



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0041401
(43) 공개일자 2024년04월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0120104
(22) 출원일자 2022년09월22일
심사청구일자 2022년09월22일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
최지하
서울특별시 강서구 강서로 348, 110동 1701호(내발산동, 우장산힐스테이트)
김보민
서울특별시 영등포구 당산로45길 9-3, 101동 1410호(당산동5가)
송효숙
서울특별시 종로구 평창10길 5(평창동)
(74) 대리인
리엔목특허법인

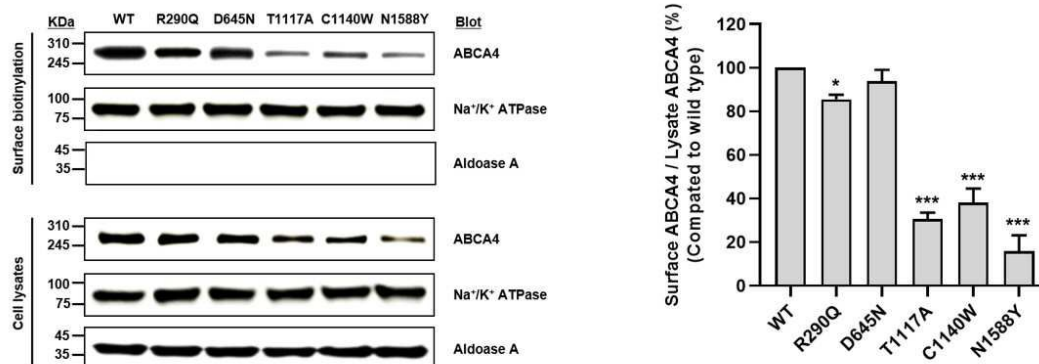
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 ABCA4 돌연변이 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명의 돌연변이는 ABCA4 돌연변이 및 이의 용도에 관한 것으로서, ABCA4에 특정 돌연변이가 발생하는 경우, ABCA4의 발현 수준이 저하되는 것을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 스타가르트병과 관련이 있는 것으로 알려진 ABCA4 발현 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170342
과제번호	2020R1A5A2019210
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	염증-암 미세환경 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345271161
과제번호	2015R1D1A1A01056652
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)
연구과제명	망막 이영양증과 관련된 기능성 ABCA4 유전자 변이 발굴 및 기전 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 조성물로서,

상기 ABCA4의 단백질 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 ABCA4 발현 저하는 프로테아좀(Proteasome) 또는 리소좀(lysosome)에 의한 것인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 ABCA4 발현 저하는 원형질막(plasma membrane) 또는 세포내 위치(subcellular localization)에서 일어나는 것인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 유전자 돌연변이를 검출하는 제제는 ABCA4 유전자 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍, 또는 프로브를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 ABCA4 단백질 돌연변이를 검출하는 제제는 ABCA4 단백질 돌연변이에 특이적으로 결합하는 올리고펩티드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA (Peptide nucleic acid) 또는 애포타머(aptamer)를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 ABCA4 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 ABCA4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 R290Q 돌연변이는 서열번호 3의 아미노산 서열;

상기 T1117A 돌연변이는 서열번호 4의 아미노산 서열;

상기 C1140W 돌연변이는 서열번호 5의 아미노산 서열; 또는

상기 N1588Y 돌연변이는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 9

청구항 1항 내지 청구항 8항 중, 어느 한 항의 조성물을 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 키트.

청구항 10

피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA 또는 단백질을 추출하는 단계; 및

상기 추출된 DNA 또는 단백질로부터, ABCA4의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인 방법으로서,

상기 ABCA4의 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 방법.

청구항 11

ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, 스타가르트병 진단용 조성물로서,

상기 ABCA4의 단백질 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ABCA4(ATP-binding cassette sub-family A member 4) 수송체(Rim protein 또는 ABCR로 알려짐)는 ABC 수송체에 해당한다. ABCA4 수송체는 2,273개의 아미노산으로 구성되어 있으며 망막에 있는 광수용체의 디스크 바깥쪽 막에서 발현됩니다. 유출 펌프(efflux pumps)로 기능하는 많은 ABC 수송체와 달리 ABCA4 수송기는 독특하게도, 수입 펌프(import pump)로 작용한다. 또한, ABCA4는 ATR(all-trans-retinal) 또는 N-PE(N-retinylidene-phosphatidylethanolamine)를 관강 측(luminal side)에서 세포질 측면(cytoplasmic side)로 수송한다. ABCA4 수송체의 기능적 결핍은 망막 색소上皮(RPE) 세포의 바깥 부분에 ATR 또는 N-PE의 축적을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 이러한 ABCA4의 유전적 변이는 스타가르트병, 색소성 망막염, 연령 관련 황반 변성 및 원추간상체 이영양증 등을 비롯한 다양한 형태의 망막 이영양증과 관련이 있는 것으로 알려져 있으나(photoreceptor cell-specific

ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy; Nat Genet. 17, 122 참조), ABCA4 수송체의 임상적 중요성에도 불구하고, 각 변이체의 기능을 조사한 연구는 거의 수행되지 않은 실정이다.

[0004] 따라서, 이 연구에서는 한국 스타가르트병 환자에서 발견되는 ABCA4 돌연변이의 효과와 이의 구체적인 메커니즘을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 또 다른 양상은 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA 또는 단백질을 추출하는 단계; 및 상기 추출된 DNA 또는 단백질로부터, ABCA4의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, 스타가르트병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은 ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 조성물로서, 상기 ABCA4의 단백질 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 ABCA4 발현 저하는 프로테아좀(Proteasome) 또는 리소좀(lysosome)에 의한 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 프로테아좀 또는 리소좀의 단백질 분해 기전에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 발현 저하는 발현 수준의 측정에 의해 확인될 수 있으며, 특정 단백질(펩타이드) 또는 이의 단편, 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것을 의미한다. 상기 단백질 또는 이의 단편의 발현 수준은 상기 단백질 또는 이의 단편의 상대적 양 또는 절대적인 양일 수 있다.

[0013] 상기 ABCA4 발현 저하는 원형질막(plasma membrane) 또는 세포내 위치(subcellular localization)에서 일어나는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명에서 “원형질막(plasma membrane)”은 외부환경으로부터 세포의 내부를 분리 및 보호하는 생물학적막으로서, 원형질 표면을 덮는 얇은 막형태이다. 또한, 세포막은 두 개의 인지질 층으로 구성된 지질 이중층으로 구성되며, 그 사이에 콜레스테롤(지질 성분)이 산재되어 적절한 막 유동성을 유지할 수 있다. 세포막은 수송체 역할을 하는 단백질을 포함 하는 막 단백질 과 세포막의 외부(말초)면에 느슨하게 부착되어 세포 환경과의 상호작용을 촉진하는 말초 단백질을 포함한다.

[0015] 개체의 시료에서 ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자의 돌연변이는 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질의 발현 여부를 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0016] 본 발명에서 “유전자 검출”이란 개체 시료에서 ABCA4 돌연변이 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RTPCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다

[0017] 상기 유전자 돌연변이를 검출하는 제제는 ABCA4 유전자 돌연변이에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레

오티드, 프라이머 쌍, 또는 프로브를 포함하는 것일 수 있다.

- [0019] 본 명세서에서 용어, "프라이머(primer)"는 자유 3'-말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 특정 염기 서열에 대해 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 바이오마커를 암호화하는 유전자의 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량을 측정할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 용어, "프로브(probe)"란 표적 핵산 예를 들면, mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 mRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 라벨링 (labeling)되어 있을 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들면 본 발명의 바이오마커를 암호화하는 유전자의 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 또는 바이오틴을 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 ABCA4 단백질 돌연변이를 검출하는 제제는 ABCA4 단백질 돌연변이 에 특이적으로 결합하는 올리고펩티드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA (Peptide nucleic acid) 또는 앵타머 (aptamer)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0023] 상기 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 앵타머 (aptamer)일 수 있다. 용어 "항체(antibody)"는 용어 "면역글로불린(immunoglobulin)"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 항체는 폴리 클론 항체 또는 모노클론 항체일 수 있다. 상기 항체는 전장 항체일 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 항원 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 말한다. 상기 항원 결합 단편은 단일-도메인 항체(single-domain antibody), Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv일 수 있다. 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 고체 지지체에 부착된 것일 수 있다. 상기 고체 지지체는 예를 들어, 금속 칩, 플레이트, 또는 웰(well)의 표면이다. 상기 앵타머는 상기 단백질 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 단일 가닥의 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이나 펩티드일 수 있다.
- [0024] 상기 제제는 상기 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 동일하거나 또는 이에 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다. 상기 핵산은 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 프라이머, 프로브, 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 그의 말단 또는 내부에 형광 물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 또는 방사성 동위원소 등으로 표지된 것일 수 있다.
- [0025] 상기 ABCA4 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, ABCA4 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 상기 ABCA4의 단백질 돌연변이인 상기 R290Q 돌연변이는 서열번호 3의 아미노산 서열, 상기 T1117A 돌연

변이는 서열번호 4의 아미노산 서열, 상기 C1140W 돌연변이는 서열번호 5의 아미노산 서열, 및 상기 N1588Y 돌연변이는 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 다른 양상은 상기 조성물을 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인용 키트를 제공한다.

[0028] 상기 키트는 고체 지지체, 항체 또는 항원 결합 단편의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적합한 완충용액, 발색 효소, 형광물질로 표지된 2 차 항체, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다. 상기 키트는 핵산 검출을 위하여, 중합 효소, 완충제, 핵산, 조효소, 형광물질, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 중합 효소는 예를 들어 Taq 중합효소이다.

[0029] 또 다른 양상은 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA 또는 단백질을 추출하는 단계; 및 상기 추출된 DNA 또는 단백질로부터, ABCA4의 돌연변이를 확인하는 단계를 포함하는, ABCA4 발현 저하 확인 방법으로서, 상기 ABCA4의 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 방법을 제공한다.

[0030] 본 명세서에서 용어, "피검체(개체)"는 스타가르트병이 발병되거나 발병될 가능성이 있는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다.

[0031] 상기 시료는 생물학적 시료일 수 있으며, 생물학적 시료는 상기 개체로부터 수득된 시료를 말한다. 상기 생물학적 시료는 예를 들면 혈액, 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 타액, 눈액, 점막액, 양수, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 시료로부터 수득된 단백질 시료 또는 핵산 시료를 포함한다.

[0032] 또 다른 양상은 ABCA4 단백질 돌연변이 또는 이를 암호화하는 유전자 돌연변이를 검출하는 제제를 포함하는, 스타가르트병 진단용 조성물로서, 상기 ABCA4의 단백질 돌연변이는 R290Q, T1117A, C1140W, 및 N1588Y로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖는 것인, 조성물을 제공한다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "스타가르트병"은 상염색체 열성으로 유전되는 망막이영양증의 일종이며, 8-15세 사이에 나타나면서 양안의 황반부 변성으로 서서히 중심시력의 저하가 일어난다. 스타가르트병은 황반(fovea)에 색소성 황반병증이 있거나 중심와변성과 함께 중심와 주위 주근깨나 황색반점이 황반부에 있을 때로 정의할 수 있고, 황백색의 반점이 망막의 후극부, 주변부 망막에 걸쳐 분포할 때 황반부 변성을 동반하거나 동반하지 않은 경우를 노란점 안저로 정의할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 스타가르트 병의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스 (therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 돌연변이의 존재가 상술한 방법을 통해 확인되면 스타가르트 병의 발병 위험도가 높은 것으로 판단된다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 돌연변이는 ABCA4 돌연변이 및 이의 용도에 관한 것으로서, ABCA4에 특정 돌연변이가 발생하는 경우, 다른 돌연변이와 달리, ABCA4의 발현 수준이 저하되는 것을 확인하였다. 상기과 같은 결과는 스타가르트병과 관련이 있는 ABCA4 발현에 관한 것으로서, 스타가르트병 치료 및 진단 등의 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 야생형 또는 돌연변이 플라스미드로 형질감염된 HEK-293T 세포에 비오틴화 분석을 수행한 도이다.

도 2는 야생형 또는 돌연변이 플라스미드로 형질감염된 HEK-293T 세포에 MG132를 처리한 다음, ABCA4 발현 수준을 확인한 도이다.

도 3은 야생형 또는 돌연변이 플라스미드로 형질감염된 HEK-293T 세포에 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 처리한 다음, ABCA4 발현 수준을 확인한 도이다.

도 4는 ABCA4 유전자의 돌연변이가 야생형 또는 돌연변이 플라스미드로 형질감염된 HEK-293T 세포 내부에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 면역염색을 수행한 다음, 관찰한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 “포함한다(comprise, include)” 및/또는 “포함하는(comprising, including)”은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0040] **실시예**
- [0041] **실시예 1. ABCA4 유전자 돌연변이 세포 준비**
- [0042] 기존에 유전성 망막 질환을 가진 환자 중에 대하여 결함 유전자의 분포를 확인하였다(J Korean Med Sci. 2019 Jun 3; 34(21): e161). 그 결과, 스타가르트병을 앓고 있는 6명의 한국인 환자의 유전자에서 ABCA4의 유전자에서 R290Q, D645N, T1117A, C1140W 및 N1588Y 돌연변이를 확인할 수 있었다.
- [0043] 상기 돌연변이의 효과에 대한 실험을 확인하기 위하여 야생형 또는 ABCA4 돌연변이를 유발할 수 있는 플라스미드를 제조하여 HEK-293T 세포에 형질전환하였다. 야생형 *ABCA4* cDNA(Horizon Discovery, Cambridge, UK)를 함유하는 플라스미드를 p3XFLAG-CMV 벡터에 서브클로닝하였다. QuikChange®II 부위 지정 돌연변이 유발 키트(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 돌연변이 유발 플라스미드를 제조하였다. 상기 DNA 서열은 직접 시퀀싱을 수행하여 확인하였다. HEK-293T 세포는 6-웰 챔버 슬라이드(Thermo Scientific)에 접종(seeding)한 다음, ABCA4 야생형 또는 돌연변이 플라스미드를 사용하여 형질감염시켰다.
- [0045] **실시예 2. 돌연변이의 ABCA4 발현 저하 효과 확인**
- [0046] **2-1. 세포 원형질막에서 ABCA4 발현 수준 확인**
- [0047] 상기 실시예 2에서 확인한 유전자 돌연변이의 구체적인 작용기전을 확인하기 위하여, HEK-293T 세포를 상기 돌연변이 플라스미드로 형질감염시킨 다음, 표면에 비오티화 분석(biotinylation assays)을 수행하였다. 구체적으로, 비오티화 분석은 제조사의 프로토콜에 따라 세포 표면 단백질 분리 키트(Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)를 사용하여 수행하였다. 토끼 다클론 항-Na⁺/K⁺ ATPase α -1 항체(Merck, Kenilworth, NJ, USA)를 내부 표준으로 사용하였다. 신호는 ImageQuant LAS 4000 mini(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)를 사용하여 획득하였으며, 각 밴드의 강도는 ImageJ(National Institute of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정하였다.
- [0048] 실험의 통계 분석은 GraphPad Prism 8.0(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. MG132 또는 바필로마이신 A1 처리 전후의 결과를 비교하기 위한 P값은 Student's t test를 이용하여 계산하였다. 다른 P 값은 일원 분산 분석을 사용하여 계산한 후 Dunnett의 양측 검정(Dunnett's two-tailed test)을 수행했다. $P < 0.05$ 은 통계적으로 유의한 것으로 하여 실험을 결과를 확인하였다.
- [0050] **2-2. 세포 내부의 ABCA4 발현 수준 확인**
- [0051] 면역블롯팅 및 면역형광법을 수행하여 세포내 위치(subcellular localization)에서 ABCA4의 발현 수준을 확인하였다. 구체적으로, 면역블롯팅은 마우스 항-FLAG M2 1차 항체(Merck) 또는 염소 항- β -액틴 항체(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 사용하여 수행하였다. 세포를 형질감염시킨 다음, 24시간이 경과했을 때, 10 μ M MG132 또는 10nM 바필로마이신 A1으로 처리하여 ABCA4 돌연변이가 ABCA4 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. ImageQuant LAS 4000 mini를 사용하여 신호를 수집하였으며, ImageJ를 사용하여 각 밴드의 강도를 측정하였다.
- [0052] 면역 형광법은 세포를 고정하고 실온에서 5분 동안 100% 메탄올(-20° C에서 미리 냉각)로 투과화시킨 다음, 30분 동안 1% BSA로 차단했다. ABCA4의 세포 내 위치를 조사하기 위해 세포를 항-FLAG M2(Merck), 항-BiP(Abcam,

Waltham, MA, USA) 또는 항-Giantin(Abcam) 항체와 함께 배양하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 3회 세척하고 Alexa Fluor®488 토끼 항-마우스 IgG 또는 Alexa Fluor®594 염소 항-토끼 IgG(Life Technologies) 2차 항체를 사용하여 인큐베이션했다. 핵산은 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색했다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 이미지를 획득하였고, LSM 이미지 검사기(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하여 분석을 수행했다.

[0053] 그 결과, 상기 5개의 돌연변이체 중 4개의 돌연변이체(R290Q, T1117A, C1140W 및 N1588Y)는 원형질막(plasma membrane) 상에서 ABCA4 발현을 유의하게 감소시키는 것을 확인하였으며, 그 중에서도 T1117A, C1140W 및 N1588Y 돌연변이의 경우, ABCA4 발현이 야생형에 비해 각각 69.3%, 61.8% 및 84.1%만큼 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나, D645N의 발현은 ABCA4 유전자에 돌연변이가 없는 야생형과 유사한 수준의 ABCA4 발현을 보여주었다(도 1).

[0054] 상기와 같은 결과를 통하여, 스타가르트병 환자에 발생하는 돌연변이 중, R290Q, T1117A, C1140W 및 N1588Y 돌연변이의 경우, ABCA4의 발현 수준을 조절함을 확인할 수 있었다.

[0056] **실시예 3. 돌연변이의 ABCA4 발현 저하 작용기전 확인**

[0057] **3-1. 프로테아좀 분해 억제제 처리에 의한 효과 확인**

[0058] 상기 실시예 2에서 확인한 돌연변이의 ABCA4 발현 저하 효과가 돌연변이에 의해 유발된 프로테아좀(proteasome) 또는 리소좀(lysosome)에 의한 것으로 예상되어, 이를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 프로테아좀 억제제인 MG132를 처리한 다음, ABCA4의 발현 수준을 확인했을 때, 도 2에 나타난 바와 같이, R290Q, T1117A, C1140W 및 N1588Y의 돌연변이의 ABCA4 발현은 MG132를 처리했을 때, 현저한 수준으로 회복됨을 확인하였다. 그 중에서도, T1117A, C1140W 및 N1588Y 돌연변이의 ABCA4 발현 수준이 비 처리 군에 비하여 각각 85.5%, 99.7% 및 92.4% 수준으로 회복됨을 확인하였다.

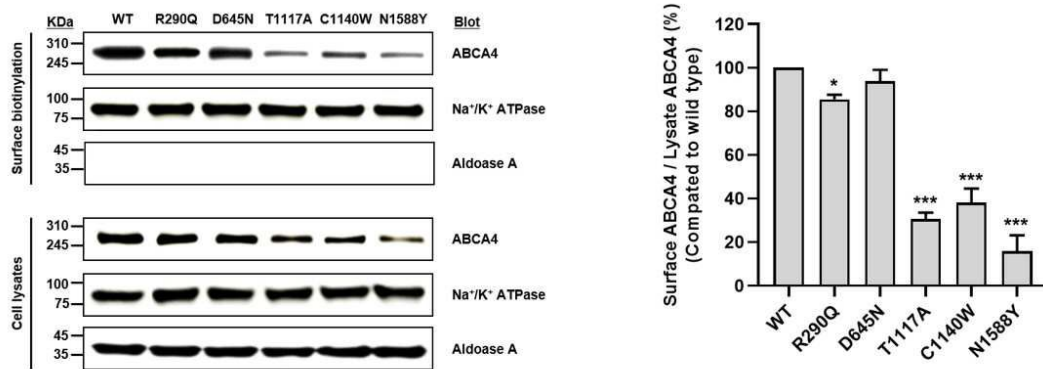
[0060] **3-2. 리소좀 분해 억제제 처리에 의한 효과 확인**

[0061] 리소좀 분해 억제제인 바필로마이신 A1을 처리한 다음, ABCA4의 발현 수준을 확인했을 때, 도 3에 나타난 바와 같이, R290Q, T1117A, C1140W 및 N1588Y의 돌연변이의 ABCA4 발현은 바필로마이신 A1을 처리했을 때, 현저한 수준으로 회복됨을 확인하였다. 그 중에서도, T1117A, C1140W 및 N1588Y 돌연변이의 ABCA4 발현 수준이 비 처리 군에 비하여 각각 98.9%, 108.5% 및 90.9% 수준으로 회복됨을 확인하였다.

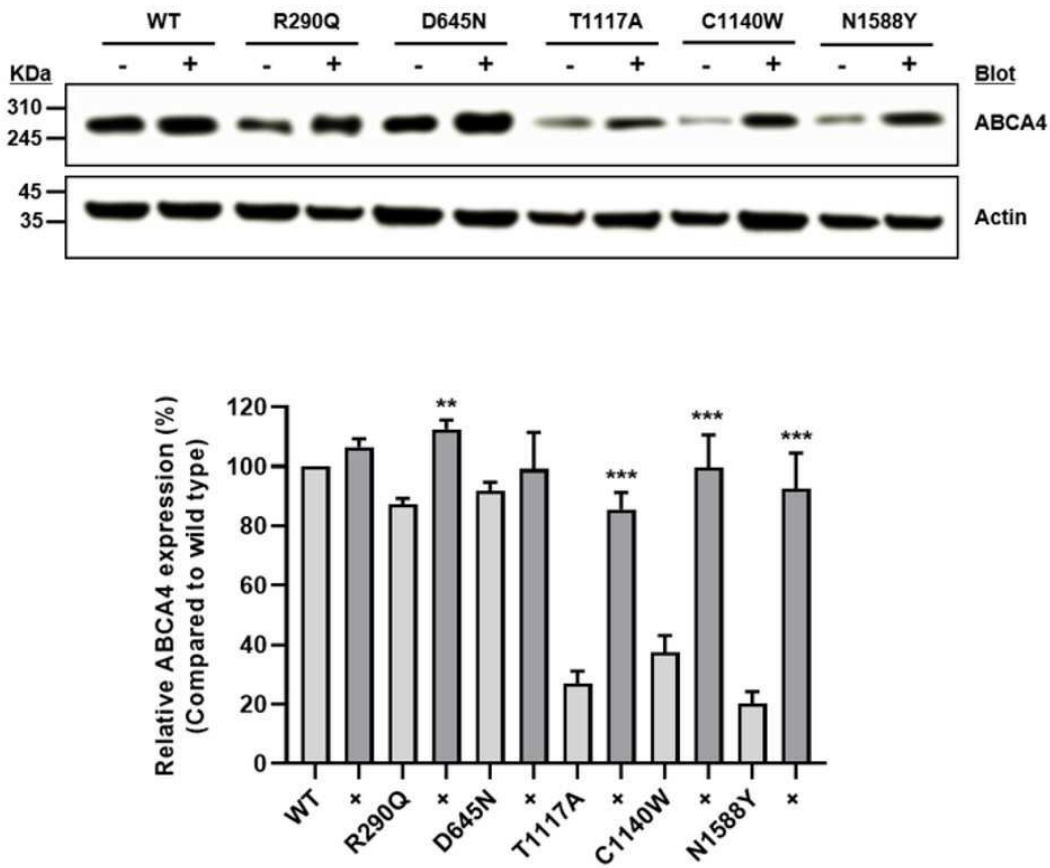
[0063] 상기와 같은 결과를 통해, 상기 R290Q, T1117A, C1140W 및 N1588Y 유전자 돌연변이는 ABCA4의 발현수준을 현저한 수준으로 저하시킬 수 있으며, 이러한 결과는 프로테아좀 및 리소좀의 단백질 분해 효과에 의한 것임을 확인하였다.

도면

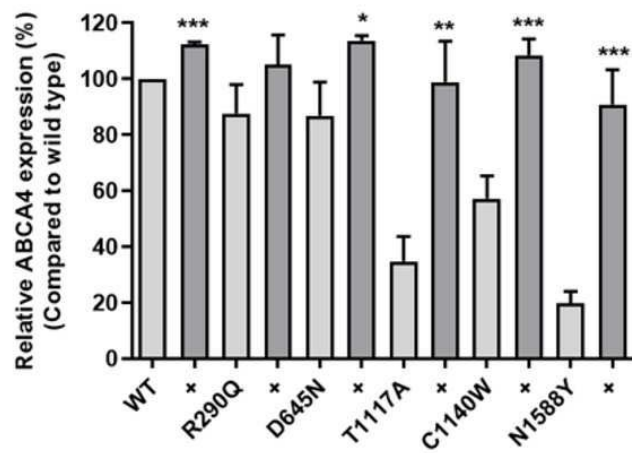
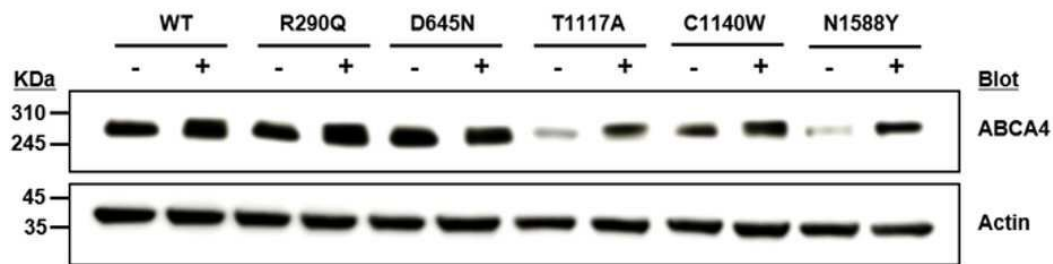
도면1



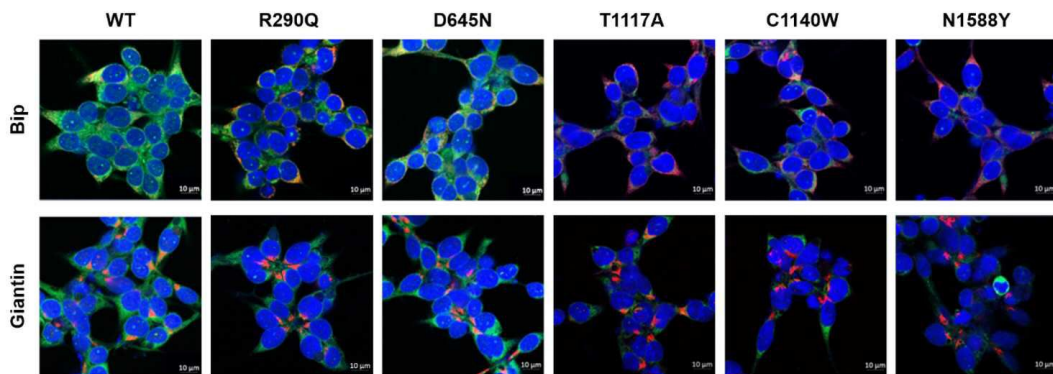
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.