(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0089999
(43) 공개일자 2021년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57446 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2020-0003268
(22) 출원일자 2020년01월09일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
진동훈
서울특별시 강동구 고덕로 131, 138동 1703호(암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
문재희
서울특별시 노원구 섬밭로 139, 101동 1504호(공릉동, 공릉풍림아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

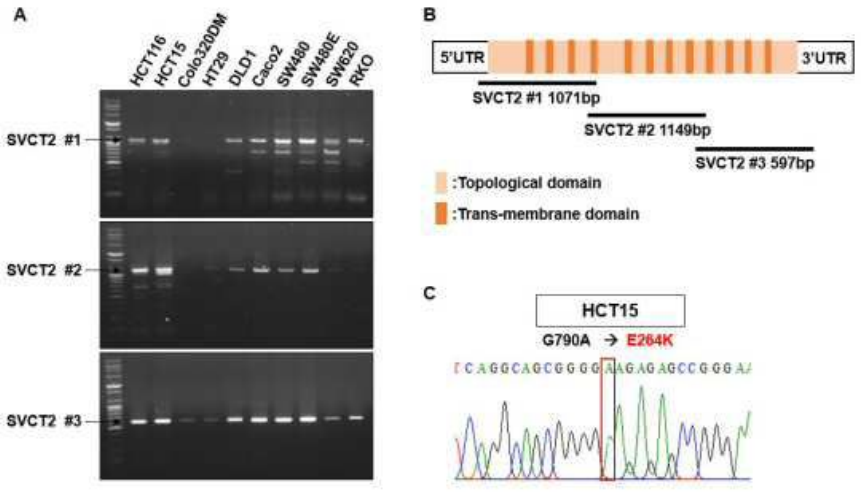
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **대장암 진단용 신규한 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 대장암 진단 및 예후 예측을 위한 신규한 바이오마커에 관한 것이다. 본 발명에 따른 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커로서 SVCT2 E264K는 정상인에 비해 암 환자에서 발현이 증가하는 양상을 보인다. 따라서, 상기 SVCT2 E264K는 대장암의 진단 및 예후 예측용 바이오마커로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
류예성
서울특별시 종로구 경교장길 35, 303동 405호(평동, 경희궁자이 3단지)
박상수
인천광역시 연수구 센트럴로 194, 2203동 804호(송도동, 더샵 센트럴파크2)

명 세 서

청구범위

청구항 1

돌연변이된 SVCT2를 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 돌연변이된 SVCT2는 서열번호 1의 아미노산 서열에 264번째 아미노산인 글루탐산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 글루탐산이 라이신으로 치환 것인, 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커.

청구항 4

제1항의 바이오마커를 검출하기 위한 물질을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 조성물.

청구항 5

제4항의 조성물을 포함하는, 대장암 진단 및 예후 예측용 키트.

청구항 6

대장암 의심 환자로부터 분리된 시료에서 돌연변이된 SVCT2의 존재 여부를 검출하는 단계; 및

상기 대장암 의심 환자가 돌연변이된 SVCT2를 가지는 경우, 상기 환자가 대장암이거나 예후가 나쁠 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 진단 및 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대장암 진단을 위한 신규한 바이오마커에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다(Klaunig & Kamendulis, Annu Rev Pharmacol Toxicol., 44:239-267, 2004). 초기에 발견된 암일 경우 수술, 방사선 치료, 화학적 요법 등의 치료법이 있으나 그 부작용이 큰 문제로 대두되고 있으며, 말기 암이나 전이된 암의 경우 특별한 치료법 없이 시한부 인생으로 삶을 마감하는 상황이다.

[0003] 최근, 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고는 있지만, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있다. 이에 따라, 암과 관련된 다양한 생체 내 분자를 동정하고 이를 표적으로 하는 약물을 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 이러한 약물 중 일부를 조합하여 암 치료 효과를 증진시키고자 하는 노력 역시 시도되고 있다.

[0004] 구체적으로, NCCN 가이드라인에 따르면, 대장암 환자에게 권고되는 치료제는 FOLFIRI(fluoropyrimidine, leucovorin, irinotecan) 및 FOLFOX (fluoropyrimidine, leucovorin, oxaliplatin), Erbitux, Vectibix와 같은 EGFR 표적 항암항체 치료제와 Avastin 혹은 Zaltrap과 같은 신생혈관 형성 억제제가 있다. 그러나, Erbitux

처방을 받은 환자에서의 치료 반응율은 20%로 매우 낮다. 뿐만 아니라, 치료 효과를 나타낸 환자들의 3년 내 재발율이 85%로서, Erbitux에 대해 반응성이 없거나 치료 후 저항성이 발생한 경우나, Avastin을 처방 받은 경우도 이후 적용할 수 있는 표적 치료 약물이 제한적이다. 특히, KRAS 변이 환자 및 기존 항암제에 저항성을 나타내는 환자에게 적용할 수 있는 새로운 표적치료제 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Klaunig & Kamendulis, Annu Rev Pharmacol Toxicol., 44:239-267, 2004

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 암과 관련된 표적 분자에 관하여 연구하던 중, 암 환자에게서 정상 대조군과 비교하여 N-말단에서 264번째 아미노산인 Glu가 Lys으로 치환된 SVCT2(이하, SVCT2 E264K라고 함)의 발현이 증가하므로, 상기 SVCT2 E264K가 암의 치료에 있어 효과적인 타겟이 될 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 본 발명의 목적은 대장암 진단 및 예후를 예측하기 위한 바이오마커를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 바이오마커를 이용한 대장암 진단 및 예후를 예측하기 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 돌연변이된 SVCT2를 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커를 제공한다.

[0010] 상기 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 바이오마커를 검출하기 위한 물질을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 및 예측용 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 대장암 진단 및 예측용 조성물을 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 대장암 의심 환자로부터 분리된 시료에서 돌연변이된 SVCT2의 존재 여부를 검출하는 단계; 및 상기 대장암 의심 환자가 돌연변이된 SVCT2를 가지는 경우, 상기 환자가 대장암이거나 예후가 나쁠 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 진단 및 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커로서 SVCT2 E264K는 정상인에 비해 암 환자에서 발현이 증가하는 양상을 보인다. 따라서, 상기 SVCT2 E264K는 대장암의 진단 및 예후 예측용 바이오마커로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 대장암 세포주에서 SVCT2의 돌연변이를 분석한 결과로서, 도 1A는 SVCT2 유전자의 중합효소 연쇄 반응 결과를 나타낸 것이고, 도 1B는 SVCT2의 모사도를 나타낸 것이고(검은 구역은 비번역부위(Untranslated region)를 의미함), 도 1C는 HCT15 세포주에서 SVCT2의 염기서열 분석 결과(빨간 부분은 돌연변이가 일어난 부분)를 나타낸 것이다.

도 2는 SVCT2 E264K의 정보 및 SVCT2 발현량에 따른 생존 곡선을 나타낸 것으로, 도 2A는 COSMIC 데이터 베이스를 통해 확인한 SVCT2 E264K의 정보이고, 도 2B는 SVCT2 E264K가 발현하고 있는 대장암 세포주이고, 도 2C는 SVCT2(wild type 및/또는 mutant type) 발현양에 따른 대장암 세포주의 생존 곡선이고, 도 2D는 SVCT2 E264K 발현 조직을 나타낸 것이다.

도 3은 SVCT2 E264K의 세포내 위치를 확인한 것으로, 도 3A 및 도 3B는 세포분획기법으로 HCT15 및 SW620 대장암 세포주에서 SVCT2의 위치를 나타낸 것이다(α-tubulin은 세포질 표지자, E-cadherin은 세포막 표지자로 사용됨; T: Total(세포 전체), C: Cytosol(세포질), M: Membrane(세포막)을 나타냄).

도 4는 SVCT2 E264K의 세포증식 정도를 분석한 결과로, 도 4A는 SVCT2 야생형과 SVCT2 E264K를 293T 세포주에 플라스미드를 활용하여 농도 의존적으로 형질 주입한 후, 웨스턴 블롯으로 단백질의 발현 수준을 확인한 것이다. 도 4B는 SVCT2 야생형과 SVCT2 E264K를 293T 세포주에 형질 주입하여 시간 의존적인 세포 분열 정도를 확인한 것이다. 도 4C는 SVCT2 야생형과 SVCT2 E264K를 293T 세포주에 형질 주입하여 콜로니 형성 정도를 확인한 것이다.

도 5는 대장암 세포주에서 SVCT2 발현과 세포 사멸을 확인한 것으로, 도 5A 및 도 5B는 RNA 간섭을 통해 SVCT2 유전자 억제시 간섭 RNA 농도 의존적으로 세포 사멸 유도한 결과를 나타내는 것이다. 또한, 도 5C는 Annexin V, PI 염색 후 FACS 분석을 통해 세포 사멸을 관찰한 것이다.

도 6은 RNA 간섭 실험을 통해 세포 분열에 대한 단백질과 세포의 운동성 표지자에 대한 단백질의 발현 수준을 분석한 결과이다.

도 7은 SVCT2 E264K가 세포의 이주성 및 침윤성에 미치는 영향을 분석한 결과로, 간섭 RNA 농도에 따른 세포의 이주성(도 7A) 및 침윤성(도 7B)의 변화를 측정한 결과이다.

도 8은 대장암 환자에서 SVCT2 E264K의 분포를 확인한 결과로, 도 8A는 64명의 환자조직에서 SVCT2 mRNA 발현을 분석한 결과이고, 도 8B는 염기서열 분석을 통한 SVCT2 E264K 돌연변이의 비율을 조사한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 일 측면으로, 돌연변이된 SVCT2를 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 바이오마커를 제공한다.

[0017] 본 발명에서 용어, "SVCT2(sodium-dependent vitamin C transporter)"는 비타민 C의 환원형인 L-ascorbic acid를 세포 내로 빠르게 수송하는 수송 막단백질로 기능이 1997년 처음 보고된 이후 다양한 장기에서 활성산소로부터 신경세포를 보호하거나 정자형성을 활성화하는데 도움을 준다고 보고가 있다. 최근 비타민 C의 항암효과에 더불어 SVCT2도 주목을 받고 있다. 고농도 비타민 C 항암치료에 있어서 SVCT2를 통한 비타민 C의 수송이 항암치료에 중요한 역할을 한다는 과학적 보고가 잇따르고 있고, 유방암의 경우 SVCT2를 통한 비타민 C가 암세포에서 활성산소를 증가시켜 세포사멸을 유도한다는 보고가 있다. 하지만 암에서의 SVCT2 발현과 역할은 여전히 불명확하다. 기존 보고에 따르면 SVCT2 발현의 증가는 항암 효능을 보인다. 하지만 대장암의 SVCT2 발현에 따른 Kaplan-meier 생존 곡선은 SVCT2 발현이 높을수록 대장암 환자의 예후가 좋지 않음을 보여준다. 이러한 결과는, 수송 막 단백질 기능이 아닌 암에서의 특이적인 기능을 가지고 있음을 알 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 SVCT2는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 SVCT2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2로 이루어진 염기서열일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 상기 돌연변이된 SVCT2는 서열번호 1의 아미노산 서열에 264번째 아미노산인 글루탐산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있고, 구체적으로는 N-말단에서 264번째 아미노산인 글루탐산이 라이신으로 치환된 것(SVCT2 E264)일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 SVCT2 E264K는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 상기 SVCT2 E264K 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 4로 이루어진 염기서열일 수 있다. 상기 서열번호 4는 서열번호 3의 790번째 뉴클레오타이드가 구아닌에서 아데닌으로 치환된 것일 수 있다.

[0020] 본 발명은 일 측면으로 상기 바이오마커를 검출하기 위한 물질을 유효성분으로 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 SVCT2 E264K 단백질, 또는 이를 암호화하는 유전자 및/또는 mRNA를 검출하는 물질을 유효성분으로 포함하는 대장암의 진단 및 예후 예측용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 용어, "유전자 및/또는 mRNA를 검출하는 물질"이란, 시료에 포함된 표적 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여, 상기 표적 유전자 및 이로부터 전사된 mRNA를 측정하는 방법에 사용되는 물질을 의미한다. 구체적으로 상기 물질은 PCR, RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 실시간 RT-PCR(real time

quantitative RT-PCR), 노던 블럿팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0023] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 SVCT2의 790번째 뉴클레오타이드가 구아닌에서 아데닌으로 치환된 것을 확인할 수 있는 프라이머라면 제한없이 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머는 790번째 뉴클레오타이드를 중심으로 제작될 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 15 내지 35개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있으며, 20 내지 25개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

[0024] 한편, 상기 "프로브"는 SVCT2 E264K 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 될 수 있고, 상기 각 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 한, 상기 프로브의 뉴클레오티드 서열은 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명에서 SVCT2의 790번째 뉴클레오타이드가 구아닌에서 아데닌으로 치환된 것을 확인할 수 있는 프로브라면 제한없이 사용될 수 있다. 또한, 상기 프로브는 15 내지 35개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있으며, 20 내지 25개의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있다.

[0025] 본 발명의 용어 "단백질을 검출하는 물질"이란, 시료에 포함된 표적 단백질의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 물질을 의미한다.

[0026] 상기 단백질의 수준을 측정하는 물질은 상기 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 일 구체예에서, SVCT2의 돌연변이에 의해 변형되는 단백질의 구조에 특이적으로 결합하는 특이적인 항체를 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 항체는 웨스턴 블럿(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(ouchterlony) 면역 확산법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용될 수 있다.

[0028] 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체과 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 인간화 항체 등을 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 경쇄 및 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 이의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), $F(ab')_2$ 및 Fv 등이 될 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 측면은 상기 조성물을 포함하는 대장암 진단 및 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0030] 상기 키트는 PCR(polymerase chain reaction) 키트, RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다. 구체적으로, 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명자들은 SVCT2 E264K 단백질이 암 환자군에서 발현이 증가함을 확인하였으므로, 대장암 진단 및 예후 예측에 유용하게 사용될 수 있음을 처음으로 규명하였다.

[0032] 이에, 본 발명은 일 측면으로, 대장암 의심 환자로부터 분리된 시료에서 돌연변이된 SVCT2의 존재 여부를 검출하는 단계; 및 상기 대장암 의심 환자가 돌연변이된 SVCT2를 가지는 경우, 상기 환자가 대장암이거나 예후가 나쁠 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 대장암 진단 및 예후 예측에 필요한 정보제공방법을 제공한다.

[0033] 본 발명에서 상기 돌연변이된 SVCT2의 존재 여부 검출은 돌연변이된 SVCT2의 단백질, 또는 이를 암호화하는 유전자 및/또는 mRNA를 검출하는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은

암의 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0035] 본 발명의 용어 "예후"란, 질환의 경과 및 사망 또는 생존의 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후 또는 예후 예측이란 질환의 경과는 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 전/후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 예후는 대장암의 치료 전/후, 질환의 경과 및 완치여부를 미리 예상하여 대장암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 행위로 해석될 수 있다.

[0036] 본 발명의 용어 "시료"란, 암 의심 환자로부터 분리되어 SVCT2 E264K의 발현 수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하며, 구체적으로 상기 시료는 혈액, 암세포 또는 암조직일 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **실험예 1. 대장암 세포주에서 SVCT2의 돌연변이 분석**

[0039] **실험예 1.1. RNA 합성**

[0040] 대장암 세포주 10개를 원심분리기 6,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. TRIZOL(ambion, 15596018) 1 ㎖을 펠렛에 넣어 30분간 ice에서 반응시킨다. 이때, 세포 펠렛을 잘 풀어주었다. 반응 후 200 ㎕ Chloroform(VWR life science 0757-950ML)을 넣어 1분간 반응 후 강하게 섞어, 원심분리기 13,000 rpm 10분 원심분리하였다. 상층액을 600 ㎕ iso-propyl alcohol(덕산, UN1219)이 들어있는 e-tube에 넣어 살살 섞는다. 원심분리기 13,000 rpm에 10분 원심분리하여 RNA 펠렛만 남기고 상층액을 버린 후, 75% 에탄올로 세척하였다. 이때, 펠렛이 살짝 떨어져서 펠렛이 전반적으로 모두 씻겨지는 것이 좋다. 세척 후 13,000 rpm에 10분 원심분리하여 펠렛만 남기고 상층액은 버린 후, 공기 중에서 건조시켰다. 펠렛이 모두 건조되면 적당량의 DEPC water로 펠렛을 녹이고 농도를 측정하였다.

[0041] **실험예 1.2. 역전사 중합효소 연쇄반응**

[0042] 역전사 중합효소 연쇄반응은 AccuPower RT-PCR premix & master mix (BIONEER, 20-k-2055)를 통해 진행하였다. 구체적으로, 합성한 RNA를 70℃에서 5분간 반응시키고, AcuuPower RT-PCR premix & master mix에 Oligo dT 10 pmole 1 ㎕, RNA 1 ㎕, DEPC water 18 ㎕(46-2224, Invitrogen)(총 부피: 20 ㎕)을 넣고 42℃, 1시간; 94℃, 5분간 반응시켜 상보적 DNA를 합성하였다.

[0043] **실험예 1.3. 중합효소 연쇄반응**

[0044] 중합효소 연쇄반응은 AccuPower Gold multiplex PCR premix(BIONEER, k-2116)를 통해 진행하였다. 구체적으로, Forward primer 10 pmole 1 ㎕, Reverse primer 10 pmole 1 ㎕, DNA template 2 ㎕, sterile water 16 ㎕를 넣고 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다. SVCT2 #1, SVCT2 #2 및 SVCT2 #3의 프라이머를 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

[0045]

	염기서열	비고
SVCT2 #1 forward primer	5'-CTGGGCTCCTAGCTTGAATAAG-3'	서열번호 5
SVCT2 #1 reverse primer	5'-ACCGTGAAGATGAAGCAGAG-3'	서열번호 6
SVCT2 #2 forward primer	5'-CATCGGTCCCTTGACCATTAC-3'	서열번호 7
SVCT2 #2 reverse primer	5'-GTTGGGCTGAATGGGTAAGTAG-3'	서열번호 8
SVCT2 #3 forward primer	5'-CCAAGTTACCTCAGACAGAACC-3'	서열번호 9
SVCT2 #3 reverse primer	5'-CCAGCAATGGACACTCTCAA-3'	서열번호 10

[0046] **실험예 1.4. 염기서열 분석**

[0047] Macrogen사에서 진행하는 sequencing 분석 시스템을 이용하여 분석하였다.

[0048] **실험예 1.5. 결과 확인**

[0049] 실험실에 구비되어 있는 총 10개의 대장암 세포주에서 RNA를 추출하여, 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 상보적 cDNA를 합성하였다. 그 후 SVCT2를 세 부분으로 나누어, 중합효소 연쇄반응을 통해 SVCT2 #1, SVCT2 #2 및 SVCT2 #3의 DNA 가닥을 얻어 염기서열 분석을 실시하였다(도 1). 그 결과, 도 1을 참조하면, HCT15 세포주에서 SVCT2 E264K라는 점 돌연변이가 발견되었다.

[0050] **실험예 2. SVCT2 E264K의 정보와 SVCT2 발현양에 따른 생존 곡선**

[0051] **실험예 2.1. 세포 배양**

[0052] HCT15, SW620 대장암 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였다. RPMI-1640배지 (WELGENE, LM 001-01)를 사용하여 37℃, 5% 이산화탄소에서 배양하였다.

[0053] **실험예 2.2. 세포분획**

[0054] The subcellular protein fractionation kit(Pierce, 78840)을 통해 진행하였다. 파쇄된 세포는 세포질과 세포막 핵으로 분획이 가능하다. 세포질 분획은 고정된 세포를 EDTA로 떨어뜨린 후 CEB 용액과 세포를 상온에서 10분간 반응시킨다. 원심분리기를 통해 500xg로 원심분리를 수행하고, 상층액을 깨끗한 튜브에 담는다. 세포막 분획은 MEB 용액과 세포를 상온에서 10분간 반응시킨다. 원심분리기를 통해 3,000xg로 원심분리를 수행하고, 상층액을 깨끗한 튜브에 담는다.

[0055] **실험예 2.3. 웨스턴 블롯**

[0056] RIPA 용액(T&I, BRI-9001)으로 세포를 30분간 반응하여 파쇄한 후, 13,000 rpm 10분간 원심분리 한다. 세포로부터 얻은 분획된 단백질은 8 내지 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDSPAGE)에 로딩되었으며, Immobilon-P membrane(EMD, IPVH00010)에 트랜스퍼하였다. Membrane은 5% skim milk, 1차 항체 혼합물과 함께 4℃로 12 내지 18시간 반응 하였다. 1차 항체는 slc23a2(ab229802, Abcam), α-tubulin(sc-5286, santacruz) 및 E-cadherin(3195, cell signaling)을 이용하여 반응하였다. 2차 항체는 2차 래빗 항체(7074, cell signaling)을 이용해 상온 1시간 반응하였다. 검출은 chemiluminescence(Amersham, RPN2106)을 통해 Membrane과 상온에서 1분간 반응 후 진행하였다.

[0057] **실험예 2.4. 결과 확인**

[0058] 도 2를 참조하면, SVCT2 E264K 점 돌연변이에 대한 빅데이터 분석 결과 SVCT2는 대장암에서만 발현하며, HCT15, DLD1, HCT8 세포주에서 발현함을 알 수 있다. SVCT2 E264K에 대한 기능에 대한 보고는 없으나 빅데이터의 예측에 의하면, SVCT2 E264K는 병원성 점수(pathogenic score)가 0.98로 최대치인 1에 근접함을 확인하였다.

[0059] SVCT2는 현재까지 vitamin C의 항암효과에 중요한 역할을 하는 단백질로 보고가 되어있다. 발현과 함암효능은 비례하여 예후가 좋을 것으로 예상되나 Kaplan-meier 생존 곡선은 반대의 양상을 나타낸다. p53은 수호자 단백질로 알려져 있다. 암에서 p53은 다양한 돌연변이를 획득하며 이로 인해 종양 억제 유전자는 본연의 기능을 잃고 오히려 암 유발 유전자로 변하게 되고 암의 발생과 성장을 촉진시킨다는 보고가 있다. 본 연구에서 SVCT2의 높은 발현양에 따른 좋지 않은 예후는 SVCT2 E264K 획득으로 인한 GOF(gain of function) 돌연변이의 영향일 것이라 가설을 세우고 SVCT2 E264K 기능 연구를 시작하였다.

[0060] **실험예 3. SVCT2 E264K의 세포내 위치 확인**

[0061] **실험예 3.1. 세포 배양**

[0062] HCT15, SW620 대장암 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였다. RPMI-1640배지 (WELGENE, LM 001-01)를 사용하여 37℃, 5% 이산화탄소에서 배양하였다.

[0063] **실험예 3.2. 세포 분획**

[0064] The subcellular protein fractionation kit(Pierce, 78840)을 통해 진행하였다. 파쇄된 세포는 세포질과 세포막 핵으로 분획이 가능하다. 세포질 분획은 고정된 세포를 EDTA로 떨어뜨린 후 CEB 용액과 세포를 상온에서 10분간 반응시킨다. 원심분리기를 통해 500xg로 원심분리를 수행하고, 상층액을 깨끗한 튜브에 담는다. 세포막 분획은 MEB 용액과 세포를 상온에서 10분간 반응시킨다. 원심분리기를 통해 3,000xg로 원심분리를 수행하고, 상층액을 깨끗한 튜브에 담는다.

[0065] **실험예 3.3. 웨스턴 블롯**

[0066] RIPA 용액(T&I, BRI-9001)으로 세포를 30분간 반응하여 파쇄한 후, 13,000 rpm 10분간 원심분리 한다. 세포로부터 얻은 분획된 단백질은 8 내지 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDSPAGE)에 로딩되었으며, Immobilon-P membrane(EMD, IPVH00010)에 트랜스퍼하였다. Membrane은 5% skim milk, 1차 항체 혼합물과 함께 4℃로 12 내지 18시간 반응 하였다. 1차 항체는 slc23a2(ab229802, Abcam), α-tubulin(sc-5286, santacruz) 및 E-cadherin(3195, cell signaling)을 이용하여 반응하였다. 2차 항체는 2차 래빗 항체(7074, cell signaling)을 이용해 상온 1시간 반응하였다. 검출은 chemiluminescence(Amersham, RPN2106)을 통해 Membrane과 상온에서 1분간 반응 후 진행하였다.

[0067] **실험예 3.4. 결과 확인**

[0068] SVCT2 E264K 형태인 HCT115 세포주와 SVCT2 야생형을 갖고 있는 세포주인 SW620 세포주를 준비하여 세포질과 세포막 분획 후 웨스턴 블롯을 통해 SVCT2 E264K의 발현 위치를 확인하였다(도 3).

[0069] 도 3을 참조하면, SW620 세포주의 분획 결과 SVCT2가 세포질과 세포막에서 발현이 확인되며 HCT15의 경우 대부분의 SVCT2는 세포막에서 발현하고 있음을 확인하였다. SW620 에서는 SVCT2의 돌연변이가 존재하지 않음에도 불구하고 세포질에서의 발현을 보인다. 단백질들은 소포체에서 만들어져 세포질로 이동, 번역 후 수정을 통해 세포막으로 이동하는 과정을 거치는데 SVCT2 야생형의 세포질에서의 위치는 이러한 세포막으로 이동중인 SVCT2로 생각된다.

[0070] 상기 결과는 SVCT2 E264K는 SVCT2 야생형과 다르게 세포막이 아닌 세포질에서 우선적으로 발현하고, 이런 발현 위치 차이를 보아 야생형과는 다른 새로운 기능을 가질 것이라는 점을 시사한다.

[0071] **실험예 4. SVCT2 E264K 과발현에 따른 세포 증식 촉진 확인**

[0072] **실험예 4.1. 세포 배양**

[0073] 293T 세포주는 ATCC에서 구입하였다. DMEM배지 (WELGENE, LM 001-05)를 사용하여 37℃, 5% 이산화탄소에서 배양하였다.

[0074] **실험예 4.2. 세포 분열 정도 실험**

[0075] SVCT2 야생형 및 SVCT2 E264K을 3 ㎍ 형질 주입한 293T 세포를 6 well plate (SPL, 30006)기준 well당 $3X10^5$개로 배양하였다. 24시간, 48시간 및 72시간 별로 세포를 각각 trypsin-EDTA(gibco, 15400054)로 떼어내어 800 rpm, 3분 원심분리 하였다. Tryphan blue(gibco, 15250-061)와 세포를 1 : 1로 섞고 혈구계수기(hematocytometer)로 살아있는 세포만 카운팅하였다.

[0076] **실험예 4.3. 돌연변이 플라스미드 제작**

[0077] Muta-Direct kit(Intron, 50710448)을 사용하여 돌연변이 플라스미드를 제조하였다. 구체적으로, 기존에 pcDNA3.1 Myc-His B 벡터(cat No: V80020, addgene에서 구입)에 들어있던 SVCT2를 반응 혼합물(Muta-Direct reaction buffer 5 ㎕, 유전자 2 ㎕, Muta-genesis forward primer 1 ㎕, Muta-genesis reverse primer 1 ㎕, dNTP mixture 2 ㎕, 정제수 28 ㎖ 및 Muta-Direct enzyme 1㎕)을 만들어 아래 표 2의 중합효소 연쇄반응 조건으로 반응시켜 돌연변이 플라스미드를 제조하였고, Muta-genesis 프라이머의 Forward 및 Reverse 서열을 표 3에 나타내었다.

표 2

[0078]

단계	온도(℃)	시간(초)	비고
1	95	30	-
2	95	30	12회 반복
	55	60	
	72	600	
3	72	300	-

표 3

[0079]

구분	염기서열	비고
Muta-genesis forward primer	5'-CCAGGCAGCGGGGAAGAGAGCCGGGAA-3'	서열번호 11
Muta-genesis reverse primer	5'-TTCCCGGCTCTCTTCCCCGCTGCCTGG-3'	서열번호 12

[0080] 반응 후 mutazyme을 통해 1시간 동안 37℃에서 반응시켰다.

[0081] **실험예 4.4. 플라스미드 형질 주입**

[0082] 플라스미드 형질 주입은 JetPRIME reagent(polyplus, 114-07)을 통해 진행하였다. 구체적으로, 100㎖ 플레이트 기준, 한 실험군당 500 ㎕의 JetPRIME 용액을 준비하고, 플라스미드와 JetPRIME 시약을 섞고, 10분간 상온에 반응 후 형질 주입하고자 하는 세포에 천천히 방울로 떨어뜨린다.

[0083] **실험예 4.5. 콜로니 형성 실험**

[0084] 293T 세포주 $1X10^4$개를 6 well plate(SPL, 30006)에 배양하였다. 4일 동안 DMEM 배지로 37℃, 5% 이산화탄소에서 배양하고 PBS로 세척 후 100% 메탄올로 고정하였다. 그 후, 0.05% crystal violet으로 20분간 상온에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다.

[0085] **실험예 4.6. 웨스턴 블롯**

[0086] RIPA 용액(T&I, BRI-9001)으로 세포를 30분간 반응하여 파쇄한 후, 13,000 rpm 10분간 원심분리 한다. 세포로부터 얻은 분획된 단백질은 8 내지 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDSPAGE)에 로딩되었으며, Immobilon-P membrane(EMD, IPVH00010)에 트랜스퍼하였다. Membrane은 5% skim milk, 1차 항체 혼합물과 함께 4℃로 12 내지 18시간 반응 하였다. 1차 항체는 Myc-tag(9B11, cell signaling), AKT(9272, cell signaling), phospho-AKT(9271, cell signaling), survivin(2803, cell signaling), ERK(9102, cell signaling) 및 phospho-ERK(9101, cell signaling)를 이용하여 반응하였다. 2차 항체는 2차 마우스 항체(7076, cell signaling) 및 2차 래빗 항체(7074, cell signaling)을 이용해 상온 1시간 반응하였다. 검출은 chemiluminescence(Amersham, RPN 2106)을 통해 Membrane과 상온에서 1분간 반응 후 진행하였다.

[0087] **실험예 4.7. 통계적 처리**

[0088] 모든 실험은 3번 반복 하였으며, two-tailed student's t-검정을 통해 분석하였다. 0.05 P 값은 유의미한 차이를 나타낸다.

[0089] **실험예 4.8. 결과 확인**

[0090] SVCT2 야생형과 E264K 기능연구를 위해 HEK293T 세포에 각각의 발현 벡터를 이용하여 농도의존적으로 SVCT2 및 SVCT2 E264K를 과발현하였다.

[0091] 그 결과, 도 4을 참조하면, SVCT2 E264K 점 돌연변이를 형질 주입한 실험군에서 SVCT2 야생형을 형질 주입한 실험군과 대조군보다 시간 의존적으로 세포증식이 1.5배 정도 빠르게 진행되었다. 또한, SVCT2 E264K 점 돌연변이 형질 주입 실험군이 콜로니 생성 또한 대조군 대비 3배 정도 증가하였다.

[0092] 이러한 세포의 형질 변화는 세포 분열에 관여하는 AKT의 인산화와 관련이 있는 것을 확인하였다. SVCT2 야생형을 형질 주입한 실험군에서는 AKT의 인산화가 농도 의존적으로 증가하지 않는 반면에, SVCT2 E264K 점 돌연변이를 형질 주입한 실험군에서는 농도 의존적으로 AKT의 인산화가 활성화되는 것을 확인하였다. 그리고 AKT의 인산화에 관여하면서 세포분열의 표지자인 survivin도 SVCT2 E264K 점 돌연변이에 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다.

[0093] 이 실험에서, SVCT2 E264K 점 돌연변이는 AKT 시그널을 통해 세포의 증식을 유도함을 확인하였다.

[0094] **실험예 5. 대장암 세포주에서 SVCT2 발현과 세포 사멸 확인**

[0095] **실험예 5.1. 간섭 RNA 형질 주입**

[0096] 간섭 RNA 형질 주입은 JetPRIME reagent (polyplus, 114-07)을 통해 진행하였다. 간섭 RNA의 염기 서열은 5'-

CAACAGAAGGCAAAUACGAUCUCUCGUAUUUGCCUUCUGUUGUU-3'(서열번호 13)이다.

[0097] 구체적으로, 100ㅠ 플레이트 기준, 한 실험군당 500 ㎕의 JetPRIME 용액을 준비하고, 간섭 RNA와 JetPRIME 시약을 섞고, 10분간 상온에 반응 후 형질 주입하고자 하는 세포에 천천히 방울로 떨어뜨렸다.

[0098] **실험예 5.2. 세포 사멸 실험**

[0099] 세포 사멸 실험은 다음과 같이 수행하였다. 60ㅠ plate(SPL, 20060)에 $4X10^5$개의 HCT15 세포를 배양하였다. JetPRIME reagent를 통해 상기 실험예 5.1.의 간섭 RNA 형질 주입을 시행하고, 24시간 후 tryphan blue(gibco, 15250-061)과 세포를 1 : 1로 희석하여 hematocytometer를 통해 살아있는 세포와 죽어있는 세포의 개수를 카운팅하였다. 이때, 사멸된 세포는 tryphan blue로 파랗게 염색된 세포이다.

[0100] **실험예 5.3. Annexin-PI 염색**

[0101] 60ㅠ plate(SPL, 20060)에 $4X10^5$개의 HCT15 세포를 배양하였다. JetPRIME reagent를 통해 상기 실험예 5.1.의 간섭 RNA 형질 주입을 시행하고, 24시간 후 Trypsin-EDTA(gibco, 15400054)를 통해 세포를 떼어내 튜브에 모았다. 1XPBS(T&I BPB-9121)로 8번 세척하였다. 1,500 rpm, 4분으로 원심분리하여 세포 펠렛을 만들었다. FITC annexin V apoptosis detection kit(BD, 556547)를 이용해 염색한 후, 1X binding 용액 500 ㎕로 펠렛을 잘 풀어주었다. 펠렛을 푼 용액을 튜브에 옮겨, 3 ㎕ FITC annexin V와 5 ㎕ PI를 넣어주었다. 이를 강하게 섞은 후 상온에서 15분 반응시킨 후, 1시간 이내로 FACS로 측정하였다.

[0102] **실험예 5.4. 통계적 처리**

[0103] 모든 실험은 3번 반복 하였으며, two-tailed student's t-검정을 통해 분석하였다. 0.05 P값은 유의미한 차이를 나타낸다.

[0104] **실험예 5.5. 결과 확인**

[0105] SVCT2 E264K를 내생적으로 갖고 있는 HCT15 대장암 세포주에서 RNA 간섭을 통해 SVCT2 발현을 억제한 결과 농도 의존적으로 세포 사멸이 유도됨을 확인하였다(도 5).

[0106] 도 5를 참조하면, Annexin V, PI 염색 후 FACS 분석을 통해 세포의 사멸이 농도 의존적으로 유도됨을 확인하였다. 또한, SVCT2 E264K를 발현 억제는 암세포의 사멸을 유도함을 확인하였다.

[0107] 상기 결과는, SVCT2 E264K 점 돌연변이는 세포의 생존에 영향을 미치는 유전자이며, 대장암 치료에 있어서 새로운 표적이 될 수 있음을 시사한다.

[0108] **실험예 6. RNA 간섭 실험을 통한 SVCT2의 단백질 변화 확인**

[0109] **실험예 6.1. 웨스턴 블롯**

[0110] RIPA 용액(T&I, BRI-9001)으로 세포를 30분간 반응하여 파쇄한 후, 13,000 rpm 10분간 원심분리 한다. 세포로부터 얻은 분획된 단백질은 8 내지 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDSPAGE)에 로딩되었으며, Immobilon-P membrane(EMD, IPVH00010)에 트랜스퍼하였다. Membrane은 5% skim milk, 1차 항체 혼합물과 함께 4℃로 12 내지 18시간 반응 하였다. 1차 항체는 SVCT2(ab229802, Abcam), AKT(9272, cell signaling), phosphor-AKT(9271, cell signaling), E-cadherin(3195, cell signaling), ERK(9102, cell signaling), phosphor-ERK(9101, cell signaling) 및 GAPDH(sc-32233, santacruz)을 이용하여 반응하였다. 2차 항체는 2차 마우스 항체(7076, cell signaling) 및 2차 래빗 항체(7074, cell signaling)을 이용해 상온 1시간 반응하였다. 검출은 chemiluminescence(Amersham, RPN 2106)을 통해 Membrane과 상온에서 1분간 반응 후 진행하였다.

[0111] **실험예 6.2. 결과 확인**

[0112] RNA 간섭 실험을 통해 SVCT2 유전자를 억제, 그에 따른 단백질의 발현 변화를 관찰하였다(도 6).

[0113] 도 6을 참조하면, 간섭 RNA 농도 의존적으로 SVCT2의 발현이 낮아짐을 확인하였으며, 그에 따라 세포의 성장 및 생존에 영향을 미치는 ERK의 인산화가 억제 되는 것을 확인하였다. 293T 세포주와는 다르게 HCT15 세포주에서는 AKT의 인산화의 활성 정도는 크게 변하지 않았다. ERK 인산화의 억제는 세포의 운동성의 억제에도 영향을 미친다. 그래서 세포 고정에 표지자인 E-cadherin을 같이 확인해본 결과 간섭 RNA 300 pmole에서 그 발현이 가장 높음을 확인 하였다.

[0114] 이로써 SVCT2 E264K 점 돌연변이는 ERK의 인산화를 통해 세포의 생존과 분열을 조절하고 운동성에도 영향을 미치는 유전자임을 확인하였다.

[0115] **실험예 7. SVCT2 E264K가 세포의 이주성과 침윤성에 미치는 영향 확인**

[0116] **실험예 7.1. 이주성 실험**

[0117] 이주성 실험은 Transwell chamber (corning, 3422)를 사용하여 진행하였다. 구체적으로, 전날 14%(collagen:PBS = 14:86) Type I collagen mix를 chamber 바깥쪽 막에 펴 바르고 5시간 공기에서 건조시켰다. 다음날 24 well plate(SPL, 30024)에 chamber를 넣고 $2X10^4$개의 세포를 배양하였다. Chamber 안은 혈청이 없는 배지를, Chamber 밖은 혈청이 포함된 배지를 넣어야 한다. 18시간 후 hematoxylin eosin(Vector, H3502) 염색을 진행한다. chamber안에 있는 배지를 모두 제거하고, 100% methanol(덕산, UN-1230)로 2분간 고정하였다. Hematoxylin을 chamber 막 양면에 모두 10분간 반응시켜주고, 물로 세척하였다. Eosin을 2분간 chamber 막 양면에 모두 반응시켜주고 물로 세척한 후, 하루 동안 건조시켰다. 건조시킨 chamber의 막을 떼어내고, Slide glass(MUTO, 5116-20F)에 놓고 mount 용액(Histomount, HS-103)을 통해 고정시킨 후, 상기 Mount 용액이 굳으면 현미경으로 사진을 촬영하였다.

[0118] **실험예 7.2. 침윤성 실험**

[0119] 침윤성 실험은 Transwell chamber (corning, 3422)를 사용하여 진행하였다. 구체적으로, 전날 14%(Matrigel:배지 = 14:86) matrigel mix를 chamber 안쪽에 넣어 하루 동안 배양기에 넣고 matrigel이 chamber 막 안쪽에 굳히게 만들었다. 다음날 24well plate(SPL, 30024)에 chamber를 넣고 $2X10^4$개의 세포를 배양하였다. Chamber 안은 혈청이 없는 배지를, Chamber 밖은 혈청이 포함된 배지를 넣어야 한다. 18시간 후 hematoxylin eosin(Vector, H3502) 염색을 진행하였다. chamber안에 있는 배지를 모두 제거하고, 100% methanol(덕산, UN-1230)로 2분간 고정시켰다. Hematoxylin을 chamber 막 양면에 모두 10분간 반응시키고, 물로 세척하였다. Eosin을 2분간 chamber 막 양면에 모 두 반응시켜주고 물로 세척한 후, 하루 동안 건조시켰다. 건조시킨 chamber의 막을 떼어내고, Slide glass(MUTO, 5116-20F)에 놓고 mount 용액(Histomount, HS-103)을 통해 고정시킨 후, Mount 용액이 굳으면 현미경으로 사진을 촬영하였다.

[0120] **실험예 7.3. 통계적 처리**

[0121] 모든 실험은 3번 반복 하였으며, two-tailed student's t-검정을 통해 분석하였다. 0.05 P값은 유의미한 차이를 나타낸다.

[0122] **실험예 7.4. 결과 확인**

[0123] 앞선 실험에서 SVCT2 발현 감소로 인해 ERK의 인산화가 억제되고 그에 따라 E-cadherin의 발현이 올라감을 확인하였다. 실제로 세포의 이주성과 침윤성에 영향을 미치는지 확인을 위해 이주 및 침윤 실험을 진행하였다(도 7).

[0124] 도 7을 참조하면, 간섭 RNA의 농도에 따라 이주성과 침윤성이 줄어들었음을 확인하였다. SVCT2 E264K 점 돌연변이는 세포의 운동성에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 상기 결과는 암 세포의 운동성이 암의 전이와 관련이 있기 때문에, SVCT2 E264K 점 돌연변이는 암 전이에도 관여하는 유전자임을 시사한다.

[0125] **실험예 8. 대장암 환자에서 SVCT2 E264K 분포 확인**

[0126] **실험예 8.1. 역전사 중합효소 연쇄반응**

[0127] 역전사 중합효소 연쇄반응은 AccuPower RT-PCR premix & master mix (BIONEER, 20-k-2055)를 통해 진행하였다. 구체적으로, 합성한 RNA를 70℃에서 5분간 반응시키고, AcuuPower RT-PCR premix & master mix에 Oligo dT 10 pmole 1 ㎕, RNA 1 ㎕, DEPC water 18 ㎕(46-2224, Invitrogen)(총 부피: 20ul)을 넣고 42℃, 1시간; 94℃, 5분간 반응시켜 상보적 DNA를 합성하였다.

[0128] **실험예 8.2. 염기서열 분석**

[0129] 염기서열 분석은 Macrogen사에서 진행하는 sequencing 분석 시스템을 이용하여 분석하였다.

[0130] **실험예 8.3. 결과 확인**

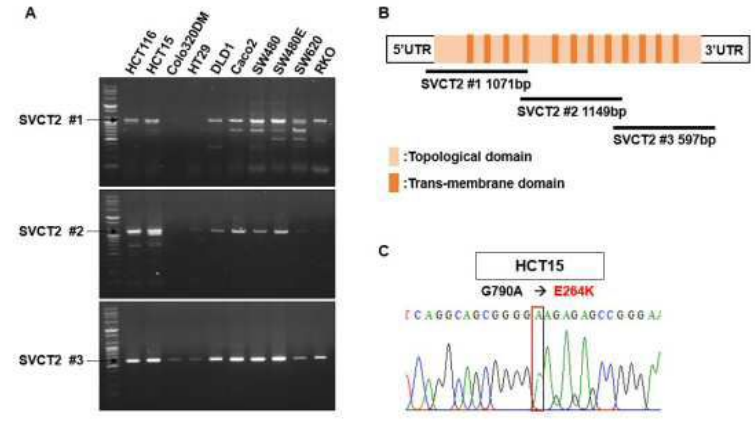
[0131] 64명의 대장암 환자조직에서 RNA를 분리하고 cDNA 합성하여 PCR을 통해 SVCT2 mRNA 발현정도를 확인 후 상보적

DNA를 합성하여 염기서열 분석을 진행하였다(도 8). 도 8을 참조하면, 염기서열 분석이 진행된 53개의 환자 RNA 중 31개의 환자 RNA에서 SVCT2 E264K 점 돌연변이의 발현이 확인되었다.

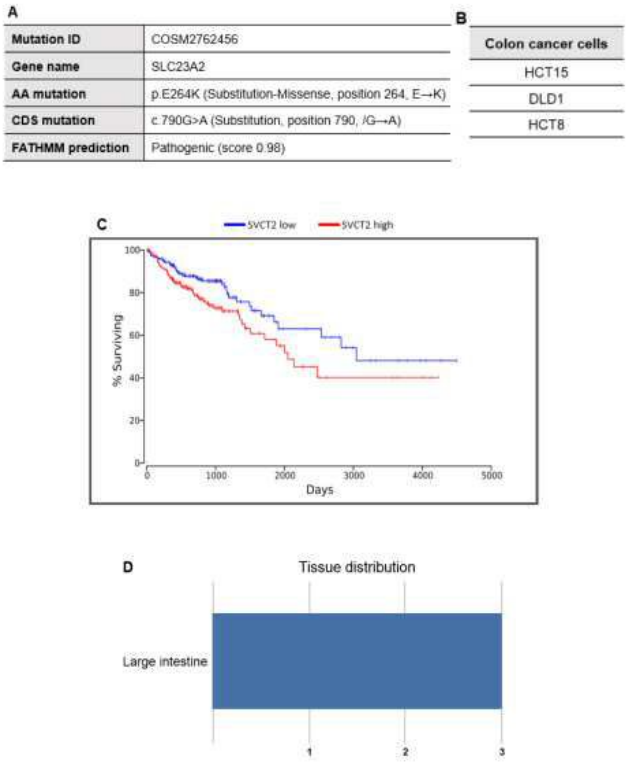
[0132] 상기 결과는 실제 대장암환자에서 58.5%의 높은 비율로 존재하는 SVCT2 E264K 점 돌연변이는 대장암 표적 치료제의 새로운 타깃으로 잠재성을 가지고 있음을 시사한다.

도면

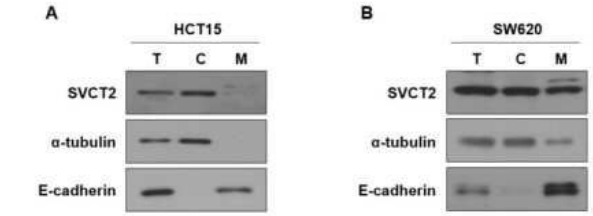
도면1



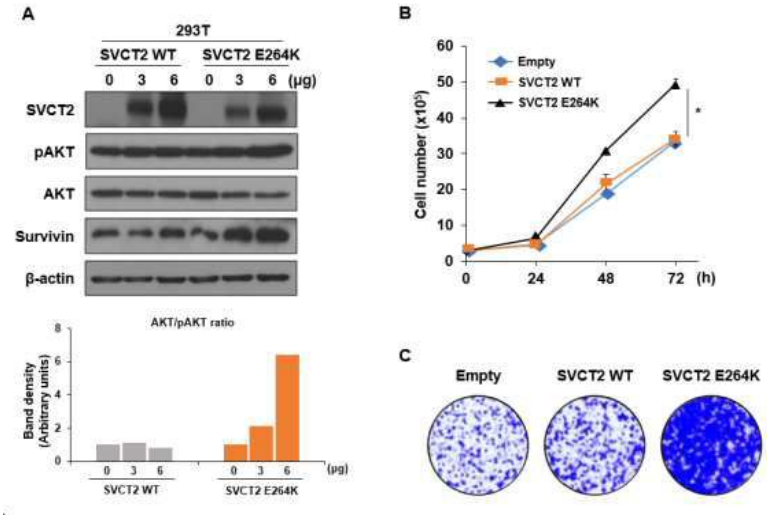
도면2



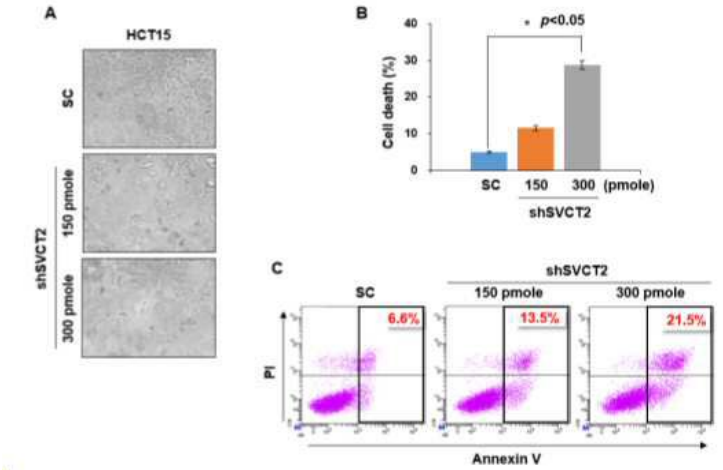
도면3


A
HCT15
T C M
SVCT2
α-tubulin
E-cadherin
B
SW620
T C M
SVCT2
α-tubulin
E-cadherin

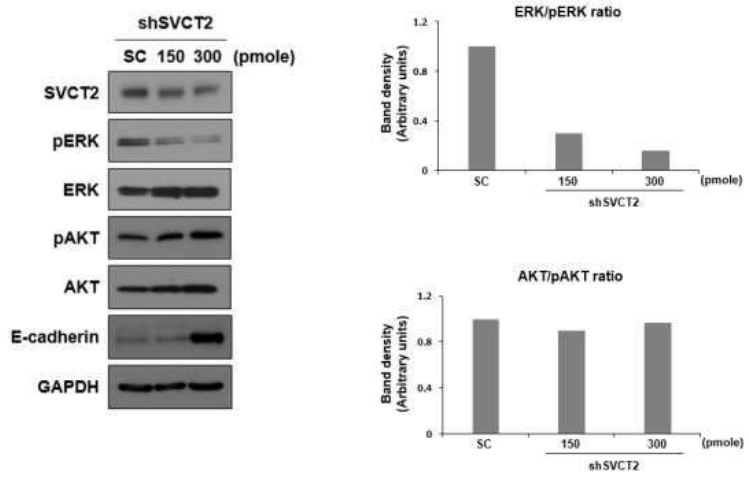
도면4


A
293T
SVCT2 WT
SVCT2 E264K
0 3 6 0 3 6 (μg)
SVCT2
pAKT
AKT
Survivin
β-actin
AKT/pAKT ratio
Band density (Arbitrary units)
SVCT2 WT
SVCT2 E264K
B
Empty
SVCT2 WT
SVCT2 E264K
Cell number (x10⁵)
0 24 48 72 (h)
C
Empty
SVCT2 WT
SVCT2 E264K

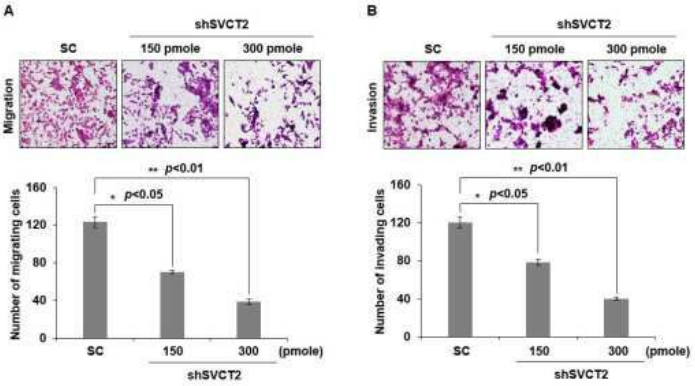
도면5


A
HCT15
SC
shSVCT2
150 pmole
300 pmole
B
p<0.05
Cell death (%)
SC 150 300 (pmole)
shSVCT2
C
shSVCT2
SC
150 pmole
300 pmole
6.6%
13.5%
21.5%
PI
Annexin V

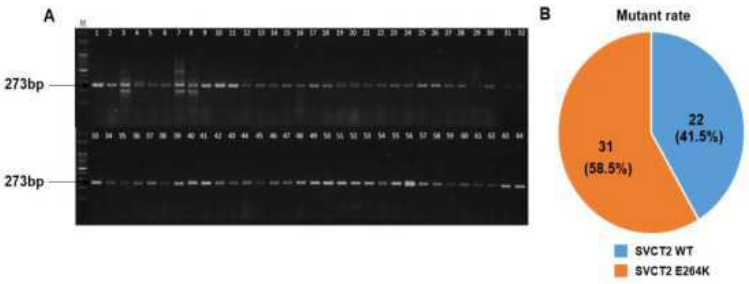
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

THE ASAN FOUNDATION

<120> NOVEL BIOMARKER FOR DIAGNOSING COLON CANCER AND USE THEREOF

<130> FPD/201912-0013/C

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 650

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 wild type

<400> 1

Met Met Gly Ile Gly Lys Asn Thr Thr Ser Lys Ser Met Glu Ala Gly
1 5 10 15

Ser Ser Thr Glu Gly Lys Tyr Glu Asp Glu Ala Lys His Pro Ala Phe
20 25 30

Phe Thr Leu Pro Val Val Ile Asn Gly Gly Ala Thr Ser Ser Gly Glu
35 40 45

Gln Asp Asn Glu Asp Thr Glu Leu Met Ala Ile Tyr Thr Thr Glu Asn
50 55 60

Gly Ile Ala Glu Lys Ser Ser Leu Ala Glu Thr Leu Asp Ser Thr Gly
65 70 75 80

Ser Leu Asp Pro Gln Arg Ser Asp Met Ile Tyr Thr Ile Glu Asp Val
85 90 95

Pro Pro Trp Tyr Leu Cys Ile Phe Leu Gly Leu Gln His Tyr Leu Thr
100 105 110

Cys Phe Ser Gly Thr Ile Ala Val Pro Phe Leu Leu Ala Asp Ala Met
115 120 125

Cys Val Gly Tyr Asp Gln Trp Ala Thr Ser Gln Leu Ile Gly Thr Ile
130 135 140

Phe Phe Cys Val Gly Ile Thr Thr Leu Leu Gln Thr Thr Phe Gly Cys
145 150 155 160

Arg Leu Pro Leu Phe Gln Ala Ser Ala Phe Ala Phe Leu Ala Pro Ala
165 170 175

Arg Ala Ile Leu Ser Leu Asp Lys Trp Lys Cys Asn Thr Thr Asp Val
180 185 190

Ser Val Ala Asn Gly Thr Ala Glu Leu Leu His Thr Glu His Ile Trp
195 200 205

Tyr Pro Arg Ile Arg Glu Ile Gln Gly Ala Ile Ile Met Ser Ser Leu
210 215 220
Ile Glu Val Val Ile Gly Leu Leu Gly Leu Pro Gly Ala Leu Leu Lys
225 230 235 240

Tyr Ile Gly Pro Leu Thr Ile Thr Pro Thr Val Ala Leu Ile Gly Leu
245 250 255
Ser Gly Phe Gln Ala Ala Gly Glu Arg Ala Gly Lys His Trp Gly Ile
260 265 270
Ala Met Leu Thr Ile Phe Leu Val Leu Leu Phe Ser Gln Tyr Ala Arg
275 280 285
Asn Val Lys Phe Pro Leu Pro Ile Tyr Lys Ser Lys Lys Gly Trp Thr
290 295 300
Ala Tyr Lys Leu Gln Leu Phe Lys Met Phe Pro Ile Ile Leu Ala Ile

305 310 315 320
Leu Val Ser Trp Leu Leu Cys Phe Ile Phe Thr Val Thr Asp Val Phe
325 330 335
Pro Pro Asp Ser Thr Lys Tyr Gly Phe Tyr Ala Arg Thr Asp Ala Arg
340 345 350
Gln Gly Val Leu Leu Val Ala Pro Trp Phe Lys Val Pro Tyr Pro Phe
355 360 365
Gln Trp Gly Leu Pro Thr Val Ser Ala Ala Gly Val Ile Gly Met Leu
370 375 380

Ser Ala Val Val Ala Ser Ile Ile Glu Ser Ile Gly Asp Tyr Tyr Ala
385 390 395 400
Cys Ala Arg Leu Ser Cys Ala Pro Pro Pro Pro Ile His Ala Ile Asn
405 410 415
Arg Gly Ile Phe Val Glu Gly Leu Ser Cys Val Leu Asp Gly Ile Phe
420 425 430
Gly Thr Gly Asn Gly Ser Thr Ser Ser Ser Pro Asn Ile Gly Val Leu
435 440 445
Gly Ile Thr Lys Val Gly Ser Arg Arg Val Ile Gln Cys Gly Ala Ala

450 455 460

Leu Met Leu Ala Leu Gly Met Ile Gly Lys Phe Ser Ala Leu Phe Ala
465 470 475 480

Ser Leu Pro Asp Pro Val Leu Gly Ala Leu Phe Cys Thr Leu Phe Gly
485 490 495

Met Ile Thr Ala Val Gly Leu Ser Asn Leu Gln Phe Ile Asp Leu Asn
500 505 510

Ser Ser Arg Asn Leu Phe Val Leu Gly Phe Ser Ile Phe Phe Gly Leu
515 520 525

Val Leu Pro Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Pro Leu Val Thr Gly Ile Thr
530 535 540

Gly Ile Asp Gln Val Leu Asn Val Leu Leu Thr Thr Ala Met Phe Val
545 550 555 560

Gly Gly Cys Val Ala Phe Ile Leu Asp Asn Thr Ile Pro Gly Thr Pro
565 570 575

Glu Glu Arg Gly Ile Arg Lys Trp Lys Lys Gly Val Gly Lys Gly Asn
580 585 590

Lys Ser Leu Asp Gly Met Glu Ser Tyr Asn Leu Pro Phe Gly Met Asn

595 600 605

Ile Ile Lys Lys Tyr Arg Cys Phe Ser Tyr Leu Pro Ile Ser Pro Thr
610 615 620

Phe Val Gly Tyr Thr Trp Lys Gly Leu Arg Lys Ser Asp Asn Ser Arg
625 630 635 640

Ser Ser Asp Glu Asp Ser Gln Ala Thr Gly
645 650

<210> 2

<211> 1953

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 wild type

<400> 2

atgatgggta ttggtaagaa taccacatcc aaatcaatgg aggctggaag ttcaacagaa 60

ggcaaatacg aagacgaggc aaagcaccca gctttcttca ctcttccggt ggtgataaat 120

ggaggcgcca cctccagcgg tgagcaggac aatgaggaca ctgagctcat ggcgatctac 180

actacggaaa acggcattgc agaaaagagc tctctcgctg agaccctgga tagcactggc 240

agtctggacc cccagcgatc agacatgatt tataccatag aagatgttcc tccctggtac 300

ctgtgtatat ttctggggct acagcactac ctgacatgct tcagcggcac gatcgcagtg 360

cccttcctgt tggccgatgc catgtgtgtg gggtacgacc agtgggccac cagccagctc 420

attgggacca ttttcttctg tgtgggaatc actactttgc tacagacaac gtttggatgc 480

aggttacccc tgtttcaggc cagtgctttt gcatttttgg cccctgctcg agccatcctg 540

tctttagata aatggaaatg taacaccaca gatgtttcag ttgccaatgg aacagcagag 600

ctgttgcaca cagaacacat ctggtatccc cggatccgag agatccaggg ggccatcatc 660

atgtcctcac tgatagaagt agtcatcggc ctcctcggcc tgcctggggc tctactgaag 720

tacatcggtc ccttgaccat tacacccacg gtggccctaa ttggcctctc tggtttccag 780

gcagcggggg agagagccgg gaagcactgg ggcattgcca tgctgacaat attcctagta 840

ttactgtttt ctcaatacgc cagaaatgtt aaatttcctc tcccgattta taaatccaag 900

aaaggatgga ctgcgtacaa gttacagctg ttcaaaatgt tccctatcat cctggccatc 960

ctggtatcct ggctgctctg cttcatcttc acggtgacag acgtcttccc tcccgacagc 1020

acaaagtatg gcttctatgc tcgcacagat gccaggcaag gcgtgcttct ggtagccccg 1080

tggtttaagg ttccataccc atttcagtgg ggactgccca ccgtgtctgc ggccggtgtc 1140

atcggcatgc tcagtgccgt ggtcgccagc atcatcgagt ctattggtga ctactacgcc 1200

tgtgcacggc tgtcctgtgc cccacccccc cccatccacg caataaacag gggaattttc 1260

gtggaaggcc tctcctgtgt tcttgatggc atatttggta ctgggaatgg ctctacttca 1320

tccagtccca acattggagt tttgggaatt acaaaggtcg gcagccgccg cgtgatacag 1380

tgcggagcag ccctcatgct cgctctgggc atgatcggga agttcagcgc cctctttgcg 1440

tcccttccgg atcctgtgct gggagccctg ttctgcacgc tctttggaat gatcacagct 1500

gttggcctct ctaacctgca gttcattgat ttaaattctt cccggaacct ctttgtgctt 1560

ggattttcga tcttctttgg gctcgtcctt ccaagttacc tcagacagaa ccctctggtc 1620

acagggataa caggaatcga tcaagtgttg aacgtccttc tcacaactgc tatgtttgta 1680

gggggctgtg tggcttttat cctggataac accatcccag gcactccaga ggaaagagga 1740

atccggaaat ggaagaaggg tgtgggcaaa gggaacaaat cactcgacgg catggagtcg 1800

tacaatttgc catttggcat gaacattata aaaaaataca gatgcttcag ctacttaccc 1860

atcagcccaa cctttgtggg ctacacatgg aaaggcctca ggaagagcga caacagccgg 1920

agttcagatg aagactccca ggccacggga tag 1953

<210> 3

<211> 650

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 E264K

<400> 3

Met Met Gly Ile Gly Lys Asn Thr Thr Ser Lys Ser Met Glu Ala Gly
1 5 10 15

Ser Ser Thr Glu Gly Lys Tyr Glu Asp Glu Ala Lys His Pro Ala Phe
20 25 30

Phe Thr Leu Pro Val Val Ile Asn Gly Gly Ala Thr Ser Ser Gly Glu
35 40 45

Gln Asp Asn Glu Asp Thr Glu Leu Met Ala Ile Tyr Thr Thr Glu Asn
50 55 60

Gly Ile Ala Glu Lys Ser Ser Leu Ala Glu Thr Leu Asp Ser Thr Gly
65 70 75 80

Ser Leu Asp Pro Gln Arg Ser Asp Met Ile Tyr Thr Ile Glu Asp Val

85 90 95

Pro Pro Trp Tyr Leu Cys Ile Phe Leu Gly Leu Gln His Tyr Leu Thr
100 105 110

Cys Phe Ser Gly Thr Ile Ala Val Pro Phe Leu Leu Ala Asp Ala Met
115 120 125

Cys Val Gly Tyr Asp Gln Trp Ala Thr Ser Gln Leu Ile Gly Thr Ile
130 135 140

Phe Phe Cys Val Gly Ile Thr Thr Leu Leu Gln Thr Thr Phe Gly Cys
145 150 155 160

Arg Leu Pro Leu Phe Gln Ala Ser Ala Phe Ala Phe Leu Ala Pro Ala

165 170 175

Arg Ala Ile Leu Ser Leu Asp Lys Trp Lys Cys Asn Thr Thr Asp Val
180 185 190

Ser Val Ala Asn Gly Thr Ala Glu Leu Leu His Thr Glu His Ile Trp

195 200 205

Tyr Pro Arg Ile Arg Glu Ile Gln Gly Ala Ile Ile Met Ser Ser Leu

210 215 220

Ile Glu Val Val Ile Gly Leu Leu Gly Leu Pro Gly Ala Leu Leu Lys

225 230 235 240

Tyr Ile Gly Pro Leu Thr Ile Thr Pro Thr Val Ala Leu Ile Gly Leu

245 250 255

Ser Gly Phe Gln Ala Ala Gly Lys Arg Ala Gly Lys His Trp Gly Ile

260 265 270

Ala Met Leu Thr Ile Phe Leu Val Leu Leu Phe Ser Gln Tyr Ala Arg

275 280 285

Asn Val Lys Phe Pro Leu Pro Ile Tyr Lys Ser Lys Lys Gly Trp Thr

290 295 300

Ala Tyr Lys Leu Gln Leu Phe Lys Met Phe Pro Ile Ile Leu Ala Ile

305 310 315 320

Leu Val Ser Trp Leu Leu Cys Phe Ile Phe Thr Val Thr Asp Val Phe

325 330 335

Pro Pro Asp Ser Thr Lys Tyr Gly Phe Tyr Ala Arg Thr Asp Ala Arg

340 345 350

Gln Gly Val Leu Leu Val Ala Pro Trp Phe Lys Val Pro Tyr Pro Phe

355 360 365

Gln Trp Gly Leu Pro Thr Val Ser Ala Ala Gly Val Ile Gly Met Leu

370 375 380

Ser Ala Val Val Ala Ser Ile Ile Glu Ser Ile Gly Asp Tyr Tyr Ala

385 390 395 400

Cys Ala Arg Leu Ser Cys Ala Pro Pro Pro Pro Ile His Ala Ile Asn

405 410 415

Arg Gly Ile Phe Val Glu Gly Leu Ser Cys Val Leu Asp Gly Ile Phe

420 425 430

Gly Thr Gly Asn Gly Ser Thr Ser Ser Ser Pro Asn Ile Gly Val Leu

435 440 445

Gly Ile Thr Lys Val Gly Ser Arg Arg Val Ile Gln Cys Gly Ala Ala
450 455 460
Leu Met Leu Ala Leu Gly Met Ile Gly Lys Phe Ser Ala Leu Phe Ala
465 470 475 480
Ser Leu Pro Asp Pro Val Leu Gly Ala Leu Phe Cys Thr Leu Phe Gly
485 490 495
Met Ile Thr Ala Val Gly Leu Ser Asn Leu Gln Phe Ile Asp Leu Asn
500 505 510
Ser Ser Arg Asn Leu Phe Val Leu Gly Phe Ser Ile Phe Phe Gly Leu

515 520 525
Val Leu Pro Ser Tyr Leu Arg Gln Asn Pro Leu Val Thr Gly Ile Thr
530 535 540
Gly Ile Asp Gln Val Leu Asn Val Leu Leu Thr Thr Ala Met Phe Val
545 550 555 560
Gly Gly Cys Val Ala Phe Ile Leu Asp Asn Thr Ile Pro Gly Thr Pro
565 570 575
Glu Glu Arg Gly Ile Arg Lys Trp Lys Lys Gly Val Gly Lys Gly Asn
580 585 590

Lys Ser Leu Asp Gly Met Glu Ser Tyr Asn Leu Pro Phe Gly Met Asn
595 600 605
Ile Ile Lys Lys Tyr Arg Cys Phe Ser Tyr Leu Pro Ile Ser Pro Thr
610 615 620
Phe Val Gly Tyr Thr Trp Lys Gly Leu Arg Lys Ser Asp Asn Ser Arg
625 630 635 640
Ser Ser Asp Glu Asp Ser Gln Ala Thr Gly
645 650

<210> 4
<211> 1953
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 E264K
<400> 4

atgatgggta ttggtaagaa taccacatcc aaatcaatgg aggctggaag ttcaacagaa 60

ggcaaatacg aagacgaggc aaagcaccca gctttcttca ctcttccggt ggtgataaat 120

ggaggcgcca cctccagcgg tgagcaggac aatgaggaca ctgagctcat ggcgatctac 180

actacggaaa acggcattgc agaaaagagc tctctcgctg agaccctgga tagcactggc 240

agtctggacc cccagcgatc agacatgatt tataccatag aagatgttcc tccctggtac 300

ctgtgtatat ttctggggct acagcactac ctgacatgct tcagcggcac gatcgcagtg 360

cccttcctgt tggccgatgc catgtgtgtg gggtacgacc agtgggccac cagccagctc 420

attgggacca ttttcttctg tgtgggaatc actactttgc tacagacaac gtttggatgc 480

aggttacccc tgtttcaggc cagtgctttt gcatttttgg cccctgctcg agccatcctg 540

tctttagata aatggaaatg taacaccaca gatgtttcag ttgccaatgg aacagcagag 600

ctgttgcaca cagaacacat ctggtatccc cggatccgag agatccaggg ggccatcatc 660

atgtcctcac tgatagaagt agtcatcggc ctcctcggcc tgcctggggc tctactgaag 720

tacatcggtc ccttgaccat tacacccacg gtggccctaa ttggcctctc tggtttccag 780

gcagcgggga agagagccgg gaagcactgg ggcattgcca tgctgacaat attcctagta 840

ttactgtttt ctcaatacgc cagaaatgtt aaatttcctc tcccgattta taaatccaag 900

aaaggatgga ctgcgtacaa gttacagctg ttcaaaatgt tccctatcat cctggccatc 960

ctggtatcct ggctgctctg cttcatcttc acggtgacag acgtcttccc tcccgacagc 1020

acaaagtatg gcttctatgc tcgcacagat gccaggcaag gcgtgcttct ggtagccccg 1080

tggtttaagg ttccataccc atttcagtgg ggactgccca ccgtgtctgc ggccggtgtc 1140

atcggcatgc tcagtgccgt ggtcgccagc atcatcgagt ctattggtga ctactacgcc 1200

tgtgcacggc tgtcctgtgc cccacccccc cccatccacg caataaacag gggaattttc 1260

gtggaaggcc tctcctgtgt tcttgatggc atatttggta ctgggaatgg ctctacttca 1320

tccagtccca acattggagt tttgggaatt acaaaggtcg gcagccgccg cgtgatacag 1380

tgcggagcag ccctcatgct cgctctgggc atgatcggga agttcagcgc cctctttgcg 1440

tcccttccgg atcctgtgct gggagccctg ttctgcacgc tctttggaat gatcacagct 1500

gttggcctct ctaacctgca gttcattgat ttaaattctt cccggaacct ctttgtgctt 1560

ggattttcga tcttctttgg gctcgtcctt ccaagttacc tcagacagaa ccctctggtc 1620

acagggataa caggaatcga tcaagtgttg aacgtccttc tcacaactgc tatgtttgta 1680

gggggctgtg tggcttttat cctggataac accatcccag gcactccaga ggaaagagga 1740

atccggaaat ggaagaaggg tgtgggcaaa gggaacaaat cactcgacgg catggagtcg 1800

tacaatttgc catttggcat gaacattata aaaaaataca gatgcttcag ctacttaccc 1860

atcagcccaa cctttgtggg ctacacatgg aaaggcctca ggaagagcga caacagccgg 1920

agttcagatg aagactccca ggccacggga tag 1953

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #1 forward primer

<400> 5

ctgggctcct agcttgaata ag 22

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #1 reverse primer

<400> 6

accgtgaaga tgaagcagag 20

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #2 forward primer

<400> 7

catcggtccc ttgaccatta c 21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #2 reverse primer

<400> 8

gttgggctga atgggtaagt ag 22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #3 forward primer

<400> 9

ccaagttacc tcagacagaa cc 22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SVCT2 #3 reverse primer

<400> 10

ccagcaatgg acactctcaa 20

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muta-genesis forward primer

<400> 11

ccaggcagcg gggaagagag ccgggaa 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muta-genesis reverse primer

<400> 12

ttcccggctc tcttccccgc tgcctgg 27

<210> 13

<211> 44

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA interference

<400> 13

caacagaagg caaauacgau cucucguauu ugccuucugu uguu 44