



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0066469
(43) 공개일자 2011년06월17일

(51) Int. Cl.

C07K 14/46 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0123142

(22) 출원일자 2009년12월11일

심사청구일자 2009년12월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

서영록

서울특별시 성북구 월곡동 삼성래미안 107동 110 2호

김상욱

경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 9동 30 2호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 4 항

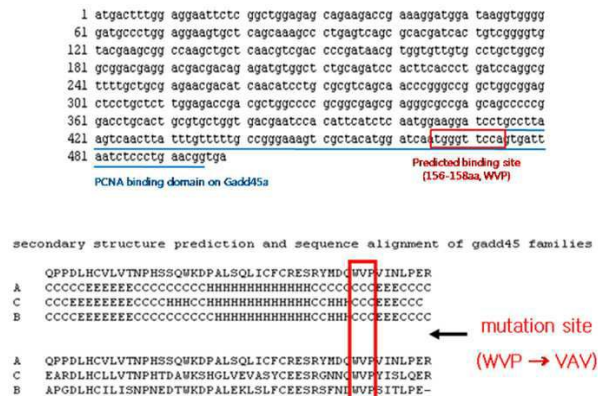
(54) APE1 활성 조절 사이트 및 이를 이용한 분석 또는 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 Gadd45a 단백질 내의 APE1 활성 조절 사이트 및 이를 이용한 암의 치료 및 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부 분석 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 Gadd45a 내의 APE1 활성 조절 사이트는 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부를 분석할 수 있는 마커로 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 이를 타겟팅하는 siRNA를 투여함으로써 암세포의 증식을 억제하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정화진

부산광역시 금정구 장전1동 125-2번지 16통 3반

김혜림

강원도 원주시 일산동 287-19번지 정상하이츠 4층

성정석

서울특별시 송파구 잠실동 레이크펠리스아파트 13
0동 2101호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-09001-0083-0

부처명 한국환경기술진흥원

연구관리전문기관

연구사업명 차세대 핵심환경기술개발사업

연구과제명 유전자 수복 네트워크 중심의 독성 유전체 기법을 이용한 환경 변이원 중금속의 새로운
분자독성 지표 발굴 및 독성평가 기술개발 연구

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2011년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

Gadd45a 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 156번 내지 158번 아미노산 잔기에 해당하는 Trp, Val 및 Pro 으로 이루어진 APE1 활성 조절 사이트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 APE1 활성 조절 사이트는 서열번호 2의 핵산 서열 중에서 466번 내지 474번 염기에 해당하는 APE1 활성 조절 사이트.

청구항 3

제1항에 따른 Gadd45a의 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제1항에 따른 APE1 활성 조절 사이트의 아미노산 서열의 변이 여부를 확인하는 단계를 포함하는 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부 분석 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Gadd45a 단백질 내의 APE1 활성 조절 사이트 및 이를 이용한 암의 치료 및 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부 분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전적 안정성은 정상적인 세포의 생명을 유지하기 위한 중요한 메커니즘으로 인식되어 왔다. 이러한 유전적 안정성은 세포가 손상된 DNA를 인식하여 고치는 능력에 의존한다. 만약 DNA 구조가 변한 채로 복구되지 않는다면 이는 암의 위험을 증가시키는 돌연변이를 유발한다. 세포를 돌연변이 유발인자(mutagenic)에의 노출로부터 보호하는 DNA절단복구 시스템은 뉴클레오티드 절단 복구(이하 NER, nucleotide excision repair), 염기 절단 복구(이하 BER, base excision repair) 및 미스매치 복구(이하 MMR, mismatch repair)를 포함한다. 특히 BER은 메틸메탄설폰네이트(MMS, methyl methanesulfonate) 같은 알킬화제(alkylating agents)에 의한 산화적 손상에 의해 야기되는 DNA 염기 변이를 고침으로써 게놈의 원형을 유지하는 핵심적인 보호 메커니즘이다.

[0003] 이러한 DNA 복구 프로세스들은 손상된 DNA를 제거하고 새로운 DNA를 합성하는 몇몇 복구 단백질들(repair proteins)로 이루어진다. 이 중에서 종양 억제인자 p53의 다운스트림 유전자의 하나로 알려진 Gadd45a (growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha)는 성장 억류와 연관된 많은 스트레스에 의해 유도되는 것으로서, 최근 Gadd45a가 DNA 절단 복구를 조절하는 것으로 알려졌다. Gadd45a는 PCNA, 코어 히스톤, p21, MAP kinase kinas 1 (MTK1), 및 Cdc2와 같은 단백질과 관련이 있으며, PCNA는 Gadd45a와의 상호작용을 통해 NER 경로에 참여한다.

[0004] PCNA는 다양한 세포 내 과정들에 있어서 커뮤니케이션 포인트 및 시그널링-프로세싱 센터로서 작용하며 DNA 손상 부위의 보완 및 Gadd45a와의 상호작용을 통해 DNA 복구 경로에서 중요한 역할을 하는 단백질이다. 한 연구에 따르면 Gadd45a 결함 세포에서 UV조사 후 PCNA 면역염색이 감소됨을 보고하였는데, 이러한 발견은 PCNA가 Gadd45a의 존재 또는 부존재에 의해 영향을 받는다는 것을 암시한다.

[0005] 또한 최근에는 PCNA와 APE1의 BER 프로세스에 대한 연관성이 보고되었다. APE1(Apurinic/aprimidinic endonuclease)은 BER 경로에서 DNA 손상에 의해 유도된 AP 사이트를 인식하고 절단하는 활성을 갖는 중요한 효소이다. 알려진 바에 의하면 APE1은 직접 p53에 결합하는데, 이는 p53 단백질이 BER을 조절함을 의미한다. 이전 연구에서 본 발명자들은 gadd45a ^{-/-} 세포에서 AP 사이트의 느린 복구와 gadd45a ^{-/-} 세포의 핵에서 APE1/Ref1

의 disrupted localization을 통하여, p53 타겟 단백질인 Gadd45a가 BER 경로에서 APE1 효소 활성 및 상호작용에 영향을 줄 수도 있다는 가능성을 최초로 제안하였다. 또한 Gadd44a 결함 세포에서 PCNA와 APE1의 상호작용이 감소됨을 통해 Gadd45a가 PCNA와 APE1의 상호작용에 영향을 미칠 수 있음을 밝혔다.

[0006] 그러나 Gadd45a와 APE1사이의 구체적인 기전이나 직접적인 연관성에 대해서는 구체적으로 밝혀진 바가 없으며, 특히 APE1의 활성을 직접적으로 조절할 수 있는 Gadd45a의 서열에 대하여서는 전혀 알려진 바가 없었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명은 DNA 절단 복구 시스템 중 염기 절단 복구(BER) 활성에 직접적으로 관여하는 Gadd45a 상의 APE1 활성 조절 사이트를 제공하고자 한다.

과제 해결수단

[0008] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 Gadd45a 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 156번 내지 158번 아미노산 잔기에 해당하는 Trp, Val 및 Pro 으로 이루어진 APE1 활성 조절 사이트를 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 APE1 활성 조절 사이트의 아미노산서열의 변이 여부를 확인하는 단계를 포함하는 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부 분석 방법을 제공한다.

효과

[0011] 본 발명에 따른 Gadd45a 내의 APE1 활성 조절 사이트는 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부를 분석할 수 있는 마커로 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 이를 타겟팅하는 siRNA를 투여함으로써 암세포의 증식을 억제하기 위해 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 Gadd45a 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 156번 내지 158번 아미노산 잔기에 해당하는 Trp, Val 및 Pro 으로 이루어진 APE1 활성 조절 사이트를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호작용을 통해 APE1의 활성이 조절됨을 발견하고, APE1 활성의 조절에 핵심적인 역할을 하는 Gadd45a 유전자 상의 서열을 발견하였다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호작용에 의해 APE1의 활성이 조절될 수 있을 것임을 가정하고, Gadd45a 서열 내에서 PCNA와 직접 작용하는 바인딩 사이트 서열을 분석하였다. PCNA와의 상호작용 부위는 PCNA와 직접 작용하기 위해 Gadd45a 구조상으로 노출되어 있을 것이며, 또한 중요한 상호작용은 진화적으로 보존될 것이기에 Gadd45a 패밀리어서 보존되어 있을 것이라고 가정하고 연구를 수행하였다. 그 결과, Gadd45a 패밀리에 보존되어 있고 표면에 노출되어 있으면서 PCNA에 직접 결합능을 갖는 서열인 Gadd45의 C-말단부 중 156번 내지 158번 아미노산 서열을 밝혀내었다.

[0014] 상기 서열은 직접 PCNA에 결합할 뿐만 아니라 PCNA를 통해 APE1과도 결합하며, 따라서 결과적으로 APE1의 엔도뉴클라아제 활성을 조절함으로써 염기 절단 복구 시스템인 BER 경로의 활성 조절에도 영향을 준다.

[0015] 본 발명의 한 구체예에서 상기 APE1 활성 조절 사이트는 서열번호 2의 핵산 서열 중에서 466번 내지 474번 염기에 해당하는 것일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 Gadd45a 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 아미노산 서열 중에서 156번 내지 158번 아미노산 잔기에 해당하는 Trp, Val 및 Pro 으로 이루어진 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물을 제공한다.

[0017] 실제로, 암세포에 염기 손상을 일으키거나 DNA 복구 활성을 억제시킴으로써 암세포를 제거하는 기작을 나타내는 항암제들이 많이 보고되어 있다. 예를 들어 폐를 비롯한 다른 암세포에서 항암 역할을 한다고 보고된

cisplatin의 경우, DNA에서 접합해 있는 퓨린기 간의 사슬내 교차결합 (intrastrand cross-link)를 형성함으로써 암세포 DNA의 손상을 유발한다고 잘 알려져 있다 (Sherman & Lippard, 1987; Takahara *et al.*, 1995). 본 발명에서 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 암세포에 처리하면 APE1 활성 조절 사이트가 녹아웃(knock-out) 되어 APE1의 엔도뉴클라아제 활성을 억제하게 된다. 이는 암세포의 BER 활성을 억제하고 결과적으로 손상된 DNA의 복구 활성이 억제됨으로써 암세포의 증식을 억제하거나 암세포의 세포괴사를 유도하여 항암 활성을 높일 수 있게 된다.

[0018] 따라서 본 발명은 상기 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물, APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA의 항암제 제조 용도, 그리고 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 암세포에 투여함으로써 APE1 활성을 억제하여 암세포의 증식을 억제하거나 암세포의 세포괴사를 유도하는 암의 치료방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따른 상기 APE1 활성 조절 사이트를 타겟팅하는 siRNA를 포함하는 암 치료용 의약 조성물은 단독으로 사용될 수도 있으나, 항암 활성을 증가시키기 위하여 암세포에 방사선 치료 또는 염기 손상을 일으킬 수 있는 다른 항암제 투여시 보조제로서 병용사용 할 수 있다. 또한 치료 대상인 암의 종류는 특별히 한정되는 것은 아니며 다양한 암의 치료에 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 siRNA를 포함하는 의약 조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 의약 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 갈슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대량체로 투여할 수 있다.

[0024] 상기 siRNA의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 1,000 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 1,000 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있다.

[0026] 또한 본 발명은 상기 APE1 활성 조절 사이트의 아미노산서열의 변이 여부를 확인하는 단계를 포함하는 염기 절단 복구 시스템의 손상 여부 분석 방법을 제공한다. 대상체의 Gadd45a 유전자 상에 있는 APE1 활성 조절 사이트의 핵산 서열의 변이 여부를 확인함으로써, BER 시스템의 손상 여부를 쉽게 확인할 수 있다.

실시예

[0027] 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.

[0028] <실시예 1> Gadd45a siRNA 처리된 세포의 APE1 활성 감소

[0029] Gadd45a의 BER 활성을 조사하기 위하여 Gadd45a 와 APE1 의 상호작용을 가정하고 APE1 엔도뉴클라아제 활성 분석을 수행하였다. Abasic 사이트와 유사한 테트라히드로퓨란(THF)이 본 실험에 사용되었다. THF 올리고는 BER 경로에서 APE1 효소에 심각한 장애로서 사용되었다.

[0030] 본 실시예에서 사용된 세포는 다음과 같이 배양하였다. 인간 간암 세포 HepG2를 10% 우태혈청(Gibco, USA), 10,000 Units/ml 페니실린 및 10,000 Units/ml 스트렙토마이신(Gibco, USA)를 포함하는 DMEM 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 세포를 포스페이트-완충 식염수(phosphate-buffered saline, pH 7.4)(Gibco, USA)로 세척한 뒤 제거하였다. 3분간 trypsinization할 후에, 1500rpm으로 5분간 원심분리하여 세포를 수득하였다. 세포 펠렛은 DMEM 배지에 다시 부유시켰고 세포 배양접시에 옮겼다(SPL Life Sciences, Korea).

[0031] 구체적인 Gadd45a siRNA의 제조 및 세포 감염방법은 다음과 같다. ON-TARGETplus SMARTpool Gadd45a siRNA 및 Non-targeting siRNAs Dharmacon Inc. (Thermo Scientific, CO)에서 구입하였다. 감염은 다른 농도의 siRNA 및 다른 세포 수득 시간에 최적화되었다. 감염 하루 전, HepG2 세포를 6-웰 플레이트에 1×10^5 cells/well로 옮겼다. 4μl의 올리고펙타민(Invitrogen, USA)을 11μl의 무혈청 DMEM 배지(Gibco, USA)에 첨가하였고 부드럽게 혼합한 후 실온에서 10분간 배양하였다. 그리고 Gadd45a siRNA 20nmol 스톡의 5μl를 180μl의 무혈청 DMEM 배지에 첨가하고 혼합하였다. siRNA와 올리고펙타민 복합체를 모두 섞어 실온에서 20분간 배양하였다. 복합체가 형성되는 동안 성장 배지는 세포에서 제거되었고 800μl의 무혈청 DMEM 배지를 세포를 포함한 각 웰에 첨가하였다. 200μl의 siRNA와 올리고펙타민 복합체를 각 웰에 첨가하고 6-웰 플레이트를 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다. 4시간 후, 3× 혈청의 일반 농도를 포함하는 성장배지 500μl를 첨가하였다.

[0032] 도 1a는 컨트롤 siRNA 처리된 세포에 비해 gadd45a siRNA 처리된 세포에서 잘린 결과물의 레벨이 감소함을 보여준다. 또한 도 1b는 전체 용해물에서, gadd45a siRNA 처리된 세포에서의 APE1 레벨은 거의 동등한 반면 Gadd45a 레벨은 감소함을 보여준다. 이러한 결과는 endogenous Gadd45a가 APE1 기능에 영향을 미침으로써 BER 활성의 조절에 관여함을 보여주는 결과이다.

[0033] <실시예 2> Gadd45a 상의 APE1 활성 조절 사이트 규명

[0034] Gadd45의 C-말단부 중 137 내지 165번째 아미노산 서열이 PCNA 결합능을 갖는 것으로 알려졌다(Vairapandi et al. Characterization of MyD118, Gadd45, and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Interacting Domains. J Biol Chem, 2000, 275: 16810-16819). 상기 서열 중 직접적으로 PCNA와 상호작용함으로써 결과적으로 APE1의 활성을 조절할 수 있는 사이트를 규명하기 위하여, Gadd45 family에서 진화적으로 보존되어 있고 또한 표면에 노출되어 있는 서열을 분석하였다.

[0035] 그 결과 도 2에 나타나듯, Gadd45a 패밀리에 보존되어 있고 표면에 노출되어있는 서열 WVP(아미노산 156-158)를 발견하였다.

[0036] <실시예 3> 돌연변이 gadd45a-감염된 세포에서 PCNA 및 APE1과의 상호작용 감소

[0037] PCNA가 실시예 2에서 규명된 사이트인 Gadd45a의 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열에 결합하는지, 그리고 상기 서열이 APE1과의 상호작용에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Gadd45a의 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열을 VAV 서열로 돌연변이시킨 후 면역침전 및 면역블로팅을 수행하여 Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호

작용을 조사하였다.

[0038] PHD 소프트웨어 패키지에 의해 규명된 Gadd45a 상의 APE1 활성 조절 사이트는 다음과 같은 방법으로 돌연변이되었다. Gadd45a 발현 벡터인 pFlagCMV4-Gadd45a는 gadd45a 유전자를 pFlagCMV4에 삽입시켜 제조하였다. Gadd45a 유전자의 올리고뉴클레오티드-조절 돌연변이 유발은 pFlagCMV4-Gadd45a를 템플레이트로 사용하여 PCR-기반 절차로 수행하였다. Gadd45a 돌연변이를 위한 돌연변이-특이적 PCR 분석은 다음의 프라이머들을 사용하여 수행하였다: 야생형 Gadd45a sense: 5'-CCCAAGCTTTGCAATATGACTTTGGA-3', anti-sense: 5'-CTTGGTACCATGCCATCACCGTTCAG-3'; 돌연변이 Gadd45a (WVP466VAV) sense: 5'-TTTGTCCGGGAAAGTCGCTACATGGATCAAGTGGCTGTAGTG-3' anti-sense: 5'-GTTCCACCGACATCACTAATTAGAGGGACTTGCCACAGGGACT-3' 야생형 또는 돌연변이 pFlagCMV4-Gadd45a로 형질전환된 *E. coli* DH5a 균주는 앰피실린(100 μ g/ml)으로 보충한 LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C로 유산소 상태로 배양하였다.

[0039] Gadd45a 플라스미드 DNA의 감염은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 감염 하루 전, HepG2 세포는 10% 우태혈청 만을 포함하는 DMEM 배지의 1×10^6 cells/100mm 접시로 옮겼다. 24시간 후 HepG2 세포는 퓨젠(Fugene) 6 감염 시약(Roche, Germany)을 사용하여 야생형과 돌연변이 Gadd45a 플라스미드 DNA로 감염되었다. 각 배양접시마다 18 μ l의 퓨젠 6를 희석하였고 582 μ l의 무혈청 DMEM 배지에서 10분간 배양하였다. 6 μ g의 Gadd45a 플라스미드 DNA를 첨가한 용액을 상온에서 15분간 배양하였고 드롭 방식(drop-wise)으로 세포에 첨가하였다. 48시간 후에, 면역침전 및 APE1 엔도뉴클라아제 활성 분석을 수행하기 위한 세포를 수득하였다.

[0040] Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호작용을 확인하기 위하여 면역침전을 수행하였다. Trypsinization을 통해 세포 펠렛을 모으고 인산-완충된 살린(pH7.4)으로 세척하였다. 수득한 세포는 네개의 100mm 접시당 50mM Tris-HCl, pH 7.8, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0.1% SDS, 1% 트리톤 X-100, 1mM DTT, 프로테아제 억제제(Roche, Germany)를 포함하는 RIPA 버퍼 500 μ l로 균질화하였다. 균질 현탁액은 얼음에서 30분 배양하였고 5초간 초음파 처리하여 13000rpm으로 30분간 원심분리하였다. 샘플들은 2 μ g의 마우스 안티-플래그 항체와 함께 12시간 배양한 후 40 μ l ExactaCruzTM C (Santa Cruz)로 밤샘 배양하였다. 몇차례의 세척 후에, 면역침전된 샘플을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)(10% (w/v) polyacrylamide)로 분리하였다.

[0041] 모든 면역블로팅은 Smith et al. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*, 1995, 10: 1053-9.에 개시된 방법으로 수행하였다. 사용한 항체들은 다음과 같다: anti-Flag M2 Monoclonal antibody for Gadd45a (F3165, Sigma); anti-PCNA (sc-7907, Santa Cruz); anti-APE1 (NB 100-101, Novus Biologicals). 면역활성 단백질은 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz) 및 enhanced chemiluminescence (AmershamTM ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare)로 검출하였다.

[0042] 도 3에 나타나듯이, Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호작용은, 야생형 gadd45a를 발현하는 세포에 비해 gadd45a 돌연변이를 과발현하는 세포에서 현저하게 감소되었다(도 3a, b). 전체 세포 용해물에서 PCNA, APE1 및 GAPDH는 모든 단백질 샘플에서 똑같이 발현되었고, Gadd45a는 mock 단백질을 제외한 다른 샘플들에서 과발현되었다. 이러한 결과를 통하여 Gadd45a 단백질에 있는 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열이 Gadd45a와 PCNA 및 APE1의 상호작용을 조절하는 핵심 부위임을 확인하였다.

[0043] <실시예 4> 돌연변이 gadd45a-감염된 세포에서 APE1의 활성 감소

[0044] 실시예 2에서 규명된 사이트인 Gadd45a의 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열이 APE1의 엔도뉴클라아제 활성에 영향을 미치는지 조사하기 위하여, Gadd45a의 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열을 VAV 서열로 돌연변이시킨 후, Gadd45a와 APE1의 상호작용을 특이적으로 검출하기 위한 flag 항체를 사용하여 면역침전한 후에 야생형과 돌연변이 gadd45a를 과발현하는 세포에서 APE1 엔도뉴클라아제 활성을 비교하였다(도 3c).

[0045] 구체적인 APE1 엔도뉴클라아제 활성 분석은 Hahn et al. Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol Microbiol*, 1999, 31: 1489-98.에 개시된 것과 같이 수행하였다. 세포는 웰당(6-웰 플레이트) 20mM HEPES-KOH (pH 8.0), 10% 글리세롤, 125mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 1mM DTT, 및 프로테아제 억제제를 포함하는 수득용 버퍼 35 μ l에 부유시켰다. 잔해들은 4 $^{\circ}$ C, 13000rpm에서 30분간 원심분리하여 제거하였다. 올리고뉴클레오티드는 17 염기쌍의 하향 올리고뉴클레오티드에 있는 테트라히드로퓨란(THF)에서 얻은 단일 뉴클레오티드 캡을 포함하고, 폴리뉴클레오티드 키나아제에 의해

[γ - ^{32} P]ATP로 말단을 라벨링하여, DNA 기질을 생성하도록 고안하였다. 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM NaCl, 1mM EDTA 와 90°C 물에서 방사성 동위원소로 표지한 가닥이 상보적인 가닥에 어닐링 한 후 실온으로 식혔다. APE1 절단 분석은 단백질 500ng (도 1) 또는 2mg (도 3d) 과 어닐링된 올리고 10pmol 를 이용하여 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 및 1mM EDTA를 포함하는 반응버퍼에서 37°C에서 15분 동안 수행하였다. 기질은 20% 폴리아크릴아미드/7M 우레아 변성 겔에서 생성물로부터 분리하였고 건조되어 X레이 필름에 노출하였다.

[0046] 감소된 Gadd45a 와 PCNA의 상호작용이 APE1 활성화에 영향을 미치는지 조사하기 위하여, Gadd45a와 APE1의 상호작용을 특이적으로 검출하기 위한 flag 항체를 사용하여 면역침전한 후에 야생형과 돌연변이 gadd45a를 과발현하는 세포에서 APE1 엔도뉴클라아제 활성을 비교하였다.

[0047] 도 3d는 야생형에 비해 돌연변이 gadd45a의 경우 THF를 포함하는 올리고의 절단 레벨이 감소함을 보여주는데, 이는 Gadd45a의 156 내지 158 위치의 WVP 아미노산 서열의 변이가 APE1 활성화에 직접적인 영향을 미침을 보여주는 결과이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 gadd45a siRNA 감염된 세포에서 APE1의 엔도뉴클라아제 활성이 감소됨을 보여준다.

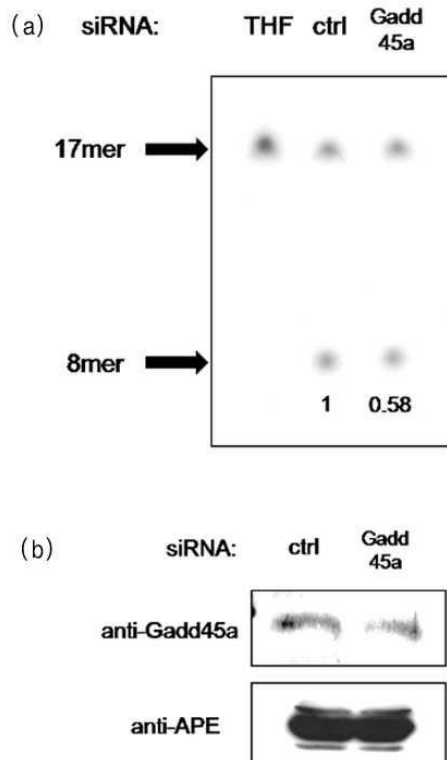
[0049] 도 2 는 Gadd45a의 염기서열 중 본 발명에 따른 APE1 활성 조절 사이트와, 상기 서열을 변이시킨 돌연변이 염기서열을 보여준다.

[0050] 도 3 은 돌연변이 Gadd45a 감염된 세포에서 Gadd45a와 PCNA 및 APE1과의 상호작용이 감소할 뿐만 아니라 APE1의 엔도뉴클라아제 활성도 감소됨을 보여준다.

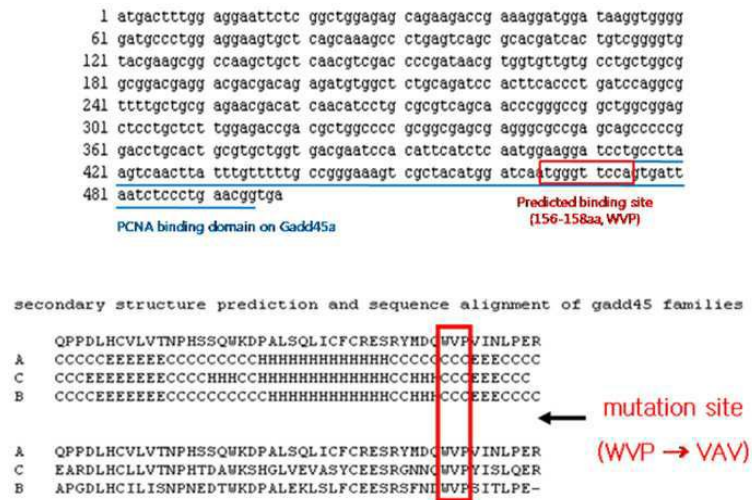
[0051] 도 4 는 Gadd45a와 PCNA 및 APE1과의 상호작용을 통한 BER 활성 조절 메커니즘을 보여주는 모식도이다.

도면

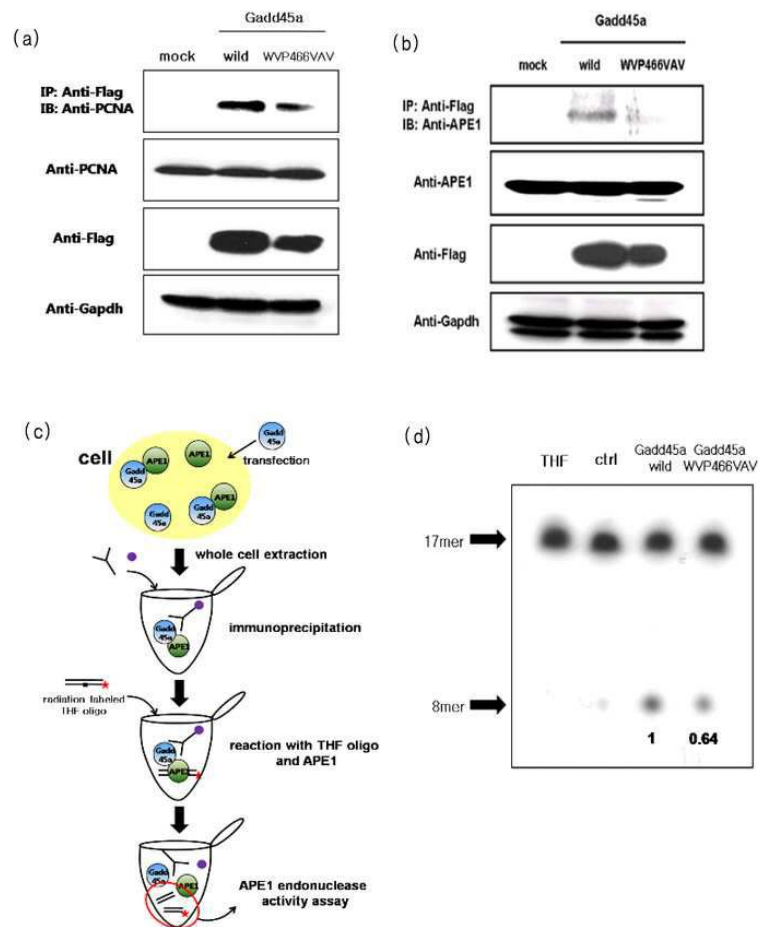
도면1



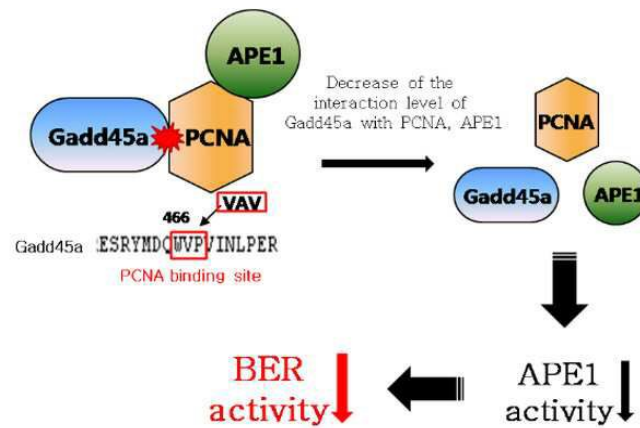
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF KYUNGHEE UNIVERSITY
 <120> APE1 Activity Modulating Site and Method of Analysis or Treatment Using Thereof

<130> P090697

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Thr Leu Glu Glu Phe Ser Ala Gly Glu Gln Lys Thr Glu Arg Met
 1 5 10 15

Asp Lys Val Gly Asp Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Lys Ala Leu Ser
 20 25 30

Gln Arg Thr Ile Thr Val Gly Val Tyr Glu Ala Ala Lys Leu Leu Asn
 35 40 45

Val Asp Pro Asp Asn Val Val Leu Cys Leu Leu Ala Ala Asp Glu Asp
 50 55 60

Asp Asp Arg Asp Val Ala Leu Gln Ile His Phe Thr Leu Ile Gln Ala
65 70 75 80

Phe Cys Cys Glu Asn Asp Ile Asn Ile Leu Arg Val Ser Asn Pro Gly
85 90 95

Arg Leu Ala Glu Leu Leu Leu Leu Glu Thr Asp Ala Gly Pro Ala Ala
100 105 110

Ser Glu Gly Ala Glu Gln Pro Pro Asp Leu His Cys Val Leu Val Thr
115 120 125

Asn Pro His Ser Ser Gln Trp Lys Asp Pro Ala Leu Ser Gln Leu Ile
130 135 140

Cys Phe Cys Arg Glu Ser Arg Tyr Met Asp Gln Trp Val Pro Val Ile
145 150 155 160

Asn Leu Pro Glu Arg
165

<210> 2
<211> 498
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgacttttg aggaattctc ggctggagag cagaagaccg aaaggatgga taaggtagggg 60

gatgccctgg aggaagtgtc cagcaaagcc ctgagtcagc gcacgatcac tgcgggggtg 120

tacgaagcgg ccaagctgct caacgtcgac cccgataacg tgggtgtgtg cctgctggcg 180

gcggacgagg acgacgacag agatgtggct ctgcagatcc acttcaccct gatccaggcg 240

ttttgctgcg agaacgacat caacatcctg cgcgtcagca acccgggccg gctggcggag 300

ctcctgctct tggagaccga cgctggcccc gcggcgagcg agggcgccga gcagcccccg 360

gacctgcact gcgtgctggt gacgaatcca cattcatctc aatggaagga tcctgcctta 420

agtcaactta ttgttttttg cgggaaagt cgctacatgg atcaatgggt tccagtgatt 480

aatctccctg aacggtga 498