(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0010940
(43) 공개일자 2019년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 38/45* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57407 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0093217
(22) 출원일자 2017년07월24일
심사청구일자 2017년07월24일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박재봉
강원도 춘천시 서부대성로 34
김재규
서울시 광진구 자양로 51길 30-9
(74) 대리인
박원미

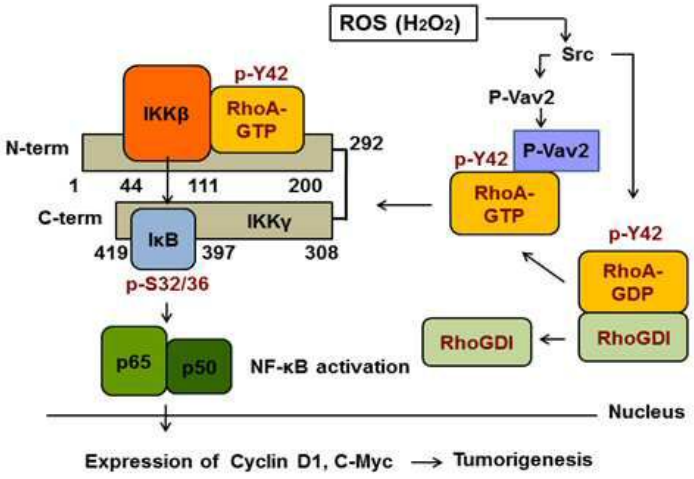
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **고형암 진단용 인산화 RhoA의 바이오마커로서의 용도**

(57) 요 약

본원은 인산화된 RhoA의 검출용 물질을 포함하는 고형암 진단용 조성물, 이를 검출하는 방법, 및 RhoA 단백질의 인산화를 이용한 고형암 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 개시한다. 본원에 따른 인산화된 RhoA 단백질의 존재 여부 또는 증감여부를 판별하면, 고형암의 진단, 모니터링 및 질병의 진행 정도, 병기를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있으며, 치료 후 치료 경과 확인에도 유용하게 사용될 수 있다. 인산화된 RhoA 단백질에 의한 암 발생기전을 이용하여, 암치료제 스크리닝에도 유용하게 사용할 수 있으며, RhoA 단백질의 인산화를 억제할 수 있는 물질은 암 치료제로서 개발될 수 있다.

대 표 도 - 도7d



(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 38/45 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2440/14 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01060393
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초연구지원사업
연구과제명 RhoA GTPase의 Tyr 인산화에 의한 발암기전의 규명
기 여 율 7/10
주관기관 한림대학교
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HRF-S-53
부처명 한림대학교
연구관리전문기관 한림대학교 산학협력단
연구사업명 특성화사업
연구과제명 아밀로이드베타에 의한 활성산소 생성 기전에 관한 연구
기 여 율 3/10
주관기관 한림대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 서열을 기준으로 42번째 타이로신 잔기가 인산화된 RhoA 단백질의 검출용 물질을 포함하는 고형암 진단용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 검출용 물질은 상기 인산화된 형태의 RhoA 단백질을 특이적으로 인식하는, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 앱타머, 아비머, 펩티도모방체, 수용체, 리간드 또는 보조인자인, 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 고형암은 유방암, 자궁경부암, 식도암, 폐암, 결장암, 위암, 또는 간세포암인, 조성물.

청구항 4

고형암의 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여,

검사 대상체 유래의 생물학적 시료로부터 서열번호 1의 서열을 기준으로 42번째 타이로신 잔기가 인산화된 RhoA 단백질의 존재 여부 및/또는 농도를 검출하는 단계;

상기 단백질의 농도 또는 존재에 대한 검출 결과를 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및

상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 유래 시료의 단백질 농도의 변화가 있거나, 또는 상기 단백질이 존재 여부에 변화가 있는 경우, 이를 고형암으로 판정하는 단계를 포함하는, 인산화된 RhoA 바이오마커를 검출하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 진단은 상기 고형암의 병기(stage) 결정을 포함하는 것으로, 병기가 진행함에 따라 상기 인산화된 RhoA 단백질의 농도가 증가하는 것인, 방법.

청구항 6

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서,

상기 인산화된 RhoA 단백질의 존재 여부 및/또는 농도를 검출하는 단계는, 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 질량분석, 또는 단백질 마이크로어레이 방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 7

제 4 항 또는 제 5 항에 있어서,

상기 고형암은 자궁경부암, 식도암, 폐암, 결장암, 위암, 간세포암, 유방암인, 방법.

청구항 8

RhoA 단백질 및 NEMO (NF-kappa-B essential modulator) 단백질을 제공하는 단계;

상기 RhoA 단백질 및 NEMO 단백질을 시험물질과 상기 RhoA 단백질의 인산화가 가능한 활성산소, 또는 LPS (Lipopolysaccharide)가 존재하는 조건에서 접촉시키는 단계;

상기 RhoA 단백질의 서열번호 1의 서열을 기준으로 42번째 타이로신 잔기의 인산화 여부를 측정하는 단계; 및

상기 측정 결과, 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질과 접촉된 RhoA 단백질에서 인산화가 감소한 경우, 상기 시험물질을 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는, 고형암 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 RhoA 단백질 및 NEMO 단백질은 상기 단백질을 발현하는 세포의 형태로 제공되는 것인, 방법.

청구항 10

RhoA 단백질의 인산화 억제제로서 Tat-C3 (C3 ADP ribosyltransferase linked to an HIV TAT Protein Transduction Domain), PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) 또는 SU6656 [(3Z)-*N*,*N*-Dimethyl-2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-ylmethylidene)-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonamide]을 포함하는 고형암 예방 또는 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 고형암 진단, 치료 또는 치료제 스크리닝에 사용되는 바이오마커와 관련된 기술이다.

배 경 기 술

[0003] 단백질 인산화는 생체내의 단백질 기능을 조절하는 핵심적인 기작 중 하나로서, 세포신호 전달 등에 매우 중요한 역할을 한다. 이러한 단백질 인산화 과정에 문제가 생길 경우 암, 당뇨병 등 심각한 질병으로 이어지게 된다. 단백질 인산화 연구는 기초과학 뿐 아니라 의학 및 약학에서도 매우 중요한 역할을 한다.

[0004] 한편 활성산소(ROS) 농도가 조절되지 않으면 암을 포함한 여러 질병이 발생하는 것으로 알려져 있다. 최적 농도에서 ROS는 생리학적 반응을 조절하기 위한 시그널 변환 경로에서 2차 메신저로서 역할을 할 수 있다. 하지만, 과량의 ROS는 심각한 세포 손상을 일으켜, 암을 포함한 여러 병을 일으킨다. 실제로 대부분의 모든 암에서 높은 ROS 농도는 종양의 발달 및 진행과 관련이 있다.

[0005] 그런데, 종양생성에서의 ROS의 분자 매카니즘, 특히 ROS와 단백질 인산화 매카니즘에 대해서 아직까지 명확하게 설명되어 있지 않다. 특히 ROS로 인한 특정 단백질 인산화가 암 특히 고형암에서 어떻게 발생하며 그 변화가 어떤지에 대해서는 알려져 있지 않다.

[0006] 대한민국 공개특허 제2015-0020508호는 종양질환 진단용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, RhoA 유전자를 이용한 혈액종양 질환 진단용 키트가 개시되어 있으나, 인산화된 RhoA 단백질에 대하여는 개시하고 있지 않

다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원에서는 인산화된 RhoA를 이용한 고형암 진단 마커 및 치료제 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 한 양태에서 본원은 서열번호 1의 서열을 기준으로 42번째 타이로신 잔기가 인산화된 RhoA 단백질의 검출용 물질을 포함하는 고형암 진단용 조성물을 제공한다.

[0011] 본원에서는 RhoA 단백질의 42번째 잔기의 인산화의 암과의 연관성을 밝힌 것으로 다양한 암의 검출의 사용될 수 있으며, 유방암, 자궁경부암, 식도암, 폐암, 결장암, 위암, 또는 간세포암의 검출에 사용될 수 있다.

[0012] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 마커를 이용한 암의 검출 또는 진단 또는 이에 필요한 정보를 제공하기 위해 본원에 따른 마커를 검출하는 방법으로서, 본원에 따른 마커는 대조군과 비교하여 암에서 인산화된 잔기의 양이 증가한다.

[0013] 본원에 따른 인산화된 잔기의 양은 암의 병기가 진행됨에 따라 그 양이 증가하는 것으로 나타나, 병기의 판별에 또한 사용될 수 있다.

[0014] 본원에 따른 인산화된 잔기의 탈 인산화를 시킬 수 있는 물질, 즉 RhoA 단백질의 인산화 억제제 예를 들면 RhoA 단백질의 인산화 억제제로서 Tat-C3 (C3 ADP ribosyltransferase linked to an HIV TAT Protein Transduction Domain), PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) 또는 Src 패밀리 단백질 키나제 억제제로서 예를 들면 SU6656 [(3Z)-*N*,*N*-Dimethyl-2-oxo-3-(4,5,6,7-tetrahydro-1H-indol-2-ylmethylidene)-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonamide]은 고형암의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본원에 따른 인산화된 RhoA 단백질의 존재 여부 또는 증감여부를 판별하면, 자궁경부암, 식도암, 폐암, 대장암, 위암, 간암, 유방암 등 고형암의 진단, 모니터링 및 질병의 진행 정도, 병기를 유의적으로 예측 또는 파악할 수 있으며, 치료 후 치료 경과 확인에도 유용하게 사용될 수 있다. 인산화된 RhoA 단백질에 의한 암 발생기전을 이용하여, 암치료제 스크리닝에도 유용하게 사용할 수 있으며, RhoA 단백질의 인산화를 억제할 수 있는 물질은 암치료제로서 개발될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 활성산소(H_2O_2)가 Src를 통해 RhoA Tyr42잔기의 인산화를 유도한다는 것을 나타낸 것이다. (A) 10 μM PP2 존재 또는 부존재하에서 대식세포(RAW264.7)를 100 μM H_2O_2로 자극하였다. 세포 용해물에서 p-Tyr가 면역침강되었고, RhoA가 웨스턴블랏 분석으로 확인되었다. (B) HA-RhoA WT, Y34F, Y42F, Y66F, Y74F, 및 Y156F를 함유하는 pCDNA3.1 플라스미드 (4㎍)를 16시간 동안 HEK293 세포로 전달이입하였다. 상기 세포를 1시간 동안 100 μM H_2O_2로 자극하였다. HA-RhoA 단백질이 면역침강되었고, p-Tyr, HA, 및 IKKγ가 웨스턴블랏 분석으로 확인되었다. (C) HA-RhoA Y42F DNA를 HEK293 세포로 전달이입하였고, HA 항체로 면역침강시켰고, p-Tyr는 면역블랏시켰다. (D) RAW264.7 세포를 100 μM H_2O_2로 자극하였고, p-Y416 Src를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (E) RAW264.7 세포를 100 μM H_2O_2로 자극시켰다. Src는 상기 세포 용해물로부터 면역침강시켰고, 공동-면역침강된 RhoA는 웨스턴블랏으로 확인하였다. (F) GST-RhoA (0.1㎍)를 100 μM H_2O_2로 1시간 동안 전(pre)처리하였고 그 후 카탈라아제(1U)를 30분 동안 추가하여 H_2O_2를 제거하였다. 인비트로 키나아제 분석을 그 후 수행하였다; ATP (20 μM) 및

정제된 활성 Src 단백질 (0.1㎍)를 RhoA와 함께 배양시켜, p-Tyr를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (G) 정제된 재조합 RhoA, RhoA Y42F, 및 RhoA Y42E (0.1㎍)을 1시간 동안 100㎛M H_2O_2 존재하에서 배양시킨 후, 카탈라아제 (1U) 존재하에서 상기 샘플을 1시간 동안 배양시켜 H_2O_2를 제거하였다. 인비트로 키나아제 분석을 수행하였다; 활성 Src (0.1㎍/50㎕) 및 20㎛M ATP를 상기 RhoA 단백질에 추가한 후, p-Tyr 및 p-Src를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (H) GST, GST-RhoA WT, RhoA Y42F, 및 RhoA Y42E 단백질 (0.5㎍/50㎕)을 1 mM GDP or 0.1 mM GTPɣS 존재하에서 30분 동안 30℃에서 혼합하였다. P-Tyr 및 p-Src를 웨스턴블랏으로 확인하였다. 인풋(input) GST, GST-RhoA WT, RhoA Y42F, 및 RhoA Y42E 단백질이 쿠마씨-블루 염색되어 아래쪽 패널에 존재하였다. (I) Rho 패밀리 GTPase의 아미노산 서열을 비교하였다. p-Tyr42 아미노산을 함유하는 aa 37-47 펩타이드를 사용하여 래빗에서 항-p-Tyr42 Rho를 생산하였다. (J) RAW264.7를 10㎛M PP2로 전처리시킨 후 100㎛M H_2O_2로 자극시켰다. P-Tyr42 Rho 항체를 사용하여 웨스턴블랏으로 P-Tyr42 Rho를 확인하였다. (K) ATP (10 mM) 및 $MgCl_2$ (60 mM) 존재하에서 정제된 재조합 RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (0.1㎍/50㎕)를 활성 Src 단백질 (0.1㎍)와 함께 배양하였다. P-Tyr42 Rho 항체를 사용하여 P-Tyr42 Rho를 확인하였다. (L) 복막 마크로파아지를 랫트에서 제조하여, H_2O_2 (100㎛M)로 자극시킨 후, p-Tyr42 Rho항체로 면역블랏하였다. (M) RAW264.7 세포를 1㎛g/ml Tat-C3 (클로스트로디움 보툴리눔 C3 엑소자임 (C3 ADP ribosyltransferase) linked to an HIV TAT PTD (Protein Transduction Domain)로 1시간 동안 전처리한 후 100㎛M H_2O_2로 자극하였다. P-Tyr42 Rho를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

도 2는 Vav2 및 Src를 통해 과산화수소가 RhoA를 활성화시킨다는 것을 나타낸 것이다. (A) RAW264.7 세포를 10㎛M SU6656 (Src 저해제)로 1시간 동안 전처리한 후 100㎛M H_2O_2로 처리하였고, RhoA-GTP 수준은 GST-Rhotekin-RBD를 사용한 풀-다운 분석법으로 결정하였다. RhoA는 웨스턴블랏으로 가시화하였다. (B) HEK293 세포를 H_2O_2로 처리하였고, RhoA-GTP는 풀-다운 어쎄이 및 웨스턴블랏으로 결정하였다. (C) RAW264.7 세포는 control-si 및 si-Vav2 (10 nM)존재하에서 72시간 동안 전달이입하였고, 상기 세포는 100㎛M H_2O_2로 1시간 동안 자극하였다. (D) RAW264.7 세포를 100㎛M H_2O_2로 자극하였다. 10㎛M PP2 (Src 저해제)존재하에서 1시간 동안 전처리한 세포 융해물 (500㎍ 단백질)로부터 Vav2 항체를 사용하여 Vav2를 면역침강시켰다. 공동-면역침강된 RhoA는 웨스턴블랏으로 확인하였다. (E) 재조합 Vav2 (0.1㎛g) 및 재조합 활성 Src (0.1㎛g)를 총 50㎕의 ATP (10 mM) 및 $MgCl_2$ (60 mM) 존재하에서 25℃에서 30분간 배양하였다. 항-p-Vav2 (p-Tyr 174) 항체를 사용하여 P-Vav2를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (F) RAW264.7 세포를 1시간 동안 10㎛M PP2로 전처리한 후 100㎛M H_2O_2로 처리하였다. P-Tyr를 면역침강시켰고, Vav2는 웨스턴블랏으로 확인하였다. (G) HA-RhoA Y42E 및 RhoA Y42F DNA (4㎛g)를 HEK293 세포로 전달이입하였고 100㎛M H_2O_2를 상기 체포에 첨가하였다. HA를 면역침강시켰고, 공동-면역침강된 Vav2를 면역블랏하였다. (H) RAW264.7 세포에 100㎛M H_2O_2를 처리하여 p-Tyr174 Src를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (I) 재조합 단백질 Vav2 (0.1㎛g)과 재조합 단백질 Src (0.1㎛g), ATP (1 mM), $MgCl_2$ (5 mM)을 함께 보관하여 Vav2의 p-Tyr174 인산화를 웨스턴블랏으로 확인하였다.

도 3은 과산화수소가 IKKɣ/NEMO와 p-Tyr42 RhoA의 연결을 자극한다는 것을 나타낸 것이다. (A) RAW264.7 및 HEK293 세포를 Tat-C3 (1㎛g/ml)로 처리한 후 H_2O_2 (100㎛M)로 자극하였다. NF-κB-루시퍼라아제 활성을 루미노미터를 사용하여 측정하였다. (B) RhoA WT, RhoA Y42F, 및 mock 벡터 DNA를 HEK293 세포로 전달이입시켰고, 상기 세포를 12시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 100㎛M H_2O_2로 자극시킨 후 p-IκB 및 p-p65를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (C) RAW264.7 세포를 100㎛M H_2O_2로 자극시켰다. IKKɣ 및 IKKβ를 면역침강시켰고, 공동-면역침강된 RhoA 또는 IKKɣ는 웨스턴블랏으로 확인하였다. (D) RAW264.7 세포를 100㎛M H_2O_2로 자극시켰다. IKKɣ 및 IKKβ를 면역침강시킨 후 p-Ty42 Rho를 면역블락하였다. (E) RAW264.7 세포를 100㎛M H_2O_2로 1시간 동안 자극시켰다. 30분 동안 60℃로 가열하거나(*) 또는 가열하지 않으면서 CIP(Calf intestinal alkaline phosphatase)(1U)와 함께 상기 세포 융해물을 30분 동안 배양하였다. IKKɣ를 면역침강시킨 후, 공동-면역침강된 RhoA를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (F) PP2 및 PP3(각각 10㎛M)을 사용하여 RAW264.7 세포를 1시간 동안 전처리하였다. IKKɣ를 상기 면역 융해물로부터 면역침강시키고, 공동-면역침강된 RhoA를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (G) p-Tyr42 Rho (녹색) 및 IKKɣ (적색)의 편재화를 공촛점 현미경으로 가시화하였다. DAPI 염색으로 핵을 확인하였다. (H) HA-RhoA WT, RhoA Y42F, 및 mock 벡터 DNA (4 ㎍)를 HEK293 세포로 전달이입하였다. HA는 면역침강되었고, 공동-면역침강된 IKKɣ는 웨스턴블랏으로 확인하였다. (I) 정제된 RhoA WT, RhoA Y42E, 및

RhoA Y42F 단백질 (각각 0.1㎍)을 1 mM GDP or 0.1 mM GTPγS와 함께 30℃에서 30분간 프리로드(preload)하였고, 그 후 10μM H_2O_2를 1시간 동안 첨가하였다. 아가로스 비드-GST-IKKγ (0.5㎍ 단백질)을 RhoA 단백질과 함께 혼합하여 25℃에서 30분 동안 배양하였다. 비드-GST-IKKγ에 결합된 RhoA를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (J) si-IKKγ (10 nM)를 RAW264.7 세포로 전달이입시켜 72시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 H_2O_2 (100μM)를 첨가하였고, GST-Rhotekin-RBD 비드를 사용하여 풀-다운 분석법으로 RhoA-GTP 수준을 결정하였다.

도 4는 Phospho-mimic RhoA Y42E가 IKKβ 활성을 자극한다는 것을 나타낸 것이다. (A) 정제된 재조합 RhoA Y42E (0.1㎍)을 1 mM GDP 또는 0.1 mM GTPγS와 함께 30℃에서 30분 동안 프리로드하였다. RhoA를 H_2O_2 (100μM)와 함께 1시간 동안 배양한 후 상기 비드에 컨쥬게이트된 GST-IKKγ 도메인(aa 1-419, 1-43, 44-111, 1-100, 101-200, 201-350, 351-419, 및 101-419)과 함께 25℃에서 30분 동안 배양하였다. GST-IKKγ에 결합된 RhoA Y42E를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (B) 정제된 재조합 RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (각각 0.1㎍)를 H_2O_2 (100μM)로 1시간 동안 전처리하였다. RhoA 단백질을 혼합시켜 정제된 재조합 GST-IKKβ (0.1μg), GST-IKKγ (0.1μg), 및 IκB (1μg)와 함께 20μM ATP 존재하에서 25℃에서 30분간 배양하였다. 항p-Ser32/36-IκB 항체를 사용하여 웨스턴블랏으로 P-Ser32/36-IκB를 확인하였다. (C) 정제된 재조합 RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (각각 0.1㎍)를 1 mM GDP 또는 0.1 mM GTPγS 존재하에서 30℃에서 30분간 프리로드하였다. RhoA를 혼합하여 정제된 GST-IKKβ (0.1μg), GST-IKKγ (0.1μg), 및 IκB (1μg)와 함께 20μM ATP 존재하에서 25℃에서 30분간 배양하였다. 항p-Ser32/36-IκB 항체를 사용하여 P-Ser32/36-IκB를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (D) LPS (1μg/ml), TGF-β (5ng/ml), and H_2O_2 (100μM)로 RAW264.7 세포를 자극시킨 후 p-IKKβ, p-IκB, 및 IκB를 면역블랏하였다. (E) Tat-C3 저해제를 처리한 경우 면역침전법으로 확인한 결과 RhoA는 IKKγ/NEMO와 결합하지 않았다.

도 5는 P-Tyr42 RhoA가 암세포주 증식을 촉진한다는 것을 나타낸 것이다. (A) 암세포주 (4T1, HT-29, MCF-7, CT-26, RAW264.7, 및 AGS)를 H_2O_2 (100μM)로 처리한 후, p-Tyr42 Rho, p-p65, 및 p-IκB를 웨스턴블랏으로 확인하였다. (B) RAW264.7, CT-26, 및 4T1 세포를 Tat-C3 (1μg/ml) 또는 Bay 117082 (NF-κB 저해제, 10μM)로 1시간 동안 처리하였고, 100μM H_2O_2 존재 또는 부존재 시의 증식 세포 수를 DAPI 염색으로 측정하였다. (C) 암세포(4T1 및 MCF7)를 mock vector, RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (4μg DNA)와 함께 전달이입시킨 후 100μM H_2O_2로 2일 동안 자극시켰다. 세포 증식은 DAPI 염색으로 측정하였다. (D) 유방암 세포주인 4T1 세포를 sh-RhoA (10 nM)로 전달이입시키고, RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (4μg DNA)로 재건시킨 후 100μM H_2O_2로 4시간 동안 자극시켰다. 그 후 NF-κB 루시퍼라아제 활성을 측정하였다.(E) 유방암 세포주인 4T1에 sh-RhoA (10 nM)을 전달이입시킨 후 RhoA WT, RhoA Y42E, 및 RhoA Y42F (4μg DNA)로 재건시킨 후 100μM H_2O_2로 24시간 동안 자극시켰다. 그 후 세포 증식을 조절하는 cyclin D1 및 C-Myc을 웨스턴블랏으로 확인하였다.

도 6은 이종이식에서 4T1 세포의 P-Tyr42 RhoA가 종양생성을 증가시키는 것을 나타낸다. (A) 유방암세포주(4T1)를 sh-RhoA (4μg DNA)로 전달이입시켜 RhoA WT 및 RhoA Y42F (4μg DNA)로 재건시켰다. 세포(4T1, $1x10^5$)를 BALB/c 마우스(n=4)의 오른쪽 다리에 주입하였다. 주입부위에 매일 PMA (1μg/50μl DMSO)를 주입하고, 종양 부피를 3주 동안 측정한 결과이고, (B) 최종 종양 무게를 측정한 결과이다.

도 7은 P-Tyr42 Rho가 환자에서 유래한 몇몇 암 조직에 발현된 것을 나타낸 것이다. (A) 자궁경부 침윤성 편평세포암종 (SCC), 식도 SCC, 폐 SCC, 결장 선암, 위 선암, 간세포암(HCC), 유방 관 암종, 피부 SCC, 연조직 림프종, 고환 정상피종(testis seminoma), 난황 낭 종양, 신장 신세포암(RCC)을 포함하는 몇몇 암조직에서 면역조직화학분석법으로 P-Tyr42 Rho를 확인한 것이다. (B) 몇몇 위암 조직에서 RhoA 및 p-Tyr42 Rho (p-Rho Y42)를 확인한 후 점수를 결정하였다. (C) 단계에 따라 위암조직에서 유래한 선암에서 P-Tyr42 Rho를 측정하였다 선암 3기를 1기 플러스 2기와 비교하였고 점수로 나타내었다. 환자의 유방암 조직에서 p-Tyr42 Rho, p-Tyr416 Src 및 p-Ser527 p65/RelA를 면역염색법으로 확인한 후 단계에 따라 증가하는 것을 확인하였다. 각각 p-Tyr42 Rho, p-Tyr416 Src 및 p-Ser527 p65/RelA는 두 단백질들 사이에 양의 상관관계가 있었다. (D) ROS에 반응하는 RhoA 변형/활성, NF-κB 활성, 및 세포 증식을 통한 종양 진행을 분자 메카니즘을 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] RhoA (Ras homolog gene family, member A)의 과도한 발현 또는 돌연변이는 암발생과 연관이 있으나, 이의 인산화된 RhoA의 암과의 관련성에 대하여는 알려진 바가 없다.

[0020] 본원은 RhoA 단백질의 42번째 타이로신 잔기의 인산화와 암의 발생이 관련되어 있음을 분자수준에서 규명하고, 여기에 관여하는 분자 및 이들 간의 상호작용을 또한 규명하였다.

[0021] Rho 단백질은 작은 GTPase들의 p21 Ras 수퍼패밀리의 잘-알려진 멤버로, 비활성 GDP-결합 상태 및 활성 GTP-결합 상태 간의 형태적 변형(conformational change)을 통해 내인성(intrinsic) GTPase 활성을 나타낸다. RhoA 단백질은 세포 표면 수용체들로부터 세포내 타겟 분자들로 시그널 전달(transduction)을 조절하고 세포 형태, 이동능(motility), 세포질 분열(cytokinesis), 평활근 수축 및 종양 성장(tumor progression)을 포함하는 다양한 생물학적 과정들에 포함되어 있다(Yoshioka, K., et al., Cancer Research, 59: 2004-2010(1999)). 종양 조직에서 RhoA의 발현 레벨은 주위의 정상 조직과 비교하여 현저하게 높을 뿐 아니라, 대장암의 단계에 따라 양성적으로 증가한다는 것이 보고되었다(Nakamori, S., et al., Rec. Adv. Gastroenterol. Carcinogenesis, 1: 901904(1996)). 하지만 인산화된 Rho, 특히 특정 잔기에서 인산화된 Rho 단백질의 암과의 관련성 및 그 기전에 대하여는 전혀 알려진 바가 없다.

[0022] 본원은 활성산소(H_2O_2)가 Src를 통해 RhoA Tyr42잔기의 인산화를 유도하며, 이어 IKKɣ/NEMO와 p-Tyr42 RhoA의 상호작용을 하고, 이러한 과정에서 P-Tyr42 RhoA가 암세포주 증식을 촉진하며, 암 조직에서 p-Tyr42 RhoA가 발현된다는 것을 밝혔으며, 특히 암의 진행 단계가 진행됨에 따라 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

[0023] 따라서 한 양태에서 본원은 42번째 타이로신 잔기가 인산화된 RhoA 단백질을 암검출용 마커의 용도로 사용하는 것이다.

[0024] 일 구현예에서 본원은 42번째 타이로신 잔기가 인산화된 RhoA 단백질 검출용 물질을 포함하는 고형암 진단용 조성물 또는 키트를 제공한다.

[0025] RhoA 단백질은 그 단백질 및 염기서열이 공개된 것으로, 단백질 서열을 NCBI reference Sequence NP_001300870, 핵산서열은 NM_001313941.1로 공지되어 있다.

[0026] 일구현예에서 RhoA는 인간유래로 아미노산 서열은 서열번호 1의 서열로 표시된다. 또한 본원 도 1i에 기재된 바와 같이 인산화되는 42번 잔기를 중심으로 동일한 서열을 갖는 RhoA, RhoB (서열번호 2) 및 RhoC (서열번호 3)도 본원의 범위에 포함된다.

[0027] 본원에서 용어 진단은 특정 질병 또는 질환에 대하여 검사 대상체의 질환에 대한 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상체의 예후(prognosis)(예컨대 질환의 단계 또는 진행상태 판별 또는 치료에 대한 질환의 반응성 결정)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0028] 본원에서 용어 진단용 바이오마커, 마커 또는 진단 마커란 질환이 발생한 대상체 유래의 시료 예를 들면 세포 또는 조직을 정상 세포 또는 질환의 치료를 위해 적절한 치료를 받은 대상체의 조직 또는 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 시료에 비하여 질환이 발생한 대상체 유래의 시료에서 증가 양상을 보이는 단백질을 일컫는 것으로, 본원에 따른 일 구현예에서는 42번째 잔기가 인산화된 RhoA, RhoB 또는 RhoC 단백질로, 그 존재 또는 발현양이 고형암에 걸린 대상체 유래의 시료에서 증가한다.

[0029] 본원에서 고형암은 백혈병과 같은 혈액암이 아닌 체내 장기에서 주로 발생하는 암을 말하며, 예를 들어 자궁경부암, 식도암, 폐암, 결장암, 위암, 간세포암, 또는 유방암을 포함하는 것이나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0030] 본원에서 생물학적 시료란 바이오마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 뇨, 혈장, 및 혈청을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 생물체에서 직접적으로 유래된 것은 물론 인비트로에서 배양된 세포 또는 조직을 포함한다. 본원에 따른 마커의 검출을 위해 다양한 시료가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서는 전혈, 혈청 및/또는 혈장이 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 질환이 발생한 또는 발생이 의심되는 또는 발생가능성이 있는 생물체에서 수득한 조직 또는 세포 또는 인비트로 세포 배양물이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 상기 혈액, 세포 또는 조직의 분획 또는 유도물을 포함하는 것이다. 세포 또는 조직을 이용하는 경우, 세포 자체 또는 세포 또는 조직의 융해물이 사용될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 대상체의 조직이 사용된다.

[0031] 본원에서 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수

있을 것이다.

[0032] 본원에 따른 마커는 정량적 또는 정성적 분석을 통해 단백질의 존재 여부의 검출 및/또는 이의 발현량 자체, 발현량의 변화, 발현량 차이의 수준에서 검출될 수 있다.

[0033] 이러한 본원에 따른 바이오마커의 검출은 마커의 기능적 특징 및/또는 항원적 특징에 기반을 둔 것일 수 있다. 본원에 따른 마커는 마커의 활성 또는 기능의 검출, 또는 단백질 수준에서 특이적으로 상호작용하는 물질을 사용하여 검출될 수 있다.

[0034] 이런 측면에서 본원에 따른 마커는 정량적 또는 정성적 분석을 통해 단백질의 존재 여부의 검출 및/또는 이의 발현량 자체, 발현량의 변화, 발현량 차이의 수준에서 검출될 수 있다.

[0035] 일 구현예에서 검출용 물질은 상기 인산화된 형태의 RhoA 단백질을 특이적으로 인식하는, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 앱타머, 아비머, 펩티도모방체, 수용체, 리간드 또는 보조인자를 포함한다.

[0036] 본원에 따른 마커의 정량적 및 정성적 분석에는 공지된 단백질을 정성 또는 정량적으로 검출하는 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0037] 단백질 수준에서의 정성적 또는 정량적 검출 방법으로는 예를 들면 웨스턴블랏, ELISA, 방사선면역분석, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 용액/현탁액 중에서 표지된 항체와의 결합 및 유세포 분석기를 통한 검출, 질량분석기 또는 항체와 같은 단백질 어레이 등을 이용한 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 공지된 것으로 예를 들면 chip-based capillary electrophoresis: Colyer et al. 1997. J Chromatogr A. 781(1-2):271-6; mass spectroscopy: Petricoin et al. 2002. Lancet 359: 572-77; eTag systems: Chan-Hui et al. 2004. Clinical Immunology 111:162-174; microparticle-enhanced nephelometric immunoassay: Montagne et al. 1992. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 30:217-22 등을 참조할 수 있다.

[0038] 일 구현예에서는 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIA (Radio Immuno Assay) 등과 같은 샌드위치 방식의 면역분석법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 고상의 기질 예를 들면 글라스, 플라스틱 (예를 들면 폴리스티렌), 폴리사카라이드, 나일론 또는 나이트로셀룰로스로 제작된 비드, 막, 슬라이드 또는 마이크로타이터플레이트에 결합된 제1 항체에 생물학적 시료를 추가한 후, 직접 또는 간접 검출이 가능한 표지물질 예를 들면 ^{3}H 또는 ^{125}I와 같은 방사선 물질, 형광물질, 화학발광물질, 햅텐, 바이오틴, 디그옥시제닌 등으로 표지되거나 또는 기질과의 작용을 통해 발색 또는 발광이 가능한 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 말레이트 데하이드로게나아제와 같은 효소와 컨쥬게이션된 항체와의 결합을 통해 단백질은 정성 또는 정량적으로 검출할 수 있다.

[0039] 기타 다른 면역 반응 기반의 방법의 사용될 수 있으며 다른 구현예에서는 항원 항체 결합을 통해 마커를 간단하게 검출할 수 있는 Ouchterlony 플레이트, 웨스턴블랏, Crossed IE, Rocket IE, Fused Rocket IE, Affinity IE와 같은 면역 전기영동(Immuno Electrophoresis)이 사용될 수 있다. 이러한 방법에 사용되는 시약 또는 물질은 공지된 것으로서, 예를 들면 항원-항체반응, 상기 마커에 특이적으로 결합하는 기질, 상기 마커와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자와의 반응을 통해 검출될 수 있거나, 또는 질량분석기를 이용할 수 있다. 상기 본원의 마커와 특이적으로 상호작용 또는 결합하는 시약 또는 물질은 칩 방식 또는 나노입자(nanoparticle)와 함께 사용될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있다. 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석하여 즉, 정상 시료와의 시그널 대조를 수행함으로써, 질환 발생 여부를 진단할 수 있다.

[0040] 이러한 방법에 사용되는 시약 또는 물질은 공지된 것으로서, 예를 들면 상기 인산화된 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 또는 펩타이드 앱타머, 또는 상기 마커와 특이적으로 상호작용하는 수용체 또는 리간드 또는 보조인자 등이 사용될 수 있다. 상기 본원의 마커와 특이적으로 상호작용 또는 결합하는 시약 또는 물질은 칩 방식 또는 나노입자(nanoparticle)와 함께 사용될 수 있다.

[0042] 또 다른 양태에서 본원은 고형암 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여 42번째 타이로신 잔기가 인

산화된 RhoA 바이오마커를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0043] 일 구현예 본원은 고형암 진단 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 인산화된 RhoA 바이오마커를 검출하는 방법으로 상기 방법은 검사 대상체 유래의 생물학적 시료로부터 인산화된 RhoA 단백질의 존재 여부 및/또는 농도를 검출하는 단계; 상기 단백질의 농도 또는 존재에 대한 검출 결과를 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 상기 대조군 시료와 비교하여, 상기 대상체 유래 시료의 단백질 농도의 변화가 있거나, 또는 상기 단백질이 존재 여부에 변화가 있는 경우, 이를 고형암으로 판정하는 단계를 포함한다.

[0044] 본원의 방법에서 마커의 존재/부존재 또는 발현양의 검출은 단백질 수준에서 결정될 수 있으며, 이에 관해서는 앞서 언급한 바와 같다.

[0045] 본원에 따른 방법에 사용되는 생물학적 시료는 앞서 언급한 바와 같다.

[0046] 본원의 방법에 따른 고형암 진단용 마커의 검출은 정성적, 및 정량적 검출을 모두 포함하는 것으로, 본 질환의 발병 및 진행에 대한 지표가 될 수 있으며, 본 질환의 발병, 질환의 진행, 질환의 진단 또는 예후에 이용될 수 있다.

[0047] 본원의 방법은 고형암의 진단 또는 예후에 관한 정보를 제공하기 위해, 마커 분석 결과에 추가하여, 환자의 비단백질 임상정보 즉, 마커 이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다. 이러한 비단백질 임상정보란, 예를 들면 환자의 나이, 성별, 체중, 식습관, 체질량, 기저질환 중 하나 이상을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0048] 본원 방법은 마커의 검출 결과를 고형암의 진단 또는 예후와 연관시키는 단계를 포함하며, 상기 연관시키는 단계는 결정된 마커의 단백질 양 또는 존재 여부를 대조군에서 결정된 상기 마커의 검출결과와 비교하여 이를 근거로 진단하는 것이다. 본원에서 인산화된 RhoA 단백질은 고형암이 발생한 조직에서 대조군과 비교하여 차별적으로 발현되며, 대조군의 검출 결과와 비교하여 인산화된 RhoA 단백질의 양이 유의하게 증가하는 경우, 대상체에서 상기 질환이 발생한 것으로 진단하는 정보를 제공할 수 있다. 본원 일 구현예에 따르면 상기 연관시키는 단계는 정상 대조군과 대상체의 시료를 비교한 후, 상기 각 마커에 대하여 발병 여부를 진단할 수 있는 임계값을 설정한 후, 대상체의 검출 결과를 상기 임계값과 비교할 수 있다.

[0049] 본원에 따른 방법은 또한 병기의 판단에서 유용하게 사용될 수 있으며, 상기 진단은 상기 고형암의 병기(stage)를 포함하는 것으로, 병기가 진행함에 따라 상기 인산화된 RhoA 단백질의 농도가 증가한다.

[0050] 본원에서는 암의 발생과정에 RhoA의 인산화 및 이와 상호작용하는 분자 및 기전을 규명하였다.

[0051] 이런 측면에서 본원은 본원에서 규명된 기전을 이용한 암치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0052] 일 구현예에서 본원에 따른 스크리닝 방법은 RhoA 단백질 및 IKKγ 또는 NEMO 단백질을 제공하는 단계; 상기 RhoA 단백질 및 IKKγ/NEMO 단백질을 시험물질과 상기 RhoA 단백질의 인산화가 가능한 활성화산소, TNF-알파, 또는 LPS (Lipopolysaccharide)가 존재하는 조건에서 접촉시키는 단계; 상기 RhoA 단백질의 서열번호 1의 서열을 기준으로 42번째 타이로신 잔기의 인산화 여부를 측정하는 단계; 및 상기 측정 결과, 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질과 접촉된 RhoA 단백질에서 인산화가 감소한 경우, 상기 시험물질을 후보물질로 선별하는 단계를 포함한다.

[0053] 본원에 따르면 활성화산소, LPS, TNF-α에 의한 Tyr42이 인산화된 RhoA가 IKKγ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunite) 또는 NEMO (NF-kappa B essential modulator)라 불리는 단백질과 결합하여 IKKβ를 활성화 시킨다(도 4E). 따라서, 본원에 따른 스크리닝 방법에서 Tyr42가 인산화된 RhoA 가 IKKγ와의 결합을 효과적으로 억제하는 물질의 규명을 위해서는 p-Tyr42 RhoA 와 IKKγ와의 상호작용이 필요하다. 본원에 따른 방법에서 RhoA 단백질 및 IKKγ 단백질은 재조합 단백질 또는 세포에서 발현되는 형태로 제공될 수 있다. IKKγ 단백질은 공지된 것으로 예를 들면 인간유래 서열은 GenBank: AAD38081.1 또는 NCBI Reference Sequence: NP_001138727.1로 검색될 수 있으며, 본원에 따른 효과를 나타내는 한 다양한 아이소폼이 사용될 수 있다.

[0054] 본원의 방법에 사용되는 시험물질은 인산화된 RhoA 단백질의 농도 및/또는 활성을 조절할 것으로 기대되는 물질로, 예를 들면 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물 (예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트

및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클 (예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본원의 스크리닝 방법에 사용될 수 있는 인산화된 RhoA는 앞서 언급한 바와 같으며, 인산화된 RhoA 단백질을 스크리닝을 하는 구체적 방법에 따라 다양한 숙주 유래의 것이 본 방법에 사용될 수 있으며, 전장 또는 잘린 형태의 것이 모두 포함된다. 또한 동일한 숙주, 예를 들면 인간에서 유래된 것이라도 특정 개인, 지역, 환경 등에 따라 서열변이가 있을 수 있으며, 이러한 것은 물론 일부 서열이 변형(결실, 치환, 부가)되었으나, 기능적으로 동등한 변이체가 모두 본 발명에 사용될 수 있다. 한 구현예에서는 인간 유래의 것으로 이에 관하여는 앞서 언급한 바와 같다.

[0057] 본 방법에서 사용되는 단백질의 양, 세포의 종류 및 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 단백질 발현 또는 활성의 증가를 가져오는 물질을 후보물질로 선별한다. 대조군과 비교 약 99% 이상 증가, 약 95% 이상 증가, 약 90% 이상 증가, 약 85% 이상 증가, 약 80% 이상 증가, 약 75% 이상 증가, 약 70% 이상 증가, 약 65% 이상 증가, 약 60% 이상 증가, 약 55% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 약 45% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 20% 이상 증가를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.

[0058] 또한 이런 치료제를 스크리닝하는 방법으로는, 본원의 마커를 친화성 칼럼에 고정시키고 이를 시료와 접촉시켜 정제하는 방법 [Pandya et al, Virus Res 87: 135-143, 2002] 및 대용량스크리닝 방법 [Aviezer et al, J Biomol Screen 6: 171-7, 2001] 등을 비롯한 다수의 공지의 방법을 사용할 수 있으며, 당업자라면 구체적인 실시양태에 따라 적절한 방법을 선택할 수 있다. 스크리닝에 사용하기 위한 시험물질을 포함하는 시료로서는 조직 추출액, 유전자 라이브러리의 발현산물, 합성화합물, 합성 펩티드, 천연 화합물 등이 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0059] 다른 측면에서 본원은 또한 서열번호 1의 서열을 기준으로 RhoA 단백질의 42번째 타이로신 잔기의 인산화 억제제를 포함하는, 고형암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0060] 본원에서는 RhoA 단백질의 인산화를 억제한 결과, 암 세포의 증식을 억제할 수 있었다. 따라서 RhoA 42번 타이로신 잔기의 인산화를 억제할 수 있는 다양한 물질이 본원에 따른 조성물에 억제제로 포함될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 C3-Tat, PP2 또는 SU6656을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0062] **실 시 예**

[0063] **실험재료 및 방법**

[0064] 실험재료: N-아세틸-L-시스테인(NAC), 소 혈청 알부민(BSA), 폴-L-라이신 용액(P8920), H_2O_2(과산화수소), NP-40 (Nonidet P-40), 및 항-β-액틴 항체는 시그마-알드리치((St. Louis, MO, USA))에서 구입하였다. PP2 (4-아미노-5-(4-클로로페닐)-7-(t-부틸)피라졸로[3,4-d]피리미딘), SU6656, PP3, MG132, 및 Y27632는 칼바이오캠(La Jolla, CA)에서 구입하였다. 둘배코 변형 이글 배지 F-12(DMEM F-12), 소태아혈청(FBS), 페니실린 및 스트렙토마이신은 캠브렉스(Verviers, Belgium)에서 구입하였다. 항-p65, 항-포스포-IκB at Ser32/36, 항-RhoA, 항-Src, 항-IKKα/β, 및 항-Vav2는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(CA, USA)에서 구입하였다. p-IKKα/β, p-p65 at Ser536, p-Src at Tyr416, 및 p-Ser에 대한 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(MA, USA)에서 구입하였다. 마우스 항-IKKα/β 및 항-IKKγ 단일항체는 BD 바이오사이언스(Mountain View, CA)에서 구입하였다. 메탄올 프리-포름알데히드는 피어스(Rockford, IL)에서 구입하였다. 항-p-Tyr (4G10), 및 항-IKKβ 항체는 업스테이트(Lake Placid, NY)에서 구입하였다. 알렉사 플루오르-488 고트 항-마우스 IgG, 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI), 및 리포펙타민 2000은 인비트로젠(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 항-ProLong-Gold 안티페이드 마운트 용액, 알렉사 플루오르-568, 및 알렉사 플루오르-594는 Molecular Probes (Eugene, OR)에서 구입하였다. 폴리비닐리덴 다이플루오라이드(PVDF) 멤브레인은 Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. Attractene (301005) 및 Hyperfect (301802) 전달이입 시약은 Qiagen (Valencia, CA)에서 구입하였다. 글루타치온-세파로스 4B 또는 아가로스 및 단백질 A/G-아가로스 비드는 Amersham 바이오사이언스(Piscataway, NJ)에서 구입하였다. 다양한 암 조직 A701 (VII) 및 위암 조직 A209 (II) 칩은 ISU ABXIS (Seoul, Korea)에서 구입하였

다.

[0066] **실험방법**

[0067] **세포 배양.**

[0068] 뮤린 마크로파아지 세포주 RAW264.7, HEK293, 4T1, 및 HT-29에서 얻은 세포는 RAW264.7의 경우 DMEM F-12에서, HEK293, 4T1, 및 HT-29의 경우 DMEM에서 보관하였고, 37℃에서 5% CO_2, 95% 습도 대기하에서 AGS에 5% 열-불활성화 FBS 및 항생제(100U/ml의 페니실린, 100㎍/ml의 스트렙토마이신)를 보충하였다. AGS alc CT26 세포는 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 배양하였다.

[0069] **웨스턴 블랏 분석.**

[0070] 세포를 PBS로 한번 세척하고, 하베스트하여 RIPA 버퍼(20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, 125 mM NaCl)에 용해하여 4℃, 12,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 세포 추출물의 총 단백질 농도는 피어스 BCA 단백질 분석 킷트(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 결정하였다. 추출물 알리쿼트 (20 ㎍ 단백질)을 12-14% SDS-PAGE를 사용하여 분리하였고, SDS-PAGE 겔은 20% 메탄올을 함유하는 트랜스퍼 버터에서 20분간 배양한 후 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 5% 탈지분유 및 0.05% 트윈-20을 함유하는 트리스-버퍼 식염수 (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4)에서 실온에서 PVDF 멤브레인을 2시간 동안 배양하여 비특이적 결합을 블락하였다(general protocol from Bio-Rad Inc.). 표적 단백질은 4℃에서 밤새 특이적 항체로 탐침하였고, 결합 항체는 퍼옥시다아제 컨쥬게이트된 고트 항-마우스 IgG 항체로 배양하여 탐지하였다. PVDF 멤브레인을 화학형광 FCL 시약(Amersham, Arlington Heights, IL)에 담궜고 X-선 필름(Agfa, VWR, USA)에 노출시켰다.

[0071] **세포질 및 핵 분획의 제조.**

[0072] 세포질 및 핵 분획은 하기 피어스 프로토콜에 따라 분리하였다. RAW 264.7 세포는 다양한 주기에서 H_2O_2 (0.1 mM)로 자극하였다. 얼음으로 차갑게 한 1x PBS에서 세포를 하베스트하고, 13,000x g에서 10분간 원심분리하여 펠렛으로 한 후 저장성(hypotonic) 버퍼 A(20 mM HEPES pH 7.4, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, and 20% glycerol)에서 얼음 상에서 30분간 용해시켰다. 융해물을 15,000x g에서 15분간 원심분리시킨 후, 얻은 상청액이 세포질 분획이다. 상기 펠렉을 저장성 버퍼 A로 세 번 세척하여, 저장성 버퍼 B(20 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 20% glycerol)에 재서스펜젼시켜, 얼음상에서 30분간 배양하여 15,000x g에서 15분간 원심분리하였다. 상기 상층액이 핵 추출물이다. 항-p65 및 항-라민A/C 항체로 면역블랏팅하여 분획을 분석하였다.

[0073] **NF-κB 루시퍼라아제 리포터 활성.**

[0074] 12-웰 플레이트에 세포(1×10^5)를 플레이트하여 CO_2 배양기, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 매뉴얼에 따라 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 사용하여 NF-κB-루시퍼라아제 리포터 컨스트럭트(Stratagene, 2㎍)를 세포 내로 전달이입하였다. 전달이입 효율의 변화를 측정하기 위하여, E. 콜라이 β-갈락토시다아제 유전자를 지닌 플라스미드인 0.5㎍의 pCMV-Gal로 세포를 전달이입하였다. 전달이입 하루 후에, 세포를 1x 리포터 융해 버퍼(Promega)에 융해시키고, 세포 잔해는 원심분리로 제거하였다. 루미노미터(Lumat LB 9057, EG and GBertold)를 사용하여 Promega의 매뉴얼에 따라 상대적 루시퍼라아제 활성을 측정하기 위하여 상청액을 사용하였다.

[0075] **면역침강.**

[0076] 1 x PBS로 세포(1×10^7)를 세척하여, 각각 10㎍/ml의 류펩틴 및 아프로티닌, 및 1 mM 소디움 플루오라이드, 1 mM Na_3VO_4, 및 5 mM $MgCl_2$를 함유하는 세포 용해 버퍼 (20 mM Tris pH 7.4, 120 mM NaCl, 1% Nonidet P-40)를 사용하여 세포 융해물을 제조하였다. 15,000x g, 4℃에서 20분 동안 원심분리하여 세포 융해물을 클리어하였다. 그후 상청액을 단백질 A/G 아가로스 비드로 30분 동안 전(pre)-클리어하였다. 상기 상청액에 항IKKɣ(1:1000 dilution) 항체를 4℃에서 밤새 첨가하였다. 그 후, 단백질 A/G-아가로스 비드(30㎕)를 상기 융해물에 첨가하여, 상기 혼합물을 쉐이킹하면서 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 비드는 원심분리를 사용하여 수집하여 용해버퍼로 3번 세척하였다. 30㎕의 5x 샘플 버퍼를 첨가하여 비드에 결합된 단백질을 용출시키고 특이적 일차 항체로 면역블랏팅하여 분석하였다(Kim et al., (2006), Blood 108, 1821-1829).

[0077] **재조합 단백질의 돌연변이 생성 및 분리.**

[0078] pGEX4T.1 플라스미드에서 RhoA 34YF, Y42F, Y66F, Y74F, 및 Y156F 돌연변이는 포이트 돌연변이 생성 키트(Intron Biotechnology, Gyeonggi, Korea)를 사용하여 구축하였다(Jeon et al., (2012), Control of neurite outgrowth by RhoA inactivation. J Neurochem 120, 684-698.). pGEX4T.1 플라스미드에서 GST-RhoA, GST-IκB, GST-IKKβ, 및 GST-IKKγ 재조합 단백질은 E. 콜라이 BL21에서 발현되었으며 상기 단백질은 GSH-비드를 사용하여 정제하였다(Kim et al., (2014) IκB kinase γ (IKKγ/NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which in turn activates Rho-associated kinase (ROCK) to phosphorylate IKKβ in response to transforming growth factor (TGF)-β1. J Biol Chem 289, 1429-1440.).

[0079] **인비트로에서 단백질에의 GTPγS- 또는 GDP-결합.**

[0080] 최종 농도 10 mM이 되도록 10 마이크로리터의 EDTA (0.5 M, pH 8.0)를 500㎕ 세포 융해물(500μg protein)에 첨가하였고, 5㎕의 10 mM GTPγS (최종농도 0.1 mM가 되도록) 또는 5㎕ 100 mM GDP (최종농도 1 mM가 되도록)를 첨가하여 볼텍스 혼합기로 혼합하였다. 상기 혼합물을 30℃에서 30분간 배양하였다. 상기 샘플을 얼음상에 둠으로써 상기 반응을 종결시키고 32㎕의 1 mM $MgCl_2$ (최종 농도 60 mM 되도록)를 혼합하였다(Pierce).

[0081] **GTP-RhoA 풀-다운 분석.**

[0082] 분석을 하기 전에 12시간 동안 혈청없는 DMEM F-12에서 세포를 배양하였다. 세포를 자극하여 얼음으로 차갑게 한 1x PBS로 세척하여 용해 버퍼 A(25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM $MgCl_2$, 5% 글리세롤 및 1 mM PMSF를 함유하는 프로테아제 저해제 및 각 1㎍/ml의 류펩틴, 아프로티닌, 및 펩스타틴 A)에 용해시켰다. 원심분리로 융해물을 클리어하게 하고 총 부피 및 단백질 농도를 동등하게 하였다. GST-Rhotekin-Rho-결합 도메인(RBD) 비드로 배양한 후 얼음으로 차갑게 한 용해 버퍼 B (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5 mM $MgCl_2$, 100μM orthovanadate, protease inhibitors)로 세 번 세척한 후, SDS-PAGE를 사용하여 상기 결합 분획(활성 RhoA-GTP)를 분리하였다(Ren et al., (2000) Determination of GTP loading on Rho. Methods Enzymol. 325, 264272). 총 RhoA 레벨은 보유중인 전(whole) 세포 융해물 알리쿼트를 사용하여 유사하게 분석하였다. 활성 RhoA 및 총 RhoA는 항-RhoA 항체(단일클론 항체 26C4; Santa Cruz, CA)를 사용하여 웨스턴블랏으로 분석하였다. 활성 RhoA의 상대적 양은 GST-RBD 비드로 침전된 RhoA(활성 RhoA) 대 전 세포 융해물 중 총 RhoA의 양의 비율로 결정하였다. Photoshop 7.01 소프트웨어 (Adobe Inc)로 결과를 정량하였다. 통계적 유의성은 PRISIM 4.0 software (GraphPad)를 사용하여 결정하였다.

[0083] **인비트로 키나아제 분석.**

[0084] 정제된 Vav2 또는 RhoA (0.1μg)를 키나아제 분석 버퍼(20 mM HEPES pH 7.5, 2 mM β-glycerophosphate, 20 mM $MgCl_2$, 및 20μM ATP)에서 Src (0.1μg)와 함께 25℃에서 30분간 배양하였다 몇몇 경우에는, 10μM H_2O_2를 사용하여 RhoA 단백질을 전처리하였고, 1U 카탈라아제를 투여하여 과잉의 H_2O_2를 제거하였다. P-Tyr는 웨스턴블랏으로 탐지하였다(Kim et al., (2014) IκB kinase γ (IKKγ/NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which in turn activates Rho-associated kinase (ROCK) to phosphorylate IKKβ in response to transforming growth factor (TGF)-β1. J Biol Chem 289, 1429-1440).

[0085] **세포 증식 실험.**

[0086] 세포(2 x 10^4)를 DMEM, 5% FBS, 및 1% P/S에서 배양한 후 FBS-free 배지에서 12시간 동안 인큐베이트하였다. H_2O_2 (100μM)를 사용하여 세포를 처리하여, CO_2 인큐베이터에서 샘플을 37℃에서 24-48시간 동안 인큐베이트하였다. 4% 포름알데히드(200㎕)로 실온에서 10분간 세포를 고정하였다. 세포 핵을 1㎍/ml DAPI (1:200)로 실온에서 10분간 염색하였다. 형광 현미경을 사용하여 세포 농도의 형광을 결정함으로써 세포 증식을 정량하였다. 최소 4개 로케이션을 선택하여 평균 세포 밀도를 계산하였다; 형광 강도는 ImageJ Pro software를 사용하여 측정하였다(Depan and Misra, (2014) The development, charaterization, and cellular response of a novel electroactive nanostructured compsite for electrical stimulation of neural cells. Biomater Sci (2014)2, 1727).

[0087] **항-포스포-Tyr42-Rho 항체의 제조.**

[0088] 항-p-Tyr42 Rho 항체를 Young-In Frontier (Seoul, Korea)에서 생산하였다. p-Tyr42 Rho peptide (epitope

peptide T^{37}VFEN(phospho-)Y^{42}VADIE^{47})를 BSA에 컨쥬게이트한 후 래빗에게 주입하여 다중클론 항-p-Tyr42를 생산하여, 펩타이드-컨쥬게이트된 비드를 사용하여 정제하였다.

[0089] **세포의 형광 현미경 검사.**

[0090] 0.01% 폴리-L-라이신 용액이 코팅되어 있는 13mm 지름의 글래스 커버-슬립(Marlenfeld, Germany)을 CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트하였고 그 후 1xPBS로 세 번 세척하였다. 글래스 커버-슬립에 5% FBS를 함유하는 DMEM F-12에서 $1x10^3$ 세포 밀도로 RAW 264.7 세포를 씨드하였고 16시간 동안 인큐베이트하였다. 그 후 상기 배지를 FBS없는 DMEM F-12로 변경하였고, 상기 세포를 12시간 동안 인큐베이트하였다. 4% 포름알데하이드를 함유하는 인산완충식염수로 실온에서 15분 동안 상기 세포를 고정하였고 그 후 PBS 내 0.2% Triton X-100로 투과성으로 만들었다. 1xPBS로 여러번 세척한 후, 0.5% BSA를 함유하는 ris/NaCl 버퍼(20 mM Tris pH 7.4, 50 mM NaCl)에서 실온에서 30분 동안 상기 세포를 인큐베이트하였다. 래빗 다중클론 항체로 염색하기 위하여, 실온에서 1시간 동안 블락킹 용액 내에서 1:100 희석의 항-p64 또는 항-RhoA 항체 중 하나와 함께 상기 세포를 인큐베이트한 후 0.1% Triton X-100을 함유하는 Tris/NaCl 버퍼로 세 번 세척하였다. Alexa-546-라벨된 고트 항-래빗 IgG(Amersham Life Science)로 상기 세포를 염색하여 0.1% Triton X-100가 첨가된 Tris/NaCl 버퍼로 다섯 번 세척하였다. 이중 면역형광을 하기 위하여, 1:50으로 희석한 단일 클론 항-p65 또는 단일클론 항-RhoA 항체(26C4) 중 하나를 첨가한 후 상기 세포와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이트하였다. 1:50 희석된 Rhodamine-컨쥬게이트된 항-래빗 IgG 또는 알렉사-488 컨쥬게이트된 항-마우스 IgG (Molecular Probes)를 실온에서 2시간 동안 인큐베이트하였다. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 핵을 염색하였다. 통상의 형광 현미경에서 형광이미지를 사진 촬영하였다(Axiovert 200, Zeiss) (Kim et al., 2014).

[0091] **동물 및 뮤린 종양 모델 제조.**

[0092] BALB/c (암컷, 4-6 주령) 마우스를 Samtako (Osan, Republic of Korea)에서 구입하였다. 동물실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. BALB/c 마우스 오른쪽 다리에 4T1 세포(1×10^5)를 주입하였다. 종양 성장은 매 3일 마다 측정하였다. 종양은 21일 동안 성장시켰다. 야생형 대조군 D. melanogaster w1118는 Bloomington Stock center에서 얻었다.

[0093] **암 환자 및 조직 샘플.**

[0094] 2012년 1월에서 6월까지, 한림대학교 춘천 성심병원에서 9명의 선암환자가 근본적 위장절제술을 받았다. AJCC(American Joint Committee on Cancer)에 의한 TNM 단계는 수술 후에 결정되었다. 각 케이스에서 하나의 대표적인 블록을 사용하였다. 모든 케이스는 두 명의 독립적인 병리학자에 의해 리뷰되었으며, 질환의 진단의 확인되었다.

[0095] **암 조직의 면역조직화학.**

[0096] P-Tyr42 Rho 발현을 Bond Polymer Intense Detection System (Vision BioSystems, Australia)을 약간 변형시킨 매뉴얼에 따라 사용하여 면역-조직화학으로 조사하였다. 포르말린으로 고정하고, 파라핀-포매시킨 조직의 4 μm의 두꺼운 섹션을 Bond Dewax Solution (Vision BioSystems)으로 탈파라핀화하였고, 항원 회수 절차는 Bond ER Solution (Vision BioSystems)을 사용하여 100℃에서 30분 동안 수행하였다. 과산화수소와 함께 5분간 배양함으로써 내인성 퍼옥시다아제를 소거하였다. Bond-Max autostainer (Vision BioSystems)에서 바이오틴-프리 폴리머 호어래디쉬퍼옥시다아제-링커 항체 접합 시스템을 사용하여 실온에서 p-Tyr42 Rho (1:200)에 대한 다중클론 래빗 항체와 함께 실온에서 15분 동안 상기 섹션을 인큐베이트하였다. 핵은 해마톡실린으로 대비염색하였다.

[0097] **암 단계의 평가 및 스코어링.**

[0098] 종래 방법(Kim et al., (2010) TNF-α induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. Cell Death Differ 17, 1420-1434)처럼 세미-정량 스코어링 방법을 사용하여 P-Tyr42 Rho 면역반응을 분석하였다. 세포질 및/또는 멤브레인 염색은 양성 발현을 지시하는 것으로 여겨진다. 스코어는 양성 종양세포의 퍼센트(0, none; 1, 25%; 2, 25-50%; or 3, >50%) 및 염색 강도(0, none; 1, weak; 2, moderate; 3, strong)의 합이다. 종양은 p-Tyr42 Rho 발현에 따라 세 그룹으로 나뉜다: 음성 (final scores of 0-2), 약한 양성 (final scores of 3-4), 또는 양성 (final scores of 5-6). 임상 병리 데이터와 환자의 동일 관계에 대해 블라인드로 하여 두 명의 독립된 병리학자가 모든 슬라이드를 검사하여 점수화하였다. 두 병리학자

사이에 부동의인 것은 합의하여 해결하였다.

[0099] **통계 분석.**

[0100] 상기 실험은 세 배수로 수행하였는데, 각 실험은 두 배 또는 세 배 샘플로 수행하였으며, 데이터는 평균 ± SE로 나타내었다. 통계학적 비교는 GraphPad Prism4.0 software (Graph Pad, San Diego, CA)를 사용하여 두 시료간 비교는 스튜던트 t-test로 이루어졌고, 여러 시료간 비교는 다중비교법으로 분석하였다. 상관관계는 Pearson의 상관계수 분석으로 시행하였다. p 수치가 0.05보다 적을 때 두 그룹 사이의 차이는 통계적으로 유의하다 (*p<0.05, 및 **p<0.01).

[0102] **실시예 1. 과산화수소 반응하여 Src에 의한 RhoA의 Tyr42에서 인산화 확인**

[0103] 본 실시예에서는 과산화수소에 반응한 RhoA에서의 Tyr의 인산화 (p-Tyr)를 측정하였다. p-Tyr을 면역침강시킨 후 RhoA에 대하여 웨스턴블랏을 수행한 결과, 과산화수소가 RhoA의 Tyr 인산화를 증강시키는 것으로 나타났다 (도 1A). 이어, 과산화수소에 반응하여 RhoA의 어느 Tyr 잔기가 인산화되는지를 확인하였다. RhoA에는 다섯 개의 Tyr34, Tyr42, Tyr66, Tyr74, 및 Tyr156가 있다. 따라서 HA 태그를 포함하는 Y34F, Y42F, Y66F, Y74F, 및 Y156F RhoA DNA 컨스트럭트 및 야생형을 HEK293 세포로 전달이입시켰고, 이어 세포를 과산화수소로 자극시킨 후에 이소적(ectopically)으로 발현된 HA-RhoA를 항-HA 항체로 면역침강시킨 후, p-Tyr에 대하여 면역블랏을 수행하였다. 그 결과 RhoA Y42F의 인산화가 현저하게 저해된 것으로 나타났다(도 1B). 과산화수소를 더 길게 처리해도 HEK293 세포에서 RhoA Y42F 인산화는 회복되지 않았다(도 1C). 상기 결과는 RhoA의 Tyr42가 과산화수소 처리 후에 주로 인산화되는 부위라는 것을 말한다. 이어 Src가 RhoA를 인산화시키는 주된 Tyr 키나아제인지 확인하기 위하여, Src 패밀리 키나아제의 억제제인 PP2의 효과를 시험하였다. 실제로, PP2는 RhoA의 Tyr 인산화를 억제하는 것으로 나타났다(도 1A). 활성 Src인 P-Tyr416 Src은 또한 과산화수소에 대한 반응하여 시간-의존 방식으로 증가하였다(도 1D). 또한, 과산화수소는 시간-의존 방식으로 RhoA와 함께 Src의 공동-면역침강을 증강시켰다(도 1E). Src가 RhoA를 인산화하는 실제 키나아제인지 확인하기 위하여, 인 비트로에서 ATP 존재하에서 활성 Src 단백질을 재조합 RhoA와 함께 배양하였다; Src에 의한 Tyr에서의 RhoA 인산화는 항-p-Tyr 항체로 확인하였다. 주목할 만하게 RhoA는 과산화수소로 산화된 후에 Tyr에서 쉽게 인산화되었다(도 1F). Src는 RhoA Y42E 및 RhoA Y42F를 인산화시킬 수 없지만, 인비트로에서 야생형 RhoA를 인산화시키는데(도 1G), 이는 Src이 과산화수소에 반응하여 RhoA의 Tyr42를 인산화시키는 키나아제라는 것을 다시 입증하는 것이다. 나아가, RhoA는 GTPɣS 보다는 GDP 존재시에 Src에 의해 Tyr 잔기에서 인산화된 반면, RhoA Y42E 또는 RhoA Y42F 어느 것도 GDP 또는 GTPɣS와 상관없이, Src에 의해 인산화되지 않았다(도 1H). 이러한 결과는 활성 RhoA-GTP 보다는 볼활성 RhoA-GDP가 Src에 의해 유리하게 인산화된다는 것을 말한다. 이어 래빗에서 항-p-Tyr42 Rho 폴리클론 항체를 제조하였다. Tyr42를 포함하는 RhoA의 펩타이드 서열(아미노산 37-47)이 RhoB 및 Rho1의 것과 정확하게 동일하기 때문에(도 1I), p-Tyr42 Rho 항체는 p-Tyr42 RhoA, 및 p-Tyr42 RhoB를 구별하지 못 할 수 있다. 본 발명자는 이 항체를 사용하여, 과산화수소에 반응하여 Rho의 Tyr42 인산화를 PP2가 약화시키는 것을 확인하여다(도 1J). 상기 항체는 미리 Src/ATP와 배양한 야생형 RhoA의 인산화를 인식하지만 RhoA Y42E 및 RhoA Y42F의 인산화를 인식하지 못한다(도 1K). 이러한 결과는 상기 항체가 Src에 의해 유도되는 p-Tyr42 RhoA(도면에 p-RhoA Y42로 표기됨)를 특이하게 인식할 수 있음을 나타내는 것이다. 랫트에서 수득한 일차 복막 마크로파아지에서 과산화수소는 또한 p-Tyr42 Rho를 유도한다(도 1L). Tat-C3은 항-p-Tyr42 Rho 항체에 의해 결정된 Tyr 42 인산화에 영향을 미치지 않는데(도 1M), 이는 RhoA 불활성화는 Tyr42 인산화에 영향이 없다는 것을 말한다.

[0104] 종합하면, 대식세포(RAW264.7)에 100㎛ H_2O_2을 처리하면 RhoA의 Tyr잔기가 인산화되었다 (도 1A). RhoA의 인산화되는 Tyr 잔기를 규명하고자, RhoA Tyr 잔기들을 모두 Phe 잔기로 치환하여 세포에 넣은 후 인산화를 조사한 결과 Tyr42 돌연변이에서 인산화가 일어나지 않았다 (도 1B, C). 따라서 p-Tyr42를 포함하는 아미노산 37-47 올리고펩타이드를 합성하여 BSA에 결합시킨 후 이를 토끼에 주사하여 항체를 포함하는 혈청을 얻었다. P-Tyr42를 포함하는 아미노산 37-47 올리고펩타이드를 지지체에 결합한 후 이를 이용하여 혈청으로부터 항체를 정제하였다. 이 항체를 이용하여 활성산소에 의한 RhoA/B의 인산화를 조사한 결과 활성산소에 의하여 p-42 Tyr RhoA/B가 증가하였다 (도 1E). 다시 한번 Tyr42 인산화를 확인하기 위하여 Tyr kinae인 Src을 RhoA와 함께 넣고 RhoA의 Tyr42인산화를 확인하였다 (도 1F). 하지만 RhoA Y42E (Tyr->Glu 돌연변이체)와 RhoA Y42F (Tyr->Phe 돌연변이체)는 인산화되지 않았다 (도 1F). 쥐의 복강 대식세포에서도 동일한 결과를 얻었다 (도 1G).

[0106] **실시예 2. 과산화수소에 반응하여, RhoGD1가 아닌 Vav2 결합에 의해 p-Tyr42 RhoA 활성화 규명**

[0107] p-Tyr42 eRhoA 및 RhoA 활성 사이의 상관관계를 이해하기 위하여, 우선 과산화수소첨가 후의 RAW264.7 세포에서의 RhoA-GTP 레벨을 결정하였다: 과산화수소는 시간-의존 방식으로 RhoA-GTP 레벨을 증가시켰지만, Tyr 키나아제 저해제인 SU6656은 과산화수소에 의한 RhoA 활성화를 방해하였다(도 2A). 다음으로, p-Tyr42 RhoA가 활성인지 불활성인지 결정하였다. 과산화수소로 자극된 세포에서 RBD-비드와 함께 폴-다운되는 RhoA-GTP를 p-Tyr42 Rho 항체로 면역블랏하였다; RhoA-GTP 레벨은 p-Tyr42 Rho와 양적 상관관계를 나타내며(도 2B), 이는 p-Tyr42 RhoA가 인 비보에서 활성 형태라는 것을 말한다. 이어 RhoA-RhoGDI 복합체 형성에 대한 p-Tyr42 RhoA의 효과를 분석하였다. RhoA-GTPγS는 RhoGDI와 거의 상호작용하지 않는 반면, RhoA WT-GDP 및 RhoA Y42F-GDP는 RhoGDI와 신속하게 상호작용하였다. 주목할만하게, GDP 존재하에서 phospho-mimic RhoA Y42E 조차도 인 비트로에서 RhoGDI과 거의 결합하지 않았는데(도 2C), 이는 RhoA의 Tyr 42 인산화가 RhoGD1에 결합한 RhoA를 방해하여, RhoA 활성화를 촉진시킨다는 것을 말한다. 또한, 과산화수소는 RhoGDI의 Tyr 인산화를 유도하여(도 2D), RhoA와 분리되게 한다(DerMardirossian et al., (2006) Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. Mol.Biol. Cell 17, 4760-4768). Vav2 (GEF)가 우선적으로 RhoA를 활성화시키는 반면, Vav1은 우선적으로 Rac1을 활성화시키기 때문에(Schuebel et al., (1998) Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. EMBO J. 17, 66086621), 본 발명자는 과산화수소에 반응하여 RhoA가 활성화되는데에 Vav2가 관여하는지 조사하였다. Vav2는 과산화수소에 반응하여 RhoA WT 및 RhoA Y42E에 결합하였지만, RhoA Y42F에 결합하지 않았다(도 2E). 이러한 결과는 RhoA의 p-Tyr42 잔기가 Vav2가 RhoA에 결합하는데 필요하다는 것을 말한다. 또한, Vav2는 과산화수소에 반응하여 RhoA와 공동-면역침강되었지만 반면 Tyr 키나아제 저해제 PP2는 RhoA 및 Vav2의 공동-면역침강을 없앴는데(도 2F), 이는 Tyr 인산화가 RhoA를 활성화시키기 위하여 Vav2 및 RhoA가 상호작용하는데 필요하다는 것을 말한다. 본 발명자가 si-Vav2를 RAW 264.7 세포로 전달이입할 때, 과산화수소는 RhoA-GTP 레벨을 상승시키지 못하였다(도 2G). 이러한 결과는 Vav2가 실제로 ROS에 반응하여 RhoA 활성화에 필요하다는 것을 말한다. 실제로, Vav2의 p-Tyr174는 과산화수소에 반응하여 시간-의존 방식으로 탐지되었고 PP2는 p-Tyr Vav2를 억제하였다(도 2H). 이와 일치하는 결과로, 활성 Src 단백질은 인비트로에서 Tyr174에서 Vav2의 인산화를 유도하였는데(도 2I), 이는 ROS가 Src를 통해 Vav2를 활성화시킨다는 것을 말한다.

[0109] **실시예 3. 과산화수소에 반응하여 IKKγ/NEMO와 Rho의 상호작용이 RhoA의 RhoA Tyr42 인산화에 필수적임을 규명**

[0110] 본 실시예에서는 과산화수소가 NF-κB 활성화를 유도한다는 것을 확인하였다(도 3A). 주목할만하게도 Tat-C3이 RAW264.7 세포에서 NF-κB 활성을 억제하였는데(도 3A), 이는 다양한 세포 타입에서 과산화수소에 반응하는 NF-κB 활성화에 RhoA GTPase가 필수적이라는 것을 말한다. 따라서 Tyr42에서 RhoA의 인산화가 NF-κB 활성화에 연관되어 있는지를 조사하였다; RhoA WT과 RhoA Y42E는 고산화수소를 첨가하였을 때 IκB 및 p65의 인산화를 증가시키는 반면 RhoA Y42F는 과산화수소를 첨가하였을 때 IκB 및 p65의 인산화를 저해하였는데(도 3B), 이는 p-Tyr42 RhoA가 NF-κB 활성화에 중요하다는 것을 의미한다. RhoA가 어떻게 NF-κB를 조절하는지 설명하기 위하여, IKKγ/NEMO가 IKKβ/IKKα로 구성된 IKK 복합체의 조절 서브유닛인 것으로 알려져 있으므로 본 발명자는 RhoA 및 IKKγ/NEMO 사이의 상호작용을 평가하였다. IKKγ/NEMO는 면역침강하였고, 그 후 IKKγ/NEMO와 RhoA의 상호작용을 확인하기 위하여 RhoA를 면역블랏하였다. 과산화수소는 IKKγ/NEMO 및 RhoA 공동-면역침강을 증가시켰는데, 이는 p-Tyr42 RhoA-GTP가 KKγ/NEMO와 상호작용한다는 것을 말한다(도 3C). 마찬가지로, RhoA는 시간-의존 방식으로 과산화수소에 의해 IKKβ와 함께 공동-면역침강되었다(도 3D). P-Tyr42 Rho는 과산화수소-자극 RAW264.7 세포로부터의 IKKγ/NEMO 및 IKKβ 면역침전에서 탐지되었는데(도 3C, 도 3D), 이는 IKKγ/NEMO 및 IKKβ에 결합된 RhoA가 p-Tyr42 RhoA라는 것을 말한다. 따라서 IKKγ/NEMO와의 상호작용에서 RhoA의 p-Tyr42 잔기가 참여하는지 조사하였다; RhoA 및 IKKγ/NEMO의 공동-면역침강은 포스파타아제(CIP)(도 3E) 및 Src 저해제인 PP2(도 3F)를 처리하였을 때 감소하였는데, 이는 RhoA의 Tyr42 인산화에는 상호작용이 필요하다는 것을 말한다. 본 발명자는 공초점 현미경을 사용하여 세포내에서의 IKKγ/NEMO 및 p-Tyr42 Rho의 편재화를 조사하였다. 과산화수소는 세포내에서 IKKγ/NEMO 및 p-Tyr42 Rho의 공동-편재화를 유도하였다(도 3G). IKKγ/NEMO와 함께 dephospho-mimic RhoA Y42F가 공동-면역침강하는 것은 상당히 감소하였다(도 3H). 인비트로 시스템을 사용하였을 때, 재조합 RhoA WT 및 과산화수소로 산화된 phospho-mimic RhoA Y42E는 GST-IKKγ/NEMO에 결합한 반면, phospho-mimic RhoA Y42E 또는 dephospho-mimic RhoA Y42F 중 어떤 것도 GDP 존재하에서 GST-IKKγ/NEMO에 결합하지 않았다(도 3I). 이러한 결과는 RhoA의 Tyr42 인산화 및 RhoA로의 GTP 결합에는 RhoA가 직접적으로 IKKγ/NEMO에 결합하는 것이 필요하다는 것을 말한다. 비록 TGF-β 시그널링에서 RhoA 활성화에는 IKKγ/NEMO가

필수적인 것이라고 보고되어 있지만(Kim et al., (2014) IκB kinase γ (IKKγ/NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which in turn activates Rho-associated kinase (ROCK) to phosphorylate IKKβ in response to transforming growth factor (TGF)-β1. J Biol Chem 289, 1429-1440.), si-IKKγ/NEMO는 과산화수소 처리시에 RhoA 활성화를 방해하지 않는데(도 3J), 이는 IKKγ/NEMO가 RhoA 활성화에는 관여하지 않는다는 것을 말한다.

[0112] **실시예 4. IKKγ/NEMO에서 p-Tyr42 RhoA에 의해 IKKβ 활성화 규명**

[0113] p-Tyr42 RhoA와 상호작용하는 IKKγ/NEMO 도메인을 결정하기 위하여, 몇몇 GST-IKKγ/NEMO 도메인을 phospho-mimic 형태의 RhoA Y42E와 함께 보관하였다. 과산화수소 존재하에서 RhoA Y42E-GTPγS는 아미노산 잔기 1-419, 101-200, 및 101-419에 결합하였고 IKKγ/NEMO의 아미노산 44-111에 약간 결합하였는데(도 4A), 이는 IKKγ/NEMO의 아미노산 101-200이, 산화되고 Tyr42에서 인산화되는 RhoA-GTP에 대한 결합 도메인이라는 것을 말한다. GTPγS, IKKβ, 및 IKKγ/NEMO 존재하에서 phospho-mimic RhoA Y42E는 인비트로에서 IκB의 가장 강력한 인산화를 유도하는 반면, dephospho-mimic RhoA Y42F는 IκB를 거의 인산화하지 않는 것으로 나타났다(도 4B, 도 4C). 다른 한편으로는, 과산화수소가 IKKβ의 인산화를 유도하지 않는 반면, 리포폴리사카라이드(LPS) 및 형질전환생장인자(TGF)-β1는 p-IKKβ를 증강시킨다(도 4D)는 것은 주목할 만하다. 이러한 결과는 과산화수소에 대한 반응에서 IKKβ 활성은 IKKβ 인산화로 인해 결정적으로 조절되는 것은 아니라는 것을 말한다. RhoA의 저해제인 Tat-C3는 Rho의 Tyr42 인산화를 방해하지는 않았지만(도 1M) RhoA가 IKKγ/NEMO에 결합하는 것을 방해하였다(도 4E).

[0115] **실시예 5. p-Tyr42 RhoA를 통한 과산화수소에 의한 암세포 증식 규명**

[0116] Tyr42에서의 RhoA 인산화가 특히 암에서 생리학적으로 중요하다는 것에 대하여 연구하였다. 4T1 및 MCF7 (유방암 세포주), HT-29 및 CT-26 (대장암 세포주), RAW264.7 (마크로파아지 세포주), 및 AGS (위암 세포주)를 포함한 여러 암 세포주에서 분석한 결과, 과산화수소는 p-Tyr42 Rho(p-Rho Y42)뿐만 아니라 p-p65 및 p-IκB도 유도하였다(도 5A). 실제로, 과산화수소는 세포 증식을 자극하는 반면, Tat-C3(Rho 저해제) 및 Bay 11-7082(NF-κB 저해제)는 증식을 억제시키는 것으로 나타났다 (도 5B). RhoA WT 및 phospho-mimic RhoA Y42E는 과산화수소에 반응하여 4T1 및 MCF7의 세포 증식을 증가시키는 것으로 나타났다 (도 5C). WT RhoA 및 Y42E가 NF-κB 활성을 촉진시키는 반면, RhoA Y42F는 4T1 세포내에서는 상기 활성을 방해하였다(도 5D). 과산화수소는 RhoA WT 및 RhoA Y42E 가 세포내에 주입되었을 때는 싸이클린 D1 및 c-Myc의 발현을 유도하였지만 RhoA Y42F 는 이들의 발현을 억제하였다. 이러한 결과는, 과산화수소에 반응하는 세포 증식이 Tyr42 인산화에 의한 RhoA 활성화 및 연이은 NF-κB 활성화에 의해 매개된다는 것을 나타낸다. 이는 Rho Tyr42 인산화 억제를 통해 암을 치료가 가능하고, Tyr42 인산화 Rho는 암마커로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0118] **실시예 6. p-Tyr42 RhoA에 의한 종양발생**

[0119] 종양생성에서의 p-Tyr42 RhoA의 역할을 알기 위하여, 4T1 세포를 이용하여 이종이식(xenograft) 실험을 수행하였다. sh-RhoA에 의한 상기 4T1 세포 녹다운으로 종양 부피 및 무게 및 비장 무게가 현저히 감소한 반면 WT RhoA로 재건한 세포에서는 종양생성이 회복되었다. 그럼에도 불구하고, 탈인산-유사 형태(dephospho-mimic form)인 RhoA Y42F로 재건된 세포는 종양 형성을 회복할 수 없었다(도 6A, 도 6B). 이는 Rho Tyr42 인산화 억제를 통해 암을 치료가 가능하고, Tyr42 인산화 Rho는 암마커로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0121] **실시예 7. 암환자에서 유래한 다양한 조직에서의 p-Tyr42 Rho의 상향조절**

[0122] 다음으로 p-Tyr42 Rho가 실지로 암과 연관되는지 조사하였다. 이에 환자에게서 유래한 몇몇 암 조직에서 p-Tyr42 Rho (p-Rho Y42)의 수준을 측정하였다. 이들 중에서, 결장 선암(colon adenocarcinoma), 위 선암, 간세포암, 식도 편평세포암(oesophagus squamous cell carcinoma, SCC), 및 폐 SCC 샘플에서는 p-Tyr42 Rho이 고수준인 것으로 나타났다(도 7A). 환자에서 유래한 몇몇 유방 암조직에서는 면역조직화학으로 분석하였을 때 p-Tyr42 Rho, p-Src, p-p65/RelA 수준이 올라간 것으로 관찰되었다. 또한 암의 진행 단계에 따라 P-Tyr42 Rho가 현저히 증가하였다; 1, 2, 3기 유방암의 환자 표본에서는 정상보다 p-Tyr42 Rho가 더 강하게 염색되는 것으로

나타났다(도 7B). 뿐만 아니라 p-Rho, p-Src, 및 p-p65 단백질들은 각각 서로 양의 상관관계가 있다는 것을 보여주었다. (도 7C).

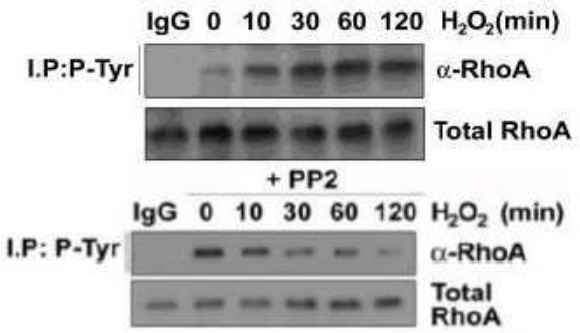
[0124] 본원에서 활성산소 ROS 자극에 대한 또다른 전자 인자인 NF-κB의 새로운 활성화 매카니즘을 밝혔다: 활성산소(H_2O_2) -> Src -> p-Vav2/p-Tyr42 RhoA -> p-Tyr42 RhoA-GTP ->IKKβ/p-Tyr42 oxRhoA-GTP/ IKKγ 복합체 -> p-IκB/분해 -> NF-κB 활성화 -> 세포 증식/종양생성(도. 7D). 환자 유래의 몇몇 암 조직에서 p-Tyr42 Rho가 확연히 관찰되었으며, p-Tyr42 Rho는 유방암 단계에 따라 증가하였다(도 7). 따라서 p-Tyr42 Rho 수준을 검출함으로써 유방암 단계를 진단할 수 있으며, 이는 암 치료제 개발에도 도움이 될 것이다.

[0126] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

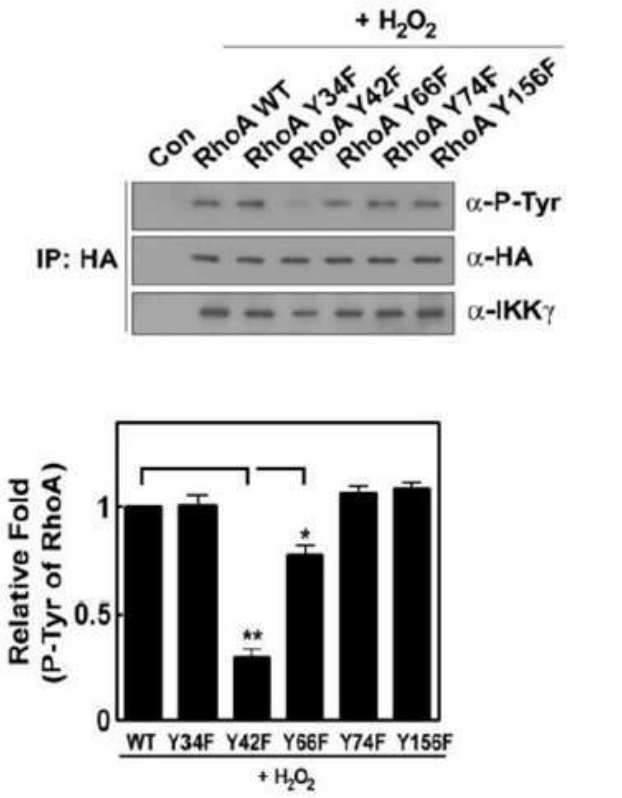
[0127] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

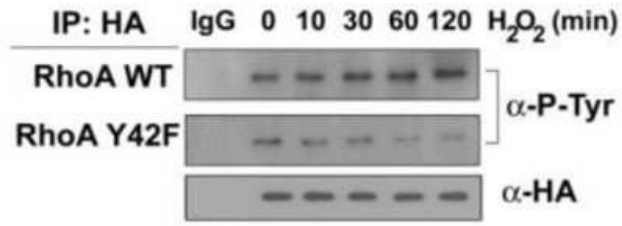
도면1a



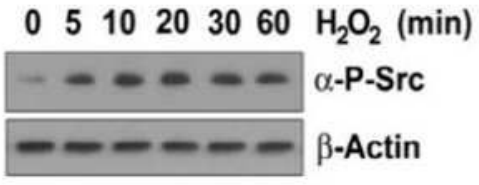
도면1b



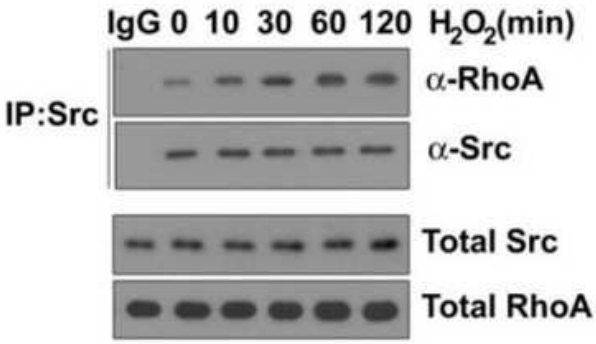
도면1c



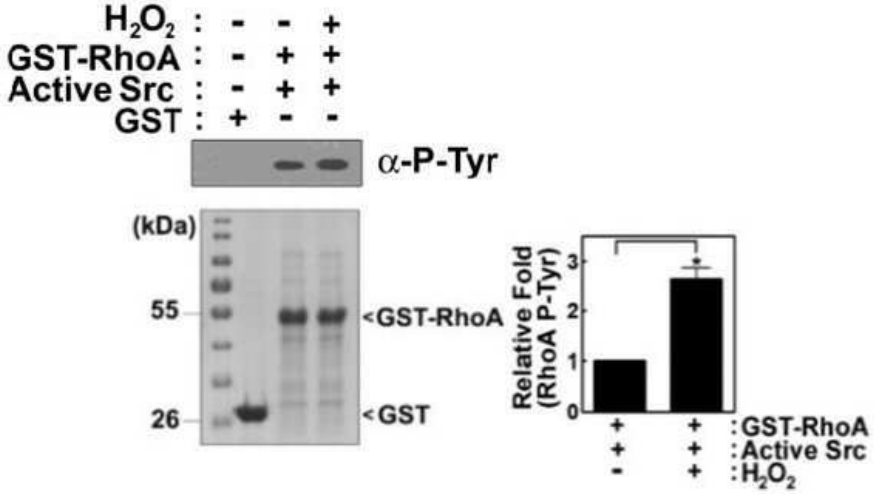
도면1d



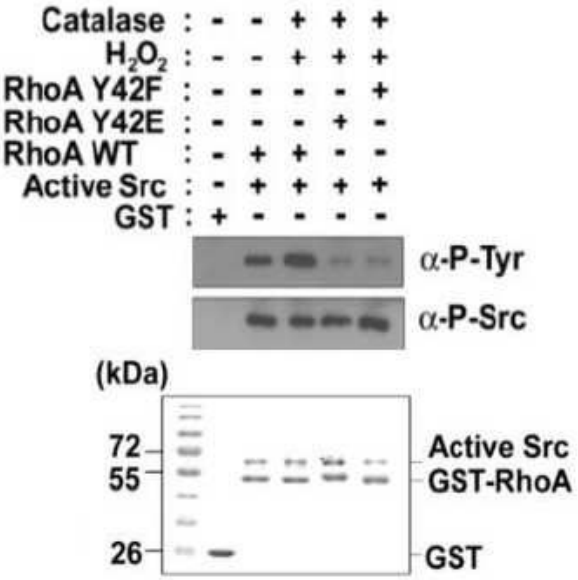
도면1e



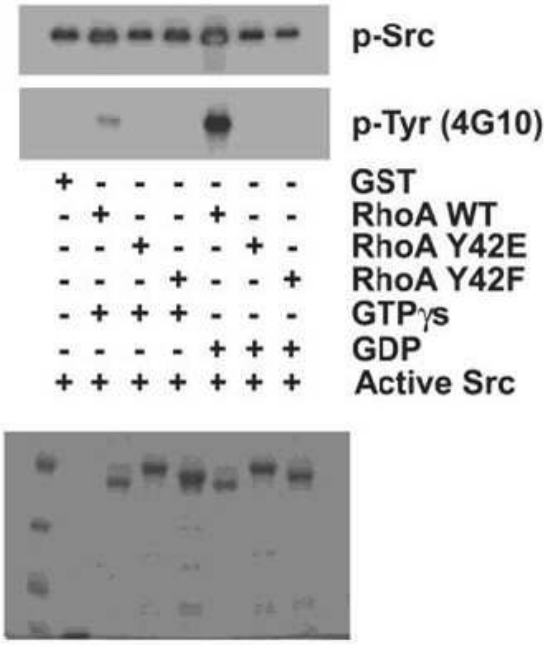
도면1f



도면1g

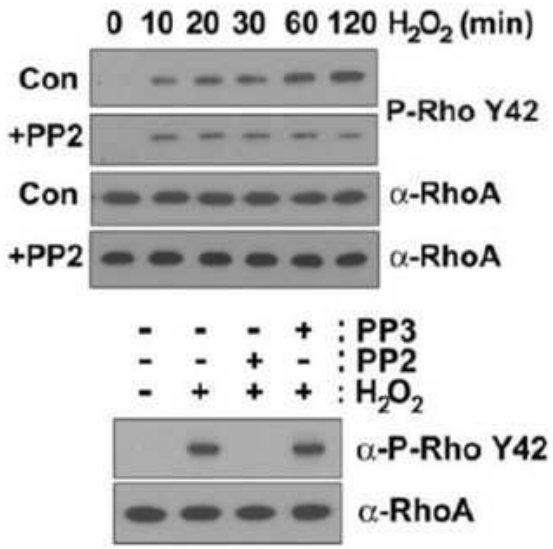


도면1h

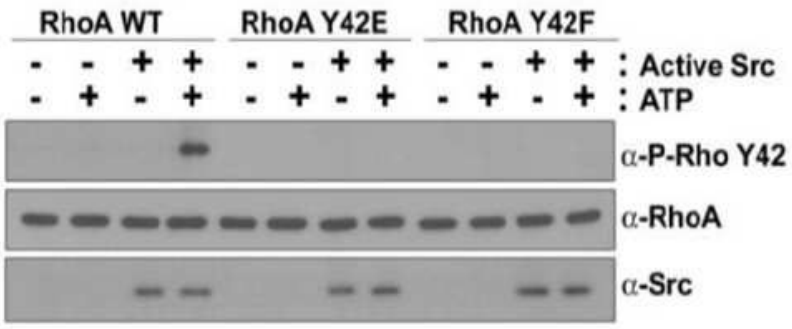


도면1i

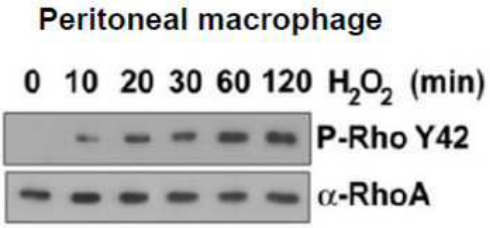
도면1j



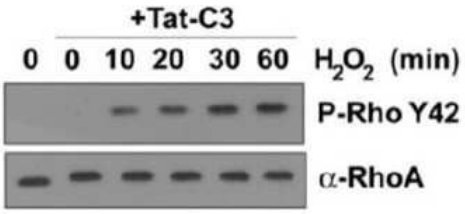
도면1k



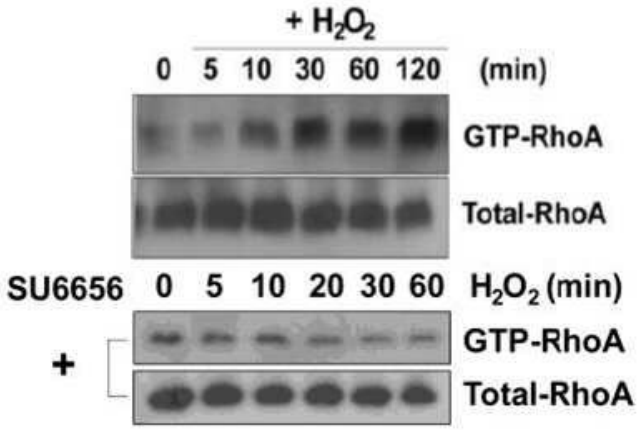
도면1l



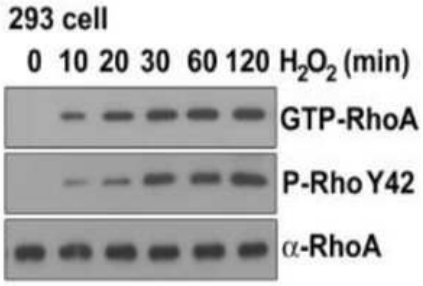
도면1m



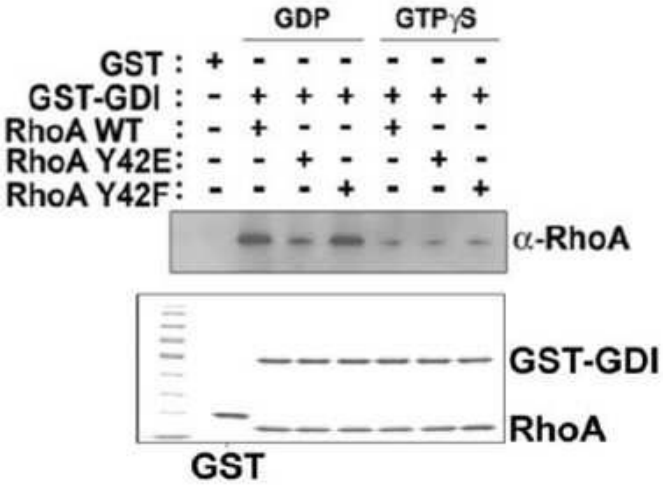
도면2a



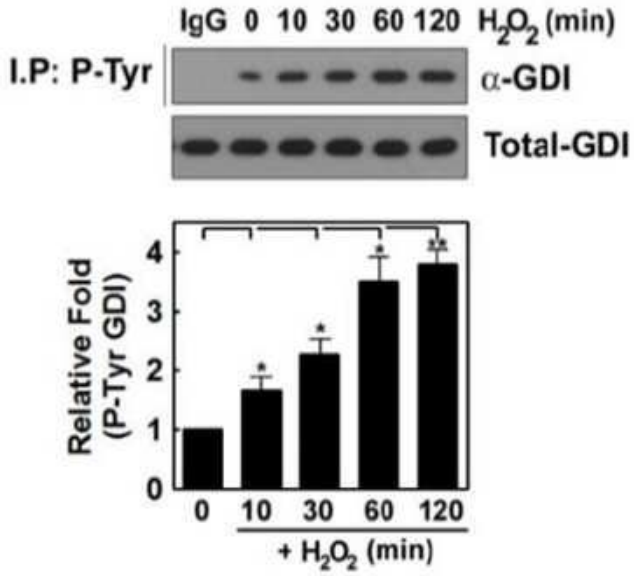
도면2b



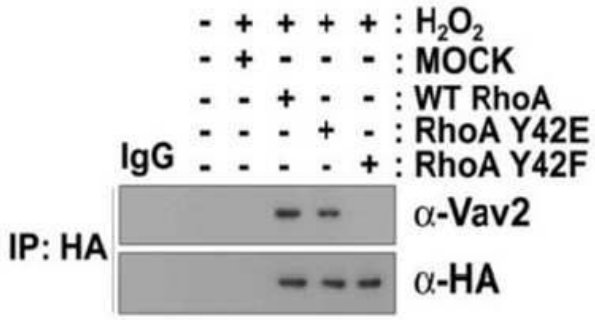
도면2c



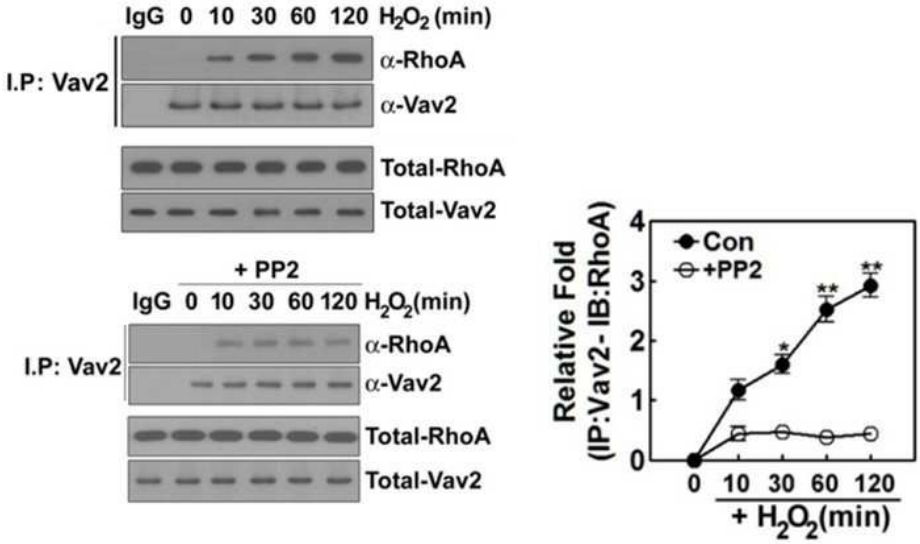
도면2d



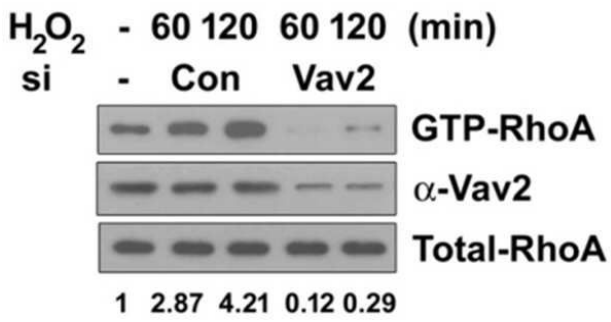
도면2e



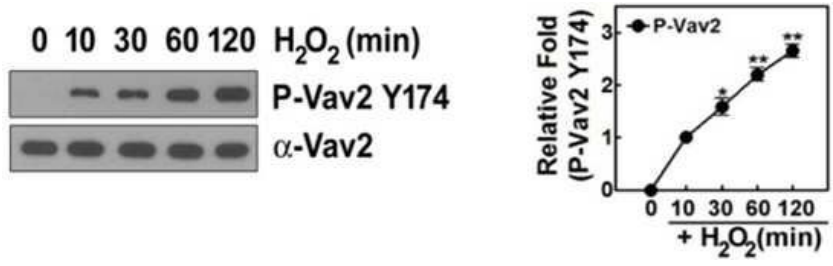
도면2f



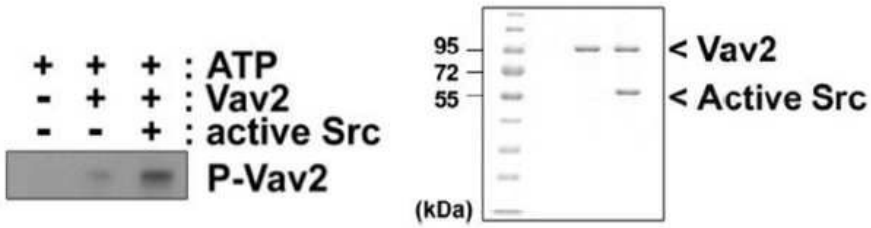
도면2g



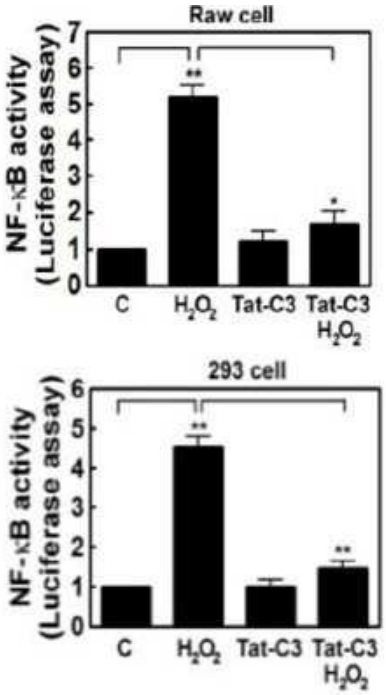
도면2h



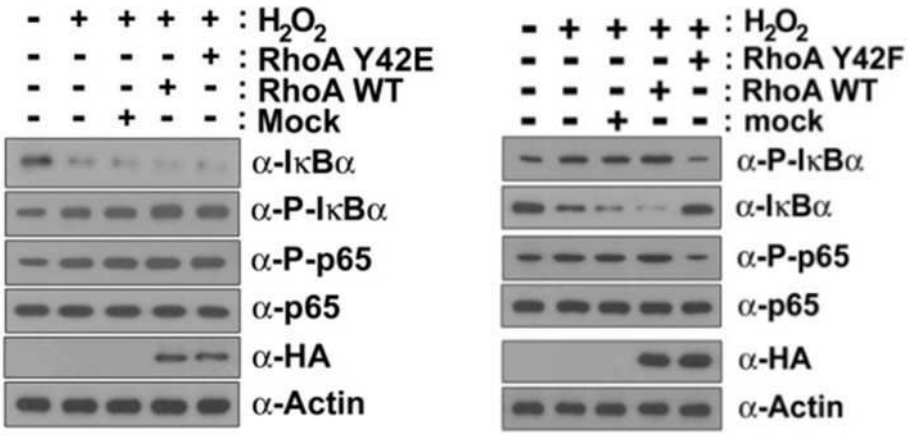
도면2i



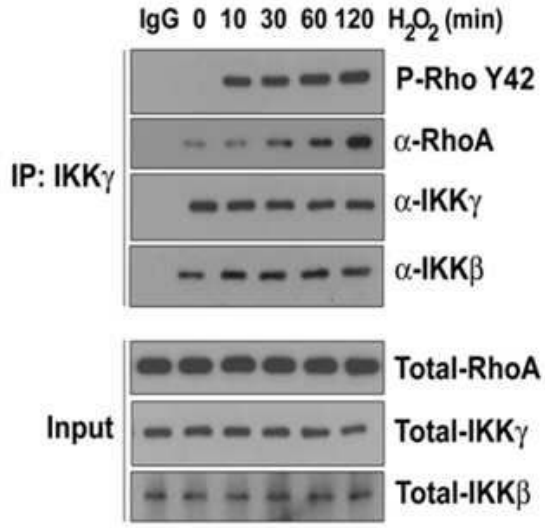
도면3a



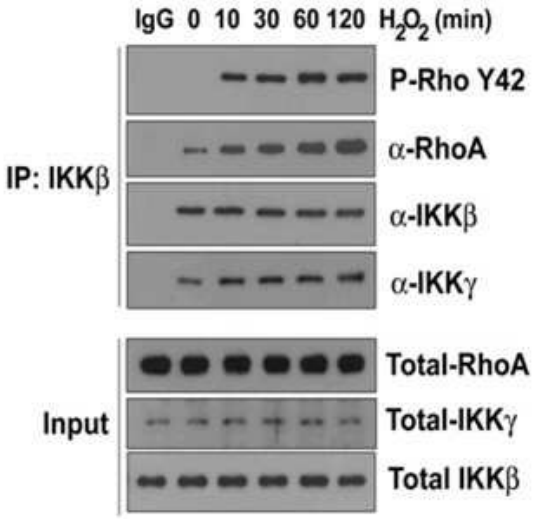
도면3b



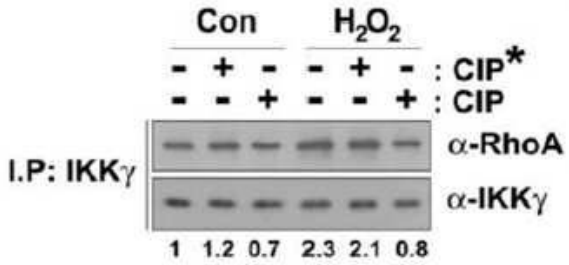
도면3c



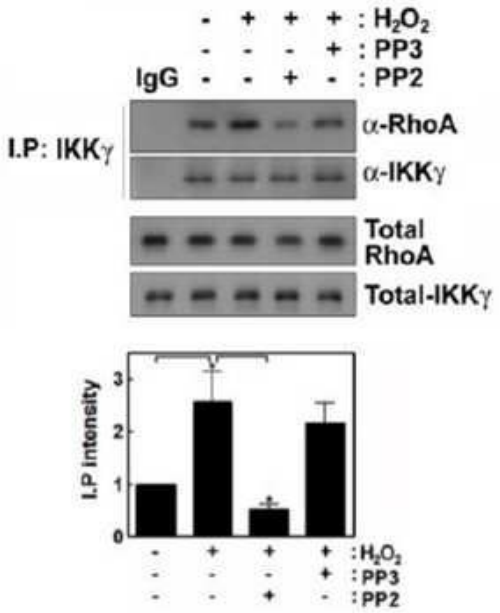
도면3d



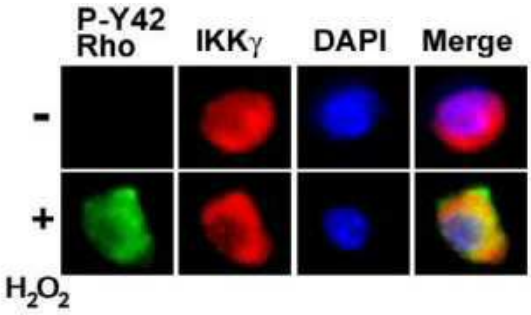
도면3e



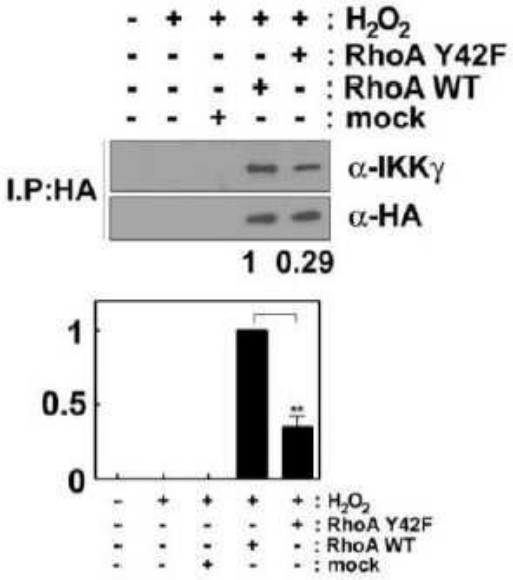
도면3f



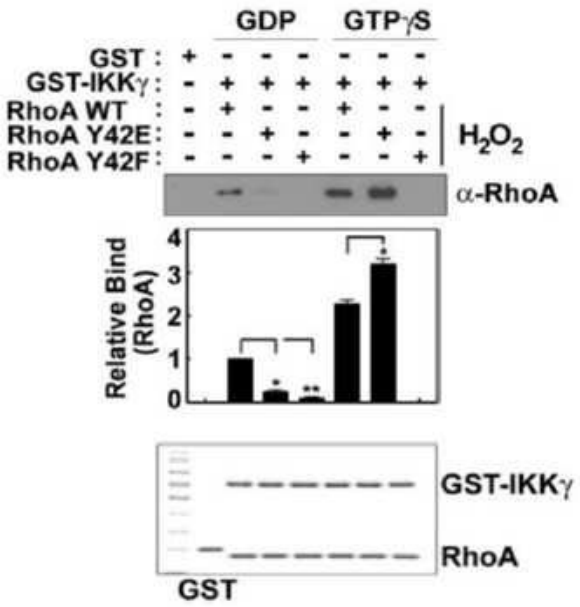
도면3g



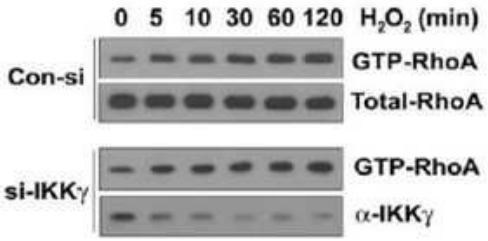
도면3h



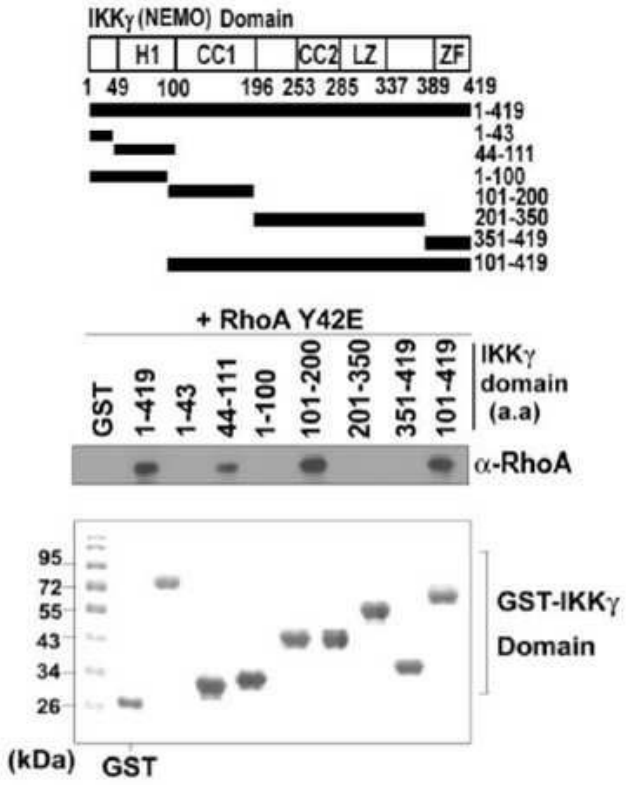
도면3i


GDP
GTPγS
GST :
GST-IKKγ :
RhoA WT :
RhoA Y42E :
RhoA Y42F :
H2O2
α-RhoA
Relative Bind (RhoA)
GST-IKKγ
RhoA
GST

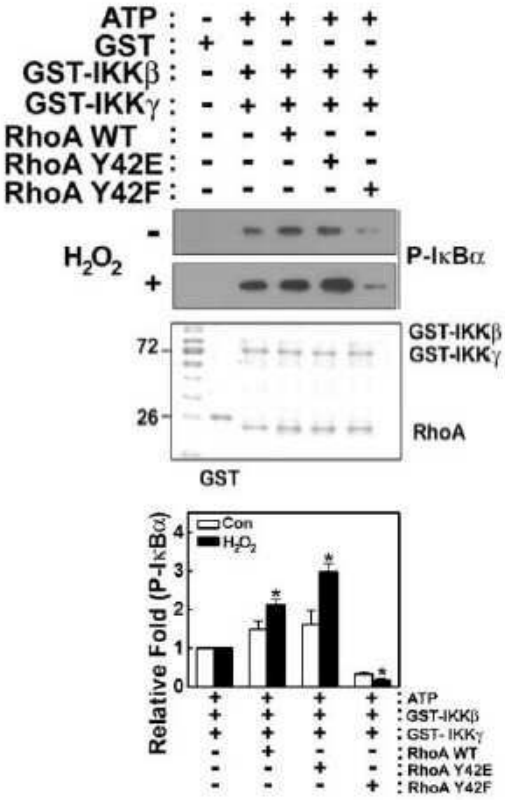
도면3j


0 5 10 30 60 120 H2O2 (min)
Con-si
GTP-RhoA
Total-RhoA
si-IKKγ
GTP-RhoA
α-IKKγ

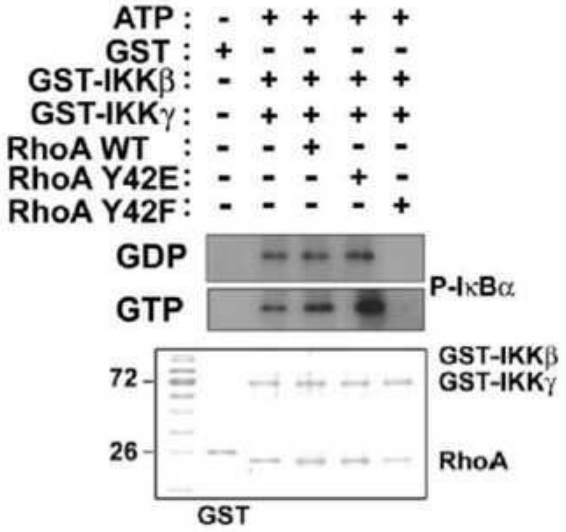
도면4a


IKKγ (NEMO) Domain
H1
CC1
CC2
LZ
ZF
1 49 100 196 253 285 337 389 419
1-419
1-43
44-111
1-100
101-200
201-350
351-419
101-419
+ RhoA Y42E
GST
1-419
1-43
44-111
1-100
101-200
201-350
351-419
101-419
IKKγ domain (a.a)
α-RhoA
95
72
55
43
34
26
(kDa)
GST
GST-IKKγ Domain

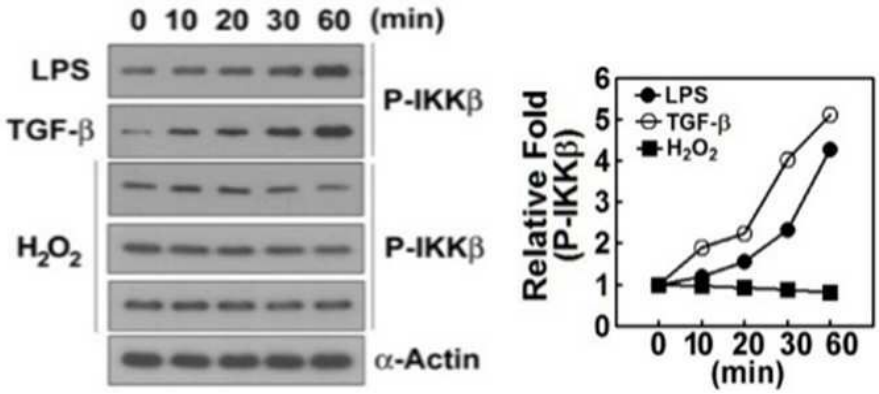
도면4b


ATP
GST
GST-IKKβ
GST-IKKγ
RhoA WT
RhoA Y42E
RhoA Y42F
H2O2
P-IκBα
72
26
GST-IKKβ
GST-IKKγ
RhoA
GST
Relative Fold (P-IκBα)
Con
H2O2
ATP
GST-IKKβ
GST-IKKγ
RhoA WT
RhoA Y42E
RhoA Y42F

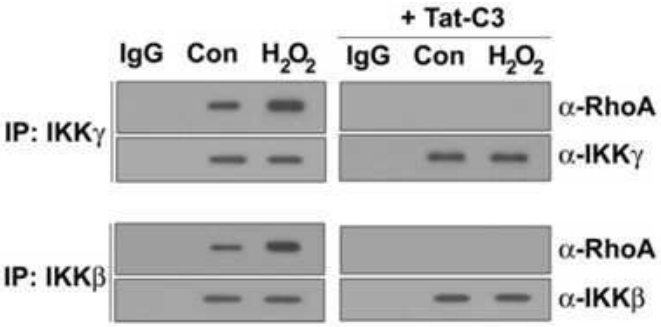
도면4c



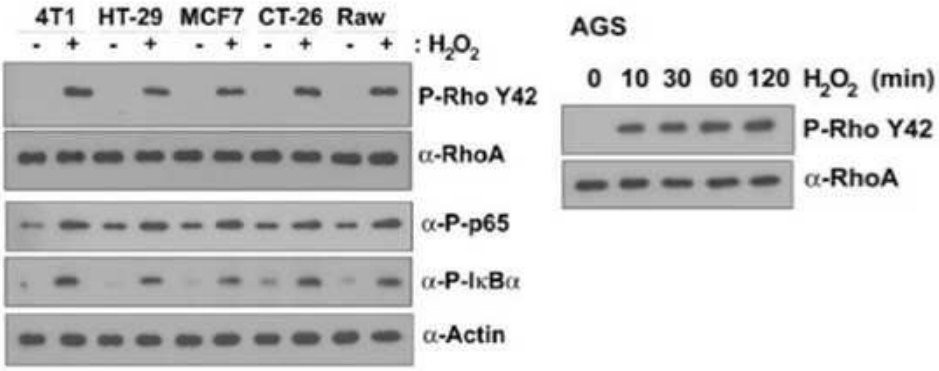
도면4d



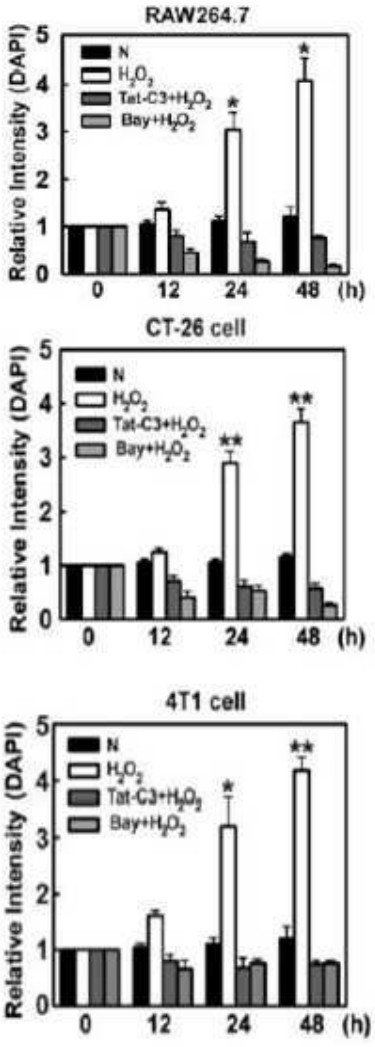
도면4e



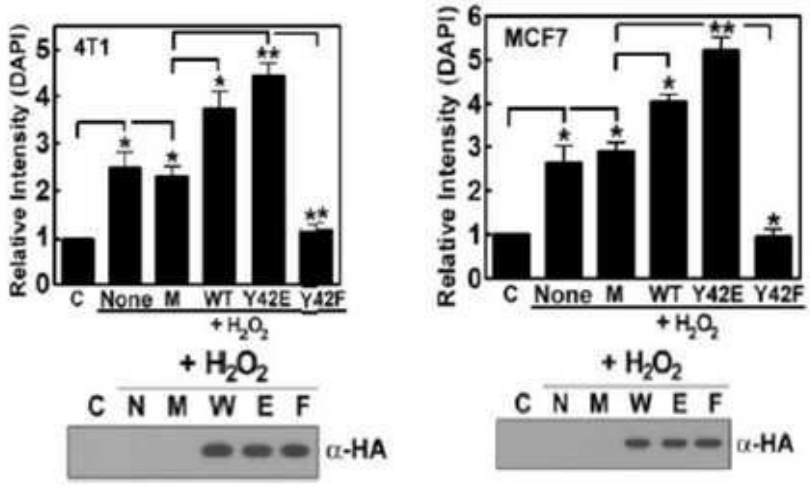
도면5a


4T1 HT-29 MCF7 CT-26 Raw
- + - + - + - + - + : H2O2
P-Rho Y42
α-RhoA
α-P-p65
α-P-IκBα
α-Actin
AGS
0 10 30 60 120 H2O2 (min)
P-Rho Y42
α-RhoA

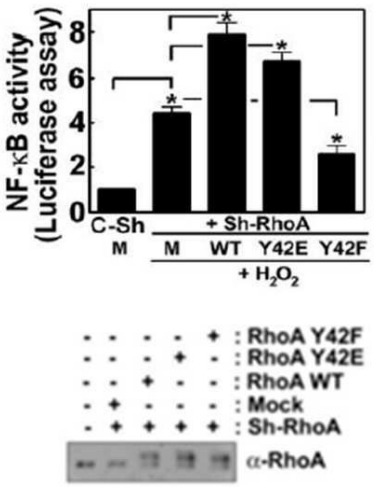
도면5b


RAW264.7
CT-26 cell
4T1 cell
Relative Intensity (DAPI)
N
H2O2
Tat-C3+H2O2
Bay+H2O2
0 12 24 48 (h)

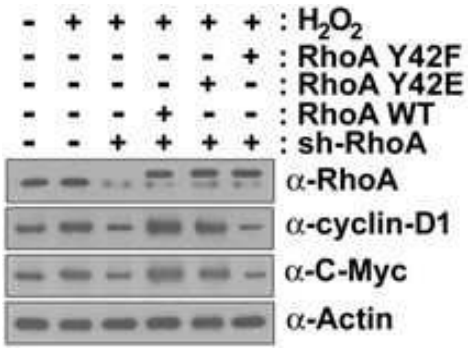
도면5c



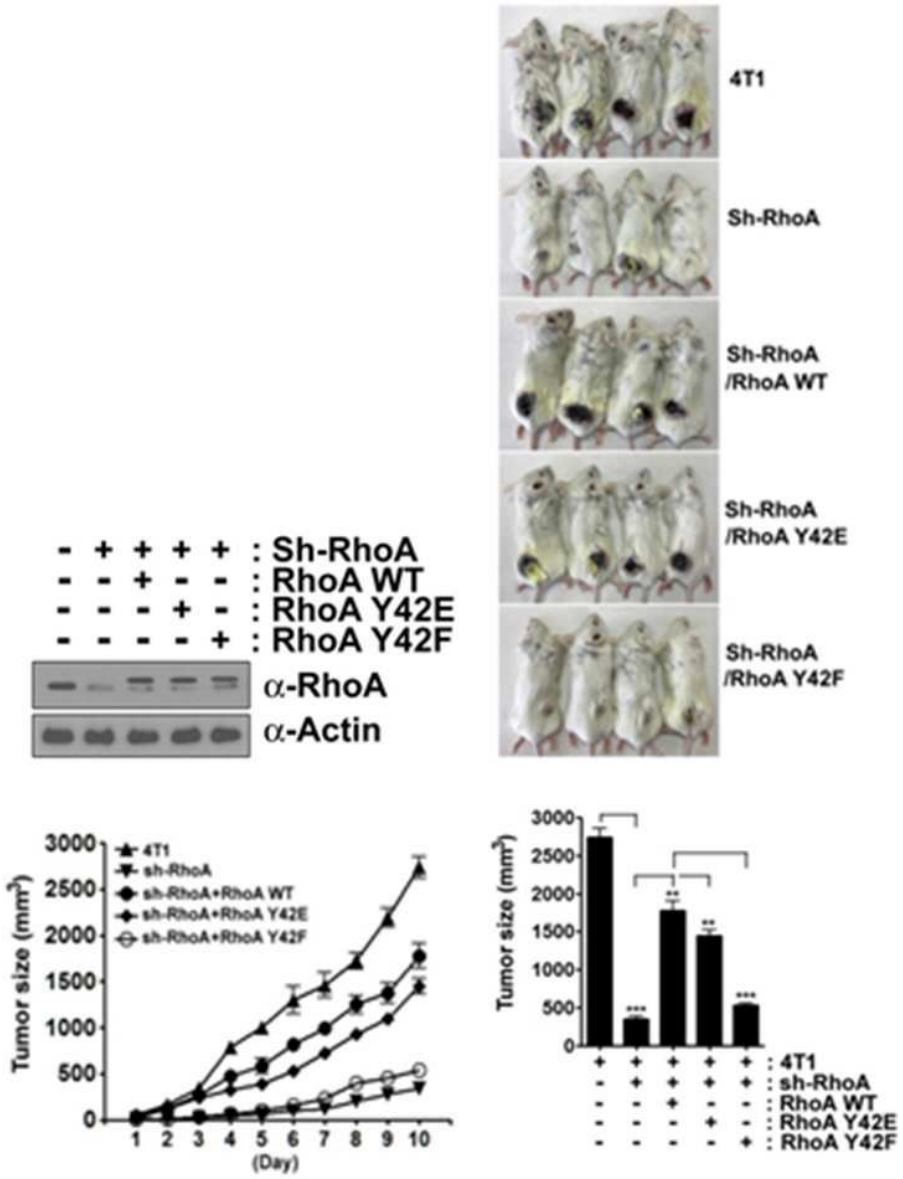
도면5d



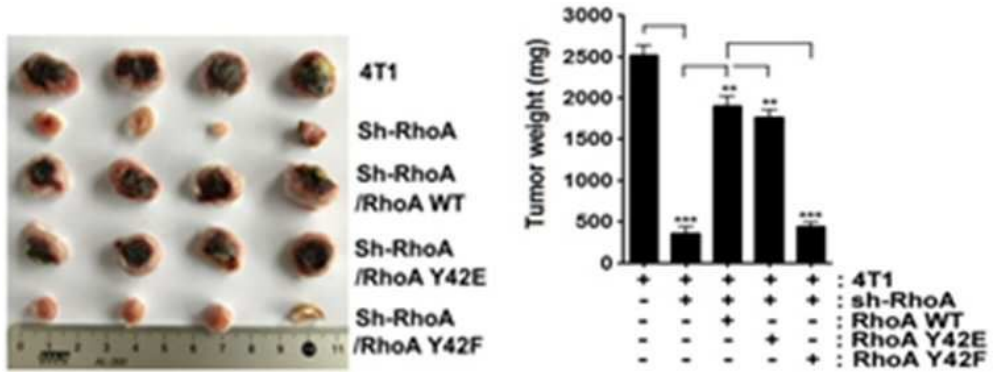
도면5e



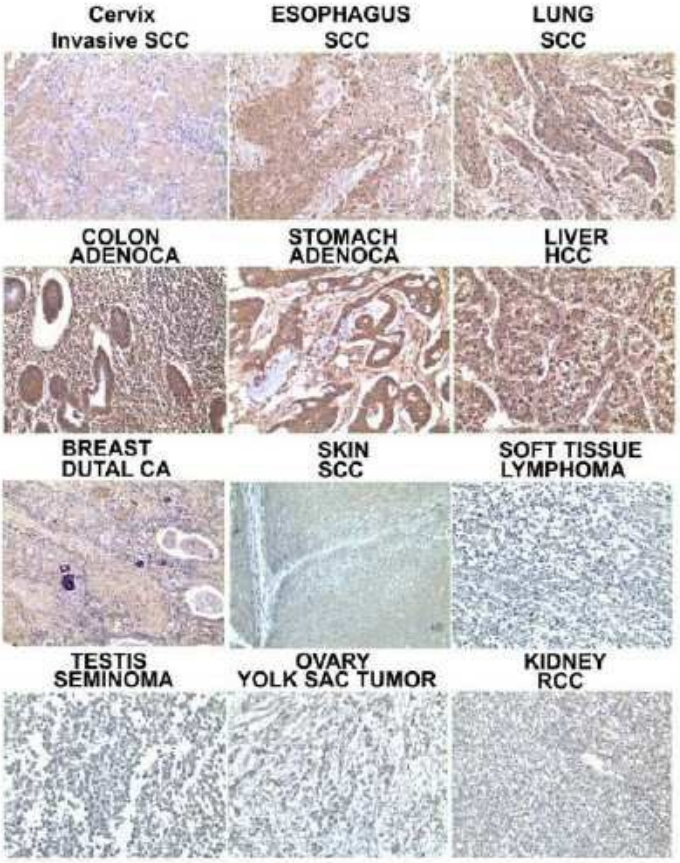
도면6a


4T1
Sh-RhoA
Sh-RhoA /RhoA WT
Sh-RhoA /RhoA Y42E
Sh-RhoA /RhoA Y42F
- + + + + : Sh-RhoA
- - + - - : RhoA WT
- - - + - : RhoA Y42E
- - - - + : RhoA Y42F
α-RhoA
α-Actin
Tumor size (mm³)
(Day)
4T1
sh-RhoA
sh-RhoA+RhoA WT
sh-RhoA+RhoA Y42E
sh-RhoA+RhoA Y42F
: 4T1
: sh-RhoA
: RhoA WT
: RhoA Y42E
: RhoA Y42F

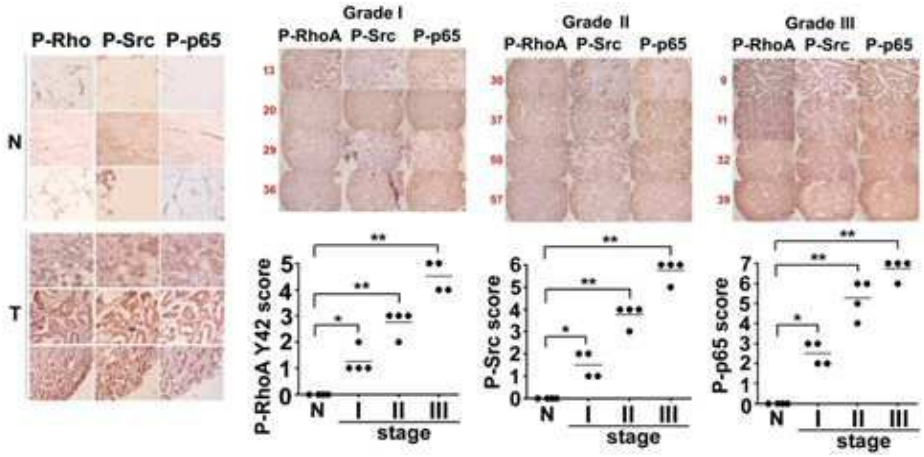
도면6b


4T1
Sh-RhoA
Sh-RhoA /RhoA WT
Sh-RhoA /RhoA Y42E
Sh-RhoA /RhoA Y42F
Tumor weight (mg)
: 4T1
: sh-RhoA
: RhoA WT
: RhoA Y42E
: RhoA Y42F

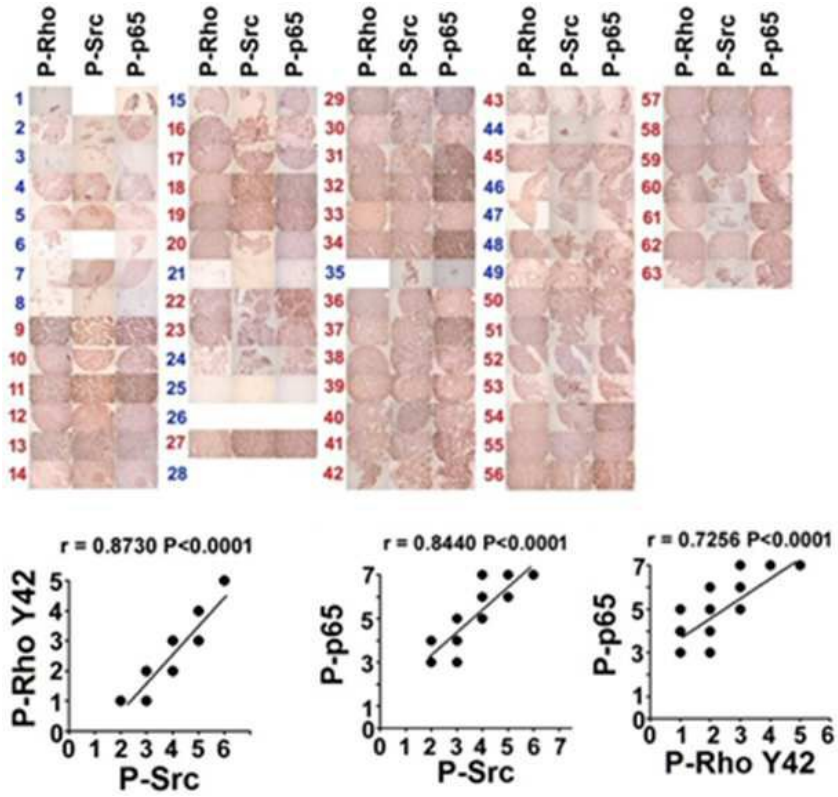
도면7a


Cervix
Invasive SCC
ESOPHAGUS
SCC
LUNG
SCC
COLON
ADENOCA
STOMACH
ADENOCA
LIVER
HCC
BREAST
DUTAL CA
SKIN
SCC
SOFT TISSUE
LYMPHOMA
TESTIS
SEMINOMA
OVARY
YOLK SAC TUMOR
KIDNEY
RCC

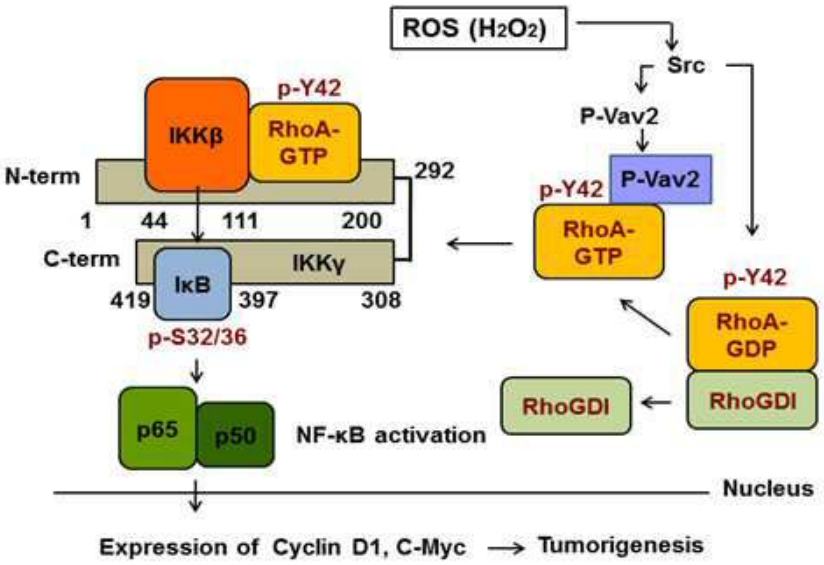
도면7b


P-Rho P-Src P-p65
N
T
Grade I
P-RhoA P-Src P-p65
Grade II
P-RhoA P-Src P-p65
Grade III
P-RhoA P-Src P-p65
P-RhoA Y42 score
P-Src score
P-p65 score
N I II III
stage

도면7c



도면7d



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Use of phosphorylated RhoA for diagnosing Solid Tumors

<130> DP201603004P

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 193

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(193)

<223> RhoA

<220><221> SITE

<222> (42)

<223> Phosphorylation residue

<400> 1

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15

Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
20 25 30

Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45

Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro

85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg
115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly
130 135 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser

145 150 155 160

Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
165 170 175
Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val
180 185 190
Leu

<210> 2
<211> 196
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(196)
<223> RhoB
<220><221> SITE
<222> (42)
<223> Phosphorylation residue
<400> 2
Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Val Val Gly Asp Gly Ala Cys

1 5 10 15
Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Glu Phe Pro Glu
20 25 30
Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45
Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60
Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Val Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
85 90 95
Glu Lys Trp Val Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
100 105 110

Ile Leu Val Ala Asn Lys Lys Asp Leu Arg Ser Asp Glu His Val Arg
115 120 125
Thr Glu Leu Ala Arg Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Thr Asp Asp Gly
130 135 140
Arg Ala Met Ala Val Arg Ile Gln Ala Tyr Asp Tyr Leu Glu Cys Ser

145 150 155 160
Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Thr Ala Thr Arg
165 170 175
Ala Ala Leu Gln Lys Arg Tyr Gly Ser Gln Asn Gly Cys Ile Asn Cys
180 185 190
Cys Lys Val Leu
195

<210> 3
<211> 193
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(193)
<223> RhoC
<220><221> SITE
<222> (42)

<223> Phosphorylation residue
<400> 3
Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
1 5 10 15
Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
20 25 30
Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Ile Ala Asp Ile Glu Val
35 40 45
Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile

65 70 75 80

Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro

85 90 95

Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile

100 105 110

Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Gln Asp Glu His Thr Arg

115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Arg Ser Glu Glu Gly

130 135 140

Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Ser Ala Phe Gly Tyr Leu Glu Cys Ser

145 150 155 160

Ala Lys Thr Lys Glu Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg

165 170 175

Ala Gly Leu Gln Val Arg Lys Asn Lys Arg Arg Arg Gly Cys Pro Ile

180 185 190

Leu