



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2132562 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2012.05.29
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2012.01.11
(86)	Europeisk søknadsnr	08733105.4
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.04.03
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.12.16
(30)	Prioritet	2007.04.06 US 910574 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(60)	Utskilt	11188198.3
(73)	Innehaver	Genzyme Corporation, 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142, USA
(72)	Oppfinner	RAPKO, Stephen, M., 12 Island Road, Franklin, MA 02038, USA DUGUAY, Stephen, J., 117 Federal Street, Salem, MA 01970, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåter for å evaluere celler og cellekulturer
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2006/094836 B1, BRITTBORG M ET AL: "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation.", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 6 OCT 1994 LNKD- PUBMED:8078550, vol. 331, no. 14, 6 October 1994 (1994-10-06), pages 889-895, ISSN: 0028-4793, STOKES ET AL: "Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 46, no. 2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 404-419, XP002253145 ISSN: 0004-3591, MARLOVITS S ET AL: "Differential gene-expression of human articular chondrocytes and human fibroblasts in two- and three-dimensional cell culture" FASEB JOURNAL, FED. OF AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, BETHESDA, MD, vol. 15, no. 4, 7 March 2001 (2001-03-07), page A34, XP008021552 ISSN: 0892-6638, RAPKO ET AL: "P195 Identification of dedifferentiated chondrocytes using gene expression - the dsc assay" OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE, BAILLIERE TINDALL., vol. 15, 5 September 2007 (2007-09-05), page B137, XP022221713 LONDON, GB ISSN: 1063-4584, KOLETTAS E ET AL: "Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes" JOURNAL OF CELL SCIENCE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, LONDON, GB, vol. 108, no. PART 5, 1 May 1995 (1995-05-01), pages 1991-1999, XP002465823 ISSN: 0021-9533

Tittel: Fremgangsmåter for å evaluere celler og cellekulturer

Beskrivelse

5 Denne søknaden krever prioritet fra den midlertidige søknaden 60/910, 574 innlevert 6. april 2007.

Denne oppfinnelsen gjelder fremgangsmåter for å bestemme sammensetningen av en cellekultur, mer spesielt, fremgangsmåter for å skille mellom kondrocytter og
10 fibroblaster.

Skadet leddbrusk leges sakte, delvis på grunn av mangel på blodforsyning i bruskvevet (Basad et al., i Hendrich et al., "Cartilage Surgery and Future Perspectives", Thieme Verlag, 49-56. (2003)). Traumer i kneledd kan resultere i,
15 for eksempel, kondrale og osteokondrale lesjoner, og slike skader kan utvikle seg til slitasjegikt (Brittberg et al., New England Journal of Medicine, 331 (14): 889-895 (1994)). I alvorlige tilfeller av slitasjegikt kan en fullstendig kneprotese bli nødvendig. Men de kunstige protesene som brukes i kneerstatninger har begrenset levetid, og dermed er ikke kneerstatning en optimal løsning, særlig for ikke-eldre
20 pasienter (Brittberg et al., *supra*).

I noen tilfeller kan leddbruskskader repareres ved hjelp av en autolog kondrocytt implantering (Brittberg et al., Clin Orthopaed Rel. Res., 367S: S147-S155 (1999)). I denne prosedyren blir kondrocytter høstet fra en pasient, ekspandert i en
25 cellekultur for å øke antall kondrocytter, og deretter implantert tilbake i det skadede området på pasienten. Kondrocyttene er dekket med en klaff av periostealt vev for å forsegle kondrocyttene inne i det skadede området. Selv om de fremdyrkede kondrocyttene har en tendens til de-differensiering i kultur, vil de-differensierte kondrocyttene i et vellykket implantat bevare sitt re-
30 differensieringspotensiale og vil redifferensieres til kondrocytter som produserer et hyalint bruskvev ved implantasjon.

I en modifisert teknikk kjent som matriksindusert autolog kondrocyttimplantasjon (MACI® implantasjonsprosedyre) dyrkes kondrocytter som legges på en
35 kollagenmatriks før de blir implantert i pasienten (Basad et al., *supra*). I tillegg kan kollagenmatriksen festes med fibrinlim snarere enn suturering, noe som fører til en enklere kirurgisk teknikk.

Ulike teknikker og medier kan brukes til å dyrke kondrocytter. Eksempler på serumfrie medier for kondrocyttedyrking og fremgangsmåter for isolering og propagering av kondrocytter er beskrevet, for eksempel, i US patent nr. 6.150.163 og 7.169.610, og i US provisional patentsøknad nr. 60/805,307.

Fibroblaster eller fibroblastlignende celler (for eksempel synoviocytt) kan samisoleres med kondrocytter og dermed dyrkes sammen i en cellekultur i løpet av forberedelsen av kondrocyttimplantater. Kondrocytter er kjent for å anta et fibroblastisk utseende når de de-differensieres i kulturen (Benya og Shaffer, Cell, 30:215-224 (1982)). Likevel opprettholder de sitt differensieringspotensiale, dvs. de er i stand til å gjenopprette en kondrocyttisk fenotype ved implantasjon. Som følge av dette, kan det være vanskelig å skille dyrkede de-differensierte kondrocytter fra samdyrkede fibroblaster eller fibroblastlignende celler basert på utseende.

I tillegg er genekspresjonsmønstrene i dyrkede, de-differensierte kondrocytter forskjellig fra de opprinnelige bruskondrocyttene. For eksempel er mange markører som uttrykkes i høy grad i opprinnelige bruskondrocytter, uttrykt ved reduserte nivåer i dyrkede kondrocytter (Binette et al., Orthopaed J. Res, 16: 207-216 (1998)). Følgelig vil ekspresjon av en slik kondrocyttmarkør ikke nødvendigvis skille seg fra en de-differensiert kondrocytt fra celler fra andre typer, som også kan være tilstede i cellekulturen. Videre er mange kjente fibroblastmarkører uttrykt i både de-differensierte kondrocytter og naturlige bruskondrocytter, om enn på ulike nivåer. Følgelig vil en slik fibroblastmarkør ikke nødvendigvis indikere hvorvidt cellene tilstede i prøven er de-differensierte kondrocytter, fibroblaster eller fibroblastlignende celler.

Fra WO 2006/094836 kjenner man en fremgangsmåte som skiller mellom kondrocytter og fibroblaster basert på ekspresjonsnivået og/eller DNA-metylering av sju gener.

Stokes et al., "Arthritis and Rheumatism", vol. 46, nr. 2, 2002, s. 404-419 viser at både differensierte og de-differensierte kondrocytter har markører som er karakteristisk for brusk, men det er ingen likhet med fibroblaster. I dokumenter fra Marlovits et al., FASEB Journal, vol. 15, nr. 4, 2001, side A34 og Kolettas et al., J. of Cell Science, vol. 108, nr. del 5, 1995, s. 1991-1999 er det fremhevet at ekspresjonsmønsteret hos de-differensierte kondrocytter og fibroblaster er likt.

Det er behov for fremgangsmåter som kan identifisere kondrocytter, fibroblaster og fibroblastlignende celler, særlig fremgangsmåter som kan anvendes for cellekultur.

5 **Sammendrag av oppfinnelsen**

I visse henseender tilveiebringer fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen måter å evaluere sammensetningen av en cellekultur på (f.eks. å skille kondrocytter fra fibroblaster), disse fremgangsmåtene kan brukes, for eksempel, til å vurdere kondrocyttkulturer som brukes til behandling av bruskdefekter. Oppfinnelsen innebærer en fremgangsmåte for å evaluere sammensetningen av en cellekultur, og nevnte fremgangsmåte omfatter:

- a) å erverve et mangfold av celler fra en cellekultur;
- 15 b) fastsettelse av det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået for en fibroblastmarkør i mangfoldet av celler hvor nevnte fibroblastmarkør er MFAP5; og
- c) fastsettelse av sammensetningen av en kultur basert på det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av mikrofibrillær assosiert protein 5 (MFAP5); hvor det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av MFAP5 under en
20 på forhånd bestemt grense indikerer at cellekulturen omfatter kondrocytter.

Det innebærer også en fremgangsmåte for å vurdere sammensetningen av en cellekultur, og nevnte fremgangsmåte omfatter:

- 25 a) å isolere celler fra en bruskbiopsi hentet fra et pattedyr;
- b) å dyrke celler isolert i trinn a) i en cellekultur;
- c) å erverve en prøve av cellekulturen;
- d) fastslå ekspresjonsnivåene av MFAP5 og HAPLN 1 i én eller flere celler fra prøven; og
- 30 e) fastslå sammensetningen av kulturen basert på ekspresjonsnivåene av MFAP5 og HAPLN1.

Oppfinnelsen er basert, i hvert fall delvis, på identifisering av MFAP5 som en celle-
35 fenotypemarkør, som er uttrykt i høy grad i visse ikke-kondrocyttiske celletyper, for eksempel fibroblaster og synoviocytter, mens den uttrykkes i et signifikant lavere nivå i kondrocytter. Oppfinnelsen er ytterligere basert, i hvert fall delvis, på

funnene om at ekspresjonsnivåratioene til MFAP5 og en kondrocyttmarkør, slik som HAPLN1, er en pålitelig indikator på cellens fenotype i kulturer avledet fra bruskbiopsier. Mens det under visse forhold kan være en fordel å bruke begge typer markører (dvs. fibroblast- og kondrocyttmarkører) for å bekrefte sammensetningen av cellekulturen eller fenotypen til en enkelt celle, tilveiebringer oppfinnelsen også utførelsesformer hvor det å fastslå det normaliserte ekspresjonsnivået av MFAP5 markøren alene, kan være tilstrekkelig for dette formålet.

Det normaliserte ekspresjonsnivået av MFAP5 er lavere i kondrocytter enn i fibroblaster. I noen utførelsesformer er fibroblastmarkøren, det vil si MFAP5 slik at dens normaliserte ekspresjonsnivåer er lavere i kondrocytter (f.eks. primær og/eller passerte kondrocytter) enn i fibroblaster og/eller synoviocytter. I noen utførelsesformer er fibroblastmarkøren uttrykt minst 2, 5, 8, 10 ganger lavere, eller mindre i kondrocytter enn i fibroblaster og/eller synoviocytter.

Dermed, i ett aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å vurdere sammensetningen av en cellekultur (fremgangsmåte 1), f.eks. en cellekultur som forsøksvis inneholder kondrocytter, og beskriver også en referansefremgangsmåte for å evaluere fenotypen av en enkelt celle (fremgangsmåte 2). I utførelsesformer av fremgangsmåte 1, bestemmes ekspresjonsnivået av en respektiv markør som gjennomsnittsekspresjonsnivået av den markøren i et mangfold av celler (f.eks. kulturprøve). I utførelsesformer av fremgangsmåte 1, kan sammensetningen av en cellekultur evalueres i sin helhet for å fastslå om den inneholder kondrocytter. I aspekter av fremgangsmåte 2, fastsettes ekspresjonsnivået av en markør som ekspresjonsnivået av markøren i den enkelte cellen som blir vurdert. Mens fremgangsmåte 1 identifiserer sammensetningen av cellekulturen, identifiserer fremgangsmåte 2 fenotypen av en enkeltcelle, for eksempel hvorvidt cellen er en kondrocytt eller ikke.

I noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåte 1:

- a) å erverve et mangfold av celler fra en cellekultur;
- b) å bestemme gjennomsnittsekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør ifølge oppfinnelsen i et mangfold av celler fra cellekulturen hvori nevnte fibroblastmarkør er MFAP5; og
- c) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på ekspresjonsnivået;

hvor ekspresjonsnivået under en på forhånd bestemt grense indikerer at cellekulturen inneholder kondrocytter. Alternativt indikerer ekspresjonsnivået over en på forhånd bestemt grense at cellekulturen ikke inneholder kondrocytter (for eksempel omfatter ikke kulturen minst 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % eller flere kondrocytter).

I noen utførelsesformer involverer fremgangsmåte 1 å sammenligne ekspresjonsnivåene av en fibroblastmarkør (MFAP5) og en kondrocyttmarkør (for eksempel HAPLN1) til en kontroll eller til hverandre. I noen utførelsesformer er fibroblastmarkøren og kondrocyttmarkøren slik at ratio av deres ekspresjonsnivåer (kondrocyttmarkør i forhold til fibroblastmarkør) i primær og/eller passerte kondrocytter er lik eller større enn 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 eller flere ganger ekspresjonsratio i dyrkede fibroblaster.

Spesielt i noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåten:

- a) å erverve et mangfold av celler fra en cellekultur;
- b) å bestemme gjennomsnittsekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør i et mangfold av celler;
- c) å bestemme gjennomsnittsekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør i et mangfold av celler; og
- d) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på gjennomsnittsekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren og gjennomsnittsekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren.

I noen utførelsesformer er kulturen identifisert til å inneholde kondrocytter hvis ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren er over en på forhånd bestemt grense, mens ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er under en på forhånd bestemt grense. Alternativt indikerer ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren over en på forhånd bestemt grense at cellekulturen ikke inneholder kondrocytter (for eksempel omfatter ikke kulturen minst 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % eller flere kondrocytter).

I noen utførelsesformer inkluderer trinnet å bestemme kultursammensetningen sammenligning av gjennomsnittsekspresjonsnivåene av kondrocyttmarkøren og gjennomsnittsekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren. I noen utførelsesformer blir markørenes ekspresjonsnivåer sammenlignet i forhold til hverandre (skjønt,

grenseverdiene kan defineres for eksempel som en gitt differanse mellom ekspresjonsnivåene av de to markørene eller en ratio derav). For eksempel i noen utførelsesformer indikerer en ratio av en kondrocyttmarkør (for eksempel HAPLN1) ekspresjonsnivå i forhold til en fibroblastmarkør (dvs. MFAP5), som er større enn en
 5 på forhånd bestemt grenseverdi, for eksempel 0,25, 0,55, 1, 2, 2,2, 5, 10, 25, 50 eller mer, at cellekulturen inneholder kondrocytter.

I noen utførelsesformer av fremgangsmåte 1 blir ekspresjonsnivåene av kondrocytt- og fibroblastmarkører bestemt på RNA-nivået, for eksempel ved en
 10 standardkurvefremgangsmåte av kvantitativ RT-PCR eller ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av kvantitativ RT-PCR (som måler forskjellen i antall grenseverdisyklus som er påkrevd for fibroblastmarkøren og kondrocyttmarkørene).

I et beslektet aspekt tilveiebringer beskrivelsen en fremgangsmåte for å evaluere
 15 fenotypen av en individuell celle (fremgangsmåte 2), for eksempel ved å bruke flowcytometri eller enkelcelle RT-PCR. Fremgangsmåten er nyttig for å identifisere individuelle celler fra en cellekultur, som inkluderer en cellekultur avledet fra brusk eller synovium, en kondrocyttkultur, en fibroblastkultur, synoviocyttkultur, eller en hvilken som helst annen egnet kultur. Fremgangsmåten er også nyttig for å
 20 identifisere individuelle celler avledet fra hvilke som helst egnede biologiske prøver hvori det er ønskelig å identifisere individuelle celler, som inkluderer bruskprøver, synoviumprøver, fibroblastprøver etc. Fibroblast- og kondrocyttmarkører i fremgangsmåte 2 kan velges og evalueres som beskrevet for fremgangsmåte 1.

25 I noen aspekter omfatter fremgangsmåte 2

- a) å bestemme ekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør ifølge oppfinnelsen i cellen; og
- b) å bestemme fenotypen av cellen basert på ekspresjonsnivået til
 30 fibroblastmarkøren;

hvori ekspresjonsnivået under en på forhånd bestemt grenseverdi indikerer at cellen er en kondrocytt. Alternativt indikerer ekspresjonsnivået over en på forhånd bestemt grenseverdi at cellen ikke er en kondrocytt (for eksempel en fibroblast eller
 35 en synoviocytt). I noen aspekter omfatter fremgangsmåte 2:

- a) å bestemme ekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør i cellen;

- b) å bestemme ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren i cellen, og
- c) å evaluere fenotypen av cellen basert på ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren og ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren.

I noen utførelsesformer identifiseres cellen som en kondrocytt hvis
 5 ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren er over et på forhånd bestemt
 grensenivå, mens ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er under et på forhånd
 bestemt grensenivå. Alternativt er cellen ikke en kondrocytt hvis ekspresjonsnivået
 av kondrocyttmarkøren er under et på forhånd bestemt grensenivå, mens
 ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er over et på forhånd bestemt grensenivå.
 10 I noen utførelsesformer inkluderer trinn c) av å evaluere fenotypen til cellen å
 sammenligne ekspresjonsnivåene av kondrocyttmarkøren og ekspresjonsnivået til
 fibroblastmarkøren.

Ytterligere aspekter ifølge oppfinnelsen vil bli fremsatt i beskrivelsen som følger.

15

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1 er et flytdiagram som illustrerer trinnene i en eksempelfremstillingsprosess
 brukt for å produsere dyrkede kondrocytter fra kondrocyttbiopsier.

20

Fig. 2 viser HAPLN1-ekspresjonsnivåer i flere cellelinjer som bestemt ved en
 standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. Ekspresjonsnivåene ble normalisert til
 18S ribosomal RNA. Ekspresjonsnivået i primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1;
 andre ratioer ble skalert tilsvarende. Cellelinjer som anvendes er oppført i tabell 2.

25

Fig. 3 viser ekspresjonsnivåene av MFAP5 i samme cellelinjer som vist i fig. 2,
 bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. Ekspresjonsnivåene ble
 normalisert til 18S ribosomalt RNA. Ekspresjonsnivået i primære kondrocytter (PC)
 ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

30

Fig. 4 viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer fra fig. 2 og 3.
 Ratioen i primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert
 tilsvarende.

35

Fig. 5 viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene
 som vist i fig. 2. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -
 fremgangsmåte av RT-PCR, og ratioene ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Fig. 6 viser HAPLN1-ekspresjonsnivåene i et antall av ytterligere kondrocytt og synoviocytlinjer. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR og normalisert til 18S ribosomalt RNA. Ekspresjonsnivået i primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende. Cellelinjene som ble anvendt, er oppført i tabell 3.

Fig. 7 viser MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i fig. 6. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR og normalisert til 18S ribosomalt RNA. Ekspresjonsnivået i primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

Fig. 8 viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer fra fig. 6 og 7. Ratioen i primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

Fig. 9 viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i fig. 6. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR, og ratioene ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Fig. 10A viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i fig. 2 og 6, så vel som ytterligere kondrocytt-, synoviocyt- og dermalfibroblastlinjer identifisert i tabell 4. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR ved å bruke spesialdesignede primere og prober som beskrevet i eksempel 3. HAPLN1:MFAP5-ratioer ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$. Fig. 10B viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i ytterligere cellelinjer identifisert i tabell 5. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved å bruke samme fremgangsmåte som beskrevet for fig. 10A.

Fig. 11 viser en sammenligning mellom ekspresjonsnivåratioene til HAPLN1 og MFAP5 i monolag- og kollagen-"scaffold"-kulturer. Cellelinjene som ble brukt, er oppført i tabell 7. HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. Ekspresjonsnivåene ble normalisert ved 18S ribosomalt RNA. Ratioen i monolagkulturen til primærkondrocyttene (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

Fig. 12 viser en sammenligning mellom ekspresjonsnivåratioene til HAPLN1 og MFAP5 i monolag- og kollagen-”scaffold”-kulturene ved å bruke samme linje som vist i fig. 11. Ekspresjonsnivåene av HAPLN1 og MFAP5 ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR og ratioene ble beregnet som

$$2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}.$$

Fig. 13 viser endringen i ekspresjonsnivåratioene til HAPLN1 og MFAP5 som en funksjon av kulturnivå. Tre synoviocytlinjer ble dyrket fra primærkultur (kulturnivå 1) gjennom fire passasjer (kulturnivå 5), som vist i fig. 5. Ekspresjonsnivåene av HAPLN1 og MFAP5 ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR og ratioene ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Fig. 14A og 14B viser endringen i ekspresjonsnivåratioene for HAPLN1 og MFAP5 som en funksjon av kulturnivå. I fig. 14A og 14B ble det tatt prøver av kondrocyttlinjene fra brusk (kulturnivå 0) og deretter dyrket fra primær (kulturnivå 1) gjennom andre passasje (kulturnivå 3), som vist i figuren. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR ved å bruke spesialdesignede primere og prober som beskrevet i eksempel 5. HAPLN1:MFAP5-ratioen ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Fig. 15 viser ratioer av ekspresjonsnivåene av HAPLN1 og MFAP5 i kulturer av blandede populasjoner av kondrocytter og synoviocytter. Tre forsøk ble utført, hvert med forskjellige andeler av de to celletypene. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR ved å bruke spesialdesignede primere og prober som beskrevet i eksempel 6. HAPLN1:MFAP5-ratioer ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Fig. 16 viser molare ratioer av ekspresjonsnivåer av HAPLN1 og MFAP5 i forskjellige cellelinjer, som er oppført i tabell 12, ved å bruke absolutte kopinumre av markørene som bestemt ved en absolutt kvantifiseringsfremgangsmåte. RC-PCR ble utført som beskrevet i eksempel 3, med unntak av at 2 µl av cDNA ble brukt per 13 µl PCR reaksjon. Standardkurvene ble fremstilt fra syntetisk HAPLN1 og MFAP5 RNA transkriptstandardkjøringer ved 10^3 , 10^4 og 10^5 kopier/reaksjon. Mengden av HAPLN1- og MFAP5-kopier tilstede i hver testkjøring ble bestemt fra disse standardkurvene.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

- Oppfinnelsen er basert, i hvert fall delvis, på identifiseringen av MFAP5 som et gen som i høy grad uttrykkes i visse ikke-kondrocyttcelletyper, slik som fibroblaster og synoviocytter, mens det blir uttrykt ved signifikant lavere nivåer i kondrocytter.
- 5 Følgelig tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å anvende MFAP5 som en cellefenotypisk markør. MFAP5 er et serin-treoninrikt protein som binder til fibrilliner og ble rapportert til å være involvert i stabiliseringen av type 1 prokollagen (Lemaire et al., Arthritis & Rheumatism, 52(6):1812-1823 (2005)).
- 10 Nukleotid- og aminosyresekvensene til humant MFAP5 kan finnes i GenBank® under aksesjonsnummer NM_003480; dets nukleotidsekvens er også tilveiebrakt som SEQ ID NO:1. I tillegg til eller i stedet for MFAP5 kan også andre fibroblast-markører anvendes i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen, som beskrevet under.
- 15 I et aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å evaluere sammensetningen av en cellekultur som omfatter kondrocytter (fremgangsmåte 1); også en referansefremgangsmåte for å evaluere fenotypen av en individuell celle (fremgangsmåte 2) er beskrevet.
- 20 I utførelsesformene som omfatter fremgangsmåte 1 blir ekspresjonsnivået av en respektiv markør bestemt som gjennomsnittsekspresjonsnivået av den markøren i et mangfold av celler. I utførelsesformene ifølge fremgangsmåte 1 kan sammensetningen av en cellekultur evalueres som et hele for å bestemme om den inneholder kondrocytter. I aspektene ifølge fremgangsmåte 2 blir ekspresjonsnivået
- 25 av en markør bestemt som ekspresjonsnivået av den markøren i en individuell celle som blir evaluert. Derfor, mens fremgangsmåte 1 identifiserer sammensetningen til cellekulturen, identifiserer fremgangsmåte 2 fenotypen til en individuell celle, for eksempel om cellen er eller ikke er en kondrocytt.
- 30 I noen utførelsesformer blir fibroblastmarkøren uttrykt ved minst 2, 5, 8, 10 ganger lavere, eller mindre, i kondrocytter enn i fibroblaster og/eller synoviocytter. Slike ytterligere markører kan identifiseres ved å bruke for eksempel gen-"array"-analyse som beskrevet i for eksempel Leung et al., Trends in Genetics, 19(11):649-659 (2003).
- 35 I noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåte 1 å bestemme ekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør ifølge oppfinnelsen i et mangfold av celler fra en cellekultur,

hvor ekspresjonsnivået under en på forhånd bestemt grense indikerer at cellekulturen inneholder kondrocytter. Alternativt indikerer ekspresjonsnivået over en på forhånd bestemt grense at cellekulturen ikke inneholder kondrocytter (for eksempel at kulturen ikke omfatter minst 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % eller flere kondrocytter).

I oppfinnelsen er fibroblastmarkøren MFAP5, og en høyere enn grenseverdiekspresjon av MFAP5 av cellekulturen indikerer at cellekulturen inneholder et vesentlig antall av ikke-kondrocytter. I noen utførelsesformer er den forhåndsbestemte grenseverdien 1) lik eller mindre enn den til MFAP5-ekspresjon i rene fibroblastkulturer (for eksempel 2, 3, 4 eller 5 ganger lavere) eller 2) lik eller større enn (for eksempel 2, 3, 4 eller 5 ganger høyere) nivået av MFAP5-ekspresjon i rene kondrocyttkulturer (for eksempel primære kondrocytter ervervet fra bruskiopsier). Det "forhåndsbestemte" nivået behøver ikke å være valgt forut for bestemmelsen av markørekspresjonsnivåene og kan velges etter at ekspresjonsnivåene er bestemt basert på for eksempel statistisk analyse av ekspresjonsresultatene.

Mangfoldet av celler fra kulturen under evaluering kan representeres ved en prøve av en alikvot ervervet fra kulturen. For eksempel i tilfeller hvor kulturene vokser på kollagenmatriks, kan "punch"-prøvetaking anvendes som beskrevet i eksemplene. Mangfoldet av celler vil typisk inneholde minst antallet av celler som er tilstrekkelig for å utføre en gitt fremgangsmåte av ekspresjonsanalyser eller mer. For eksempel, for PCR er så få som 10-1000 celler vanligvis tilstrekkelig, men et lavere antall kan også anvendes.

I noen utførelsesformer involverer fremgangsmåte 1 og fremgangsmåte 2 sammenligningsekspresjonsnivåer av en fibroblastmarkør (MFAP5) og en kondrocyttmarkør (for eksempel HAPLN1 eller en annen kondrocyttmarkør) til en kontroll eller til hverandre. Rekkefølgen hvori ekspresjonsnivåene av begge markørene er bestemt, kan variere. For eksempel kan én først bestemme ekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør og deretter bestemme ekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør, eller vice versa. I noen utførelsesformer kan ekspresjonsnivåene av begge typer av markører bestemmes samtidig.

35

Eksempler på noen kondrocyttmarkører som er nyttige i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inkluderer deres GenBank™-aksesjonsnumre og SEQ IDNOs er

tilveiebrakt i tabell 1. I noen utførelsesformer blir kondrocyttmarkørene valgt fra HAPLN1, MGP, EDIL3, WISP3, AGC1, COMP, COL2A1, COL9A1, COL11A1, LECT1, S100B, CRTAC1, SOX9 og NEBL.

5 **Tabell 1: Eksempler på kondrocyttmarkører**

Markørnavn	GenBank™-aksesjonsnr	SEQ ID NO	Referanse
Hyaluronan og proteoglykan koblingsprotein 1 (HAPLN1)	NM_001884	SEQ ID NO: 2	Buckwalter et al., J. Biol. Chem., 259(9): 5361-5363 (1984)
Matrisk Gla-protein (MGP)	NM_000900	SEQ ID NO: 3	Monroe et al., Nat Genet., 21 (1): 142-4 (1999)
GF-lignede repetisjoner og diskoidin I-lignende domainer 3 (EDIL3)	NM_005711	SEQ ID NO:4	Genes Dev., 12(1): 21-33 (1998)
WNT1 induserbart signaliserings-reaksjonsvei protein 3 (WISP3)	NM_003880	SEQ ID NO: 5	Kutz et al., Mol. Cell. Biol., 25 (1): 414-21 (2005)
aggrecan 1 (AGC1)	NM_001135	SEQ ID NO: 6	Roughley et al., Eur. Cell Mater., 11 : 1-7 (2006)
bruskoligometrisk matriksprotein (COMP)	NM_000095	SEQ ID NO:7	Song et al., J. Hum. Genet, 48 (5): 222-5 (2003)
type II-kollagen (COL2A1)	NM_001844	SEQ ID NO:8	Nishimura et al., Hum. Mutat, 26(1): 36-43 (2005)
type IX kollagen (COL9A1)	NM_001851	SEQ ID NO:9	Czarny- Ratajczak et al., Am. J. Hum. Genet, 69(5): 969-80 (2001))
type XI kollagen (COL11A1)	NM_001854	SEQ ID NO:10	Poulson et al., J. Med. Genet, 41(8):e107 (2004)
Leukocyttcelle avledet kjemotaksin 1 protein (LECT1)	NM_007015	SEQ ID NO:11	Hiraki et al., Eur. J. Biochem., 260(3): 869-78(1999)
S100 kalsiumbindingsprotein	NM_006272	SEQ ID NO:12	Steffansson et al., Nature, 295

Markørnavn	GenBank™-aksesjonsnr	SEQ ID NO	Referanse
beta (S100B)			(5844): 63-4(1982)
Surt brusk protein 1 (CRTAC1)	NM_018058	SEQ ID NO:13	Steck et al., Biochem. J., 353: 169-174 (2001)
SRY-boks 9 protein (SOX9)	NM_000346	SEQ ID NO:14	Kou and Ikegawa, J. Biol. Chem., 279(49): 50942-8 (2004)
nebulette (NEBL)	NM_006393	SEQ ID NO:15	Grogan et al., Arth. & Rheum., 56(2): 586-95 (2007)

Ytterligere kondrocyttmarkører kan identifiseres ved å bruke for eksempel gen-
 "array"-analyse som beskrevet i for eksempel Leung et al., "Trends in Genetics",
 19(11): 649-659 (2003). Generelt er en kondrocyttmarkør et gen eller protein hvis
 5 normaliserte ekspresjonsnivåer er høyere i kondrocytter (for eksempel primære
 kondrocytter, dyrkede de-differensierte kondrocytter) enn i fibroblaster (for
 eksempel dermale fibroblaster) og/eller synoviocyter. I noen utførelsesformer blir
 kondrocyttmarkøren uttrykt ved minst 2, 4, 5, 8, 10, 50, 75, 100 ganger eller
 høyere i kondrocytter enn i fibroblaster og/eller synoviocyter.

10

I noen utførelsesformer blir fibroblastmarkøren og kondrocyttmarkøren valgt på en
 slik måte at ratio for deres ekspresjonsnivåer i primære kondrocytter og/eller i
 passerte kondrocytter er lik eller større enn 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100 ganger eller
 flere enn i dermale fibroblaster og/eller synoviocyter.

15

Spesielt i noen utførelsesformer omfatter fremgangsmåte 1:

- a) å erverve et mangfold av celler fra en cellekultur;
- b) å bestemme gjennomsnittsekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør i
 20 mangfoldet av celler;
- c) å bestemme gjennomsnittsekspresjonsnivået av MFAP5 i mangfoldet av
 celler; og

- d) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på gjennomsnittsekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren og gjennomsnittsekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren.

5 I noen utførelsesformer blir kulturen identifisert til å inneholde kondrocytter hvis ekspresjonsnivå av kondrocyttmarkøren er en på forhånd bestemt grenseverdi, mens ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er under en på forhånd bestemt grenseverdi. Alternativt inneholder kulturen ikke kondrocytter (for eksempel omfatter ikke kulturen minst 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 10 95 %, 98 %, 99 % eller flere kondrocytter) hvis ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren er under en på forhånd bestemt grenseverdi, mens ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er over et forhåndsbestemt grensenivå.

15 I ytterligere utførelsesformer av fremgangsmåte 1, omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for å evaluere sammensetningen av en cellekultur, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter:

- a) å isolere celler fra en bruskbiopti ervervet fra et pattedyr;
- b) å dyrke cellene isolert i trinn a) i en cellekultur;
- 20 c) å erverve en prøve fra cellekulturen;
- d) å bestemme ekspresjonsnivåene av MFAP5 og HAPLN 1 i én eller flere celler fra prøven; og
- e) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på ekspresjonsnivåene av MFAP5 og HAPLN1

25

I noen utførelsesformer omfatter trinnet å bestemme kultursammensetningen og sammenligne gjennomsnittsekspresjonsnivåene av kondrocyttmarkøren og gjennomsnittsnivået av fibroblastmarkøren. I noen slike utførelsesformer blir cellekulturen evaluert til å inneholde kondrocytter når ratioen på HAPLN1- 30 ekspresjon i forhold til MFAP5 er høyere enn 0,25. I spesielle utførelsesformer indikerer denne ratioen at cellekulturen inneholder minst 50 % kondrocytter.

I noen utførelsesformer blir markørenes ekspresjonsnivåer sammenlignet relativt til hverandre (skjønt grenseverdiene kan defineres, for eksempel som en gitt forskjell 35 mellom ekspresjonsnivåene av to markører eller en ratio derav). For eksempel, i noen utførelsesformer, indikerer en ratio av en kondrocyttmarkør (for eksempel

HAPLN1) ekspresjonsnivået i forhold til den fra en fibroblastmarkør (dvs. MFAP5), som er større enn en på forhånd bestemt grenseverdi, for eksempel 0,25, 0,55, 1, 2, 2,2, 5, 10, 25, 50 eller mer, at cellekulturen inneholder kondrocytter.

- 5 I noen utførelsesformer av fremgangsmåte 1 blir ekspresjonsnivåene av kondrocytt- og fibroblastmarkører bestemt på RNA-nivå, for eksempel ved en standardkurvefremgangsmåte av kvantitativ RT-PCR eller ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av kvantitativ RT-PCR (som måler forskjellen i antallet av grenseverdisyklus påkrevd for fibroblastmarkøren og kondrocyttmarkørene).

10

- I et relatert aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å evaluere fenotypen til en individuell celle (fremgangsmåte 2), for eksempel ved å bruke flowcytometri. Fremgangsmåten er nyttig for å identifisere individuelle celler fra en cellekultur, som inkluderer en cellekultur avledet fra brusk eller synovium, en kondrocyttkultur, en fibroblastkultur, synoviocyttkultur, eller en hvilken som helst annen egnet kultur. Fremgangsmåten er også nyttig for å identifisere individuelle celler avledet fra hvilke som helst egnede biologiske prøver hvori det er ønskelig å identifisere individuelle celler, som inkluderer bruskprøver, synoviumprøver, fibroblastprøver etc. I noen aspekter omfatter fremgangsmåte 2 å bestemme ekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør ifølge oppfinnelsen, i cellen, hvori ekspresjonsnivået under en på forhånd bestemt grenseverdi indikerer at cellen er en kondrocytt. Alternativt indikerer ekspresjonsnivået over en på forhånd bestemt grenseverdi at cellen ikke er en kondrocytt (for eksempel cellen er en fibroblast eller en synoviocytt). I noen aspekter omfatter fremgangsmåte 2:

25

- a) å bestemme ekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør i cellen;
- b) å bestemme ekspresjonsnivået av en fibroblastmarkør i cellen, og
- c) å evaluere fenotypen av cellen basert på ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren og ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren.

30

- I noen utførelsesformer identifiseres cellen som en kondrocytt hvis ekspresjonsnivå av kondrocyttmarkøren er over et på forhånd bestemt grensenivå, mens ekspresjonsnivået av fibroblastmarkøren er under et på forhånd bestemt grensenivå. Fibroblast- og kondrocyttmarkører i aspektene ifølge fremgangsmåte 2 kan velges og evalueres som beskrevet for fremgangsmåte 1 over.

35

Flowcytometri kan brukes ved å anvende kommersielt tilgjengelige antistoffer eller

slike antistoffer kan fremstilles som beskrevet i, for eksempel, Linsenmeyer et al., Biochem. Biophys. Res. Com, 92(2): 440-6 (1980).

Celler og kulturer som evalueres ved fremgangsmåtene ifølge denne oppfinnelsen
 5 kan erverves fra en hvilken som helst biologisk prøve, som inkluderer et hvilket
 som helst vev, cellekultur eller annet materiale som kan eller som ikke inneholder
 kondrocytter. I noen utførelsesformer er cellene eller kulturene som evalueres, fra
 pattedyr, spesielt menneskelig opprinnelse. I noen utførelsesformer dyrkes
 cellekulturen fra celler frigitt fra en bruskbiopsi. For eksempel, ved autolog
 10 kondrocyttimplantasjon, blir bruskceller fra prosedyren normalt dyrket fra en
 bruskbiopsi fra pasienten som mottar implantatet. Carticel® autologt
 kondrocyttprodukt (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) er et eksempel på et
 dyrket kondrocyttprodukt. I noen utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter
 cellekulturen en kollagenmatriks pakket med kondrocytter. Slike kondrocytter kan
 15 erverves fra en bruskbiopsi og dyrket forut for pakking på matriksen, for eksempel
 som anvendt i MACI® implantatproduktet. Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er
 nyttig for å identifisere og/eller bekrefte identifiseringen av celler pakket på
 kollagenstøtte forut for implantering av matriksen.

20 For å illustrere et eksempel på utnyttelse av cellekulturbestemmelses-
 fremgangsmåten, henvises det til figur 1. Denne figuren illustrerer trinnene som er
 involvert i å produsere et dyrket kondrocyttprodukt for autolog kondrocytt-
 implantering, slik som ved å bruke Carticel® autologe kondrocytter, eller for å
 produsere et dyrket kondrocyttprodukt for MACI®-implantasjonsprosedyren. I trinn
 25 1 blir en bruskbiopsi fra en pasient som gjennomgår autolog kondrocytt-
 implantering sendt for prosessering (trinn 2). Biopsimaterialet blir brutt ned i trinn
 3 for å frigi og høste kondrocytter fra brusken. De frigitte cellene plates ut i
 vevskulturflasker og ekspanderer i primærkultur i trinn 4, og hvis nødvendig,
 subdyrket. Når cellene når et adekvat antall, kan de eventuelt kryopreserveres i
 30 trinn 5 inntil pasienten er klar for å motta implantatet. Når pasienten er klar for å
 motta cellene, blir de tint og platet ut i vevskulturflasker og dyrket for å fremstille
 en samlingskultur (trinn 6).

For anvendelse i en autolog kondrocyttimplantat, hvis et tilstrekkelig antall av celler
 35 er ervervet i samlingskulturen, blir cellene sentrifugert til en cellepellet og
 resuspendert i et forsendelsesmedium, som er "sluttproduktet", slik som det
 Carticel® autologe kondrocyttproduktet (trinn 8). Dette "sluttproduktet" utsettes

for et antall av QC-tester, som inkluderer for eksempel en sterilitetstest, en celleviabilitetstest, en endotoksinest, en mykoplasmatest og en kultursammensetningstest (trinn 9 "QC-identitet" som beskrevet heri) for å sikre at de dyrkede cellene inneholder et tilstrekkelig antall av kondrocytter. Hvis de

5 dyrkede cellene passerer alle QC-testene, blir de sendt (trinn 10) til pasienten for implantering (trinn 11).

Alternativt når samlingskulturen fra trinn 6 skal anvendes i et MACI®-implantat, blir cellene resuspendert i kulturmediet, sådd ut på en kollagen-"scaffold" og dyrket

10 i 4 dager (trinn 7). På slutten av dyrkningsperioden blir cellene rensset med forsendelsesmedium for å produsere et sluttprodukt for MACI®-implantater. Dette produktet utsettes også for QC-testene som beskrevet over. Følgelig om sluttproduktet er en suspensjon av dyrkede kondrocytter slik som Carticel® autologe kondrocytter, eller sluttproduktet i et "scaffold"-utsådd produkt for

15 MACI®-implantater, er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen nyttig som en "lot"-identifiseringsanalyse eller "lot"-frigivelsesanalyse, for å bekrefte sammensetningen av en cellekultur som inneholder kondrocytter forut for forsendelse av kulturen. For eksempel kan "QC-identitet" (trinn 9) utføres ved et hvilket som helst trinn forut for sluttproduksamlingen, for eksempel før trinn 4, 5, 6, 7 eller 8.

20 Mange fremgangsmåter for å bestemme gen- eller proteinekspresjonsnivåer er kjent for personer innen fagfeltet, for eksempel som beskrevet i Sambrook et al. (utg.) Cloning: "A Laboratory Manual", 2. utg, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; "Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. (utg.) New York: John

25 Wiley & Sons, 1998). Eksempler på slike fremgangsmåter inkluderer polymerasekjedereaksjon (inkludert absolutt kvantifisering ved PCR, "real time" PCR (RT-PCR) og qRT-PCR, multipleks eller singelpleks PCR), singelcelle-PCR, Northern blot-analyser, nukleasebeskyttelsesanalyser, in situ hybridiseringsanalyser, immunhistokjemiske analyser, immuncytokjemiske analyser, elektroforeseanalyser

30 slik som gel eller kapillær, Western blot-analyser, ELISA-tester, immunpresipiteringsanalyser, kromatografibaserte analyser slik som HPLC eller gelkromatografi, massespektrometrianalyser, RNase-beskyttelsesanalyser, flowcytometrianalyser, DNA-metyleringsanalyser og histonmodifiseringsanalyser.

35 I alle fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen kan ekspresjonsnivåene på RNA eller på proteinnivå bestemmes ved å bruke en hvilken som helst egnet fremgangsmåte, som inkluderer en hvilken som helst konvensjonell fremgangsmåte. RNA-nivåer kan

bestemmes ved for eksempel kvantitativ RT-PCR (for eksempel TaqMan™ RT-PCR eller RT-PCR), Northern blot, eller en hvilken som helst fremgangsmåte for å bestemme RNA-nivåer, eller som beskrevet i eksemplene. Proteinnivåene kan bestemmes for eksempel ved å bruke Western blot, ELISA, flowcytometri, enzymatiske aktivitetsanalyser, eller en hvilken som helst fremgangsmåte for å bestemme proteinnivåer. Ekspresjonsnivåene kan skaleres og/eller normaliseres per total mengde av RNA eller protein i prøven og/eller en kontroll, som typisk kan være et "housekeeping" gen, slik som beta-aktin eller glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAPDH), eller 18S ribosomalt RNA etc.). Normalisering blir typisk gjort for å ta hensyn til variabiliteten i mengden av protein, DNA eller RNA input. For eksempel, i eksemplene normaliseres ekspresjonsnivåene til 18S ribosomalt RNA ved å bruke en standardkurve.

I illustrative utførelsesformer blir ekspresjonsnivåene av fibroblast- og kondrocytt-markører bestemt ved å bruke RT-PCR, enten ved en standardkurve eller ved en komparativ C_T -fremgangsmåte for relativ kvantifisering. I noen utførelsesformer kan absolutt kvantifisering av markørkopiantall bestemmes ved å fremstille standardkurver ved å bruke kjente mengder av markørene. De generelle fremgangsmåtene for å utføre slike analyser er beskrevet, for eksempel i Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, Part No. 4348358 Rev. E.

Når det gjelder å sammenligne to markører ved å bruke komparativ C_T -fremgangsmåten, kan mengden av ratioen fra ekspresjonsnivåene fra en fibroblastmarkør i forhold til en kondrocyttmarkør beregnes som $(1 + E)^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$, hvori $C_{T,f}$ er antallet av fibroblastmarkørgrenseverdisykler, der $C_{T,c}$ er antallet av terskelsyklus av kondrocyttmarkører, ved å anta at effektiviteten til amplifisering (E) er den samme for begge markører, og startmengden av begge markører er normalisert til samme mengde av endogen kontroll (for eksempel som i to duplikatprøver). I tilfellet $E \approx 1$, som illustrert i eksemplene, kan ratioen være omtrent som $2^{(C_{T,f} - C_{T,c})}$. Ellers kan beregningene utføres som beskrevet i Appendix A i Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System and 7300/7500 Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, Part No. 4348358 Rev E.

Ytterligere utførelsesformer av oppfinnelsen er illustrert i følgende eksempler som

har til hensikt å eksemplifisere og ikke begrense omfanget av oppfinnelsen.

EKSEMPLER

5 **Eksempel 1: Ekspresjon av HAPLN1 og MFAP5 i kondrocytter, synoviocytter og fibroblaster**

Celleisolering og -kultur. Humane kondrocyttkulturer ble isolert fra brusk ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter eller
 10 proteasefremgangsmåten for å produsere dyrkede kondrocytter. Ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter, ble bruskvev trimmet av ben og synovium og utsatt for en første nedbryting hvor vev ble enzymatisk behandlet i kollagenaseløsning i 18 timer ved 37 °C. Cellene som ble frigitt fra den første nedbrytingen, ble platet i vevskulturflasker med føtalt bovint
 15 serum (FBS) og gentamicininneholdende medium (EGHXX). Cellene ble deretter utsatt for en andre nedbryting hvor gjenværende vev fra første nedbryting ble behandlet med en kollagenase-/trypsinløsning i 2,5 timer ved 37 °C. Cellene som ble frigitt fra andre nedbryting, ble platet ut i vevskulturflasker med EGHXX. Vevsbiter som var igjen etter andre nedbryting, ble platet i vevskulturflasker med
 20 EGHXX. Ved å bruke proteaseisoleringsfremgangsmåten ble bruskvev trimmet av ben og synovium og utsatt for en første nedbryting i Pronase E (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO)-løsning i 1,5 timer ved 37 °C. Pronaseløsningen ble deretter fjernet og en andre nedbryting av brusk ble utført i kollagenaseløsning i 18 timer ved 37 °C. De frigitte cellene ble deretter platet i vevskulturflasker med EGHXX. Etter
 25 isolering var cellekultur fremgangsmåtene den samme for celler ervervet fra begge isoleringsfremgangsmåter. Primærcellekulturer ble tilsatt fersk EGHXX hver 2. til 4. dag. Når primærkulturflaskene nådde 50 % til 80 % konfluens, ble de trypsinisert til en enkel celleduspensjon, nøytralisert med EGHXX for å inaktivere trypsin, og en celletelling ble utført. Den resulterende celleduspensjonen ble deretter enten
 30 samlet, ytterligere ekspandert ved subdyrkning, eller kryopreservert for langtidslagring. Subkulturen av primærkulturen er referert til som sekundærkulturen, eller første passasje. Etterfølgende subkulturer refereres til som andre passasje, tredje passasje, fjerde passasje etc. Subdyrkningen ble utført ved å plate cellene i vevskulturflasker med EGHXX og tilsetning av fersk EGHXX hver 2.
 35 til 4. dag. Når subkulturene nådde 80 % til 100 % konfluens, ble de trypsinisert til en enkel celleduspensjon, nøytralisert med EGHXX for å inaktivere trypsin, og en celletallet ble utført. Den resulterende celleduspensjonen ble deretter enten

samplet, ytterligere ekspandert, eller kryopreservert for langtidslagring.

Humane synoviocyttekulturer (synovium avledet fra cellekulturer, også kjent som synovialfibroblaster) S1 og S2 ble ervervet fra Cell Applications Inc. (San Diego, CA) som kryopreserverte primære dyrkede celler. Synoviocytter ble platet i vevskulturflasker med EGHXX-medium og dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet over. Humane dermale fibroblastkulturer ble kjøpt fra Cell Application Inc. som kryopreserverte-primære dyrkede celler. Dermal fibroblaster ble dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet over.

Cellekulturene brukt i dette eksemplet er oppført i tabell 2.

Tabell 2: Cellekulturer brukt i RT-PCR-analyse (Eksempel 1)

Cellekultur	Celletype	Cellekulturtype
PC	Kondrocytt	Primær kultur
C1	Kondrocytt	Andre passasje
C2	Kondrocytt	Andre passasje
S1	Synoviocyt	Andre passasje
S2	Synoviocyt	Andre passasje
F1	Dermal fibroblast	Andre passasje
F2	Dermal fibroblast	Andre passasje

RNA- og cDNA-fremstilling - RNA ble isolert fra cellekulturer ved å bruke TRI-spin-prosedyren (Reno et al., Biotechniques 22:1082-6 (1997)). Isolerte RNA-konsentrasjoner ble bestemt spektrofotometrisk. For fremstilling av cDNA fra prøvene PC, C1, C2, S1, S2, F1 og F2 ble første trådssyntesekit (Roche, Indianapolis, IN) ved å bruke tilfeldige heksamerprimere kjørt i henhold til produsentens instruksjoner. Det resulterende cDNA ble lagret ved -20 °C eller -80 °C inntil analyse.

Genekspresjonsanalyse - Genekspresjonssanalyse ble utført ved å bruke kvantitativ real time RT-PCR ved å bruke enten en standardkurvefremgangsmåte eller en komparativ C_T -fremgangsmåte. Real time PCR-fremgangsmåten ble basert på 5'-nukleasekutting av en dobbelt merket oligoprobe for å rapportere sekvensspesifikk primeramplifikasjon av målsekvensen ("TaqMan™"-analyse). Ekspresjon av genene som koder for bruskkoblingsproteinet (HAPLN1) og mikrofibrillarassosiert protein 5 (MFAP5) ble analysert ved å bruke henholdsvis TaqMan® Gene Expression Analyser Hs00157103_m1 og Hs00185803_m1 (Applied Biosystems Inc.). Real time PCR-en ble fremstilt med TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no UNG (katalognummer 4324018, Applied Biosystems Inc.), egnet TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems), og prøve cDNA ble brukt i henhold til Universal PCR Mix-protokollen. Amplifiseringene ble kjørt på et ABI 7500 Real-Time PCR-system (Applied Biosystems Inc.) ved å bruke standard TaqMan™-sykler og datainnsamlingsprogram for denne konfigurasjonen. Duplikat på 25 µl reaksjoner ble kjørt med opptil 5 ng av input cDNA per brønn. En terskel på 0,1 enheter ble brukt for alle analysene.

Standardkurvefremgangsmåte. Standardkurvefremgangsmåten ble utført ved å bruke Eukaryotisk 18S rRNA endogen kontrollanalyse (katalognummer 4319413E, Applied Biosystems Inc.), hvori 18S rRNA blir brukt som en intern kontroll i forhold til normalisert RT-PCR-resultater for å ta høyde for inputvariasjon. For å kvantifisere de relative nivåene av ekspresjonen av hvert gen, ble fortyninger av det primære kondrocytt (PC) cDNA kjørt for å generere en standardkurve med 7500 system software. Nivået for hver testprøves ekspresjon ble bestemt fra standardkurven, og de resulterende mRNA-ratioer i forhold til primærkondrocyttkontroll (PC) ble delt ved prøvens 18S rRNA ratio i forhold til PC for å normalisere for cDNA-påsetting ("loading").

Komparativ C_T -fremgangsmåte. Komparativ C_T -analyse ble utført for å bestemme de relative genekspresjonsratioene til HAPLN1 i forhold til MFAP5 i forskjellige prøver fra real time kvantitativ RT-PCR genekspresjonsanalyserådata produsert som beskrevet over. Den komparative C_T -fremgangsmåten tilveiebringer et relativt mål på ratio av HAPLN1 i forhold til MFAP5, som tillater en direkte sammenligning mellom testprøvene uten behov for standarder, standardkurveanalyse eller aktuelle kalibratorer. Denne fremgangsmåten kan anvendes i tilfellet av HAPLN1- og MFAP5-analyser brukt i dette eksempelet fordi de følgende fire betingelser var oppfylt: 1) analyseutførelsen var konsistent fra kjøring til kjøring; 2) ekvivalente mengder av

RNA ble kjørt i HAPLN1, MFAP5 og endogene kontrollanalyser; 3) C_T -verdien for endogent kontrollgen, 18S rRNA ble analysert lavere enn HAPLN1- C_T eller MFAP5- C_T når ekvivalente mengder av RNA ble kjørt i samme analyse, og dermed ble 18S C_T alltid kvantifiserbart når enten HAPLN1 eller MFAP5 var kvantifiserbare; og 4) fremgangsmåten brukte en arbitrær selektert teoretisk kalibrator definert som en teoretisk prøve som inneholdt ratioen av HAPLN1/MFAP5 som ga en HAPLN1- C_T -verdi lik MFAP5- C_T verdien når de andre tre tilstandene som nevnt over var tilstede. Derivasjon av ligningen brukt for denne komparative C_T -fremgangsmåten er som følger. Når mengden av målggen i en prøve, normalisert til et endogent kontrollgen og relativt til en kalibrator, er gitt ved:

$$(1+E)^{-\Delta\Delta C_{T,\text{målggen}}}$$

hvor

15 E = amplifiseringseffektivitet

hvor

$$\Delta\Delta C_{T,\text{målggen}} = \text{prøve } \Delta C_{T,\text{målggen}} - \text{kalibrator } \Delta C_{T,\text{målggen}}$$

og hvor

20
$$\Delta C_{T,\text{målggen}} = C_{T,\text{målggen}} - C_{T,\text{endogent kontrollgen}}$$

(Se Liu, W. og Saint, D.A., Analytical Biochemistry, 302: 52-59 (2002); Livak, K.J, ABI Prism 7700 Sequence Detection System, User Bulletin 2, ABI publication 4303859,1997). Dermed kan ratioen mellom HAPLN1 og MFAP5 beskrives som:

25
$$(1+E)^{-\Delta\Delta C_{T,\text{HAPLN1}}} / (1+E)^{-\Delta\Delta C_{T,\text{MFAP5}}}$$

som tilsvarer:

30
$$(1+E)^{-\{[\text{prøve } C_{T,\text{HAPLN1}} - \text{prøve } C_{T,\text{endogent kontrollgen}}] - [\text{kalibrator } C_{T,\text{HAPLN1}} - \text{kalibrator } C_{T,\text{endogent kontrollgen}}]\}} / (1+E)^{-\{[\text{prøve } C_{T,\text{MFAP5}} - \text{prøve } C_{T,\text{endogent kontrollgen}}] - [\text{kalibrator } C_{T,\text{MFAP5}} - \text{kalibrator } C_{T,\text{endogent kontrollgen}}]\}})$$

Hvis den samme mengde av prøve kjøres i hver analyse, da kan C_T av prøveendogent kontrollgen være representert ved betegnelsen x. Hvis den samme mengden av kalibrator er kjørt i hver analyse, da kan C_T av kalibratorendogent

35

kontrollgen være representert ved betegnelsen y . Ved å substituere disse betegnelse kan ligningen utledes til:

$$(1+E)^{-\{[\text{prøve } C_{T,HAPLN1} - x] - [\text{kalibrator } C_{T,HAPLN1} - y]\}} / (1+E)^{-\{[\text{prøve } C_{T,MFAP5} - x] - [\text{kalibrator } C_{T,MFAP5} - y]\}}$$

som tilsvarer:

$$(1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,HAPLN1}] - [y - \text{kalibrator } C_{T,HAPLN1}])} / (1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,MFAP5}] - [y - \text{kalibrator } C_{T,MFAP5}])}$$

Hvis kalibratoren er definert som en teoretisk prøve som inneholder ratioen til HAPLN1 / MFAP5 som gir en $C_{T,HAPLN1}$ verdi lik den $C_{T,MFAP5}$ verdien når ekvivalente mengder av kalibratoren kjøres i hver analyse, da kan betegnelsen z substitueres for kalibratoren $C_{T,HAPLN1}$ og kalibratoren $C_{T,MFAP5}$. Ligningen kan dermed utledes til:

$$(1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,HAPLN1}] - [y - z])} / (1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,MFAP5}] - [y - z])}$$

som tilsvarer:

$$(1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,HAPLN1}] - [y - z] - [x - \text{prøve } C_{T,MFAP5}] + [y - z])}$$

som tilsvarer:

$$(1+E)^{([x - \text{prøve } C_{T,HAPLN1}] - [x - \text{prøve } C_{T,MFAP5}])}$$

som tilsvarer:

$$(1+E)^{(\text{prøve } C_{T,MFAP5} - \text{prøve } C_{T,HAPLN1})}$$

og hvis $E=1$ (100 % effektivitet), da tilsvarer den relative ratioen til HAPLN1 i forhold til MFAP5:

$$2^{(\text{prøve } C_{T,MFAP5} - \text{prøve } C_{T,HAPLN1})}$$

De ovennevnte ligningene utledes til en endelig formel slik at bare to variabler, prøven HAPLN1 C_T og prøven MFAP5 C_T , er ukjente. Denne formelen anvendes når prøvene blir analysert under betingelser beskrevet over, og teoretisk kalibrator som anvendes settes som beskrevet over.

5

Figur 2 viser HAPLN1-ekspresjonsnivåer i flere cellelinjer som bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. Figur 3 viser ekspresjonsnivåene av MFAP5 i de samme celleprøvene som vist i figur 2, som bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. HAPLN1 ble uttrykt ved høyere nivåer i kondrocyttcellekulturene enn i synoviocyt- og fibroblastcellekulturene. MFAP5 ble uttrykt ved høyere nivåer i synoviocyt- og fibroblastcellekulturer enn i kondrocyttcellekulturene.

10

Figur 4 viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåene fra figurene 2 og 3. Ratioen i primærkondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

15

Figur 5 viser ratioene av HAPLN1 og MFAP5 ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i figur 2. Imidlertid ble ekspresjonsnivåene bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR. Resultatene av C_T -fremgangsmåten var lik de resultatene ervervet ved standardkurvefremgangsmåten.

20

Eksempel 2: Ekspresjon av HAPLN1 og MFAP5 i ytterligere linjer av kondrocytter, synoviocytter og fibroblaster

25

Ekspresjonsnivåer av HAPLN1 og MFAP5 ble bestemt i ytterligere cellekulturer for å bekrefte kvaliteten av fremgangsmåten for å differensiere mellom kondrocytt- og synoviocyttekulturer. Kulturene anvendt i dette eksemplet er oppført i tabell 3.

Tabell 3: Cellekulturer brukt i RT-PCR analyse (eksempel 2)

30

Cellekultur	Celletype	Cellekulturtype
PC	Kondrocytt	Primær kultur
C3	Kondrocytt	Andre passasje
C4	Kondrocytt	Andre passasje
C5	Kondrocytt	Andre passasje
C6	Kondrocytt	Andre passasje

C7	Kondrocytt	Andre passasje
S3	Synoviocyt	Andre passasje
S4	Synoviocyt	Andre passasje
S5	Synoviocyt	Andre passasje
S6	Synoviocyt	Andre passasje
S7	Synoviocyt	Andre passasje

Celleisolering og -kultur. Humane kondrocyttcellekulturer C3, C4, C5, C6 og C7 ble isolert og dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet i eksempel 1. Humane synoviocyttekulturer (synovium-utledede cellekulturer, også kjent som synovialfibroblaster) ble enten isolert ved Genzyme eller ervervet fra Cell Applications Inc. (San Diego, CA). Linjer S4, S6 og S7 ble isolert ved Genzyme ved å bruke forskjellige prosedyrer. S4 ble isolert ved å utsette finhakket synoviumvev for nedbryting i kollagenaseløsning i 3,5 timer ved 37 °C, etterfulgt av en andre nedbryting i trypsinløsning i 1 time ved 37 °C. Linje S6 ble isolert ved å utsette finhakket synoviumvev for nedbryting i en løsning som inneholder kollagenase og DNase i 2 timer ved 37 °C. Linje S7 ble isolert ved å utsette finhakket synovium til fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter. Etter isoleringen ble synoviumutledede celler platet i vevskulturflasker med EGHXX-medium og dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet i eksempel 1. Linjer S3 og S5 ble ervervet fra Cell Applications Inc. som kryopreserverte første passasjeceller. Etter opptining ble cellene fra linjer S3 og S5 platet i vevskulturflasker med EGHXX-medium og dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet i eksempel 1.

20

RNA-isolering og cDNA-fremstilling. RNA-fremstillinger for kondrocyttcellekulturer C3, C4, C5, C6, C7 og synoviocyttekulturer S3, S4, S5, S6, S7 ble utført som beskrevet i eksempel 1. RNA fra disse prøvene ble reverst transkribert til cDNA ved å bruke High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) i henhold til forhandlerens instruksjoner. PC cDNA fra eksempel 1 ble brukt i dette eksemplet. cDNA ble lagret ved -20 °C eller -80 °C inntil analyse.

25

Genekspresjonsanalyse. Genekspresjonsanalyse ble utført ved å bruke RT-PCR som beskrevet i eksempel 1.

30

Figur 6 viser HAPLN1-ekspresjonsnivåer i et antall av ytterligere kondrocytt- og synoviocytlinjer. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR og normalisert til 18S ribosomalt RNA.

5 Figur 7 viser MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i figur 6. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR og normalisert til 18S ribosomalt RNA.

Figur 8 viser ratioer av HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer fra figurene 6 og 7. 10 Ratioen i primærkondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert tilsvarende.

Figur 9 viser ratioer av HAPLN1 og MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som over i figur 6. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T - 15 fremgangsmåte av RT-PCR, og ratioene ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

RT-PCR-resultatene i de ytterligere cellelinjene var konsistente med resultatene ervervet i eksempel 1.

20 **Eksempel 3: Ekspresjon av HAPLN1 og MFAP5 i kondrocytter, synoviocytter og fibroblaster ved å bruke spesialdesignede primere og prober**

Testing av forskjellige kondrocytt-, synoviocyt- og dermalfibroblastkulturer utført med primere og prober fra kjente oligonukleotidsekvenser.

25

Celleisolering og -kultur. Cellelinjene som anvendes i dette eksemplet, er oppført i tabell 4 og 5 under. Humane kondrocyttcellekulturer C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C26, C28, C30 og C34 ble isolert og dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet i eksempel 1. Humane 30 kondrocyttcellekulturer C21, C22, C23, C24, C25, C27, C29, C31, C32 og C33 ble isolert (ved å bruke proteasefremgangsmåten) og dyrket som beskrevet i eksempel 1. Celleisolering og kulturfremgangsmåter for humane synoviocyttkulturer S1, S2, S3, S4, S5, S6 og S7 ble beskrevet i eksempler 1 og 2. Synoviocyttkultur S9 ble isolert ved å utsette finhakket synoviumvev til nedbrytning i en løsning som 35 inneholder kollagenase og DNase i 2 timer ved 37 °C. Synoviocyttkultur S10 ble isolert ved å utsette finhakket synoviumvev til nedbrytning i kollagenaseløsning i 3,5 timer ved 37 °C, etterfulgt av en andre nedbrytning i trypsinløsning i 1 time

ved 37 °C. Synoviocytlinjer S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17 og S18 ble ervervet fra Cell Applications Inc. som kryopreserverte førstepassasjeceller. Dermale fibroblastlinjer F1, F2, F3, F4, F5, F6, F8, F9, F10 og F11 ble ervervet fra Cell Applications Inc. som kryopreserverte primære dyrkede celler. Alle
 5 cellekulturer ble dyrket ved å bruke fremgangsmåten for å produsere Carticel® autologe kondrocytter som beskrevet i eksempel 1.

Tabell 4: Første sett av cellekulturer brukt i RT-PCR-analyse (Eksempel 3)

Cellekultur	Cellotype	Cellekulturtype
C1	Kondrocytt	Andre passasje
C2	Kondrocytt	Andre passasje
C3	Kondrocytt	Andre passasje
C4	Kondrocytt	Andre passasje
C5	Kondrocytt	Andre passasje
C6	Kondrocytt	Andre passasje
C7	Kondrocytt	Andre passasje
C8	Kondrocytt	Andre passasje
S1	Synoviocyt	Andre passasje
S2	Synoviocyt	Andre passasje
S3	Synoviocyt	Andre passasje
S4	Synoviocyt	Andre passasje
S5	Synoviocyt	Andre passasje
S6	Synoviocyt	Andre passasje
S7	Synoviocyt	Andre passasje
S9	Synoviocyt	Første passasje
S10	Synoviocyt	Tredje passasje
S11	Synoviocyt	Tredje passasje
S12	Synoviocyt	Tredje passasje
S13	Synoviocyt	Tredje passasje
F1	Dermal fibroblast	Andre passasje
F2	Dermal fibroblast	Andre passasje
F3	Dermal fibroblast	Andre passasje
F4	Dermal fibroblast	Andre passasje
F5	Dermal fibroblast	Andre passasje
F6	Dermal fibroblast	Andre passasje

Tabell 5: Andre sett av cellekulturer brukt i RT-PCR-analyser (Eksempel 3)

Cellekultur	Celletype	Cellekulturtype
C21	Kondrocytt	Andre passasje
C22	Kondrocytt	Andre passasje
C23	Kondrocytt	Andre passasje
C24	Kondrocytt	Andre passasje
C25	Kondrocytt	Andre passasje
C26	Kondrocytt	Andre passasje
C27	Kondrocytt	Andre passasje
C28	Kondrocytt	Andre passasje
C29	Kondrocytt	Andre passasje
C30	Kondrocytt	Andre passasje
C31	Kondrocytt	Andre passasje
C32	Kondrocytt	Andre passasje
C33	Kondrocytt	Andre passasje
C34	Kondrocytt	Andre passasje
S14	Synoviocyt	Tredje passasje
S15	Synoviocyt	Tredje passasje
S16	Synoviocyt	Tredje passasje
S17	Synoviocyt	Andre passasje
S18	Synoviocyt	Andre passasje
F8	Dermal fibroblast	Andre passasje
F9	Dermal fibroblast	Andre passasje
F10	Dermal fibroblast	Andre passasje
F11	Dermal fibroblast	Andre passasje

RNA-isolering og cDNA-fremstilling. RNA-fremstillingene fra kondrocyttlinjene C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, synoviocytlinjene S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, og dermal-fibroblastlinjene F1 og F2 ble beskrevet i eksempler 1 og 2. For fremstilling av RNA
5 fra kondrocyttlinje C8, synoviocytlinjene S9, S10, S11, S12, S13, S14, dermal-fibroblastlinjer F3, F4, F5 og F6, og alle linjer listet i tabell 5, ble RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) RNA-isoleringsfremgangsmåten anvendt. For RNeasy™-isolering ble 360 µl av lysisløsningen tilsatt til cellepelleten som inneholdt opptil én

million celler. Prøvene ble umiddelbart vortekssentrifugert ved full speed i 30 sekunder, deretter plassert ved 37 °C i 5 minutter. Etter inkubering ble prøvene rystet for hånd i 10 sekunder, etterfulgt av ytterligere 30 sekunder vortekssentrifugering ved full speed. Innholdet i hvert rør ble samlet sammen, og lysatet ble kjørt gjennom en Qiashredder™-kolonne (Qiagen). Tre hundre og femti 5 µl av Qiashredder-lysatet ble brukt i RNeasy™ prosedyren etterfulgt av produsentens protokoll for isolering av RNA fra dyreceller. Kolonnen ble eluert med en enkel eluering som besto av 30 µl vann. RNA ble reverst transkribert til cDNA ved å bruke High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) i henhold til produsentens instruksjoner. Det resulterende 10 cDNA ble lagret ved -20 °C eller -80 °C inntil analyse.

Genekspresjonsanalyse. RT-PCR analyser ble utført med spesialdesignede primere og prober spesifikke for regionene til HAPLN1 og MFAP5 mRNA. 15 Sekvensinformasjonen for de spesiallagde primerne og probene er vist i tabell 6. Forkortelser: 6FAM = 6-karboksyfluorescein; VIC™ et varemerke for Applied Biosystems Inc., og er en fluorofor; MGBNFQ = "minor groove" binder ikke-fluorescerende quencher. Primerne ble ervervet fra Invitrogen Corp (Carlsbad, CA). Prober ble ervervet fra Applied Biosystems Inc. For HAPLN1 er målet for den fremre 20 primeren nukleotidene 543 til 570 av HAPLN1-sekvensen deponert under GenBank-aksesjonsnr. NM_001884.2 (SEQ ID NO: 2), målet for den reverse primeren er nukleotidene 603 til 622, og målet for proben er nukleotidene 584 til 601 fra samme sekvens. For MFAP5 er målet for den fremre primeren nukleotidene 301 til 322 fra MFAP5-sekvensen deponert under GenBank-aksesjonsnr. NM_003480.2 25 (SEQ ID NO: 1); målet for den reverse primeren er nukleotidene 353 til 372, og målet for proben er nukleotidene 334 til 350 fra den samme sekvensen. Real time PCR ble utført med TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix, no UNG (katalognummer 4352042, Applied Biosystems Inc.), 900 nM primere, 250 nM prober og opptil 5 ng av prøve cDNA i henhold til TaqMan™ Fast Universal PCR Mix 30 protokoll. Reaksjonsvolumet var 13 µl og amplifiseringene ble kjørt på et ABI 7500 Real-Time PCR-system (Applied Biosystems Inc.) ved å bruke default Fast TaqMan™-syklusen og datasamlingsprogram for denne konfigurasjonen. En terskel på 0,1 enhet ble brukt for alle analysene. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T-fremgangsmåte av RT-PCR beskrevet i eksempel 1.

Tabell 6: Spesialbestilte primere og probesekvenser

Markør	Fremre primer	Revers primer	Probe
HAPLN1	5' TGAAGGATTAGAAG ATGATACTGTTGTG 3' (SEQ ID NO:16)	5' GCCCCAGTCG TGGAAAGTAA 3' (SEQ ID NO:17)	5' VIC / TACAAGGTGTGGTATTCC / MGBNFQ 3' (SEQ ID NO:18)
MFAP5	5' CGAGGAGACGA TGTGACTCAAG 3' (SEQ ID NO:19)	5' AGCGGGGATCA TTCACCAGAT 3' (SEQ ID NO:20)	5' 6FAM / ACATTCACAGAAGATCC / MGBNFQ 3' (SEQ ID NO:21)

Figur 10A viser ratioene av HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i de samme linjene som vist i figurene 2 og 6, så vel som ytterligere kondrocytt-, synoviocytt- og dermalfibroblastlinjer fra tabell 4. Figur 10B viser ratioene til HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i linjer fra tabell 5. Resultatene ervervet med de spesialdesignede primerne og probene var de samme som resultatene beskrevet i eksempler 1 og 2.

Eksempel 4: Sammenligning av HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåer i kondrocytt-, synoviocytt- og fibroblastkulturer i monolag og kollagen "Scaffolds"

Ekspresjonsnivåer av HAPLN1 og MFAP5 ble sammenlignet i forskjellige typer av kulturer i monolag og kollagen "scaffolds".

Celleisolering og -kultur. Kondrocyttkulturer C9, C10, C11, C12, C13, C14, C15, C16, C17 og C18 ble isolert ved å bruke proteasefremgangsmåten som beskrevet i eksempel 1, og dyrket som beskrevet i eksempel 1. Synoviocyttkultur S7 ble isolert og dyrket som beskrevet i eksempler 1 og 2. Dermalfibroblastkulturer F2 og F7 ble ervervet fra Cell Applications Inc. som kryopreserverte primært dyrkede celler og dyrket som beskrevet i eksempel 1. Ved ferdigstilling av andre passasjekultur (tredje passasje for kultur S7), ble en prøve tatt for RNA-isolering ("dag 0" eller monolagprøve), og deretter ble cellene resuspendert i EGHXX-medium og sådd ut på en 20 cm² MAIX™ "scaffold" (ACI-MAIX™ kollagenmembran, CE, Matricel GmbH, D-52134 Herzogenrath, Tyskland). Cellene fikk feste seg i 1 time ved 37 °C, deretter ble "scaffoldet" tilsatt ytterligere EGHXX og dyrket i 4 dager. "Scaffold"-kulturene som inneholdt synoviocytter og dermale fibroblaster ble også fremstilt på

samme måte. Etter 4 dager med "scaffold"- kultur ble kulturene samlet ved å bruke en 8 mm biopsipunch ("dag 4" eller "scaffold"-prøve), og RNA-isolering ble utført.

- 5 *RNA-isolering og cDNA-fremstilling.* RNA ble isolert ved å bruke RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). For RNeasy™ -isolering, 360 µl av lysisløsningen ble tilsatt til MACI®-implantatløsningene (opptil to 8 mm MACI®-implantatpunches per preparering). Prøvene ble umiddelbart vortekssentrifugert ved høyeste hastighet i 30 sekunder, deretter plassert ved 37 °C i 5 minutter. Etter inkubering ble prøvene
- 10 rystet for hånd i 10 sekunder for å folde ut membranen som medfulgte ved ytterligere 30 sekunder vortekssentrifugering ved høyeste hastighet. Innholdet i hvert rør ble samlet opp og lysatet ble kjørt gjennom en Qiasredder-kolonne (Qiagen). Tre hundre og femti µl av det Qiasreddede lysatet ble brukt i RNeasy™ prosedyren, etterfulgt av forhandlerens protokoll for isolering av RNA fra dyreceller.
- 15 Kolonnene ble eluert med en enkel eluering som besto av 30 µl vann. Fremstilling av cDNA fra prøve RNA ble utført ved å bruke High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) i henhold til produsentens instruksjoner. cDNA ble lagret ved -20 °C eller -80 °C.

- 20 Tabell 7 viser cellekulturene og konfigurasjonene som ble brukt i dette eksemplet

Tabell 7: Cellekulturer brukt i RT-PCR-analyse (Eksempel 4)

Kulturkode	Celletype	Kulturtype	Konfigurasjon
C9 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C10 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C11 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C12 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C13 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C14 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C15 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C16 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C17 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
C18 dag 0	Kondrocytt	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
S7 dag 0	Synoviocyt	Tredje passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
F7 dag 0	Dermal fibroblast	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet
F2 dag 0	Dermal fibroblast	Andre passasje	5 X 10 ⁵ cellepellet

C9 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C10 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C11 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C12 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C13 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C14 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C15 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C16 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C17 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
C18 dag 4	Kondrocytt	MACI®-implantat	8 mm punch
S7 dag 4	Synoviocyt	MACI®-implantat	8 mm punch
F7 dag 4	Dermal fibroblast	MACI®-implantat	8 mm punch
F2 dag 4	Dermal fibroblast	MACI®-implantat	8 mm punch

Genekspresjonsanalyse. Genekspresjonsanalyse av monolaget og MACI®-implantat-cDNA ble utført på måten som er beskrevet over i eksempel 1.

- 5 Figur 11 viser en sammenligning mellom ekspresjonsnivåratioer for HAPLN1 og MFAP5 i monolag- og kollagen-"scaffold"-kulturer. HAPLN1- og MFAP5-ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en standardkurvefremgangsmåte av RT-PCR. Ekspresjonsnivåene ble normalisert til 18S ribosomalt RNA. Ratioen i monolagskulturen til primære kondrocytter (PC) ble skalert til 1; andre ratioer ble skalert
- 10 tilsvarende.

Figur 12 viser en sammenligning mellom ekspresjonsnivåratioene for HAPLN1 og MFAP5 i monolag- og kollagen-"scaffold"-kulturene ved å bruke samme linjer som vist i figur 11. Ekspresjonsnivåene til HAPLN1 og MFAP5 ble bestemt ved en

15 komparativ C_T fremgangsmåte av RT-PCR og ratioene ble beregnet som

$$2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}.$$

Resultatene ervervet i "scaffold"-kulturene var lik de som ble ervervet i monolagskulturene.

20

Eksempel 5: Ekspresjon av HAPLN1 og MFAP5 som en funksjon av antall passasjer

Ratioen av HAPLN1 i forhold til MFAP5 i forskjellige kulturnivåer ble undersøkt.

Celleisolering og -kultur. Kondrocyttkulturene C19, C20, C31 og C32 og C33 ble isolert ved å bruke proteasefremgangsmåten som beskrevet i eksempel 1, og dyrket som beskrevet i eksempel 1. Synoviocyttkulturer S6 og S7 ble isolert og dyrket som beskrevet i eksempler 1 og 2. Synoviocyttkultur S8 ble isolert ved å utsette finhakket synoviumvev for nedbryting i en løsning som inneholder kollagenase og DNase i 2 timer ved 37 °C. Cellekulturer S8 ble utført som beskrevet i eksempel 1. For kondrocyttkulturer som C19, C20, C31, C32 og C33 prøver av bruskutledede celler (merket "0" i figur 14A og 14B), primær dyrkede celler (merket "1" i figur 14A og 14B), første passasjeceller (merket "2" i figur 14A og 14B), og andre passasjeceller (merket "3" i figur 14A og 14B) ble tatt. For synoviocyttkultur S7 ble prøver av primær dyrket (merket "1" i figur 13), første passasje (merket "2" i figur 13), andre passasje (merket "3" i figur 13), tredje passasje (merket "4" i figur 13), og fjerde passasje (merket "5" i figur 13) celler ble tatt. For synoviocyttkulturer S6 og S8 ble prøver av første passasje (merket "2" på figur 13), andre passasje (merket "3" på figur 13), tredje passasje (merket "4" på figur 13), og fjerde passasje (merket "5" på figur 13) celler ble tatt.

RNA-isolering og cDNA-fremstilling. RNA og cDNA ble fremstilt ved å bruke RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) og High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Inc.) som beskrevet i eksempel 3.

Genekspresjonsanalyse. Genekspresjonsanalyse av synoviocytprøvene ble utført som beskrevet i eksempel 1. Genekspresjonsanalysene av kondrocyttprøvene ble utført som beskrevet i eksempel 3.

Figurer 13, 14 A og 14b viser endringen i ekspresjonsnivåratioene for HAPLN1 og MFAP5 som en funksjon av antall passasjer. Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T fremgangsmåte av RT-PCR. HAPLN1:MFAP5-ratioer ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$.

Ratioene av HAPLN1 i forhold til MFAP5 var konsekvent lave ved alle dyrkningsnivåer for synoviocytprøvene i forhold til kondrocyttprøvene. Ratioene til HAPLN1 i forhold til MFAP5 var konsekvent høye ved alle dyrkningsnivåene for kondrocyttprøvene i forhold til synoviocytprøvene.

Eksempel 6: Ekspresjon av HAPLN1 og MFAP5 i blandede cellekulturer

Genekspresjonsanalyse ble anvendt på blandede kulturer av kondrocytt- og synoviocytter for å evaluere sensitivitetsnivået til fremgangsmåten i blandede kulturer. Cellekulturer fra humane kondrocytter og humane synoviocytter ble brukt for å fremstille blandinger av to celletyper ved følgende andeler:

- 1) 0 % kondrocytter / 100 % synoviocytter
- 2) 25 % kondrocytter / 75 % synoviocytter
- 3) 50 % kondrocytter / 50 % synoviocytter
- 4) 75 % kondrocytter / 25 % synoviocytter
- 5) 100 % kondrocytter / 0 % synoviocytter

Celleisolering og -kultur. Kondrocyttlinjer C5, C6 og C8 ble isolert og dyrket som beskrevet i eksempler 1 og 2. Synoviocyttekulturer S6, S7 og S9 ble isolert og dyrket som beskrevet i eksempler 1, 2 og 3. For blandingseksperiment 1 ble andre passasjekulturer av kondrocyttlinjen 6 (C6) og synoviocytlinjen 6 (S6) anvendt. For blandingseksperiment 2 ble første passasjekulturer av kondrocyttlinje 8 (C8) og synoviocytlinje 7 (S7) anvendt. For blandingseksperiment 3 ble første passasjekulturer av kondrocyttlinje 5 (C5) og synoviocytlinje 9 (S9) anvendt.

RNA-isolering og cDNA-fremstilling. RNA og cDNA ble fremstilt ved å bruke RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) og High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Inc.) som beskrevet i eksempel 3.

Genekspresjonsanalyse. Genekspresjonsanalyse ble utført som beskrevet i eksempel 3.

Ekspresjonsnivåene ble bestemt ved en komparativ C_T -fremgangsmåte av RT-PCR. HAPLN1:MFAP5-ratioer ble beregnet som $2^{(C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1})}$. Resultatene av blandeeksperimentene er tilveiebrakt i figur 15, som viser ratioene til ekspresjonsnivåene av HAPLN1 og MFAP5 i prøver som består av blandede populasjoner av kondrocytter og synoviocytter. I blandingene som inneholder 75 % eller mindre kondrocytter og 25 % eller mer synoviocytter, var HAPLN1:MFAP5-ekspresjonsnivåratioene omtrent 1 eller lavere. Høyere ratioer korresponderer til høyere andeler av kondrocytter i de testede prøvene. Evnen til analysen å skjelne blandinger av cellekulturer viste at, i gjennomsnitt, at prøver besto av minst 67 %

kondrocytter med balansen bestående av synovialfibroblaster for å produsere en positiv $C_{T, MFAP5} - C_{T, HAPLN1}$. Kontaminering av andre celletyper, slik som dermalfibroblaster, kan også detekteres med denne analysen.

5 **Eksempel 7: Analyse av sammenhengen mellom analyserespons og molekyllær ratio av markører**

Syntetiske RNA-transkripter fra HAPLN1 og MFAP5 ble anvendt for å bestemme sammenhengen mellom analyserespons og den molekyllære ratio av markørene i testprøvene. For det første ble primær PCR (Platinum PCR Supermix, Invitrogen katalognummer 11306-016) utført på humant cDNA ved å bruke primerne oppført i tabell 8. For HAPLN1 amplifiserte disse primerne nukleotider fra posisjoner 256 til 1171 fra HAPLN1-genet (aksesjonsnr. NM_001884.2). For MFAP5 amplifiserte disse primerne nukleotider fra posisjoner 32 til 728 fra MFAP5-genet (aksesjonsnr. NM_003480.2). PCR-produktene ble analysert på 1,5 % trisacetat EDTA (TAE) agarosegeler ved å bruke 100 basepar molekyllære størrelsesmarkører (100 bp PCR Molecular Ruler, BioRad katalognummer 170-8206) for referanse, og SYBR Green I (Invitrogen katalognummer S-7563) gelfarging. De resulterende primære amplikonene ble gelrenset med 4 % trisborat EDTA (TBE) polyakrylamid (PAGE) geler og brukt som et templat for sekundær PCR med primerne oppført i tabell 8. Gelrenset primæramplikontemplat for den sekundære MFAP5-amplifiseringen ble påsatt ved 0,56 ng per 200 µl av sekundærreaksjon. Gelrensningsprimæramplikontemplatet for den sekundære HAPLN1-amplifiseringen ble påsatt ved 2,5 ng per 900 µl av sekundærreaksjon. Sekundæramplikonene ble renset fra nativt TBE PAGE-geler som beskrevet og brukt som templat for *in vitro* transkripsjon med et Ambion Megascript T7 Kit. Opp til 1,3 µg av sekundært amplikontemplat ble brukt per 20 µL transkripsjonsreaksjon. De resulterende transkriptene ble gelrenset med 6 % TBE-Urea (TBU) polyakrylamidgeler, resuspendert i 0,1 mM EDTA, og kvantifisert spektrofotometrisk med avlesninger utført i duplikat ved å bruke en konversjonsfaktor på 1_{A260} enhet korresponderende til en konsentrasjon på 40 ng/µL RNA. De gelrensede transkriptene ble analysert på 6 % TBU-geler for å vurdere renhet. Etter bestemmelse av renhet ved PAGE-analyse og kvantifisering ved spektrofotometri, ble antallet av transkriptkopier per µL bestemt ved å bruke konverteringsfaktorer oppført i tabell 9. Disse konverteringsfaktorene antar en gjennomsnitts basemolekylvekt på 343 Dalton. Avagadros konstant var antatt å være $6,02 \times 10^{23}$ /mol. Det ble også antatt at den første basen som ble transkribert var +1 G fra T7 promotoren, etterfulgt av målsekvensen. Transkriptene ble

fortynnet i gjær RNA bærerbuffer (20 ng/ μ L løsning av gjær RNA (Ambion katalognummer AM7120G) i nukleasefritt vann) ved konsentrasjoner i området fra 10^3 til 10^8 kopier/ μ L. Fortynningene ble deretter testet ved å bruke RT-PCR prosedyrer gitt i eksempel 3 i patentsøknaden, med unntak av at 2 μ L cDNA ble
 5 brukt per 13 μ L PCR-reaksjon. Ratio av HAPLN1:MFAP5 ble deretter beregnet for hver fortynning ved å bruke den komparative Ct-fremgangsmåten som beskrevet i eksempel 4 i patentsøknaden.

Analyseresponsen ved å bruke kopiantallstandarder ble sammenlignet med den
 10 kjente molekylære ratioen. Disse resultatene er vist i tabell 10. Med sammenligningen mellom analyseresponsen og den molekylære ratioen som ble bestemt, ble de eksakte molekylærratioene ved forskjellige analyseresponser beregnet. Disse resultatene, vist i tabell 11, indikerer at når den komparative Ct bestemte akseptansgrense er lik 1 (for eksempel, når HAPLN1:MFAP5 = 1),
 15 korresponderer dette til en eksakt molekylær ratio av HAPLN1:MFAP5 på 2,212.

Tabell 8: Primere som anvendes for amplifisering av kopiantallstandarder

Markør	Fremre primer (primær PCR)	Fremre primer (sekundær PCR)	Revers primer (primær og sekundær PCR)
HAPLN1	5' GCCAAGGTGTTTT CACACAG 3' (SEQ ID NO:22)	5' TAATACGACTCACTATAGGG GC CAAGGTGTTTT CACACAG 3' (SEQ ID NO:23)	5' CTCTGAAGCAGTA GACACCA 3' (SEQ ID NO:24)
MFAP5	5' CCTAGCCTGGCTT TCTTGCTC 3' (SEQ ID NO:25)	5' TAATACGACTCACTATAG GGCCT AGCCTGGCTTTCTTGCTC 3' (SEQ ID NO:26)	5' CCATTGGGTCTCT GCAAATCC 3' (SEQ ID NO:27)

Tabell 9: Forventede transkriptstørrelser og konverteringsfaktorer

Transkript	Forventet transkriptstørrelse (baser)	Molekylvekt (Dalton)	Kopier/mg
HAPLN1	917	$3,145 \times 10^5$ g/mol	$1,914 \times 10^9$ /ng
MFAP5	698	$2,394 \times 10^5$ g/mol	$2,515 \times 10^9$ /ng

Tabell 10: Analyserespons versus molekylærratio av markører

Kopier av HAPLN1	Kopier av MFAP5	Eksakt molekylær ratio av HAPLN1:MFAP5	Analyserespons, HAPLN1:MFAP5
1×10^8	1×10^8	1	0,470
1×10^7	1×10^7	1	0,448
1×10^6	1×10^6	1	0,423
1×10^5	1×10^5	1	0,452
1×10^4	1×10^4	1	0,443
1×10^3	1×10^3	1	0,478
			Gjennomsnitt = 0,452

Tabell 11: Eksakt molekylær ratio av markørene ved forskjellige analyseresponser

Analyserespons, HAPLN1:MFAP5	Eksakt molekylær ratio av HAPLN1:MFAP5
500	1106
100	221,2
5	11,06
1	2,212
0,2	0,4425
0,01	0,02212
0,002	0,004425

Eksempel 8: Absolutt kvantifiseringsanalyse av kondrocytt- og fibroblastmarkører

Genekspresjonsanalyse ved å bruke en absolutt kvantifiseringsfremgangsmåte ble utført. Tabell 12 viser cellekulturene brukt i dette eksemplet. De forskjellige kulturene ble isolert og dyrket som diskutert i eksemplene over. RNA fra cellekulturene ble isolert ved å bruke RNeasy Kit som diskutert i eksempel 3. RT-PCR ble utført på cellekulturer som beskrevet i eksempel 3, unntatt at 2 µl av cDNA ble brukt per 13 µL PCR-reaksjon. *In vitro* transkriberte RNA-standarder for HAPLN1 og MFAP5 (fremstilt som beskrevet i eksempel 7) ble fortynnet for å gi cDNA med sluttkonsentrasjoner på 5×10^2 , 5×10^3 og 5×10^4 kopier per µL. Standardkurver ble fremstilt ved "graphing" av Ct-resultatene fra standardene på y-aksen, versus logaritmen av antallet av kopier per reaksjon (10^3 , 10^4 og 10^5) på x-aksen. En lineær trendlinje ble tilpasset dataene, og mengdene av HAPLN1 og MFAP5 mRNA-kopier tilstede i hver testprøve ble bestemt matematisk. Denne fremgangsmåten for kvantifisering har tidligere blitt beskrevet, for eksempel i Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System og 7300/7500

Real-Time PCR Systems, Chemistry Guide, Applied Biosystems, 2005, del nr. 4348358, Rev. E. Den molekylære ratio av HAPLN1:MFAP5 ble deretter beregnet for hver prøve. Figur 16 viser molekylære ratioer av HAPLN1:MFAP5 i forskjellige cellekulturer. Disse resultatene indikerer at den molare ratio av HAPLN1:MFAP5 i kondrocytter er høyt relativt til synoviocytt og dermale fibroblaster.

Tabell 12: Cellekulturer brukt i absolutt kvantifiseringsanalyse (Eksempel 8)

Cellekultur	Celletype	Cellekulturtype
C26	Kondrocytt	Andre passasje
C27	Kondrocytt	Andre passasje
C28	Kondrocytt	Andre passasje
S14	Synoviocytt	Tredje passasje
S15	Synoviocytt	Tredje passasje
S16	Synoviocytt	Tredje passasje
F1	Dermal fibroblast	Andre passasje
F2	Dermal fibroblast	Andre passasje

SEKVENSLISTE

5 <110> Genzyme Corporation

 <120> METHOD OF EVALUATING CELLS AND CELL STRUCTURES

 <130> 07680.0060-00304

10 <150> US 60/910, 574<151>2007-04-06

 <160> 27

 <170> Patent In version 3.5

15 <210> 1

 <211> 2900

 <212> DNA

 <213> Homo sapiens

20 <400> 1

atfccagcct cattgtlaaca cacattctac gcctagcctg gctttcttgc tctccctcat	60
ctcattgttt cagcggaggg caaatctgaa gtcccttcca gggagtggt cttgtcatct	120
tattcgccag ccaaagtagg aacagcgt aa gaggagagag acacattcag cagccaaagg	180
actcggtgga aagagcagaa caccatagac aatattgtcgc tcttgggacc caaggtgctg	240
ctgtttcttg ctgcattcat catcacctct gactggat ac cctgggggt caatagtcaa	300
cgaggagacg atgtgactca agcgactcca gaaacattca cagaagatcc taatctggtg	360
aatgatcccg ctacagatga aacagttttg gctgttttgg ctgatattgc acctccaca	420
gatgacttgg cctccctcag tgaaaaaaat accactgcag agtgctggga tgagaaattt	480
acctgcacaa ggctctactc tgtgcatcgg ccggttaaac aatgcattca tcagttaatgc	540
ttcaccagtt tacgacgtat gtacatcgtc aacaaggaga tctgctctcg tcttgtctgt	600
aaggaacacg aagctatgaa agatgagctt tggcgtcaga tggctggtct gccccctagg	660
agactccgtc gctccaalt a cttccgactt cctccctgtg aaaatgtgga ttltgcagaga	720
cccaatggtc tgtgatcatt gaaaaagagg aaagaagaaa aaatgtatgg gtgagaggaa	780
ggaggatctc cttcttctcc aaccattgac agctaacctc tagacagtat ttcttaaac	840
aatccttttg caatgtccag cttttacccc tactctctac tttttacccc aaactgataa	900
calttatctc attttctagc acttaaaata caaagtctat attattgcat aatlttgctg	960
cttctcaata tcatagacac agtgaataga tgatgactat atggcttata taaaaacatt	1020
ctatgtacaa tttcaaggga gactaaactt taggctaat a atcttacta ttgaatctgt	1080
ctgatataga tcttaggglt gaagaagcta tctttgtcta tttgggctaa ccatagaatt	1140
tcatttatft tccctacaa attttccctag accaactccc catcattcac gttgtccct	1200
ttactcttac tttaaactatt ttgctggctt gcccgaaaat ttgctggca agtcttccct	1260
ataagacaca tcatggt aag ttttgt agtc ctgt aagatt ctgcaacaca gtcaagaatt	1320
atacaatcct actagcaata tataaggacc caaaatgtct tctgctaagc tcagaggctg	1380
gggctaaagc atgaggacta tggcagctat agaacttggc ctcataattc gctatccaat	1440

41

```

t t t t c a t g c a   g t t g t c t a g t   c g g g a a g t a a   g g t t g g a a a c   t a a g t c t c a t   t t a c t g a t t c   1500
g t t t a t g g g t   a g t a c c g g g a   t g a a c c c a c c   a c c a c a a a g c   a a a t t a g a c a   a c t t a a t g t g   1560
a a a t c a t a c c   a t t g g t t g a c   g t t t c c t t g a   g t t g c t a c t t   c g t t c a t c t t   c a c a a c t t a a   1620
c a a g t g c a c g   g t c g a a t t a t   t g t g c a a g t g   g c t t t t g g a t   a t c c t g a t t g   g g g c c t a a g a   1680
a g g g c a t t c a   g a c t t g a a t t   t t a a t a g g c a   g a c a g a a a g t   t t g c c t a a t a   g t t a a t a c g a   1740
a a g a g t g a a a   g a a c a c a a t   a t t c a g a c a a   c c c a c a t t c t   t a t c c t g g c t   c t a g c a g t a a   1800
c c a c g t a g c c   t t g g a t a a g c   c a t t t t c c t t   c a t t a g g t c c   t g g t t t a a t t   t c c t c a t c t t   1860
t a a a a t g a g a   a g g t t a a a t t   t a t c t t a g t a   c t g c t g g g c g   c a g t g g c t c a   t g c c t g t a a t   1920
c t g a g c a c t t   t g g g a a g c t g   a g g c g g g t g g   a t c a c t t g a g   g t c a g a a a t t   t g a g a c g a g c   1980
c t g g c c a a c a   t g g t g a a a c c   c c a t c t c t a c   t a a a a a t a c a   a a a a t t a g c t   g g g c g t g g t g   2040
g c a c g t g c c t   g t a a t c c c a g   c t a c t c g g g a   g g c t g a g g c a   g g a g a a t c a a   t t g a a c c t g g   2100
g a g g c a g a g g   t t g c a g t g a g   c c g a g a t g g c   g c c a t t g c a c   t c c a g c c t g g   g t g a c a a a a g   2160
c a a a a g t c c a   t c t t a a g a a a   t a t a t a t a t a   t a t t a t a t a t   a t t c t t a g t t   c t a a g a t t t c   2220
c t t t a a t t c t   a t g a t t c t c t   g g a t t t a a a t   g c a t t a t t c a   t a t t t c t t g a   a g c t t a g a t a   2280
c a g t c t a a t t   c a t a g c a a c c   a t a t c t g c t t   t a t c c t a g g t   g a g g g t a g c a   g t c c a c a a t g   2340
g a a t a g a a g a   a a a t c c c a t t   a t a a c a a a t g   a c a a a t t a t a   t a t c a t g a a t   c c t t c t g t c t   2400
g a c t a a c t c a   a t a a c t t t c t   a t a a a g c c a   a t g g a a t t c a   a a t a g g a g c t   a g g a g a c a a c   2460
a a g t t a t a t a   t g a c a g t g g a   g g t t g t a t t c   c t t t t a t a t t   g c t g a g a a a a   c t a g t t a a a t   2520
g a t c a g a t t c   t t g c t g t t a a   g a a c a a a t t t   c g t t t a a t g g   g a t c t g t a c a   a c t g a t t t t a   2580
a a a a a a t g c t   a c a a a a a g c c   c c a a a g c a t a   t a a t c t c t a c   t c c t t a c a g t   c t c t a g a a t t   2640
a a a t g t a c t c   a t t t a g a c a a   c a t a t t a a a t   g c a t a t t t t a   g c c a c t t t a g   a g a a a c c t c a   2700
t a g g c a c a g a   g t t t c c a a g a   t t a a t t t t a a   g a a t a t c t t c   a c g a a c t t g a   c c c t c c t a c t   2760
c c a c a t t g c a   a c a t t t c c a t   c a g a c a g c a t   t t c a a t t c c a   g t a t t a t g t a   t a t t g c a a a t   2820
t a a a c a t t t t   a a a a t a t t t t   t t t c c a a t t t   a t t t c t c a a a   a t a a a a t g t c   t t t t g t t c t g   2880
g t a a a a a a a a   a a a a a a a a a a

```

<210> 2

<211> 1759

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gt gaggagaa agagcgct ac gt t cact t ga t ct ccagct t ccaact t aag cagaact t ga 60
 gagcat ccga act cct ggat t t caggacaa gt gaagaaga t t ct t t gggc t at aaagat g 120
 aagagt ct ac t t ct t ct ggt gct gat t t ca at ct gct ggg ct gat cat ct t t cagacaac 180
 t at act ct gg at cat gacag agct at t cac at ccaagcag aaaat ggccc ccat ct act t 240
 gt ggaagcag agcaagccaa ggt gt t t t ca cacagaggt g gcaat gt t ac act gccat gt 300
 aaat t t t at c gagaccct ac agcat t t ggc t caggaat cc at aaaat ccg aat t aagt gg 360

 accaagct aa ct t cggat t a cct caaggaa gt ggat gt t t t gt t t ccat gggat accac 420
 aaaaaaacct at ggaggct a ccagggg aga gt gt t t ct ga agggaggcag t gat agt gat 480
 gct t ct ct gg t cal cacaga cct cact ct g gaagat t at g ggagat at aa gt gt gaggt g 540
 at t gaaggat t agaagat ga t act gt t gt g gt agcact gg act t acaagg t gt ggt at t c 600
 cct t act t t c cagcact ggg gcgct acaat ct caat t t t c acgaggcgca gcaggcgt gt 660
 ct ggaccagg at gct gt gat cgcct cct t c gaccagct gt acgacgcct g gcggggcggg 720
 ct ggact ggt gcaat gccgg ct ggct cagt gat ggct ct g t gcaat at cc cat caciaag 780
 cccagagagc cct gt ggggg ccagaacaca gt gcccgag t caggaact a cggat t t t gg 840
 gat aaagat a aaagcagat a t gat gt t t t c t gt t t t acat ccaat t t caa t ggccgt t t t 900
 t act at ct ga t ccacccac caaact gacc t at gat gaag cggg gcaagc t t gt ct caat 960
 gat ggt gct c agat t gcaaa agt gggccag at at t t gct g cct ggaaaat t ct cggat at 1020
 gaccgct gt g at gcgggct g gt t ggcggat ggcagcgt cc gct accccat ct ct aggcca 1080
 agaaggcgct gcagt cct ac t gaggt gca gt gcgt t cg t ggggt t t ccc agat aaaaag 1140
 cat aagct gt at ggt gt ct a ct gct t caga gcat acaact gaat gt gcc t t agagcgca 1200
 t cagt t t t aa agt cat t aag aacat gt gaa aggt gt t t t t t t t t ccaat at gaact cat 1260
 gcaagt t acc aaaact gt ga t aacct t t t t t act t act g t aaagat ca t t t t cat aag 1320
 at caat t cat t gat t t gt t t t t gt aaagc t at cat t caa t at at at t at aaat t aat at 1380
 aaat t t aagg gaagct ct at gt aaggagac t t agagccaa act gt t t aag ct gt at cat c 1440
 ccaacaaagt at cct t t cat gaacggggca t gcaat agct t aagaat t gc t aggat t aaa 1500
 t t aaggaaag t aaagct act cagagcaaca ggt t ccacaa gcacaaact t t acacat t t g 1560
 t acaat t t t g aaat gcact a caat aaacaa at t agagcaa cacat t t gaa at acaggct t 1620
 ct t t acat aa act gagaggt t at acaaaaac t cagt t t cac aagggaacaa t ct at acct t 1680
 t ct aaaagt t aat at t t caa gt ct ct aat a ggcagaat at t t t act ct t t aaaat cct gc 1740
 ct t t ct gacc aaaaaaaaaa 1759

<210> 3

<211> 661

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

43

t ggt t c t t a t a a a a a c c t c a c a g c c t t c c a c t a a c a t c c c g t a g g a g c c t c t c t c c c t a c	60
t g c t g c t a c a c a a g a c c c t g a g a c t g a c c t g c a g g a c g a a a c c a t g a a g a g c c t g a t c c t	120
t c t t g c c a t c c t g g c c g c c t t a g c g g t a g t a a c t t t g t g t t a t g a a t c a c a t g a a a g c a t	180
g g a a t c t t a t g a a c t t a a t c c c t t c a t t a a c a g g a g a a a t g c a a a t a c c t t c a t a t c c c c	240
t c a g c a g a g a t g g a g a g c t a a a g t c c a a g a g a g g a t c c g a g a a c g c t c t a a g c c t g t c c a	300
c g a g c t c a a t a g g g a a g c c t g t g a t g a c t a c a g a c t t t g c g a a c g c t a c g c c a t g g t t t a	360
t g g a t a c a a t g c t g c c t a t a a t c g c t a c t t c a g g a a g c g c c g a g g g a c c a a a l g a g a c t g	420
a g g g a a g a a a a a a a a t c t c t t t t t t t c t g g a g g c t g g c a c c t g a t t t t g t a t c c c c c t g t	480
a g c a g c a t t a c t g a a a t a c a t a g g c t t a t a t a c a a t g c t t c t t t c c t g t a t a t t c t c t t g	540
t c t g g c t g c a c c c t t t t t c c c g c c c c c a g a t t g a t a a g t a a t g a a a g t g c a c t g c a g t g	600
a g g g t c a a a g g a g a g t c a a c a t a t g t g a t t g t t c c a t a a t a a a c t t c t g g t g t g a t a c t t	660
t	661

<210> 4 <211> 2974

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

agaagccccg cagccgccgc gcggagaaca gcgacagccg agcgcgccgt ccgcct gt ct	60
gccggg gggg ct gcct gcc gcgcagcaga cccggggcgg ccgcgggagc ccgcgccccg	120
cccgccgcgc ct ct gccggg acccaccgc agcggagggc t gagcccccc ggcggct ccc	180
cggagct cac ccacct ccgc gcgccggagc gcaggcaaaa ggggaggaaa ggct cct ct c	240
ttt agt cacc act ct ccccc t ct ccaagaa ttt gt t t aac aaagcgct ga ggaaagagaa	300
cgt ct t ct t g aat t ct t t ag t aggggcgga gt ct gct gct gccct gcgt gccacct cgg	360
ct acact gcc ct ccgcgacg accct gacc agccggggg c acgt ccggga gacgggat ca	420
t gaagcgct c ggt agccgt c t ggct ct t gg t cgggct cag cct cggg gt c cccaggt t cg	480
gcaaagggt ga t at t t gt gat cccaat ccat gt gaaaaat gg aggt at ct gt t t gccaggat	540
t ggct gat gg t t cct t t t cc t gt gagt gt c cagat ggct t cacagacccc aact gt t ct a	600
gt gt t gt gga ggt t gcat ca gat gaagaag aaccaact t c agcaggt ccc t gcaact cct a	660
at ccat gcca t aat ggagga acct gt gaaa t aagt gaagc at accgaggg gat acat t ca	720
t aggct at gt t t gt aaat gt ccccgaggat t t aat gggat t cact gt cag cacaacat aa	780
at gaat gcga agt t gagcct t gcaaaaaat g gt ggaat at g t acagat ct t gt t gct aact	840
at t cct gt ga gt gcccaggc gaat t t at gg gaagaaat t g t caat acaaa t gct caggcc	900
cact gggaal t gaagggt gga at t at at caa accagcaaat cacagct t cc t ct act cacc	960
gagct ct t t t t ggact ccaa aaat ggt at c cct act at gc acgt ct t aat aagaaggggc	1020
t t at aaat gc gt ggacagct gcagaaaaat g acagat ggcc gt ggaat t cag at aaat t t gc	1080
aaaggaaaaat gagagt t act ggt gt gat t a cccaaggagc caagaggat t ggaagcccag	1140
agt at at aaa at cct acaaa at t gcct aca gt aat gat gg aaagact t gg gcaat gt aca	1200
aagt gaaagg caccaat gaa gacat ggt gt t t cgt ggaaa cat t gat aac aacact ccat	1260
at gct aact c t t t cacaccc cccat aaaag ct cagt at gt aagact ct at ccccaagt t t	1320
gt cgaagaca t t gcaact t t g cgaat ggaac t t ct t ggct g t gaact gt cg ggt t gt t ct g	1380
agcct ct ggg t at gaaat ca ggacat at ac aagact at ca gat cact gcc t ccagcat ct	1440
t cagaacgct caacat ggac at gt t cact t gggaaccaag gaaagct cgg ct ggacaagc	1500
aaggcaaagt gaat gcct gg acct ct ggcc acaat gacca gt cacaat gg t t acaggt gg	1560

45

atcttcttgt	tccaaccaa	gtgactggca	tcatlacaca	aggagctaaa	gatttltggic	1620
atgtacagtt	tgttggctcc	tacaaactgg	cttacagcaa	tgatggagaa	cactggactg	1680
tataccagga	tgaagagcaa	agaaaagata	aggttttcca	gggaaatttt	gacaatgaca	1740
ctcacagaaa	aaatgtcatc	gacctccca	tctatgcacg	acacataaga	atccttccct	1800
gggcctggt	acgggaggatc	acattggcgt	cagagctget	gggctgcaca	gaggaggaat	1860
gaggggaggc	tacatttcac	aacctcttc	cctatttccc	taaaagtatc	tccatggaat	1920
gaactgtgca	aaatctglag	gaaactgaat	ggtttttttt	tttttttcat	gaaaaagtgc	1980
tcaaatatg	gtaggcaact	aacgggtgtt	ttaagggggg	ctaagcctgc	cttttcaalg	2040
atttaatttg	attttatitt	atccgtcaaa	tctcttaagt	aacaacacat	ttaagtgtgaa	2100
ttacttttct	ctcatgtitt	cctgaattat	tgcattggg	agaaatata	tagggaaga	2160
aagtgcctt	ctttttatag	caagagtaaa	aaagtctcaa	agtcatacaa	ttagagcaag	2220
agttgataga	gcttttacia	tcaatactca	cctaattctg	ataaaaggaa	tactgcaalg	2280
ttagcaataa	gttttttct	tctgtaatga	ctctacgtta	tectgtttcc	ctgtgcctac	2340
caaacactgt	caatgtttat	tacaaaattt	taaagaagaa	tatgtaacat	gcagtactga	2400
tattataatt	ctcattttac	ttcatttatt	tctaataaga	gattatgtga	cttctttttc	2460
ttttagtict	attctacatt	cttaataatg	tataattacct	gaataattca	atttttttct	2520
aatagaattt	cctattagtt	gactaaaaga	agtgctcatgt	ttactcatat	atgtagaaca	2580
tgactgccia	tcagtagatt	gatctgtatt	tatatctcgt	tatttaaatc	tgcagtttta	2640
tttttgaagg	aagccataac	tatttaattt	ccaaataatt	gcttcataaa	gaatcccat	2700
ctctcagitt	gcacaaaaga	acaaaaaata	tatatgtctc	tttaaattta	aatcttcatt	2760
tagalggtaa	ttacataatc	ttatatttac	tttaaaaaat	cggcttattt	gtttatttta	2820
taaaaaattt	agcaaagaaa	tattaatata	gtgctgcata	gtttggccaa	gcatactcat	2880
catttctttg	ttcagctcca	catllcctgt	gaaactaaca	tcttatigag	atttgaaact	2940
gggtggtagt	tcccaggaag	gcacagggtg	agtt			2974

<210> 5

<211> 1307

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

46

cct gagi ccc gggaggaaag t gct cgccca t t cct gacct gt gacacgct cact gcgaag	60
gcaggt t at t agaagag t cc cat gaaaggt ggct ccacgg t cccagcgac at gcaggggc	120
t cct ct t ct c cact ct t ct g ct t gct ggcc t ggcacagt t ct gct gcagg gt acagggca	180
ct ggaccat t agat acaaca cct gaaggaa ggcct ggaga agt gt cagat gcacct cagc	240
gl aaacagt t t t gt cact gg ccct gcaaat gcct cagca gaagccccgt t gccct cct g	300
gagt gagcct ggt gagagat ggct gt ggat gcl gt aaaat ct gt gccaaag caaccagggg	360
aaat ct gcaa t gaagct gac ct ct gt gacc cacacaaagg gct gt at t gt gact act cag	420
t agacaggcc t aggt acgag act ggagt gt gt gcat acct t gt agct gt t gggg gcgagt	480
t caaccaggt acat t at cat aat ggccaag t gl t t cagcc caaccct t g t t cagct gcc	540
t ct gt gt gag t ggggccat t ggat gcacac ct ct gt t cat accaaagct g gcl ggagct c	600
act gct ct gg agct aaaggt ggaaagaagt ct gat cagt c aaact gt agc ct ggaacat	660
t act acagca gct t t caaca agct acaaaa caat gccagc t t at agaaat ct cccact t a	720
t t t ggaaaaa aaaat gt ct t gt gcaagcaa caaat ggac t cct gct cc agaacat gt g	780
ggat gggaat at ct aacagg gt gaccaat g aaaacagcaa ct gt gaaat g agaaaagaga	840
aaagact gt g t t acat t cag cct t gcgaca gcaat at at t aaagacaat a aagat t ccca	900
aaggaaaaac at gccaacct act t t ccaac t ct ccaaagc t gaaaaat t t gl ct t t t ct g	960
gat gct caag t act cagagt t acaaacca ct t t t t gt gg aat at gct t g gal aagagat	1020
gct gt at ccc t aat aagt ct aaaat gat t a ct at t caat t t gat t gccca aat gaggggt	1080
cat t t aaat g gaagat gct g t ggat t acat ct t gt gt gt g t cagagaaac t gcagagaac	1140
ct ggagat at at t t t ct gag ct caagat t c t gt aaaacca agcaaat ggg ggaaaagt t a	1200
gt caat cct g t cat at aat a aaaaaat t ag t gagt aaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	1307

<210> 6

<211> 7137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

47

cggccaggig tgtgggactg aagttcttgg agaagggagt ccaactcttc aaggtgaact	60
atgaccactt tactctgggt tttcgtgact ctgaggggca tcaactgcagc tgtcaactgt a	120
gaaacttcag accatgacaa ctccgtgagt gtcagcatcc cccaaccgtc cccgctgagg	180
gtcctcctgg ggacctccct caccatcccc tgcattttca tgcaccccat gcacctgtg	240
accaccgccc ctctaccgc cccactggcc ccaagaatca agtggagccg tgtgtccaag	300
gagaaggagg tagtgctgct ggtggccact gaagggcgcg tgcgggtcaa cagtgcctat	360
caggacaagg tctcactgcc caactaccgc gccatcccca gtgacgccac ctlggaagtc	420
cagagcctgc gctccaatga ctctggggtc taccgctgcg aggtgatgca tggcatcgag	480
gacagcgagg ccacctgga agtcgtggtg aaaggcatcg tgttccatt a cagagccatc	540
tctacacgct acacctcga ctftgacagg ggcagcggg cctgcctgca gaacagtgcc	600
atcattgcc aacctgagca gctgcaggcc gctacgaag acggcttcca ccagtgtgac	660
gccggctggc tggctgacca gactgtcaga taccctatcc aactcccc ggaaggctgc	720
tatggagaca aggatgagtt tctggtgtg aggacgtatg gcatccgaga caccaacgag	780
acctatgatg tgtactgctt cgcgaggag atggaggggtg aggtctttta tgcacatct	840
ccagagaagt tcaacttcca ggaagcagcc aatgagtgcc ggcggctggg tgcgggctg	900
gccaccacgg gccacgtcta cctggcctgg caggctggca tggacatgtg cagcgccggc	960

t ggct ggccg accgcagcgt gcgct acccc at ct ccaagg cccggcccaa ct gcggt ggc	1020
aacct cct gg gcgt gaggac cgt ct acgt g cat gccaaacc agacgggct a ccccgacccc	1080
t cat ccgcct acgacgccat ct gct acaca ggt gaagact t t gt ggacat cccagaaaac	1140
t t ct t t ggag t ggggggt ga ggaggacat c accgt ccaga cagt gacct g gcct gacat g	1200
gagct gccac t gcct cgaaa cat cact gag ggt gaagccc gaggcagcgt gat cct t acc	1260
gt aaagccca t ct t cgaggt ct cccccagt cccct ggaac ccgaggagcc ct t cacgt t t	1320
gcccc gaaa t agggggccac t gcct t cgct gaggt t gaga at gagact gg agaggccacc	1380
agggcct ggg gct t t cccac acct ggct g ggccct gcc a cgcat t cac cagt gaggac	1440
ct cgt cgt gc aggt gaccgc t gt cct ggg cagccgcct t t gccaggggg ggt cgt ct t c	1500
cact accgcc cgggacccac ccgt act cg ct gacct t t g aggaggcaca gcaggcct gc	1560
cct ggacgg gggcgggt cat t gcct cgccg gacgagct cc aggcgcct a cgaagcaggc	1620
t at gagcagt gt gacgccgg ct ggct gggg gaccagaccg t cagat accc cat t gt gagg	1680
ccacggaccc cat gcgt ggg t gacaaggac agcagcccag gggg caggac ct at ggct g	1740
cgccat caa cagagacct a cgat gt ct ac t gct t t gt ag acagact t ga gggggaggt g	1800
t t ct t cgcca cagccct t ga gcagt t cacc t t ccaggaag cact ggagt t ct gt gaat ct	1860
cacaat gcc a ct gccaccac gggccagct c t acggcgct ggagccgcgg cct ggacaag	1920
t gct at gccg gct ggct ggc cgacggcagc ct ccgt acc ccat cgt cac cccaaggcct	1980
gcct gcggt g gggacaagcc aggcgt gaga acggt ct acc t ct acct aa ccagacgggc	2040
ct ccagacc cact gt cccg gcacct gcc t t ct gct t cc gaggcatt t c agcgggt t cct	2100
t ct ccaggag aagaagaggg t ggcacaccc acat caccct ct ggt gt gga ggagt ggat c	2160
gt gacccaag t ggt t cct gg t gt ggct gct gt cccct ag aagaggagac aact gct gt a	2220
ccct cagggg agact act gc cat cct agag t t caccaccg agccagaaaa ccagacagaa	2280
t ggaaccag cct at acccc agt gggcaca t ccccgct gc caggga cct t cct act t gg	2340
cct cct act g gcgcgaaac agaggaaagt acagaaggcc ct t ct gcaac t gaagt gcc	2400
t ct gcct cag aggaacct c cccct cagag gt gccat t cc cct cagagga gccat ccccc	2460
t cagaggaac cat t cccct c agt gaggcca t t cccct cag t ggagct gt t cccct cagag	2520
gagccat t cc cct ccaagga gccat ccccc t cagaggaac cat cagcct c agaagagccg	2580
t at acacct t cccccccga gccagct gg act gagct gc ccagct ct gg ggaggaat ct	2640
ggggccct g at gt cagt gg t gact t caca ggcagt ggag at gt t t cagg acacct t gac	2700
t t cagt gggc agct gt cagg ggacagggca agt ggact gc cct ct ggaga cct ggact cc	2760
agt ggt ct t a ct t ccacagt gggct caggc ct gact gt gg aaagt ggact acct caggg	2820
gat gaagaga gaat t gagt g gcccagcact cct acggt t g gt gaact gcc ct ct ggagct	2880
gagat cct ag agggct ct gc ct ct ggagt t ggggat ct ca gt ggact t cc t t ct ggagaa	2940
gt t ct agaga cct ct gcct c t ggagt agga gacct cagt g ggc t cct t c t ggagaagt t	3000
ct agagacca ct gccct gg agt agaggac at cagcgggc t t cct t ct gg agaagt t ct a	3060

gagaccact g	cccc ggagt	agaggacat c	agcgggct t c	ct t ct ggaga	agt t ct agag	3120
accact gcc	ct ggagt aga	ggacat cagc	gggct t cct t	ct ggagaagt	t ct agagacc	3180
act gcccc g	gag agagga	cat cagcggg	ct t cct t ct g	gagaagt t ct	agagaccact	3240
gcccc ggag	t agaggacat	cagcgggct t	cct t ct ggag	aagt t ct aga	gaccgct gcc	3300
cct ggagt ag	aggacat cag	cgggct t cct	t ct ggagaag	t t ct agagac	cgct gcccc	3360
ggagt agagg	acat cagcgg	gct t cct t ct	ggagaagt t c	t agagaccgc	t gcccc gga	3420
gt agaggaca	t cagcgggct	t cct t ct gga	gaagt t ct ag	agaccgct gc	cccc ggagt a	3480
gaggacat ca	gcgggct t cc	t t ct ggagaa	gt t ct agaga	ccgct gcccc	t ggagt agag	3540
gacat cagcg	ggct t cct t c	t ggagaagt t	ct agagaccg	ct gcccc gg	agt agaggac	3600
at cagcgggc	t t cct t ct gg	agaagt t ct a	gagaccgct g	cccc ggagt	agaggacat c	3660
agcgggct t c	ct t ct ggaga	agt t ct agag	act gct gcc	ct ggagt aga	ggacat cagc	3720
gggct t cct t	ct ggagaagt	t ct agagact	gct gcccc g	gag agagga	cat cagcggg	3780
ct t cct t ct g	gagaagt t ct	agagact gct	gcccc ggag	t agaggacat	cagcgggct t	3840
cct t ct ggag	aagt t ct aga	gact gct gcc	cct ggagt ag	aggacat cag	cgggct t cct	3900
t ct ggagaag	t t ct agagac	t act gcccc	ggagt agagg	agat cagcgg	gct t cct t ct	3960
ggagaagt t c	t agagact ac	t gcccc gga	gt agat gaga	t cagt gggct	t cct t ct gga	4020
gaagt t ct ag	agact act gc	cccc ggagt a	gaggagat ca	gcgggct t cc	t t ct ggagaa	4080
gt t ct agaga	ct t ct acct c	t gggg aggg	gaact cagt g	gact t cct t c	t ggaggagaa	4140
gt t ct agaga	t t t ct gl ct c	t ggagt agag	gacat cagt g	ggct t cct t c	t ggagaggt t	4200
gt agagact t	ct gcc t ct gg	aat agaggat	gt cagt gaac	t t cct t cagg	agaaggt ct a	4260
gagacct ct g	ct t ct ggagt	agaggacct c	agcaggct cc	ct t ct ggaga	agaagt t ct a	4320
gagat t t ct g	cct ct ggat t	t ggggacct c	agt ggagt t c	ct t ct ggagg	agaaggt ct a	4380
gagacct ct g	ct t ct gaagt	agggact gac	ct cagt gggc	t t cct t ct gg	aagggaggg t	4440
ct agagact t	cagct t ct gg	agct gaggac	ct cagt ggg t	t gcc t t ct gg	aaaagaagac	4500
t t ggt ggggt	cagct t ct gg	agact t ggac	t t gggcaaac	t gcc t t ct gg	aact ct agga	4560
agt gggcaag	ct ccagaaac	aagt ggt ct t	cccc ct ggat	t t agt ggt ga	gt at t ct ggg	4620
gt ggacct t g	gaagt ggccc	acct ct ggc	ct gcc t gact	t t agt ggact	t ccat ct gga	4680
t t cccaact g	t t t cct agt	ggat t ct aca	t t ggt ggaag	t ggt cacagc	ct cact gca	4740
agt gaact gg	aagggagggg	aaccat t ggc	at cagt ggt g	caggagaaat	at ct ggact g	4800
cccc ccagt g	agct ggacat	t agt gggaga	gct agt ggac	t ccc t cagg	aact gaact c	4860
agt ggccaag	cat ct ggg t c	t cct gat gt c	agt ggggaaa	t acct ggact	ct t t ggt gt c	4920
agt ggacagc	cat caggg t	t cct gacact	agt ggggaaa	cat ct ggagt	gact gagct t	4980
agcgggct gt	cct ct ggaca	accagg t gt t	agt ggagaag	cat ct ggagt	t ct t t at ggc	5040
act agt caac	cct t t ggcat	aact gat ct g	agt ggagaaa	cat ct ggggt	cccc gat ct c	5100

agt gggcagc	ctt caggggt t	accaggggt t c	agt gggggcaa	cat caggagt	ccct gacct g	5160
gt t t ct ggt a	ccacgagt gg	cagcgggt gaa	t ct t ct gggg	t t acat t t gt	ggacaccagt	5220
t t ggt t gaag	t gggccct ac	t acat t t aaa	gaagaagaag	gct t aggggt c	t gt ggaact c	5280
agt ggcct cc	ct t ccggaga	ggcagat ct g	t caggcaaat	ct gggat ggt	ggat gt cagt	5340
ggacagtt t t	ct ggaacagt	cgat t ccagt	gggt t t acat	cccagact cc	ggaat t cagt	5400
ggcct accaa	gt ggcct agc	t gaggt cagt	ggagaat cct	ccagagct ga	gat t gggagc	5460
agcct gccct	cgggagcat a	t t at ggcagt	ggaact ccat	ct agt t t ccc	cacgggt ct ct	5520
ct t gt agaca	gaact t t ggt	ggaat ct gl a	accagggct c	caacagccca	agaggcagga	5580
gaagggcct t	ct ggcct t t t	agaact cagt	gggt gct cat t	ct ggagcacc	agacat gt ct	5640
ggggagcat t	ct ggt t t ct	ggacct aagt	gggt gcagt	ccgggt gat	agagcccagc	5700
ggagagccac	caggt act cc	at at t t t agt	ggggat t t t g	ccagcaccac	caat gt aagt	5760
ggagaat cct	ct gt agccat	gggcaccagt	ggagaggcct	caggact t cc	agaagt t act	5820
t t at cact t	ct gagt t cgt	ggaggggt gt t	act gaaccaa	ct at t t ct ca	ggaact aggc	5880
caaaggcccc	ct gt gacaca	cacaccccag	ct t t t t gagt	ccagt ggaaa	agt ct ccaca	5940
gct ggggaca	t t agt ggagc	t accccaglt g	ct cctt ggggt	ct ggagt aga	agt al cat ca	6000
gt cccagaat	ct agcagt ga	gacgt ccgcc	t at cct gaag	ct ggggt t cgg	ggcat ct gcc	6060
gccccct gagg	ccagcagaga	agat t ct ggg	t cccct gat c	t gagt gaaac	cacct ct gca	6120
t t ccacgaag	ct aacct t ga	gagat cct ct	ggcct agggag	t gagcggcag	cact t t gaca	6180
t t t caagaag	gcgaggcgt c	cgct gcccc	gaagt gagt g	gagaat ccac	caccaccagt	6240
gal gt gggga	cagaggcacc	aggct t gctt	t cagccact c	ccacggct t c	t ggagacagg	6300
act gaaat ca	gcgagacct	gt ct ggt cac	acct cgcagc	t gggcgt t gt	cat cagcacc	6360
agcat cccag	agt ct gagt g	gaccagcag	accagcgcc	ct gcagagac	gcat ct agaa	6420
at t gagt cct	caagcct cct	gt act cagga	gaagagact c	acacagt cga	aacagccacc	6480
t ccccaacag	at gct t ccat	cccagct t ct	ccggaat gga	aacgt gaat c	agaat caact	6540
gct gcagacc	aggaggt at g	t gaggagggc	t ggaacaagt	accagggcca	ct gt t accgc	6600
cact t cccgg	accgcgagac	ct ggggt ggt	gct gagcgcc	gggt gt cggga	gcagcagt ca	6660
cacct gagca	gcat cgt cac	ccccgaggag	caggagt t t g	t caacaacaa	t gcccagac	6720
t accagt gga	t cggcct gaa	cgacaggacc	at cgaagggg	act t ccgct g	gt cagat gga	6780
caccccat gc	aat t t gagaa	ct ggcgcccc	aaccagcct g	acaact t t t t	t gccgct gga	6840
gaggact gt g	t ggt gat gat	ct ggcacgag	aagggcgagt	ggaat gat gt	t cctt gcaat	6900
t accacct cc	cct t cacgt g	t aaaaagggc	acagccacca	cct acaaagc	cagact acag	6960
aagcggagct	cacggcacc	t cggaggagc	cgcgccagca	cagcccact g	agaagagct t	7020
ccaggacgca	cccaggacgc	t gagcccagg	agcct gccag	gct gacgt gc	at cccacca	7080
gacgggt gt cc	t ctt ct t gt c	gct t t t t gt c	at at aaggaa	t cccat t aaa	aaaaaaa	7137

51

<210> 7

<211> 2471

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

agaaagcgag cagccacca gct ccccgcc accgccat gg t ccccgacac cgcct gcgt t	60
ct t ct gct ca cctt ggct gc cct cggcgcg t cgggacagg gccagagccc gt t gggct ca	120
gacct gggcc cgcagat gct t cgggaact g caggaaacca acgcggcgct gcaggacgt g	180
cgggagct gc t gcggcagca ggt cagggag at cacgt t cc t gaaaaacac ggt gat ggag	240
t gt gacgcgt gcgggat gca gcagt cagt a cgcaccggcc t acccagcgt gcggccct g	300
ct ccaact gcg cgcgggct t ct gct t cccc ggcgt ggcct gcat ccagac ggagagcggc	360
gcgcgt gcg gcccct gccc cgcgggct t c acgggcaacg gct cgcact g caccgacgt c	420
aacgagt gca acgcccaccc ct gct t cccc cgagt ccgt gt at caacac cagcccgggg	480
t t ccgt gcg aggt t gccc gccgggt ac agcggcccca cccaccaggg cgt ggggt g	540
gct t t cgcca aggccaacaa gcaggt t t gc acggacat ca acgagt gt ga gaccgggcaa	600
cat aact gcg t ccccaact c cgt gt gcat c aacaccggg gct cct t cca gt gcggcccg	660
t gccagcccg gct t cgt ggg cgaccaggcg t ccggct gcc agcggcgcg acagcgt t c	720
t gcccgcagc gct cgcccag cgagt gccac gagcat gcag act gcgt cct agagcgcgat	780
ggct cgcgg t cgt gcgt gt g t gccgt t ggc t gggccggca acgggat cct ct gt ggt cgc	840
gacact gacc t agacggct t cccggacgag aagct gcgt gcccgagcg ccagt gccgt	900
aaggacaact gcgt gact gt gcccact ca gggcaggagg at gt ggaccg cgat ggcat c	960
ggagacgcct gcgat ccgga t gccgacggg gacgggt cc ccaat gaaaa ggacaact gc	1020
ccgt ggt gc ggaacccaga ccagcgcaac acggacgagg acaagt gggg cgat gcgt gc	1080
gacaact gcc ggt cccagaa gaacgacgac caaaaggaca cagaccagga cggccggggc	1140
gat gcgt gcg acgacgacat cgacggcgac cggat ccgca accaggccga caact gccct	1200
agggt accca act cagacca gaaggacagt gat ggcgat g gt at agggga t gcct gt gac	1260
aact gt cccc agaagagcaa cccggat cag gcggat gt gg accacgact t t gt gggagat	1320
gct t gt gaca gcgat caaga ccaggat gga gacggacat c aggact ct cg ggacaact gt	1380
cccacggt gc ct aacagt gc ccaggaggac t cagaccacg at ggccaggg t gat gcct gc	1440
gacgacgacg acgacaat ga cggagt ccct gacagt cggg acaact gccg cct ggt gcct	1500
aaccccgcc aggaggacgc ggacaggac ggcgt gggcg acgt gt gcca ggacgact t t	1560
gat gcagaca aggt ggt aga caagat cgac gt gt gt ccgg agaacgt ga agt cacgt c	1620
accgact t ca gggcct t cca gacagt cgt g ct ggaccgg aggggt gacgc gcagat t gac	1680
cccaact ggg t ggt gct caa ccagggaagg gagat cgt gc agacaat gaa cagcgaccca	1740
ggcct ggct g t ggt t acac t gcct t caat ggcgt ggact t cgagggcac gt t ccat gt g	1800
aacacggt ca cggat gacga ct at gcggg t t cat ct t t g gct accagga cagct ccagc	1860
t t ct acgt gg t cat gt ggaa gcagat ggag caaacgt at t ggcaggcgaa cccct t ccgt	1920

53

```

gct gt ggccg agcct ggcat ccaact caag gct gt gaagt ct t ccacagg ccccggggaa 1980
cagct gcgga acgct ct gt g gcac acagga gacacagagt cccaggt gcg gct gct gt gg 2040
aaggacccgc gaaacgt ggg t t ggaaggac aagaagt cct at cgt t ggt t cct gcagcac 2100
cggccccaag t gggct acat caggggt gcga t t ct at gagg gccct gagct ggt ggccgac 2160
agcaacgt gg t ct t ggacac aacct gcgg ggt ggccgcc t ggggggt ct t ct gct t ct cc 2220
caggagaaca t cat ct gggc caacct gcgt t accgt gca at gacacct cccagaggac 2280
t at gagacc at cagct gcg gcaagcct ag ggaccaggt gaggacccgc cggat gacag 2340
ccacct cac cgcggct gga t gggggct ct gcaccagcc ccaaggggt g gccgt cct ga 2400
gggggaagt g agaagggt c agagaggaca aaat aaagt g t gt gt gcagg gaaaaaaaaa 2460
aaaaaaaaa a 2471

```

<210> 8

<211> 5087

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aacgggccc	gcggcgggga	gaagacgcag	agcgcl gcl g	ggct gccggg	t ct cccgcl t	60
cccccl cct g	ct ccaagggc	ct cct gcat g	agggcgcggt	agagacccgg	acccgcgccc	120
t gct cct gcc	gt t t cgt gc	gct ccgccc	ggcccggct c	agccaggccc	cgcggt gagg	180
cat gat t cgc	ct cggggct c	cccagacgct	ggc gcl gcl g	acgcl gcl cg	t cggcgcl gt	240
cct t cgggt gt	cagggccagg	at gt ccagga	ggct ggcagg	t gt gt gcagg	at gggcagag	300
gt at aat gat	aaggat gt gt	ggaagccgga	gcccl gccgg	at ct gt gt ct	gt gacac gg	360
gact gt cct c	t gcgacgaca	t aat ct gt ga	agacgl gaaa	gact gcct ca	gccct gagat	420
cccc t cggg	gagl gcl gcc	ccat ct gcc	aact gacct c	gccact gcca	gt gggcaacc	480
aggaccaaag	ggacagaaaag	gagaacct gg	agacal caag	gat at t gt ag	gacccaaagg	540
acct cct ggg	cct caggggac	ct gcagggga	acaaggaccc	agaggggat c	gt ggt gacaa	600
aggt gaaaaa	ggi gcccl g	gacct cgt gg	cagagal gga	gaacct gggg	cccc ggaaa	660
t cct ggcccc	cct ggt ccl c	ccggccccc	t ggt cccct	ggt ct t ggt g	gaaact t t gc	720
t gccagat g	gcl ggaggat	t t gal gaaaa	ggcl ggt ggc	gcccagl t gg	gagl aat gca	780
aggaccaat g	ggcccat gg	gacct cgagg	acct ccaggc	cct gcaggt g	ct cct gggcc	840
t caaggat t t	caaggcaat c	ct ggt gaacc	t ggt gaacct	ggt gt ct ct g	gt cccat ggg	900
t cccgt ggt	ccl cct ggt c	cccc ggaaa	gcct ggt gat	gat ggt gaag	ct ggaaaacc	960
t ggaaaagct	ggi gaaaggg	gt ccgct gg	t cct cagggt	gct cgt ggt t	t cccaggaac	1020
cccaggcct t	ccl ggt gt ca	aaggc cacag	aggt t at cca	ggcct ggacg	gt gcl aaggg	1080
agaggcgggt	gcl cct ggt g	t gaagggt ga	gagl ggt t cc	ccgggt gaga	acggat ct cc	1140
gggccaat g	ggi cct cgt g	gcct gcct gg	t gaaagagga	cggact ggcc	ct gct ggcgc	1200
t gcgggt gcc	cgaggcaacg	at ggt cagcc	aggccccgca	gggcct ccgg	gt cct gt cgg	1260

t cct gct ggt	ggt cct ggct	t cctt ggt gc	t cct ggagcc	aagggg gaag	ccggccccac	1320
t ggt gcccg	ggt cct gaag	gt gct caagg	t cct cgcgg	gaacct ggt a	ct cct gggt c	1380
ccct gggect	get ggt gcc	ccggg aaccc	t ggaacagat	ggaat t cct g	gagccaaagg	1440
at ct gct ggt	get cct ggca	t t gct ggt gc	t cct ggct t c	cct gggeccac	ggggccct cc	1500
t ggccct caa	ggt gcaact g	gt cct ct ggg	cccgaaagg	cagacgggt g	aacct ggt at	1560
t gct ggct t c	aaagg gaac	aaggcccca	gggagaacct	ggccct gct g	gccccagg	1620
agccct gga	ccgct ggt g	aagaaggcaa	gagaggt gcc	cgt ggagagc	ct ggt ggcgt	1680
t gggcccat c	ggt cccct g	gagaaagg	t gct cccggc	aaccgcggt t	t cccaggt ca	1740
agat ggt ct g	gcaggt ccca	agggagcccc	t ggagagcga	gggcccagt g	gt ct t gct gg	1800
ccccaaggga	gccaacggt g	accct ggccg	t cct ggagaa	cct ggct t c	ct ggagccc	1860
gggt ct cact	ggccgcct g	gt gat gct gg	t cct caaggc	aaagt t ggcc	ct t ct ggagc	1920
ccct ggt gaa	gat ggt cgt c	ct ggacct cc	aggt cct cag	ggggct cgt g	ggcagcct gg	1980
t gt cat ggt	t t cctt ggcc	ccaaagggt gc	caacggt gag	cct ggcaaag	ct ggt gagaa	2040
gggact gcct	ggt gct cct g	gt ct gagggg	t ct t cct ggc	aaagt ggt g	agacaggt gc	2100
t gcaggacc	cct ggccct g	ct ggacct gc	t ggt gaacga	ggcgagcagg	gt gct cct gg	2160
gccat ct ggg	t t ccagggac	t t cct ggccc	t cct ggt ccc	ccaggt gaag	gt ggaaaacc	2220
aggt gaccag	ggt gt t cccg	gt gaagct gg	agccct ggc	ct cgt ggggt c	ccaggggt ga	2280
acgaggt t t c	ccaggt gaac	gt ggct ct cc	cgggt gccag	ggcct ccagg	gt cccct gg	2340
cct ccccggc	act cct ggca	ct gat ggt cc	caaagggt gca	t ct ggcccag	cagggccccc	2400
t ggggt cag	ggccct ccag	gt ct t cagg	aat gcct ggc	gagaggggag	cagct ggt at	2460
cgtt gggccc	aaaggcgaca	gggggt gacgt	t ggt gagaaa	ggccct gagg	gagccct gg	2520
aaaggat ggt	ggacgaggcc	t gacaggt cc	cat t ggcccc	cct ggcccag	ct ggt gct aa	2580
t ggcgagaag	ggagaagt t g	gacct cct gg	t cct gcagga	agt gct ggt g	ct cgt ggcgc	2640
t ccgggt gaa	cgt ggagaga	ct gggecccc	cggaccagcg	ggat t t gct g	ggcct cct gg	2700
t gct gat ggc	cagcct gggg	ccaagggt ga	gcaaggagag	ggcgccaga	aaggcgat gc	2760
t ggt gccct	ggt cct cagg	gcccc ct gg	agcacct ggg	cct cagggt c	ct act ggagt	2820
gact ggt cct	aaaggagccc	gaggt gccca	agggccccc	ggagccact g	gat t cct gg	2880
agct gct ggc	cgcgt t ggac	ccccaggct c	caat ggcaac	cct ggacccc	ct ggt cccc	2940
t ggt cct t ct	ggaaaagat g	gt cccaaagg	t gct cgagga	gacagcgcc	ccct ggccg	3000
agct ggt gaa	cccgccct cc	aagggt cct gc	t ggaccccc	ggcgagaagg	gagagcct gg	3060
agat gacggt	ccct ct ggt g	ccgaagggt cc	accaggt ccc	cagggt ct gg	ct ggt cagag	3120
aggcat cgt c	ggt ct gcct g	ggcaacgt gg	t gagagagga	t t cctt ggct	t gcct ggccc	3180
gt cgggt gag	ccgggcaagc	agggt gct cc	t ggagcat ct	ggagacagag	gt cct cct gg	3240
cccggt ggt	cct cct ggcc	t gacgggt cc	t gcaggt gaa	cct ggacgag	agggaagccc	3300

56

cggt gct gat ggccccct g gcagagat gg cgct gct gga gt caagggg g at cgt ggt ga 3360
 gact ggt gct gt gggagct c ct ggagcccc t gggccccct ggct cccct g gccccgct gg 3420
 t ccaact ggc aagcaaggag acagaggaga agct ggt gca caaggcccca t gggaccct c 3480
 aggaccagct ggagcccggg gaat ccaggg t cct caaggc cccagaggg g acaaaggaga 3540
 ggct ggagag cct ggcgaga gaggcct gaa gggacaccgt ggct t cact g gt ct gcaggg 3600
 t ct gcccggc cct cct ggt c ct t ct ggaga ccaagggt gct t ct ggt cct g ct ggt cct t c 3660
 t gggcct aga ggt cct cct g gccccgt egg t ccct ct ggc aaagat ggt g ct aat ggaat 3720
 ccct ggcccc at t gggcct c ct ggt ccccg t ggacgat ca ggcgaaaccg gccct gct gg 3780
 t cct cct gga aat cct ggac cccct ggt cc t ccagggt ccc cct ggccct g gcat cgacat 3840
 gt ccgcct t t gct ggct t ag gcccagagaga gaagggcccc gacccct gc agt acat gcg 3900
 ggccgaccag gcagccggt g gcct gagaca gcat gacgcc gaggt ggt g ccacact caa 3960
 gt cct caac aaccagat t g agagcat ccg cagccccgag ggct cccgca agaaccct gc 4020
 t cgcacct gc agagacct ga aact ct gcca ccct ggt gg aagagt ggag act act ggt 4080
 t gacccaac caaggct gca cct t ggacgc cat gaagggt t t t ct gcaaca t ggagact gg 4140
 cgagact t gc gt ct acccca at ccagcaaa cgt t cccaag aagaact ggt ggagcagcaa 4200
 gagcaaggag aagaacaca t ct ggt t t gg agaaacct c aat ggt ggct t ccat t t cag 4260
 ct at ggagat gacaat ct gg ct cccaacac t gccaacgt c cagat gacct t cct acgcct 4320
 gct gt ccacg gaaggct ccc agaacat cac ct accact gc aagaacagca t t gcct at ct 4380
 ggacgaagca gct ggcaacc t caagaaggc cct gct cat c cagggt cca at gacgt gga 4440
 gat ccgggca gagggcaat a gcagggt t cac gt acact gcc ct gaaggat g gct gcacgaa 4500
 acat accggt aagt ggggca agact gt t at cgagt accgg t cacagaaga cct cagcct 4560
 ccccat cat t gacat t gcac ccat ggacat aggagggccc gagcaggaat t cgggt gt gga 4620
 cat agggccg gt ct gct t ct t gt aaaaacc t gaaccaga aacaacacaa t ccgt t gcaa 4680
 acccaaagga cccaagt act t t ccaat ct c agt cact ct a ggact ct gca ct gaat ggct 4740
 gacct gacct gat gt ccat t cat cccaccc t ct cacagt t cggact t t t c t cccct ct ct 4800
 t t ct aagaga cct gaact gg gcagact gca aaat aaaa c t cgggt gt t ct at t t at t t at 4860
 t gt ct t cct g t aagacct t c ggggt caaggc agaggcagga aact aact gg t gt ggt caa 4920
 at gccccct g agt gact gcc cccagcccag gccagaagac ct ccct t cag gt gccgggcg 4980
 caggaact gt gt gt gt cct a cacaat ggt g ct at t ct gt g t caaacacct ct gt at t t t t 5040
 t aaaacat ca at t gat at t a aaaa gaaaa gat t at t gga aagt aca 5087

<210> 9

<211> 3704

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

57

ccct caccgg gggcaggagg gaccaaggct gggcccagaa cacat agt cc t agggg aaca 60

gt gaaggggt cgt gagggga cagtgactcc cttccaaccc cttcttcat a gggactgtlg	120
gcaaacaag aaaatcaact gggaaaatga agacctgctg gaaaattcca gt tttcttct	180
ttgtgtgcag tttccf ggaa cccf ggcat ctcagctgt caagectcgc cccagattcc	240
ctgtcaattc caattctaat ggtggaaatg aactctgtcc aaagatcagg attggccaag	300
atgactlacc agggfittgat ctgatctctc agttccaggt agat aaagca gcatctagaa	360
gagctalcca gagagtagtg ggalcagcta cattgcaggt ggcttacaag ttgggaaat a	420
atgtagactt caggattcca actaggaatt tatatcccag tggactgcct gaagaat act	480
ccctcttfgac gacgtittcga atgactggaa gcactctcaa aaagaactgg aacatttggc	540
agattcagga ttccctctggg aaggagcaag ttggcataaa gatlaattggc caaacacaat	600
ctgttglatt ttcatacaag ggactggatg gaagtctcca aacagcagcc ttttcgaatt	660
tgtccctctt gtittgatfcc cagtgcat a agalcatgat tggcgtggag aggagt agtg	720
ctactctttt tgttgactgc aacaggattg aatctttacc talaaagcca agaggcccaa	780
ttgacattga tggctttgct glgctgggaa aacttgcaga taatcccaa gt tttctgttc	840
catttgaact tcaatggatg ctgatccatt gtgacccct gcggcccagg agagaaactt	900
gccatgagct gccagccaga ataacgccc gccagaccac cgacgagaga ggtccccgg	960
gtgagcaggg tccctccggg cctccgggcc cccctggagt tccaggcatc gatggcatcg	1020
acggtgaccg aggtcct aag ggccccccgg gccccccggg tccctgcaggt gaaccgggaa	1080
agccaggagc tccaggcaag cctggcacac ctggcgctga tggatt aaca ggacct gatg	1140
gatccccgg ctccattggg tcaaagggac aaaaaggaga acctggtgtg cctggatcgc	1200
gtggatttcc aggcctgtgt atttcctggac cccctggtcc tccctgggaca gcaggactcc	1260
ctggagagct tggccgtgta ggacctgttg gtgacctgg gagaagagga ccacctggcc	1320
ccccggccc cccaggaccc agaggaaaca ttggctttca tgalggagat ccat tgtgtc	1380
ccaatgcctg tccaccaggt cgtcaggat atccaggcct accaggcatg aggggtcata	1440
aaggggt aa agggagaaat t ggtgaaccag gaagacaagg acacaagggt gaagaagggtg	1500
accagggaga actcggagaa gt tggagctc aaggacctcc aggagcccag ggtttgcgag	1560
gcatcaccgg catagt tggg gacaaagggg aaaaagggtgc tggggctta gatggtgaac	1620
ctgggctca gggctcttcc ggtgcacctg gtgatcaagg acagcgagga cctccaggag	1680
aagcaggtcc caaaggagat agaggggctg aagggtctag aggaattcct ggtctccctg	1740
ggcccaaagg agacacgggt ttgccagggt tggatggcg tgalgggatc cctggaatgc	1800
ctggaacaaa ggggtgaacca ggaaaacctg ggcctcctgg tgalgcagga ttgcagggt	1860
taccagggtgt acctggaatt cctggtgcaa aggggtgttgc tgggtgaaaag ggtagcacag	1920
gtgctccagg gaagcctgt cagatgggaa attcaggcaa accggggccaa caggggcctc	1980
caggagaggt gggaccccca ggacccagg ggcttccctgg cagt agagga gaattaggac	2040
cagtgggatc cccaggccta ccaggtaaac tgggttctct gggtagccct ggcctccctg	2100
gcttgcctgg gccccctgga ct tccctggaa tgaagggtga caggggtgt a gtcggtgaac	2160

cgggt ccaaa gggg gaacag ggt gccf ct g gt gaagaagg t gaagcagga gaaagggggg 2220
 aact tggaga tat aggat t a cct ggcccaa agggat ct gc aggt aat cct ggggaacct g 2280
 gct t gagagg gccg gagggg agt cgggggc t t cct ggagl ggaaggacca agaggaccac 2340
 ct ggaccccg gggg gt gcag ggagaacagg gt gccacccg cct gccg ggt gt ccagggcc 2400
 ct ccgggt ag agcaccgaca gat cagcaca t t aagcaggt t t gcat gaga gt cat acaag 2460
 aacat t t t gc t gagat ggct gccagt ct t a agcgt ccaga ct cagggt gcc act gggct t c 2520
 ct ggaaggcc t ggccct cct ggt ccccccg gccct cct gg agagaat ggt t t cccaggcc 2580
 agat gggaa t t cgt ggcct t ccgggcat t a aggggcccc t ggt gct ct t ggt t t gaggg 2640
 gacct aaagg t gact t ggga gaaaaggggg agcgt ggccc t ccaggaaga ggt cccaacg 2700
 gt t t gccg agct at aggt ct cccagggt g acccaggccc t gccagct at ggcagaaat g 2760
 gccgagacgg t gaggcaggc cccccagggg t ggcaggaat t cct ggag t g cct ggacccc 2820
 cgggacct cc t gggct t ccc ggt t t ct g t g agccagcc t c ct gcacct g caggct ggt c 2880
 agcgagcat t t aacaaagg cct gacct t gaaaggct t a ct gct gcat g gct gt ct gca 2940
 t gaaccacgc ct ggt gaagg agcct ggg t g agaaacacca t ccaaagct g gggcaaagat 3000
 gatt acct t c agcat gatt a caat gt at t a cct t cagt at gat t acagaa gt cct act t g 3060
 acaat cacat at agaagaac ggt gct at t c agt aagt t ct ct t t cct t t c cct t ggaggg 3120
 aagacagcag agt cat cagt t aaaaaaaaa aaaagaaaac caaacacct c cct t gaat aa 3180
 at t t at act c ct gt t cccag gat ct t gagg t t t agt gt gc t at acct at g t gt ct t at cg 3240
 t gggccact g t gccaat aaa caaaaacaac t gt t t ggt t t acct cagt t g cagt agt t at 3300
 t t t cat t t ag aagt t gt t ct cagat t at t g t t t cagt t at at agaggat t act agact ag 3360
 t t at gaagaa accccact ac at t caat gga at t ggt gct t aaaa t ct cat cgat gt gct g 3420
 t ct ct ggagt gat aagaaag ggct acat ct cccgaaat ga t t t ct t t acg t cat gt at t g 3480
 gt t t cct t ct t cacct t gaa ct t t t g t t ga act gt at g t a ct t t acccca aacct gt t aa 3540
 t at t t t gagg gct t ct at gt gaaagcaaag aaat aat t t t aat act ct gg cat t cat aaa 3600
 t t t t at t gat gagat t at t t at t t aaagg t t t gaggt aa cat ct ct ggt t gt accaaag 3660
 aagaaat aaa t at ggt t t ct t aat ct ct t g cat gt t t t ct t a t a 3704

<210> 10

<211> 7291

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

60

acacagtact	ctcagcttgt	tggtggaagc	ccctcatctg	ccctcatctc	gaaggcaggg	60
cccggcagag	gaaggatcag	agggtcggcg	ccggagggtc	ccggccggtg	gggccaactc	120
agagggagag	gaaagggcta	gagacacgaa	gaacgcaaac	catcaaatct	agaagaaaaa	180
gccctttgac	tttttcccc	ctccctccc	caatggctgt	gtagcaaaca	tccctggcga	240
taccttggaa	aggacgaagt	tggtctgcag	tcgcaatttc	gtgggttgag	ttcacagttg	300

t g a g t g c g g g g c t c g g a g a t g g a g c c g t g g t c c t c t a g g t g g a a a c g a a a c g g t g g c t c	360
t g g g a t t t c a c c g t a a c a a c c c t c g c a t t g a c c t t c c t c t t c c a a g c t a g a g a g t c a g a	420
g g a g c t g c t c c a g t t g a t g t a c t a a a g c a c t a g a t t t t c a c a a t t c t c c a g a g g a a t a	480
t c a a a a c a a c g g g a t t t t g c a c a a c a g a a a g a a t t c t a a a g g c t c a g a t a c t g c t t a c	540
a g a g t t t c a a a g c a a g c a c a a c t c a g t g c c c a a c a a a a c a g t t a t t t c c a g g t g g a a c t	600
t t c c c a g a a g a c t t t t c a a t a c t a t t t a c a g t a a a c c a a a a a a g g a a t t c a g t c t t t c	660
c t t t t a t c t a t a t a a t g a g c a t g g t a t t c a g c a a a t t g g t g t t g a g g t t g g g a g a t c a	720
c c t g t t t t t c t g t t t g a a g a c c a c t g g a a a c c t g c c c c a g a a g a c t a t c c c c t c t t c	780
a g a a c t g t t a a c a t c g c t g a c g g g a a g t g g c a t c g g g t a g c a a t c a g c g t g g a g a g a a a	840
a c t g t g a c a a t g a t t g t t g a t t g t a a g a a g a a a c c a c g a a a c c a c t t g a t a g a a g t g a g	900
a g a g c a a t t g t t g a t a c c a a t g g a a t c a c g g t t t t t t g g a a c a a g g a t t t t g g a t g a a g a a	960
g t t t t t t g a g g g g g a c a t t c a g c a g t t t t t g a t c a c a g g t g a t c c c a a g g c a g c a t a t g a c	1020
t a c t g t g a g c a t t a t a g t c c a g a c t g t g a c t c t t c a g c a c c c a a g g c t g c t c a a g c t c a g	1080
g a a c c t c a g a t a g a t g a g t a t g c a c c a g a g g a t a a t c g a a t a t g a c t a t g a g t a t g g g	1140
g a a g c a g a g t a t a a a g a g g c t g a a a g t g t a a c a g a g g g a c c c a c t g t a a c t g a g g a g a c a	1200
a t a g c a c a g a c g g a g g c a a a c a t c g t t g a t g a t t t t c a a g a a t a c a a c t a t g g a a c a a t g	1260
g a a a g t t a c c a g a c a g a a g c t c c t a g g c a t g t t t c t g g g a c a a a t g a g c c a a a t c c a g t t	1320
g a a g a a a t a t t t a c t g a a g a a t a t c t a a c g g g a g a g g a t t a t g a t t c c c a g a g g a a a a t	1380
t c t g a g g a t a c a c t a t a t g a a a c a a a g a a a t a g a c g g c a g g g a t t c t g a t c t t c t g g t a	1440
g a t g g a g a t t t a g g c g a a t a t g a t t t t t a t g a a t a l a a a g a a t a l g a a g a t a a c c a a c a	1500
a g c c c c c c t a a t g a a g a a t t t g g t c c a g g t g t a c c a g c a g a a a c t g a t a t t a c a g a a a c a	1560
a g c a t a a a t g g c a t g g t g c a t a t g g a g a g a a g g a c a g a a g g a g a a c c a g c a g t g g t t	1620
g a g c c t g g t a t g c t t g t c g a a g g a c c a c c a g g a c c a g g a c c t g c a g g t a t t a t g g g t	1680
c c t c c a g g t c t a c a a g g c c c c a c t g g a c c c c t g g t g a c c c t g g c g a t a g g g c c c c c c a	1740
g g a c g t c c t g g c t t a c c a g g g g c t g a t g g t c t a c c t g g t c c t c c t g g t a c t a t g t t g a t g	1800
t t a c c g t t c c g t t a t g g t g g t g a t g g t t c c a a a g g a c c a a c c a t c t c t g c t c a g g a a g c t	1860
c a g g c t c a a g c t a t t c t t c a g c a g g c t c g g a t t g c t c t g a g a g g c c c a c c t g g c c c a a t g	1920
g g t c t a a c t g g a a g a c c a g g t c c t g t g g g g g g c c t g g t t c a t c t g g g g c c a a a g g t g a g	1980
a g t g g t g a t c c a g g t c c t c a g g g c c c t c g a g g c g t c c a g g g t g t c c c c c t g g t c c a a c g g g a	2040
a a a c c t g g a a a a g g g g t c g t c c a g g t g c a g a t g g a g g a a g a g a a t g c c a g g a g a a c c t	2100
g g g g c a a a g g g a g a t c g a g g g t t t g a t g g a c t t c c g g g t c t g c c a g g t g a c a a a g g t c a c	2160
a g g g g t g a a c g a g g t c c t c a a g g t c c t c c a g g t c c t c g t g a t g a t g g a a t g a g g g g a	2220
g a a g a t g g a g a a a t t g g a c c a a g a g g t c t t c c a g g t g a a g c t g g c c c a c g a g g t t t g c t g	2280
g g t c c a a g g g g a a c t c c a g g a g c t c c a g g g c a g c c t g g t a t g g c a g g t g t a g a t g g c c c c	2340

ccaggaccaa	aagggaaacat	gggtccccaa	ggggagccctg	ggcctccagg	tcaacaaggg	2400
aatccaggac	ctcagggctct	tccctgggtcca	caagggtccaa	ttaggtccctcc	tgggtgaaaaa	2460
ggaccacaag	gaaaaccagg	acttgcctgga	cttccctgggtg	ctgatgggcc	tccctgggtcat	2520
cctgggaaag	aaggccagtc	tggagaaaag	ggggctctgg	gtccccctgg	tccacaaggt	2580
cctattggat	accggggccc	ccggggagta	aagggagcag	atgggtgtcag	aggtctcaag	2640
ggatctaaag	gtgaaaaggg	tgaagatgg	tttccaggat	tcaaaggtga	catgggtctat	2700
aaaggtgaca	gaggagaagt	tgggtcaaat	tggcccaagag	gggaagatgg	ccctgaagga	2760
cccaaaggtc	gagcaggccc	aactggagac	ccagggtccct	cagggtcaagc	aggagaaaag	2820
ggaaaacttg	gagttccagg	attaccagga	tatccaggaa	gacaaggtcc	aaaggggttcc	2880
actggattcc	ctgggtttcc	agggtgccaat	ggagagaaaag	gtgcacgggg	agtagctggc	2940
aaaccaggcc	ctcggggtca	gcgtgggtcca	acgggtccctc	gaggttcaag	aggtgcaaga	3000
gggtcccactg	ggaaacctgg	gccaaagggc	acttcagggtg	gcgatggccc	tccctggccct	3060
ccagggtgaa	gaggtccctca	aggacctcag	gggtccagttg	gattccctgg	acccaaaaggc	3120
cctcctggac	cacctgggaa	ggatgggtcg	ccaggacacc	ctgggcaacg	tggggagact	3180
ggatttcaag	gcaagaccgg	ccctcctggg	ccagggggag	tgggttggacc	acagggacca	3240
accggtgaga	ctgggtccaat	aggggaacgt	gggcatcctg	gccctcctgg	ccctcctgggt	3300
gagcaaggtc	ttcctgggtgc	tgcaggaaaa	gaagggtgcaa	aggggtgatcc	aggtcctcaa	3360
gggtatctcag	ggaaagatgg	accagcagga	ttacgtgggtt	tcccagggga	aagaggtctt	3420
cctggagctc	aggggtgcacc	tggactgaaa	ggaggggaag	gtccccaggg	cccaccaggt	3480
ccagttggct	caccaggaga	acgtgggtca	gcagggtacag	ctggcccaat	tgggtttacca	3540
gggcgcccgg	gacctcaggg	tccctcctgg	ccagctggag	agaaaggtgc	tccctggagaa	3600
aaaggtcccc	aagggcctgc	agggagagat	ggagttcaag	gtcctgttgg	tctcccaggg	3660
ccagctggtc	ctgccggctc	ccctggggaa	gacggagaca	aggggtgaaat	tgggtgagccg	3720
ggacaaaaag	gcagcaaggg	tgacaaggga	gaaaaaggcc	ctcccgggtcc	cccaggtctt	3780
caaggaccag	ttaggtgcccc	tggaaatgct	ggaggtgatg	gtgaaccagg	tccctagagga	3840
cagcagggga	tgtttgggca	aaaaggtgat	gaggggtgcca	gaggttccc	tggacctcct	3900
gggtccaatag	gtcttcaggg	tctgccaggc	ccacctgggtg	aaaaaggtga	aaatggggat	3960
gttgggtccca	tggggccacc	tgggtcctcca	ggcccaagag	gccctcaagg	tcccaatgga	4020
gctgatggac	cacaaggacc	cccagggctct	gttgggtcag	ttaggtgggtgt	tggagaaaag	4080
gggtgaacctg	gagaagcagg	gaaccacagg	cctcctgggg	aagcaggtgt	aggcgggtccc	4140
aaaggagaaa	gaggagagaa	aggggaagct	gggtccacctg	gagctgctgg	acctccaggt	4200
gccaaagggc	caccaggtga	tgatggccct	aagggtaacc	cgggtcctgt	tgggttttcc	4260
ggagatcctg	gtcctcctgg	ggaacctggc	cctgcaggtc	aagatgggtgt	tgggtgggtgac	4320
aaggggtgaag	atggagatcc	tgggtcaaccg	gggtcctcctg	gcccattctgg	tgaggctggc	4380
ccaccaggtc	ctcctggaaa	acgaggtcct	cctggagctg	cagggtgcaga	gggaagacaa	4440

ggt gaaaaag gt gct aaggg ggaagcaggt gcagaaggt c ct cct ggaaa aaccggccca 4500
 gt cgggt cct c agggacct gc aggaaagcct ggt ccagaag gt ct t cgggg cat cctt ggt 4560
 cct gt gggag aacaaggt ct cctt ggagct gcaggccaag at ggaccacc t ggt cct at g 4620
 ggacct cct g gct t acct gg t ct caaaggt gacctt ggt ccaagggg ga aaagggacat 4680
 cct ggt t t aa t t ggccct gat t ggt cct cca ggagaacaag gggaaaaagg t gaccgaggg 4740
 ct cctt ggaa ct caaggat c t ccaggagca aaaggggat g ggggaat t cc t ggt cct gct 4800
 ggt cctt t ag gt ccacct gg t cct ccaggt t t accaggt c ct caaggccc aaagggg aac 4860
 aaaggct ct a ct ggaccgc t ggccagaaa ggt gacagt g gt ct t ccagg gcct cct ggg 4920
 t ct ccaggt c cacct ggt ga agt cat t cag cct t t accaa t ct t gt cct c caaaaaacg 4980
 agaagacat a ct gaaggcat gcaagcagat gcagat gat a at at t ct t ga t t act cggat 5040
 ggaat ggaag aaat at t t gg t t cctt caat t cctt gaaac aagacat t ga gcat at gaaa 5100
 t t t ccaat gg gt act cagac caat ccagcc cgaact t gt a aagacct gca act cagccat 5160
 cct gact t cc cagat ggt ga at at t ggat t gat cct aacc aaggt t gct c aggagat t cc 5220
 t t caaagt t t act gt aat t t cacat ct ggt ggt gagact t gcat t t at cc agacaaaaa 5280
 t ct gagggag t aagaat t t at cat ggcca aaggagaaac caggaagt t g gt t t agt gaa 5340
 t t t aagaggg gaaaact gct t t cat act t a gat gt t gaag gaaat t ccat caal at ggt g 5400
 caaal gacat t cct gaaact t ct gact gcc t ct gct cggc aaaal t t cac ct accact gt 5460
 cat cagt cag cagcct ggt a t gat gt gt ca t caggaagt t at gacaaagc act t cgt t c 5520
 ct gggat caa at gat gagga gat gt cct at gacaal aat c ct t t t at caa aacact gt at 5580
 gat ggt t gt g cgt ccagaaa aggt at gaa aagact gt ca t t gaaat caa t acacaaaaa 5640
 at t gat caag t acct at t gt t gat gt cal g at caat gact t t ggt gat ca gaal cagaag 5700
 t t cggat t t g aagt t ggt cc t gt t t gt t t t ct t ggct aag at t aagacaa agaacat at c 5760
 aaat caacag aaaat at acc t t ggt gccac caacccat t t t gt gccacat gcaagt t t t g 5820
 aat aaggat g gt at agaaaa caacgct gca t at acaggt a ccat t t agga aal accgat g 5880
 cct t t gt ggg ggcagaat ca cat ggcaaaa gct t t gaaaa t cat aaagat at aagt t ggt 5940
 gt ggct aaga t ggaaacagg gct gat t ct t gat t ccaat t ct caact ct cct t t cct a 6000
 t t t gaat t t c t t t ggt gct g t agaaaaaaa aaaaagaaaa at at at at t c at aaaaaat a 6060
 t ggt gct cat t ct cat ccat ccaggat gt a ct aaaacagt gt gt t t aat a aat t gt aat t 6120
 at t t t gt gt a cagt t ct at a ct gt t at ct g t gt ccat t t c caaaact t gc acgt gt cct 6180
 gaat t ccat c t gact ct aat t t t at gagaa t t gcagaact ct gat ggcaa t aaat at at g 6240
 t at t at gaaa aaat aaagt t gt aat t t ct g at gact ct aa gt cctt t t ct t t ggt t aat a 6300
 at aaaaat gcc t t t gt at at a t t gat gt t ga agagt t caat t at t t gat gt cgccaacaaa 6360
 at t ct cagag ggcaaaaat c t ggaagact t t t ggaagcac act ct gat ca act ct t ct ct 6420
 gccgacagt c at t t t gct ga at t t cagcca aaaal at t at gcat t t t gat gct t t at t ca 6480

64

```

aggctatacc tcaaactttt tcttctcaga atccaggatt tcacaggata ctigtatata 6540
tggaaaacaa gcaagtttat atttttggac agggaaatgt gtgt aagaaa gtatattaac 6600
aaatcaatgc ctccgtcaag caaacaatca tatgtatact ttttttctac gttatctcat 6660
ctccttgltt tcagtggtgt tcaataatgc aggttaatat taaagatgga aatt aagcaa 6720
ttatttatga atttgggcaa tgttagattt tcttatcaat caagttcttg aatttgattc 6780
taagttgcat attataacag tctcgaaaat tattttactt gcccaacaaa tattactttt 6840
ttcctttcaa gataatttta taaatcattt gacctacct aattgctaat gaataacata 6900
tgggtggactg ttatt aagag tatttggttt aagtcattca ggaaaatcta aacttttttt 6960
tccactaagg tattttacttt aaggtagctt gaaatagcaa tacaatttaa aaattaaaaa 7020
ctgaattttg tatctatttt aagtaatatat tgt aagactt gaaaataaat gttttatttc 7080
ttatataaag tgttaaatla attgatacca gatttcactg gaacagtttc aactgat aat 7140
ttatgacaaa agaacat acc tgt aatatgt aaattaaaaa gtgaaatttg tcat aaagaa 7200
tttcttttat ttttgaaatc gagtttgtaa atgtcctttt aagaaggagg atatgaatcc 7260
aat aaat aaa ctcaagtcct ggctacctgg a 7291

```

<210> 11

<211> 1538

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

65

ccgt gcaccg t g t g t g c g c g c g c g g c g t t g a a a t g c c c t g c a c g t c g g g g c a g c g g g a c a g a 60
 t c c c a g g g t g c c c a g g g a g t c t c c a a g t g c c t c a c t c c t c c c g c c g c a a a c a t g a c a g a g 120
 a a c t c g g a c a a a g t t c c c a t t g c c c t g g t g g g a c c t g a t g a c g t g g a a t t c t g c a g c c c c 180
 c c g g c g t a c g c t a c g c t g a c g g t g a a g c c c t c c a g c c c c g c g c g g c t g c t c a a g g t g g g a 240
 g c c g t g g t c c t c a t t t c g g g a g c t g t g c t g c t g c t c t t t g g g c c a t c g g g g c c t t c t a c 300
 t t c t g g a a g g g g a g c g a c a g t c a c a t t t a c a a t g t c c a t t a c a c c a t g a g t a t c a a t g g g 360
 a a a t t a c a a g a t g g g t c a a t g g a a a t a g a c g c t g g g a a c a a c t t g g a g a c c t t t a a a a t g 420
 g g a a g t g g a g c t g a a g a a g c a a t t g c a g t t a a t g a t t t c c a g a a t g g c a t c a c a g g a a t t 480
 c g t t t t g c t g g a g g a g a a g t g c t a c a t t a a a g c g c a a g t g a a g g c t c g t a t t c c t g a g 540
 g t g g g c g c c g t g a c c a a a c a g a g c a t c t c c t c c a a a c t g g a a g g c a a g a t c a t g c c a g t c 600
 a a a t a t g a a g a a a a t t c t c t t a t c t g g g t g g c t g t a g a t c a g c c t g t g a a g g a c a a c a g c 660
 t t c t t g a g t t c t a a g g t g t t a g a a c t c t g c g g t g a c c t t c c t a t t t t c t g g c t t a a c c a 720
 a c c t a t c c a a a a g a a a t c c a g a g g g a a a g a g a g a a g t g g t a a g a a a a t t g t t c c a a c t 780
 a c c a c a a a a a g a c c a c a c a g t g g a c c a c g g a g c a a c c c a g g c g c t g g a a g a c t g a a t a a t 840
 g a a a c c a g a c c c a g t g t c a a g a g g a c t c a c a a g c c t t c a a t c c t g a t a a t c c t t a t c a t 900
 c a g c a g g a a g g g g a a a g c a t g a c a t t c g a c c c t a g a c t g g a t c a c g a a g g a a t c t g t t g t 960
 a t a g a a t g t a g g c g g a g c t a c a c c c a c t g c c a g a a g a t c t g t g a a c c c t g g g g g g c t a t 1020

t a c c c a t g g c c t t a t a a t t a t c a a g g c t g c c g t t c g g c c t g c a g a g t c a t c a t g c c a t g t 1080
 a g c t g g t g g g t g g c c c g t a t c t t g g g c a t g g t g t g a a a t c a c t t c a t a t a t c a t g t g c t g 1140
 t a a a a t a a g a a c t a g c t g a a g a g a c a c c a a a g a a g c a t t a a g g c a g g t t g a t g c t g a t g 1200
 g g a c c a t a a a a t a t t t t t a c a c t c a a c c t g a g c g g t t a t t c t t g a c a c t c t t a a c a g a a t 1260
 t t t t t c a a t t g t t t t c c a g a a c t t t a g t a t a t g c a a a t g t a c t g a a a g g g t a g t t c a a g t 1320
 c t a a a a t g c c a t a a c c c c t t t a t t a t t t g t t a t t t t t a t t t g c a t t g c t t t g c c a t a a g 1380
 t c t t c c c t t g c t t g t a t c t t c c a a a g c t a t t t t g a a a t a a a c a t g a a a a t t t a c a g t t t g 1440
 c c a 1500
 a 1538

<210> 12

<211> 1135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

66

```

gggcagaggg aat aagaggc tgcctctgcc caccagt cct gccgccagg acccgagca      60
gagacgacgc ctgcagcaag gagaccagga aggggtgaga caaggaagag gatgtctgag      120
ctggagaagg ccatggaggc cctcatcgac gttttccacc aatattctgg aaggaggga      180
gacaagcaca agctgaagaa atccgaactg aaggagctca tcaacaatga gctttcccat      240
ttcttagagg aaatcaaaga gcaggaggtt gtggacaaag tcatggaaac actggacaat      300
gatggagacg gcgaatgtga ctccaggaa ttcatggcct ttgttgccat ggttactact      360
gcctgccacg agttctttga acatgagtga gattagaaag cagccaaacc ttctctgtaa      420
cagagacggt catgcaagaa agcagacagc aagggttgc agcctagt aggagctgagct      480
ttccagccgt gtgtgtagct aattaggaagc ttgat ttgct ttgtgat tga aaaattgaaa      540
acctctttcc aaaggctgt tttaacggcct gcatcat tct ttctgct ata ttaggcctgt      600
gtgt aagctg actggcccca gggactcttg tttaacagt aa cttaggagtc aggtctcagt      660
gat aaagcgt gcaccgtgca gccgccatg gccgtgtaga ccttaaccgc gagggaaacc      720
tgactacaga aattaccocg gggcaccctt aaaacttcca ctaccttta aaaacaaagc      780
ctlatccagc attatttgaa aacactgctg ttctttaaat gggttctca tccatgcaga      840
taacagctgg ttggccggtg tggccctgca agggcgtggt ggcttcggcc tgccttcccg      900
gatgcgcctg atcaccaggt gaacgctcag cgctggcagc gctcctggaa aaagcaactc      960
catcagaact cgcaatccga gccagctctg ggggctccag cgtggcctcc gtgacccatg      1020
cgattcaagt cgcggctgca ggatccttgc ctccaacgtg cctccagcac atcgggcttc      1080
cgagggcact accggggggt ctgagccacc gcgagggcct gcgttcaata aaaag      1135

```

<210> 13

<211> 2889

<212> DNA

<213> Homo sapiens...

<400> 13

ctggctgccg gctgctgcc cgcgaatccc ggctcctaaa tcagcgcggg gaggcgctcc	60
ctccccacgc ccggctctcc gggctctcgg ggccgcgalt ggccgcgccg gcgcccccca	120
ccccggggcc ccggctccag ctgccgcgcc attggctgcg ggcctccgcc agcctttaca	180
t aagaccggg cgcgctcgag tggagtgtat aaagcgagc gcgcggcgtc ggggcgggag	240
gctcgaggcc agccggggac cggggctggg agcaagcagg cggcggcgcc ggccgcagag	300
gcggcagcga gcgcccgtt cccacgcccc taggcggcgg ggccgagagc gggaggatgg	360
ctccgagcgc tgacccgggc atgtccagga tgtaccgtt cctgctgctg ctctggtttc	420
tgcccatcac tgaggggtcc cagcgggctg aacccatgt cactgcagtc accaactcag	480
ttctgcctcc tgactatgac agtaatccca ccagctcaa ctatggtgtg gcagttactg	540
atgtggacca tgatggggac tttgagatcg tcgtggcggg gtacaatgga cccaacctgg	600
ttctgaagta tgaccggggc cagaagcggc tggtagaat cgcggtcgat gagcgcagct	660
cacctacta cgcgctgccg gaccggcagg ggaacgccat cggggtcaca gcctgcgaca	720
tcgacgggga cggccgggag gagatctact tctcaacac caataatgcc ttctcggggg	780
tggccacgtat caccgacaag ttgttcaagt tccgcaataa ccggtgggaa gacatcctga	840
gcgatgaggt caacgtggcc cgtggtgtgg ccagcctctt tgcgggacgc tctgtggcct	900
gtgtggacag aaagggtct ggacgctact ctatctacat tccaattac gcctacggtat	960
atgtggccc tgatgcctc attgaaatgg accctgaggc cagtgacct tcccggggca	1020
ttctggcgct cagagatgtg gctgctgagg ctggggtcag caaatataca gggggccgag	1080
ggctcagcgt gggccccatc ctcagcagea gtgcctcgga tatcttctgc gacaatgaga	1140
atgggcctaa ctlctlttc cacaaccggg gcgatggcac ctltgtggac gctgcggcca	1200
gtgctggtgt ggacgacccc caccagcatg ggcgaggtgt cgcctggct gacttcaacc	1260
gtgatggcaa agtggacatc gtctatggca actggaatgg cccccaccgc ctctatctgc	1320
aaatgagcac ccatgggaag gtccgcttcc gggacatcgc ctcacccaag ttctccatgc	1380
cctccctgt ccgcacggtc atcaccgccg actttgacaa tgaccaggag ctggagatct	1440
tcttcaacaa caltgcctac cgcagctcct cagccaaccg cctcttccgc gtcattcgtat	1500
gagagcacgg agacccctc atcgaggagc tcaatccgg cgacgccttg gagcctgagg	1560
gccggggcac aggggggtgt gtgaccgaact tcgacggaga cgggatgctg gacctcatct	1620
tgtcccatgg agagtccatg gctcagccgc tgtccgtctt ccggggcaat cagggttca	1680
acaacaactg gctgcgagtgt gtgccacgca cccggtttgg ggcctttgcc aggggagctat	1740
aggtcgtgct ctacaccaag aagagtgggg ccacctgag gatcatcgac gggggctcag	1800
gctacctgtg tgagatggag ccctggcac actttggcct ggggaaggat gaagccagca	1860
gtgtggaggt gacgtggcca gatggcaaga tggtagccg gaacgtggcc agcggggaga	1920
tgaactcagt gctggagatc ctctaccccc gggatgagga cacacttcag gaccagccc	1980
cactggagtgt tggccaagga ttctccagc aggaaaatgg ccattgcatg gacaccaatg	2040

68

aat gcat cca	gt t cccat t c	gt gt gccct c	gagacaagcc	cgt at gt gt c	aacacct at g	2100
gaagct acag	gt gccggacc	aacaagaagt	gcagt cgggg	ct acgagccc	aacgaggat g	2160
gcacagcct g	cgt ggggact	ct cggccagt	caccggggccc	ccgccccacc	acccccaccg	2220
ct gct gct gc	cact gccgct	gct gct gccg	ct gct ggagg	t gccact gct	gcaccggf cc	2280
t cgt agat gg	agat ct caat	ct ggggt cgg	t ggt t aagga	gagct gcgag	cccagct gct	2340
gagcaggggt	gggacat gaa	ccagcggat g	gagt ccagca	ggggagt ggg	aaagt gggct	2400
t gt gct gct g	cct agacagt	agggat gt aa	aggcct ggga	gct agaccct	ccccaaagccc	2460
at ccat gcac	at t act t agc	t aacaat t ag	ggagact cgt	aaggccaggc	cct gt gct gg	2520
gcacat agct	gt gat cacag	cagacaggggt	cgct gccct g	at ggcgct t a	cat t ccagt g	2580
gggt ct aat ga	ccat at ct t a	ggacacagat	gt gcccaggg	aggt ggt gt c	act gcacagg	2640
aagt at gagg	act t t agt gt	cct gagt t ca	aat cct gal t	caggaact ca	caaagct at g	2700
t gacct taca	ccagt cact t	aact t gt t ag	ccat ccat t a	t cgcct ct gc	aaaat gggga	2760
t t aagaat ag	aat ct t gggg	t t agt gt gga	gat t agat t a	aat gt at gt a	agacact t gg	2820
cacaaaacct	ggcacat agt	aaaggct caa	t aaaaacaag	t gccct ct cac	t gggct t t gt	2880
caacacgt g						2889

<210> 14

<211> 3935

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

69

ggagagccga aagcggagct cgaaact gac tggaaacttc agtggcgagg agactcgcca	60
gtttcaaccc cggaaacttt tctttgcagg aggagaagag aaggggtgca agcgcccca	120
cttttgctct ttttcttccc ctctctctcc tctccaattc gcttcccccc acttggagcg	180
ggcagctgtg aactggccac ccgcgcctt cctaatgtct cgcgcggta gccggccgac	240
gcgccagctt ccccgaggagc cgcttgcctcc gcatccgggc agccgagggg agaggagccc	300
gcgctcgag tccccgagcc gccgcggctt ctgcctttc ccggccacca gcccctgcc	360
ccgggccccg gtatgaatct cctggacccc ttcatgaaga tgaccgacga gcaggagaag	420
ggcctgtccg gcgccccag cccaccatg tccgaggact ccgcgggtc gccctgccg	480
tgggctccg gctcggacac cgagaacacg cggccccagg agaacacgtt cccaagggc	540
gagccgatc tgaagaagga gagcgaggag gacaagtcc ccgtgtgcat ccgcgaggcg	600
gtcagccagg tgc taaagg ctacgactgg acgctggtgc ccatgccgt gccgtcaac	660
ggctccagca agaacaagcc gcacgtcaag cggcccatga acgccttcat ggtgtggcg	720
caggcggcgc gcaggaagct cgcggaccag taccgcact tgcacaacgc cgagctcagc	780
aagacgctgg gcaagctctg gagacttctg aacgagagcg agaagcggcc cttcgtggag	840
gaggcggagc ggctgcgct gcagcacaag aaggaccacc cggattaca gtaccagccg	900
cggcggagga agtcggtgaa gaacgggcag gcggaggcag aggaggccac ggagcagacg	960

cacatctccc ccaacgccat cttcaaggcg ctgcaggccg actcgccaca ctctctctcc	1020
ggcatgagcg aggtgcactc ccccgggcgag cactcggggc aatcccaggg cccaccgacc	1080
ccaccacca cccccaaaac cgacgtgcag cggggcaagg ctgacctgaa gcgagagggg	1140
cgcccttgc cagagggggg cagacagccc cctatcgact tccgcgacgt ggacatcggc	1200
gagctgagca gcgacgtcat ctccaacatc gagaccttcg atgtcaacga gtttgaccag	1260
tacctgccgc ccaacggcca cccgggggtg cgggccacgc acggccaggt cacctacacg	1320
ggcagctacg gcatcagcag caccgcggcc acccggcgga gcgcgggcca cgtgtggatg	1380
tccaagcagc aggcgcgcgc gccacccccg cagcagcccc cacaggcccc gccggccccg	1440
caggcgcccc cgcagcgcga ggcggcgccc ccacagcagc cggcggcacc cccgcagcag	1500
ccacaggcgc acacgctgac cagctgagc agcgagccgg gccagtcca gcgaacgcac	1560
atcaagacgg agcagctgag cccagccac tacagcgagc agcagcagca ctcgcccaa	1620
cagatcgct acagccctt caacctccca cactacagcc cctctaccc gcccatcacc	1680
cgctcacagt acgactacac cgaccaccag aactccagct cctactacag ccacggcgca	1740
ggccagggca cgggctcta ctccacctc acctacatga acccgcctca ggcgccatg	1800
tacacccca tgcgcgacac ctctggggtc ccttccatcc cgcagacca cagccccag	1860
cactgggaac aaccgctcta cacacagctc actcgacctt gaggaggcct cccacgaagg	1920
gcgaagatgg ccgagatgat cctaaaaata accgaagaaa gagaggacca accagaattc	1980
cctttggaca ttgtgtttt ttgtttttt tttttgttt tgttttttct tcttcttctt	2040
cttctttaa gacatttaag ctaaaggcaa ctcgtacca aatttccaag acacaaacat	2100
gacctatcca agcgcatfac ccacttgtgg ccaatcagt ggcaggccaa ccttggctaa	2160
atggagcagc gaaatcaacg agaaactgga ctttttaaac cctcttcaga gcaagcgtgg	2220
aggatgatgg agaatcgtgt gatcagtgtg cttaatctct ctgctgttt ggactttgta	2280
attattttt tagcagtaat taaagaaaa agtctctgt gaggaaatatt ctctatttta	2340
aatattttta gtatgtact tgtatgattc attaccattt tgaggggatt tatacatat	2400
tttagataaa attaaatgct ctatttttc caacagctaa actactctta gttgaacagt	2460
gtgccctagc tttcttgca accagagtat tttgtacag atttgcttct tcttcaaaa	2520
agaaaaaaaa aatcctgttg tattaacatt taaaacaga attgtgtlat gtgatcagtt	2580
ttgggggtta actttgctta attcctcagg ctitggat ttaaggaggag ctgecttaa	2640
aaaaaataaa ggccttattt tgaattatg ggagt aaaca atagtctaga gaagcatttg	2700
gtaagcttta tcatatatat attttttaa gaagagaaaa acacctlgag cctlaaacg	2760
gtgctgctgg gaaacatttg cactctttta gtgcatttcc tctgccitt gcttgttcac	2820
tgcagctta agaaagaggi aaaaggcaag caaaggagal gaaatctgt ctgggaatgt	2880
ttcagcagcc aatagtgcc cgagcacact gccccgggtt gcctgccgg gcccatgtg	2940
gaaggcagat gcctgctcgc tctgtcacct gtgcctctca gaacaccagc agttaacctt	3000
caagacattc cacttgctaa aattatttat ttgttagga gaggttttaa ttaaacaaa	3060

71

```

aaaaaatct ttttttttt tttttccaat tttaccttct ttaaaatagg ttgttggagc 3120
tttccctcaaa gggataggc atctgttgtt aaattatgtt cttaactgta accagttttt 3180
ttttatftat ctctttaatc tttttttatt attaaaagca agtttctttg ttttctcac 3240
cctagatttg tataaatgcc tttttgtcca tccctttttt ctttgttgtt ttgttgaaa 3300
acaaactgga aacttgttc tttttttgta taaatgagag attgcaaatg tagtgtatca 3360
ctgagtcatt tgcagtgtt tctgccacag acctttgggc tgccttatat tgttgttgtg 3420
tgtgggtgtg tgttgtttt gacacaaaaa caatgcaagc atgtgtcatc catatttctc 3480
taccttct ctggagtga gggaggctac ctggagggga tcagccact gacagacct 3540
aatcttaatt actgctgtgg ctgagaggtt tgaggattgc ttttaaaaa agacagcaaa 3600
ctttttttt tatftaaaaa aagatattt aacagtttta gaagtcagta gaataaaatc 3660
ttaagcact cataatatgg catccttcaa tttctgtata aaagcagatc ttttaaaaa 3720
gatacttctg taacttaaga aacctggcat ttaaatcata ttttgtctt aggtaaaagc 3780
tttggtttgt gttcgtgtt tgtttgttc acttgtttcc ctcccagccc caaaccttt 3840
gttctctcg tgaacttac ctctccctt tctttctct ttttttttt ttgtatattat 3900
tgtttacaat aaatatatat tgcattaaaa agaaa 3935

```

<210> 15

<211> 8034

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

cttgagtgtt agagctgagt agttttccca gaatctctaa gtcccttttta tgccttttta	60
tgaatgaata gaattagtaa aagataaata aattttttct ttggatttc ttaaccagt g	120
gaaaaaatgt tgactttaaa agttcataaa atcaaat ttt gcttaagaat atgttatttc	180
cacttgtgag gccagcctgg tagacctctg ggatcccttt ctgttcactc acacaccact	240
gagataagga gtgaagtgtg ggctaaat ag ggctgaggct tgggcaaggg cat t t c t gcc	300
agagcaccag agacgtcagc atctcaaggg cactgtggt a tggaaaagga cgccacatga	360
gtaaat t t t a aaaatataaa t a t t t t aaag ggt aaaaat g agggccctg t a t t t gagga	420
tataaaagat gaaactgaag aagaaaagat aggggaagaa gaaaalgaag aagaccaggt	480
cttctataag cctgttat t g aagacttaag catggaattg gccagaaaat gcacggaact	540
cattagcgat atccgtata aagaagagtt taaaaagtcc aaggataagt gtacatttgt	600
gactgacagt cctatgctaa accatgtaaa aaatatacgt gcttttattt ctgaggcaaa	660
atacaaaggc accattaaag ctgaccttc t a a t t c t c t t t a t a a g c g g a t g c c a g c c a c	720
aattgacagt gtttttgag gagaagttac acagctccag agtgaggtgg cctacaagca	780
gaaacatgat gctgcaaag gattctcaga ttatgccac atgaaggagc cccctgaggt	840
t aaacatgcc atggaggtca ataaacacca gagt aatatt tcttatagga aagacgtgca	900
ggacacccac acgtacagt g cagaacttga ccgaccagac atcaagatgg caaccagat	960

ct ct aagat c at aagcaat g cagaat acaa gaaaggacaa ggaat aat ga at aaagagcc	1020
cgctgt aat t ggaagaccag at t t t t gaaca t gccgt ggaa gct t ct aaac t t t ct agt ca	1080
aat t aaat ac aaagaaaaat t cgat aat ga aat gaaggat aagaaacat c at t acaat cc	1140
t ct t gaaagt gct t ct t t t a ggcagaat ca gct t gct gct acact ggcca gcaat gt gaa	1200
gt acaagaaa gacat t caaa at at gcat ga t ccagt t t ca gat ct ccaa at t t gt t gt t	1260
t t t agaccat gt t t t gaaag ccagcaaaat gct cagcggc cgagaat at a aaaagct ct t	1320
t gaggaaaac aaaggaat gt at cat t t t ga t gcagat gct gt ggaacat c t gcaccat aa	1380
aggcaat gcc gt cct ccaa gt caggt gaa at at aaagaa gaat at gaga aaaat aaggg	1440
aaagccaat g ct t gaat t t g t t gagacacc at cat at caa gct t caaagg aggct caaaa	1500
gat gcaaagt gaaaaagt t t acaaagagga t t t t gagaag gagat t aaag gaaggt cat c	1560
act ggat t t a gacaagact c cagaat t t t t acat gt aaag t acat cacca acct t ct gag	1620
ggagaaagaa t at aaaaaag at t t ggaaaa t gagat aaaa gggaaaggaa t ggaact t aa	1680
t t cagaagt t ct t gat at cc aaagagcaaa gcgggcct ct gaaat ggcaa gt gagaaaga	1740
at acaagaaa gacct ggagt caat aat t aa agggaaagga at gcaagct g gcact gacac	1800
cct t gaaat g cagcat gcc aagaaggct gc agagat agcg agt gagaaag act at aaaag	1860
agat ct ggag act gaaat t a aagggaagg gat gcagggt g agcacagaca ct ct t gat gt	1920
ccagagagct aagaaagcat ccgagat ggc cagccagaaa caat acaaga aggact t aga	1980
aaat gaaat t aaagggaagg gaat gcaagt gagcat ggat at cccagat a t cct t cgagc	2040
caagaggaca t ct gaaat ct at agccagag aaagt at aaa gat gaagcag agaagat gct	2100
t t ct aact at t ct accat ag cagat act cc t gaaat t cag agaat t aaga caact caaca	2160
aaacat t agt gcggt at t t t at aagaaaga agt gggagct ggcact gcag t gaaagat ag	2220
cccagagat c gaacgagt ga agaaaaat ca gcagaat at t agt t cagt ga aat acaaga	2280
agagat t aaa cat gcaacag ccat t t ct ga t cct ccagaa ct aaagagag t t aaagaaaa	2340
ccagaagaac at cagcaat c t ccagt at aa agagcaaaac t acaaggcca ct ccggt aag	2400
cat gaccccg gagat agaga gagt gaggcg aaaccaggag cagct gagt g cgggt aaaat a	2460
t aaggagaa ct t caacggg gaact gcaat t t ct gat cca ccagagct ga agagggcaaa	2520
agaaaaccag aaaaacat ca gcaat gt t t a t t acagaggt cagct gggaa gagct accac	2580
t t t aagt gt a act cct gaaa t ggaaagagt gaagaagaat caagaaaat a t t agct cgggt	2640
aaaat at acc caggaccat a aacagat gaa aggt agacca agt ct gat t t t agat acacc	2700
t gct at gaga cat gt t aaag aagcacaaaa t cat at t t ca at ggt aaaat accat gaaga	2760
t t t t gaaaaa acaaagggga gaggct t t ac t cccgt cgt g gacgat cct g t gacagagag	2820
agt gaggaag aacacccagg t ggt cagcga t gct gcct at aaaggggt cc accct cacat	2880
cgt ggagat g gacaggagac ct ggaat cat t gt t gacct c aaagt t t ggc gcacagat cc	2940
t ggct ccat c t t cgacct t g at cccct gga agacaat at t cagt ct agaa gt ct ccat at	3000

gct ct ct gaa aaggcgagt c act at aggcg acact ggi ct cgat cccat t ccagcagt ac 3060
 t t t cgg t aca ggt ct cggag acgacaggt c agaaat ct cc gagat t t acc ct agct t t t c 3120
 at gct gcagt gaggt aacaa gaccgt ct ga t gaaggagca cct gt t ct t c ccggagcct a 3180
 t cagcaaagc cat t cccaag gct at ggct a cat gcaccag accagt gt gt cat ccat gag 3240
 at caat gcag cat t caccaa at ct aaggac ct accgagcc at gt acgat t acagt gccca 3300
 ggat gaagac gaggt ct cct t t agagacgg cgact acat c gt caacgt gc agcct at t ga 3360
 cgat ggct gg at gt acggca cagt gcagag aacagggaga acaggaat gc t cccagcgaa 3420
 t t acat t gag t t t gt t aat t aat t at t t ct cct gccct t t gagct t t at t ct aat gt at 3480
 cccaaacct a at ct t t t t aa aagat agaag at act t t t aa gacaact t gg ccat t at t t t 3540
 acaat gat gt at cct t cct t t gacaat t ag acacacaggt accaggaaga aggaat gacc 3600
 t ct gggct ga aaacagcagc at t t t cagt a at t cct acaa acaaaaat ct t t gt gt ct gg 3660
 acgcct ggt g ct gct aat t g t gt t cat ggt t t cct t t gat t ggct at t ga accct t ct gg 3720
 gaaat gt at t t t t gt agact t t aat agaga agt t gat t gt cct t aat g t agcgt gt gt 3780
 t t gaaact t c t t agct gt ca ct t t ggaat c accccaagcc aat t ct ct t a act ct gt aat 3840
 gcagccaat a at acaaaccg gt t t t gct t t t t gat t cat ga ggcaat t t cc aat at t agt g 3900
 aaaat t gcc aat at aat aa gt gt aaacag t ggcagaagg acagt ct ggt t aaaat t at a 3960
 t t gact ggt g gcct t agga t ct agaaact t ct act aaac agagaaat t t cct t gt t ccc 4020
 t aggc t gact ggt at ct at t t at t t ct cat t t gt accaag gcat ct cct a ct ct ccat t t 4080
 at at t ct at g gacccaagt c t at gct cagt t ccacagaat gt caggacca aat aact t ca 4140
 cagct act ct gcaaagggca aat t at aat g t cat t gat at aat t t cct a gt agcat t t a 4200
 cct gt t gca t gt cat gt ag at t caagct t ct gt aacat a ggcagct gca ct gcgcgt t c 4260
 ct at t at t ga agcaaaaagg gt gact gat a cct aaaagcc ct t t ct t cct ct agt cgcca 4320
 gct cat caga aaaacat act t t gaaaagat gct t gagat t t t cct gct gc at cgcact ct 4380
 agt t t ggaag gat t t acat c t t aggaat a acat gt at ac t ct agt aat aagcgat t t a 4440
 ggt gt t ccat t gaacagct t t gat t aact t aat gccacca t t gat t t caa agt gaagaaa 4500
 at gt aacaga agccagt gaa gcaat ggaag ct ggagt gt g act ggaaaaa t act cagcaa 4560
 acaaagt t ac caat t ccat a cagagat gat ct ggt gt ct t ct t t t ggaaa at ggt at t ca 4620
 aat t ct ggaa t ggaaat ct a gccacaaaa cgggt t aat c aaaagacgt c ct t t t ccgt t 4680
 t t t t t gct t t t at t t t ct a aat cat t t t t aagggaat ga aacaggaat g t cat cagaga 4740
 t t t t t agt a caggcccaag agcct gt act ct aagaaaga aat t t t t gcc at gt at gaat 4800
 t t t cgaat aa gt gact t t gc aggc t t t t gc t agccct t gc t ggt ggt ct ggaaat t aca 4860
 t ccagagt ct gcagt ccagg t caccaagcc agcggcaccc gt cggcaacc ct gt gt t t aa 4920
 cggat t gt gc cgt t t act gt gacct gcaac ggggt ggcgt t cact t aggg t ct gact t ca 4980
 cagct at gac aaaaccgaaa aagcaaaact gcgaggaagt gct aagat gt acgggt ct t g 5040
 gggat at ct g cct t at at gt t at at t caag gaaat t aacg aaacat cct g t gaaacat cg 5100

t t t a a g g a a a c g t t t a c t a g t c c a a a g g c c a a a g c t a a t t t a t t t c c a c t t t a g a a a a g t	5160
t a g c a c a t g c t t t t g a a a a t c t g t g a t t t c a t t t t a t t a g g c t a a a a g g g t a a a t a g g c t	5220
t t a t t a c a c t g a a g c t g c a t c t a t a t g t c a c t g a c a t a a a g t t g a a a a a t a a a t g c a g g	5280
c a a a t a a c t a g a g a c t t c t t t t a a g g g g g t t t g g c t g g t t t c t c t c a c t g a a a t g g c c a g	5340
t c g t g a t t a a a g t g a t a a a a c c c a t a t c t g t t t g g t a t a t t g t a c a c a a a c c t a c a a a	5400
a a t a a a c t g a a c t t g c a a t a t t t t t g c a a t a a a a t c t g t c g t t a a a a c t g a g g a t a a a a t	5460
a c c t g c t c a a t t t t a t t t t a c t a a g t a t a t a t t t a c a t t t c a c c c a g g c a g g c a t t t t c	5520
t t t t g t g a t t a t a a g a a a g a g t a g t g t t g a t t a a a t t t t c a g a c t a a a t a t a g g a c a g g	5580
t a c a a t t t t g g a t a a a t a g c a g a t t a t a a g a a c c g c a a t g a a a a c t g a c t t g a a a t a a t	5640
g c t t g t a a t c a g g a a a g t a a t t t c a t c c a c c g a t t t c a a a a c c a g a t t c a c t g a g c a t a a	5700
a a g t c a a t a c a t a t t t g a g g a a t a a g t c t c c t a a a a t t t t a a g c t t c a c g t a a t a a t g t t	5760
t g c a t a g c a a a a t a t t t c t g c t t c a a g c c t t t a g g a a t t a a g a t c t g a t c a g a a t t t a a c	5820
t a a a g g g t a g t t g t t t t a c a a t g a a g a c t a a a a c t g a a c a a g a t g t t g c a t g c g c t t a g g	5880
c c a t a a t t t g g t a g t g t t g g c a g t t g t t a a t a a a g c t t g t c a g g a t g t t a a g c a t c t c a g	5940
g a g a a a t a t t g g a a a a t t a t a t g t a t a a a a c c a a a g t g c t g t t t t a a a a g c a t c a t t t a	6000
a a a a a a a a t g a c a t g c c t g a a c a a c t t t t c c a c t t t c c a c g t g c t t c c c t c c c a c c t t t g	6060
g t t t g g c a a c a g g t a t c t c g t g c a t g a a g c t g a c a g c t a a a g a a g a t t t t a a a a t t g a g	6120
t t a a a g a t g a c t g t g t a a a t g t c c a a g c a c a g a g a g c a t g c a c c t g a c t t t c t a a a g t t t	6180
g a t g t g t t c t c a a g c c t g a c a g a a g c a c a a g g a a c a g t t t g a t a c a c t t t t a a a a g g t t c	6240
t g a a a c a a a a g c t g t a t a g g g a t c c t c t c t c t t g a g c a a a g t a t a g c a a c a g a a t a t a	6300
t t g c t t t t g t t g t a a g c t t t t g t a g t a c a t g t t t t a c t a a t a a t t c t t g t t c t c t a g a a	6360
a g c t t t c t a t t t c t a a c c t a t g g c a a a a t g a a t c c t t c a t g t c t t c t t g t t a t t g t t t a c	6420
a c a c t t g c a g t g t a g c c c a g t t t g a a a t a t t t a t t t g g t t a t c a a c t g c c c a t g g a g g a g	6480
g c t c t t g a t g a t c c c a g g t c t c c t c g a c c t c c a t a c a c c a c a c a g g c a t t t g t a a g c a c a	6540
g t t t c c a c a a g c a c c t t g t a g g a a t a t g g a t a a g a t t a g a c c a g c c c c t c t c t g t c c a c t	6600
g g g t t t a t t t c t t g a a g a a g a t g c a g a t c t g g t t t t t c c a a t g t g c c a c a g t c t t t c c t t	6660
a t c c t c t c c a t g c t g a g c t t g a c a a c a c t c t g g g a a t g a g g a c a a g a c t t t t t c t a a a a	6720
a g a t a g t g g a a g t t c a a g g g a t g t a c c t c g t t t t c a g g t t c a t c c a t c t c c a g t g g a a t g	6780
t t t t c a a t a a a a g a t g a a g a a a t g t g t g t g a t c t t t a a t a a c a c a t c c c t a t a g a a a g t	6840
g g a t a a a a g a t a t a c c a a a a c t g t a a t a c a g a t a t a c a a a t a t a g g t g c c t t t t t g a t	6900
t a c t c t t g t t t g t c t a g t a t g c t c t t g g a a a g a a a a c c a a g c a a g a a g t t g c t g c c t a t	6960
t c t a t a g t a a t a t t t t a t t a c a c a t g a t t g a t a t t t t t g t g g t a g g g a a g t g g g a t g c t c	7020
c t c a g a t a t t a a a g g t g t t a g c t g a t t g t a t t t t a t c t c t a a a g a t t t a g a a c t t t a g a a	7080
a a t g c c g a c t t c t t c c a t c t a t t t c t g a a a g g t t c t t t g t g g a t t a t a t a g a g t t g a g c	7140

76

```

t at al aaaca t t aact t t ag at t t gggat t t aaaaat gcct at t gt aaga t aga at aat t g 7200
t gaggc t gga t t cact acac aaga t gaact t cact t cat a aat t aat t al acct t agcga 7260
t t t gct t ctg at aat ct aaa agt ggc t aga t t gt ggt t gt t t t ggt t aag gt gat at gga 7320
ggg gggagag c t t t t agt t a agt aagaagc t at gt aaact gacaaggat g ct aaaat aaa 7380
agt ct ct gaa gt at t ccat g cct t t t ggac cct t t cct cg caact aac t g t caact gt t g 7440
at caaaaaag t caaggcat t gt at gt t gct t ct gt ggt t a t t at t ct g t g at gct t agac 7500
t act t gaacc cat aaact t g gaagaat ct t t gagcaaatt t t ct cagt t g t ct gt at gac 7560
t t cagt at at t cct gggat gccat aggat t t t t t gt gct t gat acat gg t at ccagt t t 7620
gcat agt at c act t ct t t gt aat ccagt t g ct gt t aagaa t gat gt act t t aaaggaaaa 7680
gagaaaact g cat cacagt c ccat t ct cca gt gt ccat gc aat gaat t gc t gagcat t t a 7740
ggaagcagca ccaagt ct at t acaggcat g gt gt gaaact t gat gt t t ga cct gt gat ca 7800
aaat t gaacc at t gt acagt t t ggc t t ct g t t t gct t caa aat at gt aga at t gt ggt t g 7860
at gat t aat t t gcgagact a act t t gagag t gt aacagt t t t gaagaaaa cat t gaat gt 7920
t t t acaaat g aaggggct t c acggaat gt t acaat gt t ac t aat at aat t t ggc t t t t gt 7980
t at gcaaat t gt t aacacca gct at t aaaa t at at t t t ag t agaaaaaaa aaaa 8034

```

<210> 16

<211> 28

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HAPLN1 forward primer

10

<400> 16

t gaaggat t a gaagat gat a ct gt t gt g 28

.

<210> 17

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20 <223> HAPLN1 reverse primer

<400> 17

gccccagt cg t ggaaagt aa 20

25 <210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

30 <220>

<223> HAPLN1 probe sequence

<400> 18

t acaagggt gt ggt at t cc 18

35

77

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MFAP5 forward primer sequence

<400> 19

cgaggagacg at gt gact ca ag 22

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> NFAP5 reverse primer sequence

<400> 20

agcgggat ca t t caccagat 20

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> MFAP5 probe sequence

<400> 21

acat t cacag aagat cc 17

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 22

gccaaagg: gt t t t cacacag 20

<210> 23

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 23

t aat acgact cact at aggg gccaaagg: gt t t t cacacag 40

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 24

ct ct gaagca gt agacacca 20

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 25

cct agcct gg ct t t ct t gct c 21

<210> 26

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 26

t aat acgact cact at aggg cct agcct gg ct t t ct t gct c 41

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer sequence

<400> 27

ccat t gggt c t ct gcaaat c c 21

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for å vurdere sammensetningen av en cellekultur, der nevnte fremgangsmåte omfatter:

- a) å erverve et mangfold av celler fra en cellekultur;
- b) å bestemme det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået for en fibroblastmarkør i mangfoldet av celler, der nevnte fibroblastmarkør er mikrofibrillær
10 assosiert protein 5 (MFAP5);
- c) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av mikrofibrillær assosiert protein 5 (MFAP5), hvori det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av MFAP5 er under en forhåndsbestemt grense som indikerer at cellekulturen omfatter kondrocytter.

15

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori fibroblastmarkøren MFAP5 er slik at dens normaliserte ekspresjonsnivåer er lavere i passerte ("passaged") kondrocytter enn i dermale fibroblaster eller synoviocytter.

20

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, som videre omfatter å fastsette det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av en kondrocyttmarkør i mangfoldet av celler, og, i trinn c), å bestemme sammensetningen av kulturen basert på det gjennomsnittlige
25 ekspresjonsnivået av kondrocyttmarkøren og det gjennomsnittlige ekspresjonsnivået av kondrocytt- og fibroblastmarkøren MFAP5.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori fibroblastmarkøren MFAP5 og
30 kondrocyttmarkøren er slik at ratioen av deres ekspresjonsnivåer (kondrocyttmarkør i forhold til fibroblastmarkør) i kondrocyttene er lik eller 5 ganger større enn ratioen i dermale fibroblaster eller synoviocytter.

5.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori kondrocyttmarkøren er valgt fra kondrocyttmarkørene oppført i følgende gruppe:

- Hyaluronan og proteoglykan-koblingsprotein 1 (HAPLN1)

- Matrix Gla-protein (MGP)
- GF-lignende repetisjoner og discoidin I-lignende domener 3 (EDIL3)
- WNT1 induserbart signaliserende pathway protein 3 (WISP3)
- Aggrecan 1 (AGC1)
- 5 • Brusk oligomerisk matrixprotein (COMP)
- Type II kollagen (COL2A1)
- Type IX kollagen (COL9A1)
- Type XI kollagen (COL11A1)
- Leukocyttcelleavledet chemotaxin 1 protein (LECT1)
- 10 • S 100 kalsiumbindende protein beta (S 100B)
- Surt brusk protein 1 (CRTAC1)
- SRY-boks 9 protein (SOX9)
- Nebulette (NEBL)

15 6.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori kondrocyttmarkøren er HAPLN 1.

7.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori ekspresjonsnivåene av fibroblastmarkøren
20 MFAP5 og kondrocyttmarkørene fastsettes på RNA-nivå.

8.
Fremgangsmåte ifølge krav 7, hvori ekspresjonsnivåene bestemmes ved hjelp av
PCR.

25 9.
Fremgangsmåte ifølge krav 8, hvori ekspresjonsnivåene bestemmes ved å anvende
sammenlignende C_T PCR-fremgangsmåte.

30 10.
Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori ekspresjonsnivåratioen av kondrocyttmarkøren
i forhold til fibroblastmarkøren MFAP5 større enn 0,25, fastsatt ved å anvende
sammenlignende C_T PCR-fremgangsmåte, indikerer at cellekulturen inneholder
kondrocytter.

35 11.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, hvori nevnte ratio indikerer at cellekulturen inneholder minst 50 % kondrocytter.

12.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 3, hvori en molar ratio av kondrocyttmarkøren i forhold til fibroblastmarkøren MFAP5 større enn 0,55, indikerer at cellekulturen inneholder kondrocytter.

13.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 12, hvori nevnte molare ratio indikerer at cellekulturen inneholder minst 50 % kondrocytter.

14.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori cellekulturen omfatter celler ervervet fra en bruskbiopsi.

15.

Fremgangsmåte ifølge krav 14, hvori bruskbiopsien er tatt fra kneleddet.

20 16.

Fremgangsmåte for å vurdere sammensetningen av en cellekultur, hvor nevnte fremgangsmåte består av:

- a) å isolere celler fra en bruskbiopsi ervervet fra et pattedyr;
- b) å dyrke celler isolert i trinn a) i en cellekultur;
- 25 c) å erverve av en prøve av cellekulturen;
- d) å bestemme ekspresjonsnivåene til MAP5 og HAPLN 1 i én eller flere celler fra prøven; og
- e) å bestemme sammensetningen av kulturen basert på ekspresjonsnivåene til MFAP5 og HAPLN1.

30

17.

Fremgangsmåte ifølge krav 16, hvori ekspresjonsnivåene av MFAP5 og HAPLN1 bestemmes på RNA-nivået.

35 18.

Fremgangsmåte ifølge krav 17, hvori ekspresjonsnivåene bestemmes ved å anvende PCR.

19.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 18, hvori ekspresjonsnivåene bestemmes ved å anvende en sammenlignende C_T PCR-fremgangsmåte.

20.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 16, hvori en ekspresjonsnivåratio av HAPLN1 i forhold til MFAP5 større enn 0,25, fastsatt ved å anvende sammenlignende C_T PCR-fremgangsmåte, indikerer at cellekulturen inneholder kondrocytter.

21.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 20, hvori nevnte ratio indikerer at cellekulturen inneholder minst 50 % kondrocytter.

22.

Fremgangsmåte ifølge krav 21, hvori en molar ratio av HAPLN1 i forhold til MFAP5 større enn 0,55, indikerer at cellekulturen inneholder kondrocytter.

20 23.

Fremgangsmåte ifølge krav 22, hvori nevnte molare ratio indikerer at cellekulturen inneholder minst 50 % kondrocytter.

25

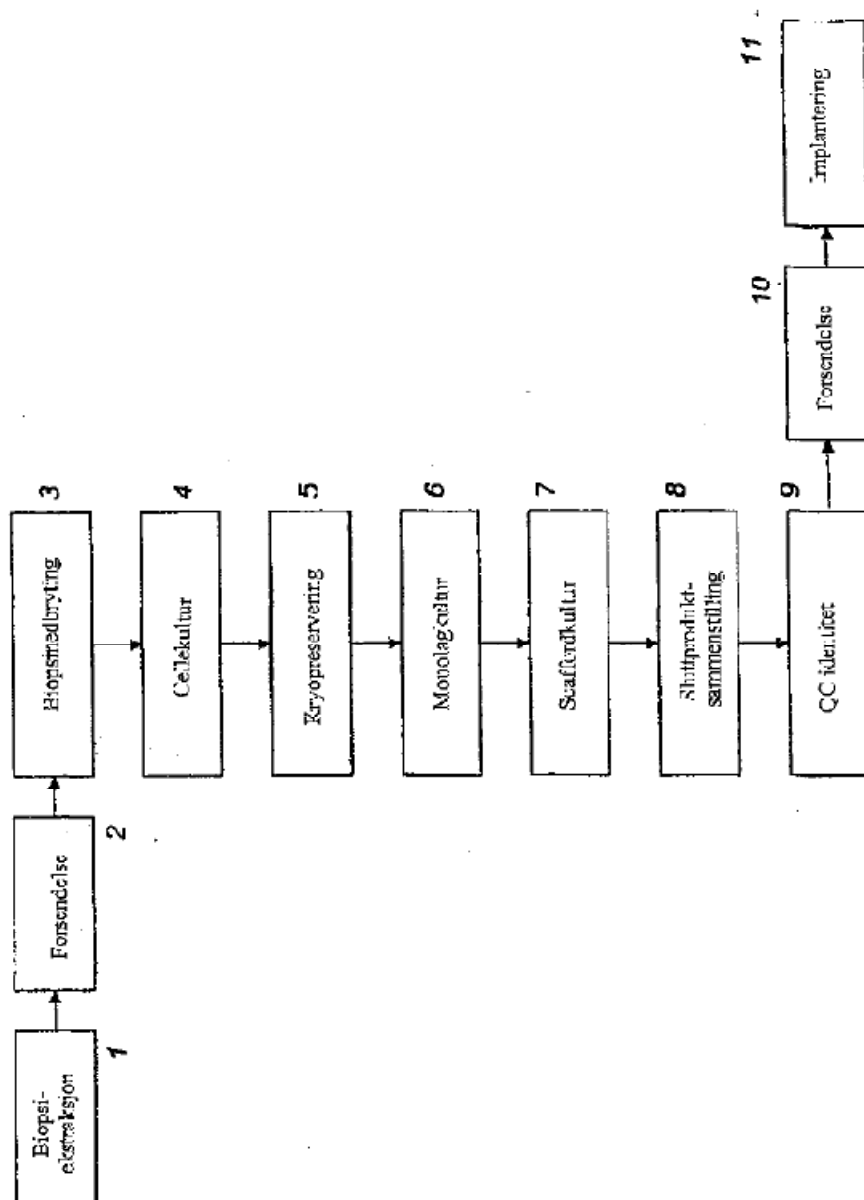
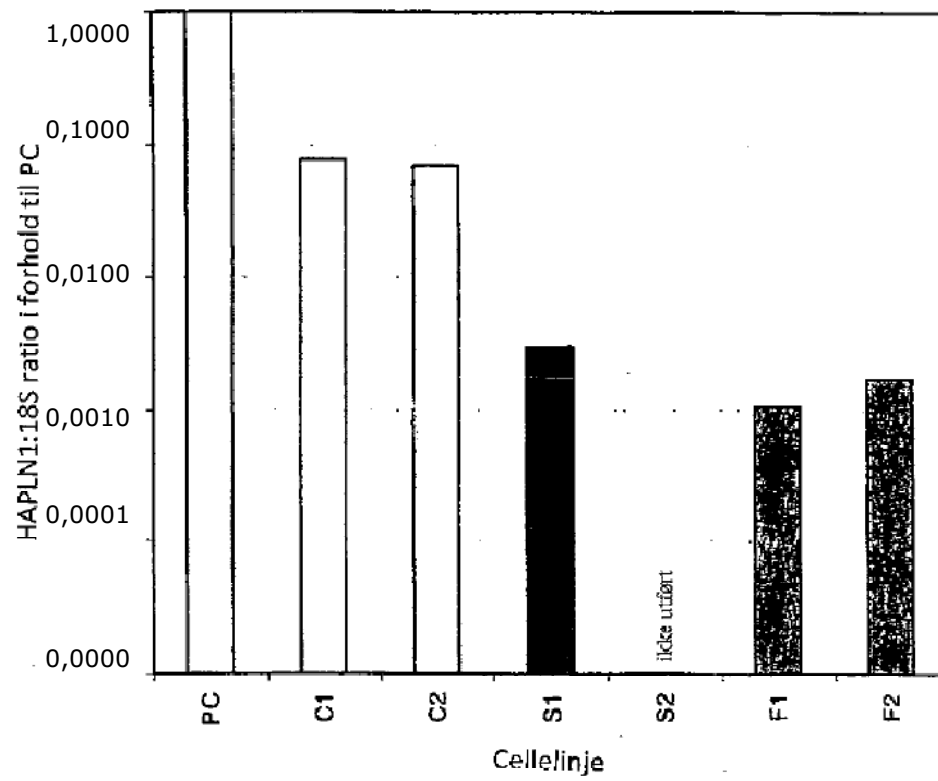
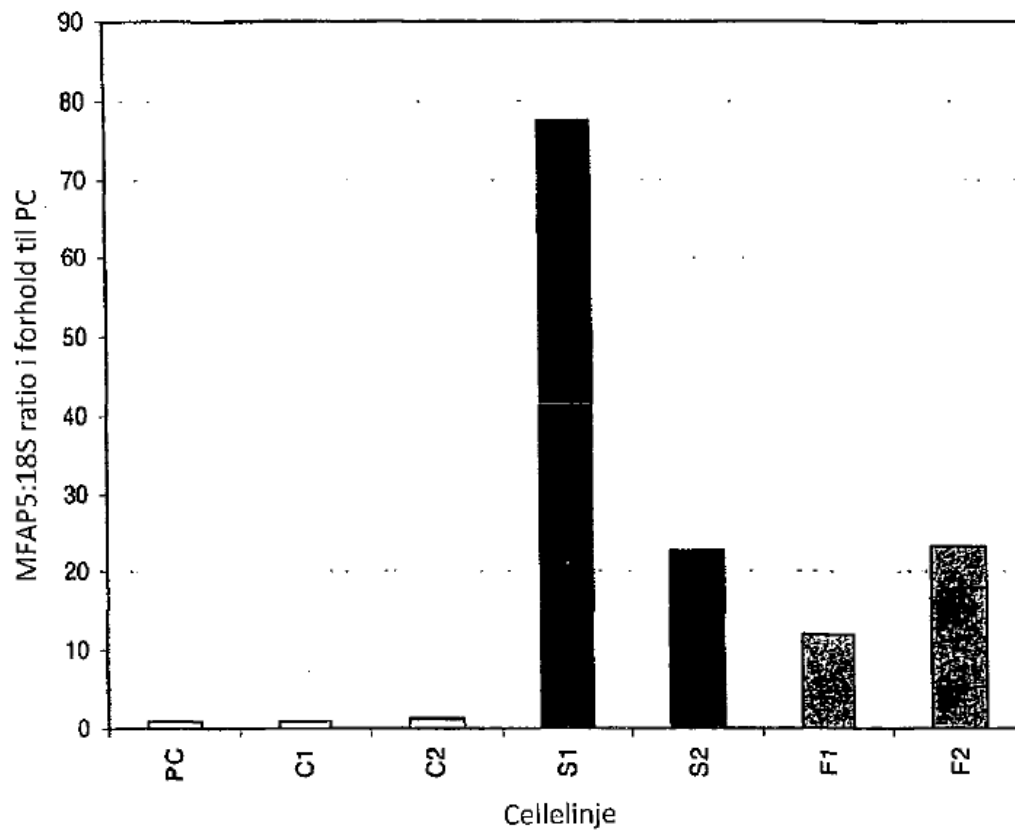


Fig. 1

*Fig. 2*

*Fig. 3*

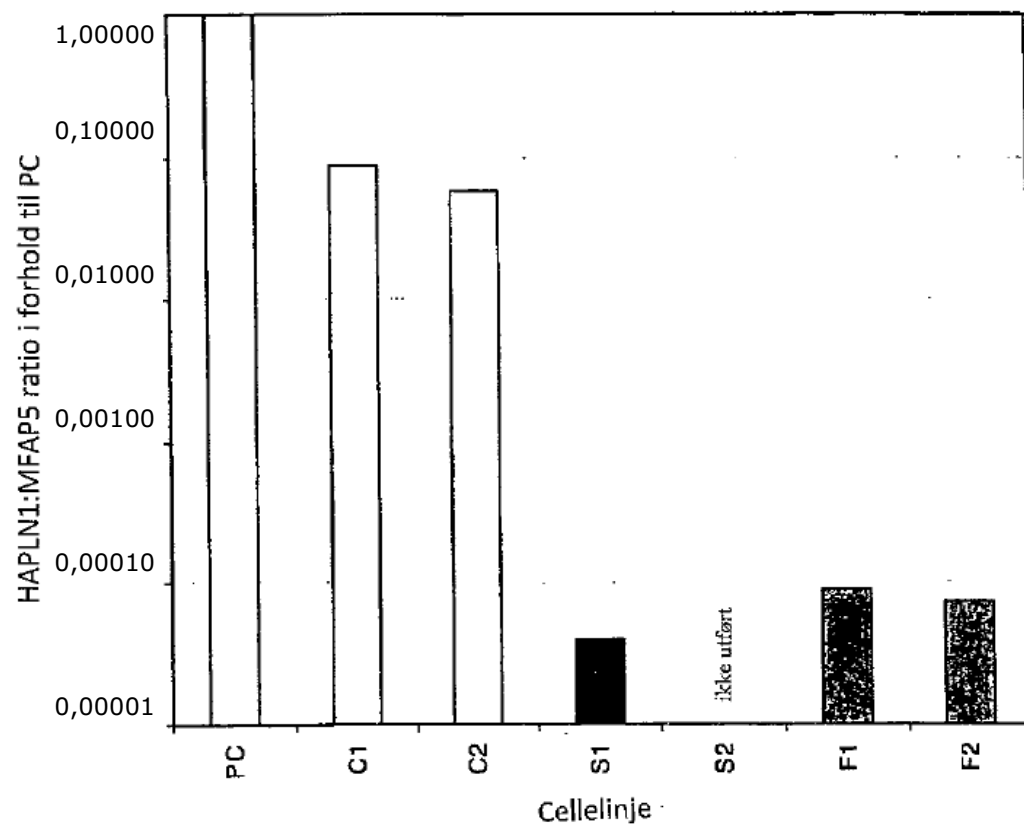


Fig. 4

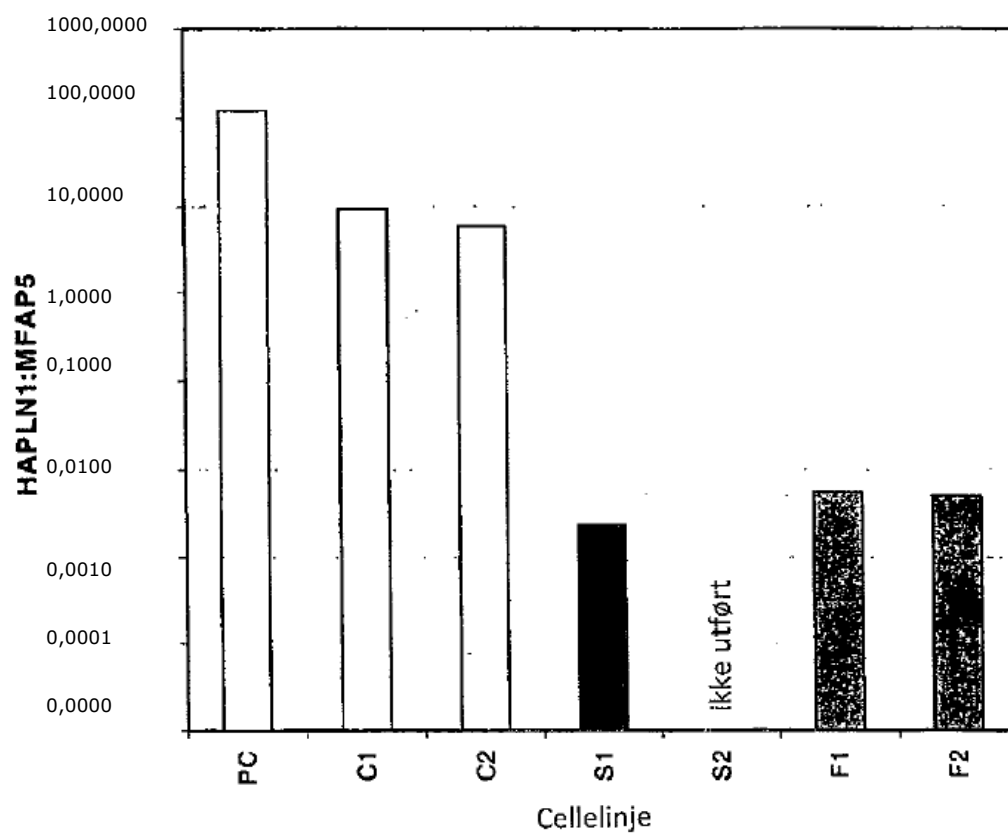


Fig. 5

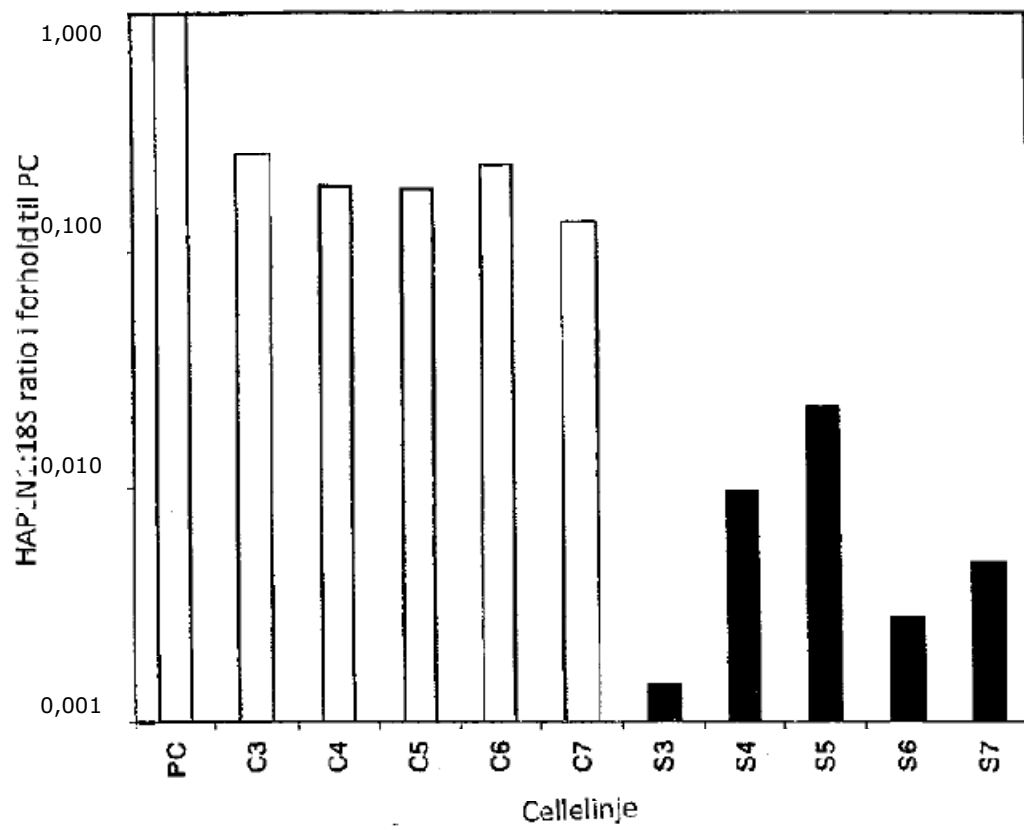


Fig. 6

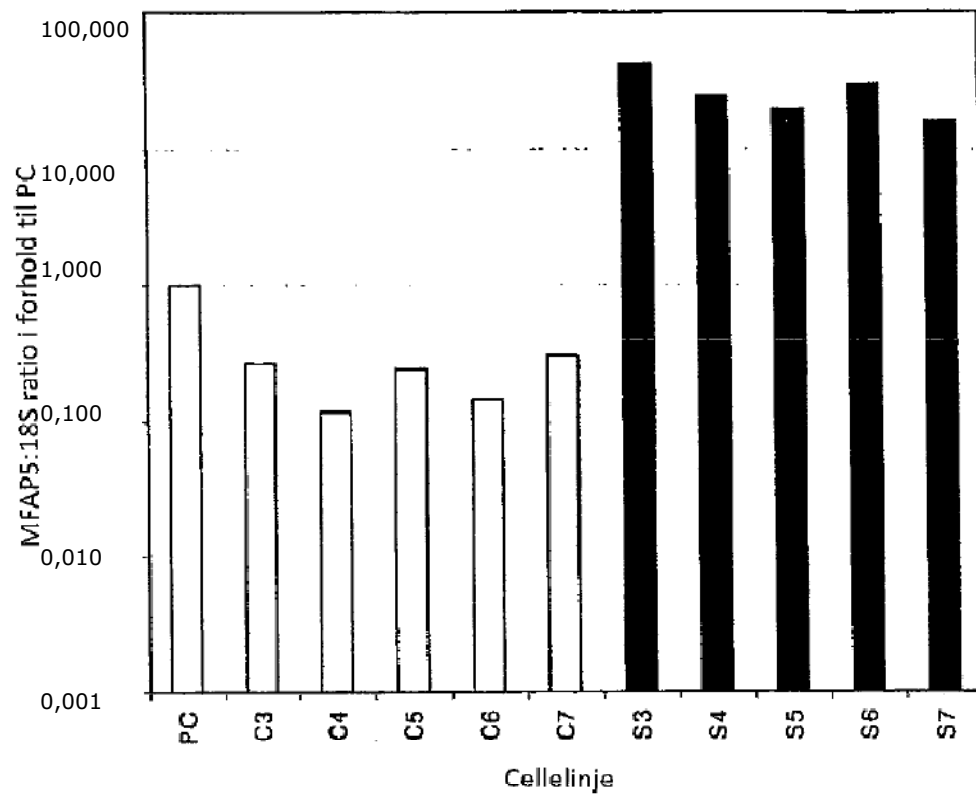
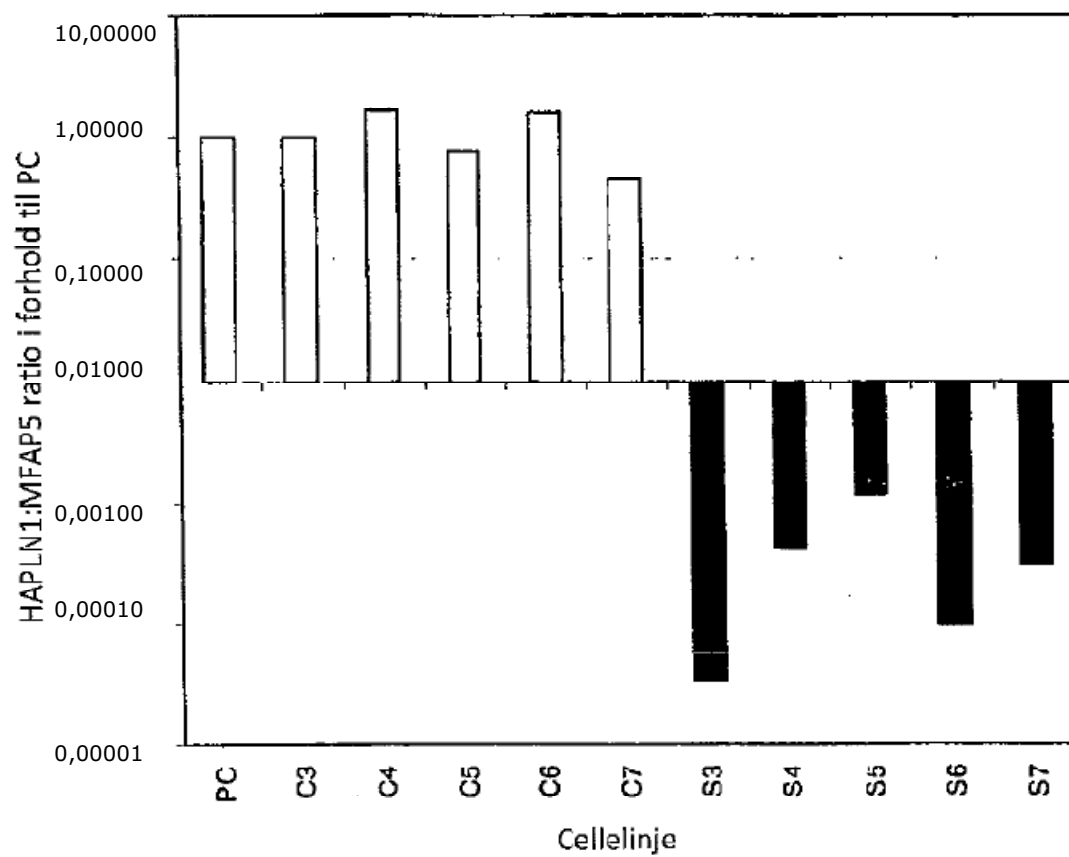
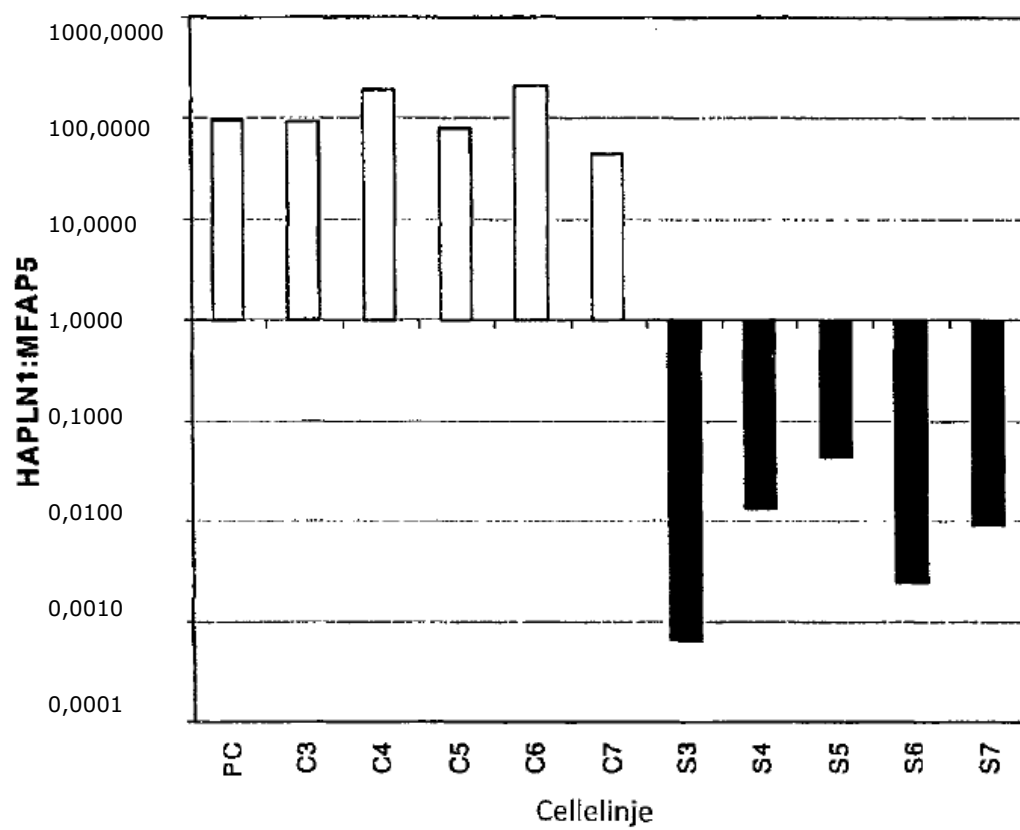


Fig. 7

*Fig. 8*

*Fig. 9*

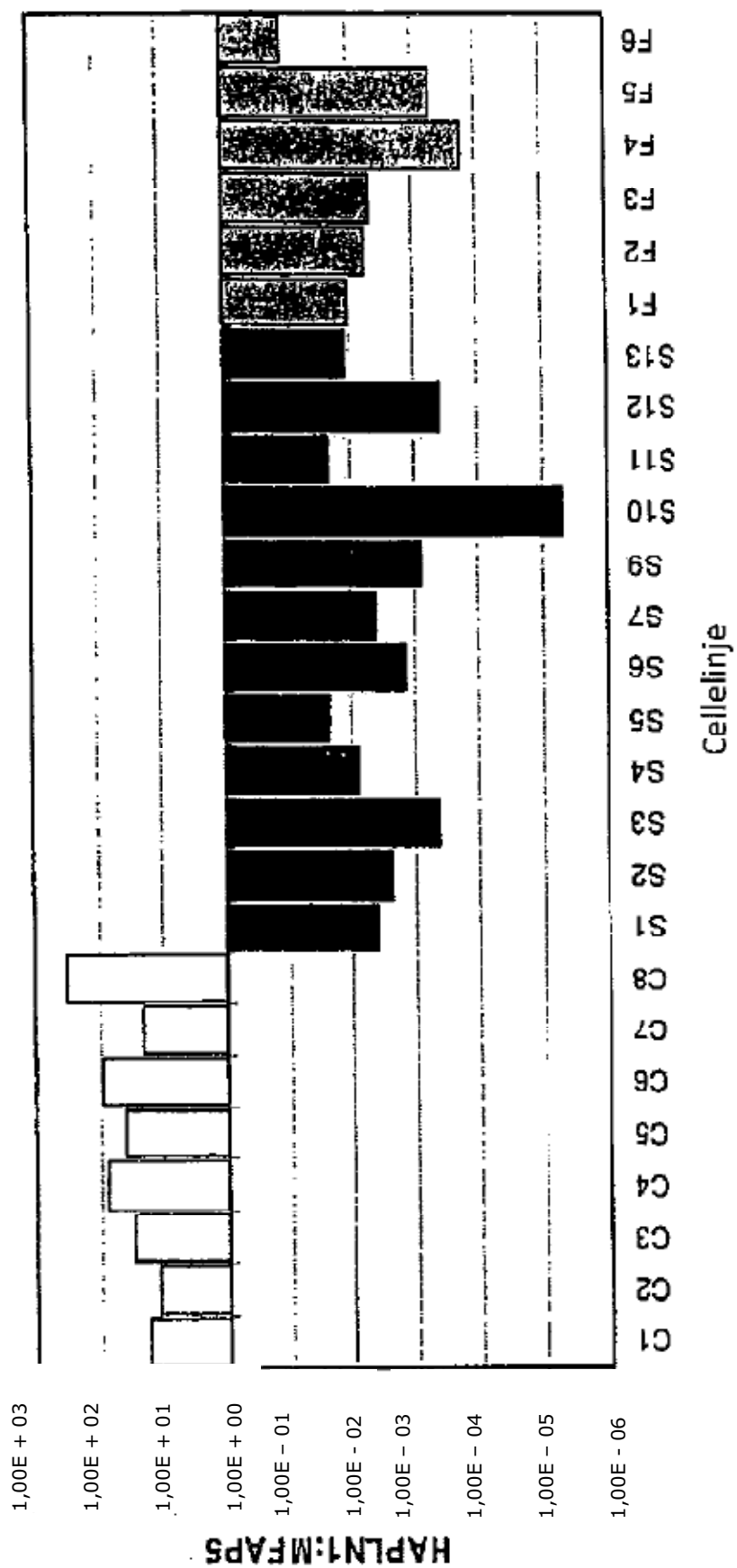


Fig. 10A

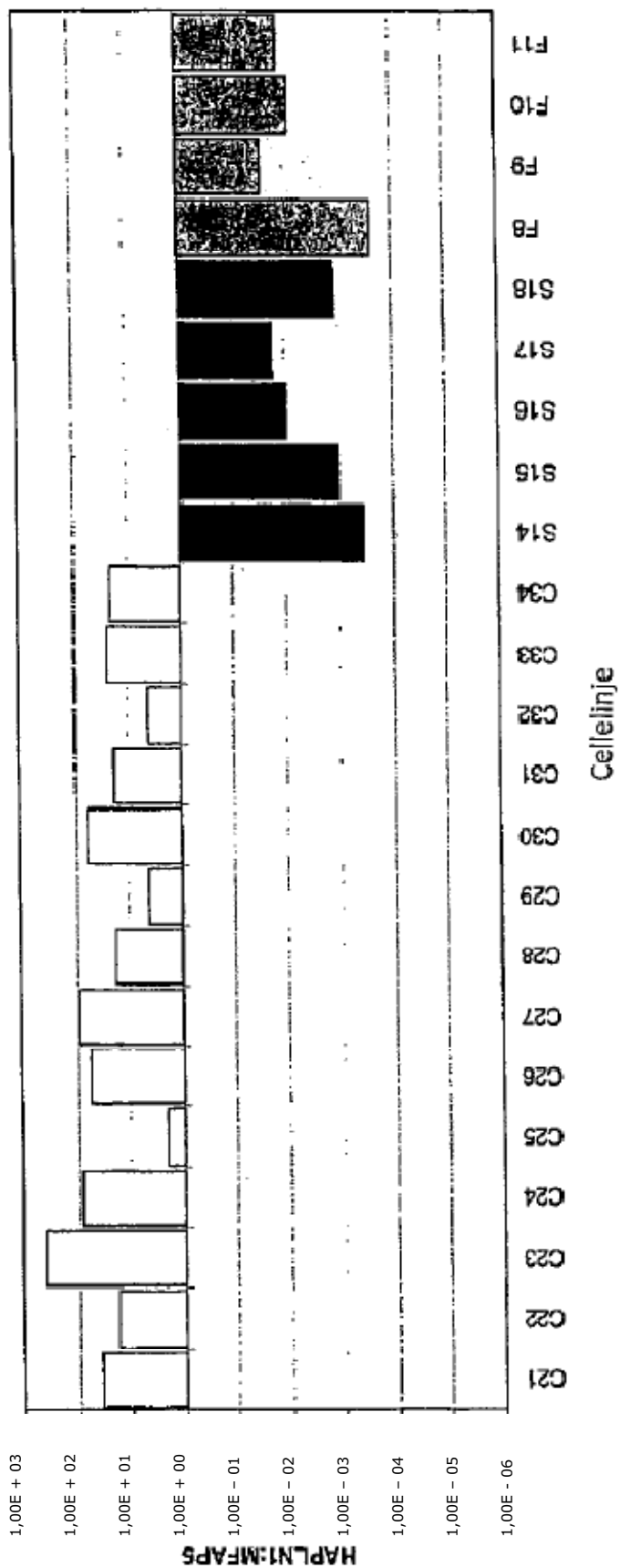


Fig. 10B

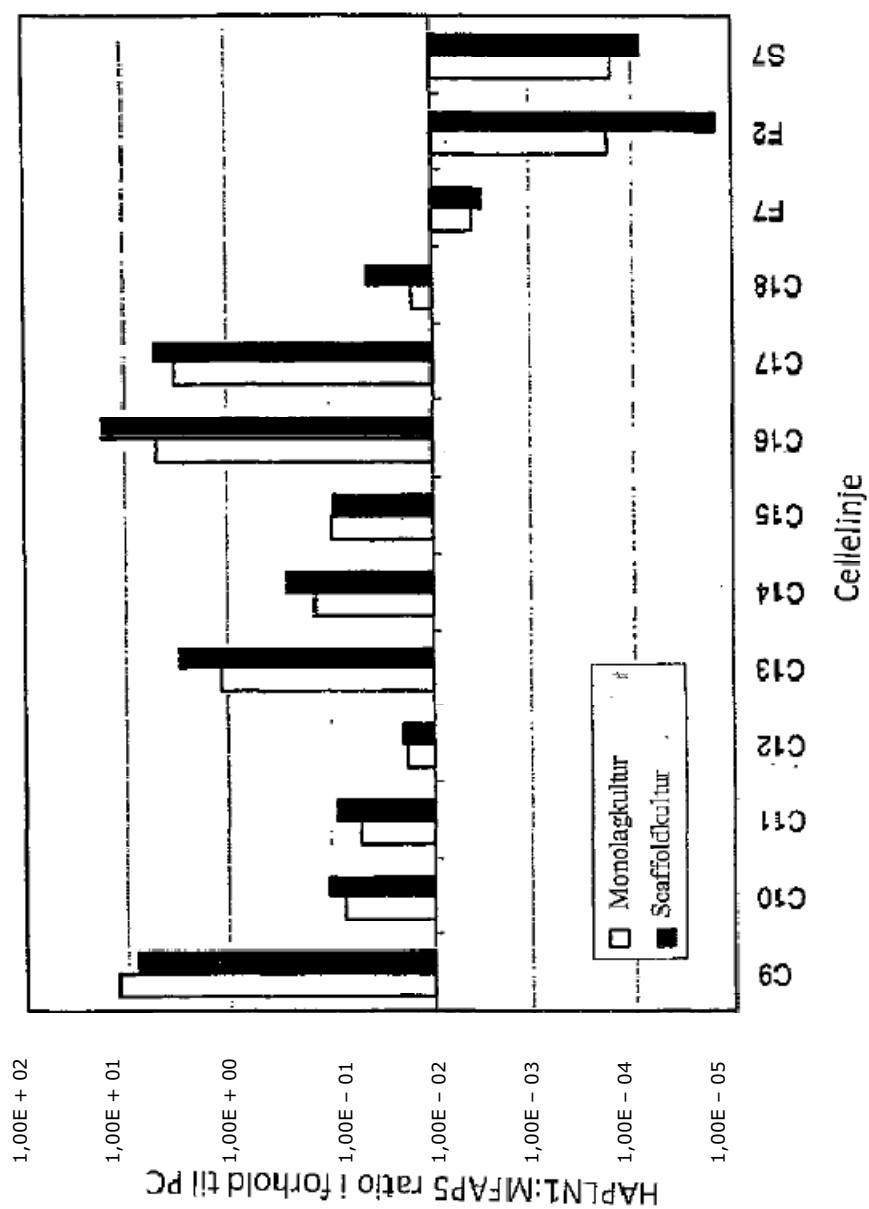


Fig. 11

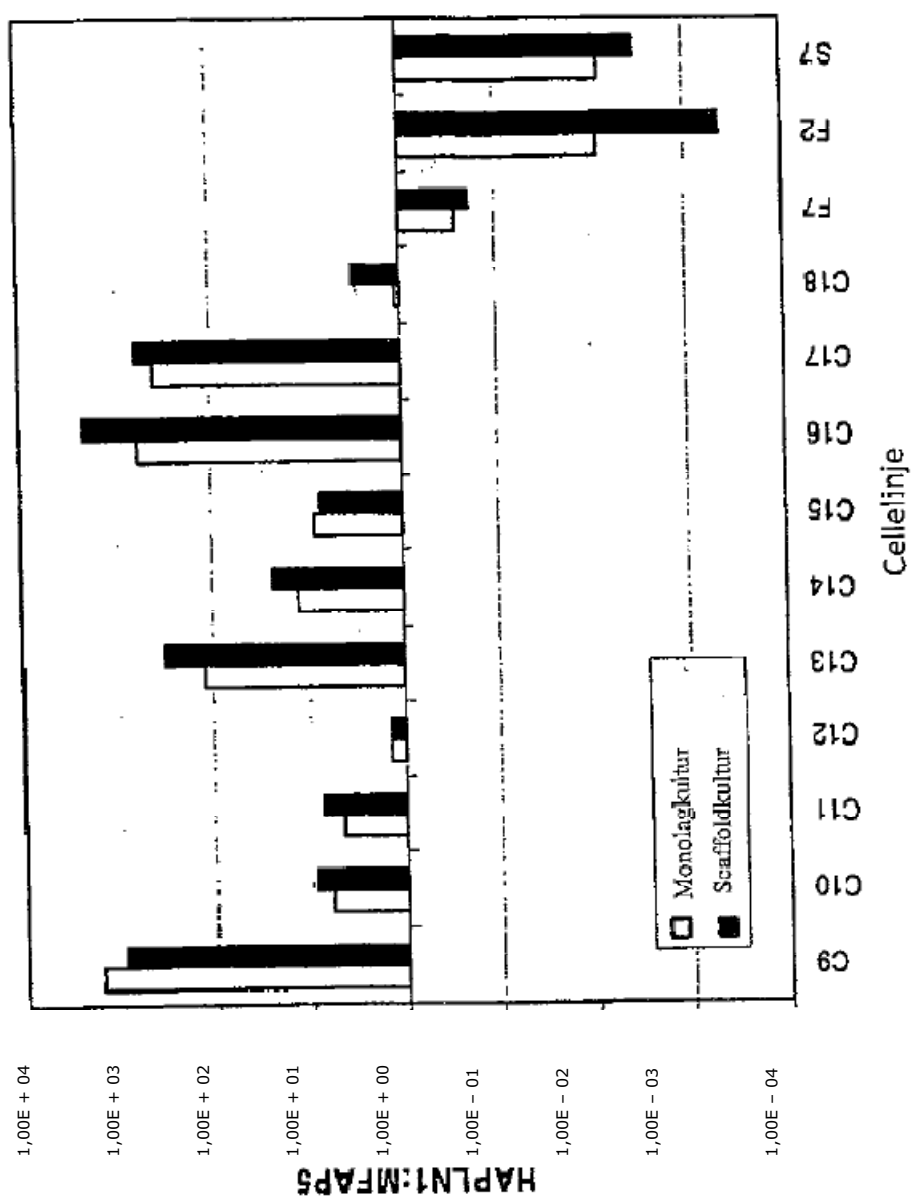


Fig. 12

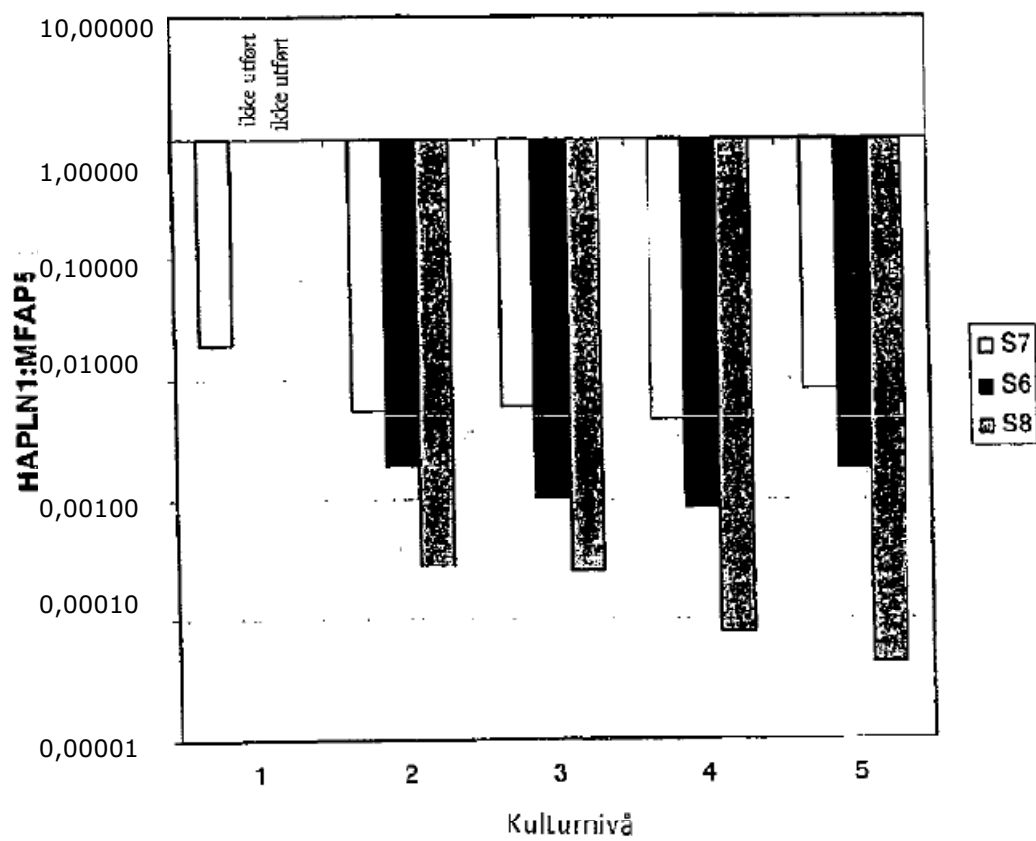
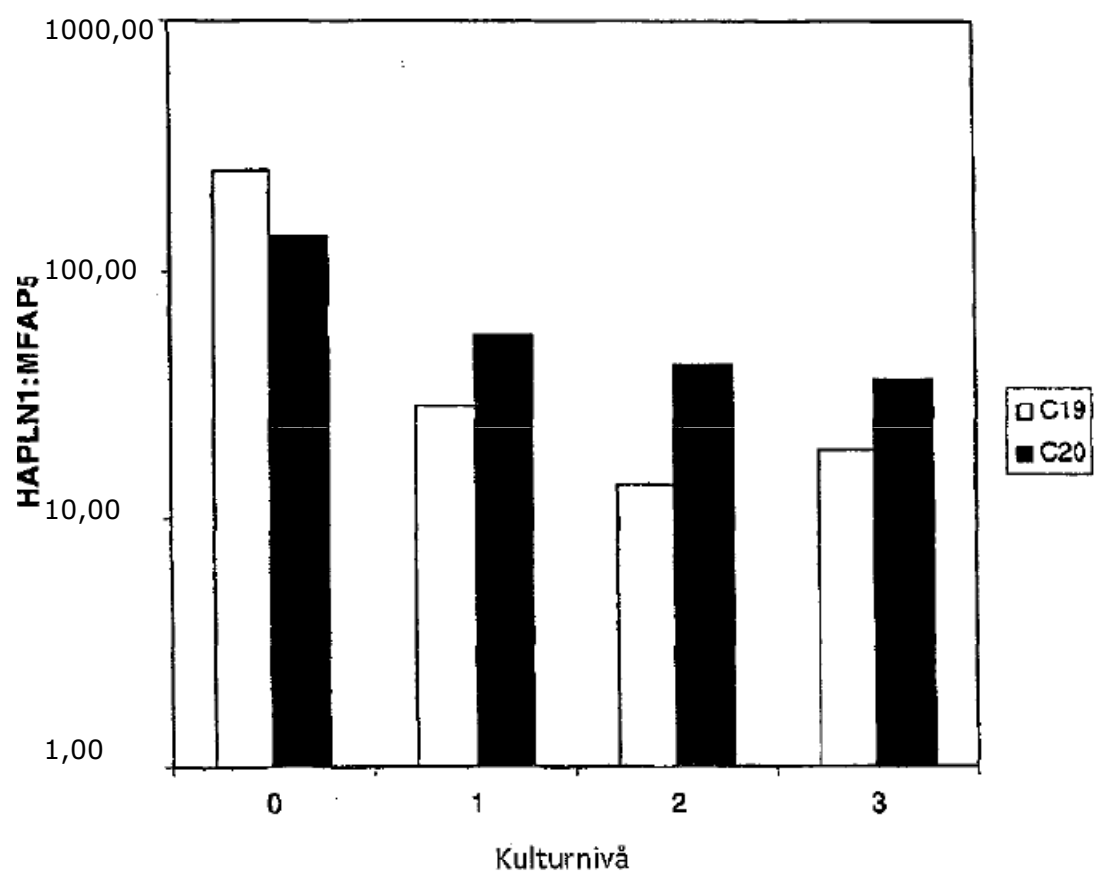
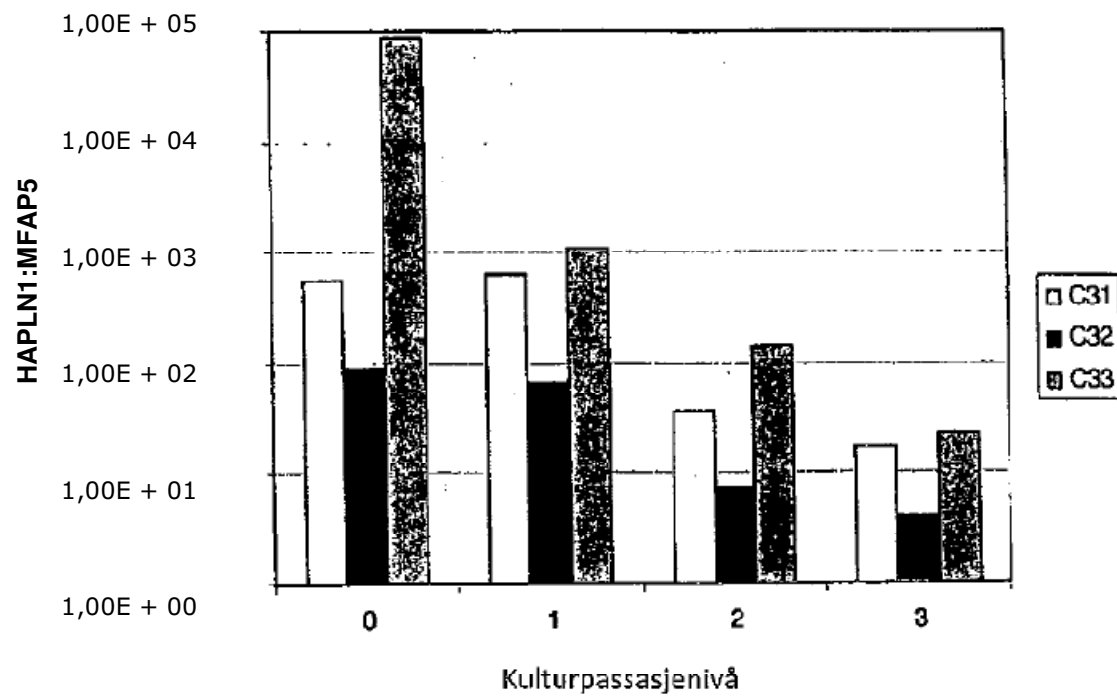
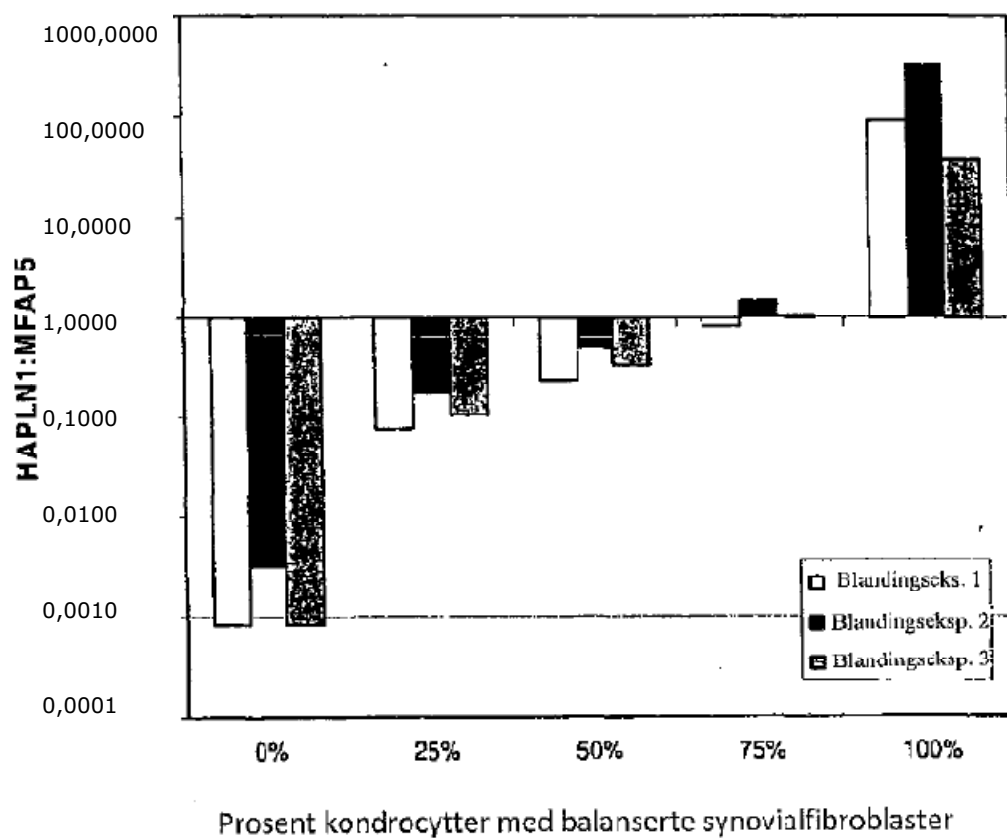


Fig. 13

*Fig. 14A*

*Fig. 14B*

*Fig. 15*

100

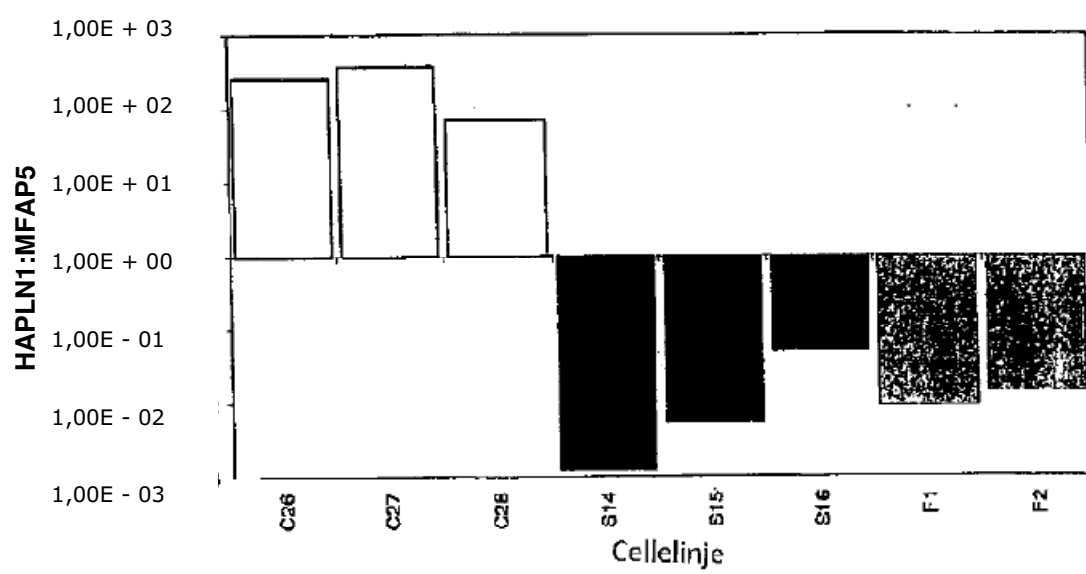


Fig. 16