

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0104690 (43) 공개일자 2012년09월24일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/53 (2006.01) G01N 23/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0022236 (22) 출원일자 2011년03월14일 심사청구일자 2011년03월14일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 박길홍 서울특별시 용산구 이촌로64길 15, LG한강자이아 파트 107동 302호 (이촌동) 한금선 서울특별시 성북구 아리랑로 68, 돈암 현대힐스테 이트 101동 402호 (돈암동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김선애

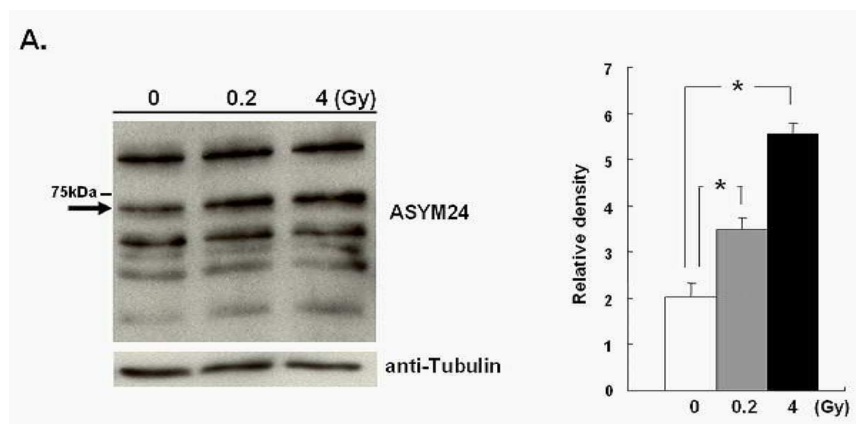
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **에즈린을 이용한 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커 및 이를 포함하는 키트**

(57) 요약

본 발명은 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커, 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정용 바이오마커 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의해 에즈린의 알지닌 메틸화를 측정함으로써 방사선 생물학적 선량을 정확하게 평가할 수 있고, 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상을 측정할 수 있다. 또한, 본 발명에 의하면, 방사선-적응응답 반응 메커니즘을 이용하여 개인별 적절한 저선량 방사선 전조사가 가능하여 방사선 조사 또는 피폭에 따른 세포손상을 방지하고 효율적인 암치료를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

장연수

서울특별시 용산구 효창원로104나길 16 (서계동)

이경미

서울특별시 서초구 서초1동 극동 디아망@ 101-904

민본홍

경기도 용인시 수지구 이종무로170번길 11 (고기동)

정경아

서울특별시 성북구 보문1동 68번지 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2050842000106B084200110

부처명 한국과학재단

연구사업명 원자력연구개발사업

연구과제명 방사선 신호전달 및 telomere 길이 조절에 의한 장수기전 연구

주관기관 고려대학교

연구기간 2006.04.01 ~ 2007.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오마커는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커.

청구항 3

알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 포함하는 방사선 생물학적 선량 평가용 키트.

청구항 4

알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정용 바이오마커.

청구항 5

알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 이용하여, 조직 시료 내에 알지닌이 메틸화된 에즈린을 측정하는 단계를 포함하는 방사선 생물학적 선량을 평가하는 방법.

청구항 6

조직 시료에 저선량 방사선을 전조사하는 단계;

상기 조직 시료에 고선량 방사선을 조사하는 단계; 및

알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 이용하여, 상기 조직 시료 내에 알지닌이 메틸화된 에즈린을 측정하는 단계를 포함하는 방사선 적응응답 반응 유도 여부를 확인하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 에즈린을 이용한 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 방사선 조사에 의해 선량 의존적으로 변화하는 에즈린의 알지닌 메틸화를 측정하여 방사선 생물학적 선량을 평가할 수 있는 바이오마커 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적인 사람들은 우주 방사선 또는 지구상의 방사선 물질로부터 발생하는 0.2 Gy 이하의 저선량의 방사선에 노출되어 있다. 거의 20여 년 동안 저선량 방사선의 생물학적 영향에 대한 연구가 관심을 끌고 있다. 그러나, 전세계적인 상당한 노력에도 불구하고, 상기 저선량 방사선의 생물학적 영향은 명확하게 밝혀지지 않았다. 현재까지 일부 연구들에 의해 저선량 방사선 조사 시 전사 변화(transcriptional changes) 및 단백질 변형(protein modifications)이 발생하는 것이 밝혀졌다(Mothersill et al. 2001, Daino et al. 2002, Fornace et al. 2002, Sutherland et al. 2002, Yang et al. 2006).

[0003] 흥미롭게도, 일부 유전자들의 발현이 고선량 방사선 조사 후에는 변화되지 않지만, 저선량 방사선 조사 후에는 변화되는 것이 밝혀졌다(Suzuki et al. 2001). 따라서 저선량 및 고선량 방사선 노출에 따른 생물학적 영향에 대한 정량분석 및 분류에 대한 관심이 증가하고 있다. 최근 cDNA 마이크로어레이 연구는 저선량 및 고선량 방사선에 대한 세포 반응에 있어서 정량적 및 정성적 차이점이 존재한다는 것을 제시하고 있다(Ding et al. 2005). 이전의 연구는 유전자 발현 수준에서 저선량 방사선에 대해 세포가 어떻게 반응하는가에 대한 전체적인 고찰을

목적으로 하고 있었으나, 정상적인 세포 기능 유지에 직접적으로 중요한 역할을 하는 것은 단백질들의 활성이라 할 수 있다(Luckey 1982). 따라서 mRNA 및 단백질 발현 수준 만으로 저선량 및 고선량 방사선에 대응하는 DNA 손상 신호전달, DNA 손상 복구, 및 세포 사이클 체크포인트 조절(cell cycle checkpoint control)과 관련된 세포내 이벤트들에 대해 정확히 알 수 없다(Gerion et al. 2003, Park et al. 2004).

[0004] 한편, 저선량의 방사선을 조사할 경우, 생체의 세포기능을 활성화시켜 고선량 방사선에 의한 손상을 줄일 수 있다는 것(적응응답 반응, adaptive response)이 Olivieri 등에 의해 제시된 바 있다 (Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S., Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. 1984: 223: 594-597). 인체 림프구를 이용하여 저선량 방사선에 대한 적응응답 반응에 대한 연구에서 저농도의 3H-싸이미딘(3H-thymidine)을 먼저 처리한 경우 1.5 Gy의 X-ray 조사에 의해 세포가 내성을 획득하는 적응응답 반응을 유도한바 있으나(Farooqi Z et. al., Low dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. Mutat. Res. 1993:302:83-89), 관련 유전자의 특성은 아직 파악하지 못하고 있다. 또한, 치료의 목적으로 사용하거나 방사능 사고에 의한 방사선 노출 직후 인체에 해를 미치는 고선량 방사선에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 저선량 방사선에 의한 여러 가지 세포손상에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 적응응답 반응에 관여하는 인자로는 세포주기관련인자, 세포사 관련 인자, DNA 손상 복구 관련 인자 등이 제시되고 있으나 아직 확실히 규명되지는 못하고 있으며, 더욱이 적응응답 반응에 어떤 유전자가 관여하는지는 거의 알려져 있지 않다.

[0005] 따라서, 방사선 피폭 또는 조사에 대한 적응응답 반응에 관련된 구체적인 단백질을 확인할 경우, 방사선 생물학적 선량 평가 및 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정이 가능할 것이며, 또한 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상의 예방 또는 개인별 맞춤형 방사선 암치료가 가능할 수 있을 것이다.

[0006] 한편, 에즈린 및 모에신은 라딕신과 함께 세포 부착 및 신호 전달을 제어하는 ERM 단백질로서 집합적으로 알려져 있으며(Mangeat et al. 1999, Tsukita and Yonemura 1997, Sato et al. 1992) 막-세포골격 링커로서 밀접하게 관련된 그룹이다.

[0007] 비록 그 기능을 확인하기 위해 더 많은 연구가 필요하지만, 이전 연구에서 ERM 단백질은 플라즈마막-액틴필라멘트 결합(plasma membrane-actin filament association)에서 핵심역할을 하는 것으로 밝혀졌다. ERM 단백질은 아미노 말단측 절반에서 플라즈마막과, 카르복실 말단측 절반에서 액틴필라멘트와 각각 결합함으로써, 가교 단백질 역할을 하여, 세포-세포 부착, 세포-기질 부착, 미세융모구조의 생성 및 유지 그리고 세포질분열과 관련되어 있다(Arpin et al. 1994, Edward et al. 1994, Henry et al. 1995, Martin et al. 1995). 적어도 인비트로에서, full-length native ERM 단백질의 액틴-바인딩 및 막-바인딩 사이트 모두 연장된 액틴-바인딩 테일 도메인에 의해 마스크된 N-말단 FERM 도메인 폴드로 마스크된 것으로 보인다(Pearson et al. 2000). 자연 상태의 ERM 단백질에서는, 분자 내부의 헤드-투-테일 결합(head-to-tail association)에 의해 아미노- 및 카르복시-말단 절반이 상호 각각의 작용, 즉 막- 및 액틴- 바인딩(membrane- and actin-binding)을 억제할 수 있다(Gary and Bretscher 1993, 1995, Andreoli et al. 1994, Magendantz et al. 1995). 또한, 비보에서는 ERM 단백질의 분자간의 헤드-투-테일 결합도 발견된다(Berryman et al. 1995, Bretscher et al. 1995). 아미노-와 카르복시-말단 절반 사이의 분자간 및 분자내 인터페이스는 서로 별개인 듯하다.

[0008] 분자내 상호 억제 메커니즘이 ERM 단백질의 불활성화의 원인임을 고려해 볼 때, 세포내에서 일부 신호들은 ERM 단백질이 플라즈마 막 바로 아래에서 가교로서 기능을 할 수 있도록 이런 억제를 제거하여야 한다. 몇가지 유형의 신호들이 고려될 수 있다. ERM 단백질은 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF) 수용체와 같은 티로신 키나제에 대한 인비보 기질로 적합한 것으로 알려져 있다 (Arpin et al. 1994). 그러나, ERM 활성 및 불활성 측면에서 ERM 단백질의 티로신 인산화반응의 생리적 관련성에 대해서는 밝혀지지 않았다. 다른 가능성이 있는 신호는 세린/트레오닌 인산화이다. 이노시톨인지질도 ERM 단백질의 활성화에 주요한 인자들이다(Hirao et al. 1996). 인산화의 활성 및 이노시톨인지질 인지질 합성에 필요한 업스트림 인자로서, 일부 연구들에 의해 Rho 키나제 및 p38 MARK와 ERM 단백질의 액틴-막 가교 활성화 사이의 밀접한 관련성이 제시되었다(Shcherbina et al. 1999, Lee et al. 2004, Shiue et al. 2005, Lan et al. 2006). 따라서, ERM 단백질의 활성 및 불활성을 통해, Rho 키나제 및 p38 MARK가 액틴-베이스드 세포골격 조직을 조절할 수 있다.

[0009] 에즈린, 라딕신 및 모에신의 비율은 본질적으로 구별할 수 없으므로, 다양한 세포 유형에서 ERM 단백질의 동시 발현(coexpression)이 안전한 방법이라고 알려져 있다(Arpin et al. 1994, Takeuchi et al. 1994, Hirao et al. 1996). 한편, 안티센스-올리고뉴클레오타이드 실험들에 의하면 모에신의 생리적 역할은 에즈린 및 라딕신과

약간 다르다는 것이 제시되었다(Takeuchi et al. 1994). 조직에서, ERM 단백질의 발현은 세포 형태에 따라 다양하다(Amieva et al. 1994, Arpin et al. 1994, Berryman et al. 1995, Schwartz et al. 1995). 조직에서 ERM 단백질 발현 차이는 ERM 단백질의 기능적 차이를 암시한다.

[0010] 상기와 같이 세포 내에서 다양한 작용을 하는 에즈린의 단백질 알지닌 메틸화에 대한 방사선의 영향에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다.

[0011] 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.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Azzam EI, Raaphorst GP, Mitchel RE. 1994. Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells. *RadiationResearch*138(1Suppl):S28-31.
- (비특허문헌 0002) Bedford MT, Richard S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular Cell* 18(3):263-72.
- (비특허문헌 0003) Boisvert FM, Chenard CA, Richard S. 2005. Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Science's STKE* 2005(271):re2.
- (비특허문헌 0004) Boisvert FM, Cote J, Boulanger MC, Richard S. 2003. A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Molecular & cellular proteomic* 2(12): 1319-30.
- (비특허문헌 0005) Broome EJ, Brown DL, Mitchel RE. 1999. Adaptation of human fibroblasts to radiation alters biases in DNA repair at the chromosomal level. *International journal of radiation biology* 75(6):681-90.
- (비특허문헌 0006) Cai L, Jiang J. 1995. Mild hyperthermia can induce adaptation to cytogenetic damage caused by subsequent X irradiation. *Radiation research* 143(1):26-33.
- (비특허문헌 0007) Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR. 1999. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284(5423):2174-7.
- (비특허문헌 0008) Daino K, Ichimura S, and Neno M. 2002. Early induction of CDKN1A (p21) and GADD45 mRNA by a low dose of ionizing radiation is due to their dose-dependent post-transcriptional regulation. *RadiationResearch*157(4):478-82.
- (비특허문헌 0009) Ding LH, Shingyoji M, Chen F, Hwang JJ, Burma S, Lee C, Cheng JF, Chen DJ. 2005. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses. *Radiation Research*164(1):17-26.
- (비특허문헌 0010) Fornace AJ Jr, Amundson SA, Do KT, Meltzer P, Trent J, Bittner M. 2002. Stress-gene induction by low-dose gamma irradiation. *Mil Med* 167(2 Suppl):13-5.
- (비특허문헌 0011) Gary JD, Clarke S. 1998. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61:65-131.
- (비특허문헌 0012) Gerion D, Chen F, Kannan B, Fu A, Parak WJ, Chen DJ, Majumdar A, Alivisatos AP. 2003. Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays. *Analytical Chemistry* 75(18):4766-72
- (비특허문헌 0013) Hyun SJ, Yoon MY, Kim TH, Kim JH. 1997. Enhancement of mitogen-stimulated

proliferation of low dose radiation-adapted mouse splenocytes. *Anticancer research* 17(1A):225-9.

(비특허문헌 0014) Lake AN, Bedford MT. 2007. Protein methylation and DNA repair. *Mutation research* 618(1-2):91-101.

(비특허문헌 0015) Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. 2005. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocrine reviews* 26(2):147-70.

(비특허문헌 0016) Liu SZ, Cai L, Sun JB. 1990. Effect of low-dose radiation on repair of DNA and chromosome damage. *Acta biologica Hungarica* 41(1-3):149-57.

(비특허문헌 0017) Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL, Das DK. 1993. Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 264(3 Pt 1):C715-22.

(비특허문헌 0018) Mangeat P, Roy C, Martin M. 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics: Authors' correction. *Trends in cell biology* 9(7):289.

(비특허문헌 0019) Mothersill C, Lyng F, Mulford A, Seymour C, Cottell D, Lyons M, Austin B. 2001. Effect of low doses of ionizing radiation on cells cultured from the hematopoietic tissue of the Dublin Bay prawn, *Nephrops norvegicus*. *Radiation Research* 156(3):241-50

(비특허문헌 0020) Mowen KA, Tang J, Zhu W, Schurter BT, Shuai K, Herschman HR, David M. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFN α /beta-induced transcription. *Cell* 104(5):731-41.

(비특허문헌 0021) Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. 2006. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764(12):1890-903.

(비특허문헌 0022) Park SJ, Ciccone SL, Freie B, Kurimasa A, Chen DJ, Li GC, Clapp DW, Lee SH. 2004. A positive role for the Ku complex in DNA replication following strand break damage in mammals. *Journal of Biological Chemistry* 279(7):6046-55.

(비특허문헌 0023) Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. 1992. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *Journal of cell science* 103 (Pt 1):131-43.

(비특허문헌 0024) Shcherbina A, Bretscher A, Kenney DM, Remold-O'Donnell E. 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett* 443(1):31-6.

(비특허문헌 0025) Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68(5):850-8.

(비특허문헌 0026) Sutherland BM, Bennett PV, Cintron-Torres N, Hada M, Trunk J, Monteleone D, Sutherland JC, Laval J, Stanislaus M, Gewirtz A. 2002. Clustered DNA damages induced in human hematopoietic cells by low doses of ionizing. radiation *Journal of radiation research (Tokyo)* 43 Suppl:S149-52.

(비특허문헌 0027) Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. 1998. Suppressive effect of low-dose preirradiation on genetic instability induced by X rays in normal human embryonic cells. *Radiation research* 150(6):656-62.

(비특허문헌 0028) Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. 2001. Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and enhances proliferation of normal human diploid cells. *Cancer Research* 61(14):5396-401.

(비특허문헌 0029) Suzuki M, Yang Z, Nakano K, Yatagai F, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. 1998. Extension of in vitro life-span of gamma-irradiated human embryo cells accompanied by chromosome instability. *Journal of radiation research (Tokyo)*. 39(3):203-13.

(비특허문헌 0030) Tsukita S, Yonemura S. 1997. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton

to signal transduction. Current opinion in cell biology 9(1):70-5.

(비특허문헌 0031) Tsutsui T, Tanaka Y, Matsudo Y, Hasegawa K, Fujino T, Kodama S, Barrett JC. 1997. Extended lifespan and immortalization of human fibroblasts induced by X-ray irradiation. Molecular carcinogenesis 18(1):7-18.

(비특허문헌 0032) Wang ZQ, Saigusa S, Sasaki MS. 1991. Adaptive response to chromosome damage in cultured human lymphocytes primed with low doses of X-rays. Mutation research 246(1):179-86.

(비특허문헌 0033) Yang F, Stenoien DL, Strittmatter EF, Wang J, Ding L, Lipton MS, Monroe ME, Nicora CD, Gristenko MA, Tang K, Fang R, Adkins JN, Camp DG 2nd, Chen DJ, Smith RD. 2006. Phosphoproteome profiling of human skin fibroblast cells in response to low- and high-dose irradiation. Journal of Proteome Research 5(5):1252-60.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 방사선 적응응답 반응(radio-adaptive response) 과정에서 에즈린 단백질의 알지닌 메틸화의 방사선 선량 의존적 변이를 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 목적은 에즈린을 이용한 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커를 포함하는 방사선 생물학적 선량 평가용 키트를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 에즈린을 이용한 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정용 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오마커를 이용하여 방사선 생물학적 선량을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커를 제공한다.
- [0020] 본 발명에서 "알지닌 메틸화(arginine methylation)"는 대표적인 번역후 변형(posttranslational modification)의 한 예이다. 알지닌 메틸화는 특히 전사조절, 신호전달, 단백질 상호작용, 단백질 세포내 운반, DNA 손상 복구 활성화 등의 조절에 관여한다.
- [0021] 에즈린(Ezrin)은 분자질량 69,268 Da의 세포내 단백질이다. 라딕신, 모에신은 동족의 분자로서 주로 세포골격계의 단백질을 세포막에 연결하는 작용을 하고 있다. 세포막의 마이크로빌리(microvilli)라고 불리는 사상(絲狀) 돌기의 내측에 국재한다. 장 상피세포의 마이크로빌리를 구성하고 있다. 티로신키나아제에 의해 인산화된다. 에즈린의 유전자 서열정보(Ezrin, J. Biol. Chem. 264: 16727-16732, 1989, X51521) 및 아미노산 서열정보(Ezrin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 224: 666-674, 1996, P15311)은 다양한 경로를 통해 용이하게 얻을 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 바이오마커는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하여 알지닌이 메틸화된 에즈린을 검출 및/또는 측정할 수 있으면 특별한 제한은 없으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 일반적인 기술을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- [0023] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 포함하는 방사선 생물학적 선량 평가용 키트를 제공한다.

- [0024] 본 발명에 따른 방사선 생물학적 선량 평가용 키트의 바이오마커는 시료 내의 알지닌이 메틸화된 에즈린의 존재를 검출 및/또는 측정하기 위한 것이면 어떤 것이든 제한 없이 사용될 수 있다. 즉, 키트 내지 시료에 존재하는 알지닌이 메틸화된 에즈린의 검출 및/또는 측정은 당업계에 공지된 통상의 기술 내지 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법으로는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 웨스턴 블로팅 방법(Western Blotting) 등을 예로 들 수 있다. 또한, 96-웰 내부에 다수의 항체를 고정화하여 한꺼번에 많은 수의 시료를 분석하는 ELISA 변형법이 이용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 키트에는 항체를 이용하여 각종의 면역화학적 반응을 수행하기에 적합한 물질들, 예를 들어, 항체의 보존제, 완충액 등이 포함될 수 있다.
- [0026] 또한, 추가적인 시약을 포함할 수 있으며, 일 예로써는, 발색 효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드로 표지한 접합체(conjugate)로 2차 항체 등이 있다. 발색효소는 퍼옥시다제(oxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)(예: 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase))일 수 있고, 형광물질인 경우, 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸이 가능하다.
- [0027] 본 발명에 따른 키트에 있어서, 정상인 또는 환자로부터 수득된 시료를 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있고, 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고정상에 고정될 수 있다. 고정상은 유리나 플라스틱, 예를 들어 미세역가플레이트(microtiter plate), 막대, 비드(bead) 또는 미세비드(microbead) 등이 될 수 있다.
- [0028] 항체는 또한 프로브 기질이나 단백질칩에 결합될 수 있다. 시료를 항체와 정온배치한 후 세척하여 항체-마커 복합체를 측정할 수 있다. 이는 세척된 혼합물을 2차 시약, 바람직하게는 2차 항체와 정온배치하여 수행된다. 항체-마커 복합체의 양 측정이나 존재 검출은 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 반사 또는 투과를 통해 이루어질 수 있다. 상기 방법 외에도 시료 내의 마커는 간접적인 분석방법 예를 들어, 마커의 다른 에피토프에 결합하는 모노클론 항체와 경쟁 또는 억제 반응 분석을 실시하여 검출할 수 있다.
- [0029] 또한, 키트는 효소와 발색반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고, 결합된 복합체만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 포함할 수 있다. 분석을 위해 사용되는 시료는 정상적인 상태와 구별될 수 있는 선량 의존적 알지닌 메틸화 에즈린을 확인할 수 있는 생체 시료로, 예컨대, 간 조직 시료, 암 조직 시료 등을 포함한다.
- [0030] 바람직하게는 간 조직 등의 조직학적 시료로부터 측정될 수 있다. 시료는 마커의 탐지감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 환자로부터 수득한 간 조직 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 알지닌 메틸화된 에즈린과의 면역반응을 위해 사용되는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체는 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다. 상기 알지닌 메틸화된 에즈린에 대한 모노클로날 항체, 또는 폴리클로날 항체를 면역학 분야의 종사자에게 잘 알려진 일반적인 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 즉, 알지닌 메틸화된 에즈린에 의해 포유동물을 면역하던가 혹은 인비트로법에 의해 면역한 임파구세포를 골수종 세포주 등과 융합시켜 통상적인 방법에 의해 하이브리도마(hybridoma)를 생성한다. 이 하이브리도마 배양액에 대하여 고도로 정제된 각각의 항원을 사용하여 솔리드 페이스(solid phase) ELISA에 의해 각각의 항원을 인식하는 항체생산 하이브리도마를 선택한다. 얻은 하이브리도마를 클로닝하고, 수득한 안정적 항체생산 하이브리도마를 각각 배양하여 목적으로 하는 항체를 얻을 수 있고, 하이브리도마의 제작에 마우스와 랫트 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정용 바이오마커를 제공한다.

- [0033] 상기 바이오마커는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하여 알지닌이 메틸화된 에즈린을 검출 및/또는 측정할 수 있으면 특별한 제한은 없으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 잘 알려진 일반적인 기술을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체이다.
- [0034] 본 발명에 의하면, 방사선 조사량 의존적으로 알지닌이 메틸화된 에즈린의 양이 변동되므로 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 이용하여 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상을 측정하는 데 활용할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 이용하여, 조직 시료 내에 알지닌이 메틸화된 에즈린을 측정하는 단계를 포함하는 방사선 생물학적 선량을 평가하는 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 측정은 메틸화된 알지닌에 결합하는 항체, 예컨대, ASYM24, SYM10 등의 항체를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0037] 생물학적 시료는, 조직 시료, 예컨대, 간 조직 시료 또는 암 조직 시료일 수 있고, 상기 검출은 시료 내 알지닌이 메틸화된 에즈린을 2차원 전기영동을 이용하여 측정하는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 조직 시료에 저선량 방사선을 전조사하는 단계; 상기 조직 시료에 고선량 방사선을 조사하는 단계; 및 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 바이오마커를 이용하여, 상기 조직 시료 내에 알지닌이 메틸화된 에즈린을 측정하는 단계를 포함하는 방사선 적응응답 반응 유도 여부를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0039] 상기 측정은 메틸화된 알지닌에 결합하는 항체, 예컨대, ASYM24, SYM10 등의 항체를 이용하여 측정할 수 있다.
- [0040] 생물학적 시료는, 조직 시료, 예컨대, 간 조직 시료 또는 암 조직 시료일 수 있고, 상기 검출은 시료 내 알지닌이 메틸화된 에즈린을 2차원 전기영동을 이용하여 측정하는 것일 수 있다.
- [0041] 따라서, 본 발명에 의하면 방사선-적응응답 반응 메커니즘을 이용하여 전조사에 의한 조직 시료 내에 알지닌이 메틸화된 에즈린의 양적 변화를 확인하여 방사선 적응응답 반응이 유도되었는지를 확인할 수 있고, 이에 기초하여 개인별 적절한 저선량 방사선 전조사가 가능하여 방사선 조사 또는 피폭에 따른 세포손상을 방지하고 효과적인 방사선 암치료를 제공할 수 있다.
- [0042] 이하, 본 발명에 대해 더욱 상세하게 설명한다.
- [0043] 염색체 이상, 시스터 크로마티드 익스체인지(sister chromatid exchange), 마이크로뉴클레어스 인덕션(micronucleus induction), 및 세포 생존 연구(Wang et al. 1991, Lu et al. 1993, Azzam et al. 1994, Sasaki 1995, Hyun et al. 1997)에서 나타난 바와 같이, 방사선 적응응답 반응은 저선량 방사선에 미리 노출되면 방사선에 의한 손상을 줄일 수 있는 생리적 과정이다(Liu et al. 1990). 그러나, 방사선 적응응답 반응의 메커니즘 및 조건들은 아직 명확하지 않다.
- [0044] 본 발명자들은 저선량 방사선으로 먼저 조사된 경우 세포는 적응응답 반응을 보이고 단백질 알지닌 메틸화에서 상응하는 변화를 보이는 것을 발견하였다. 알지닌 메틸화의 양에서 특징적인 변화를 보인 단백질은 에즈린(ezrin)이었다. 에즈린은 모에신(moesin) 및 라디신(radixin)과 함께 ERM 단백질로 알려져 있으며, 이 그룹은 세포 부착 및 신호전달을 조절하는 막-세포골격 링커(membrane-cytoskeleton linkers)와 관련되어 있다(Sato et al. 1992, Tsukita and Yonemura 1997, Mangeat et al. 1999).
- [0045] 본 발명자들은 방사선-적응응답 반응 동안에 단백질 알지닌 메틸화에 있어서 잠재적으로 중요한 변화, 특히 방사선 보호의 메커니즘에 있어서, 에즈린의 메틸화의 중요성을 발견하였다.
- [0046] 단백질 알지닌 메틸화는 알지닌의 구아니딘 질소에 모노메틸 또는 디메틸기를 추가하는 전사 후 변형이다. 진핵 세포에서 알지닌 메틸화의 주요한 3개의 형태로서, 모노메틸알지닌(MMA), 비대칭 디메틸알지닌(aDMA) 및 대칭 디메틸알지닌(sDMA)이 알려져 있다. 알지닌 메틸화는 기질 작용 및 단백질-단백질 상호작용들을 제어하여 전사, 번역, DNA 손상 복구 및 신호전달과 같은 세포적 작용(cellular function)에서 많은 역할을 한다(Gary and Clarke 1998, Chen et al. 1999, Mowen et al. 2001, Boisvert et al. 2003, 2005, Bedford and Richard

2005, Lee et al. 2005, Pahlich et al. 2006, Lake and Bedford 2007).

- [0047] 다양한 생물 기관에 대한 방사선 영향에 대한 관심이 증가하여, 방사선 선량에 따른 반응을 포함한 각 현상에 관련된 정확한 메커니즘에 대한 연구가 이루어지고 있다. 저선량 및 고선량 방사선 조사에 대한 반응에 있어서, 인간 피부 섬유아세포의 단백질체 인산화 분석(phosphoproteomic profiling)의 결과에 나타난 바와 같이, 저선량 및 고선량 방사선 조사 모두 전혀 다른 신호 전달(signaling pathways)에 영향을 미치는 것이 제시되었다(Yang et al. 2006). 그러나, 많은 잠재적 생물학적 연속작용(biological consequences)에 영향을 미치는 단백질 알지닌 메틸화에 방사선 조사가 미치는 효과에 대해 아직까지 알려진 바는 없다. 알지닌 메틸화는 신호전달, RNA 프로세싱, 전사, DNA 손상 복구 및 세포내 수송에서 중요한 역할을 하므로 많이 탐구되어 왔다(Chen et al. 1999, Mowen et al. 2001, Bedford and Richard 2005, Boisvert et al. 2005, Lee et al. 2005, Pahlich et al. 2006).
- [0048] 본 발명자들은 막-세포골격 링커로서 밀접하게 관련된 에즈린의 알지닌 메틸화 수준에 방사선이 선량 의존적으로 영향을 미친다는 것을 밝혀냈다. 또한, 저선량의 전조사에 의한 방사선-적응응답 반응은 에즈린의 알지닌 메틸화에 방사선 영향을 감소시킨다는 것도 밝혀냈다. 이러한 사실들은 단백질 알지닌 메틸화를 통한 세포 표면 조절에 있어서 방사선의 역할을 보여준다.
- [0049] MALDI-TOF을 채용한 단백질체학 분석 및 면역침강과 데이터베이스 검색에 의해 알지닌-메틸화 에즈린이 명확하게 확인되었다(도 1, 도 4a ~ 도 4c 및 표 1).
- [0050] 호메시스(hormesis)는 요소(agent)의 저선량 조사에 의해 유도된 자극 또는 유익한 영향으로서, 이런 영향은 동일한 요소의 고선량 조사에 의해 유도된 해롭거나 치명적인 영향의 보외법에 의해 예측될 수 없다. 인간 이배체 세포(diploid cell)를 이용한 연구에서 알려진 대로, 전리방사선(ionizing radiation)에 대한 응답 적응 반응 현상에 의해 세포가 먼저 저선량 방사선에 노출되면 전리방사선의 고선량에 노출에 따른 증식력, 게놈 안정성, 및 보호 단백질(protective proteins)의 생성에 대한 영향은 완화될 수 있으나, 이런 효과를 유도하는 메커니즘은 아직 명확하지 않다(Cai and Jiang 1995, Sasaki 1995, Cai 1999, Suzuki et al. 1998a, Suzuki et al. 1998b, Tsutsui et al. 1997).
- [0051] 본 발명자들은 저선량 방사선이 전조사된 Chang 간 세포에 연속하여 고선량의 방사선의 조사한 후 세포 증식면에서 방사선-적응응답 반응을 발견하였다(도 2a). 또한, 방사선-적응응답 반응에 수반된 비대칭 및 대칭 디메틸 알지닌의 수준의 변화를 확인하였다(도 3a ~ 도 4c). 상술한 바와 같이, 에즈린의 알지닌 메틸화 수준이 선량 의존적으로 변화하므로, 알지닌이 메틸화된 에즈린에 특이적으로 결합하는 항체 등은 방사선 생물학적 선량 평가용 바이오마커 또는 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상 측정용 바이오마커로서 유용하게 이용할 수 있다.
- [0052] 종합하면, 에즈린의 알지닌 메틸화가 방사선 선량 의존적으로 영향을 받기 때문에 본 발명에 의해 상기 단백질은 방사선 조사 영향 및 적응응답 반응의 생화학적 메커니즘과 관련되어 있다는 명백해졌다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명에 의해 에즈린의 알지닌 메틸화를 측정함으로써 방사선 생물학적 선량을 정확하게 평가할 수 있고, 방사선 피폭 또는 조사에 의한 세포손상을 측정할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명에 의하면, 방사선-적응응답 반응 메커니즘을 이용하여 개인별 적절한 저선량 방사선 전조사가 가능하여 방사선 조사 또는 피폭에 따른 세포손상을 방지하고 효율적인 암치료를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0055] 도 1a 및 도 1b는 Chang 간 세포에 방사선 조사 시 알지닌 메틸화가 변화된 단백질을 웨스턴 블롯으로 검출한 결과를 보인 도면이다. 화살표는 알지닌 메틸화가 변화된 단백질을 나타낸다.
- 도 2a 및 도 2b는 저선량 전조사에 의한 방사선 적응응답 반응을 세포 증식으로 확인한 결과를 나타낸다. 세포

증식은 BrdU incorporation (도 2a) 및 MTT (도 2b) assays를 이용하여 확인되었다.

도 3a 및 도 3b는 방사선-적응응답 반응에 수반되는 단백질 알지닌 메틸화 변화를 나타내는 것으로, 방사선-적응응답 반응에 있어서 단백질의 비대칭 디메틸알지닌(도 3a) 및 대칭 디메틸알지닌(도 3b) 수준의 변이를 나타낸다. 화살표는 알지닌 메틸화 수준이 변화된 단백질을 나타낸다.

도 4a ~ 도 4c는 방사선-적응응답 반응에 있어서 알지닌-메틸화된 단백질의 2-DE 및 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다. 도 4a는 ASYM24를 이용한 비대칭 디메틸알지닌-함유 단백질을, 도 4b는 SYM10을 이용한 대칭 디메틸-알지닌 함유 단백질을 나타내고, 도 4c는 실버 염색에 의해 단백질이 2-DE 젤 상에 가시화된 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0057] 재료 및 방법

[0058] 시약

[0059] ASYM24 (서열 KGRADMA GRADMA GRADMA GRADMA GPPPPPrADMA GRADMA GRADMA GRADMA G에서 비대칭 디메틸알지닌에 결합하는 항체) 및 SYM10 (서열 KRSADMA GRSDMA GRSDMA GRSDMA G에서 대칭 디메틸알지닌에 결합하는 항체)는 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다. α -tubulin에 대한 항체는 Cell Signaling(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-GAPDH는 Santa Cruz Biotech. Inc. (CA, USA)에서 구입하였다. ECL anti-rabbit IgG, ECL anti-mouse IgG, 및 Immobiline DryStrip pH 3-10, 7 cm는 Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)에서 구입하였다. PVDF 멤브레인 (Immobilon-P) 및 서양고추냉이 퍼록시다제(horse radish peroxidase (HRP)) 기질 퍼록사이드 용액(Immobilon Western)은 Millipore (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다. SDS-PAGE 시약, LMW 전기영동 칼리브레이션 키트(LMW electrophoresis calibration kits), 2-D 클린업(2-D Cleanup Kits), 및 Coomassie Brilliant blue R-250는 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다. DMEM(Dulbecco modified Eagle's medium), 소태아혈청(fetal bovine serum), 및 다른 배양 시약들은 Cambrex Corp. (NJ, USA)에서 구입하였다.

[0060] 세포배양

[0061] 정상 인간 간세포주인 Chang 간세포를 10% 소태아혈청, 100 μ g/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 가습 조건에서 배양하였다.

[0062] 방사선 조사

[0063] 10 cm 접시에 80-90%가 모여 있는 세포에 ³⁷Cs 감마선을 0.05 Gy/s의 선량 단위로 다양한 조사량으로 조사하였다. 조사 후, 세포를 24 시간 동안 배양하였고, 총 단백질을 분리하기 위해 회수하였다. 방사선-적응응답 반응을 유도하기 위해, 세포에 4-Gy 조사량으로 조사하기 4시간 전에 0.2 Gy의 감마선으로 전조사(pre-irradiation)하였다.

[0064] BrdU 인코포레이션 어세이(BrdU incorporation assay)

[0065] 제조자의 지시에 따라 상업적으로 이용가능한 ELISA 키트 (Roche, Nutley, NJ, USA)를 이용하여 BrdU 인코포레이션 어세이를 실시하였다. 흡광도(Optical density) 450nm에서 Microplate Reader (Molecular Devices, Spectra Max, Union City, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0066] MTT 어세이

[0067] 세포를 1.0×10^4 cells/well로 96-웰 플레이트에 분주하였다. 방사선 조사후, 세포를 24시간 동안 37℃에서 배양하고, 각 웰에 MTT 용액 (5 mg/ml) 20 μ l 을 첨가하고, 4시간 동안 37℃에서 계속 배양하였다. 배지를 제거한 후, 포르마잔(MTT metabolic product)을 200 μ l DMSO에 다시 현탁하고, 혼합액을 15분 동안 진탕하였다. 흡광도(Optical density) 450nm에서 Microplate Reader (Molecular Devices, Spectra Max, Union City, CA, USA) 를 이용하여 측정하였다.

[0068] **실시예 1. 단백질 추출물의 준비**

[0069] Chang 간 세포를 얼음 냉각된 라이시스 버퍼(2 M thiourea, 7 M urea, 4% (w/v) CHAPS (USB, Cleveland, OH, USA), 2% (v/v) IPG buffer (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) pH 3-10, 1% (w/v) dithiothreitol (DTT), protease inhibitors)에서 균질화하였다. 세포 용해물은 4℃에서 15분 동안 12,000 rpm 으로 원심분리하였다. 펠렛은 버리고 상청액의 단백질 농도를 protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다.

[0070] **실시예 2. 방사선 조사에 의한 알지닌이 메틸화된 단백질의 확인**

[0071] 방사선이 조사된 Chang 간 세포에서 인 비보(in vivo) 알지닌(arginine) 메틸화(methylation) 프로파일을 조사하였다.

[0072] 구체적으로, Chang 간세포에 저선량(0.2 Gy) 및 고선량(4 Gy) 감마선으로 조사하였고, 조사 후 24시간 후 세포 전체 추출물을 아래와 같이 항-비대칭(ASYM24) 또는 항-대칭(SYM10) 디메틸알지닌을 이용하여 웨스턴 블롯으로 분석하여, 단백질 알지닌 메틸화에 대한 방사선 조사에 따른 영향을 측정하였다.

[0073] **(1) 아이소일렉트릭포커싱 및 2-DE(Isoelectric focusing 및 2-DE)**

[0074] 대조군 및 Chang 간 세포로부터 세포질 단백질을 얻어, 2D 전기영동 및 항-대칭 또는 항-비대칭 디메틸알지닌 항체를 이용하여 웨스턴블롯에 의해 분석하였다.

[0075] 구체적으로, 단백질을 2D-크린업 키트(Bio-Rad, Chicago, USA)를 이용하여 침강시켰다. 단백질은 라이시스 버퍼(7M urea, 2M thiourea)에 용해시켰다. 단백질 농도는 단백질 어세이(Bio-Rad)를 이용하여 측정하였다. 총, 150 μ g 단백질이, 최종 부피 125 μ L로, 17시간 동안 리스웰링(reswelling)에 의한 3-10의 비선형 pH차로 7cm 길이의 Immobiline DryStrips (Amersham Biosciences)에 적용시켰다. 단백질 이외에도, 리스웰링 용액의 최종 조성은 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 1% DTT, 및 0.002% bromophenolblue (dye) 이었다.

[0076] 2-D 전기영동은 2-D Electrophoresis용 Amersham Biosciences에서 제공한 프로토콜에 따라 수행하였다. 2-D 분리를 위해, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 사용하였다. 2-D 겔은 실버 염색 키트(Bioseang, South Korea) 로 염색하거나, 웨스턴 블롯팅에 의한 디메틸알지닌 잔기 검출에 이용하였다.

[0077] **(2) 웨스턴 블롯 분석**

[0078] 알지닌 메틸화된 단백질을 항-디메틸알지닌 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 단백질 추출물은 Mini-PROTEAN 3Cell (Bio-Rad)를 이용한 SDS-PAGE 또는 2-D electrophoresis (2-DE)에 의해 측정되었다. 단백질은 Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)를 이용하여 60분 동안 25V로 시행하여 PVDF 멤브레인으로 이동되었다. 멤브레인은 3% 탈지유에서 1:1000으로 희석된 1차 항체에 4℃에서 밤새 인큐베이션되고, 3% 탈지유에서 1:8000으로 희석된 2차 항체에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 세척 후, TBS-T (0.05 M Tris, 0.25 M NaCl, 0.05% Tween 20)에서 단백질 밴드를 HRP 기질 퍼록사이드 용액 (Millipore)을 이용하여 보았다.

[0079] ASYM24 (서열 KGRADMA GRADMA GRADMA GRADMA GPPPPPrADMA GRADMA GRADMA GRADMA G에서 비대칭 디메틸알지닌에 결합하는 항체, Lake Placid, NY, USA) 및 SYM10 (서열 KRSDMA GRSDMA GRSDMA GRSDMA G에서 대칭 디메틸알지닌에 결합하는 항체, Lake Placid, NY, USA) 항체로 2D 웨스턴 블롯팅 한 후, 단백질 스팟들을 ImageMaster 1D

prime (GE Healthcare)에 의해 반정량적으로 측정하였다.

[0080] (3) 이미지 분석

[0081] 디지털화된 이미지의 웹핑(Wapping) 분석은 제조자 (<http://www.nonlinear.com/products/progenesis/msbio.asp>)에 의해 제공된 프로토콜에 따른 프로게네시스 소프트웨어(비선형)를 이용하여 수행되었다. 단백질 스팟은 방사선 조사 후 디메틸알지닌 함량상의 중요한 변화로 선별하였다.

[0082] 그 결과를 도 1a 및 도 1b에 나타내었다. 나타난 모든 데이터는 평균±SEM(n≥3)이었다. *t*-test에 의해 측정된 것으로서 통계적으로 중요한 차이는 *P < 0.05 로 맞추었다. 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 0.2 Gy 저선량 방사선 조사 후 4 Gy 고선량 방사선을 조사하면, 약 70 kDa의 분자량을 갖는 단백질 중 비대칭 디메틸알지닌의 발생이, 조사되지 않은 각각의 대조군 세포에 비해서 약 1.7 및 2.7배 증가하였다(도 1a 참조). 이에 반해 0.2 Gy 저선량 방사선 조사 후 4 Gy 고선량 방사선을 조사하면, 약 70 kDa의 분자량을 갖는 단백질 중 다른 단백질인 대칭 디메틸알지닌의 발생이, 조사되지 않은 각각의 대조군 세포에 비해서 약 0.7 및 0.25배 감소하였다(도 1b 참조). 대조적으로, 다른 알지닌-메틸화 단백질은 알지닌 메틸화 수준에서 유의적인 변동이 없었다.

[0083] 실시예 3. 방사선-적응응답 반응에 따른 세포증식 및 단백질 알지닌 메틸화의 변이 확인

[0084] (1) 우선, 방사선 적응응답 반응을 세포증식을 통해 확인하였다.

[0085] 80-90%가 모여있는 Chang 간 세포에 ¹³⁷Cs 감마선을 0.05 Gy/s 선량 단위로 조사하였다. 방사선 조사 후 세포는 24시간 동안 배양되었고 BrdU 인코포레이션 및 MTT 어세이에 의해 세포 증식을 측정하였다. 방사선-적응응답 반응을 유도하기 위해, Chang 간 세포를 4-Gy 감마선으로 조사하기 4시간 전에 0.2 Gy로 전조사하였다. 고선량 방사선에 노출된 24시간 후 BrdU 인코포레이션 및 MTT 어세이에 의해 세포 증식을 측정하였다. 방사선이 조사되지 않은 대조군 세포, 0.2-Gy로 전조사된 세포 및 4-Gy로만 조사된 세포간에 세포증식이 비교되었다. 나타난 모든 데이터는 평균±SEM(n≥3)이었다.

[0086] 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 4 Gy로 조사된 경우, 전형적인 방사선으로 유도된 세포 증식 억제(Luckey 1982)와 같이 세포증식이 약 25% 감소하였다. 그러나, 고선량 방사선 조사 4시간 전에 저선량 방사선으로 전조사된 세포의 상당수가 방사선으로 유도된 세포 증식 억제로부터 회복되었다(도 2a 및 도 2b). 이들 결과로 방사선-적응응답 반응은 0.2 Gy 전조사에 의해 유도될 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0087] (2) 다음, 방사선-적응응답 반응에 단백질 알지닌 메틸화 변이가 수반되는지 여부를 조사하였다.

[0088] 이를 위해 Chang 간 세포에 0.2 Gy 감마선을 전조사하고 4시간 후에 4 Gy의 고선량 방사선을 조사하였다. 저선량-전조사된 세포와 고선량 조사된 세포 사이의 알지닌-메틸화 단백질을 비교하여, 단백질 알지닌 메틸화에 대한 방사선-적응응답 반응의 영향을 관찰하였다.

[0089] 그 결과를 도 3a 및 도 3b에 나타냈다. 화살표는 알지닌 메틸화 수준이 변경된 단백질을 나타낸다. 나타난 모든 데이터는 평균±SEM(n≥3)이었다. *t*-test에 의해 측정된 것으로 통계적으로 중요한 차이는 *P < 0.01 (*), **P < 0.05로 맞추었다.

[0090] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, 저선량 방사선에 의해 미리 노출되면, 고선량 방사선에 의한 예측되는 비대칭 또는 대칭 디메틸알지닌 수준의 변화가 상쇄되었다. 즉, 세포에 4 Gy의 고선량 방사선으로 조사되기 4시간 전에 0.2 Gy 감마선으로 전조사하면, 70-kDa 단백질 중 비대칭 디메틸알지닌 수준의 예측되는 증가가 현저하게 감소되었다(도 3a). 또한, 다른 70-kDa 단백질인 대칭 디메틸알지닌의 고선량 조사에 의한 감소는 방사선-적응응답 반응에 의해 현저하게 상쇄되었다(도 3b). 다른 알지닌-메틸화된 단백질에서, 알지닌 메틸화 수준은 어떠한 유의적인 변이도 보이지 않았다. 이런 결과를 통해 에즈린 단백질 알지닌 메틸화는 방사선-적응응답 반응의 세포 메커니즘과 관련되어 있다는 것을 알 수 있다.

- [0091] **실시예 4. 2-D 전기영동 및 질량 분석을 이용한 방사선 조사에 의해 알지닌 메틸화에서 변이를 보이는 단백질의 확인**
- [0092] 방사선 조사시 알지닌 메틸화 수준에 변화를 나타내는 단백질들을 규명하기 위해, 다음과 같이 2-D 전기영동 및 MS 분석을 이용하였다.
- [0093] (1) 2-D 전기영동
- [0094] Chang 간 세포는 0.2 Gy 감마선으로 조사되고, 4시간 후에 4 Gy의 고선량으로 조사되었다. 저선량으로 전조사된 세포와 고선량으로만 조사된 세포의 단백질 알지닌 메틸화 수준을 웨스턴 블롯으로 비교하였다. 그 결과를 도 4a(ASYM24를 이용한 비대칭 디메틸알지닌-함유 단백질) 및 도 4b(SYM10을 이용한 대칭 디메틸-알지닌 함유 단백질)에 나타내었다. 도 4c는 실버 염색에 의해 단백질이 2-DE 젤 상에 가시화된 것을 나타낸다. 알지닌 메틸화의 변화를 나타내는 단백질(붉은 색 및 녹색 원)들은 다음과 같이 분리되어 MS 분석되었다.
- [0095] (2) 단백질의 인-젤(in-gel) 효소적 분해
- [0096] 상기 이미지 분석프로그램으로 찾아낸 스팟들을 동정하기 위하여, 단백질 스팟은 이전에 Shevchenko *et al.* (Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 14440-14445)에 개시된 방법과 유사하게 변형된 포르신 트립신으로 인-젤 상태에서 효소적으로 분해하였다. 젤 조각들을 50% 아세토니트릴로 세척하고, 건조한 다음, 재수화하였으며, 8-10시간 동안 37℃에서 트립신(8-10ng/ μ L)으로 인큐베이션하였다. 단백질가수분해 반응은 5ml의 0.5% 트리플루오로아세트산(TFA)의 첨가에 의해 종료되었다. 펩티드 혼합물은 C18ZipTips (Millipore, Billerica, USA)을 사용하여 탈염되었고, 펩티드들은 1~5mL의 아세토니트릴로 녹여서 분리하였다. 이 용액의 일부를 50% aqueous acetonitrile에 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid가 포화된 용액과 동일한 부피로 혼합하였고, 이 혼합물의 1 μ L를 MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) 분석 타겟 플레이트에 스팟팅하였다.
- [0097] (3) MALDI-TOF 분석 및 데이터베이스 검색
- [0098] 단백질 분석은 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England))을 이용하여 수행되었다. 펩티드들은 지연된 extraction approach를 이용하여 337nm에서 N₂ 레이저로 증발되었다. Time-of-flight 분석용 20KV injection pulse로 가속화시켰다. 각각의 스펙트럼은 누적하는 평균 300 레이저 펄스였다. Rockefeller University (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)에 의해 개발된, 검색 프로그램 ProFound는 펩티드 질량 핑거프린팅에 의해 단백질 확인용으로 사용되었다. 스펙트럼들은 내부 기준으로써 m/z 842.510, 2211.1046의 트립신 자동-분해 이온 피크를 사용하여 계산되었다.
- [0099] 상기와 같이, 1차원 PAGE 방사선에 의해 알지닌 메틸화 수준에서 변이를 보이는 단백질이 2-DE에 의해 분리되었고, 항-비대칭 및 항-대칭 디메틸알지닌 항체를 이용하여 웨스턴 블롯에 의해 시각화되었다(도 4a 및 도 4b). 그 결과 방사선-적응응답 반응에 의해, 방사선에 의한 70-kDa 단백질 중 비대칭 디메틸알지닌 수준의 증가 및 다른 70-kDa 단백질인 대칭 디메틸알지닌 생성의 감소가 완화된 것을 확인하였다.
- [0100] 알지닌 메틸화 수준이 방사선 조사에 의해 변화된 단백질은 실버 염색 후 젤을 잘라내어, 펩티드 핑거프린트를 위해 MALDI-TOF MS DP에 의해 분석되었다(도 4c). Profound 데이터베이스에 기초하여 99% 확률로 비대칭 디메틸알지닌 함유 단백질은 에즈린(도 4a 및 도 4c)이었고, 대칭 디메틸알지닌 함유 단백질은 모에신(도 4b 및 도 4c)이었다. 에즈린 및 모에신에 대한 Z 스코어 및 MS 분석 % 커버리지를 표 1에 나타내었다. 즉 표 1은 방사선-적응응답 반응에 있어서 알지닌 메틸화의 양적 변화를 보인 단백질의 분석결과이다.

표 1

spot ID	ACC no.	Protein name	pI/pI	Z score	MS analysis % coverage
A	AAH68458	Ezrin	69.34/5.9	2.17	26%
B	NP002435	Moesin	57.92/6.1	2.34	25%

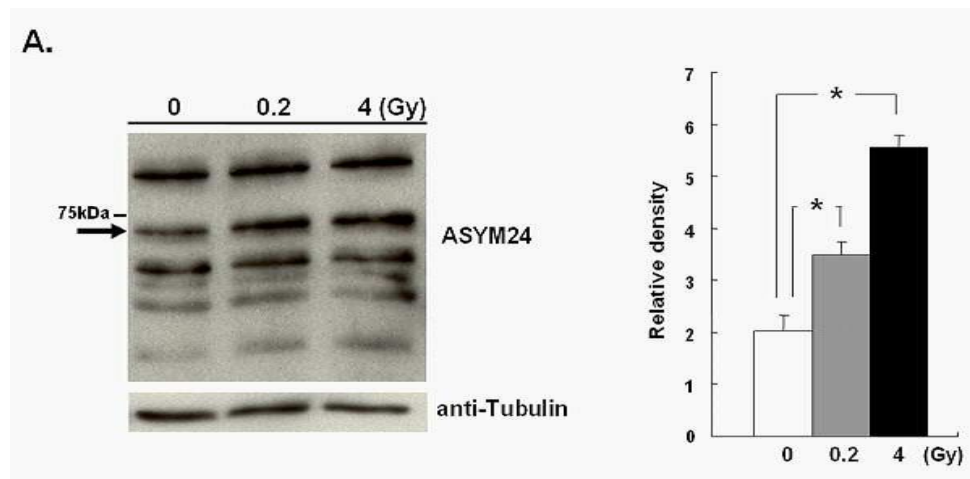
[0101]

[0102]

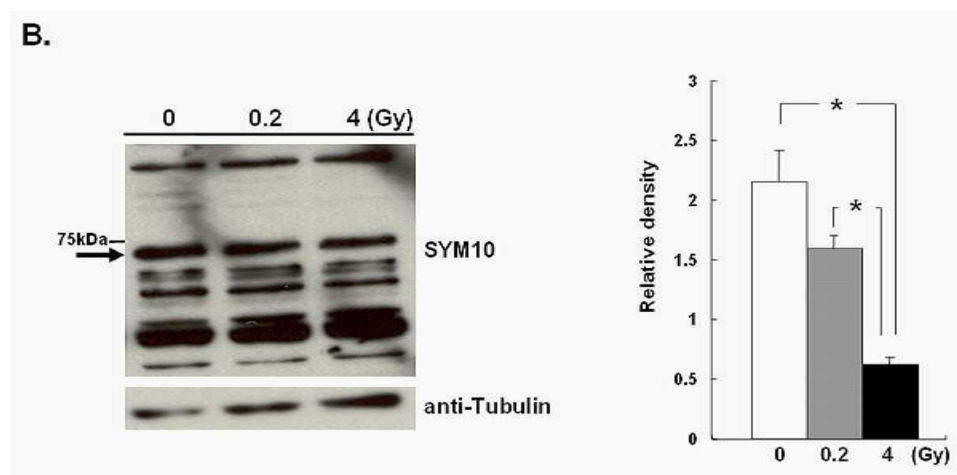
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

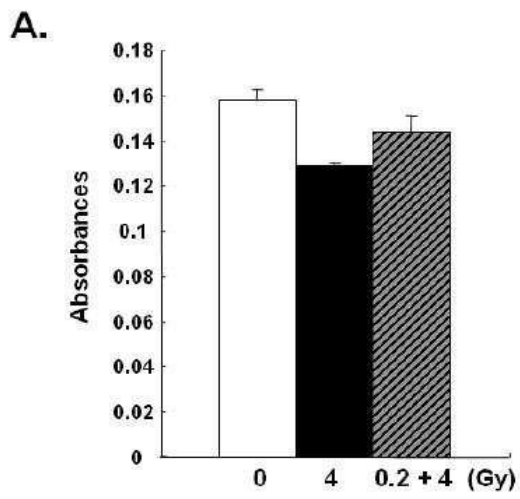
도면1a



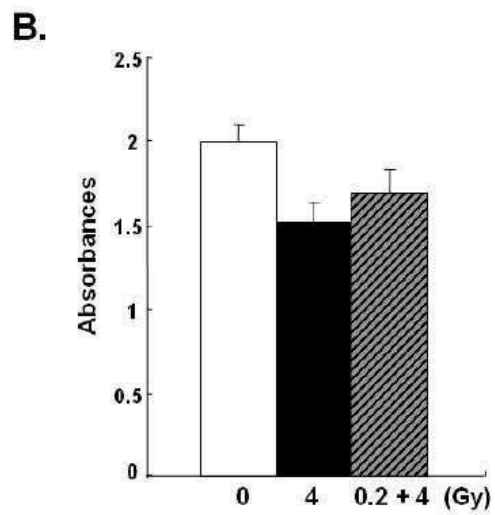
도면1b



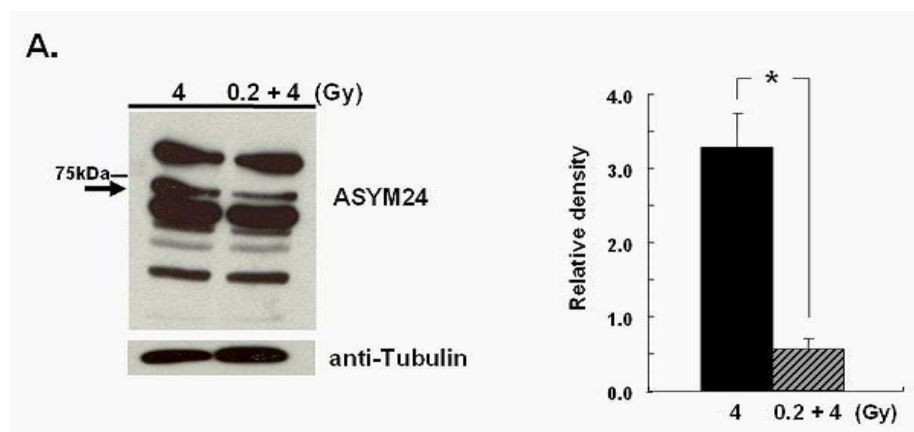
도면2a



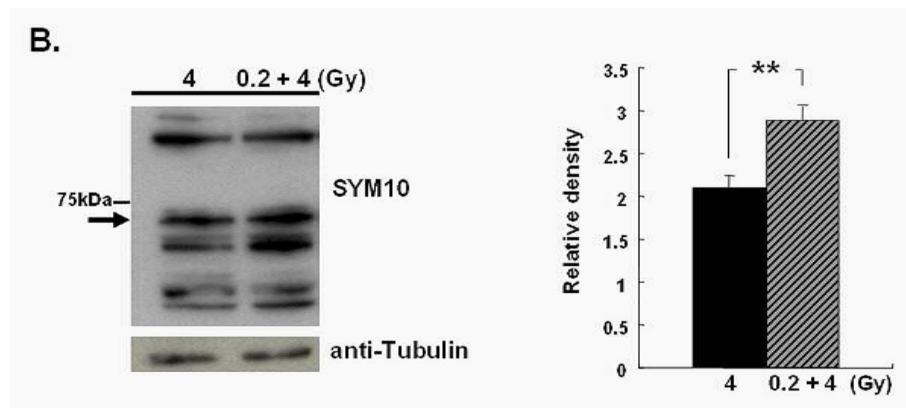
도면2b



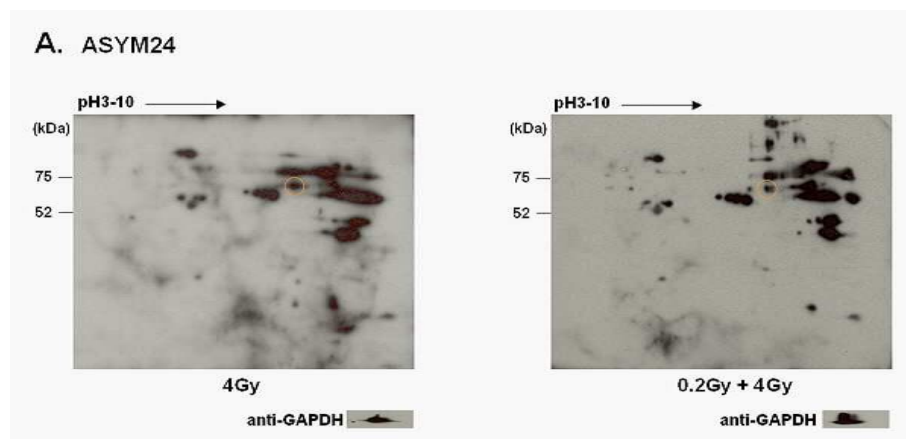
도면3a



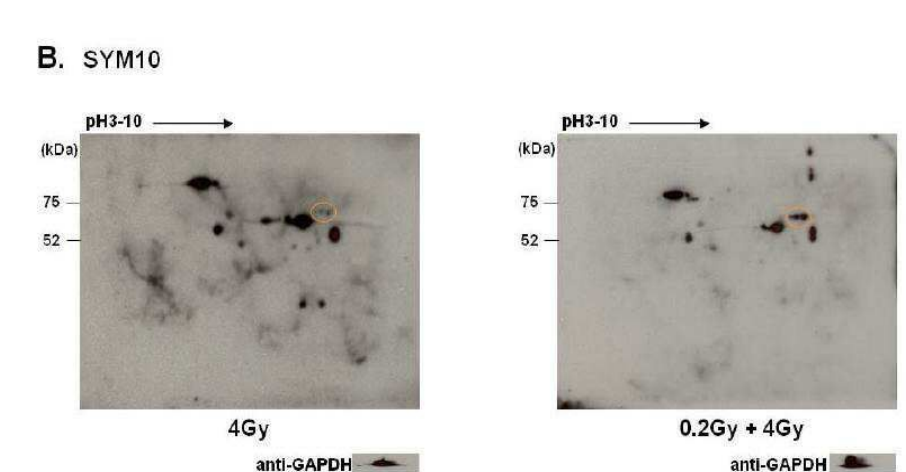
도면3b



도면4a



도면4b



도면4c

C.

