



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월20일
(11) 등록번호 10-2022948
(24) 등록일자 2019년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56966 (2013.01)
C12N 5/0606 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0063562
(22) 출원일자 2018년06월01일
심사청구일자 2018년06월01일
(56) 선행기술조사문헌
W02017170849 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
신동명
경기도 광명시 목감로 58, 116동 2504호 (광명동, 광명해모로이연)
허진범
경기도 하남시 신장로 104, 910호 (신장동, 성원상떼빌)
이승운
경상남도 거창군 거창읍 거열로3길 10, 1201호
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 22 항

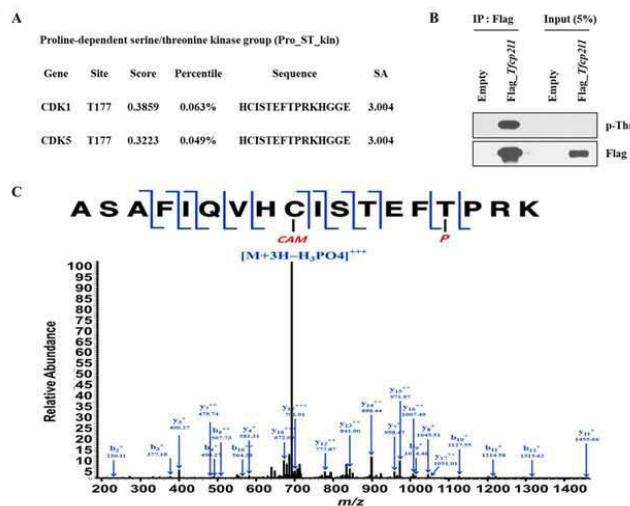
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 인산화된 TFCP2L1을 포함하는 줄기세포 다능성, 분화능 및 증식능 예측용 바이오마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인산화된 TFCP2L1 단백질을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 증가하면, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 현저하게 증가하므로, 이를 다양한 질환을 치료하는 줄기세포 치료제에 적용하여 치료 효과를 높이기 위해 활용될 수 있으며, 또한 암 줄기세포에서의 분화능 또는 증식능을 확인하여 발암 물질 혹은 암 치료제 등을 개발하기 위해 활용될 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

C12N 5/0696 (2013.01)
G01N 33/5073 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12N 2501/60 (2013.01)
G01N 2440/14 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120118619 A
 KR1020110027914 A
 Kuisheng Liu et al, Journal of Cell Science (2017), vol 130, pp 3809-3817.
 Lim J et al, Biochemical and Biophysical Research (2016), vol 473, pp 35-41.
 Grazizno Martello et al, The EMBO Journal (2013), vol 32, pp 2561-2574.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018-0103 (NRF-2018R1A2B2001392)
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	Sirt1-Dnmt3L 유전자 네트워크를 통한 줄기세포 후성유전체 안전성 조절 기전 연구
기 여 율	1/1
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인산화된 TFPC2L1 단백질을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 인산화된 TFPC2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 177번째 트레오닌이 인산화된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 성체줄기세포 및 암 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 4

인산화된 TFPC2L1 단백질을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 인산화된 TFPC2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 177번째 트레오닌이 인산화된 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 조성물.

청구항 7

제 4 항 내지 제 6 항에 따른 조성물을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 키트.

청구항 8

TFPC2L1 단백질을 인산화시키는 인산화제를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상용 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFPC2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상용 조성물.

청구항 10

TFPC2L1 단백질을 인산화시키는 단계를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFPC2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상 방법.

청구항 13

- (a) 줄기세포에서, 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계;
 - (b) 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
 - (c) 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 대조군 시료보다 높을 경우, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 증가되었다고 판단하는 단계
- 를 포함하는, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 성체줄기세포 및 암 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

- (a) 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계;
 - (b) 상기 줄기세포에서, 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계;
 - (c) 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
 - (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제로 판단하는 단계
- 를 포함하는, 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법.

청구항 19

- (a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계;
- (c) 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암 진행을 촉진시키는 물질로 판단하는 단계

를 포함하는 암 진행 촉진 물질의 스크리닝 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 암 진행 촉진 물질의 스크리닝 방법.

청구항 21

(a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계;

(c) 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및

(d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 감소한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암의 치료제로 판단하는 단계

를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 암 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 177번째 트레오닌이 인산화된 전사인자 CP2-유사 단백질 1(Transcription factor CP2-like protein 1; TFCP2L1)을 포함하는 줄기세포 다능성, 분화능 및 증식능 예측용 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 배아 발달 및 성인 조직의 항상성 발달은 줄기세포(Stem cells: SCs)의 숫자에 의해, 줄기세포 자체 풀(pool)의 자가-갱신/유지를 겪거나 일생 동안 사용되는 대체 세포인 분화된 전구체들을 생성시킴으로써 조절된다. 전사인자(Transcription-factors; TFs)와 크로마틴 조절 단백질은 특정 유전자 발현 패턴을 유지함으로써 배아 단계에서 성인기까지 나타나는 줄기세포의 핵심 기능을 조절하는 데에 중요한 역할을 한다. 실제로, 독특한 만능특성을 유지하기 위해, 배아 줄기세포들(Embryonic SCs)은 OCT4, NANOG, SOX2와 같은 특정한 핵심 전사인자를 발현하는데, 이들은 분화된 체세포에서는 발현이 멈춰있다. 이러한 전사인자들은 만능성의 줄기세포가 미분화된 상태를 계속 유지하도록 유전자 발현을 강화하고, 반대로 분화-유도 전사는 억제함으로써 만능성의 핵심 회로망(circuitry)을 형성한다. 기대되는 바와 같이, 만능성 연관 전사인자들의 발현은 한 번 조직 발달이 완료되면 크게 억제된다.

[0003] 특별히, 종양에서 배아 줄기세포 표현형을 유지하거나, 배양 시 배아 줄기세포의 급격한 증식에 공헌하는, STAT3, E-RAS, cMYC, KLF4 및 β -카테닌과 같은 여러 유전자가 장시간동안 비정상적으로 활성화되는 것이 자주 발견되어왔다. 그러므로, 배아 줄기세포와 성체 줄기세포에서 상기 전사인자들과 신호전달의 엄격한 조절의 구체적인 메커니즘을 연구하는 것은 줄기세포의 정확한 분자적 본성과, 노화 및 발암 현상과 같은 병리학적 다양성의 이해를 증진시킬 것이다.

[0004] 한편, 전사인자 CP2 패밀리의 하나인 Tfcp2l1은 마우스 배아에서 WNT 반응성 유전자로서 식별된 바 있다. Tfcp2l1의 발현은 일시적으로 배반포(blastocyst)의 내세포 집단에서 발견되었으며, 이식 후에는 즉시 하향조절되었다. 상기 초기 배아 발달 단계에서, Tfcp2l1은 만능성의 완전(naive)한 상태를 유지하는 데에 핵심적인 역할을 한다. 트랜스크립토프로파일에서 변화 분석을 기반으로, KLF2, KLF4, OCT4의 과발현에 의해 인간 배아 줄기세포가 완전한 상태와 유사하게 전환될 때, TFCP2L1의 발현이 특징적으로 상향조절됨이 발견되었고, 무린과 인간 배아줄기세포에서 만능성-연관 전사인자가 없어짐이 보고되었다. 기계적으로, 여러 가지 만능성 연관 유전자들이 TFCP2L1에 의해 표적되며, TFCP2L1의 전사는 Oct4, Nanog 및 Jmjd1a와 같은, 만능성에 요구되는 히스톤 디메틸화효소 만능성 인자들에 의해 조절된다. 게다가 Tfcp2l1은 Oct4-중심 단백질 상호작용 네트워크의 구성원

으로서 식별된 바 있다.

[0005] OCT4, NANOG와 같은 전형적인 만능성 전사인자와 달리, *Tfcp2l1*은 발달 중인 조직 또는 성체 조직의 상피, 특별히 상피 형태발생(morphogenesis), 기능 성숙 및/또는 항상성에 중요한 역할을 하는 외분비샘과 신장에서 발현된다. 실제로, *Tfcp2l1* 결함 마우스의 70%가 출생 후 5주가 되기 전에 신장의 형성 부전(hypoplasia) 때문에 죽었다. 만능성과 WNT 신호 사이의 연관성을 고려할 때, 성인 조직에서의 *TFCP2L1*의 발현은 엄격하게 조절되며 상주 줄기세포수로 제한된다. 조직 손상은 손상된 조직을 재생하기 위해 *TFCP2L1*-중심 발달성 경로의 활성화를 일으킬 수 있고, 조직에 대한 초과 자극은 악성 종양과 같은 병리학적 조건을 발생시키는데, 이러한 현상은 여러 주요한 배아 발달 유전자들(예를 들어 STAT3, E-RAS, CMYC, KLF4, β -카테닌)과 신호 전달 경로(NOTCH, WNT, HEDGEHOG)에서도 관찰된 바 있다.

[0006] 그럼에도 불구하고, 아직까지 초기 배아 발달과정 및 성인기의 병리생리학적 조건에서 *TFCP2L1*의 발현 레벨, 활성 및 번역 후 변형(post-translational modification) 상태를 조절하는 구체적인 분자적 메커니즘은 연구된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2008-0048268호(2008.06.02 공개).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능을 보다 효과적이고 정확하게 예측할 수 있는 바이오마커 조성물, 예측용 조성물 또는 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능을 향상시킬 수 있는 조성물 또는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법, 암 진행 촉진 물질의 스크리닝 방법 또는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인산화된 *TFCP2L1* 단백질을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 인산화된 *TFCP2L1* 단백질을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 키트를 제공한다.

[0015] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *TFCP2L1* 단백질을 인산화시키는 인산화제를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 *TFCP2L1* 단백질을 인산화시키는 단계를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상 방법을 제공한다.

[0017] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 줄기세포에서, 인산화된 *TFCP2L1* 단백질의 양을 측정하는 단계; (b) 상기 인산화된 *TFCP2L1* 단백질의 양을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 상기 인산화된 *TFCP2L1* 단백질의 양이 대조군 시료보다 높을 경우, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 증가되었다고 판단하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0018] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 줄기세포

포에서, 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제로 판단하는 단계를 포함하는, 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 (a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암 진행을 촉진시키는 물질로 판단하는 단계를 포함하는 암 진행 촉진 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 더불어, 본 발명은 (a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TF2P2L1 단백질의 양이 감소한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암의 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 인산화된 TF2P2L1을 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 및 증식능 예측용 바이오마커에 관한 것으로, 인산화된 TF2P2L1의 양이 많아질수록, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 현저하게 증가하였으므로, 이를 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 성체줄기세포에 적용하여 줄기세포 치료제를 개발하기 위해 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 암 줄기세포에 적용하여, 암의 진행 여부를 확인하고 암 진행 촉진 물질 또는 치료제를 스크리닝하는 방법으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 플래그(Flag)가 태그된 Tfcp2l1을 안정적으로 발현하는 무린 배아줄기세포(Flag-Tfcp2l1 mESCs)에서, 면역 침전(immunoprecipitation) 생성물로부터 질량 분석법을 이용해 Tfcp2l1 단백질 상호작용체를 식별한 결과로, 메타코어 분석에서 Tfcp2l1 상호작용체 중 10개의 가장 많이 나타난 프로세스 네트워크(A) 및 대표적인 WNT와 CDK1 연관 유전자 네트워크(B)를 나타낸 것이다(각 상호작용 단백질의 D-스코어는 빨간색의 강도로 나타냄).

도 2는 NuRD, Trapp/p400, SWI/SNF 복합체를 포함하는 만능성 및 전사 조절 네트워크와 관련된 상호작용 단백질을 식별하기 위한 Flag-태그된 N-말단의 단편화 단백질 면역 침전 분석 결과(1-260)를 나타낸 것이다(아무것도 포함되지 않은 플라스미드(Flag)가 대조군으로 사용됨).

도 3은 NuRD, Trapp/p400, SWI/SNF 복합체를 포함하는 만능성 및 전사 조절 네트워크와 관련된 상호작용 단백질을 식별하기 위한 Flag-태그된 C-말단의 단편화 단백질의 면역 침전 분석 결과(261-479)를 나타낸 것이다(아무것도 포함되지 않은 플라스미드(Flag)가 대조군으로 사용됨).

도 4는 글루타치온 S-전달효소(GST)-융합 Oct4 및 인 비트로(in vitro)에서 번역된, Flag-태그된 Tfcp2l1 단백질을 사용하여 수행한 GST 풀-다운(PD) 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 루시퍼라아제 리포터 구조가 포함된 17개의 중열(tandom) Gal4 반응요소(Gal4-RE)를 발현하는 무린 배아줄기세포에서, Gal4-DNA 결합 도메인(Gal4-DNA binding domain; DBD)과 융합된 Tfcp2l1 전체 길이(1-479), N-말단(1-260), C-말단(261-479) 단백질들의 전사 조절 활성을 확인한 결과이다(데이터 값은 Gal4-DBD 대조군에 대한 상대적인 값으로 나타내었으며, 평균±SEM으로 표시하였다[n=4, 일원변량분석, Gal4-DBD와 비교했을 때 *p<0.05, **p<0.01임]).

도 6은 (A) 입증된 47개의 Tfcp2l1 결합 지역(T1-T47)에 결합하는 Flag-태그된 Tfcp2l1 단백질의 qChIP 분석 결과, 및 (B) 컷-오프값이 0.5 연관 스코어 이상(결합 장소의 유전자 위치가 전사 시작 장소에 가장 가깝다는 것을 나타냄)인 필터링된 유전자들에 의한 Tfcp2l1 ChIP-seq 데이터세트의 유전자 온톨로지 분석 결과를 나타낸 것이다(A: 대조군으로서 마우스 항-IgG를 사용하였고, 각 표적 지역에서 나타난 단백질의 강화량은 결합 분획값(B)과 비결합 분획(UB)값의 비율로서 계산되었으며, 배수 차이는 Tfcp2l1 전체 길이 값(1 세트, 빨간 점선)에 대한 비율로서, 평균 ± SEM [n=4; 일원변량분석, *p<0.05, ***p<0.001]으로 나타내었다).

도 7은 이소성의 Tfcp2l1을 발현하는 무린 배아줄기세포(Tfcp2l1-ESCs)에서, 세포 증식 확인(A, n=8), 자가-재

생 경쟁 분석(B, n=8), 배양체 형성 실험(C, n=8) 결과를 나타낸 것이다(β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다).

도 8은 이소성의 Tfcp2l1를 발현하는 무린 배아줄기세포(Tfcp2l1-ESCs)에서, 만능성 및 세포 주기 관련 단백질들의 웨스턴 블롯 어세이 결과를 나타낸 것이다(β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다).

도 9는 (A) Tfcp2l1 shRNA(shTfcp2l1) 발현 mESCs에서, 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP) 염색 결과, (B) 배양체의 크기(둘레) 확인 결과(n=10), (C) 세포증식 확인 결과(n=5), (D) 만능성 및 생식계열 효능(왼쪽 패널) 또는 계통 분화(오른쪽 패널)와 관련된 유전자들의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다(대표적인 명시야 상(Br) 및 AP 염색 이미지들은 X200의 비율로 확대되었고(스케일 바 = 200 mm), LacZ shRNA(shLacZ)를 대조군으로 사용하였다).

도 10은 Tfcp2l1 shRNA(shTfcp2l1) 발현 mESCs에서, 만능성 및 생식계열 효능(위쪽 패널) 또는 계통 분화(아래쪽 패널)와 관련된 유전자들의 실시간 정량 PCR(real-time qPCR) 분석 결과(n=4)를 나타낸 것이다(LacZ shRNA(shLacZ)를 대조군으로 사용하였다).

도 11은 (A) shTfcp2l1 mESCs에서 FACS를 이용하여 DNA 함량 분석을 수행한 결과(n=4), 및 (B) 세포 주기와 관련된 Tfcp2l1 전사 표적 유전자의 실시간 정량 PCR 분석을 수행한 결과(n=4)이다(데이터들은 shLacZ 처리 샘플에서 상대적인 값의 비율로 나타내었으며, 평균 $\pm$ SEM으로 기재하였다; 일원변량분석 또는 이원변량 분석, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, n.s.=비유의적).

도 12는 (A) Flag-Tfcp2l1 mESCs의 Flag-면역침전 생성물을 대상으로 한 무린 Tfcp2l1 단백질 인산화의 인 실리코(In silico) 분석 결과, (B) 인산화된 트레오닌 단백질(p-Thr)의 검출 결과, 및 (C) Thr177이 인산화된 Tfcp2l1를 나타내는 검출 펩타이드들의 질량 분석법 결과를 나타낸 것이다(모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다; Tfcp2l1-WT과 비교했을 때, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001이고; ## p < 0.01, ### p < 0.001, ns: 비유의적, t; 본페로니 사후분석 및 일원- 또는 이원변량 분석 수행).

도 13은 Flag-Tfcp2l1 T177A 돌연변이 발현 세포(A)와, 5시간 동안 25 mM의 로스코비틴의 부재 또는 존재하에서 Flag-Tfcp2l1 무린 배아줄기세포(B), 혹은 Cdk1에 대한 shRNA(shCdk1)를 일시적으로 발현하는 세포(C)에서, 각각의 p-Thr 검출을 위한 Flag-면역 침전 분석 결과를 나타낸 것이다(Cdk1의 활성화는 히스톤 H3의 세린-10 인산화(p-H3S10)의 레벨량을 확인하여 결정하였고, 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다; Tfcp2l1-WT와 비교했을 때 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns : 비유의적; 본페로니 사후분석 및 일원- 또는 이원변량 분석 수행).

도 14는 (A) mESC에서 에피토프-태그된 Tfcp2l1 및 Cdk1 단백질(위쪽 패널) 또는 내재성의 Tfcp2l1 및 Cdk1 단백질들 사이의 물리적 상호작용을 검출하기 위한 면역침전 분석 결과, (B) 일시적인 Tfcp2l1-WT 또는 Cdk1 ORF(n=4)를 포함하거나(채워진 네모칸), 포함하지 않는(빈 네모칸)을 포함하는 Tfcp2l1-T177A 돌연변이 감염 후의 무린 Nanog(왼쪽 패널) 또는 6XOS2(오른쪽 패널)에서 프로모터 활성을 확인한 결과(6XOS2는 Fgf4 인핸서로부터 Oct4/Sox2 결합 부위로 구성된 중열 반복 서열(tandem repeat) 여섯 개를 의미)를 나타낸 것이다(모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다; Tfcp2l1-WT와 비교했을 때 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; ## p < 0.01, ### p < 0.001, ns: 비유의적; 본페로니 사후분석 및 일원- 또는 이원변량 분석 수행).

도 15는 (A) Tfcp2l1-WT, Tfcp2l1-T177A 또는 shTfcp2l1 과발현 mESC에서 AP 염색(X200 배율, 스케일 바 = 200 mm) 결과, (B) 세포 증식 확인 결과(n= 5), 및 (C) Tfcp2l1-WT, Tfcp2l1-T177A, Tfcp2l1-T177E 돌연변이(왼쪽 패널)을 과발현함으로써 회복된 shCdk1 배아줄기세포 콜로니의 대표적 그림(이와 같이 회복된 콜로니들(n=10)의 AP 염색 및 정량 결과는 오른쪽 패널에 나타내었음)을 나타낸 것이다(데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다; Tfcp2l1-WT와 비교했을 때 * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001## p < 0.01, ### p < 0.001, ns: 비유의적; 본페로니 사후분석 및 일원- 또는 이원변량분석 수행).

도 16은 특정한 날에 배양체들에서의 만능성 및 계통 특이적 유전자들을 대상으로 수행한 실시간 정량적 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다(Tfcp2l1-WT, T177A, T177E 구조를 포함하는 렌티바이러스로 감염된 ESC를 배양체 형성 시 사용하였고, 대조군으로는 빈 플라스미드를 포함하는 렌티바이러스를 사용하였다; 발현 레벨은 0일차-빈 대조군의 오래된 배양체에 대한 비율로 나타내었다[평균 $\pm$ SEM, n=4]).

도 17은 (A) 7일차-Tfcp2l1-WT, T177A, T177E 렌티바이러스로 감염된 gcOct4-GFP ESCs로부터 얻은 오래된 배양체들의 Oct4⁺(초록색) 배 세포에서 SSEA-1 단백질의 면역 염색 결과(빨간색, X200 또는 X400 배율, 스케일 바 =

100 mm; DAPI로 핵을 카운터염색하였고(파란색), 도식적인 gcOct4-GFP에서 Oct4 위치(locus) 및 실험 디자인은 오른쪽 패널에 나타내었다; DE: 원위 인핸서, PE: 근위 인핸서, PP: 근위 프로모터), 및 (B) GFP⁺/SSEA1⁺ 생식 세포의 정량 데이터를 평균±SEM (n = 12)으로 나타낸 결과이다(빈 대조군과 비교했을 때 **p < 0.01, ***p < 0.001, Tfcp211-WT과 비교했을 때, ###p < 0.001임).

도 18은 (A) 지시 Tfcp211 개방형 해독틀(ORF) 또는 shRNA 렌티바이러스의 부재 또는 존재하에서, SOKM-감염 OG2-MEFs로부터 발생한 유도 만능 줄기세포(iPSC) 콜로니에서 Oct4-GFP 발현 및 AP 염색(X100 배율, 스케일 바 = 100 mm)의 대표적인 형태학적 그림을 나타낸 결과, 및 (B) 조절된 Tfcp211 Thr177 인산화 또는 (C) Tfcp211 침묵 시(C)의 AP⁺ iPSC 콜로니의 정량적 데이터를 평균±SEM로 나타낸 것이다(n=10, 일원변량분석; ***p<0.001).

도 19는 (A) 노코다졸(Noc, 200 ng/ml)을 10시간 처리하여 G2/M기에서 세포 주기가 멈춘 뒤 방출된 mESC에서의 지시된 단백질의 웨스턴 블롯 분석 결과, (B) DNA 함량 확인 결과, (C) 세포 주기 단계별 비율의 히스토그램 (n=3)을 Noc-처리 및 방출된 세포에서 PI 염색법과 FACS 분석을 통해 확인한 결과[G2/M기 및 비동기화된(Asy) Flag-Tfcp211 mESC 사이에서 비교; n=4], 및 (D) 입증된 전사 표적(n=4)에 결합하는 Flag-Tfcp211의 qChIP 분석 결과[일시적으로 Flag-Tfcp211-WT 또는 Flag-Tfcp211-T177A 감염된 mESC에서 비교; n=4]를 나타낸 것이다(C에서, 배수 차이는 Asy mESC에 대한 비율로 나타내었고, D에서, 배수 차이는 Flag-Tfcp211-WT mESC에 대한 비율로 나타내었으며, 파란색 선은 대조군의 값의 1/2을 나타내고, 모든 정량 데이터는 평균±SEM로 나타내었다; 이원변량분석, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

도 20은 mESC에서 H3K4me1, H3K4me3, 및 H3K27me3가 많은 지역으로 표지된, 대표적인 Tfcp211 표적(*Rif1*, *Mcm10*, *Bmp2*, 및 *Gata6*) 유전자의 위치(loci)를 나타낸 것이다(ENCODE 프로젝트의 ChIP-seq 데이터베이스로 잘 맞춰진 UCSC 게놈 브라우저의 스냅샷이 변형되었고, 상기 지역들은 파란색 선으로 표시되었고, ChIP 어세이에서 사용된 프라이머 세트의 위치는 빨간 화살표로 표시되었다; 모든 정량 데이터는 평균±SEM로 나타내었다; 이원변량분석, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

도 21은 Tfcp211 발현 렌티바이러스로 감염된 mESC에서 세포 주기와 관련된 Tfcp211 표적 유전자의 qChIP(A) 및 유전자 발현 분석(B) 결과, 및 세포 주기 단계별 차지하는 비율의 히스토그램(C, n=5)을 나타낸 것이다(A: 상기 실험 결과를 Flag-Tfcp211-WT에 대한 상대적인 비율로 나타내거나; B: 빈 대조군에 대한 상대적인 비율로 나타내었고, 모든 정량 데이터는 평균±SEM로 나타내었다; 이원변량분석, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

도 22는 Tfcp211 상호작용체 데이터세트에서, 세포 주기 경로(A의 빨간색 화살표)와 관련된 방추체 조립 및 염색체 분리의 10개의 가장 향상된 경로 맵(A) 및 도식적인 개관(B)을 나타낸 것이다.

도 23은 (A) 루시퍼라아제 리포터(n=4)가 포함된 Gal4 반응 요소를 발현하는 E14Tg2a mESC에서, Gal4-DNA 결합 도메인(DBD)이 결합된 Tfcp211 전체 길이(1-479), N-말단(1-260) 및 C-말단(261-479) 단백질의 전사 조절 활성을 확인한 결과, 및 (B) Tfcp211 ChIP-seq 데이터베이스의 메타코어 분석에서 10개의 가장 향상된 경로 맵을 나타낸 것이다(데이터 값은 Gal4-DBD에서의 값에 상대적인 비율로 나타내었다).

도 24는 (A) 이소성의 Tfcp211 발현 mESC(n=4)에서, 만능성 및 생식계열 효능과 관련된 유전자들의 실시간 정량 PCR 분석 결과, 및 (B) 계통 분화와 관련된 유전자들의 실시간 정량 PCR 분석 결과를 나타낸 것이다(데이터값들은 빈 벡터에서의 값에 상대적인 비율로 나타내었고, 평균±SEM로 표시되었으며; 일원- 또는 이원변량분석을 수행함, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, n.s.=비유의적).

도 25는 Tfcp211의 서열 정렬(sequence alignment)를 나타낸 것으로, 인산화된 트레오닌 177(T177) 잔기가 네 모로 표시되어 있다.

도 26은 Flag-태그되거나 비태그된 Tfcp211 발현 플라스미드로 트랜스펙션된 mESC를 대상으로 인산화된 Tfcp211의 Thr177(p-Tfcp211(T177))에 특이적인 다클론성 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.(P-Tfcp211[T177]의 특이성은 블로킹 과정에서 2 mg 포스포-펩타이드 항원을 사용한 경쟁 어세이를 통해 확인하였고, Tfcp211-T177A 돌연변이 발현 세포는 신호를 거의 나타내지 않았다[왼쪽 패널]. 무린 및 인간 Tfcp211을 나타내는 펩타이드 항원의 아미노산 서열이 아래쪽에 기재되어 있고, 펩타이드 항원에서 인산화에 의해 변형된 T177는 빨간색으로 표시되었다. Tfcp211 단백질의 발현은 Flag 및 Tfcp211 특이적 항체를 이용해 확인되었으며 [오른쪽 패널], 내제적 대조군으로 β-액틴을 사용하였다; W.B.; 웨스턴 블롯).

도 27은 (A) mESC에서, Oct4(초록색) 및 총 Tfcp211 단백질(t-Tfcp211; Aviva System Biology에서 구입한

항체; OABO9732; 빨간색) 또는 인산화된 Tfcp2l1 단백질(p-Tfcp2l1; 제조된 항체; 빨간색)의 면역형광 염색의 대표적 이미지(상층 패널: X400 배율, 스케일 바 = 100 mm, 하층 패널: X400 배율, 스케일 바 = 100 mm, 핵이 DAPI(파란색)으로 카운터염색됨), 및 (B) 인간 Tfcp2l1 발현 플라스미드(두 개의 독립적인 클론인 C1 및 C2)로 트랜스펙션된 293 FT 세포들을 대상으로, 제조된 p-Tfcp2l1 항체 및 상업적으로 사용 가능한 항체(Aviva Systems Biology; OABO9732)를 이용하여 수행한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 28a 및 28b는 Tfcp2l1-WT, T177A, T177E 렌티바이러스로 감염된 gcOct4-GFP ESC로부터 분리된, 3일(3d), 5일(5d), 7일(7d), 9일(9d)-령의 EB들의 *Oct4*⁺ (초록색) 생식 계열 세포에서, SSEA-1 단백질(빨간색)의 면역 염색 결과를 나타낸 것이다(X200 또는 X400 배율, 스케일 바 = 100 mm, 핵이 DAPI(파란색)으로 카운터 염색되었다).

도 29는 (A) OG2 마우스로부터 재프로그래밍된 배반엽 줄기세포(epiblast SC; EpiSC)들에서 순수한 Oct4-GFP+ 세포의 대표적인 예들(왼쪽 패널, X200 배율, 스케일 바 = 50 mm)과 정량(오른쪽 패널) 결과 및, (B) Tfcp2l1 shRNA 발현 렌티바이러스의 존재 또는 부재 하에서 SOKM-감염 OG2-MEF로부터 얻은 iPSC 콜로니의 형태학적 사진, Oct4-GFP 발현 및 AP 염색 결과(X100 배율, 스케일 바 = 100 mm)를 나타낸 것이다.

도 30은 (A) qChIP 어세이에 사용된 mESCs에서 Flag-태그 Tfcp2l1-WT, T177A, T177E 돌연변이 단백질들의 유사 발현 레벨을 웨스턴 블롯 어세이를 통해 확인한 결과, (B) Tfcp2l1-WT, T177A, T177E 발현 렌티바이러스로 감염된 mESC(n=4)에서, 만능성과 관련된 Tfcp2l1 전사 표적의 실시간 qPCR 분석 결과(B) 및 (C) 세포 분화와 관련된 Tfcp2l1 전사 표적의 실시간 qPCR 분석 결과를 나타낸 것이다(대조군으로, 빈 플라스미드를 포함하는 렌티바이러스를 사용하였으며, 모든 발현 결과들은 빈 대조군인 mESC에 대한 비율[평균±SEM]로 나타내었다).

도 31은 특정 날짜에 배양체들에서의 Tfcp2l1 표적 분화 유전자들의 실시간 qPCR 분석(n=3) 결과를 나타낸 것이다(이때, Tfcp2l1-WT, 177A, T177E 구조를 포함하는 렌티바이러스로 감염된 ESC를 배양체 형성에 사용하였고, 모든 결과들은 발현 레벨은 0일차-빈 대조군의 오래된 배양체에 대한 비율로 나타내었다[평균±SEM]).

도 32는 방광암 환자 400명의 p-TFCP2L1⁺ 세포에서 SALL4 및 CD44 방광암 줄기세포 마커 발현의 조직 마이크로 어레이 분석(TMA)을 수행한 것으로, 보다 구체적으로 방광암에서 오판 다중 형광 면역 염색 시, 사이토케라틴(초록색), p-TFCP2L1(노란색), CDK1(빨간색), CD44(초록색) 및 SALL4(주황색)의 대표적인 그림을 나타낸 것이다(핵은 DAPI[파란색]으로 카운터염색하였고, 결과이다).

도 33은 암 줄기세포 마커인 p-TFCP2L1, CDK1, SALL4 및 CD44의 오판 다중 면역 형광 염색 시의 대표적인 도면을 나타낸 것이다.

도 34는 (A) p-TFCP2L1을 높이 또는 낮게 발현하는 암세포들 중 CDK1, SALL4 및 CD44 발현 암세포들의 비율을 사분범위수 변수의 중간값(n = 322, ***p<0.001)의 산점도로 나타낸 것 및 (B) 제안된 모델의 도식적 개요이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명의 발명자들은, CDK1에 의한 TFCP2L1의 트레오닌 177에서의 인산화가 배아 및 성체 조직 세포에서 공유되는 중심 기작임을 확인하였고, 무린 배아 줄기세포에서 Tfcp2l1의 인산화가 세포 주기 및 분화와 관련된 전사 표적과의 DNA 결합 활성을 결정함을 확인하였으며, 인산화 돌연변이가 적절한 세포 주기의 진행, 만능성, 무린 배아 줄기세포뿐만 아니라 유도 만능 줄기세포의 생성을 방해하였음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 인산화된 TFCP2L1 단백질을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 177번째 트레오닌이 인산화된 것일 수 있는 바, 인간과 마우스의 인산화된 TFCP2L1 단백질 바이오마커로 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 이외에, 소(*Bos taurus*)의 Tfcp2l1(NCBI No. Gene ID: 518436, NM_001192488.1), 시궁쥐(*Rattus norvegicus*)의 Tfcp2l1(NCBI No. Gene ID: 304741, NM_001107170.1), 히말라야 원숭이(*Macaca mulatta*)의 Tfcp2l1(NCBI No. Gene ID: 696479, XM_015109909.1), 회색늑대(*Canis lupus*)의 Tfcp2l1(NCBI No. Gene ID: 610193, XM_014121379.2), 적색야계(*Gallus gallus*)의 Tfcp2l1(NCBI No. Gene ID: 424238, XM_422087.5)의 단백질 또한 인산화되는 경우 바이오마커로 활용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 이때, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질의 양이 증가하는 경우, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 증가할

것으로 예측할 수 있다.

- [0028] 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 성체줄기세포 및 암 줄기세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있는 바, 줄기세포를 이용한 다양한 세포 치료제뿐만 아니라, 암 줄기세포에 적용하여 발암 물질이나 암 치료제를 확인하기 위한 기술로 활용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌은 CDK1 단백질에 의해 인산화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 더욱이, 본 발명은 인산화된 TFCP2L1 단백질을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 인산화된 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열 중 177번째 트레오닌이 인산화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0033] 이때, 상기 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측용 키트를 제공한다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 인산화된 TFCP2L1에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 "앵타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0042] 더불어 본 발명은 TFCP2L1 단백질을 인산화시키는 인산화제를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상용 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어질 수 있는 바, 특히, TFCP2L1 단백질의 177번째 트레오닌만을 인산화시킴으로써 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능을 현저하게 향상시킬 수 있으므로, 이러한 인산화제를 세포 치료제와 같은 기술에 적용할 수 있다.
- [0044] 상기 인산화제는 CDK1 단백질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 또한, 본 발명은 TFCP2L1 단백질을 인산화시키는 단계를 포함하는 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 향상 방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 TFCP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로

이루어지는 TFCEP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0048] 이때, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있는 바, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능을 향상시켜 보다 효과적인 세포치료제로 활용할 수 있다.

[0050] 더욱이, 본 발명은 (a) 줄기세포에서, 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (b) 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (c) 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양이 대조군 시료보다 높을 경우, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능이 증가되었다고 판단하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0051] 이때, 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포, 성체줄기세포 및 암 줄기세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은, (a) 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 줄기세포에서, 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제로 판단하는 단계를 포함하는, 줄기세포 만능성, 분화능 또는 증식능 촉진제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0054] 이때, 상기 줄기세포는 배아줄기세포, 유도만능줄기세포 및 성체줄기세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있는 바, 상기 촉진제는 줄기세포의 만능성, 분화능 또는 증식능을 효과적으로 촉진시킬 수 있으므로, 세포 치료제 사용 시 보다 효과적으로 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

[0056] 더욱이 본 발명은 (a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양이 증가한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암 진행을 촉진시키는 물질로 판단하는 단계를 포함하는 암 진행 촉진 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0058] 또한, 본 발명은 (a) 암 줄기세포에 시험 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 암 줄기세포에서, 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 측정하는 단계; (c) 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을, 시험 물질을 처리하지 않은 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (d) 상기 대조군 시료에 비해, 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양이 감소한 경우, 상기 시험 물질을 상기 암의 치료제로 판단하는 단계를 포함하는 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 TFCEP2L1 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 인산화는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 TFCEP2L1 단백질의 177번째 트레오닌에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 상세하게는, 상기 인산화된 TFCEP2L1 단백질의 양을 측정하는 방법으로서, 웨스턴 블랏, 면역 효소 측정법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법 (radioimmunoassay), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 TFCEP2L1 단백질의 인산화에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0066] <실시예 1>

[0067] 1. 실험방법

[0068] 1) 세포배양 및 배양액 형성

[0069] 뮤린 R1 세포 및 E14TG2a 배아줄기세포(ATCC, Manassas, VA), EpiSCs(OG2-EpiSCs ; Choi, H.W. et al., (2016). Distinct Enhancer Activity of Oct4 in Naive and Primed Mouse Pluripotency. Stem Cell Reports 7, 911-926 및 Kim, J.S. et al., (2016b). Protein Kinase A Signaling Is Inhibitory for Reprogramming into Pluripotent Stem Cells. Stem Cells and Development 25, 378-385에 개시된 대로 제조됨), gcOct4-GFP SCs(Hubner, K. et al., (2003). Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. Science 300, 1251-1256에 개시된 대로 제조됨), 인간 HB1EpC 1차 방광 상피세포(Cell Applications, Inc, San Diego, CA), J82 및 T24 방광암 세포주(ATCC)는 다음과 같은 조건에서 배양되었다: 정상 인간 방광(Cell Applications, Inc, San Diego, CA)으로부터 유래된 HB1EpC는 방광 상피 세포 성장 배지(Cell Applications, Inc)에서 배양시켰다. 배양 시 필요한 배양액으로 페니실린/스트렙토 마이신(Cellgro) 및 10% 열 불 활성화 우태아혈청(FBS; Hyclone)이 보충된 둘베코의 수정 이글 배지(Dulbecco 's modified Eagle 's)의 배양액을 사용하였다. 또한, 맥코이의 5A 배지(McCoy 's 5A 배지 ; ATCC)에서 인간 방광암 세포주 J82 및 T24(ATCC, Manassas, 피 츠버그, PA)를 37℃, 5%의 조건으로 CO₂ 인큐베이터에서 매일 배양액을 교체해 주면서 배양하였다.

[0070] 이후, 배양체 형성 및 인 비트로 배 세포(germ cell) 분화 실험은 <Sirt1 Regulates DNA Methylation and Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells by Antagonizing Dnmt3l; Cell Rep 18, 1930-1945; Heo, J., et al., (2017)>에 개시된 방법대로 수행하였다.

[0071] 한편, Tfcp2l1 T177A 및 Tfcp2l1 T177E 의 뮤린 Tfcp2l1 변이체를 제조하기 위하여, 부위 특이적 돌연변이 유발 프라이머(Intron, Seoul, Korea)를 이용하였다. 이때, ORF 클로닝 및 부위 돌연변이 유발에 사용한 프라이머를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

이름	종류	프라이머 서열	서열번호
Murine Tfcp2l1-T177A	센스	GTATCAGCACGGAATTCGCCCCAGGAAGCA	3
	안티센스	TGCTTCTCGGGGCGAATTCGCTGCTGATAC	4
Murine Tfcp2l1-T177E	센스	CTGTATCAGCACGGAATTCGAACCCAGGAAGCATGGGGG	5
	안티센스	CCCCATGCTTCCTGGGTTCGAATTCGCTGCTGATACAG	6

[0074] 2) Tfcp2l1 상호작용체 및 인산화 부위 식별을 위한 프로테오믹 분석

[0075] Tfcp2l1 상호작용 단백질 복합체는 면역침전(IP) 실험에 의해 준비되었다. 구체적으로 다음과 같았다: 먼저, IP 분석을 위해, 세포 추출물을 프로테아제/프로테아제 활성을 보충한 IP 용해 완충액(50 mM Tris-Cl [pH 7.4], 0.5 % NP-40, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 2 mM EGTA) 및 포스파타제 저해제 혼합물(Roche)로 세척한 후, 원심 분리(12,000 g, 4℃에서 10 분간)하였다. 이후 세포 추출물에 벤조나아제 뉴클레아제(Benzonase Nuclease)의 200 단위의 존재 또는 부재 하에서, 4℃ 조건으로 3 시간동안 1 µg 항체와 혼합된 ANTI-FLAG® M2 자기 비드(Sigma-Aldrich) 또는 단백질 G 자기 비드(Millipore, Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 이렇게 면역 침전된 단백질을 IP 용해 완충액으로 4회 세척하였고, 결합된 단백질을 제조자의 지시에 따라 3x FLAG 펩티드(Sigma-Aldrich) 또는 0.1M 글라이신-염산(HCl) 완충액(pH 3.0)으로 용출시켰다.

[0076] 상기 복합체는 다이티오테레이톨 및 알킬화된 이오도아세트아마이드로 환원되었고, 트립신으로 16시간 동안 37℃에서 분해되었다. 펩타이드 혼합물은 C18 카트리지를 이용한 고체상 추출물로 탈염되었고, 나노 LC 시스템(Shimadzu, Japan)과 연결된 질량분석기(Thermo Scientific LTQ Orbitrap-XL)에서 분석되었다. 식별을 위해서 유저 작성 스크립트(user written script)를 이용하여 로우(raw) 파일들을 mgf 파일로 처리하였고, 프로틴파일럿 소프트웨어(ProteinPilot Software; AB Sciex, Framingham, MA, USA version 5.0) 및 콤파스 알고리즘(CompPASS algorithm ; Sowa et al., 2009)을 일반적인 오염물 단백질을 포함하는 유니프로트(UniProt) 표적-데코이 시퀀스 데이터베이스의 데이터들을 찾는 데에 사용하였다. 단백질 식별 시 2% FDR(false discovery rate)를 사후확률(Posterior Error Probability ; PEP) 알고리즘을 이용하여 결정하였다. 프로테오믹스 분석의 데이터세트는 하기 <표 2>에 나타난 바와 같았다.

표 2

GeneID	Symbol	Database ID	D ^N _Score	Ave.APSM
15481	Hspa8	sp P63017 HSP7C_MOUSE	7.21	52
270685	Mthfd1l	sp Q3V3R1 C1TM_MOUSE	6.86	47
81879	Tfcp2l1	sp Q3UNW5 TF2L1_MOUSE	6.63	44
15516	Hsp90a b1	sp P11499 HS90B_MOUSE	6.48	42
106504	Stk38	sp Q91VJ4 STK38_MOUSE	6.08	37
22154	Tubb5	sp P99024 TBB5_MOUSE	6.08	37
B9EKP5_MOUSE	B9EKP5_MOUSE	tr B9EKP5 B9EKP5_MOUSE	6	36
15519	Hsp90a a1	sp P07901 HS90A_MOUSE	5.92	35
14248	Flii	sp Q9JJ28 FLII_MOUSE	5.83	34
75705	Eif4b	sp Q8BGD9 IF4B_MOUSE	5.74	33
50875	Tmod3	sp Q9JHJ0 TMOD3_MOUSE	5.48	30
22151	Tubb2a	sp Q7TMM9 TBB2A_MOUSE	5.48	30
22142	Tuba1a	sp P68369 TBA1A_MOUSE	5.39	29
TBB4B_MOUSE	TBB4B_MOUSE	sp P68372 TBB4B_MOUSE	5.29	28
192176	Flna	tr Q6KAM8 Q6KAM8_MOUSE	5.1	26
19043	Ppm1b	tr Q99NF7 Q99NF7_MOUSE	5.1	26
14433	Gapdh	sp P16858 G3P_MOUSE	5.1	26
J3QNR5_MOUSE	J3QNR5_MOUSE	tr J3QNR5 J3QNR5_MOUSE	5	25
22152	Tubb3	sp Q9ERD7 TBB3_MOUSE	4.8	23
117198	Ivns1abp	sp Q920Q8 NS1BP_MOUSE	4.58	21
22145	Tuba4a	sp P68368 TBA4A_MOUSE	4.58	21
69719	Ca d	tr B2RQC6 B2RQC6_MOUSE	4.47	20
433182	Gm 5506	sp P17182 ENOA_MOUSE	4.36	19
11947	Atp5b	sp P56480 ATPB_MOUSE	4.36	19
71268	Lrrfp2	sp Q91WK0-2 LRRF2_MOUSE	4.12	17
14104	Fasn	sp P19096 FAS_MOUSE	4.12	17
11461	Actb	sp P60710 ACTB_MOUSE	4.12	17
Q9DC41_MOUSE	Q9DC41_MOUSE	tr Q9DC41 Q9DC41_MOUSE	4	16
67951	Tubb6	sp Q922F4 TBB6_MOUSE	4	16
13627	Eef1a 1	sp P10126 EF1A1_MOUSE	4	16
230753	Thrap3	sp Q569Z6 TR150_MOUSE	3.87	15
83397	Akap12	sp Q9WTQ5-2 AKA12_MOUSE	3.87	15
17975	Ncl	sp P09405 NUCL_MOUSE	3.87	15
13669	Eif3a	sp P23116 EIF3A_MOUSE	3.87	15
18746	Pkm 2	sp P52480 KPYM_MOUSE	3.87	15
21454	Tcp1	sp P11983 TCPA_MOUSE	3.87	15
11464	Actc1	sp P68033 ACTC_MOUSE	3.87	15
Q9QZ83_MOUSE	Q9QZ83_MOUSE	tr Q9QZ83 Q9QZ83_MOUSE	3.87	15

[0077]

[0079]

3) Tfcp211 상호작용 복합체 및 전사 표적의 정의

[0080]

Tfcp211의 전체-유전자 전사 표적은 이전에 보고된, 컷 오프 값(≥ 0.5 관련 스코어)을 갖는 Tfcp211 ChIP-seq 데이터세트(GED11431; Chen, X. et al., Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. Cell 133, 1106-1117)를 이용하여 선택되었다. 유전자 네트워크, 생기능 및 규범적 경로(canonical pathways)와 관련된 Tfcp211 프로테오믹스 및 ChIP-seq 데이터세트의 기능성 분석은 디폴트 값이 셋팅된 메타코어(Clarivate Analytics, Philadelphia, PA) 마이크로어레이 소프트웨어를 이용하여 수행되었다. 구체적인 유전자 온톨로지(Gene-Ontology; GO) 카테고리 및 대응 유전자들은 하기 <표 3> 내지 <표 6>에 나타난 바와 같았다.

표 3

Enrichment by Process Networks					
#	Networks	Total	p-value	Min FDR	In Data
1	Translation_Translation initiation	171	1.914E-49	2.813E-47	82
2	Translation_Elongation-Termination	233	8.217E-31	6.039E-29	75
3	Transcription_mRNA processing	160	6.952E-21	3.406E-19	51
4	Protein folding in normal condition	119	1.141E-16	4.195E-15	39

[0081]

표 4

Enrichment by Process Networks					
#	Networks	Total	p-value	Min FDR	In Data
5	Proteolysis_Ubiquitin-proteasomal proteolysis	166	1.582E-15	4.651E-14	45
6	Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement	183	2.698E-11	6.609E-10	41
7	Cytoskeleton_Intermediate filaments	81	5.855E-09	1.23E-07	23
8	Immune response_Phagosome in antigen presentation	243	6.963E-09	1.283E-07	44
9	Cell cycle_Mitosis	179	3.527E-08	5.76E-07	35
10	Immune response_Antigen presentation	197	4.167E-07	6.126E-06	35

[0082]

표 5

Enrichment by Pathway Maps						
#	Maps	Total	p-value	FDR	In Data	Network Objects from Active Data
1	Transcription_Negative regulation of HIF1A function	66	2.816E-11	1.642E-08	18	RACK1, RUVBL2, SART1, HSP70, HSPA4, HSP90, MCM5, VCP, SKP1, HSC70, MCM3, PRDX2, MCM7, HSP90 beta, CHIP, MCM2, PSMA7, Ubiquitin
2	Regulation of degradation of deltaF508-CFTR in CF	39	7.571E-11	2.207E-08	14	HSP105, HSP70, HSP27, Hdj-2, HSP90, VCP, HSC70, SUMO-2, UBE1, CHIP, HDAC6, Ubiquitin, Sti1, Aha1
3	CFTR folding and maturation (normal and CF)	24	3.714E-10	7.218E-08	11	GANAB, HSP105, HSP70, Hdj-2, HSP90 alpha, HSP90 beta, p23 co-chaperone, UGCGL1, Sti1, Calnexin, Aha1
4	Translation_Regulation of translation initiation	27	1.748E-09	2.548E-07	11	RACK1, eIF5B (1F-2), eIF4G1/3, PABPC4, eIF3S7, eIF5, eIF3S3, eIF4A, eIF3S8, eIF3S4, eIF1A
5	Cytoskeleton remodeling_Regulation of actin cytoskeleton by Rho GTPases	23	4.559E-09	5.316E-07	10	Actin, Actin cytoskeletal, Myosin II, MyHC, Cofilin, MRLC, Fascin, MELC, Filamin A, Profilin

[0083]

표 6

Enrichment by Pathway Maps						
#	Maps	Total	p-value	FDR	In Data	Network Objects from Active Data
6	Immune response_Antigen presentation by MHC class I, classical pathway	54	9.62E-09	9.347E-07	14	GANAB, PSMB2, PDIA3, PSME1, HSP70, Bleomycin hydrolase, HSP90 alpha, PSMB5, Calreticulin, CHIP, UGCGL1, PSMB1, Calnexin, NPEPPS
7	Cell-Cell adhesion_Histamine H1 receptor signaling in the interruption of cell barrier integrity	45	7.938E-08	6.611E-06	12	Actin cytoskeletal, Calmodulin, Myosin II, Cofilin, E-cadherin, MRLC, ZO-1, Alpha-actinin, p120-catenin, MELC, Beta-catenin, Alpha-catenin
8	Development_Regulation of cytoskeleton proteins in oligodendrocyte differentiation and myelination	58	2.123E-07	1.523E-05	13	Tubulin alpha, Tubulin (in microtubules), Actin cytoskeletal, Tubulin beta, Myosin II, Cofilin, chTOG, MRLC, hnRNP A2, MELC, HDAC6, MAP4, PCBP-1
9	Cell cycle_Spindle assembly and chromosome separation	33	2.612E-07	1.523E-05	10	OCTN2, CSE1L, Tubulin alpha, Tubulin (in microtubules), Importin (karyopherin)-beta, Importin (karyopherin)-alpha, CDK1 (p34), KNSL1, Ran, Ubiquitin
10	LRRK2 in neurons in Parkinson's disease	33	2.612E-07	1.523E-05	10	VIL2 (ezrin), Tubulin (in microtubules), Actin cytoskeletal, ACTB, eEF1A, 14-3-3, HSP90, NSF, CHIP, Ubiquitin

[0084]

[0086]

4) 인간 방광암 연구 샘플

[0087]

이 후향성 연구(retrospective study)는 서울아산병원(Asan Medical Center; AMC; 2013-107)의 생명윤리위원회(Institutional Review Board)에 의해 승인되었다. 본 연구의 인간 시료는 1996년 1월부터 2006년 12월까지 서울아산병원에서 경뇨도적 방광중양 절제술(transurethral resection of bladder tumor; TURBT)를 겪었으면서, 조직 마이크로어레이(tissue microarray; TMA) 구조에 사용할 수 있는 암 조직을 가진 403명의 환자를 포함했다. 환자의 종양 재발, 원격 조직 전이 및 생존율을 포함하는 임상적 정보는 병원 차트의 전자 의무 기록으로부터 얻었다. 또한 진단 재평가 및 2016 세계보건기구의 분류에 따른 조직학적 종양 단계를 평가하기 위해 초기 및 재발 종양을 포함하는 모든 병리학적 자료들을 검토하였다. TNM 분류 단계는 AJCC(American Joint Committee on Cancer Staging System)의 8번째 판에 따라 부여되었다.

[0088]

또한, 조직 마이크로어레이(TMA)에 대한 보다 구체적인 실험 방법은 다음과 같았다: 방광암 환자 TMA 블록을 조직 마이크로 어레이 기구(Beecher Instruments, Silver Spring, MD)를 사용하여 분석하였는데, 방광암 환자 TMA 블록은 요도 절제술(TURBT) 시편이 10% 중성 완충 포르말린으로 고정된 뒤, 파라핀으로 포매된 요로 상피 방광암 조직 블록으로부터 제작되었다. 종양 이형성의 문제를 극복하기 위해, 각 종양의 다른 영역에서 3개의 대표적인 코어를 포함하도록 블록을 제조하였다. 또한 대조군으로 자궁경부암(대조군 1)과 대장암(대조군 13) 동물 및 자궁 절제술 또는 결장 절제술 중에 방광을 제거한 정상 유노 판막이(대조군 14)의 조직으로부터 블록을 제조하였다.

[0089]

면역조직화학(immunohistochemistry; IHC) 염색 및 오팔 다중 면역 형광 염색(Opal multiplexed IF staining) 방법은 다음과 같았다: TMA 슬라이드는 2명의 독립적인 병리학자(노병주 및 조영미)에 의해 평가되었으며, 이때

TMA 슬라이드의 IHC 및 오팔 다중 면역 형광 염색 후, p-Tfcp2l1의 핵 양성을 및 암 세포에서의 CDK1의 핵 및 세포질 양성물을 각각 기록하였다. 염색 강도는 음성(0), 약한 (1+), 보통(2+) 또는 강함(3+)의 4 단계 시스템으로 분류하였다.

[0091] **5) 통계학적 분석**

[0092] 인 비트로(in vitro) 분자적 및 세포 생물학 데이터들은 본페로니 사후분석(Bonferroni's post-hoc analysis)와 함께 일원분산분석(one-way ANOVA) 또는 이원분산분석(two-way ANOVA)으로 분석하였다. 또한, 모든 분석을 수행하기 위해 GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA)를 사용하였다.

[0094] **2. 실험결과**

[0095] **1) Tfcp2l1의 단백질 상호작용 네트워크의 특징(세포주기와 관련된 유전자)**

[0096] Oct 중심 단백질 상호작용 네트워크의 구성원으로서, Tfcp2l1은 전사 조절뿐만 아니라, 배아줄기세포의 자가 재생에서 역할을 한다고 알려진 많은 전사 조절자들과 물리적으로 크로마틴-변형 복합체에 결합되어 있다고 알려졌다. 이에, 본 발명의 발명자들은 무린 배아줄기세포의 Flag가 태그된 Tfcp2l1 단백질의 면역침전(immunoprecipitation; IP) 생성물을 질량 분석함으로써 Tfcp2l1 상호작용체 네트워크의 특성을 정의하고자 하였다.

[0097] 그 결과, 도 1의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 메타코어 프로테오믹스(MetaCore Proteomics) 분석 결과, Tfcp2l1 상호작용 단백질들이 단백질 전환(변역 및 분해)와 세포주기(체세포 분열 및 세포골격 재배열)에 의해 매우 강화되었고, FDK1 및 WNT 신호전달 경로로 구성된 유의적인 유전자 네트워크를 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0098] 이에 유사하게, 도 22A 및 도 22B에 나타난 바와 같이, 세포 주기와 관련된 유전자 온톨로지 분석 결과, Tfcp2l1 상호작용 단백질로서 G2/M기와 방추체(spindle) 조립과 관련된 유전자들이 매우 높게 나타났다.

[0099] 즉, 도 2에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1은 만능성과 관련된 여러 단백질(Oct4, Soc2, Nanog, 및 Klf4), 뉴클레오솜 리모델링 디아세틸화효소(Nucleosome Remodeling Deacetylase; NuRD) 복합체(Hdac1, Hdac2, Mta1) 및 전사촉진-형질전환 도메인-연관 단백질(Transactivation-transformation domain-associated protein; Ttrap)/p400 복합체(Ruvb12, Tip50, 및 Dmap1)와 상호작용함을 확인할 수 있었다. 하지만, 스위치/수크로오스 비발효성(SWITCH/Sucrose Non-Fermentable; SWI/SNF) 복합체는 Flag-Tfcp2l1 면역 침전 생성물에서 거의 검출되지 않았다.

[0101] 한편, 도 3에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1은 두 가지의 구별된 도메인인, N-말단의 CP2-유사 도메인과 C-말단의 멸균 알파 모티프(sterile alpha motif; SAM)-유사 도메인을 포함하고 있었다.

[0102] Flag-태그된 N 또는 C 말단 조각 단백질을 발현하는 배아줄기세포의 면역 침전 어세이 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, Oct4 단백질이 오직 N-말단의 CP2-유사 도메인과만 상호작용한 것을 제외하면, 전사 조절자 및 크로마틴-변형 복합체 단백질의 과반수가 Tfcp2l1의 CP2- 또는 SAM-유사 도메인 양쪽과 상호작용하였다.

[0103] 이때, 도 4에 나타난 바와 같이, Oct4와 N-말단 Tfcp2l1 도메인 사이의 직접적인 물리학적 상호작용을 정제된 재조합 단백질을 이용한 GST-폴 다운 어세이를 통해 입증하였다. 또한, Tfcp2l1의 두 도메인들의 전사 활성을 GAL4-반응성 루시페라아제 리포터 시스템을 통해 비교하였다. 그 결과, 도 5 및 도 23A에 나타난 바와 같이, SAM-유사 도메인이 R1 및 E14Rg2a 배아줄기세포주 둘 다에서 전사 억제 활성의 원인이 됨을 확인할 수 있었다. 더욱이, 크로마틴 면역침전(Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 어세이 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1의 CP2-유사 도메인이 모든 47개의 결합 지역에서 DNA 결합의 원인이 됨을 확인하였다.

[0104] 따라서, 이러한 실험결과를 종합하여, Tfcp2l1의 CP2- 또는 SAM-유사 도메인은 서로 구별되는 기능을 나타냄을 알 수 있었다.

[0106] **2) Tfcp2l1의 전사 표적의 특징(세포 주기와 관련된 유전자)**

[0107] 다음으로, 무린의 배아줄기세포에서 Tfcp2l1 전사 표적의 분자적 본성을 확인하기 위하여, Tfcp2l1 ChIP-seq 데이터셋을 토대로 메타코어 분석을 수행한 결과, 도 6B 및 도 23B에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1의 전사 표적에 다양한 범위의 세포 주기 과정과 관련된 유전자들이 많이 포함됨을 확인하였다.

[0108] 그러므로 이러한 실험 결과를 토대로, Tfcp2l1 중심 상호작용 네트워크와 전사 프로그램들이 무린의 배아줄기세포에서 세포 주기의 진행과 현저하게 연관되어 있음을 알 수 있었다.

[0110] **3) 배아줄기세포의 증식 및 세포 주기에 대한 Tfcp2l1의 필수성 확인**

[0111] 상기 실험방법에 개시된 바와 같은 유전체 전체 분석을 수행한 결과를 토대로 Tfcp2l1이 배아줄기세포의 증식과 세포주기에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, 도 7A에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1의 이소성(Ectopic) 발현이 무린 배아줄기세포의 증식 활성을 향상시켰다. 도 7B를 참조하면, Tfcp2l1이 과발현된 배아줄기세포(Tfcp2l1-ESCs)들을 녹색 형광 단백질(GFP) 발현 경쟁세포와 혼합 배양하는 경우, GFP 신호값은 배양을 진행할수록 계속해서 감소했는데, 즉, Tfcp2l1이 과발현된 배아줄기세포의 자가 재생 활성이 증가되었다. 또한, 도 7C에 나타난 바와 같이, 배양체 형성 어세이 실험 결과, Tfcp2l1-ESCs은 대조군 세포에 비해 더 큰 크기의 배양체를 형성하였다.

[0112] 더욱이, 도 8에 나타난 바와 같이, 사이클린 B 단백질과 함께 Oct4, Nanog, Sox2와 같은 만능성 전사인자들의 레벨 또한 증가하였고, 이러한 결과와 비슷하게, 도 9의 A 내지 C에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1을 침묵시킨 배아줄기세포(shTfcp2l1-ESCs)들은 알칼라인 포스파타아제(AP), 배양체 형성 및 증식 활성과 관련된 능력에 손상이 나타났으며, 도 9D에 나타난 바와 같이, 만능성 관련 전사인자 단백질들이 하향조절되었다.

[0113] 또한, 유전자 발현 분석 결과는 도 10 및 도 24A 및 도 24B에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1이 만능성 및 생식세포 능력과 연관된 유전자 발현을 강화시켰지만, 분화 프로그램과 관련된 전사는 억제함을 나타내었다. 중요하게는, 도 11A를 참조하면, shTfcp2l1-ESCs는 세포 주기의 진행에 매우 심각한 결함을 나타내었고, 도 11B에 나타난 바와 같이, 배아줄기세포 증식 및 만능성에서의 중요한 역할을 한다고 알려진 유전자 발현도 결함을 나타내었다. 이러한 실험 결과들로부터, Tfcp2l1이 무린의 배아줄기세포에서 증식과 세포 주기에 대한 중심 전사인자임을 알 수 있었다.

[0115] **4) CKD1에 의한 Tfcp2l1의 트레오닌 177번에서의 인산화 확인**

[0116] 도 12A에 나타난 바와 같이, 추정되는 번역 후 변형 위치를 대상으로 인 실리코(in silico) 분석을 수행하였다. 먼저는 Tfcp2l1 상호작용체의 가장 대표적인 네트워크로서 식별된 Cdk1이 Tfcp2l1의 177번째 트레오닌을 인산화시킬 것으로 기대하였다(도 1 참조). 실제로, Flag로 태그된 Tfcp2l1의 번역 침전 어세이 결과, 도 12B에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1 단백질의 트레오닌-인산화가 나타났고, 도 12C에 나타난 바와 같이, 질량 분석 방법을 이용하여 트레오닌 177의 인산화로 변형된 Tfcp2l1를 포함하는 펩타이드를 식별하였다. 이에 따라, 트레오닌 177을 알라닌으로 바꾼 부위 특이적 변이는 도 13A에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1의 트레오닌 177 인산화를 방해하는 결과를 나타내었다.

[0117] 다음으로, Cdk1에 특이적인 shRNA 또는 전체특이적 Cdk1 저해제인 로스코비틴(Roscovitine)을 이용하여 Cdk1의 발현 또는 활성을 억제한 결과, 도 13B 및 13C에 나타난 바와 같이, Cdk1의 저해가 Tfcp2l1의 트레오닌 인산화를 현저히 감소시켰다. 게다가, 도 14에 나타난 바와 같이, Cdk1은 Tfcp2l1 단백질과 물리적으로 상호작용한다는 사실을, 이소성으로 발현하는 단백질과 내재성 단백질을 이용한 번역 침전 어세이를 통해 입증하였다.

[0118] 따라서, 상기 전술한 결과들을 토대로, 트레오닌 177이 Tfcp2l1의 Cdk1에 의한 인산화의 아미노산 표적임을 알 수 있었다.

[0119] 한편, 도 25에 나타난 바와 같이, 트레오닌 177 위치는 실험한 모든 종들의 Tfcp2l1 단백질에 매우 잘 보존되어 있었는데, 이러한 결과를 토대로 트레오닌 177이 Tfcp2l1의 기능에 중요함을 확인하였다.

[0121] Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화의 생물학적 중요성을 확인하기 위해, *Nanog* 프로모터 활성 또는 Tfcp2l1의 전사 표적으로 잘 알려진 *Oct4/Sox2*에 결합하는 위치를 포함하는 6개의 중열 반복(Tandem repeat) 서열을 대상으로 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 14B에 나타난 바와 같이, 상기 프로모터 활성은 정상 *Tfcp2l1* (Tfcp2l1-WT)의 발현을 통해 증가하였고, Cdk1 발현에 의해 더욱 자극되었지만, *Tfcp2l1* T177A 돌연변이(Tfcp2l1-T177A)의 발현은 상기 프로모터의 활성에 영향을 미치지 않았다.

[0122] 또한, 도 15A 및 15B에 나타난 바와 같이, *Tfcp2l1*가 침묵된 경우처럼, *Tfcp2l1*-T177A 돌연변이를 발현하는 무린의 배아줄기세포는 미분화된 AP⁺ 배아줄기세포 콜로니를 형성하거나 세포 증식하는 데에 심각한 결함을 나타내었다.

[0123] 도 15C를 참조하면, T177A 돌연변이가 아닌 Tfcp2l1-WT의 이소성 발현은 *Cdk1*의 침묵에 의해 유도된 세포 죽음을 부분적으로 억제하였다. 이와 유사한 회복 효과는 또한, 트레오닌 177을 글루타메이트로 치환한(T177E) Tfcp2l1 포스포 모방 돌연변이에 의해서도 나타났는데, 이러한 결과로부터 Cdk1이 Tfcp2l1 기능에 매우 중요한

조절자임을 확인하였다.

[0125] 5) Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화의 저해 및 이의 마우스 배아줄기세포 분화/세포 재프로그래밍 과정에서 Tfcp2l1의 기능에 미치는 영향 확인

[0126] Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화의 생물학적 기능에 대한 영향을 확인하기 위해, *Tfcp2l1*(WT, T177A, T177E 돌연변이)를 과발현하는 안정 세포주를 이용하여 배양체-기반 분화 어세이를 수행한 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1-WT 또는 T177E 돌연변이 배아줄기세포에서 유래한 배양체 세포는 만능성 마커(즉, *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*) 및 배 세포 마커(즉, *Stella*, *Dppa4*, *Mvh*, *Sycp3*)의 발현이 특징적으로 향상되었지만, *Ncam*, *Mlc2v*, *Gata4*와 같은 세 배엽층 분화 유전자들은 현저하게 억제되었다. 특히, 이러한 발현 패턴은, 특징적으로 분화 마커의 다수가 상향조절된 Tfcp2l1-T177A 돌연변이 배양체 세포에서는 관찰되지 않았다.

[0127] 다음으로, 배 세포 분화에서의 Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화의 효과를 확인하기 위해, 상기에서 제조한 *Tfcp2l1*(WT, T177A, T177E 돌연변이)-과발현 gcOct4-GFP를 실험에 사용하였다. 배양체 형성 후, 면역염색된 SSEA-1 발현을 통해 원시 배세포(Primordial germ cells; PGCs)를 시각화하였을 때, GFP⁺(Oct4에서 유래된)/SSEA-1⁺ 원시 배세포들은 대조군인 *Tfcp2l1*-WT 또는 *Tfcp2l1*-T177E 배아줄기세포로 유래된 배양체에서, 콜로니로서 국소적으로 식별되었다. 하지만, 도 17A, 17B, 및 도 28a 및 28b에 나타난 바와 같이, 대부분의 *Tfcp2l1*-T177A 배양체 세포는 GFP 및 SSEA-1 단백질이 양성인 원시 배세포 콜로니를 발생시키는 데에 실패했다. 그러므로 이러한 결과들을 토대로, Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화는 생식세포 계열 관련 분화에는 호의적인 반면, 여러 가지 체세포 계통 관련 분화는 지연시킴을 입증할 수 있었다.

[0128] 마찬가지로 상기에서 제조된 EpiSCs(OG2-EpiSCs)를 실험에 사용하였다. 그 결과, 본 발명의 도 29A를 참조하면, T177A 돌연변이가 아닌 Tfcp2l1-WT가 재프로그래밍된(즉, GFP⁺) 완전한 세포의 빈도를 현저하게 증가시켰다.

[0129] 게다가, OG2 마우스 배아의 섬유아세포(OG2 mouse embryonic fibroblast; OG2-MEF)를 *c-Myc*(OSKM)과 조합하여 전사인자인 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*를 운반하는 렌티바이러스로 감염시켜 *Tfcp2l1*을 침묵시킨 결과, 도 18C 및 도 28b에 나타난 바와 같이, OG2-MEF로부터 유도된 유도성 만능성 줄기세포(iPSC) 생성 과정이 심각하게 손상되었다.

[0130] 이에 따라, 도 18A 및 18B에 개시된 바와 같이, *Tfcp2l1*-WT 또는 T177E 돌연변이의 강제된 발현은 AP⁺ iPSC 형성의 효율성을 비처리 대조군에 비해 상대적으로 약 3배 증가시켰으나, 이러한 이익 효과는 Tfcp2l1-T177A 돌연변이에서는 보이지 않았다. 따라서, 이러한 실험 결과들을 통해 완전한 만능성 및 체세포 재프로그래밍에 대한 Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화가 중요한 역할을 한다는 사실을 확인하였다.

[0132] 6) Tfcp2l1 트레오닌 177 인산화의 세포 주기 관련 유전자에 대한 직접적인 표적 여부 확인

[0133] CDK1이 주로 사이클린 B와의 상호작용을 함으로써 G2/M 전이를 유도한다는 사실에 기반하여, Tfcp2l1 Thr177 인산화가 세포 주기 의존적 조건에서 발생할 수 있는지 여부를 확인하였다. 구체적으로, 노코다줄로 R1 배아줄기세포를 G2/M 기에서 진행을 막은 후, 이후 세포 주기 진행을 위한 정상 배지로 방출시켰다. 트레오닌 177에서 인산화된 Tfcp2l1(p-Tfcp2l1(T177))를 감지하기 위해, 도 26 내지 도 27에 나타난 바와 같이, p-Tfcp2l1(T177) 단백질에 특이적인 다클론 항체를 제조하여(하기 표 7 참조), 웨스턴 블롯을 수행하였다.

표 7

이름	아미노산 서열	서열번호
항-p-Tfcp2l1	KRASAFIQVH CISTEFTPRK HGGEKGVFPR VQIDTFKQNE	7

[0136] 그 결과, 도 19A 및 도 19B에 나타난 바와 같이, 가장 많은 양의 p-Tfcp2l1(T177)이 G2/M기에 축적되었고 G1기 후(방출 1시간 후) 빠르게 사라졌으며, S기(방출 6시간 후)에서 재등장하고 방출 10시간 후까지 축적되어, 총 Tfcp2l1 단백질의 양은 세포 주기 전반에 걸쳐 거의 변화가 없음을 확인하였다. 만능성 연관 전사인자들과 Sox2 단백질들은 p-Tfcp2l1(T177)과 유사하게, G/M기 세포에서 축적됨으로써 세포-주기 의존성 발현을 보였지만, Nanog 단백질은 G1기(방출 1시간 후)에서 증가되고 S기 동안 감소함으로써 구별되는 진동 발현 패턴을 나타내었다. Oct 단백질의 전체적인 레벨은 세포 주기 전반에 걸쳐 크게 변화되지 않았다.

[0137] 게다가, Tfcp2l1의 표적 유전자에 대한 결합이 G2/M기 동안 Thr177 인산화 의존적 조건에 의해 조절되는지를 확인하기 위해, G2/M기에서 멈추고 비동기화된 무린 배아줄기세포 사이에서 표적 유전자들의 서브세트와 Tfcp2l1

간의 결합을 비교한 결과, 도 19C에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1의 표적 크로마틴 결합은 G2/M 세포기동안 증가 및 감소된 결합 활성을 나타냄으로써 변화되었는데, 이러한 차이는 표적 지역에 의존하였다. 중요하게는, 도 19D에 나타난 바와 같이, G2/M기에서 많은 표적 위치의 대다수가 Tfcp2l1-T177A 돌연변이에 의해 감소되었다. 따라서, 이러한 결과로부터 Tfcp2l1 Thr177 인산화가 전사 표적 서브세트의 DNA 결합 활성을 결정한다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0138] 또한, 하기 표 8 및 도 19 내지 21에 나타난 바와 같이, 영향을 받는 지역의 10-kb 업스트림 또는 다운스트림에 위치하는 유전자들을 선택하여 세포 주기, 증식 및 분화 과정의 유전자 온톨로지 텀(term)을 확인하기 위해 ChIP-qPCR을 수행한 결과, 도 21A 및 도 30A에 나타난 바와 같이, Tfcp2l1-T177A 돌연변이는 만능성 및 세포주기와 연관된 표적 장소에의 감소된 DNA 결합을 나타내었지만, Tfcp2l1-T177E 단백질은 이 지역에서 현저히 증량되었다.

표 8

	Primer location	T177A	G2/M	Gene	Gene Ontology
T177A (↓) & G2/M (↑)	7	↓	↑	<i>Myo1e</i>	Actin filament polymerization
	16	↓	↑	<i>Xirf1</i>	Negative regulation of cell proliferation
	22	↓	↑	<i>LF219113</i>	Polycomb-Associated Non-Coding RNAs
	29	↓	↑	<i>Ende5</i>	positive regulation of brown fat cell differentiation
	36	↓	↑	<i>Porcn</i>	Wnt signaling pathway
	45	↓	↑	<i>Map6</i>	microtubule cytoskeleton organization
T177A (↓) & G2/M (not affected)	1	↓	n.a.	<i>Dusp13</i>	Meiotic cell cycle
	1	↓	n.a.	<i>Samd8</i>	lipid metabolic process
	21	↓	n.a.	<i>Idua</i>	Carbohydrate metabolic process
	21	↓	n.a.	<i>Slc26a1</i>	Bicarbonate transport
	21	↓	n.a.	<i>Dgkq</i>	cAMP-mediated signaling
	23	↓	n.a.	<i>Lnpep</i>	proteolysis
	27	↓	n.a.	<i>C2cd4a</i>	calcium ion-dependent exocytosis
	27	↓	n.a.	<i>Vps13c</i>	mitochondrion organization
	28	↓	n.a.	<i>Wdr13</i>	negative regulation of type B pancreatic cell proliferation
	28	↓	n.a.	<i>Rbm3</i>	positive regulation of translation
	35	↓	n.a.	<i>D630039A03Rik</i>	biological_process
	39	↓	n.a.	<i>Slc25a27</i>	positive regulation of cell proliferation
	39	↓	n.a.	<i>Cyp39a1</i>	cholesterol catabolic process
	40	↓	n.a.	<i>Foxn3</i>	Cell cycle
	41	↓	n.a.	<i>Cyp26a1</i>	central nervous system development
	44	↓	n.a.	<i>Fgf1</i>	cell proliferation
	46	↓	n.a.	<i>Lrrc61</i>	Endometrial Neoplasms
*	47	↓	↓	<i>Cttnb1</i>	Wnt signaling pathway
T177A (not affected) & G2/M (↑)	5	n.a.	↑	<i>Mycl</i>	Cell proliferation
	10	n.a.	↑	<i>Cpxc</i>	Heme biosynthetic process
	11	n.a.	↑	<i>Carf</i>	Cellular response to calcium ion
	38	n.a.	↑	<i>Hyal1</i>	positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle
	38	n.a.	↑	<i>Hyal2</i>	hematopoietic progenitor cell differentiation,
	38	n.a.	↑	<i>Hyal3</i>	carbohydrate metabolic process
	38	n.a.	↑	<i>Ifrd2</i>	biological_process
	38	n.a.	↑	<i>Nat6</i>	positive regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle
T177A (not affected) & G2/M (↓)	8	n.a.	↓	<i>Muc5b</i>	O-glycan processing
	12	n.a.	↓	<i>Foxj3</i>	cell differentiation
	12	n.a.	↓	<i>Guc2a</i>	positive regulation of guanylate cyclase activity
	17	n.a.	↓	<i>Syn3</i>	Neurotransmitter secretion
	20	n.a.	↓	<i>Fam43a</i>	n.d.
	20	n.a.	↓	<i>Lsg1</i>	nuclear export
	30	n.a.	↓	<i>Sqle</i>	cholesterol metabolic process
	37	n.a.	↓	<i>Slc6a20a</i>	amino acid transport

[0139]

[0140] 한편, 기능적인 면에서, 도 21B 및 도 30B에 나타난 바와 같이, 이 감소된 DNA 결합성은 Tfcp2l1-T177A 발현 무린 배아줄기세포에서 세포 주기 및 만능성과 관련된 유전자의 전사를 손상시켰고, 도 21C에 나타난 바와 같이, 세포주기 중 S기를 대폭 감소시켰다.

[0141] 더욱이, 도 30C(배아줄기세포) 및 도 31(분화된 배양체 세포)에서, Tfcp2l1-WT 또는 Tfcp2l1 T177E 돌연변이의 강요된 발현은 BMP, GATA 및 ID 패밀리를 포함하는 여러 가지 분화 매개자들을 억제하였지만, Tfcp2l1 Thr177 인산화의 손상에 의해 상기 분화 매개자들의 발현이 활성화되었다.

[0142] 이러한 결과들을 종합하면, Tfcp2l1의 Thr177가 인산화된 배아줄기세포에서의 세포주기와 발달 과정을 미세하게 조절하는 신규한 메커니즘임을 확인할 수 있었다.

[0144] 7) TFCP2L1 트레오닌 177 인산화와 암 줄기세포 마커 발현과의 관계 확인

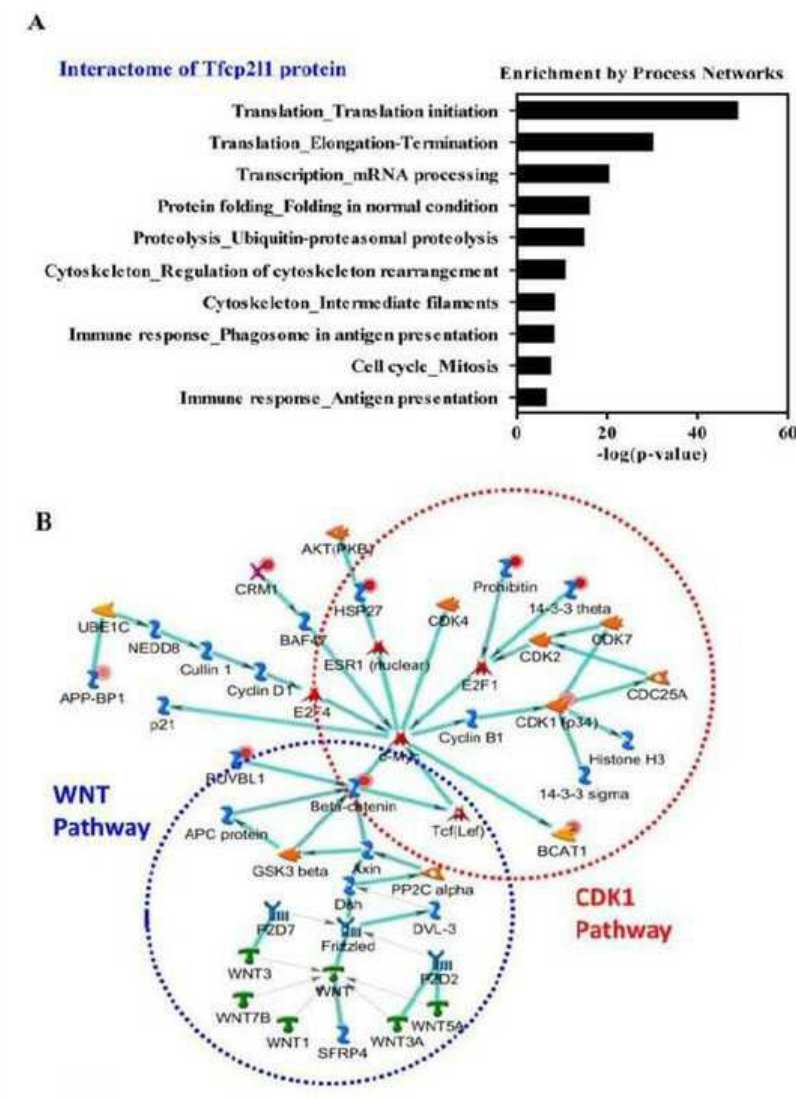
[0145] 전술한 바와 같이, 트레오닌 177이 Tfcp2l1의 Cdk1에 의한 인산화의 아미노산 표적임을 알 수 있었다. 이에, TFCP2L1의 트레오닌 177 인산화의 암 줄기세포에서의 기능을 확인하기 위하여, 사이토케라틴(cytokeratin; CK)

으로 표지된, 방광암 환자들에게서 얻은 세포로 오팔 다중 면역 형광 염색을 수행한 결과, 도 32 및 도 33에 나타난 바와 같이, 방광암에서의 p-TFCP2L1⁺ 세포들이 SALL4 및 CD44를 포함한 기존에 보고되었던 방광암 줄기세포(Cancer Stem cell)의 마커들을 많이 발현하였음을 확인할 수 있었다. 이들의 정량 결과는 도 34에 나타난 바와 같이, CDK1도 마찬가지로 높은 p-TFCP2L1 레벨을 나타내는 암세포들에 SALL4 및 CD44 단백질도 동시에 위치되어 있음을 나타내었는데, 이는 방광암의 발암 시 p-TFCP2L1⁺ 세포들이 암 줄기세포 군을 대표할 수 있다는 것을 의미한다.

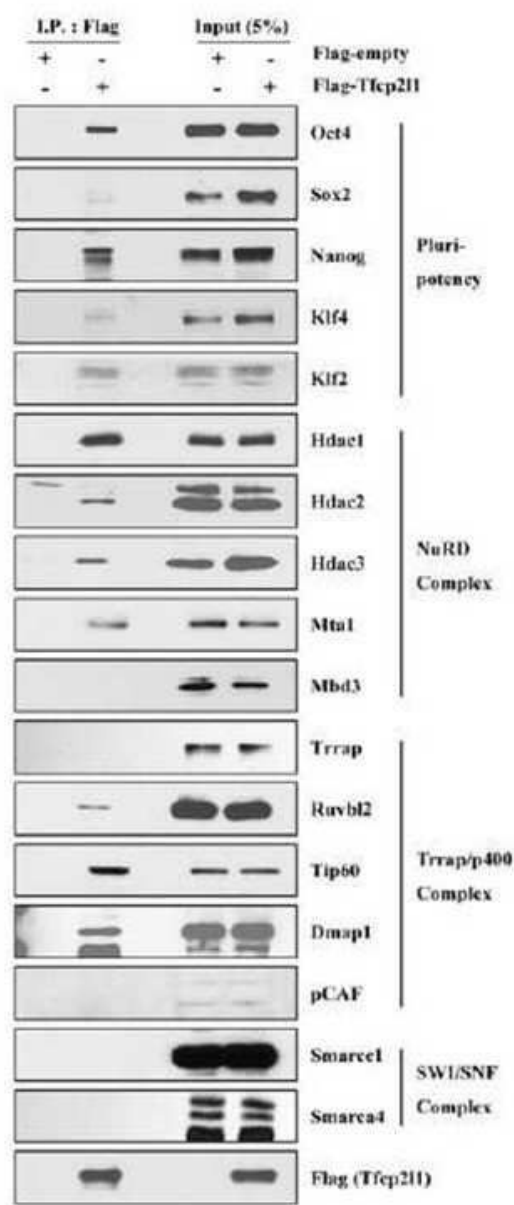
[0147] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

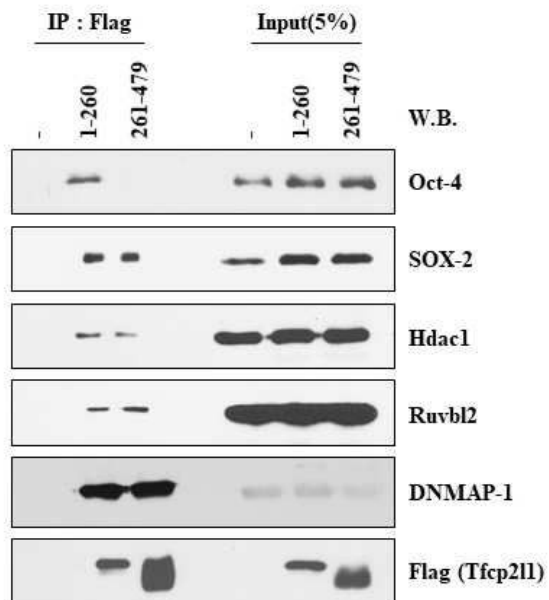
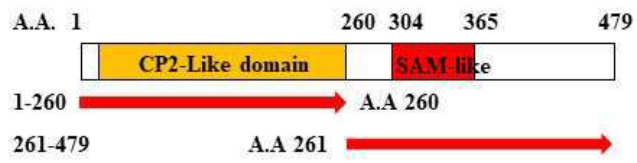
도면1



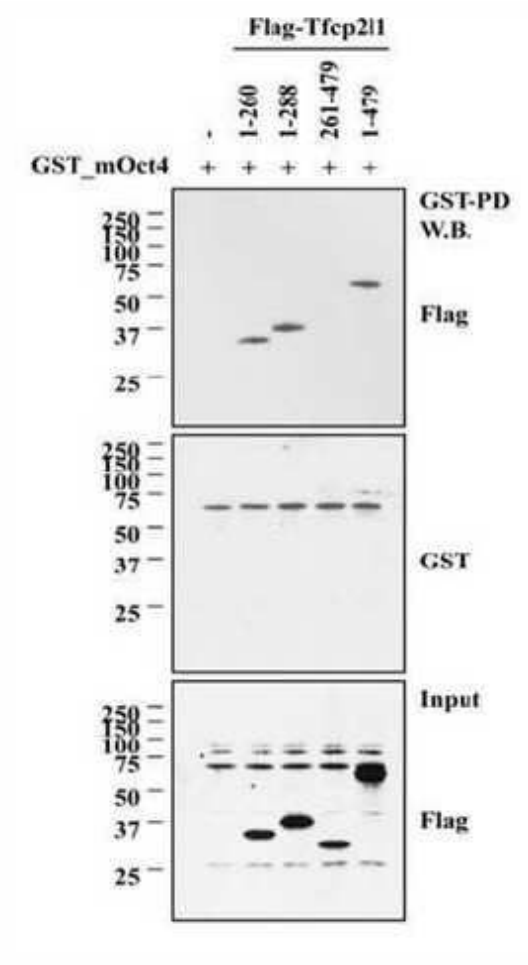
도면2



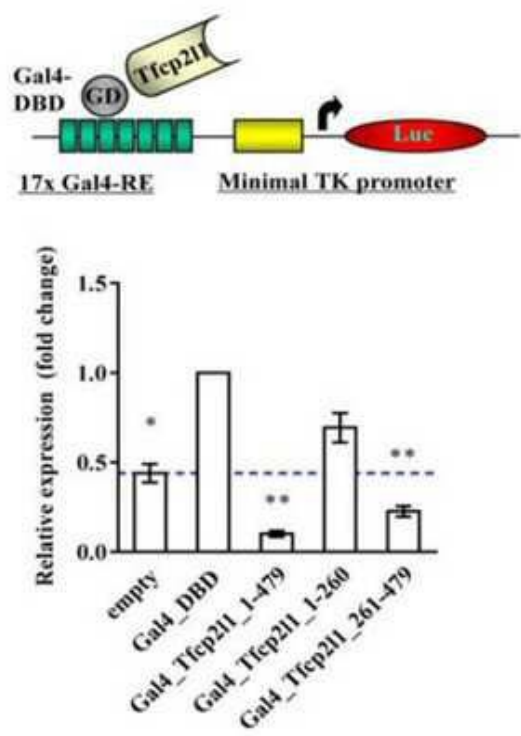
도면3



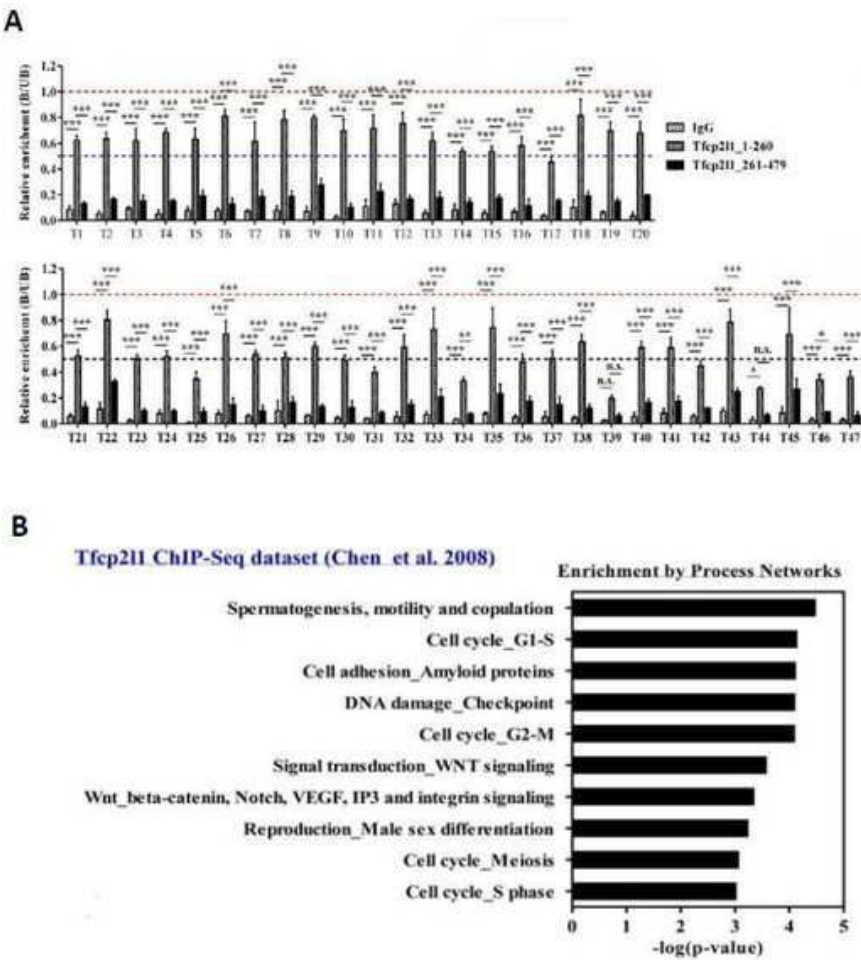
도면4



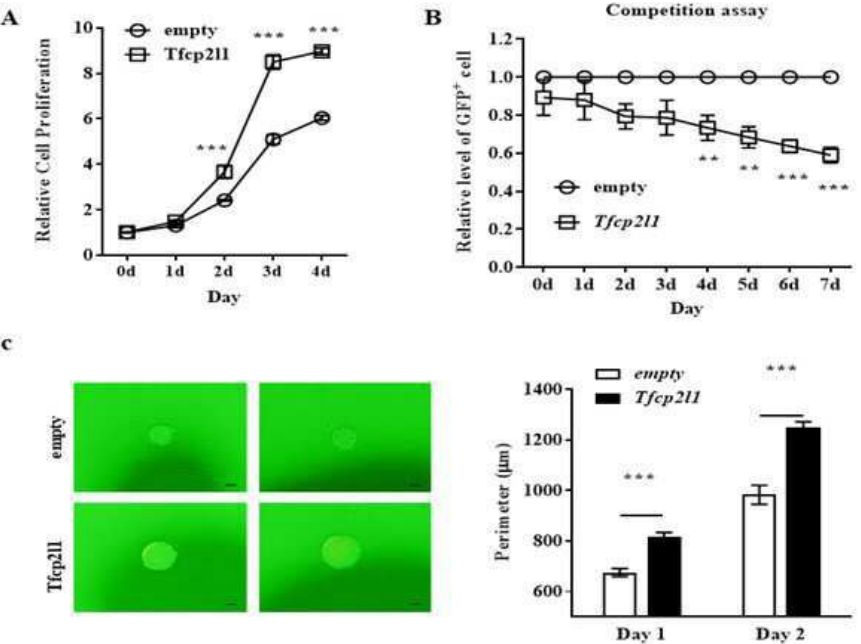
도면5



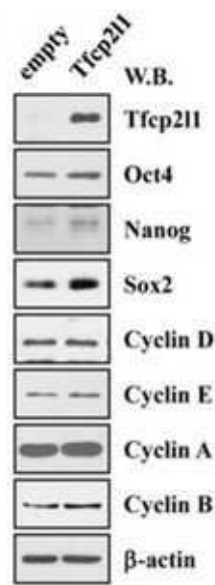
도면6



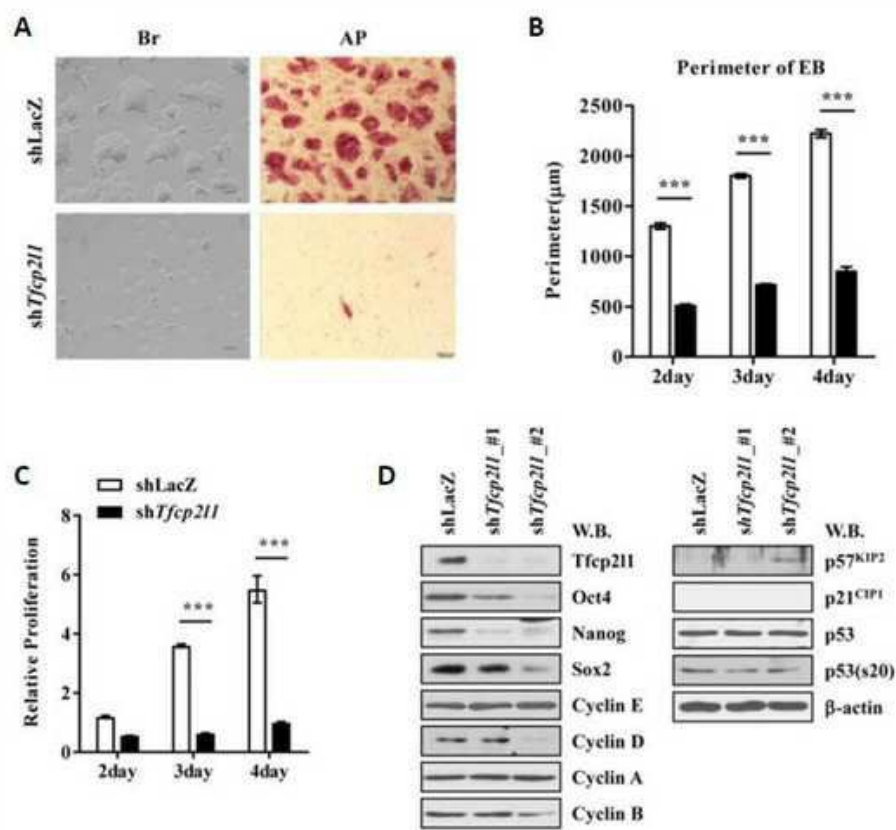
도면7



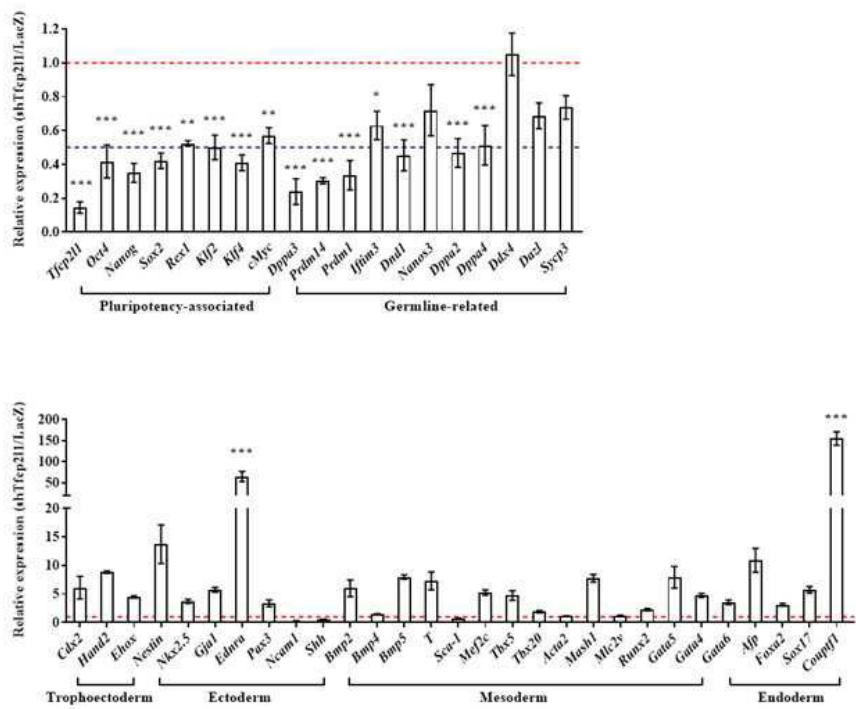
도면8



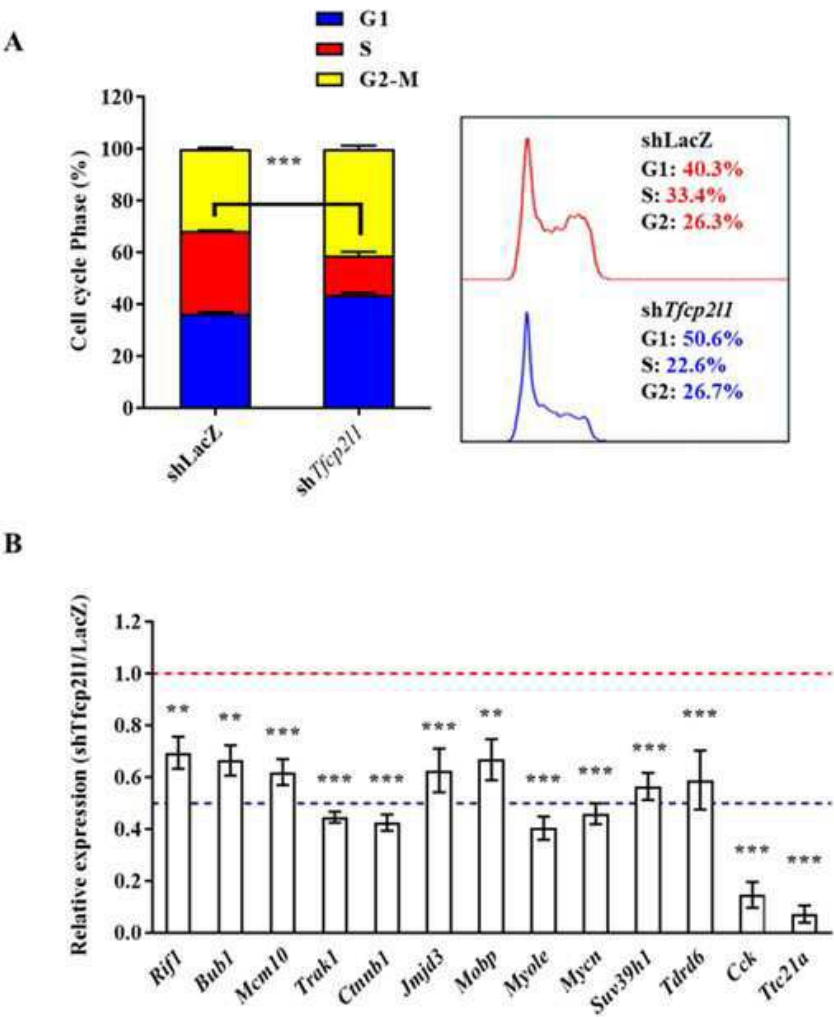
도면9



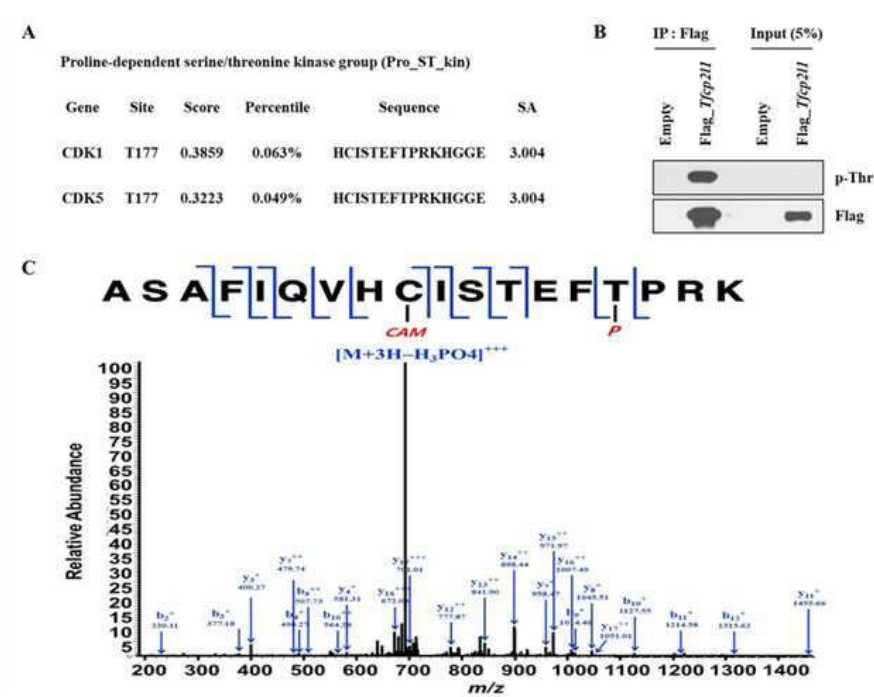
도면10



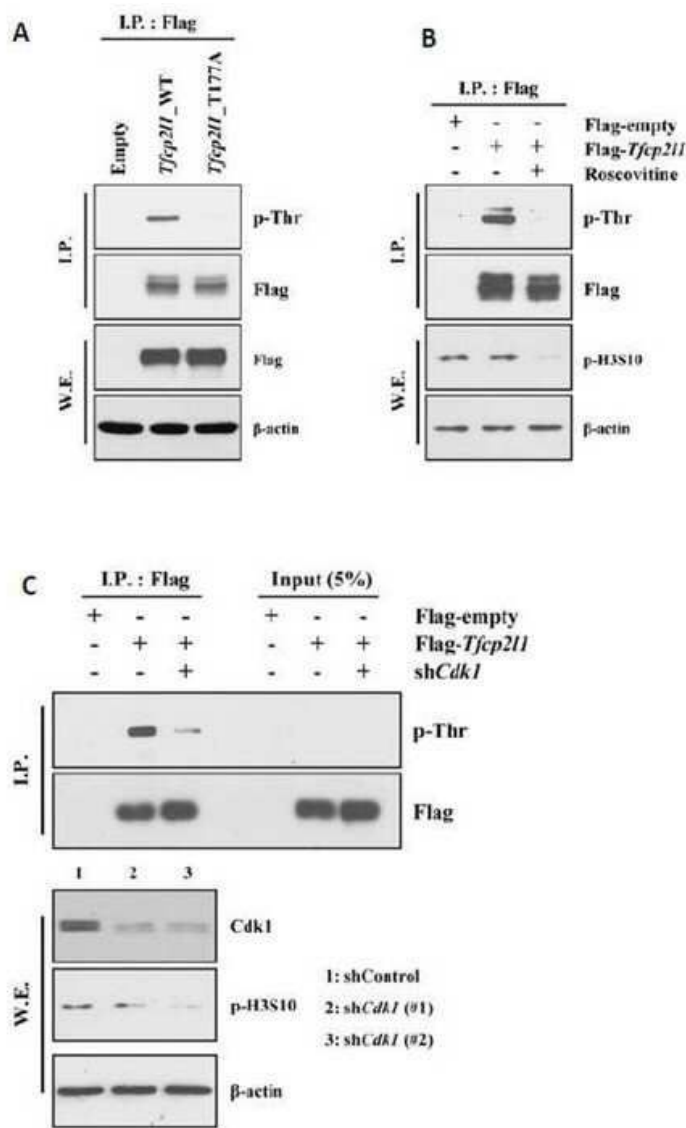
도면11



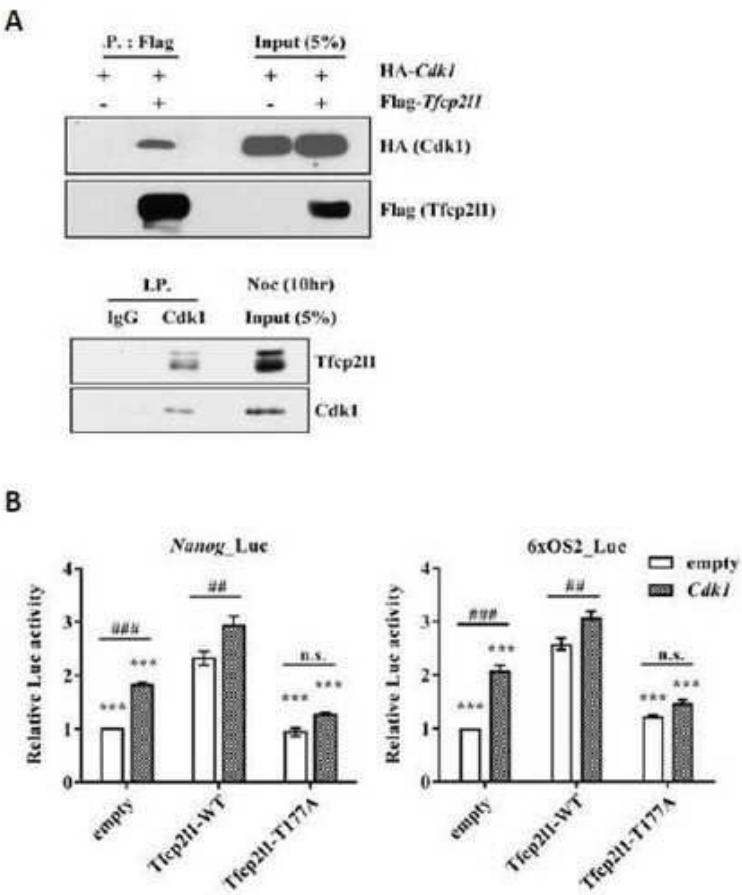
도면12



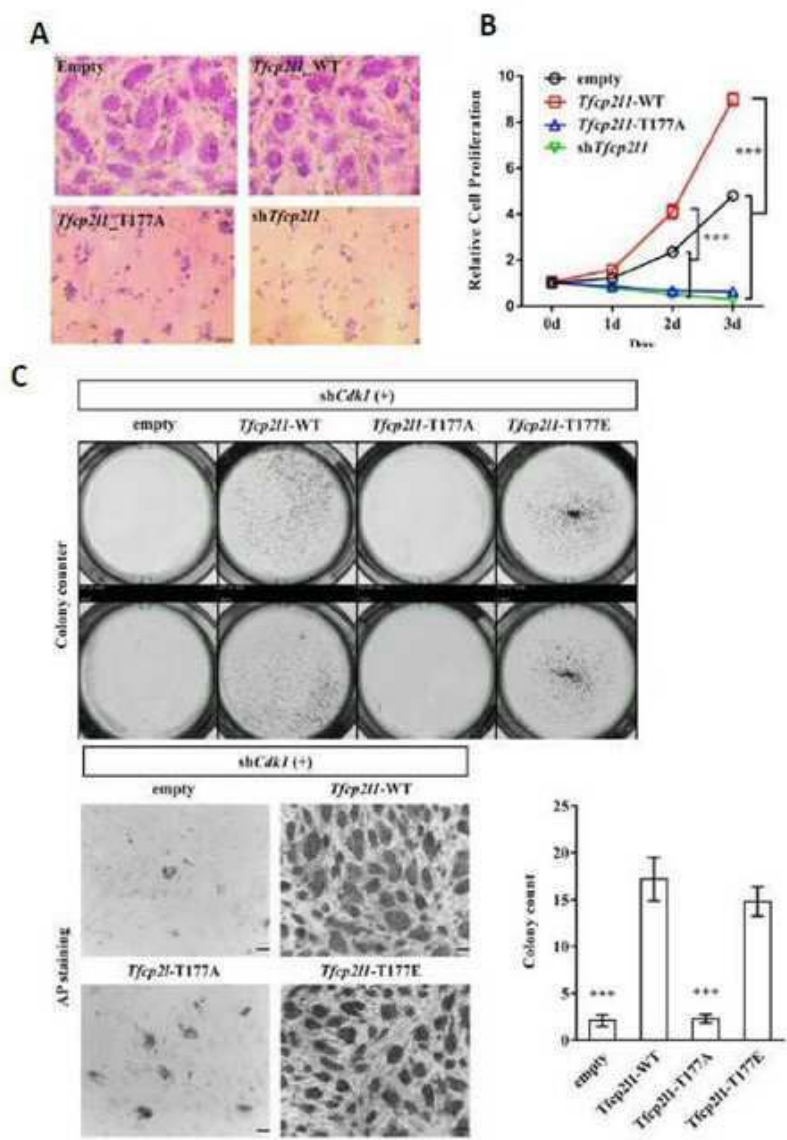
도면13



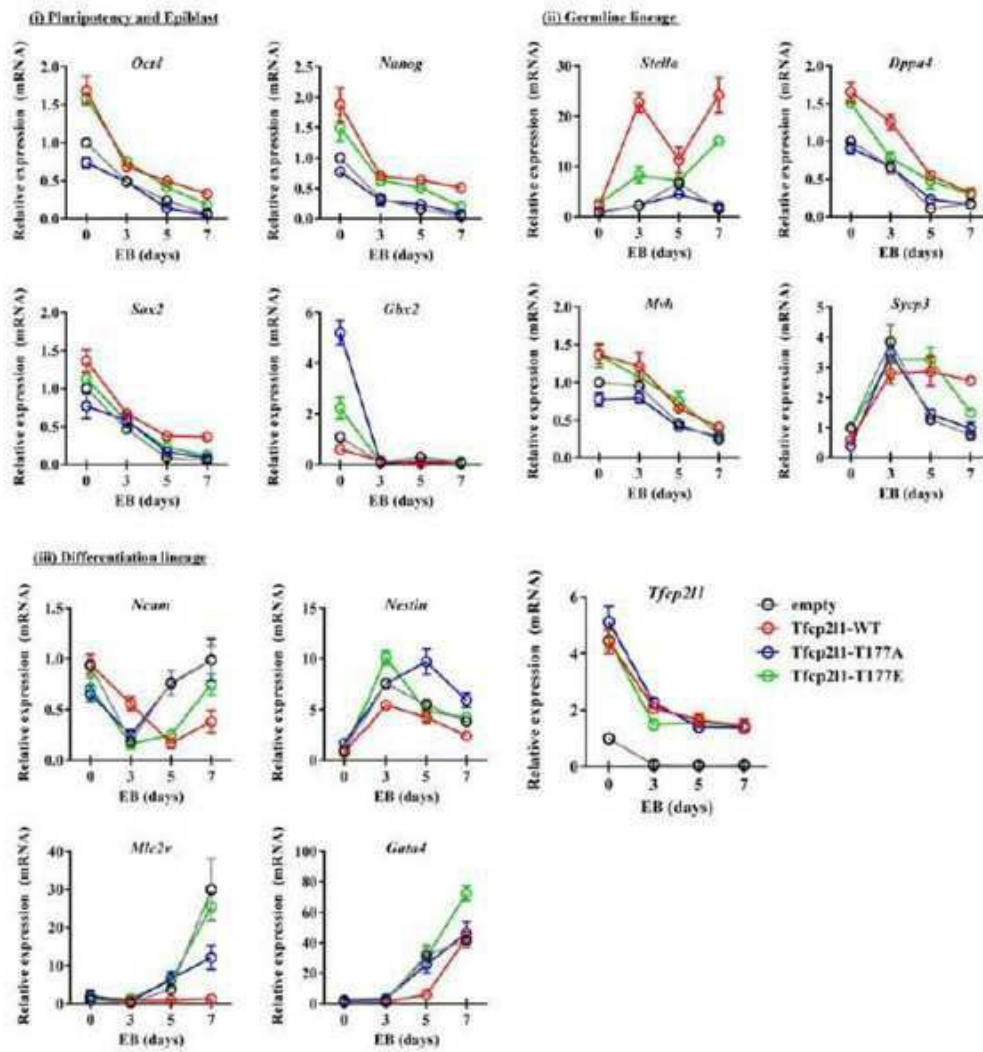
도면14



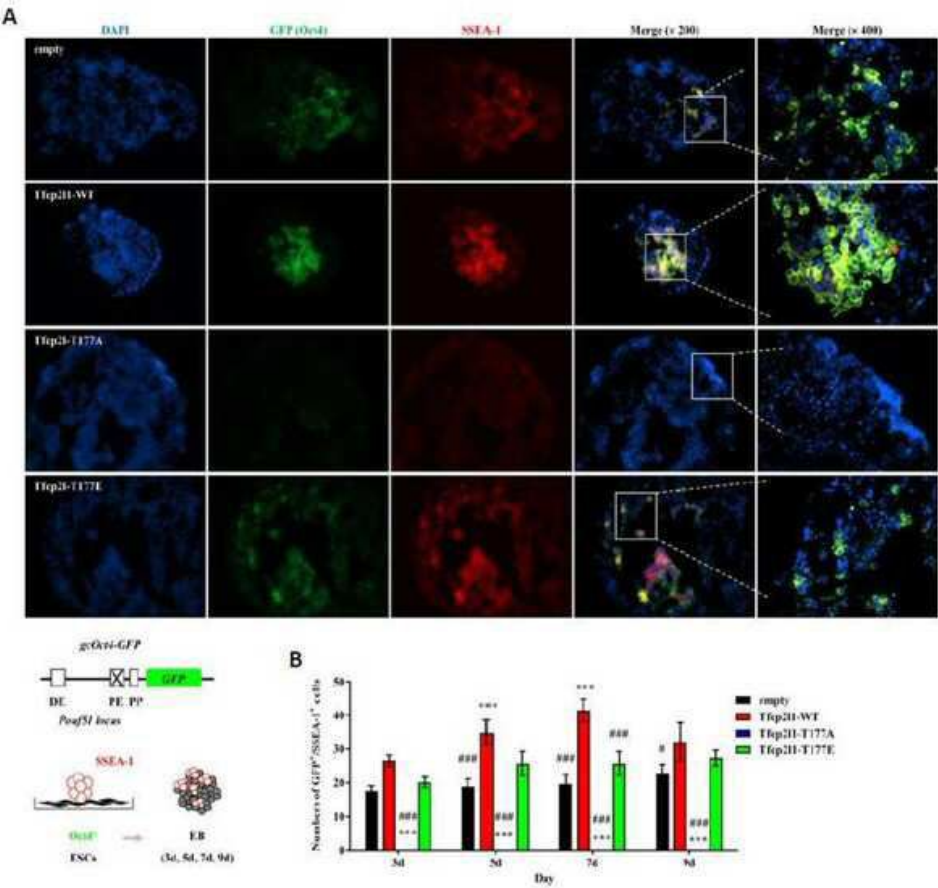
도면15



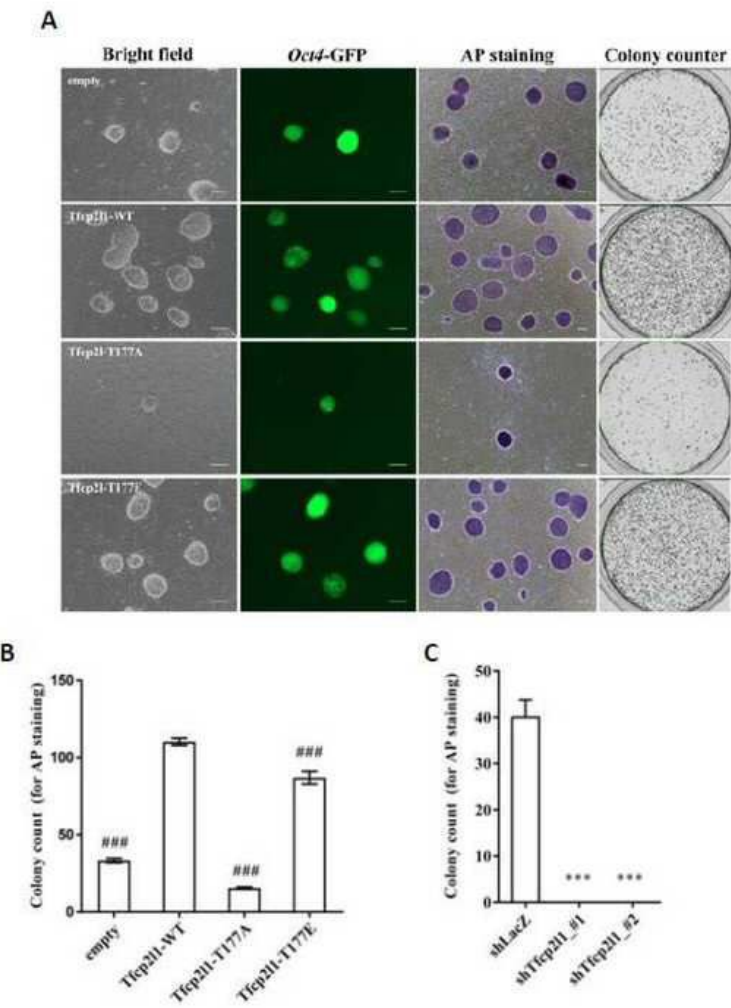
도면16



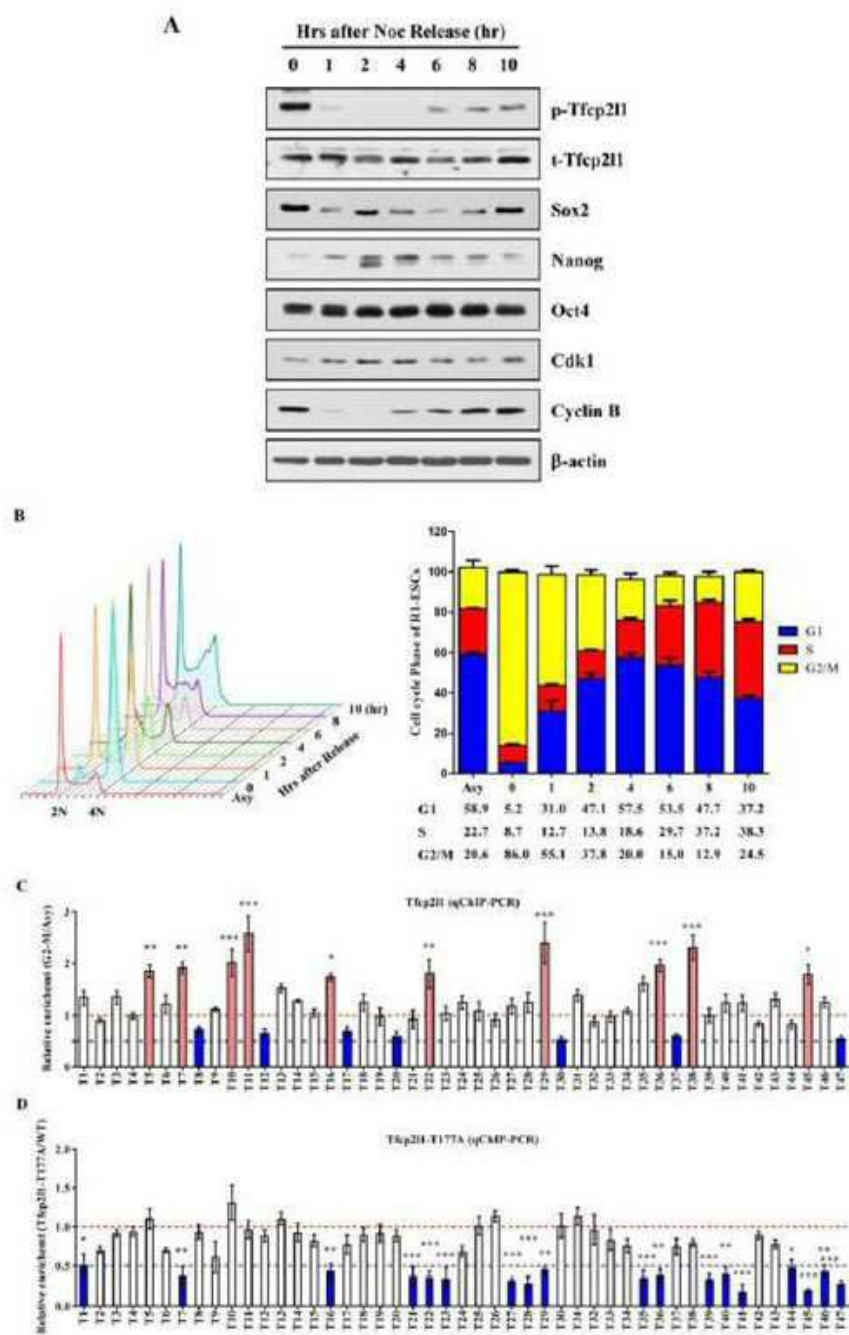
도면17



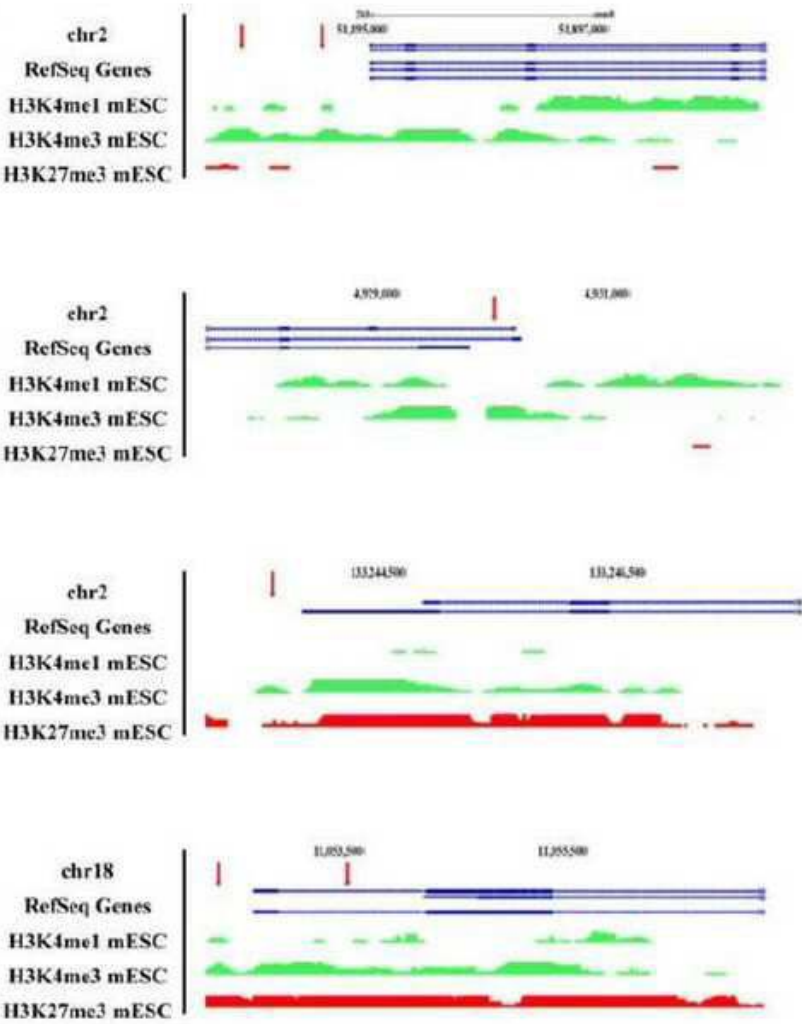
도면18



도면19

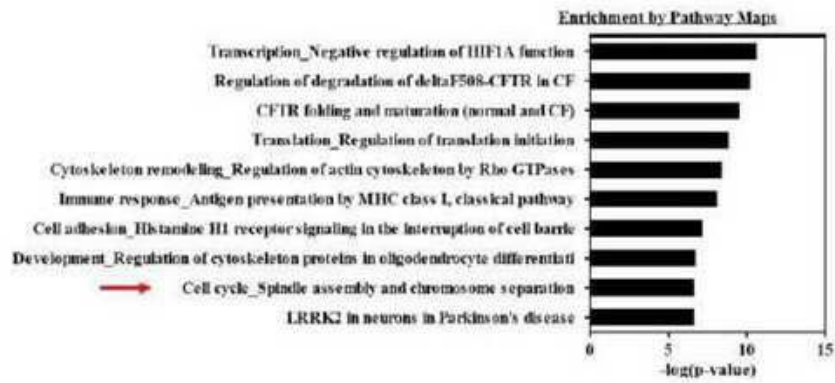


도면20



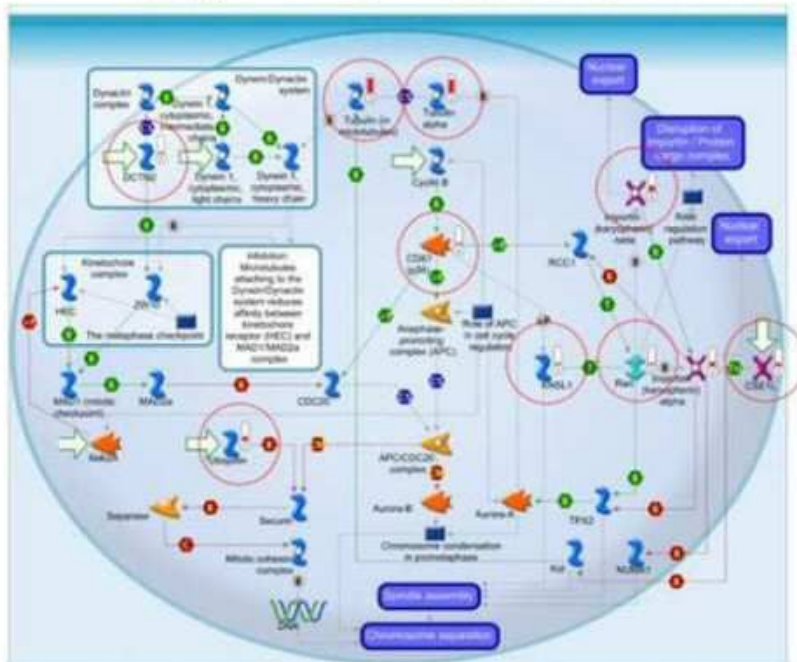
도면22

A

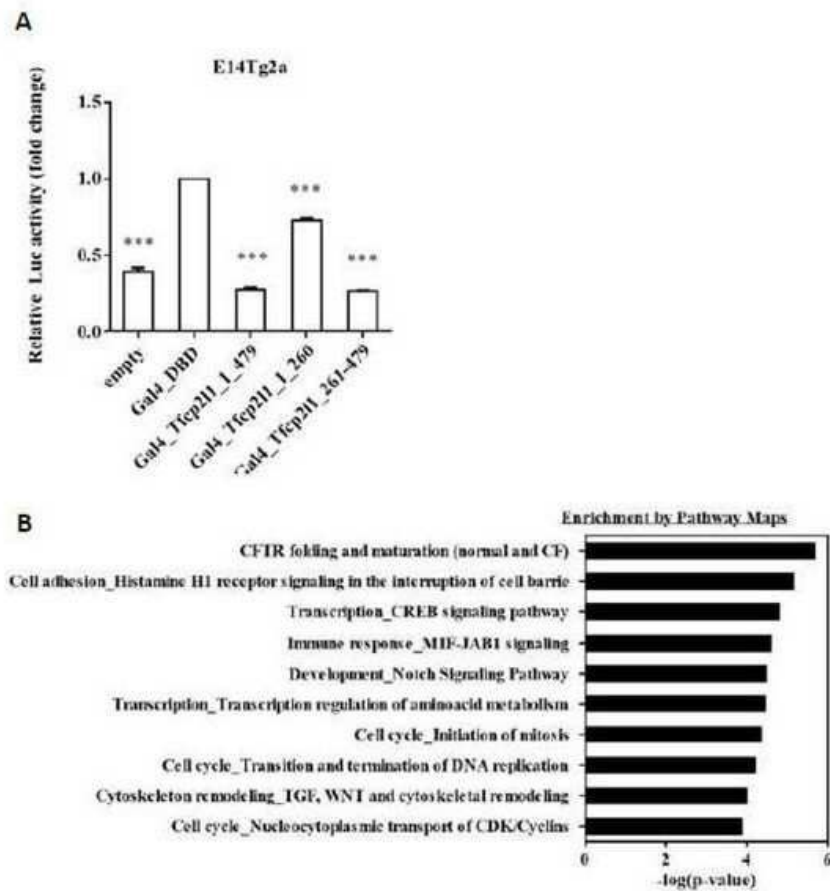


B

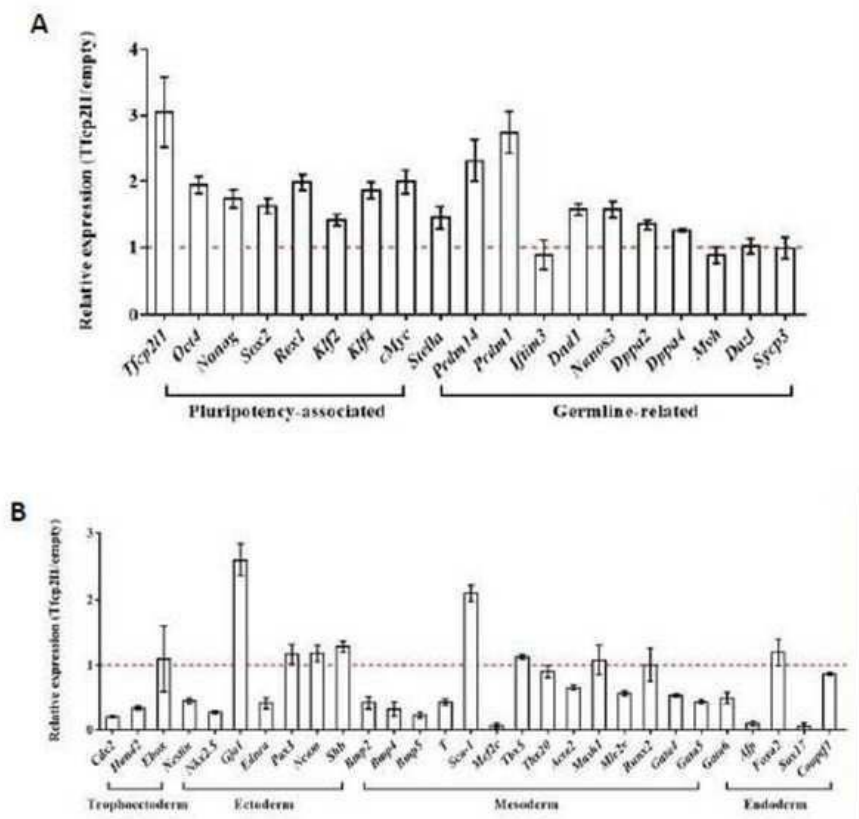
Cell cycle_Spindle assembly and chromosome separation



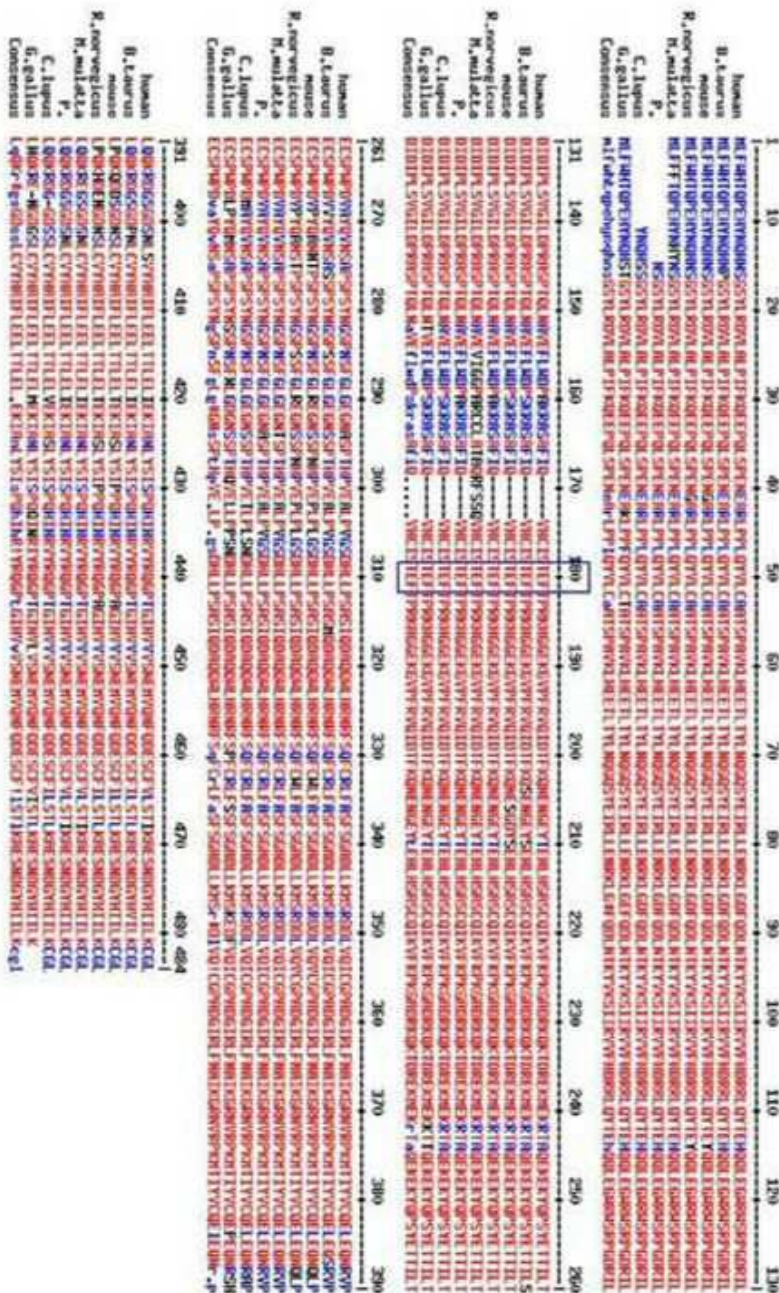
도면23



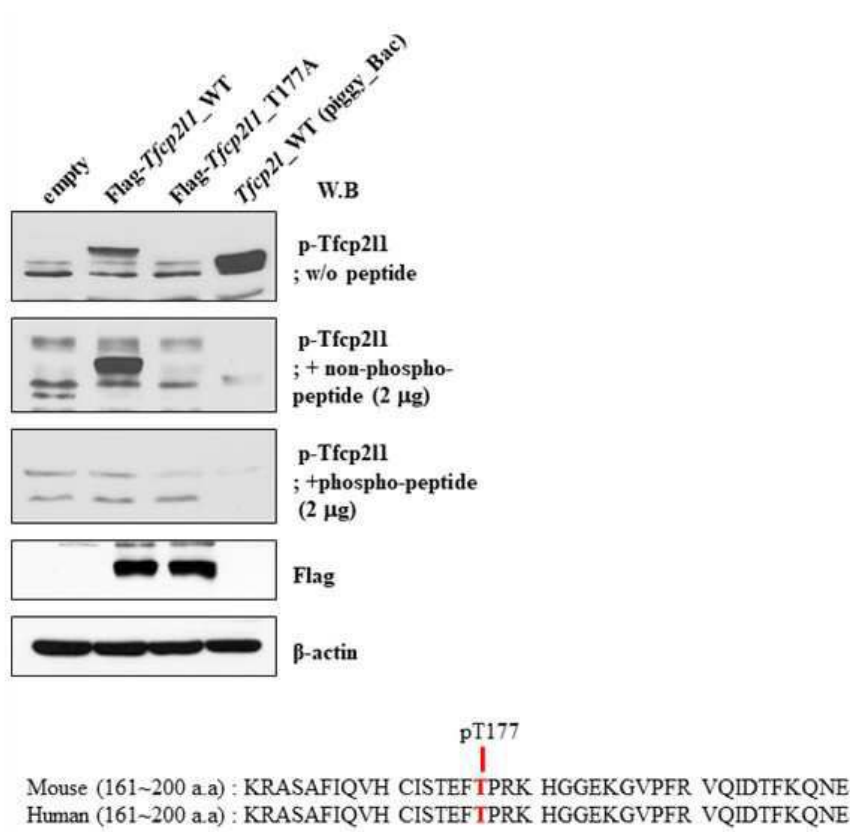
도면24



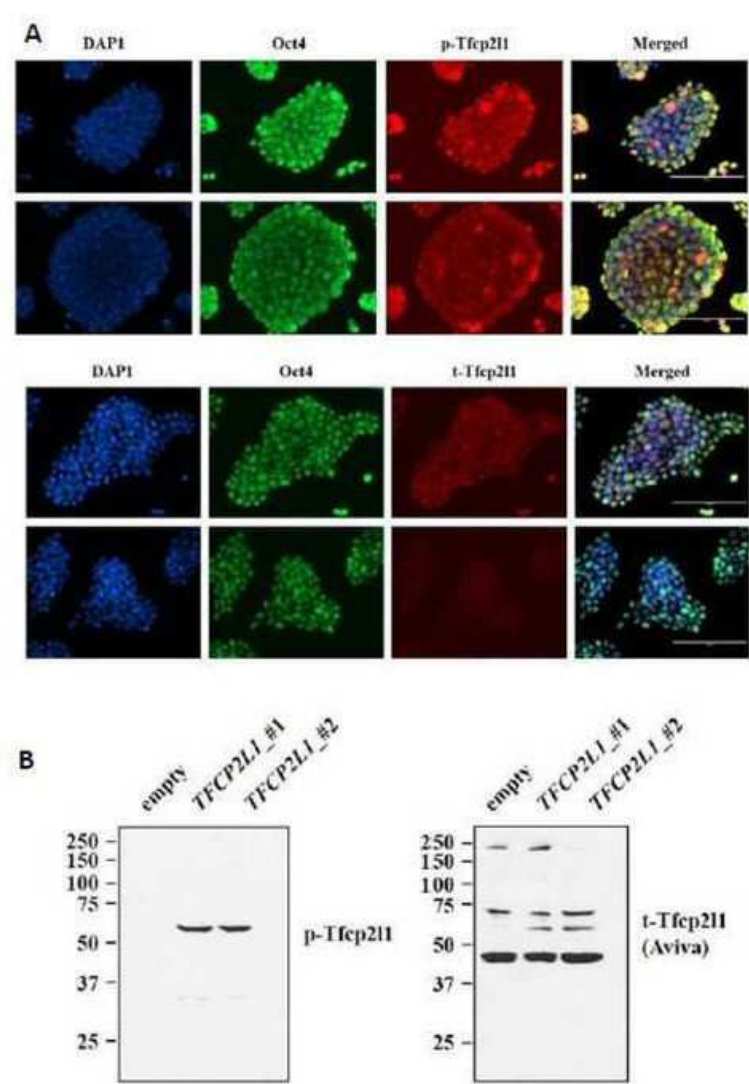
도면25



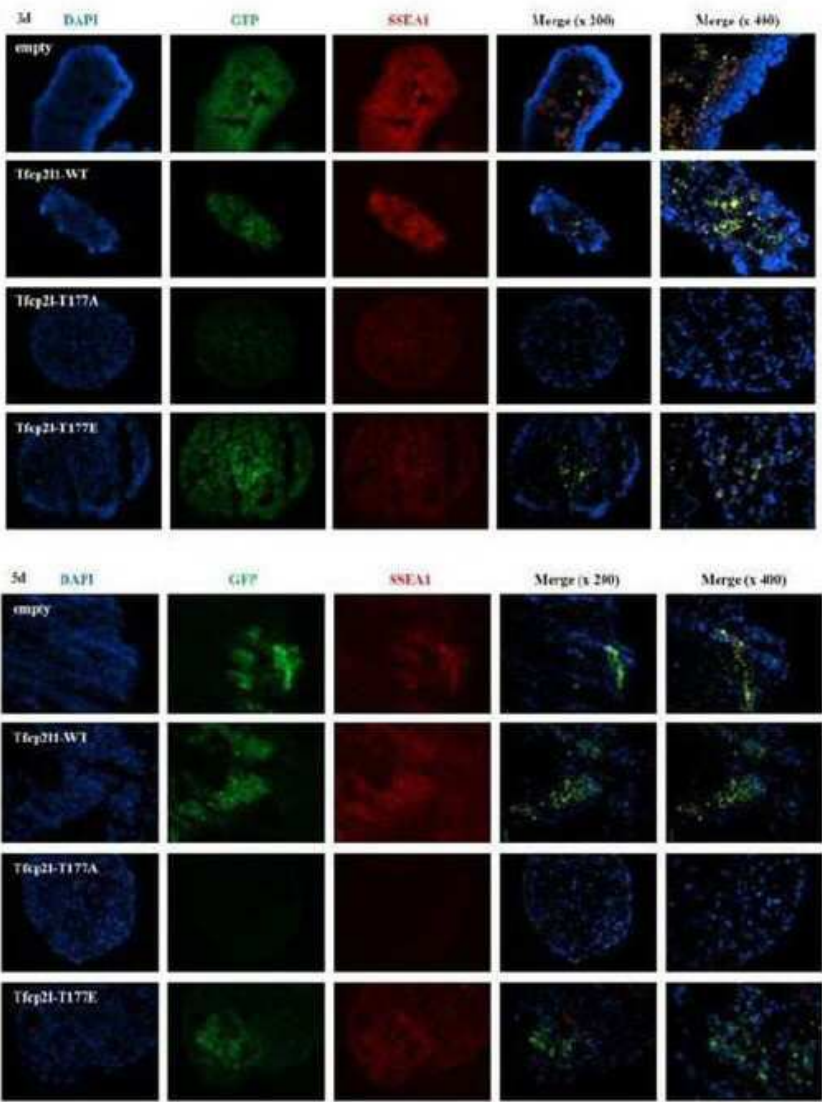
도면26



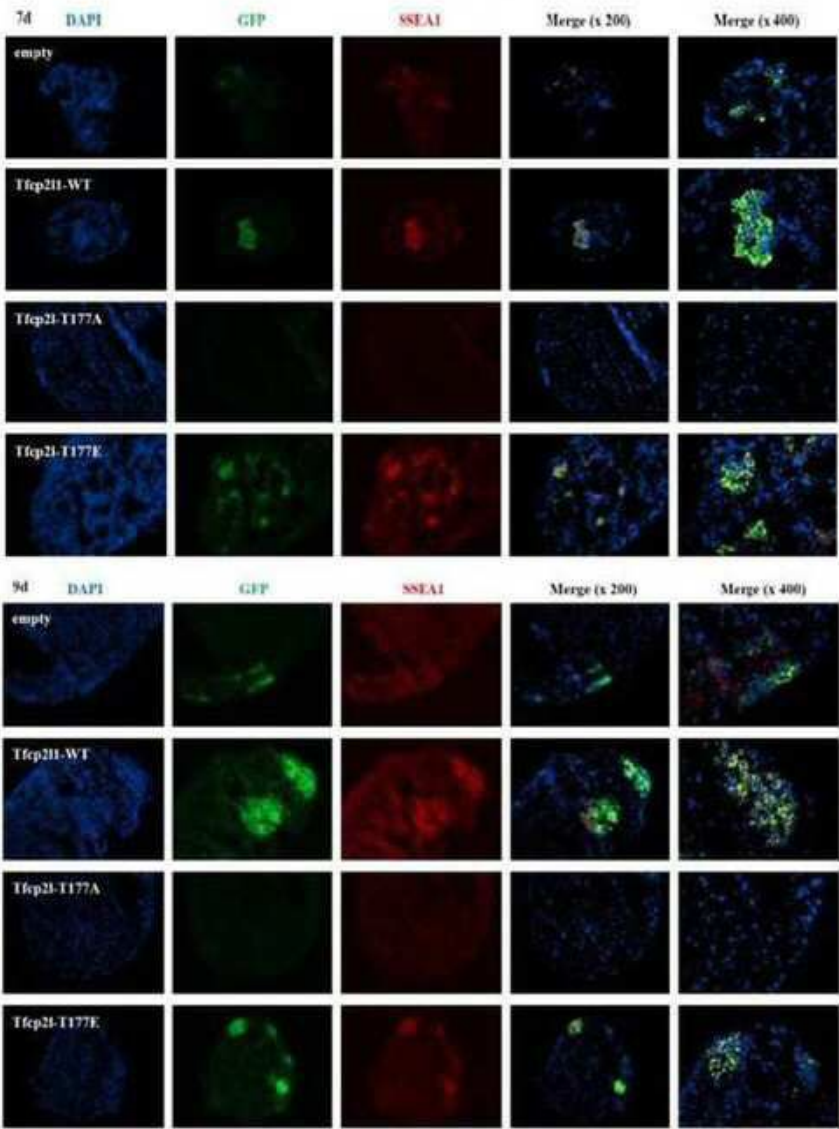
도면27



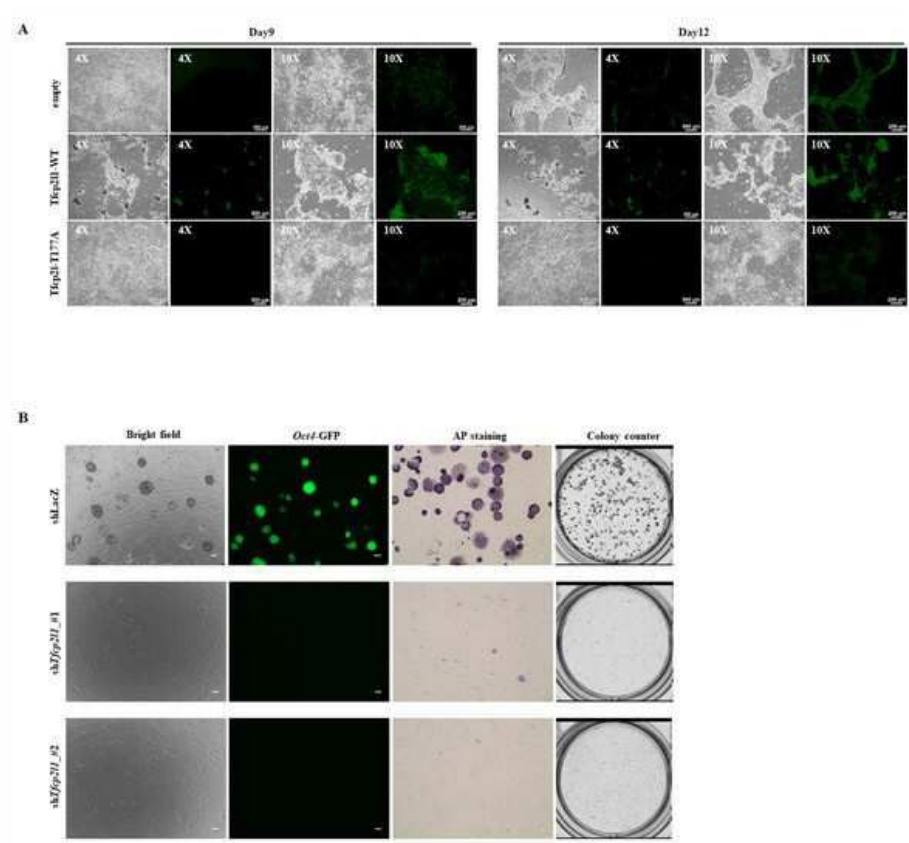
도면28a



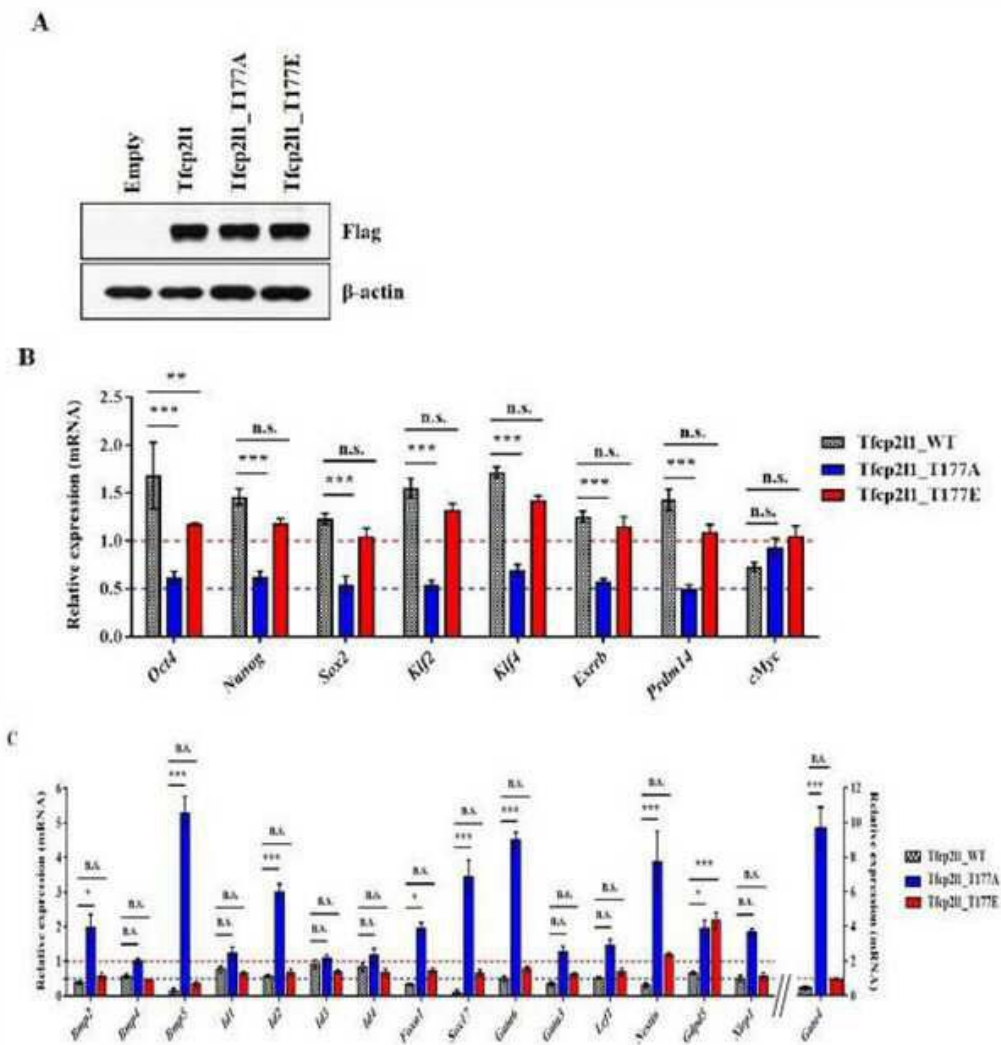
도면28b



도면29

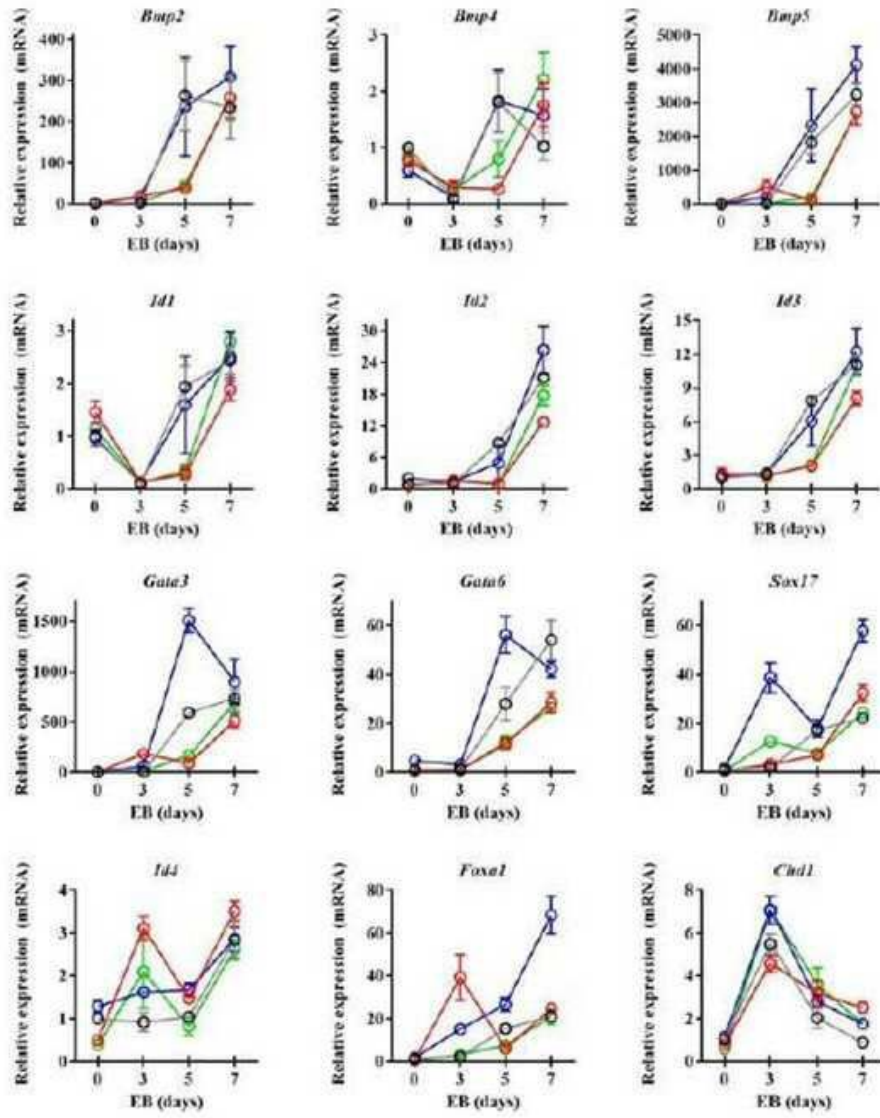


도면30

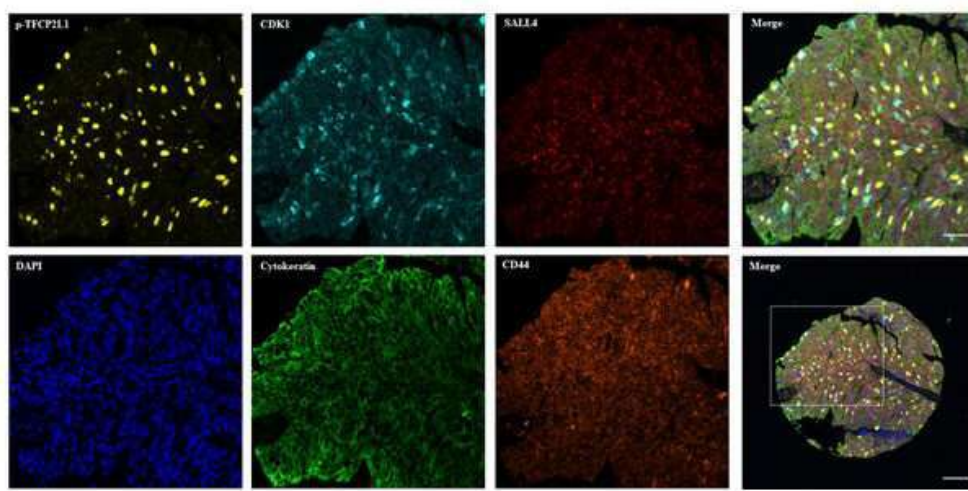


도면31

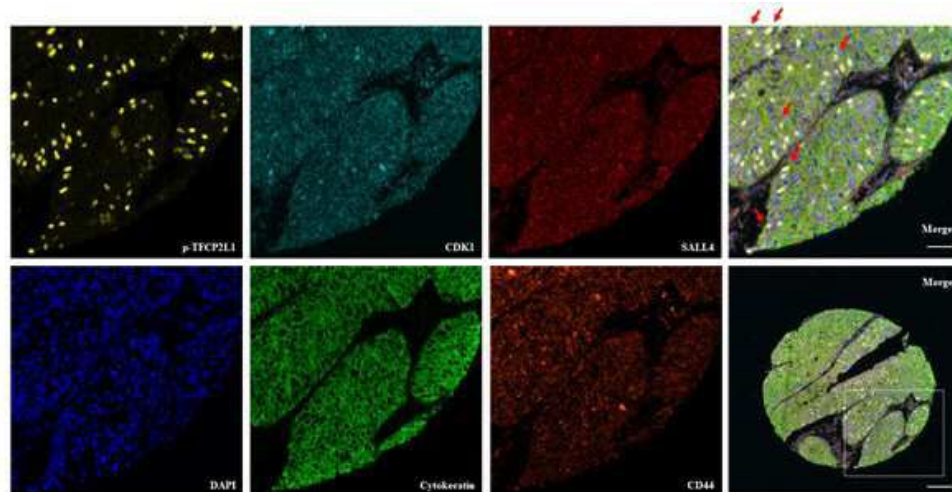
○ empty
 ○ Tfp2II_WT
 ○ Tfp2II_T177A



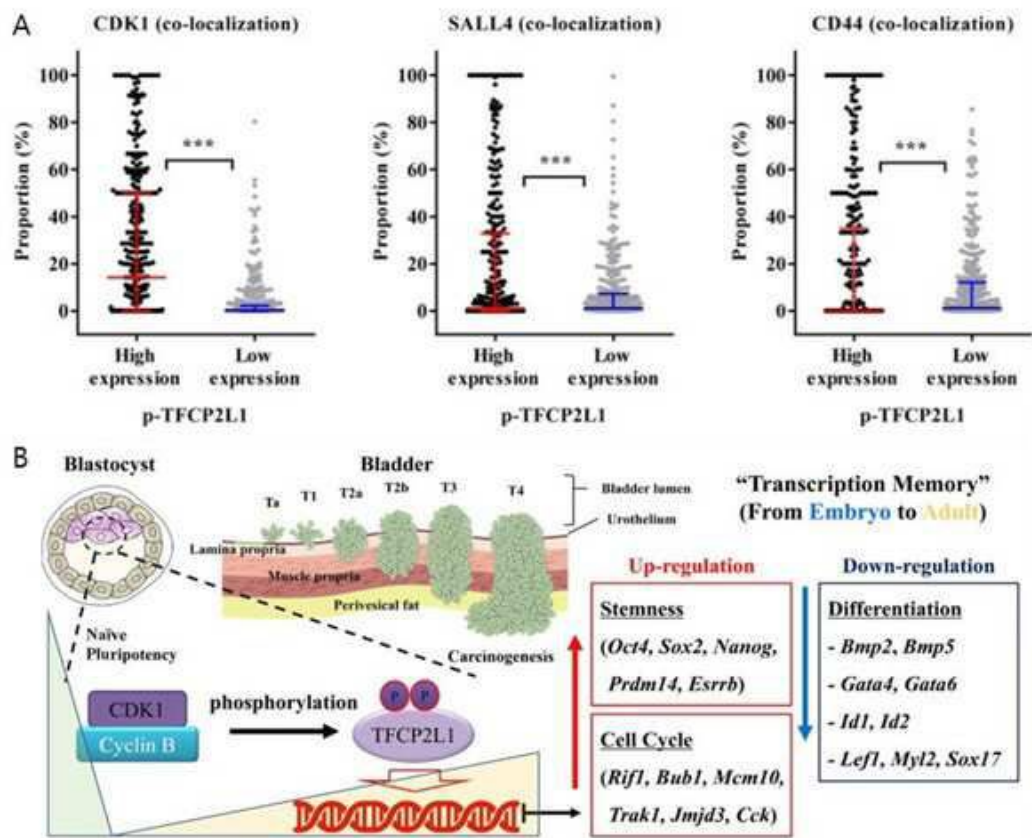
도면32



도면33



도면34



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION
- <120> Biomarker Composition for Predicting Pluripotent, Differentiation
and Proliferation of Stem Cells Comprising Phosphated TFCP2L1,
and Uses thereof
- <130> ADP-2018-0186
- <160> 7
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 479
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TFCP2L1
- <400> 1

Met Leu Phe Trp His Thr Gln Pro Glu His Tyr Asn Gln His Asn Ser

1	5	10	15
Gly Ser Tyr Leu Arg Asp Val Leu Ala Leu Pro Ile Phe Lys Gln Glu			
	20	25	30
Glu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Asn Glu Ala Arg Leu Pro Pro Leu Gln			
	35	40	45
Tyr Val Leu Cys Ala Ala Thr Ser Pro Ala Val Lys Leu His Glu Glu			
	50	55	60
Thr Leu Thr Tyr Leu Asn Gln Gly Gln Ser Tyr Glu Ile Arg Leu Leu			
65	70	75	80
Glu Asn Arg Lys Leu Gly Asp Phe Gln Asp Leu Asn Thr Lys Tyr Val			
	85	90	95
Lys Ser Ile Ile Arg Val Val Phe His Asp Arg Arg Leu Gln Tyr Thr			
	100	105	110
Glu His Gln Gln Leu Glu Gly Trp Arg Trp Ser Arg Pro Gly Asp Arg			
	115	120	125
Ile Leu Asp Ile Asp Ile Pro Leu Ser Val Gly Ile Leu Asp Pro Arg			
130	135	140	
Ala Ser Pro Thr Gln Leu Asn Ala Val Glu Phe Leu Trp Asp Pro Ala			
145	150	155	160
Lys Arg Ala Ser Ala Phe Ile Gln Val His Cys Ile Ser Thr Glu Phe			
	165	170	175
Thr Pro Arg Lys His Gly Gly Glu Lys Gly Val Pro Phe Arg Val Gln			
	180	185	190
Ile Asp Thr Phe Lys Gln Asn Glu Asn Gly Glu Tyr Thr Glu His Leu			
	195	200	205
His Ser Ala Ser Cys Gln Ile Lys Val Phe Lys Pro Lys Gly Ala Asp			
210	215	220	
Arg Lys Gln Lys Thr Asp Arg Glu Lys Met Glu Lys Arg Thr Ala Gln			
225	230	235	240
Glu Lys Glu Lys Tyr Gln Pro Ser Tyr Glu Thr Thr Ile Leu Thr Glu			
	245	250	255
Cys Ser Pro Trp Pro Asp Val Ala Tyr Gln Val Asn Ser Ala Pro Ser			

260 265 270
Pro Ser Tyr Asn Gly Ser Pro Asn Ser Phe Gly Leu Gly Glu Gly Asn
275 280 285
Ala Ser Pro Thr His Pro Val Glu Ala Leu Pro Val Gly Ser Asp His

290 295 300
Leu Leu Pro Ser Ala Ser Ile Gln Asp Ala Gln Gln Trp Leu His Arg
305 310 315 320
Asn Arg Phe Ser Gln Phe Cys Arg Leu Phe Ala Ser Phe Ser Gly Ala
325 330 335
Asp Leu Leu Lys Met Ser Arg Asp Asp Leu Val Gln Ile Cys Gly Pro
340 345 350
Ala Asp Gly Ile Arg Leu Phe Asn Ala Ile Lys Gly Arg Asn Val Arg
355 360 365

Pro Lys Met Thr Ile Tyr Val Cys Gln Glu Leu Glu Gln Asn Arg Val
370 375 380
Pro Leu Gln Gln Lys Arg Asp Gly Ser Gly Asp Ser Asn Leu Ser Val
385 390 395 400
Tyr His Ala Ile Phe Leu Glu Glu Leu Thr Thr Leu Glu Leu Ile Glu
405 410 415
Lys Ile Ala Asn Leu Tyr Ser Ile Ser Pro Gln His Ile His Arg Val
420 425 430
Tyr Arg Gln Gly Pro Thr Gly Ile His Val Val Val Ser Asn Glu Met

435 440 445
Val Gln Asn Phe Gln Asp Glu Ser Cys Phe Val Leu Ser Thr Ile Lys
450 455 460
Ala Glu Ser Asn Asp Gly Tyr His Ile Ile Leu Lys Cys Gly Leu
465 470 475

<210> 2

<211> 479

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse Tfcp211

<400> 2

Met Leu Phe Trp His Thr Gln Pro Glu His Tyr Asn Gln His Asn Ser
1 5 10 15

Gly Ser Tyr Leu Arg Asp Val Leu Ala Leu Pro Ile Phe Lys Gln Glu
20 25 30

Glu Pro Gln Leu Ser Pro Glu Asn Gly Ala Arg Leu Pro Pro Leu Gln
35 40 45

Tyr Val Leu Cys Ala Ala Thr Ser Pro Ala Val Lys Leu His Glu Glu
50 55 60

Thr Leu Thr Tyr Leu Asn Gln Gly Gln Ser Tyr Glu Ile Arg Leu Leu
65 70 75 80

Glu Asn Arg Lys Leu Gly Asp Phe Gln Asp Leu Asn Thr Lys Tyr Val

85 90 95

Lys Ser Ile Ile Arg Val Val Phe His Asp Arg Arg Leu Gln Tyr Thr
100 105 110

Glu Tyr Gln Gln Leu Glu Gly Trp Arg Trp Ser Arg Pro Gly Asp Arg
115 120 125

Ile Leu Asp Ile Asp Ile Pro Leu Ser Val Gly Ile Leu Asp Pro Arg
130 135 140

Ala Ser Pro Thr Gln Leu Asn Ala Val Glu Phe Leu Trp Asp Pro Ser
145 150 155 160

Lys Arg Ala Ser Ala Phe Ile Gln Val His Cys Ile Ser Thr Glu Phe
165 170 175

Thr Pro Arg Lys His Gly Gly Glu Lys Gly Val Pro Phe Arg Val Gln
180 185 190

Ile Asp Thr Phe Lys Gln Asn Glu Ser Gly Asp Tyr Ser Glu His Leu
195 200 205

His Ser Ala Ser Cys Gln Ile Lys Val Phe Lys Pro Lys Gly Ala Asp
210 215 220

Arg Lys Gln Lys Thr Asp Arg Glu Lys Met Glu Lys Arg Thr Ala Gln

225 230 235 240

Glu Lys Glu Lys Tyr Gln Pro Ser Tyr Glu Thr Thr Ile Leu Thr Glu
 245 250 255
 Cys Ser Pro Trp Pro Asp Val Pro Tyr Gln Ala Asn Asn Thr Pro Ser
 260 265 270
 Pro Ser Tyr Asn Gly Ser Pro Asn Ser Phe Gly Leu Arg Glu Gly Asn
 275 280 285
 Ser Ser Pro Asn His Pro Val Glu Pro Leu Pro Leu Gly Ser Asp His
 290 295 300

 Leu Leu Pro Ser Ala Ser Ile Gln Asp Ala Gln Gln Trp Leu His Arg
 305 310 315 320
 Asn Arg Phe Ser Gln Phe Cys Trp Leu Phe Ala Ser Phe Ser Gly Ala
 325 330 335
 Asp Leu Leu Lys Met Ser Arg Asp Asp Leu Val Gln Val Cys Gly Pro
 340 345 350
 Ala Asp Gly Ile Arg Leu Phe Asn Ala Ile Lys Gly Arg Asn Val Arg
 355 360 365
 Pro Lys Met Thr Ile Tyr Val Cys Gln Glu Leu Glu Gln Asn Gln Leu

 370 375 380
 Pro Leu Pro Gln Lys Gln Asp Asp Ser Gly Asp Asn Ser Leu Cys Val
 385 390 395 400
 Tyr His Ala Ile Phe Leu Glu Glu Leu Thr Thr Leu Glu Leu Thr Glu
 405 410 415
 Lys Ile Ala Ser Leu Tyr Ser Ile Pro Pro Gln His Ile His Arg Val
 420 425 430
 Tyr Arg Gln Gly Pro Ala Gly Ile His Val Val Val Ser Asn Glu Met
 435 440 445

 Val Gln Asn Phe Gln Asp Glu Ser Cys Phe Ile Leu Ser Thr Leu Lys
 450 455 460
 Ala Glu Ser Asn Asp Gly Tyr His Ile Ile Leu Lys Cys Gly Leu
 465 470 475
 <210> 3
 <211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine Tfcp211-T177A sense

<400> 3

glatcagcac ggaattcgcc cccaggaagc a 31

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine Tfcp211-T177A antisense

<400> 4

tgcttcctgg gggcgaattc cgtgctgata c 31

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine Tfcp211-T177E sense

<400> 5

ctgtatcagc acggaattcg aaccaggaa gcatggggg 39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine Tfcp211-T177E antisense

<400> 6

cccccatgct tcttgggttc gaattccgtg ctgatacag 39

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-p-Tfpc211 antibody

<400> 7

Lys Arg Ala Ser Ala Phe Ile Gln Val His Cys Ile Ser Thr Glu Phe

1	5	10	15
Thr	Pro	Arg	Lys
His	Gly	Gly	Glu
Lys	Gly	Val	Pro
Phe	Arg	Val	Gln
20	25	30	
Ile	Asp	Thr	Phe
Lys	Gln	Asn	Glu
35	40		