



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0041821
(43) 공개일자 2012년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0083508
(22) 출원일자 2010년08월27일
심사청구일자 2010년08월27일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김찬화
서울 용산구 이촌1동 이촌코오롱아파트 103-402
김남희
부산광역시 해운대구 해운대로161번길 12, 동부센트레빌아파트 106동 1101호 (재송동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커

(57) 요약

본 발명은 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물, 상기 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트, 상기 알츠하이머병 진단용 단백질을 검출하는 방법, 및 상기 단백질을 활용한 알츠하이머병 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2

Spot No.	6-NTg	6-Tg	12-Tg	12-NTg
# 724				
# 986				
# 1039				
# 1140				

(72) 발명자

박승아

서울특별시 성동구 마장동 세림아파트 1동 1407호

박혜원

서울특별시 송파구 신천동 7 장미아파트 12-207

이현경

서울특별시 동대문구 약령사로 25, 벽산아파트 10
6동 804호 (제기동)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커:

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 45-47 kD의 분자량을 갖는 Secernin-1;

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 25-27 kD의 분자량을 갖는 V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1);

서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 28-30 kD의 분자량을 갖는 carbonic anhydrase II; 및

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 23-25 kD의 분자량을 갖는 Glutathione S-transferase P1.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Glutathione S-transferase P1은 정상 개체와 비교하여 알츠하이머병 초기 단계의 대뇌 피질에서 상대적으로 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 carbonic anhydrase II는 정상 개체와 비교하여 알츠하이머병 중기 단계의 대뇌 피질에서 상대적으로 발현이 감소하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커.

청구항 4

제 1항의 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질은 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 조성물.

청구항 6

제 1항의 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질은 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 mRNA를 검출하기 위한 RT-PCR용 프라이머인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 조성물.

청구항 8

제 4항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트.

청구항 9

알츠하이머병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자로부터 제 1항의 단백질성 마커를 검출하는 방법.

청구항 10

제 1항의 단백질성 마커를 발현하는 세포 또는 동물에 시험 화합물을 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 마커의 생리학적 활성을 촉진하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 치료제의 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 정상 개체의 대뇌 피질에서 보다 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질에서 더 적게 또는 더 많이 존재하는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커, 및 이를 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)은 임상적으로 노년에서 다른 원인 없이 점차 진행되는 비가역적 치매(irreversible dementia) 현상으로 나이가 들어감에 따라 뇌에서 선택적으로 대뇌 피질의 신경세포가 죽어서 대뇌의 전두엽과 측두엽의 뇌회가 위축되거나 줄어드는 것이 특징인 대표적인 퇴행성 신경질환(neurodegenerative disease)이며, 50세 이전에 증상이 나타나는 경우가 드물지만 60세 이후로는 나이가 들어감에 따라 발생 빈도가 점진적으로 증가하기 때문에 노인 인구가 증가하고 있는 현 시점에서 중요한 의료, 사회 및 경제적 문제를 야기하고 있다.

[0003] 알츠하이머 질병은 초로치매(노령 이전에 생기는 치매)의 주원인이고, 또한 노인성 치매의 주요 요인 중의 하나이다. 이 병에 걸리면 언어장애, 심한 단기 기억상실, 정신기능의 진행성 상실에 이르는 지남력상실(地南力喪失) 등이 나타나며, 아직까지 효과적인 치료법은 없는 상태이다.

[0004] 알츠하이머 질병의 원인은 아직까지 밝혀지지 않았지만 노인판과 신경섬유농축제와 같은 신경 독성물질이 대뇌에 축적은 신경전달물질인 아세틸콜린의 결핍에 영향을 미치며 알츠하이머 질병에 걸린 환자의 대부분의 뇌에서는 이 물질이 정상 40~90% 감소한다.

[0005] 현재 알츠하이머병의 진단 기준의 개발과 뇌 자기공명영상촬영(MRI)이나 양성자단층촬영(PET) 등의 검사를 통한 알츠하이머병의 진단법 개발 등 많은 연구가 진행되고 있지만, 알츠하이머병은 일단 발병하면 계속 진행되고 근본적인 치료법이 없는 악성 질환으로 간주되므로 병의 진행을 완화시키기 위한 타겟(target)이 되는 물질 개발에 대한 연구가 필요하다. 알츠하이머 질병의 발병 원인 및 치료제 개발을 위한 연구는 전 세계적으로 학계는 물론 제약회사들에 의해 활발히 진행되고 있으나 현재까지 개발된 알츠하이머 질병의 치료 약물들에는 아세틸콜린 합성전구체(acetylcholine precursor)로 레시틴, 수용체 활성제(Receptor agonist)로 RS-86, 니코틴 등이 있으며, 아세틸콜린 분해 억제제(Acetylcholin-esterase inhibitor)로 FDA의 승인을 받아 국내에서도 시판사용 중인 타크린(Tacrine)과 최근에 승인된 아리셉트(Aricept; donepezil)가 있으며 이런 약물들은 아세틸콜린이라고 하는 신경전달물질의 분해를 막아 주어 감퇴된 인지기능을 개선시켜 주는 효과를 가지고 있다. 하지만 이들도 근본적인 치료제라기보다는 단지 발병 초기에 인지기능 손상을 개선시키는 효능만이 인정된 정도이다. 게다가 안전성과 효능면에서도 문제가 많이 보고되고 있어 AD 치료제로 인정을 받기에는 아직도 여러 가지 개선이 필요한 약물들이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 2차원 전기영동기술을 이용하여 알츠하이머병이 진행되는 장소인 대뇌 피질에서 병이 진행됨에 따라 발현 정도가 급격히 변화하

는 단백질을 확인하였으며, 이는 알츠하이머 치료제의 개발을 위한 타겟 단백질로 사용될 수 있다고 판단되어, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 정상 개체의 대뇌 피질과 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질에서 얻은 단백질 사이의 발현 차이를 확인할 수 있는 단백질 연구를 통해 알츠하이머병의 진단 및 치료에 적용하기 위한, 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, 상기 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 검출하는 방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은, 상기 단백질성 마커를 활용한 알츠하이머병 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 하기 폴리펩티드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상의 조합인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커:
 - [0013] 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지고 45-47 kD의 분자량을 갖는 Secernin-1;
 - [0014] 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지고 25-27 kD의 분자량을 갖는 V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1);
 - [0015] 서열번호 3의 아미노산 서열을 가지고 28-30 kD의 분자량을 갖는 carbonic anhydrase II; 및
 - [0016] 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고 23-25 kD의 분자량을 갖는 Glutathione S-transferase P1.
- [0017] 본 발명에서, 상기 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커는 알츠하이머병의 진행에 따라 생화학적 변화가 일어나는 대뇌 피질의 단백질 분석을 통하여 선별된 알츠하이머병 진단용 마커로서, 본 발명자들은 정상 개체의 대뇌 피질과 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질에서 얻은 단백질들의 프로테오믹을 분석하여 정상 개체에 비하여 알츠하이머병 개체에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소하는 단백질들을 검출하여 알츠하이머병의 진단 또는 치료에 사용될 수 있는 단백질성 마커들을 발굴하였다.
- [0018] 본 발명에 사용된 용어, 알츠하이머의 “초기 단계” 또는 초기 증상은 모호한 경우가 많기 때문에 이상한 점을 발견해 내는 것이 매우 어렵다. 주로 최근 기억이 장애를 받게 되는데, 같은 질문을 반복하거나 대화 도중 주제를 잊거나 적절한 단어를 찾아내는데 어려움을 느낀다. 기억력 저하가 뚜렷해지는 것을 느끼며 자신에 대한 분노, 좌절, 무력감 등으로 이어지며 우울증이 흔히 이 시기에 발생한다. 또한 용어, “중기 단계”는 증상이 분명히 나타나므로 환자는 기억력 감퇴와 더불어 판단력이 흐려진다. 이 시기부터 언어장애가 시작되며 대화를 유지하는 것이 힘들다. 이 외에 계산력이 필요하거나 계획성이 요구되는 일 처리가 힘들어진다. 본 발명에서는, 알츠하이머를 유발시킨 Transgenic mice의 6개월과 12개월 초기와 중기 사이에 알츠하이머 질병의 대표적인 원인 물질인 tau 단백질의 발현이 증가하는 것을 기준으로 알츠하이머의 초기 단계와 중기 단계로 구분하였다. 최근 연구에 따르면, 알츠하이머를 유발시킨 Transgenic mice에서 tau 단백질의 발현된 정도를 통하여 6개월과 12개월 초기와 중기로 판단하고 있다 (S. B. Shim., et al., Neuroscience 146 (2007) 730-740).
- [0019] 상기 Glutathione S-transferase P1은 알츠하이머병의 초기 단계, 상기 carbonic anhydrase II은 알츠하이머병의 중기 단계, 그리고 상기 Secernin-1 및 V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1)은 알츠하이머병의 초기 단계 및 중기 단계에서 발현 변화가 나타나므로, 정상 개체에 비하여 발현이 변화하는 상기 단백질들을 검출함

으로써 알츠하이머병을 진단할 수 있다 (도 3b 참조).

- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 단백질성 마커들은 알츠하이머가 의심되는 환자에서 알츠하이머병 진단용 마커로 적용될 수 있을 뿐만 아니라, 병의 진행정도를 진단할 수 있는 마커로도 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 Glutathione S-transferase P1은 정상 개체와 비교하여 알츠하이머병 초기 단계의 대뇌 피질에서 상대적으로 발현이 감소하기 때문에, 진단 개체에서 이들 단백질의 감소가 확인된다면 초기 단계의 알츠하이머로 진단할 수 있다. 또한, 상기 carbonic anhydrase II는 정상 개체와 비교하여 알츠하이머병 중기 단계의 대뇌 피질에서 상대적으로 발현이 감소하기 때문에, 진단 개체에서 이 단백질의 감소가 확인된다면 중기 단계의 알츠하이머로 진단할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 사용된 용어, ‘프로테옴(proteome)’이란 유전체로부터 만들어질 수 있는 모든 단백질의 총체를 의미하는데, 이는 한 세포 또는 조직에서 특이적인 생리 상태나 병리 상태에 따라 프로테옴의 양상이 항상 변화하게 되는 동적인 개념이다. 프로테오믹스(proteomics)는 이러한 프로테옴을 연구하는 방법과 기술을 포괄적으로 지칭하는 것으로, 단백질의 성질을 유전자의 발현, 번역 후 변형(post-translational modification), 다른 단백질과의 결합에 초점을 두어 연구함으로써 세포내 변형 과정과 네트워크 형성을 질병의 진행 과정과 연계시켜서 총체적으로 이해하고자 하는 연구 분야를 뜻한다. 이와 같이 프로테옴은 한 세포 또는 조직에서의 생리 상태나 병리 상태를 대변하므로, 질병의 진단에 직접 쓰일 수 있는 진단의 마커를 찾는 방법으로는 가장 적합한 것이다. 또한, 알츠하이머병과 같은 경우 특정 유전자의 발현이 질병의 진행 정도에 관여하여 알츠하이머병을 촉진하는 것으로 확인된다면, 그 단백질의 존재를 확인 및 동정하여 알츠하이머병 저해제 개발의 표적 단백질로 삼을 수도 있다. 게노믹스(Genomics)의 뛰어난 민감도와 유전자의 쉬운 증폭 등의 장점으로 이를 이용한 진단 및 치료제 개발 역시 많이 진행되고 있으나, DNA나 mRNA 단계에서의 변화가 실제로 세포 내에서 활성을 갖는 단백질의 변화로 곧바로 연결되지는 않을 수 있다는 점에서 이론상의 문제점이 남아있으며, 나아가 현실적으로는 유전물질이 없는 체액의 경우 프로테오믹스가 유일한 연구방법이다. 현재 비-침습적 접근(non-invasive approach)으로 진단에 쓰이고 있는 것은 혈장, 혈청, 뇨, 뇌척수액, 양수, 분비액 등의 체액인데, 많은 연구자들이 진단 마커로 질병 특이적인 단백질을 발굴하기 위해 프로테오믹스 방법을 도입하고 있다.
- [0022] 본 명세서에서 “알츠하이머병 진단용 단백질성 마커”는 정상 개체의 대뇌 피질과 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질을 구분해내는 기준이 되는 물질 중에서 이 물질이 특히 단백질을 주요 구성물질로 하고 있는 것을 지칭한다. 본 발명에서 이 단백질성 마커는 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질에서의 존재량이 정상 개체의 조직에서의 존재량과 비교할 때 특징적으로 많거나 적다.
- [0023] 본 발명은 알츠하이머병 개체의 조직의 프로테옴을 정상 개체의 조직의 프로테옴과 분석한 것이기 때문에, 이렇게 확인된 단백질성 마커는 알츠하이머병에 대하여 특이적이라고 할 수 있으며, 따라서 알츠하이머병을 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다. 나아가, 이렇게 확인된 단백질성 마커가 알츠하이머병에서 변화 양상이 두드러지는 것이라는 점을 감안한다면, 이 단백질성 마커의 생리학적 기능은 알츠하이머병의 발병에 직접적으로 관계된 것일 가능성이 있으며, 따라서 이 단백질성 마커는 알츠하이머병 발병의 메커니즘을 연구하거나 알츠하이머병 치료제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있다.
- [0024] 특히 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커는 실제의 알츠하이머병 개체의 대뇌 피질에서 프로테옴 수준에서 발굴해낸 것이기 때문에, 종래 DNA 또는 mRNA 수준에서 발견되는 알츠하이머병의 특이적 마커들에 비하여 더욱 임상적으로 활용 가치가 높은 마커들이며, 알츠하이머병에만 한정되어 있다는 점에서 알츠하이머병의 치료제의 표적으로서도 매우 유용한 것이다.
- [0025] 본 발명에서, 상기 단백질성 마커는 상기 분자량을 가지는 한 상기 서열번호를 가지는 전장 단백질의 일부일 수 있으며, 이 경우 도 6a 내지 도 6d의 MS/MS 결과에서 빨간색으로 표시된 트립신 분해된 펩티드 서열들을 가진다. 상기 트립신 분해된 펩티드란 프로테옴 분석의 방법으로서 MALDI-TOF 또는 MS/MS 분석을 위해 트립신(trypsin)으로 분해된 단백질의 펩티드를 의미한다. 또한 상기 분자량은 2차원 전기영동(two-dimensional electrophoresis) 상에서 확인된 값으로서 일반적으로 허용되는 실험상의 오차범위를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커의 존재 여부와, 그 양, 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물에서, 상기 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 특이적인 검출은 생물학적 시료 내에 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커가 존재하는지 여부 및 그 양과 패턴을

확인하는 과정을 의미하며, 예를 들어, 상기 단백질성 마커에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 그 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하는 과정이 활용될 수 있다. 본 명세서에서 “생물학적 시료”란 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴이나, 이 단백질성 마커에 관한 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출할 수 있는 세포나 조직 등을 의미한다. 또한, 본 명세서에서 “항체”란 항원의 항원결정기(epitope)에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 의미하며, 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함하는 개념이다.

[0028] 본 발명에서, 상기 다클론 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 항원인 단백질성 마커 또는 그 항원결정기를 갖는 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리·정제한다.

[0029] 또한 상기 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495)에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 단백질을 20 µg을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩티드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화 시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, ELISA 방법을 사용하여 원하는 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 단일클론 항체를 분리·정제한다.

[0030] 상기 항체를 이용하여 단백질의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 측정하는 방법으로는, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0031] 이 분석 방법들을 통하여, 정상 개체의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 알츠하이머병 개체의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 판단할 수 있으며, 궁극적으로 알츠하이머병이 의심되는 환자의 발병 여부를 진단할 수 있게 된다.

[0032] 여기서 “항원-항체 복합체”란 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커와 이에 특이적인 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량이나 형성 패턴은 통상 2차 항체에 연계된 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기 및 패턴을 검출함으로써 측정이 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자, 레독스 분자, 방사선 동위원소 등을 예로 들 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제, 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β-라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 형광물이 사용되는 경우 이용 가능한 형광물에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, o-프탈데히드, 플루오레스카민 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 리간드가 사용되는 경우 이용 가능한 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 발광물이 사용되는 경우 이용 가능한 발광물에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 미소입자가 사용되는 경우 이용 가능한 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 레독스 분자가 사용되는 경우 이용 가능한 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, K₄W(CN)₈, [Os(bpy)₃]²⁺, [Ru(bpy)₃]²⁺, [Mo(CN)₈]⁴⁻ 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 방사성 동위원소가 사용되는 경우 이용 가능한 방사성 동위원소에는 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I 또는 ¹⁸⁶Re 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물에서, 상기 “알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”은 해당 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 검출하기 위

한 분석 방법에서 해당 단백질성 마커에 대하여 특이적으로 사용될 수 있는 임의의 물질일 수 있으며, 반드시 항체로 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물은 정상 개체의 생물학적 시료와 알츠하이머병이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서 상기 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 차이를 검출하는 것에 기술적 특징이 있는 것이기 때문에, 이렇게 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 가능하게 하는 물질이라면 어떠한 것이라도 “알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”로서 사용될 수 있고 발명이 목적하는 기술적 효과를 달성할 수 있으며, 당업자라면 당업계의 평균적인 지식 및 공지기술을 참고하여 구체적인 실시양상에 따라 적당한 물질을 특별한 어려움 없이 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와, 그 발현량, 발현 패턴 또는 양자 모두를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물에서, 상기 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴은, 상기 단백질 자체를 검출하는 방법을 사용하는 것 외에도, 조직 내에서 해당 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출함으로써 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 유추하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0036] 여기서 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 검출은 통상적으로 해당 유전자의 전사로 인해 생성된 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하는 과정으로써 수행될 수 있다. 이러한 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 확인하기 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블롯, DNA 칩 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0037] 이 분석 방법들을 통하여, 정상 개체의 생물학적 시료에서의 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 알츠하이머병이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서의 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴과 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 판단하며, 궁극적으로 알츠하이머병이 의심되는 환자의 조직에서 알츠하이머병의 발병 여부를 진단하는 것이 가능하게 된다.

[0038] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물에서, 상기 mRNA의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 RT-PCR로 측정하기 위한 키트는 본 발명의 단백질성 마커에 관한 mRNA에 특이적인 프라이머를 포함한다. 본 명세서에서 “프라이머”는 템플레이트(template)와 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 템플레이트의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 특정 유전자의 핵산 서열에 상보적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이가 사용될 수 있다. 그 외 RT-PCR 키트는 구체적인 실시 양상에 따라 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPCwater), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시시킬 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 다른 염기 서열을 포함할 수도 있다. 프라이머는 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.

[0039] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물에서, 상기 “알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질”은 해당 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 분석 방법에 있어서 해당 단백질성 마커에 특이적으로 사용될 수 있는 임의의 물질일 수 있으며, 반드시 RT-PCR용 프라이머에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물은 정상 개체의 생물학적 시료와 알츠하이머병이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 검출하는 것에 기술적 특징이 있는 것이기 때문에, 이러한 차이의 검출을 가능하게 하는 물질은 어떠한 것이라도 “알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질

”로서 사용될 수 있고 발명이 목적하는 기술적 효과를 달성할 수 있으며, 당업자라면 당업계의 평균적인 지식을 참고하여 구체적인 실시양상에 따라 적당한 물질을 선택하여 사용할 수 있을 것이다.

[0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트를 제공한다.

[0041] 본 발명의 알츠하이머병 진단용 키트는, 상기 알츠하이머병 진단용 조성물에 포함되는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 특이적으로 검출하는 물질, 또는 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 특이적으로 검출하는 물질 외에 단백질 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 분석 방법 또는 유전자 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 진단 키트가 단백질의 존재 여부와 그 양 또는 패턴을 검출하기 위한 진단 키트인 경우에는, 이 진단 키트는 예를 들어 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 진단 키트일 수 있으며, 이러한 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 성분들, 예를 들어 표지된 2차 항체, 발색단 (chromophores), 효소 (예를 들어, 항체와 결합된 효소) 및 그의 기질, 및 정량 대조군 단백질에 특이적인 항체 등을 포함할 수 있다. 한편, 상기 진단 키트가 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴을 검출하기 위한 진단 키트인 경우에는, 이 진단 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 성분을 포함하는 진단 키트일 수 있으며, 이러한 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 구체적인 실시 양상에 따라 예를 들어 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPCwater), 멸균수, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍 등을 포함할 수 있다. 또한, 구체적인 실시 양상에 따라서는, 상기 알츠하이머병 진단용 키트는 DNA 칩 또는 단백질 칩을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 알츠하이머병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자로부터 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0043] 상기 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 검출하는 방법은, 상기 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물을 알츠하이머병이 의심되는 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하고, 그 처리 결과로부터 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 또는 패턴의 차이를 검출함으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 본 발명의 알츠하이머병 진단용 조성물을 알츠하이머병이 의심되는 환자에게서 채취한 생물학적 시료에 처리하고, 그 처리 결과로부터 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 코딩하는 유전자의 발현 여부와 그 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 검출함으로써 수행될 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 단백질성 마커를 발현하는 세포 및 동물에 시험 화합물을 처리하는 단계, 및 시험 화합물이 상기 단백질성 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 알츠하이머병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명에서, 상기 시험 화합물이 상기 단백질성 마커의 생리학적 활성을 촉진 또는 억제하는지 여부는 단백질성 마커의 발현을 증가 또는 감소시키는지 여부를 확인함으로써 판단할 수도 있다.

[0046] 상기 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커는 알츠하이머병 개체의 혈액에서 변화 양상이 두드러지는 것이기 때문에 알츠하이머병의 발병에 직접 관여하는 단백질일 가능성이 있으며, 따라서 알츠하이머병 발병의 메커니즘을 연구하거나 알츠하이머병의 치료제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있는 것이다. 즉, 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커는 알츠하이머병의 치료제 개발의 중요한 전제를 해결한 것이므로, 따라서 이 단백질성 마커를 이용하여 알츠하이머병의 치료제를 스크리닝하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다.

[0047] 이런 치료제를 스크리닝하는 방법으로는, 본 발명의 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커를 어피니티 칼럼에 고정시키고 이를 시료와 접촉시켜 정제하는 방법 [Pandya et al, Virus Res 87: 135-143, 2002], 투-하이프리드 방법을 이용하는 방법 [Fields, S and Song, O., Nature 340: 245 -246, 1989], 웨스턴 블랏["Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY, Maniatis, T. et al.(1982) section 18.30-18.74], 하이스루풋스크리닝 방법 [Aviezer et al, J Biomol Screen 6: 171-7, 2001] 등 을 비롯한 다수

의 공지의 방법을 사용할 수 있으며, 당업자라면 구체적인 실시 양상에 따라 적절한 방법을 선택할 수 있다. 스크리닝에 사용하기 위한 시험 화합물을 포함하는 시료로서는 조직 추출액, 유전자 라이브러리의 발현산물, 합성 화합물, 합성 펩티드, 천연 화합물 등이 있으나 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0048] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 알츠하이머병 진단용 단백질성 마커, 상기 단백질성 마커의 변화를 검출하는 물질을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물, 상기 알츠하이머병 진단용 조성물을 포함하는 알츠하이머병 진단용 키트, 상기 알츠하이머병 진단용 단백질을 검출하는 방법, 및 상기 단백질을 활용한 알츠하이머병 치료제의 스크리닝 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1a는 6개월된 정상 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1b는 6개월된 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1c는 12개월된 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1d는 12개월된 정상 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 2는 6개월 정상군(6-NTg), 6개월 알츠하이머군(6-Tg), 12개월 알츠하이머군(12-Tg), 및 12개월 정상군(12-NTg)에서 노화와 관계없이 질병이 진행됨에 따라 증가 또는 감소하는 단백질을 상세하게 보여주는 확대 이미지이고, 도 3a 내지 3d는 도 2의 상대적인 강도를 각각 나타낸 결과로서, 도 3a는 Secernin-1, 도 3b는 V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1), 도 3c는 carbonic anhydrase II, 그리고 도 3d는 Glutathione S-transferase P1 단백질의 전기영동 이미지의 상대적인 강도를 나타낸 결과이고, 도 4는 도 2에서 동정된 단백질의 발현량을 확인한 웨스턴 블롯한 실험 결과 이미지 이고, 도 5a 내지 5d는 도 4의 상대적인 강도를 나타낸 결과이다. 도 6a 내지 6d는 정상 대조군과 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 다르게 발현되는 단백질들을 ESI-Q-TOF를 이용하여 동정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0051] 실시예 1. 시료준비 (Sample preparation)

[0052] 알츠하이머 질병의 주요 원인 물질인 타우(tau) 단백질을 과다 발현시켜 알츠하이머 질병을 유발시킨 마우스(S. B. Shim., et al., Neuroscience 146 (2007) 730-740 논문 참조)는 식품의약품안전청에서 제공되었다. 타우 형질전환 마우스는 NSE 프로모터에 인체 wild type 타우 cDNA (htau23) (GenBank accession No. J03778)를 연결한 pNSE/htau23 유전자를 BDF1 마우스의 수정된 난자내의 남성 전핵(male pronucleus)에 미세주입(microinjection)하고 가임시킨 ICR 마우스에 착상시킨 후 태어난 새끼를 wild type BDF1 마우스와 교배하여 제작되었다. 인체 타우 유전자가 과발현 되도록 제작된 형질전환 마우스는 알츠하이머병이 유발되게 되며 이는 형질전환 유전자의 발현과 행동학적 증상의 관찰 등에 의해 확인되었다.

[0053] 알츠하이머 질병이 진행되는 초기와 중기 단계의 단백질 발현을 확인하기 위하여 마우스가 6개월과 12개월이 되었을 때 마우스의 대뇌에서 피질 부분만을 분리하였다 (S. B. Shim., et al., Neuroscience 146 (2007) 730-

740 - tau 단백질의 발현된 정도를 통하여 6개월과 12개월 초기와 중기로 판단하여 구분). 분리된 마우스의 대뇌 피질부분에서 PlusOne Sampe Grinding Kit (GE Healthcare, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였다. Grinding resin이 포함되어 있는 튜브를 4℃, 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하고 상층액을 제거한 후 샘플 버퍼 (8 M urea, 2 % CHAPS, 40 Mm DTT, 0.5 % IPF buffer, 및 2 % protease inhibitor) 500 µl와 조직 100 mg을 넣고 막자를 이용하여 1분간 조직을 파쇄시킨 후 4℃, 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 상층액만을 새로운 튜브에 옮기고 Bradford 방법을 이용하여 단백질 농도를 분석하고 -70℃에 보관하였다. 시료 완충액의 조성은 다음과 같다: 8 M urea, 2 % CHAPS, 40 Mm DTT, 0.5 % IPF buffer, and 2 % protease inhibitor.

[0054] 실시예 2: 이차원 전기영동(Two-Dimensional Electrophoresis)

[0055] 2-1. 일차원 전기영동(Isoelectrofocusing, IEF)

[0056] 시료 완충액으로 처리된 시료의 단백질 양을 100 µg으로 하여 일차원 전기영동을 실시하였다. 시료의 총 부피가 450 µl가 되게 rehydration 완충액(8 M urea, 2% CHAPS, 13 mM DTT, 1 % IPG buffer)을 섞어 일차원 전기영동을 할 수 있는 24cm 스트립 홀더(strip holder)에 넣은 뒤 pH 4-7 범위의 Drystrip(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 스트립 홀더에 장착하였다. 20℃에서 5시간가량 스트립(strip)을 rehydration 완충액으로 불려준 뒤 다음과 같은 조건으로 일차원 전기영동을 수행하였다: 200 V 30분, 500 V 1분, 8,000 V 45분, 8,000 V 72000 Vhrs, 11시간 30분. 총 146 kVhr. 일차원 전기영동은 IPGphor(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 수행하였다.

[0057] 2-2. 이차원 전기영동(SDS-PAGE)

[0058] 이차원 전기영동을 하기 위해, 일차원 전기영동이 끝난 스트립을 캡튜브(cap tube)에 넣고 일차 평형화 용액[6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT] 10 ml에 15분간 반응시킨 후 버리고, 다시 이차 평형화 용액 [6 M urea, 50 mM Tris-cl(pH 8.8), 30% glycerol, 2% SDS, 1.5% IAA] 10 ml을 넣고 10분간 재반응시켰다. 11~16%로 만들어진 폴리아크릴아마이드 겔(Polyacrylamide gel, 25×30 cm) 위에 반응이 끝난 스트립을 장착하고 0.5% 아가로스로 실링(sealing)하였다. 이차원 전기영동은 Ettan Dalt(Amerahsm Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 전기영동 완충액(24 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS)을 넣고 전기영동을 실시하였다. 전기영동 조건은 다음과 같다: 55 V 1시간, 160 V 1시간, 360 V 4시간.

[0059] 2-3. 염색(Staining)

[0060] 이차원 전기영동이 끝난 뒤 겔을 가시화시키기 위해 은(silver) 염색을 하였다. 은 염색과정은 다음과 같다. 50% 메탄올, 12% 아세트산으로 이루어진 용액에 3시간가량 반응시켜 고정화(Fixation)하고, 50% 에탄올로 20분간 3회 세척하고, 0.2% 티오황산나트륨(Sodium thiosulfate) 용액으로 1분간 반응시켜 민감화(Sensitizing)하고, 증류수(distilled water, DW)로 세척하고, 0.1% 질산은(Silver nitrate), 0.075% 포름알데히드(formaldehyde, 37%) 용액으로 20분간 반응시켜 반응화(Improving)하고, 증류수로 다시 세척하고, 미리 차게 만든 6% 탄산나트륨(Sodium carbonate), 0.075% 포름알데히드(37%) 용액으로 약 7분간 반응시켜 가시화(Developing)하고, 50% 메탄올, 12% 아세트산 용액으로 처리하여 반응을 정지시켰다.

[0061] 2-4. 이미지 분석(Image Analysis)

[0062] 실험한 겔들을 분석하기 위해 먼저 ImageScanner(Amersham Pharmacia Bio-tech, Uppsala, Sweden)로 스캔하였다. 단백질 발현이 차이나는 점들을 분석하기 위해 이차원 전기영동 분석 전용 프로그램인 ImageMaster(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 분석을 수행하였다.

[0063] 도 1a는 6개월된 정상 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1b는 6개월된 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1c는 12개월된 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D 전기영동 이미지이고, 도 1d는 12개월된 정상 마우스의 대뇌 피질에서 감소 및 증가한 단백질을 나타내는 2-D

전기영동 이미지이다. 2-D 전기영동 이미지 결과에서 발현의 차이가 있는 점(spot)들을 이하에서 분석하였다.

[0064] 실시예 3: 질량분석 (ESI-Q-TOF/MS/MS Analysis)

[0065] 이미지 분석프로그램으로 찾아낸 점들을 동정하기 위해 이차원 전기영동이 끝난 젤로부터 점(spot)들을 오려냈다. 먼저 은을 없애기 위해 30 mM 페리시안화칼륨(Potassium Ferricyanide)과 100 mM 티오황산나트륨(Sodium Thiosulfate) 용액이 1:1로 섞인 탈염색 용액 100 μ l을 젤 조각에 5분간 처리하였다. 이후에 400 μ l의 물로 3번 세척하였다.

[0066] 다시 200 mM 탄화수소암모늄(ammonium bicarbonate)으로 반응한 뒤 물로 세척하였다. 아세토나이트릴(Acetonitrile)을 넣어 젤이 하얗게 변할 때까지 탈수시켰다. 이 젤을 진공 원심분리기(Speed vacuum centrifuge)에 넣어서 젤로부터 용액을 완전히 없앴다. 건조된 젤 조각은 0.2 μ g의 트립신(promega)이 들어있는 50 mM의 탄화수소암모늄 20 μ l로 얼음(ice)상에서 45분간 함수시켰다. 반응용액을 제거 후 50 mM의 탄화수소암모늄 30 μ l을 넣은 후 37°C로 밤새 반응시켰다. 그 펩티드 용액은 C18 나노 칼럼(nano column, home made)를 이용하여 염분을 제거하였다.

[0067] 크로마토그래피 칼럼(Custom-made chromatographic columns)은 질량분석 이전에 펩티드 염분제거와 농축용으로 사용되었다. Poros reverse R2 material(20-30 μ m bead size, PerSeptive Biosystems)의 100-300 nL로 구성된 칼럼은 단단히 조여진 GELoader tip(Eppendorf, hamburg, Germany)에 팩킹하였다. 10 mL 실린지(syringe)는 공기압으로 칼럼을 통해 물질을 통과시켰다. 펩티드 용액 30 μ l은 5% 포름산(formic acid) 용액 내에서 희석되어 칼럼 안으로 이동되었다. 그리고 30 μ l은 5% 포름산 용액으로 세척되었다. MS/MS분석을 위해 펩티드는 borosilicate nanoelectrospray needle(Micromass, Manchester, UK)에 50% methanol/49% H₂O/1% formic acid와 섞여 용출시켰다.

[0068] MS/MS는 Q-TOF2 mass spectrometer(Micromass, Mancheser, UK)상에서 nano-ESI로 수행되어진다. 그 소스(source) 온도는 80°C이다. 1 kV의 전압은 안정된 flow rate(10-30 nL/min)를 생성하기 위해 0-5 psi의 nitrogen back-pressure와 혼합되어진 이온 소스(ion source)에서 borosilicate nanoelectrospray needles(EconoTip™, New Objective, USA)에 적용하였다. 그 원뿔(cone) 전류는 40 V이다. Quadrupole analyser는 hexapole collision cell에서 분절화를 하기 위해 전구 이온(precursor ion)을 선택하는데 사용되었다. 충돌가스(collison gas)는 6-7 x 10⁻⁵ mbar의 아르곤(Ar)이며 충돌 에너지(collison energy)는 20-30 V이다. 생성 이온은 반사기(reflector)와 작은 통로판 검사기(micro channel plate detector) 그리고 time-to-digital 변환기에 맞추어지는 TOF 분석기를 이용하여 분석된다. 그 자료는 Mass Lynx Widows NT PC system을 이용하여 진행되었다.

[0069] 단백질을 동정하기 위해 모든 MS/MS 스펙트럼은 MASCOT search program(www.matrixscience.com)을 이용하여 NCBInr 데이터베이스에서 단백질 서열을 조사하였다.

[0070] 실시예 4. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)

[0071] 4-1. SDS-PAGE 전기영동

[0072] 정상 및 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질 단백질 10 μ g을 12% SDS-PAGE (Carbonic anhydrase II, Glutathione S-transferase P1, Secerin-1)와 8% SDS-PAGE (ATP6V1E) 전기영동을 실시하였다. 대뇌 피질에서 분리한 단백질 시료 10 μ g에 SDS-PAGE loading 완충액 (60 mM Tris-Cl, 2% SDS, 25% Glycerol, 14.4 mM 2-Mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue, pH 6.8) 2.5 μ l을 섞어 mini gel (6×8 cm)에서 분자량별(separating gel상에서 100 V로 로딩)로 분리하였다. 이때 사용한 running 완충액의 조성은 0.025 M Tris-Cl, 0.192 M Glycine, 1% SDS(pH 8.3)이다.

[0073] 4-2. 블롯팅(Blotting)

[0074] SDS-PAGE가 끝난 뒤 젤의 단백질을 Semi-dry 형태의 transfer kit(Bio-rad)을 이용하여 NitroCellulose 막 (Carbonic anhydrase II, Glutathione S-transferase P1, Secerin 1)과 PVDF(polyvinylidene fluoride)막

(ATP6V1E)으로 옮겼다. 50 mA에서 1시간 30분 동안 실시하였다.

[0075] 4-3. 항체반응

[0076] 1) Glutathione S-transferase P1은 막(membrane)을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹(blocking)시켰다. 일차 항체로는 Goat polyclonal Glutathione S-transferase를 사용하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/3000으로 하였다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 사용하고, 희석농도는 1/20,000이었다. 이차항체 반응 후에 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시켰다.

[0077] 2) Carbonic anhydrase II membrane을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 일차 항체로는 Rabbit polyclonal carbonic anhydryase II를 사용하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/20,000으로 하였다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 사용하고, 희석농도는 1/20,000이었다. 이차항체 반응 후에 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시켰다.

[0078] 3) V-type proton ATPase subunit E 1 (Atp6v1e1) Membrane을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 일차 항체로는 Chicken polyclonal ATP6V1E1를 사용하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차 항체의 희석농도는 1/5000으로 하였다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-chicken IgY를 사용하고, 희석농도는 1/10,000이었다. 이차항체 반응 후에 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시켰다.

[0079] 4) Secernin-1 Membrane을 5% w/v nonfat dry milk로 실온에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 일차 항체로는 Rabbit polyclonal secernin-1이며 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체의 희석농도는 1/500으로 하였다. TBS/T(0.1%, Tris-buffered saline-tween 20)로 세척한 후에 이차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG를 사용하고, 희석농도는 1/1000이었다. 이차항체 반응 후에 TBS/T로 세척하고 난 뒤, ECL (Pierce Biotechnology, Inc., USA.)로 가시화 시켰다.

[0080] 상기와 같이 이차원 전기영동실험을 수행한 결과, 다음과 같이 정상 개체의 대뇌 피질에서 보다 알츠하이머병 유발 개체의 대뇌 피질에서 발현량이 감소 또는 증가하는 단백질들이 동정되었다.

[0081] 1. 알츠하이머병 유발 개체의 대뇌 피질에서 발현이 현저히 감소 또는 증가하는 단백질

[0082] 알츠하이머병이 진행되는 초기 단계인 6개월과 중기 단계인 12개월에 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질을 대상으로 전기영동을 수행한 결과, 초기 단계에서 발현이 증가 또는 감소한 단백질(감소:#1140, 증가:724)과 중기 단계에서 발현이 감소한 단백질(#986, 1039)을 찾을 수 있었다 (도 1a 내지 1d).

[0083] ESI-Q-TOF를 수행한 결과 초기 및 중기 단계의 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 발현이 감소 또는 증가한 단백질을 하기 표 1과 같이 동정하였다.

[0084] [표 1]

Spot No.	Classification	protein	Mw(Da)	Scorea
724	Up-regulation	Secernin- 1	46296.6	90.29
986	Down-regulation	V-typeprotonATPasesubunitE1(Atp6v1e1)	26140.8	100.26
1039	Down-regulation	carbonicanhydraseII	29165	82
1140	Down-regulation	GlutathioneS-transferaseP1	23594.1	40.27

[0085]

[0086] 2. 단백질의 아미노산 서열의 결정

[0087] 상기와 같이 정상 대조군과 알츠하이머병 유발 마우스의 대뇌 피질에서 발현량이 현저히 감소 또는 증가하는 단백질들을 ESI-Q-TOF를 이용하여 동정하여 도 6a 내지 도 6d의 결과를 얻었다. 도면에서 빨간색은 매치된 트립신 분해 펩티드의 서열을 나타낸다.

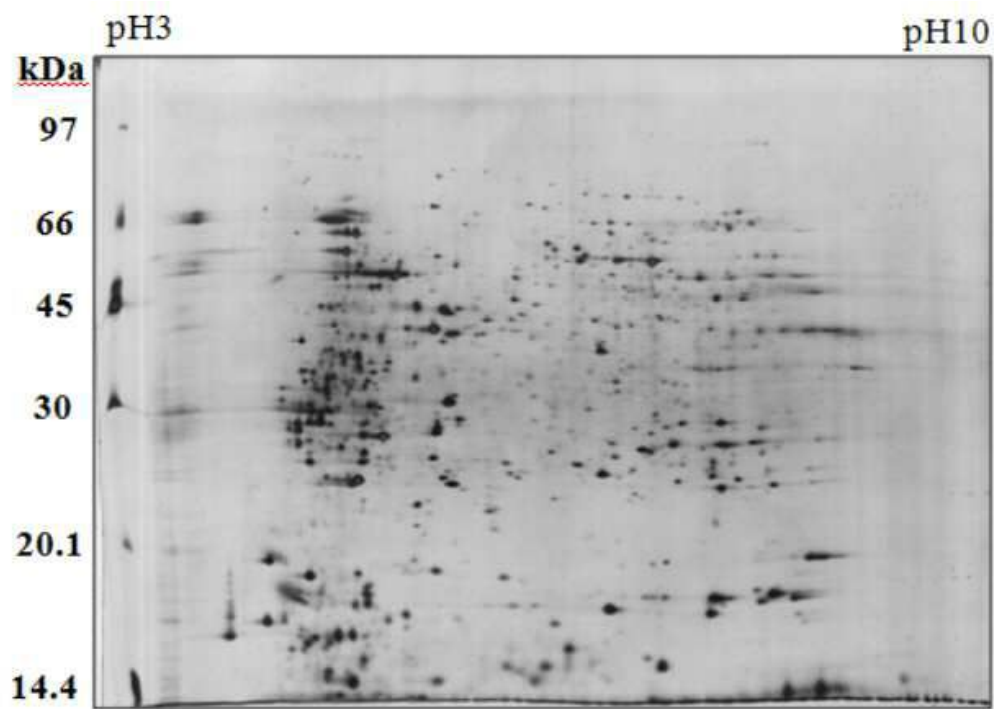
[0088] 이들 단백질의 아미노산 서열은 NCBInr 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 서치하여 Secernin-1 (서열번호 1), V-typeprotonATPasesubunitE1(Atp6v1e1) (서열번호 2), carbonicanhydraseII (서열번호 3), GlutathioneS-transferaseP1 (서열번호 4)을 가짐을 확인하였다.

[0089] 3. 웨스턴 블롯팅 시험결과

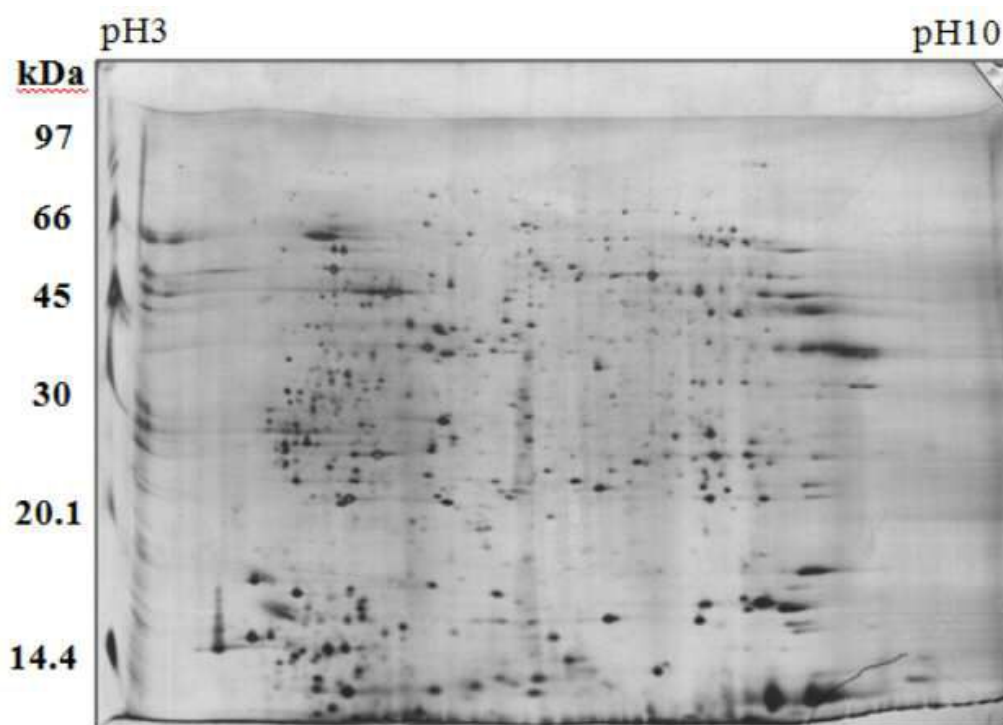
[0090] 상기 발현이 변화된 단백질들로 동정된 Secernin-1, V-typeprotonATPasesubunitE1(Atp6v1e1), carbonicanhydraseII, 및 GlutathioneS-transferaseP1을 웨스턴 블롯 실험 결과를 도 4에 나타내고, 그 상대적인 강도를 도 5a 내지 5d에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이, 알츠하이머병의 진행정도에 따라 단백질 발현 변화가 초기 단계에서는 Glutathione S-transferase P1이 감소하고 Secernin-1이 증가하였으며, 중기 단계에서는 V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1)과 carbonicanhydrase II이 감소하는 것으로 나타났다.

[0091] 이것으로 보아 Secernin-1, V-type proton ATPase subunit E1(Atp6v1e1), carbonicanhydrase II, 및 Glutathione S-transferase P1은 알츠하이머병 초기 단계 또는 중기 단계의 치료제로서의 사용과 연구에 매우 유용할 것으로 생각된다.

도면1c



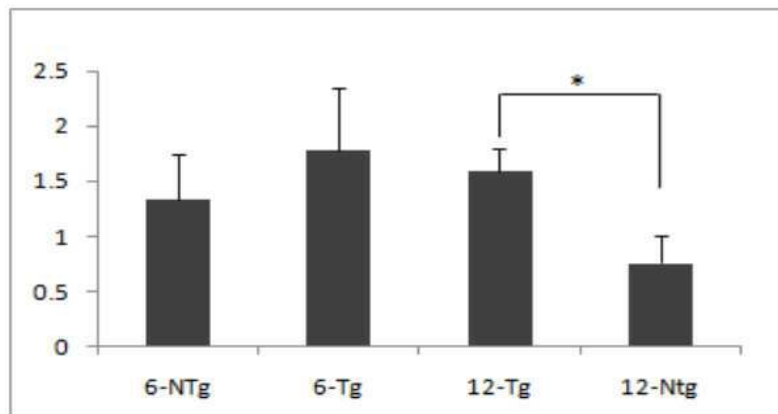
도면1d



도면2

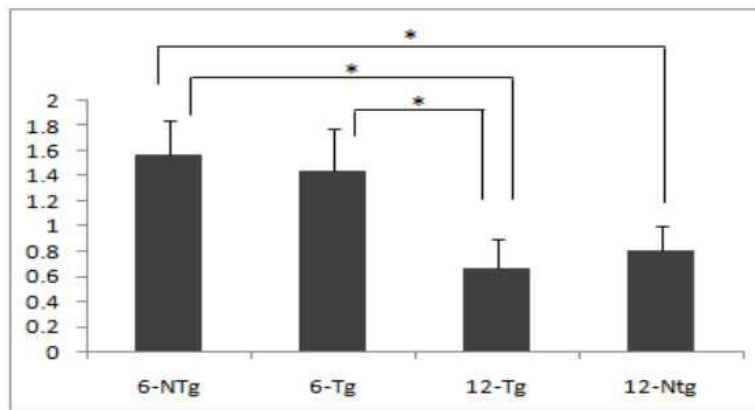
Spot No.	6-NTg	6-Tg	12-Tg	12-NTg
# 724				
# 986				
# 1039				
# 1140				

도면3a



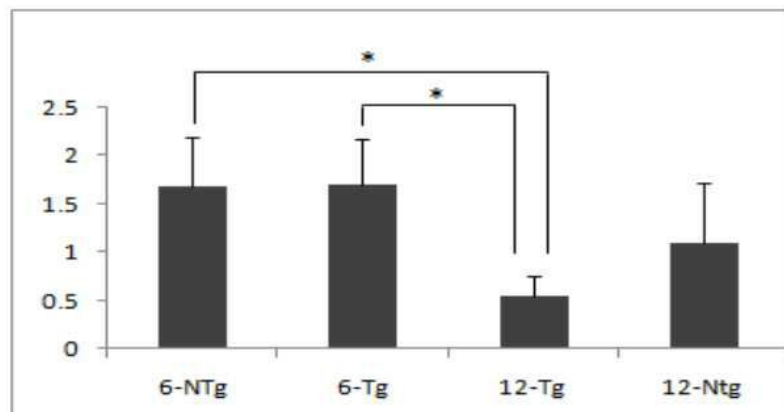
Secernin-1

도면3b



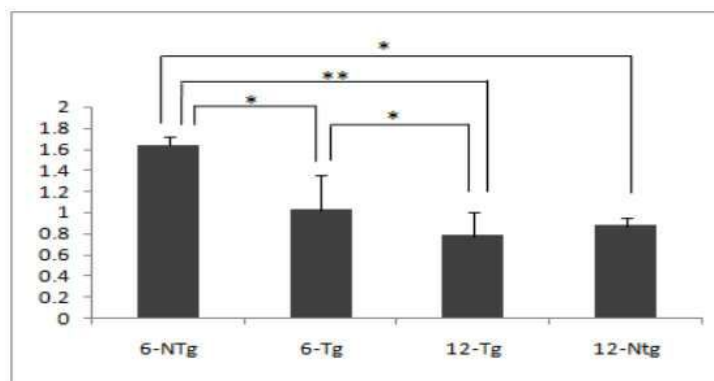
V-type proton ATPase subunit E1 (Atp6v1e1)

도면3c



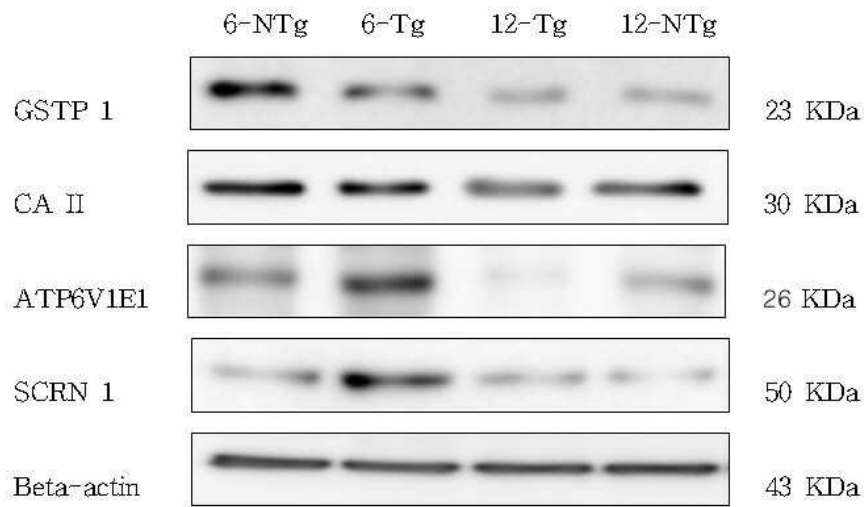
Carbonic anhydrase

도면3d



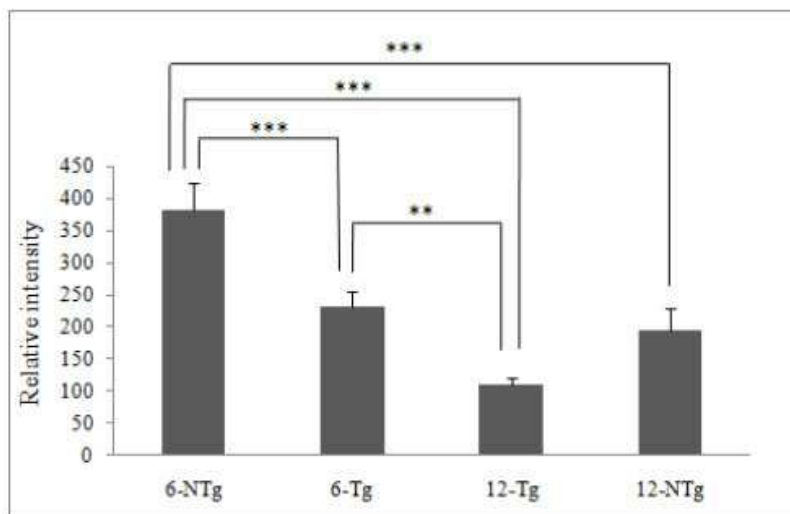
Glutathione S-transferase P1

도면4



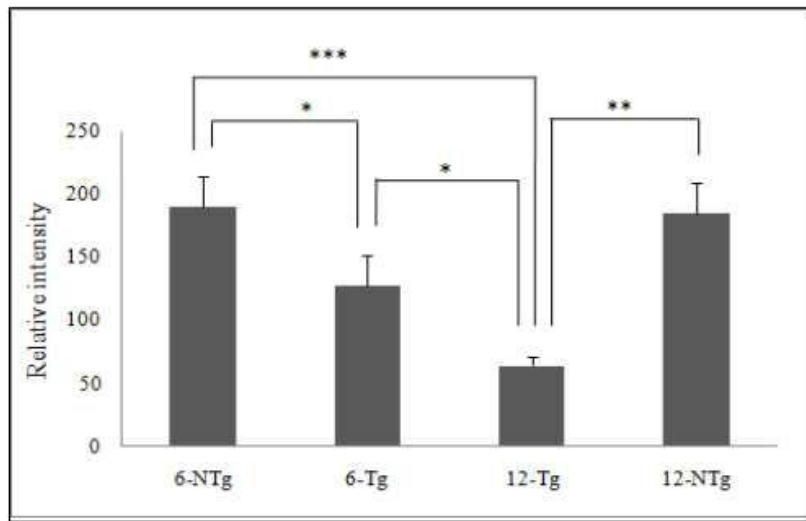
도면5a

(A) GSTP1



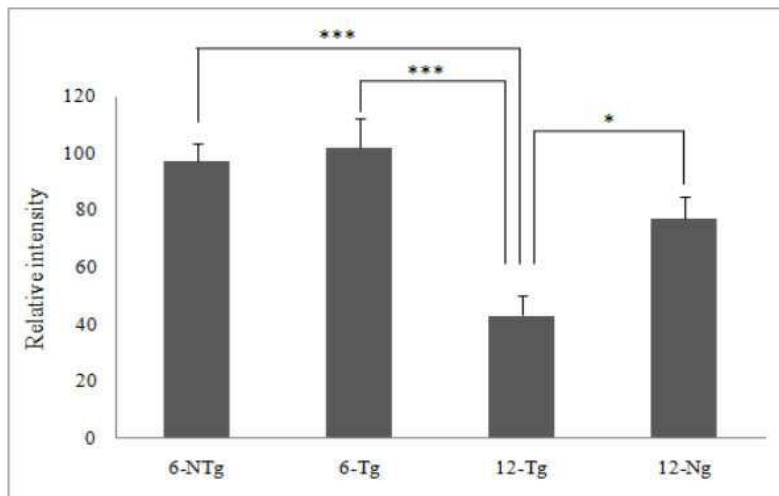
도면5b

(B) CA II



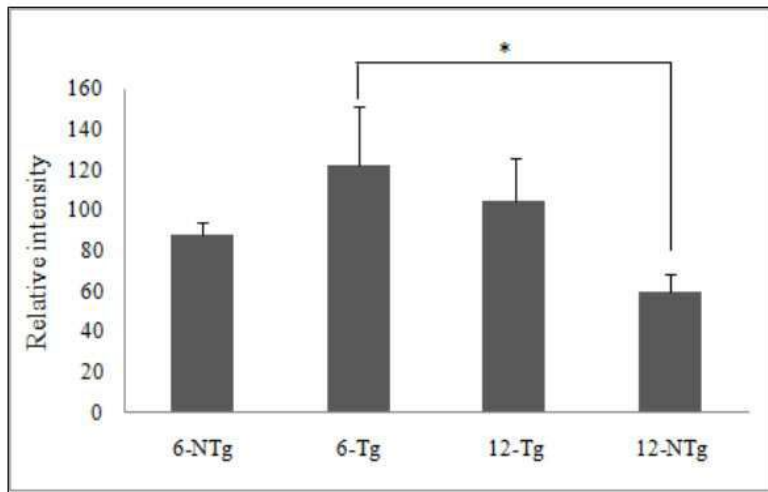
도면5c

(C) ATP6V1E1



도면5d

(D) SCR N 1



도면6a

gagcctggagctcgggaaaccggagcgcggcggtcttctgcgctacggatgcagaggct 60
 gtaacctagccgcccagcgcgcccccaactccgcagtcgcagcatcagcaccgttggaccc 120
 ggctggagccggctgcttggcaggatgtctggcgcgcctccaagttactcttttgtggct 180
 ctgccacctcgagctaaggacggcttgggtggtatttgggaaaaattcagctcggcccaga 240
 gatgaagtccaggaggttgtgtatttccagctgttgaccatgacgctgagagcaaagtt 300
 gagtgcacttacatctcaatcgaccaagtccccaggaccacgccatcgtgataagcaga 360
 cctgcctggctcttggggggcagaaatgggagccaatgaacatggggtatgcatagccaac 420
 gaagccatcaatgccagagaaccagctgctgagacggaagccttactgggaatggatctg 480
 gtcaggcttggcttagaacgagggacaacagctaaagaagccctagacatcattgtttct 540
 ttattggatgagcacggacaaggtggaaattattatgaagatgccactcctgccatagc 600
 ttccaaagtgcatactgctgggtggaccgagatgaagcctgggtgctggagactgtaggg 660
 aagtattgggctgctgagagaatcacagagggagtgagggtgcatttgaaccatctttcc 720
 ctgcgactaagctggatgaagagcaccagaaactcaggacttatgctcagagtcaaggc 780
 tgggtggacgggagacgacgaattcaactttgccagggtttttctccagccgatgaccgt 840
 ttggactgctgtgcaggccaagacagcttagaaaagcaagaagaagcatcactgtgcag 900
 acgatgattaacatcttacgagacaaagccagtggtgtttgcatagattctgagctttc 960
 ctcaccacagccagtatagtgctgtcttgctcagaacagaagttcaccgtgtatccac 1020
 tacttcaccgggaccccagatccttccagggtccatattcaagcctttcatctttgttgat 1080
 gatgtaaaacttgtcccaaagcacagtcaccctgttttggtgacgatgaccagccaaa 1140
 aaggaacctcgggtccaggagaagccagaccgcccacatgagctgtacaaggcacacgag 1200
 tgggcacgtgctgtcatcgagagtgacgaggagcaaggtcgaccctgaggaagaccatg 1260
 ctggagttggagaagcaaggcctggaggccatggacgagattctgagcagccccgagccc 1320
 ccggaccccgcgaggtgggggacctattctatgactgtgtggacaccgagatgaagttc 1380
 ttttaagtgatgtaagcaccctcacccttactcaaaacttcccacccgactaaattaccag 1440
 cagataaacactcttctgtgtgagtaaacggagagttaccatgtggcctccttgtgtcta 1500
 aatgttccctctgttcagcttagcaaccctccccctttgctatgtaacgcgatcccatt 1560
 tgccctcttgctccattgtgtgataagctatgggctgaagatgttcttatatttcagtga 1620
 caatggacaccttagcttcttatgaggaacttgagttccctccgccttggacagggtgc 1680
 agggccacgctgggtgggaaagacaagagctgtgaaggcctgggtccctctctagatagt 1740
 gtcttcttaggggttaacaaaaggcttttgttcatacc 1777

도면6b

181 acattgagaaaggctgccttgtgcaaacgcaagactgaagattatggaatactacgaga
241 agaaagaaaagcagattgagcagcagaagaaaattcagatgtccaacttgatgaatcaag
301 caaggctcaaagtcctcagagcaagggatgacctcatcactgatctgctaaatgaggcaa
361 agcagagactcagtaagggtggtaaaagatacgaccogttaccaagtgctgctggatgggc
421 tggctccttcagggttgtaccagctgctggagcctcgaatgatcgtgcgttgagaaaac
481 aagatttccctttggtgaaggccgcagtacaaaaagcaatccctatgtataaaattgcta
541 ccaaaaaggatgttgatgtccagattgaccaggaggcctacctgcctgaggaaatagctg

도면6c

agcgccggggcgagctggagagcgcgagctgctgcagagcgggtcggacgcagaagcgg 60
agagcagccggaggggcgccccgccccagcaagggtgcgggggcccctgaacaccgaggcc 120
tccgctgtcacctctgctgtcacctccgtccgccacctccacggctcctccccctgc 180
tcaggctccactcggctcccctcccttgggcccgcagagcaccaagttggcgggagcctata 240
aaagccggagcgtgagaccgcgacacacactgcaggaccgctagacggacgacaacttc 300
tgctctgccccaatcaccggcgtgacctgtcccaccactggggatacagcaagcacaac 360
ggaccagagaactggcacaaggacttccccattgccaatggagaccggcagtcacctgtg 420
gacattgacacagcaactgcccagcatgacctgcccctacagcctctgctcatatcttat 480
gataaagctgcgtccaagagcatgtcaacaacggccactcctttaacgttgagtttgat 540
gactctcaggacaatgcagtgctgaaaggaggacccctcagtgactcctacagattgatc 600
cagtttcactttcactggggctcatctgatggccagggtctgagcacactgtgaacaaa 660
aaaaaatatgctgcagagcttcacttggttcacttggaaacaccaaataatggggactttgga 720
aaagctgtgcagcaaccggatggattggctgttttgggtattttttgaagattggacct 780
gcctcacaaggccttcagaaagtccttgaagcactgcattccattaaaacaaaggggaag 840
cgtgcgcccttgcctaacttcgatccttgctcccttcttcttgaaaacttgactactgg 900
acataccctggctctctgaccactccgctctgctggaatgtgtgacctggatcgtgctc 960
agggagcccattactgtcagcagcagcagatgtctcatttccgtacgctgaacttcaat 1020
gaggagggggatgctgaagaagcgtggtggacaactggcgtccagctcagccgctaaag 1080
aatagaaagatcaaagcgtcctttaagtaaaacaacctgcagcaggggtccgaaggga 1140
caagtgtgaccgctctctgtagctaagcacagttaggctgggtgatttggatcccgaact 1200
cgcacttggtattgttagaccttttacctctcatccgttgtgcttactaacaaaatgtgaa 1260
aagcaagaccaggtgtctcatgtggtggcagcacagtggcaggccagtggtcaacttag 1320
ggcatcttttctctgccacggcagcgcaatgcaaagacagacatggcctcttgcttctc 1380
ttcacagccataggataatgaatactcaggcctgtttgttaaaatgctatttttaaaacc 1440
atatgaaggtaggataatattacaagtcacatcatgagacaaactgaagtaacttag 1500
gcaaaacaggtaaaacagtcatagttttgtgattataaatgagatgaatgttcaccttc 1560
caagatcttatattaaagaaaaatttttaaaagccttatatattttagcaaaagtatttc 1620
ttaaatatgaattatgtttataacttagtgacttttgatttctagagggtgaaatgaggat 1680
gtaaaaattgatatagtttgtgatacagagtatatttcccttcagataacataccacaaca 1740
caatggataatgtatttttagatatatttcttaataaaattgagaactctaaaaaaaaa 1800
aaaaaaa 1807

도면6d

361 tgtcacccctcatctacaccaactatgagaatggtaagaatgactacgtgaaggccctgcc
421 tgggcatctgaagccttttgagaccctgctgtcccagaaccaggagggaagcctttcat
481 cgtgggtgaccagatctcctttgccgattacaacttgctggacctgctgctgatccacca
541 agtcctggccctggctgcctggacaacttccccctgctctctgcctatgtggctgcct
601 cagtgcccggcccaagatcaaggcctttctgtcctccccggaacatgtgaaccgtcccat

서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Proteinic markers for diagnosing Alzheimer's disease
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 1777
 <212> PRT
 <213> Tau transgenic mouse
 <400> 1

Gly Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Cys
 20 25 30

Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys Gly Cys Thr Ala Cys Gly
 35 40 45

Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Thr Ala Ala
 50 55 60

Cys Cys Thr Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Cys Gly
 65 70 75 80

Cys Cys Cys Cys Cys Ala Ala Cys Thr Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr
 85 90 95

Cys Gly Cys Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Gly

100 105 110

Thr Thr Gly Gly Ala Cys Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 115 120 125

Cys Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Gly Gly Cys Ala Gly Gly
 130 135 140

Ala Thr Gly Thr Cys Thr Gly Gly Cys Gly Cys Gly Cys Cys Thr Cys
 145 150 155 160

Cys Ala Ala Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr
 165 170 175

Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys Gly Ala

180	185	190	
Gly Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly			
195	200	205	
Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala			
210	215	220	
Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala			
225	230	235	240
Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly			
245	250	255	
Thr Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys			
260	265	270	
Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Thr			
275	280	285	
Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Ala Gly Thr			
290	295	300	
Gly Cys Ala Cys Thr Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Ala Thr			
305	310	315	320
Cys Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Cys Cys Ala Gly Gly			
325	330	335	
Ala Cys Cys Cys Ala Cys Gly Cys Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala			
340	345	350	
Thr Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly			
355	360	365	
Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala Ala			
370	375	380	
Ala Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys			
385	390	395	400
Ala Thr Gly Gly Gly Gly Thr Ala Thr Gly Cys Ala Thr Ala Gly Cys			
405	410	415	
Cys Ala Ala Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr			
420	425	430	
Gly Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly			

435 440 445
 Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Gly Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr
 450 455 460

 Ala Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly
 465 470 475 480
 Gly Thr Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Cys Thr Thr Ala Gly
 485 490 495
 Ala Ala Cys Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys
 500 505 510
 Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Thr Ala Gly Ala Cys
 515 520 525
 Ala Thr Cys Ala Thr Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr Ala Thr

 530 535 540
 Thr Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Cys Ala Cys Gly Gly Ala Cys Ala
 545 550 555 560
 Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr
 565 570 575
 Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr
 580 585 590
 Gly Cys Cys Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly
 595 600 605

 Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly
 610 615 620
 Gly Ala Cys Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 625 630 635 640
 Gly Gly Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Thr
 645 650 655
 Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Cys Thr
 660 665 670
 Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Thr Cys Ala Cys Ala Gly

675 680 685

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr
690 695 700
Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys
705 710 715 720
Cys Thr Cys Gly Cys Gly Ala Cys Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly
725 730 735
Ala Thr Gly Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala
740 745 750

Ala Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Ala Thr Gly Cys Thr
755 760 765
Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Thr
770 775 780
Gly Gly Ala Cys Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala
785 790 795 800
Ala Thr Thr Cys Ala Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly
805 810 815
Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly
820 825 830
Ala Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Thr Thr Gly Gly Ala Cys Thr Gly
835 840 845
Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys
850 855 860
Ala Gly Cys Thr Thr Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly
865 870 875 880
Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr
885 890 895

Gly Cys Ala Gly Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Ala Cys
900 905 910
Ala Thr Cys Thr Thr Ala Cys Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Gly
915 920 925
Cys Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr Thr Thr Gly Cys Ala Thr
930 935 940

Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Gly Ala Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys
945 950 955 960
Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Ala
965 970 975
Thr Ala Gly Thr Gly Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Gly Cys Cys
980 985 990
Thr Cys Ala Gly Ala Ala Cys Ala Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala
995 1000 1005
Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Cys Thr
1010 1015 1020
Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Ala Gly Ala
1025 1030 1035 1040
Thr Cys Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Thr Ala
1045 1050 1055
Thr Thr Cys Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Thr Cys Ala Thr Cys Thr
1060 1065 1070
Thr Thr Gly Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Thr Ala Ala Ala
1075 1080 1085
Ala Cys Thr Thr Gly Thr Cys Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala
1090 1095 1100
Cys Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr Gly
1105 1110 1115 1120
Gly Thr Gly Ala Cys Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys
1125 1130 1135
Cys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Cys Cys Thr Cys Gly Gly
1140 1145 1150
Thr Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Ala Gly
1155 1160 1165
Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr
1170 1175 1180
Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala Cys Ala Cys Gly Ala Gly

1185 1190 1195 1200
 Thr Gly Gly Gly Cys Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys Ala
 1205 1210 1215
 Thr Cys Gly Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Cys Gly Ala Gly Gly Ala
 1220 1225 1230
 Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly
 1235 1240 1245
 Ala Gly Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Thr Gly Cys Thr Gly Gly

 1250 1255 1260
 Ala Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly
 1265 1270 1275 1280
 Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys
 1285 1290 1295
 Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Gly Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys
 1300 1305 1310
 Cys Cys Gly Ala Gly Cys Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Cys Cys Cys
 1315 1320 1325

 Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Cys
 1330 1335 1340
 Cys Thr Ala Thr Thr Cys Thr Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly Thr Gly
 1345 1350 1355 1360
 Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala
 1365 1370 1375
 Gly Thr Thr Cys Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Gly Ala Thr Gly Thr
 1380 1385 1390
 Ala Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Cys Thr Thr

 1395 1400 1405
 Ala Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys
 1410 1415 1420
 Cys Cys Gly Ala Cys Thr Ala Ala Ala Thr Thr Ala Cys Cys Ala Gly
 1425 1430 1435 1440
 Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Ala Cys Ala Cys Thr Cys Thr Thr Cys

1445 1450 1455
 Thr Gly Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Ala Ala Cys Cys Gly Ala
 1460 1465 1470

 Gly Ala Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Cys
 1475 1480 1485
 Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Ala Ala Ala Thr Gly
 1490 1495 1500
 Thr Thr Cys Cys Cys Thr Cys Thr Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr
 1505 1510 1515 1520
 Thr Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Cys Cys
 1525 1530 1535
 Thr Thr Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Thr Ala Ala Cys Gly Cys Gly

 1540 1545 1550
 Ala Thr Cys Cys Cys Ala Thr Thr Thr Gly Cys Cys Thr Cys Thr Thr
 1555 1560 1565
 Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Gly Ala Thr Ala
 1570 1575 1580
 Ala Gly Cys Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly
 1585 1590 1595 1600
 Ala Thr Gly Thr Thr Cys Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala
 1605 1610 1615

 Gly Thr Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr
 1620 1625 1630
 Thr Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala
 1635 1640 1645
 Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr Cys Cys Cys Thr Cys Cys Gly
 1650 1655 1660
 Cys Cys Thr Thr Gly Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys
 1665 1670 1675 1680
 Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly

 1685 1690 1695

Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr
1700 1705 1710
Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr
1715 1720 1725
Cys Thr Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Thr
1730 1735 1740
Cys Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala Ala
1745 1750 1755 1760

Ala Gly Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly Thr Thr Cys Ala Thr Ala Cys
1765 1770 1775
Cys

<210> 2
<211> 420
<212> PRT
<213> Tau transgenic mouse
<400> 2

Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gly Thr Cys Gly
1 5 10 15
Cys Cys Thr Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Ala Cys Gly Cys Ala Ala
20 25 30
Ala Gly Ala Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr Ala Thr Gly Gly
35 40 45
Ala Ala Thr Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala
50 55 60
Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly
65 70 75 80
Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Thr Cys
85 90 95
Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Ala Cys Thr Thr Gly Ala Thr
100 105 110

Gly Ala Ala Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Thr Cys

115 120 125
 Ala Ala Ala Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Cys
 145 150 155 160
 Thr Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly
 165 170 175
 Gly Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Ala

 180 185 190
 Gly Thr Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Gly Ala
 195 200 205
 Thr Ala Cys Gly Ala Cys Cys Cys Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Ala
 210 215 220
 Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Thr Gly Gly Gly Cys
 225 230 235 240
 Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Thr Thr
 245 250 255

 Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly
 260 265 270
 Cys Cys Thr Cys Gly Ala Ala Thr Gly Ala Thr Cys Gly Thr Gly Cys
 275 280 285
 Gly Thr Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala Gly Ala
 290 295 300
 Thr Thr Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly
 305 310 315 320
 Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Gly

 325 330 335
 Cys Ala Ala Thr Cys Cys Cys Thr Ala Thr Gly Thr Ala Thr Ala Ala
 340 345 350
 Ala Ala Thr Thr Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Gly
 355 360 365
 Gly Ala Thr Gly Thr Thr Gly Ala Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala

370 375 380
 Thr Thr Gly Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Ala
 385 390 395 400

 Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Thr Ala
 405 410 415
 Gly Cys Thr Gly
 420
 <210> 3
 <211> 1807
 <212> PRT
 <213> Tau transgenic mouse
 <400> 3
 Ala Gly Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Cys Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly
 20 25 30
 Cys Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Gly Gly Gly Thr Cys Gly Gly

 35 40 45
 Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Cys Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 50 55 60
 Cys Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Cys Cys Cys
 65 70 75 80
 Cys Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly
 85 90 95
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Cys Cys Cys Thr Cys Gly Ala Ala Cys Ala
 100 105 110

 Cys Cys Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Cys Cys Gly Cys Cys Thr Gly
 115 120 125
 Thr Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Cys Ala
 130 135 140
 Cys Cys Thr Cys Cys Gly Thr Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Cys Thr
 145 150 155 160

Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys
 165 170 175
 Thr Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Cys Thr Cys
 180 185 190
 Gly Gly Thr Cys Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys
 195 200 205
 Cys Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Gly
 210 215 220
 Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Ala Thr Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Gly Cys Cys Gly Gly Ala Cys Gly Gly Thr Gly Cys Gly
 245 250 255
 Ala Cys Cys Cys Gly Cys Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Ala Cys Thr
 260 265 270
 Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Ala Gly Ala Cys Gly
 275 280 285
 Gly Ala Cys Gly Ala Cys Ala Ala Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr
 290 295 300
 Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly
 305 310 315 320
 Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala Cys
 325 330 335
 Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Cys Ala
 340 345 350
 Ala Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Gly Gly Ala Cys Cys Ala Gly Ala
 355 360 365
 Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys
 370 375 380
 Thr Thr Cys Cys Cys Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Ala Thr Gly
 385 390 395 400
 Gly Ala Gly Ala Cys Cys Gly Gly Cys Ala Gly Thr Cys Cys Cys Cys

405 410 415
 Thr Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala
 420 425 430
 Gly Cys Ala Ala Cys Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Thr Gly
 435 440 445
 Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys
 450 455 460
 Thr Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr

 465 470 475 480
 Gly Ala Thr Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Gly Thr Cys Cys Ala
 485 490 495
 Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala
 500 505 510
 Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala Cys
 515 520 525
 Gly Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Thr
 530 535 540

 Cys Thr Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Thr
 545 550 555 560
 Gly Cys Thr Gly Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Cys
 565 570 575
 Cys Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Cys Thr Cys Cys Thr Ala Cys Ala
 580 585 590
 Gly Ala Thr Thr Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Ala
 595 600 605
 Cys Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Cys Ala

 610 615 620
 Thr Cys Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Cys Thr
 625 630 635 640
 Cys Thr Gly Ala Gly Cys Ala Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Ala Ala
 645 650 655
 Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Cys Thr

660 665 670
 Gly Cys Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Gly
 675 680 685

 Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Cys Ala Ala
 690 695 700
 Ala Thr Ala Thr Gly Gly Gly Gly Ala Cys Thr Thr Thr Gly Gly Ala
 705 710 715 720
 Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys
 725 730 735
 Cys Gly Gly Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr
 740 745 750
 Thr Thr Thr Gly Gly Gly Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly

 755 760 765
 Ala Ala Gly Ala Thr Thr Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr
 770 775 780
 Cys Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Ala Ala
 785 790 795 800
 Ala Gly Thr Cys Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Cys Thr Gly
 805 810 815
 Cys Ala Thr Thr Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala
 820 825 830

 Ala Gly Gly Gly Gly Ala Ala Gly Cys Gly Thr Gly Cys Gly Gly Cys
 835 840 845
 Cys Thr Thr Thr Gly Cys Thr Ala Ala Cys Thr Thr Cys Gly Ala Thr
 850 855 860
 Cys Cys Thr Thr Gly Cys Thr Cys Cys Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys
 865 870 875 880
 Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala
 885 890 895
 Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys

 900 905 910

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Gly Cys
 915 920 925
 Cys Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr Gly Thr Gly Thr
 930 935 940
 Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Gly Thr Gly Cys Thr Cys
 945 950 955 960
 Ala Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly
 965 970 975

 Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Gly Ala Gly Cys Ala Gly Ala Thr
 980 985 990
 Gly Thr Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Gly Thr Ala Cys Gly
 995 1000 1005
 Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Gly Ala Gly Gly
 1010 1015 1020
 Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala
 1025 1030 1035 1040
 Ala Gly Cys Gly Ala Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys

 1045 1050 1055
 Thr Gly Gly Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys
 1060 1065 1070
 Cys Gly Cys Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Ala Gly Ala Ala Ala
 1075 1080 1085
 Gly Ala Thr Cys Ala Ala Ala Gly Cys Gly Thr Cys Cys Thr Thr Thr
 1090 1095 1100
 Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly
 1105 1110 1115 1120

 Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Cys Cys Gly Ala Ala Gly
 1125 1130 1135
 Gly Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly
 1140 1145 1150
 Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr Ala Gly Cys Thr Ala Ala Gly
 1155 1160 1165

Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr
 1170 1175 1180
 Gly Ala Thr Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Gly Ala Cys Thr

 1185 1190 1195 1200
 Cys Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Ala Thr Thr Gly Thr Ala
 1205 1210 1215
 Gly Ala Cys Cys Thr Thr Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Ala
 1220 1225 1230
 Thr Cys Cys Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala
 1235 1240 1245
 Ala Cys Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Cys
 1250 1255 1260

 Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys
 1265 1270 1275 1280
 Ala Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala
 1285 1290 1295
 Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Gly Gly Thr
 1300 1305 1310
 Cys Ala Ala Cys Thr Thr Ala Gly Gly Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr
 1315 1320 1325
 Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys Gly Gly Cys Ala Gly

 1330 1335 1340
 Cys Gly Cys Ala Ala Thr Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala
 1345 1350 1355 1360
 Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys Cys Thr Cys Thr Thr Gly Cys Thr
 1365 1370 1375
 Thr Cys Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Thr Ala
 1380 1385 1390
 Gly Gly Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Thr Cys Ala
 1395 1400 1405

 Gly Gly Cys Cys Thr Gly Thr Thr Thr Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala

1410 1415 1420
 Thr Gly Cys Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Cys
 1425 1430 1435 1440
 Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Ala Gly Gly Ala Thr Ala
 1445 1450 1455
 Ala Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Ala
 1460 1465 1470
 Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Cys Thr

 1475 1480 1485
 Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Ala Ala
 1490 1495 1500
 Ala Ala Cys Ala Gly Gly Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Thr Cys
 1505 1510 1515 1520
 Ala Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Thr Ala Thr
 1525 1530 1535
 Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Thr Gly Thr Thr
 1540 1545 1550

 Cys Ala Cys Cys Cys Thr Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Thr Cys Thr
 1555 1560 1565
 Thr Ala Thr Ala Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1570 1575 1580
 Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr Ala
 1585 1590 1595 1600
 Thr Ala Thr Thr Thr Gly Thr Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Thr
 1605 1610 1615
 Ala Thr Thr Cys Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Thr

 1620 1625 1630
 Thr Ala Thr Gly Thr Thr Ala Thr Ala Ala Cys Thr Thr Ala Gly Thr
 1635 1640 1645
 Gly Ala Cys Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Thr Cys Thr Ala Gly
 1650 1655 1660
 Ala Gly Gly Thr Gly Thr Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr

1665 1670 1675 1680
 Gly Thr Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr Ala Thr Ala Gly
 1685 1690 1695

 Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Ala Cys Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr
 1700 1705 1710
 Ala Thr Thr Thr Cys Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala
 1715 1720 1725
 Cys Ala Thr Ala Cys Cys Ala Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala Ala Thr
 1730 1735 1740
 Gly Gly Ala Thr Ala Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Thr Ala Gly
 1745 1750 1755 1760
 Ala Thr Ala Thr Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala

 1765 1770 1775
 Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Ala
 1780 1785 1790
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1795 1800 1805

 <210> 4
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Tau transgenic mouse
 <400> 4

 Thr Gly Thr Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Ala Cys
 1 5 10 15

 Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly
 20 25 30
 Gly Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Gly Thr
 35 40 45
 Gly Ala Ala Gly Gly Cys Cys Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly
 50 55 60
 Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Thr Thr Gly
 65 70 75 80

Ala Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala

85 90 95

Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala

100 105 110

Gly Cys Thr Thr Thr Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Gly Thr Gly

115 120 125

Ala Cys Cys Ala Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr Thr Gly Cys

130 135 140

Cys Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Thr Gly Cys Thr Gly

145 150 155 160

Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Cys

165 170 175

Ala Cys Cys Ala Ala Gly Thr Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Cys Cys

180 185 190

Thr Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Cys Ala Ala Cys

195 200 205

Thr Thr Cys Cys Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Cys Thr Gly

210 215 220

Cys Cys Thr Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Thr

225 230 235 240

Cys Ala Gly Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly

245 250 255

Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Thr Thr Thr Cys Thr Gly Thr

260 265 270

Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Ala Thr Gly Thr

275 280 285

Gly Ala Ala Cys Cys Gly Thr Cys Cys Cys Ala Thr

290 295 300