



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0056239
(43) 공개일자 2017년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6886 (2013.01)

C12Q 1/6869 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0159661

(22) 출원일자 2015년11월13일

심사청구일자 2015년11월13일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

최지하

서울특별시 양천구 목동동로 430, 612동 802호

천재희

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 103동 501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

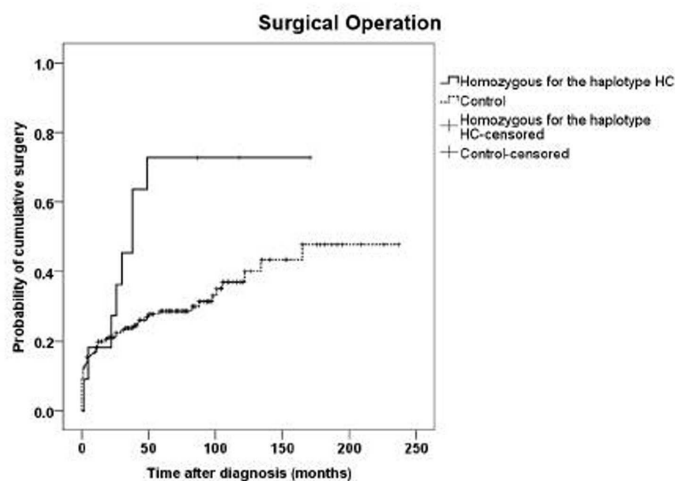
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **크론병의 임상적 특성의 예측 방법**

(57) 요약

본 발명은 *OCIN2*(organic cation/carnitine transporter2) 유전자 다형성(polymorphism)을 이용하여 크론병(crohn's disease)의 임상적 특성을 예측하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 *OCIN2* 유전자의 일배체형 중 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형은 참조(reference)의 일배체형과 비교하여 낮은 프로모터의 활성을 나타내고, 공장 침범성(jejunal involvement) 및 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications) 발생과 현저하게 연관되어 있어, 입원 및 외과적 수술을 진행하는 경우가 많음을 확인함으로써, 본 발명의 *OCIN2*의 유전적 변이체 및 일배체형을 확인할 수 있는 키트는 크론병의 임상적 특성 예측에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

(72) 발명자

박효진

경기도 수원시 권선구 권선로694번길 26, 212동
1402호

정은석

서울특별시 서초구 현릉로8길 22, 302동 1405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111218-PG03

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-차세대 맞춤의료 유전체 사업단

연구과제명 양이온계 약물 SLC 수송단백 연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2015.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)

연구과제명 조진손상방어연구센터-(1총괄3세부)만성염증질환 진단키트 개발 및 세포치료 연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

OCTN2(organic cation/carnitine transporter2)의 프로모터 부위에서 g.-1889T>C 및 g.-945T>G의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 각각 포함하는 10 내지 100개의 연속되는 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 크론병(Crohn's disease; CD)의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 *OCTN2* 프로모터 서열은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 SNP는 일배체형(haplotype)을 형성하는 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 임상적 특성은 공장 침범성(jejunal involvement) 확률, 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications)이 일어날 확률, 또는 입원 및 외과적 수술을 진행할 확률인 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 5

*OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 SNP는 일배체형을 검출할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 임상적 특성은 공장 침범성 확률, 비-항문주위 침투 합병증이 일어날 확률, 또는 입원 및 외과적 수술을 진행할 확률인 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트.

청구항 8

1) 피험자에서 분리된 게놈 DNA로부터 *OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출하는 단계;

2) 상기 두 개의 SNP를 갖는 개체를 크론병에 대한 임상적 특성이 높게 나타나는 것으로 판단하는 단계; 를 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 단계 1)의 SNP 검출은 EST sequence data, Array Analysis, Amplicon resequencing, 또는 Genome sequencing으로 구성된 방법 중에서 선택하여 수행하는 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 단계 2)에서 SNP들은 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형을 형성하는 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 단계 2)의 두 개의 SNP를 가지면 *OCTN2* 프로모터의 활성도가 낮고, 공장 침범성 확률, 비-항문주위 침투 합병증이 일어날 확률, 또는 입원 및 외과적 수술을 진행할 확률이 높은 것을 특징으로 하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2) 유전자 다형성(polymorphism)을 이용하여 크론병(crohn's disease)의 임상적 특성을 예측하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 크론병(Crohn's disease; CD)은 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease; IBD)의 일종으로써, 유전적 및 환경적인 요인들의 조합에 의해 야기되는 면역-매개의 질환이다. 크론병에 대한 가장 일반적인 환경적 위험 요소인 흡연에 더하여, 위생, 모유수유, 항생제 사용, 및 서양식 식단과 같은 다양한 환경적 요인들이 크론병의 위험성을 증가시킨다고 알려져 있다. 이러한 환경적인 위험 요소들은 중요하다고 생각되지만, 크론병을 갖게 만드는 유전적 배경 또한 쌍둥이 및 가족적 연구, 및 민족-특이적인 연구에 설명된 것처럼 중요하게 인식된다. 특히, 크론병 감수성에대한 환경적인 위험 요소들의 역할을 조사한, 이민자들에 대한 최근 연구는 특정 민족, 특히 아시아인에서, 크론병의 높은 발병을 보이는 다른 민족들과 비슷한 환경에 노출되어 있음에도 불구하고 낮은 크론병의 발병을 나타냄이 밝혀졌다. 이러한 크론병에서의 특징적이고 집단-특이적인 패턴은 민족-특이적인 유전성 연구로부터 충분한 정보의 수집이 크론병의 민족 특이적인 유전적 발병을 이해하기 위해 매우 유용하게 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0004] 전장유전체연관분석연구(genome-wide association study)와 같은 유전적 접근의 발전은 인간 게놈에서 크론병 및 염증성 장 질환에 연관된 140개의 유전자 및 유전자 위치(loci)를 확인할 수 있게 하였다. 이전의 유전적 연구들은 *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*, *IBD5*, 및 *TNFSF15* 등의 유전자들이 크론병과 연관이 있음을 보고하였다. 이 중에서, 세포내부의 패턴 인식 수용체(intracellular pattern recognition receptor) 및 자기소화(autophagy) 유도체인 *NOD2*, *ATG16L1* 및 *IRGM*과 같은 자기소화-연관된 단백질들은 크론병의 발병에 연관되어 있음이 알려져 있다; 상기 결과는 자기소화가 장표피(intestinal epithelium)에서 숙주-미생물 작용을 유지하는 중요한 역할을 함을 제시한다. 특정 *TNFSF15* 다형성은 다양한 집단에서 크론병의 감수성과 연관이 있을 뿐만 아니라, 임상적인 진단과도 연관이 있는데, 이는 환자의 유전적 정보가 독립적인 예측 요인임을 나타낸다. 이러한 연구들과 같이, 장표피에서 유전적으로 민감한 개체들에서 다양한 환경적 요인들이 숙주-미생물 항상성을 방해하였을 때, 크론병의 발달 및 진행에 기인하는 비정상적인 면역 반응 및 만성적 염증이 일어날 수 있다.

[0005] 하지만, 크론병의 발명 및 상기에 기재된 단백질들의 역할에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0007] OCTN2(organic cation/carnitine transporter 2)는 *IBD5* 영역에 있는 크로모좀 5q31에 위치해 있고, 신장, 골격근, 태반, 심장, 췌장, 간, 폐, 장, 및 뇌에 존재하는 세포에서 골고루 발현되는 polyspecific membrane transporter이다. 최근 연구들은 장표피의 염증성 부위에서 OCTN의 발현 수치는 비염증성 부위보다 더 높음을 밝혔다. OCTN2는 세포외부로부터 세포내부의 공간으로 나트륨-의존적인 방법으로 이동되는 미토콘드리아 내 지방산의 β -산화(β -oxidation)에 연관된 조효소인 카르니틴(carnitine), 양성자-의존적인 방법으로 반대 방향으로 이동되는 테트라에틸암모늄(tetraethylammonium)과 같은 기질들에 대한 양방향성 수송을 매개한다. 게다가, 베라파밀(verapamil), 세팔로리딘(cephaloridine), 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)과 같은 다양한 생체화합물(xenobiotics)로 수송하는 OCTN2의 능력은 약동학 및 약력학의 영역에서 상기 단백질이 잠재적으로 유용하게 사용될 수 있게 한다. 게다가, 몇몇의 *OCTN2* 변이체들은 primary systemic carnitine deficiency(SCD), 천식, 및 크론병과 같은 인간의 질병과 연관되어 있음이 밝혀졌다. 예를 들면, 다수의 *OCTN2* 변이체들은 카르니틴의 불충분한 흡수에 따른 점진적인 골격 근육병(progressive skeletal myopathy) 및 심근증(cardiomyopathy)을 포함하는 증상을 보이는 SCD와 연관이 되어 있음이 알려져 있어, *OCTN2*가 상기 질병의 주요 유발 유전자임이 확인되었다.

[0008] 현재까지, *OCTN2*의 몇 개의 기능적 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphisms; SNPs)이 확인 및 특성화되었는데, 예를 들어, *OCTN2*의 비-동의적(nonsynonymous) 다형성인 F17L은 세포막으로의 이동에 결함이 있어 불완전한 기능을 하는 수송체를 암호화하고 있어, 직접적으로 수송체의 수송에 영향을 미친다고 알려져 있다. 특히, 현재까지, 다양한-민족 집단에서 *OCTN2* 및 *OCTN1*의 기초적 프로모터 영역에 존재하는 기능적인 변이체들을 조사한 Tahara 등에 의한 연구를 제외하고(Tahara, H 등, 2009), *OCTNs*의 기능적인 프로모터 변이체를 특성화한 데이터는 거의 알려진 바가 없다. 이전의 연구에서, Peltekova 등은 크론병의 감수성과 *OCTNs*의 TC 일배체형, 즉, *OCTN1* L503F, rs1050152, 및 *OCTN2* g.-207G>C, rs2631367 간의 연관을 보고하였다(Peltekova, V.D. 등, 2004). 상기 결과는 나중에 전체 집단에서 몇몇의 연관성에 의해 검증되었다(Martinez, A 등, 2006; Tomer, G. 등, 2009; Leung, E. 등, 2006). 하지만, 상기 두 개의 *OCTN* 다형성은 아시아 집단에서는 없는 것으로 밝혀졌고(Li, M. 등, 2008; Yamazaki, K. 등, 2004; Tosa, M. 등, 2006), 이전의 연관된 연구들의 주요한 한계는 *OCTNs*의 TC 일배체형에 집중되었다는 점이다. 그러므로, *OCTNs*의 다른 크론병-연관된 다형성을 확인하는 것이 크론병에서 *OCTNs*의 기능적인 역할을 확증하기 위해 필요하다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 *OCTN2* 유전자의 일배체형 중 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형은 참조(reference)의 일배체형과 비교하여 낮은 프로모터의 활성을 나타내고, 공장 침범성(jejunal involvement) 및 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications) 발생과 현저하게 연관되어 있어, 입원 및 외과적 수술을 진행하는 경우가 많음을 확인하여, 본 발명의 *OCTN2*의 유전적 변이체 및 일배체형을 확인할 수 있는 키트는 크론병의 임상적 특성 예측에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2) 유전자 다형성(polymorphism)을 이용하여 크론병(crohn's disease)의 임상적 특성을 예측하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2)의 프로모터 부위에서 g.-1889T>C 및 g.-945T>G의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 각각 포함하는 10 내지 100개의 연속되는 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 크론병(Crohn's disease; CD)의 임상적 특성 예측용 키트를 제공한다.

- [0015] 또한, 본 발명은 *OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트를 제공한다.
- [0016] 아울러, 본 발명은
- [0017] 1) 피험자에서 분리된 게놈 DNA로부터 *OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출하는 단계;
- [0018] 2) 상기 두 개의 SNP를 갖는 개체를 크론병에 대한 임상적 특성이 높게 나타나는 것으로 판단하는 단계; 를 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에서 확인한 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2) 유전자의 일배체형 중 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형은 참조(reference)의 일배체형 보다 낮은 프로모터의 활성을 나타내고, 공장 침범성(jejunal involvement) 및 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications) 발생과 현저하게 연관되어 있어, 입원 및 외과적 수술을 진행하는 경우가 많음을 확인함으로써, 본 발명의 *OCTN2*의 유전적 변이체 및 일배체형을 확인할 수 있는 키트는 크론병의 임상적 특성 예측에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 *OCTN2* 프로모터 영역의 일배체형 또는 유전적 변이체들의 루시퍼라제 활성을 나타낸 도이다:
REF: 참조(reference).
- 도 2는 EMSA를 통한 *OCTN2* 프로모터에 대한 전사 인자와 유전적 변이체간의 작용을 확인한 도이다.
- 도 3은 *OCTN2* 프로모터 활성에 대한 NF-E2 및 YY1의 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4는 후속조치 동안 한국인 크론병 환자들에서 누적된 수술 곡선의 개연성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0026] 본 명세서에서, 용어 “감수성(susceptibility)”은 개체에서 특정 질병이 발병할 위험도를 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0028] 본 명세서에서 용어 “단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(C 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population)내에서, SNP는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 인간 집단 내에서 변이성(variations)이 존재하며, 지질학적 또는 민족적 군에서 공통적인 하나의 SNP 대립 유전자는 매우 희귀하다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다.
- [0029] 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic

regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불림), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비정숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.

[0030] 인간의 DNA 서열상의 변이성은 병의 발병 및 인간이 어떻게 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 반응하는가에 영향을 미칠 수 있다. 또한, SNP는 맞춤형 의학의 개념을 실현하기 위한 중요한 도구(key enabler)로 생각된다. 무엇보다도, 최근에 마커로서 활발하게 개발되고 있는 SNP는 질병을 가지거나 또는 가지지 않는 군들 간에 게놈 부위를 비교함으로써 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 가장 중요하다. SNP는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 추측되고 있다(Sachidanandam 등., 2001). SNP는 매우 안정된 유전적 마커이고, 때때로 표현형에 직접적인 영향을 미치며, 자동화된 유전자형규명 시스템에 매우 적합하다(Landegren 등., 1998; Isaksson et al., 2000). 또한, SNP 연구는 곡식 및 가축 육성 프로그램에서도 중요하다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오티드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오티드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오티드 또는 비-자연 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오티드도 포함할 수 있다.

[0032] 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 프라이머는 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

[0033] 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오티드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오티드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

[0034] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오티드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오티드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0035] 본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(Rogers 및 Bendich, 1994).

[0036] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간으로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, 등., Science, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. 등., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

[0037] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 특정 서열을 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수

있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 시투 혼성화 (FISH), 직접적 염기서열 분석, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita 등., PNAS, USA 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein 등., Genomics, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell 등., Nucl.Acids Res., 18:2699(1990)), 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 SNP를 포함하는 서열에 상보적인 프로브 또는 프라이머를 이용한다.

[0040] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2)의 프로모터 부위에서 g.-1889T>C 및 g.-945T>G의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 각각 포함하는 10 내지 100개의 연속되는 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 크론병(Crohn's disease; CD)의 임상적 특성 예측용 키트를 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 *OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출할 수 있는 프로브 또는 프라이머 쌍을 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측용 키트를 제공한다.

[0042] 상기 *OCTN2* 프로모터 서열은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것이 바람직하고, 상기 SNP는 일배체형(haplotype)을 형성하는 것이 바람직하며, 상기 임상적 특성은 공장 침범성(jejunal involvement) 확률, 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications)이 일어날 확률, 또는 입원 및 외과적 수술을 진행할 확률인 것이 바람직하다.

[0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 서로 친족관계가 아닌 건강한 48명의 한국인으로부터 DNA 샘플을 수집하여 *OCTN2* 유전자의 세 개의 일배체형을 확인하였고(표 2 참조), 그 중 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형은 참조(reference)의 일배체형과 비교하여 낮은 프로모터의 활성을 나타내고(도 1a 참조), 공장 침범성(jejunal involvement) 및 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications) 발생과 현저하게 연관되어 있어(표 5 참조), 입원 및 외과적 수술을 진행하는 경우가 많음을 확인하였다(도 4 참조).

[0045] 따라서, 본 발명의 *OCTN2*(organic cation/carnitine transporter2) 유전자 다형성(polymorphism)을 이용하는 키트는 크론병(crohn's disease)의 임상적 특성을 예측하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0047] 아울러, 본 발명은

[0048] 1) 피험자에서 분리된 게놈 DNA로부터 *OCTN2*의 프로모터 부위에서 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 검출하는 단계;

[0049] 2) 상기 두 개의 SNP를 갖는 개체를 크론병에 대한 임상적 특성이 높게 나타나는 것으로 판단하는 단계; 를 포함하는 크론병의 임상적 특성 예측 방법을 제공한다.

[0050] 상기 단계 1)의 SNP 검출은 EST sequence data, Array Analysis, Amplicon resequencing, 또는 Genome sequencing으로 구성된 방법 중에서 선택하여 수행하는 것이 바람직하고, Genome sequencing 중 직접 염기서열 분석(direct sequencing)으로 수행하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서는 직접 염기서열 분석 수행 후, 일배체형은 Haploview 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0051] 또한, 단계 2)에서 SNP들은 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형을 형성하는 것이 바람직하며, 단계 2)의 두 개의 SNP를 가지면 *OCTN2* 프로모터의 활성도가 낮고, 공장 침범성 확률, 비-항문주위 침투 합병증이 일어날 확률, 또는 입원 및 외과적 수술을 진행할 확률이 높은 것이 바람직하다.

[0053] 본 발명의 방법이 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 방법은 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키지 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

- [0054] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시된다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.
- [0055] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 감수성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0056] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.
- [0057] 본 발명의 방법은 마이크로어레이 방식으로 실시될 수도 있다. 본 발명의 방법이 마이크로어레이 방식에 의하는 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어있다.
- [0058] 본 발명의 방법에서 이용되는 프로브는 상기 나열한 본 발명의 SNP를 포함하는 각 유전자상의 10-100개의 연속 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 갖는다.
- [0059] 프로브 제작 시 참조하여야 하는 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 GenBank에서 확인할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 뉴클레오티드는 GenBank SNP 데이터베이스 rs2631370 및 rs34786243에 뉴클레오타이드 서열이 개시되어 있으며, 이 서열을 참조하여 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [0061] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0062] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5(Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐(hapten)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션(nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0064] 본 발명에서, *OCTN2* 유전자의 세 개의 일배체형 중 g.-1889가 C 및 g.-945가 G인 일배체형은 참조(reference)의 일배체형과 비교하여 낮은 프로모터의 활성을 나타내고, 공장 침범성 및 비-항문주위 침투 합병증 발생과 현저하게 연관되어 있어, 입원 및 외과적 수술을 진행하는 경우가 많음을 확인함으로써, 본 발명은

OCTN2(organic cation/carnitine transporter2) 유전자 다형성(polymorphism)을 이용하여 크론병(crohn's disease)의 임상적 특성을 예측하는 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0067] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0069] <실시예 1> *OCTN2* 프로모터 영역의 유전적 변이체 및 일배체형의 확인

[0070] *OCTN2* 유전자의 프로모터 영역에 존재하는 유전적 변이체 및 일배체형을 확인하기 위하여, *OCTN2* 프로모터의 유전적 분석을 수행하였다.

[0071] 구체적으로, 본 발명은 이화의료원(대한민국, 서울)의 연구심사위원회(Institutional Review Board)로부터 검토 및 승인을 받아 진행하였다. 모든 실험은 이화의료원의 연구심사위원회의 적절한 지침 및 규정을 따라서 수행하였다. *OCTN2* 프로모터의 유전적 변이체를 확인하기 위하여, 서울대학교 한국 약물유전체 연구 네트워크(대한민국, 서울)의 유전자 은행에서 서로 친족관계가 아닌 건강한 48명의 한국인으로부터 획득한 DNA 샘플을 이용하여 2,166bp PCR 단편(번역 시작점으로부터 -2,354 에서 -189bp)을 증폭하고 직접 염기서열 분석을 실시하였다. 일배체형 조합(haplotype assembly)은 Haploview 소프트웨어(버전 4.3, Broad Institute, Cambridge, MA, 미국)를 사용하여 수행하였다. 뉴클레오타이드 위치 번호(nucleotide location numbers)는 *OCTN2*의 mRNA 염기서열(GenBank 등록 번호, NM_003060.3)에 있는 번역(translation) 시작 위치로부터 지정하였다.

[0072] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 0.021 내지 0.427 범위의 대립유전자형 빈도(minor allele frequency)를 갖는 열 개의 *OCTN2* 프로모터 변이체를 확인하였고, 이중 하나는(g.-299G>C) 신규한 것으로 확인되었다(표 1). 본 발명에서 모든 변이체의 이름은 인간유전체다형성협회(Human Genome Variation Society; HGVS) 명명법으로 확인하였다. 함께 물려받을 수 있는 경향이 있는 변이체들의 조합을 확인하기 위하여, 개체들의 유전형 데이터를 수집하였고 일배체형을 생성한 뒤, Haploview 4.3 프로그램으로 분석하였다. 그 결과, 총 3개의 일반적인 (5% 이상의 빈도를 갖는) 주요한 일배체형(H1 내지 H3)을 확인하였고, 이들의 자세한 조성 및 빈도는 표 2에 나타내었다. 상기 일배체형 중, 미국 국립생물학정보센터(National Center for Biotechnology Information)의 데이터베이스의 NM_003060.3에 기초하고, 본 실험에서 가장 높은 빈도(40.6%)를 나타낸 H1 일배체형을 참조(reference) 일배체형으로 사용하였다.

표 1

[0073]

rs 번호	변이체	소수 대립 유전자	빈도
rs2631372	g.-2087G>C	C	0.313
rs2631371	g.-1974G>A	A	0.313
rs2631370	g.-1889T>C	T	0.427
rs186829555	g.-1679C>G	G	0.021
rs34786243	g.-945T>G	G	0.255
rs4646298	g.-446C>T	T	0.260
rs2631369	g.-399T>C	G	0.313
rs2631368	g.-368T>G	G	0.313
-	g.-299G>C	C	0.021
rs4646300	g.-234C>G	G	0.032

표 2

[0074]

ID	g.-2087 G>C	g.-1974 G>A	g.-1889 T>C	g.-1679 C>G	g.-945 T>G	g.-446 C>T	g.-399 T>C	g.-368 T>G	g.-299 G>C	g.-234C> G	빈도
H1	G	G	T	C	T	C	G	T	G	C	0.406
H2	C	A	C	C	T	C	C	G	G	C	0.280
H3	G	G	C	C	G	T	G	T	G	C	0.240

- [0075] SNP는 굵은 글씨체로 표시하였다.
- [0076] 소수 대립 유전자(minor allele)는 밑줄 친 글씨체로 표시하였다.
- [0078] <실험예 1> *OCTN2* 프로모터 활성화에 대한 일배체형 및 변이체의 기능적인 영향 확인
- [0079] <1-1> 세포 배양
- [0080] HCT-116 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB, 서울, 대한민국)에서 분양받아 사용하였다. 상기 세포는 10% 불활성화 우태아 혈청, 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640(WELGENE Inc, 서울, 대한민국)을 사용하여 배양하였고, 5% CO₂의 37℃ 배양기에서 유지하였다.
- [0082] <1-2> *OCTN2* 프로모터 염기서열 및 이들의 변이체들의 리포터 플라스미드의 제조
- [0083] *OCTN2* 참조 서열의 프로모터 영역을 포함하는 루시페라제(luciferase) 리포터 플라스미드를 제작하기 위하여, 전사 시작 위치에 대하여 -2,490에서 +128로 연장되어 있는 인간 *OCTN2* 유전자의 2,618bp는 NM_00360.3을 따르는 참조 서열을 갖는 개체로부터 획득한 유전자 DNA 샘플로부터 증폭하였다(*OCTN2* 유전자 프로모터: 서열번호 1). 그런 다음, 상기 증폭된 생성물을 pGL4.11[*luc2P*] 벡터(Promega Corporation, Madison, WI, 미국)의 NheI 및 KpnI(Enzymomics, 대전, 대한민국) 제한효소 위치 사이에 삽입하였다. 프로모터 영역의 유전적 변이체를 포함하는 변형된 pGL4.1-OCTN2 벡터는 Quik-Change[®] II Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, 미국)를 사용하여 제조사의 지시를 따라 수행하였다. 상기에서 사용된 프라이머는 표 4에 나타내었고, 모든 재조합 유전자는 직접 염기서열에 의해 확인하였다.

표 3

[0084]

OCTN2(SLC22A5) 유전자 프로모터 염기서열	
tgctgaaggtataacccatccatcttcaggaagtaagaatagtgaatagta agtataaagaacaacaagtcctgtgataacatctttatcataattttt ttaagtctattatgctttatgcaaatgttagatttccttggtaaaaatc tgctggccaggttaggttcctttctgtagctttattttcaactcataat atagtactatttaatatctttactcaacacattatattgtaaaaatat acacttagttctgtttctatcactaagccactactattttaaaaggaat atcttgcatgtttaagtttagcagcccaaatctttaaaggccttaggaat ggtgctgtccaataagataaccaatagctacatgtggctactgagcactt aaaaaatgagctctggccagcatagtggtcacgtctgtaatcagcatt ttgggaggctgaggtgggaggattgcttaaacccaggagctctgagaccag cctgggcaacacagggatgccttgtctctgtaaaaataaaaaaataaaaa aattagctgggcacggtggcatgtgcctgtagtcttagctactcagcagg ctgaggcaggaggccacttaagcttaggagttcagggtgctgctgagct atgattgtgccactgcactctagcctgggtgacacagtgaggacctgtct ccaataaataaatgaataaataaattaaaaataaaaagtgtggctag tccaaattgaaatgtgctgtaaaatacacactggattcctttttttttt ttttcaaatcctgagaacctgtgaaacacactgaattcttaagatttagt atgaggaggggaaaaaagatcaatgattacataaacaatgtaaaata tcaataatttctatatgtattatgatgaaatgatcatgttctggatat acttgattaaataataccattaaagttaatctcttttatttttacttt ttaaatatgcagcattgccaataaaaatacaggacaaccagttacatttt tattttatatatctctgctgggacataaatttaaaaattattcattct atatctgaaattcaaatttaactaggagtcctatatttttatttgcataa tctggcaattttattaatatggctactagaaaagttaacataacaatgt agctccttatcctatggaacattgctgctttagaatcacctcgctgcctt tttttttttccagttagcttctgaataaactctgcacggaataactaa tctgtggggaatatttaaccctaggctaggatcgttaatcgtgaagttaa atttttacatctgcatgaacaaaatggcttggtacagacgaaaatgtgga aagggcactctggactagaatgaaaagtcataagctcccagcctctctacta gggtagttaacagctcccaggttcaaaaataatccccgtccctcttataaga tttagcggtgtcaagagcaactatctgtgagaccctgggacagtgacttt ctctttacctccgcccccaagtaggccttgcaaaaagctgggagggtgc gttttcaacactggagcttcgcggccgctctcccactcgctccccgccg gcgctagaggagcgagttcggactcggaccccaaggcctcgagtcccgt gccttcttaagccgagccccgggtacctcggtcgtcccagcaggttgg ctggcagaggccggcctcgccaggtcccagacaggccccgccgggc ctcaggtgcactccggcccgccccgcgcctcgcgctccgccccagctc	

표 4

[0085]

OCTN2 프로모터 클로닝을 위한 프라이머 ^a (-2,490에서 +128; 2,618bp)	
정방향(KpnI 위치)	5'-CAG GTA CCA CTG GAC GGC ACC ATC TTA G-3' (서열번호 2)
역방향 (NheI 위치)	5'-CAG CTA GCA TCA GGA ACA CGG AGG ACA G-3' (서열번호 3)
OCTN2 돌연변이생성(mutagenesis) PCR을 위한 프라이머 ^b	
g.-2087G>C	5'-GAA GGT ATA ACC ATC CAT CTT CAC GAA GTA AGA ATA GTG AAT AGT AA-3' (서열번호 4)
g.-1974G>A	5'-TAT GCA AAT GTT TAG ATT TCC TTA TTA AAA ATC TGC TGG CCA GGT TA-3' (서열번호 5)
g.-1889T>C	5'-CTC ATA ATA TAG TGA CTA TTA AAT ATT CTT TAC CCA ACA CAT TAT ATT GTA AAA ATA TAC ACT TAG T-3' (서열번호 6)

g.-945T>G	5'-CTA TAT TTT TAT TTG CTA AAT CTG GCA ATT TTA TTA ATA GGG CTA CTA GAA AAG TTA ACA-3' (서열번호 7)
g.-446C>T	5'-CTA GAG GAG CGA GTT TGG ACT CGG ACC CC-3' (서열번호 8)
g.-399G>C	5'-GCC TTC CTA AGC CGA CCC CGG GCT-3' (서열번호 9)
g.-368T>G	5'-TCC CCA GCA GGC GTG GCT GGC AGA G-3' (서열번호 10)
EMSA를 위한 올리고뉴클레오타이드	
참조(g.-1889T) ^b	5'-AAT ATT CTT TAC TCA ACA CAT TAT A-3' (서열번호 11)
변이체(g.-1889C) ^b	5'-AAT ATT CTT TAC CCA ACA CAT TAT A-3' (서열번호 12)
공통(consensus) NF-E2 ^c	5'-CCT CCA GTG ACT CAG CAC AGG TTC C-3' (서열번호 13)
변형 공통(mutant consensus) NF-E2 ^d	5'-CCT CCA GTG CTG TCG CAC AGG TTC C-3' (서열번호 14)
참조(g.-945T) ^b	5'-ATT TTA TTA ATA TGG CTA CTA GAA A-3' (서열번호 15)
변이체(g.-945G) ^b	5'-ATT TTA TTA ATA GGG CTA CTA GAA A-3' (서열번호 16)
공통 YY1 ^c	5'-CGC TTC CCG GCC ATC TTG GCG GCT GGT-3' (서열번호 17)
NF-E2 클로닝을 위한 프라이머 ^a	
정방향(HindIII 위치)	5'-CGA AGC TTC TAG AGC CAT CTG GGC TGT C-3' (서열번호 18)
역방향(XhoI 위치)	5'-CGC TCG AGA ATC CCA TCA GCA GTT CCA C-3' (서열번호 19)

[0086] ^a제한효소 위치는 밑줄 친 굵은 글씨체로 표시하였다.

[0087] ^bSNP 위치는 밑줄 친 굵은 글씨체로 표시하였다.

[0088] ^c전사 인자의 공통 서열은 밑줄 친 굵은 글씨체로 표시하였다.

[0089] ^d공통 서열에서의 변화는 밑줄 친 굵은 글씨체로 표시하였다.

[0091] <1-3> OCTN2 프로모터 변이체들의 특성 확인

[0092] OCTN2 프로모터 변이체들의 특성을 확인하기 위하여, 상기 실험예 <1-2>에서 제조된 OCTN2 프로모터 영역의 참조 또는 다른 일배체형 염기서열을 포함하는 리포터 플라스미드를 이용하여 하기 실험을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 리포터 플라스미드들은 인간 대장암 세포(human colorectal carcinoma; HCT-116)에 일시적으로 형질전환하였고, 이들의 프로모터 활성은 루시페라제 분석을 이용하여 이전에 기술한 방법(Park, H.J. & Choi, J.H. (2014))으로 측정하였다. 간략하게, 60~80% 밀집도의 HCT-116 세포를 Lipofectamine LTX 및 Plus 시약(Life Technologies, Carlsbad, CA, 미국)을 사용하여 상기 실험예 <1-2>의 리포터 플라스미드를 형질전환하였다. 형질전환 48시간 후에, 프로모터 변이체들의 활성을 분석하기 위하여 Dual-luciferase[®] 리포터 분석 시스템 및 Glomax 96-well plate luminometer(Promega, Fitchburg, WI, 미국)를 사용하였다. 상대적인 루시페라제 활성은 반딧불이와 레닐라(Renilla) 루시페라제 활성의 비율로서 정의하였다.

[0094] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 주요 프로모터 일배체형 중 하나인 H3가 현저하게 감소된 프로모터 활성을 나타냄을 확인하였고, 반면 또 다른 일배체형인 H2의 프로모터 활성은 참조의 것과 비슷하였다(도 1a).

[0095] 또한, H3 프로모터 활성을 감소시키는 데 관여하는 변이체를 확인하기 위하여, H3에 존재하는 각각의 변이체를 포함하는 벡터를 제조하였고 이들의 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, H3에 존재하는 두개의 다형성(g.-1889T>C, rs2631370 및 g.-945T>G, rs34786243)이 현저하게 감소된 프로모터 활성을 나타냄(각각 21.9%, 55.4% 감소)을 확인하였다(도 1b). 그러나, g.-446C>T(rs4646298) 다형성과 참조간의 프로모터 활성은 차이가 없었다. 상기 결과는 H3가 두개의 다형성인 g.-1889T>C 및 g.-945T>G의 영향으로 참조와 비교하여 감소된 프로모터 활성을 나타냄을 제시한다.

[0097] <실험예 2> *OCTN2* 프로모터에 결합하는 잠재적인 전사 인자의 확인

[0098] <2-1> *OCTN2* 프로모터에 결합하는 전사 인자의 예측

[0099] *OCTN2* 프로모터의 전사 조절에 관련된 기전을 더 조사하기 위하여, *OCTN2* 프로모터 영역에 있는 두 개의 이전에 알려진 다형성(g.-1889T>C 및 g.-945T>G)에 대한 잠재적인 전사 인자 결합 위치의 예측을 TFSearch(version 3.1, Real-World Company Partnership, 도쿄, 일본), Consite(<http://consite.genereg.net/cgi-bin/consite>), 및 MarInspector(Genomatrix Software GmbH, Munich, 독일)를 사용하는 *in silico* 분석을 수행하여 확인하였다. 그 결과, 두 개의 전사 인자, nuclear factor erythroid 2(NF-E2) 및 Yin Yan 1(YY1)이 *OCTN2* 프로모터에 결합하는 것으로 예측되었고 참조와 변이체 염기서열간의 결합 친화도에서 큰 차이를 나타냄을 확인하였다.

[0101] <2-2> *OCTN2* 프로모터에 결합하는 전사인자의 확인

[0102] 상기 실험예 <2-1>의 예측을 확인하기 위하여, HCT-116 세포의 핵 추출물 및 ³²P-표지된 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 이용하여 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다.

[0103] 구체적으로, EMSA는 이전에 기술한 방법(Jang, G.H. et al, (2013))으로 수행하였고, 간략하게, ³²P-표지된 올리고뉴클레오티드(1×10^5 counts/min)는 상온에서 30분 동안 HCT-116 세포로부터 분리한 핵 추출물 10-15 μ g과 배양하였다. EMSA에 사용된 올리고뉴클레오티드의 염기서열은 상기 표 4에 나타내었다.

[0104] 경쟁 분석(competition assay)을 위해서, 비표지된 NF-E2 및 YY1 공통 또는 변형 올리고뉴클레오티드는 결합 반응 이전에 100-배의 몰수 과다량으로 첨가하였다. 그런 다음, 상기 샘플은 6% 비-변형 폴리아크릴아미드 겔(non-denaturing polyacrylamide gel)에 로딩하였고, 80V에서 70시간 동안 전기영동하였다. 신호 탐지를 위하여, 건조된 겔은 -80℃에서 16시간 동안 CP-BU 필름(Agfa, Mortsel, 벨기에)에 노출하였다. 각 밴드의 강도는 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, 미국)를 사용하여 정량하였다.

[0105] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, NF-E2는 변이체 g.-1889C에 비교하여 참조 g.-1889T에 평균적으로 1.53배 더 강하게 결합함을 확인하였다(도 2a, 레인 4 및 7). 비표지된 공통 올리고뉴클레오티드의 100-배 농도가 표지된 공통(도 2a, 레인 2), *OCTN2* 참조(레인 5), 또는 변이체(레인 8) 프로브(probe)와 경쟁한다는 점에서, 표시된 밴드는 경쟁 분석에 의한 NF-E2-올리고뉴클레오티드 복합체에 일치함을 확인하였다. 그러나, 이러한 결합 복합체들은 각 전사 인자의 변형된 중심 서열을 포함하는 비표지된 올리고뉴클레오티드의 100-배에 해당하는 농도와 경쟁하지 않았다(도 2a, 레인 3, 6, 9). g.-945T>G 다형성에 대하여, TFSearch 및 Consite 프로그램은 YY1이 변이체(g.-945G)에 비하여 참조 서열(g.-945T)과 더 우호적으로 작용함을 예측하였다. EMSA의 결과는 상기 예측과 일치하였는데, 변이체 g.-945G는 YY1-프로브 복합체의 상응하는 밴드에 약하게 표시되었다(도 2g, 레인 1, 4, 및 7). 게다가, YY1에 대항하는 항체의 존재에서 초이동(supershift)을 통해 YY1이 상기 복합체에 존재한다는 것을 확인하였다(도 2b, 레인 3 내지 6).

[0107] <실험예 3> NF-E2 및 YY1의 *OCTN2* 전사에 대한 효과 확인

[0108] <3-1> NF-E2의 *OCTN2* 프로모터 활성화에 대한 효과 확인

[0109] NF-E2 및 YY1의 *OCTN2* 프로모터 활성화에 대한 효과를 확인하기 위하여, *OCTN2* 리포터 벡터는 다양한 양의 NF-E2-pcDNA3.1 벡터로 HCT-116 세포에 공동-형질전환하였다. NF-E2 cDNA(Origene Technologies Inc., Rockville, MD, 미국)는 pcDNA3.1(+) 벡터(Life technologies, 미국)에 삽입하였다. 상기 NF-E2-pcDNA3.1의 제작에 사용된 프라이머의 서열은 상기 표 4에 나타내었다.

[0110] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 농도 의존적인 NF-E2-활성화된 *OCTN2* 프로모터 활성을 확인하였다. 특히, 참조 서열을 갖는 *OCTN2*의 프로모터 활성화에 대한 NF-E2의 효과는 변이체 서열을 갖는 *OCTN2*의 효과보다 컸다. 상기 결과는 EMSA 데이터와 일치했으며, 자세하게, 25ng의 NF-E2는 리포터 플라스미드와 공동-형질전환하였는데, g.-1889C를 포함하는 *OCTN2*의 프로모터 활성화는 24.0% 증가한 반면, g.-1889T를 포함하는 *OCTN2*의 프로모터 활성화는 55.1% 증가함을 확인하였다(도 3a).

[0112] <3-2> YY1의 *OCTN2* 프로모터 활성화에 대한 효과 확인

[0113] YY1의 *OCTN2* 프로모터 활성화에 대한 효과를 확인하기 위하여, YY1(HSS187726) siRNA(small interfering RNA) 및 Lipofectamine RNAiMAX를 사용하여 제조사의 프로토콜(Life Technologies, 미국) 대로 역 형질전환(reverse transfection)으로 HCT-116 세포에서 YY1을 하향조절하였다. 음성 대조군으로써 높은 GC Duplex를 갖는 Stealth™RNAiNegative Control(Life technologies)을 사용하였다. HCT-116 세포에 YY1에 대한 siRNA를 형질 전환하고 24시간 후, 참조(g.-945T) 또는 변이체(g.-945G) 리포터 벡터를 상기 세포에 형질전환하였다. 그런 다음, 48시간 후에 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0114] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 음성 대조군 siRNA의 루시퍼라제 활성과 비교하여 YY1 siRNA의 존재하의 *OCTN2* 참조 및 변이체의 루시퍼라제 활성에서 현저한 감소를 확인하였다(도 3b).

[0115] 상기 실험에 <3-1> 및 <3-2>의 결과 데이터는 NF-E2 및 YY1이 *OCTN2* 전사에서 활성제(activator)로서 역할을 함을 나타낸다.

[0117] <실험예 4> 크론병 감수성에 대한 *OCTN2* 기능적인 프로모터 변이체의 영향 확인

[0118] 크론병의 감수성 또는 임상적 경과에 대한 *OCTN2* 프로모터의 기능적인 변이체들의 잠재적인 효과를 확인하기 위하여, 크론병 환자들(한국인, 193명) 및 건강한 대조군(한국인, 287명)으로부터의 DNA 샘플을 사용하여 두 개의 *OCTN2* 변이체의 유전자형을 확인하였다. 본 실험은 연세의료원 세브란스 병원(대한민국, 서울)의 연구윤리심의위원회(Institutional Review Board)로부터 승인을 받았다. 모든 분석은 연세의료원 세브란스 병원의 연구윤리심의위원회의 적절한 지시와 규정을 따라서 수행하였다. 크론병으로 진단을 받은 환자들은 내과 전문의로부터 최소 24개월 동안의 후속조치를 받았다. 참가자들에 대한 동의서는 모든 참가자들 또는 보호자들로부터 연구 시작 전에 받았고, 임상적 데이터는 의학 기록을 검토하여 수집하였다.

[0120] <4-1> *OCTN2* 기능적 프로모터 변이체들의 크론병 감수성에 대한 영향 확인

[0121] *OCTN2* 기능적 프로모터 변이체들의 크론병 감수성에 대한 영향을 확인하기 위하여, 크론병 환자 193명 및 287명의 건강한 개체들로부터 DNA 샘플을 취합하여 유전적 분석을 실시하였다. 그 결과, 두 그룹의 각 변이체 또는 일배체형의 빈도를 비교하였을 때, *OCTN2* 프로모터의 두 개의 기능적인 변이체들의 빈도에 차이가 없음을 확인하였다. 또한, 표 5에 나타난 바와 같이, 두 그룹 간의 *OCTN2* 프로모터의 세 개의 기능적인 일배체형의 빈도에 서로 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(표 5).

표 5

ID	g.-1889T>C`	g.-945T>G	환자, 명(%)	대조군, 명(%)	P 값
HA	T	T	146(37.8)	209(37.2)	0.852
HB	C	T	147(38.1)	211(37.5)	0.673
HC	C	G	93(24.1)	142(25.3)	0.792

[0124] <4-2> *OCTN2* 기능적 프로모터 변이체들의 크론병의 임상적 특성에 대한 영향 확인

[0125] 표 5에 나타난 바와 같이, *OCTN2* 일배체형인 HC 일배체형이 감소된 프로모터 활성을 보이는 변이체로만(g.-1889C 및 g.-945G) 구성되어 있다. 상기 기능적 *OCTN2* HC 일배체형의 크론병의 임상적 특성에 대한 영향을 확인하기 위하여, 193명의 환자를 두 개의 그룹으로 나누었다: 대조군(182명) 및 변이체군(11명). 변이체군은 HC 일배체형에 대한 동형(homozygous)인 개체들로 이루어졌고, 대조군은 변이체군이 아닌 개체로 구성하였다. 표 6은 *OCTN2* 일배체형에 따른 환자들의 임상적 특성을 나타내었는데, 변이체군에서 대조군에 비하여 공장 침범성(jejunal involvement)이 높음을 확인하였다(OR(odds ratio; 오차비율)=3.738, P=0.047). 또한, *OCTN2* HC 일배체형은 비-항문주위 침투 합병증(non-perianal penetrating complications)과 현저하게 연관되어 있었다(OR=3.500, P=0.048); 진단 또는 후속조치 동안에 변이체군의 45.5%가 비-항문주위 침투 합병증을 경험한 반면,

대조군은 19.2%만이 상기 합병증을 나타내었다. 결과적으로, 변이체군의 환자들은 대조군보다 더 높은 비율로 입원 및 외과적 수술을 진행하였다(각각 OR=4.914 및 6.000, $P=0.048$ 및 0.010).

표 6

변수	HC 일배체형 동질성(%)	대조군(%)	HC 일배체형 동질성 평균±표준편차	대조군 평균±표준편차	P 값 (오차비율)
총 개수	11	182			
성별, 남성	10(90.9)	130(71.4)			0.192
개시 연령(년)			24.73	24.89	0.957
<16	0(0.0)	17(9.3)			
16≤<40	11(100.0)	153(84.1)			0.808a
≥40	0(0.0)	12(6.6)			
위치					
회장 침범(ileal involvement)	1(9.1)	27(14.8)			0.604
공장 침범	4(36.4)	24(13.3)			0.047 (3.738)
대장 침범	4(36.4)	38(21.0)			0.241
항문 주위 누관(perianal fistula)	6(54.5)	89(48.9)			0.717
양상					
염증	4(36.4)	105(57.7)			0.177
협착(stenosing)	2(18.2)	42(23.1)			0.708
침투	5(45.5)	35(19.2)			0.048 (3.500)
입원	9(81.8)	87(47.8)			0.045 (4.914)
스테로이드 사용	1(10.0)	29(18.0)			0.526
아자티오프린 사용	9(81.8)	135(74.2)			0.575
항-TNF 제제 사용	3(27.3)	46(25.3)			0.883
외과적 수술(SO)	8(72.7)	56(30.8)			0.010 (6.000)
SO 횟수(≥2)	3(37.5)	17(29.3)			0.638

^aFisher's exact test에 의한 P 값.

또한, *OCTN2* 일배체형과 상기 결과의 발달 과정에 대한 시간과의 연관성을 확인한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 외과적 수술에 대한 시간은 *OCTN2* HC 일배체형과 현저한 연관성이 있음을 확인하였다(도 4).

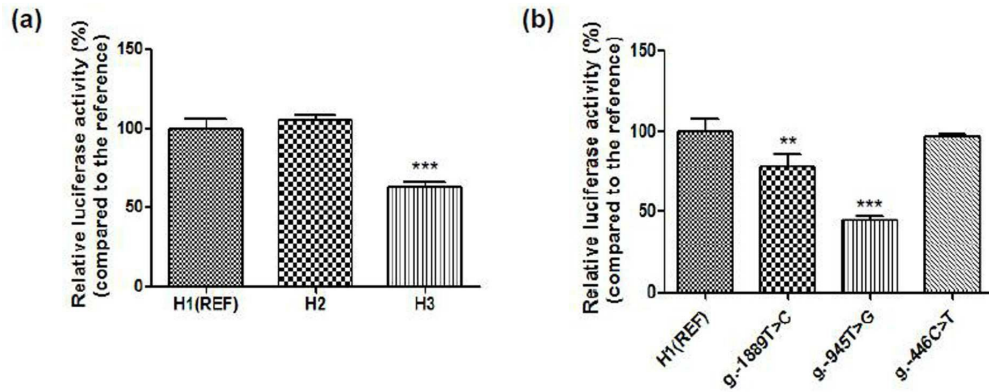
<실시예 2> 통계적 분석

모든 결과들은 평균±표준 편차로서 나타내었으며, 통계적 분석은 GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, 미국) 및 Windows 용 PASW software v.18.0 및 v.21.0(SPSS Inc., Chicago, IL, 미국)을 사용하여 수행하였다. 통계적으로 유의한 결과는 $P<0.05$ 로 정의하였으며, 루시퍼라제 분석에 대한 P 값은 Cunnett's two-tailed test를 따르는 일원 분산 분석(one-way analysis of variance)을 사용하여 계산하였다. 참조 또는 변이체 서열을 포함하는 *OCTN2* 프로모터의 루시퍼라제 활성에 대한 NF-E2 또는 YY1의 영향을 비교하기 위하여 짝비교 t-검정(paired t-test)를 수행하였다. 실험군 및 대조군 그룹 간의 유전적 변이 또는 일배체형의 빈도는 χ^2 -시험을 사용하여 비교하였다. *OCTN2* 일배체형을 따르는 실험군 그룹 내에서 임상적 특성을 비교하기 위하여, 일변량 직선/로지스틱 회귀 검정(univariate linear/logistic regression test)을 사용하였다. 또한, 환자들간의 임상적 이벤트(외과적 수술, 입원, 질병 행동, 아자티오프린(azathioprine) 사용, 및 항-TNF 제제 사용)에 대한 시간은 Kaplan-Meier 예측을 사용하여 평가하였다. 결과적으로, *OCTN2* 일배체형과 누적된

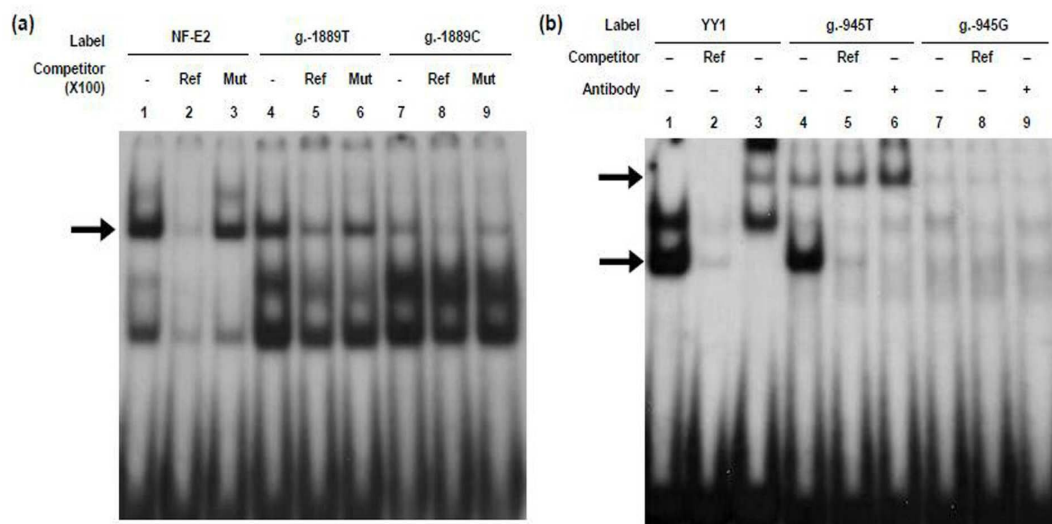
사건 데이터간의 관계를 분석하기 위하여 log-rank 검정을 수행하였다.

도면

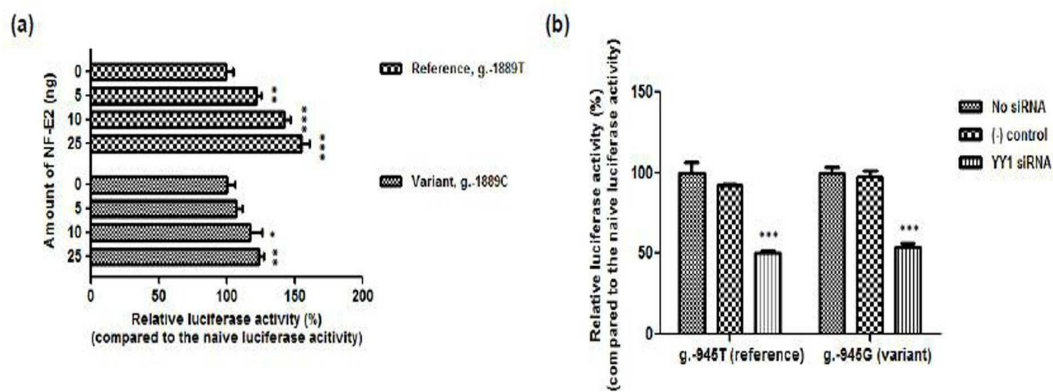
도면1



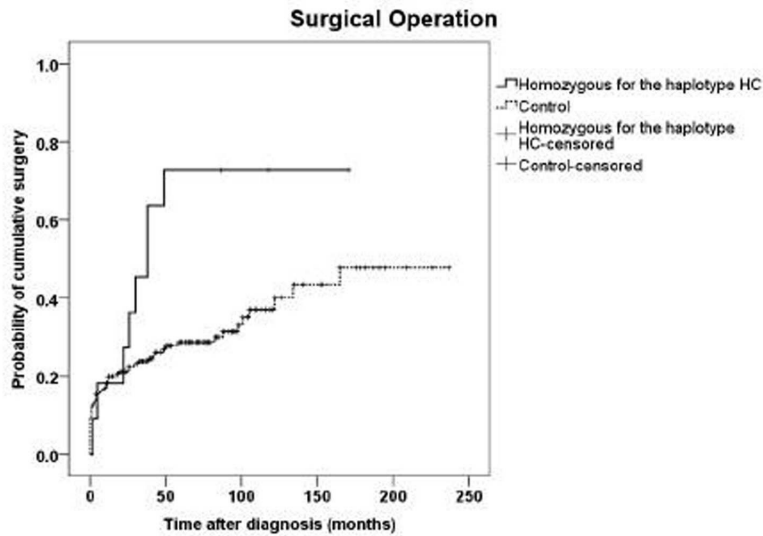
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Prediction method for clinical characteristics of Crohn's disease
- <130> 15P-10-012
- <160> 19
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1850
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

tgctgaaggt ataaccatcc atcttcagga agtaagaata gtgaatagta agtataaaga	60
aacaaacaag tctgtgata acatctttat cataattttt ttaagtctat tatgctttat	120
gcaaatgttt agatttcctt gttaaaaatc tgcctggccag gttaggttcc ctttctgtag	180
ctttattttc aactcataat atagtgacta ttaaataattc ttactcaac acattatatt	240
gtaaaaatat acacttagtt ctgtttctat cactaagcca ctactatttt aaaaaggaat	300
atcttgcatg gttaaagttt gcagcccaaa ttcttaaagg ccttaggaat ggtgctgtcc	360
aataagataa ccaatagcta catgtggcta ctgagcactt aaaaaatgag tctggccagg	420
catagtggct cacgtctgta attcagcatt ttgggaggct gaggtgggag gattgcttaa	480
accaggaggt ctgagaccag cctgggcaac acagggatgc cttgtctctg taaaataaaa	540

aaaataaaaa aattagctgg gcacggtggc atgtgcctgt agtcctagct actcagcagg 600

ctgaggcagg aggccactt aagcttagga gttcagggt gcggtgagct atgattgtgc 660

cactgcactc tagcctgggt gacacagtgg gaccgtgtct ccaataaata aatgaataaa 720

taaatattaa aaaataaaaa gtgtggctag tccaaattga aatgtgctgt aaaatacaca 780

ctggattcct tttttttttt ttttcaaatc ctgagaacct gtgaacaca ctgaattctt 840

aagatttagt atgaggagg gaaaaaaga tcaatgattt acatataaca atgtaaaata 900

tcaataattt ctatattgat tataatgatga aatgatcatg ttctggatat acttgattaa 960

atataccatt aaagttaatt tcatctttta tttttacttt ttaaataatgc agcattgccc 1020

aataaaatac aggacaacca gttacatttt tatattatat attcctgctt gggacataat 1080

atttaaaaat tattcattct atatctgaaa ttcaaattta actaggagtc ctatattttt 1140

atttgctaaa tctggcaatt ttattaatat ggctactaga aaagttaaca taacaaatgt 1200

agctccttat cctatggaac attgtgctt tagaatcacc tcgtgcctt tttttttttt 1260

ccagttagct tctgaataaa ctctgcacgg aaataactaa tctgtgggga atatttaacc 1320

ctaggctagg atcgttaatc gtgaagttaa atttttacat ctgcatgaac aaaatggctt 1380

gttacagacg aaaatgtgga aaggcatct ggactagaat gaaaagtcac agctcccagc 1440

ctcttacta gggtagttaa cagtcccagg ttcaaaataa tccccgtccc tcttataaga 1500

ttaggcggtg tcaagagcaa ctatctgtga gaccctgggc cagtgacttt ctccttacct 1560

ccgcccccaa gtaggccttg caaaaagctg ggaggggtgc gttttcaaca ctggagcttc 1620

gcggcgcgtc tccactcgc tccccgccg gcgctagagg agcgagttcg gactcggacc 1680

ccaaggcctc gactcccgt gccttcctaa gccgagcccg ggctacctcg gtcgtcccca 1740

gcaggttggt ctggcagagg ccgggcctcg ccaggtcccc aggacaggcc ccgcccgggc 1800

ctcaggtgca ctcccggccc gcccgcgcc ctgcgtccc gcccagctc 1850

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

caggtaccac tggacggcac catcttag 28

<210> 3

<211> 28

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 cagctagcat caggaacacg gaggacag 28
 <210> 4
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gaaggataa ccatccatct tcacgaagta agaatagtga atagtaa 47

 <210> 5
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 tatgcaaattg tttagatttc cttattaaaa atctgctggc caggtaa 47
 <210> 6
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ctcataatat agtgactatt aaatattctt tacccaacac attatattgt aaaaatatac 60
 acttagt 67
 <210> 7
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> primer
 <400> 7

ctatatTTTT atttgctaaa tctggcaatt ttattaatag ggctactaga aaagttaaca	60
	60
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
ctagaggagc gagtttggac tcggacccc	29
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
gccttcctaa gccgaccccg ggct	24
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 10	
tccccagcag gcgtggctgg cagag	25
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
aatattcttt actcaacaca ttata	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	primer	
<400>	12	
aatattctttt	acccaacaca	ttata
		25
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
cctccagtga	ctcagcacag	gttcc
		25
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
cctccagtgc	tgtcgcacag	gttcc
		25
<210>	15	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
atattattaa	tatggctact	agaaa
		25
<210>	16	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
atattattaa	tagggctact	agaaa
		25
<210>	17	
<211>	27	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 cgcttcccgg ccattcttggc ggctggt 27
 <210> 18
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 cgaagcttct agagccatct gggctgtc 28

 <210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 cgctcgagaa tcccatcagc agttccac 28