



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0119888
(43) 공개일자 2017년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/574 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0048124
(22) 출원일자 2016년04월20일
심사청구일자 2017년02월21일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(
둔산동, 국화아파트)
박지수
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(
둔산동, 국화아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

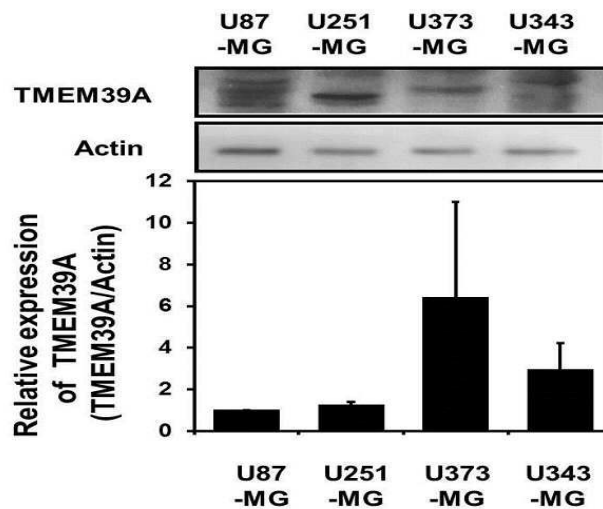
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **TMEM39A 유전자를 포함하는 암 진단용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 TMEM39A(Transmembrane Protein 39A) 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 암, 특히 뇌종양을 진단할 수 있는 마커로서 TMEM39A에 대한 검출 재제를 제공함으로써, 해당 환자에게서 상기 유전자 또는 그 단백질의 발현 수준을 측정 및 비교하여 발병 진단, 질병 정도 예측 또는 파악할 수 있으므로, 암, 특히, 뇌종양의 치료 및 예후 관리에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/46 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

김선환

대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호(둔산동, 목련아파트)

이현지

대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동 104호(정림동, 강변들보람아파트)

김도훈

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대학 약리학교실 412호 (문화동)

트란광돈

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교의과대학 약리학교실 412호 (문화동)

홍영은

대전광역시 중구 충무로6번길 27, 303호 (대사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구

기 여 율 1/3

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구사업

연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴

기 여 율 1/3

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A3050752

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 여성과학자지원사업

연구과제명 대사성 질환에서 PHF20 기능 및 작용기전에 관한 연구

기 여 율 1/3

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.07.03

명세서

청구범위

청구항 1

TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 뇌종양(brain cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 뇌종양(brain cancer)은 뇌간 신경교종(Brain Stem Glioma), 뇌실막세포종(Ependymoma), 혼합성 신경교종(Mixed Glioma), 희소돌기아세포종(Oligodendroglioma), 시신경교종(Optic Nerve Glioma), 성상세포종(Astrocytoma), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic Astrocytoma), 저등급 성상세포종(Low-Grade Astrocytoma), 역형성 성상세포종>Anaplastic Astrocytoma), 다형성 신경교아세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM), 뇌하수체종(Pituitary Tumor), 척삭종(Chordoma), 송과체종(Pineal Tumor), 수아세포종(Medulloblastoma), 뇌수막종(Meningioma), 혈관아세포종(Hemangioblastoma), 두개인두종(Craniopharyngioma), 청신경초종(Acoustic Neuroma) 및 중추신경계 림프종(CNS Lymphoma)으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는, TMEM39A 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 상기 단백질 또는 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 및 아타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터

선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 8

개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방법은 상기 생물학적 시료에 존재하는 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 정상 개체에 비해 증가된 경우, 뇌종양이 발병 또는 진행된 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법:

(a) 암 환자로부터 분리된 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 시료에서 TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준의 변화를 측정하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 후보물질 접촉 전과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 암 치료제로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TMEM39A(Transmembrane Protein 39A) 유전자를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] GBM(Glioblastoma multiform)은 정상 세포에서 발생하는 신경 교종 중 가장 공격적인 형태이다(Friedmann-Morvinski, 2012). 모든 일차 뇌 종양의 약 15%가 신생물(de novo) 또는 저-등급 정상 세포종에서 발생할 수 있는 GBM이다. GBM에서 유전적 이상은 일반적이다(Arif Arshad A, 2015). GBM은 일반적으로 진단 1년내 환자의 죽음이 초래되는 악성 뇌 종양이다(Virk, 2015). 또한, 고 우회적인 고체 연결, 증폭된 기저막 두께를 갖는 큰 직경 혈관을 특징으로 한다(Wesseling, 1997). 종양 혈관은 기능적으로 이상이 있다. 혈관 투과성이 증가되어, 혈관성부종 및 출혈을 초래한다(Jain, 2007). GBMs의 혈관은 매우 무질서한 것을 특징으로 하므로, 이는 혈류 저하를 발생하는 방사성 및 화학 요법의 효능을 제한할 수 있다(Das, 2013). 최근 전임상 및 임상 연구는 항-혈관 전략에서 치료 효과를 향상시킬 수 있는 기회를 제공할 수 있는 신규 분자 타겟을 보여주었다(Carmeliet, 2011).

[0003] 현재, 가장 주요한 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 타겟팅하는 약물은 인간 VEGF-A를 타겟으로 하는 재조합 인간 화 단일 클론 항체인 베바 시주맙(BEV)이다(Norden, 2008). 그러나, 초기 보고된 BEV 처리의 유익한 효과가 신

생혈관형성 (neoangiogenesis) 둔화 및 혈관 투과성 감소로부터 기인된 영상화 한계에 어느 정도 기여할 수 있었고, 이는 대비-향상 중앙 부피에서 명백하지만 논란의 감소로 이어졌다(Chinot, 2013). 최근 예비 단계 III 임상 시험 (아바스틴 및 방사선 치료)는 GBM 환자에 대하여 BEV 처리한 테모졸로마이드(TMZ)-기반 방사선 화학 요법의 효율성을 검증하기 위해 실시되었다(Chinot, 2014). 방사선 치료 종양학 그룹(RTOG) 0825 임상이 PFS(progression-free survival) 및 전체 생존율의 측면에서 상당한 이점을 나타내는데 실패한 반면, GBM (AVAglio) 연구에서 아바스틴은 BEV 공동 치료에 의한 4.4 개월의 PFS의 유의한 연장을 보여주었다. 그러나, 이러한 PFS 이점은 전체 생존율의 향상으로는 되지 않았다(Gilbert, 2014). 따라서, TMZ 및 VEGF 타겟팅 약물을 제외한 GBM 환자의 신규한 치료 타겟을 찾을 필요가 있다.

[0004] TMEM39A(Transmembrane protein 39A)은 TMEM39A 및 TMEM39B로 구성된 TMEM39군에 속해 있다. TMEM39의 아형 (isoform)은 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 생성된다(Hao, 2015). 막관통 단백질은 다른 측을 통해 세포막의 한 측에 배치된 단백질의 한 부류이다. 다수의 막 관통 단백질의 기능은 생체막에 걸쳐 특정 물질의 수송을 제어하기 위한 것이다(Moon, 2011). TMEM39A는 감수성 유전자좌와 같은 다발성 경화증에 연결되어 있다는 것이 제시된 바 있다(International Multiple Sclerosis Genetics, 2010; Varade, 2012). 또한, TMEM39A는 전신성 홍반성 낭창과 연결되는 것으로 나타난다(You, 2015; Sheng, 2015; Lessard, 2012). 그러나, 보고된 연구 중 어느 것도 현재 암에서의 TMEM39A의 가능한 역할을 조사한 바는 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 뇌 종양의 발병 또는 진행과 관련된 신규한 바이오 마커 또는 치료 타겟을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 교아세포종 세포주 및 신경 교종 환자 조직에서의 TMEM39A의 상향 조절을 지지하는 명백한 증거를 확인하였으며, TMEM39A이 종양의 발병 또는 진행과 직접적인 연관이 있음을 규명하였다. 이러한 정보는 교아세포종에서의 TMEM39A의 기능에 대한 새로운 통찰력 및 뇌 종양에 대한 신규한 치료 타겟을 제공할 수 있음을 제시함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 TMEM39A 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 조성물에 의한 진단 대상 질병인 "암(cancer)" 또는 "종양(tumor)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다.

[0013] 상기 암은 TMEM39A 유전자의 mRNA 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 또는 활성 수준을 측정한 경우 TMEM39A 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 과발현되는 것이다.

[0014] 본 발명의 TMEM39A가 과다 발현된 암을 표현하기 위해 사용된 용어 "과발현(overexpression)"은 적합한 발현 분석법을 통해 TMEM39A의 발현 수준을 측정한 경우에 있어서, 비교 대상 세포(예컨대, 해당 기관의 정상 세포)의 TMEM39A 발현 수준에 비하여 2 배 이상인 것을 의미한다.

[0015] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 암은 뇌종양(brain cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종

(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 대장암(colon cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 뇌종양(brain cancer)은 뇌간 신경교종(Brain Stem Glioma), 뇌실막 세포종(Ependymoma), 혼합성 신경교종(Mixed Glioma), 희소돌기아세포종(Oligodendroglioma), 시신경교종(Optic Nerve Glioma), 성상세포종(Astrocytoma), 모양세포성 성상세포종(Pilocytic Astrocytoma), 저등급 성상세포종(Low-Grade Astrocytoma), 역형성 성상세포종(Anaplastic Astrocytoma), 다형성 신경교아세포종(Glioblastoma Multiforme, GBM), 뇌하수체종(Pituitary Tumor), 척삭종(Chordoma), 송과체종(Pineal Tumor), 수아세포종(Medulloblastoma), 뇌수막종(Meningioma), 혈관아세포종(Hemangioblastoma), 두개인두종(Craniopharyngioma), 청신경초종(Acoustic Neuroma) 및 중추신경계 림프종(CNS Lymphoma)으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 표현 " 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준 측정"은 해당 시료 내에서 검출하고자 하는 타겟을 검출하는 것을 의미한다.
- [0018] 본 발명에서, 검출하고자 하는 타겟은 시료 내 해당 유전자의 mRNA 및/또는 단백질이다. 즉, 타겟의 전사 산물인 RNA 또는 유전자 산물인 단백질을 검출함으로써 상기 유전자의 발현 여부를 확인할 수 있다.
- [0019] RNA 또는 단백질의 검출은 통상적으로는 시료부터 RNA 또는 단백질을 추출하여, 추출물 중의 RNA 또는 단백질을 검출함으로써 실시할 수 있다. 이러한 RNA 또는 단백질의 검출은 면역분석학적 방법, 하이브리드화 반응 및 증폭반응에 의해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 용이하게 실시될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는, TMEM39A 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0021] 즉, 핵산의 검출은 유전자를 암호화하는 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자의 상보물에 하이브리드화되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 증폭반응에 의해 수행될 수 있다.
- [0022] 예컨대, 프라이머를 이용한 mRNA의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [0023] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0024] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머쌍이다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는, 상기 단백질 또는 펩티드 단편에 특이적으로 결합하는 항체, 상호작용 단백질, 리간드, 나노입자(nanoparticles) 또는 아타머(aptamer)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 의

미하고, 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합을 모두 포함한다.

- [0028] 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv를 모두 포함한다. 항체 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 상술한 유전자의 발현 여부를 측정하는 제제뿐만 아니라, 항원-항체 복합체의 형성을 정량 또는 정성적으로 측정 가능하게 하는 라벨, 면역학적 분석에 사용되는 통상적인 도구, 시약 등을 더 포함할 수 있다.
- [0030] 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정 가능하게 하는 라벨에는 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 산화환원 분자 및 방사선 동위원소 등이 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠코니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 펄록시다아제, 알칼라인포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈옥시다제와루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트카복실라제, 아스파르테이트아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트데카복실라제, β-라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리트린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리딘에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 산화환원 분자에는 페로센, 루테늄착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti³⁺ 이온, Cs⁺ 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, K₄ W(CN)₈⁴⁻, [Os(bpy)₃]²⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺, [Mo(CN)₈]⁴⁻ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.
- [0031] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리 아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [0033] 상기 키트는 사용하는 방법에 따라 다양한 형태의 키트일 수 있으며, 예를 들어, PCR 키트, DNA 칩 키트, 마이크로어레이 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 키트에는 상기 유전자의 발현; 또는 상기 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0035] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리 아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 키트는 상술한 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

- [0038] 상기 방법은 상기 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함한다.
- [0039] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 용어 "대조군"은 정상인 건강한 사람의 해당 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준; 또는 비교 대상인 환자의 해당 유전자 또는 이의 단백질 발현 수준을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 개체로부터 생물학적 시료를 획득하고, 상기 생물학적 시료에 존재하는 상기 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정된 후, 정상 개체에 비해 증가된 경우, 암, 바람직하게는 뇌종양이 발병 또는 진행된 것으로 판정하는 단계를 포함한다.
- [0041] 또한, 바이오 마커로서 상기 유전자의 발현 수준을 언급하면서 사용되는 용어들은 "정상" 발현 수준 혹은 값과 비교해서 "차동(differential) 수준" 혹은 "차동 값"을 지니거나 "상이하게 발현된" 것으로서 지칭될 수 있으며, 발현에 있어서 정량적 차이뿐만 아니라 정성적 차이의 둘 모두를 포함한다.
- [0042] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생물학적 시료"란 본 발명의 상기 유전자 또는 단백질의 발현이 검출될 수 있는 개체로부터 얻어지는 모든 시료를 의미한다.
- [0043] 상기 생물학적 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 세포, 객담, 조직, 타액(saliva), 생검(biopsy), 액체 배양물, 분변 및 소변으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이며, 특별히 이에 제한되지 않고, 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 방법은 상술한 유전자의 발현 수준을 이용하여 암을 판정하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 암 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0046] (a) 암 환자로부터 분리된 시료에 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0047] (b) 상기 (a) 단계의 시료에서 TMEM39A (Transmembrane Protein 39A, gene bank accession number: BC021277.2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준의 변화를 측정하는 단계.
- [0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 후보 물질 접촉 전과 비교하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 암 치료제로 판정하는 단계를 포함한다.
- [0049] 구체적으로, 치료 후보 물질의 존재 및 부재하(처리 전 및 후)에서 TMEM39A의 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. TMEM39A의 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 감소시키는 물질은 암 치료제로서 선택할 수 있다.
- [0050] 즉, 암 치료 후보 물질의 부재하(처리 전)에 본 발명에서 개시된 시료에서의 본 발명의 TMEM39A의 발현 수준을 측정하고, 또한 치료 후보 물질의 존재하(처리 후)에서 본 발명의 TMEM39A의 발현 수준을 측정하여 양자를 비교한 후, 폐질환 치료 후보 물질이 존재할 때의 본 발명의 마커의 발현 수준이 암 치료 후보 물질의 부재 하에서의 마커의 발현 수준보다 감소시키는 물질을 본 발명에서 개시된 암 치료제로 예측할 수 있는 것이다.
- [0051] 상기 후보 물질은 본 발명의 유전자의 발현; 또는 상기 유전자의 단백질의 발현 또는 활성을 억제할 수 있는 모든 종류의 억제제를 의미한다.
- [0052] 본 발명의 방법은 상술한 유전자의 발현 수준을 이용하여 치료제를 판정하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명에 따르면, 암, 특히 뇌종양을 진단할 수 있는 마커에 대한 검출 제제를 제공함으로써, 해당 환자에게서 TMEM39A 유전자 또는 그 단백질의 발현 수준을 측정 및 비교하여 발병 진단, 질병 정도 예측 또는 파악할 수 있으므로, 암, 특히 뇌종양의 치료 및 예후 관리에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1은 신경교아세포종(glioblastoma, GBM) 세포주에서 TMEM39A 발현 수준을 보여준다.
- 도 2는 기준 RNA-seq 데이터에서 GBM 세포 내 TMEM39A 전사체(transcripts)의 상대적인 차이를 보여준다.

도 3은 U251-MG 세포주에서의 TMEM39A의 세포내 위치를 보여준다.

도 4는 인간 뇌 종양에서의 TMEM39A의 발현 수준을 보여준다.

도 5는 REMBRANDT 코호트에서 신경교종 표본 내 TMEM39A mRNA의 상이한 발현 양상을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1. 재료 및 방법

1-1. 항체 및 시약

항-TMEM39A 항체 및 항-액틴 항체는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 호울스래디쉬 퍼옥시다제-콘주게이트 항-마우스 IgG 또는 항-래빗 IgG 이차 항체는 Komabitech (서울, 한국)으로부터 구입하였다

1-2. 환자 샘플

본 연구는 충남대학교 병원에서 헬싱키 선언에 따라 병원 임상 시험 심사위원회 (승인 번호 CNUH 2013-11-006)의 승인을 받았고, 서면 동의서는 수술 전 연구팀에 의해 각 환자로부터 얻었다. 정상적인 뇌 조직 샘플을 사체, 대안적으로 수술을 받은 신경교아세포종 환자의 정상적인 뇌 주변의 부검으로부터 획득하였다.

1-3. 세포 배양

신경교아세포종 세포주(U87-MG, U251-MG, U343-MG 및 U373-MG)를 10% FBS, 25 mM HEPES (Thermo Scientific), 1% 항생제-항진균제(Life Technologies)를 보충한 배지(RPMI)에서 배양하였다.

1-4. 면역블롯 분석

면역블롯 분석은 당업계에 공지된 방법으로 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다(Kim, 2015; Li, 2013; Kim, 2015). 간략하게, 세포를 얼음에 위치시키고 50 mM 트리스-염산을 pH 7.5, 1% v/v Nonidet P-40, 120 mM 염화나트륨, 25 mM 불소화 나트륨, 40 mM β-글리세롤 포스페이트, 0.1 mM 나트륨 오르토바나테이트, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오리드, 1 mM 벤즈아미딘, 및 2 μM 마이크로시스틴-LR을 함유하는 용해 완충액으로 추출하였다. 용해물을 12,000g에서 15 분간 원심분리 하였다. 세포 추출물을 10 - 15 % SDS-PAGE로 분리하고 Immobilon-P membranes (Millipore)으로 트랜스퍼하였다. 5% 우유 및 0.2% 트윈 20을 함유하는 1 X TBS(tri-buffered saline buffer)에서 1 시간 동안 필터를 블로킹한 후, 항-1,000 배 희석한 TMEM39A 및 항-액틴 항체와 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다. 이차 항체는 블로킹 버퍼에 5000 배 희석한 호울스래디쉬 퍼옥시다제-콘주게이트 항-마우스 IgG 또는 항-래빗 IgG (Komabitech)이었다. 단백질 발현의 검출은 제조업체(Thermo Fisher Scientific)의 지시에 따라, 강화된 화학 발광으로 가시화하였다.

1-5. 실시간 정량적 역전사-중합 효소 연쇄 반응(Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)

PureHelix RNA 추출 용액(Nanohelix, 한국)을 이용하여 총 RNA를 동결 조직 샘플 또는 세포로부터 추출하였다. qRT-PCR용 SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, Grand Island, NY)을 이용하여 총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. SYBR 그린 염료를 사용하여 각 cDNA의 qRT-PCR 측정을 실시하여 StepOne Plus real-time PCR system (Invitrogen)으로 듀플렉스 DNA 형성을 측정하고 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) RNA의 발현에 대해 정규화하였다.

qRT-PCR에 이용된 프라이머는 다음과 같다(F: 정방향, R: 역방향);

인간 TMEM39A : F-5'-CCCACCTATCACAGCCTTAATC(서열번호 1)/ R-5'-AAAGAGCAACCAACAGGTAGAT(서열번호 2);

인간 GAPDH : F-5'-TCGACAGTCAGCCGATCTTCTTT(서열번호 3)/ R-5'-TACGACCAATCCGTTGACTCCGA(서열번호 4).

1-6. RNA 시퀀싱 및 RNA-Seq 데이터 분석

제조사의 절차에 따라 트리폴 시약 (Invitrogen)를 이용하여 U87-MG, U251-MG 및 정상 뇌의 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 양과 순도는 Bioanalyzer 2100 RNA 6000 나노 LabChip 키트(Agilent, Santa Clara, CA, USA)로

분석하였다. 약 10 μ g 총 RNA로 자성 비드(Invitrogen)가 부착된 poly-T 올리고가 있는 poly(A) mRNA를 분리하였다. 정제 후, mRNA를 상향 온도 하에서 이가 양이온을 사용하여 작은 조각으로 단편화하였다. 이후 mRNA-Seq 샘플 준비 키트(Illumina)에 대한 프로토콜에 따라 절단된 RNA 단편을 역-전사하여 최종 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 페어드-엔드(paired-end) 라이브러리의 평균 인서트 크기는 300 bp($\pm$ 50 BP)이었다.

[0072] 다음으로, 본 발명자들은 공급업체의 권장 프로토콜에 따라 마크로젠(서울, 한국)에서 Illumina Hiseq 2000 시스템 상 페어드-엔드 시퀀싱을 실시하였다. 각 샘플에 대해, 각 판독 결과에 해당하는 정성 정보를 기반으로 하여 판독 결과의 일부를 제거한 Tophat 패키지(Kim, 2015)를 이용하여 서열화된 판독 결과들을 UCSC 인간 레퍼런스 게놈(Bioinformatics, 2015)에 대하여 정렬한 후 레퍼런스 게놈에 대한 판독 결과를 매핑하였다.

[0073] FPKM(fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)을 계산하여 각 샘플에서 TMEM39A mRNA 변이체(variant)의 발현 수준을 비교하였다.

[0074] 1-7. 공초점 이미지 분석 및 간접 면역 형광

[0075] 50~70% 컨플루언시가 될 때까지 U251-MG 세포를 커버 글라스 위에 배양시켰다. 24 시간 후, 세포를 실온에서 10 분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 실온에서 5 분 동안 0.2% 트리톤 X-100으로 투과시켰다. 이어서 세포를 37℃에서 1 시간 동안 1X TBS에 5% 소 혈청 알부민(Sigma)를 함유하는 블록킹 완충액으로 인큐베이션하였다. 일차 항체로서 래빗 폴리클로날 항-TMEM39A를 200 배 희석하고, 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 이차 항체로서 FITC-접합 항-래빗 항체 (BD Biosciences)을 사용하였다. 적절히 세정한 후, 커버 슬립을 Vectashield (Vector Laboratories)으로 마운팅하고 자이스 공초점 현미경을 사용하여 시각 화하였다.

[0076] 1-8. 면역조직화학염색

[0077] 면역 조직 화학 분석을 앞서 설명한 바와 같이 실시하였다(Na, 2015). 파라핀으로 절편화한 인간 암 조직 어레이 슬라이드를 Bio Max (US Biomax Inc)로부터 구매하였다. 조직 어레이의 면역조직화학염색을 위하여 제조사의 지시에 따라 Histostain-Plus kits (Zymed Laboratories Inc.)을 이용하였다. 간단히, 파라핀 절편을 크실렌으로 탈파라핀화하고, 일련의 에탄올로 재수화하였다. 슬라이드를 10 분 동안 과산화 퀴닝 용액에 침지하였다. 5 분 동안 PBS로 두 번 세척 한 후, 블록킹용 시약 A 2 방울을 첨가하여, 30 분간 인큐베이션하였다. PBS로 두 번 세척한 후, 일차 항체, 항-TMEM39A 항체를 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다. 이어서 PBS로 세척 한 후 비오틴-이차 항체, 시약 B를 첨가하였다. 이를 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 세척하고 효소-결합 시약 C를 적하하였다. PBS로 세척한 후, DAB 발색제 및 시약 D1, D2 및 D3의 혼합물을 적하하여, 시그널을 현미경으로 관찰하였다. 그 후 반응을 증류수로 정지시키고, 이미지를 현미경으로 촬영하였다.

[0078] 1-9. 생물정보학 데이터 세트

[0079] 신경교종 데이터 세트 및 해당 임상 데이터를 공개적으로 이용가능한 데이터베이스(분자 뇌 종양 데이터의 기록으로부터 446 레(REMBRANDT; <http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>))에서 다운로드하였다. 정상; n=21, GBM; n = 214, 희소돌기아세포종(Oligodendroglioma); n=66, 성상세포종(Astrocytoma); n=145.

[0080] 1-10. 통계 분석

[0081] 데이터는 적어도 세 번 실시한 독립 실험의 평균 $\pm$ S.D로 나타낸다. 그룹 간의 차이는 스튜던트 t 테스트를 이용하여 분석하였고, p<0.05(*)는 유의한 것으로 간주하고, p<0.01(**)는 해당 대조군 값에 비해 매우 유의하였다. 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 13.0 버전 (SPSS Inc.)을 사용하여 실시하였다. 위험 비율(HR) 및 95% 신뢰 구간(CI)이 변량 콕스 회귀에 의해 결정된 반면, 카플란-마이어 생존 곡선의 분석의 경우, P 값은 로그-랭크 테스트로부터 획득하였다.

[0082] 실험예 1. 신경교아세포종 세포주에서 TMEM39A 발현의 상향 조절 확인

[0083] 본 발명자들은 뇌 종양에서의 TMEM39A의 추정되는 역할을 조사하기 위하여, 신경교아세포종 세포주에서 웨스턴 블롯 및 qRT-PCR을 실시하였다.

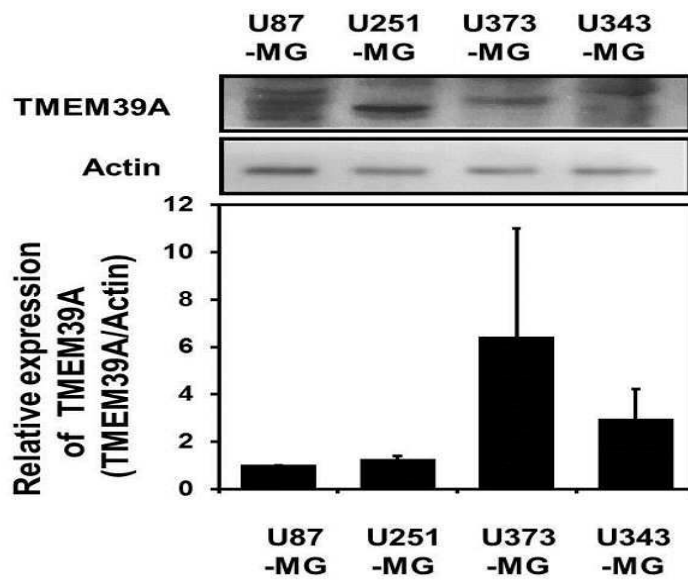
[0084] 도 1a에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯을 실시한 결과, 다른 신경교아세포종 세포들에 비해 U343-MG 세포 및 U373-MG 세포에서 TMEM39A 단백질의 발현이 현저하게 증가하였다.

[0085] 또한, 도 1b에 나타난 바와 같이, 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 실시한 결과, 다른 신경교아세포종 세포들에 비해 U343-MG 세포 및 U373-MG 세포에서 TMEM39A mRNA의 발현이 증가되는 것으로 나타났다.

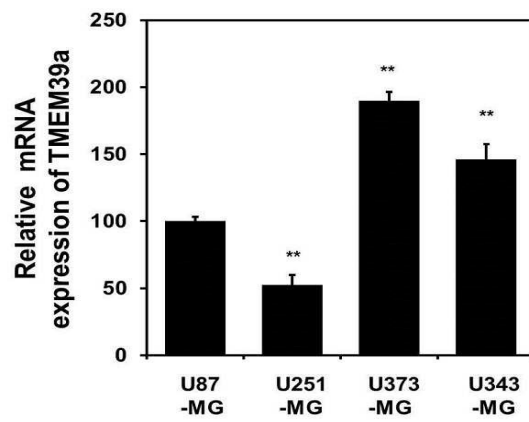
- [0086] 한편, U87-MG 세포 및 U251-MG 세포에서 TMEM39A는 전사 수준에서 증가되는 것으로 나타난다. 도 1a 및 도 1b에서의 관찰을 기반으로 하여, 신경교아세포종 세포주의 RNA 시퀀싱을 이용함으로써 TMEM39A의 mRNA 수준을 모니터링하였다. TMEM39A 발현의 비교를 위하여, 웨스턴 블롯 분석에서 낮은 발현 수준을 나타냈던 두 세포주(U87-MG 및 U251-MG)와 정상적인 뇌로부터 총 RNA를 분리하였다. 약 10 μ g의 총 RNA를 mRNA에 대해 추가적으로 분리하였다. 이어서 mRNA를 작은 조각으로 단편화한 후, 절단된 RNA 단편을 역-전사하여 최종 cDNA 라이브러리를 제작하였다. FPKM(fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)을 계산하여 각 샘플에서 TMEM39A mRNA 변이체(variant)의 발현 수준을 비교하였다.
- [0087] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, FPKM 값은 대뇌 피질(1.87)보다는 U87-MG 세포(17.08) 및 U251-MG 세포(11.12)에서 현저히 높았으며, 이는 신경교아세포종 세포에서 TMEM39A가 전사적으로 상향 조절된다는 것을 나타낸다.
- [0088] 또한, TMEM39A의 기능을 조사하기 위해, U251-MG 세포 내에서의 TMEM39A 위치를 면역세포화학법을 이용하여 모니터링하였다.
- [0089] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, TMEM39A는 핵 가까이, 미토콘드리아와 엔도솜에 점-유사 구조로 위치하였으며, 이는 TMEM39A의 막 결합 특성이 신경교아세포종 세포에서의 기능과 관련이 있음을 시사한다.
- [0090] 따라서, 상기 결과를 통해 TMEM39A의 발현 수준을 측정함으로써 신경교아세포종을 진단할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0091] **실험예 2. 신경교아세포종 환자 조직에서 TMEM39A 발현이 미치는 영향 확인**
- [0092] 본 발명자들은 뇌 종양에서의 TMEM39A의 추정되는 역할을 조사하기 위하여, 추가적으로 신경교아세포종 환자의 조직 표본에서 인간 암 조직 어레이를 이용하여 면역조직화학염색을 실시하였다.
- [0093] 도 4a에 나타난 바와 같이, 종양 조직은 주변 정상 조직에 비해 항-TMEM39A 항체로 강하게 염색되었다.
- [0094] 또한, 신경교아세포종에 대한 수술을 받은 2 명의 환자로부터 획득한 정상 및 암 조직의 전체 세포 용해물을 항-TMEM39A 항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다.
- [0095] 따라서, 신경교아세포종 조직은 일반적으로 주변 정상 조직에 비해 TMEM39A의 고발현이 확인되었고, 이는 TMEM39A 발현이 신경교아세포종 환자에서 상향 조절되었음을 나타낸다.
- [0096] 또한, 이전 결과(도 1 내지 3)를 추가적으로 평가하기 위하여, TMEM39A의 상이한 mRNA 발현 및 예후적 수치의 유의성을 REMBRANDT 코호트(cohort)에서 분석하였다(<http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/>).
- [0097] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 조직 마이크로어레이, 웨스턴 블롯 및 RNA 시퀀싱을 포함한 상기 언급된 분석에서의 결과와 일치하듯이, 다양한 신경교아세포종에서 정상 대조군에 비해 TMEM39A 유전자 발현이 현저하게 증가하였다(GBM; n=214, 희소돌기아세포종(Oligodendroglioma); n=66, 성상세포종(Astrocytoma); n=145)(n=21; 일방향 ANOVA $P < 0.0001$).
- [0098] 또한, 도 5b에 나타난 바와 같이, TMEM39A이 저발현된 경우(n=31; Log-rank $P = 0.012$; HR =2.17, 95% CI 0.80-2.89)와 비교하여, TMEM39A mRNA의 고발현(n=167)은 신경교종(glioma) 환자의 전반적으로 낮은 생존율과 크게 관련이 있으며, 이는 TMEM39A 발현이 신경교종의 임상적 예후와 연관이 있다는 것을 제시한다.
- [0099] 따라서, TMEM39A이 고발현되어 있는 대상에서는 신경교종의 발생 가능성이 높은 것을 확인할 수 있으며, 이를 통해 TMEM39A 수준을 측정함으로써 신경교종 환자를 진단할 수 있음을 알 수 있다.

도면

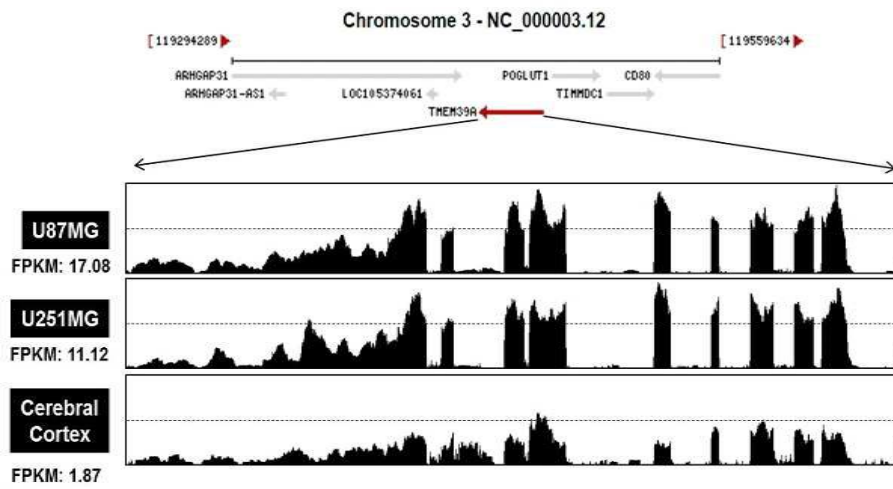
도면1a



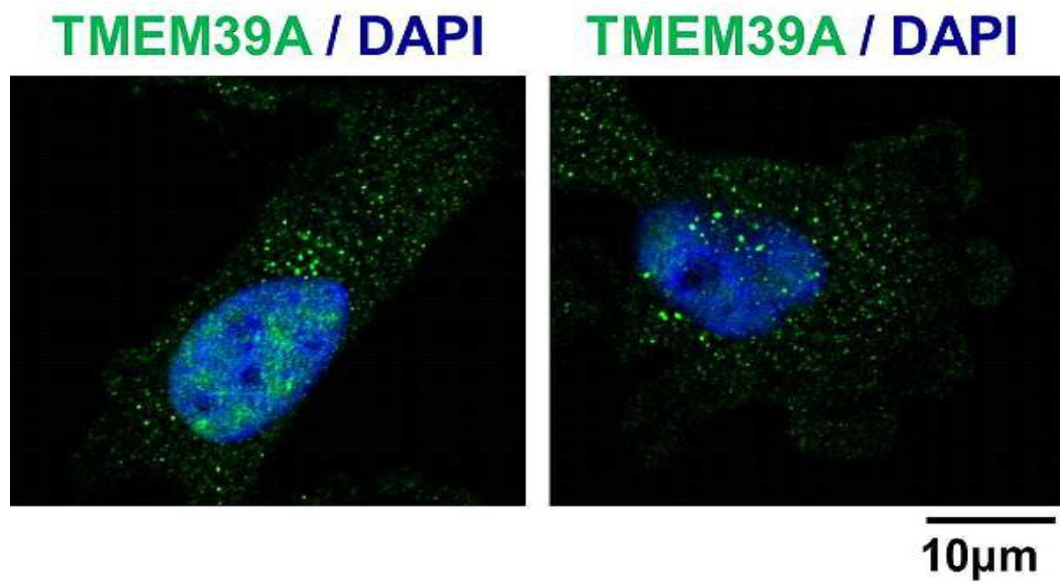
도면1b



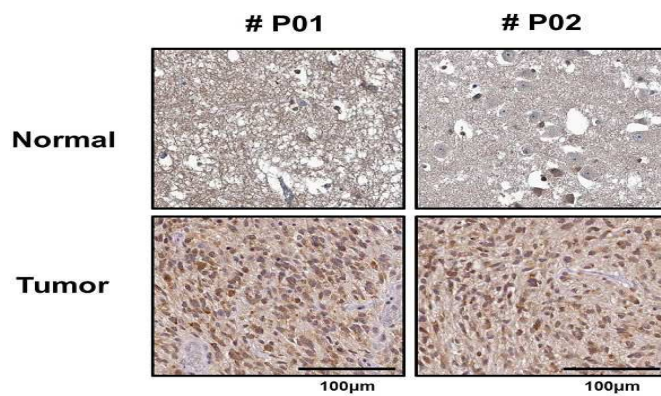
도면2



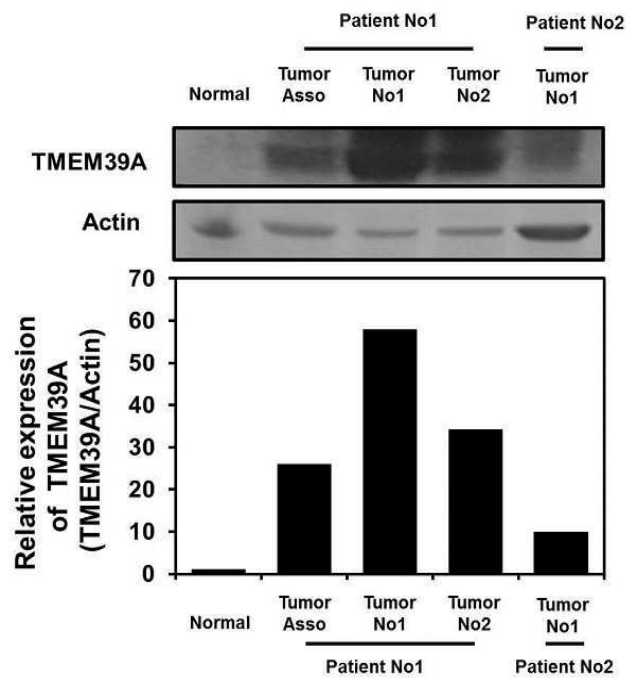
도면3



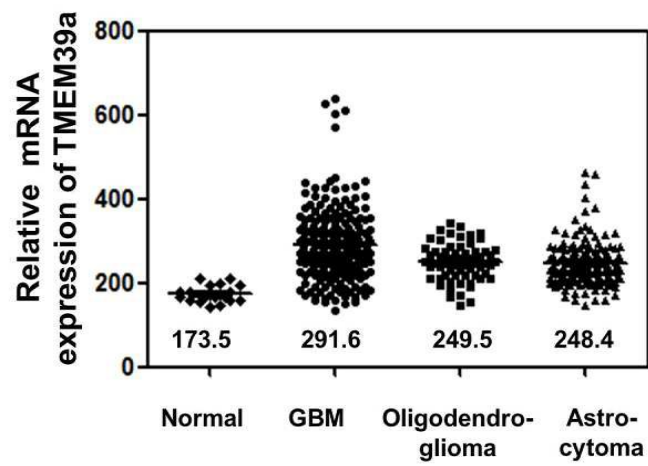
도면4a



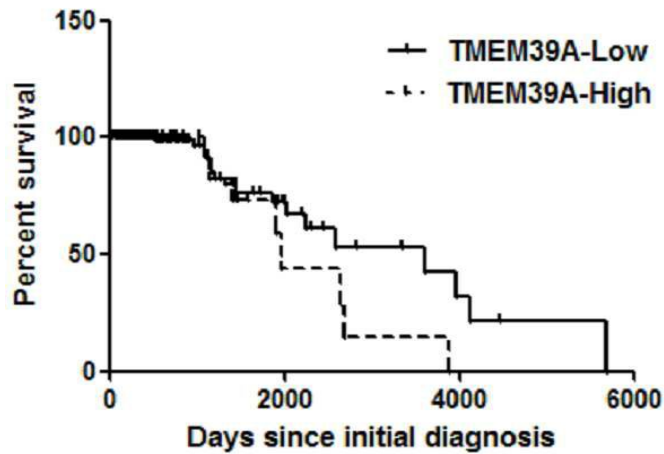
도면4b



도면5a



도면5b



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for Diagnosing Cancer Comprising TMEM39A

<130> CNU1-38p

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TMEM39A primer F

<400> 1

cccacctatc acagccttaa tc

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TMEM39A primer R

<

400> 2

aaagagcaac caacaggtag at

22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer F

<400> 3

tcgacagtca gccgcacatctt cttt

24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer R

<400> 4

tacgaccaaa tccgttgact ccga

24