(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0060716
(43) 공개일자 2022년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0146616
(22) 출원일자 2020년11월05일
심사청구일자 2020년11월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)
김봉준
강원도 춘천시 교동길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

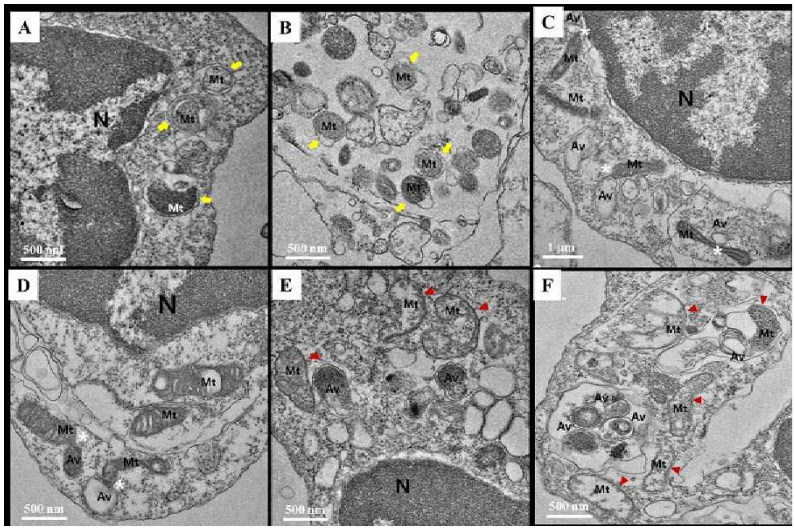
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **지연성 뇌허혈 진단을 위한 뇌척수액 마이토파지 마커**

(57) 요 약

뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/2871 (2013.01)
(72) 발명자
김영미
강원도 춘천시 국사봉길 7, 104-301

윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345322048
과제번호	2020R1I1A3070726
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	마이토파지 조절기전에 근거한 지주막하 출혈 후 뇌손상 규명 및 나노기반 미토콘드리아 표적 치료 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 2

뇌척수액 세포(CSF)에서 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 지연성 뇌허혈은 지주막하 출혈 이후 발병하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 키트.

청구항 5

개체로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 대조군으로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 상기 대조군의 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 수준을 비교하는 단계;를 추가로 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 7

개체로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 대조군으로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정하는 단계; 및

상기 개체 및 상기 대조군의 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 비교하는 단계;를 추가로 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지주막하출혈(Subarachnoid hemorrhage, SAH)은 두개 내 동맥류 파열로 인한 지주막하 공간의 급성 출혈로 정의된다. 최소 침습적 수술 관리의 발전에도 불구하고, SAH 등급이 낮은 환자의 사망률은 여전히 높으며, Hunt and Hess (H-H) 등급 4의 경우 사망률이 24%이고, 등급 5의 경우 71%이다. 파열된 동맥류가 외과적 클리핑 또는 혈관 내 코일 색전술로 성공적으로 치료된다면, SAH 이후의 의학적 합병증은 신경임계 치료에서 여전히 어려운 문제이다. 합병증 중 조기 뇌 손상 (early brain injury, EBI) 및 지연된 뇌허혈 (DCI)은 SAH 환자의 신경학적 결과가 좋지 않은 주요 원인이다. 조기 뇌 손상 (early brain injury, EBI), 증가된 두개 내압 및 감소된 뇌관류압에 의한 혈액-뇌 장벽 및 뇌부종은 SAH ictus 직후에 발생한다. 지연된 뇌허혈(delayed cerebral ischemia, DCI)은 증상 변동이 있는 새로 개발된 신경학적 결손을 특징으로 하는 임상 증후군을 의미하며, 일반적으로 SAH ictus 후 4 일에서 14 일 사이에 발생한다. DCI 병인은 대뇌 혈관 경련, 피질 확산 탈분극, 미세 혈전증 또는 EBI4와 관련이 있는 것으로 알려져 있지만, DCI의 기초가 되는 자세한 메커니즘은 더 연구되어야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2019-0008216호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 및 상기 조성물 및 키트를 이용한 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0005] 한편, 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본원의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 발명의 실시예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 발명의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 제1 측면은, 뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 제2 측면은, 뇌척수액 세포(CSF)에서 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 제3 측면은, 전술한 상기 지연성 뇌허혈은 지주막하 출혈 이후 발병하는 것인, 지연성 뇌허혈 진단용

조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 제4 측면은, 전술한 조성물을 포함하는 지연성 뇌허혈 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 제5 측면은, 개체로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 제6 측면은, 상기 대조군으로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정하는 단계 및 상기 개체 및 상기 대조군의 뇌척수액 세포(CSF)의 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 수준을 비교하는 단계;를 추가로 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 제7 측면은, 개체로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

[0013] 본 발명의 제8 측면은, 상기 대조군으로부터 분리된 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 측정하는 단계 및 상기 개체 및 상기 대조군의 뇌척수액 세포(CSF)의 BECN1의 단백질 발현 증가 수준을 비교하는 단계;를 추가로 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보제공 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 지연성 뇌허혈 진단용 조성물, 지연성 뇌허혈 진단용 키트 및 지연성 뇌허혈 진단을 위한 정보 제공 방법에 따르면, 지주막하 출혈 후 발생하는 중증 합병증인 지연성 뇌허혈 발생에 뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지 및 마이토파지 연관 유전자의 발현에 차이가 발생하며, 특히 여러 유전자와 상호 작용을 하는 BECN1이 허브 유전자(hub gene)이라는 것을 최초로 밝혀낸 연구이다.

[0015] 이에 따라, 향후 한국인 및 아시아인을 대상으로 한 유전체 기반 맞춤 진단 및 조기 키트 개발 및 상기 부위 조절 기작을 통한 치료에 이용 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 DCI를 가진 SAH 환자의 CSF 세포에서 autophagy 및 mitophagy가 있는 미토콘드리아 기능 장애의 투과 전자 현미경 이미지이다. A 및 B에서 손상된 미토콘드리아를 포함하는 자가 포식 액포는 노란색 화살표로 표시된다. C및 D에서 미토콘드리아와 자가 포식 액포 사이의 상호 작용은 흰색 별표로 표시된다. E및 F에서 자가 포식 공포는 손상된 미토콘드리아 (빨간색 화살촉) 근처에서 매트릭스 팽창과 붕괴된 크리스타가 관찰되었다. Mt, 미토콘드리아; Av,자가 포식 공포; N, 핵. 스케일 바; 1㎛, 500nm이다.

도 2는 환자의 CSF 세포에서 autophagy 및 mitophagy 마커의 발현 분석이다. A에서 DCI가 있는 SAH 환자는 qRT-PCR에 의해 DCI가 없는 환자보다 DAPK1, BNIP3L 및 PINK1의 mRNA 발현이 증가했다. BAX, ULK1 및 NDP52의 mRNA 발현 차이는 두 그룹간에 통계적으로 유의하지 않았다. B에서 Ser15에서의 BECN의 증가된 단백질 발현 및 인산화 및 p62 분해를 동반한 LC3II 발현이 DCI를 갖는 SAH 환자에서 관찰되었다. 액틴은 로딩 컨트롤로 사용되었다.

도 3은 DCI가 있는 SAH 환자의 CSF 세포에서 autophagy 및 mitophagy가 증가한 미토콘드리아 기능 장애의 공 초점 현미경이다. vWF 양성인 CSF 세포를 DAPK1, BNIP3L / NIX, PINK1 및 BECN1에 특이적인 항체로 면역 염색하고 현미경으로 분석했다. 노란색 화살표로 표시된 흰색 점은 적색 형광 라벨이 부착된 기능 장애 미토콘드리아에서 자가 포식 및 마이토파지 마커와 공동 국소화 됨을 나타낸다.

도 4는 DCI를 가진 SAH 환자의 CSF 세포에서 DAPK1의 세포 내 국소화이다. DAPK1의 발현 및 국소화는 EM 하에서 immunogold 라벨링에 의해 분석되었다. A, D, G, 부종이 있는 손상된 미토콘드리아는 별표로 표시되었다. Immunogold 입자는 주로 미토콘드리아 (흰색 화살표)에서 검출되었다. B-C, E-F, H-I, 각각 A, D 및 G의 박스 영역 확대이다.

도 5는 본 발명의 DC에 따른 자가 포식 및 마이토파지와 관련하여 차별적으로 발현된 유전자의 유전자 온톨로지 (A) 및 단백질-단백질 상호 작용 네트워크 (B)의 생물학적 과정으로, p62는 격리체 1 (SQSTM1)이라고도 한다.

도 6은 DCI를 가진 SAH 환자에서 autophagy 및 mitophagy와 관련된 차별적으로 발현된 유전자의 분자 기능 (A) 및 세포 구성 요소 (B)의 유전자 온톨로지 네트워크로, p62는 격리 체 1 (SQSTM1)이라고 한다.

도 7은 자가 포식 (A)의 KEGG 경로로 포식 및 마이토파지와 관련하여 차별적으로 발현된 유전자는 빨간색으로 표시되었으며, p62는 격리 체 1 (SQSTM1)이라고도 한다. 도 8은 마이토파지 (B)의 KEGG 경로로 포식 및 마이토파지와 관련하여 차별적으로 발현된 유전자는 빨간색으로 표시되었으며, p62는 격리 체 1 (SQSTM1)이라고도 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적으로 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에서 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따라, 뇌척수액 세포(CSF)에서 오토파지(autophagy) 또는 마이토파지(mitophagy)를 측정할 수 있는 제재를 포함하는, 지연성 뇌허혈 진단용 조성물이 제공된다.

[0019] 오토파지(autophagy)는 기능 장애 세포질 구성 요소의 리소좀 분해를 통해 세포 항상성을 유지하는 회복 과정이다. SAH 이후 초기 단계에서 오토파지(autophagy) 경로가 활성화되어 부적절하거나 과도한 오토파지(autophagy) 반응이 조기 뇌 손상 (early brain injury, EBI) 발달과 밀접한 관련이 있다. 한편, 전두엽 피질에서 beclin-1 (BECN1), microtubule-related protein light chain-3 (LC3) 전환 및 Cathepsin-D의 더 높은 발현을 보고하여 SAH 이후 뉴런에서 증가된 자가 포식 경로를 시사한다. 또한 마이토파지가 혈관 내 천공에 의해 쥐 SAH 모델에서 산화 스트레스 관련 신경 세포 죽음과 관련이 있음을 보여주다. 마이토파지(mitophagy)는 오토파지(autophagy) 반응을 통해 손상되거나 기능 장애가 있는 미토콘드리아를 선택적으로 제거하여 건강한 미토콘드리아를 유지하는 과정이다. *P*포스파타제 및 텐신 동족체 (PTEN) 유도 키나제 1 (PINK1) 및 파킨의 녹다운이 내피세포에서 감소된 마이토파지를 통해 미토콘드리아 단편 및 손상된 미토콘드리아의 세포 내 축적과 관련이 있다고 보고했다. 미토콘드리아 기능 장애는 뇌졸중 발병 기전에서 신경 세포 사멸과 관련이 있으며, 뇌허혈 상태에서 미토콘드리아 탈분극은 활성 산소 종 (ROS), PINK1 및 전개 단백질 반응을 증가시킨다. DCI가 있는 SAH 환자에서 관찰된 뇌척수액 (CSF) 세포에서 미토콘드리아 막 잠재력이 감소하여 미토콘드리아 기능 장애와 DCI 발달 사이의 가능한 연관성이 있다. DCI 병인이 뇌동맥과 동맥류를 둘러싼 지주막하 공간에서 CSF에서 더 정확하게 평가될 수 있다는 점을 감안할 때, 본 발명자들은 미토콘드리아 기능 장애를 조사했다. 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 세포에서 오토파지(autophagy) 및 마이토파지(mitophagy)를 사용하여 SAH 이후 DCI 병인에 반영될 수 있는지 여부를 결정한다.

[0020] 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF)에서 감소된 미토콘드리아 막 잠재력은 지연된 대뇌허혈 (DCI)을 동반한 지주막하출혈 (SAH)에서 관찰되었지만, 이 연관성의 기전은 불분명하였다. 이에 본 발명자들은 먼저 뇌척수액 (CSF)세포에서 오토파지 (autophagy) 및 마이토파지(mitophagy)로 미토콘드리아 기능 장애를 지연된 대뇌허혈 (DCI) 병인에 반영할 수 있는지 여부를 평가했다.

[0022] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0024] **실험예 1: 연구 코호트**

[0025] 유도 코호트는 2016 년 3 월과 2020 년 5 월의 지역 뇌졸중 데이터베이스에서 파생되었다. 이 데이터베이스에서 다음과 같은 상태의 SAH 환자를 포함했다 : 1) 18 세 이상의 성인 환자; 2) 동맥류 파열로 인한 SAH; 3) 컴퓨터 단층 촬영 (CT)에서 1mm 두께를 초과하는 조밀한 국소 응고 및 / 또는 혈액의 수직층; 및 4) 혈관 내 코일 색전술로 치료한 SAH 환자이다. 제외 기준은 다음과 같다 : 1) 외상, 감염 또는 뇌 주위 SAH와 같은 비 동맥류 SAH, 2) 외과적 클리핑으로 치료받은 환자이다. 본 실시예에서 우리는 두꺼운 출혈량을 보이는 SAH 환자만을 등록하고 코일 색전술을 받았는데, 이는 초기 출혈량과 절단 중 얇은 층의 침투 또는 뇌 수축 손상에 의한 CSF의 오염이 CSF 미토콘드리아의 결과를 편향시킬 수 있기 때문이다.

[0026] 전송 전자 현미경 (Transmission electron microscopy TEM) 분석은 DCI를 가진 SAH 환자에서 파생된 CSF 세포에서 미토콘드리아의자가 포식 공포와 형태학적 변화를 검출하기 위해 적용되었다. 우리는 실시간 정량적 PCR

(qRT-PCR)을 사용하여 DCI 유무에 관계없이 SAH 환자 간의 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 세포에서 오토파지(autophagy) 및 마이토파지(mitophagy) 바이오 마커를 평가하고 비교했다. 마커에는 사망 관련 단백질 키나제 (death associated protein kinase DAPK) -1, BCL2 상호 작용 단백질 3 유사 (BCL2 Interacting Protein 3 Like, BNIP3L), Bcl-1 길항제 X (Bcl-1 antagonist X, BAX), 포스파타제(phosphatase) 및 텐신 동족체 (tensin homolog , PTEN) 유도 키나제 1 (induced kinase 1, PINK1), 핵 도트 단백질 52 (nuclear dot protein 52, NDP52)가 포함되었다. 우리는 BECN1의 autophagy executor 유전자와 p62.20의 autophagy 어댑터 단백질의 발현 수준을 추가로 평가했다. 마지막으로 우리는 생물 정보학 분석을 수행하여 DCI 발병 기전에서 차별적으로 발현된 유전자 간의 상호 작용을 밝혀냈다.

[0027] DCI는 새로 발생한 신경학적 변화 (예 : 실증, 운동 쇠약, 감각 변화 및 의식 감소)와 같은 다음과 같은 상태로 정의되고 중증이 있는 경우 글래스고혼수척도(Glasgow Coma Scale) 또는 심각한 혈관 조영 혈관 연축이 있는 국립 보건 기관 뇌졸중 규모에서 2점 이상의 점수가 변화된다. DCI는 경두개 도플러 (transcranial Doppler, TCD) 속도를 사용하여 매일 모니터링되었다. TCD에서 심한 혈관 경련이 의심될 때 (중뇌 동맥에서 200cm / s 이상 또는 기저 동맥에서 85cm / s 이상), 추가적으로 혈관 경련과 화학적 혈관 성형술의 정도를 확인하기 위해 카테터 혈관 조영술을 시행했다. 불량한 결과는 수정된 Rankin 척도 (mRS) 점수 ≥ 3 또는 Glasgow 결과 척도 (GOS) ≤ 4로 정의되었다. CSF 세포의 미토콘드리아 막 잠재력의 차이가 대부분이었기 때문이다. 따라서 DCI가있는 SAH 환자와 없는 SAH 환자 사이에서 5 일째에 두드러지게 나타났다. 우리는 조사를 위해 지속적인 요추 배액을 통해 5 일에서 7 일 사이에 얻은 CSF 샘플을 분석했다. 이 연구는 참여 병원의 기관 심의위원회 (No. 2017-9, 2018-6, 2019-6)의 승인을 받았으며 환자 또는 그 친척들로부터 사전 동의를 받았다.

[0029] **실험예 2: 투과전자현미경**

[0030] 이전에 DCI를 가진 SAH 환자는 미토콘드리아 기능과 형태의 변화를 유발하는 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 보였다. 본 발명에서는 DCI를 가진 SAH 환자의 CSF 세포에서 세포 하 미세 구조의 변화를 조사하기 위해 TEM을 적용했다. CSF 샘플을 4000rpm에서10 분 동안 원심 분리한 후 전자 현미경으로 펠릿을 검사하였다.

[0031] 펠릿을 4℃에서 카코 딜레이트 완충액 (0.1M 카코 딜산 나트륨, 2mM MgCl2) 중 2% 글루타르 알데히드에 밤새 고정시켰다. 4℃에서 카코 딜레이트 완충액으로 3 회 세척한 후 샘플을 4℃에서 1 시간 동안 2% 오스뮴 사산화물에 후 고정시켰다. 샘플을 탈이온수로 헹구고 50% 에탄올에서 시작하여 100% 에탄올로 끝나는 각 단계마다 20 분씩 그라데이션 일련의 에탄올을 통해 탈수시켰다. 그 다음, 샘플을 에탄올에 용해된 점진적으로 농축된 프로필렌 옥사이드와 함께 배양한 다음 증가하는 농도의 Eponate 812 수지와 함께 침투시켰다. 샘플을 65 ℃ 오븐에서 밤새 베이킹 한 다음 울트라 마이크로톰을 사용하여 절편했다. 한국 기초 과학 연구원 춘천에서 Field Emission TEM 유닛 (JEM-2100F, JEOL)으로 섹션을 보았다.

[0033] **실험예 3: 웨스턴 블롯 분석**

[0034] SAH 환자로부터 얻은 CSF 세포를 RIPA 버퍼 (50mM Tris-base, 10mM EDTA, 150nM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% 나트륨 데 옥시 콜레이트, 1mM PMSF)로 용해시켰다. BCA 단백질 분석 키트 (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 상청액의 단백질 용해물을 정량화하였다. 동일한 양의 단백질을 10% SDS- 폴리 아크릴 아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)에서 분리하고 PVDF 막 (Bio-Rad, USA)으로 옮겼다. TBS-T (0.1% Tween-20을 포함하는 Tris-buffered saline)에서 2% BSA로 막을 1 시간 동안 차단한 후, 막을 1 차 항체와 함께 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 광범위한 세척 후, 멤브레인을 HRP- 접합된 2 차 항체와 함께 배양하고 향상된 화학 발광 (ECL) 키트 (Thermo Scientific, USA)를 사용하여 개발했다. 본 발명에서 사용된 항체는 BECN1 (Cell Signaling Technology, USA), p62 (Santa Cruz Biotechnology, USA), LC3 (Cell Signaling Technology, USA), pBECN1Ser15 (Cell Signaling Technology, USA), DAPK (Invitrogen, USA), PINK1 (Abcam, 영국), BNIP3L / NIX (Abcam, 영국), Actin (Santa Cruz Biotechnology, 미국)이다.

[0036] **실험예 4: 면역형광염색**

[0037] vWF 양성 CSF 세포에서 기능 장애가 있고, 미토콘드리아가 있는 autophagy 및 mitophagy 제작자의 공동지역화 (colocalization)를 평가하기 위해 공 초점 현미경을 사용하여 다색 면역 형광 염색을 수행했다. CSF 세포를 파

라 포름알데히드 (4 % w / v)로 고정한 다음 PBS로 세척하였다. 2.5 % 차단 용액 (Vector, USA)으로 1 시간 동안 차단한 후 세포를 DAPK1 (1 : 100), PINK1 (1; 100), BECN1 (1; 100) 및 BNIP3L / NIX (1 : 100) 4 ℃에서 하룻밤 두었다. 항-토끼 Alexa Fluor 750- 접합된 2 차 항체와 함께 배양한 후, 커버 슬립을 DABCO (ImmunoBioScience Corp. USA)와 함께 Fluoroshield ™에 장착했습니다. vWF-FITC (von Willebrand factor-fluorescein; 1 : 500, Abcam)는 CSF 세포가 내피에서 유래되었는지 확인하기 위한 내피 마커로 사용되었다. vWF 양성 CSF 세포에서 자가 포식을 겪고 있는 기능 장애 미토콘드리아를 평가하기 위해, 자가 포식- 또는 마이토파지 관련 마커는 마이토파지를 결정하기 위해 미토콘드리아 선택적 염료로 널리 사용되는 Mito Tracker Deep Red (MTDR, Invitrogen, USA)로 염색된 공동 면역 형광이었다. 핵은 DAPI (4 ', 6-Diamidino- 2- 페닐 인돌 디하이드로 클로라이드)이다. 형광 이미지는 400x 배율에서 공 초점 현미경을 사용하여 얻었다.

[0039] **실험예 5: 실시간 qRT-PCR**

[0040] 미토콘드리아 기능 장애로 이어지는 미토콘드리아 막 잠재력의 손실이 미토콘드리아자가 포식의 활성화를 초래한다는 점을 감안할 때, DAPK1, PINK1, BAX, BNIP3L 및 NDP52와 같은 미토콘드리아자가 포식 생성자는 DCI가 있거나 없는 SAH 환자 사이의 CSF 세포에서 조사되었다. 합계 RNA는 제조사의 지시에 따라 Trizol (Ivitrogen, USA)을 사용하여 CSF 세포로부터 분리되었다. Maxime RT PreMix Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 5μg의 RNA로부터 cDNA를 합성했다. 마이토파지 관련 유전자의 발현 수준은 Rotor-Gene Q (Qiagen, USA)에서 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 qRT-PCR 반응에 의해 측정되었다. 프라이머는 다음과 같았다 : DAPK1 (정방향) : 5'- GACCGTGAAGCATTACCTGAG-3 '및 (역방향) 5'-GCTGCTGAAGCTTTCCTTGTA-3'; BNIP3L (앞으로) 5'- ACAACAACAACTGC GAGGAAA-3 '및 (역방향) 5'-GAGGATGAGGATGGTACGTGT-3'; BAX (순방향) 5'- GTTTCATCCAGGATCGAGCAG-3'및 (역방향) 5'- CTGCAGCTCCATGTTACTG TC-3'; PINK1 (정방향) 5'- GTATGAAGCCACCATGCCTAC-3'및 (역방향) 5'- CATCATCTTGATGGCCAAGGG TC-3'; ULK (정방향) 5'- AACAAGAAGAACCTCG CCAAG-3 '및 (역방향) 5'- CCGTT GCAGTACTCCATAACC-3'; NDP52 (순방향) 5'-CCCCTACCATGGAGGAGACC -3'및 (역방향) 5'- CCTGCAATTTCTGTCCTTGGC- 3'

[0042] **실험예 6: Immunogold 염색**

[0043] 우리는 DCI를 가진 SAH 환자의 CSF 세포에서 미토콘드리아 내에서 가장 현저하게 차별적으로 발현되는 마커의 위치를 확인하기 위해 immunogold 염색을 수행했다. CSF 세포를 4 ° C에서 1 시간 동안 pH 7.4의 인산염 완충액에 0.1 % 글루타르 알데히드 및 2% 파라 포름알데히드로 고정한 다음 4℃에서 30 분 동안 사 산화 오스뮴을 후 고정했다. 샘플은 등급이 매겨진 일련의 에탄올에서 탈수되었다. 샘플을 등급이 매겨진 에탄올 시리즈로 처리하고 LR 백색 수지 (EMS)에 매립했다. 그런 다음 섹션을 80nm로 초박형 섹션으로 나누고 구리 그리드에 배치했다. 담금질이 없는 알데히드 그룹의 경우, 섹션을 0.02M 글리신으로 10분 동안 처리했다. 그런 다음 절편을 탈 이온수로 세척하고 1% BSA에서 차단하고 토끼 항 -DAPK1 항체 (1 : 100)와 함께 1 시간 동안 배양했다. 그리드를 PBS 중 0.1% BSA로 5회 세척하고, PBS 중 0.1% BSA에서 1 : 100으로 희석된 10nm 금 (AURION)에 접합된 2 차 항체에서 인큐베이션 했다. 최종 샘플은 우라닐 아세테이트와 납 시트 레이트로 염색 한 후 200 KV에서 투과 전자 현미경 (JEOL-2100F, USA)을 사용하여 관찰했다.

[0045] **실험예 7: 생물정보학분석**

[0046] 기능 강화 분석은 시각화 도구 https://tools.dice-database.org/GOnet/ and https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html)를 수행했다. 오류 발견률이 0.05 미만인 유전자는 유의하게 풍부하다고 정의되었다. 상호 작용하는 유전자 / 단백질 (STRING)의 검색을 위한 검색 도구를 사용하는 추가 단백질-단백질 상호 작용 (PPI) 네트워크가 수행되었다. 최소 필수 상호 작용 점수는 0.7.31, 32의 가장 높은 신뢰도로 설정되었다.

[0048] **실험예 8: 통계분석**

[0049] 연속 변수는 평균 및 ± 표준 편차 (SD)로 표시된다. 카이-제곱 또는 스튜던트 t 테스트를 수행하여 DCI와 비 DCI 환자 간의 의미 있는 차이를 확인했다. qRT-PCR 발현의 비교는 Mann-Whitney U 테스트 테스트를 사용하여

수행되었다. 결과는 중앙값과 25-75 번째 백분위 수로 표시되었다. 통계는 SPSS V.21 (SPSS, Illinois, USA) 및 MedCalc (www.Medcalc.org)로 수행되었으며 통계적 유의성은 p <0.05로 표시되었다.

[0051] **평가예 1: 연구의 임상적 특징**

[0052] 혈관 내 코일 색전술로 치료받은 총 57 명의 SAH 환자가 분석에 포함되었다 (표 1). 22 명의 환자 (38.6 %)가 후속 조치 동안 DCI를 경험했다. 두 그룹간에 임상 결과 (예 : 여성 성별, 연령, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 흡연)에서 통계적 차이가 없었다. DCI가 있는 SAH 환자는 Hunt 및 Hess 등급이 IV와 V가 더 높았으며 3 개월째 임상 결과가 좋지 않았지만 통계적으로 중요하지 않았다. 고혈압 치료가 DCI 환자에 대해 수행되었기 때문에 DCI의 MAP는 비 DCI 환자의 MAP보다 유의하게 높았다 (DCI에서 97.4 ± 7.7 mmHg 대 비 DCI에서 92.7 ± 3.6 mmHg). DCI와 non-DCI 환자에서 전방 순환 동맥류의 수는 각각 18 명 (81.8 %)과 28 명 (80.0 %)이었다.

표 1

[0054]

변수	비-DCI (n=35)	DCI (n=22)	p-value
임상 결과			
여성	22 (62.9%)	18 (81.8%)	0.1311
나이	62.7 ± 17.1	57.6 ± 10.3	0.1623
고혈압	18 (51.4%)	9 (40.9%)	0.4428
진성 당뇨병	4 (11.4%)	2 (9.1%)	0.7814
고지혈증	4 (11.4%)	4 (18.2%)	0.4788
흡연	4 (11.4%)	3 (13.6%)	0.8064
Hunt and Hess grade ≥ IV	11 (31.4%)	12 (54.5%)	0.0861
실험실 결과			
헤모글로빈	11.6 ± 1.2	12.0 ± 1.3	0.2891
SaO_2 (%)	94.9 ± 1.6	95.2 ± 1.7	0.5909
MAP (mmHg)	92.7 ± 3.6	97.4 ± 7.7	0.0118
Heart rate (BPM)	89.6 ± 8.0	91.5 ± 6.2	0.3528
방사선학적 발견			
크기 (mm)	5.3 ±1.2	5.6 ±1.2	0.3671
전방 순환	28 (80.0%)	18 (81.8%)	0.8667
치료 결과			
화학적 혈관 성형술	-	9 (40.9%)	
좋지 않은 임상 결과	11 (31.4%)	10 (45.4%)	0.2895

[0055] BPM, 분당 비트; DCI, 지연된 대뇌 허혈; MAP, 평균 동맥압.데이터는 이산 형 및 범주 형 변수와 평균 ± 표준 편차에 대한 대상 수 (백분율)로 표시된다.

[0057] **평가예 2: DCI를 가진 SAH 환자에서 미토콘드리아의 형태학적 변화**

[0058] TEM을 적용하여 DCI가 있는 SAH 환자로부터 얻은 CSF 세포에서 세포하 미세 구조의 변화를 조사했다(도 1). 미토콘드리아를 포함하는 수많은 자가 포식 공포와 매트릭스 부종 및 붕괴된 크리스테가 있는 비정상적인 미토콘드리아와 자가 포식 공포의 융합이 CSF 세포에 축적되었다. 또한 오토파지 공포는 내부 미토콘드리아 막을 가진 부은 미토콘드리아에 가깝게 나타났다. 이러한 결과는 형태학적 손상을 동반한 미토콘드리아 기능 장애가 자가 포식 플럭스와 연관되어 DCI 병인에서 CSF 세포에서 자가 포식 및 마이토파지의 가능성을 시사함을 나타냈다.

[0060] **평가예 3: CSF 세포에서 미토콘드리아의자가 포식 증가**

[0061] CSF 세포에서 autophagy 및 mitophagy 마커의 mRNA 발현을 측정하고 DCI가 있는 SAH 환자와없는 SAH 환자간에 비교했다. DCI 환자는 비 DCI 환자보다 현저하게 높은 발현 수준을 나타냈다 : DAPK1, DCI에서 0.279 (0.227-0.293) 대 비 DCI에서 0.043 (0.021-0.086), p <0.0001; BNIP3L, DCI에서 0.134 (0.060-0.199) 대 비 DCI에서

0.045 (0.020-0.101), p = 0.0005; PINK1, DCI에서 0.069 (0.044-0.820) 대 비 DCI에서 0.045 (0.012-0.063), p = 0.006. BAX [0.208 (0.167-0.314), DCI가 아닌 경우 0.166 (0.095-0.223), p = 0.116], ULK1 [DCI의 0.011 (0.003-0.025) 대 0.004 (0.001- 0.008) 비 DCI, p = 0.127] 및 NDP52 [DCI 0.237 (0.046-0.316) 대 [비 DCI 0.155 (0.030-0.229), p = 0.123]. 우리는 DCI와 non-DCI 환자 사이의 CSF 세포에서 ULK1, BECN, LC3 및 p62를 포함한 autophagy 마커를 추가로 조사했다. 웨스턴 블로팅 분석은 비 -DCI 환자에 비해 DCI 환자에서 Ser15에서 BECN1의 단백질 발현 증가와 인산화를 나타냈다 (도 2B). 또한, DCI 환자에서 증가된 LC3II 발현과 p62 분해가 관찰되었다.

[0063] **평가예 4: DCI에서 vWF 양성 CSF 세포의자가 포식 및 마이토파지**

[0064] 이전에 우리는 vWF 양성으로 보이는 내피 기원 세포가 미토콘드리아 막 잠재력 감소와 함께 DCI 환자의 CSF에서 점점 더 많이 존재한다는 것을 입증했다. DCI가 있는 SAH 환자, 다색 면역 형광 염색은 기능 장애 미토콘드리아의 마커로서 vWF 및 MTDR에 특이적인 항체를 사용하여 수행되었다 (도 3). DAPK1, BNIP3L / NIX, PINK1 및 BECN1의 형광 신호는 vWF 양성 CSF 세포에서 MTDR의 형광 신호와 중첩되었다. 결과는 vWF 양성 CSF 세포에서 autophagy 및 mitophagy로 인한 증가된 미토콘드리아 기능 장애가 SAH 환자의 DCI 병인과 관련 될 수 있음을 시사했다.

[0066] 평가예 5: DCI에서 DAPK1 증가와 함께 미토콘드리아 기능 장애

[0067] DAPK1 발현은 DCI 환자가 아닌 환자에 비해 DCI 환자에서 가장 유의하게 증가했기 때문에 (도 2A), 우리는 DCI를 가진 SAH 환자의 CSF 세포에서 향상된 DPAK1의 세포 하 국소화를 확인하기 위해 anti-DAPK1로 immunogold 라벨링을 추가로 수행했다 (도 4). 흥미롭게도 DAPK 면역 금 입자는 비정상적인 형태를 가진 손상된 미토콘드리아에서 주로 관찰되었으며, 이는 그림 3에 제시된 결과와 일치한다. 이 결과를 종합하면 DAPK1 증가가 DCI 개발에서 미토콘드리아 기능 장애에 중추적인 역할을 할 수 있음을 시사했다.

[0069] **평가예 6: 생물 정보학 분석**

[0070] 생물학적 과정 (BP)의 상위 4 개 범주는 자가 포식의 양성 조절, 미토콘드리아 탈분극에 대한 반응, 세포 사멸 과정의 양성 조절 및 미토콘드리아의자가 포식이었다 (표 2 및 도 5A). DCI 관련 분자 기능 및 세포 구성 요소는 유비퀴틴 유사 단백질 리가 제 결합, 유비퀴틴 단백질 리가 제 결합, 루이 바디 및 포 식단 조립 부위였다 (표 2 및 도 6). PPI는 BECN1이 차등적으로 발현된 autophagy 및 mitophagy 마커 중에서 가장 높은 결합 유전자였으며 SQSTM1로도 알려진 BNIP3L, PINK1 및 p62가 뒤따랐다 (그림 5B).

표 2

[0072]

ID	GO term	P value	Genes
생물학적 과정			
GO:0010508	positive regulation of autophagy	6.40E-09	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1
GO:0098780	response to mitochondrial depolarisation	7.50E-09	BECN1,PINK1, SQSTM1*
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	3.36E-08	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:0000422	autophagy of mitochondrion	7.07E-08	BECN1,PINK1, SQSTM1
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	1.68E-07	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:0016239	positive regulation of macroautophagy	3.70E-07	BECN1,BNIP3L, PINK1
GO:0000423	mitophagy	7.67E-07	BECN1,SQSTM1
GO:0007005	mitochondrion organization	1.17E-06	BECN1,BNIP3L, PINK1,SQSTM1
GO:1902902	negative regulation of autophagosome assembly	3.99E-06	BECN1,PINK1
GO:0033554	cellular response to stress	4.36E-06	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:0016236	macroautophagy	5.14E-06	BECN1,PINK1, SQSTM1

GO:0010821	regulation of mitochondrion organization	7.32E-06	BNIP3L, PINK1, SQSTM1
GO:0034599	cellular response to oxidative stress	1.65E-05	BECN1,DAPK1, PINK1
GO:0006915	apoptotic process	2.07E-05	BECN1,BNIP3L, DAPK1,SQSTM1
GO:0060341	regulation of cellular localization	2.07E-05	BECN1,BNIP3L, PINK1,SQSTM1
GO:2000310	regulation of NMDA receptor activity	3.21E-05	DAPK1,PINK1
GO:0009057	macromolecule catabolic process	3.63E-05	BECN1,BNIP3L, PINK1,SQSTM1
GO:1903146	regulation of autophagy of mitochondrion	4.39E-05	BNIP3L, PINK1
GO:1903214	regulation of protein targeting to mitochondrion	4.82E-05	BNIP3L, PINK1
GO:0001666	response to hypoxia	4.91E-05	BECN1,BNIP3L, PINK1
GO:0002931	response to ischemia	5.99E-05	PINK1,SQSTM1
GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	6.57E-05	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:2000378	negative regulation of reactive oxygen species metabolic process	7.28E-05	BECN1,PINK1
GO:0051881	regulation of mitochondrial membrane potential	1.23E-04	BNIP3L, PINK1
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	1.25E-04	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:1903827	regulation of cellular protein localization	1.86E-04	BNIP3L, PINK1, SQSTM1
GO:0044267	cellular protein metabolic process	2.35E-04	BECN1,BNIP3L, DAPK1,PINK1,SQSTM1
GO:0044257	cellular protein catabolic process	2.87E-04	BNIP3L, PINK1, SQSTM1
분자기능			
GO:0044389	ubiquitin-like protein ligase binding	3.62E-05	BECN1, PINK1, SQSTM1
GO:0031625	ubiquitin protein ligase binding	3.02E-05	BECN1, PINK1, SQSTM1
셀룰러 구성요소			
GO:0097413	Lewy body	1.43E-06	PINK1, SQSTM1
GO:0000407	phagophore assembly site	2.53E-05	BECN1, SQSTM1

[0073] SAH의 오토파지 과정은 일반적으로 조기 뇌 손상 (early brain injury, EBI)에 대해 연구되었다. 뉴런에서 오토파지체(autophagosomes)와 자가리소좀(autolysosomes)은 ictus 후 3 일까지 증가했다. 오토파지 활성화는 24 시간에 정점을 찍은 후 48 시간에 회복되었다. 라파 마이신의 포유류 표적을 표적으로하는자가 포식 활성화 제인 라파 마이신으로 처리된 SAH 래트는 뇌 부종 감소, BBB 파괴, 세포 자멸사 및 개선된 행동 척도를 보였다. 따라서 자가 포식 경로의 활성화가 급성기에 EBI를 완화시키는 잠재적인 치료 표적이 될 수 있다고 제안할 수 있다. 또한, SAH 쥐에서 세포 사멸 및 괴사 분자 경로를 감소시킴으로써 전압 의존성 음이온 채널 (VDAC) 1을 통해 EBI를 개선하는 데 있어 마이토파지의 신경 보호 효과를 입증했다. 세포질 및 미토콘드리아 Ca2 + 농도의 감쇠에 의해 에피 갈로 카테킨 -3- 갈 레이트 (EGCG) 보호 미토콘드리아 기능을 보여주며, 차례로 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 줄이고 전이 기공 개방의 투과성 증가 및 ROS 생성을 감소시켰다.

[0074] SAH 발병 후 처음 72 시간 동안 뇌 실질에서 발생하는 EBI와 비교할 때, DCI는 일반적으로 그 후 3 일에 발생하고 7 일부터 14 일 사이에 최고조에 달한다. SAH는 말 그대로 대뇌 동맥을 둘러싼 지주막 하 공간 내의 급성 출혈을 의미한다. 지주막하 공간이 있는 유리 헤모글로빈은 산화 스트레스와 염증을 유발하여 DCI 발달을 초래한다. 먼저 SAH 이후 인간 CSF 샘플에서 미토콘드리아의 기능적 관련성을 조사했으며 본 발명에서는 더 높은 미토콘드리아 막 잠재력은 3 개월 후속 조치에서 유리한 기능적 결과에 반영되었다. 특히, 성상 세포에서 잠재적으로 발생하는 미토콘드리아의 비율이 높을수록 좋은 결과가 나타났다. DCI와 관련하여 DCI가 없는 SAH 환자에서 5 일째에 CSF 미토콘드리아에서 미토콘드리아 막 잠재력이 DCI가 없는 환자보다 크게 감소한 것으로 나타났다. 내피 세포 기원 미토콘드리아의 더 높은 비율은 비 -DCI 환자에 비해 DCI 환자에서 더 자주 관찰되었다. 본 발명에서 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 세포의 오토파지(autophagy) 및 마이토파지(mitophagy 마커를 추가로 평가하여 미토콘드리아 기능 장애에 대한 DCI 병인 관계의 기본을 밝힌다. 본 발명에서는 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF) 세포에서 오토파지(autophagy) 및 마이토파지(mitophagy)로 인한 증가된 미토콘드리아 기능 장애가 DCI 병인의 원인이 될 수 있음을 보여주었다. 마커 중 DAPK1은 DCI 환자와 비 DCI 환자간에 가장 유의한 차이가 있었다. 또한, 항 -DAPK1 항체를 가진 면역 금 입자는 EM 하의 미토콘드리아에서 주로 검출

되었다.

[0075] DAPK1은 미토콘드리아 독소 유발 세포 사멸에서 미토콘드리아 막 전위의 센서 역할을 한다. 로테 논과 같은 미토콘드리아 독소 및 미토콘드리아 산화적 인산화 언 커플러인 CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)는 막 전위의 손실과 미토콘드리아의 팽창을 유발한다. 신경 모세포종 세포에서 DAPK1 활성화를 통해 세포 사멸로 이어지는 구조이다. 손상된 미토콘드리아에서 외부 막에 PINK1 및 LC3의 축적은 막 잠재력 손실을 동반한다. 뇌졸중으로 인한 신경 세포 사멸은 DAPK1-N- 메틸 -D- 아스 파르 테이트 수용체 (NMDAR), DAPK1-p53과 같은 DAPK1 신호 전달 경로와 관련이 있다. 대뇌 허혈 하에서 DAPK1이 마우스의 피질에서 NMDAR의 NR2B 서브 유닛과 직접 결합하고, 차례로 NR1 / NR2B 채널 전도도를 향상시켜 칼슘 역류를 악화시킨다고 보고했다. 또한, DPAPK1의 유전적 결실 또는 아미노산 1292-1304로 구성된 카르복실 꼬리 영역으로 정의되는 NR2BCT의 투여는 칼슘 역류를 억제하고 허혈성 모욕 후 신경 손상을 보호했다. DAPK-1은 또한 다음과 같은 조절에 관여했습니다. DAPK의 활성화는 T 세포 활성화 및 IL-2 생산을 감소시켰다. DAPK가 T 세포 수용체 (TCR) 활성화 NF-kappaB 및 T 림프구 활성화에 대한 조절자이다. DCI는 일반적으로 SAH로부터 4 일째에 발생하므로 CSF 내의 T 세포 활성화가 DCI에 기여할 수 있다. SAH 환자에서 높은 처리량 시퀀싱을 통해 말초 혈액 T 세포에서 TCR β 사슬 상보 결정 영역 (CDR) 3 레퍼토리를 조사했다. 중증 DCI 환자는 CDR3 길이의 유의한 차이없이 중증이 아닌 DCI 환자에 비해 낮은 클론 성과 높은 다양성을 나타냈다. 따라서 CSF 공간에서 DCI 발병 기전에서 DAPK1 및 T 세포 면역의 역할에 대한 추가 연구가 더 필요하다.

[0076] 기존의 마이토파지는 PINK1 / Parkin 경로에 의해 조절된다. 상 염색체 열성 파킨슨 병의 손상된 미토콘드리아에서 외막에 남아있는 PINK1은 파킨의 E3 유비퀴틴 리가아제 활성을 활성화하고 파킨을 모집한다. 그런 다음 선택적 리소좀 제거 후 파킨 매개 폴리 유비퀴틴화가 이어졌다. 파킨 매개 마이토파지도 심장 스트레스 반응 메커니즘에 관여했다. 파킨 결핍 마우스가 마이토파지 심근 감소와 함께 증가된 미토콘드리아 기능 장애를 보였다. 그러나 대체 Parkin-independent mitophagy 또는 autophagy 어댑터 단백질도 mitophagy 경로에 관여한다. 허혈성 또는 포도당 결핍 상태의 심장에서 Unc-51 유사 키나제 1 (Ulk1)의 인산화는 Ras 관련 단백질 (Rab) 9과 상호 작용한다. 세린 179에서, Rip 1 및 동적 관련 단백질 (Drp) 1과 복합체를 형성한다. 그런 다음 Drp1의 인산화가 격리되고 미토콘드리아에서 리소좀 분해가 뒤 따른다. PPI는 BECN1이 DCI와 비 -DCI 환자 사이에서 차별적으로 발현된 autophagy 및 mitophagy 마커 중 가장 높은 결합 유전자이다. 또한 BECN1은 autophagy 및 mitophagy 경로에 적극적으로 참여했다 (도 7 및 도 8). BECN1은 미토콘드리아 및 소포체와 같은 세포질 구조 내에서 발현되며 Bcl-2 상 동성 모티프, 코일 형 코일 도메인 및 진화 적으로 보존된 도메인 (ECD)의 3 개 도메인을 가지고 있다. BECN1은 ECD를 통해 PI3KCIII / Vps34와 상호 작용하고 자가 포식을 긍정적으로 조절한다. 당뇨병 생쥐는 BECN1, 미 세관 관련 단백질 경쇄 II (LC3-II)의 더 높은 발현과 p62.49의 더 낮은 발현으로 증가된 자가 포식체 형성 및 자가 포식 플럭스를 보였다. 암 치료를 위해 BECN1은 다음과 같은 치료 표적으로 제안되었다. 항 종양제를 사용하여 BECN1 활성을 향상시킨다. 기능적 농축 분석은 자가 포식 및 미토콘드리아 탈분극의 긍정적인 조절이 DCI 개발에서 생물학적 과정과 가장 관련이 있는 것으로 나타났다. 따라서 SAH 후 DCI를 치료하기 위해서는 BECN1을 통해 미토콘드리아에서 자가 포식 반응을 조절하는 제어 경로에 대한 추가 연구가 필요하다.

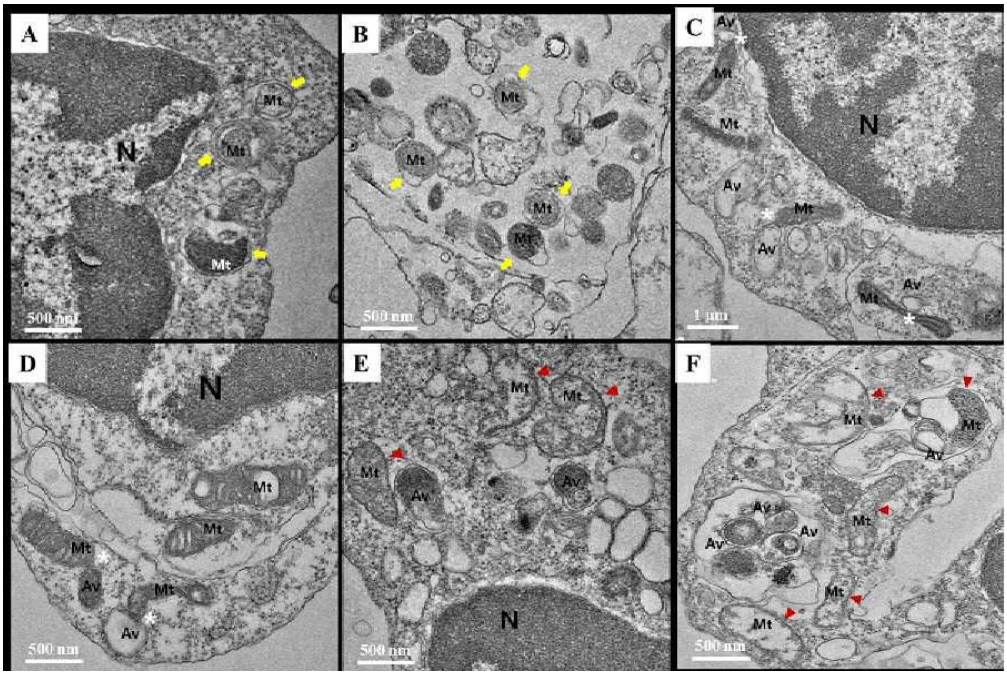
[0077] 본 발명에서 DCI를 가진 SAH 환자의 vWF 양성 CSF 세포에서 차등적으로 발현된 autophagy 및 mitophagy 마커를 확인하기 위해 공 초점 현미경을 추가로 평가했다. autophagy 및 mitophagy에 의한 미토콘드리아 기능 장애는 DCI 병인에 적극적으로 관여할 수 있다. 내피 기능 장애는 뇌 혈관 질환과 관련이 있다. 내피에서 방출된 산화질소와 엔도텔린은 혈관 기능을 조절한다. 건강한 대조군에 비해 SAH 환자는 높은 내피 미세 입자를 보였다. 또한 혈관 연축이 있는 SAH 환자에서 CSF 및 혈장 엔도 텔린 수치의 증가가 관찰되었다. DCI 환자에서 더 높은 비율 vWF 양성 미토콘드리아는 비 DCI 환자와 비교하여 관찰되었다. TCD에서 혈관 경련이 있는 SAH 환자는 CD105 + 및 CD62e +의 내피 미세 입자가 크게 증가한 것으로 나타났다. 따라서 향후 연구는 DCI 환자의 내피에서 기인하는 CSF 세포의 미토콘드리아 기능 장애의 완화에 초점을 맞추어야 한다.

[0079] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예를 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 본 발명을 구현할 수 있음을 이해할 것이다. 그러므로 상기 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 한다.

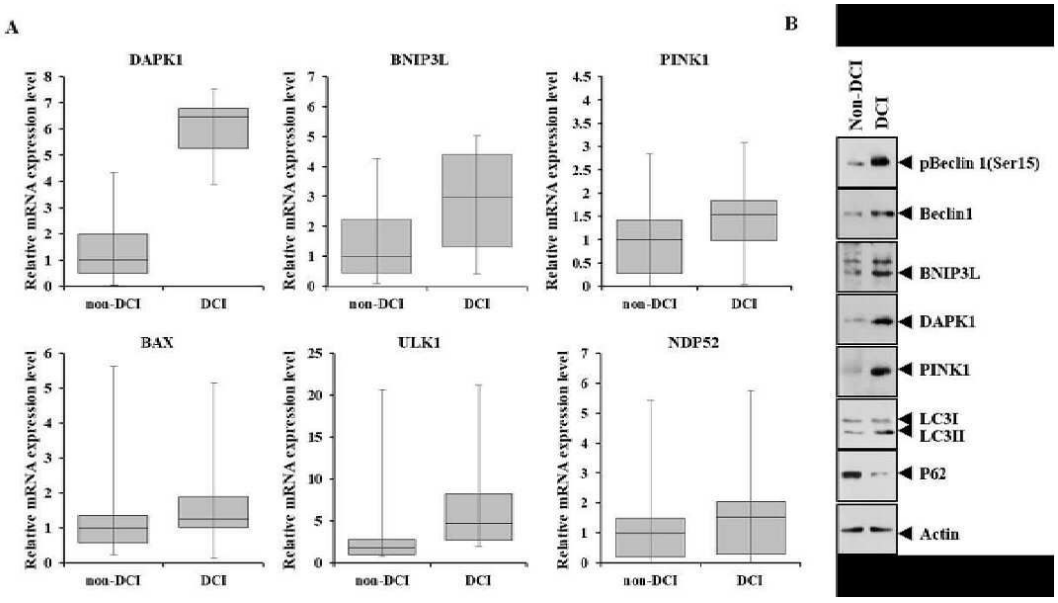
[0080] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

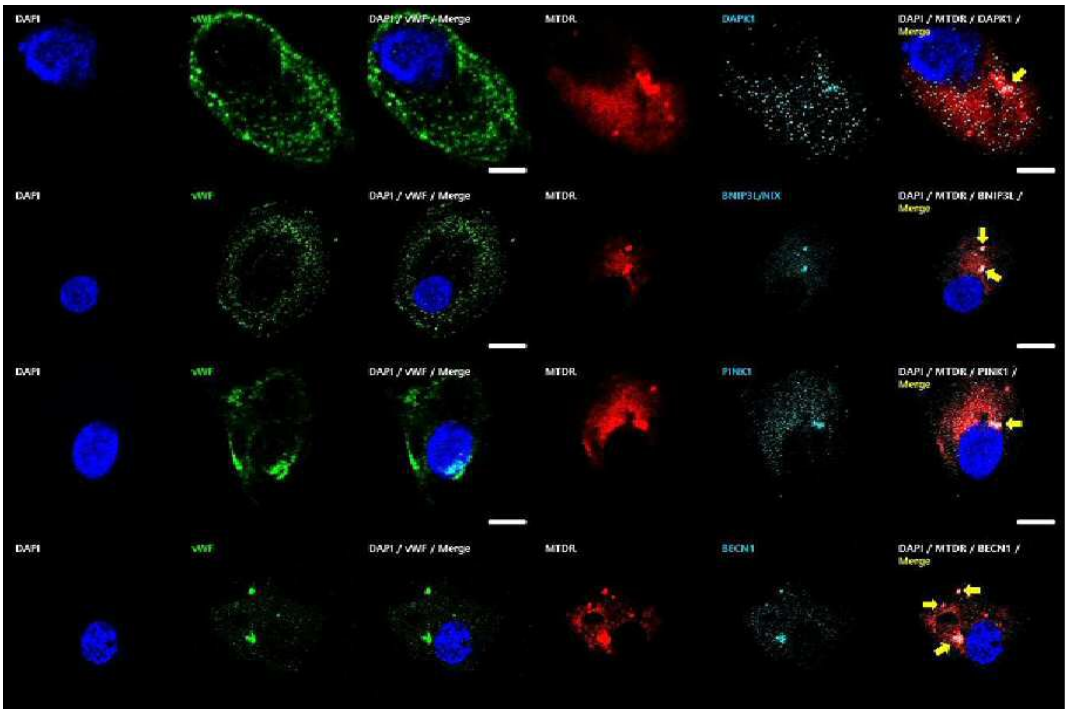
도면1



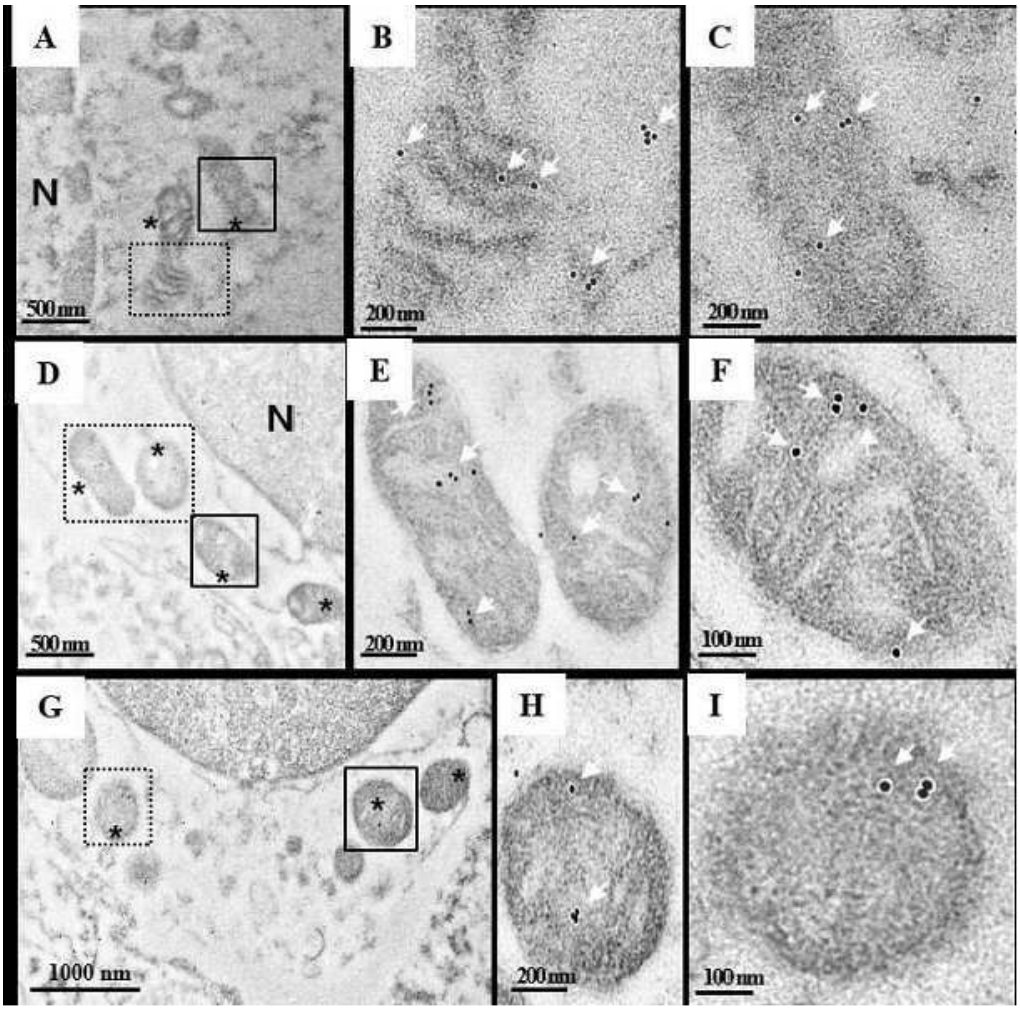
도면2



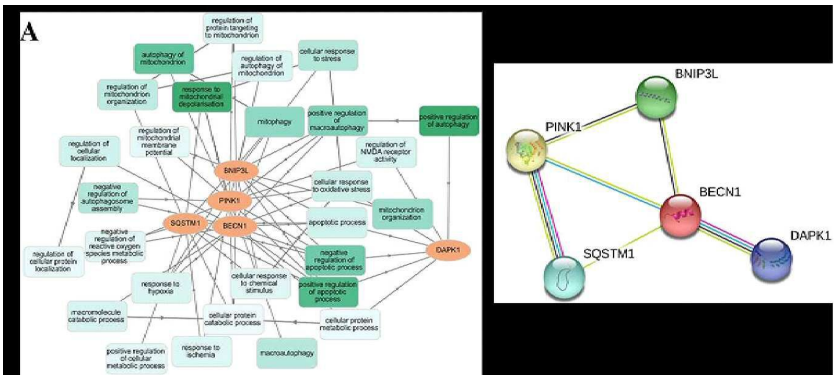
도면3


DAPI
vWF
DAPI / vWF / Merge
MtDR
DAPK1
DAPI / MtDR / DAPK1 / Merge
DAPI
vWF
DAPI / vWF / Merge
MtDR
BNIP3L/NIX
DAPI / MtDR / BNIP3L / Merge
DAPI
vWF
DAPI / vWF / Merge
MtDR
PINK1
DAPI / MtDR / PINK1 / Merge
DAPI
vWF
DAPI / vWF / Merge
MtDR
BECN1
DAPI / MtDR / BECN1 / Merge

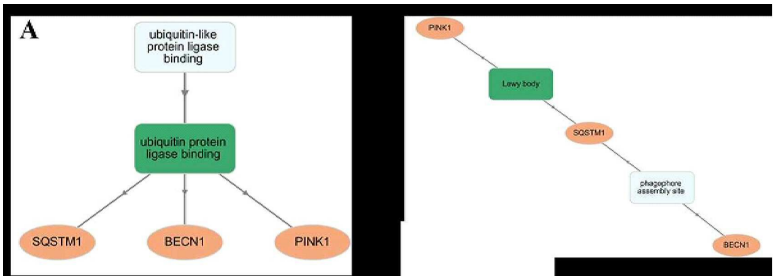
도면4


A
N
500 nm
B
200 nm
C
200 nm
D
N
500 nm
E
200 nm
F
100 nm
G
1000 nm
H
200 nm
I
100 nm

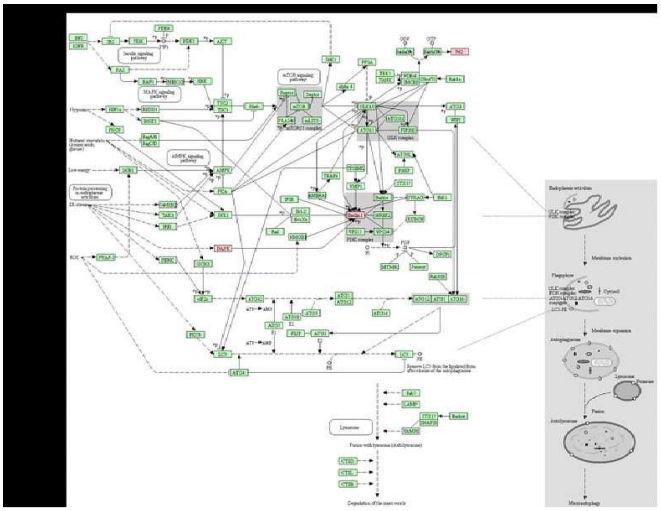
도면5


A
BNIP3L
PINK1
BECN1
DAPK1
SQSTM1

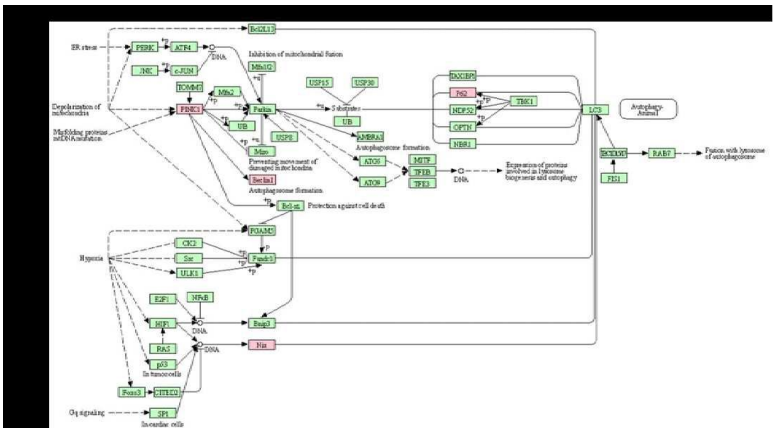
도면6


A
ubiquitin-like protein ligase binding
ubiquitin protein ligase binding
SQSTM1
BECN1
PINK1
PINK1
Lewy body
SQSTM1
phagophore assembly site
BECN1

도면7



도면8


ER stress
PERK
ATF4
DNA
JNK
c-JUN
TOMM7
Mfn2
PINK1
Parkin
Degeneration of mitochondria
Misfolding proteins in ER/Aberration
Inhibition of mitochondrial fusion
MIRO
USP15
USP30
UB
USP8
Mfn
Preventing movement of damaged mitochondria
Bcl-B21
Autophagosome formation
Bcl-xL
Protection against cell death
FOXM1
CK2
Src
ULK1
Hypoxia
Fas
E2F1
NF-B
MDM2
RAS
p53
In tumorcells
Fasn
CTTEC0
Oxi signaling
SP1
In ovarian cells
Bcl2L13
BNIP3
NIX
FKBP8
TBK1
LC3
Autophagy-Animal
BCN1/M
RAB7
Fusion with lysosome of autophagosome
PI31
ATG5
ATG9
MTF
TFEB
TFE3
DNA
Expression of proteins involved in lysosome biogenesis and autophagy