(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0035833
(43) 공개일자 2009년04월13일

(51) Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0100839
(22) 출원일자 2007년10월08일
심사청구일자 2007년10월08일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
김정호
경기도 김포시 고촌면 한화아파트 104-502
이정운
서울 송파구 잠실7동 86 아시아선수촌아파트 13-407
김자영
서울 마포구 동교동 158-8
(74) 대리인
양부현

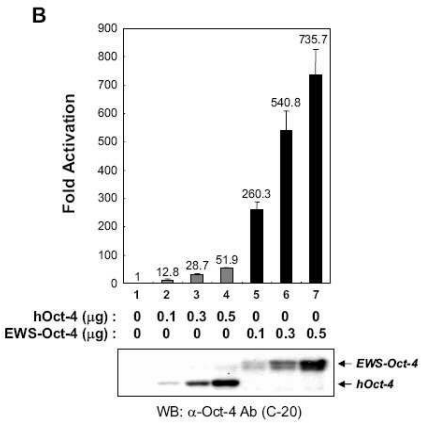
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하는항종양제의 스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하는 항종양제의 스크리닝 방법 및 이에 사용되는 스크리닝 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 스크리닝 시스템 및 이를 이용한 스크리닝 방법에 따르면, EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 억제하는 항종양제를 대량/고속(highthroughput) 방식으로 스크리닝 할 수 있다.

대 표 도 - 도4b



특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 저해하는 항종양제의 스크리닝 방법.

(a) (ⅰ) 프로모터에 작동적으로 연결된 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 항종양제 후보물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)의 형질전환된 숙주 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 항종양제 후보물질을 처리하지 않은 것에 비해 항종양제 후보물질을 처리한 경우에서 리포터 유전자의 발현 수준이 억제되는 후보물질을 선별하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터는 Oct-4 결합 자리를 포함하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 *E. coli* β-갈락토시다아제(galactosidase), 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase), 갈락토카이나아제(galactokinase), 인터루킨(interleukin)-2, 티미딘 카이나아제(thymidine kinase), 루시퍼라아제(firefly luciferase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 종양은 뼈(bone) 또는 연조직(soft-tissue)에서 발생되는 종양인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

(i) 프로모터에 작동적으로 연결된 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주세포를 포함하는 항종양제 스크리닝 시스템.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터는 Oct-4 결합 자리를 포함하는 것임을 특징으로 하는 스크리닝 시스템.

청구항 12

제 8 항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 *E. coli* β-갈락토시다아제, 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제, 갈락토카이나아제, 인터루킨-2, 티미딘 카이나아제, 루시퍼라아제, 알칼라인 포스파타아제, 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템.

청구항 13

제 8 항에 있어서, 상기 종양은 뼈 또는 연조직에서 발생되는 종양인 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 저해하는 항종양제의 스크리닝 방법 및 이 스크리닝 방법에 사용되는 스크리닝 시스템에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 암(cancer)은 변이의 연속의 결과로서 발생되며, 이러한 변이 중 가장 두드러진 것은 염색체 이상(chromosomal abnormality)이다. 염색체 전좌는 이미 존재하는 유전자를 활성화시키거나 새로운 융합 단백질을 형성함으로써 암을 일으킨다[1]. 최근에, 뼈(bone) 및 연조직(soft tissue)에서의 종양이 22q12 위치에서의 EWS 유전자 및 6p21 위치에서의 Oct-4 유전자를 포함하는 전좌 t(6;22)(p21;q12)을 갖는다는 것이 밝혀졌다[2]. 이 종양은 미분화 종양 세포들의 산만한 증식 패턴과, 바이멘틴(vimentin), S-100 및 뉴런-특이적 에놀라제(enolase)에 대한 양성 면역반응성의 놀랄만한 특징을 갖는다. 약 1.8-kb의 카이메릭 전사물(chimeric transcript)이 EWS 및 Oct-4 프로브로 노던 블롯팅함으로써 검출되었고, EWS-Oct-4 융합 전사물이 종양에서 RT-PCR에 의해 발견되었으나 반대의 Oct-4-EWS 융합 전사물은 발견되지 않았다 [2].

<3> EWS 유전자는 전사인자(transcription factors)로 기능할 것으로 추정되는 유전자와의 융합을 생성하는 다수의 종양-관련 전좌(translocation)에 관련되어 있다[3]. 각 경우에서 전좌는 파트너의 DNA 결합 도메인에 융합된 EWS의 N-말단 도메인(N-terminal domain, NTD)를 포함하는 카이메릭 분자를 생성한다. EWS 유전자는 세 개의 아르기닌 및 글라이신 풍부 관(tract) 및 C-말단에서의 85-아미노산의 RNA 인식 모티프를 포함하는 656-아미노산 단백질을 인코딩한다. EWS의 N-말단 도메인(NTD)(aa 1-285)은 거의(~90%) 티로신, 글라이신, 알라닌, 세린, 트레오닌으로 구성되어 있고, 프롤린 잔기는 공통(consensus)의 NSYGQQS 서열을 갖는 반복적이며 중첩된 폴리펩타이드 모티프의 형태로 구성되어 있다. 이 도메인은 진핵세포 RNA 폴리머라아제 II의 C-말단 부위에 대해 약한 상동성을 가지고 있다[4].

<4> Oct-3으로도 불리우는 Oct-4는 다분화능성(pluripotent) 배아줄기세포 및 생식세포내에서 발현되는 POU 전사인자 패밀리의 한 구성원이다[5-10]. POU 전사 인자 패밀리의 구성원은 전사 인자 Pit-1, Oct-1, Oct-2, 및 Unc-86에서 최초로 확인된 보존된(conserved) POU DNA 결합 도메인을 공유한다[11]. Oct-4는 전사 개시 위치에 대한 인접부위 또는 말단부위에 위치하는 옥타머 모티프를 통해 전사를 활성화시킨다. 이의 결합 위치는 fgf 4 (fibroblast growth factor 4), pdgfαr (platelet-derived growth factor α receptor), osteopontin 및 nanog를 포함하는 다양한 유전자에서 발견되어 왔다[12-16]. 또한, 배반포 형성전의 트로펙토덤(trophectoderm)에서는 발현되지만 배아에서는 발현되지 않는, 인간 융모성 고나도트로핀(human chorionic gonadotropin)의 α 및 β 서브 유닛 또는 타우 인터페론 (tau interferon, IFN-τ)과 같은 유전자가 Oct-4에 의한 사일런싱

(silencing) 타겟이 될 수 있다[17-19]. 이러한 사실은 Oct-4가 다분화능성 세포 또는 다분화능성 세포로 발전할 수 있는 세포에서 유전자 발현을 조절함으로써 분화 과정에서 주요 스위치로서 기능하리라는 것을 암시한다[20, 21].

<5> 최근, Oct-4가 인간 고환 생식선 세포 종양 (human testicular germ cell tumors, TGCTs)의 생성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다[22, 23]. 인간 TGCT는 청소년 및 유성인(young adult) 코카시안 남성에서 가장 일반적인 악성 종양이며 이 종양 그룹에서 7명중 1명이 사망한다 [24, 25]. Oct-4 전사물(transcript)은 청소년 및 유성인의 인간 TGCT의 특정 세트에서 일관되게 검출된다: 정상피종(seminoma) 및 배아성 종양(embryonal carcinomas) [26].

<6> 또한, CIS로 알려진 인간 TGCT의 전구체 손상부위도 Oct-4를 발현시킨다[26]. Oct-4가 인간 1차성 유방암, 인간 유방암 세포주 및 다른 타입의 종양 세포주에서 발현된다는 것이 보고되었는데, 이는 타겟 유전자들을 상향 조절하거나 하향 조절함으로써 종양발생에 관련될 수 있다는 것을 암시하는 것이다 [22, 27-29]. 이러한 발견들과 일치하게, 이종 기원 세포내에서 *Oct-4*를 발현시키면 비-종양발생적 세포들을 형질변환시키고, 누드 마우스에서 암발생성(tumorigenicity)을 부여한다. 성체 마우스에서 독시사이클린(doxycycline)-의존적 발현 시스템을 사용하여 *Oct-4*를 활성화시키면, 연속적 Oct-4 발현 의존적인 상피조직의 이상 성장(dysplastic growth)이 발생된다[30].

<7> Oct-4와 비교하면, EWS-Oct-4 유전자 생성물은 그 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 암발생 과정에서 EWS-Oct-4 단백질이 어떻게 기여하는 가에 관한 조사의 최초의 연구로서 본 발명자들은 이의 전사적 활성화 행동 및 발암적 특성을 연구하였다. 본 발명자들은 EWS-Oct-4 단백질이 Oct-4 단백질의 것과 구별되지 않는 서열 특이성을 가지면서 DNA에 결합하는 핵질 단백질이라는 것을 밝혔다. 그러나, 이는 다수의 기능성 도메인에 의존적인 전사 활성화 가능성을 매우 증가시켰다. 또한 본 발명자는 발암성 Oct-4 다운 스트림 타겟 유전자의 활성화 및 누드 마우스에서의 종양 형성에 의해 측정되는 것과 같이, EWS-Oct-4는 지배적으로 작용하는 발암성 유전자라는 것을 증명하였다. 이러한 결과들은 EWS-Oct-4 가 Oct-4 타겟 유전자들의 전사를 활성화시킴으로써 뼈 및 연조직의 종양형성에서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 암시한다.

<8> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 본 발명자들은 뼈 및 연조직의 종양 형성과정에서 염색체 전좌에 의해 발생된 EWS 단백질과 Oct-4 단백질의 융합 단백질인 EWS-Oct-4 단백질의 역할에 대해 심도있게 연구한 결과, 상기 EWS-Oct-4 단백질이 이의 발암성 다운 스트림 타겟 유전자의 전사를 활성화시키는 일종의 전사인자(transcription factor)로 기능함으로써, 뼈 및 연조직에서 종양의 형성에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 실험적으로 확인하였다. 본 발명은 이와 같은 EWS-Oct-4 융합 단백질의 새로운 종양형성 촉진 기능을 발견한 것에 기초한 것이다.

<10> 따라서, 본 발명의 목적은 뼈 및 연조직의 종양 형성과정에서 전사인자로써 기능하는 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사 촉진 활성을 억제함으로써 종양형성 억제 활성을 가진 항암제를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것에 있다.

<11> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 항암제 스크리닝 방법에 사용되는 스크리닝 시스템을 제공하는 것에 있다.

<12> 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

<13> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 저해하는 항종양제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) (ⅰ) 프로모터에 작동적으로 연결된 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 항암제 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 단계 (a)의 형질전환 숙주 세포에서 상기 리포터 유전자의 발현

수준을 측정하는 단계.

<14> 본 발명자들은 뼈 및 연조직의 종양 형성과정에서 염색체 전좌에 의해 발생된 EWS 단백질과 Oct-4 단백질의 융합 단백질인 EWS-Oct-4 단백질의 역할에 대해 심도있게 연구한 결과, 상기 EWS-Oct-4 단백질이 이의 발암성 다운 스트림 타겟 유전자의 전사를 활성화시키는 일종의 전사인자(transcription factor)로 기능함으로써, 뼈 및 연조직에서 종양의 형성에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 실험적으로 확인하였다. 본 발명은 이와 같은 EWS-Oct-4 융합 단백질의 새로운 종양형성 촉진 기능을 발견한 것에 기초한 것이다.

<15> 본 명세서에서 사용된 용어 "EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열"은 EWS 유전자와 Oct-4 유전자가 염색체 전좌(chromosomal translocation)에 의해 융합되어 형성된 EWS-Oct-4 융합 단백질(fusion protein)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질의 유전자는 EWS의 엑손(exon)1-6과 Oct-4의 엑손 1-4의 인-프레임(in-frame) 융합에 의해 생성된다. EWS 유전자에서의 중단점(breakpoint)은 인트론 6에 존재하고 Oct-4에서의 중단점은 엑손 1에 존재한다. 융합 유전자는 Oct-4의 NTD(N Terminal Domain)에 존재하는 최초 122개 아미노산이, EWS의 정상 인트론(intron) 6에 의해 코딩된 추가의 6개 아미노산 서열을 통해, EWS의 N-말단 193개의 아미노산에 의해 교체되어 형성된 단백질을 인코딩한다(도 1 참조).

<16> 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질이 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열로 이루어지는 스크리닝 방법을 제공한다.

<17> 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

<18> 본 명세서에서 표현 "프로모터에 작동적으로 연결된 EWS-Oct-4 융합 유전자"에서 사용된 용어 "프로모터"는 EWS-Oct-4 융합 유전자의 발현을 조절할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 일반적인 프로모터 부위는 당업자라면 용이하게 인식할 수 있다. 즉, ATG 모티프를 포함하는 추정의 개시코돈이 확인되어 있고, 이 개시코돈으로부터 업스트림이 추정 프로모터 부위이다. 프로모터는 인접 및 원거리의 업스트림 엘리먼트(element)들로 구성되어 있다. 인접 엘리먼트로서는 통상적으로 RNA 중합효소 II가 적합한 전사 개시 위치에서 RNA의 합성을 개시할 수 있게 하는 TATA 박스(box)를 포함한다. 원거리 엘리먼트은 인헨서(enhancer)라고도 불리우는 조절 서열을 포함하는데, 이는 TATA 박스의 업스트림 부위에 조직 특이적 또는 시간 특이적 발현에 관여하는 추가 조절 엘리먼트이다. 인헨서는 프로모터의 활성을 촉진할 수 있는 DNA 서열이고, 프로모터의 고유의 엘리먼트이거나, 프로모터의 조직-특이성이나 발현 수준을 향상시키기 위해서 삽입되는 이종기원(heterologous)의 엘리먼트일 수 있다. 프로모터는 본래의 유전자로부터 그 전체가 유래한 것일 수 있고, 또는 자연계에서 발견된 상이한 프로모터들로부터 유래한 상이한 엘리먼트들로 구성될 수도 있고, 심지어 합성 DNA를 포함할 수도 있다. 당업자라면 각각 상이한 프로모터는 각각 상이한 조직 또는 세포 타입에서, 또는 발달단계의 상이한 단계에서, 또는 상이한 환경조건에 대응하여서 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 유전자를 대부분의 세포타입에서 대부분의 시간동안 발현시키는 프로모터를 "구성성(constitutive) 프로모터"라고 한다.

<19> 본 발명의 EWS-Oct-4 융합 유전자의 발현을 조절하기 위해 사용 가능한 프로모터로는 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

<20> 본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

<21> 본 명세서의 용어 "리포터 유전자"는 예컨대 생물학적 활성 분석, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 RIA (radioimmunoassay)와 같은 방법으로 용이하게 측정 가능한 발현 산물을 인코딩하는 DNA 분자를 의미한다. 이러한 DNA 분자는 인트론을 갖거나 갖지 않는 지놈(genomic) DNA 또는 mRNA를 주형으로 하여 제작된 cDNA 일 수 있다.

<22> 본 발명의 방법에서 사용가능한 리포터 유전자로는 *E. coli* β-갈락토시다아제(galactosidase) [An et al., *Mol. Cell. Biol.* 2:1628 (1982)], 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) [Chu et al., *Nucleic Acids Res.* 13:2921 (1985)], 갈락토카이나아제(galactokinase) [Shumperli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:257 (1982)], 인터루킨(interleukin)-2

[Cullen, *Cell* 46:973 (1986)], 티미딘 카이나아제(thymidine kinase) [Searle et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:1480 (1985)], 루시퍼라아제(firefly luciferase) [De Wet et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:725 (1987)], 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) [Henthorn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6342 (1988)], 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) [Berger et al., *Gene* 66:1 (1988)] 및 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT) [Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982); Tsang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8598 (1988)]를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이들 리포터 유전자는 상업적으로 구입이 가능하다. 바람직하게는 본 발명의 방법에서는 상기 리포터 유전자로서 루시퍼라아제를 사용한다.

<23> 리포터 유전자의 발현 산물은 표준 방법을 사용하여 측정이 가능하며, 다음에 기술되는 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 방법에 따라 측정할 수 있다.

<24> 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

<25> 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

<26> 예를 들어, 본 발명에서 리포터 유전자의 발현 산물의 측정 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체를 리포터 유전자의 발현 산물의 양을 측정하는 데 이용할 수 있다.

<27> 본 발명에서 리포터 유전자의 발현 산물의 측정이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 세포 용해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서 리포터 유전자 발현 산물에 대한 항체와 상기 세포 용해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.

<28> 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P_{450}을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진),TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 *o*-페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

<29> 본 발명에서 리포터 유전자의 발현 산물의 측정에 이용되는 분석방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, (i) 포획항체(capturing antibody)로서 리포터 유전자 발현 산물에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 용해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 리포터 유전자 발현 산물에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

<30> 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P_{450}), 방사능물질((예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory*

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

<31> 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 세포 용해물에서 리포터 유전자 발현 단백질이 존재한다는 것을 가리키는 것이다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다. 숙주 세포에 의해 발현된 리포터 유전자 산물은 표준 곡선(standard curve)으로부터 얻어진 결과와 측정된 값을 비교하여 정량할 수 있다.

<32> 본 명세서에서 "EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터"는 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질이 결합하여 프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 전사(transcription)를 촉진하는 DNA 분자 서열을 의미한다. 바람직하게는 본 발명에서 상기 "EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터"는 "Oct-4-결합 자리"를 포함한다. 바람직하게는 상기 "Oct-4-결합 자리"는 옥타머 시퀀스 모티프인 5'-ATGCAAAT-3'를 포함한다.

<33> 바람직하게는 본 발명의 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터는 리포터 유전자의 전사를 위한 프로모터 서열을 추가적으로 포함할 수 있다.

<34> 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

<35> 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

<36> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

<37> 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

<38> 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

<39> 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

<40> 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic.Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)),

리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

<41> 본 발명의 항종양제를 스크리닝하는 방법에 따르면, 우선, 단계 (a)에서 항종양제 후보물질을 세포에 처리한다. 이와 함께, 단계 (a)에서 세포에 항종양제 후보물질을 처리하지 않는 대조군도 준비하는 것이 바람직하다. 이 단계에서 이용될 수 있는 세포는 동물세포, 바람직하게는 포유동물 세포, 보다 바람직하게는 인간 세포이다. 상기 세포로서, 다양한 형태의 세포가 이용될 수 있다. 예를 들어, 즉시 분리된 세포, 초기 배양(primary culture)된 세포 또는 암세포화된 세포주를 이용할 수 있다. 항종양제 후보물질을 세포에 처리하는 방법은 세포 배양액에 항종양제 후보물질을 첨가하여 적합한 온도에서 항온배양(incubation)하여 실시할 수 있다.

<42> 이 단계에서 세포에 처리될 수 있는 항종양제 후보물질은, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앱타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함한다.

<43> 이어, 상기 (a) 단계에서 후보물질 처리된 세포와 후보물질 처리되지 않은 세포에서, 리포터 유전자의 발현 산물의 수준을 분석하여 리포터 유전자의 발현 수준을 감소시키는 후보물질을 선별한다. 즉, EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 리포터 유전자의 발현수준을 억제하는 물질이 본 발명의 방법에서 타겟으로 하는 항종양제이다.

<44> 따라서, 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 단계 (b)에서 항종양제 후보물질을 처리하지 않은 것에 비해 항종양제 후보물질을 처리한 경우에서 리포터 유전자의 발현 수준이 억제되는 후보물질을 선별하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

<45> 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 종양이 뼈(bone) 또는 연조직(soft-tissue)에서 발생되는 종양인 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다. 본 발명의 EWS-Oct-4 융합 단백질은 뼈 또는 연조직에서의 종양 발생에 중요한 전사촉진 인자로서 작용한다. 따라서, 본 발명의 방법에 의해 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사 활성을 억제하는 물질을 스크리닝하면 뼈 또는 연조직에서의 종양발생을 억제하는 항종양제를 용이하게 얻을 수 있다.

<46> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 프로모터에 작동적으로 연결된 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터; 및 (ii) EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결된 리포터 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주세포를 포함하는 항종양제 스크리닝 시스템을 제공한다.

<47> 본 발명의 항종양제를 스크리닝하기 위한 시스템은 상술한 본 발명의 일 양태인 항종양제를 스크리닝 하기 위한 방법에 사용하는 것이므로, 양 발명에서 공통되는 내용은 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복하여 기재하지 않는다.

<48> 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템을 제공한다.

<49> 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질 코딩 폴리뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 2 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템을 제공한다.

<50> 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 EWS-Oct-4 융합 단백질에 의해 포지티브하게 조절되는 프로모터는 Oct-4 결합 자리를 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템을 제공한다.

<51> 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 리포터 유전자는 *E. coli* β-갈락토시다아제(galactosidase), 크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라아제(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase), 갈락토카이나아제(galactokinase), 인터루킨(interleukin)-2, 티미딘 카이나아제(thymidine kinase), 루시퍼라아제(firefly luciferase) [De Wet et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:725 (1987)], 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 분비성 태반 알칼라인 포스파타아제(secreted placental alkaline phosphatase) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템을 제공한다.

<52> 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명은 상기 종양이 뼈(bone) 또는 연조직(soft-tissue)에서

발생되는 종양인 것을 특징으로 하는 스크리닝 시스템을 제공한다.

효 과

<53> 본 발명은 EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 저해하는 항종양제의 스크리닝 방법 및 이러한 스크리닝 방법에 사용되는 스크리닝 시스템을 제공한다. 본 발명의 스크리닝 시스템 및 스크리닝 방법에 따르면, EWS-Oct-4 융합 단백질의 전사활성을 억제하여 종양의 형성을 억제하는 항종양제를 대량/고속(highthroughput) 방식으로 스크리닝 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<54> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<55> **실시예**

<56> **실험재료 및 실험방법**

<57> 제한효소, 카프 인테스티날 알카라인 포스파타아제(calf intestinal alkaline phosphatase), DNA 폴리머라아제 I의 Klenow 단편, 및 T4 DNA 리가아제는 New England Biolabs 으로부터 구입하였다. Pfu Turbo 폴리머라아제는 Stratagene으로부터 구입하였고 [γ-^{32}P] ATP (3000 Ci/mmol)는 PerkinElmer 로부터 구입하였다. 플라스미드 DNA의 준비, 제한효소 절단방법, DNA의 아가로스겔 전기영동, DNA 라이게이션, 박테리아 형질전환 및 단백질의 SDS-폴리아크릴아마이드겔 전기영동은 표준 방법에 따라 수행하였다 [31]. PCR 생성물로부터 제조된 서브클론은 변이체(mutant) 부존재를 확인하기 위해 이중-가닥 DNA 주형을 사용하여 사슬 종결 방법(chain termination method)에 의해 시퀀싱하였다.

<58> **컨스트럭트**

<59> 플라스미드 pcDNA3-EWS-Oct-4를 제조하기 위해, EWS (NTD)를 pSG5/Flag-EWS로부터 프라이머 5'-EWS-1HindIII (5'-GATCAAGCTTATGGCGTCCACGGATTAC-3', *Hin*dIII 위치는 밑줄로 표시함) 및 3'-SpacerEWS (5'-pATAGTGAACCCCACCTGGTAGGAGGGTAGGA-3')를 사용하여 PCR 방법에 의해 증폭하여 얻었다.

<60> Oct-4 (CTD)는 프라이머 5'-POU5F1 (5'-pTGAGGCTGGAGAAGGAG-3') 및 3'-hOct-4-437 (5'-CTAGGAATTCTCAGTTTGAATGCATGGG-3', *Eco*RI 위치는 밑줄로 표시함)를 사용하여 PCR 방법에 의해 pcDNA3/hOct-4로부터 증폭시켜 얻었다.

<61> 두 개의 PCR 생성물 [EWS (NTD) 및 Oct-4 (CTD)]을 라이게이션시키고, *Hin*dIII 및 *Eco*RI으로 절단한 후, pBluscript II KS 벡터(Stratagene)의 동일한 위치안으로 클로닝하여 pKSII-EWS-Oct-4을 제조하였다. pKSII-EWS-Oct-4의 *Hin*dIII-*Eco*RI 단편을 pcDNA3 vector (Invitrogen)의 동일한 제한효소 자리로 서브클로닝하여 pcDNA3-EWS-Oct-4를 제조하였다.

<62> GST-EWS-Oct-4를 제조하기 위해, pKSII-EWS-Oct-4을 *Cla*I으로 절단하고, Klenow 단편으로 복구(repair) 처리한 후, *Not*I으로 다시 절단 처리하였다. pGEX(4T-1) 벡터도 *Bam*HI으로 절단하고, Klenow 단편으로 처리한 후, 이어서 *Not*I 으로 다시 처리하였다. 절단된 EWS-Oct-4 인서트를 pGEX (4T-1) 벡터의 *Not*I 및 블런티드 처리한 *Bam*HI 제한효소 자리에 직접 라이게이션 하였다. GST-hOct-4를 인코딩하는 플라스미드는 선행문헌에 기술되어 있다[32].

<63> pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4 결실 변이체를 다음의 단계에 의해 제조하였다. 올리고뉴클레오타이드 5'-HindIII-Flag-HindIII (5'-pAGCTTATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGA-3') 및 3'-HindIII-Flag-HindIII (5'-pAGCTTCTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATA-3')를 어닐링함으로써 제조한 합성 Flag 인서트를 pKSII/EWS-Oct-4의 *Hin*dIII 자리안으로 클로닝하여 pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (2xHindIIIplusMet)를 제조하였다. pKSII/Flag-EWS-Oct-4를 제조하기 위해, 두 번째 *Hin*dIII 자리의 결실 및 EWS-Oct-4의 N-말단에서의 Met 첫번째 잔기를 변이체 유도 프라이머 세트 5'-Flag-9 (5'-CAAGGATGACGACGATAAGGCGTCCACGGATTACAGTAC-3') 및 3'- EWS-23 (5'-GTACTGTAATCCGTGGACGCCTTATCGTCGTCATCCTTG-3') 및 QuikChange kit TM (Stratagene)을 사용한 위치-지시적 변이체 유도법(site-directed mutagenesis)에 의해 도입하였다.

<64> (A) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4에 대해서는, 플라스미드 pKSII/Flag-EWS-Oct-4 을 *Hin*dIII 및 *Eco*RI 으로 절단하고

pcDNA3의 동일한 위치안으로 클로닝하였다.

<65> (B) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4(ΔEWS)에 대해서는, 아미노산 1 내지 193의 결실을 변이체 유도 프라이머 세트 5'-EWS-Oct-4ΔEWS (5'- AAGGATGACGACGATAAGAGGTGGGGTTCACTATTG-3') 및 3'-EWS-Oct-4ΔEWS (5'-CAATAGTGAACCCCACCTCTTATCGTCGTCATCCTTG-3') 및 QuikChange kit™ 을 사용한 위치-지시적 변이체 유도법에 의해 도입하여 pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (ΔEWS)을 제조하였다. 이어서, pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (ΔEWS)의 Flag-EWS-Oct-4 (ΔEWS) 단편을 *Hin*dII 및 *Eco*RI으로 절단하고, pcDNA3의 동일한 제한효소 자리안으로 클로닝하였다.

<66> (C) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4(ΔExt)에 대해서는, 6개의 추가 아미노산 (아미노산 194 내지 199)을 변이체 유도 프라이머 세트 5'-EWS-Oct-4ΔExt (5'-CCATCCTACCCTCCTACCAAGCTGGAGAAGGAGAAG-3') 및 3'-EWS-Oct-4ΔExt (5'-CTTCTCCTTCTCCAGCTTGGTAGGAGGGTAGGATGG-3') 및 QuikChange kit™를 사용한 위치-지시적 변이체 유도법에 의해 도입하여 pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (ΔExt)을 제조하였다. 이어서, pKSII/Flag-EWS-Oct-4(ΔExt) 컨스트럭트의 Flag-EWS-Oct-4 (ΔExt) 단편을 *Hin*dII 및 *Eco*RI으로 절단하고, 이를 pcDNA3의 동일한 제한효소 자리안으로 클로닝하였다.

<67> (D) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4 (ΔNTD)에 대해서는, Oct-4(NTD)의 결실(아미노산 200 내지 210)을 변이체 유도 프라이머 세트 5'-DeltaOct4NTD (5'- AGGTGGGGTTCACTATTGGAGGAGTCCCAGGACATC-3') 및 3'-DeltaOct4NTD (5'-GATGTCCTGGGACTCCTCCAATAGTGAACCCCACCTG-3')를 사용한 위치-지시적 변이체 유도법에 의해 도입시켜, pKSII/Flag-EWS-Oct-4(ΔNTD)을 제조하였다. 이어서, pKSII/Flag-EWS-Oct-4(ΔNTD) 컨스트럭트의 Flag-EWS-Oct-4 (ΔNTD) 단편을 *Hin*dII 및 *Eco*RI으로 절단하고, pcDNA3의 동일한 자리로 클로닝하였다.

<68> (E) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4(ΔPOU)에 대해서는, Oct-4 (POU)의 결실(아미노산 211 내지 366)을 변이체 유도 프라이머 세트 5'-E/OdPOU-613 (5'- AAGCTGGAGCAAAACCCGAGCGACTATGCACAACGAG-3') 및 3'-E/OdPOU-1116 (5'-TCGTTGTGCATAGTCGCTCGGGTTTTGCTCCAGCTTC-3' 을 사용한 위치 지시적 변이체 유도법에 의해 도입시켜 pKSII/Flag-EWS-Oct-4(ΔPOU)을 제조하였다. 이어서, pKSII/Flag-EWS-Oct-4(ΔPOU) 컨스트럭트의 Flag-EWS-Oct-4(ΔPOU) 단편을 *Hin*dII 및 *Eco*RI으로 절단하고 pcDNA3의 동일한 위치안으로 클로닝하였다.

<69> (F) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4(ΔCTD)에 대해서는, Flag-EWS-Oct-4(ΔCTD)을 pKSII/Flag-EWS-Oct-4로부터, 프라이머 5'-Flag(-6) BamHI (5'- GATCGGATCCGCCACCATGGATTACAAG-3', *Bam*HI 자리는 밑줄로 표시함) 및 3'-hOct4-867 EcoRI (5'-GATCGAATTCGCTTGATCGCTTGCCCTT-3', *Eco*RI 자리는 밑줄로 표시함)을 사용한 PCR 방법에 의해 증폭하고, *Bam*HI 및 *Eco*RI으로 절단한 후 pcDNA3의 동일한 자리안으로 클로닝하였다.

<70> (G) pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4 (V351P)에 대해서는, POU (V351 → P351)의 미스센스(missense) 변이체를 변이체 유도 프라이머 세트 5'-hOct4 V274P (5'-GAAGGATGTGCCCCGAGTGTGG-3') 및 3'-hOct4 V274P (5'-CCACACTCGGGGCACATCCTTC-3')를 사용한 위치-지시적 변이체 유도법에 의해 도입하여, pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (V351P)를 제조하였다. 이어서, pKSII/Flag-EWS-Oct-4 (V351P) 컨스트럭트의 Flag-EWS-Oct-4 (V351P) 단편을 *Hin*dII 및 *Eco*RI으로 절단하고 pcDNA3의 동일한 위치안으로 클로닝하였다.

<71> pCAG-IP/EGFP 의 컨스트럭트 및 이의 제조방법은 선행기술문헌에 설명되어 있다[32]. pCAGIP/EWS-Oct-4-EGFP을 제조하기 위해, EWS-Oct-4을 프라이머 5'-BamHIFlagE-O (5'-GATCGGATCCATGGATTACAAGGATGAC-3', *Bam*HI 자리는 밑줄로 표시함) 및 3'-hOct4CTDGFP (5'-GATCGGATCCGCTCCGTTTGAATGCATGGG-3', *Bam*HI 자리는 밑줄로 표시함)를 사용한 PCR 방법에 의해 pcDNA3/Flag-EWS-Oct-4 로부터 증폭하였다. PCR 생성물을 *Bam*HI 으로 절단하고 pEGFP (N1) 벡터(Clontech)의 동일한 자리안으로 클로닝하여 pEGFP(N1)-EWS-Oct-4을 제조하였다. pCAGIP/EWS-Oct-4을 제조하기 위해, pEGFP(N1)-EWS-Oct-4의 *Sal*I 및 *Not*I 단편을 pCAG-IP 벡터의 *Xho*I 및 *Not*I 자리안으로 서브클로닝하였다.

<72> **GST 융합 단백질의 발현 및 정제**

<73> 선행기술 문헌에 기재된 바와 같이, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST)-EWS-Oct-4 및 GST-hOct-4 단백질은 *Escherichia coli* (*E. coli*)에서 발현시켰다 [32]. 글루타티온-세파로스에 결합시킨 후 세정한 후에, 단백질들을 환원된 글루타티온(Sigma)을 사용하여 용출시켰다. 단백질의 농도는 브래드포드(Bradford)(Bio-Rad) 방법에 의해 결정하였다. 용출된 단백질들의 순도 및 크기는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔의 코마시(Coomassie) 염색에 의해 평가하였다.

<74> **전기영동 이동성 시프트 분석법(Electrophoretic mobility shift assays, EMSAs)**

<75> 서열이 선행기술문헌에 기술된 합성 올리고뉴클레오타이드로부터 EMSAs 용 프로브를 제조하였다[32]. 프로브는 어닐링된 상보적 올리고뉴클레오타이드를 T4 폴리뉴클레오타이드 카이나제를 사용하여 [γ-^{32}P] ATP로 엔드-라벨링하여 제조하였다. DNA 결합 반응은 재조합 GST-융합 EWS-Oct-4 및 hOct-4 단백질들을 사용하여 20 mM HEPES (pH 7.4), 40 mM KCl, 1 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP-40, 및 0.2 μg 의 poly (dIdC)(dIdC)를 포함하는 결합 버퍼안에서, 4℃ 에서 30분 동안 수행하였다. 결합에 이어서, 반응 혼합액을 0.5X TBE (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM 붕산, 1 mM EDTA) 버퍼내의 4% 폴리아크릴아마이드겔 (아크릴아마이드/비스아크릴아마이드 비율 37:1)에서 150 V 으로 4℃, 2-3 시간 동안 전기영동시켰다. 겔을 건조시키고 -70 ℃에서 강화스크린(intensifying screen)과 함께 Kodak X-Omat 필름에 노출시켰다.

<76> **세포내에서의 국재화(Subcellular localization)**

<77> 선행문헌에 기재되어 있는 바와 같이, 면역조직화학 분석(immunocytochemical analyse)을 수행하였다 [33]. 간략하게, COS-7 세포들을 유리 커버 슬립상에 플레이팅하고, VivaMagic Reagent (Vivagen Co., Ltd.) 또는 FuGene (Roche Diagnostic)를 사용하여 각각의 DNA 플라스미드로 형질전환시켰다. 48 시간 후에, 세포들을 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세정한 후, 아세톤 및 메탄올 (1:1, v/v)의 혼합물에서 -20 ℃에서 10 분간 고정시켰다. EWS-Oct-4 또는 hOct-4를 검출하기 위해, 항-Oct-4 항체 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) 및 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였고, 형광은 CoolSNAP 디지털 카메라 (Olympus)가 구비된 형광현미경(Olympus, IX51)으로 검출하였다.

<78> **리포터 유전자 분석**

<79> 세포들은 Gene Pulser II RF module system (Bio-Rad)을 사용하여 전기천공법(electroporation)에 의해 플라스미드로 일시적 형질전환(transfection)시켰다. 루시퍼라제(luciferase) 분석은 Dual-luciferase Assay System (Promega)를 사용하여 수행하였다. Renilla luciferase 활성을 사용하여 형질전환 효율을 표준화하였다.

<80> **EWS-Oct-4을 발현하는 ZHBTc4 ES 세포주의 확립**

<81> 안정적으로 발현하는 ES 세포주를 제조하기 위해, pCAG-IP/EGFP 및 pCAG-IP/EWS-Oct-4-EGFP을 *Pvu*I로 선형화시키고, 이들 각각 20μg 을 Gene Pulser II RF module system (Bio-Rad)을 사용하여 ZHBTc4 ES 세포(1×10^7) 안으로 형질전환시켰다. 전기천공한 후 48 시간 후에 푸로마이신(puromycin, Sigma)를 최종 농도 1μg/㎖이 되도록 첨가하여 안정적으로 삽입된 플라스미드 DNA를 갖는 클론을 선별하였다. 형질전환된 ZHBTc4 세포를 선별한 후, 모노클로날 세포주를 개별 푸로마이신-저항성 콜로니를 채취하여 분리하였다.

<82> **RT-PCR**

<83> 총 RNA를 RNeasy mini kit (Qiagen)와 함께 on-column DNase 처리를 사용하여 EWS-Oct-4 발현 또는 벡터만을 발현하는 ZHBTc4 ES 세포로부터 얻었고, mRNA Oligodex-dT mRNA mini kit (Qiagen)를 사용하여 정제하고, 이어서, RT-PCR 용 Superscript First-strand Synthesis System (Invitrogen)을 사용하여 cDNA 합성을 실시하였다. fgf-4 및 nanog 유전자에 대한 RT-PCR 반응을 선행기술문헌에 언급된 유전자-특이적 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다 [32].

<84> **누드 마우스에서 종양발생 분석**

<85> 선행기술문헌에 설명된 방법에 따라 누드마우스에 대해 종양발생 분석을 수행하였다[34]. 간략하게, 5-주령 흉선이 없는 누드 마우스(CD1 nu/nu; Charles River)를 주입 전 2주간 마우스 음료수에 테트라사이클린 유사체 독시사이클린(doxycycline)(10 μg/㎖)을 첨가하여 전처리하였다. 이어서, 각 클론으로부터의 100 μl PBS 내의 2 x 10^7 세포들을 누드 마우스에 피하주사하여 주입하였고, 이들 마우스를 계속적으로 독시사이클린에 노출시켰다. 종양을 형성시키는 마우스는 26일 후에 희생시켰다.

<86> **실험결과**

<87> **EWS-Oct-4 는 Oct-4와 유사하게 Oct-4 보존 서열에 결합한다.**

<88> 뼈 및 연조직 종양에서의 EWS-Oct-4 전좌 융합 생성물에 대한 특성을 연구한 결과, EWS 엑손 1-6와 oct-4 엑손 1-4의 인-프레임(in-frame) 융합에 의해 생성된 카이메릭 유전자를 발견하였다[2]. EWS에서의 중단점(breakpoint)은 인트론 6에 존재하였고, Oct-4에서의 중단점은 엑손 1에 존재하였다. 카이메릭 유전자는 Oct-4의 NTD에 존재하는 최초 122개 아미노산이, EWS의 정상 인트론 6에 의해 인코딩된 추가의 6개 아미노산 서열을

통해 EWS의 N-말단 193개의 아미노산에 의해 교체되어 있는 단백질을 인코딩한다(도 1 참조). oct-4 엑손 1에 숨겨진(cryptic) 스플라이싱 수용자 신호를 추가할 수 있는 EWS 인트론 6에서의 스플라이싱 수용자에 대한 비전형적인 보존 서열이 존재한다. Oct-4의 POU 도메인은 옥타머 서열 모티프인 5'-ATGCAAAT-3'에 모노머로써 결합하는 보존된 DNA-결합 도멘인 이다[35]. EWS-Oct-4와 Oct-4은 상당한 구조적 차이가 있지만, POU DNA 결합 도메인은 변하지 않은 채로 존재한다. EWS-Oct-4가 Oct-4의 본래 타깃 유전자들에 결합할 수 있는 지를 결정하기 위해서 전기영동 이동성 시프트 분석(electrophoretic mobility shift assays, EMSAs)을 수행하였다.

<89> 공통의 Oct-4 DNA 결합 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드[35]를 합성하여 결합 반응에서 타겟으로 사용하였다. EWS-Oct-4 및 hOct-4의 GST 융합을 *E. coli* 에서 발현시켜, 이를 정제한 후, 글루타티온-세파로오스 비드에 결합시켰다. 사용된 각각의 단백질의 양을 정량하기 위해, 친화-정제된 GST, GST-EWS-Oct-4 및 GST-hOct-4 단백질을 SDS-PAGE에 의해 분획하고, 코마시 블루(Coomassie blue) 염색또는 PVDF 막으로 전달한 다음 항-Oct-4 항체(C-20, Santa Cruz Biotechnology)에 의해 면역블로팅에 의해 시각화하였다 (데이타 제시하지 않음). 이어서, EMSAs를 Oct-4 프로브의 농도를 일정하게 유지하고 투입하는 단백질의 양을 변화시키면서 수행하였다. 단백질-DNA 복합체는 EWS-Oct-4 및 hOct-4 단백질 모두에서 형성되었으나(도 2a의 레인 5-7 및 8-10), 반면에 GST 단독으로는 거의 결합하지 않았다 (도 2a 레인 2-4). 결합은 특이성을 나타내었는데, Oct-4 결합 자리를 포함하는 콜드(cold) 올리고뉴클레오타이드 100-배 초과량에 의해서는 대체(displacement)되었으나, Oct-4에 의해 인지되지 않는 변이체 Oct-4 결합 서열을 포함하는 콜드 변이체 올리고뉴클레오타이드의 100-배 초과량에 의해서는 대체되지 않았다(도 2b). 이러한 결과들은 EWS-Oct-4의 DNA 결합 특이성이 이미 확인된 hOct-4에 대한 특이성의 것과 유사하다는 것을 나타낸다.

<90> **EWS-Oct-4는 핵질 단백질이다**

<91> hOct-4의 NTD가 EWS의 NTD에 의해 대체되기 때문에, 본 발명자들은 EWS-Oct-4의 세포내 존재 위치(국재화, localization)를 간접적 면역형광방법에 의해 확인하였다. hOct-4가 핵에 위치하며 Oct-4 POU 도메인이 핵질 국재화 신호(nuclear localization signal)을 가지고 있다는 것이 보고되어 있다[32, 33, 36]. 따라서, EWS-Oct-4도 핵질 단백질이어야 한다. EWS-Oct-4의 세포내 분석 결정을 시작하기 위해, COS-7 세포들을 인서트를 갖지 않는 pcDNA3 발현 벡터 (데이터 제시하지 않음), pcDNA3-hOct-4 (도 3a 및 도 3b), 또는 pcDNA3-EWS-Oct-4 (도 3c 및 도 3d)로 형질전환시키고 면역형광분석을 실시하였다. 선행 보고와 일치하게 [32], hOct-4 단백질은 핵에 국재화되어 있었다(도 3a 및 도 3b). 흥미롭게도, 간접적인 면역조직화학방법에 의해 카이메릭 EWS-Oct-4 단백질도 핵에 국재화되어 있다는 것을 확인하였다(도 3c 및 도 3d). 이러한 결과들은 hOct-4 및 EWS-Oct-4 가 핵 단백질이라는 것을 나타낸다.

<92> **EWS-Oct-4는 Oct-4 결합 자리를 포함하는 리포터 유전자로부터의 전사를 활성화시킨다**

<93> EWS의 NTD는 강한 트랜스 활성화(transactivation) 도메인을 제공함으로써 EWS-융합 단백질에 의한 전사활성화에 기여하는 것으로 추정된다[3]. EWS-Oct-4에서의 NTD-EWS의 전사적(transcriptional) 영향을 평가하기 위해, 10 카피(copy)의 Oct-4-결합 자리 및 루시퍼라제 유전자의 TATA 박스 업스트림 [33]을 포함하는 리포터 플라스미드를 갖는 각각의 발현벡터를 공동 형질전환함으로써 EWS-Oct-4 및 hOct-4의 전사활성을 비교하였다. 또한 사이토메갈로바이러스-유래의 Renilla 루시퍼라제 유전자로 구성된 대조군 플라스미드도 포함시켰다(도 4a). 도 4b에서 나타나는 바와 같이 공동 형질전환된 EWS-Oct-4는, hOct-4에 의한 약 50-배의 증가(도 4b 막대 2-4)와 비교하여, 293T 세포들에서 리포터 발현을 735배 증가시켰다(도 4b 막대 5-7). 이러한 결과로써 명백하게 EWS-Oct-4는 hOct-4 보다 더욱 큰 잠재적 전사 활성자임을 확인하였다. 형질전환된 세포의 세포 추출물의 웨스턴 블로팅에 의하면 hOct-4 및 EWS-Oct-4 단백질의 양은 대응하는 플라스미드의 증가되는 양에 대응하여 합성되어 증가된다는 것을 증명하고 있다(도 4b 하부측 패널). 또한, 웨스턴 블로팅 분석에 의하면 Oct-4 와 EWS-Oct-4 사이의 트랜스 활성화 잠재능에서의 차이는 이들 단백질들의 양에 있어서의 차이에 기인한다는 것을 보여준다. 이와 유사한 결과들을 COS-7 세포들에서도 얻었다(데이타 제시하지 않음).

<94> **3개의 기능적 도메인들이 EWS-Oct-4에 의한 트랜스 활성화에 중요하다**

<95> EWS-Oct-4 내에서 트랜스활성화에 요구되는 중요 부위를 결정하기 위해, flag-태그된 결실(deletion)로 일시적 형질전환 실험을 수행하였다. EWS-Oct-4 결실 변이체의 구조는 도 4c에 모식적으로 나타내었다. 우측 패널에 있는 데이터에 의하면, EWS (NTD)의 결실 [EWS-Oct-4 (ΔEWS)로 명명됨] 또는 POU 도메인의 결실 [EWS-Oct-4 (ΔPOU)]이 트랜스 활성화 활성을 없애는 반면, EWS-Oct-4의 C-말단 도메인 [EWS-Oct-4 (ΔCTD)]은 트랜스 활성화 활성을 감소시킨다는 것을 나타내고 있다. (^{351}Val을 ^{351}Pro으로 전환시키는 POU DNA 결합 도메인내에서의 미스센스(missense) 변이체를 갖는) 플라스미드 EWS-Oct-4 (V351P)도 리포터 유전자의 발현을 활성화시키지 못하였다.

반면에 6개의 추가 아미노산(RWGSLL) 또는 Oct-4의 일부분(NTD)의 결실에 의해서도 리포터 유전자 발현을 감소시키지 못하였다(도 4c). 이러한 결과는 EWS(NTD), Oct-4(CTD) 및 EWS-Oct-4의 Oct-4 POU 도메인이 이 융합단백질의 전체 트랜스 활성화 잠재능력에 있어서 중요하다는 사실을 암시한다. 유사한 결과들을 COS-7 세포들에 대해서 얻었다(데이터 제시하지 않음). 모든 변이체 단백질들의 발현수준들은 웨스턴 블로팅에 의해 검증하였다(도 4d 상부측 패널). 형질전환된 세포내에서 생성된 EWS-Oct-4 단백질의 산출된 분자량은 예상된 분자량 ~48 kDa 보다 약간 큰 ~58 kDa 이었는데(도 4d 상부측 패널), 이의 이유는 정확히 알려져 있지 않지만, NSYGQQS 반복서열의 특성 및/또는 EWS-Oct-4의 EWS 도메인내의 23개 프롤린(proline)의 존재와 관련된 것일 수 있다. 동일한 현상이 EWS/ATF1 및 EWS/WT1 융합에서도 관찰되었는데, 이들도 예측되는 것보다 큰 겉보기 분자량을 가졌다[37, 38]. EGFP의 발현을 형질전환 효율을 모니터링하는 내부 대조군으로 사용하였다(도 4d 하부측 패널).

<96> **EWS-Oct-4 에 의한 내재성 Oct-4 다운 스트림 타겟 유전자들의 조절**

<97> EWS-Oct-4의 정규장소 이외의 발현이 fgf-4 [14, 27] 및 nanog [12, 16]와 같은 내재성 Oct-4 다운스트림 타겟 유전자들의 발현을 조절할 수 있는 지를 확인하기 위해서, pCAG-IP/EGFP 및 pCAG-IP/EWS-Oct-4 컨스트럭트로 Oct-4-부존재 ZHBTc4 ES 세포를 안정적으로 형질전환시켰다(도 5a). 본 발명자들은 ZHBTc4 ES 세포주를 사용하였는데, 그 이유는 (i) EWS-Oct-4 포지티브 뼈 및 연조직 종양 세포주 또는 이들의 동등물의 입수가 가능하지 않고, (ii) Oct-4 가 ES 세포에서 발현되며, (iii) ZHBTc4 ES 세포에서 Oct-4 트랜스 유전자의 발현이 테트라사이클린(tetracycline) 에 의해 완전히 중단되기 때문이다. Oct-4의내 재성 양쪽 대립유전자를 테트라사이클린-억제성 마우스 Oct-4 트랜스 유전자도 가지고 있는 ZHBTc4 ES 세포주에서 유전자 타겟팅에 의해 불활성시켰다[39]. 3개의 상이한 클론(EWS-Oct-4-EGFP #1-3)내에서의 EWS-Oct-4 단백질의 양을 웨스턴 블로팅에 의해 결정하였다. 클론으로부터 유도된 3개의 세포주는 유사한 수준의 EWS-Oct-4 단백질을 생성하였고(도 5b 레인 2-4), 대조군 세포주에서는 EWS-Oct-4 단백질은 검출되지 않았다(도 5b 레인 1). 도 5c에서 보여지는 바와 같이, fgf-4 및 nanog의 발현이 테트라사이클린-처리된 EWS-Oct-4 카이메릭 단백질을 발현하는 ZHBTc4 ES 세포내에서 검출되었다(도 5c, 레인 2-4). 그러나, 이들 유전자들은 EGFP 벡터만을 발현하는 ZHBTc4 ES 세포들에서는 검출되지 않았다(도 5c, 레인 1). 따라서, EWS-Oct-4는 *인 비보*에서 Oct-4 다운 스트림 타겟 유전자들을 활성화시킬 수 있는 능력을 가진다.

<98> **EWS-Oct-4를 갖는 ZHBTc4 ES 세포는 누드 마우스에서 종양 생성 잠재능을 갖는다**

<99> 마지막으로, 본 발명자들은 EWS-Oct-4 카이메라의 누드 마우스에서의 종양 유도능력을 검증하였다. 누드 마우스에게 EWS-Oct-4 세포의 주입전에 2주 동안 테트라사이클린 유사체인 독시사이클린(doxycycline, Dc)를 음료수의 형태로 공급하였고, 그 이후로 공급을 계속 유지하였다. 도 6에서 나타낸 바와 같이, EWS-Oct-4를 발현하는 ZHBTc4 세포들을 주입한 6 마리의 마우스 모두가 비교적 짧은 잠복기내에 커다란 종양을 형성하였는데, 이는 EWS-Oct-4가 Oct-4의 경우와 같이 발암 유전자로 작용한다는 것을 보여주는 것이다[22]. 동일한 결과를 EWS-Oct-4를 발현하는 다른 독립적인 2개의 ZHBTc4 클론에 대해서 얻었다(데이타 제시하지 않음). 이러한 결과들은 EWS-Oct-4 카이메릭 단백질의 과발현에 의해 누드 마우스에서 종양발생을 충분히 유도할 수 있다는 것을 증명하는 것이다.

<100> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

<101> **참고문헌**

<102> 1. Rabbitts, T. H. (1999) Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *J. Pathol.* 187, 39-42.

<103> 2. Yamaguchi, S., Yamazaki, Y., Ishikawa, Y., Kawaguchi, N., Mukai, H. and Nakamura, T.(2005) EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 43, 217-222.

<104> 3. Kim, J. and Pelletier, J. (1999) Molecular genetics of chromosome translocations involving EWS and related family members. Physiol. Genomics 1, 127-138.

<105> 4. Delattre, O., Zucman, J., Plougastel, B., Desmaze, C., Melot, T., Peter, M., Kovar, H.,Joubert, I., de Jong, P., Rouleau, G. and et al. (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by

chromosome translocation in human tumours. Nature 359, 162-165.

<106> 5. Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H. and Gruss, P. (1990) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. Embo J. 9, 2185-2195.

<107> 6. Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M. and Hamada, H. (1990) A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell 60, 461-472.

<108> 7. Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W. and Staudt, L. M. (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. Nature 345, 686-692.

<109> 8. Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C. H. and Monk, M. (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. Mol. Hum. Reprod. 5, 851-860.

<110> 9. Hansis, C., Grifo, J. A. and Krey, L. C. (2000) Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. Mol. Hum. Reprod. 6, 999-1004.

<111> 10. Burdon, T., Smith, A. and Savatier, P. (2002) Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. Trends Cell Biol. 12, 432-438.

<112> 11. Herr, W. and Cleary, M. A. (1995) The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. Genes Dev. 9, 1679-1693.

<113> 12. Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H. and Robson, P. (2005) Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J. Biol. Chem. 280, 24731-24737.

<114> 13. Lamb, K. A. and Rizzino, A. (1998) Effects of differentiation on the transcriptional regulation of the FGF-4 gene: critical roles played by a distal enhancer. Mol. Reprod. Dev. 51, 218-224.

<115> 14. Ambrosetti, D. C., Basilico, C. and Dailey, L. (1997) Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. Mol. Cell. Biol. 17, 6321-6329.

<116> 15. Vigano, M. A. and Staudt, L. M. (1996) Transcriptional activation by Oct-3: evidence for a specific role of the POU-specific domain in mediating functional interaction with Oct-1. Nucleic Acids Res. 24, 2112-2118.

<117> 16. Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Tada, T. (2005) Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. Mol. Cell. Biol. 25, 2475-2485.

<118> 17. Ezashi, T., Ghosh, D. and Roberts, R. M. (2001) Repression of Ets-2-induced transactivation of the tau interferon promoter by Oct-4. Mol. Cell. Biol. 21, 7883-7891.

<119> 18. Liu, L., Leaman, D., Villalta, M. and Roberts, R. M. (1997) Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. Mol. Endocrinol 11, 1651-1658.

<120> 19. Liu, L. and Roberts, R. M. (1996) Silencing of the gene for the beta subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. J. Biol. Chem. 271, 16683-16689.

<121> 20. Pesce, M. and Scholer, H. R. (2001) Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. Stem Cells 19, 271-278.

<122> 21. Ovitt, C. E. and Scholer, H. R. (1998) The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo. Mol. Hum. Reprod. 4, 1021-1031.

<123> 22. Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y. and Pikarsky, E. (2003) Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic

fate determinant. Cancer Cell 4, 361-370.

<124> 23. Looijenga, L. H., Stoop, H., de Leeuw, H. P., de Gouveia Brazao, C. A., Gillis, A. J., van Roozendaal, K. E., van Zoelen, E. J., Weber, R. F., Wolffenbuttel, K. P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E. J., Schneider, D. T., Kononen, J., Sauter, G. and Oosterhuis, J. W. (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. Cancer Res. 63, 2244-2250.

<125> 24. Hellerstedt, B. A. and Pienta, K. J. (2003) Germ cell tumors: review of selected studies from 2002. Curr. Opin. Oncol. 15, 234-238.

<126> 25. Oliver, R. T. (1999) Germ cell cancer. Curr. Opin. Oncol. 11, 236-241.

<127> 26. Palumbo, C., van Roozendaal, K., Gillis, A. J., van Gurp, R. H., de Munnik, H., Oosterhuis, J. W., van Zoelen, E. J. and Looijenga, L. H. (2002) Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding ofregulatory mechanisms. J. Pathol. 196, 467-477.

<128> 27. Wang, P., Branch, D. R., Bali, M., Schultz, G. A., Goss, P. E. and Jin, T. (2003) The POU homeodomain protein OCT3 as a potential transcriptional activator for fibroblast growth factor-4 (FGF-4) in human breast cancer cells. Biochem. J. 375, 199-205.

<129> 28. Monk, M. and Holding, C. (2001) Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. Oncogene 20, 8085-8091.

<130> 29. Jin, T., Branch, D. R., Zhang, X., Qi, S., Youngson, B. and Goss, P. E. (1999) Examination of POU homeobox gene expression in human breast cancer cells. Int. J. Cancer 81, 104-112.

<131> 30. Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. and Jaenisch, R. (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. Cell 121, 465-477.

<132> 31. Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

<133> 32. Lee, J., Kim, H. K., Rho, J. Y., Han, Y. M. and Kim, J. (2006) The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. J. Biol. Chem. 281, 33554-33565.

<134> 33. Lee, J., Rhee, B. K., Bae, G. Y., Han, Y. M. and Kim, J. (2005) Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's sarcoma protein. Stem Cells 23, 738-751.

<135> 34. Kim, J., Lee, K. and Pelletier, J. (1998) The desmoplastic small round cell tumor t(11;22) translocation produces EWS/WT1 isoforms with differing oncogenic properties. Oncogene 16, 1973-1979.

<136> 35. Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M. K., Vriend, G. and Scholer, H. R. (1998) New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. Genes Dev. 12, 2073-2090.

<137> 36. Pan, G., Qin, B., Liu, N., Scholer, H. R. and Pei, D. (2004) Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. J. Biol. Chem. 279, 37013-37020.

<138> 37. Kim, J., Lee, K. and Pelletier, J. (1998) The DNA binding domains of the WT1 tumor suppressor gene product and chimeric EWS/WT1 oncoprotein are functionally distinct. Oncogene 16, 1021-1030.

<139> 38. Brown, A. D., Lopez-Terrada, D., Denny, C. and Lee, K. A. (1995) Promoters containing ATF-binding sites are de-regulated in cells that express the EWS/ATF1 oncogene. Oncogene 10, 1749-1756.

<140> 39. Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat. Genet. 24, 372-376.

<141> 40. Rabbitts, T. H. and Stocks, M. R. (2003) Chromosomal translocation products engender new intracellular therapeutic technologies. Nat. Med. 9, 383-386.

<142> 41. Baskaran, R., Dahmus, M. E. and Wang, J. Y. (1993) Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90, 11167-11171.

<143> 42. O'Brien, T., Hardin, S., Greenleaf, A. and Lis, J. T. (1994) Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation. Nature 370, 75-77.

<144> 43. Kim, J., Lee, J. M., Branton, P. E. and Pelletier, J. (1999) Modification of EWS/WT1 functional properties by phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96, 14300-14305.

<145> 44. McLeskey, S. W., Kurebayashi, J., Honig, S. F., Zwiebel, J., Lippman, M. E., Dickson, R. B. and Kern, F. G. (1993) Fibroblast growth factor 4 transfection of MCF-7 cells produces cell lines that are tumorigenic and metastatic in ovariectomized or tamoxifen-treated athymic nude mice. Cancer Res. 53, 2168-2177.

<146> 45. Souttou, B., Gamby, C., Crepin, M. and Hamelin, R. (1996) Tumoral progression of human breast epithelial cells secreting FGF2 and FGF4. Int. J. Cancer 68, 675-681.

<147> 46. Piestun, D., Kochupurakkal, B. S., Jacob-Hirsch, J., Zeligson, S., Koudritsky, M., Domany, E., Amariglio, N., Rechavi, G. and Givol, D. (2006) Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343, 279-285.

도면의 간단한 설명

<148> 도 1은 t(6;22)(p21;q12) 전좌를 나타내는 모식도이다. EWS 및 oct-4 유전자의 엑손/인트론 구조가 나타나있다. 아미노산 위치가 융합단백질을 나타내는 모식도 위에 표시되어 있다. EWS의 최초 193 아미노산(1-193 잔기)가 융합 전사물(transcript)에서의 EWS의 정상 인트론 6에 의해 코딩된 6개의 추가 아미노산 서열을 통해 Oct-4의 절단된 형태의 코딩 서열(123-360 잔기)에 융합되어 있는데, 이는 Oct-4에 존재하는 최초 122 아미노산(1-122 잔기)을 갖지 않는 형태이다. EWS-Oct-4 카이메라에서 기능적으로 중요한 도메인은 다음과 같다: EWS (NTD), EWS의 N-말단 도메인; extra 6 aa, 추가의 6개의 아미노산; N, Oct-4의 절단된 N-말단 도메인; POU, Oct-4의 POU DNA 결합 도메인; CTD, Oct-4의 C-말단 도메인. S.A.는 EWS 인트론 6에서의 숨겨진 스플라이싱 수용자 신호를 나타낸다.

<149> 도 2a 및 도 2b는 EWS-Oct-4 카이메라에 의한 특이적 DNA 결합에 대한 결과를 보여준다.

<150> 도 2a는 EWS-Oct-4 및 hOct-4의 DNA 결합 특성의 EMSAs이다. EMSAs는 실험방법에서 설명된 바와 같이 재조합 단백질 없이 (레인 1), 재조합 GST (레인 2, 10 ng; 레인 3, 20 ng ; 레인 4, 30 ng), GST-EWS-Oct-4 (레인 5, 10 ng; 레인 6, 20 ng ; 레인 7; 30 ng), 또는 GST-hOct-4 (레인 8, 10 ng; 레인 9, 20 ng; 레인 10, 30 ng) 및 방사능 표지된 프로브로 행하였다. 각 EMSA에서 사용된 재조합 단백질들을 젤의 상부측에 표기하였다. 단백질-DNA 복합체를 0.5X TBE (44.5 mM Tris-HCl, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA)내에서의 비변성 4% 폴리아크릴아마이드(아크릴아마이드:비스아크릴아마이드 비율, 37:1)겔상에서 4℃로 분리하였다. 프로브 단독 및 단백질-DNA 복합체의 위치를 표기하였다.

<151> 도 2b는 EWS-Oct-4에 의한 서열 특이적 DNA 결합을 나타내는 결과를 보여준다. 경쟁실험은 야생형 Oct-4 올리고뉴클레오타이드의 100배 초과량(레인 4 및 7) 또는 변이체 Oct-4 올리고뉴클레오타이드 (레인 5 및 8)으로 수행하였다. 프로브와 단백질-DNA 복합체의 위치를 화살표로 표기하였다.

<152> 도 3은 EWS-Oct-4의 세포내 국재화를 실험한 결과을 보여준다. COS-7 세포는 커버 슬립상에서 성장시켰고 hOct-4 (a-b) 또는 EWS-Oct-4 (c-d)을 코딩하는 포유동물 발현 벡터로 형질전환시켰다. hOct-4 또는 EWS-Oct-4을 발현하는 세포를 항-Oct-4 항체(C-20, Santa Cruz Biotechnology)를 사용한 면역형광 현미경으로 관찰하였고 DNA는 DAPI로 시각화하였다(b 및 d).

<153> 도 4a 내지 도 4d는 EWS-Oct-4의 트랜스 활성화 잠재능을 확인한 결과를 보여준다.

<154> 도 4a는 리포터 및 발현 플라스미드의 모식도이다. pOct-4(10x) TATA-Luc 리포터 플라스미드는 기본 프로모터-루시퍼라아제 컨스트럭트의 업스트림에 Oct-4 인지 자리 10 카피를 포함한다. 10 카피는 흑색 막대로 표

시하였고, TATA 박스는 흰색 박스로 표시하였으며, 루시퍼라아제 유전자는 흑색 긴 막대로 표시하였다. EWS-Oct-4 또는 hOct-4를 생성하는 발현 벡터도 나타내었다. 최초 및 마지막 아미노산의 위치를 각 컨스트럭트의 아래쪽에 표시하였다.

<155> 도 4b는 EWS-Oct-4 및 hOct-4의 전사 특성을 나타내는 결과를 보여준다. 293T 세포들은 hOct-4 (회색 막대) 또는 EWS-Oct-4 (흑색 막대), pOct-4 (10x) TATA luc 리포터 플라스미드 및 Renilla 루시퍼라아제 (상부측 패널)를 코딩하는 발현 벡터로 공동-형질전환하였다. 리포터 활성도는 상이한 형질전환 효율을 보정하기 위해 Renilla 루시퍼라아제로 표준화하였다. 유도 배수(fold induction)를 인서트를 갖지 않는 발현 벡터와 비교하여 표시하였다. 각 형질전환은 독립적으로 적어도 3회를 수행하였고 평균값을 이들의 표준편차와 함께 나타내었다(± S.E., 수직 막대). 루시퍼라아제 분석을 위한 추출물은 12% SDS-PAGE로 분리한 후, PVDF 막으로 옮기고, 항-Oct-4 항체(C-20)로 면역블로팅하였다(하부측 패널).

<156> 도 4c는 EWS-Oct-4의 기능적 부위를 확인한 실험결과를 보여준다. 좌측에는 EWSOct-4의 결실 컨스트럭트를 모식적으로 나타내었다. 숫자는 아미노산 잔기의 수를 나타낸다. 리포터 플라스미드, pOct-4(10x) TATA luc를 다양한 flag-tagged EWS-Oct-4 변이체들과 함께 293T 세포안으로 공동 형질전환하였다. 상대적 전사 활성도를 리포터 플라스미드만을 형질전환시킨것을 1 값으로 하여 평균값 증가 ± S.E.로써 오른쪽에 나타내었다. 결과는 각각 2회 반복한 3회의 독립적 실험 수행값의 평균으로 나타내었다.

<157> 도 4d는 일시적으로 형질전환된 세포에서의 EWS-Oct-4 결실 변이체 발현의 면역블로팅 분석 결과를 보여준다. 총 세포 용해물을 12% SDS-PAGE에 의해 분획하고 항-Flag (M2, Sigma-Aldrich) 또는 항-EGFP (BD Biosciences) 항체들에 의한 웨스턴 블로팅에 의해 시각화하였다. 전 염색한 분자량 마커(New England Biolabs)의 위치를 좌측에 표시하였다(kDa). 레인 1, 벡터 단독; 레인 2, EWS-Oct-4; 레인 3, EWS-Oct- 4 (ΔEWS); 레인 4, EWS-Oct-4 (ΔExt); 레인 5, EWS-Oct-4 (ΔNTD); 레인 6, EWS-Oct-4 (ΔPOU); 레인 7, EWS-Oct-4 (ΔCTD); 레인 8, EWS-Oct-4 (V351P).

<158> 도 5a 내지 도 5c는 *인 비보*에서 EWS-Oct-4에 의한 Oct-4 다운 스트림 타겟 유전자의 전사적 활성화에 대한 실험결과를 보여준다.

<159> 도 5a는 사용된 발현벡터의 모식도이다. 발현벡터 pCAG-IP/EWS-Oct-4-EGFP 은 EGFP에 융합된 EWS-Oct-4에 대응한다. pCAG-IP/EGFP 발현 벡터는 대조군으로서 사용되었다. CAG 발현 단위(CAGs)은 어두운 박스로 표시되어 있고, EWS-Oct-4는 사선 박스로 표시되어 있고 EGFP는 흑색 박스로 표시되어 있다.

<160> 도 5b는 안정되게 형질전환된 ZHBTc4 ES 세포내에서 EWS-Oct-4 발현의 면역블로팅 분석 결과를 나타낸다. 총 세포 용해물을 (35 μg proteins) 12% SDS-PAGE로 분획한 후, 항-Oct-4 항체(C-20, Santa Cruz Biotechnology) 또는 항-actin 항체(I-19, Santa Cruz Biotechnology, lower panels)를 사용하여 웨스턴 블로팅에 의해 시각화하였다.

<161> 도 5c는 인 비보에서 EWS-Oct-4 에 의한 Oct-4 다운스트림 타겟 유전자들의 유도 결과를 보여준다. fgf-4 및 nanog mRNAs의 RT-PCR 분석을 벡터 또는 EWS-Oct-4 융합 단백질을 발현하는 ZHBTc4 ES 세포내에서 수행하였다. β-액틴을 표준화를 위해 사용하였다. 증폭에 이어서, 각 생성물의 일정량을 에티디움 브로마이드를 사용하여 겔을 염색하였다. RT에서 사용된 투입된 RNAs가 유래된 안정된 세포주를 패널의 상부측에 표시하였다.

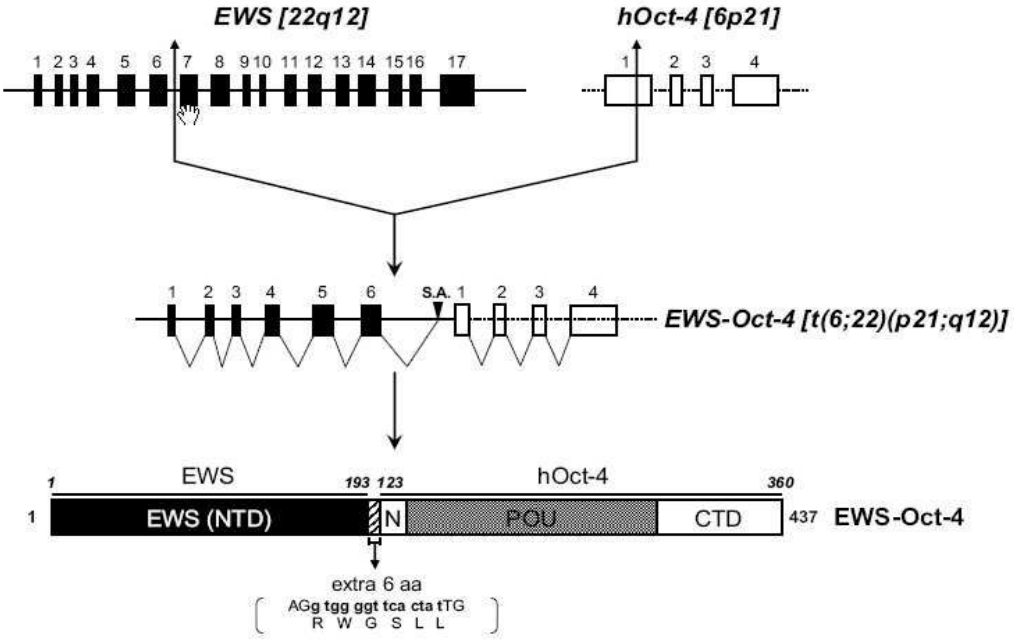
<162> 도 6a 및 도 6b은 누드 마우스에서 EWS-Oct-4-발현 ZHBTc ES 세포의 종양 유도 특성을 분석한 실험결과를 보여준다.

<163> 도 6a는 누드 마우스의 발달에 대한 EWS-Oct-4 발현의 영향을 보여준다. EWS-Oct-4 또는 벡터만을 발현하는 약 2 x 10^7 의 Oct-4-부존재 ZHBTc ES 세포를 0.1 ml PBS에 현탁시킨 후 5-주령의 Balb/c 흉선제거 누드 마우스에 주입하였다. 종양 발생을 관찰하고 사진을 주입 후 26일에 촬영하였다. 화살표는 누드 마우스상의 종양을 나타낸다.

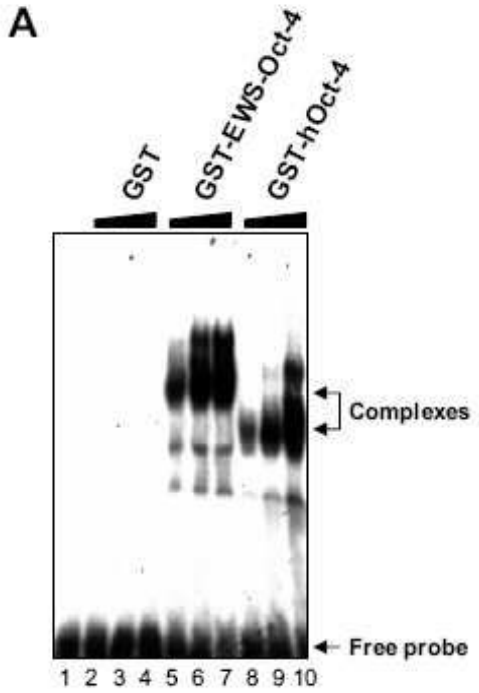
<164> 도 6b는 누드 마우스에서 EWS-Oct-4을 발현하는 Oct-4-부존재 ZHBTc4 ES 세포의 종양 성장의 결과를 보여준다. 각 동물에서 종양의 무게는 주입(n=6)후 26일에서 측정하였고 평균 증가량 ± S.E.으로 플로팅하였다.

도면

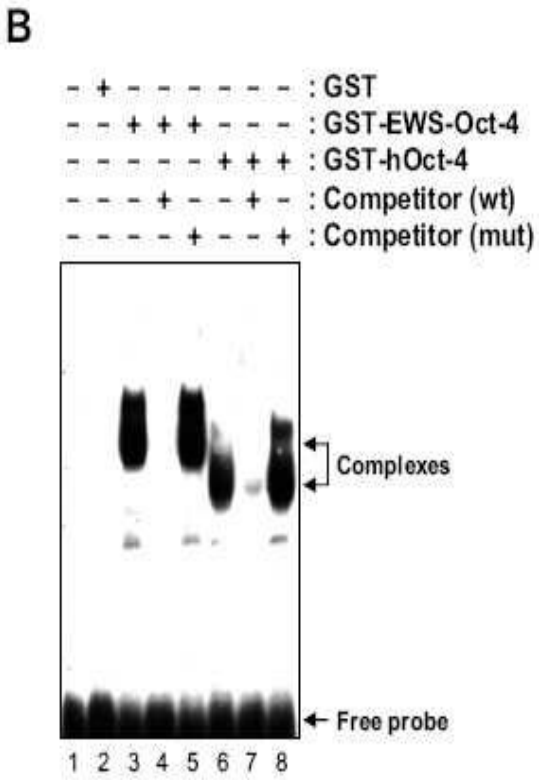
도면1


EWS [22q12]
hOct-4 [6p21]
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
1 2 3 4
1 2 3 4 5 6 S.A. 1 2 3 4
EWS-Oct-4 [t(6;22)(p21;q12)]
1
EWS
193 123
hOct-4
360
1
EWS (NTD)
N
POU
CTD
437
EWS-Oct-4
extra 6 aa
AGg tgg ggt tca cta tTG
R W G S L L

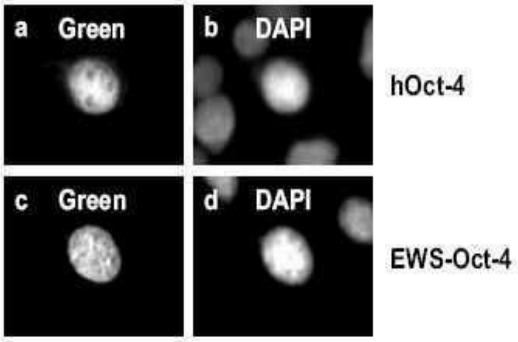
도면2a


A
GST
GST-EWS-Oct-4
GST-hOct-4
Complexes
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

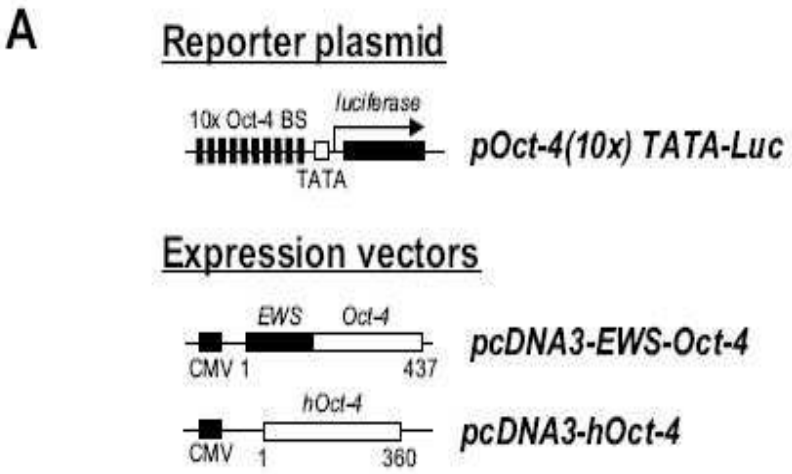
도면2b


B
- + - - - - - - : GST
- - + + + - - - : GST-EWS-Oct-4
- - - - - + + + : GST-hOct-4
- - - + - - + - : Competitor (wt)
- - - - + - - + : Competitor (mut)
Complexes
Free probe
1 2 3 4 5 6 7 8

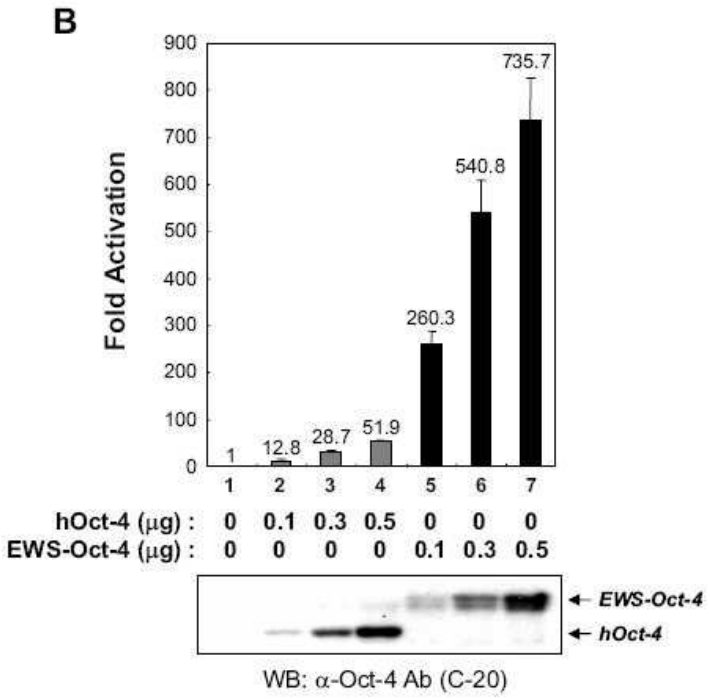
도면3


a Green
b DAPI
hOct-4
c Green
d DAPI
EWS-Oct-4

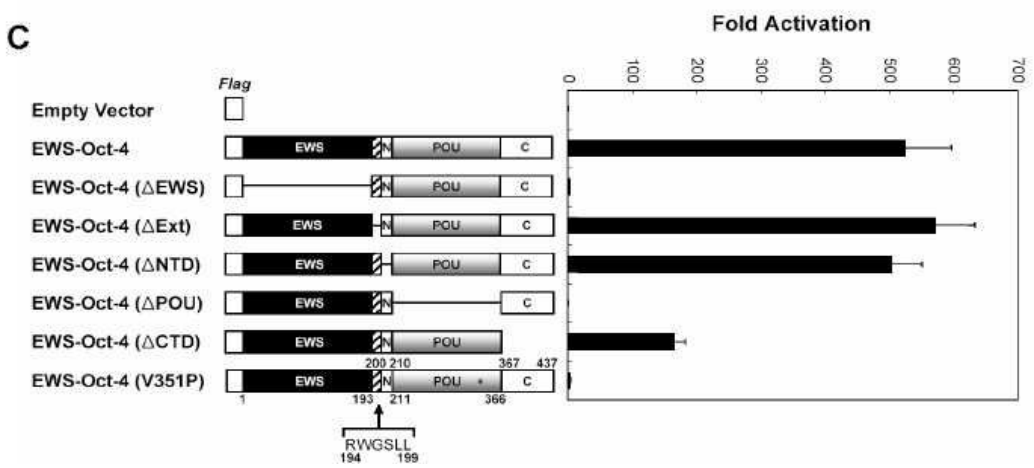
도면4a


A
Reporter plasmid
10x Oct-4 BS
luciferase
TATA
pOct-4(10x) TATA-Luc
Expression vectors
EWS
Oct-4
CMV 1
437
pcDNA3-EWS-Oct-4
hOct-4
CMV
1
360
pcDNA3-hOct-4

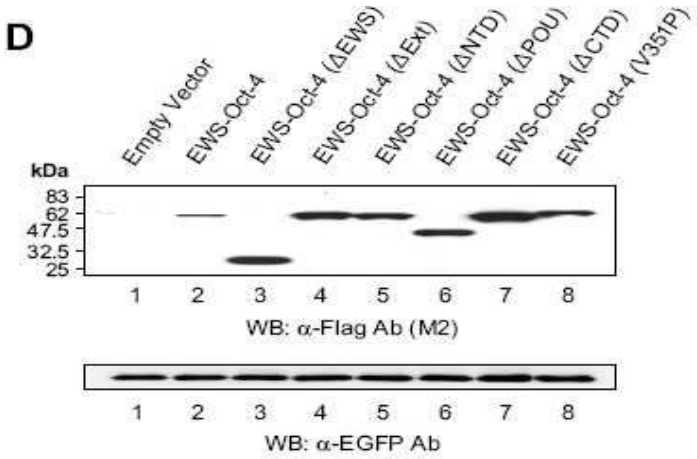
도면4b


B
Fold Activation
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
735.7
540.8
260.3
51.9
28.7
12.8
1
1 2 3 4 5 6 7
hOct-4 (μg) : 0 0.1 0.3 0.5 0 0 0
EWS-Oct-4 (μg) : 0 0 0 0 0.1 0.3 0.5
EWS-Oct-4
hOct-4
WB: α-Oct-4 Ab (C-20)

도면4c



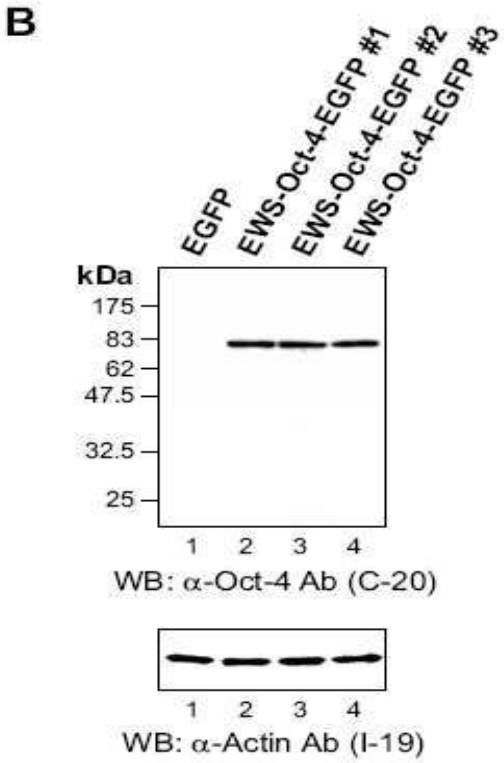
도면4d



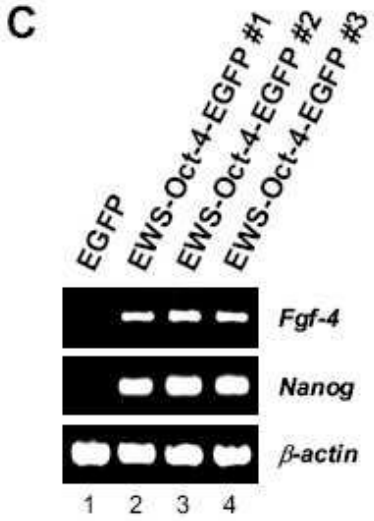
도면5a



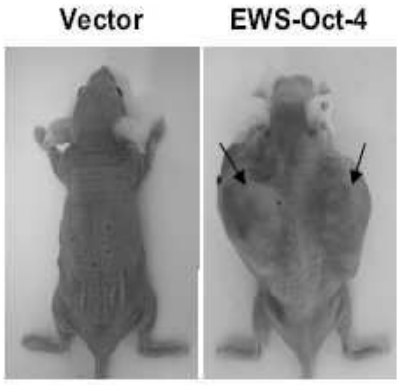
도면5b


B
EGFP
EWS-Oct-4-EGFP #1
EWS-Oct-4-EGFP #2
EWS-Oct-4-EGFP #3
kDa
175
83
62
47.5
32.5
25
1 2 3 4
WB: α-Oct-4 Ab (C-20)
1 2 3 4
WB: α-Actin Ab (I-19)

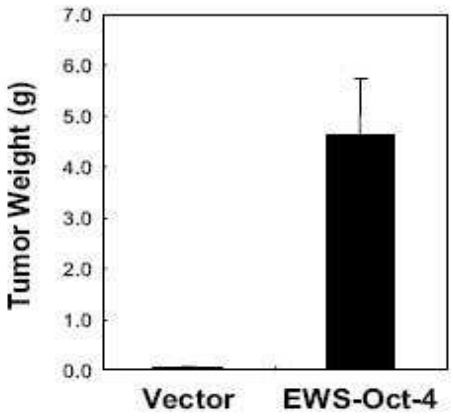
도면5c


C
EGFP
EWS-Oct-4-EGFP #1
EWS-Oct-4-EGFP #2
EWS-Oct-4-EGFP #3
Fgf-4
Nanog
β-actin
1 2 3 4

도면6a



도면6b



서 열 목 록

<110> Sogang University Corporation
<120> Method for screening anti-tumor agent having the ability of inhibiting transcription promoting activity of EWS-Oct-4 fusion protein

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 437
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Thr Tyr Ser Gln Ala Ala Ala Gln Gln
  1               5                  10                  15

Gly Tyr Ser Ala Tyr Thr Ala Gln Pro Thr Gln Gly Tyr Ala Gln Thr
             20                  25                  30

Thr Gln Ala Tyr Gly Gln Gln Ser Tyr Gly Thr Tyr Gly Gln Pro Thr
         35                  40                  45

Asp Val Ser Tyr Thr Gln Ala Gln Thr Thr Ala Thr Tyr Gly Gln Thr
     50                  55                  60

Ala Tyr Ala Thr Ser Tyr Gly Gln Pro Pro Thr Gly Tyr Thr Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Thr Ala Pro Gln Ala Tyr Ser Gln Pro Val Gln Gly Tyr Gly Thr Gly
                 85                  90                  95

Ala Tyr Asp Thr Thr Thr Ala Thr Val Thr Thr Thr Gln Ala Ser Tyr
            100                 105                 110

Ala Ala Gln Ser Ala Tyr Gly Thr Gln Pro Ala Tyr Pro Ala Tyr Gly
        115                 120                 125

Gln Gln Pro Ala Ala Thr Ala Pro Thr Arg Pro Gln Asp Gly Asn Lys
    130                 135                 140

Pro Thr Glu Thr Ser Gln Pro Gln Ser Ser Thr Gly Gly Tyr Asn Gln
145                 150                 155                 160

Pro Ser Leu Gly Tyr Gly Gln Ser Asn Tyr Ser Tyr Pro Gln Val Pro
                165                 170                 175

Gly Ser Tyr Pro Met Gln Pro Val Thr Ala Pro Pro Ser Tyr Pro Pro
            180                 185                 190

Thr Arg Trp Gly Ser Leu Leu Lys Leu Glu Lys Glu Lys Leu Glu Gln
        195                 200                 205

Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu
    210                 215                 220

Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr
225                 230                 235                 240
```

```
Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe
               245                 250                 255

Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys
            260                 265                 270

Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val Glu Glu Ala
        275                 280                 285

Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu Thr Leu Val
    290                 295                 300

Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Gly
305                 310                 315                 320

Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gln
               325                 330                 335

Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg
            340                 345                 350

Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ser Asp
        355                 360                 365

Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro Phe Ser Gly
    370                 375                 380

Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro
385                 390                 395                 400

Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser Val Pro Phe
               405                 410                 415

Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Gly Ser
            420                 425                 430

Pro Met His Ser Asn
        435
```

<210> 2
<211> 1314
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcgtcca cggattacag tacctatagc caagctgcag cgcagcaggg ctacagtgct 60

tacaccgccc agcccactca aggatatgca cagaccaccc aggcatatgg gcaacaaagc 120

tatggaacct atggacagcc cactgatgtc agctataccc aggctcagac cactgcaacc 180

tatgggcaga ccgcctatgc aacttcttat ggacagcctc ccactggtta tactactcca 240

actgcccccc aggcatacag ccagcctgtc caggggtatg gcactggtgc ttatgatacc 300

accactgcta cagtcaccac cacccaggcc tcctatgcag ctcagtctgc atatggcact 360

cagcctgctt atccagccta tgggcagcag ccagcagcca ctgcacctac aagaccgcag 420

gatggaaaca agcccactga gactagtcaa cctcaatcta gcacaggggg ttacaaccag 480

cccagcctag gatatggaca gagtaactac agttatcccc aggtacctgg gagctacccc 540

atgcagccag tcactgcacc tccatcctac cctcctacca ggtggggttc actattgaag 600

ctggagaagg agaagctgga gcaaaacccg gaggagtccc aggacatcaa agctctgcag 660

aaagaactcg agcaatttgc caagctcctg aagcagaaga ggatcaccct gggatataca 720

caggccgatg tggggctcac cctgggggtt ctatttggga aggtattcag ccaaacgacc 780

atctgccgct ttgaggctct gcagcttagc ttcaagaaca tgtgtaagct gcggcccttg 840

ctgcagaagt gggtggagga agctgacaac aatgaaaatc ttcaggagat atgcaaagca 900

gaaaccctcg tgcaggcccg aaagagaaag cgaaccagta tcgagaaccg agtgagaggc 960

aacctggaga atttgttcct gcagtgcccg aaacccacac tgcagcagat cagccacatc 1020

gcccagcagc ttgggctcga gaaggatgtg gtccgagtgt ggttctgtaa ccggcgccag 1080

aagggcaagc gatcaagcag cgactatgca caacgagagg attttgaggc tgctgggtct 1140

cctttctcag ggggaccagt gtcctttcct ctggccccag ggccccattt tggtacccca 1200

ggctatggga gccctcactt cactgcactg tactcctcgg tccctttccc tgagggggaa 1260

gcctttcccc ctgtctctgt caccactctg ggctctccca tgcattcaaa ctga 1314