

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0018005 (43) 공개일자 2013년02월20일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0080801 (22) 출원일자 2011년08월12일 심사청구일자 2011년08월12일		(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 손형진 서울특별시 용산구 서빙고로 35, 용산시티파크1단지아파트 102동 3402호 (한강로3가) 김경희 경기도 성남시 분당구 서현로429번길 28-2 (분당동) 심정희 서울특별시 강남구 압구정로33길 70, 구현대아파트 55동 505호 (압구정동) (74) 대리인 손민

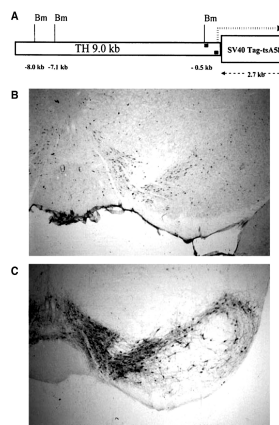
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 이상 모델 세포로서의 PINK1 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주**

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 이상 모델 세포로서의 PINK1 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주에 관한 것이다. 본 발명의 PINK1-, 또는 PINK1- 및 DJ1-유전자를 결실시킨 불멸화 도파민성 신경 세포주는 비도파민신경세포 및 PINK1 녹아웃 동물모델 (복합체 I 활성의 경미한 저하, 미토콘드리아 형태적 변화 없음)과는 달리, 미토콘드리아 형태적 결함, 복합체 I, II, IV 활성의 급격한 저하, ATP 생산, 산소 소비 속도 저하 등의 표현형이 발생적 보상(developmental compensation)에 의한 희석(masking) 없이 직접적으로 나타나기 때문에, 미토콘드리아의 이상 표현형을 평가하여, 파킨슨병과 연관된 도파민성 신경세포 손실의 주요 병리학적 메커니즘을 분자적 수준에서 특이적으로 연구하고, 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아 이상 관련 질환의 모델로서 치료제 스크리닝 및 연구에 보다 적합하게 사용될 수 있다. 또한, 저비용으로 순수 도파민 신경 세포 다량 확보가 가능하므로, 병리학적 연구, 진단 및 치료제 개발에 필수적인 일차모델세포로서 효과적으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0009233

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 2차 오토파지조절 신규 유전자패밀리에 의한 오토파지 제어기전 및 신경보호연구

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자를 포함하고 PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주로서, 미토콘드리아 이상 특성을 나타내는 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터는 TH(tyrosine hydroxylase) 유전자의 프로모터인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 온도-민감성 변이형 발암유전자는 온도-민감성(ts) 변이형 SV40Tag(Simian virus 40 T antigen)인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 온도-민감성 변이형 발암유전자는 SV40Tag-tsA58인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 불멸화된 도파민성 신경세포주는 DJ-1 유전자가 추가로 결실된 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 불멸화된 도파민성 신경세포주는 미토콘드리아의 형태 결함, 복합체(complex) I, II 또는 IV 활성의 저하, ATP 생산 속도 저하, 및 산소 소비 속도 저하로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 표현형을 나타내는 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 7

제7항에 있어서, 상기 표현형이 계대적으로 안정되어 있는 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자는 도 1A에 기재된 개열지도를 갖는 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 미토콘드리아 이상 모델 세포는 수탁번호 KCTC11982BP로 기탁된 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포.

청구항 10

도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자로 형질전환된 제1 형질전환 비인간동물을 제조하는 단계;

PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 동일 종의 제2 형질전환 비인간 동물을 제조하는 단계;

제1 형질전환 비인간동물 및 제2 형질전환 비인간동물을 교배하여 상기 제1 형질전환 및 제2 형질전환 특성을 모두 가지는 형질전환 배아를 획득하는 단계; 및

상기 배아의 뇌 조직을 온도-민감성 변이형 발암유전자의 허용온도에서 배양하여 온도-민감성 변이형 발암유전

자를 발현하는 불멸화 도파민성 신경 세포를 획득하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터는 TH(tyrosine hydroxylase) 유전자의 프로모터인, 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 온도-민감성 변이형 발암유전자는 온도-민감성(ts) 변이형 SV40Tag(Simian virus 40 T antigen)인, 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 온도-민감성 변이형 발암유전자는 SV40Tag-tsA58인, 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자는 도 1A에 기재된 개열지도를 갖는 것인, 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법.

청구항 15

제1항의 모델 세포에 피검물질을 투여하는 단계; 및

상기 모델 세포에 있어서의 미토콘드리아의 형태 평가, 복합체(complex) I, II 또는 IV 활성 평가, ATP 생산 속도 평가, 및 산소 소비 속도 평가로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 평가를 실시하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 미토콘드리아 이상 관련 질환이 파킨슨병인 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 이상 모델 세포로서의 PINK1 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주에 관한 것이다. 구체적으로는 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자를 포함하고 PINK1 유전자가 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주로서, 미토콘드리아 이상 특성을 나타내는 미토콘드리아 이상 모델 세포, 상기 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법, 및 상기 모델 세포를 이용하여 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 1817년 James Parkinson에 의해 최초로 보고된 질병으로서, 중뇌의 흑색질(substantial nigra; SN)에서 도파민성(dopaminergic) 신경세포의 선택적 손실 및 선조체(striatum)의 도파민 결핍으로 인해 운동능력을 상실하는 대표적인 퇴행성 뇌질환의 일종이다. 파킨슨병은 65세 이상 인구의 1%, 85세 이상 인구에서는 5%정도가 발병하는 것으로 보고되고 있다. 특징적인 임상적 증상으로는 떨림(resting tremor), 서행(bradykinesia), 강직(rigidity) 및 자세 불안정(postural instability)을 수반하고, 루이체(Lewy body)로 알려진 신경세포간 단백질집체(intraneuronal proteinous inclusion)의 존재가 대표적인 병리학적 특성이다(Olanow et al., Annu Rev Neurosci 22,123-44).

[0003] 파킨슨병의 발병 원인은 정확히 밝혀지지 않고 있다. 따라서, 현재 파킨슨병 치료법은 매우 제한적이며 발병 이전에 따른 세부적인 치료법이 발견되어지지 않는 실정이다. 최근까지 가장 효율적인 치료법이라고 알려져 있는 방법은 도파민 전구체인 L-dopa를 투여하여 부족한 도파민으로 전환시키는 방법이다. 하지만 이 치료법은 많은 부작용을 초래하기도 한다.

[0004] 대부분의 파킨슨병인 산발형(sporadic form)의 경우 그 원인은 특발성(idiopathic)으로 거의 알려져 있지 않지

만 환경적 요인(environmental factor)들과 아직 완전히 규명되지 않은 유전적 감수성(genetic susceptibility)간의 복잡한 상호작용이 중요한 원인으로 추정되고 있다(Langston et al., Ann Neurol 44(3 Suppl 1): S45-52). 파킨슨병은 유전적 인자에 의해서도 발병되어지는데(familial Parkinson's disease), 지금까지 파킨슨병과 관련된 유전자로는 Polymeropoulos등에 의해서 α -synuclein(Science 276 (1997) 2045-2047), C. Paisan-Ruiz등에 의해서 LRRK2(Neuron 44 (2004) 595-600), Kitada등에 의해서 AR-JP를 나타내는 일본 가계의 유전적 결함에 대한 positional cloning(Nature ,392 (1998) 605-608)에 의해서 처음 보고되었다. 또한 Valente등에 의해서 PINK1(Nat. Genet. 38 (2006) 1184-1191), Bonifati등에 의해서 DJ-1(Science 299 (2003) 256-259), 그리고 Ramirez등에 의해서 ATP13A2(Nat. Genet. 38 (2006) 1184-1191)이 보고되어 있다.

[0005] 최근에는 상기 유전자들의 기능 상실시 나타나는 변화들을 통해 신경 보호를 위한 치료제 및 바이오 마커를 발굴하고자 하는 연구들이 시도되고 있다. 상기 유전자에 대하여 형질전환된 파킨슨병 동물 모델이 제작, 연구에 사용되고 있으나, 동물 모델로부터 도파민 신경 세포 확보는 1회성에 불과하고, 분자, 생화학적 연구를 진행하기에 충분한 순수 도파민성 신경 세포를 얻기란 어려운 실정이다. 또한, 동물 모델로부터 획득한 도파민 신경 세포라고 하더라도 혼합배양이어서, 반복적이고 대규모 분자수준 분석이 필요한 병리학적 연구, 진단 및 치료제 개발에는 부적합하다.

[0006] 세포 수준에서의 연구를 진행하기 위하여 현재 보편적으로 사용되고 있는 도파민성 신경 세포는 MES23.5 세포, MN9D 세포, PC12 세포, SHSY5Y 세포와 CATH.a 세포 등이 있다. 그러나 이들 세포 모델들은 도파민 신경 세포만의 세포내 환경이 유지되지 못하고 있으며 세포의 기원이 전혀 다르거나 또는 융합된 세포의 유전적 특성을 함께 보유하고 있다. 또한 특정 유전자 적중된 세포 모델을 통해 연구되어지고 있는데 이들 대부분은 유전자 상실 이 아닌 siRNA와 같은 유전자 부분 상실을 일으킨 세포 모델로써 완벽한 유전자 기능 소실시 나타날 수 있는 변화에 대한 타겟 발굴에는 미흡한 점이 있다. 또한, 줄기세포주를 이용한 모델도 공지되어 있지만, 이 경우도 도파민 신경분화 효율이 30% 미만으로 낮고 다른 신경 및 글리아세포 분화도 동시에 발생해 순수 도파민성 신경 세포의 다량 확보가 어려워 병리학적 연구, 진단 및 치료제 개발에는 부적합하다.

[0007] 한편, 파킨슨병을 비롯한 도파민성 신경세포 손실의 주요 병리학적 메커니즘에 대하여 미토콘드리아의 기능 장애가 기여한다고 알려진데 반해 이러한 미토콘드리아 기능 장애의 본질과 심각성은 도파민성 신경세포 모델의 부족으로 아직 밝혀지지 않고 있다. 구체적으로, 다음과 같은 이유로 인하여 미토콘드리아 기능 장애의 본질과 심각성은 아직 밝혀지지 않고 있다. 첫째, 파킨슨병과 파킨슨병 모델 샘플에서의 도파민성 신경세포의 부족으로 인해 기능적 분석을 위한 충분한 미토콘드리아 획득이 지극히 어렵다. 둘째, SN 조직 호모제네이트에서 일어나는 희석 효과가 특별히 도파민에 반응하는 신경세포에서의 미토콘드리아 활성의 정량적 분석을 방해한다. 마지막으로, PINK1과 DJ-1 같은, 가족력적 파킨슨병과 연관된 유전자의 녹아웃 마우스 모델에서 사실상의 병리표현 형이 발생적 보상 (developmental compensation)에 의해 종종 가리워진다. 그 결과 파킨슨병에서 미토콘드리아 결손을 완화시킬 신경보호적 치료법을 위한 어떤 치료상의 타겟도 제시되지 못하고 있다.

[0008] 지금까지 미토콘드리아 이상은 파킨슨병의 형질전환 마우스와 초파리 모델, 인간 환자의 다양한 비-도파민성 조직에서 주로 보고되어왔다. 가족력적 파킨슨병의 경우 PINK1-, DJ-1-, 또는 parkin-결핍이 미토콘드리아 이상과 연관되어있는 것으로 알려졌다. 특히 복합체 I의 활성화에 있어서 완전한 감소가 PINK1 돌연변이를 가진 파킨슨병 환자로부터의 섬유아세포 배양조직에서 보여졌다. 또한, PINK1 녹아웃 마우스는 선조체(striatal) 미토콘드리아 초미세구조의 총체적 변화없이 복합체 I 활성화의 완전한 감소를 보이고, PINK1 녹아웃 초파리는 형태상의 변화 없이 복합체 I 결핍을 보였다. DJ-1 녹아웃 마우스의 경우에는, 아마도 발생적 보상 (developmental compensation)으로 인해, 어떠한 두드러진 미토콘드리아의 결함도 밝혀지지 않고 있으나, 산화적 자극과 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 (MPTP)에 민감하며, 이들은 미토콘드리아에 작용하는 것으로 알려져있다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 파킨슨병을 비롯한 도파민성 신경세포 손실의 주요 병리학적 메커니즘을 더욱 특이적으로 연구하고 미토콘드리아의 이상을 평가하기 위하여 PINK1-, 또는 PINK1- 및 DJ1-유전자를 상실시킨 불멸화 도파민성 세포주를 제작하고, 이를 이용하여 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아 이상 관련 질환의 모델 세포로서 사용할 수 있고, 상기 질환의 치료, 예방 및 병의 진행완화를 위한 치료약물 탐색과 임상진단에 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 용

합 유전자를 포함하고 PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주로서, 미토콘드리아 이상 특성을 나타내는 미토콘드리아 이상 모델 세포를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자로 형질전환된 제1 형질전환 비인간동물을 제조하는 단계; PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 동일 종의 제2 형질전환 비인간 동물을 제조하는 단계; 제1 형질전환 비인간동물 및 제2 형질전환 비인간동물을 교배하여 상기 제1 형질전환 및 제2 형질전환 특성을 모두 가지는 형질전환 배아를 획득하는 단계; 및 상기 배아의 뇌 조직을 온도-민감성 변이형 발암유전자의 허용온도에서 배양하여 온도-민감성 변이형 발암유전자를 발현하는 불멸화 도파민성 신경 세포를 획득하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또다른 목적은 상기 모델 세포에 피검물질을 투여하는 단계; 및 상기 모델 세포에 있어서의 미토콘드리아의 형태 평가, 복합체(complex) I, II 또는 IV 활성 평가, ATP 생산 속도 평가, 및 산소 소비 속도 평가로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 평가를 실시하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 하나의 양태로서, 본 발명은 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자를 포함하고 PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주로서, 미토콘드리아 이상 특성을 나타내는 미토콘드리아 이상 모델 세포를 제공한다.

[0014] 본 발명에서 용어 "도파민성 신경세포-특이적인 프로모터"는 도파민성 신경세포에서 특이적으로 발현되는 유전자의 프로모터일 수 있으며, 특히 TH(tyrosine hydroxylase) 유전자의 프로모터일 수 있다. 상기 프로모터는 발암유전자를 도파민성 신경세포에서만 특이적으로 발현시키기 위한 것으로서, 도파민성 신경 세포만을 불멸화하여 순수하게 분리된 세포주를 생산하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명에서 용어 "온도-민감성 변이형"은 허용온도에서는 야생형과 동일하거나 유사한 수준의 표현형이 나타나는 반면, 비허용온도에서는 변이형의 표현형이 나타나는 조건부 변이형을 의미할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 용어 "온도-민감성 변이형 발암유전자"는 허용온도에서는 야생형과 동일하거나 유사한 수준으로 발암유전자가 발현되는 반면, 비허용온도에서는 발암유전자가 발현되지 않는 변이형 발암유전자를 의미할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 온도-민감성(ts) 변이형 SV40Tag(Simian virus 40 T antigen), 특히, SV40Tag-tsA58를 사용하였다. 상기 본 발명의 구체적인 실시예에 따른 온도-민감형 변이형 발암유전자는 허용온도가 33℃이고, 비허용온도가 38-39℃이다. 이는 본 발명의 불멸화 도파민성 신경세포주를 제조하기 위하여, 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자로 형질전환된 형질전환 마우스를 교배하여 형질전환 배아를 획득할 때까지는, 마우스의 체온(39℃)에서 SV40Tag를 불활성화시킴으로써 암세포 발생을 막아 동물을 정상적으로 유지, 교배하고, 필요시에만 형질전환 세포들을 허용온도(33℃)에서 배양하여 목적 세포의 불멸화를 유도하기 위한 것이다.

[0017] 본 발명에서 용어 "도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자"는 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 서열과 온도-민감성 변이형 발암유전자 서열을 작동 가능하게 연결한 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 "작동가능하게 연결(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 제조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다. 본 발명의 구체적 실시예에서는 온도-민감성 변이형 발암유전자인 SV40Tag-tsA58에 융합된 9.0 kb의 5' TH 프로모터 영역으로 구성된 DNA 구조물로서, 도 1A와 같이 TH9.0-SV40Tag-tsA58를 제작하였다.

[0018] 본 발명에서 용어 "PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자"는 세포스트레스 중 미토콘드리아를 보호하는 데 연관되는 것으로 알려진 미토콘드리아 키나아제 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있고, 특히, 마우스 유래 세포 모델을 제조하는 경우 4번 염색체 상에 존재하는 유전자로서 NCBI Gene ID: 68943 유전자를 의미할 수 있다.

- [0019] 본 발명에서 용어 "PINK1 유전자 결실"은, 게놈 DNA 상에서 해당 유전자가 특이적으로 결손된 것을 의미할 수 있으며, 게놈상에서 목적한 유전자만의 특이적 결손(결실)은 당 분야에서 확립된 방법을 통하여 수행할 수 있고, 방법은 특별히 제한되지 않는다. 상동 재조합(homologous recombination)법을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서는 Xiong, H. et al., 2009. J Clin Invest, 119, 650-660를 참고하여 결실시켰다. 구체적으로, Pink1 로커스에 있는 엑손 4-7 및 엑손 8의 코딩 부분을 포함하는 5.6-kb 게놈 영역을 FRT 서열이 옆에 배치된 PGK-neo-polyA 선택 카세트에 치환함으로써 PINK1 유전자 결실을 수행하였다. 사용되는 선별마커(selection marker)는 이에 제한되지 않고, 약물 내성, 영양 요구성, 세포독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "도파민성 신경세포"는 주요 신경전달물질이 도파민인 신경세포를 의미할 수 있고, 중뇌의 복측피개영역(ventral tegmental area, VTA), 흑색질 치밀부(substantia nigra pars compacta), 시상하부 궁상핵(arcuate nucleus of the hypothalamus)에 위치할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "불멸화 도파민성 신경세포주"는 발암 유전자 발현으로 인하여 불멸화된 도파민성 신경세포주를 의미할 수 있으며, 비인간 동물 유래 도파민성 신경세포주이며, 바람직하게는 마우스 유래 도파민성 신경 세포주일 수 있다. 본 발명의 불멸화 도파민성 신경세포주는 배아 초기 발생 단계의 배아 SN으로부터 유래된 도파민성 신경 전구 세포일 수 있다. 본 발명의 불멸화 도파민성 신경세포주는 목적 표현형이 계대적으로 안정되어 있는 장점이 있다. 상기와 같이 확보된 PINK1 유전자 결실 불멸화 도파민성 신경세포주는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures(KCTC))에 2011년 7월 14일자로 기탁번호 KCTC11982BP로 기탁하였다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "미토콘드리아 이상 특성"은 미토콘드리아 관련 형태적, 기능적 이상을 의미할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서, PINK1 유전자 결실된 불멸화 도파민성 신경세포주는 미토콘드리아의 형태적 결함, 복합체(complex) I, II 또는 IV 활성의 저하, ATP 생산 속도 저하, 및 산소 소비 속도 저하의 표현형을 나타내었다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시예에서, PINK1-결실 불멸화 도파민성 신경 세포를 확립한 후, 먼저 PINK1 결여가 산화 스트레스 또는 ROS를 증가시키는지를 확인하였다. ROS의 세포내 축적은 형광 DCF의 증가로 보여지는 것과 같이 PINK1-결실 신경세포 모두에서 명확하였다(도 2A). 또한, 복합체 I, II 및 IV와 같은 ETC 효소의 활성을 측정된 결과, PINK1-결실 도파민성 신경세포들은, 야생형 도파민성 신경세포들과 비교하여, 복합체 I, II 및 IV의 활성에서 각각 28%, 39%와 59%로 현저한 감소를 보였다(도 5A). 또한, 산소 소모율 및 ATP 생산을 관련하여, PINK1-결실 도파민성 신경 세포는 야생형에 비해 ATP 생산율에서 약 50% 감소되고(도 6A-B) 산소 소모율에서 약 30% 감소되는(도 6C-D) 것을 확인하였다. 또한, 전자 현미경으로 확인한 결과, 야생형 신경세포(도 3A)과 비교하여, PINK1 결실 도파민성 신경 세포의 미토콘드리아는 크리스테의 두드러진 손실과 몇몇 부분 상태 조직에 의해 주로 특징지어지는 미토콘드리아적 손상을 유도한다는 것을 확인하였다(도 3B). PINK1-결실 도파민성 신경 세포에서 손상된 미토콘드리아의 정량 결과, PINK1-결실 도파민성 신경 세포에서 손상된 미토콘드리아의 발생율은 야생형의 것과 비교하여(<10%) 훨씬 더 높았다(82%)(도 4).
- [0024] 본 발명에서 용어 "미토콘드리아 이상 모델 세포"는 미토콘드리아의 이상 표현형을 평가하여, 파킨슨병과 연관된 도파민성 신경세포 손실의 주요 병리학적 메커니즘을 특이적으로 연구하고, 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아 이상 관련 질환의 치료, 예방, 진행완화를 위한 치료약물 탐색과 임상진단모델로서 사용할 수 있는 세포를 의미할 수 있다.
- [0025] 지금까지 특징적인 미토콘드리아 이상은 파킨슨병 환자들과 파킨슨병의 형질전환 마우스와 초파리 모델, 상기 모델에서 얻어진 비도파민성 세포 및 조직 샘플들에서만 보고되어왔다. 예를 들어, PINK1 돌연변이를 가진 파킨슨병 환자로부터의 섬유아세포 배양조직에서 복합체 I의 활성에 있어서 완만한 감소가 나타났다. 또한, PINK1 녹아웃 마우스는 선조체(striatal) 미토콘드리아 초미세구조의 총체적 변화없이 복합체 I 활성의 완만한 감소만을 보였고, PINK1 녹아웃 초파리는 형태상의 변화 없이 복합체 I 결핍만을 보였다.
- [0026] 본 발명의 PINK1 결실 도파민성 신경세포주는 비도파민성 신경세포 모델 및 동물모델과 비교하여, 증가된 ROS 생성, 손상된 크리스테를 비롯한 미토콘드리아 구조적 결함, 복합체 I, II, IV 활성의 급격한 저하(40-60%), ATP 생산, 산소 소비 속도 저하(각각 50%와 30% 정도) 등의 표현형이 발생적 보상(developmental compensation)에 의한 희석(masking) 없이 직접적으로 나타나기 때문에, 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아이상 관련 질환의 모델로서 치료제 스크리닝 및 연구에 보다 적합하게 사용될 수 있다.

- [0027] 본 발명의 불멸화된 도파민성 신경세포주는 DJ-1 유전자가 추가로 결실된 것일 수 있다. 본 발명에서 용어 "DJ-1 유전자"는 미토콘드리아 복합체 I에 결합하여 그 활성을 유지하도록 돕는 것으로 알려진 미토콘드리아 단백질을 코딩하는 유전자를 의미할 수 있고, Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7라고도 알려져 있으며, 특히, 마우스 유래 세포 모델을 제조하는 경우 4번 염색체 상에 존재하는 유전자로서 NCBI Gene ID : 57320 유전자를 의미할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 구체적 실시예에서, DJ-1 결실이 PINK1 결실과 동시에 존재할 때, 산화 스트레스 하(500 μ M 과산화수소)에서 세포의 생존력이 DJ-1만 결여된 경우와 비교하여 매우 현격하게 감소(30%만큼)되는 것을 확인하였다(도 7D). DJ-1과 PINK1은 산화적 자극에 대해 미토콘드리아를 보호하기 위해 함께 작용하는 것으로 나타났다.
- [0029] 또다른 양태로서, 본 발명은 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자로 형질전환된 제1 형질전환 비인간동물을 제조하는 단계; PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 동일 종의 제2 형질전환 비인간 동물을 제조하는 단계; 제1 형질전환 비인간동물 및 제2 형질전환 비인간동물을 교배하여 상기 제1 형질전환 및 제2 형질전환 특성을 모두 가지는 형질전환 배아를 획득하는 단계; 및 상기 배아의 뇌 조직을 온도-민감성 변이형 발암유전자의 허용온도에서 배양하여 온도-민감성 변이형 발암유전자를 발현하는 불멸화 도파민성 신경 세포를 획득하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 모델 세포 제조방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 구체적 실시예에서, 먼저 상기 기재된 도파민성 신경세포-특이적인 프로모터 및 온도-민감성 변이형 발암유전자로 구성된 융합 유전자인 TH9.0-SV40Tag-tsA58를 가지는 형질전환 마우스를 제조하였다. 구체적으로, 9.0 kb TH 프로모터 영역을 포함하는 pTH9000 (Min N, et al., (1994) Mol Brain Res 27:281-289)의 EcoRV 부위 내로, SV40Tag-tsA58를 포괄하는 2.7 kb BglI/BamHI 초기 영역(early region) 코딩 서열 (pMFSV-tsA58-T 기원)을 비점착말단 연결을 이용하여 클로닝하였다. 그 결과 제작된 11.7 kb의 융합 유전자를 HindIII로 절단하여 플라스미드 벡터로부터 분리하였다. 형질전환 마우스를 비롯한 형질전환 비인간 동물은 당업계에 알려진 방법에 따라 제작될 수 있으나, 본 발명의 구체적 실시예에서는 Min N et al., (1994) Mol Brain Res 27:281-289 및 Son JH et al., (1996) Mol Brain Res 36:300-308에 기재된 방법에 따라 형질전환 마우스를 제작하였다. 요약하면, 정제된 11.7 kb 융합 유전자 DNA를 (CBA/J x C57BL/6J)F2 마우스 접합체 전핵에 2ng/microliter 의 농도로 미세주입한 후, TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자를 가지는 확립된 2개의 형질전환 창시자인 TA58-#8 및 TA58-#13를 F1 잡종 (CBA/J x C57BL/6J)과 연속 교배하여 유지하였다. 형질전환 자손을 확인하기 위하여, 꼬리 조직으로부터 분리된 게놈 DNA를 TH 9.0 kb를 프로브로 사용하여 서던 블롯에 이용(BamHI 절단)하거나, PCR 분석(프라이머: 뉴클레오티드 -493 ~ -473 및 -171 ~ -151)한 후, TA58-#8 라인이 SV40Tag 면역염색(도 1B) 및 TH 면역염색 (도 1C)결과에서 확인할 수 있는 바와 같이 SN 및 VTA의 도파민성 신경세포에서 SV40Tag-tsA58 를 발현하는 자손을 지속적으로 생산한다는 것을 확인하고서, 이후의 불멸화 도파민성 신경세포 분리를 위하여 TA58-#8 라인을 사용하였다.
- [0031] 또한, 본 발명의 구체적 실시예에서, PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 유전자가 결실된 형질전환 마우스를 제조하기 위하여, 상기 기재한 바와 같이, Xiong, H. et al., 2009. J Clin Invest, 119, 650-660를 참고하였다. 구체적으로, Pink1 로커스에 있는 엑손 4-7 및 엑손 8의 코딩 부분을 포함하는 5.6-kb 게놈 영역을 FRT 서열이 옆에 배치된 PGK-neo-polyA 선택 카세트에 치환함으로써 PINK1 유전자 결실을 수행하였다.
- [0032] 그 후, 상기 제작된 TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자를 가지는 형질전환 마우스와 PINK1 녹아웃 마우스를 교배시켜 TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자 및 PINK1 녹아웃 동종접합 변이를 가진 이중 형질변환 마우스 유래 배아 일령 13.5 (E13.5) 형질전환 배아를 획득하였다.
- [0033] 상기 배아의 뇌 조직 SN-VTA 영역으로부터 형질전환 도파민성 신경 세포를 분리하기 위하여, RF 배지 (10% 우태아혈청(Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 1% 글루코코르티코이드, 페니실린-스트렙토마이신, 및 L-글루타민으로 보충된 DMEM)에서 5% CO₂, 33°C(온도-민감성 변이형 발암유전자 허용온도)에서 배양하여, 온도-민감성 변이형 발암유전자를 도파민성 신경 세포 특이적으로 발현시켰다. 그 결과, 오직 형질전환 도파민성 신경 세포만이 불멸화되어 살아남아서 콜로니를 형성하고, 이를 반복 계대를 통하여 성장시켜서 순수한 PINK1 결실 도파민성 신경 세포 군집을 확립하였다.
- [0034] 또다른 양태로서, 본 발명은 본 발명의 모델 세포에 피검물질을 투여하는 단계; 및 상기 모델 세포에 있어서의 미토콘드리아의 형태 평가, 복합체(complex) I, II 또는 IV 활성 평가, ATP 생산 속도 평가, 및 산소 소비 속도 평가로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 평가를 실시하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환

의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 PINK1 결실 도파민성 신경세포주는 비도파민성 신경 세포 모델 및 동물모델과 비교하여, 증가된 ROS 생성, 손상된 크리스테를 비롯한 미토콘드리아 구조적 결함, 복합체 I, II, IV 활성의 급격한 저하(40-60%), ATP 생산, 산소 소비 속도 저하(각각 50%와 30% 정도) 등의 표현형이 발생적 보상(developmental compensation)에 의한 회색(masking) 없이 직접적으로 나타나기 때문에, 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아이상 관련 질환의 모델로서 치료제 스크리닝 및 연구에 보다 적합하게 사용될 수 있다. 상기 미토콘드리아 이상 관련 질환은 파킨슨병일 수 있다.

[0035] 미토콘드리아의 상기 여러 가지 표현형을 평가하는 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 본 발명의 구체적 실시예에서는, 복합체 I, II, IV 활성 분석을 위하여, 분리되어 준비된 미토콘드리아에 대하여 Janssen, A.J. et al., 2007. Clin Chem, 53, 729-734 방법, Cooperstein, S.J., Lazarow, A., 1951. J Biol Chem, 189, 665-670을 약간 변형하여 측정하였다. 또한, 분리된 미토콘드리아의 산소 소모는 Vives-Bauza, C. et al., 2007. Methods Cell Biol, 80, 155-171 방법과 같이 Instech Two Channel Fiber Optic Oxygen Monitor System(Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA)을 사용하여 관찰하고, ATP 생산율은 Lopez-Lluch, G. et al., 2006. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 1768-1773 방법을 약간 변형하여 발광효소(루시페라아제) 분석을 이용하여 측정하였다. 미토콘드리아의 형태적 결함을 분석하기 위하여, 세포 배양 시료를 OsO_4 후고정시키고, 모든 후고정된 조직들을 탈수시킨 후, 에폰 에폭시 수지에 묻혀 초박편(ultrathin section)으로 잘라 투과 전자 현미경으로 관찰하였다.

[0036] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 산화억제제인 Trolox 처리한 후 세포 표현형을 평가한 결과, 야생형 도파민성 신경 세포에서의 ETC 효소 활성에는 영향을 미치지 않은 반면(도 7A), PINK1-결실 도파민성 신경 세포에서는 복합체 I 활성을 눈에 띄게 증가(미처리된 세포에 비해 70% 증가)시키고 복합체 IV의 활성을 개선시킨 것을 확인하였다(도 7B). 이러한 데이터는 산화억제제 처리가 복합체 I 내, 및 복합체 IV 내에서 산화적 손상으로부터의 회복을 촉진시킴으로써 가족력적 파킨슨병에서 미토콘드리아의 기능장애를 개선할 수 있음을 암시한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 PINK1-, 또는 PINK1- 및 DJ1-유전자를 결실시킨 불멸화 도파민성 신경 세포주는 비도파민성 신경세포 및 PINK1 녹아웃 동물모델(복합체 I 활성의 경미한 저하, 미토콘드리아 형태적 변화 없음)과는 달리, 미토콘드리아 형태적 결함, 복합체 I, II, IV 활성의 급격한 저하, ATP 생산, 산소 소비 속도 저하 등의 표현형이 발생적 보상(developmental compensation)에 의한 회색(masking) 없이 직접적으로 나타나기 때문에, 미토콘드리아의 이상 표현형을 평가하여, 파킨슨병과 연관된 도파민성 신경세포 손실의 주요 병리학적 메커니즘을 분자적 수준에서 특이적으로 연구하고, 파킨슨병을 비롯한 미토콘드리아 이상 관련 질환의 모델로서 치료제 스크리닝 및 연구에 보다 적합하게 사용될 수 있다. 또한, 저비용으로 순수 도파민 신경 세포 다량 확보가 가능하므로, 병리학적 연구, 진단 및 치료제 개발에 필수적인 일차모델세포로서 효과적으로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 SV40Tag-tsA58로 형질전환된 형질전환 마우스를 제조하기 위하여 도입하는 융합유전자 TH9.0-SV40Tag-tsA58(A), 형질전환 창시자 마우스 중 TA58-#8 라인의 SV40Tag 면역염색 결과(B) 및 TH 면역염색 결과(C)를 나타내는 도면이다.

도 2는 PINK1-결실 도파민성 신경세포에서 증가된 ROS와 미토콘드리아 마커 단백질들을 나타내는 도면이다. (A)PINK1-결실 도파민성 신경세포에서 증가된 ROS 측정은 야생형 SN4741 세포(WT)에 비해 증가된 형광 DCF(dihydrodichlorofluorescein)로 나타났다. (B) 특정 미토콘드리아 마커 단백질들(프로히비틴, NDUFB6, NDUFS3, NDUFA9, COX IV, 베타-튜불린, 시토크롬 b5 및 베타-액틴)의 변화된 발현은 웨스턴 블롯 분석에 측정되었다. (C) PINK1-결실 도파민성 신경세포에서 시토크롬 b5의 수준은 야생형 세포에 비해 약 30배 눈에 띄게 증가되었다. 미토콘드리아 샤페론 HSP60은 야생형에 비해 PINK1-결실 세포에서 53%만큼 현저하게 감소되었다. (D) 야생형 및 PINK1 결실 세포에서 시토크롬 b5와 HSP60 mRNA의 정량적 실시간 PCR분석은 그들의 변화된 발현이 주로 전사적 제어에 인함을 보였다. 수치는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균±표준오차로 표기하였다. *p<0.05, **p<0.01.

도 3은 PINK1-결실 도파민성 신경세포에서 형태적으로 손상된 미토콘드리아의 측적을 나타내는 도면이다. (A)전자 현미경 사진은 야생형 신경세포가 미토콘드리아에서 손상되지 않은 크리스테와 외부 막을 유지하는 것을 보여준다. (B) PINK1-결실 도파민성 신경세포는 크리스테의 상당한 손실과 몇몇 부분 상태의 조직에 의해 특징지

어지는 미토콘드리아 손상을 보였다. (C) DJ-1-결실 도파민성 신경세포는 특징적인 파열된 크리스테를 갖는 미토콘드리아 손상을 보였다.

도 4는 PINK1-결실 세포에서 결함을 가진 미토콘드리아의 발생율을 야생형의 경우와 비교한 도면이다. 야생형 (<10%)에 비해 상당히 더 높다(70-80%)는 것을 알 수 있다. 모든 수치는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균±표준오차로 표기하였다. *p<0.05.

도 5는 PINK1-결실에 의한 미토콘드리아 복합체 I, II, IV 효소 활성의 감소를 나타내는 도면이다. ETC 효소 (복합체 I, II와 IV) 및 구연산 신타아제의 활성은 야생형과 PINK1-결실 세포에서 분리된 미토콘드리아에서 특정되었다. (A) 야생형 세포에 비해 PINK1-결실 세포들은 복합체 I, 복합체 II, 및 복합체 IV 활성에서 각각 38%, 39%와 59%의 현저한 감소를 보였다. (B) 야생형 세포에 비해 DJ-1-결실 세포들은 복합체 I 활성에서 28% 감소를, 복합체 II 활성에서 19% 감소를 보였고, 복합체 IV 활성에서는 변화를 보이지 않았다. 모든 수치는 5회의 독립적인 실험으로부터 평균±표준오차로 표기하였다. **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

도 6은 PINK1-결실에 의한 ATP 생성률과 산소 소모율의 감소를 나타내는 도면이다. 야생형 세포들에 비해 PINK1-결실 세포로부터 분리된 미토콘드리아의 ATP 생성률은 숙신산 존재하에 (A) 현저하게 47% 감소했고 글루탐산/말산 존재하에 (B) 44% 감소했다. 유사하게 PINK1-결실 세포에서 산소 소모율도 숙신산 존재하에 (C) 30%와 글루탐산/말산 존재하에 (D) 27% 감소했다. 모든 수치는 5회의 독립적인 실험으로부터 평균±표준오차로 표기하였다. **p<0.01.

도 7은 PINK1- 및 DJ-1-결실 도파민성 신경세포에 대한 ETC 효소 활성에서의 Trolox-유도된 부분적 기능 회복을 나타내는 도면이다. 야생형, PINK1- 및 DJ-1-결실 신경세포를 100 μ M Trolox로 24시간 동안 처리한 후 미토콘드리아를 준비하고 분석하였다. (A) Trolox 로 처리된 야생형 세포들은 처리하지 않은 야생형 세포들과 비슷한 수준의 복합체 I, II와 IV 활성을 보였다. (B) PINK1-결실 도파민성 신경세포는 처리하지 않은 세포에 비해 Trolox에 반응하여 복합체 I에서 70% 향상을, 복합체 IV에서 14% 향상을 보였다. 복합체 II의 활성에서는 변화가 관찰되지 않았다. (C) DJ-1-결실 도파민에 반응하는 신경세포는 복합체 I 활성에 있어 Trolox에 대해 200% 증가를 보였다. 복합체 II와 IV의 활성에서는 변화가 관찰되지 않았다. 모든 수치는 5회의 독립적인 실험으로부터 평균±표준오차로 표기하였다. (D) DJ-1-결실 세포에서 PINK1 유전자를 추가적으로 녹다운시킨 경우, 산화 스트레스 하 (500 μ M 과산화수소 24시간)에서 대조군에 비해 40%에서 10%로 세포 생존률이 감소되었다. 같은 조건하에서 Trolox 처리는 PINK1 유전자 녹다운된 DJ-1-결실 세포의 생존률을 8%만큼 증가시켰다. PINK1 유전자-특이적 녹다운에 의한 PINK1 mRNA의 현저한 손실(~90%)이 명백하다[CON: 미처리; OS: 산화 스트레스 (500 μ M 과산화수소 24시간); ScsiRNA: 스크램블 siRNA; PINK1 KD: PINK1-특이적 siRNA; Tro: Trolox 처리. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001.

도 8은 PINK1 및 DJ-1 녹아웃 도파민성 신경 세포주의 확립을 나타내는 도면이다. TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자와 PINK1 KO 동형접합 변이 모두를 가진 13.5일령 배아의 SN 영역으로부터 불멸화된 PINK1 및 DJ-1 KO 도파민성 세포를 확립했다. 세포주 #2가 실시예에 사용되었다.

도 9는 PINK1 및 DJ-1 결실 도파민성 신경 세포에서 일반적 신경세포 마커 (TuJ1 및 NeuN)와 도파민성 신경세포 마커(TH)가 발현되는 것을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0040] 1. TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자를 가지는 형질전환 마우스의 제작.

[0041] 발암유전자인 SV40Tag-tsA58의 온도-민감성 변이형에 융합된 9.0 kb의 5' TH 프로모터 영역으로 구성된 DNA 구조물을 가지는 형질 전환 마우스를 확립하기 위하여, 도 1A와 같이 TH9.0-SV40Tag-tsA58를 제작하였다.

[0042] 9.0 kb TH 프로모터 영역을 포함하는 pTH9000 (Min et al., (1994) Mol Brain Res 27:281289)의 EcoRV 부위 내로, SV40Tag-tsA58를 포괄하는 2.7 kb BglI/BamHI 초기 영역(early region) 코딩 서열 (pMFSV-tsA58-T 기원, SV40Tag-tsA58는 게놈의 3505 염기 위치의 G가 A로 돌연변이되어 알라닌(Alanine)이 발린(Valine)으로 바뀐 돌연변이임, ALAIN GENTIL et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9556-9560 참고)을 비점착말단 연결

을 이용하여 클로닝하였다. 그 결과 제작된 11.7 kb의 융합 유전자를 HindIII로 절단하여 플라스미드 벡터로부터 분리하였다. 형질전환 마우스는 Min N et al., (1994) Mol Brain Res 27:281-289.; Son JH et al., (1996) Mol Brain Res 36:300-308에 기재된 방법에 따라 제작되었다. 요약하면, 11.7 kb 융합 유전자를 0.8% 아가로오스 젤 전기영동 및 전기용출 방법으로 정제하고, 세슘클로라이드 구배 원심분리하였다. 정제된 DNA를 (CBA/J x C57BL/6J)F2 마우스 접합체 전핵에 2ng/microliter 의 농도로 미세주입하였다. TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자를 가지는 확립된 2개의 형질전환 창시자인 TA58-#8 및 TA58-#13를 F1 잡종 (CBA/J x C57BL/6J)과 연속 교배하여 유지하였다. 형질전환 자손을 확인하기 위하여, 꼬리 조직으로부터 분리된 게놈 DNA를 TH 9.0 kb를 프로브로 사용하여 서던 블롯에 이용(BamHI 절단)하거나, PCR 분석(프라이머: 뉴클레오티드 -493 ~ -473 및 -171 ~ -151)하였다. (Jin H. Son et al., (1999) The Journal of Neuroscience, January 1, 19(1):10-20 참고)

[0043] 형질전환 창시자 중 TA58-#8 라인이 SV40Tag 면역염색(Fig. 1B) 및 TH 면역염색 (Fig. 1C)결과에서 확인할 수 있는 바와 같이 SN 및 VTA의 도파민성 신경세포에서 SV40Tag-tsA58 를 발현하는 자손을 지속적으로 생산하였다. TA58-#8 라인의 자손들은 성체기(4 ~ 6 개월령)에서 어떠한 중량도 발생시키지 않았다. 따라서, 이후의 불멸화 도파민성 신경세포 분리를 위하여 TA58-#8 라인이 사용되었다.

[0044] 2. PINK1-결실 도파민성 신경 세포의 생산, 배양

[0045] 상기 제작된 TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자를 가지는 형질전환 마우스와PINK1 녹아웃 마우스(Xiong, H. et al., 2009. J Clin Invest, 119, 650-660 참고)를 교배시켜 PINK1-결실 불멸화 도파민성 세포주를 만들었다(도 8A).

[0046] 불멸화 도파민성 전구 세포주의 확립을 위하여, TH9.0-SV40Tag-tsA58 융합 유전자 및 PINK1 녹아웃 동종접합 변이를 가진 이중 형질변환 마우스 유래 배아 일령 13.5 (E13.5) 형질전환 배아를 획득하였다. 태아 마우스 뇌의 Atlas (Schambra et al., 1992)를 참고하여, E13.5 배아의 중뇌 SN 영역을 Leibowitz's L-15배지에서 멸균 조건 하에 수술로 분리하였다. E13.5 중뇌로부터 SN-복측 피개 영역 (VTA) 복합체의 도파민성 세포를 분리하기 위하여, 복측 중뇌에 손상을 입히지 않도록 주의하면서 형질전환 배아를 유색 안구(pigmented eye) 바로 위의 뇌의 기저 아래를 수직으로 절개하였다. 피부와 뇌막은 배아의 뇌로부터 제거하였다. 중뇌 굴곡 위의 복측 중뇌를 시개(tectum) 및 시상의 등쪽 표면을 통하여 2 컷만큼 절개하였다. 그 후, 복측 부분으로부터 나비 모양의 SN-VTA 영역을 분리하였다. VTA는 나비모양의 SN-VTA 영역의 중간 부분의 제거에 의하여 SN으로부터 분리되었다. SN 조직을 작은 조각으로 자르고 트립신-EDTA (최종 농도, 0.1%)를 포함하는 Leibowitz's L-15 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 내에서 물리적으로 연마하고 37℃에서 30 분동안 배양한 후, RF 배지 (10% 우태아혈청(Irvine Scientific, Santa Ana, CA), 1% 글루코오스, 페니실린-스트렙토마이신, 및 L-글루타민으로 보충된 DMEM)를 추가하여 반응을 정지시켰다. 세포를 펠렛화하여 RF 배지에서 5% CO₂, 33℃(허용온도)에서 최소한 3-5주 배양하였다. 배지는 매 4일마다 교체하였다. 오직 형질전환 배아로부터 기원한 도파민성 전구 신경 세포만이 불멸화되어 살아남아서 콜로니를 형성하게 된다. 형질전환 배아로부터의 기원한 도파민성 전구 신경 세포를 3-4 개월동안 반복 계대를 통하여 성장시켜서 순수한 세포 군집을 확립하였다.

[0047] 클로닝을 위하여, 클로닝 실린더(Bel-Art Products, Pequannock, NJ)를 사용하였다. 클로닝 과정은 폴리오르니틴(Sigma, St. Louis, MO) (1 mg/ml)으로 코팅된 24-웰 플레이트에 플레이팅함으로써 최소한 3회 수행되었다. Lab-Tek 챔버 슬라이드를 사용할 때, 폴리오르니틴 (0.15 M 봉산 완충액 1 mg/ml, pH 8.4)으로 밤새 33℃에서 코팅하여 사용전 D-PBS로 3회 세척하였다. 콜로니의 클로닝 기원을 모니터하였고 콜로니 형성 동안의 현미경 관찰로 확인하였으며, 슬라이드 배양 (Lab-Tek chamber slide; Nunc, Naperville, IL)를 이용한 TH 및 SV40Tag 면역염색에 의하여 재확인하였다.

[0048] SN 도파민성 세포주 성장에 대한 배가시간(doubling time)은 ~36시간이었다. 배양 온도를 0.5-1% FCS 포함하는 RF 배지 또는 N2로 보충된 Neurobasal 배지(Life Technologies) 중 하나에서 비허용 온도(39℃)로 변화시키면 분화시킬 수 있다.

[0049] 3. 통계적 분석

[0050] 실험 결과는 3 내지 8회의 개별실험에서 얻어진 자료를 기본으로 평균±표준오차 (mean±SEM)로 표현되었다. 통계적 분석은 시그마플롯 소프트웨어와 스튜던트 t-검정을 사용하여 수행되었다. 필요에 따라, one-way ANOVA를

사용하여 다중 비교를 했다.

4. 정량적 RT-PCR 분석

제작된 PINK1-결실 불멸화 도파민성 신경 세포들로부터 총 RNA를 분리하였다. cDNA는 5 µg의 총 RNA와 RT-PCR 키트를 이용하여 합성되었다. 내재적 Hsp60, 시토크롬 b5와 PINK1 mRNA 수준은 표준 곡선법에 의해 베타-액틴에 상대적으로 측정되었다. 정량적 PCR은 AB7300 실시간 PCR system와 DyNAmo HS SYBR green qPCR kit에 의해 수행되었다 (*p < 0.05).

시토크롬 b5 프라이머 세트 (F: 5-CTGCATCATAAGGTGTACGA-3 (서열번호 1); R: 5-TTGATCTGTCATCTGG-3(서열번호 2)); Hsp60 프라이머 세트 (F: 5-GCTTGCAAACTTTCAGATGGA-3(서열번호 3); R: 5-CTTTTCATTCACTCAACATCACTTGT-3 (서열번호 4)); PINK1 프라이머 세트 (F: 5-TGA TCT CAG ACT TTG GCT GCT-3(서열번호 5); R: 5-CCT TGG CCA TAG AAG GGA TT-3 (서열번호 6)).

5. 면역블롯분석

제작된 PINK1-결실 불멸화 도파민성 신경 세포들은 일반적인 신경 마커와 도파민성 신경세포-특이적 마커들의 발현을 위해 허용 온도 (33°C)에서 면역블롯분석에 의해 특성을 밝혔다. 분석 결과, TuJ1과 NeuN 같은 신경세포 특이적 마커들과 도파민성 신경세포 특이적 마커인 TH의 존재가 확인되었다(도 9).

실험 조건하에서 배양된 PINK1-결실 불멸화 도파민성 신경 세포들을 빙냉 PBS로 두 번 세척하고 프로테아제와 포스파타아제 억제제 각테일을 포함한 RIPA 완충액으로 얼음위에서 10분간 용해했다. 세포들을 균질화하고 13,000g로 4°C에서 15분간 원심분리했다. 단백질 농도는 Bradford 법으로 결정하였다. (단백질 시료는 8-16% 트리스-글리신 젤에서 분리하여 폴리비닐리덴 다이플루오라이드(PVDF) 막으로 블롯했다.) 다음의 일차 항체들이 사용되었다: 프로히비틴 (prohibitin), 베타-튜불린 (β -tubulin), 시토크롬 b5 (cytochrome b5), HSP60, 베타-액틴 (β -actin), NDUFA9, COX IV, NDUFB6, 및 NDUFS3. 블롯은 항-염소 또는 항-토끼 IgG-HRP로 검출하였고 ECL 전기발광법으로 시각화하였다. 막은 BioMax Light Kodak film에 노출시켰다. 밴드들의 농도계의 (densitometric) 정량은 Multi Gauge version 2.3 software를 사용한 Image Analyzer system에 의해 수행되었다.

결과

PINK1-결실 도파민성 신경 세포를 확립한 다음, 먼저 PINK1 결여가 산화스트레스 또는 ROS를 증가시키는지를 연구하였다. ROS의 세포내 축적은 형광 DCF의 증가로 보여지는 것과 같이 PINK1-결실 신경세포 모두에서 명확하였다 (도 2A). ROS 생성의 주요원인은 보통 결합있는 미토콘드리아이므로 ETC 효소의 아단위 (subunit)를 포함하는 대표적인 미토콘드리아 마커 단백질의 발현을 연구하기 위해 비교 면역블롯분석을 실행하였다. 미토콘드리아 내 ROS 생성의 주요원인 복합체 I과 IV의 아단위 발현에서는 주요한 변화가 없었다 (도 2B). 흥미롭게도 편재하는 전자 전달 헵단백질인 시토크롬 b5는 야생형 SN4741 세포에 비해 PINK1-결실 세포에서 30배의 증가를 보였다. 미토콘드리아 샤페론, 열충격단백질 60 (HSP60)은 야생형 세포와 비교하여 PINK1-결실 세포에서 53%까지 현저히 감소되었다 (도 2C). 이들의 변화된 발현은 주로 전사 제어에 기인한다(도 2D). 또한 PINK1-결실이 로테논, 6-히드록시도파민, MPP+, H2O2, MG132 및 탐시가르긴(thapsigargin) 같이 알려진 PD-관련된 독신들에 대한 민감성 증가를 야기하는지도 연구하였지만, 놀랍게도 이들 돌연변이 세포들은 야생형 SN4741과 비교했을 때 DJ-1과 PINK1의 이중손실에 의한 산화적 자극에 대한 민감성이 증가(도 7D 참고)한 것을 제외하고는 동일한 민감성을 보였다.

6. 복합체 I, II, IV 분석

(1) 미토콘드리아의 분리

PINK1-결실 불멸화 도파민성 신경 세포를 빙냉 PBS로 세척하고 프로테아제 억제제 각테일과 함께 빙냉 10 mM 트리스 완충액 (pH 7.6)로 부유시켰다. 세포를 1-ml 주사기로 기계적으로 분쇄시키고, 즉시 빙냉 1.5 M 수크로스

를 더한 후 2℃에서 600g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 다시 2℃에서 14,000g로 10분간 원심분리 하고 얻어진 펠렛은 세척하고 프로테아제 억제제 카테일과 함께 빙냉 10 mM 트리스 완충액 (pH 7.6)로 부유시켰다. 일부 펠렛은 정량을 위해 용해시켰고 나머지는 분석시까지 얼음위에 보관했다.

[0062] (2) 복합체 I 분석

[0063] 활성 분석은 상기 분리되어 준비된 미토콘드리아에서 측정하였다. 복합체 I 활성은 이전에 알려진 방법들 (Janssen, A.J. et al., 2007. Clin Chem, 53, 729-734) 약간 변형하여 측정하였다. 특히, 활성은 pH 7.8의 25 mM 인산칼륨, 3.5 g/L BSA, 60 μM DCIP, 70 μM 데시루비퀴논 (decylubiquinone), 1.0 μM 안티마이신-에이 (antimycin-A) 및 3.2 mM NADH를 포함한 240 μl 인큐베이션을 600nm에서 분광학적으로 측정하였다. 미토콘드리아 샘플(1 μg/10 μl)을 NADH 없는 완충용액에서 37℃에서 3분간 전인큐베이션했다. 이후 5 μl의 160 mM NADH를 가하고 37℃에서 5분간 30초 간격으로 흡광도를 측정하였다. 5분후 2.5 μL 로테논 (1mM 디메틸술폰옥사이드 용액이고 10 mM 트리스, pH 7.6으로 100 μM로 희석)을 가하고 37℃에서 5분간 30초 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0064] (3) 복합체 II 분석

[0065] 복합체 II 활성은 이전에 알려진 방법들(Janssen et al., 2007) 약간 변형하여 측정하였다. 특히, 활성은 pH 7.8의 80 mM 인산칼륨, 1 g/L BSA, 2 mM EDTA, 0.2 mM ATP, 10 mM 숙신산, 0.3mM 시안화칼륨, 60 μM DCIP, 50 μM 데시루비퀴논 (decylubiquinone), 1 μM 안티마이신-에이 (antimycin-A) 및 3 μM 로테논을 포함한 240 μl 인큐베이션을 600 nm에서 분광학적으로 측정하였다. 미토콘드리아 샘플 (1 μg/10 μl)을 숙신산과 시안화칼륨 없이 37℃에서 10분간 전인큐베이션했다. 이후 20 μl의 1.5 M 숙신산과 0.75 μl의 0.1 M KCN를 가하고 37℃에서 5분간 30초 간격으로 흡광도를 측정하였다. 공시험 (blanks)은 5 mM 말론산을 포함하며 이는 전인큐베이션 전에 더해졌다.

[0066] (4) 복합체 IV 분석

[0067] 복합체 IV 활성은 이전에 알려진 방법들(Cooperstein, S.J. , Lazarow, A., 1951. J Biol Chem, 189, 665-670) 약간 변형하여 측정하였다. 특히, 활성은 pH 7.4의 30 mM 인산칼륨, 2.5 mM 도데실말토시드 (dodecylmaltoside), 그리고 34 μM 페로시토크롬 c를 포함한 240 μl 인큐베이션을 550 nm에서 분광학적으로 측정하였다. 미토콘드리아 샘플 (1 μg/10 μl)을 완충액에 가하고 곧바로 37℃에서 5분간 30초 간격으로 흡광도를 측정하였다. 공시험은 1 mM KCN을 포함한다.

[0068] (5) 구연산 신타아제 분석 (citrate synthase assay)

[0069] TCA 회로 효소인 구연산 신타아제의 활성은 전자 전달 사슬 (electron transfer chain; ETC) 효소의 활성을 표준화하기 위해 사용된다. 구연산 신타아제 활성은 이전에 알려진 방법들(Sugden, P.H., Newsholme, E.A., 1975. Biochem J, 150, 105-111) 약간 변형하여 측정하였다. 특히, 활성은 50mM 트리스-HCl (pH 7.5), 0.2 mM 5,5-디티오비스-2-니트로벤조산 (5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)), 0.1 mM 아세틸-코에이 (acetyl-CoA), 그리고 0.5 mM 옥살로아세트산을 포함한 240 μl 인큐베이션을 412 nm에서 분광학적으로 측정하였다. 미토콘드리아 샘플 (1 μg/10 μl)을 옥살로아세트산 없는 완충액에서 30℃에서 5분간 전인큐베이션했다. 이후 2.5 μl의 50 mM 옥살로아세트산을 가하고 37℃에서 5분간 30초 간격으로 흡광도를 측정하였다. 대조표준으로는 옥살로아세트산 대신 동량의 물을 가했다.

[0070] 결과

[0071] 복합체 I, II 및 IV와 같은, ETC 효소의 활성을 측정한 결과, PINK1-결실 도파민성 신경세포들은, 야생형 도파민성 신경세포들과 비교하여, 복합체 I, II 및 IV의 활성에서 각각 28%, 39%와 59%로 현저한 감소를 보였다 (도 5A).

[0072] **7. 산소 소모율 및 ATP 생산율**

[0073] 분리된 미토콘드리아의 산소 소모는 이전에 알려진 바와 같이(Vives-Bauza, C. et al., 2007. Methods Cell Biol., 80, 155-171.) Instech Two Channel Fiber Optic Oxygen Monitor System(Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, USA)을 사용하여 관찰했다. 세포 챔버는 순환 항온 수조에 의해 37°C로 유지시켰다. 모든 측정은 Fiber Optic Oxygen Monitor Operating Software와 Slope Calculator Software로 평가했다. 호흡율은 5 mM 숙신산 또는 5 mM 글루탐산/말산의 존재하에 각각의 미토콘드리아 부분 중 20 μ g에서 이행되었고 결과는 소모된 산소량 nmol/min/mg 단백질로 계산되었다. 휴면 호흡율은 억제제나 결합해제 물질(uncoupler)이 부족한 조건하에서의 산소 소모율로 결정하였다. 비미토콘드리아 산소 소모는 100 μ M 시안화칼륨과의 세포배양에 따른 호흡율로 결정하였다.

[0074] ATP 생산율은 이전에 알려진 방법을(Lopez-Lluch, G. et al., 2006. Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 1768-1773) 약간 변형하여 발광효소(루시페라아제) 분석에 의해 측정되었다. 간략히, 분리된 미토콘드리아 10 μ g을 160 μ M 다이(아데노신 펜타포스페이트), 1 mM 피루브산, 100 mM ADP 및 5mM 숙신산 또는 5 mM 글루탐산/말산을 함유한 반응 완충액 A (0.1% BSA, 150 mM KCl, 0.1 mM MgCl₂, 25 mM Tris-HCl, 10 mM 인산 칼륨, pH 7.4)에 가했다. 완충액 B (500 mM 트리스-아세트산, pH 7.5)는 20 μ g/ml 발광효소와 0.8mM D-루시페린을 포함한다. 발광은 루미노미터를 이용하여 10초 간격으로 5분간 측정되었다. 다른 농도의 ATP 용액을 사용하여 발광에 대한 표준 곡선을 만들었다.

[0075] **결과**

[0076] PINK1-결실 도파민성 신경 세포들로부터 분리된 미토콘드리아는 복합체 I (글루탐산/말산)과 복합체 II (숙신산)에서 전자를 제공하는 기질로부터 에너지를 공급받는다. PINK1 결실은 야생형에 비해 ATP 생산율에서 약 50% 감소되고 (도 6A-B) 산소 소모율에서 약 30% 감소되는 (도 6C-D) 것과 연관된다.

[0077] **8. 전자 현미경검사 및 결합있는 미토콘드리아의 계수**

[0078] 세포 배양 시료를 즉시 2.5% 글루타르알데히드-2% 파라포름알데히드의 0.1 M 인산 완충액, pH7.4 용액에 담구고, 시료를 4°C에 두 시간동안 두었다가 0.1 M 인산 완충액으로 10분 간격으로 세 번 행구었다. OsO₄ 후고정을 위해, 암실에서 1% OsO₄-0.1 M 인산 완충액에 시료를 후고정시켰다. 모든 후 고정된 조직들은 10분간 0.1 M 인산 완충액으로 행구고, graded ethanol series에서 탈수시키고, 에폰 에폭시 수지에 물었다. 초박편(ultrathin section)으로 잘라 투과 전자 현미경으로 관찰했다. 형태적으로 결합이 있는 미토콘드리아의 백분율은 온전한 미토콘드리아와 유효한 손실이 있는 크리스테를 가진 미토콘드리아를 모두 계수하여 결정하였다: 최소 50개의 다른 절편을 가지고 각각의 세포 형태에 대해 임의적으로 계수하였다.

[0079] **결과**

[0080] 손상된 미토콘드리아가 ROS 생산 증가의 주요 원인이므로 전체적인 미토콘드리아의 형태적 결합이 있는지를 연구하였다. 전자 현미경 사진은 손상되지 않은 크리스테와 외부 미토콘드리아 막을 유지하고 있는 야생형 신경세포들을 보여준다 (도 3A). 그러나 PINK1 결실은 크리스테의 두드러진 손실과 몇몇 부분 상태 조직에 의해 주로 특징지어지는 미토콘드리아적 손상을 유도한다 (도 3B). PINK1-결실 세포에서 손상된 미토콘드리아의 정량 결과, PINK1-결실 세포에서 손상된 미토콘드리아의 발생율은 야생형의 것과 비교하여 (<10%) 훨씬 더 높았다 (82%) (도 4). 따라서, PINK1의 기능적 손실은 형태적으로 손상된 미토콘드리아의 축적으로 귀결된다는 것을 확인하였다.

[0081] **9. 복합체 I 효소 결손으로부터 산화방지제-매개된 복구 확인**

[0082] 마지막으로, 산화억제제 처리가 복합체 I 결손으로부터의 회복을 증대할 수 있는지를 연구했다. Trolox 처리는 야생형 도파민성 신경 세포에서 ETC 효소 활성화에 영향을 미치지 않았다 (도 7A). 반대로 PINK1- 결실 도파민성 신경 세포에서는 복합체 I 효소 활성을 눈에 띄게 증가시켰다. 특히 미처리된 세포에 비해 70% 증가되었다 (도 7B). 산화억제제 처리는 야생형 신경세포가 아닌 돌연변이 도파민성 신경세포에서 복합체 I 효소 결핍을 개선한 다는 것을 확인하였다.

[0083] 한편, PINK1이 DJ-1과 상호작용할 것으로 예상되었으므로, DJ-1-결실 세포에서 PINK1의 추가적 결실이 산화 스트레스 하에서 세포의 생존에 영향을 미치는지를 연구하였다. DJ-1-결실 세포들은 산화 스트레스에 대해 야생형 과 동등하게 반응하는데 비해 PINK1의 추가적으로 결실시킨 경우에 대해서는 증가된 민감성을 관찰했다(도 7D). 달리 말하면, DJ-1 결실이 PINK1 유전자 녹다운과 결합되었을 때 세포의 생존률은 산화 스트레스 하에서 (500 μ M 과산화 수소) DJ-1만 결여시킨 대조군 세포에 비해 30%만큼 현저하게 감소되었다. 같은 자극 조건하에서 Trolox 처리는 DJ-1-결실 세포의 생존률을 8%만큼 증가시킨다. (도 7D).

수탁번호

[0084]

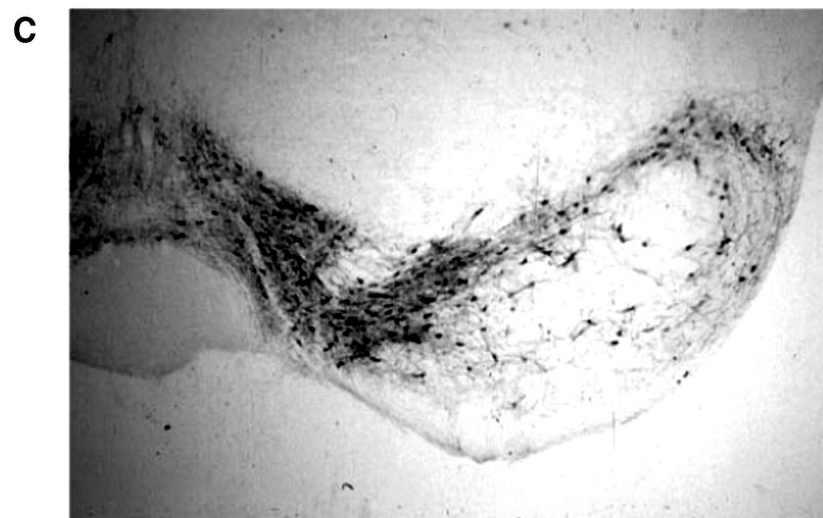
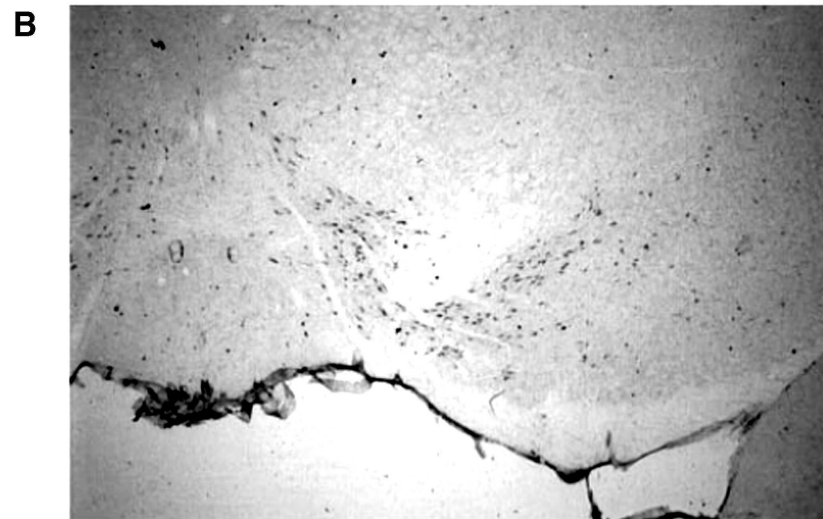
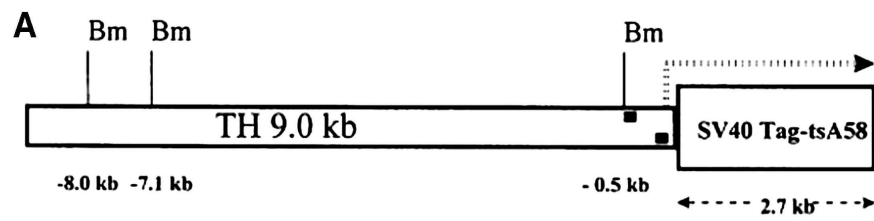
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11982BP

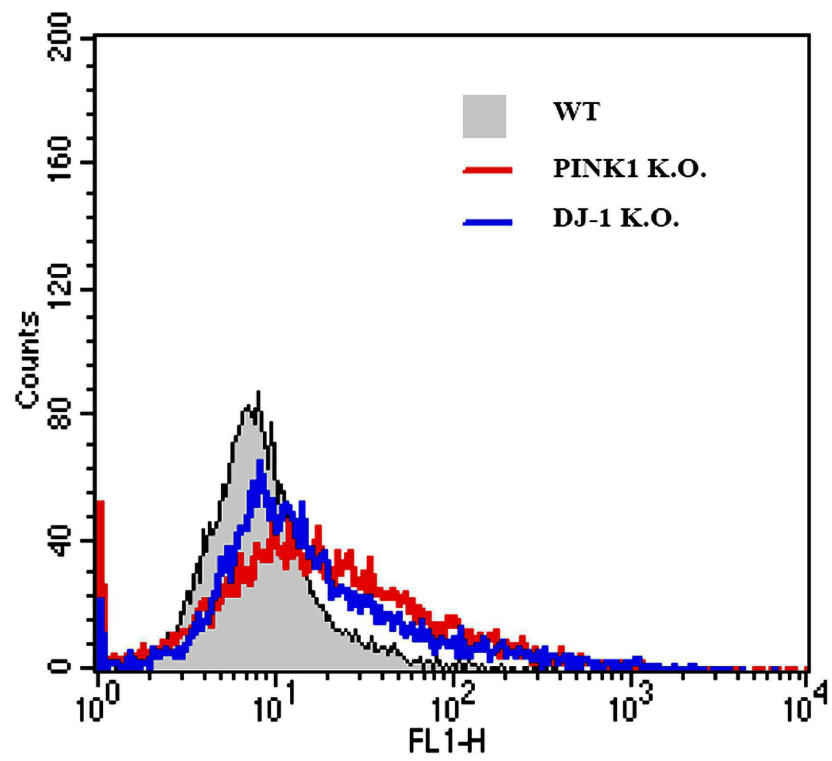
수탁일자 : 20110714

도면

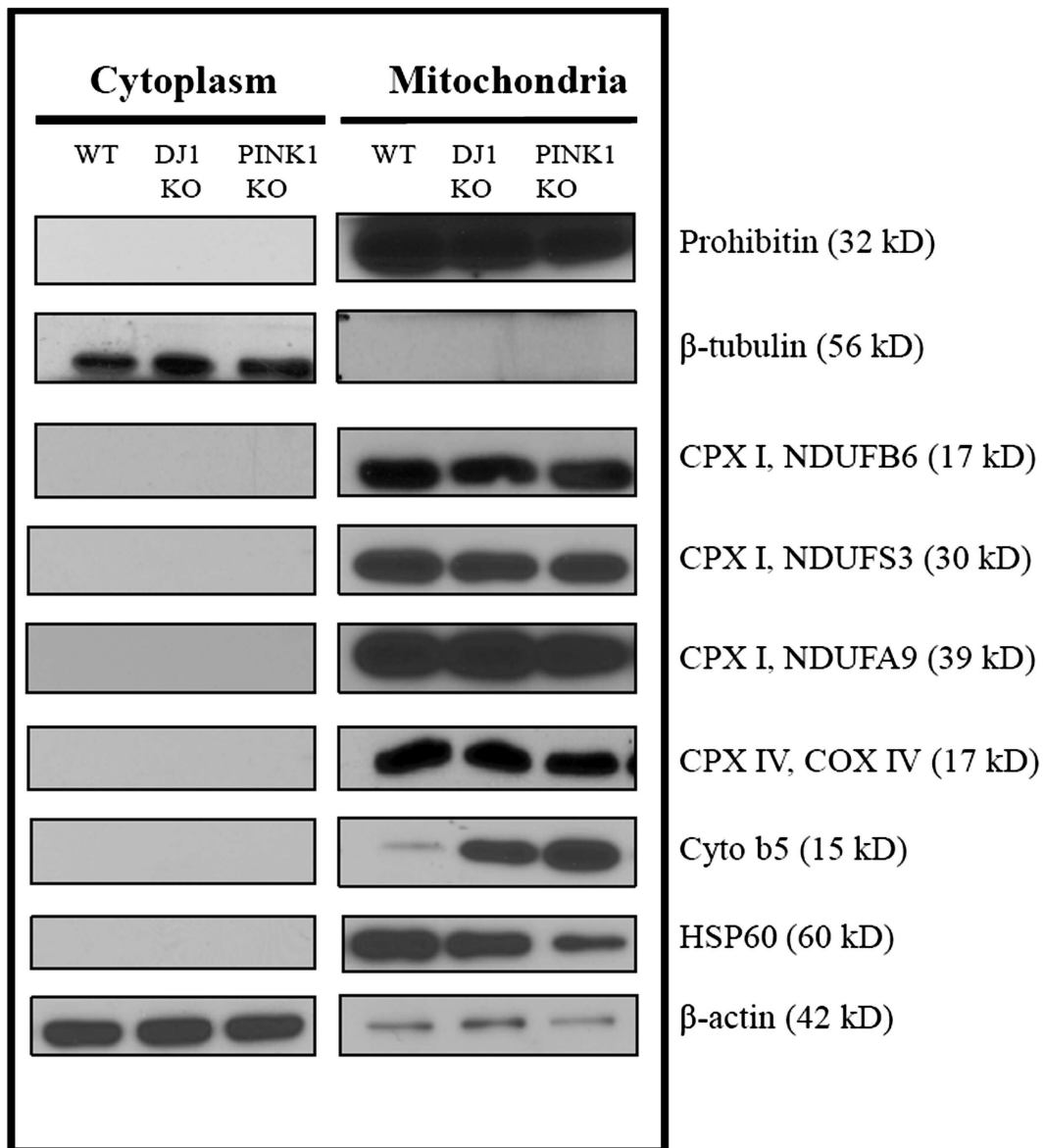
도면1



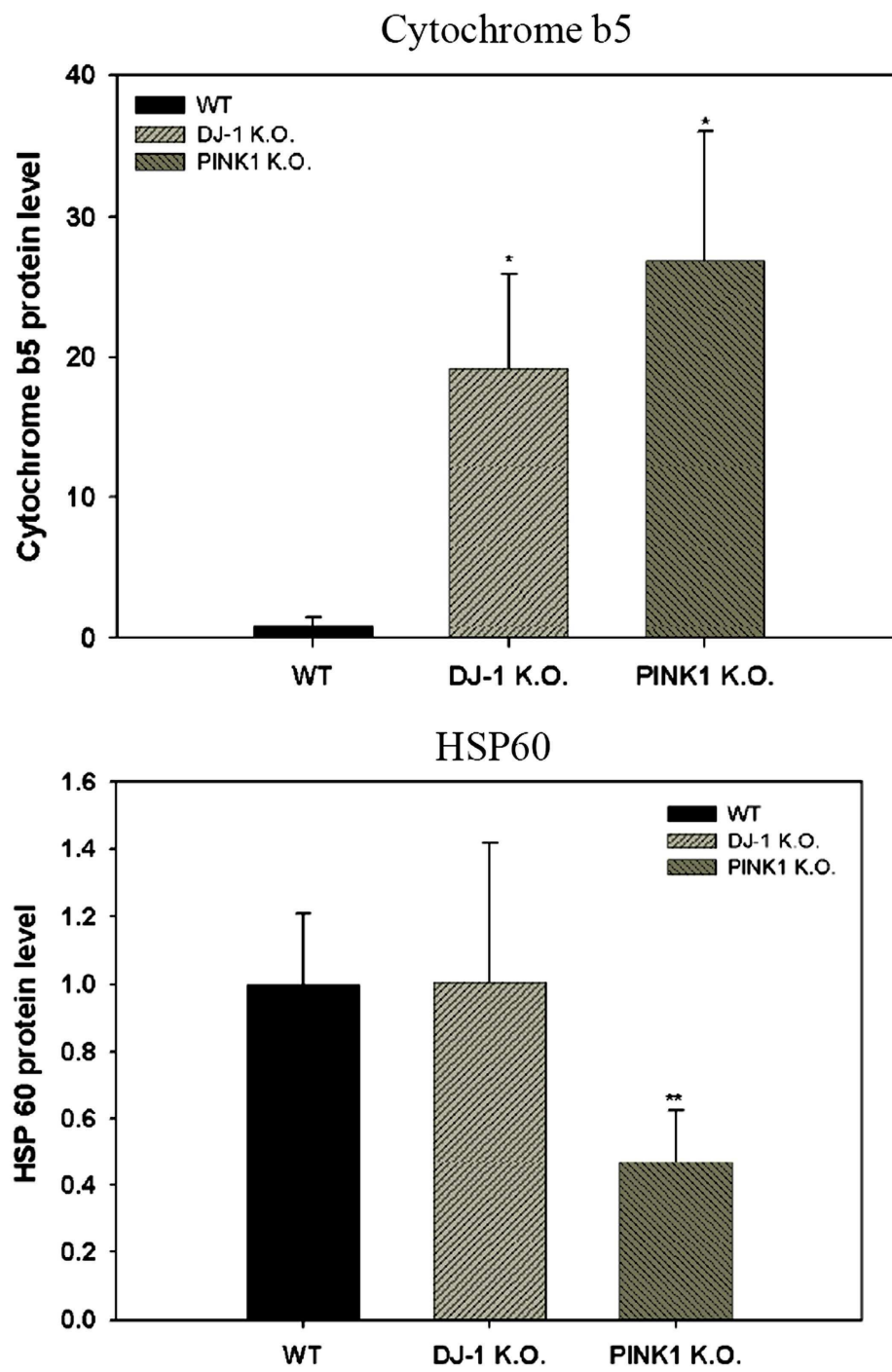
도면2a



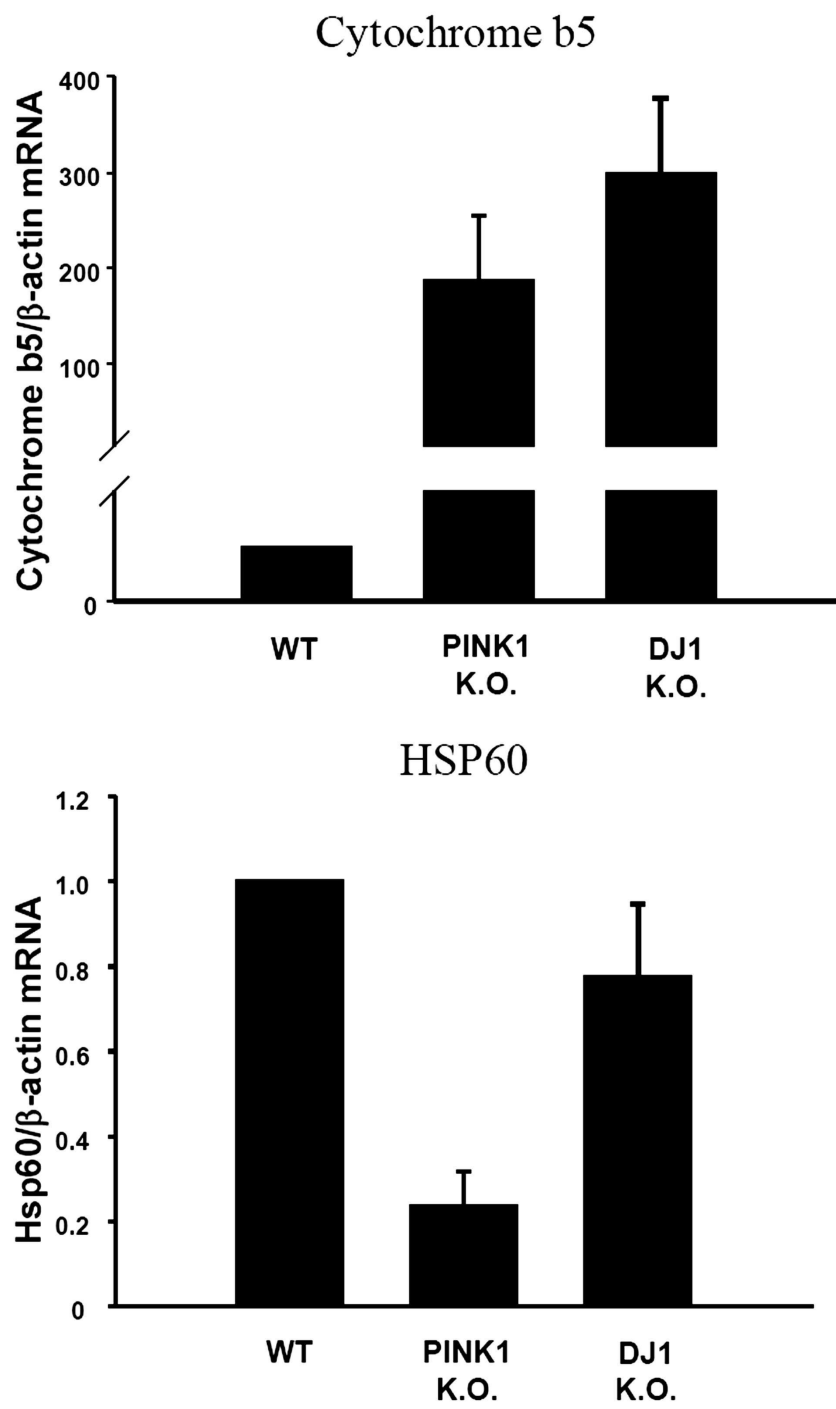
도면2b



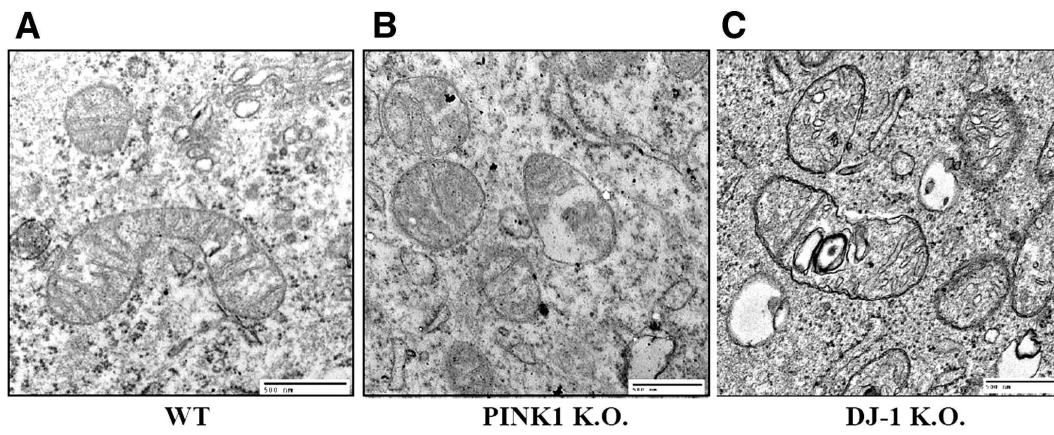
도면2c



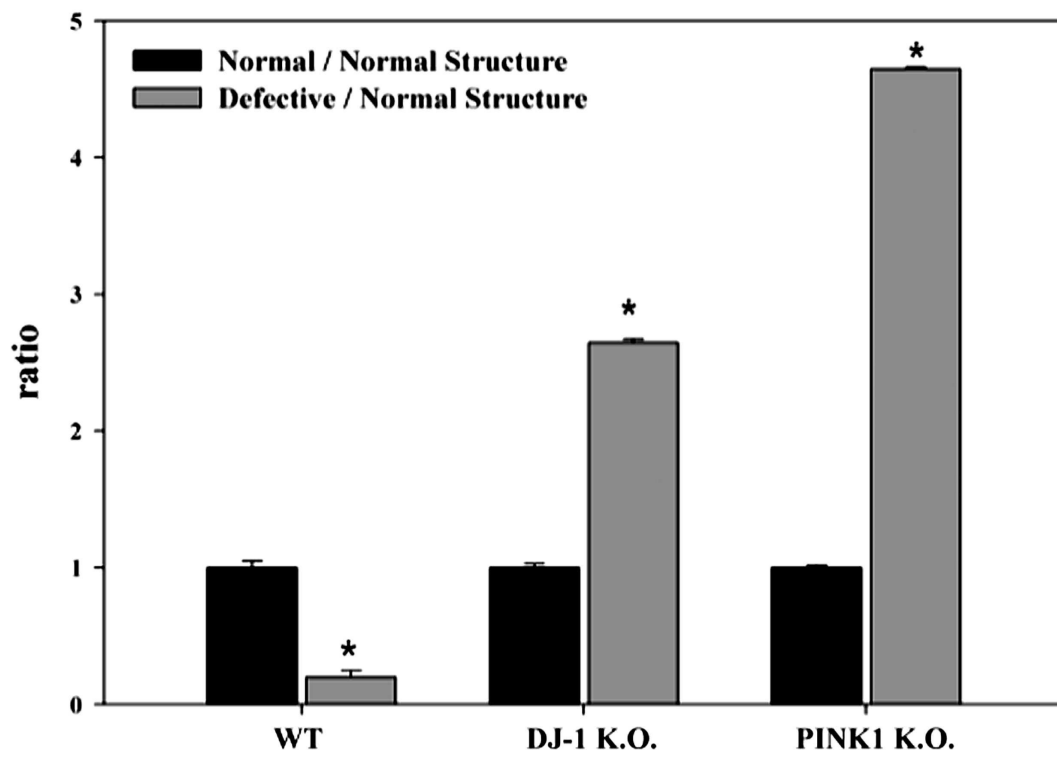
도면2d



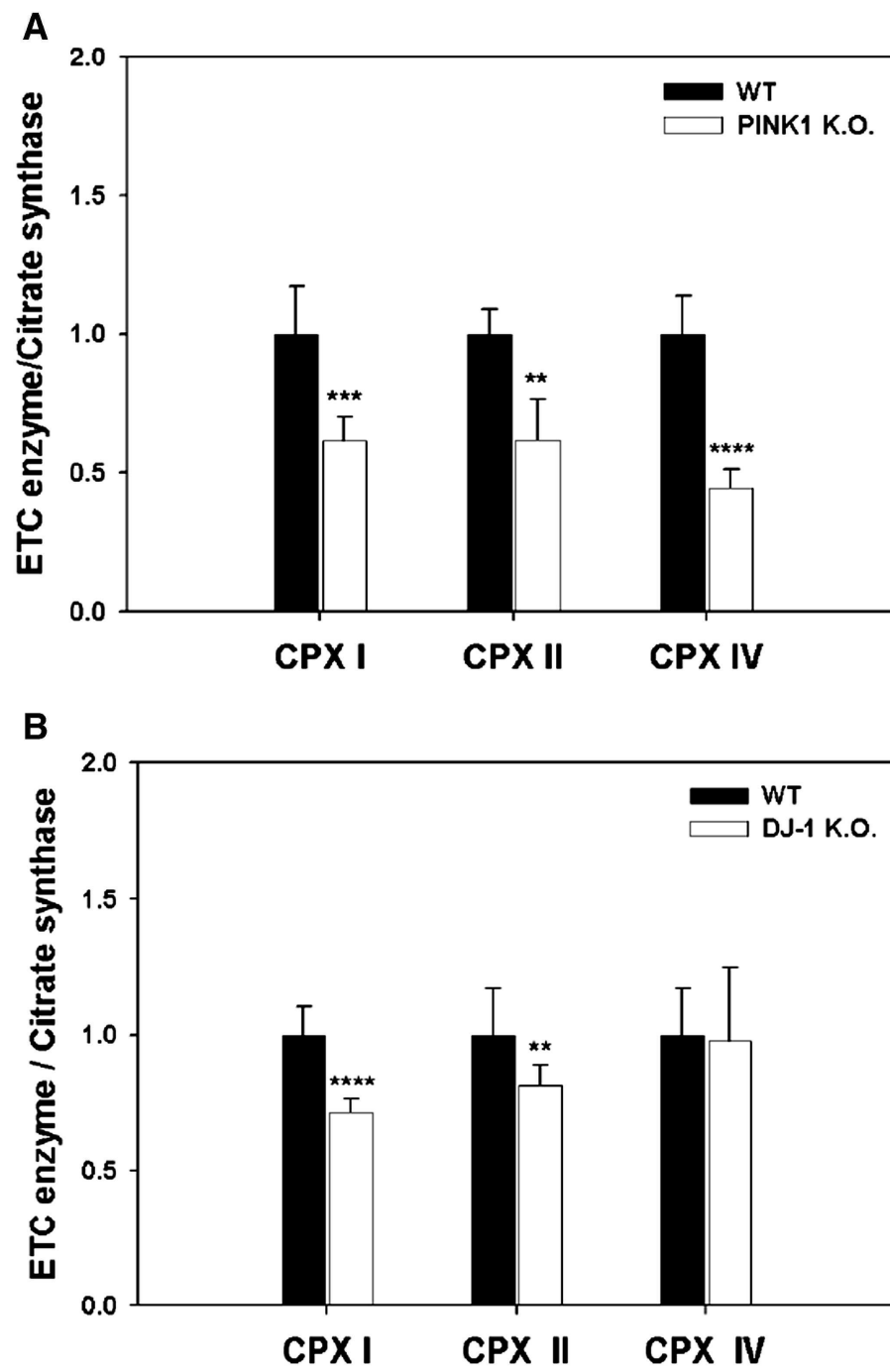
도면3



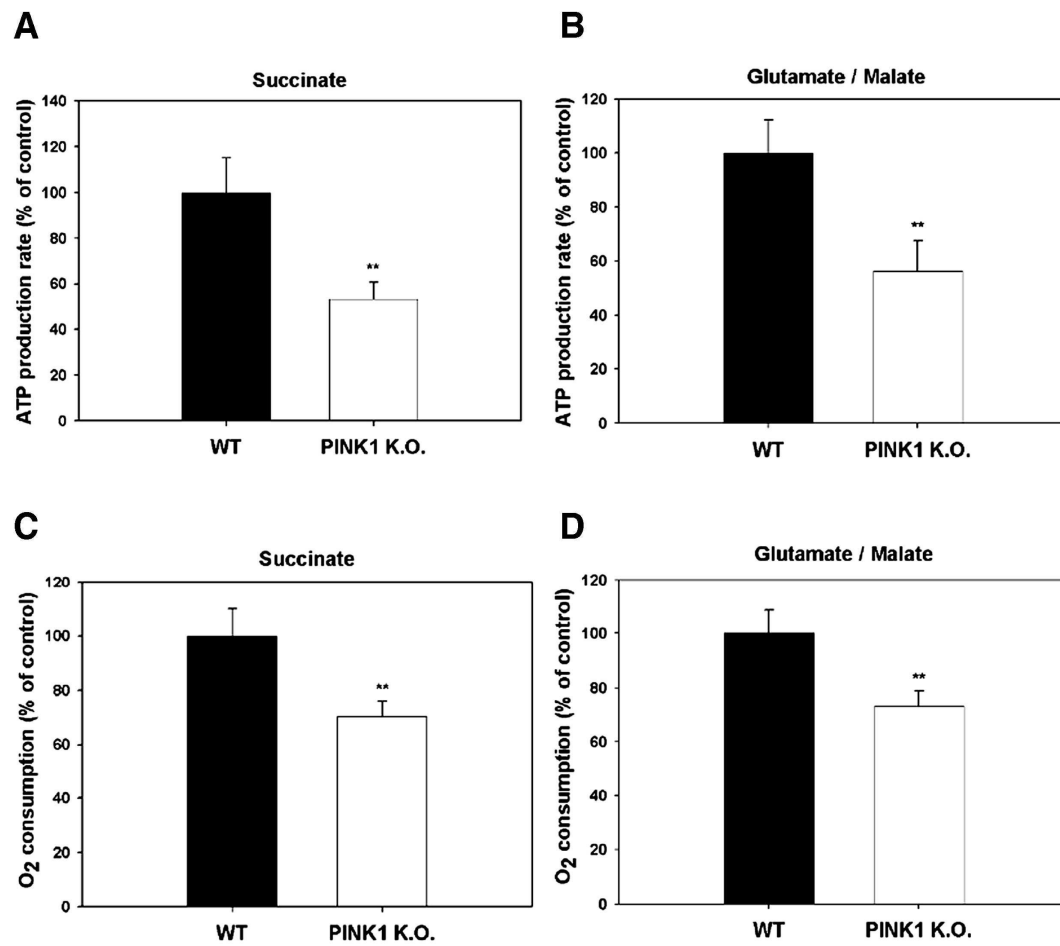
도면4



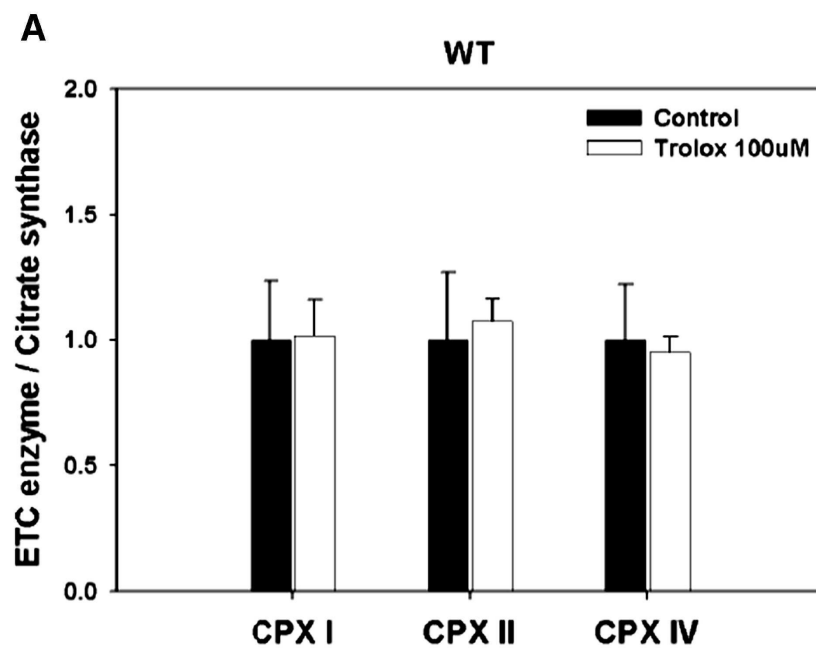
도면5



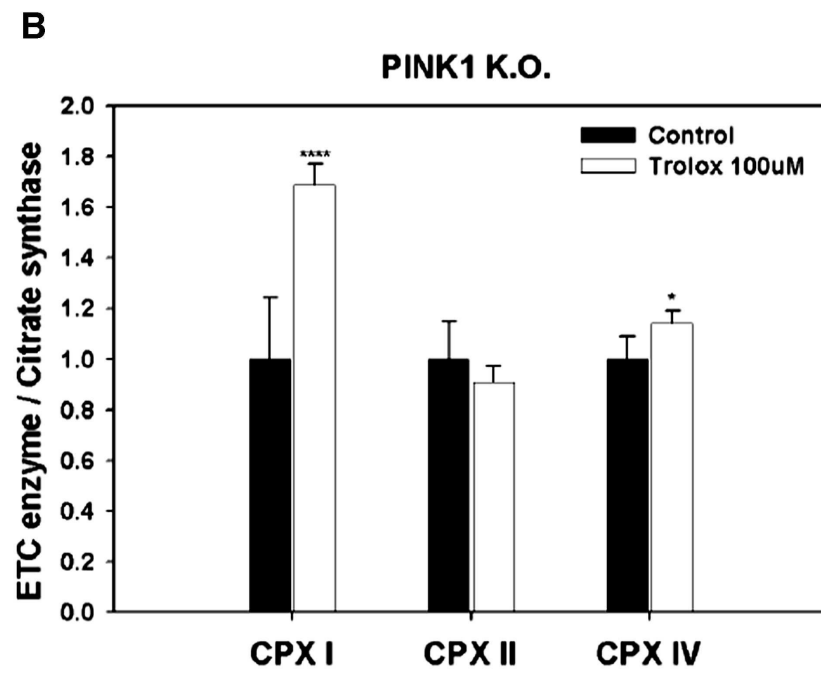
도면6



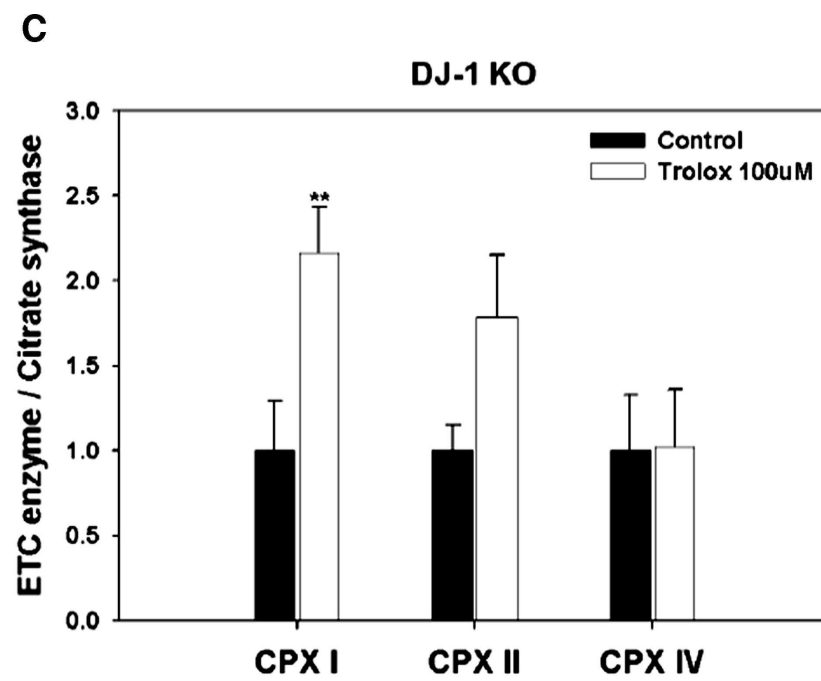
도면7a



도면7b

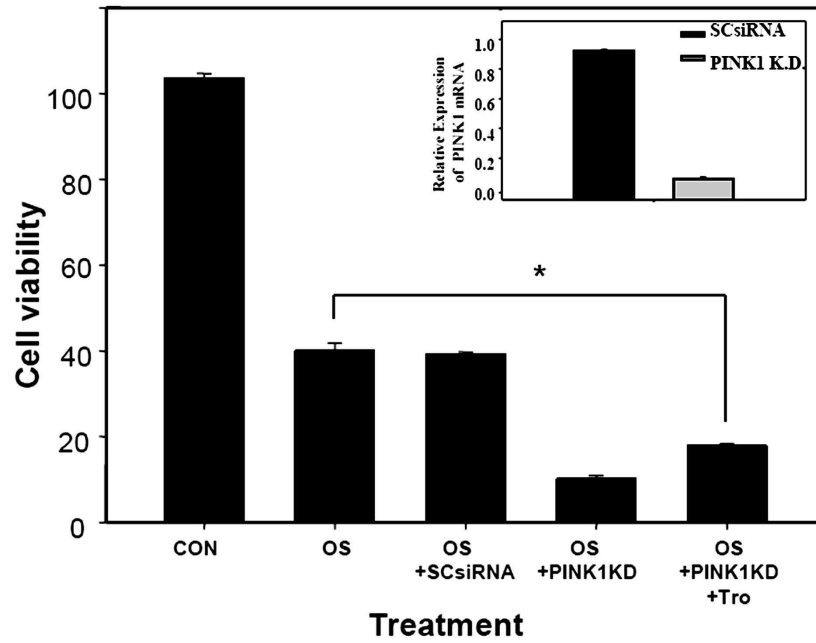


도면7c



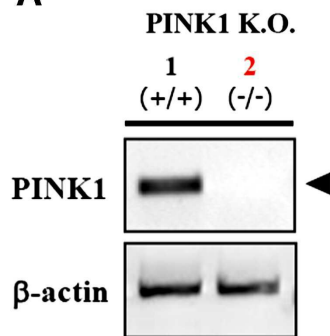
도면7d

D

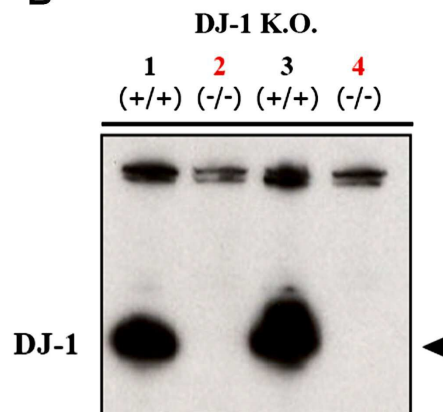


도면8

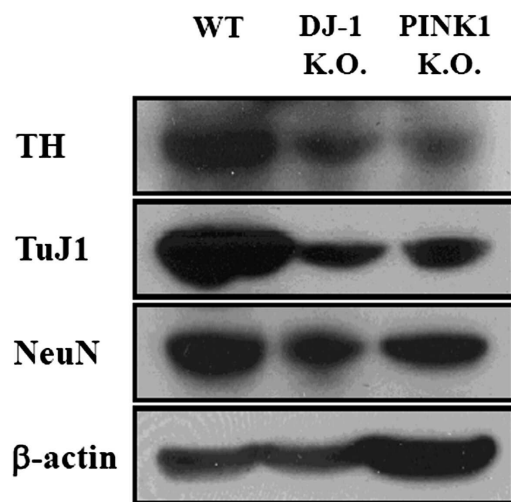
A



B



도면9



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
 <120> Immortalized PINK1 mutant dopaminergic neuron as a model for mitochondrial dysfunction

<130> PA110433/KR

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytochrome b5 forward primer

<400> 1

ctgcatcata aggtgtacga

20

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cytochrome b5 reverse primer

<400> 2

ttgatctgtc atctgg

16

<210> 3

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hsp60 forward primer
 <400> 3
 gcttgcaaaa ctttcagatg ga 22
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hsp60 reverse primer
 <400> 4
 cttttcattc acttcaacat cacttgt 27

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PINK1 forward primer
 <400> 5
 tgatctcaga ctttggctgc t 21
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PINK1 reverse primer
 <400> 6
 ccttggccat agaagggatt 20