



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0124112
(43) 공개일자 2022년09월13일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/1137 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0089225(분할)
(22) 출원일자 2022년07월19일
심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2020-0023178
원출원일자 2020년02월25일
심사청구일자 2020년02월25일</p> <p>(30) 우선권주장
1020190022551 2019년02월26일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)</p> <p>(72) 발명자
김해동
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 생명과학부 504동 509호
김지미
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 생명과학부 504동 509호
김빛내리
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 생명과학부 504동 509호</p> <p>(74) 대리인
공병욱</p> |
|---|--|

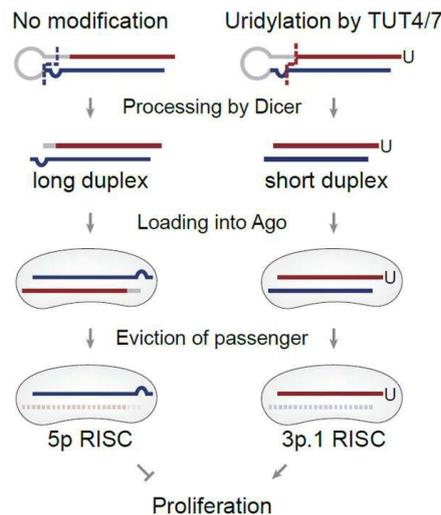
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 TUT4/7 발현 조절인자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 TUT4/7 발현 조절인자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 약학 조성물은 TUT4/7의 기능을 억제시킴으로써 세포 분열을 막고 암 발달을 저해시킬 수 있으며, miR-324-5p의 양을 늘리고 miR-324-3p.1의 기능을 억제시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 암 예방, 치료 또는 진단에 이용할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

- A61K 48/00 (2013.01)
- A61P 35/00 (2018.01)
- C12N 9/1282 (2013.01)
- C12Q 1/6886 (2022.01)
- C12Y 207/07052 (2013.01)
- C12N 2310/141 (2013.01)
- C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711079098
과제번호	IBS-R008-D1-2018-A00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원
연구과제명	RNA에 의한 세포 운명 조절 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA);

서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산; 및

서열번호 5 내지 20으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA);

로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 마이크로 RNA는 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA 및 상기 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA가 서로 결합된 복합체(duplex) 형태인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 짧은 간섭 RNA는 서열번호 5 내지 8 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA 및 상기 서열번호 9 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA가 서로 결합된 복합체 형태; 또는 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA 및 상기 서열번호 17 내지 20 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA가 서로 결합된 복합체 형태인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 결장암, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 유모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암 및 악성 흑색종으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 암은 뇌종양인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

miR-324-5p 및 miR-324-3p.1로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 제제는 상기 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 8

제 6 항 및 제 7 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 노던 블롯팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩용인, 암 진단용 키트.

청구항 10

TUT4(Terminal uridylyl transferases 4) 및 TUT7(Terminal uridylyl transferases 7)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 상기 TUT4 및 TUT7 중 하나 이상의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 TUT4 및 TUT7 중 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 것인, 암 진단용 조성물.

청구항 13

제 10 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩용인, 암 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 TUT4/7 발현 조절인자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 TUT4/7 발현을 조절하는 핵산 서열을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA)의 생성 과정은 드로셔(Drosha)와 다이서(Dicer)에 의한 절단 과정을 통해 이중나선 RNA를 만들고, 이를 구성하는 두 개의 가닥(5p와 3p) 중에 한 가닥을 선택하는 과정을 수반한다. 두 가닥은 엄연히 다른 서열을 가지고 있어 서로 다른 유전자들의 발현을 조절할 수 있기 때문에 어떤 가닥이 선택되는지를 결정하는 가닥 선택(strand selection) 과정은 생물학적으로 중요하다.

[0003] 한편, 세포 유형에 따라서 주로 선택되는 miRNA 가닥이 바뀔 수 있는데, 이를 대안적 가닥(alternative processing) 선택(또는 "암 스위칭(arm switching)")이라 부른다. 대안적 가닥 선택은 조직 분화와 암 발달에 영향을 미칠 수 있다. 하지만, 이러한 대안적 가닥 선택이 어떻게 조절을 받는지 등 그의 분자 메커니즘 및 생리적 중요성은 애매하게 남아있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2018-0068524호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 TUT4 및 TUT7(TUT4/7)에 의한 유리딘화 현상이 pre-mir-324의 다이서 절단 위치를 조절함으로써 기능이 서로 다른 3가지 마이크로 RNA(5p 및 두 3p 이형태)를 생성함을 확인하고, TUT4/7의 기능을 억제시켜 세포 분열을 막고 암 발달을 저해시킬 수 있으며, miR-324-5p의 양을 늘리고 miR-324-3p.1의 기능을 억제시켜 동일한 효과를 나타낼 수 있음을 규명하고, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA); 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산; 및 서열번호 5 내지 20으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA);를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제

공하는 것이다.

- [0007] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA); 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산; 및 서열번호 5 내지 20으로 이루어진 균으로부터 선택된 1개 이상의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA);를 이용한 암 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA); 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산; 및 서열번호 5 내지 20으로 이루어진 균으로부터 선택된 1개 이상의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA);의 암 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 miR-324-5p 또는 miR-324-3p.1의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 miR-324-5p 또는 miR-324-3p.1의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 TUT4(Terminal uridylyl transferases 4) 또는 TUT7(Terminal uridylyl transferases 7)의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 TUT4 또는 TUT7의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 TUT4 및 TUT7(TUT4/7)에 의한 유리딘화 현상이 pre-mir-324의 다이스 절단 위치를 조절함으로써 기능이 서로 다른 3가지 마이크로 RNA(5p 및 두 3p 이형체)를 생성함을 확인하고, TUT4/7의 기능을 억제시켜 세포 분열을 막고 암 발달을 저해시킬 수 있으며, miR-324-5p의 양을 늘리고 miR-324-3p.1의 기능을 억제시켜 동일한 효과를 나타낼 수 있음을 규명하였다.
- [0014] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0016] 본 발명의 일 양태는 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(micro RNA; miRNA);
- [0017] 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 핵산; 및
- [0018] 서열번호 5 내지 20으로 이루어진 균으로부터 선택된 1개 이상의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA);로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 상기 암은 뇌종양, 결장암, 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 용모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암 및/또는 악성흑색종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서, "마이크로 RNA(miRNA)"란 mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 억제자 역할을 하는 대략 22 nt의 비번역 RNA로 유전자 발현을 조절하는 역할을 한다.
- [0021] 본 발명의 상기 마이크로 RNA는 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 구체적으로, 상기 마이크로 RNA(5p duplex miRNA)는 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(miR-324-5p) 및 상기 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 마이크로 RNA(miR-324-3p.2)가 서로 결합을 이루고 있는 하나의 복합체(duplex)일 수 있다.
- [0023] 상기 서열번호 1 및 2의 염기서열의 5' 말단에는 인산염(phosphate)(5phos)이 위치할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서, "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무손상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 핵산은 화학적으로 변형된 DNA 또는 RNA를 포함하는 것으로 해석된다. 당업자는 당해 기술 분야에 공

지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 핵산을 합성하고 변형시킬 수 있다.

- [0026] 본 발명의 상기 핵산은 서열번호 4의 염기서열(CAGCAGCACCTGGGGCAG)로 이루어진 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, "짧은 간섭 RNA(siRNA)"란 이중가닥 RNA가 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 생성되는 18~23 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 당해 단백질의 발현을 억제하는 역할을 한다.
- [0028] 본 발명의 siRNA는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위해 화학적으로 변형된 siRNA를 포함하는 것으로 해석된다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 세포 내로의 도입 효율을 증강시키기 위해 공지의 핵산 전달체와 함께 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 짧은 간섭 RNA는 서열번호 5 내지 20의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 상기 짧은 간섭 RNA(siTUT4)는 상기 서열번호 5 내지 8 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA 및 상기 서열번호 9 내지 12 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA가 서로 결합을 이루고 있는 하나의 복합체일 수 있다.
- [0032] 또한, 구체적으로, 상기 짧은 간섭 RNA(siTUT7)는 상기 서열번호 13 내지 16 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA 및 상기 서열번호 17 내지 20 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 짧은 간섭 RNA가 서로 결합을 이루고 있는 하나의 복합체일 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA, 핵산 및/또는 siRNA의 치료상 유효량은 암 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 투여되는 핵산의 종류, 제형, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별, 식이, 투여시간, 투여경로 및 치료기간, 동시에 사용되는 화학 항암제 등의 약물을 포함하는 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 이를 위하여 본 발명에 의한 miRNA, 핵산 및/또는 siRNA에 추가적으로 다른 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 의한 조성물의 제형은 정제, 환제, 산제, 새세이, 엘릭서제, 현탁제, 유제, 액제, 시럽제, 에어로졸, 캡슐제, 멸균주사제, 멸균 산제 등의 형태일 수 있으며, 바람직하게는 정맥주사, 피하주사, 내피주사, 근육주사 등의 주사제로 제제화된다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 및 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여, 비강 내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 경막 내 투여, 안구 투여, 피부 투여 및 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 다른 일 양태는 miR-324-5p 및 miR-324-3p.1로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 상기 마이크로 RNA(miR-324-5p)는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 상기 마이크로 RNA(miR-324-3p.1)는 서열번호 3(ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG)의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 상기 마이크로 RNA(miR-324-3p.1)는 상기 서열번호 3의 염기서열을 포함하되 3' 말단에 1개 또는 그 이상의 우라실(U)이 추가로 포함되는 것일 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 마이크로 RNA는 MIR324 유전자(GenBank Number: 442898)에서 만들어진 하나의 전사체(transcript)로부터 드로셔 및 다이서에 의해 절단되어 만들어진 것일 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therapeutics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.
- [0046] 본 명세서에서 "개체", "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0047] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 표현 "miRNA의 발현 수준 측정"은 해당 시료 내에서 검출하고자 하는 대상을 검출하는 것을 의미한다.
- [0048] 본 발명에서 검출하고자 하는 대상은 시료 내 해당 miRNA이다. 즉, miRNA를 검출함으로써 상기 암의 발병 여부를 확인 할 수 있다.
- [0049] 예를 들어, 상기 miRNA의 발현 수준은 암이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 측정할 수 있다.
- [0050] 본 발명은 암인 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 생체 내 miR-324-5p의 발현 수준이 유의적으로 감소하고, miR-324-3p.1의 발현 수준이 유의적으로 증가한다는 점을 확인한 것에 기초하여, miR-324-5p 및 miR-324-3p.1는 암의 발병 여부에 대한 진단 마커로 사용된다.
- [0051] 본 발명의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 암이 발병한 경우 대상의 생물학적 시료의 검체에서 발현 수준이 감소되는 마커인 miRNA 및 추가적으로 발현 수준이 증가되는 마커인 miRNA의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0052] 구체적으로, 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 miRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0053] 즉, 핵산의 검출은 유전자를 암호화하는 핵산 분자 또는 상기 핵산 분자의 상보물에 하이브리드화되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 사용하는 증폭반응에 의해 수행될 수 있다.
- [0054] 예컨대, 프라이머를 이용한 miRNA의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 유전자 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭 여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [0055] 프라이머는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 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 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다. 본 발명에서는 위 하나 이상의 miRNA에 특이적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 암 발병 여부를 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0056] 프로브는 짧은 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 위 하나 이상의 miRNA와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여 발현 수준을 확인함으로써 암 발병 여부를 진단할

수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [0057] 이러한 프라이머 또는 프로브는 공지된 서열을 바탕으로 당업자가 적절히 디자인할 수 있다.
- [0058] 예컨대, 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0059] miRNA의 발현 수준은 바이오 키트 분야에서 통상 사용되는 방법에 따라 측정될 수 있는데, 예컨대 역전사효소 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 증합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사효소 증합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting) 또는 유전자 칩 등이 포함되며 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0062] 상기 키트에는 상기 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 암의 진단 키트로 사용되기에 적합하도록 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0063] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0064] 예컨대 본 발명의 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 miRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 키트는 상술한 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 일 양태는 TUT4(Terminal uridylyl transferases 4) (GenBank Number: 23318) 및 TUT7(Terminal uridylyl transferases 7)(GenBank Number: 79670)로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0068] 상기 TUT4 유전자의 염기서열은 서열번호 21에 나타내었으며, 상기 TUT7 유전자의 염기서열은 서열번호 22에 나타내었다.
- [0069] 본 명세서에서 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)를 포함한다.
- [0070] 본 명세서에서 "개체", "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0071] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에서 사용되는 표현 "유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준 측정"은 해당 시료 내에서 검출하고자 하는 대상을 검출하는 것을 의미한다.

- [0072] 본 발명에서 검출하고자 하는 대상은 시료 내 해당 유전자 mRNA 또는 이의 단백질이다. 즉, mRNA 또는 이의 단백질을 검출함으로써 상기 암의 발병 여부를 확인 할 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 상기 mRNA 또는 이의 단백질의 수준은 암이 의심되는 환자의 생물학적 시료로부터 측정할 수 있다.
- [0074] 본 발명은 암인 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 생체 내 TUT4 및 TUT7의 발현 수준이 유의적으로 증가한다는 점을 확인한 것에 기초하여, TUT4 및 TUT7은 암의 발병 여부에 대한 진단 마커로 사용된다.
- [0075] 본 명세서에서 "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0076] 본 발명의 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 암이 발병한 경우 대상의 생물학적 시료의 검체에서 발현 수준이 증가되는 마커인 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0077] 구체적으로, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.
- [0078] 상술한 "miR-324-5p 및 miR-324-3p.1의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물"과 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0079] 본 명세서에서 "단백질"은 또한 기준 단백질과 본질적으로 동일한 생물 활성 또는 기능을 보유하는, 단백질의 단편, 유사체 및 유도체를 포함하는 것이다.
- [0080] 본 발명의 단백질 수준을 측정하는 제제는 암이 발병한 경우 대상의 생물학적 시료의 검체에서 수준이 증가되는 마커인 단백질의 발현 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0081] 구체적으로, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0082] 본 발명에서 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로 무손상 모노클로날(단일클론) 항체, 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어 이중특이적 항체) 및 목적하는 생물학적 활성을 보이는 항체 단편을 포함한다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0085] 상기 키트에는 상기 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 암의 진단 키트로 사용되기에 적합하도록 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0086] 상술한 "miR-324-5p 및 miR-324-3p.1의 miRNA의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물;을 포함하는 암 진단용 키트"와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0087] 본 발명은 TUT4/7 발현 조절인자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 약학 조성물은 TUT4/7의 기능을 억제시킴으로써 세포 분열을 막고 암 발달을 저해시킬 수 있으며, miR-324-5p의 양을 늘리고 miR-324-3p.1의 기능을 억제시킬 수 있으므로, 이를 효과적으로 암 예방, 치료 또는 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 mir-324 암 스위칭(Arm switching) 결과로, 도 1a는 miRNA에 대한 5p 비율의 중간 절대 편차의 산점도 (풍부하고 어디에나 있는 miRNA(양 데이터셋에서 >100 median RPM, 모든 샘플에서 >0 RPM)가 분석에 포함), 도 1b는 AQ-seq에 의해 측정된 HEK293T에서의 miR-324의 IsomiR 프로파일(RPM 정규화 읽기 횟수는 왼쪽, 5p 및 3p의 참조 시퀀스는 회색 음영으로 표시), 도 1c는 AQ-seq에 의해 측정된 마우스 조직의 지시된 패널에 대한 miR-324의 가닥 비(5p/3p.1), 및 도 1d는 포유 동물에서 miR-324의 5'-isomiR의 보존을 나타낸다.
- 도 2는 TUT4/7에 의해 조절되는 mir-324 암 스위칭 결과로, 도 2a는 9개의 인간 세포주 및 15개의 마우스 조직에서 miR-324-3p의 유리된화 프리퀀시와 miR-324의 5p/3p.1 비(ratio) 사이의 음성 연관성(선형 회귀는 점선으

로 표시. r_s : 스피어만 상관 계수(Spearman correlation coefficient)), 도 2b는 마우스 조직의 지시된 패널에서의 상대 TUT4/7 수준 및 mir-324의 5p/3p.1 비(ratio)(TUT4/7 mRNA 수준 및 5p/3p.1 비는 각각 RT-qPCR 및 AQ-seq에 의해 정량화. r_s : 스피어만 상관 계수), 도 2c는 HEK293T에서 TUT4/7의 녹다운 후 AQ-seq 결과(왼쪽 및 중간: 유리딘화 생성 빈도 및 miRNA의 5p 비율 산포도. siNC-형질주입된 샘플에서 풍부한 miRNA(> 100 RPM)가 분석에 포함. 오른쪽: 3개의 5'-isomiR의 상대적 풍부도 및 mir-324의 \log_2 -변형된 5p/3p.1 비), 도 2d는 HEK293T에서 miR-324-5p 및 miR-324-3p의 노던 블롯(합성 miR-324 이중 복합체(duplex)를 크기 기준으로 사용), 및 도 2e는 마우스에서 Tut4/7의 이중 녹아웃 후 sRNA-seq 결과(왼쪽: 골수에서 TUT4/7 열화(depletion)에 의한 5'-isomiR의 풍부도 변화. 대조군 샘플에서 10 초과 RPM을 갖는 5'-isomiR가 분석에 포함. two-sided Student's *t* test에 의한 P-값. 오른쪽: mir-324의 \log_2 -변형된 5p/3p.1 비. 막대는 평균 \pm s.d.. 골수 n=2; 배아 섬유 아세포 n=2; 배아 줄기 세포 n=3; 간에서의 대조군 및 Tut4/7 dKO 각각 n=4 및 3. two-sided Student's *t* test에 의한 * p <0.05, *** p <0.001 RPM. RPM: reads per million)를 나타낸다.

도 3은 유리딘화(Uridylation)에 의해 유도된 pre-mir-324의 대안적 다이서 절단 결과로, 도 3a는 번역정제된 다이서에 의한 pre-mir-324의 변형되지 않은, 모노- 또는 다이-유리딘화된 형태의 시험관 내(*in vitro*) 절단 (processing)(청색으로 표시된 합성 miR-324-5p(23nt)를 크기 기준으로 사용. 주요 절단 산물 및 해당 절단 부위는 화살촉으로 표시. *: 방사성 표지된 5' 포스페이트), 도 3b는 HEK293T에서 miR-324-3p의 5'-isomiR 조성물, 및 도 3c는 마우스에서 miR-324-3p의 5'-isomiR 조성물(막대는 평균. 골수 n=2; 배아 섬유 아세포 n=2; 배아 줄기 세포 n=3; 간에서의 대조군 및 Tut4/7 dKO 각각 n=4 및 3)을 나타낸다.

도 4는 이중가닥 RNA 결합 도메인(double stranded RNA-binding domain; dsRBD)에 의해 촉진된 대안적 다이서 절단의 결과로, 도 4a는 번역정제된 다이서에 의한 야생형 또는 벌지가 없는(no-bulge) 돌연변이체 pre-mir-324의 변형되지 않은, 모노- 또는 다이-유리딘화된 형태의 시험관 내(*in vitro*) 절단, 도 4b 및 4c는 번역정제된 포켓 다이서 돌연변이체(4b) 또는 dsRBD-삭제 돌연변이체(4c)에 의한 pre-mir-324의 변형되지 않은, 모노- 또는 다이-유리딘화된 형태의 시험관 내(*in vitro*) 절단(주요 절단 산물 및 해당 절단 부위는 화살촉으로 표시. *: 방사성 표지된 5' 포스페이트. 꺾: 3p 위치 nicked 산물), 및 도 4d는 pre-mir-324의 유리딘화-매개 대안적 다이서 절단을 위한 제안된 모델을 나타낸다.

도 5는 대안적 다이서 절단에 의해 유도된 암 스위칭 결과로, 도 5a는 변형되지 않은 및 유리딘화된 pre-mir-324로부터 제조된 mir-324 이중 복합체의 가닥 선택의 개략도(점선 사각형은 각 이중 복합체의 가닥 선택을 지시하는 끝을 나타냄) 및, 도 5b는 2개의 mir-324 이중 복합체를 사용한 루시퍼라제 리포터 분석(왼쪽: miR-324-5p 또는 3p.1의 3개의 8mer 표적 부위가 있는 파이어플라이(firefly) 리포터 mRNA의 그림. 오른쪽: HEK293T에서 2개의 mir-324 이중 복합체에 대한 파이어플라이 루시퍼라제의 상대 리포터 활성. 레닐라(renilla) 루시퍼라제의 리포터 활성을 대조군으로 사용. 막대는 평균 \pm s.d..(n=2, biological replicates). two-sided Student's *t* test에 의한 ** p <0.01)을 나타낸다.

도 6은 mir-324 암 스위칭에 의해 조절되는 세포 주기 진행 결과로, 도 6a는 교모세포종(glioblastoma) 및 정상 뇌 조직에서 miR-324-3p의 5'-isomiR 조성물의 비율(정상 뇌 n=3; 교모세포종 n=6), 도 6b는 Oncopression 데이터베이스의 정상, 저 등급 교종(glioma) 및 교모세포종 조직에서 TUT4/7의 발현 수준(정상 n=723; 1 등급 n=74; 2 등급 n=133; 3 등급 n=132; 교모세포종 n=865. 다중 비교를 위한 one-way ANOVA with Tukey's post hoc test에 의한 *** p <0.001), 도 6c는 교모세포종(검은색)과 일치하는 정상 뇌 조직(흰색)에서 TUT4/7 발현 수준과 miR-324-5p/3p 비 간의 음의 상관 관계(선형 회귀는 점선으로 표시. r_s : 스피어만 상관 계수), 도 6d는 A172 세포에서 mir-324의 합성 5p 이중 복합체(긴 듀플렉스) 또는 3p.1 이중 복합체(짧은 듀플렉스)를 과발현한 후 표시된 사이클린 단백질의 웨스턴 블롯 및 세포 주기 프로파일, 도 6e는 A172 세포에서 locked 핵산 안티센스 올리고 뉴클레오타이드에 의해 miR-324를 억제한 후 지시된 사이클린 단백질의 웨스턴 블롯 및 세포 주기 프로파일, 및 도 6f는 A172 세포에서 TUT4/7을 녹다운한 후 지시된 단백질의 웨스턴 블롯 및 세포 주기 프로파일 (*: 교차 반응 밴드. PI: 요오드화 프로피디움. BrdU: 브로모데옥시우리딘)을 나타낸다.

도 7은 mir-324 암 스위칭 메커니즘 모델을 모식화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0089]

- [0090] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.
- [0092] **[준비에]**
- [0093] **1. AQ-seq 라이브러리**
- [0094] AQ-seq(바이어스가 최소화된 sRNA-seq) 라이브러리는 이전 연구(Kim et al., 2019)에 설명된대로 15개의 마우스 조직의 전체 RNA를 사용하여 구성되었다.
- [0095] 구체적으로, 총 RNA 5 μg를 30개의 등물 스파이크-인 RNA 10 fmole(바이어스 평가에 사용되는 miRNA-유사 비-인간/마우스/개구리/피쉬 RNA)과 혼합하였다. Small RNA는 15% 우레아-폴리아크릴아마이드 겔 전기 영동을 이용한 크기 분별에 의해 농축되었고, 3' 및 5' 말단에서 무작위화된 어댑터에 순차적으로 연결되었다. 결합된 RNA는 SuperScript III 역전사 효소(Invitrogen)를 사용하여 역전사되고, Phusion High-Fidelity DNA 폴리머라제(Thermo Scientific)를 사용하여 증폭되었으며, MiSeq 플랫폼(Illumina)에서 대용량 시퀀싱(high-throughput sequencing; HTS)되었다.
- [0097] **2. miRNA의 대용량 시퀀싱(high-throughput sequencing) 분석**
- [0098] 마우스에서의 sRNA-seq 결과의 관독 값이 마우스 게놈(mm10)에 매핑된 것을 제외하고는, 이전 연구(Kim et al., 2019)에 설명된대로 데이터를 처리하였다.
- [0099] 구체적으로, cutadapt(Martin, 2011)를 사용하여 관독 값(reads)으로부터 3' 어댑터를 클리핑하였다. AQ-seq 데이터의 경우 4-nt 변성 서열을 FNTX-Toolkit(http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)를 이용하여 추가로 제거하였다. FASTX-Toolkit을 사용하여 짧고 품질이 낮은 인공 관독 값을 필터링 한 후, AQ-seq 데이터를 먼저 스파이크-인 시퀀스에 정렬하고, 정렬되지 않은 관독 값을 다음 게놈에 맵핑하고, 다른 sRNA-seq 데이터는 BWA를 사용하여 게놈에 맵핑하였다(Li and Durbin, 2010). 그 다음, 3' 말단 불일치만 허용하는 최상의 정렬 점수를 갖는 정렬 결과를 선택하였다. miRNA annotation은 BEDTools(Cozomara and Griffiths-Jones, 2014; Quinlan and Hall, 2010)의 교차 도구로 miRBase release 21을 사용하여 검색하였다.
- [0100] miRNA 가닥 비율(strand ratio)의 정량 분석을 위하여, 먼저 가장 풍부하게 발현된 세포주 또는 조직에서 주어진 성숙 miRNA에 대해 가장 풍부한 5'-isomiR을 확인하였다. 그 다음, 모든 세포주 또는 조직에 대해 5p 및 3p로부터 top 5'-isomiR 사이의 비를 계산하였다. miRBase release 21에서 양쪽 가닥이 주석 처리된 비-반복 miRNA 유전자가 이 분석에 포함되었다.
- [0102] **3. Targetome 분석**
- [0103] 수정된 버전의 AGO CLIP-seq(CLEAR-CLIP 및 CLASH)의 결과를 분석하여, miR-324 표적(target)을 식별하였다(Helwak et al., 2013; Moore et al., 2015).
- [0104] 먼저 CLEAR-CLIP의 분석을 위하여, cutadapt를 사용하여 3' 및 5' 어댑터를 클리핑한 후 miR-324 서열을 포함하는 관독 값을 추출하였다. 그 다음, 표적 RNA 서열을 마우스 게놈(mm10)에 맵핑하였다. Annotation은 BEDTools의 교차 도구로 GENCODE release M19를 사용하여 검색하였다.
- [0105] 다음으로 CLASH의 분석을 위하여, 프로토콜 E4에 의해 생성된 CLASH 데이터의 보충 파일이 사용되었다. miR-324-3p의 표적 유전자는 miR-324-3p 서열의 5' 말단에 따라 세분되었다.
- [0107] **4. 플라스미드 구축**
- [0108] 야생형(wild type), 5' 포켓 다이서 돌연변이체 및 3' 포켓 다이서 돌연변이체의 발현을 위한 플라스미드를 구축하기 위하여, 인간 다이서 레퍼런스(RefSeq NM_030621)의 코딩 서열을 이전 연구에서 도입된 돌연변이의 존재 또는 부재하에 증폭시켰다 (Park et al. 2011). 증폭된 DNA를 In-Fusion HD Cloning Kit(Clontech)를 사용하여 BamHI 및 XhoI 부위에서 pCK-FLAG 벡터(CMV 프로모터-구동 벡터)로 서브 클로닝하였다.

- [0109] 이중가닥 RNA 결합 도메인(double stranded RNA-binding domain; dsRBD)-삭제 다이서의 경우, V1849-S1922 아미노산에 상응하는 서열을 제외한 코딩 영역을 증폭시키고, 동일한 방식을 이용하여 pCK-FLAG 벡터 내로 서브 클로닝하였다.
- [0110] TRBP의 경우, 인간 TRBP 레퍼런스(RefSeq NM_134323)의 코딩 서열을 증폭시키고, BamHI 및 XhoI 부위에서 pcDNA3-cMyc 벡터(Invitrogen)로 서브 클로닝하였다.
- [0111] 끝으로, 루시퍼라제(luciferase) 분석을 위한 플라스미드를 구축하기 위하여, miR-1-3p, miR-324-5p 또는 miR-324-3p.1의 3개의 8mer 표적 부위를 포함하는 합성 DNA 올리고를 증폭시키고, XhoI 및 XbaI 부위에서 pmirGLO(Promega)에 삽입하였다. 합성 DNA 올리고 및 PCR 프라이머의 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

명칭	서열(5' -> 3')
3X miR-1-3p	AGTTGTTTCAATCTACTTCCGAACATTCCACGCGCAATCTACTTCCGAACATTCCACGCGCAA TCTACTTCCGAACATTCCAAAACGAGC(서열번호 23)
3X miR-324-5p	AGTTGTTTCAATCTACTTCCGAGGGATGCACGCGCAATCTACTTCCGAGGGATGCACGCGCAA TCTACTTCCGAGGGATGCAAAAACGAGC(서열번호 24)
3X miR-324-3p.1	AGTTGTTTCAATCTACTTCCGAGGGGCAGACGCGCAATCTACTTCCGAGGGGCAGACGCGCAA TCTACTTCCGAGGGGCAGAAAACGAGC(서열번호 25)
miRNA_forward primer	CTCGTAGCTCGAGAGTGTTCATCTACTTCC(서열번호 26)
miR-1-3p_reverse primer	CAGGTCGACTCTAGAGCTCGTTTGGATGTTCCGG(서열번호 27)
miR-324-5p_reverse primer	CAGGTCGACTCTAGAGCTCGTTTGCATCCCTCGG(서열번호 28)
miR-324-3p.1_reverse primer	CAGGTCGACTCTAGAGCTCGTTTCTGCCCTCGG(서열번호 29)

[0114] **5. 세포 배양 및 형질주입(transfection)**

- [0115] A172 및 U87MG는 한국 세포주 은행에서 입수하였다. HEK293T, A172 및 U87MG를 10% 소 태아 혈청(WELGENE)이 보충된 DMEM(WELGENE)에서 유지시켰다. 교모세포종(glioblastoma) 환자(TS13-64)로부터 유래된 1차 종양 세포는 연세대학교 의과대학(4-2012-0212, 4-2014-0649)의 기관 검토위원회에 의해 승인된 바와 같이, 신선한 교모세포종 조직 표본으로부터 확립되었다.
- [0116] 종양구(tumorsphere) 배양을 위하여, TS13-64 세포를 1X B-27(Thermo Scientific), 20ng/mL의 bFGF(R&D Systems) 및 20ng/mL의 EGF(Sigma-Aldrich)가 보충된 DMEM(WELGENE)에서 성장시켰다(Sigma-Aldrich)(Kong et al., 2013).
- [0117] TUT4/7을 녹다운시키기 위하여, 리포펙타민(Lipofectamine) 3000(Thermo Scientific)을 사용하여 20 내지 22nM siRNA로 두 번에 걸쳐 세포에 형질주입시키고, 제1 형질주입 4일 후에 수확하였다.
- [0118] 다이서의 과발현을 위하여, 리포펙타민 3000을 사용하여 HEK293T 세포에 pCK-FLAG-DICER를 형질주입시키고, 형질주입 2일 후에 수확하였다.
- [0119] 합성 miRNA 또는 억제제를 전달하기 위하여, 리포펙타민 3000을 사용하여 20 nM의 합성 miRNA 듀플렉스 또는 80 nM의 LNA miRNA 억제제를 세포에 형질주입시키고, 형질주입 2일 후에 수확하였다.
- [0120] 대조군 siRNA(AccuTarget 음성 대조군 siRNA), siRNA, 대조군 miRNA 및 합성 mir-324 이중체는 Bioner로부터 입수하였다. 대조군 miRNA 억제제(miRCURY LNA miRNA 억제제 음성 대조군 A) 및 miR-324 억제제(hsa-miR-324-5p 및 hsa-miR-324-3p miRCURY LNA miRNA 억제제)를 QIAGEN으로부터 수득하였다. 합성 siRNA 및 miRNA의 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0121]

명칭	각 복합체의 센스 가닥 서열(5' -> 3') (밑줄: 테옥시리보뉴클레오타이드에 의한 3' 돌출부)
siTUT4 (복합체 결합 서열)	GGUUGCUUCAGACUUUAUATT(서열번호 5) (UAUAAAGUCUGAAGCAACCTT)(서열번호 9) GGAAUGAAGAAGAGAAAGATT(서열번호 6) (UCUUUCUCUUCUUCUUCCTT)(서열번호 10) GGAGAAACGACAUAGAAATT(서열번호 7) (UUUCUUUUGUCUUUCCTT)(서열번호 11) GGUUAGAGCUGCUAAAUUTI(서열번호 8) (AAUUUAAGCAGCUCUACCTT)(서열번호 12)
siTUT7 (복합체 결합 서열)	GAAAAGAGGCACAAGAAATT(서열번호 13) (UUUUCUUGGCCUUCUUCCTT)(서열번호 17) GCAAAGAGGACAAAGAAUTI(서열번호 14) (AUUUCUUUGUCCUUCUUCCTT)(서열번호 18) GAUAAGUAUUCGUGUCAATT(서열번호 15) (UUUGACACGAAUACUUAUCTT)(서열번호 19) GAACAUAGUACCUAAUUTI(서열번호 16) (UAAAUAGGUACUCAUGUUCTT)(서열번호 20)
명칭	서열(5' -> 3')
miNC	Sense: 5Phos/CCUACGCCACCAUUUCGUUU(서열번호 30)Ant isense: 5Phos/ACGAAAUUGGCGGUAGGU(서열번호 31)
mir-324 long duplex (5p duplex)	5p: 5Phos/CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU(서열번호 1)3p.2: 5phos/CCACUGCCCCAGGUGCUGUGG(서열번호 2)
mir-324 short duplex (3p.1 duplex)	5p: 5Phos/CGCAUCCCUAGGGCAUUGG(서열번호 32)3p.1+U: 5phos/ACUGCCCCAGGUGCUGUGGU(서열번호 33)
miR-324-5p	CGCAUCCCUAGGGCAUUGGUGU(서열번호 1)

[0123]

6. 노던 블롯(Northern blot)

[0124]

TRIzol(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 분리하고, mirVana miRNA Isolation Kit(Ambion)로 small RNA(<200nt)를 농축하였다. 그 다음, RNA를 15% 우레아-폴리아크릴아마이드 겔에서 분석하였다. 합성 mir-324 이중 복합체 및 Decade Markers System(Ambion)을 크기 마커로 사용하였다. RNA를 Hybond-NX 막(Amersham)으로 옮기고, 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카보다이이미드로 막에 가교시켰다. 안티센스 프로브 5' 말단은 T4 폴리뉴클레오타이드(Takara)에 의해 [-32P] ATP로 방사성 표지되었고, Performa Spin 컬럼(Edge BioSystems)을 사용하여 정제되었다. 막을 PerfectHyb Plus 하이브리드화 버퍼에서 변성된 UltraPure Salmon Sperm DNA 용액(Thermo Scientific)과 함께 배양하고, 안티센스 프로브와 하이브리드화한 후, mild 세척 버퍼(0.05% SDS 및 2X SSC)로 세척하고 stringent 세척 버퍼(0.1% SDS 및 0.1X SSC)로 세척하였다. 방사능 신호는 Typhoon FLA 7000(GE Healthcare)에 의해 감지되었으며, Multi Gauge 소프트웨어(FujiFilm)를 사용하여 분석되었다.

[0125]

miR-324-3p가 먼저 검출되었고, 프로브를 벗겨낸 다음에 miR-324-5p가 검출되었다. 블롯으로부터 프로브를 제거하기 위하여, 막을 미리 끓인 0.5% SDS에 15분 동안 침지시켰다. 합성 mir-324 이중 복합체(AccuTarget)는 Bioneer로부터 입수하였다. 프로브의 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0126]

명칭	서열(5' -> 3')
miR-324-5p probe	ACCAATGCCCTAGGGGATGCG(서열번호 34)
miR-324-3p probe	CAGCAGCACCTGGGCAGT(서열번호 35)

[0128]

7. 정량적 실시간 PCR (RT-qPCR)

[0129] 마우스 조직에서 mRNA 수준을 측정하기 위하여, RevertAid First Strand cDNA 합성 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 Mouse Total RNA Master Panel (Takara)의 RNA를 역전사하고 Power SYBR Green PCR Master Mix(Thermo Scientific)로 StepOnePlus Real-Time PCR 시스템(Thermo Scientific)에서 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 내부 제어에는 GAPDH가 사용되었으며, qPCR 프라이머의 서열은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

명칭	서열(5' -> 3')
TUT4 forward primer	GCCTAAAAGGCGGATAGCCATTG(서열번호 36)
TUT4 reverse primer	GCTGCTCTGAATCTTCCACAAC(서열번호 37)
TUT7 forward primer	CAGCTCAGCAAAAGAGGAGGCA(서열번호 38)
TUT7 reverse primer	CATAGAACCGCAGCAATCCACC(서열번호 39)
GAPDH forward primer	ACCACAGTCCATGCCATCAC(서열번호 40)
GAPDH reverse primer	TCCACCACCCTGTTGCTGTA(서열번호 41)

[0132] miR-324-5p/3p 가닥 비를 정량화하기 위하여, 총 RNA를 TRIzol을 사용하여 분리하였다. 그 다음, TaqMan miRNA 역전사 키트(Applied Biosystems)를 사용하여 cDNA를 합성하고 TaqMan 유전자 발현 분석 키트(Applied Biosystems)로 StepOnePlus Real-Time PCR 시스템에서 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 내부 제어에는 U6 snRNA가 사용되었다.

[0134] 8. 시험관 내(*In vitro*) 다이서 절단 분석

[0135] pre-mir-324 및 그 변이체는 T4 폴리뉴클레오타이드에 의해 [-32P] ATP로 방사성 표지되었고, 제조사의 지시에 따라 Oligo Clean & Concentrator(Zymo Research)를 사용하여 정제되었다.

[0136] FLAG-DICER의 면역 침전을 위하여, 다이서 단백질을 과발현하는 HEK293T 세포를 용해 버퍼(500 mM NaCl, 20 mM Tris(pH 8.0), 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100)로 용해시키고 Bioruptor Standard(Diagenode)를 사용하여 초음파 처리하였다. 원심분리 후, 상층액을 10 µL의 ANTI-FLAG M2 Affinity Gel(Sigma-Aldrich)과 함께 배양하였다. 비즈(beads)를 용해 버퍼로 2회, 고염 버퍼(800mM NaCl 및 50mM 트리스(pH 8.0))로 4회, 버퍼 D(200mM KCl, 20mM 트리스(pH 8.0), 0.2mM EDTA)로 4회 세척하였다.

[0137] 면역정제된 다이서는 총 부피 30 µL(2mM MgCl₂, 1mM DTT, SUPERase In RNase Inhibitor(Thermo Scientific) 60unit, 5'-방사성 표지된 pre-mir-324 포함)에서 시험관 내(*in vitro*) 반응을 거쳤다. RNA를 페놀 추출물 또는 Oligo Clean & Concentrator로 정제하고 15% 우레아-폴리-아크릴아마이드 겔에서 분석하였다. 합성 miR-324-5p 및 Decade Markers System을 크기 마커로 사용하였다. 합성 pre-mir-324 단편은 IDT로부터 획득되었다. 합성 miR-324-5p는 Bioneer로부터 입수하였다. 합성 pre-mir-324 단편 및 miR-324-5p의 서열은 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

명칭	서열(5' -> 3')
Pre-mir-324 5' half	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGUAAAGCUG(서열번호 42)
No-bulge pre-mir-324 5' half	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGGUAAAGCUG(서열번호 43)
Pre-mir-324 3' half	5Phos/GAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGG(서열번호 44)
Pre-mir-324 3' half + U	5Phos/GAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGGU(서열번호 45)
Pre-mir-324 3' half + UU	5Phos/GAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGGUU(서열번호 46)

[0140] 9. 듀얼 루시퍼라제 리포터 분석

[0141] miR-1-3p, miR-324-5p 또는 miR-324-3p.1의 3개의 8mer 표적 부위를 함유하는 pmirGLO를 대조 miRNA 또는 miR-324 이중 복합체와 함께 리포펙타민 3000을 사용하여 HEK293T 세포에 공동 형질주입(co-transfected)되었다. 형

질주입 2일 후 세포를 수확하고 리포터 분석을 수행하였다. 리포터 활성은 제조사의 지시(Promega)에 따라 Spark microplate reader(TECAN)에서 Dual-Luciferase Reporter Assay System을 사용하여 측정되었다. miR-1-3p가 HEK293T에서 거의 발현되지 않았음을 감안할 때(AQ-seq에서 ~8 RPM), miR-1-3p의 3개의 8mer 표적 부위를 갖는 pmirGLO가 플라스미드 대조군으로 사용되었다. 추가 표준화를 위해 대조군 miRNA가 사용되었다.

[0143] **10. 교모세포종(glioblastoma) 환자 데이터의 유전자 발현 분석**

[0144] Oncopression(<http://oncopression.com>)에서 마이크로어레이를 사용하여 전처리된 유전자 발현 데이터를 검색하였다(Lee and Choi, 2017). REMBRANDT 유전자 발현 데이터세트(E-MTAB-3073)는 ArrayExpress(Madhavan et al., 2009)로부터 입수 하였다.

[0145] mRNA 및 miRNA의 동시 프로파일링을 분석하기 위하여(Gulluoglu et al., 2018), 가공 전 마이크로어레이 데이터를 R의 limma 패키지를 사용하여 RMA(robust multi-array average)으로 정규화한 다음, 유전자 발현 분석에 사용하였다.

[0147] **11. 생존 분석(Survival analysis)**

[0148] TCGA 교모세포종 환자에 대한 level 3 miRNA 유전자 정량화 데이터 및 임상 데이터는 각각 GDC legacy archive 및 GDC 데이터 포털로부터 획득하였다. 환자들은 miR-324-5p/3p 비에 따라 계층화되었으며, 상위 및 하위 40%가 분석에 포함되었다. 환자의 생존은 Kaplan-Meier 방법으로 추정하고, R의 생존 패키지를 사용하여 two-sided log-rank test로 테스트하였다.

[0150] **12. 웨스턴 블롯(Western blot)**

[0151] 세포를 PBS로 세척하고, 프로테아제 억제제 카테일 세트 III(Merck Millipore) 및 포스파타아제 억제제 카테일 II(AG Scientific)가 보충된 RIPA 버퍼(Thermo Scientific)에 용해시켰다. BCA 단백질 분석 키트(Pierce Biotechnology)로 단백질 농도를 측정하고, 동일한 양의 단백질을 4-12% 트리스-글라이신 겔(Thermo Scientific)에서 분리하여 Immobilon-P PVDF 막(Merck Millipore)으로 옮겼다. 막을 5% 탈지유가 포함된 PBS-T(PBS(Amresco) + 0.1% 트윈 20(Anatrace))와 함께 배양한 후 일차 항체로 처리하였다. PBS-T로 3회 세척한 후, 막을 HRP-접합 이차 항체와 함께 배양하였다. 단백질 밴드는 SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific)에 의해 검출되었고, ChemiDoc XRS+ 시스템(Bio-Rad)에 의해 스캔되었다.

[0152] TUT4(18980-1-AP, RRID:AB_10598327, 1:500) 및 TUT7(25196-1-AP, 1:500)에 대한 래빗 다클론 항체는 Proteintech에서 입수하였다. Cyclin E(sc-247, RRID:AB_627357, 1:1,000)에 대한 마우스 단일클론 항체 및 Cyclin A(sc-751, RRID:AB_631329, 1:1,000), Cyclin B1(sc-752, RRID:AB_2072134, 1:1,000) 및 Cyclin D1(sc-753, RRID:AB_2070433, 1:1,000)에 대한 토끼 다클론 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 입수하였다. HSP90(4874, RRID:AB_2121214, 1:1,000)에 대한 토끼 다클론 항체는 Cell Signaling에서 입수하였다. 토끼 IgG(111-035-144, RRID:AB_2307391, 1:10,000) 및 마우스 IgG(115-035-146, RRID:AB_2307392, 1:10,000)에 대한 HRP-접합 염소 다클론 항체는 Jackson ImmunoResearch에서 입수하였다.

[0154] **13. 유세포 분석(Flow cytometry)**

[0155] 세포를 3-8시간 동안 10 μM BrdU와 함께 배양한 후, ice-cold 70% 에탄올로 고정하였다. 고정된 세포를 FITC-접합 항-BrdU 항체(11-5071-42, RRID:AB_11042627, Invitrogen)와 함께 배양하고, 10 μg/mL RNase A(Thermo Scientific)의 존재 하에 20 μg/mL 요오드화 프로피디움(Sigma-Aldrich)으로 추가 염색하였다. 그 다음, BD Accuri C6 Plus 유세포 분석기를 사용하여 검출하였다. 세포 주기는 BD Accuri C6 시스템 소프트웨어에 의해 분석되었다.

[0157] **[실시예]**

[0158] 1. mir-324의 대안적 가닥 선택(또는 암 스위칭(Arm switching))

[0159] 먼저, 가닥 비율(strand ratio)에 큰 변화를 나타내는 miRNA를 검색하였다. 가닥 비율의 정확한 정량을 위하여, AQ-seq 라이브러리 프로토콜을 사용하였다. 가닥 선택(strand selection)의 변이(variation)는 15개의 상이한 마우스 조직/발달 단계에 따라 추정되었다(도 1a x축). 또한, 인간의 가닥 사용을 비교하기 위하여, 9개의 인간 세포주에서 얻은 sRNA-seq 데이터셋을 사용하였다.

[0160] 도 1a에서 확인할 수 있듯이, 인간 및 마우스 데이터셋 모두 대부분의 miRNA가 가닥 비율(~79%, 3% 미만의 중간 분산)이 변하지는 않았다. 그러나, mir-324, mir-362, mir-193a 및 mir-140과 같이 변화를 명확하게 보여주는 몇 가지 사례를 확인하였다.

[0161] 특히, mir-324의 암 스위칭이 세포 운명 결정에 실질적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 보아, mir-324의 가닥 변화에 집중하였다.

[0162] 도 1b 내지 1d에서 확인할 수 있듯이, 단일 MIR324 유전자좌에서 생성된 5'-isomiRs(5p, 3p.1 및 3p.2)의 3가지 그룹이 검출되었다(도 1b). 5p 가닥은 마우스 배아 및 신경 조직에서 우세한 반면, 주요(major) 3p 이형체인 3p.1은 간 및 위에서 우세하게 나타났다(도 1c). 또한, 5'-isomiR 그룹은 포유류에서 발견되었으며, 이는 대안적 가닥 선택 메커니즘이 진화적으로 보존된다는 것을 암시한다(도 1d).

[0164] 2. mir-324 암 스위칭은 TUT4 및 TUT7에 의해 조절된다.

[0165] 3p의 유리딘화 빈도(uridylation frequency)는 5p/3p.1 비(ratio)와 음의 상관 관계가 있음을 확인하였다(도 2a). 이에 따라, 유리딘화가 암 스위칭에 관여할 수 있다는 가설을 세웠다.

[0166] 한편, 터미널 유리딜릴 트랜스퍼라제(Terminal uridylyl transferases)인 TUT4(ZCCHC11 및 TENT3A로도 알려져 있음) 및 TUT7(ZCCHC6 및 TENT3B로도 알려져 있음)은 pre-miRNA의 특정 세트(예를 들어, let-7 전구체)를 포함하는 다양한 RNA 종의 유리딘화를 촉매하는 것으로 알려져 있다. TUT4 및 TUT7(TUT4/7)은 대부분의 기질에서 중복적으로 작동한다.

[0167] 상기와 같은 사실에 기초하여, 마우스 조직에서 TUT4/7 수준을 정량화(RT-qPCR)한 결과, TUT4 및 TUT7 수준이 비교적 낮은 세포 유형에서 5p/3p.1 비율이 더 높다는 것을 알 수 있었다(도 2b).

[0168] mir-324 성숙(maturation)에서 TUT4/7의 관여를 확인하기 위하여, HEK293T 세포에서 TUT4/7을 열화시키고(depleted) sRNA-seq(AQ-seq)를 수행하였다.

[0169] 도 2c에서 확인할 수 있듯이, TUT4/7 녹다운은 miR-324-3p를 포함하여 miRNA의 유리딘화를 감소시켰다(왼쪽 위 패널). 또한, TUT4/7 녹다운은 3p.1의 감소, 및 5p 및 보조(minor) 이형체 3p.2의 증가 등 miR-324의 이형체 조성의 변화를 초래하며, 결과적으로, 주요 이형체 사이(5p/3p.1)의 비가 증가하였다(오른쪽 위 및 아래 패널).

[0170] 이러한 시퀀싱 데이터는 노던 블롯 결과(도 2d)와도 일치하였고, 이는 TUT4/7 녹다운 시 miR-324 이형체의 양에 변화가 나타남을 의미한다.

[0171] 또한, 도 2e에서 확인할 수 있듯이, TUT4/7 이중 녹아웃 마우스로부터 공개된 sRNA-seq 데이터의 재분석 결과, TUT4/7 녹아웃 시 3p.1 수준은 감소하는 반면 5p 수준은 증가하였다(왼쪽 패널). 결과적으로, 검사된 모든 조직/세포 유형(글수, 배아 섬유 아세포, 배아 줄기 세포 및 간)에서 TUT4/7 이중 녹아웃에 의한 가닥 비율의 변화가 관찰되었다(오른쪽 패널).

[0173] 3. 유리딘화는 pre-mir-324의 대안적 다이서 절단을 유도한다.

[0174] TUT4/7은 성숙 miRNA보다는 pre-miRNA를 변형시키는 것으로 알려져 있다. 이에, TUT4/7이 mir-324 가닥 선택을 어떻게 조절하는지 확인하기 위하여, 합성 pre-mir-324로 시험관 내(*in vitro*) 다이서 절단 분석을 수행함으로써 pre-miRNA 절단에 대한 유리딘화의 영향을 확인하였다.

[0175] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, pre-mir-324가 3' 말단에 1개 또는 2개의 여분의 유리딘 잔기를 보유할 때, 다이서 절단 부위는 3-nt만큼 이동되었다(도 3a의 위치 A에서 위치 B로 이동). 변형되지 않은 pre-mir-324는 주로

5p 및 3p.2를 포함하는 더 긴 이중 복합체(검은색 화살표)를 방출하는 반면, 유리딘화된 pre-mir-324는 대체 위치(위치 B)에서 쪼개져 더 짧은 5p 및 3p.1로 구성된 더 짧은 이중 복합체를 생성하였다(흰색 화살표). 따라서, pre-mir-324의 TUT4/7-매개 유리딘화는 대안적 다이스 절단으로 이어짐을 알 수 있었다.

[0176] 또한, 도 3b 및 3c에서 확인할 수 있듯이, TUT4/7-열화된 인간 및 마우스 세포로부터의 시퀀싱 데이터는 3p isomiRs(3p.1 vs. 3p.2)의 상대적 풍부도가 TUT4/7 녹다운(도 3b) 및 녹아웃(도 3c)에 따라 변하고, 이에 따라 유리딘화가 다이스 절단 부위 선택을 변경시킨다는 결론을 뒷받침한다.

[0178] **4. 대안적 다이스 절단은 이중가닥 RNA 결합 도메인(double stranded RNA-binding domain)에 의해 촉진된다.**

[0179] 먼저, 3-nt 이동을 담당하는 결정 요인을 확인하기 위하여, pre-mir-324에서 U 벌지(bulge)를 제거하였다.

[0180] 도 4a에서 확인할 수 있듯이, "U 벌지가 없는(no-bulge)" 돌연변이체의 경우, 다이스의 절단 부위가 유리딘화에 의해 더 이상 위치 B로 갑작스럽게 이동하지 않고, 유리딘 개수에 따라 점차적으로 이동하였다(레인 10-12). 따라서, U 벌지는 위치 A와 B 사이 부위에서의 절단에 대한 반-결정요인(anti-determinant)이고, 이에 의해 다이스의 대안적 절단을 담당하는시스-작용(cis-acting) 요소로서 작용함을 확인하였다.

[0181] 다음으로, 5'- 및 3'-카운팅 규칙이 pre-mir-324 절단과 어떠한 관련이 있는지 확인하기 위하여, 5' 또는 3' 포켓에서의 다이스 돌연변이체를 활용하였다.

[0182] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 5' 포켓 다이스 돌연변이체는 위치 A에서 pre-mir-324를 절단하지 못했으며, 3' 포켓 돌연변이체는 절단 부위 선택에 영향을 미치지 않으면서 절단 효율에 약간 영향을 미쳤다. 이러한 결과는, 위치 A에서의 절단에 대한 5' 포켓의 중요성을 시사한다.

[0183] 나아가, 다이스에서 다른 도메인의 기여도를 조사하였다. 시험관 내(*in vitro*) 다이스 dsRBD의 역할을 확인하기 위하여, dsRBD-결실 돌연변이체를 생성하였다.

[0184] 도 4c에서 확인할 수 있듯이, dsRBD 결실은 절단 패턴에 상당한 변화를 가져 왔다. 즉, dsRBD가 없으면 다이스는 주로 위치 A를 절단하며, 이는 dsRBD가 위치 B에서의 절단을 담당한다는 것을 시사한다.

[0185] 종합해 보면, 도 4d에서 확인할 수 있듯이, 변형되지 않은 pre-mir-324는 다이스의 플랫폼 영역에 존재하는 5' 포켓에 의존하여 위치 A가 절단됨을 알 수 있다(왼쪽 패널). 그러나, 유리딘화되면, 플랫폼/PAZ 도메인에 단단히 고정되지 않기 때문에 최종 구조(3-4 nt 3' 돌출부)는 dsRBD의 도움으로 pre-mir-324가 다이스에서 재배치되어, 위치 B에서 대안적 절단이 가능해짐을 알 수 있다(오른쪽 패널).

[0187] **5. 대안적 다이스 절단은 암 스위칭을 유도한다.**

[0188] 상기 실시예들의 결과에 따르면, 도 5a에서 확인할 수 있듯이, pre-mir-324가 2가지 대안적 형태의 이중 복합체, 즉 긴 이중 복합체(위치 A; 5p/3p.2) 및 짧은 이중 복합체(위치 B; 5p/3p.1)를 생성할 수 있음을 알 수 있다.

[0189] 이에, 세포에서의 가닥 선택을 확인하기 위하여, miR-324-5p 또는 miR-324-3p.1에 상보적인 3' UTR을 함유하는 리포터를 구성하고(도 5b 왼쪽 패널), 합성 이중 복합체((5p/3p.2) 또는 (5p/3p.1))를 리포터와 공동 형질주입(co-transfected)시켰다. 그 결과, 긴 이중 복합체는 3p.1 부위가 아닌 5p 보완 부위(complementary sites)가 있는 리포터를 선택적으로 억제하였다. 반면, 짧은 이중 복합체는 3p.1 리포터를 하향 조절하였으나, 5p 리포터는 하향 조절하지 않았다(도 5b 오른쪽 패널).

[0190] 이러한 결과는, 5p 및 3p.1이 실제로는 긴 이중 복합체 및 짧은 이중 복합체로부터 각각 다르게 생성됨을 시사한다. 즉, 긴 이중 복합체의 경우 5p의 5' 말단이 3p.2의 5' 말단에 비해 열역학적으로 불안정하기 때문에 5p 가닥이 선택되는 반면(도 5a, 청색 점선 사각형), 짧은 이중 복합체의 경우 3p.1은 AGO에 의해 선호되는 5' 아데노신으로 시작함을 알 수 있었다(도 5a, 빨간색 점선 사각형).

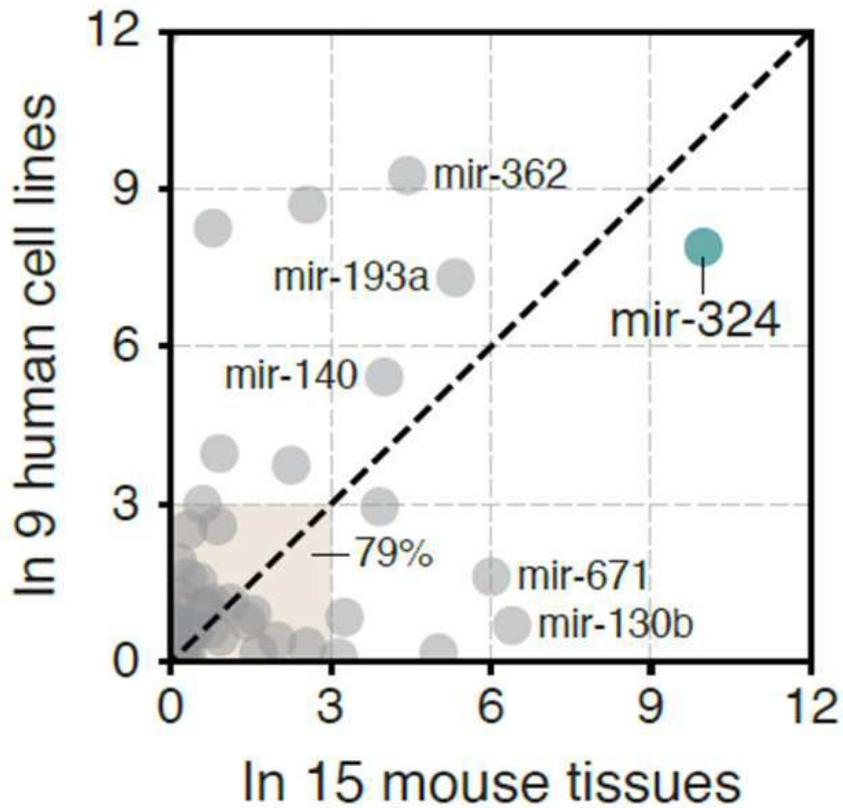
[0191] 종합해 보면, 대안적 다이스 절단으로 인해 mir-324의 암 스위칭이 발생함을 알 수 있다.

[0193] **6. mir-324 암 스위칭은 세포 주기 진행을 조절한다.**

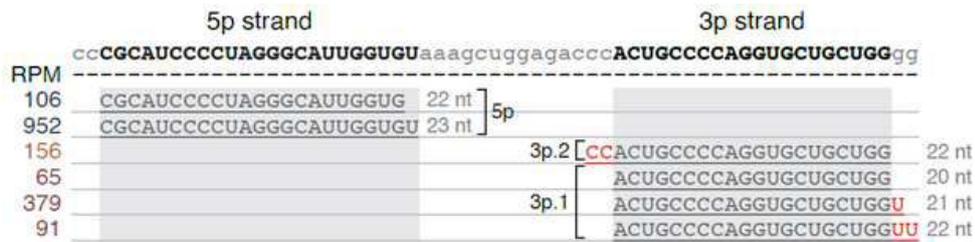
- [0194] 인간 교모세포종(GBM)에서 miR-324-3p의 5' 말단 변화가 보고된 바 있으며, 도 6a에서도 확인할 수 있듯이, 정상적인 뇌 조직(Normal brain)보다 종양(GBM)에서 3p.1의 비율이 실질적으로 더 높게 나타났다.
- [0195] 이에, TUT4/7-매개 mir-324 성숙이 GBM에서 다르게 조절될 가능성을 조사하기 위하여, Oncopression을 이용하여 전사체 데이터세트를 분석하였다.
- [0196] 도 6b에서 확인할 수 있듯이, TUT4 및 TUT7 모두 GBM에서 크게 상향 조절되었다.
- [0197] 추가적으로, mRNA와 miRNA를 모두 프로파일링하는 독립적인 데이터세트를 사용하여 정상 샘플과 비교하였을 때, GBM에서 TUT4/7 양이 상향 조절되고, miR-324-5p/3p 비가 감소함을 확인하였다.
- [0198] 도 6c에서 확인할 수 있듯이, TUT4/7 레벨은 5p/3p 비율과 음의 상관 관계가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는, GBM에서 TUT4/7-매개 mir-324 조절이 생리학적으로 관련될 수 있음을 시사한다.
- [0200] 상기 결과를 기초로, mir-324 암 스위칭의 기능을 이해하기 위하여, GBM 세포주에서 mir-324 대안적 가닥 선택에 의해 유도되는 분자 및 세포 표현형을 조사하였다.
- [0201] 도 6d 및 6e에서 확인할 수 있듯이, 합성 긴 이중 복합체("5p duplex") 또는 3p에 대한 안티센스 올리고("3p inhibitor")의 형질주입은 사이클린 D 및 E의 축적 및 사이클린 A 및 B의 감소를 초래하였다(왼쪽 패널). 또한, 세포 주기 프로파일링에 따르면, 세포가 G1 단계에서 정지되었음을 알 수 있었다(우측 패널).
- [0202] 도 6f에서 확인할 수 있듯이, TUT4/7 녹다운도 마찬가지로 사이클린 조절 이상 및 G1 정지를 야기하였다.
- [0203] 종합해 보면, miR-324 isomiRs는 GBM 세포 증식에 대해 반대 기능을 가지고 있음을 알 수 있다.
- [0205] **[소결]**
- [0206] 도 7에서 확인할 수 있듯이, 말단 유리딘화 효소인 TUT4/7은 pre-mir-324를 유리딘화함으로써 mir-324 대안적 가닥 선택에 주요 플레이어로서 기능한다. 즉, TUT4/7은 pre-mir-324를 유리딘화시키고, 유리딘화 현상이 pre-mir-324의 다이서 절단 위치를 조절함으로써 기능이 서로 다른 3가지 마이크로 RNA(5p 및 두 3p 이형체) 간의 비율을 변화시킨다. 따라서, 유리딘화에 의한 miR-324 조절을 저해시키면 세포 분열 관련 유전자들의 발현을 억제할 수 있고, 교모세포종의 성장을 억제할 수 있다.
- [0207] 본 발명에 따르면, TUT4/7에 의한 마이크로 RNA(miR-324)의 대안적 가닥 선택을 조절할 수 있으므로, 이를 효과적으로 암(뇌종양)의 예방, 치료에 이용할 수 있다.

도면

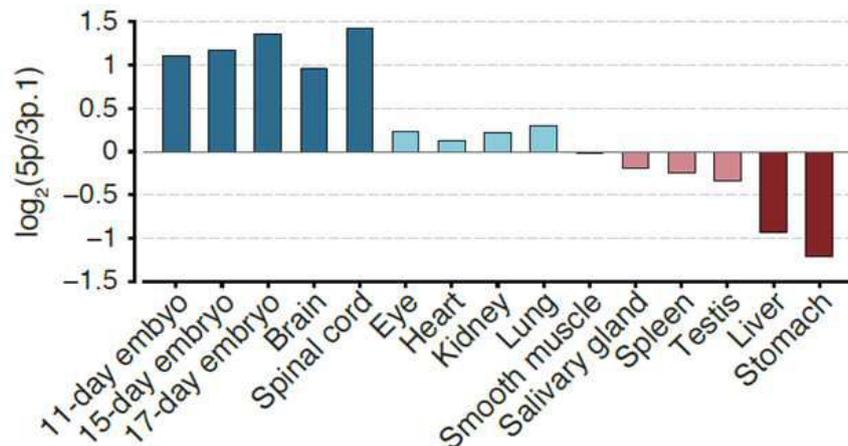
도면1a



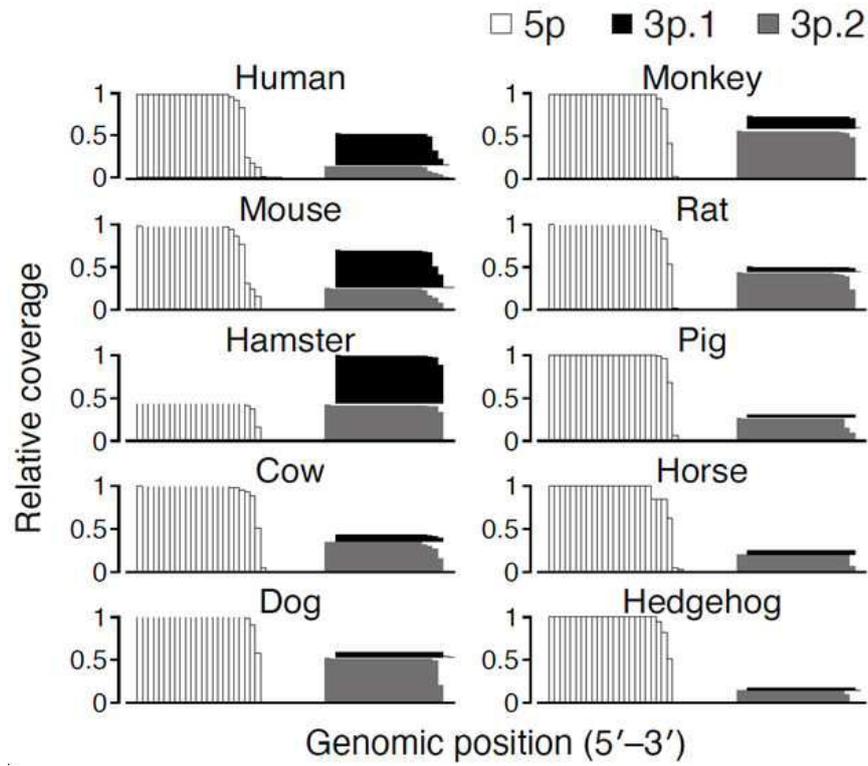
도면1b



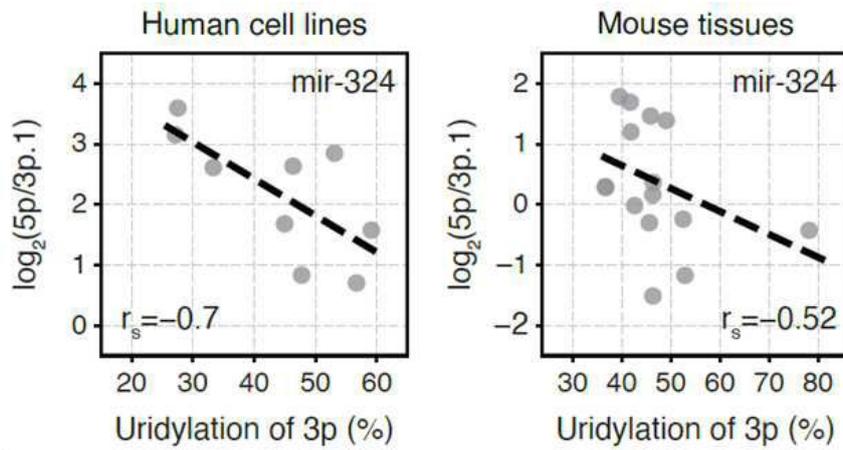
도면1c



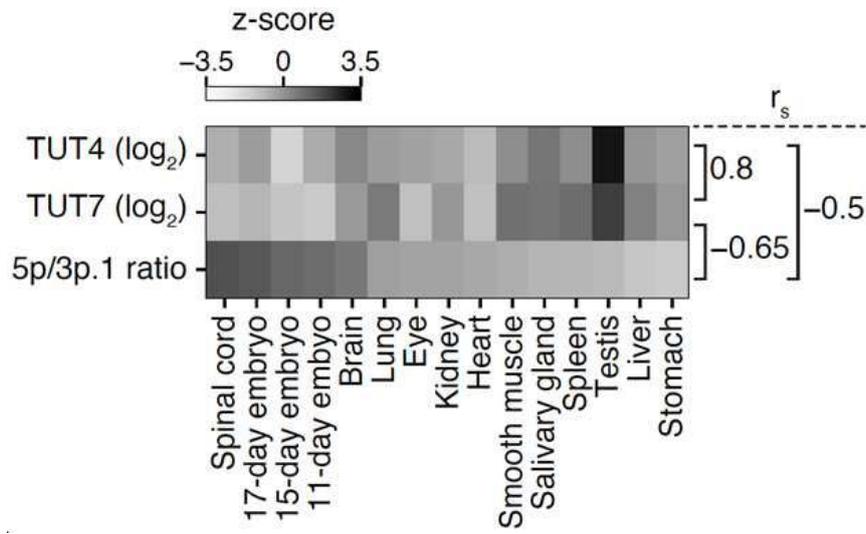
도면1d



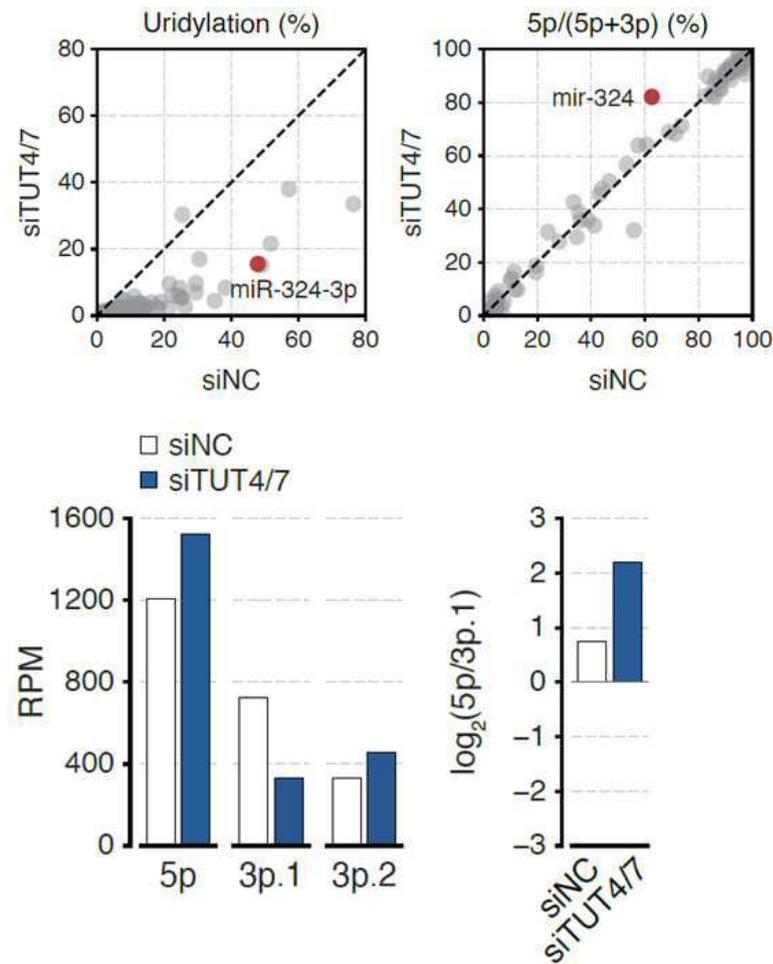
도면2a



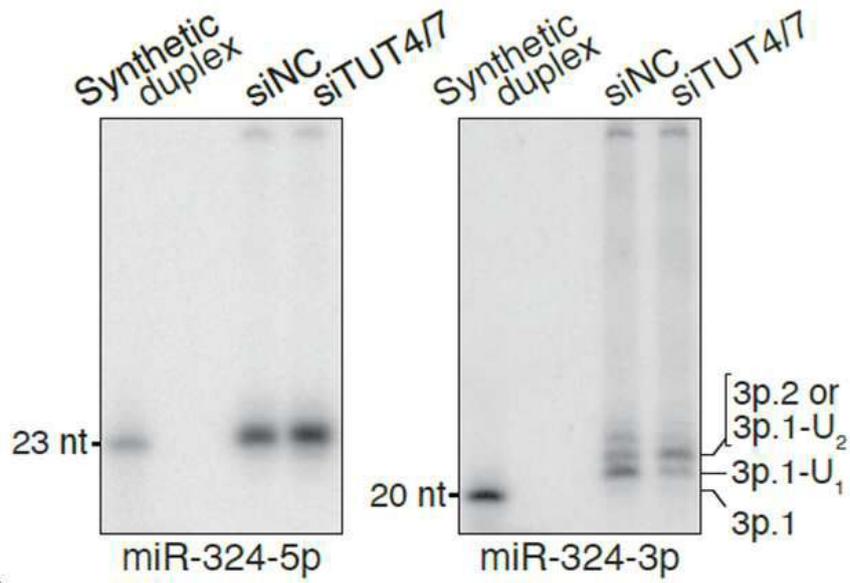
도면2b



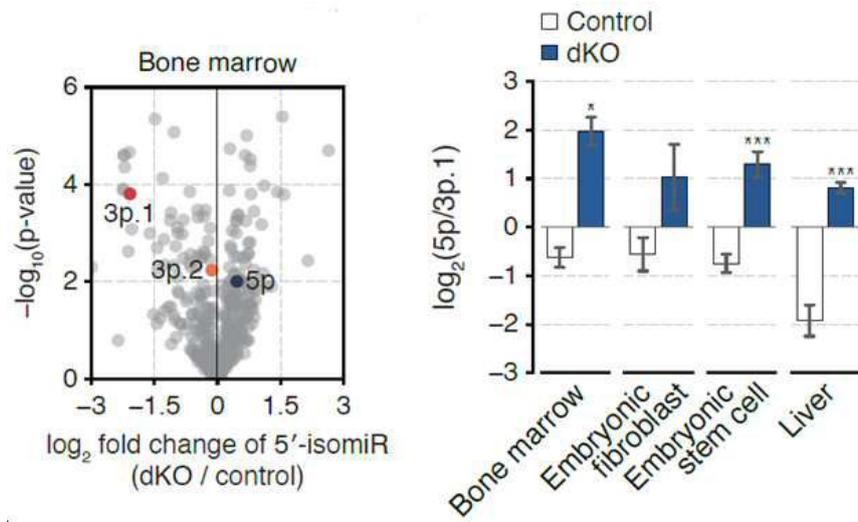
도면2c



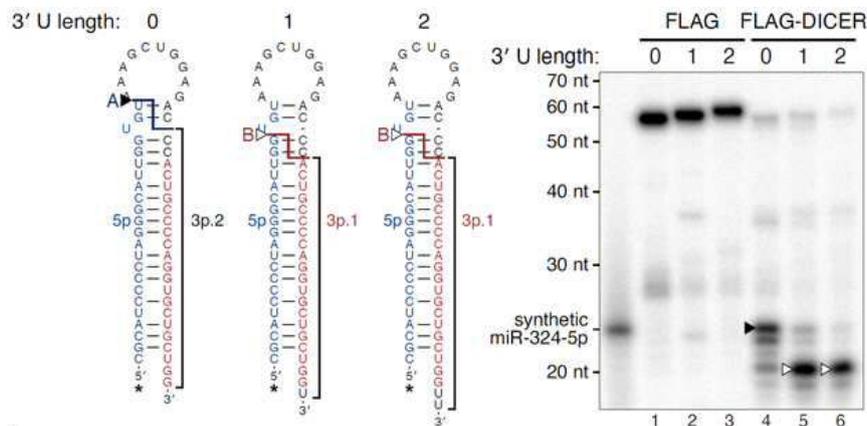
도면2d



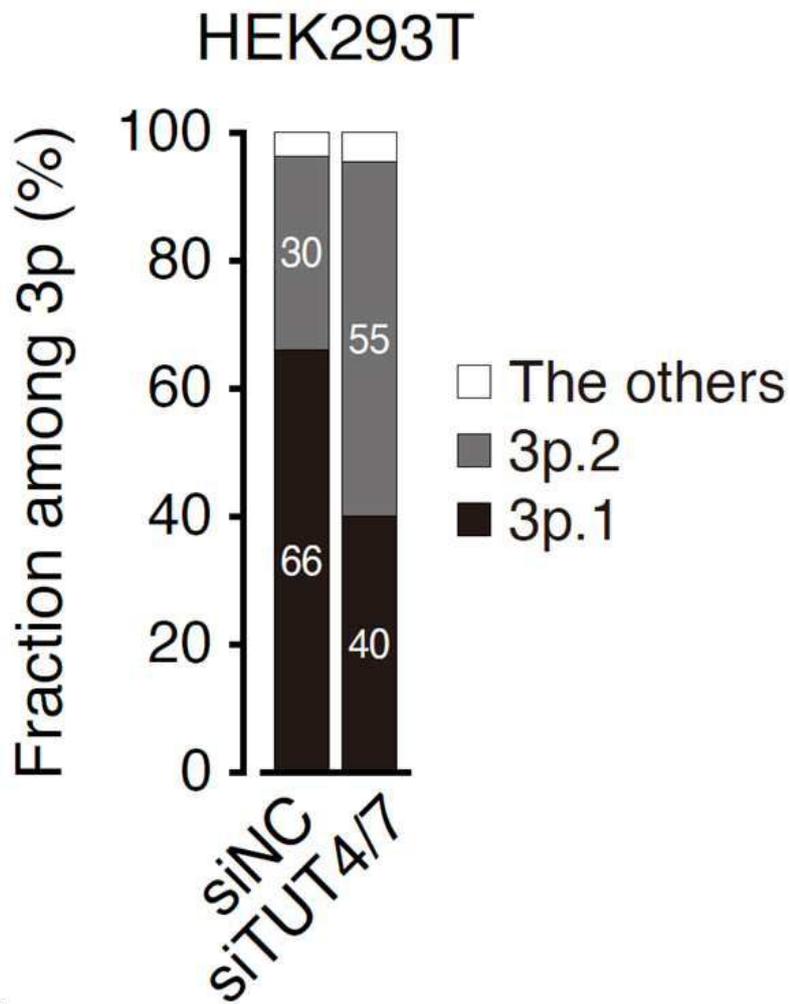
도면2e



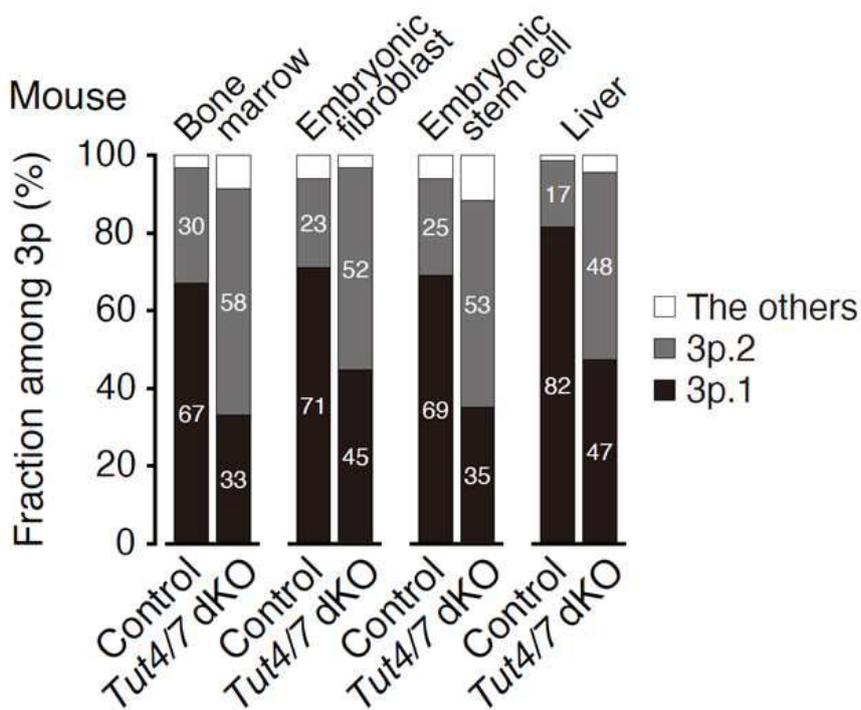
도면3a



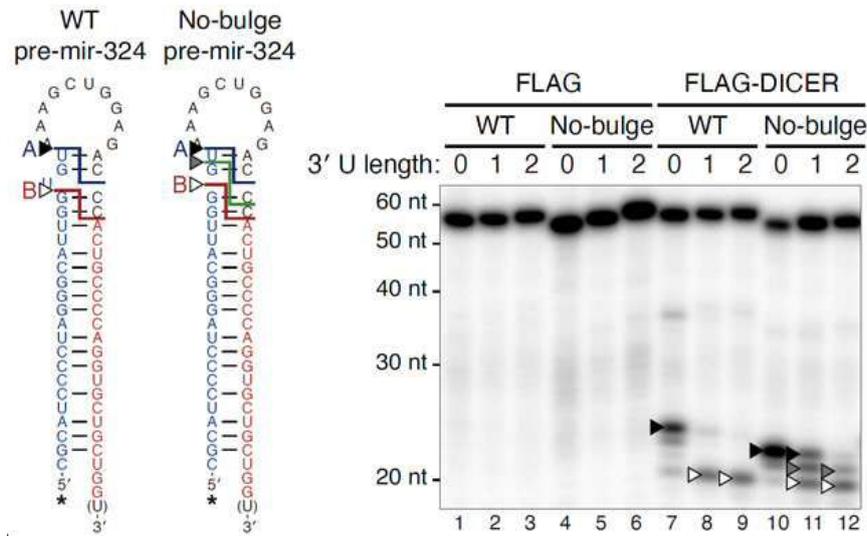
도면3b



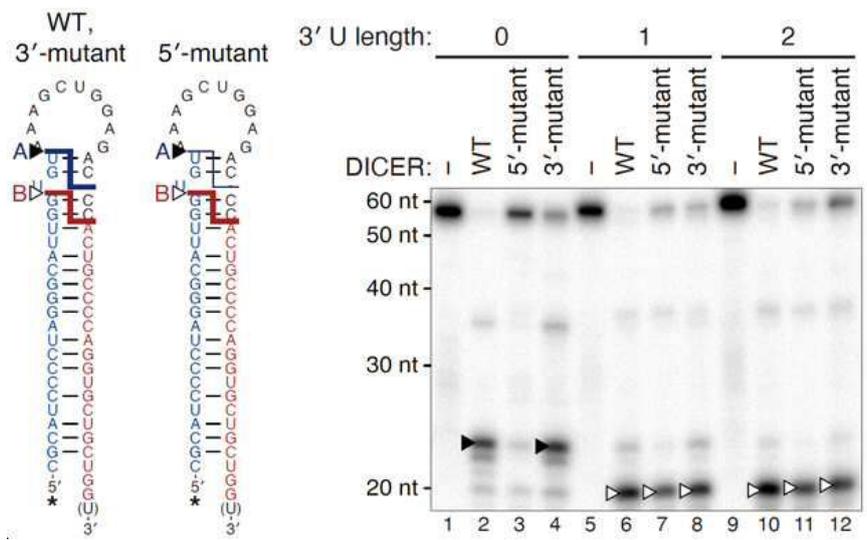
도면3c



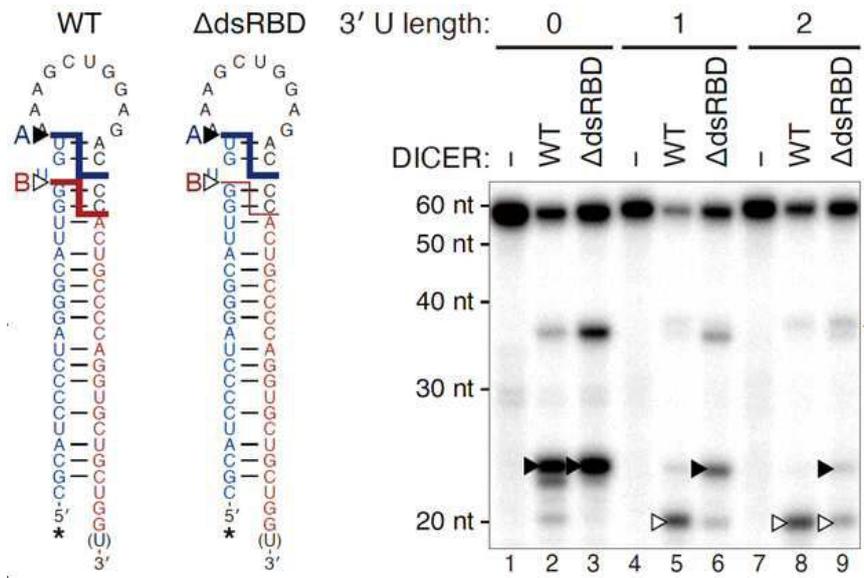
도면4a



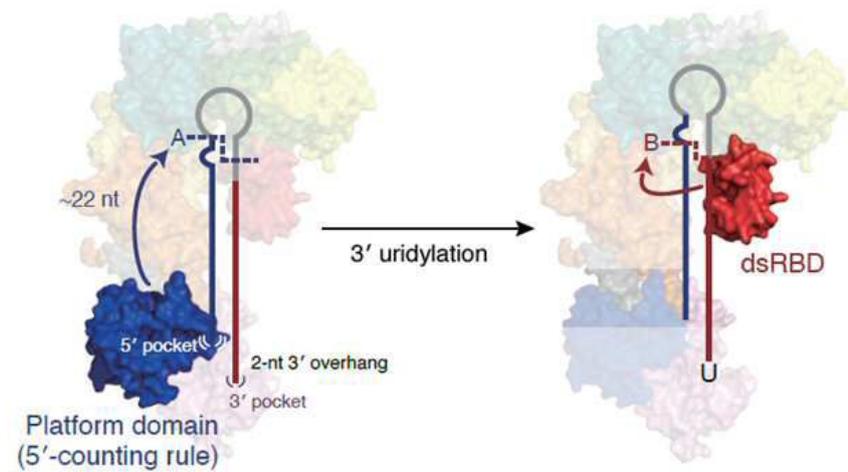
도면4b



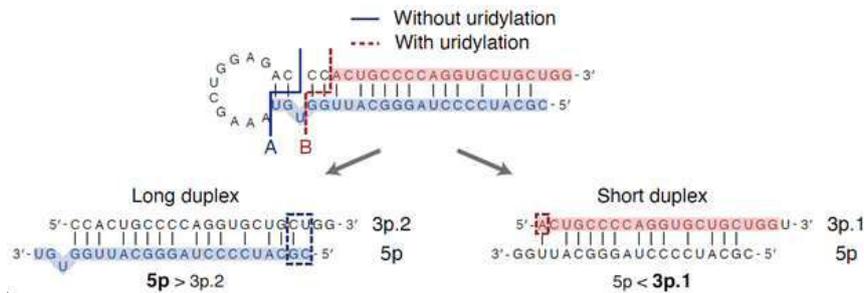
도면4c



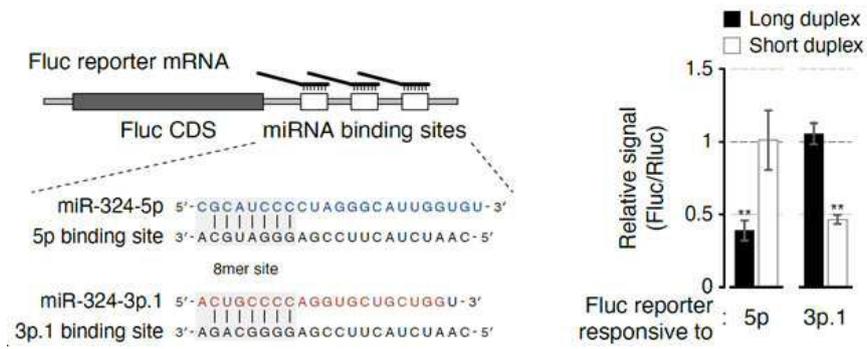
도면4d



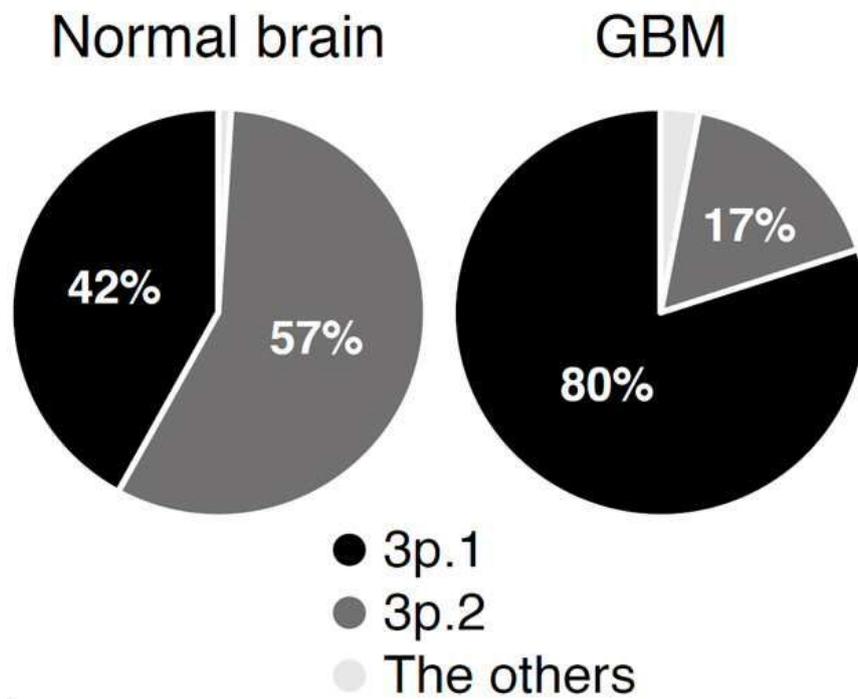
도면5a



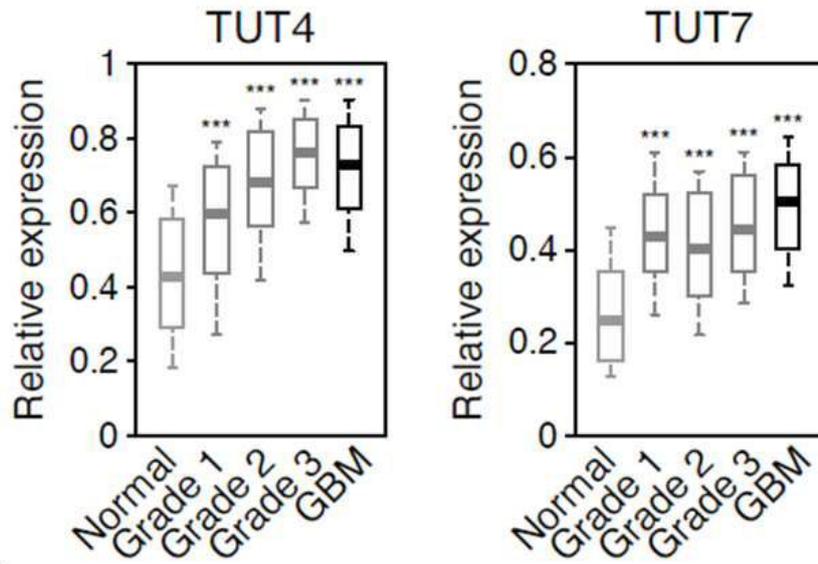
도면5b



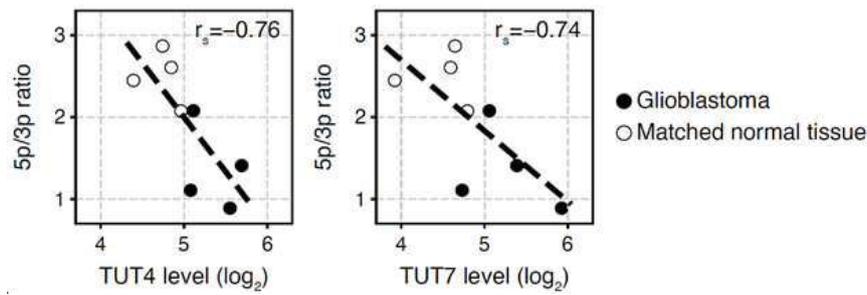
도면6a



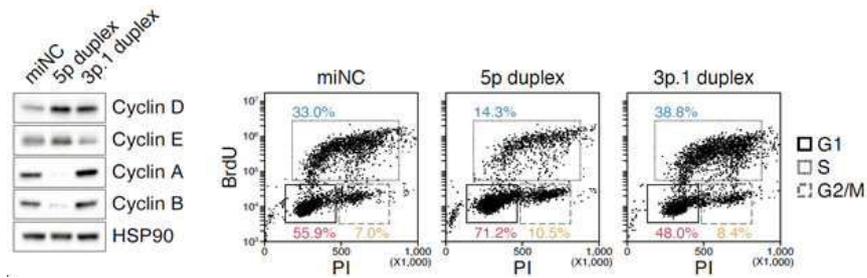
도면6b



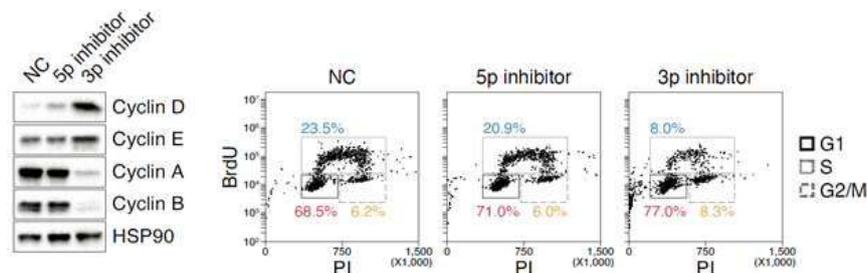
도면6c



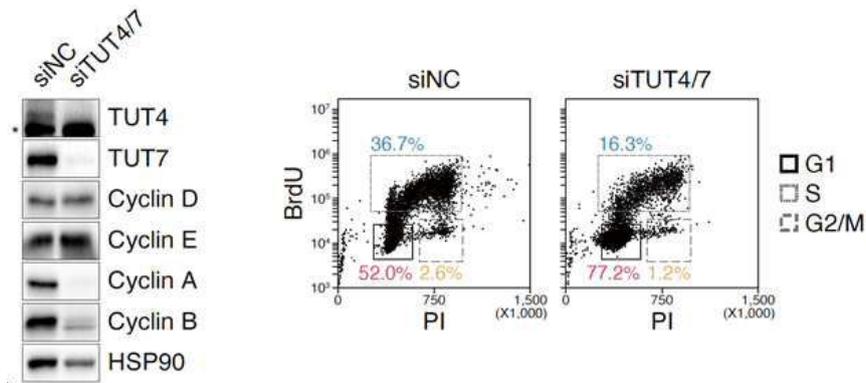
도면6d



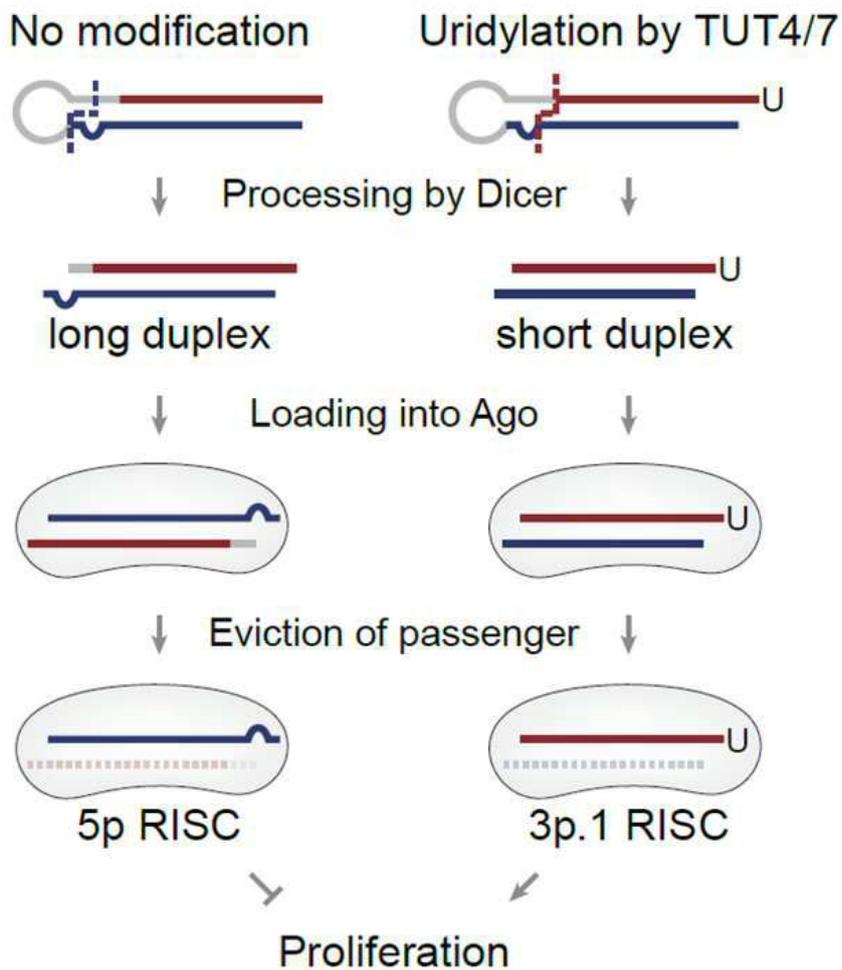
도면6e



도면6f



도면7



서열 목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE
- <120> Pharmaceutical Composition Comprising Modulator of TUT4/7
Expression

<130> PN190082P
 <150> KR 10-2019-0022551
 <151> 2019-02-26
 <160> 46
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-5p
 <400> 1
 cgcauccccu agggcauugg ugu 23
 <210> 2
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-3p.2
 <400> 2
 ccacugcccc aggugcugcu gg 22
 <210> 3
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-3p.1
 <400> 3
 acugccccag gugcugcugg 20
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-3p inhibitor
 <400> 4
 cagcagcacc tggggcag 18

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 5
 gguugcuuca gacuuuauat t 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 6
 ggaaugaaga agagaaagat t 21

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 7
 ggagaaacga cauaagaat t 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 8
 gguuagagcu gcuuaaaaut t 21

 <210> 9

<211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 9
 uauaaagucu gaagcaacct t 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 10
 uuuuucucu cuucauucct t 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 11
 uuucuuuagu cguuucucct t 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT4 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 12
 aauuuuagca gcucuaacct t 21

 <210> 13
 <211> 21

<212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 13
 gaaaagaggc acaagaaaat t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 14
 gcaaagagga caaagaaat t 21

 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 15
 gauaaguauu cgugucaat t 21
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 16
 gaacaugagu accuauuat t 21

 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA_RNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 17
 uuuucuugug ccucuuuuct t 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 18
 auuucuugu ccucuuugct t 21

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 19
 uuugacacga auacuuauct t 21
 <210> 20
 <211> 21
 <212> DNA_RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> siTUT7 duplex
 <220><223> 3-overhang with deoxyribonucleotides are TT
 <400> 20
 uuugacacga auacuuauct t 21

 <210> 21
 <211> 4938
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Terminal uridylyl transferases 4

<400> 21

auggaagagu cuaaaacuu aaaaagugaa aaucaugaac caaagaagaa uguuuuuugu	60
gaagaaagca aagcaguuca aguuauaggu aaucacaau ugaaagcuag aaaugauaaa	120
uccguaaaag aaauugagaa cagcucucca aauggaaua guaguaaaa aaauagcaa	180
aaugauuuu guauagaaaa aacagaagu aaaucaugua aaguaaaugc ugccaacuu	240
ccagguccua aagauuuggg guuaguccu cgagaucaaa gucauugcaa agcaaaaaa	300
uuuccuaau caccggugaa agccgaaaag gcaaccuuu cacaggcaa aucagaaaag	360
gcaaccaguu uacaggcaa agcagaaaa ucaccaaagu caccuaauuc agugaaagca	420
gaaaaagcau ccaguuauca gaugaaguca gaaaaaguac caaguucacc agcagaagca	480
gaaaagggac ccaguuuacu guugaagac augagacaga agacagaau acaacagauu	540
ggaaaaaaa uccaagcuc cuuuacuuc guggacaaag ugaauuuuga agcuguaggg	600
ggagaaaaa gucucugca aaacucacca cgaucucaga agcaacagac auguacagau	660
aaucuggug auucugauga uagugcuuca ggaauugaag acguaucgga cgauuuuagu	720
aaaugaaga augaugaauc uaauaaagaa aaucuucag agauggacua cuuagaaaau	780
gccacuguga uaugaauuc ugcauugaca ccugagcaga ggcugggguu gaaacaagca	840
gaagaacgcu uagaagaga ucacauuuu cgacuugaaa aacgaucacc agaauuacc	900
aaugucggu aucuugcaa acuuugcuu auucacauug aaaauacca gggggcucau	960
aaacauaua aggagaaacg acauaagaa aaauuuugg aaaaacaaga agaaugag	1020
cuucguuc ucaccucc uucccugcc cacuuggcug cuuuuagugu ugcagucuu	1080
gaaauagca aagaacugg aaauacagau gaugaccuca gaguccguca gaaauugug	1140
gaggaaaugu caaagguau aacgacuuu uuaccagaau guucacuuag guuguaggc	1200
ucaucucuga cuaguuugc ucugaaaagu agugauguu auauagauu aaaaauccu	1260
ccaagauga aucauccaga ucuucugua aaaguacuug ggauuuuaa gaaaaauga	1320
uuauauguag auguggaauc ugauuuucac gcuaaaguuc cuguuguggu gugcagagau	1380
cgaaaagug guuuacuug uagagugagu gcaggaaacg auauggcaug ucucacuacu	1440
gauuuacua cugcccuug caaaaagaa ccugucuuu uucccuuggu guuagccuu	1500
cgcuacuggg cuaaguug cuauauugac uccaaacug augguggaau ccuucuuac	1560
uguuuugcu uauuggugau guuuuuucua caacagagaa aaccccuu ucuccuugc	1620
uuacuuggaa guuggauuga aggcuugac caaaaagaa uggaugacu ucagcugaag	1680
ggcauaguag aagagaagu ugugaagug gaauguauu caaguaguc aacugagaa	1740

aacucaauug cugaggaaaa caaagcuaag gcagaccaac caaaagauga uaccaagaag	1800
acagaaacag acaaccaaaug uaaugccaug aaggaaaaac auggcaaauc uccuuuagca	1860
uuggaaacac caaaucgggu auccuuggga caguuauuggu uagagcugcu uaaaauucac	1920
acacuggauu uugcuuugga ggaauauguc auauguguac ggauacaaga uauuuuaaca	1980
agagaaaaua aaaacuggcc uaaaaggcga auagccauug aagaucgauu uucagucaag	2040
aggaauguug cacggagcuu aaacagccag cugguuuacg aauauguugu ggagagauuu	2100
agggcagcuu aucgguauuu ugccuguccu cagacgaagg guggaaaaua gucuacagug	2160
gauuucaaga aaagagagaa ggggaaaaua agcaauaaga aaccagucua gucgaacaau	2220
auggcaacca augguuguau ucugcuuggg gaaaccacag aaaaauuaa ugcagaaaga	2280
gagcaaccug uucaauguga ugaaauggac uguacaucac agagauguau uauugacaac	2340
aacaauuugu ugguaaauga acuagauuuu gcugaccacg gacaggacuc uucaucucu	2400
ucuaccagca aaagcaguga aaugagcca aaauuagaua agaaacaaga ugauuuagcg	2460
ccuucagaaa cuuguuuaaa aaaagagcuc agccaaugua auugcauuga uuugucuaag	2520
ucgccugacc cagauaaaa uacuggaaca gacugcaggu caaaauuaga aacagagagu	2580
ucacaucaga gugugugcac cgacacaucu gcuaccucu gcaacugcaa agcuacagaa	2640
gaugcuucug accuuuauga ugaugauaac cuccccacc aggaauuua uuauguguuu	2700
gauaaguuuu uuuuaaccuc uggcaagcca ccaacgauag uaugcagcau cugcaaaaag	2760
gauggccaau caaagauga uugcccagag gauuuuagga aaauugauuu aaaaccucua	2820
ccaccaauga caaacggaau ucgggaaaaa cuugauuuag uauguaaaag auguuuugau	2880
gaguuaucac caccuuguuc ugaacaacac aacagggagc aaauuuuaa uggcuuggaa	2940
aaguuuuuuc aaaaagaaua ugaugaaaag gcaagguugu gcuuuuuugg cucuucuaag	3000
aauggauuug gauuucguga uagugaucug gauuuuugua ugaccugga aggccaugaa	3060
aaugcagaga aaauuuuuug uaaggaaaua auugaaaau uggcaaaaau ucuuaagaga	3120
cauccagguu uaagaaacau uuugccuuaa acuacugcca aagugccuau aguaaaaauu	3180
gaacacaggc gaaguggguu agaaggcgau aucaguuuau auaauacguu ggcucaacau	3240
aacacaagaa ugcuagcuac uuaugcagcu auugauccua gagugcagua uuugggauu	3300
acuauagaaug uguuugcuua gcgaugugac auuggggaug cuuccagggg aaguuuaucu	3360
ucauauagcau auauccuuau ggugcuguac uuucugcagc agagaaagcc accuguuuac	3420
ccaguucuaa aagagaucuu ugauggaaaa cagauuccac agagaauggu ugauggaugg	3480
aaugcuuuu ucuuugauaa aacagaagaa cugaaaaagc guuuaccuuc acuuggaaag	3540
aacacagaau cauuaggga gcuuuggcug ggacugcuuc guuuuauac ugaagaguuu	3600

gauuucaagg aauauguauu uagcauucgg cagaaaaagc uguugacaac uuuugagaag	3660
caguggacuu ccaagugcau ugcaauugaa gaccuuuuug acuugaauca uaaccuuggu	3720
gcuggaguuu ccagaaaaau gaccauuuuc aucaugaaag cauuuaucaa uggaaggaaa	3780
cuuuuuggua cccuuuuuuu uccacucau ggacagagaag cugaguacuu cuuugauucc	3840
agaguauuaa cagauggaga acuggcuccc aaugauagau guugccgugu gugggaaaa	3900
auaggccacu acaugaaaga cugcccuaaa aggaaaagca guuuacuguu uagacuaaag	3960
aagaaagaca gugaagaaga gaaggaaggg aaugaagaag agaaagauuc ccgagauguu	4020
cuugaccccc gagaccucca cgauacucga gacuuuagag acccgagaga ccucagaugu	4080
uuuauaugug gagaucgugg acauguacga agggagugcc cagaggucua gcuggcccgu	4140
cagaggaaua gcaguguggc agcagcccag cugguccgca accuuguaaa ugcuaacag	4200
guggcugguu cagcucagca acagggugau caguccauaa ggacuagaca gucaucagaa	4260
uguucugaau caccaucuua uucuccucag ccucagccau uuccacagaa cucuuccag	4320
ucagcugcua uuacucagcc uucaucucag ccaggauccc aaccuaagcu ugcccaccu	4380
cagcagggag cccaaccucc ccaucagguc cagaugccac uguauaacuu uccccaguc	4440
ccaccagcuc aguauucucc caugcacaau augggauugu ugccaaugca cccucuccag	4500
aucccugccc cguccuggcc cauccauggc ccagugauc acucugcacc aggcagugcc	4560
cccagcaua uuggccuaaa ugaucccagc aucaucuug cacagccugc ugccagaccu	4620
guggcaaucc cuaacacguc ucacgaugga cacuggcccc guacuguggc uccaaauucc	4680
cugguaaaca guggugcagu ggggaaauca gagccaggcu uucgaggacu gacuccuca	4740
auuccuuggg acaugcacc gcgucccau ucccccuug ucccagcuuc guggccuuau	4800
gguuugcauc aaaacuauca gcaucagga aaugcccgau uccagccaa caaacuuuc	4860
uauacuaag acagauggc cacccugcg uguagagagc guuguccca cccaccaaga	4920
ggaacgugu cggaguaa	4938
<210> 22	
<211> 4488	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Terminal uridylyl transferases 7	
<400> 22	
augggagaua cagcaaaacc uuuuucgug aagcgcacua aagaccgggg gacuauggau	60
gaugaugacu ucagaagggg ucaccccaa caagauuuu uauuuuaga ugaccaugcu	120

aaaggccaug gcaguaaaa ggaaaagggc cuucaaaaa agaagauaac accagggaac	180
uaugggaaua cccccagaaa aggaccaugu gcuguuucca gcaauccaua ugcuuuuuuuu	240
aaaccaauuc acagucaacc cgcuuggaug aaugacagcc acaaagauca gaguaagaga	300
uggcugucug augaacauac ugguaauuca gacaacugga gagaauuca accuggaccu	360
agaauuccug uuuaaaaccg acaaagaaaa gacuccuuuc aagaaaauga agaugguuuu	420
agguggcaag acacaagagg cugcagaacu gaaagacgac uguuucuuuu agaccuaaca	480
agccuagaaa ccacgucaga aauggaagca ggaaguccug aaaacaagaa gcagaggucc	540
agaccuagga agccacggaa gacuagaaau gaggaaaaug agcaggaugg agacuuggaa	600
ggcccuguga ucgaugaguc uguacuuiuca acgaaggagc ugcuaaggcu acagcaggcu	660
gaggagagac ugaagagaga cugcauugac aggcuaaaaa ggcgaccacg aaacuacccu	720
acagcaaagu acaccugcag acucugugau guuuuuuuuu aauccauugc auuugcccau	780
aagcauauca aggaaaagag gcacaagaaa acauuuagg agaagcaaga ggaagaguug	840
cucacuacgu uacccccacc aacaccucc cagauuuuuu caguuggcau ugccauugac	900
aaagugguac aggaauuuug cuuacacaau gagaacuugg aacagaggcu ggaaauuuuu	960
cguaucaugg aaaauguuuu ccaacacaag uuaccagauu guucccuuag auuuuuuuuu	1020
ucauccugua gcagauuuuu uuucuuuuuu ucggauuuuu acauugacau ccaguuuuuu	1080
gccauuuuuu cucagccaga uguccuuuu cuuguuuaag aauguuuuuu gaacagugac	1140
uccuuuuuuu auguugaugc agacuuccau gcuagggugc cagugguggu gugcagagaa	1200
aagcaaagug gucuucugug uaaagugagc gcaggaaaug aaaaugcuug ucugacaaca	1260
aagcauuuuu cugcccuugg aaaacuagaa ccaaagcugg uuccuuuggu gauugcauuu	1320
agguacuggg caaagcuuuu caguauagau cgcccugaag aaggaggucu gccaccuuuu	1380
guguuuuuuu ugauggccau uuucuuuuuu cagcagagga aagaaccccu uuugccugua	1440
uaucuaggau cauggauuga aggauucua uuaagcaaac uagggaauuu caaccuucua	1500
gacauugaaa aagauguugu gaucugggaa cauacugaca gugcugcagg ggacacaggc	1560
auaacaaaag aagaggcacc aagagaaacg ccgaauuuuu ggggacaggu gucauuuuuu	1620
uuggauguga aacaccagcc uucaguacca guugggcagc ucugggugga auugcugcgg	1680
uucuaugcuu uagaauuuuu uuuggcugau uuagugauaa guuuucuguu caaagaaauu	1740
guaucucggg aaauugaagga uuggcccaaa aagcgcauug ccuuugaaga uccuacucu	1800
guuuuuuuuu auguggcaag aaccuuuuuu agucaaccug uguuuuuuuu uauacuucuu	1860

uguuuaagga caacauacaa guuuuuugcu cuuccacaca aaauuacaaa auccagccuu	1920
cuaaagccuc ugaaugcaau uacauguauu ucagaacauu cuaaagaagu aaauaaucou	1980
cauccagaug uacaaacaaa agaugauaag cucaaaaacu caguuuuggc ccaagguccu	2040
ggugcuacca guucagcugc aaauaccugu aagguacagc cacuuacucu uaaagagacu	2100
gcugaaaauu uuggaagccc accaaaagaa gaaauuggaa augaacacau caguguccac	2160
ccugaaaacu cagacuguau ccaagcagau guuaacucug augauuacaa gggugauaaa	2220
guauaccauc cagaaacagg aaggaaaaac gagaaagaga aaguuggaag gaagggcaag	2280
caucuguuga cuguugauc gaaacgugga gagcauguug ucuguggcag cacacguauu	2340
aaugagucag agagcacuuu ggauuuagaa ggcuuccaaa auccacagc uaaagagugu	2400
gagggacuug ccacuuuaga uaacaaggcu gaucuugaug gagaaguac agaagguacu	2460
gaggaacuag aagacucucu aaaccacuuu acccacucag uacagggcca gacaucagaa	2520
augaucccu cugaugaaga ggaggaggac gacgaagaag aggaggagga agaagaaccu	2580
aggcucacca uuaaccaaag ggaagaugaa gauggcaugg cuaaugaaga ugaguuagac	2640
aacaccuaca cugggucagg ggauaggac gccuauucug aagaggauga ugaguuaggc	2700
gaagcugcua aguauagaaga cgugaaagaa uguggaaaac auguagaaag agcucuccua	2760
guggaacuuu aaaaauaag ucucaaggaa gaaaauuuu gugaagaaaa aaauucaccu	2820
guggaucagu cugauuuuuu uuauagaauuc aguaaacuuu ucuucaccaa aggcaagucu	2880
ccuacgguag ugugcagcuu augcaaacga gagggucauc uaaagaagga cuguccugaa	2940
gacuucaaaa gaauccagcu agaaccucug ccaccauuua cacccaaguu uuuuuuuuuc	3000
uuagaucag ucuguaucca guguuuaaag gauuuuucuc caacaauuuu agaagaucag	3060
gcucgugaac auauucggca aaaccuagaa aguuucuuu gacaggacuu uccaggaacu	3120
aaauugagcc uguuuggcuc cuccaaaaau ggauuugggu ucaaacagag ugaccuugac	3180
gucuguaua cauuuaugg acuugaaacu gcugagggau uggacugugu cagaacuauu	3240
gaagaauuag caagaguccu cagaaaacau ucaggucuga gaaacauuuu accuauuaca	3300
acagcaaagg ugccaauugu gaaguucuuu cauuugagaa guggucugga aguagauauc	3360
aguuuguaua acacauuggc ccuucuuuac acaaggcuuu uaucugcuua uuccgccauu	3420
gaucccagag ugaaguauuu gugcuauacc augaauguau uuacaagauu gugugauuuu	3480
ggugaugcau cuagaggcag cuuaucaucg uaugcauua cucuuuuggu gcuuuuuuuu	3540
cuccagcaga ggaauccacc agucuuuccu guccuucaag agauuuacaa aggugaaaag	3600

aaaccugaaa uauuuguuga uggcuggaau auuuuuuuuu uugaucaaa uagaugaacug	3660
ccuaccuauu ggucagaaug uggaaaaau acagaaucug uugggcaguu augguugggc	3720
cuucuucguu ucuaacaga ggaauuugau uuuuaagaac auguuuuuag caucaggaga	3780
aaaagucugc uuacaacuuu uaagaaacag uggaccucaa aaucacuugu uauugaagau	3840
cccuuugauu ugaaucauaa ucuuggagcu ggauuaucua gaaaaaugac aaaaauuua	3900
augaaggcuu uuaucaaug uagaagagua uuugguauuc cugucaaggg auuuccaag	3960
gacuaccccu caaaaugga auacuuuuuu gauccagaug uguuaacuga aggagagcug	4020
gccccaaug auagauguug ucgaauuugu ggaaaaaucg gacacucau gaaggacugu	4080
ccuauagga gaaaaguaag acggcggcga gaucaggaag augccugaa ccaaagauac	4140
ccugagaaca aggaaaaag aagcaaagag gacaaagaa uucacaaca guacacagaa	4200
agggaggugu caacaaaaga agauaagccc auacagugca caccucagaa agccaagcca	4260
augcggcgag cugcugaccu ggggaggag aagaucuca ggccaccagu aaaaaaugg	4320
aagagacagg augacaaaga cuuaagagaa aaacguuguu uuuuuugg aagagaagg	4380
cacauaaaa aggaugccc acaguuuaa ggcucuucag guagccuuc caguauuuu	4440
augacucagg gaaaagccuc agcgaagagg acccagcagg aaucauga	4488
<210> 23	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3X miR-1-3p	
<400> 23	
agttgtttca atctacttc gaacattcca cgcgcaatct acttccgaac attccacgcg	60
caatctactt ccgaacattc caaacgagc	90
<210> 24	
<211> 90	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 3X miR-324-5p	
<400> 24	
agttgtttca atctacttc gaggatgca cgcgcaatct acttccgagg gatgcacgcg	60
caatctactt ccgagggatg caaacgagc	90
<210> 25	

<211> 90
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3X miR-324-3p.1
 <400> 25
 agttgtttca atctacttcc gaggggcaga cgcgcaatct acttccgagg ggcagacgcg 60
 caatctactt cggaggggca gaaaacgagc 90
 <210> 26
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miRNA_forward primer
 <400> 26
 ctcgctagcc tcgagagttg tttcaatcta cttcc 35

 <210> 27
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-3p_reverse primer
 <400> 27
 caggtcgact ctagagctcg ttttggaaatg ttcgg 35
 <210> 28
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-5p_reverse primer
 <400> 28
 caggtcgact ctagagctcg ttttgcattcc ctcgg 35
 <210> 29
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-3p.1_reverse primer

<400>	29	
	caggtcgact ctagagctcg ttttctgccc ctgg	35
<210>	30	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miNC Sense	
<400>	30	
	ccuacgccac caauucguu u	21
<210>	31	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	miNC Antisense	
<400>	31	
	acgaaaugg uggcguaggu u	21
<210>	32	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3p.1 duplex_5p	
<400>	32	
	cgcauccccu agggcauugg	20
<210>	33	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	3p.1 duplex_3p.1+U	
<400>	33	
	acugcccag gugcugcugg u	21
<210>	34	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> miR-324-5p probe
 <400> 34
 accaatgccc taggggatgc g 21

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-324-3p probe
 <400> 35
 cagcagcacc tggggcagt 19

<210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TUT4 forward primer
 <400> 36
 gcctaaaagg cggatagcca ttg 23

<210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TUT4 reverse primer
 <400> 37
 gctgctctga atctttccac aac 23

<210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TUT7 forward primer
 <400> 38
 cagctcagca aaagaggagg ca 22

<210> 39
 <211> 23

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TUT7 reverse primer
 <400> 39
 catagaaccg cagcaattcc acc 23
 <210> 40

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH forward primer
 <400> 40
 accacagtcc atgcatcac 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH reverse primer
 <400> 41
 tccaccaccc tgttgctgta 20
 <210> 42
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pre-mir-324 5' half
 <400> 42

 cgcauccccu agggcauugg uguaaagcug 30
 <210> 43
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> No-bulge pre-mir-324 5' half
 <400> 43
 cgcauccccu agggcauugg guaaagcug 29

<210> 44
 <211> 27
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pre-mir-324 3' half
 <400> 44
 gagaccacu gcccaggug cugcugg 27
 <210> 45
 <211>
 28
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pre-mir-324 3' half + U
 <400> 45
 gagaccacu gcccaggug cugcuggu 28
 <210> 46
 <211> 29
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pre-mir-324 3' half + UU
 <400> 46
 gagaccacu gcccaggug cugcugguu 29