



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0006545
(43) 공개일자 2011년01월20일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0064238

(22) 출원일자 2009년07월14일

심사청구일자 2009년07월14일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김명옥

경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호

정봉철

서울특별시 성북구 하월곡동 39-1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

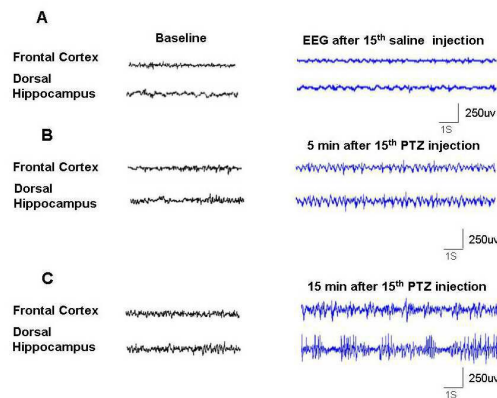
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 모체 간질에 의한 태아의 신경기능장애 질환의 진단방법 및 이의 치료제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 임신 중인 모체의 간질에 의한 신경기능장애 질환에 대한 정보 제공 방법 및 상기 질환을 치료하기 위한 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 간질이 의심되는 개체와 정상 개체의 태아 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 양상을 확인함으로써, 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보를 제공하는 방법 및 모체 간질 발작 모델에 후보 물질을 투여한 후, 상기 단백질의 발현증감의 변화 여부를 확인함으로써 신경기능장애 관련 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

양병철

경기도 수원시 권선구 서둔동 농촌진흥청 축산연구
소

박문석

경상남도 진주시 가좌동 900

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2008-0159/03-2009-0074

부처명 과학기술부/과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 대사체 분석 및 연구사업/과학재단 중견과학자 연구사업

연구과제명 전립선암, 유방암에서 호르몬 의존적 표지물질에 의한 세포-특이유전자-대사의 cross
link에 의한 대사체의 기능해석 및 질환 대사체 구축/태아 신경장애 동물모델에서 세포간의 신호전달 및 세포사
멸 이상 발현 연구 siRNA의 응용

기여율

주관기관 경상대학교 산학협력단/경상대학교 산학협력단

연구기간 2008.04.01 ~ 2009.03.31/2009.03.01 ~2010.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 개체의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체(GABA_{B1} receptor) 및 PKA(protein kinase A)의 발현을 확인하는 단계;
- (b) 상기 개체에 PTZ(pentylenetetrazol) 또는 에탄올을 투여하는 단계;
- (c) 상기 개체의 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현량이 (a) 단계에 비해 감소된 개체를 선별하는 단계;
- (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및
- (e) GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현량 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)단계에서 사이토크롬-c(Cytochrome-c) 및 카스파제-3(caspases-3)의 발현을 추가적으로 확인하고, 상기 (c) 단계에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현의 증가를 추가적으로 확인함으로써 개체를 선별하며, 상기 (e) 단계에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현이 감소하는 것을 추가적으로 확인하는 것을 포함하는 스크리닝 방법.

청구항 3

- (a) 개체의 해마 뉴런에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현을 확인하는 단계;
- (b) 상기 개체에 PTZ 또는 에탄올을 투여하는 단계;
- (c) 상기 개체의 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현량이 (a) 단계에 비해 증가된 개체를 선별하는 단계;
- (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및
- (e) 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현량 감소를 확인하는 단계를 포함하는 신경기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 해마 뉴런은 태아의 해마 뉴런인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경기능장애 관련 질환은 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 및 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)으로 구성된 군으로부터 선택된 질환을 치료하기 위한 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현은 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 확인하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 mRNA 수준에서 확인하는 방법은 RT-PCR에 의한 것인 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 단백질 수준에서 확인하는 방법은 웨스턴 블롯에 의한 것인 방법.

청구항 9

- (a) 간질 의심 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런 내 GABA_{B1} 수용체 및 PKA 발현을 비교하는 단계;
- (b) 간질 의심 개체에서 GABA_{B1} 수용체 또는 PKA 발현이 정상 개체에서의 발현보다 감소된 개체를 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 태아를 신경기능장애 질환을 가진 개체로 확인하는 단계를 포함하는 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현을 추가적으로 비교하고, 상기 (b) 단계에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현 증가를 추가적으로 확인하여 선별하는 단계를 포함하는 정보제공방법.

청구항 11

- (a) 간질 의심 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런 내 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현을 비교하는 단계;
- (b) 간질 의심 개체에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현이 정상 개체에서의 발현보다 증가된 개체를 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 태아를 신경기능장애 질환을 가진 개체로 확인하는 단계를 포함하는 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보제공방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 임신 중인 모체의 간질에 의한 신경기능장애 질환에 대한 정보 제공 방법 및 상기 질환을 치료하기 위한 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 간질이 의심되는 개체와 정상 개체의 태아 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 양상을 확인함으로써, 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보를 제공하는 방법 및 모체 간질 발작 모델에 후보 물질을 투여한 후, 상기 단백질의 발현증감의 변화 여부를 확인함으로써 신경기능장애 관련 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

간질이란, 단일한 간질 발작을 유발할 수 있는 원인 인자, 예를 들어 전해질 불균형, 산-염기 이상, 요독증, 알코올 금단현상, 심한 수면박탈상태 등 발작을 초래할 수 있는 신체적 이상이 없음에도 불구하고, 반복적으로(24시간 이상의 간격을 두고 2회 이상) 발생하여 발작을 일으키는 만성화된 질환군, 또는 발작이 1회만 발생하였다고 하더라도 뇌 영상검사(뇌 MRI 등)에서 간질을 일으킬 수 있는 병리적 변화가 존재하는 질환을 의미한다. 간

질의 발병률과 유병률은 생후 1년 이내에 가장 높았다가 급격히 낮아지고 청소년기와 장년기에 걸쳐 낮은 발생률을 유지하다가 60세 이상의 노년층에서는 다시 급격히 증가하는 U자형의 형태를 보인다.

[0003] 이와 같은 경향을 보이는 간질은 그 원인과 임상적 특성이 다양한 증후군들로 구성되기 때문에 병의 경과 및 치료 결과를 정확하게 규명하기는 어렵다. 지금까지 알려진 사실은 상당수 환자의 간질이 시간이 지나면서 서서히 발생 빈도가 줄어들고, 약 70%에서는 항간질약에 의해 장기간에 걸쳐 증상의 완화가 가능하다는 것이다. 일반적으로 간질환자의 30~40%는 소량의 단독약물요법으로 쉽게 증상을 조절할 수 있고, 장기간 발작이 없는 경우에는 약물치료를 중단해도 재발이 없는 완치 상태가 된다고 알려져 있다. 그러나 약 30% 정도에서는 단독약물요법으로 증상이 조절되지만 약물 치료를 중단하게 되면 재발하고, 약 20%에서는 적극적인 약물 치료로 증상을 조절할 수 있지만 투약 중에도 발작이 재발한다고 알려져 있다. 그리고 약 20% 정도의 환자는 난치성 간질(intractable epilepsy)이 되어 약물치료를 잘 반응하지 않고 발작이 계속된다.

[0004] 특히 간질은 신경세포의 손상을 야기시키며, 발작이 조절되지 않는다면 이러한 영향도 계속 진행될 수 있는 것으로 알려져 있는데, 구체적으로 간질은 흔히 신경세포 사멸, 축색 성장(axonal sprouting), 수상돌기변화(dendritic change), 수용체 변화(receptor change), 세포분자변화(cellular molecular change) 등이 올 수 있으며, 이중 가장 잘 알려진 증상으로는 신경세포의 사멸망이다. 이와 같이 신경 세포 사멸을 일으키는 발작을 억제하기 위한 방법으로 신경전달물질(neurotransmitter)의 일종인 GABA의 억제를 조절하고자 하는 조절제 등에 대한 연구가 이루어져 왔다. 그럼에도 불구하고 아직까지도 간질에 대한 효과적인 완화제 또는 치료제는 많지 않은 실정이며, 특히 임신 중 모체의 간질로 인하여 태아에 미치는 영향 및 이에 대한 치료제에 대해서는 알려진 바 없다.

[0005] 한편, 신경전달물질(neurotransmitter)이란, 뇌를 비롯한 체내의 신경 세포에서 방출되어, 인접하고 있는 신경 세포 등에 정보를 전달하는 일련의 물질로서, 크게 아미노산류(아세틸콜린, 글리신, 아스파라긴산, 글루타메이트(glutamate)), 아민류(도파민, 아드레날린(에피네프린), (노르아드레날린), 펩티드류(바소프레신), 및 지방산류(히스타민, 세로토닌) 등으로 분류된다. 그 중, GABA(gamma-aminobutyric acid)는 억제성(ingibiutory) 시냅스 후(post synaptic) 전위를 일으키는 신경전달물질로서, 주로 다른 신경세포나 축색돌기의 근위부와 시냅스를 이루며 억제역할을 하는 신경세포에 존재한다. GABA는 GABA 수용체와 결합하면, GABA 수용체 중 특히 GABA-A에 의해 Cl^- 채널이 열리면서 음전하를 띠는 염소가 세포 안쪽으로 들어오게 되며, 유입된 전하에 의한 세포 내 이온 구배의 변화로, 흥분성을 유지하던 세포 내 작용을 억제성으로 이끌게 된다. 이러한 GABA는 GABA 또는 GABA 수용체의 이상, 또는 상기 분자들의 결핍시 억제성 기작에 이상이 초래되어 다양한 신경 질환을 야기하는 것으로 알려져 있다. GABA계의 이상은 우울증, 및 간질 등과 같은 질환을 야기하는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 그 밖의 GABA 수용체는 크게 GABA-A 와 GABA-B 수용체로 구분되며, GABA-B 수용체는 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}로 구분될 수 있다. 그 중 GABA_{B1} 수용체는 G-단백질과 연결된 구조로 세포막의 이온채널인 K^+ 채널을 활성화 시키며, 비간접적 억제성을 지닌 것으로 알려져 있으나, 간질에서 GABA_{B1} 수용체 역할, 특히 태아에서 그의 분자적 발현 및 분포에 대해서는 알려진 바가 없다. 특히, 태아의 해마 뉴런 영역에 의한 분석으로부터 간질의 발병 여부 진단이 가능할 수 있음에 대해서는 알려져 있지 않다. 또한, GABA_{B1} 수용체 발현과 사이토크롬-c, 카스파제-3 및 PKA의 발현 양상을 함께 분석함으로써 상기 질환의 진단 및 자체 스크리닝이 가능할 수 있음에 대해서는 보고된 바 없다.

[0007] 이에 본 발명자들은 PTZ 또는 에탄올에 의해 유발된 간질 모델에서 GABA 중 특히 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 변화를 확인하고, 후보 물질을 처리함에 따라 상기 발현 증감의 변화를 확인함으로써, 간질을 포함하는 신경기능장애 질환의 치료제를 스크리닝 할 수 있음을 확인하는 한편, 상기과 같은 단백질의 발현 양상을 확인함으로써 태아의 신경기능장애 질환 유무를 진단할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 개체에 PTZ(pentylenetetrazol) 또는 에탄올을 투여함으로써 유도된 간질 모델에 후보 물질을 투여하는 한편, 해당 개체의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 양상을 확인함으로써, 신경기능장애 질환 치료제를 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 간질 의심 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런 내 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현 양상을 확인함으로써, 태아의 신경기능장애 질환 여부에 대한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 하나의 양태로서 본 발명은, 임신 중 간질 발작으로 인한 태아의 신경기능장애 질환 치료제를 스크리닝 하는 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 (a) 개체의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체(GABA_{B1} receptor) 및 PKA(protein kinase A)의 발현을 확인하는 단계; (b) 상기 개체에 PTZ(pentylenetetrazol) 또는 에탄올을 투여하는 단계; (c) 상기 개체의 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현량이 (a) 단계에 비해 감소된 개체를 선별하는 단계; (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및 (e) GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현량 증가를 확인하는 단계를 포함하는 신경기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0011] 또한, 다른 하나의 양태로서 본 발명은, (a) 개체의 해마 뉴런에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현을 확인하는 단계; (b) 상기 개체에 PTZ 또는 에탄올을 투여하는 단계; (c) 상기 개체의 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현량이 (a) 단계에 비해 증가된 개체를 선별하는 단계; (d) 선별된 개체에 후보 물질을 투여하는 단계; 및 (e) 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현량 감소를 확인하는 단계를 포함하는 신경기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 개체의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현을 확인하는 한편, 후보 물질의 처리 전후에 상기 단백질들의 발현의 증감 변화를 확인함으로써 치료제를 스크리닝 할 수 있다. 바람직하게 본 발명은 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 및 카스파제-3로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 발현을 확인함으로써 치료제를 스크리닝 할 수 있고, 상기 네 종류의 단백질 중 어느 둘 이상, 셋 이상, 또는 전부의 발현 양상을 확인함으로써 달성될 수 있다. 또한, 이러한 발현 양상은 순차적으로 또는 동시에 수행할 수 있으며, 필요에 따라 단백질 수준이 아닌 mRNA 수준에서 확인할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 GABA란, 억제 기능을 담당하는 신경전달물질로서, 시냅스(synapse) 뉴런의 막 단백질에 존재하는 GABA 수용체와 결합하는 분자를 의미한다. 이러한 GABA와 결합하는 GABA 수용체는 크게 GABA-A 및 GABA-B로 구성되며 GABA-B는 다시 GABA_{B1} 및 GABA_{B2}로 구분될 수 있다. 본 발명에서의 용어 "GABA_{B1} 수용체란", G-단백을 통하여 느린반응을 매개하며 이는 주로 Glutamatergic 시냅스전 뉴런(presynaptic) 수용체로서 글루탐산(glutamic acid)의 배출을 억제함으로써 흥분 기능(excitatory function)을 억제한다.

[0014] 본 발명에서의 용어 "PKA(protein kinase A)"란, 세포 성장 조절 역할을 하는 단백질로서, 세포의 생존과 성장을 위하여 호르몬이나 신경전달물질이 세포막에 존재하는 수용체에 결합하면 신호가 발생하게 되는데, 이 신호는 세포 내부로 전달하는 역할을 하는 2차 전달자에 의해 전달된다. 특히, cAMP에 의한 신호는 PKA라는 인산화효소에 전달되어 다른 단백질을 인산화시킴으로써 그 작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서, PKA는 간질 발생(epileptogenesis) 과정과 관련이 있는 시냅스 전달(synaptic transmission)의 주요 매개자이다.

[0015] 한편, 본 발명에서의 용어 "사이토크롬-c(Cytochrome-c)"란, 초기 세포 사멸단계에서 간질 발작 후 미토콘드리아에서의 증가된 칼슘 농도로 인하여 세포질로 사이토크롬-c의 방출이 일어남으로서 카스파제-3를 활성화 시키는 중요한 키로 작용한다.

[0016] 또한, 본 발명에서의 용어 "카스파제-3(caspases-3)"는, 신경 세포의 손상으로 인한 간질 발작에서의 신경 세포 사멸과정에서 활성화 되며, 활성화된 카스파제-3가 세포 내에서 광범위하게 단백질을 분해하고 세포 골격을 공

격하며, 핵 내에서는 DNA 복구 효소를 비활성화시켜 DNA를 분해시키는 작용을 한다. 궁극적으로는 카스파제-3가 활성화되면서 세포내 단백질 분해, 핵내 DNA 손상을 일으켜 작은 일부 핵 조각과 세포의 막 부분으로 이루어진 여러 개의 고사체(apoptotic body)로 분해된다.

[0017] 본 발명은 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 증감의 확인을 통해 해당 개체의 해마 뉴런에서 간질을 포함하는 신경기능장애 질환의 신규한 치료제를 스크리닝 할 수 있다.

[0018] GABA 수용체와 간질과의 관계에 대해서는 일부 알려진 바가 있으나, 임신 중 모체의 간질 발작이 태아의 해마 뉴런에 어떠한 영향을 미치는지, 나아가 모체의 간질이 태아의 해마 뉴런 내 관련 단백질의 발현 변화를 일으킴으로서 태아에 간질을 유도하는지 여부에 대해서는 알려진 바 없으며, 특히 PTZ에 의한 간질성 발작을 유발한 임신 중인 모체의 태아 해마 뉴런에서의 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현 양상의 변화에 따른 태아의 간질 여부에 관한 연구는 본 발명이 최초이다.

[0019] 또한, 본 발명에서의 용어 "PTZ(pentyleneetetrazol)"란, 설치류에서 경련성 인지 결핍증 (convulsant cognitive deficits)을 발생시키는 물질로 알려져 (Corda and Biggio, 1986; Becker et al., 1994) 있으며, GABA 길항제(GABA antagonist)로 중추신경흥분제인 펜틸렌테트라졸(pentyleneetetrazol, PTZ, 상품명 Metrazol)을 동물에게 투여하여 학습능력과 기억력을 개선하는 데 효과가 있다는 실험결과가 나온 바 있다. 또한, 순환계 및 호흡기 촉진제로도 사용되는 약물이며, 과량 섭취시 경련을 일으키므로 쇼크 요법으로도 사용되어 왔으나, 정신질환 치료제로 처방되다가 발작을 유발하는 위험성 때문에 1982년 FDA가 퇴출시켰던 약물이기도 하다.

[0020] 본 발명에서의 용어 "에탄올"이란, 탄소 2개의 에탄(ethan)에서 수소 원자 하나가 하이드록시기 (-OH)로 치환된 알코올의 한 종류로서 에틸알코올 (ethyl alcohol)이라고도 한다. 특히, 신경계와 관련하여서는 에탄올을 섭취할 경우 대뇌의 기능 억제에 의해 흥분 상태가 되고, 이후 중추신경 억제의 효과가 나타난다. 이러한 에탄올은 예방 가능한 선천성 장애 (preventable cause of birth defects), 정신 지체 (mental retardation) 및 신경 발달 장애 (neurodevelopmental disorders)를 일으키는 주요 요인 중 하나로서, 임신부의 에탄올 섭취는 장기 인지 (long-term cognitive), 신경 행동 장애 (neurobehavioral disruption), 성장 결핍 (growth deficits), 및 간질 (epilepsy) (Berman and Hannigan, 2000; Mattson, 2001, Kelly et al., 2000, Sampson et al., 2000; Autti-Ramo et al., 2000)을 나타내는 중추 신경 시스템 (central nervous system)의 발달 (Zhou et al. 2000; McGoey et al., 2003; Guerri, 2002)에 손상을 일으킨다.

[0021] 본 발명에서는 모체의 간질이 태아에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 상기 PTZ 또는 에탄올을 임신 중인 래트에 투여하여 간질 발작을 유도하였으며, 특히 간질 유도 물질로 널리 사용되는 PTZ를 임신 중 래트의 복강 내 주사하여 태아의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현에 어떠한 영향을 미치는지 최초로 확인하였다. 그 결과, PTZ 유도성 간질 발작 모델에서 태아의 해마 뉴런에서 mRNA 및 단백질 수준에서 GABA_{B1} 수용체 발현이 대조군에 비하여 PTZ-유도성 발작 모델에서 현저히 감소하였음을 확인하였다 (도 5). 또한, PKA 단백질의 발현에서 모체 간질 발작의 조절 영향을 밝히기 위해, 간질 발작 모델에서 PKA 수준을 RT-PCR 및 웨스턴 블롯으로 측정한 결과, PTZ-유도성 발작 모델에서 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다 (도 6c). 아울러, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 양상에 있어서 PTZ-유도성 발작 모델에서 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 2c, 도 3a 및 3b).

[0022] 상기와 같은 단백질의 발현 양상의 변화를 측정함으로써, 임신 중 모체의 태아에 간질을 포함하는 신경기능장애 질환의 발명 여부를 확인할 수 있으며, 상기 단백질의 발현 변화를 통해 신규한 신경기능장애 질환 치료제를 발굴할 수 있다.

- [0023] 또한, 바람직하게 본 발명은 PTZ 또는 에탄올을 임신 중인 래트에 투여하여 간질 발작을 유도하였으며, 특히 간질 유도 물질로 널리 사용된 PTZ를 임신 중 래트의 복강 내 주사하여 태아의 해마 뉴런에서 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 최초로 확인하였다. 그 결과, 배양된 해마 뉴런(신경)에서 PTZ를 처리하지 않은 그룹에 비하여 PTZ-유도성 발작 모델에서는 사이토크롬-c의 증가된 발현으로부터 세포질(cytoplasm) 내로 사이토크롬-c 분비가 세포 사멸체(apoptosome) 형성을 유도함을 알 수 있었다(도 2c). 또한, 본 발명자는 PTZ-유도성 발작 모델에서 카스파제-3의 활성화에 기인한 것인지 여부를 웨스턴 블롯 분석으로 초기 발생 단계 동안 해마의 뉴런에서 카스파제-3의 발현 변화를 조사한 결과, 대조군에 비하여 태아기 래트 해마의 뉴런에서 카스파제-3의 활성화로 절단된 카스파제-3의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 3a 및 3b).
- [0024] 한편, 본 발명에서 사용되는 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 래트, 닭 또는 인간을 포함한 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 본 발명의 포유류가 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 래트를 사용하여 임신 중인 래트에서 PTZ 또는 에탄올 노출에 의한 신경기능장애 관련 여부를 측정하였다.
- [0025] 본 발명에서 상기 PTZ 또는 에탄올의 투여는 그 방법에 있어서, 경구, 정맥내, 피하, 피내, 비강내, 복강내, 근육내, 경피등 다양한 방법을 이용할 수 있고, 투여량은 개체의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며 당업자에게 용이하게 결정될 수 있으나, 바람직하게 본 발명에서는 PTZ 를 40mg/kg의 용량으로 복강 내 주사하였다(실시예 1).
- [0026] 또한, 바람직하게 본 발명의 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현량 확인 방법은 당업계에서 사용되는 통상의 발현 확인 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 또한 발현량의 확인은 당업자의 선택 또는 필요에 따라 mRNA 수준 또는 이들에 의해 코딩되는 단백질 수준으로부터 측정될 수 있으며, 그 예로 mRNA의 경우 해당 서열에 상보적인 프라이머 또는 프로브 서열을 통해 확인할 수 있고, 단백질의 경우, 단백질 또는 이의 단편에 결합하는 항체를 사용함으로써 확인할 수 있다. 바람직하게 본 발명은 mRNA 수준에서의 GABA_{B1} 수용체 및 PKA 의 발현 양상을 확인하기 위하여 RT-PCR을 사용할 수 있다. 뿐만 아니라, GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 단백질 수준에서 상기 발현 양상을 확인하기 위해서는 웨스턴 블롯을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서의 용어, 'mRNA 발현수준 확인'이란 신경기능장애 관련 질환을 진단하기 위하여 개체에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 및 mRNA 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서의 용어 '단백질 발현수준 확인'이란, 신경기능장애 관련 질환을 진단하기 위하여 개체에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 mRNA로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 또한, 상기 단백질의 발현 확인은 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 단백질 각각에 대한 특이적 항체를 이용하여 면역 측정법에 의해 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA), 방사선 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트 (rocket) 면역 전기 영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement fixation assay), FACS 및 단백질 칩 (protein chip)등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한 단백질의 양을 확인하는 방법으로서 항체를 이용하는 경우에는, 표적 단백질에 특이적이고 검출 가능한 표지에 연결된 제2항체를 첨가할 수 있으며, 검출은 또한 제2항체를 첨가한 후, 제2항체에 대한 결합 친화도를 가지며, 검출 가능한 표지에 연결된 제3항체를 첨가할 수도 있다. 제2항체 또는 제3항체에 검출될 수 있는 표지는 적절한 발색성 기질과 배양시 발색을 나타내는 효소가 사용될 수 있다. 검출 가능한 부분은 분광학적, 효소적, 광화학적, 생화학적, 생체전자공학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단으로 검출가능한 조성물을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 형광 마커 및 염료, 자성 표지, 연결된 효소, 질량 분광 태그, 스핀 표지, 전자 전달 공여자 및 수용자 등이 있

으나 상기 예들에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 '신경기능장애 질환'이란 개체에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3와 관련하여 발생하는 모든 질환을 의미하며, 신경 질환의 예로 간질 (epilepsy), 정신분열증 (schizophrenia), 공황장애 (panic disorder), 우울증 (depression), 정신지체 (mental retardation), 헌팅턴 무도병 (huntington's disease), 경직 (spasticity), 약물 중독 (drug addiction) 또는 신경 퇴행성 질환 (mental degeneration)등이 있으나, 상기 예들에 의해 본원 발명의 신경기능장애 질환이 한정되는 것은 아니다.

[0029] 한편, GABA_{B1} 수용체 또는 PKA의 발현이 감소된 개체 또는 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현이 증가된 개체를 선별하는 한편, 이들에 후보 물질을 투여하여 이들의 발현량 증감을 확인함으로써 해당 후보 물질을 신경기능장애 관련 질환의 치료제로 판정할 수 있고, 이를 통하여 상기 질환의 치료제를 스크리닝 할 수 있다.

[0030] 본 발명에서의 용어, '후보 물질'이란, 임신 중 래트에서 특히 태아의 해마 뉴런에서 간질 발작과 같은 신경기능장애 관련 질환의 예방 또는 치료가 가능할 것으로 여겨지는 모든 물질을 의미하며, 뇌의 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현량의 변화를 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써 상기 질환을 치료할 수 있는 능력을 측정하는 대상을 말한다. 예컨대 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의 분자를 포함한다. 이러한 후보 물질은 또한 천연 물질 뿐 아니라 합성 물질을 모두 포함한다.

[0031] 한편, 상기와 같은 방법으로 PTZ 또는 에탄올이 투여되지 않은 개체에 비해 투여된 개체에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현이 감소된 개체를 선별한 후, 해당 개체에 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현을 증가 또는 감소시킬 것으로 예상되는 후보 물질을 투여한 뒤, 이들의 발현 양상의 변화를 확인함으로써, 처리된 후보 물질이 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현을 PTZ 또는 에탄올에 노출 되기 전의 상태로 회복시키는지 여부를 확인할 수 있다. 구체적으로 상기 선별된 개체로 부터 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현을 증가시키는 경우, 해당 물질을 생식기능장애 관련 질환에 대한 치료제로 판정할 수 있고, 반대로 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 발현을 감소시키는 후보 물질은 신경기능장애 관련 질환의 치료에 대한 억제제로 판단할 수 있다. 또한, 상기와 같은 방법으로 PTZ 또는 에탄올이 투여되지 않은 개체에 비해 투여된 개체에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3 가 증가된 개체를 선별한 후, 해당 개체에 사이토크롬-c 및 카스파제-3 를 증가 또는 감소시킬 것으로 예상되는 후보 물질을 투여한 뒤, 이들의 발현 양상의 변화를 확인함으로써, 처리된 후보 물질이 사이토크롬-c 및 카스파제-3 의 발현을 PTZ 또는 에탄올에 노출 되기 전의 상태로 회복시키는지 여부를 확인할 수 있다. 구체적으로 상기 선별된 개체로 부터 사이토크롬-c 및 카스파제-3 의 발현을 감소시키는 경우, 해당 물질을 생식기능장애 관련 질환에 대한 치료제로 판정할 수 있고, 반대로 사이토크롬-c 및 카스파제-3 의 발현을 증가시키는 후보 물질은 신경기능장애 관련 질환의 치료에 대한 억제제로 판단할 수 있다.

[0032] 이와 같이, 본 발명에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현 증감을 측정하는 방법은 상기 기재된 바와 같이 당업계에서 사용되는 방법을 제한없이 사용할 수 있으나, 바람직하게 본 발명은 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 사용하였으며, 개체에 후보 물질의 투여 후 GABA_{B1} 수용체 및 PKA, 또는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현량의 증가를 확인함으로써 상기 후보 물질을 신경기능장애 질환의 치료제로 스크리닝 할 수 있다.

[0033] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은, 간질이 의심되는 개체와 정상 개체의 태아에서 GABA_{B1} 수용체 및 PKA 발현 양상의 변화를 측정함으로써 태아의 신경기능장애 질환을 진단할 수 있는 방법을 제공하는 것이다. 상세하게는 (a) 간질 의심 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런 내 GABA_{B1} 수용체 및 PKA 발현을 비교하는 단계; (b) 간질

의심 개체에서 GABA_{B1} 수용체 또는 PKA 발현이 정상 개체에서의 발현보다 감소된 개체를 선별하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 태아를 신경기능장애 질환을 가진 개체로 확인하는 단계를 포함하는 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0034] 또한, 본 발명은 (a) 간질 의심 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런 내 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현을 비교하는 단계; (b) 간질 의심 개체에서 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현이 정상 개체에서의 발현보다 증가된 개체를 선별하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 선별된 태아를 신경기능장애 질환을 가진 개체로 확인하는 단계를 포함하는 태아의 신경기능장애 질환에 대한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0035] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 언급한 바와 같이 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 및 카스파제-3로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 발현 양상을 확인할 수 있고, 이 경우 역시 어느 하나 이상 또는 단백질 모두의 발현을 확인할 수 있으며, 동시 또는 순차적 확인이 가능하고 단백질 뿐 아니라 mRNA 수준에서의 확인도 가능하다. 이와 같이 간질 의심 개체와 정상 개체(대조군)를 비교함으로써 확인할 수 있고, GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 경우 그 발현이 감소하고, 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 경우 그 발현이 증가하는 개체를 신경기능장애 질환을 가진 개체로 판정할 수 있다.

[0036] 본 발명은 간질이 의심되는 개체 및 정상 개체 태아의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현 증감을 확인한 후, GABA_{B1} 수용체 또는 PKA의 발현이 증가 또는 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현이 감소된 개체를 선별하여 상기 개체가 태아의 신경기능장애 질환을 가진 개체로 판단할 수 있는 정보를 제공할 수 있다.

[0037] 바람직하게 본 발명의 발현양상 확인 방법은 상기 태아의 신경기능장애 질환 치료제의 스크리닝 방법에서 사용된 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3 발현 양상 확인 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 바람직하게 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 경우 상기 단백질의 mRNA 및 단백질의 발현 감소를 확인함으로써, 해당 개체가 태아의 신경기능장애 질환을 가진 개체로 판단할 수 있다. 또한, 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 경우, 상기 단백질의 발현 증가를 확인함으로써 해당 개체가 신경기능장애 질환을 가진 개체임을 알 수 있다.

효 과

[0038] 본 발명은 임신 중 모체의 간질 발작이 태아의 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체, PKA, 사이토크롬-c 또는 카스파제-3의 발현 증감을 확인함으로써 태아의 신경기능장애 질환 여부를 판단할 수 있다. 또한, 간질 유도 모델에 후보 물질을 투여한 후, 투여 전후의 상기 단백질 발현 증감 여부를 확인함으로써 태아의 신경기능장애 질환과 관련한 신규 치료제를 개발하는 데 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 실시예에 의해 본 발명의 내용이 제한되는 것은 아니다.

[0040] 실시예 1. 동물 처리 (Animal treatment)

[0041] 암컷(n=48) 스프라그-도울리(Sprague-Dawley) 래트(250g, 경상 국립 대학교, 신경생물학 실험실, 진주, 대한민국)에 사료를 공급하여 06:00-20:00 h까지 빛을 주어 온도 조절된 환경에서 사육하였다. (수정된 날을 임신 0.5일로 봄) 임신(gestational days, GD) 17.5일이 지난 후, 펜토바르비탈 나트륨(pentobarbital sodium) (3 mg/100 g b.w)을 정맥 주사(Intravenous injection) 한 다음, 임신 중인 스프라그-도울리 래트를 단두하여 사살하였다.

[0042] 실험 동물은 무작위로 다음과 같이 두 개의 그룹으로 나누었다:

[0043] (1) PTZ를 처리한 그룹 : 수정 후 2-16일 동안 PTZ (40mg/kg)를 복강내 주사 한 암컷 래트(female rat)

[0044] (2) 대조군 : 0.9% 살린(saline)을 복강내 주사

[0045] **실시예 2. 발작 확인 과정 및 뇌파 기록**

[0046] 17일 이상, 실험 동물에 매 24시간 동안 살린(saline)내 PTZ (40 mg/kg)를 준경련 용량으로 복강내 (intraperitoneally, i.p) 투여하였고, 대조군은 살린만 투여하였다. 각각의 시약을 투여한 후, 발작 행동을 30 분 동안 관찰하였고, 결과적으로 생기는 발작은 다음과 같이 스코어(score)가 매겨졌다 :

[0047] stage 0, 반응이 없음; stage 1, 귀 및 안면 경련(facial twitching); stage 2, 몸 전체를 통한 전신성 발작; stage 3, 근육간대성경련(myoclonic jerks) 및 곧추서기(rearing); stage 4, 바닥에 측면으로 떨어진 동물의 간대성 경련(clonic convulsions); 및 stage 5, 반복된 심각한 강직 간대성 경련(tonic clonic convulsions) 또는 치명적 경련(lethal convulsions).

[0048] 실험 동물에 10(mg/kg) PTZ를 투여하면 자극을 받아 적어도 세 번 지속적으로 단계 4 또는 단계 5의 발작에 도달한다고 생각되었다. 잠복기는 시약 투여 및 발작 징후 사이에서 수분 내 평균 시간에 따라 결정된다. 발생한 발작은 대칭 전지(symmetric forelimb), 후방 사지 긴장(limb tonus), 사지 간헐성 경련(limb clonus) 및 지독한 활성화(flipping activity)이 특징이다. 발작 지속 시간은 각 동물에 대하여 측정된 다중 발작의 총합으로 계산되었다. 본 발명자는 PTZ를 래트에 투여하고 발작을 관찰하는 데 있어 각 래트의 PTZ 노출 조건을 모르는 상태에서 진행하였다. 그 후, 각 개체에 대해 첫 번째 발작의 발병까지 잠복기, 전체 발작 지속 기간, 발작 수를 기록하였다. EEG 테이터는 증폭기(LAXTHA, LXEJ 108)를 사용하여 30분 동안 기록하였고, EEG 기록실에서 250Hz로 계수화하였다. 전체 EEG 샘플을 기존에 개시된 조건에 따라 간질형태 활동(epileptiform activity)이 있는 동안 시각 검사(visual inspection)로 분석하였다.

[0049] 발작 중 발작 행동 및 뇌파(electroencephalogram, EEGs)를 검사한 결과, 임신 중 40mg/kg의 준경련 용량(subconvulsive dose)으로 15일 동안 만성 투여하자 스코어(score) 3-4에 해당하는 최소 발작이 유도되었다. 추가로, 몸통 회전(barrel rotation) 및 강직성 발작이 몇몇 동물에서 확인되었다: 10th (10 번째) 투여한 동물의 65%부터 15th (15 번째) 투여한 85%까지. 임신 중인 래트에서 PTZ에 의해 유도된 발작은 전형적으로 hind limb kicks으로부터 시작하고 이어서 사지의 강직성 및 간헐적 경련이 발생한다.

[0050] PTZ 투여 후에 정확한 관찰 결과는 표 1에 요약하였다.

표 1

PTZ 투여	
발작 수	2.1±1.5
잠복 기간(초)	60±21.5
발작 시간(분)	4.8±0.9
편측 또는 양측 전지 반사	1.9±0.5
마우스 오토메티즘(mouth automatisms)	5.1±0.7
양측 전지 반사가 있는 선 자세	3.1±0.9
사지 반사가 있는 쓰러지거나 누운 자세	4.5±0.4

[0052] 발작을 확인하기 위해, 뇌파검사(EEG)는 30분 동안 5에서 시작하였고 PTZ 투여후에 15분에서 확인되었다. 대조군 5마리 래트와 PTZ 처리한 15마리 래트를 관찰하였다. 뇌파 (EEG) 평가 결과는 도 1에 도시하였다.

[0053] **실시예 3. 초기 세포 배양 및 시약처리**

[0054] 임신한 래트에 임신(gestational days) 2-16일 동안 매일 PTZ (40mg/kg)를 복강내 주사(i.p injections)하였다. 임신한 래트로부터 임신 GD 17.5일에 태아 래트의 해마 뉴런에서 배양 준비를 하였다. 해마

조직은 20분 동안 0.25% 트립신 EDTA로 처리하였고, 냉 CMF(calcium- and magnesium-free Hank's balanced salt solution) (pH 7.4)에서 기계적 분쇄에 의해 해리하였다. 원심분리로 펠렛팅(pelleting) 한 후, 세포를 폴리-라이신(poly-lysine) (0.02 g/l)이 사전 코팅된 세포 배양 플레이트와 챔버 슬라이드에 접종하였다(1×10^6 cells/ml). 배지는 10% 열 불활성 우 태아 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 1 mM 피루베이트(pyruvate), 4.2 mM 탄산수소나트륨, 20 mM HEPES, 0.3 g/l BSA(bovine serum albumin), 50 U/ml 페니실린, 및 50 mg/l 스트렙토마이신이 있는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)으로 구성되었다. 배양은 5% CO₂ 및 95%의 습한 공기에서 37 °C로 유지시켰다. 신경교 세포(Neuroglia cells)는 12시간 동안 100 μ M Ara-C (Cytosine β -D-Arabinofuranoside (Sigma))가 포함된 배지로 억제하였다. 3일 후, 해마 뉴런 세포는 다른 그룹으로 조합한 에탄올 100mM, PTZ 10 mM, 바클로펜(baclofen) 50 μ M 및 파클로펜(phaclofen) 100 μ M을 포함한 배지로 처리하였다. 시약을 처리한 모든 그룹은 시험관 내(in vitro) 20분 동안 배양하였다.

실시예 4. RT-PCR (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction)

RT-PCR 분석은 시약 처리한 그룹으로부터 cDNA으로 수행하였다. 전체 RNA는 Trizol Reagent(Life Technologies, Rockville, MD)로 분리하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 제조사에서 제공한 방법에 따라, oligo (dt)₁₅M-m ℓ V 역전사 효소(reverse transcriptase (Promega))를 사용하여 RNA 2 μ g으로부터 전사하였다. 전체 4 μ l cDNA를 1 μ l Taq DNA 중합효소 존재하에서 PCR 증폭을 위해 사용하였다. 열 사이클링(Thermal cycling)을 다음과 같은 조건으로 수행하였다: 94 °C에서 5분, 94 °C에서 1분, 68 °C에서 1분, 72 °C에서 1분간 30사이클, 그 다음 최종 연장을 위해 72 °C에서 5분.

음성 대조군으로 GAPDH (58°C, 25 사이클)를 사용하였다. PCR 산물은 EtBr(ethidium bromide)를 포함한 1% 아가로즈 겔에서 영동하였고, UV 광선 아래에서 시각화하였다.

사용된 프라이머들은 다음과 같다

표 2

서열번호 1	GABA _{B1} 수용체 정방향 프라이머	5'-AATTGAATTCGCTACCATCCAACAGACCA-3'
서열번호 2	GABA _{B1} 수용체역방향 프라이머	5'-AATTAAGCTTTCTGTGACGTCATGTTGGAA-3'
서열번호 3	PKA 정방향 프라이머	5'-GTGGCAAGGAGTTTACTGAG-3
서열번호 4	PKA 역방향 프라이머	5'-CCAGTATCTGACTTTCCTGC-3
서열번호 5	GAPDH 정방향 프라이머	5'-GCCATCAATGACCCCTTCATT-3'
서열번호 6	GAPDH 역방향 프라이머	5'-CGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'

생체 내(in vivo)에서 GABA_{B1} 수용체의 변화 및 PTZ-유도성 발현과 관련하여 태아 해마 뉴런 세포에서 영향을 밝히기 위하여, 대조군에서 배양된 초기 배양 세포, 바클로펜, 파클로펜이 처리된 세포를 연구하였고 GABA_{B1} 수용체 mRNA 수준을 RT-PCR로 조사하였다. 그 결과 PTZ-유도성 발작 모델의 태아 해마 뉴런의 mRNA 수준에서 GABA_{B1} 수용체 발현이 대조군에 비하여 현저히 감소하였다(도 5a 및 5b).

반면, PKA 발현은 해마 뉴런에서 에탄올, KA, 에탄올 및 PTZ, 바클로펜 및 파클로펜 처리에도 현저하게 감소되지 않았다(도 6a).

실시예 5. 웨스턴 블롯(Western blotting)

초기 배양된 해마 세포를 프로테아제 억제제(protease inhibitor)인 100mM PMSF가 있는 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer) (Cell signaling #9803)로 균질화 하였다. 샘플을 4분 동안 (operate 15 sec, pause 10sec) 초음파 분해 처리하기 전 20분 동안 아이스에 방치하였다. 초원심분리(12,000 rpm, 10 min $\times$ 2) 후, 상청액을 포함한 단백질을 분리하였다. 단백질 함량을 Bio-Rad Protein Assay를 사용하여 295 nm에서 분광광도계적으로

(spectrophotometrically) 측정하였으며, 각 라인 당 30 μ l 단백질을 적용하였다. 가용성 단편(soluble fraction) (30 μ g)을 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gels) (30% Acrylamide, 1% Bis, 1 M Tris, 10% SDS, 10% APS, TEMED)에 중복으로 분리하였다. 하나의 겔을 쿠마시 블루(Comassie Blue)로 염색하였고, 다른 겔에 있는 단백질을 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane) (90 V for 1 h in a 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% MeOH 및 0.037% SDS transfer buffer)상으로 이동시켰다. 비특이적 결합을 줄이기 위해 0.1% (v/v) 트윈 20 및 6% (w/v) 탈지유(non-fat dry milk)를 포함한 차단 용액(blocking solution) (Tris-buffered saline (TBS))으로 니트로셀룰로오스 막을 처리하였다. 면역 반응을 래빗 다클론 IgG GABA_{B1} 수용체 및 PKA- α 항체 (1:1000, 24 h, 4 °C, Santa Cruz, Cell signaling) 또는 래빗-유래 항 래트 GABA_{B1} 수용체 항체 (1:1000, Abcam Limited, UK)를 사용하여 수행하였다. 세척 후, 염소 항-마우스(goat anti-mouse)가 부착된 HRP(horseradish peroxidase) 및 염소 항-래빗(goat anti-rabbit) IgG-HRP (1:10000, Bio-Rad)를 첨가하여 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 단백질은 제조사의 시험법에 따라 ECL-detecting reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Western blotting detection reagents)를 사용하여 화학발광(chemiluminescence) 시킴으로서 단백질을 측정하였다. 웨스턴 블롯을 computer-based Sigma Gel (SPSS Inc. Chicago, USA) 시스템을 사용하여 밀도계(densitometry)로 분석하였다.

[0064] 임신 중 사이토크롬-c의 PTZ-유도성 발작 효과를 조사하기 위하여, 태아 래트의 해마 뉴런에 에탄올, PTZ, 카인산(kainic acid (KA 1 μ M)), 바클로펜(baclofen (50 μ M)) 및 파클로펜(phaclofen (100 μ M))을 20분 동안 각기 다른 조합으로 처리하여 사이토크롬-c의 분비를 웨스턴 블롯 분석으로 조사하였다. 그 결과, PTZ-유도성 발작에서 사이토크롬-c의 증가된 발현이 나타났으며, 세포질(cytoplasm) 내로의 사이토크롬-c 분비가 세포 사멸체(apoptosome) 형성을 유도함을 의미한다. 또한, PTZ-유도성 발작이 카스파제-3의 활성화에 기인한 것인지 여부를 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 카스파제-3의 발현 변화를 조사하였다. 카스파제-3가 활성화되면, 각각 17 및 12 kDa의 두 개의 작은 서브유닛으로 절단된다. 그 결과, 시험관 내(in vitro)에서 대조군에 비하여 태아 래트 해마의 뉴런에서 절단된 카스파제-3의 발현이 증가하였따(도 3).

[0065] 본 발명자는 PTZ-유도성 발작 모델의 태아 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체의 단백질 수준에서의 발현이 현저하게 감소되었고(도 5c 및 5d) 반면, 파클로펜 (GABA_{B1} 수용체 길항제(antagonist))을 처리한 GABA_{B1} 수용체 발현이 전자에 비하여 좀 더 감소되었음을 확인하였다. 따라서, 상기 결과로부터 임신 중 PTZ-유도성 발작 모델에서 GABA_{B1} 수용체의 발현이 mRNA 수준에서가 아닌 단백질 수준에서 조절할 수 있음을 의미한다. 한편, PKA와 관련하여 PTZ에 의해 유도된 발작의 효과는 단백질 수준에서 현저히 그 발현 양상이 감소되었음을 확인하였다(도 6c 및 6d)

[0066] 실시예 6. 미토콘드리아 사이토크롬-c 분비 및 핵 형태의 시각화

[0067] 사이토크롬-c(cytochrome-c)의 인 시츄 분석(in situ analysis)을 면역형광 분석(immunofluorescence technique)으로 수행하였다. 간단히 말해, 해마 뉴런 세포(배양 플레이트에 1×10^6 세포)의 초기 배양을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정된 에탄올, PTZ, 에탄올과 PTZ로 처리하고 냉각 상태에서 PBS로 세척하였다. 사이토크롬-c를 마우스 항-사이토크롬-c 항체(mouse anti-cytochrome-c antibody) 및 래빗 항-마우스 FITC-표지 항체(rabbit anti-mouse FITC-labeled antibody) (1:250 and 1:200, respectively; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 검출하였다. 연속적으로, 크로마틴을 20분 동안 암실에서 PI (1 mg/ml in PBS)로 염색(현상)하고, 슬라이드를 시약(reagent) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)으로 부착하였다. 사이토크롬-c(녹색) 및 크로마틴 (적색) 염색 패턴을 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope (Fluoview FV 1000, Olympus, Japan))을 사용하여 얻었다.

[0068] 그 결과, PTZ, 에탄올 및 PTZ 및 에탄올을 처리함으로써 카스파제-3 (TRITC-표지, 적색)는 미토콘드리아 (사이토크롬-c, 녹색 FITC-표지)로부터 사이토크롬-c의 분비를 의미하며, 사이토크롬-c의 전좌에 의한 초기 해마 뉴런 세포에서 발생하는 사이토크롬-c 염색 양상이 나타난 공초점 현미경으로 더욱 확실해졌다. 융합된 이미지(황

색)는 PTZ 및 에탄올 처리 결과 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 발현이 해마 뉴런 세포 배양에서 세포질로 분비됨을 나타낸다.

[0069] **실시예 7. 세포 사멸의 조직학적 분석 및 측정**

[0070] PI(Propidium iodide) 및 Fluoro-Jade-B 염색을 종래 개시된 방법에 따라 수행하였다. 임신 17.5 일에 PTZ (15 일 동안 40mg/kg을 복강 내 투여)를 모체에 노출시킨 후, 실험 동물을 펜토바르비탈 나트륨 (sodium pentobarbital) (50mg/g. i.p)로 마취시켰다. 태아를 제거하고, 48시간 동안 차가운 4% NBP에 고정시킨 다음 48시간 동안 4 °C에서 20% 수크로스 인산 완충액(sucrose phosphate buffer)에 침전시켜 동결방지하였다. 전체 태아(fetus)를 O.C.T compound (A.O. USA)에서 동결시키고 그 다음 동결된 14 μm 섹션(section)을 관상면 (coronal planes) (Leica cryostat CM 3050C, Germany)으로 제조하였다. 섹션을 양전하가 전하된 탐침이 있는 슬라이드(Fisher) 위에 놓고 해동하였다. 슬라이드를 약하게 흔들어진 다음, 실온에서 20분 동안 PBS 내 1 μg/ml의 PI 용액에 담그고, 10분 동안 PBS로 두 번 세척하였다. Glass cover slip을 마운팅 배지(mounting medium)로 글라스 슬라이드(glass slides) 위에 놓았다. PI 여과는 PI 염색 (Red color)을 확인하기 위해 사용되었고, FITC 여과는 Fluoro-Jade-B (Green color)를 확인하기 위해 사용되었다. 이미지를 위해 본 발명자는 Zeiss fluorescent microscope (Zeiss, Germany) 및 공초점 현미경(confocal microscope (Olympus, Japan))을 사용하였다. 사진은 이미징 시스템 비디오 카메라(soft imaging systems video camer)로 찍었다.

[0071]

[0072] 임신 중 PTZ-유도성 발작이 해마에서 생체 내(in vivo) 신경 세포 사멸을 유도하는지 여부를 측정하기 위해 PI 및 Fluoro-Jade-B (FJB) 염색을 사용하여 수행하였다. PI는 통상적으로 다중 칼라 형광 기술(multicolor fluorescence techniques)에서 대비 염색으로 핵산을 염색한다. 조직 섹션에서, 상기 PI는 핵 마커로 사용되고 때로는 고사성 변화를 보이는 핵을 확인하는데 사용된다. 공초점 현미경 분석(Confocal microscopic analysis)을 통해 대조군에 비하여 PTZ-유도성 발작 모델로부터 태아기 래트 뇌에서 해마 영역 전체를 확실하게 염색되었음을 확인하였다. 해마의 CA1 subfields에서, 피라미드 뉴런(pyramidal neurons)이 줄어들고 움츠러들었으며 (shrunk), 핵이 뚜렷하게 축적되었다(도 4, A-F). PI 및 FJB 염색이 대조군에서 핵 주변에 나타나는 정상적인 형태학적 특징들로 신경 세포에서 나타났으나, 많은 세포가 움츠러들고 처리된 그룹에서 핵이 축적되었다. Fluoro-JadeB 및 PI 염색은, 유력한 신경 손상 마커로서, PTZ-유도성 발작 모델로부터 태아 래트 해마 영역 전체가 신경 퇴행(neurodegeneration)을 나타내었다(도 4). 또한, Fluoro-JadeB 및 PI 염색을 공동 처리하고 고배율(high magnification)로 확인하자, 살린 처리 그룹에 비하여 PTZ-유도성 발작 모델로부터 태아기 래트의 해마 영역에서 Fluoro-JadeB 및 PI가 현저히 증가함을 보였다.

[0073] **실시예 8. 데이터 분석 및 통계(Data analysis and statistics)**

[0074] RT-PCR 및 웨스턴 블롯으로부터 얻은 목적 밴드를 스캔하고 Sigma Gel System (SPSS Inc., Chicago, IL)을 기초 컴퓨터를 사용하여 밀도계로 분석하였다. 밀도값은 평균±SEM으로 나타내었다. TukeyKramer multiple-comparisons test에 따른 하나의 방법으로 ANOVA 분석은 관련성 있는 처리 그룹(relevant treatment groups)간 현저한 차이점을 측정하였다. 모든 경우에서, 통계적 유의성(statistical significance)을 위한 허용 범위는 *P< 및 **P < 0.01이었다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 15th 투여 후에 임신 중인 래트에서 대표 EEG 추적을 나타낸 것이다. 16th에 임신 중 PTZ (40mg/kg)을 15th 투여 후에 5분 및 15분에 기록된 대표적 30s EEG 샘플. A는 살린 그룹(saline group)에서 정상 EEG를 나타냄. B는 15th PTZ 투여 후 5분에 EEG를 나타냄 C 는 15th PTZ 투여 후 15분에 EEG를 나타냄.

[0076] 도 2는 발작을 유도한 PTZ가 태아 래트 해마 뉴런으로부터 사이토크롬-c 의 분비가 증가함을 나타낸 것이다.

[0077] 도 2a는 임신 중 PTZ-유도성 발작 모델로부터 GD 17.5에서 초기 배양된 해마 뉴런 세포에서의 사이토크롬-c의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. 세포는 대조군(C)로서 정상 배지, 100 mM 에탄올(E)을 포함한 배지, 10 mM PTZ (pentylentetrazol)를 포함한 배지, 1 μM K.A(Kainic acid)를 포함한 배지, PTZ 및 에탄올(E+PTZ)을 포

함한 배지, 에탄올에 바클로펜과 파클로펜을 포함한 배지(E+B+P), 50 μ M 바클로펜 (B), 및 100 μ M 파클로펜 (P)을 포함한 배지로 각각 20분 동안 처리하였다. β -actin은 각 경우에 있어서 로딩 컨트롤로서 사용되었다.

[0078] 2a: 각기 다른 처리 조건에서 해마 뉴런 세포의 사이토크롬-c의 이뮤노 블롯. 이뮤노 블롯은 항 사이토크롬-c 항체로 표지하였다. 2b: 밀도값은 사이토크롬-c에 상응한 단백질의 평균 $\pm$ SEM ($n = 4$, 그룹 당 평균 4마리)으로 나타내었다. $*P < 0.05$ 및 $**P < 0.01$ 은 대조군 대한 것이다. 도 2c는 동일한 신경 세포에서 미토콘드리아 사이토크롬-c 분비 및 카스파제-3 발현의 시각화를 나타낸 것이다. 해마 뉴런 세포 배양에서 미토콘드리아 사이토크롬-c 및 카스파제-3의 분비에 있어서 PTZ 및 에탄올의 영향. 20분 동안 PTZ 및 에탄올에 노출된 태아 래트의 초기 신경 세포 배양. 상세한 과정은 실시예에서 개시하였다. 사이토크롬-c (FITC-표지된 사이토크롬-c 항체, 녹색) 및 카스파제-3 (TRITC-표지, 적색)에 대하여 이중 염색된 해마 세포의 면역형광. 황색 컬러(녹색 + 적색; 융합된 이미지)는 공초점 현미경(confocal microscopy)에 의해 측정된 미토콘드리아에서 세포질로 사이토크롬-c의 분비 및 동일한 신경 세포에서 카스파제-3 분비를 나타낸다. 화살표는 사이토크롬-c 및 카스파제-3 발현의 분비가 있는 죽은 세포를 나타낸다. 확대 40 X, A-C에 대한 Scale bar=20.

[0079] 도 3은 태아 래트 해마 뉴런에서 쪼개진 카스파제-3의 발현이 증가된 PTZ 유도성 발작을 나타낸 것이다.

[0080] 임신 중 PTZ-유도성 발작 모델에서 임신 17.5일에 초기 배양된 해마 뉴런 세포에서 카스파제-3의 웨스턴 블롯. 세포는 사전에 개시된 바에 따라 20 분 동안 다른 시약에 노출시켰다. 상세한 과정은 실시예에 개시되어 있다. β -actin은 각각 로딩 컨트롤로서 사용되었다. 3a: 다른 처리 조건하에서 해마 및 피질 뉴런 세포에서의 카스파제-3의 이뮤노 블롯. 이뮤노 블롯은 항 카스파제-3 항체로 표지되어 있다. 3b: 밀도값은 카스파제-3 단백질에 해당하는 평균 $\pm$ SEM ($n = 4$, 그룹 당 평균 4마리)으로 나타내었다. $*P < 0.05$ 및 $**P < 0.01$ 은 대조군에 대한 것이다.

[0081] 도 4는 고사성 신경 퇴행을 유도하는 PTZ-유도성 발작을 나타낸 것이다.

[0082] 4a는 PTZ-유도성 발작 모델에서 태아기 래트의 해마에서 신경 퇴행의 P.I (Propidium iodide) 및 Fluoro-jade B 염색 분석을 나타낸 것이다. 상세한 과정은 실시예에 나타나 있다. 상기 조직학적 섹션은 비히클(vehicle)-처리된 모체에서 GD 17.5 일 된 태아 래트이다. 임신 중 PTZ의 모체 노출은 태아 래트 뇌의 해마 영역에서 신경 퇴행을 유도한다(A-F). CA1 lamination에서 Interruptions, 세포 형태에서 분명한 신경 퇴행 및 변화가 PTZ를 처리한 임신한 래트의 태아기에서 확인되었다. 사진은 PTZ-유도성 발작 모델이 태아기 래트 해마 영역에서 전 영역에 걸쳐 강력한 신경 퇴행 반응에 자극하고 있음을 나타낸 것인 반면, 살린은 발생 뇌에서 정상적으로 일어나는 생리학적 세포 사멸에 기인하는 고사성 퇴행이 회박함을 보이는 뇌가 남아있음을 나타낸다. 패널(B, E = X100 및 C, F = X40)은 패널(A, D = X 20)로부터 확대된 영상이며, 해마에서 PI 및 FJB 염색을 나타낸다.

[0083] 4b는 뇌의 해마 영역에서 FJB 및 PI 염색 공동 처리한 것을 나타낸 것이다. 확대 100 X, Scale bar=10

[0084] 도 5는 임신 중 PTZ-유도성 발작이 태아 래트 해마 뉴런에서 GABA_{B1} 수용체의 mRNA 및 단백질 수준을 감소시키는 것을 나타낸다. 5a: 임신 중 PTZ-유도성 발작 모델에서 GD 17.5인 초기 배양된 해마 뉴런 세포에서 mRNA에서 RT-PCR 분석 (5a) 및 GABA_{B1} 수용체의 단백질 수준 분석(5c). 세포를 미리 개시된 바 대로 20분 동안 다른 시약에 노출시켰다. 상세한 과정은 실시예에 나타내었다. GAPDH 및 β -actin은 대조군으로 사용되었다. 웨스턴 블롯의 경우 항 GABA_{B1} 수용체 항체로 표지하였다.

[0085] 5b 및 5d: 밀도값은 GABA_{B1} 수용체의 mRNA 및 단백질에 상응하는 평균 $\pm$ SEM($n = 4$, 그룹당 평균 4마리)으로 나타내었다. $*P < 0.05$ 및 $**P < 0.01$ 은 대조군에 대한 것이다.

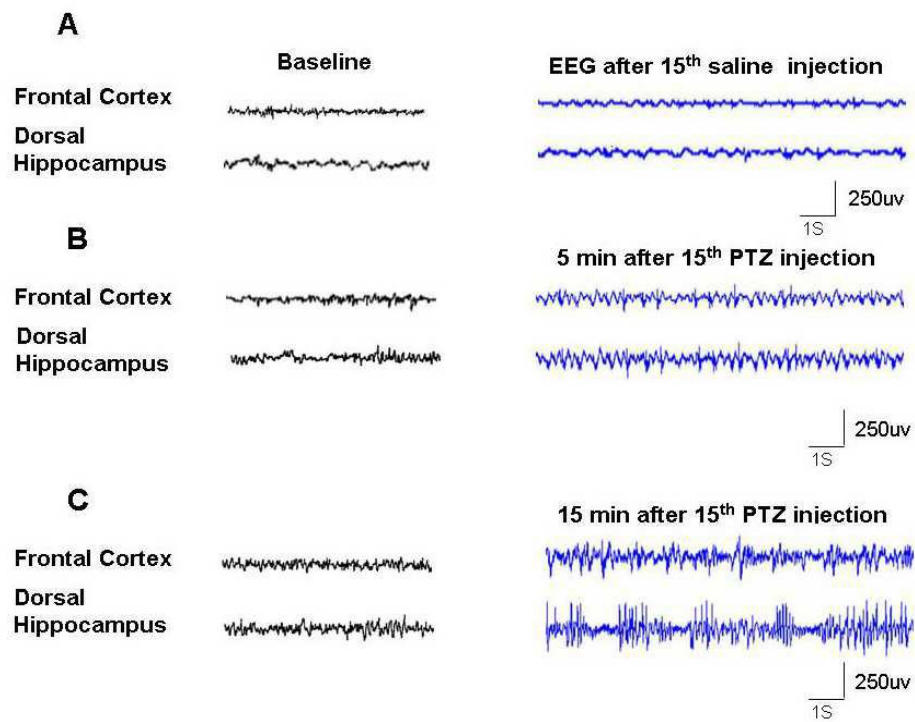
[0086] 도 6은 임신 중 PTZ-유도성 발작이 태아기 래트 해마 뉴런에서 PKA의 mRNA 발현 수준을 감소를 나타낸 것이다.

[0087] 6a 및 6c: 임신 중 PTZ-유도성 발작 모델에서 GD 17.5에서 초기 배양된 해마 뉴런 세포에서의 mRNA 상에서의 RT-PCR 분석 변화 및 PKA의 단백질 수준을 나타낸 것이다. 세포를 사전에 개시된 바에 따라 20분 동안 다른 시약에 노출시켰다. 상세한 과정은 실시예에 나타내었다. GAPDH 및 β -actin은 대조군으로 사용되었다.

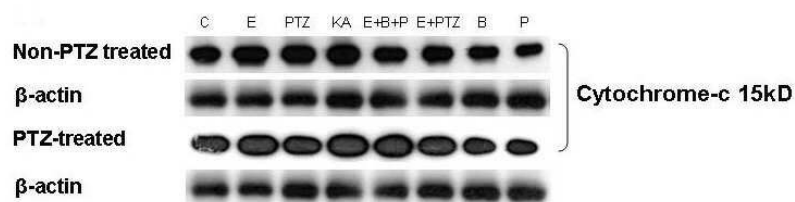
[0088] 웨스턴 블롯의 경우에서 항 PKA 항체로 표지하였다. 6b 및 6d: 밀도값은 GABA_{B1} 수용체 및 PKA의 mRNA 및 단백질에 상응하는 평균 $\pm$ SEM($n = 4$, 그룹 당 평균 4마리)으로 나타내었다. $*P < 0.05$ 및 $**P < 0.01$ 는 대조군에 대한 것이다.

도면

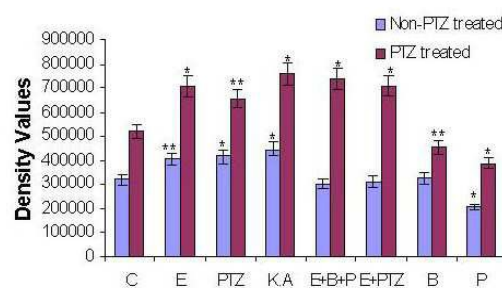
도면1



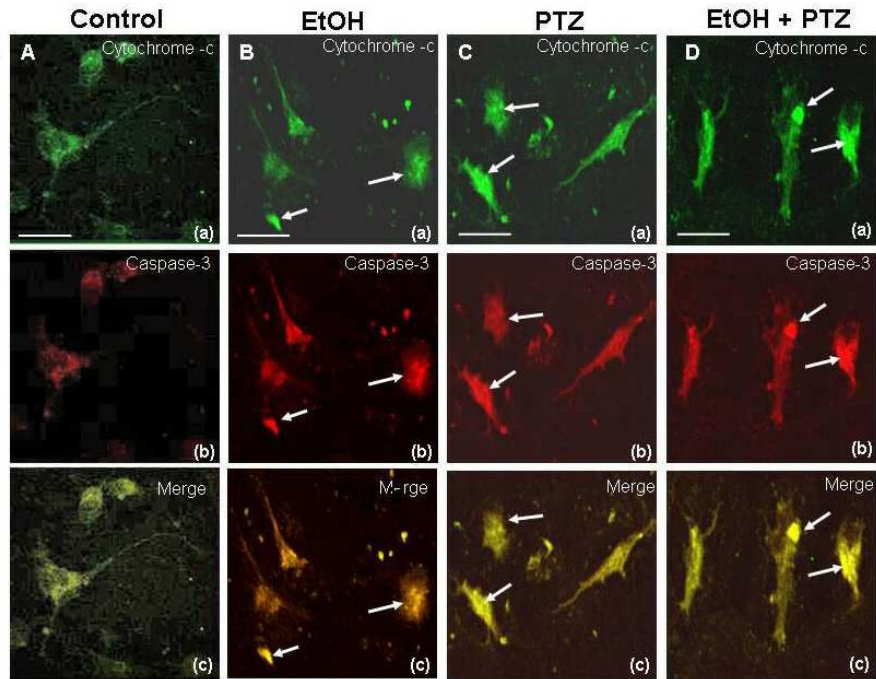
도면2a



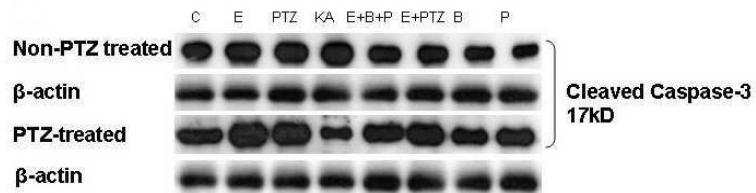
도면2b



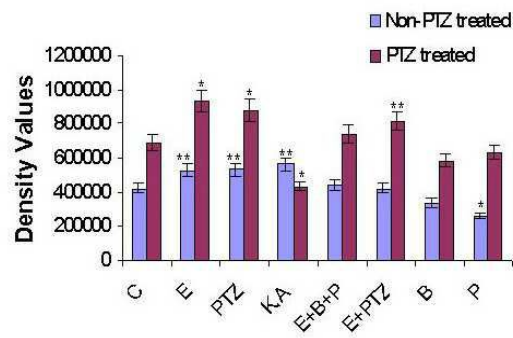
도면2c



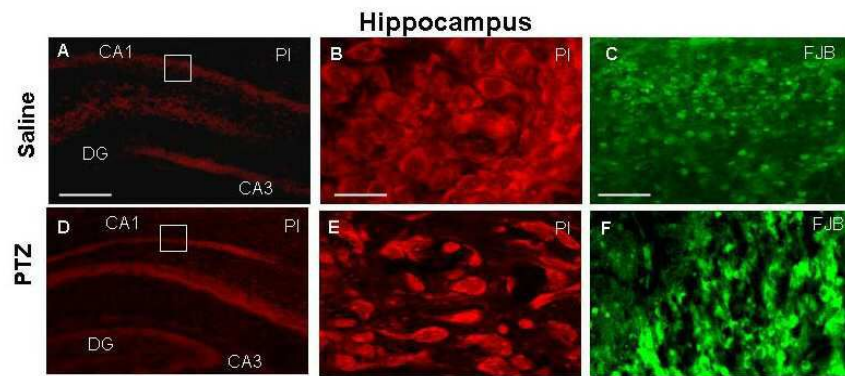
도면3a



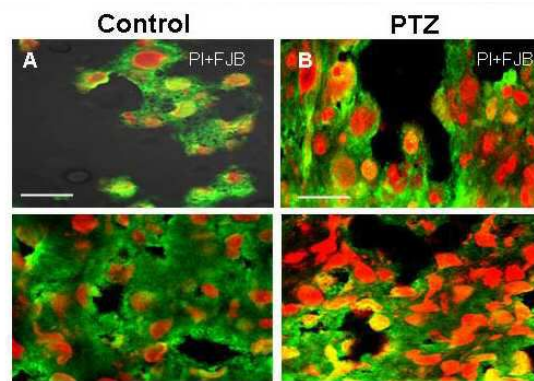
도면3b



도면4a



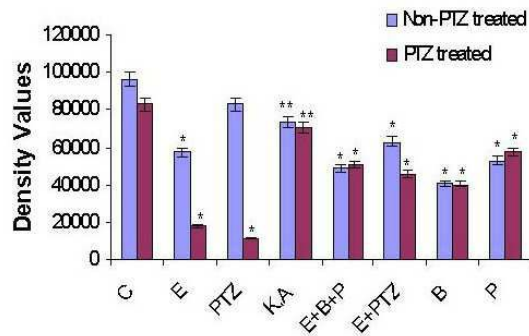
도면4b



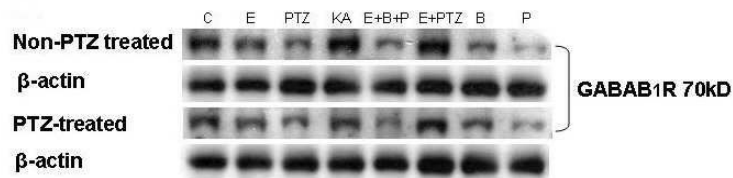
도면5a



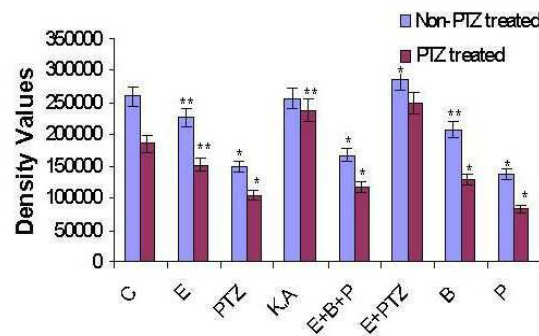
도면5b



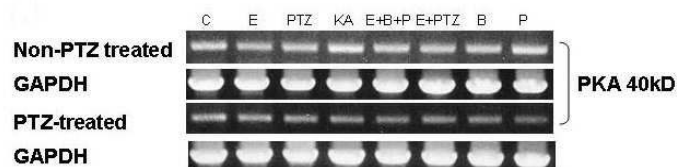
도면5c



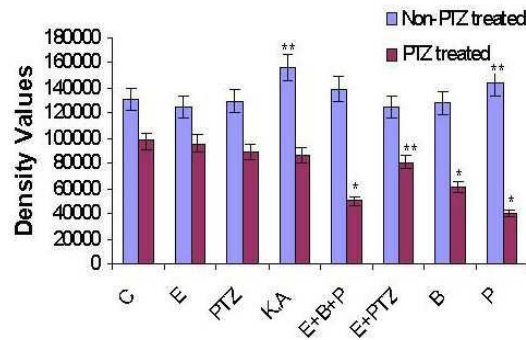
도면5d



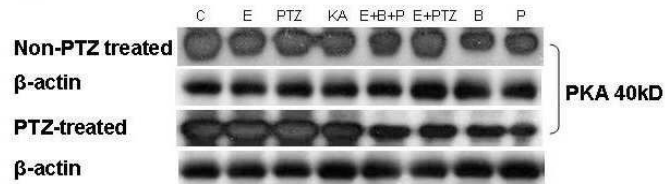
도면6a



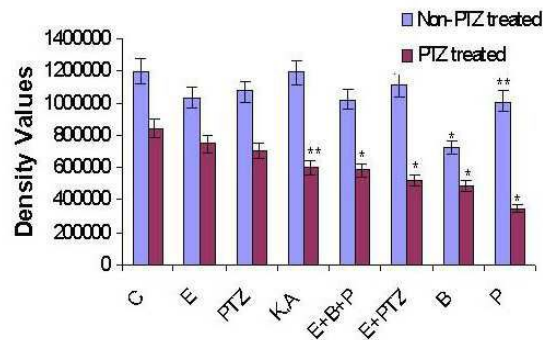
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> METHOD FOR SCREENING OF AGENT FOR TREATING AND DIAGNOSING
 PRENATAL NEURONAL DISEASE IN MATERNAL EPILEPSY

<130> PA090197/KR

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for GABA B1 receptor

<400> 1

aattgaattc cgtaccatc caacagacca

30

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for GABA B1 receptor

<400> 2

aattaagctt tcctgtgacg tcatgttgga a

31

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for PKA

<400> 3

gtggcaagga gtttactgag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for PKA

<400> 4

ccagtatctg actttcctgc

20

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for GAPDH

<400> 5

gccatcaatg accccttcat t

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer for GAPDH

<400> 6

cgccctgcttc accaccttct t

21