



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0106876
(43) 공개일자 2022년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0278 (2013.01)

A01K 2227/40 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0009198

(22) 출원일자 2021년01월22일

심사청구일자 2021년01월22일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김철희

대전광역시 유성구 어은로 57, 132동 204호 (어은동, 한빛아파트)

이유리

충청남도 논산시 양촌면 바랑산길 121

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 동물모델 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 eif2b3를 녹아웃시킨 동물모델 및 이의 용도에 관한 것으로 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease) 환자의 원인 유전자인 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 동물모델을 제조하고, 상기 동물모델이 백질뇌증의 표현형을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 백질뇌증은 수초 형성 유전자 발현 및 아교 세포(glial cell) 분화의 결함이 있는 질병임을 증명하였다. 따라서 상기 eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬는 백질뇌증 연구를 위한 동물모델 또는 백질뇌증 발병 기전연구를 통한 백질뇌증 치료제 스크리닝 방법에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A01K 2267/0356 (2013.01)

A01K 2267/0393 (2013.01)

(72) 발명자

최태익

대전광역시 유성구 장대동 문화원로6번길 31, 402호

강훈철

서울특별시 강남구 역삼로 315-1 개나리 SK뷰 아파트 502동 1201호

김세희

서울특별시 서대문구 북아현로1길 50, 103-1405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103607
과제번호	2018M3A9B8021980
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업-바이오·의료기술개발사업-연구소재지원사업
연구과제명	질환모델링 제브라피쉬 연구지원 코어 퍼실리티 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

EIF2B3 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease) 동물모델.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 백질뇌증은 EIF2B3 단백질의 168번째 아미노산이 류신(leucine, L)에서 프롤린(proline, P)으로 치환된 돌연변이에 의한 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 작은 눈과 심장 부종 결함을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 수초 발달 결함을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 신경아교세포(glia cell) 및 미세세포(microglial cell) 분화의 이상을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 이소성 신생혈관 형성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 제브라피쉬 모델인 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델.

청구항 8

- 1) EIF2B3 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 수정란을 성체로 배아 발생(embryonic development)시키는 단계; 및
- 4) 상기 단계 3)의 성체에서 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출하여 EIF2B3 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 동물모델은 작은 눈과 심장 부종 결함을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 동물모델은 수초 발달 결함을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 동물모델은 신경아교세포 및 미세세포 분화의 이상을 나타내는 것이 특징인, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 동물모델은 이소성 신생혈관 형성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 동물모델은 제브라피쉬 모델인 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법.

청구항 14

- 1) 제1항의 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복 여부를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 15

- 1) 제1항의 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 수초 형성 (myelination)에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 16

- 1) 제1항의 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 혈관 신생에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 17

- 1) 제1항의 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response; UPR) 경로에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 18

- 1) 제1항의 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 단백질의 잘못접힘(misfolding) 및 입체장애(steric hindrance)를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 19

제14항 내지 제18항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 인 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 (Vanishing white matter, VWM disease) 동물 모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백질뇌증(Vanishing white matter, VWM disease)은 중추 신경계의 백질에 영향을 주어 운동 장애 및 지적 장애를 유발하고 조기 사망으로 이어질 수 있는 만성 장애이다. 소실 백질(vanishing white matter) 질환으로 알려진 백질뇌증은 진핵 번역 개시 인자(eukaryotic translation initiation factor; EIF2B)에 대한 소단위(subunit)를 암호화하는 5개의 유전자 (EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 또는 EIF2B5) 중 하나에서 병원성 돌연변이로 인해 발생하는 상 염색체 열성 질병으로 알려져 있다. EIF2B는 2개의 5량체로 구성된 10량체 단백질로 기능하며, 각 5량체는 서브 유닛 EIF2B1 내지 5로 구성된다. EIF2B는 단백질 합성의 시작에 중요하며, G-단백질(G-protein) 주기에서 비활성 GDP 결합 상태(GDP-bound state)를 활성 GTP 결합 상태(GTP-bound state)로 전환하여 연속적인 번역 시작 주기를 유도하는 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(guanine nucleotide exchange factor)로 알려져 있다.

[0004] 일반적으로 소아기에 발병하는 VWM 질병의 경우, 만성 진행성 신경학적 퇴화, 소뇌 운동 실조(cerebellar ataxia), 시신경 위축 및 바이러스성 열병과 같은 경미한 스트레스에 의해 촉진될 수 있는 급성 퇴화의 특징을 보인다. 경미한 VWM 질병의 경우, 경증 운동 실조, 난소 부전 및 경련으로 나타날 수 있는 성인 발병 변종을 포함한다.

[0005] EIF2B 유전자의 마우스 녹아웃(knockout)의 Null 대립 유전자는 치사성을 나타내어 VWM 질병의 병원성에 대한 추가 연구를 위한 사용에는 한계가 있다. VWM 질병에 대한 마우스 녹인(knock-in) 모델은 Eif2b5(R132H 돌연변이)에 대한 마우스 모델에서 볼 수 있는 것과 같이 로타로드(rotarod) 및 개방 필드(open field) 테스트를 통한 경미한 운동 문제를 포함하여 미묘한 표현형을 나타낸다. 그 후, Eif2b5에서 R191H 및 Eif2b4에서 R484W의 점 돌연변이(point mutations)를 가진 다른 VWM 마우스 모델이 제작되었다. 최근에 Eif2b5(I98M) 마우스 모델에서 작은 몸, 비정상적인 보행, 남성 및 여성 불임, 간질 발작 및 수명이 단축이 보고되었다.

[0006] 제브라피쉬(zebrafish)는 발생배가 투명하고, 체외수정을 하며, 수정란을 대량으로 쉽게 확보할 수 있고, 발생이 매우 빨라 대부분의 조직 및 장기가 하루 만에 형성된다. 또한, 현재 전체 유전체의 유전정보가 밝혀졌고 이를 제브라피쉬 데이터베이스를 통해 쉽게 검색할 수 있으며, 제브라피쉬와 인간 유전자 사이의 높은 상동성은 복잡한 신경 및 신경 정신 질환 분석에 적합한 모델로 제브라피쉬를 사용하는 데 장점이 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 제브라피쉬(Danio rerio)를 사용하여 VWM 환자의 원인 유전자로 밝혀진 eif2b3 유전자를 생물학적으로 검증하고 eif2b3 유전자가 상기 질병에 미치는 영향을 확인하기 위해, 제브라피쉬(Danio rerio)를 사용하여 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델을 제작하여 척추 동물의 VWM 질병에 대한 EIF2B3 동물 모델을 최초로 확립하였고, 상기 동물모델을 이용하여 수초(myelin) 형성 유전자 발현 및 아교 세포(glial cell) 분화의 결함을 확인하였으며, EIF2B3의 새로운 변이를 포함한 다른 EIF2B 돌연변이의 분자모델링 및 구조 실험(rescue experiment)을 통하여 돌연변이의 병원성을 확인하였다. 따라서 본 발명자들은 본 발명의 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델이 VWM 환자에서 확인된 새로운 EIF2B3 변이체의 신속한 기능 검증을 위한 생체 내(in vivo) 도구로서의 활용될 수 있음을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Matthew D. Keefe, Haille E. Soderholm, Hung-Yu Shih, Tamara J. Stevenson, Kathryn A. Glaittli, D. Miranda Bowles, Erika Scholl, Samuel Colby, Samer Merchant, Edward W. Hsu, Joshua L. Bonkowsky (2020) Vanishing White Matter Disease Expression of Truncated EIF2B5 Activates Induced Stress Response. bioRxiv, May 5, 2020(doi:https://doi.org/10.1101/2020.05.05.078295)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 eif2b3 유전자를 녹아웃 (knock-out)시킨 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease) 동물모델을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은

[0012] 1) eif2b3 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계;

[0013] 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계;

[0014] 3) 상기 단계 2)의 수정란을 성체로 배아 발생(embryonic development)시키는 단계; 및

[0015] 4) 상기 단계 3)의 성체에서 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출하여 eif2b3 녹아웃 배아를 선별하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은

[0017] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;

[0018] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복여부를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은

[0020] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;

[0021] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 수초 형성(myelination)에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은

- [0023] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0024] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 혈관 신생에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은
- [0026] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0027] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 혈관 신생에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은
- [0029] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0030] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response; UPR) 경로에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은
- [0032] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0033] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 단백질의 잘못접힘(misfolding) 및 입체장애(steric hindrance)를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 eif2b3를 녹아웃시킨 동물모델에 관한 것으로 백질뇌증(Vanishing white matter, VWM disease) 환자의 원인 유전자인 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 동물모델을 제조하고, 상기 동물모델이 백질뇌증의 표현형을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 백질뇌증은 수초(myelin) 형성 유전자 발현 및 아교 세포(glial cell) 분화의 결함이 있는 질병임을 증명하였다. 따라서 상기 eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬는 백질뇌증 연구를 위한 동물 모델 또는 백질뇌증 발병기전 연구를 통한 백질뇌증 치료제 스크리닝 방법에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1a는 제브라피쉬 eif2b3의 게놈 구조 및 엑손 2에서 CRISPR-Cas9 표적 부위를 보여주는 개략도이다.
- 도 1b는 야생형, 16-bp 및 10-bp 결실된 돌연변이체 (각각 eif2b3ck156a 및 eif2b3ck156b로 명명됨)에 대한 표적화된 서열을 나타내는 도이다.
- 도 1c는 야생형 및 16-bp 결실된 eif2b3ck156a 돌연변이체 단백질의 예측된 구조를 나타낸 도이다.
- 도 1d는 eif2b3ck156a 돌연변이 배아의 유전자형에 사용한 PCR 결과물의 아가로스겔 이미지를 나타낸 도이다.
- 도 1e는 각각 3 dpf 및 5 dpf에서, 야생형 및 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 대표적인 명시 야상 이미지(bright field images)를 나타낸 도이다.
- 도 2a는 Clustal X로 생성된 452개의 아미노산을 갖는 인간 EIF2B3 및 453개의 아미노산을 갖는 제브라피쉬 EIF2B3 단백질 서열의 정렬을 나타낸 것이다. 검은색으로 표시된 부분은 보존된 잔기; 빨간색 화살표는 VWM 환자에서 발견된 변이체의 돌연변이 위치를 나타낸다.
- 도 2b는 각 단계의 제브라피쉬에서 eif2b3의 발현을 확인한 도이다. eif1a는 컨트롤로 사용되었다.
- 도 2c는 제브라피쉬의 발달 중 eif2b3 mRNA의 홀-마운트 정위치 교잡법을 이용한 대표적인 이미지를 나타낸 도

이다. 1 dpf에서 eif2b3 발현은 어디에서나 검출되었으며, 몸통 영역(점)에서 더 높은 발현을 확인하였다. 2dpf에서 그 발현은 주로 간, 장 및 중뇌(별표 및 흰색 화살표)에서 유지되었다.

도 3a는 1 dpf에서 eif2b3 돌연변이 배아의 초기 운동 활성을 나타낸 도이며 WT, eif2b3ck156a/+ 및 eif2b3ck156a/ck156a의 꼬리 감기 빈도(Hz) 차이는 관찰되지 않았다.

도 3b는 2 dpf에서 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬의 운동뉴런(motoneuron)의 정상적인 발달을 나타낸 도이다. 화살표는 성장하는 신경 축삭(neuronal axon)을 나타낸다.

도 3c 및 도3d는 3 및 4 dpf에서 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬의 수초(myelin) 발생마커인 mbp를 이용한 홀-마운트 정위치 교잡법(whole mount in situ hybridization)을 나타낸 도이다.

도 3e는 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬와 Tg(mbp : mGFP) 상호교배를 이용하여 살아있는 동물에서 수초화의 시각화를 나타낸 도이다.

도 4a는 2dpf(왼쪽), 3dpf(중간)에서 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬에서 초기 미성숙 신경아교 세포마커(glial cell marker)인 nestin의 이소성 발현, 3dpf에서 eif2b3 돌연변이체에서 후기 성숙 신경아교 세포 마커(glial cell marker)인 olig2의 발현(오른쪽)이 특히 전뇌 영역(별표) 및 망막(R)에서 감소된 것을 나타낸 도이다.

도 4b는 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬에서 미세아교 전구세포(microglial progenitor cell)의 이소성 출현(왼쪽), 야생형에 비해 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬의 중뇌에서 apoeb(화살표) 발현된 미세아교세포(microglial cell)의 감소(오른쪽)를 나타낸 도이다.

도 5는 36, 48, 및 72 hpf에서 eif2b3 돌연변이체에서 후기 성숙 신경아교 세포 마커(glial cell marker)인 olig2의 발현을 나타낸 도이다.

도 6a(왼쪽, 중간)는 Tg(kdr1 : eGFP)와 교배한 eif2b3 돌연변이 제브라 피쉬의 중뇌(점선 원)에 있는 과분지(Hyper-branching) 혈관을 나타낸 도이다.

도 6a(오른쪽) 및 6b는 야생형과 비교하여 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬의 증가된 혈관 직경을 나타내는 도이다.

도 6c는 야생형과 비교하여 2 dpf에서 eif2b3 돌연변이체의 중뇌 영역(별표)에서 vegfaa mRNA 발현 증가 및 차이 없는 vegfab 발현을 나타낸 도이다.

도 6d는 VEGFR 억제제인 SU5416을 처리하였을 때, 3dpf에서 eif2b3 녹아웃 돌연변이체에서 혈관 신생을 억제함을 보여주는 도이다.

도 7은 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬에서 이소성 혈관 신생의 고해상도 이미지를 나타낸 도이다. 과분지(Hyper-branching) 혈관은 야생형에 비해 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 중뇌 영역에서 두드러진다. 이소성 혈관 신생은 화살표로 표시된 바와 같이 분 절간 혈관(intersegmental vessels; ISV) 및 장하 정맥(subintestinal veins)과 같은 녹아웃 제브라피쉬의 다른 영역에서도 관찰되었다.

도 8은 UPR(Unfolded protein response) 경로 유전자가 eif2b3 녹아웃 돌연변이에서 상향 조절됨을 나타내는 도이다. 3dpf에서 xbp1, atf6 및 atf4 유전자의 발현 증가는 야생형에 비해 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬의 뇌뿐만 아니라 간, 위장 및 장에서도 나타난다. 세포 사멸 관련 유전자인 tp53(종양 단백질 p53)의 발현이 eif2b3 녹아웃 돌연변이 제브라피쉬에서 UPR 경로 유전자의 발현과 겹친다. 뇌 영역의 이소성 유도는 화살표로 표시된다.

도 9a는 19개월 환자의 MRI를 나타낸 도이다.

도 9b는 EIF2B3의 돌연변이 및 단백질의 도메인 구조를 나타낸 도이다. 여기에 묘사되어있는 알려진 25개의 돌연변이 중 19개의 돌연변이가 제브라피쉬를 평가하였다(테스트되지 않은 6 개의 돌연변이는 검은 색으로 표시됨). 우리 환자에게서 발견된 2개의 이형접합 돌연변이는 빨간색 별표로 표시하였다. 단백질 모델링을 위해 테스트된 5개의 추가 돌연변이는 갈색으로 표시하였다. 12 개의 엑손을 포함하는 NM_020365.5의 가장 긴 아이소폼(isoform)은 흰색과 회색 상자로 표시하였으며, 인트론은 검은색 가로선으로 연결하였다. 5'- 및 3'-UTR은 흰색 상자로 표시하였다. cDNA 수준에서 확인된 돌연변이는 엑손 위에 빨간색으로 표시하였고, 해당 아미노산 변화는 두 개의 기능적 도메인의 단백질(NP_065098.1)로 표시하였다.

도 10a는 EIF2B3 변종의 분자모델링을 나타낸 도이며, VWM 환자에서 영향을 받는 10개 아미노산의 측쇄는 구체(sphere)로 표시하였다. 이 중 4개의 잔기(G11, L27, V30, K33)는 불확실한 유연한 형태를 채택할 수 있으므로

포함되지 않았다.

도 10b는 EIF2B3 변종의 분자모델링을 나타낸 도이며, L168P 돌연변이의 변형으로 인한 내부 잘못 접힘을 나타내는 도이다. EIF2B3 돌연변이 L168P (오른쪽)는 야생형 EIF2B3(왼쪽) 구조 (PDB 코드 6CAJ)를 기반으로 모델링되었다. EIF2B3 잔기는 보라색으로 표시되는 치환된 잔기를 제외하고 녹색으로 표시하였다. 왼쪽의 야생형은 적절한 내부 단백질 접힘을 위해 L168과 R166 및 H190의 상호 작용을 보여주는 반면, 오른쪽 돌연변이는 L168P가 R166 및 H190과의 접촉을 잃어버리면서 잘못 접힌 형태를 보여준다. 돌연변이는 또한 돌연변이된 프롤린의 C δ 원자와 G159의 주사슬 카르보닐기(main chain carbonyl group) 사이에 입체 장애(steric hindrance)를 일으켰다.

도 10c 내지 f는 EIF2B3 변종의 분자모델링을 나타낸 도이며, V46I, G47E, A87V, R91H 또는 R225Q와 같은 다른 돌연변이가 내부 원자 접촉의 손실로 인해 구조적 온전성(structural integrity)을 손상시킬 수 있는 EIF2B 서브 유닛 사이에서 분자간 입체 장애(steric hindrance)를 유발할 수 있음을 나타낸다

도 11a는 각각의 발현 벡터의 합성 mRNA를 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬 배아에 미세 주입한 결과를 나타낸 도이다. 정상 EIF2B3 mRNA (KO + EIF2B3, n = 84)와 비교하여 돌연변이체 L168P mRNA (KO + L168P, n = 51)에 대표적인 데이터를 표시하였다. 미세 주사 5 일 후, 형태학적 결함, 특히 입술 열림 및 튀어나온 입 (화살표), 심장 부위의 부종 (별표)의 형태학적 결함이 회복되었다.

도 11b는 각각의 발현 벡터의 합성 mRNA를 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬 배아에 미세 주입하여 눈 크기 (눈 직경, μm)의 회복을 평가한 도이다.

도 12는 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬 모델을 사용한 인간 EIF2B3 변이체의 체계적인 기능 분석을 나타낸 도이다. 야생형 EIF2B3 및 VWM 환자로부터 확인된 19 개의 변이체를 포함한 20개의 발현 벡터를 제브라피쉬 모델에서 테스트하였다. 각 돌연변이 부위의 상대 위치는 인간 EIF2B3 단백질의 아미노산 서열에 표시하였다. 각 변이 발현 벡터의 합성 mRNA를 eif2b3 돌연변이 제브라피쉬 배아에 미세주입하였다. 미세 주사 5 일 후, 심장 부종과 눈 크기와 같은 여러 형태학적 결함에 대한 회복을 평가하였다. 정상 EIF2B3 (KO + EIF2B3, n = 84) 또는 변이 mRNA가 주입된 동물의 수를 표시하였다. 다른 18개의 돌연변이 형태에 의한 각 구조(rescue) 실험에 대한 대표적인 데이터를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0039] 본 발명은 eif2b3 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease) 동물 모델을 제공한다.
- [0040] 상기 eif2b3는 제브라피쉬일 경우, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 eif2b3는 Translation initiation factor eIF-2B subunit gamma, eIF-2B GDP-GTP exchange factor subunit gamma와 혼용될 수 있다.
- [0042] 상기 백질뇌증은 중추 신경계의 백질에 영향을 주어 운동 장애 및 지적 장애를 유발하고 조기 사망으로 이어질 수 있는 만성 장애이다.
- [0043] 상기 백질뇌증은 eif2b3 단백질의 168번째 아미노산이 류신(Leucine, L)에서 프롤린(Proline, P)으로 치환된 돌연변이에 의한 것일 수 있다.
- [0044] 상기 동물모델은 부레(swim bladder) 팽창, 난황 흡수, 심장 부종, 작은 눈, 수초(myelin) 발달 결함으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 형태학적 결함을 나타낼 수 있고, 바람직하게는 상기 동물모델은 작은 눈, 심장 부종 결함 및 수초(myelin) 발달 결함으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 형태학적 결함을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 동물모델은 수초(myelin)를 형성하는 신경아교세포(glia cell) 및 미세세포(microglial)의 발생과 분화 과정에 이상을 나타낼 수 있고, 바람직하게는 상기 동물모델은 신경아교세포 및 미세세포 분화의 이상을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 상기 동물모델은 이소성 신생혈관 형성을 나타낼 수 있다.
- [0047] 상기 동물모델은 인간을 제외한 제브라피쉬, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을

포함하는 모든 동물일 수 있으나, 바람직하게는 제브라피쉬일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0049] 또한, 본 발명은
- [0050] 1) eif2b3 유전자 녹아웃(knock-out) 콘스트럭트(construct)를 제조하는 단계;
- [0051] 2) 상기 단계 1)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 단계;
- [0052] 3) 상기 단계 2)의 수정란을 성체로 배아 발생(embryonic development)시키는 단계; 및
- [0053] 4) 상기 단계 3)의 성체에서 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출하여 eif2b3 녹아웃 배아를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0054] 상기 동물모델은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 일례로, 상기 동물모델은 부레(swim bladder) 팽창, 난황 흡수, 심장 부종, 작은 눈, 수초 발달 결함으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 형태학적 결함을 나타낼 수 있고, 바람직하게는 상기 동물모델은 작은 눈, 심장 부종 결함 및 수초 발달 결함으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 형태학적 결함을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 상기 동물모델은 수초를 형성하는 신경아교세포 및 미세세포의 발생과 분화 과정에 이상을 나타낼 수 있고, 바람직하게는 상기 동물모델은 신경아교세포 및 미세세포 분화의 이상을 나타낼 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0056] 상기 동물모델은 이소성 신생혈관 형성을 나타낼 수 있다.
- [0057] 상기 동물모델은 인간을 제외한 제브라피쉬, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물일 수 있고, 바람직하게는 상기 동물모델은 제브라피쉬일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0058] 상기 eif2b3는 제브라피쉬일 경우, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0059] 상기 단계 1)의 녹아웃 콘스트럭트는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 상기 단계 1)의 녹아웃 콘스트럭트는 유전자 가위를 포함하는 것이 바람직하고, 상기 유전자 가위는 CRISPR/Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein-9), ZFN(zinc-finger nuclease) 및 TALEN(transcription activator-like effector nuclease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 또한, 상기 유전자 가위를 포함하는 콘스트럭트는 eif2b3를 녹아웃시키는 것이 바람직하나, eif2b3 서열 전체뿐만 아니라 서열의 일부만 녹아웃된 경우도 모두 포함한다.
- [0061] 또한, 상기 단계 2)의 수정란은 제브라피쉬의 수정란일 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 인간을 제외한 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물 유래 수정란을 모두 사용할 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 단계 2)의 콘스트럭트를 수정란에 도입하는 방법은 유전자 콘스트럭트를 제조한 후 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation), 입자 분사법(particle bombardment), 정자를 이용하는 방법(sperm-mediated gene transfer), 바이러스 감염법(viral infection), 직접근육주입법(direct muscle injection), 인슐레이터(insulator) 및 트랜스포존(transposon)을 이용한 기법 중에서 적절하게 선택하여 형질 전환 시킬 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 단계 4)의 genomic DNA는 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 동물모델의 꼬리에서 추출하는 것일 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 단계 4)의 eif2b3 유전자 녹아웃 배아를 선별하는 단계는 당업계에 주지된 각종 방법에 따라 선별될 수 있다. 이러한 선별 방법을 예를 들면, 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 방법 또는 녹아웃 배아의 이상 증상을 육안으로 판별하는 방법 등일 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은
- [0067] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0068] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 증상 회복 여부를 판단

하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0069] 상기 동물모델은 인간을 제외한 제브라피쉬, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 개, 고양이, 마우스, 생쥐, 토끼 등을 포함하는 모든 동물일 수 있다.
- [0070] 상기 증상은 운동 장애, 지적장애를 일으키고 수초를 형성하는 신경아교세포의 발생과 분화의 이상으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 이상일 수 있다.
- [0071] 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0073] 또한 본 발명은
- [0074] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0075] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 수초 형성(myelination)에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0076] 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0077] 상기 수초 형성에 관련된 유전자는 Myelin basic protein (MBP), Oligodendrocyte transcription factor (OLIG2), Nestin, apolipoprotein-E (apoE)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0079] 또한, 본 발명은
- [0080] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0081] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 혈관 신생에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0082] 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0083] 상기 혈관 신생에 관련된 유전자는 vascular endothelial growth factor(VEGF) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 또한 본 발명은,
- [0086] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0087] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물 모델을 무처리된 대조군과 비교하여 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response; UPR) 경로에 관련된 유전자의 발현 변화를 판단하는 단계를 포함하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0088] 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0089] 상기 미접힘 단백질 반응(unfolded protein response; UPR) 경로에 관련된 유전자는 X-box-binding protein (XBP1), activating transcription factor-4 (ATF4), activating transcription factor-6 (ATF6)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0091] 또한, 본 발명은

- [0092] 1) eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 백질뇌증 동물모델에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0093] 2) 상기 단계 1)의 피검물질이 처리된 백질뇌증 동물모델을 무처리된 대조군과 비교하여 단백질의 잘못접힘(misfolding) 및 입체장애(steric hindrance)를 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 백질뇌증 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0094] 상기 단계 1)의 피검 화합물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0096] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 인간과 제브라피쉬의 eif2b3 유전자의 아미노산 서열이 유사함을 확인하였고, eif2b3 유전자의 시공간적 발현을 확인하였다. eif2b3 유전자의 엑손 2를 표적으로 하여 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬를 제작한 결과, 수초를 형성하는 신경아교세포의 발생과 분화 과정에 이상이 있음을 밝혔으며, 특히 혈관 신생이 신경아교세포의 발생에 관여할 수 있음을 발견하였다. 또한, 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease)의 소견을 갖는 한국의 19개월 여아에서 새로운 EIF2B3 돌연변이를 확인하였고, 새로운 EIF2B3의 돌연변이를 포함한 다른 EIF2B 돌연변이의 분자모델링 및 구조 실험(rescue experiment)을 통하여 돌연변이의 병원성을 확인하였다.
- [0097] 따라서 본 발명의 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델은 VWM 환자에서 확인된 새로운 EIF2B3 변이체의 신속한 기능 검증을 위한 생체 내 (in vivo) 도구로서의 활용될 수 있음을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0098] 따라서, 본 발명의 eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬 동물모델은 백질뇌증(vanishing white matter, VWM disease) 연구를 위한 동물모델 또는 백질뇌증 발병 기전연구를 통한 백질뇌증 치료제 스크리닝 방법에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 백질뇌증은 다발성경화증(Multiple Sclerosis, MS), 루게릭병(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)의 발병 원인이기도 하므로, 혈관성치매(cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy; CADASIL)까지 포함한 기초연구 모델동물로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0100] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0101] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0103] <실시예 1> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬의 제작
- [0104] <1-1> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬의 제작
- [0105] eif2b3의 생체 내(in vivo) 역할을 알기 위하여, CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 eif2b3 유전자의 엑손 2를 표적으로 하는 guide RNA 및 캠퍼된 Cas9 mRNA를 주입하여 고도로 보존된 뉴클레오티드 전이효소(nucleotidyl transferase) 도메인이 결실된 eif2b3 녹아웃제브라피쉬 모델을 제작하였다(도 1a).
- [0106] 구체적으로, CRISPR 단일 가이드(single guide; sg) RNA 및 Cas9의 eif2b3 표적 부위를 Optimized CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>)을 사용하여 확인하였고, 선택된 올리고 뉴클레오티드를 BsaI(BioLabs)로 선형화된 pDR274(Addgene) 삽입 접합하여 클로닝하였다. sgRNA의 시험관 내 전사를 위한 주형은 하기 표 1의 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 생성되었다. 시험관 내 전사는 150-200ng의 주형과 MaxiScript T7 Kit(Ambion)를 사용하여 수행하였다. RNA는 이소프로판올로 침전시켰다. Cas9 발현 벡터(Addgene)를 Dra I(Takara)으로 선형화하고 아가로스겔 DNA 추출 키트(ELPIS)로 정제하였다. E.Coli 폴리(A) 폴리머라제(NEB)로 테일링된 mMESSAGE mMACHINE T7 키트(Ambion) Cas9 mRNA를 전사한 다음 제조업체 프로토콜에 따라 염화리튬 침전으로 정제하였다. 단일 세포 단계의 제브라피쉬 수정란에 300 ng/μl의 Cas9 mRNA 및 150 ng/μl의 sgRNA를 주입하였다.
- [0107] 그 결과, 최종적으로 2개의 돌연변이 대립 유전자(16-bp 결실된 eif2b3ck156a 및 10-bp 결실된 eif2b3ck156b)를 확립하였다(도 1b). 예측된 돌연변이는 결실에 의한 프레임 이동(frame-shift)이동으로 조기 종료

(premature termination)를 일으킨다. 우리는 후속 실험을 위해 16-bp 결실된 돌연변이체(eif2b3ck156a)를 사용하였다. eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬는 도 1 에 나타난 바와 같이 eif2b3의 주요 도메인인 뉴클레오티드 전이효소(nucleotidyl transferase domain) 및 아실 트랜스퍼라제(acyltransferase) 도메인 내의 서열이 결실된 것을 확인하였다(도 1c).

표 1

	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
sgRNA	정방향	TAGGGGTGCTGATGGCAGCCGG	2
	역방향	AAACCCGGCTGCCATCAGCACC	3

[0110] <1-2> eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬의 eif2b3 유전자 결실 확인

[0111] 제브라피쉬 eif2b3 녹아웃 돌연변이체의 유전자형 분석을 위하여 하기 표 2의 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다.

[0112] 그 결과, 도 1d에 나타난 바와 같이, 16-bp 결실된 돌연변이체 (eif2b3ck156a) 녹아웃 제브라피쉬는 eif2b3 유전자가 결실된 것을 확인하였다.

[0113] eif2b3ck156a 돌연변이 배아는 수정 후 3일(3dpf)까지는 야생형과 비교해서 유사한 총체적 형태를 나타냈으나, 5일 후에는 작은 눈과 심장 부종(도 1e)을 나타냈으며, 8일 후에는 죽음을 초래했다.

표 2

	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
eif2b3	정방향	TGTTTCGGGATGGAGCTACAG	4
	역방향	TTTGTGCCCACAGGAAGCA	5

[0116] <실험예 1> 인간과 제브라피쉬에서 단백질의 서열 비교

[0117] 인간과 제브라피쉬에서 eif2b3 단백질의 서열을 비교하기 위하여 상호간의 BLAST를 수행하였다(Ensembl ID : ENST00000360403.7).

[0118] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬 계놈은 452개의 아미노산을 가진 인간의 eif2b3 단백질과 길이가 유사하고 고도로 보존(80% 유사성, 63% 동일성, ENSDART00000184618.1)된 단백질을 암호화하는 단일 eif2b3 동원체(ortholog)를 가지는 것을 확인하였다.

[0120] <실험예 2> eif2b3 유전자의 시공간적 발현 확인

[0121] 제브라피쉬에서 eif2b3의 시간적 발현 패턴을 결정하기 위해 단계별 RT-PCR 수행하였다. 이를 위해, 발생 단계별로 total RNA를 분리 및 cDNA를 합성하고, 하기 표 3의 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하였다.

[0122] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬 eif2b3 전사체가 모체(maternal) 및 접합체(zygotic) 발현을 모두 가지고 있음을 확인하였다.

[0123] 또한, 하기 표 3의 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머를 사용하여 합성한 eif2b3에 대한 프로브를 이용하여 홀마운트 정위치 교잡법(whole-mount in situ hybridization)을 수행하였다.

[0124] 구체적으로, 각 단계의 배아를 4% PFA에서 밤새 고정시킨 후, 메탄올 구배로 탈수시켰다. 이어서 배아를 0.1 % Tween-20를 함유하는 인산염완충식염수(PBS)에서 재수화시켰다. 배아는 프로 테이나제 K 분해에 의해 투과시킨 후 70℃에서 밤새 digoxin-표지된 프로브와 혼성화시켰다. 다음날, 배아는 70℃에서 0.1% Tween-20 및 50% 혼성화 용액을 함유하는 50 % 식염수 구연산 나트륨 용액으로 세척되었다. 배아를 다시 실온에서 세척하고 충분한

염색이 나타날 때까지 어두운 곳에서 염색 용액에서 배양하였다. 배아를 글리세롤에 장착하고 Nikon AZ100 현미경 (일본, Nikon)을 사용하여 시각화하였다. Nikon DIGITAL SIGHT DS-Fi11 디지털 카메라(일본, Nikon)를 사용하여 이미지를 캡처하고 NIS-Elements F 3.0 (Nikon)으로 처리하였다.

[0125] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬 배아에서 장배 형성(gastrulation) 전과 전체 과정에 걸친 모든 부위에서 발현하는 것을 확인하였다. 수정 후 발생 1일째(1dpf), eif2b3는 몸통(trunk) 부위의 체절에서 조직 특이적 패턴으로 발현되었으며, 수정 후 발생 2일째(2dpf)에는 eif2b3가 중뇌개(tectum), 중간뇌(midbrain)-후뇌(hindbrain) 경계, 눈, 내장 및 간에서 발현되었다. 이러한 제한적인 발현 패턴은 eif2b3이 초기 발달 동안의 증식 세포에서 주로 발현된다는 것을 의미한다.

표 3

[0126]	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
	정방향	GCAACAGGAAGCTCACATCAA	6
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGGTCCAATACCGCGTGACTG	7

[0128] <실험예 3> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 백질뇌증 관련 표현형 확인

[0129] eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 백질뇌증 관련 표현형을 하기의 방법으로 확인하였다.

[0131] <3-1> eif2b3 돌연변이 제브라피쉬에서 발달 초기 정상적인 발달을 확인

[0132] 제브라피쉬의 첫번째 운동 활성은 수정 후 발생 17시간(17hpf)에 자발적인 꼬리 감기 움직임으로 시작되는데, 이 단순한 행동 패턴은 척수에 있는 운동뉴런 (motoneuron)과 중간뉴런(interneurons)의 중추패턴발생기(central pattern generator; CPG)에 의해 매개되는 꼬리의 좌우 움직임을 포함한다.

[0133] eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 운동 활성을 확인하기 위기 위해, 하기의 실험을 수행하였다.

[0134] 구체적으로, 해치되지 않은 야생형 및 eif2b3 녹아웃 돌연변이체에서 자발적인 꼬리감기 활성을 평가하기 위하여, 수정 후 발생 24시간(24 hpf)에서 24 개의 배아를 입체경(S6E, Leica)으로 1분 동안 기록한 후 유전형을 분석하였다.

[0135] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 24시간(24 hpf)의 야생형 배아에서 그 빈도는 약 0.5Hz로 나타났다으며, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 이와 유사한 꼬리 감기 빈도를 관찰하였다.

[0136] 또한 항-Synaptotagmin 2 (Znp1)를 사용한 것을 제외하고 상기 실험예 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, 대조군과 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 운동뉴런(motoneuron)의 발달을 확인하였다.

[0137] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬와 야생형 사이의 면역 조직 화학 패턴의 큰 차이가 없다는 것을 확인하였다. 상기의 결과들은 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 운동뉴런(motoneuron)의 정상적인 발달을 시사한다.

[0139] <3-2> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 수초발달 결함 확인

[0140] 백질뇌증에서 백질 아교성상세포는 제대로 성숙하지 않아 정상적인 기능을 수행할 수 없다고 가설에 기초하여, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 신경아교세포 (glial cell)의 성숙과 수초 형성(myelination)에 영향을 주는 지 확인하기 위하여, 수초발생마커인 수초염기성단백질(myelin basic protein; MBP)의 발현 변화를 확인하였다.

[0141] 구체적으로, MBP의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험예 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, 수초형성 발달과 관련있는 마커인 MBP의 발현 변화를 확인하였다.

[0142] 그 결과, 도 3c 및 3d에 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 3일 및 4일에서 (3-4dpf)에서 야생형에 비해 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 두개골 신경절(cranial ganglia; CG) 및 후부 측면 선 신경(posterior lateral line

nerves; PLN)에서 MBP mRNA 발현의 현저한 감소를 확인하였다.

- [0143] 수초 형성하는 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)를 살아있는 동물에서 시각화하기 위해, 하기의 실험을 수행하였다.
- [0144] 구체적으로, 본 연구진이 기존에 개발한 수초염기성단백질(MBP) 프로모터(promoter)의 제어 하에 막-표적 녹색 형광단백질 (mGFP)을 발현하는 형질전환 제브라피쉬 Tg (mbp:mgfp) (S.H., et al. (2010) Visualization of myelination in GFP-transgenic zebrafish. Dev. Dyn., 239, 592-597)와 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬를 이중교배하였다.
- [0145] 그 결과, 도 3e에 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 5일(5 dpf)에서 야행성 제브라피쉬와 비교하여 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 두개골 신경절(cranial ganglia; CG) 및 후부 측면 선 신경(posterior lateral line nerves; PLN)에서 수초 형성에 심각한 결함을 관찰하였고, 난황과 눈에서도 자가형광이 관찰되었다. 상기의 결과는 수초염기성단백질(MBP) 유전자 발현의 감소와 일치하는 결과로, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 수초 발달 결함을 시사한다.
- [0147] <3-3> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 신경아교(glial) 및 미세아교(microglial) 세포의 분화 이상 확인
- [0148] eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 수초화 결함을 이해하기 위해, 신경아교(Glial) 세포, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 분화에 관련된 마커의 발현을 확인하였다.
- [0149] 구체적으로, OLIG2 프로브 및 하기 표 4의 서열번호 8 내지 9의 프라이머를 사용하여 합성한 Nestin의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험에 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, 후기 성숙 신경아교세포(late mature glial cell marker) 마커인 희소돌기아교세포 전사인자(Oligodendrocyte transcription factor; OLIG2) 및 초기 미성숙 신경아교 세포마커(glial cell marker)인 nestin의 발현 변화를 확인하였다.
- [0150] 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 2일(2dpf)에서 녹아웃 제브라피쉬의 전뇌(forebrain) 및 중뇌(midbrain) 영역에서 네스틴(nestin) 유전자 전사의 상향 조절을 발견했다. 또한, 도 4a 및 도 5에 나타난 바와 같이, 수정후 발생 36, 48 및 72시간(3dpf)에 야생형 제브라피쉬와 후기 성숙 신경교세포(late mature glial cell marker) 마커인 OLIG2의 발현을 비교한 결과, 36시간에는 발현의 차이가 없었으나, 72시간(3dpf)에는 전뇌(forebrain) 영역 및 망막에서의 감소된 발현을 확인하였다.
- [0151] 백질뇌증 발병 기전에서 신경아교(Glial) 세포 유형의 변경된 분화가 보고된 것을 감안하여, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 다른 세포 유형에도 영향을 받는지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 뉴트럴 레드(neutral red) 염색을 진행하였다. 제브라피쉬는 28℃ 암실에서 5 mg/ml 농도의 뉴트럴 레드(neutral red)에 2시간 가량 배양하였고, 그 후 현미경 관찰과 사진 작업을 진행하였다.
- [0152] 그 결과, 도 4b(왼쪽)에 나타난 바와 같이, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 수정 후 발생 3일(3dpf)에서 중뇌뿐만 아니라 2dpf의 눈에서 중성 적색-양성 미세아교 전구세포(microglial progenitor cell)의 이소성 출현을 감지하였는데, 이 중성 적색-양성 세포는 배아 난황낭에서 유래한 다음 뇌를 이동하고 침범하여 미세아교세포(microglia)로 분화하는 것으로 알려져 있다.
- [0153] 미세아교(microglial) 세포의 분화를 확인하기 위하여, 하기 표 4의 서열번호 10 및 11의 프라이머를 사용하여 합성한 apoeb의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험에 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법 (Whole-mount immunostaining)을 사용하여, 미세아교세포(microglial)의 마커인 apoeb의 발현 변화를 확인하였다.
- [0154] 그 결과, 도 4b(오른쪽)에 나타난 바와 같이, 야생형에 비해 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 apoeb를 발현하는 미세아교세포(microglial cell)의 현저한 감소를 확인하였다.

표 4

nestin	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
	정방향	CCATGCAGCAAAGAGAAGAA	8
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGTGTGACTTGTAGACACAGAAC TGC	9

apoeb	정방향	GGTGGACCGTTTCTGGCAGTATGTGTCT	10
	역방향	TTCATCAGCTCGCTAATGGCGCCAGTT	11

[0157] <3-4> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 이소성 신생혈관 형성 확인

[0158] eif2b3 유전자를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 혈관의 발달을 시각화하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0159] 구체적으로, eif2b3ck15a6/+ 돌연변이체를 혈관 내피 세포를 녹색으로 표시하는 형질 전환 Tg (kdr1 : egfp) 제브라피쉬와 상호교배하였다. 배아의 혈관은 Lightsheet Z.1 형광 현미경(Carl Zeiss AG)을 사용하여 라이브 3D 선택적 평면 조명 현미경(live 3D selective plane illumination microscopy; SPIM)으로 관찰하였다. 각각의 3dpf 배아를 0.02% 트리카인(tricaine)을 함유하는 E3 배지에서 마취하고 동일한 배지에서 1.5% 저-용점 아가로스(low-melting point agarose)로 채워진 유리 모세관 (1.0mm I.D. ; Carl Zeiss AG) 내에 삽입하였다. 배아의 주둥이 부분을 모세관에서 압출하고 이미징하는 동안 27℃에서 E3 배지/0.02% 트리카인으로 채워진 이미징 챔버에서 유지하였다. Lightsheet Z.1 형광 현미경은 3D 이미징에서 데이터를 수집하기 위해 대물 렌즈(W Plan-Apochromat 20X /1.0 UV-IS_4909000119)를 장착하였다. GFP 형광은 488nm 레이저로 활성화되었고 방출은 490nm Longpass (LP) 필터로 감지되었다. SPIM 이미징에서 얻은 원본 데이터는 ZEN 소프트웨어 v3.0(Carl Zeiss AG)으로 처리되었으며, 광학 섹션은 최대 강도 투영에 의해 각 z-stack에 대해 병합되었다.

[0160] 그 결과, 도 6a(오른쪽 및 중간)에 나타난 바와 같이, 돌연변이 배아가 야생형에 비해 중뇌 영역에서 두개골 혈관의 과분지(hyper-branching)를 나타냄을 확인하였다. 또한, 야생형에 비해 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 증가된 혈관 직경을 확인하였다(도 6a 오른쪽 및 6b). 또한, 이소성 혈관신생(angiogenesis)는 분절사이의 혈관(intersegmental vessel) 및 서브인테스티날(subintestinal) 정맥과 같은 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 다른 영역에서도 관찰되었다(도 7).

[0161] 이소성 혈관 신생의 메커니즘을 조사하기 위해, 혈관형성을 자극하는 세포에서 생성되는 신호 단백질인 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)의 발현의 변화를 확인하는 하기의 실험을 수행하였다.

[0162] 구체적으로, 하기 표 5의 서열번호 12 내지 15의 프라이머를 사용하여 합성한 VEGF의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험에 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, VEGF의 발현 변화를 확인하였다.

표 5

[0163]

	프라이머	서열 (5'-3')	서열번호
vegfaa	정방향	AAAGAGTGCCTGCAAGACCCGA	12
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGGGTTTGAAAGTGCTGTGCCGTT	13
vegfab	정방향	TTCAGCTGTCAAGAGTGCCT	14
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGCCTTGTTTGTACATCTGCAG	15

[0164] 그 결과, 도 6c에 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 2일(2 dpf)에서 야생형과 비교하여 제브라피쉬의 VEGF 유전자인 vegfaa는 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 이소성 혈관 신생이 가장 두드러진 중뇌 영역에서 발현이 증가하였으나 VEGF 동족체(homologue)인 vegfab의 발현은 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0165] 또한, eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 이소성 혈관신생으로 이어지는 과정에서 VEGF의 관여를 확인하기 위하여, 배아를 VEGF 수용체의 억제제인 SU5416으로 처리하는 실험을 수행하였다.

[0166] 구체적으로, 제브라피쉬 배아를 수정 후 26 내지 72 시간(hpf)까지 2 μM SU5416(Sigma)으로 처리하였다. 대조군으로 동일한 배치의 배아를 동일한 농도(0.1 %)의 DMSO로 처리하였다.

[0167] 그 결과, 그림 6d에 나타난 바와 같이, 3dpf에서 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 이소성 혈관 신생이 억제됨을 확인하였다. 상기의 결과는 eif2b3가 VEGF 신호 전달을 조절함으로써 적절한 혈관 발달을 위해 필요하다는 것을 시사한다.

[0169] <3-3> eif2b3를 녹아웃시킨 제브라피쉬에서 UPR 경로(Unfolded protein response pathway) 관련 유전자 및 세포사멸 관련 유전자 p53의 발현 변화 확인

[0170] ER 스트레스 후 UPR 경로의 비정상적인 활성화는 백질뇌증의 병인에 기여할 것이라는 가설을 바탕으로, UPR 경로 유전자인 X-box 결합 단백질(X-box-binding protein; XBP1), 활성화 전사인자-4(activating transcription factor-4; ATF4) 및 활성화 전사인자-6(activating transcription factor-6; ATF6)의 발현 변화를 확인하였다.

[0171] 구체적으로, 하기 표 6의 서열번호 16 내지 21의 프라이머를 사용하여 합성한 XBP1, ATF4 및 ATF6의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험에 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, UPR 경로 유전자인 XBP1, ATF4 및 ATF6의 발현 변화를 확인하였다.

표 6

	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
XBP1	정방향	CCATGGATACTCACAGCCCT	16
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGTTCTCGTAGCCGCCGAAAGAG	17
ATF4	정방향	TGAGCCTCTCTCCGTCTCACAT	18
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGGGATGGATCTGGACCGACAG	19
ATF6	정방향	ACCAAACTCGCCGCATGAGCAA	20
	역방향	TAATACGACTCACTATAGGGGCCACGAGGACTCCAACAG	21

[0173] 그 결과, 도 8에서 나타난 바와 같이, 수정 후 발생 3일(3dpf)에서 야생형에 비하여 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 XBP1, ATF4 및 ATF6의 발현이 모두 증가함을 확인하였는데, 특히 뇌 뿐만 아니라 간, 췌장 및 장에서 증가되었음을 확인하였다.

[0174] 또한, 하기 표 7의 서열번호 22 내지 23의 프라이머를 사용하여 합성한 tp53의 프로브를 사용한 것을 제외하고 상기 실험에 2와 동일한 방법 및 조건으로 홀-마운트 정위치 교잡법(Whole-mount immunostaining)을 사용하여, 세포사멸(apoptosis) 관련 유전자인 종양 단백질 p53(tp53)의 발현 변화를 확인하였다.

[0175] 그 결과, 수정 후 발생 3일(3dpf)에서 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬에서 UPR 경로 유전자의 발현이 증가한 부분에서 tp53의 발현도 증가했음을 확인하였다(도 8).

표 7

	프라이머	서열(5'-3')	서열번호
tp53	정방향	CACGCGGATTGCTTTGTGG	22
	역방향	ACTTCAGCCACATGCTCGGAC	23

[0178] <실험예 4> 백질뇌증의 돌연변이 확인 및 기능적 검증

[0179] <4-1> 19개월령 환자에서 새로운 EIF2B3 돌연변이 유전자 확인

[0180] <4-1-1> 19개월령 환자의 임상 및 MRI를 통한 백질뇌증 진단

[0181] 이 연구는 환자에 대한 서면 동의를 얻었으며, 세브란스 병원 기관 검토위원회(4-2018-0021)의 승인을 받았다. 19 개월된 여아가 급격한 균형과 협응력을 잃고 발달의 급속한 퇴행으로 응급실에 내원하였다. 방문 4일 전에 열이 있는 상부 호흡기 감염이 있었으며, 그 후 아이는 앉거나 물건을 잡거나 말하는 능력을 상실하였다. 아이는 제왕 절개를 통해 한국 조상의 건강한 비친족적 부모에게 눈에 띄지 않는 임신 후 만삭에 태어났으나, 아이의 발달은 약간 지연되었습니다. 여아는 9개월에 뒤집기를 하고, 9개월에 팔을 지지하여 앉았고, 13개월에 기었고, 12개월에 잡고 일어섰고, 19개월에 가구의 주위를 걸었다. 아이는 도움없이 서 있거나 걸을 수 없었다. 아이는 19개월이 되어서야 3 단어를 말할 수 있었다. 검사를 통한 아이의 글래스고 혼수 척도 점수(Glasgow coma scale score)는 8점(E2V2M4)이었다. 신경학적 검사에서 활발한 심부 건 반사(brisk deep tendon reflexe), 신근 발바닥 반응(extensor plantar responses) 및 운동 실조(ataxia)를 보였다. 방문 후 1 주일이 지나자 그녀는 더욱 기민해졌고, 글래스고 혼수 척도 점수(Glasgow coma scale score)는 13점(E4V4M5)으로 향상되었다. 25개월에 아이는 운동 능력과 언어 능력이 지체되었다. 아이는 머리를 제어하거나, 구르거나, 앉거나, 도움을받

을 수 없었다. 아이는 말을 할 수 없었고 이해할 수 없는 소리만 낼 수 있었다.

[0182] 뇌 MRI 결과(도 9a), (1) 축 방향 T2 강조영상(axial T2-weighted image)은 뇌실의 고강도 신호 및 깊은 백질의 확산을 보여주었다. (2) T2 FLAIR 이미지는 CSF와 유사한 관련 백질의 저강도 신호를 보여주었다. 피질하 U-fiber의 상대적 감소가 관찰되었다. 관련 백질에서 방사되는 고강도 줄무늬도 관찰되었다. (3) 명암 강조 T1 강조 영상은 명암의 향상 없이 관련 백질의 저강도를 보여주었다. 확산 가중 이미지(diffusion weighted image; DWI) (4) 및 겔보기확산계수(apparent diffusion coefficient; ADC) 맵 (5)에서 내포(internal capsule), 뇌량(corpus callosum) 및 피질하 백질에서 제한된 확산을 볼 수 있었다.

[0184] <4-1-2> 새로운 EIF2B3 돌연변이 유전자 확인

[0185] 백질뇌증의 임상 및 MRI 소견을 가진 19 개월된 여성 환자를 대상으로 엑솜 시퀀싱(Clinical exome sequencing)을 수행하였다.

[0186] 구체적으로, 임상 엑솜 시퀀싱(Clinical exome sequencing)은 세브란스병원에서 수행되었다. Proband의 Genomic 337 DNA 샘플은 맞춤형 xGen Inherited Diseases Panel (Integrated DNA Technologies, USA)을 사용하여 4503개 유전자를 스크리닝하기 위해 패널 시퀀싱(panel sequencing)을 거쳤다.

[0187] 그 결과, 도 9b에 나타난 바와 같이, EIF2B3(NP_065098.1, 서열번호 24)에서 유의성이 알려지지 않은 2 개의 새로운 이형접합변이체(c.89T> C, 엑손 2의 p.Val130Ala 및 c.503T> C, 엑손 5의 p.Leu168Pro)가 검출되었다(EIF2B3 변종은 수탁 번호 VCV000617677.2 및 VCV000972716.1로 ClinVar 데이터베이스에 기탁되었다). c.89T> C (p.Val130Ala) 돌연변이는 이전 연구에서 그 기능의 분석없이 백질뇌증을 가진 한국인 유아 환자에서도 보고되었으나(Hyun, S.E et al., (2019) Correlation Between Vanishing White Matter Disease and Novel Heterozygous EIF2B3 Variants Using Next500 Generation Sequencing: A Case Report. Ann. Rehabil. Med., 43, 234-238.), c.503 T> C (p.Leu168Pro)는 다른 연구에서 보고된 적 없는 새로운 돌연변이였다. 2 개의 잔기 Valine30과 Leucine168은 제브라피쉬를 포함한 종 전체에 걸쳐 매우 보존되어있는 것으로 밝혀졌다.

[0189] <4-2> 새로운 EIF2B3 돌연변이를 포함한 EIF2B3 돌연변이의 분자모델링

[0190] 백질뇌증 환자의 EIF2B3 유전자에서 발견한 새로운 돌연변이(L168P)와 이전에 보고 된 5개의 돌연변이(V46I, G47E, A87V, R91H 및 R225Q)의 EIF2B3 단백질 구조를 분석하는 실험을 수행하였다.

[0191] 구체적으로, 초저온전자현미경(cryo-electron microscopy, cryo-EM; cryo-EM)으로 EIF2B3의 C-말단 영역의 구조를 관찰할 수 없다는 점을 고려할 때(PDB code 6CAJ), R225Q의 경우를 제외하고 N-말단 영역의 돌연변이에 초점을 맞추었다.

[0192] 그 결과, 도 10b에 나타난 바와 같이, 구조 기반 모델링은 Leu168의 프롤린 치환이 단백질 잘못된 접힘을 유발할 수 있음을 보여주었다. 이 돌연변이는 내부 폴딩에 기여하는 Arg166 및 His190과의 접촉 손실을 초래할뿐만 아니라 돌연변이된 프롤린의 Cδ 원자와 Gly159의 주사슬 카르보닐기(main chain carbonyl group) 사이에 입체 장애를 유발할 수 있음을 확인하였다. 또한, 돌연변이 단백질의 분자 모델링은 V46I, G47E, A87V, R91H 또는 R225Q와 같은 다른 돌연변이가 내부 원자 접촉의 손실로 인해 구조적 온전성(structural integrity)을 손상시킬 수 있는 EIF2B 서브 유닛 사이에서 분자간 입체 장애(steric hindrance)를 유발할 수 있음을 시사하였다(도 10 c 내지 f).

[0194] <4-3> eif2b3 녹아웃 제브라피쉬 동물모델을 사용한 환자 돌연변이의 기능적 검증

[0195] 인간 백질뇌증 환자 61명에서 확인된 25개의 돌연변이 중 19 개의 미스센스 돌연변이를 이용하여 제브라피쉬 구조 실험(rescue experiment)을 수행하였다(NM_020365.5 및 NP_065098.1).

[0196] 구체적으로, 부위 지정 돌연변이 유발법(site-directed mutagenesis)을 사용하여 야생형 EIF2B3 cDNA와 백질뇌증 환자로부터 확인된 19개의 변이체(p.Gly11Val, p.Leu27Gln, p.Val130Ala, p.Lys33Glu, p.Val146Ile, p.Gly47Glu, p.Ala87Val, p.Arg91His, p.Gln136Pro, p.Leu168Pro, p.Arg225Gln, p.Gln236Glu, p.Arg312Gln, p.Ala322Gly, p.His341Gln, p.Ile346Thr, p.Ser369fs, p.Val398fs 및 p.Cys424Gly)에 대한 20개의 발현 벡터

를 생성했다. 각 점 돌연변이(point mutation)는 하기 표 8에 나와있는 프라이머를 사용하여 야생형 EIF2B3 발현 벡터에 도입되었고, 전체 플라스미드 주형을 증폭하기 위한 PCR을 수행하였다. PCR은 Pfu Turbo DNA 중합 효소(NEB)를 사용하여 수행되었으며, 95℃에서 5 분 동안 변성, 95℃에서 30초 동안 12사이클 반복, 55℃에서 1분 동안 어닐링 및 68℃에서 11분 및 72℃에서 10분 동안 연장되었다. 모 주형(parent template)은 메틸화-의존 엔도뉴클레아제(methylation-dependent endonuclease)인 Dpn I(NEB)를 사용하여 제거되었다. 플라스미드를 생성된 콜로니로부터 분리하고 원하는 변형에 대해 스크리닝하였다. 원하는 변형 및 특정 뉴클레오티드 치환을 확인하기 위해 각 돌연변이 컨스트럭트(construct)를 시퀀싱하였다.

표 8

[0198]

뉴클레오타이드	아미노산	프라이머	서열 (5' - 3')	서열번호
c.32G>T	p.Gly11Val (G11V)	정방향	AGCAGTAGTGATGGCAGTAG(T)TGGAGGATCTCGGATGACAG	25
		역방향	CTGTCATCCGAGATCCTCCAACACTACTGCCATCACTACTGCT	26
c.80 T>A	p.Leu27Gln (L27Q)	정방향	TTCCAGCATT CCCAAACCTC (A)GCTTCCA GTTGGAACA AAC	27
		역방향	GTTTGTTCCTC AACTGGAAGC TGAGGTTTGG GAATGCTGGA A	28
c.89 T>C	p.Val30Ala (V30A)	정방향	TCCCAAACCT CTGCTTCCAG (C)TGGAAC AAACCTTTAA TTT	29
		역방향	AAATTAAAGG TTGTTCCTC GCTGGAAGCA GAGGTTTGGG A	30
c.97 A>G	p.Lys33Glu (K33E)	정방향	CTCTGCTTCC AGTTGGGAAC (G)AACCTTT AATTTGGTAC CCA	31
		역방향	TGGGTACCAA ATTAAAGGTT CGTTCCCAAC TGGAAGCAGA G	32
c.136G>A	p.Val46Ile (V46I)	정방향	CATTGAACCT GCTTGAGCGT (A)TTGGATT TGAAGAAGTC ATT	33
		역방향	AATGACTTCT TCAAATCCAA TACGCTCAAG CAGGTTCAAT G	34

c. 14 0G>A	p.Gly47Glu (G47E)	정 방 향	GAACCTGCTT GAGCGTGTG (A)ATTGAA GAAGTCATTG TGG	35
		역 방 향	CCACAATGAC TTCTTCAAAT TCAACACGCT CAAGCAGGTT C	36
c. 26 0C>T	p.Ala87Val (A87V)	정 방 향	TGATGCTGAC ATGGGAACG (T)AGATTCT TTGCGCTACA TAT	37
		역 방 향	ATATGTAGCG CAAAGAATCT ACAGTTCCCA TGTCAGCATC A	38
c. 27 2G>A	p.Arg91His (R91H)	정 방 향	GGGAACTGCA GATTCTTTGC (A)CTACATA TATCCAAAAC TTA	39
		역 방 향	TAAGTTTGG ATATATGTAG TGCAAAGAAT CTGCAGTTCC C	40
c. 40 7A>C	p.Gln136Pro (Q136P)	정 방 향	TATGTTGATG AGAAAAGGCC (C)AGATAGC ATAGAACCTG TTC	41
		역 방 향	GAACAGGTTT TATGCTATCT GGGCCTTTTC TCATCAACAT A	42
c. 50 3T>C	p.Leu168Pro (L168P)	정 방 향	CAGCACAGGA AAGAGGCTGC (C)CTTCATG GCTAATGAAG CAG	43
		역 방 향	CTGCTTCATT AGCCATGAAG GGCAGCCTCT TTCCTGTGCT G	44
c. 67 4G>A	p.Arg225Gln (R225Q)	정 방 향	TGGGTCAATA ACTTCTATCC (A)GAGTGAA CTGATTCCAT ATT	45
		역 방 향	AATATGGAAT CAGTTCATC TGGATAGAAG TTATTGACCC A	46

c. 70 6C>G	p.Gln236Glu (Q236E)	정 방 향	TTCCATATTT AGTGAGAAAA (G)AGTTTTC CTCAGCTTCC TCA	47
		역 방 향	TGAGGAAGCT GAGGAAAAC CTTTCTCAC TAAATATGGA A	48
c. 93 5G>A	p.Arg312Gln (R312Q)	정 방 향	GAAAGAGGGG CTCTGCTCTC (A)AGTGAGC ACACTGGGAC TCT	49
		역 방 향	AGAGTCCCAG TGTGCTCACT TGAGAGCAGA GCCCCCTTT C	50
c. 96 5C>G	p.Ala322Gly (A322G)	정 방 향	ACTGGGACTC TACATGGAAG (G)AAACAGA CAGGTGCCCA AAT	51
		역 방 향	ATTTGGGCAC CTGTCTGTTT CCTTCCATGT AGAGTCCCAG T	52
c. 10 23T> G	p.His341Gln (H341Q)	정 방 향	CCAGAAGAAC CACCAGTCCA (G)TCGTCAG CCCAGATTGT CAG	53
		역 방 향	CTGACAATCT GGGCTGACGA CTGGACTGGT GGTTCTTCTG G	54
c. 10 37T> C	p.Ile346Thr (I346T)	정 방 향	AGTCCATTCG TCAGCCCAGA (C)TGTCAGC AAACACCTGG TTG	55
		역 방 향	CAACCAGGTG TTTGCTGACA GTCTGGGCTG ACGAATGGAC T	56
c. 11 06_1 113d el	p.Ser369fs (S369fs)	정 방 향	ACAGATTGGA GAGAAGTCAT CGCTCAGTCA TTGGCTCATC	57
		역 방 향	GATGAGCCAA TGAAGTACG ATGACTTCTC TCCAATCTGT	58
c. 11 93_1 194d elTG	p.Val398fs (V398fs)	정 방 향	TCTCATGAAC TCAGTCACTG GAGGAAGGAA GCAATATCCA	59
		역 방 향	TGGATATTGC TTCCTTCCTC CAGTGACTGA GTTCATGAGA	60

c. 1270T>G	p.Cys424Gly (C424G)	정방향	AGGGTGCAGA CATCAAGGAC (G)GCTTGAT TGGAAGTGGC CAG	61
		역방향	CTGGCCACTT CCAATCAAGC CGTCCTTGAT GTCTGCACCC T	62

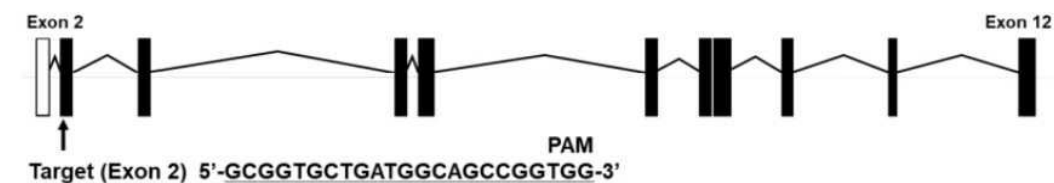
[0200] 상기의 방법으로 만들어진 19개의 변이체 및 야생형 발현 벡터를 이용하여 구조 실험(rescue experiment)을 수행하였다.

[0201] 구체적으로, 선형화된 플라스미드 DNA를 주형으로 사용하여 mMACHINE SP6 Transcription kit(ThermoFisher)를 통해 캡핑된 합성 mRNA (Synthetic capped mRNAs)를 전사하였다. 다목적 pCS2+ 발현 벡터를 사용하였다. 합성 mRNA는 0.2% 페놀 레드를 추적 염료(tracking dye)로 사용한 0.2M KCl에 용해시킨 다음, PV820 Pneumatic PicoPump(WPI)를 사용하여 단일 세포 단계의 제브라피쉬 배아에 미세 주입하고 5 dpf에서 분석하였다. 주입된 mRNA의 구조 활동(rescue activity)을 테스트하기 위해 부레(swim bladder) 팽창, 난황 흡수, 심장 부종, 눈 크기등의 몇 가지 형태학적 결함에 대한 회복을 주의깊게 조사하였다.

[0202] 그 결과, 그림 11 및 도 12에서 나타낸 바와 같이, 야생형 인간 EIF2B3의 과발현은 부레(swim bladder) 팽창을 제외하고 대부분의 표현형 특히, 입술 열림, 튀어 나온 입, 심장 부종 및 눈 크기를 회복하였다. 새로운 환자 변이체를 포함한 환자 유래 EIF2B3 돌연변이 변이체는 eif2b3 녹아웃 제브라피쉬의 형태학적 표현형을 구제하지 못하였다. 상기의 결과는 19개의 확인된 EIF2B3 미스센스 돌연변이가 병원성이라는 최초의 유전적 증거를 제공한다. 또한, eif2b3 제브라피쉬 모델은 백질뇌증 환자에서 확인된 새로운 EIF2B3 변이체의 신속한 기능 검증을 위한 생체 내 (in vivo) 도구로서의 응용을 시사한다.

도면

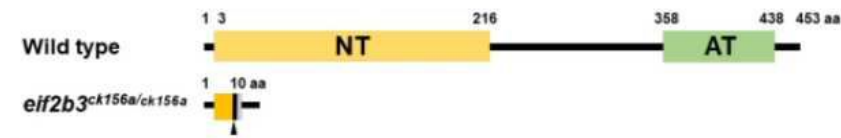
도면1a



도면1b

	Wild type	5'- TACAGGCGGTGCTGATGGCAGCCGGTGGAGGCTCCA -3'	Reference
<i>eif2b3^{ck156b}</i>		TACAGGCGGTGCTGATGGCAGCA - - - - - CCA	-10
<i>eif2b3^{ck156a}</i>		TACAGGCGGTG - - - - - GAGGCTCCA	-16

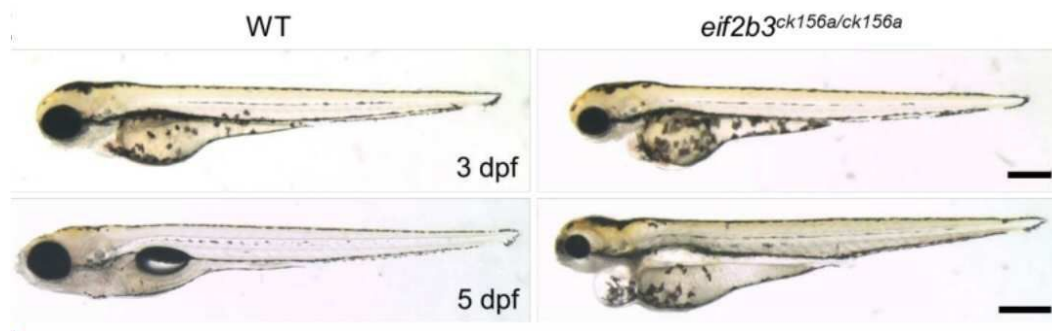
도면1c



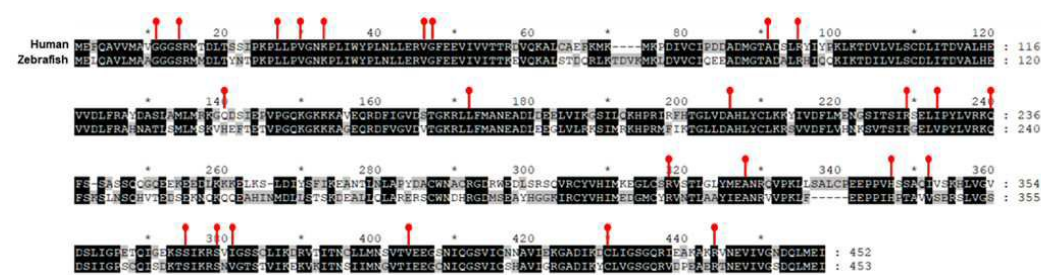
도면1d



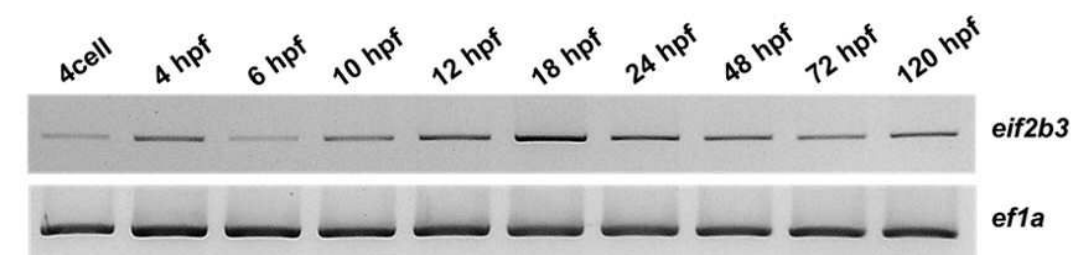
도면1e



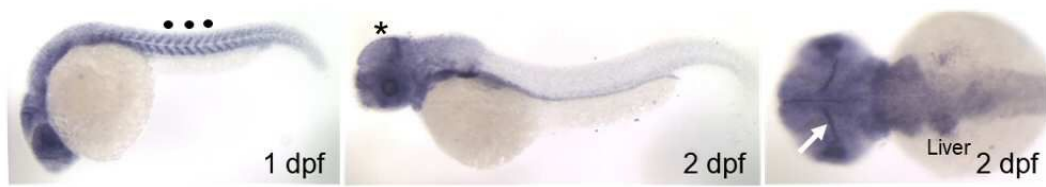
도면2a



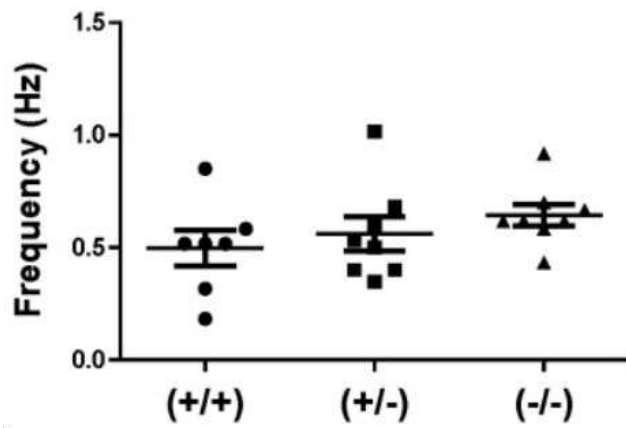
도면2b



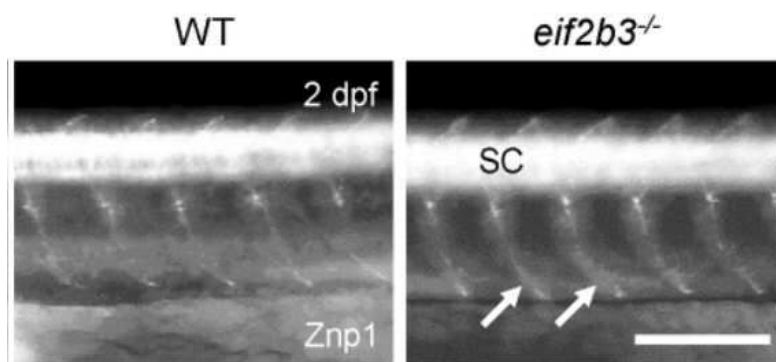
도면2c



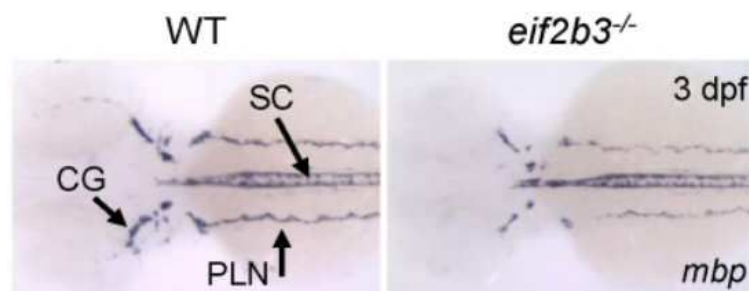
도면3a



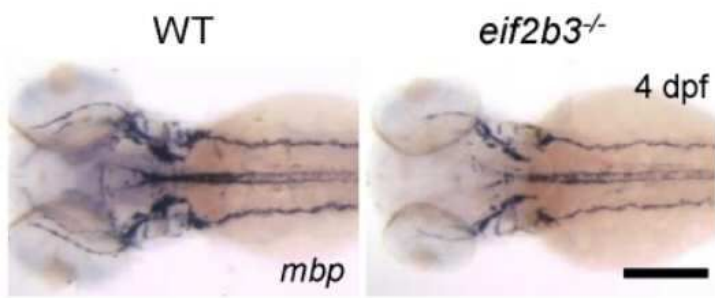
도면3b



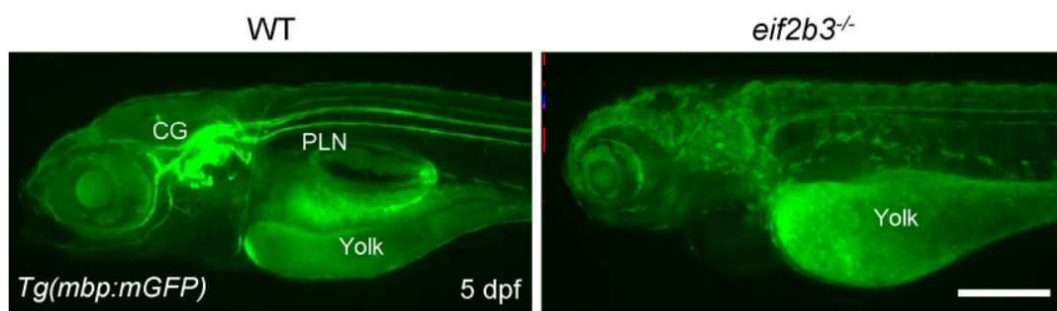
도면3c



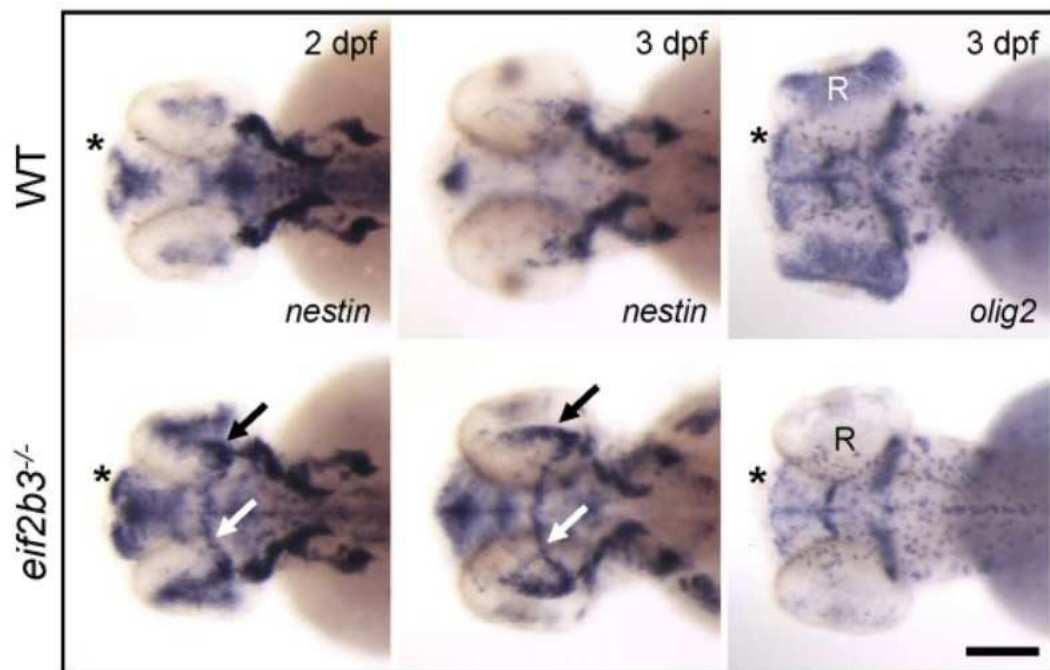
도면3d



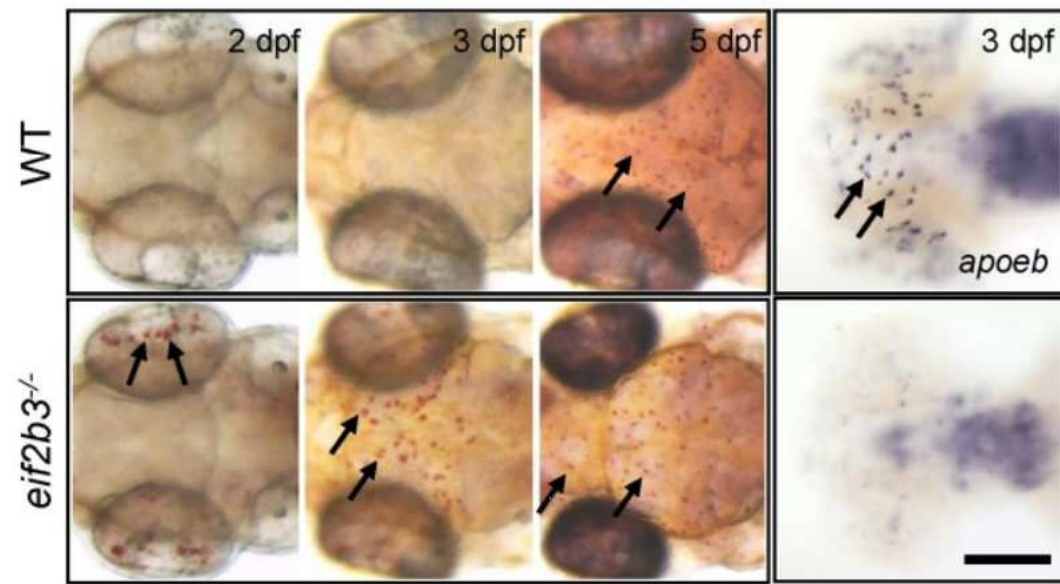
도면3e



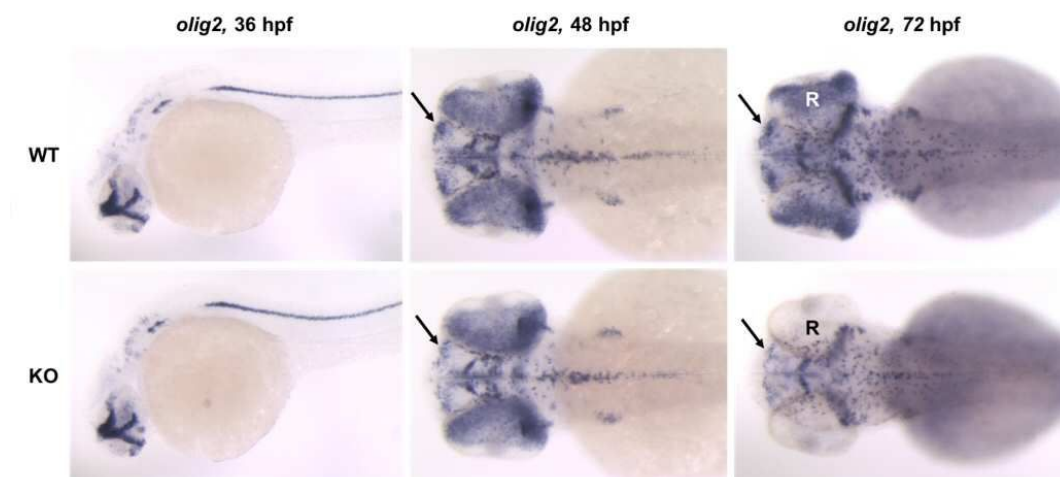
도면4a



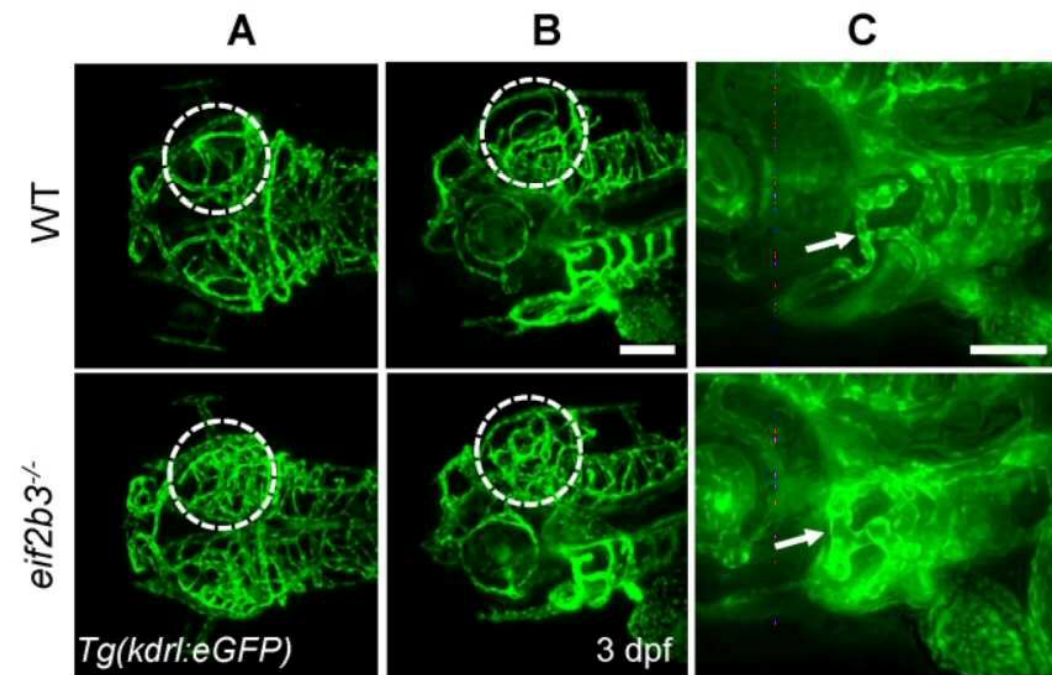
도면4b



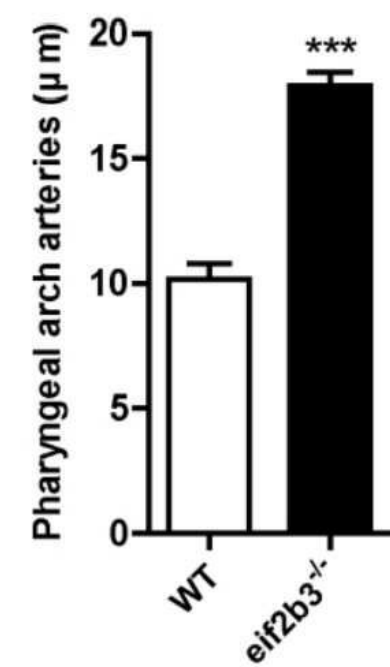
도면5



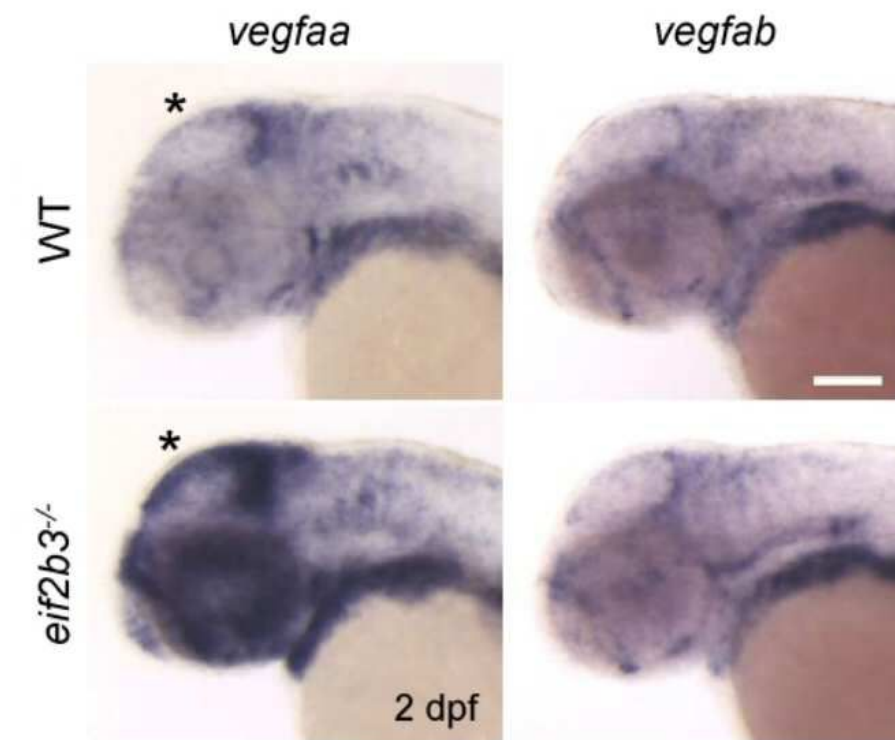
도면6a



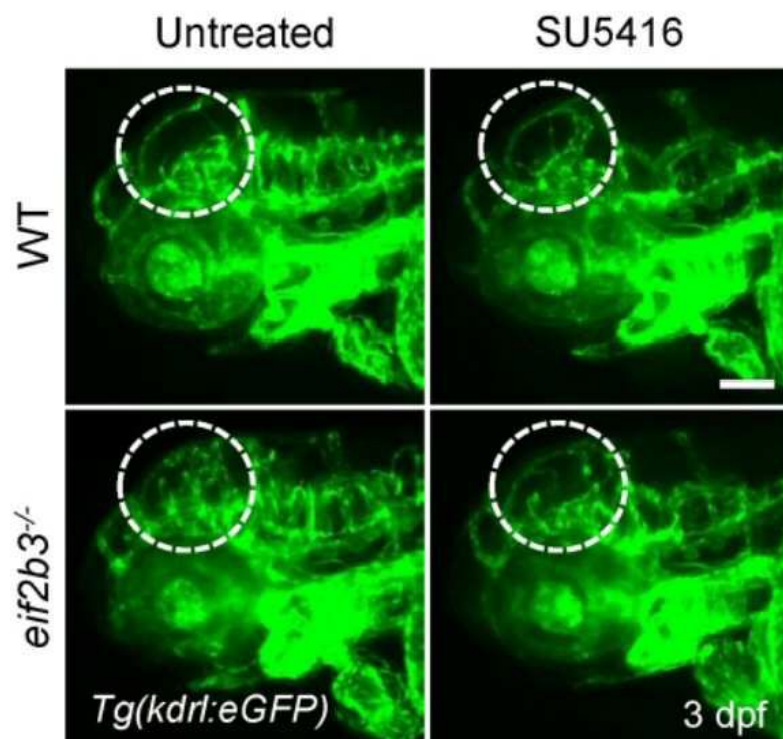
도면6b



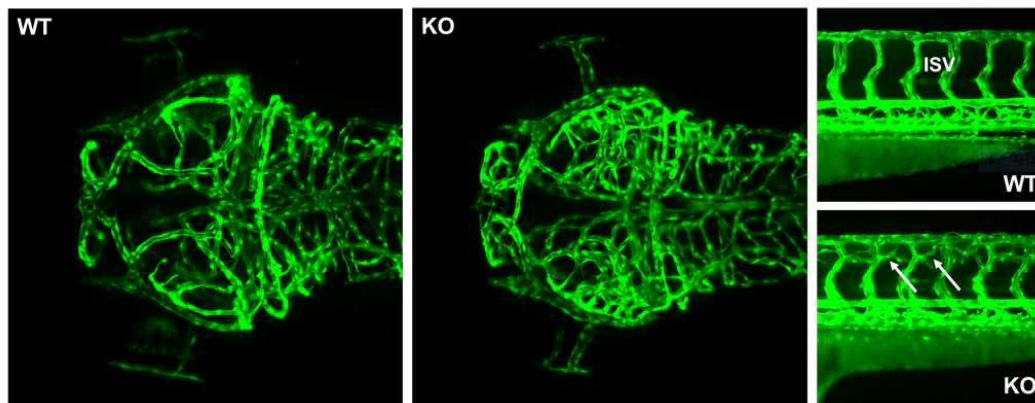
도면6c



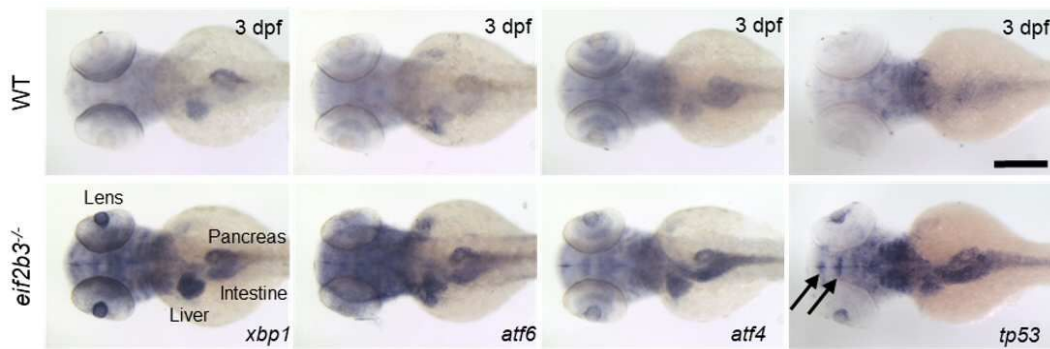
도면6d



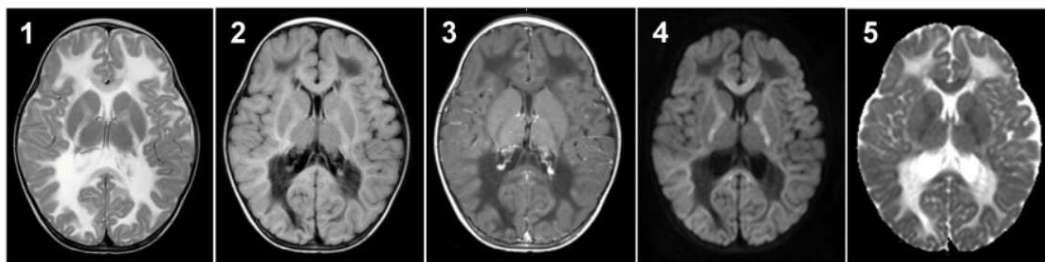
도면7



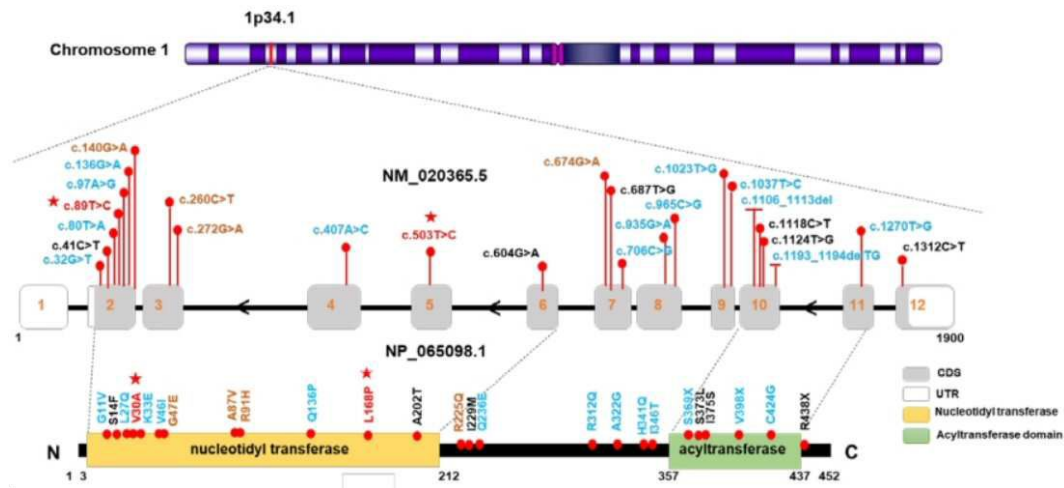
도면8



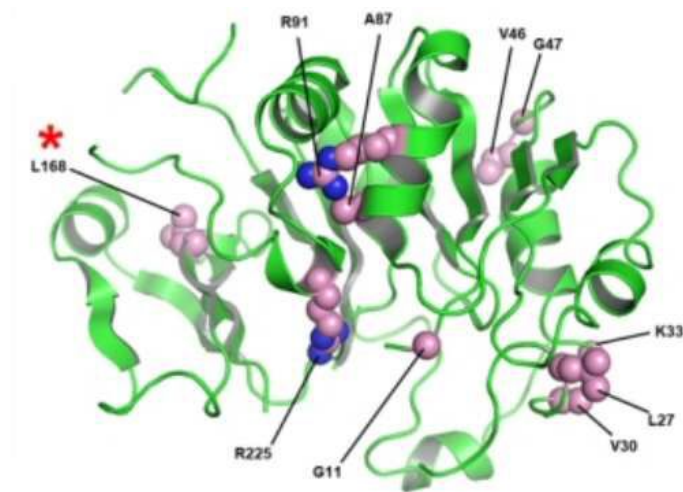
도면9a



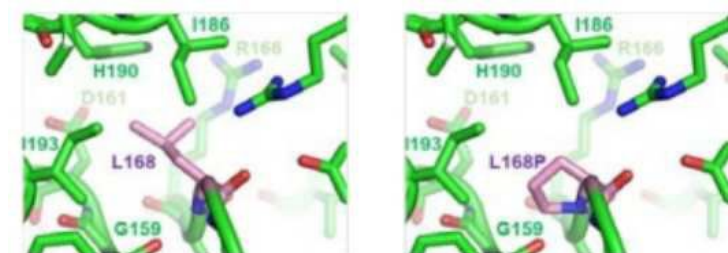
도면9b



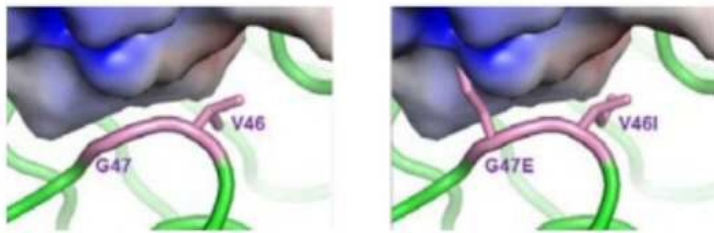
도면10a



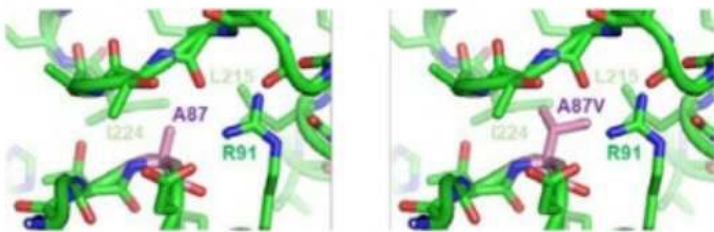
도면10b



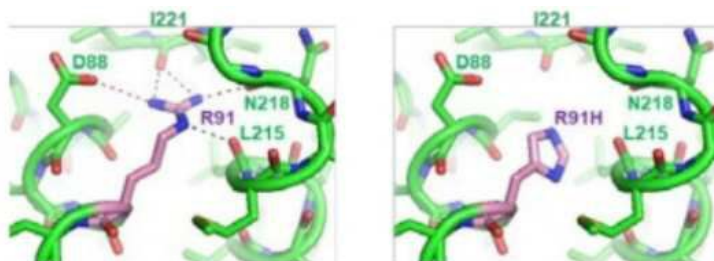
도면10c



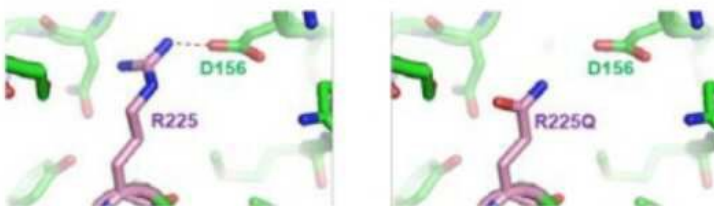
도면10d



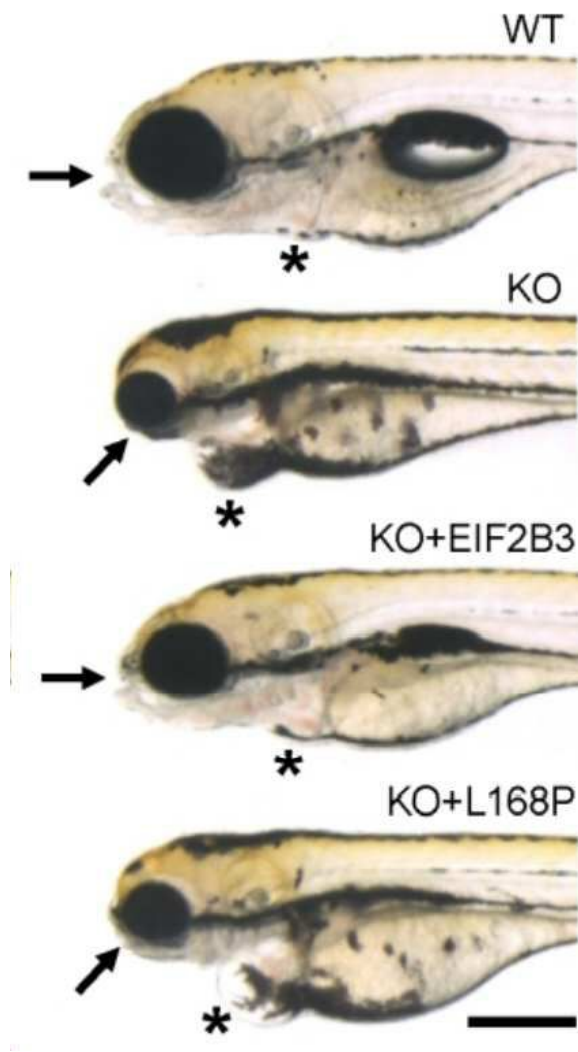
도면10e



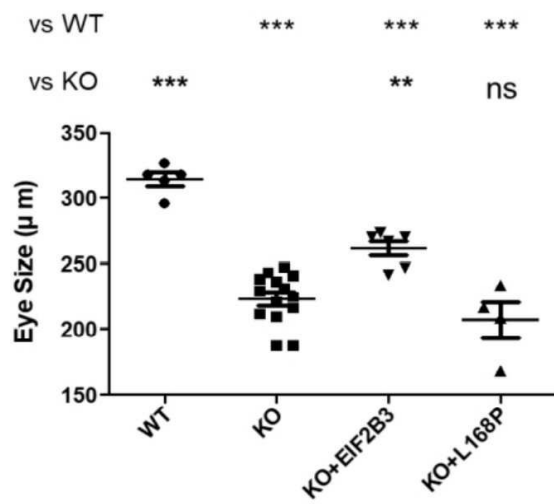
도면10f



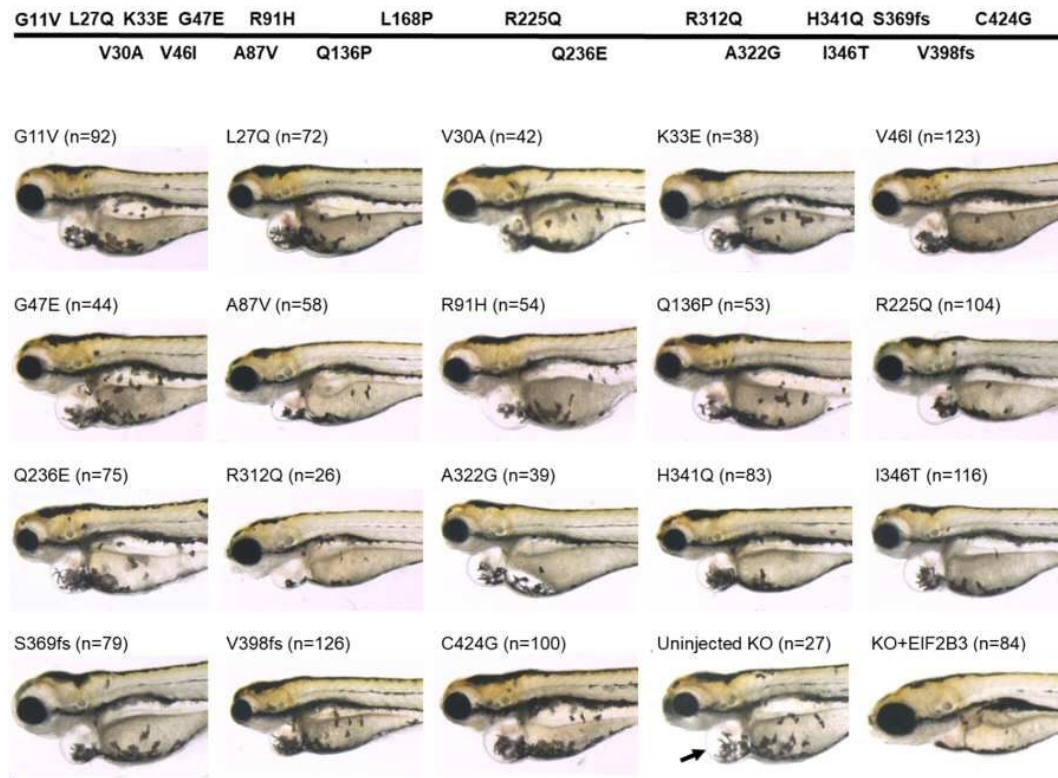
도면11a



도면11b



도면12



서열 목록

<110> The Industry Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> eif2b3 knock-out animal model and using thereof

<130> 2020p-12-015

<160> 62

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1362

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> eif2b3 DNA sequence

<400> 1

atggagctac aggcgggtgct gatggcagcc ggtggaggct ccaggatgat ggatctcacc 60

tataacaccc ccaaacctct gcttcctgtg ggcaacaaac cctcatctg gtacccctt 120

aacctgctgg agagagtggg atttgaagag gtattgtca tcacaactaa agaggttcaa 180

aaggccctca gcactgatca acgcttgaag acggatgtga agatgaagtt ggatgtggtg 240

tgcattcaag aagaggctga tatgggcacc gcagatgtct ttgcacacat ccagcaaaag 300

atcaagacag acatcttagt gctgagctgt gatttgataa ctgatgtggc cctgcatgag 360

gttgtggacc tcttccgtgc acacaacgcc acgctgtcca tgcttatgag caaagtgcac 420
gaattcacag agaccgtccc gggccaaaag ggcaagaaaa aagcaggaga acagcgggac 480
tttgtcggcg tggacgtcac aggggaagagg cttctgttca tggccaatga ggcagatctg 540
gaggaaggcc ttgttctccg gaagtcctac atgcgcaaac atcccagaat gttcatcaag 600

accggcctgc tggatgcaca cctgtactgc ctgaagagat ccgtggtgga tttcttagtt 660
cacaacaagt ctgtcacttc aatcagagga gaattagtgc cgtatttggc ccgtaagcag 720
ttctcaaagt ctctaaactc ccaacatgtc accgaggatt cagagaagaa tcaaaagcaa 780
caggaagctc acatcaatat ggatctctc agcaccagta aagacgaggc gctgctacag 840
cttgcctggg agaggtcgtg ttggaacgat catcgtggag acatgagcga agcctacat 900
ggcggtaaaa tacgtgcta tgttcacatc atggaggacg gcatgtgtta tcgcgtcaat 960
acactcgccg cttacataga ggccaatcgt gtggttccaa agttgtttga ggaacctcca 1020

atccatccaa ctgcggtggc ctcggaacgc tctttggttg ggagtgacag cataattggg 1080
ccatcttgc agatatcgga caagacatca atcaagcgt caaatgttgg cacatcaact 1140
gtaatcaagg aaaagtgaa gatcaccaac tccatcatca tgaacggagt cactattgaa 1200
gaagggtgca acatccaggg cagtgtgac tgacgtcacg cggtgattgg acgtggagcc 1260
gacatcaagt actgtctggt gggcagcggg cagcgcgtcg atccagaggc tgaaagaacc 1320
aatgaggtca tcgtaggatc tgaccagctc atggaaatct ag 1362

<210> 2
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA forward primer

<400> 2
taggggtgct gatggcagcc gg 22

<210> 3
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sgRNA reverse primer

<400> 3
aaaccggct gccatcagca cc 22

<210> 4

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> eif2b3 forward primer
 <400> 4
 tgttcgggat ggagctacag 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> eif2b3 reverse primer
 <400> 5
 tttgttgccc acaggaagca 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> eif2b3 foward primer
 <400> 6
 gcaacaggaa gctcacatca a 21

<210> 7
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> eif2b3 reverse primer
 <400> 7
 taatacgact cactataggg gtccaatcac cgcgtgactg 40

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nestin foward primer
 <400> 8

ccatgcagca aagagaagaa	20
<210> 9	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> nestin reverse primer	
<400> 9	
taatacgact cactataggt gtgacttgta gacacagaac tgc	43
<210> 10	
<211>	
> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> apoeb foward primer	
<400> 10	
ggtggaccgt ttctggcagt atgtgtct	28
<210> 11	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> apoeb reverse primer	
<400> 11	
ttcatcagct cgctaattggc gcccgatt	28
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> vegfaa forward primer	
<400> 12	
aaagagtgcg tgcaagaccc ga	22
<210> 13	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> vegfaa reverse primer
 <400> 13
 taatacgact cactataggg ggttttgaaa gtgctgtgcc gtt 43
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> vegfab forward primer
 <400> 14
 ttcagctgtc aagagtcct 20
 <210> 15
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> vegfab reverse primer
 <400> 15
 taatacgact cactataggg ccttggtttg tcacatctgc ag 42
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XBP1 forward primer
 <400> 16
 ccatggatac tcacagccct 20
 <210> 17
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> XBP1 reverse primer
 <400> 17
 taatacgact cactataggg ttctcgtagc cgccgaaaga g 41
 <210> 18
 <211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATF4 forward primer
 <400> 18
 tgagcctctc tccgtctcac at 22
 <210> 19
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATF4 reverse primer
 <400> 19
 taatacgact cactataggg ggatggatct ggaccgacag 40
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATF6 foward primer
 <400> 20
 accaaaaactc gccgcatgag caa 23
 <210> 21
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ATF6 reverse primer
 <400> 21
 taatacgact cactataggg gcccacgagg actccaacag 40
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tp53 forward primer
 <400> 22
 cacgcggatt tgctttgtgg 20

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tp53 reverse primer

<400> 23

acttcagcca catgctcgga c

21

<210> 24

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EIF2B3 protein sequence

<400> 24

Met Glu Phe Gln Ala Val Val Met Ala Val Gly Gly Gly Ser Arg Met

1 5 10 15

Thr Asp Leu Thr Ser Ser Ile Pro Lys Pro Leu Leu Pro Val Gly Asn

20 25 30

Lys Pro Leu Ile Trp Tyr Pro Leu Asn Leu Leu Glu Arg Val Gly Phe

35 40 45

Glu Glu Val Ile Val Val Thr Thr Arg Asp Val Gln Lys Ala Leu Cys

50 55 60

Ala Glu Phe Lys Met Lys Met Lys Pro Asp Ile Val Cys Ile Pro Asp

65 70 75 80

Asp Ala Asp Met Gly Thr Ala Asp Ser Leu Arg Tyr Ile Tyr Pro Lys

85 90 95

Leu Lys Thr Asp Val Leu Val Leu Ser Cys Asp Leu Ile Thr Asp Val

100 105 110

Ala Leu His Glu Val Val Asp Leu Phe Arg Ala Tyr Asp Ala Ser Leu

115 120 125

Ala Met Leu Met Arg Lys Gly Gln Asp Ser Ile Glu Pro Val Pro Gly

130 135 140

Gln Lys Gly Lys Lys Lys Ala Val Glu Gln Arg Asp Phe Ile Gly Val

145 150 155 160
 Asp Ser Thr Gly Lys Arg Leu Leu Phe Met Ala Asn Glu Ala Asp Leu
 165 170 175

 Asp Glu Glu Leu Val Ile Lys Gly Ser Ile Leu Gln Lys His Pro Arg
 180 185 190
 Ile Arg Phe His Thr Gly Leu Val Asp Ala His Leu Tyr Cys Leu Lys
 195 200 205
 Lys Tyr Ile Val Asp Phe Leu Met Glu Asn Gly Ser Ile Thr Ser Ile
 210 215 220
 Arg Ser Glu Leu Ile Pro Tyr Leu Val Arg Lys Gln Phe Ser Ser Ala
 225 230 235 240
 Ser Ser Gln Gln Gly Gln Glu Glu Lys Glu Glu Asp Leu Lys Lys Lys

 245 250 255
 Glu Leu Lys Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Phe Ile Lys Glu Ala Asn Thr
 260 265 270
 Leu Asn Leu Ala Pro Tyr Asp Ala Cys Trp Asn Ala Cys Arg Gly Asp
 275 280 285
 Arg Trp Glu Asp Leu Ser Arg Ser Gln Val Arg Cys Tyr Val His Ile
 290 295 300
 Met Lys Glu Gly Leu Cys Ser Arg Val Ser Thr Leu Gly Leu Tyr Met
 305 310 315 320

 Glu Ala Asn Arg Gln Val Pro Lys Leu Leu Ser Ala Leu Cys Pro Glu
 325 330 335
 Glu Pro Pro Val His Ser Ser Ala Gln Ile Val Ser Lys His Leu Val
 340 345 350
 Gly Val Asp Ser Leu Ile Gly Pro Glu Thr Gln Ile Gly Glu Lys Ser
 355 360 365
 Ser Ile Lys Arg Ser Val Ile Gly Ser Ser Cys Leu Ile Lys Asp Arg
 370 375 380
 Val Thr Ile Thr Asn Cys Leu Leu Met Asn Ser Val Thr Val Glu Glu

 385 390 395 400

Gly Ser Asn Ile Gln Gly Ser Val Ile Cys Asn Asn Ala Val Ile Glu
405 410 415
Lys Gly Ala Asp Ile Lys Asp Cys Leu Ile Gly Ser Gly Gln Arg Ile
420 425 430
Glu Ala Lys Ala Lys Arg Val Asn Glu Val Ile Val Gly Asn Asp Gln
435 440 445
Leu Met Glu Ile
450

<210> 25
<211> 41
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.32G>T forward primer

<400> 25

agcagtagtg atggcagtag ttggaggatc tcggatgaca g 41

<210> 26

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.32G>T reverse primer

<400> 26

ctgtcatccg agatcctcca actactgcc a tcactactgc t 41

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.80T>A forward primer

<400> 27

ttccagcatt cccaaacctc agcttccagt tggaacaaa c 41

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.80T>A reverse primer

<400> 28

gtttgttccc aactggaagc tgaggtttgg gaatgctgga a 41

<210> 29

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.89T>C forward primer

<400> 29

tcccaaacct ctgcttcag ctgggaacaa acctttaatt t 41

<210> 30

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.89T>C reverse primer

<400> 30

aaattaaagg tttgttccca gctggaagca gaggtttggg a 41

<210> 31

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.97A>G forward primer

<400> 31

ctctgcttc agttggaac gaacctttaa ttggtaccc a 41

<210> 32

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.97A>G reverse primer

<400> 32

tgggtaccaa attaaaggtt cgttcccaac tggaagcaga g 41

<210> 33

<211> 41

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.136G>A forward primer
 <400> 33
 cattgaacct gcttgagcgt attggatttg aagaagtcac t 41
 <210> 34
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.136G>A reverse primer
 <400> 34
 aatgacttct tcaaatccaa tacgtcaag caggttcaat g 41
 <210> 35
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.140G>A forward primer
 <400> 35
 gaacctgctt gagcgtgttg aatttgaaga agtcattgtg g 41
 <210> 36
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.140G>A reverse primer
 <400> 36
 ccacaatgac ttcttcaaat tcaacacgt caagcaggtt c 41
 <210> 37
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.260C>T forward primer
 <400> 37
 tgatgtgac atgggaactg tagattcttt gcgtacata t 41

<210> 38

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.260C>T reverse primer

<400> 38

atatgtagcg caaagaatct acagttccca tgcagcatc a 41

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.272G>A forward primer

<400> 39

gggaactgca gattctttgc actacatata tccaaaactt a 41

<210> 40

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.272G>A reverse primer

<400> 40

taagttttgg atatatgtag tgcaaagaat ctgcagttcc c 41

<210> 41

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.407A>C forward primer

<400> 41

tatgttgatg agaaaaggcc cagatagcat agaacctgtt c 41

<210> 42

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.407A>C reverse primer

<400> 42
gaacaggttc tatgctatct gggccttttc tcatcaacat a 41

<210> 43

<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> c.503T>C forward primer

<400> 43
cagcacagga aagaggctgc cttcatggc taatgaagca g 41

<210> 44
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> c.503T>C reverse primer

<400> 44
ctgcttcatt agccatgaag ggcagcctct ttctgtgct g 41

<210> 45
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> c.674G>A forward primer

<400> 45
tgggtcaata acttctatcc agagtgaact gattccatat t 41

<210> 46
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> c.674G>A reverse primer

<400> 46
aatatggaat cagttcactc tggatagaag ttattgaccc a 41

<210> 47
<211> 41
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.706C>G forward primer

<400> 47

ttccatattt agtgagaaaa gagttttcct cagcttcctc a 41

<210> 48

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.706C>G reverse primer

<400> 48

tgaggaagct gaggaaaact cttttctcac taaatatgga a 41

<210> 49

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.935G>A forward primer

<400> 49

gaaagagggg ctctgctctc aagtgagcac actgggactc t 41

<210> 50

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.935G>A reverse primer

<400> 50

agagtcccag tgtgtcact tgagagcaga gcccctcttt c 41

<210> 51

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.965C>G forward primer

<400> 51

actgggactc tacatggaag gaaacagaca ggtgcccaa t 41

<210> 52

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.965C>G reverse primer
 <400> 52
 atttgggcac ctgtctgttt cttccatgt agagtcccag t 41
 <210> 53

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.1023T>G forward primer
 <400> 53
 ccagaagaac caccagtcca gtcgtcagcc cagattgtca g 41
 <210> 54

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.1023T>G reverse primer
 <400> 54
 ctgacaatct gggctgacga ctggactggt ggttcttctg g 41
 <210> 55

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.1037T>C forward primer
 <400> 55
 agtcattcg tcagcccaga ctgtcagcaa acacctggtt g 41
 <210> 56

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.1037T>C reverse primer
 <400> 56

caaccaggtg ttgctgaca gtctgggctg acgaatggac t 41

<210> 57

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.1106_1113del forward primer

<400> 57

acagattgga gagaagtcac cgctcagtc tggctcatc 40

<210> 58

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.1106_1113del reverse primer

<400> 58

gatgagccaa tgactgagcg atgacttctc tccaatctgt 40

<210> 59

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.1193_1194delTG forward primer

<400> 59

tctcatgaac tcagtcactg gaggaaggaa gcaatatcca 40

<210> 60

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.1193_1194delTG reverse primer

<400> 60

tggatattgc ttcttctc cagtgactga gttcatgaga 40

<210> 61

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c.1270T>G forward primer
 <400> 61
 aggggtgcaga catcaaggac ggcttgattg gaagtggcca g 41
 <210> 62
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c.1270T>G reverse primer
 <400> 62
 ctggccactt ccaatcaagc cgtccttgat gtctgcaccc t 41