(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월22일
(11) 등록번호 10-2158721
(24) 등록일자 2020년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/156 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0039245
(22) 출원일자 2019년04월03일
심사청구일자 2019년04월03일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Clinical Medicine (2019.02.25.) 8:275*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
강원도 춘천시 삭주로 77
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김승범

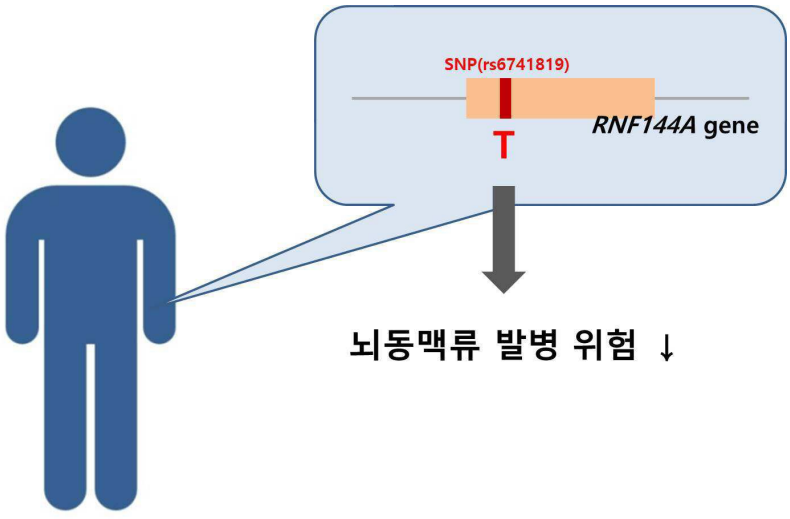
(54) 발명의 명칭 **RNF144A 유전자의 단일염기다형성을 포함하는 뇌동맥류 진단용 SNP 마커**

(57) 요 약

본 발명은 RNF144A 유전자의 SNP를 포함하는, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 뇌동맥류 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 뇌동맥류 진단용 키트, 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명의 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물, 뇌동맥류 진단용 조성물, 뇌동맥류 진단용 키트 및 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, RNF144A 유전자 상의 단일염기다형성(SNP)을 한국인 또는 아시아인에서 뇌동맥류의 발병 위험 예측 또는 진단을 위한 마커로서 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
Yonsei Medical Journal (2017) 58(5):1006-1011
World Neurosurgery (2018) 110:e823-e829
KR101974786 B1
KR101211280 B1
KR102009838 B1
KR101412649 B1
NCBI, dbSNP, Submitted SNP(ss) Details: ss1919689503 (2015.10.16.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017M3A9E8033223
부처명 미래창조과학부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 Multiple risk assessment of intracranial aneurysm using protein coding variants and non-genetic factor in a Korean population
기 여 율 1/1
과제수행기관명 한림대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2019.02.28
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

RNF144A(Ring Finger Protein 144A) 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)인 rs6741819을 포함하는, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819는 서열번호 9의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은

1) GBA(Glucocerebrosidase) 유전자의 SNP인 rs75822236,

2) TCF24(transcription factor 24) 유전자의 SNP인 rs112859779,

3) OLFML2A(Olfactomedin Like 2A) 유전자의 SNP인 rs79134766,

4) ARHGAP32(Rho GTPase Activating Protein 32) 유전자의 SNP인 rs371331393,

5) CD163L1(CD163 Molecule Like 1) 유전자의 SNP인 rs138525217,

6) CUL4A(cullin 4A) 유전자의 SNP인 rs74115822,

7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150,

8) LRRC3(Leucine rich repeat containing 3) 유전자의 SNP인 rs116969723,

9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274,

10) SPCS3(Signal Peptidase Complex Subunit 3) 유전자의 SNP인 rs17688188,

11) LINGO2(Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 2) 유전자의 SNP인 rs56942085, 및

12) MINK1(misshapen/Nck-interacting kinase(NIK)-related kinase 1) 유전자의 SNP인 rs72835045로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 추가로 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물.

청구항 4

RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 뇌동맥류 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은

1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236,

2) TCF24유전자의 SNP인 rs112859779,

3) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766,

4) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393,

5) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217,

6) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822,

7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150,

8) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723,

9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274,

10) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188,

11) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085, 및

12) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단용 조성물.

청구항 6

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819의 대립형질을 결정하는 단계를 포함하는, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 방법은 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 판별하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터,

1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236,

2) TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779,

3) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766,

4) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393,

5) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217,

6) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822,

7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150,

8) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723,

9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274,

10) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188,

11) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085, 및

12) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP의 대립형질을 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은

1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236의 대립형질이 C인 경우,

2) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393의 대립형질이 G인 경우,

3) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217의 대립형질이 C인 경우,

4) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822의 대립형질이 G인 경우,

5) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085의 대립형질이 G인 경우, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 판별하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 방법은

1) TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779의 대립형질이 T인 경우,

2) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766의 대립형질이 A인 경우,

3) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150의 대립형질이 C인 경우,

4) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723의 대립형질이 A인 경우,

5) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274의 대립형질이 T인 경우,

6) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188의 대립형질이 A인 경우,

7) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045의 대립형질이 A인 경우, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 판별하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 개체는 한국인 및 아시아인인 것인, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 RNF144A 유전자의 SNP를 포함하는, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물, 상기 SNP 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 뇌동맥류 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 뇌동맥류 진단용 키트, 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뇌동맥류란 뇌동맥의 일부에 결손이 생겨 그 부분이 돌출된 것을 말하며, 즉, 뇌혈관의 일부가 약한 경우에는 혈관벽이 늘어나 꽈리모양으로 불거져 나오는 것을 의미한다. 뇌동맥류의 원인으로는 선천적으로 대뇌동맥 분지부의 혈관벽이 약하기 때문이라고 생각해 왔지만, 최근에는 후천적으로 혈관벽에 가해지는 지속적인 스트레스가

뇌동맥류를 발생하는 것을 중요하게 생각하게 되었으며, 이 밖에도 흡연, 고혈압, 동맥경화, 직계 중에서 동맥류가 2명 이상 발견될 경우 등이 위험인자로 작용한다는 것이 밝혀졌다. 주로 뇌동맥류 파열은 자발성 지주막하 출혈이 원인 중 대부분을 차지한다. 뇌동맥류 진단 방법으로는 파열된 경우에는 뇌컴퓨터단층촬영(CT촬영), 뇌혈관조영술이 있고, 파열되지 않은 뇌동맥류의 진단으로는 자기공명혈관조영술(MRA)이 있다. 다만, 상기와 같은 방법은 번거로울 뿐만 아니라, 뇌동맥류가 발병하기 전이나 또는 예후를 예측하기에는 어렵다는 문제점이 있다.

[0004] 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)이란 염색체의 단일부위에서 여러 가지 DNA 염기들 중의 하나에 나타나는 일반적인 돌연변이로 인간의 게놈(genome)에는 약 3백만 개의 SNP가 존재한다. SNP는 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 분포되어 있고 이에 의하여 개인의 유전적 다양성이 발생한다. 이러한 SNP 차이는 서로 다른 질병에 대한 감수성의 차이를 만들어 낸다. 따라서 최근에는 SNP 정보를 바탕으로, 인간의 질병에 관여하는 적절한 유전자(질환 후보 유전자)들을 선정하고 이들의 변이형을 발굴하고 질환과의 연관성을 통계적으로 확인하는 과정을 포함하는 “질병 예측 유전자 검사 기술”이 개발되고 있다. 따라서, 단일염기다형성을 분석함으로써 사람의 경우 특정 질환에 대한 개인의 감수성을 파악하여 염기서열의 차이로 인해 발생하는 선천성 질병에 대한 예방 또는 발병한 질환의 치료에 도움이 될 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 뇌동맥류 발병 진단, 발병 위험 예측 및 예후 예측을 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 특정 유전자 상의 SNP 대립형질로부터 뇌동맥류를 진단 또는 예측할 수 있는 진단용 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0134203호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원의 제 1 측면은, RNF144A(Ring Finger Protein 144A) 유전자의 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)인 rs6741819을 포함하는, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본원의 제 2 측면은, RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 뇌동맥류 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본원의 제 3 측면은, 뇌동맥류 진단용 조성물을 포함하는, 뇌동맥류 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본원의 제 4 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819의 대립형질을 결정하는 단계를 포함하는, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 본원의 제 1 측면은, RNF144A(Ring Finger Protein 144A) 유전자의 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)인 rs6741819을 포함하는, 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0016] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "SNP(single nucleotide polymorphism)”는 단일염기다형성을 의미하며, 염색체의 단일부위에서 여러 가지 DNA 염기들 중의 하나에 나타나는 일반적인 돌연변이로 SNP는 그 빈도가 높고 안정하며 유전체 전체에 분포되어 있고 이에 의하여 개인의 유전적 다양성이 발생한다. 본원에서, 상기 “SNP 마커”는 “SNP”와 혼용되어 명명될 수 있다.

[0017] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "마커(marker)"는 바이오마커를 의미하며 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있다.

[0018] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "뇌동맥류(cerebral aneurysm 또는 brain aneurysm)"는 두개내 동맥류(Intracranial aneurysm. IA)로도 지칭되며, 뇌동맥 또는 뇌정맥의 벽의 약화가 혈관의 국소적 확장 또는 풍선 확장(ballooning)을 유발하는 뇌혈관 질환이다. 뇌동맥류의 일반적인 위치는 윌리스환(Circle of Willis)이라고 알려진, 뇌의 기부에 있는 동맥이다. 뇌동맥류의 약 85%가 윌리스환의 앞부분에서 발생하고, 뇌의 앞부분과 중간부분에 혈액을 공급하는 내부 경동맥 및 그들의 주요 분지를 포함한다. 뇌동맥류는 크기와 형태에 의해 분류된다. 소 동맥류(small aneurysm)는 15 mm 미만의 직경을 갖는다. 더 큰 동맥류(larger aneurysm)는 대형(large)(15 내지 25mm), 특대형(giant)(25 내지 50mm), 및 초특대형(super giant)(50mm 초과)으로 분류되는 동맥류를 포함한다. 낭형 동맥류(saccular aneurysm)는 낭형 돌출(saccular outpouching)을 갖는 동맥류이고, 뇌동맥류의 가장 흔한 형태이다. 딸기형 동맥류는 딸기를 닮은 목 또는 줄기를 갖는 낭형 동맥류이다. 방추형 동맥류(fusiform aneurysm)는 줄기가 없는 동맥류이다.

[0019] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물은 뇌동맥류 발병을 진단하거나, 뇌동맥류 발병 위험을 예측하거나 또는 뇌동맥류의 예후를 예측하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "진단"은, 특정 개인에 대하여 뇌동맥류가 이미 발병하였는지 여부를 판별하는 것을 의미한다.

[0021] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예측"은, 특정 개인에 대하여 뇌동맥류가 발병할 가능성이 있는지, 발병할 가능성이 있다면 뇌동맥류가 발병할 가능성이 불특정 다수인에 비하여 상대적으로 높은지 여부를 판별하는 것을 의미한다.

[0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819는 서열번호 9의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs6741819의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs6741819의 염기의 대립형질이 T이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 A인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs6741819가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.72)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0023] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "대립형질" 또는 "대립유전자"는 상동염색체의 동일한 유전자 좌위에 존재하는 한 유전자의 여러 유형을 의미한다. 대립유전자는 다형성을 나타내는데 사용되기도 하며, 예컨대, SNP는 두 종류 이상, 예를 들어 두 종류의 대립형질을 갖는다.

[0024] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물은 1) GBA(Glucocerebrosidase) 유전자의 SNP인 rs75822236, 2) TCF24(transcription factor 24) 유전자의 SNP인 rs112859779, 3) OLFML2A(Olfactomedin Like 2A) 유전자의 SNP인 rs79134766, 4) ARHGAP32(Rho GTPase Activating Protein 32) 유전자의 SNP인 rs371331393, 5) CD163L1(CD163 Molecule Like 1) 유전자의 SNP인 rs138525217, 6) CUL4A(cullin 4A) 유전자의 SNP인 rs74115822, 7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150, 8) LRRC3(Leucine rich repeat containing 3) 유전자의 SNP인 rs116969723, 9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274, 10) SPCS3(Signal Peptidase Complex Subunit 3) 유전자의 SNP인 rs17688188, 11) LINGO2(Leucine Rich Repeat And Ig Domain Containing 2) 유전자의 SNP인 rs56942085, 및 12) MINK1(misshapen/Nck-interacting kinase(NIK)-related kinase 1) 유전자의 SNP인 rs72835045으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 GBA(Glucocerebrosidase) 유전자의 SNP인 rs75822236는 서열번호 1의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs75822236의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs75822236의 염기의 대립형질이 C이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 G인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs75822236가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 1.00)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779는 서열번호 2의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs112859779의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs112859779의 염기의 대립형질이 C이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 G인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs112859779가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는

바(통계적 유의성 0.94)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0027] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766는 서열번호 3의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs79134766의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs79134766의 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs79134766가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.96)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0028] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393는 서열번호 4의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs371331393의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs371331393의 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs371331393가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 1.00)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0029] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217는 서열번호 5의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs138525217의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs138525217의 염기의 대립형질이 C이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 G인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs138525217가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 1.00)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822는 서열번호 6의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs74115822의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs74115822의 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs74115822가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.80)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0031] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150는 서열번호 7의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs75861150의 염기의 대립형질은 T 또는 C일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs75861150의 염기의 대립형질이 C이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 G인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs75861150가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 1.00)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723는 서열번호 8의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs116969723의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs116969723의 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs116969723가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.81)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274는 서열번호 10의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs59626274의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs59626274의 염기의 대립형질이 T이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 A인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs59626274가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.71)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0034] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188는 서열번호 11의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs17688188의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs17688188의 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전

장유전체 연관 분석 결과 rs17688188가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.73)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0035] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085는 서열번호 12의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs56942085의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs56942085의 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs56942085가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.78)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0036] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045는 서열번호 13의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs72835045의 염기의 대립형질은 G 또는 A일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 rs72835045의 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측할 수 있다. 본원의 일 실시예에 따르면, 전장유전체 연관 분석 결과 rs72835045가 뇌동맥류 진단에 있어서 높은 통계적 유의성을 갖는 것을 확인하였는 바(통계적 유의성 0.79)(표 2), 상기 SNP를 이용하면 효율적으로 뇌동맥류를 진단할 수 있다.

[0037] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물은 LOX(lysyl oxidase) 유전자 중의 서열번호 14의 서열의 205번째 염기(rs2303656)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 서열의 488번째 염기(rs3900446)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 서열의 678번째 염기(rs763497)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 및 이들의 조합을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 14의 205번째 염기의 대립형질이 T이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 A인 경우가 상기 서열번호 14의 205번째 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우보다 뇌동맥류의 발병 위험이 낮다고 예측할 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 15의 488번째 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우가 상기 서열번호 15의 488번째 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우보다 뇌동맥류의 발병 위험이 높다고 예측하거나 뇌동맥류의 발병을 진단할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 15의 678번째 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우가 상기 서열번호 15의 678번째 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우보다 뇌동맥류의 발병 위험이 높다고 예측하거나 뇌동맥류의 발병을 진단할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 15의 488번째 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C이고, 상기 서열번호 15의 678번째 염기의 대립형질이 G이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 C인 경우가 상기 서열번호 15의 488번째 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T이고, 상기 서열번호 15의 678번째 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우보다 뇌동맥류의 발병 위험이 높다고 예측하거나 뇌동맥류의 발병을 진단할 수 있다.

[0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물은 SOX17(SRY-box 17) 유전자 중의 서열번호 38의 서열의 326번째 염기(rs1072737)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 서열번호 38의 326번째 염기의 대립형질이 C이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 G인 경우가 상기 서열번호 38의 326번째 염기의 대립형질이 A이거나 그의 상보적인 염기의 대립형질이 T인 경우보다 뇌동맥류의 발병 위험이 높다고 예측할 수 있다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따른 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물에 포함되는 SNP의 유전적 정보는 공지의 데이터 베이스에서 얻을 수 있으며, 그 예로 미국 국립생물정보센터 (National Center for Biotechnology Information; NCBI)의 GenBank 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물은 한국인 및 아시아인을 대상으로 뇌동맥류를 진단하는 데에 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본원의 일 실시예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물에 포함되는 SNP는 전장유전체 관련분석을

통해 개발된 것으로서, 상기 SNP의 대립형질을 확인함으로써, 뇌동맥류를 간단하고 효율적으로 진단할 수 있다.

[0047] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "전장유전체 관련분석(Genome-wide association study; GWAS)"은 약 50만-200만개 단일염기다형성의 유전자형을 탐색하여 질병과의 연관성을 통계적으로 분석하는 방법을 일컫는 것으로서, 일본 이화학연구소의 Ozaki(2002) 그룹에서 최초로 시도된 연구 방법이다. 구체적으로, GWAS 연구는 환자와 건강한 사람의 DNA 또는 SNP를 비교 분석하는 방식으로 진행되며, 만약 질병을 갖고 있는 사람에게서 유전적 변이가 더 많이 발견된다면, 연구자들은 이 변이가 앓고 있는 질병과 '연관이 있다'고 본다. 현재, HapMap 프로젝트의 완성 및 마이크로어레이 기술의 급속한 발전으로, 유전자 다형성에 관한 전장유전체 스캔이 일상적인 작업이 되었고, 수백의 전장유전체 연관 분석이 성공적으로 수행되어, 심혈관 질환, 당뇨 등의 통상적인 질병과 관련된 다수의 공지되거나 신규한 유전자 변이체의 발견을 이끌고 있다. 또한, 이러한 기술은 다양한 질환의 진단과 관련된 유전자 다형성 식별에 대한 강력한 수단을 제공하고 있다.

[0049] 본원의 제 2 측면은, RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, 뇌동맥류 진단용 조성물을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 뇌동맥류 진단용 조성물에도 공히 적용된다.

[0050] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 조성물은 1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236, 2) TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779, 3) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766, 4) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393, 5) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217, 6) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822, 7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150, 8) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723, 9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274, 10) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188, 11) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085, 및 12) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "SNP를 검출할 수 있는 제제"는 상기 SNP 마커 조성물에 포함된 SNP 마커 또는 SNP에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나 상기 SNP를 검출하여 증폭시킬 수 있는 제제를 의미하고, "SNP 마커를 증폭할 수 있는 제제"는 상기 SNP 마커 조성물에 포함된 SNP 마커 또는 SNP의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 제제를 의미하며, 예를 들어 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 상기 SNP 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 상기 프라이머 서열은 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 상기 SNP를 포함하는 폴리뉴클레오티드와 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

[0053] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프라이머"는, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 이때, PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0054] 상기 SNP 검출에 사용되는 프로브는 혼성화 프로브를 의미하는 것일 수 있으며, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 혼성화 조건은 대립형질 간의 혼성화 강도에 있어서 유의한 차이를 보여 대립형질 중 하나에만 혼성화되도록 충분히 엄격해야 한다. 이러한 본 발명의 프로브는 중앙 부위가 다형성 서열의 다형성 부위와 정렬하는 것이 바람직하다. 이에 따라 서로 다른 대립형질성 형태 간에 좋은 혼성화 차이를 유발할 수 있다. 상기 프로브는 대립형질을 검출하여 뇌동맥류를 진단하기 위한 마이크로어레이 등의 키트나 예측 방법 등에 사용될 수 있다. 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지될 수 있으며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0055] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르,포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0056] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819는 서열번호 9의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 rs6741819의 염기의 대립형질은 C 또는 T일 수 있다.

[0057] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 조성물은 LOX(lysyl oxidase) 유전자 중의 서열번호 14의 서열의 205번째 염기(rs2303656)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 서열의 488번째 염기(rs3900446)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 서열번호 15의 서열의 678번째 염기(rs763497)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드, 및 이들의 조합을 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 조성물은 SOX17(SRY-box 17) 유전자 중의 서열번호 38의 서열의 326번째 염기(rs1072737)를 포함하는 10개 이상의 연속 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적 폴리뉴클레오티드를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본원의 제 3 측면은, 상기 뇌동맥류 진단용 조성물을 포함하는, 뇌동맥류 진단용 키트를 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제2측면의 뇌동맥류 진단용 키트에도 공히 적용된다.

[0061] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 PCR 키트, RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 본원의 SNP, 폴리뉴클레오티드, cDNA 등뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 PCT 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 SNP 에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0064] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 DNA 칩 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 SNP에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0065] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단용 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, RT-PCR 키트는, 상기 SNP에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0067] 본원의 제 4 측면은, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819의 대립형질을 결정하는 단계를 포함하는, 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에도 공히 적용된다.

[0068] 본원의 일 구현예에 따르면, 본원의 뇌동맥류 진단은 뇌동맥류 발병을 진단하거나, 뇌동맥류 발병 위험을 예측하거나 또는 뇌동맥류의 예후를 진단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"는 뇌동맥류가 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류

등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "시료"는 뇌동맥류가 발병되거나 발병될 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 SNP의 염기 정보를 확인할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체는 인간일 수 있으며, 구체적으로 한국인 또는 아시아인일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 개체의 위험 예측 또는 진단을 수행하기 위해, 비유전적(non-genetic) 정보를 분석하는 단계를 더 포함하고, 상기 비유전적 정보는 성별, 연령, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 흡연, 동맥류의 가족력, 생화학적 척도 및 임상적 척도로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0073] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 정보 제공 방법에서 SNP의 염기를 결정하는 단계는 SNP의 유전자형을 확인하는 단계를 의미하는 것일 수 있다. SNP의 유전자형을 확인하는 단계는, 시퀀싱 분석, 예를 들어, 자동염기서열 분석기를 사용한 시퀀싱 분석, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 마이크로어레이에 의한 혼성화, PCR-RELP(restriction fragment length polymorphism)법, PCR-SSCP(single strand conformation polymorphism)법, PCR-SSO(specific sequence oligonucleotide)법, PCR-SSO법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, MALDI-TOF/MS법, RCA(rolling circle amplification)법, HRM(high resolution melting)법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 등의 방법에 의하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 본원의 정보 제공 방법에서 SNP의 염기를 결정하는 단계는, 예를 들어, 대상으로부터 얻은 시료로부터 분리한 핵산으로부터 SNP 부위를 포함하는 염기서열을 시퀀싱(sequencing)하고, SNP의 대립형질을 직접적으로 확인함으로써 수행될 수 있다. 염기서열의 시퀀싱은 당 업계에 공지된 방법을 통하여 수행될 수 있다. 예를들어, 염기서열의 시퀀싱은 개체로부터 얻은 시료로부터 분리한 핵산을 주형으로 하고, 각 SNP 부위를 포함하는 유전자 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하는 단계, 및 상기 PCR 반응물을 제한효소 절단방법으로 그 서열을 확인하는 단계를 순차적으로 수행함으로써 이뤄질 수 있다.

[0074] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819는 서열번호 9의 26번째 뉴클레오타이드를 포함하는 것일 수 있고, 상기 rs6741819의 대립형질이 T인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0075] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236, 2) TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779, 3) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766, 4) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393, 5) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217, 6) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822, 7) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150, 8) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723, 9) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274, 10) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188, 11) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085, 및 12) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 SNP의 대립형질을 결정하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0076] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법은 1) GBA 유전자의 SNP인 rs75822236의 대립형질이 C인 경우, 2) ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393의 대립형질이 G인 경우, 3) CD163L1 유전자의 SNP인 rs138525217의 대립형질이 C인 경우, 4) CUL4A 유전자의 SNP인 rs74115822의 대립형질이 G인 경우, 5) LINGO2 유전자의 SNP인 rs56942085의 대립형질이 G인 경우, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 경우, 뇌동맥류가 발병한 것으로 진단하거나 발병 위험을 높은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0077] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법은 1) TCF24 유전자의 SNP인 rs112859779의 대립형질이 T인 경우, 2) OLFML2A 유전자의 SNP인 rs79134766의 대립형질이 A인 경우, 3) LOC102724084 유전자의 SNP인 rs75861150의 대립형질이 C인 경우, 4) LRRC3 유전자의 SNP인 rs116969723의 대립형질이 A인 경우, 5) FLJ45964 유전자의 SNP인 rs59626274의 대립형질이 T인 경우, 6) SPCS3 유전자의 SNP인 rs17688188의 대립형질이 A인 경우, 7) MINK1 유전자의 SNP인 rs72835045의 대립형질이 A인 경우, 또는 이들 중 둘 이상의 조합인 경우, 뇌동맥류가 발병하지 않은 것으로 진단하거나 발병 위험을 낮은 수준으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0078] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, LOX 유전자 중의 서열번호 14의 서열의 205번째 염기(rs2303656), 서열번호 15의 서열의 488번째 염기(rs3900446), 서열번호 15의 서열의 678번째 염기(rs763497) 및 이들의 조합의 대립형질을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0079] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법은 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, SOX17 유전자 중의 서열번호 38의 서열의 326번째 염기(rs1072737)의 대립형질을 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0080] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에서상기 SNP 다형성의 결과들은 당업계에서 일반적으로 사용되는 통계학적 분석 방법을 이용하여 통계처리 할 수 있으며, 예를 들어, 스튜던트 t-검정(Student's t-test), 카이-스퀘어 검정(Chi-square test), 선형 회귀선 분석(linear regression line analysis), 다변량 로지스틱 회귀분석(multiple logistic regression analysis), 메타 분석(meta-analysis) 등을 통해 얻은 연속 변수(continuous variables), 절대 변수 (categorical variables), 대응비(odds ratio, OR) 및 95% 신뢰구간(confidence interval, CI) 등의 변수를 이용하여 분석할 수 있다.

발명의 효과

[0082] 본 발명의 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 조성물, 뇌동맥류 진단용 조성물, 뇌동맥류 진단용 키트 및 뇌동맥류 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, RNF144A 유전자 상의 단일염기다형성(SNP)을 한국인 또는 아시아인에서 뇌동맥류의 발병 위험 예측 또는 진단을 위한 마커로서 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0084] **<1. 13개의 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 개발>**

도 1은 GBA 유전자의 SNP를 이용한 뇌동맥류 진단 과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 GWAS 결과를 맨하탄 플롯으로 나타낸 도면이다. 빨간선은 전장유전체 유의적 임계적 (P-value= 5 x 10-8)을 표시하는 것이다.

도 3은 ARHGAP32 유전자의 SNP인 rs371331393 변이체의 위치 ± 500kb에 대한 지역 플랏(regional plot)을 나타내는 도면으로서, 상기 도면은 250명의 뇌동맥류 환자 및 294명의 대조군(연령, 성별, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연 및 4가지 주요 요소를 조정)에서의 rs371331393와 뇌동맥류와의 연관성을 나타낸다. X축은 염색체 위치(Mb)를 나타내고, Y축은 P-값을 $-\log_{10}$로 변환한 수치를 나타낸다. 보라색 마름모는 본원의 GWAS에서 가장 유의미한 연관성을 나타내는 rs371331393 변이체를 나타내며($P = 9.3 \times 10^{-27}$), 회색원은 rs371331393 변이체의 500kb 내의 다른 SNP를 나타낸다.

도 4의 A는 RNF144A 유전자의 SNP인 rs6741819 변이체의 위치(± 500kb)에 대한 지역 플랏(regional plot)을 나타내는 도면으로서, 상기 도면은 250명의 뇌동맥류 환자 및 294명의 대조군(연령, 성별, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연 및 4가지 주요 요소를 조정)에서의 rs6741819와 뇌동맥류와의 연관성을 나타낸다. X축은 염색체 위치(Mb)를 나타내고, Y축은 P-값을 $-\log_{10}$로 변환한 수치를 나타낸다. 보라색 마름모는 본원의 GWAS에서의 rs6741819 변이체를 나타내며($P = 4.0 \times 10^{-14}$), 회색원은 rs6741819 변이체의 500kb 내의 다른 SNP를 나타낸다.

도 4의 B는 단일-세포 eQTL을 이용하여 부신 조직(n=175)에서의 rs6741819 변이체의 발현수준을 나타낸 도면이다. X 축은 유전자형을 나타내고, Y 축은 순위-표준화된 유전자 발현 수준을 나타낸다. 상기 변이체 유전자형의 참조형(Ref)/대립형(Alt) 대립형질은 메이저/마이너 대립형질과 동일하다.

도 4의 C는 TMOD1 유전자의 SNP인 rs1052270 변이체의 위치(± 500kb)에 대한 지역 플랏(regional plot)을 나타내는 도면으로서, 상기 도면은 250명의 뇌동맥류 환자 및 294명의 대조군(연령, 성별, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연 및 4가지 주요 요소를 조정)에서의 rs1052270와 뇌동맥류와의 연관성을 나타낸다. X축은 염색체 위치(Mb)를 나타내고, Y축은 P-값을 $-\log_{10}$로 변환한 수치를 나타낸다. 보라색 마름모는 본원의 GWAS에서의 rs1052270 변이체를 나타내며($P = 4.0 \times 10^{-14}$), 회색원은 rs1052270 변이체의 500kb 내의 다른 SNP를 나타낸다.

도 4의 D는 단일-세포 eQTL을 이용하여 고환 조직(n=225)에서의 rs1052270 변이체의 발현수준을 나타낸 도면이다. X 축은 유전자형을 나타내고, Y 축은 순위-표준화된 유전자 발현 수준을 나타낸다. 상기 변이체 유전자형의

참조형(Ref)/대립형(Alt) 대립형질은 메이저/마이너 대립형질과 동일하다.

도 5의 A는 EDNRA 유전자의 SNP인 rs6841581 변이체의 위치(± 500kb)에 대한 지역 플랏(regional plot)을 나타내는 도면으로서, 상기 도면은 250명의 뇌동맥류 환자 및 294명의 대조군(연령, 성별, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연 및 4가지 주요 요소를 조정)에서의 rs6741819와 뇌동맥류와의 연관성을 나타낸다. X축은 염색체 위치(Mb)를 나타내고, Y축은 P-값을 $-\log_{10}$로 변환한 수치를 나타낸다. 보라색 마름모는 본원의 GWAS에서의 rs6841581 변이체를 나타내며($P = 4.0 \times 10^{-14}$), 회색원은 rs6841581 변이체의 500kb 내의 다른 SNP를 나타낸다.

도 5의 B 및 C는 단일-세포 eQTL을 이용하여 식도(점막)(B) (358개 샘플, effect size = 0.38, p = 5.2×10^{-12}) 및 햇빛에 노출되지 않은 피부(치골상부)(C) (335개 샘플, effect size = 0.21, p = 1.2×10^{-6})에서의 rs6841581 변이체의 발현수준을 나타낸 도면이다. X 축은 유전자형을 나타내고, Y 축은 순위-표준화된 유전자 발현 수준을 나타낸다. 상기 변이체 유전자형의 참조형(Ref)/대립형(Alt) 대립형질은 메이저/마이너 대립형질과 동일하다.

<2. LOX(Lysyl oxidase) 유전자의 SNP 이용한 뇌동맥류 진단>

도 6은 실시예 4에서의 뇌동맥류와 10개의 SNP와의 연관성 분석 결과를 나타낸다.

도 7은 실시예 4에서의 뇌동맥류와 10개의 SNP의 일배체형 연관성 분석 결과를 나타낸다.

<3. SOX17(SRY-box 17) 유전자의 SNP 이용한 뇌동맥류 진단>

도 8은 실시예 4에서의 뇌동맥류와 4개의 SNP와의 연관성 분석 결과를 나타낸다.

도 9는 실시예 4에서의 뇌동맥류 파열과 4개의 SNP의 연관성 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0087] **<1. 13개의 뇌동맥류 진단용 SNP 마커 개발>**

[0089] **실시예 1: 실험군 및 대조군 수집**

[0091] 본 발명을 수행하기 위한 코호트(cohort)는 춘천 성심병원 뇌졸중 데이터베이스(2015-2018)로부터 유래되었으며, 데이터베이스 수집을 위해, 출혈성 또는 허혈성 뇌졸중과 일치하는 임상적 진단 및 신경영상을 나타내는 환자를 모집했으며, GWAS 연구에서, 낭형(saccular) 및 산발성(sporadic) 뇌동맥류를 갖는 18세 이상의 환자를 분석하였다. 또한, 추형, 해부학, 외상성, 및 전염성 동맥류, 및 가족성 동맥류와 같은, 비낭형 동맥류는 제외하였다.

[0092] 대조군은 다음과 같은 기준을 만족시켰다: 1) 두통 진단 또는 건강 검진을 위해 전산화 단층 촬영 또는 자기 공명 혈관 조영술을 받은 환자, 2) 뇌동정맥기형, 두개내 출혈 또는 경색과 같은 신경질환이 수반되지 않음, 3) 가까운 친척에게서 뇌동맥류 또는 지주막하 출혈에 대한 가족력이 없음, 4) 파킨슨병 또는 알츠하이머병이 없음, 및 5) 18세 이상.

[0093] 또한, 성별, 연령, 비파열 뇌동맥류 또는 지주막하 출혈과 같은 임상 증상, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 흡연, 동맥류의 가족력 등 여러 변수를 고려하여 의료 기록을 검토하였으며, 동맥류의 크기, 위치(전방 순환 또는 후방 순환), 및 수(단수 또는 복수)에 대한 혈관조영 변수를 검토하였다. 본 연구는 춘천 성심 병원의 임상 시험 위원회에 의해 승인되었다(No. 2016-3, 2017-9).

[0095] **실시예 2: 유전자형 분석(Genotyping) 및 샘플 품질 관리(sample quality control)**

[0097] 게놈 DNA는 HiGeneTM Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT, 대전, 한국)를 이용하여 실험군 및 대조군의 말초혈액으로부터 수득하였다. 상기 샘플들의 유전자형 분석을 위해, 인간 게놈 version 19(build 37)을 기반으로 하고, 동남아시아 인구를 포괄하며, 5만개의 신규한 마커를 포함하는 75만개 SNP가 포함된 AxiomTM Asia Precision Medicine Research Array (PMRA) 키트 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 사용하였다. 작은 삽입/결실(indels)를 포함하는 798,148개의 변이 중 508,192개의 변이가 다음 기준의 품질 평가 검정을 통과하였고(유전자형 call rate = 95%, 마이너 대립유전자 빈도(MAF) = 0.01, 및 하디-바인버그 평형(HWE) p-값 = 1×10^{-6}), 통

과된 변이를 이용하여 GWAS를 수행하였다.

[0099] **실시예 3: 통계적 분석**

[0101] 기술적 분석(Descriptive analysis)은 개별형 및 범주형 변수의 주체수(백분율)를 사용하여 표시되며, 평균은 표준 오류로 표시된다. 본 발명에서는 2가지 누락된 값을 제거한 후에, 250명의 뇌동맥류 환자 및 294명의 대조군에 대해 7개의 교란 인자(성별, 나이, 고혈압, 당뇨, 고질혈증, 흡연 및 4개의 주요 요인)를 갖는 다변량 기호 논리학 해석(multivariate logistic analysis)을 수행하였으며, 상기 분석은 STATA v11.2 (Stata Corp., TX, USA)을 이용하여 수행하였다. 또한 전장유전체 관련 분석은 상기 7개의 교란 인자를 조정한 후, 추가 유적적 효과 모델 하에서 뇌동맥류 감수성에 대한 후보 유전 변이를 확인하기 위해 수행하였으며, PLINK 1.9 프로그램(https://www.cog-genomics.org/plink/1.9/)을 이용하였다.

[0102] 또한, GWAS에서의 잠재적인 유전적 신뢰성을 평가하기 위한 통계적 유의성(statistics power)을 산정하기 위해, 하기와 같은 가정에 근거하여, Genetic Power Calculator (http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/)을 사용하였다: 5% 확률의 뇌동맥류 발병; 부가적 효과 모델(additive effect model)에서의 오즈비(odds-ratio, OR); D-prime 0.8; 1:1.18의 실험군-대조군 비율; 및 5×10^{-8}(전장유전체 유의 수준)의 타입 1 에러 비율.

[0103] 추가적으로, 차후의 분석에서 151명의 지주막하출혈 및 99명의 비파열성 뇌동맥류 환자 사이의 유전적 연관성을 평가하였으며, GWAS에서 전장유전체의 연관성을 나타내는 개별 변이체의 발현 수준에 대한 유전적 영향을 평가하기 위해, Genotype-Tissue Expression (GTEx v7) (https://gtexportal.org/home/)을 이용하여 단일 조직 발현 양적형질 유전자좌(expression quantitative trait loci, eQTL)를 분석하였다. 맨하탄 플롯(Manhattan plot) 및 지역 관련 플롯(regional association plot)은 각각 R 패키지 v3.4.0의 "*qqman*" 명령어(https://cran.r-project.org/web/packages/qqman) 및 LocusZoom v1.3 (http://locuszoom.org/)을 이용하였다.

[0105] **실험예 1: 실험군 및 대조군의 구체적 특성 확인**

[0107] 실시예 1에 기재된 기준으로 환자(실험군) 및 대조군(비환자)을 분류하였으며, 이의 특성은 하기 표 1에 기재되어 있다. 구체적으로, 546명 중, 250명은 뇌동맥류(intracranial aneurysm, IA) 환자로 분류되었고, 나머지 296명은 비환자(대조군)로 분류되었다. 상기 두 그룹간에 성별, 고혈압(Hypertension, HTN), 당뇨병(Diabetes mellitus, DM), 고지혈증(hyperlipidemia) 및 흡연에 따른 통계적 차이는 없었고, 대조군은 뇌동맥류 환자보다 젊었다($p < 0.001$). 상기 뇌동맥류 환자 중 지주막하 출혈(subarachnoid hemorrhage, SAH) 및 비파열성 뇌동맥류(unruptured intracranial aneurysm, UIA)가 발생한 환자는 각각 151명(60.4%) 및 99명(39.6%)였다. 또한, 뇌동맥류 환자 중 대부분은 전방순환동맥류(Anterior-circulation aneurysms)였고(n=221, 88.4%), 상기 전방순환동맥류는 중대뇌동맥(middle cerebral artery)(n=71), 전교통동맥(anterior communicating artery) 또는 전대뇌동맥(anterior cerebral artery) (n=50), 내경동맥(internal carotid artery)(n=38) 및 후교통동맥(posterior communicating artery)(n=53)으로 나타났다.

표 1

[0109]

변수[a]	실험군 (n = 250)	대조군 (n = 296)	P[b]
여성, 명(%)	146 (58.4)	154 (52.0)	0.74
연령, 세	59.3±0.8	52.1±1.0	< 0.001
고혈압(Hypertension), 명(%)	93 (37.2)	88 (29.7)	0.865
당뇨(Diabetes mellitus), 명(%)	17 (6.8)	37 (12.5)	0.001
고지혈증(Hyperlipidemia), 명(%)	29 (11.6)	27 (9.1)	0.476
흡연(Cigarette smoking), 명(%)	26 (10.4)	37 (12.5)	0.615
주요 요소(Principal components), 평균[c]			
주요 요소 1	0.0014	-0.0012	0.169
주요 요소 2	-0.0002	0.0001	0.656
주요 요소 3	-0.0010	0.0008	0.039
주요 요소 4	-0.0011	0.0009	0.031
파열 상태(Rupture status), N (%)			
비파열성 뇌동맥류(UIA)	99 (39.6)	-	-
지주막하 출혈(SAH)	151 (60.4)	-	-

[0110] * a: 표의 데이터는 환자의 수(%) 및 평균 ± 표준오차로 표현함

[0111] * b: P 값은 다변량 논리학적 회귀 모델에서 평가됨.

[0112] * c: 주요 요소는 4개의 클러스터로 주요 요소 분석을 수행하여 추정됨.

[0114] **실험예 2: 전장유전체 연관분석(GWAS) 결과 분석**

[0116] 뇌동맥류 발병과 관련된 SNP 마커를 발굴하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0117] 먼저, 상기 실험예 1에서 확인한 실험군 및 대조군에서 교란 요인(나이, 성별, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 흡연) 및 4가지 주요 요소(principal components)를 조정한 후, 전장유전체 연관분석(genome-wide association study, GWAS)을 통해, p-값이 $1X10^{-5}$ 미만의 암시적 연관성을 나타내는, 총 315개의 SNP(indel 포함)를 선별하였다(도 2).

[0118] 다음으로, 상기의 315개의 SNP 중 pairwise 연관불균형(linkage disequilibrium)이 0.8 미만인 SNP를 제거하였고, 전장유전체 유의적 임계적(genome-wide significance threshold)인 5×10^{-8} 미만의 p-값을 나타내는 총 29개의 SNP를 선별하였다. 선별된 SNP의 구체적인 내용은 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

유전자	염색체.	SNP	클래스(class)	M/m[a]	MAF[b]	OR[c]	L95[c]	U95[c]	P[c]	통계적 유의성[d]
PRDM2	1p36.21	rs61775135	intron	C/A	0.16/0.41	0.32	0.23	0.43	3.6E-13	0.42
GBA	1q22	rs75822236	R535H	C/T	0.33/0.01	161.40	53.86	483.60	1.1E-19	1.00
FMO4	1q24.3	rs3737926	F281F	C/T	0.16/0.37	0.36	0.27	0.50	1.8E-10	0.32
RNF144A	2p25.1	rs6741819	intron	C/T	0.13/0.37	0.25	0.18	0.36	4.0E-14	0.72
FLJ45964	2q37.3	rs59626274	stop-gained	C/T	0.13/0.36	0.26	0.18	0.37	5.8E-14	0.71
LINC01237	2q37.3	rs78458145	intron	G/A	0.17/0.4	0.24	0.17	0.35	3.1E-15	0.68
SPCS3	4q34.2	rs17688188	intergenic	G/A	0.11/0.33	0.27	0.19	0.38	6.0E-13	0.73
TCF24	8q13.1	rs112859779	G141S	C/T	0.1/0.33	0.19	0.12	0.28	3.3E-16	0.94
C9orf92	9p22.3	rs12350582	intergenic	A/G	0.33/0.18	2.43	1.79	3.31	1.5E-08	0.20
LINGO2	9p21.1	rs56942085	intron	G/A	0.1/0.03	6.11	3.20	11.64	3.9E-08	0.78
TMOD1	9q22.33	rs1052270	intron	C/T	0.27/0.42	0.41	0.30	0.56	2.7E-08	0.15
SUSD1	9q31.3	rs79461840	intron	T/C	0.13/0.02	6.92	3.55	13.49	1.4E-08	0.65
LINC00474	9q33.1	rs4979583	intergenic	C/T	0.41/0.24	2.45	1.82	3.31	4.6E-09	0.24
OLFML2A	9q33.3	rs79134766	A208T	G/A	0.07/0.37	0.14	0.09	0.21	1.7E-19	0.96
MTEOV	11q13.3	rs76855873	intron	C/T	0.16/0.37	0.33	0.24	0.46	1.2E-11	0.43
ARHGAP32	11q24.3	rs371331393	stop-gained	G/A	0.32/0.02	43.57	21.84	86.95	9.3E-27	1.00
CD163L1	12p13.31	rs138525217	splice-site	C/T	0.31/0.01	75.98	32.13	179.70	6.2E-23	1.00
SLC2A14	12p13.31	rs118107419	intron	C/A	0.14/0.39	0.25	0.17	0.35	1.4E-14	0.67
DRAM1	12q23.2	rs7964241[e]	intergenic	A/G	0.35/0.21	2.49	1.81	3.42	2.0E-08	0.25
CUL4A	13q34	rs74115822	intergenic	G/A	0.19/0.03	6.25	3.58	10.90	1.1E-10	0.80
LINC02130	16p13.12	rs11646803	intron	C/T	0.28/0.48	0.45	0.35	0.58	4.8E-10	0.06
LOC102724084	16q23.2	rs75861150	intron	T/C	0.02/0.16	0.14	0.07	0.28	1.3E-08	1.00
SCARF1	17p13.3	rs3744644	E639D	G/C	0.18/0.35	0.39	0.28	0.54	6.0E-09	0.26
MINK1	17p13.2	rs72835045	intron	G/A	0.11/0.33	0.25	0.17	0.37	1.7E-12	0.79
SLC47A1	17p11.2	rs2440154[e]	intron	G/A	0.28/0.13	2.67	1.90	3.75	1.4E-08	0.26
NAPA-AS1	19q13.32	rs55800589	intron	G/C	0.32/0.4	0.38	0.29	0.49	3.4E-13	0.23
DSCAM	21q22.2	rs727333	intron	C/A	0.14/0.38	0.26	0.18	0.36	3.7E-14	0.69
LRRC3	21q22.3	rs116969723	P63P	G/A	0.11/0.35	0.24	0.16	0.34	3.8E-15	0.81
SLC5A4-AS1	22q12.3	rs117398778	intron	T/C	0.21/0.07	3.74	2.43	5.75	2.0E-09	0.56

[0120]

[0121] * L95, lower 95% confidence interval; OR, odds ratio; U95, upper 95% confidence interval.

[0122] * a: M/m, 주 대립형질(major allele type)/부 대립형질(minor allele type)

[0123] * b: MAF, 실험군(왼쪽) 및 대조군(오른쪽)의 대립유전자형빈도(minor allele frequency)

[0124] * c: OR, 95% 신뢰구간 및 P-값은 연령, 성별, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증, 흡연 및 4가지 주요 요소를 보정한 후, 다변량 논리학적 회귀 분석에서 추정됨.

[0125] * d: 각 SNP의 통계적 유의성(power)은 웹-기반의 Genetic Power Calculator (http://zzz.bwh.harvard.edu/gpc/cc2.html)을 이용하여 추정되었고, 하기의 파라미터를 사용하였다: 5% 확률의 뇌동맥류 발병, 대조군에서의 MAF, 부가적 효과 모델에서의 OR, D-prime 0.8; 1:1.18의 실험군-대조군 비율(대조군 296명/실험군 250명 = 1.18), 및 5×10^{-8}(전장유전체 유의 수준)의 타입 1 에러 비율.

[0126] * e: pairwise 연관 불균형(LD, r^2 < 0.8)에서 나타난 1개의 SNP: rs7964241 및 rs56168082 (r^2 =0.81); rs2440154 및 rs2289668 (r^2 = 1.0)

[0128] 구체적으로, *ARHGAP32* (11q24.3) 상에 위치하는 rs3713331393가 뇌동맥류 형성에 있어서 가장 유의미한 연관성을 나타냈으며(OR = 43.57, 95% 신뢰구간 21.84-86.95; p = 9.3×10^{-27}) (도 3), *GBA* 유전자 상에 위치하는 rs75822236 SNP 또한 뇌동맥류 형성에 있어서 유의미한 연관성을 나타냈으며(OR = 161.46, 95% CI 53.86-483.60; p = 1.1×10^{-19}), 상기 변이의 경우, 대조군에서의 "T" 대립형질은 뇌동맥류 환자에서의 "C" 대립형질에 비해 희귀했다(MAF = 0.01 vs 0.33). 또한, *CD163L1* 유전자 3' 비번역 부위(untranslated region, UTR) 상에 위치한 rs138525217 SNP에서의 "T" 대립형질은 드물게 나타나며, 큰 효과 크기(effect size)를 보여준다(MAF 실험군/대조군 = 0.31/0.01, OR = 75.98; p = 6.2×10^{-23}).

[0130] 또한, 추가적으로 4개의 SNP[rs75822236 (R535H, *GBA*, 1q22), rs112859779 (G141S, *TCF24*, 8q13.1), rs79134766 (A208T, *OLFML2A*, 9q33.3), rs3744644 (E639D, *SCARF1*, 17p13.3)] 및 추가적인 넌센스 SNP인 rs59626274 (stop-gained, *FLJ45964*, 2q37.3)은 서열상에 암호화된 단백질과 잠재적인 직접적 연관성이 있음을

확인하였다.

[0132] 결론적으로, 뇌동맥류 발병과 관련하여, *GBA*, *TCF24*, *OLFML2A*, *ARHGAP32*, *CD163L1*, *CUL4A*, *LOC102724084*, 및 *LRRC3* 유전자 상에 위치한 SNP는 0.8 이상의 통계적 유의성을 나타내며, *RNF144A*, *FLJ45964 SPCS3*, *LINGO2*, *MINK1* 유전자 상에 위치하는 SNP는 0.7 내지 0.8의 통계적 유의성을 나타내는 바, 상기 13개의 SNP를 이용하여 뇌동맥류의 발병 위험을 예측하거나 발병 여부를 진단하는 데 유용하게 이용할 수 있다.

[0134] **실험예 3: 단일-세포 eQTL 분석**

[0136] 상기 실험예 2에서 선별한 SNP 마커의 조직에서의 발현여부를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0137] 구체적으로, 45개의 인간 조직으로부터 얻은 70개 이상의 샘플을 이용한 단일-세포 eQTL(single-cell eQTL) 분석에서, 3개의 SNP가 발현상의 유의미한 차이를 나타냈다($p < 1X10^{-5}$). 구체적으로, rs6741819 (*RNF144A*, 2p25.1; $p = 4.0X10^{-14}$)는 부신 조직에서 하향-조절되었고(175개 샘플, effect size = -0.36, $p = 1.5X10^{-6}$) (도 4A, B), rs1052270 (*TMOD1*. 9q22.33; $p = 2.7X10^{-8}$)는 고환 조직에서 상향-조절되었다(225개 샘플, effect size = 0.42, $p = 8.6X10^{-10}$) (도 4C, D).

[0138] 또한, rs6841581 (*EDNRA*, 4q31.22; $p = 6.5X10^{-4}$)는 식도(점막) (358개 샘플, effect size = 0.38, $p = 5.2X10^{-12}$) 및 햇빛에 노출되지 않은 피부(치골상부) (335개 샘플, effect size = 0.21, $p = 1.2X10^{-6}$) 모두에서 상향-조절되었다(도 5).

[0140] **<2. LOX(Lysyl oxidase) 유전자의 SNP 이용한 뇌동맥류 진단>**

[0142] **실시예 1. 연구 대상**

[0144] 단일 기관에서 방사선학적으로 낭형(saccular shape)을 갖는 것으로 확인된 뇌동맥류 환자군 80명과, 환자군의 환자의 나이 및 성별과 매칭된 대조군 80명을 모집하였다. 상기 뇌동맥류에서, 방추형 또는 해부학 비낭성 동맥류 및 외상성 또는 전염성 동맥류는 제외하였다. 대조군은, 동정맥 기형, 두개내 출혈 또는 경색 등과 같은 다른 신경계 질환을 제외한, 두통 진단 또는 건강 검진을 위해 전산화 단층 촬영 또는 자기 공명 혈관 조영술을 받은, 매칭된 환자들로 구성하였다. 성별, 연령, 비파열 뇌동맥류 또는 지주막하 출혈과 같은 임상 증상, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 흡연, 동맥류의 가족력 등 여러 변수를 고려하여 의료 기록을 검토하였다. 동맥류의 크기, 위치(전방 순환 또는 후방 순환), 및 수(단수 또는 복수)에 대한 혈관조영 변수를 검토하였다. 본 연구는 춘천성심 병원의 임상 시험 위원회에 의해 승인되었다(No. 2016-31).

[0145] 검토 결과, 뇌동맥류 환자군에서, 여성의 수는 43명(53.8%)이었고, 평균 연령은 57.1 ± 12.9세였다. 지주막하 출혈 증상은 41명(51.3%)의 환자에게서 나타났다. 동맥류 위치와 관련하여, 전방순환동맥류(n = 73, 91.3%)가 다음과 같이 기록되었다: 내경동맥, n = 15; 전교통동맥 또는 전대뇌동맥, n = 21; 중간대뇌동맥, n = 25; 및 후교통동맥, n = 12. 단일 동맥류가 있는 환자는 75명(93.8%)이었으며, 지주막하 출혈의 가족력이 없는 환자는 없었다. 두 군간에 고혈압, 당뇨, 고지혈증 및 흡연의 발생률은 유의하게 다르지 않았다.

[0147] **실시예 2. 단일염기 다형성 선택 및 검사**

[0149] LOX 유전자 상의 단일염기 다형성과 뇌동맥류 발병 가능성의 연관성을 조사하기 위하여, 대립형질에 대한 SNPinfo(https://snpinfo.niehs.nih.gov/)의 LD TAG SNP 셀렉션(TagSNP)로부터의 일본 및 중국(JPT+CHB) HapMap 데이터베이스(Phase II)에서 연관불균형(linkage disequilibrium, LD; $r^2 < 0.8$)을 적용한 후, LOX 유전자의 5'-상류와 3'-하류 사이에 위치한 10개의 태그(tag) SNP를 선택하였다(서열번호 14 내지 서열번호 21 참조).

표 3

[0151]

SNP	서열	서열 번호
rs2303656	5'-TACGCATGATGTCCTGTGTAGCGAATGTCACAGCGCACAACATTGTTGGTATAGTCAGATTCAGGAACCAGGTAGCT GGGGTTTACACTGACCTGGGCAACACAAAGAGTTCCTCAGTATTTCTTTTTCCATAGGGCTACAATAAGGAAATTGTTAA TGAGGACTTAGCTAAATCAAGCAGGGAAGGGATTTTAACTTAAGTAA[G/T]TGGTTAAACTCTGGAGACGTTATGGAAA GAGACTGCATATTTTCCCCTGAAGTTCTTTAAAATAAGACAGATTAGATTAGATTAGATTGTTTATAAATAGTTTGAGGA TGTATAATTGCTTCCAATACCATGATTATTTAACATTTGAATCCAGAGAAGAGGGCCTATTGATCTGCAATATCAATATA TGATATATTTTCAAAGGTCTTTACCTTTAGGATATAGTTTCCAGGTTTTACATCTGTAATATCAATCCACTGGCAGTCTA TGTCTGCACCATAGGTATCATAACAGCCAGG-3'	14
rs3900446[a] 및 rs763497[b]	5'-GAGCATGCAACCTAAATCCCTCATATGCACAGTTCACAATGGGGTTCACGCTCATATGAGAATCTAATGCCATGATTGAT CTGACAGGAAGCAAAGCTCAGGTGGTAATGTGAGGAAAGAGGATCTTGGTAAACATGCTATTGTAAGTTTAATGTCTCTA CTCCCCTTCCGAGAACCCCATGTCTCCTTACTGGGAAACTTCAAGTCAAATGGTTTTAGGATTTACTGACAGAGGTTACT TGCTAGTATGAATTTGAGAAATTCATGGGAGGTACCTCACCAGGAACCCAAAAAATGGAATTTTTGACGTGGGGAGTGTC TGTAAATACAGATGAAGCTTCACTTGCTGGCCCACTGCTCACCTCCTGCTGTGCAGCCCAGTTCCTAACAGGGATGGTAC TGGTCCGTGTCCTGGGGTTTGGGAACCACTGGTTTATTGAAAAGACATTCTGCTGGGTTGGTATGGAGCCCAAGTTATAT TTGGGTT[A/G][a]CACATTAGGGACTACTTCTTGTGATTTTGAGCCTAAATTATAATAAACTCTAGATATACACACCCTA TGCCTATCAGAATAGTAATGAAGGGGTAAATGGCCCCCAACACAAGTGGCAATGGTTTTTGGAATAATACCAAAAGCCAA CGAAATGTGATGGAGATTTACTGAAGCTAAGC[A/G][b]TTAATTTTGGGGATAGGATGTTCTCGATGTAGGCCTAGATGT ATGCAGCATCGTGTAAGGCTATCTATTAAAGAAGTCTAAAAAATTCACTTGTGATATTGAGTCATAAAGTTGGTTTTTAA TCCATTCTCAACAGACTCTCAATTT-3'	15
rs10040971	5'-TCTAGCTCAGGGCATCAACAAACAGTACAAAAATGAGAGTGCAAATGAATAAATAAATGGAGAATGGATGAATAAAT TAAGGAATTATAAAAATTAAGAAAAAACTAATCTGTTTATTTAAGTGCAAATTATTTTAGCTTAAATTATAATGGTGTTC TGGCGGTGGGGGTCGGGGGTTGGTTCTACTATAACCAACTCCACACAATATGGGCCATAAAACCTGCCAGGTTTTCTGTG CTGTGGGCATGTTCAGAAGAATGTATGTGACTCTGTTTTTTCAGTGCTATCCTTTTGCTATCACAGGCTTCATCTATCTC TAA[T]GTTGTGACAACACTTGTAAAGCACAGTCTCTGCTTCTTTATGTAGAAAGTCCTGGGTTTTTGTATCAGGCAGAA ATTTCTATTAATTATGAGATTCTAGTATAGCTCTGCTATACCTGTCTGTATGATCCAGTGGCACTGGTGGTTCTCCAGTG ACAAAGCAAAGCTGATGAGTGTTGAGTATCATTCCAATGGAAATAGTATTCTCATTGTTGGGAAGGCATAACTCAAGTGG CATATGTAATTATAATCTAGCACCCAGCAACACTTGGGGAGGTAGTGC -3'	16
rs17148773[a] 및 rs3792801[b]	5'-AATAGGCAGAAACTGGACCAAAGCTAATCAATCAAATATTACTGTCTTTAAATGTGACCATAGATCTTCATGTAAGGAAG TGAAAATTCACTTATTCAAATCATAAACTACCAATTTCCAAACAGTAAATTCTGTGAGGAGAAAAAAAAAAACTTACATA GTATCTTATAACTGAAAGAAGCCTCAGAGTCACCTGGTC[C][a]GTACATTTTGTTTCAGTGAGGAAAATGAAGGAGAGAG GGTACATTAACAGCACATACCTATTCAACTATTTACTGGGTGGCTTTTACACATCAACAGAATGCTCTTAAATATCTGGC AGGAAAAGCAATCAGTGAACTGATACATGATATGTCTTCAGAGTCACACTCACTGCTGCTTACACAGCCACCAGACTGAC CTGATGGCCTTAGGCAAGTTACACTTCCTGCTCAAAAAGCTTCAGCCTCCCACTGCCTCCAGAATAAATTTTAGCCTGCT CTTCAGGGCTGTCTTCCATCTGGCTCAACTTACTTTTCCATCCTTTTTGTCCAACTCGTAACTCCACAAAATT[C][b]ATG CTTTAGCCAAACTAGAAGACTTGTTTTTCCAAACATGCCCTGCAGTTTCCTCCTGCCATGCAAGTTGCCTGTGACGTTGA CTTGCCCTGGGCTTCCTTTCCTTAATGCTCCCCGGTGCATTCCCCAGACTTCAAGGCTCAA-3'	17
rs10519694	5'-CTACATGAGGGGCTATTATCTCCATTTTATAGATGAGAAAACTAAGGCACACTAAGATCAAATAACTTACCCAAGGG TATCCAGCCTAGTAAGTGGCTAAGCTGGTTTTGAGTTTAGGTAATCAAGGTCCAGAGTCCCTGTTCTTAACTACCCCACT ATACTCTCTCTCATACAGTCACTGAAATATGACATATTTTGTTGAAGGGGTAAATGCATGACTAAATTGATGAATGCCAC ATCACTCCACTTGCTAAAATATTCACATCAATAAGTAAATGAATG[C]CTTCTACAGGCTGGGAGGAGAAAAATATAACA AATACAATCCTTGCTTTTAAGAATGTTATAGTCTAGAGAAGTTTCCTCAGATTGGAGTCTGTAGGTATATTCTTGATTCC ATTAGTTCTTCACAAAAAGTTTTAACTTGTATTTTTATTCTAATAGTAATTTAAATTCAAAGTACATGCTAGATTCATTT TAACTCAATACTGCCATTCAATTCTAGCAACCAATATTGCTTTGCTGTTTAAGATCACTTTGGTCACCCAAGAG-3'	18
rs1800449	5'-CCGGGACTGCAAAGCAATGTGAAAAGGAAGCAGGAGGGGCCAGACGCGCGGTTTGCACTGGATTCCAGGGCTGCCACTGC AGGCGCGTGGGGGAGGGATCGGATCTGCGAGGACCGGGGCCCGCCGCGCCCAGGCAGCCACGTCGAGAAGCCACATAGCT GGGGACCAGGTGCACGGGTGCTTCCAGCGGACTTGGGGGTACTTACCGTACTGGAAGTAGCCAGTGCCGTATCCGGGCCG GTACCTGCCCCCAGGTCTGGGCCTTTCATAAGTATCGTAGTAGTTGTAATAAGGGTTGTCGTCAGAGTACTTGTAGGGGT TGTAAGGGTCGTCGCCCACCATGCCGTCCACGCGGCTGGGCGGC[C]GCAGGTTACTGAGCGCAGGAACTTCTCCCGGCG CTGTCTGGTTCTCCGCGCGCGAGGCGCCAGCTTCGCGGGCTCTAGATGTCGAGTAGCCAGCTTGGAACCAGTGACGGGCG GTGGGCCTGGGGCGGCCAGCGGTGACTCCAGATGAGCCGGCCGTCCGCGTTCGCGCCGCGGCGGTGCGGTTGTCGCGGAT CAGCAGGATCGGAGTGCGGGGCTGCTGGGCGGAGGCGTTGGCTGCACCAGGGACGGCGGCGCCCGGGTCCCGGCGGCGCT GAGGCTGGTACTGTGAGCCCAGGCTCAGCAAGCTGAACACCTGCCCGTTGTTCTCCCATTGGATCTGC-3'	19
rs2956540	5'-GATCTGGGCGGGAGTCAAATTATAATGTCCTTTTACAAATTAGGGTTTCATATGGAAATACTGACATAGATTTTAACTGA CACGCATTTTCCAATGATAAAACATGCAAACTGCTTAGTTCAGCACTACTTTAAAAAAATCCATCCAAACAACATCTGAC ATCAATTATACTGTAGATTTAAATATATATGTGTGGAGAAAGAAATGGTGTCCTTCTGCTCTTATTTGCATTATTAAAAG AGGCAACTTTTTAAAGTGCTTTTAAAGAAACTTATTTTTCCTCCATTTGCTAACC[G]CAACCACTATTCTATTTTCAGC ATAAAACAGAAGGAAGGAATGGTTTCACAGGTGAAAAAACAGAGATATCTTTTTTTACAGTTATTTACTAAGCCGGTTAA GGAATACAGAATGGGTGCATATGTTGTCAACCATTCAGACTTTTTCAGAGAGTAAATTTTTGTTCTTCATTGTGGACTGT AACAAGGACCCACACTGACCTGTGATC-3'	20

rs3853401	5'- CTACCCTTTGTCACACATGCTAATGAAAAGCTTAGTTGATTTTCACTCTCCTTCATTTCCTCTAAAATCTCTCTGGCTTA GGACTCTGTCAGCTGAAAAACAAACATGTGGCTACCACATTTGGGGACAATACAGTGTTTGCAAGCCCTGCGGGAGATAA TCTAGCCACACATTGTGTTCCCTGTTCAATAACAAAACTATTATTCACAAAATTGGAGAAACCATAGTTCCTTTCCACTC AAATCTGAGATGATAATGATGATGACAATAATAATAATAAGCCACGGCTACATCAAGATACAAACAGCTTTTTTTGCTTT GATAAGATCCACAGCTGATTTCACTTTTGACCATGAGATTTTCTTCTC**[G]**TGAACAATTCTGCAGTATGTGCCATAAGA GAAGGGAAGGAATGTTGCTAATTCTTTTTTTGAGTTTCTAGCCCATCAATATCAAATCTTTAAATGGCAATGTCTGGCCC ATTGGCCAAGAAATGAAAGTTGTTGTAATGCTATGTTCCTGGTATTTGTTAAATACATTTATTTTTGTAGGACATTTCAC ATAAATGGAAAACAGAAAGCCGAAACCATAAAGCAGGGCCTCTGAATTGCAGAAGCCAGAACAGTAATGCCACATTCAAA GCAATCAGGTTCAAGTGTAAATTCTTTTGTTTGAGGCTCAAGAAGCTCATACAAAGCTTG-3'	21

[0153] 10개의 태그 SNP의 유전자형 분석(genotyping)을 위해, HiGene™ Genomic DNA 프렙 키트(BIOFACT, 대전, 한국)를 이용하여, 피험자 160명의 말초 혈액으로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 10개의 SNP 프라이머는 프라이머-3 v.0.4.0 프로그램(http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)을 사용하여 설계되었으며, 설계된 프라이머는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0155]

SNP	프라이머	서열	서열번호
rs2303656	정방향	5'-CGCATGATGTCCTGTGTAGC-3'	22
	역방향	5'-TGGCTGTTATGATACCTATGGTG-3'	23
rs3900446, rs763497	정방향	5'-CATGCAACCTAAATCCCTCAT-3'	24
	역방향	5'-TTGAGAGTCTGTTGAGAATGGA-3'	25
rs10040971	정방향	5'-AGCTCAGGGCATCAACAAAC-3'	26
	역방향	5'-CTACCTCCCCAAGTGTTGCT-3'	27
rs17148773, rs3792801	정방향	5'-AGGCAGAAACTGGACCAAAG-3'	28
	역방향	5'-AGCCTTGAAGTCTGGGGAAT-3'	29
rs10519694	정방향	5'-CATGAGGGGCTATTATCTCCA-3'	30
	역방향	5'-TTGGGTGACCAAAGTGATCTT-3'	31
rs1800449	정방향	5'-GGACTGCAAAGCAATGTGAA-3'	32
	역방향	5'-GATCCAATGGGAGAACAACG-3'	33
rs2956540	정방향	5'-CTGGGCGGGAGTCAAATTAT-3'	34
	역방향	5'-CACAGGTCAGTGTGGGTCCT-3'	35
rs3853401	정방향	5'-CCCTTTGTCACACATGCTAATG-3'	36
	역방향	5'-GCTTTGTATGAGCTTCTTGAGC-3'	37

[0157] 상기 표 4의 프라이머와 Solg™ 2X Taq PCR Pre-Mix(Solgent, 대전, 한국)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 예비 변성은 95℃에서 5분간 수행되었고, 95℃에서 30초간 변성, 63℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 1분간 연장, 및 72℃에서 5분간 최종연장이 34사이클 수행되었다. 1.5% 아가로스 겔 전기 영동에 의해 증폭된 단편을 확인하고, Solg™ PCR 정제 키트(SolGent, 대전, 한국)로 정제한 후, ABI PRISM 3730XL 분석기(Applied Biosystems, 캘리포니아, USA)에 의해 각 서열을 분석하였다.

[0159] **실시예 3. 통계 분석**

[0161] 크러스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정을 수행하여, 뇌동맥류 환자 80명 및 대조군 80명 사이의 비유전적 인자에 대한 차이를 평가했다. 피셔 정확검정은, 교차비(OR)를 추정하기 위해, 뇌동맥류와 LOX 유전자 근처 또는 LOX 유전자 상에 위치하는 10개의 SNP 사이의 대립 관계를 평가하기 위해 수행되었다.

[0162] 후속 분석에서, 동맥류 파열에 따른 뇌동맥류 형성에의 LOX 유전자의 유전적 영향을 분석했다. 또한, h-1의 자유도(h는 SNP의 수에 따라 슬라이딩 윈도우에서 모든 가능한 일배체형의 수)를 포함하는, 점근선 카이-제곱 통계를 통해 일배체형-특이적 연관 분석을 사용한 옴니버스 검정을 수행하여 뇌동맥류와의 유의한 일배체형 연관성을 검정하였다. 상기 검정에서 10개의 SNP를 사용하여 가능한 조합의 0.01 미만의 마이너 일배체형 빈도(MHF)를 갖는 일배체형 구조를 제외하였다.

[0163] 단일 SNP 및 일배체형 연관에서 각각 0.01 및 0.001의 다중 비교 보정 및 암시적 유효 p값을 시험한 후, 본페로

니(Bonferroni)-보정된 유의한 p값을 0.005 미만 및 2.0 x 10^{-4} 미만으로 적용하였다. 기술 및 단변수 분석은 STATA 소프트웨어 v.11.2(Stata Corp., College Station, 텍사스, 미국)에 의해 수행되었다. 유전자형 분류율(genotyping call rate, GCR), 마이너 대립유전자 빈도(MAF), 하디-바인버그 평형(Hardy Weinberg equilibrium, HWE) p값 및 쌍별 LD(pairwise LD)를 평가하기 위해, Haploview v.4.2 (https://www.broadinstitute.org /haploview/haploview)를 사용하여 10개의 SNP에 대한 품질 관리 검정을 수행하였다. 유전자형 및 일배체형 연관성을 PLINK 프로그램 v.1.07(http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/)을 사용하여 분석하였다.

[0165] **실시예 4. 단일염기 다형성과 뇌동맥류와의 유전적 연관성의 검토**

[0167] 상기 실시예 2에서 선택된 10개의 모든 SNP는, 품질 관리 검정 후, 완전한 유전자형 분류율(GCR), 마이너 대립유전자 빈도(MAF)는 0.01 초과, 하디-바인버그 평형(HWE) p값은 0.05 초과, 쌍별 연관불균형(LD)은 0.8 초과였다.

[0168] 10개의 SNP 중 3개의 SNP(rs2303656, rs3900446 및 rs763497)는 뇌동맥류와 통계적으로 유의한 연관성을 보였다($p < 0.05$)(도 6). 2개의 SNP(rs2303656 및 rs3900446)는 본페로니-보정된 유의 수준($p < 0.005$)에 도달했다. rs3900446의 C 대립 유전자는 뇌동맥류의 위험이 증가하면서 가장 유의미하고 강한 연관성을 보였다(OR = 20.15, p = 4.8 Y 10^{-5}). 반대로, rs2303656의 A 대립 유전자는 뇌동맥류에서 보호 효과가 있었고, 환자군에서는 빈번하게 관찰되지 않았다(p = 8.2 Y 10^{-4}). rs763497의 G 대립 유전자는 증가된 뇌동맥류 위험과의 연관성을 보여 주었다(OR = 2.26, p = 0.009). 그러나, 이후의 분석에서 뇌동맥류를 가진 80명의 환자 중 뇌동맥류 파열과 연관된 SNP는 없었다($p > 0.05$).

[0169] 일배체형 연관성에 대한 옴니버스 검정에서, 45개의 슬라이딩 윈도우(SNP 세트)에서 전체 247개 일배체형 구조 중 136개는 0.05 미만의 점근선 p값을 보였으며, 17개의 일배체형은 뇌동맥류와 암시적 연관성을 보였다(점근선 $p < 0.001$, 도 7). 10개의 SNP 일배체형 조합 중 rs3900446과 rs763497의 CG 조합은 단일 SNP 분석(MHF = 0.113, 점근선 p = 1.3 Y 10^{-5})에서 유의한 연관성을 보였다.

[0170] 단일 SNP 분석에서 6개의 SNP(rs10040971, rs17148773, rs3792801, rs10519694, rs2956540 및 rs1800449)가 독립적으로 연관되어 있지는 않았지만, 이들 SNP를 rs2303656, rs3900446 또는 rs763497과 조합한 일배체형 구조는 일배체형 분석에서 유의했다($6.5 Y 10^{-4} < p < 7.5 Y 10^{-4}$).

[0172] **<3. SOX17(SRY-box 17) 유전자의 SNP 이용한 뇌동맥류 진단>**

[0174] **실시예 1. 연구 대상**

[0176] 단일 기관(춘천 성심 병원)에서 방사선학적으로 낭형(saccular shape)을 갖는 것으로 확인된 뇌동맥류 환자군 187명과, 환자군의 환자의 나이 및 성별과 매칭된 대조군 372명을 모집하였다(환자군 및 대조군의 비율은 1:2임). 상기 뇌동맥류에서, 방추형 또는 해부학 비낭성 동맥류 및 외상성 또는 전염성 동맥류는 제외하였다. 대조군은, 동정맥 기형, 두개내 출혈 또는 경색 등과 같은 다른 신경계 질환을 제외한, 두통 진단 또는 건강 검진을 위해 전산화 단층 촬영 또는 자기 공명 혈관 조영술을 받은, 매칭된 환자들로 구성하였다. 성별, 연령, 비파열 뇌동맥류 또는 지주막하 출혈과 같은 임상 증상, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 흡연, 동맥류의 가족력 등 여러 변수를 고려하여 의료 기록을 검토하였다. 동맥류의 크기, 위치(전방 순환 또는 후방 순환), 및 수(단수 또는 복수)에 대한 혈관조영 변수를 검토하였다. 본 연구는 춘천 성심 병원의 임상 시험 위원회에 의해 승인되었다(No. 2017-9).

[0177] 검토 결과, 뇌동맥류 환자군 및 대조군에서, 여성의 수는 각각 108명(57.8%) 및 212명(57.9%)이었고, 평균 연령은 각각 58.2 ± 11.5세 및 56.9 ± 14.2세였다(P = 0.305). 고혈압, 당뇨, 고지혈증 및 흡연 상태를 포함하는 다른 요인들은 두 군 간에 크게 다르지 않았다. 지주막하 출혈 증상은 95명(50.8%)의 환자에게서 나타났다. 동맥류 위치와 관련하여, 전방순환동맥류(n = 167; 89.3%)가 다음과 같이 기록되었다: 내경동맥, n = 34; 전교통동맥 또는 전대뇌동맥, n = 39; 중간대뇌동맥, n = 56; 및 후교통동맥, n = 38. 본 코호트에서 뇌동맥류의 가족력은 언급되지 않았다.

[0179] **실시예 2. 단일염기 다형성 선택 및 검사**

[0181] SOX17 유전자 상의 단일염기 다형성과 뇌동맥류 발병 가능성의 연관성을 조사하기 위하여, 동아시아인 및 유럽

인 조성 집단으로 구성된 이전의 GWAS로부터 이전에 보고된 SNP 5개(rs1072737, rs1504749, rs10958409, rs12541742 및 rs9298506)를 선택하였다(표 5의 서열번호 38 내지 서열번호 42 참조).

표 5

[0183]

SNP	서열	서열번호
rs1072737	5'-GACATGGTTTTGCCATGTTGGCCCGGCTGGTATCAAACTCCTGGCCTCAGGTGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATAGGCGTGAGCCACCGTGGCTTAACCTAAACTTCTAGATATGAAAACTATAATGTCTGAGGTGAAAAATAGACTGGAGGAAGAAAAAGGCAGATTGGACATTGTAGAAGAAAGGCGAGATCAGTGAAATTAAAAGTGTGGCAATGAAAACTACCCAAAATAAAACACGCAGAAAATAAAATTCCAAAAAATGAAAAAGCATAAGTGATATGTGGGATAGTTTCAGTGGCCTAATAC[A/C]TGAGTAACTGGAGTCCCTGAAGAAGAAAGACTGAAAAATATATTTTTAGAAATAATGGCTGAAAAATTTCCAAACTTAGTGAAGCTATAAACCTACAGATCTAAGCTCAATGAACACCAAGAAAAATAAACATGAAAATAACTACCCCAAATTACAGCATAAGTTACTAAAAAACAATGACAAAGAGAAAAATCTGACAGCCAGAAAATATACCCGTATTACATCCAGAGAAACAAAGATAAGGCTG-3'	38
rs1504749	5'-CGTGCTGGCAAACTTGAAATCTGATGAACCCACTACCTTCACTACACTCACTGTCTGGTCTCTCTCAGGTAGCTGAGGACTGAGAAACACCCCAGCCAGGCAGGTTGGGGTCACTATAAATTCACAGTCACCAACCACACATGGTGCTCTGTTTGGCTGGCCATCTCATTATACCTGTCTGACTTGCTTACTGTCCTGCCCTCCGAAAAAGCTTTTCAAACACTATCTCCTTCTGCCTCAAATGT[A]TCACCTCCCCCTCAATGACTTTGCTTCATATGTGACACAAAGAAATGTTAATACCAGCCAAGACCTTCCTCAACTTCCGGCCAGCAAATCTGGAACACAAGCTGCATCTGTCCTGGTTTGCCTCTTCTCTCTTCTCGTTACAGTAGAGTAGCCATTCCTCTTCTAAAAAACACTGATCTCCCATCCTGCTCTGGACATTAAAGTACTGAGAAGTGGTTTTGTGTTCCCAGCAATATGGGAGTCATTGG-3'	39
rs10958409	5'-AAGTGATCCACCCACCTGAGCCTCCCAAAGTTCTGGGATTACAGGCTTGAGCCACTGCGCCCAGCTATAACCTTCACGTTCAAAGCACTCTCCCATCTATTATTAAGGCCTCTGAGAAAATCTCCTTTTTATATATATTCTCAAGTCAGAATTATTAGTCTCCATCTTTCATCTTAGTCTTCTTCAAATACCAAACTCTTTACTAAGCAGTTAGACACAAGTAGTTTCACCAGTTCTATCACTCAAATACGGTTTCATAAGTTCTGCCTAGTGATTGCCCATCAGAGGGGATATGGATTT[G]TGGGCAGGAAATAGAATAGAAACCTAACTCTAACTCTTCTGTGAAATGTAGTGTTTAGGTTAATATTCTTCCTTAACTGCCATCTGCTTTTTTTTGTTTGTTTAACACTTTGTCCAAATCTCTCAAACCTTACACCGCAGAATCATGGA-3'	40
rs12541742	5'-GCTTTCATGGTGTGGGCTAAGGACGAGCGCAAGCGGCTGGCGCAGCAGAATCCAGACCTGCACAACGCCGAGTTGAGCAAGATGCTGGGTGAGTCCGAGTCGCAGACCCAGGCGGCCGGGCGCGCTGGCGCGAATCGCTAGGCCGATTTCTTAAACCCCAAACTGTTCTTTGCGAGCCTGACGCCCAAAACCAGGGGTGTGTAGCGGCCACGTCCTTTCTTAAGGCTCTGGGTTCC[C]TTCCCGCTTCCCGCCCTCCGACCCTCCAAAGCAGCTTTCCGCCTTGCTCTCCGGCTCCCGGATTCCCCAGGTGGCCGGGGGCGCGGGTCCAACGGCTCTGGGAAGGCGACTTCCCGGCACCTCCGGGCGGCGCGAGAGCACCCTTGGCCCTGAACTGGGCCGGTTGTGTCCATCCCTCGACCCCTTCCCTAGTTAGGTGTCCTTTTCTGTTTTTCGAACGACCGGGTGATGGGTGAGCGGAAAGCCGCTTCCAGGAGACCAAAAGAAAGGGGTGCCTTTAGAGGACGGGTGTTCCCCAAGGGCTCGGACTCAGGAGTCCCAGATCTCCCTC-3'	41
rs9298506	5'-AGGTGTACCAACCCCAGACACTGGCAGAACGCTCTCTTTATGTAAGACCTCAAAATCTTACTGGTTGGTGTCTGCTGACTTGTTTTTCTCTGTTATCTTGCCTGTCTGCAGTGACAAATTCAGTGCAGCTCTAACTCATGTGGACAGGGAGGAAATGATTCTAGGATTGAGGACTTAAGGGTGTCTGGAAGAGAAGAGAATTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTAGTTGTTGTTTTCCTCAGACAGGACCTTGTCA[A]CGCTTTCAAATATGTAGGCTGTTTGCTGTTTCCTTTATGTTGGTCCCTGAGAAGGATCTGCCCTTCTACCCTGTTTCCCTGGGGGGTGTGGACAGAGCCTTTGTCTTTGGGGAAGGGGGTCATCTTGGGAAAAGGAGAACAGGGCATCCTGAGGACCTGCTCCGTCTAAGGAGAGAAAGCCGAACAGATGGCAGCTGCCACGCAGAGGGCACTTTGTAGGAACTCTGGCTGGAGCAGGCTTCCTGCGCTCCAATGCCAAATCCTTCCCTTC-3'	42

[0185] 5개의 SNP의 유전자형 분석(genotyping)을 위해, HiGene™ Genomic DNA 프렙 키트(BIOFACT, 대전, 한국)를 이용하여, 피험자 559명의 말초 혈액으로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 5개의 SNP 프라이머는 프라이머-3 v.0.4.0 프로그램(http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)을 사용하여 설계되었으며, 설계된 프라이머는 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0187]

SNP	프라이머	서열	서열번호
rs1072737	정방향	5'-GACATGGTTTTGCCATGTTG-3'	43
	역방향	5'-CAGCCTTATCTTTGTTTCTCTGG-3'	44
rs1504749	정방향	5'-CGTGCTGGCAAACTTGAAAT-3'	45
	역방향	5'-CCAATGACTCCCATATTGCTG-3'	46
rs10958409	정방향	5'-AAGTGATCCACCCACCTGAG-3'	47
	역방향	5'-TCCATGATTCTGCGGTGTAA-3'	48
rs12541742	정방향	5'-GCTTTCATGGTGTGGGCTA-3'	49
	역방향	5'-GAGGGAGATCTGGGACTCCT-3'	50

rs9298506	정방향 역방향	5'-AGGTGTACCAACCCCAGACA-3' 5'-GAAGGGAAGGATTTGGCATT-3'	51 52

[0189] 상기 표 6의 프라이머와 Solg™ 2X Taq PCR Pre-Mix(Solgent, 대전, 한국)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하였다. 예비 변성은 95℃에서 5분간 수행되었고, 95℃에서 30초간 변성, 63℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 1분간 연장, 및 72℃에서 5분간 최종연장이 34사이클 수행되었다. 1.5% 아가로스 겔 전기 영동에 의해 증폭된 단편을 확인하고, Solg™ PCR 정제 키트(SolGent, 대전, 한국)로 정제한 후, ABI PRISM 3730XL 분석기(Applied Biosystems, 캘리포니아, USA)에 의해 각 서열을 분석하였다.

[0191] **실시예 3. 통계 분석**

[0193] 연령, 성별, 고혈압, 당뇨, 고지혈증 및 흡연에 대한 뇌동맥류 환자군 187명과 대조군 372명과의 차이를 평가하기 위해 단변량 로지스틱 회귀 분석(Univariate logistic regression analysis)을 수행했다. 일반화된 선형 모델은 추가적 효과 상속 모델 하에서 뇌동맥류와 SOX17 유전자 다형성 사이의 유전 연관성을 평가하기 위해 수행되어 95% 신뢰구간(CI)과 대응비(OR)를 추정했다. 후속 분석에서 우리는 동맥류 파열에 따른 뇌동맥류 형성에 대한 SOX17의 유전적 효과를 분석했다. 설명적 및 단변량 분석을 Stata II.2(StataCorp LLC, College Station, 텍사스, 미국)를 사용하여 수행하였다. 유전자형 분류율(genotyping call rate, GCR), 마이너 대립유전자 빈도(MAF), 하디-바인버그 평형(Hardy Weinberg equilibrium, HWE) p값 및 쌍별 LD(pairwise LD)를 평가하기 위해, Haploview 4.2(https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview)를 사용하여 SOX17 유전자 근처 또는 SOX17 유전자 상에 위치한 5개의 SNP에 대한 품질 관리 검정을 수행하였다. 유전자형 및 일배체형 연관성을 PLINK 프로그램 1.07(http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/)을 사용하여 분석하였다.

[0195] **실시예 4. 단일염기 다형성과 뇌동맥류와의 유전적 연관성의 검토**

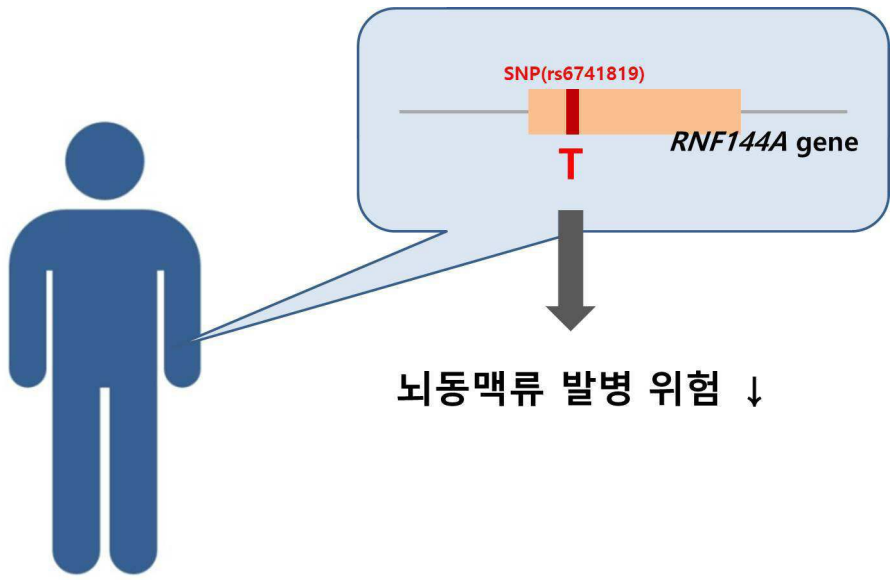
[0197] 품질 관리 검정 후, 상기 실시예 2에서 선택된 5개의 SNP 중 4개는 완전한 유전자형 분류율(GCR), 마이너 대립유전자 빈도(MAF)는 10% 초과, 하디-바인버그 평형(HWE) P값은 0.05 초과, 쌍별 연관불균형(LD)은 0.8 초과였다. SOX17 유전자의 인트론 영역에 위치한 rs12541742를 하디-바인버그 평형(HWE) 때문에 본 연관성 시험에서 제외하였다.

[0198] 4개의 SNP 중 오직 1개의 SNP, 즉 SOX17 유전자의 5'-비번역 영역(5'-UTR)으로부터 약 41kb의 상류 영역에 위치한 rs1072737의 마이너 C 대립유전자만이 뇌동맥류와 통계적으로 유의한 연관성을 보였다(OR = 0.69, 95% CI = 0.49-0. 96, P = 0.03) (도 8). 이 변종은 유럽인 조상 집단을 포함하는 디전 연구와 비교하여 반대 효과 크기를 나타냈다(각각, OR = 0.69 및 OR = 1.02). 후속 분석에서 4개의 SNP 중 뇌동맥류 파열과 관련된 SNP는 없었다(P > 0.2, 도 9).

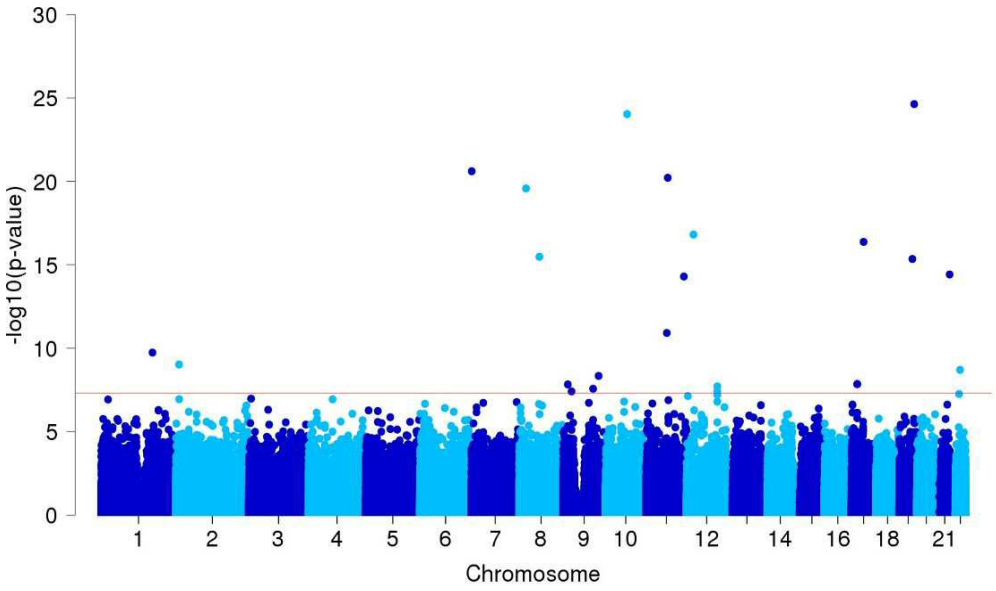
[0200] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

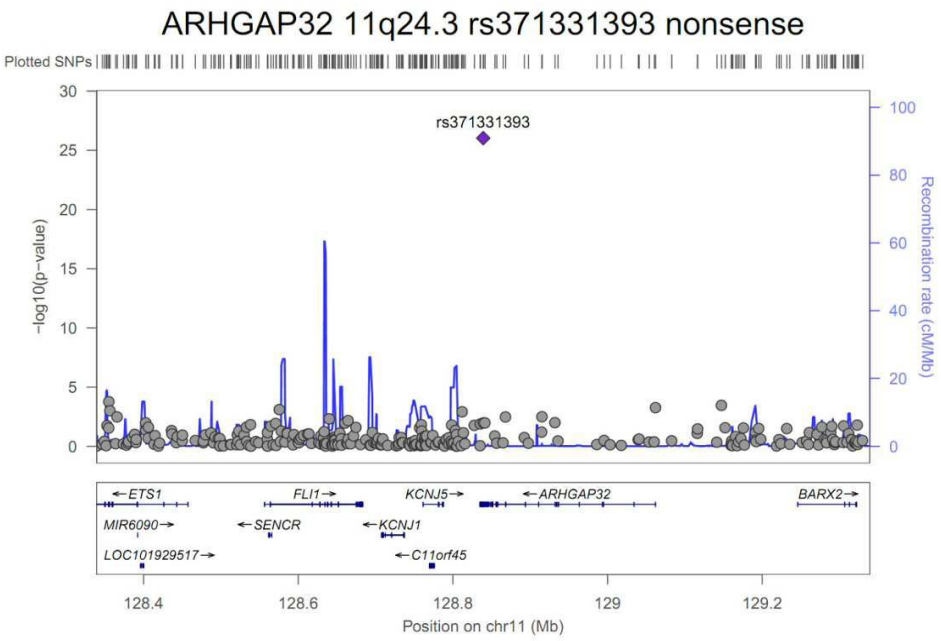
도면1


SNP(rs6741819)
T
RNF144A gene
뇌동맥류 발병 위험 ↓

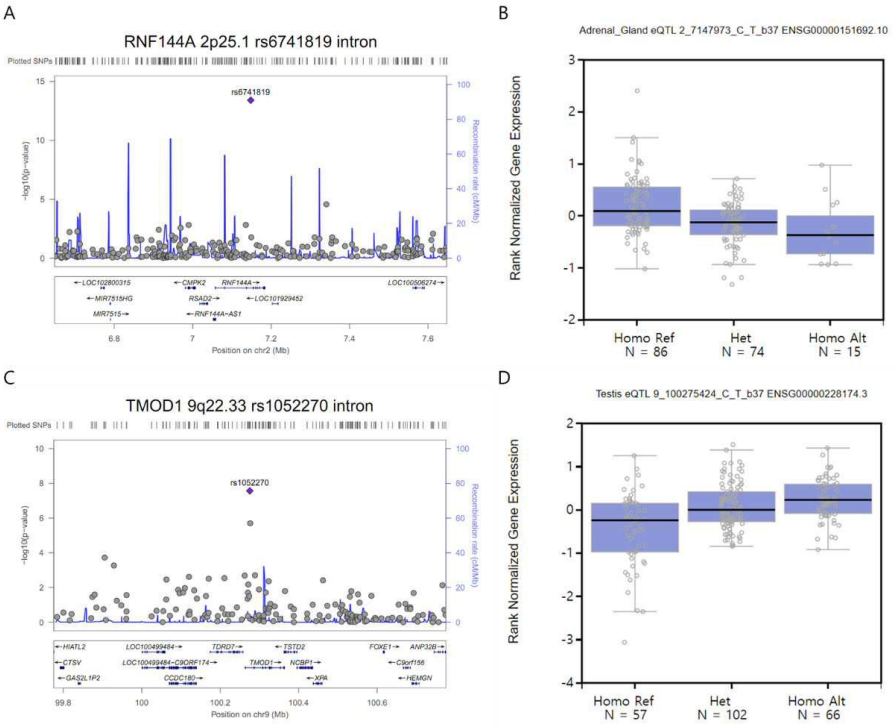
도면2


-log10(p-value)
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
12
14
16
18
21
Chromosome

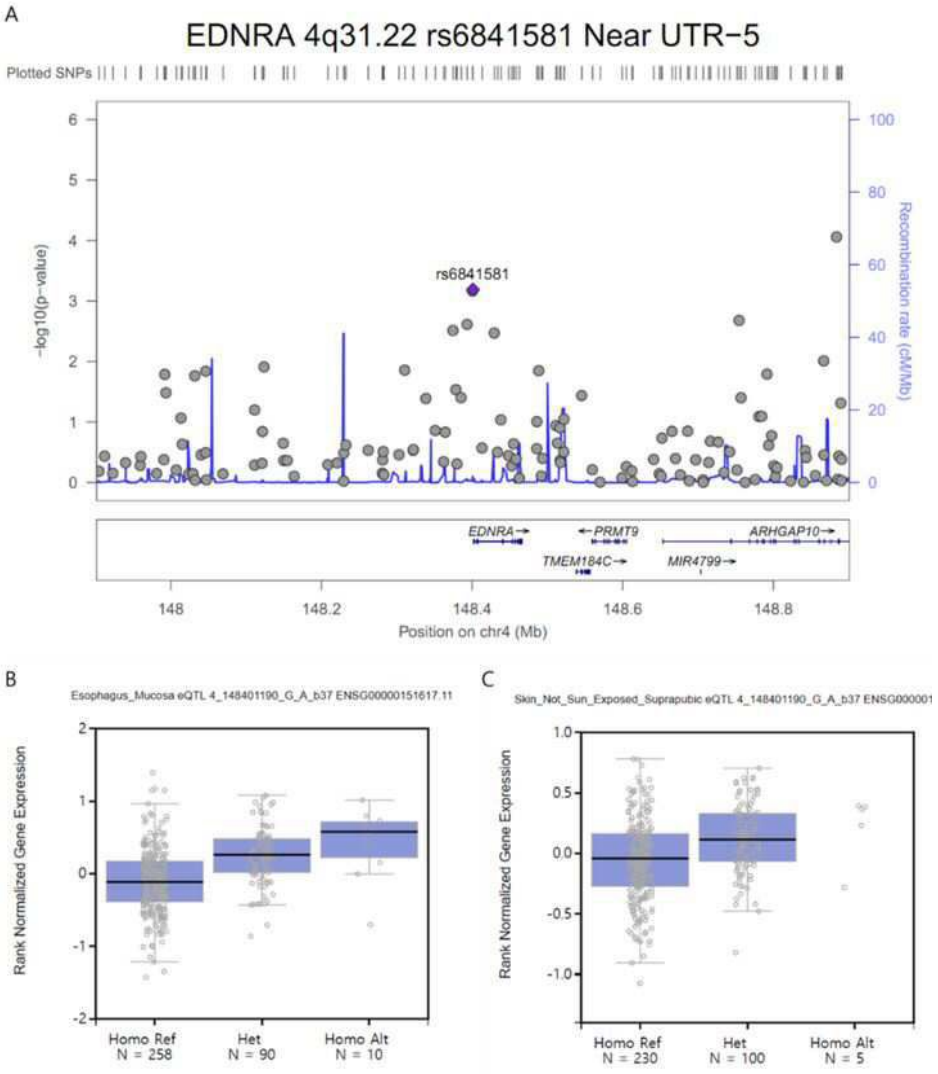
도면3


ARHGAP32 11q24.3 rs371331393 nonsense
Plotted SNPs
rs371331393
−log10(p−value)
Recombination rate (cM/Mb)
ETS1
FLI1
KCNJ5
ARHGAP32
BARX2
MIR6090
SENCR
KCNJ1
LOC101929517
C11orf45
128.4
128.6
128.8
129
129.2
Position on chr11 (Mb)

도면4


A
RNF144A 2p25.1 rs6741819 intron
rs6741819
Position on chr2 (Mb)
B
Adrenal_Gland eQTL 2_7147973_C_T_b37 ENSG00000151692.10
Rank Normalized Gene Expression
Homo Ref N = 86
Het N = 74
Homo Alt N = 15
C
TMOD1 9q22.33 rs1052270 intron
rs1052270
Position on chr9 (Mb)
D
Testis eQTL 9_100275424_C_T_b37 ENSG00000228174.3
Rank Normalized Gene Expression
Homo Ref N = 57
Het N = 102
Homo Alt N = 66

도면5


A
EDNRA 4q31.22 rs6841581 Near UTR-5
Plotted SNPs
rs6841581
-log10(p-value)
Recombination rate (cM/Mb)
EDNRA
PRMT9
ARHGAP10
TMEM184C
MIR4799
148
148.2
148.4
148.6
148.8
Position on chr4 (Mb)
B
Esophagus_Mucosa eQTL 4_148401190_G_A_b37 ENSG00000151617.11
Rank Normalized Gene Expression
Homo Ref N = 258
Het N = 90
Homo Alt N = 10
C
Skin_Not_Sun_Exposed_Suprapubic eQTL 4_148401190_G_A_b37 ENSG000001
Rank Normalized Gene Expression
Homo Ref N = 230
Het N = 100
Homo Alt N = 5

도면6

Gene Chr.	SNP	Position	Function		M/m*	80 patients with IA and 80 controls				41 IA rupture and 39 non-rupture in 80 patients		
			Class	Effect		MAF†	HWE p‡	OR§	p value¶	MAF†	OR§	p value¶
	rs10040971	122063842	Intron	None	T/C	0.04/0.03	1.00	1.42	0.770	0.06/0.03	2.47	0.444
	rs17148773	122067364	Intron	None	C/T	0.00/0.03	1.00	0.00	0.061	0.00/0.00	NA	1.000
	rs3792801	122067715	Intron	None	C/T	0.04/0.10	1.00	0.41	0.081	0.06/0.03	2.47	0.444
	rs2303656	122070281	Intron	None	C/A	0.00/0.07	1.00	0.00	8.2×10^{-4}	0.00/0.00	NA	1.000
LOX	rs10519694	122071524	Intron	None	C/T	0.06/0.03	1.00	2.60	0.170	0.05/0.08	0.62	0.527
5q23.2	rs2956540	122073485	Intron	None	C/G	0.24/0.19	0.73	1.40	0.277	0.24/0.24	1.00	1.000
	rs1800449	122077513	R158Q	Benign	G/A	0.15/0.18	1.00	0.83	0.650	0.16/0.14	1.15	0.827
	rs3853401	122081992	5–4 kb	None	C/T	0.06/0.07	1.00	0.81	0.818	0.04/0.08	0.46	0.320
	rs3900446	122090980	5–13 kb	None	T/C	0.11/0.01	1.00	20.15	4.8×10^{-5}	0.07/0.15	0.43	0.135
	rs763497	122091535	5–13 kb	None	A/G	0.24/0.13	1.00	2.26	0.009	0.22/0.27	0.76	0.581

Chr., chromosome; IA, intracranial aneurysm; NA, not available; OR, odds ratio; MAF, minor allele frequency; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; SNPs, single nucleotide polymorphisms.
*Major/minor allele type, †MAF in case (left) and control (right) groups, ‡HWE p-value for control group, §OR and p value were estimated from allelic association analysis using Fisher's exact test.

표 7

SNPset	Haplotype	MHF*	Chi-square†	p_{asym}†
rs3792801-rs2303656	TA	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs2303656-rs10519694	AC	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs3853401-rs3900446	TT	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs3900446-rs763497	CG	0.113/0.000	18.96	1.3×10^{-5}
rs10040971-rs17148773-rs3792801	TCT	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs17148773-rs3792801-rs2303656	CTA	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs3792801-rs2303656-rs10519694	TAC	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs2303656-rs10519694-rs2956540	ACG	0.000/0.070	11.52	6.9×10^{-4}
rs10040971-rs17148773-rs3792801-rs2303656	TCTA	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694	CTAC	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540	TACG	0.000/0.070	11.52	6.9×10^{-4}
rs2303656-rs10519694-rs2956540-rs1800449	ACGA	0.000/0.070	11.54	6.8×10^{-4}
rs10040971-rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694	TCTAC	0.000/0.069	11.39	7.4×10^{-4}
rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540	CTACG	0.000/0.070	11.52	6.9×10^{-4}
rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540-rs1800449	TACGA	0.000/0.070	11.54	6.8×10^{-4}
rs10040971-rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540	TCTACG	0.000/0.070	11.52	6.9×10^{-4}
rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540-rs1800449	CTACGA	0.000/0.070	11.54	6.8×10^{-4}
rs10040971-rs17148773-rs3792801-rs2303656-rs10519694-rs2956540-rs1800449	TCTACGA	0.000/0.070	11.54	6.8×10^{-4}

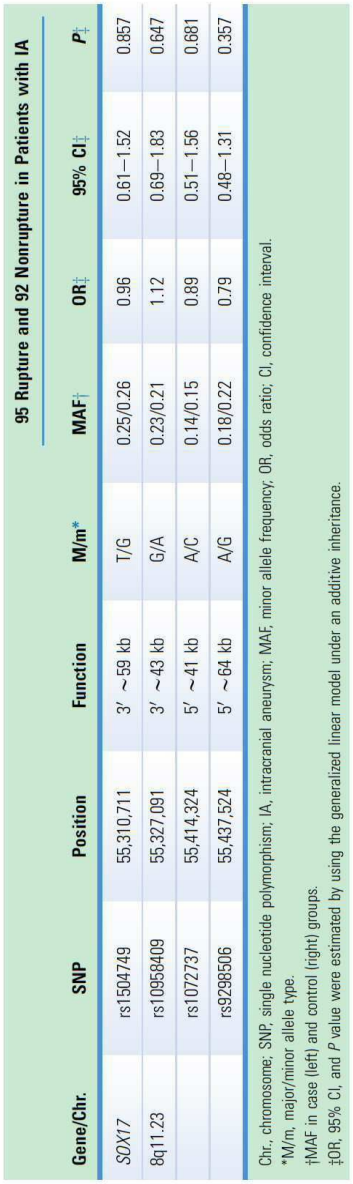
MHF, minor haplotype frequency; SNP, single nucleotide polymorphism.
*MHF of case (left) and control (right), †Asymptotic chi-square statistics and *p* value were estimated by the omnibus-based haplotype association test.

					187 Patients with IA and 372 Control Subjects				2617 Patients and 1413 Control Subjects[5]			
Gene/Chr.	SNP	Position	Function	M/m*	MAF†	OR‡	95% CI‡	*P*‡	MAF†	OR§	95% CI§	*P*§
SOX17	rs1504749	55,310,711	3′ ~59 kb	T/G	0.26/0.28	0.90	0.68–1.19	0.453	0.23/0.21	1.10	0.98–1.22	0.1
8q11.23	rs10958409	55,327,091	3′ ~43 kb	G/A	0.22/0.22	1.01	0.75–1.35	0.955	0.18/0.16	1.17	1.03–1.32	0.013
	rs1072737	55,414,324	5′ ~41 kb	A/C	0.14/0.20	0.69	0.49–0.96	0.030	0.47/0.42	1.20	1.09–1.31	8.2×10^{-5}
	rs9298506	55,437,524	5′ ~64 kb	A/G	0.20/0.19	1.06	0.78–1.43	0.711	0.17/0.19	0.83	0.73–0.93	0.001

Chr., chromosome; SNP, single nucleotide polymorphism; IA, intracranial aneurysm; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
*M/m, major/minor allele type.
†MAF in case (left) and control (right) groups.
‡Hardy-Weinberg equilibrium *P* value for control group.
§OR and *P* value were estimated from allelic association analysis using Fisher exact test.

등록특허 10-2158721

도면9



95 Rupture and 92 Nonrupture in Patients with IA

Gene/Chr.	SNP	Position	Function	M/m*	MAF†	OR‡	95% CI‡	P‡
SOX17	rs1504749	55,310,711	3′ ~59 kb	T/G	0.25/0.26	0.96	0.61–1.52	0.857
8q11.23	rs10958409	55,327,091	3′ ~43 kb	G/A	0.23/0.21	1.12	0.69–1.83	0.647
	rs1072737	55,414,324	5′ ~41 kb	A/C	0.14/0.15	0.89	0.51–1.56	0.681
	rs9298506	55,437,524	5′ ~64 kb	A/G	0.18/0.22	0.79	0.48–1.31	0.357

Chr., chromosome; SNP, single nucleotide polymorphism; IA, intracranial aneurysm; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; CI, confidence interval.
*M/m, major/minor allele type.
†MAF in case (left) and control (right) groups.
‡OR, 95% CI, and *P* value were estimated by using the generalized linear model under an additive inheritance.

서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> SNP marker for diagnosis of intracranial aneurysm comprising SNP of RNF144A gene

<130> 9

<160> 52

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccttgagtat ctgctccatc actggygacg ccacaggtag gtgtgaatgg a 51

<210> 2

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tgcttcagaa actgaccagt agcacygatg tacaatcttg atcgcatggg c 51

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cctccagctg ctgcagaagg atgccrccgc cgcccctgcc acccctgcca c 51

<210> 4

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ttgtggttca gtcttaaaga ttcttrcccg gatgcagcat attttactcc a 51

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ttcacaagtc ggacatctgt atatcytagg aggagacaag gccatagaag a 51

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gaatccacgt tgaaaaatct gtccarggct cacccagtat caacaatagt g 51

<210> 7

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atatctttct gtgcctttat ttattytgca tatgttaaaa gtggatgagg c 51

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

ttcaggaggt ccccgaggac atcccrgcca acaccgtgct cctgaagctc g 51

<210> 9

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tattgaacag atagaacaaa cgggcygcgc tgcccacacc accgcttctc t 51

<210> 10

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gaggcccgag aaccaggcac gccgaygaca gcacacttcc agcctgagag c 51

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

acagagaaaa tgtgggaggc aatacrgtga cagtggtgta attaaaatgt t 51

<210> 12

<211> 51

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aagttttgac tattctactg gcctgrattt atctaacttg tgttgtactt t 51

<210> 13

<211> 51

<212>

DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctcagtctca gggggactgg gaagarggaa ggacaaaagg atggtggccc t 51

<210> 14

<211> 504

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tacgcatgat gtcctgtgta gcgaatgtca cagcgcacaa cattgttggt atagtcagat 60

tcaggaacca ggtagctggg gtttacactg acctgggcaa cacaaagagt tcctcagtat 120

ttctttttcc atagggctac aataaggaaa ttgttaatga ggacttagct aaatcaagca 180

gggaagggat tttaacttaa gtaagtggtt aaactctgga gacgttatgg aaagagactg 240

catattttcc cctgaagttc tttaaaataa gacagattag attagattag attgtttata 300

aatagtttga ggatgtataa ttgcttccaa taccatgatt atttaacatt tgaatccaga 360

gaagagggcc tattgatctg caatatcaat atatgatata ttttcaaagg tctttacctt 420

taggatatag tttccaggtt ttacatctgt aatatcaatc cactggcagt ctatgtctgc 480

accataggta tcataacagc cagg 504

<210> 15

<211> 815

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

gagcatgcaa cctaaatccc tcatatgcac agttcacaat ggggttcacg ctcatatgag 60

aatctaatgc catgattgat ctgacaggaa gcaaagctca ggtggtaatg tgaggaaaga 120

ggatcttggt aaacatgcta ttgtaagttt aatgtctcta ctccccttcc gagaacccca 180

tgtctcctta ctgggaaact tcaagtcaaa tggttttagg atttactgac agaggttact 240

tgctagtatg aatttgagaa attcatggga ggtacctcac caggaaccca aaaaatggaa 300

tttttgacgt ggggagtgtc tgtaaataca gatgaagctt cacttgctgg cccactgctc 360

acctcctgct gtgcagccca gttcctaaca gggatggtac tggtccgtgt cctggggttt 420

gggaaccact ggtttattga aaagacattc tgctgggttg gtatggagcc caagttatat 480

ttgggttaca cattagggac tacttcttgt gattttgagc ctaaattata ataaactcta 540

gatatacaca ccctatgcct atcagaatag taatgaaggg gtaaatggcc cccaacacaa 600

gtggcaatgg tttttggaat aataccaaaa gccaacgaaa tgtgatggag atttactgaa 660

gctaagcatt aattttgggg ataggatgtt ctcgatgtag gcctagatgt atgcagcatc 720

gtgtaaggct atctattaaa gaagtctaaa aaattcactt gtgatattga gtcataaagt 780

tggtttttaa tccattctca acagactctc aattt 815

<210> 16

<211> 603

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

tctagctcag ggcatcaaca aacagtacaa aaatgagagt gcaaatgaat aaataaatgg 60

agaatggatg aataaattaa ggaattataa aaattaagaa aaaactaatc tgtttattta 120

agtgcaaatt attttagctt aaattataat ggtgttctgg cggtgggggt cgggggttgg 180

ttctactata accaactcca cacaatatgg gccataaaac ctgccaggtt ttctgtgctg 240

tgggcatgtt cagaagaatg tatgtgactc tgtttttttca gtgctatcct tttgctatca 300

caggcttcat ctatctctaa tgttgtgaca acacttgtaa agcacagtct ctgcttcttt 360

atgtagaaag tcctgggttt ttgtatcagg cagaaatttc tattaattat gagattctag 420

tatagctctg ctatacctgt ctgtatgatc cagtggcact ggtggttctc cagtgacaaa 480

gcaaagctga tgagtgttga gtatcattcc aatggaaata gtattctcat tgttgggaag 540

gcataactca agtggcatat gtaattataa tctagcaccc agcaacactt ggggaggtag 600

tgc 603

<210> 17

<211> 696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aataggcaga aactggacca aagctaatca atcaaatatt actgtcttta aatgtgacca 60

tagatcttca tgtaaggaag tgaaaattca cttattcaaa tcataaacta ccaatttcca 120

aacagtaaat tctgtgagga gaaaaaaaaa aacttacata gtatcttata actgaaagaa 180

gcctcagagt cacctggtcc gtacattttg tttcagtgag gaaaatgaag gagagagggt 240

acattaacag cacataccta ttcaactatt tactgggtgg cttttacaca tcaacagaat 300

gctcttaaat atctggcagg aaaagcaatc agtgaactga tacatgatat gtcttcagag 360

tcacactcac tgctgcttac acagccacca gactgacctg atggccttag gcaagttaca 420

cttcctgctc aaaaagcttc agcctcccac tgcctccaga ataaatttta gcctgctctt 480

cagggctgtc ttccatctgg ctcaacttac ttttccatcc tttttgtcca actcgtaact 540

ccacaaaatt cbatgcttta gccaaactag aagacttgtt tttccaaaca tgccctgcag 600

tttcctcctg ccatgcaagt tgcctgtgac gttgacttgc cctgggcttc ctttccttaa 660

tgctccccgg tgcattcccc agacttcaag gctcaa 696

<210> 18

<211> 549

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

ctacatgagg ggctattatc tccattttat agatgagaaa actaaggcac actaagatca 60

aataacttac ccaagggtat ccagcctagt aagtggctaa gctggttttg agtttaggta 120

atcaaggtcc agagtccctg ttcttaacta ccccactata ctctctctca tacagtcact 180

gaaatatgac atattttgtt gaaggggtaa atgcatgact aaattgatga atgccacatc 240

actccacttg ctaaaatatt cacatcaata agtaaatgaa tgccttctac aggctgggag 300

gagaaaaata taacaaatac aatccttgct tttaagaatg ttatagtcta gagaagtttc 360

ctcagattgg agtctgtagg tatattcttg attccattag ttcttcacaa aaagttttaa 420

cttgtatttt tattctaata gtaatttaaa ttcaaagtac atgctagatt cattttaact 480

caatactgcc attcaattct agcaaccaat attgctttgc tgtttaagat cactttggtc 540

acccaagag 549

<210> 19

<211> 706

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ccgggactgc aaagcaatgt gaaaaggaag caggaggggc cagacgcgcg gtttgcactg 60

gattccaggg ctgccactgc aggcgcgtgg gggagggatc ggatctgcga ggaccggggc 120

ccgccgcgcc caggcagcca cgtcgagaag ccacatagct ggggaccagg tgcacgggtg 180

cttccagcgg acttgggggt acttaccgta ctggaagtag ccagtgccgt atccgggccg 240

gtacctgccc ccaggtctgg gcctttcata agtatcgtag tagttgtaat aagggttgtc 300

gtcagagtac ttgtaggggt tgtaagggtc gtcgcccacc atgccgtcca cgcggctggg 360

cggccgcagg ttactgagcg caggaacttc tcccggcgct gtctggttct ccgcgcgcga 420

ggcgccagct tcgcgggctc tagatgtcga gtagccagct tggaaccagt gacgggcggt 480

gggcctgggg cggccagcgg tgactccaga tgagccggcc gtccgcgttc gcgccgcggc 540

ggtgcggttg tcgcggatca gcaggatcgg agtgcggggc tgctgggcgg aggcgttggc 600

tgcaccaggg acggcggcgc ccgggtcccg gcggcgctga ggctggtact gtgagcccag 660

gctcagcaag ctgaacacct gcccgttgtt ctcccattgg atctgc 706

<210> 20

<211> 505

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

gatctgggcg ggagtcaaat tataatgtcc ttttacaaat tagggtttca tatggaaata 60

ctgacataga ttttaactga cacgcatttt ccaatgataa aacatgcaaa ctgcttagtt 120

cagcactact ttaaaaaaat ccatccaaac aacatctgac atcaattata ctgtagattt 180

aaatatatat gtgtggagaa agaaatggtg tccttctgct cttatttgca ttattaaaag 240

aggcaacttt ttaaagtgct tttaaagaaa cttatttttc ctccatttgc taaccgcaac 300

cactattcta ttttcagcat aaaacagaag gaaggaatgg tttcacaggt gaaaaaacag 360

agatatcttt ttttacagtt atttactaag ccggttaagg aatacagaat gggtgcatat 420

gttgtcaacc attcagactt tttcagagag taaatttttg ttcttcattg tggactgtaa 480

caaggaccca cactgacctg tgatc 505

<210> 21

<211> 698

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

ctacccttttg tcacacatgc taatgaaaag cttagttgat tttcactctc cttcatttcc 60

tctaaaatct ctctggctta ggactctgtc agctgaaaaa caaacatgtg gctaccacat 120

ttggggacaa tacagtgttt gcaagccctg cgggagataa tctagccaca cattgtgttc 180

cctgttcaat aacaaaacta ttattcacaa aattggagaa accatagttc ctttccactc 240

aaatctgaga tgataatgat gatgacaata ataataataa gccacggcta catcaagata 300

caaacagctt tttttgcttt gataagatcc acagctgatt tcacttttga ccatgagatt 360

ttcttctcgt gaacaattct gcagtatgtg ccataagaga agggaaggaa tgttgctaat 420

tctttttttg agtttctagc ccatcaatat caaatcttta aatggcaatg tctggcccat 480

tggccaagaa atgaaagttg ttgtaatgct atgttcctgg tatttgttaa atacatttat 540

ttttgtagga catttcacat aaatggaaaa cagaaagccg aaaccataaa gcagggcctc 600

tgaattgcag aagccagaac agtaatgcca cattcaaagc aatcaggttc aagtgtaaat 660

tcttttgttt gaggctcaag aagctcatac aaagcttg 698

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 22

cgcatgatgt cctgtgtagc 20

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 23

tggctgttat gatacctatg gtg 23

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 24

catgcaacct aaatccctca t 21

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 25

ttgagagtct gttgagaatg ga 22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 26

agctcagggc atcaacaaac 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 27

ctacctcccc aagtgttgct 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 28

aggcagaaac tggaccaaag 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 29

agccttgaag tctggggaat 20

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 30

catgaggggc tattatctcc a 21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 31

ttgggtgacc aaagtgatct t 21

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 32

ggactgcaaa gcaatgtgaa 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 33

gatccaatgg gagaacaacg 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 34

ctgggcggga gtcaaattat 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 35

cacaggtcag tgtgggtcct 20

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 36

ccctttgtca cacatgctaa tg 22

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 37

gctttgtatg agcttcttga gc 22

<210> 38

<211> 573

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

gacatggttt tgccatgttg gcccggctgg tatcaaactc ctggcctcag gtgatccacc 60

tgcctcggcc tcccaaagtg ctgggattat aggcgtgagc caccgtggct taacctaaac 120

ttctagatat gaaaactata atgtctgagg tgaaaaatag actggaggaa gaaaaaggca 180

gattggacat tgtagaagaa aggcgagatc agtgaaatta aaagtgtggc aatgaaaact 240

acccaaaata aaacacgcag aaaataaaat tccaaaaaat gaaaaagcat aagtgatatg 300

tgggatagtt tcagtggcct aatacatgag taactggagt ccctgaagaa gaaagactga 360

aaaatatatt tttagaaata atggctgaaa aatttccaaa cttagtgaag ctataaacct 420

acagatctaa gctcaatgaa caccaagaaa aataaacatg aaaataacta ccccaaatta 480

cagcataagt tactaaaaaa caatgacaaa gagaaaaatc tgacagccag aaaatatacc 540

cgtattacat ccagagaaac aaagataagg ctg 573

<210> 39

<211> 494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

cgtgctggca aacttgaaat ctgatgaacc cactaccttc actacactca ctgtctggtc 60

tctctcaggt agctgaggac tgagaaacac cccagccagg caggttgggg tcactataaa 120

ttcacagtca ccaaccacac atggtgctct gtttggctgg ccatctcatt atacctgtct 180

gacttgctta ctgtcctgcc ctccgaaaaa gcttttcaaa cactatctcc ttctgcctca 240

aatgtatcac ctccccctca atgactttgc ttcatatgtg acacaaagaa atgttaatac 300

cagccaagac cttcctcaac ttccggccag caaatctgga acacaagctg catctgtcct 360

ggtttgcctc ttctctcttc tcgttacagt agagtagcca ttcctcttct aaaaaacact 420

gatctcccat cctgctctgg acattaaagt actgagaagt ggttttgtgt tcccagcaat 480

atgggagtca ttgg 494

<210> 40

<211> 450

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

aagtgatcca cccacctgag cctcccaaag ttctgggatt acaggcttga gccactgcgc 60

ccagctataa ccttcacgtt caaagcactc tcccatctat tattaaggcc tctgagaaaa 120

tctccttttt atatatattc tcaagtcaga attattagtc tccatctttc atcttagtct 180

tcttcaaata ccaaactctt tactaagcag ttagacacaa gtagtttcac cagttctatc 240

actcaaatac ggtttcataa gttctgccta gtgattgccc atcagagggg atatggattt 300

gtgggcagga aatagaatag aaacctaact ctaactcttc tgtgaaatgt agtgtttagg 360

ttaatattct tccttaactg ccatctgctt ttttttgttt gtttaacact ttgtccaaat 420

ctctcaaacc ttacaccgca gaatcatgga 450

<210> 41

<211> 568

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gctttcatgg tgtgggctaa ggacgagcgc aagcggctgg cgcagcagaa tccagacctg 60

cacaacgccg agttgagcaa gatgctgggt gagtccgagt cgcagaccca ggcggccggg 120

cgcgctggcg cgaatcgcta ggccgatttc ttaaacccca aactgttctt tgcgagcctg 180

acgcccaaaa ccaggggtgt gtagcggcca cgtcctttct taaggctctg ggttcccttc 240

ccgcttcccg ccctccgacc ctccaaagca gctttccgcc ttgctctccg gctcccggat 300

tccccaggtg gccgggggcg cgggtccaac ggctctggga aggcgacttc ccggcacctc 360

cgggcggcgc gagagcaccc ttggccctga actgggccgg ttgtgtccat ccctcgaccc 420

cttccctagt taggtgtcct tttctgtttt tcgaacgacc gggtgatggg tgagcggaaa 480

gccgcttcca ggagaccaaa agaaaggggt gcctttagag gacgggtgtt ccccaagggc 540

tcggactcag gagtcccaga tctccctc 568

<210> 42

<211> 529

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

aggtgtacca accccagaca ctggcagaac gctctcttta tgtaagacct caaaatctta 60

ctggttggtg tctgctgact tgtttttctc tgttatcttg cctgtctgca gtgacaaatt 120

cagtgcagct ctaactcatg tggacaggga ggaaatgatt ctaggattga ggacttaagg 180

gtgtctggaa gagaagagaa ttgttttgtt ttgttttgtt ttgttagttg ttgttttcct 240

cagacaggac cttgtcaacg ctttcaaata tgtaggctgt ttgctgtttc ctttatgttg 300

gtccctgaga aggatctgcc cttctaccct gtttccctgg ggggtgtgga cagagccttt 360

gtctttgggg aagggggtca tcttgggaaa aggagaacag ggcatcctga ggacctgctc 420

cgtctaagga gagaaagccg aacagatggc agctgccacg cagagggcac tttgtaggaa 480

ctctggctgg agcaggcttc ctgcgctcca atgccaaatc cttcccttc 529

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 43

gacatggttt tgccatgttg 20

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 44

cagccttatc tttgtttctc tgg 23

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 45

cgtgctggca aacttgaaat 20

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 46

ccaatgactc ccatattgct g 21

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 47

aagtgatcca cccacctgag 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 48

tccatgattc tgcggtgtaa 20

<210> 49

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 49

gctttcatgg tgtgggcta 19

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 50

gagggagatc tgggactcct 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Fwd)

<400> 51

aggtgtacca accccagaca 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer (Rev)

<400> 52

gaagggaagg atttggcatt 20