



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0131461  
(43) 공개일자 2013년12월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)  
A61P 25/16 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7026112
- (22) 출원일자(국제) 2012년03월07일  
심사청구일자 2013년10월02일
- (85) 번역문제출일자 2013년10월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/053921
- (87) 국제공개번호 WO 2012/120044  
국제공개일자 2012년09월13일
- (30) 우선권주장  
61/449,751 2011년03월07일 미국(US)  
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인  
폰다지오네 텔레톤  
이탈리아 로마 00154 비아 데이 마가지니 제네랄리 18/20
- (72) 발명자  
세텡브르 카르민  
이탈리아 나폴리 I-80131 비아 피에트로 카스텔리노 111, 타이젼 내  
발라비오 안드레아  
이탈리아 나폴리 I-80131 비아 피에트로 카스텔리노 111, 타이젼 내  
메디나 사나브리아 디에고 루이스  
이탈리아 나폴리 I-80131 비아 피에트로 카스텔리노 111, 타이젼 내
- (74) 대리인  
특허법인우인

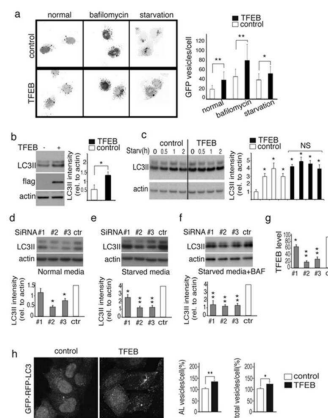
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 TFEB 변종 및 그의 용도

**(57) 요약**

진핵생물 세포의 핵에서 구성적으로 국소화되는 변종(variants), 돌연변이(mutants), 말단이 잘린 단백질(truncated proteins), 키메라 등과 같은 TFEB 관련 분자들에 관한 것이다. 그러한 분자들은 리소좀 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환과 같은 세포 오토파지/리소좀 시스템의 유도를 필요로 하는 모든 질환에서 치료학적 적용성을 가진다.

**대표도 - 도1**



(30) 우선권주장

61/579,793 2011년12월23일 미국(US)

61/596,485 2012년02월08일 미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

진핵생물의 세포의 핵에 구성적으로 국소화되는 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 변종은 동일한 인산화 둔감성을 부여하는 세린 잔기의 치환을 포함하는 것인 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 3

Seq. Id No. 2 에 포함된 아미노산 서열로 구성되고 그리고 Seq. Id No. 2 의 SER 142 및/또는 SER 211에서 세린 잔기의 치환이 있는 제1항 또는 제2항에 따른 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 Seq. Id No. 2 에 포함된 아미노산 서열은 aa.117 내지 aa.166이고 그리고 세린 잔기의 치환이 Seq. Id No. 4와 같이 Seq. Id No. 2 의 SER 142에서 있는 것인 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 Seq. Id No. 2 의 SER 142 및/또는 SER 211의 치환은 ALA에 있는 것인 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 6

의학적 사용을 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

세포 오토파지/리소좀 시스템의 유도를 필요로 하는 질환의 치료에서의 사용을 위한 TFEB 변종 단백질.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

다음 병리 중의 어느 하나의 치료에서의 사용을 위한 TFEB 변종 단백질: 리소좀 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 리소좀 축적 질환은 활성체 결핍/GM2 강글리오시드 축적증, 알파-만노시도시스, 아스파르틸글루코사민노, 콜레스테롤 에스테르 축적 질환, 만성 헥소사미나아제 A 결핍증, 시스틴 축적증, 다논 질병, 파브리병, 파버 질병, 푸코시드 축적증, 갈락토시알리도시스, 고셔병(I형, II형 및 III형 포함), GM1 강글리오시드 축적증(유아형 (infantile), 아동형/청소년형(late infantile/juvenile), 성인형/만성 포함), I-세포 질환/뮤코리피드증 II, ISSD(infantile free sialic acid storage disease), 연소성 헥소사미나아제 A 결핍증(juvenile hexosaminidase A deficiency), 크라베병(유아기 발병(infantile onset), 후기 발병(late onset) 포함), 이엽 성백질이영양증, 의사-후를러 폴리아이스트로피(pseudo-Hurler polydystrohy)/뮤코리피드증 IIIA, MPS I 후를러 증후군, MPS I 사이에 증후군, MPS I 후를러-사이에 증후군, MPS II 헌터 증후군, 산필리포증후군 타입 A/MPS IIIA, 산필리포 증후군 타입 B/MPS IIIB, 모르퀴오 타입 A/MPS IVA, 모르퀴오 타입 B/MPS IVB, MPS IX 히알루로디나아제 결핍증, 니만-피크병(A형, B형 및 C형 포함), 신경 세로이드 리포푸신증(Neural ceroidlipofuscinoses)(CLN6 질병, 비정형적 아동형(atypical late infantile), 만발성 변종(late onset variant), 초기 연소성 바텐-스필마이어-포그트병/연소성 NCL/CLN3 질환, 피니쉬 변종 아동형 CLN5(Finnish variant late infantile CLN5, 잔스키-빌쇼우스키병(Jansky-Bielschowsky)/아동형 CLN2/TPP1 질환, 콥스/성인형(adult onset) NCL/CLN4 질환, 북부 뇌전증(northern epilepsy)/변종 아동형(variant late infantile) CLN8, 및 산타보오리-할티아(Santavuori-Haltia)/유아형 CLN1/PPT 질환), 베타-만노시도시스, 폼페병/글리코겐 축적 질환 타입 II, 피크노디소토시스, 샌드호프병(Sandhoff disease)/성인형(adult onset)/GM2 강글리오시도시스, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 유아형, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 청소년형, 언들러병, 살라병/시알산 축적 질환, 테이-사쉬(Tay-Sachs)/GM2 강글리오시도시스, 울만병, 다중 설패타제 결핍증 그룹에 속하는 것인 TFEB 변종 단백질.

**청구항 10**

제8항에 있어서,

상기 간 질환은 알파1 항트립신 결핍증 및 지방간 질환의 그룹에 속하는 것인 TFEB 변종 단백질.

**청구항 11**

제8항에 있어서,

상기 근육 질환은 자가 소화성 액포 근병증성(Autophagic Vacuolar Myopathies) 및 과도한 자가소화성을 가진 X-연관성 근병증성이 속하는 것인 TFEB 변종 단백질.

**청구항 12**

제8항에 있어서,

상기 대사 질환은 고콜레스테롤증 및 지방간 질환 그룹에 속하는 것인 TFEB 변종 단백질.

**청구항 13**

제8항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크로이즈펠트-야콥병 및 척수 소뇌성 실조증 (spinocerebellar ataxia) 그룹에 속하는 것인 TFEB 변종 단백질.

**청구항 14**

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 TFEB 변종 단백질에 대해 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산.

**청구항 15**

제14항에 있어서,

상기 핵산은 Seq Id No. 3의 서열을 포함하는 것인 핵산.

**청구항 16**

제14항 또는 제15항에 따른 핵산을 적합한 조절적 서열하에서 포함하는 발현 벡터.

**청구항 17**

유전자 치료를 위한 제16항에 따른 발현 벡터.

**청구항 18**

하기 단계를 포함하는 엑스 비보(ex vivo) 배양된 세포에서 내인성 또는 재조합 리소솜 효소의 생산을 증가시키기 위한 방법:

- 제14항 또는 제15항에 따른 핵산을 또는 제16항에 따른 발현 벡터를 도입하는 단계, 및
- 인코딩된 TFEB 변종 단백질의 발현을 허용하는 단계.

**청구항 19**

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 TFEB 변종 단백질의 약학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하여 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 장애는 세포 오토포지/리소솜 시스템의 유도에 의해 완화되는 것인 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 따른 TFEB 변종 단백질의 약학적으로 유효한 양을 투여하는 것에 의한 장애를 치료하는 방법으로서,

상기 장애는 리소솜 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

상기 장애는 대사 질환이고,

상기 대사 질환은 고콜레스테롤증 또는 지방간 질환인 방법.

**청구항 22**

제20항에 있어서,

상기 장애는 신경퇴행성 질환이고,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크로이츠펠트-야콥병 또는 척수 소뇌성 실조증 (spinocerebellar ataxia)인 방법.

**청구항 23**

제20항에 있어서,

상기 장애는 리소좀 축적 질환이고,

상기 리소좀 축적 질환은 활성체 결핍/GM2 강글리오시드 축적증, 알파-만노시도시스, 아스파르틸글루코사민노, 콜레스테롤 에스테르 축적 질환, 만성 헥소사미나아제 A 결핍증, 시스틴 축적증, 다논 질병, 파브리병, 파버 질병, 푸코시드 축적증, 갈락토시알리도시스, 고셔병(I형, II형 및 III형 포함), GM1 강글리오시드 축적증(유아형 (infantile), 아동형/청소년형(late infantile/juvenile), 성인형/만성 포함), I-세포 질환/뮤코리피드증 II, ISSD(infantile free sialic acid storage disease), 연소성 헥소사미나아제 A 결핍증(juvenile hexosaminidase A deficiency), 크라베병(유아기 발병(infantile onset), 후기 발병(late onset) 포함), 이염성 백질이영양증, 의사-후를리 폴리아이스트로피(pseudo-Hurler polydystrophy)/뮤코리피드증 IIIA, MPS I 후를리 증후군, MPS I 사이에 증후군, MPS I 후를리-사이에 증후군, MPS II 헌터 증후군, 산필리포증후군 타입 A/MPS IIIA, 산필리포 증후군 타입 B/MPS IIIB, 모르quio 타입 A/MPS IVA, 모르quio 타입 B/MPS IVB, MPS IX 히알루로디나아제 결핍증, 니만-피크병(A형, B형 및 C형 포함), 신경 세로이드 리포푸신증(Neural ceroidlipofuscinoses)(CLN6 질병, 비정형적 아동형(atypical late infantile), 만발성 변종(late onset variant), 초기 연소성 바텐-스필마이어-포그트병/연소성 NCL/CLN3 질환, 피니쉬 변종 아동형 CLN5(Finnish variant late infantile CLN5, 잔스키-빌쇼우스키병(Jansky-Bielschowsky)/아동형 CLN2/TPP1 질환, 쿵스/성인형(adult onset) NCL/CLN4 질환, 북부 뇌전증(northern epilepsy)/변종 아동형(variant late infantile) CLN8, 및 산타보오리-할티아(Santavuori-Haltia)/유아형 CLN1/PPT 질환), 베타-만노시도시스, 폼페병/글리코젠 축적 질환 타입 II, 피크노디소토시스, 샌드호프병(Sandhoff disease)/성인형(adult onset)/GM2 강글리오시도시스, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 유아형, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 청소년형, 윈들러병, 살라병/시알산 축적 질환, 테이-사쉬(Tay-Sachs)/GM2 강글리오시도시스, 울만병 또는 다중 설파타제 결핍증인 방법.

**청구항 24**

제20항에 있어서,

상기 장애는 간질환이고,

상기 간질환은 알파1 항트립신 결핍증 또는 지방간 질환인 방법.

**청구항 25**

제20항에 있어서,

상기 장애는 근육 질환이고,

상기 근육 질환은 자가 소화성 액포 근병증성(Autophagic Vacuolar Myopathies) 또는 과도한 자가소화성을 가진 X-연관성 근병증성인 방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 진핵생물 세포의 핵에서 구성적으로 국소화되는 변종(variants), 돌연변이(mutants), 말단이 잘린 단백질(truncated proteins), 키메라 등과 같은 TFEB 관련 분자들에 관한 것이다. 그러한 분자들은 리소좀 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환과 같은 세포 오토파지/리소좀 시스템의 유도를 필요로 하는 모든 질환에서 치료학적 적용성을 가진다.

### 배경 기술

[0002] 오토파지(autophagy)는 두 개의 구별되는 세포 소기관(cellular organelle)인, 오토파고솜(autophagosome)과 리소좀의 협동에 의존하는 이화 과정이다(1). 절식(starvation) 동안 세포는 분해(degradation)를 향상시키기 위한 구획과 재생 과정 둘 다를 확장한다.

[0003] 리소좀은 세포 항상성을 유지하고 세포 제거(cellular clearance), 지질 항상성, 에너지 대사, 플라즈마 멤브레인 리페어, 뼈 리모델링 및 병원균 방어를 포함하는 다양한 생리학적 과정을 조정한다(mediate). 이러한 모든 과정은 환경적 신호에 대해 리소좀의 적응적이고 역동적인 반응을 요구한다. 실제, 리소좀 축적 질환(LSDs), 신경퇴행성 질환, 부상 및 감염을 포함하는 노화 및 다이어트와 같은 생리학적 신호 및 병리학적 조건은 리소좀의 적응반응(adaptive response)을 발생시킬 수 있다(34, 35, 36).

[0004] 리소좀 기능 및 근원적인 리소좀 적응성을 조절하는 메카니즘의 이해는 아직 초기 상태에 있다. 리소좀 바이오제네시스의 조절에 있어 주요 플레이어는 염기성 헬릭스-루프-헬릭스(Helix-Loop-Helix)(bHLH) 류신 지퍼 전사 인자, TFEB이다(2). 확인된 TFEB 전사 표적은 리소좀 가수분해 효소, 리소좀 멤브레인 단백질 및 액포 H<sup>+</sup>-ATPase(vATPase) 복합체의 구성성분이며, 리소좀 가수분해 효소는 기질 분해시에 수반되고, 리소좀 멤브레인 단백질은 리소좀과 다른 세포 조직의 상호작용을 가능하게 하고, 액포 H<sup>+</sup>-ATPase(vATPase) 복합체의 구성성분은 리소좀 산성화에 참여한다(37, 2).

[0005] WO2010/092112는 소위 CLEAR 요소(CLEAR element)에서 작용하는 세포 분해 경로를 향상할 수 있는 분자를 개시하고 있으며, 그들 중에 TFEB가 제시되어 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] WO2010/092112호 공보

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 의학적 사용을 위한 TFEB 변종 단백질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 TFEB 변종 단백질에 대해 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 적합한 조절적 서열(appropriate regulative sequences) 하에서 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 엑스 비보(ex vivo) 배양된 세포에서 내인성 또는 재조합 리소좀 효소의 생산을 증가시키기 위한 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다:

[0011] - 상기 세포에서 상기한 바에 따라서 핵산을 또는 상기한 바와 같이 발현 벡터를 도입하는 단계, 및

[0012] - 인코딩된 TFEB 변종 단백질의 발현을 허용하는 단계.

[0013] 본 발명은 바람직하게 질환이 오토파지/리소좀 시스템의 유도에 의해 완화될 때, 전술한 바와 같이 TFEB 변종 단백질의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하여 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 출원인들은 절식동안 오토파고솜 형성, 오토파고솜-리소좀 융합 및 기질 분해를 포함하는 오토파지 경로의 주요 단계를 제어하는 전사 프로그램이 활성화된 세포를 보여주었다. 전사 인자 EB(TFEB), 리소좀 바이오제네시스를 위한 미리 확인된 마스터 유전자(2)는 오토파지와 리소좀 유전자 둘 다를 발현하게 하기 위해 이 프로그램을 조정한다(coordinate).
- [0015] 출원인들은 핵 국소화(nuclear localization) 및 TFEB의 활성이 특정한 세린 인산화에 의해 조절된다는 것을 알아내었다. 절식과 유사하게, 특정 인산화의 저해에 기반하는 약학적 또는 유전자 돌연변이가 TFEB를 활성화하게 하여 오토파지를 유도한다. 이들 데이터는 신규하며, 키나아제-의존성인, 바이오제네시스 및 두 개의 협동하는 세포 소기관의 파트너십을 제어하여 리소좀-오토파지 경로의 조절에서 수반되는 메카니즘을 보여준다.
- [0016] 따라서 여기에 개시되는 진핵생물 세포의 핵에 구성적으로 국소화되어 있는 TFEB 변종 단백질을 본 발명의 목적으로 한다. 본 발명의 TFEB 변종 단백질은 동일한 인산화 둔감성(Insensitive)을 부여하기 위해 세린 잔기(Serine residue)의 치환 또는 변경을 포함한다. 이 기술 분야의 통상의 기술자는 티로신 이외의, 다른 아미노산 치환이, TFEB 변종 인산화 둔감성을 부여하기 위해 만들어질 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들면, 세린 잔기는 알라닌과 같은 중성 아미노산 같은 천연 아미노산, 또는 비천연 아미노산으로 대체될 수 있다. TFEB 변종 단백질은 돌연변이, 말단이 잘린 단백질, TFEB의 키메라를 포함하는 진핵생물 세포의 핵에 구성적으로(constitutively) 국소화되어 있다.
- [0017] 바람직한 구현예에서, TFEB 변종 단백질은 Seq. Id No. 2에 포함되는 아미노산 서열로 구성되며, 세린 잔기의 치환은 Seq. Id No. 2의 SER 142 및/또는 SER 211에서 있다. 바람직하게 Seq. Id No. 2에 포함된 아미노산 서열은 aa.117부터 aa.166까지이며 세린 잔기의 치환은 Seq. Id No. 2의 SER 142(Seq. Id No. 4)에서 있다. 대안적으로 아미노산 서열은 필수적으로 Seq. Id No. 2로 구성되며 그리고 세린 잔기의 치환은 SER 142 및/또는 SER 211에서 있다. 더 바람직한 구현예에서 Seq. Id No. 2의 SER 142 및/또는 SER 211에서의 치환은 ALA에 있다.
- [0018] 본 발명의 상기한 TFEB 변종 단백질의 의학적 용도를 다른 목적으로 한다.
- [0019] 진술한 TFEB 변종 단백질은 세포 오토파지/리소좀 시스템(authophagic/lysosomal system)의 유도를 필요로 하는 장애의 치료에 유용하게 이용될 수 있다. 바람직하게 다음의 병리학 중의 어느 하나의 치료를 위한 용도로 이용될 수 있다: 리소좀 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환.
- [0020] 리소좀 축적 질환의 예는 활성체 결핍/GM2 강글리오시드 축적증, 알파-만노시도시스, 아스파르틸글루코사민노, 콜레스테롤 에스테르 축적 질환, 만성 헥소사미나아제 A 결핍증, 시스틴 축적증, 다논 질병, 파브리병, 파버 질병, 푸코시드 축적증, 갈락토시알리도시스, 고셔병(I형, II형 및 III형 포함), GM1 강글리오시드 축적증(유아형(infantile), 아동형/청소년형(late infantile/juvenile), 성인형/만성 포함), I-세포 질환/뮤코리피드증 II, ISSD(infantile free sialic acid storage disease/ISSD), 연소성 헥소사미나아제 A 결핍증(juvenile hexosaminidase A deficiency), 크라베병(유아기 발병(infantile onset), 후기 발병(late onset) 포함), 이염성백질이영양증, 의사-후를러 폴리아이스트로피(pseudo-Hurler polydystrophy)/뮤코리피드증 IIIA, MPS I 후를러 증후군, MPS I 사이에 증후군, MPS I 후를러-사이에 증후군, MPS II 헌터 증후군, 산필리포증후군 타입 A/MPS IIIA, 산필리포 증후군 타입 B/MPS IIIB, 모르quio 타입 A/MPS IVA, 모르quio 타입 B/MPS IVB, MPS IX 히알루로디나아제 결핍증, 니만-피크병(A형, B형 및 C형 포함), 신경 세로이드 리포푸신증(Neuronal ceroid lipofuscinoses)(CLN6 질병, 비정형적 아동형(atypical late infantile), 만발성 변종(late onset variant), 초기 연소성 바텐-스필마이어-포그트병/연소성 NCL/CLN3 질환, 피니쉬 변종 아동형 CLN5(Finnish variant late infantile CLN5, 잔스키-빌쇼우스키병(Jansky-Bielschowsky)/아동형 CLN2/TPP1 질환, 쿵스/성인형(adult onset) NCL/CLN4 질환, 북부 뇌전증(northern epilepsy)/변종 아동형(variant late infantile) CLN8, 및 산타보오리-할티아(Santavuori-Haltia)/유아형 CLN1/PPT 질환), 베타-만노시도시스, 폼페병/글리코젠 축적 질환 타입 II, 피코노디소토시스, 샌드호프병(Sandhoff disease)/성인형(adult onset)/GM2 강글리오시도시스, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 유아형, 샌드호프병/GM2 강글리오시도시스 청소년형, 쉬들러병, 살라병/시알산 축적 질환, 테이-사쉬(Tay-Sachs)/GM2 강글리오시도시스, 울만병, 다중 설파타제 결핍증이 있다.
- [0021] 간 질환의 예는 알파 1 항트립신 결핍증 및 지방간 질환이 있다.
- [0022] 근육 질환의 예는 자가 소화성 액포 근병증성(Autophagic Vacuolar Myopathies)과 과도한 자가소화성을 가진 X-연관성 근병증성이 있다.
- [0023] 대사질환의 예는 하이퍼콜레스테롤레미(hypercholesterolemia)와 지방간 질환이 있다.

- [0024] 신경퇴행성 질환의 예는 알츠하이머 질환, 파킨슨병, 헌팅턴병, 크로이츠펠트-야콥병, 및 척수 소뇌성 실조증 (spinocerebellar ataxia)이 있다.
- [0025] 본 발명은 전술한 바와 같이 TFEB 변종 단백질에 대해 인코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산을 또 다른 목적으로 한다. 바람직하게 핵산은 Seq. Id No. 3의 서열을 포함한다.
- [0026] 본 발명은 전술한 바와 같이 적합한 조절적 서열(appropriate regulative sequences) 하에서 핵산을 포함하는 발현 벡터를 또 다른 목적으로 한다.
- [0027] 본 발명의 발현 벡터는 유전자 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 엑스 비보(ex vivo) 배양된 세포에서 내인성 또는 재조합 리소솜 효소의 생산을 증가시키기 위한 방법을 또 다른 목적으로 한다:
- [0029] - 상기 세포에서 상기한 바에 따라서 핵산을 또는 상기한 바와 같이 발현 벡터를 도입하는 단계, 및
- [0030] - 인코딩된 TFEB 변종 단백질의 발현을 허용하는 단계.
- [0031] 본 발명은 바람직하게 질환이 오토파지/리소솜 시스템의 유도에 의해 완화될 때, 전술한 바와 같이 TFEB 변종 단백질의 치료학적으로 유효한 양을 대상에게 투여하여 장애를 치료하는 방법을 또 다른 목적으로 한다.
- [0032] 더 바람직하게 장애는 리소솜 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환을 포함하는 군에서 선택된다. 그러한 질환의 예는 앞서 제시하였다.

**발명의 효과**

- [0033] 본 발명은 리소솜 축적 질환, 신경퇴행성 질환, 간 질환, 근육 질환 및 대사 질환과 같은 세포 오토파지/리소솜 시스템(autophagic/lysosomal system)의 유도가 필요한 모든 장애에 치료학적 적용 가능성을 가지는 TFEB 변종 단백질을 제공한다.

**도면의 간단한 설명**

**[0034] 도 1. TFEB는 오토파지를 유도한다.**

(A) TFEB를 안정하게 과발현하는 HeLa 세포에 GFP-LC3 플라스미드로 형질주입하고 표시된 대로 처리하였다. 대략 100개의 세포를 각 실험에 대해 3회 분석하였다. 그래프는 GFP-양성 세포의 정량화한 것을 나타낸다. (B-F) LC3의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. (B) TFEB-3xflag을 안정하게 과발현하는 (+) 및 대조군 세포 (-)에서 LC3의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 그래프는 세 개의 독립된 블롯으로부터 LC3II 발현(액틴에 대해)을 이미지J 소프트웨어 분석을 사용하여 정량화한 것을 나타낸다; (C) TFEB를 안정하게 발현하는 세포로, 세립이며, 나타낸 시간 (h=시간) 동안 아미노산-결핍(aminoacid-starved)(Starv)된 것이다. (D-F) TFEB-RNAi로부터 분리된 세포 용해물과 스크램블된 RNAi(ctr)로 처리된 대조군을 (D) 표준 배지에서, (E) 결핍 배지(starved media)에서, 또는 (F) 바필로마이신(4h; 400nM)으로 보충된 결핍 배지에서 배양하였다. 그래프는 세 개의 독립된 블롯으로부터 LC3II 발현(액틴에 대해)을 정량화한 것을 나타내며 밴드 강도는 이미지J 소프트웨어 분석을 사용하여 정량화하였다. (G) TFEB mRNA 레벨을 TFEB를 타겟팅하는 세 개의 다른 siRNA올리고(올리고 #1, #2, #3)로, 또는 스크램블된 siRNA올리고(ctr)로 형질주입하여 제조된 세포로부터 준비된 cDNAs를 사용하는 qPCR로 분석하였다. (H) 안정하게 빈 벡터(대조군) 또는 TFEB 벡터로 형질주입된 GFP-mRFP-LC3를 발현하는 고정된 HeLa 세포의 대표적인 공초점 이미지이다. 최소 2000개의 세포를 세었으며 그 값은 세 개의 독립된 실험에서 얻어진 세포의 평균 수(대조군에 대해, %)를 나타낸다. AL(오토리소솜(autolysosomes)) = mRFP 양성/GFP 음성 세포; 전체: mRFP 양성 세포.(모든 에러 바는 표준 편차를 나타낸다. T-테스트(언페어드(unpaired)) p 값 (\*)<0.05, (\*\*)<0.01)

**도 2. 절식은 TFEB 핵 전좌 및 활성을 조절한다.**

(A) 다른 조건에서 배양된 HeLa 세포 내 51개의 오토파지-관련된 유전자의 상대적 발현 레벨에서의 폴드 변화 차이의 대수값을 보여주는 스캐터 플롯 그래프이다. X-축 = 대조군, Y-축 = 처리된 군. 원은 증가되는(붉은 색) 또는 감소되는(초록색) 폴드 변화가 있는 유전자를 나타낸다. 비교 결과는 나타난 대로이다. (B) 크로마틴 면역 침강반응(ChIP) 분석이다. 히스토그램은 qPCR 분석에 의해 검출되는 면역침강된 DNA의 양을 보여준다. 값은 입력에 대해 정규화되고 모의 대조군을 넘어 상대적으로 풍부하게 플롯되었다. 실험은 3회 실시되었다. (C) 정상, 절식, TFEB-siRNA 절식 세포에서 TFEB-표적 유전자 발현의 qPCR 분석이다. GAPDH 및 HPRT는 하우스키핑 유전자를 나타내고, ATG10, ATG9A 및 ATG-4D는 대조 유전자(비-TFEB 표적 유전자)를 나타낸다. (D-F) 안정하게 TFEB

를 과발현하는 HeLa 세포를 처리없이 둔 것 또는 4시간 동안 영양소를 공급하지 않고 둔 것이다. (D) 각 필드당 50~100개의 세포를 함유하는 다섯 개의 필드를 TFEB 핵 국소화(nuclear localization)에 대해 분석했다.  $P$ 값(\*) = <0.01. (E) 세포를 핵/세포질(nuclear/cytosolic) 분별화를 거치게 하고 플래그(Flag) 항체로 블롯했다(blot). H3과 튜블린을 각각 핵과 세포질 마커로 사용했다. (F) 핵 부분을 플래그와 H3(로딩 대조군(loading control)) 항체로 블롯했다. (G) 1시간 동안 표준 배지 세포(정상(normal))로 또는 배지 활성화(media stimulation)에 앞서 미리 1시간 동안 Ap-2(AKT 저해제), 라파마이신(mTOR 저해제) 및 U0126(MEK 저해제)으로 처리된 정상, 절식 및 절식/활성화하여 준비된 핵 추출물에서 플래그(Flag), 튜블린 및 H3의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 전체 추출물을 저해제의 효능을 입증하기 위해 사용했다. (H) 구성적(constitutive) 활성 MEK(caMEK) 플라스미드 또는 빈 벡터로 형질주입된 TFEB siRNA 또는 TFEB-스크램블된 대조 세포에서 리소좀 및 오토파지 유전자의 qPCR 분석 결과이다. 절식은 표시된 대로 실시되었다.(모든 에러 바는 표준 편차를 나타낸다. T-테스트(언페어드)  $P$ 값(\*) <0.05, (\*\*)<0.01)

### 도 3. 세린 인산화가 TFEB 활성을 조절한다.

(A) 플래그(Flag) 항체로 면역염색되고, TFEB-3xFlag의 변이된 버전을 발현하는 HeLa 세포에서 TFEB 준세포 국소화(subcellular localization)이다. 세 개의 독립된 실험에서, 각각 50~100개의 세포를 함유하는 다섯 개 필드를 분석했다. (B) 빈, 정상 및 변이 TFEB 플라스미드로 24시간 사후-형질주입 후 TFEB 표적 유전자 발현의 qPCR 분석이다. (C, D) 빈(pCDNA), TFEB-3xFlag 또는 TFEB-S142A-3xFlag 벡터를 동량으로 형질주입한 HeLa 세포의 단백질 추출물에서 LC3II(C)와 Lamp1(D)의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 바필로마이신을 표시한 곳에서 첨가했다. 실험을 3회 실시했고 단백질 레벨의 정량화를 액틴 레벨로 정규화했다. (E) 안정하게 GFP-mRFP-LC3를 발현하고 pCDNA, Tfeb 또는 Ser-Tfeb로 24시간 동안 형질주입된 HeLa 세포의 오토리소좀(autolysosomes)(AL = RFP 양성/GFP 음성) 분석 결과이다. 정량화는 도 1H에서 언급한 바와 같다. (F) 전체 세럼 또는 4시간 동안 영양소 절식된 상태에서 유지되고, 항-플래그 항체로 면역침강된 HA-Erk2 및/또는 TFEB-3xFlag로 형질주입된 HeLa 세포 상에서 항-Erk 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 용해물을 항-플래그로 면역침강시키고 항-Erk 항체로 블롯했다. (G) 인 비트로 키나아제 분석이다. 재조합 키나아제를 ATP- $\gamma$ -<sup>32</sup>P 및 TFEB 단백질(TFEB-S-142)의 아미노산 120 내지 170으로부터 스페닝한 펩티드 존재하에 또는 세린 142를 알라닌(TFEB-A-142)으로 치환한 유사한 펩티드로 배양했다. 인산화 효율("인산화 감도")을 펩티드에 의해 병합된 방사능의 양으로 측정했다. (H) TFEB를 과발현하는 HeLa 안정한 클론을 ERK1/2에 대해 특이적인 siRNA 올리고로 또는 대조 siRNA로 형질주입했다. 48시간 후 세포를 처리하지 않은 채로, 세럼 절식한 채로, 또는 세럼 및 아미노산(a.a.) 절식한 채로 4시간 동안 두고나서, 수집하고 핵 격리(nuclear isolation) 및 플래그 면역블로팅을 실시했다. 전체 용해물을 ERK 항체로 조사했다(probe). 모든 에러바는 표준 편차를 나타낸다.  $P$ 값(\*) = <0.05.

### 도 4. 오토파지의 TFEB-매개 유도의 인 비보 분석.

(A) 영양분이 공급된(fed), 16시간 절식시킨, 및 24시간 절식시킨 쥐(mice)의 GFP-양성 세포의 면역형광 분석 결과이다. 세포의 정량화를 그래프에 나타내었다. (B) 영양소가 공급된 동물과 금식시킨 동물로부터 얻은 간 샘플에서 TFEB 표적 유전자 발현의 qPCR 분석 결과이다(n=3: 에러바는 표준 편차를 나타낸다.  $p$ 값(\*) <0.05). Gapdh와 Hprt를 참조 유전자로서 사용했다. (C, D) AAV2/9Tcfef-HA를 주사하고 희생시키기에 앞서 16시간 금식시킨 두 달 된 야생형 쥐에서 TFEB 준세포 국소화 분석 결과이다. (C) HA-면역형광 분석 결과이다. 그래프는 핵 HA 신호의 정량화를 보여준다. 100개의 형질도입된 세포를 각각의 간에 대해 세었다. n = 3 쥐/그룹. \* = <0.001. (D) 핵 분별화(nuclear fractionation)가 된 간 세포에서 HA, 튜블린 및 H3의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 전체 간 용해물을 영양소가 공급된 동물과 금식시킨 동물 사이의 비교할만한 트랜스유전자 발현을 입증하기 위해 HA 항체로 조사했다. (E) AAV2/9Tcfef-HA 주입된 쥐로부터 얻은 간 추출물의 LC3, 액틴, p-ERK1/2 및 ERK1/2 웨스턴 블롯 분석 결과이다. (F) AAV-Tcfef-HA나 식염수(대조군)를 주사하고 희생에 앞서 자유식(ad libitum)으로 공급하거나 또는 24시간 동안 금식시킨 두 달 된 GFP-LC3 트랜스제닉 쥐로부터 얻은 저온보존된 간 조각에 염색한 GFP와 DAPI의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. GFP-양성 세포의 정량화를 그래프에 나타내었다. (G) 조건부 Tcfef-3xFLAG 트랜스제닉 쥐(Tcfef-3xflag;AlbCRE)로부터 분리된 간 샘플에서 오토파지 및 리소좀 TFEB-표적 유전자 발현의 qPCR 분석 결과로, 트랜스유전자 발현은 간-특이적 CRE 재조합효소(즉, 알부민-CRE)에 의해 추진된다. (H) Alb-CRE, Tcfef-3xFlag 및 Tcfef-3xFlag;Alb-CRE 쥐로부터 얻은 간 단백질 추출물의 LC3와 액틴의 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

### 도 5. TFEB 일시적 과발현은 오토파지를 유도한다.

(A) HeLa 세포를 일시적으로 플래그된 TFEB 단백질에 대해 엔코딩하는 플라스미드로 형질주입하였다. 48시간 후

에 형질주입된 세포를 수집하고, 용해시키고, 10mg 단백질 샘플을 LC3, 플래그 액틴 면역반응성에 대해 분석했다. 실험을 3회 실시했으며 밴드 강도는 이미지 j 소프트웨어 분석을 사용하여 정량화했다(에러바는 표준 편차를 나타낸다.  $p$ 값 (\*) < 0.05). (B) COS-7 세포를 일시적으로 빈 벡터 또는 TFEB-3xFlag 벡터로 형질주입했다. 24시간 후에 세포를 4시간 동안 리소좀 저해제(웍스타틴/E64, 10 $\mu$ g/ml, SIGMA)로 처리했다. 세포 용해물 10 $\mu$ g를 LC3 및 액틴 면역블로팅 처리를 했다.

**도 6. MEFs를 과발현하는 TcFEB에서 오토파지의 유도.**

(A,B) TcFEB를 발현하는 렌티바이러스 및 대조군 세포로 주사한 MEFs의 전자 마이크로그래프이다. (A) 오토파고솜(AV)과 오토리소솜(AL)을 포함하는 오토파지 조직을 TcFEB 발현시에 관찰했다. (B) 초기 오토파고솜의 형성이다. 전자-고밀도 사이토플라즘 관련 물질을 둘러싸는 격리막(화살표)이다. (C) 오토파지 조직(AV와 AL) 수의 정량화이고, (D) 초기 오토파고솜이다. 최소한 그룹당 30개 세포를 분석했다. 에러바는 SEM;  $P$ 값(\*) < 0.05; (\*\*\*) < 0.0001을 나타낸다.

**도 7. TFEB가 오토파고솜 형성을 촉진한다.**

(A) 대조군 및 안정한 TFEB-과발현 세포를 바필로마이신(baf; 12시간 400nM)으로 처리하고 수거하고 LCII3, 플래그 및 액틴 면역블로팅 처리를 했다. (B) 대조군 및 TFEB-과발현 세포를 처리하지 않거나 또는 10 $\mu$ g/ml 리소솜 저해제 웍스타틴/E64로 4시간 동안 처리하여 둔 후, 용해시키고 LC3, 플래그 및 액틴 면역블로팅 처리를 했다. 실험을 3회 실시했으며 밴드 강도를 이미지 J 소프트웨어 분석을 사용하여 정량화하였다(에러 바는 표준 편차를 나타낸다.  $P$ 값(\*) < 0.05).

**도 8. TFEB가 오토파지 단백질분해(proteolysis)를 증가시킨다.**

정상 또는 절식 조건에서 TFEB-과발현, TFEB-고갈(depleted) 및 대조군 세포에서의 장수 단백질 분해율이다. 3-메틸 아데닌(3MA)을 표시된 곳에 첨가했다(에러 바는 표준 편차를 나타낸다.  $p$ 값(\*) < 0.05).

**도 9. 오토파지 유전자의 서브셋의 프로모터 영역에서 TFEB 추정 바인딩 요소의 분포.**

숫자는 전사 개시 사이트(TSS)로부터 바인딩 요소(binding element)의 거리를 나타낸다.

**도 10. 절식은 TFEB 활성을 향상시킨다.**

TFEB 바인딩 사이트의 4개의 탠덤(tandem) 카피를 수행하는 구조체를 이용하는 루시페라아제 리포트 분석이다. 정상과 TFEB-과발현 HeLa 세포 둘 다에 TFEB 바인딩 사이트를 가지는 인공적인 프로모터로 형질주입했다. 나타내어진 양 세포 타입은 절식 조건에서 배양했을 때 전사활성화 잠재력이 증가되었다.(에러 바는 표준 편차를 나타낸다.  $p$ (\*) < 0.05).

**도 11. 절식은 MAPK를 통해서 TFEB 핵 전좌를 유도한다.**

(A) 절식이 세포질 TFEB 이동성 변화(mobility shift)와 핵 전좌를 유도한다. 정상 배지; 절식 배지(4h); 세포를 절식 배지(4h)에서 배양한 후 수거에 앞서 정상 배지로 1시간 보충한 절식+정상 배지이다. 세포질 및 핵 부분을 플래그 면역블로팅 처리를 했다. (B) 도 2G에서 제시된 바와 같이 처리된 HeLa 세포에서 면역형광법에 의해 TFEB 세포 국소화의 분석 결과이다. 그래프는 TFEB 핵 국소화를 나타내는 세포의 퍼센트를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.  $P$ 값(\*) < 0.05.

**도 12. TFEB 핵 전좌는 S142 인산화에 의존한다.**

(A) TFEB-3xFlag, S142A-3xFlag, S332-3xFlag 또는 S423-3xFlag 단백질을 발현하는 HeLa 세포를 핵 단백질 격리 처리했다. (B) TFEB-3xFlag, S142A-3xFlag 및 S142D-3xFlag 단백질을 발현하는 HeLa 세포를 정상 및 절식 조건에서 핵 단백질 격리 처리했다. (C) 정상 배지 S142A가 WT TFEB에 비해 더 낮은 MW 밴드로 이동하는 것을, 이 변화가 절식 조건에서 더 이상 뚜렷하지 않은 동안에, 보여주는 TFEB-3xFlag 및 TFEB-S142A-3xFlag를 발현하는 HeLa 세포로부터 분리된 세포질 단백질의 플래그 면역블로팅 결과이다. (D) TFEB-S142D의 감소된 변화를 보여주는, TFEB-3xFlag, S142A-3xFlag 및 S142D-3xFlag를 발현하는 절식시킨 HeLa 세포로부터 분리된 세포질 단백질의 플래그 면역블로팅 결과이다.

**도 13. S142A TFEB 돌연변이가 향상된 활성을 보여준다.**

안정하게 GFP-LC3를 과발현하는 HeLa 세포에 동일한 양의 빈, TFEB-3xFlag 또는 S142A-TFEB-3xFlag 플라스미드로 형질주입하고 오토파고솜의 수를 정량화했다. 최소한 열 개 필드(4-10개 세포를 포함)를 각 지점에 대해 분

석했다. 실험을 3회 실시했다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.  $p$ 값(\*) <0.05.

**도 14. TFEB 파라로그(paralogues), MITF 및 관련있는 TFEB-연관 패밀리 멤버를 가진 TFEB-인간 S142 인산화 사이트의 다중서열정렬(multiple sequence alignment).**

TFEB\_인간 호모로그를 ExPASy 프로테오믹스 서버에서 UniProtKB 데이터베이스에 대해 BLAST(2.2.17) 서치로 확인하였다. 출원인들은 "추정되는(putative)", "특징이 없는(uncharacterized)" 및 "cDNA" 키워드를 가진 검색건을 제거하고 유전자 이름이 없이 히트했다(hit). 다음으로, 출원인들은 클러스탈W(ClustalW)(1.82)로 남아있는 호모로그를 정렬했다. 다중서열정렬을 씨뷰(Seaview)에 의해 생성시켰다. 도면은 TFEB, MITF, TCFEB, TFE3 및 TCFE3 패밀리로부터 나온 다른 단백질로 정렬된 TFEB\_HUMAN 서열의 단지 20개의 아미노산-긴 절편을 보여준다. "sp"는 스위스프로트(SwissProt) 엔트리를 나타내고, "tr"은 트렘블(Tremble) 엔트리를 의미한다. P19484는 UniProrKB 어세션 코드이다. TFEB\_HUMAN은 각각 유전자 이름과 종명을 나타낸다.

**도 15. 인 비보에서 TcFEB 과발현을 위한 전략.**

(A) 항-HA 항체로 면역염색된 저온보존된 간 조각의 대표적 이미지이다(바이러스성 형질도입 효능을 입증하기 위함). (B) Tcfef-HA 주사된 쥐와 대조 쥐로부터 추출된 간 단백질을 HA와 액틴 항체로 면역블롯했다. (C) TcFEB 조건부 과발현에 대해 트랜스제닉 마우스 라인의 발생을 나타낸 것이다. CRE 재조합 효소 전후의 트랜스젠(transgene) 벡터 지도를 맨 위에 도시했다. 한배 새끼(littermates)의 대표적인 유전자형을 왼쪽에 나타내고, 마우스 n4에서 상응하는 간-특이적 TFEB 과발현을 오른쪽에 나타냈다.

**도 16. TFEB 과발현은 MEFs, NSCs, HeLa 및 COS-7 세포의 배양 배지에서 리소솜 효소의 방출을 증가시킨다.**

리소솜 효소 산 포스파타아제, 베타-갈락토시다아제, 및 베타-헥소사미니다아제의 활성을 배양 배지와 빈 벡터 또는 TFEB-발현 벡터로 형질주입한 세포에서 결정했다. MLIV (S7), MPSIIIA (S7), 및 MSD의 마우스 모델로부터 온 HeLa, Cos7 세포 및 마우스 배아 섬유아세포(fibroblasts)를 폴리펙트 트랜스펙션 시약(PolyFect Transfection Reagent)(퀴아젠)(Qiagen) 또는 리포펙타민 2000 시약(lipofectamine 2000 Reagent)(인비트로젠)(Invitrogen)을 이용하여 형질주입했다. TFEB-3xFLAG HeLa 안정한 세포선(CF7)을 미리 설명했다(2). 도면은 전체 활성에 대해 방출된 효소 활성의 퍼센트를 보여준다.

**도 17. TFEB가 리소솜 엑소시토시스(exocytosis)에서 양성 조절(positive control)을 한다(exert).**

MPSIIIA MEF 세포를 10% PBS와 페니실린/스트렙토마이신(표준 배양 배지)으로 보충한 DMEM에서 유지시켰다. 서브-컨플루언트(sub-confluent) 세포에 리포펙타민TM(LipofectamineTM) 2000(인비트로젠)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라서 형질주입했다. MPS-IIIA MEFs에 태그된 설파아미다아제(SGSH3XFlag)를 인코딩하는 플라스미드와 빈 플라스미드나 또는 TFEB를 인코딩하는 플라스미드로 상호 형질주입했다. 형질주입 하루 후에 배지를 0.5% FBS DMEM으로 교체했다. 형질주입 이틀 후에 조정 배지 및 펠렛을 설파아미다아제 활성 측정과 계산된 배지에서 방출된 효소 퍼센트를 위해 수집했다.

**도 18. 리소솜 스트레스가 TFEB 핵 전좌를 유도한다.**

클로로퀸(CQ) 또는 살리실리할라마이드 A(Sa1A)로 처리된 TFEB-3xFlag를 발현하는 HeLa 세포로부터 추출되고, 핵/세포질 분별화되고, TFEB를 검출하기 위해 FLAG에 대해 항체로 블롯된 단백질의 면역블로팅이다. 히스톤 3(H3)과 튜블린을 각각 핵과 세포질 마커로서 사용했다. 블롯은 3회 실험을 대표한다.

**도 19. mTOR1이 TFEB를 조절한다.**

(A) 리소솜 스트레스가 mTOR 시그널링을 저해한다. 표시되는 바와 같이, 밤새 처리된 HeLa 세포로부터 분리된 단백질 추출물의 면역블로팅이다. 멤브레인을 ERK 및 mTORC1 활성을 측정하기 위해 p-T202/Y204-ERK1/2, ERK1/2, p-T389-S6K, 및 S6K에 대해 항체로 조사했다(probe). (B) 토린 1이 TFEB 탈인산화 및 핵 전좌를 유도한다. 무아미노산 배지에서 배양된 TFEB-3xFlag HeLa 세포로부터 분리하고 이어서 최소한 3시간 동안 표시된 대로 활성화시킨 세포질 및 핵 부분의 FLAG 면역블로팅. 수집한 준세포 분별화를 H3와 튜블린 항체로 입증했다. (C, D) TFEB 핵 전좌시 ERK 및 mTOR 저해제의 효과 및 용량-반응 곡선이다. TFEB-GFP HeLa 세포를 384-웰 플레이트에 씨드하고(seed), 12시간 동안 배양하고, ERK 저해제 U0126 또는 mTOR 저해제 라파마이신, 토린 1 및 토린 2를 2.54nM 내지 50 μM 내에서 10개의 다른 농도로 처리했다. 각각의 화합물 중 하나를 함유하는 RPMI 배지에서 37°C, 3시간 후에, 세포를 세정하고, 고정하고, DAPI로 염색하고 공초점 자동화된 현미경 관찰(오페라 하이 컨텐트 시스템, 페르킨 엘머(Opera high content system, Perkin Elmer))를 이용하여 촬영하였다. (C) 각 화합물에 대한 테스트 농도의 대표 이미지를 나타낸 것이다. 스케일바는 30 μm를 나타낸다. (D) 그래프는 각 화

합물의 10개의 다른 농도에서 핵 전좌의 퍼센트(농도의 대수(log)로서)를 보여준다. 각 화합물에 대한 EC50을 프리즘 소프트웨어(상세 내용은 "재료 및 방법"란 참조)를 사용하여 계산했다. (E) 아미노산이 TFEB 분자량 변화(shift)를 유도한다. TFEB-3XFLAG나 영양소를 절식시키고 아미노산(a.a.)으로 50분 동안 활성화시킨 빈 벡터로 형질주입된 HEK-293T 세포로부터 분리한 단백질 추출물의 면역블로팅이다. 사용된 항체는 p-T389-S6K, S6K 및 FLAG였다. (F) Rag 녹다운이 TFEB 핵 전좌를 유도한다. Flag-3x TFEB를 안정하게 발현하는 HeLa 세포에 루시페라아제(대조군) 또는 RagC 및 RagD mRNAs를 타겟팅하는 쇼트헤어핀(Short hairpin)(Sh-) RNA를 인코딩하는 렌티바이러스를 주사했다. 모두에서, 주사 96시간 후, 세포를 그대로 두거나(N=표준 배지(normal media)), 절식시키거나(S=절식시킨 배지(starved media)) 또는 토린 1(T=토린 1(Torin 1))로 4시간 동안 처리하고, 그리고 나서 핵/세포질 분별화 처리를 했다. TFEB 국소화를 FLAG 항체로 검출하고, 튜블린 및 H3를 각각 세포질 및 핵 부분에 대한 대조군으로 사용했다; S6K 인산화의 레벨을 RagC 및 RagD 녹다운 효능을 테스트하기 위해 사용했다. (G) mTORC2는 TFEB 인산화에 영향을 주지 않는다. Sin1-/- 또는 대조 배아(E14.5)로부터 분리된 마우스 배아 섬유아세포(MEFs)에 TFEB-3xFLAG를 인코딩하는 레트로바이러스를 주사했다; 주사 48시간 후, 세포를 토린 1(T)로 4시간 동안 처리하고, 표시된 곳에서, 핵/세포질 분별화 처리를 하고 FLAG, 튜블린 및 H3에 대해 면역블로팅했다.

**도 20. mTORC1이 세린 142(S142)에서 TFEB를 인산화한다.**

(A) 토린 1이 S142 탈인산화를 유도한다. HeLa 세포를 표시된 대로 처리하고, 전체 및 핵 추출물을 TFEB p-S142 포스포-항체 및 항-FLAG 항체로 조사했다. (B) 척추동물 중 예측된 mTORC1 인산화 사이트 및 그들이 보존이 된 TFEB 단백질 조직의 도식적인 표현이다. 넘버링은 인간 아이소폼 1에 따른 것이다. (C) 인산화 사이트의 서열 보존 스코어 및 mTOR 교감 모티프(mTOR consensus motif)와 TFEB의 인산화 사이트 주위 서열 사이의 정량적 합의(quantitative agreement). (D) S142와 S211이 TFEB 국소화를 조절한다. TFEB-3xFlag의 세린-투-알라닌(serine-to-alanine) 변형된 버전을 발현하는 HeLa 세포에서 세린-TFEB 준세포 국소화의 플래그(Flag) 면역염색이다. 핵을 DAPI로 염색했다. 값은 최소한 50개의 형질주입된 세포를 함유하는 다섯 개 필드의 평균이다. 스튜던트 t-테스트(언페어드) \*\*\*P<0.001. 스케일바는 30µm를 나타낸다.

**도 21. 리소좀이 TFEB에 의해 유전자 발현을 조절한다.**

(A) 클로로퀸(Chloroquine) 처리는 일차 간세포에서 mTORC1 활성을 저해한다. 2달 된 Tcfeflox/flox(대조군)과 Tcfeflox/flox;Alb-Cre(Tcfef-/-) 쥐로부터 분리된 일차 간세포를 그대로 또는 밤새 토린 1, U0126 또는 클로로퀸으로 처리했다. 이어서, 세포를 용해시키고 단백질 추출물을 표시된 항체로 면역블로팅했다. (B, C) TFEB는 클로로퀸과 토린 1에 대해 전사 반응을 조정한다(mediate). 대조군(flox/flox)과 Tcfef-/- (flox/flox;alb-Cre) 쥐로부터 얻은 일차 간세포에서 TFEB 표적 유전자의 정량적 PCR(qPCR)이다. 세포를 클로로퀸(왼쪽)과 토린 1(오른쪽)로 처리했다. 발현 수준을 처리된 샘플 대 상응하는 처리되지 않은 샘플의 증가된 발현 %로 나타내었다. 값은 세 개의 독립된 간세포 제제(세 마리 쥐/제노타입)의 평균±표준편차(s.d.)를 나타낸다. 스튜던트 t-테스트(양방 검증(two tailed)) \* P-값≤0.05.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0035]

**재료 및 방법**

[0036]

**세포 배양, 배지, 약물 및 세포 처리**

[0037]

HeLa, COS 및 HEK-293T 세포를 ATCC로부터 구입하였다. 세포를 다음 배지에서 배양했다: (표준) 10% FBS로 고글루코오스 보충된 DMEM; (절식) 10mM HEPES로 보충된 Ca 및 Mg를 가진 HBSS 배지; (세럼) 20% FBS로 보충된 EBSS; (아미노산 배지) 무글루코오스 및 무세럼 DMEM; 약물 처리: 라파마이신(2.5mg/ml, 시그마(SIGMA)) 2-4시간 기타 지시된 대로; 바필로마이신(400nM, 시그마) 2-4시간; 인슐린(100ng/ml 시그마) 2시간 동안; EGF, FGF(BD 바이오사이언스); LIF(100ng/ml; ESGRO, 밀리포어) 2시간; PMA(1µg/ml) 2시간. U0126(MEKi)을 25mM(셀 시그널링)로 사용했으며, API2(AKT 저해제)를 1mM로 사용했다. 리소좀 저해제는 펩스타틴과 E64(10mg/ml 4h 시그마)를 사용했다. 하기하는 약물을 도 18-21의 실험에서 사용했다. 시그마의 라파마이신(2.5µM, 기타 지시된 대로); 토크리스(TOCRIS)의 토린 1(250nM, 기타 지시된 대로); 셀 시그널링 기술(Cell Signaling technology)의 U0126(50µM); 시그마의 클로로퀸(100µM); 살리실리할라미드 A(Salicylhalalamide A)(2µM)는 제프 드 브라밴더(Jeff De Brabander)(UT Southwestern)로부터 기증받은 것이었다.

[0038]

일차 간세포를 하기와 같이 생성시켰다: 2달 된 쥐를 애버틴(240mg/kg)으로 깊게 마취시키고 10mM HEPES 및 0.5mM EGTA로 보충된 HBSS(시그마 H6648) 25ml로 일차 관류시키고, 후에 100U/ml 콜라게나아제(와코(Wako)) 및

0.05mg/ml 트립신 저해제(시그마)를 함유하는 유사 용액으로 관류시켰다. 간을 페트리 접시에서 분리하고, 세포 펠렛을 HBSS에서 세정하고 35mm 접시당  $5 \times 10^5$  세포의 밀도로 두고 10% FBS, 2mM 글루타민, 0.1mM 인슐린, 0.1mM 텍사메타손 및 페니실린/스트렙토마이신(pen/strep)으로 보충된 윌리엄스 배지 E에서 배양했다. 다음 날, 세포를 텍스트에서 기재한 대로 처리했다. Sin1<sup>-/-</sup> 및 대조 MEFs를 앞서 기재한 대로(46) 생성시키고 10% FBS, 글루타민 및 페니실린/스트렙토마이신(pen/strep)으로 보충된 DMEM에서 유지시켰다.

[0039] **Tcfef<sup>flox</sup> 마우스 라인의 생성**

[0040] 출원인들은 공개적으로 사용할 수 있는 배아 줄기(ES) 세포 클론(<http://www.eucomm.org/>)을 사용했으며, 클론에서 Tcfef는 엑손 4 및 5에서 호모로거스 재조합에 의해 표적화되었다. 재조합 ES 세포 클론을 섬유아세포 내로 주사하고, 조작된 대립 형질(allele)을 수반하는 마우스 라인을 생성시키기 위하여 사용했다. 간-특이적 KO를 잭슨 실험실(Jackson laboratory)로부터 얻은 알부민 프로모터(ALB-CRE) 하에서 CRE를 발현하는 트랜스제닉 라인과 Flox/Flox 쥐를 교차하여 생성시켰다. 쥐가 수반되는 모든 절차는 인스티튜셔널 애니멀 케어(순 Institutional Animal Care) 및 유스 커미티 오브 베이러 칼리지 오브 메디슨(Use Committee of the Baylor College of Medicine)에 의해 승인되었다.

[0041] **형질주입, 플라스미드 및 siRNA**

[0042] 플라스미드와 siRNA 둘 다에 리버스 트랜스펙션 프로토콜(reverse transfection protocols)을 이용하는 리포펙타민 LTX(인비트로젠)로 형질주입했다. siRNA-형질주입된 세포를 48시간 후 또는 72시간 후에 수집했다. siRNA TFEB를 50nM(다르마콘(Dharmacon))에서 사용하고, siRNA ERK1/2를 100nM에서 사용했다(셀 시그널링).

[0043] 세포에 제조자로부터의 프로토콜에 따라서 리포펙타민 2000 또는 LTX(인비트로젠)를 이용하여 일시적으로 DNA 플라스미드 pRK5-mycPAT1, pCEP4-TFEB-his, pC1G2-TFEB, 및 p3 x FLAG-CMVTfEB로 형질주입했다. 서열화에 의해 맞는 변이 기법(correct mutagenesis)을 입증하는 제조자 지시(스트라타젠)에 따라서 위치-지정 변이 기법(Site-direct mutagenesis)을 수행했다.

[0044] **웨스턴 블로팅**

[0045] 세포 또는 조직을 프로테아제(로슈(ROCHE)) 및 포스파타아제(시그마)로 보충된 RIPA 버퍼에서 가용화시켰다. 10 내지 30 마이크로그램을 4-12% 비스-트리스 겔(Bis-Tris gel)(NUPAGE, 인비트로젠) 상에 로드하고, PVDF 멤브레인으로 전달하고 ECL법(피어스(Pierce))을 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 다음 항체를 사용했다: LC3(노버스 바이올로지컬(Novus Biological)), FLAG, b-ACTIN, TUBULIN(시그마), HA(코반스(Covance)), H3, ERK1/2, p-ERK1/2, p-AKT, p-70S6K(셀 시그널링(Cell Signaling)), ERK2(산타 크루즈(Santa Cruz)). 단백질 레벨을 이미지 J 소프트웨어 분석을 사용하여 정량화하였다.

[0046] **핵/세포질 분별화**

[0047] 세포를 6 웰 접시에 50% 컨플루언스(confluence)로 씨드하고 밤새 세럼 절식시켰다(ON). 표준 배지를 DMSO 또는 키나아제 저해제 존재하에 다음날 첨가했다. 준세포 분별화를 앞서 언급한 대로 수행했다. 간략하게, 세포를 0.5 트리톤 X-100 용해 버퍼(50mM Tris-HCL, 0.5% 트리톤, 137.5mM NaCl, 10% 글리세롤), 신선한 프로테아제 및 포스파타아제 저해제로 보충된 5mM EDTA에서 용해시켰다. 핵 펠렛을 2회 세정하고 0.5 트리톤 X-100 버퍼 0.5% SDS에서 용해시키고 초음파 처리하는 동안 상등액은 세포질 부분을 나타낸다.

[0048] **장수 단백질의 분해(degradation)**

[0049] 단명 단백질을 분해하기 위해 서브-컨플루언트 세포를 L-U<sup>14</sup>C-세린으로 20시간 동안 배양하고 1시간 동안 차가운 배지로 추적했다. 이어서 세포를 표준 배지 또는 절식 배지로(결론적으로 3-MA 존재하에) 4시간 동안 배양했다. 장수 단백질의 분해 비율을 산-침전가능한 세포 펠렛에서 불가용성인 방사능에 대해 배지에서 가용성인 방사능

비로부터 계산했다.

[0050] RNA 추출, 역전사, ChIP 및 정량적 PCR

[0051] 전체 RNA를 TRIzol(인비트로젠)을 사용하는 조직 또는 RNAasy 컬럼(퀴아젠(Qiagen))을 사용하는 세포로부터 추출했다. 역전사를 TaqMan 역전사 시약(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems))을 사용하여 수행하였다. 리소좀 및 오토파지 유전자 특이적 프라이머가 미리 언급되었다<sup>2</sup>. 오토파지 유전자 프라이머와 마우스 프라이머를 SA바이오사이언스(SABiosciences)로부터 구입하였다. 폴드 체인지 계산(fold change calculations)을 DDC<sub>i</sub>법을 사용하는 SA바이오사이언스의 온라인 데이터 분석 웹사이트 (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>)를 이용하여 계산하였다. 간략하게, 가장 안정한 하우스키핑 유전자(GAPDH, ACTB, B2M, RPL13A, HPRT and Cyclophilin)의 평균을, DDC<sub>i</sub> 값을 계산하기 위해, "표준화(normalizer)" 유전자로서 사용하였다. 다음으로, DDC<sub>i</sub> 값을 "대조"군과 "실험"군 사이에서 계산하였다. 마지막으로, 폴드 체인지를  $2^{(-DDC_i)}$ 를 사용하여 계산하였다. 생물학적 자기 복제가 폴드 체인지 값을 계산하도록 나누어졌다. 언페어드 T-테스트를 통계적 유의성을 계산하기 위해 사용하였다. 그래프에서 별표는 P-값이 <0.05인 것을 나타낸다.

[0052] 단백질 키나아제 예측

[0053] 출원인들은 CrPhos0.8, GPS-2.1, 포스포모티프파인더(PhosphoMotifFinder), 네트워크(Networkin) 및 디폴트 파라미터를 사용하는 포시다(PHOSIDA)(15-19)를 포함하는 다섯 가지 방법을 사용했다. 또한 출원인들은 CrPhos0.8 및 GPS-2.1 예측을 그들의 신뢰 점수(confidence score)에 따라서 여과했다. 전자를 위해, 30% 이하의 위양성율(FPR)을 가지는 예측을 고려했다. 후자를 위해, 출원인들은 5 이상의 점수를 가지는 예측을 고려했다. GPS-2.1 스코어를 실제 스코어와 역치 값 사이의 차이로서 계산하였다. 출원인들은 다른 세 개의 방법으로 모든 예측을 취했다. 네트워크의 경우에, 출원인들은 네트워크와 네트워크 2 둘 다로부터의 예측을 결합했다. 각 방법은 다른 키나아제 분류에서 S142 사이트에 의해 연관되는 키나아제를 언급하며, 간단하게 4개의 계층별 레벨을 수반한다: 키나아제 그룹, 키나아제 패밀리, 키나아제 서브패밀리 및 키나아제 자체. 각 계층별 레벨에서 일반적인 합의를 얻기 위해서, 만약 예측이 이미 다른 방식으로 분류화되어 있지 않은 경우, 출원인들은 이들 4 개의 계층별 레벨에서 각각의 예측을 분류화했다. 척추동물 클레이드 및 인간 종하에서 <http://kinase.org/kinbase> 데이터베이스에서 빠트린 분류에 대해 조사했다. 각 분류에서 합의는 각 분류에서 다수결(majority vote)에 따라서 정하였다.

[0054] 인 비트로 키나아제 분석

[0055] TFEB-S-142: Seq Id No. 2의 aa. o 117-166:

[0056] PPPAASPGVRAGHVLSSAGNSAPNAPMAMHLHIGSNPERELDDVIDNIMR 및 TFEB-A-142: Seq Id No. 2의 aa. of 117-166가 Ser 142 위치에서 Ala(bold)로 치환된 것에 상응하는 Seq Id No. 4:

[0057] PPPAASPGVRAGHVLSSAGNSAPNAPMAMHLHIGSNPERELDDVIDNIMR를 제네스크립트사(GENESCRIPT corp)에 따라 합성하였다. 테스트 펩타이드 TFEB-A-142 및 TFEB-S-142를 50mM HEPES pH7에서 1mM으로 만들었다. 용해는 아무 문제가 없는 것으로 나타났다. 밀리포어 표준 방사성 동위원소 분석을 이용하여, 키나아제 분석을 실온에서 40분 동안 200 μM ATP 및 100 μM의 각 펩타이드에서 실시했다. 모든 단백질 키나아제를 그들의 표준 키나아제프로파일러<sub>TM</sub>(KinaseProfiler<sub>TM</sub>) 분석 농도에서 사용했다. 배양 후, 모든 분석을 산을 첨가하여 중지시키고 생성물을 분리하기 위해 얼리쿼트(aliquot)를 P30 및 필터매트 A 상에 점적(spot)했다. 모든 테스트를 3회 실시했으며, 각각의 단백질 키나아제에 대한 보통의 기질이 대조군으로 포함되었다.

[0058] 인 비보 유전자 전달(delivery)

[0059] 쥐를 베일러 칼리지 오브 메디슨(Baylor College of Medicine)(휴스턴, TX, USA)의 트랜스제닉 마우스 기관에

서 보관하였다. GFP-LC3 트랜스제닉 쥐를 N. Mizushima로부터 기증받았다. 달리 지정하지 않을 경우, C57B6 암컷 쥐(4주령)를 사용했다. AAV 벡터를 TIGEM AAV 벡터 코어 기관(TIGEM AAV Vector Core Facility)에서 생산하였다. 간략하게, 서열을 코딩하는 마우스 TFEB(TcFEB)를 GFP 서열을 대체하여 pAAV2.1-CMV-GFP 플라스미드 내로 클론하고 HA 태그와 프레임 내에서 융합했다. 그런 후 얻어진 pAAV2.1-CMV-TcFEB-HA를 3회 서브-퀸플루언트 293 세포에서 pAd-Helper 및 pack2/9 패키징 플라스미드와 함께 형질주입하였다. 제조한 AAV2/9 벡터를 CsCl로 두 차례 정제하였다. 게놈 카피(GC/mL)로 표현되는 벡터 역가를 TagMan(퍼킨-엘머, 라이프 앤 애널리티컬 사이언스, 윌스햄, MA)을 사용하는 PCR 정량화와 도트 블롯 분석 둘 다로 평가했다. 각각의 마우스를  $1.25 \times 10^{11}$  바이러스 입자로 레트로-오비탈 주사하고 3주 후에 희생시켰다. 절식시킨 쥐를 유전자 발현에 대해 분석할 때 16시간 동안 음식을 주지 않았으며 또는 GFP-LC3 도트 수에 대해 분석할 때 24시간 동안 음식을 주지 않았다.

[0060] **조직학 및 면역형광 검사**

[0061] 간 샘플을 수집하고 밤새 PBS중의 4% 파라포름알데히드에서 고정했다. PBS 중의 10% 및 30% 수크로오스에서 저온 보존 후, 견본을 OCT(사쿠라 파인테크, 토렌스, CA)에서 동결시키고 30 $\mu$ m 두께로 절개했다. 이미지를 악시오플랜2(Axioplan2)(차이스, 토르우드, NY(Zeiss, Thorwood, NY))에서 얻었다. 면역형광 검사를 위해, 조각을 2시간 동안 실온(RT), PBS+0.1% 트리톤 X-100 중의 2.5% BSA에서 블록했다. 블로킹 후에, 견본을 20시간 동안 일차 항체로 배양시키고, PBS+0.05% TX-100에서 3회(3X) 세정 후, 3시간 동안 알렉사플루오르 488 또는 알렉사플루오르 555(인비트로젠)로 퀴징게이트된 2차 항체로 배양시켰다. HA의 면역형광학적 분석을 위해, 아비딘-바이오틴 콤플렉스(ABC)법을 사용했다(백타스타인 엘리트 ABC 키트(Vectastain Elite ABC kit)). 항-GFP는 Abcam으로부터 얻었다;(희석 1:500).

[0062] **전자 현미경**

[0063] 대조군 및 TFEB-과발현 세포를 PBS로 세정하고, 0.2M 헤페스(Hepes) 버퍼(pH 7.4)에 용해된 1% 글루타르알데히드로 30분 동안 실온에서 고정했다. 그런 후 세포를 OsO<sub>4</sub>에서 2시간 동안 사후 고정했다. 에탄올의 등급화된 시리즈에서 탈수한 후에, 세포를 에폰(Epon) 812(플루카(Fluka))에 포함시키고(embed) 72시간 동안 60°C에서 중합했다. 얇은 절편(thin section)을 레이카 EM UC6로 자르고, 우라닐 아세테이트와 리드 시트레이트로 대조염색했다. EM 이미지를 울트라 뷰 CCD 디지털 카메라(Philips, Eindhoven, The Netherlands)를 장착한 필립스 테크나이-12 전자 현미경을 이용하여 얇은 절편으로부터 얻었다. 액포화의 정량화를 AnalySIS 소프트웨어(Soft Imaging Systems GmbH, Munster, Germany)를 사용하여 수행하였다. 정량화를 위한 세포의 선택은 입체적 분석을 위한 그들의 적합성에 근거하였다. 즉 그들의 중심 영역(골지(Golgi) 멤브레인의 존재하에 검출된)을 통해 박편화된 세포만을 분석하였다.

[0064] **동물 모델**

[0065] 쥐가 수반되는 모든 절차는 인스티튜셔널 애니멀 케어 및 유스 커미티 오브 베일러 칼리지 오브 메디슨으로부터 승인받았다. GFP-LC3 트랜스제닉 라인은 이미 설명했다. Tcfef의 조직 특이적 과발현이 다음과 같이 생성되었다: Tcfef-3xFlag cDNA를 CAGCAT 카셋[2 loxP 사이트 옆에 배치된 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT) cDNA에 이어지는 치킨 액틴 프로모터] 뒤에 삽입했다. 그리고 트랜스제닉 쥐(베일러 칼리지 오브 메디슨 트랜스제닉 코어)를 생성시키기 위해 사용했다. 그리고나서 쥐를 알부민-CRE(잭슨 라보라토리로 부터 얻음) 라인으로 크로스했다. 48 절식 프로토콜에 따라 쥐에게 22시간 동안 음식을 주지 않고, 이어서 2시간동안 음식을 주고 다시 24시간 동안 음식을 주지 않고 희생시켰다.

[0066] **효소 활성**

[0067] 리소좀 효소 산 포스파타아제, 베타-갈라토시다아제, 및 베타-헥소사미니다아제 활성을 적합한 형광측정 또는 색깔측정 기질을 이용하여 측정하였다. SGSH 활성을 Fraldi et al., Hum Mol Gen 2007 (33)에서 설명된 프로토콜을 따라서 측정하였다.

[0068] **면역블로팅 및 항체**

[0069] 마우스 항-TFEB 모노클로날 항체를 마이 바이오소스(My Biosource) 카탈로그 No.MBS120432로부터 구매하였다. 항-pS142 특이적 항체를 생성시키기 위해, 토끼를 KLH와 커플된 다음의 펩타이드: AGNSAPN{pSer}PMAMLHC로 면역력을 갖게 하였다. 4회째 면역접종 후에 토끼를 희생시키고 세럼을 수집하였다. 비-포스포특이적(non-phosphospecific) 항체를 비인산화된 항원을 함유하는 컬럼을 통해 순환에 의해 세럼으로부터 감소시켰다. 이어서 포스포특이적 항체를 인산화된 펩티드를 함유하는 컬럼을 이용하여 정제하였다.

[0070] 세포를 프로테아제 및 포스파타아제 저해제(시그마)를 함유하는 M-PER 버퍼(테르모(Thermo))로 용해시켰다; 핵/세포질 부분을 위에서 설명한 대로 분리했다. 단백질을 SDS-PAGE(인비트로젠; 감소된 NuPAGE 4-12% Bis-tris Gel, MES SDS 버퍼)에 의해 분리했다. 필요하다면, 겔을 20ml 임페리얼 프로테인 스테인(테르모 피셔(Thermo Fisher))을 이용하여 실온에서 1시간 동안 염색하고 물로 탈색했다. 면역블로팅 분석을 I-Blot(인비트로젠)을 사용하여 니트로셀룰로오스 멤브레인상으로 단백질을 전달(transfer)하여 수행하였다. 멤브레인을 5% 탈지 우유로 TBS-T 버퍼(0.05% 트윈-20 함유 TBS)에서 블록하고 일차 항체 항-FLAG 및 항-TUBULIN(시그마; 1:2000), 항-H3(셀 스크널링; 1:10000)으로 실온에서 2시간 동안 배양하는 한편, 하기 항체를 5% BSA에서 ON 배양했다: 항-TFEB (마이 바이오소스; 1:1000), 항-P TFEB (1:1000) ERK1/2, p-ERK1/2, p-P70S6K, P70S6K (셀 스크널링; 1:1000). 멤브레인을 TBS-T 버퍼로 세 번 세정하고 알칼리성의 포스파타아제-컨쥬게이트된 LgG(프로메가; 0.2 mg/ml)로 실온에서 1시간 동안 배양했다. 멤브레인을 TBS 버퍼로 3회 세정하고 발현된 단백질을 10ml 웨스턴 블루 스테빌라이즈드 서브스트레이트(Western Blue Stabilized Substrate)(프로메가(Promega))를 첨가하여 시각화하였다.

[0071] **고 함량 핵 전좌 분석**

[0072] TFEB-GFP 세포를 384-웰 플레이트에 씨드하고, 12시간 동안 배양하고, ERK 저해제 U0126(시그마-알드리히) 또는 mTOR 저해제 라파마이신(시그마-알드리히), 토린 1(바이오마린) 및 토린 2(바이오마린)의 열 개의 다른 농도(50000 nM, 16666,66 nM, 5555,55 nM, 1851,85 nM, 617,28 nM, 205,76 nM, 68,58 nM, 22,86 nM, 22,86 nM, 7,62 nM, 및 2,54 nM)로 처리했다. 3시간 후에 37°C RPMI 배지에서 세포를 세정하고, 고정하고, DAPI로 염색했다. 이미지 획득을 위해, 384-웰 플레이트의 각 웰당 열 개의 사진을 공초점 자동화된 현미경(오페라 하이 컨텐트 시스템, 퍼킨 엘머)을 이용하여 얻었다. 전용 스크립트를 다른 이미지상(아카펠라 소프트웨어, 퍼킨 엘머(Acapella software, Perkin Elmer))에서 TFEB 국소화 분석을 수행하기 위해 현상했다. 스크립트는 TFEB-GFP 형광의 세포질 강도의 평균값으로 나뉘는 핵 TFEB-GFP 형광의 평균 강도로부터 얻어지는 비의 값을 계산한다. 결과를 네가티브(RPMI 배지) 및 포지티브(HBSS 절식) 대조군 샘플을 이용하여 샘플 플레이트에서 정규화했다. 데이터는 프리즘 소프트웨어(Prism software)(그래프패드 소프트웨어(GraphPad software))를 사용하는 각각의 화합물의 다른 농도에서 핵 전좌의 퍼센트로 표현된다. 각각의 화합물에 대한 EC50은 비-선형 회귀 근접(non-linear regression fitting)을 사용하여 계산하였다.

[0073] **결과**

[0074] **TFEB는 오토파지를 유도한다.**

[0075] (마크로)오토파지는 리소솜에 대해 세포질 내(intracytoplasmic) 물질을 표적으로 하는 진화 보존 메카니즘으로, 따라서 영양소 절식 동안 에너지 공급을 제공하는 메카니즘이다(1, 3). 절식동안 오토파지 활성화는 mTOR에 의해 조절되고, mTOR의 활성화는 세포의 에너지 요구에 의존한다.

[0076] 오토파지는 오토파고솜과 리소솜 사이의 강한 파트너십의 결과(1)이기 때문에, 출원인들은 리소솜 바이오제네시스를 조절하는 전사 인자인 TFEB가 오토파지를 조절하는 지에 대해 테스트했다. TFEB가 리소솜 바이오제네시스와 기능 및 리소솜 엑소시토시스(도 16 및 17) 상에서 양성 조절(positive control)을 하기 때문에, TFEB 과발현은 리소솜에 의해 오토파고솜의 분해가 증가되기 때문에 오토파고솜의 수를 감소시킬 것이라는 것이 예상된다. 놀랍게도, 특이적으로 오토파고솜과 연결되는 LC3 마커를 이용하여 결정된 대로, HeLa 세포에서 안정한 TFEB 과발현이 상당히 오토파고솜의 수를 증가시켰다(4-7)(도 1a, b). 유사한 데이터가 HeLa 및 Cos 세포에서 TFEB의 일시적인 과발현에 의해 얻어졌다(도 5). 오토파고솜 수의 증가는 또한 TFEB를 과발현하는 렌티바이

러스로 감염된 쥐 배아 섬유아세포(MEFs)상에서 전자현미경으로 검출되었다(도 6). TFEB가 오토파고솜의 형성을 활성화하는 것을 나타내는(도 1a 및 7), 이 증가는 오토파고솜/LC3II 분해 바필로마이신 및 펩스타틴/E64(8)의 리소좀 저해제로 처리된 세포에서 계속되었다. 오토파지에서 TFEB 과발현의 포화 영향을 제시하고 TFEB가 절식-유도된 오토파지의 중요한 중재자일 수도 있다는 가능성을 제기하는, 영양소 절식은 TFEB-과발현 세포에서 오토파고솜의 수를 더 증가시키지 않았다(도 1).

[0077] 이들 발견과 일치하는, HeLa 세포에서 TFEB의 RNA 간섭(RNAi)은 바필로마이신이 존재하든 부재하든 간에 정상 및 절식 조건 둘 다에서 LC3II의 감소된 레벨을 가져왔다(도 1d-f). 특히, LC3II의 감소는 분석의 특이성을 증명하는 다른 RNAi 올리고에 의해 달성되는 TFEB 하향조절의 레벨과 상호관련되었다(도 1g). 기능 데이터의 이들 득과 실은 오토파고솜과 리소좀의 바이오제네시스가 TFEB에 의해 상호 조절된다는 것을 제시한다. 출원인들은 다음에, GFP 시그널(mRFP는 아니고)이 산성 구획 내부에서 퀀치(Quench)되기 때문에(9), 산성화된 오토리소좀(GFP-네거티브/mRFP-포지티브)으로부터 초기 오토파지 세포 기관(GFP-포지티브/m-RFP-포지티브)을 구별하는, LC3 단백질(9) 태그된 RFP-GFP 텐덤을 이용하는 리소좀에 대한 오토파고솜의 전달율을 측정하였다. TFEB가 오토파고솜-리소좀 융합을 촉진하는 것을 나타내고, 따라서 오토파지 작용의 플럭스를 향상시키는(도 1h), 오토파고솜의 수가 대조군 세포에 비해 TFEB 과발현하는 세포에서 더 높다는 것을 발견하였다. 오토파지 작용의 조절에서 TFEB 역할의 기능적 증거는 장수 단백질의 분해가 TFEB 과발현에 의해 향상되었고, 그리고 TFEB 녹다운에 의해 감소했다는 관찰에서 왔다. 이 향상은 오토파지 저해제 3-메틸 아데닌(3-MA)910에 의해 없어졌다(도 8).

[0078] TFEB가 오토파지 유전자의 발현을 조절하는 지를 테스트하기 위해, 출원인들은 오토파지 작용 경로의 몇 개 스텝에서 수반되는 것으로 보고된 51개 유전자 그룹의 mRNA 레벨(1, 12, 13)을 분석했다. TFEB 침묵 후에 그들이 하향조절되는 동안(도 2a 및 표 1, 2), TFEB를 과발현하는 세포에서 오토파지 유전자의 발현 레벨의 향상이 절식(EBSS 배지에서 4시간 동안 HeLa 세포) 동안 얻어진 것과 매우 유사하다는 것을 관찰했다(피어슨 상관분석:  $r$  값 = 0.42;  $p$  값 = 0.001). 그들 중에서 *UVRAG*, *WIPI1*, *MAPLC3B*, *SQSTM1*, *VPS11*, *VPS18* 및 *ATG9B*의 발현이 매우 상당히 TFEB 과발현에 의해 영향을 받았다(표 1, 2). 이들 유전자는 오토파지의 다른 단계에서 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 그들의 프로모터에서 그들이 최소한 하나의 CLEAR 사이트를 옮기는(2) 동안에, TFEB의 직접 표적이 되는 것으로 나타났다(도 9). 흥미롭게도, *VPS11*, *VPS18* 및 *UVRAG*는 리소좀에 오토파고솜 전달 역할을 하며(14), 이는 TFEB를 과발현하는 세포에서 리소좀-오토파고솜 융합이 상당히 향상하는 관찰 결과와 일치한다.

[0079] 이 데이터는 TFEB가 절식-유도된 오토파지의 전사 조절에서 수반된다는 것을 나타낸다. 이 결론은 강하게 다음 관찰에 의해 강화된다. 첫째, 루시페라아제 리포터 분석(2)은 절식이 표적 유전자 전사시 TFEB의 효과를 향상시켰다는 것을 보여준다(도 10). 둘째, TFEB 직접적 표적의 발현은 절식된 세포에서 상향조절되었으며 이 상향조절은 TFEB 침묵에 의해 저해되었다(도 2a, c).

[0080] **절식은 TFEB 핵 전좌 및 활성을 조절한다.**

[0081] TFEB의 절식-유도된 활성 메커니즘을 확인하기 위해, 출원인들은 절식시킨 세포에서 TFEB의 준세포 국소화 및 전사 후 변형(post-translational modifications)을 분석했다. 정상 조건에서 TFEB는 세포질(cytoplasm)에 위치한다(2). 영양소 절식(EBSS 배지)이 빠르게 TFEB 핵 전좌를 유도했으며(도 2d, e), 절식된 세포로부터 세포질 TFEB가 웨스턴 블롯 분석에 의해 드러난 바와 같이 정상적으로 영양공급된 세포의 분자량에 비해 더 낮은 분자량을 가지는 것으로 나타났다(도 11a). 이 분자량 변화(shift)는, 핵 TFEB의 감소에 수반되어, 빠르게 그러나 일시적으로 일어났으며 절식된 세포에 대해 표준 배지 재-첨가 후 1시간 내에 사라졌다. 세럼, 아미노산이나 성장 인자(즉, 인슐린 또는 EGF)로 EBSS 배지를 보충하여, 출원인들은 절식된 배지 단독과 비교할 때 TFEB 핵 전좌의 상당한 저해를 관찰하였다(도 2f). EBSS를 사이토킨(즉, INF 또는 LIF)으로 보충했을 때 TFEB의 활성이 영양소 및 성장인자에 민감한 시그널링 메커니즘에 의해 조절되는 과정임을 제시하는 효과는 거의 관찰되지 않았다(도 2f). 출원인들은 mTOR(라파마이신), PI3K-AKT(트리스리빈) 및 MEK(U0126) 키나아제를 저해하는 약물로 보충된 표준 배지로 절식시킨 세포를 자극했다. AKT 및 mTOR 저해는 효과가 없는 반면 MEKi-저해가 절식과 유사한 레벨에서 TFEB 핵 국소화를 야기하였다(도 2g 및 도 11b). 이 데이터는 TFEB 활성이, 절식-유도되는 자가포식의 조절에서 이 시그널링 경로의 예상되지 않은 역할을 드러내는, MAP 키나아제에 의해 조절되는 것을 제시한다. 더 나아가, TFEB-고갈 세포에서 caMEK 과발현이 TFEB 표적 유전자의 발현에서 효과가 없는(도 2h) 반면, HeLa 세포에서 구조적으로 활성인 MEK(caMEK)의 발현은 절식 동안 TFEB 표적 유전자 발현의 하향조절을 야기하였으며, 따라서 TFEB 녹다운 효과처럼 보였다(도 2h).

[0082] 세린 인산화가 TFEB 활성을 조절한다.

[0083] 더 자세히 MAPK 시그널링과 TFEB 사이의 관계를 분석하기 위해, 출원인들은 질량-분광분석을 실시하고, 영양소 풍부 배지에서 인산화되었으나 절식된 배지에서는 인산화되지 않은 최소한 세 개의 세린(즉, S142, S332 및 S402)을 확인하였다. 인산화를 없애기 위해 각각의 이들 세 개의 세린을 알라닌으로 변이시켰다. 돌연변이 TFEB 단백질은 개별적으로 HeLa 세포 내로 발현시키고 TFEB 핵 전좌를 분석하였다. TFEB(S142A) 돌연변이가 TFEB(WT), TFEB(S332A) 및 TFEB(S402A)에 비해 매우 증가된 핵 국소화를 나타내었다(도 3a 및 도 12a). 반대로 포스포-모방 돌연변이(TFEB S142D)는 영양소 절식시 핵 속으로 전좌될 수 없었다(도 12b). S142D 돌연변이가 WT TFEB에 비해 절식 동안 감소된 변화를 나타내는(도 12c, d) 반면, S142A TFEB 돌연변이는 절식된 배지에서는 아니지만 정상 배지에서는 더 낮은 분자량으로 이동하며, 이는 S142가 절식 배지에서는 아니지만 표준 배지에서는 인산화되는 것을 더 증명한다. TFEB(S142)의 발현은 TFEB(WT), TFEB(S332A) 및 TFEB(S402A)에 비해 TFEB 표적 유전자의 증가된 발현 레벨을 야기하였다(도 3b). 지속적으로, TFEB(S142)는, wt TFEB에 비해, 오토파고솜(도 3c 및 도 13), 리소솜(도 3d) 및 오토파고리소솜(도 3e)의 증가된 수에 의해 증명되는 바와 같이 오토파지/리소솜 시스템의 더 강한 유도를 일으켰다. 따라서 TFEB 핵 전좌 및 활성이 세린 142의 인산화에 의해 조절된다.

[0084] 세린 142의 인산화에 대해 신뢰할 만한 특이적 키나아제를 확인하기 위해, 출원인들은 생물 정보학 분석을 인산화 사이트를 실험적으로 입증하는 세트를 기반으로 구축된 컴퓨터 모델링에 기반하는 방법을 사용하여 분석하였다(15-19)(상세는 방법 참조). 앞의 결과와 일관되게, 세린-특이적 세포의 규제 키나아제(Extracellular Regulated Kinases)(ERKs)를 세린 142의 인산화를 위한 탐-랭킹 후보로서 확인했다(표 3). 흥미롭게도, 세린 142는 소안구 전사 인자(Microphthalmia Transcription Factor)(MITF)와 같은 HLH-류신 지퍼 유전자 패밀리의 다른 멤버 내에서 높게 보존되고 있으며, 여기서 ERK2(20)에 의해 인산화되는 것이 발견되었다. ERK2-매개된 TFEB 인산화의 또 다른 증거는 절식시킨 배지에서는 아니지만 표준 배지에서 ERK2-TFEB 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)으로부터(도 3f) 나왔다. 더 나아가, ERK1/2 단백질의 siRNA-중재된 녹다운은 영양소 절식과 유사한 범위까지 핵 전좌를 유도하였다(도 3h).

[0085] 오토파지의 TFEB-매개된 유도의 인 비보 분석

[0086] 출원인들은 GFP-LC3 트랜스제닉 쥐(11)에서 인 비보 리소솜/오토파지 작용 경로의 TFEB-매개된 대조군의 생리학적 관련성을 분석하였다. 영양소 고갈시 간에서 관찰되는 보고된 오토파지 반응에 기인하는 간에서의 연구에 초점을 두었다. 간에서, GFP-양성 세포의 수가 금식 24시간 후에 증가하기 시작하였으며 48시간에서 정점을 이루었으며(48시간 절식 프로토콜에 대해서 물질 및 방법 참조)(도 4a), 반면 오토파지 및 리소솜 TFEB 표적 유전자들 다의 전사 유도가 금식 16시간 후에 드러났다(도 4b). 따라서 전사 활성은 인 비보에서 오토파고솜 형성에 선행한다. 중요하게, 금식 16시간에 TFEB의 준세포 국소화가 완전하게 핵이었으며(도 4c, d), 배양된 세포에서 관찰된 것과 유사하게, 인 비보에서 절식은 TFEB 활성을 조절한다는 것을 나타내는 ERK 인산화의 레벨이 영양소 섭취 동물에 비해 감소했다(도 4e).

[0087] 출원인들은 바이러스- 및 트랜스젠-매개된 TFEB 과발현을 이용하여 TFEB가 인 비보에서 오토파지 작용을 유도하는 것이 충분한 지를 평가했다. GFP-LC3 트랜스제닉 쥐(11)에 HA 에피토프(AAV 2/9-*Tcfef*-HA)로 태그된 쥐(murine)의 *Tcfef*cDNA를 함유하는 아데노-연관된 바이러스성(VVA) 벡터로 시스템적으로 주사했다(도 15a, b). *Tcfef*-주사된 동물로부터 얻은 간 건본은 GFP 양성 세포 수에서 상당한 증가를 보여주었으며, 이 증가는 절식에 의해 더 향상되었다(도 4e, f). 게다가, 조건적 *Tcfef*-3xFLAG 트랜스제닉 쥐로부터 얻은 간 샘플에서 전이유전자 발현이 간-특이적 CRE 재조합효소(즉, 알부민-CRE)에 의해 추진되었고(도 15c), 대조군 리터메이트에 비해 리소솜 및 오토파지 유전자의 발현과 오토파고솜의 수에서 현저한 증가를 나타내었다(도 4g, h). 동시에, 이 테이터는 절식-유도된 오토파지의 전사 제어에서 TFEB의 중요한 역할을 제시한다.

[0088] TORC1이 TFEB 준세포 국소화를 조절한다.

[0089] TFEB 준세포 국소화를 TFEB-3x FLAG 플라스미드로 일시적으로 형질주입되고 리소솜 기능 저해제로 밤새 처리된 HeLa 및 HEK-293T 세포에서 분석했다. 이 처리에는 클로로퀸, 리소솜 pH 기울기의 저해제 및 v-ATPase(38)의 선택적 저해제인 살리실리할라마이드 A(Sa1A)의 사용이 포함되었다. 핵/세포질 분별화 후에 수행된 면역블로팅은

또한, 리소좀 스트레스가 외인성으로 발현된 TFEB의 핵 전좌를 유도하였으며 그리고 리소좀 스트레스가 TFEB 인산화 상태에 영향을 줄 수도 있다는 것을 제시하는, TFEB 핵 축적이 더 낮은 분자량으로의 TFEB-3xFLAG의 변화와 관련되었다는 것을 드러내었다(도 18).

[0090] mTORC1이 리소좀 막에 상주하고 그것의 활성이 영양소 및 리소좀 기능(39, 40) 둘 다에 의존한다는 관찰에 근거하여, 출원인들은 TFEB 핵 전좌에서 리소좀 스트레스의 효과가 mTORC1에 의해 조절될 수 있다는 것을 가정했다. 이 생각과 일치되게, 클로로퀸 또는 SalA가 mTORC1 기질로 알려진 p-P70S6K의 레벨로 측정되는 mTORC1 활성을 저해했다(도 19A), (40). mTOR의 참여는 mTOR 저해제로 알려진 라파마이신이 TFEB 활성화에 영향을 주지 않는다는 우리의 앞선 관찰과 대조되어 나타난다. 그렇지만, 일부 기질이 아직 이 약물의 존재하에 효과적으로 인산화되기 때문에, 최근 데이터는 라파마이신이 mTOR의 부분적 저해제임을 나타낸다(41). 따라서, 출원인들은 키나아제로 mTOR 촉매 사이트를 표적하는 새로운 클래스의 분자들에 속하며, 그에 의해 완전하게 mTOR 활성을 저해할 수 있는 저해제 톨린 1과 톨린 2를 사용했다(41, 47, 48).

[0091] 출원인들은 TFEB가 탈인산화되고 핵에 국소화된 절식시킨 세포를 톨린 1(250nM), 라파마이신(2.5 μM) 또는 ERK 저해제 U0126(50 μM)로 보충된 아미노산 풍부 배지로 자극했다. 영양소만 있는 절식시킨 세포의 자극은 상당한 TFEB 분자량 이동과 세포질에 대해 재-국소화를 유도한다(도 19B). 50 μM 농도의 ERK 저해제 U0126의 존재하 영양소 자극은, ERK에 의한 인산화는 부분적으로 TFEB 세포질(cytoplasmic)의 국소화에 기여한다는 것을 제시하는, 오로지 부분적인 TFEB 분자량 변화를 유도하였다. 2.5 μM 라파마이신 처리도 또한 부분적인 분자량 이동을 야기하였으나 TFEB 준세포 국소화에는 영향을 주지 않았다(도 19B). 그렇지만, 톨린 1(250nM) 처리는 영양소에 의해 유도되는 분자량 변화가 완전히 방지되었으며, 차례로 대량의 TFEB 핵 축적을 야기하였다. 이들 데이터는 초록 형광 단백질(TFEB-GFP)에 융합되는 TFEB를 과발현하는 안정한 HeLa 세포를 사용하는 세포-기반 고품량 분석으로 확인되었다. 이 분석에서 처리된 세포의 이미지는 자동화된 공초점 현미경(오페라 시스템)에 의해 얻었으며 이들 이미지의 분석은 아카펠라 이미지 소프트웨어를 이용하여 세포질과 세포의 핵 사이의 TFEB-GFP의 형광 강도 평균의 비를 계산하였다(상세는 재료 및 방법 참조)(도 19C 및 D). 톨린 1이 mTORC1 및 mTORC2 복합체를 모두 저해하기 때문에, 출원인들은 다음에 TFEB 조절에 대해 각각의 복합체의 기여를 평가하였다. 세계의 주요 관찰은 TFEB가 mTORC1에 의해 대부분 조절된다는 것을 제시한다:(1) mTORC1을 활성화하나 mTORC2는 활성화하지 않는 아미노산으로 절식된 세포의 자극은, 인산화 이벤트의 높은 암시가 되는, 강한 TFEB 분자량 변화를 유도하였다(도 19E); (2) 아미노산 신호를 mTORC1에 매개하는 RagC 및 RagD의 녹다운은 전체 영양소 배지에서 있었던 세포에서조차 TFEB 핵 축적을 일으켰다(도 19F); (3) 방해되는 mTORC2 시그널링(Sin1-/- 쥐 배아 섬유아세포(MEFs))(49, 50, 46)으로 세포에서 분자량 변화 및 톨린 1 처리시 핵 전좌를 겪은 TFEB는 대조군 세포와 유사했다(도 19G).

[0092] **mTORC1은 S142의 인산화를 통해 TFEB 준세포 국소화를 조절한다.**

[0093] S142에서 mTORC1이 TFEB를 인산화하는 지를 테스트하기 위해, 출원인들은 S142에서 인산화될 때 오직 TFEB만을 인식하는 포스포특이적 항체를 생성시켰다. 이 항체를 사용하여, 출원인들은 출원인들이 미리 보고한 결과와 일치되게, TFEB가 더 이상 안정하게 TFEB-3xFLAG를 발현하는 HeLa 세포내 S142에서 인산화하지 않으며 영양소-고갈 배지에서 배양되지 않는다는 것을 관찰했다(도 20A).

[0094] 이어서, 톨린 1이나 라파마이신이 함유되었거나 또는 함유되지 않은 표준 배지로 보충된 절식시킨 세포에서 S142 인산화의 레벨을 분석했다. 톨린 1이 영양소-유도된 S142 인산화를 완벽하게 둔하게 한 반면, 라파마이신은 그렇지 않았으며, 이는 S142가 라파마이신-저항성 mTORC1 사이트를 나타낸다는 것을 제시한다(도 20A). 이 결과는 명백하게 TFEB가 mTOR 기질이며 S142가 mTOR에 의한 TFEB의 인산화 동안 주요 잔류물(key residue)이라는 것을 증명한다.

[0095] 최근의 발견은 mTORC1이 그것의 표적 단백질을 다중 사이트(42, 43, 44)에서 인산화한다는 것을 제시한다. 부가적인 세린 잔류물이 mTOR에 의해 인산화될 수 있다는 것을 확인하기 위해, 출원인들은 TFEB의 코딩 서열에서 mTORC1(42)에 대해 합의 포스포억셉터 모티프(consensus phosphoacceptor motif)에 대해 조사했다(도 20B 및 C).

[0096] 동시에, 이 데이터는 S142 외에 S211도 또한 TFEB 준세포 국소화에 역할을 하고 S211이 mTORC1의 추가적인 표적 사이트를 나타낸다는 것을 시사하는 것을 나타낸다.

[0097] 리소좀이 TFEB에서 유전자 발현을 조절한다.

[0098] mTORC1과 TFEB의 상호작용이 TFEB 핵 전좌를 제어하기 때문에, 출원인들은 유전자 발현을 조절하는 TFEB의 능력이 또한 이 상호작용에 의해 영향을 받는 지를 테스트했다. TFEB(37)의 표적이 되는 것으로 나타난 몇 개의 리소좀/오토파지 유전자의 발현을 TFEB가 간에서 고갈된 조건부 녹아웃 마우스 라인(Tcfebflox/flox; *alb*-CRE)으로부터 얻은 일차 간세포에서, 그리고 대조군 마우스 라인(Tcfebflox/flox)에서 테스트했다. 세포를 클로로퀸이나 토린 1로 처리했거나, 또는 처리하지 않고 두었다. 이 처리는 p-ERK의 레벨이 영향을 받지 않았으나, 반면 p-S6K의 레벨로 측정된 바와 같이 mTOR을 저해했다(도 21A). 조절된 배지에서 배양된 TFEB 조건부 녹아웃 쥐로부터 분리된 일차 간세포는 몇 개의 TFEB 표적 유전자의 발현 레벨에서 대조군 간세포에 비해 큰 차이를 보이지 않았다. 그렇지만, TFEB 표적 유전자의 발현이 클로로퀸 처리 후 대조군 쥐로부터 얻은 간세포에서 상향조절되었으며, 이 상향조절은 TFEB 조건부 녹아웃 쥐로부터 얻은 간세포에서 현저하게 무더졌다(도 21B). 비슷하게, 토린 1 처리시 전사 반응이 TFEB 조건부 녹아웃 쥐로부터 얻어진 간세포에서 상당히 감소했다(도 21C). 동시에, 이 결과는 TFEB가 mTOR을 거쳐서 리소좀에 의해 유도되는 전사 반응에서 주요 역할을 하는 것을 나타낸다.

[0099] 오토파지 작용을 조절하는 전사-의존성(24, 25) 및 비의존성 메카니즘 둘 다 설명되었다(26, 27). 연구는 오토파고솜 형성, 오토파고솜-리소좀 융합 및 오토파고솜 함량의 리소좀-매개된 분해와 같은 오토파지 경로의 여러 중요한 단계를 제어하는 신규한, 키나아제-의존성, 조절성 회로를 확인한다. 흥미롭게도, 출원인들은 오토파지/리소좀 유전자의 전사 유도가 오토파고솜 형성에 선행하는 것을 관찰했다. 전사-의존성 메카니즘은 오토파지 작용의 더 장기적이고 지속적인 활성을 보증한다는 것을 예상할 수 있다.

[0100] 오토파지 작용 기능장애가 몇몇 유전자 질환에 관련되어 있으며(28-30) 앞서의 연구는 오토파지 작용의 향상은 동물의 신경퇴행성 질환 및 간염유증에 치료 효과를 가진다는 것을 보여주었다(29, 31, 32).

[0101] 전사 레벨에서 리소좀-오토파지 경로를 제어하는 신규한 메카니즘의 발견은 이러한 질환에서 세포 제거를 조절하기 위한 새로운 접근을 제시한다. 또한, 내생(endogeneous) 또는 재조합 리소좀 효소를 생산하는 세포 라인의 생산성을 증가시키기 위한 새로운 전략을 제시하는, 리소좀 효소에 기반하는 치료학적 접근에 대한 스핀-오프를 제공한다(도 16 및 17). 게다가, TFEB 과발현은 기질 제거를 촉진할 수 있고 LSDs에서 세포 엑포화를 구출할 수 있다(45); 따라서 TFEB 활성을 조절하는 인산화-매개된 메카니즘의 확인은 건강 상태 및 질환 상태에서 세포 제거를 촉진하기 위한 새로운 툴을 제공한다.

**표 1**

[0102] TFEB 과발현 또는 세포 절식에 반응한 유전자 발현 변화(피어슨 상관분석 0.42)

| TFEB 안정한 과발현            |                          | 세포 절식                   |                          |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 유전자 표시<br>(GENE SYMBOL) | 폴드 증가<br>(FOLD INCREASE) | 유전자 표시<br>(GENE SYMBOL) | 폴드 증가<br>(FOLD INCREASE) |
| AKT1                    | 1.2                      | AKT1                    | 1.1                      |
| AMBRA1                  | 1.2                      | AMBRA1                  | 1.3                      |
| APP                     | 1.4                      | APP                     | 1.2                      |
| ARSA                    | 1.3                      | ARSA                    | 1.4                      |
| ATG10                   | 1.1                      | ATG10                   | 1.0                      |
| ATG12                   | 1.2                      | ATG12                   | 1.2                      |
| ATG16L1                 | -1.2                     | ATG16L1                 | -1.5                     |
| ATG16L2                 | 1.1                      | ATG16L2                 | 1.0                      |
| ATG3                    | 1.2                      | ATG3                    | 1.0                      |
| ATG4A                   | 1.2                      | ATG4A                   | -1.2                     |
| ATG4B                   | 1.3                      | ATG4B                   | 1.1                      |
| ATG4C                   | 1.1                      | ATG4C                   | 1.1                      |
| ATG4D                   | 1.6                      | ATG4D                   | 1.8                      |
| ATG5                    | 1.2                      | ATG5                    | 1.1                      |
| ATG7                    | 1.2                      | ATG7                    | 1.0                      |
| ATG9A                   | 1.1                      | ATG9A                   | 1.3                      |
| <b>ATG9B</b>            | <b>5.6</b>               | <b>ATG9B</b>            | <b>1.8</b>               |
| BAD                     | 1.0                      | BAD                     | 1.0                      |
| BAK1                    | 1.4                      | BAK1                    | 1.0                      |
| BAX                     | 1.2                      | BAX                     | 1.1                      |

|           |      |           |      |
|-----------|------|-----------|------|
| BCL2      | 1.5  | BCL2      | 1.4  |
| BECN1     | 1.2  | BECN1     | 1.0  |
| BID       | 1.2  | BID       | 1.1  |
| BNIP3     | 1.1  | BNIP3     | 1.1  |
| CLN3      | 1.5  | CLN3      | 1.2  |
| CXCR4     | 1.3  | CXCR4     | 1.2  |
| DRAM      | 1.8  | DRAM      | -1.3 |
| EIF2AK3   | 1.4  | EIF2AK3   | 1.2  |
| EIF4G1    | 1.3  | EIF4G1    | -1.2 |
| FAM176A   | 1.6  | FAM176A   | -1.3 |
| GAA       | 1.3  | GAA       | 1.2  |
| GABARAP   | 1.1  | GABARAP   | 1.3  |
| GABARAPL1 | 1.0  | GABARAPL1 | 1.2  |
| GABARAPL2 | 1.1  | GABARAPL2 | 1.0  |
| HGS       | -1.1 | HGS       | -1.2 |
| HTT       | 1.0  | HTT       | 1.0  |
| MAP1LC3A  | 1.1  | MAP1LC3A  | 1.4  |
| MAP1LC3B  | 1.2  | MAP1LC3B  | 1.2  |
| PIK3C3    | -1.2 | PIK3C3    | -1.2 |
| PIK3R4    | 1.1  | PIK3R4    | -1.2 |
| PTEN      | 1.1  | PTEN      | 1.1  |
| RAB24     | 1.2  | RAB24     | 1.2  |
| RGS19     | 1.2  | RGS19     | -1.2 |
| SNCA      | 1.6  | SNCA      | -1.2 |
| SQSTM1    | 2.4  | SQSTM1    | 1.6  |
| TP53      | 1.1  | TP53      | 1.0  |
| ULK1      | 1.1  | ULK1      | 2.0  |
| UVRAG     | 1.8  | UVRAG     | 2.4  |
| VPS11     | 1.4  | VPS11     | 1.6  |
| VPS18     | 1.4  | VPS18     | 1.4  |
| WIPI      | 2.5  | WIPI      | 1.5  |

[0103] 피어슨 적률 상관계수(Pearson product-moment correlation coefficient)(PMCC)가 보여준 유전자 발현 프로파일, 즉 TFEB 안정한 과발현 대 절식시킨 HeLa 세포의 유전자 발현 프로파일의 비교에 의하여 얻어졌다.

**표 2**

[0104] siRNA를 사용하는 TFEB 저해에 반응한 유전자 발현 변화

| 유전자 표시<br>(GENE SYMBOL) | 폴드 증가<br>(FOLD INCREASE) |
|-------------------------|--------------------------|
| AKT1                    | -2.1962                  |
| AMBRA1                  | 1.1134                   |
| APP                     | -1.1769                  |
| ARSA                    | -2.858                   |
| ATG10                   | 1.0389                   |
| ATG12                   | 1.0461                   |
| ATG16L1                 | -1.6529                  |
| ATG16L2                 | -1.3333                  |
| ATG3                    | 1.2702                   |
| ATG4A                   | -1.3333                  |
| ATG4B                   | -1.244                   |
| ATG4C                   | -1.6077                  |
| ATG4D                   | -1.1527                  |
| ATG5                    | -1.0607                  |
| ATG7                    | -1.6994                  |
| ATG9A                   | -1.9793                  |
| ATG9B                   | -4.4229                  |

|           |         |
|-----------|---------|
| BAK1      | 1.4489  |
| BAX       | -1.3803 |
| BCL2      | -2.3054 |
| BECN1     | -1.1769 |
| BID       | 1.3241  |
| BNIP3     | -1.1212 |
| CLN3      | -1.4692 |
| CXCR4     | -1.5529 |
| DRAM      | -1.1769 |
| EIF2AK3   | -1.3996 |
| EIF4G1    | -2.3702 |
| ESR1      | -1.676  |
| GAA       | -1.3613 |
| GABARAP   | 1.4093  |
| GABARAPL1 | -1.2016 |
| GABARAPL2 | 1.3899  |
| HGS       | -1.5594 |
| HTT       | -1.3899 |
| MAP1LC3A  | -1.0389 |
| MAP1LC3B  | -1.4175 |
| PIK3R4    | -1.6189 |
| PTEN      | -1.2702 |
| RAB24     | 1.3333  |
| SNCA      | 1.2269  |
| SQSTM1    | -1.4093 |
| TP53      | -1.279  |
| ULK1      | -3.668  |
| UVRAG     | -1.3059 |
| VPS11     | -1.84   |
| VPS18     | -2.1    |
| WIPI      | -1.94   |

[0105] siRNA-중재된 TFEB 녹다운시 하향-조절된 유전자. 폴드 체인지는 4개의 독립된 실험의 평균을 나타낸다. 현저하게 하향-조절된 유전자는 적자로(in red) 표시했다(p<0.05).

**표 3**

[0106] 다른 방법을 사용하는 S142 인산화의 예측

| 방법                  | 컷오프       | S142에 대한 실제 예측       | 그룹   | 패밀리  | 서브패밀리  | 키나아제   |
|---------------------|-----------|----------------------|------|------|--------|--------|
| CrPhos0.8           | FPR = 30% | MAPK8                | CMGC | MAPK | JNK    | MAPK8  |
| CrPhos0.8           | FPR = 30% | MAPK3                | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK3  |
| CrPhos0.8           | FPR = 30% | MAPK1                | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK1  |
| CrPhos0.8           | FPR = 30% | CDK2                 | CMGC | CDK  | CDK2   | CDK2   |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/CDK/CDK5        | CMGC | CDK  | CDK5   |        |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/CDK/CDK4/CDK4   | CMGC | CDK  | CDK4   | CDK4   |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/MAPK/ERK/MAPK1  | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK1  |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/MAPK/ERK/MAPK3  | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK3  |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/MAPK/JNK/MAPK8  | CMGC | MAPK | JNK    | MAPK8  |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/MAPK/JNK/MAPK10 | CMGC | MAPK | JNK    | MAPK10 |
| GPS-2.1             | Score = 5 | STE/STE7/MAP2K7      | STE  | STE7 | MAP2K7 |        |
| GPS-2.1             | Score = 5 | CMGC/MAPK/p38/MAPK12 | CMGC | MAPK | p38    | MAPK12 |
| PhosphoMot ifFinder |           | GSK3                 | CMGC | GSK  | GSK3   |        |
| PhosphoMot ifFinder |           | ERK1                 | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK3  |
| PhosphoMot ifFinder |           | ERK2                 | CMGC | MAPK | ERK    | MAPK1  |

|                    |                |      |      |      |       |
|--------------------|----------------|------|------|------|-------|
| PhosphoMotifFinder | ERK3           | CMGC | MAPK | ERK  | MAPK6 |
| PhosphoMotifFinder | CDK5           | CMGC | CDK  | CDK5 | CDK5  |
| Networkin          | p38MAPK/MAPK9  | CMGC | MAPK | JNK  | MAPK9 |
| Networkin          | GSK3/GSK3B     | CMGC | GSK  | GSK3 | GSK3B |
| Networkin          | CDK5/CDK2      | CMGC | CDK  | CDK2 | CDK2  |
| networkin 2        | CDK2_CDK3/CDK2 | CMGC | CDK  | CDK2 | CDK2  |
| PHOSIDA            | CK1_group      | CK1  | CK1  |      |       |
| PHOSIDA            | ERK            | CMGC | MAPK | ERK  |       |

[0107] 다섯 개의 다른 방법을 사용하는 S142의 인산화의 예측 결과이다. 방법은 첫 번째 컬럼에 주어졌다. 두 번째 컬럼은 방법에서 설명된 바와 같이, 가능한 경우에 신뢰도 점수 컷오프를 나타낸다. 세 번째 컬럼은 상응하는 반응에 의해 얻어지는 예측의 실제 포맷을 나타낸다. 네 번째 컬럼 다음은 각각 키나아제 그룹, 키나아제 패밀리, 키나아제 서브패밀리 및 키나아제 분류화에서 예측을 나타낸다.

[0108] **참고문헌**

[0109] 1. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93 (2009).

[0110] 2. Sardiello, M. *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473-477 (2009).

[0111] 3. Lum, J. J. *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248 (2005).

[0112] 4. Klionsky, D. J., Elazar, Z., Seglen, P. O. & Rubinsztein, D. C. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy* 4, 849-950 (2008).

[0113] 5. Xie, Z. & Klionsky, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109 (2007).

[0114] 6. Rubinsztein, D. C. *et al.* In search of an "autophagometer". *Autophagy* 5, 585-589 (2009).

[0115] 7. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313-326 (2010).

[0116] 8. Klionsky, D. J., Cuervo, A. M. & Seglen, P. O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3, 181-206 (2007).

[0117] 9. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3, 452-460 (2007).

[0118] 10. Bauvy, C., Meijer, A. J. & Codogno, P. Assaying of autophagic protein degradation. *Methods Enzymol* 452, 47-61 (2009).

[0119] 11. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111 (2004).

[0120] 12. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873 (2007).

[0121] 13. Behrends, C., Sowa, M. E., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 466, 68-76 (2010).

[0122] 14. Liang, C. *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10, 776-787 (2008).

[0123] 15. Dang, T. H., Van Leemput, K., Verschoren, A. & Laukens, K. Prediction of kinase-specific phosphorylation sites using conditional random fields. *Bioinformatics* 24, 2857-2864 (2008).

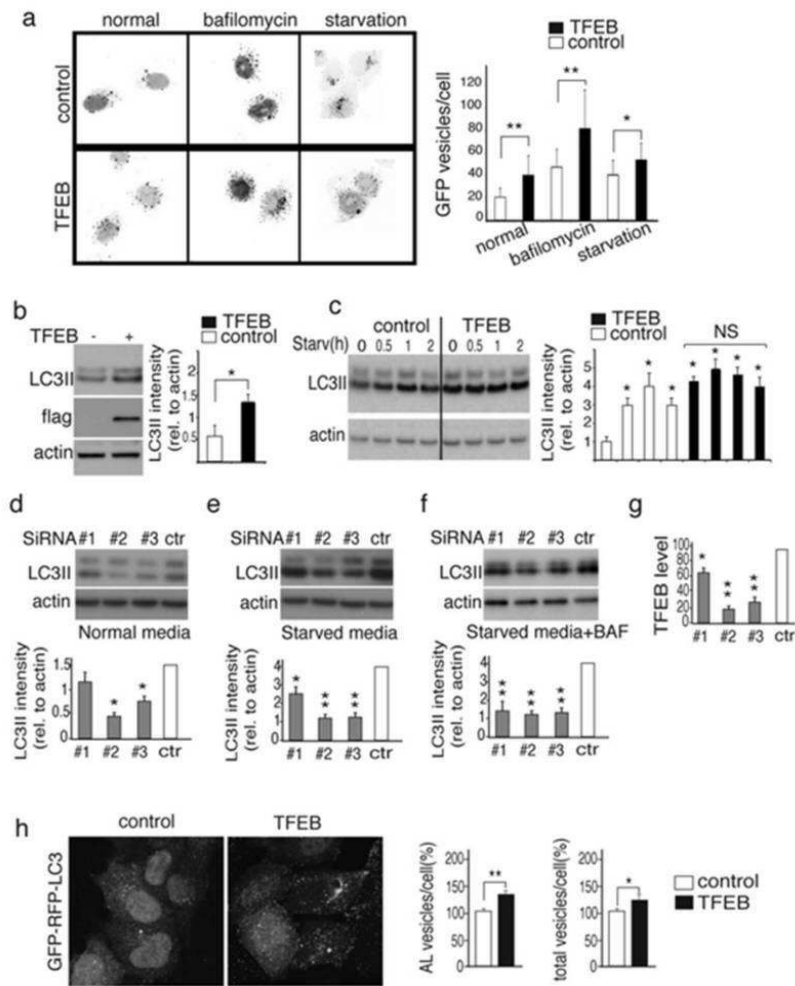
- [0124] 16. Xue, Y. *et al.* GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7, 1598-1608 (2008).
- [0125] 17. Amanchy, R. *et al.* A curated compendium of phosphorylation motifs. *Nat Biotechnol* 25, 285-286 (2007).
- [0126] 18. Linding, R. *et al.* Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell* 129, 1415-1426 (2007).
- [0127] 19. Gnad, F. *et al.* PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol* 8, R250 (2007).
- [0128] 20. Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T. & Fisher, D. E. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301 (1998).
- [0129] 21. Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 827-837 (2005).
- [0130] 22. Corcelle, E. *et al.* Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* 66, 6861-6870 (2006).
- [0131] 23. Lipinski, M. M. *et al.* A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell* 18, 1041-1052 (2010).
- [0132] 24. Zhao, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 6, 472-483 (2007).
- [0133] 25. Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6, 458-471 (2007).
- [0134] 26. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 140-149 (2010).
- [0135] 27. Neufeld, T. P. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* 22, 157-168 (2010).
- [0136] 28. Wong, E. & Cuervo, A. M. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 13, 805-811 (2010).
- [0137] 29. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42 (2008).
- [0138] 30. Settembre, C. *et al.* A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17, 119-129 (2008).
- [0139] 31. Hidvegi, T. *et al.* An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis. *Science* 329, 229-232 (2010).
- [0140] 32. Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O. & Klionsky, D. J. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* 6, 304-312 (2007).
- [0141] 33. Fraldi, A., Hemsley, K., Crawley, A., Lombardi, A., Lau, A., Sutherland, L., Auricchio, A., Ballabio, A. and Hopwood, J.J. Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Hum Mol Genet*, 16, 2693-702 (2007).
- [0142] 34. Ballabio A, Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793: 684-696
- [0143] 35. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA (2007) Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 622-632
- [0144] 36. Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking

meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*10: 623-635

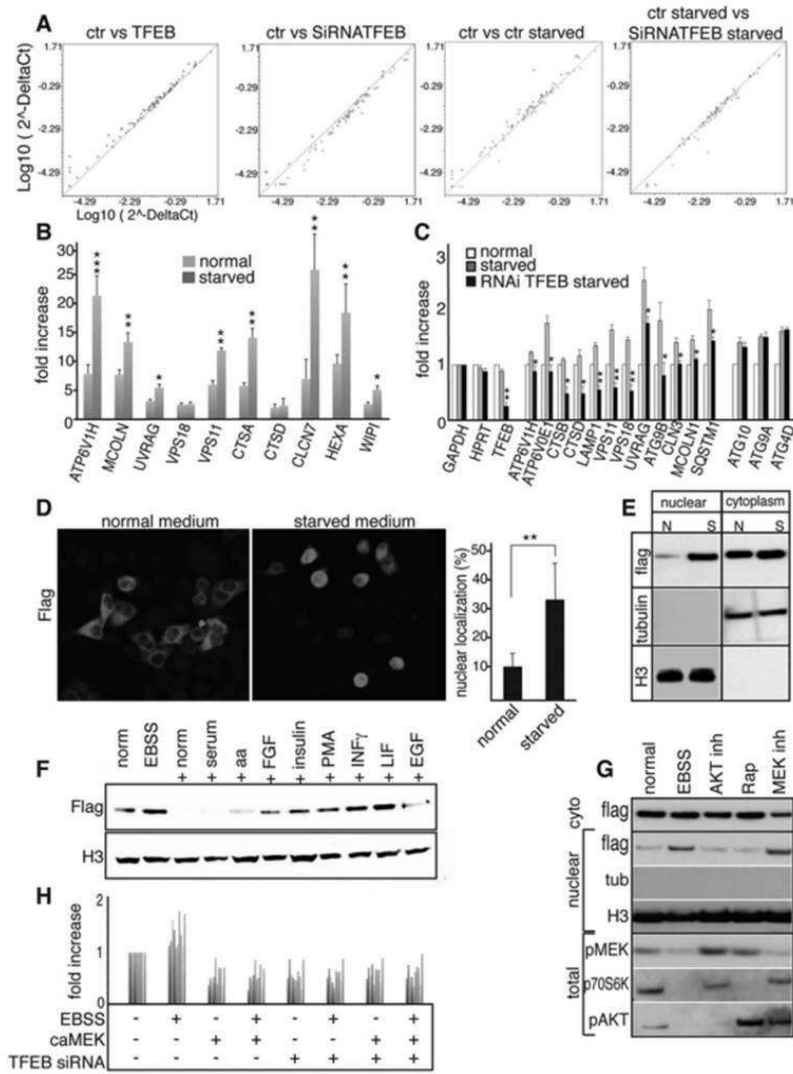
- [0145] 37. Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, Ballabio A (2011) Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*20: 3852-3866
- [0146] 38. Xie XS, Padron D, Liao X, Wang J, Roth MG, De Brabander JK (2004) Salicylilalamide A inhibits the V0 sector of the V-ATPase through a mechanism distinct from bafilomycin A1. *J Biol Chem*279: 19755-19763
- [0147] 39. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*141: 290-303
- [0148] 40. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM (2011a) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H-ATPase. *Science*334: 678-683
- [0149] 41. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, Liu Q, Zhang J, Gao Y, Reichling LJ, Sim T, Sabatini DM, Gray NS (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*284: 8023-8032
- [0150] 42. Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, Peterson TR, Choi Y, Gray NS, Yaffe MB, Marto JA, Sabatini DM (2011) The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*332: 1317-1322
- [0151] 43. Peterson TR, Sengupta SS, Harris TE, Carmack AE, Kang SA, Balderas E, Guertin DA, Madden KL, Carpenter AE, Finck BN, Sabatini DM (2011) mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*146: 408-420
- [0152] 44. Yu Y, Yoon SO, Pouligiannis G, Yang Q, Ma XM, Villen J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP, Blenis J (2011) Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science* 332: 1322-1326
- [0153] 45. Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spanpanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R, Ballabio A (2011) Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell*21: 421-430
- [0154] 46. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B (2006) SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*127: 125-137
- [0155] 47. Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggiero D, Shokat KM (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*7: e38
- [0156] 48. Garcia-Martinez JM, Moran J, Clarke RG, Gray A, Cosulich SC, Chresta CM, Alessi DR (2009) KU-0063794 is a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR). *Biochem J*421: 29-42
- [0157] 49. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*16: 1865-1870
- [0158] 50. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL (2006) Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & development*20: 2820-2832

도면

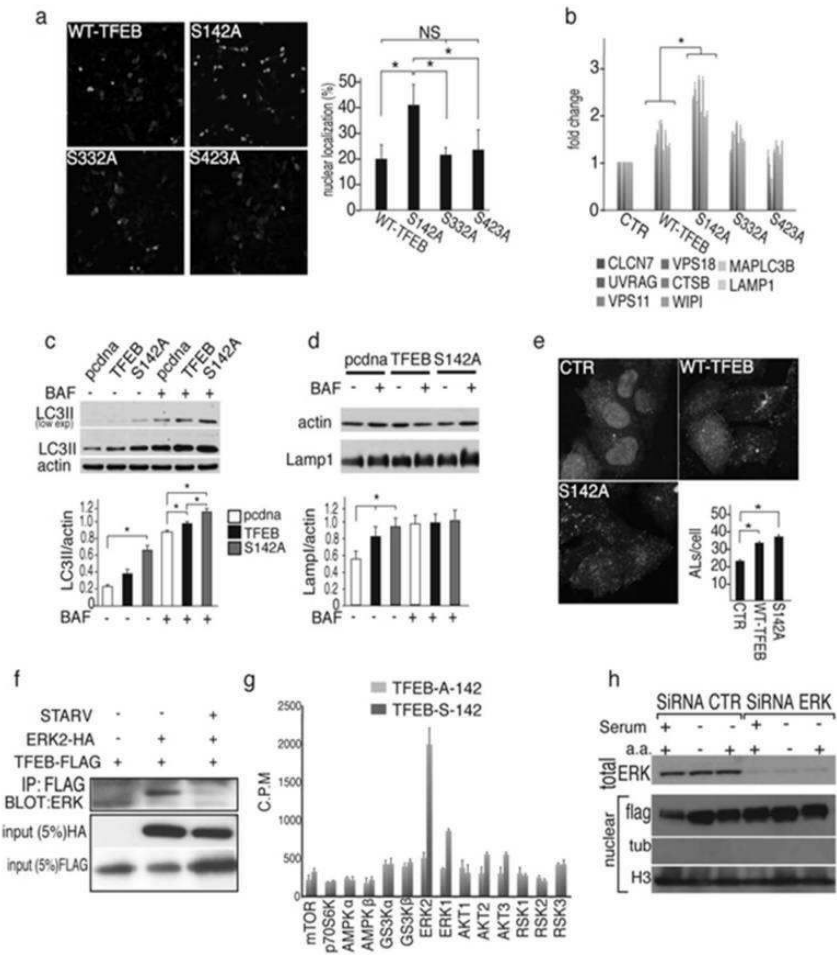
도면1



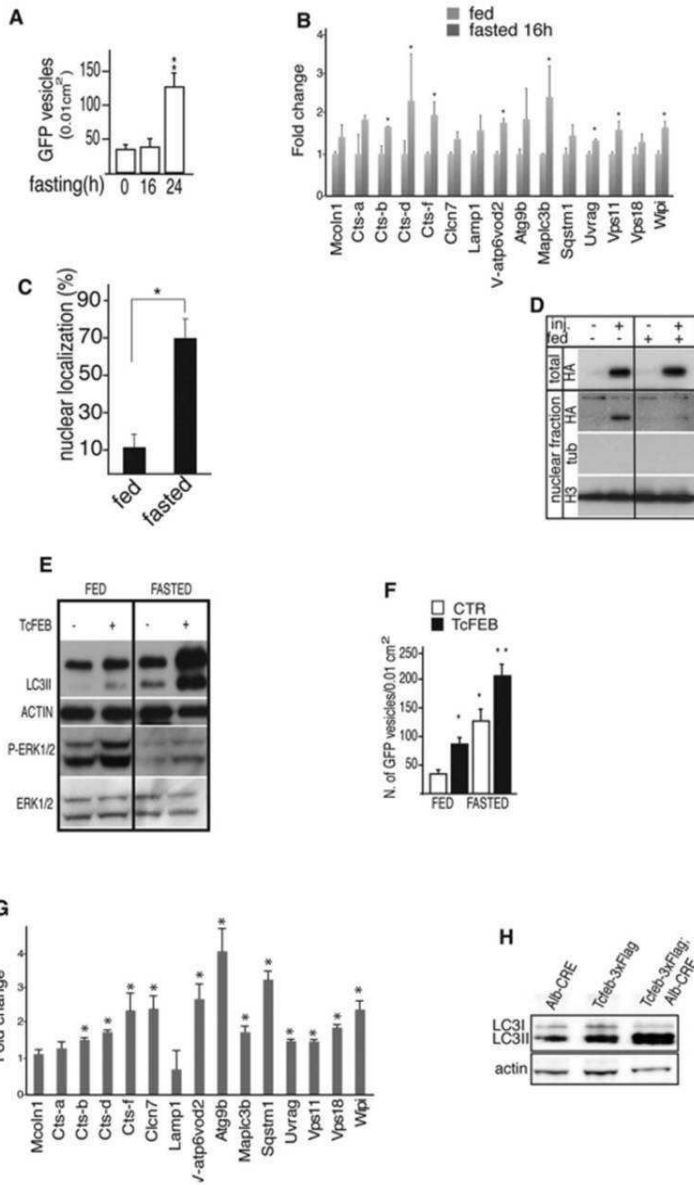
도면2



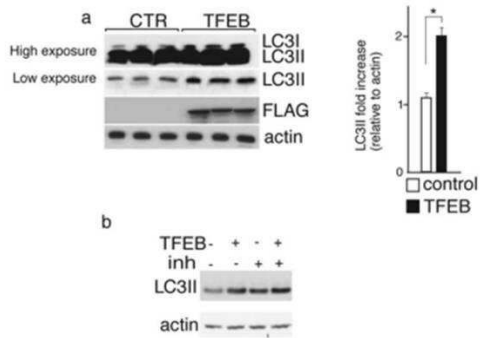
도면3



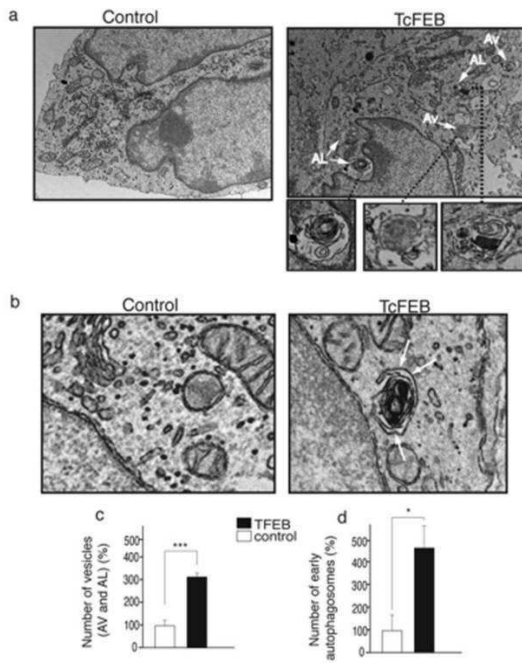
도면4



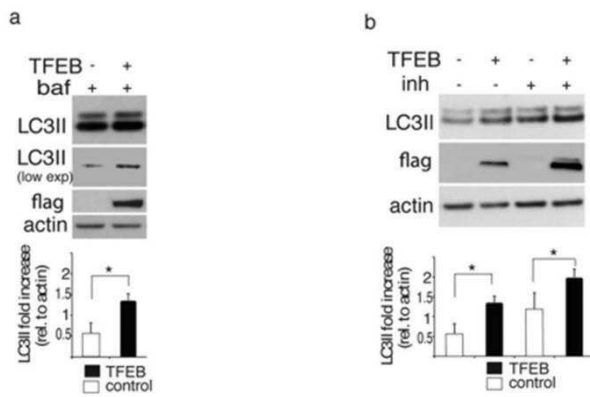
도면5



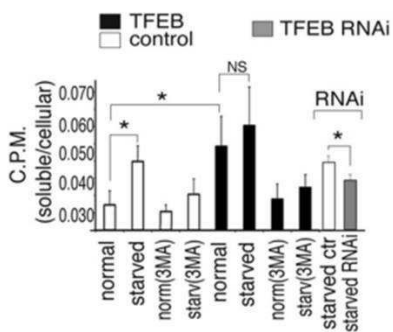
도면6



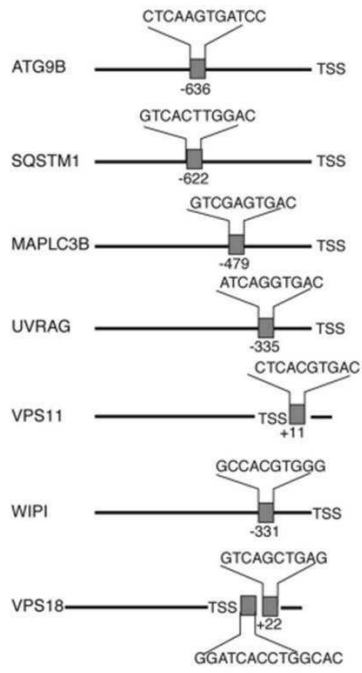
도면7



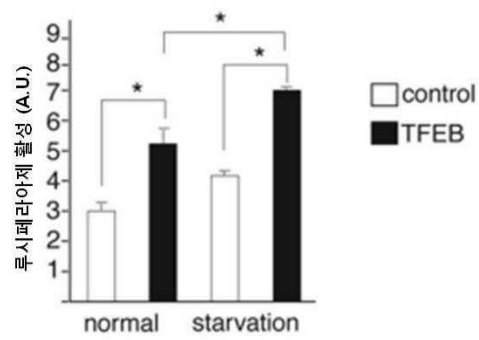
도면8



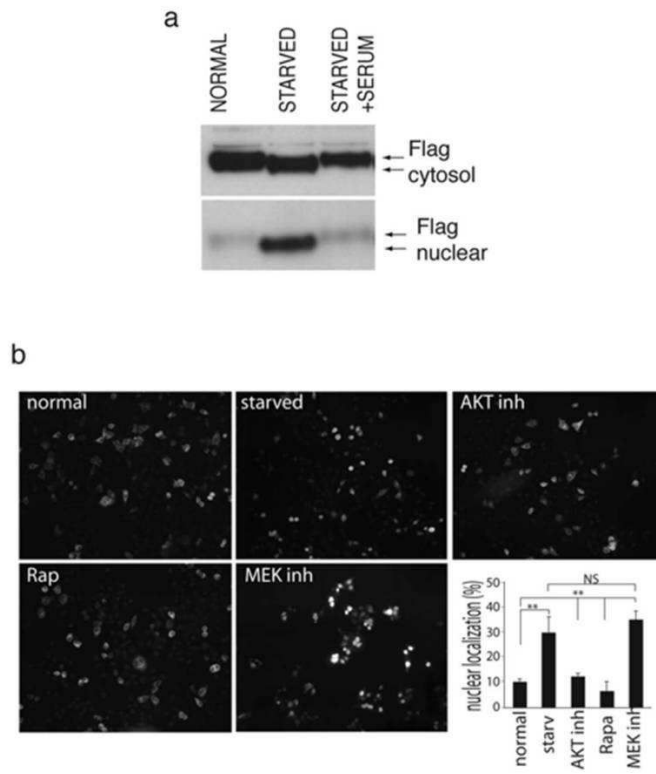
도면9



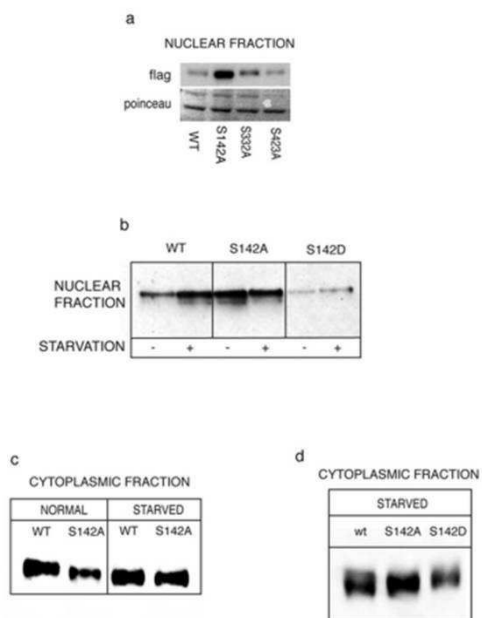
도면10



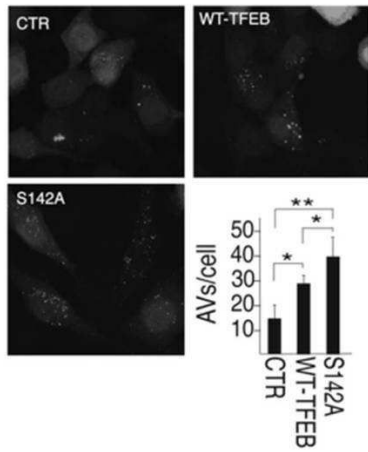
도면11



도면12



도면13

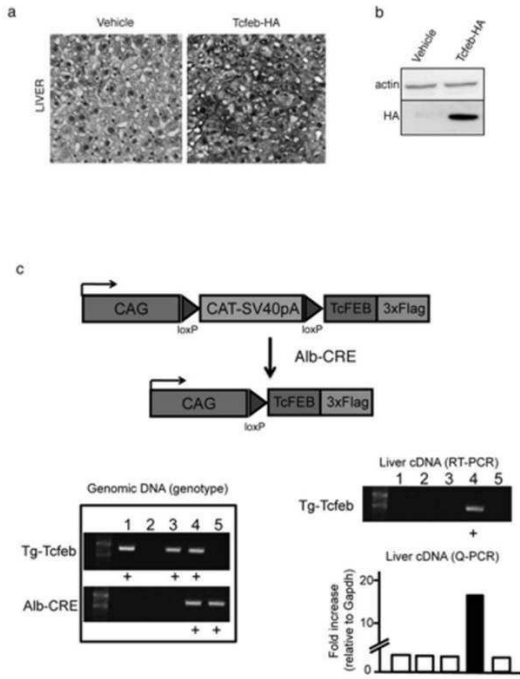


도면14

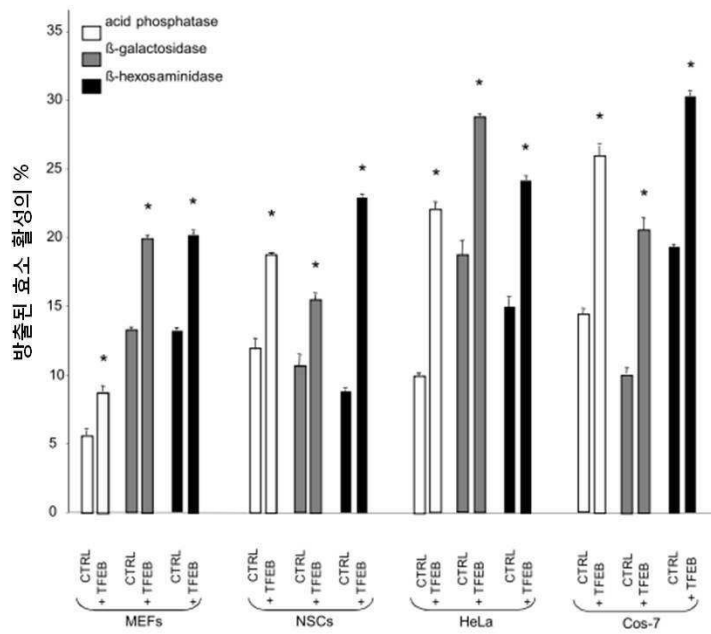
S142  
↓

|    |        |             |            |            |
|----|--------|-------------|------------|------------|
| sp | P19484 | TFEB_HUMAN  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | B0KWN0 | TFEB_CALJA  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | A8MN25 | TFEB_PAPAN  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | B7NZJ9 | TFEB_RABIT  | LSTSAGNSAP | NSPMAMLHIS |
| tr | Q4KLM8 | TFEB_RAT    | LSTSAGNSAP | NSPMAMLHIS |
| sp | Q9R210 | TFEB_MOUSE  | LSTSAGNSAP | NSPMAMLHIS |
| tr | Q6P203 | TCFEB_MOUSE | LSTSAGNSAP | NSPMAMLHIS |
| tr | C3PT72 | TFEB_DASNO  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | B5SNL7 | TFEB_OTOGA  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | B3RFC8 | TFEB_SORAR  | LSSSAGNSAP | NSPMAMLHIG |
| tr | Q08D59 | TFEB_XENTR  | LSSSAGNSAP | NSPMARMNLC |
| tr | A4IID0 | MITF_XENTR  | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIG |
| tr | Q76DN4 | MITFA_XENLA | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIG |
| tr | O73871 | MITF_CHICK  | MPPGTGSSAP | NSPMAMLTIN |
| tr | Q76DN2 | MITFA_XENLA | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIG |
| tr | D2JUK2 | MITF_PIG    | MPPVPGSSAP | NSPMAMLTIN |
| sp | O75030 | MITF_HUMAN  | MPPVPGSSAP | NSPMAMLTIN |
| sp | Q08874 | MITF_MOUSE  | MPPVPGSSAP | NSPMAMLTIN |
| sp | Q64092 | TFE3_MOUSE  | HATGPTGSAP | NSPMALLTIG |
| tr | A2AEW1 | TCFE3_MOUSE | HATGPTGSAP | NSPMALLTIG |
| sp | P19532 | TFE3_HUMAN  | HTGPTGSAP  | NSPMALLTIG |
| sp | Q05B92 | TFE3_BOVIN  | HAPGPTSSAP | NSPMALLTIG |
| tr | Q561Z2 | TFE3A_DANRE | ELAPASSTP  | SSPLAVLSIG |
| tr | Q78ZX8 | TFE3B_DANRE | EMGPGSSAP  | NSPMHNLIG  |
| tr | A9UJQ4 | MITFA_9CICH | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIS |
| tr | Q6TGR1 | MITF_BOVIN  | MPPVPGSSAP | NSPMAMLTIN |
| tr | B6E281 | MITF_CHICK  | MPPGTGSSAP | NSPMAMLTIN |
| tr | Q5XHC0 | TFE3_XENLA  | ATOPGSSAP  | NSPLAMKID  |
| tr | Q864F3 | MITF_CANFA  | MPPVPGSSAP | NSPMAMLTIN |
| tr | Q90XP4 | MITFB_DANRE | MPPGPGNSAP | NSPMALLTIN |
| tr | Q9PWC2 | MITFA_DANRE | MTGPGGASAP | NSPMALLTIN |
| tr | B5UB80 | MITFA_PAROL | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIS |
| tr | Q76DN5 | MITFM_XENLA | MPPGPGSSAP | NSPMALLTIG |

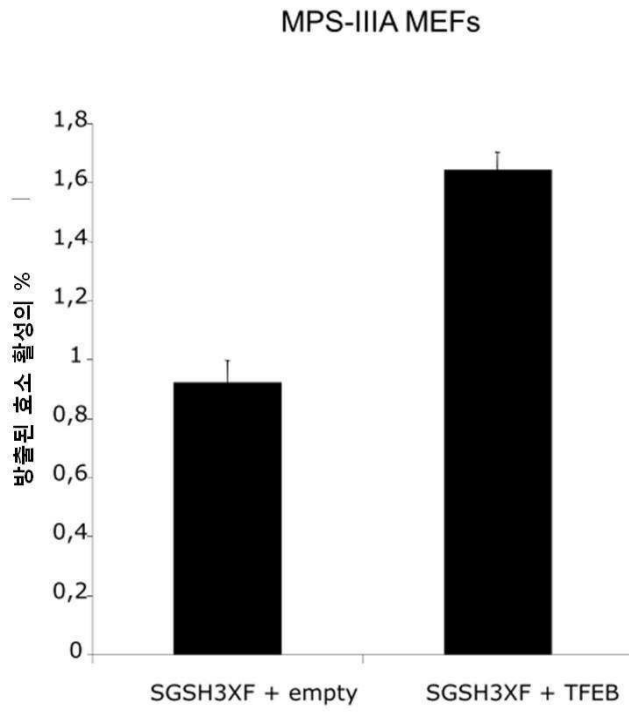
도면15



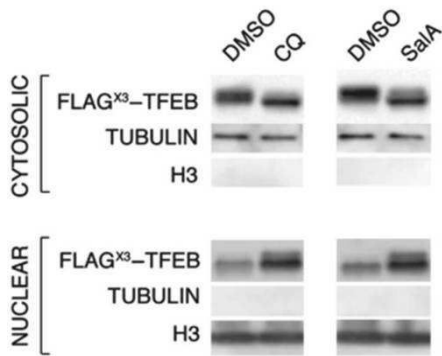
도면16



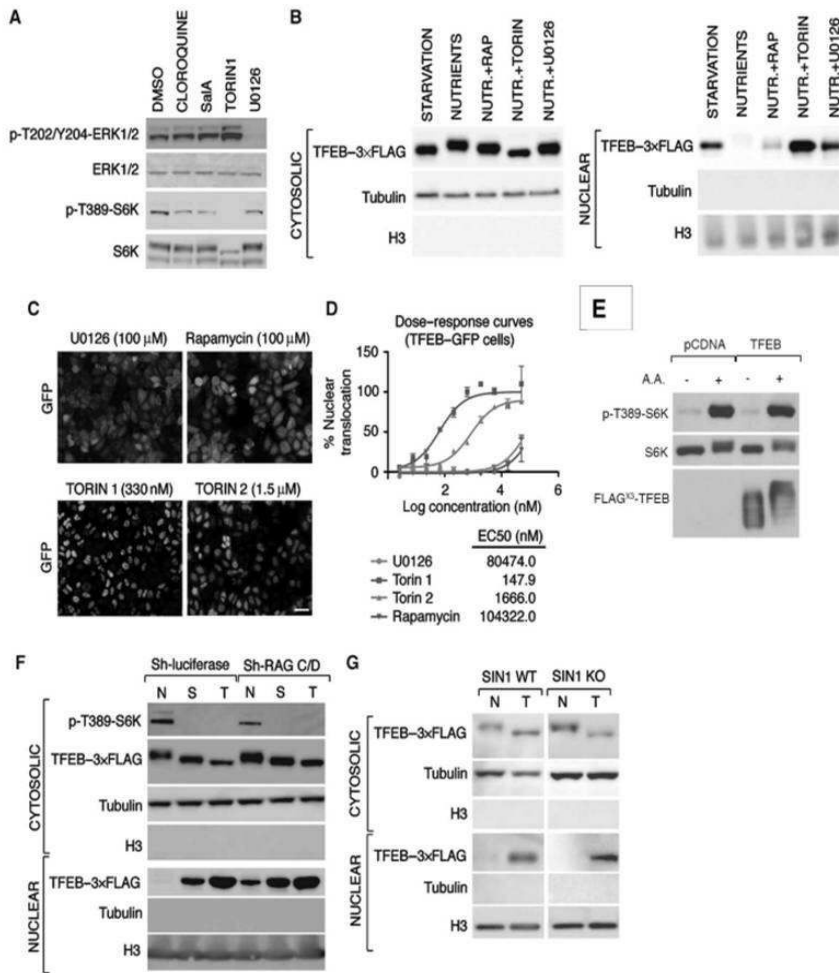
도면17



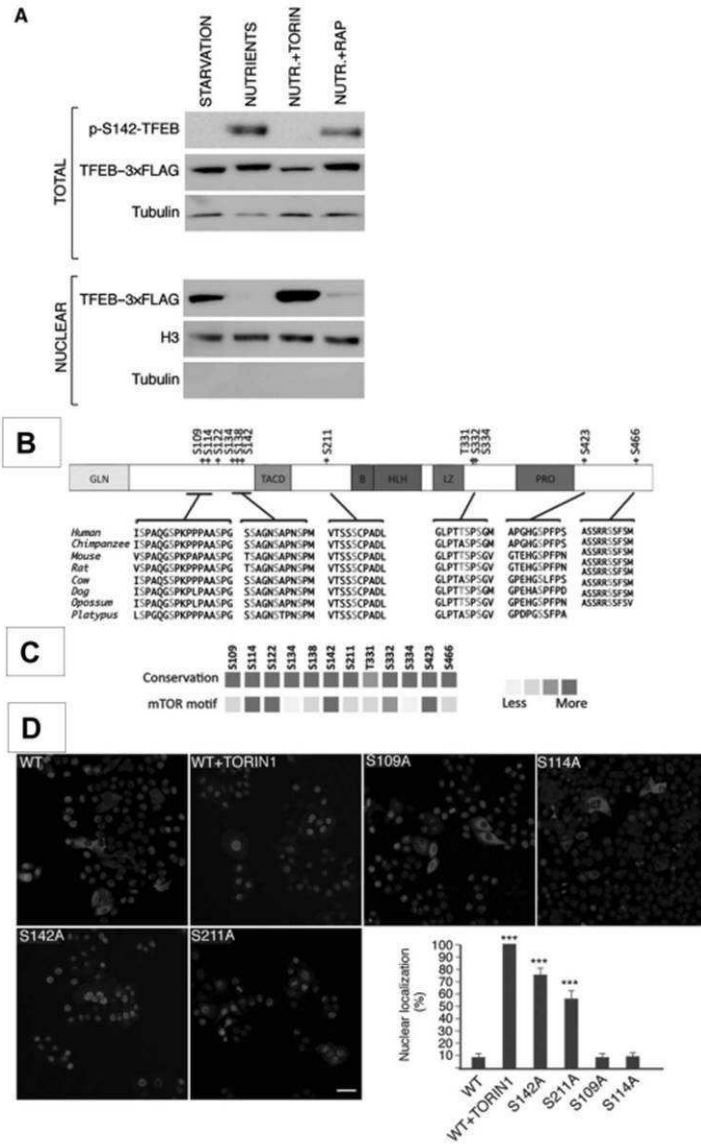
도면18



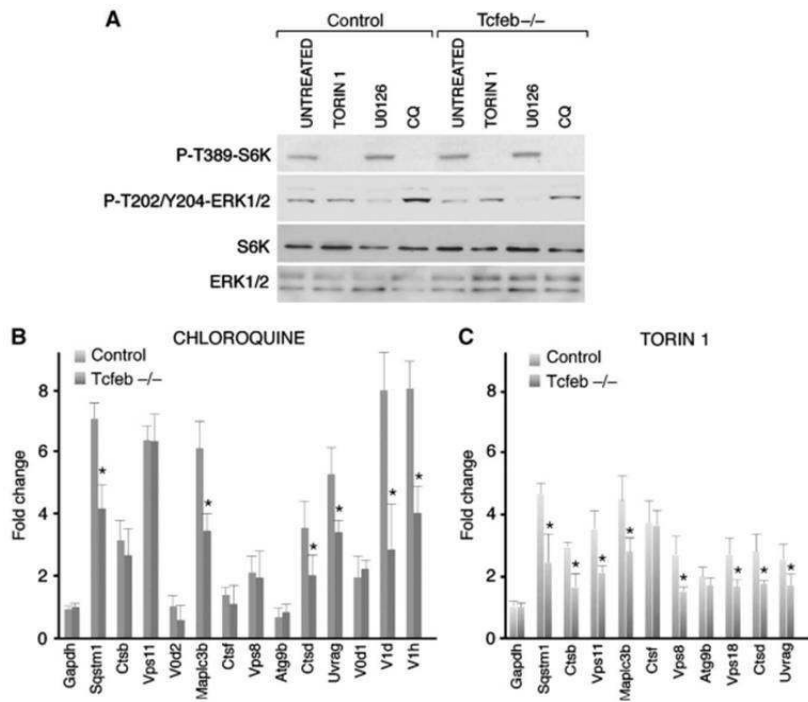
도면19



도면20



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Fondazione Telethon

<120> TFEB VARIANTS AND USES THEREOF

<130> PCT115803

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1431

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1431)

<400> 1

atg gcg tca cgc ata ggg ttg cgc atg cag ctc atg cgg gag cag gcg 48

Met Ala Ser Arg Ile Gly Leu Arg Met Gln Leu Met Arg Glu Gln Ala

1 5 10 15

cag cag gag gag cag cgg gag cgc atg cag caa cag gct gtc atg cat 96  
 Gln Gln Glu Glu Gln Arg Glu Arg Met Gln Gln Gln Ala Val Met His  
 20 25 30

tac atg cag cag cag cag cag cag caa cag cag cag ctc gga ggg ccg 144  
 Tyr Met Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gly Gly Pro  
 35 40 45

ccc acc ccg gcc atc aat acc ccc gtc cac ttc cag tcg cca cca cct 192

Pro Thr Pro Ala Ile Asn Thr Pro Val His Phe Gln Ser Pro Pro Pro  
 50 55 60

gtg cct ggg gag gtg ttg aag gtg cag tcc tac ctg gag aat ccc aca 240  
 Val Pro Gly Glu Val Leu Lys Val Gln Ser Tyr Leu Glu Asn Pro Thr  
 65 70 75 80

tcc tac cat ctg cag cag tcg cag cat cag aag gtg cgg gag tac ctg 288  
 Ser Tyr His Leu Gln Gln Ser Gln His Gln Lys Val Arg Glu Tyr Leu  
 85 90 95

tcc gag acc tat ggg aac aag ttt gct gcc cac atc agc cca gcc cag 336  
 Ser Glu Thr Tyr Gly Asn Lys Phe Ala Ala His Ile Ser Pro Ala Gln  
 100 105 110

ggc tct ccg aaa ccc cca cca gcc gcc tcc cca ggg gtg cga gct gga 384  
 Gly Ser Pro Lys Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Gly Val Arg Ala Gly  
 115 120 125

cac gtg ctg tcc tcc tcc gct ggc aac agt gct ccc aat agc ccc atg 432  
 His Val Leu Ser Ser Ser Ala Gly Asn Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met  
 130 135 140

gcc atg ctg cac att ggc tcc aac cct gag agg gag ttg gat gat gtc 480  
 Ala Met Leu His Ile Gly Ser Asn Pro Glu Arg Glu Leu Asp Asp Val  
 145 150 155 160

att gac aac att atg cgt ctg gac gat gtc ctt ggc tac atc aat cct 528

Ile Asp Asn Ile Met Arg Leu Asp Asp Val Leu Gly Tyr Ile Asn Pro  
 165 170 175

gaa atg cag atg ccc aac acg cta ccc ctg tcc agc agc cac ctg aat 576

Glu Met Gln Met Pro Asn Thr Leu Pro Leu Ser Ser Ser His Leu Asn  
 180 185 190  
 gtg tac agc agc gac ccc cag gtc aca gcc tcc ctg gtg ggc gtc acc 624  
 Val Tyr Ser Ser Asp Pro Gln Val Thr Ala Ser Leu Val Gly Val Thr  
 195 200 205  
 agc agc tcc tgc cct gcg gac ctg acc cag aag cga gag ctc aca gat 672  
 Ser Ser Ser Cys Pro Ala Asp Leu Thr Gln Lys Arg Glu Leu Thr Asp  
 210 215 220  
 gct gag agc agg gcc ctg gcc aag gag cgg cag aag aaa gac aat cac 720  
 Ala Glu Ser Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His  
 225 230 235 240  
 aac tta att gaa agg aga cga agg ttc aac atc aat gac cgc atc aag 768  
 Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys  
 245 250 255  
 gag ttg gga atg ctg atc ccc aag gcc aat gac ctg gac gtg cgc tgg 816  
 Glu Leu Gly Met Leu Ile Pro Lys Ala Asn Asp Leu Asp Val Arg Trp  
 260 265 270  
 aac aag ggc acc atc ctc aag gcc tct gtg gat tac atc cgg agg atg 864  
 Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Arg Met  
 275 280 285  
 cag aag gac ctg caa aag tcc agg gag ctg gag aac cac tct cgc cgc 912  
 Gln Lys Asp Leu Gln Lys Ser Arg Glu Leu Glu Asn His Ser Arg Arg  
 290 295 300  
 ctg gag atg acc aac aag cag ctc tgg ctc cgt atc cag gag ctg gag 960  
 Leu Glu Met Thr Asn Lys Gln Leu Trp Leu Arg Ile Gln Glu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 atg cag gct cga gtg cac ggc ctc cct acc acc tcc ccg tcc ggc atg 1008  
 Met Gln Ala Arg Val His Gly Leu Pro Thr Thr Ser Pro Ser Gly Met  
 325 330 335  
 aac atg gct gag ctg gcc cag cag gtg gtg aag cag gag ctg cct agc 1056  
 Asn Met Ala Glu Leu Ala Gln Gln Val Val Lys Gln Glu Leu Pro Ser

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 340   | 345 | 350 |      |
| gaa gag ggc cca ggg gag gcc ctg atg ctg ggg gct gag gtc cct gac |     |     | 1104 |
| Glu Glu Gly Pro Gly Glu Ala Leu Met Leu Gly Ala Glu Val Pro Asp |     |     |      |
| 355   | 360 | 365 |      |
| cct gag cca ctg cca gct ctg ccc ccg caa gcc ccg ctg ccc ctg ccc |     |     | 1152 |
| Pro Glu Pro Leu Pro Ala Leu Pro Pro Gln Ala Pro Leu Pro Leu Pro |     |     |      |
| 370   | 375 | 380 |      |
| acc cag cca cca tcc cca ttc cat cac ctg gac ttc agc cac agc ctg |     |     | 1200 |
|   |     |     |      |
| Thr Gln Pro Pro Ser Pro Phe His His Leu Asp Phe Ser His Ser Leu |     |     |      |
| 385   | 390 | 395 | 400  |
| agc ttt ggg ggc agg gag gac gag ggt ccc ccg ggc tac ccc gaa ccc |     |     | 1248 |
| Ser Phe Gly Gly Arg Glu Asp Glu Gly Pro Pro Gly Tyr Pro Glu Pro |     |     |      |
| 405   | 410 | 415 |      |
| ctg gcg ccg ggg cat ggc tcc cca ttc ccc agc ctg tcc aag aag gat |     |     | 1296 |
| Leu Ala Pro Gly His Gly Ser Pro Phe Pro Ser Leu Ser Lys Lys Asp |     |     |      |
|   |     |     |      |
| 420   | 425 | 430 |      |
| ctg gac ctc atg ctc ctg gac gac tca ctg cta ccg ctg gcc tct gat |     |     | 1344 |
| Leu Asp Leu Met Leu Leu Asp Asp Ser Leu Leu Pro Leu Ala Ser Asp |     |     |      |
| 435   | 440 | 445 |      |
| cca ctt ctg tcc acc atg tcc ccc gag gcc tcc aag gcc agc agc cgc |     |     | 1392 |
| Pro Leu Leu Ser Thr Met Ser Pro Glu Ala Ser Lys Ala Ser Ser Arg |     |     |      |
| 450   | 455 | 460 |      |
|   |     |     |      |
| cgg agc agc ttc agc atg gag gag ggc gat gtg ctg tga             |     |     | 1431 |
| Arg Ser Ser Phe Ser Met Glu Glu Gly Asp Val Leu                 |     |     |      |
| 465   | 470 | 475 |      |
| <210> 2   |     |     |      |
| <211> 476   |     |     |      |
| <212> PRT   |     |     |      |
| <213> Homo sapiens  |     |     |      |
| <400> 2   |     |     |      |
| Met Ala Ser Arg Ile Gly Leu Arg Met Gln Leu Met Arg Glu Gln Ala |     |     |      |

1                    5                    10                    15  
 Gln Gln Glu Glu Gln Arg Glu Arg Met Gln Gln Gln Ala Val Met His  
                           20                    25                    30  
  
 Tyr Met Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Gly Gly Pro  
                           35                    40                    45  
 Pro Thr Pro Ala Ile Asn Thr Pro Val His Phe Gln Ser Pro Pro Pro  
                           50                    55                    60  
 Val Pro Gly Glu Val Leu Lys Val Gln Ser Tyr Leu Glu Asn Pro Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Tyr His Leu Gln Gln Ser Gln His Gln Lys Val Arg Glu Tyr Leu  
                           85                    90                    95  
  
 Ser Glu Thr Tyr Gly Asn Lys Phe Ala Ala His Ile Ser Pro Ala Gln  
                           100                    105                    110  
 Gly Ser Pro Lys Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Gly Val Arg Ala Gly  
                           115                    120                    125  
 His Val Leu Ser Ser Ser Ala Gly Asn Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met  
                           130                    135                    140  
 Ala Met Leu His Ile Gly Ser Asn Pro Glu Arg Glu Leu Asp Asp Val  
 145                    150                    155                    160  
  
 Ile Asp Asn Ile Met Arg Leu Asp Asp Val Leu Gly Tyr Ile Asn Pro  
                           165                    170                    175  
 Glu Met Gln Met Pro Asn Thr Leu Pro Leu Ser Ser Ser His Leu Asn  
                           180                    185                    190  
 Val Tyr Ser Ser Asp Pro Gln Val Thr Ala Ser Leu Val Gly Val Thr  
                           195                    200                    205  
 Ser Ser Ser Cys Pro Ala Asp Leu Thr Gln Lys Arg Glu Leu Thr Asp  
                           210                    215                    220  
  
 Ala Glu Ser Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His  
 225                    230                    235                    240  
 Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys  
                           245                    250                    255

Glu Leu Gly Met Leu Ile Pro Lys Ala Asn Asp Leu Asp Val Arg Trp  
 260 265 270

Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Arg Met  
 275 280 285

Gln Lys Asp Leu Gln Lys Ser Arg Glu Leu Glu Asn His Ser Arg Arg  
 290 295 300

Leu Glu Met Thr Asn Lys Gln Leu Trp Leu Arg Ile Gln Glu Leu Glu  
 305 310 315 320

Met Gln Ala Arg Val His Gly Leu Pro Thr Thr Ser Pro Ser Gly Met  
 325 330 335

Asn Met Ala Glu Leu Ala Gln Gln Val Val Lys Gln Glu Leu Pro Ser  
 340 345 350

Glu Glu Gly Pro Gly Glu Ala Leu Met Leu Gly Ala Glu Val Pro Asp  
 355 360 365

Pro Glu Pro Leu Pro Ala Leu Pro Pro Gln Ala Pro Leu Pro Leu Pro  
 370 375 380

Thr Gln Pro Pro Ser Pro Phe His His Leu Asp Phe Ser His Ser Leu  
 385 390 395 400

Ser Phe Gly Gly Arg Glu Asp Glu Gly Pro Pro Gly Tyr Pro Glu Pro  
 405 410 415

Leu Ala Pro Gly His Gly Ser Pro Phe Pro Ser Leu Ser Lys Lys Asp  
 420 425 430

Leu Asp Leu Met Leu Leu Asp Asp Ser Leu Leu Pro Leu Ala Ser Asp  
 435 440 445

Pro Leu Leu Ser Thr Met Ser Pro Glu Ala Ser Lys Ala Ser Ser Arg  
 450 455 460

Arg Ser Ser Phe Ser Met Glu Glu Gly Asp Val Leu  
 465 470 475

<210> 3

<211

> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding for a variant fragment of TFEB

<220><221> CDS

<222> (1)..(150)

<400> 3

ccc cca cca gcc gcc tcc cca ggg gtg cga gct gga cac gtg ctg tcc 48

Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Gly Val Arg Ala Gly His Val Leu Ser

1 5 10 15

tcc tcc get ggc aac agt gct ccc aat gcc ccc atg gcc atg ctg cac 96

Ser Ser Ala Gly Asn Ser Ala Pro Asn Ala Pro Met Ala Met Leu His

20 25 30

att ggc tcc aac cct gag agg gag ttg gat gat gtc att gac aac att 144

Ile Gly Ser Asn Pro Glu Arg Glu Leu Asp Asp Val Ile Asp Asn Ile

35 40 45

atg cgt 150

Met Arg

50

<210> 4

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Gly Val Arg Ala Gly His Val Leu Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ala Gly Asn Ser Ala Pro Asn Ala Pro Met Ala Met Leu His

20 25 30

Ile Gly Ser Asn Pro Glu Arg Glu Leu Asp Asp Val Ile Asp Asn Ile

35 40 45

Met Arg

50