(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0085317
(43) 공개일자 2010년07월29일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0004528
(22) 출원일자 2009년01월20일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀
(72) 발명자
유호진
광주 광역시 남구 봉선동 한국아델리움 103동 1702호
장인엽
광주시 북구 우산동 현대 아파트 104-1404
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

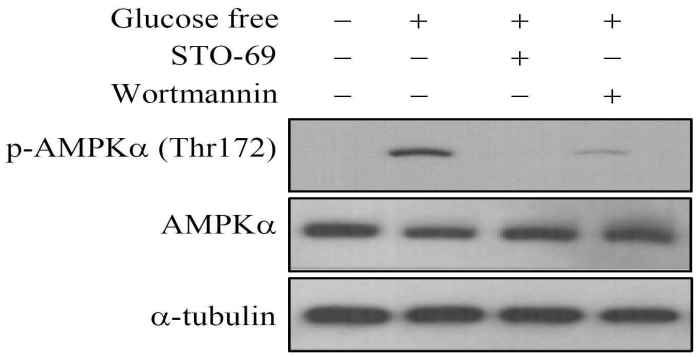
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) AMPK 활성 억제물질의 스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 AMPK 활성 억제물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로, AMPKγ1 및 DNA-PKcs의 상호결합을 억제함으로써 AMPK 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법으로 스크리닝된 AMPKγ1 및 DNA-PKcs의 상호결합을 억제하는 물질은 항암제 또는 신경 호보 약물로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도6c



(72) 발명자

이정희

광주시 동구 서석동 472-10 뜨란채 203

강윤성

서울시 동작구 노량진1동 신동아이리버파크 101-1122

김홍범

광주 광역시 북구 용봉동 1416-7

강미영

광주시 북구 문흥동 명지 아파트 101-203

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	M 1063901, M 20706000032
부처명	교육과학기술부
연구사업명	DNA수복활성조절 및 관련질환연구개발사업, 원자력기술개발사업
연구과제명	바이오재생연구사업, 유전자손상 체크시스템 규명을 통한 방사선 손상억제 기술개발
주관기관	조선대학교
연구기간	2008년 04월 01일 ~ 2009년 03월 31일 , 2008년 06월 01일 ~ 2009년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

1) AMPK γ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPK γ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

2) AMPK γ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 암의 증식 및/또는 전이 억제용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 2

1) AMPK γ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPK γ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

2) AMPK γ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경보호용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 단계 1)의 AMPK γ1 및 DNA-PKcs는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, DNA-PKcs와 AMPK γ1 사이의 상호결합 억제에 의해 AMPK γ1의 인산화가 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 단계 1) 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, siRNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 단계 2)의 상호결합 활성의 측정은 AMPK γ1 및 DNA-PKcs 중의 하나가 고형 기질에 고정화된 단백질 칩에 검출체로 형광물질이 부착된 나머지 단백질을 결합시킨 후 상기 검출체를 측정하는 방법, 고형기질에 부착된 단백질, 상기 나머지 단백질 및 상기 나머지 단백질에 특이적으로 결합하고, 검출체로 표지된 항체를 결합시킨 후 상기 검출체를 측정하는 방법, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 및 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AMPK 활성 억제물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] DNA-PK(DNA-dependent protein kinase)는 DNA 이중가닥파괴(double strand break: DSB)에 의해 활성화된 핵 세린/쓰레오닌 단백질 키나아제(nuclear serine/threonine protein kinase)이다(Hartley KO *et al.*, *Cell* 82:849-856, 1995; Jackson SP *Int J Biochem Cell Biol* 29:935-938, 1997; Jeggo PA *Adv Genet* 38:185-218, 1998). DNA-PK는 전리(ionizing) 및 UV 방사에 의해 유도된 DNA 손상을 초기에 인식하여 활성화 되고 DNA 손상 센서로 간주된다(Burma S & Chen DJ, *DNA Repair, Amst* 3:909-918, 2004). DNA-PK는 손상된 DNA에 결합한 후, 다른 복구 활성을 손상 부위로 표적화함으로써 NHEJ(nonhomologous DNA end-joining)로 알려진 DNA 수선 과정에서 중요한 역할을 수행한다. DNA-PK는 470-kDa의 촉매적 서브유닛(DNA-PKcs; DNA-PK catalytic subunit) 및 Ku70/Ku80 헤테로다이머의 조절 성분으로 구성된다(Smith GC & Jackson SP, *Genes Dev* 13:916-934, 1999; Lees-Miller SP & Meek K, *Biochimie* 85:1161-1173, 2003). 상기 DNA-PKcs는 포유동물에서 ATM(ataxia telangiectasia mutated) 및 ATR(ATM-RAD-3-related)- 키나아제 등을 포함하는 PIKK(phosphatidyl-inositol 3-OH kinase-related kinases) 패밀리에 속하고(Smith GC & Jackson SP, *Genes Dev* 13:916-934, 1999; Bentley NJ *et al.*, *Embo J* 15:6641-6651, 1996; Cliby WA *et al.*, *Embo J* 17:159-169, 1998), 상기 패밀리의 구성원들은 PIK(phosphatidylinositol-3-OH kinase)의 촉매활성 도메인과 상동성을 갖는, 보존된 C-말단 영역을 공유하는 고분자량 폴리펩타이드이다. 상기 ATM, ATR 및 DNA-PKcs는 DSB에 대한 세포성 반응에 관련되어 H2AX, Chk1, Chk2, Nbs1 및 MDC1과 같은 표적을 인산화 시키는 작용을 한다(Abraham RT, *DNA Repair, Amst* 3:883-887, 2004). p53과 결합한 DNA-PK는 비정상적인 DNA 구조를 감지하는 역할을 수행하고(Achanta G *et al.*, *Cancer Res* 61:8723-8729, 2001), p53은 DNA-PKcs가 매개된 신호전달에 대해 효과기(effector)로 작용하는 것으로 나타났고, DNA-PKcs는 선택적으로 p53-비의존성 세포사멸 반응을 조절한다(Wang S *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* U S A 97:1584-1588, 2000).

[0003] AMPK(AMP-activated protein kinase)는 진핵 세포에서 에너지 센서로 작용하는 세린/쓰레오닌 단백질 키나아제이다(Warden SM *et al.*, *Biochem J* 354:275-283, 2001). AMPK는 촉매적 활성을 띄는 α 서브유닛과 두 개의 조절 및 표적화 서브유닛인 β 및 γ로 구성된 헤테로다이머이다. 포유동물의 AMPK에는 두 개의 α 서브유닛, 세 개의 γ 서브유닛 및 2 개의 β 서브유닛(α1, α2, γ1, γ2, γ3, β1 및 β2)이 포함된다(Mitchelhill KI *et al.*, *J Biol Chem* 272:24475-24479, 1997). 상기 α 서브유닛은 각각 N-말단에 촉매적 활성을 갖는 코어(1-312)를 포함하고, C-말단에는 자기 조절 작용(autoregulation)에 관련되고, β 및 γ 서브유닛에 결합하는 서열(313-548)을 포함한다(Crute BE *et al.*, *J Biol Chem* 273:35347-35354, 1998). 상기 γ 서브유닛은 각각 두 개의 AMP 분자와 함께 결합하고 아데닌 뉴클레오티드의 양을 인지하는 키나아제 복합체를 허락하는 네 개의 탠덤 시스타티온 β-합성효소(cystathione β-synthase: CBS) 도메인을 포함한다. 상기 β 서브유닛은 이의 N-말단의 미리스토일레이션(myristoylation)을 통해 세포막과 같은 세포내 위치(Polekhina G *et al.*, *Curr Biol* 13:867-871, 2003; Long YC & Zierath JR, *J Clin Invest* 116:1776-1783, 2006) 및 글리코겐 결합 도메인을 통한 세포내 글리코겐(Alessi DR *et al.*, *Annu Rev Biochem* 75:137-163, 2006)에서 상기 복합체를 표적화할 뿐만 아니라, α 및 γ 서브유닛에 대한 골격으로 작용하는 것으로 보고되었다. 상기 AMPKγ 서브유닛의 CBS 도메인으로 상기 AMP의 결합은 AMPK 복합체의 활성화를 유도하고, 상기 활성하는 고농도 ATP에 의해 중화되며, 세포내 AMP:ATP 비율의 변화를 감시하기 위한 시스템을 가능하게 한다(Hardie DG *et al.*, *Biochem* J 338, Pt 3):717-722, 1999; Scott JW *et al.*, *J Clin Invest* 113:274-284, 2004). 세포내 AMP 농도의 증가에 의해 AMPK가 활성화되면, 동화작용 경로를 억제하고 세포내 에너지 수준을 회복시키는 이화작용 경로를 촉진시킨다. AMPK의 활성화는 수 많은 단백질의 인산화를 유도하여 포도당 섭취, 해당(당분해) 및 지방산 산화와 동시에 지방산 합성, 콜레스테롤 합성 및 포도당 생산의 억제를 초래한다(Hardie DG & Hawley SA, *Bioessays* 23:1112-1119, 2001; Kahn BB *et al.*, *Cell Metab* 1:15-25, 2005).

[0004] 적어도 두 개의 키나아제가 AMPK를 인산화하는 것으로 나타났다: 두 개의 액세서리 서브유닛인 STRAD 및 MO25의 복합체인, 종양 억제 키나아제인 LKB1(Hawley SA *et al., J Biol* 2:28, 2003; Hong SP *et al., Proc Natl Acad Sci* U S A 100:8839-8843, 2003; Shaw RJ *et al., Proc Natl Acad Sci* U S A 101:3329-3335, 2004; Woods A *et al., Curr Biol* 13:2004-2008, 2003) 및 CaMKKβ(Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinase β)(Hawley SA *et al., Cell Metab* 2:9-19, 2005; Woods A *et al., Cell Metab* 2:21-33, 2005). 상기 LKB1 및 CaMKKβ는 AMPK의 촉매활성을 갖는 α 서브유닛의 Thr172를 직접적으로 인산화한다. 최근에는 MAPKK(mitogen-activated protein kinase kinase) 패밀리의 구성원인 Tak1도 AMPK 인산화 및 활성화를 할 수 있는 것으로 보고되었다(Momcilovic M *et al., J Biol Chem* 281:25336-25343, 2006). 상기 LKB1은 AMP에 의해 자극되지는 않지만 구조적으로 활성형이다(Woods A *et al., Curr Biol* 13:2004-2008, 2003; Lizcano JM *et al., Embo J* 23:833-843, 2004; Sakamoto K *et al., Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E310-E317, 2004). 시험관 연구에서 LKB1에 의한 AMPK의 인산화를 자극하는 기본적인 조절 기작으로 AMP와 AMPK의 결합이 제안되었다(Hawley SA *et al., J Biol* 2:28, 2003). 종양 억제 유전자인 LKB1은 주요 AMPK 키나아제로, Peutz-Jeghers 증후군은 LKB1의 돌연변이에 의한다(Hawley SA *et al., J Biol* 2:28, 2003; Shaw RJ *et al., Proc Natl Acad Sci* U S A 101:3329-3335, 2004; Woods A *et al., Curr Biol* 13:2004-2008, 2003). 또한 AMPK는 고삼투압 스트레스 또는 항당뇨병치료약 메트포민(metformin)에 의해 AMP-비의존적 방법으로도 활성화될 수 있다(Fryer LG *et al., J Biol Chem* 277:25226-25232, 2002). 어떤 조직에서는 CaMMKβ가 Ca^{2+}-의존성 조건에서 AMPK를 활성화 하는 대체의 상류 키나아제이다(24. Hawley SA *et al., Cell Metab* 2:9-19, 2005; Woods A *et al., Cell Metab* 2:21-33, 2005). 상기 CAMKKβ가 AMPK의 상위에서 작용하는 것은 세포내 Ca^{2+}의 증가에 의해 AMP:ATP 비율의 변화와 더불어 AMPK를 활성화 하는 2차 경로로서 작용할 수 있는 것을 제안한다.

[0005] 세포내 주요 에너지원인 포도당의 소모는 AMP 농도의 증가 및 ATP 농도의 감소에 의해 지시되고, 영양소 결핍, 저산소증 및 산화적 스트레스와 같은 다양한 스트레스로부터 발생될 수 있다(Long YC & Zierath JR, *J Clin Invest* 116:1776-1783, 2006). 포도당 소모에 의한 AMP 증가에 의해 활성화되는 단백질 키나아제인 AMPK는 세포내 에너지 센서로 세포내 에너지 항상성(homeostasis)에서 중요한 역할을 수행한다(Kahn BB *et al., Cell Metab* 1:15-25, 2005). 포도당 소모에 의해 AMP가 AMPKγ에 결합함으로써 AMPK가 활성화 되는 것이 잘 알려져 있다. AMP가 매개된 알로스테릭(allosteric) 활성화, 상류 키나아제에 의해 향상된 인산화 및 단백질 인산분해효소에 의한 Thr172 탈인산화의 억제 등의 세가지 분리된 방법으로[Hardie DG *et al., Biochem* J 338, Pt 3):717-722, 1999], 세포 내 에너지가 소모된 후 생하는 AMPKα의 인산화를 유도하는 AMPK의 조절 γ 서브유닛에 AMP가 결합한다(Adams J *et al., Protein Sci* 13:155-165, 2004).

[0006] 상기 AMPK는 심장, 골격근, 간, 지방 등의 인체 장기와 조직에 폭넓게 발현되어 상기 작용을 나타낸다. 심장의 AMPK 활성이 증가하면 세포 안으로의 포도당 유입이 증가하여 해당과정이 활성화되며 지방산 산화가 촉진되고, 골격근에서는 포도당 유입을 증가시키고 해당과정, 지방 산화로 인한 ATP 생산을 증가시킬 뿐 아니라 미토콘드리아의 발생도 촉진하고, UCP(Uncoupling Protein)의 발현도 증가시켜 에너지 소비를 촉진한다. 간의 AMPK는 지방산과 콜레스테롤 합성을 억제하고 당신생성도 억제하며 지방에서는 지방산 합성을 억제하고 지방분해를 촉진한다고 알려져 있다. 이에, 상기 'AMPK 활성화시켜 항비만 및 항당뇨 효과를 가지는 트랜스-레스베라트롤(trans-resveratrol)을 유효성분으로 하는 제제'에 관한 특허(대한민국 등록특허 제10-0681439호)도 보고된바 있다.

[0007] 또한, 상기 AMPK의 활성을 억제함으로써 항암제에 의한 약리 효과를 증진시키고, 암의 증식 및/또는 전이를 억제하는 방법(대한민국 공개특허 제10-2006-0066610호) 및 AMPK의 약리학적 저해에 의한 신경 보호 방법(대한민국 공개특허 제10-2007-0085093호) 등이 보고된바 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 DNA-PKcs에 결합하는 단백질을 효모 Two-Hybrid 방법으로 스크리닝하던 중 AMPKγ1을 발견하고, 상기 AMPKγ1이 DNA-PKcs가 풍부한 신경교종 세포에서 DNA-PKcs의 내생적 상호작용 파트너이며, 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성이 DNA-PKcs 활성 억제에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 이에 상기 DNA-PKcs이 AMPKγ1의 활성제이므로, DNA-PKcs와 AMPKγ1의 상호작용을 조절하는 물질을 스크리닝하는 방법에 유용하게 이

용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 AMPKγ1(AMP-activated protein kinase γ1) 및 DNA-PKcs(DNA-PK catalytic subunit) 사이의 상호결합 활성을 억제함으로써, 암의 증식 및/또는 전이 억제 또는 신경보호에 이용될 수 있는 약물을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0011] 1) AMPKγ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

[0012] 2) AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0013] 3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 암의 증식 및/또는 전이 억제용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은

[0015] 1) AMPKγ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

[0016] 2) AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0017] 3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경보호용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서, M059K 및 M059J 세포주를 정상 또는 포도당 소모 배지에서 12시간 동안 배양한 후, 세포를 파쇄하였다. 파쇄액으로부터 DNA-PK-특이적 항체를 이용하여 단백질을 면역침강한 후, 항-AMPKγ1 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다. 그 결과, M059K 에서는 내생적 DNA-PKcs가 AMPKγ1에 결합하는 것으로 나타났으나, M059J 세포에서는 결합하지 않았다. 포도당이 소모된 상태에서는 AMPKγ1에 결합한 DNA-PKcs의 양을 유의하게 변화시키지 않았다(도 1a 참조). 항-AMPKγ1 항체를 이용한 상호간 공동 면역침강 검사에서는, 세포 파쇄액으로부터 내생적 DNA-PKcs가 용이하게 면역침강되었다(도 1b 참조). 상기 결합은 특이적이어서, DNA-PKcs가 토끼 IgG를 이용하여 면역침강된 시료에서는 검출되지 않았다. 상기 결과로부터 AMPKγ1가 DNA-PKcs의 내생적 상호작용 파트너임을 확인하였다.

[0020] AMP/ATP 비율의 증가로 정의되는, 에너지 결핍은 포도당 소모, 저산소증(hypoxia) 및 산화적 스트레스와 같은 여러가지 인자에 의해 발생할 수 있다(Long YC & Zierath JR, *J Clin Invest* 116:1776-1783, 2006). 상기 세포성 AMP/ATP 비율은 AMPK 활성을 결정하는 주요한 인자 중의 하나로, 포도당 소모에 의해 AMPK 인산화가 유도된다. 본 발명자들은 DNA-PKcs의 AMPKγ1에 대한 결합이 AMPKα 인산화 및 활성화에 영향을 주는지 여부를 결정하기 위해, DNA-PKcs가 결여 및 DNA-PKcs가 충분한 세포를 대상으로 포도당이 소모된 상황에서 AMPK를 인산화하는 능력을 측정하였다. 그 결과, 포도당 소모에 의해 유도된, Thr172 위치에서 AMPK 인산화는 DNA-PKcs가 결여된 인간 신경교종 세포(M059J)에서 억제되었고, DNA-PKcs가 충분한 M059K 세포에서 현저하게 컸었다(도 2a 참조). 유사하게는 두 개의 세포 유형이 24 시간 동안 포도당 농도가 일률적으로 감소하는 조건으로 배양되었을 때, 포도당이 없을 때 AMPK에 대한 영향이 M059J 세포보다 M059K 세포에서 더 컸으나(도 2b 참조), 전체 AMPKα

의 발현량은 일정하게 유지되었다. 또한, AMPK 활성은 ACC(acetyl-CoA carboxylase) 기질의 Ser79의 인산화 정도에 따라 지시되는 속도가 제한된 효소인 긴사슬 지방산 합성효소이므로(Hardie DG *et al., J Physiol* 574:7-15, 2006), 이에 본 발명자들은 AMPK 활성의 마커로써 ACC 인산화도 검사하였다. 그 결과, Ser79에서 ACC의 기본 및 촉진된 인산화는 M059J 세포에서보다 M059K 세포에서 더 높았고, 이는 DNA-PK가 AMPK 활성화에 포함된 것을 다시 한번 나타낸다(도 2 참조). M059K 세포에서 UV 방사선 조사는 Thr172에서 AMPK 인산화 및 AMPK 활성화를 증가시키지 않는데(데이타 없음), 이는 비록 DNA-PKcs가 DNA 회복에 일차적으로 관련되어 있고, 단일 또는 이중가닥 절단에 반응하는 다양한 하류의 표적 단백질을 인산화하더라도, DNA 손상에 관련된 DNA-PKcs 활성화는 AMPK 활성화에 영향을 주지 않는다.

[0021] AMPK 활성에 관여한 DNA-PKcs의 역할을 더욱 조사하기 위하여, 면역침강된 전체 AMPK를 대상으로 SAMS 펩타이드 분석법을 이용하여 인산화를 측정하였다. 그 결과, M059J 및 M059K 세포의 기본 AMPK 활성은 각각 995 ± 22 및 1020 ± 25 cpm이었는데, 포도당 소모에 노출된 M059J 및 M059K 세포에서 AMPK 활성은 각각 1160 ± 26 및 1480 ± 36 cpm으로 증가된 것으로 나타났다. 즉, 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성은 DNA-PK가 결여된 세포에서 억제되었다(도 3 참조).

[0022] 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK의 인산화는 M059K 세포에서 DNA-PKcs의 억제에 의해 감소되는 것을 나타났다. 포도당 소모 조건에서 AMPK의 인산화에서 DNA-PKcs의 역할을 조사하기 위하여, siRNA를 이용하여 DNA-PKcs의 발현량을 억제하거나, 고농도(10 μM 이상)에서 강력한 및 비가역성 효소 억제제인 월트마닌(wortmannin)을 이용하여 DNA-PKcs의 활성을 억제하였다. 그 결과, DNA-PKcs siRNA로 형질전환된 M059K 세포에서, DNA-PKcs 발현양의 감소가 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK의 인산화가 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 4a 참조). 또한, DNA-PKcs의 발현이 억제된 세포에서 AMPK(Thr172) 활성은 대조군에 비해 적게 증가하였다(도 4b 참조). 아울러, 월트마닌을 처리하지 않은 세포에서 보다 월트마닌을 처리한 세포에서, 포도당 소모에 의해 자극된 AMPK 인산화가 적게 증가된 것을 확인하였다(도 4c 참조). 상기 결과는 DNA-PKcs가 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성을 증가시키는 것을 의미한다.

[0023] DNA-PKcs가 정말로 AMPK 활성화를 증가시키는지 결정하기 위하여, 본 발명자들은 인간 섬유아세포 WI38 및 IMR90 세포주에서 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK의 활성이 DNA-PKcs 발현 억제에 의해 감소되는 것을 확인하였다(도 5 참조). 상기 결과는 DNA-PKcs가 일차 인간 이배체 섬유아세포에서 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성에 포함된 것을 나타낸다.

[0024] 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성은 LKB1이 결핍된 HeLa 세포주에서 DNA-PKcs의 억제에 의해 감소되었다. LKB1은 저산소증(hypoxia), 산화적 스트레스 및 영양소 결핍과 같은 조건하에서 AMPK의 인산화에 포함된, 주요 단백질 키나아제이다(Alessi DR *et al., Annu Rev Biochem* 75:137-163, 2006). 상기 결과들이 제시하는 바와 같이 DNA-PKcs는 AMPK의 인산화에 기여하는 것으로 나타났으므로, 본 발명자들은 LKB1을 발현하지 않는 HeLa 세포주(Hurley RL *et al., J Biol Chem* 280:29060-29066, 2005)에서 AMPK 인산화에 대한 DNA-PK의 효과도 검사하였다. DNA-PKcs가 HeLa 세포주에서도 AMPK의 촉진제로서 기능하는 것에 대한 이론을 검증하기 위하여, DNA-PKcs siRNA로 형질감염된 HeLa 세포주를 포도당 소모 조건에서 배양시킨 후, AMPKα의 인산화를 면역 블랏팅 방법으로 측정하였다. 그 결과, 포도당 소모 조건하에서, AMPK의 인산화는 대조군 세포와 비교하여 DNA-PKcs의 발현이 억제된 HeLa 세포에서 현저하게 감소하였다(도 6a 참조). 또한, 상기 DNA-PKcs 억제제인 월트마닌에 의해서도 역시 포도당 소모 조건에서 AMPK의 인산화는 비처리된 대조군 세포에서 보다 처리된 세포에서 현저하게 낮았다(도 6b 참조). 상기 결과는 포도당 소모 조건에서 AMPK의 인산화에 DNA-PKcs가 포함된 것을 강력하게 지지한다. 그러나 또한 상기 월트마닌의 농도는 PI4 키나아제 및 미오신 경쇄 키나아제(myosin light chain kinase: MLCK)과 같은 그 외의 키나아제뿐만 아니라, 거의 모든 PI3 키나아제를 억제한다. 따라서, 포도당 소모에 반응하는 AMPK 활성화에 포함된 상기 키나아제들 중의 하나가 관련된 것을 제외할 수 없다.

[0025] LKB1은 인간 자궁경부암 세포 HeLa 세포주에서 검출되지 않는다(Hurley RL *et al., J Biol Chem* 280:29060-29066, 2005). 따라서 CaMKK는 HeLa 세포주에서 AMPK를 조절하기 위하여, AMPK 키나아제로 작용한다. 그러나 상기 CaMKK 억제제 STO-609는 만니톨 및 2-디옥시글루코오스에 반응하는 AMPK의 인산화 및 활성화를 완벽하게 차단하지 않고(Hurley RL *et al., J Biol Chem* 280:29060-29066, 2005), 이에 상기 세포에 다른 AMPK 조절 기작이 존재할 수 있다는 것을 제안한다. 또한, 본 발명자들은 AMPK를 인산화시키는데 관여하는 것으로 알려진 CAMKK의 억제제인 STO-609와 DNA-PKcs 저해제인 월트마닌을 투여한 후, 포도당 소모에 의한 AMPK 인산화에 미치는 영향을 비교한 결과, 본 발명에서 DNA-PKcs 억제를 통해 AMPK 활성을 억제하는 것이 확인된 DNA-PKcs 억제제인 월트마닌과 기존에 AMPK를 강력하게 저해한다고 알려진 STO-609의 AMPK 인산화 활성 억제 효과가 거의 비슷함을 알 수 있었다(도 6c 참조). 따라서 DNA-PKcs는 포도당 결핍 시 AMPK를 활성화하는데 중요한 역할을 할 것

으로 사료된다. 상기 발견은 포유동물 세포에서 AMPK의 조절자 후보로 DNA-PK를 지시한다.

[0026] 이에 본 발명의 방법은 AMPKγ1 및 DNA-PKcs의 상호결합 활성을 억제함으로써, 암의 증식 및/또는 전이 억제 또는 신경보호에 이용될 수 있는 약물을 스크리닝하는 방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0027] 본 발명은

[0028] 1) AMPKγ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

[0029] 2) AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0030] 3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 암의 증식 및/또는 전이 억제용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0031] 단계 1)의 AMPKγ1 및 DNA-PKcs는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 한다. 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs는 이미 분리 및 정제된 형태로 구입하여 사용하거나, 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 각각의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체에 내재된 형태로 사용하거나, 상기 형질전환체로부터 분리 및 정제하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 중 하나는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 고형 기질에 결합시키기 위해, 미세구체를 현탁한 후 마이크로튜브(microtube)에 옮겨 원심분리로 상층액을 제거한 후 재현탁하고, N-하이드록시-설포숙시니마이드(N-hydroxy-sulfosuccinimide) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이마이드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)를 차례로 처리한 후 원심분리로 상층액을 제거한 후 세척하여 보관하였다.

[0032] 단계 1) 후보물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, siRNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 단계 2)의 상호결합 활성의 측정은 단백질 간의 상호결합 활성을 측정할 수 있는 방법으로 당업계에 알려진 방법은 무엇이든지 사용가능한데, 그 예로는 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 중의 하나가 고형 기질에 고정화된 단백질 칩에 검출체로 형광물질이 부착된 나머지 단백질을 결합시킨 후 상기 검출체를 측정하는 방법, 고형기질에 부착된 단백질, 나머지 단백질 및 상기 나머지 단백질에 특이적으로 결합하고, 검출체로 표지된 항체를 결합시킨 후 상기 검출체를 측정하는 방법, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한 검출체로는 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 또한, 본 발명은

[0035] 1) AMPKγ1, 이의 결합파트너인 DNA-PKcs 및 상기 AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합을 억제하는 후보물질을 처리하는 단계(실험군);

[0036] 2) AMPKγ1 및 DNA-PKcs 사이의 상호결합 활성(양성대조군) 및 단계 1)의 실험군의 상호결합 활성을 각각 측정하는 단계; 및,

[0037] 3) 양성대조군 보다 상기 상호결합 활성을 억제하는 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경보호용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

효 과

[0038] 본 발명의 방법으로 스크리닝된 AMPKγ1 및 DNA-PKcs의 상호결합을 억제하는 물질은 항암제 또는 신경 호보 약물로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0040] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **<실시예 1> DNA-PKcs와 결합하는 단백질의 선별**

[0042] 신규 DNA-PKcs-상호작용 단백질을 동정하기 위하여, 본 발명자들은 인간 성인 전립선 cDNA 발현 라이브러리를 대상으로, Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3(Clontech, USA)을 이용하여 제조사에서 제시한 방법대로 효모 Two-Hybrid 스크린을 수행하였다.

[0043] 1) 구체적으로, 인간 DNA-PKcs(nts 서열번호 6, aa 서열번호 1)의 cDNA를 수득하기 위하여, 인간 GM00637 세포(ATCC, USA)로부터 RNeasy mini kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, 전체 RNA 1 ㎍과 oligo-d(T) 1 ㎕(Invitrogen, USA, 0.5 ㎍/㎕)에 증류수를 50 ㎕까지 채운 후, AccuPower RT-premix(Bioneer, 한국)에 넣어 RT-PCR(reverse transcription polymerasechain reaction) 반응시켰다. 70℃에서 5분, 4℃에서 5분, 42℃에서 60분, 94℃에서 5분, 4℃에서 5분간 반응하여 cDNA를 합성함으로써 수득하였다. 상기 cDNA(3-5 ㎕) 혹은 증류수(음성 대조군)를 주형으로 하여, 서열번호 7(센스: 5'-GAATTCAAGCGAGTCCGTGGGAAGGCC-3') 및 서열번호 8(안티센스: 5'-GTCGACTTCGCTGCTTATGATGAAGGG-3')의 프라이머 쌍 및 PCR Master Mix(Promega, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 더욱 상세하게는, 95℃에서 5분 동안 변성해주고, 95℃ 45초, 65℃ 45초, 72℃ 45초의 조건으로 35 회전을 돌린 후, 72℃에서 5분 동안 신장시켜준 뒤, 4℃에서 냉각의 순서로 수행하였다. 상기의 반응 완료 후 생성된 PCR 산물을 *EcoR*I 및 *Sal*I 제한효소(promega, USA)로 GAL4 DNA-결합 도메인(DNA-binding domain)에 연결하여 제조한 pGBT9(Clontech, USA)를 미끼 플라스미드로 사용하여 ADE2, HIS3, lacZ 및 MEL1 리포터 구조물을 포함하는, 싸카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주 AH109(Clontech, USA)에 삽입하였다. 상기 형질전환체를 Trp이 결여된 SD 고체 선별배지에서 3-5일 동안 30℃로 배양함으로써, 미끼 플라스미드가 형질전환된 효모 균주를 선별하였다.

[0044] 2) 상기 선별된 효모 균주를 GAL4 활성화 도메인(activating domain)과 전립선 cDNA 라이브러리가 연결되도록 제작된 pACT2 플라스미드(Clontech, USA)로 형질전환하였다. 상기 형질전환체를 Leu, Trp 및 His가 결여된 SD 고체 선별배지에서 배양한 후, 추가로 푸른색 콜로니를 형성함으로써 α-갈락토시다아제를 발현하는 균주를 선별하기 위하여, X-α-Gal을 포함하는 SD 배지에서 배양하였다.

[0045] 3) 선별된 클론으로부터 플라스미드 DNA를 분리한 후, 관심 단백질을 암호화하는 유전자를 확인하기 위해 염기서열을 분석하였다. 상기 염기서열(서열번호 9)을 NCBI의 BLAST를 이용해 분석한 결과, AMPKγ1으로 확인되었다.

[0046] 4) 상기 AMPKγ1을 다시 pACT2 벡터에 클로닝 한 후, 대장균 DH5α로 형질도입시켰다. 발현이 제대로 되는지 확인한 후, AMPKγ1이 포함된 pACT2 미끼 플라스미드까지를 포함하는 AH109 효모 균주로 형집도입시켰다. 선별배지에서 배양함으로써 분석을 반복하였고, 푸른색 콜로니를 형성하는 클론의 염기서열을 재분석하여 AMPKγ1를 다시 확인하였다.

[0047] **<실시예 2> 신경교종 세포에서 DNA-PKcs와 AMPKγ1의 결합 확인**

[0048] DNA-PKcs가 풍부한 M059K 세포주 및 M059K DNA-PKcs가 결핍된 M059J 세포주를 대상으로, DNA-PKcs가 AMPKγ1과 상호결합하는 것을 조사하였다.

[0049] 1) 인간 신경교종 M059K 및 M059J 세포주(American Type Culture Collection; ATCC, USA)는 10% FBS, 페니실린

(100 U/㎖) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖)이 첨가된 DMEM/F12(Dulbecco's modified Eagle medium with Ham's F-12 nutrient mixture, 1:1; Invitrogen, USA)에서 배양하였다. 상기 각각의 세포주를 추가로 정상 또는 포도당 소모 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 모든 배양은 5% CO_2 및 37℃의 조건에서 습도가 조절되는 인큐베이터에서 수행되었다.

[0050] 2) 상기 세포주를 세포분해용액(25 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 5% glycerol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 2 ㎍/㎖ pepstatin, 2 ㎍/㎖ leupeptin 및 2 ㎍/㎖ 아프로티닌)에 넣어서 한시간 동안 4℃에서 배양하였다. 13,000×g로 30분동안 원심분리한 후, 상기 상등액으로부터 항-DNA-PK 항체 또는 항-AMPKγ1 항체(Abcam, USA) 및 정상 면역글로불린(정상 래빗 IgG; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 이용하여 세포내 단백질을 면역침강하였다. 상기 결합된 단백질 G-아가로오스 비드(Amersham Biosciences, USA)와 결합시킨 후, 과량의 상기 세포분해용액으로 세척하였고, SDS 시료 완충용액에서 끓여주었다. 단백질들을 SDS-PAGE 방법으로 분획한 후, 항-DNA-PKcs 및 항-AMPKγ1 항체를 이용하여 면역블랏팅을 수행하였다.

[0051] 3) 분리된 단백질 농도는 염료-결합 마이크로어세이(Bio-Rad, USA)를 이용하여 측정하였다. 상기 분리된 단백질(20 ㎍)을 Laemmli 시료 완충용액와 1:4로 섞어 100℃에서 5분간 끓였다. 끓인 시료를 10% SDS-PAGE겔의 웰에 로딩하고 125 V에서 2시간 동안 전기영동 하여 분자량에 따라 분리하였고, 상기 단백질을 20V, 400A이하의 조건으로 1시간 동안 전기영동 하여 Bio-trace PVDF 막(PALL Life Sciences, USA)으로 옮겼다. 상기 단백질이 옮겨진 막에 0.1% Tween-20 및 5% 스킴밀크를 포함하는 트리스-완충 식염수(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl)를 처리하여 상기 막에 단백질이 결합되지 않은 부분을 차단한 후, 상기 차단 용액에 제조자의 프로토콜에 따라 희석된 1차 항체[항-DNA-PK 항체 또는 항-AMPKγ1 항체 및 α-튜불린 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)]를 결합시킨 후, 세척하였다. 이후, 차단용액에 1:4,000로 희석한 2차 항체(항토끼-IgG-HRP; Amersham Bioscience, UK)와 함께 2시간 동안 인큐베이션 한 후, 다시 세척하였다. ECL 검출 키트(iNtRON Biotech, Korea)로 발광반응을 유발하였고 필름(Las-4000, Fuji)에 노출시켜 결합 반응을 관찰하였다.

[0052] 그 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이 M059K에서는 내생적 DNA-PKcs가 AMPKγ1에 결합하는 것으로 나타났으나, M059J 세포에서는 결합하지 않았다. 포도당이 소모된 상태에서는 AMPKγ1에 결합한 DNA-PKcs의 양을 유의하게 변화시키지 않았다.

[0053] 또한, 도 1b에서 나타난 바와 같이 항-AMPKγ1 항체를 이용한 상호간 공동 면역침강 검사에서는, 세포 파쇄액으로부터 내생적 DNA-PKcs가 용이하게 면역침강되었다. 상기 결합은 특이적이어서, DNA-PKcs가 토끼 IgG를 이용하여 면역침강된 시료에서는 검출되지 않았다.

[0054] **<실시예 3> DNA-PKcs가 결여된 세포에서 AMPKγ1의 인산화 확인**

[0055] DNA-PKcs가 풍부한 M059K 세포주 및 M059K DNA-PKcs가 결핍된 M059J 세포주를 대상으로, 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 인산화를 조사하였다.

[0056] **<3-1> 포도당 소모에 의한 AMPK 인산화**

[0057] 0, 6, 12 및 24시간 동안 포도당이 소모된 배지에서 실시예 2의 방법대로 배양한 M059K 및 M059J 인간 신경교종 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 세포분해용액(20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM 글리세롤 인산염, 1% 트리톤 X-100, 10% 글리세롤, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 10 ㎍/㎖ leupeptin, 10 ㎍/㎖ aprotinin, 1 mM Na3VO4 및 5 mM NaF)에 넣어서 30분 동안 0℃에서 배양하였다. 14,000×g로 30분동안 원심분리 한 후, 상기 상등액으로부터 항-인산-AMPKα(Cell Signaling Technology, USA), 항-AMPKα(Cell Signaling Technology, USA), 항-인산-ACC(acetyl-CoA carboxylase; Cell Signaling Technology, USA), 항-DNA-PKcs, 항-인산-DNA-PKcs(Abcam, USA) 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0058] 그 결과, 도 2a에서 나타난 바와 같이 포도당 소모가 AMPKα의 발현량 및 DNA-PKcs 발현량 및 인산화에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 그러나 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 인산화는 DNA-PKcs가 결여된 인간 신경교종 세포에서 억제되었다. 또한, Ser79에서 ACC의 인산화는 M059J 세포에서보다 M059K 세포에서 더 높았다.

[0059] **<3-2> 포도당 농도에 따른 AMPK 인산화**

[0060] 17.5, 10, 1 및 0 mM 포도당이 포함된 배지에서 12시간 동안 실시예 2의 방법대로 배양한 M059K 및 M059J 인간 신경교종 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출한 후, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα, 항-인산-ACC 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0061] 그 결과, 도 2b에서 나타난 바와 같이 AMPKα의 발현량은 일정하게 유지되었으나, 포도당이 없을 때 AMPK의 인산화과 M059J 세포보다 M059K 세포에서 더 컸다. 또한, Ser79에서 ACC의 인산화는 M059J 세포에서보다 M059K 세포에서 더 높았다.

[0062] **<실시예 4> DNA-PKcs가 결여된 세포에서 AMPKγ1의 활성 확인**

[0063] DNA-PKcs가 풍부한 M059K 세포주 및 M059K DNA-PKcs가 결핍된 M059J 세포주를 대상으로, 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성을 측정하였다.

[0064] 1) M059J 및 M059K 세포를 포도당이 있거나 없는 배지에서 12시간 동안 실시예 2의 방법대로 배양한 M059K 및 M059J 인간 신경교종 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 단백질을 추출한 후 정량하였다. 200 ㎍의 단백질이 포함된 전체 세포 분쇄액을 단백질 G-세파로오스 비드(Amersham Biosciences, USA) 및 항-AMPKα 항체와 2시간 동안 4℃에서 인큐베이션 하였다. 이후 12,000 rpm에서 20초 동안 원심분리 함으로써 상기 비드를 펠렛화 하였다. 조심스럽게 상등액을 제거하고 상기 비드를 1% Triton X-100을 포함하는 완충용액으로 1회 세척한 후, 1% Triton X-100이 포함되지 않은 완충용액으로 2회 세척하였다. 상기 비드를 50 ㎕의 상기 완충용액에 현탁한 후, AMPK 활성을 측정하였다.

[0065] 2) AMPK 활성은 5 μCi [γ-^{32}P]ATP(IZOTOP, 헝가리) 5 ㎕, AMP(1 mM) 5 ㎕ 및 세포 용해물 검사 완충용액 5 ㎕를 이용하여, SAMS(서열번호 3: HMRSAMSGLHLVKRR) 합성 펩타이드 기질(1 ㎍/㎕; Upstate, USA) 5 ㎍과 ^{32}P의 결합을 측정함으로써 결정되었다(Davies SP *et al., Eur J Biochem* 186:123-128, 1989). 검사 혼합물을 30℃에서 10분 동안 배양한 후, P-81 포스포셀룰로오스 종이(Upstate Cell signaling, USA) 위에 상기 혼합물을 점적하고 1% 인산으로 5분씩 3회 세척함으로써 반응을 종결시켰다. 상기 시료를 건조한 후 표지된 인산의 결합량을 액체 신틸레이션(scintillation) 카운터(Packard Instruments, USA)를 이용하여 정량하였다. 상기 검사는 세 번씩 수행되었다. 각 수치는 평균 ± s.d.로 나타내었다(**, $P < 0.01$ 및 *, $p < 0.05$).

[0066] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성은 DNA-PK가 결여된 세포에서 억제되었다. M059J 및 M059K 세포의 기본 AMPK 활성은 각각 995 ± 22 및 1020 ± 25 cpm이었는데, 포도당 소모에 노출된 M059J 및 M059K 세포에서 AMPK 활성은 각각 1160 ± 26 및 1480 ± 36 cpm으로 증가된 것으로 나타났다.

[0067] **<실시예 5> DNA-PK siRNA에 의한 AMPKγ1의 활성 확인**

[0068] DNA-PKcs가 풍부한 M059K 세포주를 대상으로, DNA-PK siRNA에 의한 AMPKγ1의 활성을 측정하였다.

[0069] **<5-1> DNA-PK siRNA에 의한 AMPK 인산화 억제**

[0070] 1) M059K 세포에 Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen, USA)를 이용하여, 제조업자의 프로토콜에 따라 Scrambled siRNA(음성대조군: Bioneer, Korea; 센스 siRNA 서열번호 3:5'-CCU ACG CCA CCA AUU UCG U-3', 안티센스 siRNA 서열번호 4:5'-ACG AAA UUG GUG GCG UAG G-3') 또는 DNA-PKcs siRNA(Santa Cruz Biotechnology, USA: Catalog # SC-35200, 염기서열은 회사에서 공개 안 함)를 형질도입시켰다.

[0071] 2) 상기 형질도입된 세포를 포도당이 있거나 없는 배지에서 12시간 동안 배양한 후, 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출한 후, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα, 항-DNA-PKcs 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0072] 그 결과, 도 4a에서 나타난 바와 같이 DNA-PKcs siRNA로 형질전환된 M059K 세포에서, DNA-PKcs의 단백질 발현량이 80% 이상 감소한 것을 확인하였다. 또한, DNA-PKcs의 mRNA 양이 현저하게 감소된 것을 RT-PCR로 확인하였다(데이타는 기재하지 않았음). 아울러, AMPK의 인산화도 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0073] **<5-2> DNA-PK siRNA에 의한 AMPK 활성 억제**

[0074] 실시예 5-1의 상기 형질도입된 세포를 포도당이 있거나 없는 배지에서 12시간 동안 배양한 후, 실시예 4-1의 방법으로 단백질 분리, AMPK 면역침강 및 SAMS 펩타이드 분석을 수행하였다. 각 실험은 세 번씩 따로 수행하였고, 각 수치는 평균 ± s.d.의 형태로 나타내었다(**, P < 0.01).

[0075] 그 결과, 도 4b에서 나타난 바와 같이 상기 대조군 siRNA로 형질감염된 세포에서 AMPK 활성은 포도당 소모에 의해 대략 46%(1010 ± 22 대 1470 ± 31)까지 증가하였고, 반면에 동일한 조건의 DNA-PKcs의 발현이 억제된 세포에서 AMPK 활성은 겨우 24%(820 ± 19 대 1020 ± 27)까지 증가하였다(도 4b 참조). 상기 결과는 DNA-PKcs가 포도당 소모에 의해 유도된 AMPK 활성을 증가시키는 것을 의미한다.

[0076] **<5-3> DNA-PK 억제제에 의한 AMPK 활성 억제**

[0077] 포도당이 없는 배지에서 MO59K 세포를 배양할 때에, 20 μM 의 월트마닌(wortmannin; Cell Signaling Technology, USA)을 첨가하여 1시간 동안 DNA-PKcs의 활성을 억제하였다. 추가로 0, 6, 12 및 24시간 동안 포도당이 없는 배지에서 배양한 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출하였고, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα, 항-인산-ACC 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0078] 그 결과, 도 4c에서 나타난 바와 같이 월트마닌을 처리하지 않은 세포에서 보다 월트마닌을 처리한 세포에서, 포도당 소모에 의해 자극된 AMPK 인산화가 적게 증가된 것을 확인하였다. 상기 결과는 DNA-PKcs가 포도당 소모 상태에서 AMPK의 인산화에 기여하는 것을 나타낸다.

[0079] **<실시예 6> 일차 인간 이배체 섬유아세포(primary human diploid fibroblasts)에서 AMPK 활성 억제의 확인**

[0080] 10% FBS, 페니실린(100 U/㎖) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖)을 포함하는 Earle's MEM 배지(Invitrogen, USA)에서 배양한, 일차 인간 이배체 섬유아세포 IMR90 및 WI38(ATCC, USA)를 실시예 5-1의 방법에 따라 대조군 siRNA 또는 DNA-PKcs siRNA로 형질도입하였다. 48시간 후, 포도당이 없는 배지에서 0, 6, 12 및 24시간 동안 상기 형질감염된 세포를 추가배양한 후 인산 완충 식염수로 세척하였다. 이후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출하였고, 항-DNA-PKcs, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα, 항-인산-ACC 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0081] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 인간 섬유아세포 WI38 및 IMR90 세포주에서 DNA-PKcs 발현 억제에 의해 DNA-PKcs 단백질의 발현량이 감소되었고, 또한 포도당 소모에 의해 유도된 AMPKα 인산화가 감소되었다. 또한 대조군과 비교하여 DNA-PKcs siRNA로 형질감염된 세포에서 포도당 소모에 반응하는 ACC 인산화의 양이 감소되었다.

[0082] **<실시예 7> HeLa 세포주에서 AMPK 활성 억제의 확인**

[0083] **<7-1> DNA-PKcs siRNA에 의한 AMPK 활성 억제**

[0084] 10% FBS, 페니실린(100 U/㎖) 및 스트렙토마이신(100 ㎍/㎖)이 포함된 DMEM(Invitrogen, USA)에서 배양한 인간 자궁경부암 세포주 HeLa(ATCC, USA)를 실시예 5-1의 방법에 따라 대조군 siRNA 또는 DNA-PKcs siRNA로 형질도입하였다. 48시간 후, 포도당이 없는 배지에서 0, 6, 12 및 24시간 동안 상기 형질감염된 세포를 추가배양한 후 인산 완충 식염수로 세척하였다. 이후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출하였고, 항-DNA-PKcs, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0085] 그 결과, 도 6a에서 나타난 바와 같이 포도당 소모 조건하에서, AMPK의 인산화는 대조군 세포와 비교하여 DNA-PKcs의 발현이 억제된 HeLa 세포에서 현저하게 감소하였다.

[0086] **<7-2> DNA-PK 억제제에 의한 AMPK 활성 억제**

[0087] 포도당이 없는 배지에서 HeLa 세포를 배양할 때에, 20 μM 의 월트마닌을 첨가하여 1시간 동안 DNA-PKcs의 활성을 억제하였다. 추가로 0, 6, 12 및 24시간 동안 포도당이 없는 배지에서 배양한 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출하였고, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0088] 그 결과, 도 6b에서 나타난 바와 같이 포도당 소모 조건하에서, AMPK의 인산화는 비처리된 대조군 세포에서 보

다 월트마닌으로 처리된 세포에서 현저하게 낮았다.

[0089] **<7-2> CAMKK 억제제에 의한 AMPK 활성 억제**

[0090] 포도당이 없는 배지에서 HeLa 세포를 배양할 때에, CAMKK 억제제인 STO-609(1 ㎍/㎖: Sigma, USA) 또는 20 μM의 월트마닌을 첨가하여 각각 6시간 또는 1시간 동안 처리하였다. 추가로 12 시간 동안 포도당이 없는 배지에서 배양한 세포를 인산 완충 식염수로 세척한 후, 실시예 3-1의 방법으로 전체 단백질을 추출하였고, 항-인산-AMPKα, 항-AMPKα 및 항-α-튜불린 항체를 이용하여 면역 블랏팅을 수행하였다.

[0091] 그 결과, 도 6c에서 나타난 바와 같이 포도당 소모에 의한 AMPK 인산화의 억제효과가 월트마닌과 STO-609에서 거의 비슷한 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 신경교종세포에서 DNA-PKcs와 AMPKγ1가 결합하는 것을 나타낸 도이다:

[0093] a: DNA-PKcs가 풍부한 M059K 세포주 및 M059K DNA-PKcs가 결핍된 M059J 세포주; 및,

[0094] b: M059J 세포주.

[0095] 도 2는 포도당 소모에 의한 AMPKγ1 인산화를 DNA-PKcs가 촉진하는 것을 확인한 도이다:

[0096] a: 포도당 소모 시간별; 및,

[0097] b: 포도당 농도별;.

[0098] 도 3은 DNA-PKcs가 포도당 소모에 의한 AMPKγ1 활성에 영향을 주는 것을 확인한 도이다.

[0099] 도 4는 DNA-PKcs 발현 및 활성이 억제된 세포에서 AMPKγ1 인산화 및 활성 및 AMPK의 기질인 ACC의 인산화가 억제된 것을 확인한 도이다:

[0100] a: AMPKγ1 인산화;

[0101] b: AMPKγ1 활성; 및,

[0102] c: ACC 인산화.

[0103] 도 5는 인간 섬유아세포에서 DNA-PKcs 발현 억제에 의해 AMPKγ1 인산화 및 ACC 인산화가 억제된 것을 확인한 도이다.

[0104] 도 6은 LKB1이 결핍된 HeLa 세포주에서 DNA-PKcs 발현 및 활성이 억제에 의해 AMPKγ1 인산화가 억제된 것을 확인한 도이다:

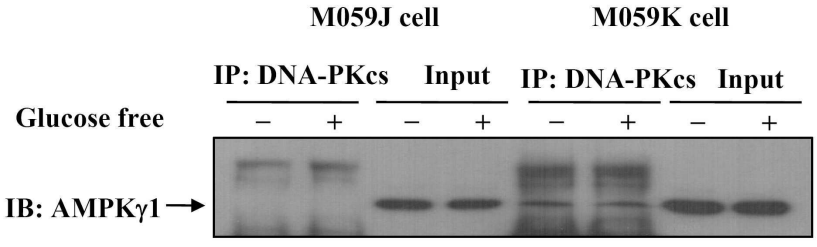
[0105] a: siRNA에 의해 AMPKγ1 활성이 억제된 세포;

[0106] b: 월트마닌에 의해 AMPKγ1 활성이 억제된 세포; 및,

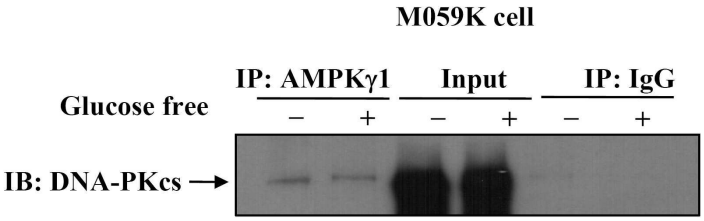
[0107] c: STO-609와 월트마닌에 의해 AMPKγ1 활성이 억제된 세포.

도면

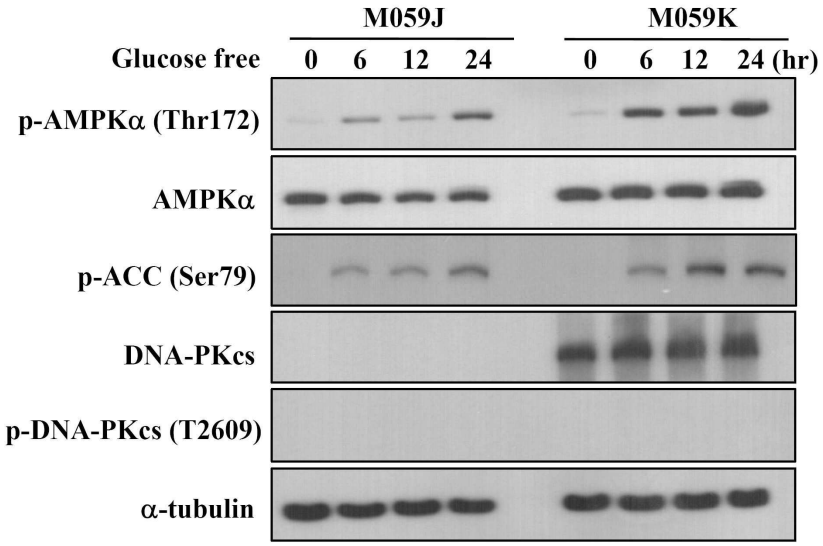
도면1a



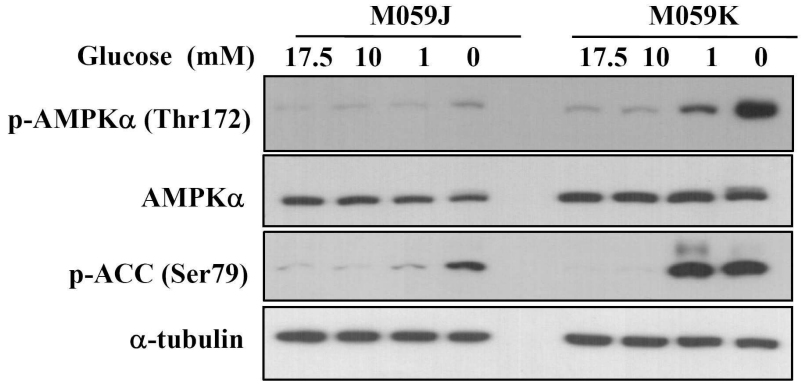
도면1b



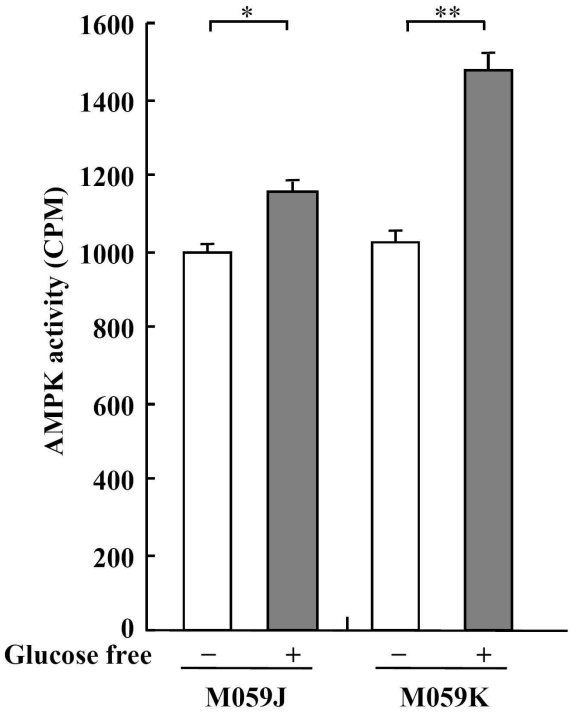
도면2a



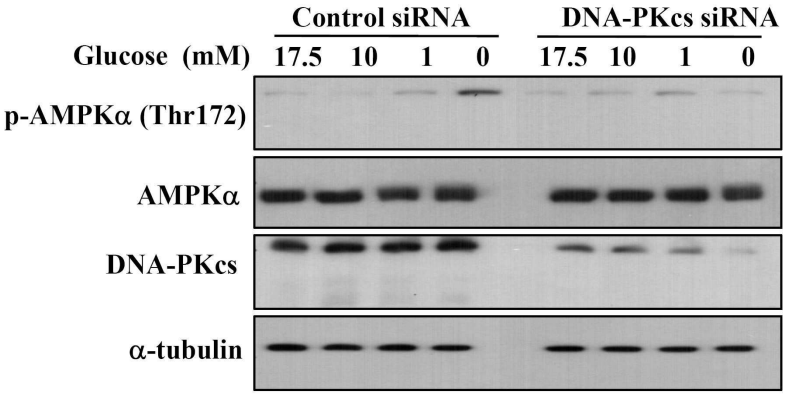
도면2b



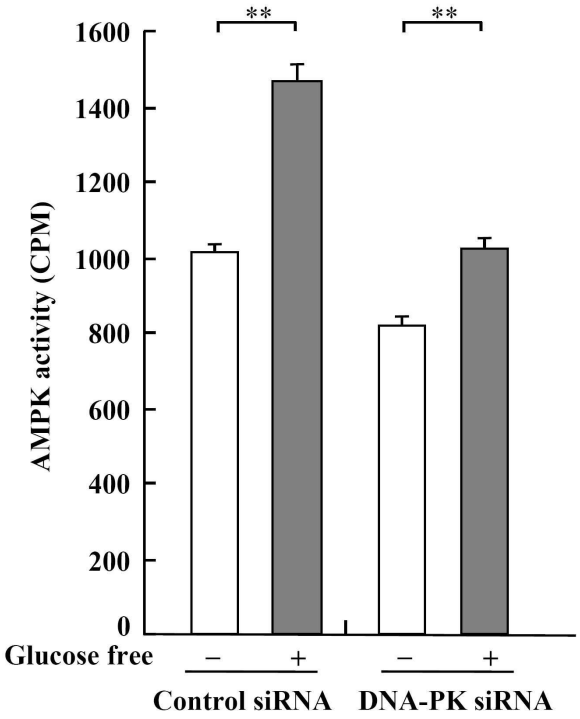
도면3


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
AMPK activity (CPM)
*
**
Glucose free
−
+
−
+
M059J
M059K

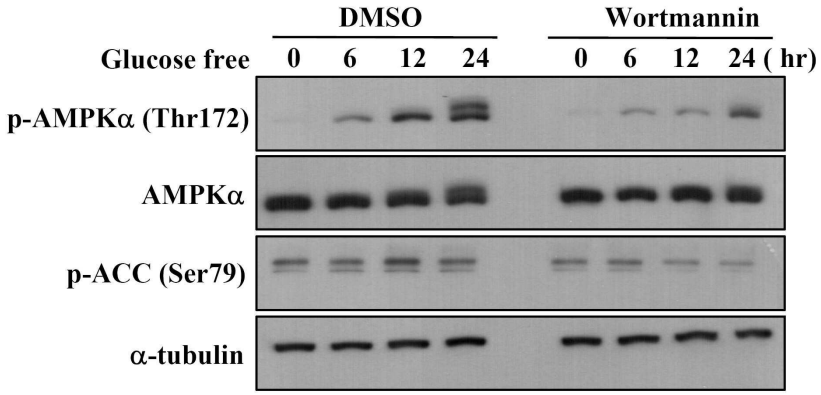
도면4a


Control siRNA
DNA-PKcs siRNA
Glucose (mM)
17.5
10
1
0
17.5
10
1
0
p-AMPKα (Thr172)
AMPKα
DNA-PKcs
α-tubulin

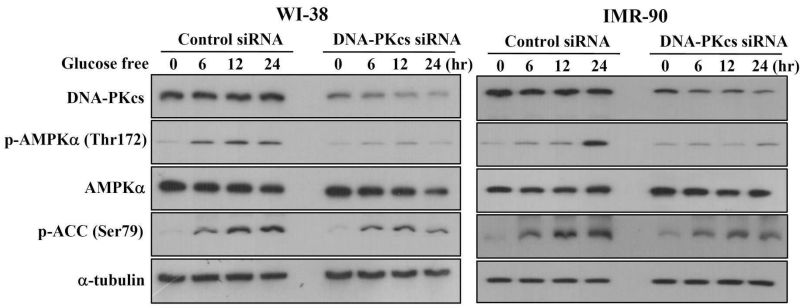
도면4b



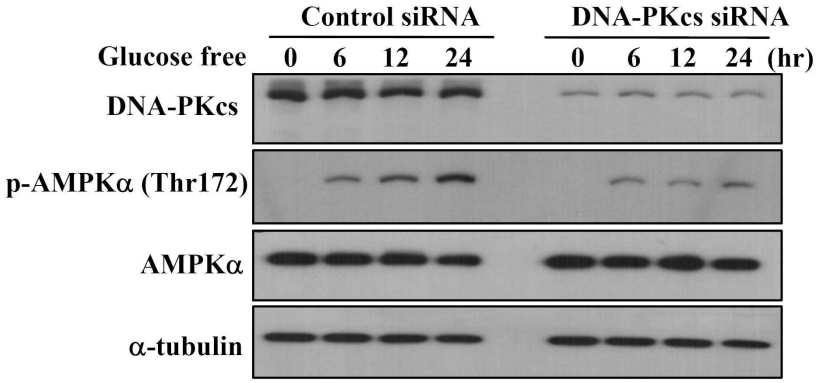
도면4c



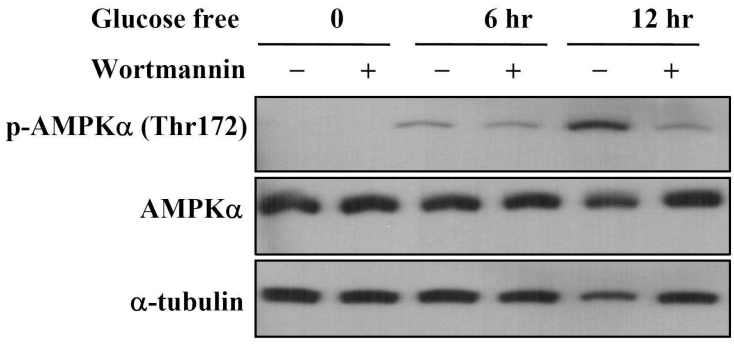
도면5



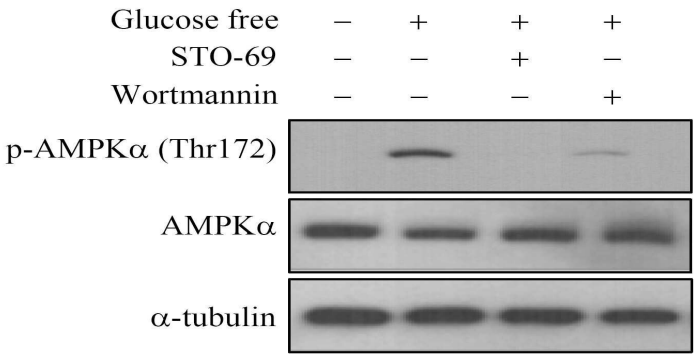
도면6a



도면6b



도면6c



서 열 목 록

<110> Industry Academy Cooperation Foundation Chosun University
<120> Method for screening inhibitor of AMPK activity

<130> 8P-12-51

<160> 9

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 331
<212> PRT
<213> human AMPK gamma1

<400> 1

```
Met Glu Thr Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Pro Ala Val Glu Asn Glu
  1               5                  10                  15

His Pro Gln Glu Thr Pro Glu Ser Asn Asn Ser Val Tyr Thr Ser Phe
             20                  25                  30

Met Lys Ser His Arg Cys Tyr Asp Leu Ile Pro Thr Ser Ser Lys Leu
         35                  40                  45

Val Val Phe Asp Thr Ser Leu Gln Val Lys Lys Ala Phe Phe Ala Leu
     50                  55                  60

Val Thr Asn Gly Val Arg Ala Ala Pro Leu Trp Asp Ser Lys Lys Gln
 65                  70                  75                  80

Ser Phe Val Gly Met Leu Thr Ile Thr Asp Phe Ile Asn Ile Leu His
                 85                  90                  95

Arg Tyr Tyr Lys Ser Ala Leu Val Gln Ile Tyr Glu Leu Glu Glu His
            100                 105                 110

Lys Ile Glu Thr Trp Arg Glu Val Tyr Leu Gln Asp Ser Phe Lys Pro
        115                 120                 125

Leu Val Cys Ile Ser Pro Asn Ala Ser Leu Phe Asp Ala Val Ser Ser
    130                 135                 140

Leu Ile Arg Asn Lys Ile His Arg Leu Pro Val Ile Asp Pro Glu Ser
145                 150                 155                 160
```

```
Gly Asn Thr Leu Tyr Ile Leu Thr His Lys Arg Ile Leu Lys Phe Leu
                165                 170                 175

Lys Leu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Lys Pro Glu Phe Met Ser Lys Ser
            180                 185                 190

Leu Glu Glu Leu Gln Ile Gly Thr Tyr Ala Asn Ile Ala Met Val Arg
        195                 200                 205

Thr Thr Thr Pro Val Tyr Val Ala Leu Gly Ile Phe Val Gln His Arg
    210                 215                 220

Val Ser Ala Leu Pro Val Val Asp Glu Lys Gly Arg Val Val Asp Ile
225                 230                 235                 240

Tyr Ser Lys Phe Asp Val Ile Asn Leu Ala Ala Glu Lys Thr Tyr Asn
                245                 250                 255

Asn Leu Asp Val Ser Val Thr Lys Ala Leu Gln His Arg Ser His Tyr
            260                 265                 270

Phe Glu Gly Val Leu Lys Cys Tyr Leu His Glu Thr Leu Glu Thr Ile
        275                 280                 285

Ile Asn Arg Leu Val Glu Ala Glu Val His Arg Leu Val Val Val Asp
    290                 295                 300

Glu Asn Asp Val Val Lys Gly Ile Val Ser Leu Ser Asp Ile Leu Gln
305                 310                 315                 320

Ala Leu Val Leu Thr Gly Gly Glu Lys Lys Pro
                325                 330
```

<210> 2
<211> 4128
<212> PRT
<213> human DNA-PKcs

<400> 2

```
Met Ala Gly Ser Gly Ala Gly Val Arg Cys Ser Leu Leu Arg Leu Gln
  1               5                  10                  15

Glu Thr Leu Ser Ala Ala Asp Arg Cys Gly Ala Ala Leu Ala Gly His
```

```
             20                  25                  30

Gln Leu Ile Arg Gly Leu Gly Gln Glu Cys Val Leu Ser Ser Ser Pro
         35                  40                  45

Ala Val Leu Ala Leu Gln Thr Ser Leu Val Phe Ser Arg Asp Phe Gly
     50                  55                  60

Leu Leu Val Phe Val Arg Lys Ser Leu Asn Ser Ile Glu Phe Arg Glu
 65                  70                  75                  80

Cys Arg Glu Glu Ile Leu Lys Phe Leu Cys Ile Phe Leu Glu Lys Met
                 85                  90                  95

Gly Gln Lys Ile Ala Pro Tyr Ser Val Glu Ile Lys Asn Thr Cys Thr
            100                 105                 110

Ser Val Tyr Thr Lys Asp Arg Ala Ala Lys Cys Lys Ile Pro Ala Leu
        115                 120                 125

Asp Leu Leu Ile Lys Leu Leu Gln Thr Phe Arg Ser Ser Arg Leu Met
    130                 135                 140

Asp Glu Phe Lys Ile Gly Glu Leu Phe Ser Lys Phe Tyr Gly Glu Leu
145                 150                 155                 160

Ala Leu Lys Lys Lys Ile Pro Asp Thr Val Leu Glu Lys Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Leu Leu Gly Leu Leu Gly Glu Val His Pro Ser Glu Met Ile Asn Asn
            180                 185                 190

Ala Glu Asn Leu Phe Arg Ala Phe Leu Gly Glu Leu Lys Thr Gln Met
        195                 200                 205

Thr Ser Ala Val Arg Glu Pro Lys Leu Pro Val Leu Ala Gly Cys Leu
    210                 215                 220

Lys Gly Leu Ser Ser Leu Leu Cys Asn Phe Thr Lys Ser Met Glu Glu
225                 230                 235                 240

Asp Pro Gln Thr Ser Arg Glu Ile Phe Asn Phe Val Leu Lys Ala Ile
                245                 250                 255
```

```
Arg Pro Gln Ile Asp Leu Lys Arg Tyr Ala Val Pro Ser Ala Gly Leu
            260                 265                 270

Arg Leu Phe Ala Leu His Ala Ser Gln Phe Ser Thr Cys Leu Leu Asp
        275                 280                 285

Asn Tyr Val Ser Leu Phe Glu Val Leu Leu Lys Trp Cys Ala His Thr
    290                 295                 300

Asn Val Glu Leu Lys Lys Ala Ala Leu Ser Ala Leu Glu Ser Phe Leu
305                 310                 315                 320

Lys Gln Val Ser Asn Met Val Ala Lys Asn Ala Glu Met His Lys Asn
                325                 330                 335

Lys Leu Gln Tyr Phe Met Glu Gln Phe Tyr Gly Ile Ile Arg Asn Val
            340                 345                 350

Asp Ser Asn Asn Lys Glu Leu Ser Ile Ala Ile Arg Gly Tyr Gly Leu
        355                 360                 365

Phe Ala Gly Pro Cys Lys Val Ile Asn Ala Lys Asp Val Asp Phe Met
    370                 375                 380

Tyr Val Glu Leu Ile Gln Arg Cys Lys Gln Met Phe Leu Thr Gln Thr
385                 390                 395                 400

Asp Thr Gly Asp Asp Arg Val Tyr Gln Met Pro Ser Phe Leu Gln Ser
                405                 410                 415

Val Ala Ser Val Leu Leu Tyr Leu Asp Thr Val Pro Glu Val Tyr Thr
            420                 425                 430

Pro Val Leu Glu His Leu Val Val Met Gln Ile Asp Ser Phe Pro Gln
        435                 440                 445

Tyr Ser Pro Lys Met Gln Leu Val Cys Cys Arg Ala Ile Val Lys Val
    450                 455                 460

Phe Leu Ala Leu Ala Ala Lys Gly Pro Val Leu Arg Asn Cys Ile Ser
465                 470                 475                 480

Thr Val Val His Gln Gly Leu Ile Arg Ile Cys Ser Lys Pro Val Val
                485                 490                 495
```

Leu Pro Lys Gly Pro Glu Ser Glu Ser Glu Asp His Arg Ala Ser Gly
500 505 510

Glu Val Arg Thr Gly Lys Trp Lys Val Pro Thr Tyr Lys Asp Tyr Val
515 520 525

Asp Leu Phe Arg His Leu Leu Ser Ser Asp Gln Met Met Asp Ser Ile
530 535 540

Leu Ala Asp Glu Ala Phe Phe Ser Val Asn Ser Ser Ser Glu Ser Leu
545 550 555 560

Asn His Leu Leu Tyr Asp Glu Phe Val Lys Ser Val Leu Lys Ile Val
565 570 575

Glu Lys Leu Asp Leu Thr Leu Glu Ile Gln Thr Val Gly Glu Gln Glu
580 585 590

Asn Gly Asp Glu Ala Pro Gly Val Trp Met Ile Pro Thr Ser Asp Pro
595 600 605

Ala Ala Asn Leu His Pro Ala Lys Pro Lys Asp Phe Ser Ala Phe Ile
610 615 620

Asn Leu Val Glu Phe Cys Arg Glu Ile Leu Pro Glu Lys Gln Ala Glu
625 630 635 640

Phe Phe Glu Pro Trp Val Tyr Ser Phe Ser Tyr Glu Leu Ile Leu Gln
645 650 655

Ser Thr Arg Leu Pro Leu Ile Ser Gly Phe Tyr Lys Leu Leu Ser Ile
660 665 670

Thr Val Arg Asn Ala Lys Lys Ile Lys Tyr Phe Glu Gly Val Ser Pro
675 680 685

Lys Ser Leu Lys His Ser Pro Glu Asp Pro Glu Lys Tyr Ser Cys Phe
690 695 700

Ala Leu Phe Val Lys Phe Gly Lys Glu Val Ala Val Lys Met Lys Gln
705 710 715 720

Tyr Lys Asp Glu Leu Leu Ala Ser Cys Leu Thr Phe Leu Leu Ser Leu

725 730 735

Pro His Asn Ile Ile Glu Leu Asp Val Arg Ala Tyr Val Pro Ala Leu
740 745 750

Gln Met Ala Phe Lys Leu Gly Leu Ser Tyr Thr Pro Leu Ala Glu Val
755 760 765

Gly Leu Asn Ala Leu Glu Glu Trp Ser Ile Tyr Ile Asp Arg His Val
770 775 780

Met Gln Pro Tyr Tyr Lys Asp Ile Leu Pro Cys Leu Asp Gly Tyr Leu
785 790 795 800

Lys Thr Ser Ala Leu Ser Asp Glu Thr Lys Asn Asn Trp Glu Val Ser
805 810 815

Ala Leu Ser Arg Ala Ala Gln Lys Gly Phe Asn Lys Val Val Leu Lys
820 825 830

His Leu Lys Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Asn Glu Ala Ile Ser Leu
835 840 845

Glu Glu Ile Arg Ile Arg Val Val Gln Met Leu Gly Ser Leu Gly Gly
850 855 860

Gln Ile Asn Lys Asn Leu Leu Thr Val Thr Ser Ser Asp Glu Met Met
865 870 875 880

Lys Ser Tyr Val Ala Trp Asp Arg Glu Lys Arg Leu Ser Phe Ala Val
885 890 895

Pro Phe Arg Glu Met Lys Pro Val Ile Phe Leu Asp Val Phe Leu Pro
900 905 910

Arg Val Thr Glu Leu Ala Leu Thr Ala Ser Asp Arg Gln Thr Lys Val
915 920 925

Ala Ala Cys Glu Leu Leu His Ser Met Val Met Phe Met Leu Gly Lys
930 935 940

Ala Thr Gln Met Pro Glu Gly Gly Gln Gly Ala Pro Pro Met Tyr Gln
945 950 955 960

```
Leu Tyr Lys Arg Thr Phe Pro Val Leu Leu Arg Leu Ala Cys Asp Val
                965                 970                 975

Asp Gln Val Thr Arg Gln Leu Tyr Glu Pro Leu Val Met Gln Leu Ile
            980                 985                 990

His Trp Phe Thr Asn Asn Lys Lys Phe Glu Ser Gln Asp Thr Val Ala
        995                1000                1005

Leu Leu Glu Ala Ile Leu Asp Gly Ile Val Asp Pro Val Asp Ser Thr
   1010                1015                1020

Leu Arg Asp Phe Cys Gly Arg Cys Ile Arg Glu Phe Leu Lys Trp Ser
1025                1030                1035                1040

Ile Lys Gln Ile Thr Pro Gln Gln Gln Glu Lys Ser Pro Val Asn Thr
                1045                1050                1055

Lys Ser Leu Phe Lys Arg Leu Tyr Ser Leu Ala Leu His Pro Asn Ala
            1060                1065                1070

Phe Lys Arg Leu Gly Ala Ser Leu Ala Phe Asn Asn Ile Tyr Arg Glu
        1075                1080                1085

Phe Arg Glu Glu Glu Ser Leu Val Glu Gln Phe Val Phe Glu Ala Leu
   1090                1095                1100

Val Ile Tyr Met Glu Ser Leu Ala Leu Ala His Ala Asp Glu Lys Ser
1105                1110                1115                1120

Leu Gly Thr Ile Gln Gln Cys Cys Asp Ala Ile Asp His Leu Cys Arg
                1125                1130                1135

Ile Ile Glu Lys Lys His Val Ser Leu Asn Lys Ala Lys Lys Arg Arg
            1140                1145                1150

Leu Pro Arg Gly Phe Pro Pro Ser Ala Ser Leu Cys Leu Leu Asp Leu
        1155                1160                1165

Val Lys Trp Leu Leu Ala His Cys Gly Arg Pro Gln Thr Glu Cys Arg
   1170                1175                1180

His Lys Ser Ile Glu Leu Phe Tyr Lys Phe Val Pro Leu Leu Pro Gly
1185                1190                1195                1200
```

Asn Arg Ser Pro Asn Leu Trp Leu Lys Asp Val Leu Lys Glu Glu Gly
1205 1210 1215

Val Ser Phe Leu Ile Asn Thr Phe Glu Gly Gly Gly Cys Gly Gln Pro
1220 1225 1230

Ser Gly Ile Leu Ala Gln Pro Thr Leu Leu Tyr Leu Arg Gly Pro Phe
1235 1240 1245

Ser Leu Gln Ala Thr Leu Cys Trp Leu Asp Leu Leu Leu Ala Ala Leu
1250 1255 1260

Glu Cys Tyr Asn Thr Phe Ile Gly Glu Arg Thr Val Gly Ala Leu Gln
1265 1270 1275 1280

Val Leu Gly Thr Glu Ala Gln Ser Ser Leu Leu Lys Ala Val Ala Phe
1285 1290 1295

Phe Leu Glu Ser Ile Ala Met His Asp Ile Ile Ala Ala Glu Lys Cys
1300 1305 1310

Phe Gly Thr Gly Ala Ala Gly Asn Arg Thr Ser Pro Gln Glu Gly Glu
1315 1320 1325

Arg Tyr Asn Tyr Ser Lys Cys Thr Val Val Val Arg Ile Met Glu Phe
1330 1335 1340

Thr Thr Thr Leu Leu Asn Thr Ser Pro Glu Gly Trp Lys Leu Leu Lys
1345 1350 1355 1360

Lys Asp Leu Cys Asn Thr His Leu Met Arg Val Leu Val Gln Thr Leu
1365 1370 1375

Cys Glu Pro Ala Ser Ile Gly Phe Asn Ile Gly Asp Val Gln Val Met
1380 1385 1390

Ala His Leu Pro Asp Val Cys Val Asn Leu Met Lys Ala Leu Lys Met
1395 1400 1405

Ser Pro Tyr Lys Asp Ile Leu Glu Thr His Leu Arg Glu Lys Ile Thr
1410 1415 1420

Ala Gln Ser Ile Glu Glu Leu Cys Ala Val Asn Leu Tyr Gly Pro Asp

1425 1430 1435 1440

Ala Gln Val Asp Arg Ser Arg Leu Ala Ala Val Val Ser Ala Cys Lys
1445 1450 1455

Gln Leu His Arg Ala Gly Leu Leu His Asn Ile Leu Pro Ser Gln Ser
1460 1465 1470

Thr Asp Leu His His Ser Val Gly Thr Glu Leu Leu Ser Leu Val Tyr
1475 1480 1485

Lys Gly Ile Ala Pro Gly Asp Glu Arg Gln Cys Leu Pro Ser Leu Asp
1490 1495 1500

Leu Ser Cys Lys Gln Leu Ala Ser Gly Leu Leu Glu Leu Ala Phe Ala
1505 1510 1515 1520

Phe Gly Gly Leu Cys Glu Arg Leu Val Ser Leu Leu Leu Asn Pro Ala
1525 1530 1535

Val Leu Ser Thr Ala Ser Leu Gly Ser Ser Gln Gly Ser Val Ile His
1540 1545 1550

Phe Ser His Gly Glu Tyr Phe Tyr Ser Leu Phe Ser Glu Thr Ile Asn
1555 1560 1565

Thr Glu Leu Leu Lys Asn Leu Asp Leu Ala Val Leu Glu Leu Met Gln
1570 1575 1580

Ser Ser Val Asp Asn Thr Lys Met Val Ser Ala Val Leu Asn Gly Met
1585 1590 1595 1600

Leu Asp Gln Ser Phe Arg Glu Arg Ala Asn Gln Lys His Gln Gly Leu
1605 1610 1615

Lys Leu Ala Thr Thr Ile Leu Gln His Trp Lys Lys Cys Asp Ser Trp
1620 1625 1630

Trp Ala Lys Asp Ser Pro Leu Glu Thr Lys Met Ala Val Leu Ala Leu
1635 1640 1645

Leu Ala Lys Ile Leu Gln Ile Asp Ser Ser Val Ser Phe Asn Thr Ser
1650 1655 1660

His Gly Ser Phe Pro Glu Val Phe Thr Thr Tyr Ile Ser Leu Leu Ala
1665 1670 1675 1680

Asp Thr Lys Leu Asp Leu His Leu Lys Gly Gln Ala Val Thr Leu Leu
1685 1690 1695

Pro Phe Phe Thr Ser Leu Thr Gly Gly Ser Leu Glu Glu Leu Arg Arg
1700 1705 1710

Val Leu Glu Gln Leu Ile Val Ala His Phe Pro Met Gln Ser Arg Glu
1715 1720 1725

Phe Pro Pro Gly Thr Pro Arg Phe Asn Asn Tyr Val Asp Cys Met Lys
1730 1735 1740

Lys Phe Leu Asp Ala Leu Glu Leu Ser Gln Ser Pro Met Leu Leu Glu
1745 1750 1755 1760

Leu Met Thr Glu Val Leu Cys Arg Glu Gln Gln His Val Met Glu Glu
1765 1770 1775

Leu Phe Gln Ser Ser Phe Arg Arg Ile Ala Arg Arg Gly Ser Cys Val
1780 1785 1790

Thr Gln Val Gly Leu Leu Glu Ser Val Tyr Glu Met Phe Arg Lys Asp
1795 1800 1805

Asp Pro Arg Leu Ser Phe Thr Arg Gln Ser Phe Val Asp Arg Ser Leu
1810 1815 1820

Leu Thr Leu Leu Trp His Cys Ser Leu Asp Ala Leu Arg Glu Phe Phe
1825 1830 1835 1840

Ser Thr Ile Val Val Asp Ala Ile Asp Val Leu Lys Ser Arg Phe Thr
1845 1850 1855

Lys Leu Asn Glu Ser Thr Phe Asp Thr Gln Ile Thr Lys Lys Met Gly
1860 1865 1870

Tyr Tyr Lys Ile Leu Asp Val Met Tyr Ser Arg Leu Pro Lys Asp Asp
1875 1880 1885

Val His Ala Lys Glu Ser Lys Ile Asn Gln Val Phe His Gly Ser Cys
1890 1895 1900

Ile Thr Glu Gly Asn Glu Leu Thr Lys Thr Leu Ile Lys Leu Cys Tyr
1905 1910 1915 1920

Asp Ala Phe Thr Glu Asn Met Ala Gly Glu Asn Gln Leu Leu Glu Arg
1925 1930 1935

Arg Arg Leu Tyr His Cys Ala Ala Tyr Asn Cys Ala Ile Ser Val Ile
1940 1945 1950

Cys Cys Val Phe Asn Glu Leu Lys Phe Tyr Gln Gly Phe Leu Phe Ser
1955 1960 1965

Glu Lys Pro Glu Lys Asn Leu Leu Ile Phe Glu Asn Leu Ile Asp Leu
1970 1975 1980

Lys Arg Arg Tyr Asn Phe Pro Val Glu Val Glu Val Pro Met Glu Arg
1985 1990 1995 2000

Lys Lys Lys Tyr Ile Glu Ile Arg Lys Glu Ala Arg Glu Ala Ala Asn
2005 2010 2015

Gly Asp Ser Asp Gly Pro Ser Tyr Met Ser Ser Leu Ser Tyr Leu Ala
2020 2025 2030

Asp Ser Thr Leu Ser Glu Glu Met Ser Gln Phe Asp Phe Ser Thr Gly
2035 2040 2045

Val Gln Ser Tyr Ser Tyr Ser Ser Gln Asp Pro Arg Pro Ala Thr Gly
2050 2055 2060

Arg Phe Arg Arg Arg Glu Gln Arg Asp Pro Thr Val His Asp Asp Val
2065 2070 2075 2080

Leu Glu Leu Glu Met Asp Glu Leu Asn Arg His Glu Cys Met Ala Pro
2085 2090 2095

Leu Thr Ala Leu Val Lys His Met His Arg Ser Leu Gly Pro Pro Gln
2100 2105 2110

Gly Glu Glu Asp Ser Val Pro Arg Asp Leu Pro Ser Trp Met Lys Phe
2115 2120 2125

Leu His Gly Lys Leu Gly Asn Pro Ile Val Pro Leu Asn Ile Arg Leu

2130 2135 2140

Phe Leu Ala Lys Leu Val Ile Asn Thr Glu Glu Val Phe Arg Pro Tyr
2145 2150 2155 2160

Ala Lys His Trp Leu Ser Pro Leu Leu Gln Leu Ala Ala Ser Glu Asn
2165 2170 2175

Asn Gly Gly Glu Gly Ile His Tyr Met Val Val Glu Ile Val Ala Thr
2180 2185 2190

Ile Leu Ser Trp Thr Gly Leu Ala Thr Pro Thr Gly Val Pro Lys Asp
2195 2200 2205

Glu Val Leu Ala Asn Arg Leu Leu Asn Phe Leu Met Lys His Val Phe
2210 2215 2220

His Pro Lys Arg Ala Val Phe Arg His Asn Leu Glu Ile Ile Lys Thr
2225 2230 2235 2240

Leu Val Glu Cys Trp Lys Asp Cys Leu Ser Ile Pro Tyr Arg Leu Ile
2245 2250 2255

Phe Glu Lys Phe Ser Gly Lys Asp Pro Asn Ser Lys Asp Asn Ser Val
2260 2265 2270

Gly Ile Gln Leu Leu Gly Ile Val Met Ala Asn Asp Leu Pro Pro Tyr
2275 2280 2285

Asp Pro Gln Cys Gly Ile Gln Ser Ser Glu Tyr Phe Gln Ala Leu Val
2290 2295 2300

Asn Asn Met Ser Phe Val Arg Tyr Lys Glu Val Tyr Ala Ala Ala Ala
2305 2310 2315 2320

Glu Val Leu Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Val Met Glu Arg Lys Asn Ile
2325 2330 2335

Leu Glu Glu Ser Leu Cys Glu Leu Val Ala Lys Gln Leu Lys Gln His
2340 2345 2350

Gln Asn Thr Met Glu Asp Lys Phe Ile Val Cys Leu Asn Lys Val Thr
2355 2360 2365

Lys Ser Phe Pro Pro Leu Ala Asp Arg Phe Met Asn Ala Val Phe Phe
2370 2375 2380

Leu Leu Pro Lys Phe His Gly Val Leu Lys Thr Leu Cys Leu Glu Val
2385 2390 2395 2400

Val Leu Cys Arg Val Glu Gly Met Thr Glu Leu Tyr Phe Gln Leu Lys
2405 2410 2415

Ser Lys Asp Phe Val Gln Val Met Arg His Arg Asp Asp Glu Arg Gln
2420 2425 2430

Lys Val Cys Leu Asp Ile Ile Tyr Lys Met Met Pro Lys Leu Lys Pro
2435 2440 2445

Val Glu Leu Arg Glu Leu Leu Asn Pro Val Val Glu Phe Val Ser His
2450 2455 2460

Pro Ser Thr Thr Cys Arg Glu Gln Met Tyr Asn Ile Leu Met Trp Ile
2465 2470 2475 2480

His Asp Asn Tyr Arg Asp Pro Glu Ser Glu Thr Asp Asn Asp Ser Gln
2485 2490 2495

Glu Ile Phe Lys Leu Ala Lys Asp Val Leu Ile Gln Gly Leu Ile Asp
2500 2505 2510

Glu Asn Pro Gly Leu Gln Leu Ile Ile Arg Asn Phe Trp Ser His Glu
2515 2520 2525

Thr Arg Leu Pro Ser Asn Thr Leu Asp Arg Leu Leu Ala Leu Asn Ser
2530 2535 2540

Leu Tyr Ser Pro Lys Ile Glu Val His Phe Leu Ser Leu Ala Thr Asn
2545 2550 2555 2560

Phe Leu Leu Glu Met Thr Ser Met Ser Pro Asp Tyr Pro Asn Pro Met
2565 2570 2575

Phe Glu His Pro Leu Ser Glu Cys Glu Phe Gln Glu Tyr Thr Ile Asp
2580 2585 2590

Ser Asp Trp Arg Phe Arg Ser Thr Val Leu Thr Pro Met Phe Val Glu
2595 2600 2605

Thr Gln Ala Ser Gln Gly Thr Leu Gln Thr Arg Thr Gln Glu Gly Ser
2610 2615 2620

Leu Ser Ala Arg Trp Pro Val Ala Gly Gln Ile Arg Ala Thr Gln Gln
2625 2630 2635 2640

Gln His Asp Phe Thr Leu Thr Gln Thr Ala Asp Gly Arg Ser Ser Phe
2645 2650 2655

Asp Trp Leu Thr Gly Ser Ser Thr Asp Pro Leu Val Asp His Thr Ser
2660 2665 2670

Pro Ser Ser Asp Ser Leu Leu Phe Ala His Lys Arg Ser Glu Arg Leu
2675 2680 2685

Gln Arg Ala Pro Leu Lys Ser Val Gly Pro Asp Phe Gly Lys Lys Arg
2690 2695 2700

Leu Gly Leu Pro Gly Asp Glu Val Asp Asn Lys Val Lys Gly Ala Ala
2705 2710 2715 2720

Gly Arg Thr Asp Leu Leu Arg Leu Arg Arg Arg Phe Met Arg Asp Gln
2725 2730 2735

Glu Lys Leu Ser Leu Met Tyr Ala Arg Lys Gly Val Ala Glu Gln Lys
2740 2745 2750

Arg Glu Lys Glu Ile Lys Ser Glu Leu Lys Met Lys Gln Asp Ala Gln
2755 2760 2765

Val Val Leu Tyr Arg Ser Tyr Arg His Gly Asp Leu Pro Asp Ile Gln
2770 2775 2780

Ile Lys His Ser Ser Leu Ile Thr Pro Leu Gln Ala Val Ala Gln Arg
2785 2790 2795 2800

Asp Pro Ile Ile Ala Lys Gln Leu Phe Ser Ser Leu Phe Ser Gly Ile
2805 2810 2815

Leu Lys Glu Met Asp Lys Phe Lys Thr Leu Ser Glu Lys Asn Asn Ile
2820 2825 2830

Thr Gln Lys Leu Leu Gln Asp Phe Asn Arg Phe Leu Asn Thr Thr Phe

2835 2840 2845

Ser Phe Phe Pro Pro Phe Val Ser Cys Ile Gln Asp Ile Ser Cys Gln
2850 2855 2860

His Ala Ala Leu Leu Ser Leu Asp Pro Ala Ala Val Ser Ala Gly Cys
2865 2870 2875 2880

Leu Ala Ser Leu Gln Gln Pro Val Gly Ile Arg Leu Leu Glu Glu Ala
2885 2890 2895

Leu Leu Arg Leu Leu Pro Ala Glu Leu Pro Ala Lys Arg Val Arg Gly
2900 2905 2910

Lys Ala Arg Leu Pro Pro Asp Val Leu Arg Trp Val Glu Leu Ala Lys
2915 2920 2925

Leu Tyr Arg Ser Ile Gly Glu Tyr Asp Val Leu Arg Gly Ile Phe Thr
2930 2935 2940

Ser Glu Ile Gly Thr Lys Gln Ile Thr Gln Ser Ala Leu Leu Ala Glu
2945 2950 2955 2960

Ala Arg Ser Asp Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Gln Tyr Asp Glu Ala Leu
2965 2970 2975

Asn Lys Gln Asp Trp Val Asp Gly Glu Pro Thr Glu Ala Glu Lys Asp
2980 2985 2990

Phe Trp Glu Leu Ala Ser Leu Asp Cys Tyr Asn His Leu Ala Glu Trp
2995 3000 3005

Lys Ser Leu Glu Tyr Cys Ser Thr Ala Ser Ile Asp Ser Glu Asn Pro
3010 3015 3020

Pro Asp Leu Asn Lys Ile Trp Ser Glu Pro Phe Tyr Gln Glu Thr Tyr
3025 3030 3035 3040

Leu Pro Tyr Met Ile Arg Ser Lys Leu Lys Leu Leu Leu Gln Gly Glu
3045 3050 3055

Ala Asp Gln Ser Leu Leu Thr Phe Ile Asp Lys Ala Met His Gly Glu
3060 3065 3070

Leu Gln Lys Ala Ile Leu Glu Leu His Tyr Ser Gln Glu Leu Ser Leu
3075 3080 3085

Leu Tyr Leu Leu Gln Asp Asp Val Asp Arg Ala Lys Tyr Tyr Ile Gln
3090 3095 3100

Asn Gly Ile Gln Ser Phe Met Gln Asn Tyr Ser Ser Ile Asp Val Leu
3105 3110 3115 3120

Leu His Gln Ser Arg Leu Thr Lys Leu Gln Ser Val Gln Ala Leu Thr
3125 3130 3135

Glu Ile Gln Glu Phe Ile Ser Phe Ile Ser Lys Gln Gly Asn Leu Ser
3140 3145 3150

Ser Gln Val Pro Leu Lys Arg Leu Leu Asn Thr Trp Thr Asn Arg Tyr
3155 3160 3165

Pro Asp Ala Lys Met Asp Pro Met Asn Ile Trp Asp Asp Ile Ile Thr
3170 3175 3180

Asn Arg Cys Phe Phe Leu Ser Lys Ile Glu Glu Lys Leu Thr Pro Leu
3185 3190 3195 3200

Pro Glu Asp Asn Ser Met Asn Val Asp Gln Asp Gly Asp Pro Ser Asp
3205 3210 3215

Arg Met Glu Val Gln Glu Gln Glu Glu Asp Ile Ser Ser Leu Ile Arg
3220 3225 3230

Ser Cys Lys Phe Ser Met Lys Met Lys Met Ile Asp Ser Ala Arg Lys
3235 3240 3245

Gln Asn Asn Phe Ser Leu Ala Met Lys Leu Leu Lys Glu Leu His Lys
3250 3255 3260

Glu Ser Lys Thr Arg Asp Asp Trp Leu Val Ser Trp Val Gln Ser Tyr
3265 3270 3275 3280

Cys Arg Leu Ser His Cys Arg Ser Arg Ser Gln Gly Cys Ser Glu Gln
3285 3290 3295

Val Leu Thr Val Leu Lys Thr Val Ser Leu Leu Asp Glu Asn Asn Val
3300 3305 3310

Ser Ser Tyr Leu Ser Lys Asn Ile Leu Ala Phe Arg Asp Gln Asn Ile
3315 3320 3325

Leu Leu Gly Thr Thr Tyr Arg Ile Ile Ala Asn Ala Leu Ser Ser Glu
3330 3335 3340

Pro Ala Cys Leu Ala Glu Ile Glu Glu Asp Lys Ala Arg Arg Ile Leu
3345 3350 3355 3360

Glu Leu Ser Gly Ser Ser Ser Glu Asp Ser Glu Lys Val Ile Ala Gly
3365 3370 3375

Leu Tyr Gln Arg Ala Phe Gln His Leu Ser Glu Ala Val Gln Ala Ala
3380 3385 3390

Glu Glu Glu Ala Gln Pro Pro Ser Trp Ser Cys Gly Pro Ala Ala Gly
3395 3400 3405

Val Ile Asp Ala Tyr Met Thr Leu Ala Asp Phe Cys Asp Gln Gln Leu
3410 3415 3420

Arg Lys Glu Glu Glu Asn Ala Ser Val Ile Asp Ser Ala Glu Leu Gln
3425 3430 3435 3440

Ala Tyr Pro Ala Leu Val Val Glu Lys Met Leu Lys Ala Leu Lys Leu
3445 3450 3455

Asn Ser Asn Glu Ala Arg Leu Lys Phe Pro Arg Leu Leu Gln Ile Ile
3460 3465 3470

Glu Arg Tyr Pro Glu Glu Thr Leu Ser Leu Met Thr Lys Glu Ile Ser
3475 3480 3485

Ser Val Pro Cys Trp Gln Phe Ile Ser Trp Ile Ser His Met Val Ala
3490 3495 3500

Leu Leu Asp Lys Asp Gln Ala Val Ala Val Gln His Ser Val Glu Glu
3505 3510 3515 3520

Ile Thr Asp Asn Tyr Pro Gln Ala Ile Val Tyr Pro Phe Ile Ile Ser
3525 3530 3535

Ser Glu Ser Tyr Ser Phe Lys Asp Thr Ser Thr Gly His Lys Asn Lys

3540 3545 3550

Glu Phe Val Ala Arg Ile Lys Ser Lys Leu Asp Gln Gly Gly Val Ile
3555 3560 3565

Gln Asp Phe Ile Asn Ala Leu Asp Gln Leu Ser Asn Pro Glu Leu Leu
3570 3575 3580

Phe Lys Asp Trp Ser Asn Asp Val Arg Ala Glu Leu Ala Lys Thr Pro
3585 3590 3595 3600

Val Asn Lys Lys Asn Ile Glu Lys Met Tyr Glu Arg Met Tyr Ala Ala
3605 3610 3615

Leu Gly Asp Pro Lys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Phe Arg Arg Lys Phe
3620 3625 3630

Ile Gln Thr Phe Gly Lys Glu Phe Asp Lys His Phe Gly Lys Gly Gly
3635 3640 3645

Ser Lys Leu Leu Arg Met Lys Leu Ser Asp Phe Asn Asp Ile Thr Asn
3650 3655 3660

Met Leu Leu Leu Lys Met Asn Lys Asp Ser Lys Pro Pro Gly Asn Leu
3665 3670 3675 3680

Lys Glu Cys Ser Pro Trp Met Ser Asp Phe Lys Val Glu Phe Leu Arg
3685 3690 3695

Asn Glu Leu Glu Ile Pro Gly Gln Tyr Asp Gly Arg Gly Lys Pro Leu
3700 3705 3710

Pro Glu Tyr His Val Arg Ile Ala Gly Phe Asp Glu Arg Val Thr Val
3715 3720 3725

Met Ala Ser Leu Arg Arg Pro Lys Arg Ile Ile Ile Arg Gly His Asp
3730 3735 3740

Glu Arg Glu His Pro Phe Leu Val Lys Gly Gly Glu Asp Leu Arg Gln
3745 3750 3755 3760

Asp Gln Arg Val Glu Gln Leu Phe Gln Val Met Asn Gly Ile Leu Ala
3765 3770 3775

Gln Asp Ser Ala Cys Ser Gln Arg Ala Leu Gln Leu Arg Thr Tyr Ser
3780 3785 3790

Val Val Pro Met Thr Ser Arg Leu Gly Leu Ile Glu Trp Leu Glu Asn
3795 3800 3805

Thr Val Thr Leu Lys Asp Leu Leu Leu Asn Thr Met Ser Gln Glu Glu
3810 3815 3820

Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Asp Pro Arg Ala Pro Pro Cys Glu Tyr Lys
3825 3830 3835 3840

Asp Trp Leu Thr Lys Met Ser Gly Lys His Asp Val Gly Ala Tyr Met
3845 3850 3855

Leu Met Tyr Lys Gly Ala Asn Arg Thr Glu Thr Val Thr Ser Phe Arg
3860 3865 3870

Lys Arg Glu Ser Lys Val Pro Ala Asp Leu Leu Lys Arg Ala Phe Val
3875 3880 3885

Arg Met Ser Thr Ser Pro Glu Ala Phe Leu Ala Leu Arg Ser His Phe
3890 3895 3900

Ala Ser Ser His Ala Leu Ile Cys Ile Ser His Trp Ile Leu Gly Ile
3905 3910 3915 3920

Gly Asp Arg His Leu Asn Asn Phe Met Val Ala Met Glu Thr Gly Gly
3925 3930 3935

Val Ile Gly Ile Asp Phe Gly His Ala Phe Gly Ser Ala Thr Gln Phe
3940 3945 3950

Leu Pro Val Pro Glu Leu Met Pro Phe Arg Leu Thr Arg Gln Phe Ile
3955 3960 3965

Asn Leu Met Leu Pro Met Lys Glu Thr Gly Leu Met Tyr Ser Ile Met
3970 3975 3980

Val His Ala Leu Arg Ala Phe Arg Ser Asp Pro Gly Leu Leu Thr Asn
3985 3990 3995 4000

Thr Met Asp Val Phe Val Lys Glu Pro Ser Phe Asp Trp Lys Asn Phe
4005 4010 4015

Glu Gln Lys Met Leu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Ile Gln Glu Ile Asn
4020 4025 4030

Val Ala Glu Lys Asn Trp Tyr Pro Arg Gln Lys Ile Cys Tyr Ala Lys
4035 4040 4045

Arg Lys Leu Ala Gly Ala Asn Pro Ala Val Ile Thr Cys Asp Glu Leu
4050 4055 4060

Leu Leu Gly His Glu Lys Ala Pro Ala Phe Arg Asp Tyr Val Ala Val
4065 4070 4075 4080

Ala Arg Gly Ser Lys Asp His Asn Ile Arg Ala Gln Glu Pro Glu Ser
4085 4090 4095

Gly Leu Ser Glu Glu Thr Gln Val Lys Cys Leu Met Asp Gln Ala Thr
4100 4105 4110

Asp Pro Asn Ile Leu Gly Arg Thr Trp Glu Gly Trp Glu Pro Trp Met
4115 4120 4125

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAMS

<400> 3
His Met Arg Ser Ala Met Ser Gly Leu His Leu Val Lys Arg Arg
1 5 10 15

<210> 4
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Scrambled sense siRNA

<400> 4
ccuacgccac caauuucgu 19

<210> 5
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Scrambled antisense siRNA

<400> 5
acgaaauugg uggcguagg 19

<210> 6
<211> 13509
<212> DNA
<213> human DNA-PKcs

<400> 6
ggggcatttc cgggtccggg ccgagcgggc gcacgcgcgg gagcgggact cggcggcatg 60

gcgggctccg gagccggtgt gcgttgctcc ctgctgcggc tgcaggagac cttgtccgct 120

gcggaccgct gcggtgctgc cctggccggt catcaactga tccgcggcct ggggcaggaa 180

tgcgtcctga gcagcagccc cgcggtgctg gcattacaga catctttagt tttttccaga 240

gatttcggtt tgcttgtatt tgtccggaag tcactcaaca gtattgaatt tcgtgaatgt 300

agagaagaaa tcctaaagtt tttatgtatt ttcttagaaa aaatgggcca gaagatcgca 360

ccttactctg ttgaaattaa gaacacttgt accagtgttt atacaaaaga tagagctgct 420

aaatgtaaaa ttccagccct ggaccttctt attaagttac ttcagacttt tagaagttct 480

agactcatgg atgaatttaa aattggagaa ttatttagta aattctatgg agaacttgca 540

ttgaaaaaaa aaataccaga tacagtttta gaaaaagtat atgagctcct aggattattg 600

ggtgaagttc atcctagtga gatgataaat aatgcagaaa acctgttccg cgcttttctg 660

ggtgaactta agacccagat gacatcagca gtaagagagc ccaaactacc tgttctggca 720

ggatgtctga aggggttgtc ctcacttctg tgcaacttca ctaagtccat ggaagaagat 780

ccccagactt caagggagat ttttaatttt gtactaaagg caattcgtcc tcagattgat 840

ctgaagagat atgctgtgcc ctcagctggc ttgcgcctat ttgccctgca tgcatctcag 900

tttagcacct gccttctgga caactacgtg tctctatttg aagtcttgtt aaagtggtgt 960

gcccacacaa atgtagaatt gaaaaaagct gcactttcag ccctggaatc ctttctgaaa 1020

caggtttcta atatggtggc gaaaaatgca gaaatgcata aaaataaact gcagtacttt 1080

atggagcagt tttatggaat catcagaaat gtggattcga acaacaagga gttatctatt 1140

gctatccgtg gatatggact ttttgcagga ccgtgcaagg ttataaacgc aaaagatgtt 1200

gacttcatgt acgttgagct cattcagcgc tgcaagcaga tgttcctcac ccagacagac 1260

actggtgacg accgtgttta tcagatgcca agcttcctcc agtctgttgc aagcgtcttg 1320

ctgtaccttg acacagttcc tgaggtgtat actccagttc tggagcacct cgtggtgatg 1380

cagatagaca gtttcccaca gtacagtcca aaaatgcagc tggtgtgttg cagagccata 1440

gtgaaggtgt tcctagcttt ggcagcaaaa gggccagttc tcaggaattg cattagtact 1500

gtggtgcatc agggtttaat cagaatatgt tctaaaccag tggtccttcc aaagggccct 1560

gagtctgaat ctgaagacca ccgtgcttca ggggaagtca gaactggcaa atggaaggtg 1620

cccacataca aagactacgt ggatctcttc agacatctcc tgagctctga ccagatgatg 1680

gattctattt tagcagatga agcatttttc tctgtgaatt cctccagtga aagtctgaat 1740

catttacttt atgatgaatt tgtaaaatcc gttttgaaga ttgttgagaa attggatctt 1800

acacttgaaa tacagactgt tggggaacaa gagaatggag atgaggcgcc tggtgtttgg 1860

atgatcccaa cttcagatcc agcggctaac ttgcatccag ctaaacctaa agatttttcg 1920

gctttcatta acctggtgga attttgcaga gagattctcc ctgagaaaca agcagaattt 1980

tttgaaccat gggtgtactc attttcatat gaattaattt tgcaatctac aaggttgccc 2040

ctcatcagtg gtttctacaa attgctttct attacagtaa gaaatgccaa gaaaataaaa 2100

tatttcgagg gagttagtcc aaagagtctg aaacactctc ctgaagaccc agaaaagtat 2160

tcttgctttg ctttatttgt gaaatttggc aaagaggtgg cagttaaaat gaagcagtac 2220

aaagatgaac ttttggcctc ttgtttgacc tttcttctgt ccttgccaca caacatcatt 2280

gaactcgatg ttagagccta cgttcctgca ctgcagatgg ctttcaaact gggcctgagc 2340

tataccccct tggcagaagt aggcctgaat gctctagaag aatggtcaat ttatattgac 2400

agacatgtaa tgcagcctta ttacaaagac attctcccct gcctggatgg atacctgaag 2460

acttcagcct tgtcagatga gaccaagaat aactgggaag tgtcagctct ttctcgggct 2520

gcccagaaag gatttaataa agtggtgtta aagcatctga agaagacaaa gaacctttca 2580

tcaaacgaag caatatcctt agaagaaata agaattagag tagtacaaat gcttggatct 2640

ctaggaggac aaataaacaa aaatcttctg acagtcacgt cctcagatga gatgatgaag 2700

agctatgtgg cctgggacag agagaagcgg ctgagctttg cagtgccctt tagagagatg 2760

aaacctgtca ttttcctgga tgtgttcctg cctcgagtca cagaattagc gctcacagcc 2820

agtgacagac aaactaaagt tgcagcctgt gaacttttac atagcatggt tatgtttatg 2880

ttgggcaaag ccacgcagat gccagaaggg ggacagggag ccccacccat gtaccagctc 2940

tataagcgga cgtttcctgt gctgcttcga cttgcgtgtg atgttgatca ggtgacaagg 3000

caactgtatg agccactagt tatgcagctg attcactggt tcactaacaa caagaaattt 3060

gaaagtcagg atactgttgc cttactagaa gctatattgg atggaattgt ggaccctgtt 3120

gacagtactt taagagattt ttgtggtcgg tgtattcgag aattccttaa atggtccatt 3180

aagcaaataa caccacagca gcaggagaag agtccagtaa acaccaaatc gcttttcaag 3240

cgactttata gccttgcgct tcaccccaat gctttcaaga ggctgggagc atcacttgcc 3300

tttaataata tctacaggga attcagggaa gaagagtctc tggtggaaca gtttgtgttt 3360

gaagccttgg tgatatacat ggagagtctg gccttagcac atgcagatga gaagtcctta 3420

ggtacaattc aacagtgttg tgatgccatt gatcacctat gccgcatcat tgaaaagaag 3480

catgtttctt taaataaagc aaagaaacga cgtttgccgc gaggatttcc accttccgca 3540

tcattgtgtt tattggatct ggtcaagtgg cttttagctc attgtgggag gccccagaca 3600

gaatgtcgac acaaatccat tgaactcttt tataaattcg ttcctttatt gccaggcaac 3660

agatccccta atttgtggct gaaagatgtt ctcaaggaag aaggtgtctc ttttctcatc 3720

aacacctttg agggggggtgg ctgtggccag ccctcgggca tcctggccca gcccaccctc 3780

ttgtaccttc gggggccatt cagcctgcag gccacgctat gctggctgga cctgctcctg 3840

gccgcgttgg agtgctacaa cacgttcatt ggcgagagaa ctgtaggagc gctccaggtc 3900

ctaggtactg aagcccagtc ttcacttttg aaagcagtgg ctttcttctt agaaagcatt 3960

gccatgcatg acattatagc agcagaaaag tgctttggca ctggggcagc aggtaacaga 4020

acaagcccac aagagggaga aaggtacaac tacagcaaat gcaccgttgt ggtccggatt 4080

atggagttta ccacgactct gctaaacacc tccccggaag gatggaagct cctgaagaag 4140

gacttgtgta atacacacct gatgagagtc ctggtgcaga cgctgtgtga gcccgcaagc 4200

ataggtttca acatcggaga cgtccaggtt atggctcatc ttcctgatgt ttgtgtgaat 4260

ctgatgaaag ctctaaagat gtccccatac aaagatatcc tagagaccca tctgagagag 4320

aaaataacag cacagagcat tgaggagctt tgtgccgtca acttgtatgg ccctgacgcg 4380

caagtggaca ggagcaggct ggctgctgtt gtgtctgcct gtaaacagct tcacagagct 4440

gggcttctgc ataatatatt accgtctcag tccacagatt tgcatcattc tgttggcaca 4500

gaacttcttt ccctggttta taaaggcatt gcccctggag atgagagaca gtgtctgcct 4560

tctctagacc tcagttgtaa gcagctggcc agcggacttc tggagttagc ctttgctttt 4620

ggaggactgt gtgagcgcct tgtgagtctt ctcctgaacc cagcggtgct gtccacggcg 4680

tccttgggca gctcacaggg cagcgtcatc cacttctccc atggggagta tttctatagc 4740

ttgttctcag aaacgatcaa cacggaatta ttgaaaaatc tggatcttgc tgtattggag 4800

ctcatgcagt cttcagtgga taataccaaa atggtgagtg ccgttttgaa cggcatgtta 4860

gaccagagct tcagggagcg agcaaaccag aaacaccaag gactgaaact tgcgactaca 4920

attctgcaac actggaagaa gtgtgattca tggtgggcca aagattcccc tctcgaaact 4980

aaaatggcag tgctggcctt actggcaaaa attttacaga ttgattcatc tgtatctttt 5040

aatacaagtc atggttcatt ccctgaagtc tttacaacat atattagtct acttgctgac 5100

acaaagctgg atctacattt aaagggccaa gctgtcactc ttcttccatt cttcaccagc 5160

ctcactggag gcagtctgga ggaacttaga cgtgttctgg agcagctcat cgttgctcac 5220

ttccccatgc agtccaggga atttcctcca ggaactccgc ggttcaataa ttatgtggac 5280

tgcatgaaaa agtttctaga tgcattggaa ttatctcaaa gccctatgtt gttggaattg 5340

atgacagaag ttctttgtcg ggaacagcag catgtcatgg aagaattatt tcaatccagt 5400

ttcaggagga ttgccagaag gggttcatgt gtcacacaag taggccttct ggaaagcgtg 5460

tatgaaatgt tcaggaagga tgacccccgc ctaagtttca cacgccagtc ctttgtggac 5520

cgctccctcc tcactctgct gtggcactgt agcctggatg ctttgagaga attcttcagc 5580

acaattgtgg tggatgccat tgatgtgttg aagtccaggt ttacaaagct aaatgaatct 5640

acctttgata ctcaaatcac caagaagatg ggctactata agattctaga cgtgatgtat 5700

tctcgccttc ccaaagatga tgttcatgct aaggaatcaa aaattaatca agttttccat 5760

ggctcgtgta ttacagaagg aaatgaactt acaaagacat tgattaaatt gtgctacgat 5820

gcatttacag agaacatggc aggagagaat cagctgctgg agaggagaag actttaccat 5880

tgtgcagcat acaactgcgc catatctgtc atctgctgtg tcttcaatga gttaaaattt 5940

taccaaggtt ttctgtttag tgaaaaacca gaaaagaact tgcttatttt tgaaaatctg 6000

atcgacctga agcgccgcta taattttcct gtagaagttg aggttcctat ggaaagaaag 6060

aaaaagtaca ttgaaattag gaaagaagcc agagaagcag caaatgggga ttcagatggt 6120

ccttcctata tgtcttccct gtcatatttg gcagacagta ccctgagtga ggaaatgagt 6180

caatttgatt tctcaaccgg agttcagagc tattcataca gctcccaaga ccctagacct 6240

gccactggtc gttttcggag acgggagcag cgggacccca cggtgcatga tgatgtgctg 6300

gagctggaga tggacgagct caatcggcat gagtgcatgg cgcccctgac ggccctggtc 6360

aagcacatgc acagaagcct gggcccgcct caaggagaag aggattcagt gccaagagat 6420

cttccttctt ggatgaaatt cctccatggc aaactgggaa atccaatagt accattaaat 6480

atccgtctct tcttagccaa gcttgttatt aatacagaag aggtctttcg cccttacgcg 6540

aagcactggc ttagcccctt gctgcagctg gctgcttctg aaaacaatgg aggagaagga 6600

attcactaca tggtggttga gatagtggcc actattcttt catggacagg cttggccact 6660

ccaacagggg tccctaaaga tgaagtgtta gcaaatcgat tgcttaattt cctaatgaaa 6720

catgtctttc atccaaaaag agctgtgttt agacacaacc ttgaaattat aaagaccctt 6780

gtcgagtgct ggaaggattg tttatccatc ccttataggt taatatttga aaagttttcc 6840

ggtaaagatc ctaattctaa agacaactca gtagggattc aattgctagg catcgtgatg 6900

gccaatgacc tgcctcccta tgacccacag tgtggcatcc agagtagcga atacttccag 6960

gctttggtga ataatatgtc ctttgtaaga tataaagaag tgtatgccgc tgcagcagaa 7020

gttctaggac ttatacttcg atatgttatg gagagaaaaa acatactgga ggagtctctg 7080

tgtgaactgg ttgcgaaaca attgaagcaa catcagaata ctatggagga caagtttatt 7140

gtgtgcttga acaaagtgac caagagcttc cctcctcttg cagacaggtt catgaatgct 7200

gtgttctttc tgctgccaaa atttcatgga gtgttgaaaa cactctgtct ggaggtggta 7260

ctttgtcgtg tggagggaat gacagagctg tacttccagt taaagagcaa ggacttcgtt 7320

caagtcatga gacatagaga tgatgaaaga caaaaagtat gtttggacat aatttataag 7380

atgatgccaa agttaaaacc agtagaactc cgagaacttc tgaaccccgt tgtggaattc 7440

gtttcccatc cttctacaac atgtagggaa caaatgtata atattctcat gtggattcat 7500

gataattaca gagatccaga aagtgagaca gataatgact cccaggaaat atttaagttg 7560

gcaaaagatg tgctgattca aggattgatc gatgagaacc ctggacttca attaattatt 7620

cgaaatttct ggagccatga aactaggtta ccttcaaata ccttggaccg gttgctggca 7680

ctaaattcct tatattctcc taagatagaa gtgcactttt taagtttagc aacaaatttt 7740

ctgctcgaaa tgaccagcat gagcccagat tatccaaacc ccatgttcga gcatcctctg 7800

tcagaatgcg aatttcagga atataccatt gattctgatt ggcgtttccg aagtactgtt 7860

ctcactccga tgtttgtgga gacccaggcc tcccagggca ctctccagac ccgtacccag 7920

gaagggtccc tctcagctcg ctggccagtg gcagggcaga taagggccac ccagcagcag 7980

catgacttca cactgacaca gactgcagat ggaagaagct catttgattg gctgaccggg 8040

agcagcactg acccgctggt cgaccacacc agtccctcat ctgactcctt gctgtttgcc 8100

cacaagagga gtgaaaggtt acagagagca cccttgaagt cagtggggcc tgattttggg 8160

aaaaaaaggc tgggccttcc aggggacgag gtggataaca aagtgaaagg tgcggccggc 8220

cggacggacc tactacgact gcgcagacgg tttatgaggg accaggagaa gctcagtttg 8280

atgtatgcca gaaaaggcgt tgctgagcaa aaacgagaga aggaaatcaa gagtgagtta 8340

aaaatgaagc aggatgccca ggtcgttctg tacagaagct accggcacgg agaccttcct 8400

gacattcaga tcaagcacag cagcctcatc accccgttac aggccgtggc ccagagggac 8460

ccaataattg caaaacagct ctttagcagc ttgttttctg gaattttgaa agagatggat 8520

aaatttaaga cactgtctga aaaaaacaac atcactcaaa agttgcttca agacttcaat 8580

cgttttctta ataccacctt ctctttcttt ccacccttg tctcttgtat tcaggacatt 8640

agctgtcagc acgcagccct gctgagcctc gacccagcgg ctgttagcgc tggttgcctg 8700

gccagcctac agcagcccgt gggcatccgc ctgctagagg aggctctgct ccgcctgctg 8760

cctgctgagc tgcctgccaa gcgagtccgt gggaaggccc gcctccctcc tgatgtcctc 8820

agatgggtgg agcttgctaa gctgtataga tcaattggag aatacgacgt cctccgtggg 8880

atttttacca gtgagatagg aacaaagcaa atcactcaga gtgcattatt agcagaagcc 8940

agaagtgatt attctgaagc tgctaagcag tatgatgagg ctctcaataa acaagactgg 9000

gtagatggtg agcccacaga agccgagaag gatttttggg aacttgcatc ccttgactgt 9060

tacaaccacc ttgctgagtg gaaatcactt gaatactgtt ctacagccag tatagacagt 9120

gagaaccccc cagacctaaa taaaatctgg agtgaaccat tttatcagga aacatatcta 9180

ccttacatga tccgcagcaa gctgaagctg ctgctccagg gagaggctga ccagtccctg 9240

ctgacattta ttgacaaagc tatgcacggg gagctccaga aggcgattct agagcttcat 9300

tacagtcaag agctgagtct gctttacctc ctgcaagatg atgttgacag agccaaatat 9360

tacattcaaa atggcattca gagttttatg cagaattatt ctagtattga tgtcctctta 9420

caccaaagta gactcaccaa attgcagtct gtacaggctt taacagaaat tcaggagttc 9480

atcagcttta taagcaaaca aggcaattta tcatctcaag ttccccttaa gagacttctg 9540

aacacctgga caaacagata tccagatgct aaaatggacc caatgaacat ctgggatgac 9600

atcatcacaa atcgatgttt ctttctcagc aaaatagagg agaagcttac ccctcttcca 9660

gaagataata gtatgaatgt ggatcaagat ggagacccca gtgacaggat ggaagtgcaa 9720

gagcaggaag aagatatcag ctccctgatc aggagttgca agttttccat gaaaatgaag 9780

atgatagaca gtgcccggaa gcagaacaat ttctcacttg ctatgaaact actgaaggag 9840

ctgcataaag agtcaaaaac cagagacgat tggctggtga gctgggtgca gagctactgc 9900

cgcctgagcc actgccggag ccggtcccag ggctgctctg agcaggtgct cactgtgctg 9960

aaaacagtct ctttgttgga tgagaacaac gtgtcaagct acttaagcaa aaatattctg 10020

gctttccgtg accagaacat tctcttgggt acaacttaca ggatcatagc gaatgctctc 10080

agcagtgagc cagcctgcct tgctgaaatc gaggaggaca aggctagaag aatcttagag 10140

ctttctggat ccagttcaga ggattcagag aaggtgatcg cgggtctgta ccagagagca 10200

ttccagcacc tctctgaggc tgtgcaggcg gctgaggagg aggcccagcc tccctcctgg 10260

agctgtgggc ctgcagctgg ggtgattgat gcttacatga cgctggcaga tttctgtgac 10320

caacagctgc gcaaggagga agagaatgca tcagttattg attctgcaga actgcaggcg 10380

tatccagcac ttgtggtgga gaaaatgttg aaagctttaa aattaaattc caatgaagcc 10440

agattgaagt ttcctagatt acttcagatt atagaacggt atccagagga gactttgagc 10500

ctcatgacaa aagagatctc ttccgttccc tgctggcagt tcatcagctg gatcagccac 10560

atggtggcct tactggacaa agaccaagcc gttgctgttc agcactctgt ggaagaaatc 10620

actgataact acccgcaggc tattgtttat cccttcatca taagcagcga aagctattcc 10680

ttcaaggata cttctactgg tcataagaat aaggagtttg tggcaaggat taaaagtaag 10740

ttggatcaag gaggagtgat tcaagatttt attaatgcct tagatcagct ctctaatcct 10800

gaactgctct ttaaggattg gagcaatgat gtaagagctg aactagcaaa aacccctgta 10860

aataaaaaaa acattgaaaa aatgtatgaa agaatgtatg cagccttggg tgacccaaag 10920

gctccaggcc tgggggcctt tagaaggaag tttattcaga cttttggaaa agaatttgat 10980

aaacattttg ggaaaggagg ttctaaacta ctgagaatga agctcagtga cttcaacgac 11040

attaccaaca tgctactttt aaaaatgaac aaagactcaa agccccctgg gaatctgaaa 11100

gaatgttcac cctggatgag cgacttcaaa gtggagttcc tgagaaatga gctggagatt 11160

cccggtcagt atgacggtag gggaaagcca ttgccagagt accacgtgcg aatcgccggg 11220

tttgatgagc gggtgacagt catggcgtct ctgcgaaggc ccaagcgcat catcatccgt 11280

ggccatgacg agagggaaca ccctttcctg gtgaagggtg gcgaggacct gcggcaggac 11340

cagcgcgtgg agcagctctt ccaggtcatg aatgggatcc tggcccaaga ctccgcctgc 11400

agccagaggg ccctgcagct gaggacctat agcgttgtgc ccatgacctc caggttagga 11460

ttaattgagt ggcttgaaaa tactgttacc ttgaaggacc ttcttttgaa caccatgtcc 11520

caagaggaga aggcggctta cctgagtgat cccagggcac cgccgtgtga atataaagat 11580

tggctgacaa aaatgtcagg aaaacatgat gttggagctt acatgctaat gtataagggc 11640

gctaatcgta ctgaaacagt cacgtctttt agaaaacgag aaagtaaagt gcctgctgat 11700

ctcttaaagc gggccttcgt gaggatgagt acaagccctg aggctttcct ggcgctccgc 11760

tcccacttcg ccagctctca cgctctgata tgcatcagcc actggatcct cgggattgga 11820

gacagacatc tgaacaactt tatggtggcc atggagactg gcggcgtgat cgggatcgac 11880

tttgggcatg cgtttggatc cgctacacag tttctgccag tccctgagtt gatgcctttt 11940

cggctaactc gccagtttat caatctgatg ttaccaatga aagaaacggg ccttatgtac 12000

agcatcatgg tacacgcact ccgggccttc cgctcagacc ctggcctgct caccaacacc 12060

atggatgtgt ttgtcaagga gccctccttt gattggaaaa attttgaaca gaaaatgctg 12120

aaaaaaggag ggtcatggat tcaagaaata aatgttgctg aaaaaaattg gtacccccga 12180

cagaaaatat gttacgctaa gagaaagtta gcaggtgcca atccagcagt cattacttgt 12240

gatgagctac tcctgggtca tgagaaggcc cctgccttca gagactatgt ggctgtggca 12300

cgaggaagca aagatcacaa cattcgtgcc caagaaccag agagtgggct ttcagaagag 12360

actcaagtga agtgcctgat ggaccaggca acagacccca acatccttgg cagaacctgg 12420

gaaggatggg agccctggat gtgaggtctg tgggagtctg cagatagaaa gcattacatt 12480

gtttaaagaa tctactatac tttggttggc agcattccat gagctgattt tcctgaaaca 12540

ctaaagagaa atgtcttttg tgctacagtt tcgtagcatg agtttaaatc aagattatga 12600

tgagtaaatg tgtatgggtt aaatcaaaga taaggttata gtaacatcaa agattaggtg 12660

aggtttatag aaagatagat atccaggctt accaaagtat taagtcaaga atataatatg 12720

tgatcagctt tcaaagcatt tacaagtgct gcaagttagt gaaacagctg tctccgtaaa 12780

tggaggaaat gtggggaagc cttggaatgc ccttctggtt ctggcacatt ggaaagcaca 12840

ctcagaaggc ttcatcacca agattttggg agagtaaagc taagtatagt tgatgtaaca 12900

ttgtagaagc agcataggaa caataagaac aataggtaaa gctataatta tggcttatat 12960

ttagaaatga ctgcatttga tattttagga tatttttcta ggtttttcc tttcatttta 13020

ttctcttcta gttttgacat tttatgatag atttgctctc tagaaggaaa cgtctttatt 13080

taggagggca aaaattttgg tcatagcatt cacttttgct attccaatct acaactggaa 13140

gatacataaa agtgctttgc attgaatttg ggataacttc aaaaatccca tggttgttgt 13200

tagggatagt actaagcatt tcagttccag gagaataaaa gaaattccta tttgaaatga 13260

attcctcatt tggaggaaaa aaagcatgca ttctagcaca acaagatgaa attatggaat 13320

acaaaagtgg ctccttccca tgtgcagtcc ctgtcccccc ccgccagtcc tccacaccca 13380

aactgtttct gattggcttt tagctttttg ttgttttttt ttttccttct aacacttgta 13440

tttggaggct cttctgtgat tttgagaagt atactcttga gtgtttaata aagttttttt 13500

ccaaaagta 13509

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA-PKcs sense primer

<400> 7
gaattcaagc gagtccgtgg gaaggcc 27

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> DNA-PKcs anti-sense primer

<400> 8
gtcgacttcg ctgcttatga tgaaggg 27

<210> 9
<211> 424
<212> DNA
<213> human AMPK gamma1

<400> 9
catacgatgt tccagattac gctagcttgg gtggtcatat ggccatggag gccccgggga 60

tccgaattcg cggccgcgtc gaccgcggcc gcgtcgacca ggactccttt aaaccgcttg 120

tctgcatttc tcctaatgcc agcttgtttg atgctgtctc ttcattaatt cggaacaaga 180

tccacaggct gccagttatt gacccagaat caggcaatac tttgtacatc ctcacccaca 240

agcgcattct gaagttcctc aaattgttta tcactgagtt ccccaagcca gagttcatgt 300

ccaagtctct ggaagagcta cagattggca cctatgccaa tattgctatg gttcgcacta 360

ccacccccgt ctatgtggct ctggggattt ttgtacagca tcgagtctca gccctgccag 420

tggt 424