

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136906

(43) 공개일자 2022년10월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
 (52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
 (21) 출원번호 10-2022-0038410
 (22) 출원일자 2022년03월28일
 심사청구일자 2022년03월28일
 (30) 우선권주장
 1020210042911 2021년04월01일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
 (72) 발명자
 박재용
 서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)
 조은실
 서울특별시 성북구 돌곶이로40길 46, 꿈의숲 아이파크 713동 702호 (장위동)
 (74) 대리인
 이명진

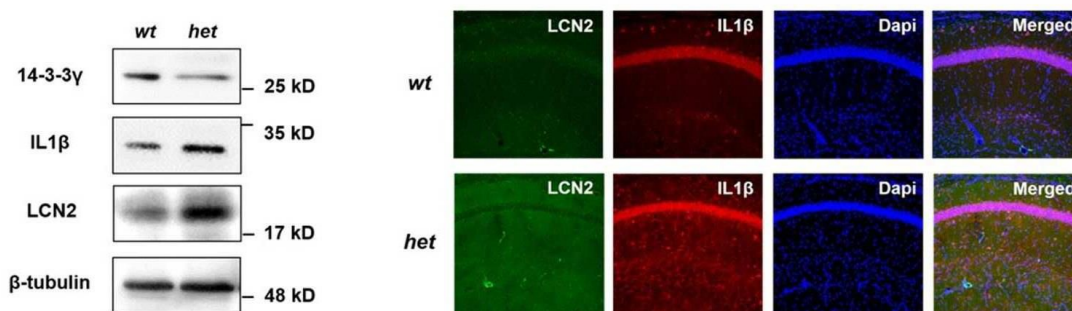
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 뇌염증 질환 진단용 마커로서의 14-3-3 γ 의 용도

(57) 요약

본 발명은 뇌염증 질환 진단용 마커로서의 14-3-3 γ 의 용도 등에 관한 것이다. 본 발명은 뇌염증 질환을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있는 뇌염증 질환 진단용 조성물, 뇌염증 질환 진단 방법, 및 뇌염증 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통해 뇌염증 질환의 진단이 가능할 것으로 기대되며, 본 발명의 마커인 14-3-3 γ 의 발현 및 활성을 조절하여 뇌염증 질환 치료제 개발에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133475
과제번호	2016M3C7A1904149
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명	막단백 기반 뇌염증 제어기술 개발
기 여 율	40/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128057
과제번호	2017M3A9C4092979
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	질병 막단백질 핵심마커 기반 천연물 작용기전 및 효능 규명
기 여 율	30/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130286
과제번호	2017M3C7A1079692
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명	정서장애 관련 고빠핵 신경회로 규명 및 국소적 조절기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뇌염증 질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병인 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류인 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 해마 유래 시료인 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 방법은 측정한 상기 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 대조군의 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 뇌염증 질환으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 6

YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 진단용 조성물.

청구항 8

YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제; 및 지시서를 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 키트.

청구항 9

하기 단계를 포함하는 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) 뇌염증 질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 시료의 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 뇌염증 질환 치료제로 판정하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 뇌염증 질환은 알츠하이머, 또는 파킨슨병인 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 방법은 상기 시료의 LCN2, 및 IL1 β 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정; 또는 정상 세포 또는 미세아교세포의 수와 형태를 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌염증 질환 진단용 마커로서의 14-3-3 γ 의 용도 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뇌염증 질환은 뇌 실질의 염증성 질환을 의미하는 것이다. 이는 원인에 따라 감염성, 혈관염성, 종양성, 화학성, 특발성 등으로 크게 분류할 수 있으며, 알츠하이머 또는 파킨슨병을 포함한다.

[0004] 알츠하이머는 주로 65세 이상 노년층에서 점진적인 기억력 감소와 인지기능 손상으로 특징되는 퇴행성 뇌질환이다. 병리수준에서는 베타-아밀로이드 단백질 침전물과 신경섬유 타우 단백질의 엉킴현상이 대표적인 병인이다. 알츠하이머는 그 진행과정에서 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변 실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증까지 나타나게 된다. 현미경으로 알츠하이머 치매 환자의 뇌 조직을 검사하였을 때 특징적인 병변인 신경반(neuritic plaque)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등이 관찰되고, 육안 관찰 시에는 신경세포 소실로 인해 전반적 뇌 위축 소견이 보인다. 이러한 뇌 병리 소견은 질병 초기에는 주로 기억력을 담당하는 주요 뇌 부위인 해마와 내후각뇌피질 부위에 국한되어 나타나지만 점차 두정엽, 전두엽 등을 거쳐 뇌 전체로 퍼져나간다. 이러한 뇌 병리 침범 부위의 진행에 따라 초기에는 기억력 저하가 주로 나타나다가 진행됨에 따라 점진적인 경과를 보이면서 임상 증상이 다양해지고 점점 더 심해지게 된다. 하지만, 현재 치매의 치료방법은 근본 원인의 해결이 아닌 증상 완화 목적의 처치에 불과하여, 알츠하이머의 발병의 억제, 지연 또는 치료를 위한 물질의 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 형질전환 동물(transgenic animals)이란 인위적으로 외부의 유전자를 삽입하거나 또는 유전자를 제거하여 의도하는 유전형질을 발현시킨 동물을 말하며, 생명체에서의 특정 유전자의 역할을 파악하는 기초연구에 유용하게

쓰일 수 있다. 즉, 연구하고자 하는 유전자를 삽입 또는 결손시키고, 그 영향이 어떻게 나타나는지를 관찰하여 상기 유전자가 매개하는 생리적 기능을 유추할 수 있다. 뿐만 아니라, 형질전환 동물은 사람 질병의 한 모델로서 사용할 수 있고, 질병의 원인이나 질병의 진행과정 등을 파악하거나 잠재적 치료약품의 효과나 부작용을 알아보는데 매우 유용하게 사용되고 있다. 현재 치매, 암, 심장병, 유전병 등의 질병에 걸린 형질전환 생쥐, 제브라피쉬 등이 개발되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-2210530호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 YWHAG (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Gamma) 유전자 녹아웃 형질전환 동물모델을 제작하여, 뇌염증 질환의 진단 및 치료제 스크리닝에 유용한 생체 시스템을 완성하였고, 14-3-3 γ 단백질을 뇌염증 질환 진단용 바이오 마커로서 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 이에 본 발명의 목적은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제; 및 지시서를 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 하기 단계를 포함하는 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:
- [0013] (a) 뇌염증 질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0014] (b) 상기 시료의 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0015] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 뇌염증 질환 치료제로 판정하는 단계.
- [0016] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제; 및 지시서를 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 키트를 제공한다,
- [0021] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

- [0022] (a) 뇌염증 질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0023] (b) 상기 시료의 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및
- [0024] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 뇌염증 질환 치료제로 판정하는 단계.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에서 상기 뇌염증 질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 생물학적 시료는 해마 유래 시료인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 방법은 측정한 상기 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 대조군의 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 뇌염증 질환으로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 제제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 방법은 상기 시료의 LCN2, 및 IL1 β 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정; 또는 정상 세포 또는 미세아교세포의 수와 형태를 측정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은 뇌염증 질환을 조기에 효과적으로 진단 및 예측할 수 있는 뇌염증 질환 진단용 조성물, 뇌염증 질환 진단 방법, 및 뇌염증 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통해 뇌염증 질환의 진단이 가능할 것으로 기대되며, 본 발명의 마커인 14-3-3 γ 의 발현 및 활성을 조절하여 뇌염증 질환 치료제 개발에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1a는 14-3-3 γ 녹아웃 형질전환 생쥐에 대한 유전자-트랩 벡터의 계층 일러스트이다. pU-21W 트랩 벡터의 구성은 다음과 같다: EN2 intron; lox71, left-element mutant lox; EN2-SA, 마우스 En2 엑손 2의 스플라이스 수용체; β geo-less CpG, β 를 리포터로 발현하는 less-CPG 서열; pA1, SV40 폴리아데닐화 시그널; pA2, 마우스 PGK 유전자 폴리아데닐화 시그널; FRT, FLP 재조합 효소 표적 서열; lox2272, heterospecific lox; pSP73, pSP73 벡터 서열; lox511, lox 사이트 서열.
- 도 1b는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 계층 DNA 형질표현을 나타낸 것이다.
- 도 2a는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 뇌에서의 14-3-3 γ 단백질을 암호화하는 YWHAG 유전자의 발현량을 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2b는 세 개의 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 뇌 샘플을 사용하여 단백질 면역 블롯을 실시한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2c는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서의 14-3-3 γ 단백질의 감소를 조직 면역 염색법으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3a는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마의 유전자를 mRNA 시퀀싱을 하여 얻은 유의성 있는 유전자의 볼케이노 플롯(배수 변화 > 1.25, P 값 < 0.5)을 나타낸 것이다.

도 3b는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마 (hippocampus)에서 14-3-3 γ 단백질 이소형 및 LacZ의 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3c는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 통계적으로 유의한 염증 반응과 관련한 유전자들의 생물학적 기능에 대한 유전자 온톨로지 분석(배수 변화 > 1.5, P 값 < 0.5)을 나타낸 것이다.

도 4는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 mRNA 시퀀싱을 통해서 얻은 통계적으로 유의성 있는 유전자(배수 변화 > 1.5; P 값 < 0.5; Count > 10)의 DAVID 기능 주석 생물정보학 마이크로 어레이 분석(DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis)을 통한 생물학적 정보 기반의 유전자 온톨로지 상위 명단을 나타낸 것이다.

도 5a 및 5b는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 신경염증 반응에 관여하는 유전자의 변화 양상 및 개체간 발현 패턴을 계층적 클러스터링 유전자 트리(Hierarchical Clustering gene tree)로 나타낸 모식도(배수 변화 > 1.5, P 값 < 0.5)이다.

도 5c 및 5d는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 사이토카인 및 케모카인 유전자의 변화 양상 및 개체 간 발현 패턴을 계층적 클러스터링 유전자 트리(Hierarchical Clustering gene tree)로 나타낸 모식도(배수 변화 > 1.5, P 값 < 0.5)이다.

도 6은 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 신경 염증 반응에 관여하는 반응성 성상세포의 세부 타입인 PAN 반응성 유형, A1 특이적 유형, 및 A2 특이적 유형에 따른 유전자 변화 양상을 계층적 클러스터링 유전자 트리(Hierarchical Clustering gene tree)로 나타낸 모식도(배수 변화 > 1.5, P 값 < 0.5)이다.

도 7은 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 대표적 염증 관련 유전자인 LCN2, IL1 β , 및 YWHAG 유전자 발현량을 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 LCN2 및 IL1 β 단백질의 발현량을 면역블롯 기법 및 조직 면역 염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 성상 세포 및 미세 아교 세포의 수와 형태의 변화를 조직 면역 염색법으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명의 일 실시예에서는 YWHAG 녹아웃 이형접합체 형질전환 생쥐를 제작하고, 상기 형질전환 생쥐의 해마에서 YWHAG 유전자 및 14-3-3 γ 단백질의 발현량이 감소하였음을 확인하였다(실시예 1 및 2 참조).
- [0036] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 형질전환 생쥐 해마에서 신경면역반응에 관여하는 유전자가 변화되어 있음을 확인하였고, 사이토카인 및 케모카인 유전자의 발현량이 증가하였음을 확인하였다. 또한, 대표적 염증 관련 유전자인 LCN2, IL1 β 의 발현량이 증가하였고 성상세포, 및 미세아교세포의 수가 증가하였음을 확인하였다(실시예 3 내지 6 참조).
- [0038] 본 발명자들은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌염증 질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0039] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 뇌염증 질환 진단 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 뇌염증 질환 진단 방법은 뇌염증 질환을 신속하게 진단을 하여, 뇌염증 질환이 악화되기 전에 치료제 투여 등과 같이 즉각 대응을 가능하게 한다. 이에 본 발명의 진단 방법을 뇌염증 질환 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 YWHAG 유전자는 14-3-3 γ 단백질의 코딩 유전자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에 있어서, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것을 포함한다.

- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 뇌염증 질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류일 수 있으며, 뇌염증 질환이 있을 것으로 의심되는 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 생물학적 시료는 해마 유래 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 방법은 측정된 상기 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 대조군의 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 뇌염증 질환으로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정은 당업계에 공지된 단백질의 활성 수준 측정 방법에 의한 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어, 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “측정”은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 유전자 또는 단백질)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험방법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서, 상기 목적 단백질 검출은 절단된 14-3-3 γ 의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0046] 본 발명에서 있어서, 상기 생물학적 시료는 뇌염증 질환을 진단하고자 하는 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 및 뇨 등이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 생물학적 조직 시료 또는 세포 시료, 예를 들어 병변 조직에서 유래한 세포, 조직, 기관, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 진공흡입 생검 검체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 측정될 수 있다. 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 피검체로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다. 또한, 상기 생물학적 시료는 해마 조직 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명에 있어서, “14-3-3 γ ”는 14-3-3 단백질 family로, 14-3-3 단백질들은 진핵생물에서 어디에서나 발현되는 보존된 세포내 조절 분자들의 집단이다. 14-3-3 단백질들은 키나아제, 포스파타아제 및 막투과 수용체 등을 포함하는 여러 기능적으로 다양한 시그널링 단백질들과 결합하는 능력을 가진다. 포유류들에서 발현될 것으로 알려진 14-3-3 단백질들의 7개 뚜렷한 유전적으로 암호화된 아이소형들이 있고, 각각의 아이소형은 242-255개 아미노산을 포함한다. 7개 14-3-3 단백질 아이소형들은 14-3-3 α/β (알파/베타), 14-3-3 δ/ξ (델타/제타), 14-3-3 ϵ (입실론), 14-3-3 γ (감마), 14-3-3 η (에타), 14-3-3 τ/θ (타우/쉴타), 및 14-3-3 σ (시그마/스트라핀)로 지정된다.
- [0048] 본 발명에 있어서, “뇌염증 질환”은 뇌 실질의 염증성 질환을 의미하는 것이다. 뇌염증 질환은 원인에 따라 감염성, 혈관염성, 종양성, 화학성, 특발성 등으로 크게 분류할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 뇌염증 질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 발명은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 체제는 상기 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명에 있어서, “프라이머”는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한

4 가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에 있어서, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(Labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 14-3-3 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지 물질(labeling material)의 결합 등이 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이라면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 14-3-3에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 14-3-3 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다. 본 발명에 있어서, '애타머'는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 애타머의 제조는 일반적인 애타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질(본 발명에서는 14-3-3 단백질)에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 애타머 칩의 판능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명에 있어서, 상기 14-3-3 단백질 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 진단용 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 재제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한없이 사용하여 피검체에서 14-3-3 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

[0056] 본 발명에 있어서, 유전자는 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[0057] 본 발명에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 단백질의 활성 수준을 측정하는 제제; 및 지시서를 포함하는, 뇌염증 질환 진단용 키트를 제공한다.

[0059] 본 발명에 있어서, 상기 키트에는 14-3-3 단백질 또는 14-3-3 mRNA를 마커로 인식하는 항체 또는 14-3-3 mRNA를 마커로 인식하는 프라이머, 프로브뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다. 구체적인 양태로서 상기 진단 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7bp 내지 50bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10bp 내지 30bp의 길이이다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs),

Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또 다른 양태로는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 진단 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)가 부착 되어 있는 기판, 및 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 분석을 위해 사용되는 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 비액, 객담, 관절낭액, 양수, 복수, 자궁경부 분비물, 질 분비물, 소변 및 뇌척수액 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 뇌염증 질환 특이적 단백질을 확인할 수 있는 생체 시료를 포함한다. 바람직하게는 생물학적 액체 시료, 예를 들어 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변으로부터 측정될 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로 부터 수득한 혈청 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 지시서는 피검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 YWHAG 유전자의 발현 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명에 있어서, 하기 단계를 포함하는 뇌염증 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0063] (a) 뇌염증 질환 환자로 부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[0064] (b) 상기 시료의 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계; 및

[0065] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 증가한 경우, 상기 후보물질을 뇌염증 질환 치료제로 판정하는 단계.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 뇌염증 질환은 알츠하이머, 또는 파킨슨병일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 방법은 상기 시료의 LCN2, 및 IL1 β 유전자 또는 단백질의 발현량을 측정; 또는 정상 세포 또는 미세아교세포의 수와 형태를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 해마 유래 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 (b) 단계의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunoassay), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 후보 물질은 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 정상 수준으로 회복되는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화학 물질, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 뇌염증 질환의 치료 방법을 제공할 수 있다:

[0071] (a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계;

[0072] (b) YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준이 대조군의 YWHAG 유전자의 발현 수준 또는 14-3-3 γ 단백질의 활성 수준과 비교하여 감소된 경우, 알츠하이머 치매로 판정하는 단계; 및

[0073] (c) 뇌염증 질환을 치료하는 단계.

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에서 치료는 약물치료, 수술치료, 인지재활치료, 작업치료 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 도네페질(Donepezil), 리바스티그민(Rivastigmine), 갈란타민(Galantamine), 메만틴(memantine), Tacrine-huperzine A, 레보도파(levodopa), 또는 아만타딘(amantadine)로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물일 수 있으며, 아세틸콜린 분해효소 억제제, NMDA 수용체 길항제, 또는 COMT 저해제(catechol-O-methyltransferase inhibitor)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1. 형질전환된 생쥐의 제작**

[0080] 14-3-3 γ 결핍 마우스는 유전자 트랩 벡터 pU-21W를 마우스 염색체 5qG2에 위치하며 14-3-3 γ 단백질을 암호화하는 YWHAG 유전자에 유전자 트랩 벡터(gene trap vector) pU-21W를 무작위 삽입하는 방식으로 제작되었으며, 그 결과로 YWHAG 유전자 엑손 2 지역의 앞부분에 해당벡터가 삽입되었다. 이는 도 1a에 나타내었다. 이를 통해, 14-3-3 γ 를 발현하지 못하는 YWHAG 녹아웃 생쥐를 제작하였다. 이때, β -Geo-less CpG를 포함하는 대립유전자는 LacZ를 발현하였다. 또한, 상기 유전자 트랩 벡터의 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

[0081] 또한, 해당 유전자의 동형접합체(homozygous) 녹아웃 생쥐의 경우 발생 중 사망으로 인해 출생 후 생존 개체 확보가 어려우므로, 이형접합체(heterozygous) 녹아웃 생쥐를 실험에 사용하였다. 이는 도 1b에 나타내었다.

표 1

서열(5'-3')	
유전자 트랩 벡터	GGTCCCTCGGACACACGAGTCCAAGCCGCTCCTCTCTTTTCCTGA
인터널 코드	AGCCCTTCAAGGCGGTTTCGGTTTCCTTCTTTCCAGCCGATCCTCT
(Ayu21-W266)	TCAGCCCTGTGAAGATGGTGGACCGCGAGCAACTGGTGCAGAAAG
Accession ID:	CCCGGCTGGCCGAGCAGGCGGAGCGCTACGACGATATGGCCGCGG
AB505804	CCATGAAGAACGTGACCGAGCTGAACGAACCACTGTCCAATGAGG
	AACGGAACCTCCTGTGCGGTGGCCTACAAGAACGTGGTGGGGGCTC
	GCCGCTCCTCCCTGGAGGGTCATCAGCAGCATCGAGCAGAAGACG
	TCTTCTT
서열(5'-3')	
유전자 트랩 벡터	actagtgaagaggaaaccgaaagtatgtttttcagatgttcttttcagaaataggagtgtgc
(gene trap vector)	ggaggttgagagtgtgtgttaggacacgaaccccgaggtggagggagactggaggacag
Accession ID:	agccctctttcccgaggagggaaggaggagagtttgagatccgctccggaagtggggtt
AB427140	cgagtttgagcagggccaggccctctccgtggtctcgccctctgtctcagaagccctcactg
	gcccaggtgtaagccaggtcgtgggtgcccagccctgctccctcactcactcagcatggatgt
	gaagaggactgtatggcgtgagggtgtgtgacccgtgggtacacttaaacacccgggtt
	tggatctgcactgtcccgatgtctctgtgtgctcaagacccttttgggtttgccccttgggt
	aagagcgccgggactctactgtctggaggccaggagagtcctcagccagaggttgccgcc
	cctgactgcactgcactgagtagtggtggagaggtctggtaacgcactgcccgtttctc
	caaccatcccccagcagcagggcagtgcaattccgtctcgtgccaagggggaggtgg
	gctctctcagcctcttccgttttagcggaggggccttgatggaaggggcccgcatgtctcc
	aaagttgattcatgtcttctgcaacagagaagaccagaagaagggtcctcaggttttagccg
	gtagcccggttgccctttctgcaacggaaccatgtgaacctgtgacccgtgacaaagag
	acccctctaacccaaagaccctacacatttaaccccttccctttgaaggcttccacacca

[0083]

oottoaacacttgccccaaacactgccaactatgtaggagaaggggttggaactaacag
 aagaaccogttgtggggaagotgttgaggaggttoactttatgttcttggccaaggtcagttg
 ggtggcctgcttctgatgaggtggtoccaaaggtotgggtagaaggtgagaggacaggc
 caccoaaggtcagccccccccctatcccataggagccaggtccctctctggacagg
 aagactgaaggggagatgccaagagactcaggaagcctggggtacccattggagtoct
 caaggaaacaaaactggcctcaccaggcctcagcctggctctctgggaactctactg
 cccctgggacccctgttagttgtgggttacataggaaaggggaagggtattcccttgactgg
 ctaggcctactcttttctcagttctctccatctctctcaccgtctctgaccccttccctagg
 atagacttgaaaaagataagggggagaaaaacaaatgcaaacaggggccagaagattt
 tggctgggcattctctcctagcttttattgggtacccctcaggtcgagggaacctatacgg
 ttogtatagcatacattatcagaagttatattaagggttcggatccctcagtttgtatagg
 ccttttagctacatctgcaaatccatctcttttccacacacacacacacacacacttctctgg
 toagtgggcacatgtccagcctcagtttatatccaccccccaatgccccacacttgat
 ggcccttgccggggtcctcccccccccaacccagttatctgcaaccccaagctagctggg
 tgcgttggttggtgataagtagctagactccagcaaccagtaacctctgccccttctctcc
 atgacaaccagggtccaggtcccgaaaaacaaagagagaacctatacaaaaggagg
 caaggcgccctgcatagccttccactgcttaggtacccatgggaagatcccgctgttttaaac
 gtogtgactgggaaaaacccctggcggttaacccaacttaatgccttgacacatccccctt
 cgcagctggcggtaatagcgaagaggcccgccacccgatcgcccttcccaacagttgcgc
 agcctgaatggcgaatggcgctttgcccgtttccggcaccagaagcgggtccgggaag
 ctggctggagtgcatcttctgaggccgatactgtctgtctccctcaaaactggcagatg
 caagggttacgatgcgccaatctacaccaacgtaacctatccattacggtaacatccgcgg
 ttgttcccaagggaatccgaagggttggtactctgctcatttaattgtgatgaagctgg
 ctacagggaaggccagacgggaattttttgatggcggttaactctgcttccacctctggtg
 caatggcaggtgggttggtatggccaagacagcaggctgcccctctgagtttgacctctct

[0084]

gcttctctcagagctggagagaaacaggctggctgtoatggctcaggtggtgatggc
 agctacotggagagaaacagacatgtggaggatgttgcatcttcaggsgatgagcctg
 ctgcacaagcccaacccagattttgacttccatgttgccaaagggtcaatgatgact
 toagcagagctgtgtggaggctgaggtgcagatgtgtggagaactcagagactacotga
 gagtcacagtgagcctctggcaagggtgagacccagggtgctctggcacagccccctt
 ggaggagagatcattgatgagagaggaggtatgtgcacagagtcacccctgaggtctcaa
 tgtggagaaaccccaagctgtggctgtgtgagatcccaacotctacagggtgtgtgga
 gctgcacactgtgatggcaccctgattgaagctgaagcctgtgtgttgattoagagaa
 gtcaggattgagaatggcctgtgtgtcctaatggcaagcctgtgtcctcaggaggagto
 aacagggtatgagcaccacccctctgcatggacaagtgatggatgaacagacaatggctc
 aagatatcctgtcaatgaagcagacaacttcaatgtgtcagggtctctcactacccca
 accacccctctgtgtacacccctgtgtgacagggtatggcctgtatgtgttgatgaagccaa
 attgagacacatggcatgggtgccatgaacagggtcaccagatgaacccagggtgctgoc
 tgccatgtgtgagagagtgaccagggtggtgcagagagacagggaacacccctctgtga
 toatgtgtgtgtggcaatgagctgtgacatggagcccaacatgatgtctctacagggtg
 gatcaagtgtgtgacccagcagacccctgtgcagtatgaaggagggtggagcagaccca
 caggccacagacatcatctgccccatgtatgcagggttgatgaggacagcccttccctg
 ctgtgcccagggtgagcctcagaagtggtctctctgtgctggagagaccagacctctga
 toctgtgtgaatatgcacatgcaatgggcaactctctgggagggtttgcaagtaactggca
 agccttcagacagtaacccagggtgcaaggaggattgtgtggactgggtggaccaatc
 totoatcaagtatgatgagaatggcaacccctggtctgctatgaggagactttggtgac
 acccccaatgacaggcagttctgcatgaatggcctgtgtttgcagacaggacccctcacc
 cctgcccctcagaggcccaagcaccagcaacagttcttcagggttccagggtgtctggaca
 gaccattgaggtagacatctgagtaactcttcaggcactctgacaatgagctcctgactgg
 atgggtggccctggatggcaagcctctggtctgtgggtgggtgctctggatgtggccctc

[0085]

aaggaaagcagctgattgaactgcoctgagctgcoctagcagagctgtgtggacaactgt
ggctaacagtgagggtgggttaagcccaatgcaacagcttggtgtgaggcaggccacatct
ctgoatggcagcagtgagggtgggtgagaaacctotctgtgacctgcoctgctgcoctca
tgcoactcoctacactgacaacatctgaaatggactctgcatggagctgggcaacaagag
atggcagtttaacaggcagctgtggttcoctgtctcagatgtggttggagacaagaagca
gctcoctacccctctcagggaaccaatcaccagggtcoctctggacaatgacattggagt
gtgtgaggccacaggattgacccaatgctgggtggagaggtggaaggctgtggao
actaccaggctgagggtgcoctgtcoctgacagcagacacccctggctgatgtgtto
tgatocacacagcccatgctggcagcaccagggaagacctgttcatcagcagaag
acctacaggattgatggctgtggacagatggcaatcacagtggtgtggaggtgcoctgt
acacacccctacccctgcaaggattggcoctgaactgtcaactggcaccagggtggctgagagg
gtgaactggctgggttaggcoctcaggagaactacctgacaggctgacagctgcoctg
cttgacagggtgggaacctgcoctgtgtgacatgtacacccctatgtgttcoctctgagaa
tgcoctgagggtgtggcaccagggtggaactatggtcoctcaccagtgaggggagactt
ccagttcaacatctccagggtactctcagcaacagctcatggaaaacctctcaccaggccact
gtcoctcagcaggagggaacctgggtgaacattgatggcttccacatgggcattggagg
agatgactcttggctcoctctgtgtgtgtgagttcagttatctgtggcagggtacacctat
cagctggtgtgtgtgcaagaagttacatccattgaacaagatggattgcaogcaggttctc
cggccggttggtgtgagaggctattggctgtgactgggcacaacagacaatgggtgt
ctgatgccgcgtgttccgggtgtcagcgcaggggcgccgggtttttttgtcaagacoga
cctgtccgggtgcoctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatgtggctggcoa
cgaggggcgttcocttgccagctgtgtcgaactgtgcaactgaagcgggaagggaactggc
tgtattgggcgaagtgccggggcagggtatctgtcattctcaccctgtcoctgcccagaa
agtatoccatgagctgatgcaatgcggcggtgcatacgttgatccgggtacotgccc
attgacacacaaagogaacatcgcacagcagcagcagctactcggatggaagccgggt

[0086]

ottgtgatcaggatgatctggacgaagagcatoaggggctcggccagccgaactgttc
 gccagggtcaaggcgcgcgatgcccgaacggcggaggatctctgtgacccatggcgatg
 cctgcttgcgaatatcatggaggaaaatggccgcttttttggaattoatcgactgtggccgg
 ctgggtgtggcggacccgatcaggacatagcgttggctacccgtgataattgtgaagag
 cttggcggcgaaatgggctgacccgcttctctgtgctttaaggatagccgctcccgattgc
 agcgcatcgcccttatcgcccttctgacaggttcttgagcgggaactctggggttgaaa
 tgaaccgacaaagcgacgcccacccctgcaatcacgagatttcgattccacccgccccttc
 tatgaaagggtgggcttgggaatgctttccgggaacggcgctggatgacccagcgcg
 gggatctcatgtgaggttcttgcccaccccggaatataagctotagataagtaagatcat
 aatcagccataccacattgttagaggtttaactgtttaaaaaactccacacccccc
 tgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgtgtgttaactgtttattgacgttataatgg
 ttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattota
 gttgtggtttgtccaaactcacaatgatattatcatgtctggatccgggctagtggaatt
 gaagttctattccgaagttctattctatgaaagtataggaaactcagagcgttttgaa
 gctggtcgagggaactaataactgtatagcatcattatacgaagttatattaagggttc
 cggatccgatgatcatcagatcccccgggatgcagaaattgatgatattaaacaataaag
 atgtccactaaaatggaagttttctgtcatacttgttaagaaagggtgagaaacagagtao
 ctacattttgaatggaaggattggagctacgggggtgggggtggggtgggattagataaat
 gootgcttttactgaaggctctttactattgctttatgataatgittcattgtgtatata
 atttaaacagcaaaacaaattaaggggccagctcattctccactcatgatctatagat
 cccccggggcagcttatcgctagtggatcttgaagttctattccgaagttctattctota
 gaaagtataggaaactcagagcgttttgaaagcttatcgctcaggtcgagggaactaata
 aactgtataggatactttatacgaagttatattaagggttcggatctctagagtcgaact
 gcaggcatgcaagcttcagctgctcgaggccggtctccctatagttagtgatgataatttg
 ataagccagggttaacctgcattaatgaatggccaaacgcgggggagggcggtttgct

[0087]

[0089]

[0091] 실시예 2. 형질전환된 생쥐에서 YWHAG 유전자 및 14-3-3 γ 단백질의 발현량 확인

[0092] 제작된 성체 이형 접합체 녹아웃 생쥐의 뇌에서의 14-3-3 γ 단백질을 암호화하는 YWHAG 유전자의 발현량을 실시간 중합효소연쇄반응 (qRT-PCR)을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 2a에 나타내었다.

[0093] 도 2a에 나타난 바와 같이, YWHAG 유전자의 발현량이 성체 이형 접합체 녹아웃 생쥐의 전체 뇌에서 감소되어 있음을 확인하였다.

[0094] 또한, 세 개의 다른 샘플을 사용하여 단백질 면역 블롯을 실시하였다. 구체적으로, 확보된 생쥐의 뇌를 균질화(homogenization)하여 세포를 용해 (lysis)하고 단일 단백질로 환원(reducing)하여, 젤 전기영동(gel electrophoresis)을 통해 전류를 걸어 단백질을 크기에 따라 분리하였다. 분리된 단백질을 PVDF 소재의 막으로 이동시킨 후 특정 단백질을 인식할 수 있는 항체를 이용하여 표지하고 화학발광시약 (chemiluminescence agent)을 사용하여 이미지화하고 관찰하였다. 그 결과는 도 2b에 나타내었다.

[0095] 도 2b에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해서 형질전환된 생쥐에서 14-3-3 γ 단백질 수준이 유의하게 감소한 것을 확인하였다.

[0096] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마 에서의 14-3-3 γ 단백질의 감소를 조직 면역 염색법으로 확인하였다. 구체적으로, 확보된 생쥐의 뇌를 30 μ m의 두께로 동결 절편(cryosection)하고, 특정 단백질을 인식할 수 있는 항체(Anti-ywhag, ATLAS antibodies사)를 이용하여 표지한 후, 형광 물질을 달아 공초점 현미경(confocal microscope)을 통해 이미지화 하여 관찰하였다. 그 결과는 도 2c에 나타내었다.

[0097] 도 2c에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해서 형질전환된 생쥐에서 14-3-3 γ 단백질의 발현이 감소하였음을 확인하였다.

[0099] 실시예 3. 형질전환된 생쥐에서 신경면역반응에 관여하는 유전자 변화 확인

[0100] 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마 (hippocampus)를 유전자 분석법 (mRNA sequencing)을 이용하여 분석하였다. 그 결과는 도 3a에 나타내었다.

[0101] 도 3a에 나타난 바와 같이, 신경 면역 반응에 관여하는 다수의 유전자들이 변화되어 있음을 확인하였다.

[0102] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마 (hippocampus)에서 14-3-3 γ 단백질 이소형 및 LacZ의 mRNA 발현량을 확인하였다. 그 결과는 도 3b에 나타내었다.

[0103] 도 3b에 나타난 바와 같이, 14-3-3 γ 단백질 발현량이 다른 이소형들보다 유의하게 감소하였음을 확인하였다.

[0104] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 통계적으로 유의한 염증 반응과 관련한 유전자들의 생물학적 기능에 대해 유전자 온톨로지 분석을 하였다. 그 결과는 도 3c에 나타내었다.

[0105] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 mRNA 시퀀싱을 통해서 얻은 통계적으로 유의성 있는 유전자(배수 변화> 1.5; P 값 <0.5; Count> 10)의 DAVID 기능 주석 생물정보학 마이크로 어레이 분석(DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis)을 통한 생물학적 정보 기반의 유전자 온톨로지 상위 명단을 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0106] 도 4에 나타난 바와 같이, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 변화된 유전자의 생물학적 기능은 면역반응과 밀접하게 관련이 있음을 확인하였다.

[0108] 실시예 4. 형질전환된 생쥐에서 신경염증 반응에 관여하는 유전자 및 사이토카인 및 케모카인 유전자의 발현량 확인

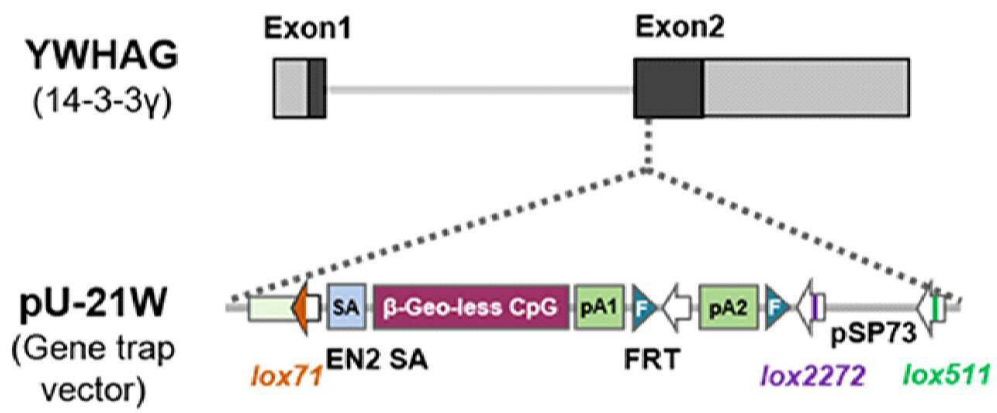
[0109] 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 신경염증 반응에 관여하는 유전자의 변화 양상을 확인하였다. 그 결과는 도 5a 및 5b에 나타내었다.

[0110] 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 신경염증 반응에 관여하는 다량의 유전자의 발현이 변화되어 있고, 그룹 간 유사성이 있음을 확인하였다.

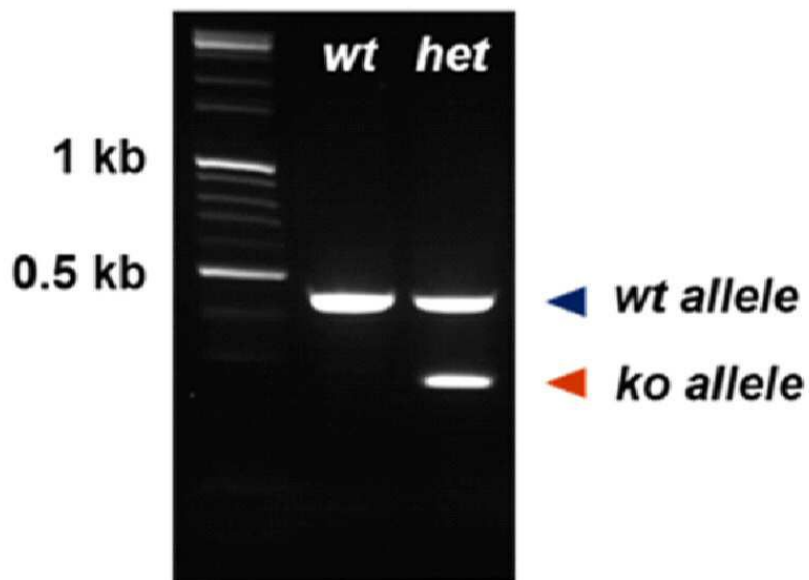
- [0111] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 사이토카인 및 케모카인 유전자의 변화 양상을 확인하였다. 그 결과는 도 5c 및 5d에 나타내었다.
- [0112] 도 5c 및 5d에 나타난 바와 같이, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 다량의 사이토카인 및 케모카인 유전자의 발현이 변화되어 있고 그룹 간 유사성이 있음을 확인하였다.
- [0113] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 신경 염증 반응에 관여하는 반응성 성상세포의 세부 타입인 PAN 반응성 유형; A1 특이적 유형; 및 A2 특이적 유형에 따른 유전자 변화 양상을 확인하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0114] 도 6에 나타난 바와 같이, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 염증성 성상세포 세부 타입과 연루된 유전자의 발현이 변화되어 있음을 확인하였다.
- [0116] **실시예 5. 형질전환된 생쥐에서 LCN2, IL1 β 의 유전자 및 단백질의 변화 확인**
- [0117] 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체(heterozygote) 생쥐의 해마에서 대표적 염증 관련 유전자인 LCN2, IL1 β , 및 YWHAG 유전자 발현량을 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었다,
- [0118] 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 이형접합체 생쥐의 해마에서 LCN2 및 IL1 β 유전자의 발현량이 증가되어 있으며, YWHAG 유전자 발현량이 감소한 것을 확인하였다.
- [0119] 또한, 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 LCN2 및 IL1 β 단백질의 발현량을 면역블롯 기법 및 조직 면역 염색법을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0120] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 이형접합체 생쥐의 해마에서 LCN2 및 IL1 β 단백질의 발현량이 증가하였다.
- [0122] **실시예 6. 형질전환된 생쥐에서 성상세포, 및 미세아교세포의 수 및 형태의 변화 확인**
- [0123] 제작된 YWHAG 녹아웃 이형접합체 (heterozygote) 생쥐의 해마에서 성상 세포 및 미세 아교 세포의 수와 형태의 변화를 조직 면역 염색법으로 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다.
- [0124] 도 9에 나타난 바와 같이, 성상 세포 및 미세 아교 세포의 수가 증가한 것을 확인하였다. 이는 염증 관련 마커가 증가한 것을 의미한다.
- [0126] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

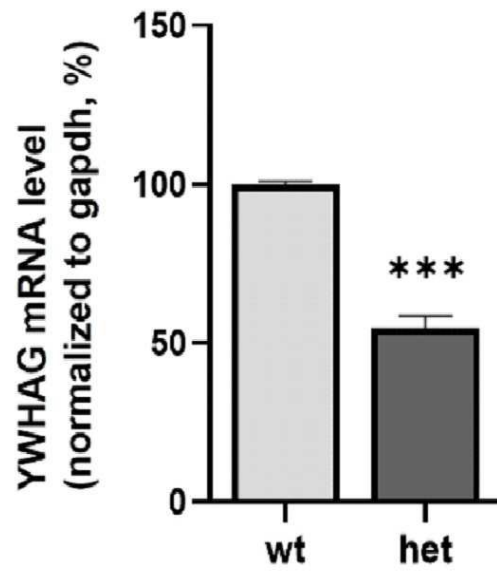
도면1a



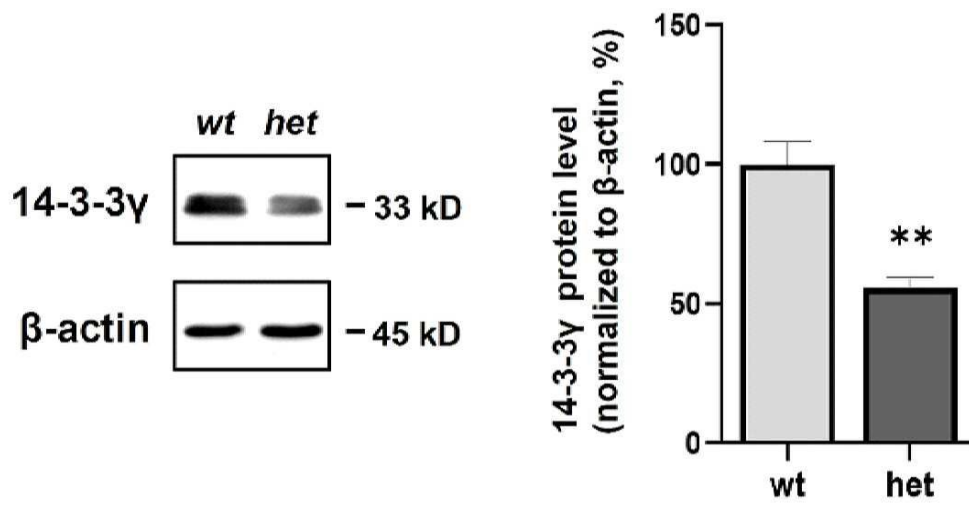
도면1b



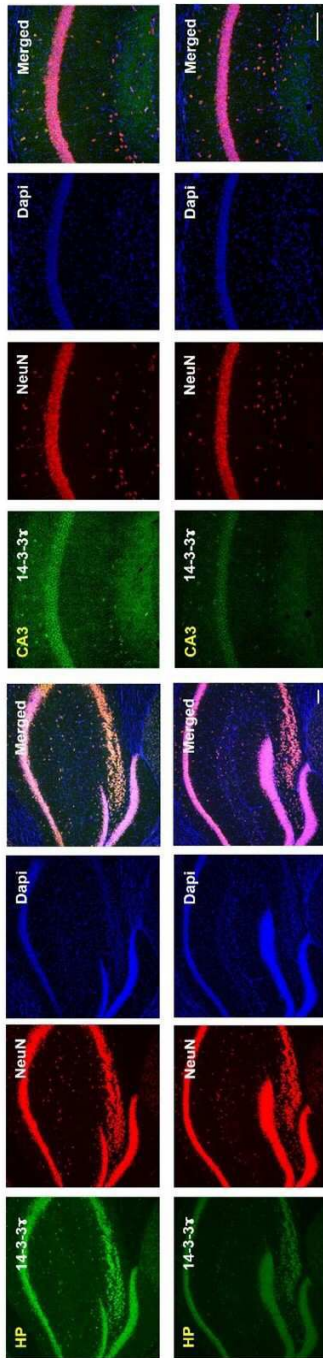
도면2a



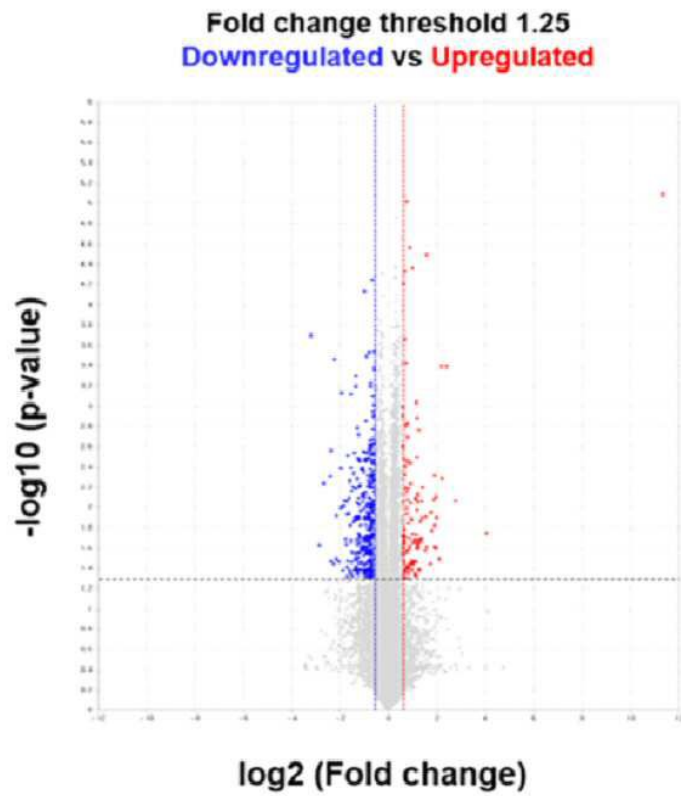
도면2b



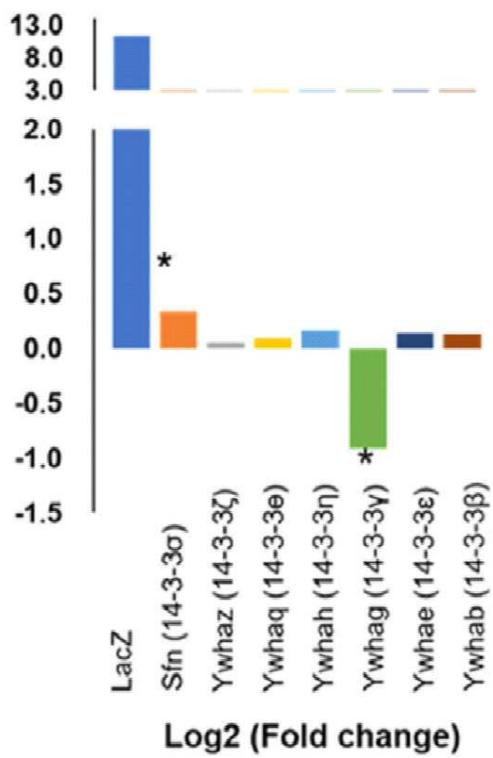
도면2c



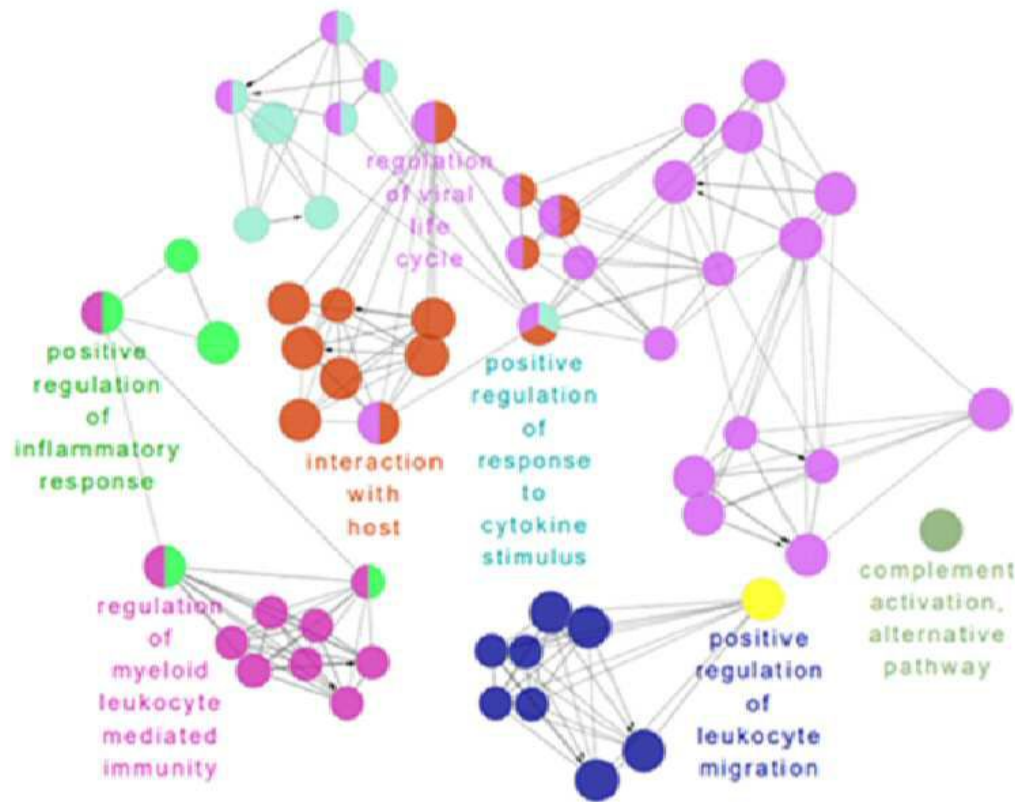
도면3a



도면3b



도면3c

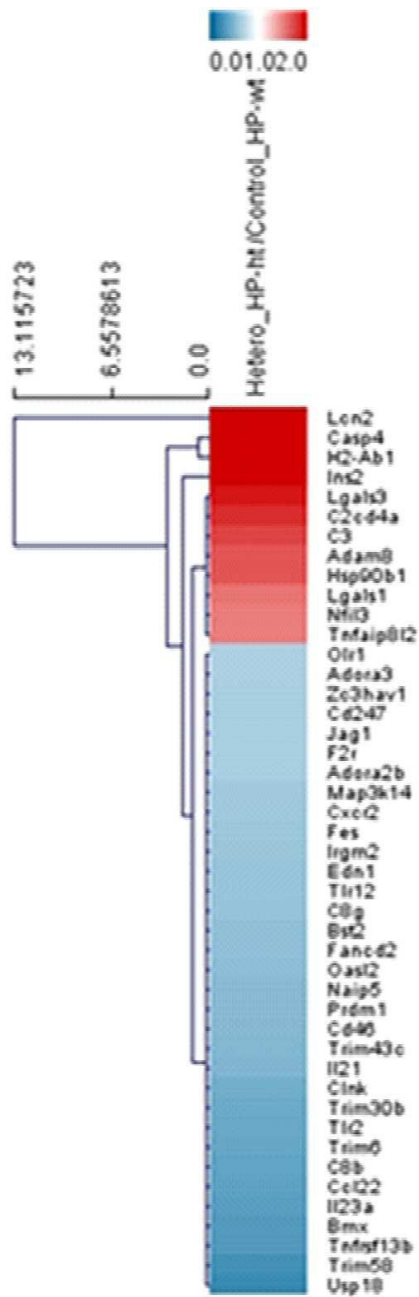


도면4

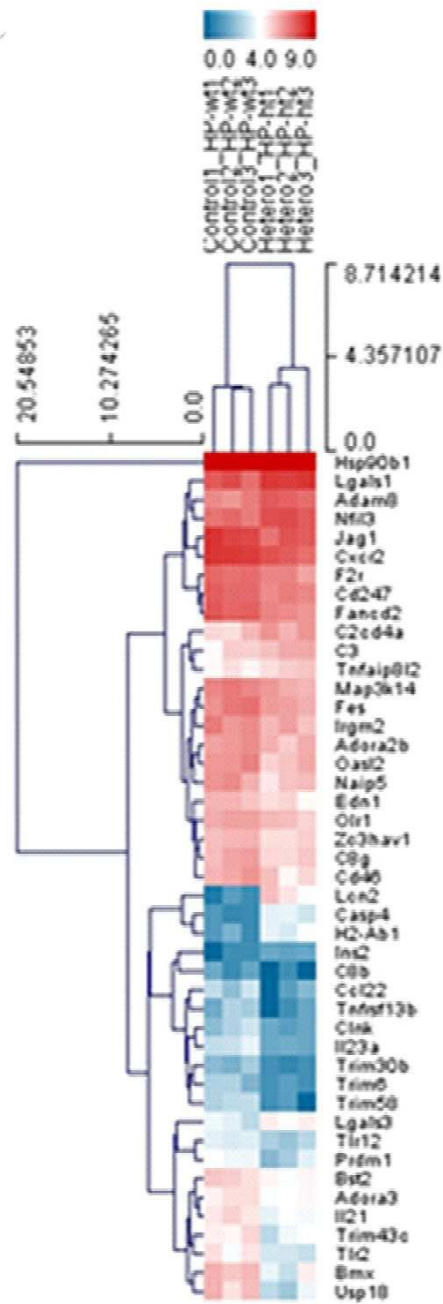
DAVID Gene ontology term enrichment analysis [FC]>1.5, p≤0.05, n≥10

Category	GO ID	Go term	Count	%	P-Value
Biological process	GO:003019	Extracellular matrix organization	14	3.1	1.32E-07
	GO:0007155	Cell adhesion	24	5.2	2.30E-05
	GO:0002376	Immune system process	18	3.9	5.81E-04
	GO:0007275	Multicellular organism development	33	7.2	1.76E-03
	GO:0030154	Cell differentiation	27	5.9	1.84E-03
	GO:0045087	Innate immune response	17	3.7	2.41E-03
	GO:0000122	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	25	5.5	3.21E-03
	GO:0008285	Negative regulation of cell proliferation	16	3.5	4.09E-03
	GO:0008284	Positive regulation of cell proliferation	20	4.4	4.32E-03
	GO:0007166	Cell surface receptor signaling pathway	11	2.4	6.29E-03
	GO:0042127	Regulation of cell proliferation	11	2.4	8.02E-03
	GO:0001525	Angiogenesis	11	2.4	1.12E-02
	GO:0006955	Immune response	11	2.4	2.49E-02
	GO:0006357	Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	14	3.1	2.74E-02
	GO:0010628	Positive regulation of gene expression	14	3.1	2.85E-02

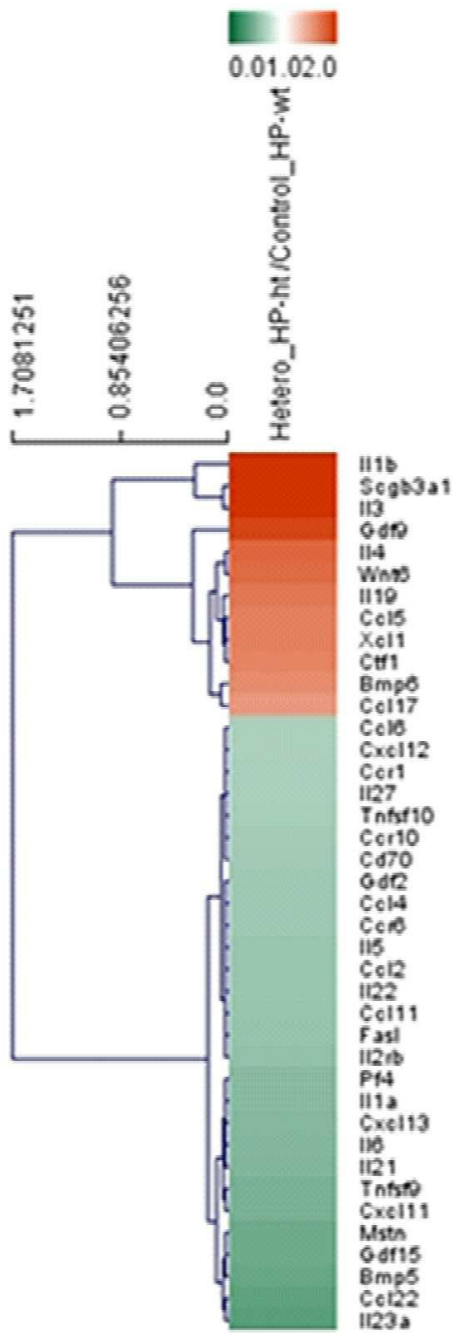
도면5a



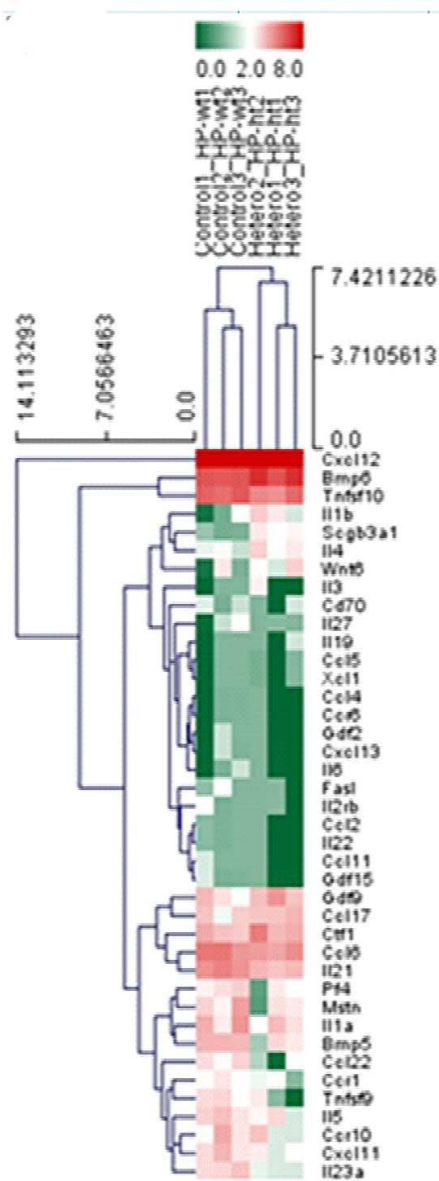
도면5b



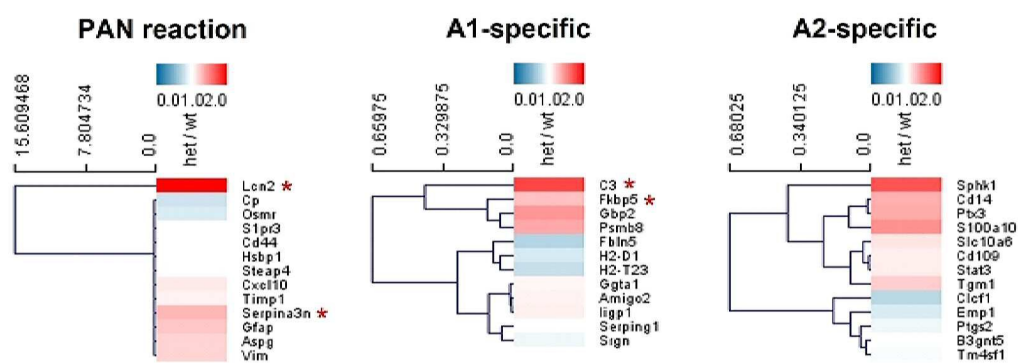
도면5c



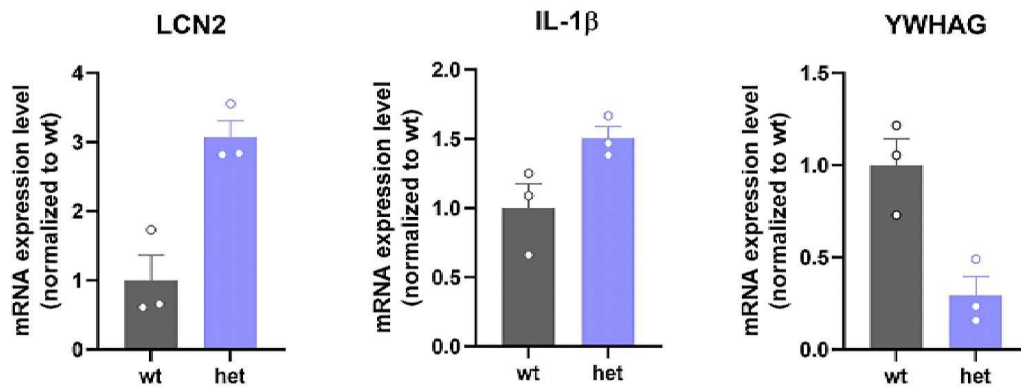
도면5d



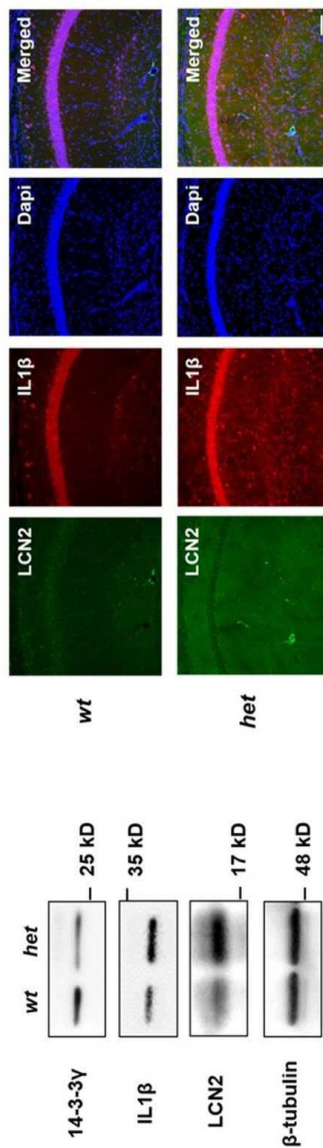
도면6



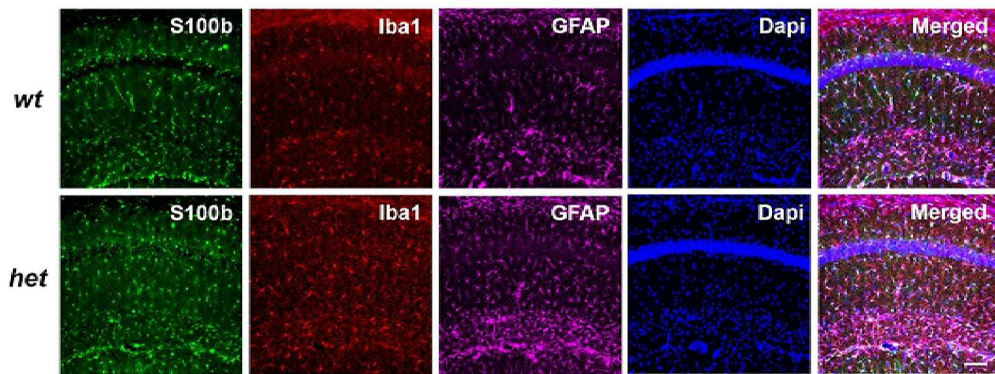
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Use of 14-3-3 gamma as brain inflammation diseases diagnostic marker	
<130>	MP21-063P1	
<150>	KR 10-2021-0042911	
<151>	2021-04-01	
<160>	2	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	323	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ayu21-W266_AB505804	
<400>	1	
	ggtcctcgg acacacgagt ccaagccgct cctctctttt cctgaagccc ttcaaggcgg	60
	tttcggtttc cttctttcca gccgatactc ttcagccctg tgaagatggt ggaccgcgag	120
	caactggtgc agaaagcccg gctggccgag caggcggagc gctacgacga tatggccgcg	180
	gccatgaaga acgtgaccga gctgaacgaa ccactgtcca atgaggaacg gaacctcctg	240
	tcggtggcct acaagaacgt ggtgggggct cgccgctcct ccctggaggg tcatcagcag	300
	catcgagcag aagacgtctt ctt	323
<210>	2	
<211>	9331	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> gene trap vector_AB427140

<400> 2

actagtgaag aggaaccgaa agtatgtttt tcagatgttc tttctcagaa ataggagttt	60
gcggagggttg gagtgttgtt tgtaggacac gaacccagg gtggaggaga ctggaggaca	120
gagccctctt tcccaggag ggaaggagga gagtttgaga tccgctccgg aagtcggggt	180
tcaggtttga gcaggccagg cctctcccgt ggtctcgccc tcttgctcta gaagcctcac	240
tggccagggtg taagccagggt cgtgggtgcc gagccctgct ccctcatcct cagcatggat	300
gtgaagagga ctgtatggcg tgcgggtgtg tgtgaccgtg ggtacactta aaacaccggg	360
ttttggatct gcactgtccc ggatgtccctc tgggtgtcaa agaccctttt gggtttgccc	420
tttgtaaga gcgccgggat ctacttgtct ggaggccagg gagtccctcag ccgaggcttg	480
ccgccccga ctgcactgca ctgagtagtg gatgggagag tctggtaccg cactgccggt	540
tctctccacc atccccgcag cgcagggcag tgcatccgt cctggctgcg aagggggatg	600
gtcgggcctt ctccagcctc ttccgttcta gcggaagggc cttgatggaa gggcccgcat	660
gtctccaaag ttgattcatg cttcttgcaac agaaaaagac cagaaagaag gtctcaagtt	720
ttagccggta gcccgatgg ccttttccctg cacggcacca tatgaacctt gtgacctga	780
caaagagacc cctctaacc aagacccta ccactttacc ctttcccttt gaaggtttc	840
ccacaccacc ctcaacactt gcccacaaca ctgccaacta tgtaggagaa ggggttgga	900
ctaacagaag aaccgttgtt ggggaagctg ttgggagggt cactttatgt tcttgccaa	960
ggtcagttag gtggcctgct tctgatgagg tgggccaaag gtctggggtg gaaggtgaga	1020
gggacaggcc accaagggtc gcccccccc cctatcccat aggagccagg tccctctcct	1080
ggacaggaag actgaagggg agatgccaga gactcagtga agcctggggt accctattgg	1140
agtccttcaa ggaacaacac ttggcctcac caggcctcag ccttggtcc tcttggaac	1200
tctactgccc ttgggatccc ttgtagtgtt gggttacata ggaaggggga cgggattccc	1260
cttgactggc tagcctactc ttttcttcag tcttctccat ctcctctcac ctgtctctcg	1320
accctttccc taggatagac ttggaaaaag ataaggggag aaaaacaaat gcaaacgagg	1380
ccagaaagat ttggctggg cattccttcc gctagctttt attgggatcc ctgcaggtcg	1440
agggacctat accgttcgta tagcatacat tatacgaagt tatattaagg gttccggatc	1500
ccctagtttg tgataggcct tttagctaca tctgccaatc catctcattt tcacacacac	1560
acacaccact ttccttctgg tcagtgggca catgtccagc ctcaagttaa taccaccacc	1620
cccaatgccc aacacttgta tggccttggc ggggtcatcc cccccacc cccagtatct	1680

gcaacctcaa gctagcttgg gtgcgttggg ttgggataag tagctagact ccagcaacca	1740
gtaacctctg ccccttctcc tccatgacaa ccagggtccca ggtcccgaag accaaagaag	1800
aagaacccta acaaagagga caagcggcct cgcatagcct tcaactgctta ggtaccatgg	1860
aagatcccgt cgctttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc	1920
gccttgacgc acatccccct ttgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc	1980
gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg ctttgcctgg ttccggcac	2040
cagaagcggg gccggaaagc tggctggagc gcgatcttcc tgaggccgat actgtcgtcg	2100
tccctcaaa ctggcagatg cagggttacg atgcgcccat ctacaccaac gtaacctatc	2160
ccattacggg caatccgccg ttgttccca cggagaatcc gacgggttgt tactcgtca	2220
catttaatgt tgatgaaagc tggctacagg aaggccagac gcgaattatt ttgatggcg	2280
ttaactctgc cttccacctc tgggtcaatg gcagggtggg tggctatggc caagacagca	2340
ggctgccctc tgagtttgac ctctctgcct tcctcagagc tggagagaac aggctggctg	2400
tcatggtgct cagggtggtc gatggcagct acctggaaga ccaagacatg tggaggatgt	2460
ctggcatctt cagggatgtg agcctgctgc acaagccac caccagatt tetgacttcc	2520
atgttgccac caggttcaat gatgacttca gcagagctgt gctggaggct gaggtgcaga	2580
tgtgtggaga actcagagac tacctgagag tcacagttag cctctggcaa ggtgagacc	2640
agggtggcctc tggcacagcc ccttttgag gagagatcat tgatgagaga ggaggctatg	2700
ctgacagagt caccctgagg ctcaatgtgg agaaccctaa gctgtggtct gctgagatcc	2760
ccaacctcta cagggtgtt gtggagctgc aactgtctga tggcaccctg attgaagctg	2820
aagcctgtga tgttgattc agagaagtca ggattgagaa tggcctgctg ctgctcaatg	2880
gcaagcctct gctcatcagg ggagtaaca ggcatgagca ccacctctg catggacaag	2940
tgatggatga acagacaatg gtgcaagata tctgtctaata gaagcagaac aacttcaatg	3000
ctgtcagggt ctctcactac cccaaccacc ctctctggta caccctgtgt gacaggtatg	3060
gcctgtatgt tgttgatgaa gccaacattg agacacatgg catggtgccc atgaacaggc	3120
tcacagatga cccaggtgg ctgcctgccca tgtctgagag agtgaccagg atggtgcaga	3180
gagacaggaa ccacctctct gtgatcatct ggtctctggg caatgagtct ggacatggag	3240
ccaacctga tctctctac aggtggatca agtctgtga cccagcaga cctgtgcagt	3300
atgaaggagg tggagcagac accacagcca cagacatcat ctgccccatg tatgccaggg	3360
ttgatgagga ccagcccttc cctgtgtgct ccaagtggag catcaagaag tggctctctc	3420

tgcctggaga gaccagacct ctgatcctgt gtgaatatgc acatgcaatg ggcaactctc	3480
tgggaggctt tgccaaglac tggcaagcct tcagacagta ccccaggctg caaggaggat	3540
ttgtgtggga ctgggtggac caatctctca tcaagtatga tgagaatggc aacccttggt	3600
ctgcctatgg aggagacttt ggtgacaccc ccaatgacag gcagttctgc atgaatggcc	3660
tggctctttg agacaggacc cctcacctg cctcacaga ggccaagcac cagcaacagt	3720
tcttccagtt caggctgtct ggacagacca ttgaggtagc atctgagtac ctcttcaggc	3780
actctgacaa tgagctcctg cactggatgg tggccctgga tggcaagcct ctggcttctg	3840
gtgaggtagc tctggatgtg gcccctcaag gaaagcagct gattgaactg cctgagctgc	3900
ctcagccaga gtctgctgga caactgtggc taacagttag ggtggttcag cccaatgcaa	3960
cagcttggtc tgaggcaggc cacatctctg catggcagca gtggaggctg gctgagaacc	4020
tctctgtgac cctgcctgct gcctctcatg ccacccctca cctgacaaca tctgaaatgg	4080
acttctgcat tgagctgggc aacaagagat ggcagttcaa caggcagttc ggcttcctgt	4140
ctcagatgtg gattggagac aagaagcagc tcctcacccc tctcaggac caattacca	4200
gggctcctct ggacaatgac attggagtgt ctgaggccac caggattgac ccaaagctt	4260
gggtggagag gtggaaggct gctggacact accaggctga ggctgccctg ctccagtga	4320
cagcagacac cctggctgat gctgttctga tcaccacagc ccatgcttgg cagcaccaag	4380
gcaagacctt gttcatcagc agaaagacct acaggattga tggtcttggc cagatggcaa	4440
tcacagtgga tgtggaggtt gcctctgaca cacctaccc tgcaaggatt ggctgaact	4500
gtcaactggc acaggtggct gagagggtag actggctggg cttaggcctc caggagaact	4560
accctgacag gctgacagct gcctgctttg acaggtggga cctgcctctg tctgacatgt	4620
acaccctta tgtgttcctt tctgagaatg gcctgaggtag tggcaccagg gagctgaact	4680
atggtcctca ccagtggagg ggagacttcc agttcaacat ctccaggtag tctcagcaac	4740
agctcatgga aacctctcac aggcacctgc tccatgcaga ggagggaacc tggctgaaca	4800
ttgatggctt ccacatgggc attggaggag atgactcttg gtctccttct gtgtctgctg	4860
agttccagtt atctgctggc aggtaccact atcagctggg gtggtgccag aagttacatc	4920
ccattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg	4980
gctatgactg ggcacaacag acaatcggtc gctctgatgc cgccgtgttc cggtgtcag	5040
cgcaggggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactgc	5100
aggacgaggc agcgcggtta tcgtggctgg ccacgacggg cgcttccttg gcagctgtgc	5160
tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggaact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg	5220
atctctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc	5280

ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcgca ccaccaagcg aaacatcgca	5340
tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgctga tcaggatgat ctggacgaag	5400
agcatcaggg gctcgcgcc gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgcgc	5460
gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg	5520
gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaaccgc tatcaggaca	5580
tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc	5640
tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg	5700
acgagtctct ctgagcggga ctctgggggt cgaatgacc gaccaagcga cgcccaacct	5760
gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt	5820
tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc	5880
ccaccccgga tctaagctct agataagtaa tgatcataat cagccatacc acattttag	5940
aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga	6000
atgcaattgt tgttgtaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata	6060
gcatcacaaa ttccacaaa aaagcatttt ttctactgca ttctagtgt ggtttgtcca	6120
aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga tccggggcta gtggatcttg aagttcctat	6180
tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttcaga gcgcttttga agctggtcga	6240
gggacctaat aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt atattaaggg ttccggatcc	6300
gatgatatca gatccccggg atgcagaaat tgatgatcta ttaacaata aagatgtcca	6360
ctaaaatgga agtttttctt gtcatacttt gttagaagg gtgagaacag agtacctaca	6420
ttttgaatgg aaggattgga gctacggggg tgggggtggg gtgggattag ataaatgcct	6480
gctctttact gaaggctctt tactattgct ttatgataat gtttcatagt tggatatacat	6540
aatttaaca agcaaaacca aattaagggc cagctcattc ctccactca tgatctatag	6600
atcccccggg ggcagcttat cgctagtgga tcttgaagtt cctattccga agttcctatt	6660
ctctagaaag tataggaact tcagagcgt tttgaagctt atcgctgcag gtcgaggac	6720
ctaataactt cgtataggat actttatacg aagttatatt aagggttccg gatcctctag	6780
agtcgacctg caggcatgca agcttcagct gctcgaggcc ggtctcccta tagtgagtcg	6840
tattaatttc gataagccag gttaacctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag	6900
gcggtttgcg tattgggcgc tcttcgcctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg	6960
ttcggttcgc gcgagcggt tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat	7020
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta	7080
aaaaggccgc gttgctggcg tttttcata ggctccgcc ccctgacgag catcacaaaa	7140

atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc	7200
cccttggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttcgaccct gccgcttacc ggatacctgt	7260
ccgcctttct ccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca	7320
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc	7380
accgctgcgc cttatccgtt aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagacttat	7440
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta	7500
cagagtctct gaagtggtag cctaactacg gctacactag aaggacagta ttggtatct	7560
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagtgg tagctcttga tccggcaaac	7620
aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa	7680
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa	7740
actcagttta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt	7800
taaatataaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggcttgaca	7860
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca	7920
tagttgcctg actccccgc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc	7980
ccagtctgc aatgataccg cgagaccac gctcacggc tccagattta tcagcaataa	8040
accagccagc cggaagggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc	8100
agtctattaa ttgttccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca	8160
acgttgttgc cattgtaca ggcacgttg tgcacgctc gtcgttttgt atggcttcat	8220
tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag ttacatgac cccatgttg tgcaaaaaag	8280
cggtagctc cticggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac	8340
tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt	8400
ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt	8460
gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc	8520
tcacatttgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat	8580
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttacca	8640
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca	8700
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg	8760
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg	8820
ttccgcgcac atttccccga aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga	8880

cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg	8940
acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg	9000
atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tggtggcggg tgcggggct	9060
ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg gacatatgt	9120
cgtagaacg cggctacaat taatacataa ccttatgtat catacacata cgatttaggt	9180
gacactatag aaccagatcc cccgggctgc aggtcgaggg acctaataac ttcgtatagt	9240
atacattata cgaagttata ttaagggttc cggatctgat atcatgatg aattcgagct	9300
 ccaccgcggt ggccggccgct ctagaactag a	 9331