



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0027659
(43) 공개일자 2007년03월09일

(21) 출원번호 10-2007-0004418(분할)
(22) 출원일자 2007년01월15일
 심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허10-2005-0009487
 원출원일자 : 2005년02월02일 심사청구일자 2005년03월21일

(30) 우선권주장 1020040011326 2004년02월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인 삼성전자주식회사
 경기도 수원시 영통구 매탄동 416

(72) 발명자 이연수
 경기 고양시 일산서구 대화동 성저마을 건영빌라 1006-403
 박중훈
 서울 용산구 청파동2가 53-12
 박경희
 서울특별시 강남구 대치동 927-28
 안태진
 서울 강남구 대치3동 대치현대아파트 101-602

(74) 대리인 리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 유방암 특이적 단백질, 그를 코딩하는 유전자, 및 상기단백질 또는 유전자를 이용한 유방암의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖고, 세포자가사 (apoptosis)를 유도하는 활성을 갖는 분리된 단백질, 및 그를 코딩하는 유전자를 제공한다. 또한, 상기 유전자 또는 그 단편이 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 유방암을 진단하는 방법 또는 세포 내에서 상기 유전자의 발현 유무를 결정하여 유방암을 진단하는 방법을 제공한다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로부터 유래한 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 유방암 진단 또는 치료용 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드.

청구항 2.

제1항에 있어서, 길이가 10 내지 100 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 세포자가사를 유도하는 활성을 가진 BCRP 단백질, 그를 코딩하는 유전자, 및 BCRP 유전자의 단편이 고정화된 마이크로어레이에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 BCRP 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 유방암을 진단하는 방법 및 BCRP 유전자가 발현되는지를 결정하여 유방암을 진단하는 방법에 관한 것이다.

유방암은 세계에서 가장 흔하게 진단되는 여성 암이다. 유방암은 암 관련 사망자수의 수에 있어서, 꽤 다음으로 많다. 유방암의 발생율은 지난 50년간 꾸준히 증가하여 왔으며, 특히 한국에서는 급속한 증가 추세를 보이고 있다. 다수의 확립된 인자가 여성의 유방암 위험을 증가시킬 수 있는데, 이들 인자에는 노화, 과거 유방암 병력, 상당한 방사선 노출, 강한 유방암 가족력, 사회경제적 상류 클래스, 미산, 초경, 폐경 또는 30 세 보다 많은 연령에서의 초기 임신이 포함된다.

유방암은 불균질 질환으로서, 여성 호르몬에 의하여 여러 유방 종양이 유도되는 것으로 알려져 있으나, 그 외에도 다른 인자 및 미공지된 인자가 다수 존재한다. 확인된 온코진 (oncogene)에서의 변화에는, HER-2 및 상피성장인자 수용체 유전자의 증폭 및 시클린 D1의 과발현이 포함된다. 이들 온코진의 과발현은 상당히 약한 예후와 관련되어 있다. 유사하게, p53 유전자와 같은 종양 억제 유전자의 유전적인 변화 또는 상실은 유방암에서 잘 입증되어 있고, 보다 약한 예후와도 관련되어 있다. 연구자들은 폐경전 가족성 유방암의 예측자인 BRCA1 및 BRCA2라 불리는 두 개의 유전자를 찾았다. 현재, 화학예방 시험에 대한 후보자의 동정을 강화시킬 수 있는 유전적 위험 평가가 가능하다. 유방암의 조기 진단은 가장 좋은 치료 결과를 보증하는데 필수적인데, 진보된 헬스케어 시스템을 갖는 많은 나라들이 유방암의 스크리닝 프로그램을 시행하고 있다. 치료 선택 및 예후와 관련된 정보들, 예를 들어 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체의 상태 측정도 포함되어 있다.

유방암 치료에서의 주요 과제는 조기 검출물을 개선시키는 것, 질환 진행을 추적하고 재발을 확인하는데 사용할 수 있는 새로운 비-침해성 마커를 찾는 것, 그리고 특히 5년 생존율이 여전히 매우 낮은, 보다 진행된 질환에 대한 보다 덜 독한 개선된 치료법을 찾는 것이다. 면역 요법 및 표적화된 독소 등과 같은 유망한 새로운 방법으로 종양 세포를 공격할 수 있도록 암세포에 보다 특이적인 표적, 이상적으로는 종양 세포의 표면에서 발현되는 것을 찾는 것이 필요하다.

이에 본 발명자들은 유방암 특이적인 SNP를 연구하던 중 유방암 특이적으로 발현되는 단백질을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 목적은 유방암 세포에서 특이적으로 발현되는 분리된 단백질을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 상기 단백질을 코딩하는 핵산 서열 또는 그의 단편이 고정화되어 있는 마이크로어레이를 제공하는 것이다.

또한, 본 발명은 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 유방암을 진단하는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 유전자가 유방조직에서 발현되는지를 결정하여 유방암을 진단하는 방법을 제공한다.

발명의 구성

본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖고, 유방암 특이적으로 발현되는 세포자가사 (apoptosis)를 유도하는 활성을 갖는 분리된 단백질을 제공한다. 본 발명의 단백질 (이하, BCRP (breast cancer related protein) 단백질이라고도 한다.)은 막단백질로서, 정상 조직에서는 심장 조직에서 특이적으로 발현되는 특성을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 단백질은 여러가지 암 조직 중에서 유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 특성이 있다. 따라서, 본 발명의 단백질의 발현 유무를 이용하여 유방암의 존재여부를 검출할 수 있다.

본 발명에 있어서, 상기 단백질은 세포내에서, 바람직하게는 과발현되는 경우, p53 및 p21로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현을 증가시킬 수 있다.

본 발명은 또한, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항-BCRP 항체를 인간 유방조직으로부터 유래된 폴리펩티드 시료와 반응시키는 단계를 포함하는, 유방암의 존재 유무를 검출하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 단백질의 발현 양이 정상 조직에서의 발현양 보다 많은 경우, 바람직하게는, 3%, 5%, 10% 또는 15% 이상 많은 경우 유방암이 존재하는 것으로 판별한다. 특정한 단백질 항원에 대한 항체를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 발명에서도 그러한 종래의 항체 제조방법에 의하여 항-BCRP 항체를 생산할 수 있다.

본 발명은 또한, 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖고, 세포자가사 (apoptosis)를 유도하는 활성을 갖는 분리된 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드이다. 이러한 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 단백질을 발현시키는데 사용될 뿐만 아니라, 상기 단백질의 발현 유무를 조사하여 유방암의 존재 유무를 판별하기 위한 목적으로도 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명은 또한, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로부터 유래한 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 유방암 진단 또는 치료용 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 길이가 10 내지 100 뉴클레오티드, 더 바람직하게는, 10 내지 50 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드이다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 프라이머 또는 프로브인 폴리뉴클레오티드로서 사용될 수 있다.

본 발명은 또한, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로부터 유래한 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 유방암 진단 또는 치료용 폴리뉴클레오티드 또는 그의 상보적 폴리뉴클레오티드가 고정화되어 있는 기판을 갖는 것을 특징으로 하는 유방암 진단용 마이크로어레이를 제공한다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드는 길이가 10 내지 100 뉴클레오티드, 더 바람직하게는, 10 내지 50 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하나, 여기에 한정되는 것은 아니다.

본 발명은 또한, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로부터 유래한 10개 이상의 연속적 뉴클레오티드를 포함하는, 유방암 진단 또는 치료용 키트를 제공한다.

더욱이, 본 발명은 검체로부터 유방 조직 유래의 핵산 시료를 얻는 단계; 및

상기 유방 조직 시료에서 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 발현의 정도를 결정하고, 그로부터 유방암의 존재 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 유방암의 진단 방법을 제공한다.

본 발명의 상기 방법에 있어서, 상기 단백질의 발현의 양은 당업계에서 알려진 다양한 방법을 이용하여 측정할 수 있다. 본 발명의 방법에 있어서, BCRP 유전자의 발현의 유무는 mRNA 수준에서 BCRP 유전자 특이적인 프로브를 이용하여 노던 블롯팅을 함으로써 결정할 수 있다. 또한, BCRP 유전자의 발현의 유무는 전 RNA를 추출한 다음, BCRP 유전자 특이적인

프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하고, 얻어지는 산물을 확인함으로써 결정할 수도 있다. 그러나, 발현의 유무를 결정하는 방법이 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 유방 조직 유래의 핵산 시료는, 반드시 순수하게 정제된 핵산 시료만을 의미하는 것은 아니고, 분석 방법에 따라 분석에 사용될 수 있는 핵산이 존재하기만 하면 되는 경우도 있다. 예를 들면, PCR을 이용하여 BCRP 유전자의 발현 유무를 확인하고자하는 경우, 핵산을 분리하지 않고 세포를 파쇄한 시료를 그대로 사용할 수도 있다.

본 발명의 상기 방법에 있어서, 상기 단백질의 발현의 양이, 정상적인 유방 조직 세포에서 발현되는 양보다 높은 경우에는 유방암으로 판별할 수 있다.

본 발명자들은 상업적으로 이용가능한 핵산 또는 단백질 데이터베이스로부터 선택된 여러 핵산 서열에 대하여 유방암 세포에서 특이적으로 발현되는 핵산 또는 단백질을 탐색하였다. 그 결과, 유방암 세포에서 특이적으로 발현되는 것으로 확인된 하나의 핵산 또는 그로부터 추정되는 단백질, BCRP 핵산 또는 단백질을 선택하였다. 다음으로, cDNA 라이브러리로부터 상기 BCRP 전장 유전자를 탐색하여 서열분석하였으며, 노던 분석을 통하여 이 유전자가 유방암 세포주 및 환자의 유방암 세포 (도 12 및 13)에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다. 반복 측정을 통하여 유방암 세포에서는 정상 세포에서 보다 약 2배 높게 발현되는 것을 확인하였다 (도 13). 또한, 상기 BCRP 유전자에 의하여 코딩되는 단백질의 세포 내에서 발현되는 위치를 면역세포화학법 (immunocytochemistry method)를 이용하여 확인하였다. 하나의 방법으로서, 상기 단백질의 유전자를 pFLAG 벡터에 재조합하고, 그로부터 얻어지는 재조합 벡터를 동물 세포주에 트랜스펙션한 다음, 그 발현을 pFLAG 형광 시스템을 이용하여 확인하였다 (도 3, 4, 및 5). 또한, BCRP 단백질의 기능을 확인하기 위하여 이를 세포내에서 과발현시키고, 상기 BCRP 단백질이 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 상기 BCRP 단백질을 코딩하는 유전자를 동물 세포주에 트랜스펙션시키고, 그로부터 전 RNA를 추출하고 이를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행하였다. 상기 RT-PCR에 의하여 상기 BCRP 유전자, 및 다른 p53 및 p21과 같은 세포자가사에 관련된 유전자의 발현정도를 모니터링하였다 (도 6). 본 발명자들은 또한, 상기 BCRP 유전자의 프로모터의 구조를 확인하였다.

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1 : SNP 데이터에 근거한 BCRP 유전자의 탐색

1. BCRP 유전자의 탐색

별도의 연구를 통해서 유방암과 연관성이 있다고 밝혀진 SNP에 대해, 데이터베이스 (NCBI) 서치 및 분석을 통하여, SNP가 존재하는 부위의 염기 서열을 찾아내고, 이를 통하여 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 만들 수 있는 정보를 입수하였다.

2. BCRP 유전자 단편의 증폭

입수된 염기 서열 정보를 이용하여 상기 탐색된 SNP 주위의 DNA를 증폭하기 위한 프라이머를 디자인하였다 (서열번호 1 및 2).

다음으로, 계놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 프라이머로 하여 PCR을 수행하여, 239 bp의 BCRP 유전자 단편을 증폭하였다. 이때 사용된 PCR 조건은 포워드 및 리버스 프라이머를 각각 10 pmol 씩 사용하고, 계놈 DNA 주형을 200-1 µg을 사용하였으며, 95 °C에서 40 초, 57 °C에서 40 초, 72 °C에서 1 분 동안의 반응을 각각 35회 반복하였다. 그 결과를 1% 아가로스 겔 전기영동을 통하여 확인하였으며, 239 bp의 예상 DNA 단편이 증폭되었음을 확인하였다. 이를 전장 BCRP 유전자 탐색을 위한 프로브로 사용하였다.

3. cDNA 라이브러리를 통한 BCRP 전장 유전자의 탐색

사용된 cDNA 라이브러리는 인간 태아 뇌 cDNA 라이브러리 (λtriplrEx 라이브러리) (Clontech Corp. 사)이었으며, 탐색 과정은 제조사의 실험 지침 (PT3003-1)에 따랐다. 탐색 과정을 간단히 설명하면 다음과 같다.

mRNA를 얻기 위하여 PCR을 함과 동시에, 앞서 얻은 PCR 산물을 프로브로 하여 cDNA 라이브러리 탐색을 실시하였다. 탐색에 사용된 세포는 일반적으로 많이 사용되는 *E.coli* XL-1 blue 세포를 사용하였다.

먼저, 라이브러리의 역가를 확인한 결과, 2 세트 모두 2.0×10^9 pfu/ml이었다. 다음으로, 상기 cDNA 라이브러리를 *E. coli* XL-1 blue의 플레이트에 도말하였다. 일반적으로, $2 \sim 5 \times 10^4$ pfu/150 mm로 도말하였다. 다음으로, 람다 파아지를 (+) 전하를 띠는 나일론 막에 전이하였다. 방사능 동위원소로 표지된 dCTP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000 Ci/mmol)를 이용하여 무작위 개시 (random primed) DNA 표지법에 의하여 표지된 프로브를 사용하여, 필터 혼성화 (filter hybridization) 반응을 수행하고, 검출하였다. 그 결과 양성 클론을 얻었다.

4. BCRP 전장 유전자의 염기서열분석 및 단백질 서열 예측

얻어진 클론으로부터 얻은 BCRP 유전자 서열을 서열자동 분석기 (ABI 3700)를 이용하여 염기서열을 분석을 하여, BCRP 전장 유전자의 염기서열을 확인하였다. 또한, NCBI와 프로그램 (new GENSCANW web program)을 이용하여 유전자의 추정 단백질 서열을 확인하였다. BCRP 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3과 같으며, 그에 의하여 코딩되는 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 4와 같다. 분석결과, BCRP의 탐색에 사용된 SNP는 프로모터 영역에 위치하며, BCRP 게놈 유전자는 16032 내지 96554에 걸쳐 있으며, 3개의 인트론과 4개의 엑손으로 구성되어 있는 것을 알 수 있다.

실시에 2 : BCRP 유전자의 세포 및 조직 내 발현의 확인

1. 노던 블롯팅을 통한 BCRP 유전자의 세포 내 발현의 확인

실시에 1에서 얻은 PCR 산물을 프로브로 하여, 복수 개의 인간 정상 조직과 종양 조직들 (Clontech corp. 사)에 대하여 노던 블롯팅 분석을 하였다. 그 결과를 도 1과 2에 나타내었다. 도 1과 2에 나타낸 바와 같이, 정상 조직에서는 심장 조직에서만 BCRP 유전자가 특이적으로 발현되는 것으로 확인되었으며, 종양 조직에서는 유방암 조직에서 특이적으로 발현되는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 본 발명의 BCRP 유전자의 발현 여부를 조사함으로써, 유방암이 존재하는지 여부를 검출하는데 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다. 도 1에서, 노던 블롯팅에 사용된 조직은 뇌심 (brain heart), 심장, 골격근, 결장 (colon), 흉선, 지라, 신장, 간, 소장, 태반, 폐, 및 말단 혈액 백혈구 세포이었으며, 도 2에서, 노던 블롯팅에 사용된 암조직은, 유방암, 난소암, 자궁암, 폐암, 신장암, 위암, 결장암 및 직장암 조직 (clontech 사에 제작된 multiple tissue northern blot 를 사용)이었다. 도 1과 2의 윗 부분에 있는 1.00 kb와 1.2 kb라는 수치는 크기 마커를 나타내며, 블로팅 결과는 1.37 kb에서 나타났다.

상기 노던 블롯팅의 구체적인 과정은 다음과 같이 수행하였다.

(1) 방사능 표지된 프로브의 제작

무작위 개시 (random primed) DNA 표지법 (Roche Corp. Random primed DNA labelling kit, #1004760)을 사용하여 프로브를 제작하였다. BCRP PCR 산물을 정제하여 약 25 ng을 사용하였으며, 동위원소 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP, 250 μCi (BMS Corp. 사)를 이용하였다.

(2) 혼성화 병 (bottle)을 이용한 전혼성화 (prehybridization)

7 ml의 ExpressHyb 용액 (#8015-1, BD Clontech Corp. 사)을 68 °C에서 미리 데워 나일론 막을 68 °C에서 30 분 동안 전혼성화하였다.

(3) 방사성 표지된 프로브의 변성

방사성 표지된 프로브를 95 °C-100 °C에서, 8-10 분 동안 끓인 후 재빨리 얼음에 두었다.

(4) 혼성화

10ml의 신선한 ExpressHyb 용액에 상기 방사성 프로브를 혼합하였다. 그리고 나일론막이 들어 있는 혼성화병에 전혼성화 용액을 버리고 상기 방사성 프로브가 혼합된 신선한 ExpressHyb 용액에 넣어준 후, 약 1 시간 동안 68 °C에서 흔들어 주면서 배양하였다.

(5) 세척

세척 용액 1을 이용하여 실온에서 30~40 분 동안 세척하였다. 다음으로, 세척 용액 2로 50 °C에서 40 분 동안 다시 세척하였다. 다음으로, 나일론 막을 병에서 꺼내어 물기를 마르지 않을 정도로 제거한 뒤, 플라스틱 랩에 넣었다.

(6) X-레이 필름에 넣고, -70°C에서 노출시킨 다음, 1-2일 후에 꺼내어 밴드를 확인하였다.

2. BCRP 유전자의 조직 내 발현의 확인

유방암 환자의 상흔부분 (lesional part)와 비상흔 부분 (nonlesional part)에서의 BCRP 유전자의 발현을 확인하였다.

도 11 및 12는 서로 다른 유방암 환자의 유방암 조직으로부터 유래된 세포로부터 RNA를 분리하고, 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 RT-PCR한 결과를 나타내는 도면이다. 도 11 및 12에 나타낸 바와 같이, 정상조직에 비하여 BCRP 유전자의 발현이 증가하였고, 비교 유전자로서 선정된, 암과 관련이 있는 것이 이미 밝혀진 p53의 발현이 현저하게 증가하였다.

도 13은 유방 정상조직 및 종양 조직들의 RNA에 대하여 노던블롯팅 분석한 결과를 나타내는 도면이다. 도 13에 나타낸 바와 같이, BCRP 유전자 (약 1.8kb)의 발현이 증가되어 있음을 알 수 있다. 도 13에서 레인 1 내지 3은 다른 종양 공여자에 대한 결과이고, 레인 4는 대조군으로서 정상 유방조직에 대한 결과이다. 레인 1 내지 3의 발현량의 평균값을 계산하고, 정상조직에서의 발현량과 비교한 결과, 유방암 세포에서는 정상 세포에 비하여 BCRP 유전자가 약 2.05배 높게 발현되었다.

실시예 3 : BCRP 단백질의 세포내 발현 위치의 확인

본 실시예에서는 면역세포화학법 (immunocytochemistry method)를 통하여 BCRP 유전자가 세포 내에서 발현되는 위치를 확인하였다. 이를 위하여 먼저, BCRP 유전자를 pFLAG 벡터 (Sigma, Amherst, NY)에 클로닝하였다. 클로닝 과정은 다음과 같다. 서열번호 3의 BCRP 유전자를 Not I 효소와 Sal I 효소로 소화하고, pFLAG 벡터 또한 BCRP 유전자와 동일한 효소로 소화하여 라이게이션하였다. 클로닝된 BCRP-pFLAG 벡터 DNA를 여러 세포주에 Lipofection 2000을 이용하여 트랜스펙션하였다. BCRP 유전자가 발현될 수 있도록 트랜스펙션된 세포를 5% CO₂, 37 °C에서 48 시간 동안 배양한 다음, 3.5% 파라포름알데히드를 사용하여 플레이트 상에 고정하였다. 다음으로, 세포 내부의 부분이 염색될 수 있도록 하기 위하여, 0.1% Triton X-100으로 세포를 투과성으로 만들었다. 1% BSA 차단 용액을 이용하여 여백을 차단하였다. Flag 특이적 항체를 상기 세포가 고정되어 있는 플레이트에 반응시켜, Flag 특이적 항체 (항-FLAG M2)가 BCRP 단백질-Flag에 특이적으로 결합하도록 하였다. 마지막으로, FITC 접합된 2차 항체 (항-생쥐 IgG-FITC)를 상기 BCRP 단백질-Flag-1차 항체 복합체에 반응시켰다. 결과는 형광현미경을 이용하여 FITC로부터 발생하는 형광을 통하여 BCRP 단백질이 발현되는 위치를 확인하였다. 비교를 위하여 아무것도 트랜스펙션시키지 않은 세포주에 Flag 특이적 항체를 이용하여 상기 방법으로 같이 실험하였다.

그 결과를 도 3 내지 5에 나타내었다. 도 3 내지 5는 각각 BCRP-pFLAG 벡터 DNA로 트랜스펙션된 결장암 세포주 Clone A (CA), 일차 배양된 정상 신장 세포, 및 HEK 293 세포주에 대하여 FITC 형광을 관찰한 결과를 나타내는 것이다. 도 3 내지 5에 나타낸 바와 같이, 3개의 세포주에서 BCRP는 모두 세포막에서 관찰되었다.

이러한 실험 결과로부터, 본 발명의 BCRP 단백질은 세포막에서 특이적으로 발현되는 것으로 여겨진다.

실시예 4 : BCRP 유전자의 발현이 세포주 내의 유전자 발현에 미치는 영향

본 실시예에서는 BCRP 유전자 발현이 세포주의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 먼저, 노던 블롯팅 분석을 통하여 BCRP 유전자의 mRNA의 존재 여부를 확인하였다. 다음으로, 실제 세포주에서 BCRP 유전자의 발현이 세포내의 기존에 알려진 암 및 세포자가사와 관련된 유전자들의 발현에 미치는 영향을 알아 보았다. 먼저, CA (Colon A 결장암) 세포주에 상기에서 제작된 BCRP-pFLAG 벡터 DNA를 Lipofection 2000을 이용하여 트랜스펙션하, 5% CO₂, 37°C에서 48시간 동안 배양한 다음, 전 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실시하였다. β-액틴을 대조군으로 사용하였다. 프라이머로써, BCRP 유전자, β-액틴, p53, p21, CytC, 카스파제 5, 카스파제 3 및 Apaf 1 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 각각 사용하였다 (표 1). RT-PCR 결과 얻어지는 PCR 산물의 양을 모니터링함으로써, 각 유전자의 발현 정도를 확인할 수 있었다.

표 1. 각 유전자의 증폭에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열
BCRP	F : 서열번호 5
	R : 서열번호 6
β-액틴	F : 서열번호 7
	R : 서열번호 8
p53	F : 서열번호 9
	R : 서열번호 10
p21	F : 서열번호 11
	R : 서열번호 12
CytC	F : 서열번호 13
	R : 서열번호 14
카스파제 5	F : 서열번호 15
	R : 서열번호 16
카스파제 3	F : 서열번호 17
	R : 서열번호 18
Apaf 1	F : 서열번호 19
	R : 서열번호 20

RT-PCR은 과정은 다음과 같다. BCRP 유전자가 과발현된 세포주로부터 추출한 전 RNA를 Superscript II 역전사 효소 (reverse transcriptase) (Invitrogen 사)을 이용하여 역전사시켜 cDNA를 수득한다. 수득한 cDNA 1- 200 μg을 주형으로 Taq 폴리머라제를 이용하여, 각각 10 pmol의 포워드 및 리버스 프라이머 (표1 참조)로 PCR을 수행하였다. 주형으로 사용된 게놈 DNA는 BCRP-pFLAG 벡터 DNA로 트랜스펙션된 CA 세포주와 대조군 세포주로부터 추출된 전 RNA로부터 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용된 PCR 조건은 95 °C에서 40 초, 증폭 대상 유전자에 따라 각각 다른 어닐링 온도에서 40 초, 72 °C에서 1 분 동안의 반응을 각각 30회 반복하였다. 상기 어닐링 온도는, 베타-액틴, 카스파제 5 및 BCRP의 경우 58 °C, p53, p21, Cyt C, 카스파제 3 및 Apaf1의 경우 52 °C에서 어닐링하였다. 그 결과를 1% 아가로스 겔 전기영동을 통하여 확인하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이, p53의 발현이 증가하였고, p53-의존성 성장 중지 (arrest)의 잠정적인 매개자인 것으로 알려진 p21의 발현이 증가하였다. 그러나, 그 외의 다른 유전자들에 대하여는 발현의 차이를 발견할 수 없었다.

실시예 5 : BCRP 유전자의 과발현이 세포주의 증식과 세포자가사에 미치는 영향

1. MTT 분석

MTT 분석을 통하여 세포내에서의 BCRP 유전자의 과발현이 세포주의 증식과 세포자가사에 미치는 영향을 확인하였다. MTT 분석은 살아있는 세포내 미토콘드리아 탈수소효소가 MTT를 환원시킨 결과 생성되는 포르마잔 (formazan)의 흡광도를 측정하는 방법으로, 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 분석에 사용된 세포주는 Clone A와 CX-1 (결장암 세포주), 및 정상 신장 세포주인 HEK 293을 사용하였다. 실시예 4와 같이 pFLAG-BCRP 벡터 DNA를 Lipofection 2000을 이용하여 트랜스펙션하였고, 대조군으로는 pFLAG 만을 트랜스펙션한 벡터 대조군, 아무 것도 트랜스펙션하지 않았으나 같은 스트레스 (stress)를 받은 닛팅 대조군 (nothing control), 그리고 세포가 없는 블랑크 대조군을 사용하였다.

실험 결과는 두 번의 반복 실험에서 얻은 것이다. CA와 CX-1 세포주에서 대조군에 비하여 세포 증식이 적게 일어났다. 즉, 세포 성장이 대조군에 비하여 억제되었다. 또한, HEK 293 세포주의 경우에도, 결장암 세포주 (CA 및 CX-1)에서와 같이, 두 개의 다른 대조군에 비하여 상대적으로 적은 세포증식이 일어났다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7은 HEK 293, CA, 및 CX-1 (각각, A, B, 및 C) 세포주에서 BCRP의 과발현이 세포주의 증식에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

2. 세포자가사 (apoptosis) 분석

이 분석 실험에서는, HEK 293, CA, 및 CX-1 세포주를 사용하여, 세포흐름분석 (flowcytometry)를 이용하여 BCRP 유전자의 발현이 세포자가사에 미치는 영향을 조사하였다. 대조군으로는 pFLAG 벡터만을 트랜스펙션한 벡터 대조군을 사용하였다.

두 번의 반복 분석한 결과, CA와 CX-1에서는 두 번 모두 대조군 세포에 비하여 세포자가사가 약하게 나타났으나, HEK 293에서는 거의 변화가 일어나지 않았거나 약한 세포자가사의 경향을 보였다. 분석결과를 도 8 내지 10에 나타내었다. 도 8 내지 10은 각각 HEK 293, CA 및 CX-1에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸 것이다.

실시예 6 : 인간 유방암 세포에서 세포자가사 (apoptosis)가 BCRP 유전자의 발현에 미치는 영향

종래 인간 유방암 세포에 항암제 택솔 (taxol)을 처리하는 경우, 세포자가사가 유도되는 것으로 알려져 있다. 본 실시예에서는 세포자가사가 일어나는 경우에, BCRP 유전자의 발현정도를 검사하기 위하여 MDA-MB-231 세포주에 대하여 택솔을 처리하여 세포자가사를 유도하고, BCRP 유전자의 발현정도를 상기한 바와 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하여 확인하였다.

도 14는 MDA-MB-231 세포주에 택솔을 처리한 경우, 세포 형태의 변화를 나타내는 도면이다. 도 14의 B에 나타낸 바와 같이, 택솔 처리에 의하여 세포자가사가 일어남을 알 수 있다.

도 15는 택솔처리가 BCRP 유전자의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타내는 도면이다. 도 15에 나타낸 바와 같이, 택솔의 처리에 의하여 BCRP 유전자의 발현이 증가함을 알 수 있다.

이상과 같은 결과로부터, 본 발명의 BCRP 유전자에 의하여 세포증식이 억제되고, 세포자가사가 강하지는 않지만 대조군에 비하여 약하게 유도되는 것을 알 수 있었다. 여기에 덧붙여 간접적인 증거인 택솔처리한 세포주에서의 BCRP의 발현 등의 결과를 종합해 본다면 BCRP가 세포자가사에 관여한다고 여겨진다. 또한, 실시예 4에서 확인한 바와 같이, BCRP 유전자에 의하여 p53과 p21의 발현이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 보면, BCRP 유전자의 과발현에 의하여 p53의 발현량이 증가하게 되고, p53의 활성화에 의하여 p21의 발현량이 증가되는 것으로 여겨진다.

발명의 효과

본 발명에 따른 분리된 단백질 및 그를 코딩하는 핵산에 의하면, 유방암의 진단과 상기 단백질을 표적으로 하는 약제의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명의 BCRP 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 유방암의 진단 방법에 의하면, 유방암을 효과적으로 진단할 수 있다.

또한, 세포내의 BCRP 유전자의 발현정도를 측정하여 유방암을 진단하는 본 발명의 방법에 의하면, 유방암을 효과적으로 진단할 수 있다.

본 발명의 마이크로어레이는 유방암의 존재 여부를 검출하는 분석과 같은 여러 분석 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 여러 정상 조직에 대하여 BCRP (breast cancer related protein) 유전자 특이적 프로브를 사용하여 노던 블롯팅한 결과를 나타내는 것이다.

도 2는 여러 암 조직에 대하여 BCRP 유전자 특이적 프로브를 사용하여 노던 블롯팅한 결과를 나타내는 것이다.

도 3 내지 5는 각각 BCRP-pFLAG 벡터 DNA로 트랜스펙션된 결합암 세포주 Clone A (CA), 일차 배양된 정상 신장 세포, 및 HEK 293 세포주에 대하여 FITC 형광을 관찰하여 세포 내에서 BCRP가 발현되어 존재하는 위치를 살펴본 결과를 나타내는 것이다.

도 6은 BCRP 유전자로 트랜스펙션된 CA 세포주에서 BCRP의 발현 정도를 보았고, BCRP가 과발현되었을 때 세포자가사 (apoptosis) 관련 여러 유전자의 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 확인한 결과를 나타내는 것이다.

도 7은 세포증식 분석 (MTT 분석)을 통하여 HEK 293, CA, 및 CX-1 (각각, A, B, 및 C) 세포주에서 BCRP의 과발현이 세포주의 증식에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 8 내지 10은 BCRP의 트랜스펙션에 의한 과발현이 세포주에 미치는 영향을 보기 위하여 세포자가사 분석 (apoptosis assay)을 실시하여, 각각 BCRP-pFLAG 벡터 DNA로 트랜스펙션된 HEK 293, CA 및 CX-1에 대한 FACS 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 11 및 12는 서로 다른 유방암 환자의 유방암 조직 및 정상조직으로부터 RNA를 분리하고, 서열번호 4 및 5의 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 하여 RT-PCR을 하여 BCRP의 발현의 차이를 살펴본 결과를 나타내는 도면이다.

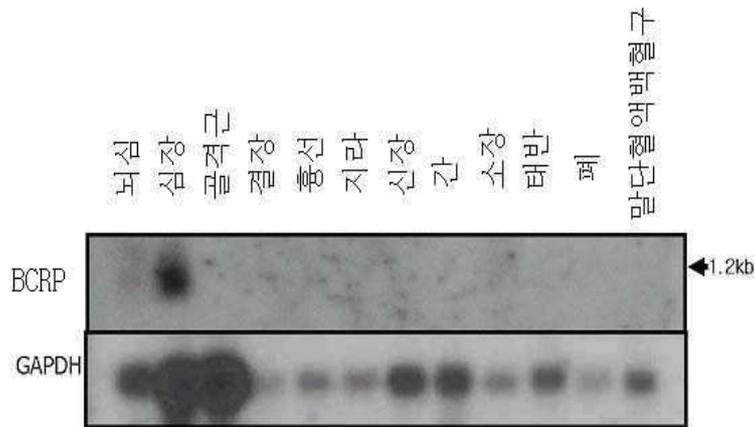
도 13은 서로 다른 3명의 유방암 환자의 유방 종양 조직의 RNA에 대하여 노던블롯팅 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 14는 MDA-MB-231 세포주에 항암제인 택솔을 처리하여 세포자가사를 유도한 경우, 세포 형태의 변화를 나타내는 도면이다.

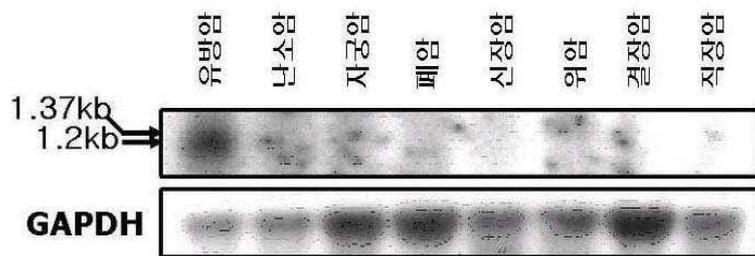
도 15은 도 14에서의 세포들로부터 추출된 RNA를 이용하여, 택솔처리가 BCRP 유전자의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

도면

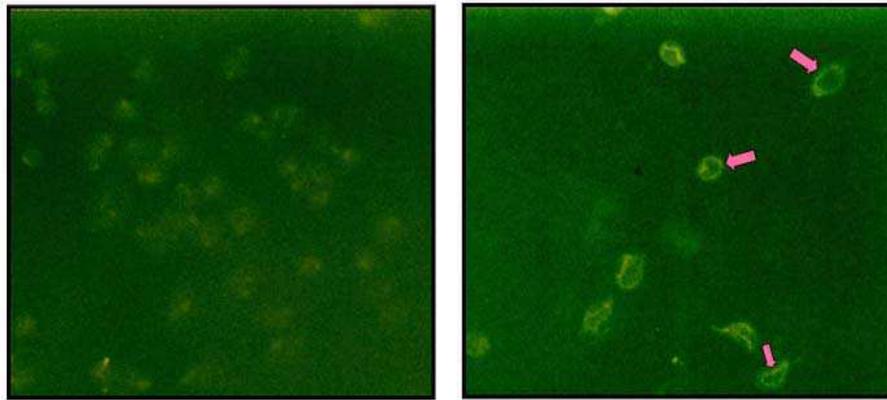
도면1



도면2



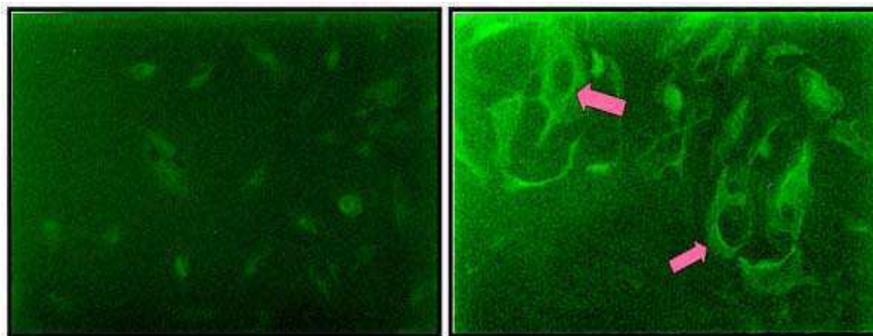
도면3



대조군 x 200

CA x 200

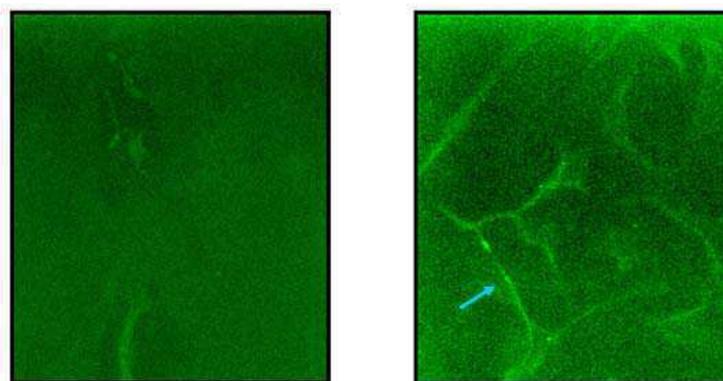
도면4



대조군 x 200

정상 신장세포 x 200

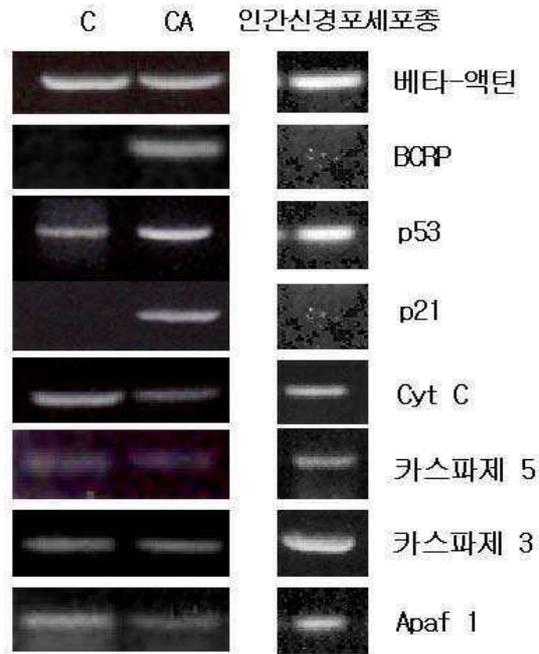
도면5



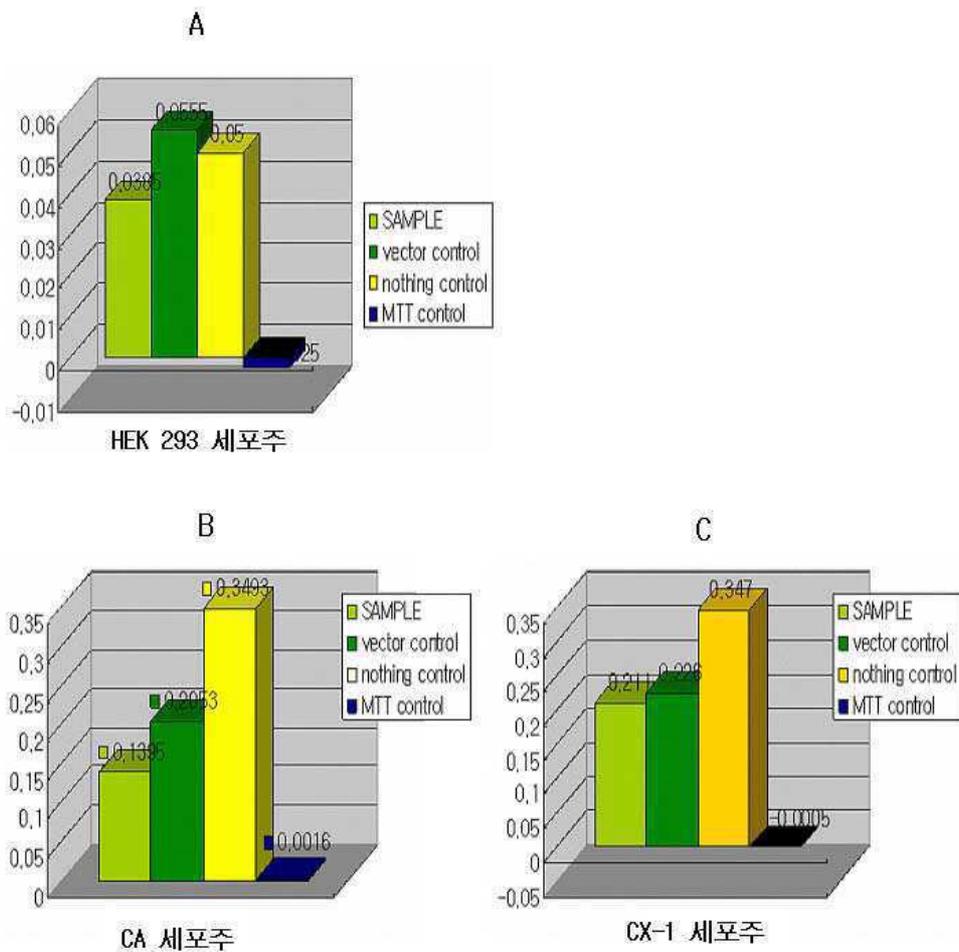
대조군 x 200

HEK 293 x 200

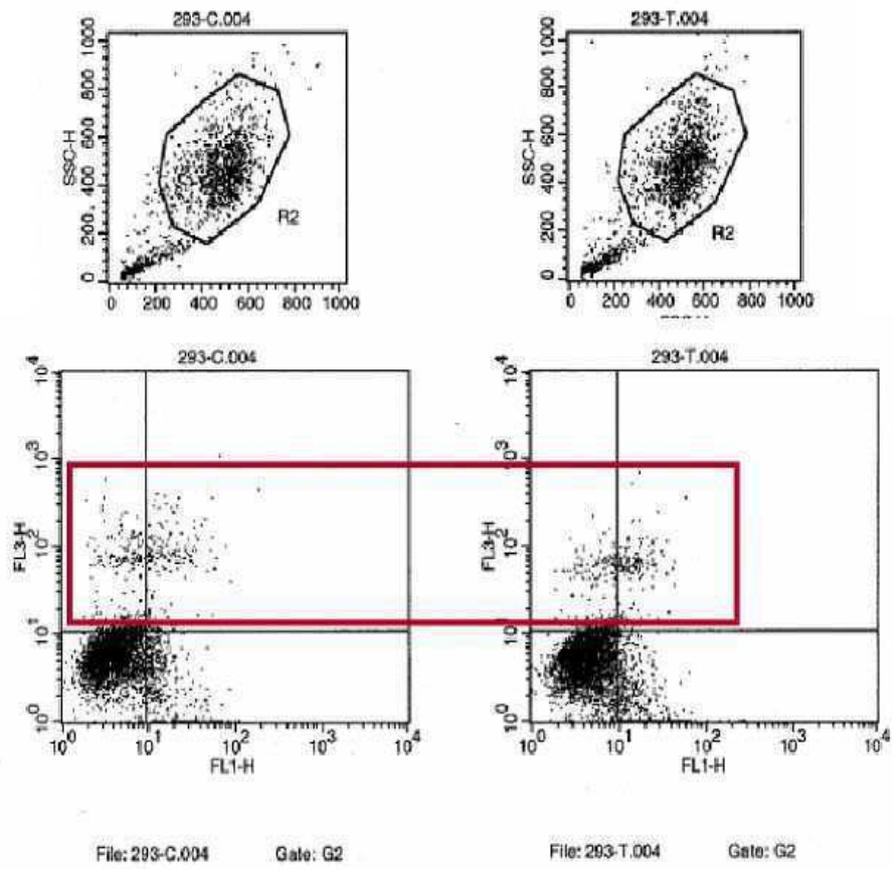
도면6



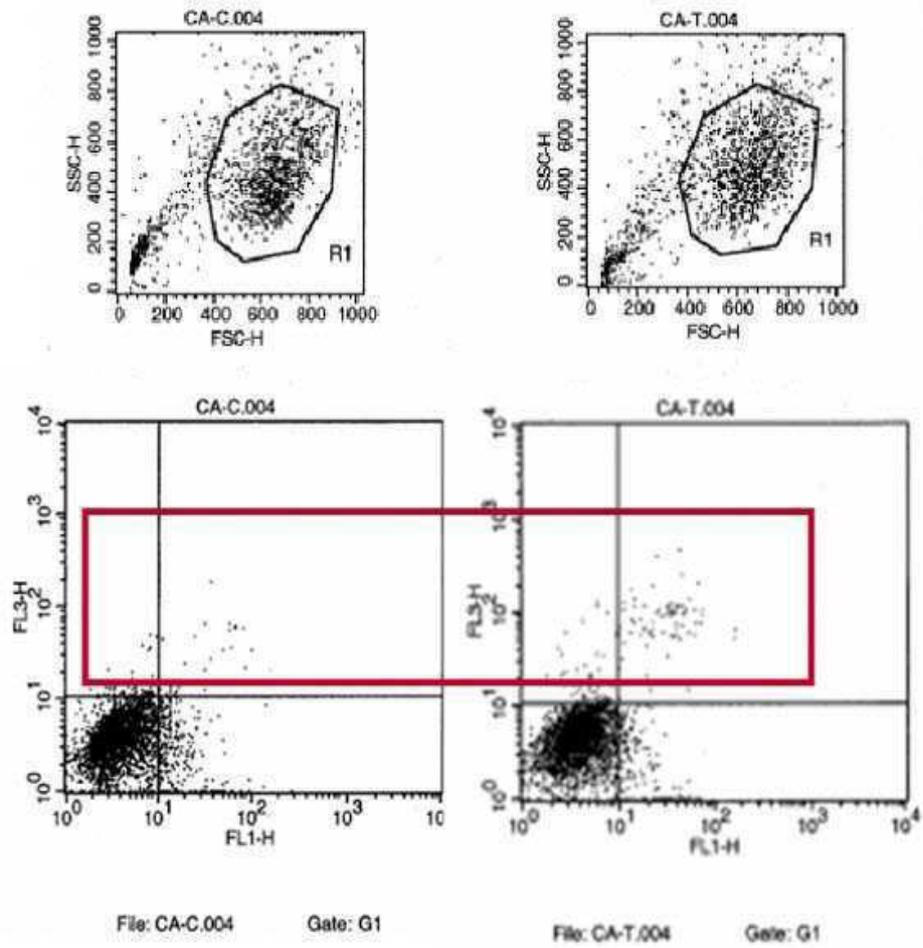
도면7



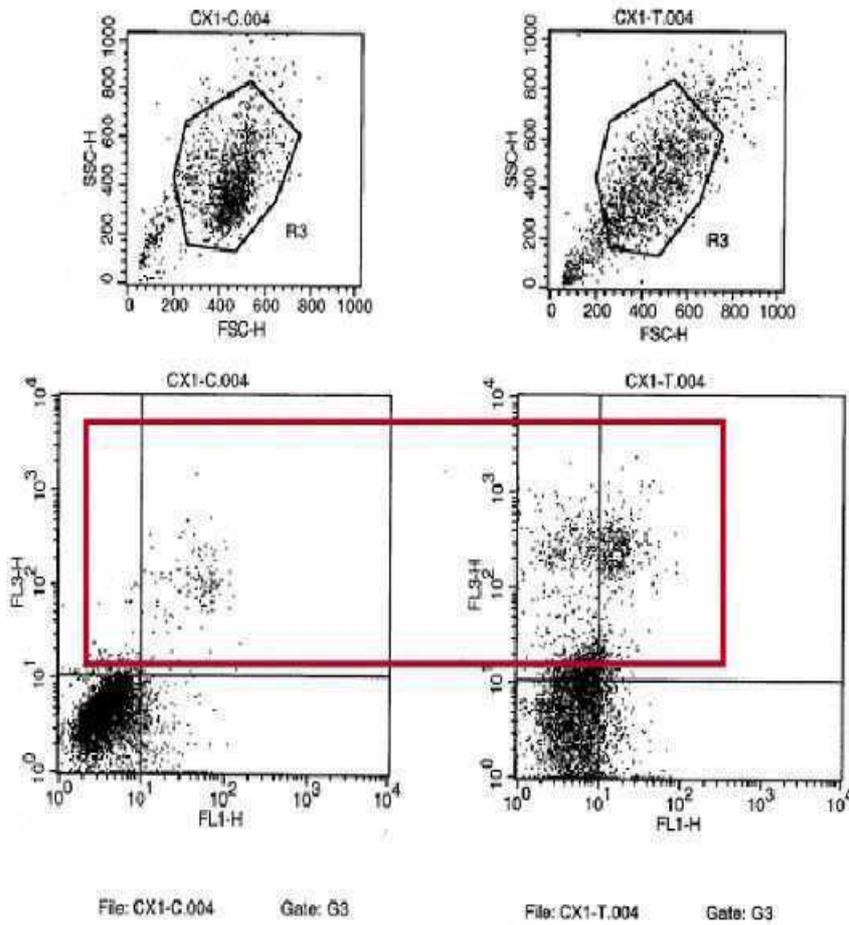
도면8



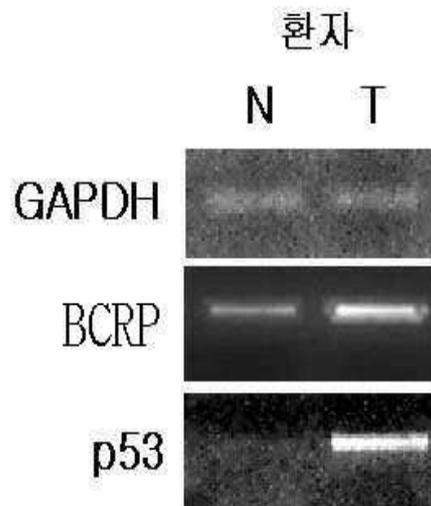
도면9



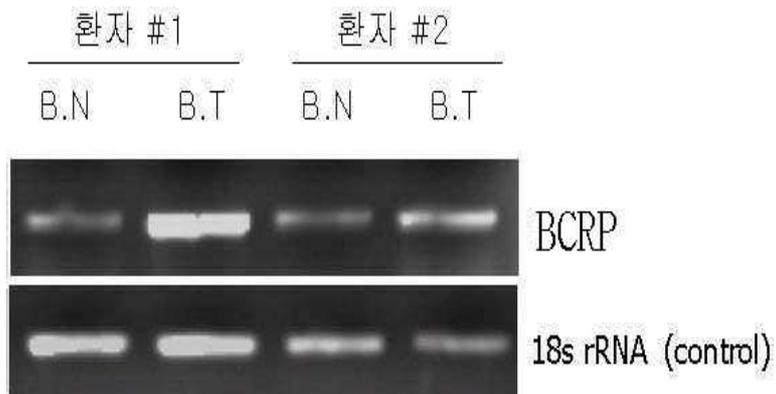
도면10



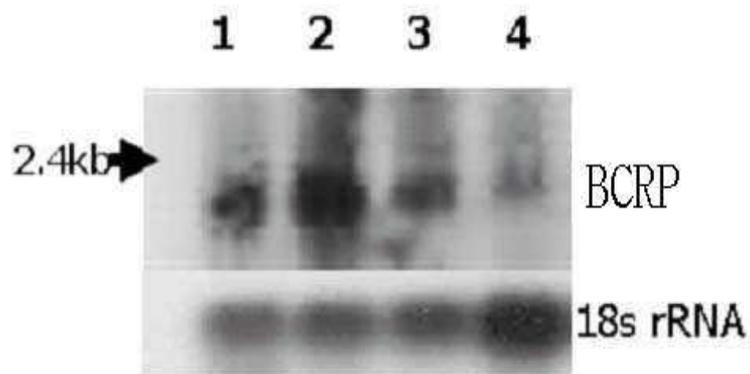
도면11



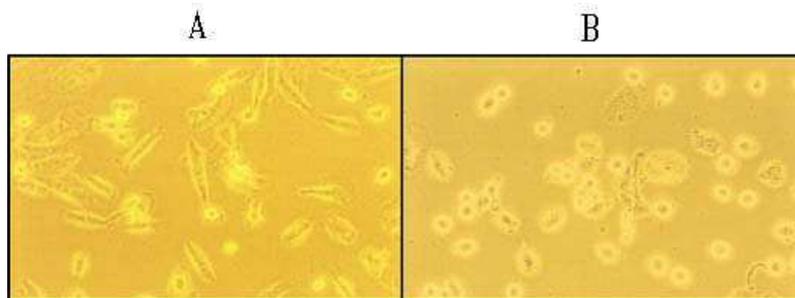
도면12



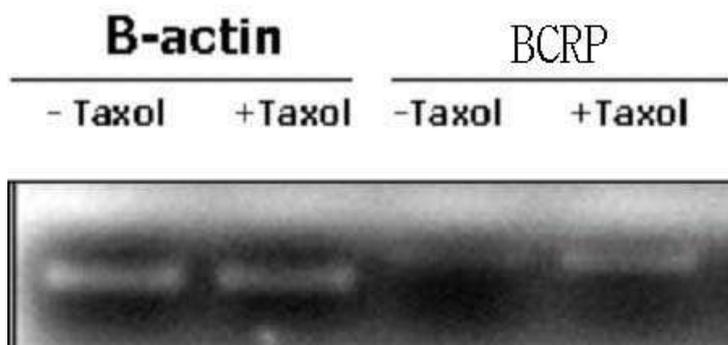
도면13



도면14



도면15



<110> Samsung Electronics Co. LTD.

<120> A breast cancer cell related protein, a gene encoding the same, and a method for diagnosing a breast cancer using the protein and gene

<130> PN060423

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 1
acggacgagg gtgacaatag 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 2
aggtaaaaga agggcatggg 20

<210> 3

<211> 672

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3
atgaggctcc aaagacccccg acaggccccg gcggggtggga ggcgcgcgcc ccggggcggg 60
cggggctccc cctaccggcc agaccggggg agaggcgcgc ggaggctgcg aaggttccag 120
aagggcgggg agggggcgcc gcgcgctgac cctccctggg caccgctggg gacgatggcg 180
ctgctcgcct tgctgctggt cgtggcccta ccgcggggtgt ggacagacgc caacctgact 240

gcgagacaac gagatccaga ggactcccag cgaacggacg aggggtgacaa tagagtgtgg 300
 tgtcatgttt gtgagagaga aaacactttc gagtgccaga acccaaggag gtgcaaatgg 360
 acagagccat actgcgttat agcggcogtg aaaatatttc cacgtttttt catggttgcg 420
 aagcagtgct ccgctggttg tgcagcgatg gagagacca agccagagga gaagcggttt 480
 ctctggaag agcccatgcc cttcttttac ctcaagtgtt gtaaaattcg ctactgcaat 540
 ttagaggggc cacctatcaa ctcatcagtg ttcaaagaat atgctgggag catgggtgag 600
 agctgtggtg ggctgtggct ggccatocctc ctgctgctgg cctccattgc agccggcctc 660
 agcctgtctt ga 672

<210> 4
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly
 20 25 30
 Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg
 35 40 45
 Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu
 50 55 60
 Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Leu Thr
 65 70 75 80
 Ala Arg Gln Arg Asp Pro Glu Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp
 85 90 95
 Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys
 100 105 110
 Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala
 115 120 125
 Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser
 130 135 140
 Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe
 145 150 155 160

Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile
 165 170 175

Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys
 180 185 190

Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala
 195 200 205

Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser
 210 215 220

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer of BCRP amplification

<400> 5
 cggacgaggg tgacaatag 19

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for BCRP amplification

<400> 6
 aggtaaaaga agggcatggg 20

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for beta-actin amplification

<400> 7
 aggactttga ttgcacattg ttgttt 26

<210> 8
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for beta actin amplification

 <400> 8
 gagaccaaaa gccttcatac atctca 26

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for p53 amplification

 <400> 9
 atttgcgtgt ggagtatttg 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for p53 amplification

 <400> 10
 ggaacaagaa gtggagaatg 20

 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for p21 amplification

 <400> 11
 gtgagcgatg gaacttcgac tt 22

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for p21 amplification

 <400> 12
 ggcgtttgga gtggtagaaa tc 22

 <210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for CytC amplification

 <400> 13
 tttgatcca atgggtgatg ttgag 25

 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for CytC amplification

 <400> 14
 tttgaattcc tcattagtag cttttttgag 30

 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for caspase 5 amplification

 <400> 15
 ctgacattga aggaagagg 19

<210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for caspase 5 amplification

 <400> 16
 gccaggtgat caaactttg 19

 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for caspase 3 amplification

 <400> 17
 tggaattgat gcgtgatggt 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> reverse primer for caspase 2 amplification

 <400> 18
 ggcaggcctg aataatgaaa 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> forward primer for Apaf 1 amplification

 <400> 19
 gggtttcagt tgggaaacaa 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for Apaf 1 amplification

<400> 20
cacccaagag tcccaaacat

20