

|                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                 |                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                            | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A)                                                                                                                                              | (11) 공개번호 10-2008-0071785<br>(43) 공개일자 2008년08월05일 |
| <hr/>                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                 |                                                    |
| (51) Int. Cl.<br><i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61P 25/00</i> (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2007-0010084<br>(22) 출원일자 2007년01월31일<br>심사청구일자 없음 | (71) 출원인<br>경희대학교 산학협력단<br>경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내<br>(72) 발명자<br>김윤희<br>서울 강남구 대치동 청실아파트 6-606<br>한아미<br>경기 구리시 인창동 삼보아파트 307동 702호<br>(뒷면에 계속)<br>(74) 대리인<br>특허법인 신성 |                                                    |

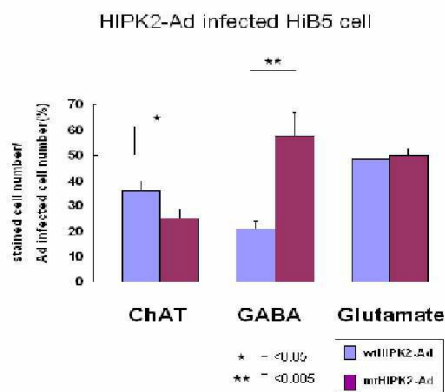
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 유효성분으로 HIPK2 단백질을 포함하는 신경 질환치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유효성분으로 호메오도메인 인터액팅 단백질 카이네이즈(Homeodomain interacting protein kinase 2; 이하 HIPK2) 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 HIPK2 효소를 신경 간세포와 중간엽 세포에 형질도입, 특이적 신경세포 수립과 치매동물모델내 형질도입된 신경 간세포와 중간엽 세포의 뇌 내 주입으로 퇴행성 신경질환 등의 치료에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

**유민주**

경기 안양시 동안구 관양동 공작부영아파트 301동  
804호

**최철용**

경기 성남시 분당구 수내동 양지마을청구아파트  
213-705

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

유효성분으로 호메오도메인 인터랙팅 단백질 카이네이즈페어드 (Homeodomain interacting protein kinase; HIPK) 2 단백질을 포함하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HIPK 2 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질, 그들의 절편 또는 그 변이체인 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 3

제1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 HIPK 2 단백질은 서열번호 2에 기재된 DNA 염기서열에 의하여 코딩되는 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HIPK 2 단백질은 신경 줄기세포를 콜린성 신경으로 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 HIPK 2 단백질은 신경 줄기세포를 가바성 신경 세포로 분화하는 것을 억제하는 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 HIPK 2 단백질은 중간엽 줄기세포를 신경으로 유도하는 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경질환 치료용 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 뇌 신경질환은 퇴행성 또는 신경세포 손상 질환인 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경 질환 치료용 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 뇌 신경질환은 알츠하이머, 노인성 치매, 간질, 루게릭, 뇌졸중, 헌팅톤 또는 파킨슨 병인 것을 특징으로 하는 뇌 및/또는 척수 신경 질환 치료용 조성물.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<17> 본 발명은 유효성분으로 호메오도메인 인터랙팅 단백질 카이네이즈(Homeodomain interacting protein kinase 2; 이하 HIPK2) 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 호메오도메인 인터랙팅 단백질 카이네이즈(Homeodomain interacting protein kinase 2; 이하 HIPK2)를 신경 간세포에 형질도입, 신경 분화 과정에 전사인자들의 발현을 조절하여 특이적 신경세포로 분화되는 신경세포의 수립과 퇴행성 신경 질환 및 뇌척수 손상의 치료에 관한 것이다.

<18> 해마와 망막의 신경 간세포인 HiB5 세포주를 이용하여 HIPK2가 아데노바이러스 벡터를 통해 과발현되었을 시에 또는 돌연변이 형태의 HIPK2가 발현되었을 시에 분화에 끼치는 영향을 보았다. HIPK2에 의한 전사인자들의 발현 변화와 그에 따른 특정 신경 세포로의 분화는 퇴행성 뇌질환 치료에 유용한 도구로 이용될 수 있을 것이다.

- <19> 포유동물의 뇌는 신경줄기세포(neuronal stem cell)의 분열과 분화 및 생존과 사멸(apoptosis) 그리고 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경 회로망(neural network)을 발생(development)하여 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다. 신경 세포는 발생 과정에서 적절한 뇌 내 위치로 이동한 후 적절한 전사인자의 발현을 통하여 특정 신경 세포로 성장하게 된다. 이러한 특정 신경 세포는 각각의 고유한 신경 전달물질을 내어 신경망을 구성하게 되며 기억, 감정 형성 등 뇌의 특정 기능을 수행하도록 한다. 포유동물의 성체시기에도 뇌 신경세포에서는 신경성장에 필요한 많은 물질을 생산하여 축색돌기(axon)과 수상돌기(dendrite)가 성장하게 되고 새로운 학습과 기억을 할 때마다 시냅스 연결과 신경 회로망(neural network)을 끊임없이 재구성(synaptic remodeling)하고 있다. 또한 초기 발생중인 배아가 아니라 성체에도 신경줄기세포가 존재하는데 그 줄기세포가 성체의 뇌에서 발생 분화하는 과정을 거치는 것은 재생과정으로 이해될 수 있다.
- <20> 최근 고령화 사회에 따라 뇌의 특정 신경이 죽어서 기능을 하지 못하여 여러 질병이 일어나고 있다. 특히 선진국 통계에 의하면 85세 이상의 노인에서 50%가 노인성 치매에 걸리므로 이에 대한 대비가 시급하다고 하겠다. 특정 신경세포 사멸로 인한 퇴행성 뇌질환 외에도 중추조직 손상에 대한 치료로서 약품과 수술 및 줄기세포 주입을 통한 뇌 내의 자체 신경망 복구를 기대한 세포치료가 이용되고 있다. 또한 중추조직 손상과 특정신경세포 사멸로 인한 퇴행성 뇌질환에 신경줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위해서는 특정신경세포로 분화하는 기술이 개발되어야 한다.
- <21> 알츠하이머 병 환자는 기억력 손상과 공간지각능력 상실 등을 특징으로 하며, 초기증상으로 대뇌측두엽에서 해마로 연결되는 부위(entorhinal cortex)와 전뇌기저핵(basal forebrain)에서의 콜린성 신경세포의 사멸, 또 이들 세포사멸에의해 표적유래 생존인자(target derived survival factor)를 역전달(retrograde transfer) 받지 못한 해마의 pyramidal neuron과 dentate gyrus의 granule cell들이 세포사멸하게 된다(Miwa C., 외. (2001). Psychiatry Clin Neurosci. 55:573-578). 또한, 파킨슨씨병, 헌팅톤병 대부분의 퇴행성 뇌질환에서는 후기에는 기억력 손상을 일으킨다(Bondi M.W., 외(1991) J Clin Exp Neuropsychol. 13:339-358; Perry R.J., 외(1996) Curr Opin Neurol. 9:281-285).
- <22> HIPK2는 핵 내에서 작은 반점(speckle)을 형성하는 serine-threonine kinase로, homeodomain 전사인자를 비롯한 전사인자의 조절에 관여한다(Kim Y.H., 외(1998) J Biol Chem. 283(40):25875-25879; Moilanen A.M., 외(1998) Mol. Biol. Cell 9:2527-2543). 또한 인산화를 통하여 Groucho의 포유동물 유사 단백질인 TLE의 co-repressor 활성을 조절하며 세포 내 사멸과 관련하여 p53, CtBP, Sp100과의 조절 기작이 알려졌다(Choi C.Y., 외(1999) J. Biol. Chem.274:33194-33197; Hofmann T.G., 외(2002) Nat. Cell Biol. 4:1-10).
- <23> 발생 초기 신경 줄기 세포에서는 Pax6를 비롯한 여러 homeodomain을 포함하는 전사인자의 발현과 Hes1, Mash1를 비롯한 basic helix-loop-helix 전사인자들의 발현이 각기 조절되며 신경세포의 분화가 이루어진다(Ishibashi et al., 1994, 1995; Guillemot et al., 1993). 이러한 전사 인자들의 발현 조절은 신경 줄기세포가 특정 기능을 하는 신경 세포로 분화하도록 하는데 중요한 역할을 한다.
- <24> 신경줄기세포가 분화하는 과정 동안 특정전사인자 발현의 조절을 밝혀냄으로서 특정신경세포의 재생을 수립함은 성체의 퇴행성 뇌질환 치료에 이바지할 수 있어 유용하다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <25> 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 뇌신경 질환의 치료제를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

- <26> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유효성분으로 호메오도메인 인터랙팅 프로틴 카이네이스 2(Homeodomain interacting protein kinase 2: HIPK2) 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물을 제공한다.
- <27> 본 발명에서 상기 HIPK2 단백질은 본 발명의 효과를 가지는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 그것의 절편 및 그들의 변이체를 포함한다.
- <28> 본 발명에서 상기 HIPK2 단백질은 신경줄기세포를 콜린성 신경으로 분화를 유도하는 것을 특징으로 하며, 또한 중간엽 줄기세포를 콜린성 신경으로 유도하기도 한다.
- <29> 본 발명의 단백질로 치료가능한 신경질환은 기억손상을 동반하는 퇴행성 또는 신경세포 손상 질환과 운동신경 손상을 동반하는 뇌 및 척수 손상 등이다. 상기 뇌 신경질환은 알츠하이머, 노인성 치매, 간질, 루게릭,

뇌졸중, 헌팅톤 또는 파킨슨 병, 정신분열증, 발생장애, 자폐증, 뇌척수 손상 등을 포함한다.

- <30> 본 발명의 약학적으로 수용가능한 조성물은 예를 들어 수용가능한 희석제, 첨가제 또는 담체를 포함한다.
- <31> 본 발명의 약학적으로 수용가능한 조성물은 체내 또는 체외 조직 또는 기관에 운반 또는 투여에 적합한 약학적으로 수용가능한 조성물에 상기 폴리펩타이드를 포함한다.
- <32> 상기 약학적 조성물은 예를 들어, 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 단백질들은 산성 및/또는 염기성 말단 및/또는 결 사슬을 포함할 수 있기 때문에, 자유 산 또는 염기의 형태 또는 약학적으로 수용가능한 염들의 형태의 약학적 조성물로 포함할 수 있다. 약학적으로 수용가능한 염들은 염산, 브롬수소산, 과염소산, 질산, 싸이오시아닉(thiocyanic) 산, 황산, 인산 및 그 유사체와 같은 무기산; 그리고 포름산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 젖산, 피루빈산, 옥살산, 말로닉(malonic) 산, 호박산, 말레산, 푸마르산, 안트라닐산, 시나믹(cinnamic) 산, 나프탈린 설푼산, 술파닐산 및 그 유사체와 같은 유기산을 포함하는 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 단백질들과 염을 형성할 수 있는 적당한 산들을 포함할 수 있다. 대상 단백질과 염을 형성할 수 있는 적당한 염기들은 예를 들어 수산화 나트륨, 수산화 암모늄, 수산화 칼륨 및 그 유사체와 같은 무기 염기; 및 모노-, 다이- 및 트리-알킬 아민(예를 들어 트리에틸 아민, 다이이소프로필 아민, 메틸 아민, 다이메틸 아민 및 그 유사체) 및 선택적으로 치환된 에탄올아민들(예를 들어 에탄올아민, 다이에탄올아민 및 그 유사체)와 같은 유기 염기를 포함할 수 있다.
- <33> 상기 약학적 조성물은 비경구적, 경장, 국소 또는 흡입을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 어떤 투여 경로에 적합한 여러 형태일 수 있다. 비경구적인 투여는 주사 투여(즉 정맥 내, 근육내 및 하기 기재한 것과 유사한 것)를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 소화관을 통하지 않는 어떠한 투여 경로를 의미한다. 경장(enteral) 투여는 정제, 캡슐들, 경구 용액, 서스펜전, 스프레이 및 그 유사체를 포함하나 이에 한정되지 아니하는 경구 투여의 어떠한 형태를 의미한다. 이 부분의 목적을 위해, 경장 투여는 직장 및 질 투여 경로를 의미한다. 국소 투여는 크림들, 연고들, 젤들 그리고 경피 패치들을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 피부를 통한 어떤 투여경로를 의미한다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판 Gennaro 외, eds. Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania, 1990 참조).
- <34> 본 발명의 비경구적 약학 조성물들은 예를 들어 정맥(정맥내로), 동맥(동맥 내로), 근육(근육내로), 피부(피하적 또는 데포 조성물내로)의 아래, 심낭에, 관상동맥들에 주사에 의하여 또는 조직 또는 기관에 운반용 용액으로 사용되어 투여될 수 있다.
- <35> 주사 가능한 조성물들은 정맥 내, 동맥내, 관상혈관내, 심막, 혈관주변, 근육내, 피하 및 관절을 포함하나 이에 한정되지 아니하는 주사 투여의 경로에 적합한 약학적 조성물일 수 있다. 주사 가능한 약학적 조성물들은 심장, 심낭 또는 관상동맥들로 직접적인 투여에 적합한 약학적 조성물일 수 있다.
- <36> 경구 투여를 위하여 상기 약학 제제들은 예를 들어 결합제(예를 들어 전젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스); 충전제(예를 들어 유당, 미결정 셀룰로오스 또는 칼슘 수소 인산염); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아르산염, 활석 또는 실리카); 분해제(예를 들어 감자 전분 또는 소듐스타치 글리코레이트); 또는 습윤제 (예를 들어 소듐 라우릴 설페이트)와 같은 약학적으로 수용 가능한 첨가제와 통상적인 방법으로 제조된 정제 또는 캡슐의 형태로 섭취될 수 있다. 상기 정제들은 당업계에 주지된 방법에 의하여 코팅될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판 Gennaro 외, eds. Mack Printing Company, Easton, Pennsylvania, 1990 참조).
- <37> 경구 투여용 약학 조성물 용액은 예를 들어 용액, 시럽 또는 서스펜전의 형태로 섭취될 수 있거나 또는 그들은 사용 전에 물 또는 다른 적당한 다매와 구성을 하기 위한 건조 산물일 수 있다. 그러한 약학 조성물 용액은 서스펜전화제(예를 들어 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 수소화된 식물 지방들); 에멀전화제들(예를 들어 레시틴 또는 아카시아); 비 수용성 담체들(예를 들어 아몬드유, 오일 에스테르, 에틸알콜 또는 분획화된 식물유); 그리고 보존제(예를 들어 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르빅 산)과 같은 약학적으로 수용가능한 첨가제와 통상의 방법에 의하여 제조될 수 있다.
- <38> 상기 약학 조성물들은 또한 필요에 따라 버퍼 염, 향료, 색소 및 감미료를 포함할 수 있다.
- <39> 경장용 약학 조성물들은 예를 들어 정제, 트로키제들 또는 로젠지의 형태로 구강 투여에 적합할 수 있다. 직장 그리고 질 투여 경로를 위하여 본 발명의 폴리펩타이드 및/또는 단백질은 용액(관장 유지), 좌약 또는 연고로 제조될 수 있다. 경장 약학 조성물들은 전체 비경구적 영양(TPN) 혼합물 또는 섭취 튜브에 의한 운반용과 같은 섭취 혼합물의 혼합액에 적합할 수 있다.(Dudrick 외, 1998, Surg. Technol. Int. VII: 174-184; Mohandas 외

2003, Natl. Med. J. India 16(1) : 29-33; Bueno 외, 2003, Gastrointest. Endosc. 57 (4): 536-40; Shike 외, 1996, Gastrointest. Endosc. 44(5) : 536-40 참조).

- <40> 흡입에 의한 투여를 위하여, 본 발명의 폴리캡타이드 및/또는 단백질은 예를 들어 다이클로로다이후로로메탄, 트리클로로후로로메탄, 다이클로로테트라후로로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적당한 가스와 같은 적합한 추진제로 가압된 용기에서 에어로졸 스프레이 존재 또는 네블라이저의 형태로 통상적으로 운반될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우에 상기 용량 단위는 계량된 양을 운반하는 밸브를 제공하여 결정될 수 있다. 유당 또는 전분과 같은 적당한 분말 베이스와 상기 화합물의 분말 믹스를 포함하는 흡입제 또는 취입기에 사용하기 위하여 캡슐 및 예를 들어 젤라틴 카트리지를 제제화될 수 있다.
- <41> 본 발명의 조성물은 뇌 또는 척수 신경 관련 질환의 치료가 필요한 대상에게 투여된다. 그러한 조성물의 독성 및 치료학적 효효성은 세포 배양 또는 LD50 (일군의 50% 치사량) 측정 및 ED50(일군의 50%가 치료학적으로 유효한 양) 측정과 같은, 실험동물에 있어 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료학적 효과 사이의 투여량 비율은 치료계수이고, 그것은 LD50/ED50 비율로 표시될 수 있다. 큰 치료계수를 보이는 조성물이 바람직하다.
- <42> 일실시예에서, 세포 배양 분석과 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에 적용하기 위한 투여량의 범위를 설계하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 조성물의 투여량은 바람직하게는 독성이 없거나 또는 거의 없는 ED50을 포함하는 순환 농도의 범위 이내이다. 투여량은 이러한 범위 내에서 적용된 제형과 이용된 투여경로에 따라서 다양하다. 본 발명의 방법에서 사용된 조성물에 있어, 치료학적으로 유효한 투여량은 초기에 세포 배양 분석으로부터 측정될 수 있다. 투여량은 세포 배양에서 결정된 것처럼 IC50 (즉, 증상의 반-최대 억제를 달성하는 시험 물질의 농도)을 포함하는 혈장 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 설계된다. 그러한 정보는 인간에 있어 유용한 투여량을 더 정확히 결정하기 위하여 사용될 수 있다. 혈장 내 레벨은 예를 들어 고속 액체 크로마토그래피에 의하여 결정될 수도 있다.
- <43> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <44> 1. HIPK2가 신경 분화 관련한 bHLH (basic Helix-loop-helix) 전사 인자들의 발현 조절.
- <45> 신경의 분화 동안에는 세포 내부의 전사 인자들의 발현이 활발히 조절되면서 특정 신경 세포로의 운명을 결정하게 된다. 신경 세포 분화를 위해 사용한 HiB5 세포주는 분화 시기 동안에 초기 Hes1, Pax6 등의 전사인자 발현량 증가를 보이며 후기에 Mash1 등의 전사 인자 발현을 보인다(도 3 참조). 본 발명에서는 HIPK2가 분화 동안에 전사 인자들의 발현 정도를 조절하는지를 알아보기 위하여 RT-PCR 방법과 면역 세포 화학법을 통한 형광 염색 방법을 이용하였다(도 4, 도 5a, 5b 참조). 흰 쥐 16일자 배아의 해마에서 유래한 HiB5 세포주는 흰 쥐 16일자 배아 해마의 세포를 일차 배양한 것과 유사한 분화 양상을 보이는데(도 1과 도 2 참조) 여기에 HIPK2 재조합 아데노 바이러스를 감염시키고 분화 동안 세포 사멸을 감소시키고 생존을 증진시키는 성장인자인 PDGF를 처리하였다. 그 결과 정상 HIPK2를 과발현하는 HiB5 세포의 경우 분화 시작 초기 시기인 PDGF 처리 2시간에서 Hes1의 mRNA가 많은 증가를 보였다. 또한 분화가 계속 진행 되어서 다른 세포들이 발현을 하지 않는 시간에도 Hes1 단백질을 발현하는 세포가 면역 세포 화학 염색 방법을 썼을 때 정상 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에서 보여졌다. Hes1의 경우 분화 초기에 신경 줄기세포에서 특정 신경 세포로 분화하는 과정을 조절하는 기능이 알려져 있으며 이런 전사 인자가 HIPK2에 의해 과발현한다는 것은 신경 분화시기에 HIPK2의 관여로 인하여 이후의 분화 단계에 영향을 끼친다는 것을 알 수 있게 한다. 이에 반해 돌연변이형 HIPK2의 아데노 바이러스를 처리한 군에서는 PDGF 분화 후기 단계에서 Mash1 전사인자의 발현이 크게 증가되는 것을 볼 수 있다. 돌연변이형 HIPK2는 HIPK2의 인산화 기능을 제거하기 위하여 221번째 아미노산이 치환된 것으로 기존의 HIPK2의 작용이 제대로 일어나지 못하였을 경우에 세포에 어떤 변화가 일어나는지 확인할 수 있다. HIPK2의 기능이 제대로 일어나지 못할 경우 Mash1의 mRNA와 단백질 발현이 증가하는데 이것은 Hes1이 Mash1의 발현을 조절하는데 쓰인다는 기존 연구 결과에 부합하는 것이다. 이와 같은 실험의 결과는 분화 동안에 HIPK2가 Hes1과 Mash1 등의 전사인자 발현을 조절한다는 사실을 나타낸다.
- <46> 2. 신경 줄기세포 내 HIPK2에 의한 콜린성 신경세포 분화유도 확인
- <47> HiB5 세포주에 HIPK2 재조합 아데노 바이러스를 처리하여 어떤 특정 신경 세포로 분화되는지 각각의 신경 분화 마커를 인지하는 항체를 이용하여 면역 세포 화학법을 실행하였다(도 6 참조). 콜린성 신경 세포로 분화되는 세포를 확인하기 위하여 ChAT 항체를 이용하였으며 GABAergic 신경 세포로 분화되는 것을 확인하기 위하여 GABA 항체로 염색, glutamatergic 세포로 분화하는 것을 확인하기 위하여 glutamate 항체로 염색하였다. 재조합 아데

노 바이러스를 32℃의 HiB5 세포에 감염시켰으며 N2 배지 상태에서 하루 후, PDGF 처리하고 하루 반 후 세포를 고정하여 염색을 실행하였다. 재조합 아데노 바이러스 감염 여부는 HIPK2에 결합되어 발현하는 GFP 단백질의 녹색 형광 발현을 통하여 확인되었으며 감염된 세포는 다시 특정 신경 세포 분화 마커를 통해 어떤 신경 세포가 되었는지 확인하였다. 정상 HIPK2가 과발현 하는 경우에는 ChAT의 발현양이 돌연변이형 HIPK2가 과발현하는 군에서 더 많이 나타나는 반면에 GABA는 돌연변이형 HIPK2가 과발현하는 군에서 현저하게 증가되어 나타난다. Glutamate의 발현은 정상 HIPK2나 돌연변이형 HIPK2 처리군 모두에서 유의한 차이가 보여 지지 않고 있다(도 7 참조). 이러한 결과는 HIPK2가 GABAergic 신경 세포로 분화하는 것은 억제하며 콜린성 신경 세포로 분화하도록 한다는 것을 보여준다.

<48> 3. Homeobox 전사인자를 매개로 한 HIPK2의 신경 분화 조절

<49> Homeobox 도메인을 지니는 전사인자들은 발생 초기에 관여하는 전사 인자로 신경의 분화 동안에도 초기의 운명을 결정짓는 역할을 한다. 그중에서도 Pax6는 DNA와 직접 결합하는 paired 도메인을 지니며 여러 variant가 존재한다. 맨 처음 Pax6는 시신경의 분화에 관여하는 전사인자로 밝혀졌으며, 이후 spinal cord 형성 과정에서 전반적인 발현을 통하여 하위단계의 전사 인자 발현을 다시 조절하여 운동 신경의 분화를 일으키는 중요한 상위단계의 전사인자로 알려졌다. 시신경 형성 과정에서 여러 bHLH 전사인자와 함께 일하는 것이 밝혀져 왔으며 특히 Hes1과의 연관성(Brown N.L., 외(1998) Development 125(23):4821-4833)이 알려졌다. 이러한 Pax6 전사 인자를 도입하고 HIPK2 아데노 바이러스 또한 감염시킨 후 PDGF 처리 2시간에서 mRNA를 얻어 GAPDH를 이용한 정량을 통해 Hes1 발현을 확인하였다. 이때 정상 Pax6와 HIPK2가 과발현하는 세포에서 Hes1 mRNA가 가장 많은 발현을 보였다. 반면에 돌연변이형 HIPK2를 과발현하는 세포에서는 Pax6나 돌연변이형 Pax6가 발현하는 여부와 상관없이 별다른 증가를 보이지 않았다. 이는 HIPK2가 Hes1 mRNA 발현에 우선적으로 작용하고 있음을 보여주고 있는 것이다. 또한 Pax6의 활성화 도메인이 제거된 돌연변이형 Pax6를 과발현시키고 HIPK2 아데노 바이러스를 처리한 경우에는 정상 Pax6를 도입한 경우보다 Hes1 mRNA 발현이 적은 것으로 보여 졌다(도 8 참조). 위와 같이 HIPK2에 의해 인산화되어 활성화되는 Pax6가 세포의 분화 시기 동안에 콜린성 신경세포로 가게 하는 작용을 하는 것을 콜린성 세포의 전사인자 표지자인 Hb9 염색과 immunoblot을 통해 확인 하였다(도 9, 도 10 참조). 이러한 결과는 HIPK2가 pax6를 매개로 한 전사인자의 발현 조절을 통하여 콜린성 신경으로 분화하게 한다는 것을 알게 한다.

<50> 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

<51> 실시예

<52> 1) HIPK2의 재조합 아데노 바이러스

<53> 본 실험에 이용하기 위하여 HIPK2의 유전자가 클로닝되어 들어가 있는 재조합 아데노 바이러스를 사용하였다. HIPK2의 유전자 뒤에는 GFP 단백질(green fluorescence protein:녹색 형광 단백질)이 붙여져 HIPK2가 발현되고 있는 세포의 직접적인 확인이 가능하도록 되어있다. 돌연변이형 HIPK2 재조합 아데노 바이러스의 경우 HIPK2의 인산화를 시키는데 관여하는 부위의 아미노산 하나가 라이신에서 아르기닌으로 치환되어 인산화 활성이 없는 돌연변이(Kim Y.H., 외(1998) J Biol Chem. 283(40):25875-25879)가 클로닝 되어 있다.

<54> 2) 신경 줄기 세포주 HiB5 배양 및 바이러스 감염

<55> 16일자 흰 쥐 배아의 해마 부위에서 기원한 HiB5 신경줄기세포주는 온도 (temperature sensitive) SV 40 T-항원(antigen)을 레트로 바이러스로 감염시켜(retrovirus infection) 만들었으므로, 32℃에서 배양할 때는 세포 분열을 하나 쥐의 정상 체온인 39℃로 옮기면 분열을 멈춘다. 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린/스트렙토마이신, 글루타민, sodium carbonate 첨가하여 분열 조건에서 배양한다. 39℃에서 분화시킬 때에는 무혈청(serum-free media) 배지인 N2(DMEM/F12, 인슐린, 트랜스페린, 셀레니움, 퓨트리신, BSA를 포함; botten Stein & Sato, 1979)에 피루베이트(pyruvate)를 첨가하여 사용하였다.

<56> 재조합 아데노 바이러스는 293 세포주 내에서 증식시킨 후 얻어내어 농도를 쟈 후 사용한다. 본 실험에서는 2%의 FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 50moi의 재조합 바이러스를 이용하여 HiB5 세포주에 2시간 동안 감염시킨 후 분열 조건의 정상 배지로 16시간 동안 배양하였다. 이후 실험을 위해 39℃ 온도에 N2 serum free media 로 옮긴 후 혈소판 유래 성장인자(PDGF)를 처리하여 시간대별로 나누어 실험군을 얻어 이용하였다.

<57> 3)일차 세포(Primary cell) 배양

- <58> 임신한 지 16일 이 지난 흰쥐를 죽인 후 배아를 분리하여 뇌부분에서 해마 부위를 분리하여 세포 분리과정을 거친 일차 세포를 poly-L-ornithine, Fibronectin으로 코팅한 디쉬에 세포를 심어 배양하였다. 배지는 N2(DMEM/F12,D+ glucose ,L-Glutamine ,인슐린,프랜스페린,푸트레신,selenium, BSA 포함 )을 사용하며 분열을 촉진하는 FGF를 처리하여 배양하였다.
- <59> 4)immunoblot 분석법
- <60> 일차 배양한 해마의 신경 줄기 세포와 HiB5 세포주의 분화 양상이 유사한 것을 확인하기 위하여 세포가 자라고 있는 디쉬를 PBS로 씻은 후 NP-40가 포함되어 있는 라이시스 버퍼(Tris buffered saline에 NP-40,단백질 분해 억제제인 pyrophosphate ortho-vanadate, fluoride, aprotinin, pepstatin, Leupeptin 첨가)를 넣어 세포를 추출하였다. 10분간 얼음에서 반응한 후 10분간 원심분리기로 핵을 제거하였다. 각각 neurofilament, PSD95, synapsin Ia, syntaxin에 대한 항체를 이용하여 세포추출물을 면역침전한 후 면역침전물을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔로 분획한 후 나이트로셀룰로스에 단백질을 이전하였다. 이후 표지자의 발현을 확인하기 위하여 면역블롯(Western blot)분석법을 시행하였다. 또한 신경 분화 동안의 전사인자 발현을 확인하기 위하여 Ngn1과 Hb9 등의 항체를 이용하여 확인하였다.
- <61> 5)RNA 추출 및 RT-PCR
- <62> 분화 동안에 HIPK2가 세포의 전사인자 발현에 영향을 끼친다는 것을 알아내기 위하여 역-전사 증합효소 체인 반응(RT-PCR) 방법을 이용하여 분석하였다. 재조합 HIPK2 아데노 바이러스가 처리된 HiB5 세포의 mRNA는 TriZol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출되었다. 추출된 mRNA는 AMV-RT 역전사 효소(Promega)를 이용하여 cDNA로 합성되었으며 전사인자에 대한 primer를 제작한 후 PCR 되었다.
- <63> 6)면역 세포 화학법
- <64> HIPK2가 전사인자의 단백질 발현이나 세포 특이적 분화에 영향을 끼치는 지를 알아보기 위하여 각각의 항체를 이용하여 면역 세포 화학법을 실행하였다. Hes1과 Mash1 전사인자의 단백질 발현을 알아보기 위해 이들의 항체를 이용하였고, 세포 특이적 분화를 알아보기 위하여 ChAT, GABA, Glutamate에 대한 항체를 이용하였다. Alexa Fluor 546(Molecular Probes)이 부착되어 있는 이차 항체를 이용하여 붉은 형광 염색 사진을 얻었다.
- <65> 염색에 사용될 HiB5 세포는 커버슬립 위에서 배양되어 4% formaldehyde로 4℃에서 15분 동안 고정한 후 0.5% triton X100으로 5분간 세포막 투과 상태(permeablizing)를 만들고 5% normal serum(normal horse, goat, donkey)으로 1시간 동안 blocking 하였다. 각각의 일차 항체를 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 일차 항체 검출을 위하여 Alexa Fluor 546이 결합된 이차 항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 이후 상온에서 5분 동안 DAPI를 이용하여 세포의 핵을 염색하였다. 형광 물질의 발현은 공초점 레이저 주사 현미경(LSM510, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 200배로 확대하여 촬영하였다.
- <66> 7) 면역 조직 화학법
- <67> 조직 샘플을 PBS 용액 내 0.5% Triton X-100으로 20분간 4℃ 챔버에서 얼음 위에 셰이커로 돌린다. 이후 PBS 용액 내 0.1% Triton X-100을 가지는 3% Bovine Serum Albumin(BSA)의 15% 정상 혈청에서 비특이적 면역반응에 대한 블러킹 단계를 2시간 동안 셰이커 위에서 시행하고 이후 1차 항체(primary antibody)를 4시간 동안 부착시킨다(3시간 4℃, 1시간 실온). 이때 항체는 1% BSA in PBS에 희석하여 사용하였다. 이때 사용된 것은 ChAT와 Pax6에 대한 항체이다. 이후 1차 항체에 상보적인 형광 표지된 2차 항체를 실온에서 45분간 부착하였다. 이후 모든 과정이 끝나면 마운팅하여 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰 및 촬영하였다.
- <68> 8)Quantitative real-time PCR
- <69> 정량적 실시간 PCR는 기존에 행해진(Mitransinovic *et al.*, 2001) 바와 같이 실행되었다. 역전사 효소를 이용하여 HIPK2 재조합 아데노 바이러스가 처리된 HiB5 세포의 mRNA를 cDNA로 만들어서 이용한다. 이러한 HiB5 세포는 Hes1 mRNA 발현량이 증가하는 시기인 PDGF를 처리 후 2시간에서 얻어졌으며 cDNA(50ng/ml) 4ul를 20ul의 SYBR green 반응 단위에 넣어서 iCycler iQTM(BIO-RAD) 기계에서 반응시켰다.
- <70> Hes1 mRNA의 발현량을 측정한 후 정량화하기 위하여 GAPDH의 mRNA양 발현에 대한 Hes1 mRNA발현을 보았으며 다음과 같은 프라이머를 제작하여 사용하였다; Hes1 Forward, CGGCTTCAGCGAGTGCAT(서열번호 3); Hes1 Reverse, CGGTGTTAACGCCCTCACA(서열번호 4); GAPDH Forward, AAGAGAGGCCCTCAGTTGCT(서열번호 5); GAPDH Reverse, TTGTGAGGGAGATGCTCAGTGT(서열번호 6).

## 발명의 효과

- <71> 상기의 구성에서 알 수 있듯이 본 발명의 HIPK2 효소는 해마에서 분리된 신경 줄기 세포에서 전사인자 발현을 조절하여 콜린성 신경 세포로 분화 유도, GAD, GABA를 생산하는 신경세포의 분화 억제, 줄기세포 치료 및 유전자치료에서 특정 신경세포의 수립과 분화증진 효과를 보여주었다. 반대로 이들이 제대로 일하지 못할 경우에는 GABAergic 신경 세포로 분화하는 것으로 보아 HIPK2는 GABAergic 신경 세포로 분화하는 것을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다. 알츠하이머 병을 비롯한 퇴행성 뇌질환에서 기억력 손상과 공간지각능력 상실 등을 일으키는 데에 콜린성 신경 세포의 세포사멸은 중요한 초기 증상이므로, HIPK2가 내재성 신경줄기세포의 콜린성세포로의 분화 유도 또는 뇌 이식하는 줄기세포(신경줄기세포 또는 중간엽 줄기세포)를 콜린성 신경 세포로 분화하도록 하는 역할을 이용하여 다양한 퇴행성 뇌질환에 대한 줄기세포 치료, 유전자 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- <1> 도 1과 도 2는 흰쥐 16일자 배아의 해마에서 유래한 HiB5 신경세포주가 신경 성장인자의 도움을 받아 분화하는 동안에 보이는 분화 표지자의 발현 양상이 흰쥐의 16일자 배아의 해마의 세포를 일차 배양하여 분화 시킨 동안에 보이는 분화 표지자의 발현 양상과 같음을 immunoblot 분석법과 면역 세포 화학 염색법을 통하여 보여준다. 이는 HIPK2 (제조함 HIPK2-아데노 바이러스)의 기능을 알아보기 위해 사용한 HiB5 세포주가 분화 시 일차 배양한 신경과 같은 결과를 나타낸다는 것을 알려준다.
- <2> 도 1a에서는 신경 성장 인자인 PDGF를 첨가함에 따라 1일에서 2일 동안 배양되어 신경이 분화할 시에 발현하는 pan-neurofilament(Pan-NF)가 증가하고 신경 줄기세포 초기 발현 표지자인 nestin은 감소하는 것을 면역 세포 화학 염색법을 통해 보여 준다. 이는 PDGF가 일차 배양된 신경의 분화를 돕고 있는 것을 알게 한다.
- <3> 도 1c는 RT-PCR(reverse transcriptase polymerase chain reaction) 방법을 통하여 분화 동안 PDGF 수용체 중 베타 수용체(PDGF  $\beta$  R)의 mRNA는 PDGF에 의한 신호를 받은 후 감소하고 알파 수용체(PDGF  $\alpha$  R) mRNA의 경우 발현이 증가 하는 것을 보여준다.
- <4> 도 2는 신경 줄기 세포주인 HiB5의 분화동안의 여러 단백질 표지자와 mRNA 발현 양상을 나타낸다. 도 2a는 HiB5가 PDGF가 처리되어 분화됨에 따라 pan-neurofilament 단백질 발현이 증가하는 것을 염색을 통해 보여주며 역시 신경에서 나타나는 단백질인 베타 III Tubulin( $\alpha$ Tu)의 발현도 증가하는 것을 보여준다. 도 2b는 HiB5에서 PDGF 첨가에 의해 도 1b에서와 같이 neurofilament, PSD95, synapsin Ia, syntaxin등의 분화 표지자 단백질 발현이 증가하는 것을 보여 주고 있다. 도 2c의 PDGF 알파 수용체와 베타 수용체의 mRNA 발현 양상도 분화 시 일차 배양한 신경 줄기 세포(도 1c 참조)와 HiB5 세포주가 동일하게 나타나는 것을 보여준다. 도 2d의 경우 HiB5를 분화 배지 N2로 교환, 1일 뒤 PDGF나 신경 성장 인자 중 하나인 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)와 함께 처리하여 immunoblot 방법으로 특정 신경세포로의 분화를 판별하였다. PDGF를 처리한 실험군에서 콜린성 신경의 마커인 ChAT의 발현이 처리하지 않은 군에 비하여 증가하였으며 이외에도 GABA성 신경과 glutamate성 신경의 분화 또한 증가시켰다.
- <5> 도 3은 HiB5 세포가 분화하는 동안 전사인자의 발현양상을 보여주는 염색 사진이다. HiB5를 분화 N2 배지에서 1일 놓은 뒤 PDGF를 처리하여 시간대별로 Hes1, Pax6, Mash1의 발현(붉은색)을 DAPI(파란색)로 염색된 전체 세포수에 비교하여 살펴보았다. PDGF를 처리하게 되면 신경이 분화하게 됨에 따라 Pax6는 초기 PDGF처리 3시간에서(N21d+PDGF3h)에서 가장 뚜렷한 증가를 보이며 Hes1 단백질 역시 같은 시간에서 증가를 보인다. Mash1의 경우 분화 후기인 PDGF처리 1일에서(N21d+PDGF1d)에서 가장 큰 증가를 보인다. HiB5세포의 분화시기 동안에 Pax6, Hes1, Mash1이 발현이 조절된다는 것을 알 수 있다.
- <6> 도 4와 5a, 5b는 HIPK2가 HiB5 신경줄기 세포주에서 분화 시기 동안에 분화 관련 전사인자들의 발현을 변화시키는 것을 보여주고 있다. 실험을 위하여 정상 HIPK2와 돌연변이형 HIPK2의 DNA를 포함하는 제조함 아데노 바이러스를 HiB5 세포주에 감염시켜 세포 내에서 과발현하도록 하였다. HiB5 신경 줄기세포주는 50 moi로 32°C 세포 증식 허용 상태에서 제조함 아데노 바이러스가 처리된 후 16시간이 지난 뒤 분화를 이끄는 39°C, N2 배지 상태에서 배양되었다.
- <7> 도 4에서는 N2상태에서 하루(N2 1d)가 지난 후에 mRNA 변화량을 살펴 볼 때 Hes1의 발현 양이 대조군이나 돌연변이형 HIPK2 제조함 아데노 바이러스 처리 군에 비해 HIPK2 아데노 바이러스를 처리한 군에서 높게 나타난 것이 보여졌다. PDGF를 20ng/ml의 농도로 처리하여 분화를 촉진(Kwon, 1997) 시킨 후에 2시간(2h), 6시간(6h),

하루(1d) 상태에서 다시 mRNA 발현량을 비교하였으며 beta( $\beta$ ) actin 은 동일한 양의 mRNA를 이용하여 Hes1과 Mash1 mRNA 발현을 비교하였다는 것을 나타내기 위해 사용되었다. PDGF 처리 후 2시간, 6시간에서 HIPK2 아데노 바이러스를 처리군에서 Hes1의 mRNA량이 증가 되었으며 PDGF 처리 후 6시간, 하루 상태에서는 돌연변이형 HIPK2 처리군에서 Mash1 mRNA 발현이 증가하였다.

<8> 도 5a과 도 5b는 도 4에서 보여준 mRNA 발현량 변화를 단백질 수준에서 확인하기 위하여 Hes1과 Mash1의 항체를 사용하여 면역형광 염색방법으로 염색한 사진이다(X200). 도 4a는 분화시키는 상태에서 Hes1의 발현 정도를 알아본 사진으로, HIPK2 돌연변이형 아데노 바이러스(mt hipk2-GFP) 처리군에서는 붉은 색으로 염색된 Hes1이 재조합 아데노 바이러스가 감염되어 녹색의 형광을 발하는 세포에서 주변의 다른 세포에 비해 호리게 나타난 반면, HIPK2 아데노 바이러스 처리군(mt hipk2-GFP)에서는 주변 세포에 비해 Hes1이 진하게 염색되어 HIPK2가 Hes1 단백질의 발현을 증가시키는데 관여한다는 것을 알려준다.

<9> 도 5b의 경우 Mash1 항체로 염색하여 각 분화 시기 동안에 보았을 때 돌연변이형 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에서 정상 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에 비해 더 진하게 Mash1의 발현이 보여 진다. Merged: HIPK2가 발현된 세포가 내는 녹색 형광 물질 사진과 Hes1, Mash1의 항체를 이용하여 염색한 사진이 모든 세포의 핵을 잡는 DAPI 사진과 함께 겹쳐진 사진.

<10> 도 6a와 도 6b는 신경줄기세포인 HiB5에 재조합 HIPK2 아데노 바이러스를 감염시킨 뒤 39℃, N2 배지 상태에서 하루를 둔 뒤 PDGF를 처리한 분화 유도 상태에서 하루 반(1.5d) 이 지난 후 신경 특이적 표지자 항체를 이용하여 형광 염색을 한 사진이다(X200). 콜린성 신경세포를 확인하기 위하여 표지자인 Choline acetyltransferase (이하 ChAT) 단백질을 대한 항체를 이용하였으며, GABAergic 신경 세포로 분화 여부를 확인하기 위하여 GABA항체, Glutaminergic 신경 세포를 확인하기 위하여 Glutamate 항체를 이용하였다. 도 5a는 GABA 항체(붉은색)를 이용하여 GABAergic 신경 세포로 분화하는지를 알아본 염색한 결과이다. HIPK2 돌연변이형 아데노 바이러스(녹색)를 처리한 군에서 GABA 단백질의 발현이 보여지는 반면 HIPK2 아데노 바이러스를 처리한 군에서는 GABA 단백질 발현이 적게 보여졌다. 도 5b는 ChAT 항체(붉은색)를 이용하여 염색한 결과로, 정상 HIPK2 아데노 바이러스(녹색)를 처리한 HiB5 세포군에서는 ChAT 염색이 잘 발현하고 있다. 반면에 돌연변이형 HIPK2 아데노 바이러스를 처리했을 경우에는 염색이 제대로 되지 않았다.

<11> 도 7은 도 6a와 도 6b의 신경분화의 염색 결과를 세포 종류별 분화 정도에 따라 분석하여 도표로 나타낸 것이다. 정상 HIPK2 아데노 바이러스와 돌연변이형 HIPK2의 아데노 바이러스를 처리한 후 분화 상태에서 어떤 종류의 세포로 변하는지 염색한 세포 수를 세어 통계처리 하였다. 정상 HIPK2 아데노 바이러스를 처리한 HiB5가 분화할시 ChAT로 염색된 세포 수는 전체 바이러스가 infection 된 세포 수에 대하여 36%가 염색되어 보였으며 그에 반해 돌연변이형 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에서는 25%의 세포만이 염색되었다. GABA 항체로 염색된 세포의 수는 정상 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에서는 21%인 반면에, 돌연변이형 HIPK2 아데노 바이러스 처리군에서는 57%나 염색되어서 세배 가까운 증가율을 보였다. Glutamate의 경우 각각 48%와 50%의 세포가 재조합 아데노 바이러스 처리군에서 염색되어 정상과 돌연변이형 HIPK2 아데노 바이러스를 처리한 두 군 간의 차이가 보이지 않았다.

<12> 도 8은 real-time PCR 방법을 통하여 HIPK2가 관여하는 신경 분화 동안에 Hes1의 증가가 Pax6를 매개로 하였는지 알아본 그래프이다. Pax6 유전자를 형질 도입되고 재조합 HIPK2 아데노 바이러스가 감염된 HiB5 세포에서 Hes1 mRNA 의 발현을 확인하기 위하여 RT-PCR 방법을 통해 cDNA를 얻었으며 이를 SYBER green Supermix를 이용하여 PCR 하였다. 정상 Pax6와 HIPK2가 과 발현하는 세포군에서는 Hes1의 mRNA 발현이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비하여 2.7배나 증가하였으며 활성 부위가 존재하지 않는 돌연변이형 Pax6(활성화 도메인을 제거한 PD/HD Pax6)와 HIPK2를 과 발현시켰을 때에는 2배 정도 증가하였다. 돌연변이형 HIPK2가 과 발현된 경우에는 Pax6의 형질도입 여부에 관계없이 대조군과 유사한 Hes1 mRNA 발현양상을 보였다.

<13> 도 9와 도 10은 HIPK2에 의해 활성화되는 pax6에 의한 콜린성 신경 세포 분화를 확인한 그림이다. 호메오 도메인 전사인자인 pax6는 신경의 분화 동안에 조절 작용을 한다. 도 8에서 HIPK2가 pax6와 함께 Hes1 mRNA 발현을 조절하는 것이 보여지므로, HIPK2가 콜린성 신경 분화에 작용하는 과정이 pax6에 의해 매개 될 수 있다.

<14> 도 9는 HiB5 세포에 정상 pax6과 돌연변이형 pax6를 도입하고 분화배지로 교환 1일 뒤, PDGF를 처리한 후 1일 뒤 콜린성 운동신경의 표지자인 전사인자 HB9항체와 초기 신경 전사인자이자 glutamate성 신경의 분화와 관련 있는 전사인자인 Neurogenin2(Ngn2)항체로 Immunoblot 한 것으로 PDGF처리 시 HB9의 발현이 증가하며 Pax6를 도입 시 더 증가하는 것을 알 수 있다. 돌연변이형 Pax6도입 시 PDGF만 처리한 군과 비교하여 감소하였다. 반면에 Ngn2의 증감은 큰 차이가 없는 것을 보여준다. 사용한 Plasmid는 myc-tag가 달려있는 것으로, myc항체로 동일시

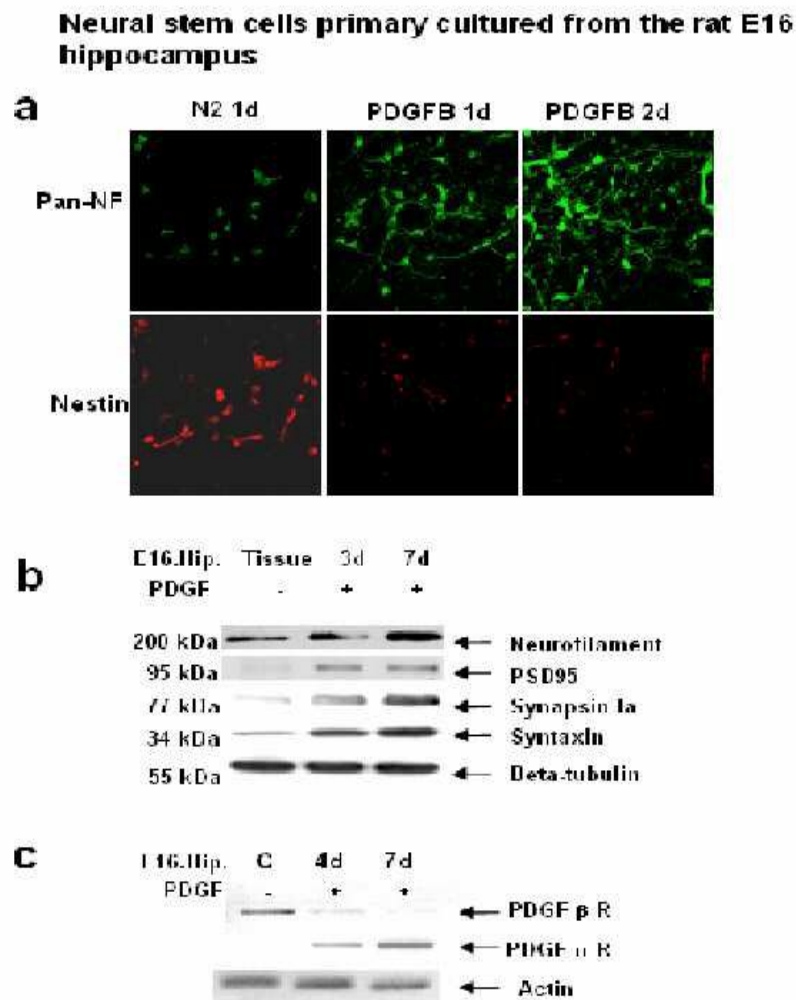
료를 Immunoblot하여 도입여부를 확인하였다. Beta-tubulin의 Immunoblot은 동량의 시료가 사용되었음을 의미한다.

<15> 도 10a(도 10의 윗 사진)은 흰쥐의 배아 및 성체 뇌에서 (in vivo) HIPK2의 downstream 유전자인 pax6가 콜린성 신경과 함께 발현되는 것을 염색하여 콜린성 신경의 분화에 pax6가 작용하는 것을 알려주는 사진이다. 흰쥐 성체와 배아 16일째의 뇌 조직 중 해마 부위를 면역 형광 염색하였을 때 Pax6의 발현이 나타난 세포(붉은 색)에서 콜린성 신경의 표지자인 ChAT(녹색)가 염색되었다.

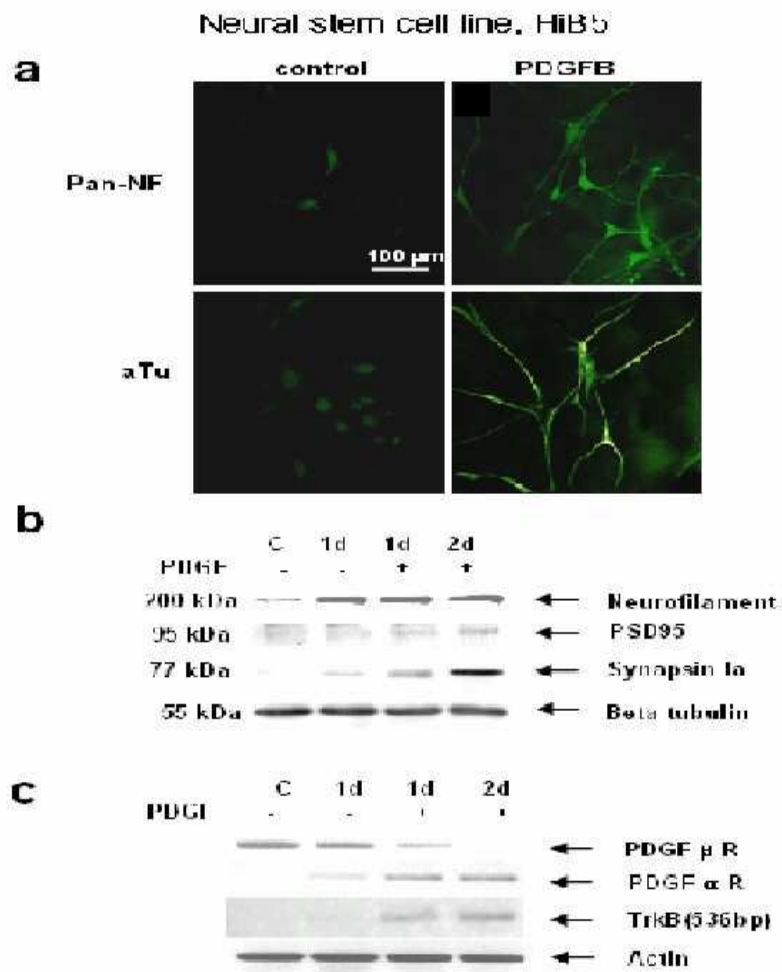
<16> 도 10b(도 10의 아래 사진)는 HiB5 신경 세포주에서 pax6 전사인자가 발현되는 세포가 콜린성 신경 세포임을 보여주는 사진이다. PDGF를 처리한 HiB5세포를 Pax6항체와 Chat항체로 면역 형광염색하고 핵을 염색하는 DAPI를 공초점 주사현미경으로 찍은 사진으로 pax6의 발현이 유지되는 세포에서 Chat 발현이 나타나 콜린성 신경 세포의 분화와 관련됨을 보여준다.

## 도면

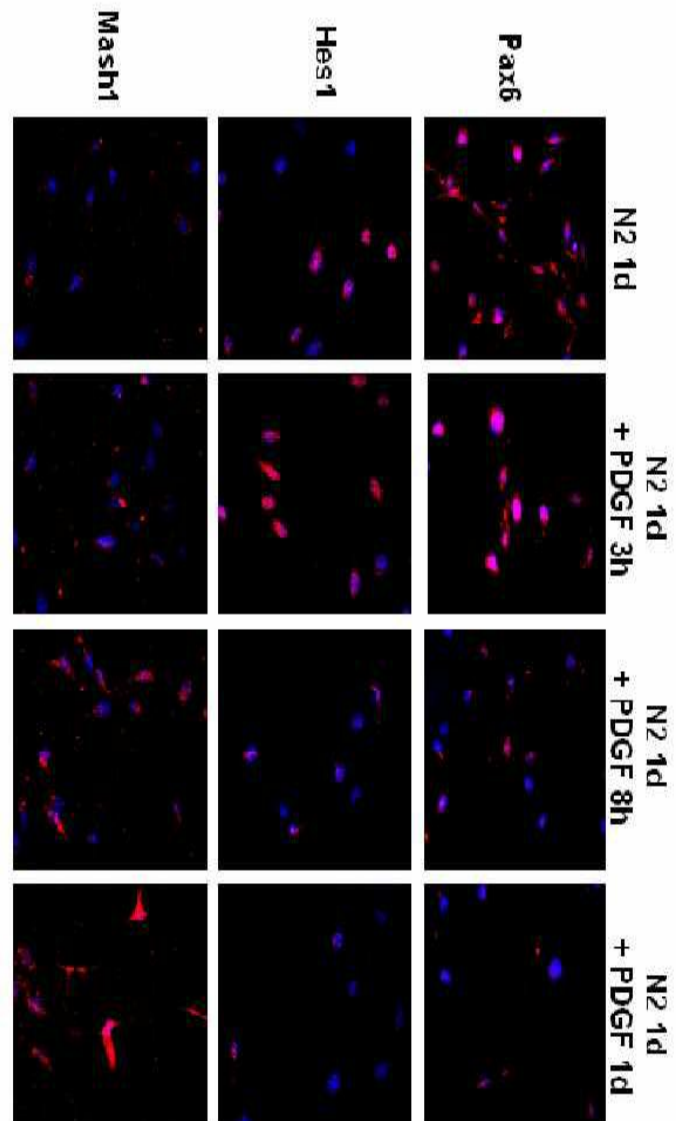
### 도면1



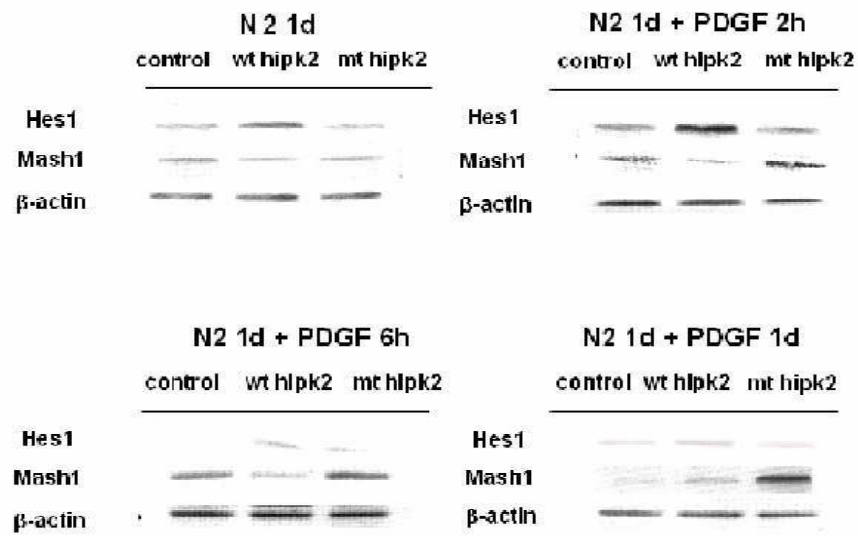
도면2



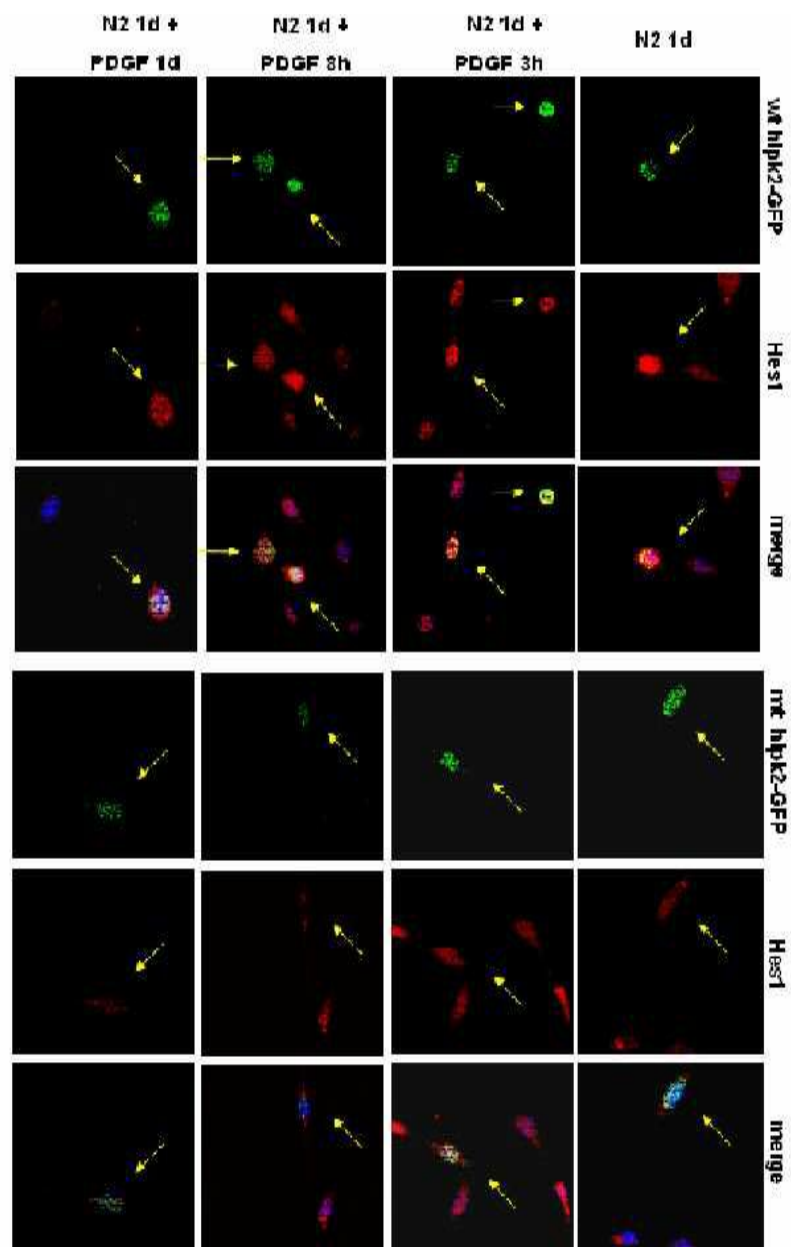
도면3



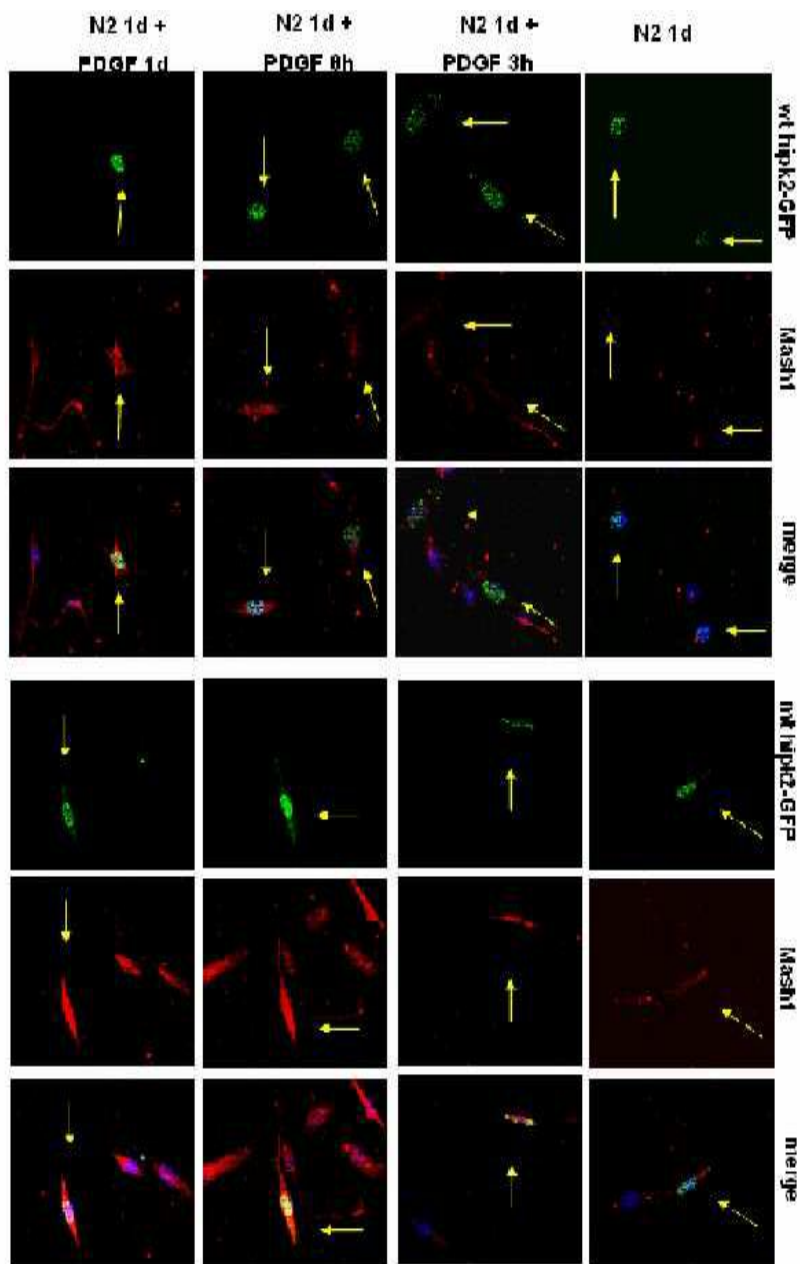
도면4



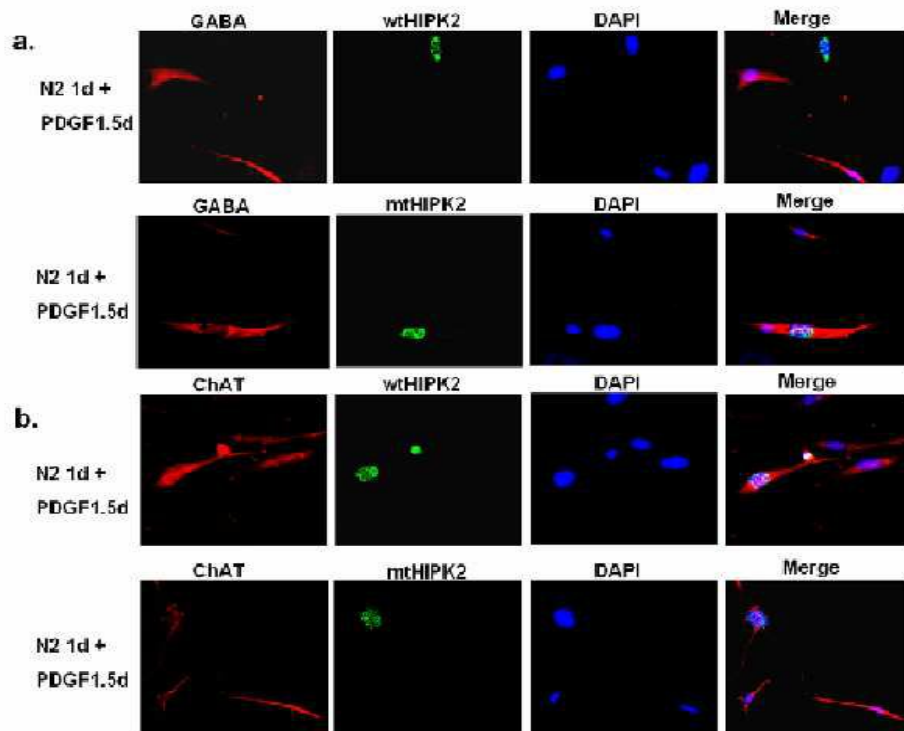
도면5a



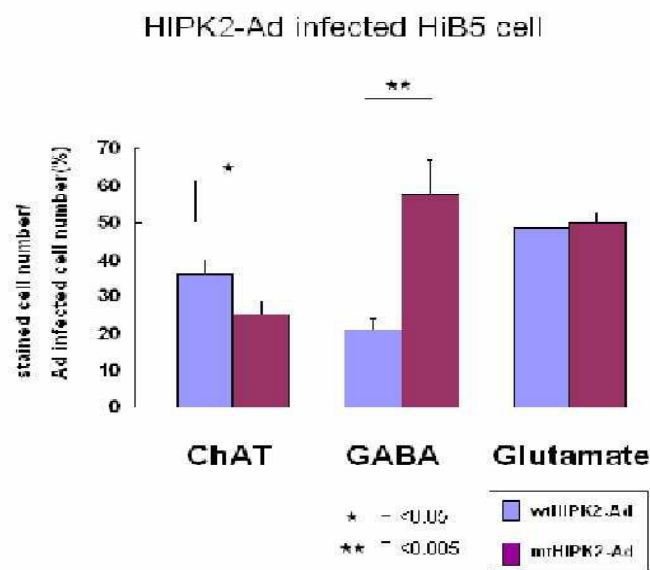
도면5b



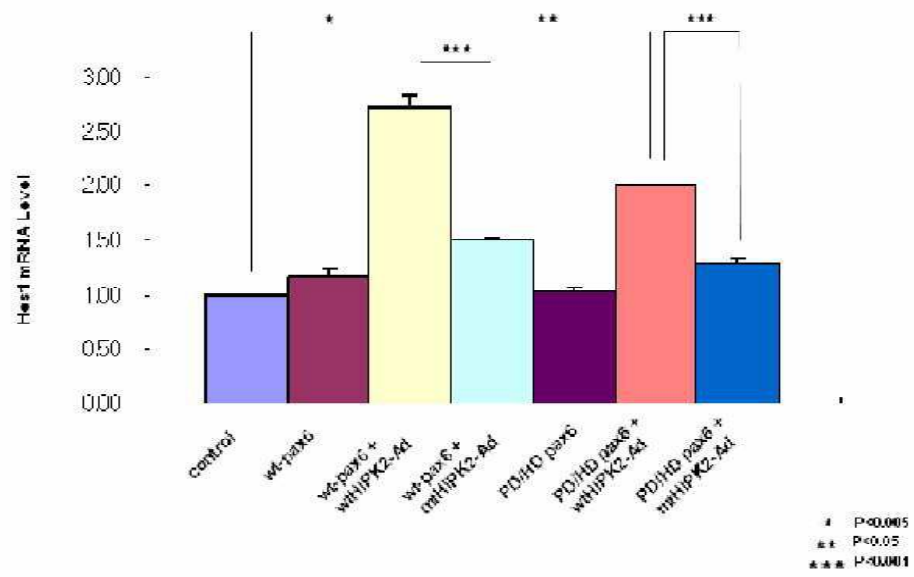
도면6



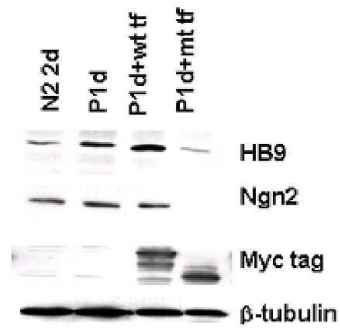
도면7



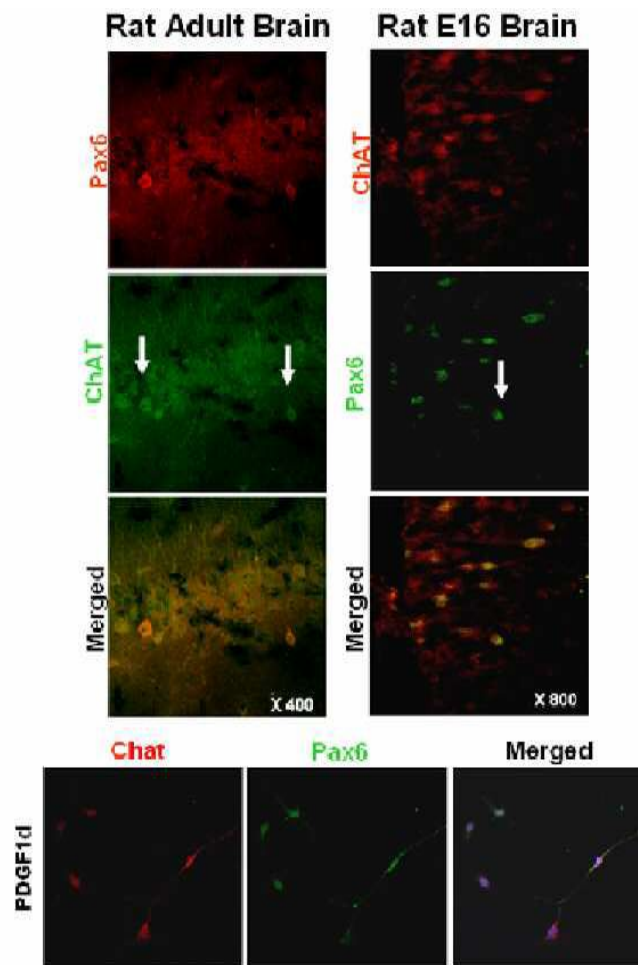
도면8



도면9



도면10



## 서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University  
 <120> Composition for treating neurologic diseases comprising HIPK2

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 1189  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> HIPK 2

<400> 1

Met Ala Ser His Val Gln Val Phe Ser Pro His Thr Leu Gln Ser Ser  
1 5 10 15

Ala Phe Cys Ser Val Lys Lys Leu Lys Val Glu Pro Ser Ser Asn Trp  
20 25 30

Asp Met Thr Gly Tyr Gly Ser His Ser Lys Val Tyr Ser Gln Ser Lys  
35 40 45

Asn Ile Pro Pro Ser Gln Pro Ala Ser Thr Thr Val Ser Thr Ser Leu  
50 55 60

Pro Ile Pro Asn Pro Ser Leu Pro Tyr Glu Gln Thr Ile Ile Phe Pro  
65 70 75 80

Gly Ser Thr Gly His Ile Val Val Thr Ser Ala Ser Ser Thr Ser Val  
85 90 95

Thr Gly Gln Val Leu Gly Gly Pro His Asn Leu Met Arg Arg Ser Thr  
100 105 110

Val Ser Leu Leu Asp Thr Tyr Gln Lys Cys Gly Leu Lys Arg Lys Ser  
115 120 125

Glu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Ser Val Gln Ile Ile Glu Glu His Pro  
130 135 140

Pro Met Ile Gln Asn Asn Ala Ser Gly Ala Thr Val Ala Thr Ala Thr  
145 150 155 160

Thr Ser Thr Ala Thr Ser Lys Asn Ser Gly Ser Asn Ser Glu Gly Asp  
165 170 175

Tyr Gln Leu Val Gln His Glu Val Leu Cys Ser Met Thr Asn Thr Tyr  
180 185 190

Glu Val Leu Glu Phe Leu Gly Arg Gly Thr Phe Gly Gln Val Val Lys  
195 200 205

Cys Trp Lys Arg Gly Thr Asn Glu Ile Val Ala Ile Lys Ile Leu Lys  
210 215 220

Asn His Pro Ser Tyr Ala Arg Gln Gly Gln Ile Glu Val Ser Ile Leu  
225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Thr Glu Ser Ala Asp Asp Tyr Asn Phe Val Arg Ala  
245 250 255

Tyr Glu Cys Phe Gln His Lys Asn His Thr Cys Leu Val Phe Glu Met  
260 265 270

Leu Glu Gln Asn Leu Tyr Asp Phe Leu Lys Gln Asn Lys Phe Ser Pro  
275 280 285

Leu Pro Leu Lys Tyr Ile Arg Pro Val Leu Gln Gln Val Ala Thr Ala  
290 295 300

Leu Met Lys Leu Lys Ser Leu Gly Leu Ile His Ala Asp Leu Lys Pro  
305 310 315 320

Glu Asn Ile Met Leu Val Asp Pro Ser Arg Gln Pro Tyr Arg Val Lys  
325 330 335

Val Ile Asp Phe Gly Ser Ala Ser His Val Ser Lys Ala Val Cys Ser  
340 345 350

Thr Tyr Leu Gln Ser Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Ile Ile Leu Gly  
355 360 365

Leu Pro Phe Cys Glu Ala Ile Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Val Ile  
370 375 380

Ala Glu Leu Phe Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Pro Gly Ala Ser Glu Tyr  
385 390 395 400

Asp Gln Ile Arg Tyr Ile Ser Gln Thr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Tyr  
405 410 415

Leu Leu Ser Ala Gly Thr Lys Thr Thr Arg Phe Phe Asn Arg Asp Thr  
420 425 430

Asp Ser Pro Tyr Pro Leu Trp Arg Leu Lys Thr Pro Asp Asp His Glu  
435 440 445

Ala Glu Thr Gly Thr Lys Ser Lys Glu Ala Arg Lys Tyr Ile Phe Asn  
450 455 460

Cys Leu Asp Asp Met Ala Gln Gly Asn Met Thr Thr Asp Leu Glu Gly

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 465                                                             | 470 | 475 | 480 |
| Ser Asp Met Leu Val Glu Lys Ala Asp Arg Arg Glu Phe Ile Asp Leu |     |     |     |
|                                                                 | 485 | 490 | 495 |
| Leu Lys Lys Met Leu Thr Ile Asp Ala Asp Lys Arg Val Thr Pro Ile |     |     |     |
|                                                                 | 500 | 505 | 510 |
| Glu Thr Leu Asn His Pro Phe Val Thr Met Thr His Leu Leu Asp Phe |     |     |     |
|                                                                 | 515 | 520 | 525 |
| Pro His Ser Ala His Val Lys Ser Cys Phe Gln Asn Met Glu Ile Cys |     |     |     |
|                                                                 | 530 | 535 | 540 |
| Lys Arg Arg Val Asn Met Tyr Asp Thr Val Asn Gln Ser Lys Thr Pro |     |     |     |
| 545                                                             | 550 | 555 | 560 |
| Phe Ile Thr His Val Ala Pro Ser Thr Ser Thr Asn Leu Thr Met Thr |     |     |     |
|                                                                 | 565 | 570 | 575 |
| Phe Asn Asn Gln Leu Thr Thr Val His Asn Gln Ala Pro Thr Thr Ser |     |     |     |
|                                                                 | 580 | 585 | 590 |
| Ser Ala Thr Leu Ser Leu Ala Asn Pro Glu Val Ser Ile Leu Asn Tyr |     |     |     |
|                                                                 | 595 | 600 | 605 |
| Gln Ser Ala Leu Tyr Gln Pro Ser Ala Ala Ser Met Ala Ala Val Ala |     |     |     |
| 610                                                             | 615 | 620 |     |
| Pro Arg Ser Met Pro Leu Gln Thr Gly Thr Ala Gln Ile Cys Ala Arg |     |     |     |
| 625                                                             | 630 | 635 | 640 |
| Pro Asp Pro Phe Gln Gln Ala Leu Ile Val Cys Pro Pro Gly Phe Gln |     |     |     |
|                                                                 | 645 | 650 | 655 |
| Gly Leu Gln Ala Ser Pro Ser Lys His Ala Gly Tyr Ser Val Arg Met |     |     |     |
|                                                                 | 660 | 665 | 670 |
| Glu Asn Ala Val Pro Ile Val Thr Gln Ala Pro Gly Ala Gln Pro Leu |     |     |     |
|                                                                 | 675 | 680 | 685 |
| Gln Ile Gln Pro Gly Leu Leu Ala Gln Gln Ala Trp Pro Gly Gly Ala |     |     |     |
| 690                                                             | 695 | 700 |     |

Gln Gln Ile Leu Leu Pro Pro Thr Trp Gln Gln Leu Thr Gly Val Ala  
705 710 715 720

Thr His Thr Ser Val Gln His Ala Ala Val Ile Pro Glu Thr Met Ala  
725 730 735

Gly Thr Gln Gln Leu Ala Asp Trp Arg Asn Thr His Ala His Gly Ser  
740 745 750

His Tyr Asn Pro Ile Met Gln Gln Pro Ala Leu Leu Thr Gly His Val  
755 760 765

Thr Leu Pro Ala Ala Gln Pro Leu Asn Val Gly Val Ala His Val Met  
770 775 780

Arg Gln Gln Pro Thr Ser Thr Thr Ser Ser Arg Lys Ser Lys Gln His  
785 790 795 800

Gln Ser Ser Val Arg Asn Val Ser Thr Cys Glu Val Thr Ser Ser Gln  
805 810 815

Ala Ile Ser Ser Pro Gln Arg Ser Lys Arg Val Lys Glu Asn Thr Pro  
820 825 830

Pro Arg Cys Ala Met Val His Ser Ser Pro Ala Cys Ser Thr Ser Val  
835 840 845

Thr Cys Gly Trp Gly Asp Val Ala Ser Ser Thr Thr Arg Glu Arg Gln  
850 855 860

Arg Gln Thr Ile Val Ile Pro Asp Thr Pro Ser Pro Thr Val Ser Val  
865 870 875 880

Ile Thr Ile Ser Ser Asp Thr Asp Glu Glu Glu Glu Gln Lys His Ala  
885 890 895

Pro Thr Ser Thr Val Ser Lys Gln Arg Lys Asn Val Ile Ser Cys Val  
900 905 910

Thr Val His Asp Ser Pro Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Asn Thr Ser Pro  
915 920 925

Tyr Ser Val Gln Gln Arg Thr Gly His Asn Gly Thr Asn Thr Leu Asp  
930 935 940

Thr Lys Gly Gly Leu Glu Asn His Cys Thr Gly Asn Pro Arg Thr Ile  
945 950 955 960

Ile Val Pro Pro Leu Lys Thr Gln Ala Ser Glu Val Leu Val Glu Cys  
965 970 975

Asp Ser Leu Gly Pro Ala Ile Ser Ala Ser His His Ser Ser Ser Phe  
980 985 990

Lys Ser Lys Ser Ser Ser Thr Val Thr Ser Thr Ser Gly His Ser Ser  
995 1000 1005

Gly Ser Ser Ser Gly Ala Ile Ala Tyr Arg Gln Gln Arg Pro Gly Pro  
1010 1015 1020

His Phe Gln Gln Gln Gln Pro Leu Asn Leu Ser Gln Ala Gln Gln His  
1025 1030 1035 1040

Met Ala Ala Asp Arg Thr Gly Ser His Arg Arg Gln Gln Ala Tyr Ile  
1045 1050 1055

Thr Pro Thr Met Ala Gln Ala Pro Tyr Thr Phe Pro His Asn Ser Pro  
1060 1065 1070

Ser His Gly Thr Val His Pro His Leu Ala Ala Ala Ala His Leu Pro  
1075 1080 1085

Thr Gln Pro His Leu Tyr Thr Tyr Thr Ala Pro Thr Ala Leu Gly Ser  
1090 1095 1100

Thr Gly Thr Val Ala His Leu Val Arg Ser Gln Gly Ser Ala Arg His  
1105 1110 1115 1120

Thr Val Gln His Thr Ala Tyr Pro Ala Ser Ile Val His Gln Val Pro  
1125 1130 1135

Val Ser Met Gly Pro Arg Val Leu Pro Ser Pro Thr Ile His Pro Ser  
1140 1145 1150

Gln Tyr Pro Ala Gln Phe Ala His Gln Thr Tyr Ile Ser Ala Ser Pro  
1155 1160 1165

Ala Ser Thr Val Tyr Thr Gly Tyr Pro Leu Ser Pro Ala Lys Val Asn

|                                                                   |                     |      |     |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------|------|-----|
| 1170                                                              | 1175                | 1180 |     |
| Gln Tyr Pro Tyr Ile                                               |                     |      |     |
| 1185                                                              |                     |      |     |
| <210>                                                             | 2                   |      |     |
| <211>                                                             | 3570                |      |     |
| <212>                                                             | DNA                 |      |     |
| <213>                                                             | Artificial Sequence |      |     |
| <220>                                                             |                     |      |     |
| <223>                                                             | HIPK 2 gene         |      |     |
| <400>                                                             | 2                   |      |     |
| atggcctcac atgtgcaagt tttctccct cacacccttc aatcaagtgc ctctcttagt  |                     |      | 60  |
| gtgaagaaac taaaagtaga gccaaattcc aactgggaca tgactgggta cggctccac  |                     |      | 120 |
| agcaaagtgt acagccagag caagaacata ccacctctc agccagcctc cacaaccgtc  |                     |      | 180 |
| agcacctcct tgccaatccc caaccaagc ctaccttacg agcagaccat catcttccca  |                     |      | 240 |
| ggaagtactg gacacatagt tgtaacatca gcaagtagca ctctgtcac cgggcaagtc  |                     |      | 300 |
| ctcggtagac cacataacct aatgcgtcga agcactgtga gcctcctga cacctaccaa  |                     |      | 360 |
| aaatgtggac tcaagcgcaa gaggtaggag attgagaaca caagcagcgt gcagatcatt |                     |      | 420 |
| gaagagcatc cacccatgat tcagaataat gccagcgggg cactgttagc cactgccacc |                     |      | 480 |
| acatccactg ccacctcaa aaacagtggc tccaacagtg aaggggacta tcagctggtg  |                     |      | 540 |
| cagcatgaag tactgtgtct catgaccaac acctatgagg ttttagagtt cttggggcga |                     |      | 600 |
| gggacatttg ggcaagtggc caagtgtgg aaacggggca ccaatgaaat tgtggccatt  |                     |      | 660 |
| aagatcctca agaaccaccc ctctatgcc cggcaaggcc agattgaagt gagcatcttg  |                     |      | 720 |
| gcccggctga gcacggagag cgctgatgac tacaattttg tgcgggccta tgagtgttc  |                     |      | 780 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| cagcacaaga accacacgtg cttagtcttt gagatgttgg agcagaacct ttatgacttt | 840  |
| ctgaaacaga acaagtttag tcccttgccc ctcaagtata ttgcccagt cctccagcag  | 900  |
| gtagccacag ccctgatgaa actcaaaagc ctgggtctta tccatgctga cctcaaacca | 960  |
| gaaaacatca tgctgggtga tccatccaga caaccgtacc gagtgaaggt cattgacttt | 1020 |
| ggttcagcta gtcatgtgtc caaagctgtc tgctctacgt acttgcaatc cagatactac | 1080 |
| cgggccctg agatcatcct tggtttgcca ttctgtgagg caattgacat gtggtcctt   | 1140 |
| ggttggtgca ttgctgaact gttcctgggc tggccattat acccaggtgc ttctgagtat | 1200 |
| gatcagattc ggtatatttc acaaacacag ggtttaccag ctgaatat tttaagtga    | 1260 |
| gggacaaaga caactaggtt ttccaaccgt gacacagact caccgtatcc ttgtggagg  | 1320 |
| ctaaagacac cagatgacca tgaagcagag acgggaacca agtcaaagga agcaagaaag | 1380 |
| tacattttca actgtttgga tgatatggcc caggggaaca tgacaacaga ttggaaggg  | 1440 |
| agtgacatgt tagtagagaa ggcagaccga cgggagtcca ttgacctgtt aaagaagatg | 1500 |
| ctgaccatcg atgtgataa gagagtcact ccattgaaa ctctgaacca cccctttgtc   | 1560 |
| accatgacac acctgcttga cttcccccatt agtgcccatg tcaaattctt tttccaaac | 1620 |
| atggagattt gcaagcgccg ggtgaatatg tatgacacag tgaaccagag caaaacacct | 1680 |
| ttcatcactc acgtggcccc cagcacatcc accaacttga ccatgacctt taacaaccag | 1740 |
| ctgaccactg tccacaacca ggtccccc accctccagt ccactctttc cttagccaat   | 1800 |
| cccgaagtct ccatactaaa ctaccaatct gcactctacc agccctcagc ggcatccatg | 1860 |
| gccgcggtgg ccccgaggag catgcccctg cagacgggaa cagcccaaat ttgtgccga  | 1920 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| cctgatccct tccagcaagc tctcatcgtg tgtcccccgt gcttccaagg cctgcaggcc  | 1980 |
| tctccctcca agcacgctgg ctactcagtg cggatggaaa atgctgtccc catcgtcacc  | 2040 |
| caggcgccag gagctcagcc tcttcagatc caaccaggcc tgcttgctca gcaggcctgg  | 2100 |
| ccaggtagggg cccaacagat cctacttctt ccaacatggc agcagctgac tggcgtggcc | 2160 |
| accacacat ctgtacagca tgcagctgtg attcctgaga ccatggcagg cactcagcaa   | 2220 |
| ctggctgact ggaggaacac gcattgctat ggaagtcatt acaatcccat catgcagcag  | 2280 |
| cctgcactct tgactggica tgtgacctt ccagctgccc agcccttaa tgtgggtgta    | 2340 |
| gccccatgta tgaggcaaca accaaccagc accacctctt ccaggaagag taagcagcac  | 2400 |
| cagtcactct tgagaaatgt ctccacctgt gaggtgacct cttcacaggc tatcagctcc  | 2460 |
| cctcagcgt ccaagcgtgt caaggagaac actccccac ggtgcgcat ggtacacagc     | 2520 |
| agcccagctt gcagcacctc agtcacctgt gggtagggcg acgtggcctc cagcaccacc  | 2580 |
| cgggagcgac agcggcagac gattgtcatc cccgacaccc cgagccccac agtcagtgtc  | 2640 |
| atcaccatca gcagtgcac cgatgaagaa gaggagcaga agcacgcccc caccagcaca   | 2700 |
| gtctccaagc aaagaaaaaa tgtcatcagc tgtgtcaccg tccagcactc tccctactct  | 2760 |
| gactcctcca gcaacaccag cccctactcg gtgcagcagc gcacagggca caacggcacc  | 2820 |
| aacaccttgg acaccaaggg gggcctagag aatcactgca ctggcaaccc ccgcaccatc  | 2880 |
| atcgtacccc cactgaagac ccaggccagt gaagtgttgg tagaatgtga cagcctaggg  | 2940 |
| ccagcgatca gtgccagtca ccattcgtcc tctttcaagt ccaagtctc cagcaccgtg   | 3000 |
| acctccacca gtggacactc ttcaggagc tcttcaggag ccatcgcta ccgtcagcag    | 3060 |
| cggccaggcc cccacttcca gcagcagcag cccctcaatc tcagccaggc ccagcagcac  | 3120 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| atggctgctg accgcaccgg gagtcaccgt cgacagcagg cctacatcac tccgaccatg | 3180 |
| gcgcaagctc cgtacacctt cccgcacaac agccccagcc atggcactgt tcacccccac | 3240 |
| ctggctgctg ctgcccacct ccccaccag cctcacctct acacctatac agcgcccaca  | 3300 |
| gccctaggct ccaccggcac tgtagccac ctggtgcat cccaaggctc agcacgccac   | 3360 |
| accgtgcagc acactgccta tccggccagc atcgtccacc aggtccctgt gagcatgggg | 3420 |
| ccccgggtcc tgcctcgc caccatccac ccagtcagt atccagccca gtttgccac     | 3480 |
| cagacctata tcagcgctc gccagcctcc accgtctaca ctggataccc actgagtcct  | 3540 |
| gccaaggtca accaataccc ttacatataa                                  | 3570 |

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Hes1 Forward

|                  |    |
|------------------|----|
| <400> 3          |    |
| cggttcagc gagtgc | 18 |

<210> 4  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Hes1 Reverse

|                      |    |
|----------------------|----|
| <400> 4              |    |
| cggtgttaac gccctcaca | 19 |

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GAPDH Forward

<400> 5  
 aagagaggcc ctcagttgct 20

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> GAPDH Reverse

<400> 6  
 ttgtgaggga gatgctcagt gt 22