



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0064432

(43) 공개일자 2020년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

A01K 2207/35 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0150551

(22) 출원일자 2018년11월29일

심사청구일자 2018년11월29일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

한인옥

서울특별시 서초구 방배로 14, 5동 606호

이윤경

인천광역시 남동구 청능대로718번길 7, 114동 403호

박지원

서울특별시 광진구 광나루로30가길 24, 202호

(74) 대리인

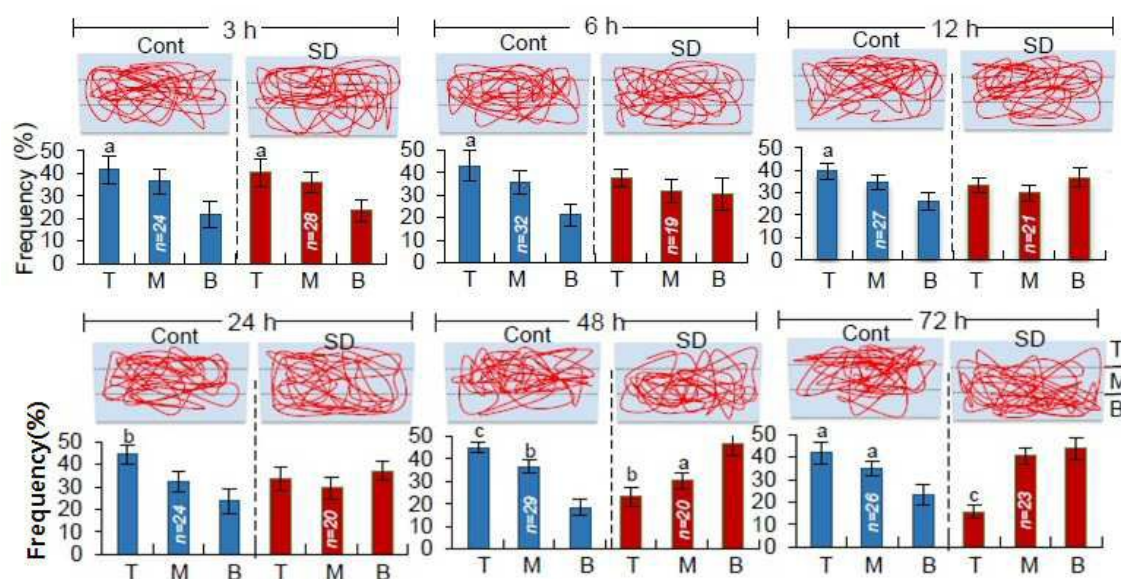
한윤호

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법 및 그에 의해 제조된 알츠하이머병 모델 동물

(57) 요약

본 발명은 실험동물에 대하여 수면박탈(sleep deprivation)을 처리하는 수면박탈 처리 단계; 및 상기 수면박탈을 처리한 실험동물을 정상 명암 주기 하에 두어 회복시키는 회복 단계로 구성되는 수면박탈 처리 및 회복 사이클을 반복수행하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1a

(52) CPC특허분류

A01K 2227/40 (2013.01)

A01K 2267/0312 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2007199

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 헥소오스아민 생합성경로 (HBP)를 타겟으로하는 염증성 대사질환 조절 및 제어기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1D1A1B03031431

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 제브라피쉬 지방간 모델을 이용한 지방 대사 조절에서 헥소오스아민 생합성 경로의 역할 연구

기 여 율 2/2

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

실험동물에 대하여 수면박탈(sleep deprivation)을 처리하는 수면박탈 처리 단계; 및

상기 수면박탈을 처리한 실험동물을 정상 명암 주기 하에 두어 회복시키는 회복 단계로 구성되는 수면박탈 처리 및 회복 사이클을 반복수행하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수면박탈은 상기 실험동물을 60시간 내지 84시간 동안 광조건에 방치함으로써 수행되는, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 정상 명암 주기는 광 12 내지 16시간 및 암 8 내지 12시간으로 구성되는, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 수면박탈 처리 및 회복 사이클은 3 내지 8회 반복수행되는, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 실험동물은 마우스, 랫트, 개, 돼지, 기니피크, 햄스터, 또는 제브라피쉬인, 방법.

청구항 6

제1항의 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법으로 제조된 알츠하이머병 모델 동물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머병 모델 동물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법 및 그에 의해 제조된 알츠하이머병 모델 동물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재까지 동물 실험과 인간에 관한 연구에 따르면 수면(sleep)의 양과 질 모두가 학습과 기억(learning and memory, L/M)에 큰 영향을 미친다는 것을 시사한다. 수면의 핵심 기능은 수면구조와 두뇌의 복잡성의 차이와 상관없이 단백질 기능이 수면의 필요성과 같이 종 전체에서 현저하게 일관되고 계통 발생 라인(phylogenetic lines)을 넘어서 보존되어 있기 때문에 세포 수준에서 분자 현상의 관리일 가능성이 높다. 번역 후 변형(post-translational modifications)은 단기 정보 저장에 필수적이며 장기간 정보 저장을 위해서는 새로운 단백질의 합성이 필요하다. 기억과 관련된 유전자 발현에 대한 많은 연구는 다른 유전자의 발현을 유도하고 뉴런의 기억 형성 중에 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 조절하는 N-methyl-D-aspartate(NMDA), brain-derived neurotrophic factor(BDNF), Homer1, cyclic AMP(cAMP) response element binding protein(CREB), CCAAT enhancer binding protein(C/EBP), early growth response factor(egr), c-fos, activity-regulated cytoskeleton-associated protein(Arc) 및 activating protein 1(AP-1)을 비롯한 몇몇 전사 인자 및 직접 초기 유전자의 활성 의존성 변화를 조사했다. 신진대사와 L/M의 핵심성분인 cAMP 의존성 단백질 카이네이즈 A(PKA)의

중요한 표적 중 하나인 CREB는 단기간에서 장기간의 기억으로의 전환에 중요하며 그 기능 결함은 많은 동물 모델에서 기억상실(memory deficits)을 일으킨다. 적절한 수면(proper sleep)은 정상적인 기억 기능을 위한 필수 요소로 간주되지만 근본적인 분자 메커니즘은 아직 많이 알려지지 않았으며 과학적 탐구의 영역으로 남아있다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2017-0143176는 나노 알루미늄을 이용한 알츠하이머병 동물모델의 제작방법 및 이를 이용한 알츠하이머병 치료제 스크리닝 방법에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 그러나 상기 선행기술의 경우, 나노 알루미늄을 마우스에 투여하여 뇌에서 아밀로이드 베타의 축적에 따른 알츠하이머병 동물모델의 제작방법에 관한 것으로 수면박탈(SD)에 의한 학습 및 기억 장애(L/M disorder) 질환이 유발된 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법에 관한 연구는 아직 알려진 바가 없다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 수면장애에 의해 유발되는 학습 및 기억 장애 치료제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있는 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 실험동물에 대하여 수면박탈(sleep deprivation)을 처리하는 수면박탈 처리 단계; 및 상기 수면박탈을 처리한 실험동물을 정상 명암 주기 하에 두어 회복시키는 회복 단계로 구성되는 수면박탈 처리 및 회복 사이클을 반복수행하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법이 제공된다.

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법으로 제조된 알츠하이머병 모델 동물이 제공된다.

발명의 효과

[0007] 상기한 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따르면, 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법을 이용하여 수면박탈에 의해 알츠하이머병 증상인 학습 및 기억 장애(L/M)를 유발하는 모델 동물을 제조할 수 있으므로 상기 모델 동물을 알츠하이머병 치료제 스크리닝에 활용할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1a는 성체 체브라피쉬 SD에서 수면장애(SD)에 의해 유도된 행동 및 인지 변화를 관찰한 것으로 SD의 표시된 시점에서 체브라피쉬 탐색 활동의 대표적인 흔적을 분석한 그래프이다. 막대는 1시간 세션 동안 상단, 중간 및 하단 레이어의 유영 횟수를 나타낸다. $n=19-32$ /실험군; Tukey 다중 비교 사후검정 결과로, 하층 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타냄. 정상적인 명/암 조건 하에서 12시간 내지 144시간 동안 회복 유무에 관계없이 3, 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 연장된 빛 단계 하에서 체브라피쉬를 노출시킴으로써 유도되었다.

도 1b는 SD의 표시된 시점에서 신규 탱크 잠수 테스트(novel tank diving test) 결과를 분석한 그래프이다. 막대는 1시간 세션 동안 상단, 중간 및 하단에 대한 유영 횟수를 나타낸다. $n=9-22$ /실험군; Tukey 다중 비교 사후검정 결과로, 상층 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타냄.

도 1c는 본 발명의 수동 회피 시험 탱크(passive avoidance test tank)의 개략적인 형태를 나타내는 개략도이다.

도 1d는 명시된 SD 시점의 대표적인 수동 회피 테스트를 결과를 분석한 그래프이다. 교차 시간은 훈련 세션에서 3회 측정되었고 2시간 간격 후에 시험 세션에서 1회 측정되었다. 그래프는 교차 시간 및 SEM의 평균을 나타낸다. $n=10-18$ /실험군; 사후검정 스튜던트-뉴만-쿨스(Student-Newman-Keuls) 검정 결과로, 1차 학습 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #은 윌콕슨(Wilcoxon) 순위 합계 검정 결과로 3차 학습 $P > 0.05$ 을 나타냄.

도 1e는 72시간 SD 후 정상적인 명암주기에서 지시된 회복 시점에서의 탐색 활동 결과를 나타내는 그래프이다. n=14-25/실험군; 튜키(Tukey's) 다중 비교 사후검정 결과로, 하층 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타냄.

도 1f는 72h SD 후 정상적인 명암주기 하에서 지시된 회복 시간 지점에서 대표적인 수동 회피 시험 결과를 분석한 그래프이다. n=13-19/실험군; 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정 결과로, 1차 학습 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨(Wilcoxon) 순위 합계 검정 결과로 3차 학습 대비 $P > 0.05$ 를 나타냄.

Cont, 대조군;

SD, 수면박탈;

T, 상단;

M, 중간;

B, 바닥;

L, 학습;

M, 기억;

T, 테스트;

R, 회복.

도 2a는 제브라피쉬 두뇌에서 L/M에 관여하는 유전자의 변화를 관찰한 것으로 표시된 SD 시점에서 선택된 유전자의 대표적인 PCR 및 정량 실시간 PCR 그래프이다. 막대는 세 가지 독립적인 실험의 평균과 SEM을 나타낸다. n=4/실험군; 튜키 다중 비교 사후검정 결과로, 0시간 또는 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타냄:

C, 대조군;

SD, 수면박탈;

Rec, 회복.

도 2b는 제브라피쉬 두뇌에서 L/M에 관여하는 유전자의 변화를 관찰한 것으로 72 시간 SD 실험군의 회복 시간을 분석한 그래프이다.

도 3a는 학습 훈련 유무에 따른 대조군과 SD 제브라피쉬의 뇌에서 HBP의 글루코스 대사 경로 효소와 대사 산물의 변화를 관찰한 것으로 글루코스 HBP의 플럭스 맵(Flux maps)이다.

도 3b는 학습 훈련 유무에 따른 대조군 또는 SD 제브라피쉬의 두뇌에서 GC-MS/MS에 의해 선택된 대사 물질의 정량을 분석한 그래프이다. 실험은 7번 반복하였다. n=31/실험군, 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis) 검정 결과로, a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타냄.

도 3c는 학습과제 수행 유무에 따른 SD 제브라피쉬 및 대조군의 두뇌에서 대사산물의 변화를 나타내는 해당과정(glycolysis) 및 TCA 주기의 플럭스 맵이다.

도 3d는 학습과제 수행 유무에 따른 SD 제브라피쉬 및 대조군의 두뇌에서 GC-MS/MS에 의해 선택된 대사산물의 정량을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 각 실험은 7차례 반복하였고, n=31/그룹이며 통계처리를 위해 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis) 검정을 적용한 결과, a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 를 나타낸다.

도 3e는 수면박탈 실험군(SD)의 SD 유도 시간에 따른 선택된 유전자(HK-1, HK-2, GK, PFKP- α , PFKP- β , PFKL- α , PFKL- β , G6PDH, PKM- α , GFPT-1, GFPT-2, OGT1, OGT2, OGA, TK- α , PYGB, GLUT1, GLUT3)의 PCR 결과를 나타내는 아가로스 젤 전기영동 사진(좌측) 및 상기 유전자들에 대한 정량적 실시간 PCR 결과를 분석한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. n=4/실험군; 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 0시간 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타낸다.

도 3f는 대조군의 학습 훈련 후 회복시간의 경과에 따른 선택된 유전자(HK-1, HK-2, GK, PFKP- α , PFKP- β , PFKL- α , PFKL- β , G6PDH, PKM- α , GFPT-1, GFPT-2, OGT1, OGT2, OGA, TK- α , PYGB, GLUT1, GLUT3)의 PCR 결과를 나타내는 아가로스 겔 전기영동 사진(좌측) 및 상기 유전자들에 대한 정량적 실시간 PCR 결과를 분석한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. n=4/실험군; 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 0시간 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타낸다.

도 3g는 72시간 SD 실험군의 학습훈련 후 회복시간의 경과에 따른 선택된 유전자(HK-1, HK-2, GK, PFKP- α , PFKP- β , PFKL- α , PFKL- β , G6PDH, PKM- α , GFPT-1, GFPT-2, OGT1, OGT2, OGA, TK- α , PYGB, GLUT1, GLUT3)의 PCR 결과를 나타내는 아가로스 겔 전기영동 사진(좌측) 및 상기 유전자들에 대한 정량적 실시간 PCR 결과를 분석한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. n=4/실험군; 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 0시간 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타낸다.

도 3h는 학습 및 기억 과정에서의 대조군 및 SD 제브라피쉬 실험군의 두뇌에서의 글루코스 대사 효소의 발현 변화를 관찰한 결과를 나타내는 그래프이다. 교차 시간은 훈련 및 시험 세션에서 측정되었다. 첫 번째 학습 세션 2 시간 후에 1차 테스트 세션(M1)이 실시되었고, 첫 번째 학습 세션 24시간 경과 후 두 번째 학습 세션이 실시되었으며, 두 번째 학습 세션 2 시간 후 및 24시간 후 각각 두 번째(M2) 및 세 번째(M3) 테스트 세션이 실시되었다. n=11-13/실험군으로, 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과, c는 1차 학습 대비 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 월콕슨 순위 합계 검정 결과로 3차 학습 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 3i는 대조군 또는 72 시간 SD 제브라피쉬 두뇌에서 회피 훈련 및 기억 테스트 후 표시된 시점에서 수행한 PCR 및 정량 실시간 PCR 결과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 총 mRNA는 첫 번째 학습 세션 후 2시간 후 (M1) 및 두 번째 학습 세션 후 2시간(M2) 및 24시간 후(M3) 수득하였다. 막대는 세 번 독립적인 실험에서의 평균 및 표준오차(SEM)를 나타내며, n=4/실험군으로 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내며, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용한 결과로, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다.

도 4a는 성체 제브라피쉬의 전체 두뇌의 구조를 개략적으로 도시한 개요도(좌측) 및 좌측의 박스는 a축 단면의 확대도이다. D1(등쪽 중뇌의 측면 구역) 및 Vd(중뇌의 배쪽 지역)은 좌측 박스에 표시되었다.

도 4b는 대조군(C)과 72시간 SD 실험군(SD)에서 수동 회피 테스트 6시간 후 희생시킨 제브라피쉬의 중뇌를 대상으로 공초점 형광현미경을 이용하여 40배율로 촬영된 DAPI(청색) 염색 및 PKA-c α (좌측 패널, 녹색) 또는 p-CREB(우측 패널, 녹색)에 대한 각각의 면역형광 염색 이미지(x40) 및 상기 이미지들의 병합 이미지(상단) 및 상기 형광면역 염색 결과를 정량화하여 나타낸 그래프(하단)이다. 우측 패널에서 확대된 이미지는 흰색 박스로 표시하였다. 그래프는 PKA-c α 또는 p-CREB의 농도 측정결과를 나타낸다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물당 5개의 박편을 사용하였으며, 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, 및 c는 $P < 0.001$ 를 나타내며, 두 그룹 간 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용한 결과, 대조군 대비 b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내며, 스케일 바는 50 μm 을 나타낸다.

도 4c는 수동 회피 테스트 6시간 후 희생시킨 대조군(C) 및 72시간 SD 실험군(SD) 제브라피쉬로부터 적출된 뇌의 사이토졸(Cyt)과 핵(Nuc)에서 p-CREB와 CREB 발현을 웨스턴블랏 분석을 이용하여 분석한 결과를 나타내는 사진(상단) 및 상기 웨스턴블랏 분석 결과를 농도계적으로 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. p-CREB의 상대농도는 CREB로 정규화함으로써 정량적으로 측정되었다. n=20 또는 25/실험군으로, 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검증을 사용하였고, 대조군(C) 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용한 결과, 대조군(C) 대비, a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타낸다:

L, 학습;

A.U., 임의 단위.

도 4d는 CRE 사이트에 결합된 p-CREB 및 CREB의 웨스턴블랏 분석 결과를 나타내는 사진(상단) 및 상기 웨스턴블랏 분석 결과를 농도계적으로 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 제브라피쉬 뇌의 핵 분획물을 준비하고 비오틴화된 CRE-함유 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양하였다. 상대적 농도계를 정량적으로 측정하고 배수 변화를 임의적 단위로 제시하였다. 실험은 3회 반복하였다. n=20 또는 25/실험군; 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검증을 사용하였고, 대조군(Cont) 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용한 결과, 대조군(C) 대비, a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타낸다.

0.05, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타낸다:

C, 대조군;

SD, 수면장애;

L, 학습;

A. U., 임의 단위.

도 4e는 대조군(Cont) 및 72 시간 SD 실험군(SD) 제브라피쉬의 종뇌(telencephalon)에서의 DAPI(청색) 염색 및 O-GlcNAc, OGT 및 OGA(녹색) 각각에 대한 면역형광 염색 및 이들을 중첩한 일련의 공초점 형광현미경 이미지(상단, 40배) 및 대조군 대비 표적분자의 형광 정도를 계량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 상단에서 확대된 이미지는 백색 상자에 표시되어 있으며, 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5개의 박편을 제작하였다. 상기 그래프에서 두 그룹사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용하였고, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타낸다:

Cont: 대조군;

SD: 72시간 SD(수면박탈) 실험군.

도 4f는 72시간 SD 실험군(SD) 또는 대조군(Cont) 제브라피쉬 뇌의 총 용해물로부터 항-GlcNAc 항체를 이용하여 O-연결 N-아세틸글루코사민화(O-GlcNAcylation) 정도를 웨스턴블랏 분석을 통해 관찰한 결과를 나타내는 사진(좌측) 및 상기 웨스턴블랏 분석 결과를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. 상대 농도는 GAPDH로 정규화하여 정량적으로 측정하였다. n=5/그룹; 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용하였고, 대조군(Cont) 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다. A.U.는 임의적 단위를 나타낸다.

도 4g는 72시간 SD 실험군(SD) 또는 대조군(Cont) 제브라피쉬 뇌의 총 용해물로부터 OGT 및 OGA의 발현을 웨스턴블랏 분석을 통해 관찰한 결과를 나타내는 사진(좌측) 및 상기 웨스턴블랏 분석 결과를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. 상대 농도는 GAPDH로 정규화하여 정량적으로 측정하였다. n=5/그룹; 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용하였고, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다. A.U.는 임의적 단위를 나타낸다.

도 4h는 제브라피쉬 뇌 총 단백질 용해물로부터 OGA 효소 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 흡광도 값은 대조군에 대비 배수 변화로 나타내었다. n=5/그룹; 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 적용하였고, 대조군(Cont) 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다. A.U.는 임의적 단위를 나타낸다.

도 4i는 대조군의 회피 훈련 후 경과시점에서의 총 뇌 용해물로부터의 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, c-Fos 및 PKA-c α에 대한 웨스턴블랏 분석결과를 나타내는 이미지이다. α-tubulin(α-Tub)을 내부표준으로 사용하였다.

도 4j는 72 시간 SD 실험군의 회피 훈련 후 경과시점에서의 총 뇌 용해물에서의 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, c-Fos 및 PKA-c α에 대한 웨스턴블랏 분석 결과를 나타내는 이미지이다. α-tubulin(α-Tub)을 내부표준으로 사용하였다.

도 4k는 대조군(C) 또는 72시간 SD 실험군(SD) 제브라피쉬의 종뇌에서 DAPI(청색)와 O-GlcNAc화(녹색), OGT(적색) 각각에 대한 면역형광염색 및 이들의 중첩을 나타내는 일련의 공초점 현미경 사진(좌측) 및 상기 사진에서의 면역형광을 농도계적으로 정량한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. 각 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물당 5개의 박편을 제조하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검증을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용하였으며, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다. 스케일 바는 50 μm를 나타낸다:

C, 대조군;

SD, 수면장애;

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역;

A.U., 임의 단위.

도 41은 대조군(C) 또는 72시간 SD 실험군(SD) 제브라피쉬의 종뇌에서 DAPI(청색)와 O-GlcNAc화(녹색), OGA(적색) 각각에 대한 면역형광염색 및 이들의 중첩을 나타내는 일련의 공초점 현미경 사진(좌측) 및 상기 사진에서의 면역형광을 농도계적으로 정량한 결과를 나타내는 그래프(우측)이다. 각 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물당 5개의 박편을 제조하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검증을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용하였으며, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타낸다. 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다:

C, 대조군;

SD, 수면장애;

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역;

A.U., 임의 단위.

도 5a는 대조군(C) 및 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1 g/L)의 N-아세틸글루코사민(Glc-N) 처리 실험군에 대한 수동 회피 테스트 결과를 나타내는 그래프로, 학습 훈련시(L) 그리고 기억 테스트시(M)의 교차시간(crossing time)을 측정한 결과를 나타낸다. $n=13\sim18/\text{그룹}$ 으로, 상기 그래프에서 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 사용한 결과, 1차 훈련(1st trial) 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, #는 월콕슨 순위 합계 검정 결과로 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 을 나타낸다.

도 5b는 대조군(Cont) 및 72 시간 SD 실험군(SD) 제브라피쉬를 72시간 동안 0.2 g/L의 GlcN와 함께 또는 GlcN 없이 배양한 후 수동 회피 테스트한 결과를 나타내는 그래프로, 1기 학습 세션이 끝나고 2시간 후에 1차 기억 테스트 세션(M1)이 적용되었고, M1 24시간 경과 후 2기 학습 세션을 수행하고 2시간 경과 후 2차 기억 테스트 세션(M2)이 적용되었으며, M2 24시간 경과 후 별도의 학습 없이 3차 기억 테스트 세션(M3)이 적용되었다. 그래프는 각 시점에서의 평균 교차시간 및 표준오차를 나타낸다. $n=13\sim20/\text{실험군}$; 상기 그래프에서 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 사용한 결과, 1차 학습훈련 대비 c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, #는 월콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 학습훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 5c는 대조군으로 α -tubulin을 사용하여 72시간 동안 0.2 g/L GlcN 처리 유무에 따른 대조군 제브라피쉬의 총 뇌 용해물에서 O-GlcNAc화 OGT, OGA, p-CREB, CREB, C-Fos와 PKA-c α , C/EBP- β 및 C/EBP- δ 의 발현을 웨스턴블랏 분석으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -tubulin을 내부표준으로 사용하였다. $n=5/\text{실험군}$.

도 5d는 지시된 시점(M1, M2 및 M3)에서의 회피 학습 훈련 후에 제브라피쉬의 총 뇌 용해물에서 O-GlcNAc화, OGT, OGA, PKA-c α , p-CREB, CREB, C/EBP- β 및 C/EBP- δ 의 발현을 웨스턴블랏 분석으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 제브라피쉬를 상기 M1, M2, 및 M3 6시간 경과 후 희생시켜 뇌를 적출하였다. 알파-튜블린을 내부표준으로 사용하였다. $n=10/\text{그룹}$.

도 5e는 대조군(C) 및 72시간 SD 실험군(SD)의 총 뇌 용해액으로부터 OGA의 효소 활성을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 흡광도 값은 대조군과 비교하여 배수 변화로서 나타내었다. 실험은 3번 반복되었다. $n=5/\text{실험군}$; 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과 a는 SD 대비 $P < 0.05$ 를 나타낸다.

도 5f는 대조군(C) 및 72 시간 SD 실험군(SD)을 GlcN 처리 또는 무처리시 학습시 또는 무학습시 뇌에서 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, PKA-c α , p-ERK1/2, C/EBP- β 및 C/EBP- δ 의 발현을 웨스턴블랏 분석으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -tubulin과 HDAC1은 각각 세포질 분획과 핵 분획에 대한 내부표준으로 사용하였다. $n = 20/\text{실험군}$.

도 5g는 대조군(Cont) 및 72시간 SD 실험군(SD)에 대하여 GlcN(0.2 g/L) 처리 또는 무처리시 회피 훈련 후에 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(blue) 염색 및 p-CREB(녹색)에 대한 면역형광을 공초점 형광현미경으로 각각 촬영한 일련의 이미지 및 DAPI 및 상기 면역형광의 병합 이미지(40배, 상단) 및 상기 형광 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 상단의 병합이미지에서 확대된 부분은 백색 박스로 나타내었다. 그룹당 4두의 실험동물을 사용하였고 실험동물당 5개의 박편을 사용하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과 SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타내며, 상단의 이

미지에서 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다:

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역.

도 5h는 대조군(Cont) 및 72시간 SD 실험군(SD)에 대하여 GlcN(0.2 g/L) 처리 또는 무처리시 회피 훈련 후에 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(blue) 염색 및 PKA-c α (적색), O-GlcNAc(녹색)에 대한 면역형광을 공초점 형광현미경으로 각각 촬영한 일련의 이미지 및 DAPI 및 상기 면역형광의 병합 이미지(40배, 상단) 및 상기 형광 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 상단의 병합이미지에서 확대된 부분은 백색 박스로 나타내었다. 그룹당 4두의 실험동물을 사용하였고 실험동물당 5개의 박편을 사용하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과 SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타내며, 상단의 이미지에서 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다:

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역.

도 5i는 대조군(Cont) 및 72시간 SD 실험군(SD)에 대하여 GlcN(0.2 g/L) 처리 또는 무처리시 회피 훈련 후에 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(blue) 염색 및 OGT(적색), O-GlcNAc(녹색)에 대한 면역형광을 공초점 형광현미경으로 각각 촬영한 일련의 이미지 및 DAPI 및 상기 면역형광의 병합 이미지(40배, 상단) 및 상기 형광 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 상단의 병합이미지에서 확대된 부분은 백색 박스로 나타내었다. 그룹당 4두의 실험동물을 사용하였고 실험동물당 5개의 박편을 사용하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과 SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타내며, 상단의 이미지에서 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다:

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역.

도 5j는 대조군(Cont) 및 72시간 SD 실험군(SD)에 대하여 GlcN(0.2 g/L) 처리 또는 무처리시 회피 훈련 후에 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(blue) 염색 및 OGA(적색), O-GlcNAc(녹색)에 대한 면역형광을 공초점 형광현미경으로 각각 촬영한 일련의 이미지 및 DAPI 및 상기 면역형광의 병합 이미지(40배, 상단) 및 상기 형광 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 상단의 병합이미지에서 확대된 부분은 백색 박스로 나타내었다. 그룹당 4두의 실험동물을 사용하였고 실험동물당 5개의 박편을 사용하였다. 상기 그래프에서 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 사용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, 두 그룹간의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과 SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 을 나타내며, 상단의 이미지에서 스케일 바는 50 μm 를 나타낸다:

D1, 등쪽 종뇌의 측면 구역.

도 5k는 대조군 또는 72시간 SD 실험군 동물에 지시된 농도(0.5, 1, 5, 10 및 50 ng/g)의 다아조-5-옥소노르뉴신(DON)을 복강 내 주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. n=11~18/실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-콜스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 월콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 5l는 대조군(C) 또는 다양한 농도의 DON(1, 5, 10, 50, 100, 및 300 ng/g)을 복강 내 주입한 제브라피쉬의 총 뇌 용해액으로부터 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB 및 PKA-c α 의 학습 유도된 변화를 웨스턴블랏 분석을 통해 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -Tubulin은 내부 표준으로 사용되었다. n=10/그룹

도 5m는 대조군 또는 72시간 SD 실험군 동물에 지시된 농도(0.1, 1, 5, 10 및 20 mg/g)의 아자세린(Aza)을 복강 내 주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. n=10~17/실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-콜스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 월콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 5n는 대조군(C) 또는 다양한 농도의 아자세린(0.1, 1, 5, 10 및 20 mg/g)을 복강 내 주입한 제브라피쉬의 총 뇌 용해액으로부터 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB 및 PKA-c α 의 학습 유도된 변화를 웨스턴블랏 분석을 통해 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -Tubulin은 내부 표준으로 사용되었다. n=10/그룹

도 6a는 대조군 또는 72시간 SD 실험군 동물에 다양한 농도(5, 20, 40 및 100 $\mu\text{g/g}$)의 알록산(Alx)을 복강 내

주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. $n=13\sim17$ /실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 6b는 대조군 또는 72시간 SD 실험군 동물에 다양한 농도(5, 20, 40 및 100 $\mu\text{g/g}$)의 OSMI-1를 복강 내 주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. $n=13\sim17$ /실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 6c는 대조군(C) 또는 다양한 농도의 OSMI-1(5, 50, 100 및 300 ng/g)을 복강 내 주입한 제브라피쉬의 총 뇌 용해액으로부터 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, PKA-c α , C/EBP- β 및 C/EBP- δ 의 학습 유도된 변화를 웨스턴블랏 분석을 통해 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -Tubulin은 내부 표준으로 사용되었다. $n=5$ /그룹

도 6d는 대조군(C) 또는 50 $\mu\text{g/g}$ 의 Thiamet G를 제브라피쉬의 복강 내에 주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. $n=13\sim18$ /실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 6e는 상기 도 6d의 제브라피쉬를 수동 회피 훈련 후 희생시킨 후 적출한 뇌 용해물로부터 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, PKA-c α , C/EBP- β , C/EBP- δ 의 발현을 웨스턴블랏 분석으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 뇌 용해물은 1차 훈련 세션 2 시간 후(M1) 또는 2차 훈련 세션 후 2 시간(M2) 및 24 시간(M3) 후에 획득하였다. α -Tubulin(α -Tub)을 대조군으로 사용하였다. $n=10$ /그룹.

도 6f는 대조군(C) 또는 50 $\mu\text{g/g}$ 의 PugNac 또는 5, 20, 또는 50 $\mu\text{g/g}$ 의 Thiamet G를 제브라피쉬의 복강 내에 주입한 후 수동 회피 테스트를 수행한 결과를 나타낸 그래프이다. 교육훈련 및 기억 테스트 세션에서 교차시간을 측정하였다. $n=11\sim19$ /실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과 1차 훈련 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨 순위 합계 검정 결과로, 3차 훈련 대비 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 6g는 상기 도 6f의 제브라피쉬를 수동 회피 훈련 후 희생시킨 후 적출한 뇌 용해물로부터 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, PKA-c α , C/EBP- β , C/EBP- δ 의 발현을 웨스턴블랏 분석으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. α -Tubulin(α -Tub)을 대조군으로 사용하였다. $n=10$ /그룹.

도 6h는 0.2g/L GlcN으로 매일 처리 또는 무처리한 대조군 및/또는 72 시간 DON(300 ng/g)을 투여하거나 하지 않은 제브라피쉬의 수동 회피 테스트 결과를 나타낸 그래프이다. 교차시간은 훈련학습 및 기억 테스트 세션에서 측정되었다. $n=14\sim20$ /실험군; 통계처리를 위해 스튜던트-뉴만-쿨스 사후검정을 적용한 결과, c는 1차 훈련 대비 $P < 0.001$ 를 나타내고, #는 윌콕슨 순위 합계 검정시 $P > 0.05$ 를 나타낸다.

도 6i는 상기 도 6h의 제브라피쉬를 수동 회피 테스트 후 희생시켜 적출한 뇌 용해물에서 O-GlcNAc화, OGT, OGA, p-CREB, CREB, PKA-c α , C/EBP- β , C/EBP- δ 및 p-mTOR의 발현 양상을 관찰한 웨스턴블랏 겔 사진이다. 제브라피쉬의 뇌 용해물은 1차 훈련 2 시간(M1) 또는 2차 훈련 2 시간(M2) 및 24 시간(M3) 후에 수득하였다. 액틴을 내부표준으로 사용하였다. $n = 10$ /실험군.

도 6j는 GlcN(0.2 g/L), Thiamet G(50 $\mu\text{g/g}$), DON(300 ng/g) 또는 OSMI-1을 24시간 동안 처리 또는 무처리한 제브라피쉬 두뇌에서의 다양한 유전자(HK-1, HK-2, GK, PFKP- α , PFKP- β , PFKL- α , PFKL- β , G6PDH, PKM- α , GFPT-1, GFPT-2, OGT1, OGT2, 및 OGA)의 발현 정도를 확인하기 위한 PCR 결과를 나타내는 아가로즈 겔 전기영동 사진(좌측) 및 개별 유전자의 정량을 위한 RT-PCR 결과를 나타낸 일련의 막대그래프들이다. 상기 그래프에서 막대와 바는 각각 세 번의 독립적인 실험에서 각 유전자의 발현량의 평균 및 표준오차를 나타낸다. 액틴을 내부 표준으로 이용하였으며, $n=4$ /실험군이다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 를 나타낸다.

C 또는 Cont, 대조군;

G 또는 GlcN, 글루코사민;

OS, OSMI;

Thia G 또는 TG, Thiamet G;

D 또는 DON, diazo-5-oxonorneucine.

도 6k는 GlcN(0.2 g/L), Thiamet G(50 μ g/g), DON(300 ng/g) 또는 OSMI-1을 24시간 동안 처리 또는 무처리한 제브라피쉬 두뇌에서의 다양한 유전자(NMDA, Arc, ubH1, ubH5, NRG1, Homer1, GHRH, egr1, c-fos, BDNF, per-2, 및 bmal-1)의 발현 정도를 확인하기 위한 PCR 결과를 나타내는 아가로즈 겔 전기영동 사진(좌측) 및 개별 유전자의 정량을 위한 RT-PCR 결과를 나타낸 일련의 막대그래프들이다. 상기 그래프에서 막대와 바는 각각 세 번의 독립적인 실험에서 각 유전자의 발현량의 평균 및 표준오차를 나타낸다. 내부표준으로 액틴을 사용하였고, n=4/실험군이다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 를 나타낸다.

C 또는 Cont, 대조군;

G 또는 GlcN, 글루코사민;

OS, OSMI;

Thia G 또는 TG, Thiamet G;

D 또는 DON, diazo-5-oxonorneucine.

도 6l은 GlcN (0.2 g/L)을 투여하거나 하지 않은 제브라피쉬 두뇌에 대한 다양한 유전자(NMDA, Arc, ubH1, ubH5, NRG1, Homer1, GHRH, egr1, c-fos, BDNF, per-2, 및 bmal-1)의 발현 정도를 확인하기 위한 PCR 결과를 나타내는 아가로즈 겔 전기영동 사진(좌측) 및 개별 유전자의 정량을 위한 RT-PCR 결과를 나타낸 일련의 막대그래프들이다. 상기 그래프에서 막대와 바는 각각 세 번의 독립적인 실험에서 각 유전자의 발현량의 평균 및 표준오차를 나타낸다. 내부표준으로 액틴을 사용하였고, n=4/실험군이다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 사후검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 를 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이다.

도 7a는 제브라피쉬 두뇌에서 β -아밀로이드(A β)와 p-Tau와 gliosis의 반복적인 SD-유도 축적에 있어서 GlcN의 효과를 관찰을 위한 실험 일정을 개략적으로 나타낸 개요도이다.

도 7b는 72시간 SD(1X) 및 72시간 SD를 네 번 반복시킨 반복 SD 실험군(4X)에 GlcN을 처리 또는 무처리한 제브라피쉬의 뇌에서 Thioflavin S(녹색, Thio S)을 면역형광 염색한 공초점 형광현미경 사진(40배, 상단) 및 형광을 농도계적으로 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

도 7c는 72시간 SD 실험군(1X) 및 반복된 SD 실험군(4X)에 GlcN을 처리 또는 무처리한 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(파란색) 염색 및 A β (적색)에 대한 면역형광 염색 이미지 및 이들 두 이미지에 대한 병합이미지(상단) 및 상기 이미지에서 형광의 정도를 정량화하여 나타낸 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

도 7d는 72시간 SD 실험군(1X) 및 반복된 SD 실험군(4X)에 GlcN을 처리 또는 무처리한 제브라피쉬 종뇌에서의 DAPI(파란색) 염색 및 pTau(녹색)에 대한 면역형광 염색 이미지 및 이들 두 이미지에 대한 병합이미지(상단) 및 상기 이미지에서 형광의 정도를 정량화하여 나타낸 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

도 7e는 GlcN(0.2 g/L)를 처리하거나 처리하지 않은 대조군(Cont) 및 반복 SD 실험군(SD) 제브라피쉬를 수동 회피 테스트 후 희생시켜 추출한 종뇌에 대한 DAPI(청색) 염색 및 O-GlcNAc화(녹색) 및 A β (적색) 각각에 대한 일련의 면역형광 염색 이미지 및 이들 이미지들의 병합 이미지(상단) 및 상기 이미지에서 측정된 형광을 이용하

여 O-GlcNAc화 정도 및 A β 발현 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다:

D1, 등쪽 중뇌의 측면 구역.

도 7f는 GlcN(0.2 g/L)를 처리하거나 처리하지 않은 대조군(Cont) 및 반복 SD 실험군(SD) 제브라피쉬를 수동 회피 테스트 후 희생시켜 적출한 중뇌에 대한 DAPI(청색) 염색 및 O-GlcNAc화(녹색) 및 pTau(적색) 각각에 대한 일련의 면역형광 염색 이미지 및 이들 이미지들의 병합 이미지(상단) 및 상기 이미지에서 측정된 형광을 이용하여 O-GlcNAc화 정도 및 A β 발현 정도를 정량화한 결과를 나타내는 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다:

D1, 등쪽 중뇌의 측면 구역.

도 7g는 GlcN을 처리 또는 무처리한 대조군(Cont), 72시간 SD 실험군(1X) 및 72시간 SD를 네 차례 반복한 반복 SD 실험군(4X) 제브라피쉬를 희생시켜 적출한 뇌의 중뇌 배쪽 지역(Vd)에 대한 DAPI(청색) 염색, 및 GFAP(녹색), S100 β (적색) 각각에 대한 면역형광 염색 이미지 및 상기 이미지들에 대한 병합이미지(상단) 및 상기 이미지에서의 GFAP 및 S100 β 의 형광 정도를 정량화하여 나타낸 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

도 7h는 GlcN을 처리 또는 무처리한 대조군(Cont), 72시간 SD 실험군(1X) 및 72시간 SD를 네 차례 반복한 반복 SD 실험군(4X) 제브라피쉬를 희생시켜 적출한 뇌의 중뇌 등쪽 측면 구역(D1)에 대한 DAPI(청색) 염색, 및 GFAP(녹색), S100 β (적색) 각각에 대한 면역형광 염색 이미지 및 상기 이미지들에 대한 병합이미지(상단) 및 상기 이미지에서의 GFAP 및 S100 β 의 형광 정도를 정량화하여 나타낸 그래프(하단)이다. 실험군당 4두의 실험동물을 사용하였고, 각 실험동물 당 5 박편을 사용하였다. 통계처리를 위해 튜키 다중 비교 검정을 적용한 결과, 대조군 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$, c는 $P < 0.001$ 을 나타내고, 두 그룹 사이의 비교를 위해 대응표본 스튜던트 t-검정을 사용한 결과, SD 대비 a는 $P < 0.05$, b는 $P < 0.01$ 이며, 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009]

용어의 정의:

[0010]

본 문서에서 사용되는 "수면박탈(sleep deprivation, SD)"은 실험동물로 하여금 강제로 잠을 못 자게 하는 행위를 의미하며, 임상적으로는 수면장애를 모사함으로써 수면의 생리학적 기능을 알아내는 데 목적을 위해 사용되는 것이다. 즉, 잠을 못 잘때 나타나는 여러 가지 현상을 분석·종합하면, 수면이 생물체의 생활에서 차지하는 비중이나 생활에 미치는 영향 또는 수면의 역할을 알 수 있다. 수면장애는 이처럼 강제로 잠을 못 자게 함으로써 수면의 기능을 연구할 목적으로 행해지는 강제행위를 말한다. 본 발명에서는 수면장애를 제브라피쉬에 적용한 결과 헥소사민(Hexosamine) 생합성 경로와 O-GlcNAcylation을 통해 포도당 대사를 억제함으로써 학습과 기억(learning & memory)에 장애를 주는 것으로 나타났다.

[0011]

본 문서에서 사용되는 "OGT(O-linked β -N-acetylglucosamine transferase)"는 세포 내 단백질의 세린(serine) 또는 트레오닌(threonine) 잔기에 O-glycosidic 결합으로 단일 N-아세틸글루코사민을 첨가하는 것을 촉매하는 효소이다. OGT에 의해 단백질에 N-아세틸글루코사민이 부가되는 것을 O-GlcNAcylation(또는 O-GlcNAc화)라고 한다.

[0012]

본 문서에서 사용되는 "OGA(O-linked β -N-acetylglucosamine hydrolase)"는 단백질로부터 GlcNAc의 제거를 촉매하는 가수분해효소를 의미한다.

[0013]

발명의 상세한 설명:

[0014]

본 발명의 일 관점에 따르면, 실험동물에 대하여 수면박탈(sleep deprivation)을 처리하는 수면박탈 처리 단계; 및 상기 수면박탈을 처리한 실험동물을 정상 명암 주기 하에 두어 회복시키는 회복 단계로 구성되는 수면박탈

처리 및 회복 사이클을 반복수행하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법이 제공된다.

- [0015] 상기 제조방법에 있어서, 상기 수면박탈은 상기 실험동물을 60시간 내지 84시간 동안 광 조건에 방치함으로써 수행될 수 있고 상기 정상 명암 주기는 광 12 내지 16시간 및 암 8 내지 12시간으로 구성될 수 있으며 상기 수면박탈 처리 및 회복 사이클은 3 내지 8회 반복 수행될 수 있다.
- [0016] 상기 제조방법에 있어서, 상기 실험동물은 마우스, 랫트, 개, 돼지, 기니피크, 햄스터, 또는 제브라피쉬일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법으로 제조된 알츠하이머병 모델 동물이 제공된다.
- [0018] 수면과 L/M 사이의 관계를 결정하는 최적의 접근법은 전체 또는 부분 수면장애(SD)이 L/M에 미치는 영향을 관찰하는 것이고 L/M에 대한 수면의 영향에 관한 대부분의 연구는 설치류 모델을 이용한 행동 및 전기 생리학적 신경과학(electrophysiological neurosciences)에 집중되어왔다. 행동특성 및 수면구조의 복잡성은 수면과 기억 형성 사이의 기본 분자 교차점과 연관성을 해결할 수 있는 간단한 모델 시스템이 필요하다. 제브라피쉬(Danio rerio)는 신경 행동 연구 및 인간에 대한 번역 관련성이 있는 수면 행동 및 L/M을 조절하는 진화적 보존 메커니즘의 명확성 연구를 위한 우수한 척추동물 모델로 주목받고 있다. 제브라피쉬에서의 메모리 평가는 강력하고 안정적이고 진화론적으로 보존된 메모리 트레이스(memory trace)를 밝혀내는 수단으로 회피 작업 패러다임(avoidance tasks paradigm)의 사용과 관련이 있다. 특히 마우스 및 랫(rat)에 비해 약물 투여의 비 침습성(non-invasive nature) 및 대규모 스크리닝 시스템의 용이한 취급으로 인해 약물의 대량 스크리닝을 위한 탁월한 모델 시스템을 제공한다.
- [0019] 포유류의 두뇌는 글루코스(glucose)를 주 에너지 원으로 하며 글루코스 대사를 엄격하게 조절하는 것이 정상적인 뇌 생리학에 중요하다. 최근 글루코스 대사와 신경 퇴행의 변화 사이의 직접 연관성에 대한 축적된 증거가 제시되었다. 예를 들어, 비만이나 2형 당뇨병(type II diabetes mellitus)과 같은 대사장애에서 조절되지 않는 글루코스 대사는 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)의 진행 및 인지손상과 관련되어 있다. 최근 보고에 따르면 포도당 소비의 결함으로 인해 에너지 대사의 전반적인 손상이나 헥소사민(hexosamine) 생합성 경로(HBP)-의존적 당화(glycosylation)를 비롯한 여러 메커니즘을 통해 신경세포가 손상 받기 쉬운 것으로 나타났다. 소량의 세포 내 글루코스(3-5%)는 O-linked-GlcNAc modification(O-GlcNAcylation) 반응에서 GlcNAc 공여체로 작용하는 UDP-N-아세틸글루코사민(UDP-GlcNAc)으로 전환된다. 상기 O-GlcNAcylation은 뉴런의 정상 기능에 관여하는 것으로 추정되며, 이의 조절 장애는 다양한 신경계 질환의 발병 기전에 영향을 미친다. 상기 과정은 GlcNAc 잔기를 단백질 기질로 이동시키는 O-linked β -N-acetylglucosamine transferase(OGT) 및 GlcNAc의 제거를 촉매하는 O-GlcNAc hydrolase(OGA)에 의해 조절된다. 상기 OGT와 OGA는 모두 시냅스 전 말단(presynaptic terminal)의 시냅스 소포(synaptic vesicle) 근처에서 풍부하고, 시냅스 전후의 많은 단백질들이 O-GlcNAc로 변형된 뉴런에서 특히 풍부하다. 그러나, 시냅스 가소성(synaptic plasticity)에서 O-GlcNAcylation의 기능적 역할은 아직 확립되어 있지 않다. 사실, 정상적인 두뇌 기능에서 HBP/O-GlcNAcylation의 중요한 역할에 대한 장기적인 징후를 고려할 때, 기억 장애 및 인지기능 장애에 대한 이 신호 전달 체계의 기여를 이해하는 것이 관련된 건강 상태의 효과적인 평가 및 치료에 중요하다.
- [0020] 이에 본 발명자들은 SD 제브라피쉬 실험군에서 상기 경로에 관여하는 유전자의 회피 학습 과제 및 결함에서 HBP/O-GlcNAcylation의 강력한 활성화를 입증함으로써 학습 및 기억(L/M) 과정에서 HBP 변화 및 GlcNAcylation의 중요성을 확인하였다. 반대로, HBP/O-GlcNAcylation의 향상은 제브라피쉬의 SD-유도 L/M 결손을 회복시켰고 이러한 발견은 인지기능에 대한 역동적인 O-GlcNAcylation의 중요성을 검증하였으며, 두뇌 내에서 글루코스 조절된 HBP 신호 전달의 중단이 AD의 진행에 기여한다는 이론을 뒷받침한다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 알츠하이머병 모델 동물의 제조방법을 통해 알츠하이머병 모델 동물을 제조하고 이를 이용하여 수면장애에 의해 유발되는 학습 및 기억 장애 치료제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.
- [0022] **일반적 실험방법**
- [0023] **공시 재료**
- [0024] 본 발명에서 사용한 제브라피쉬(Danio rerio)는 대한민국의 지침 및 규정에 따라 표준 조건(standard

condition)으로 하기와 같이 사육하였다. 6월령의 제브라피쉬 성체(대략 2.5 cm 길이)는 대상라인 아쿠아리움 (Seoul, Korea)에서 구매하였고 14시간/10시간 명암 주기 및 28.0±1.0℃의 조건으로 유지하였다. 그 후, 침전 물 필터, 포스트-카본 필터 및 형광 자외선 살균 필터가 장착된 다단 여과 시스템을 통해 여과한 수돗물을 물고 기용 수족관 용기에 공급하였다(Zebrafish AutoSystem, Genomic Design, Seoul, South Korea). 상기 용기 내의 물은 연속적으로 폭기(aerated)되어 6.5 내지 7.5의 pH로 유지되었고 하루 두 번 플레이크(flake) 사료 (TetraBits, Luzerne, Singapore)를 제브라피쉬에 급여하였으며 실험을 위해 저온 노출(0-4℃) 또는 0.03% 메 탄 술폰 네이트염(MS-222) 주입 후 참수(decapitation)방법으로 안락사시켰다.

[0025] 수면장애(SD) 프로토콜

[0026] 본 발명에서 사용된 제브라피쉬는 14:10의 명암주기(오후 10시에 불을 끄고, 오전 8시에 불을 켜기)하에 유지되 었다. SD 모델을 생성하기 위해, 다양한 시간 조건에 따른 연장된 명(24:0)조건에 노출되었다.

[0027] 행동 패러다임(behavioral paradigm)

[0028] 본 발명자들이 수행한 행동 패러다임은 종래의 방법을 통해 수행하였다(Lee Y, *et al.*, *Mol Neurobiol.* 55(11):8738-8753. 2018). 먼저, 오픈 탱크 테스트(open tank test)는 탐색활동(exploratory activity)을 분석 하기 위해 제브라피쉬를 개별적으로 1 L의 시스템 용수로 채운 홈 탱크(home tank)에 방치하였다. 상기 탱크의 전면은 3개의 가상 층으로 각각 2.5 cm(상단, 중앙 및 하단)로 나뉘어져 있고 순응 1시간 후 물고기를 1시간 동 안 촬영하였고 수직 위치를 1시간 동안 매분 기록했다. 또한 신규 탱크 잠수 분석(novel tank diving test)은 불안 수준(anxiety level)을 결정하기 위해 제브라피쉬를 홈 탱크에서 시스템 용수로 채운 1 L 플라스틱 탱크로 개별적으로 이송하였다. 상기 탱크의 전면은 3개의 가상 층으로 각각 2.5 cm(상단, 중앙 및 하단)로 나뉘어져 있고 1시간의 적응 후 1시간 동안 CCD 카메라(JYCOS, Incheon, Korea)로 행동을 추적하였고 수직 위치는 매분마 다 기록했다. 아울러, 수동 회피 테스트(passive avoidance test)는 종래의 방법에 따라 암 조건으로 오전 10시 및 오후 5시 사이에 억제 회피 학습(inhibitory avoidance learning)을 평가하였다.

[0029] Reverse Transcription PCR

[0030] 본 발명자들은 PCR 증폭을 위해 제브라피쉬 뇌의 총 RNA를 TRIzol™(Invitrogen, Carlsbad, CA) 시약으로 추출 하였고 제조사의 지침에 따라 GoScript™ Reverse Transcriptase(Promega, Madison, Wisconsin, USA)로 RNA 2 µg에서 cDNA를 합성하였다. 그 후 제브라피쉬의 특이적 프라이머(표 1 참조)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 반 응조건은 94℃ 5분, 94℃ 30초, 57℃ 30초, 72℃ 30초, 32사이클 및 72℃ 7분으로 PCR을 수행하였고 증폭 후 PCR 생성물을 전기영동하였으며 1% 아가로스 겔에서 분석하였다. 정량 실시간(quantitative real-time) PCR을 위해 SYBR Green Real-time PCR Master Mix(Toyobo, Osaka, Japan)로 cDNA를 증폭시켰으며 모든 결과는 β-액 틴의 발현에 대해 정상화하였다. 상기 PCR 증폭에 사용한 프라이머의 핵산서열을 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

프라이머 핵산서열 정보

명칭	핵산서열(5' -> 3')	서열번호
NMDA F	TAT CTG GCA TTG GTG AGT GC	1
NMDA R	CAG ACT GGT TCC CAC ATA GC	2
Arc F	ACA AAC AAG CCT TCG AGT TC	3
Arc R	TCC TTC TTC TTG GAG ACT GC	4
ubH1 F	TAG TAA CGA AAG CAC GGA CA	5
ubH1 R	TCT GCT TTC ATC TCC ACT GA	6
ubH5 F	TGA TGC TAA ATC AAC GGC TA	7
ubH5 R	GAG CTG ATA CTT GGC GAT CT	8
NRGN F	ATG GAC TGT CGA AAC GAA GG	9
NRGN R	ACC AGC TTG AAT CTT AGC GG	10
Homer1 F	CTT GGA TGG ATC GAA GGC AA	11
Homer1 R	GGC TAT TCT GGC TGC TTC TT	12
GHRH F	CTT GCT AGT GCT ATG CTG CT	13
GHRH R	AGC TGT TGG TAA AGA TGG CA	14
egr1 F	TCT TCC TCT TCC ACG TCT TC	15
egr1 R	TCT GGA TGG GTT TCT GAT CT	16
c-fos F	CTG AGT GTC TCA AGT GCC TC	17

c-fos R	TGG AGG TCT TTG CTC CAG TA	18
BDNF F	GAC ACT TTC GAG CAG GTC AT	19
BDNF R	GCA TAC AGG TCA ACG TCC TT	20
per-2 F	TGT TTC AGG ATG TGG ATG AG	21
per-2 R	AGG AGT CTG TGG ATC TGC TC	22
bmal-1 F	GCT CCA CGA GAG AGA CTC AT	23
bmal-1 R	TAT TCA GTG GGT TTG ACA CG	24
HK-1 F	CGG GAA ATG GAG AAC GGA TT	25
HK-1 R	GTC CAT GTC AGC AAA ACA GC	26
HK-2 F	ACC AAT TTT CGG GTT CTG CT	27
HK-2 R	ACA GGC TCA CGA CAT CTT TC	28
GK F	AGG CTG CAA TGC GTG TTA TA	29
GK R	GAT CTG CTT TCT GTC CCC TG	30
TK- α F	TGG TGT GCC AGA GTA AAG AA	31
TK- α R	AGA TTT TCA GCA GGT CGT TC	32
PYGB F	CCC AAA GAG GAT AAA CAT GG	33
PYGB R	TGA CCT GGA TGT CAA AGA TG	34
GLUT1 F	TAA CGC TCC ACA GAA GAT CA	35
GLUT1 R	GGG CAA TTT CTC CAA CAT AC	36
GLUT3 F	GCT CCT CCT TCG AGA TGA TA	37
GLUT3 R	CTT CCC CAC ATC CTC ATA AC	38
PFKP- α F	TAT CTG GCA TTG GTG AGT GC	39
PFKP- α R	CAG ACT GGT TCC CAC ATA GC	40
PFKP- β F	AGG AAC AAA ACG AAC CCT CC	41
PFKP- β R	CGG TTG CCA GAT ATC CAC AA	42
PFKL- α F	ATT CCC ATG TGC ATC ATC CC	43
PFKL- α R	GTG CTC ATG ACA CTT CTC GT	44
PFKL- β F	AGA GCA TCG TGG ACA ACA TC	45
PFKL- β R	CCT CAT AGA TGT ACA CCG CG	46
G6PDH F	ACT GAG GAG CAA ATC TAC CG	47
G6PDH R	TCA ATG CAC TTC AGC ACT TT	48
PKM- α F	TGC AGT CTC AGA GAA GGA CA	49
PKM- α R	CCT TGT TGC AAC GAC CAA TC	50
GFPT-1 F	CTG GGA AAG CAA CTC CAA GT	51
GFPT-1 R	ACT TCA CCA GCT TAG CGA TG	52
GFPT-2 F	GTT GCT GTA GTG ATG GAG GG	53
GFPT-2 R	TGC GAT CCA GGA AAT CAC TG	54
OGT-1 F	AGC CAT TGA CAC ATA CCG TC	55
OGT-1 R	CTT GAA GCT TTC CTT GCT GC	56
OGT-2 F	GCA TTG TGC TGA ATG GCA TT	57
OGT-2 R	AGA GCT GGT TGA AGT TGC AA	58
OGA F	GCT TGA GGA TGA GGA AGG TG	59
OGA R	AGC ACC ATG TGA GCC ATT AG	60
Actin F	GTG CCC ATC TAC GAG GGT TA	61
Actin R	TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG	62
CRE F	CAG TCA TTGCTACACATGGGCTTGG	63
CRE R	CCA AGC CCA TGT GAC GAA ATG ACT	64

[0032] 웨스턴블랏 분석

[0033] 본 발명자들은 제브라피쉬 뇌의 총 조직 용해물을 Nonidet P-40(NP-40) 용해 완충액[150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 프로테아제를 포함하는 0.5 % NP-40, 포스파타아제 억제제 및 20 μ M streptozotocin(STZ)]을 이용하여 수득하였고 이를 웨스턴블랏 분석에 사용하였다. 우선, 핵 및 세포질 분획물의 분리를 위해, 제브라피쉬 뇌를 완충액[150 mM NaCl, 300 mM sucrose, 프로테아제, 포스파타아제 억제제 및 STZ를 함유한 1 mM EDTA(pH 8.0)]에서 용해시켰다. 그 후 핵 분획물을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화하였고 고장액(1 mM EDTA, pH 8.0)에서 배양하여 수득한 단백질 용해물을 수득하였다. 단백질 농도는 Bradford 분석을 사용하여 결정하였고 단백질(40 μ g의)을 SDS-PAGE로 분리하였으며, 니트로 셀룰로오스 멤브레인(Amersham Biosciences,

Piscataway, NJ, USA)에 3% 소 혈청 알부민(BSA) 또는 5% 탈지 우유를 1시간 동안 처리하였다. 그 후 상기 멤브레인을 4℃의 조건으로 각각 O-GlcNAc CTD110.6, OGT, phospho-CREB, CREB, c-Fos, C/EBP- β , C/EBP- δ , HDAC1, Actin(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), OGA (Proteintech, Chicago, IL), PKA-c α , phospho-ERK1/2, α -Tubulin, 또는 GAPDH(Cell signaling Technology, Danvers, MA)에 특이적인 항체와 함께 밤새 배양하였다. 이어서 TBS-T로 세척 후, 상기 멤브레인을 퍼옥시다아제(HRP)-결합 2차 항체(Amersham Biosciences, TBS-T 중의 1:10,000 희석)와 함께 배양하였고, 화학발광(ECL) 검출 시스템(Amersham Biosciences)으로 시각화하였으며 단백질 밴드의 농도 측정을 ImageJ(NIH)를 사용하여 분석하였다.

[0034] **Streptavidin-Agarose 풀다운 분석**

[0035] 본 발명자들은 비오틴 풀다운 분석을 종래의 방법으로 수행하였다(Hwang SY, *et al.*, *Br J Pharmacol.* 169(7):1551-1560. 2013). 상기 과정은 특정 프로브에 특이적인 전사 인자의 정량적 결합을 허용한다 : CREB 프로모터의 -42/-66 위치에서 CRE 결합 부위를 함유하는 25개의 뉴클레오타이드 서열(서열번호 63 및 64).

[0036] **OGA 활동 분석**

[0037] 본 발명자들은 OGA 활동 분석을 위해 체브라피쉬 두뇌를 용해 완충액 A(150 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% NP-40 containing protease, phosphatase inhibitors, 20 μ M streptozotocin (STZ))로 용해시킨 후 샘플(100 μ g)을 활성 분석 완충액(50 mM cacodylate, pH 6.4, 50 mM N-GalNAc, 0.3 % BSA, 1 mM FD-GlcNAc)과 혼합하였다. 그 후 37℃에서 3시간 동안 배양하였고 500 mM Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 종결시켰으며 흡광도는 485 nm의 여기 파장 및 535 nm의 방사 파장에서 측정하였다.

[0038] **면역형광 염색**

[0039] 본 발명자들은 면역형광 염색을 위해 0.1% PBS-T로 두뇌 절편을 세척하였고 0.1 % PBS-T에서 일반 염소 혈청 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)으로 차단하였다. 상기 절편을 0.1% PBS-T로 세척 후 각각 O-GlcNAc, phospho-CREB, OGT, GFAP(Santa Cruz Biotechnology), OGA(Proteintech), PKA-c α , β -아밀로이드 (Cell signaling technology), S100 β USA) 또는 p-Tau (Abcam, Cambridge, MA, USA)에 대해 특이적인 항체를 포함하는 수용액에서 배양하였고 Alexa Flour 488 또는 568(Molecular Probes)에 염소 항-마우스 IgG 컨쥬게이트를 포함하는 2차 항체의 혼합물과 배양하였다. 그 후 상기 세포를 DAPI(Sigma-Aldrich)로 대조 염색하여 핵을 시각화하였다. 또한 Thioflavin S 염색을 위해, 두뇌 절편을 1% Thioflavin S(Sigma-Aldrich) 용액과 함께 실온에서 8분 동안 배양하였고, 80 및 95% EtOH 및 D.W 순으로 각각 3분간 세척하였으며 박편을 공초점 LSM 510 META 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰 후 ZEN 라이트 에디션 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0040] **두뇌 조직의 대사물질 추출**

[0041] 본 발명자들은 체브라피쉬 두뇌 조직의 대사물질을 추출하기 위해 두뇌 조직을 부피비 7:3:5의 메탄올/물/클로로포름 혼합액으로 균질화하였고 상기 조직 용해물을 4℃에서 10분간 배양한 후 20분 동안 원심분리하였다. 그 후 상등액을 질소 기류(stream of nitrogen) 하에서 증발시키고 피리딘에 40 mg/ml의 농도로 용해된 메톡시아민 하이드로클로라이드 용액 40 μ l를 가한 후 60℃에서 90분 동안 가열한 후 70℃에서 50 μ l의 N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide로 30분 동안 처리함으로써 유도체화(derivatized)하였다. 그 다음, 10 μ l의 250 nM Mirex-13C8(Cambridge Isotope Laboratories, USA)을 내부 표준(internal standard) 물질로 첨가하였다.

[0042] **가스 크로마토그래피 질량 분석(GC-MS)/MS 분석**

[0043] 본 발명자들은 대사산물(metabolites)의 정량분석을 위해 7010 질량 선택형 TQ(Triple Quadrupole) 질량 분석기 시스템(Palo Alto, CA, USA)이 장착된 Agilent 7890B 가스 크로마토그래프를 이용하여 가스 크로마토그래피/탠덤(tandem) 질량 분석을 수행하였다. 그 후 J&W Scientific(Santa Clara, CA, USA) 모세관 컬럼의 DB-5MS UI(30 m $\times$ 0.25 mm I. D; 0.25 μ m 필름 두께)를 사용하여 크로마토그래피 분리를 수행하였다. injector 온도는 270℃, 오븐 온도는 하기와 같이 프로그램되었다: 초기 오븐 온도는 5분 동안 60℃, 10℃/분의 가열 속도로 300℃로 증가되었으며 상기 최종 온도는 10분 동안 일정하게 유지되었다. 또한 전달 라인(transfer line)은 280℃로 유지되었다. 헬륨은 1 mL/분의 일정한 유량에서 캐리어 가스로 사용되었고 이온 소스(ion source) 온도는 230℃로 설정하였다. 각각의 유도체화된 샘플 1 마이크로 리터를 분할 모드(1:10)로 주입하였다. 그 후 질소를 충돌 가스(collison gas)로서 1.5 mL/분의 유속으로 사용하였고, 헬륨을 2.25 mL/분의 유속으로 급냉 가스(quenching gas)로서 사용하였다. 이온 소스는 230℃로 유지하였고 질량 분석기는 다중 반응 모니터링 모드

(MRM)에서 70 eV의 전자 충격 이온화(EI)를 통해 조정되었다.

[0044] **실시예 1: 본능적인 행동 탐색**

[0045] 본 발명자들은 익숙하고 안전한 장소를 찾기 위한 제브라피쉬의 본능적인 행동을 탐색하기 위해 3 내지 72시간의 장기간 수면박탈시(SD), 상기 일반적 실험방법에 기재된 바와 같이, 오픈 탱크 테스트 및 신규 탱크 잠수 테스트를 수행하였다.

[0046] 오픈 탱크 테스트를 통해 탐색활동을 분석한 결과, 수면박탈시 6시간 경과시부터 대조군과 비교하여 상층에 머무르는 시간이 감소하는 것으로 나타났고, 72시간 수면박탈시에는 매우 제한적인 시간동안만 상층에 머물렀다(도 1a). 신규 탱크 잠수 테스트 결과 역시 상기 오픈 탱크 테스트와 상응하게 수면박탈 시간이 길어질수록 대조군과 비교하여 상층에 더 짧은 시간동안 머물렀고 하층에 더 긴 시간동안 머물렀으며, 이는 증가된 불안행동을 나타내는 것이다(도 1b).

[0047] 아울러, 수동 회피(passive avoidance)는 제브라피쉬에서 학습과 단기간 또는 장기간 기억을 평가하기 위해 전통적으로 사용되는 공포-동기(fear-motivated) 분석방법이다(Lee, Y. *et al.*, *Mol Neurobiol.* 55(11): 8738-8753, 2018). 본 발명자들은 도 1c에 도시된 방법을 이용하여 제브라피쉬에 대한 수동 회피 분석을 수행하였다. 제브라피쉬를 훈련학습 및 기억(L/M) 테스트 동안 빛으로부터 가장 멀리 떨어진 챔버에 위치시키고 돌이 광원에 가장 가까운 챔버의 위에서 떨어졌을 때 다른 챔버로 이동하는데 소요되는 시간을 측정하였다. 단기기억(short-term memory)은 3회 연속 훈련 시험 후 2시간 경과시점에서 측정하였다. 본 발명자들은 학습/기억 세션 동안 교차시간이 대조군에 비해 점진적으로 감소하여 SD의 시간 경과에 따라 학습/기억 능력이 손상됨을 확인하였다(도 1d). 그 후 72시간 동안 SD 제브라피쉬를 정상 명/암 주기 하에서 12-144 시간 동안 회복시켰고, 그 결과 탐색 활동의 SD-유발 손상은 SD 후 48 시간이 지나 회복됨을 확인하였다(도 1e). 72시간의 SD-유도 기억 손상, 특히 SD 후 부분적으로 회복하기 위해서는 적어도 72시간, L/M 능력을 완전히 회복하려면 144시간의 더 긴 회복시간이 필요한 것으로 나타났다(도 1f).

[0048] **실험예 2: L/M과 관련된 유전자의 발현**

[0049] 본 발명자들은 SD-유발 인지기능 저하의 근본적인 분자 메커니즘을 연구를 위해, 제브라피쉬의 뇌에서의 신경 전달물질(neurotransmitters), 생물학적 주기(circadian) 조절 단백질 및 뉴런의 가소성과 관련된 유전자들의 3-72 시간 SD 적용 후 시간의 경과에 따른 전사의 변화를 PCR 및 상술한 바와 같은 방법을 이용하여 정량적 실시간 PCR(q-PCR)을 통해 조사하였다. 그 결과, NMDA와 BDNF 유전자는 3시간 경과시점 부터 감소하기 시작하여 시간의 경과에 따라 점진적으로 감소하였다. 또한 Arc, Homer1, GHRH, eger1 및 c-fos의 유전자 발현은 3시간에서 24 시간으로 점차적으로 증가하였으나, 24시간 후에 급격히 감소하였고, 48-72 시간에서 기저 수준(basal levels)을 회복하였다. 유비퀴틴 카복시-말단 가수분해효소 1(ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 1, ubH1) 및 5(ubH5)와 뉴로그라닌(neurogranin, NRGN)은 반대 패턴을 보였으며, 초기 감소와 48-72 시간에 대조군 수준으로 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. SD 기간 동안 per-2 및 Bmal-1의 mRNA 수준은 변화하지 않았다(도 2a).

[0050] 또한 본 발명자들은 12-120시간 동안 회복된 72 시간 SD 제브라피쉬에서의 신경 가소성(neuronal plasticity)에 관여하는 유전자의 시간의 경과에 따른 전사 변화를 조사하였다. 그 결과, NMDA, Arc 및 BDNF 유전자의 SD-유도된 하향 조절은 72 시간 후에 회복하기 시작하였고, SD 후 120시간에서 완전히 대조군 수준으로 회복하였다. 또한 Homer1 및 GHRH mRNA 수준은 24-72 시간에서 증가하였고 회복 120 시간에 대조군 수준으로 복귀하였다(도 2b).

[0051] **실험예 3: L/M 과정 동안 효소 및 대사 변화**

[0052] 본 발명자들은 수동 회피(passive-avoidance) 테스트의 학습 전후에 있어서, 대조군 및 SD 제브라피쉬의 뇌에서 헥소사민 생합성 경로(hexosamine biosynthetic pathway, 이하, 'HBP'로 약칭함)에서의 몇몇 포도당 중간 대사 산물(glucose intermediate metabolites)과 비교하였다. 세포로 흡수된 포도당 중 2-5%는 HBP 대사 경로를 따르며 0-연결 N-아세틸글루코사민화(0-GlcNAcylation)를 위한 기질인 UDP-GlcNAc를 생성한다(도 3a). 본 발명자들은 신경 대사산물 농도를 상술한 바와 같이 가스 크로마토그래피-질량 분석기(GC-MS)를 이용하여 분석하였다. 대사산물의 농도를 정량화하기 위해 MRM 모드에서 GC-TQ-MS를 사용하여 표적 분석(targeted analysis)을 수행하였다. 포도당 대사에 속하는 18가지 대사산물을 단일 분석으로 수행하였고 정통 표준(authentic standard)을 보정에 사용하였다. 뇌 조직의 대사산물 수준은 검량선(calibration curves)을 사용하여 계산한 결과, 모든 표적 화합물에 대한 선형 상관 계수(R^2)는 0.99 보다 높았고 선형성(linearity)이 양호하였다. 특히, 글루코스, 글루

코스-6-인산염(G-6-P) 및 과당-6-인산염(F-6-P)은 대조군의 뇌에서 학습시 명백하게 증가하였지만 SD 제브라피쉬에서는 증가하지 않았다(도 3b). 증가된 G-6-P와 F-6-P는 중간 대사산물 또는 해당과정(glycolysis)의 유전자 및 TCA 주기의 변화를 수반하지 않았다(도 3c 및 3d). 그 대신, HBP의 핵심 중간체인 GlcNAc-6-P는 정상 제브라피쉬의 두뇌에서는 학습에 의해 활성화되었으나, SD 제브라피쉬에서는 그렇지 아니하였다(도 3b).

[0053] 다음으로, RT-PCR 및 q-PCR에 의한 학습과제의 유무에 관계없이 대조군 및 SD 제브라피쉬 두뇌에서의 당분해성(glycolytic) 및 HBP 경로의 유전자 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 헥소카이네이스 1(HK1), HK2, 글루코카이네이스(GK), 글루타민:과당-6-포스페이트 아미도트랜스퍼레이스(glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 1, GFPT1), GFPT2, OGT1, OGT2, 뇌글리코겐 인산분해효소(brain glycogen phosphorylase, PYGB) 및 포도당 수송체 3(glucose transporter 3, GLUT3)는 SD 시간이 증가함에 따라 지속적으로 하향조절되었다(도 3e). 흥미롭게도, OGA mRNA 발현은 SD 동안 시간이 경과함에 따라 점진적으로 증가하였으며, OGT 및 OGA의 발현 양상은 SD 조건 하에서 역으로 조절되었다. 본 발명자들은 대조군 및 SD 제브라피쉬 실험군에서 학습훈련 후의 포도당 대사효소의 전사수준을 추가로 조사하였다. 그 결과, 학습자극에 의해 특징적으로 대조군에서는 HKs, GK, GFPTs, OGTs, PYGB, GLUT1 및 GLUT3의 mRNA 발현이 유의하게 증가되었으나(도 3f 및 3g), 72시간 SD 실험군(SD)에서는 이들 유전자들이 6시간 까지 높은 발현을 나타내다가 감소하는 양상을 나타냈다(도 3e). OGA 유전자는 대조군과 SD 실험군 모두에서 학습 과제에 의해 유의한 변화를 나타내지 않았다.

[0054] 또한 본 발명자들은 단기 및 장기 기억 및 학습 강화에 대한 SD의 효과를 평가하였다. 학습 강화 이후의 장기 기억은 24시간의 휴식 기간 후에 두 번째 동일한 일련의 세 가지 훈련 시험과 단일 기억 시험을 통해 측정되었다. 그 결과, 대조군과 비교하여, SD 실험군에서 단기 및 장기기억뿐만 아니라 학습기능도 현저하게 손상된 것을 확인하였다(도 3h). 또한 학습훈련 중 증가된 HK, GK, GFPT, OGT, PYGB, GLUT1 및 GLUT3 mRNA 수준은 두 번째 훈련학습 및 장기기억 기간 동안 유지되었다(도 3i).

[0055] 실험예 4: PKAc α 및 p-CREB의 발현 분석

[0056] 본 발명자들은 PKA 신호 조절의 기초가 되는 조절 경로(regulatory pathways)를 조사하기 위해, 수동 회피 훈련(passive avoidance training) 후에 대조군과 SD 제브라피쉬 간에 PKAc α 및 p-CREB의 발현 양상을 비교했다. 그 결과, 면역형광 염색법을 통해 대조군과 비교하여 SD 제브라피쉬의 종뇌(telencephalon) 영역에서 PKAc α 의 감소를 나타냈고 학습 훈련에 의해 대조군 제브라피쉬의 PKAc α 및 p-CREB가 현저히 증가하였으나 SD 제브라피쉬의 두뇌에서는 증가하지 않았음을 확인하였다(도 4a 및 4b). 또한, 대조군에서의 학습훈련은 SD 제브라피쉬에서 둔화되었던 p-CREB의 핵 전좌(nuclear translocation)를 증가시켰다(도 4b). 이는 핵 및 세포질 분획에서 p-CREB에 대한 웨스턴블롯 분석 결과 대조군의 뇌에서 학습훈련 이후에 p-CREB의 핵 전좌가 확인되었으나 SD 실험군에서 관찰되지 않은 결과와 일치하는 것이다(도 4c). CREB의 향상된 전사활성은 대조군 제브라피쉬의 뇌에서 학습훈련 후에 CREB 및 p-CREB의 DNA 결합 활성 증가에 기반하는 것으로 추정되나 비교대상인 SD 실험군에서는 그렇지 않았다(도 4d).

[0057] 또한 SD에 의한 HBP/O-GlcNAc 대사 경로의 감소의 징후를 고려하여, 본 발명자들은 대조군 및 SD 제브라피쉬의 뇌에서의 O-GlcNAc화의 변화를 추가로 조사하였다. 그 결과, 면역형광 및 웨스턴블롯 분석 실험 모두 대조군과 비교하여 SD 제브라피쉬 뇌에서 OGA 수준의 증가를 보였고 반대로 O-GlcNAc화 및 OGT 수준의 감소를 나타내었다(도 4e, 4f 및 4g). OGA 효소 활성은 대조군과 비교하여 SD 제브라피쉬 뇌에서 추가로 증가하였다(도 4h).

[0058] 아울러, 본 발명자들은 학습훈련 이후의 대조군 및 SD 제브라피쉬의 뇌에서의 의 시간의 경과에 따른 O-GlcNAc화의 변화 및 OGT, OGA, p-CREB, c-fos 및 PKAc α 의 발현의 변화를 조사하였다. 그 결과, 대조군에서는 학습훈련 직후 O-GlcNAc화가 증가하기 시작하여 서서히 2 ~ 24 시간까지 유지되고 48 시간에 기저 수준으로 감소하였다(도 4i). OGT, p-CREB, c-fos 및 PKAc α 의 단백질 수준은 시간의 경과에 따른 O-GlcNAc화와 유사한 패턴을 나타냈으나, SD 실험군에서는 그러한 변화가 관찰되지 않았다(도 4j). 또한 면역형광 염색 결과 OGT와 O-GlcNAc화 수준이 대조군의 종뇌(telencephalon)에서 학습훈련에 의해 증가 되었으나, SD 실험군에서는 증가하지 않았음을 보여 주었다. 반면 OGA는 학습훈련의 유무에 관계없이 SD에서 증가하였다(도 4k 및 4l).

[0059] 실험예 5: L/M, HBP/O-GlcNAcation 및 PKA/CREB 활성화

[0060] 본 발명자들은 L/M의 GlcN에 의한 증가된 HBP 유입의 효과를 조사하기 위해, 대조군 및 72시간 SD 제브라피쉬를 2 시간 동안 다양한 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.5 및 1 mg/L)의 GlcN으로 배양하고 학습 및 단기기억을 평가하였다. 그 결과, 0.05 및 0.1 mg/L의 농도의 GlcN 처리시 L/M 능력의 약하지만 유의한 증가를 확인할 수 있었다(도 5a). 다음으로, 단기간 및 장기간의 기억 및 학습 강화를 조사하여 SD-유도된 L/M 손상에 대한 GlcN의 효과를

측정한 결과 24시간의 회복 기간 후에 평가된 장기기억의 유지는 SD 실험군에서 손상되었으며 GlcN에 의해 유의하게 회복되었다(도 5b).

[0061] 또한 GlcN이 O-GlcNAc화 및 OGT 또는 OGA의 수준에 미치는 영향을 조사하기 위해 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과 GlcN이 제브라피쉬의 두뇌에서 O-GlcNAc화, OGT, p-CREB, c-fos 및 PKAc α 뿐만 아니라 C/EBP β 및 C/EBP δ 의 단백질 수준을 증가시킨다는 것을 확인하였다(도 5c). O-GlcNAc화 및 PKA/CREB 신호 전달에 관여하는 분자는 대조군에서 L/M 과정에 의해 급격히 증가하였지만 SD 군에서는 증가하지 않았다(도 5d). SD에서 인지기능의 회복과 연관되게, GlcN 처리는 SD 제브라피쉬의 뇌에서 학습과 단기 및 장기기억 과정 후에 O-GlcNAc화, OGT, p-CREB, c-fos 및 PKAc α , C/EBP β 및 C/EBP δ 를 회복시켰다(도 5d). 또한, SD에서 관찰된 OGA 발현의 증가는 L/M 과정 동안 GlcN에 의해 억제되었다. OGA의 효소활성은 GlcN에 의해 저해되었지만 대조군보다 높게 유지된 SD 제브라피쉬의 뇌에서 증가되었다(도 5e). 대조군 제브라피쉬에서 학습한 후에 O-GlcNAc화, OGT, PKAc α , p-CREB 및 C/EBP β 및 C/EBP δ 의 전반적인 수준이 증가되었지만, 세포질 및 핵 사이의 p-CREB를 제외하고는 상기 단백질의 상대적 세포 내 위치에는 유의한 차이가 없었다(도 5f). p-ERK1/2 단백질 발현은 SD 및/또는 학습 과정에 의해 유의한 영향을 받지 않았다. 면역형광 실험은 SD 제브라피쉬의 뇌에서 GlcN이 학습훈련(learning task) 후에 OGA 수준을 감소시키면서 p-CREB, PKA-c α , OGT 및 O-GlcNAc화 수준 및 p-CREB 핵 전좌를 촉진한다는 것을 추가로 증명하였다(도 5g 내지 5j).

[0062] GlcN에 의한 HBP 경로 활성화가 SD-유도 기억결손의 회복을 유도하기 때문에, 본 발명자들은 HBP의 약리학적 억제제가 기억기능에 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 GFPT 억제제인 diazo-5-oxonorleucine(DON)을 복강 내 투여한 제브라피쉬에서는 L/M이 농도 의존적으로 손상되었다(도 5k). 동시에, 학습 유도 O-GlcNAc화, OGT 및 PKA/CREB 활성화는 DON에 의해 농도 의존적으로 하향 조절되었다(도 5l). 대조적으로 다른 GFPT 억제제인 아자세린(azaserine)은 상기 분자가 혈뇌장벽(BBB)을 통과하지 못해 L/M에 아무런 영향을 미치지 않았고 O-GlcNAc화 및 PKA/CREB 신호전달 경로에도 영향을 미치지 않았다(도 5m 및 5n).

[0063] 실험예 6: OGA 억제제 투여에 따른 L/M 손상 회복

[0064] 본 발명자들은 OGA 억제제 투여에 따른 SD 제브라피쉬에서 L/M 손상의 회복 여부를 조사하였다. 구체적으로 제브라피쉬에 OGT 억제제인 알록산(alloxan, Sigma-Aldrich) 또는 OSMI-1(Sigma-Aldrich, USA)를 복강 내 주입하고, L/M을 조사하였다. 그 결과 알록산이 아닌 OSMI-1는 농도의존적으로 L/M(도 6a 및 6b), 학습 유도 O-GlcNAc화 및 PKA/CREB 신호 활성화의 감소를 유도하였다(도 6c). L/M에 대한 알록산 효과의 결핍은 당해 알록산이 BBB를 통과하지 못하는 것과 관련이 있는 것으로 추정된다. 이어, 본 발명자들은 OGA 억제제인 PugNAc 및 Thiamet G가 SD-유도 L/M 손상에 미치는 영향을 조사하였다. PugNAc는 L/M 또는 PKA/CREB 신호전달의 SD 유발 결함에는 영향을 미치지 않았으며, 이 역시 PugNAc가 BBB를 통과하지 못했기 때문인 것으로 사료된다(도 6f 및 6g). 그러나, Thiamet G는 제브라피쉬 뇌에서의 C/EBP β , C/EBP δ 및 O-GlcNAcylation, OGT, p-CREB, c-fos 및 PKAc α 의 학습 유도된 활성화에서의 SD 매개 결함(도 6e) 뿐만 아니라 학습, 단기 및 장기기억 손상도 회복시켰다(도 6f). 한편, GlcN은 처리된 제브라피쉬의 두뇌에서 L/M의 DON-매개 결함을 회복시키고 GlcNAcylation, OGT, p-CREB, c-fos 및 PKAc α 수준을 자극하였다(도 6h 및 6i).

[0065] 아울러 본 발명자들은 HBP/O-GlcNAc화에 관여하는 유전자뿐만 아니라 특이적 억제제 또는 GlcN으로 시냅스 가소성을 조절하는 유전자들에 대한 HBP의 효과를 조사하였다. 그 결과 DON 또는 OSMI-1에 의한 HBP의 억제는 HBP 효소의 mRNA를 하향 조절하는 SD 유사 효과를 나타내었지만, GlcN은 HBP 효소의 전사수준을 상향 조절했다(도 6j). OGA mRNA는 Thiamet G에 의해 억제되었고 DON과 OSMI-1는 Arc, Homer1, GHRH, egr1 및 c-fos의 발현을 향상시켰으며 24시간에 NMDA, ubH1, ubH5, NGRN 및 BDNF mRNA 수준을 억제하였다(도 6k). 또한 DON과 OSMI-1의 상기 효과는 24시간 SD에서의 유전자 발현 변화와 거의 일치하였고 GlcN은 이러한 유전자의 SD-유도 감소를 기본 수준으로 회복시켰다(도 6l).

[0066] 실험예 7: 베타-아밀로이드 및 p-타우의 축적

[0067] 반복된 SD는 베타-아밀로이드 및 인산화 타우(p-Tau)의 축적을 증가시키고 제브라 피쉬의 뇌에서 정상세포(astrocyte)의 아교세포 증가증(gliosis)을 유도한다. 최근 SD는 β -아밀로이드(A β)와 p-Tau 단백질의 응집과 관련하여 알츠하이머 병(AD)과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 발명자들은 SD에 의한 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)의 변화를 조사하기 위해, 티오플라빈(thioflavin) S 및 A β 및 p-Tau에 대한 항체를 사용하여 제브라피쉬의 뇌에서 중앙 영역의 복부(Vd) 및 지느러미(DI)를 면역염색하였다(도 7a). 제브라피쉬 단일 SD 실험군은 72시간(3일) 동안 SD를 처리 후(1X SD) 실험에 이용하였고 반복 SD 실험군은 72시간(3일) 동안 SD를 처리 후 6일 동안 정상 회복기간을 적용하였으며 이를 4번 반복한 후(4X SD) 실험에 이용하였다(도 7b).

그 결과, 한 차례 수면박탈을 실시한 실험군에서 티오플라빈 S, A β 및 p-Tau 면역형광에는 유의한 변화가 없었다. 그러나 반복된 SD 실험군에서 종뇌(telencephalon) 부위의 등쪽 측면 지역(D1)에서 면역형광성이 유의하게 증가하였고, 상기 증가는 GlcN 처리에 의해 억제되었다(도 7c 내지 7e).

[0068] 또한 본 발명자들은 대조군과 반복 SD 실험군에서 학습-유도 O-GlcNAc 변화 및 p-Tau/A β 침착(deposition) 사이의 상관관계를 조사하였다. GlcN 처리된 SD 실험군에서 O-GlcNAc는 학습 후 증가되었으나 대조군의 경우보다 낮은 반면, 반복된 SD 실험군에서는 학습훈련에 의해 O-GlcNAc의 증가가 관찰되지 않았다. 이 때 O-GlcNAc는 주로 세포질에서 관찰되었으나 A β 는 핵에서 주로 염색되었고 일부 p-Tau는 O-GlcNAc와 함께 세포질에서 공-염색되었다(도 7f 및 7g).

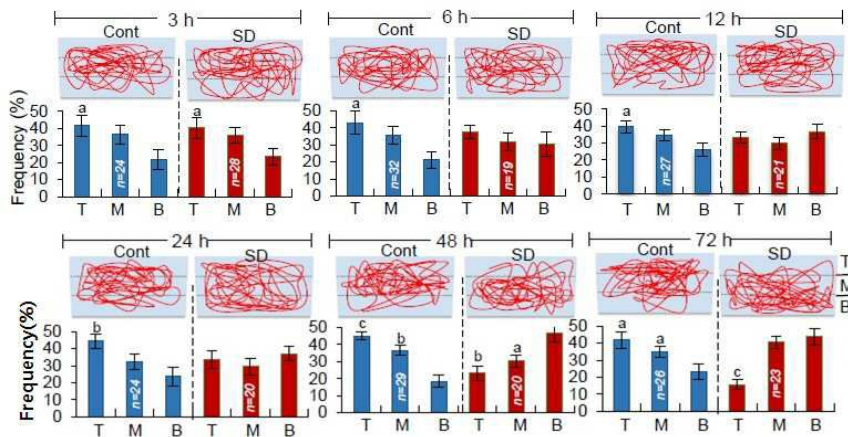
[0069] 아울러, 아밀로이드 플라크는 AD의 초기 단계에서 반응성 정상 세포로 둘러싸여 있으며, 섬유소 GFAP 발현은 플라크 부하와 관련이 있다. 정상 세포 활성화에 대한 GlcN의 유무에 따른 SD의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 제브라피쉬 두뇌에서 S100 β 와 GFAP의 발현을 검사하였다. 그 결과, 단일 수면박탈을 시행한 실험군(1X SD)에서는 GFAP 및 S100 β 수준의 유의한 변화는 없었으나 반복 SD 실험군에서는 제브라피쉬 뇌의 Vd 및 D1에서의 GFAP 및 S100 β 면역반응 세포의 수가 유의하게 증가하였고, 이는 GlcN 사전 처리(preincubation)에 의해 현저하게 억제되었다(도 7h 및 7i).

[0070] 결론적으로 본 발명의 수면장애에 의해 유발되는 학습 및 기억 장애 치료용 약학적 조성물은 뇌신경 스트레스 저해효과 및 신경세포 보호능력이 우수하여, 인지기능 또는 기억능력 예방, 개선 또는 치료에 이용될 수 있음을 확인함으로써, 학습/기억(L/M) 과정에서 HBP의 역할을 강조하고 알츠하이머 병의 인지결핍(cognitive defects)에 대한 잠재적 치료 후보물질로 활용가능하다.

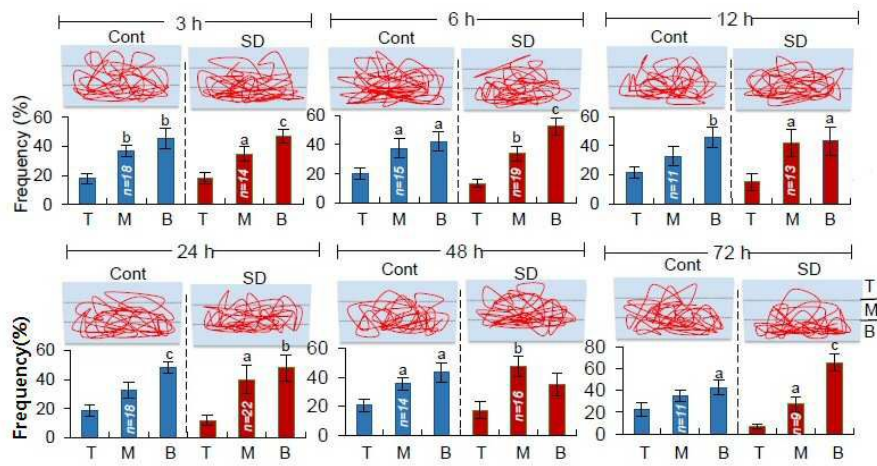
[0071] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예 및 실험예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

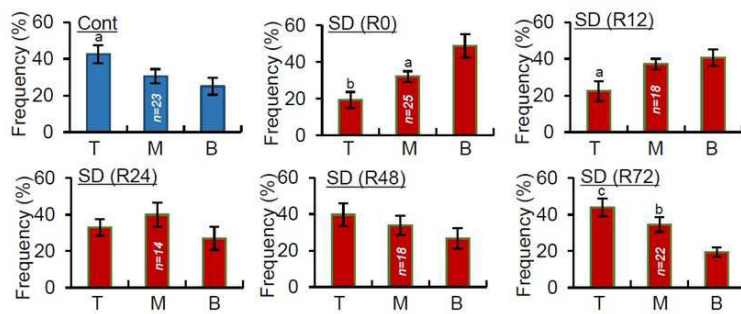
도면1a



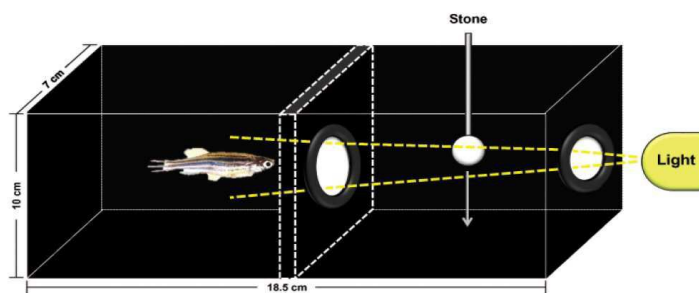
도면1b



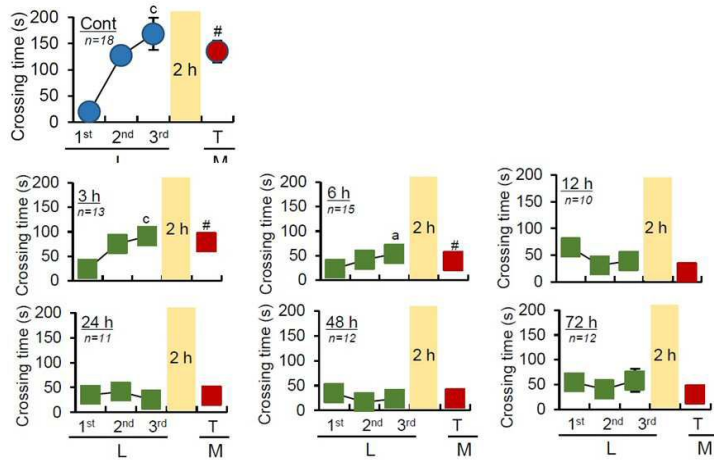
도면1c



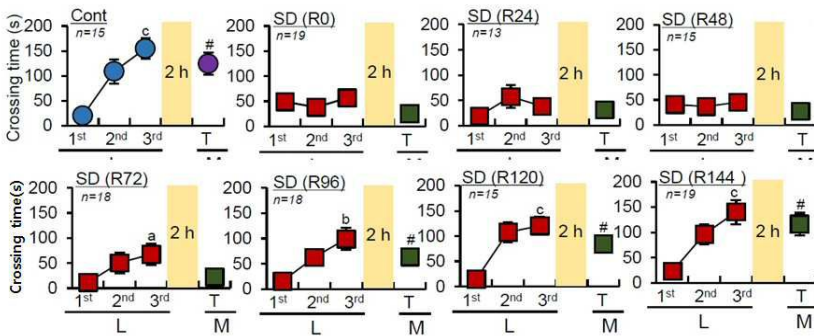
도면1d



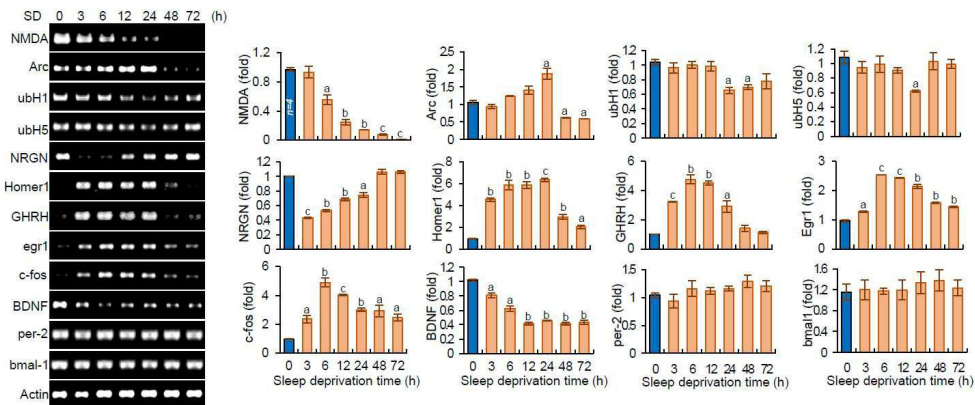
도면1e



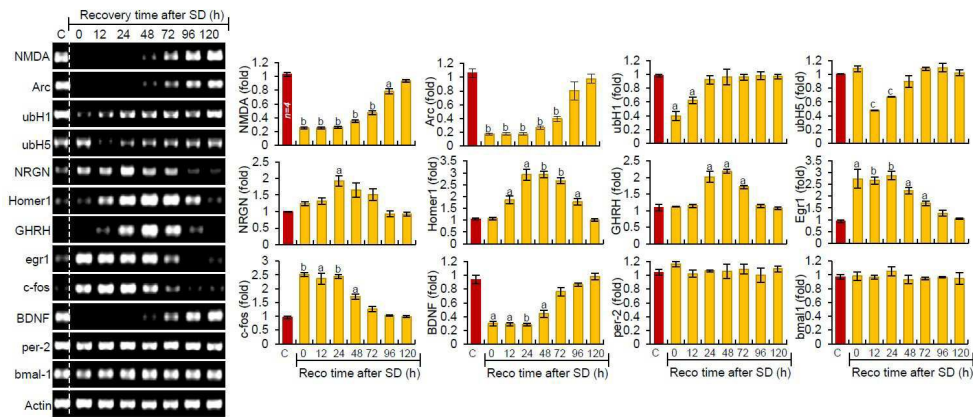
도면1f



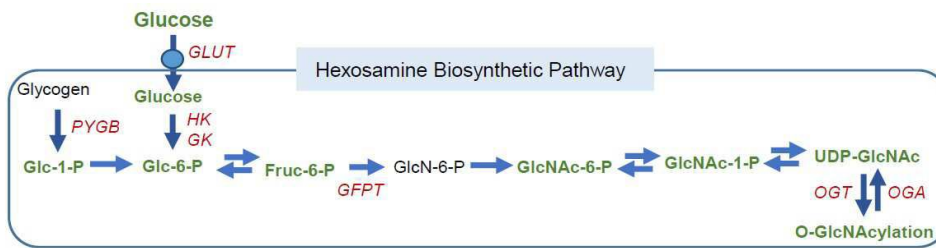
도면2a



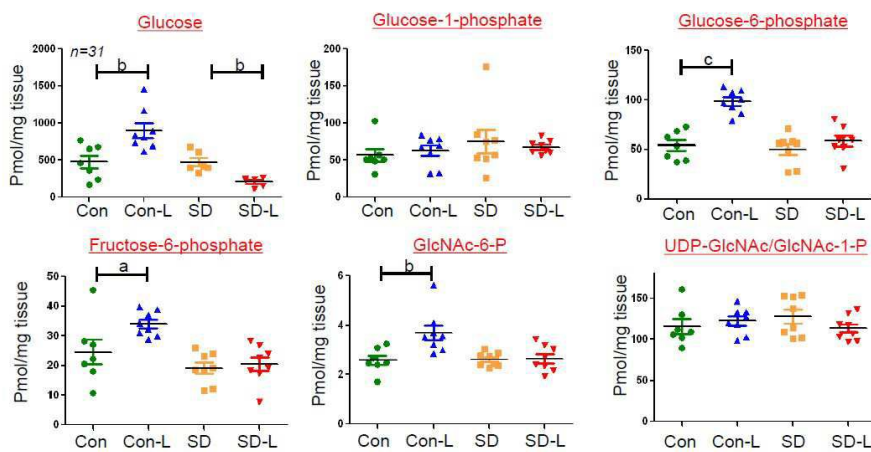
도면2b



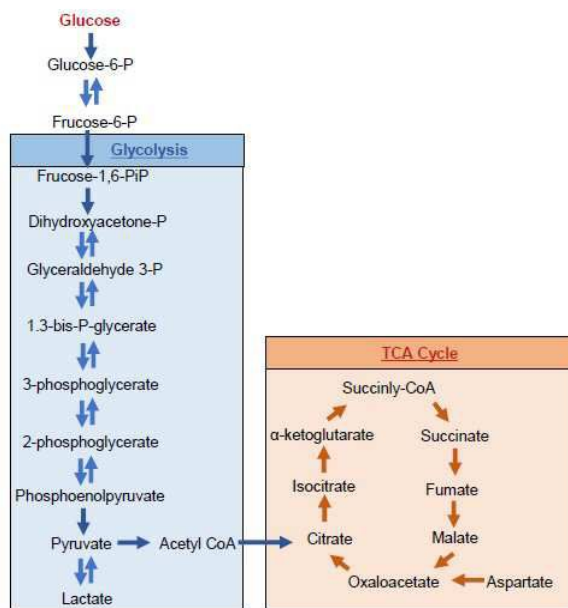
도면3a



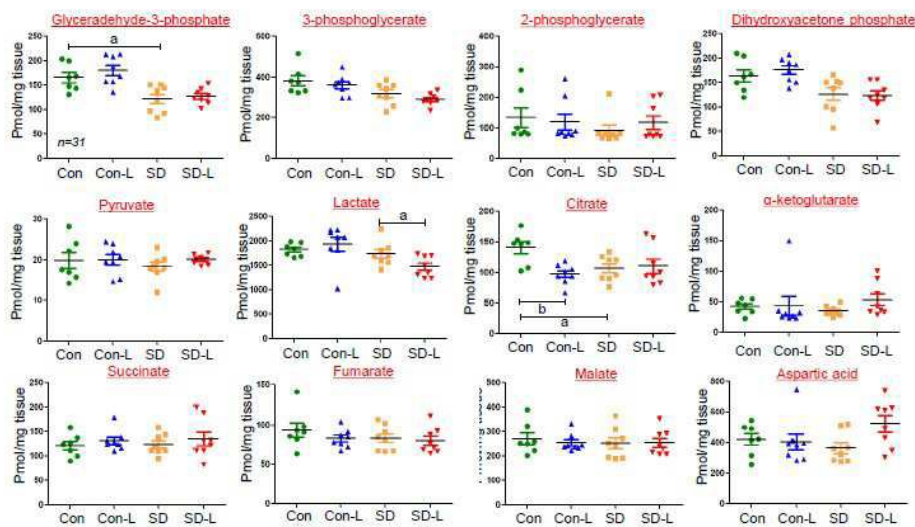
도면3b



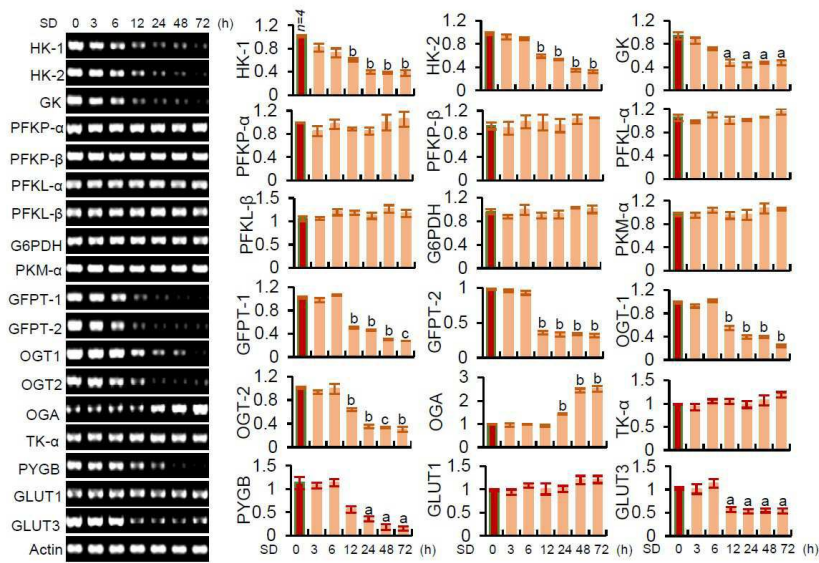
도면3c



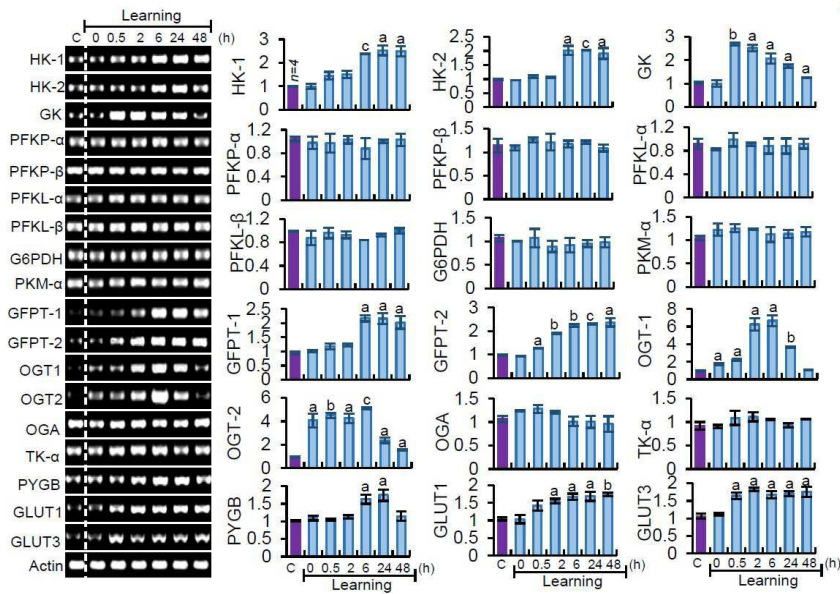
도면3d



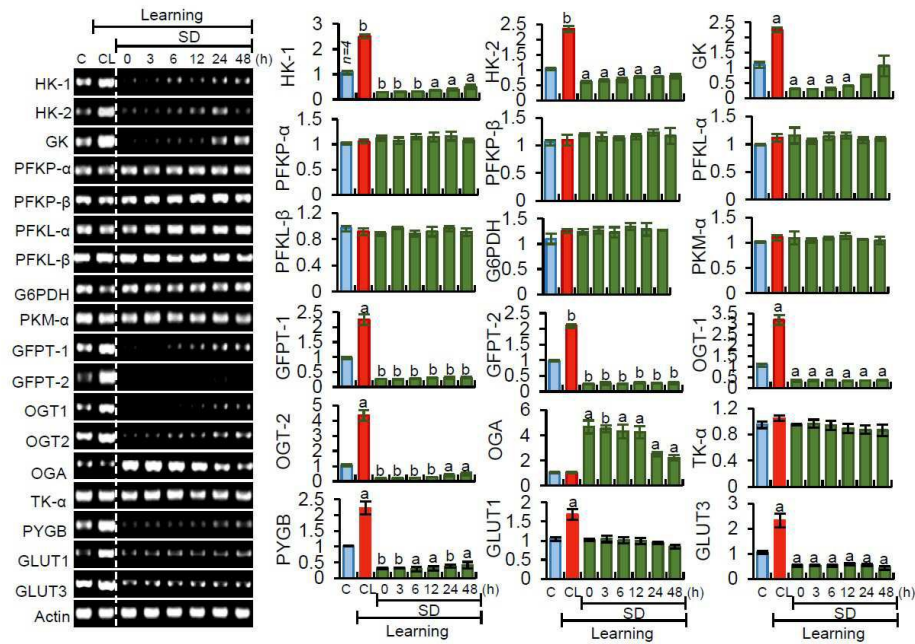
도면3e



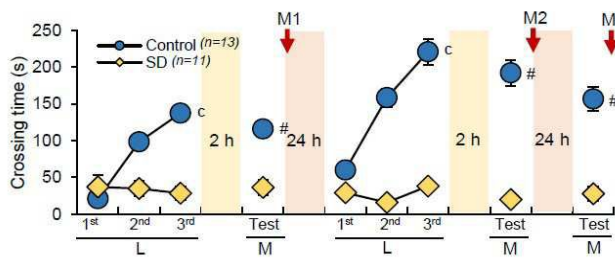
도면3f



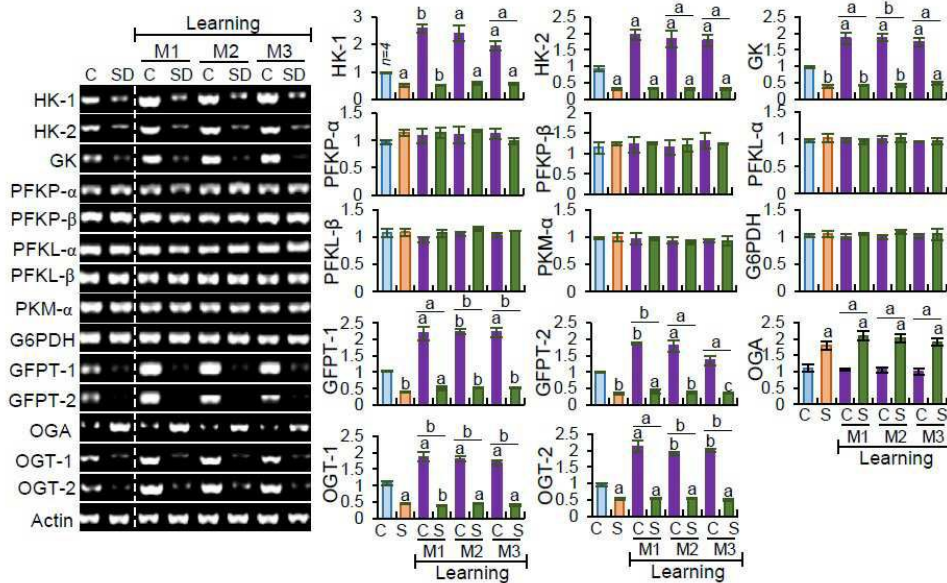
도면3g



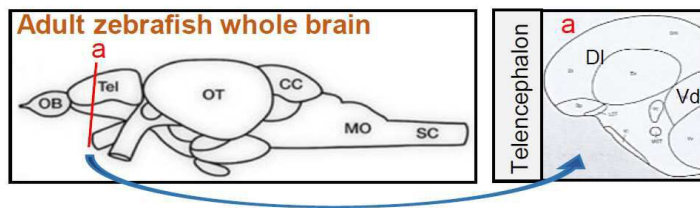
도면3h



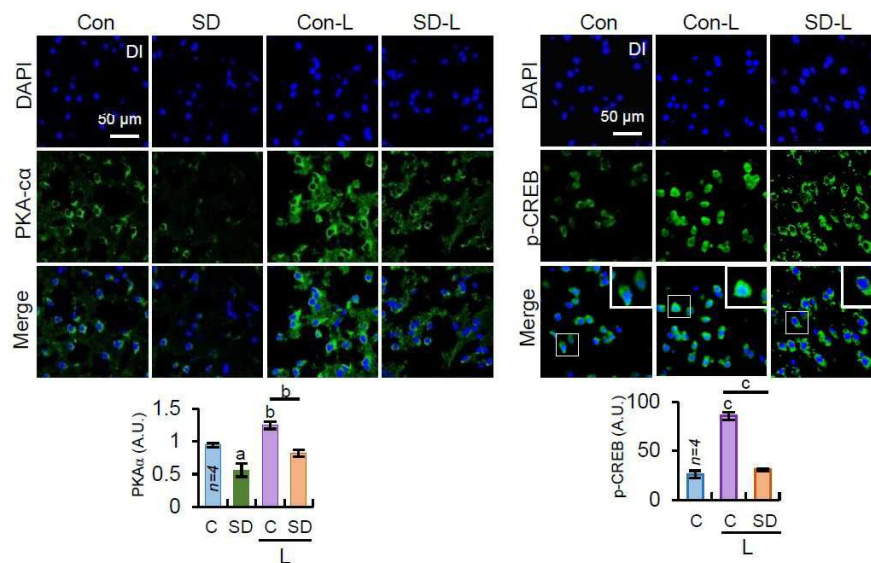
도면3i



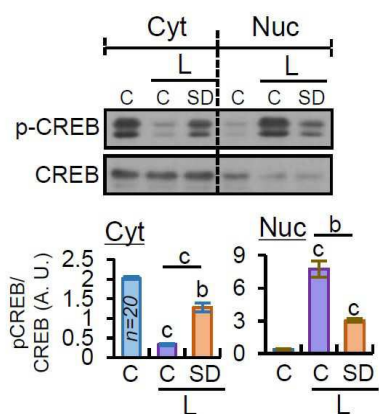
도면4a



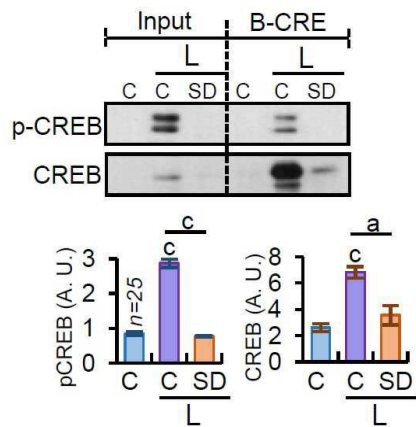
도면4b



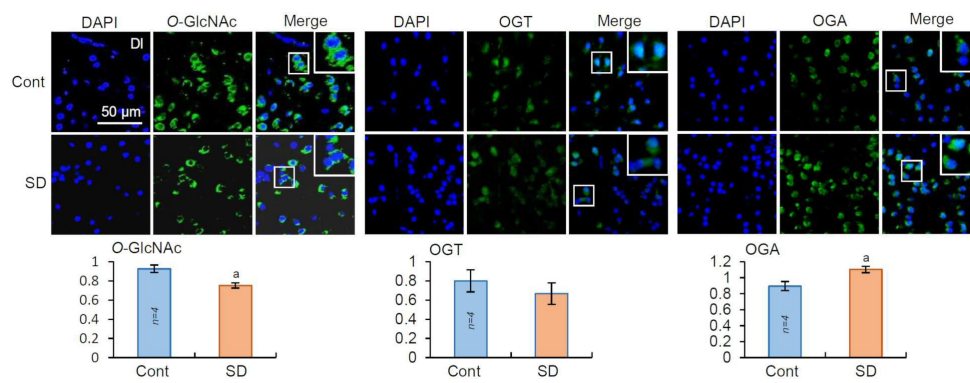
도면4c



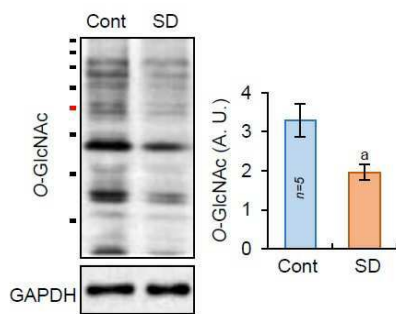
도면4d



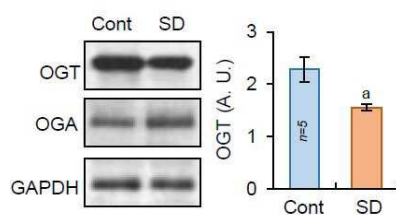
도면4e



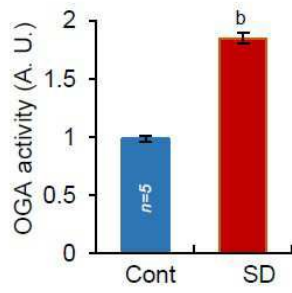
도면4f



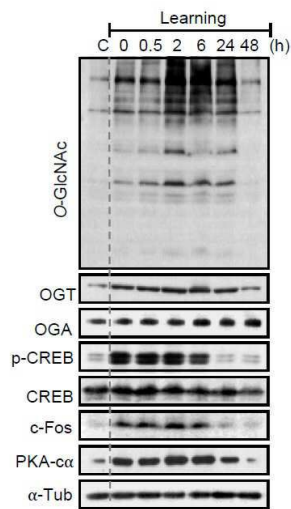
도면4g



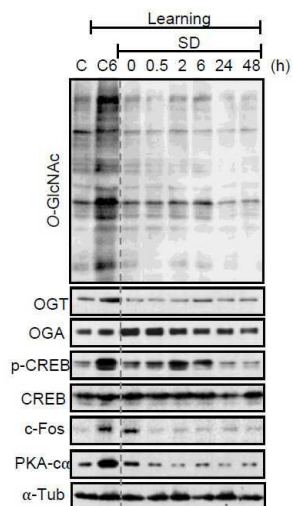
도면4h



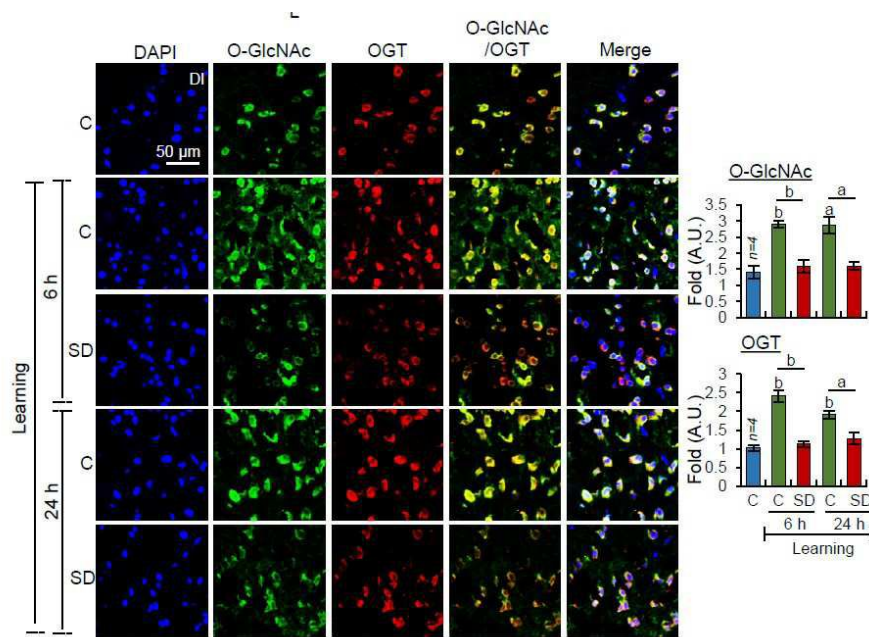
도면4i



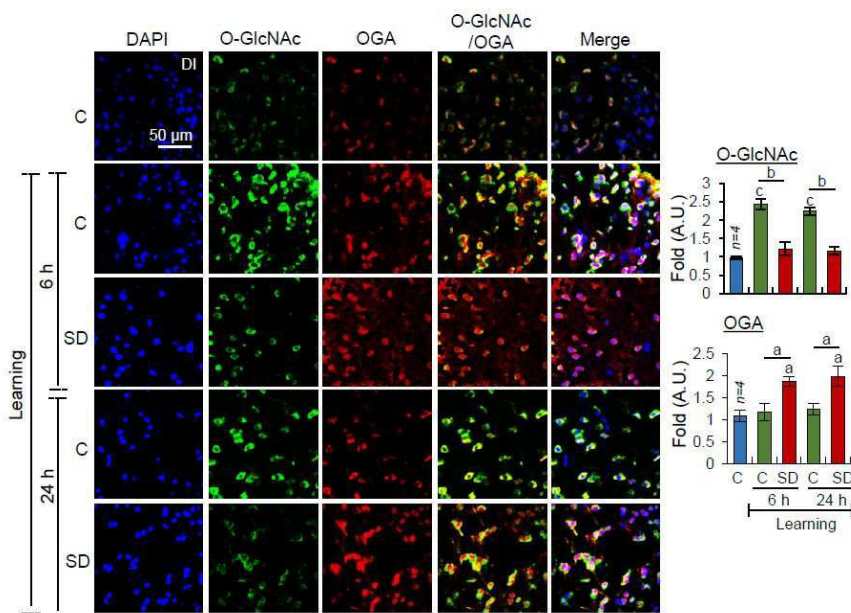
도면4j



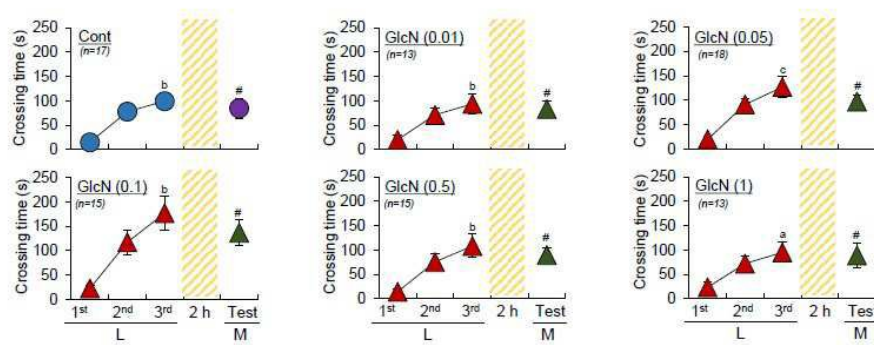
도면4k



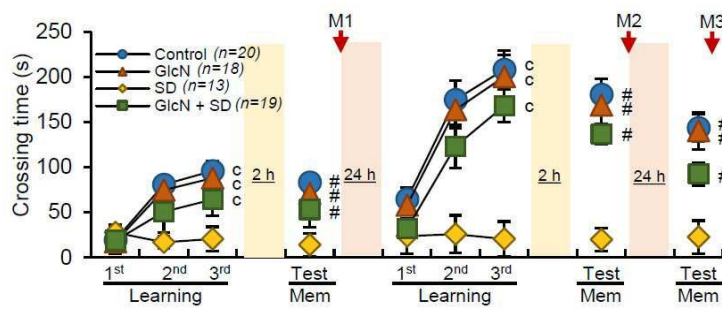
도면4l



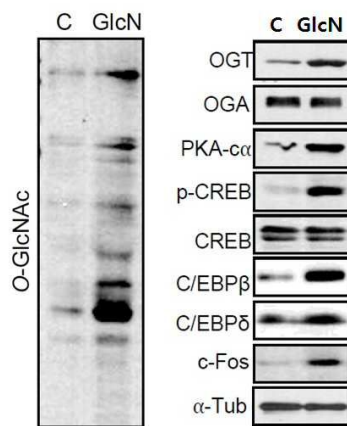
도면5a



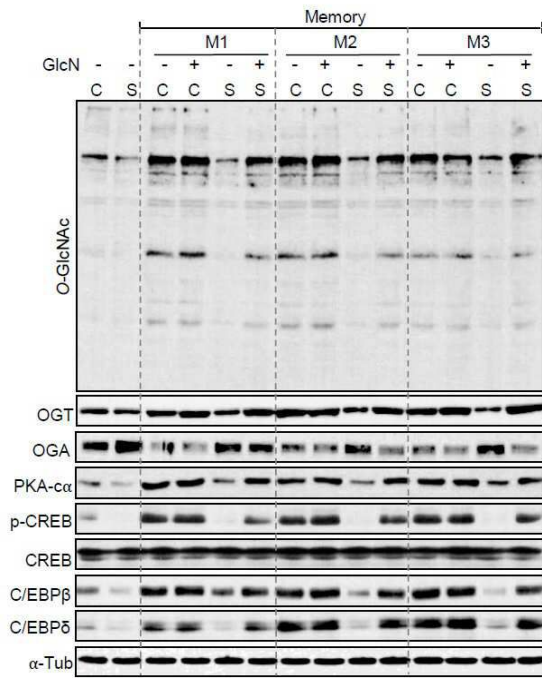
도면5b



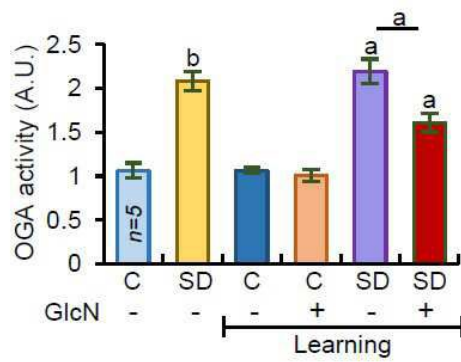
도면5c



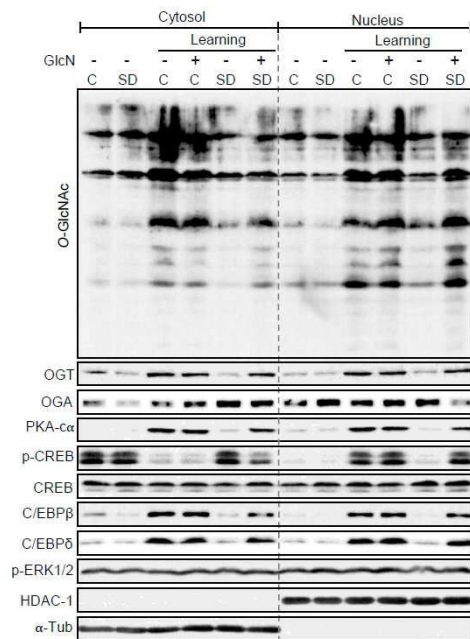
도면5d



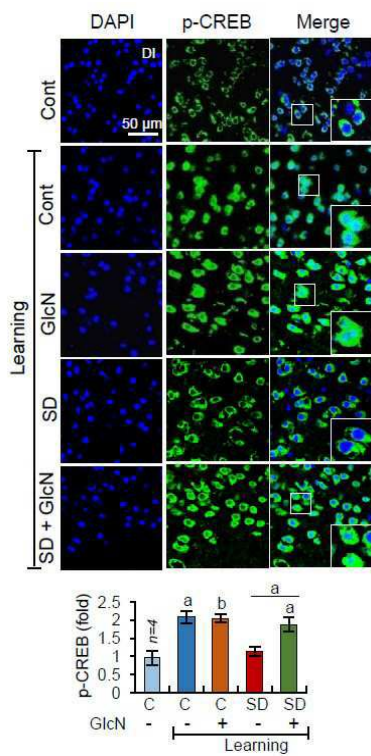
도면5e



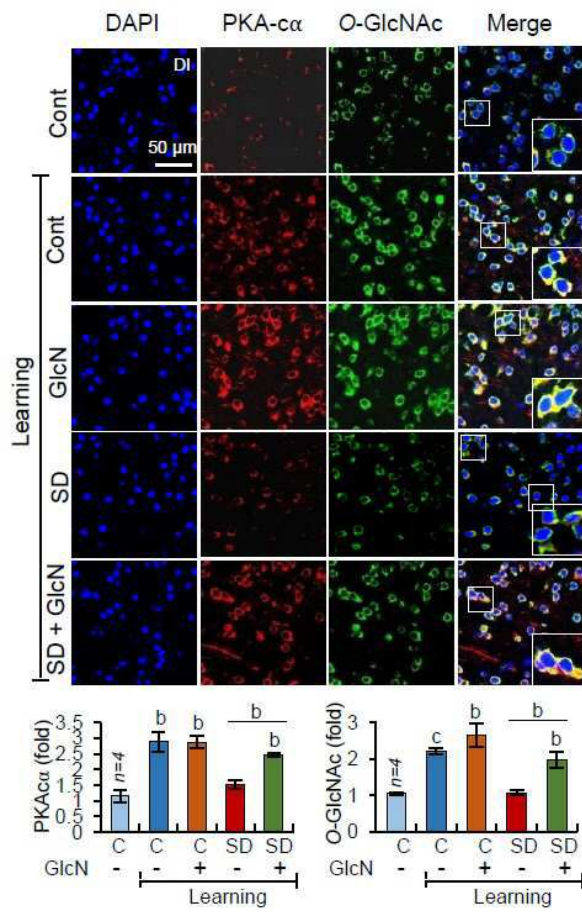
도면5f



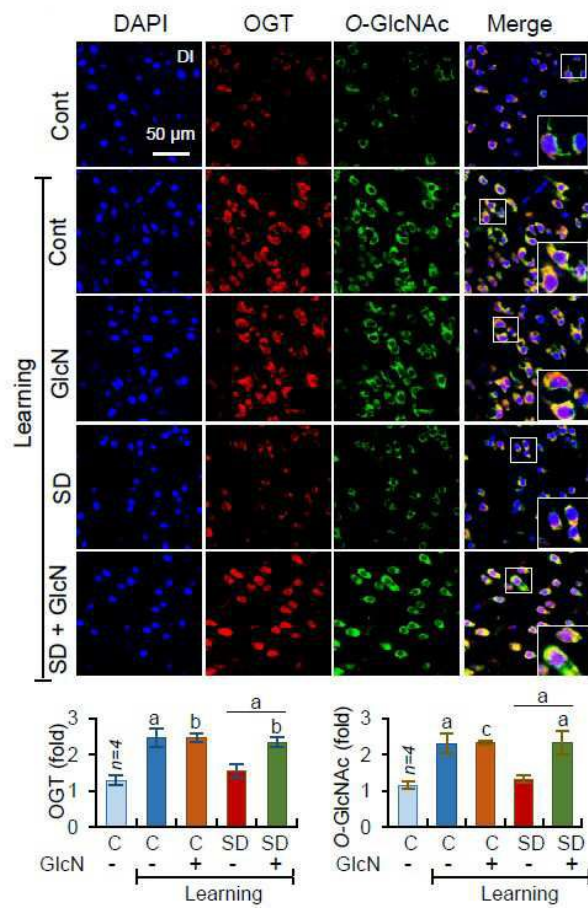
도면5g



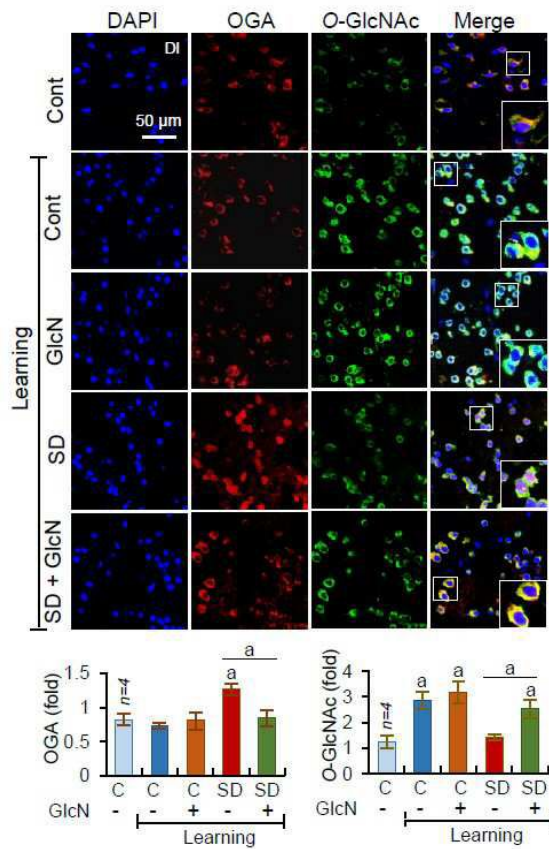
도면5h



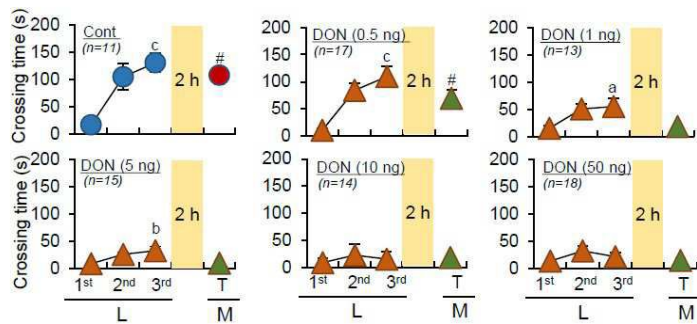
도면5i



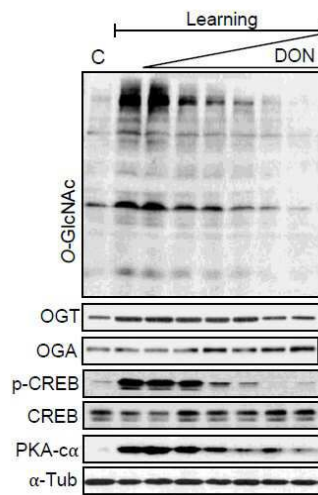
도면5j



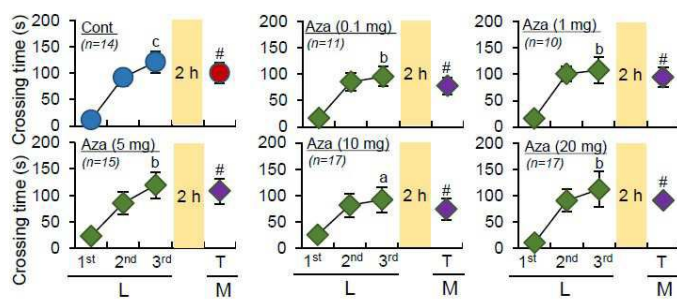
도면5k



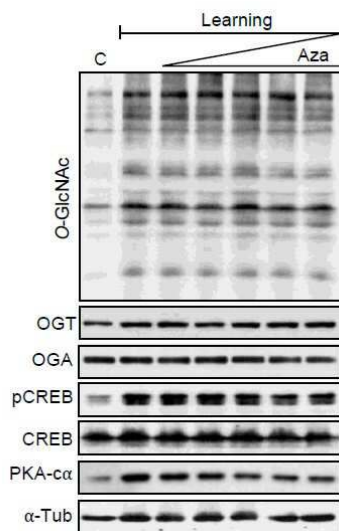
도면5l



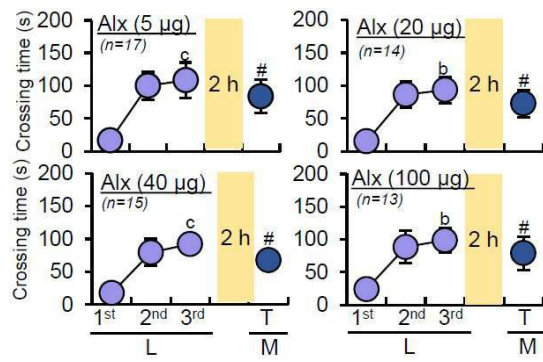
도면5m



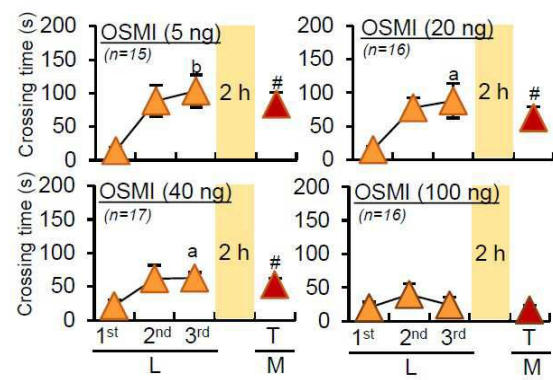
도면5n



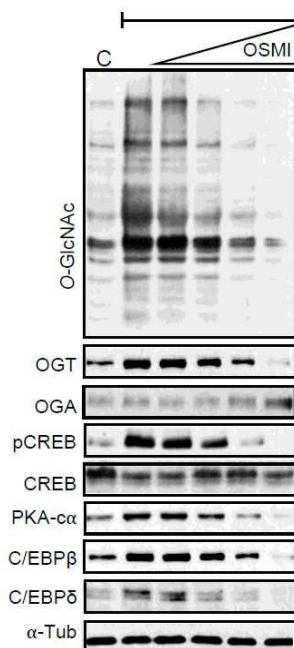
도면6a



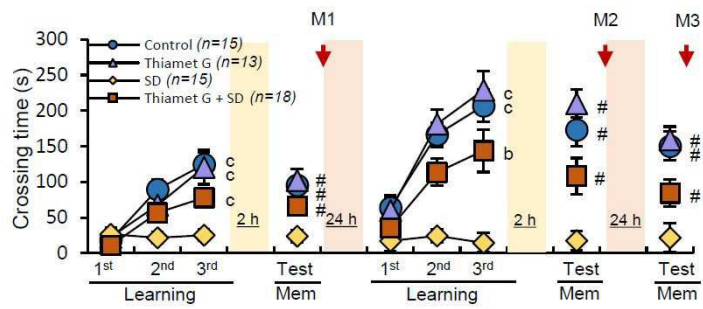
도면6b



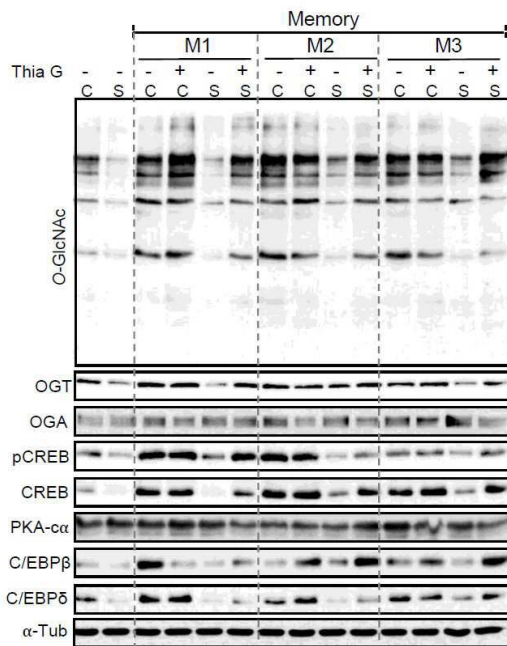
도면6c



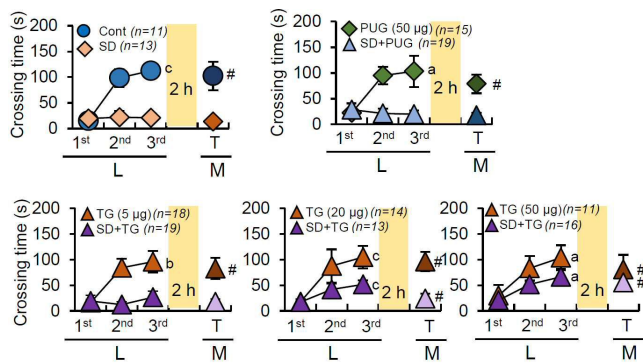
도면6d



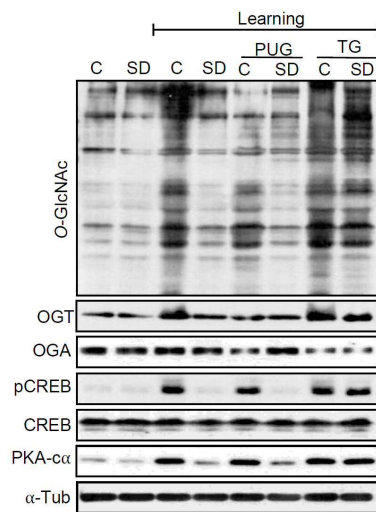
도면6e



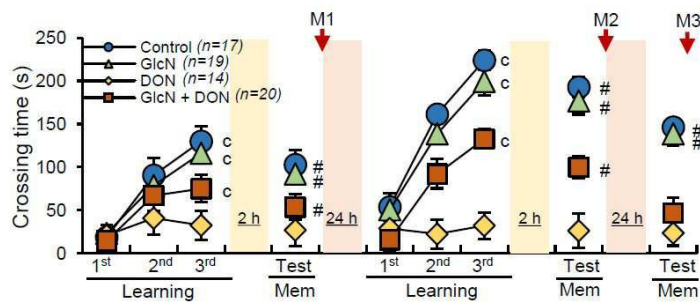
도면6f



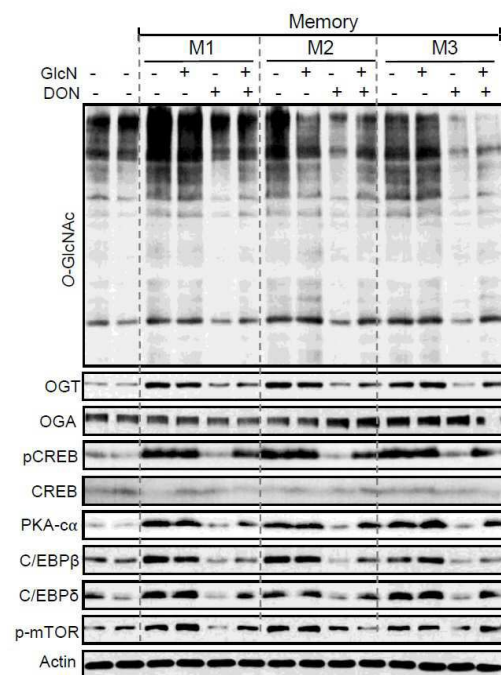
도면6g



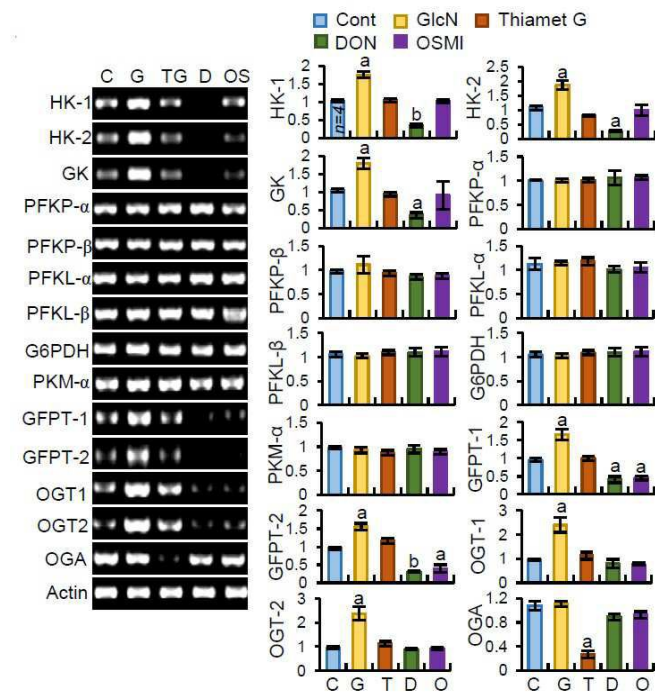
도면6h



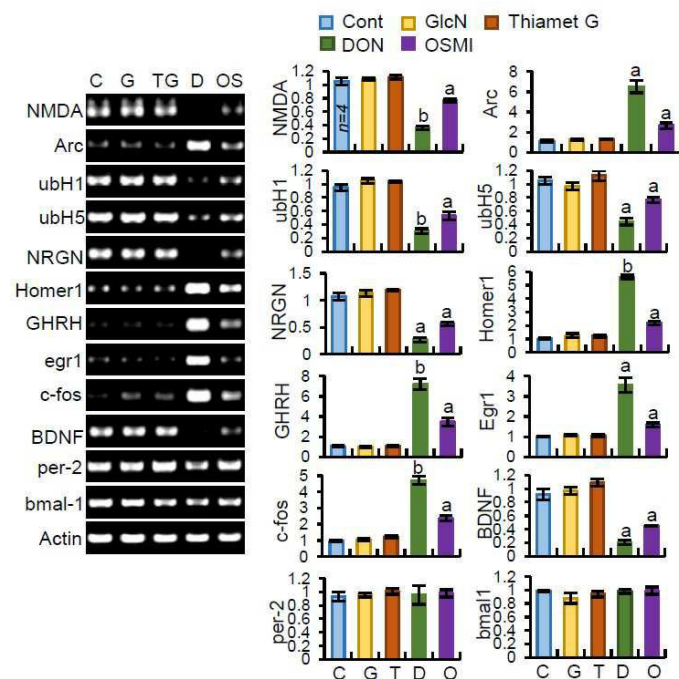
도면6i



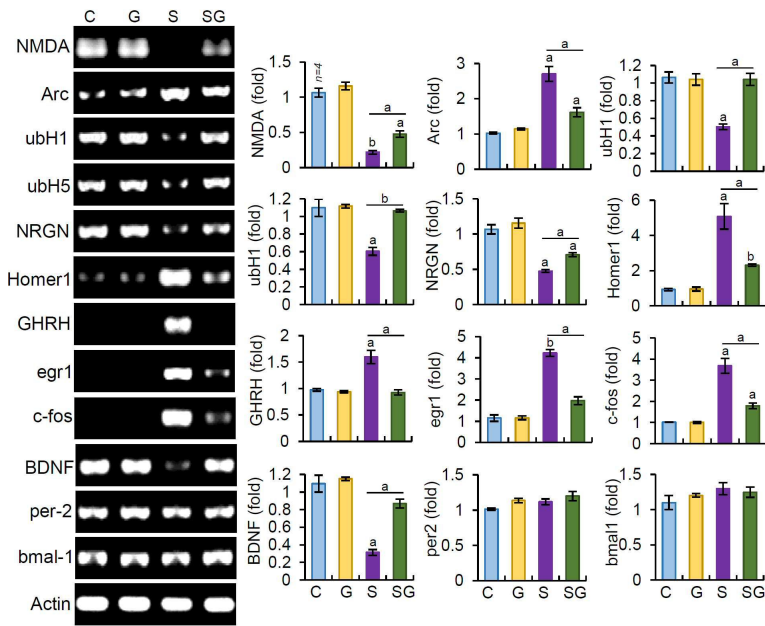
도면6j



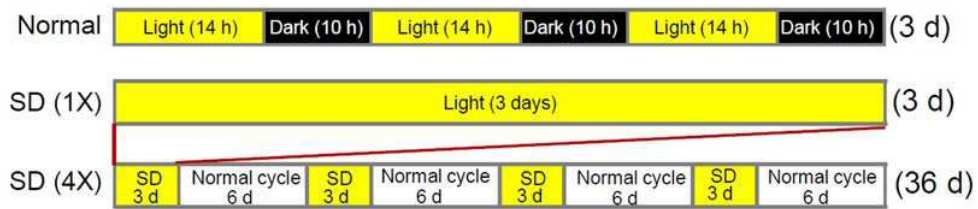
도면6k



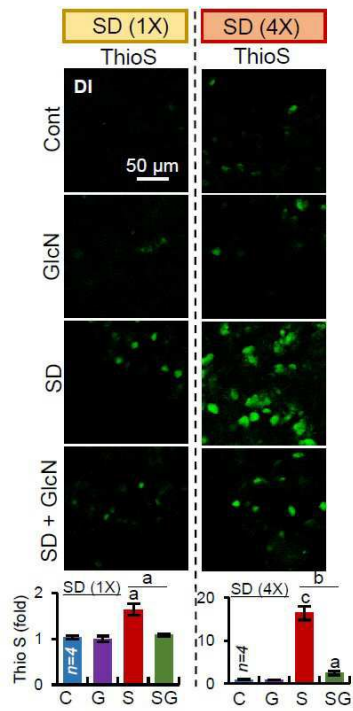
도면61



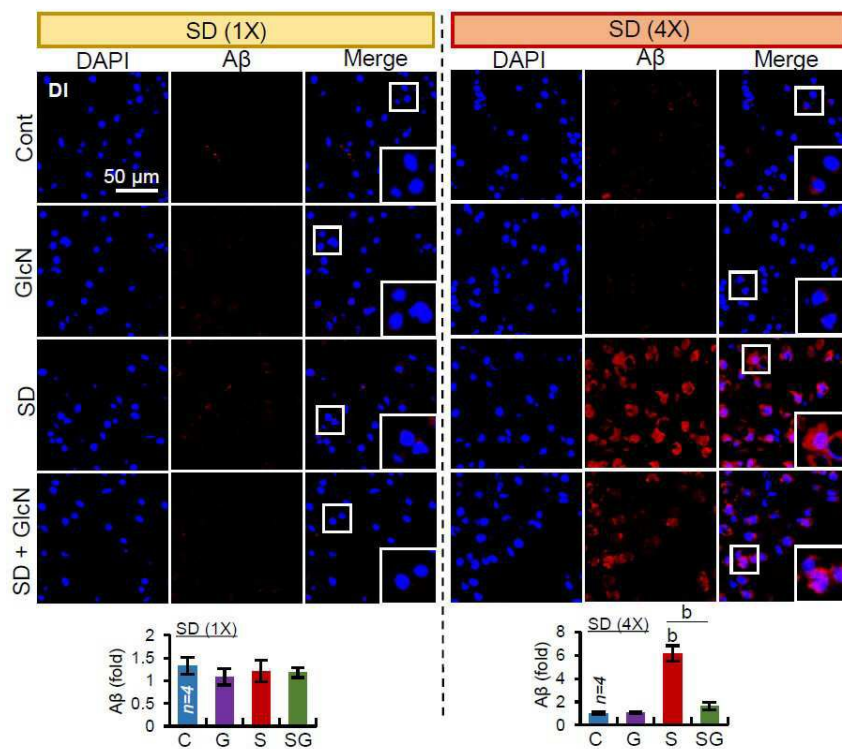
도면7a



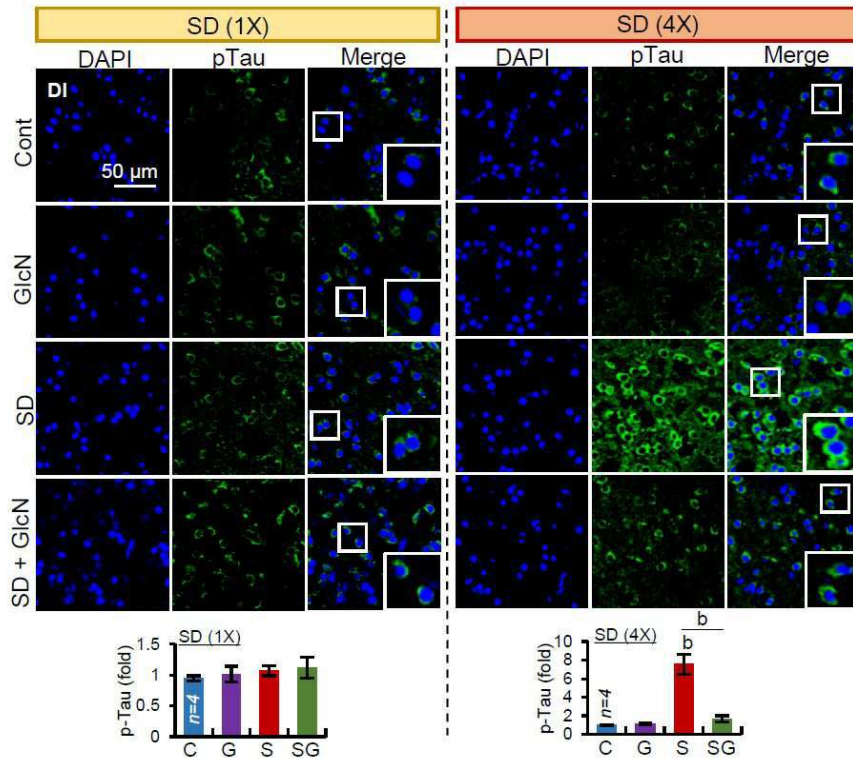
도면7b



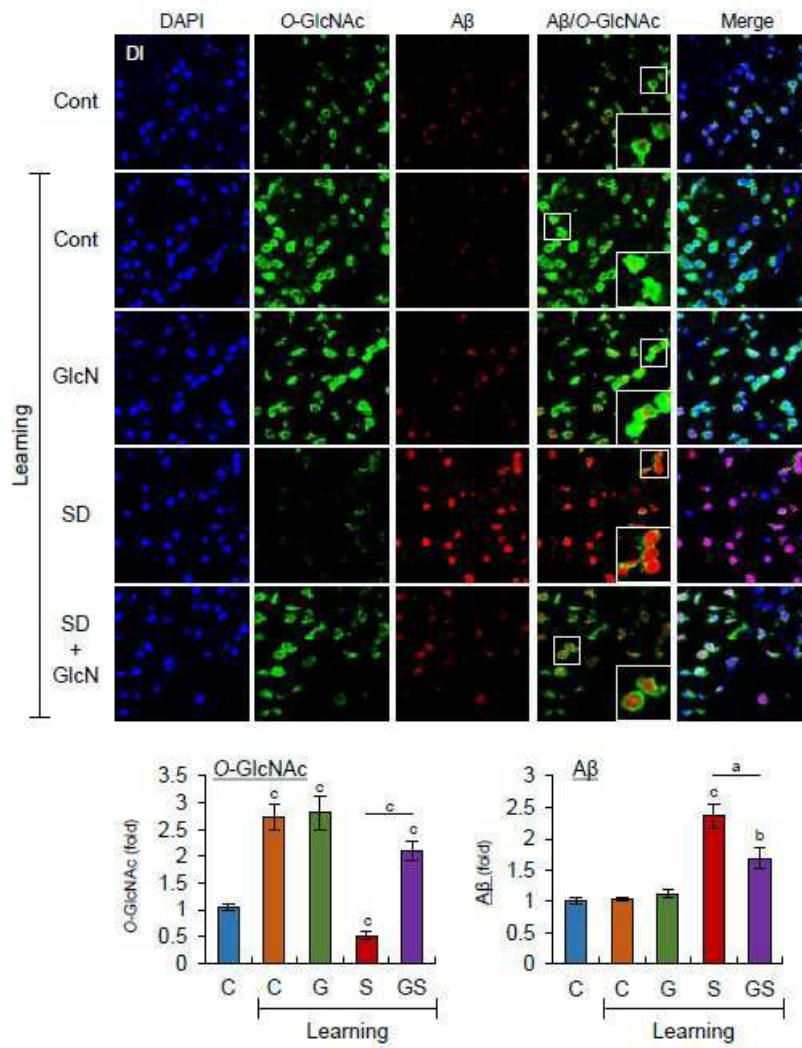
도면7c



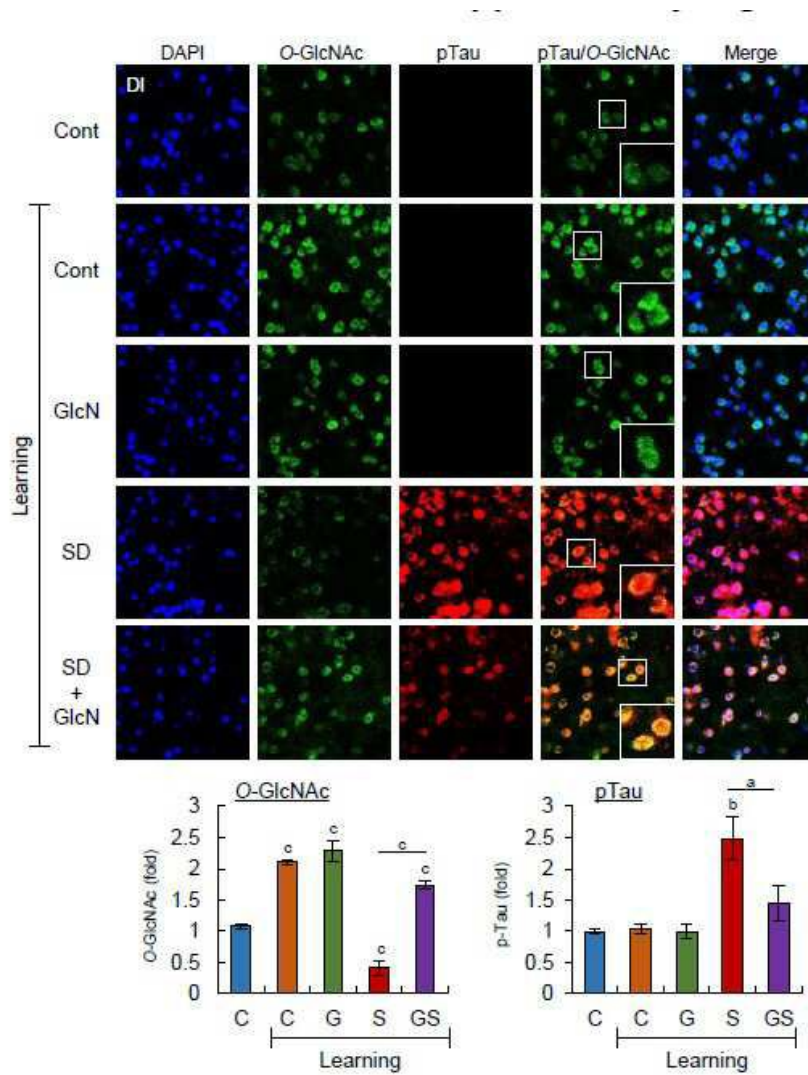
도면7d



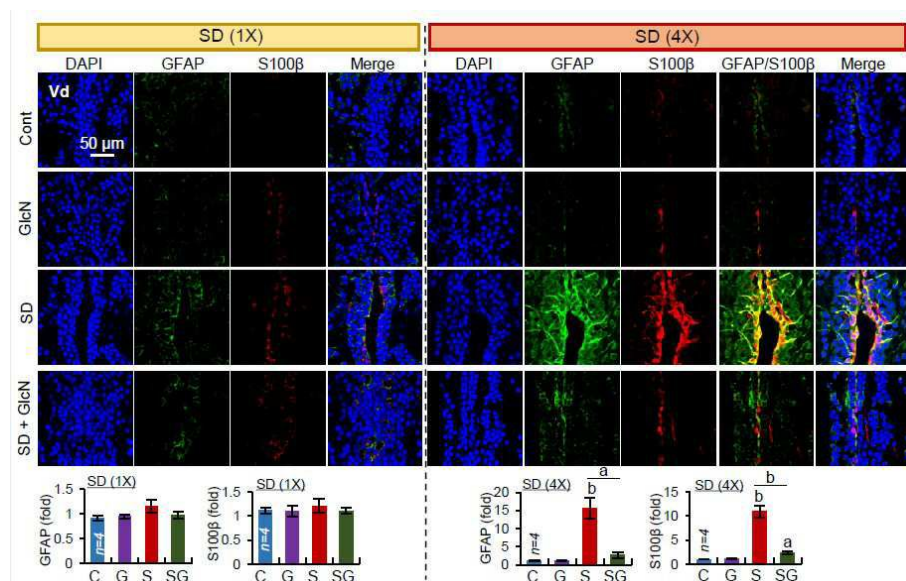
도면7e



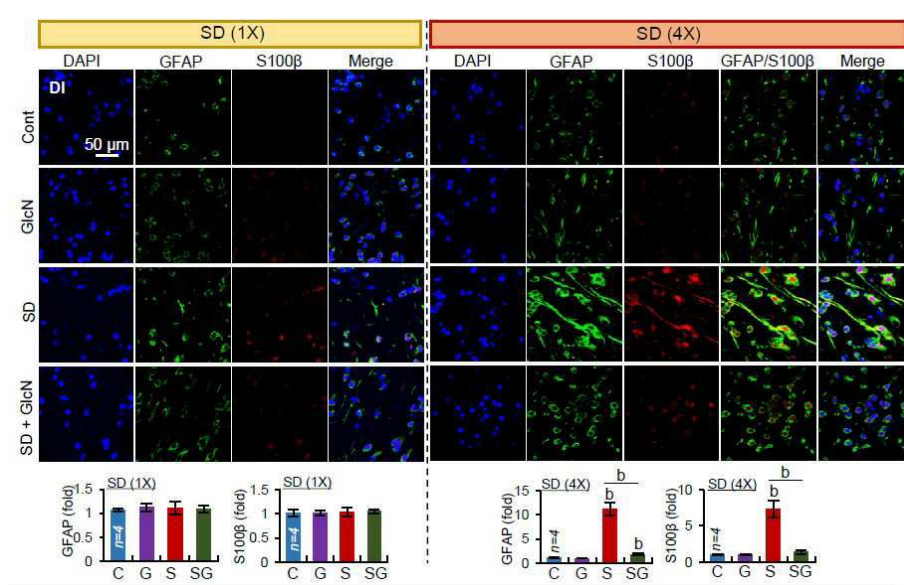
도면7f



도면7g



도면7h



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> A preparation method for animal model of alzheimer's disease and animal model of alzheimer's disease using the same
- <130> PD18-5686
- <160> 86
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> NMDA F
- <400> 1
- tatctggcat tggtagtg
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><
- 223> NMDA R
- <400> 2
- cagactgggtt cccacatagc

20

20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Arc F
 <400> 3
 acaaacaagc cttcgagttc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Arc R
 <400> 4
 tcctttcttct tggagactgc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ubH1 F
 <400> 5
 tagtaacgaa agcacggaca 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ubH1 R
 <400> 6
 tctgctttca tctccactga 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ubH5 F
 <400> 7

tgatgctaaa tcaacggcta	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ubH5 R	
<400> 8	
gagctgatac ttggcgatct	20
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NRGN F	
<400> 9	
atggactgtc gaaacgaagg	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NRGN R	
<400> 10	
accagcttga atcttagcgg	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Homer1 F	
<400> 11	
cttggatgga tcgaaggcaa	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Homer1 R
 <400> 12
 ggctattctg gctgcttctt 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GHRH F
 <400> 13
 cttgctagtg ctatgctgct 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GHRH R
 <400> 14
 agctgttggt aaagatggca 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> egr1 F
 <400> 15
 tcttcctctt ccacgtcttc 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> egr1 R
 <400> 16
 tctggatggg tttctgatct 20
 <210> 17
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c-fos F
 <400> 17
 ctgagtgtct caagtcctc 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c-fos R
 <400> 18
 tggaggtctt tgetccagta 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BDNF F
 <400> 19
 gacactttcg agcaggtcat 20

 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BDNF R
 <400> 20
 gcatacaggt caacgtcctt 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> per-2 F
 <400> 21
 tgtttcagga tgtggatgag 20
 <210> 22

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> per-2 R
 <400> 22
 aggagtctgt ggatctgctc 20

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bmal-1 F
 <400> 23
 gctccacgag agagactcat 20

<210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bmal-1 R
 <400> 24
 tattcagtgg gtttgacacg 20

<210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HK-1 F
 <400> 25
 cgggaaatgg agaacggatt 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HK-1 R
 <400> 26

gtccatgtca gcaaaacagc	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HK-2 F	
<400> 27	
accaattttc gggttctgct	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HK-2 R	
<400> 28	
acaggctcac gacatctttc	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GK F	
<400> 29	
aggctgcaat gcgtgttata	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GK R	
<400> 30	
gatctgcttt ctgtcccctg	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> TK-alpha F	

<400>	31	
tggtgtgcca gagtaaagaa		20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TK-alpha R	
<400>	32	
agattttcag caggtcgttc		20
<210>	33	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PYGB F	
<400>	33	
cccaaagagg ataaacatgg		20
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PYGB R	
<400>	34	
tgacctggat gtcaaagatg		20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GLUT1 F	
<400>	35	
taacgtcca cagaagatca		20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT1 R

<400> 36

gggcaatttc tccaacatac

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT3 F

<400> 37

gctcctcctt cgagatgata

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GLUT3 R

<400> 38

cttccccaca tctcataac

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFKP-alpha F

<400> 39

tatctggcat tggtagtgc

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFKP-alpha R

<400> 40

cagactggtt cccacatagc

20

<210> 41

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKP-beta F
 <400> 41
 aggaacaaaa cgaaccctcc 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKP-beta R
 <400> 42
 cggttgccag atatccaca 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKL-alpha F
 <400> 43
 attcccatgt gcatcatccc 20

 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKL-alpha R
 <400> 44
 gtgctcatga cacttctcgt 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKL-beta F
 <400> 45
 agagcatcgt ggacaacatc 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PFKL-beta R
 <400> 46
 cctcatagat gtacaccgcg 20

<210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6PDH F
 <400> 47
 actgaggagc aaatctaccg 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6PDH R
 <400> 48
 tcaatgcact tcagcacttt 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PKM-alpha F
 <400> 49
 tgcagtctca gagaaggaca 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PKM-alpha R

<400> 50
ccttgttgca acgaccaatc 20

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GFPT-1 F
<400> 51
ctgggaaagc aactccaagt 20

<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GFPT-1 R
<400> 52
acttcaccag ctttagcgatg 20

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GFPT-2 F
<400> 53
gttgctgtag tgatggaggg 20

<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GFPT-2 R
<400> 54
tgcgatccag gaaatcactg 20

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> OGT-1 F

<400> 55

agccattgac acataaccgtc 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGT-1 R

<400> 56

cttgaagctt tccttgctgc 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGT-2 F

<400> 57

gcattgtgct gaatggcatt 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGT-2 R

<400> 58

agagctgggt gaagttgcaa 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OGA F

<400> 59

gcttgaggat gaggaaggtg 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> OGA R
 <400> 60
 agcaccatgt gagccattag 20
 <210> 61
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actin F
 <400> 61
 gtgcccatct acgagggtta 20

 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Actin R
 <400> 62
 tctcagctgt ggtggtgaag 20
 <210> 63
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CRE F
 <400> 63
 cagtcatttg ctacacatgg gcttgg 26
 <210> 64
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CRE R
 <400> 64
 ccaagcccat gtgacgaaat gact 24

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCKD_45_27

<400> 65

Glu Arg Ser Lys Thr Val Thr Ser Phe Tyr Asn Gln Ser

1 5 10

<210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GYS2_1_13

<400> 66

Met Leu Arg Gly Arg Ser Leu Ser Val Thr Ser Leu Gly

1 5 10

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KCNB1_489_501

<400> 67

Lys Trp Thr Lys Arg Thr Leu Ser Glu Thr Ser Ser Ser

1 5 10

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KPB1_1011_1023

<400> 68

Gln Val Glu Phe Arg Arg Leu Ser Ile Ser Ala Glu Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MYBB_513_525

<400> 69

Asp Asn Thr Pro His Thr Pro Thr Pro Phe Lys Asn Ala

1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MYPC3_266_280

<400> 70

Leu Ser Ala Phe Arg Arg Thr Ser Leu Ala Gly Gly Gly

1 5 10

<210> 71

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> KIF2C_105_118_S106G

<400> 71

Glu Gly Leu Arg Ser Arg Ser Thr Arg Met Ser Thr Val Ser

1 5 10

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBL-2_410_422

<400> 72

Lys Glu Asn Ser Pro Cys Val Thr Pro Val Ser Thr Ala

1 5 10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RBL-2_655_667

<400> 73

Gly Leu Gly Arg Ser Ile Thr Ser Pro Thr Thr Leu Tyr

1 5 10

<210> 74

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DHX30_241_262

<400> 74

Gln Phe Pro Leu Pro Lys Asn Leu Leu Ala Lys Val Ile Gln Ile Ala

1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Thr Ala

20

<210> 75

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCOA2_866_888

<400> 75

Ser Gln Ser Thr Phe Asn Asn Pro Arg Pro Gly Gln Leu Gly Arg Leu

1 5 10 15

Leu Pro Asn Gln Asn Leu Pro

20

<210> 76

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCOA3_MOUSE_1029_1051

<400> 76

His Gly Ser Gln Asn Arg Pro Leu Leu Arg Asn Ser Leu Asp Asp Leu

1 5 10 15

Leu Gly Pro Pro Ser Asn Ala

20

<210> 77

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NCOA6_1479_1501

<400> 77

Leu Val Ser Pro Ala Met Arg Glu Ala Pro Thr Ser Leu Ser Gln Leu

1 5 10 15

Leu Asp Asn Ser Gly Ala Arg

20

<210> 78

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRIP1_121_143_P124R

<400> 78

Asp Ser Val Arg Lys Gly Lys Gln Asp Ser Thr Leu Leu Ala Ser Leu

1 5 10 15

Leu Gln Ser Phe Ser Ser Arg

20

<210> 79

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MED1_591_614

<400> 79

His Gly Glu Asp Phe Ser Lys Val Ser Gln Asn Pro Ile Leu Thr Ser

1 5 10 15

Leu Leu Gln Ile Thr Gly Asn Gly

20

<210> 80

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NROB2_9_31_C9S/C11S
 <400> 80
 Ser Pro Ser Gln Gly Ala Ala Ser Arg Pro Ala Ile Leu Tyr Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Ser Leu Lys Ala
 20

<210> 81
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> BRD8_254_276
 <400> 81
 Thr Val Ala Ala Ser Pro Ala Ala Ser Gly Ala Pro Thr Leu Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Ala Gly Pro Thr
 20

<210> 82
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> NRIP1_8_30
 <400> 82
 Gly Ser Asp Val His Gln Asp Ser Ile Val Leu Thr Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Met His Gln Ala Ala
 20

<210> 83
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> NRIP1_253_275_C263S

<400> 83

Pro Ala Thr Ser Pro Lys Pro Ser Val Ala Ser Ser Gln Leu Ala Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Glu Ala His

20

<210> 84

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PRGR_42_64_C64S

<400> 84

Ser Asp Thr Leu Pro Glu Val Ser Ala Ile Pro Ile Ser Leu Asp Gly

1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Arg Pro Ser

20

<210> 85

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCOR_40_62

<400> 85

Thr Thr Ser Pro Thr Ala Ala Thr Thr Gln Asn Pro Val Leu Ser Lys

1 5 10 15

Leu Leu Met Ala Asp Gln Asp

20

<210> 86

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WIPI1_313_335_C318S

<400> 86

Gly Gln Arg Asn Ile Ser Thr Leu Ser Thr Ile Gln Lys Leu Pro Arg

1 5 10 15

Leu Leu Val Ala Ser Ser Ser

20