(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0066508
(43) 공개일자 2024년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/57446 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2022-0143845
(22) 출원일자 2022년11월01일
심사청구일자 2022년11월01일

(71) 출원인
숙명여자대학교산학협력단
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
장대영
서울특별시 서초구 서초중앙로 188, C동 702호
김홍태
경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 305동 1904호
김용환
서울특별시 양천구 신목로2길 11, 105동 106호
(74) 대리인
박상훈

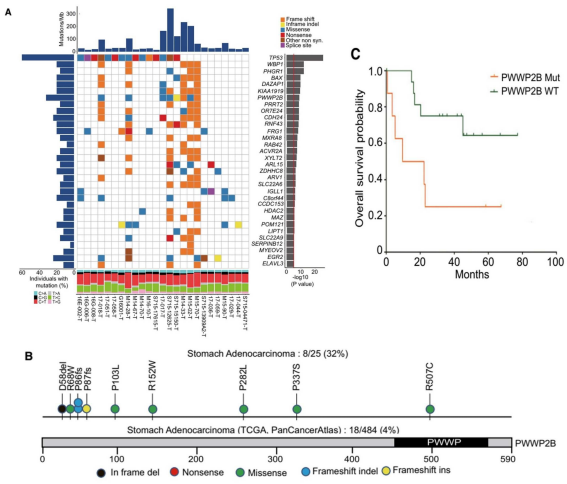
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **PWWP2B 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물, 키트 또는 이를 이용한 정보제공방법을 개시한다. 본 발명에 따른 조성물, 키트 또는 정보제공방법을 이용하여 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 여부를 파악할 수 있고, *PWWP2B* 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있고, 이를 통해 정상인의 것과 대비함으로써 위암 발생 가능성을 진단하거나 이미 위암을 진단받은 환자에게 있어서는 위암의 예후를 예측하는 데 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465035482
과제번호 HA17C0054000022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 국립암센터
연구사업명 암정복추진연구개발사업
연구과제명 위암의 면역치료제 및 표적치료제 효능예측 동반진단법 개발 및 치료가이드라인 확립
기 여 율 0.34/1
과제수행기관명 한림대학교산학협력단
연구기간 2017.12.01 ~ 2022.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711115511
과제번호 2018R1A2B2003129
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 유전자 손상에 의한 BCR-ABL 융합 단백질 생성에 대한 LOC 단백질의 역할 및 만성백혈병 발병에서의 기능적 연관성 연구
기 여 율 0.33/1
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711112814
과제번호 2019R1A2C2089746
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업.중견연구자지원사업.(유형1-2)중견연구
연구과제명 DNA 손상 복구 및 DNA 복제 과정에서 TONSL 복합체의 기능연구
기 여 율 0.132/1
과제수행기관명 숙명여자대학교 산학협력단
연구기간 2019.09.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711153844
과제번호 2014M3C9A2064688
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업.포스트게놈 다부처유전체사업.공동연구
연구과제명 희귀난치성 골격계 발달장애 질환 유발 유전자의 생물학적 기능 연구를 통한 발병기전 규명
기 여 율 0.132/1
과제수행기관명 숙명여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.10.01 ~ 2022.09.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345333952

과제번호 2021R1A6A1A03038890
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 숙명여자대학교 여성건강연구소
기 여 율 0.033/1
과제수행기관명 숙명여자대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2030.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345358405
과제번호 2021R1A6C101A564
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초과학연구역량강화사업
연구과제명 핵심연구지원센터 조성지원과제(만성대사질환연구)
기 여 율 0.033/1
과제수행기관명 숙명여자대학교 산학협력단
연구기간 2021.08.01 ~ 2027.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

PWWP2B 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돌연변이는 하기 (ⅰ) 내지 (ix) 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물:

(ⅰ) PWWP2B 유전자의 845번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 2;

(ii) PWWP2B 유전자의 1519번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 3;

(iii) PWWP2B 유전자의 257번째 염기서열의 C가 중복된 서열 식별번호 4;

(iv) PWWP2B 유전자의 308번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 5;

(v) PWWP2B 유전자의 257번째 염기서열 C가 결실된 서열 식별번호 6;

(vi) PWWP2B 유전자의 202번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 7;

(vii) PWWP2B 유전자의 454번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 8;

(viii) PWWP2B 유전자의 1009번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 10;

(ix) PWWP2B 유전자의 174 내지 176번째 염기서열이 결실된 서열 식별번호 11.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준 측정 제제 또는 상기 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준 측정 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 돌연변이 검출 제제는 상기 *PWWP2B* 유전자 또는 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하고,

상기 mRNA 수준 측정 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하고,

상기 단백질 수준 측정 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 것을 특징으로 하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 키트.

청구항 6

위암 진단 또는 예후 예측용 정보제공방법으로서,

상기 정보제공방법은 피험자의 샘플로부터 *PWWP2B* 유전자를 증폭하는 단계;

상기 증폭된 유전자의 서열을 분석하고 정상인의 유전자 서열과 비교하여 돌연변이 수준을 측정하는 단계;

상기 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및

상기 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 정보 제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 검출 제제 및 *PWWP2B* 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 위암은 세계에서 다섯 번째로 흔한 암이며 전 세계적으로 암 관련 사망의 세 번째 주요 원인이다(비특허문헌 1 참조). 대부분의 위암은 선암종(adenocarcinoma)이며 환경적, 유전적 요인이 발병에 기여한다. 위암의 위치에 따라 헬리코박터균 감염, 흡연, 고염분 섭취, 비만 및 위식도 역류가 위암의 위험인자로 알려져 있다(비특허문헌 2 참조). 그러나, 축적된 증거는 유전적 불안정성 또한 위 종양 형성의 발병에 기여함을 시사한다. 위암에서 일반적으로 알려진 두 가지 유형의 게놈 불안정성(genomic instability)은 미세위성 불안정성 (microsatellite instability, MSI) 및 염색체 불안정성이다. 두 유전적 변화가 반드시 독립적인 것은 아니며 경우에 따라 중첩될 수도 있다(비특허문헌 3 및 4 참조). 높은 수준의 MSI(5-50%)는 인종 그룹 간에 상당한 차이가 있는 다양한 위암에서 확인되었다. MSI는 주로 MMR(mismatch repair) 경로에서 중요한 유전자, 특히 *MLH1* 또는 *MSH2*의 비활성화에 기인한다(비특허문헌 5 및 6 참조). MMR의 결함은 코딩 또는 비코딩 영역에 돌연변이 축적을 유발한다. 위암의 임상 결과는 유전적 변화의 상태에 따라 다르기 때문에 위암에 대한 정의된 분자 분류의 확립이 시급하다. 그러나 두 가지 유형의 위암의 시작 및/또는 진행으로 이어지는 이러한 유전적 또는 후성적(epigenetic) 변화는 크게 알려지지 않은 상태로 남아 있다.

[0003] 유전 물질은 다양한 내적 또는 외적 손상에 의해 구성적으로 도전을 받으며, 적절하게 복구되지 않으면 이로 인한 유전적 병변은 유전자 기능의 손상, 세포 항상성 상실, 게놈 불안정성 및 결국 종양 발생으로 이어진다(비특허문헌 7 및 8 참조). 따라서 세포는 게놈 유지를 위한 효율적인 DNA 손상 반응(DNA damage response; DDR) 및 DNA 복구 경로를 진화시켰다. DNA 손상 유형 중 DNA 이중 가닥 절단(DNA double-strand break; DSB)은 염색체의 물리적 해리로 이어질 수 있기 때문에 치명적인 유형의 DNA 손상이다(비특허문헌 9 참조). DSB를 복구하기 위한 두 가지 주요 경로, 상동 재조합(homologous recombination; HR) 및 비상동말단연결(non-homologous end-joining; NHEJ)이 있다. 그러나 DSB 복구의 경로 선택에 대한 기본 분자 메커니즘은 아직 완전히 이해되지 않았다. Np95 및 ICBP90으로도 알려진 유비퀴틴과 유사하고 PHD 및 RING finger domains1이 있는(ubiquitin-like with PHD and RING finger domains1; UHRF1) E3 유비퀴틴 리가제(E3 ubiquitin ligase)는 DSB 복구의 경로 선택을 조절하는 핵심 요인 중 하나로 보고되었으며, 특히 세포 주기의 S/G2 단계에서 복구를 HR 경로로 일어나게 한다. RIF1은 BRCA1 의존성 HR을 억제하기 위해 G1 단계의 DSB 부위에 축적되는 것으로 나타났다. 인산화된 UHRF1은 BRCA1과의 직접적인 상호작용을 통해 DNA 손상 부위로 모아진 다음 K63가 연결된 RIF1의 유비퀴틴화를 촉매했다. RIF1의 유비퀴틴화는 DSB 사이트에서 53BP1과의 연계의 손실로 이어지고, 이는 차례로 S/G2 단계 동안 HR을 촉진한다고 제안되었다(비특허문헌 10 참조). HR 동안 MRE11-RAD50-NBS1(MRN) 복합체는 먼저 DSB를 인식한 다음 3' 단일 가닥 DNA(ssDNA) 돌출부를 생성하는 DNA 말단 절제를 시작한다. 드러난 ssDNA는 RPA 복합체에 의해 빠르게 결합되며, 이는 RAD51 재조합효소(RAD51 recombinase)에 의해 대체된다. RAD51은 ssDNA에 실려지고 RAD51-ssDNA 핵단백질 필라멘트(nucleoprotein filament)를 형성하여 상동성 검색(homology search) 및 가닥 침입(strand invasion)을 가능하게 한다(비특허문헌 11 참조). DNA 말단 절제(DNA end resection)의 경우, CtIP는 DSB의 부위에 국한되고 MRN 복합체와 결합하는 것으로 나타났다. DSB 부위의 CtIP는 MRN 복합체의 뉴클레아제(nuclease) 활성을 촉진하여 DNA 말단 절제를 촉진한다. 이 과정은 HR 매개 복구의 핵심 단계로 간주된다(비특허문헌 12 참조). UHRF1은 S 단계에서 HR 경로로 복구하도록 하는데 충분한 반면 G2 단계에서는 UHRF1 및 CtIP 모두가 이 과정에 필요한 것으로 나타났다(비특허문헌 10 참조). 그러나 DSB 부위에서 UHRF1 조절에 대한 정확한 분자 기반은 완전히 이해되지 않았다.

[0004] PWWP 도메인은 Royal superfamily 단백질 중 하나이다. PWWP 도메인은 보존된 Pro - Trp - Trp -Pro 모티브의

이름을 따서 명명되었지만 마지막 Pro만 무조건 보존된다. 사람에게서 PWWP 도메인을 포함하는 20개의 단백질이 확인되었다(비특허문헌 13 및 14 참조). 이러한 단백질은 대부분 염색질과 관련되어 있으며 유전자 발현 및/또는 DNA 복구 경로의 조절과 관련이 있다. PWWP 도메인의 구조 분석은 현저한 양전하를 띤 아미노산이 표면에 위치하여 이를 포함한 단백질이 일반적으로 DNA와 결합될 수 있음을 보여주었다(비특허문헌 15 및 16 참조). 또한, 축적된 증거는 PWWP 도메인이 염색질 및 뉴클레오솜의 변형된 상태를 읽는 역할을 한다는 것을 입증했다(비특허문헌 16 내지 18 참조). 많은 PWWP 함유 단백질의 기능은 특성화되어 있지만 PWWP2B 단백질의 분자 및 세포 기능은 크게 알려져 있지 않다. 최근 PWWP2B 단백질은 PWWP2A와 함께 MTA1/2/3, HDAC1/2 및 RBBP4/7과 같은 NuRD 소 단위체(subunit)와 복합체를 형성하여 히스톤 아세틸화 및 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(비특허문헌 19 참조). 그러나 DNA 복구와 관련한 PWWP2B 단백질의 다른 기능적 역할은 아직 결정되지 않았다.

[0005] [비특허문헌]

[0006] 1. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L et al (2017) Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. JAMA Oncol 3: 524 - 548

[0007] 2. Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND, Kamangar F (2014) Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 23: 700 - 713

[0008] 3. Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Sasao S, Kose K, Shima H, Tuncel H, Ueno Y, Ito M, Kitadai Y et al (2004) Chromosomal and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol 19: 756 - 760

[0009] 4. Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature 513: 202

[0010] 5. Falchetti M, Saieva C, Lupi R, Masala G, Rizzolo P, Zanna I, Ceccarelli K, Sera F, Mariani-Costantini R, Nesi G et al (2008) Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. Hum Pathol 39: 925 - 932

[0011] 6. Haron NH, Hanif EAM, Abdul MR, Manaf JAY, Harun R, Mohamed R, Mohamed I (2019) Microsatellite instability and altered expressions of MLH1 and MSH2 in gastric cancer. Asian Pac J Cancer Prev 20: 509 - 517

[0012] 7. Mills KD, Ferguson DO, Alt FW (2003) The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. Immunol Rev 194: 77 - 95

[0013] 8. Lee S et al (2016) A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice. Nat Commun 7: 10201

[0014] 9. Aparicio T, Baer R, Gautier J (2014) DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. DNA Repair 19: 169 - 175

[0015] 10. Zhang H, Liu H, Chen Y, Yang XU, Wang P, Liu T, Deng M, Qin BO, Correia C, Lee S et al (2016) A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice. Nat Commun 7: 10201

[0016] 11. Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. Nat Rev Mol Cell Biol 20: 698 - 714

[0017] 12. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. Nature 450: 509 - 514

[0018] 13. Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP (2003) The Tudor domain 'Royal Family': tudor, plant agenet, chromo, PWWP and MBT domains. Trends Biochem Sci 28: 69 - 74

[0019] 14. Qin S, Min J (2014) Structure and function of the nucleosome-binding PWWP domain. Trends Biochem Sci 39: 536 - 547

[0020] 15. Qiu C, Sawada K, Zhang X, Cheng X (2002) The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNAbinding folds. Nat Struct Mol Biol 9: 217

[0021] 16. Eidahl JO, Crowe BL, North JA, McKee CJ, Shkriabai N, Feng L, Plumb M, Graham RL, Gorelick RJ, Hess S et al (2013) Structural basis for highaffinity binding of LEDGF PWWP to mononucleosomes. Nucleic Acids Res 41: 3924 - 3936

[0022] 17. Qiu YU, Zhang W, Zhao C, Wang Y, Wang W, Zhang J, Zhang Z, Li G, Shi Y, Tu X et al (2012) Solution structure of the Pdp1 PWWP domain reveals its unique binding sites for methylated H4K20 and DNA. Biochem J 442: 527 - 538

[0023] 18. van Nuland R, van Schaik FM, Simonis M, van Heesch S, Cuppen E, Boelens R, Timmers HM, van Ingen H (2013) Nucleosomal DNA binding drives the recognition of H3K36-methylated nucleosomes by the PSIP1-PWWP domain. Epigenetics Chromatin 6: 12

[0024] 19. Zhang T, Wei G, Millard CJ, Fischer R, Konietzny R, Kessler BM, Schwabe JW, Brockdorff N (2018) A variant NuRD complex containing PWWP2A/B excludes MBD2/3 to regulate transcription at active genes. Nat Commun 9: 3798

[0025] 20. Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv https://doi.org/10.48550/arXiv.1303.3997 [PREPRINT]

[0026] 21. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics 25: 2078 - 2079

[0027] 22. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M et al (2011) A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat Genet 43: 491

[0028] 23. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G (2013) Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat Biotechnol 31: 213

[0029] 24. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F (2016) The ensembl variant effect predictor. Genome Biol 17: 122

[0030] 25. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA et al (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature 499: 214

[0031] 26. Ng PC, Henikoff S (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res 31: 3812 - 3814

[0032] 27. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 7: 248 - 249

[0033] 28. Cingolani P, Platts A, le Wang L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. Fly 6: 80 - 92

[0034] 29. Gunn A, Bennardo N, Cheng A, Stark JM (2011) Correct end use during end joining of multiple chromosomal double strand breaks is influenced by repair protein RAD50, DNA-dependent protein kinase DNA-PKcs, and transcription context. J Biol Chem 286: 42470 - 42482

[0035] 30. Zhou Y, Caron P, Legube G, Paull TT (2014) Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. Nucleic Acids Res 42: e19

[0036] 31. Tian Y, Paramasivam M, Ghosal G, Chen D, Shen XI, Huang Y, Akhter S, Legerski R, Chen J, Seidman M et al (2015) UHRF1 contributes to DNA damage repair as a lesion recognition factor and nuclease scaffold. Cell Rep 10: 1957 - 1966

[0037] [특허문헌]

[0038] 1. 한국 등록특허 제10-1999895호 (2019.07.08.)

[0039] 2. 한국 공개특허 제10-2022-0052296호 (2022.04.27.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0040] 이에 본 발명자들은 상기와 같이 PWWP2B 단백질의 DNA 복구와 관련된 기능을 확인하는 일련의 실험의 결과로써, *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 및 *PWWP2B* 유전자의 발현 저하가 DNA 복구에 문제를 일으켜 위암 발생 및 위암 예후 악화에 영향을 줄 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0041] 따라서, 본 발명의 목적은 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이를 검출하거나 *PWWP2B* 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 위암을 진단하거나 위암의 예후를 예측할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

[0042] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용한 위암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0043] 본 발명의 또 다른 목적은 위암 진단 또는 예후 예측용 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0044] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0045] 또한 상기 돌연변이는 (ⅰ) PWWP2B 유전자의 845번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 2; (ⅱ) PWWP2B 유전자의 1519번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 3; (ⅲ) PWWP2B 유전자의 257번째 염기서열의 C가 중복된 서열 식별번호 4; (ⅳ) PWWP2B 유전자의 308번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 5; (ⅴ) PWWP2B 유전자의 257번째 염기서열 C가 결실된 서열 식별번호 6; (ⅵ) PWWP2B 유전자의 202번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 7; (ⅶ) PWWP2B 유전자의 454번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 8; (ⅷ) PWWP2B 유전자의 1009번째 염기서열이 C에서 T로 치환된 서열 식별번호 10; (ⅸ) PWWP2B 유전자의 174 내지 176번째 염기서열이 결실된 서열 식별번호 11 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0046] 또한 상기 조성물은 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준 측정 제제 또는 상기 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준 측정 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0047] 또한 상기 돌연변이 검출 제제는 상기 *PWWP2B* 유전자 또는 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하고, 상기 mRNA 수준 측정 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하고, 상기 단백질 수준 측정 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0048] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0049] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 위암 진단 또는 예후 예측용 정보제공방법으로서 상기 정보제공방법은 피험자의 샘플로부터 *PWWP2B* 유전자를 증폭하는 단계; 상기 증폭된 유전자의 서열을 분석하고 정상인의 유전자 서열과 비교하여 돌연변이 수준을 측정하는 단계; 상기 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 상기 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 정보제공방법을 제공한다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에 따른 조성물, 키트 또는 정보제공방법을 이용하여 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 여부를 파악할 수 있고, *PWWP2B* 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있고, 이를 통해 정상인의 것과 대비함으로써 위암 발생 가능성을 진단하거나 이미 위암을 진단받은 환자에게 있어서는 위암의 예후를 예측하는 데 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 실시예에서 위암 환자의 샘플을 대상으로 전장 엑솜 시퀀싱을 수행하여 돌연변이 분포 및 전체 생존기간을 분석한 결과를 나타내는 도면,

도 2는 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 및 UHRF1의 결합 여부를 확인한 실험 결과를 나타내는 사진 및 도식,

도 3은 본 발명의 실시예에서 레이저 미세조사 후 PWWP2B 및 UHRF1의 결합 여부에 따른 DNA 손상 부위로의 이동을 확인한 결과를 나타내는 사진 및 그래프,

도 4는 본 발명의 실시예에서 IR 처리한 Hela 세포를 이용한 PWWP2B의 DSB 복구 기능을 확인한 결과를 나타내는 그래프 및 사진,

도 5는 본 발명의 실시예에서 HR 동안 말단 절제에 기능함을 확인한 결과를 나타내는 그래프, 도식 및 사진,

도 6은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 및 MRE11의 상호작용을 확인한 결과를 나타내는 사진 및 그래프,

도 7은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 및 UHRF1이 DDR 및 HR 매개 DSB 복구에 있어 상위성이 있음을 확인한 결과를 나타내는 그래프 및 사진,

도 8은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 및 UHRF1의 결합 영역을 확인하기 위해 일련의 결실 돌연변이에 GST 풀다운을 수행한 결과를 나타내는 사진,

도 9는 본 발명의 실시예에서 UHRF1과 결합하는 PWWP2B의 핵심 영역을 나타낸 도식 및 사진,

도 10은 본 발명의 실시예에서 Fok1- 유도 DNA 이중 가닥 손상에 PWWP2B가 이동하는 것을 나타낸 사진

도 11은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 고갈에 따른 DNA 손상에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 siRNA로 형질 주입되고 IR 처리된 HeLa 세포에서 시간 별 γH2AX foci의 수를 나타낸 그래프,

도 12는 본 발명의 실시예에서 PWWP2B의 상동 재조합에서의 역할을 확인한 결과를 나타낸 사진 및 그래프,

도 13은 본 발명의 실시예에서 S기에 DNA 손상 부위로 이동하는 GFP-PWWP2B를 나타내는 사진 및 그래프,

도 14는 본 발명의 실시예에서 티미딘 블록 방법을 사용하여 세포 주기를 일치시키는 실험 방법을 도식화한 그림 및 세포 주기를 나타내는 그래프,

도 15는 본 발명의 실시예에서 미세조사로 유도된 RAD51, BRCA1 및 53BP1 foci 형성의 면역형광 분석 결과를 나타낸 그래프 및 사진,

도 16은 본 발명의 실시예에서 siRNA-resistant PWWP2B 발현 벡터의 적용 결과를 나타내는 도식 및 사진,

도 17은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B가 고갈된 세포에서 미세조사로 유도된 ubiquitin, MDC1, γH2AX 및 RAP80 foci 형성을 나타낸 그래프 및 사진,

도 18은 본 발명의 실시예에서 IR 노출 시간에 따른 RPA 인산화 결과를 나타낸 사진,

도 19는 본 발명의 실시예에서 PWWP2B 고갈이 DNA 손상 반응에 미치는 영향을 나타낸 사진,

도 20은 본 발명의 실시예에서 PWWP2B의 기능이 UHRF1에 의해 조절됨을 나타내는 그래프 및 사진,

도 21은 PWWPW2B 및 UHRF1의 상위성 분석 결과를 나타낸 사진 및 그래프 및

도 22는 RAD51 foci 형성 및 세포 생존에 있어 PWWP2B의 일련의 결실 돌연변이가 미치는 영향을 나타낸 사진 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선

의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예의 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0054] 상술한 바와 같이 본 발명자들은 DNA 복구와 관련된 *PWWP2B* 유전자의 역할을 하기 실시예들을 통해 확인하였고, *PWWP2B* 유전자가 돌연변이를 갖거나 *PWWP2B* 유전자의 발현이 저하되면 DNA 복구에 문제가 발생하여 위암에 걸릴 가능성이 높고, 위암의 예후가 악화될 수 있음을 확인하고 본 발명에 이르게 되었다.

[0055] 따라서 본 발명은 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 조성물을 개시한다.

[0056] 본 발명에서, 용어 “돌연변이”는 유전 정보를 담고 있던 유전체에서 여러가지 요인에 의해 적어도 하나 이상의 염기서열이 바뀌는 것을 의미하고, 점 돌연변이(Point mutation)에 해당하는 미스센스 돌연변이(Missense mutation) 및 넌센스 돌연변이(Nonsense mutation), 프레임 이동 돌연변이(Frameshift mutation)에 해당하는 삽입 돌연변이(Insertion) 및 결실 돌연변이(Deletion), 염색체 수 이상 돌연변이 등을 모두 포함하는 개념이다.

[0057] 상기 돌연변이 검출 제제는 상기 *PWWP2B* 유전자 또는 상기 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 당 업자가 상기 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이를 검출하는 데 사용 가능한 제제라면 이에 한정되지 않는다.

[0058] 본 발명에 따른 상기 조성물을 사용하여 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 여부를 검출할 때, 당 업계에 널리 공지되어 있는 표적 분자 클로닝, 서열 분석 기술을 이용할 수 있다. 예컨대, DNA 서열분석; 대립유전자-특이적 뉴클레오티드 혼입 검정 및 대립유전자-특이적 프라이머 연장 검정 (예를 들어, 대립유전자-특이적 PCR, 대립유전자-특이적 라이게이션 연쇄 반응 (LCR) 및 갭-LCR)을 비롯한 프라이머 연장 검정; 대립유전자-특이적 올리고뉴클레오티드 혼성화 검정 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드라이게이션 검정); 절단제로부터의 보호를 이용하여 핵산 이중나선 내의 미스매치된 염기를 검출하는 절단 보호 검정; MutS단백질 결합 분석; 변이체 및 야생형 핵산 분자의 이동성을 비교하는 전기영동 분석; 변성-구배 겔 전기영동(DGGE, 예를 들어 문헌 [Myers et al. (1985) Nature 313:495]에서와 같음); 미스매치된 염기 쌍에서의 RNase절단의 분석; 헤테로 이중나선 DNA의 화학적 또는 효소적 절단의 분석; 질량 분광측정법 (예를 들어, MALDITOF); 유전적 비트 분석 (GBA); 5' 뉴클레아제 검정 (예를 들어, 택맨(TaqMan); 및 분자 비콘을 사용하는 검정으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 기술을 이용할 수 있다.

[0059] 여기서 상기 조성물은 당 업계에 공지된 형광물, 발광물, 미소입자(microparticle), 방사성 동위원소 등의 라벨(label)을 더 포함할 수 있고, 이를 통해 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이를 검출하는 과정에서 상기 돌연변이의 존재 여부를 가시적으로 확인할 수 있다.

[0060] 또한 상기 돌연변이 검출 제제는 상기 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이로 변경된 특정 아미노산 부위에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드 및 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 당 업자가 상기 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이를 검출하는 데 사용 가능한 제제라면 이에 한정되지 않는다.

[0061] 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체, 재조합 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 구체적으로, 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 포함하는 것일 수 있다. 항체 생산은 본 발명이 속하는 분야에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있고, 제조되어 상업적으로 판매되는 항체를 이용할 수 있다.

[0062] 또한 본 발명에 따른 상기 조성물은 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이의 단순 검출보다 나아가서 항원-항체 복합체의 형성을 정량 또는 정성적으로 측정 가능하게 하는 라벨, 면역학적 분석에 사용되는 통상적인 도구, 시약 등을 더 포함할 수 있다.

[0063] 상기 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 β글루쿠로니다제, β글루코시다제, β갈락토시다제, 우레아제, 퍼

옥시다아제, 알칼라인포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈옥시다제와루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트카복실라제, 아스파르테이트아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트데카복실라제, β라타마제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 리간드에는바이오틴 유도체 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 발광물에는 아크리디늄에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 산화환원 분자에는 페로센, 루테늄착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 K_4 $W(CN)^8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[RU(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re 등이 있으며 이로 제한되지 않는다.

[0064] 상기 도구 또는 시약의 예로는 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, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0065] 또한 상기 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이는 이로부터 발현된 PWWP2B 단백질의 아미노산 서열 부위의 특정 돌연변이로 나타날 수 있다. 특히 PWWP2B 단백질의 아미노산 서열 130 내지 317에서의 돌연변이는 후술할 UHRF1 단백질과의 결합 능력이 저하되어 DNA 복구에 문제를 일으킬 수 있고, 또한 아미노산 서열 317 내지 474에서의 돌연변이는 DNA 손상 부위로의 이동이 저하되어 DNA 복구에 문제를 일으킬 수 있으며, 이로 인한 유전체 불안정성은 위암 발생의 가능성을 높일 수 있다.

[0066] 또한 본 발명에 따른 상기 조성물은 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준 측정 제제 또는 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준 측정 제제를 포함할 수 있다.

[0067] 상기 mRNA 수준 측정 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있으나, 당 업자가 상기 mRNA의 수준을 측정하는 데 사용 가능한 제제라면 이에 한정되지 않는다.

[0068] 상기 단백질 수준 측정 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함할 수 있으나, 당 업자가 상기 단백질 수준을 측정하는 데 사용 가능한 제제라면 이에 한정되지 않는다.

[0069] 본 발명에 따른 상기 조성물을 사용하여 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준을 측정할 때, 당 업계에 공지된 기술인 역전사효소 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RTPCR), 실시간 역전사효소 중합효소반응(real time quantitative RTPCR), RNase 보호분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 방법(DNA chip technology)을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 또한 본 발명에 따른 상기 조성물을 사용하여 *PWWP2B* 유전자로부터 발현한 단백질의 수준을 측정할 때, 당 업계에 공지된 기술인 웨스턴블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmuno assay), 방사 면역 확산법(radial immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동 (rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining, IHC 염색), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescence activated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology)을 이용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0071] 본 발명의 다른 과제를 해결하기 위한, 한 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0072] 상기 키트는 상술한 돌연변이 여부 검출, mRNA 수준 측정 또는 단백질 발현 수준 측정에 사용되는 기술에 따라서 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치가 더 포함될 수 있다. 예컨대, mRNA 수준 측정 기술로서 RT-PCR을 사용할 경우, *PWWP2B* 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또

는 프로브 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0073] 본 발명의 또 다른 과제를 해결하기 위한, 다른 양태로서, 본 발명은 피험자의 샘플로부터 *PWWP2B* 유전자를 증폭하는 단계; 상기 증폭된 유전자의 서열을 분석하고 정상인의 유전자 서열과 비교하여 돌연변이 수준을 측정하는 단계; 상기 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계; 및 상기 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 위암 진단 또는 예후 예측용 정보제공방법을 제공한다.

[0074] 상기 정상인의 유전자 서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 같이 유전체 정보가 보관되고 공개되는 데이터베이스를 통해 획득될 수 있고, 여기에 기재되어 있는 *PWWP2B* 유전자의 참조서열(Reference Sequence)이 사용될 수 있다.

[0075] 상기 돌연변이 수준을 측정하는 단계, 상기 mRNA 수준을 측정하는 단계 및 상기 단백질 수준을 측정하는 단계에서 사용되는 제제 및 기술과 관련해서는 상술한 바와 같다.

[0076] 상기 정보제공방법은 피험자의 샘플에 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이가 있으면 피험자가 위암에 걸릴 가능성이 높거나 이미 위암에 걸린 경우 위암의 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있는 정보를 제공할 수 있고, 바람직하게는 상기 돌연변이가 상술한 바와 같이 PWWP2B 단백질의 아미노산서열 130 내지 474에서의 돌연변이일 수 있다.

[0077] 또한 상기 정보제공방법은 피험자의 샘플에서 *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준 또는 *PWWP2B* 유전자로부터 발현한 단백질의 수준이 정상인 대비 저하될 경우 피험자가 위암의 걸릴 가능성이 높거나 이미 위암에 걸린 경우 위암의 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있는 정보를 제공할 수 있다.

[0078] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 상세히 설명한다.

[0080] **실시예 1: 위암 환자의 *PWWP2B* 돌연변이 정도에 따른 생존율 평가**

[0081] 위암을 유발하는 드라이버 유전자를 찾기 위해 위암 환자 샘플에서 게놈 DNA를 수집해 전장 엑솜 시퀀싱을 수행하였고, 여기서 특정한 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 여부에 따른 위암 환자의 생존율을 비교하였다.

[0082] (1) 연구 집단

[0083] 25명의 위암 환자로부터 서면 동의를 받은 후 게놈 DNA를 얻었다. 한국 안양시에 있는 한림 대학교 성심병원 기관심사위원회에서 이 연구를 승인했다(HUSHH IRB No: 2015-I078).

[0084] (2) 전장 엑솜 시퀀싱

[0085] 상기 25명의 위암 환자 샘플을 대상으로 테라젠바이오(성남, 한국)에 의뢰하여전장 엑솜 시퀀싱을 진행하였고, 그 과정에서 생성된 시퀀싱 리드는 "-M" 옵션(비특허문헌 20 참조)과 함께 BWA-MEM(버전 0.7.15)을 사용하여 GRCh37 인간 참조 게놈에 맞추어 정렬되었다. 매핑된 BAM 파일은 samtools (버전 1.6; 비특허문헌 21 참조)를 사용하여 구분 및 색인화되었다. 중복된 리드는 Markduplicates 모듈(http://broadinstitute.github.io/picard)과 함께 Picard(ver.2.9.0)를 사용하여 제거되었다. BaseRecalibrator 및 GATK (Genome Analysis Tool Kit)(버전 3.7, 비특허문헌 22 참조)를 사용하는 PrintReads 모듈을 사용하여 매핑 품질이 재보정되었다. "--disable-read-filter MateOnSameContigOrNoMappedMateReadFilter " 및 "--max - mnp - distance 0" 옵션이 있는 GATK(버전 4.1.0.0)에서 MuTect2(비특허문헌 23 참조)를 사용하여 체세포 단일 뉴클레오티드 변이체(Single-nucleotide variants; SNV) 및 삽입결실 돌연변이가 확인됐다. MuTect2에 의해 식별된 모든 변이는 기본 옵션이 있는 FilterMutectCalls 모듈을 사용하여 필터링되었으며 Ensembl Variants Effect Predictor(버전 92.1; 비특허문헌 24 참조)를 사용하여 주석이 달렸다. MuTect2를 실행할 때 "--panel-of- normals" 옵션을 사용하여 일치하는 정상 샘플이 없는 3개의 종양 샘플의 돌연변이가 필터링 됐다. 22개의 조직 및 혈액 정상 샘플을 기반으로 GATK의 CreateSomaticPanelOfNormals 모듈을 사용하여 정상 패널이 생성됐다. 잠재적인 생식계열 변이체(Germline variant)를 걸러내기 위해 일치하는 정상 샘플이 없는 3개의 샘플에 대해 1000 Genomes 프로젝트와 gnomAD 기반 대립유전자 빈도 차단(gnomAD-based allele frequency cut-off)(AF < 0.001)이 추가로 적용됐다. 드라이버 유전자(driver gene) 감지를 위해 기본 옵션의 MutSigCV (버전 1.41; 비특허문헌 25 참조) 알고리즘을 사용했다. 단백질 서열에서 돌연변이의 잠재적 영향은 SIFT(비특허문헌 26 참조), PolyPhen (비특허문헌 27 참조) 및 SNPEff (비특허문헌 28 참조)에 의해 예측되었다.

[0086] 상기 전장 엑솜 시퀀싱 결과에 MutSigCV 알고리즘을 적용하여 정리한 결과를 도 1A에 나타내었다. 도 1A를 참조하면, 32개의 유전자에서 아미노산 서열을 변경시킬 수 있는 유의미한 돌연변이가 반복적으로 일어난 것을 확인할 수 있다. 그 중 이미 위암 발병에 관련이 있는 것으로 보고된 *TP53, PHGR1, BAX, PRRT2, OR7E24* 및 *CDH24*를 제외하고, 위암과 관련한 역할이 알려지지 않은 유전자 중 돌연변이 빈도가 2 번째로 높은 *PWWP2B* 유전자를 선택하였다.

[0087] 도 1B는 25명의 위암 환자 중 *PWWP2B* 유전자에 발생한 돌연변이의 종류 및 분포를 도식화한 도면이다. 상기 도 1B를 참조하면, 위암 환자 25명 중 상기 *PWWP2B* 유전자에 돌연변이가 발생한 위암 환자는 총 8명이고, 8명의 샘플 내 상기 *PWWP2B* 유전자에서 발생한 돌연변이의 수는 10개이며, 이 중 P86 frame-shift(fs) 돌연변이만 2명의 샘플에서 중복하여 발견되는 것을 알 수 있다.

[0088] 상기 돌연변이의 발생 여부는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 Accession number가 NM_138499 XM_096329인 *PWWP2B* 유전자의 참조서열(Reference Sequence)을 기준으로 판단되었고, 상기 참조서열의 Coding sequence(CDS)는 첨부한 서열목록 전자파일의 서열 식별번호 1에 나타내었으며, 상기 돌연변이가 발생한 8개의 샘플 각각의 구체적인 CDS 염기서열은 첨부한 서열목록 전자파일에 서열 식별번호 2 내지 11에 나타내었다.

[0089] 또한 상기 *PWWP2B* 유전자 및 이로부터 발현된 PWWP2B 단백질에 발생한 돌연변이를 HGVS(Human Genome Variation Society) 명명법에 따라 표기하고, 각 돌연변이의 잠재적 영향을 예측한 결과를 나타낸 하기 표 1을 참조하면, 상기 *PWWP2B* 유전자에서 발생한 9 종류의 돌연변이 중 7종류가 단백질 서열에서 해로운(Deleterious) 변이 또는 큰(High) 영향을 미치는 변이로 예상된다.

표 1

[0090]

Gene	Chr	Start	End	Variants Classification	Reference genotype	Alternative genotype	Sample ID	HGVSc	HGVSp	SIFT	PolyPhen	SNPEff	1KG_AF[1]	gnomAD_AF[2]
PWWP2B	10	134218849	134218849	Missense_Mutation	C	T	17-017-T	c.845C>T	p.Pro282Leu	Deleterious (0.04)	probably_damaging (0.917)	MODERATE	NA	3.414e-05
PWWP2B	10	134219523	134219523	Missense_Mutation	C	T	17-018-T	c.1519C>T	p.Arg507Cys	Deleterious (0)	probably_damaging (0.998)	MODERATE	NA	NA
PWWP2B	10	134218254	134218255	Frame_Shift_Ins	-	C	M14-28-T	c.257dup	p.Pro87SerfsTer93			HIGH	NA	NA
PWWP2B	10	134218312	134218312	Missense_Mutation	C	T	M14-28-T	c.308C>T	p.Pro103Leu	Tolerated (0.19)	Benign (0.007)	MODERATE	NA	NA
PWWP2B	10	134218255	134218255	Frame_Shift_Del	C	-	M14-33-T	c.257del	p.Pro86LeufsTer100			HIGH	NA	NA
PWWP2B	10	134218206	134218206	Missense_Mutation	C	T	M15-02-T	c.202C>T	p.Arg68Trp	Deleterious (0.04)	Benign (0)	MODERATE	NA	2.459e-05
PWWP2B	10	134218458	134218458	Missense_Mutation	C	T	M15-02-T	c.454C>T	p.Arg152Trp	Deleterious (0)	possibly_damaging (0.846)	MODERATE	NA	NA
PWWP2B	10	134218255	134218255	Frame_Shift_Del	C	-	M15-70-T	c.257del	p.Pro86LeufsTer100			HIGH	NA	NA
PWWP2B	10	134219013	134219013	Missense_Mutation	C	T	S715-12625-T	c.1009C>T	p.Pro337Ser	Tolerated (0.05)	probably_damaging (0.999)	MODERATE	NA	NA
PWWP2B	10	134218176	134218178	In_Frame_Del	GAT	-	S715-15150-T	c.174_176del	p.Asp58del			MODERATE	NA	NA

1) Frequency of existing variant in 1000 Genomes
2) Frequency of existing variant in gnomAD exomes combined population

[0091] (3) 생존율과의 상관 관계

[0092] 상기 *PWWP2B* 유전자에 돌연변이가 발생한 위암 환자 그룹과 *PWWP2B* 유전자에 돌연변이가 발생하지 않은 위암 환자 그룹 간의 전체 생존 기간(Overall survival; OS)에 따른 생존율을 비교한 결과를 도 1C에 나타내었고, 위암 환자의 전체 생존 기간에 여러 변수가 미치는 잠재적인 간섭을 조정하기 위해 단변수(univariate) 및 다변수(multivariate) 분석을 수행한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0093]

Variables (*n*)	OS, months		Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Mean[a]	95% CI	HR (95% CI)	*P*	HR (95% CI)	*P*
Sex						
Male (18)	39.3	26.2–52.3	Reference		Reference	
Female (7)	60.3	40.7–80.0	0.45 (0.10–2.08)	0.31	–	–
Age (years)						
≤ 65 (11)	54.7	37.2–72.3	Reference		Reference	
> 65 (14)	39.2	24.3–54.1	1.63 (0.48–5.59)	0.44	–	–
Stage at diagnosis						
≤ Stage III (19)	57.6	44.7–70.5	Reference		Reference	
Stage IV (6)	15.8	4.3–27.3	5.83 (1.63–20.92)	0.007	11.33 (2.07–37.37)	0.003
PWWP2B mutation						
Negative (17)	58.6	45.3–72.0	Reference		Reference	
Positive (8)	24.9	7.0–42.7	4.08 (1.19–14.00)	0.025	5.52 (1.45–20.97)	0.012

[a]The mean value is shown because of the small number of patients.

[0094] 도 1C 및 상기 표 2를 참조하면, *PWWP2B* 유전자에서 돌연변이가 발생하지 않은 그룹의 전체 생존 기간의 평균은 58.6개월인 반면, *PWWP2B* 유전자에서 돌연변이가 발생한 그룹의 전체 생존 기간의 평균은 24.9개월로 돌연변이가 발생하지 않은 그룹 대비 유의하게 짧았다.

[0095] 또한 진단 후 12개월이 경과한 때, *PWWP2B* 유전자에서 돌연변이가 발생하지 않은 그룹의 생존율은 100 %인 반면, *PWWP2B* 유전자에서 돌연변이가 발생한 그룹은 생존율이 50 %였으며, 진단 후 24개월이 경과한 때, *PWWP2B* 유전자에 돌연변이가 발생하지 않은 그룹의 생존율은 75 %인 반면, *PWWP2B* 유전자의 돌연변이가 발생한 그룹의 생존율은 25 %로 유의미한 차이를 보였다.

[0096] (4) 통계분석

[0097] 상술한 바와 같이 돌연변이 여부 및 그 외 변수에 따른 생존 기간의 분석에는 단변수 및 다변수 분석이 사용되었는데, 구체적으로 다변수 Cox 회귀 모델은 단변수 분석에서 P 값이 < 0.01인 변수를 선택하여 후진제거법으로 개발됐고 0.05 미만의 양측 *P*-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0098] 모든 통계 분석은 Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS, Chicago, IL, USA) 버전 21.0을 사용하여 수행되었다.

[0100] **실시예2: PWWP2B 단백질의 기능 확인 실험**

[0101] [실험 방법 및 재료]

[0102] (1) 세포 배양

[0103] HeLa 및 human embryonic kidney (HEK) 293T 세포주는 the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 구입하였다. HeLa 및 293T 세포주는 10 % fetal bovine serum(FBS; Gibco, Franklin Lakes, NJ, USA) 및 1 % antibiotic/antimycotic (Gibco)으로 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 배양액으로 하여, 37° C에서 5 %(v/v) CO_2 조건으로 배양되었다.

[0104] (2) 형질주입(Transfection), 면역침강(immunoprecipitation) 및 GST 풀다운

[0105] 일시적 형질주입은 폴리에틸렌이민을 사용하여 수행되었다. 면역침강을 위해서 세포들은 저온 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척된 다음 4℃에서 10분 동안 NETN 완충액(0.5% Nonidet P-40, 20 mM Tris [pH 8.0], 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 100 μM Na3VO4, 1 mM dithiothreitol (DTT) 및 50 μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF))에 용해되었다. 상기 혼탁한 용해물은 4℃에서 5분 동안 14,000rpm으로 원심분리되어 투명하게 되고, 상층액은 단백질 A-아가로스-접합 1차 항체와 함께 배양되었다. 면역복합체(Immunocomplex)를 NETN 완충액으로 3번 세척하고 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0106] 글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 융합 단백질 또는 GST는 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현되었고 글루타티온-세파로스 4B 비드(glutathione- Sepharose 4B beads)에 고정되었다. 각각의 단백질을 암호화하는 플라스미드로 형질주입된 HEK293T 세포의 세포 용해물은 4° C에서 1시간 동안 GST 융합 단백질 또는 GST와 함께 배양되었다. 이들은 상기 NETN 버퍼로 세척된 후 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯이 수행되었다.

[0107] (3) 플라스미드

[0108] SFB-PWWP2B 발현 플라스미드를 SFB-tagged mammalian expression vector에 클로닝하였다. HA-PWWP2B 발현 플라스미드를 pDONR223에 클로닝하였고, 상기 pDONR223 유도체를 pHAGE vector에 재조합하였다. Green fluorescent protein (GFP)-UHRF1 wild-type (WT), PWWP2B WT, PWWP2B D-1 (6 내지 129aa 결실), D-2 (130 내지 219aa 결실), D-3 (220 내지 316aa 결실), D-4 (317 내지 473aa 결실) 및 D-5 (474 내지 584aa 결실) 결실 돌연변이 발현 플라스미드를 GFP-tagged mammalian expression vectors에 클로닝하였다. Myc-UHRF1 WT, UHRF1 D-1 (15 내지 90aa 결실), D-2 (147 내지 297aa 결실), D-3 (331 내지 375aa 결실), D-4 (430 내지 597aa 결실) 및 D-5 (735 내지 780aa 결실) 결실 돌연변이 발현 플라스미드를 Myc-tagged mammalian expression vectors에 클로닝하였다. GST-tagged PWWP2B-N 및 PWWP2B-C 결실 돌연변이 발현 플라스미드를 GST-tagged mammalian expression vectors에 클로닝하였다. mCherry-PWWP2B 발현 플라스미드를 mCherry-tagged mammalian expression vector에 클로닝하였다. GFP-PWWP2B A2A3 및 A4 결실 돌연변이 발현 플라스미드를 GFP-tagged mammalian expression vectors에 클로닝하였다. *PWWP2B* 유전자는 한국인간유전자은행에서 구입하였다.

[0109] (4) 레이저 미세 조사(Laser microirradiation) 및 세포 이미징

[0110] 레이저 미세조사(Laser microirradiation)를 위해서 세포는 35-mm round glass bottom dishes (SPL)에 씨딩 되고 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU, final 10 μM)이 미세조사 30시간 전에 배양액에 첨가되었다. 공초점 이미징을 위해서 60배 오일 대물렌즈와 온도 제어 챔버(37℃, 5 % CO_2)가 있는 A1 공초점 현미경(Nikon)을 사용하였다. 405 nm 레이저를 1.2초의 조사 시간(32 줄/sec)으로 손상 부위를 유도하였다. 이미지는 10분, 30분 또는 2시간이 경과할 때 1초씩 획득되었다.

[0111] (5) Fok1을 이용한 특정 부위의 DNA 이중 가닥 손상

[0112] 24-웰 플레이트에서 안정적으로 FokI 제한 효소 부위를 함유하는 U2OS 세포에 0.4mg의 야생형 GFP-PWWP2B 또는 GFP-PWWP2B-A2A3와 함께 0.4mg의 LacI-mCherry-FokI 발현 플라스미드를 형질주입하였다. 48시간 후, 공초점으로 살아있는 세포 이미징을 수행하였다.

[0113] (5) 짧은 간섭 RNA(Small interfering RNA, siRNA)

[0114] 모든 UHRF1 및 PWWP2B의 siRNA 이합체는 IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA, USA)에서 구매하였다. UHRF1 및 PWWP2B에 대한 siRNA는 Lipofectamine RNAiMAX reagent (Invitrogen)를 사용하여 세포에 도입되었다. 사용된 siRNA의 염기서열은 하기 표 3 및 첨부한 서열목록 전자파일에 나타내었다.

표 3

[0115]

서열 식별번호	이름	염기서열
12	PWWP2B siRNA1 sense	5′ -GUUCUUGUCUAUUUCAAAAUU-3′
13	PWWP2B siRNA1 antisense	5′ -UUUUGAAAUAGACAAGAACUU-3′
14	PWWP2B siRNA2 sense	5′ -GAAAUCAGGGAGCUCUUAAUU-3′
15	PWWP2B siRNA2 antisense	5′ -UUAAGAGCUCCCUGAUUUCUU-3′
16	UHRF1 siRNA1 sense	5′ -GUCAUUUACCACGUGAAAUUU-3′
17	UHRF1 siRNA1 antisense	5′ -AUUUCACGUGGUAAAUGACUU-3′

[0116] (6) 상동 재조합(Homologous recombination) 및 비상동 말단 결합(non-homologous end-joining) 분석

[0117] 상동 재조합 분석은 비특허문헌 29에 설명된 대로 수행되었다. U2OS DR-GFP 또는 EJ5-GFP 세포를 먼저 24웰 플레이트에 상기 siRNA로 처리한 다음 siRNA 형질주입 24시간 후 웰당 0.4 μg의 I-SceI로 형질주입시켰다. I-SceI 형질주입 72시간 후, 세포를 트립신 처리하고, GFP-양성 세포의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정되었다. 통계 분석은 paired *t*-test로 수행되었다. 숙명 여자대학교 만성대사질환 핵심시설센터에 있는 BD FACSCanto II(NFEC-2011-02-145106)를 FACS 분석에 사용하였다.

[0118] (7) ER-AsiSI U2OS 세포를 이용한 말단 절제술의 정량적 분석

[0119] ER-AsiSI U2OS 세포를 사용한 말단 절제(end resection)의 정량적 분석은 이전에 설명된 대로 수행되었다(비특허문헌 30 참조). ER-AsiSI U2OS 세포를 10 % FBS를 함유하는 DMEM에서 성장시켰다. ER-AsiSI U2OS 세포의 siRNA 형질주입은 제조사의 지시에 따라 Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)를 사용하여 수행되었다. ER-AsiSI U2OS 세포를 mock(공벡터) 또는 4-하이드록시타목시펜(4-OHT, Sigma; H7904)으로 4시간 동안 처리하였다. ER-AsiSI U2OS 세포는 37℃ 0.6 % 저겔화점 아가로스(low-gelling point agarose, Bio-Rad)를 포함하는 PBS에서 1.2×10^7 cells/ml의 농도로 수집되었다. 50 ㎕ 세포 현탁액을 Parafilm (Pechiney)에 떨어뜨리고 응고된 한천 볼을 만든 다음 튜브로 옮겼다. 상기 한천 볼은 회전하면서 16℃에서 20시간 동안 ESP 완충액(0.5M EDTA, 2% N-라우로일사르코신(N-lauroylsarcosine), 1mg/ml proteinase-K 및 1mM $CaCl_2$, pH 8.0) 1ml 로 처리된 후, 1 ml의 HS 완충액(1.85 M NaCl, 0.15 M KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 4 mM Tris 및 0.5% Triton X-100, pH 7.5)으로 16℃에서 회전하면서 20시간 동안 처리되었다. 회전하면서 4℃에서 6시간 동안 PBS 1ml로 세척한 후, 튜브를 68℃ 히팅 블록에 10분 동안 놓아 한천 볼을 녹였다. 녹은 샘플을 68℃ ddH_2O로 15배 희석하고 동량의 적절한 제한 효소 완충액과 혼합하였다. 특정 DSB 근처의 절제는 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR) 분석에 의해 측정되었다. 상기 qPCR에서 사용된 프라이머 및 프로브는 하기 표 4 및 첨부한 서열목록 전자파일에 나타내었다.

표 4

[0120]

서열 식별번호	이름	염기서열
18	DSB1-335 bp (Primer FW)	GAATCGGATGTATGCGACTGATC
19	DSB1-335 bp (Primer REV)	TTCCAAAGTTATTCCAACCCGAT
20	DSB1-335 bp (Probe)	6FAM-CACAGCTTGCCCATCCTTGCAAACC-TAMRA
21	DSB1-1618 bp (Primer FW)	TGAGGAGGTGACATTAGAACTCAGA
22	DSB1-1618 bp (Primer REV)	AGGACTCACTTACACGGCCTTT
23	DSB1-1618 bp (Probe)	6FAM-TTGCAAGGCTGCTTCCTTACCATTCAA-TAMRA
24	DSB1-3500 bp (Primer FW)	TCCTAGCCAGATAATAATAGCTATACAAACA
25	DSB1-3500 bp (Primer REV)	TGAATAGACAGACAACAGATAAATGAGACA
26	DSB1-3500 bp (Probe)	6FAM-ACCCTGATCAGCCTTTCCATGGGTTAAG-TAMRA
27	No DSB (Primer FW)	ATTGGGTATCTGCGTCTAGTGAGG
28	No DSB (Primer REV)	GACTCAATTACATCCCTGCAGCT
29	No DSB (Probe)	6FAM-TCTCTGCACAGACCGGCTTCCCTTC-TAMRA

[0121] 게놈 DNA 샘플(36 ㎕)을 37℃에서 밤새 80 유닛의 BsrG1 또는 HindIII (New England Biolabs) 제한 효소로 분해하였다. 분해된 샘플(3 ㎕)은 QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR 시스템(ABI)을 사용하여 12.5 ㎕의 TaqMan Universal PCR Master Mix(ABI), 0.5mM의 각 프라이머 및 0.2mM 프로브를 포함하는 25 ㎕를 qPCR에서 템플릿으로 사용하였다. 선택된 부위에서 절제에 의해 생성된 ssDNA의 백분율은 이전에 설명된 대로 계산되었다(비특허문헌 30 참조). 각 샘플에 대한 Ct(Cycle Threshold)는 소화된 샘플의 Ct 값에서 mock(공벡터)로 소화된 샘플의 Ct 값을 빼서 계산하였다. ssDNA의 백분율은 하기 수학식 1에 의해 계산되었다.

수학식 1

[0122] $$ssDNA(\%) = 1/(2^{(4Ct-1)} + 0.5) * 100$$

[0123] (8) 세포 생존 분석(Cell survival assay)

[0124] HeLa 세포는 60 mm 직경 플레이트에서 상기 siRNA로 24시간 간격으로 2 회 형질 주입되었다. 2 번째 형질주입 48시간 후, 상기 형질주입된 세포는 상기 조사 광원을 사용하여 상술된 바와 같이 조사되었다. 조사 14일 후, 상기 세포는 PBS로 세척되고, 2 %(w/v) 메틸렌 블루(methylene blue)로 고정 및 염색되었고, 콜로니의 수가 계수되었다.

[0125] [실험 결과]

[0126] PWWP2B 단백질의 분자 메커니즘을 이해하기 위해 SFB-PWWP2B를 과발현하는 인간 배아 신장(human embryonic a kidney, HEK) 293T 세포주를 사용하여 탠덤 친화성 정제(tandem affinity purification)를 수행하였다. 질량분석법 분석은 HDAC1/2 및 인간 망막모세포종 결합 단백질 4(RBBP4; 비특허문헌 19 참조)를 포함하여 이전에 확인된 PWWP2B 결합 단백질을 확인했으며, 이는 단백질체 분석의 유효성을 인증하였다. 알려지지 않은 상호 작용 후보 중에서 UHRF1은 37%의 커버리지(Coverage)를 보이며 가장 유망한 PWWP2B 상호 작용 단백질로 밝혀졌기 때문에 이하 실험을 위해 선택되었다(도 2A 참조). PWWP2B와 UHRF1 간의 상호 작용을 확인하기 위해 SFB-PWWP2B 및 Myc-UHRF1을 과발현하는 세포를 사용하여 면역 침전 분석(immunoprecipitation assays)을 수행했으며 PWWP2B가 UHRF1과 결합하는 것을 확인하였다(도 2B 참조). PWWP2B-상호작용 단백질의 내인성(endogenous) 면역침전은 PWWP2B가 UHRF1과 결합하는 것을 추가로 입증하였다(도 2C 참조). UHRF1와의 결합을 담당하는 PWWP2B의 중요한 도메인을 결정하기 위해 일련의 PWWP2B 결실 돌연변이를 생성하고(도 2D 참조) WT Myc-UHRF1이 있는 개별 GFP - PWWP2B 결실 돌연변이를 HEK293T 세포에 공동 형질주입시킨 후 공동 면역침전시켰다. 면역 침전 분석은 PWWP2B WT, -D1, -D4 및 -D5가 UHRF1과 상호 작용하는 반면 PWWP2B-D2 및 -D3 돌연변이는 상호 작용에 실패했음을 보여줬고, 이는 PWWP2B의 130 내지 317의 아미노산 서열이 UHRF1과의 상호작용에 필요하다는 것을 가리킨다(도 2E 참조). 다음으로, 도 2F에서 도시된 바(UHRF1-D1에서 UHRF1-D5)와 같이 UHRF1의 일련의 내부 결실 돌연변이를 구성하여 UHRF1의 어느 영역이 PWWP2B와의 결합에 필요한지 확인하였고 그 결과 UHRF1의 SRA(SET and RING-associated) 도메인이 PWWP2B에 결합한다는 것을 발견하였다(도 2G 참조). 이러한 발견은 GST-PWWP2B-N(도 2H, 도 2I 및 도 8A 참조), GST-PWWP2B-220 및 -317(도 9 참조) 융합 단백질은 UHRF1과의 상호작용에 충분하다는 것 및 Myc-UHRF1-D4는 PWWP2B와의 상호 작용에 충분하지 않다는 것(도 2J 및 도 8B 참조)을 보여주는 결과에 의해 더 뒷받침된다.

[0127] 종합하면, 이들 결과는 UHRF1이 UHRF1 결합 도메인(UBD)(도 2K 참조)을 통해 PWWP2B 단백질과 결합하는 것을 입증하였다.

[0128] UHRF1은 DNA 손상 부위로 이동하여 DNA 복구 경로에서 역할을 하는 것으로 보고되었다(비특허문헌 10 및 31 참조). PWWP2B가 새로운 UHRF1 결합 단백질로 확인됨에 따라 우리는 PWWP2B가 DNA 손상 부위로 이동할 수 있을 것이라 가정하였다. 이 가설을 테스트하기 위해 특정 핵 영역에서 제한된 양의 DNA 손상을 생성하는 레이저 미세조사(laser microirradiation)를 이용하였다. GFP 태그가 붙은 PWWP2B가 구성되고 HeLa 세포에서 발현되었다. GFP - PWWP2B는 상기 레이저 조사에 의해 생성된 DNA 병변 (도 3A 참조) 및 Fok1- 유도 DNA 이중 가닥 손상(도 10A 및 10B 참조)에 축적되었다. 또한, 레이저 스트라이프에 축적된 GFP-PWWP2B는 HeLa 세포에서 DNA 손상의 마커인 γH2AX(도 3B 참조)와 공동 국소화되고, 또한 UHRF1과 공동 국소화되었다(도 3C 참조). PWWP2B 항체가 있으면 내인성 PWWP2B가 레이저 유도 DNA 병변 부위에 축적됨을 추가로 확인하였다(도 3D 참조). DNA 병변에 대한 PWWP2B 및 UHRF1가 모이는 역학을 연구하기 위해 실시간 영상 기술을 사용하여 미세 조사 시 레이저 스트라이프(laser stripe)에서의 단백질 축적을 모니터링 하였다. 우리는 GFP-UHRF1과 mCherry-PWWP2B가 레이저 미세 조사 후 1분 이내에 DNA 손상 부위로 빠르게 이동한다는 것을 발견하였다(도 3E 참조). 특히, 우리는 DNA 손상 부위에서 GFP-UHRF1 및 mCherry - PWWP2B의 축적이 3분에 정점을 찍은 다음 유사한 역학으로 최대 20분까지 일정하게 유지되었으며(도 3E 참조), 이는 UHRF1 및 PWWP2B가 DNA 손상 반응(DNA damage response, DDR)의 초기 단계에서 중요한 역할을 하고 나머지 DDR 프로세스에서 계속해서 효과를 발휘함을 시사한다.

[0129] 다음으로, DNA 손상 부위로의 이동을 담당하는 PWWP2B의 특정 영역을 결정하였다. 이를 위해 일련의 GFP 태그 PWWP2B WT 및 결실 돌연변이체(D1, D2, D3, D4 및 D5)를 생성한 다음 HeLa 세포에서 개별 클론을 일시적으로 발현하였다(도 3F 참조). 개별 클론을 발현하는 HeLa 세포에 조사하고, 레이저 스트라이프에서 양성 GFP를 갖는 세포를 계수하였다. PWWP2B WT 또는 D1 돌연변이를 발현하는 세포의 약 80 % 및 PWWP2B D5 돌연변이를 발현하는 세포의 약 55 %를 발견하였다. 그러나, GFP-PWWP2B D2 및 D3는 레이저 스트라이프에 거의 국소화되지 않았는데 이는 UHRF1와의 상호작용을 담당하는 PWWP2B 도메인이 DNA 손상 부위에 대한 PWWP2B의 국소화에 중요함을 나타낸다(도 3F 참조). GFP-PWWP2B-D4가 레이저 스트라이프에 국소화되지 않은 결과를 통해 UHRF1와의 상호 작용을 담당하지 않는 PWWP2B의 아미노산 서열 317 내지 474가 DNA 손상 부위에 PWWP2B를 모으는 데에도 중요하다는 것을 알아냈다. 변경된 단백질 구조 변화로 인해 PWWP2B D2 및 D3 돌연변이가 레이저 스트라이프에 국소화 되지 않을 가능성을 배제하기 위해 GFP-PWWP2B-A2A3 돌연변이를 생성한 다음(도 3G 참조), 미세조사 시 PWWP2B의 아미노산 서열 130 내지 317의 모집을 테스트하였다(도 3H 참조). 미세 조사 분석 데이터는 PWWP2B(A2A3 돌연변이체)의 아미노산 서열 130 내지 317이 레이저 스트라이프에 대한 국소화에 그 자체로 충분하다는 것을 보여주었다(도 3H 참조). PWWP2B의 아미노산 서열 130 내지 317(A2A3 결실 돌연변이체에 대응됨)이 UHRF1과의 결합과

DNA 손상 부위에 대한 국소화 모두에 중요하다는 결과는 DNA 손상 부위에 대한 PWWP2B의 국소화가 UHRF1과의 상호 작용에 의존적임을 시사한다. 그러나 GFP-PWWP2B-A4 클론은 레이저 스트라이프로 이동하지 않았는데(도 3H 참조), 이는 PWWP2B - UHRF1 상호 작용과 아미노산 서열 317 내지 474 모두가 DNA 손상 부위에 PWWP2B를 적절하게 모집하는 데 필요함을 의미한다(도 3G 및 H 참조). UHRF1이 DNA 손상 부위에 대한 PWWP2B의 국소화를 제어하는지 여부를 테스트하기 위해 UHRF1 고갈 시 미세 조사 분석을 수행하였다. 레이저 줄무늬에서 PWWP2B A2A3 돌연변이 및 야생형 PWWP2B의 축적은 UHRF1이 고갈된 세포에서 극적으로 손상된(도 3I 및 J 참조) 반면, 레이저 스트라이프에서 UHRF1의 축적은 PWWP2B가 고갈된 세포에서 손상되지 않았고(도 3K 참조), 이는 UHRF1이 DDR에서 PWWP2B의 상위 단계(upstream)에서 작용했을 가능성이 있음을 나타낸다. 종합하면, 이러한 발견은 PWWP2B가 UHRF1 과의 상호 작용을 통해 DNA 손상 부위로 이동되고 UHRF1의 하위 단계(downstream)에서 그 효과를 발휘했을 가능성이 있음을 보여준다.

[0130] 다음으로, DNA 복구 경로에서 PWWP2B의 기능을 조사하였다. 첫째, 우리는 대조군으로서 siRNA가 처리된 세포와 비교하여 이온화 방사선(IR) 처리 시 PWWP2B가 고갈된 HeLa 세포에서 손상 유도된 γH2AX foci가 천천히 사라지는 것을 발견하였다(도 4A 및 부록 도 11 참조). 이 결과로 PWWP2B가 DSB 수리에 참여했을 가능성은 높아졌다. DSB 수리에는 HR(homologous recombination) 및 NHEJ(Non-homologous end joining)의 두 가지 주요 경로가 있다. 어느 DSB 복구 경로로 PWWP2B가 참여했는지 테스트하였다. GFP 기반 리포터 분석 결과에서 siPWWP2B로 처리된 세포에서 HR 복구 효율이 크게 감소했음을 발견했다(도 4B 및 도 12A 내지 도 12C 참조). 그러나 동일한 설정에서 NHEJ 용량은 PWWP2B 고갈에 의해 약간 영향을 받았으며(도 4C 및 부록 도 12D 참조), PWWP2B가 이러한 세포의 HR 경로에서 주로 기능함을 보여준다. UHRF1은 HR이 주로 발생하는 S-기에서 DNA 손상 부위에 모집되는 것으로 보고되었다(비특허문헌 10 참조). 일관되게, 우리는 PWWP2B 또한 S 기에서 DNA 손상 부위에 모집되었음을 확인했다(도 13 참조). 이러한 발견은 중요한 HR 단백질인 RAD51의 IR 유도 foci 형성이 S 세포 주기 단계의 PWWP2B-고갈된 세포에서 심각하게 손상되었다는 사실에 의해 추가로 뒷받침되었다(도 4D, 도 14 및 도 15A 참조). PWWP2B의 siRNA 매개 녹다운(KD)의 표적 외 효과를 제거하기 위해 rescue 실험을 siRNA 내성 PWWP2B WT 발현 벡터를 사용하여 수행했다(도 16A 및 B 참조). PWWP2B-KD 세포에서 PWWP2B WT의 재구성은 IR 유도된 RAD51 foci 형성을 성공적으로 회복시켰다(도 4E 참조). 이러한 결과와 함께, 또한 IR-유도 BRCA1 foci 형성이 PWWP2B-고갈된 세포에서 S기에서 감소한(도 4F 및 도 15B 참조) 반면, IR-유도 53BP1(도 4G 및 도 15C 참조), γH2AX, ubiquitin, MDC1 또는 RAP80 foci 형성은 이러한 조건에 의해 변경되지 않았다(도 17 참조). 이러한 결과는 PWWP2B 단백질이 DNA 손상 부위에 HR 인자의 동원을 촉진함으로써 DSB 복구에 역할을 했음을 시사한다. 다음으로, 우리는 IR에 대응하여 HeLa 세포의 클론 생성 생존에 대한 PWWP2B 고갈의 효과를 테스트했다. 현저하게, PWWP2B 고갈은 대조군 KD 세포에 비해 세포를 IR에 더 민감하게 만들었다(도 4H 참조). 이러한 결과는 IR 유도된 DNA 손상에 대한 반응으로 세포 생존을 위한 HR을 촉진하는 데 PWWP2B가 필요함을 시사한다.

[0131] 도 4D에 도시된 바와 같이, PWWP2B는 손상 유도된 RAD51 foci 형성에 결정적이었고, 이는 PWWP2B가 HR 동안 최종 절제 단계에서 기능할 수 있음을 시사한다. 또한, 우리는 이러한 관찰이 PWWP2B-KD 세포에서 RAD51, RPA2 및 BRCA1 단백질의 발현 수준을 검증함으로써 PWWP2B 고갈의 진정한 표현형임을 확인했다(도 5A 및 B 참조). 말단 절제에서 PWWP2B의 역할을 더 이해하기 위해 DNA 손상에 대한 반응으로 복제 단백질 A(replication protein A; RPA)의 축적을 조사했다. RPA는 인산화되어 ssDNA에 결합되는데, 여기서 ssDNA는 DNA DSB의 부위에서 말단 절제 후에 생성된다. 흥미롭게도, PWWP2B의 고갈은 IR에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 반응으로 RPA 인산화의 심각한 감소로 이어진다(도 5B 및 도 18 참조). 유사하게, 우리는 siPWWP2B로 처리된 세포에서 손상 유도된 RPA2의 foci 형성 및 RPA2 S4/S8의 인산화가 상당히 손상되었음을 발견하였다(도 5C 및 도 5D 참조). *in vivo*에서 말단 절제술의 결함을 보다 정확하게 확인하기 위해 PCR 기반 방법을 사용하여 정의된 이중 가닥 DNA에서 절제된 DNA의 일부를 측정하였다(도 5E 참조). 도 5F에 도시된 바와 같이, PWWP2B의 고갈은 MRE11 고갈의 동일한 수준에서 DNA 말단 절제의 상당한 감소를 초래하였다. 종합하면, 이러한 발견은 PWWP2B가 HR 동안 말단 절제에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었다.

[0132] 다음으로, PWWP2B가 DNA 말단 절제를 어떻게 조절하는지에 대한 분자적 기초를 이해하고자 다음의 실험을 진행했다. 도 17에서 도시한 바와 같이, DNA 손상 반응을 조절하는 γH2AX, 유비퀴틴, MDC1 및 RAP80의 손상 유도 foci 형성이 PWWP2B가 없을 때 정상임을 주목했다. 따라서 말단 절제를 위한 뉴클레아제(nuclease) 또는 뉴클레아제 관련 인자가 DNA 손상 부위를 표적으로 하는지 테스트했다. 흥미롭게도, 미세조사에 의해 유도된 MRE11 foci 형성이 PWWP2B가 고갈된 세포에서 심하게 손상되었음을 발견했다(도 6A 참조). 예상대로 PWWP2B의 Upstream에서 기능하는 UHRF1이 고갈된 HeLa 세포에서 조사 유도 MRE11 foci 형성에 심각한 결함이 있었다. 일관되게, 레이저 미세 조사 분석은 레이저 스트라이프 상의 GFP-MRE11 모집이 PWWP2B 고갈된 HeLa 세포에서 상당히 손상되었음을 보여주었다(도 6B 참조). MRE11 결함은 PWWP2B에 대해 siRNA로 처리된 세포에서 손상된 ATM 활

성화에 의해 추가로 확인되었다(도 19 참조). 이러한 발견으로 인해 PWWP2B가 MRE11과 결합하는지 확인하는 실험을 진행하게 되었다. 이를 위해, HA-PWWP2B 및 Myc-MRE11을 발현하는 HEK293T 세포로부터 제조된 용해물을 사용하여 면역침전을 수행하였다. 도 6C에 도시된 바와 같이, 본 발명자들은 Myc-MRE11이 HA-PWWP2B와 공동 면역침전됨을 발견하였다. 내인성 PWWP2B와 MRE11 사이의 상호작용이 확인되었다(도 6D 참조). MRE11 상호작용을 담당하는 PWWP2B 도메인을 결정하기 위해 GFP-PWWP2B와 그 결실 돌연변이를 HA - MRE11로 형질주입시켰고 PWWP2B의 아미노산 잔기 130-220 및 474-580이 PWWP2B와 MRE11 상호작용에 중요하다는 것을 발견했다(도 6E 참조). 종합하면, 이러한 발견은 PWWP2B가 DNA 손상 부위에 대한 MRE11 모집을 조절하고 따라서 HR 동안 말단 절제에 중요한 역할을 한다는 것을 입증했다.

[0133] UHRF1의 고갈은 HR, 말단 절제 및 DNA 손상 부위에 대한 MRE11 모집을 손상시킨다. 결함이 UHRF1-PWWP2B 상호작용에 의해 매개되는지 테스트하기 위해 우리는 UHRF1이 고갈된 HeLa 세포에 siRNA 내성 야생형 UHRF1을 도입하고 이러한 결함이 회복되었음을 발견했다. 그러나 PWWP2B와 상호 작용하지 않는 siRNA 내성 UHRF1-D4의 발현은 그렇게 하지 못하여 UHRF1이 PWWP2B 상호 작용을 통해 HR에서 역할을 한다는 것을 보여준다(도 20 참조). 이러한 결과는 PWWP2B가 DDR 및 HRR에서 UHRF1에 상위성(epistatic)일 가능성이 있음을 시사했다. 이 가능성을 증명하기 위해 우리는 PWWP2B, UHRF1 또는 둘 모두를 고갈시켜 DDR과 HR에 대한 PWWP2B와 UHRF1 간의 유전적 상호작용 효과를 테스트했다. 우리는 PWWP2B 및 UHRF1의 개별 또는 이중 고갈이 IR 유도 γH2AX, RAD51 및 BRCA1 foci 형성에서 유사한 수준의 결함을 초래한다는 것을 발견했으며, 이는 PWWP2B 및 UHRF1이 DDR 및 HRR에 대해 epistatic임을 나타낸다(도 7A 내지 도 7C 참조). 또한, PWWP2B는 IR 민감도에서 UHRF1에 대해 epistatic이었고(도 7D 및 도 21A 참조), 상동성은 DSB 복구 경로를 매개했다 (도 7E 및 부록 도 21B 참조). 개별 또는 결합된 PWWP2B 및 UHRF1의 고갈은 BRCA1, 53BP1 및 RAD51의 단백질 발현 수준에 영향을 미치지 않았으며, 이는 두 단백질 모두 DDR 및 HRR과 관련된 인자의 유전자 발현 프로파일을 조절하지 않음을 나타낸다(도 21C 참조). DDR에서 PWWP2B의 기능에 중요한 PWWP2B의 특정 영역을 식별하기 위해 siRNA 내성 PWWP2B WT 및 결실 돌연변이체를 생성했다. siRNA-저항성 PWWP2B WT 및 이의 연속 결실 돌연변이를 사용한 복원 실험은 PWWP2B-KD 세포에서 IR-유도된 RAD51 foci 형성의 결함이 siRNA-저항성 PWWP2B WT의 발현에 의해 회복되었지만 PWWP2B- D2, - D3, 또는 -D4 돌연변이체의 발현에 의해 회복되지 않았다는 것을 보여주었다(도 22A 참조). 일관되게, IR에 대한 PWWP2B-KD 세포의 과민성은 siRNA 내성 PWWP2B WT의 재발현에 의해 회복된 반면, PWWP2B - D2, -D3 및 -D4의 발현은 회복되지 않았다(도 22B 참조). 종합하면, 이러한 데이터는 PWWP2B가 DNA 손상 부위에 위치하여 HR을 촉진하고 PWWP2B가 이들 세포에서의 DDR 및 HR 매개 DSB 복구에서 UHRF1에 대한 epistatic 인자일 가능성이 있음을 강력하게 시사한다.

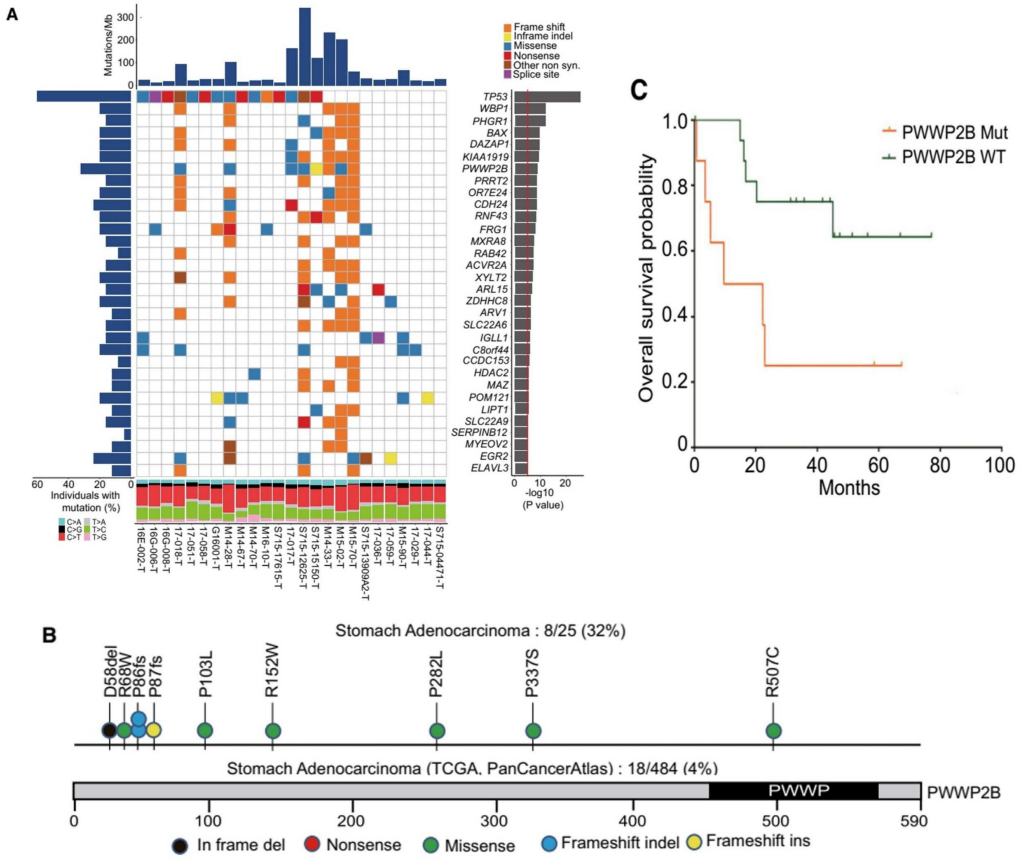
[0135] 상기와 같은 결과를 통해 PWWP2B가 DNA 손상에 대한 DNA 복구에 있어 기존의 DNA 복구에 기능하는 것으로 알려진 UHRF1 및 MRE11 단백질과 상호작용하며 DNA 손상 부위로의 이동 및 HR 매개 복구에 특정 역할을 담당하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 *PWWP2B* 유전자에 돌연변이가 발생하여 DNA 복구 기능에 문제가 생길 경우 유전체 불안정성이 증가하여 위암 발생의 가능성이 높아질 수 있으므로, 본 발명에 따른 *PWWP2B* 유전자의 돌연변이 검출 제제를 포함하는 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이들을 이용한 정보제공방법은 위암 진단 용도로 사용될 수 있고, *PWWP2B* 유전자에서 돌연변이가 발생하면 *PWWP2B* 유전자의 전사 및 발현에도 영향을 줄 수 있으므로, *PWWP2B* 유전자의 mRNA 수준 측정 제제 또는 *PWWP2B* 유전자로부터 발현된 단백질 수준 측정 제제를 포함하는 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이들을 이용한 정보제공방법은 위암 진단 용도로 사용될 수 있다.

[0136] 또한 실시예 1에서 상술한 바와 같이 이미 위암으로 진단받은 환자에 대하여 본 발명에 따른 상기 조성물, 상기 키트 및 상기 정보제공방법은 위암 환자의 예후 예측 용도로 사용될 수 있다.

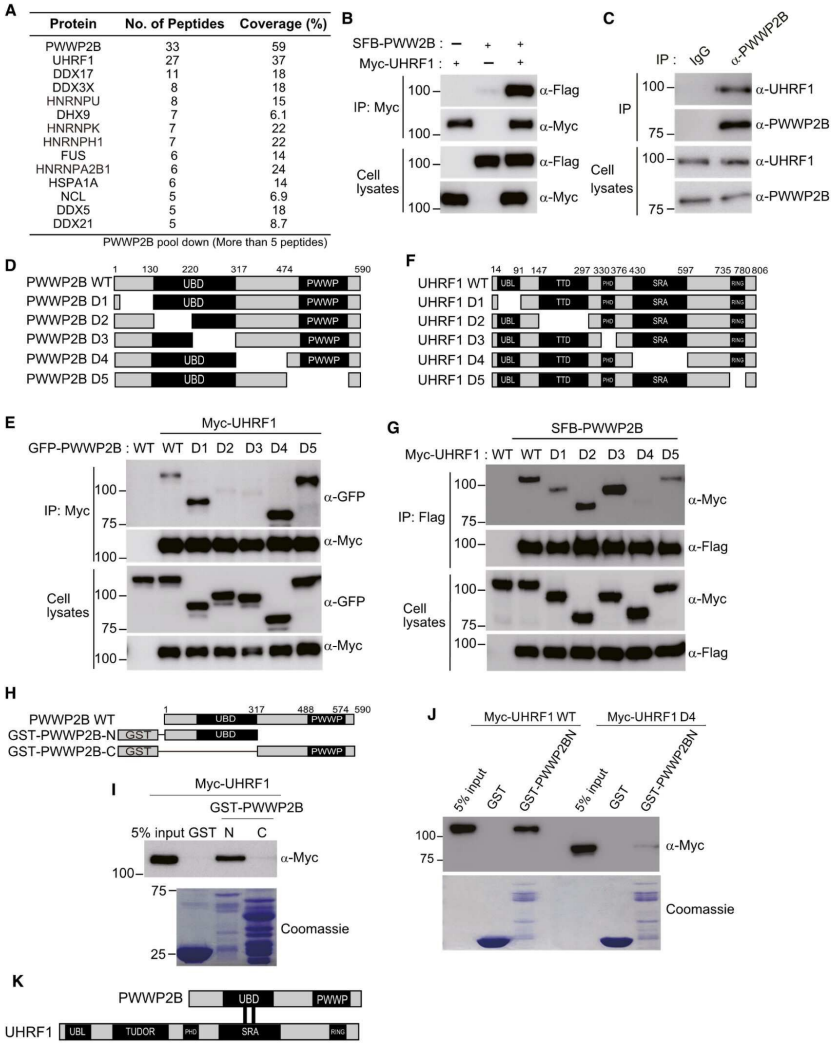
[0138] 이상에서 설명한 본 발명의 바람직한 실시예들은 기술적 과제를 해결하기 위해 개시된 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 사상 및 범위 안에서 다양한 수정, 변경, 부가 등이 가능할 것이며, 이러한 수정 변경 등은 이하의 특허청구범위에 속하는 것으로 보아야 할 것이다.

도면

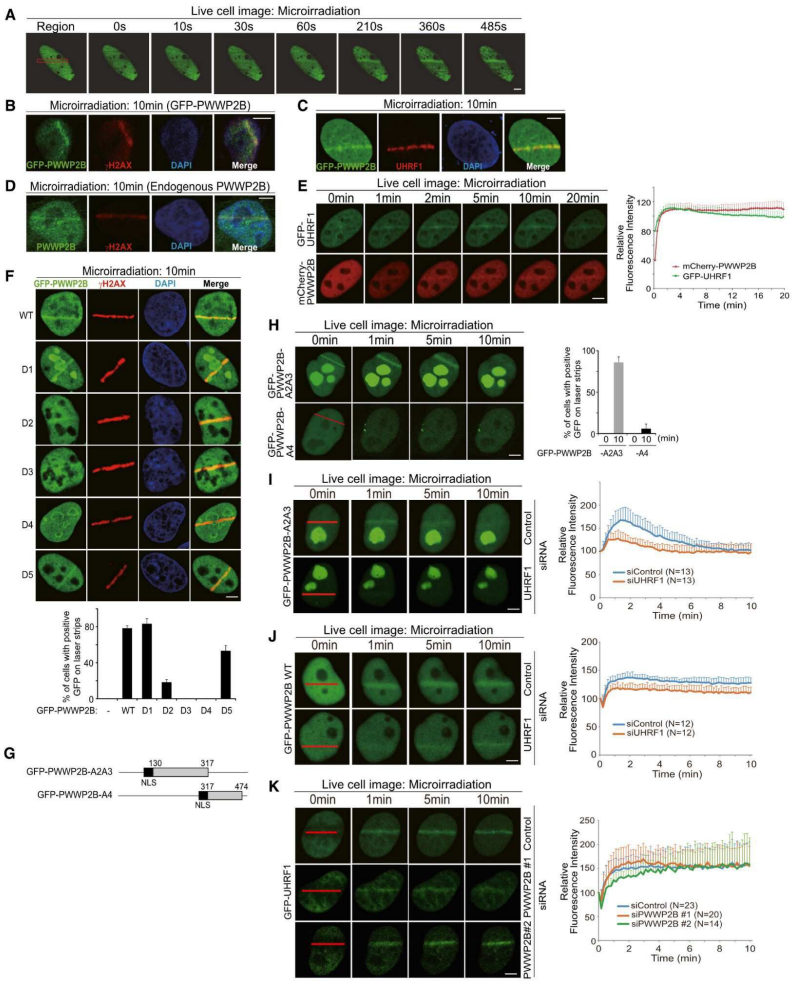
도면1


A
Mutations/Mb
300
200
100
0
Frame shift
Inframe indel
Missense
Nonsense
Other non syn.
Splice site
TP53
WBP1
PHGR1
BAX
DAZAP1
KIAA1919
PWWP2B
PRRT2
OR7E24
CDH24
RNF43
FRG1
MXRA8
RAB42
ACVR2A
XYLT2
ARL15
ZDHHC8
ARV1
SLC22A6
IGLL1
C8orf44
CCDC153
HDAC2
MAZ
POM121
LIPT1
SLC22A9
SERPINB12
MYEOV2
EGR2
ELAVL3
60 40 20 0
Individuals with mutation (%)
C>A
C>G
C>T
T>A
T>C
T>G
0 10 20
-log10 (P value)
C
Overall survival probability
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 20 40 60 80 100
Months
PWWP2B Mut
PWWP2B WT
B
Stomach Adenocarcinoma : 8/25 (32%)
D58del
R68W
P86fs
P87fs
P103L
R152W
P282L
P337S
R507C
Stomach Adenocarcinoma (TCGA, PanCancerAtlas) : 18/484 (4%)
PWWP
PWWP2B
0 100 200 300 400 500 590
In frame del
Nonsense
Missense
Frameshift indel
Frameshift ins

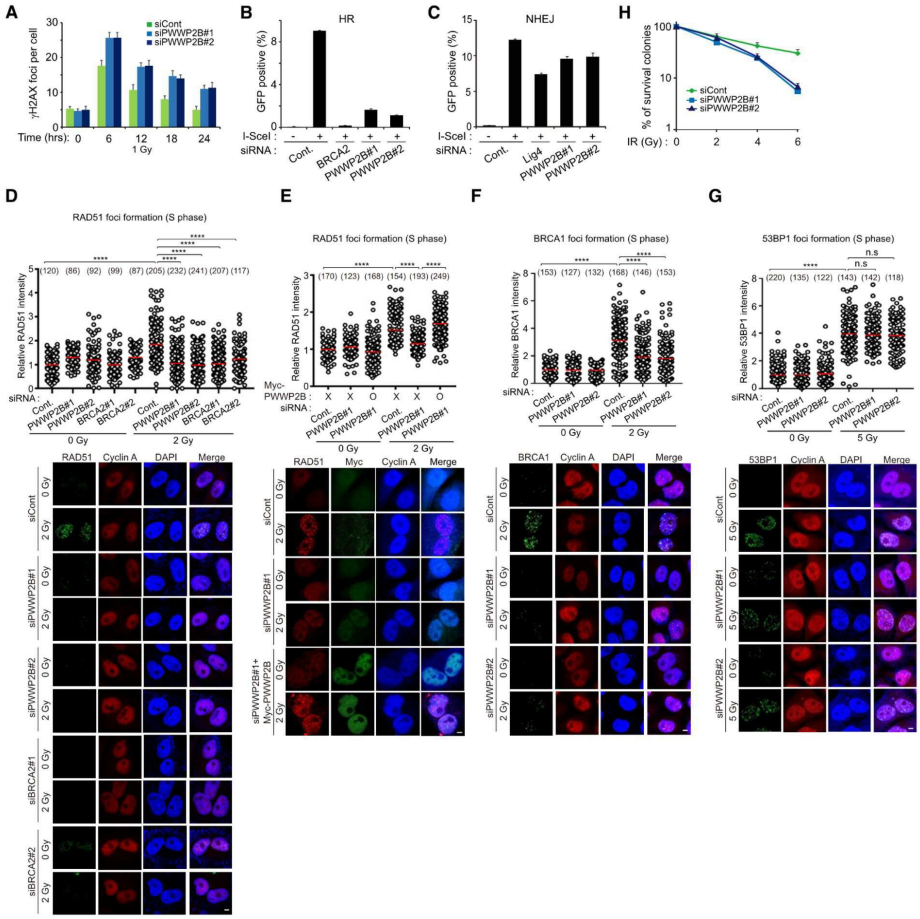
도면2


A
Protein | No. of Peptides | Coverage (%)
PWWP2B 33 59
UHRF1 27 37
DDX17 11 18
DDX3X 8 18
HNRNPU 8 15
DHX9 7 6.1
HNRNPK 7 22
HNRNPH1 7 22
FUS 6 14
HNRNPA2B1 6 24
HSPA1A 6 14
NCL 5 6.9
DDX5 5 18
DDX21 5 8.7
PWWP2B pool down (More than 5 peptides)
B
SFB-PWW2B : – + +
Myc-UHRF1 : + – +
IP: Myc
Cell lysates
α-Flag
α-Myc
C
IP : IgG α-PWWP2B
IP
Cell lysates
α-UHRF1
α-PWWP2B
D
PWWP2B WT
PWWP2B D1
PWWP2B D2
PWWP2B D3
PWWP2B D4
PWWP2B D5
UBD
PWWP
F
UHRF1 WT
UHRF1 D1
UHRF1 D2
UHRF1 D3
UHRF1 D4
UHRF1 D5
UBL
TTD
PHD
SRA
RING
E
Myc-UHRF1
GFP-PWWP2B : WT WT D1 D2 D3 D4 D5
IP: Myc
Cell lysates
α-GFP
α-Myc
G
SFB-PWWP2B
Myc-UHRF1 : WT WT D1 D2 D3 D4 D5
IP: Flag
Cell lysates
α-Myc
α-Flag
H
PWWP2B WT
GST-PWWP2B-N
GST-PWWP2B-C
GST
I
Myc-UHRF1
GST-PWWP2B
5% input GST N C
α-Myc
Coomassie
J
Myc-UHRF1 WT
Myc-UHRF1 D4
5% input
GST
GST-PWWP2BN
α-Myc
Coomassie
K
PWWP2B
UHRF1
TUDOR

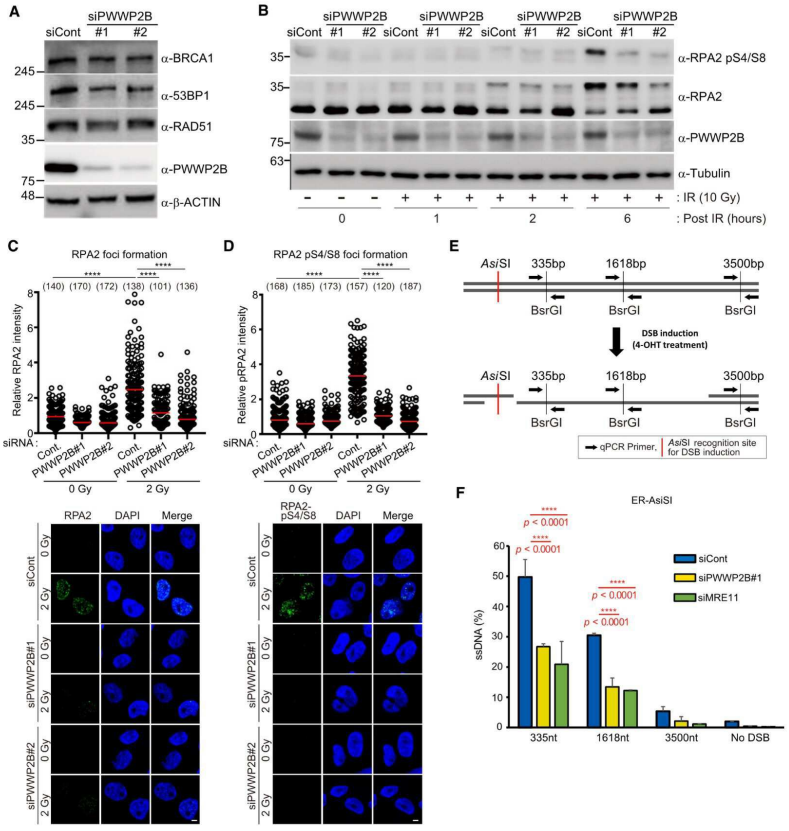
도면3


A
Live cell image: Microirradiation
Region
0s
10s
30s
60s
210s
360s
485s
B
Microirradiation: 10min (GFP-PWWP2B)
GFP-PWWP2B
γH2AX
DAPI
Merge
C
Microirradiation: 10min
GFP-PWWP2B
UHRF1
DAPI
Merge
D
Microirradiation: 10min (Endogenous PWWP2B)
PWWP2B
γH2AX
DAPI
Merge
E
Live cell image: Microirradiation
0min
1min
2min
5min
10min
20min
GFP-UHRF1
mCherry-PWWP2B
Relative Fluorescence Intensity
mCherry-PWWP2B
GFP-UHRF1
Time (min)
F
Microirradiation: 10min
GFP-PWWP2B
γH2AX
DAPI
Merge
WT
D1
D2
D3
D4
D5
% of cells with positive GFP on laser strips
GFP-PWWP2B: - WT D1 D2 D3 D4 D5
G
GFP-PWWP2B-A2A3
130
317
NLS
GFP-PWWP2B-A4
317
474
NLS
H
Live cell image: Microirradiation
0min
1min
5min
10min
GFP-PWWP2B-A2A3
GFP-PWWP2B-A4
% of cells with positive GFP on laser strips
0 10 0 10 (min)
GFP-PWWP2B -A2A3 -A4
I
Live cell image: Microirradiation
0min
1min
5min
10min
GFP-PWWP2B-A2A3
Control siRNA
UHRF1
Relative Fluorescence Intensity
siControl (N=13)
siUHRF1 (N=13)
Time (min)
J
Live cell image: Microirradiation
0min
1min
5min
10min
GFP-PWWP2B WT
Control siRNA
UHRF1
Relative Fluorescence Intensity
siControl (N=12)
siUHRF1 (N=12)
Time (min)
K
Live cell image: Microirradiation
0min
1min
5min
10min
GFP-UHRF1
Control siRNA
PWWP2B #1
PWWP2B#2
Relative Fluorescence Intensity
siControl (N=23)
siPWWP2B #1 (N=20)
siPWWP2B #2 (N=14)
Time (min)

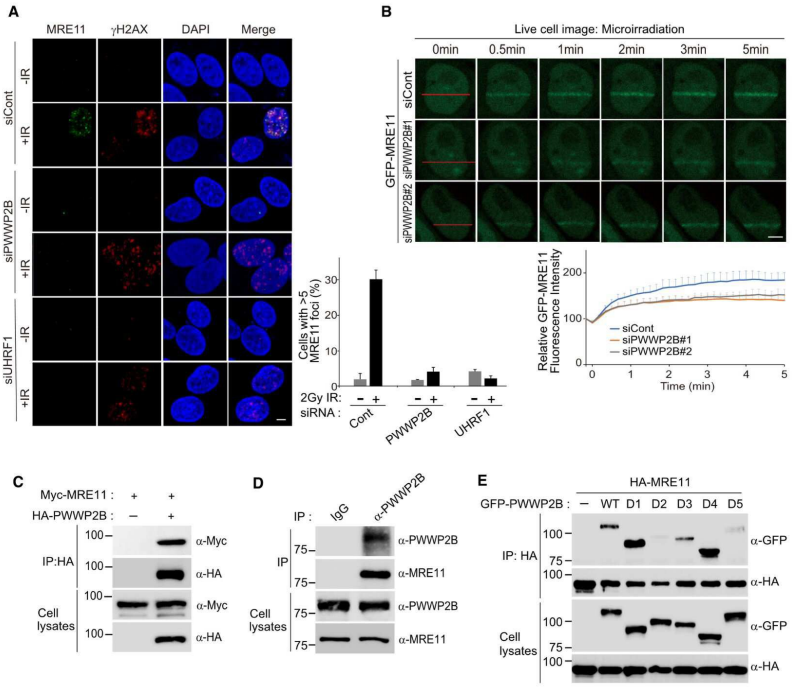
도면4


A
γH2AX foci per cell
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
Time (hrs): 0 6 12 18 24
1 Gy
B
HR
GFP positive (%)
I-SceI :
siRNA :
Cont.
BRCA2
PWWP2B#1
PWWP2B#2
C
NHEJ
GFP positive (%)
I-SceI :
siRNA :
Cont.
Lig4
PWWP2B#1
PWWP2B#2
H
% of survival colonies
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
IR (Gy) : 0 2 4 6
D
RAD51 foci formation (S phase)
Relative RAD51 intensity
(120) (86) (92) (99) (87) (205) (232) (241) (207) (117)
siRNA :
Cont.
PWWP2B#1
PWWP2B#2
BRCA2#1
BRCA2#2
0 Gy
2 Gy
RAD51
Cyclin A
DAPI
Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
siBRCA2#1
siBRCA2#2
E
RAD51 foci formation (S phase)
Relative RAD51 intensity
(170) (123) (168) (154) (193) (249)
Myc-PWWP2B :
siRNA :
0 Gy
2 Gy
RAD51
Myc
Cyclin A
Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#1+ Myc-PWWP2B
F
BRCA1 foci formation (S phase)
Relative BRCA1 intensity
(153) (127) (132) (168) (146) (153)
siRNA :
0 Gy
2 Gy
BRCA1
Cyclin A
DAPI
Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
G
53BP1 foci formation (S phase)
Relative 53BP1 intensity
n.s
(220) (135) (122) (143) (142) (118)
siRNA :
0 Gy
5 Gy
53BP1
Cyclin A
DAPI
Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2

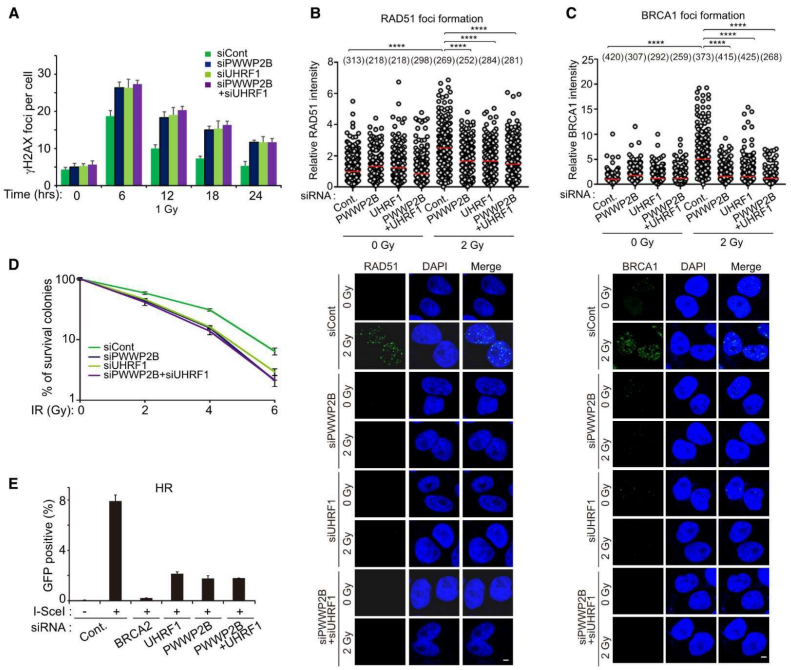
도면5


A
siPWWP2B
siCont #1 #2
α-BRCA1
α-53BP1
α-RAD51
α-PWWP2B
α-β-ACTIN
B
siPWWP2B
α-RPA2 pS4/S8
α-RPA2
α-PWWP2B
α-Tubulin
: IR (10 Gy)
: Post IR (hours)
C
RPA2 foci formation
Relative RPA2 intensity
siRNA : Cont. PWWP2B#1 PWWP2B#2
0 Gy
2 Gy
RPA2 DAPI Merge
D
RPA2 pS4/S8 foci formation
Relative pRPA2 intensity
RPA2-pS4/S8 DAPI Merge
E
AsiSI 335bp 1618bp 3500bp
BsrGI
DSB induction (4-OHT treatment)
qPCR Primer,
AsiSI recognition site for DSB induction
F
ER-AsiSI
ssDNA (%)
siCont
siPWWP2B#1
siMRE11
335nt 1618nt 3500nt No DSB

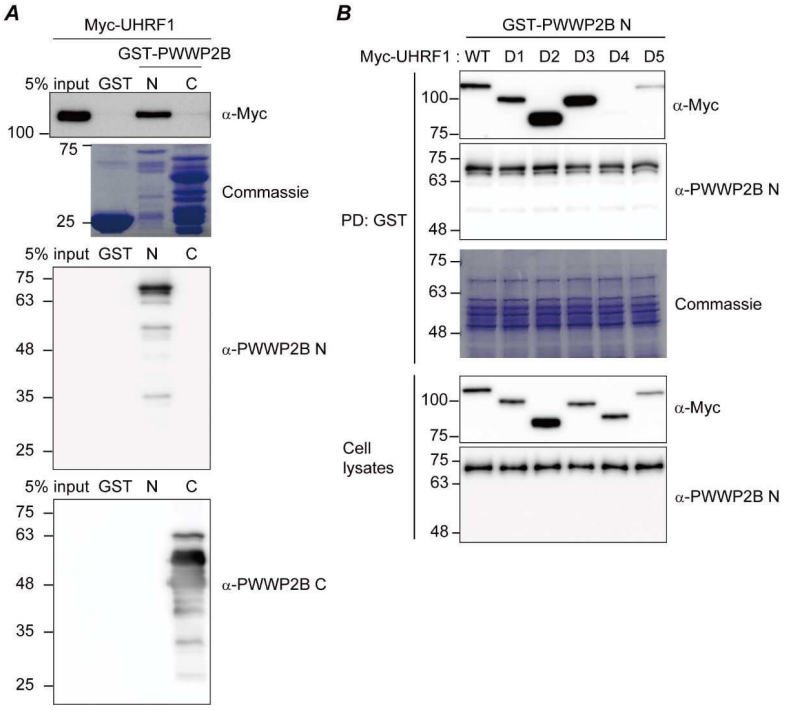
도면6


A
MRE11 γH2AX DAPI Merge
siCont -IR +IR
siPWWP2B -IR +IR
siUHRF1 -IR +IR
B
Live cell image: Microirradiation
0min 0.5min 1min 2min 3min 5min
GFP-MRE11
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
Cells with >5 MRE11 foci (%)
2Gy IR:
siRNA : Cont PWWP2B UHRF1
Relative GFP-MRE11 Fluorescence Intensity
Time (min)
C
Myc-MRE11 :
HA-PWWP2B :
IP:HA
Cell lysates
α-Myc
α-HA
D
IP : IgG α-PWWP2B
IP
Cell lysates
α-PWWP2B
α-MRE11
E
HA-MRE11
GFP-PWWP2B : – WT D1 D2 D3 D4 D5
IP: HA
Cell lysates
α-GFP
α-HA

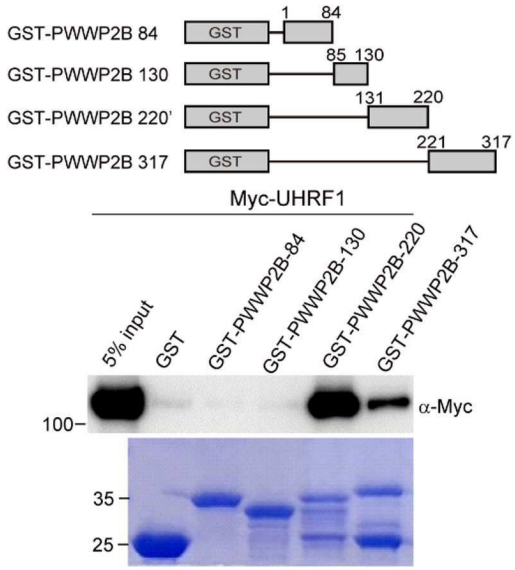
도면7


A
siCont
siPWWP2B
siUHRF1
siPWWP2B +siUHRF1
γH2AX foci per cell
Time (hrs): 0 6 12 18 24
1 Gy
B
RAD51 foci formation
Relative RAD51 intensity
(313)(218)(218)(298)(269)(252)(284)(281)
siRNA : Cont. PWWP2B UHRF1 PWWP2B +UHRF1 Cont. PWWP2B UHRF1 PWWP2B +UHRF1
0 Gy
2 Gy
C
BRCA1 foci formation
Relative BRCA1 intensity
(420)(307)(292)(259)(373)(415)(425)(268)
siRNA : Cont. PWWP2B UHRF1 PWWP2B +UHRF1 Cont. PWWP2B UHRF1 PWWP2B +UHRF1
0 Gy
2 Gy
D
% of survival colonies
siCont
siPWWP2B
siUHRF1
siPWWP2B+siUHRF1
IR (Gy): 0 2 4 6
RAD51
DAPI
Merge
BRCA1
DAPI
Merge
siCont
siPWWP2B
siUHRF1
siPWWP2B +siUHRF1
0 Gy
2 Gy
E
HR
GFP positive (%)
I-SceI : - + + + + +
siRNA : Cont. BRCA2 UHRF1 PWWP2B PWWP2B +UHRF1

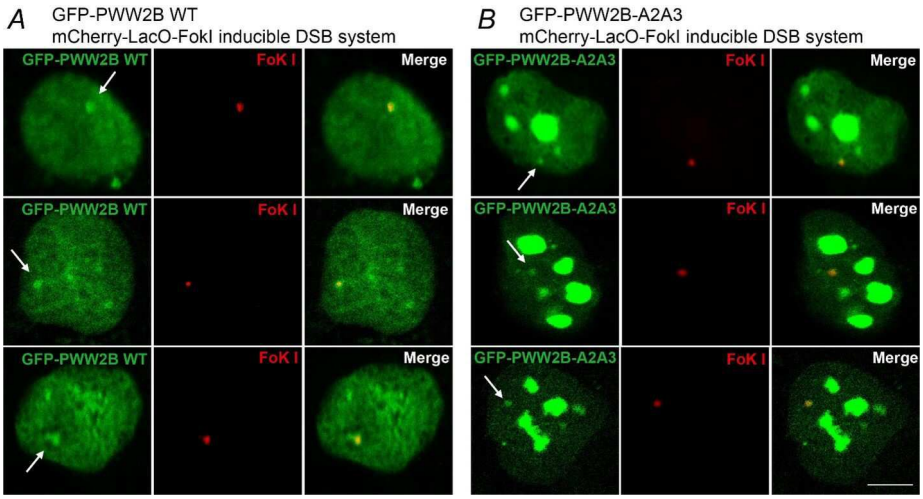
도면8


A
Myc-UHRF1
GST-PWWP2B
5% input GST N C
α-Myc
Commassie
α-PWWP2B N
α-PWWP2B C
B
GST-PWWP2B N
Myc-UHRF1 : WT D1 D2 D3 D4 D5
PD: GST
Cell lysates
α-Myc
α-PWWP2B N
Commassie

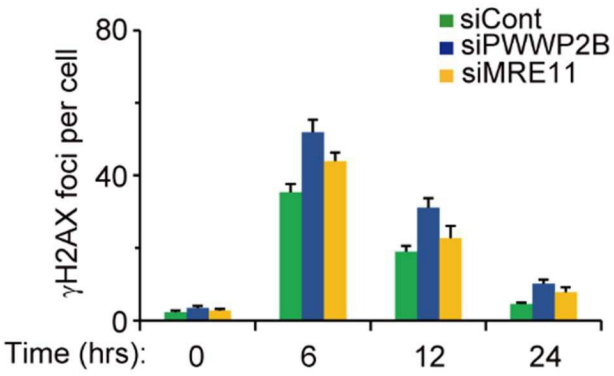
도면9



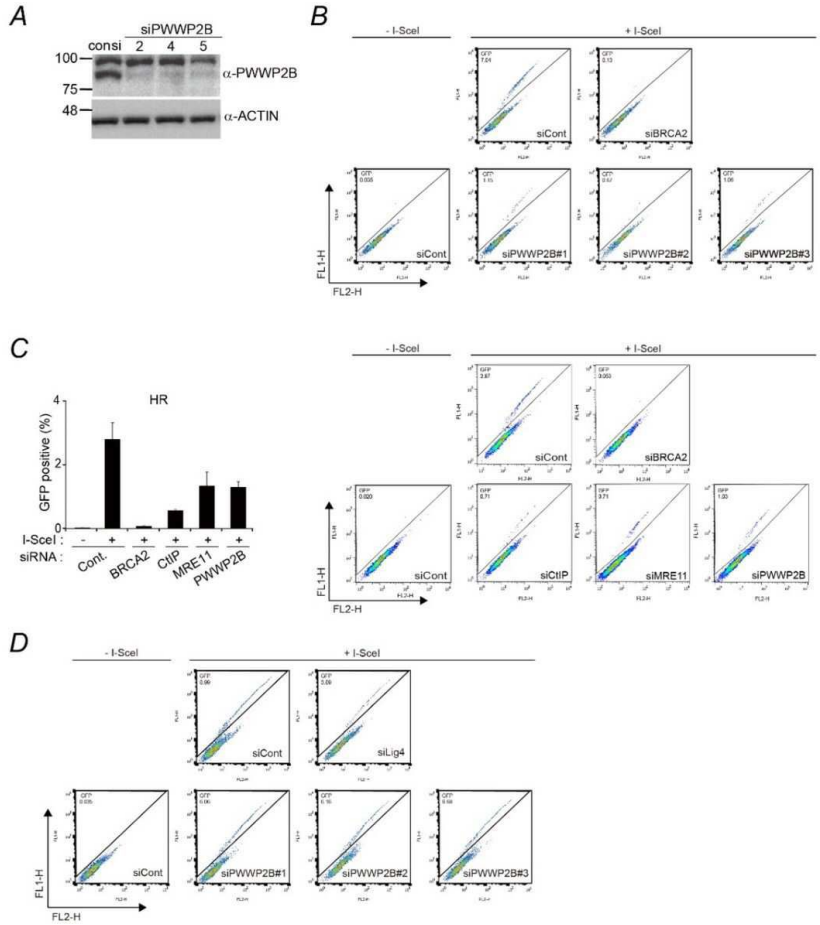
도면10



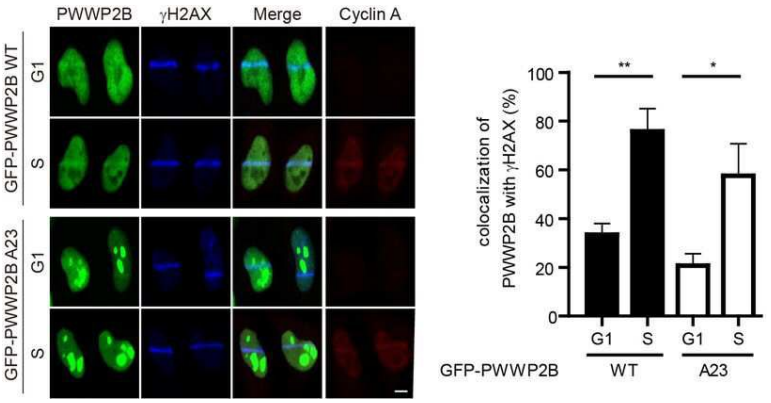
도면11



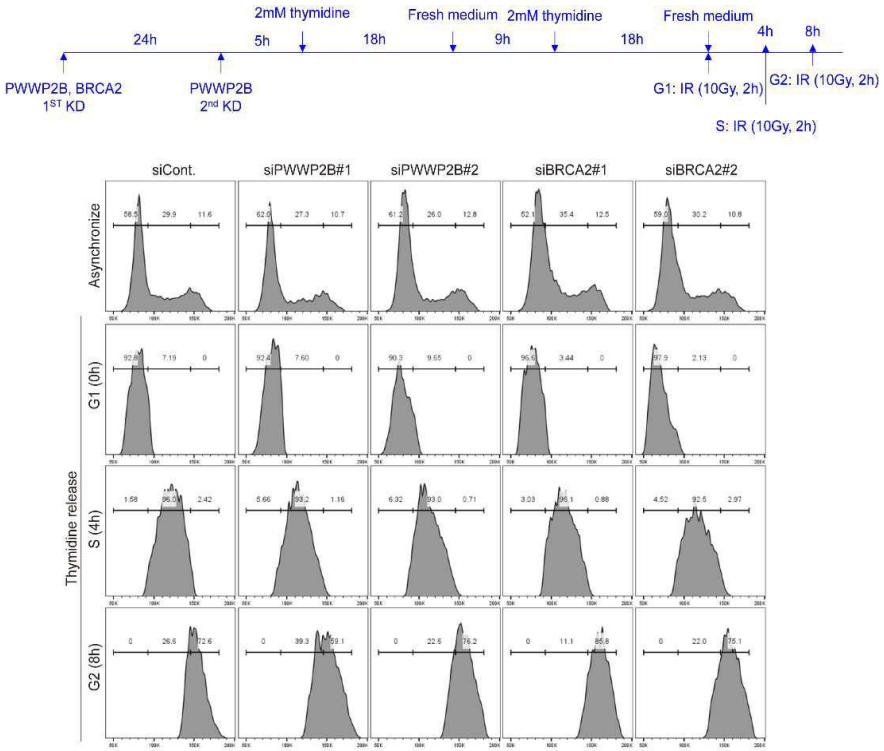
도면12


A
siPWWP2B
consi 2 4 5
100
75
48
α-PWWP2B
α-ACTIN
B
- I-SceI
+ I-SceI
siCont
siBRCA2
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
siPWWP2B#3
FL1-H
FL2-H
C
HR
GFP positive (%)
I-SceI :
siRNA :
Cont.
BRCA2
CtIP
MRE11
PWWP2B
siCtIP
siMRE11
D
siLig4

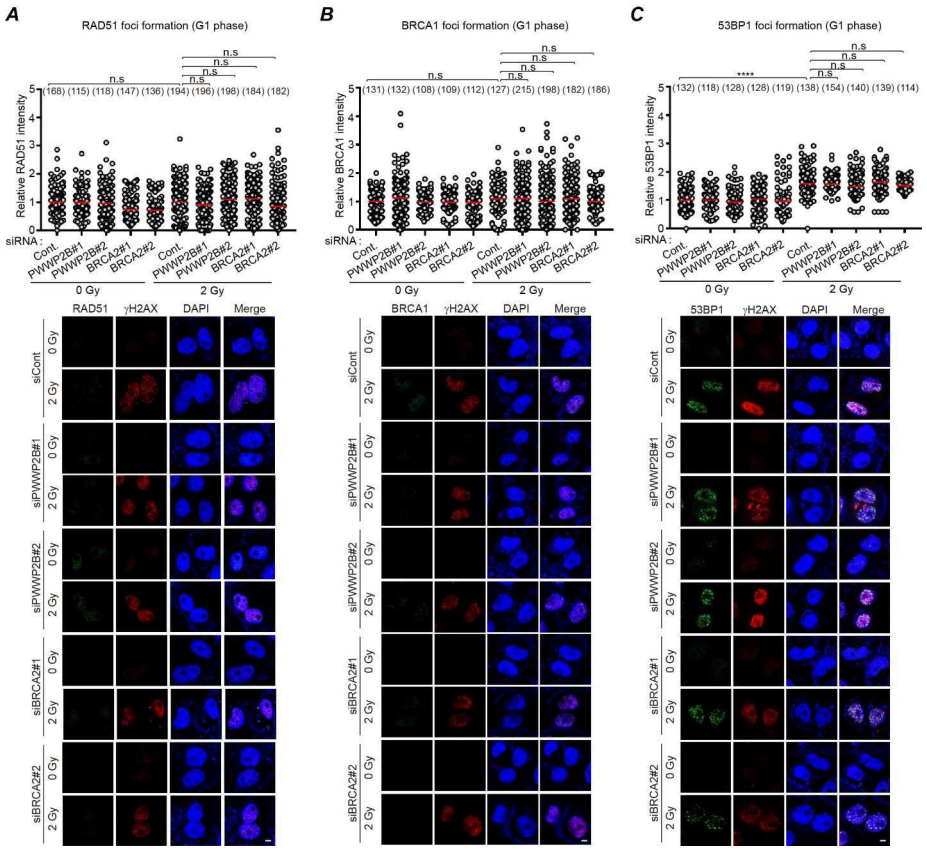
도면13


PWWP2B
γH2AX
Merge
Cyclin A
GFP-PWWP2B WT
GFP-PWWP2B A23
G1
S
colocalization of PWWP2B with γH2AX (%)
**
*
GFP-PWWP2B
WT
A23

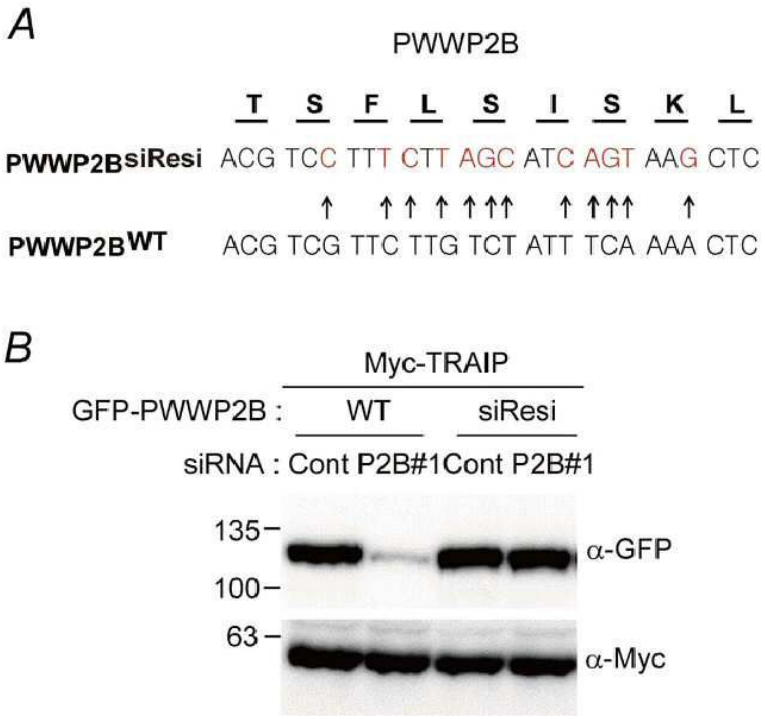
도면14


2mM thymidine
Fresh medium
2mM thymidine
Fresh medium
24h
5h
18h
9h
18h
4h
8h
PWWP2B, BRCA2
1ST KD
PWWP2B
2nd KD
G1: IR (10Gy, 2h)
G2: IR (10Gy, 2h)
S: IR (10Gy, 2h)
siCont.
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
siBRCA2#1
siBRCA2#2
Asynchronize
Thymidine release
G1 (0h)
S (4h)
G2 (8h)

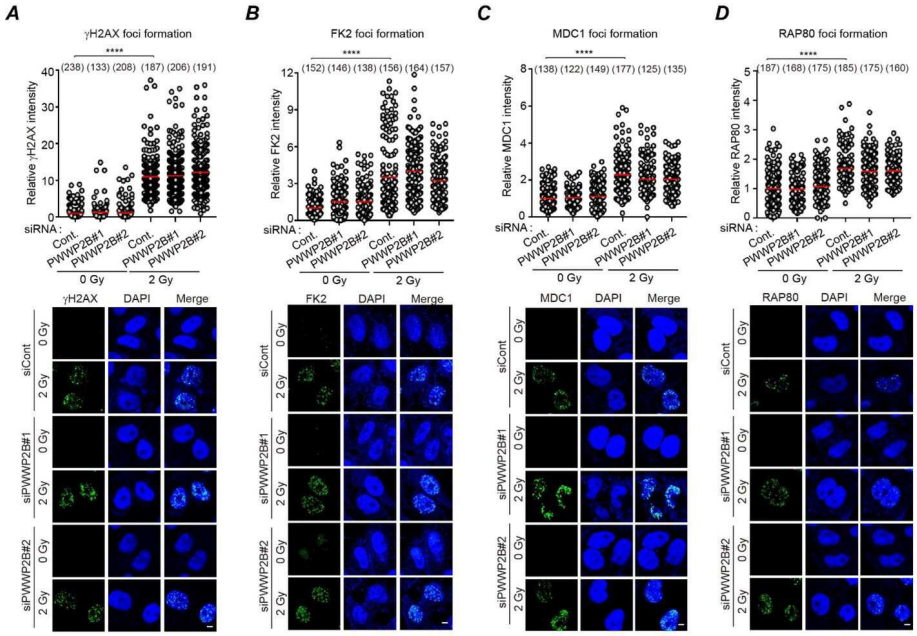
도면15


A
RAD51 foci formation (G1 phase)
Relative RAD51 intensity
(168) (115) (118) (147) (136) (194) (196) (198) (184) (182)
B
BRCA1 foci formation (G1 phase)
Relative BRCA1 intensity
(131) (132) (108) (109) (112) (127) (215) (198) (182) (186)
C
53BP1 foci formation (G1 phase)
Relative 53BP1 intensity
(132) (118) (128) (128) (119) (138) (154) (140) (139) (114)
n.s
****
siRNA :
Cont.
PWWP2B#1
PWWP2B#2
BRCA2#1
BRCA2#2
0 Gy
2 Gy
RAD51
BRCA1
53BP1
γH2AX
DAPI
Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
siBRCA2#1
siBRCA2#2

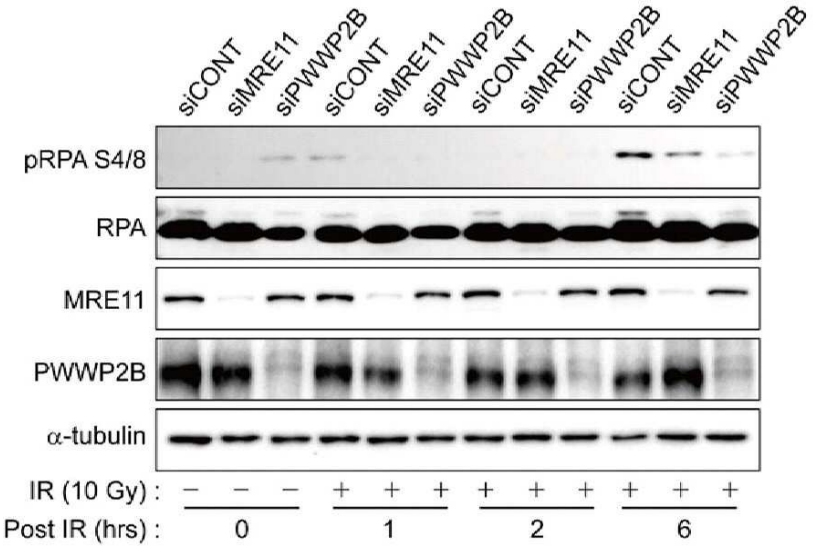
도면16


A
PWWP2B
T S F L S I S K L
PWWP2BsiResi ACG TCC TTT CTT AGC ATC AGT AAG CTC
PWWP2BWT ACG TCG TTC TTG TCT ATT TCA AAA CTC
B
Myc-TRAIP
GFP-PWWP2B : WT siResi
siRNA : Cont P2B#1Cont P2B#1
135
100
63
α-GFP
α-Myc

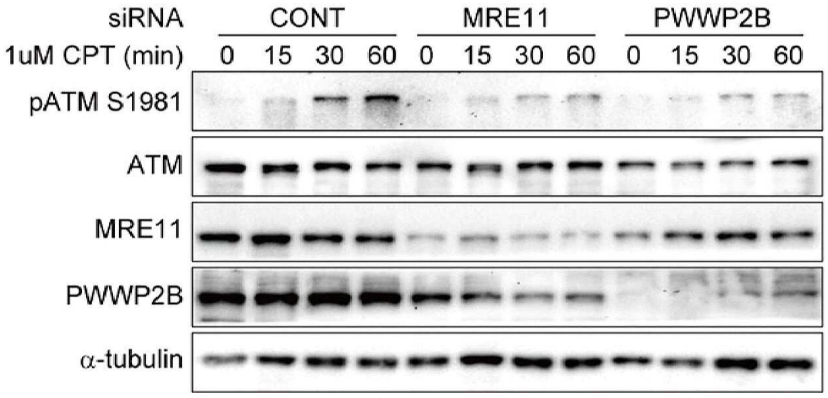
도면17


A
γH2AX foci formation
Relative γH2AX intensity
siRNA :
Cont. PWWP2B#1 PWWP2B#2 Cont. PWWP2B#1 PWWP2B#2
0 Gy 2 Gy
γH2AX DAPI Merge
siCont
siPWWP2B#1
siPWWP2B#2
B
FK2 foci formation
Relative FK2 intensity
FK2 DAPI Merge
C
MDC1 foci formation
Relative MDC1 intensity
MDC1 DAPI Merge
D
RAP80 foci formation
Relative RAP80 intensity
RAP80 DAPI Merge

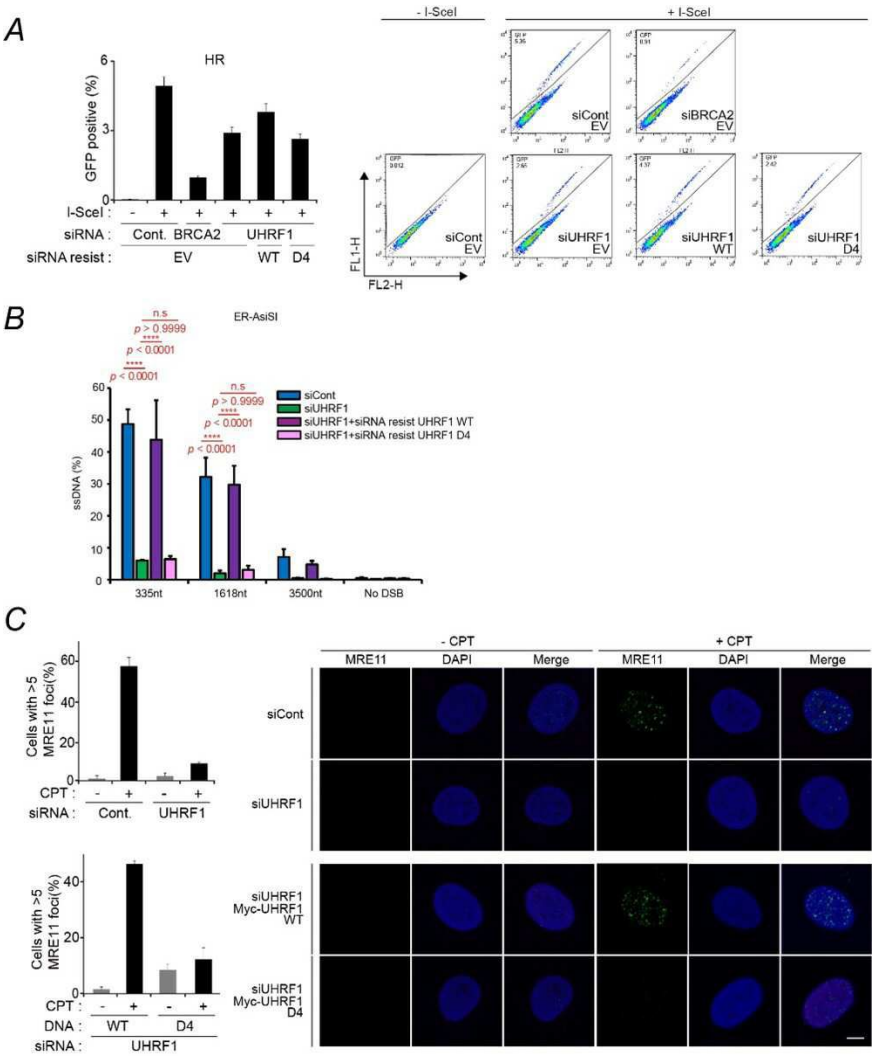
도면18


siCONT
siMRE11
siPWWP2B
siCONT
siMRE11
siPWWP2B
siCONT
siMRE11
siPWWP2B
siCONT
siMRE11
siPWWP2B
pRPA S4/8
RPA
MRE11
PWWP2B
α-tubulin
IR (10 Gy) : − − − + + + + + + + + +
Post IR (hrs) : 0 1 2 6

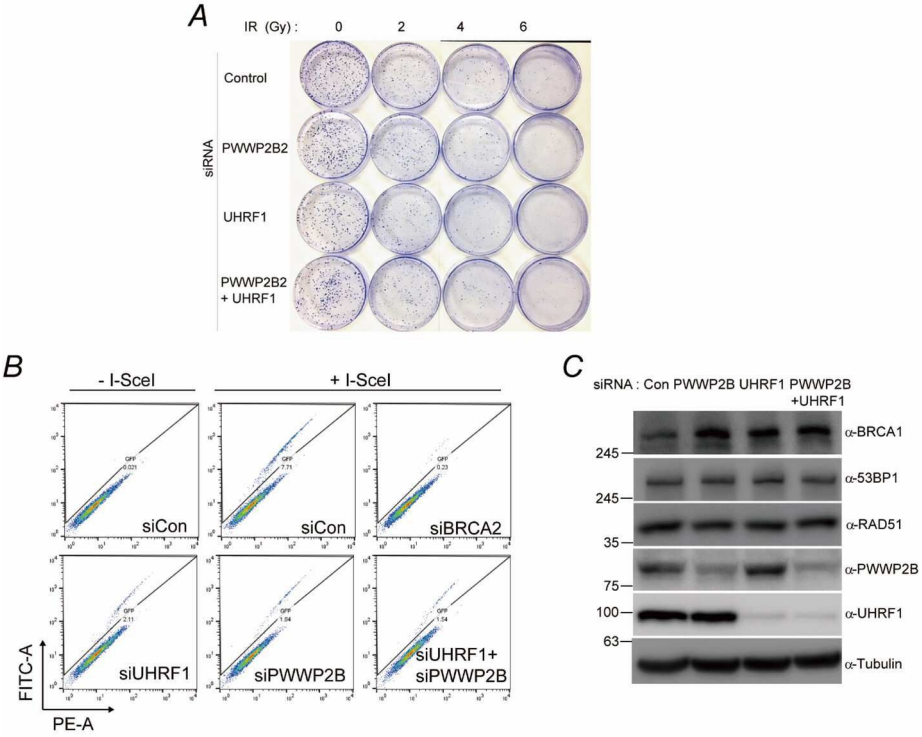
도면19


siRNA
CONT
MRE11
PWWP2B
1uM CPT (min)
0 15 30 60 0 15 30 60 0 15 30 60
pATM S1981
ATM
MRE11
PWWP2B
α-tubulin

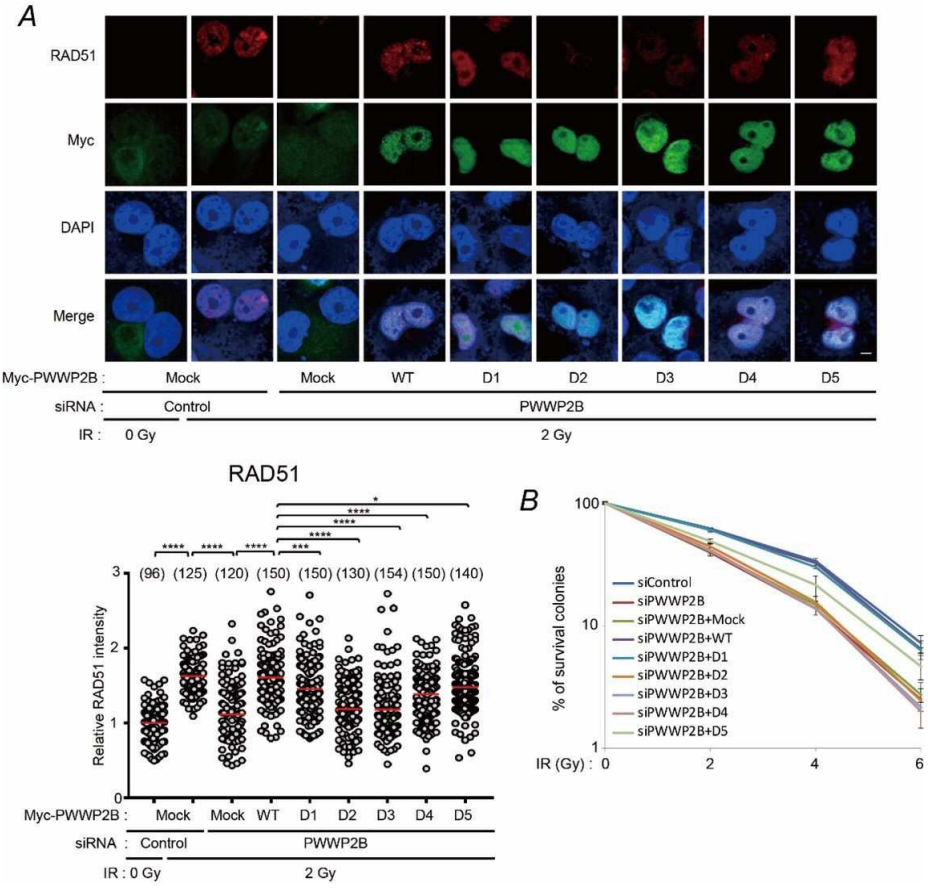
도면20


A
HR
GFP positive (%)
I-SceI :
siRNA :
siRNA resist :
Cont.
BRCA2
UHRF1
EV
WT
D4
- I-SceI
+ I-SceI
siCont EV
siBRCA2 EV
siUHRF1 EV
siUHRF1 WT
siUHRF1 D4
FL1-H
FL2-H
B
ER-AsiSI
ssDNA (%)
siCont
siUHRF1
siUHRF1+siRNA resist UHRF1 WT
siUHRF1+siRNA resist UHRF1 D4
335nt
1618nt
3500nt
No DSB
C
- CPT
+ CPT
MRE11
DAPI
Merge
siCont
siUHRF1
siUHRF1 Myc-UHRF1 WT
siUHRF1 Myc-UHRF1 D4
Cells with >5 MRE11 foci(%)
CPT :
siRNA :
DNA :

도면21


A
IR (Gy) : 0 2 4 6
siRNA
Control
PWWP2B2
UHRF1
PWWP2B2 + UHRF1
B
- I-SceI
+ I-SceI
siCon
siCon
siBRCA2
siUHRF1
siPWWP2B
siUHRF1+ siPWWP2B
FITC-A
PE-A
C
siRNA : Con PWWP2B UHRF1 PWWP2B +UHRF1
α-BRCA1
α-53BP1
α-RAD51
α-PWWP2B
α-UHRF1
α-Tubulin
245
245
35
75
100
63

도면22


A
RAD51
Myc
DAPI
Merge
Myc-PWWP2B : Mock Mock WT D1 D2 D3 D4 D5
siRNA : Control PWWP2B
IR : 0 Gy 2 Gy
RAD51
Relative RAD51 intensity
(96) (125) (120) (150) (150) (130) (154) (150) (140)
Myc-PWWP2B : Mock Mock WT D1 D2 D3 D4 D5
siRNA : Control PWWP2B
IR : 0 Gy 2 Gy
B
% of survival colonies
IR (Gy) : 0 2 4 6
siControl
siPWWP2B
siPWWP2B+Mock
siPWWP2B+WT
siPWWP2B+D1
siPWWP2B+D2
siPWWP2B+D3
siPWWP2B+D4
siPWWP2B+D5

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.