

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/47

C12N 15/10

G01N 33/53

C12Q 1/68

A61P 25/24

[21] 申请号 200380102546.8

[43] 公开日 2005 年 12 月 14 日

[11] 公开号 CN 1708511A

[22] 申请日 2003.10.23

[21] 申请号 200380102546.8

[30] 优先权

[32] 2002.10.31 [33] EP [31] PCT/EP02/12273

[86] 国际申请 PCT/EP2003/011793 2003.10.23

[87] 国际公布 WO2004/039835 英 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.29

[71] 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯特恩豪特斯路 30 号

[72] 发明人 P·J·彼得斯

H·W·H·格尔曼

S·M·A·斯瓦格马克斯

F·L·P·费伦斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 6 页 说明书 44 页 序列表 17 页
附图 10 页

[54] 发明名称 对促肾上腺皮质激素释放激素刺激的
的应答而表达增加的基因

[57] 摘要

本发明一般涉及抑郁症的治疗和诊断。具体地,本发明涉及多肽以及编码这些多肽的多核苷酸,其中所述多肽表现出在介导促肾上腺皮质激素释放激素的细胞应答中起主要作用。这些多肽和多核苷酸可用于抑郁症的诊断、治疗和/或预防。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 编码一种蛋白质的分离的多核苷酸, 该蛋白质调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化, 所述蛋白质具有选自 SEQ ID NO.: 46 和 SEQ ID NO.: 48 的氨基酸序列。
- 5 2. 根据权利要求 1 的分离的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是 mRNA、DNA 或 cDNA。
3. 编码一种蛋白质的分离的多核苷酸, 该蛋白质调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化, 所述多核苷酸含有选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的核酸序列。
- 10 4. 编码一种蛋白质的分离的多核苷酸, 该蛋白质调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化, 所述多核苷酸由选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的核酸序列组成。
5. 编码一种蛋白质的分离的多核苷酸, 该蛋白质调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化, 所述蛋白质包含选自 SEQ ID
15 NO.: 46 和 SEQ ID NO.: 48 的氨基酸序列。
6. 含有根据权利要求 1 到 4 任一项的分离的多核苷酸的载体。
7. 根据权利要求 6 的载体, 其中多核苷酸可操作地连接到表达控制序列。
- 20 8. 能够表达调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化的蛋白质的宿主细胞, 所述蛋白质具有选自 SEQ ID NO.: 46 和 SEQ ID NO.: 48 的氨基酸序列。
9. 用含有调节序列的载体转染的根据权利要求 8 的宿主细胞。
- 25 10. 用根据权利要求 6 或 7 的载体转染的根据权利要求 8 的宿主细胞。
11. 鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法, 所述方法包括:
 - a) 所述化合物存在和不存在时将所述细胞与 CRH 接触;
 - 30 b) 确定调节所述细胞中促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化的至少一种蛋白质的量; 和
 - c) 比较在所述化合物存在和不存在时所述蛋白质的量; 其

中，调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化的蛋白质选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、
5 SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中细胞是真核细胞，如鼠垂体促肾上腺皮质激素细胞来源的腺瘤细胞系 AtT-20。

10 13. 根据权利要求 11 或 12 的方法，其中使用抗体确定调节 CRH 信号化的蛋白质的量，该抗体结合含有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、
15 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的多肽。

14. 根据权利要求 11 或 12 的方法，其中通过评估一种基因的基因转录水平确定调节 CRH 信号化的蛋白质的量，该基因编码选自 SEQ
20 ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、
25 SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中使用探针评估基因转录的水平，该探针结合编码选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、
30 SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46

和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的多核苷酸。

16. 根据权利要求 14 或 15 的方法, 其中使用微阵列技术分析基因表达的水平。

17. 根据权利要求 16 的方法, 其中使用寡核苷酸探针的阵列
5 评估基因表达水平, 所述探针结合编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 2、
SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID
NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID
NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO.
28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO.
10 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、
SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的多肽组的多核苷酸。

18. 鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法, 所述方法包括:

a) 在受试化合物存在和不存在时接触所述细胞; 和
15 b) 确定编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ
ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID
NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID
NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO.
30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、
20 SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46
和 SEQ ID NO. 48 的多肽的基因的表达水平。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其中使用寡核苷酸探针的阵列
确定基因的表达水平, 所述探针结合具有核酸序列 SEQ ID No.1、SEQ
ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO.11、
25 SEQ ID NO 13、SEQ ID No.15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ
ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ
ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ
ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ
ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸。

30 20. 鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的方
法, 所述方法包括:

a) 将表达含有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、

SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、
SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、
SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、
SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、
5 SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46
和 SEQID NO. 48 的氨基酸序列的至少一种蛋白质的细胞与所述受试化
合物接触；和

b) 比较所述化合物存在和不存在时所述细胞的 CRH 应答活
性。

10 21. 根据权利要求 20 的方法，其中细胞表达具有氨基酸序列
SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO.
10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO.
18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、
SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、
15 SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、
SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48 的蛋白质组。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中 CRH 应答活性被评估为基
因水平上转录的变化。

23. 根据权利要求 21 或 22 的方法，其中使用微阵列技术评估
20 CRH 应答活性。

24. 根据权利要求 20 到 23 任一项的方法，其中细胞是能够表
达具有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、
SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、
SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、
25 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、
SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO. 40、
SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48
的氨基酸序列的至少一种蛋白质的宿主细胞。

25. 根据权利要求 24 的方法，其中宿主细胞被含有调节序列
30 的至少一种载体转染。

26. 根据权利要求 24 的方法，其中宿主细胞被含有编码选自
SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO.

10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、
5 SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的多核苷酸序列的至少一种载体转染。

27. 诊断个体中 CRH 诱导的抑郁症的方法，所述方法包括：

a) 得到所述个体的生物样品；和

b) 确定所述生物样品中调节促肾上腺皮质激素释放激素
10 (CRH) 信号化的至少一种蛋白质的量；其中调节促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 信号化的蛋白质选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、
15 SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。

28. 根据权利要求 27 的方法，其中生物样品是体液或组织样品。

20 29. 根据权利要求 27 或 28 的方法，其中使用抗体确定调节 CRH 信号化的蛋白质的量，该抗体结合含有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、
25 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的多肽。

30 30. 根据权利要求 27 或 28 的方法，其中通过评估一种基因的基因转录水平来确定调节 CRH 信号化的蛋白质的量，该基因编码选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、

SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列。

31. 根据权利要求 30 的方法，其中使用探针评估基因转录的水平，该探针结合编码选自 SEQ ID NO.2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48 的氨基酸序列的多核苷酸。

32. 根据权利要求 30 或 31 的方法，其中使用微阵列技术分析基因转录的水平。

33. 根据权利要求 32 的方法，其中使用寡核苷酸探针的阵列分析基因转录水平，所述探针结合编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO.2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48 的多肽组的多核苷酸。

34. 根据权利要求 32 的方法，其中使用寡核苷酸探针的阵列分析基因转录的水平，这些探针结合具有核酸序列 SEQ ID No.1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No.15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸。

对促肾上腺皮质激素释放激素刺激的应答而表达增加的基因

本发明一般涉及抑郁症的治疗和诊断。具体地，本发明涉及多肽
5 以及编码这些多肽的多核苷酸，其中所述多肽表现出在介导促肾上腺
皮质激素释放激素的细胞应答中起主要作用。这些多肽和多核苷酸可
用于抑郁症的诊断、治疗和/或预防。

发明背景

10 最近的社会经济学分析发现抑郁症是无能的首要原因和其他疾病
发展的主要的危险因素。此外，在世界范围规模内，抑郁症被诊断不
足和治疗不足。最近的抗抑郁药物已经被证明是有效的，但是存在作
用起效慢和副作用的问题。在这方面，仍然不清楚它们通过哪种药理
15 学作用模式发挥它们的临床效果。基于抑郁症的皮质类固醇受体假说
的假说-驱动的研究已经导致一种新观念，其聚焦在脑神经肽受体，特
别是促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 受体作为药物靶标。

促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 是一种 41 个氨基酸的多肽，在
下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节中起中心作用，介导对各种应激物的内
分泌应答。下丘脑神经元应答压力而释放 CRH 到垂体门脉系统，刺激
20 垂体促肾上腺皮质激素 (ACTH) 的分泌和生物合成，导致肾上腺糖皮质
激素产生增加 (1)。一些临床和临床前研究针对抑郁症发展中 CRH 系
统中变化的原因角色 (2)。在人中对 CRH 的最初研究表明在抑郁症患者
中对 CRH 的 ACTH 应答被钝化，反映了连续增加的下丘脑 CRH 分泌继发的
CRH 受体脱敏 (3; 4)。支持钝化的 ACTH 应答作为增加的 CRH 释放的结
25 果的证据是发现抑郁症患者的脑脊液中 CRH 水平升高。加强抑郁状态
中 CRH 分泌过多这一观念的其他发现为患有抑郁症的自杀者中 CRH 分
泌性神经元的数目增多和 CRH 受体的数目减少 (5; 6)。

关于 CRH 已经描述了两种高亲和性受体 CRH1-R1 和 CRH-R2，它们
两者都以几种剪接变体形式存在。这些受体被 CRH 的活化导致腺苷酸
30 环化酶的 Gs-介导的刺激，导致胞内 cAMP 水平上升。这自身将活化依
赖 cAMP 的蛋白激酶 A (KPA) 和最终导致 cAMP 和 Ca^{2+} 的升高的胞质水
平。cAMP 和 Ca^{2+} 的升高的水平导致一些其他的激酶如依赖 Ca^{2+} /钙调蛋

白的激酶 II (CAMKII) 和 p42/p44 促分裂原活化的激酶 (MAPK) 的活化。结果, Ca^{2+} /cAMP 应答元件结合蛋白 (CREB) 被磷酸化并且这反过来将调节在启动子区含有 cAMP 应答元件 (CRE) 的基因的转录。表明参与 CRH 信号化 (signaling) 调节的这些基因的实例包括 c-fos、巨噬细胞迁移-抑制因子基因 Mif、孤儿核受体 Nurrl7 和 Nurrl1。

尽管已经在 AtT20-细胞——促肾上腺皮质细胞的一种细胞模型中广泛研究了 CRH 活化的受体的下游途径并且导致参与信号级联的许多基因的鉴定, 但是一个主要领域还未被探索。因此, 本发明的目的是研究基因组水平上对 CRH 刺激的转录应答以鉴定与促肾上腺皮质激素释放激素受体活化的基因网络有关的其他基因。这样鉴定的多肽和编码所述多肽的多核苷酸作为筛选技术的药物靶标为药物开发提供了新的机会, 或者可用于抑郁症的诊断、预防和/或治疗。

发明概述

本发明涉及在基因组水平上与 CRH 刺激的转录应答有关的许多基因的鉴定。尤其涉及编码调节 CRH 信号化的蛋白质的许多迄今未知的基因的鉴定, 这些基因具有选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47、SEQ ID No. 49 和其功能类似物的序列。

另一方面, 本发明涉及前述核苷酸序列, 包括含有这些序列的载体、含有编码前述序列之一的载体的宿主细胞以及含有根据本发明的多核苷酸或载体的转基因非-人动物的重组用途。

本发明的另一个目的是提供许多基因, 这些基因迄今还未与 CRH 信号化相关并因此可用于鉴定调节细胞中 CRH 信号应答的化合物的方法中, 或者用于诊断方法以鉴定个体中 CRH 诱导的抑郁症。在一个实施方案中, 鉴定能够改变细胞中 CRH 信号应答的化合物的方法包括在所述化合物存在和不存在下将所述细胞与 CRH 接触并确定含有一核酸序列的多核苷酸的表达水平, 该核酸序列选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID

No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQID No. 49。在该筛选方法中，通常使用结合前述多核苷酸的寡核苷酸探针，优选使用阵列技术方法评估表达水平。因此，在特定实施方案中，本发明提供了鉴定调节细胞中 CRH 信号应答的化合物的方法，所述方法包括在所述化合物存在和不存在下将所述细胞与 CRH 接触；并确定具有核酸序列 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQID No. 49 的多核苷酸的表达水平，其中这些序列的表达谱的变化指示能够改变所述细胞中 CRH 信号化应答的化合物。

附图简述

表 1: 调节 CRH 信号化的蛋白质列表

图 1: 通过对 β -肌动蛋白 mRNA 水平 (视为 100%) 标准化的定量 RT-PCR 评估用 DMSO、CRH、CRH+R121919 或 R121919 处理的 AtT-20 细胞中不同时间点的 c-fos mRNA 水平。

图 2: 对所有时间点和处理的标准化微阵列数据应用的一致性分析。正方形描绘不同样品，而圆形描绘基因。正方形之间的距离是对样品之间相似性的量度。基因与给定样品的正关联 (即该特定样品中那个基因的上调) 导致该基因和样品位于穿过矩心 (通过十字形描绘) 的共有线 (common line) 上。一致性分析清楚地将时间鉴定为样品之间的主要辨别者。此外，可以鉴定 CRH 处理的效果在早期时间点中是最突出的。

图 3: 描绘 CRH 处理时有变化的基因的热图。通过将每个样品的强度与相应时间点 DMSO 样品的强度相除计算值。用 \log_2 换算将这些计算的比值转化成色道 (color ramp)。这样，表达诱导的不同时间选择将变得明显。用 CRH 处理 30 分钟后表现出 2 倍变化的基因被称为“早应答者”，“中间应答者”在处理 1 到 2 小时后表现出变化，“晚应答者”在 2 小时或更长时间之后应答。

图 4: CRH 诱导的基因的概述, 通过本文中讨论的途径或功能对这些基因分类。通过将每个样品的强度与相应时间点 DMSO 样品的强度相除计算值。用 \log_2 换算将这些计算的比值转化成色道并在热图中描绘。

5 图 5: AtT-20 细胞中 CRH 对 Rgs2 的诱导。与任何处理前 AtT-20 细胞中观察到的水平相比较计算诱导。上面显示了对 Rgs2 所得到的阵列数据。下面, 显示了通过定量 RT-PCR 对用于阵列实验的相同样品所测量的 Rgs2 mRNA 水平和对重复实验所测量的 Rgs2 mRNA 水平。

10 发明详述

如此处所用的, 术语“化合物”或“试剂”指生物或化学化合物如简单或复杂的有机分子、肽、蛋白质或寡核苷酸。如此处所用的“受试化合物”指用于根据本发明的方法的“化合物”或“试剂”, 用以评估所述化合物是否调节 CRH 信号化活性。

15 如此处所用的“CRH 信号化”指细胞中 CRH 使促肾上腺皮质激素释放激素受体活化后所述细胞基因转录的变化。其从而诱导 CRH 特异基因表达谱。可以在蛋白质或基因—RNA 水平上评估转录水平的变化。

如此处所用的“CRH 应答活性”一般指由于细胞暴露于 CRH 导致可检测的细胞参数的变化。可检测的细胞参数包括膜电位的变化、调节
20 所述细胞中 CRH 信号化的酶的酶活性变化、根据本发明的蛋白质的表达水平的变化或者第二信使如 cGMP、cAMP、 Ca^{2+} 或 IP_3 的量的变化。

术语“类似物”或“功能类似物”指根据本发明的蛋白质的修饰形式, 其中已经进行了至少一个氨基酸置换使得所述类似物在体外和/或体内保持和未修饰的蛋白质基本相同的生物学活性。

25 术语“功能类似物”旨在包括根据本发明的多肽的“片段”、“变体”、“简并变体”、“类似物”和“同系物”或“化学衍生物”。多肽的有用的化学衍生物是本领域中熟知的并包括, 例如具有次级化学部分的多肽内所含的反应性有机位点的共价修饰。熟知的交联试剂可用于与氨基、羧基或醛残基反应以导入例如亲和标记如生物素、荧光染料, 或者将多肽缀合到固相表面(例如, 产生亲和树脂)。
30

多核苷酸或多肽的变体, 如该术语在此处所用的, 分别是与参比多核苷酸或多肽不同的多核苷酸或多肽。多核苷酸的变体可以是天然

发生的变体如天然发生的等位基因变体，或者其可以是不知道是天然发生的变体。(1)在核苷酸序列中与参比多核苷酸不同的多核苷酸。通常差异受到限制从而参比和变体的核苷酸序列总体上非常类似，在许多区域中相同。如下面所指出的，变体的核苷酸序列的改变可以是沉默的。即，它们可能不改变该多核苷酸编码的氨基酸。当改变局限于这种类型的沉默变化时，变体将编码具有与参比相同的氨基酸序列的多肽。还如下面所提到的，变体的核苷酸序列的改变可以改变参比多核苷酸所编码的多肽的氨基酸序列。这种核苷酸改变可导致如上讨论的参比序列编码的多肽中氨基酸置换、加入、缺失、融合和截断。(2)氨基酸序列与另一参比多肽不同的多肽。一般地，差异受到限制从而参比和变体的多肽序列总体上非常类似并且，在许多区域中相同。变体和参比多肽在氨基酸序列中可以相差一个或多个置换、插入、缺失、融合和截断，它们可以以任一组合呈现。

如此处所用的术语“互补的”或“互补性”指嘌呤和嘧啶核苷酸通过氢键结合形成双链核酸分子的能力。下面的碱基对通过互补性相关联：鸟嘌呤和胞嘧啶；腺嘌呤和胸腺嘧啶；腺嘌呤和尿嘧啶。如此处所用的“互补的”指前述关系应用于所述分子的全长上，含有两条单链核酸分子的基本所有碱基对。“部分互补的”指前述关系，其中两条单链核酸分子之一在长度上短于另一条从而两个分子之一的一部分保持单链的。

术语“保守置换”或者“保守氨基酸置换”指基于本领域认识到的某些氨基酸的可置换性，亲本蛋白质中一个或多个氨基酸残基置换而不影响亲本分子的生物学活性(见，例如，M. Dayhoff, Atlas of Protein Sequence and Structure, 卷5, 增补3, 345-352页, 1978)。

“其片段”指序列在此处公开的核酸或蛋白质的片段、片、或亚区域，从而所述片段含有5或更多氨基酸，或者10个或多个核苷酸，在亲本蛋白质或核酸分子中这些氨基酸或核苷酸是相邻的。

如此处所用的“功能片段”指此处公开的蛋白质的分离的亚区域或者片段，或者氨基酸序列，它们例如，含有功能上明显的区域，如受体的活化位点。功能片段可通过克隆技术产生，或者作为备选剪接机制的天然产物。

术语“同系物”或“同源的”描述不同核酸分子或氨基酸序列之

间的关系，其中所述序列或分子通过所述分子或序列内一个或多个区组或区域处的部分同一或类似性相联系。“分离的核酸化合物”指任一 RNA 或 DNA 序列，其无论如何分析或合成，在位置上与其天然位置不同。

5 如此处所用的“核酸探针”或“探针”是标记的核酸化合物，其与另一种核酸化合物杂交。“核酸探针”指将与单链靶核酸序列杂交的单链核酸序列。核酸探针可以是寡核苷酸或核苷酸聚合物。“探针”通常含有可检测部分，其可以附着到该探针的末端或者可以在该探针的序列内部。

10 术语“引物”是作为例如核酸分子的酶促或合成的延伸的起始底物的核酸片段。

如此处所用的术语“杂交”指一种过程，其中单链核酸分子与互补链通过核苷酸碱基配对接合。

15 术语“严格性”指杂交条件。高严格性调节不利于非同源碱基配对。低严格性条件具有相反作用。例如，通过温度和盐浓度可以改变严格性。“严格条件”指在含有 50%甲酰胺、5 × SSC (750 mM NaCl, 75 mM 柠檬酸钠)、50 mM 磷酸钠 (pH 7.6)、5 × Denhardt 溶液、10%硫酸葡聚糖、和 20 μg/ml 变性的、剪切的鲑精 DNA 的溶液中于 42℃ 下过夜孵育，然后在 0.1 × SSC 中约 65℃ 下洗涤滤器。其他适宜的杂交条件在实施例中描述。

20 “较低的严格条件”包括在含有 6 × SSPE (20X SSPE = 3M NaCl ; 0.2M NaH₂PO₄ ; 0.02M EDTA, pH 7.4)、0.5% SDS、30%甲酰胺、100 μg/ml 鲑鱼精子封闭 DNA 的溶液中 37℃ 整夜孵育，然后用 1 × SSPE、0.1% SDS 在 50℃ 洗涤。此外，为了实现甚至更低的严格性，可以在更高盐浓度 (例如，5 × SSC) 下进行严格杂交后的洗涤。注意到通过用于抑制杂交实验中背景的备选封闭试剂的包括和/或替换可以实现上面条件的改变。典型的封闭试剂包括 Denhardt 试剂、BLOTTO、肝素、变性的鲑精 DNA、和通过商业途径可得到的专利制剂。特异封闭试剂的包含由于相容性问题可能需要修改上述杂交条件。

30 如此处所用的术语“融合蛋白”指为了得到结构域或者接头 (linker) 区的组合功能，组合多个蛋白质结构域或者连接体区导致的蛋白质构建体。这可以通过编码这种结构域的核苷酸序列的分子克

隆以产生编码所希望的融合蛋白的新的多核苷酸序列实现。备选地，通过化学方法连接两个蛋白质产生融合蛋白。

如此处所用的术语“接头区”或者“接头结构域”或者类似的这些描述性术语指用于克隆载体或融合蛋白的构建中的多核苷酸或多肽序列。接头区的功能可以包括将克隆位点导入核苷酸序列、将柔性组分或空间产生区域导入两个蛋白质结构域之间，或者产生用于特定分子相互作用的亲和标记。接头区可被导入在多肽或多核苷酸序列构建期间作出的选择导致的融合蛋白中。

10 筛选方法

本发明涉及用于鉴定调节促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 诱导的抑郁症和紧张的化合物的筛选方法。该方法基于作为 CRH 活化的 CRH 受体的下游调节剂的许多基因的鉴定。具体地，本发明提供了鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法，所述方法包括：

- 15 a) 所述化合物存在或不存在时将所述细胞与 CRH 接触；
 - b) 确定调节所述细胞中促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 信号化的至少一种蛋白质在转录水平上的改变；和
 - c) 比较在所述化合物存在和不存在时所述蛋白质的转录水平；
- 其中，调节促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 信号化的蛋白质选自
- 20 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、
- 25 SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。

为了确定蛋白质水平上转录的变化，可以使用本领域中公知的技术确定所述蛋白质的量。例如，使用分离技术如等电聚焦或 SDS-PAGE 联合蛋白质染色技术如考马斯或银染。备选地，对于是酶的蛋白质，可以按照该酶产生的催化效果，即其底物向反应产物的转化，测量或

30 分析给定溶液或组织提取物中的量。例如，对于激酶，可以使用含有激酶特异磷酸化位点的底物并通过测量由于放射性磷酸向底物的掺入导致的该底物的磷酸化来评估激酶活性。可以在受试化合物存在或不

存在时实施该测定法。对于不是酶的蛋白质，需要其他定量方法。例如，转运蛋白可通过它们与它们所转运的分子的结合来测量，激素和毒素可通过它们产生的生物学效应来测定。

5 为评估基因水平上转录的变化，RNA 或 cDNA 可被直接使用或者可以在分析前通过使用 PCR 或其他扩增技术酶促扩增。优选地，所述分析方法包括使用标记的寡核苷酸探针，该探针靶定基因的适宜区域。

因此，在优选的实施方案中，使用结合编码氨基酸序列的多核苷酸的探针评估基因转录水平，该氨基酸序列选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、
10 SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。

15 在另一实施方案中，可以构建含有编码调节 CRH 信号化的蛋白的核苷酸序列或者其片段的寡核苷酸探针阵列以实施基因表达的有效筛选。阵列技术是熟知的并且具有普遍适用性并且可用于处理分子遗传学中的各种问题，包括基因表达、遗传连锁，和遗传变异性(见例如：M. Chee 等人，Science，卷 274，610-613 页(1996))。从而本发明的一个目的是提供鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法，所述方法包括：在受试化合物存在和不存在时将所述细胞与 CRH 接触；和使用结合编码具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的多肽组的多核苷酸的寡核苷酸探针阵列确定基因转录的水平。

30 在备选的实施方案中，鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法包括：

a) 在所述化合物存在和不存在时将所述细胞与 CRH 接触；和

b) 确定含有核酸序列的多核苷酸的表达水平, 该核酸序列选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、
5 SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQ ID No. 49。

为了评估表达水平的改变, RNA 或 cDNA 可被直接使用或者可以在分析前通过使用 PCR 或其他扩增技术酶促扩增。优选地, 所述分析方法包括使用标记的寡核苷酸探针, 该探针靶定该多核苷酸的适宜区域。因此, 在优选的实施方案中, 使用结合含有核酸序列的多核苷酸的探针评估基因转录水平, 该核酸序列选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ
10 ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49。

在另一实施方案中, 可以构建陈列含有编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核苷酸或者其片段的寡核苷酸探针阵列以有效筛选基因表达。在该实施方案中, 本发明提供了鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法, 所述方法包括在所述化合物存在或不存在时将所述细胞与 CRH 接触; 确定具有核酸序列 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ
20 ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQ ID No. 49 的多核苷酸的表达水平。具体地,
30 使用结合具有核酸序列 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID

No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸的寡核苷酸探针阵列。

5 在另一实施方案中，寡核苷酸探针阵列含有编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核苷酸序列或者其片段，可以构建该寡核苷酸探针的阵列用于实施基因表达的有效筛选。阵列技术是熟知的并且具有普遍适用性并且可用于处理分子遗传学中的各种问题，包括基因表达、遗传连锁，和遗传变异性(见例如：M. Chee 等人，*Science*，卷 274，610-613
10 页(1996))。

对于基因组 DNA 不被直接使用的情況，可以分离 mRNA，并实施第一条链 cDNA 合成。可以实施 DNA 合成的第二轮以产生第二条链。随后，通过特异 PCR 扩增，可以得到分离的 cDNA。如果希望，双链 cDNA 可
15 被克隆到任一适宜的载体，例如，质粒，从而形成 cDNA 文库。类似于上面的方法，可以用靶定编码调节 CRH 信号化的蛋白质的基因的任一适宜的区域
的标记的寡核苷酸探针筛选在噬菌体或质粒穿梭载体中构建的 cDNA 文库。见例如，PCR Protocols: A Guide to Method and Application，编者 M. Innis 等人，Academic Press (1990)。

20 在适宜的载体如质粒或噬菌体中构建 cDNA 文库以在原核或真核细胞中增殖的方法是本领域技术人员熟知的。[见例如 Maniatis 等人，如前]。适宜的克隆载体是熟知的并且可普遍得到。

在另一实施方案中，在 mRNA 水平确定基因转录的变化。可以使用用于多核苷酸定量的本领域中熟知的方法之一在 RNA 水平测量减少或增加的表达，这些方法为，例如，核酸扩增，例如，通过 PCR、RT-PCR；
25 RNA 酶保护；Northern 印迹和其他杂交方法。可用于确定蛋白质，如来自宿主的样品中本发明的多肽的水平测定技术是本领域技术人员熟知的。这些测定方法包括放射免疫测定法、竞争-结合测定法、蛋白质印迹分析和 ELISA 测定法。可用于确定蛋白质衍生物或者变体的存在的测定技术包括质谱法。

30 从而，本发明的一个目的是提供鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答的化合物的方法，所述方法包括：

a) 所述化合物存在或不存在时将所述细胞与 CRH 接触；

b) 确定调节所述细胞中促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 信号化的至少一种蛋白质的量; 和

c) 比较在所述化合物存在和不存在时所述蛋白质的量; 其中, 调节促肾上腺皮质激素-释放激素 (CRH) 信号化的蛋白质选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。

优选地, 测定调节 CRH 信号化的蛋白质的量的方法是使用结合含有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的多肽的抗体。

从而, 在另一实施方案中, 本发明提供了与调节 CRH 信号化的蛋白质具有免疫反应性的单特异抗体, 所述蛋白质选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48。使用常规方案, 通过将本发明多肽或者含有表位的片段、类似物或者表达这些的细胞施用于动物, 优选非-人动物, 可以得到所产生的针对本发明多肽的抗体。对于单克隆抗体制备, 可以使用提供通过连续细胞系培养产生的抗体的任一技术。实例包括杂交瘤技术 (Kohler, G. 和 Milstein, C., Nature (1975) 256: 495-497)、trioma 技术、人 B-细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等人, Immunology Today (1983) 4: 72) 和 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等人,

MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, 77-96 页, Alan R. Liss, Inc. , 1985)。

产生单链抗体, 如美国专利号 4, 946, 778 中所描述的那些单链抗体的技术也可适用于产生针对本发明多肽的单链抗体。而且, 转基因小鼠, 或者其他生物, 包括其他哺乳动物, 也可以用于表达人源化抗体。

上述抗体可用于分离或鉴定表达该多肽的克隆或者通过亲和层析纯化这些多肽。

针对本发明多肽的抗体也可用于治疗 CRH 代谢相关的失调如 CRH 诱导的紧张或抑郁症。

为了确定调节 CRH 信号化的蛋白质的量, 根据本发明的抗体被用于常规免疫学技术。适宜的免疫学技术是本领域技术人员熟知的并包括例如, ELISA、蛋白质印迹分析、竞争性或三明治免疫测定法等, 如所熟知的, 它们都依赖于抗原-抗体免疫复合物的形成, 其中为了测定法起见, 抗体可以被例如, 放射、酶或荧光标记物可检测地标记, 或者可固定在不可溶的载体上。

例如, 在一种 ELISA 筛选方法中, 抗体被加到固相(例如, 微量滴定板的底部), 该固相被偶联到载体(如 BSA)的蛋白质或者其片段包被, 然后加入缀合可检测标记如酶, 优选辣根过氧化物酶, 或者放射性同位素如 ^{125}I 的抗-免疫球蛋白抗体(例如, 当在小鼠中进行免疫时, 使用抗-小鼠免疫球蛋白抗体, 例如, 绵羊-抗-小鼠免疫球蛋白(Ig))。

从而本发明的一个目的是提供确定或检测调节样品中 CRH 信号化的蛋白质的免疫测定法, 该方法包括将样品与根据本发明的蛋白质接触并确定在该抗体和所述蛋白质之间是否形成免疫复合体。可以对组织样品或者体液样品实施这些方法并且它们通常包括从受试者的身体得到样品; 将所述样品与根据本发明的可检测标记的抗体的成像有效量接触; 并检测标记以鉴定调节样品中 CRH 信号化的蛋白质的存在。

使用本发明抗体的测量方法不被具体限制。可以使用任一测量方法, 只要相应于抗原的抗体、抗原或者抗原-抗体复合体的量可被化学或物理方法检测, 并且从通过使用含有已知量的抗原的标准溶液制备的标准曲线计算得到。例如, 可以适宜地使用浊度测定法、竞争法、免疫测量方法和三明治方法。对于灵敏性和特异性, 尤其优选使用下

面描述的三明治方法。

在使用标记物质的测量方法中，放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质等被用作标记剂。放射性同位素的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 和 ^{14}C 。酶通常被缀合适宜的底物，该底物又反过来催化可检测的反应物而使得该酶可被检测。该底物的实例包括，例如， β -半乳糖苷酶、 β -葡糖苷酶、碱性磷酸酶、过氧化物酶和苹果酸脱氢酶，优选辣根过氧化物酶。发光物质包括，例如，鲁米诺、鲁米诺衍生物、萤光素、水母发光蛋白和萤光素酶。此外，抗生物素蛋白-生物素系统也可以用于标记抗体和本发明的免疫原。

10 因此，在另一方面，本发明提供了鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的方法，该方法包括：

a) 将表达含有选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、15 SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的氨基酸序列的至少一种蛋白质的细胞与所述受试化合物接触；和

20 b) 比较所述化合物存在和不存在时所述细胞中 CRH 应答活性。

使用常规电生理学技术并且当它们可以得到时，使用当前正在开发的新的高通量方法测量膜电位的变化。因为膜电位的改变通常是离子通量的结果，作为备选方法，使用离子敏感的荧光染料，包括 fluo-3、fluo-4、fluo-5N、fura red、Sodium Green、SBFI 和来自 25 包括 Molecular Probes 的供应商的其他类似探针，可以通过细胞内离子浓度的变化间接测量膜电位的变化。来自包括 Molecular Probes 的供应商的其他荧光染料如 DIBAC₄₍₃₎ 或 Di-4-Anepps 可以检测膜电位变化。例如，使用荧光测量和荧光成像技术，包括荧光显微术，用或不用激光共聚焦方法组合图像分析算法，可以实时表征钙和钠离子通 30 量。

在优选的实施方案中，该测定法基于称作荧光成像板读出器 (FLIPR, Molecular Devices Corporation) 的仪器。在其最通常

的配置中，该仪器激发并测量基于萤光素的染料发出的荧光。其使用氩离子激光在荧光团的 488 nm 处产生高能量激发，用光学系统快速扫描 96-/384-孔板的底部并用灵敏的冷 CCD 相机捕捉发出的荧光。其还包括 96-/384-孔移液头以允许该仪器递送试剂溶液到 96-/384-孔板的孔中。FLIPR 测定法被设计用于同时从所有 96-/384-孔实时地测量化合物加入之前、之中和之后来自细胞群体的荧光信号。

从而本发明的一个目的是提供用于筛选和鉴定在调节细胞 CRH 应答中具有功能活性的化合物的 FLIPR 测定法，所述细胞表达选自 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32 和 SEQ ID NO. 34 的蛋白。

在备选实施方案中，可以使用电生理学方法评估细胞的活性。因此，可以使用全细胞和单通道电生理学鉴定调节细胞中 CRH 信号化的蛋白质。

从而，本发明的另一个目的是提供鉴定调节细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的筛选方法，所述方法包括：

a) 将表达选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48 的蛋白质的宿主细胞与受试化合物接触；

b) 使用电生理技术检测受试化合物对所述细胞膜电位的影响；和

c) 比较所述化合物存在和不存在时所述细胞中 CRH 应答活性。备选地，前述筛选方法中的宿主细胞表达选自 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32 和 SEQ ID NO. 34 的蛋白质。

在优选的实施方案中，宿主细胞是爪蟾 (*Xenopus*) 卵母细胞并且电生理学测量由使用电压钳技术在不同的膜电位测量膜电流组成。

调节所述细胞中 CRH 信号化的酶的酶活性的变化一般可以按照酶产生的催化效果，即其底物向反应产物的转化来测量或分析。例如，

对于激酶，可以使用含有该激酶特异磷酸化位点的底物并通过测量该底物的磷酸化评估该激酶的活性。类似地对于磷酸酶，可以使用磷酸化底物并通过测量该底物的去磷酸化评估磷酸酶活性。

可以在受试化合物存在和不存在时实施这些测定。

5 从而本发明的一个目的是提供鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的方法，所述方法包括：

a) 将包括选自 SEQ ID NO. 10、SEQ ID 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16 和 SEQ ID NO. 18 的激酶的混合物与磷酸源和适宜的激酶底物接触；

10 b) 在所述化合物存在或不存在时孵育所述混合物；和
检测与所述受试化合物不存在时所述底物的磷酸化水平相比所述化合物存在时所述底物的磷酸化水平。

在本发明的测定法中，激酶可作为蛋白质提供或者其可以作为编码所述激酶的 mRNA 在测定混合物中提供。当该测定法包括无细胞组分时，该激酶以蛋白质提供。当该测定法在细胞环境中实施时，该激酶
15 可以作为蛋白质或者作为编码所述激酶的 mRNA 提供，其中，为了该激酶可以在该测定法中被利用，该 mRNA 被翻译从而产生激酶蛋白。从此处提供的实施例显然的是得到该激酶的 mRNA 并将该 mRNA 注射到细胞中以产生激酶蛋白是简单的事情。还可以通过编码激酶蛋白的质粒的
20 表达提供激酶。可以用标准分子生物学技术构建编码激酶蛋白的可操作质粒并在细胞中表达质粒 (Sambrook, 等人, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。

如此处所讨论的，可以在体外（其中测定混合物无细胞或者其中
25 活细胞被包括在测定法中），或者体内在动物中实施鉴定激酶调节剂的方法。从而，在本发明的一个方面，混合物被包含在真核细胞中并且可以实施本发明的方法，其中测定混合物的一些组分可以通过这些组分向细胞的微注射外源地提供给细胞，一些组分可以是细胞内源的。

30 如此处所用的术语“细胞内源的”指该组分在受试细胞中天然地产生。

如此处所用的术语“细胞外源的”指该组分在受试细胞中没有天

然地发现，或者在细胞中以低水平发现，和被加到细胞中。

当使用真核细胞实施本发明方法时，一种或多种激酶蛋白、激酶底物和受试化合物可以在真核细胞孵育前注射到真核细胞中。然后如此注射的细胞在促进蛋白质激酶活性的条件下孵育，在孵育期之后，
5 使用此处描述的测定法随后测量蛋白质激酶活性水平。

用于本发明方法中的真核细胞可以是非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 卵母细胞、非洲爪蟾胚细胞、哺乳动物细胞 (如 IOTI/2 细胞)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) S2 细胞、*Dictyostelium discoideum* 细胞和酵母细胞。更优选地，真核细胞是鼠垂体促肾上腺皮质激素细胞-来源的腺瘤细胞系细胞 AtT-20 之一。
10

用于本发明方法的磷酸源可以是磷酸的任一普通来源，包括，但不限于，核苷酸三磷酸如，但不限于，ATP 或 GTP。在优选的实施方案中，磷酸源上结合可检测的标记，在反应期间该标记随磷酸基团转移到激酶底物。这样，磷酸化激酶底物可以与非-磷酸化激酶底物区分，
15 因为磷酸化底物将含有可检测的标记而非磷酸化底物将不含有标记。在另一实施方案中，磷酸源上不结合可检测标记；而是，例如通过抗体识别底物的一种形式而不能识别另一种形式，可以将磷酸化激酶底物与非-磷酸化激酶底物区分。

用于本发明的方法中的可检测标记可包括任一已知或至今未知的可检测标记，该标记由于蛋白质激酶活性的结果在磷酸根基团转移时转移到激酶底物。可用的标记包括，但不限于，放射性标记，如 γ ^{32}P 、 ^{35}S 和非放射性标记，如生物素等。
20

在另一实施方案中，本发明提供了鉴定能够改变细胞内 CRH 信号化应答活性的化合物的方法，所述方法包括：

25 a) 将含有选自 SEQ ID NO. 36 和 SEQ ID NO. 38 的磷酸酶的混合物与适宜的磷酸化底物接触；

b) 在所述化合物存在或不存在时孵育所述混合物；和

检测与所述受试化合物不存在时所述底物的磷酸化水平相比，所述化合物存在时所述底物的磷酸化水平。

30 对于激酶测定法，本发明的测定法中的磷酸酶可以以蛋白质提供或者其可以作为编码所述磷酸酶的 mRNA 在测定混合物中提供。通常用可检测的磷酸残基标记磷酸化底物。可用的标记物包括，但不限于，

放射性标记，如 γ ^{32}P 、 ^{31}S 和非放射性标记，如生物素等。对于用于磷酸酶活性测定法，底物优选由在酪氨酸或丝氨酸残基被磷酸化，典型地用 γ ^{32}P 标记的肽底物组成。通常，可以以各种方法完成磷酸化。典型地，使用蛋白质酪氨酸激酶。例如，可以使用可溶的 EGF-受体激酶联合、sup、 ^{32}P 标记的 ATP 磷酸化本发明的肽上的酪氨酸残基。这种磷酸化反应通常允许在 30°C 持续约 2 小时或者在室温过夜。

然后从磷酸化反应混合物纯化磷酸化肽，其在下文中被称为“磷酸肽”。例如，通过加入三氯乙酸并离心，从而肽保留在上清液中，可以从反应混合物分离肽。一般通过柱层析，例如在 C18 上进一步纯化肽。纯化的磷酸化肽可被冻干并在 -20°C 保存备用。

孵育后，通过磷酸肽的去磷酸化（即从去磷酸化释放的游离放射性磷）释放的放射性分离没有去磷酸化的磷酸肽（“未-去磷酸化的磷酸肽”）。如此处所用的，术语“放射性磷”包括所有形式，其中放射性磷原子可存在于酪氨酸残基上并且可通过去磷酸化，例如，作为磷酸基团被除去。通常，通过离心，然后通过加入包括非放射性磷酸和活性炭的物质终止去磷酸化反应实现未-去磷酸化的磷酸肽与磷酸肽的去磷酸化释放的游离的放射性磷的分离。通过本领域普通技术人员熟知的方法确定上清液的放射性。基于最初通过磷酸肽加入测定混合物的放射性的量和作为去磷酸化释放的放射性在测定法的末尾检测的放射性的量，可以计算所分析的样品的磷酸酶酶促活性。

本发明的一个实施方案是提供鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的方法，所述方法包括：

a) 将表达包括选自 SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32 和 SEQ ID NO. 34 的至少一种蛋白质的细胞与所述受试化合物接触；和

b) 比较所述化合物存在和不存在时所述细胞中第二信使，如 cAMP、cGMP、 Ca^{2+} 或 IP_3 的水平。

使用本领域公知的技术确定含有前述蛋白质之一的全细胞或细胞提取物中第二信使的水平。

30 鉴定能够改变细胞中 CRH 信号化应答活性的化合物的另一方法是基于基因的使用，如报告基因，其可操作地连接基因启动子或者其调节序列元件，其特征是所述基因启动子或者调节序列元件含有转录因

子结合位点，其中所述转录因子能够调节细胞中 CRH 信号化。在优选的实施方案中，能够调节细胞中 CRH 信号化的转录因子选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6 和 SEQ ID NO. 8。因此，本发明提供了含有如上面定义的基因启动子区的重组 DNA 分子。在所述重组 DNA 分子中，启动子区可操作地连接编码可检测的产物的核酸分子，如报道基因。如此处所用的，术语“可操作地连接”指按适宜的框将基因与启动子功能性融合以表达处于该启动子控制下的基因。如此处所用的，术语“报道基因”指一种基因，其编码的基因产物可以用简单、便宜的方法鉴定并且该基因可以可操作地连接到启动子区或者其活性片段。报道基因如，例如，萤火虫萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、细菌氯霉素乙酰基转移酶或者绿色荧光蛋白报道基因可用于确定根据本发明的筛选测定法中的转录活性(见，例如，Goeddel (编著)，Methods Enzymol.，卷 185，San Diego: Academic Press, Inc. (1990); 还见 Sambrook, 如前)。在优选的实施方案中，报道基因是萤火虫萤光素酶基因。本发明还提供了含有如上定义的重组 DNA 分子的载体，以及用所述载体，或者一般用根据本发明的重组 DNA 分子稳定转化的宿主细胞。术语“载体”指用于将 DNA 转移到宿主细胞中并通过宿主细胞复制和/或适宜表达外源 DNA 的任何外源 DNA 的运载工具。因此，在特定实施方案中，所述载体是表达载体，如 pGL3luc、pBLCAT5 (LMBP 2451)、pGMCSFlacZ (LMBP 2979)、pEGFP 或 pSEAPbasic (DMB 3115)，其中 LMBP 和 DMB 号指比利时微生物保藏中心 (Belgian Co-ordinated Collections of Microorganisms) 的这些表达载体的保藏号。

另一方面，本发明提供了鉴定调节 CRH 信号化活性的化合物的方法，所述方法包括步骤：(i) 将候选试剂与如上面定义的基因启动子区接触；和 (ii) 确定所述候选试剂是否调节可检测产物的表达，该调节指示能够调节 CRH 信号化活性的试剂。可检测的产物指该基因编码的蛋白或者报道基因的产物如萤光素酶、 β -半乳糖苷酶或绿色荧光蛋白。定量可检测产物的方法是本领域中公知的并且包括如果表达产物是酶则使用比色底物，或者在 RIA 或 ELISA 测定法中使用特异抗体或者测量从可操作地连接到启动子的基因转录的 mRNA 的水平，其中可以使用标准方法直接测量所述 mRNA 或者间接测量所述 mRNA。优选地，

基因启动子包含转录因子结合位点，所述转录因子选自 SEQ Ib No. 2、SEQ Ib No. 4、SEQ Ib No. 6 和 SEQ Ib No. 8。

编码能够调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸的鉴定

5 另一方面，本发明涉及分离并纯化的核酸分子，它们编码能够调节 CRH 信号化的蛋白质，其中所述核酸分子是 RNA、DNA、cDNA 或基因组 DNA。

具体地，本发明包括分离并纯化的核酸分子，它们含有选自下面组的一个成员：

10 (a) 编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸分子，该蛋白质与含有选自 SEQ ID No. 46 和 SEQ ID No. 48 的氨基酸序列的多肽具有至少 70% 同一性；

(b) 与 (a) 的多核苷酸互补的核酸分子；

15 (c) 含有 (a) 或 (b) 的多核苷酸的至少 15 个连续碱基的核酸分子；

(d) 在严格条件下与 (a) 或 (b) 的多核苷酸分子杂交的核酸分子；和

20 (e) 编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸分子，该核酸分子含有由于 (a) 到 (d) 任一个的多核苷酸的核苷酸序列的遗传密码的简并产生的核苷酸序列。

本领域技术人员将认识到由于遗传密码简并性，核苷酸碱基对的许多“沉默”置换可被导入由 SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO 47 或 SEQ ID NO: 49 鉴定的序列而不改变所编码的氨基酸或蛋白质产物的同一性。所有这些置换都旨在位于本发明的范围内。

25 另一方面，本发明涉及人嘌呤通透酶多核苷酸。这些多核苷酸包括分离的多核苷酸，其含有编码多肽的核苷酸序列，该多肽与选自 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 48 的氨基酸序列在该氨基酸序列的全长上具有至少 70% 同一性，优选至少 80% 同一性，更优选至少 90% 同一性，更优选至少 95% 同一性。这一点上，高度优选具有至少 97% 同一性的多肽，更高度优选具有至少 98-99% 同一性的多肽，最优选具有至少 99% 同一性的多肽。这些多核苷酸基本上由选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQ ID No. 49 的多核苷酸序列组成。

30

因此, 另一方面, 本发明提供了分离的多核苷酸, 其含有:

5 a) 编码与选自 SEQ ID NO : 46 和 SEQ ID NO : 48 的氨基酸序列具有至少 70%同一性, 优选至少 80%同一性, 更优选至少 90%同一性, 更优选至少 95%同一性, 甚至更优选至少 97-99%同一性的多肽的核苷酸序列;

b) 与选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸在所述多核苷酸的全长上具有至少 70%同一性, 优选至少 80%同一性, 更优选至少 90%同一性, 更优选至少 95%同一性, 甚至更优选至少 97-99%同一性的核苷酸序列;

10 c) 与选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸在所述多核苷酸的全部编码区上具有至少 70%同一性, 优选至少 80%同一性, 更优选至少 90%同一性, 更优选至少 95%同一性, 甚至更优选至少 97-99%同一性的核苷酸序列; 和

15 d) 由选自 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 和 SEQ ID No. 49 的多核苷酸组成的核苷酸序列。

具体提供了上面概述的多核苷酸用于根据本发明的筛选方法或诊断方法。尤其用于鉴定能够调节细胞中 CRH 信号化的化合物或者诊断个体中改变的 CRH 代谢。

20 同一性或相似性, 如本领域中公知的, 是如通过比较序列确定的两个或多个多肽序列或者两个或多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中, 同一性还指多肽或多核苷酸序列之间的序列相关性程度, 可以如通过这些序列串之间的匹配确定。可以容易地计算同一性或相似性 (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 编者, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., 编者, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 和 Sequence Analysis Primer, Gribskov, 25 M. 和 Devereux, J., 编者, M Stockton Press, New York, 1991)。尽管有许多方法可以测量两种多核苷酸或两种多肽序列之间的同一性或相似性, 但是两种术语都是技术人员熟知的 (Sequence Analysis in

Molecular Biology, von Heinje, G. , Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. , 编者, M Stockton Press, New York, 1991; 和 Carillo, H. , 和 Lipman, D. , (1988) SIAM J. Applied Math. , 48,1073)。通常用于确定
5 序列之间的同一性或相似性的方法包括, 但不限于 Carillo, H. , 和 Lipman, D. , (1988) SIAM J. Applied Math. , 48,1073 中公开的那些方法。设计确定同一性的优选方法以给出所试验的序列之间的最大匹配。确定同一性或相似性的方法在计算机程序中编码。确定两个序列之间同一性和相似性的优选的计算机程序方法包括, 但不限于
10 GCG 程序包 (Devereux, J. , 等人, (1984) Nucleic Acids Research 12 (1), 387)、BLASTP、BLASTN、和 FASTA (Atschul, S. F. 等人, (1990) J. Molec. Biol. 215, 403)。

可以从所述基因被表达的组织, 如但不限于, 脑、心脏、肾脏、胰腺、肝脏和皮肤分离编码能够调节 CRH 活性的蛋白质的核酸序列或
15 者其片段。也可以从人和小鼠之外的哺乳动物分离所述序列。其他细胞和细胞系也可以适宜用以分离哺乳动物嘌呤通透酶 cDNA。如此处描述的, 通过筛选细胞提取物或全细胞测定中 CRH 活性可以进行适宜的细胞的选择。在这些测定法的任一种中具有 CRH 调节活性的细胞可适于分离嘌呤通透酶 DNA 或 mRNA。

20 本领域中公知的各种方法的任一种可用于编码根据本发明的蛋白质的 DNA 的分子克隆。在一种方法中, mRNA 被分离, 并且实施第一条链 cDNA 合成。可以实施第二轮 DNA 合成以产生第二条链。随后通过从调节 CRH 信号化的纯化蛋白的氨基酸序列设计简并寡核苷酸引物对 DNA 片段进行特异 PCR 扩增, 可以得到分离的 cDNA。如果希望, 可将
25 双链 cDNA 克隆到任一适宜的载体, 例如, 质粒, 从而形成 cDNA 文库。另一种方法是筛选用靶定 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No.15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ
30 ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQ ID No. 49 的任一适宜区域的标记的寡核苷酸探针在噬

菌体或质粒穿梭载体中构建的 cDNA 文库。见例如, PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis 等人, Academic Press (1990)。

5 在适宜的载体如质粒或噬菌体中构建 cDNA 文库以在原核或真核细胞中增殖的方法是本领域技术人员熟知的。[见例如, Maniatis 等人, 如前]。适宜的克隆载体是熟知的和普遍可得到的。

对本领域技术人员显而易见的是其他类型的文库, 以及从其他细胞或细胞类型构建的文库, 可用于分离根据本发明的核酸序列。其他类型的文库包括, 但不限于, 从其他细胞、从不同于人和小鼠的其他生物得到的 cDNA 文库, 和基因组文库, 其包括 YAC (酵母人工染色体) 10 和粘粒文库。可通过本领域中熟知的标准技术实施基因组 DNA 文库的构建。在 T. Maniatis 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, 14 章 (1989) 可发现熟知的基因组 DNA 文库构建技术。

15 技术人员将明白, 在许多情况中, 分离的 cDNA 序列将是不完整的, 因为编码多肽的区域在该 cDNA 的 5' 末端短。这是逆转录酶——具有内在的低“持续合成能力”(酶在聚合反应期间保持附着到模板的能力的一种测量)的一种酶——在第一条链 cDNA 合成期间不能完成 mRNA 模板的 DNA 拷贝的结果。

20 有一些方法可利用并且是本领域中技术人员熟知的, 用于得到全长 cDNA, 或者延伸短 cDNA, 例如, 基于 cDNA 末端的快速扩增 (RACE) 的方法 (Frohman 等人, 1988, PNAS USA 85, 8998-9002), 或者该技术的最近改良方法, 例如 Marathon™ 技术 (Clontech Laboratories Inc.)。

25 为了通过上面的方法克隆编码根据本发明的蛋白质的多核苷酸, 所述核酸序列编码的多肽的氨基酸序列可能是必要的。为了实现该目的, 可以纯化根据本发明的蛋白质并通过自动测序仪测定部分氨基酸序列。不必确定全部氨基酸序列, 但是确定该蛋白质的 6 到 8 个氨基酸的两个区域的线性序列以产生用于部分 DNA 片段的 PCR 扩增的引物。
30

一旦已经鉴定了适宜的氨基酸序列, 就合成能够编码它们的 DNA 序列。因为遗传密码是简并的, 可以使用一个以上的密码子编码一个

特定氨基酸，因此，该氨基酸序列可被一组相似的 DNA 寡核苷酸的任一个编码。该组中只有一个成员与根据本发明的多核苷酸序列相同并且将能够与编码所希望的蛋白质的 DNA 杂交，即使存在具有错配的 DNA 寡核苷酸也是如此。通过这些方法分离的 DNA 可用于从各种细胞型、
5 无脊椎动物和脊椎动物来源筛选 DNA 文库，和分离同源基因。

多肽

在另一实施方案中，本发明涉及调节 CRH 信号化的基本纯的形式
的多肽，其中所述多肽被分离和纯化的根据本发明的核酸分子编码。
10 在优选实施方案中，该多肽具有选自 SEQ ID NO. 46 和 SEQ ID NO. 48
和其功能类似物的氨基酸序列。

根据本发明的蛋白质包括根据本发明的核酸编码的所有可能的氨基酸变体，包括被所述分子编码和具有保守氨基酸变化的多肽。

本领域技术人员将认识到通过多种重组 DNA 技术包括，例如，杂
15 交、聚合酶链式反应 (PCR) 扩增，或者从头 DNA 合成 (见，例如，T.
Maniatis 等人. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第
二版. 14 章 (1989))，可以得到调节 CRH 信号化的蛋白质。

调节 CRH 信号化的纯化的生物活性蛋白质可以具有几种不同的物
理形式。根据本发明的多肽可以以全长新生的或者未加工的多肽，或
20 者作为部分加工的多肽或者加工的多肽的组合存在。全长新生多肽可
以是被特定蛋白质水解切割事件翻译后修饰的，该事件导致全长新生
多肽的片段的形成。片段，或者片段的物理缔合可以具有与根据本发
明的蛋白质相关的全部生物学活性；然而，CRH 调节活性的程度可以在
个体片段之间变化。

在本发明的该方面还优选的是该多肽的结构或功能属性所表征的
片段。在这一点上本发明的优选实施方案包括含有 α -螺旋和 α -螺旋
形成区、 β -折叠和 β -折叠-形成区、转角和转角-形成区、卷曲螺旋
和卷曲螺旋-形成区、亲水区、疏水区、 α 两性区、 β 两性区、弹性区、
表面-形成区、底物结合区、本发明的多肽的高抗原性指数区的片段，
30 和这些片段的组合。优选的区是介导本发明的多肽的活性的区。在这
一点上最优选的是具有本发明的应答调节多肽的化学、生物学或其
他活性的片段，包括具有类似活性或者提高的活性，或者具有降低

的不希望的活性的那些片段。

编码调节 CRH 活性的蛋白质的多核苷酸的重组表达

5 在另一实施方案中，根据本发明的多核苷酸可以通过分子克隆到含有适宜的启动子和其他适宜的转录调节元件的表达载体中，并转移到原核和真核宿主细胞以产生调节 CRH 信号化的蛋白质，而被重组地表达。这种操作技术在 Maniatis, T, 等人(如前)中完整描述，并且是本领域中熟知的。

10 因此，在另一方面，本发明提供了在重组宿主中表达调节 CRH 信号化的蛋白质的表达载体，其中所述载体含有编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸序列和其功能类似物。在本发明的更优选的方面，该表达载体含有编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸分子，其具有选自 SEQID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQID No. 49 的核苷酸序列和其功能类似物或者含有编码调节 CRH 信号化的蛋白质的基因组 DNA。

15 表达载体在此处被定义为适宜的宿主中所克隆基因拷贝的转录和它们的 mRNA 翻译所需要的 DNA 序列。这些载体可用于在各种宿主中表达真核基因，该宿主为如细菌(包括大肠杆菌)、蓝细菌、植物细胞、昆虫细胞、两栖动物细胞、真菌细胞(包括酵母细胞)和动物细胞。

20 特别设计的载体允许宿主之间的 DNA 穿梭，如细菌-酵母或细菌-动物细胞或者细菌-真菌细胞或细菌-无脊椎动物细胞。适宜构建的表达载体可含有：用于在宿主细胞中自主复制的复制起点、可选择的标记物、有限数目的有用的限制酶位点、高拷贝数的潜力，和活性启动子。启动子被定义为指导 RNA 聚合酶结合 DNA 并启动 RNA 合成的 DNA 序列。强启动子是导致 mRNA 以高频率启动的 mRNA。表达载体可包括，
25 但不限于，克隆载体、修饰的克隆载体、特别设计的质粒或病毒。

30 编码调节 CRH 信号化的蛋白质的根据本发明的分离和纯化的核酸分子可被克隆到表达载体中以在重组宿主细胞中表达。重组宿主细胞可以是原核或真核的，包括但不限于细菌如大肠杆菌、真菌细胞如酵母、两栖动物细胞如爪蟾卵母细胞、哺乳动物细胞包括但不限于人、牛、猪、猴和啮齿类来源的细胞系，和昆虫细胞包括但不限于果蝇-和蚕-来源的细胞系。适宜的并且可通过商业途径得到的来自哺乳动物种类的细胞系包括但不限于：CV-1 (ATCC CCL 70)、COS-1 (ATCC CRL

1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、CHO-K1 (ATCC CCL 61)、3T3 (ATCC CCL 92)、NIH/3T3 (ATCC CRL 1658)、HeLa (ATCC CCL 2)、C127I (ATCC CRL 1616)、BS-C-1 (ATCC CCL 26)、MRC- 5 (ATCC CCL 171)、L-细胞、成神经细胞瘤、神经胶质细胞和 HEK-293 (ATCC CRL1573)。

5 因此, 在另一实施方案中, 本发明涉及重组宿主细胞, 其含有编码调节 CRH 信号化的蛋白的重组克隆的核酸分子或其功能类似物。在另一方面, 根据本发明的重组宿主细胞含有核酸分子, 其或者是基因组 DNA 或者具有选自: (SEQ ID No. 45)、(SEQ ID No. 47)、(SEQ ID No. 49)、和其功能类似物的核苷酸序列。

10 通过包括但不限于转化、转染、原生质体融合、脂转染、和电穿孔的许多技术之一可以将表达载体导入宿主细胞中。含有表达载体的细胞被克隆增殖和分析以确定它们是否产生介导 CRH 信号化的蛋白质。表达通透酶的宿主细胞克隆的鉴定可通过几种方法进行, 这些方法包括但不限于与针对根据本发明的多肽的抗体的免疫反应性, 和宿
15 主细胞相关的哺乳动物嘌呤通透酶活性的存在。

从而, 本发明还涉及在重组细胞中表达调节 CRH 信号化的蛋白质的方法, 该方法包括在允许调节来自如此处概述的表达载体的调节 CRH 信号化的蛋白质表达的条件下培养根据本发明的宿主细胞。本发明的蛋白质可以通过直接表达合成或者作为融合蛋白合成, 该融合蛋白含
20 有作为与另一种蛋白质或肽翻译融合的目标蛋白, 该另一种蛋白质或肽可自身地、通过酶或化学切割除去。因此, 在具体实施方案中, 本发明提供了根据本发明的蛋白, 其中所述多肽是融合蛋白的部分。

在重组系统的某些肽的产生中经常观察到作为融合蛋白的表达延长了寿命, 增加了所希望的肽的产率, 或者提供了纯化该蛋白质的方便的方法。当在原核宿主中表达哺乳动物蛋白时这尤其相关。公知各种肽酶(例如, 肠激酶和凝血酶), 它们在特定位点切割多肽或者, 从肽链的氨基或羧基末端(例如二氨基肽酶)消化肽。此外, 特定化学药品(例如溴化氰)将在特定位点切割多肽。技术人员将明白如何对氨基酸序列进行必要的修饰(和如果使用重组方法, 合成的或半合成的编码
25 序列)以掺入位点-特异的内部切割位点。见例如, P. Carter, "融合蛋白的位点特异的蛋白酶解", 第 13 章, Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes, American
30

Chemical Society, Washington, D. C. (1990)。

此外，可以使用例如，已经在其基因组中含有如上面描述的编码调节 CRH 信号化的蛋白质的核酸分子，但是由于例如，弱启动子而不表达该核酸分子或者不以适宜的方式表达该核酸分子的哺乳动物细胞，并向该哺乳动物细胞导入与编码所述嘌呤通透酶多肽的内源核酸分子紧邻的调节序列如强启动子，以便诱导该核酸分子的表达。

同样，含有编码处于异源转录和/或调节序列或蛋白质控制下的调节 CRH 信号化的蛋白质的多核苷酸的重组宿主细胞将是本发明的另一实施方案。

在该上下文中，术语“调节序列”指可用于增加嘌呤通透酶多肽的表达的核酸分子，这是由于该核酸分子整合到细胞的基因组中并且与 CRH 调节蛋白-编码基因紧邻。这些调节序列包括启动子、增强子、失活的沉默子内含子序列、3'UTR 和/或 5'UTR 编码区、蛋白质和/或 RNA 稳定元件、编码调节蛋白的核酸分子，例如，转录因子，这些调节序列能够诱导或引发 CRH 调节蛋白-编码基因的表达，或者公知活化基因表达和/或增加基因产物的量的其他基因表达控制元件。所述调节序列的导入导致多肽的表的增加和/或诱导，该多肽调节 CRH 信号化，最后导致细胞中所述多肽的量增加。从而，本发明的目的是提供调节 CRH 信号化的多肽的从头和/或增加的表达。

通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质-介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法可以实现构建体向宿主细胞的导入。这些方法在许多标准实验室手册，如 Davis, Basic Methods In Molecular Biology (1986) 中描述。特别考虑调节 CRH 信号化的多肽可以实际上被缺乏重组载体的宿主细胞表达。

此外，使用体外产生的合成 mRNA 也可以实施根据本发明的多核苷酸的表达。合成的 mRNA 或者从能够调节 CRH 信号化的细胞分离的 mRNA 可被有效地在各种无细胞系统中翻译，这些无细胞系统包括但不限于麦芽提取物和网织红细胞提取物，以及在基于细胞的系统中有效翻译，其包括但不限于微注射到蛙卵母细胞，一般优选微注射到蛙卵母细胞。

转基因非-人动物

本发明还涉及产生转基因非人动物，优选转基因小鼠的方法，该方法包括将本发明的多核苷酸或载体导入生殖细胞、胚胎细胞、干细胞或卵或者从它们得到的细胞。非-人动物可以按照此处描述的本发明的筛选方法使用并且可以是非-转基因健康动物，或者可以有磷酸摄入或再吸收失调，优选由调节 CRH 信号化的蛋白质中至少一个突变导致的失调。这些转基因动物很适于，例如，与上述多肽的突变形式有关的药物的药理学研究。可以，例如，如 A. L. Joyner 编者，Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press 描述的 5 实施转基因胚胎的产生和这些胚胎的筛选。使用例如，DNA 印迹，用适宜的探针可以分析胚胎的胚胎膜的 DNA；见如前。

优选地，本发明的转基因非-人动物还含有相应哺乳动物 CRH 调节蛋白-编码基因的至少一个失活的野生型等位基因；见如前。该实施方案允许例如，研究根据本发明的多肽的各种突变形式的相互作用对 CRH 代谢中疾病相关的失调的临床症状的发作的影响。此前关于转基因动物讨论的所有应用也应用于携带两个、三个或更多转基因；例如编码中性内肽酶 (NEP) 的动物。还希望使调节 CRH 信号化表达或者处于该转基因动物的发育和/或生命的一定阶段的功能失活。这可以通过使用，例如，组织特异的、发育和/或细胞调节的和/或可诱导的启动子，该启动子驱动例如，针对编码能够调节 CRH 信号化的蛋白的 RNA 转录物的反义或核酶的表达，来实现；也见上文。适宜的可诱导的系统例如四环素-调节的基因表达，如例如，Gossen 和 Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) 和 Gossen 等人 (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62) 所描述的。类似地，通过这些调节元件可以控制调节 CRH 信号化的突变蛋白的表达。

此外，本发明还涉及含有 (优选稳定整合到其基因组) 根据本发明的核酸或者其部分的转基因哺乳动物细胞，其中该核酸分子或者其部分的转录和/或表达导致调节 CRH 信号化的蛋白质的合成的减少。

在优选的实施方案中，通过反义、有义、核酶、共抑制和/或显性突变体效应实现减少。“反义”和“反义核苷酸”指阻断天然发生的基因产物的表达的 DNA 或 RNA 构建体。

根据本发明的多核苷酸的提供打开了产生具有如上述的蛋白质的降低的水平并，从而，具有磷酸代谢缺陷的转基因非-人动物的可能

性。怎样实现该可能性的技术是本领域中技术人员熟知的。这些技术包括，例如，反义-RNA、核酶或者组合反义和核酶功能的分子和/或提供共抑制效果的分子的表达；也见上文。当使用反义方法减少调节细胞中 CRH 信号化的蛋白质的量时，编码反义-RNA 的核酸分子对于用于转化的动物种类优选为同源来源。然而，还可能使用表现出与编码调节 CRH 信号化的蛋白质的内源发生的核酸分子具有高度同源性的核酸分子。在这种情况下，同源性优选高于 80%，特别优选高于 90%，更优选高于 95%。转基因哺乳动物细胞中根据本发明的蛋白质的合成的减少可导致例如腺嘌呤再吸收的改变。在含有这些细胞的转基因动物中，这可导致各种生理的、发育的和/或形态的改变。

从而，本发明还涉及含有上述转基因细胞的转基因非-人动物。这些动物可以表现出，例如，与野生型动物相比 CRH 代谢的不足，这是由于外来 DNA 的稳定或瞬时存在导致至少一种下面的特征：

- (a) 编码能够调节 CRH 信号化的内源基因的破坏；
- (b) 针对含有本发明的多核苷酸的转录物的至少一种反义 RNA 和/或核酶的表达；
- (c) 本发明的多核苷酸的有义和/或不翻译的 mRNA 的表达；
- (d) 本发明的抗体的表达；
- (e) 本发明的调节序列的功能或非功能拷贝的掺入；或
- (f) 本发明的重组 DNA 分子或载体的掺入。

使用本发明的多肽、它们的编码多核苷酸和载体，现在可能研究体内和体外关于调节患者的 CRH 信号化的蛋白质中特定突变的药物的效率和受到影响的表型。此外，本发明的多肽的突变形式可用于确定药物的药理学图谱和鉴定和制备其他药物，这些药物可有效治疗与 CRH 代谢有关的失调，尤其改善 CRH 诱导的紧张或抑郁症。

从而将明白本发明还涉及预防、治疗或改善与包括 CRH 受体相关的失调的 CRH 代谢失调有关的医学病症的方法，该方法包括对哺乳动物受试者使用治疗有效量的本发明的多肽、编码能够调节 CRH 信号化的蛋白质的多核苷酸或者载体。

诊断试验

本发明还涉及本发明的多核苷酸作为诊断试剂的用途。通过与

功能异常相关的 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、
5 SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQ ID No. 49 的多核苷酸为特征的基因的突变形式的检测将提供一种诊断工具，其可辅助，或者限定疾病或者对疾病的易感性的诊断，该疾病，或者对疾病的易感性来自该基因的表达不足、过表达或者改变的空间或时间上的表达。通过各种技术可以在 DNA 水平上检测携带该基因突变的个体。

从而将明白本发明提供了诊断与 CRH 活性失调相关的受试者中的病理状况或者对病理状况的易感性的方法，该方法包括：

- (a) 确定根据本发明的多核苷酸中突变的存在或不存在；和
- 15 (b) 基于所述突变的存在或不存在检测病理状况或者对病理状况的易感性。

用于诊断的核酸可从受试者的细胞，如从血液、尿、唾液、组织活检或尸检材料得到。基因组 DNA 可直接用于检测或者在分析前使用 PCR 或者其他扩增技术酶促扩增。RNA 或者 cDNA 也可以以类似方式使用。通过与正常表型相比扩增产物的大小的改变检测缺失或插入。将扩增的 DNA 与哺乳动物嘌呤通透酶核苷酸序列杂交可以鉴定点突变。通过 RNA 酶消化或者通过溶解温度的差异可以将完美匹配的序列与错配的双链体区别。通过改变毛细管电泳柱或者凝胶中的 DNA 片段的电泳迁移率，使用或不使用变性剂，或者通过直接 DNA 测序（例如，Myers
20 等人，Science (1985) 230: 1242) 也可以检测 DNA 序列差异。通过特定限制性内切酶、核酸酶保护测定法，如 RNase 和 S1 保护或者化学切割方法也可以揭示特定位置的序列变化（见 Cotton 等人，Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85 : 4397-4401)。在另一实施方案中，可以构建含有编码能够调节 CRH 活性的蛋白的核酸序列或者其片段的寡核苷酸探针阵列以实施例如基因突变的有效筛选。阵列技术是熟知的并且具有普遍适用性并且可用于处理分子遗传学中的各种问题包括基因
25 表达、遗传连锁，和基因变异性（见例如：M. Chee 等人，Science，卷
30

274, 610-613 页(1996))。

该诊断试验提供了通过用所描述的方法检测 CRH 调节蛋白-编码基因中的突变, 诊断或确定对疾病的易感性的方法。此外, 通过包括从来自受试者的样品确定多肽或者 mRNA 的异常减少或增加的水平, 以及通过从所述样品确定与正常结构(见上面)相比蛋白质衍生物的存在的方法诊断这些疾病。可以使用用于多核苷酸定量的本领域中熟知的方法的任一种在 RNA 水平上测量减少或增加的表达, 该方法为如, 例如, 核酸扩增, 例如, 通过 PCR、RT-PCR; RNA 酶保护; RNA 印迹和其他杂交方法。可用于确定来自宿主的样品中蛋白质, 如本发明的多肽的水平的测定技术是本领域中熟知的。这些测定方法包括放射免疫测定法、竞争-结合测定法、蛋白质印迹分析和 ELISA 测定法。可用于确定蛋白质衍生物或变体的存在的测定技术包括质谱法。

从而, 另一方面, 本发明提供了诊断与长期 CRH 暴露的失调有关的受试者中病理学状况或者对病理学状况的易感性的方法, 该方法包括:

(a) 确定生物样品中根据本发明的多肽或者其衍生物的存在或者表达量; 和

(b) 基于该多肽或者其衍生物的存在或者表达量诊断病理学状况或者对病理学状况的易感性。

具体地, 本发明提供了诊断个体中 CRH 诱导的基因表达的方法, 所选方法包括:

a) 得到所述个体的生物样品; 和

b) 确定所述生物样品中调节促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)信号化的至少一种蛋白质的量; 其中调节促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)信号化的蛋白选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ ID NO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46和 SEQ ID NO. 48。在备选实施方案中, 诊断 CRH 诱导的表达谱的方法不限于根据本发明的至少一种蛋白, 但是需要同时评估鉴定为与 CRH

信号化有关的蛋白质组，即具有氨基酸序列 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、
5 SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48 的蛋白质的表达水平。

优选地，在蛋白质水平上，优选使用结合该蛋白质的抗体，或者在基因转录水平上，优选使用结合编码选自 SEQ ID NO. 2、SEQ ID 4、
10 SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18、SEQ ID NO. 20、SEQ ID NO. 22、SEQ IDNO. 24、SEQ ID NO. 26、SEQ ID NO. 28、SEQ ID NO. 30、SEQ ID NO. 32、SEQ ID NO. 34、SEQ ID NO. 36、SEQ ID NO. 38、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 44、
15 SEQ ID NO. 46 和 SEQID NO. 48 的氨基酸序列的多核苷酸的探针确定所述蛋白质的量。在与 CRH 信号化有关的蛋白质组的同时评估中，使用微阵列技术分析基因表达的水平。

备选地，通过评估含有选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、
20 SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQID No. 49 的核酸序列的基因的基因转录水平确定 CRH
25 诱导的基因表达谱。确定基因转录水平的方法已经在上文中描述并且包括在优选的实施方案中使用结合、优选选择性结合选自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 3、SEQ ID No. 5、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID NO. 11、SEQ ID NO 13、SEQ ID No. 15、SEQ ID No 17、SEQ ID No 19、SEQ ID No. 21、SEQ ID No. 23、SEQ ID No. 25、SEQ ID
30 No. 27、SEQ ID No. 29、SEQ ID NO. 31、SEQ ID No. 33、SEQ ID No. 35、SEQ ID No. 37、SEQ ID No. 39、SEQ ID No. 41、SEQ ID No. 43、SEQID No. 45、SEQ ID No. 47 或 SEQID No. 49 的多核苷

酸或者其互补序列的探针。在另一实施方案中，可以构建含有根据本发明的核苷酸序列或者其片段的寡核苷酸探针阵列以实施个体样品中基因转录水平的有效筛选。

在另一方面，本发明涉及诊断试剂盒，其含有：

- 5 (a) 本发明的多核苷酸，优选 SEQ ID No. 45、SEQ ID No. 47、SEQ ID No. 49 的核苷酸序列或者其片段；
- (b) 与(a)的核苷酸序列互补的核苷酸序列；
- (c) 本发明的多肽，优选 SEQ ID NO. 46、SEQ ID NO. 48 的多肽或者其片段；或
- 10 (d) 本发明的多肽的抗体，优选 SEQ ID NO. 46 或 SEQ ID NO. 48 的多肽和任选适宜的检测方法。

将明白在任何这种试剂盒中，(a)、(b)、(c)或(d)可以含有实质性组分。这种试剂盒将用于诊断疾病或对疾病的易感性，尤其 CRH 代谢相关的失调如 CRH 诱导的紧张或抑郁症。

- 15 本发明的核苷酸序列对于染色体定位也是有价值的。这些序列特异靶定，并可以与个人染色体上的特定位置杂交。与根据本发明的染色体相关的序列的作图是将这些序列与基因-相关的疾病相互关联的重要的第一步。一旦序列被映射到精确的染色体位置，那么染色体上该序列的物理位置可以与遗传图数据相关联。这些数据在例如，V. 20 McKusick, Mendelian Inheritance in Man (可通过 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在线获得) 中发现。然后通过连锁分析(物理上相邻的基因的共遗传)鉴定已经被映射到相同的染色体区域的基因和疾病之间的关系。本发明的基因映射到人 15 号染色体。

- 25 也可以确定受影响和未受影响的个体之间 cDNA 或基因组序列中的差异。如果在一些或者所有受影响的个体中但是没有在任一正常个体中观察到突变，那么该突变可能是该疾病的病因。

- 30 本发明的核苷酸序列对于组织定位也是有价值的。这些技术允许通过检测编码根据本发明的多肽的 mRNA 来确定这些多肽的表达模式。这些技术包括原位杂交技术和核苷酸扩增技术，例如，PCR。这些技术是本领域中熟知的。来自这些研究的结果指出生物中这些多肽的正常功能。

本发明的多肽或者它们的片段或它们的类似物，或者表达它们的

细胞，也可用作免疫原以产生对本发明的多肽免疫特异的抗体。术语“免疫特异的”指抗体具有对本发明的多肽比它们对现有技术中其他相关多肽大得多的亲和性。

从而在另一实施方案中，本发明提供了与哺乳动物嘌呤通透酶具有免疫反应性的单特异抗体。在优选的实施方案中，所述抗体与具有选自 (SEQ ID NO. 46)、(SEQ ID NO. 48) 的氨基酸序列的多肽和其功能类似物具有免疫反应性或者所述抗体阻断调节 CRH 信号化的蛋白质的活性。

针对本发明的多肽的抗体可以通过使用常规方案，将该多肽或者含有表位的片段、类似物或者表达这些的细胞施用于动物，优选非人哺乳动物得到。对于单克隆抗体的制备，可以使用通过连续细胞系培养产生的抗体。实例包括杂交瘤技术 (Kohler, G. 和 Milstein, C., Nature (1975) 256 : 495-497)、trioma 技术、人 B-细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等人, Immunology Today (1983) 4: 72) 和 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等人, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, 77-96 页, Alan R. Liss, Inc. , 1985)。

产生单链抗体，如美国专利号 4,946,778 中所描述的那些单链抗体的技术也可适用于产生针对本发明多肽的单链抗体。而且，转基因小鼠，或者其他生物，包括其他哺乳动物，也可以用于表达人源化抗体。

上述抗体可用于分离或鉴定表达该多肽的克隆或者通过亲和层析纯化这些多肽。

针对本发明多肽的抗体也可用于治疗 CRH 代谢相关的失调。

另一方面，本发明涉及基因工程化的可溶的融合蛋白，其包括本发明的多肽，或者其片段，和各种亚类 (IgG、IgM、IgD、IgE) 的免疫球蛋白的重链或轻链恒定区的各种部分。优选作为免疫球蛋白的是人 IgG，特别是 IgG I 的重链的恒定部分，其中在铰链区发生融合。在具体实施方案中，通过切割序列的掺入可以简单地除去 Fc 部分，该切割序列可以用例如血液凝固因子 Xa 切割。此外，本发明涉及通过基因工程制备这些融合蛋白的方法，还涉及它们用于药物筛选、诊断和治疗的用途。本发明的另一方面还涉及编码这些融合蛋白的多核苷酸。融合蛋白技术的实例可以在国际专利申请号 WO 94/29458 和 WO 94/22914

中发现。

治疗效用

本发明的另一方面涉及免疫/疫苗制剂(组合物),其当导入哺乳动物宿主时,在该哺乳动物中诱导针对本发明的多肽的免疫应答,其中该组合物含有本发明的多肽或者多核苷酸。疫苗制剂可以还含有适宜的载体。因为多肽可以在胃中分解,所以其优选肠胃外(例如,皮下、肌内、静脉内,或者皮内注射)施用。适于肠胃外施用的制剂包括水性和非水性无菌注射液,其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与接受者的血液等渗的溶质;和水性和非水性无菌悬浮液,其可以包括悬浮剂或增稠剂。该制剂可以在单剂量或者多剂量容器,例如,密闭的安瓿和小瓶中提供并且可以保存在冰冻干燥的条件中,仅需要在使用前加入无菌液体载体。该疫苗制剂还可包括用于增强制剂的免疫原性的佐剂系统,如水包油系统和本领域中公知的其他系统。剂量将依赖于疫苗的特异活性并且可通过常规实验方法容易地确定。

在再一个方法中,可以使用表达阻断技术抑制编码调节 CRH 信号化的蛋白质的基因的表达。公知的这些技术包括使用反义序列,其或者是内部产生的或者是外部施用的(见,例如, O'Connor, J. Neurochem (1991) 56: 560; 寡脱氧核糖核苷酸作为基因表达的反义抑制剂, CRC Press, Boca Raton, FL (1988))。备选地,可以提供与基因形成三螺旋(“三链体”)的寡核苷酸(见,例如, Lee 等人, Nucleic Acids Res (1979) 6: 3073; Cooney 等人, Science (1988) 241: 456; Dervan 等人, Science (1991) 251: 1360)。这些寡聚体本身可被施用或者可以体内表达相关的寡聚体。合成的反义或三链体寡核苷酸可含有修饰的碱基或者修饰的主链。修饰的主链的实例包括甲基磷酸酯、硫代磷酸酯和肽核酸主链。这些主链被掺入反义和三链体寡核苷酸中以提供保护防止核酸酶降解并且是本领域中熟知的。用这些和/或其他修饰的主链合成的反义和三链体分子也形成本发明的部分。

在用于抑制细胞中靶基因表达的另一方法中,具有部分和完全双链特征的 RNA 被导入细胞或者胞外环境。抑制是特异的,因为选择来自靶基因的一部分的核苷酸序列产生抑制性 RNA。该 RNA 可含有聚合的

核糖核苷酸的一条或多条链；其可以包括对磷酸酯-糖主链或者核苷的修饰。通过单条自身-互补 RNA 链或者两条互补链可以形成双链结构。抑制是序列-特异的，因为相应于 RNA 的双链体区的核苷酸序列被靶定用于基因抑制。优选含有与靶序列的一部分相同的核苷酸序列的 RNA。

5 可以在国际专利申请 WO 99/32619 中发现 RNA 抑制技术的实例。

此外，调节 CRH 信号化的蛋白质的表达可以通过使用对编码所述蛋白质的 mRNA 序列特异的核酶来防止。核酶是具有催化活性的 RNA，其可以是天然的或合成的（见例如 Usman, N, 等人, *Curr. Opin. Struct. Biol* (1996) 6 (4), 527-33)。可以设计合成的核酶以在所

10 选的位置特异切割前述 mRNA，从而防止所述 mRNA 翻译成功能多肽。可以合成具有天然核糖磷酸酯主链和天然碱基的核酶，如通常在 RNA 分子中发现的。备选地，可以合成具有非天然主链的核酶，例如，2'-O-甲基 RNA 以提供对核糖核酸酶降解的保护，并且可以含有修饰的碱基。

15 对于治疗与调节 CRH 信号化的蛋白质的表达不足有关的异常病症，也可以利用几种方法。一种方法包括对受试者施用治疗有效量的激活本发明的多肽的化合物，例如，如上述的激动剂，与药学上可接受的载体相组合，从而减轻异常病症。备选地，可以使用基因治疗来影响受试者的相关细胞内源产生哺乳动物嘌呤通透酶。例如，可以将

20 本发明的多核苷酸工程化以在复制-缺陷的逆转录病毒载体中表达，如上面讨论的。然后逆转录病毒表达构建体可被分离并导入用含有编码本发明的多肽的 RNA 的逆转录病毒质粒载体转导的包装细胞中，从而该包装细胞产生含有目标基因的感染性病毒微粒。这些生产者细胞可被施用于受试者以体内工程化细胞并体内表达多肽。对于基因治疗的

25 综述，见 *Human Molecular Genetics*, T Strachan 和 A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) 中第 20 章：基因治疗及其他基于分子遗传学的治疗方法（和其中引用的参考文献）。另一种方法是施用本发明的多肽的治疗量与适宜的药物载体相组合。

另一方面，本发明提供了含有治疗有效量的多肽，如本发明多肽

30 的可溶形式，激动剂/拮抗剂肽或者小分子化合物，与药学上可接受的载体或赋形剂相组合的药物组合物。这些载体包括，但不限于，盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇和它们的组合。本发明还涉及药

物包装和试剂盒，它们含有装有一种或多种本发明的前述组合物的成分的一个或多个容器。本发明的多肽和其他化合物可以单独使用或者与其他化合物，如治疗性化合物联合使用。

该组合物将被适应于施用途径，例如，通过全身的或者口服途径。5 全身性施用的优选形式包括注射，通常通过静脉内注射。可以使用其他注射途径，如皮下、肌内或者腹膜内注射。全身性使用的备选方法包括使用渗透剂如胆汁盐或者梭链孢酸或者其他去污剂透粘膜和透皮施用。此外，如果本发明的多肽和其他化合物可以制备成肠或者胶囊化制剂，那么经口施用也是可能的。这些化合物的施用也可以是局部10 和/或局部化的，为贴剂、药膏、糊剂、凝胶剂等的形式。

所需要的剂量范围依赖于本发明的多肽和其他化合物的选择、施用途径、制剂的性质、受试者病症的性质，和主治医生的判断。然而，适宜的剂量为 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 受试者。然而，考虑到可利用的化合物的多样性和各种施用途径的不同效率，可以预期所需剂量的宽的变化。15 例如，口服施用预期比通过静脉内注射施用需要更高的剂量。使用用于优化的标准经验常规可以判断这些剂量水平的变化，如本领域中熟知的。

也可以在受试者内内源地产生用于治疗的多肽，这在治疗模式中通常被称为如上述的“基因治疗”。从而，例如，来自个体的细胞可20 被多核苷酸，如 DNA 或 RNA 工程化以体外编码多肽，以及例如，通过使用逆转录病毒治疗载体。然后将细胞导入受试者中。

通过参考下面的实验细节可以更好地理解本发明，但是本领域中技术人员将容易明白这些实验细节仅用于阐明本发明，其在后面的权利要求书中更完全地描述。此外，在该申请书的全文中，应用了各种25 出版物。这些出版物的公开在此处被并入本申请的参考文献中以更完整地描述本发明所属的本领域的状态。

实验程序

细胞培养和样品制备-AtT-20 细胞购于 ATCC 并被保持在 37 $^{\circ}\text{C}$ ，30 5%CO₂ 湿润空气，含有 10%胎牛血清、5%马血清和 4.5 g/L D-葡萄糖的 Dulbecco 氏改良的 Eagle 培养基 (Invitrogen Life Technologies) 中。为了实验，将细胞接种于 25cm² 烧瓶中。培养基在 48h 后被替换并

将细胞用新鲜培养基中的 0.1% DMSO、DMSO 中的 1 μ M CRH (Sigma)、DMSO 中的 1 μ M R121919 或者 DMSO 中的 1 μ M CRH + 1 μ M R121919 处理 0、0.5、1、2、4、8 和 24 小时。通过抽出孵育培养基并加入用于细胞裂解的 3 ml Trizol (Invitrogen Life Technologies) 中止孵育。根据生产商的使用说明书用 Trizol 提取总 RNA。使用 Rneasy 试剂盒 (Qiagen) 进一步纯化 100 μ g 总 RNA，用 DNaseI 处理柱子。

微阵列杂交—如下制备 cRNA。使用 T7-oligo(dT)₂₄-引物和 SuperscriptII RT (Invitrogen Life Technologies) 对 10 μ g 总 RNA 在 42°C 实施逆转录 1h。用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、DNA 连接酶和 RNaseH (Invitrogen Life Technologies) 在 16°C 进行 2h 的第二条链 cDNA 合成。用相-锁定凝胶 (Eppendorf) 进行苯酚-氯仿萃取后，使用 Bioarray 高产率 RNA 转录物标记试剂盒与生物素标记的核糖核苷酸 (Enzo Diagnostics) 在 37°C 实施体外转录 6h。cRNA 样品在 Qiagen Rneasy 柱上纯化并在 95°C 片段化 35 分钟。cRNA 产率为 50 到 100 μ g。在 GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, CA) 上处理样品。为了检查每个样品的质量，将 5 μ g 标记的 cRNA 在 Test2-阵列上运行。实际的实验在 Murine Genome U74Av2 阵列上实施，该阵列含有检查约 12,000 个全长小鼠基因和来自 UniGene database (Build 74) 的 EST 簇的探针组。在持续旋转下用 15 μ g cRNA 于 45°C 实施杂交 16h。将阵列在 Affymetrix Fluidics 工作台 (Station) 中用链霉抗生物素蛋白/藻红蛋白 (SAPE) 染色，然后用抗-链霉抗生物素蛋白的抗体染色并进行第二次 SAPE 染色。随后，用 HP-激光扫描器扫描阵列并用 Microarray Suite Software (Affymetrix) 分析数据。在该阶段不进行分级或者标准化。基于所有样品间当前调用 (present calls) 百分数 (平均值为 $47.06 \pm 2.45\%$) 评估实验的质量。胞质 β -肌动蛋白和 GAPDH5'/3' 的比分别为 1.10 ± 0.08 和 0.93 ± 0.05 。

数据分析和基因选择

使用下面的全局平均算法将每个阵列上的原始强度校准：

$$\log I_{\text{校准的}} = \log I_{\text{原始}} + \left(\log \frac{\sum_{\text{所有样品}} I_{\text{原始}}}{\# \text{基因} \times \# \text{样品}} - \log \frac{\sum_{\text{样品}} I_{\text{原始}}}{\# \text{基因}} \right)$$

基本上该校准将一个阵列的平均强度设定为对所有阵列间测量的
 5 平均值，弥补了杂交、洗涤和染色中阵列与阵列的差异，最终允许阵
 列之间合理的比较。校准后，使用加权光谱作图分析所校准的数据。
 加权光谱作图是一种无监督的多变量分析方法，其包括数据的双中心
 化与代表两种最高的主要组分的专门的可视化相组合。尽管双中心化
 除去了阵列数据的“大小”成分，但是通过代表各自样品和基因大小
 10 的符号的面积，该信息在可视化中被再次导入。该方法允许减小大的
 微阵列数据集和提供可视地检查从而鉴定数据中的基因簇和/或受试
 者。用 OmniViz 程序实施了更详细的分析。除去所有实验中缺乏的所有
 记录并将小于 20 的所有信号设为 20。计算每个时间点上 CRH、
 R121919 和 CRH+R121919 处理的基因表达倍数差异。对于那些计算，
 15 DMSO 处理的样品中相应时间点的信号被用于计算比值。

定量 RT-PCR-使用实时 PCR 分析证实微阵列数据。使用随机六聚
 物引物和 SuperscriptII RT (Invitrogen Life Technologies) 对
 0.5 μ g 总 RNA 实施第一条链 cDNA 合成。用 Taqman PCR 试剂盒在 ABI
 Prism 7700 循环仪 (Applied Biosystems) 上实施定量 PCR。cDNA 的
 20 连续稀释液被用于产生相对 β -肌动蛋白、c-fos、Crh-R1、Crh-R2、
 Rgs2 和目的基因 (序列见表 2) 的浓度的对数的循环阈值的标准曲线。
 从标准曲线计算的线性回归线容许确定来自不同时间点的 RNA 样品的
 转录水平。

25 结果

在表达 CRH-R1 的鼠 AtT-20 垂体促肾上腺皮质激素细胞-来源的腺
 瘤细胞系中研究了对 CRH 的转录应答。尽管通过实时定量 RT-PCR (RTq)
 和蛋白质印迹都可以容易地检测 CRH-R1，但是在 AtT-20 细胞中不能
 看出 CRH-R2 表达。为了鉴定 CRH-R1 特异应答，细胞被暴露于 1 μ M

CRH、1 μ M CRH 与 1 μ M CRH-R1 特异拮抗剂 R121919 和仅暴露于 R121919。随时间跟踪转录应答直到第一次施用后 24 小时。为了评估处理效能,通过 RTq 对来自阵列实验实施之前不同处理和时间点的 RNA 确定 c-fos mRNA 水平。与以前的报导一致,暴露于 CRH 引起 c-fos 转录瞬时猛增,0.5 到 1h 后水平已经下降(见图 1) (8;9)。存在 R121919 时该应答几乎被完全抑制。有趣的是,0.1% DMSO 诱导 c-fos 表达,然而与 CRH 诱导的表达相比,表达水平低 5 到 10 倍。

在含有约 12000 个小鼠基因和 ESTs 的微阵列上分析了所有时间点。使用光谱作图(称作无监督的方法)对表达谱的总体分析表明时间进度是造成所观察到的基因表达中大多数变化的原因(图 2)。通过加入新培养基和血清所诱导的这些培养物中细胞周期的同步化可能是该现象的原因,尽管代谢物的积累和不断进行的细胞培养也是另外的贡献因素。光谱图分析还表明 CRH 处理的样品与其他样品的不同之处主要在早期时间点(0.5h 到 2h),表达中的总体差异在 8h 后变得非常小。因为时间的这种明显影响,所以相对于在 DMSO 处理的对照样品中相应时间点观察的那些表达测量值分析了这些表达测量值。

受调节的基因被定义为在任一时间点表现出转录物水平的变化大于 2 倍的那些基因。使用 OmniViz Treescape view,选择了满足该标准的 111 种基因,它们表现出与拮抗剂处理相比,CRH 处理后表达的差异。这 111 种基因中的 26 种是“早应答者”,它们用 CRH 处理 30 分钟后已经表现出 2 倍变化。32 种基因是“中期应答者”,它们在处理 1 到 2h 后应答,53 种基因是“晚应答者”,处理后 2 小时或更长时间内表现应答(见图 3)。这些应答被 CRH-R1 拮抗剂 R121919 抑制。在早应答者中是 CRH-R1 下游途径中公知的成员,如转录因子 Nurrl、Nurr77、Jun-B,它们验证了该测定。

所鉴定的有趣的新成员包括转录因子(例如,毛发/分叉相关的增强子 1(Hey1)、白介素 3 调节的核因子(NFIL3)、cAMP 应答元件调节子(CREM)和前列腺特异的 ets 转录因子(Pse));受体和通道调节物(例如,Ras-相关的 GTP-结合蛋白(GEM)和受体(降钙素)活性修饰蛋白 3(RAMP3));分泌肽(例如,肾上腺髓质素、降钙素、缩胆囊素)和与胞内信号化有关的蛋白质(例如,G-蛋白信号化调节物 2(Rgs2)、cAMP 特异的磷酸二酯酶 4B(Pde4b)、肌醇 1,4,5-三磷酸受体 1(IP₃R1)和调

节性亚基磷脂酰肌醇 3-激酶, p85)。其他有趣的受调节基因包括 Period 同系物 Per1、成纤维细胞生长因子受体 2 (Fgfr2)、血清/糖皮质激素调节的激酶和血清-可诱导的激酶(图 4)。

有趣的是, 根据上面提到的标准鉴定的所有应答者暴露于 CRH 后
5 都被上调。该诱导是瞬时的并且 4 到 8h 后几乎所有被诱导的基因都回到基线。许多被诱导的转录物编码对 CRH-R1 信号化产生负反馈的蛋白质(例如, Pde4、Rgs2、CREM, 等), 可能是该诱导的瞬时性质的原因。除了该负反馈, 其他机理如通过磷酸化和内化而去敏的 CRF, 可有助于转录诱导的瞬时性质。在这方面, 有趣的是注意到用 CRF 刺激可以快速
10 下调大鼠垂体细胞中 CRF₁ mRNA 水平。然而, 我们没有检测到暴露于 1 μ M CRF 的垂体来源的 AtT-20 细胞中 CRF₁ mRNA 的变化。用定量实时 PCR 分析对用于杂交实验和重复实验的相同样品实施微阵列数据证实。通过微阵列鉴定的调节水平和时间历程相应于图 5 中显示的通过定量 PCR 观察的对 Rgs2 的那些调节水平和时间历程。对于已经被检
15 验的那些基因, 在图 4 中显示了与未处理样品相比的诱导水平。

讨论

我们已经用 CRH-R1 特异拮抗剂鉴定了 AtT-20 细胞中 CRH-R1 下游的转录途径。我们的发现与用 CRH 刺激时一些第二信使如 cAMP 和 Ca²⁺
20 的活化一致。一些转录应答可通过 CREB 的磷酸化和 cAMP 应答元件下游基因的随后转录来解释。在例如 Per1、Nurr1、CREM-ICER、c-Fos 的启动子中已经发现了这些元件。此外, 这些基因的诱导的动力学图谱相应于 cAMP 形成 0.5 小时后通过 CREB 所观察的最大转录率。CREM-ICER 的诱导在衰减对 cAMP 的转录应答方面构成负反馈机制。有
25 趣的是所报导的响应垂体腺的中叶急性压力的 CREM-ICER 诱导。缺乏 CREM-ICER 的小鼠表现出 β -内啡肽水平的慢性增加, 表明 CREM-ICER 诱导可能参与响应压力的基因表达的调节(10)。我们的结果表明 CREM-ICER 直接参与 CRH 信号化调节并且结果, CREM-ICER 的除去可导致对压力信号的应答改变。CRH 信号化的另一种新的假定的负反馈调
30 节物是 Rgs2。我们鉴定了人 RGS2 基因启动子中的两个单一的 CRE 基序, 可能解释用 CRH 刺激时该基因的早应答行为。支持我们的发现的是一份最近报导, 其指出磷酸肌醇信号化和 cAMP 都可诱导人星形细胞

瘤和成神经细胞瘤细胞中 Rgs2 mRNA 的快速和瞬时增加。Rgs2 蛋白是 $G_{\alpha q}$ 功能的选择性抑制剂。

最近已经表明 Rgs2 降低增味剂-引起的 cAMP 产生, Rgs2 不是作用于 G_{α} 而是直接抑制 III 型腺苷酸环化酶的活性。虽然 Rgs2 最初被鉴定为活化的 T 淋巴细胞中立即早应答基因, 但是在 Rgs2 缺陷小鼠中的研究表明 Rgs2 在压力相关的行为的调节中也起作用, 因为这些小鼠表现出增加的焦虑和攻击行为 (11)。而且, cAMP 特异磷酸二酯酶 4B (Pde4b) 的诱导也可根据负反馈分类, 直接减弱 cAMP 信号。CRH 刺激时产生的另一种重要的第二信使是 Ca^{2+} 。已经表明 CRH 通过电压控制的 Ca^{2+} 通道引发稳态去极化刺激的胞外 Ca^{2+} 进入并通过从肌醇 1, 4, 5-三磷酸 (InsP3) 敏感 Ca^{2+} 库释放而升高胞内 Ca^{2+} 浓度 (12)。InsP3 受体和磷脂酰肌醇 3-激酶的 p85 调节亚单位都被上调, 这可能解释长时间 Ca^{2+} 信号化的补偿机制。而且小 G-蛋白 kir/Gem 的上调针对长时间 Ca^{2+} 信号化的衰减。最近的研究已经表明 Gem 通过这些辅助性亚单位调节细胞膜上的 Ca^{2+} 通道表达。已经表明 Gem 的上升的水平抑制 Ca^{2+} -引发的胞吐, 并且已经提出 Gem 可能具有针对 Ca^{2+} 负荷的保护作用。 Ca^{2+} 除了作为第二信使, 还表现出在调节基因表达中起关键作用。有趣的是 钙调磷酸酶/NFAT 和 CaM 激酶信号化对 NFIL3/E4BP4 的调节, 其可解释 CRH 处理时 NFIL3 mRNA 水平的增加。在 B 淋巴细胞中, 白介素 2 通过 Raf-有丝分裂原-活化的蛋白质激酶和磷脂酰肌醇 3-激酶途径诱导 NFIL3 的表达。在该细胞类型中, NFIL3 与依赖 Bcl-x1 的途径协同抑制凋亡。我们的数据表明 NFIL3 在防止 AtT-20 细胞凋亡中扮演角色。

CRH 是最有效的 ACTH 促分泌素。不幸地是, 所用的微阵列不询问 POMC 水平。然而, CRH 施用后发现一些其他前肽原 mRNA 被上调, 这些前肽原为如缩胆囊素 (CCK) 和两个降钙素肽家族成员: 肾上腺髓质素 (ADM) 和降钙素 (CT)。在该方面还有趣的是 RAMP3 的上调。RAMPs 控制降钙素受体样受体 (CRLR) 的转运和糖基化。对于 RAMP3, 已经表明其与 CRLR 一起产生 ADM 受体。该基因的上调可能在 CRH 暴露或者其他细胞外 (因为还不知 RAMP3 是否调节其他 G-偶联的受体) 刺激后 AtT-20 细胞对 ADM 的应答性的调节中起作用。

尽管 CCK 由 AtT-20 细胞分泌, 但是以前还没有报导 CRH 诱导 CCK

表达(13)。然而,已经深入研究了 CCK 和 CRH 之间的相互作用并且在惊恐、抑郁症、焦虑和胃排空中论证该相互作用(14-19)。大多数这些实验指出 CRH 在介导 CCK 的中心作用中的角色。我们的数据表明 CRH 还可能作为 CCK 促分泌素发挥作用。肾上腺髓质素也可能具有和 CCK 的非常类似的条件。已经阐明 ADM 在垂体腺中表达并且影响动物中基础和 CRH-刺激的 ACTH 释放,从而表明其在调节下丘脑-垂体-肾上腺轴中的有力角色(20-23)。当前的表达数据表明 CRH 诱导 ADM 和 CT。此外,最近的发现表明循环的肾上腺髓质素在库兴氏病中增加,并且垂体腺可能代表 ADM 的产生增加的位置(24),表明 CRH 可能诱导 ADM。

10 总之,我们解开了促肾上腺皮质激素-释放激素受体 1 活化的基因网络的一部分并且已经鉴定了该信号级联的一些新的靶标。我们的发现引起了对进一步实验的需求,这些实验用于阐明细胞和完整生物水平上对 CRH 刺激的这些转录应答的功能。

参考文献

1. De Souza EB 1995 Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819
2. Holsboer F 2001 Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91
3. Holsboer F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA 1987 Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry* 144:229-231
4. Holsboer F, Gerken A, von Bardeleben U, Grimm W, Beyer H, Muller OA, Stalla GK 1986 Human corticotropin-releasing hormone in depression--correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry* 21:601-611
5. Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M 1988 Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45:577-579
6. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF 1994 Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60:436-444
7. Wouters L, Göhlmann HW, Bijmans L, Kass SU, Molenberghs G, Lewi PJ 2002 Graphical exploration of gene expression data: a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics*

8. Boutillier AL, Monnier D, Lorang D, Lundblad JR, Roberts JL, Loeffler JP 1995 Corticotropin-releasing hormone stimulates proopiomelanocortin transcription by cFos-dependent and -independent pathways: characterization of an AP1 site in exon 1. *Mol Endocrinol* 9:745-755
9. Boutillier AL, Sassone-Corsi P, Loeffler JP 1991 The protooncogene c-fos is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 5:1301-1310
10. Mazzucchelli C, Sassone-Corsi P 1999 The inducible cyclic adenosine monophosphate early repressor (ICER) in the pituitary intermediate lobe: role in the stress response. *Mol Cell Endocrinol* 155:101-113
11. Oliveira-Dos-Santos AJ, Matsumoto G, Snow BE, Bai D, Houston FP, Wishaw IQ, Mariathasan S, Sasaki T, Wakeham A, Ohashi PS, Roder JC, Barnes CA, Siderovski DP, Penninger JM 2000 Regulation of T cell activation, anxiety, and male aggression by RGS2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12272-12277
12. Tse A, Lee AK 2000 Voltage-gated Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ release regulate exocytosis in identified rat corticotrophs. *J Physiol* 528 Pt 1:79-90.:79-90
13. Beinfeld MC 1992 CCK mRNA expression, pro-CCK processing, and regulated secretion of immunoreactive CCK peptides by rat insulinoma (RIN 5F) and mouse pituitary tumor (AtT-20) cells in culture. *Neuropeptides* 22:213-217
14. Coskun T, Bozkurt A, Alican I, Ozkutlu U, Kurtel H, Yegen BC 1997 Pathways mediating CRF-induced inhibition of gastric emptying in rats. *Regul Pept* 69:113-120
15. Kellner M, Wiedemann K, Yassouridis A, Levengood R, Guo LS, Holsboer F, Yehuda R 2000 Behavioral and endocrine response to cholecystokinin tetrapeptide in patients with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 47:107-111
16. Geraciotti TD, Jr., Ekhtor NN, Nicholson WE, Arndt S, Loosen PT, Orth DN 1999 Intra- and inter-individual correlations between cholecystokinin and corticotropin-releasing hormone concentrations in human cerebrospinal fluid. *Depress Anxiety* 10:77-80
17. Calogero AE, Nicolosi AM, Moncada ML, Coniglione F, Vicari E, Polosa P, D'Agata R 1993 Effects of cholecystokinin octapeptide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and on vasopressin, prolactin and growth hormone release in humans. *Neuroendocrinology* 58:71-76

18. Biro E, Sarnyai Z, Penke B, Szabo G, Telegdy G 1993 Role of endogenous corticotropin-releasing factor in mediation of neuroendocrine and behavioral responses to cholecystokinin octapeptide sulfate ester in rats. *Neuroendocrinology* 57:340-345
19. Kamilaris TC, Johnson EO, Calogero AE, Kalogeras KT, Bernardini R, Chrousos GP, Gold PW 1992 Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130:1764-1774
20. Shan J, Krukoff TL 2001 Intracerebroventricular adrenomedullin stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system and production of hypothalamic nitric oxide. *J Neuroendocrinol* 13:975-984
21. Martinez V, Cuttitta F, Tache Y 1997 Central action of adrenomedullin to inhibit gastric emptying in rats. *Endocrinology* 138:3749-3755
22. Parkes DG, May CN 1995 ACTH-suppressive and vasodilator actions of adrenomedullin in conscious sheep. *J Neuroendocrinol* 7:923-929
23. Samson WK, Murphy T, Schell DA 1995 A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* 136:2349-2352
24. Letizia C, Di Iorio R, De Toma G, Marinoni E, Cerci S, Celi M, Subioli S, D'Erasmus E 2000 Circulating adrenomedullin is increased in patients with corticotropin-dependent Cushing's syndrome due to pituitary adenoma. *Metabolism* 49:760-763

SEQ ID NO.1

5 atgcagctgagaaaaatgcagaccatcaaaaaggagccccgacccccctagatcctaccagcagctcagacaagatgctgctgctgaactctgccttagct
 gaggtggccgaggacctagcctcaggtgaagattgctcctgaacgaaggagcatggggaaaaacaatcctggcgtgctggagaaaaagggaat
 tcattccggacgagaagaagacgccatgtattgggagaaacggcgaaaaacaacgaagctgcaaaagatctcgggagaagcggccctcaatg
 acctggtttggagaacaagctgattgccctgggagaaagaaatgccactitaaaagctgagctgctcctgaaattaaagtttggttaattagctccac
 ggcgtatcccaagaaatccgaaacacagtaattccacagctgctacttccagactaccagacatccaaggctccctgagctcttttggagcagc
 10 atgagcctgcgatggtagccgggaagttgcatctcagtcacgaactctcccagagctcgcctccgatgtgtcagagggtcctcgggtggagccac
 tcaggaaagccccgcacagggaggctgccggagccctgagaacaagttccctgtatcaagcaggagcccgagggtggagcttggcaggga
 ggccaggaggaggcggggcagctattccacctcactaccagagctacalgggaagctcttctcacttactcaccactcccacccctcttgaggtc
 catgggtccactagcaactcccaagaacctcagaggccgatgagggtgtatgggcaagctctctgatggggaagacgaacaacaggtccctaagg
 gccccatcattctcagtgagctgcaacgggtcacgccacgggtggaagttccggaagtgaaccttctccttaccgcacaagctcggattaa
 15 agccaagggcatgacagctcaagtgaggctttggacagcaggttgaaggcatgcagaactctctcaccgccgatgcgatcccaaaagacattt
 tgacctggagaacaatggaacctcgggtatggccattctcctcctcctcttctcagtgaggtgacgaacatcaagattgctccctcaaatcggaac
 actggcatcacaagaactgagcagcaaaaactcagatgactcacaagaagtggtgtggtggaagcaagacgggtgctataaggtttccgaagctgag
 aattttgattgaagcagggaatagcaaaactatctcagagggtgtctcgtcaagagattcatagccacacaaccgatctcggcttcggactccaagtaa

20 SEQ ID No.2

MQLRKMQTIKKEPAPLDPTSSSDKMLLLNSALAEVAEDLASGEDLLLNEGSMGKNKSSACRRK
 REFIPDEKDDAMYWEKRRKNNEAAKRSREKRRLNDLVLENKLIALGEENATLKAELLSLKLKFG
 LISSTAYAQEIQKLSNSTAVYFQDYQTSKAAVSSFVDEHEPAMVAGSCISVIKHSFQSSLSDVSEV
 25 SSVEHTQESPAQGGCRSPENKFPVIKQEPVELESFAREAREERTYSTIYQSYMSSSFSTYSHSPP
 LLQVHGSTSNSPRTSEADEGVVKGSSDGEDEQQVPKGPIHSPVELQRVHATVVKVPEVNPALP
 HKLRIKAKAMQVKVEALDSEFEGMQKLSFPADALAKRHFLEKHGTSGMAHSSLPFSVQVTNI
 QDWSLKSEHWHKELSSKTQSSFKTGVVEVKDGGYKVSEAEENLYLKQGIANLSAEVVSLKRFI
 30 ATQPISASDSR

SEQ ID No. 3

tgccgctctgctccccacacctagcaccacagcccggctgctgccccgggtgagaacccccagcttggcccttgatggtgccagcaggtggccctgag
 cttctgacaggggctgctatagacctgacggcctgagggctcagactcacaactcaaggggcaagaggccctggtggcccaactaagagccacctct
 35 gtcaccaagcctgctgccccactgatgtctgactgagaccagcagtgacctgagctgctcctgcccactgctcctcctggtccctgaggttggctctg
 cgaggaccggacactcttgaagcagggcgtaacggaagcaccacccagcctcaccgagcatgggcagtgccaagcggcctgagcaacg
 tgtccccgggtgctgctactgttccagatgtggcaccacgaacagggagcaggaagggcagcatcaggcaatgggcccctggaagcaggaatg
 gagtccatgtccaccgccacccctgagcagggcctgctgcttctactctcttactitaaatgtatcccgacgatagcagctgggtcggcaaaatccc
 cgaggccctgcccgggaggaccaccggaggagcccgagcagtgctccgtcattgacagccagcctctgggagcagcttggatgagcactcgt
 40 agagcaggtgcaatc gatggttggggcaggtcctgaaagatattgagcggcctgcaagcttctgaacatcacagcagaccctggggactggagcc
 ctggtaacgtgcagaagtggctttatggacagaacaccgtaccggctgctccagcagggcaagcctccaggagctgggggtaaggagctgtgc
 gccatgtccgaggaacagtccgtcagcgtgacccttgggtgggatgactgcatgccacctggacatctggaagtcagcggcctggatgaagga
 gaggacctgctgggaccttactactgcgcctccaccagcaggaaggctggacggatggtgaggtggactcgtcgtgctccgggcaagccatt
 cacctgtggcagttcctgaaaactgctcctcaagccccacagctatggcccttctcgtggtcacaagaaggagaagggcatcttcaaaattgagg
 45 actcagcacaaggtggcccactgtgggtgtgcccgaagaaccggccagccatgaactatgataaactaagccgctccatccgccagtattacaagaag
 ggcatattcgtaaaccgacatctctcagcgccttgtctaccaatlttgatccagctctgagagccacagagaccagagcctacaacctgccccagg
 cagccactctctggttggcctgctcctctgctcacttgaaatcaggggtgctggtatccagaacccaaggtcccagatagacagccactgatctag
 ggatacacatgagctctctgggtcatacacagccccaggaagatcgaggagctagtctcagcacagggactggaccaagtcagctcaccgggaca
 50 gtgatgcaactgctctgctcctgcccaatcctgtaccatctgcatggtgctaaagatgctgtaccctcgttggggaagccaggggtgcccctggg
 gatggataataagacgtaagataactg

SEQ ID No.4

MGSASPLSNVSPGCLLLFPDVAPRTGTEKAASGAMGPEKQEWSPSPATPEQGLSAFYLSYFN
 55 MYPDDSSWVAKVPEARAGEDHPPEEQPCPVIDSQASGSLDEHSLEQVQSMVVGEVLKDIETAC
 KLLNITADPGDWSPGNVQKWLLWTEHQYRLPPAGKAFQELGGKELCAMSEEQFRQRAPLGGD

VLHAHLDIWKSAAWMKERTSPGTLHYCASTSEGWTDGEVDSSCSGQPIHLWQFLKELLLKPH
SYGRFIRWLNKEKGIFKIEDSAQVARLWGVKRNRPAMNYDKLSRSIRQYYKKGIIRKPDISQRLV
YQFVHPV

5 SEQ ID No.5

cgggctgaccacgcgtccgccacgcgtccggcggagcttctgggttgcggccgaaacggcaagcgatggaggcgcctcgaacggccagggtg
 tctgtattaaatgatcagccctcagagacagcgtcctacctctttatccagacctcaaaagcccgttgcaccctgggtgcttctcacttccctg
 10 tttctctccactgtatggcccagacatgatggctccctagaaggggccgatgggggaggagaccccaggcccggagaaccttttgcctggagga
 gtcccatccctggggcccgcagcaccggccttgcaggccccagcctggctgatgacctgatgcaaacagcaatggctcaatggcaatgagtc
 caacggaccggatccaggggcgatctcagcggagtctcatagttcctctctgcaatggcaaggactcagctctgctggagaccactgagagca
 caagagtacaactcacagacccatccccccagcagctccaltgcctacagcctcctgagtgcgagctcagagcaggacaacctatcaccagt
 gctcgacagtgaacgtcagctcagccagaccagaaagaactcatgactgcacttcgggagctcaaaactcactgccaccaagcgcggggg
 caaggggccgctctgggaccttggccacactgcagctacgctctggcctgtgtcaagcagggtcaggctaaccaggaaatattaccagcagtgagctgga
 15 ggagggtgagccttgcctatgacatgtctacttacacctggaggaattggagcatatcacatccgaatacacactcgaaacccaggaacaccttctctg
 tggctgtctctctcagagggcggattgctatatttggagcaggcaggttctctctgctgcttgcgaaacgggatgtttcgggggtcccgtctcag
 agctcctggctcccaggatgtgggtgtcttctatggcttactacacctcgcactgccacctggggcactggcactctgcagggttcaagctcaag
 gacttaccaggaaaagtcttcttctgccaatcagaggaggtcctgaccgggatccaggccctcggfaccagccattccgctaaccatgatgta
 ccaagattcgggtctcagatggagcccctgcacagccgtgctgctactcattgccagcgcacactcctggttatgaagctccccggatccctcctga
 20 caaggagatctcaccaccgacacacacaaagctgctcttccaggatgtagatgaaaggctgccaccctgctggttacctccccaggatctcctg
 gggctccagctacttctttacatcctgaggaccgacctcatgctggcattcataagaagatactgacgtggcaggccaccttaccattcc
 cctattcgttctgtctcggaacggggaalatgtccatggacaccagctgggcccggtttgcaccctggagccgcaaggtgcttctgtgtggg
 tgcataaagtgcgcacggcaccctgaatgaggacgtcttcaactccccagccccagcccagctccgctccctgactctgatatccaggagctctc
 agagcagatccatcattgctgctgcagcctgtgcacagctccagccccaggggctctgtggagtggccctctgatgccccgtctctcacacgc
 25 cctggctcctccagtgatagcaatgggggggacgctgaggggctggcctcctgctccagtgacttccagcagatctgaaagatgctcatctgtaa
 agcaccagggacaacagcttcttcaatctgggccaagccccaccccggccccgctcttctacaggtacattcaaaagccaaagtcttccct
 gccagtcaccaaaccccgaactggaggtggccccagttctgaccaagcctctgtagccttggccccgagggagccagagaaagaaacctctgg
 ctgttctaccagcagatcaactgctgacagcatcctcaggtatttggagagctgcaacatccccagtaacaacagcgttaaagtggctcctcctcct
 ctacactgcctctcagcctctgatgatgacaagcagaggggcaggtccagttccttggggggccaaagaaatccgctcgaacatgctgtgggga
 30 gggggcaactcctcggaaaggagccagtggtggggggcaccctgagcccctcgccttggcaataaggcagagagcgtggtgtcctgaccagta
 gftagcttccagctccaccatctcctatgtgggagacaagaagccccggagctggacatcatcatgatgaaagacctgctggcctggccccctggcc
 cagcccccaagtcggccccagccccacagtagccccctgacccaaccagatgcttatccagctgggtctgaccaagggctgctcctcagccccctgac
 acacagaaggaaagcagccttctcaaccgctcagagatcttggcaggctctgtgacttgacaccttctgtggccccctcagccccctggctgcc
 accatggccccattccccctggcggcaccactggcctatgaaagcaagcgtcccccaccaccaccaccagacccccggcccgaaacctc
 35 ctgctatgtctccatccttaccctgtgcccccttctgacctggccacccccaccagccacgacccccctccagcaatggctcagccccaccactcc
 cagtatctccccctcagaggagccccagccccctccccctgccccatctgtgtccccctgctaccttcccccttcccccttacctgacccccaatgggtg
 gctgctccctaactatcttccctaccccactgattatccataggggtgtccccagccccctgttggaggggccaccacgctctcctcactcgcctc
 tccatcctgccccaccactctcagcccccccaccgcccagactccccactgttcaactcagatgcaactccccactccagctcaactctgctcag
 40 ctgaggagctccccccgacggaggggggcgtgctgctcaggagggccaggaagcagctgctggccccctgctccagtgagagactgctgagcc
 agaggccagattggtgagggtactgagcttcaatcaggatgacattcagcctccagcagctgctggagctactgctcacaagagactctcgtctg
 ggacagcctccgacgctcaggctcctgggcttggcctggtctggttctcaggatccacgaagggggaaagcactcagccagcaica
 cccgacagctcagagccatacaagcaagcttggcagcctcacttccgaggtgaaagctggggctgctggccaggactgagcctgg
 ggaccaggtcattaaagtgtgtctcaggacccccatctggctgctcagccaatgcccagcagctgctatgatgacataccaggtgctcagggga
 45 tgcacctctgtgctgnaagcagaccggagaggtccggccatgcagaacagcagccacggttctcagaggaccagaggcggaaactgggtg
 ctgtgactcctgggtccggaaggccagctgcccggccctgatgtatggcgtgtgtgactgtgagcagcagcttcaagatctggccactctga
 tgaccgctctctcagaactggatggattgggctggagccccatgaaaggggtggagggcaggggtggtgggtgtggttggcggtggtgggggtg
 atgtgtgtgaggagccccagccaaattggggctaaagggtcaagctcaggaactcgcactggcaggaagaaagcaaggtgggggctcatccag
 50 cccagcttacctcagaagaaaacagcaccagctagatccatttggggccgcttacagcagctaatgagagggcttcttaccatgttgggttctt
 ataactcaagatacagctggaccaaccaataggaaactccccagcttctcccaacataggggctggacccccattaccagcccagcagcagggact
 gcctctagcttcttagcagagtggagtctcagccccattggaggattgcccagcccgtccactgaggagacggcgggcttccggttaagggtgct
 gacaagctgctgaagtgtcttccaaatccagctgagcctgagctccagctcaggggtggggctgacttatttgggagagacagctcactctc
 ccacctaccocaaagatggaggaggggaaacctgggatctgttagatccaggtccgtgaaccctcagctgctccaggggtgggggaggttgggga
 ccatggatgctctgctgctccccctcaggtgggaccaggtgttctcagctcaccctctaccaatgacatttgtttttgatattgtctgttatttttttta
 atacaaaatgacaaaatgaaaaacaaaaa

55 SEQ ID No.6

MSGPLEGADGGDPRPGEPFCPPGVPSPGAPQHRPCPGPSLADDDTDANSNGSSGNESNGPESRG
 ASQRSSHHSSSSGNGKDSALLETTESSKSTNSQSPSPSSIAYSLLSASSEQDNPSTSGCSSEQSARA
 RTQKELMTALRELKLRLPPERRGKGRSGTLATLQYALACVKQVQANQEYYQQWSLEEGECA
 5 MDMSTYTL EHELEHITSEYTLRNQDTSFVA VSFLTGRIVYISEQAGVLLRCKRDVFRGARFSELLAP
 QDVGVFYGSTTPSRLPTWGTGTSAGSGLKDFTQEKSVFCRIRGGPDRDPGPVRYQPFRTPYVTKI
 RVSDGAPAQPCCLLIAERIHSGYEAPRIKRPDKRIFTRHTPSCLFQDVERAAPLLGYPQDLLGA
 PVLLFLHPEDRPLMLAIHKILQLAGQPFHDSPIRFCARNGEYVTMDTSWAGFVHPWSRKYAFV
 LGRHKVVRTAPLNEDVFTPPAPSPAPSLDSDIQELSEQIHRLLQLPVHSSSPTGLCGVGPLMSPGPL
 HSPGSSSDSNGGDAEAGPGPPAPVTFQICKDVHLVKHQGQQLFIESRAKPPPRPRLATGTFFKAK
 10 VLPCQSPNPELEVAPVPDQASLALAPEEPRKETS GCYSYQQINCLDSILRYLESCNIPSTTKRKCAS
 SSSYTASSASDDDKQRAGFPVPGAKKDPSSAMLSGEGATPRKEPVVGGTSLPALANKAESVVS
 VTSQCSFSSSTIVHVGDKKPPESDIIMMEDLPGLAPGAPSPAPSPPTVAPDPTPDAYRPVGLTKAVL
 SLHTQKEEQAFNLNRFRDLGRLRLGDLTSSVAPSPGCHHGPIPPGRRHRCRKAKRSRHHHQTP
 RPETPCYVSHFPVPSGPPWPPPPATPPFAMVQPYPLVFSRGGQPPLPAPTSPATFSPVPLV
 15 TPMVALVLPNYLFTPPSYGYVSQAPVEGPPPTASHSPSPSLPPPLSPHPPSPLFNRCSSPQL
 LNLLQLEESPRTEGGAAAAGGPGSSAGPLPPEETAEPEARLVEVTESSNQDALS GSSDLLELLQE
 DSRSGTGSAAAGSLGSLGSLGSGSGSHEGGSTSASITRSSQSHTSKYFGSIDSSEAEAGAARART
 EPGDQVIKCVLQDPIWLLMANADQRVMPTYQVPSRDAASVLKQDRERLRAMQKQPRFSEEQ
 RRELGAVHSWVRKGLPRALDVMACVDCGSSVQDPGHSDPLFSELDGGLGLEPMEEGGGEGG
 20 GCGVGGGGDGGEEAQTQIGAKGSSSQDSAMEBEEQGGSSSPALPABENSTS

SEQ ID No.7

gaaltggcagcagcagcagcagcggcgacgggtgcttcccagtggagccaatgggtaaccccgctccggcagagtccttggcgctcgccc
 25 ccggcgggacagaccaccgctctggcgcctcttgaccctggcggcccccagcgaagactggagcaaatgatgctcaacatcaggccagggt
 ctctgctcagaagtcagtgaccgccattgctccctgctctcaccctcgggtcactggtataggatttgctaacctgacaccttgcaagaa
 gagctgagatccacatcagaataaacacctctgcatcggatgcctctgcctggtgagtgctgacgtgacatccatcaacagaccctggagatgcatca
 ccaagtctgaggcggccctgaagaagatgagagggaaaaggaggcgcgagaaaataaaaatgctgctccaagtgtcgaacaaagaaanag
 30 gagaagacagagtgcctgcagaagagtgacagaactggaggtgtaaatctgagctgaaagccagcagtgagagctgaaatgagaacag
 cattsatatacatcaccatgacacccacctgacggcctccgggctcagaatggagacaccggaaagacgagaggaacatcttaccacag
 ataaaagaaggcaatgacagcctaagcagaggtggcaggcaatggagggtgcttactgaatccctctttccaccccacacctgaaagccatt
 ggaaaactgcttcttgcactctagaatccacagcgaagaccgcttggggcagagggctggtgacactgactgacccactctgcccc
 cgagtgaaccgtggagcaggcaggagcattcttctcaccatccaggtataggccttcatcccggcagctcagatgacctgctggcccca
 ggctggggtctatcaagcaggtaccactaatgggattcaggcagaagtgtctacctgagtggtggggaccacatcctcactggtgctgac
 35 aacgccctccaaagggaatggaatgagaacattcattgagggtgccaatgccagggtatgcttctagaataatgctgtctcccagatgac
 tgtcatagggatccggttcagagcctgggtggtgctatttagattggtgttcccaacattggcatgattttccgggagttcatcagatgtattctgag
 agtctgggactgcctggtgaaagtgcccctcaaaagcattggtggcaccatgagctgaccagagggagtgaactggctgatgaccag
 ctgagccattgtgccaacagaggatggcgacaccttccctgtaccactgcagaagaagaccctggcaccagagccttggctccacaac
 tgttacacctcacacaatgaaggcacaagtcacaacttcaagggtgtaggactccatactcagtgacagggcaggaagagcacaagataaccaca
 40 gccacagcctgtggagaccaggtggaagccaggtgcaggccaggcactctgatttggaggttaatggcacttctgtgtagctatttgaatgt
 ggccagagcatttcagctgggagatctccctctggcaccagactctgctactgttaaatctgatgttctgtggaatctcaggtttaatccactc
 aatagatcattcagcttctgtaaagaaaaatattactatttaccagattcctagcctgcaacataataataatcgaacaaaacctgga

SEQ ID No.8

MMLQHPGQVSASEVSATAIIVPCLSPGSLVFEDFANLTPFVKEELRFAIQNKHLCHRMSSALESV
 TVNNRPLEMSVTKSEAAPEEDERKRRRRERNKIAAAKCRNKKKEKTECLQKESKLESVNAELK
 AQIEELKNEKQHLYMLNLHRPTCIVRAQNGRTPEDERNLFIQIQKEGTLQS

SEQ ID No.9

cccagagataagctgacgctgggcaaaccctggggaaagggtgcttcggccaagtagtcatggctgaagcagtggaatcgataagacaacc
 55 aggagcggctcaccgtggcagtgaagtgtgaaagtgatcccacagagaaggacctgtctgatctggtatcagagatggagatgatgaatgattg
 ggaaacataaagaacattatcaacctcctggggctgcacgaggatggacctctctacgtcatagttgaatgcatcgaagggcaacctccggaata
 cctccgagccggaggccacctggcatggagtactcctatgacattaacctgtccccgaggagcagatgacctcaaggactgtgtctctcactca
 ccagctggcctagaggcatggagtacttggctcccaaaaatgtatccatcagatttgctgcccagaacctgtggtaacagaaaaaatgtgatgaag
 atagcagactttggcctggccaggatataacaacatagactataaaaaagaccacaatggcagctccagcaagtgatgctcctgaagcc

5 cttttgatagatttacactcatcagagcgatgctcggcttcggggttaatgtggagatcttacttttaggggctcacctaccaggattcccgt
 ggaggaacttttaagcigtctcaaaaggagacacagatggacaagcccaccaactgcaccaatgaactglacatgatgatgggattgctggcatgc
 gtacctcacagagaccacattcaagcagtggtgcgaagactggatcgaattctgacttcacaaccaatgaggaatactggatcaccacgctct
 cgaacagatattctctagttaccccacacaagtagctcttctcaggggacgattctgttttctccagaccccatgccttatgaacctgtctcctca
 gatccacacataaacggcagtgtaaacatga

SEQ ID No.10

10 PRDKLTLGKPLGEGCFGQVVMMAEAVGIDKDKPKAEVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEM
 MKMIGKHKHNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLRRRPPGMEYSYDINRVPPEQMTEK
 DLVSCYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTENVMKIADFLARDINNIDYKKTNNGR
 LPVKWMAPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPTN
 CTNELYMMMRDCWHA VPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTTNEEYLDLTQPLEQYSPSPYPTSSSCS
 SGDDSVFSPDMPYEPCLPQYPHINGSVKT

15 SEQ ID No.11

20 acccacgctccggccggttactgctcccctcagctctttggctcttccgggcatcgggacgatgaccgtcaaagccgaggctcctgaagcac
 ccttacctactcagaatgaggggaatgtagcattctcctgtttatgaacagagaaggatggcctgaacgattttatcagaagattgccagcaa
 cacctatgatcgaaacacgctgaagtccattttgaaatgtcccactcagagaccggagctatgaacgtaacccctctctccgccaagtc
 cctctcaacaaatcaactgggtccgcctccaacctcagcgaacacctccgacttctcttgaagtgtcggaaaggcagtttggaaaggctc
 ttctgctaggcacaaaggcagaagattctatcagtcacaagtttacagaagaagccatcctgaagaagaagaggagaagcatattatgcaga
 gcggaatgtctgtgaagatgtgaagacccttctggggccttctcattccagaccgctgacaactctcttctcctggactacattaatg
 gtggagagcttctaccatctccagaggagcgcctcctcctgaaccaggctcattctcagcagctgaaatagccagctcctgggctatctgca
 25 ctcctaaacatcgtttatagacttaaacctgagaatattctctagactcccaggggcacatcgtctcactgacttgggctcgaagagaatatt
 ggcataacgggacaacatctacctctgtggcacgctgagatctggctcctgaggtcctcataagcagccgtatgaccggacgggtgactgggt
 gtcttgggctgctctgatgatgctctacggcctgccccgtttatagccggaacacggctgagatgtacgacaatattctgaacaagcctctccagt
 tgaaccacaatattacaactcggcaaggcacctctggaaggcctcctcgaagaaggaccggaccaagaggctgggtccaaggatgactttatggag
 attaagagtcattttctctttaaactgggatgatcctcaataagaagattacaccccaatgaagtgaggccagtgacctcgg
 30 cactttgatcccagttaccaggagccggtcccagctccatggcaggtcccctgacagcatcctgtcacggccagtgtgaaggagcagcagaa
 gccctctcggctctctatgcacctcctgtgaltcctcctcagtgctcccggatggttctgaaggactcctcagcgtttcctaagtgtttcccttac
 cctttggagggtgccagctgacagaacattttaaaagaattgcacacctggaagcttggcagctcgcctcccggcgtggcgcgacgcagcgcg
 cgtctgtgatggagctttccgaagcagcacacctcctctcaatgagctgtgaggctcttctctctcctccaactgggtgtagctccaggcag
 cgagcgtgagtgccgcctgagacagacacctgtgtcagtagaagaagatcgaggtcgaaggaaatccccgcagctgtctgagctgtgatca
 35 agaattctgcaatgtcctttctgagatcgtgttagctcaaaagcttttctctatcgcagagtggttcagttgtttgttttttttttttttttttttt
 gggattcccgtgtgagtgccgtgagtgctctgctatgcacagcgtttgtgtgagcatcaatgtgacactgcaaggacactacaatgtggg
 acattgtttctccacatttgaagataaattatgtgactgtttgtaagatatgtaataactaaaacctatgaaacggcttgcattgacgagcat
 tcagatgctaaaggaaagcattgctgctacaaaatttctatttttaaaaagggttttatgaccaatgccccagttgctcagcaagccgttgggtttcattg
 ttaaaatgtcactataaaacggcattattatgttttttcccttgtctatctttgctcctgattattgtatgtatcgttaaaagagctgtacattgg
 40 gtataacactagatattaaactacagcctatttgaacctcattttaatgtactgtaataacatgggtataatgtacaattcctcctctaccacaca
 actttttgtgtcgataaaccaatttgggttgcaataaaacttgaacct

SEQ ID No.12

45 MTKVKAEEARSTLTYSRMRGMVAILIAFMKQRRMGLNDFIQKIASNTYACKHAEVQSILKMSHP
 QPELMNANPSPPPSPSQINLGPSSNPHAKPSDFHFLKVIGKGSFGKVLLARHKAEVIFYAVKV
 LQKKAAILKKKEEKHIMSERNVLLKNV KHPFLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRE
 CFLEPRARFYAAEIASALGYLHSLNIVYRDLKPENILLDSQGHIVLTDGFLCKENIEHNGTSTFCG
 TPEYLAPEVLHKQPYDRTVDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNITN
 50 SARHILLEGLLQKDRTKRLGAKDDFMEEKSHIFFSLINWDDLINKKITPPFNPNVSGPSDLRHFDP
 FTEEPVPSIGRSPDSILVTASVKEAAEAFGLGFSYAPPVDSFL

SEQ ID No.13

55 gcaggcggggtgagagcgcggtgaaagccgcggaagcggctgcacctccgcgactctactacggcaagctagtccggacgggtcgtctcccgc
 gcgccaccagccctgtgaaacgacagggagcgtccggctccccagcccgctcgcgagactcaaacagccacaccgcaaaagcagcctcgc
 ggcggaaggagcggagctcagggccccgcctccgggaagatacacatctcctgggtcaaacccccggggcgaaggcggcgggcgctg

5 tgagcgtctcgccagctgccgtctacgcgctttcgcggccaccggcaactgcgccgcggctgccccgctgagcgtcggcctcggggccgt
 gggatccggcgcgtgctcgggtaggaagaccgccctccgctccttggcggacgggtcagaggcggcaccgcacgagccaccggcgat
 gctgcttccaagttcggctccctggcgcacctctgcggcctggcggctggaccacctcccaagtgaagatctacagcccaaggctgacaag
 gagagcttcagaaagggtaccagggtggcggcgtgctggcagcggcggcttcggcacggctlacgcggcagccgatccggactccc
 10 gggtgctgtgaagcagctgtgtagaggagcgggtgaccgagtgggcagctctcggcggagtgggcctgccccggagggtgctgctgcgcaagg
 gggcgcggcggcggcgcggcgtcatccgcttggactgctgagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 acaggacctcttcgactcaactgaacgaggcggcctggacgagccgctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
 caattgtagggctgtgaccgagacatcaaggacgagaacctgctggtggacctgcccgggagagctgaagctcatcgacttcggctggcggc
 gtgctcaaggacaggctacactgactttgatggcaccctgtgtacagccccagagtgatccgataaccgatatacggcgggtgctgccactg
 15 tgtgtctctgggtgactgctctacgacatgggtgtgtgggacattccctttagcaggatgaggagatcttgcggcagcgtctttccggaggagg
 tctcccagagtgccaagcagcttattgagtggtgctctccctgaggccctcagagaggccctccctggaccaaatgctgccaccctgggatgctggg
 gacagaggggagcgttcagagaactgtgacctggctttgtccctgatactgacgagggagccagtaccactccagcagtgagagctgtgagg
 aggagaaggggcctggctcggcctaagcagcgtctccagaaatgaacactttcgtcgggatgctgctgcaaaaagcagtgaccttgaccctg
 gtgaccttgctctggcaccggcctgtttccttgccttgagtgccttttgaacgctgctccacaggcctgggttttcttgactctctgcaaaagatg
 20 ctgagggttaagcagcttccctgggtgatactgaaccagagatcccacctgctgctccatcagaggcagcctcctgaccaagtggtt
 tgacatggagcggcctgtgggtgccacctcaacctccagctcctgtgtatctggcattgtgcacaagcaatgaacgctgggccactgctgc
 ccgtctcctccccggcagcggcagggctccgacgcaacctaaagctgcccaccagcgtcttattatgtgtgatccctggaggcggcccccc
 ctgtgggctattattgttaattattgtgaggtccccaagcaaccctctccagggcctgggtgtgaagctcaaatgtgctgtgagtcga
 cagacccccatcctaattcctgacactggaggagtcccccaaccctggttgcgggaggaagcattgtacagtgctcaatttaaggaggagtgga
 25 ccctgacacctgagcactctgcgctggggagggtttaaattatgacctgtacagctcgtgctgctgtaaaactggggtgggagacagagctc
 aagcccttaattatttagcagctgtttctgacccgtgtgactaagcatcaggggtgggtgtataaagttcaaaagtgaatgtctgaagatcat
 atttttatacaggtatttcaattaatgttttggatatataatggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID No.14

25 MLLSKFGSLAHLCPGGVDHLPVKILQPAKADKESFEKVYQVGAVLGSGGFGTVYAGSRIADGL
 PVAVKHVYKERVTEWGSLLGVAVPLEVVLLRKVGAAGGARGVIRLLDWFERPDLFLVLERPE
 PAQDLDFDITERGALDEPLARRFFAQVLAAVRHCHNCGVVHRDIKDENLLVDLRSGLKLDIFGS
 30 GAVLKDTVYTDGTRVYSPPEWIRYHR YHGRSATVWSLGVLLYDMVCGDIPFEQDEEILRGR
 LFFRRRVSPECQQLIEWCLSLRPSERPSLDQIAAHPWMLGTEGSPENC DLRLCALD TDGASTT
 SSSESL

SEQ ID No.15

35 cctggggccccgccggagcgcggagcccgctggccggcggcggaggagggcggggagaggacctggaatgtctccggagctgagcggc
 aagccaagcagctgttgaagaagcaggatgctgatcaatgtagcaaaaagcagtcggaccctggtttcgaagacatgtgtgtatataaagtgt
 gatagttggtgaaattgggagccttgataatggcgtgtgcaatgtaaggataaagaagcagcgaactgacagaggagggagggcggcagcctga
 accagagctctgggtaaccgctatggcacagacccaccctcagcactaccaccgctcggcgtgacctccatcccgaactacaacaactccacgca
 gctggggccaggagactaccgctttgggggtgtgaactcctcctcacactggaccctacgcacgagaggaggacaggagtacactgtttgt
 40 ggcgtttatgactatgaagcagggaggaagatgacctgagtttcacaaaaggagaaaaattcaaatatgaacagctcggaaaggagattgtgggaa
 ggccgctccttgacaaccgggaaactgttacatccagcaaatcgtgctccagtgtactccaggcgaagagtggtactttgaaactgtg
 cggcaaatgctgagagacagctcctgtcctttgaaacccaagggtaccttctatccggagagcgaacccaagggtgctactcactttcc
 aacactcagcaactggtagcactactcagagaagctgagttgtgttttaacttaactgtggtttcatcaagttgacccccacaactctgagattggc
 45 taaagatgctgggaagttgcactgactgtttgttctggagaagaagctggggcagggtgttctgctgaaagtggcttgactcctggaatggaata
 caaaagtgcctataaagaccttaagcaggcaccatgtctccggagctctcctggaggggcagatcatgaagaagctgaagcatgacaagctg
 gtgcagctctacggctgtgctgaggagcccatttacatgctcagggatgacgcaaaaggagttgctgactcttataaagatggtgaaggaag
 agctctgaaagtgccaacctgtggacatggcggcagaggtgctgcaagatggccttacatcgaagcagatgattatccacagagatctgcgatca
 gcaaacattctagtgggaaatgactaattgcaagattgctgactttgattgctcgtgattgaaacaatgaatacacagcaagacaaggtgcgaa
 50 gttcccattaagtggacgccccgaagcggcctgtatggaaggttcaacaatcaagctgactgatggtctttggaafcttactcacagagctgtcac
 caaaaggaagagtgccatcccaggcatgaacaaccgggaggtgctggagcaggtgagagaggctataggtgccccggccacaggactggcggc
 ctcccggcagagctcatgactcctggaaaaaaggatccggaagcggccggaccttcgagtagtactgcaagggtcctcctggagactcttacc
 cacagagccccagatcagccccgtgaaaaacctgtgagagcctgcctcagacggcctctcccaggcctccctaccctcccactgctcaattct
 gtagccagctgccccagagcaggagaaccgtccaggatcagattgcatgtgactctgaaagctgaactccacggcctcatatgacactgtcccc
 55 agtccgaacctcctgtgaacctctgagacagaagcgtgtatttctcagacttgaaaatgcatgtagtattatgcaaaagcgaacctctgttcag
 ftaaatagctgctcctgtcccacaatcccagcttcttttaaaaaaagaaaagcaaatcctatgattttaaactgtatttcaactgattcaactaaa
 aaaaaaaaagattattttcaaaaagtggcctcttctcaaaaacaataaaaattttttcatgttttaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID No. 25

5 aaaggcagcctgataaagctccttgtagaggctgtctgccagctcccagtagctcctctgctctgaaagtgtccaggatgaaccacagcttccca
 actccatcagacatgacagcaaaaaattcctcaaaagaatttactgcttcggaatctagggttgataaaagactttcaaggagcagatgcgcttggaaact
 10 tggcttccaaagctaccaggaaacagacctacatctcccaaaattctccacgcagttcaccaaggaaatccacctgcttttcagaaagtgtggtgaaat
 aaaaagcatccgacagcggcgtcgttcacgggtgctcatacatgctttgatgtggaanaatggcccttctccaggctggagcccactggaccctcaagcc
 ggctctctgctgggactggtactcatccgctttcctgggcacagccagcgcaggagctgttcctctacgatctgacagcgcactatgactgtcacc
 15 aaagcagatgicaggaactcatcctccagtgagcaacacggcagatgacctgattgctactccttttcccaggcttccagccttgcgaagtgaaga
 aacaactcaccctgctgacgaacctcatggagcgcgaacaagaggtcaccagcggctagtcaggctccagctccagagtcagcctgcaagagga
 atcatatcagaactagcaatggagacgctggaggaactagactggtgctcctgaccagctagagaccatccagacctaccgctctgacgagatgg
 cttaacaacagttcaaaaggatgctgaaccgggagctgacacacctctcagagatgagcagatcagggaaccaggctgtctgactatcacaacagtt
 cttagacaagcagaacgatgtgaaatcccactctccacgcagaaggacagggagaagaagaagcagcagctcatgaccagataagtggagt
 gaagaaactgatgcacagctcaagcctgaacaacacagcatctcagcctcgggatcaacacggaaaatgaggatcatctagccaaggagctggaa
 20 gacctgaacaatggggccttaacatctcaatgtgctggtgactcacataatcgcccttacgtgcatcatgtatgcaatattccaggaagagacct
 ctgaagactttaaactctatctgacaccttgaacctacatgatgactttaagaagaccattaccattctgatgtggcatalcacaacgctgactgctg
 gactggtcccagtcactcactgcttctctacgccggcactggatgctgtctcagacctggaaactcctggctgcatcttttgcagctgcatcctatg
 atgctgactatcctggagctccaatcagttctcatcaatacaaatctgaactgctttgatgtataatgatgaatctgtctggaaaacctaccttgtgtg
 ggattcaaatgctcaaaaggaaactgcgacatcttcagaaatccaagaagcaacgccagacctcaggaaaatgggtgattgacatggtgtggaacta
 25 caactgatgtccaacacatgagcctctggcagaccttaaaacaatggtagaaccaagaagtgacaagctcgggtgtctcctctggacaacta
 tactgaccggatacaggtcttcgcaacatggtacactgtgcagacctgagcaaccccaccagcttggaaatgtatcggcaatggaccgatcgtatca
 tggaggagttttccagcaggagacaagaacgggagaggggaatggaattagcccaatgtgtataagcagacacctctgtgaaaaatcccag
 gttgtttcattgactacattgctccactgtgggagacctgggcagacctggttcaaccggatgctcaagataattcggatacactagaagataacagg
 aactggtaccagagatgatacccgagccctccccgacctggtgagaggagcaggactgccaaggcctgatggagaagtgtcagttgactg
 30 accttgaggagaaggattctgaggaccggaaaaggaggagaaggccacagctattcagcagcacaagacgctttgtgtgattgaccagaga
 caggattctctggaagagactgacatgacatfgcaacagaagacaaactcctcagcagacataatctctcctctgtgtggagatgaacattccac
 ccttgactgagcatgcccgtgagtgtagggtaacctaccatggcgaaggcctgacagggacaagaagccacctggccttccagttacttgattgattgga
 gccagaatgccaggccgtgaagcaaatagcagttccatgctgtctgcttgcctgcaagctggcggagaccgcagctgtatgtgtagtagaggcc
 agttccatcaaaagctaaaatggctgaaaacagaggacacaagaagctgagagattgctctgactaggtgtgggaagctgctgacagatgactgaac
 35 tcaactaactcatctataaattcaccaccaacccatgtctgccaacctggtgctctttttgtaaaatgtttcgcgcttttgaatgctgttgaatc
 tagagtttagtaccacttcaacaactttttgagcttttctgaaaaacaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID No.26

35 MTAKNSPKFTASESEVCIKTFKEQMRLELELPKLPGNRPTSPKISPRSSPRNSPCFFRKLKLVNKSIRQRRRFTVAHTCFDVENGPSGRSPLDPQAGSSSGLVLHAAFFGHSQRRESFLYDLSDYDLSPK
 AMSRNSLPSEHQHDDLIVTFFAQVLASLRSVRNNFTLLTNLHGAPNKRSPAASQAPVSRVSLQE
 40 ESYQKLAMETLEELDWCLELQLETIQTYRSVSEMASNKFKRMLNRELTHLSEMSRSGNQVSEYIS
 NTFLDKQNDVEIPSFTQKDREKKKKQQLMTQISGVKKLMHSSSLNNTSISRFGINTENEDHLAKE
 LEDLNKWGLNIFNVAGYSHNRPLTCIMY AIFQERDLLKTFKISSDTFVTYMMTLEDHYHSDVA Y
 HNSLHAADV AQSTHVLLSTPALDAVFTDLEILAAIFAAAIAHVDHDPGVSNQFLINTNSELALMYN
 DESVLENHHLAVGFKLLQEBHCDIFQNLTKKQRQTLRKMVIDMVLATDMSKHMSLLADLKT
 45 VETKKVTSSGVLLLDNYTDRIQVLRNMVHCADLSNPTKSLEYRQWTDRIIMEFFQQGDKERE
 RGMEISPMCDKHTASVEKSQVGFIDYIVHPLWETWADLVQPD AQDILD TLEDNRNWYQSMIPQ
 SPSPLDERSRDCQGLMEKFQFELTLEEDSEGPEKEGEGHSYFSSTKTLVIDPENRDSLEETDID
 IATEDKSPIDT

SEQ ID No.27

50 ggcggcggggagctctgagaatgcaaaagtgccatgtctctggctgtccagcagcactgctaccatggacaagagtgaggcaacggcccaaggt
 cgaggagaagcgggagaaaatgaagcggacactctaaaccattggaagaccggttgagctactcttgcaaatcctctgctcctgggaagcccaa
 aactggcaagaaaagcaaacagcaactttatcaagccttctcctgaggaaagcgcagctctggcagaaagcatttgatgaactgctgccaataat
 55 gggctggctgattcaggcgttttaagtcgagttctgtgaagaaacattgaattcgtgtgcttgaagactcaaaaaacaaatcaccctca
 aaactgctcctaaaagcaaggaatctataccgactcatagagaaggaagctcccaagagataaacatagactccaacgaatctctgattgcc
 aaaatccaagaggctacaagtggctgctcaccacagctcagaagagggtgtacagtttgatggagaacaattctctcctggttcttgagtcggaat
 tctaccaggacttatgtaaaagccacagatcaccagggagcccatgctacatgagaccaggagtcccccacacaaaaggacattcctctgctc
 ccaagagcaaggctgtgacctgcccagaaaaaaaactgacctgaattcagcctgaggttaggaaaacatcgtcagaactattgattcaatg

5 tgggtagtgaatcaggaagcagcaacctaggaaggctctgtgtgagaacggctccctactgtgtgaagaacagaggagggaacaggcctctg
aatgtgtcttccctcttgcgggaaagcagagtttagatgaaagatccgatgcaatgttgggagcatttaaaatcaagggtctgggattatggcctt
agctagttggctgtacaccttccctaaactagtcctatgttacatagtggtgttagtctagtttaaatatttagtactaagtaacattacaatgtttactgtgtg
caagggtgttgacgttcttaggactacagatcatagtagtgtgtcacgtatcactgaaactgagaagatgtttgagtgttaaatgggtgtgtgatgga
ccgaatgtgtgcccgtctglagaa

SEQ ID No.28

10 MQSAMFLAVQHDCVPMDKSAGNGPKVEEKREKMKRLLNHWKTRLSYFLQNSSAPGKPKTKGK
KSKQQTFIKPSPEEAHVWAEAFDELLASKYGLAAFRFLKSEFCBENIEFWLACEDFKKTKSPQK
LSSKARKIYTDFFIEKEAPKEINIDFQTKSLAQNIQEATSGCPTTAQKRKYSLMENNSYPRFLESEF
YQDLCKKPKQITTEPHAT

SEQ ID No.29

15 aaaaagtatatgaggacaatgtaaggcaaatgacctggaaacagttgaatcacagcaggatcgaagtgaacacgttctgtggcagagcatagctct
gctcatatgcagactgtgcaaaattctgttctactctagctcaggtagcaacaattgcagagacagatgattctgcagactcagaagtaattgattcgcata
aacgtagagaaattcttccacgaaaccctcatatagaaaatactgaatgaacttctctgatgtgcctgtattcccaagattgaagaagaaaaatcaga
20 ggaaggaaggacaccctaacattgctccatggcagtagcaactatgcataatcagactagcacggggcaatacaatgaggagactgaccttccc
caagtcacatggctgtgccacaggtgacatgccaacttaccagatccgagctcctactactgcttggccacaagggtgtgtgtgatggctcaccagg
aagcctgcacagtcgccagcaactgcaagaagcaactcgaagcgggagctgaggtgatgaaaacagggagctgcccgggagtgctgca
ggaagaagaaaagaatgtcaaatgtcttgaatcgtgtgctgtgctgaaaatcaaaacagacctcattgaggaactcaaggccctcaaacctt
tattgccataaagcagagtaactgtgttattgacctgtgtgactgtgaacttaactcggggcaggcgtatgcagatcctcataatggccatgtggactt
25 gtgatgggtctcttaaccttgccttaagaatagctctgttagagtgtaattgggaactgttccatgggtggaatgcagctcccctacattacca
gcttgcctattgccaatgcatgcaacatatttttggcccttctgcttactttttcagggagctgtaaaagaatgctgacgtcgaagaagagat
gtgaagtgtctgagagtgagtcgagtgctggaagtcagaacaagaagcttatagaggactgaaacttgaagacattgctctccaaaacaga
ttagtgaataatttaactatgaactgattacagcatgtacagttgcttttgaatgcaatacaaatatagccggcaagaattatggcttttcttcttgc
atctaacttctaaaactaacattcctaagatgcttgggtatttaattgtccttacccttaaggtaattttgaagagacaaactcaaaaaatgtatglaac
30 naattcttaaaatgaagtattgtaagactgttccagtcacaatattacagttcccagtcctctgtcatgaatagtgctctatgcaataaaatttgcagg
taagaatcatttaggaaagggtgaatcaaaaggcagtgcatctctccagtagtaagataaaatcaaccatagagatacctcaggaaaagaatgaaggaa
gtgtatcctgatgacatgacgtgagaatgacctacaatgaatttatgattatagaitttataatcgtcacttgtaaagaaagtattgtatgctgcttgg
gtgccacagttgagacagttttaaatagaacctgttgggtgctcttactatttggatatttaagatctgagcattactacagctcctactatgtatgt
agtatgtgaatttctacaaaagtgtgctcttggctgtatattaatgaaagagacaacatattttcattatctggaatgagttccacaagtatgaatttattgctaca
35 ctggatcagcagccttgcanaactgggccattcattagaggacaacagcagggctctaggagcagagttcagttgaggacacttgcctggcatgctac
atgttcagttgaaagggagacctcaagctctgcaaatggaatgggtccaggggaaagaggttagaggttagccttggctgctactaggtcttctgctgat
cgtctggagagttctgtgatgacctccattgtgaattctgcaacctcaggaattgtaacgtttaaanaacttcccaagatgcaattttgatttacaactg
gatacaattttgttcttgggaatagctgtgacattgtcacgttaggtttaggctggccctfaaactcacagttcttcttgcctcagcctctgagtgcttggga
ttacggatgtgggccaataatccagttgatcaagtattctttataaataattacttctttt

40 SEQ ID No.30

MTMETVESQQDRSVTRSVAEHSSAHMQTGQISVPTLAQVATIAETDDSDADSEVIDSHKRREILSR
RPSYRKILNELSSDVPGIPKIEEEKSEEEGTPPNIAATMAVPTSIYQTSSTGQYNEETDLAPSHMAAAT
45 GDMPTYQIRAPTTALPQGVVMAASPGSLHSPQQLAEEATRKRRLMKNREAARECRKKEY
VKLENRVAVLENQNKTLIEELKALKDLYCHKAE

SEQ ID No.31

50 gctgaagcgttctcaagcctgccgggtgggagagaggagaggtgtgtgtgtgggagaggtggaggaaggggtggagagagagaaaagc
gcacgccagaggaggtgtgggttccgctccatcctaacggaacgagctccctctcgcggacatgggattgccagcggctgtaacccctctcc
tggtcctgatccccaaaccggcgtgctccccggctcacaagagctgattacaaggaccaggttgcactctggctggcgtccattggctaca
gagtgctgacctgggtcagcgttccaacagcagatgtctgacaaaatgtcagtttctacatattggagacattgttctctgtatgaggaggatcta
cgaattgattatcagcacttaggcttgggtgatgaccgttgggtgtacagccagaagcggggaccttaacaatccaccacaagaatcagagactgc
ctcttaagctatgtcctatgaatcactccgcacagaacaagttctggaaagctgtaagccggggccaacagcactacagatgacgtgctgctcaa
55 caaattgcatctgctgacactggaaaaagcagaatgagacagaaaacaggaattgttggggaccgtcatccaatatggcaacgtgatccagct
cctgactttgaaaagcaataatactgactgtgaataagagctcccagcctgctagagaagaatgccatgagggtgacgttggacagggtggaat
gaagggtcctgttttaccattcaaccatttacaagcttccctcagcagacagtggtgctatagggcgacaaggtagtttgaatcctgtcaatgctggcc

5 agcctctacatgccagcagtcacagctgggtgataaccaggctgcaatgaggtaacctccgtaactgtaatacaagctggaagatagtgctttcatg
 aatggagtgatacaaaagcagacattctcaaggaggatggtggtgaggctctccatgccagcaagagaagttctcactgtgatgagaccgg
 aagaagcagcatgttctctgaggaccaccggcaggcagtcagccacgtcggccaccagtctaaagccctgtgggaagtgaggtagtccagcacg
 acccatgtcggggtgagctgggtactggaatagcctctccgggtcaagcaccctgtacaggcattactggctcagaggtagaccctgactttga
 10 ggaagaatgcctggagttcagccctcagtgaccctgatcaggatgcatctcggagtaggtgagaacgcgcaagaaaaatggtatactctctggtc
 tccgtgcctgaaggcaacgacatctcctccatctttagctagaccaccgactctcgtggagggtgacagcctgtcccaaggaaactcctatgtccgct
 cagacacctgtgcaccaaacctgggtacacagcacaacaatccccatcgacaaggaaaggagaagcctgtgatgctgaaaattggtaccttcccc
 tgaaggaggacaagagcattggccatgttctctgttccctctgctgaggtcgggacctggactttgccaatgatccagcaaggtgctgggctccatc
 15 ctggccaagcagtgcttgaagttgcttctctaaagcccaatcgagagcggcagcagcctccctacgactcttggaaagacttggttactttgacgggtggaactaact
 caggcccccttcacggactgggggatgcccgatctcggctggaggagctgggggatcagcccatgctcctttcagacataattgccgactctgct
 acagggtcctcgacactcacgcaagactacaggaagaaccaggagtacatagccaagcagtttggcttcatcgagaagcagattggctatgacgtg
 ctggccgaagacaccatcactgcccctgctccacaacaaccggaaactcctggagaagcaccatccggcgcagagattgacagctttgacgctgtg
 20 gcaagaagacagggaagccagggttggattacctctgacctctgctgatccatgaacaagcaatccctgtgacacaggaagcctatctgtaagctg
 tgcataatcccacaatgctgacatcctgattgagaccaagctgggtcttctcgtttgagttgaaagcgttccactggagagaatgctctggaagccgg
 ggaggatgaggaagaggtgtggtctgttggaggacagcaacaagagatccgtagtaagagtgctccggaaattggcgcagatgtaaaagagg
 acagaaggagacagggacatcctcagctactacagalatcagctgaacctttgcaaggatgtgctggaccgccagtacctggcctcatgttcacatgcatg
 25 tccggcagctggagttgatctctccgctgcatgtctgacgagaacctccctacgacctcaggcctccttttccgcccctcatgttcacatgcatg
 tggaccgagatcccaagagcaggtgacacctgtgaaatgcccactgtggtcagaaatccctctgagatgacctgactatgacagcagctgg
 aacatccaaaagatgaaatgaaggagagtttgcacagacgatggattgtggaggagtlactaagagatgtggttgcaaaattcccctctctgataa
 ggagaaaaataagctcactttgaggtgtgaaactagccgaatctcatalactttgttctacaacttttctgaccttccgattaaccaagatcctctf
 30 gcaatcttagactgtgctcatgtgaccactatctccccattagcaagatgacaaaaggagaaagagaataaaggcagtaacgtgatggctatccatgg
 cgttggggagctgatgaccagggtgctgctgggggagagccttctgcccactgacctccatggctgcccctgaaagaaatgtgaaagcagcga
 gagccagaanaagaggacatcatggtcatggaccacaagttgaaatgcaatgaaatctccagtttattttgaaatgtagattgattatagatctcctgcc
 35 tccgtgtatatttaagcagaggttgatgaaagcaatccagctcatgaaactcctccgaaacagcagccaagaaaggcccaagtaatgtgcccagg
 tgccttactgtgaacacattgaaagaacagcggaaagcactttgggagagtgaggagaacacaccttggacctggatgacctgggtggcgaac
 ctctcagggctcctgctccactgacaatgcatgactaccacacctgggtgctcggggccctgcaagctcctcttccggcacttcagccagggcaggg
 40 tcttcaggccctcaaacaggttcaactgctggttactagccaagatgaggacaactacaacagatcaagcaagacttggccaactaaggctcacttgg
 gagaagctgagctctgggtgtacaaggccaaaggtcccgatgagcctatggacggagcctccgggtaaaatgagcataagaaaaccaggagggg
 acgagcaagccactgaaagcagagagcaccagcagctacaactaccgagtggtgaaagagattttgattcacttagcaagctctcgtgaggagag
 cgtgctggtaggaagagccggaagcagcagcaaacgactgctgaggaacatgggcgcacacgctgtggtgctggagctgctcagatcccctacga
 45 gaagccgaagacacaaagatgcaagagatcatggcgtgctcatgaattttgcaaatctctgtagcaggcaaccagagaatcaagcttctgcat
 aaacacataaacctgttctcaagccaggatcctggaggcagtgacgatgcacacatctcatgaaacttccagctgtgagtgatcaacgaga
 50 gagggtccagcactttgttactgcatagagaccacggctgaaactctggagagcagctcctctgttctacaatgacagagcctcttccagactctgatccagatg
 aaaaagtgccaagacatggtcactggctgagcttgcactctggagagcagctcctctgttctacaatgacagagcctcttccagactctgatccagatg
 atgctgctccgagcgtgaccggatggatgagaacaccctctcatgtaccacatccatctggaggagctcttggccgtgtgcacagagggcaagaaatg
 55 tacacggagatcaagtcaactcctctcccgtcgtgatgacatgctgtggtcactcatgaaactgcatccccagggttaagatgcttacatcaaac
 tccctgaatcactgctatgtgatacggaggtggagatgaaggagattacacaaagcaaccacatgtggaagttgttggaaatttctctgacatctgc
 agggcctgtaacaacacaaagcagacaggaagcagcagactccattctggagaagtacgctactgaaatcgtgatgacatgctaccaccttctcagc
 60 tctccctctcagaccagacaccactctgcagaccgccagcctgtcttctgcaactcctgcaaggcgttccgagttaccactgcaactggctgatg
 ccgagccaaaaagcctcgggtggagagctgcacccgggtgctctctgacgtagccaagagccggccatagccattcctgttgacctggacagccaagt
 caacaacctctctgaggtcccacaacattgtcagaacacagccctgaactggcgggttatcagcccgaacgccgctcgcagagactctgactggc
 agcatccagagactaccgaaatattgagagggttacaggacatcgtctgctccctagaggaccggctcagccctgggtcagcgtgagctgtctgt
 65 gctcgtggatgttctacacagaccagaactgctcttccccgagaacacggatgccagggaaatgtgagatggagggtttcactctcagcctaataaaa
 cataccaagcaactctggaggagaatgaagagaactatgcataaagtcttacagaccctcagggaatgatgaccaagacagaggctatggaga
 gaagcaaatctcattgatgaatggaaaatccgagctgccacagccggaaagctgagaactccacagagcaggacttgaaccaagtcaccacc
 ctgaggcaactggaagaccataaaagggtgagcactccgacaattttgtcaaccgttactatgaaacatcagaccttcaggaaagagagag
 70 ccttaccagcttggcaatggcccactatcaccaggaggaccagcaagcctgtgtggaggagggggagctcctgcatctgtccacaagcagggggtg
 agatgagcctggctgaggttcagctgacctcgacaaggaggggcctccaacctggtcatcgtatcataatgaatgcatccagtgaccgagattcca
 tgaagcattctgctggccatcgacttggaaaggaggcaaccaccatccagcactgttttctgcccgtgacagaagatagaaatcagagaag
 75 tcttcaagggtttttacatcgaatgaagggtggcccagcaggaaatcaaggcagacagtacagtgaaacaccagcacttgggaacaaaaagaaat
 gatgaagtgacagggatgcccgtctcggaaagaaagccaaagagcccacaacagataacagaagaggtccgggatcagctcctggaaagcactc
 gctgccaccaggaaagccttaccaccttccggaggaggccgacctgatgaccattaccagctctggggaggccaccagcctacaaccgacaag
 ccaaggtgacctagagatgagcgtgcatcaccatcatgacgctatctgccttctgagctgctgtgaaaccacaaccgagatctgcagaa
 80 tttcctctgttccaaaataaagaccaactacaatttgggtgtgagacactgcaatttctgactgtatttgggagcacaaccggaggccttggcttct
 ttggactgtacataaatgaaaagaatgtagcacttatcaacaaacctggagagctgacggagtagtcaaggccttgcattgagaaccagaactg
 catgccaccacagtgccaatggcatcgtatcatcagcccctatcctcaatgatacaacctctgggaaagaaagggatggacctggtttagaa

ctgaagaacaatgcttcgaagctgctactggccatcatggaagcagacacgatagtgaaaatgcagagaggatcctgtacaacatgagcccaaggga
gctggtegaagtgatcaagaaggcctacatgcaagggaagtgaattgaggatggggggaacgggagggatggagctcaccaggaacgtg
ggccacaacatctacatcctcgtcaccagttggctcggcataacaagaactcaaacatgctgaaacctggaggccaggtggatggggaagct
5 ctggagttctacgcgaagcagacacagcaaaatgagattgctgagactggaccggacaatggaacagatcgtcttccctgtgccagcatctgtgaattcct
gactaaggaaatcgaacttcgaatattacaccagagcgggatgagcaaggtagcaagalcaatgacttctcctcgtcctcggagaccttitaac
gagatgaactggcagaagaacttcgagcccagcctgtcttgactgtgtgcccgaacatgctttctggagcagcatccttcacactggccgtcct
gatgaactgctggggcgttttctatccattaaaggagtgaggggaggaaactagagccacactggtcaggcctcctgtggacagccatgctcatct
10 cctggccattgctgctcgtcccaagccccagcctcggccttaattgcttcaaatcctacgactgatattttcagttgggttcagcccaactg
ttctgtgggagccttcaatgtcgaataaaatcctcctgatgagcttgggcaactggggacctcaccagaggctaccggccatggttctgg
atgtggagttcctctatcattgtgtatctactctgtccatgggctctcgtcatgagttctctatagcttggctgttttgatttagtgcagagagg
15 agactttccttaatgcaataaaagtgcaccgcaatggacggctcactcttgacagcggctcctggctctgatcctggttacctgttcaattgtggct
atctgttctcaagatgactttatctggaagttagagttgcccgaatgaaacagctgttccagaacctggcgagagttggccaacgatttctctact
gatgtgtcagggttagagacgggggagaactgcacctcctcctgaccacaagaagagctgctcctcctcgaagaacggaacagataaagaacac
acgtgtgagacctgctcatgtcactgtcactgttctgagtcacgggtcggagtgggggaggggtaggagacgtgctcaggaacccatcaaaaga
20 ggagcctctgttgcctcaaggggtgatctacgacctcctctctctcatggtcatcatcctcctgaacctgatttccgggtcatcagacaccttct
gacctgaggagtgagaagcaaaagaggagagatctaaaaccagcttctcctcctggccttggaaagggaacagttgacaataagactgtcac
ctttgaagagacatcaaggaaacacacaacatgtggcactatctgtcttcaicgtgctgtaaaagtgaaggactccacagagtacaccggcctga
gagttactgtggcagatgatcagggaagaacctgattggtcctcagaatgagaccatgctcctggtcagcagcattctgaagggaacagaa
25 cgagctgaggaacctgcaaggagaagctggagctaccatgaagctgtcaccatcttctggccaactgtcagaactaaaggaccagatgacagaac
agaggagcagaacaagaatcggcctcctcagacatcctcctcactgaaatgcaaccacagcagccggcctaggcaaatgagcagagggact
ctgctcagccctgtatatactgtcaggggtgggtacggctcattgttctgatttgcctcactaagggtacatgtgccttagtataatgactagttt
tgtaltgtatgatgattgctattcctcagaggttggacttctgattgtaattgctctgtggcatggtgactgtcactcctcgaataatataaaatgctt
30 ttttggagactacagaaagtacctgattgcaactgaaccagattatgatttaaaagtatatgacatgtattttgattttaaactagaatgccagtatta
tgtttttataaaactgtgcaafacaattatgcaatcaccatacttctgaactcctgagtgctcctaaaggagtcacatcttgaagctgatttggatactc
25 tgaataaatggttaaatatacaatgctgctgctgctgcccataataatagcagatttctgcccctggcgaattttgacctgttaattatcctatggtga
tgctgttctcgtgtaagcalttagccctgtatctctgataactccaggtctgtgaaacctcaaacagcattcattttgagaaaagcaacttagt
tcaaggataattttaagcttcaaaatcaatcattaaagtgttctttaaagagccatgttagaggtcactttagcttgaaggaggtgatgaattaattttt
aaagggaactttttacatgacgttggaaataacagcatattgctgaccagtcagtctcctcgggtgaattttgatgtcacgtitacgcaaatgaggtgac
35 tgatgttcttagatttctcctcgaaccatgatgcatgtaggtaagaaatgattatgctgataatataacattatatacagcaaatgaggtgctcct
cttaggatgcatagctcccctaggttacgtagctgaacactgacaatggcgttctcctgaaagagccacglttgggtttatttcttctgacatgattcttt
ctggatgggtgcaaatgatacaggaagtgttctctctgctgccttggtttctgactcctgcttactagaccgtctctgcacaaaagttaaaactg
aaccgtatgcagagttccgaagcaagtcaagttgtaaatgatacctaaaaatatttaaaacatgatcagaatcct

SEQ ID No.32

35 MSDKMSSFLHIGDICSLEYAEGSTNGFISTLGLVDDRVCVQPEAGDLNPPKFRDCLFKLCPMNR
YSAQKQFWKAAPGANSTTDAVLLNKLHHAADLEKKQNETENRKLGLT VIQYGNVIQLLHLKS
NKYLT VNKRLPALLEKNAMR VTLDEAGNEGSWFYIQPFYKLRSIGDS VVIGDKVVLNPNVAGQ
40 PLHASSHQLVDNPGCNEVNSVNCNTSWKIVLFMKWSDNKDDILKGGDVVRLFHAEQEKFLTCD
EHRKKQHVFRLRTTGRQSATSATSSKALWEVEVVQHDPCCRGAGYWNLSLFRFKHLATGHYLA
EVDPDFEEECLEFQPSVDPDQASRSRLRNAQEKMVYSLVSVPEGNDISSIFELDPTTLRGGDSL
PRNSYVRLRHLCTNTWVHSTNIPIDKEEEKPVMLKIGTSPLKEDKEAFAIVPVSPA EVRDLDFAN
45 DASKVLGSIAGKLEKGTITQNERRSVTKLELDLVYFVVTGGTNSGQDVLEV VFSKPNRERQKLMR
EQNILKQIFKLLQAPFTDCGDGPMLRLEELGDQRHAPFRHICRLCYRVLRHSQQDYRKNQEIYAK
QFGFMQKQIGYDVL AEDTITALLHNNRKLLEKHITA AEDITFVSLVRKNRPRFLDYLSDLCSVM
50 NKSIPVTQELICKAVLNPTNADILIETKLVLSRFEFEGVSTGENALEAGEDEEEVWLFWRDSNKEI
RSKSVRELAQDAKEGQKEDRDILSYRYQLNLFARMCLDRQYL AINEISGQLD VDLILRCMSDE
NLPYDLRASFCRLMLHMHVDRDPQE QVTPVKYARL WSEIPSEIAIDYDSSGTSKDEIKERFAQT
MEFVEEYLRDVVCCQRFPSDKENKLTFFEVVNLARNLIYFGFYNFSDLLRLTKILLAILDCVHVT
55 TIFPISKMTKGEENKGSNVMRSIHGVGELMTQVVLRGGGFLPMPMAAAPEGNVKQAEPEKEDI
MVMADTKLKITEILQFILNVRLDYRISCLLCIFKREFDESNSQSSETSSGNSSQEGPSNVRQALDFEHI
EEQAEGIFGSEENTPLDLDDHGGRITFLRVLHLTMHDY PPLVSGALQLLFRHFSQKQEVLFQAFK
QVQLLVTSQVDNRYKQIKQLDLQRLSIVEKSELWVYKQGQDPDEPMDGASGENEHKQTEBGTSK
60 PLKHESTSSYNRYVVKELIRLSKLCVQESASVRKSRKQQQRLLRNMGAHAVVLELLQIPYEKAE
55 DTKMQEIMRLAHEFLQNFCAGNQONQALLHKHINLFLKPGILEAVTMQHIFMNNFQLCSEINER
VVQHFVHCIEHGRNVQYIKFLQTIKAEKGFIKCCQDMVMAELVNSGEDVLFYNDRASFTL
IQMMRSERDRMDENSPLMYHIHLVELLAVCTEGKNVYTEIKCNLLPLDDIVRVVTHEDCIPEV

KIAIYNFLNHCYVDTEVEMKEIYTSNHMWKLFENFLVDICRACNNTSDRKHADSILEKYVTEIV
 MSIVTTFFSSPFSQSTTLQTRQPVFVQLLQGVFRVYHCNWLMPQS KASVESCIRVLSVAKSRA
 IAIPVDLDSQVNNLFLKSHNIVQKTALNWRLSARNAARRDSVLAASRDYRNIIERLQDIVSALED
 5 RLRPLVQAELS VLVDVLRPELLEFPENTDARRKCESGGFICKLIKHTKQLLEENBEKLCIKVLQTL
 REMMTKDRGYGEKQISIDSENAELPQAPEAENSTEQELEPSPPLRQLEDHKRGEALRQILVNRV
 YGNIRPSGRRESLTSFGNGPLSPGGPSKPGGGGGGPGSSSTRGEMSLAEVQCHLDKEGASNLVI
 DLIMNASDRV FHESILLAIALLEGGNTTIQHSFFCRLTEDKKSEKFFKVFYDRMKVAQQEIKATV
 10 TVNTSDLGNKKKDDDEVDRDAPSRKKAKEPTTQITEEVRDQLEASAAATRKAFNTFRREADPDDH
 YQSGEGTQATIDKAKDDLEMSAVITIMQPILRFLQLLCEHNHRDLQNFRLCQNNKTNYNLV CET
 LQFLDCICGSTTGGGLLGLYINEKNVALINQTLSELT EYCQGPCHENQNCIATHE SNGDIITALI
 LNDINPLGKKRMDLVLELKNNA SKLLLAIMESRHSENAERILYNMRPKELVEVIKAYMQGEV
 EFEDGENGEDGAASPRNVGHNIYILAHQLARHNKELQTMLKPGGQVDGDEALEFYAKHTAQIBI
 15 VRLDRTMEQIVFPVPSICEFLTKESKLRIYTTTERDEQGSKINDFFLRSEDLFNEMNWQKLLRAQ
 PVLWYWCARNMSFWSSISFNLAVLMNLLVAFFYPFKGVRGGTLEPHWSGLLWTAMLISLAIVIAL
 PKPHGIRALIASTILRLIFS VGLQPTLFLLGAFNV CNKIIFLMSFVGNCGTFTRGYRAMVLDVEFLY
 HLLYLLICAMDLFVHEFFYSLLLFDLVYREETLLNVIKSVTRNGRSIILTA VLALILVYLSIVGYLF
 FKDDFILEVDRLPNETAVPETGESLANDFLYSDVCRVETGENCTSPAPKEELLPAEBETEQDKHEFT
 20 CETLLMCIVTVLSHGLRSGGVGDVLRKPSKEEPLFAARVIYDILLFFFMVIIIPLNLFQVIDTFA
 DLRSEKQKKEEILKTTFCICGLERDKFDNKT VTFEEHIKEEHNMWHYLCFIVLVKVKDSTEYTG P
 ESYVAEMIRERNLDWFLMRAMSLVSSDSEGEQNELRNLQEKLESTMKLVTNLSGQLSELKDQ
 MTEQRKQKQRIGLLGHPHNMVNPQQA

SEQ ID No.33

25 ggcacgagccgagttggaggagcagcggcagcggcagcggcagcggtagcggtaggagcggctgtgcagccaaggaaccgggacagcgaag
 cgacggcaggtcgagctggatcgagggagcctggagctggagcttcagagggcctgaagccagcctgggagaggaaggaagcagcggc
 acccgaggtgaagctgagagtgagcgtggcagtaaaatcagcagacagatggacagtgacaggaacgtcagagagattggcctcgtcgcg
 agagtcagcctggagtaaggttgacaagtgtgagaaagacagctgggagcggtagcgcggagggagagccctgtctcagtcaccccg
 30 ttgatggagacagatggacagcggcagcggcagtcacctctttaaaccttggatagtgctcttggctctgctggacacctgtgggattta
 gccattcttgaactcatttcttaaacgtaaactcggcgcagctgtgcgagccagctcctctgtggcagggcactagagctgcagacatgagtg
 agaggctaccagtacagcactgtacgactacaagaaggagcagaggaagcattgacctacacctggggacatactgactgtgaataaagc
 tccttagtgacactgtgattcagtgatgccaggaagcccggcctgaagatattgctggttaaatggctacaatgaaacactggggagaggggagac
 35 ttccaggaacttacgtgaatacattgaaagaaaagaattcaccctactcccaagcctcggccccctcagccctctctgttccgggttcttaa
 aaactgaagctgacacggagcagcaagcgtgccccctcctgacctgcccagcagcttggccccctctgattgccccctcctctctataaagctcctg
 gaagccattgagaagaaggactggaatgtcactctatacagaacacaaaagctccagcaacctgcaaatcagacagctcttgattgtgagctg
 40 cgtcagtgacttgagatgacgactgacagctttagcagatgcttcaaacgctatctgccgacttaccaaaatcctgtcattctgtagctgtttacaat
 gagatgattctttagccaaactacagaccctgaagactgcatccagctgtgaagaagctcattagattgctcctaatacctcatcagtggtgctta
 cgctcagatttctcaagcatttttcaagctctcaagcctccagcaaaaacctttgaaatgcaagagctcctctgagatttcagccccgtcttccag
 45 atttccagcccagcctctgataactgaacacctataaaagcgatagatttatactcaacggaatggaatgagagacgccagcaccagcactg
 cccccaaaccaccagcccactactgtagccaacaacagcagatgaacaacaatgctcctgagagatgctgaatggtagggagacatctcaag
 gaagaagtgaatgaaaactccgagacactgctgagggaccttttggtagagacgcatctactaaaatgacggcgattacactcttacacctagga
 50 aaggaggaatacaaaatcaaaatcttaccgtgatggaaaatattggctctctgacccataaacctcaactctgtggtgagttataaaccactac
 cggaaatgagcttttagctcagfacaaccccaagctggatgtgaagtgctctaccagtgctcaaataccagcagatcaagttgcaagaagataatf
 gaagctgtagggaataatcatgaatataactcaatitcaagaaaaagtcgggaatatgatagattatgaggagacacccgtacttcccagga
 55 aatccaaatgaaaaaacggctatcgaagcatttaataaaccataaaatattgaagaacatgcaaacccagggagcgtacagcaagaatcat
 agagaagttaaacggaagcaacgagaagaattcaaaagattatgcataacctgataagctgaagtcgctatcagtgatcattgacagtag
 gaggaggtggaagaagactgaagaagcagcagctgagtagcagagatcgacaacgcagatgaacagtattaagccggacctatccaggtgaga
 aagacaagagaccaatactttagtggtgacgcagaaggtgtgcccagagaagctgaacgagtgctggggaatgaaaataccgaagatcaat
 actccctggtagaagatgagagattccccccatgacgagaagcgtggaatgctgggagcagcaaccgaaacaaagcggagaacctattgcg
 50 agggaagcagagcggcacttctgtccgggagcagtagaagcgggctctatcctgctccgtagtgtagagggcgaagtcagcattcgtcat
 taacaagactcccaccggctatggccttccgagccctacaacctgtacagctccctgaaggagctggtgctacattataacacacctccctcgtcag
 cacaatgactccctaatgtcacactagcataaccagtatatgcacaacagaggcagatgaagcctcggatccagttccacacctcaagccacc
 caaggcctctgagaagcaaaaggctcctccagcccacgtgtgaactgagctgcagaatgaagccgctgctgcacatgggactagagctttctt
 55 ggacaaaaagaaagtcggggaagacacgcagcctcggactgtggatgaccagacgtttcctaacctatcctctttctttctttctttctttctt
 tttctttctttctttctttcttaattaaagccacaacacacaaccaacacacagagagaagaatgcaaaaatctctccgtcagggacaaaag
 gcccttaacctggtgcttgaacgcttttgagctttaccagctacaagctgggactttggagaccagaaggtgacagggccggaagcctcgcct
 gggccgcttgctcagcctggtgtagcctgggtgctgctgggtggtggaaccagacacatcactgtgattattccttttaaaagagcgaatgat

atgtatcagagaccgcgctgctcacgcaggacactttagagaacattgatgagctgttcggaggaaaaatgaaacaccagaaaacgttttgttt
aacttatcaagtacgcaaccaacaaccaccaacaagaaaaa

SEQ ID No. 34

5

MSAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDILT VNKGS LVALGFS DGEAR PEDIGWLN GYN ETT
GERGDFFPGTYVEYIGRKRISPPTPKPRPPRPLVAPGSSKTEADTEQQALPLPD LAEQFAPPDVAP
PLLIKLEAIEKKGLECSTLYRTQSSSNP AELRQLLDCAASVDLEMIDVHVLADAFKRYLADLP
NPVIPVAVYNEMMSLAQELQSPEDCIQLLKKLRLPNIPHQCWLT LQYLLKHFFKLSQASSKNLL
10 NARVLS EIFS PVLFRFPAASD NTEHLK AIEILISTEWNERQPAPALPPKPPKPTTVANNSMNNNM
SLQDAEWYWGDISREEVNEKLRDTADGTF LVRDASKMHGDY T LTPRKGGNNKLKIFHRDGKY
GFSDPLTFNSVVELINHYNESLAQYNPKL DVKLLY PVS KY QDQVVKEDNIEAVGKKL HEYNT
QFQESREYDRL YEEY TRTSQEIQMKRTAIEAFNETIKIFEEQCQT QERYSKEYIEKFKREGNEKE
IQRIMHNHDKLKSRISEIISRRL EEDLK KQAEYREIDKRMNSIKPDLIQLR KTRDQYLMWL TQ
15 KGV RQK KLN EW L GN ENT ED QYSL VEDDEDLPHHDEK TWN V GSSNRNK AENLLR GK RDGTF L V
RESSK QGCY ACSV VVDGEVKHCVINKTATG YGFAEPYNL YSS LKELVLHYQHTSLVQHND SLN
VTLAYPVYAQR R

SEQ ID No.35

20

ggaaggatgaggcggcggcggcggggtccgggggctccgggggtccgggggctccggggcctccggctgctgctgctgctgctgttgctgagcgg
ccgcccgggggtgcagcgccatcagtgcccacggctgtctgaccgcagactttgctgcatctggaagctgtattcaggatgcttgtttgaca
gtgcccagcaggatggggcaggcacggcccctcttacaagtccctccaggcttccagcgctcaagggtgtctccggcaactcatgtcccag
gctgtctgcatgatgacitaccagcatgtgtctccagagatggaacgcatccagccttgcctcccccagagccccatcaagggcagaggt
25 ctgtttggtgcccagaaaccaggccctgcagggaattgctaactcagggaatcactctctgctgctgctgctgctgctgcccaggcttccaaggctgc
aggggacggagctggggcggctcccactgtcctctctgagcgtgagtgttaccctctcttgagcactgtctaatccccacagcctccac
ctgctctgacctatgaaacctgactcaagccttacctctccaccagtttggctcccagatggctccggggctcagagagcctctggttagt
ggtggtgactgtccaaggctgaaggtcctgcaactcagcaagtgctcctcaaggccatgtgggactcaactgacactctgtgggactct
acaggtccctccactgcaacttccaagattcagggtgtctcatatgcccgaagtggccgtgctggcagagccccggcaccaagggtgcca
30 gagaatggggcacaaggcagagactctcagaggccatgaggagaagtactaggggtggtggggagaagttccctcccgaagcagcaca
accagaattgagctgcagagattgactgtgtctgagggatgagtagagctgctgacttgaccccgagcagtttctacccttgaccctgat
gcagtgctgcccaaggcacagaagaatctgaagggctgtaaatgtggaggagccgatgcaagaaaatacaacagatgcagagagga
gaccagcagaagctgccccacacccctgcttctggctcctcctcagtccttgagaagaagaatgtccctggccaagccaagcaggtggtggaagc
35 gccaacgctgacatgcccagggatgaggtatggtatctcactgaccagaaacctgagcctggtggctggagtgagctgagatgctggagattctgcc
tgagcagctgcatgtctcggtagctttatcaacatcagtggtgggaccagctgtcactccgaatccggcacaatgagcagaacctgtcttggc
agatgtagccagcaagctgggtgtgtagctgaactggaagcgcagacagggctccagatttgcagacaggggtggagcagagggaggaaagc
agctgaagctctcccacaaagccatggcatatcccatgcgtcagtgtgtctactctagtgcccctggcaggcgtcgtggcctgctagtggct
tggcagtgcccgtgtgatgccatcattgcagacagcgggataaggcgcctggcagcgtggggccggaggggcccatggtgactactt
40 gagtaccaggactgtgtgcccagcatgcccacaaggtccctgttaaccggcgagggtcagccagagccttctaggtgagcagtggtgctc
ccagltcagcgagcgcccagggcagccccagttcccaacagagctcctatctggtgcagagccccgcccagccaactgacatctccaca
ggacacatgallctgcatatagtagggtacccttccaaccgggacggggtggccaagagtgagcaggtctgtgctaccacaagcagagccaa
acactgtgcccggcacaggatgagagcaacatcaagaagaaccgcatctgacttctaccctatgacctgcccgaatcaagctgaaagtgagg
agcagcctctcggagtattacatcaacgccagcccatacagcagcattgacccctggatgccgctcatagccacagaggaccactgcccc
45 caccatgcggactctgacagatggtgtgggagagtgctgctcactgcaatgtctgacctggggggagcggtgcaaacagtgtagccgc
tactggcggatgaaagtctcctctaccagcttatgaggtgaacctgtgctggagcacatctggcagagacttctggtggagcttaccct
aagaacctgacagccagagagcgcacgctcactcagttccctcctcagctggcggcagagggcactccggcctccaccggcggctgctgg
actccgaggaagtgacaagtgctacagagcccctcctgccccatcatagtgactcagtgacgggtgagggagagcagcacctacatcct
atfgacatggtcctgaaatgcagtgccaaaaggagtaggagattgataatgctccacctggagcatlccgtgaccagcggcctggaactgtccgtt
50 ctaaggaccagttgattgtgctgacagcgtggcagaggaggtgaatgctatcctaaggccctgccccagtgaccctggcgcctcagtg
ggcatctgcccctcctcctgctgtgtgagcactgtgaccaccctcaccctcaccatctgcccacttggctgacttgcccattggggagcctt
tcccacccagtggagggagtgagggaagggagggtaggctgcccctgtttatccatgctagaaacatggatcccattgggaagcagaca
gcaggcaaggagggctgtgacacggccacagggtgcccaggccccatcactcagtgctcctctctgataatgctgctcccactccc
accagctaccacatatagaaaagcagaacgggaacccccagctccccaccctgctaccactggcctccacctgaccctgctcaacctctcc
55 ctctagcacaagggacattctagaaaagtaaatctactttgtatcagtgtaataaagttagtggtgtctgtgc

SEQ ID No. 36

MRRPRRPGSGSGSGGLRLLVCLLLSGRPGGCSAISAHGCLFDRRLCSHLEVCIQDGLFGQC
 QAGVGVQARPLLQVTSVPLQRLQGVLRQLMSQGLSWHDDLTHQVISQEMERIPRLRPPEPHPRDR
 SGLVPRKPGPAGELLTQGNPTGSSPAAQGFPRPAGGRSWGGSPSSSLQAELLPLLEHLLMPPQP
 5 PHPALTYEPALLQPYLFHQFGSRDGSRGSESSSGVVGVGHLSKAEGPALFSRSASKAILGTHSGHS
 FGDLTGSPSAQLFQDSGLLYMAQELPVPGRARAPRLPENGGNRAEDSSEGHEEEVLGGRGEKSP
 PQAAQPELSQLRLTAVLAGYGVELRQLTPEQFSTLLTLMQLLPKGTGRNLEGAVNVGGADVVK
 TIQQMQRGDPAEALPPTPSLPGYLTASPASSEVQQVLSPGFPEPHTPSPLGSSSVLLEKKSPLGQS
 QPTVVVGRPSARPSAEEYGYIVTDQKPLSLVAGVRLLEILAEHVHMSSGSFINISVVGPAVTFRIRH
 10 NEQNLADVTQQAGLVKSELEAQTGLQLQTGVGQREEAAEVLPRQAHGISPMRSVLLTLVAL
 AGVAGLLVALAVALCMRHHSRQRDKERLALGPEGAHGDTTFEYQDLCRQHMA TKSLFNRAE
 GQPEPSRVSSVSSQFSDAAQASPSHSSSSPWCEEP AQANMDISTGHMILAYMEDHLNRNDRLAK
 EWQALCAYQAEPN TCAAQDESNIKKNRHPDFLPYDHARIKLVVSSPSRSDYINASPIIHDPR
 MPAYIATQGPLSHTIADFWQMVWESGCTVIVMLTPLVEDGVKQCDRYWPDEGSSLYHYVEVN
 15 LVSEHIWCEDFLVRSFYLNLTQETRTLQFHFLSWPAEGTPASTRPLDFRRKVNKCYRGRSCP
 IIVHCSDBGAGRTGTIYLIDMVLNRMAGKVKEIDIAATLEHVRDQRPGLVRSKDQFEFALTAVAE
 VNAILKALPQ

SEQ ID No.37

20 cggcgggaggaaagcggcgtgaagccagattaggagcagcagcacttgggacttagggccacaggacaccgcacaagatcgaccacttttct
 ggagaaccgcagaacggcacgctggggtcgtgggctggccatggtgatggaggtggcatcctggacgccgggggctgcgcgcgctgctg
 gagagggcgccgcgagtcctgttggattgctgctctctccttcaacggcgccacatcggggctcagtgaaactgctcagcaccat
 cgtgcggcgccgccaaggcgccatgggctggagcatalcgtgccaacgctgaactcgtggccgctgctggccggagcctaccacggcgt
 25 gctgctgctggacgagcagcgcctccctggagcgcgcaagcgcgacggcaccctggccctggccgcgggcgcgctctgcccagaggcgcgc
 tccactcaagctcttcttcccaaggagatagcgttttggcttctgcccctgagcgtgagcagcaaacagtcacccccacgggctcagcctccc
 cctgagtagtctgctgacagtgcaaatccggatgacgctcctgtagtaccctctctacgatcaggggggcccaagtgagatcctgctcctctgt
 acctggcagtgccatcacgcttccggaagatagcttgacgcttggcaccgacctgatcaactcctcagccaattgctcaaccactttgagg
 gtcactaccagtacaagatccctgtggaggacaaccacaaggcagacatcagctcctggttcaacaggctatgactcatagactccatcaagg
 30 atgctggaggagagtggttttcaatgcccaggccggcatctcccggcagccaccatctgcttgcctacatgaggactaacgggtaagctggac
 gagcctttgagtttgaaagcagaggcggatcatctccccgaactcagcttcatggccagctgctgagtttgagtcocaaagtgtgagccctca
 ctgctctgctgaagctgggagccctgcatgcttgcaccgggacacctactaccacagcttcaacttcccgtttccatccccgtccacccac
 gaacagtgccctgaactacctaaagccccatcaccacctccaaagctgctgaaaggcaaggagggtgagtttcaactgccaocgggctgcca
 ctccctctgtgggaggcaatgcaataacttgggagaggctcatggagctggtcctattatttaacacccccctaccccccaactcctcctgagt
 35 ccactgagttcctaagcagtcacaacaatgactgaccgcaagacatttctgaaactcggcacattcgggaccaaatatttgggtacatcaagtcctc
 gacaaaacagggcagaagaaaggactctgtttgaggcagtttctgctgctgttttttttctagaacttcatgctgacacaccaccagtataa
 ccattcccgatgacatgcgctatgagattttacctttatttttgttagtgctggtgttctgcttccaaaatgcttactctacatagaagaacca
 atacctcaatttgtttgctgactgactatctgtaaatagaccagagcagtttcttgcgactgacagacaaagccagtgtaggtttgtgacttca
 40 gttatcgacagttgtattgtttatgatctgaagtaataatttcttctgtggaagacatttctgactgggagactttttatacaacaagaataatga
 acgttctattga

SEQ ID No.38

45 MVMEVGILDAGGLRALLREGAAQCLLLDCRSFFAFNAGHIAGSVNVRFSTIVRRRAK GAMGLEH
 IVPNAELRGRLLAGAYHAVVLLDERSASLDGAKRDGTLALAAGALCREARSTQVFFLQGGYEAF
 SASCPPELCSKQSTPTGLSLPLSTVPDSAESGSSCSTPLYDQGGPVEILSFLYLGSAYHASRKDM
 LDALGITALINVSANCPNHFEHGYQYKSIPVEDNHKADISSWFNEAIDFIDSIKDAGGRVVFVHCQA
 GISRSATICLAYLMRTNRVKLDEAFEFVKQRRSIUSPNFSFMGQLLQFESQVLAPHCSAEAGSPAM
 50 AVLDRGTSTTVFNFPVSIHVHTNSALNYLKSPIITSPSC

SEQ ID No.39

55 ataccatcaaatgaagcaccaaaagacaactgtgtgagcggccctgggctggctcattcttaatcatattgccatcttactgctctgattcctagatccc
 cgcaatgactctgataatgtcaccatgcccaggcactgtgggcatgagccacagcagcgtggagtagcctgctgatgccaggcatctgatgtg
 ccagaaggatccccaccctgcaacctccgaacccggcactctactgctcggagagcactgcccgggacgtggctgctccgactccacagactcg
 gtcatctctctgagctggaaacactactaccgagtagtcttataggggagcaaggagtgggcaagtcacccctggccaacatcttgcaggtgtcga
 tgacagcatggacagcactgtgaggtctgggagaagatacatatgagcgtaccctggtgtgacggagagagtgcaaccattatcctcctgacatg

5 tggaaaaataagggggagaacgaatggctccatgaccactgcatgcaggctggggatgcctatctgaicgtctactatcacagaccgtgcaagcttc
 gagaaggcatctgagctgaggattcagctccgagggcccggcagacagaagacattcctataatttggttggcaacaaaagcgacttggcgggtg
 cgagaagtgtctgtcagaaggagagctgtgctgtggttgcgactgcaaatcagcagacctctgaggctgtgcagcacaacgtgaaggaaactgt
 10 tgaggcattgagcgacaggtgcccctgcccaggggacagcaaggagaagaatgagaggaggctggcctaccagaagagcggggagagcattccc
 aggaaagccaggcgtcttggggcaaaaattgtggcaaaaacaacaagaacatggcttcaagctccaagtcaaaatcctccatgacctgtctgtctct
 aggcaccacagtgtcaccagatgtcccttgggtgacatcgttgaaggctattggaccagtgatctatattagattggatacataagcattgttagacgcaa
 ctccccctatggcagatggaaaccaacagggttagccttggggcaaccaagtgcacgggcaatgaatgagctctgtcaagagtcagattattcatagga
 15 aaagcttgagctgctacgtggatgtctcagactcatttaagacacgcttgggttcacatgagtttctctccttggacagcagaatatttttccctcaggtt
 gttccatgtgatttcgaggtccttgggtcatatagaaatgtagggaaatggcgtgatttttggaggagaagggtcactgcatactatataccctgaaac
 gacatcttagagctggcctcatcagatgtgactatttctgctcagtgaaagaattgtagattgctgaaactgaggcttactaacagttttgtttaa
 gaccacagagattgtagactaggagctatattgactactataggtcaaaaattgttactatgtctgtagaaggtttatttgggaaactattttttt
 ttgcaaaattctcatgcaaatcattctctgtctgtttttaaatacattaagctatcaaaaatatttttaaaaaaatcacaactatgtataacctgcag
 20 tgcaaaattttaaataatgctcgtttttcccccaaacataaacatgccccatccttgggttgcctctgtatgccacagctgaattatatttttgaataa
 ccattttatattgataaagattatagcatttctactgagaaaatgtctgtttattaccittttatattttcaagtatcagttttacattgtctataat
 25 aaataaataaatctttgaaaagg

SEQ ID No.40

20 MTLNNVTMRQGTVGMQPQRWSMPADARHLMVQKDPHPCNLRNRHSTAPEEHCRRTWSSDS
 TDSVISESGNTY YR VVLIGE QGVGKSTLANIFAGVHDSMDS DCEVLGEDTYERTLVVDGESATI
 ILLDMWENKGENEWLHDHCMQVGDAYLIVYSITDRASFEKASELRIQLRRARQTEDIPILVGNK
 SDLVRCREVS VSEGRACA VVFDCKFIETSAAVQHNVKELFEGIERQVRLPRDSKEKNERRLAYQ
 KRRESIPRKARRFWGKIVAKNNKNMASSSKSKSCHDLSVL

25 SEQ ID No. 41

30 tatcccgcigtgtgcaagccggctgcatcttagttggccatgaagaccagcacagcggtgcacctctccactgtttgtgctcttgggtgagtg
 tgcccaggtatcggtgcaacgagacagggatgctggagagctgcctcgctgtgggaaagccttcgctgacatgatgcagaaggtggctgctgga
 agtggtgcaacctgtcggatcctgtgtattatgaaagcttcaactcaccagatggagaccaatcatggctgctactggccaaccgctg
 35 gccagagcttcaactggaaatccacaggeagtttttccaactgcacgggtggacagggaccactgggaaagacccccggatgaagtactatccca
 ctgacgcgggtctctgtgctgactgtggctatggctggcctgtgtgtggcgcagcaagcacactgacggctgctgtgagatctgtggatgga
 ggccatcctgagcggctgggagaatgtgtcagagctcagagctggcagactggctctgtctgtttgctttggccacacctaccctggccatg
 ccaaagtctcccagcaggtgtgtgcccctgctgttagcctgcccgtgctgggttcagattgcccatacttgcctttctgggctaagtgaaga
 40 aagtgacaatcccaagtttggaccagcagatgaaatcaactgtgctgagccccgctccccagcctgggtccctgattttagccgtttctggcaga
 gtcttgcagcctgaaccccgcccaaggctcctgacccattctagctcctgacctgacctggccaagagaggcagggcaaggtcactc
 gaagatgtgagccccccgcttattcaagagactgagcacatcattatcagacatgaaggatagcctggggctattaggaccacgtgtgacct
 ctgaccacctgctctctctctgtgatctgtcacgattctgtccagtgtggcgtggagctgtggctgttttagccctcaagacaccctccaggt
 agagcgtgaacctcctcttgagggttattcctggagtgggcgcactgagtgctcaagggtctgtctgctgatgtcagttcttttgattaaagtct
 ccttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

40 SEQ ID No.42

45 MKTPAQLRHLLPLLLL CGECAQVCGCNETGMLERLPRCGKAFADMMQKVA VWKWCNLSEFI
 VYYESFTNCTEMETNIMGCYWPNPLAQSFTHIHRQFFSNCTVDR THWEDPPDEVLIPLIAVPVV
 LTVAMAGLVVWRSKHTDRLL

SEQ ID No. 43

50 atgctcaacaaagccaagaattcaagagtgcccagggctgtgctgtctcgaacacctgggaacacgtgcttcatgaactcaattctcagtgctgag
 caacaccgagagctgagagattactgctccagaggtgtacatgcgggacctggccaccaccagcagcgtcacacggccctcatggaagagttt
 gcaaaactaatccagaccatagagctgctccccaatgatgtgtgagccatctgagttcaagaccagatccagagatgcccacgcttcatgg
 gctataatcagcaggatgctcaggaattcctcgtttcctctggatggtctccacaatgaggtgaaccgggtggcagcaagcctaaggccaaccctga
 gacctgatcatctccctgatgaagaaaaggggcagacatgtggaggagatcttggaaagggagacagtcggatggggaicctctcgtgggca
 55 gctgaagagctccctcacatgcaccgattgtggctactgctctacagcttcgatccctctgggatctctggtcccatcgaagagagaggttacctga
 ggtgaccttaatggattgtatgagctctcaccaaagagacatattggatggtgatgagaagccaactgctgccgctgccgagccagaaaacgatgc
 ataaaaaagtctctcagagggttccaaagatcttggctccacctgaagcattctcagaatccaggatacgaaccagcaagctcacaacattgtg
 aattcccactaagagacctggacttgagagaattgctcagaaaaccacacatgctgtttacaacctgatgctgtgtccaatcactccggaccacc

atgggaggccactatacgcctactgccgaagtcgggttacaggcgaatggcacacttcaatgattccagtgacacccatgtctccagccaagtgc
gcaccagcgacgcctattgtctctatgaactggccagtcaccctcccgatgtagcattgaggagctggccctccctctccctgtggtgcccc
acgtcctaag

5 SEQ ID No. 44

MLNKAKNSKSAQGLAGLRNLGNTCFMNSILQCLSNTRRLDYCLQRLYMRDLGHTSSAHTALM
EEFAKLIQTIWTSSPNDVVPSEFKTQIQRYAPRFMGYNQDAQEFLRFLLDGLHNEVNRVAARP
KASPETLDHLPDEEKGRQMWRKYLEREDSRIGDLFVGQLKSSLTCTDCGYCSTVDFPFWDLSP
10 AKRGYPEVTLMDCMRLFTKEDILDGDEKPTCCRCRARKRCIKKFSVQRFPKILVLHLKRFSESRI
RTSKLTTFVNFPLRDLDLREFASENTNHA VYNLYAVSNHSGTTMGGHYTAYCRSPVTGEWHFF
NDSSVTPMSSSQVRTSDAYLLFYELASPPSRM

SEQ ID No.45

15

gcggagcgtgagctgtgcgagcgcgagcgcgagcatagcctgcgagcgcgagcagagagaaaagagcgggcaagagagcggcgaaggcgcct
gcgcgatctcggccctaagcccgcggcgctgagccagccgggacggacatgcggggaggcgccggcggtcccgctcccttgggggaat
gaaagctactggtgacttaaaaacacctgggctttacaaattgaagcctccagagtggggcacaatgtcaacagcaggagtgtgctcaggatatt
cgagtccttaaaaaactggatttccataatggctcagccctggggaatgatgaagtcctgctgggcagtcacagtgaattgaaaataacttttaaat
20 tgatcaataaccatggcctacaatctgaactcccctgctcaggacacctaacaactgttgatgtgctgctcggctcctccaggagcggccactctt
tgcagagtgtgctcctcaaggtcaagctgcccccttcttatcaccagtgaaagctcgggacagcgtgaagaggatcaagttatgtgtggttt
aagaaactctcagtgaaagggtctgcactccacacctccacttacaccattaagagctgcccttcccccttccctgtgcggctctgtgtatcggggt
ctcgccgctcccgcactgccatctctgaagacctatgtgtggatgagcggcagcagtgaggtagagcttaaccaccagctcagacacagacttgc
ttagaagactctgcctcagattcaaatagatgctcctggcagcgcagctccggtgggtgcggccagatcaactatgcatatttgacagcccaac

25

tgcttctgtggcagatcttagctgtgcatcaccagaacagagtggtccagaccaaacctccccacctaagaaccatcgagatgaaggaggtctc
actcaggaccagctgggtcattacaagccagccattcggatctagctgcacacacagagcttctcctagctctgatgaagcaagcctgaggtcct
cccagggttctatacctctagccagcaaaagccagactatagcaggtgctcagctccaacacctaagctgagatgaagataagcctcctcc
aaagtcccccgagagaaccttctctcggagtaacctccctaccccaagctctaaagccttccgcttaccctcaatggggtcagccccaacacaga
gcttcgctcctgacccaagtgtgcaagcagcaaaagccctgcagagacagcagcgaaggatctgccaacaaggctcctgcatcctgcccattatga
30 aaatgggaagaaggttagctcaacgcattactactactcagagaccctgacccaataatgaaaagtatttaagggaagcagaagaaca
aacccaagcaccacaattcagccattactctgctgctgtggtatgctcctgcccacagaaaagctggcctccagaatgaaaatagatgggtagccac
gggaaagcgaacactatctcagctgtgttccataaatatggggctcatgattcaacagaagttacatgggatgaatggctcccagtttccagttgag
gtctgtagaacaatgtcaagtggaataatgaagtggtgactccgcttaatgagaaaggcttagagcagttatgagtgctgtatgctgggagctcc
gatcatcagcataggaagaaatgatgatttaagatgtgtagggggaaggaaatgggcaactttacattgactacattatatacctatgataaa

35

agtgcggtgtaaccatagaccatagctcaggaataccaattagcactctagagtaattctgattcaagaacattcaaacagctggggaacagctcc
tgatgtgtgagaattgagcaaatgggagaaagcaatattgttagatcagattataaattgttaagtttaagattcctggcatcagccctgctctataaatt
lgtttccccctccctgccagcagcttccatcacgacagggcgtgttccaccagccctgtaacatctgttgagatcatttctatggccaataactgt
cgctctggggttctgtgtgaggagaggacagcgttctgaccatgtatcacctgtgtgtctcatalcttggaaattgacagattgtgtaataact
40 ttccatacttctctgttccatccactgaaacagcctgtgtagcaagagccttcaagagtgcaaggatgtgcgctggccatcagttgtgggtctg
agtttgatagactagtgcagcgtacccatagattgagagccttgggatataatgtgtgtgttttttttagacttaataaaggacaacacagc
tggctctgtgtgctgttccatcagtttctgggattgttcttttaagtgaaacacttctgaccaatagcacagaacgcttaatgccagaggctcact
tcagcatcttctgcttgaanaactcagctgctcctcactgacctgaaitcagtgagacagcagttgtgttcagttttacatcctctgaltgtttatctg
tgcagataaacacaagaagaggtgctgtagcagggacactgctccatgtccaacaagctgttcagtttaaacctgtaagacattttgagctat
ftaaagcttactttagtaactaaatgaaggtaaaacatgcttgaaaaaatgcactgatcctccgactgtgtgtacagattggacaaggaatttattcatt
45 itgttcattattttgaatattgtcttttcatttaataaagttatattactatitagaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID No. 46

MSTAGVAAQDIRVPLKTGFLHNGQALGNMKSVCWGSSEFENNFNLNIDPITMAYNLNSPAQEHLL
50 TVGCAARSAPGSGHFFAECCGSPRSLPLVISPSESSGQREEDQVMCGFKKLSVNGVCTSTPPLT
PIKSCSPFPFCAALCDRGSRLPLPISEDLVDEADSEVELLTTSSDLDLLEDSDAPDFKYDAPG
RRSFRGCGQINYAYFDSPTVSVADLSCASDQNRVVPDPNPPPPQSHRRLRRSHSGPAGSFKPAI
RISSCTHRASPSSDEDKPEVPPRVPPIPRPAKPDYRRWSAEVTSNTYSDEDRPPKVPPREPLSRNS
RTPSPKSLPSYLNQVMPPTQSFAPDPKYVSSKALQRSSEGSANKVPCILPIIENGKKVSSTHYYL
55 LPERPPYLDKYEKYFKEAETNPSTQIQPLAACGMASATEKLASRMKIDMGSHGKRKHLVYV
SP

SEQ ID No.47

atggctgaacaacttctcctcaggcttgtatttgcaaatatcgggaaagctgtgaagatacgaagagaaccccaagaacatttcaaacctaccaat
 5 gggatcatctatcactttaaaccatgcaccgatacacgctggagatgtcagaacatgccagtttggcccacagttccgagagatcatccacaaagcactt
 attgacagaagtgtccaggcttccctggaaagccagaagaagctcaactgggtgtcgtgaaagtcaggaaagctcgtggctctgaaaccaatgggtgatgga
 aactgcctcatgcatcagcttgcagtacatgtgggtgttcaggatactgacctggctcgtgaggaaagccctctgcagacccttaaggagacagaca
 ctcgaaactttaaattccgctggcagctggaactctgaaatctcaggaaattgtgaaacaggacttctacgacactcggaaactggaatgacgaatgg
 gacaacttggctcaaatggcatcagcagacacacctgcagcccgaagtgactcagtaaatccctggaagaatccacataattgtcctcagcaaacat
 10 cctcagaagaccatcattgtcalttca gacaaaatgtaagaatttggaaatcgggtcctcaatttgcctcttgaagtgggtgggatttatctgcctctcac
 tggcctgcccaggagtgtacagatatccatcgtcctaggctatgacagccagcacttgtaccctggtgacctgaaggacagtgacctgaacttgc
 cgctgtccacttgttaacagagaccgggtagtttgaagacttaaaagttcacttctgacagatcctgagaatgagatgaaggaaagcttctaagga
 gtacttgatgtatggagatccctgtcaaggctggaccacggcagcactcactgatcaacgctcaaaattggatgaagctaacttaccacaaagaa
 ataaattggtagacgattactttagcttgttcagcagcaatacaagaatggcaggagaacagcgtacagccaggagagcggcacatgctcagaa
 ccccttggagccttccacaccccagctatcactatggatataaaatgtgagacaccaactgtccttcttcagtccgtgaactcagcctttagccac
 15 gaatgctcagagagcggccaaaagaatcagagcaagctcccaagctgaactcgaagctaggccctgaaggactcccaggcgtgggacttggctcct
 caaactggagcccga gaaacccgctggaggacctcaltcagccccaccacagcaccagccttttctctcagttagaccactgcaatgaatgca
 ggagtctgggtgcccttttgaatgtgcagcataatggattctgtgagcgttgcacgccggcagattaatgccgccacaccgagaccttggga
 aagtccaagcctgcctcagatgtcactcggacctttaatggcatctgcagctcctgttcaaaaggactacagcagagcccagctccagcctcactt
 cagtatccctgcctcctgtcacaacgctccaagctgaccctcacaactatcaaaagtctcactccacactcttggccacggactggaatgtctctcc
 20 ttctgctgcctcctccagcgtgcagcactccagagagacagcaggacaagcaagtgaggaaagctggctgcatgtatttgggactccagaaa
 acaagggttggcactctatgttcatcgaatacagagaaaataagcagctgttactgcctctgcgaaagctgggtccccggccccagggtccagaaca
 atgcccctgctcggcaggagtgctggcaccactcggaaagcaccatgttgaagggtactgtcagaaggtttcatcgaagcicagaaccagagattcc
 atgaagcaagaa gaacggaaagaacagctgagatcaagccagcatagagacatgcctcgaactacacaggtagcctcaaggctgaaatgtccccggg
 cctctgcaagaacattctgcctgtgcagtgaggaaactctgtatggagtgccagcctaagccaacgagtaggttctgtgcccaccggggtgagc
 25 ccacgcctgaagagccccctaaacagcgtgccgggcccctgctgtgatcatttggcaatgccaagtgaatggttactgcaatgagtgctaccagttc
 aagcagatgtatggctaa

SEQ ID No.48

30 MAEQLLPQALYLSNMRKA VKIRERTPEDIFKPTNGIYHFKTMHR YTLEMFR TCQFCPQFREIHK
 ALIDRSVQASLESQKLNWCREVRKLVALKTNGDGNCLMHAACQYMWGVQD TDLVLRKALC
 STLKETDTRNFKFRWQLESLSQEFVETGLCYDTRNWNDEWDNLVKMASADTPAARSLQYN
 SLEEIHFVLSNILRRPIIVISDKMLRSLESGSNFAPLKVGGIYLP LHWPAQECYRYPIVLGYDSQHF
 35 VPLVTLKDSGPELRAVPLVNRDRGRFEDLKVHFL TDPENEMKEKLLKEYLIVMEIPVQGW DHTGT
 THLINA AKLDEANLPKEINLVDDYFELVQHEYKKWQENSDQARRA AHAQNPLEPSTPQLSLMDI
 KCETPNCPFFMSVNTQPLCHECSERRQKNQSKLPKLSKLGPEGLPGVGLGSSNWSPEETAGGP
 HSAPPTAPSLFLFSETTAMKCRSPGCPFTLN VQHNGFCERCHARQINASHTADPGKCAQLQDVT
 RTFNGICSTCFKRITAE PSSSLTSSIPASCHQRSKSDPSQLIQSLTPHSCHR TGNVSPSGLSQAART
 PGDRAGTSKCRKAGCMYFGTPENKGFCTLCFIEYRE NKQSVTASAKAGSPAPRFQNNVPC LGRE
 40 CGTLGSTMFEGYCQKCFIEAQNQR FHEARRTEEQLRSSQH RDMPTTQVASRLKCARASCKNIL
 ACRSEELCMECQHLSQRVGSVAHRGEPTPEEPPKQRCRAPACDHF GNAKCNNGYCN ECYQFKQM
 YG

SEQ ID No. 49

45 ttttttccatactgataaaatttatttaaaaaaaagagaataaataattat acccttgacaaaataaagatctataatataatgttcttagaaaatatga
 aaagataaattacaaatataataaatcaatattcacatgacagcaaaagtgcaatgattctacaagaagtgaggaggaagatgcttccggctccgca
 gcaatgtctcggagaggcctcctgtcccttctcctcaatgaggtgtcctcattttaagaaaacctgatacaagcagatcaatcaggttaggaagct
 50 ggtatttattgaccgcaaaataatttttcaaaaaaaattctatcaaggatcctttaataatcaagttcccaatgcacttagaatacagtaaccaaatcc
 aagctctcgaacttctctcgtgtagctctaccgcanngcgtgaggtattgctgaagtgagtgctgctcctg

能够调节CRH信变化的蛋白质列表		SEQ ID No.	AA	NA	AA	gene symbol	描述	AC.N
转录因子								
102955_at	NFIL3	1	2			转录因子介导素3, 受调节的	U83148	
104008_at	Pse	3	4			前列腺特异性的c1s转录因子	A6019436	
93619_at	Per	5	6			周期同系物(果蝇)	AF022992	
104155_f.at	Pat3	7	8			活化转录因子3	U13118	
激酶								
93090_at	Fgfr2	9	10			成纤维生长因子受体2	M23362	
97690_at	Sgk	11	12			血清/糖皮质激素调节的激酶	NM_011361	
96844_at	Pim3	13	14			丝氨酸、苏氨酸激酶p1m3	BC017621	
100133_at	Fyn	15	16			tyr原癌基因	M27266	
92310_at	Src	17	18			血清可诱导的激酶	NM_152804	
分泌型肽								
96055_at	Cck	19	20			胆囊素	NM_031161	
102798_at	Adh1	21	22			肾上腺髓质素	U177630	
92533_at	Cl	23	24			降钙素	X97991	
CAMP信号								
103610_at	Pde4b	25	26			磷酸二酯酶4B, CAMP特异的	NM_019940	
97844_at	Rgs2	27	28			G-蛋白活化调节物2	U87187	
106533_s.at	Crem	29	30			CAMP应答元件调节剂	M60285	
肌醇信号								
94977_at	IP3R1	31	32			肌醇1,4,5-三磷酸受体1	X15373	
96592_at	Plc31	33	34			磷脂酰肌醇3-激酶, 调节性亚单位, 多肽I (P85 α)	U50419	
磷酸酶								
104422_at	Plppn	35	36			蛋白质酪氨酸磷酸酶受体型N	U11812	
104536_at	Plom16	37	38			蛋白质酪氨酸磷酸酶非受体型16	X61940	
受体和通道调节物								
92534_at	Osmkr	39	40			Res相关的GTP结合蛋白	U10551	
92368_at	Ramp3	41	42			受体(降钙素)活性调节蛋白3	AJ250491	
蛋白酶								
92620_at	Usp2	43	44			泛素特异的蛋白酶2	NM_016808	
未知的								
93974_at		45	46			RIKEN cDNA 1300002F13基因	NM_133765	
96326_at		47	48			Mus. musculus, 类似于酪氨酸转氨酶; 克隆MCC_3792.D1IMAGE5097591	AJ255363	
99392_at		49	...			肿瘤坏死因子, α -诱导的蛋白质3	NM_008397	

表 1

B-肌动蛋白正向引物	5'-CATCTGGCCTCACTGTCCAC-3'
β -肌动蛋白探针	5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGCTGGA-3'
B-肌动蛋白反向引物	5'-GGGCCGGACTCATCGTACT-3'
c-fos正向引物	5'-GGGAGGACCTTACCTGTTGGT-3'
c-fos探针	5'-CACCAGGCTGTGGCCTCAAGG-3'
c-fos反向引物	5'-CCAGATGTGGATGCTTGCAA-3'
CRF ₂ 反向引物	5'-GGGAGAACAGAAAGCGCTG-3'
CRF ₂ 探针	5'-AGAAGGGTGAGGATCCCCCAAATCAGAGT-3'
CRF ₂ 反向引物	5'-CCCTTGTTTCAATCACTCCCA-3'
CRF ₁ 反向引物	5'-TTTCTGAACAGTGAGGTCCGC-3'
CRF ₁ 探针	5'-CCGGAAGAGGTGGCGGCGA-3'
CRF ₁ 反向引物	5'-GGGCTCTGATGGAGTGCTG-3'
Rgs2正向引物	5'-TTGGAAGACCCGTTTGGCTA-3'
Rgs2探针	5'-TCTTGCAAGATTCCTCTGCTCCTGGG-3'
Rgs2反向引物	5'-TTTCTTGCCAGTTTGGGGCT-3'
Fcfr2正向引物	5'-AGACTTCCATGGGAATGATAGCA-3'
Fcfr2探针	5'-CCTCTCGTCCGGCAGCTGGC-3'
Fcfr2反向引物	5'-AATGTGTAAGCCGGCAGAA-3'
Mig-6正向引物	5'-AATCCTTTGTCCAATACTGTACACACA-3'
Mig-6探针	5'-GAAAAATGCACTGATCTCCGCA-3'
Mig-6反向引物	5'-GTATGAACATAAATGAAGGTTAAAACATGCT-3'
Pi3k正向引物	5'-CCATGGTGCTTGTAAACGCTTT-3'
Pi3k探针	5'-CCCAACTTGTAGCTGGTAAAGCTTCA-3'
Pi3k反向引物	5'-CCTGTCTACCTTCTGGTCTCCAA-3'
Crem正向引物	5'-CTTGCTGATCGTCTGGAGAGTTT-3'
Crem探针	5'-TGCTGATGACCCCTCCATTGTGA-3'
Crem反向引物	5'-TTAACATTCTGAGGTTGCAAGAA-3'
Pde4b正向引物	5'-GCCGTGTGTATGGCTGCAT-3'
Pde4b探针	5'-CAGCCCCCAGGCCACTGTGG-3'
Pde4b反向引物	5'-AGGAGGGATAACAGGTGCTGTGT-3'
CCK正向引物	5'-CCTGGACCCAGCCATAGA-3'
CCK探针	5'-AGCCCATGTAGTCCCGGTCACTTA-3'
CCK反向引物	5'-TGCGCCGGCCAAA-3'
CT正向引物	5'-GCTTGACAGCCCCAGATC-3'
CT探针	5'-GGTACTCAGATTCCCACACCGCTT-3'
CT反向引物	5'-TGTGTGTACGTGCCAGCAT-3'
Nf11-3正向引物	5'-GCGAGTTTGAAGGCATGCA-3'
Nf11-3探针	5'-CTCTCTCACCCGCCGATGCGAT-3'
Nf11-3反向引物	5'-CCATGTTTCTCCAGGTCAAATG-3'
Ramp-3正向引物	5'-TGGCAGACTCGGCTTCTGT-3'
Ramp-3探针	5'-TTTGCTTTGGCCACACCCTACCTGG-3'
Ramp-3反向引物	5'-CTGGTCCGGAGGACTTGG-3'
SGK正向引物	5'-TGGACCAATGCCCAAGTT-3'
SGK探针	5'-TCAGTCAAAGCCGTTGGTGTTCATTG-3'
SGK反向引物	5'-GCCCGTTTTATAGGTGACATTTTAA-3'

表 2

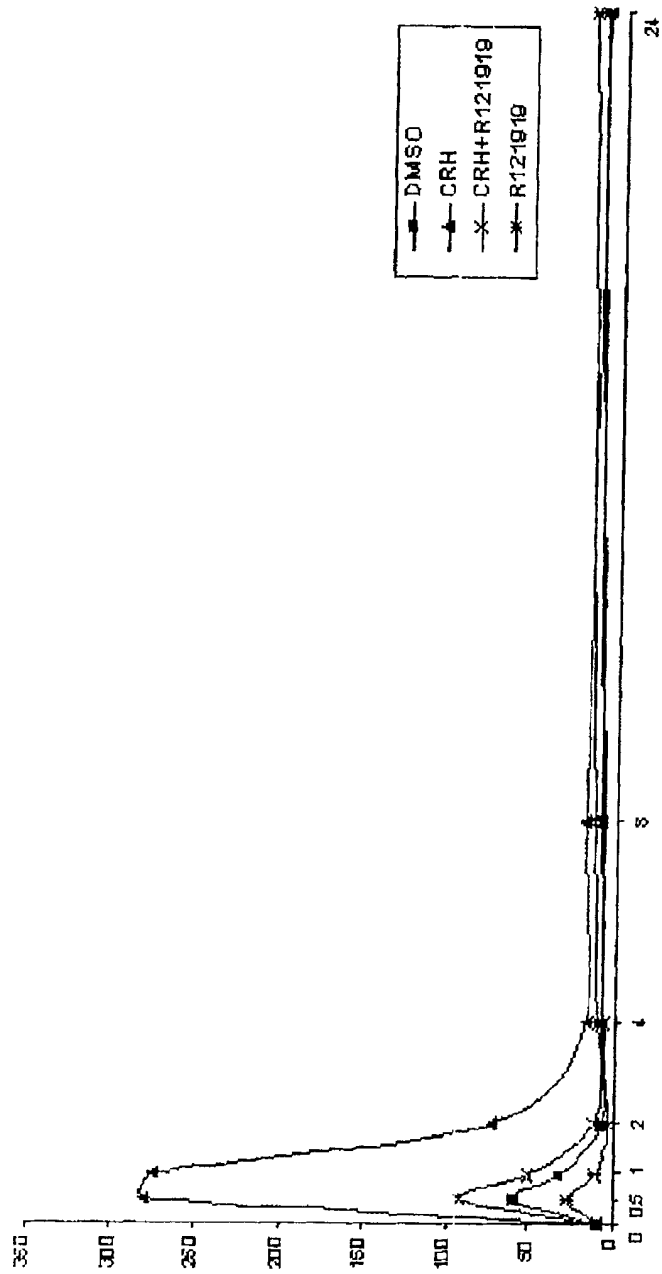


图 1

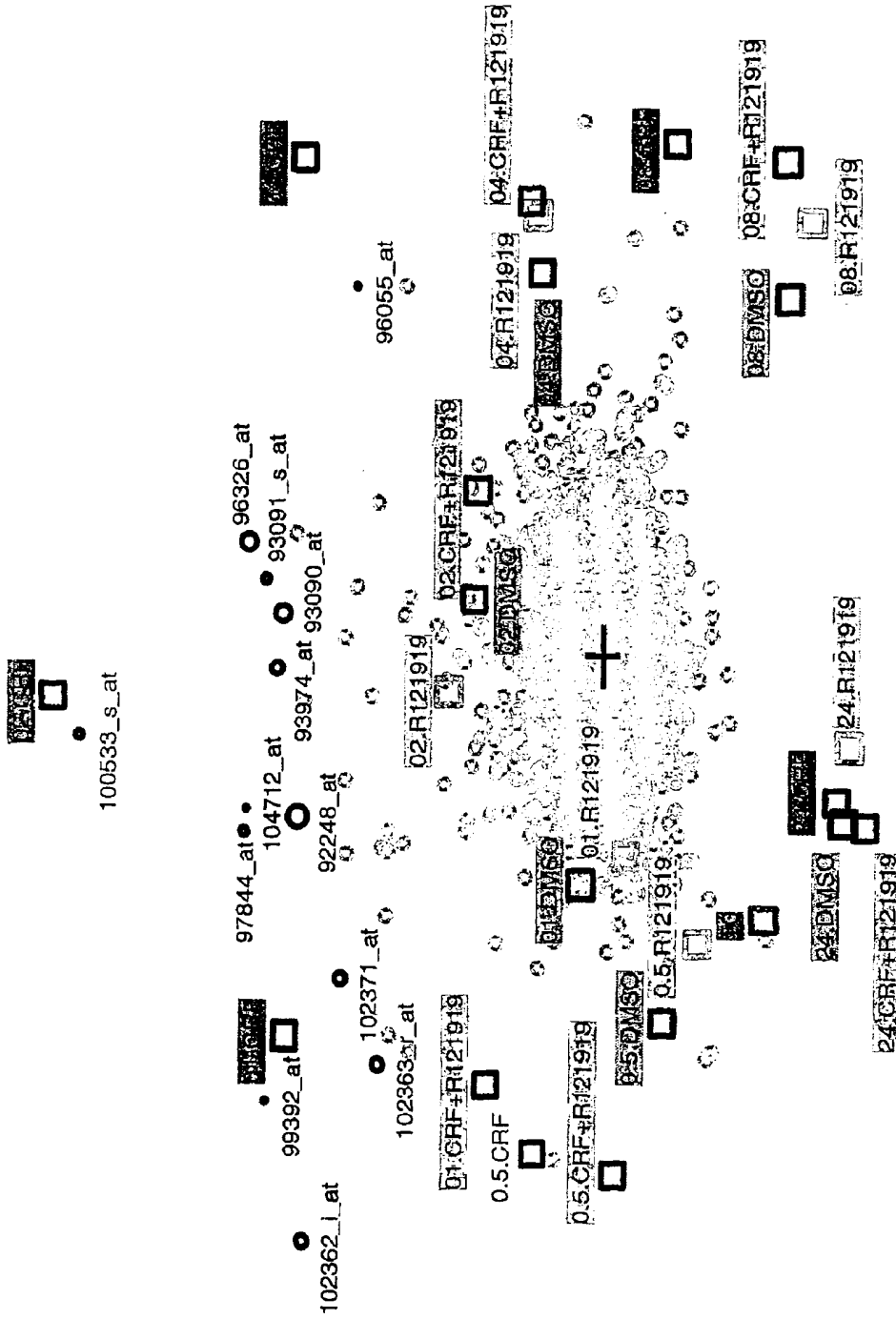


图 2

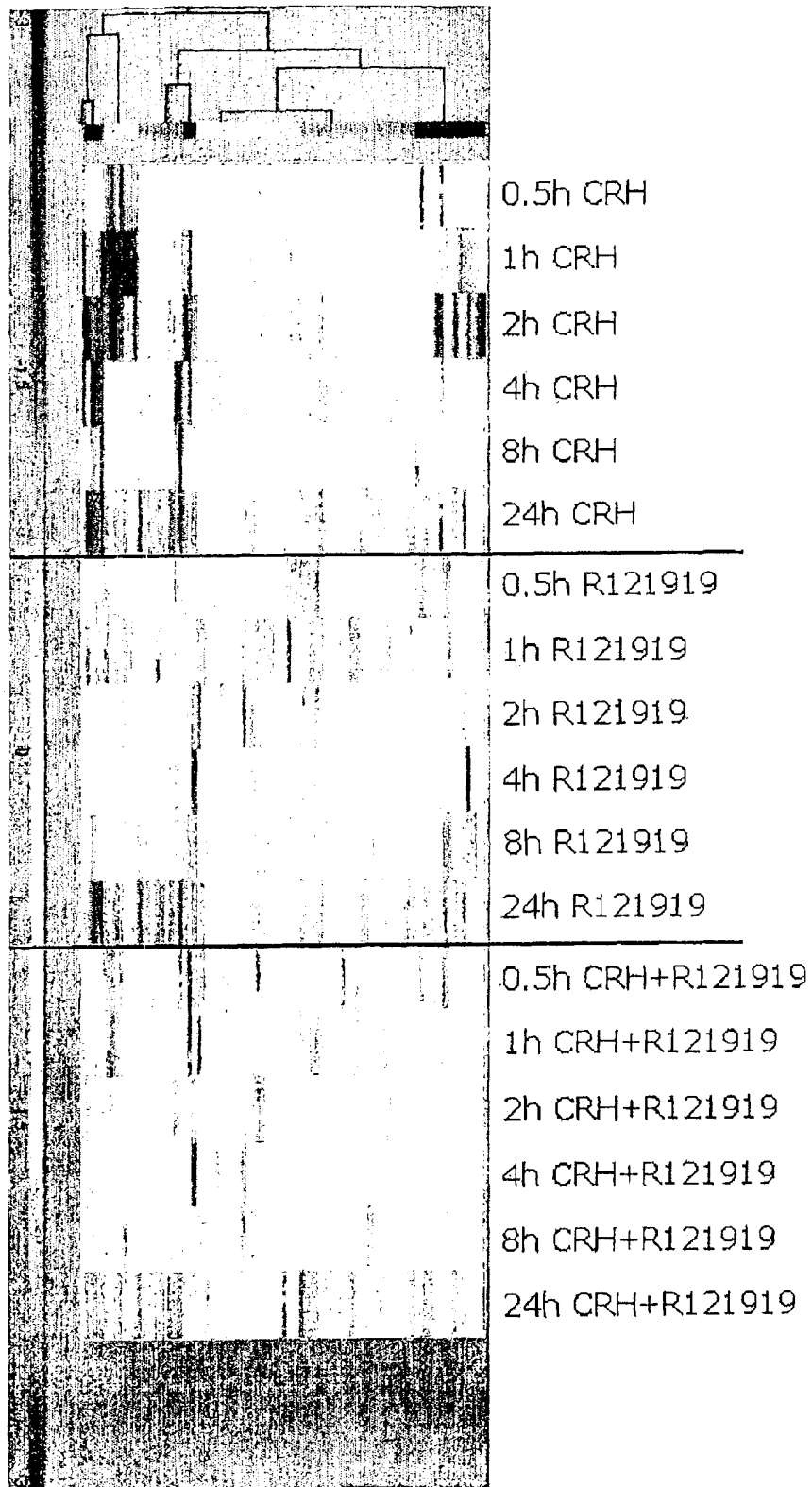


图 3

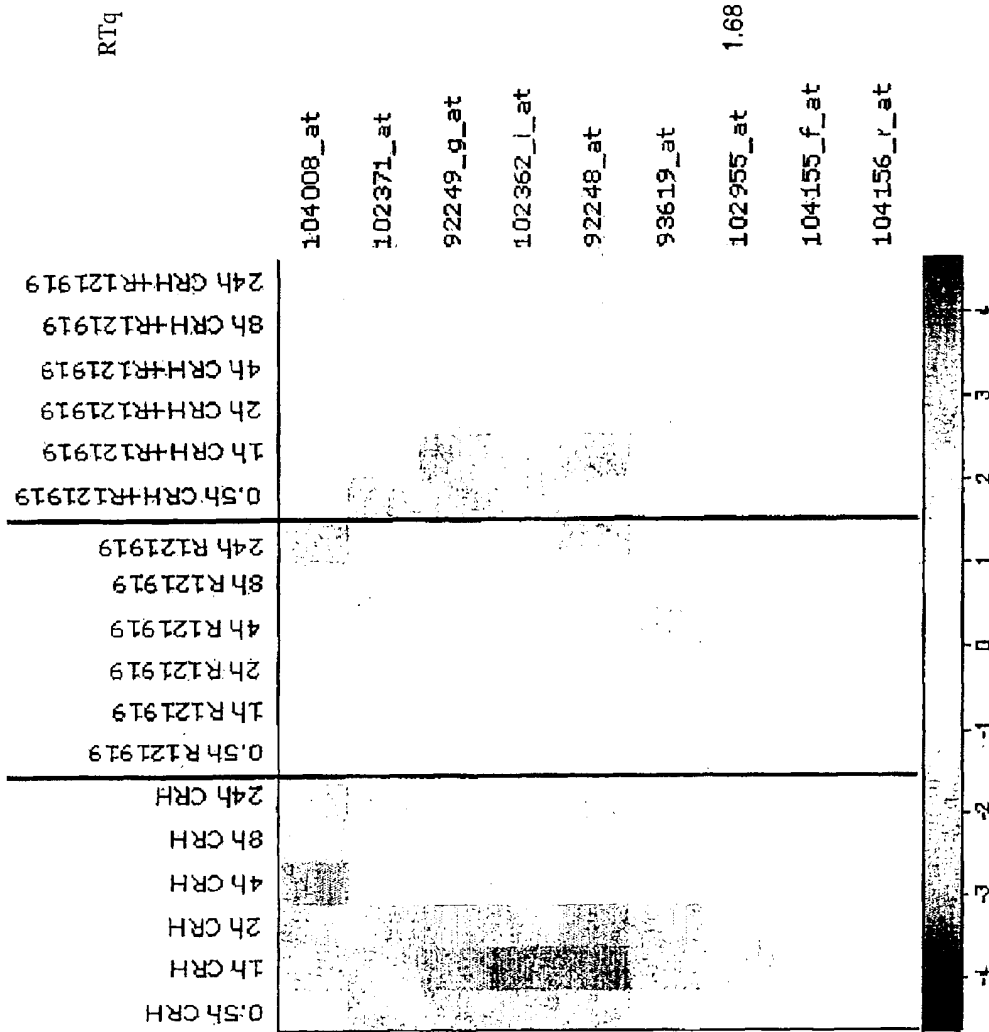


图 4

转录因子

前列腺特异转录因子

核受体亚家族4, 组A, 成员1

核受体亚家族4, 组A, 成员2

Jun-B癌基因

核受体亚家族4, 组A, 成员2

周期同系物

核因子, 白介素3可调节

转录激活因子3

转录激活因子3

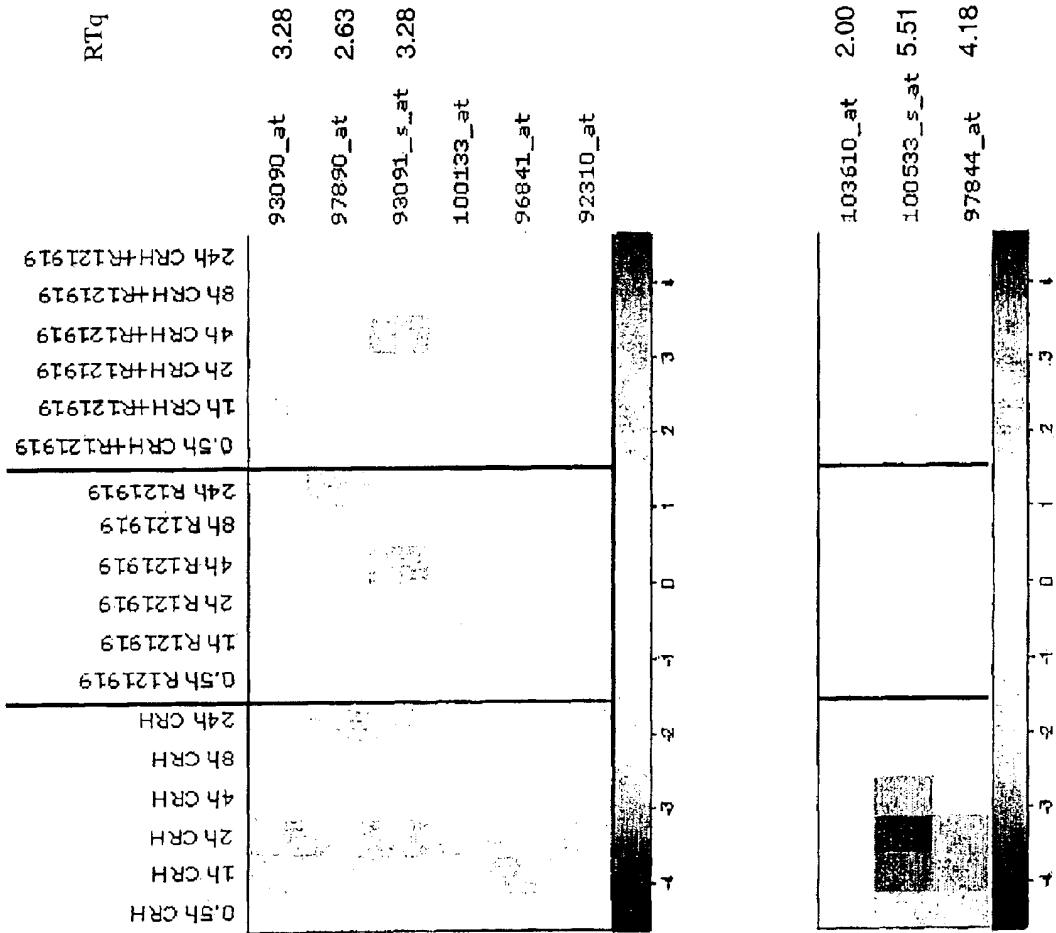


图 4续

激酶
 成纤维细胞生长因子受体2
 血清/糖皮质激素可调制型激酶
 成纤维细胞生长因子受体2
 Fun原-癌基因
 丝氨酸苏氨酸激酶pim3
 血清可诱导的激酶

 cAMP信号
 磷酸二酯酶4B, cAMP特异
 cAMP效应元件调节剂
 G蛋白信号调节物2

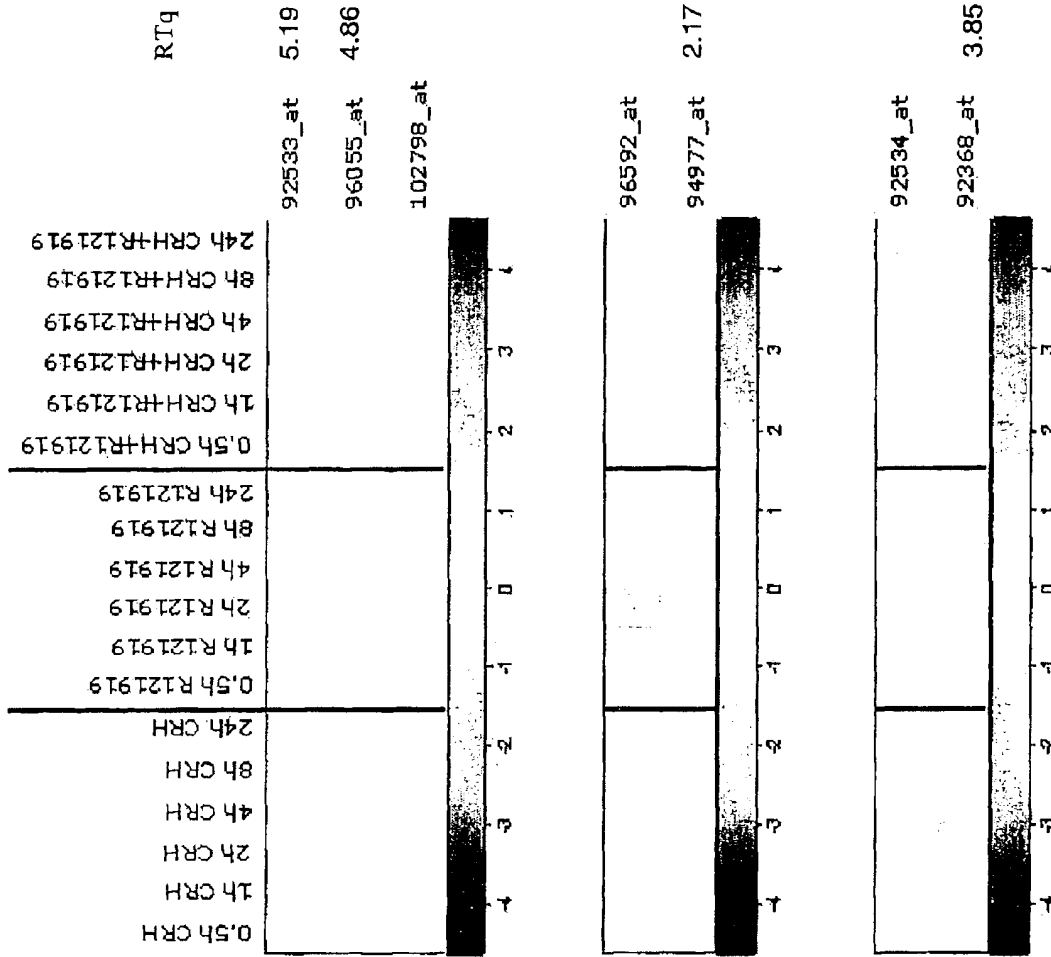
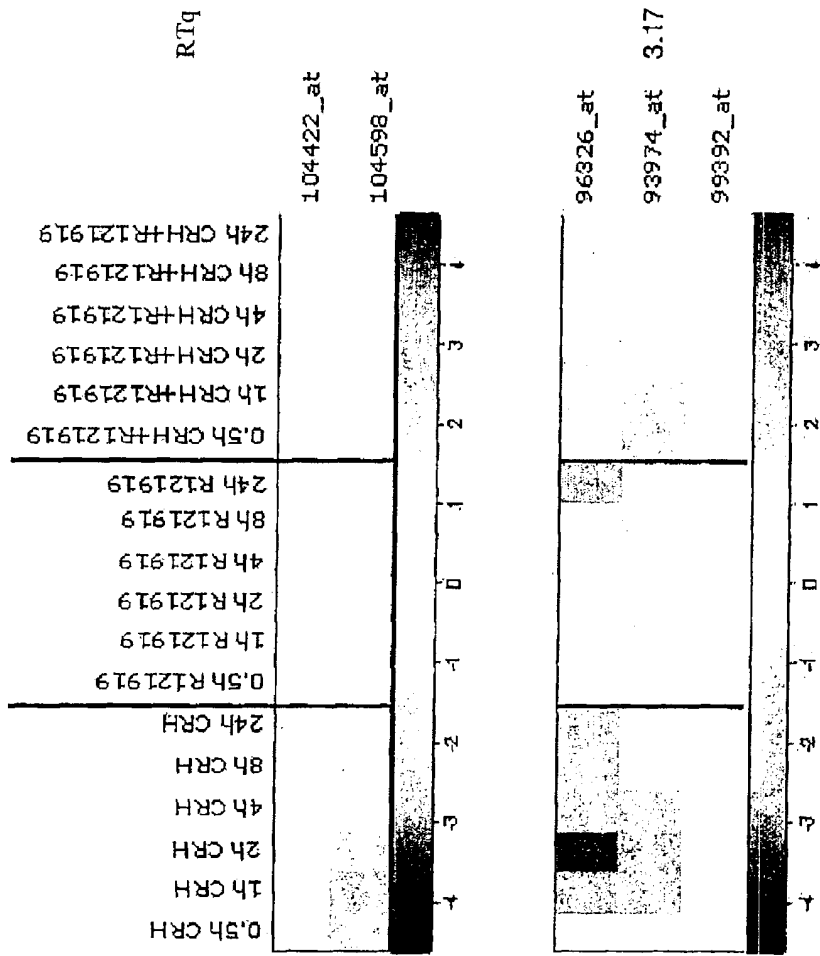


图 4续



磷酸酶

蛋白酪氨酸磷酸酶, 受体类型, N

蛋白酪氨酸磷酸酶, 非受体类型, 16

未知的

MGC:37790 IMAGE:5097591

RIKEN CDNA 1300002F13 基因

肿瘤坏死因子, α -诱导的蛋白3

图 4续

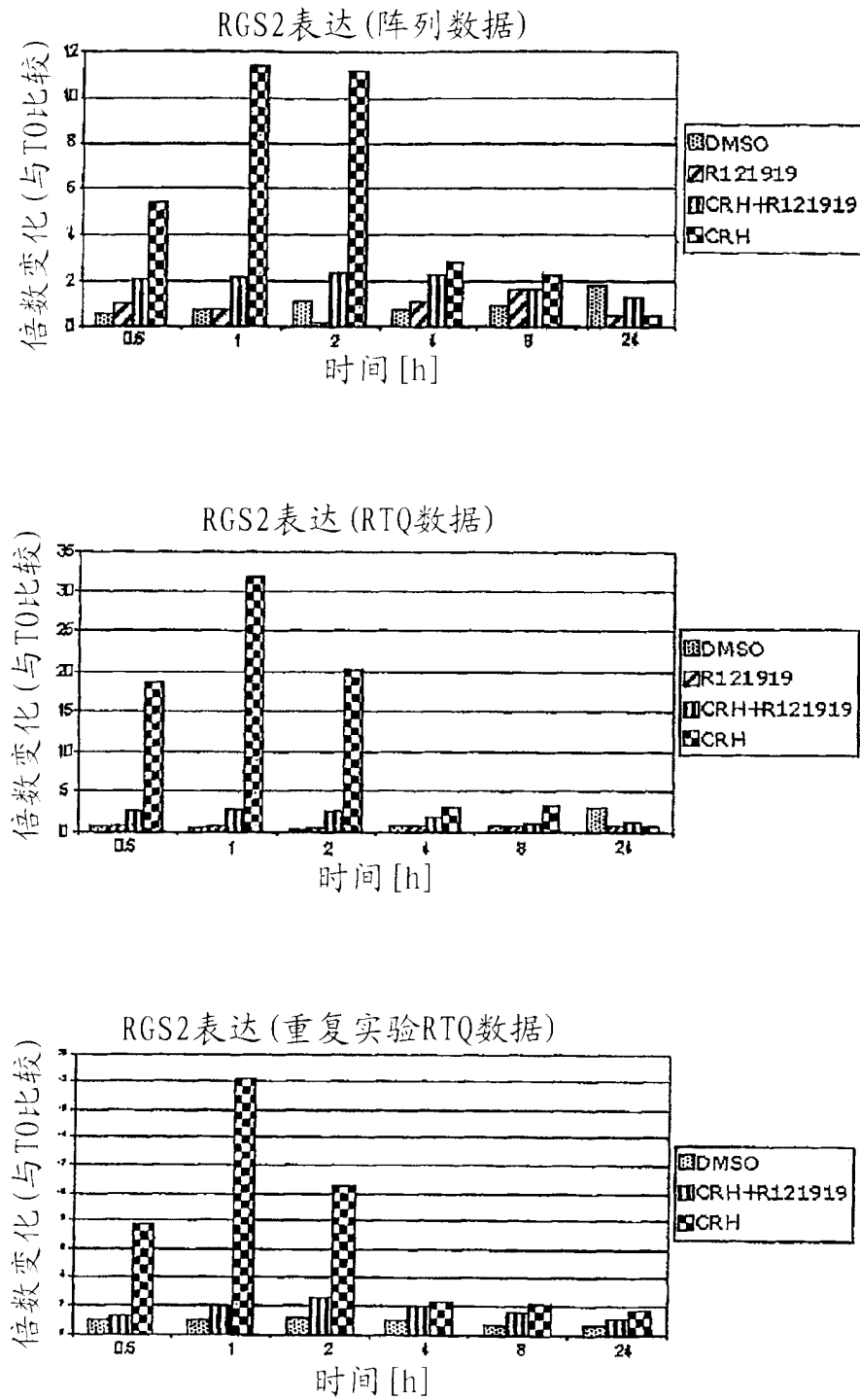


图 5