

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022395

(43) 공개일자 2025년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/48 (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/485 (2013.01)*G01N 33/573* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0103374

(22) 출원일자 2023년08월08일

심사청구일자 2023년08월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김자은

서울특별시 성북구 보문로38길 11, 101동 1103호
(동소문동5가, 돈암동일하이빌)

류재욱

서울특별시 동대문구 회기로23가길 48-9 (회기동)
101호

(74) 대리인

특허법인지담

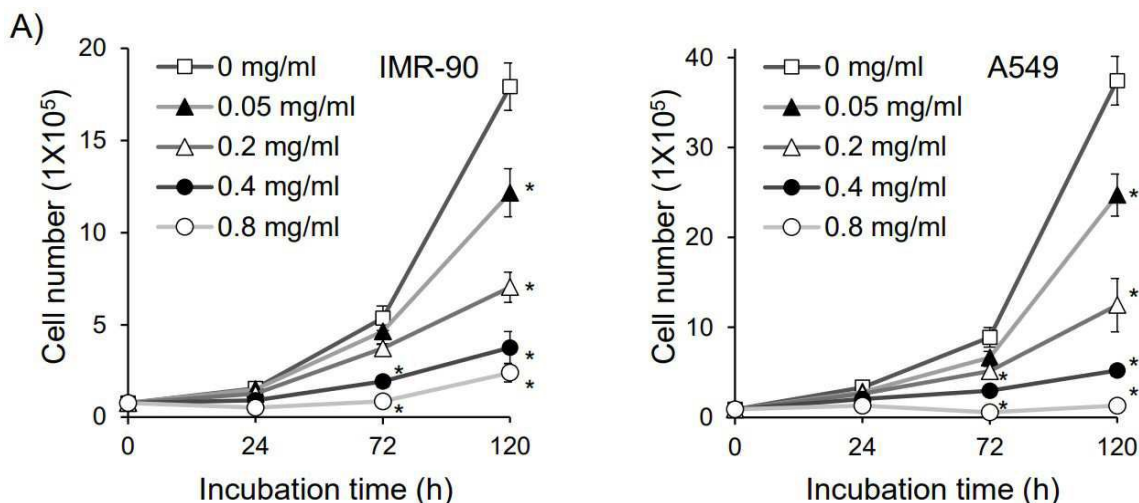
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 Aurora kinase B 활성 수준을 이용한 미세먼지로 인한 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법

(57) 요약

본 발명은 Aurora kinase B의 활성 수준을 확인하여 미세먼지로 인한 유전독성을 측정하기 위한 정보 제공 방법과 유전독성 측정에 사용되는 키트에 관한 것이다. 구체적으로, 미세먼지의 노출이 세포의 유사분열기를 조절하는 주요단백질 Aurora kinase B의 비활성화, 이로 인한 세포주기 교란, 염색체 불안정성을 유발할 수 있음을 확인하고, 이를 유전독성의 지표로 활용한 대기 중에 존재하는 미세먼지 노출에 의한 염색체 손상을 진단하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면 Aurora kinase B 활성정도를 확인하여 염색체 불안정성 측정을 빠르고 효율적으로 측정하고, 이를 통해 대기오염에 의한 유전독성을 빠르게 평가할 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 2800/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711187465
과제번호	2021R1A2C2008053
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	Cilia 조절 단백질에 의한 cisplatin 유도 신장독성제어 기능 규명
기 여 율	50/100
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345358638
과제번호	2022R1A6A3A01086285
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	미세입자의 염색체 불안정성 유도 기전 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2022.09.01 ~ 2023.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 생물학적 시료로부터 Aurora kinase B 단백질의 활성 정도를 확인하여 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Aurora kinase B의 활성 정도가 대조군보다 감소한 경우 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전독성은 미세먼지에 의한 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 방법에서 중심체를 구성하는 딸 중심소체의 수 증가 정도를 추가로 확인하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 딸 중심소체의 수가 대조군에 비해 증가한 경우 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법에서 다핵 형성 정도를 추가로 확인하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 다핵 형성이 대조군에 비해 증가한 경우 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 방법에서 유사분열기 연장 정도를 추가로 확인하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 유사분열기 지속 시간이 대조군보다 증가한 경우 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단하는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 Aurora kinase B의 활성 수준 측정은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정되는 것인, 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

대상체의 생물학적 시료로부터 Aurora kinase B 활성 정도를 확인하여, 대상체의 미세먼지 노출 여부 확인을 위한 정보 제공 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 Aurora kinase B의 활성 정도가 대조군보다 감소한 경우 상기 대상체가 미세먼지에 노출된 것으로 판단하는 것인, 대상체의 미세먼지 노출여부 확인을 위한 정보 제공 방법.

청구항 13

Aurora kinase B 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 Aurora kinase B 단백질 활성 수준 측정 제제는 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 리간드 및 압타머로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 조성물.

청구항 15

제13항의 조성물을 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Aurora kinase B의 활성 수준을 이용하여 미세먼지로 인한 유전독성 측정을 위한 정보제공방법과, 유전독성 측정용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 미세먼지(Particulate Matter, PM)는 화석연료의 사용에서 발생하는 고체 상태의 1차 미세먼지뿐만 아니라, 질소산화물, 황산화물, 휘발성유기화합물 등 가스 상태의 오염물질이 대기 중 산소, 수증기 등과 만나 화학반응을 일으켜 형성되는 2차 미세먼지가 있다. 전자는 직경 10 μm 이하인 미세먼지에 포함되며, 후자는 직경 2.5 μm 이하의 초미세먼지에 속한다. 미세먼지(PM)이 크면 상기도에서 제거되고, 작으면 기침, 객담 등에 의해 제거되나, 2.5 μm 이하인 경우는 깊은 폐포에 도달하여 폐손상을 유발할 뿐만 아니라 폐혈관을 따라 혈액 순환을 통해 전신에 영향을 미쳐 심혈관계, 신경계, 비노생식기계 등에서 많은 질환을 초래할 수 있다.

[0004] 특히 미세먼지는 발암원으로 세계보건기구에서 규정하였기에 미세먼지의 유전성 파악은 발암원성을 파악하기에 용이하다. 종래에 사용하는 유전독성시험법으로는 돌연변이시험(mutation test), 소핵시험(micronucleus test), 코멧시험(Comet assay) 등이 주를 이루었다. 상기 방법은 염색체이상, DNA 절단 등을 관찰하기 위한 방법으로 매우 심각한 염색체 이상 및 DNA 손상이 있어야만 측정이 가능하다. 즉 시험관에서 독성시험시에 독성물질의 농도와 배양 시간 노출을 높여야 하는 단점이 발생하며 그만큼 독성시험의 감도가 낮다고 할 수 있다. 또한, 각기 다른 대기오염 환경에서 포집한 물질에는 각기 다른 화합물의 종류, 크기를 포함한 미세먼지의 집합으로 특정 환경에서 포집한 미세먼지의 유전독성을 측정하기 위하여 실험실적으로 시료의 농도를 적정화시키는 작업을 해야 할 뿐만 아니라 염색체의 구조적 혹은 수적 이상을 관찰하기 위해서 장시간의 배양이 요구되는 등의 한계점이 있다.

[0005] 이에 본 발명자는 Aurora kinase B의 활성 정도를 측정하여 낮은 농도에서도 민감도 높게 미세먼지에 의한 유전독성을 빠르게 예측할 수 있는 유전독성 진단 방법을 개발하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 Aurora kinase B 활성 정도를 확인하여 미세먼지로 인한 유전독성을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 Aurora kinase B 활성 정도를 확인하여 대상체의 미세먼지 노출 여부를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, Aurora kinase B를 포함하는 미세먼지 노출여부 확인용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 해결 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면에 따라, 대상체의 생물학적 시료로부터 Aurora kinase B 단백질의 활성 정도를 확인하여 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.

- [0013] 본 발명의 다른 측면에 따라, 대상체의 생물학적 시료로부터 Aurora kinase B 활성정도를 확인하여, 대상체의 미세먼지 노출 여부 확인을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면에 따라, Aurora kinase B 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 조성물이 제공된다.
- [0015] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따라, 상기 조성물을 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 키트가 제공된다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 대기 중에 존재하는 미세먼지 노출에 의한 염색체 손상을 진단하는 방법을 규명하였으며, 염색체 불안정성을 조절하는 상위 단계의 주요 유사분열 조절 효소의 활성을 빠르게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 높은 감도로 용이하게 독성 평가에 적용할 수 있다.
- [0018] 본 발명을 통하여, 폐암 환자의 생검 시료를 대상으로 조직 형광염색을 시행하여 유사분열 관련 단백질 활성 및 주요 구조물을 검출함으로써, 염색체 불안정성의 결과물인 다핵 생성 정도를 예측함으로써 환자의 예후 평가에 도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.
- [0019] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 UDPs가 폐세포의 생존을 억제하는 것을 확인한 도면이다. 도 1A는 IMR-90 또는 A549 세포를 지시된 시간 동안 다양한 농도의 UDPs로 처리한 것이고, 도 1B는 A549 세포를 상이한 농도의 UDPs로 72시간 동안 처리하여 콜로니 형성을 확인한 것이다.
- 도 2는 UDPs가 세포분열의 억제에 영향을 미치는 것을 확인한 도면이다. 도 2A는 A549 세포를 UDPs로 처리하고 면역형광 염색한 후 S기 단계의 세포의 수를 확인한 결과이고, 도 2B는 A549 세포를 UDPs로 처리하고 면역형광 염색한 후 유사분열 및 후속 세포질분열을 겪는 M기 단계의 세포의 수를 확인한 결과이다.
- 도 3A는 낮은 PM과 높은 PM에 노출된 폐암 환자를 대상으로 분석한 DEG를 히트맵으로 시각화한 것이다.
- 도 3B는 DAVID 유전자 집합 농축 분석을 수행하여 낮은 PM 노출 폐암환자 대비 높은 PM 노출 폐암 환자군에서 유의하게 발현이 낮아진 유전자군을 네트워크로 시각화한 도면이다.
- 도 4A는 M기의 진행 연장 여부를 확인한 도면으로, H2B-RFP를 발현하는 A549 세포를 0.2 mg/mL UDP로 24시간 동안 처리한 후, 형광 현미경으로 48시간 동안 생세포 이미징을 수행한 도면이다.
- 도 4B는 M기(유사분열 및 세포질분열)의 지속시간을 나타낸 것이고, 도 4C는 각 유사분열단계의 지속시간을 나타낸 것이다.
- 도 5A 및 5B는 UDPs의 유사분열 방추 안정화, 딸 중심소체 과증폭 유도 여부에 대하여 면역형광법으로 확인한 도면이다.
- 도 6A는 미세소관 탈중합체에 의한 Aurora kinase B의 활성을 UDPs가 비활성화 시키는지 여부에 대해서 웨스턴 블롯팅에 의해 확인한 도면이고, 도 6B 및 6C는 미세소관 탈중합체가 존재하지 않는 상황에서 A549 세포를 UDPs로 처리한 후 키네토코어 관련 Aurora kinase B-T232p의 형광 강도를 전중기(B) 및 중기(C)에서 Con의 형광 강도로 표준화한 것이다.
- 도 7은 UDPs가 분열 고랑 함입을 지연시키는 것을 나타낸 도면이다. 도 7A는 분열 고랑 함입이 UDP에 의해 영향을 받는지 여부를 결정하기 위해 말기 시작부터 세포질분열 시작까지의 함입 속도를 측정한 결과이고, 도 7B는 양극성 세포질분열 및 단극성 세포질분열 이전에 극성 피질로부터 액틴 제거의 형광강도를 측정하여 정량화한 결과이다. 도 7C는 후기동안 미드존과 적도 피질에서, 도 7D는 말기 동안 중간체에서 Aurora kinase B-T232p의 형광강도를 측정하여 표준화한 결과이다.

도 8은 핵, 세포질, 중심체를 각각 Hoechst, anti- α -tubulin, pericentrin으로 염색하여 다핵 형성을 유발하는 UDPs의 영향을 가시화한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명 명세서 전체에서 "미세먼지"는 인간의 눈에 보이지 않는 아주 작은 물질로 대기 중에 오랫동안 떠다니거나 흩날리는 입자상의 물질로서, 평균 입경 $10\mu\text{m}$ 이하의 물질을 의미한다. 특히 평균 입경이 $2.5\mu\text{m}$ 이하인 입자상의 물질은 "초미세먼지"라고 하는데, 본 명세서에서 "미세먼지"는 "초미세먼지", "입자성물질 (Particulate matter, PM)"도 포함하는 것으로 의미한다. 대기 중 미세먼지는 도시 환경의 대기 오염 악화로 인한 주요 환경 건강 문제 중 하나이다. 미세먼지는 뇌, 심장, 신장 및 폐를 포함한 다양한 내부 장기에 영향을 미치며, 궁극적으로 다양한 신경계, 심혈관계, 대사, 생식기 및 호흡기 질환의 발병으로 이어진다. 특히 세계 보건기구(WHO) 산하 국제암연구소(IARC)는 실외 미세먼지를 인체 발암물질로 분류하고 있다.
- [0024] 본 발명의 용어 "유전독성"은 유전 물질(예를 들어, DNA, RNA)에 손상을 야기하는 물질 또는 과정(즉, 유전독소)의 파괴적 특성을 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 손상, 유전자 돌연변이의 형성 및/또는 유전독소에 대한 노출로부터 직접적으로 또는 간접적으로 생긴 일반 핵산 구조의 파괴는 유전독성의 양태이다. 유전독소에 노출된 대상체는 바로 또는 몇 년 후 질병 또는 장애(예를 들어, 암)를 잠재적으로 발생시킬 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 기술내용은 부분적으로 질병 또는 장애 발생의 위험을 예방하거나 감소시키기 위해 그리고/또는 이의 불리한 효과에 대응하기 위해 대상체에서 유전독성을 야기하는 사건 및/또는 인자(예를 들어, 물질, 과정)를 확인하는 것에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 용어 "Aurora kinase(오로라 키나아제)"는 유사분열의 진행에 관련된 세린/트레오닌 키나아제 부류 중 임의의 것을 지칭한다. 세포 분열에서 일정 역할을 담당하는 다양한 세포 단백질은 Aurora kinase 효소에 의한 인산화를 위한 기질이며, 이들에는, 히스톤(histone) H3, p53, CENP-A, 미오신 II조절경쇄, 단백질 포스파타아제-1, TPX-2, INCENP, 사르비빈(survivin), 토포아이스머라아제 II 알파, 비멘틴, MBD-3, MgcRacGAP, 데스민(Desmin), Ajuba, XIEg5(Xenopus), Ndc10p(발아하고 있는 이스트균), 및 D-TACC(Drosophila)를 들 수 있지만, 이들로 한정되지 않는다. Aurora kinase 효소는 또한, 그 자체, 예를 들면, Aurora kinase A는 Thr288에 있어서, Aurora kinase B는 Thr232에 있어서, 자기 인산화를 위한 기질이다. 특히 명기하지 않는 한, "Aurora kinase"라는 용어는 임의의 종으로 유래한 임의의 Aurora kinase 단백질을 의미하고, 이들에는, Aurora kinase A, Aurora kinase B 및 Aurora kinase C가 존재한다. 본 발명에서 Aurora kinase는 인간 Aurora kinase이다.
- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 대상체의 생물학적 시료로부터 Aurora kinase B 단백질의 활성 정도를 확인하여 미세먼지로 인한 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0029] 이하, 본 발명의 Aurora kinase B 활성 정도를 확인하여 미세먼지로 인한 유전독성 측정을 위한 정보 제공 방법에 대하여 실시예 및 실험예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 실시예 및 실험예와 도면에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명은 대기 오염의 주요물질인 미세먼지의 노출이 Aurora kinase B 와 같은 유사분열 효소의 기능과 유사분열 단계의 진행을 방해하며, 염색체 안정성에 영향을 준다는 근거를 제시한다. Aurora kinase B의 활성 정도는 미세먼지로 인한 대기 유전독성 마커 역할을 할 수 있다. 이러한 결과는 대기오염이 인간의 건강에 미치는 영향을 보다 잘 이해하는데 도움이 될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 정보 제공 방법에서, 상기 Aurora kinase B의 활성 정도가 대조군보다 감소한 경우 대상체가 유전독성을 축적시킬 것으로 판단하는 것이다.
- [0032] 구체적으로 본 발명의 실시예에 따르면, 도시지역에서 채취된 미세입자, 즉 도시먼지입자(urban dust particles, UDPs)를 사용하였다. Aurora kinase B의 단순 발현이 아닌 Aurora kinase B의 활성형인 Aurora B-T232p를 관찰함으로써 활성정도 뿐만 아니라, 면역형광이미지를 통하여 키네토코어, 미드존, 적도피질, 중간체에서의 위치를 관찰하였다. 또한, UDPs 처리시 미세소관과 키네토코어와의 결합이 더욱 안정해지는 것을 확인하였으며, Aurora kinase B 활성 감소에 따라 유사분열기 중 후반부에 있는 분열 고랑 함입도 느려지는 것을 확인

하였다. 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 대상체에 미세먼지 처리시 Aurora kinase B의 활성이 저하된다. 구체적으로, UDPs 처리된 세포는 전중기 및 중기 기간동안 키네토코어에서 Aurora kinase B의 활성화가 더 적게 나타난 것을 확인하였고, 이는 Aurora kinase B의 활성이 낮을 경우, 미세소관이 안정해진다는 것을 나타낸다.

[0033] 대상체에 노출된 미세먼지는 유사분열기를 조절하는 주요 단백질인 Aurora kinase B의 비활성화로 인해 체세포 진행에 교란을 초래하고 이것이 곧 염색체 불안정성을 야기한다. 즉 불안정성을 지닌 체세포는 잘못된 유전체를 포함한 세포로 성장하게 되므로 이는 곧 독성의 지표가 될 수 있다.

[0034] 구체적으로, 상기 대상체에 UDPs 처리한 후 염색체 응축, 정렬, 운동 및 막분리와 같은 각 유사분열 진행단계를 실시간으로 확인한 결과, UDPs가 처리된 세포에서 전중기부터 세포질분열까지 기간이 상당히 연장된 것을 확인할 수 있었다. 이는 미세먼지 처리시 유사분열 진행 교란을 초래하고, 이는 분열하는데 어려움을 겪어 염색체 불안정성을 야기한다는 것을 나타낸 것이다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 중심체를 구성하는 중심소체의 수 증가 정도를 추가로 확인할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 중심체 정체성을 명확하게 확인하기 위해 특정항체를 사용하여 중심체(Centrosome)를 구성하는 모체 중심소체(mother centriole)과 딸 중심소체(daughter centriole)의 무결성을 파악하였으며 딸 중심소체의 개수가 늘어남을 확인하였다. UDPs는 A549 세포에서 다극성 방추체를 유도하지 않지만 각 대칭 이중극에서 다중 딸 중심소체의 형성을 유발하였다. 따라서, 상기 중심소체의 수가 대조군에 비해 증가한 경우 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단하는 것을 특징으로 한다.

[0036] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 정보 제공 방법은 다핵 형성 정도를 추가로 확인하는 것을 포함한다. 구체적으로, 유전자 복제 및 구조의 공간적 및 시간적 동역학의 조절 장애는 충실한 유사분열 분열을 방해하고 다핵 형성으로 이어진다. 비정상적인 유사분열 진행은 유사분열 결함에 취약하며 세포질분열의 실패는 다핵 형성으로 이어진다. 본 발명에서 UDPs로 처리한 세포에서 다핵 세포가 증가함을 확인하였고, 이는 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것이며, UDPs가 염색체 불안정성 야기한다는 것을 시사한다.

[0037] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 정보 제공 방법에서 유사분열기 연장 정도를 추가하는 것을 포함한다. 상기 유사분열기 지속 시간이 대조군보다 증가한 경우 상기 대상체가 유전독성에 노출된 것으로 판단한다.

[0038] 본 발명에서 상기 단백질의 활성 수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서 Aurora kinase B 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상여부 진단용 조성물을 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명에서 상기 Aurora kinase B 단백질 활성 수준 측정 제제는 상기 단백질을 특이적으로 인식하는 항체, 리간드 및 애타머로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하며, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0041] 본 발명의 용어, "단백질의 활성 수준을 측정하는 제제"는 시료에 포함된 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 활성 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미한다. 보다 구체적으로, 상기 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 펩타이드, 또는 애타머를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 제제는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescence activated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 용어 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미한다. 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의

항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함될 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 폐 손상 여부 진단용 조성물을 포함하는 미세먼지 노출에 의한 폐 손상 여부 진단용 키트에 관한 것이다.

[0044] 또한, 본 발명은 폐암 환자의 생검 시료를 대상으로 조직 형광염색을 시행하여 유사분열 관련 단백질 활성 및 주요 구조물 그리고 염색체 불안정성의 결과물인 다핵 생성 정도를 예측함으로써, 환자의 예후 평가에도 활용할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명의 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[0047] 재료 및 방법

[0048] 세포 배양(Cell culture)

[0049] IMR-90 인간 정상 폐 섬유아세포 및 A549 인간 폐 선암 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하였다. IMR-90 및 A549 세포는 각각 Eagle's Minimum Essential Medium(Welgene Inc.; LM007-07) 및 Dulbecco's modified Eagle's medium(LM001-05)에서 배양되었다. 배지에는 10% 소 태아 혈청, 페니실린 G 나트륨(penicillin G sodium, 100 U/ml), 스트렙토마이신 황산염(streptomycin sulfate, 100 µg/ml) 및 암포테리신 B(amphotericin B, 0.25 µg/ml)가 첨가되었으며, 세포는 37° C, 5% CO₂ 유지조건에서 배양되었다. 세포주는 Hoechst 염색을 통해 마이코플라스마(mycoplasma)의 존재에 대해 주기적으로 테스트되었다.

[0051] Urban dust particles(UDPs)

[0052] 도시먼지(Urban dust) NIST® SRM® 1649는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 입자는 증류수에서 현탁하고 사용 전 30분 동안 초음파 처리하였다. 레이저 회절(Laser diffraction)법으로 관찰 시 입자는 0.3~60 µm에 분포되어 있었고, 주사전자현미경(scanning electron microscopy)로 개별 입자를 관찰 시 96% 이상의 입자가 2.5 µm 이하에 해당하였다.

[0054] 세포 생존율 분석

[0055] 세포 성장은 트리판 블루 배제 테스트(trypan blue exclusion test)를 사용하여 평가하였다. 세포들은 다양한 농도의 UDPs로 처리하였다. 지정된 시간 동안 인큐베이션(배양)한 후, 세포를 분리하고, 0.4% 트리판 블루 용액과 혼합하였다. 그런 다음 트리판 블루를 흡수하지 않은 살아있는 세포의 수를 계산하였다.

[0057] 콜로니 생성 분석

[0058] 세포는 72시간 동안 물 또는 UDPs로 처리한 후, 세포들(60mm 접시당 2×10^3 개 세포)을 도말한 후 14일 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 세포를 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS)로 행구고 상온에서 5분 동안 아세트산:메탄올(1:7, vol/vol)로 고정한 다음 염색 용액(25% 메탄올에서 0.5% 크리스탈 바이올렛(crystal violet))으로 염색했다. 콜로니는 3개의 각기 다른 접시에서 계산되었고, 독립적인 실험이 반복적으로 수행되었다.

[0060] 유전자 집합 농축 분석(Gene set enrichment analysis)

[0061] 본 발명은 이전 연구[PMID 3712000]에서 사용된 유전자 발현 데이터를 분석하여, 낮거나 높은 PM에 노출된 폐암 환자들 간에 비교하였다. WHO 대기질 데이터베이스는 PM₁₀ 및/또는 PM_{2.5}의 평균 농도에 대한 연간 보고서를 제공하며 개별 스테이션의 값이 아닌 전체 도시 또는 마을의 평균을 제시하는 것을 목표로 합니다(<https://www.who.int/data/gho/data/themes/air-pollution/who-air-quality-database>). 2023년 5월 15일에

발표된 정보에 따르면 2010년부터 2020년까지 PM₁₀ 및 PM_{2.5}의 전 세계 평균 농도는 각각 약 30 mg/m³ 및 20 mg/m³였습니다. 인도와 중국은 지난 10년 동안 PM₁₀과 PM_{2.5}의 높은 농도를 보고한 고위험 국가입니다(인도: PM₁₀ 99 mg/m³, PM_{2.5} 64 mg/m³; 중국: PM₁₀ 90 mg/m³, PM_{2.5} 43 mg/m³). 덴마크와 핀란드는 낮은 농도를 보고하는 저위험 국가입니다(덴마크: PM₁₀ 19 mg/m³, PM_{2.5} 11 mg/m³; 핀란드: PM₁₀ 12 mg/m³, PM_{2.5} 6 mg/m³).

[0062] 각 국가에서 폐암 환자의 유전자 발현을 수집하기 위해 총 67 건의 사례를 다루는 4 개의 데이터 세트를 사용했다. 이들은 인도의 GSE138682(n=10), 중국의 GSE168466(n=49), 덴마크의 GSE131027(n=4), 핀란드의 GSE144338(n=4)이다. 데이터 세트는 R(버전 4.1.0)의 "oligo" 패키지에서 강력한 다중칩 평균(robust multichip average (RMA) 알고리즘을 사용하여 처리되었다. 배치 효과와 인종간의 차이를 보정하기 위해 "sva" 패키지의 ComBat 알고리즘을 사용하였다. 높은 PM 노출군과 낮은 PM 노출군의 유전자 평균 발현량을 비교하기 위해 T-테스트를 사용하였으며, 차등적으로 발현된 유전자(DEG)는 다음 기준에 따라 얻어졌다(높은 PM 노출과 낮은 PM 노출의 log2 배수 변화(FC) | ≥ 1.5 및 FDR(False Discovery Rate) < 0.05이다.)

[0063] 상향 및 하향 조절된 유전자의 기능을 조사하기 위해, 데이터베이스인 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)에서 유전자 집합 농축 분석 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) 을 수행했다. Enrichment Map 플러그인에 의해 선택된 농축 경로는 Cytoscape(버전 3.8.2)에서 시각화되었다. Jaccard 계수는 2개의 유전자 집합간의 중복을 측정하기 위해 계산되었다. 그런 다음 농축 경로 간의 관계를 연결하기 위해 Jaccard 계수 컷오프 값을 기본값으로 설정하고 농축 네트워크를 구성했다.

[0065] 라이브-세포 이미징(live-cell imaging)

[0066] 세포는 폴리브렌(polybrene, 8 µg/ml)의 존재 하에 히스톤 H2B-RFP를 암호화하는 렌티바이러스에 감염시켰다. 그 후 타임랩스 이미징은 탐 스테이지 인큐베이터 시스템(LCI; TC-W, FC-5N)이 장착된 형광 현미경(Nikon Corporation; ECLIPSE Ti2-E)을 사용하여 수행하였고, 프레임은 2.5분마다 기록되었다. 세포 형태는 미분 간섭 대비 현미경으로 시각화되었으며 히스톤 H2B를 나타내는 적색 형광이 검출되어 염색체 응축 및 이동을 추적했다.

[0068] 면역세포 화학적 형광 염색

[0069] 커버슬립에서 성장한 세포를 실온에서 3% 파라포름알데히드 용액에 10분 동안 고정한 다음 실온에서 0.5% Triton X-100으로 5분 동안 투과시켰다. 세포를 히스톤 H3-S10p (시그마; 06570), Aurora kinase B-T232p (산 타크루즈 바이오테크놀로지; sc-293127), 페리센트린 (Pericentrin, 앱캠; ab28144), α-튜불린 (α-Tubulin, 인비트로젠; PA5-29444, 시그마; T5168), 크레스트(CREST, 이뮤노비전; HCT-0100), 중심체단백질164 (CEP164; 프로테인테크; 22227-1-AP), 또는 센트로빈(Centrobilin, 앱캠; ab70448)항체와 37℃에서 20 분 동안 체외배양한 후, 이차항체와 함께 37℃에서 20분 동안 함께 체외배양하였다. 형광 강도는 임의의 단위(A.U.)로 표현되었으며, 이는 대조군 세포와 비교하여 UDP 처리된 세포에서의 상대적 측정을 나타낸다.

[0070] 5-브로모-2'-데옥시우리딘 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) 염색을 위해, 세포를 30 µM BrdU (시그마; B5002)를 37℃ 5% CO₂ 인큐베이터에서 30분 동안 DNA에 혼입시킨다. 상기와 같이 고정 및 투과 후, DNA를 37℃에서 10분 동안 2N HCl에 침지하여 변성시켰다.

[0071] PBS로 세척한 후, 세포를 항-BrdU 항체 (BD 파밍겐; 555627) 및 상응하는 2차 항체와 함께 배양하였다. 핵은 Hoechst 33342 (인비트로젠; H21492)로 염색되었다. PBS로 최종 세척한 후, 파라-페닐렌디아민 및 글리세롤을 함유하는 퇴색 방지 용액으로 커버슬립을 장착했다. 염색된 세포는 역상형 현미경(Nikon Corporation; 이클립스 Ti2-E)하에 관찰되었다. 세포를 무작위로 선택하고, 계수는 맹검 방식으로 수행하였다.

[0073] 저온 안정 미세소관 분석

[0074] 세포는 프로테아좀 억제제인 20 µM MG132로 중기에서 2시간 동안 정지시켰으며, 이후 배지에서 10분 동안 얼음 상에서 온도를 유지하며 배양되었다. 저온에서 안정한 미세소관은 항-α-튜불린-K40ac 항체(시그마 T7451)를 사

용하여 면역형광염색으로 분석하였다.

[0076] 피질액틴(cortical actin)의 제거 분석

[0077] 세포 액틴을 시각화하기 위해 세포를 메탄올이나 아세톤이 아닌 3% 파라포름알데히드로 고정하여 액틴 구조를 방해하지 않도록 했다. 극 피질로부터의 액틴 제거는 양극성 말기 세포에서 결정되었다. 대체 분석을 위해, 세포들을 단극성(monopole)을 유도하기 위해 세포를 Eg-5 억제제인 50 μ M 모나스트롤(Monastrol)로 처리하였다. 그 후, 세포들은 세포질분열을 유발하기 위해, CDK1 억제제인 30 μ M RO-3306으로 처리되었다. 세포 표면 주위의 피질은 항-b-액틴 항체(셀 시그널링 테크놀로지; 4970)를 이용한 면역형광염색으로 분석하였다. 극부 피질 또는 분열 고랑에서 액틴 마이크로필라멘트의 형광 강도를 측정했다.

[0079] 웨스턴 블롯팅

[0080] 세포를 NETN 용해 완충액(100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0.5% Nonidet P-40, 50 mM b-glycerophosphate, 10 mM NaF, 및 1 mM Na_3VO_4)을 사용하여 프로테아제 억제제인 칵테일 (Millipore;535140)을 첨가된 상태로 얼음 위에서 10분동안 용해되었다.

[0081] 12,000 x g에서 5 분 동안 원심분리한 후, 상등액은 조 세포 추출물로 저장하였고, 이 추출물은 Laemmli 완충액에서 끓여서 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다.

[0082] 웨스턴 블롯팅은 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 웨스턴 블롯팅에는 다음과 같은 항체를 사용하였다: Aurora kinase B-T232p (산타 크루즈 바이오테크놀로지; sc-293127), Aurora kinase B (셀 시그널링 테크놀로지; 3094), BubR1 (BD 바이오사이언시스; 612503), PLK1 (산타 크루즈 바이오테크놀로지; sc-55504), PLK1-T210p (엠펙, ab39068) GAPDH (산타 크루즈 바이오테크놀로지; sc-25778). BubR1-S670p 항체는 비상업적인 것이다.

[0084] 데이터 및 통계분석

[0085] 모든 실험은 3회 이상 반복하였다. 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 (IBM; 버전 28)를 사용하여 수행하였다. 두 그룹 간의 차이는 unpaired t-테스트(모수 분석) 또는 Mann-Whitney U 테스트 (비모수 분석)를 사용하여 평가되었다. 3개 이상의 그룹 간의 차이는 분산 분석(ANOVA)에 이어 Tukey의 정직한 유의 차이(HSD)(모수 분석)을 사용하거나, Kruskal-Wallis의 테스트에 이어 Dunn의 다중 비교 테스트(비모수 분석)를 사용하여 평가되었다. 사후 테스트는 F-테스트가 $P < 0.05$ 를 달성하고 유의한 비균질성이 없는 경우에만 실행되었다. 통계적 차이는 $P < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주되었으며 별표(*)로 표시된다.

[0087] 실험예 1. 도시 먼지 입자(UDPs)의 폐세포 생존 억제 여부 확인

[0088] UDPs에 대한 단기 및 장기 노출 후 IMR-90 인간 정상 폐 섬유아세포 및 A549 인간 폐 선암 세포의 증식을 조사했다. 입자들은 플라즈마 막(원형질막)에 부착되었지만 세포 내부로도 흡수되었다. UDPs 처리된 세포는 시간에 따라(24시간에서 120시간) 대조군 세포보다 더 느리게 성장했다. 또한, 성장속도는 UDPs 농도에 따라 감소하였다(도 1A 참고). IMR-90 정상 세포는 콜로니를 쉽게 형성하지 않기 때문에 UDPs의 장기적인 영향을 조사하기 위해, A549 세포만을 대상으로 콜로니 형성 분석을 진행하였다. UDPs에 72시간 동안 노출된 세포는 14일 동안 콜로니를 형성할 수 있었고, UDPs 처리된 세포에 의한 콜로니 형성은 대조군 세포에 의한 콜로니 형성보다 현저히 낮았다. 이러한 콜로니 형성의 감소는 UDPs의 농도에 의존적이었다(도 1B 참고). 상기 결과는 UDPs에 대한 급성 노출이 세포 성장에 불가역한 결함을 유발한다는 것을 나타낸다.

[0090] 실험예 2. UDPs 변화가 세포 주기 변화에 미치는 영향 확인

[0091] 본 발명에서는 UDPs가 세포 사멸 유발 및 증식 억제 여부에 관하여 확인하였다. 그러나 현미경으로 Hoechst 염색된 세포에서 세포 사멸 또는 파열된 세포체를 발견하지 못했기 때문에 UDPs 처리된 세포의 증식 결함이 세포 사멸로 인한 것이 아님을 발견하였다.

[0092] 그 다음으로, 세포주기 중단으로 인해 세포증식이 느리게 되는지 확인하였다. 세포주기 단계는 일반적으로 유세포 분석(flow cytometry)에 의해 측정되지만, 입자들의 플라즈마 막 부착으로 인해 유세포 분석 데이터의 잘못된 해석을 피하기 위해, 면역세포화학을 통해 S기 및 M기의 세포 집단을 측정하였다. 본 발명에서는 생존 세포의 운명을 모니터링하기 위해 0.2 mg/mL(치사량 아닌 농도)의 UDPs를 테스트 농도로 선택했다. S기 세포는 DNA 복제 동안 BrdU를 포함한 세포로 확인되었다. UDPs로 처리된 세포 집단은 대조군 세포 집단보다 현저히 더 적은 수의 BrdU-양성 세포를 포함하였다(도 2A 참고).

[0093] 유사분열 및 후속 세포분열을 겪는 M기 세포의 수를 계산하기 위해 유사분열을 위한 마커로 잘 알려진 히스톤 H3-S10p를 사용하지 않고, 염색체 응축, 정렬 및 유사분열 방추체의 검사에 의해 확인되었다. UDPs 처리된 집단에서 M기 단계 (전기부터 세포질분열)를 겪는 세포의 수는 대조군 집단보다 낮았다(도 2B 참고). 이러한 결과는 UDPs 처리된 세포가 활발하게 증식하지 않는다는 것을 의미한다. 또한, 이러한 데이터는 도 1A 및 1B에 제시된 증식 감소와 일치한다. 이러한 결과는 UDPs가 세포 분열을 억제한다는 것을 보여준다.

[0095] 실험예 3. 억제된 유전자 세트 클러스터에 세포주기와 세포분열과 관련된 기능 포함 여부 확인

[0096] 본 발명에서는 높은 PM 또는 낮은 PM에 노출된 폐암 환자들을 대상으로 DEG(Differentially Expressed Genes) 분석을 수행하였다. 결과적으로, 높은 PM에 노출된 그룹과 낮은 PM에 노출된 그룹 간에는 각각 2411개의 억제된 유전자와 1017개의 상승된 유전자가 확인되었다. DEG는 열지도(heat map)로 시각화 하였다(도 3A 참고). 세포주기 또는 세포분열과 관련된 유전자들이 억제되거나 상승되었는지 조사하기 위해 DAVID 유전자 집합 농축 분석을 수행하였고, 상위 20개의 유의미하게 억제된 농축된 경로를 선택하고, 이를 네트워크로 시각화했다(도 3B 참고).

[0097] 세포주기와 세포분열을 포함한 유사분열 관련 기능들이 상당히 풍부하게 나타났다. 또한, 양쪽의 자매 염색분체가 연결된 영역인 중심체 역시 풍부하게 나타났다. 상위 20개의 하향조절된 유전자 세트와 함께 키네토코어, 미세소관 기반 운동 및 키네신 복합체와 같은 유사분열 구조 및 기능과 관련된 유전자 세트도 상당히 억제되었다(표 1). 이는 유사분열 및 유사분열 구조 관련 유전자가 높은 PM 노출군에서 억제된다는 것을 나타낸다.

표 1

[0098]

Functional group	P value	Number of genes
Cell cycle	1.28×10^{-23}	179
Cell division	3.00×10^{-21}	112
Mitosis	1.24×10^{-18}	93
Centromere	9.37×10^{-11}	46
Kinetochores	4.63×10^{-9}	36
Microtubule-based movement	8.55×10^{-4}	22
Kinesin complex	3.28×10^{-3}	13

[0099] 반대로, 상위 20개의 상당히 상승된 경로도 분석했다. 그러나 세포분열 또는 세포주기와 관련된 유전자는 풍부하지 않았다. 전반적으로 PM은 유전자 발현을 교란하며, 특히 유사분열은 높은 PM 농도 노출 폐암 환자에서 방해받을 수 있다는 것을 확인하였다.

[0101] 실험예 4. UDPs 처리에 따른 유사분열 진행 방해 여부 확인

[0102] PM은 유사분열과 관련된 유전자 세트의 발현을 억제하므로(표 1 참고), 염색체 응축, 정렬, 운동 및 막 분리와 같은 각 유사분열 단계의 기간을 확인하였다(도 4A 참고).

[0103] 그 결과, UDPs 처리된 세포의 대부분은 핵분열 및 세포질 분열을 통해 두개의 딸세포를 생성하였다. 그러나 UDPs 처리된 세포에서는 전중기부터 세포질분열까지의 총 기간이 상당히 길었다(도 4B 참고). 특히 전중기, 중

기, 후기, 말기 및 세포질분열의 기간이 상당히 연장되었다(도 4C 참고). 즉, 초기 유사분열에서 후기 유사분열의 전환 및 세포분열 다음 G1단계로의 전환이 지연되었다. 도 2에서 나타난 세포 증식 결함은 유사분열 진행방해와 관련이 있다. 전반적으로 이러한 데이터는 UDPs 처리된 세포가 분열하는데 어려움을 겪는다는 것을 시사한다.

[0105] **실험예 5. UDPs의 중심소체 무결성 및 미세소관의 안정성 조절 불가 확인**

[0106] 유사분열 방추체 및 중심체와 같은 주요한 유사분열 구조는 유사분열 진행을 조정한다. 먼저, 중기 기간이 길어진 것은 중기에서 후기로의 전환이 지연된 것을 의미한다. 전중기 동안 중심체로부터 돌출된 미세소관은 키네토코어를 검색하고 포획하는 반면, 운동 단백질을 통해 염색체에서 나오는 미세소관은 중심체-핵 배열로 포획된다.

[0107] 그런 다음, 키네토코어에 부착된 미세소관은 중기 동안 자매 염색분체를 끌어당기기 전에 안정화된다. 냉충격은 비-키네토코어 미세관(예: 자유, 극성 및 아스트랄 미세소관)을 선택적으로 분해하고, 염색체의 키네토코어에 부착된 키네토코어 미세소관을 일시적으로 탈중합시킨다. 아세틸화된 미세소관은 비아세틸화된 형태보다 안정적이고 오래 지속되는 것으로 간주된다. 저온에 안정한 미세소관을 나타내는 α -튜불린-K40ac 수준은 대조군 세포보다 UDPs 처리된 세포에서 더 높았다(도 5A 참고). 즉, 키네토코어 부착 미세소관 점유는 UDPs 처리된 세포에서 중기 플레이트를 따라 염색체를 강하게 잡으며, 이는 과안정화된 미세소관이 후기동안 염색체를 분리하기 전에 탈중합 되는데 오랜 시간이 걸리므로 중기에서 후기로의 전환이 연장된다는 것을 시사한다(도 4 참고). 다음으로, UDPs 처리된 세포에서의 중심체의 무결성을 검사하였다. 미세소관 구성 센터인 중심체는 직각으로 배열된 모체 중심소체와 딸 중심소체를 포함한다. UDPs 처리된 세포에서 딸 중심소체가 과증폭되었고 이는 염색체의 불안정성의 축적을 유발한다.

[0108] 따라서, 여분의 중심소체가 모체 중심소체에서 유래했는지 또는 딸 중심소체에서 유래했는지 여부를 확인하기 위해 성숙한 모체 중심체의 원위 부속 단백질인 CEP164와 딸 중심소체의 중심체 주위 벽에 존재하는 단백질인 센트로빈(centrobin)에 대해 세포를 염색했다. UDPs 처리된 세포에서 딸 중심소체의 수는 대조군 세포에서 더 높았다(도 5B 참고). 따라서, UDPs는 미세소관 조직센터 및 미세소관 역학의 기능 장애를 초래한다.

[0110] **실험예 6. UDPs의 방추사 조립 체크포인트(spindle assembly checkpoint, SAC) 비활성화 확인**

[0111] 상기 실험예 5는 UDPs가 후기 진행에 장벽임을 증명한다. SAC는 키네토코어-미세소관(KT-MT) 부착에 대한 실패를 교정하며, 후기의 시작은 SAC의 해제와 동시에 발생한다. 상기 오류를 수정하려면 키네토코어와 미세소관 사이의 장력을 감지하는데 Aurora kinase B-의존적인 감지가 필요하다. Aurora kinase B 활성의 손실로 인해 잘못된 미세소관을 불안정시키지 못한다.

[0112] UDPs로 처리된 세포에서 Aurora kinase B의 활성을 측정하기 위해 미세소관을 탈중합하고 KT-MT 부착물의 손실을 유도하는 노코다졸(nocodazole)을 처리하여 전중기에서 세포를 정지시켰다. Aurora kinase B 활성은 자가인산화된 Aurora kinase B-T232의 수준을 측정하여 결정되었다. UDPs와의 병용 처리는 Aurora kinase B의 활성을 감소시켰다(도 6A 참고). 대조적으로, 주로 Aurora kinase A 효소에 의해 인산화되는 PLK1-T210의 수준은 UDPs 병용 처리시 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다. 또한 Mps1(TTK라고도 함)에 의해 촉매되는 BubR1의 인산화 수준은 노코다졸 처리된 세포에서 증가했지만 UDPs 병용 처리된 세포에서는 감소하지 않았다(도 6A 참고). 이는 UDPs가 특이적으로 Aurora kinase B를 비활성화함을 나타낸다.

[0113] 다음으로 외인성 유사분열 스트레스가 없는 상태에서 Aurora kinase B의 활성을 조사했다. 키네토코어를 시각화하기 위해 CREST 증후군 환자의 혈청에서 유래한 항중심체 자가항체인 CREST를 사용하였다. UDPs로 처리된 세포는 전중기(도 6B) 및 중기(도 6C)에서 키네토코어에서 Aurora kinase B의 활성화가 더 적은 것으로 나타났다. 이는 Aurora kinase B의 활성이 낮을 경우, 미세소관의 탈중합화 활성이 억제된다는 것을 나타낸다. 전반적으로, 데이터는 Aurora kinase B의 조기 비활성화가 KT-MT 부착물의 수정 손실과 함께 SAC 활성의 실패로 이어진다는 것을 보여준다.

[0115] **실험예 7. UDPs의 분열 고랑 함입 결함 발생 여부 확인**

[0116] UDPs 처리된 세포는 SAC의 온-오프 전환 실패로 인해 후기의 개시가 지연되었지만(도 4C 및 도 6 참고), 세포는 결국 후기 유사분열 단계(후기, 말기 및 세포질분열)에 도달하였다. 다음으로 UDPs가 염색체 분리, 분열 고랑 함입 및 이탈을 포함하는 후기 유사분열의 진행에 미치는 영향을 조사했다. 염색체는 후기 동안 양극을 향해 분리된다. 그런 다음 적도 피질 주변의 필라멘트 액틴과 미오신 II로 구성된 수축성 고리가 후기 말기 동안 성숙되고 초기 말기 동안 수축된다. 이것은 분열 고랑을 형성한다. 후기 말기에 수축 고리가 두 딸 세포를 조일 때 세포 간 다리가 생성된다. 그런 다음 중간체의 측면을 절단하여 세포질 분열을 종료한다. 상기에서 UDPs로 처리된 세포가 말기에서 세포질분열로, 그리고 세포질분열에서 다음 G1기로 지연된 진행을 겪었음을 보여주었다(도 4C 참고). 분열 고랑 함입이 UDPs에 의해 영향을 받는지 여부를 확인하기 위해 말기 시작부터 세포질분열 시작까지 함입 속도를 측정했다. UDPs 처리된 세포는 대조군 세포보다 더 느린 함입 속도를 보였다(도 7A 참고).

[0117] 다음으로 함입 지연의 원인을 조사했다. 가장 보편적인 액틴 이소형 중 하나인 b-액틴은 대조군 세포에서 초기 말기 동안 반대편 극 피질에서 정상적으로 제거되었다. 대조적으로, UDP 처리된 세포에서 b-액틴은 극피질에 남아 있었다(도 7B). 극피질의 b-액틴 대 분열 고랑의 b-액틴의 상대적 비율도 UDPs 처리된 세포에서 대조 세포보다 높았으며, 이는 UDPs 처리 후 극피질의 이완에 결함이 있음을 나타낸다. 대안적인 접근법으로, 유사분열을 단극성 방추체로 남겨두도록 하기 위해 R0-3306(CDK1 억제제)을 모나스트롤(monastrol; Eg-5 억제제) 처리된 세포에 첨가하였다. 이 경우 단극성 세포질 분열을 유도했지만 기능적 중간 영역이 결여되었다. 대조군 세포는 DNA에 가까운 피질에서 b-액틴 제거를 보인 반면, UDP 처리 세포는 b-액틴 제거에 실패했다(도 7B 참고). 이 결과는 Aurora kinase B가 극피질 액틴의 제거에 필요함을 보여준다. Aurora kinase B의 위치 및 활성이 분열 고랑 함입 및 세포질분열의 완료에 중요함을 확인하기 위해, 후기 동안 적도 피질과 방추 미드존에서, 그리고 말기 동안 중간체에서 Aurora kinase B의 위치와 활동을 조사하였다. 도 7C 및 7D를 살펴보면 Aurora kinase B-T232p의 수준은 대조군 세포보다 UDP 처리된 세포에서 더 낮았다. 전반적으로, 말기에서 세포질분열로의 진행 지연은 분열 고랑에서의 느린 함입으로 인한 것으로 보이며, 아마도 Aurora kinase B의 잘못된 위치와 낮은 활성에 의한 것으로 보인다.

[0119] 실험예 8. UDPs의 염색체 불안정성의 축적 유발 확인

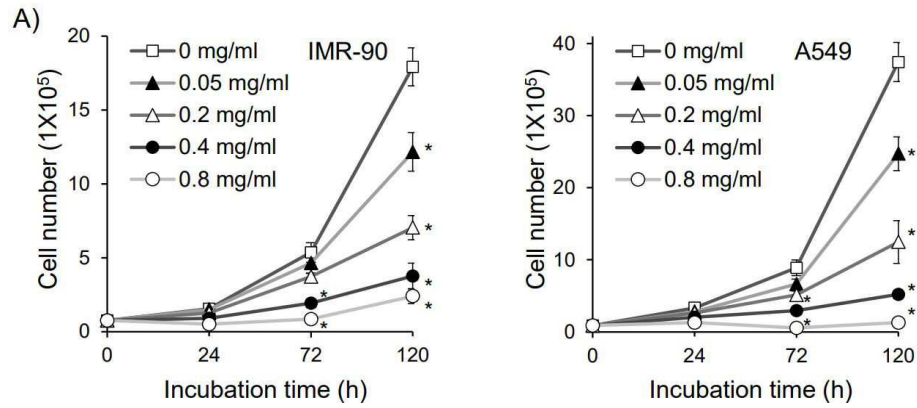
[0120] SAC 기능 및 분열 고랑 함입에 대한 장애물은 세포질 분열의 결함을 유발하고 세포질분열의 실패는 다핵형성 형성을 유발한다. UDPs 처리된 세포에서 24시간 또는 48시간 후에 다핵 세포의 수를 확인하였으나 다핵세포 수가 크게 증가하지 않았음을 발견했다(도 8 참고). 72시간 후에는 다핵 UDPs 처리된 세포가 많았지만, 예상만큼 배수 증가는 높지 않았다. 이는 유사분열 진행이 느리지만 세포가 마침내 세포질 분열을 겪는다는 것을 의미한다. 그러나 120시간 후에는 다핵세포 수가 유의하게 증가하였다. 결론적으로, 데이터는 UDPs가 세포를 염색체 불안정의 축적에 취약하게 만든다는 것을 나타낸다.

[0122] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

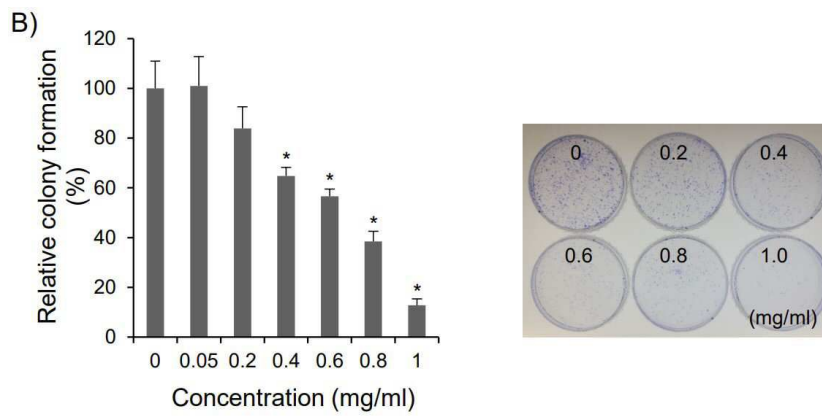
[0123] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

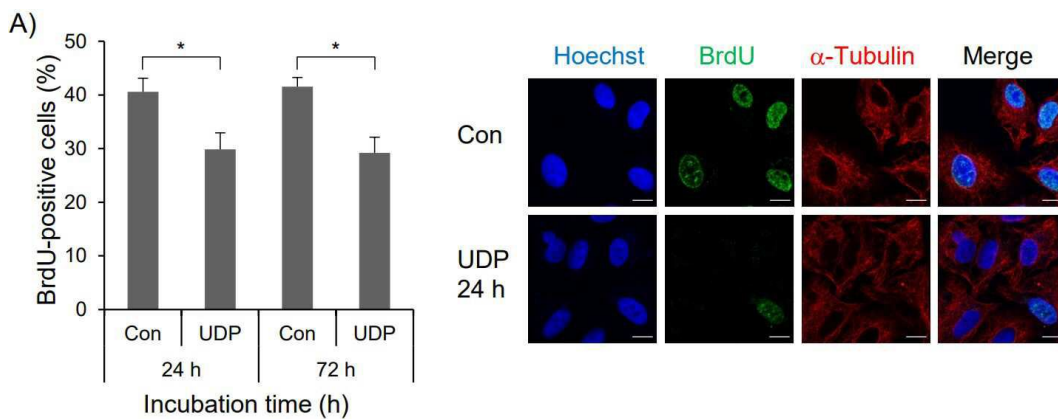
도면1a



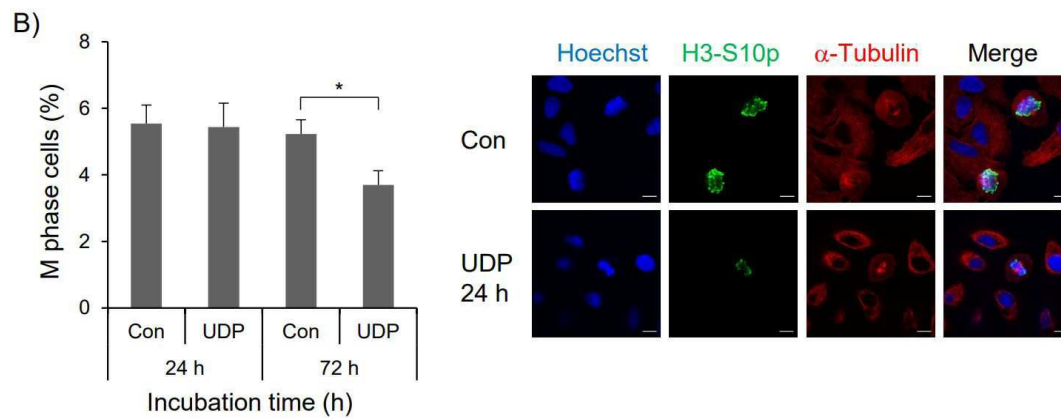
도면1b



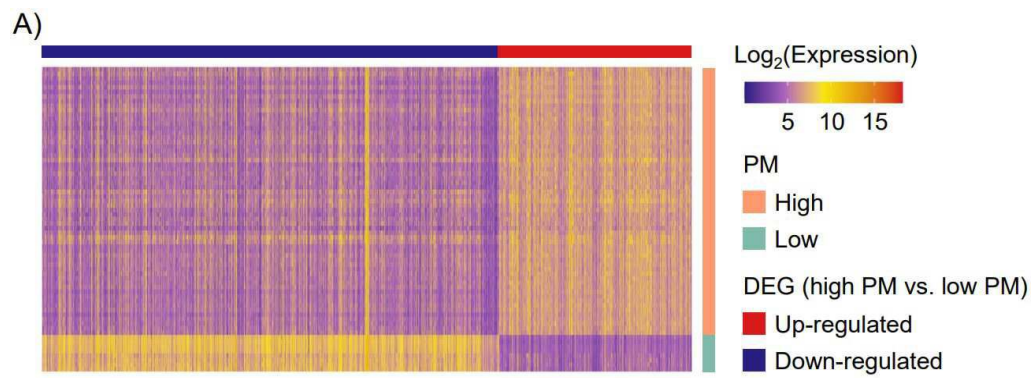
도면2a



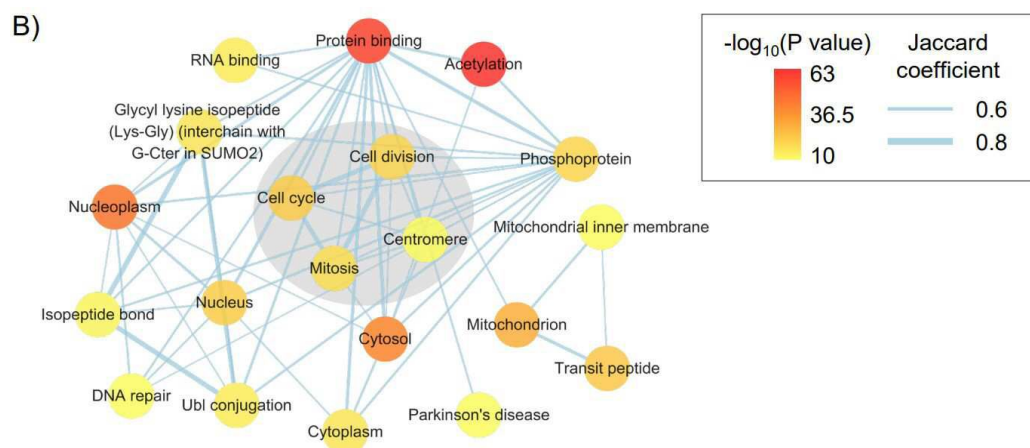
도면2b



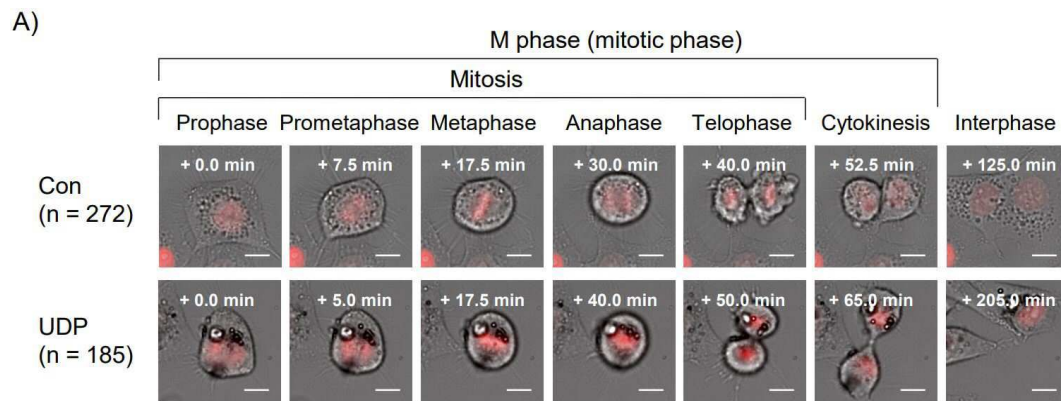
도면3a



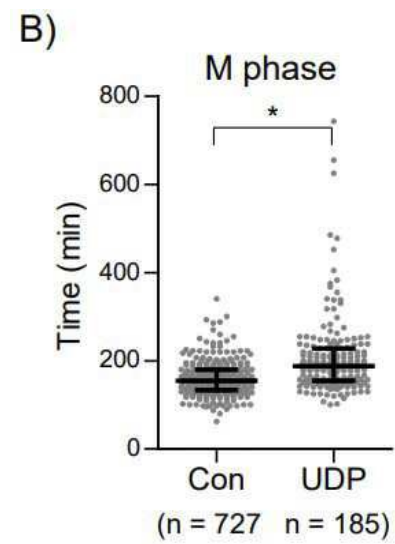
도면3b



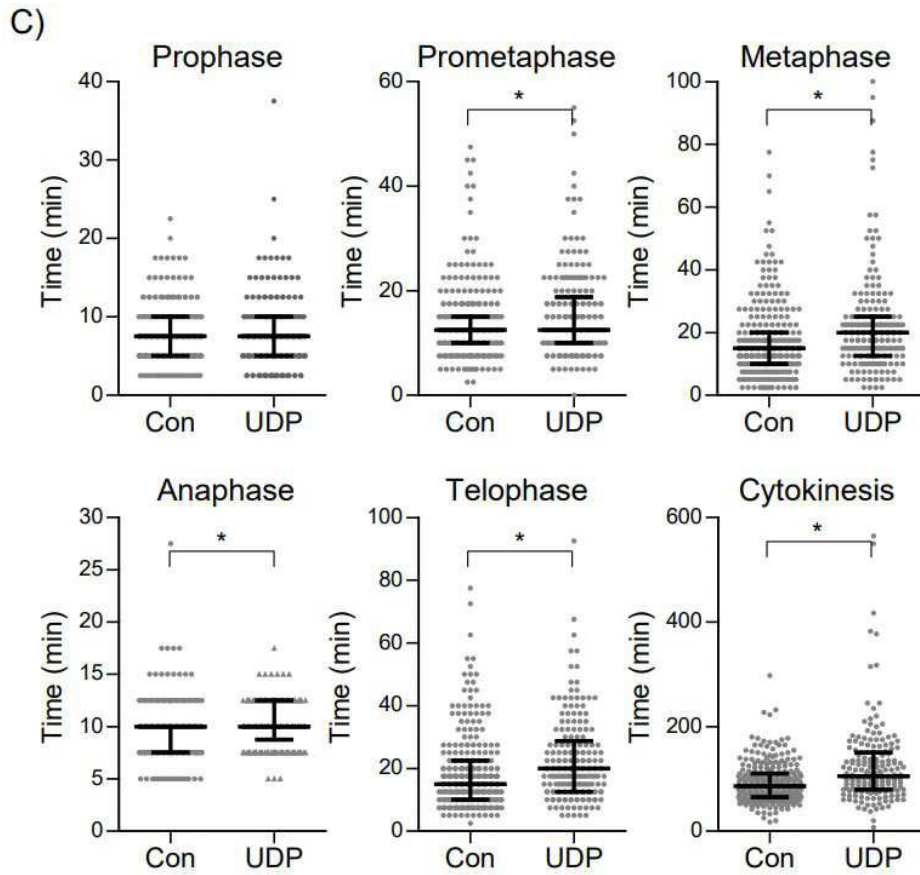
도면4a



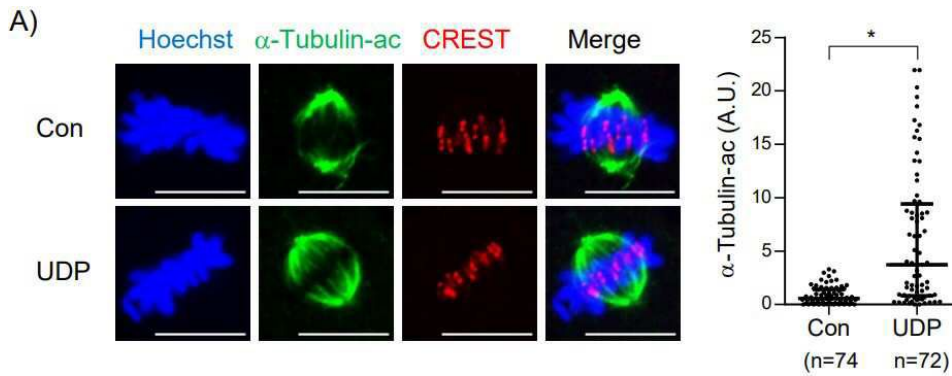
도면4b



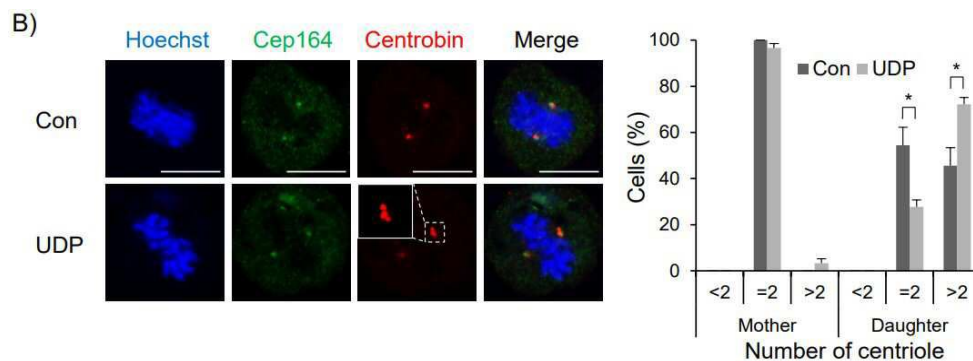
도면4c



도면5a

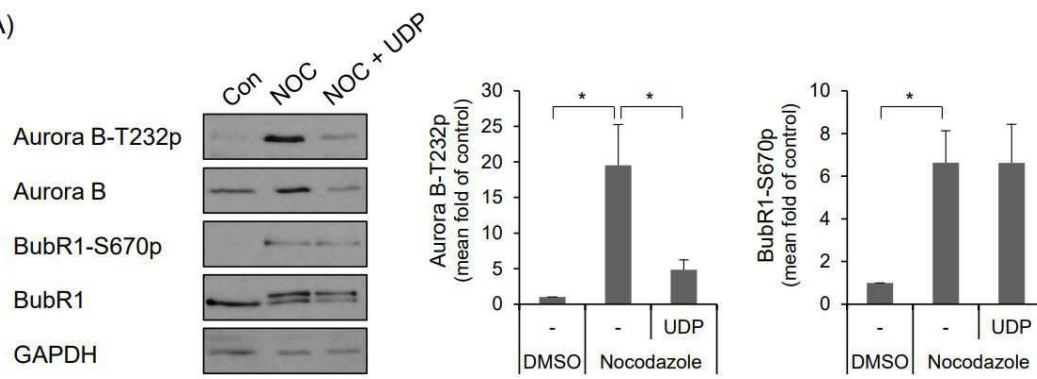


도면5b



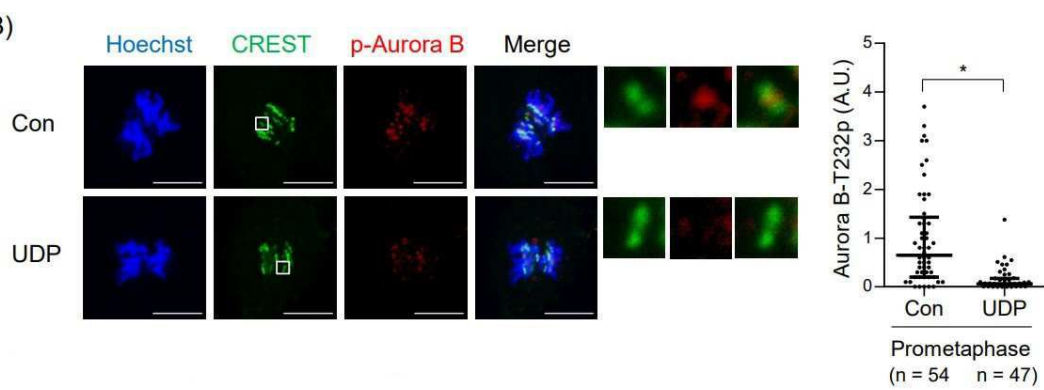
도면6a

A)



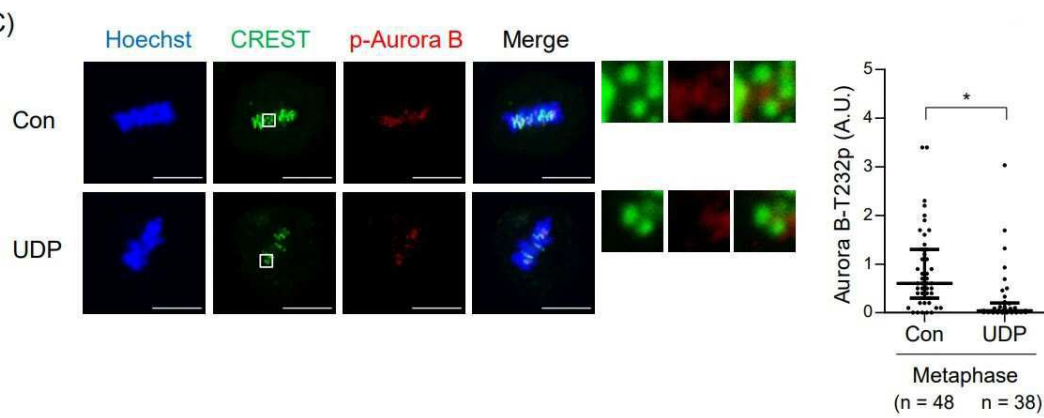
도면6b

B)

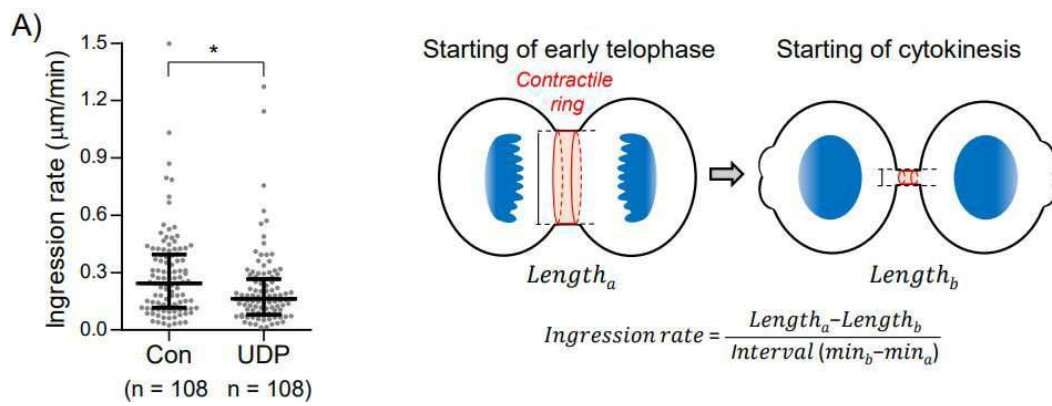


도면6c

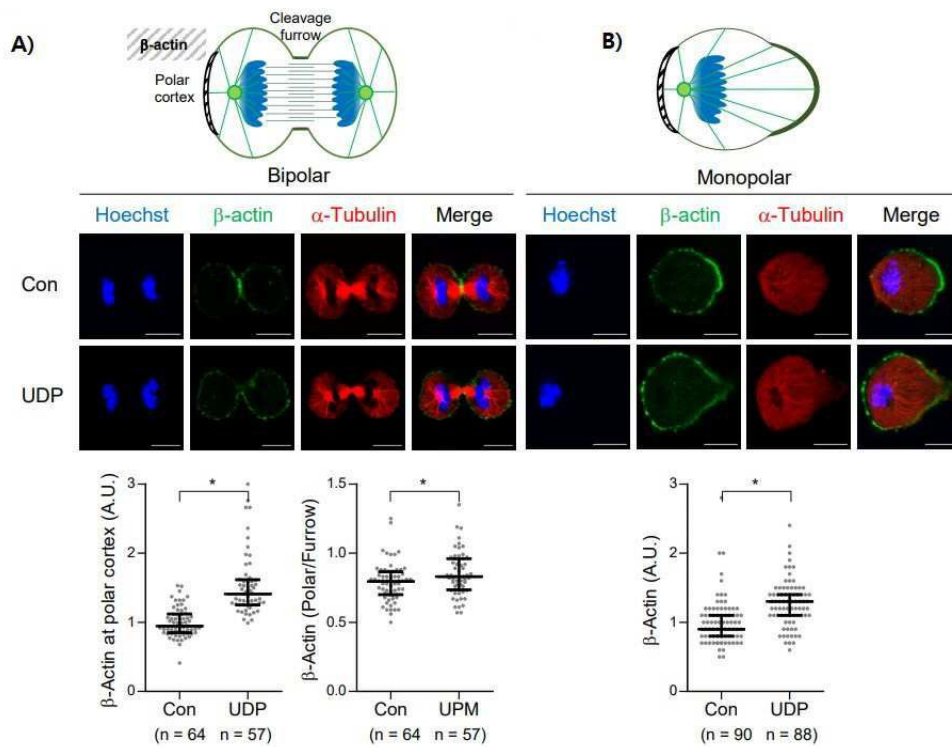
C)



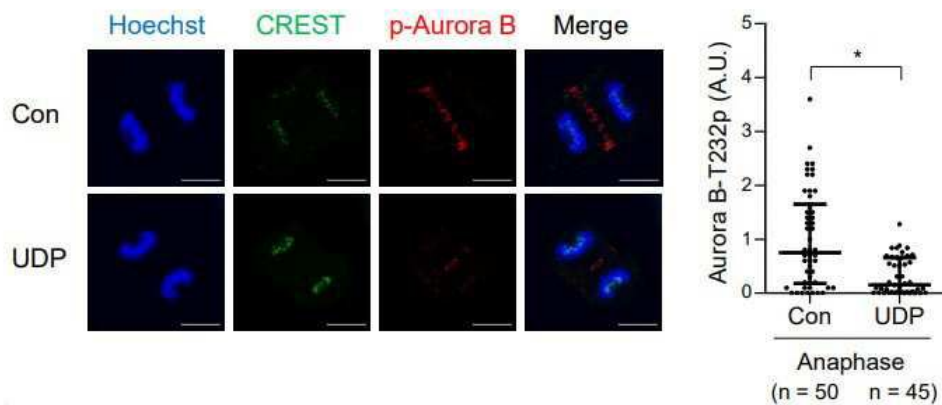
도면7a



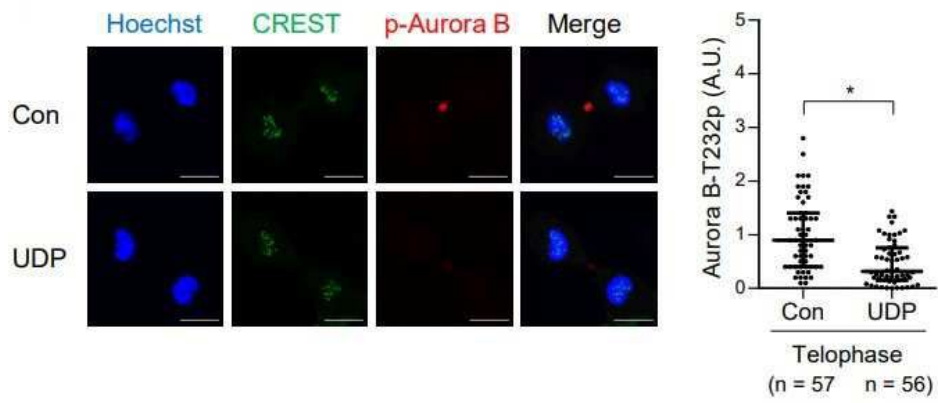
도면7b



도면7c



도면7d



도면8

