



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0087227
(43) 공개일자 2025년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5044 (2013.01)
G01N 33/6845 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0176796
(22) 출원일자 2023년12월07일
심사청구일자 2023년12월07일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
최장현
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
지하늘
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
김건우
울산 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
김중석

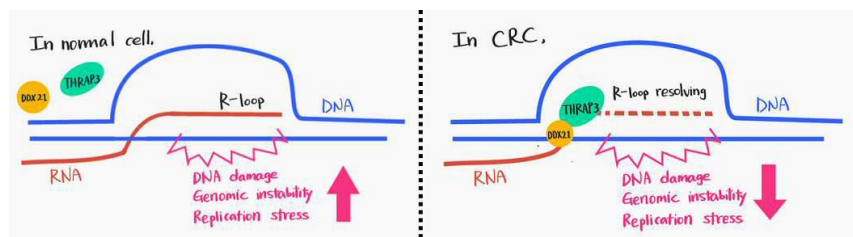
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 THRAP3 및 DDX21의 결합을 이용한 대장암 치료제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 THRAP3 및 DDX21의 결합을 이용한 대장암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합하는 상호작용으로 R-loop라는 DNA 손상성 구조의 축적을 줄여주어 DNA손상을 억제시키는 것을 확인함에 따라, THRAP3 및 DDX21의 결합을 억제하여 대장암 세포의 DNA 손상을 유도시키는 후보약물을 선별하기 위한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이며, 이는 대장암 치료제 개발에 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

G01N 2500/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345362691
과제번호	2021R1I1A2041463
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	지방-간 대사축 규명을 통한 비알코올성 지방간 및 간암 유발기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180283
과제번호	2018R1A5A1024340
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	대사스트레스 세포대응 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

인간으로부터 분리된 대장암 세포에 후보 물질을 접촉시키는 단계;

상기 후보 물질을 접촉한 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 후보 물질을 접촉한 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준이 감소된 대장암 치료제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 대장암 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계는 THRAP3 및 DDX21 유전자의 mRNA 수준 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 대장암 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 THRAP3은 R-loop(DNA:RNA hybrid) 내에서 DDX21과 결합하여 R-loop를 분해시키는 것을 특징으로 하는 대장암 치료제 스크리닝 방법

청구항 5

제 1항에 있어서

상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준 감소는 대장암 세포 내 R-loop (DNA:RNA hybrid) 분해를 억제시킴으로써, DNA 손상을 유도하여 대장암 세포를 사멸시키는 것을 특징으로 하는 대장암 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 THRAP3 및 DDX21의 결합을 이용한 대장암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 상호작용으로 R-loop라는 DNA 손상성 구조의 축적을 줄여주어 DNA손상을 억제시키는 것을 확인함에 따라, THRAP3 및 DDX21의 결합을 억제하여 대장암 세포의 DNA 손상을 유도시키는 후보약물을 선별하기 위한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 대장암은 세계에서 세 번째로 흔히 진단되는 암이며 네 번째로 많은 사망 원인이다. 대장암을 포함한 대부분의 암은 산발적이며 유전적, 후천적 및 환경적 요인의 통제하에 있다. 대장암은 초기 비전이성 단계에서 진단될 때 치료 가능한 것으로 알려져 있으며 5년 내 생존율은 90% 이상으로 높다. 그러나 림프절로 전이되는 경우, 타 장기로의 전이가 가능해지기 때문에 5년 내 생존율은 10 % 이하로 감소한다. 최근의 몇몇 연구는 분자 표적 치료와 조기 진단이 대장암 치료의 잠재적 접근 방법이라는 것을 암시하고 있다. 따라서 대장암에 대한 메커니즘 및 이에 상응하는 새로운 치료 표적의 발견은 환자의 삶을 개선하는데 매우 중요하다고 할 수 있다
- [0004] DNA 손상(DNA damage)은 암 및 노화 축진을 포함한 많은 질환의 발병 원인으로 알려져 있다. 이를 극복하기 위하여 세포 내에는 DNA 손상을 인지하여 세포주기를 멈추고 이를 복구시키는 시스템이 존재한다. 그러나 많은 질환 세포에서 이 시스템이 정상적으로 작동되지 않음이 관찰되었다. 따라서 DNA 손상 후 DNA 손상 반응(DNA damage response)이 정상적으로 작동되어 이들 손상이 돌연변이를 발생하지 않고 복구되도록 하는 것은 DNA 돌연변이 관련 질환을 예방하고 치료하는데 매우 중요한 의미를 지닌다.
- [0005] DNA-RNA 잡종 (DNA:RNA hybrid, R-loop)은 DNA 사슬과 염기순서가 그것에 상보적인 RNA 사슬로 구성된 핵산분자로, A형 DNA 및 2중 사슬 RNA와 유사한 2중 나선구조이다. RNA-DNA잡종과 그 형성반응은 역전사효소에 의한 cDNA합성을 비롯하여 노던잡입법, S1 지도작성법 등 유전자해석기술에 이용되고 있으며, 생체에서는 전사반응이나 DNA 복제에서 시발체 합성 등으로 짧은 RNA-DNA 잡종을 형성한다. 그러나 DNA 전사-복제 과정에서 형성된 R-loop (DNA:RNA hybrid)가 해소되지 않을 경우 DNA 손상이 나타나며, 이러한 DNA 손상은 암 질환 발생의 원인이 되므로, DNA 전사-복제 과정 후 형성된 R-loop의 분해가 암 질환 치료에 주요 타겟이 될 수 있다.
- [0006] 본 발명자들은 상기 대장암 치료제 개발의 새로운 대안으로, 대장암 세포에서 R-loop라는 DNA 손상성 구조의 축적을 줄여주어 DNA손상을 억제시키는 기능을 가진 THRAP3 및 DDX21의 결합을 억제하여 대장암 세포의 DNA 손상을 유도하는 후보물질을 선별하기 위한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2348602호 (2022.01.04.)

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Chenlin S, Agnes HW, Renate V, Ingrid G, Genes Dev., 2017 Jul 1, 31(13), 1370-1381. [DOI:10.1101/gad.300624.117]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 상호작용으로 R-loop라는 DNA 손상성 구조의 축적을 줄여 주어 DNA손상을 억제시키는 것을 확인함에 따라, THRAP3 및 DDX21의 결합을 억제하여 대장암 세포의 DNA 손상을 유도시키는 후보 물질을 선별하기 위한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위해, 인간으로부터 분리된 대장암 세포에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 상기 후보 물질을 접촉한 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하

여 상기 후보 물질을 접촉한 대장암세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준이 감소된 대장암 치료제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0013] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계는 THRAP3 및 DDX21 유전자의 mRNA 수준 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정함으로써 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 상기 THRAP3은 R-loop(DNA:RNA hybrid) 내에서 DDX21과 결합하여 R-loop를 분해시키는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준 감소는 대장암 세포 내 R-loop (DNA:RNA hybrid) 분해를 억제시킴으로써, DNA 손상을 유도하여 대장암 세포를 사멸시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 THRAP3 및 DDX21의 결합을 이용한 대장암 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합하는 상호작용으로 R-loop라는 DNA 손상성 구조의 축적을 줄여주어 DNA손상을 억제시키는 것을 확인함에 따라, THRAP3 및 DDX21의 결합을 억제하여 대장암 세포의 DNA 손상을 유도시키는 후보약물을 선별하기 위한 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공함으로써 효과적인 암 치료제 개발에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 대장암 환자의 종양 조직 및 대장암 세포의 THRAP3 발현을 비교하여 분석한 도면이다.
- 도 2는 THRAP3의 손실에 따른 대장암 세포 및 대장암 조직의 증식 감소와 대장암 세포 주기의 영향을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 THRAP3의 손실에 따른 R-loop(DNA:RNA hybrid)의 축적과 DNA 손상 활성화를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 대장암에서 R-loop 축적 해소와 DNA 안정성의 조절에 관여하는 THRAP3과 상호작용하는 단백질들 중 DDX21 발현의 연관성을 나타낸 도면이다.
- 도 5는 대장암 세포에서 THRAP3의 N말단 위치에 결합하는 DDX21을 나타낸 도면이다.
- 도 6은 THRAP3과 DDX21의 결핍에 의한 대장암 세포의 증식과 성장 저해를 나타낸 도면이다.
- 도 7은 대장암에서 THRAP3과 DDX21의 결합으로 R-loop의 축적이 해소됨에 따라 DNA 손상이 감소되는 것을 도식화한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대해 간략히 설명하고, 본 발명에 대해 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0023] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다.
- [0024] 아래에서는 첨부한 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 대한 해결하고자 하는 과제, 과제의 해결 수단, 발명의 효과를 포함한 구체적인 사항들은 다음에 기재할 실시예 및 도면들에 포함되어 있다. 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는

도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다.

- [0026] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.
- [0028] 본 발명은 인간으로부터 분리된 대장암 세포에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 상기 후보 물질을 접촉한 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 후보 물질을 접촉한 대장암 세포에서 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준이 감소된 대장암 치료제 후보물질을 선별하는 단계를 포함하는 대장암 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0030] 상기 후보물질은 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 감소시킬 것으로 예상되는 물질을 의미하는 것일 수 있다.
- [0031] 상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 대조구 시료는 인간 대장 세포 또는 대장암 세포의 시료일 수 있다.
- [0033] 상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준을 확인하는 단계는 THRAP3 및 DDX21 유전자의 mRNA 수준 또는 상기 유전자가 암호화하는 단백질 수준을 측정함으로써 이루어지는 것일 수 있다.
- [0034] 상기 mRNA 수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄 반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정할 수 있다.
- [0035] 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "프라이머"란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로써, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기 쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화등으로 변형시킬 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "프로브"란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수 백 염기길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 단백질 수준을 측정하는 제제는 유전자가 암호화하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단일 클론(monoclonal) 항체 및 다중 클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [0040] 상기 THRAP3은 R-loop(DNA:RNA hybrid) 내에서 DDX21과 결합하여 R-loop를 분해시키는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 THRAP3 및 DDX21의 결합 수준 감소는 대장암 세포 내 R-loop (DNA:RNA hybrid) 분해를 억제시킴으로써, DNA 손상을 유도하여 암세포를 사멸시키는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 대장암은 결장암, 직장암 및 항문암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0046] <실시예 1> 세포 배양

[0047] 인간 대장암 세포는 한국 세포주 은행에서 구매하여 분양받았고, 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI1640 배지를 사용하여 37℃에서, 5% CO₂가 공급되는 조건에서 배양되었다.

[0049] <실시예 2> 렌티바이러스의 short hairpin RNA를 이용한 형질 전환

[0050] ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구매한 HEK-293T 세포에 packaging, envelop 플라스미드와 함께 THRAP3을 타겟으로 하는 [표 1]의 short hairpin RNA를 포함하는 pLKO.1 플라스미드의 형질 전환을 통해 렌티바이러스 생산하였다. 형질 전환된 렌티바이러스가 포함된 상기 실시예 1의 배지를 이용하여 대장암 세포 HCT116, SW480에 감염을 시키고, 감염된 세포는 puromycin넣은 상기 실시예 1의 배지에서 형질 전환된 THRAP3 knockdown HCT116 세포와 THRAP3 knockdown SW480 세포로 분리하였다.

표 1

shRNA	서열 (5' →3')
THRAP3 shRNA #3	AGATCTCGTTCTCGTTCATT
THRAP3 shRNA #4	AGTATATCAGAATCGGGATT

[0053] <실시예 3> siRNA 형질 주입

[0054] 대장암 세포의 siRNA 형질 주입은 20 nM siRNA를 Lipofectamine 2000 및 RNAiMAX transfection reagent로 제조사 설명서의 형질 주입 과정에 따라 수행되었다.

표 2

siRNA	서열 (5' →3')
THRAP3 siRNA	GGUUAUAGCUCCGAGAUGA
DDX21 siRNA	ACTCCGTAGTGACGCTGGTTTGAA
Negative control siRNA	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

[0057] <실시예 4> Colony forming assay

[0058] 대장암 세포를 6well 플레이트에 1x10³ cell/well로 넣어 상기 실시예 1과 같이 배양시킨다. 14일 후 colony가 형성되면 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후 70%에탄올에 용해시킨 10% 메틸렌 블루 용액으로 염색하여 남아있는 염색용액을 제거 하고 colony 개수를 센다.

[0060] <실시예 5> 유세포 분석

[0061] 세포주기 분석을 위한 유세포 분석은 BD LSRII flow cytometer 및 FlowJo software를 이용하여 실시하였다. 대장암 세포들의 세포주기를 G1/S기로 일치시키기 위해 thymidine double-block 방법을 이용하였는데, 세포에 2 mM thymidine을 16시간 처리해준 후 새로 교체한 배지에 8시간 배양한 다음, 2 mM thymidine을 16시간 동안 한번 더 처리해준다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 70% 에탄올에 모아서 -20℃의 온도에서 한 시간 이상 둔다. 세포는 200 µg/ml RNase A가 들어있는 PBS로 재현탁 시켜주고 10 µg/ml propidium iodide를 넣어 37℃에서 반응시킨 후 BD LSRII flow cytometer 및 FlowJo software로 분석을 실시하였다.

[0063] <실시예 6> 면역형광법

[0064] 대장암 세포를 상기 실시예 1과 같이 chamber slide에 배양시키고 1일 뒤에 PBS로 세척한다. 0.5% Triton X-100을 5분간 처리하고 PBS로 세척한 후 15분간 파라포름알데히드로 고정한다. PBS로 세척한 후, blocking 용액으로 1시간 처리한 다음 1차 항체로 16시간 동안 배양시키고, 다시 PBS로 세척한 후 Alexa Fluor-conjugated 2차 항체로 1시간 동안 배양한다. PBS로 세척한 세포는 형광 현미경 이미징 시스템으로 분석한다.

[0066] <실시예 7> HCT116 세포주의 마우스 이중 이식 및 종양형성

[0067] THRAP3 knock-down HCT116 및 대조군(shScramble HCT116) 세포를 5×10^6 세포 수만큼 모아 $150 \mu\text{l}$ HBSS에 현탁한 다음 6주령 수컷 BALB/c nude 마우스의 피하에 주입한다. 일주일 뒤부터 종양 부피를 측정하였고, 4주 후에 CO₂로 안락사시켜 종양의 무게를 측정하였다.

[0069] <실시예 8> Real-Time RT-PCT (qPCR)

[0070] ABI 역전사 키트를 사용하여 RNA의 역전사를 수행하여 cDNA를 합성하였고, qPCR은 [표 3]의 프라이머를 이용하여 7900HT Fast Real-Time PCR system으로 수행하였다. 각 유전자의 상대적인 mRNA의 발현 수준은 36B4 또는 TBP 유전자로 표준화 되었으며, 각 분석은 3회 수행하였고, 데이터는 microsoft excel 프로그램으로 분석하였다.

표 3

[0071]

프라이머	서열 (5' →3')
human TBP primer (Forward)	CCACTCACAGACTCTCACAAC
human TBP primer (Reverse)	CTGCGGTACAATCCCAGAACT
human 36B4 primer (Forward)	TGGTCATCCAGCAGGTGTTCTGA
human 36B4 primer (Reverse)	ACAGACACTGGCAACATTGCGG
human THRAP3 (Forward)	ACAAGAAAAGCCCAGAGATACACA
human THRAP3 (Reverse)	CCTCAGCCTTGTTAGCCAGGTTTC

[0073] <실시예 9> 웨스턴 블롯팅 및 면역침강 분석

[0074] 배양된 세포 또는 조직을 파쇄하고 단백질을 추출하여 농도를 확인한 다음, 샘플 간의 동량의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하고 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨 블로킹 용액으로 블로킹하고, 1차 항체 THRPA3 또는 DDX21 항체와 함께 4℃에서 1일 동안 배양하였다. TBST 버퍼로 니트로셀룰로오스 막을 30분 동안 세척하고 HRP가 결합된 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 배양하여 chemiluminescent HRP substrate solution을 이용하여 웨스턴 블롯팅 분석을 하였다.

[0075] 면역침강 분석을 실시하기 위해, 세포 단백질 추출물을 1차 항체 THRPA3 또는 DDX21 또는 Flag 와 함께 4℃에서 1일 동안 회전 배양하였다. 이후 단백질-항체 시료를 단백질 A/G agarose beads와 4℃에서 1일 동안 혼합하여 침강하였다.

[0077] <실험 예1> 대장암에서의 THRAP3의 임상적 역할

[0078] 대장암에서 THRAP3의 임상적 역할을 보기 위해, 대장암 환자의 종양 조직과 정상 조직 및 정상 세포와 대장암 세포에서 THRAP3의 발현을 비교하였다. 대장암 환자의 종양 조직과 정상 조직 내에서 THRAP3의 단백질, RNA 수준에서 모두 과발현되어 있었고(도 1A, B), Public transcriptome 분석을 통한 암 발단 단계 데이터 역시 THRPA3의 발현이 암 발달 단계에 따라서 증가하고 있고, 생존율에도 영향을 주는 것을 확인하였으며(도 1C, D), 정상 대장세포(CCD-18Co) 대비 다양한 대장암 세포에서도 THRAP3의 과발현되어 있는 것을 확인 할 수 있었다(도 1E). 이는 대장암의 생성 및 발달에 있어서 THRAP3이 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있는 것이다.

[0080] <실험 예2> 대장암 세포에서 THRAP3의 영향

[0081] 상기 실시 예2에 따라 제작된 THRAP3 knock-down HCT116와 THRAP3 knock-down SW480 세포 및 shScramble HCT116와 shScramble SW480의 대조군 세포를 이용하여(도 2A, D) 대장암 세포에서 THRAP3의 영향을 알아보았다. THRAP3 knock-down HCT116와 THRAP3 knock-down SW480 세포의 증식이 대조군 세포에 비해서 감소되는 것을 확인하였으며(도 2B, E), colony 형성 능력을 상기 실시 예4와 같이 확인 해본 결과, colony 형성 능력도 THRAP3 knock-down HCT116와 THRAP3 knock-down SW480 세포에서 저해되는 것을 확인 할 수 있었다(도 2C, F). 또한 세포 주기에 대한 THRAP3 영향을 상기 실시 예5에 따라 실험하여 확인해 본 결과, 대장암 세포에서 THRAP3의 발현 감소는 세포 주기 조절과 관련 있음을 확인 할 수 있었으며(도 2G, H), 생체 내에서 THRAP3의 발현 감소로 인한 세포 성장 저해를 확인하기 위해 상기 실시예 7과 같이 이중 이식 실험을 진행하였는데, 종양 크기, 무게가 모두 감소하였고, 세포 증식 마커인 Ki-67의 발현 역시 THRAP3 knock-down HCT116 세포에서 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 2I, J, K, L). 상기 결과들은 THRAP3이 대장암 세포의 생존과 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 in vitro 또는 in vivo에서 확인 할 수 있었다.

[0083] <실험 예3> THRAP3 결실에 따른 R-loop(DNA:RNA hybrid)의 축적과 DNA 손상

[0084] THRAP3 결실에 따라 대장암세포의 증식 감소와 주기에 영향을 받는 것이 THRAP3 결실에 의한 DNA손상 때문인지 확인하기 위해, 상기 실시 예2, 실시 예6 및 실시 예9에 따라 실험하여 확인해보았다. R-loop(DNA:RNA hybrid)를 확인할 수 있는 S9.6의 발현이 shScramble 대조군 세포 대비 THRAP3 knock-down 대장암 세포에서 증가된 것으로 보아 R-loop가 축적됨을 알 수 있었다(도 3A). 또한 THRAP3 knock-down 대장암세포와 shScramble 대조군 세포에 DNA 이중 나선 구조 손상 유도체인 CPT(camptothecin)를 처리하여 DNA 손상 마커 γ H2AX 발현과 DNA 손상 신호 전달자 단백질인 CHK2의 발현을 확인해 보았는데, THRAP3 knock-down 대장암세포에서 γ H2AX의 발현이 증가되어 DNA손상이 진행되는 것을 알 수 있었고, 또한 CHK2의 발현이 감소되고 인산화된 CHK2의 발현이 증가되어 DNA손상이 진행되고 있음을 확인하였다(도 3B). 이는 THRAP3 knock-down 대장암세포에서 DNA 이중 나선 구조가 손상이 되면 R-loop의 축적되어 DNA 안전성에 변동을 유발하고 대장암 세포 증식 및 주기 조절의 저해를 유발할 수 있다.

[0086] <실험 예4> 대장암에서 R-loop 분해와 게놈 안정성의 조절에 관여하는 THRAP3과 DDX21의 상관관계를 분석

[0087] 대장암에서 R-loop 해소와 게놈 안정성의 조절에 관여하는 THRAP3과 상호작용하는 단백질을 찾기 위해, HCT116 세포에서 THRAP3의 결합 단백질을 질량분석법을 사용해 분석하였고, R-loop관련 상호작용 및 THRAP3의 결합에 동시에 연관된 78개의 단백질을 찾을 수 있었다(도 4A). 상기 단백질 중 사람 정상 조직과 대장암 조직에서 종양 발생에 관여하는 단백질의 유의미한 발현을 분석하였는데, 다른 DDX계 단백질과 달리 대부분의 암에서 발현되어있고, 대장암에서 특히 과발현되어 있다고 알려진 DDX21단백질을 THRAP3과의 상호작용에 대해 확인하였다(도 4B). 도 4C에서 나타난 바와 같이 대장암 조직에서 THRAP3뿐만 아니라 DDX21의 발현이 증가하는 것을 확인하였고, DDX21과 THRAP3 사이의 관련성을 연구하기 위해, 두 유전자 발현의 상관관계를 분석하였는데, public 유전자 발현 분석 데이터(GSE100179)의 대장암 조직에서 THRAP3과 DDX21의 전사 발현을 확인할 수 있었다(도 4D).

[0089] <실험 예5> 대장암 세포에서의 THRAP3과 DDX21의 상호작용

[0090] 대장암 세포에서 THRAP3과 DDX21의 결합에 따른 상호작용을 상기 실시 예9에따라 실험하여 확인해 보았다. 도 5A, B에서 나타난 바와 같이, 대장암 세포 HCT116, SW480에서 발현된 THRAP3과 DDX21이 결합하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 THRAP3 도메인에 대한 DDX21 결합위치를 확인하기 위해, V5 tagged DDX21 및 Flag/Myc tagged THRAP3 도메인의 위치 별 결실 돌연변이체를 제작하여 세포에 형질 주입하여 Flag항체로 실험하여 도 5C, D와 같이 나타내 보았는데, N 말단이 결실된 THRAP3(Δ N)에서 DDX21이 결합하지 못하는 것을 확인되는 것으로 보아 DDX21이 THRAP3의 N 말단(N-terminal)에 결합하는 것을 알 수 있었다.

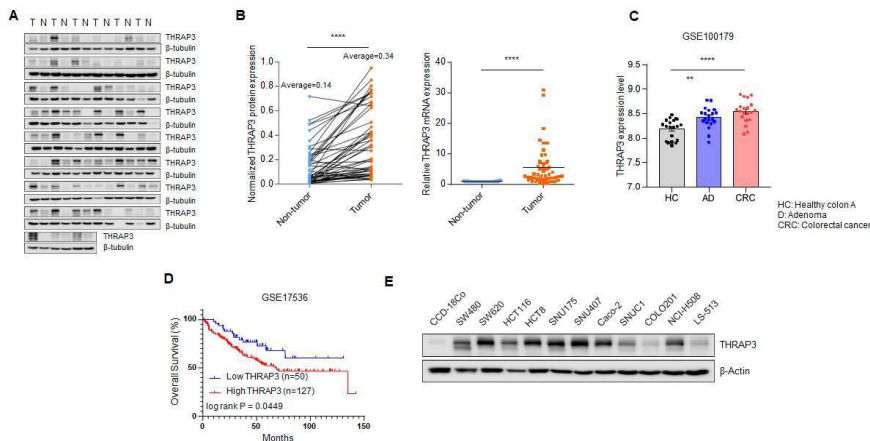
[0092] <실험 예6> THRAP3과 DDX21의 결핍에 의한 대장암 세포의 성장과 증식의 쇠퇴

[0093] 대장암 세포의 증식과 손상에 대한 DDX21과 THRAP3 발현의 영향을 확인하기 위해, DDX21의 발현이 저해된 HCT116 대장암 세포(siDDX21)와 DDX21 과 THRAP3의 발현이 저해된 HCT116 대장암 세포(siDDX21+siTHRAP3) 및 대조군 HCT116 대장암 세포(control)의 세포 증식과 콜로니 형성 능력을 상기 실시 예3 및 실시 예4에 따라 실험하여 도 6과 같이 나타내 보았다. DDX21의 발현이 저해된 HCT116 대장암 세포(siDDX21)가 대조군 HCT116 대장암 세포(control)보다 성장속도가 느려지고 콜로니 형성이 적었으며, DDX21과 THRAP3의 발현이 저해된 HCT116 대장암 세포(siDDX21+siTHRAP3)에서는 DDX21의 발현이 저해된 HCT116 대장암 세포(siDDX21)세포 보다 훨씬 더 성장 속도가 느려지고, 콜로니 형성도 적었다. 상기 DDX21과 THRAP3의 결핍이 대장암세포 성장과 증식의 쇠퇴에 영향을 주는 것은 도 7에서 나타낸바와 같이 DDX21과 THRAP3이 상호작용하여 DNA 손상을 일으키는 R-loop축적을 감소시켜 대장암 세포의 성장과 증식을 활성화 시키는 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

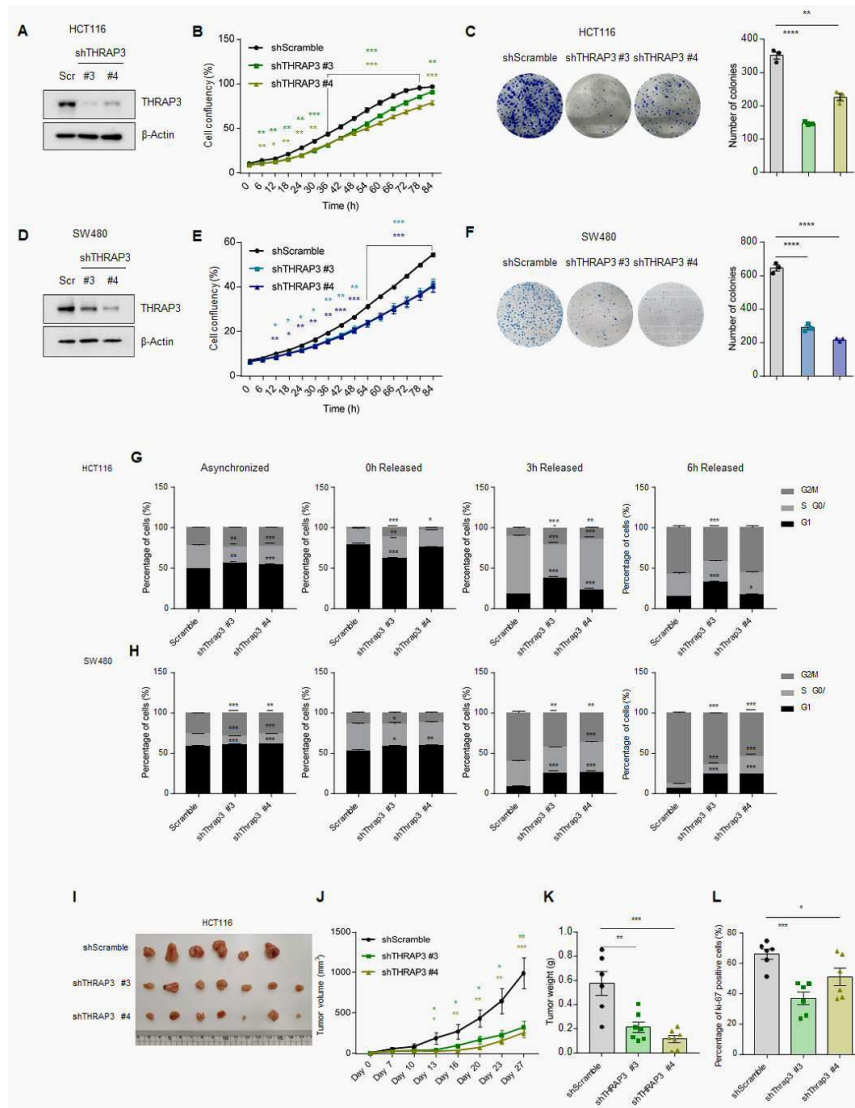
[0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

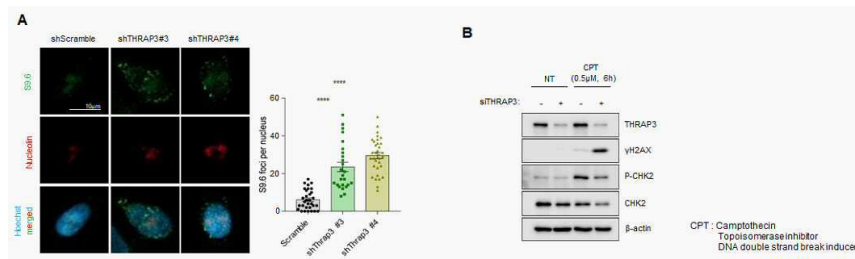
도면1



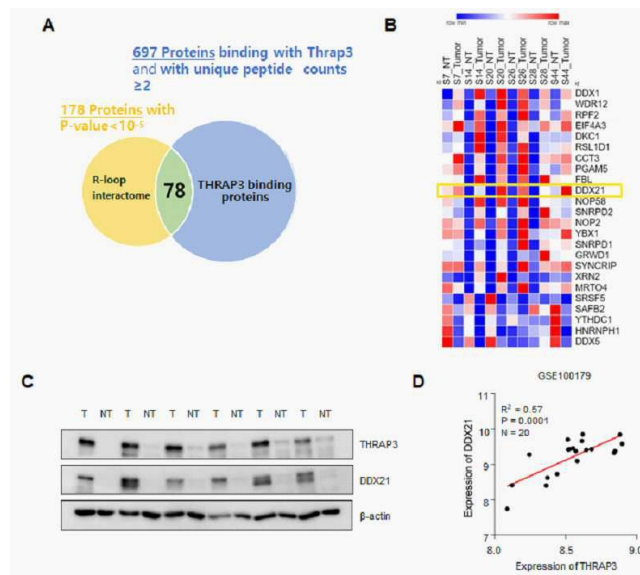
도면2



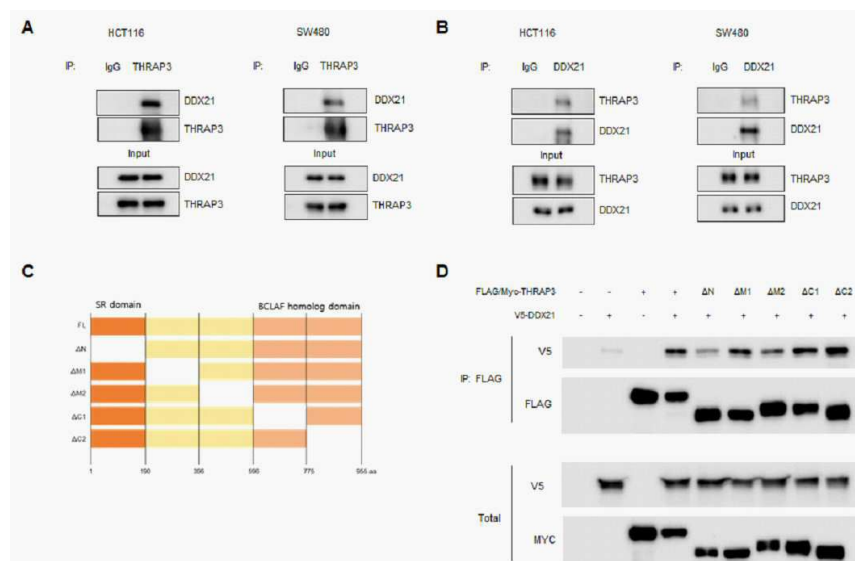
도면3



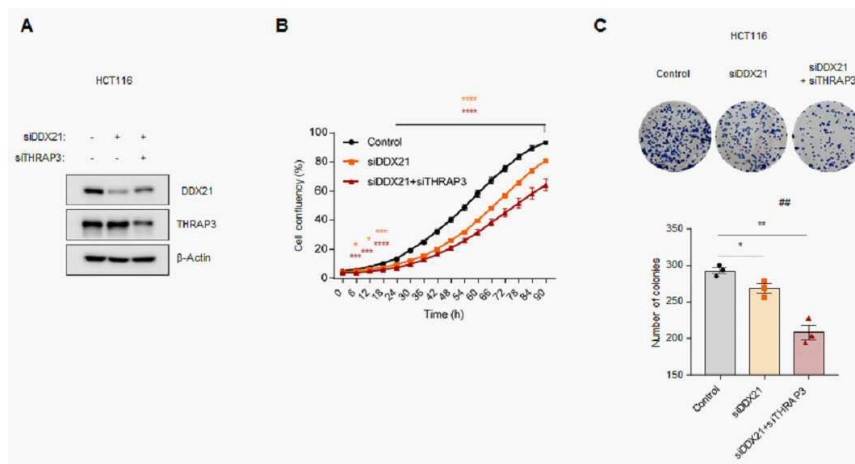
도면4



도면5



도면6



도면7

