



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0040951
(43) 공개일자 2009년04월28일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/32* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0106386

(22) 출원일자 2007년10월23일

심사청구일자 2007년10월23일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김명옥

경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

이혜령

경남 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 대학원응용생명과학부

(74) 대리인

김동완

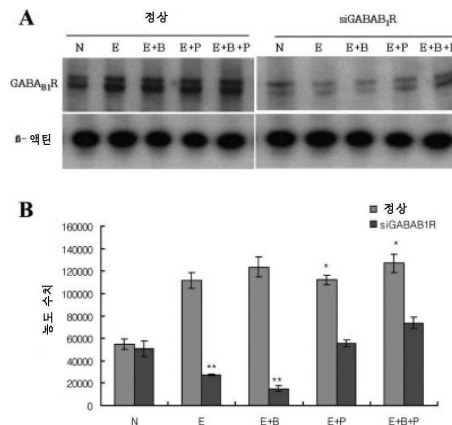
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 감마-아미노부티르산 B1 수용체의 억다운을 통한 에탄올의 신경세포 효과 억제방법

(57) 요약

본 발명은 에탄올의 신경세포에 대한 중독 또는 마취 효과를 억제하기 위한 간섭 RNA를 이용하여 억다운된 GABA_{B1} 수용체를 제공하는 것으로, 상기 간섭 RNA는 서열번호: 1의 GABA_{B1} 수용체 유전자의 1097~1516번째 염기로부터 전사된 mRNA에 상보적으로 결합된다. 또한 본 발명은 상기 억다운된 GABA_{B1} 수용체를 이용하여 신경세포에 대한 에탄올의 중독 또는 마취 효과를 억제시키는 방법을 제공하는 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

에탄올의 신경세포에 대한 중독 또는 마취 효과를 억제하기 위한 간섭 RNA를 이용하여 녹다운된 GABA_{B1} 수용체

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 간섭 RNA는 서열번호: 1의 GABA_{B1} 수용체 유전자의 1097~1516번째 염기로부터 전사된 mRNA에 상보적으로 결합함으로써 녹다운된 GABA_{B1} 수용체

청구항 3

제 1항의 녹다운된 GABA_{B1} 수용체를 이용하여 신경세포에 대한 에탄올의 중독 또는 마취 효과를 억제시키는 방법

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 녹다운된 GABA_{B1} 수용체는 신경세포에 PKA(단백질 키나제 A)와 CREB(cAMP-반응 요소 결합 단백질)의 발현을 억제시킴으로서 에탄올에 의한 중독 또는 마취 효과를 억제시키는 방법

청구항 5

제 3항에 있어서, 바클로펜과 파클로펜은 신경세포에 녹다운된 GABA_{B1} 수용체 존재시 PKA와 CREB의 발현을 더욱 억제시킴으로서 에탄올에 의한 중독 또는 마취 효과를 억제시키는 방법

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 감마-아미노부티르산(gamma-amino butyric acid, GABA)_{B1} 수용체의 녹다운을 통한 에탄올의 신경세포 효과 억제방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 간섭 RNA를 통해 GABA_{B1} 수용체를 녹다운시켜 에탄올의 신경세포에 대한 효과를 감소시키고 상기 녹다운된 GABA_{B1} 수용체를 통해 단백질 키나제 A(PKA)와 cAMP-반응 요소 결합 단백질(CREB)의 발현을 억제함으로써 에탄올의 신경세포에 대한 효과를 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 에탄올 노출은 중독, 내성, 의존성 및 금단을 포함한 다양한 신경생물학적 변화를 포함할 수 있다. 이들 변화를 설명하는 정확한 메커니즘이 명확하지는 않으나 신경전달물질 및 cAMP 및 MAPK를 포함한 그의 신호 변환 경로가 중독 행동 발달 동안 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 종전 연구를 통해 에탄올의 세포내 효과가 cAMP, 단백질 키나제 A(PKA) 및 cAMP-반응 요소 결합 단백질(CREB) 내 추가적인 세포내 다운스트림 생화학적 변화를 유발하는 아데노신 A₂ 수용체 및 도파민(DA) D₂ 수용체의 상승 작용을 통해 매개된다는 가설이 수립되었다. cAMP-신호전달 네트워크의 다양한 구성요소가 급성 에탄올 노출에 대한 민감도를 조절한다. 시험관 내 모델 시스템을 이용한 연구는 에탄올이 G_s 서브유닛 활성 비율을 증가시키고 G_s와 아데닐 사이클라제(AC)의 상호작용을 증가시켜 cAMP 및 PKA 증가를 유발함을 나타내었다. 더욱이 PKA가 급성 및 만성 에탄올 투여에 대한 뇌의 일부 반응이 매개됨이 제안되어 왔다.

<3> 또한 GABA_B 수용체는 cAMP-PKA 신호전달 조절에 결합되고 DA 수용체 신호 시스템과 공유되는 G-단백질 및 세포내 단백질 키나제 시스템을 활성화시킬 수 있다. 또한 GABA_B 수용체의 활성화는 래트 전두 피질 내 백일해 독소-민감성 G 단백질 G(i)/G(o)의 베타 감마 서브유닛을 포함한 메커니즘을 통해 AG 활성화의 부신피질 자극호르몬-방출-호르몬 자극을 상승시킨다. 더욱이 GABA_B 활성화시 PTX-민감성 G-단백질로부터 방출된 G 베타 감마는 제2형(또는 i.v.) AC를 활성화시키고 이러한 과정은 G_s-결합 수용체에 의한 G_s 활성화를 요구한다. 따라서

GABA_B 수용체가 세포내 수준으로 에탄올 효과를 조절함이 가능하다.

<4> 종전 연구는 GABA_A 및 GABA_B 수용체 모두 에탄올 효과의 조절에 중요한 역할을 함을 나타내었다. 바클로펜은 마우스 내에서 에탄올-유도 마취를 증가시키고 래트 내 에탄올 선호를 감소시킨다. 파클로펜은 마우스 내에서 경련 작용뿐만 아니라 운동 활성, 운동 조정 및 체온조절의 손상을 포함한 에탄올 중독을 감소시키고, 이는 에탄올 중독 동안 GABA_B 수용체의 증가된 활성을 나타낸다. GABA_B 수용체 조절의 정확한 메커니즘은 아직 규명되지 않고 있다.

<5> 본 발명은 GABA_B 수용체의 억다운을 통해 PKA 및 인산화(p)-CREB와 같은 세포내 신호 단백질의 발현 억제를 측정하였다. 즉 본 발명은 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 억다운된 1차 배양된 피질 신경세포 내 에탄올 효과를 측정하였고 에탄올이 GABA_{B1} 수용체 발현에 따라 PKA 및 p-CREB에 다르게 영향을 미침을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

<6> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 간섭 RNA를 통해 GABA_{B1} 수용체를 억다운시킨 후, 신경세포 내의 단백질 키나제 A(PKA)와 cAMP-반응 요소 결합 단백질(CREB)의 발현을 억제시킴으로서 에탄올의 신경세포 중독 및 마취 효과를 억제하기 위한 방법을 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

<7> 본 발명의 목적은 에탄올의 신경세포에 대한 중독 또는 마취 효과를 억제하기 위한 간섭 RNA를 이용하여 억다운된 GABA_{B1} 수용체를 제공하는 것이다.

<8> 또한 상기 간섭 RNA는 서열번호: 1의 GABA_{B1} 수용체 유전자의 1097~1516번째 염기로부터 전사된 mRNA에 상보적으로 결합됨을 특징으로 한다.

<9> 한편, 본 발명의 또다른 목적은 상기 억다운된 GABA_{B1} 수용체를 이용하여 신경세포에 대한 에탄올의 중독 또는 마취 효과를 억제시키는 방법을 제공하는 것이다.

<10> 이때 상기 억다운된 GABA_{B1} 수용체는 신경세포에 PKA(단백질 키나제 A)와 CREB(cAMP-반응 요소 결합 단백질)의 발현을 억제시키고, 바클로펜과 파클로펜은 신경세포에 억다운된 GABA_{B1} 수용체 존재시 PKA와 CREB의 발현을 더욱 억제시킴으로서 에탄올의 중독 또는 마취 효과를 억제시킴을 특징으로 한다.

효과

<11> 본 발명의 효과는 간섭 RNA를 통해 GABA_{B1} 수용체를 억다운시킨 후, 신경세포 내의 단백질 키나제 A(PKA)와 cAMP-반응 요소 결합 단백질(CREB)의 발현을 억제시킴으로서 에탄올의 신경세포 중독 및 마취 효과를 억제하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 본 발명은 에탄올의 GABA_B의 조절 역할을 확인하기 위해 시험관 내 배양된 피질 신경세포 내에서 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 억다운(knock down)된 시스템을 이용하여 신경세포 세포내 신호, 단백질 키나제 A(PKA) 및 cAMP-반응 요소 결합 단백질(CREB)의 발현을 측정함으로써 에탄올의 효과를 조사하였다. 실험 결과는 PKA α 서브유니트가 에탄올 처리에 따라 증가하였고 바클로펜(baclofen) 및 파클로펜(phaclofen)의 투여에 의해 더욱 증가될 수 있음을 나타내었다.

<13> 그러나 바클로펜 및/또는 파클로펜은 GABA_{B1} 수용체 RAN 간섭을 이용하여 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 억다운된 1차 배양된 피질 신경세포 내 PKA α 서브유니트 발현 상의 에탄올의 상향-조절 효과를 감소시킬 수 있었다. 더욱이 이들 효과는 PKA와 동일한 발현 패턴을 나타내는 인(p)-CREB 발현의 변화를 유발할 수 있다. 마지막으

로 본 발명은 동일한 신경세포 내 GABA_{B1}, PKA 및 p-CREB 분포 변화를 관찰하였다. 그 결과 GABA_{B1} 수용체가 에탄올의 세포내 효과에 중요하고, 이는 PKA 및 CREB 전사 경로를 조절함으로써 발생하는 에탄올 중독 또는 마취 효과의 근본적인 해결책이 될 수 있음을 규명하였다.

<14> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> siRNA를 이용한 GABA_{B1} 수용체 억다운

<16> 본 발명은 신경세포 내에서 GABA_{B1} 수용체를 특이적으로 억다운시키기 위해 GABA_B 수용체 발현을 강하게 저해하는 것으로 측정된 siRNA 단편을 선택하였다. 또한 트랜스펙션 조건은 저해 효과를 최대화하도록 조사되었다. 실험 결과는 siRNA 단편이 높은 트랜스펙션 효율을 지님을 나타내었다(도 1). 트랜스펙션 후 GABA_{B1} 수용체 발현은 유의적으로 감소된 반면 대조군으로서의 액틴 발현은 변화를 나타내지 않았다(도 2). 또한 GABA_{B2} 수용체 및 GAPDH 모두 다른 군에서 어떠한 변화도 나타내지 않았기 때문에 GABA_{B1} 수용체의 억다운 효과는 mRNA 내 변화를 특이적으로 유발하였다(도 3).

<17> PKA 발현 상의 에탄올 효과를 조절하는 GABA_B 수용체

<18> 에탄올 투여는 2차 메신저인 cAMP의 변화를 포함한 다양한 세포내 변화를 유도하고, 이는 인산화 상태의 변화를 통해 PKA의 활성화를 더욱 유발하고 따라서 다운스트림 유전자 발현 변화를 조절할 수 있다. GABA_B 수용체 활성이 PKA 상에 어떠한 효과를 지니는지 여부를 조사하기 위해 본 발명은 에탄올 전처리된 1차 신경세포 상의 바클로펜 및 파클로펜 처리 동안 PKA 발현 변화를 조사하였다. 대조군과의 비교시 에탄올 처리는 PKA 수치를 증가시켰고; 또한 바클로펜 및 파클로펜 투여는 PKA 수치 상의 유의적인 증가 효과를 지녔다(도 4A 및 4B).

<19> 본 발명은 에탄올 노출 상의 GABA_B 수용체의 조절 효과를 더욱 조사하기 위해 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 억다운된 1차 신경세포 모델을 수립하였다. 실험 결과는 PKA 발현이 억다운 후 유의적으로 감소된 반면 에탄올 처리시 증가된 PKA 발현이 관찰됨을 나타내었고, 이는 PKA 수치가 정상 조건 하에서 GABA_B 수용체 수치와 밀접하게 관련됨을 입증하였다. 그러나 바클로펜 및 파클로펜 처리는 바클로펜 및 파클로펜 처리군에 의해 입증된 바와 같이 PKA 수치 상의 에탄올 증가 효과를 역전시켰다. 더욱이 바클로펜 및 파클로펜 동시-처리하는 단독 처리된 것의 역전 효과를 나타내었고, 이는 이들 역전 효과가 GABA_B 수용체 상의 작용에 기인함을 입증하였다. 이들 결과에 의해 PKA 수치가 GABA_B 수용체 수치와 밀접하게 관련되고 에탄올 처리 효과가 부분적으로 억다운된 모듈 내에서 조절될 수 있음을 나타낸다(도 4A 및 4B).

<20> p-CREB 상의 에탄올 효과를 조절하는 GABA_B 수용체

<21> 에탄올은 세포핵으로의 PKA Cα 전위를 유도하고, 이는 CRE 결합 단백질 상의 Ser-133을 인산화시킨다. CREB의 인산화는 CRE를 포함한 유전자 전사를 개시한다. 본 발명은 PKA 상의 GABA_B 수용체의 다운스트림 효과를 더욱 조사하기 위해 동일한 처리 프로토콜 하에서 인산화 CREB 수치를 조사하였다. 실험 결과는 PKA 변화와 대조적으로 p-CREB가 에탄올 처리시 유의적인 감소를 나타낸 반면 바클로펜 및 파클로펜은 에탄올 효과를 역전시킬 수 있었고, 이는 GABA_B 수용체의 조절 효과를 나타낸다. 더욱이 에탄올은 GABA_B 억다운 그룹에서 p-CREB 수치를 변화시키지 않았고 바클로펜 및/또는 파클로펜 처리 후 p-CREB 수치는 에탄올만의 그룹과 비교시 증가 효과를 나타내었으며, 따라서 PKA 상의 GABA_B 수용체의 조절 효과가 p-CREB의 변화를 더욱 유발할 수 있음을 입증하였다(도 5A 및 도 5B).

<22> GABA_{B1}, PKA 및 p-CREB의 동시-위치 및 분포 변화

<23> 본 발명은 GABA_{B1} 수용체, PKA 및 p-CREB의 분포 변화를 직접 관찰하기 위해 이중-표지 면역-형광 실험을 수행하였다. 실험 결과는 GABA_{B1} 수용체가 정상(도 6 및 8) 및 트랜스펙트(도 7 및 9) 조건 모두에서 PKA 및 p-CREB와 주로 동시-위치됨을 나타내었다. 또한 GABA_{B1} 수용체 및 p-CREB는 각각 세포질 및 세포핵 내에서 주로 발견될 수 있는 반면(도 8 및 9) PKA는 세포핵 및 세포질 모두에 위치하였다(도 6 및 7).

<24> 에탄올 의존 동안 신경 2차-메신저 경로의 분자적 및 세포적 변화를 규명하게 되었다. 적어도 하나 이상의 에탄올 작용 사이트가 cAMP-의존적 신호전달 경로와의 상호작용 내에 존재한다. cAMP-PKA 경로의 유전자 조작은

에탄올 섭취 및 그의 진정 효과에 대한 민감성을 조절한다. 따라서 D₂ 및 A2 수용체에서 유발된 PKA 변화는 에탄올 섭취와 관련된 행동 변화의 근본적인 원인이 된다. 본 발명은 에탄올 조절과 관련된 GABA_{B1R} 수용체의 역할을 규명하였으며, 그 결과는 GABA_B 수용체가 관찰되는 에탄올의 중독 효과 상에 중요한 영향을 지닌 PKA 및 CREB 시스템 상의 에탄올 효과를 조절할 수 있음을 나타내었다.

<25> 바클로펜 및 파클로펜 처리는 정상 조건 하에서는 어떠한 효과도 지니지 않았으나 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 억제된 피질 세포 내 PKA 수치 상의 에탄올 증가 효과를 유의적으로 감소시켰다. 종전 연구는 에탄올이 PKA α의 총 함량에 어떠한 영향을 미치지 않고 에탄올이 Gas 또는 Gi/o-γ β를 통해 PKA 신호전달을 활성화시킴을 나타낸다. 또한 GABA_B 수용체는 COOH 말단에서 -4 위치의 아미노산에서 Gi/o α와 결합될 수 있다. 따라서 GABA_B 수용체의 Gi/o α 단백질과의 에탄올 결합은 PKA 시스템을 직접적으로 활성화시키지 않는다. 에탄올 처리 조건 하에서 Gi/o α와의 결합은 더 많은 Gi/o-γ β를 방출시키고 에탄올 효과를 더욱 강화시킨다. 그러나 바클로펜이 에탄올의 반대 효과인 세포 내 cAMP의 수치 감소를 유발하는 G-단백질-의존적 메커니즘을 통해 뇌질편 내 기본 및 포르스콜린(forskolin)-자극 신경세포 AC를 저해할 수 있다는 연구가 보고되었다.

<26> 본 발명은 PKA 상의 조절 효과의 결과를 더욱 조사하기 위해 다운스트림 신호 마커인 p-CREB의 변화를 조사하였다. 실험 결과는 에탄올 및 바클로펜 처리가 에탄올 처리시 p-CREB 수치를 감소시킬 수 있는 반면 파클로펜 처리는 에탄올 효과를 역전시킬 수 있음을 나타내었다. 더욱이 GABA_{B1} 수용체가 RNAi로 특이적으로 억제된 후 바클로펜 및 파클로펜은 p-CREB 발현 상의 유의적인 감소 효과를 나타내었다. p-CREB 수치 변화는 그의 다른 변화 패턴으로 인해 PKA 수치에만 기인할 수 없다. 더욱이 바클로펜 및 파클로펜은 그의 효과를 다르게 발휘한다.

<27> 종전 연구에서는 바클로펜이 마우스의 에탄올-유도된 마취를 증가시키고 래트의 에탄올 선호를 급성적으로 감소시킴을 나타내었다. 파클로펜은 생체 내로 투여시 항경련 작용뿐만 아니라 운동 활성, 운동 조정 및 체온조절의 손상을 포함한 에탄올 중독의 일부 척도를 감소시킬 수 있다. 따라서 바클로펜 및 파클로펜이 PKA를 조절하고 p-CREB의 다른 발현적 변화를 유도하는 것과 동일한 경로를 에탄올이 변화시킴이 가능하다.

<28> 따라서 본 발명은 GABA_B 수용체 활성이 에탄올 처리시 PKA 및 p-CREB의 발현 변화를 조절할 수 있음을 나타내었다. 더욱이 에탄올 효과 상의 GABA_B 수용체 수용체의 영향은 정상군과 RNAi군 사이에 다르다.

<29> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<30> (실시예 1) 1차 세포 배양 및 처리

<31> Sprague-Dawley 래트(n = 50, 250 g, 한국 진주시 경상대학교 신경생물학 연구실)는 오전 6시부터 오후 8시까지 광조건으로 원하는대로 사료를 공급하면서 온도-제어된 환경에 수용되었다. 배양물은 Sprague-Dawley 래트에서 임신일(GD 17.5)의 대뇌 피질로부터 준비되었다. 수집된 피질 조직은 20분간 0.25% 트립신-EDTA로 처리되고 얼음-냉각된 무-칼슘 및 무-마그네슘 Hank 평형 염 용액(pH 7.4) 내에서의 기계적 분쇄에 의해 분해되었다. 원심분리에 의한 펠leting 후 세포는 폴리리신(0.02 g/l)으로 전-코팅된 세포 배양 플레이트 및 챔버 슬라이드 내에 도말되었다(1×10^6 세포/ml). 10% 열-불활성화 우태아 혈청, 1 mM 피루브산염, 4.2 mM 중탄산나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/l 우혈청 알부민, 50 U/ml 페니실린 및 50 mg/l 스트렙토마이신을 지닌 Dulbecco 변형 Eagle 배지(DMEM)으로 구성된 배양 배지는 5% CO₂ 및 95% 공기의 가습 대기 내에서 37°C로 유지되었다. 신경아교 세포는 12시간 동안 100 μM 사이토신 β-D-아라비노 푸라노시드(Sigma)를 함유한 배지로 억제되었다. 5일 후 피질 신경세포는 정상 배지, 100 mM 에탄올을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 50 μM 바클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 100 μM 파클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜을 함유한 배지로 20분 또는 1시간 동안 처리되었다.

<32> (실시예 2) RNA 간섭(i) 및 트랜스펙션

<33> RNA 간섭(RNAi)은 ShortCut™ RNAi Kit(New England Biolabs, 영국)을 이용하여 수행되었다. 최대 침묵(silent) 활성을 지닌 1097~1516 bp의 420 bp GABAB₁ 수용체 단편은 프라이머(전방 프라이머 AATTGAATCCGCTACCATCCAACAGACCA)(서열번호: 2); 역방 프라이머 AATTAAGCTTTCCTGTGACGTCATGTTGGAA)(서열번호:

3)로 Ambion Inc에 따라 선택되었고 전체 길이 GABA_{B1} cDNA(Novatis Pharma, 스웨덴 제공)에서 클론되었다. 리트머스 38i 벡터 내로의 삽입을 촉진시키기 위해 EcoRI 및 HindIII 효소 사이트가 통합되었다. 최종 플라스미드는 리트머스-B1으로 명명되었고 어떠한 돌연변이 도입도 배제시키기 위해 서열 분석되었다.

<34> 트랜스펙션 하루 전 배지는 항생제 및 혈청이 없는 DMEM으로 변경되었다. 리포솜 용액(LipofectAMINE2000TM 함유 DMEM, Invitrogen)은 실온에서 5분간 인큐베이트되었고 이후 동일한 부피의 dsRNA 용액(숫컷 dsRNA 함유 DMEM)과 혼합되었고, 혼합물은 20분간 인큐베이트된 후 10 nM의 최종 농도에 도달하도록 각각의 플레이트 내 배양 배지로의 혼합물 첨가 직전 다시 혼합되었다. 지질-dsRNA 복합체는 배양 배지에 한 방울씩 첨가되었고 플레이트는 첨가 종료시 수차례 교반되었다. 트랜스펙션 12시간 후 배지는 배양 배지로 교체되었다. 이후 정상 및 GABA_{B1} 수용체 siRNA 트랜스펙트된 피질 세포는 정상 배지, 100 mM 에탄올을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 50 μ M 바클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 100 μ M 파클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올, 50 μ M 바클로펜 및 100 μ M 파클로펜을 함유한 배지로 20분간 처리되었다.

<35> (실시예 3) 역방 횡단 중합효소 연쇄 반응

<36> RT-PCR 분석은 트랜스펙트되거나 트랜스펙트되지 않은 세포 유래 cDNA를 이용하여 수행되었다. 전체 RNA는 Trizol 시약(Life Technologies, Gibco BRL)으로 분리되었고 무-RNase 물에 용해되었고; 표본 농도는 분광광도법에 의해 측정되었다. RNA는 일정량으로 분할되었고 사용 전까지 -80°C에서 저장되었다. 첫 번째 나선 cDNA는 공급자에 의해 제공된 프로토콜에 따라 Superscript RT(Invitrogen)를 이용하여 1 μ g의 RNA에서 전사되었다. PCR은 94°C 1분간, 55°C 1분간 및 72°C 1분간 30 사이클로 수행되었다(OSCAR 및 칼시토닌 수용체용).

<37> (실시예 4) 웨스턴 블롯팅

<38> 정상, 에탄올, 바클로펜(10 mg/kg) 처리된 래트의 대뇌 피질 조직에서 수득된 표본 또는 100 mM 에탄올, 50 μ M 바클로펜, 100 μ M 파클로펜으로 처리된 배양 세포는 인산염 완충 식염수(0.02 M PBS) 내에서 균질화되었다. 초원심분리(12,000 rpm, 10분 $\times$ 2) 후 상청액은 Bio-Rad 단백질 에세이 키트를 이용하여 측정되었고 20 MI 단백질이 레인 당 적용되었다. 용해성 분획(30 μ g)이 이중 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔(30% 아크릴아미드/1% bis/1 M 트리스/D.W/20% SDS/10%APS/TEMED) 상에서 분리되었다. 하나의 겔은 쿠마시 블루로 염색된 반면 다른 겔 상의 단백질은 일렉트로블롯팅(48 mM 트리스, 39 mM 글리신, 20% MeOH 및 0.037% SDS 일렉트로트랜스퍼 완충액 내 1시간 동안 90V)에 의해 니트로셀룰로즈막으로 옮겨졌다. 니트로셀룰로즈막은 비특이적 결합을 감소시키기 위해 차단 용액(0.1%(v/v) Tween 20 및 6%(w/v) 비지방 건조 우유를 함유한 트리스-완충 식염수(TBS))로 처리되었다. 면역반응은 기니아 피그-유래 항-래트 GABA_{B1} 수용체 항체(1:500, 24시간, 4°C; Chemicon, CA), 토끼 항-래트 PKA α (1:500, Santa Cruz, 미국) 또는 토끼 항-래트 p-CREB(1:500, Cell Signalling)를 이용하여 수행되었다. 항원 단백질은 제조사의 프로토콜에 따라 ECL-검출 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 웨스턴 블롯팅 검출 시약)을 이용하여 화학발광에 의해 검출되었다. 웨스턴 블롯은 컴퓨터-기반 Sigma Gel(SPSS, Chicago, 미국) 시스템을 이용하여 alf도계측에 의해 분석되었다. 농도 수치는 평균 $\pm$ SEM으로 표기되었다. 관련 처리군 사이의 차이의 유의성을 측정하기 위해 일원 ANOVA 분석 후 Tukey-Kramer 다중-비교 시험이 수행되었다. 모든 경우에서 통계적 유의성의 수용 수준은 $P < 0.05$ 이었다.

<39> (실시예 5) 면역-형광

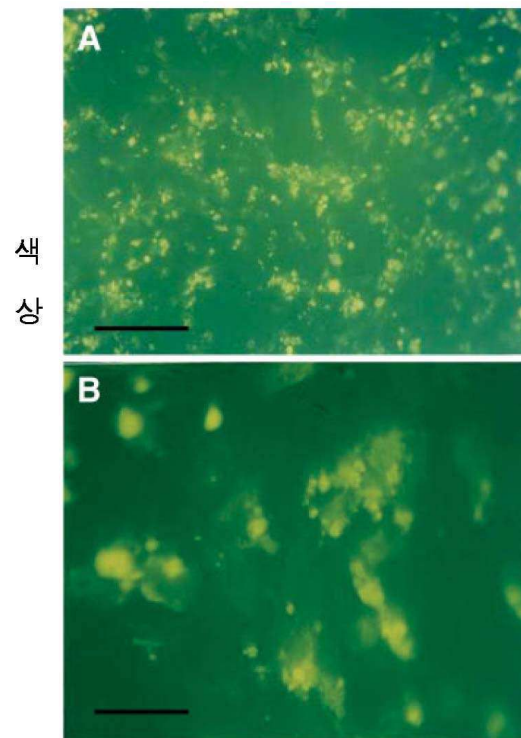
<40> 면역-형광은 시험관 내 폴리-D-리신-코팅된 원형 글라스 커버슬립 상에서 성장된 GD 17.5 1차 피질 세포 배양물로 수행되었다. 배양물은 PBS so 4% 파라포름알데하이드로 5분간 고정되었고, PBS 내 0.3% Triton X-100으로 투과되었고 PBS로 2회 세척되었다. 세포는 37°C에서 1시간 동안 PBS so 10% BSA로 전-인큐베이트되고 4°C에서 밤새 1차 항체에 노출되었다. 면역반응은 기니아 피그-유래 항-래트 GABA_{B1} 수용체(1:500, 24시간, 4°C, Chemicon, CA), 토끼 항-래트 PKA α (1:500, Santa Cruz, 미국) 또는 토끼 항-래트 p-CREB(1:500, Cell Signalling)를 이용하여 수행되었다. 인큐베이션 후 세포는 세척되었고 1:100의 항-토끼 IgG-TRITC 및 FITC 컨쥬게이트, 1:150의 항-기니아 피그 IgG-FITC 컨쥬게이트(DAKOCytomation, 덴마크)의 농도로 2차 항체가 적용되었다. 이중 염색을 위해 인큐베이션은 병렬로 수행되었다. 유리 커버슬립은 봉입제로 유리 슬라이드 위에 봉입되었다. 이미지를 위해 본 발명은 Zeiss 형광 현미경(Zeiss, 독일) 및 공초점 현미경(Olympus, 일본)을 이용하였다. 사진은 소프트 이미지 시스템 비디오 카메라로 촬영되었다.

도면의 간단한 설명

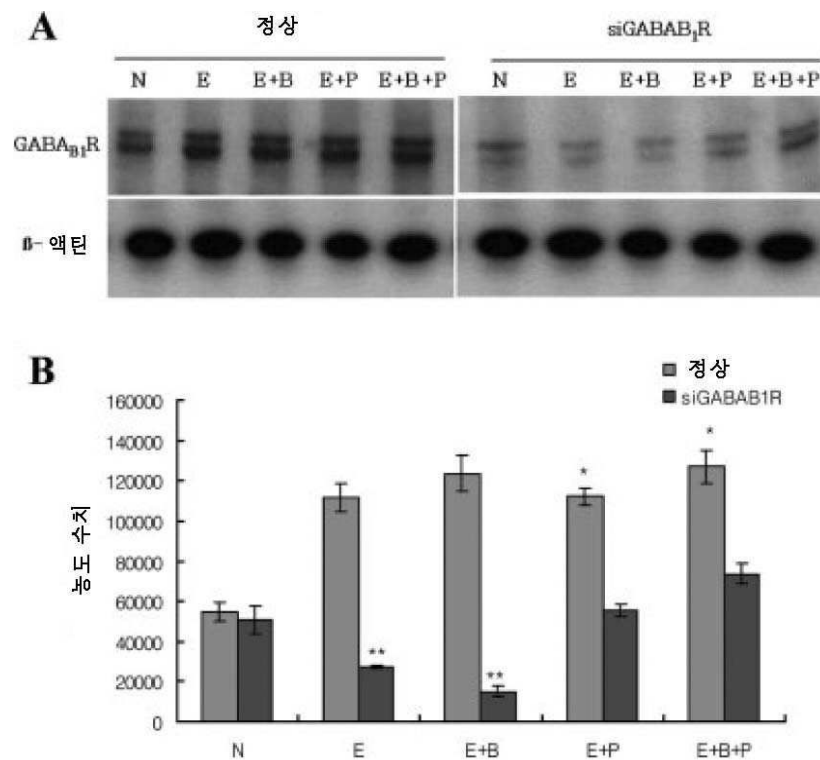
- <41> 도 1은 트랜스펙션 2일 후 siRNA에 대한 형광 올리고뉴클레오타이드를 포함한 BLCOKi™ 트랜스펙션 키트를 이용한 트랜스펙션 효율의 확인을 나타낸 것이다. 축척 막대 = 400 μm (A) 및 30 μm (B)
- <42> 도 2는 siRNA GABA_{B1} 수용체 트랜스펙션이 특이적으로 녹다운된 GD 17.5 유래 1차 배양된 피질 신경세포의 GABA_{B1} 수용체의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 세포는 정상 배지, 100 mM 에탄올을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 50 μM 바클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 100 μM 파클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜을 함유한 배지로 처리되었다. 도 2A는 다른 처리 조건 하에서의 피질 신경세포의 GABA_{B1}의 면역 블롯을 나타낸다. 면역블롯은 항-GABA_{B1} 수용체 항체로 표지되었다. N, 정상 배지 대조군; E, 에탄올 100 mM 처리; E+B, 에탄올 100 mM과 50 μM 바클로펜; E+P, 에탄올 100 mM과 100 μM 파클로펜; E+B+P, 에탄올 100 mM, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜. 도 2B는 (A) 내 GABA_{B1} 수용체 밴드의 농도계측 조사를 나타낸 것이다. * < 0.05 대 정상군.
- <43> 도 3은 RT-PCR에 의해 나타난 바와 같이 내인성 GABA_{B1} mRNA에 상보적인 siRNA 트랜스펙션이 GABA_{B1} 수용체 mRNA의 유의적인 감소를 유발하는 반면 GABA_{B2} 및 GAPDH mRNA 수치는 변화를 나타내지 않음을 나타낸 것이다.
- <44> 도 4는 siRNA GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 녹다운된 GD 17.5 유래 1차 배양된 피질 신경세포의 PKA의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 세포는 정상 배지, 100 mM 에탄올을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 50 μM 바클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 100 μM 파클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜을 함유한 배지로 처리되었다. 도 4A는 다른 처리 조건 하에서의 피질 신경세포의 PKA의 면역 블롯을 나타낸다. 면역블롯은 항-PKA 폴리클론 항체로 표지되었다. N, 정상 배지 대조군; E, 에탄올 100 mM 처리; E+B, 에탄올 100 mM과 50 μM 바클로펜; E+P, 에탄올 100 mM과 100 μM 파클로펜; E+B+P, 에탄올 100 mM, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜. 도 4B는 (A) 내 PKA 밴드의 농도계측 조사를 나타낸 것이다. * < 0.05 대 정상군.
- <45> 도 5는 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 녹다운된 GD 17.5 유래 1차 배양된 피질 신경세포의 p-CREB의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 세포는 정상 배지, 100 mM 에탄올을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 50 μM 바클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올과 100 μM 파클로펜을 함유한 배지, 100 mM 에탄올, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜을 함유한 배지로 처리되었다. 도 5A는 다른 처리 조건 하에서의 피질 신경세포의 CREB의 면역 블롯을 나타낸다. 면역블롯은 항-CREB 폴리클론 항체로 표지되었다. N, 정상 배지 대조군; E, 에탄올 100 mM 처리; E+B, 에탄올 100 mM과 50 μM 바클로펜; E+P, 에탄올 100 mM과 100 μM 파클로펜; E+B+P, 에탄올 100 mM, 50 μM 바클로펜 및 100 μM 파클로펜. 도 5B는 (A) 내 PKA 밴드의 농도계측 조사를 나타낸 것이다. * < 0.05 대 정상군.
- <46> 도 6은 에탄올 100 mM과 50 μM 바클로펜 처리된 1차 배양 피질 신경세포 내 GABA_{B1} 및 PKA의 발현 및 세포 내 분포를 나타낸 것이다. 동일한 신경세포 내 GABA_{B1} 및 PKA의 면역형광 이미지를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm
- <47> 도 7은 GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 녹다운된 100 mM 에탄올 처리된 1차 배양 피질 신경세포의 GABA_{B1} 및 PKA의 동시-위치를 나타낸 것이다. 동일한 신경세포의 세포질 내에 동시-위치한 GABA_{B1} 및 PKA의 면역형광 공초점 이미지를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm
- <48> 도 8은 에탄올 100 mM과 50 μM 바클로펜 처리된 1차 배양 피질 신경세포 내 GABA_{B1} 및 p-CREB의 동시-위치를 나타낸 것이다. 동일한 신경세포 내에 동시-위치한 GABA_{B1} 및 p-CREB의 면역형광 이미지를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm
- <49> 도 9는 siRNA GABA_{B1} 수용체가 특이적으로 트랜스펙트된 에탄올 100 mM 처리된 1차 배양 피질 신경세포 내 GABA_{B1} 및 p-CREB의 동시-위치를 나타낸 것이다. 동일한 신경세포 내에 동시-위치한 GABA_{B1} 및 p-CREB의 면역형광 공초점 이미지를 나타낸다. 축척 막대 = 30 μm

도면

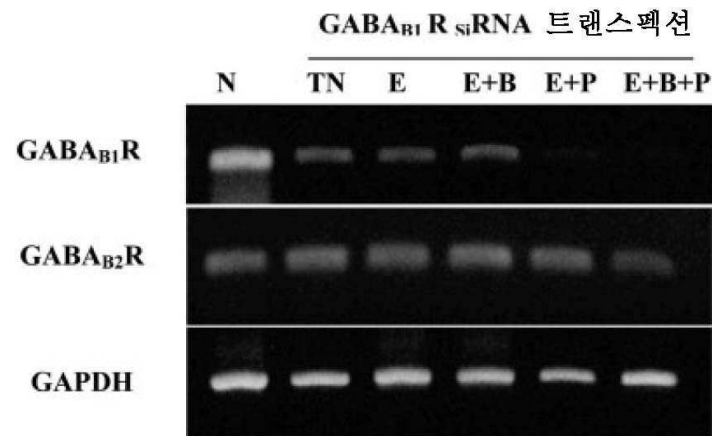
도면1



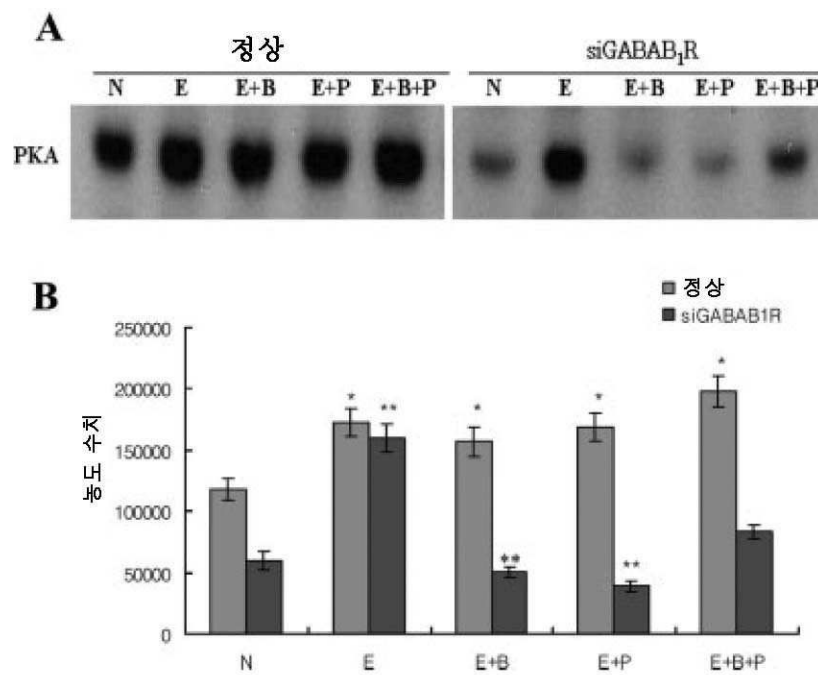
도면2



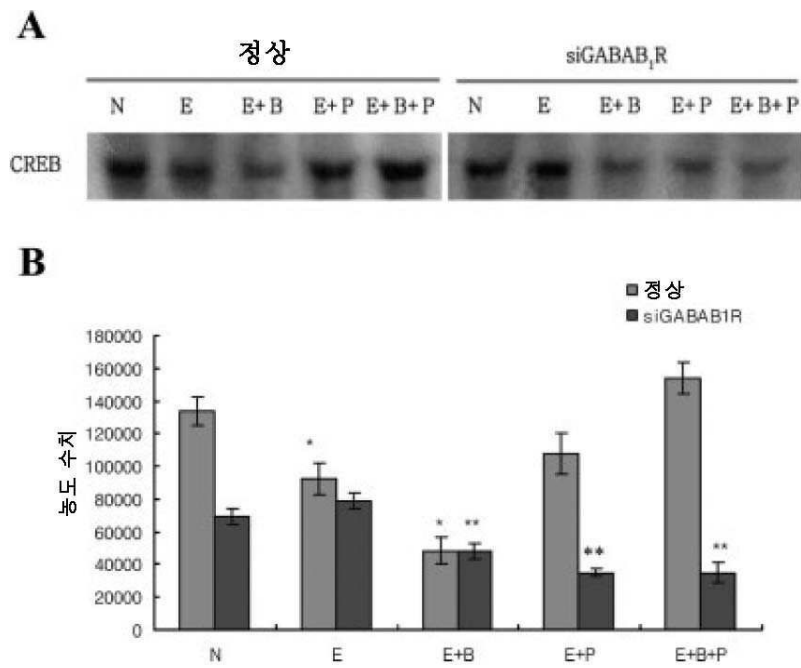
도면3



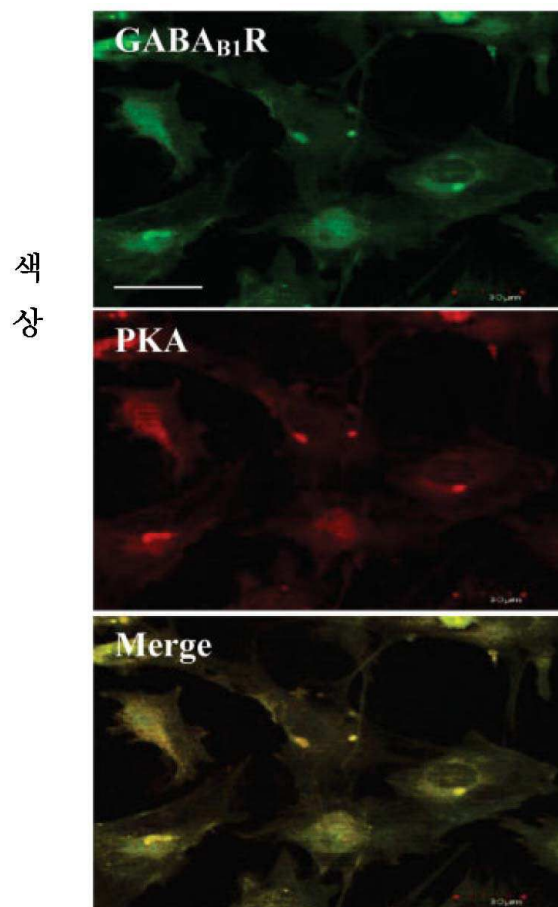
도면4



도면5

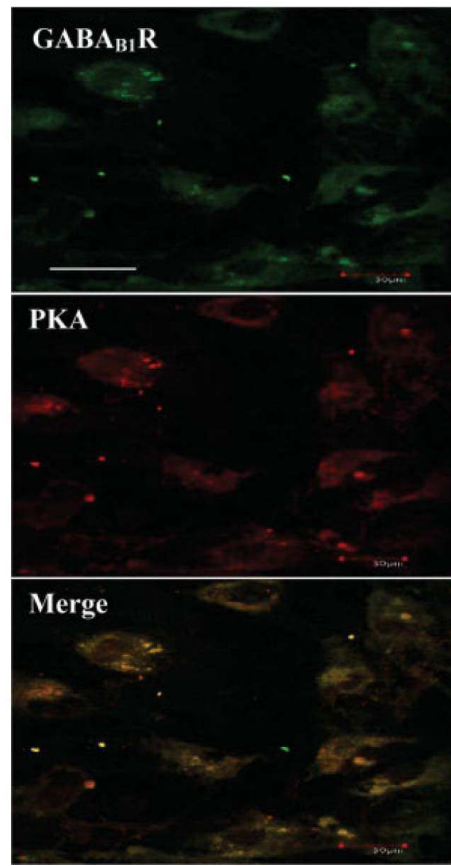


도면6



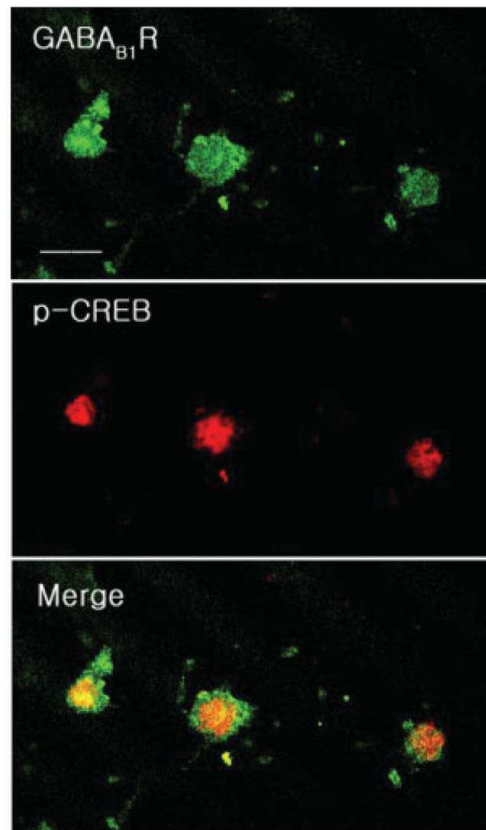
도면7

색
상



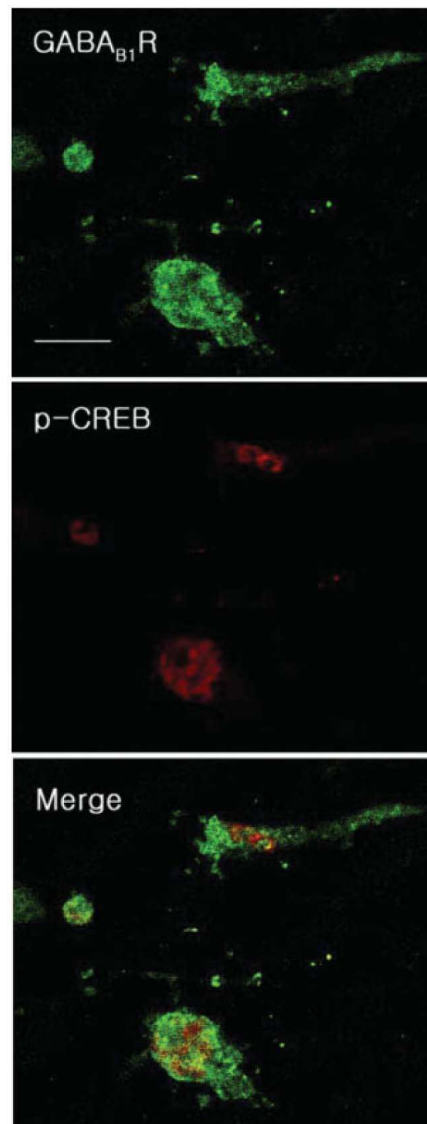
도면8

색
상



도면9

색
상



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for suppression of ethanol effect to neuron by knock
downed gamma-amino butyric acid receptor B1

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 4376

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 1
gtggggtttg cgggtagcga tcgagaaggg gagagacccc ggccaggcag gaggctggat 60

tcctgtggaa gaagaacagg gggaggggaa gctggaggac cgggaggag aacggggagc 120

cgcgccggg cctggggcct tgaggcccgg ggagagccgc ggagcgggac cgccgccga 180

gatgctgtg ctgctgtgg tgcctctctt cctccgccc ctgggcgctg gcggggcgca 240

gacccccaac gccacctcgg aaggttgcca gattatacat ccgccctggg aaggtggcat 300

caggtaccgt ggcttgactc gcgaccaggt gaaggccatc aacttcctgc ctgtggacta 360

tgagatcgaa taigtgtgcc gaggggagcg cgaggtggtg gggcccaagg tgcgcaaatg 420

cctggccaac ggctcctgga cggatatgga cacaccagc cgctgtgtcc gaatctgctc 480

caagtcttat ttgacctgg aaaatgggaa ggttttcctg acgggtgggg acctcccagc 540

tctggatgga gcccgggtgg agttccgatg tgaccccgac ttccatctgg tgggcagctc 600

ccggagcgtc tgtagtcagg gccagtggag caccccaag cccactgcc aggtgaatcg 660

aacgccacac tcagaacggc gtgcagtata catcggggcg ctgtttccca tgagcggggg 720

ctggccgggg ggccaggcct gccagccgc ggtggagatg gcgctggagg acgttaacag 780

ccgcagagac atctgcccg actacgagct caagcttacc caccagaca gcaagtgtga 840

cccagggcaa gccaccaagt acttgtaaga actactctac aatgaccca tcaagatcat 900

tctcatgcct ggctgtagtt ctgtctccac acttgtagct gaggtgccc ggatgtggaa 960

ccttattgtg ctctcatatg gctccagttc accagccttg tcaaaccgac agcggtttcc 1020

cacgtttctc cggacgcac catccgccac actccacaat cccaccggg tgaaactctt 1080

cgaaaagtgg ggctggaaga agatcgctac catccaacag accaccgagg tcttcacctc 1140

aacgctggat gacctggagg agcgagtgaag agaggctggg atcgagatca ctttccgaca	1200
gagttttcttc tcggatccag ctgtgcctgt taaaaacctg aagcgtcaag atgctcgaat	1260
catcgtggga cttttctatg agacggaagc ccggaaagt tttgtgagg tctataagga	1320
aaggctcttt gggaagaagt acgtctggtt cctcatcggg tggatgctg acaactggtt	1380
caagacctat gacctgcaa tcaattgtac agtggaaaga atgaccgagg cggtagggg	1440
ccacatcacc acggagattg tcatgctgaa cctgccaac accgaagca tttccaacat	1500
gacgtcacag gaatttggg agaaactaac caagcgctg aaaagacacc ccgaggagac	1560
tggagcttc caggaggcac cactggccta tgatgctatc tgggccttgg ctttggcctt	1620
gaacaagacg tctggaggag gtggtcgttc cggcgtgcgc ctggaggact ttaactacaa	1680
caaccagacc attacagacc agatctaccg ggccatgaac tctcctcct ttgagggcgt	1740
ttctggccat gtggtctttg atgccagcgg ctcccggatg gcatggacac ttatcgagca	1800
gtctacagggc ggcagctaca agaagatcgg ctactacgac agcaccaagg atgatcttc	1860
ctggtccaaa acggacaagt ggattggagg gtctcccca gctgaccaga ccttggcat	1920
caagacattc cgtttcctgt ctcaaaaact ctttatctcc gtctcagttc tctccagcct	1980
gggcattgtt ctgtctgtg tctgtctgtc ctttaacatc tacaactccc acgttcgtta	2040
tatccagaac tccagccca acctgaacaa tctgactgct gtgggctgct cactggcact	2100
ggctgtgtc ttcctctcg ggctggatgg ttaccacata gggagaagcc agttcccgtt	2160
tgtctgccag gccgccttt ggctcttggg ctgggcttt agtctgggct atggctctat	2220
gttcaccaag atctggtggg tccacacagt cttcacgaag aaggaggaga agaaggagtg	2280
gaggaagacc ctgagccct ggaaactcta tgccactgtg ggctgtgtg tgggcatgga	2340

tgctctgact cttgccaatct ggcagattgt ggaccccttg caccgaacca ttgagacttt	2400
tgccaaggag gaaccaaagg aagacatcga tgtctccatt ctgccccagt tggagcactg	2460
cagctccaag aagatgaata cgtggcttgg catTTTctat ggTiacaagg ggctgctgct	2520
gctgctggga atctttcttg cttacgaaac caagagcgtg tccactgaaa agatcaatga	2580
ccacagggcc gtgggcatgg ctatctacaa tgtcgcggtc ctgtgtctca tcactgctcc	2640
tgtgaccatg atcctttcca gtcagcagga cgcagccttt gcctttgcct ctctggccat	2700
ctgtttctct tctacatca ctctggttgi gctctttgtg cccaagatgc gcaggtgat	2760
cacccgaggg gaatggcagt ctgaaacga ggacaccatg aaaacaggat catccaccaa	2820
caacaacgag gaagagaagt cccgactgtt ggagaaggaa aaccgagaac tggaaaagat	2880
catcgtgag aaagaggagc gcgtctctga actgcgccat cagctccagt ctcggcagca	2940
actccgtca cggcgccacc ccccaacacc cccagatccc tctgggggcc tttccagggg	3000
accctctgag cccctgacc ggcttagctg tgatgggagt cgagtacatt tgctttacaa	3060
gtgagggggc atggagaagg atcaagccag taggggaggg aagggtctgg gaagagggtg	3120
ggggcctggg aggagggtaa ggactcctat ctccaactg gagagcacac gctccaatcc	3180
ccctcttata aatacatgtc gctctgtgca tctggggtta tttgggtctc cagtactctg	3240
ggaaacagac tgTTTTcttt ctcccctata atTTtatc tccacttcac aggttttgtt	3300
tgaacctgc ttggagtta ttttactca tggtccaga ggggcatctc atTTTctcc	3360
ggtagcctgt cttgtacagt taccacagca actcctgtca tttcagcagc aggggtcttc	3420
ctacactagc agggctctcg ctctctccat tttcagcct cagaatctcc ttccattatt	3480

cttctccttc tacatgtctc catggcttcc tctcccagg gactcgttct acacacatac	3540
acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acaccccgc tctgtccctc	3600
tcctaggcag ctgcatgtcg tctgttacia atgtgtctcg tcttgagtgc tttgtgcggc	3660
cgttcacttg tgctgtctgc ataagctgcg tctgtgagtg cacggtggtt tgtgggtgcg	3720
tgaagtggca tgctccggtg ggtgtgtatg atgcgttgag cacgtacgc tgtctccctc	3780
atgtgcacgc attgtgtctg cttatgtttt acttgatgc ctctgtgtac tgtgtgtgtg	3840
tgtgtgtgtg cccacgcgtg cgcccgtgtg catgcgttcg tgttgccctg actggctgtc	3900
tcagccttct gagtaattgg gattccagtt gctgtcttag ctcatgtcct gtcttcttcc	3960
agtagagccg tgaacaccca acacacacag ttaatcgggc tccccccagt ccatgttttc	4020
tgagccatcc aaaaactctc ctggcctta ggttcacta caaatgttcc ctctgttctt	4080
tgctctctg cgccacatt cattctctc agtcatttct cagatctgct gcgtctggt	4140
ttcctttcct tcattatcat cgtcattatt tttcagaact taagggaata agaaatgggg	4200
acaggttgga ggctgtttcc agtgggaatag tgggtgcgcg tcctgaccaa atgaaggcac	4260
ggacagatgg actgacgggg cgggaggcgg cgtcccttcc acactgtggt gtctcttggg	4320
ggggaaggat ctccctgaat ctcaataaag cagtgaacag taaaaaaaa aaaaaa	4376

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 2

aattgaattc cgctaccatc caacagacca

30

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer

<400> 3

aattaagctt tcctgtgacg tcatgttgga a

31