



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월19일  
(11) 등록번호 10-2352161  
(24) 등록일자 2022년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6883 (2022.01)  
G01N 33/6893 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0135030  
(22) 출원일자 2019년10월29일  
심사청구일자 2019년10월29일  
(65) 공개번호 10-2021-0050676  
(43) 공개일자 2021년05월10일  
(56) 선행기술조사문헌  
이은경, "Understanding functional roles of the ubiquitin-like (UBL) domain of the human TONSL protein", 석사학위논문, 숙명여자대학교 대학원 (2020)  
숙명여자대학교, "회귀난치성 골격계 발달장애 질환 유발 유전자의 생물학적 기능 연구를 통한 발병기전 규명", 포스트게놈신산업육성을위한다부처 유전체사업 최종보고서 (2018.03.15. 제출)\*  
The American Journal of Human Genetics (2019.02.14.) 104:422-438\*  
NCBI, Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs778155094 (2015.03.04.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
숙명여자대학교산학협력단  
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
(뒷면에 계속)  
(72) 발명자  
김용환  
경기도 광명시 사성로103번길 14, 103동 1704호  
조태준  
서울특별시 용산구 한강대로 95, B동 2703호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김승범

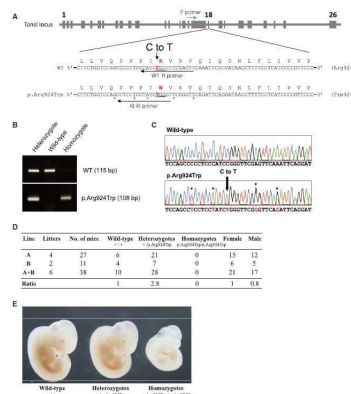
(54) 발명의 명칭 TONSL 유전자를 이용한 스포나스트림 이형성증의 진단 마커

(57) 요약

본 발명은 스포나스트림 이형성증의 진단 마커로서, TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질, 이를 이용한 스포나스트림 이형성증의 진단용 조성물 및 키트, 및 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트림 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으

(뒷면에 계속)

대표도 - 도11



로, 본 발명에 따른 스포나스트립 이형성증의 진단 마커로서, TONSL 돌연변이 유전자 또는 이로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용하면, 희귀 유전 근골격계 질환인 스포나스트립 이형성증을 조기에 진단하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 이에 따라 최근 개발되고 있는 치료방법을 조기에 적용하여 치료 효과를 극대화할 수 있고, 나아가 정확한 병인에 따른 맞춤치료를 가능하게 할 수 있는바, 의학 산업 등 다양한 분야에서 널리 활용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2333/435 (2013.01)

G01N 2800/10 (2013.01)

(73) 특허권자

**성균관대학교산학협력단**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

**연세대학교 산학협력단**

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

**이한웅**

서울특별시 중구 소월로2길 30, 704호

**이재훈**

서울특별시 마포구 마포대로7길 22, 305동 204호

**조성윤**

서울특별시 송파구 오금로32길 10, 3동 1105호

**장혜령**

서울특별시 마포구 백범로 212, 102동 902호

**이은경**

경기도 부천시 범안로96번길 23, 407동 305호

공지예외적용 : 있음

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

스포나스트립 이형성증의 진단 마커로서,  
서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서,  
521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환된 것을 특징으로 하는 TONSL 돌연변이 유전자.

#### 청구항 2

제1항의 TONSL 돌연변이 유전자로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,  
상기 TONSL 돌연변이 단백질은,  
서열번호 2의 염기서열로 이루어진 TONSL 단백질의 아미노산 서열에서,  
174번째 아미노산 잔기인 세린이 아스파라긴으로 치환된 것을 특징으로 하는 TONSL 돌연변이 단백질.

#### 청구항 4

TONSL 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하고,  
상기 TONSL 돌연변이 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서, 125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 및 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 스포나스트립 이형성증 진단용 조성물.

#### 청구항 5

TONSL 돌연변이 단백질에 특이적인 항체를 포함하고,  
상기 TONSL 돌연변이 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 TONSL 단백질의 아미노산 서열에서, 42번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 히스티딘으로 치환; 및 174번째 아미노산 잔기인 세린이 아스파라긴으로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 하는 스포나스트립 이형성증 진단용 조성물.

#### 청구항 6

제4항 또는 제5항의 조성물을 포함하는 스포나스트립 이형성증 진단용 키트.

#### 청구항 7

다음 단계를 포함하는 스포나스트립 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법:

(a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터,

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서,

125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 또는 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환된 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA, 또는 상기 TONSL 돌연변이 유전자에 의해 코딩되는 TONSL 돌연변이 단백질을 검출하는 단계; 및

(b) 상기 생물학적 시료에서 상기 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 TONSL 돌연변이 단백질이 검출된 경우 상기 개체는 스포나스트림 이형성증인 것으로 판정하는 단계.

## 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 TONSL 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여 상기 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA를 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 9

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 TONSL 돌연변이 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 상기 TONSL 돌연변이 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 스포나스트림 이형성증의 진단 마커로서, TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질, 이를 이용한 스포나스트림 이형성증의 진단용 조성물 및 키트, 및 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트림 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 스포나스트림 이형성증(SPONASTRIME dysplasia, MIM: 271510)은 "줄무늬가 있는 골간단을 가진 척추 및 비강 변화(spondylar and nasal alterations with striated mataphyses"(Fanconi, S. et al., Helv. Paediatr. Acta 38, 267-280, 1983)에서 비롯된 것으로, 상염색체 열성 형질로서 전이되는 척추골간단골간단 이형성증(spondyloepimetaphyseal dysplasia)으로 분류될 수 있는, 매우 희귀하지만 별개의 독립체이다. 지금까지, 임상 및 방사선 소견의 독특한 조합으로 구성된, Langer 등(Langer, L.O. et al., Pediatr. Radiol. 27, 409-414, 1997)에 의해 제안된 진단 기준을 근거로 하여, 단 15명만이 이 장애가 있는 것으로 보고된바 있다 (Fanconi, S. et al., Helv. Paediatr. Acta 38, 267-280, 1983; Lachman, R.S. et al., Pediatr. Radiol. 19, 417-424, 1989; Langer, L.O. et al., Am. J. Med. Genet. 63, 20-27, 1996; Masuno, M. et al., Am. J. Med. Genet. 66, 429-432, 1996; Langer, L.O. et al., Pediatr. Radiol. 27, 409-414, 1997; Nishimura, G., Am. J. Med. Genet. 80, 288-290, 1998; Cooper, H.A. et al., Am. J. Med. Genet. 92, 33-39, 2000; Offiah, A. C. et al., J. Med. Genet. 38, 889-893, 2001; Umpaichitra, V. et al., Clin. Dysmorphol. 11, 53-56, 2002; Jeong, J.H. et al., Medicine (Baltimore) 95, e3155, 2016). 주요한 임상적 특징들은 경증에서부터 중증까지의 짧은 팔 왜소증 및 눈에 띄는 이마를 가진 상대적으로 큰 머리, 뿐만 아니라, 유아기 또는 유년기에 관찰되는 몽고주름이다. 그러나, 임상 기준은 비특이적이고, 방사선 특징들이 진단을 위해 존재하여야만 한다. 방사선 특징에 근거한 진단 기준은 요추의 변화 및 긴 뼈의 골간단 변화에 초점을 맞춘다. 질병명으로 제안된 바와 같이, 골간단 불규칙성 및 횡문은 또한 중요한 진단 기준이나, 요추 변화로 일관되게 보이지 않는다 (Langer, L.O. et al., Pediatr. Radiol. 27, 409-414, 1997). 지금까지, 스포나스트림 이형성증에 대한 원인 유전자 돌연변이가 확인된바 없으므로, 따라서 이 질병에 대한 유전적 시험은 아직까지 임상적으로 이용가능하지 않다.

[0004] 톤소쿠-유사 DNA 수선 단백질(Tonsoku-like DNA repair protein, TONSL)은 항-침묵 기능 1(anti-silencing

function 1, ASF1), 꼬마염색체 유지 복합 성분 헬리카제(minichromosome maintenance complex component helicases, MCM helicases), H3 히스톤, H4 히스톤 및 MMS22-유사 단백질(MMS22L)을 포함하는, DNA 복제 및 수선 인자와 상호작용하는 다중도메인 스캐폴드 단백질이다(O'Donnell, L. et al., Mol. Cell, 40, 619-631, 2010; Duro, E. et al., Mol. Cell 40, 632-644, 2010; O'Connell, B.C. et al., Mol. Cell 40, 645-657, 2010; Piwko, W. et al., EMBO J. 29, 4210-4222, 2010; Saredi, G. et al., Nature 534, 714-718, 2016). TONSL은 주석이 달린 도메인과 함께, 8개의 테트라트라이코펩티드 리피트(tetratricopeptide repeats, TPR), 3개의 안키린(Ankyrin, ANK) 리피트, 유비퀴틴 유사 도메인(UBL) 및 7개의 류신-풍부 리피트(LRR)과 같은, 1,378개의 아미노산으로 구성되어 있다(O'Connell, B.C. et al., Mol. Cell 40, 645-657, 2010). TONSL-MMS22L 헤테로다이머는 자발적 복제-관련 DNA 병변을 수선하는데 필요한 상동성 재조합에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Duro, E. et al., Mol. Cell 40, 632-644, 2010; O'Connell, B.C. et al., Mol. Cell 40, 645-657, 2010). 세포 수준에서, TONSL 고갈은 세포 증식 속도에 현저한 결함을 일으키고, 캄프토테신(camptothecin, CPT), 복제분기점에서 DNA 파손을 유도하는 토포이소머라제 1 억제제에 대한 민감도를 향상시킨다. 구체적으로, TONSL-MMS22L은 단일가닥 DNA(ssDNA)에 결합된 복제 단백질 A(RPA1, RPA2 및 RPA3)에 의해 정상 S기 동안 정지된 복제분기점 부위로 모집되고, 가닥 침입에 대한 RAD51 로딩을 촉진한다(Piwko, W. et al., EMBO J. 35, 2584-2601, 2016). 그러므로, 소간섭 RNA(siRNA)-매개 TONSL 녹다운은 유전독성 제제로 처리된 세포에서 손상-유도 RAD51-병소(foci) 형성의 손실을 초래한다는 것이 입증되었다(O'Donnell, L. et al., Mol. Cell, 40, 619-631, 2010; Duro, E. et al., Mol. Cell 40, 632-644, 2010; Piwko, W. et al., EMBO J. 35, 2584-2601, 2016).

[0005] 본 연구에서, 스포나스트림 이형성증에 대한 원인 유전자 변이를 확인하기 위하여, 이전에 보고된 사례를 포함하여(Jeong, J.H. et al., Medicine (Baltimore) 95, e3155, 2016), 네 가지 다른 민족에서, 13명의 사람들을 모집하였다; 이들 모든 사람들은 질병의 진단 기준을 만족하였다. 전장-엑솜 시퀀싱(WES) 및 생어 시퀀싱을 수행하여, 스포나스트림 이형성증 환자의 TONSL(MIM: 604546) 유전자에서 상염색체 열성 하이모모르프 및 기능상실(loss-of-function, LoF) 돌연변이를 확인하였다. 추가 연구에서, 시험관내 세포-기반 분석에서, 인실리코 구조 시뮬레이션에서, 및 생체내 녹-인(knock-in, KI) 생쥐(mouse) 모델에서, 감염된 개인의 피부 섬유아세포를 이용하여, TONSL 변이체의 병원성을 입증하였고, 이는 복제-관련 DNA-손상 수선에의 결함 및 그 결과에 따른 TONSL 돌연변이에 의한 비효율적 세포 증식이 스포나스트림 이형성증의 근본적인 발병 메커니즘일 수 있다는 것을 시사한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 스포나스트림 이형성증의 진단 마커로서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서, 125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1090번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환; 1459번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1615번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1673번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 2800번째 염기인 시토신이 티민으로 치환; 2917번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 및 3862번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 TONSL 돌연변이 유전자, 및 이로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트림 이형성증 진단용 조성물 및 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트림 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 스포나스트림 이형성증의 진단 마커로서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서, 125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1090번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환; 1459번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1615번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1673번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 2800번째 염기인 시토신이 티민으로 치환; 2917번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 및 3862번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환으로

이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 TONSL 돌연변이 유전자, 및 이로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트립 이형성증 진단용 조성물 및 키트를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 TONSL 돌연변이 유전자 또는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용한 스포나스트립 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 스포나스트립 이형성증의 진단 마커로서, TONSL 돌연변이 유전자 또는 이로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질을 이용하면, 희귀 유전 근골격계 질환인 스포나스트립 이형성증을 조기에 진단하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 이에 따라 최근 개발되고 있는 치료방법을 조기에 적용하여 치료 효과를 극대화할 수 있고, 나아가 정확한 병인에 따른 맞춤치료를 가능하게 할 수 있는바, 의학 산업 등 다양한 분야에서 널리 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 스포나스트립 이형성증 개체의 특징적인 얼굴 모습 및 방사선 검사 결과를 나타낸 것이다. (A)는 세 가지 상이한 인종의 개체의 얼굴 사진으로, 중앙 얼굴 형성부전, 부진한 코 뿌리, 짧은 들창코, 주걱턱 및 눈에 띄는 이마를 가진 상대적으로 큰 머리 크기를 공유한다. (B)에서 3세 8개월된 개체 P02의 측면 척추는 더 큰 전면 척추 및 볼록한 전면 종말판을 나타내고, 13세인 개체 P01-2의 측면 척추는 종말판의 양면오목을 나타내며, 개체 P02의 엉덩이와 무릎 전후면은 골간단 불규칙성 및 수직 횡문, 및 작은 이형성 골단을 나타내고, 개체 P01-2의 엉덩이와 무릎 전후면은 좌측 대퇴골두의 잔존 혈관 괴사 및 무릎 골간단에서 혼합된 밀집 횡문 및 빛을 내는 영역을 나타낸다.

도 2는 TONSL 변이체의 확인에 관한 것이다. (A)는 야생형 2.9 kb 앰플리콘과 함께 엑손 23 결실로부터 엑손 23-생성 1.3 kb 앰플리콘을 포함하는 프라이머를 이용한 P01-1, P01-2 및 그의 어머니의 장기(long range) PCR을 나타낸다. P01-1 내지 P1-에서 WES에 의해 확인된 돌연변이를 생어 시퀀싱에 의해 입증하였다. P11 및 P12는 생어 방법만을 이용한 TONSL 전체 시퀀싱을 하였다. (B)는 P11에서 스플라이싱 부위에 의해 유발된 스플라이싱 변화 및 깊은 인트론 돌연변이를 조사하기 위하여, 발단자의 백혈구로부터 수득한 mRNA의 역전사-PCR을 두 가지 돌연변이를 포함하는 프라이머를 이용하여 수행하고, 그의 앰플리콘을 클로닝한 결과를 나타낸다. 30개의 콜로니를 선택하여 생어 시퀀싱을 수행하였다. 12개 클론이 야생형인 반면, 5개 콜로니는 아버지로부터 상속된, 엑손 5 생략을 나타내었고, 5개 콜로니는 일부 인트론 10 보유를 나타내었고, 6개 콜로니는 어머니로부터 상속된, 일부 엑손 11 생략을 나타내었다. 이상 스플라이싱 및 그 결과에 따른 mRNA 서열의 개략도를 나타낸다. 아래 화살표는 변이된 서열을 나타내고, 오른쪽 또는 왼쪽 화살표는 각각 정방향 및 역방향 서열을 나타낸다.

도 3은 스포나스트립 이형성증 개체에서 확인된 TONSL 변이체를 나타낸 것이다. (A)에서 스포나스트립에 감염된 개체에서 발견된 TONSL의 병원성 변이체는 TONSL 단백질 상에 표시되며, 이의 기능적 도메인이 표시된다. 적색의 변이체에 대해 변이체 기능성이 분석되었다. (B)는 스포나스트립에 감염된 개체에서 발견된 9개의 미스센스 변이체의 진화 보존을 나타낸다. (C)에서, 개체의 미스센스-변이체("병원성(pathogenic)") 기능성의 파라미터이므로, CADD 및 GERP 값을 ExAC 데이터베이스에 중첩되는 잔기("ExAC") 및 다형성이 아닌 잔기("다른 잔기(Other residues)")와 함께 플롯팅하였다.

도 4는 TONSL 미스센스 변이체 기능성의 추론에 관한 것이다. (A)는 TONSL 기능성 도메인의 간단한 지도이다. (B)는 아미노산 잔기로 플롯팅된 인간 TONSL과 아미노산을 공유하는 보존된 포유류 종을 나타낸다. 적색 점은 스포나스트립 개체에서 발견된 미스센스 변이체를 나타내고, 회색은 ExAC 데이터베이스에서의 변이체 잔기를 나타내며, 흑색은 비-다형성 잔기를 나타낸다. 오른쪽 도표는 각 군의 히스토그램을 나타낸다. (C) 및 (D)는 TONSL 잔기의 (C) CADD 또는 (D) GERP를 이용한 유사한 도표를 나타낸다.

도 5는 TONSL cDNA 형질도입을 통한 개체 P03 및 P04의 진피 섬유아세포의 상보성을 나타낸 것이다. (A)는 스포나스트립 이형성증 개체 유래 세포의 TONSL 단백질 수준 및 상응하는 siRNA-매개 TONSL 고갈을 나타낸 것으로, BJ 세포는 정상 대조군으로 사용되었고, 감염된 개체로부터 유래된 세포 내 TONSL 수준은 BJ 세포 보다 낮았으며, 모든 세포는 siNRA 처리에 의해 성공적으로 고갈되었다. C = siControl 및 T = siTONSL. (B)는 개체 P03 및 P04 모두에서 유래된 섬유아세포에의 렌티바이러스 형질도입을 통해 전달된 야생형(WT) TONSL의 안정한 단백



질 수준을 나타낸 것으로, EV 및 WT는 공 벡터 및 야생형을 각각 나타내며, 별표는 교차반응 밴드를 나타낸다. (C)는 감염된 개체 유래 세포는 CPT에 민감하였으나, WT TONSL의 형질도입에 의한 BJ 세포에 필적할만한 수준으로 구해졌음을 나타낸다. 지시된 세포를, 3회, 0-32 nM의 범위의 상이한 CPT 농도에 노출하고, 5일 후, 세포를 쿨터 계산기로 계수하고, 각각의 농도에서의 세포의 전체 수를 처리되지 않은 세포 수로 나누었다. FANCP/EV, SLX4 결핍 판코니 빈혈-유래 세포주 및 TANC/P03-SLX4, SLX4-4-상보 세포의 유전적으로 동등한 주를 대조군으로 사용하였다. 오차 막대는 3회 반복의 표준 편차(SD)를 나타낸다. (D)는 Rad 51 및  $\gamma$ H2A.X 병소 내 CPT-유도 DNA 손상의 대표적인 이미지를 나타낸다. P03/EV, P03/WT-TONSL, P04/EV, 및 P04/WT-TONSL 세포를 CPT(50nM)로 밤새 처리하고, 고정시키고, 항-RAD51 및 항- $\gamma$ H2A.X 항체로 염색하였다. 약화된 DNA 손상이 WT-TONSL의 형질도입을 통해 정상 세포 수준으로 회복된 감염된 개체 유래 세포에서 RAD51 병소의 형성을 유도하였다. (E)는 Rad51 병소의 통계학적 분석으로, 비-처리 세포 유래 핵의 전체 수로 나누거나, 또는 CPT-처리된 세포의 경우,  $\gamma$ H2A.X-양성 핵의 수로 나눈,  $n \geq 10$  Rad51 병소의 핵 수를 취해, Rad 51 병소의 백분율을 계산하였다. 오차 막대는 SD를 나타낸다. (F)는 WT-TONSL의 형질도입에 의해 정상 수준으로 구해진, P03/EV 및 P04/EV 세포에서 감소된 BrdU의 DNA로의 통합을 나타낸다. BrdU 통합 비율을 BrdU-통합 세포의 수를 계산된 전체 세포 수로 나누어 계산하였다. 오차 막대는 3회 반복의 SD를 나타낸다. (G)는 스포나스트립에 감염된 개체 유래 CPT-처리 세포주의 DNA 섬유 분석을 나타낸다. BJ 세포는 대조군으로 사용되었다. 실험의 개략적 표현을 상단에 나타내고, 하단에 대표적인 DNA 섬유를 나타내었다. 적색선은 중간값을 나타낸다; \*\*p=0.003 및 \*\*\*p<0.001.

도 6은 TONSL 변이체의 시험관내 세포-기반 기능 분석에 관한 것이다. (A) TONSL 코딩 영역을 표적으로 하는 siRNA의 처리가 HeLa 세포 내 TONSL의 완전 녹-다운을 유발하고(왼쪽 패널), CPT 민감성을 나타낸다는(오른쪽 패널) 것을 나타낸다. (B)는 TONSL 3' UTR을 표적으로 하는 siRNA의 HeLa에의 처리가 다양한 정도로 TONSL 발현을 억제하고(왼쪽 패널), 따라서 CPT 민감성을 향상시킨다는(오른쪽 패널) 것을 나타낸다. (C)는 HeLa 세포에서 재조합 야생형 또는 개체 TONSL 변이체 발현을 확인한 것이다. 항-TONSL 항체는 내인성 및 HA-태그 TONSL 모두를 검출할 수 있는 반면, HA 항체는 내인성 TONSL을 검출할 수 없다.

도 7은 스포나스트립 이형성증 개체 유래 세포가 수산화요소(HU)에 민감하지 않음을 나타낸다. EV 또는 WT-TONSL, P03-EV/WT-TONSL 및 P04-EV/WT-TONSL을 발현시키는 스포나스트립 개체로부터 확립된 세포주에 HU 농도를 증가시켜 처리하였다. BJ 세포를 대조군으로 사용하였다. P03 및 P04 세포는 BJ 세포와 유사한 HU에 대한 민감성을 나타내었고, WT TONSL의 발현은 세포 생존에 영향을 미치지 않았다. 오차 막대는 3회 반복의 표준 편차를 나타낸다.

도 8은 스포나스트립 개체 유래 세포, P03이 증가된 수준의 자발적 복제분기점 지연을 나타낸다는 것을 나타낸다. 세포상 DNA 섬유 분석은 P03 유래의 섬유아세포를 이용하여 확립되었다. 진행 분기점(ongoing forks, 왼쪽) 또는 지연된 분기점(stalled forks, 오른쪽)의 백분율을 정량화하였다. 진행 분기점 및 지연된 분기점의 대표적인 이미지를 포함한다. DNA 섬유 분석의 개략도를 포함한다. 간략하게, TONSL-섬유아세포주를 CldU로 30분 동안 펄스처리한 다음, IdU로 30분 동안 펄스처리하였다. N=3. 통계; 스튜던트 T-시험. 오차 막대; SEM.

도 9는 세포 증식의 결함 및 향상된 캄프토테신에 대한 민감성을 나타내는 TONSL 변이체의 시험관내 세포-기반 분석 결과를 나타낸다. (A)는 TONSL 30 UTR을 표적으로 하는 siRNA를 통한 내인성 TONSL 고갈된 HeLa 세포에서 형질도입되고 안정하게 발현된 감염된 개체 유래 재조합 WT 및 TONSL 변이체의 단백질 수준을 나타낸다. TONSL 항체는 내인성 및 HA-태그 TONSL 모두를 검출할 수 있는 반면, HA 항체는 내인성 TONSL을 검출할 수 없다. 별표는 교차반응 밴드를 나타낸다. (B)는 변이체 TONSL을 발현시키는 세포의 다양한 증식 속도를 나타내는 세포 증식 분석 결과로, EV 세포를 비-표적 siCtrl 또는 30 UTR을 표적으로 하는 siTONSL 중 하나로 처리하였다. 세포 증식 속도는 1일째 세포 수로 정상화하였다. 오차 막대는 3회 반복의 SD를 나타낸다. siCtrl = siControl. (C)는 내인성 TONSL이 없는 TONSL 변이체가 체크포인트 활성화를 유도하는 것을 나타낸다. 변이체 TONSL을 발현시키는 HeLa 세포의 전체 세포 추출물을 30 UTR을 표적으로 하는 siRNA로 처리하고, DNA-손상-반응 인자, 인산화된 CHK1(pCHK1) 또는 인산화된 CHK2(pCHK2)로 면역블롯하여 분석하였다. (D)는 TONSL 변이체 세포주를 (B)에서와 같이 30 UTR을 표적으로 하는 siRNA로 처리한 다음, CPT 농도를 증가시켜 처리한 결과를 나타낸 것이다. 세포를 핵소트(Hoechst)로 염색하고, CPT 처리 5일 후에 핵을 계수하였다. 세포 생존은 비히클 처리 세포에서와 같이 정상화되었다. 오차 막대는 3회 반복의 SD를 나타낸다.

도 10은 TONSL의 3D 구조 시뮬레이션에 의한 TONSL의 이상 기능의 이론적 설명이다. TONSL 변이체의 구조적 이상을 통찰하기 위하여, 존재하는 가능한 구조를 기반으로 한 야생형 및 변이체 TONSL을 모델링하여, TONSL 변이체의 이상 기능의 근거를 확인하였다. 개체 P01-1 및 P01-2 유래 엑손 23 결실을 LRR 도메인의 상동 모델링으로

모델링하였다. 개체 P02(p.Glu539Lys), P04(p.Arg558Gln) 및 P09(p.664delLeu) 유래 TONSL 변이체의 구조를 Protein Data Bank(PDBID: 5JA4)로부터 검색한 ANK 도메인을 가진 복합 모델을 이용하여 모델링하였다. (A)는 야생형과 엑손 23 1 카피 결실 TONSL 사이의 LRR 도메인에 대한 구조 비교 및 서열 배열을 나타낸 것이다: (왼쪽) 야생형 TONSL의 LRR 도메인의 구조. 돌연변이 후 결실될 영역은 적색으로 표시된다. (중간) 엑손 23 1 카피 결실에 의해 변이된 TONSL의 LRR 도메인의 구조. (오른쪽) 야생형 및 엑손 23 1 카피 결실 TONSL 사이의 곡률의 비교. LRR 도메인의 오목 곡률은 단백질이 변이된 후 상당히 변화한다. (하단) 야생형 및 변이 TONSL 사이의 LRR 도메인의 배열. 류신-풍부 모티프를 주황색 박스로 강조하고, 돌연변이에 의해 결실된 서열을 적색 글자로 나타낸다. 류신-풍부 모티프의 2회 반복은 돌연변이 단백질에서 상실된다. (B)는 인간 야생형 TONSL 복합 모델: 인간 TONSL(녹색) 및 MCM2 및 히스톤 단백질을 포함하는 결합 파트너(하늘색)의 3D 구조를 나타낸다. (C)는 FoldX 시뮬레이션을 이용한 야생형(녹색) 및 p.Glu539Lys 돌연변이 모델(자홍색)로, 535번째 잔기가 변화된 극성 상호작용을 나타낸다. (D) Gromacs MD 시뮬레이션을 이용한 야생형(녹색) 및 p.Glu539Lys 돌연변이 모델(자홍색)로, 돌연변이 후 감소된 히스톤 H4 내 리신 잔기와 주변 TONSL 잔기의 극성 상호작용을 나타낸다. (E)는 FoldX 시뮬레이션을 이용한 야생형(녹색) 및 p.Arg558Gln 돌연변이 모델(자홍색)로, 주변 잔기가 감소된 극성 상호작용을 나타낸다. (F)는 MODELLER에 의해 구축된 TONSL 복합체 내 야생형(녹색) 및 p.664delLeu 돌연변이(자홍색)로, 돌연변이 모델은 야생형과 비교하여 결실 부위에서 쪼그라들어 있다. (G)는 TONSL 복합체 내 야생형 및 p.664delLeu 돌연변이를 나타낸다. (왼쪽) 야생형(녹색, 30% 투명도) 및 돌연변이 모델(적색)의 쪼그라든 영역의 비교이다. (중간) 돌연변이 모델의 Gromacs MD 시뮬레이션 결과이다: 초기 상태(자홍색) 및 최종 상태(하늘색). (오른쪽) 초기 상태 및 최종 상태 사이에 변화된, 흑색 화살표로 표시된, C-말단의 방향을 나타낸다.

도 11은 CRISPR-Cas9을 통한 동형접합 *Tonsl* p.Arg924Trp 녹-인 생쥐의 발생 및 분석에 관한 것이다. (A)는 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 대립유전자의 서열과 함께, 생쥐 *Tonsl* 유전자좌 및 *tTonsl*의 엑손 18의 확대된 서열을 나타내는 개략도로서, *Tonsl*<sup>WT</sup> 대립유전자의 청색 글자는 프로토-스페이스 인접 모티프(PAM) 서열을 나타내고, 적색 글자는 *Tonsl*<sup>WT</sup> 및 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 대립유전자 내 치환(C에서 T로) 표적 뉴클레오티드를 나타낸다. *Tonsl*<sup>WT</sup> 및 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 대립유전자 유래 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열 상부에 나타난다. 동의의 그리고 표적 돌연변이 모두에 대해 치환된 뉴클레오티드는 각각 흑색 및 적색 별표(\*)에 의해 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 대립유전자 서열의 하단에 나타난다. 지노타이핑용 정방향(F) 및 역방향(R) PCR 프라이머를 나타낸다. (B)는 *Tonsl*<sup>WT</sup> 및 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 대립유전자에 대한 지노타이핑 PCR을 나타낸 것으로, 상단 및 하단 패널은 각각 *Tonsl*<sup>WT</sup> (115 bp) 및 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> (108 bp) 대립유전자로부터 증폭된 PCR 산물을 나타낸다. (C)는 *Tonsl*<sup>WT</sup> 및 *Tonsl*<sup>Arg924Trp</sup> 유전자좌의 서열을 나타내는 크로마토그램이다. (D)는 이형접합 이종교배 유래 자손의 유전자형 분포를 나타낸다. (E)는 단계 E11.5. *Tonsl*<sup>+/+</sup> 및 *Tonsl*<sup>+/Arg924Trp</sup> 생쥐 배아의 전체 배아의 총 형태학은 정상 발달을 나타낸 반면, *Tonsl*<sup>Arg924Trp/Arg924Trp</sup> 배아는 눈 및 팔다리의 비정상적 발달과 함께 성장 지연을 나타낸다.

도 12는 *Tonsl* p.Arg924Trp 녹-인 생쥐의 분석에 관한 것이다. (A)는 인간 및 생쥐 *Tonsl* 아미노산 서열의 배열을 나타내는데, 적색 박스는 생쥐 및 인간(각각, Arg924 및 Arg934) 사이의 보존된 아르기닌 잔기를 나타낸다. (B) 내지 (D)는 입체-육안검사로 관찰한, 발달 단계 E10.5(B), E11.5(C) 및 E12.5(D)에서의 생쥐 배아를 나타낸다. +/p.Arg924Trp(HT) 생쥐의 배아 발달은 정상으로 나타난 반면, p.Arg924Trp/p.Arg924Trp(HT) 배아는 발달 결함 및 성장 지연을 나타낸다. 또한, E12.5의 KI 배아는 여전히 전환 과정에 있었고 내부 출혈을 나타내었다. 박스는 상기 배아(D)의 반대쪽을 나타낸다. (E)는 단계 E11.5에서 HT 배아의 난황낭의 형태학(왼쪽) 및 KI 한배 자식(중간 및 오른쪽)을 나타낸다. HT 배아와 비교할 때, KI 배아의 난황낭은 가시적인 혈관이 결핍되어 있었고, HT 배아 보다 더 작았다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0020] 본 발명자들은 스포나스트림 이형성증 환자 및 그들의 부모를 대상으로 스포나스트림 이형성증의 유전학적 원인 유전자를 발견하고자 예의 노력한 결과, 스포나스트림 이형성증 환자에서 신규한 TONSL 돌연변이 유전자를 발견



하여 이를 스포나스트립 이형성증의 원인 유전자로 규명하고, 이러한 신규한 돌연변이 유전자가 스포나스트립 이형성증의 진단에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

- [0021] TONSL 유전자는 서열번호 1로 나타낸 염기서열을 갖는다(NCBI Gene reference number: NM\_013432.5). 상기 유전자로부터 서열번호 2로 나타낸 아미노산 서열을 갖는 TONSL 단백질이 암호화된다.
- [0022] 본 발명은 일 관점에서 스포나스트립 이형성증의 진단 마커로서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서, 125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1090번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환; 1459번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1615번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1673번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 2800번째 염기인 시토신이 티민으로 치환; 2917번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 및 3862번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 TONSL 돌연변이 유전자에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 TONSL 돌연변이 유전자로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 TONSL 돌연변이 단백질은, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 TONSL 단백질의 아미노산 서열에서, 42번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 히스티딘으로 치환; 174번째 아미노산 잔기인 세린이 아스파라긴으로 치환; 364번째 아미노산 잔기인 아스파르트산이 히스티딘으로 치환; 487번째 아미노산 잔기인 글루탐산이 리신으로 치환; 539번째 아미노산 잔기인 글루탐산이 리신으로 치환; 558번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 글루타민으로 치환; 934번째 아미노산 잔기인 아르기닌이 트립토판으로 치환; 973번째 아미노산 잔기인 글리신이 아르기닌으로 치환; 및 1288번째 아미노산 잔기인 글루탐산이 글루타민으로 치환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 용어 "진단 마커"는 스포나스트립 이형성증의 발병 여부를 진단할 수 있는 물질로, 본 발명의 목적상, 진단 마커는 정상인과는 달리 스포나스트립 이형성증 환자에서만 특이적으로 검출되는 본 발명에 따른 TONSL 돌연변이 유전자 또는 이로부터 암호화되는 TONSL 돌연변이 단백질이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 스포나스트립 이형성증의 발병 여부를 확인하는 것이다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 TONSL 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 스포나스트립 이형성증 진단용 조성물, 또는 상기 TONSL 돌연변이 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 스포나스트립 이형성증 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 용어 "프라이머"는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예를 들어, 온도와 프라이머의 용도에 따라 상이하다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 용어 "프로브"는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하고 타겟 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 TONSL 돌연변이 유전자 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. "상보적"이라는 용어는 어떠한 특정 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 상기 뉴클레오티드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에서 널리 알려진 다양한 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 용어 "항체"는 당업계에 널리 알려진 용어로서, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미하는 것으로, 상기 항체는 바람직하게는 모노클로날 또는 폴리클로날 항체이며, 상기 항체 외에도 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 압타머 등이 상기 TONSL 돌연변이 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 조성물을 포함하는 스포나스트립 이형성증 진단용 키트에 관한 것이다.

- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 마이크로어레이, 유전자 증폭 키트 또는 면역분석용 키트일 수 있다.
- [0035] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 TONSL 유전자의 염기서열에서, 125번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 521번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1090번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환; 1459번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1615번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 1673번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 2800번째 염기인 시토신이 티민으로 치환; 2917번째 염기인 구아닌이 아데닌으로 치환; 또는 3862번째 염기인 구아닌이 시토신으로 치환된 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA, 또는 상기 TONSL 돌연변이 유전자에 의해 코딩되는 TONSL 돌연변이 단백질을 검출하는 단계; 및 (b) 상기 생물학적 시료에서 상기 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA 또는 상기 TONSL 돌연변이 단백질이 검출된 경우 상기 개체는 스포나스트림 이형성증인 것으로 판정하는 단계를 포함하는 스포나스트림 이형성증의 발병 가능성을 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 TONSL 돌연변이 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여 상기 TONSL 돌연변이 유전자의 mRNA를 검출, 또는 상기 TONSL 돌연변이 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 상기 TONSL 돌연변이 단백질을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 용어 "생물학적 시료"는 스포나스트림 이형성증 발병 여부를 확인하고자 하는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA를 검출하기 위한 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯, DNA 마이크로어레이 칩 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 단백질을 검출하기 위한 방법으로는 웨스턴 블롯팅, ELISA, 방사선 면역분석법, 방사선 면역확산법, 오우크테로니 면역확산법, 로켓 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, 유세포분석, 단백질 칩 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] [실시예]
- [0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0044] **실시예 1: 재료 및 방법**
- [0045] 대상
- [0046] 병에 걸린 개체 또는 그 부모로부터 서면 동의를 얻었다. 서울대학교 병원(서울, 대한민국)과 삼성의료원(서울, 대한민국)의 생명윤리위원회가 연구를 승인하였다.
- [0048] 전장-엑솔 시퀀싱 및 전장-게놈 시퀀싱
- [0049] 스포나스트림을 유발하는 게놈 변이체를 확인하기 위하여, WES를 수행하였다. 전장-게놈 시퀀싱(WGS)은 단일 병원성 TONSL 대립유전자만이 WES에 의해 확인된 경우에 수행하였다(개체 P01-1 및 P01-2). WES 데이터의 기본 통계를 표 1에 요약하였다.

[0050] [표 1]

ID	구성원 지위	임상적 지위	성별	판독 길이(bp)	판독 # (M)	평균 커버리지 (x)	게놈 상 %	표적 상 %	적어도 4x로 덮인 염기 %	적어도 8x로 덮인 염기 %	적어도 20x로 덮인 염기 %	PCR 중복률(%)
P01-I	발단자	병에 걸린	여	100	137.6	85.8	99.8%	34.6%	91.1%	89.8%	85.5%	7.7%
P01-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	150.8	95.2	99.8%	34.8%	91.2%	90.0%	86.2%	7.0%
P01-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	177.5	113.0	99.8%	35.3%	91.3%	90.3%	87.5%	7.4%
P02	발단자	병에 걸린	남	100	56.6	66.1	99.4%	74.0%	99.7%	99.0%	93.2%	5.4%
P02	발단자	병에 걸린	남	100	134.3	138.5	99.9%	48.8%	94.9%	93.5%	90.6%	4.2%
P02-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	41.5	49.2	99.3%	75.1%	99.4%	98.2%	87.5%	31.4%
P02-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	62.8	71.6	99.1%	72.0%	99.7%	99.1%	94.1%	16.0%
P03	발단자	병에 걸린	여	100	85.1	88.3	99.5%	52.5%	99.7%	99.1%	95.4%	3.33%
P03-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	72.1	75.1	99.6%	52.7%	99.6%	98.9%	93.5%	4.46%
P03-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	70.6	74.5	99.6%	53.5%	99.5%	98.8%	93.8%	3.24%
P04	발단자	병에 걸린	남	100	147.5	177.9	100.0%	72.3%	99.7%	99.3%	98.0%	14.5%
P04-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	159.1	191.3	100.0%	69.0%	99.8%	99.5%	98.5%	10.7%
P04-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	143.2	167.5	100.0%	69.9%	99.6%	99.4%	98.3%	14.3%
P05	발단자	병에 걸린	여	100	115.6	85.4	99.8%	37.2%	91.5%	90.4%	86.5%	9.8%
P05-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	160.2	126.4	99.9%	38.1%	92.5%	91.7%	89.4%	6.0%
P05-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	78.3	64.2	99.7%	39.3%	91.0%	89.5%	82.8%	5.2%
P06	발단자	병에 걸린	여	100	147.5	101.9	100.0%	35.4%	91.7%	90.8%	87.8%	14.5%
P06-F	부	병에 걸리지 않은	남	100	149.1	95.4	99.9%	34.9%	91.7%	90.8%	87.4%	5.9%
P06-M	모	병에 걸리지 않은	여	100	143.2	101.2	100.0%	35.0%	91.7%	90.8%	87.8%	14.3%
P08	발단자	병에 걸린	남	150	68.5	83.6	99.7%	33.0%	99.4%	98.4%	93.7%	8.4%
P09	발단자	병에 걸린	여	150	86.0	94.6	99.8%	30.3%	99.5%	98.9%	95.6%	10.0%
P10	발단자	병에 걸린	여	150	67.6	82.5	94.9%	36.3%	99.5%	98.7%	94.7%	11.8%

[0051]

[0052]

병에 걸린 개체의 유전 패턴을 기반으로, 질병이 상염색체 열성 방식으로 유전된다고 가정하였다. 따라서, 다음 기준을 만족하지 않는 변이체는 제거하였다: (1) 변이체는 국립 심장, 폐 및 혈액 연구소(NHLBI) 엑솜 시퀀싱 프로젝트(ESP6500) 및 1000 게놈 프로젝트에서 <1%의 대립유전자 빈도를 나타내었다; (2) 변이체는 인-하우스 데이터베이스에서 발견되지 않았다; (3) 변이체는 단백질-변형 변이체이다; 및 (4) 변이체는 고품질의 판독(판독수>20, 품질 점수(QS)>30, 또는 부-대립유전자(minor-allele) 빈도(MAF)>20%)을 가졌다. 그 결과 변이체의 목록을 표 2에 나타낸다.

[표 2]

ID	접근법	유형	위치 (hg19)	염기 변화	변이체 유형	유전자	아미노산 변화	아미노산 위치	발단자		부		모	
									Ref. cov.	Nonref. cov.	Ref. cov.	Nonref. cov.	Ref. cov.	Nonref. cov.
P01-1	Trio(WES)	Comp. het	chr15:32928766	A>G	Missense	ARHGAP11A	p.Lys598Gln	598/1023	42	36	112	0	64	57
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr15:32912309	G>A	Missense	ARHGAP11A	p.Gly44Ser	44/1023	73	51	78	34	196	0
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr7:103207075	C>T	Missense	RELN	p.Ala1574Thr	1574/3460	36	31	91	0	58	55
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr7:103179394	C>T	Missense	RELN	p.Ala2571Thr	2571/3460	25	22	34	25	66	0
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr10:123845455	C>T	Missense	TACC2	p.Pro1147Leu	1147/2948	68	63	74	73	161	0
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr10:123843210	G>A	Missense	TACC2	p.Gly399Arg	399/2948	44	32	102	0	62	64
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr22:50277352	T>G	Missense	ZBED4	p.Asp14Glu	14/1171	39	48	59	55	162	0
P01-1	Trio-WES	Comp. het	chr22:50280156	C>T	Missense	ZBED4	p.Thr949Met	949/1171	49	44	115	0	61	59
P01-1	Trio-WES	Het (부 유래)	chr8:145660909	G>A	Missense	TONSL	p.Arg934Trp	934/1378	59	50	67	67	135	0
P02	Trio-WES	Hemizygous	chrX:34148043	C>T	Missense	FAM47A	p.Val785Ile	785/791	0	36	30	30		
P02	Trio-WES	Comp. het	chr8:145660489	C>T	Missense	TONSL	p.Gly973Arg	973/1378	13	16	11	11		
P02	Trio-WES	Comp. het	chr8:145664068	G>A	Stop gained	TONSL	p.Gln511*	511/1378	17	14			13	16
P03	Trio-WES	Comp. het	chr8:145663892	C>T	Missense	TONSL	p.Gln539Lys	539/1378	50	48	227	228	80	0
P03	Trio-WES	Comp. het	chr8:145667636	CA>C	Framedshift deletion	TONSL	p.Val246fs	246/1378	111	76	0	0	102	68
P03	Trio-WES	Rare hom.	chr1:210267700	C>T	Missense	STTJ4	p.Pro204Leu	204/619	0	98	217	217	52	37
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr4:155219788	C>A	Missense	DCHS2	p.Arg1438Leu	1438/2916	0	109	64	62	73	58
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr10:55955567	T>C	Missense	PCDH15	p.Tyr394Cys	394/1957	0	158	73	76	96	68
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr19:35758275	1(각주참조)	Inframe insertion	LSR	p.Arg519dup	519/649	0	121	92	68	71	56
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr8:145662463	C>T	Missense	TONSL	p.Arg558Gln	558/1378	0	168	101	100	70	60
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr1:6111610	C>T	Missense	ECNAB2	p.Thr5Met	5/415	0	18	9	12	6	10
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr6:36688962	2(각주참조)	Inframe insertion	RAB44	4(각주참조)	251/914	0	39	81	17	59	23
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr1:77334295	3(각주참조)	Inframe insertion	STGALNAC3	5(각주참조)	44/336	0	84	70	46	57	46
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr2:211523343	G>T	Missense	CP51	p.Lys1235Asn	1235/1506	0	193	93	83	86	67
P04	Trio-WES	Rare hom.	chr1:152059278	G>A	Stop gained	TCHHL1	p.Gln294*	294/904	0	332	194	178	162	138
P04	Trio-WES	Comp. het	chr3:48677114	C>G	Missense	CELSR3	p.Asp3307His	3307/3317	40	27	37	38	60	0
P04	Trio-WES	Comp. het	chr3:48697654	C>G	Missense	CELSR3	p.Ser805Thr	805/3317	160	143	321	0	106	93
P04	Trio-WES	Comp. het	chr11:9051475	G>C	Missense	SCUBE2	p.Thr820Ser	820/1028	42	44	48	35	66	0
P04	Trio-WES	Comp. het	chr20:1292989	C>T	Missense	SDCBP2	p.Gly242Arg	242/292	98	84	268	0	102	73
P04	Trio-WES	Comp. het	chr6:147674466	G>A	Missense	STXBP5	p.Met754Ile	754/1151	12	11	25	0	18	22
P04	Trio-WES	Comp. het	chr6:147685274	A>G	Missense	STXBP5	p.Tyr1018Cys	1018/1151	58	76	63	52	183	0
P05	단독(Singleton)-WES	Rare hom.	chr21:41151203	G>A	Missense	JGSF5	p.Arg302His	302/407	0	32				
P05	Singleton-WES	Rare hom.	chr5:180626104	G>A	Missense	TRIM7	p.Thr288Met	288/511	0	52				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr12:49447776	C>T	Missense	KMT2D	p.Gly220Arg	220/5537	76	84				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr12:49431094	T>C	Missense	KMT2D	p.Met3349Val	3349/5537	67	54				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr6:31922488	G>C	Missense	NELFE	p.Arg203Gly	203/387	8	11				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr6:31921568	T>C	Missense	NELFE	p.Asn335Ser	335/387	66	73				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr15:85639278	T>C	Missense	PDE8A	p.Ile488Thr	488/829	14	17				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr15:85641242	A>C	Missense	PDE8A	p.Ile306Leu	306/829	63	52				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr6:160557260	C>T	Missense	SLC22A1	p.Pro283Leu	283/554	55	58				
P05	Singleton-WES	Comp. het	chr6:160543065	C>T	Missense	SLC22A1	p.Ala33Val	33/554	31	28				
P05	Singleton-WES	Het (부 유래)	chr8:145666175	C>G	Missense	TONSL	p.Asp364His	364/1378	61	53				
P06	Singleton-WES	Comp. het	chr19:47259734	G>C	Missense	FKRP	p.Gln343Gln	343/495	16	8				
P06	Singleton-WES	Comp. het	chr19:47259048	C>G	Missense	FKRP	p.Ala114Gly	114/495	45	29				
P06	Singleton-WES	Het (모 유래)	chr8:145668059	C>A	Splice donor	TONSL	-	-	12	22				
P07	Singleton-WES	Rare hom.	chr9:136029611	C>T	Missense	GBG1	p.Glu133Lys	133/347	0	31				
P07	Singleton-WES	Rare hom.	chrX:152018953	C>G	Missense	NSDHL	p.Leu85Val	85/373	0	32				
P07	Singleton-WES	Possible comp. het	chr6:168349078	C>G	Missense	MLLT4	p.Pro1243Ala	1243/1834	65	60				
P07	Singleton-WES	Possible comp. het	chr6:168294583	G>A	Missense	MLLT4	p.Glu406Lys	406/1834	67	62				
P07	Singleton-WES	Possible comp. het	chr8:145660499	G>T	Stop gained	TONSL	p.Tyr969*	969/1378	42	42				
P07	Singleton-WES	Possible comp. het	chr8:145655868	C>G	Missense	TONSL	p.Glu1288Gln	1288/1378	14	22				

1 GGGAG-GGGAGGAG  
2 CAGGCTGCTCCCTGAGGAGGC-CAGGCTGCTCCCTGAGGAGGCTGCTCCCTGAGGAGGC  
3 CA-GCAACATCA  
4 p.Ala251\_Pro252insAlaSerProGluGlnAla  
5 p.Gln44\_Gln45insHisGln

\*Comp. 화합물(Compound); het, 이형접합(heterozygous); hom, 동형접합(homozygous); Rare, 드물게; Possible, 가능한  
Missense, 미스센스; Stop gained, 획득 정지; Framedshift deletion, 프레임시프트 결실; Inframe insertion: 인프레임 삽입; Splice donor, 스플라이스 공여체

[0054]

[0055]

WGS 데이터 유래 구조적 변이체에 대하여, 복제수 변이체(copy-number variant, CNV)를 확인하기 위하여 기본 설정의 Manta(0.20.2) 및 Control-FREEC(6.4)를 사용하였다(http://boevalab.com/FREEC/). Control-FREEC에서, 창 크기를 10,000으로 설정하고 판독 수는 GC-함량 편차에 근거하여 표준화하였다. CNV 유형을 2의 계층 배수성 값에 근거하여 분류하였다; 2 미만의 값은 손실로 표시되고, 2 초과인 값은 이득으로 표시되었다.

[0057]

아미노산 보존 및 염기-수준 기능성 분석

[0058]

TONSL에서 9개의 미스센스(missense) 변이체의 기능성을 평가하기 위하여, UCSC Browser에서 61개의 포유동물 종으로부터 오르토로그 서열을 다운로드하고, 인간 TONSL로 정렬하였다.TONSL 코딩 서열 전반의 CADD 및 GERP 점수를 dbNSFP에서 다운로드하였다(Liu, X. et al., Hum. Mutat. 37, 235-241, 2016).

[0060]

장거리(Long-range) PCR

[0061]

개체 P01-1, P01-2 및 그들의 모체에서 발견된 TONSL 엑손 23 결실을 분석하기 위하여, 다음의 프라이머를 사용하여, 장거리 PCR(LP-PCR)을 수행하였다: TONSL-exon22-F: 5'-GAAGAGACTGCCAAGCCAAG-3' 및 TONSL-exon24-R: 5'--TACCATTCTGTGGCCCTC-3'.



- [0063] 생어 시퀀싱
- [0064] WES 또는 WGS 분석에서 발견된 TONSL 후보 변이체의 시퀀싱을 표준 PCR 및 생어 시퀀싱 방법(필요시 이용가능한 프라이머 서열)을 통해 수행하였다. 서열 데이터를 Sequencher 소프트웨어(Gene Codes)에서 참조 서열에 정렬하였다.
- [0066] 역전사-PCR 및 클로닝
- [0067] 스플라이싱 부위에 의해 야기된 스플라이싱 변화 및 개체 P11에서의 깊은 인트론 돌연변이 모두를 조사하기 위하여, 역전사-PCR(RT-PCR)을 수행하고 앰플리콘을 클로닝하였다. 발단자의 및 부모의 mRNA를 QIAamp RNA Blood Mini Kit(QIAGEN)로 순환하는 백혈구에서 수확하였다. cDNA를 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit로 전사한 다음, 부계 및 모계 돌연변이를 모두 망라하는, 프라이머 TONSL4F 5'-TATGACCACTGCCAGTCGAG-3' 및 TONSL11R 5'-TGAGCTCCCGTAGTCTGGTT-3'로 PCR 증폭을 수행하였다. PCR-기반 클로닝을 All in One PCR Cloning Kit(Biofact)로 수행한 후, 동일한 프라이머로 수행되는 PCR 및 시퀀싱 분석을 위해 30개의 콜로니를 선택하였다.
- [0069] 세포 배양, 세포 고정, 돌연변이 유발 및 TONSL 세포주 확립
- [0070] 병에 걸린 개체의 피부 섬유아세포를 15% 소태아혈청(FBS; GIBCO), 글루타민(GIBCO, 35050-061), 최소필수배지(MEM) 비-필수 아미노산(GIBCO, 11140-050) 및 페니실린 및 스트렙토마이신(GIBCO, 15140-122)로 보충된 고포도당 및 무-글루타민 DMEM(GIBCO, 10313)에서 성장시키고, 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> 및 3% O<sub>2</sub>에서 성장시켰다. ATCC에서 얻은 BJ 포피 섬유아세포를 정상 대조군으로 사용하였다. HeLa, U2OS 및 293T 세포를 10% FBS 및 페니실린 및 스트렙토마이신(GIBCO, 15140-122)으로 보충된 고포도당 DMEM(GIBCO, 11965)에서 성장시키고, 37℃에서 5% CO<sub>2</sub>에서 성장시켰다. 병에 걸린 개체 유래 피부 섬유아세포를 인간 유두종 바이러스 E6 및 E7(HPV16 E6E7)로 형질 전환하고, 레트로바이러스 형질도입을 통해 인간 텔로머라아제(hTERT)의 촉매 서브유닛에 의해 불멸화시켰다. HPV16 E6E7 유전자(Howley 실험실, 하버드 의대)를 pMSCVneo(Clontech)로 서브클로닝하고, 피부 섬유아세포를 형질전환시키기 위해 사용하였다. pWZL-hTERT를 병에 걸린 개체 유래 피부 섬유아세포를 불멸화시키기 위해 사용하였다. 유전자-코딩 야생형(WT) TONSL을 다음의 프라이머를 이용한 PCR에 의해 U2OS로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 증폭시켰다: TONSL-F(5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATGAGCCTGGAGCGCGAGC-3') 및 TONSL-R(5'-GGGGACCACTTTGTACAGAAAGCTGGTCTCAGAGCGCCGAAAGAAGAGC-3'). PCR 산물을 BP 클로나아제로, Gateway BP 벡터, pDONR223로 클로닝하였다. pDONR223 클론을 시퀀싱한 다음, LR 클로나아제(Thermo Fisher Scientific)로, pHAGE 벡터로 재조합하였다. pDONR223-TONSL 주형을 이용하여, QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Genomics)로, 본 연구에서 사용되는 점 돌연변이 플라스미드를 생성하였다. TONSL 돌연변이를 생성하기 위해 사용한 프라이머를 표 3에 열거하였다.
- [0071] [표 3]
- |                  |   |
|------------------|---|
| TONSL Glu539Lys  | CGAGCCTGCATCAAGGGCCAGCTGC<br>GCAGCTGGCCCTTGATGCAGGCTCG                                      |
| TONSL Arg558Gln  | CCCCCTTAACCCTCAGGACTACTGTGGCT<br>AGCCACAGTAGTCCTGAGGGTTAAGGGGG<br>CCAGACCTGCAGGCTGCTGCCAGGC |
| TONSL Gly973Arg  | GCCTGGGCAGCAGCCTGCAGGTCTGG<br>GCCCCCTCCCATCTGGGTTCGAGTTCA                                   |
| TONSL Arg934Trp  | TGAACCTCGAACCCAGATGGGAGGGGGC<br>TCTGTCTGCCAACCCTCAGATCAGCTGTGC                              |
| TONSL Glu1288Gln | GCACAGCTGATCTGAGGGTTGGCAGACAGA<br>GCCACCACACTGGGACACATGAAGGACC                              |
| TONSL Asp364His  | GGTCCTTCATGTGTCCCAGTGTGGTGGC<br>CTGGGCCTCACCTTTGAGAACCTGCAGCAG                              |
| TONSL Ser174Asn  | CTGCTGCAGGTTCTCAAAGGTGAGGCCAG   |
- [0072]
- [0073]
- [0074] 섬유 분석
- [0075] 복제 분기점 지연(stalling)을 위해, 개체 P03 유래 세포를 25 μM 5-클로로-20-데옥시유리딘(CldU: Sigma-

Aldrich C6891)으로 파동-표지하고, PBS로 세척하고, 250  $\mu$ M 5-아이오도-20-데옥시유리딘(IdU; Sigma-Aldrich I7125)으로 파동-표지하고, 수득하였다. 세포를 세척하고 PBS에서  $5 \times 10^5$  세포/mL로 재부유시켰다. 세포를 유리 슬라이드 상의 확산 버퍼(200 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM EDTA, 0.5% SDS)에서 용해시켰다. DNA 섬유를 증력에 의해 확산시킨 다음, 메탄올:아세트산(3:1)로 고정시키고, 2.5M HCl로 변성시켰다. CldU를 쥐(rat) 항-BrdU 항체(클론 BU1/75, ICR1; Abcam, ab6326; 1:750)로 검출하고, IdU를 생쥐 항-BrdU 항체(클론 B44; BD Biosciences, 347583; 1:750). 슬라이드를 4% 파라포름알데하이드로 고정시킨 다음, Alexa Fluor 594- 또는 488-접합 이차 항체(Life Technologies)로 염색하였다. 603 오일-담금 대상물과 NISElements 소프트웨어가 구비된 Nikon Eclipse Ni 현미경(Nikon Instruments)을 이용하여 이미지를 얻었다. 복제분기점 구조(>1000 분기 구조) 및 CldU/IdU 트랙 길이(>300 진행 분기)를 ImageJ 소프트웨어(US National Institutes of Health [NIH])에서 분석하였다. CPT 처리(DNA 손상 수선) 섬유 분석을 위해, 세포를 100  $\mu$ M CldU로 30분 동안, 그 다음 2.5 $\mu$ M/50 nM CPT 또는 DMSO와 함께, 250  $\mu$ M 5-아이오도-20-데옥시유리딘(IdU; Sigma-Aldrich I7125)로 30분 동안 처리하였다. 저-용융 아가로오스(Bio-Rad 161-3112)를 이용하여  $\sim 2 \times 10^5$  내지  $4.5 \times 10^5$  세포/플러그로 DNA 플러그를 준비한 다음, 50°C에서 2일 동안 20 mg/mL의 단백질 분해효소 K(Roche 03115828001)로 용해시켰다. DNA 섬유의 스트레칭을 위해, 22 mm x 22 mm 실란화 커버슬립(Genomic Vision)을 13분 동안 DNA 용액에 침지하고, Molecular Combing System(Genomic Vision MCS-001)로 일정한 속도(300  $\mu$ M/s)로 꺼내었다. 커버슬립을 60°C에서 4시간 동안 베이킹하고 변성을 위해 산과 함께 배양하였다. CldU- 및 IdU-표지 검출을 위해, 커버슬립을 쥐 항-BrdU 항체(희석 1:100 BrdU 및 CldU 검출; Abcam 6326) 및 생쥐 항-BrdU 항체(1:10, BrdU 및 IdU 검출; Becton Dickinson 347580)으로 상온(RT)에서 2시간 동안 배양하였다. 슬라이드를 PBS 내 4% 파라포름알데하이드에서 고정시키고, Alexa Fluor 488-접합 염소 항-쥐 항체(희석 1:100, A21208; Molecular Probes/Thermo Fisher) 또는 Alexa Fluor 568-접합 염소 항-생쥐 항체(희석 1:100, A21124; Molecular Probes/Thermo Fisher)로 RT에서 1 시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 그것들을 ProLong Gold Antifade Reagent(Molecular Probes)으로 고정시키고, 20°C에 저장하였다. DNA 섬유를 Carl Zeiss Axio Observer 7 및 ApoTome 2(그리드 투영을 이용한 전동 형광 현미경) 63 대물 렌즈로 관찰하였다. 각각의 실험에서, 총 200개의 DNA 섬유를 분석하였다; DNA 섬유의 수는 ImageJ로 측정하였다.

[0077] siRNA 형질주입(transfection), 세포 증식 및 CPT 민감도 분석

[0078] siRNA 표적 TONSL 코딩 영역을 표 4에 나타내었다.

[0079] [표 4]

TONSL coding region #1	GAGCUGGACUUAAGCAUGA
TONSL coding region #2	UGCAGAGUUGCAGUGCGCCAGUAAA
TONSL 3' UTR #1	CACCGAAGCCCCUAAUAAA
TONSL 3' UTR #2	CCUGUAAUCCCAACACUUU
TONSL 3' UTR #3	GAGACCAUCCUGGCUAACA
TONSL 3' UTR #4	CUAAAAAUACCAAAAAUUA
TONSL 3' UTR #5	GGUGGUGGAAGCCUGUAGU

[0080]

[0081] 여기서,  $3 \times 10^5$  세포를 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, siRNA로 역 형질주입 방식으로 형질주입하였다. 세포를 24시간 동안 이차로 형질주입하였다. 그 다음, 이차 형질주입 48시간 후, 4,000 세포를 세포 계수를 위해 4개의 웰(12-웰 플레이트, SPL)에 플레이팅하고, 1,000 세포를 Hoechst 염색을 위해 4개의 웰(96-웰 플레이트, Corning #3603)에 플레이팅하였다. 12-웰 플레이트 내 세포를 Z1 Coulter Particle Counter(Beckman Coulter)로 계수하고, 96-웰 플레이트 내 Hoechst 염색된 세포의 핵을 Cytation 3(BioTek)으로 계수하였다. 그 다음, 1,000 세포를 96-웰 플레이트 내 4개의 웰에 플레이팅하고, 플레이팅 24시간 후 CPT의 농도를 증가시켜 처리하였다. 처리 5일 후 세포를 계수하였다. 그 다음 세포를 Hoechst로 염색하고, Gen 5(BioTek)로 계수하였다. 병에 걸린 개체 유래 세포주에 있어서, 40,000 세포/웰을 CPT 농도 당 3배씩 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, 24시간 후, CPT의 농도를 증가시켜 처리하였다. 약물 처리 4일 후, 세포 Q3을 6-웰 플레이트에 1:4로 통과시키고; 그 다음 그것들을 Z1 Coulter Particle Counter(Beckman Coulter)로 4일 후에 계수하였다(Kim, Y. et al., Blood 121, 54-63, 2013).

[0083] 면역블롯

[0084] 95°C에서 2 x SDS 샘플 버퍼(RBC)에서 5분 동안 세포를 보일링하여 세포 용해물을 제조하였다. 단백질 해상도를



위해 7.5% 프리캐스트 겔(Bio-Rad)을 사용하였다. 각각의 단백질을 검출하기 위하여, 항-HA(Biolegend; MMS-101R, Lot B224726), 항-TONSL(Bethyl: A303-843A, Lot #1), 항-GAPDH(Santa Cruz: SC-25778, Lot K0615), 항-인산화 체크포인트 키나아제 1(CHK1)(Cell Signaling: 2348P, Lot #11), 항-인산화 체크포인트 키나아제 2(CHK2)(Cell Signaling: 2661P, Lot #11), 및 항- $\alpha$ -튜불린(Abfrontier: LF-PA0146, Lot MJL01-02) 항체로 면역블롯을 수행하였다.

[0086] 면역형광(BrdU/Rad51)

[0087] 면역형광을 위해,  $3 \times 10^5$  세포를 커버 유리가 있는 6-웰 플레이트(SPL)에 두었다. HeLa 및 U2OS 세포에 대하여, siRNA를 역방향 및 순방향 형질주입 방식으로 처리하고 이차 형질주입 48시간 후 플레이트링하였다. BrdU 통합을 위해, 플레이트링 24시간 후, 세포를 BrdU(20mg/mL)로 4시간 동안 처리한 다음, PBS 내 3.7% 포름알데하이드로 고정시켰다. Invitrogen 프로토콜을 따랐다. 세포를 PBS에서 세척하고 PBS 내 3.7% 포름알데하이드에서 15분 동안 고정시켰다. PBS에서 세척한 후, 세포를 0.1% Triton X-100 버퍼에서 20분 동안, 그 다음 얼음상 10분 동안 1N HCl에서, 투과시켰다. 그 다음 세포를 RT에서 10분 동안 2N HCl에서, 그 다음 10분 동안 인산 시트르산 버퍼에서, 배양시켰다. 세포를 투과 버퍼에서 두 번 세척한 다음, RT에서 밤새 Alexa-Fluor-488-접합 항-BrdU 일차 항체로 배양하였다. Rad51 및  $\gamma$ -H2A.X 면역형광을 위해, 플레이트링 24시간 후에, 세포를 밤새 CPT(500  $\mu$ M)로 처리한 다음, 15분 동안 3.7% 포름알데하이드로 고정시키고, 그 후 중간에 PBS 세척과 함께, 20분 동안 0.1% Triton X-100으로 투과시켰다. PBS로 두 번 세척한 후, 세포를 RT에서 1시간 동안 PBG(0.2% [w/v] 냉어류 젤라틴, PBS 내 0.5% BSA)로 차단시켰다. 그 다음, 세포를 4°C에서 밤새 PBG에서 1:7000의 항-Rad51 항체(Abcam, ab133534, Lot #: GR219215-36) 및 1:1000 항- $\gamma$ -H2A.X 항체(Cell Signaling, #9718S, Lot #13)로 배양시켰다. 다음 날, 세포를 PBG에서 세 번 세척하고, 30분 동안 형광-접합 이차 항체로 배양시켰다. 이차 항체는 Abcam에서 구입하였다 (Ms Alexa Fluor 594: ab150112; Rb Alexa Fluor 594: ab150064; Ms Alexa Fluor 488: ab150109; 및 Rb Alexa Fluor 488: ab150061). PBG에서 세 번 세척한 후, 커버슬립을 DAPI가 보충된 Vectashield(Vector Laboratories)에 끼워넣었다. CFI-Apochromat 603 NA-1.4 오일 대물 렌즈, AI-DUG GaAsP 다중검출기 장치 및 NIS-Element C-ER 소프트웨어가 구비된 Nikon A1 공초점 현미경으로 이미지를 수행하였다. BrdU 분석을 위해, BrdU-통합 세포의 수를 계수된 전체 세포 수로 나누어 그 비율을 계산하였다.

[0089] 동물 및 윤리 강령

[0090] 모든 생쥐는 Taconic Biosciences(Dae Han Biolink)에서 구입하였고, 연세 실험 동물 연구 센터의 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF) 시설에서 보관하였다. 동물 실험 절차는 연세대학교의 동물실험윤리위원회(IACUC)에 의해 검토되고 승인된, 한국 식품의약품안전청의 지침에 따라 수행하였다(허가 번호: 201506-322-02).

[0092] CRISPR-Cas9 mRNA 및 공여체 DNA의 제조

[0093] Cas9 mRNA를 mMACHINE T7 Ultra kit(Ambion)로 합성하고, 미세주입 전에 즉시, 엔도뉴클라아제가 없는 주입 버퍼(0.25 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 7.4])에서 작동 농도로 희석하였다. *S. 피오게네스(S. pyogenes)* Cas9(SpCas9) 단백질을 인코딩하는 플라스미드(Cho, S.W. et al., Nat. Biotechnol. 31, 230-232, 2013)를 ToolGen에서 얻었다. crRNA를 점 돌연변이 표적 부위 주변의 "NGG" 또는 "CCN"(NGG의 역 보완 서열) 서열을 찾아 설계하였다. 본 연구에서 사용된 crRNA 서열은 다음과 같다: crRNA1 5'-GGTCCAGCCCCCTCCATCC-3', crRNA2 5'-GAACCCGATGGGAGGGGC-3', crRNA3 5'-CCGGTTCGAGTTCAAATTC-3', 및 crRNA4 5'-CCTGAATTTGAACGCAACC-3'. 공여체 DNA로 사용한, 106 bp 합성된 단일가닥 올리고뉴클레오타이드(ssDNA)는 c.T2770C(p.Arg924Trp) ssDNA 5'-TAGAACTTCTGTCTTCTGACTGTCCCTCCCTGTCTTTCTCTGCTAGCTTCTGGTCCAGCCTCTCTATCTGGGTTCTGGGTTCTGAGTTTCTTCTCATCCCCGTTCCC-3'이다. 상동-직접 수선(HDR)을 위한 tracrRNA, *Tons1* 유전자를 표적화하는 crRNA 및 ssDNA 공여체를 Integrated DNA Technologies(IDT)에서 얻었다.

[0095] 미세주입

[0096] 하나의 세포 배아의 미세주입을 이전에 설명된 바에 따라 수행하였다(Sung, Y.H. et al., Genome Res. 24, 125-131, 2014). 간략히, 3-4주령의 C57BL/6 암컷 생쥐를 48시간 간격으로, 5IU 임신 수컷 혈청 생식선자극호르몬(PMSG, Sigma) 및 5IU 인간 융모막 생식선자극호르몬(hCG, Sigma)의 복강내(i.p.) 주사로 과잉배란시켰다. 그 다음 과잉배란된 암컷을 번식용 수컷과 교배시키고, 수정란을 수득하고, Cas9 mRNA(50 또는 100 ng/ $\mu$ L), 네 개의 crRNA(각각 10, 25 또는 50 ng/ $\mu$ L), tracrRNA(1:1 몰비로 crRNA와 혼합된 tracrRNA) 및 공여체 DNA(200 ng/ $\mu$ L)의 혼합물로 미세주입하였다. 미세주입은 피에조-구동 조종기(Prime Tech)로 하나의 세포 배아의 세포질

에서 수행하고, 허위-임신 ICR 생쥐의 난관으로 배아를 이동시켜, 살아있는 생쥐를 생산하였다.

[0098]

창립자(Founder) 스크리닝 및 유전형(genotyping) PCR

[0099]

*Tons1* 유전자에서 p.Arg924Trp 돌연변이가 있는 창립자를 스크리닝하기 위하여, 미세주입된 배아에서 생산된 신 생아에서 얻은 게놈 DNA로, 이전에 설명된 바와 같이(Lee, J.H. et al., Transgenic Res. 27, 241-251, 2018), PAGE-PCR 분석을 수행하였다. 간략히, crRNA 표적 부위에 걸친 게놈 영역을 PCR로 증폭시켰다. PCR 산물을 단순히 변성시키고 어닐링한 후, 아크릴아미드 겔 전기영동을 통해 결과 발생된 산물을 분석하였다. 그 다음, 후보 물질을 T-Blunt PCR Cloning Vector(SolGent)에서 클로닝하고, 직접 시퀀싱 분석(Cosmobio)으로 입증하였다. PAGE-PCR에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같아: 정방향, 5'-TGAATGCAGAGCCTGCAGAGA-3' 및 역방향, 5'-TCTAGGGAGCAGAGTGCCAAG-3'. 유전형 PCR을 위해, DNA를 꼬리 또는 난황낭에서 추출하였다. *Tons1* WT 대립유전자를 확인하기 위하여, 정방향 프라이머 5'-AAGCAGTCTTCAGCATGGGACT-3' 및 역방향 WT 프라이머 5'-AACTCGAACCCGGATG-3'를 사용하였다. *Tons1* p.Arg924Trp 대립유전자를 확인하기 위하여, 정방향 프라이머 5'-AAGCAGTCTTCAGCATGGGACT-3' 및 역방향 KI 프라이머 5'-ACCCAGATAGGAGGAG-3'를 사용하였다. 역방향 WT 프라이머는 *Tons1* WT 대립유전자의 서열에 특이적으로 어닐링되는 반면, 역방향 KI 프라이머는 *Tons1* p.Arg924Trp 대립유전자의 서열에 대해 어닐링된다.

[0101]

배아 수득

[0102]

임신은 질 플러그(E0.5)의 검출에 의해, 또는 시험관내 수정(IVF) 및 배아 이동 후에 낱짜를 기입하였다. 배아는 10% 중성 버퍼 포르말린(Sigma-Aldrich)에서 고정시키거나, 또는 액체 질소에서 급속동결시켰다. 임체현미경 이미지를 고정된 배아의 표본으로부터 생성하였다.

[0104]

등록번호

[0105]

쥐 게놈 데이터는 <http://biodata.kr/>에서 다운로드받을 수 있다(제출 ID: 1711075636).

[0107]

TONSL 야생형 및 돌연변이의 3D 구조 모델링

[0108]

인간 TONSL의 구조적 분석을 위하여, 3차원 구조의 이용가능성에 따라 다양한 재료와 방법을 활용하였다(Saredi, G. et al., Nature, 534, 714-718, 2016). ANK 도메인(AA 528-626)의 경우, ANK 도메인 및 그의 결합 파트너의 구조를 Protein Data Bank(PDBID: 5JA4)에서 얻었다. 그러나, 인간 TONSL 단백질의 LRR 도메인(AA 1069-1354)에 대한 구조는 알려져 있지 않았다. 그러므로, 주형(PDBID: 4PEQ)로서 소 리보뉴클레아제 억제제 1을 사용한 상동성 모델링에 의해 LRR 도메인의 3차원 모델을 구축하였다. 모델을 구축하기 위해 MODELLER를 사용하였으나, 문의(query) 및 주형 사이의 정렬은 MODELLER에 의해 만들어진 정렬을 채택하기 보다는 HHpred에 의해 만들었다. 또한 점 돌연변이에 의해 변형된 단백질의 구조를 구축하기 위하여 FoldX를 활용하였다. 반면에, 59개 아미노산 결실이 있는 LRR 도메인의 돌연변이 구조를 MODELLER를 이용하여 구축하였다. 또한 ANK 도메인의 구조는 그의 결합 파트너의 구조를 포함하고, 이는 Histone H3 및 DNA 복제 라이센싱 인자 MCM2이다. ANK 도메인 내 돌연변이의 영향을 평가하기 위하여, 돌연변이 ANK 도메인을 가진 복잡한 구조를 GROMACS Molecular Dynamics를 사용하여 시뮬레이션하고 야생형 구조와 비교하였다.

[0110]

실시예 2: 결과

[0111]

스포나스트립 이형성증 개체의 진단 및 임상 정보

[0112]

네 가지 상이한 인종 - 한국인, 인도인, 판란드인 및 브라질인(아프리카계 흑인 및 비-라틴계 유럽인)으로부터, 질병의 진단 기준을 만족시키는, 이전에 보고된 경우(Jeong, J.H. et al., Medicine (Baltimore) 95, e3155, 2016)를 포함하여, 13명의 개체를 모집하였다. 그들의 임상적 특징을 표 5에 나타내었다.

표 5

[0113]

ID	P01-1 <sup>a</sup>	P01-2 <sup>a</sup>	P02	P03	P04	P05	P06	P07 <sup>b</sup>	P08	P09	P10	P11	P12
인종	한국인	한국인	한국인	한국인	브라질인 (아프리카계 흑인 및 비-라틴계 유럽인)	한국인	핀란드인	한국인	인도인	인도인	인도인	한국인	인도인
최초 보고 나이	8세 5개월	6세	2개월	13세	2세, 2개월	2세, 7개월	신생아	36세	13세	14세	11세	3세, 5개월	1세, 9개월
성별	여	남	남	남	남	여	여	남	남	여	여	여	여
혈족	무	무	무	무	유	무	무	무	무	무	무	무	무
최초 보고	단신	단신	단신	무릎의 방사선학적 이상	단신	단신	단신	목 및 어깨 통증	단신	단신	단신 및 사지 기형	단신	단신
최초 측정 키 (cm) (SDS)	104.1 (-3.6)	93.4 (-4.7)	47.9 (-4.9)	145.2 (-0.9)	76 (-4.0)	74 (-4.5)	40 (-5.6)	136 (-6.2)	120 (-4)	119 (-7)	93 (-10)	73.6 (-5.6)	53 (-10)
마지막 측정 나이	17세, 5개월	15세	5세, 7개월	N/A	13세	6세	12세, 6개월	37세	13세	14세	11세	4세, 2개월	2세
마지막 키 (cm) (SDS)	124.4 (-6.8)	143.5 (-4.8)	82.6 (-6.0)		122 (-4.6)	98.8 (-3.4)	85.8 (-10.4)	136 (-6.2)	120 (-4)	119 (-7)	93 (-10)	80.6 (-5.8)	
얼굴이형증	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
인지기능장애	(-)	(-)	(-)	(-)	경계선	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
기타 소견	짧은 치근	짧은 치근		갑상선 기능저하증; 안구진탕증; 요도하열; 기도협착 <sup>c</sup>	첫해에 재발성 폐렴; 짧은 치근	갑상선 기능저하증; 5세까지 재발성 폐렴; 성조숙증	백내장; 뇌혈관 동맥류; 과열; 약한 목소리	아놀드-키아리 기형; 백내장	N/A	N/A	관절이완	관절이완; 둔부염좌; 기도협착 <sup>c</sup>	

SDS = 표준 편차 점수(Standard deviation score), N/A = 사용가능하지 않음.

<sup>a</sup>이들 두 개체가 형제임.

<sup>b</sup>이전에 보고됨(Jeong, J.H. et al., Medicine (Baltimore) 95, e3155, 2016)

<sup>c</sup>기도 협착은 성문 협착(glottic narrowing) 및 확산 기도 협착(diffuse tracheal narrowing)으로 구성됨.

[0114] 본 연구의 개체에 대한 중앙 높이 표준 편차 점수(SDS)는 -4.9이었다; SDS는 -0.9 내지 -10.1의 범위로, 경미한 것에서 심각한 단신까지의 넓은 범위를 나타내었다. 모집된 개체 모두 유사한 얼굴 이형증을 공유하였다(도 1A). 한 명 이상의 개체에 의해 공유되는 다른 임상적 소견은 짧은 치근, 기도 협착, 백내장 및 관절 이완을 포함한다. 방사선 특징들은 척추 및 긴 뼈의 골간단의 뚜렷한 변화를 특징으로 하였다. 방사선 특징이 변화하고 연령에 따라 더욱 두드러진다는 것에 주목할 가치가 있다(도 1B 및 표 6).

[0115] [표 6]

ID	P01-1	P01-2	P02	P03	P04	P05	P06	P07	P08	P09	P10	P11	P12
골격조사 나이 (년.월)	16	13	3.8	13	6.7	4	5.10	36	13	14	11	3.5	1.9
두개골													
장두 대두증/전두부 돌출	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
중앙 안면 편평화	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
주걱턱	(+/-)	(+/-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+/-)
척추													
키 큰 전방 척추체	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
볼록 전방 종말판	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
우성/열성 종말판의 양면 볼록	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+/-)
밀집 종말판	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
추궁근간거리 L1-L5의 고리 협착	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+/-)	(+)	(-)	(+)	(+/-)	(-)	(-)
흉요추 척추측만증	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
요추전만증	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
골반													
내반고 또는 외반고	쌍방 내반고	일방 내반고	쌍방 내반고	정상	정상	정상	쌍방 내반고	정상	일방 내반고	쌍방 외반고	정상	쌍방 내반고	쌍방 내반고
주요 대퇴부 골단의 무혈관성 괴사	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
사지													
골간단 이상	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
골간단 밀집 밴드	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
골간단 가장자리의 혼합된 밀집된 빛을 내는 영역	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
골간단 수직 횡문	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
작은, 이형성 골단	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
손													
지연된 손목 골화	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
단중수증	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

[0116]

[0118] 스포나스트립 이형성증 개체 내 TONSL 돌연변이의 확인

[0119] 질병을 일으키는 병원성 돌연변이를 확인하기 위하여, 8명의 병에 걸린 개체 및 7 가족의 가능한 가족 구성원 (한국인 5, 브라질인 1 및 핀란드인 1; 개체 P01-1 내지 P07)의 WES를 수행하였다(표 1 및 2). 이 질병이 상염 색체 열성 방식으로 유전된다는 가정에 근거하여, 동형접합 또는 화합물-이형접합 상태의 8명의 개체 중에서 발 단자에 의해 특별히 보호된 희소한 변이체 (공공 데이터베이스에서 <1% 빈도)를 회수하였다. 열성 패턴이 뒤따르는 개체-특이적 변이체 중에서, TONSL 내 변이체가 4명의 개체에 존재하였다(표 7).

표 7

[0120]

ID	돌연변이 1	돌연변이 2	유전 연구
P01-1 <sup>a</sup>	엑손 23 결실 <sup>b</sup>	c.2800C>T	p.Arg934Trp
P01-2 <sup>a</sup>	엑손 23 결실 <sup>b</sup>	c.2800C>T	p.Arg934Trp
P02	c.1531C>T	p.Gln511 <sup>*</sup>	c.2917G>A
			p.Gly973Arg

P03	c.735C>G/c.737delT <sup>c</sup>	p.Cys245Trpfs <sup>*20</sup>	c.1615G>A	p.Glu539Lys	트리오 WES
P04	c.1673G>A	p.Arg558Gln	c.1673G>A	p.Arg558Gln	트리오 WES
P05	c.1090G>C	p.Asp364His	확인되지 않음	확인되지 않음	쿼드 WES
P06	c.578+1G>T	N/A	확인되지 않음	확인되지 않음	트리오 WES
P07	c.2907C>A	p.Tyr969 <sup>*</sup>	c.3862G>C	p.Glu1288Gln	단독 WES
P08	c.1471_1472delTC	p.Ser491Argfs <sup>*65</sup>	c.521G>A	p.Ser174Asn	단독 WES
P09	c.1459G>A/c.1989)1991del <sup>d</sup>	p.Glu487Lys/p.664delLeu	c.125G>A	p.Arg42His	단독 WES
P10	c.295delT	p.Ser99fs <sup>*59</sup>	c.1459G>A	p.Glu487Lys	단독 WES
P11	c.578+1G>A	p.Thr51Argfs <sup>*42<sup>c</sup></sup>	c.1292-11_1291_14delCCTC	p.Arg431Profs <sup>*6</sup> /p.431_441del <sup>f</sup>	생어 시퀀싱
P12	c.1459G>A	p.Glu487Lys	확인되지 않음	확인되지 않음	생어 시퀀싱

WES: 전장 엑솜 시퀀싱(whole-exome sequencing)

<sup>a</sup> 이들 두 개체가 형제임.

<sup>b</sup> g.145657122\_145658684del.

<sup>c</sup> 부계 대립 유전자는 치환 및 뒤이은 하나의 뉴클레오타이드의 결실을 포함.

<sup>d</sup> 부계 대립 유전자는 치환 및 인-프레임 결실을 포함.

<sup>e</sup> RT-PCR은 절단된 단백질 또는 비센스-매개 mRNA 부패를 예측하는, mRNA 서열 변화를 나타냄.

<sup>f</sup> RT-PCR 및 그 산물을 클로닝하여, WT(14/25), 및 일부 인트론 10(5/25)의 보유 및 일부 엑손 11(6/25)의 스킵에 의해 형성된 두 개의 상이한 돌연변이 mRNA를 나타냄; 이러한 변화는 이러한 두 개의 상이한 폴리펩티드를 예측함.

<sup>g</sup> P07은 그 부모가 이미 죽었기 때문에, 그 형제자매를 시험하여 이-대립유전자인 것으로 확인된 두 개의 돌연변이를 가짐. 둘 또는 셋 돌연변이를 가진 모든 다른 개체는 그의 부모를 시험하여 이-대립유전자인 것으로 확인됨.

[0121]

남아있는 4명의 개체는 유전자에서 단일 변이체를 포함하고, 나아가 그들 또한 열성 모델에 적합한지 여부를 입증할 수 있도록 분석을 요구하였다. 예를 들어, 형제 발단자(개체 P01-1 및 P01-2)의 그 다음 WGS 분석은 모계 대립유전자에서 엑손 23 결실을 확인하였다; 이 결실은 PCR에 의해 입증하였다. 다음으로, 인도 유래 추가 집단을 모집하고 단독(singleton) WES의 대상으로 하였는데, 이는 *TONSL* 내 이(bi)-대립유전자 변이체의 발견을 유도하였다. 마지막으로, 생어 시퀀싱에 의해 이러한 *TONSL* 변이체에 대하여 두 명의 추가 개체(한국인 1 및 인도인 1)를 스크리닝하고, 하나(개체 P11)에서 이-대립유전자 돌연변이 및 나머지(개체 P12)에서 단일 돌연변이를 확인하였다. 개체 P11은 mRNA 내 뒤이은 변화가 RT-PCR에 의해 확인된 스플라이싱 부위 변이체 및 깊은 인트론 변이체를 가진다. 오로지 하나의 돌연변이만이 세 가지 발단자 P05, P06 및 P12의 *TONSL* 유전자에서 확인되었다(표 7). 동일한 돌연변이를 포함하는 부모들은 병에 걸리지 않았으므로, 병에 걸린 개체들은 남아있는 *TONSL* 대립유전자에, 아리송한 구조적 변이 또는 비-코딩 변이와 같은, 미확인 변이체를 가질 가능성이 매우 높다. 확인된 모든 *TONSL* 돌연변이를 생어 시퀀싱에 의해 확인하였다(도 2A 및 2B). 병에 걸린 개체에서 다른 골격-이형성 증-관련 유전자 내 유의한 변이는 발견되지 않았다. 병에 걸린 개체의 13분의 10(76.9%)이 하나의 LoF 대립유전자 및 하나의 미스센스 대립유전자를 가지고 있었다(표 7). 비센스-매개 mRNA 부패를 유발할 수도 있는, 비센스 돌연변이를 제외하고, *TONSL* 미스센스 돌연변이는 단백질-코딩 영역에 걸쳐 다양한 위치에서, 대부분 기능적으로 주석이 달린 도메인(9분의 8) 내에 발견되었다(도 3A). 9개의 미스센스 변이체는 척추동물 중에서 완벽하거나 거의 완벽한 진화의 보존을 나타내었고(도 3B), 건강한 집단에서 낮은 빈도로 발견되었다(5/9가 ExAC 데이터베이스에서 발견되지 않았다; 9개 모두  $< 1.0 \times 10^{-4}$ ). 미스센스 변이체의 기능성을 예측하기 위하여, CADD 및 GERP 점수를 단백질의 아미노산 잔기 나머지와 비교하였고, 그들은 유의한 차이를 나타내었다(도 3C 및 4A-4D). *TONSL*은 LoF 변이체에 대하여 저항성이 있었으나(ExAC pLI = 0.00), 본 연구의 개체 어느 것도 대립유전자 둘다에서 LoF 변이체를 포함하지 않았는데, 이는 생존을 위한 *TONSL* 기능의 중요하지만 최소의 필요조건을 암시한다.



[0123] 야생형 TONSL의 발현에 의한 개체 유래 피부 섬유아세포 내 결함의 보완

[0124] TONSL 변이체가 스포나스트립 표현형에 대한 원인이라는 것을 입증하기 위한 시도로, 두 개체, P03 및 P04에서 일차 피부 섬유아세포 주를 확립하였다. 면역블롯 분석은 정상 인간 섬유아세포(BJ 세포)와 비교하여 뚜렷한 감소를 나타내었다(도 5A). siRNA 처리는 내인성 TONSL 단백질 수준을 없앴다(도 5A 및 도 6A). TONSL 변이체의 원인 본성을 추가로 입증하기 위하여, P03 및 P4 세포로 공 벡터(EV) 및 HA-태그 WT TONSL을 형질도입하고(도 5B), 기능성 보완 분석을 수행하였다. WT-TONSL을 발현시키는 것은 CPT에 대한 세포의 향상된 민감도(도 5C) 및 두 세포주에서 DNA-손상-유도 RAD51-병소 형성(도 5D 및 5E)을 성공적으로 구하였다. CPT 민감도 분석에 대한 대조군으로, BJ 세포 및 FANCP 세포(SLX4로도 알려짐)를 사용하였고, 이는 이 경우에서, 판코니 빈혈 개체에서 유래된 SLX4-결핍 피부 섬유아세포이다. FANCP 세포는 CPT에 민감한 것으로 발견되었다; 이러한 민감도는 렌티 바이러스 형질도입을 통해 WT SLX4 단백질을 도입하여 구하였다(Kim, Y. et al., Blood, 121, 54-63, 2013; Kim, Y. et al., Nat. Genet. 43, 142-146, 2011). P03 및 P04 세포의 CPT 민감도 분석을 이전 FANCP 세포 분석과 유사하게 설계하였으나, 그들은 EV 및 WT TONSL-보완 세포를 포함하였다. 정상 대조군 BJ 세포에 더하여, CPT 민감도를 비교하기 위하여, EV 및 WT SLX4 FANCP 세포를 사용하였다. 또한, 병에 걸린 개체에서 발견된 TONSL 변이체에 의해 유발된 손상된 DNA 복제를 확인하기 위하여, BrdU-통합 분석을 수행하고, 면역형광으로 정량화하였다. 예상대로, P03/EV 및 P04/EV 세포에서 BrdU 통합 비율은 BJ 세포에서 보다 적었고, 한편 보완된 세포는 증가된 BrdU 통합을 나타내었다(도 5F). Duro 등에 의한 연구에서, 비록 TONSL 녹-다운 세포가 CPT에 민감하다고 하더라도, 그들은 대조군 세포와 비교할 때 수산화요소(HU)에 대해 민감하지 않다는 것이 보고되었다(Nishimura, G. et al., Am. J. Med. Genet. 80, 288-290, 1998). 돌연변이 TONSL을 가진 개체 유래 섬유아세포가 유사한 특성을 나타내는지 여부를 시험하기 위하여, P03 및 P04 세포를 HU로 처리하였다. 이전 보고에 일치하게, P03 또는 P04 세포 모두 HU에 대해 민감하지 않았다(도 7). 상술된 바와 같이, TONSL은 상동성 재조합에 연관되어 있고, 그의 손상은 감소된 세포 증식 및 증가된 CPT에 대한 민감도를 야기한다(Duro, E. et al., Mol. Cell 40, 632-644, 2010; O'Connell, B.C. et al., Mol. Cell 40, 645-657, 2010). 상동성 재조합이 DNA 손상 수선, 따라서 DNA 복제에 중요한 부분이므로, TONSL 변이체가 DNA 손상 수선의 결함의 결과로서 정지된 복제분기점의 발생을 증가시키는 것이 가능하다. 돌연변이 TONSL의 복제 재시작 및 DNA 손상 수선의 장애를 평가하기 위하여, 개체 P03 유래 섬유아세포 및 정상 대조군 세포를 이용하여 섬유 분석을 수행하였다(도 8). 각각, 첫번째 표지 기원 및 두번째 표지 기원에서 새롭게 합성된 DNA를 추적하기 위하여, 뉴클레오티드 아날로그 CldU 및 IdU를 사용하였다. 진행중인 분기점은 CldU 및 IdU 트랙을 모두 가지고, 한편 정지된 분기점은 CldU-만 표지된 트랙에 의해 모니터링될 수 있다. 진행중이거나 정지된 복제분기점의 변화를 비교하기 위하여, 모든 CldU-통합 트랙의 합계에서 CldU 및 IdU 트랙의 백분율을 계산하였다. 정상 인간 섬유아세포와 비교하여, 진행중인 복제분기점의 퍼센트-나이는 P03 세포에서 약간 감소하였고, 정지된 분기점의 수는 상당하였다(도 8). 다음으로, P03 및 P04 세포에서 CPT 민감도에 대한 섬유 분석을 수행하였고, 대조군으로서 EV, WT-TONSL 및 BJ 세포를 사용하였다. 50 nM의 CPT로 처리되었을 때, P03/EV 및 P04/EV 세포는 BJ 세포와 비교할 때 복제 길이의 감소를 나타내었다; 이러한 감소는 WT-TONSL에 의해 구하였다(도 5G). 종합해보면, 이러한 데이터는 병에 걸린 개체에서 발견된 TONSL 변이체가 DNA 복제 및 수선 능력을 손상시킨다는 것에 대한 강한 증거를 제공한다; 이러한 손상은 모두 WT-TONSL에 의해 구하였고, 따라서 질병 표현형에서 TONSL 돌연변이의 병원성 본성을 입증한다.

[0126] 시험관내 세포-기반 분석에서 병원성 TONSL 돌연변이의 입증

[0127] 일차 섬유아세포가 이용가능하지 않은 다른 개체에서 발견된 TONSL 변이체의 병원성을 조직적으로 평가하기 위하여, HeLa 세포주를 이용한 시험관내 세포-기반 분석을 확립하였다. 비센스 돌연변이는 비센스-매개 mRNA 부패의 대상이 될 수 있으므로, 미스센스 TONSL 돌연변이에 초점을 맞추었다. 우선, TONSL 고갈이 CPT에 대한 향상된 민감도를 야기한다는 것을 나타내는 이전의 보고의 결과를 개괄할 수 있는지 여부를 시험하였다(O'Donnell, L. et al., Mol. Cell 40, 619-631, 2010; Duro, E. et al., Mol. Cell 40, 632-644, 2010). 이를 달성하기 위하여, 돌연변이 TONSL이 HeLa 세포주에서 발현하지만, 내인성 WT는 선택적으로 녹다운된, 분석 시스템을 확립하였다. 전략은 렌티바이러스 형질도입을 통해, 각각의 돌연변이 TONSL 변이체를 안정적으로 발현시키고 그 다음 세포를 TONSL 3'-비번역 영역(UTR)을 표적화하는 siRNA로 처리하는, 개별 HeLa 세포주를 확립하는 것이다; 이 과정은 선택적으로 내인성 TONSL mRNA만을 녹다운한다. 성공적이라면, HA-태그 TONSL이 발현되고, TONSL 돌연변이에서 발생한 임의의 세포 결함이 내인성 TONSL의 간섭없이 관찰될 수 있다. WT-TONSL 및 EV 세포주를 각각, 양성 및 음성 대조군으로 확립하였다. 우선 siRNA를 시험하기 위하여, HeLa 세포를 코딩 영역 및 3' UTR을 표적하는 siRNA로 처리하였다. 도 6A 및 도 6B에 나타난 바와 같이, HeLa 세포 내 코딩 또는 3' UTR 영역을 표적하여 TONSL을 고갈시키는 것은 CPT에 대한 과민감도를 야기하였다. 그 다음, 개별 EV, HA-태그 WT-TONSL 및



HA-태그 *TONSL* 미스센스 돌연변이를 안정적으로 발현시키는 HeLa 세포를 성공적으로 확립하였다(도 6C). *TONSL* 3' UTR을 표적화하는 siRNA는 내인성 *TONSL*를 선택적으로 녹다운시키나, HA-태그 WT 또는 돌연변이 *TONSL*는 그렇지 않았다(도 9A). 내인성 *TONSL*의 선택적 녹다운 및 감소된 *TONSL* 단백질 수준을 확인한 후, EV, WT-*TONSL* 및 *TONSL* 변이체 세포를 *TONSL* 3' UTR을 표적화하는 siRNA로 처리한 다음, 세포를 5일 동안 성장시켜, 세포 증식을 모니터링하였다. 전반적으로, WT-*TONSL* 세포와 비교할 때 *TONSL*-변이체 HeLa 세포에서 눈에 띄는 증식 결함이 관찰되었다(도 9B). 이들 중, P02 c.2917G>A, (p.Gly973Arg), P01-1 및 P01-2 c.2800C>T(p.Arg934Trp), P05 c.1090G>C (p.Asp364His), 및 P08 c.521G>A (p.Ser174Asn) 변이체를 가진 세포의 증식은 si*TONSL*-처리 HeLa-EV 세포와 유사한 수준으로 상당히 억제되었다(도 9B). 이러한 결과는 모든 조사된 *TONSL* 변이체가 직접적으로 세포 증식에 다양한 정도로 영향을 준다는 것을 나타낸다. 동시에, 개별 *TONSL*-변이체 HeLa 세포 내 내인성 *TONSL* 고갈 후 인산화된 CHK1 및 CHK2를 평가하였다. 체크포인트가 증식 결함과 함께 세포에서 활성화되는 것을 발견하였는데(도 9C), 이는 *TONSL*의 기능적 손상이 세포-주기 정지 및 세포 분할의 억제를 야기하는, 게놈 불안정성을 유발한다는 것을 시사한다. 복제-관련 DNA 손상을 수선하는데 있어서 각각의 *TONSL* 변이체의 역할을 추가로 조사하기 위하여, CPT 민감도 분석을 수행하였다. 증식 결과와 일치하게, *TONSL* 변이체 세포의 CPT 민감도는 *TONSL*이 결핍된, si*TONSL*-처리 HeLa-EV 세포에 필적할만하였다(도 9D). 아울러, *TONSL* 변이체의 이상 기능의 이유를 확인하기 위하여 기존의 이용가능한 구조를 기반으로 WT 및 *TONSL* 변이체를 모델링하였다(도 10). c.1615G>A (p.Glu539Lys) (P03) 및 c.1673G>A (p.Arg558Gln) (P04)는 아미노산 사이의 극성 상호작용을 변형시켰다. 개체 P01-1 및 P01-2에서의 엑손 23 결실은 LRR 도메인의 곡률을 상당히 변화시켰고, c.1989\_1991del (p.664delLeu) (P09)는 헬릭스의 C 말단의 방향을 변형시켰다(도 10A-G). 이러한 변화는 전체 구조를 변형시켰고, 이러한 변화는 변이체 *TONSL*과 그의 결합 파트너 사이의 결합 친화도에 영향을 미칠 수 있다(도 10). 시험관내 세포-기반 분석 및 인실리코 구조 분석을 실행한 연구에서, 확인된 *TONSL* 변이체가 *TONSL* 기능 활성화에 타협하며, 이러한 타협이 잠재적으로 인간 질병을 야기한다는 결론을 내렸다.

[0129] *Tonsl* 녹-인 생쥐 모델의 배아 치사율

[0130] 병리생리학 및 임상적 상관관계를 보다 잘 이해하기 위하여, *Tonsl* 내 p.Arg924Trp 치환(개체 P01-1 및 P01-2에서 발견된 인간 대응 *TONSL* p.Arg934Trp 변이체와 유사)을 포함하는 CRISPR-Cas9-매개 *Tonsl* KI 생쥐를 생성하였다(도 11A-C 및 도 12). 이형접합 *Tonsl*<sup>+/Arg924Trp</sup> (HT) 생쥐는 생식력이 있었고, 정상 전체 형태학을 나타내었다. 흥미롭게도, 비록 그들의 WT 및 HT 한배 자식이 1:2.8의 비율로 태어났다고 하더라도, 이-대립유전자 p.Arg924Trp 변이체를 포함하는 자식 한배 자식(n = 38)는 이종접합 이종교배에서는 얻을 수 없었는데(도 11D), 이는 동형접합은 생존가능하지 않다는 것을 시사한다. 발달 분석을 위해, 배아 일 10.5 내지 12.5(E10.5-E12.5)의 배아를 수득하고, WT:HT:KI 배아의 1:1.4:0.6 비율을 관찰하였다(표 8).

표 8

[0131]

라인	한배 자식	배아 수	야생형	이형	동형	NA <sup>A</sup>
E10	3	14	7	6	1	5
E11	1	9	1	6	2	1
E12	3	7	2	2	3	14
합계	7	30	10	14	6	20
비율			1	1.4	0.6	
NA, 사용가능하지 않음.						
<sup>A</sup> 배아 흡수가 이미 진행되어, 완전한 배아는 수득될 수 없었음.						

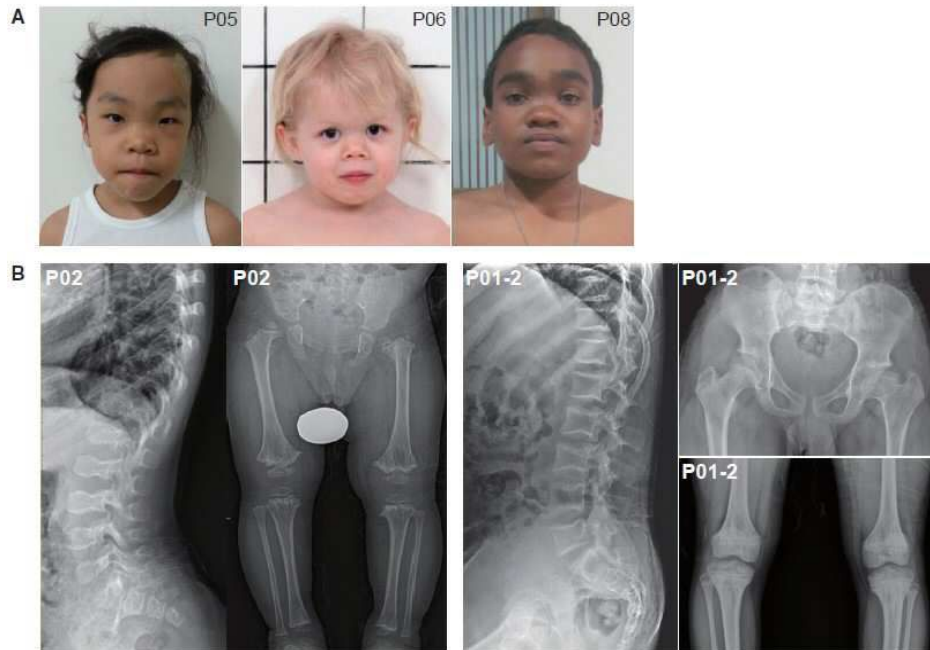
[0132] 그러나, 모든 동형접합 *Tonsl*<sup>Arg924Trp/Arg924Trp</sup> 배아는 약 E10.5에 태아 성장 제한에 따라 이른 배아 치사율을 나타내었다(도 11E 및 12B-D). 동형접합 *Tonsl*<sup>Arg924Trp/Arg924Trp</sup> 배아의 난황낭은 가시적 혈관이 결핍되었고, 다른 것들보다 작았다(도 12E). 인간 *TONSL* p.Arg934Trp 변이체의 시험관내 세포-기반 분석에 일치하여, 이러한 결과는 *Tonsl* p.Arg924Trp 변이체가 기능적이지 않고, 이러한 기능성 단백질의 결핍이 배아 치사의 주요 원인일 수 있다는 것을 시사한다. 종합해보면, 이러한 발견은 *TONSL* p.Arg934Trp 변이체의 배아 발달 및 병원성 본성에 있어서의 기능성 *Tonsl* 단백질의 생리학적 중요성을 입증하였다.

[0134] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

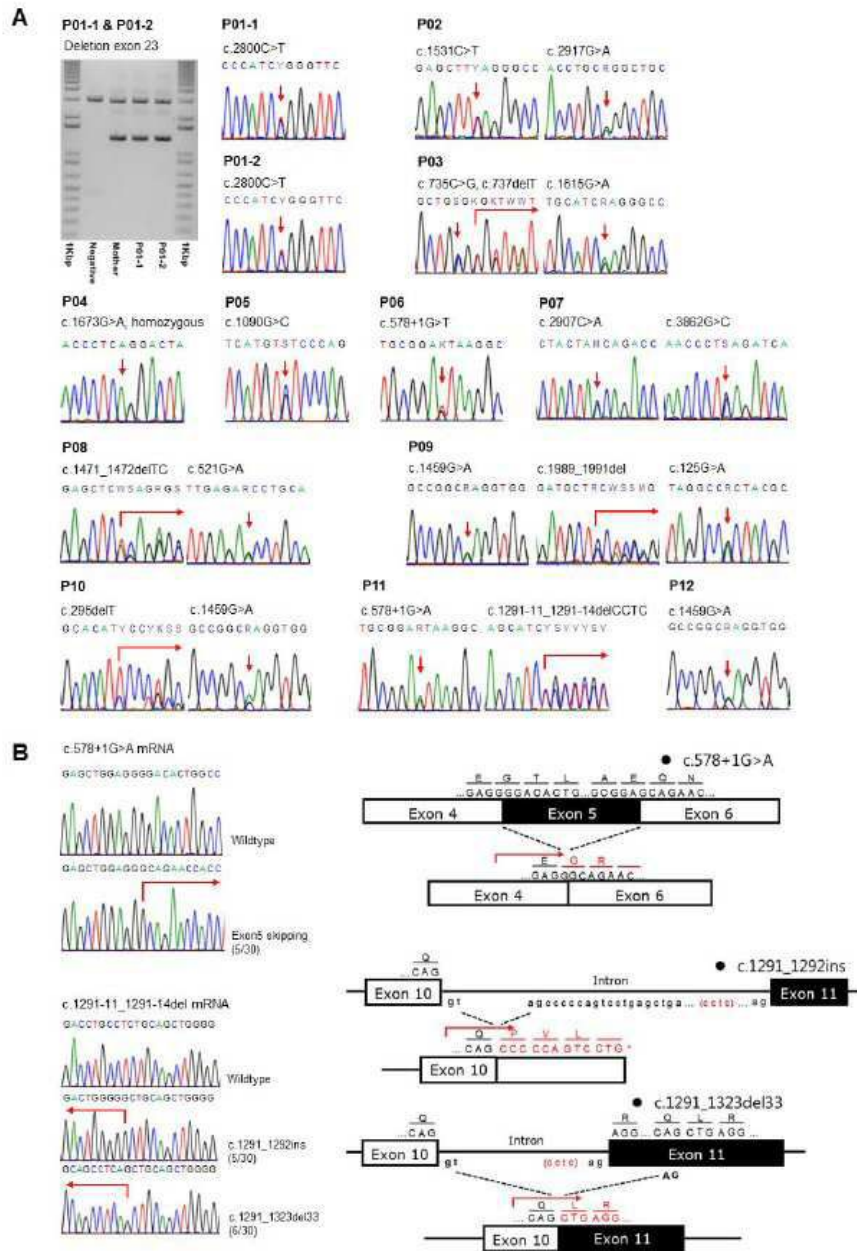
명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

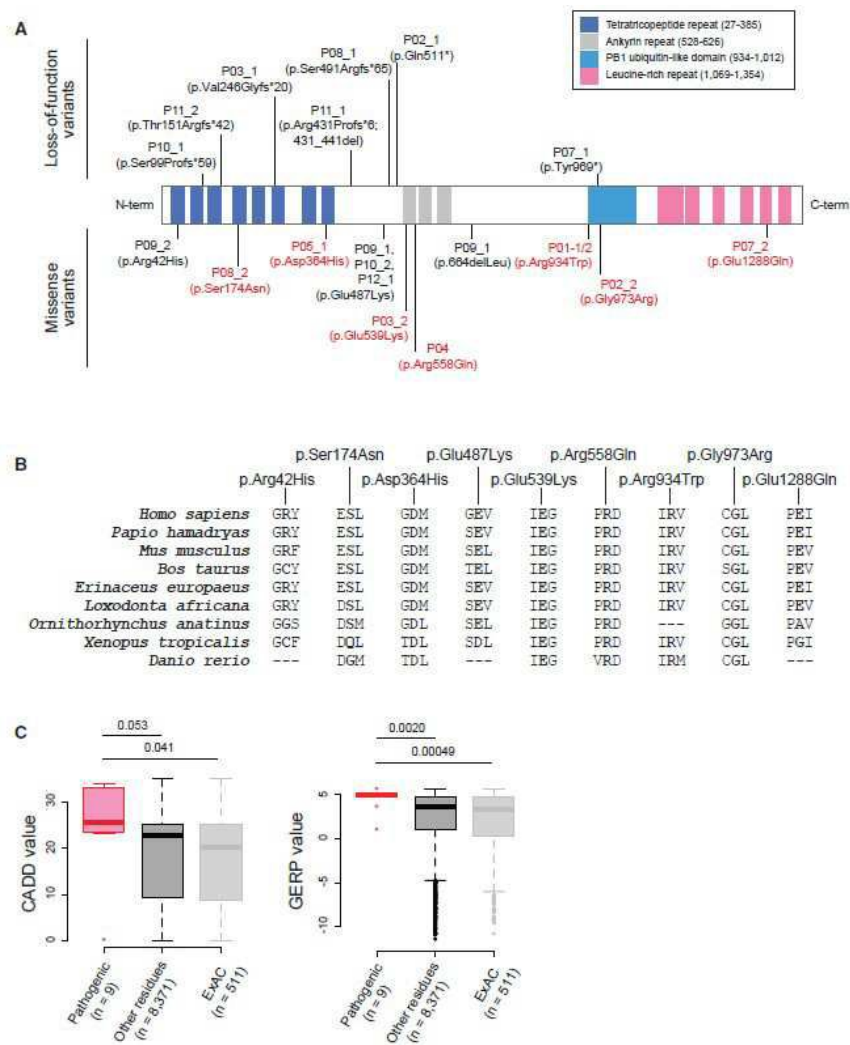
### 도면1



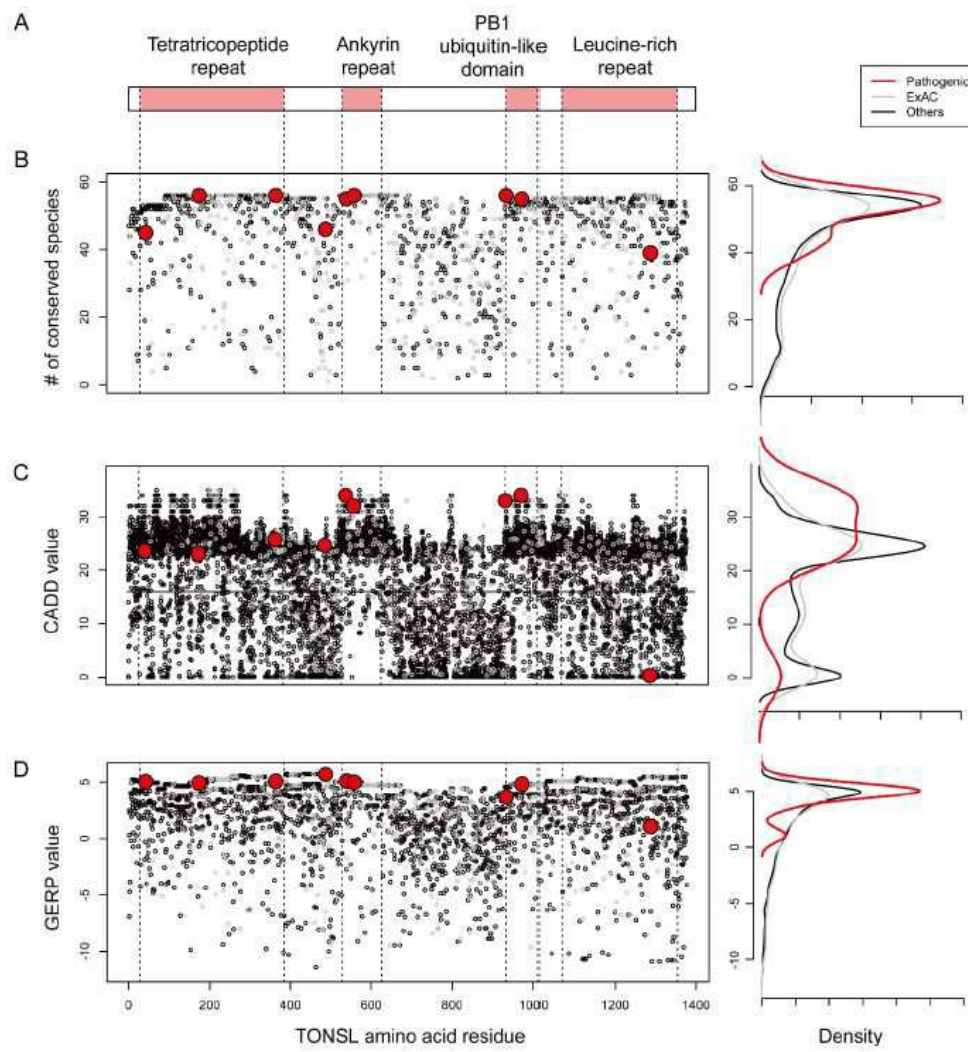
도면2



도면3

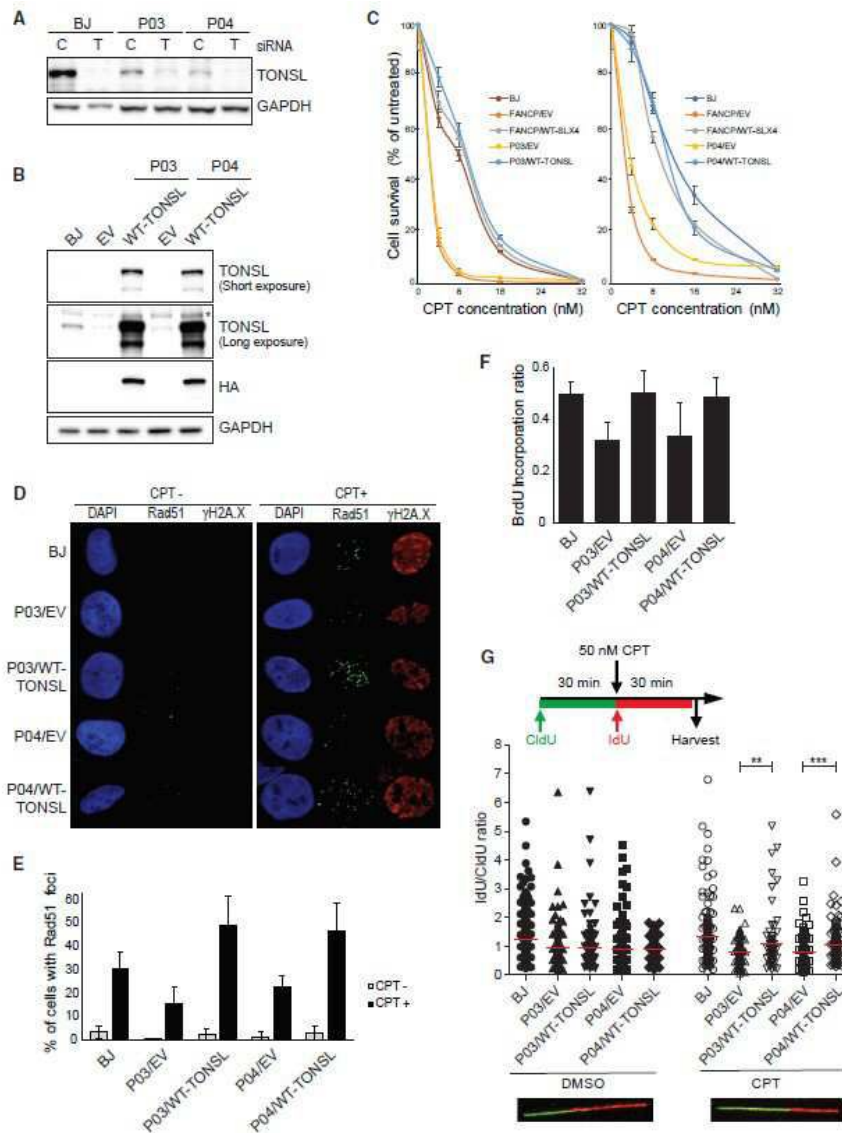


도면4



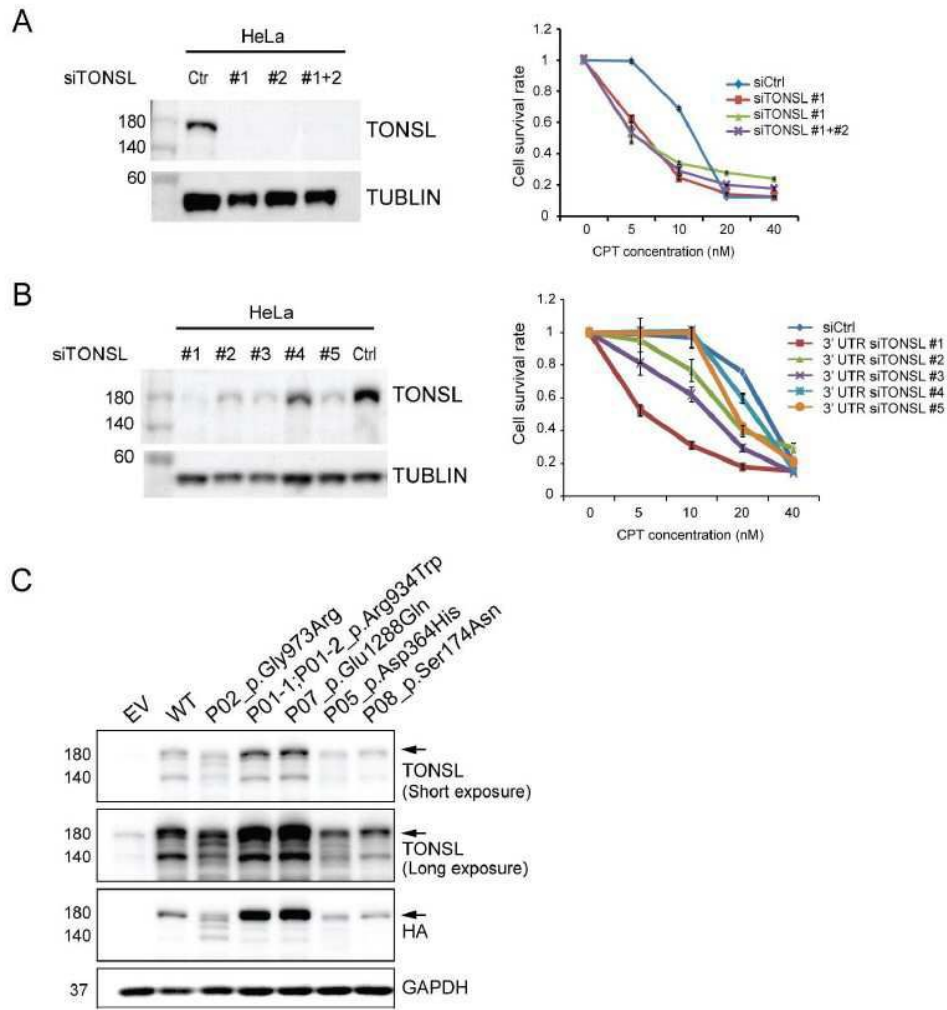


도면5

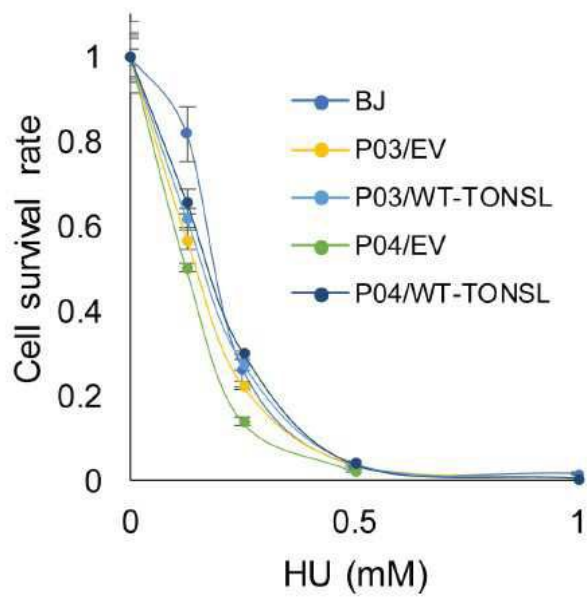




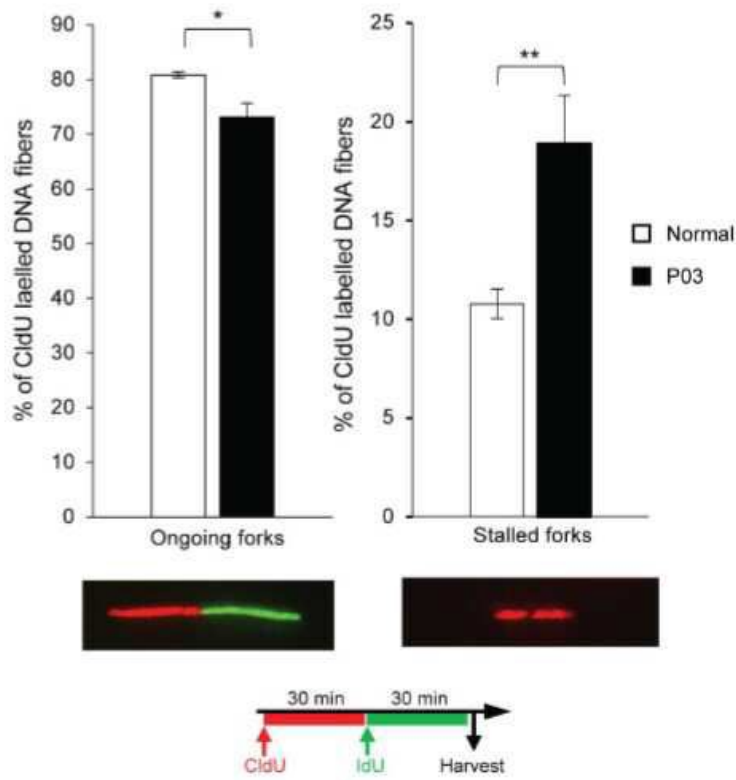
도면6



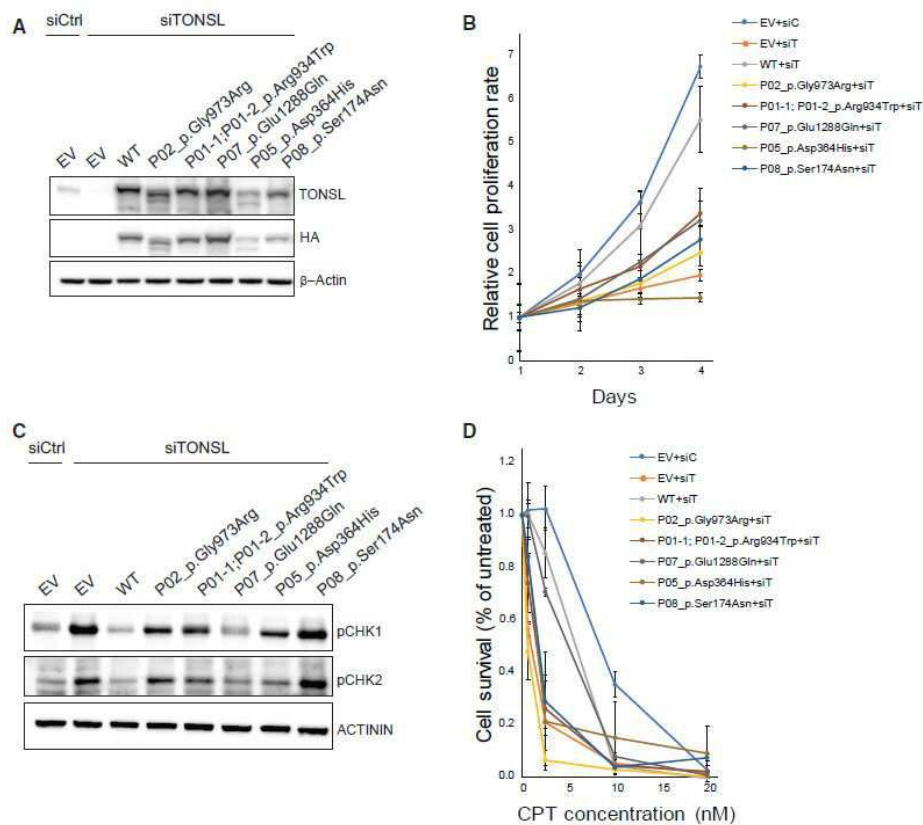
도면7



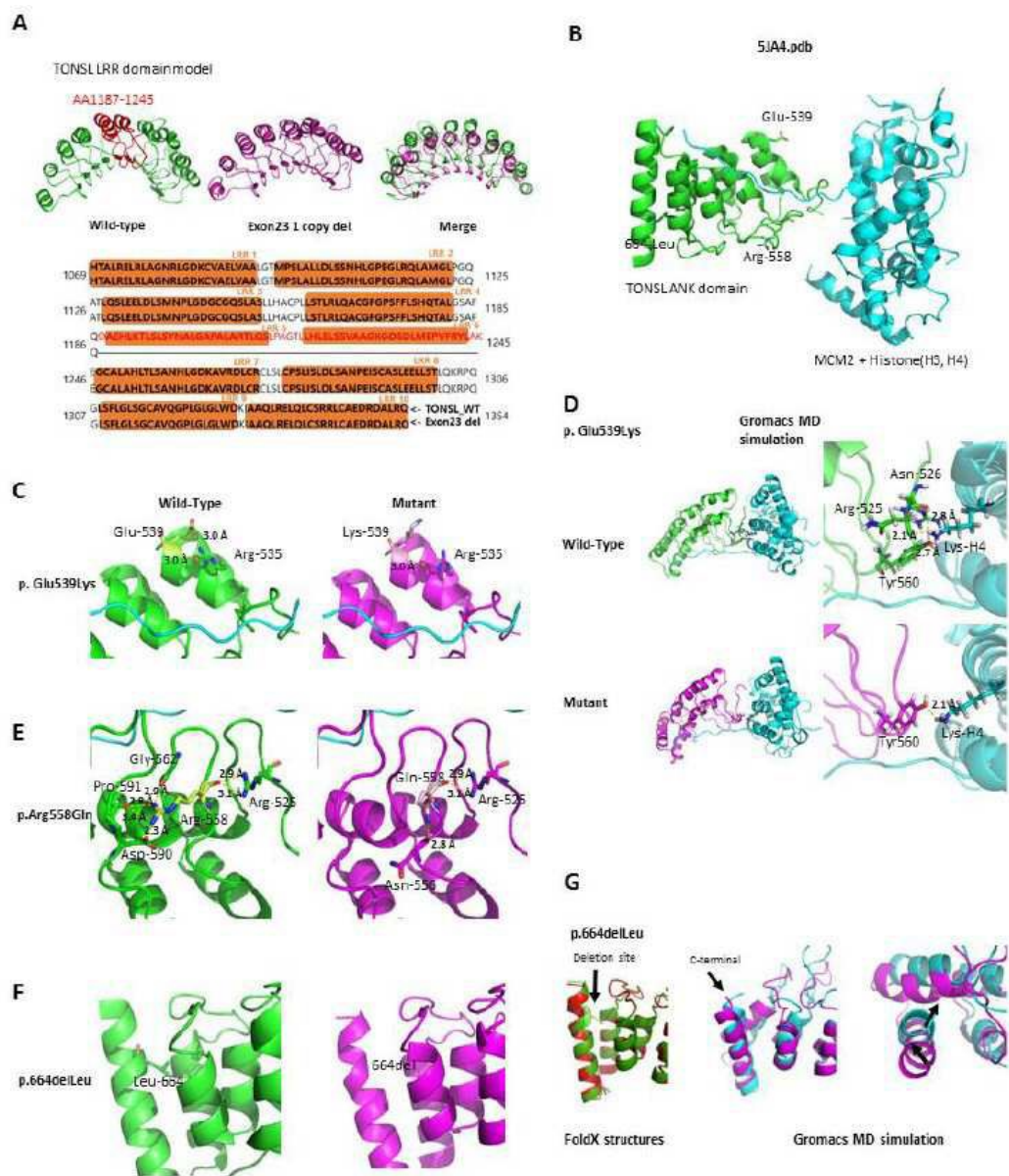
도면8



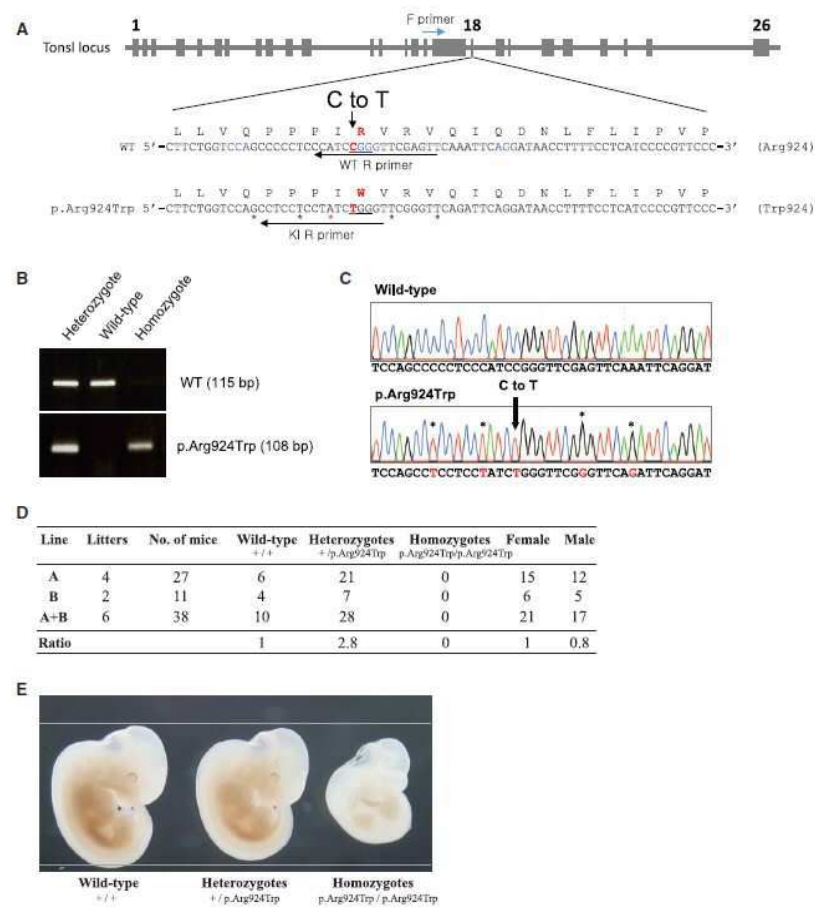
도면9



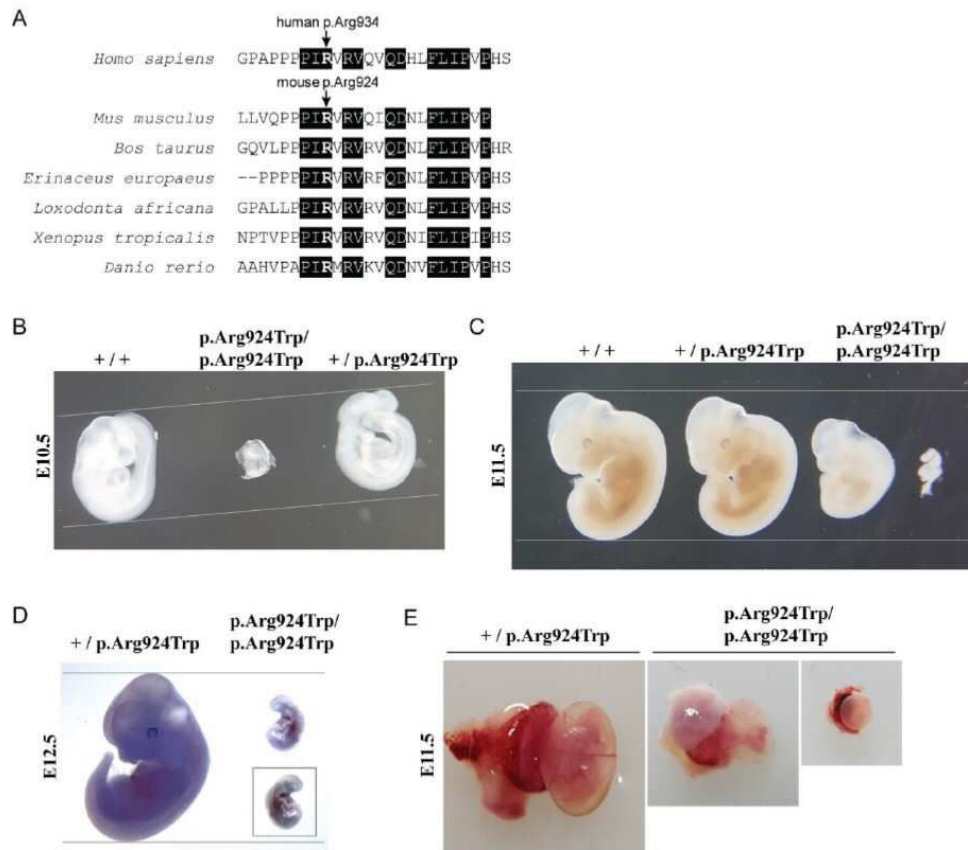
도면10



도면11



도면12



서열목록

<110> Sookmyung Women's University Industry Academic Cooperation Foundation

<120> DIAGNOSTIC MARKER FOR SPONASTRIME DYSPLASIA USING TONSL GENE

<130> JKP-1244

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 4137

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgagcctgg agcgcgagct tcgccagctg agcaaggcga aagccaaggc gcagagggcc 60

gggcagcggc gcgaagaggc cgcgctgtgc caccagctgg gggagctcct ggccggccat 120

ggccgctacg ccgaggctct ggagcagcac tggcaggagc tgcagcttcg ggagcgcgct 180

gacgaccctc tgggctgtgc cgtggccac cgcaagatcg gagagcgctt ggccgagatg 240

gaggactacc cgctgcctt gcagcaccag caccagtacc tggagctggc acattccctg 300

cgcaaccaca cggagctgca gagggcctgg gccaccatcg gccgcaccca cctggacatc	360
tatgaccact gccagtcgag ggatgctttg ctgcaggcac aggcctgcctt tgagaagagc	420
ttggctattg tggatgagga gctggagggg aacttgcccc agggagagct gaatgagatg	480
aggacccgcc tctatctcaa cctgggcctc acctttgaga gcctgcagca gacagccctg	540
tgcaacgatt acttcaggaa gagcatcttc ctgcggagc agaaccacct ttacaggagc	600
ctattccgcg cccgctacaa cctgggcacc atccactggc gcgcgggcca gcactcccag	660
gctatgcgct gcttggaggg tggccgggag tgtgcgcaca ccatgaggaa gcggttcattg	720
gagagcgagt gctgcgtggt tattgcacag gtccctcaag acctgggaga ctttttggct	780
gccaagcgag cctgaagaa ggcctacagg ctgggctccc agaagcctgt gcagagggca	840
gccatctgtc agaacctcca gcatgtgtg gcagtgggtcc ggctgcagca acagctggaa	900
gaggctgagg gcagagacc tcagggtgcc atggtcatct gtgagcagct aggggacctc	960
ttctccaagg caggagactt tcccagggca gctgaggctt accagaagca gctgcgtttt	1020
gctgagctgc tggacagacc ggggtgctgag cgggccatca tccacgtgtc cctggccacc	1080
aactgggag acatgaagga ccaccatggg gccgtgcgcc actatgagga ggaactgagg	1140
ctgcgcagcg gcaacgtgct ggaggaggcc aagacctggc tgaacattgc actgtcccgc	1200
gaggaggccg gcgatgccta cgagctgtg gccccgtgct tccagaaaag gctcagctgt	1260
gcccagcagg cccagctcc ccagctgcag aggcaggtct tgcagcatct ccataccgtg	1320
cagctgaggc tgcagcccca ggaggcccc gagaccgaaa ccagactacg ggagctcagt	1380
gtagctgaag atgaagatga ggaggaggag gcggaggagg cggcagccac agcggagagc	1440
gaagccctgg aggccggcga ggtggagctc tcagaggcg aggacgacac cgatggcctg	1500
acccgcagc tggaggagga cgaggagctt cagggccacc tgggccggcg gaaggggagc	1560
aagtgaacc ggcgaaacga catgggggag acctgtgtgc accgagcctg catcgagggc	1620
cagctgcgcc gcgtccagga ccttgtgagg cagggccacc cccttaacc tcgggactac	1680
tgtggctgga cacctctgca cgaggcctgc aactacgggc atctagaaat tgtccgttc	1740
ctgctggacc acggggccgc agtggacgac ccaggtggcc agggctgcga aggcatacc	1800
ccctccacg atgccctcaa ctgtggccac ttcgaggtgg ctgagctgct gcttgaacgg	1860
ggggcgctcg tcacctccg cactcgaaag ggccctagcc cgctggagac gctgcagcag	1920
tgggtgaagc tgiaccgag ggacctggac ctggagacgc ggcagaaggc cagggccatg	1980
gagatgctgc tccaggcggc tgcctcgggc caagatcccc acagctcca gcccttcac	2040
acccaagca gccctctgtt tgaccccgag acctctctc ctttgagccc ctgccagaa	2100
ccccctcta atagcactag actccagag gcctctcagg cccatgtcag ggtctccca	2160



gggcaggcgg caccagccat ggccaggcct cggaggagca ggcatgggcc agccagcagc	2220
agcagcagct cagaaggcga ggacagcgca ggccccgcac ggccgtccca gaagaggcct	2280
cggtgctcgg ccacagcaca acgggtggca gcctggacgc ctggccccgc cagcaacagg	2340
gaagcagcca cagccagcac cagccgggca gcctaccagg cagccatccg ggggtgtgggc	2400
agtgtctaga gccggctggg gcctggccca ccgcggggcc acagcaaagc ccttgcccc	2460
caggcagcgc tcatcccga ggaggagtgc ctggccgggg actggctgga gctggacatg	2520
cccctgacct gcagccgcgc gccccgcccc cggggcactg gagacaaccg caggcccagt	2580
agtacctctg ggtcggacag tgaggagagc agggcccgtg cccgagccaa gcaggtccgc	2640
ctgacctgca tgcagagtig cagtgcgcca gttaacgcag ggcccagcag cctggcttca	2700
gaacctccag ggagccccag cacccccagg gtctcagagc ccagtgggga cagctctgcg	2760
gcaggccagc ccttggttcc ggccccgccc cctcccatcc gggttcagat tcaagttcag	2820
gatcatctct tctcatccc tgtccacac agcagtgaca cccactctgt ggcctggctg	2880
gccgagcagg cggcccagcg ctactaccag acctgcgggc tgctgccag gctcaccta	2940
cggaaagagg ggccctgtct ggccccacag gacctcatcc ctgatgtgt gcagagcaat	3000
gacgaggtgt tggctgaggt gacttcgtgg gacctgcccc cgttgactga ccgtaccgc	3060
agggcctgcc agagcctggg gcaaggggag caccaacagg tgctgcaggc cgtggagctc	3120
cagggtcttg gcctctcgtt cagcgctgc tccttgccc tggaccaggc ccagcttaca	3180
cccctgctgc ggccctcaa gctgcacaca gactccggg agctgcgcct ggcagggaac	3240
cggctggggg acaagtgtgt ggctgagctg gtggctgccc tgggcacat gccagcctg	3300
gccctccttg acctctctc caatcacctg ggtccgaag gcctgcgcca gcttgccatg	3360
gggctcccag gccaagccac cttgcagagt ttggaggagc tggacttaag catgaacccc	3420
ctgggggacg gctgtggcca gtccctggcc tcctctctgc acgcctgccc ctactcagc	3480
acctgcgc tgcaggcgtg tggcttcggc ccagcttct ttctgagcca ccagacagca	3540
ctgggtagtg ctttccaaga tgctgagcac ctgaagacce tgtccctgtc ctacaacgcc	3600
ctgggagccc ctgccctggc caggacctg cagagcctgc ccgccggcac cctcctgcac	3660
ttagagctca gctccgtggc agccggcaag ggtgattcgg acctcatgga gcctgtattc	3720
cgatactgg ccaaggaagg ctgtgctcta gcccacctga cctgtctctc aaaccacctg	3780
ggggacaagg ctgttagaga cctgtgcaga tgtctctctc tgtgcccctc actcatctca	3840
ctggatctgt ctgccaaccc tgagatcagc tgtgccagct tggaagagct cctgtccacc	3900

```

ctccaaaagc ggccccaagg ccttagcttc cttggcctgt caggtgcgc cgtccagggt      3960

ccctggggcc tgggcctgtg ggacaagata gccgcgcagc tccgggaact gcagctgtgc      4020
agcagacgcc tctgcgtga ggacaggac gccctgcgcc agctgcagcc cagtcggcgc      4080
ggccccggcg agtgcacgct ggaccacggc tccaagctct tcttcggcg cctctga      4137
<210>      2
<211>      1378
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
<400>      2
Met Ser Leu Glu Arg Glu Leu Arg Gln Leu Ser Lys Ala Lys Ala Lys
      1              5              10              15
Ala Gln Arg Ala Gly Gln Arg Arg Glu Glu Ala Ala Leu Cys His Gln
              20              25              30

Leu Gly Glu Leu Leu Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Glu Ala Leu Glu
      35              40              45
Gln His Trp Gln Glu Leu Gln Leu Arg Glu Arg Ala Asp Asp Pro Leu
      50              55              60
Gly Cys Ala Val Ala His Arg Lys Ile Gly Glu Arg Leu Ala Glu Met
      65              70              75              80
Glu Asp Tyr Pro Ala Ala Leu Gln His Gln His Gln Tyr Leu Glu Leu
              85              90              95
Ala His Ser Leu Arg Asn His Thr Glu Leu Gln Arg Ala Trp Ala Thr

              100              105              110
Ile Gly Arg Thr His Leu Asp Ile Tyr Asp His Cys Gln Ser Arg Asp
              115              120              125
Ala Leu Leu Gln Ala Gln Ala Ala Phe Glu Lys Ser Leu Ala Ile Val
              130              135              140
Asp Glu Glu Leu Glu Gly Thr Leu Ala Gln Gly Glu Leu Asn Glu Met
      145              150              155              160
Arg Thr Arg Leu Tyr Leu Asn Leu Gly Leu Thr Phe Glu Ser Leu Gln
              165              170              175

```

Gln Thr Ala Leu Cys Asn Asp Tyr Phe Arg Lys Ser Ile Phe Leu Ala  
180 185 190

Glu Gln Asn His Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Ala Arg Tyr Asn Leu  
195 200 205

Gly Thr Ile His Trp Arg Ala Gly Gln His Ser Gln Ala Met Arg Cys  
210 215 220

Leu Glu Gly Ala Arg Glu Cys Ala His Thr Met Arg Lys Arg Phe Met  
225 230 235 240

Glu Ser Glu Cys Cys Val Val Ile Ala Gln Val Leu Gln Asp Leu Gly  
245 250 255

Asp Phe Leu Ala Ala Lys Arg Ala Leu Lys Lys Ala Tyr Arg Leu Gly  
260 265 270

Ser Gln Lys Pro Val Gln Arg Ala Ala Ile Cys Gln Asn Leu Gln His  
275 280 285

Val Leu Ala Val Val Arg Leu Gln Gln Gln Leu Glu Glu Ala Glu Gly  
290 295 300

Arg Asp Pro Gln Gly Ala Met Val Ile Cys Glu Gln Leu Gly Asp Leu  
305 310 315 320

Phe Ser Lys Ala Gly Asp Phe Pro Arg Ala Ala Glu Ala Tyr Gln Lys  
325 330 335

Gln Leu Arg Phe Ala Glu Leu Leu Asp Arg Pro Gly Ala Glu Arg Ala  
340 345 350

Ile Ile His Val Ser Leu Ala Thr Thr Leu Gly Asp Met Lys Asp His  
355 360 365

His Gly Ala Val Arg His Tyr Glu Glu Glu Leu Arg Leu Arg Ser Gly  
370 375 380

Asn Val Leu Glu Glu Ala Lys Thr Trp Leu Asn Ile Ala Leu Ser Arg  
385 390 395 400

Glu Glu Ala Gly Asp Ala Tyr Glu Leu Leu Ala Pro Cys Phe Gln Lys  
405 410 415

Ala Leu Ser Cys Ala Gln Gln Ala Gln Arg Pro Gln Leu Gln Arg Gln  
420 425 430

Val Leu Gln His Leu His Thr Val Gln Leu Arg Leu Gln Pro Gln Glu  
435 440 445

Ala Pro Glu Thr Glu Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ser Val Ala Glu Asp  
450 455 460

Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Thr Ala Glu Ser  
465 470 475 480

Glu Ala Leu Glu Ala Gly Glu Val Glu Leu Ser Glu Gly Glu Asp Asp  
485 490 495

Thr Asp Gly Leu Thr Pro Gln Leu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Gln Gly  
500 505 510

His Leu Gly Arg Arg Lys Gly Ser Lys Trp Asn Arg Arg Asn Asp Met  
515 520 525

Gly Glu Thr Leu Leu His Arg Ala Cys Ile Glu Gly Gln Leu Arg Arg  
530 535 540

Val Gln Asp Leu Val Arg Gln Gly His Pro Leu Asn Pro Arg Asp Tyr  
545 550 555 560

Cys Gly Trp Thr Pro Leu His Glu Ala Cys Asn Tyr Gly His Leu Glu  
565 570 575

Ile Val Arg Phe Leu Leu Asp His Gly Ala Ala Val Asp Asp Pro Gly  
580 585 590

Gly Gln Gly Cys Glu Gly Ile Thr Pro Leu His Asp Ala Leu Asn Cys  
595 600 605

Gly His Phe Glu Val Ala Glu Leu Leu Leu Glu Arg Gly Ala Ser Val  
610 615 620

Thr Leu Arg Thr Arg Lys Gly Leu Ser Pro Leu Glu Thr Leu Gln Gln  
625 630 635 640

Trp Val Lys Leu Tyr Arg Arg Asp Leu Asp Leu Glu Thr Arg Gln Lys  
645 650 655

Ala Arg Ala Met Glu Met Leu Leu Gln Ala Ala Ala Ser Gly Gln Asp  
660 665 670

Pro His Ser Ser Gln Ala Phe His Thr Pro Ser Ser Leu Leu Phe Asp

675                      680                      685  
 Pro Glu Thr Ser Pro Pro Leu Ser Pro Cys Pro Glu Pro Pro Ser Asn  
 690                      695                      700  
 Ser Thr Arg Leu Pro Glu Ala Ser Gln Ala His Val Arg Val Ser Pro  
 705                      710                      715                      720  
 Gly Gln Ala Ala Pro Ala Met Ala Arg Pro Arg Arg Ser Arg His Gly  
 725                      730                      735  
 Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Gly Glu Asp Ser Ala Gly Pro  
 740                      745                      750  
  
 Ala Arg Pro Ser Gln Lys Arg Pro Arg Cys Ser Ala Thr Ala Gln Arg  
 755                      760                      765  
 Val Ala Ala Trp Thr Pro Gly Pro Ala Ser Asn Arg Glu Ala Ala Thr  
 770                      775                      780  
 Ala Ser Thr Ser Arg Ala Ala Tyr Gln Ala Ala Ile Arg Gly Val Gly  
 785                      790                      795                      800  
 Ser Ala Gln Ser Arg Leu Gly Pro Gly Pro Pro Arg Gly His Ser Lys  
 805                      810                      815  
 Ala Leu Ala Pro Gln Ala Ala Leu Ile Pro Glu Glu Glu Cys Leu Ala  
  
 820                      825                      830  
 Gly Asp Trp Leu Glu Leu Asp Met Pro Leu Thr Arg Ser Arg Arg Pro  
 835                      840                      845  
 Arg Pro Arg Gly Thr Gly Asp Asn Arg Arg Pro Ser Ser Thr Ser Gly  
 850                      855                      860  
 Ser Asp Ser Glu Glu Ser Arg Pro Arg Ala Arg Ala Lys Gln Val Arg  
 865                      870                      875                      880  
 Leu Thr Cys Met Gln Ser Cys Ser Ala Pro Val Asn Ala Gly Pro Ser  
 885                      890                      895  
  
 Ser Leu Ala Ser Glu Pro Pro Gly Ser Pro Ser Thr Pro Arg Val Ser  
 900                      905                      910  
 Glu Pro Ser Gly Asp Ser Ser Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Pro Ala  
 915                      920                      925  
 Pro Pro Pro Pro Ile Arg Val Arg Val Gln Val Gln Asp His Leu Phe



930                      935                      940  
 Leu Ile Pro Val Pro His Ser Ser Asp Thr His Ser Val Ala Trp Leu  
 945                      950                      955                      960  
 Ala Glu Gln Ala Ala Gln Arg Tyr Tyr Gln Thr Cys Gly Leu Leu Pro  
  
                          965                      970                      975  
 Arg Leu Thr Leu Arg Lys Glu Gly Ala Leu Leu Ala Pro Gln Asp Leu  
                          980                      985                      990  
 Ile Pro Asp Val Leu Gln Ser Asn Asp Glu Val Leu Ala Glu Val Thr  
                          995                      1000                      1005  
 Ser Trp Asp Leu Pro Pro Leu Thr Asp Arg Tyr Arg Arg Ala Cys Gln  
                          1010                      1015                      1020  
 Ser Leu Gly Gln Gly Glu His Gln Gln Val Leu Gln Ala Val Glu Leu  
 1025                      1030                      1035                      1040  
  
 Gln Gly Leu Gly Leu Ser Phe Ser Ala Cys Ser Leu Ala Leu Asp Gln  
                          1045                      1050                      1055  
 Ala Gln Leu Thr Pro Leu Leu Arg Ala Leu Lys Leu His Thr Ala Leu  
                          1060                      1065                      1070  
 Arg Glu Leu Arg Leu Ala Gly Asn Arg Leu Gly Asp Lys Cys Val Ala  
                          1075                      1080                      1085  
 Glu Leu Val Ala Ala Leu Gly Thr Met Pro Ser Leu Ala Leu Leu Asp  
                          1090                      1095                      1100  
 Leu Ser Ser Asn His Leu Gly Pro Glu Gly Leu Arg Gln Leu Ala Met  
  
 1105                      1110                      1115                      1120  
 Gly Leu Pro Gly Gln Ala Thr Leu Gln Ser Leu Glu Glu Leu Asp Leu  
                          1125                      1130                      1135  
 Ser Met Asn Pro Leu Gly Asp Gly Cys Gly Gln Ser Leu Ala Ser Leu  
                          1140                      1145                      1150  
 Leu His Ala Cys Pro Leu Leu Ser Thr Leu Arg Leu Gln Ala Cys Gly  
                          1155                      1160                      1165  
 Phe Gly Pro Ser Phe Phe Leu Ser His Gln Thr Ala Leu Gly Ser Ala  
                          1170                      1175                      1180

Phe Gln Asp Ala Glu His Leu Lys Thr Leu Ser Leu Ser Tyr Asn Ala  
 1185                      1190                      1195                      1200  
 Leu Gly Ala Pro Ala Leu Ala Arg Thr Leu Gln Ser Leu Pro Ala Gly  
                          1205                      1210                      1215  
 Thr Leu Leu His Leu Glu Leu Ser Ser Val Ala Ala Gly Lys Gly Asp  
                          1220                      1225                      1230  
 Ser Asp Leu Met Glu Pro Val Phe Arg Tyr Leu Ala Lys Glu Gly Cys  
                          1235                      1240                      1245  
 Ala Leu Ala His Leu Thr Leu Ser Ala Asn His Leu Gly Asp Lys Ala  
  
                          1250                      1255                      1260  
 Val Arg Asp Leu Cys Arg Cys Leu Ser Leu Cys Pro Ser Leu Ile Ser  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Leu Asp Leu Ser Ala Asn Pro Glu Ile Ser Cys Ala Ser Leu Glu Glu  
                          1285                      1290                      1295  
 Leu Leu Ser Thr Leu Gln Lys Arg Pro Gln Gly Leu Ser Phe Leu Gly  
                          1300                      1305                      1310  
 Leu Ser Gly Cys Ala Val Gln Gly Pro Leu Gly Leu Gly Leu Trp Asp  
                          1315                      1320                      1325  
  
 Lys Ile Ala Ala Gln Leu Arg Glu Leu Gln Leu Cys Ser Arg Arg Leu  
                          1330                      1335                      1340  
 Cys Ala Glu Asp Arg Asp Ala Leu Arg Gln Leu Gln Pro Ser Arg Pro  
 1345                      1350                      1355                      1360  
 Gly Pro Gly Glu Cys Thr Leu Asp His Gly Ser Lys Leu Phe Phe Arg  
                          1365                      1370                      1375  
 Arg Leu