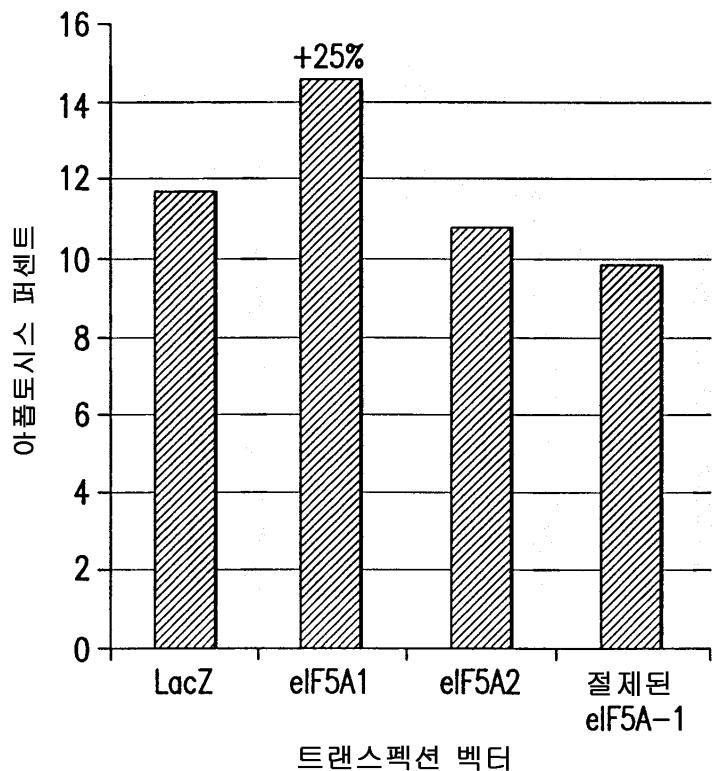
도면39

악티노마이신 D로 처리된 순간적으로 트랜스펙트된 RKO 및 RKO-E6 세포의 아폽토시스 퍼센트



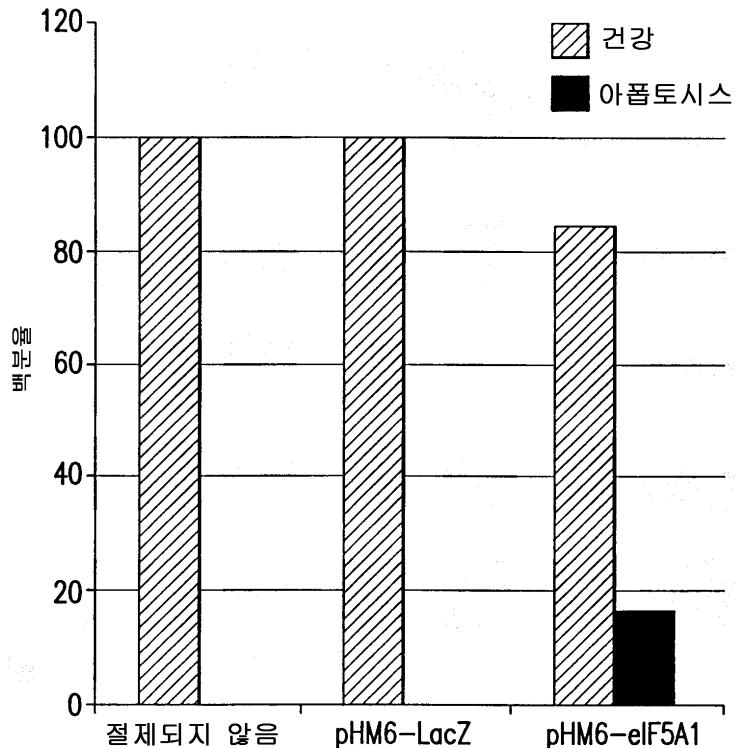
도면40

순간적으로 트랜스펙트된 RKO 세포의 아폽토시스 퍼센트



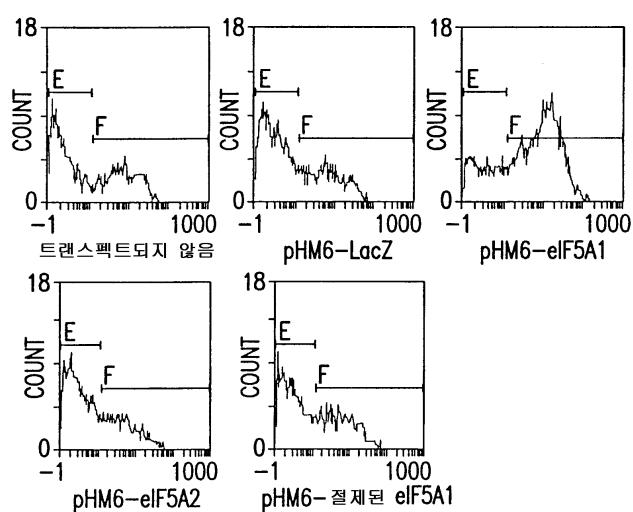
도면41

트랜스펙션 48시간 후 건강 및 아폽토시스 RKO세포의 백분율



트랜스펙션 벡터
트랜스펙션 효율 = 30%

도면42a

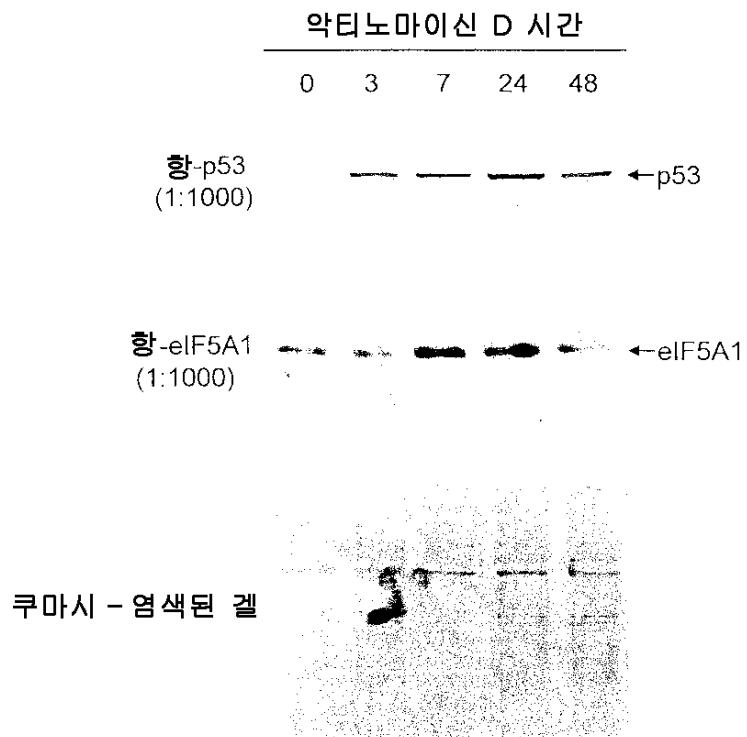
트랜스펙션 벡터

도면42b

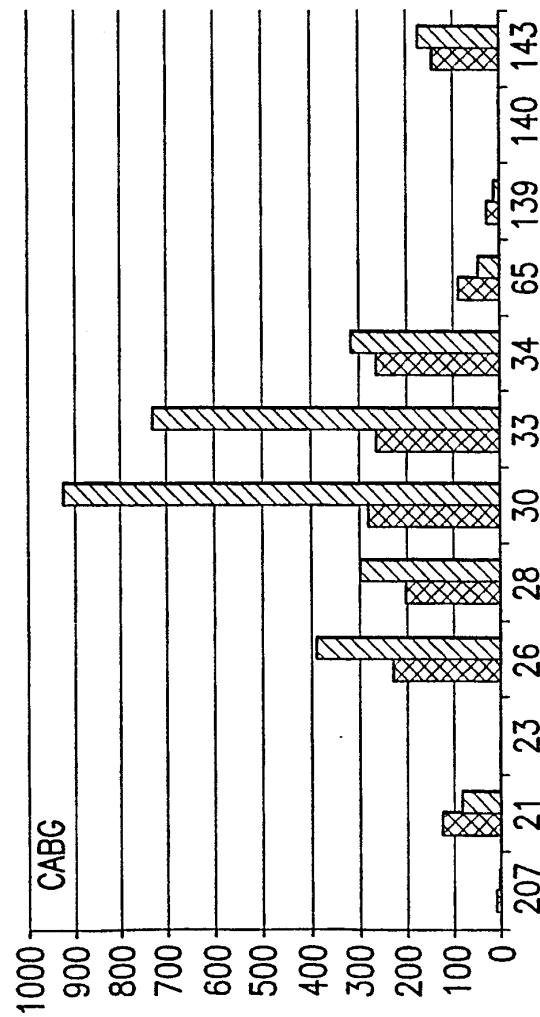
트랜스펙트된 플라스미드	아폽토시스 퍼센트
트랜스펙트되지 않음	21.2 %
pHM6-Lac Z	21.7 %
pHM6-eIF5A1	60.7 % (80%)*
pHM6-eIF5A2	20.5 %
pHM6-절제된 eIF5A1	24.1 %

* 트랜스펙트된 세포 내 백그라운드 아폽토시스 및 트랜스펙션 효율에 대해 보정됨

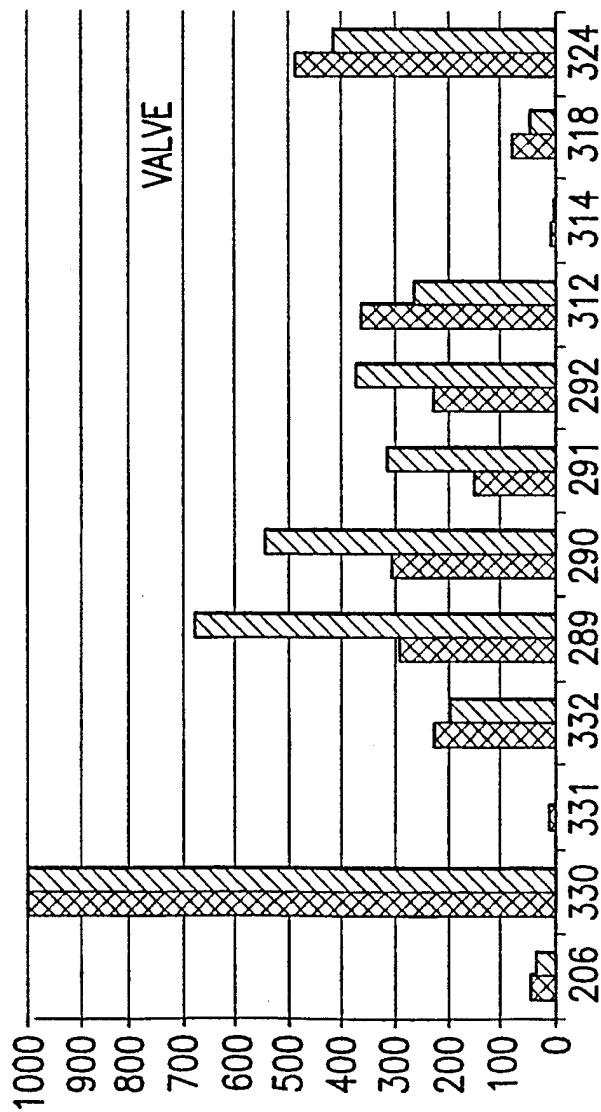
도면43



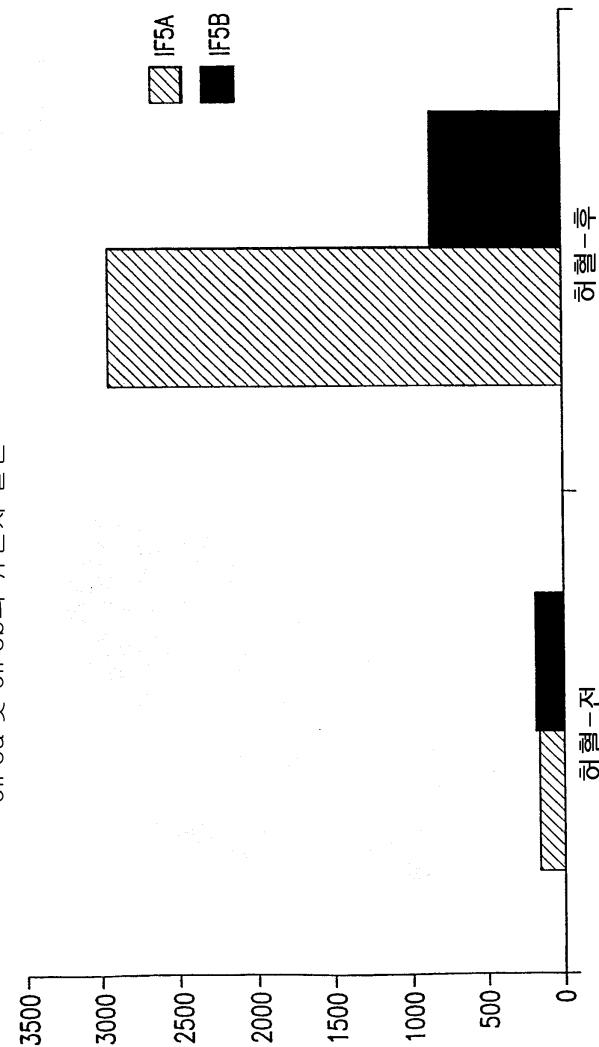
도면44



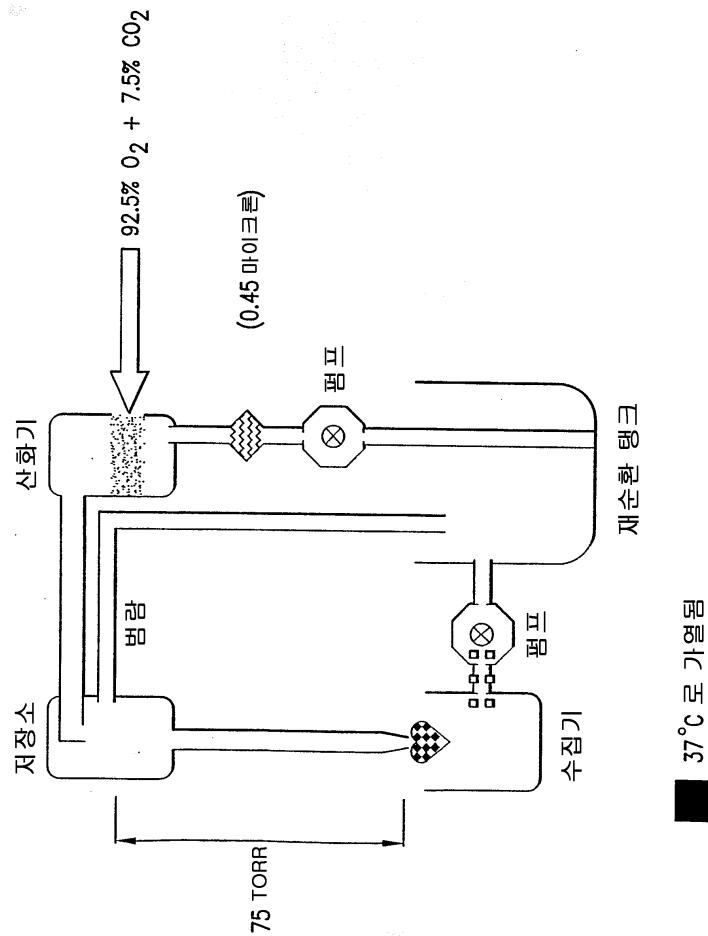
도면45



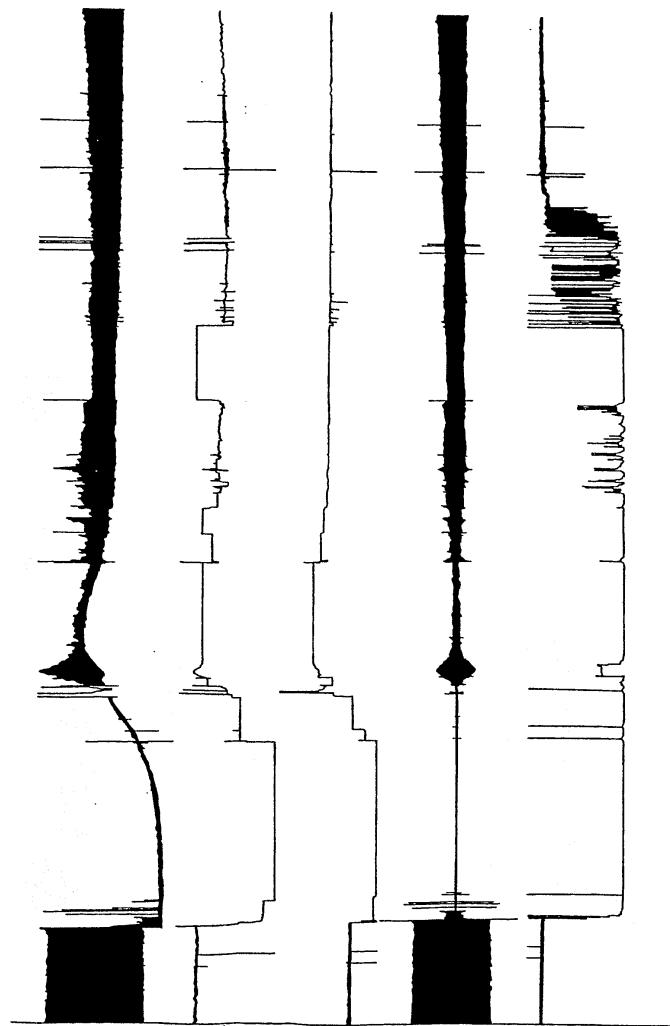
도면46



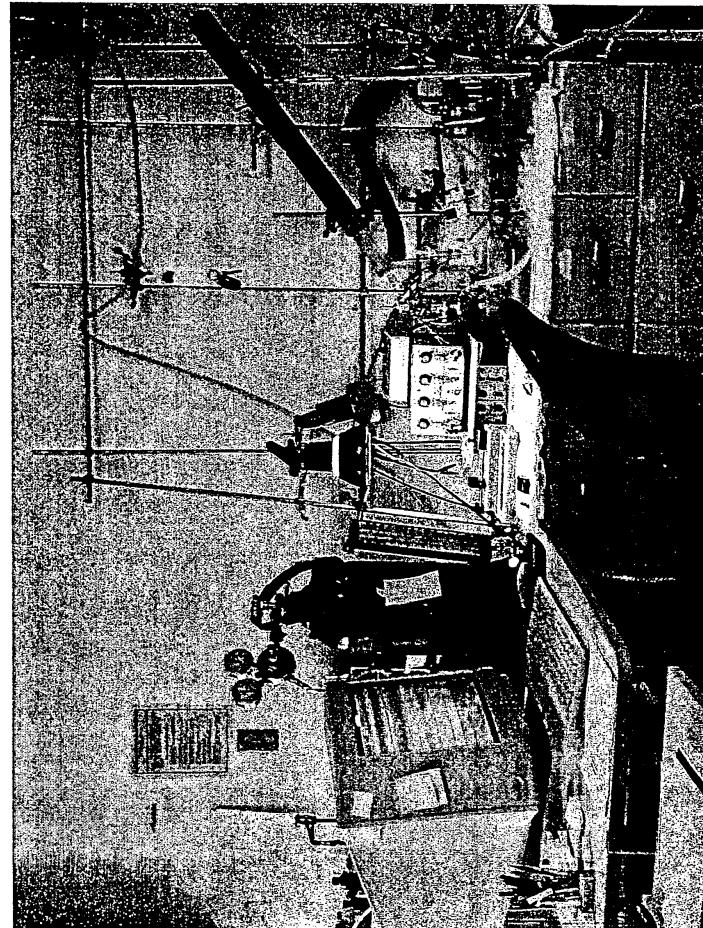
도면47



도면48



도면49



<110> SENESCO TECHNOLOGIES, INC.

<120> Nucleic acids, polypeptides, and methods for modulating apoptosis

<150> US 10/277,969

<151> 2002-10-23

<160> 30

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1139

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (33) .. (494)

<400> 1

caggtaga gttggaatcg aaggcctctta aa	atg gca gat gat ttg	47
	Met Ala Asp Asp Leu	
	1	5

gac ttc gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc cca atg cag	95
Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln	

10	15	20	
tgc tca gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cg ^g cca			143
Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro			
25	30	35	
tgt aag atc gtc gag atg tct act tcg aag act ggc aag cat ggc cat			191
Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His			
40	45	50	
gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat			239
Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr			
55	60	65	
gaa gat atc tgc ccg tcg act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa			287
Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys			
70	75	80	85
agg aat gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg			335
Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu			
90	95	100	
ctc cag gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga			383
Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly			
105	110	115	
gac ctt ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc			431
Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile			
120	125	130	
ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc			479
Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile			
135	140	145	
aag gcc atg gca aaa	taactg gcttccaggg tggcggtgggt ggcagcagtg	530	
Lys Ala Met Ala Lys			
150			
atccatgagc ctacagaggc ccctccccca gctctggctg ggcccttggc tggactccta			590
tccaatttat ttgacgtttt attttggttt tcctcacccc ttcaaactgt cggggagacc			650
ctgcccttca cctagctccc ttggccaggc atgagggagc catggccttg gtgaagctac			710
ctgcctcttc tctcgcagcc ctgatggggg aaagggagtg ggtactgcct gtggtttagg			770
ttcccccttc ccttttctt tttaattcaa tttggaatca gaaagctgtg gattctggca			830
aatggtcttg tgcctttat cccactcaa cccatctggt cccctgttct ccatagtcct			890
tcaccccaa gcaccactga cagactgggg accagccccc ttccctgcct gtgtctttc			950
ccaaaccct ctatagggt gacaagaaga ggaggggggg aggggacacg atccctcctc			1010
aggcatctgg gaaggccttg cccccatggg ctttaccctt tcctgtggc tttccctg			1070
acacatttgt taaaaatcaa acctgaataa aactacaagt ttaatatgaa aaaaaaaaaa			1130
aaaaaaaaaa			1139

<210> 2
<211> 154
<212> PRT
<213> Rattus sp.

<400> 2
Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala
1 5 10 15
Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val
20 25 30
Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr
35 40 45
Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe
50 55 60
Thr Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp
65 70 75 80
Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp
85 90 95
Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu
100 105 110
Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp
115 120 125
Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu
130 135 140
Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys
145 150

<210> 3
<211> 462
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggcagatg acttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttccaaatg 60
cagtgcttag cattacgtaa gaatggcttt gtggtgctca aaggccggcc atgtaagatc 120
gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag cacggccacg ccaagggtcca tctggttgg 180
attgacatct ttactggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcaactca taatatggat 240
gtccccaaaca tcaaaaggaa tgacttccag ctgattggca tccaggatgg gtacctatca 300
ctgctccagg acagcgggga ggtacgagag gacccctcgac tccctgaggg agaccttggc 360
aaggagattg agcagaagta cgactgtgga gaagagatcc tgatcacggg gctgtctgcc 420
atgacagagg aggcaatcaag gcccattggcaa aa 462

<210> 4
<211> 462
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> modified_base
<222> (455)..(456)
<223> a, t, c or g

<400> 4
atggcagacg aaattgattt cactactgga gatgccgggg cttccagcac ttaccctatg 60
cagtgctcg ccttgcgcaa aaacggcttc gtggtgctca aaggacgacc atgcaaata 120
gtggagatgt caacttccaa aactggaaag catggtcatg ccaaggttca cttgttgga 180
attgatattt tcacgggcaa aaaatatgaa gatatttgc cttctactca caacatggat 240
gttccaaata ttaagagaaa tgattatcaa ctgatatgca ttcaagatgg ttaccttcc 300
ctgctgacag aaactggtga agttcgtgag gatcttaaac tgccagaagg tgaactaggc 360
aaagaaaatag agggaaaata caatgcaggt gaagatgtac aggtgtctgt catgtgtgca 420
atgagtgaag aatatgctgt agccataaaa ccctnngcaa at 462

<210> 5
<211> 462
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<400> 5
atggcagatg atttggactt cgagacagga gatgcagggg cctcagccac cttcccaatg 60
cagtgctcag cattacgtaa gaatggttt gtggtgctca aaggccggcc atgtaagatc 120
gtcgagatgt ctacttcgaa gactggcaag catggccatg ccaagggtcca tctggttggc 180
attgacattt ttactggaa gaaatatgaa gatatctgcc cgtcgactca taatatggat 240
gtcccccaaca tcaaacggaa tgacttccag ctgattggca tccaggatgg gtacctatcc 300
ctgctccagg acagtgggaa ggtacgagag gaccttcgtc tgcctgaagg agaccttggc 360
aaggagattg agcagaagta tgactgtgga gaagagatcc tgatcacagt gctgtctgcc 420
atgacagagg aggcagctgt tgcaatcaag gccatggcaa aa 462

<210> 6
<211> 606
<212> DNA
<213> Rattus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (453)

<400>	6																
gct	gtg	tat	tat	tgg	gcc	cat	aag	aac	cac	ata	cct	gtg	ctg	agt	cct		48
Ala	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ala	His	Lys	Asn	His	Ile	Pro	Val	Leu	Ser	Pro		
1		5			10					15							
gca	ctc	aca	gac	ggc	tca	ctg	ggt	gac	atg	atc	ttt	ttc	cat	tcc	tat		96
Ala	Leu	Thr	Asp	Gly	Ser	Leu	Gly	Asp	Met	Ile	Phe	Phe	His	Ser	Tyr		
20			25							30							
aaa	aac	cca	ggc	ttg	gtc	ctg	gac	atc	gtt	gaa	gac	ctg	cgg	ctc	atc		144
Lys	Asn	Pro	Gly	Leu	Val	Leu	Asp	Ile	Val	Glu	Asp	Leu	Arg	Leu	Ile		
35			40							45							
aac	atg	cag	gcc	att	ttc	gcc	aag	cgc	act	ggg	atg	atc	atc	ctg	ggt		192
Asn	Met	Gln	Ala	Ile	Phe	Ala	Lys	Arg	Thr	Gly	Met	Ile	Ile	Leu	Gly		
50			55							60							
gga	ggc	gtg	gtc	aag	cac	cac	atc	gcc	aat	gct	aac	ctc	atg	cgg	aat		240
Gly	Gly	Val	Val	Lys	His	His	Ile	Ala	Asn	Ala	Asn	Leu	Met	Arg	Asn		
65			70				75			80							
gga	gct	gac	tac	gct	gtt	tat	atc	aac	aca	gcc	cag	gag	ttt	gat	ggc		288
Gly	Ala	Asp	Tyr	Ala	Val	Tyr	Ile	Asn	Thr	Ala	Gln	Glu	Phe	Asp	Gly		
85			90				95										
tca	gac	tca	gga	gcc	cg	cca	gat	gag	gct	gtc	tcc	tgg	ggc	aag	atc		336
Ser	Asp	Ser	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Glu	Ala	Val	Ser	Trp	Gly	Lys	Ile		
100			105				110										
cgg	atg	gat	gca	cag	cca	gta	aag	gtc	tat	gct	gat	gca	tct	ctg	gtt		384
Arg	Met	Asp	Ala	Gln	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Val		
115			120				125										
ttc	ccc	ttg	ctg	gtg	gct	gag	aca	ttc	gcc	caa	aag	gca	gat	gcc	ttc		432
Phe	Pro	Leu	Leu	Val	Ala	Glu	Thr	Phe	Ala	Gln	Lys	Ala	Asp	Ala	Phe		
130			135				140										
aga	gct	gag	aag	aat	gag	gac									tgagcag atgggtaaag acggaggctt	480	
Arg	Ala	Glu	Lys	Asn	Glu	Asp											
145			150														
ctgccacacc	tttattttattt	atttgcatac	caacccctcc	tggggccctct	ccttggtcag												540
cagcatcttg	agaataaaatg	gcctttttgt	tggtttctgt	aaaaaaaaagga	ctttaaaaaaaa												600
aaaaaaa																	606

<210> 7
 <211> 151
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 7
 Ala Val Tyr Tyr Trp Ala His Lys Asn His Ile Pro Val Leu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Asp Gly Ser Leu Gly Asp Met Ile Phe Phe His Ser Tyr
 20 25 30
 Lys Asn Pro Gly Leu Val Leu Asp Ile Val Glu Asp Leu Arg Leu Ile
 35 40 45
 Asn Met Gln Ala Ile Phe Ala Lys Arg Thr Gly Met Ile Ile Leu Gly
 50 55 60
 Gly Gly Val Val Lys His His Ile Ala Asn Ala Asn Leu Met Arg Asn
 65 70 75 80
 Gly Ala Asp Tyr Ala Val Tyr Ile Asn Thr Ala Gln Glu Phe Asp Gly
 85 90 95
 Ser Asp Ser Gly Ala Arg Pro Asp Glu Ala Val Ser Trp Gly Lys Ile
 100 105 110
 Arg Met Asp Ala Gln Pro Val Lys Val Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Leu Val Ala Glu Thr Phe Ala Gln Lys Ala Asp Ala Phe
 130 135 140
 Arg Ala Glu Lys Asn Glu Asp
 145 150

<210> 8
 <211> 453
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 tccgtgtatt actgggccca gaagaaccac atccctgtgt ttagtccgc acttacagac 60
 ggctcgctgg ggcacatgat cttcttccat tcctacaaga acccgggcct ggtcctggac 120
 atcgttgagg acctgaggct catcaacaca caggccatct ttgccaagtg cactggatg 180
 atcattctgg gcgggggcgt ggtcaagcac cacattgcca atgccaacct catgcggAAC 240
 gggccgact acgctgttta catcaacaca gcccaggagt ttgatggctc tgactcaggt 300
 gcccgaccag acgaggctgt ctcctggggc aagatccggg tggatgcaca gcccgtcaag 360
 gtctatgctg acgcctccct ggtcttcccc ctgcttgcgtgg ctgaaacctt tgcccagaag 420
 atggatgcct tcatgcatga gaagaacgag gac 453

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> a, t, c or g

<400> 9

tcsaarachg gnaagcaygg

20

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 10

gcgaagcttc catggctcga gttttttttt tttttttttt tt

42

<210> 11

<211> 972

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<400> 11

tcg aag acc ggt aag cac ggc cat gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att
Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile

1 5 10 15

gat att ttt act ggg aag aaa tat gaa gat atc tgc ccg tcg act cat
Asp Ile Phe Thr Gly Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His

20 25 30

aac atg gat gtc ccc aac atc aaa agg aat gat ttc cag ctg att ggc
Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly

35 40 45

atc cag gat ggg tac cta tcc ctg ctc cag gac agt ggg gag gta cga
Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg

50 55 60

gag gac ctt cgt ctg cct gag gga gac ctt ggc aag gag att gag cag
Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln

65 70 75 80

96

144

192

240

aag tat gac tgt gga gaa gag atc ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met	85	90	95	288
aca gag gag gca gct gtt gca atc aag gcc atg gca aaa Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys	100	105	taa	330
ctggcttcca ggggtggcggt ggtggcagca gtgatccatg agcctacaga ggcccctccc				390
ccagctctgg ctggggccctt ggctggactc ctatccaatt tatttgacgt tttatgg				450
ttttcctcac cccttcaaacc tgtcggggag accctgccc tcacctagct cccttggcca				510
ggcatgaggg agccatggcc ttggtaaagc tacctgcctc ttctctcgca gccctgatgg				570
gggaaaggga gtgggtactg cctgtggttt aggttcccct ctccctttt cttttaatt				630
caatttggaa tcagaaagct gtggattctg gcaaattggc ttgtgtcctt tatccactc				690
aaacccatct ggtccctgt tctccatagt cttcacccca aagcaccac tgacagactg				750
gggaccagcc cccttccctg cctgtgtctc ttcccaaacc cctctatagg ggtgacaaga				810
agaggagggg gggaggggac acgatccctc ctcaggcatc tggaaaggcc ttgccccat				870
gggcttacc ctccctgtg ggcttctcc ctgacacatt tggtaaaaat caaacctgaa				930
taaaactaca agtttaatat gaaaaaaaaaaaaaa aa				972

<210> 12
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile	1	5	10	15
Asp Ile Phe Thr Gly Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His	20	25	30	
Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly	35	40	45	
Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg	50	55	60	
Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln	65	70	75	80
Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met	85	90	95	
Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala Met Ala Lys	100	105		

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 13
 caggtctaga gttggaatcg aagc 24

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

 <400> 14
 atatctcgag ccttgattgc aacagctgcc 30

<210> 15
 <211> 489
 <212> DNA
 <213> Rattus sp.

 <220>
 <221> CDS
 <222> (33)..(485)

 <400> 15
 caggtctaga gttggaatcg aagcctctta aa atg gca gat gat ttg 47
 Met Ala Asp Asp Leu
 1 5

gac ttc gag aca gga gat gca ggg gcc tca gcc acc ttc cca atg cag 95
 Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala Thr Phe Pro Met Gln
 10 15 20

tgc tca gca tta cgt aag aat ggt ttt gtg gtg ctc aag ggc cgg cca 143
 Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val Leu Lys Gly Arg Pro
 25 30 35

tgt aag atc gtc gag atg tct act tcg aag act ggc aag cat ggc cat 191
 Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His
 40 45 50

gcc aag gtc cat ctg gtt ggt att gat att ttt act ggg aag aaa tat 239
 Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe Thr Gly Lys Lys Tyr
 55 60 65

gaa gat atc tgc ccg tcg act cat aac atg gat gtc ccc aac atc aaa			287
Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp Val Pro Asn Ile Lys			
70	75	80	85
agg aat gat ttc cag ctg att ggc atc cag gat ggg tac cta tcc ctg			335
Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp Gly Tyr Leu Ser Leu			
90	95	100	
ctc cag gac agt ggg gag gta cga gag gac ctt cgt ctg cct gag gga			383
Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu Arg Leu Pro Glu Gly			
105	110	115	
gac ctt ggc aag gag att gag cag aag tat gac tgt gga gaa gag atc			431
Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp Cys Gly Glu Glu Ile			
120	125	130	
ctg atc aca gtg ctg tcc gcc atg aca gag gag gca gct gtt gca atc			479
Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu Ala Ala Val Ala Ile			
135	140	145	
aag gct	cgag		489
Lys Ala			
150			
<210> 16			
<211> 151			
<212> PRT			
<213> Rattus sp.			
<400> 16			
Met Ala Asp Asp Leu Asp Phe Glu Thr Gly Asp Ala Gly Ala Ser Ala			
1	5	10	15
Thr Phe Pro Met Gln Cys Ser Ala Leu Arg Lys Asn Gly Phe Val Val			
20	25	30	
Leu Lys Gly Arg Pro Cys Lys Ile Val Glu Met Ser Thr Ser Lys Thr			
35	40	45	
Gly Lys His Gly His Ala Lys Val His Leu Val Gly Ile Asp Ile Phe			
50	55	60	
Thr Gly Lys Tyr Glu Asp Ile Cys Pro Ser Thr His Asn Met Asp			
65	70	75	80
Val Pro Asn Ile Lys Arg Asn Asp Phe Gln Leu Ile Gly Ile Gln Asp			
85	90	95	
Gly Tyr Leu Ser Leu Leu Gln Asp Ser Gly Glu Val Arg Glu Asp Leu			
100	105	110	
Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr Asp			
115	120	125	
Cys Gly Glu Glu Ile Leu Ile Thr Val Leu Ser Ala Met Thr Glu Glu			
130	135	140	
Ala Ala Val Ala Ile Lys Ala			
145	150		

```

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 17
gtctgtgtat tattgggcc 20

<210> 18
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 18
gcgaagcttc catggctcga gttttttttt tttttttttt tt 42

<210> 19
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 19
ttgaaggggt gagaaaaa 18

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 20
ttgagtggga taaaag 15

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 21
 aatcatctgc cattttaa 18

<210> 22
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 22
 gccaaagctta atggcagatg atttgg 26

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 23
 ctgaattcca gttattttgc catgg 25

<210> 24
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 24
 aatgaattcc gccatgacag aggaggc 27

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25
 aaactaccat ctccccctgcc 20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26
tgccctacac aggctgaaag 20

<210> 27
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27
atcaagcttg cccaccatgg cagacg 26

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28
aacgaattcc atgcctgatg tttccg 26

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 29
tccgaattcg tacttctgct caatc 25

<210> 30
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 30

Cys Arg Leu Pro Glu Gly Asp Leu Gly Lys Glu Ile Glu Gln Lys Tyr
1 5 10 15

Asp