



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월05일
(11) 등록번호 10-1250193
(24) 등록일자 2013년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0004405
(22) 출원일자 2011년01월17일
심사청구일자 2011년01월17일
(65) 공개번호 10-2012-0099306
(43) 공개일자 2012년09월10일
(56) 선행기술조사문헌
Breast Cancer Research. 2008, 10(Suppl 2):04.
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY. 2010, Vol.
30, No. 16, pp. 4006-4021.
European Journal of Haematology. 2009, Vol.
82, No. 5, pp. 354-363.
KR1020040071812 A

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
백성희
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 교수아파트 122E동 302호 (신림동)
김근일
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 교수아파트 122E동 302호 (신림동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김미숙, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 20 항

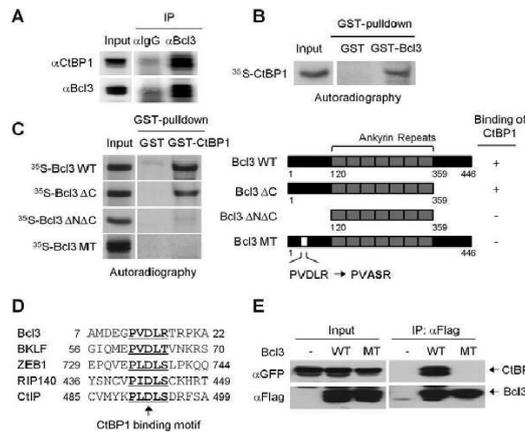
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 B c 1 3를 이용한 항-세포사멸 또는 세포사멸-유도 물질의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 항-세포사멸 물질 또는 세포사멸 유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 Bcl3의 원종 양 형성 유전자 작용의 근간을 이루는 분자적 메커니즘을 통한 스크리닝하는 방법을 최초로 제공한다. 본 발명의 스크리닝 방법은 암의 예방 또는 치료에 효과적인 물질 또는 발암물질과 같은 항-세포사멸 물질을 간편하고도 효율적으로 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김정화

경기도 부천시 원미구 소향로 11, B동 603호 (상동, 코오롱이데아폴리스)

최희준

서울특별시 강남구 언주로 3, 우성6차아파트 8동 501호 (개포동)

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 항-세포사멸(anti-apoptosis) 물질의 스크리닝 방법:

- (a) Bcl3 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 세포에서 Bcl3 및 CtBP1 단백질의 결합을 확인하는 단계;
- (c) 상기 시험물질의 접촉으로 Bcl3가 상향조절(upregulation)되는지 여부 및 상기 상향조절을 통하여 CtBP1의 안정화가 유도되는지 여부를 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 상향조절 및 안정화를 유발한 시험물질을 선별하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 암세포는 유방암 세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 Bcl3 및 CtBP1은 양의 상관관계(positive correlation)에 있음을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 결합은 Bcl3 N-말단에 위치하는 PXDLS/R 서열에 의해 중재되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 PXDLS/R서열은 서열목록 제1서열의 13번 내지 17번 서열인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화는 Bcl3가 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하여 유도되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화는 CtBP1의 프로테아좀-의존 분해가 차단되어 유도되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화는 세포사멸 유도 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 세포사멸 유도 유전자는 *p53*, *p21* 또는 *NOXA*인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 세포사멸 유도(pro-apoptosis) 물질의 스크리닝 방법:

(a) Bcl3 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계;

(b) 상기 세포에서 Bcl3 및 CtBP1 단백질의 결합을 확인하는 단계;

(c) 상기 Bcl3의 하향조절(downregulation)을 통하여 상기 CtBP1의 안정화가 억제되는지 여부를 측정하는 단계; 및

(d) 상기 하향조절 및 안정화 억제를 유발한 시험물질을 선별하는 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 세포는 암세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 암세포는 유방암 세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 Bcl3 및 CtBP1은 양의 상관관계(positive correlation)에 있음을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 결합은 Bcl3 N-말단에 위치하는 PxDLS/R 서열에 의해 중재되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 PxDLS/R서열은 서열목록 제1서열의 13번 내지 17번 서열인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 17

제 11 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화의 억제는 Bcl3가 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하지 못하여 유도되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 18

제 11 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화의 억제제는 CtBP1의 프로테아좀-의존 분해로 유도되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 19

제 11 항에 있어서, 상기 CtBP1의 안정화의 억제제는 세포사멸 유도 유전자의 발현을 촉진하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 세포사멸 유도 유전자는 *p53*, *p21* 또는 *NOXA*인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 Bcl3 및 CtBP1을 이용한 항-세포사멸 또는 세포사멸-유도 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포사멸(apoptosis)은 암 형성의 주요 장벽에 해당되는데, 이는 활성화된 발암유전자를 갖는 비정상적인 세포들이 상기 경로에 의해 제거되기 때문이다; 비정상적인 세포가 암세포로 발달할 수 있기 위해서는 세포사멸을 우회하여야만 한다. 따라서, 세포사멸에 대한 저항성은 암세포의 주요한 특징에 해당된다[1]. 세포사멸에 대한 저항성은 p53 경로를 대부분 포함하는, 다양한 전략을 통하여 획득된다고 보고되었다[2]. 암세포에서 세포사멸 유도 조절자(regulator)는 전형적으로 기능적 돌연변이 또는 변형된 발현양상을 갖는다; 이러한 조절자들은 p53의 다운스트림(downstream) 작동자(effector)(예를 들어, PTEN, Bax, Bak 또는 Apaf-1)가 되거나 업스트림(upstream) 조절자(예를 들어, ATM, Chk2, Mdm2 또는 p19ARF)가 될 수 있다[2]. 다양한 증거들은 암세포 진행에 있어 수많은 p53-비의존성 경로 역시 중요하다고 제시한다[3].

[0003] Bcl3은 IκB 군에 속한 원(原)종양 형성 유전자로, 만성적 B-세포 림프구성 백혈병(B-CLL; B-cell lymphocytic leukemia)에서 비정상적인 발현이 최초로 보고되었다. 유방암을 포함하는 수많은 암에서 Bcl3가 증가된 수치로 검출되었으며[5], Bcl3의 항-세포사멸 효과가 보고되었다[6]. 게다가, Bcl3은 일반 세포 및 암세포에서 Hdm2의 전사를 향상시켜 p53 활성이 하향조절(downregulation) 되게 하여, DNA 손상-유도 세포사멸이 억제되도록 유도한다[7]. 상기 Bcl3의 항-세포사멸 작용은 Bcl3의 과발현이 암세포에게 생존 혜택을 줄 수 있다는 것을 제시함으로써, Bcl3의 원종양 형성 유전자 기능에 대한 가능성 분자 메커니즘을 제공한다.

[0004] 최초 E1A-상호작용 분자로 클로닝된 CtBP1은 E1A에 의한 종양형성 유전자 변형 촉진을 억제한다[8]. CtBP1-상호작용 분자는 전사요소(transcription factor), 보조억제인자(corepressor) 및 히스톤-변형 효소를 포함하며, 상기 분자에 결합하는 것은 CtBP1이 전사 억제 역할을 한다는 것을 반영한다[9]. CtBP1에 의한 억제가 세포생존에 있어서 중요한 역할을 할 것이라는 것이 제안되었다. CtBP1의 발현양이 감소되면 암세포가 세포사멸에 민감해 진다[10]. 또한, CtBP1 단백질양의 감소는 p53-Null 세포(null cell)에서 세포사멸을 유발하는데 충분하다[11]. *ctbp*-Null 세포를 이용한 마이크로레이 분석은 p21 및 NOXA를 포함하는 세포사멸 유도 유전자 집단이 CtBP1에 의해 전사적으로 억제된다는 것을 나타내었다[10]. 세포사멸 자극에 의해, CtBP1은 프로테아좀-의존성 분해되어, 세포사멸 유도 유전자를 활성화시키고 세포사멸이 진행되도록 한다[12].

[0005] 비록 Bcl3 및 CtBP1 모두 항-세포사멸 역할을 하지만, 세포사멸 조절에 있어서 이들 두 분자간의 기능적인 상호연관성은 광범위하게 연구되지 않았다. 본 발명자들은 Bcl3가 CtBP1에 결합하여 CtBP1이 유비퀴틴화되는 것을 차단함으로써, CtBP1의 안정화를 유도한다는 것을 발견하였다. 또한, Bcl3의 과발현은 세포사멸 유도 유전자의 CtBP1-중재 억제를 지속적으로 유지하도록 하여 세포사멸 자극에 대해 세포가 저항성을 갖도록 하였다. 본 발

명은 Bcl3의 비정상적인 발현이 어떻게 CtBP1 안정성을 조절하여 세포사멸에 대한 저항성을 부여할 수 있는지를 설명하는 새로운 모델을 제시한다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 Bcl3(B-cell lymphoma 3)의 원종양 형성 유전자 작용의 근간을 이루는 분자적 메커니즘을 밝히고, 상기 메커니즘을 이용하여 항-세포사멸(anti-apoptosis) 또는 세포사멸-유도(pro-apoptosis) 물질을 스크리닝하는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 Bcl3 및 CtBP1간 상호작용을 중재하는 Bcl3 내 PXDLS/R 모티프를 발견하였으며, 상기 모티프가 프로테아좀-의존 분해를 차단함으로써 CtBP1의 안정성을 유도한다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 항-세포사멸 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 세포사멸 유도 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 항-세포사멸(anti-apoptosis) 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0012] (a) Bcl3 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계;

[0013] (b) 상기 세포에서 Bcl3 및 CtBP1 단백질의 결합을 확인하는 단계;

[0014] (c) 상기 시험물질의 접촉으로 Bcl3가 상향조절(upregulation)되는지 여부 및 상기 상향조절을 통하여 CtBP1의 안정화가 유도되는지 여부를 측정하는 단계; 및

[0015] (d) 상기 상향조절 및 안정화를 유발한 시험물질을 선별하는 단계.

[0016] 본 발명자들은 항-세포사멸 유도 기능을 보유한 Bcl3가 CtBP1과 어떻게 상호작용하는지에 관하여 분자적 메커니즘을 발굴하고자 노력하였고, 그 결과 Bcl3가 CtBP1에 결합하여 CtBP1의 안정화를 조절하는 메커니즘을 이용하여 항-세포사멸 또는 세포사멸-유도 물질을 효율적으로 스크리닝할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0017] Bcl3(B-cell lymphoma 3)는 유방암을 포함하는 다양한 암에서 상향조절(upregulated)되는 원(原)종양 형성 유전자이다. 비록 Bcl3가 세포 증식을 촉진하고 세포사멸(apoptosis)을 억제한다고 알려져 있지만, Bcl3의 원종양 형성 유전자 작용의 근간을 이루는 분자적 메커니즘에 대해서는 완전히 밝혀지지 않았다. Bcl3의 원종양 형성 유전자 역할을 밝히기 위하여, 본 발명자들은 Bcl3의 결합 파트너인 CtBP1(C-terminal binding protein 1)을 동정하는 프로테오믹(proteomic) 접근을 시도하였다. 본 발명자들은 Bcl3 및 CtBP1간 상호작용을 중재하는 Bcl3 내 PXDLS/R 모티프를 발견하였으며, 상기 모티프가 프로테아좀-의존 분해를 차단함으로써 CtBP1의 안정성을 유발한다는 것을 확인하였다. CtBP1의 세포사멸 자극-유도 분해는 Bcl3의 상향조절에 의해 유의적으로 차단되었으며, 세포사멸 유도 유전자 발현의 지속적 억제 및 궁극적으로 세포사멸을 차단하였다. 흥미롭게도, Bcl3 및 CtBP1의 단백질 수준 간 강한 양의 상관관계(positive correlation)가 유방암 환자 샘플에서 검출되었

다. 본 발명은 Bc13 및 CtBP1의 신규한 조합 작용을 밝혔으며, 상기 조합작용은 암의 발달에 있어 필수요소인 암세포에서의 세포사멸 저항성 획득에 대한 설명을 제공한다.

- [0018] 본 발명의 방법을 각각의 단계에 따라 상세하게 설명하면 다음과 같다;
- [0019] 단계 (a): Bc13 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉
- [0020] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 Bc13 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시킨다. 바람직하게는, Bc13 및 CtBP1 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포는 암세포이며, 보다 바람직하게는 유방암 세포이다.
- [0021] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험 물질”은 Bc13 및 CtBP1 유전자의 발현량, Bc13 및 CtBP1 단백질의 양 또는 CtBP1 단백질의 유비퀴틴화에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험 물질은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.
- [0023] 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레사블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0024] 단계 (b): Bc13 및 CtBP1 단백질의 결합 확인
- [0025] 이어서, 상기 세포에서 Bc13 및 CtBP1 단백질의 결합을 확인한다. 이는 상기 두 단백질이 서로 상호작용하는 지 여부를 확인하기 위한 첫 단계로, 시험 물질 접촉으로 유발된 Bc13의 발현양 또는 단백질 생산량의 증가/감소에 따라 CtBP1의 발현양 또는 단백질 생산량이 이에 연관되어 증가/감소되는데 서로 연관되어 상호작용하는 지를 확인하는 것이다. 바람직하게는, Bc13 및 CtBP1은 양의 상관관계(positive correlation)에 있어 Bc13의 발현양 또는 단백질 생산량의 증가에 따라 CtBP1의 발현양 또는 단백질 생산량이 이에 연관되어 증가되거나 Bc13의 발현양 또는 단백질 생산량의 감소에 따라 CtBP1의 발현양 또는 단백질 생산량이 이에 연관되어 감소되는 것이다.
- [0026] 본 단계에 따른 Bc13과 CtBP1 간의 결합 또는 복합체 형성을 확인하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 포함하며, 바람직하게는 조직면역 염색, 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법 (ELISA), 웨스턴 블롯팅 (Western Blotting), 면역침전 또는 공동-면역침전 분석법(Immunoprecipitation or Co-immunoprecipitation Assay), 면역확산 분석법(Immunodiffusion assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip)등을 이용할 수 있고, 보다 바람직하게는 면역침전 또는 공동-면역침전 분석법을 이용하여 Bc13 및 CtBP1의 결합여부를 확인할 수 있다.
- [0027] Bc13 부위 중 CtBP1과의 상호작용을 증재하는 부위는, 바람직하게는 Bc13의 N-말단 부위이며, 보다 바람직하게는 Bc13 N-말단의 PXDLS/R 서열이고, 가장 바람직하게는 서열목록 제1서열의 Bc13 아미노산 잔기 중 13번 내지 17번의 PVDLR 서열이다. 상기 PXDLS/R 서열에서 P는 프롤린, D는 아스파라긴, L은 류신, S는 세린, R은 아르기닌을 의미하며, X는 어떠한 아미노산도 서열도 될 수 있다. 상기 서열은 CtBP1에 결합하는 단백질들이 CtBP1과 결합할 수 있도록 하는 공통된 모티프(motif)이며, 본 발명의 일 실시예에서 Bc13의 N-말단 도메인에 위치하는 PXDLS/R 서열에 의해 Bc13 및 CtBP1의 결합이 증재됨을 확인하였다.

- [0028] 단계 (c): Bcl3의 상향조절 및 이와 연관된 CtBP1의 안정화 유도 측정
- [0029] 이어서, 상기 시험물질의 접촉으로 Bcl3가 상향조절되는지 여부 및 상기 상향조절을 통하여 CtBP1의 안정화가 유도되는지 여부를 측정한다. 본 명세서에서 용어 “상향조절(upregulation)”은 시험 물질을 접촉시키기 전과 비교하여 Bcl3의 발현량 또는 Bcl3 단백질의 양이 증가된 상태를 의미하며, “하향조절(downregulation)”은 시험 물질을 접촉시키기 전과 비교하여 Bcl3의 발현량 또는 Bcl3 단백질의 양이 감소된 상태를 의미한다. 예컨대, 용어 “상향조절”은 RT-PCR에 의해 측정된 Bcl3의 발현량, 또는 ELISA 방법에 의해 측정된 Bcl3 단백질의 양이 시험 물질을 접촉시키기 전과 비교하여 증가된 상태를 의미한다.
- [0030] 측정 결과, Bcl3 유전자의 발현량 또는 Bcl3 단백질의 양이 상향조절되는 것이 측정되면, Bcl3에 결합된 CtBP1의 안정화가 유도되는지 확인한다.
- [0031] 본 명세서에서, 용어 CtBP1의 “안정화” 또는 “안정성”은 CtBP1의 분해가 차단 또는 감소된다는 것을 의미하며, 바람직하게는 세포사멸 자극에 대해 CtBP1이 분해가 차단 또는 감소, 보다 바람직하게는 프로테아좀-의존 분해(proteasome-dependent degradation)가 차단 또는 감소되는 것을 말한다. 상기 CtBP1의 분해 차단 또는 감소는 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제함으로써 유도될 수 있으며, 본 발명의 Bcl3은 CtBP1에 결합하여 CtBP1의 유비퀴틴화를 조절함으로써 CtBP1의 안정성을 조절하게 된다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명자들은 *in vivo* 유비퀴틴화 분석시험으로 Bcl3가 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하여 CtBP1의 안정화에 기여한다는 것을 확인하였다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 CtBP1의 안정화는 세포사멸 유도 유전자의 발현을 억제하는 것이다.
- [0033] 본 명세서에서, 용어 “세포사멸 유도 유전자”는 발현되어 세포사멸을 유도하는 유전자를 의미하며, 바람직하게는 CtBP1-의존 세포사멸 유도 유전자이고, 보다 바람직하게는 *p53*, *p21* 또는 *NOXA*이며, 가장 바람직하게는 *p21* 또는 *NOXA*이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 Bcl3가 과발현될 경우 세포사멸-유도 시약인 에토포사이드(etoposide) 처리시에도 CtBP1-의존 세포사멸 유도 유전자들의 유도를 유의하게 감소시켜 세포사멸이 억제되었다.
- [0034] 단계 (d): 상향조절 및 안정화를 유발한 시험물질의 선별
- [0035] 최종적으로, 상기 Bcl3의 상향조절 및/또는 CtBP1의 안정화를 유발한 시험물질을 선별한다. 구체적으로는, 상기 상향조절 및/또는 안정화를 유발한 시험물질은 항-세포사멸 물질로 판정할 수 있으며, 하향조절 및/또는 안정화 억제를 유발한 시험물질은 세포사멸-유도 물질로 판정할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 세포사멸 유도(pro-apoptosis) 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0037] (a) Bcl3 및 CtBP1 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 접촉시키는 단계;
- [0038] (b) 상기 세포에서 Bcl3 및 CtBP1 단백질의 결합을 확인하는 단계;
- [0039] (c) 상기 Bcl3의 하향조절(upregulation)을 통하여 상기 CtBP1의 안정화가 억제되는지 여부를 측정하는 단계; 및
- [0040] (d) 상기 하향조절 및 안정화 억제를 유발한 시험물질을 선별하는 단계.
- [0041] 본 발명의 방법 중 상기 스크리닝 방법과 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 CtBP1의 안정화의 억제는 Bcl3가 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하지 못하여 유도되는 것이다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 CtBP1의 안정화의 억제는 CtBP1의 프로테아좀-의존 분해로 유도되는

것이다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 CtBP1의 안정화의 억제제는 세포사멸 유도 유전자의 발현을 촉진하는 것이다.

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 세포사멸 유도 유전자는 *p53*, *p21* 또는 *NOXA*인 것이다.

[0046] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 스크리닝-인(screening-in)된 물질은 세포사멸을 유도하거나 항-세포사멸 활성을 갖는 물질이며, 이는 세포사멸을 유발하여 치료될 수 있는 다양한 질환 및 질병의 치료제로서 이용될 수 있거나, 항-세포사멸 물질(예를 들어, 발암물질)로 선별할 수 있다. 예를 들어, 세포사멸을 유발하여 치료될 수 있는 질환은, 암 및 섬유증(fibrosis)을 포함하며, 상기 섬유증은 간섬유증, 폐섬유증 및 신장 섬유증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 방법에 따르면, 세포사멸을 유도하는 신약의 선도 화합물(lead compounds)을 효과적으로 스크리닝하여, 전임상 및 임상 시험에서의 적중률(hit-ratio)을 향상시킬 수 있으며, 결과적으로 세포사멸을 유도하여 작용하는 신약을 개발하는데 요구되는 비용 및 시간을 크게 줄일 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0048] (i) 본 발명은 Bcl3의 원종양 형성 유전자 작용의 근간을 이루는 분자적 메커니즘을 통한 스크리닝하는 방법을 최초로 제공한다.

[0049] (ii) 본 발명의 스크리닝 방법은 암의 예방 또는 치료에 효과적인 물질 또는 발암물질과 같은 항-세포사멸 물질을 간편하고도 효율적으로 스크리닝할 수 있는 새로운 접근법이다.

[0050] (iii) 본 발명은 신규한 치료 타겟으로서 Bcl3 및 CtBP1을 채택하여 암 치료방법을 개발하는데 있어서 새로운 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 Bcl3의 결합 파트너로서 CtBP1을 동정한 도면이다. 패널 A는 MCF7 세포 과쇄물로부터 항-Bcl3 항체를 이용한 Bcl3의 내생 면역침전 후, 항-CtBP1 항체를 이용한 면역블롯팅 분석 결과이다. 패널 B는 인 비트로 상에서 변형된 ³⁵S-메티오닌-라벨된 CtBP1과 재조합 GST-태깅된 Bcl3를 이용한 GST-폴-다운 분석시험의 자가 방사 기록 사진을 나타낸다. 패널 C는 각각 인 비트로 상에서 변형된 ³⁵S-메티오닌-라벨된 Bcl3 돌연변이와 재조합 GST-CtBP1 단백질을 이용한 GST-폴-다운 분석시험의 자가 방사 기록 사진을 나타낸다. 오른쪽은 각각의 Bcl3 컨스트럭트를 나타낸 개요도이다. 패널 D는 CtBP1-결합 단백질 간 보존된 PXDLS/R 모티프를 나타낸 개요도이다. 패널 E는 HEK293 세포에서 Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT를 이용한 Bcl3의 공동-면역침전 결과이다.

도 2는 Bcl3에 의한 CtBP 유비퀴틴화 억제에 관한 도면이다. 패널 A는 U2OS 세포에서 CtBP1 단백질 수준에 대한 녹다운된 Bcl3의 영향을 나타내는 면역블롯팅 분석 시험 결과이다. 세포들은 프로테아좀 분해를 차단하기 위해 12시간 동안 MG132(5 μ g/ml)로 처리하였다. 패널 B는 U2OS 세포에서 *CtBP1* 전사 수준에 대한 녹다운된 Bcl3의 영향을 실시간-PCR로 분석한 시험결과를 나타낸다. 패널 C는 6시간 동안 MG132(5 μ g/ml)로 처리 후 HA-CtBP1, HisMax-유비퀴틴 및 투여용량을 점차 증가시킨 Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT를 공동 발현하는 HEK293T 세포를 이용한 생체내 유비퀴틴화 분석 결과를 나타낸다. 유비퀴틴화된 CtBP1 검출에는 항-HA 항체를 이용하였다. 패널 D는 UV 투여용량을 점점 증가되게 처리 후 8시간 배양한 경우 U2OS 세포에서 *Bcl3*의 전사 수준을 실시간 RT-PCR 분석 결과를 나타낸다. 패널 E는 50 또는 2000 J/m² UV 처리 후 표기된 시간만큼 배양한 경우 U2OS 세포에서 Bcl3 및 CtBP1의 내생 단백질 수준에 대한 면역블롯팅 결과를 나타낸다. 패널 F 및 G는 12시간(패널 F) 또는 표기된 시간(패널 G) 동안 에토포사이드(500 μ M)로 처리한 후 Flag-Bcl3의 과발현 존재 하 또는 비존재 하 U2OS 세포에서 CtBP1의 내생 단백질 수준에 대한 면역블롯팅 결과를 나타낸다. 패널 H는 패널 G에 나타난 CtBP1의 상대적인 단백질 수준을 농도계를 사용하여 에토포사이드 비-처리 대조군과 비교하여 퍼센트 비율로 나타낸 선 그래프이다.

도 3은 Bcl3에 의한 CtBP1-중재 세포사멸 반응 억제를 나타내는 도면이다. 패널 A 및 B는 에토포사이드(500 μ M)의 존재 하 18 시간의 배양 조건 또는 배양 없이 U2OS 세포에서 Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT를 안정적으로 발현하는 *NOXA* 및 *p21*(CtBP1-의존 유전자)(패널 A) 또는 *PUMA*(CtBP1-비의존 유전자)(패널 B)의 전사수준을 실-시간 정량 RT-PCR로 분석한 것이다. 결과들을 에토포사이드 비-처리 대조군과 비교하여 활성화된 배수로 표현하였다. 패널 C 및 D는 500 J/m²의 UV 처리 후 18시간 배양 유무에 따라 Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT를 발현하는 *ctbp*^{+/-} 및 *ctbp*^{-/-} MEFs(패널 C)와 H1299 세포(패널 D)에서 *NOXA*의 전사수준을 실-시간 정량 RT-PCR로 분석한 것이다. 결과들을 UV 비-처리 대조군과 비교하여 활성화된 배수로 표현하였다. 패널 E는 500 J/m²의 UV 처리 후 12시간 배양 유무에 따라 Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT를 발현하는 *ctbp*^{+/-} 및 *ctbp*^{-/-} MEFs에서 PI(propidium iodide) 염색 및 FACS로 분석한 세포주기 분포를 나타낸 것이다. sub-G 군이 세포사멸 군으로 사료되었다.

도 4는 유방암 조직에서 발현하는 Bcl3 및 CtBP1의 양의 상관관계를 나타내는 도면이다. 패널 A는 정상 유방 세포주(MCF10A) 및 유방암 세포주(MCF7, HCC1419, HCC38, BT20 및 KPL4)에서 각각 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 내생 CtBP1 및 Bcl3 단백질 수준을 면역블롯팅 분석한 결과이다. 로딩 대조군으로 β -액틴을 이용하였다. 패널 B는 Bcl3를 녹다운 시킨 후에 CtBP1을 면역블롯팅 분석한 결과이다. 패널 C는 인간 유방암 환자 샘플 및 이에 대응하는 정상 점막 샘플을 각각 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 내생 CtBP1 및 Bcl3 단백질 수준을 면역블롯팅 분석한 결과이다. 패널 D 및 E는 정상조직과 비교하여 인간 유방암 조직에서 상대적인 Bcl3 및 CtBP1의 단백질 수준을 대응 t-검정(paired t-test)을 이용한 계산을 통하여 통계적으로 분석한 결과이다. 데이터는 조사된 모든 검체의 평균(median) 및 50%(바, bar)와 99.3%(휘스커, whisker) 분포를 나타내는 바 및 휘스커로 표현하였다. 암조직과 정상조직의 비교 *p* 값은 *p*<0.001. 패널 F는 유방암 및 정상조직에서 Bcl3(x-축) 및 CtBP1(y-축)의 발현 수준 간 상관관계를 분산 플롯(Scatter plot)으로 분석한 결과를 나타낸다. R² 값은 0.8643으로 계산되었으며, 이는 유의적인 양의 상관관계를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053] **실시예**

[0054] **실험재료 및 실험방법**

[0055] 1. 항체 및 면역 블롯팅

[0056] 다음과 같은 항체를 준비하였다: anti-Flag 및 anti-b-actin (Sigma-Aldrich), anti-GFP 및 anti-Bcl3 (Santa Cruz Biotechnology), anti-CtBP1 (Millipore), anti-HA (Roche), 및 anti-tubulin (Abfrontier). 면역블롯팅을 위해 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고 폴리비닐리덴 다이플로라이드 (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(Millipore)으로 이동시켰다. 면역블롯팅(immunoblot) 검출에는 HRP-결합 이차 항체 및 HRP-결합 이차 항체에 특이적인 경쇄(The Jackson Laboratory), 및 화학발광 시스템(chemiluminescence system, Animal Genetics)을 이용하였다.

[0057] 2. 인 비보 유비퀴틴화 분석

[0058] Flag-Bcl3 WT 또는 Flag-Bcl3 MT, HA-CtBP1, 및 HisMax-ubiquitin을 코딩하는 플라스미드를 이용하여 HEK 293T 세포(ATCC)를 감염시켰다. 48 시간의 배양 후, 세포에 MG132(5 μ M)를 6시간 동안 처리하였다. 용해완충액(150 mM NaCl, pH 7.8의 25 mM Tri-HCl, 0.15 Nonidet P40 및 1 mM EDTA)을 이용하여 세포를 파쇄한 다음 Talon metal affinity resin(Clontech)을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 원심분리로 레진(resin)을 제거한 후 용해완충액으로 4시간 동안 세척하였다. 그리고 나서, 시료를 SDS-PAGE 시킨 후 면역블롯팅 분석을 하였다.

[0059] 3. 실시간 RT-PCR

[0060] 프라이머쌍의 서열은 다음과 같다: CtBP1 5' -GGTCCTGAACGAGGCTGTG-3' (서열목록 제2서열) 및 5' -TGTTGTCAAACCCTGCAA-3' (서열목록 제3서열); p21 5' -GCAGACCAGCATGACAGATTTC-3' (서열목록 제4서열) 및 5' -GGATTAGGGCTCTCTTGGGA-3' (서열목록 제5서열); 및 NOXA 5' -CAAACGAACTCCGGCAGAA-3' (서열목록 제6서열) 및 5' -TCCCCTCATGCAAGTTTTTGA-3' (서열목록 제7서열).

[0061] 4. PI(Propidium iodide)-염색 및 FACS(fluorescent-activated cell scan) 분석

[0062] 배양된 세포를 신선하게 준비된 IP 염색 용액(20 µg/ml propidium iodide, 200 µg/ml DNase-free RNase A, 및 0.1% Triton X-100 in PBS)으로 염색을 하기 전에 트립신화한 후 70% 에탄올을 이용하여 4°C에서 밤새 고정하였다. DNA 함량은 FACSCalibur 유세포 분석기(Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다. 세포 선별은 FACSvantage 유세포 분석기(BD Biosciences)를 이용하였다. 데이터는 CellQuest 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

[0063] 실험결과

[0064] 1. Bcl3의 신규한 결합 파트너 CtBP1

[0065] 본 발명자들은 Bcl3의 원(原)종양 형성 유전자 기능(proto-oncogenic function)에 공헌하는 Bcl3-상호작용 분자를 규명하고자 노력하였다. Flag-tagged Bcl3를 이용하여 Affinity purification-mass 질량분석법을 4회 수행한 후, 나노유체(nano-flow) 액체크로마토그래피/탠덤 질량분석기(LC-MS/MS; liquid chromatography/tandem mass spectrometry) 분석으로부터 여러 가지의 Bcl3 결합 단백질을 획득하였다[13] (표 1).

표 1

Bcl3-상호작용 분자

[0066]

유전자	빈도수/전체 LC-MS	단백질 이름
BCL3	4/4	B-cell CLL/lymphoma3
CTBP1	4/4	C-terminal binding protein 1
NFKB1	3/4	p50
NFKB2	3/4	p52
RUVBL1	3/4	Pontin (RuvB-like1)
RUVBL2	3/4	Reptin(RuvB-like2)

[0067] Flag-Bcl3는 HEK293 세포에서 일시적으로 발현되었으며, 세포 과쇄물은 항-Flag 항체와 30분동안 반응시키고 Flag 썬타이드를 이용하여 용출하였다. LC-MS/MS로 용출을 분석하였다. 전체 프로세스는 4회 반복하였으며, 각 단백질의 빈도수를 명시하였다.

[0068] Bcl3의 결합 파트너로 알려진 p50, p52, reptin, 및 pontin의 존재는 본 발명자들의 정제 데이터가 타당하다는 것을 입증하였다[14,15]. Bcl3 및 CtBP1 양자 모두가 세포사멸 억제 효과를 발휘한다고 알려져 있기 때문에 CtBP를 확인 한 것은 흥미로운 일이었다[7,10]. Bcl3 및 CtBP1의 상호 결합은 면역침전법에 의한 내생 수준(endogenous level)에서 입증하였다(도 1A). Bcl3 및 CtBP1의 직접 결합은 GST 풀-다운(pull-down) 분석 시험으로 확인하였다(도 1B). CtBP1과의 결합에 관여하는 Bcl3 부위를 좁히기 위해, Bcl3 제거 돌연변이를 이용하여 GST 풀-다운 분석 시험을 수행하였다. Bcl3의 C-말단 부위 제거시(Bcl3 DC) 여전히 CtBP1에 결합하였으나, N-말단 부위를 추가 제거시(Bcl3 DNDC) 결합력을 상실하였다(도 1C). 상기의 결과는 Bcl3의 N-말단 부위가 Bcl3 및 CtBP1의 상호작용을 중재한다는 것을 시사하는 것이었다.

[0069] 이러한 점에 있어서, 본 발명자들은 Bcl3의 N-말단 부위에 위치하고 있는 PXDLS/R 서열을 인식하였다. PXDLS/R 서열은 CtBP1-결합 단백질들이 CtBP1과 결합하도록 하는 CtBP1-결합 단백질 내 공통된 모티프(motif)였다[9](도 1D). Bcl3가 CtBP1에 결합하는 것이 실제로 PXDLS/R 모티프에 의해 중재되는지 여부를 조사하기 위

해, 상기 서열을 PVASR로 돌연변이 시켜 보았다. 이러한 돌연변이는 E1A가 CtBP1에 결합하지 못하는 E1A 공통 모터프에서와 아미노산의 변화가 동일한 것이다. 야생형 Bcl3(Bcl3 WT)는 CtBP1에 결합하였으나, 돌연변이(Bcl3 MT)는 GST 폴-다운(도 1C) 및 공동-면역침전(도 1E) 분석 시험에서 평가된 것처럼 CtBP1과 상호작용하는데 실패하였다. 요컨대, Bcl3의 CtBP1에 대한 직접 결합은 Bcl3의 N-말단 도메인 내 위치하는 PXDLS/R 서열에 의해 중재되는 것을 알 수 있었다.

[0070] 2. Bcl3는 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하여 CtBP1을 안정화시킨다.

[0071] Bcl3 및 CtBP1의 상호작용은 상기 두 항-세포사멸 분자 간 기능적 연결관계를 시사하였다. 세포사멸 유도 유전자의 억제에는 CtBP1이 요구되기 때문에, 유비퀴틴화에 의한 CtBP1의 분해는 세포사멸 촉진에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다[12]. Bcl3가 유비퀴틴화에 의해 p50 호모다이머(homodimer)의 턴오버(turnover)를 조절하는 것으로 나타났기 때문에[17], 본 발명자들은 Bcl3가 CtBP1의 유비퀴틴화를 조절하여 CtBP1의 안정화를 조절할 것이라고 가정하였다.

[0072] Bcl3가 CtBP1의 안정화를 조절하는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 U2OS 세포에 프로테아좀 저해제인 MG132를 처리한 후, CtBP1 및 Bcl3의 발현 수준을 측정하였다(도 2A). 흥미롭게도, siRNA로 닉다운(knockdown)시킨 Bcl3는 CtBP1 단백질 수준을 감소시켰으나, MG132 처리 시 CtBP1의 하향조절을 억제하였다. 비록 Bcl3는 CtBP1의 단백질 수준을 조절하였으나, CtBP1의 전사 수준은 Bcl3에 대한 siRNA에 의해 영향을 받지 않았다(도 2B). 상기의 데이터는 Bcl3에 의해 단백질 수준에서 CtBP1을 조절하는 것은 프로테아좀-의존 방법으로 단백질 안정성을 조절하여 달성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0073] 다음으로, 본 발명자들은 Bcl3가 CtBP1 유비퀴틴화를 직접적으로 조절하는지 여부를 조사하기 위한 인 비보 유비퀴틴화 분석시험을 실시하였다. Bcl3 WT은 거의 완벽하게 CtBP1 유비퀴틴화를 억제하였음에도 불구하고, Bcl3의 CtBP1-결합 돌연변이는 유비퀴틴화를 차단하는데 실패하였다(도 2C). 상기의 데이터는 Bcl3가 PVDLR 서열을 이용하여 CtBP1에 직접적으로 결합하여 CtBP1의 유비퀴틴화를 차단하며, 이는 CtBP1 안정성의 증가를 유도한다는 것을 시사한다.

[0074] Bcl3의 하향조절은 CtBP1의 안정성을 감소시키는데 충분하였기 때문에, Bcl3가 CtBP1에 대한 유비퀴틴 기작을 조절하는 게이트키퍼(gatekeeper)로 작용하리라 생각되었다. UV 조사 시 프로테아좀-중재 경로를 통하여 CtBP1 수준이 감소된다는 것이 보고되었다[12]. 따라서, 본 발명자들은 CtBP1이 Bcl3로부터 어떻게 방출되는지 및 이러한 방출이 어떻게 세포사멸 자극에 CtBP1의 분해를 유도하는지 의문을 갖게 되었다. 상기의 경로를 연구하기 위하여, 본 발명자들은 UV 처리시 Bcl3 mRNA 및 단백질 수준을 감소시키는지 여부를 조사하였다. UV 처리 강도 증가 시 용량 의존적 방법으로 Bcl3 mRNA 수준을 감소시켰다(도 2D). 50 J/m²로 UV 처리 후 8시간 배양한 경우 Bcl3 단백질 수준에서 약간의 증가를 나타내었으나, 2000 J/m²로 UV 처리 시 Bcl3 단백질 수준의 감소는 Bcl3 전사 수준의 감소를 반영하였다(도 2E). 상기의 결과는 본 발명자들이 이전에 보고한 40 J/m² UV 가 Bcl3를 안정화시키고 단백질 수준을 증가시킨다는 내용과 부합하였다[7]. 주목할 점은 2000 J/m²로 UV 처리 시 Bcl3 단백질이 감소되었을 때 CtBP1 단백질 수준이 이에 대응하여 감소되었다는 것이다(도 2E). 요컨대, 상기 데이터는 세포사멸 자극이 Bcl3의 하향조절을 유도하고 CtBP1이 분해되도록 하는 것을 나타낸다.

[0075] 대조적으로, 이소성(ectopic)의 Bcl3의 도입은 세포사멸 자극에 대하여 CtBP1을 안정화 시켰다. Bcl3 WT의 과발현은 또 다른 세포사멸-유도 시약인 에토포사이드(etoposide)의 처리 후에도 CtBP1 단백질 수준을 유지하였다(도 2F). 게다가, CtBP1 단백질 수준의 시간-경로 검출은 Bcl3 WT의 과발현이 CtBP1의 분해를 차단하는 반면에, Bcl3 MT는 CtBP1의 안정화에 실패하여 CtBP1이 분해되도록 한다는 것을 확인하였다(도 2G 및 H). 상기의 결과는 CtBP1 분해의 억제가 Bcl3 및 CtBP1 간 직접결합에 의해 중재된다는 것을 뒷받침한다.

[0076] 3. Bcl3는 CtBP1-중재 세포사멸 반응에 길항작용한다.

[0077] CtBP1는 세포사멸 유도 유전자를 억제한다고 보고되었기 때문에, 본 발명자들은 Bcl3가 CtBP1 분해를 억제함으로써 세포사멸 반응을 차단할 것이라는 가정을 세웠다. Bcl3에 의한 CtBP1 안정화 결과를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 세포사멸 유도 CtBP1 타겟 유전자인 p21 및 NOXA의 전사 수준을 측정하였는데, 이들은 CtBP1 분해에 기인한 세포사멸 자극으로 유도되는 유전자들이다[10]. 실시간 RT-PCR 분석은 Bcl3 WT의 과발현이 에토

포사이드 처리 시에도 p21 및 NOXA의 유도를 유의하게 감소시킨 반면, Bcl3 MT가 과발현 되었을 때 상기 억제가 거의 나타나지 않았다는 것을 나타내었으며(도 3A), 이는 CtBP1-의존 세포사멸 유도 유전자의 억제에 Bcl3 및 CtBP1 간 상호작용이 요구된다는 것을 시사한다. 상기 상호작용은 명확하게 CtBP1-의존 세포사멸 유도 유전자를 조절하였으나, PUMA로 예시된 CtBP1-비의존 세포사멸 유도 유전자 조절[10]은 영향 받지 않았다(도 3B).

[0078] Bcl3이 CtBP1을 통해 세포사멸 유도 유전자의 유도를 억제하는 지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 UV 조사를 이용하여 *ctbp*^{+/-} 및 *ctbp*^{-/-} MEFs를 자극하였다. Bcl3 WT 과발현은 *ctbp*^{+/-} MEFs에서 NOXA의 UV-자극 유도를 억제하였으나, Bcl3 MT의 과발현은 그러하지 않았다(도 3C). 그러나, 대조군, Bcl3 WT-과발현, 및 Bcl3 MT-과발현 *ctbp*^{-/-} MEFs 간에는 차이가 거의 또는 전혀 관찰되지 않았다(도 3C). 상기의 데이터는 Bcl3가 CtBP1에 결합함으로써 세포사멸 유도 유전자의 도입을 억제한다는 가설을 지지한다. Bcl3에 의한 NOXA의 억제가 작동 가능한 p53이 없는 H1229 세포(ATCC)내에서 유지되었으므로, Bcl3의 CtBP1-중재 항-세포사멸 역할은 p53에 독립적인 것으로 보였다(도 3D).

[0079] 게다가, FACS 분석은 Bcl3에 의한 세포사멸의 CtBP1-중재 억제를 공고히 하였다. *ctbp*^{+/-} MEFs에서 Bcl3 WT의 과발현은 세포사멸 세포의 sub-G1을 감소시켰으나, Bcl3 MT의 과발현은 대조군과 비교하여 식별가능한 변화를 유발하지 못하였다(도 3E). 상기의 데이터는 Bcl3가 CtBP1에 직접적으로 결합하여 세포사멸을 차단하며, Bcl3의 항-세포사멸 기능은 CtBP1의 안정화에 의해 적어도 부분적으로는 중재된다는 것을 시사한다.

[0080] 4. 유방암 조직에서 증가된 Bcl3 및 CtBP1 단백질 수준 간 양의 상관관계

[0081] 세포사멸의 적시 조절이 파괴되면, 세포들은 암으로 보다 진행되는 경향이 있다[1]. Bcl3가 유방암을 포함하는 암 전반에 걸쳐 상향조절된다는 점을 고려하여[5], 본 발명자들은 유방암에서 CtBP1의 단백질 수준이 Bcl3의 단백질 수준과 양의 상관관계가 있는지 여부를 조사하였다. 다양한 유방암 세포주에서, Bcl3 및 CtBP1의 내생 단백질 수준을 조사하였다(도 4A). 기대했던 바와 같이, Bcl3의 수준은 정상 유방 세포주(MCF10A)에서 보다 암 세포주(MCF7, HCC1419, HCC38, BT20, 및 KPL4(ATCC))에서 높았다. Bcl3 및 CtBP1의 단백질 수준간 양의 상관관계는 MCF7 세포에서 Bcl3의 너다운 이후 CtBP1 하향조절에 의해 입증되었다(도 4B).

[0082] 유방암의 진행에 있어서 CtBP1의 Bcl3-의존 조절의 관련성은 임상적 증거에 의해 보다 뒷받침 되었다. Bcl3 및 CtBP1의 단백질 수준은 12명의 인간 유방암 조직 샘플 및 이에 대응한 정상 점막 표본을 이용하여 조사하였다(도 4C). 12개의 시료 중 9개에서, 정상 점막 보다 유방암 표본의 Bcl3가 더 발현되었다(도 4C 및 D). 주목할 만하게도, Bcl3 단백질이 증가된 거의 모든 샘플에서, CtBP1 단백질 또한 증가되었다(도 4C 및 E). 유방암 조직 표본에서 Bcl3 및 CtBP1 단백질 수준 간 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 나타내었다(도 4F). 상기의 데이터는 인간 유방암에서 CtBP1 단백질 수준이 Bcl3의 단백질 수준과 아주 높게 상관되어 있다는 것을 증명한다. 요컨대, 상기의 증거는 Bcl3에 의한 CtBP1의 안정화가 Bcl3의 원종양 형성 유전자 작용의 기저를 이루는 강력한 분자적 메커니즘이 될 가능성을 나타내는 것이다.

[0083] **결론**

[0084] 본 발명은 Bcl3 및 CtBP1이라는 두 항-세포사멸 분자간 신규한 연결관계 및 종양형성의 기저를 이루는 분자적 메커니즘에 대한 해석을 제공한다. 암에 있어서 비정상적인 Bcl3 상향조절은 Bcl3의 원종양 형성 유전자 기능에 어떻게 연관되는지 Bcl3의 결합 파트너인 CtBP1의 유비퀴틴화를 억제하는 Bcl3의 보호 기능에 의해 적어도 부분적으로는 설명될 수 있다. 게다가, 본 발명자들은 CtBP1 유비퀴틴화에 대한 신규한 억제 경로를 찾아내었다. 본 발명은 CtBP1 기능 조절 및 암의 진행에 있어 단백질 기능들의 복잡한 상호작용을 밝힌다. 본 발명의 임상적 적용은 신규한 치료 타겟으로서 Bcl3 및 CtBP1을 채택하여 암 치료방법을 개발하는데 있어서 새로운 통로를 제공할 것이다.

[0085] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0086] 참조 문헌

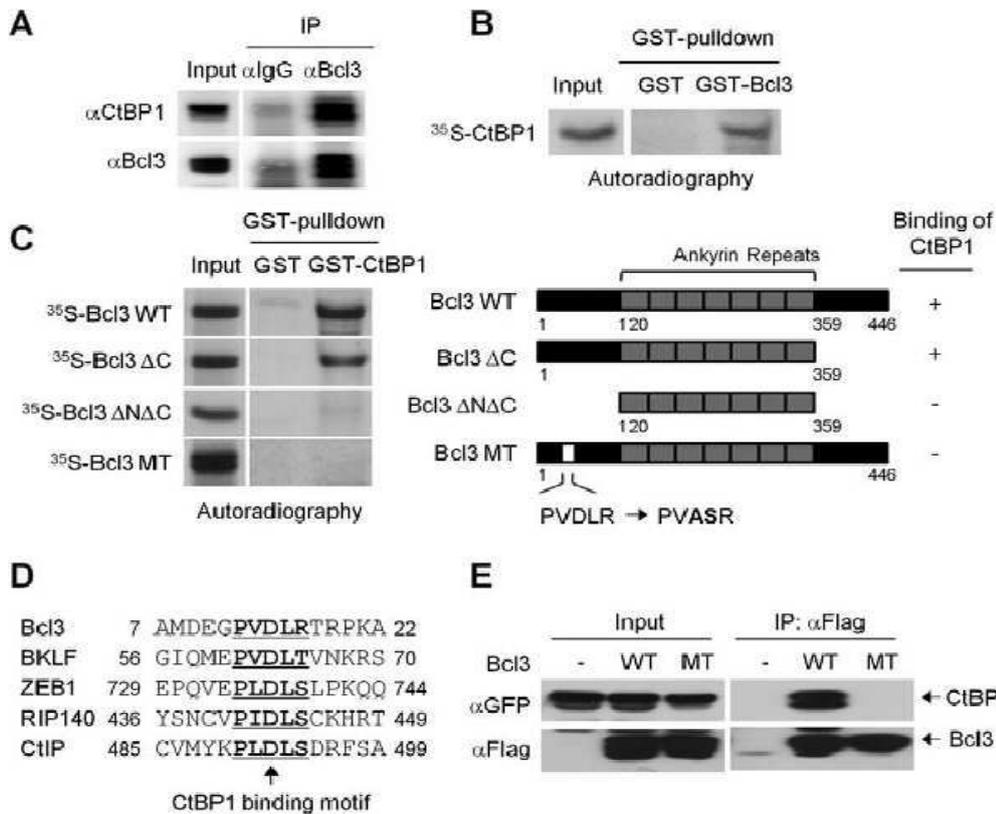
- [0087] [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* 100 (2000) 57-70.
- [0088] [2] R.W. Johnstone, A.A. Ruefli, S.W. Lowe, Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy, *Cell* 108 (2002) 153-164.
- [0089] [3] M. Corazzari, P.E. Lovat, S. Oliverio, F. Di Sano, R.P. Donnorso, C.P. Redfern, M. Piacentini, Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331 (2005) 810-815.
- [0090] [4] H. Ohno, G. Takimoto, T.W. McKeithan, The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control, *Cell* 60 (1990) 991-997.
- [0091] [5] P.C. Cogswell, D.C. Guttridge, W.K. Funkhouser, A.S. Baldwin Jr., Selective activation of NF-kappa B subunits in human breast cancer: potential roles for NF-kappa B2/p52 and for Bcl-3, *Oncogene* 19 (2000) 1123-1131.
- [0092] [6] S.U. Ahmed, J. Milner, Basal cancer cell survival involves JNK2 suppression of a novel JNK1/c-Jun/Bcl-3 apoptotic network, *PLoS One* 4 (2009) e7305.
- [0093] [7] D. Kashatus, P. Cogswell, A.S. Baldwin, Expression of the Bcl-3 proto-oncogene suppresses p53 activation, *Genes Dev.* 20 (2006) 225-235.
- [0094] [8] T. Subramanian, M. La Regina, G. Chinnadurai, Enhanced ras oncogene mediated cell transformation and tumorigenesis by adenovirus 2 mutants lacking the C-terminal region of Ela protein, *Oncogene* 4 (1989) 415-420.
- [0095] [9] G. Chinnadurai, CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis, *Mol. Cell* 9 (2002) 213-224.
- [0096] [10] M. Grootclaes, Q. Deveraux, J. Hildebrand, Q. Zhang, R.H. Goodman, S.M. Frisch, C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 4568-4573.
- [0097] [11] Q. Zhang, Y. Yoshimatsu, J. Hildebrand, S.M. Frisch, R.H. Goodman, Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP, *Cell* 115 (2003) 177-186.
- [0098] [12] Q. Zhang, A. Nottke, R.H. Goodman, Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 2802-2807.
- [0099] [13] T. Natsume, Y. Yamauchi, H. Nakayama, T. Shinkawa, M. Yanagida, N. Takahashi, T. Isobe, A direct nanoflow liquid chromatography.tandem mass spectrometry system for interaction proteomics, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4725-4733.
- [0100] [14] R. Dechend, F. Hirano, K. Lehmann, V. Heissmeyer, S. Ansieau, F.G. Wulczyn, C. Scheidereit, A. Leutz, The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators, *Oncogene* 18 (1999) 3316-3323.
- [0101] [15] J.H. Kim, B. Kim, L. Cai, H.J. Choi, K.A. Ohgi, C. Tran, C. Chen, C.H. Chung, O. Huber, D.W. Rose, C.L. Sawyers, M.G. Rosenfeld, S.H. Baek, Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes, *Nature* 434 (2005) 921-926.
- [0102] [16] M.L. Grootclaes, S.M. Frisch, Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis, *Oncogene* 19 (2000) 3823-3828.
- [0103] [17] R.J. Carmody, Q. Ruan, S. Palmer, B. Hilliard, Y.H. Chen, Negative regulation of toll-like

receptor signaling by NF-kappaB p50 ubiquitination blockade, Science 317 (2007) 675-678.

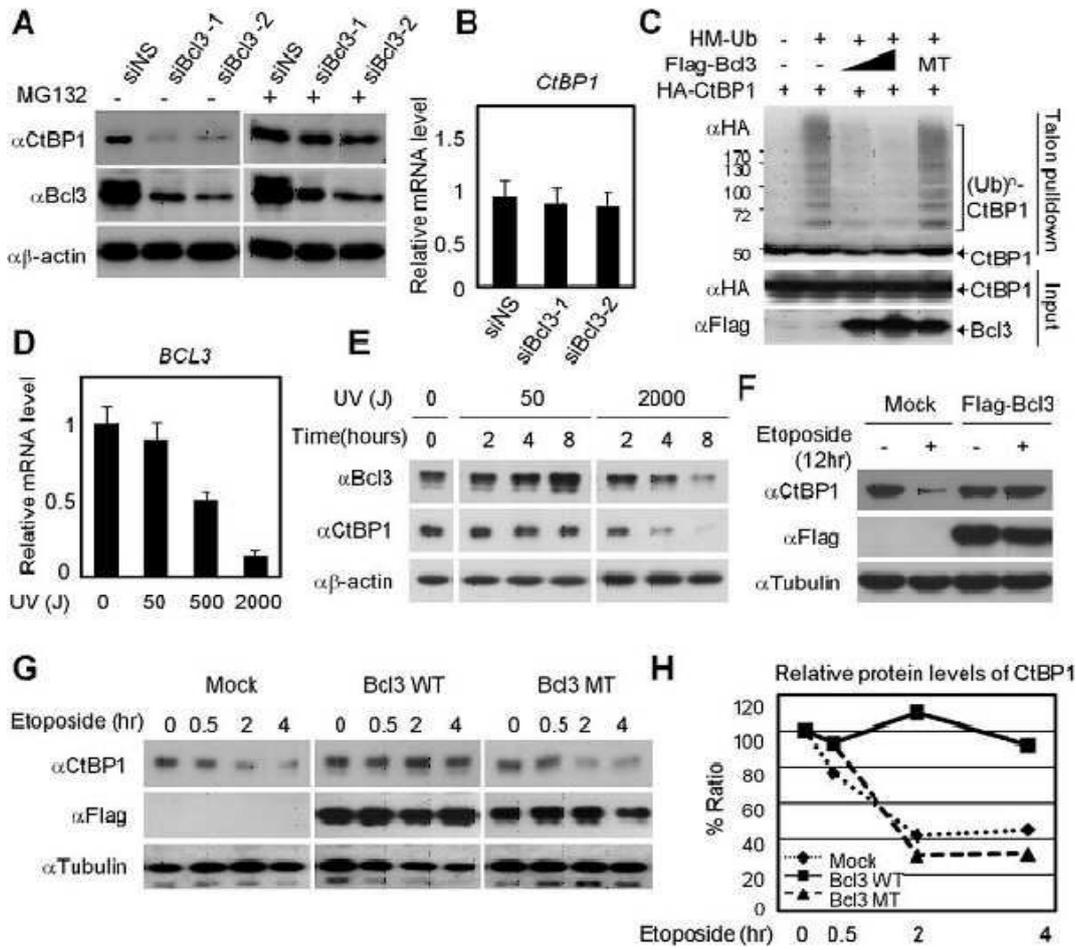
- [0104] [18] A. Keutgens, K. Shostak, P. Close, X. Zhang, B. Henny, M. Aussems, J.P. Chapelle, P. Viatour, A. Gothot, M. Fillet, A. Chariot, The repressing function of the oncoprotein BCL-3 requires CtBP, while its polyubiquitination and degradation involve the E3 ligase TBLR1, Mol. Cell Biol. 30 (2010) 4006-4021.
- [0105] [19] B.H. O' Neil, P. Buzkova, H. Farrah, D. Kashatus, H. Sanoff, R.M. Goldberg, A.S. Baldwin, W.K. Funkhouser, Expression of nuclear factor-kappaB family proteins in hepatocellular carcinomas, Oncology 72 (2007) 97-104.
- [0106] [20] N.J. Thornburg, R. Pathmanathan, N. Raab-Traub, Activation of nuclear factor-kappaB p50 homodimer/Bcl-3 complexes in nasopharyngeal carcinoma, Cancer Res. 63 (2003) 8293-8301.
- [0107] [21] S.Y. Wang, M. Iordanov, Q. Zhang, C-Jun NH2-terminal kinase promotes apoptosis by down-regulating the transcriptional co-repressor CtBP, J. Biol. Chem. 281 (2006) 34810-34815.
- [0108] [22] S. Paliwal, S. Pande, R.C. Kovi, N.E. Sharpless, N. Bardeesy, S.R. Grossman, Targeting of C-terminal binding protein (CtBP) by ARF results in p53-independent apoptosis, Mol. Cell Biol. 26 (2006) 2360-2372.

도면

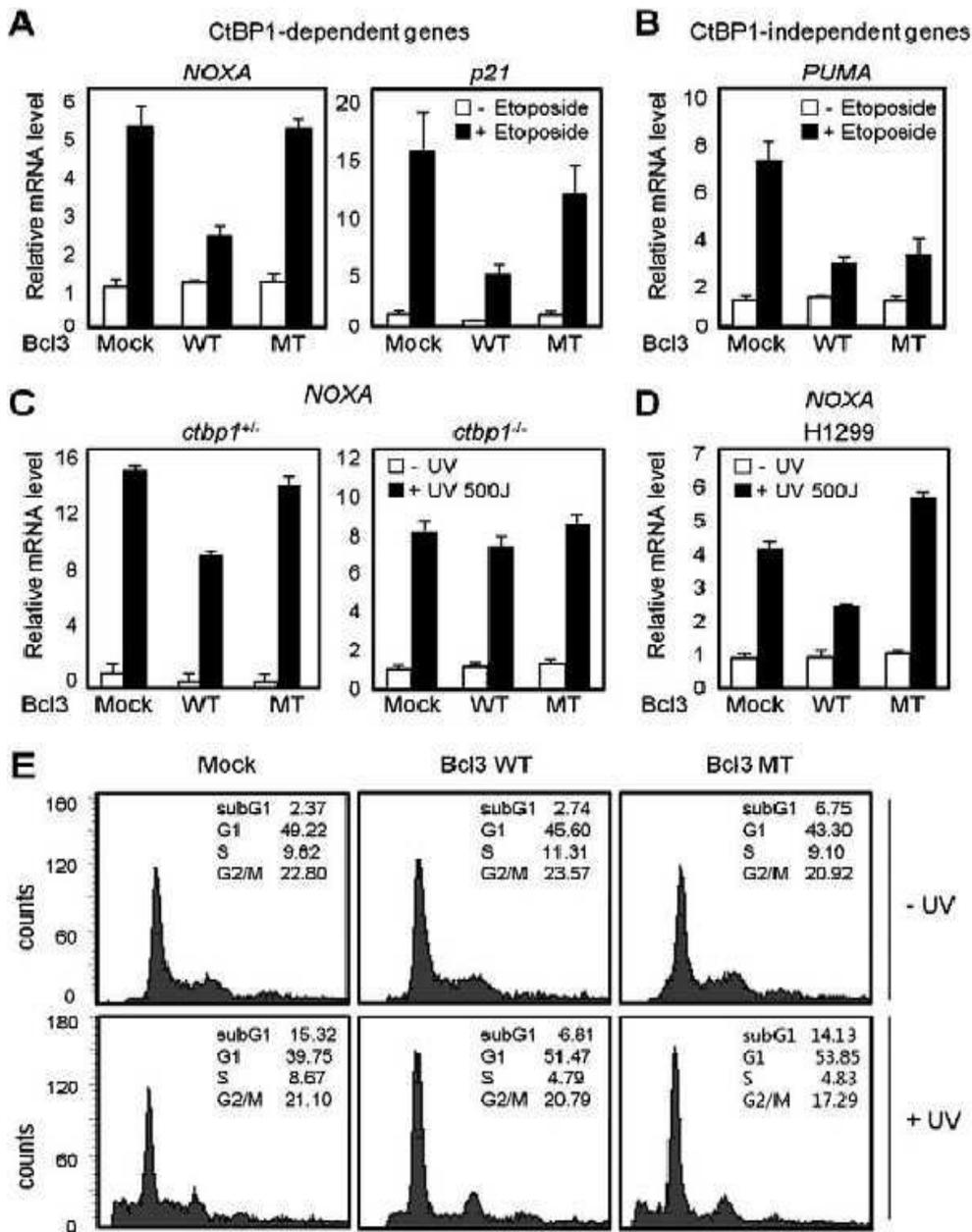
도면1



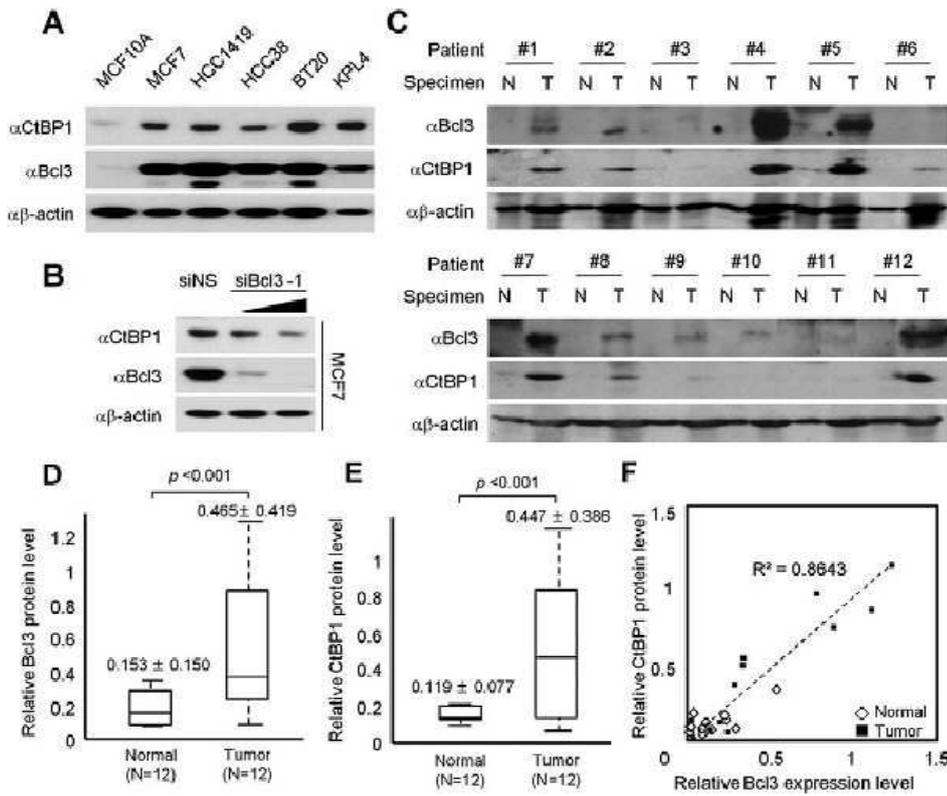
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> SNU R&DB Foundation

<120> Screening Methods of Anti-apoptotic or Pro-apoptotic Agents Using Bcl3

<160> 7

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Arg Cys Pro Ala Gly Ala Met Asp Glu Gly Pro Val Asp Leu

1 5 10 15

Arg Thr Arg Pro Lys Ala Ala Gly Leu Pro Gly Ala Ala Leu Pro Leu

20 25 30

Arg Lys Arg Pro Leu Arg Ala Pro Ser Pro Glu Pro Ala Ala Pro Arg

35 40 45

Gly Ala Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Asp Pro Leu Arg Gly Gly Cys

305 310 315 320
 Leu Leu Pro Leu Val Arg Thr Leu Val Arg Ser Gly Ala Asp Ser Ser

 325 330 335
 Leu Lys Asn Cys His Asn Asp Thr Pro Leu Met Val Ala Arg Ser Arg
 340 345 350
 Arg Val Ile Asp Ile Leu Arg Gly Lys Ala Thr Arg Pro Ala Ser Thr
 355 360 365
 Ser Gln Pro Asp Pro Ser Pro Asp Arg Ser Ala Asn Thr Ser Pro Glu
 370 375 380
 Ser Ser Ser Arg Leu Ser Ser Asn Gly Leu Leu Ser Ala Ser Pro Ser
 385 390 395 400

Ser Ser Pro Ser Gln Ser Pro Pro Arg Asp Pro Pro Gly Phe Pro Met
 405 410 415
 Ala Pro Pro Asn Phe Phe Leu Pro Ser Pro Ser Pro Pro Ala Phe Leu
 420 425 430
 Pro Phe Ala Gly Val Leu Arg Gly Pro Gly Arg Pro Val Pro Pro Ser
 435 440 445
 Pro Ala Pro Gly Gly Ser

450
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CtBP1-F

<400> 2
 ggtcctgaac gaggctgtg
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CtBP1-R
 <400> 3

tgttgtcaaa accactgcca a 21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p21-F

<400> 4

gcagaccagc atgacagatt tc 22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> p21-R

<400> 5

ggattagggc ttctcttgg a 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NOXA-F

<400> 6

caaactgaac ttccggcaga a 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NOXA-R

<400> 7

tcccctcatg caagtttttg a 21