(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월11일
(11) 등록번호 10-2612714
(24) 등록일자 2023년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/74 (2015.01) *A61K 38/46* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61K 38/46 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0000632
(22) 출원일자 2023년01월03일
심사청구일자 2023년01월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020190026045 A

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김경원
강원도 춘천시 방송길 70 온의롯데캐슬스카이클래스 104동 2202호
최수지
강원도 홍천군 내면 구룡령로 6461
(74) 대리인
특허법인본

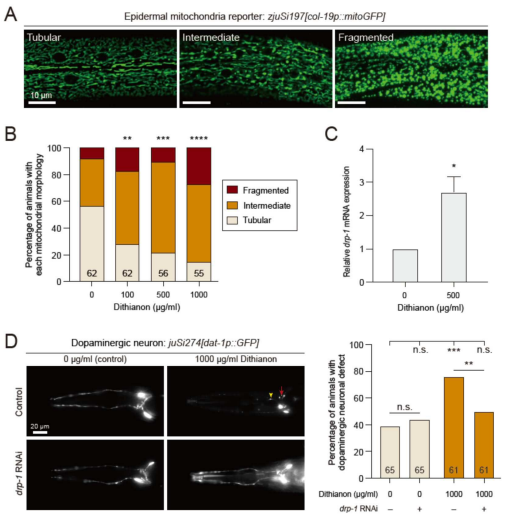
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 여경숙

(54) 발명의 명칭 **디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물 및 신경 손상 관련 증상의 경감 방법**

(57) 요 약

본 발명은 RNA 간섭을 이용한 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감 방법에 관한 것이다. 본 발명은 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 플라스미드를 포함하는 HT115 박테리아를 포함하는, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61P 25/16 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711159451
과제번호 2019M3C7A1031836
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발
연구과제명 다중 동물모델의 신경생물학적 정밀분석을 통한 환경 유해물질의 뇌발달장애 유발기전 분석과 진단 및 제어원천기술 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 강원대학교
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 플라스미드를 포함하는 HT115 박테리아를 포함하는, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 도파민 신경 손상 관련 증상은 파킨슨병인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 미토콘드리아의 절편화는 *drp-1* mRNA 과발현에 의한 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 *drp-1* RNA 간섭(RNAi)에 의해 *drp-1* 발현 수준을 경감시키는, 조성물.

청구항 7

디티아논에 의해 신경독성이 유도된 인간 이외의 동물 모델에 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 플라스미드를 포함하는 HT115 박테리아를 포함하는 조성물을 처리하여 도파민 신경 손상 관련 증상을 경감시키는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 동물 모델은 예쁜꼬마선충 동물 모델인, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 도파민성 신경 독성이 유도되는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 디티아논에 의해 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 미토콘드리아의 절편화는 *drp-1* mRNA의 과발현에 의한 것인, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 RNA 간섭을 이용한 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 디티아논(dithianon)은 1963년부터 사과, 배, 포도 및 기타 과일과 채소의 광범위한 곰팡이 질병을 방제하기 위해 광범위하게 사용된 퀴논 기반의 다중 부위 살진균제이다. 디티아논은 살충제의 일종으로서, 곤충, 선충류, 곰팡이, 박테리아 및 잡초를 죽임으로써 작물 성장을 촉진하기 위해 농업에서 일반적으로 사용되는 화학 물질 중 하나이다. 정확한 작용 방식은 알려져 있지 않지만 많은 단백질의 시스테인 잔기에서 발견되는 티올(설프하이드릴) 그룹에 비특이적으로 부착하여 단백질 구조 변화 및 효소 억제를 유발한다. 디티아논은 식물 병원성 진균의 포자 발아를 억제한다. 그러나 디티아논은 비식물성 Saccharomyces cerevisiae에도 독성이 있어 미토콘드리아 막 전위를 변경하여 막 무결성을 저하시키고 활성 산소 종(Reactive Oxygen Species; ROS)의 축적을 유발한다. 또한 디티아논은 인간 단핵구 유래 대식세포에도 독성이 있어 면역 조절 효과가 있음을 암시한다. 또한, 디티아논은 티올 반응성이 있는 다중 부위 살진균제로서 미토콘드리아 무결성을 변경하고 세포 내 ROS 생산을 증가시킬 가능성이 있으므로 비식물병원성 효모, 땅벌, 심지어 인간과 같은 비표적 유기체에 의도하지 않은 결과를 초래할 수 있다.

[0003] 농작물 재배시 사용된 살충제는 곤충이나 균류를 죽인 이후에도 종종 환경에 남아 있으며 대상이 아닌 식물과 동물에 독성을 나타낼 수 있다. 이러한 살충제는 또한 인간 건강에 심각한 악영향을 미치며 농업 종사자, 임산부 및 유아에게 특히 위험한다. 만성적으로 인체에 노출되면 면역체계를 파괴하고 생식기능을 손상시키며 퇴행성 신경질환을 일으킬 수 있다. 특히 살충제 노출은 파킨슨병(PD)의 위험 증가와 관련이 있다. PD는 중뇌에서 도파민 방출 뉴런의 손실로 인해 떨림, 느린 움직임, 경직된 근육, 손상된 자세 및 균형을 포함한 움직임에 영향을 미치는 진행성 신경계 장애이다. 모든 파킨슨병 환자의 10~15%만이 유전적 요인으로 발생하며 나머지는 주로 살충제, 중금속, 유기 오염물질과 같은 환경 독소로 인한 환경적 요인이다.

[0004] 본 발명에서는 디티아논이 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)에서 신경 독성에 미치는 영향을 확인하고, 디티아논에 의해 유도된 신경 독성을 감소시키는 방법에 대해 연구하였다.

선행기술문헌

[0005] Alavanja, M. C., et al., 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. Annu Rev Public Health. 25, 155-97.

[0006] Aryal, B., Lee, Y., 2019. Disease model organism for Parkinson disease: Drosophila melanogaster. BMB Rep. 52, 250-258.

[0007] Asikainen, S., et al., 2005. Selective sensitivity of Caenorhabditis elegans neurons to RNA interference. Neuroreport. 16, 1995-9.

[0008] Atkuri, K. R., et al., 2007. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. Curr Opin Pharmacol. 7, 355-9.

[0009] Baltazar, M. T., et al., 2014. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. Toxicol Lett. 230, 85-103.

[0010] Barnham, K. J., et al., 2004. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Nat Rev Drug Discov. 3, 205-14.

[0011] Berk, M., et al., 2013. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. Trends Pharmacol Sci. 34, 167-77.

[0012] Berker, J., Hierholzer, O., Mohr, G., 1963. dithianon, a new organic compound with fungicidal properties. Insecticide Fung. Conf., 351-366.

[0013] Blackwell, T. K., et al., 2015. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in Caenorhabditis elegans. Free Radic Biol Med. 88, 290-301.

[0014] Bove, J., et al., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. NeuroRx. 2, 484-94.

[0015] Braungart, E., et al., 2004. Caenorhabditis elegans MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. Neurodegener Dis. 1, 175-83.

[0016] Brenner, S., 1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics. 77, 71-94.

[0017] Byrne, J. J., et al., 2019. Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in Caenorhabditis elegans. Cell Mol Life Sci. 76, 1967-1985.

[0018] Caldwell, K. A., et al., 2020. Modeling neurodegeneration in Caenorhabditis elegans. Dis Model Mech. 13.

[0019] Cooper, J. F., Van Raamsdonk, J. M., 2018. Modeling Parkinson's Disease in C. elegans. J Parkinsons Dis. 8, 17-32.

[0020] de Graaf, L., et al., 2022. Occupational pesticide exposure, cancer and chronic neurological disorders: A systematic review of epidemiological studies in greenspace workers. Environ Res. 203, 111822.

[0021] Deng, H., et al., 2018. The genetics of Parkinson disease. Ageing Res Rev. 42, 72-85.

[0022] Dias, V., et al., 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. J Parkinsons Dis. 3, 461-91.

[0023] European Food Safety, A., et al., 2020. Updated peer review of the pesticide risk assessment for the active substance dithianon in light of confirmatory data submitted. EFSA J. 18, e06189.

[0024] Ewald, C. Y., et al., 2015. Dauer-independent insulin/IGF-1-signalling implicates collagen remodelling in longevity. Nature. 519, 97-101.

[0025] Floor, E., Wetzel, M. G., 1998. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. J Neurochem. 70, 268-75.

[0026] Fu, H., et al., 2020. Wounding triggers MIRO-1 dependent mitochondrial fragmentation that accelerates epidermal wound closure through oxidative signaling. Nat Commun. 11, 1050.

[0027] Harley, K. G., et al., 2016. Prenatal Exposure to Organophosphorous Pesticides and Fetal Growth: Pooled Results from Four Longitudinal Birth Cohort Studies. Environ Health Perspect. 124, 1084-92.

[0028] Hauser, D. N., Hastings, T. G., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. Neurobiol Dis. 51, 35-42.

[0029] Helley, M. P., et al., 2017. Mitochondria: A Common Target for Genetic Mutations and Environmental

Toxicants in Parkinson's Disease. Front Genet. 8, 177.

[0030] Hemmati-Dinarvand, M., et al., 2019. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. Neurosci Lett. 709, 134296.

[0031] Henchcliffe, C., Beal, M. F., 2008. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. Nat Clin Pract Neurol. 4, 600-9.

[0032] Hobert, O., 2013. The neuronal genome of Caenorhabditis elegans. WormBook. 1-106.

[0033] Inglis, P. N., et al., 2007. The sensory cilia of Caenorhabditis elegans. WormBook. 1-22.

[0034] Islam, M. S., et al., 2021. Pesticides and Parkinson's disease: Current and future perspective. J Chem Neuroanat. 115, 101966.

[0035] Jezek, J., et al., 2018. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. Antioxidants (Basel). 7.

[0036] Kahn, N. W., et al., 2008. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in Caenorhabditis elegans. Biochem J. 409, 205-13.

[0037] Kim, K. W., Jin, Y., 2015. Neuronal responses to stress and injury in C. elegans. FEBS Lett. 589, 1644-52.

[0038] Labrousse, A. M., et al., 1999. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. Mol Cell. 4, 815-26.

[0039] Lee, Y., et al., 2020. Effects of NAD(+) in Caenorhabditis elegans Models of Neuronal Damage. Biomolecules. 10.

[0040] Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 53, 401-26.

[0041] Martinez, T. N., Greenamyre, J. T., 2012. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Antioxid Redox Signal. 16, 920-34.

[0042] Martins, A. C., et al., 2022. Caenorhabditis elegans as a Model to Study Manganese-Induced Neurotoxicity. Biomolecules. 12, 1396.

[0043] Meiser, J., et al., 2013. Complexity of dopamine metabolism. Cell Commun Signal. 11, 34.

[0044] Meyer, J. N., et al., 2017. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. Toxicology. 391, 42-53.

[0045] Miller, K. G., et al., 1996. A genetic selection for Caenorhabditis elegans synaptic transmission mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 12593-8.

[0046] Min, H., et al., 2021. Nicotinamide Supplementation Improves Oocyte Quality and Offspring Development by Modulating Mitochondrial Function in an Aged Caenorhabditis elegans Model. Antioxidants (Basel). 10.

[0047] Miyazaki, I., Asanuma, M., 2008. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. Acta Med Okayama. 62, 141-50.

[0048] Moon, H. E., Paek, S. H., 2015. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Exp Neurobiol. 24, 103-16.

[0049] Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. Arch Toxicol. 91, 549-599.

[0050] Murphy, M. P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 417, 1-13.

[0051] Nass, R., et al., 2002. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 3264-9.

[0052] Onyango, I. G., 2008. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. Neurochem Res. 33, 589-97.

[0053] Palikaras, K., et al., 2022. Assessment of dopaminergic neuron degeneration in a C. elegans model of Parkinson's disease. STAR Protoc. 3, 101264.

[0054] Parny, M., et al., 2022. Differential immunomodulatory effects of six pesticides of different chemical classes on human monocyte-derived macrophage functions. Food Chem Toxicol. 163, 112992.

[0055] Pekec, T., et al., 2022. Ferritin-mediated iron detoxification promotes hypothermia survival in Caenorhabditis elegans and murine neurons. Nat Commun. 13, 4883.

[0056] Perfeito, R., et al., 2012. Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease--resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. Free Radic Biol Med. 53, 1791-806.

[0057] Prahl, M., et al., 2021. Exposure to pesticides in utero impacts the fetal immune system and response to vaccination in infancy. Nat Commun. 12, 132.

[0058] Qi, X., et al., 2013. A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. J Cell Sci. 126, 789-802.

[0059] Queiros, L., et al., 2021. Assessing the neurotoxicity of the carbamate methomyl in Caenorhabditis elegans with a multi-level approach. Toxicology. 451, 152684.

[0060] Raccagni, C., et al., 2020. Gait and postural disorders in parkinsonism: a clinical approach. J Neurol. 267, 3169-3176.

[0061] Raza, C., et al., 2019. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. Life Sci. 226, 77-90.

[0062] Richardson, J. R., et al., 2019. Neurotoxicity of pesticides. Acta Neuropathol. 138, 343-362.

[0063] Roux, A. E., et al., 2016. Reversible Age-Related Phenotypes Induced during Larval Quiescence in C. elegans. Cell Metab. 23, 1113-1126.

[0064] Ruszkiewicz, J. A., et al., 2018. C. elegans as a model in developmental neurotoxicology. Toxicol Appl Pharmacol. 354, 126-135.

[0065] Sammi, S. R., et al., 2022. Complementary biological and computational approaches identify distinct mechanisms of chlorpyrifos versus chlorpyrifos oxon induced dopaminergic neurotoxicity. Toxicol Sci.

[0066] Sarasija, S., Norman, K. R., 2018. Analysis of Mitochondrial Structure in the Body Wall Muscle of Caenorhabditis elegans. Bio Protoc. 8.

[0067] Sawin, E. R., et al., 2000. C. elegans locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. Neuron. 26, 619-31.

[0068] Scariot, F. J., et al., 2018. Necrotic cell death induced by dithianon on Saccharomyces cerevisiae. Pestic Biochem Physiol. 149, 137-142.

[0069] Schapira, A. H., et al., 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. J Neurochem. 54, 823-7.

[0070] Schapira, A. H., et al., 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet. 1, 1269.

[0071] Starkov, A. A., 2008. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. Ann N Y Acad Sci. 1147, 37-52.

[0072] Sturdik, E., Drobnica, L., 1980. Effect of 2,3-dinitrilo-1,4-dithia-9,10-antraquinone on Ehrlich ascites carcinoma and yeast cells. Chem Biol Interact. 30, 105-4.

[0073] Subramaniam, S. R., Chesselet, M. F., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. Prog Neurobiol. 106-107, 17-32.

[0074] Syromyatnikov, M. Y., et al., 2017. Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (Bombus terrestris L.). Pestic Biochem Physiol. 135, 41-46.

[0075] Tao, J., et al., 2017. Antioxidant response is a protective mechanism against nutrient deprivation in C. elegans. Sci Rep. 7, 43547.

[0076] Tejeda-Benitez, L., Olivero-Verbel, J., 2016. Caenorhabditis elegans, a Biological Model for Research in Toxicology. Rev Environ Contam Toxicol. 237, 1-35.

[0077] Timmons, L., et al., 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans. Gene. 263, 103-12.

[0078] Tudi, M., et al., 2021. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. Int J Environ Res Public Health. 18.

[0079] Tullet, J. M., et al., 2008. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans. Cell. 132, 1025-38.

[0080] Varghese, J. V., et al., 2021. Pesticide applicators and cancer: a systematic review. Rev Environ Health. 36, 467-476.

[0081] Verstraeten, A., et al., 2015. Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. Trends Genet. 31, 140-9.

[0082] Vitkalova, I. Y., et al., 2021. The effect of pesticides on the mtDNA integrity and bioenergetic properties of potato mitochondria. Pestic Biochem Physiol. 172, 104764.

[0083] Wilson, J., et al., 2020. Gait Progression Over 6 Years in Parkinson's Disease: Effects of Age, Medication, and Pathology. Front Aging Neurosci. 12, 577435.

[0084] Wood, P., Fisher, B., 2017. The effect of fungicides on spore germination, mycelial growth and lesion development of Phlyctema vagabunda (syn: Neofabraea alba)(bull's eye rot of apples). New Zealand Plant Protection. 70, 112-119.

[0085] Yang, D., et al., 2021. Mitochondrial Dynamics: A Key Role in Neurodegeneration and a Potential Target for Neurodegenerative Disease. Front Neurosci. 15, 654785.

[0086] Zhang, X., et al., 2020. Drp1, a potential therapeutic target for Parkinson's disease, is involved in olfactory bulb pathological alteration in the Rotenone-induced rat model. Toxicol Lett. 325, 1-13.

[0087] Zhou, S., et al., 2013. Caenorhabditis elegans neuron degeneration and mitochondrial suppression caused by selected environmental chemicals. Int J Biochem Mol Biol. 4, 191-200.

[0088] Ziv, I., et al., 1997. Nigrostriatal neuronal death in Parkinson's disease--a passive or an active genetically-controlled process? J Neural Transm Suppl. 49, 69-76.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0089] 본 발명은 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 박테리아를 포함하는, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0090] 또한, 본 발명은 디티아논에 의해 신경독성이 유도된 동물 모델에서 RNA 간섭 처리를 통해 도파민 신경 손상 관련 증상을 경감시키는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0091] 또한, 본 발명은 디티아논에 의해 유도된 신경 손상 관련 증상의 예방 또는 치료용 조성물 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0092] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0093] 본 발명은 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 박테리아를 포함하는, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물을 제공한다.

[0094] 상기 *drp-1* RNA 간섭(RNAi) 공급 박테리아는 *drp-1* RNAi 플라스미드를 포함하는 박테리아를 성장시켜 제조된 것일 수 있다.

[0095] 상기 도파민 신경 손상 관련 증상은 파킨슨병일 수 있다.

[0096] 상기 디티아논에 의해 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도될 수 있다.

[0097] 상기 산화 미토콘드리아의 절편화는 *drp-1* 과발현에 의한 것일 수 있다.

[0098] 상기 조성물은 *drp-1* RNA 간섭(RNAi)에 의해 *drp-1* 발현 수준을 경감시키는 것일 수 있다.

[0099] 본 발명은 또한, 디티아논에 의해 신경독성이 유도된 동물 모델에 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 박테리아를 포함하는 조성물을 처리하여 도파민 신경 손상 관련 증상을 경감시키는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법을 제공한다.

[0100] 상기 *drp-1* RNA 간섭(RNAi) 공급 박테리아는 *drp-1* RNAi 플라스미드를 포함하는 박테리아를 성장시켜 제조된 것일 수 있다.

[0101] 상기 동물 모델은 예쁜꼬마선충 동물 모델일 수 있다.

[0102] 상기 디티아논에 의해 도파민성 신경 독성이 유도되는 것일 수 있다.

[0103] 상기 디티아논에 의해 표피 세포에서 미토콘드리아 절편화가 유도되는 것일 수 있다.

[0104] 상기 산화 미토콘드리아의 절편화는 *drp-1* mRNA의 과발현에 의한 것일 수 있다.

[0105] 본 발명은 또한, 하기 단계를 포함하는 디티아논에 의해 유도된 신경 손상 관련 증상의 예방 또는 치료용 조성물 후보물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다: 디티아논을 예쁜꼬마선충에 처리하여 동물 모델을 제조하는 단계; 상기 동물 모델에서 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) mRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 대조군(미처리군)에 비하여 상기 *drp-1* mRNA의 발현 수준을 감소시키는 물질을 후보 물질로 선별하는 단계.

[0106] 상기 *drp-1* mRNA의 발현 수준은 정량적 RT-PCR에 의해 측정되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0107] 본 발명은 dynamin 관련 단백질-1(*drp-1*) RNA 간섭(RNAi) 박테리아를 포함하는, 디티아논에 의해 유도된 도파민 신경 손상 관련 증상의 경감용 조성물을 제공할 수 있다.

[0108] 또한, 본 발명은 디티아논에 의해 신경독성이 유도된 동물 모델에서 RNA 간섭 처리를 통해 도파민 신경 손상 관련 증상을 경감시키는, 신경 손상 관련 증상의 경감 방법을 제공할 수 있다.

[0109] 또한, 본 발명은 디티아논에 의해 유도된 신경 손상 관련 증상의 예방 또는 치료용 조성물 후보물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0110] 도 1은 디티아논이 예쁜꼬마선충에서 도파민성 신경변성을 유도한 결과를 나타낸 도이다: (A) 실험 절차의 개략도. (B) 도파민성 뉴런에서 GFP를 발현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽 패널). 노란색 화살표는 기포를 나타내고 노란색 화살표는 둥근 세포체를 나타내고 빨간색 화살표는 세포 손실을 나타낸다. 축척 막대=20 μm. 디티아논에 의해 유도된 도파민성 CEP 신경 손상의 정량화(오른쪽 패널). (C) GABAergic 뉴런에서 GFP를 발현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽). 축척 막대=50 μm. 디티아논에 의해 유도된 GABAergic 신경변성의 정량화(오른쪽). (D) 콜린성 뉴런에서 GFP를 발현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽). 축척

막대=50㎛. 디티아논에 의해 유도된 콜린성 신경퇴행의 정량화(오른쪽). 총 샘플 크기는 막대에 표시된다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 통계: Fisher의 정확 검정; 중요하지 않음(n.s.), *p<0.05, ***p<0.001.

도 2는, 디티아논에 노출된 선충의 발달 실험 결과를 나타낸 도이다: (A) 실험 절차의 개략도. L1 단계의 선충은 48시간 동안 디티아논에 노출되었고 발달 단계는 즉시(0시간), 24시간 후 또는 48시간 후의 세 가지 다른 시점에서 결정되었다. (B) 예쁜꼬마선충의 발달 단계. (C) 디티아논 노출 후 0시간(상단 패널) 및 24시간(하단 패널)에서 시드된 NGM 플레이트에서 성장하는 예쁜꼬마선충의 대표 이미지.

도 3은. 디티아논에 의해 유도된 산화 스트레스 실험 결과를 나타낸 도이다: (A) 실험 절차의 개략도. (B) 특정 ROS 감지 형광 프로브인 CellROX deep red를 사용하여 총 세포 ROS 수준을 측정했다. 선충의 형광 현미경 사진(머리 영역). 축척 막대=20㎛. 마이크로플레이트 리더를 사용한 형광 강도의 정량화(오른쪽). (C) 산화 스트레스 반응 리포터를 표현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽). 축척 막대=50㎛. 마이크로플레이트 판독기로 자동화된 방법을 사용한 GFP 형광 강도의 정량화(오른쪽). 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 통계: one-way ANOVA, **p <0.01, ***p <0.001, ****p <0.0001. (D) NAC는 디티아논 유발 도파민성 신경변성을 예방했다. 도파민성 뉴런에서 GFP를 발현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽). 노란색 화살촉은 물집을 나타냅니다. 축척 막대=20㎛. NAC 보충 후 CEP 신경 손상의 정량화(오른쪽). 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 통계: Fisher의 정확 검정; 중요하지 않음(n.s.), *p<0.05, ***p<0.001.

도 4는, 디티아논은 미토콘드리아 절편화를 유도하고 *drp-1* 발현을 증가시킨 결과를 나타낸 도이다: (A) 표피 미토콘드리아의 대표적인 공초점 이미지. 축척 막대=10㎛. (B) 표피에서 미토콘드리아 형태의 각 카테고리를 갖는 선충의 백분율. 총 샘플 크기는 막대에 표시된다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 통계: Fisher의 정확 검정; ***p<0.001, ****p<0.0001. (C) gpd-1/4로 정규화된 미처리 및 처리 조건에서 drp-1의 전사체 풍부성을 나타내는 qRT-PCR의 상대적 정량화. 데이터는 두 생물학적 복제의 평균 ± SEM으로 표시된다. 통계: unpaired 스튜던트 t-테스트; *p<0.05. (D) 도파민성 뉴런에서 GFP를 발현하는 형질전환 선충의 형광 현미경 사진(왼쪽). 노란색 화살표는 기포를 나타내고 빨간색 화살표는 셀 손실을 나타낸다. 축척 막대=20㎛. *drp-1* RNAi 처리 후 도파민성 CEP 신경 손상의 정량화(오른쪽). 총 샘플 크기는 막대에 표시된다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 통계: Fisher의 정확 검정; 중요하지 않음(n.s.), **p<0.01, ***p<0.001

도 5는, 디티아논은 스래싱 횟수를 감소시키고 기본 느린 응답을 손상시키는 결과를 나타낸 도이다: (A) 스래싱 동작의 도식. 스래싱 동작은 30초 동안 C자 모양의 중간 몸체 굽힘 수를 세어 평가한다. (B) 디티아논에 노출 시 스래싱 속도(30초 동안 몸이 구부러짐)의 정량화. 총 샘플 크기는 막대에 표시된다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다. 통계: Dunnett의 다중 비교 테스트를 통한 one-way ANOVA; *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001. (C) BSR 분석의 개략도. (D) 디티아논에 노출 시 BSR의 정량화. 잘 먹은 동물을 박테리아가 있거나 없는 NGM 플레이트로 옮기고 각 동물의 운동 속도를 세었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 통계: unpaired 스튜던트 t-테스트; 중요하지 않음(n.s.), ****p <0.0001.

도 6은, 디티아논은 산화 스트레스와 미토콘드리아 절편화를 통해 도파민성 신경변성을 유발하는 실험 결과를 나타낸 도이다. 예쁜꼬마선충 모델에서 디티아논은 도파민성 신경독성 및 도파민 관련 행동의 결손을 유발한다. 만성 디티아논 노출은 예쁜꼬마선충에서 산화 스트레스와 미토콘드리아 분열을 일으켜 미토콘드리아 기능 장애와 신경 퇴화를 촉진하는 악순환을 유발할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0111] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 증상, 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 증상, 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 개체에서 증상, 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.

[0112] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 개체에서 (a) 증상, 질환 또는 질병의 발전의 억제 (b) 증상, 질환 또는 질병의 경감 및 (c) 증상, 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.

[0113] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0115] **재료 및 방법**

[0117] **1. 예쁜꼬마선충 균주 및 유지**

[0118] 모든 예쁜꼬마선충 균주는 살아있는 Escherichia coli OP50(Brenner, 1974)이 접종된 Nematode Growth Medium(NGM) 플레이트에서 20° C로 유지되었다. 본 연구에서는 N2(야생형; WT), CZ22632(*juSi274[dat-1p::GFP]*) IV), CZ13799(*juIs76[unc-25p::GFP]* II), CZ631(*juIs14[acr-2p::GFP]* IV), CL2166(*dvIs19[gst-4p::GFP::NLS]*) III), SHX2157(*zjuSi197[col-19p::mitoGFP]* I) 및 SD1347(*ccIs4251[myo-3p ::mitoGFP + myo-3p::GFP::LacZ::NLS]* I). 일부 균주는 샌디에이고 캘리포니아 대학교의 Yishi Jin 실험실, Zhejiang University의 Suhong Xu 실험실 및 NIH Office of Research Infrastructure Programs(P40 OD010440)에서 자금을 지원하는 CGC에서 제공되었다.

[0119] 표백 용액(1% NaOCl, 0.5M NaOH)을 사용하여 임신한 자웅동체를 표백 처리하여 선충 배양물의 동기화를 얻었다. 동기화된 첫 번째 애벌레(L1) 단계 개체군을 얻기 위해 배아를 M9 완충액(42mM Na_2HPO_4, 22mM KH_2PO_4, 8.5mM NaCl 및 1mM $MgSO_4$)에 재현탁하고 20° C에서 밤새 부화했다.

[0121] **2. 예쁜꼬마선충의 디티아논 노출**

[0122] 동기화된 L1 선충을 증류수로 한 번 세척한 다음 대장균 OP50이 보충된 완전 K-배지(32mM KCl, 51mM NaCl, 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgSO_4$ 및 13μM 콜레스테롤)로 희석했다. 디티아논(Sigma-Aldrich, cat# 45462)을 완전한 K-배지에서 준비하고 노출 전 5분 동안 초음파 처리했다(그림 S1A). 투명한 48웰 플레이트에 웰당 약 50마리의 선충을 넣고 다양한 양의 디티아논(0, 100, 500, 1000μg/ml)을 최종 부피 200μL로 노출시켰다. 선충은 실험 기간 동안 가끔 흔들면서 20° C에서 배양되었다.

[0124] **3. 신경 변성 분석 및 선충 이미징**

[0125] 우리는 다음 GFP 리포터 선충 변종을 사용하여 신경 형태를 관찰했다: 도파민성 뉴런의 경우 CZ22632(*juSi274[dat-1p::GFP]*), GABAergic 뉴런의 경우 CZ13799(*juIs76[unc-25p::GFP]*) 및 콜린성 뉴런의 경우 CZ631(juIs14*[acr -2p::GFP]*). 요약하면, 동기화된 L1 선충을 다양한 양의 디티아논에 노출시키고 액체 배지에서 72시간 동안 배양했다. M9 완충액으로 두 번 세척한 후 선충을 OP50 시드 NGM 플레이트에 올려 복구했다. 30분의 회복 기간 후, 각 조건에서 약 10마리의 선충을 10% 아가로스 패드가 포함된 현미경 슬라이드에 장착하고 표면형광 현미경(Leica DM 2000)으로 관찰했다. Leica DFC 7000 GT 카메라를 사용하여 이미지를 얻었다(이미지화를 위해 선충을 5mM levamisole(Sigma, cat# L9756)이 포함된 10% 아가로스 패드에 장착함). 하나 이상의 뉴런에서 신경변성 표현형을 나타내는 선충은 영향을 받는 것으로 계산되었다. Dopaminergic cephalic sensilla (CEP) 뉴런은 다음과 같은 표현형이 있는 경우 퇴행하는 것으로 생각되었다: 수포(수상돌기에서 비정상적 분기 또는 점상 형성), 둥글림(세포체가 둥글고 수축) 또는 신경 손실(수상돌기 또는 세포체의 손실). 각 표현형을 가진 개인의 수를 세었다. 신경변성은 다음 기준에 따라 점수를 매겼다: '마일드' = 수포 또는 둥근 유형; '보통' = 수포 및 둥근 유형, '심각' = 신경돌기 또는 세포체의 완전한 손실. GABAergic 및 cholinergic 운동 뉴런은 선충에 복부 신경 코드 간격이 있으면 퇴화되는 것으로 생각되었다.

[0127] **4. 예쁜꼬마선충 발달 분석**

[0128] 48시간 동안 디티아논으로 처리된 L1 단계의 선충을 OP50 시드 NGM 플레이트로 옮기고 발달 단계를 세 가지 다른 시점에서 결정했다: 즉시(0시간; L1에서 48시간), 24시간 후(L1에서 72시간) , 그리고 48시간 후(L1에서 96시간).

[0130] **5. CellROX 프로브를 사용한 ROS 검출 분석**

[0131] 세포질 ROS는 CellROX 프로브에 의해 검출되었다. L4 단계의 선충을 디티아논에 24시간 동안 노출시키고 M9 완충액으로 2회 세척하였다. 그런 다음 이 선충을 바닥이 투명한 96웰 블랙 플레이트로 옮겼다(웰당 M9 버퍼 200μL에 ~200마리의 선충). 이 선충을 5 μM CellROX Deep Red 프로브 염색 용액(Invitrogen, cat# C10422)과 함께 20° C에서 30분 동안 배양했다. 형광 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices SpectraMax iD3)를 사용하여 여기의 경우 630nm에서, 방출의 경우 670nm에서 형광 강도를 측정했다. 형광 현미경 이미징을 위해 이 선충을 5mM levamisole이 포함된 10% 아가로즈 패드가 포함된 현미경 슬라이드에 장착한 다음 OP50 시드 NGM 플레이트에서 30분 동안 복구했다. Leica DFC 7000 GT 카메라를 사용하여 형광 현미경(Leica DM 2000)에서 이미지를 얻었다.

[0133] **6. 상대적 gst-4p::예쁜꼬마선충의 GFP 형광 강도**

[0134] glutathione-S-transferase-4(*gst-4*)는 ROS에 의해 유도될 수 있기 때문에 CL2166(*dvIs19[gst-4p::GFP::NLS]*) 균주를 사용하여 산화 스트레스에 대한 마커로서 형광 강도를 측정했다. 형광 강도는 두 가지 방법으로 측정되었다. (1) 다중 모드 마이크로플레이트 리더를 사용하여 더 많은 선충 집단을 위한 자동화된 방법 및 (2) 형광 현미경을 사용하여 개별 선충에 대한 이미징 방법.

[0135] 자동화 방법의 경우, L4 단계에서 24시간 동안 디티아논 처리된 선충을 M9 완충액으로 두 번 세척하고 바닥이 깨끗한 96웰 블랙 플레이트로 옮겼다(웰당 200 μL의 K-배지에서 ~200 선충). 5분의 회복 기간 후, 형광 마이크로플레이트 판독기(BioTek Synergy H1)를 사용하여 선충의 GFP 강도를 여기의 경우 485nm에서, 방출의 경우 530nm에서 측정했다.

[0136] 이미징 방법은 위에서 언급한 디티아논 처리 및 선충 회수 후 각 조건에서 약 10마리의 선충을 5mM levamisole이 포함된 10% agarose 패드가 포함된 현미경 슬라이드에 장착하고 epifluorescence 현미경(Leica DM 2000)으로 관찰했다. 각 선충은 이전에 설명한 대로 '낮음', '중간' 또는 '높음'으로 분류되었다. '낮음' = GFP 신호가 약하거나 없음, '중간' = 선충의 전방 및 후방 끝(즉, 인두 및 꼬리)에서 비교적 높은 신호, '높음' = 선충 본체 전체에 걸쳐 강한 GFP 강도.

[0138] **7. NAC(N-acetylcysteine)로 항산화 치료**

[0139] 우리는 NAC를 사용한 항산화 처리에 의한 도파민 신경세포의 회복을 관찰했다. 동기화된 CZ22632(*juSi274[dat-1p::GFP]*) L1 선충은 대장균 OP50이 보충된 완전한 K-배지에서 준비되었다. 디티아논은 완전한 K-배지에서 준비되었고 노출 전에 5분 동안 초음파 처리되었다. NAC(Sigma-Aldrich, cat# A9165)도 완전한 K-배지로 준비했다. 노출된 선충 그룹을 1000 μg/ml 디티아논 및/또는 1 mM NAC로 처리한 다음 20° C에서 72시간 동안 배양했다. M9 완충액으로 두 번 세척한 후 선충을 OP50 시드 NGM 플레이트에 올려 복구했다. 30분의 복구 기간 후 위에서 설명한 대로 선충이 관찰되었다.

[0141] **8. 미토콘드리아 형태 분석**

[0142] 표피용 SHX2157(*zjuSi197[col-19p::mitoGFP]*) 및 체벽 근육용 SD1347(*ccIs4251[myo-3p::mitoGFP]*)의 두 가지 미토콘드리아 리포터 계통을 사용하여 미토콘드리아 형태를 관찰했다. 간단히, 동기화된 L4 선충은 24시간 동안 다양한 양의 디티아논에 노출되었다. M9 완충액으로 두 번 세척한 후 선충을 OP50 시드 NGM 플레이트에 올려 복구했다. 30분의 회복 기간 후, 각 조건에서 약 10마리의 선충을 M9 완충액이 포함된 10% 아가로스 패드를 포함하는 현미경 슬라이드에 장착하고 형광 현미경(Leica DM 2000)으로 관찰했다. 우리는 이전에 설명한 대로 다음과 같은 미토콘드리아 형태를 나타내는 선충에 점수를 매겼다: '튜브형' = 미토콘드리아가 그물 모양으로 연결되어 있는 형태, '절편형' = 모든 미토콘드리아가 핵분열에 의해 구형 또는 타원형 형태, '중간형' = '튜브형'과 '절편형'의 혼합 표현형. Nikon Eclipse Ti2 공초점 현미경을 사용하여 표피 미토콘드리아 이미지를 촬영했다.

[0144] **9. 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)**

[0145] 하우스키핑 유전자로서 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(*gpd-1/4*)에 대해 정상화하는 dynamin 관련 단백질-1(dynamin-related protein-1; *drp-1*)의 상대적인 mRNA 발현 수준을 정량화했다. Trizol(Ambion)을 사용한 RNA 추출 후, gDNA 제거 키트(Toyobo)가 포함된 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix를 사용하여 총 RNA 500ng에서 cDNA를 합성했다. Bioneer exicycler 96에서 KOD SYBR qPCR Mix(Toyobo)로 PCR을 수행했다. 상대 RNA 발현 수준은 RQ(2-ddCt) 값으로 계산되었다. qRT-PCR에 사용되는 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

표 1

[0146]

Gene	Gene function	Forward Primer(5`-3`	Reverse Primer(3`-5`)
gpd-1	Housekeeping gene	GGACCAATGAAGGGAATCCTC	CATTGTCGTACCAAGAGACGAG
drp-1	Mitochondrial dynamics regulator	GAAAGAGCGCAGCTACAACC	TCTTGTGGGGACGTCTTGCT

[0147] **10. 2.10. RNA 간섭(RNA interference; RNAi) 공급 실험**우리는 RNAi에 의한 도파민성 뉴런 회복을 관찰했다. 동기화된 CZ22632(*juSi274[dat-1p::GFP]*) L1 선충은 디티아논 및/또는 *drp-1* RNAi 박테리아가 보충된 완전한 K-배지에서 준비되었다. RNAi 공급 박테리아는 50 μg/ml 암피실린 및 4mM IPTG가 포함된 LB에서 *drp-1* RNAi

플라스미드를 포함하는 HT115 박테리아를 성장시켜 준비했다. 박테리아를 펠릿화하고 K-배지에 재현탁시켰다. 노출된 선충 그룹을 48웰 플레이트에서 1000 μg/ml 디티아논 및 *drp-1* RNAi 박테리아로 처리했으며 최종 부피는 25 μg/ml 암피실린 및 1 mM IPTG가 보충된 완전한 K-배지 200 μL로 처리했다. 선충이 성충이 될 때까지 20 °C에서 배양하는 동안 배지는 매일 교체되었다. M9 완충액으로 두 번 세척한 후 선충을 OP50 시드 NGM 플레이트에 올려 복구했다. 30분의 복구 기간 후 위에서 설명한 대로 선충이 관찰되었다.

[0149] **11. 스레싱 분석**

[0150] 운동 능력을 평가하기 위해 N2 선충을 사용하여 thrashing assay를 수행했다. 동기화된 L1 선충을 다양한 양의 디티아논에 노출시키고 액체 배지에서 48시간 동안 배양했다. M9 완충액으로 2회 세척한 후 선충을 종자가 없는 NGM 플레이트로 옮기고 2 μl의 M9 완충액에 떨어뜨렸다. 30초의 적응 기간 후, 동영상 녹화기를 사용하여 선충의 움직임을 기록했다. 스래시는 헤드 투 테일 정현파 움직임으로 기록되었다.

[0152] **12. 기초 둔화 반응(BSR) 분석**

[0153] 도파민 의존성 행동 결함을 평가하기 위해 N2 선충을 사용하여 BSR 분석을 수행했다. 위에서 언급한 바와 같이 디티아논 처리 및 선충 회복 후, 선충을 OP50 시드 또는 시드되지 않은 NGM 플레이트로 옮겼습니다. 초기 5분의 적응 기간 후 BSR은 20초 동안 몸을 구부린 횟수를 세어 평가했다.

[0155] **13. 통계 분석**

[0156] 통계 분석은 GraphPad Prism, 버전 9(USA)를 사용하여 수행되었다. 모든 실험에서 $p < 0.05$는 통계적 유의성으로 간주되었다.

[0158] **결과**

[0159] **1. 디티아논 노출은 예쁜꼬마선충에서 도파민 신경 독성을 유발한다**

[0160] 디티아논의 신경독성학적 효과를 조사하기 위해 우리는 먼저 디티아논에 예쁜꼬마선충의 만성 노출 시 도파민 신경세포를 검사했다. 우리는 첫 번째 애벌레로부터 72시간 노출 후 도파민 신경세포(*juSi274[dat-1p::GFP]*)에서 GFP를 발현하는 선충에서 다양한 농도의 디티아논(0, 100, 500 및 1000 μg/ml)의 효과를 확인했다(L1) 단계(도 1A). 농업적 적용을 위해서는 75% 디티아논이 함유된 살충제를 800~1000배 또는 600~750 μg/ml의 디티아논으로 희석하는 것이 좋다. 따라서 우리는 100~1000 μg/ml(0.333~3.33mM) 범위의 농도에서 디티아논을 테스트하기로 결정했다. 디티아논 치료 시 도파민성 신경변성을 확인하기 위해 선충의 머리 부분에 위치한 감각 섬모가 있는 4개의 CEP 도파민성 뉴런을 모두 관찰했다. 디티아논 노출은 기포, 파손, 세포체 반올림 또는 신경돌기 또는 세포체의 완전한 손실과 같은 다양한 형태학적 변화를 초래했다(도 1B). 우리는 퇴행성 CEP 도파민 뉴런을 퇴행 정도에 따라 세 가지 범주로 나누었다: '마일드' = 기포 또는 둥근 유형; '보통' = 기포 및 둥근 유형, '심각' = 신경돌기 또는 세포체의 완전한 손실. 우리는 선충이 농도 의존적 방식으로 도파민성 뉴런의 변성을 나타내어 100 μg/ml의 디티아논만큼 낮은 용량에서 신경 변성을 나타내는 것을 발견했다(도 1B).

[0161] GABAergic 또는 cholinergic 운동 뉴런 변성을 평가하기 위해 우리는 L1 단계부터 72시간 노출 후 GABAergic 뉴런(*juIs76[unc-25p::GFP]*) 또는 cholinergic 뉴런(*juIs14[acr-2p:: GFP]*)에서 GFP를 발현하는 선충에서 복부 신경 코드 간격이 있는 선충의 수를 카운트했다. 놀랍게도 디티아논 치료는 두 운동 뉴런 모두에 유의미한 효과를 나타내지 않았다(GABAergic 뉴런의 경우 도 1C, 콜린성 뉴런의 경우 도 1D). 따라서 우리는 도파민 작동성 뉴런이 운동 뉴런에 비해 디티아논 유발 신경 퇴행에 더 취약하다는 결론을 내렸다.

[0162] 디티아논이 심각한 발달 독성을 일으키는지 여부를 테스트하기 위해 디티아논 처리된 선충의 발달을 관찰했다(도 2A). 우리는 선충이 발달이 약간 지연되었지만 모든 처리 조건에서 생존 가능하고 번식력이 있음을 발견했다(도 2B 및 2C). 처리된 선충의 발달 단계는 48시간 노출에서 처리되지 않은 선충에 비해 더 가변적이었다(L3에서 성체까지). 그러나 대부분의 선충은 노출된 지 72시간 만에 성충이 되었다.

[0163] 함께 찍은, 예쁜꼬마선충의 디티아논에 대한 만성 노출은 운동 뉴런보다 디티아논 노출에 더 취약한 도파민성 뉴런의 농도 의존적 신경 변성을 유도한다. 또한 디티아논은 발달 독성이 낮지만 선충 발달을 지연시킨다.

[0165] **2. 디티아논은 산화 스트레스를 유발한다.**

[0166] ROS 수준을 감지하는 데 사용되는 형광 프로브인 CellROX 시약을 사용하여 예쁜꼬마선충의 ROS 수준을 측정하였다(도 3A). 우리는 디티아논 노출이 농도 의존적 방식으로 세포 ROS 수준을 유의하게 증가시킨다는 것을 발견했다(도 3B). 100 μg/ml의 낮은 농도에서도 디티아논에 장기간 노출되면 ROS가 크게 유도되었다.

[0167] 이어서 디티아논이 산화 스트레스 반응을 유도하는지 알아보기 위해 산화 스트레스 반응 유전자인 gst-4의 발현을 조사하였다. gst-4는 핵 인자 E2 관련 인자 2(Nrf2)의 포유류 동족체이자 산화 스트레스 방어 메커니즘의 마스터 조절자인 SKN-1의 주요 다운스트림 표적이다. gst-4는 ROS에 의해 유도될 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 우리는 gst-4 리포터 균주(*dvIs19[gst-4p::GFP]*)를 사용하여 디티아논이 노출은 산화 스트레스 수준을 증가시킵니다. 형광 강도는 디티아논을 100 μg/ml만큼 낮은 용량으로 처리한 선충에서 극적으로 증가했다(자동 분석의 경우 도 3C).

[0168] ROS 유도가 디티아논에 의해 유발된 도파민성 신경변성에서 역할을 하는지 여부를 테스트하기 위해 우리는 ROS 스캐빈저인 N-아세틸시스테인(NAC)을 보충하려고 시도했다. 흥미롭게도 NAC는 디티아논에 의해 유도된 신경변성을 부분적으로 회복시켰다(도 3D). 우리는 또한 NAC 자체가 상당한 도파민성 신경변성(1 및 3mM)을 일으킨다는 것을 발견했다.

[0169] 그리고, 디티아논은 100μg/ml의 낮은 농도에서도 예쁜꼬마선충에서 ROS 및 *gst-4* 발현을 유도하여 디티아논이 선충에서 산화 스트레스를 유발함을 나타냈다. 또한, 항산화 보충제는 디티아논 유발 도파민성 신경퇴행을 예방할 수 있다.

[0171] **3. 디티아논은 미토콘드리아 절편화를 유도한다.**

[0172] 산화 스트레스가 미토콘드리아 분해와 밀접하게 관련되어 있다는 증거가 많은 기존 연구를 통해 알려지고 있다. 이전 연구에서는 디티아논이 석신산 탈수소효소(호흡기 복합체 II) 및 글리세롤-3-인산 탈수소효소를 억제함으로써 미토콘드리아에 영향을 미친다는 것을 보여주었다. 이러한 발견을 바탕으로 우리는 미토콘드리아의 미세구조를 조사했다. 우리는 표피(*zjuSi197[col-19allon::mitoGFP]*)에서 형광 태그가 부착된 미토콘드리아 균주를 사용하여 미토콘드리아 역학을 관찰했다. 표피 세포에서 미토콘드리아는 길쭉한 미토콘드리아의 평행 트랙으로 존재한다. 절편화 정도에 따라 미토콘드리아 역학을 튜브형, 중간 또는 절편형의 세 가지 표현형으로 분류했다(도 4A). 처리되지 않은 선충에서 대다수의 미토콘드리아는 튜브형을 취했다(도 4B). 디티아논에 노출된 후 더 많은 비율의 선충이 미토콘드리아 절편화를 보였다(도 4B). 또한, 우리는 디티아논 노출 후 체벽 근육(*ccIs4251[myo-3p::mitoGFP]*)에서 유사한 미토콘드리아 절편형을 발견했다. 따라서 디티아논 노출은 표피와 근육 세포 모두에서 농도 의존 방식으로 미토콘드리아 절편화를 증가시켰다.

[0173] Dynamin 관련 단백질-1(*Drp-1*)은 미토콘드리아 핵분열 단백질이며, 증가된 *Drp-1* mRNA의 발현은 과도한 미토콘드리아 핵분열을 촉진하여 PD로 이어진다. 우리는 qRT-PCR을 수행하여 *drp-1* mRNA의 발현 수준을 정량화했으며 500 μg/ml 농도에서 디티아논 노출 시 2.7배 증가함을 발견했다(도 4C). 디티아논이 선충에 노출되면 *drp-1* mRNA의 과발현으로 인해 발생하는 미토콘드리아 절편화를 유발한다.

[0174] 이어서 *drp-1* 하향 조절이 디티아논 유발 신경 독성으로부터 보호할 수 있는지 여부를 조사했다. 이를 위해 먹이를 주어 *drp-1* RNA 간섭(RNAi)을 수행했다. 디티아논에 노출된 선충에서, 도파민성 뉴런은 *drp-1* RNAi 공급 후 신경돌기 형태가 상당히 개선된 것으로 나타났다(도 4D). 이러한 데이터는 미토콘드리아 절편화가 디티아논 유발 신경독성에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0176] **4. 디티아논 노출은 도파민 의존 반응을 감소시킨다.**

[0177] 미토콘드리아는 근육에 풍부하기 때문에 미토콘드리아 기능 장애는 동물의 운동성을 손상시킬 것으로 예상된다. 우리는 디티아논 노출이 선충의 운동성을 감소시키는지 확인하기 위해 스래싱(액체에서 측면 수영) 분석을 수행했다(도 5A). 스래싱 분석은 운동성 결함을 식별하기 위한 민감한 방법이다. 야생형 동물의 몸부림은 지속적이고 높은 빈도로 발생하며 분당 약 150번의 몸부림이 발생한다. 우리는 디티아논을 선충에 장기간 노출시키면 농도 의존적으로 스래싱 빈도가 감소한다는 것을 발견했다(도 5B).

[0178] 디티아논 노출이 도파민 신경 퇴행을 유발했기 때문에 우리는 디티아논 노출에 대한 반응으로 선충의 기저 반응을 늦추는 도파민 의존성 행동 중 하나를 추가로 조사했다(도 5C). 잘 먹은 야생형 예쁜꼬마선충은 먹이가 없을 때보다 먹이가 있을 때 더 느리게 움직이며, 기본 둔화 반응으로 알려진 이 행동은 도파민 함유 신경 회로에 의해 매개된다. 디티아논 처리된 선충을 처리되지 않은 선충과 비교했을 때 음식을 감지할 때 상당히 손상된 행동을 보였다(도 5D). 디티아논에 대한 만성 노출은 예쁜꼬마선충의 스래싱 및 기본 느린 응답 동작을 모두 손상시킨다.

[0180] **결론**

[0181] 디티아논은 농업에서 널리 사용되는 일반적인 광범위 살균제이지만 동물에 대한 잠재적인 신경 독성 위험은 잘

알려져 있지 않았다. 도파민 신경세포에 대한 디티아논의 신경독성 효과를 연구했다. 예쁜꼬마선충 모델 시스템을 사용하여 디티아논에 대한 만성 노출로 인한 신경 손상을 조사했다. 본 연구 결과에 따르면 디티아논은 산화 스트레스와 미토콘드리아 분열을 크게 증가시키고 도파민성 신경 퇴행을 유발하며 움직임과 도파민 관련 행동을 손상시킨다.

[0182] 흥미롭게도, 우리는 디티아논 노출 시 변성에 대한 도파민성 뉴런의 더 높은 감수성을 관찰했다. 우리의 결과는 100 μg/ml의 낮은 농도에서도 디티아논에 장기간 노출되면 PD의 특징인 도파민성 신경변성을 유발한다는 것을 보여주었다. 놀랍게도 디티아논은 500μg/ml의 더 높은 농도에서도 GABAergic 또는 cholinergic 운동 뉴런에 눈에 띄는 영향을 미치지 않았다(도 1). 이는 도파민 작동성 뉴런이 디티아논 노출에 더 취약하다는 것을 의미하며, 예쁜꼬마선충의 도파민 작동성 시스템이 도파민 생합성, 방출, 재흡수 및 신호 전달을 담당하는 동일한 유전자를 공유하기 때문에 인간과 상동적이라는 점은 주목할 가치가 있다.

[0183] 도파민 뉴런은 산화 스트레스에 더 민감한 것으로 제안된다. 도파민 분해는 ROS를 생성하고 도파민 산화도 내인성 신경독소를 유발할 수 있기 때문에 도파민 대사는 세포 내 ROS 생산의 주요 공급원으로 생각된다. 유사한 현상이 6-하이드록시도파민(6-OHDA), 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라하이드로피리딘(MPTP), 로테논 및 파라콰트를 포함하는 독소를 이용한 PD 동물 모델에서도 관찰된다. 이러한 독소는 산화 스트레스를 유발하고 미토콘드리아 기능을 방해한다. 이러한 독소가 모든 세포 유형에 해를 끼칠 수 있지만 도파민 신경세포는 다른 뇌 영역의 세포보다 산화 스트레스 손상에 더 민감한다. 또한 인간의 매우 선택적인 흑질선조체 도파민성 변성 및 PD와 관련이 있다. 따라서 디티아논 유도 도파민성 신경독성은 다른 많은 PD 동물 모델 및 인간 환자와 동일한 특징을 많이 공유한다.

[0184] 본 연구는 디티아논의 신경 독성 효과가 PD의 두 가지 분리할 수 없는 구성 요소인 산화 스트레스와 미토콘드리아 손상 증가에 기인할 수 있음을 발견했다. 우리는 디티아논이 세포 ROS 및 산화 스트레스 반응을 유의하게 증가시켰음을 보여주었고(도 3), 이는 디티아논이 산화 스트레스를 유도함을 나타낸다. 디티아논은 또한 미토콘드리아 절편화와 핵분열 유전자인 *drp-1* mRNA의 발현을 증가시켰다(도 4). 미토콘드리아가 ROS의 주요 공급원이고, 미토콘드리아 미세구조가 ROS 생산과 밀접하게 관련되어 있다는 기존 연구가 늘어나고 있다. 따라서 핵분열과 융합의 불균형에 의해 유도된 미토콘드리아 절편화는 과도한 ROS 생산과 미토콘드리아 기능 장애로 이어져 미토콘드리아 건강을 악화시키고 악순환의 산화 스트레스를 증가시킬 수 있다. 디티아논은 ROS와 미토콘드리아 절편화를 증가시켜 이 악순환을 촉발하는 것으로 보인다.

[0185] 또한, 우리의 결과는 디티아논에 노출된 선충이 움직임과 도파민 의존적 행동에 결함이 있음을 보여주었다(도 5). 유전 및 독성 모델을 모두 포함하는 예쁜꼬마선충 PD 모델은 도파민 의존 행동의 이동 및 중단에 결함이 있음을 보여준다. 디티아논은 액체에서 선충의 움직임 속도(thrashing rate)를 감소시켰고 PD의 주요 증상인 느린 움직임 및 보행 장애와 같은 운동 결함과 유사한다. 따라서 디티아논에 의해 유발된 선충의 느린 움직임은 근육 및/또는 운동 뉴런의 기능 장애로 인해 발생한 것일 수 있다. 디티아논은 체벽 근육의 미토콘드리아 미세구조에 상당한 영향을 미쳤지만 운동 뉴런에는 영향을 미치지 않았다. 따라서 근육 기능 장애는 근육 약화를 초래할 수 있다. 이전 연구에서는 디티아논이 땅벌의 비행 근육에서 미토콘드리아 호흡을 억제하는 것으로 나타났다. 이 모든 것은 디티아논이 미토콘드리아 건강에 영향을 미쳐 동물의 움직임을 손상시킨다는 것을 암시한다. 디티아논에 의한 도파민성 신경퇴행과 일관되게, 연충은 또한 기초 둔화 반응이라고 하는 도파민 관련 음식 감지 행동에서 결손을 보였다. 디티아논 유발 도파민성 신경 독성 및 행동 결함은 디티아논이 잠재적인 PD 관련 신경독성임을 시사한다.

[0186] 디티아논은 티올 반응성을 지닌 효과적인 살균제이다. 작용 방식은 아직 불분명하지만 ROS 증가를 유발하고 비표적 유기체에서 미토콘드리아에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 많은 PD 유발 신경 독성이 미토콘드리아 복합체 I 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 이전 연구에서는 디티아논이 호흡 복합체 II를 억제하지만 복합체 I은 억제하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 디티아논 유발 신경독성은 분명한 PD 모델을 제공할 수 있다.

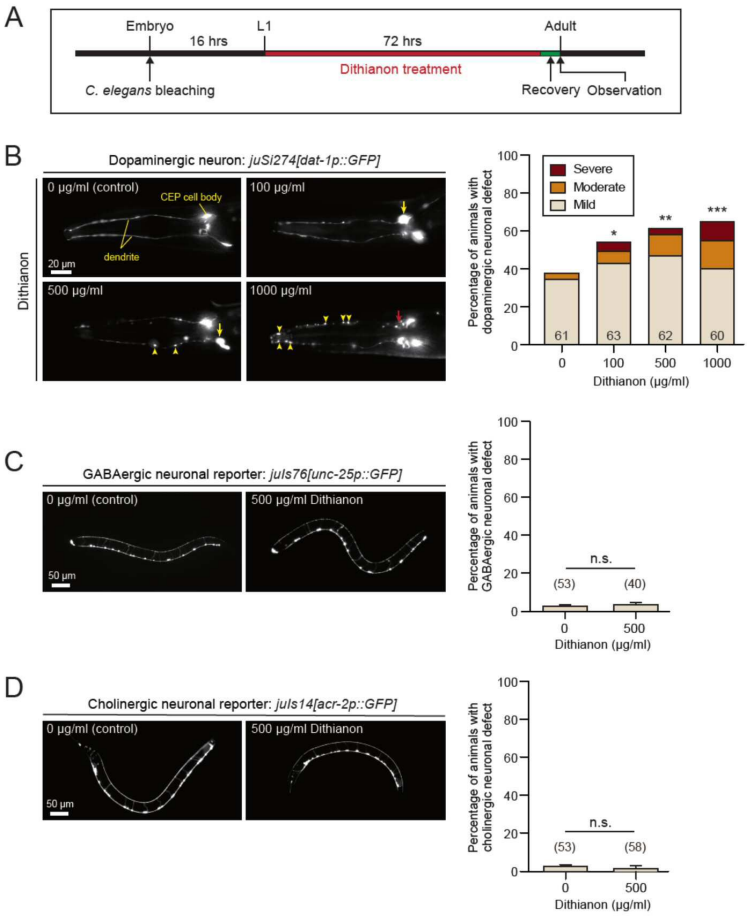
[0187] 디티아논에 의해 유도된 도파민성 신경독성이 과도한 ROS 때문인지 미토콘드리아 조각화 때문인지를 알아보기 위해 항산화제인 NAC를 사용하거나 *drp-1* RNAi를 사용하여 차단했다. 두 치료법 모두 Dithianon 유발 도파민성 신경퇴행의 예방에 도움이 되는 것으로 밝혀졌으며, 이는 산화 스트레스와 미토콘드리아 절편화가 디티아논 유발 신경독성의 중요한 구성 요소임을 시사한다.

[0188] 결론적으로, 우리의 연구는 선충 모델에서 디티아논에 대한 만성 노출이 산화 스트레스 증가뿐만 아니라 증가된 도파민성 신경 변성 및 신경 행동 결손과 관련이 있음을 보여줍니다. 이러한 결과는 디티아논이 PD 증상에 신경독성 효과가 있음을 의미한다. 디티아논이 급성 독성 측면에서 합리적으로 안전하더라도, 저용량 디티아논에 장

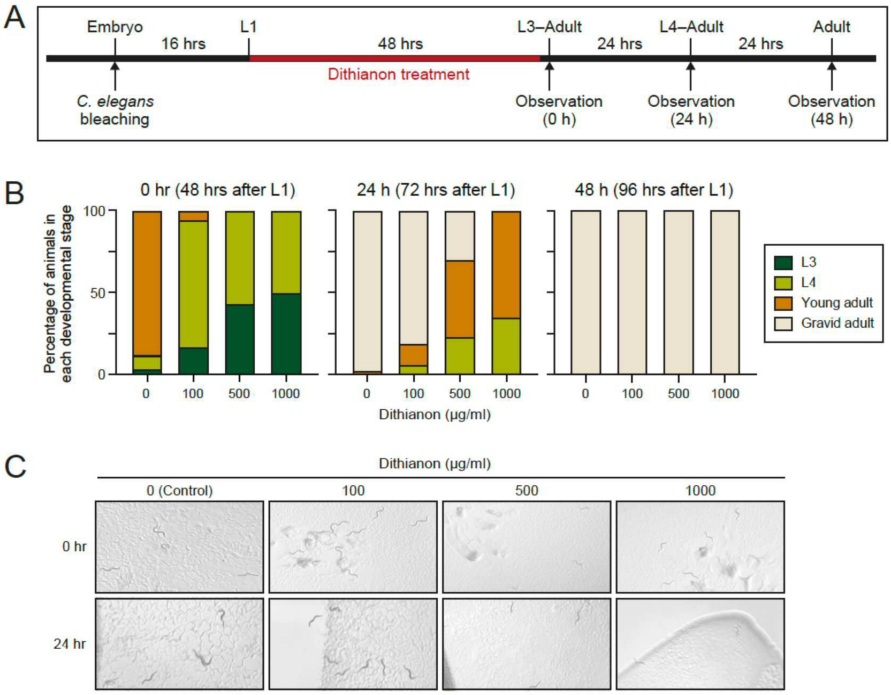
기간 노출되면 신경퇴행성 질환 발병 위험이 증가할 수 있다.

도면

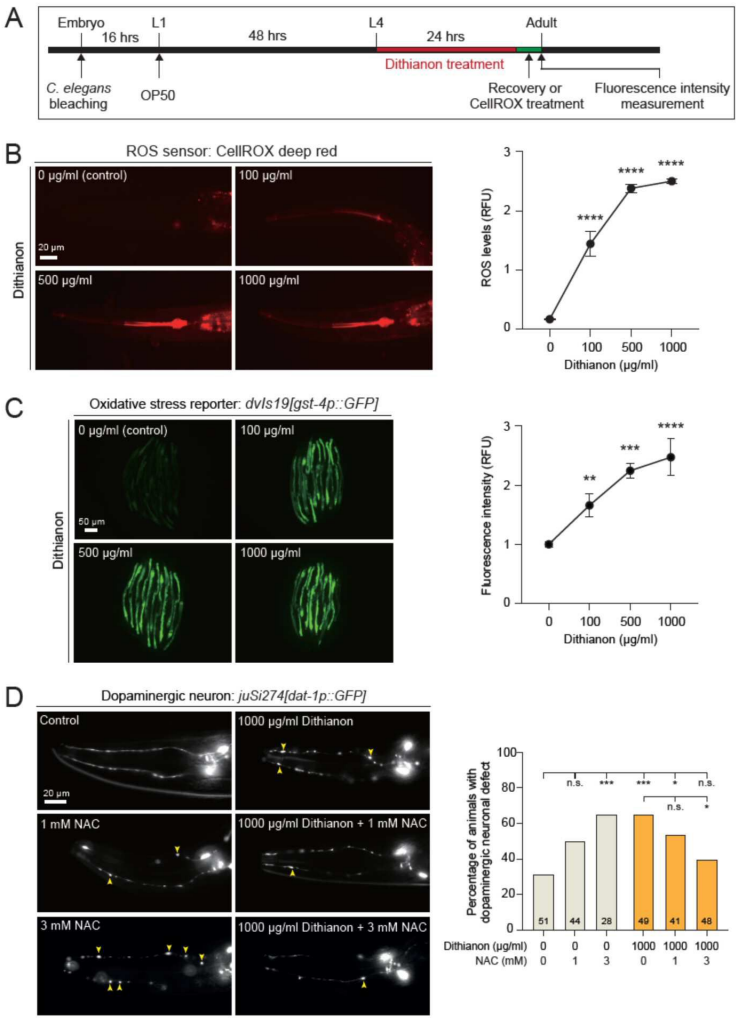
도면1



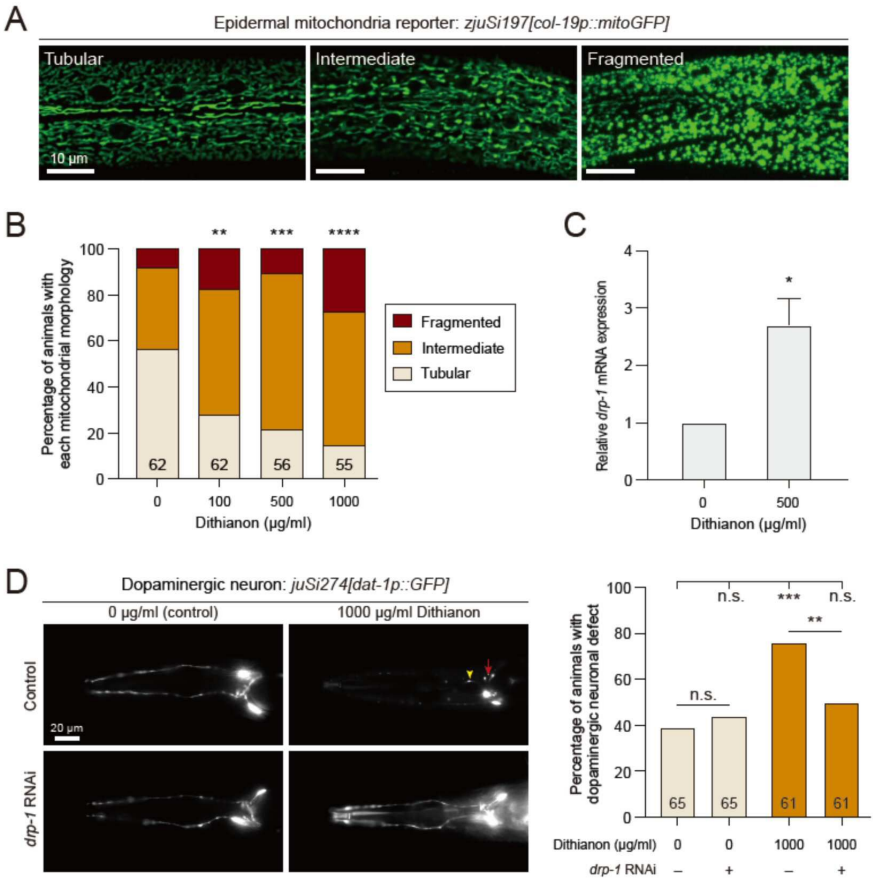
도면2


A
Embryo
16 hrs
L1
48 hrs
L3–Adult
24 hrs
L4–Adult
24 hrs
Adult
Dithianon treatment
C. elegans bleaching
Observation (0 h)
Observation (24 h)
Observation (48 h)
B
0 hr (48 hrs after L1)
24 h (72 hrs after L1)
48 h (96 hrs after L1)
Percentage of animals in each developmental stage
100
50
0
0
100
500
1000
Dithianon (μg/ml)
L3
L4
Young adult
Gravid adult
C
Dithianon (μg/ml)
0 (Control)
100
500
1000
0 hr
24 hr

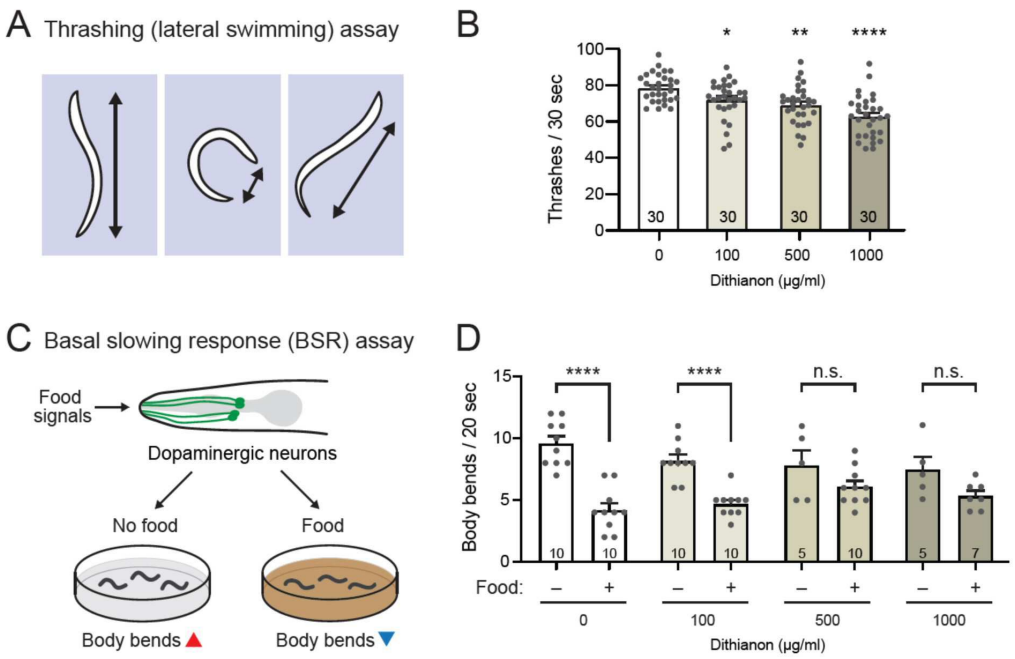
도면3


A
Embryo
16 hrs
L1
48 hrs
L4
24 hrs
Adult
Dithianon treatment
C. elegans bleaching
OP50
Recovery or CellROX treatment
Fluorescence intensity measurement
B
ROS sensor: CellROX deep red
Dithianon
0 μg/ml (control)
100 μg/ml
500 μg/ml
1000 μg/ml
20 μm
ROS levels (RFU)
Dithianon (μg/ml)
C
Oxidative stress reporter: dvIs19[gst-4p::GFP]
Fluorescence intensity (RFU)
50 μm
D
Dopaminergic neuron: juSi274[dat-1p::GFP]
Control
1000 μg/ml Dithianon
1 mM NAC
1000 μg/ml Dithianon + 1 mM NAC
3 mM NAC
1000 μg/ml Dithianon + 3 mM NAC
Percentage of animals with dopaminergic neuronal defect
Dithianon (μg/ml)
NAC (mM)

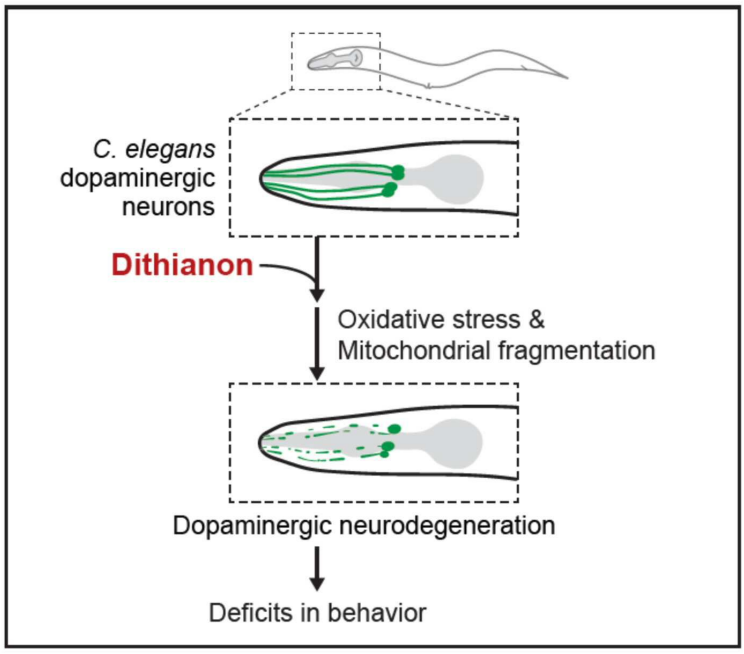
도면4


A
Epidermal mitochondria reporter: zjuSi197[col-19p::mitoGFP]
Tubular
Intermediate
Fragmented
10 μm
B
Percentage of animals with each mitochondrial morphology
Fragmented
Intermediate
Tubular
62
62
56
55
Dithianon (μg/ml)
C
Relative drp-1 mRNA expression
Dithianon (μg/ml)
D
Dopaminergic neuron: juSi274[dat-1p::GFP]
0 μg/ml (control)
1000 μg/ml Dithianon
Control
drp-1 RNAi
20 μm
Percentage of animals with dopaminergic neuronal defect
n.s.
65
65
61
61
Dithianon (μg/ml)
drp-1 RNAi

도면5


A Thrashing (lateral swimming) assay
B
Thrashes / 30 sec
30
Dithianon (μg/ml)
C Basal slowing response (BSR) assay
Food signals
Dopaminergic neurons
No food
Food
Body bends
Body bends
D
Body bends / 20 sec
n.s.
Food:
Dithianon (μg/ml)

도면6


C. elegans
dopaminergic
neurons
Dithianon
Oxidative stress &
Mitochondrial fragmentation
Dopaminergic neurodegeneration
Deficits in behavior