



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0103258
(43) 공개일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01) *A01K 67/027* (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

A01K 67/0276 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0029917

(22) 출원일자 2017년03월09일

심사청구일자 2017년03월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김현

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

이현우

경기도 구리시 동구릉로 226, 102동 201호(인창동, 구리인창금호어울림)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 21 항

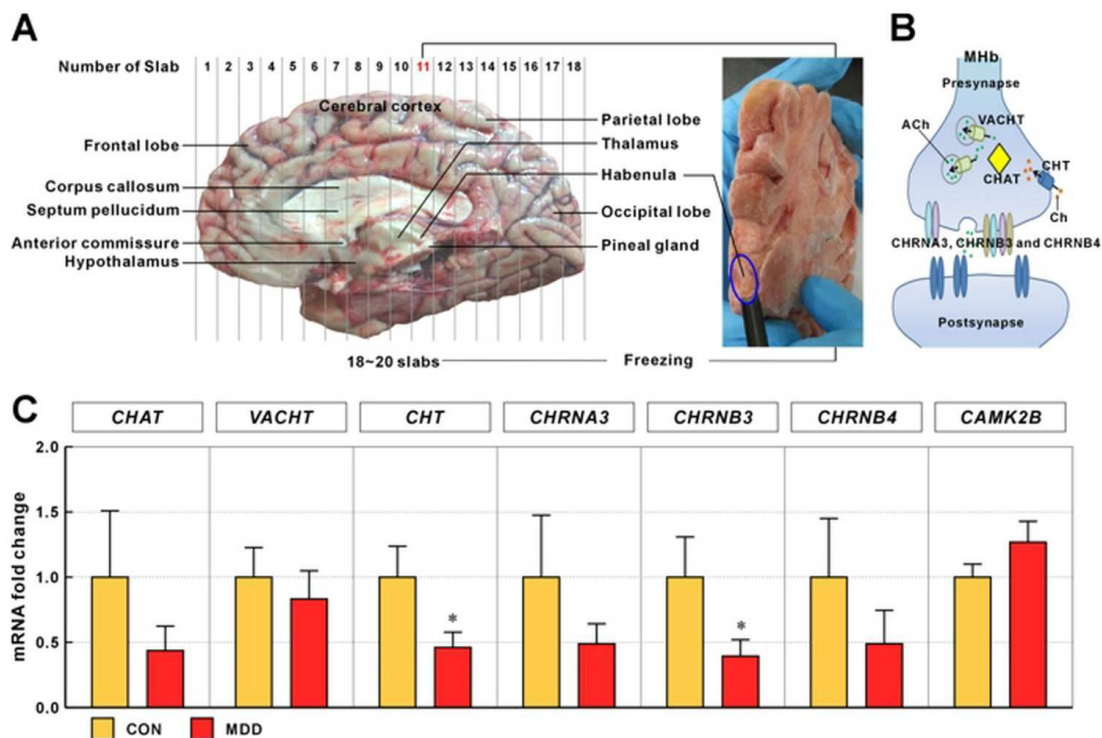
(54) 발명의 명칭 우울증 예방 또는 치료를 위한 콜린성 유전자의 용도

(57) 요약

본 발명은 우울증 예방 또는 치료를 위한 콜린성 유전자의 용도에 관한 것으로, 콜린성 유전자의 발현을 분석함으로써 우울증 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법, 콜린성 유전자의 발현을 조절하는 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 콜린성 유전자의 발현을 분석하는 항우울제 치료불응성 진단 방법, 콜린성 유전자의 발현을

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



조절하는 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델 제조방법 및 이에 따른 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델에 관한 것이다.

본 발명에 따라 콜린성 유전자(Cholinergic genes)의 발현을 변화를 분석함으로써 우울증을 예방 또는 치료하기 위한 약물을 스크리닝할 수 있고, 나아가 우울증을 조기에 진단하거나 예후를 분석할 수 있다.

본 발명에 따른 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 콜린성 유전자의 발현을 조절함으로써 우울증을 예방 또는 치료할 수 있다.

또한, 우울증의 핵심 증상인 무쾌감증을 보이는 동물모델의 개발과 더불어 항우울증에 대한 치료불응성 동물모델을 개발하여 우울증 치료에 있어 난제를 극복하기 위한 다양한 연구에 적용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0356 (2013.01)

C12N 2015/8536 (2013.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/304 (2013.01)

(72) 발명자

김진용

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

양수현

서울특별시 송파구 거마로9길 19, 101동 903호(거여동, 삼호아파트)

양에스더

경기도 의정부시 오목로 72, 404동 1403호(민락동, 송산주공아파트)

최병일

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 *CHT*(choline transporter) 유전자, 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현율의 변화를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 각 유전자의 발현율의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,

상기 단계 (a)의 세포는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자를 포함하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

(a) *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, *CHT*(choline transporter) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현율의 변화를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 각 유전자의 발현율의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,

상기 단계 (a)의 세포는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자를 포함하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

(a) *CHAT*(choline acetyltransferase) 단백질, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 단백질, *CHT*(choline transporter) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 단백질 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;

(b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 단백

질의 발현을 또는 활성의 변화를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 각 단백질의 발현을 또는 활성의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,

상기 단계 (a)의 세포는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포는 CHAT(choline acetyltransferase) 단백질을 포함하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

(a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, 각 CHAT(choline acetyltransferase) 유전자, VACHT(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, CHT(choline transporter) 유전자, CHRNA3(nicotinic acetylcholine receptor α 3) 유전자, CHRNB3(nicotinic acetylcholine receptor β 3) 유전자 또는 CHRNB4(nicotinic acetylcholine receptor β 4) 유전자의 발현율을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 각 CHAT, VACHT, CHT, CHRNA3, CHRNB3 또는 CHRNB4 유전자의 발현율과 비교하는 단계;를 포함하여,

상기 단계 (a)에서 측정한 각 유전자의 발현율이 감소하는 결과를 보이는 경우, 우울증으로 판단하는 우울증 진단 방법.

청구항 8

(a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, 각 CHAT(choline acetyltransferase) 단백질, VACHT(vesicular acetylcholine transporter) 단백질, CHT(choline transporter) 단백질, CHRNA3(nicotinic acetylcholine receptor α 3) 단백질, CHRNB3(nicotinic acetylcholine receptor β 3) 단백질 또는 CHRNB4(nicotinic acetylcholine receptor β 4) 단백질의 발현율 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 각 CHAT, VACHT, CHT, CHRNA3, CHRNB3 또는 CHRNB4 단백질의 발현율 또는 활성과 비교하는 단계;를 포함하여,

상기 단계 (a)에서 측정한 각 단백질의 발현율 또는 활성이 감소하는 결과를 보이는 경우, 우울증으로 판단하는 우울증 진단 방법.

청구항 9

제 7항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 우울증 진단 방법은 생체 외에서 수행하는 것을 특징으로 하는 우울증 진단 방법.

청구항 10

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 CHAT(choline acetyltransferase) 유전자, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 VACHT(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 CHT(choline transporter) 유전자, 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 CHRNA3(nicotinic acetylcholine receptor α 3) 유전자, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 CHRNB3(nicotinic acetylcholine receptor β 3) 유전자 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 CHRNB4(nicotinic acetylcholine receptor β 4) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 대한 RNAi 서열을 유효성분으로 포함하는, 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 CHAT(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는, 우

울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

(a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자의 발현율을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 *CHAT* 유전자의 발현율과 비교하는 단계;를 포함하여,

상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율이 감소하는 결과를 보이는 경우, 항우울제에 대한 치료불응성으로 판단하는 항우울제 치료불응성 진단 방법.

청구항 13

(a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, *CHAT*(choline acetyltransferase) 단백질의 발현율 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 *CHAT* 단백질의 발현율 또는 활성과 비교하는 단계;를 포함하여,

상기 단계 (a)에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성이 감소하는 결과를 보이는 경우, 항우울제에 대한 치료불응성으로 판단하는 항우울제 치료불응성 진단 방법.

청구항 14

제 12항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항우울제 치료불응성 진단 방법은 생체 외에서 수행하는 것을 특징으로 하는 항우울제 치료불응성 진단 방법.

청구항 15

제 12항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항우울제는 세로토닌 흡수 억제제인 것을 특징으로 하는 항우울제 치료불응성 진단 방법.

청구항 16

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 발현하는 재조합 바이러스 벡터를 제작하는 단계; 및

인간을 제외한 정상 포유동물의 뇌 내 고삐핵(Habenula)에 상기 재조합 바이러스 벡터를 주입하여 *CHAT* 유전자를 녹다운(knock-down)시키는 단계;를 포함하는 항우울제 치료불응성 동물모델 제조방법.

청구항 17

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 발현하는 재조합 바이러스 벡터를 제작하는 단계; 및

인간을 제외한 정상 포유동물의 뇌 내 고삐핵(Habenula)에 상기 재조합 바이러스 벡터를 주입하여 *CHAT* 유전자를 녹다운(knock-down)시키는 단계;를 포함하는 무쾌감증 동물모델 제조방법.

청구항 18

제 16항 또는 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 도 3A에 기재된 개열지도를 갖는 벡터인 AAV-*CHAT* shRNA인 것을 특징으로 하는 동물모델 제조방법.

청구항 19

제 16항 또는 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간을 제외한 정상 포유동물은 마우스 또는 랫트인 것을 특징으로 하는 동물모델 제조방법.

청구항 20

제 16항의 방법에 따라 제조된 항우울제 치료불응성 동물모델.

청구항 21

제 17항의 방법에 따라 제조된 무쾌감증 동물모델.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 우울증 예방 또는 치료를 위한 콜린성 유전자의 용도에 관한 것으로, 콜린성 유전자의 발현을 분석함으로써 우울증 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법, 콜린성 유전자의 발현을 조절하는 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 콜린성 유전자의 발현을 분석하는 항우울제 치료불응성 진단 방법, 콜린성 유전자의 발현을 조절하는 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델 제조방법 및 이에 따른 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주요 우울 장애(Major depressive disorder, MDD) 또는 우울증(depression)은 자살 시도와 밀접한 관련이 있는 심각한 정신의학적 질환이다(비특허문헌 1). 뇌에서 일어나는 콜린성 전도(Cholinergic transmission)가 우울증에 대한 내적표현형(Endophenotype)의 기반이 되는 것으로 생각되어 왔다(비특허문헌 2-4). 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 억제제의 조절을 통한 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)의 증가는 인간과 설치류 모두에서 우울증 증상을 야기할 수 있다(비특허문헌 5-6). 더욱이, 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs) 또는 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptors, mAChRs)의 억제는 우울증 증상을 개선한다(비특허문헌 7-8). 이러한 증거들은 아세틸콜린 신호전달이 우울증에 기여하는 것을 시사하나, 어떠한 특정 콜린성 신경 세포의 집단이 특정 우울증 증상과 관련이 있는지는 아직 명확하게 알려진 바가 없다.

[0003] 시상상부(Epithalamus)의 고삐핵(Habenula)은 해부학적 또는 기능적으로 전뇌(forebrain)와 도파민(즉, 흑색질 치밀부(substantia nigra pars compacta) 및 복측피개영역(ventral tegmental area, VTA) 및 세로토닌(즉, 솔기핵)의 방출과 관련이 있는 중뇌(midbrain)를 연결하고 있다(비특허문헌 9-10). 고삐핵은 내측 고삐핵(medial habenula, MHb)과 외측 고삐핵(lateral habenula, LHb)으로 세분할 수 있다. 동물모델과 인간을 대상으로 한 연구로부터의 다양한 증거들은 내측 고삐핵이 니코틴 중독에서 중요한 역할을 하는 것을 시사하는 한편(비특허문헌 11-13), 외측 고삐핵의 조절 장애는 우울증을 포함한 다양한 정신 질환에 관여할 가능성이 있음을 제시한다. 외측 고삐핵의 뇌 심부 자극술은 환자에서 치료-난치성(therapy-refractory) 우울증과 랫트에서 선천적으로 습득된 무기력을 현저히 경감시킨다(비특허문헌 14-15). 그러나, 우울증의 병리 생리학적 측면에 있어, 내측 고삐핵의 역할은 아직까지 불분명하다.

[0004] 이에, 본 발명자들은 우울증 환자에서 내측 고삐핵 내 콜린성 유전자군이 감소하는 것을 확인하고, 인간 및 랫트의 우울증 모델로부터 내측 고삐핵의 콜린성 신호전달이 우울증적 상태, 특히 무쾌감적 행동을 조절하는 데에 있어 중요함을 밝혀 이를 이용한 우울증 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝에 이용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Ferrari AJ., et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. PLoS Med. 2013;10(11):e1001547.
- (비특허문헌 0002) Dilsaver SC. Cholinergic mechanisms in depression. Brain Res. 1986;396(3):285-316.
- (비특허문헌 0003) Janowsky DS., et al. A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. Lancet. 1972;2(7778):632-5.
- (비특허문헌 0004) Janowsky DS., et al. Adrenergic-cholinergic balance and the treatment of affective

disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1983;7(2-3):297-307.

(비특허문헌 0005) Risch SC., et al. Mood and behavioral effects of physostigmine on humans are accompanied by elevations in plasma beta-endorphin and cortisol. Science. 1980;209(4464):1545-6.

(비특허문헌 0006) Mineur YS., et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(9):3573-8.

(비특허문헌 0007) Shytle RD., et al. Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. Mol Psychiatry. 2002;7(6):525-35.

(비특허문헌 0008) Drevets WC., et al. Antidepressant effects of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine: a review. Biol Psychiatry. 2013;73(12):1156-63.

(비특허문헌 0009) Klemm WR. Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. Med Sci Monit. 2004;10(11):RA261-73.

(비특허문헌 0010) Lecourtier L., et al. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. Neurosci Biobehav Rev. 2007;31:658-72.

(비특허문헌 0011) Hsu YW., et al. Medial habenula output circuit mediated by alpha5 nicotinic receptor-expressing GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus. J Neurosci. 2013;33(46):18022-35.

(비특허문헌 0012) Zhao-Shea R., et al, Tapper AR. Activation of GABAergic neurons in the interpeduncular nucleus triggers physical nicotine withdrawal symptoms. Curr Biol. 2013;23(23):2327-35.

(비특허문헌 0013) Dao DQ., et al. Nicotine enhances excitability of medial habenular neurons via facilitation of neurokinin signaling. J Neurosci. 2014;34(12):4273-84.

(비특허문헌 0014) Sartorius A., et al. Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. Med Hypotheses. 2007;69:1305-8.

(비특허문헌 0015) Li B., et al. Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. Nature. 2011;470(7335):535-9.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 목적은 생체 외에서 이루어지는 우울증 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 목적은 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 목적은 생체 외에서 이루어지는 항우울제 치료불응성 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 목적은 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 따른 항우울제 치료불응성 또는 무쾌감증 동물모델을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 (a) 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 *CHT*(choline transporter) 유전자, 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic

acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;

- [0013] (b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현율의 변화를 측정하는 단계; 및
- [0014] (c) 상기 각 유전자의 발현율의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,
- [0015] 상기 단계 (a)의 세포는 고배핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0016] 용어 "약물 후보물질"이란, 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 양 또는 활성에 영향을 미칠 가능성이 있다고 판단되는 미지의 물질로서, 본 발명에서는 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자 또는 단백질의 발현량 또는 활성에 영향을 미칠 가능성이 있는 미지의 물질을 의미한다. 상기 약물 후보물질은 siRNA(small interference RNA), 안티센스 RNA(antisense RNA), 뉴클레오타이드(nucleotide), 화학적으로 합성된 물질, 천연물 추출물을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0017] 용어 "고배핵(Habenula)"이란, 대뇌 변연계의 신경 회로에서 신경 신호 전달을 중계하는 기능을 하는 부분으로, 내측 고배핵(medial habenula, MHb)과 외측 고배핵(lateral habenula, LHb)으로 세분할 수 있다.
- [0018] 상기 단계 (a)의 세포는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자를 포함하는 세포일 수 있다.
- [0019] 상기 (b) 단계에서 유전자 발현율의 변화는 DNA 마이크로어레이 또는 cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응뿐만 아니라 해당 유전자의 전사로 인해 생성된 mRNA 발현율, 양 또는 패턴을 확인하는 통상적인 생화학적 분석방법으로 검출될 수 있다. 이러한 mRNA의 발현율, 양 또는 패턴을 확인하기 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, qRT-PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction), 경쟁적 RT-PCR (Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RNase protection assay), 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응, 또는 노던 블로팅(Northern Blotting) 등이 있으며, 그 외에도 당업계에서 통상적으로 수행되는 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다. 일례로, RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 단일가닥 cDNA를 제조한다. 이어, 단일가닥 cDNA를 주형으로 이용하고, 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 실시간 정량 PCR 반응(real time quantitative PCR)을 실시함으로써 유전자 발현량의 변화를 측정한다. 실시간 PCR에 대한 결과는 절대정량 표준 곡선법(Absolute Quantification standard curve method)에 따라 분석한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에서는 mRNA 발현율의 변화를 qRT-PCR 또는 인 시투(*in situ*) 혼성화 반응을 이용하여 측정하였으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 제제는 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현수준 확인에 사용될 수 있는 분자로 구성되며, 바람직하게는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0023] 용어 "프로브"란, mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 라벨링되어 있어 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 이러한 핵산 서열은 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클

레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0025] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 유전자 외에도 상기 염기서열들의 변이체를 비롯하여, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열로부터 번역되는 아미노산 서열 및 이로부터 구성되는 단백질이 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 본다. 변이체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열로 이루어진 유전자이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 유전자는 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열과 80% 이상, 바람직하게는 84% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 아미노산 서열은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열로부터 번역되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 본 발명에 따른 단백질은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열로부터 번역된 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 (a) *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, *CHT*(choline transporter) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;
- [0027] (b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현율의 변화를 측정하는 단계; 및
- [0028] (c) 상기 각 유전자의 발현율의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,
- [0029] 상기 단계 (a)의 세포는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 (a) 단계의 세포는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자를 포함하는 세포일 수 있다.
- [0031] 본 발명은 (a) *CHAT*(choline acetyltransferase) 단백질, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 단백질, *CHT*(choline transporter) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 단백질 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 세포에 분석할 약물 후보물질을 접촉시키는 단계;
- [0032] (b) 약물 후보물질 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 단백질의 발현율 또는 활성의 변화를 측정하는 단계; 및
- [0033] (c) 상기 각 단백질의 발현율 또는 활성의 변화가 확인되는 경우, 상기 약물 후보물질이 우울증의 예방 또는 치료제임을 판별하는 단계;
- [0034] 를 포함하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법으로,
- [0035] 상기 단계 (a)의 세포는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래하는 세포인 것을 특징으로 하는 우울증의 예방 또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 단계 (a)의 세포는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 단백질을 포함하는 세포일 수 있다.
- [0037] 상기 (b) 단계에서 단백질 발현율 또는 활성의 변화는 항체를 이용하여 단백질의 존재량이나 활성형 또는 비활성형을 나타내는 단백질의 존재량을 측정하는 것일 수 있으며, 구체적으로는, 웨스턴 블로팅, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석 (Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테를로니 (Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓 면역 전기영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩 (protein chip) 등이 있고, 그 외에도 당업계에서 통상적으로 수행되는 어떠한 방법이라도 사용될 수 있다. 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법 등을 실시하는 경우에는 방사능동위원소(예: C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체를 사용할 수 있다.

- [0038] 본 발명의 일실시예에서는 단백질 발현율의 변화를 웨스턴 블로팅을 이용하여 측정하였으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 용어 "항체"란, 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미하며, 상기 단백질에 대한 모노클로날 항체는 당업계에서 통상적인 모노클로날 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클로날 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클로날 항체를 사용할 수도 있고, 이는 당업계에서 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다.
- [0040] 본 발명은 (a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, 각 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, *CHT*(choline transporter) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자의 발현율을 측정하는 단계; 및
- [0041] (b) 상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자의 발현율과 비교하는 단계;를 포함하여, 상기 단계 (a)에서 측정한 각 유전자의 발현율이 감소하는 결과를 보이는 경우, 우울증으로 판단하는 우울증 진단 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명은 (a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, 각 *CHAT*(choline acetyltransferase) 단백질, *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 단백질, *CHT*(choline transporter) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 단백질, *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 단백질 또는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 단백질의 발현율 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [0043] (b) 상기 (a)단계에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 각 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 단백질의 발현율 또는 활성과 비교하는 단계;를 포함하여, 상기 단계 (a)에서 측정한 각 단백질의 발현율 또는 활성이 감소하는 결과를 보이는 경우, 우울증으로 판단하는 우울증 진단 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 우울증 진단 방법은 생체 외에서 수행하는 것일 수 있다.
- [0045] 용어 "정신질환적 증상이 없는"은 사고·감정·행동 등에 영향을 미치는 병적인 정신상태의 증상, 보다 구체적으로, 정신병, 신경병 및 그 밖의 인격장애를 포함하는 정신질환과 관련된 증상이 나타나지 않는 것을 의미한다.
- [0046] 용어 "진단"은 우울증으로 진단받은 대상에 약물(또는 약물 후보물질)과 같은 우울증 예방 또는 치료제를 투여한 후 이에 대한 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 상기 대상이 우울증을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것(예: 우울증 증상의 완화를 확인하는 것), 상기 대상의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예: 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0047] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter) 유전자, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 *CHT*(choline transporter) 유전자, 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$) 유전자, 서열번호 9 또는 서열번호 10으로 표시되는 *CHRNA3*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 3$) 유전자 또는 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 *CHRNA4*(nicotinic acetylcholine receptor $\beta 4$) 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 대한 RNAi 서열을 유효성분으로 포함하는, 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0048] 상기 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 *CHAT*(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0049] 용어 "RNAi"는 RNA 간섭(RNA inteference)의 약어이고, 이중나선 RNA(dsRNA로도 불림)과 같은 RNAi를 유발하는 작용제가 세포 내로 도입시 이에 대해 상동적인 mRNA가 특이적으로 분해되어 유전자 생성물의 합성이 억제되는 현상을 나타낸다. 여기에 사용된 RNAi는 RNAi를 유발하는 작용제와 동일한 의미를 지닌다.
- [0050] 상기 RNAi는 짧은 이중가닥 RNA가 자신의 염기서열에 해당하는 표적 mRNA를 선택적으로 분해하여 표적 유전자의 전사와 단백질 합성을 중단시키는 과정이며, 이러한 RNAi 현상을 특이적으로 유도하는데 사용되는 siRNA(small interfering RNA)을 제조하기 위한 방법은, in vitro에서 siRNA를 직접 합성한 후 트랜스펙션(transfection)을

통해 세포 안으로 도입시키는 방법 및 세포 내에서 siRNA를 발현할 수 있도록 제작된 shRNA(short hairpin RNA) 발현백터를 활용하는 방법이 있다. 발현백터를 활용하는 방법을 이용하여 shRNA 발현백터를 형질전환을 통해 세포 내에서 발현시키면 프로모터로부터 표적 염기서열의 센스(sense) 및 안티센스(anti-sense) 서열이 링커(linker)를 사이에 두고 위치하며 발현되게 되고, 이를 통해 루프(loop)가 있는 작은 헤어핀(small hairpin) 구조의 shRNA가 합성된다. 이렇게 합성된 shRNA는 세포 안에 존재하는 다이서(Dicer)라는 RNase III 효소에 의해 분해되어 정확한 구조를 갖는 약 21 내지 23개의 뉴클레오타이드의 siRNA로 전환되고, RISC(RNA-induced Silencing Complex)라는 단백질 복합체와 결합하여 표적 mRNA를 분해시키는 것은 통상의 기술자에게 자명하다. 이와 같이, siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 효율적인 유전자 녹다운 방법, 유전자 사일렌싱(silencing) 방법, 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.

[0051] 보다 구체적으로, shRNA(small hairpin RNA)는 표적 유전자 siRNA 염기서열의 센스(sense)와 상보적인 넌센스(nonsense) 사이에 3 ~ 10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나, 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 또는 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시킬 수 있으며, siRNA에 비해 RNA 간섭 효과가 비교적 길다.

[0052] 용어 "벡터"란 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 보유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, MackPublishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0055] 본 발명의 약학적 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구 내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 예를 들면, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여 시, 본 발명에 따른 RNAi의 경우 0.01 ng/kg ~ 10 g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0057] 본 발명의 일실시예에서, 본 발명에 따른 *CHAT* 유전자를 녹다운시킬 수 있는 RANi는 AAV-*CHAT* shRNA로 명명되며, 도 3A 위와 같이 아데노바이러스 벡터인 AAV2/9(adeno-associated virus 2/9)를 기반으로 EGFP를 발현하는 PGK 프로모터 및 shRNA를 발현하는 U6 프로모터를 포함하여 제작하였다.

[0058] 또한, 본 발명의 일실시예에서는 동물모델을 확립하였다. 본 발명의 일실시예에서 제작한 RANi인 AAV-*CHAT* shRNA가 주입되어 *CHAT* 유전자가 녹다운된 랫트를 대상으로 우울증 관련 동물 행동 실험을 수행하였다. 특히, 이와 같이 *CHAT* 유전자가 녹다운된 랫트에서 *CHAT* 외의 *VACHT* 단백질 발현은 정상적으로 이루어져 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 또는 *CHRNA4* 유전자 또는 단백질의 발현 억제/녹다운에 따른 변화를 개별적으로 모니터링하는 것이 가능하다.

- [0059] 본 발명은 (a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, CHAT(choline acetyltransferase) 유전자의 발현율을 측정하는 단계; 및
- [0060] (b) 상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 CHAT 유전자의 발현율과 비교하는 단계;를 포함하여,
- [0061] 상기 단계 (a)에서 측정한 유전자의 발현율이 감소하는 결과를 보이는 경우, 항우울제에 대한 치료불응성으로 판단하는 항우울제 치료불응성 진단 방법을 제공한다.
- [0062] 본 발명은 (a) 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해, CHAT(choline acetyltransferase) 단백질의 발현율 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- [0063] (b) 상기 (a)단계에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성을, 정신질환적 증상이 없는 고삐핵(Habenula)으로부터 유래한 세포에 대해 측정한 CHAT 단백질의 발현율 또는 활성과 비교하는 단계;를 포함하여,
- [0064] 상기 단계 (a)에서 측정한 단백질의 발현율 또는 활성이 감소하는 결과를 보이는 경우, 항우울제에 대한 치료불응성으로 판단하는 항우울제 치료불응성 진단 방법을 제공한다.
- [0065] 용어 "치료불응성"은 치료제로 기능하는 약물 투여 시 질환의 증상이 호전되지 않는 성질을 의미하며, 본 발명에서는 항우울제(우울증 치료제)에 대하여 무쾌감증 등을 포함하는 우울증의 증상이 호전되지 않는 성질을 의미한다.
- [0066] 상기 항우울제는 세로토닌 흡수 억제제인 것일 수 있으며, 바람직하게는 플루옥세틴(Fluoxetine), 시탈로프람(citalopram), 다폭세틴(Dapoxetine), 에스시탈로프람(escitalopram), 플루복사민(flvoxamine), 파록세틴(Paroxetine), 설프랄린 (sertraline) 또는 지멜리딘(Zimelidine)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있고, 보다 바람직하게는 플루옥세틴인 것일 수 있으나, 이로 한정되지 않는다.
- [0067] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 CHAT(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 발현하는 재조합 바이러스 벡터를 제작하는 단계; 및
- [0068] 인간을 제외한 정상 포유동물의 뇌 내 고삐핵(Habenula)에 상기 재조합 바이러스 벡터를 주입하여 CHAT 유전자를 녹다운(knock-down)시키는 단계;를 포함하는 항우울제 치료불응성 동물모델 제조방법을 제공한다.
- [0069] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 CHAT(choline acetyltransferase) 유전자에 대한 RNAi 서열을 발현하는 재조합 바이러스 벡터를 제작하는 단계; 및
- [0070] 인간을 제외한 정상 포유동물의 뇌 내 고삐핵(Habenula)에 상기 재조합 바이러스 벡터를 주입하여 CHAT 유전자를 녹다운(knock-down)시키는 단계;를 포함하는 무쾌감증 동물모델 제조방법을 제공한다.
- [0071] 상기 재조합 바이러스 벡터는 도 3A에 기재된 개열지도를 갖는 벡터인 AAV-CHAT shRNA인 것일 수 있다.
- [0072] 상기 인간을 제외한 정상 포유동물은 마우스 또는 랫트인 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 항우울제 치료불응성 동물모델을 제공한다.
- [0074] 또한, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 무쾌감증 동물모델을 제공한다.

발명의 효과

- [0075] 본 발명에 따라 콜린성 유전자(Cholinergic genes)의 발현율 변화를 분석함으로써 우울증을 예방 또는 치료하기 위한 약물을 스크리닝할 수 있고, 나아가 우울증을 조기에 진단하거나 예후를 분석할 수 있다.
- [0076] 본 발명에 따른 우울증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 콜린성 유전자의 발현을 조절함으로써 우울증을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0077] 또한, 우울증의 핵심 증상인 무쾌감증을 보이는 동물모델의 개발과 더불어 항우울증에 대한 치료불응성 동물모델을 개발하여 우울증 치료에 있어 난제를 극복하기 위한 다양한 연구에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0078] 도 1은 자살한 우울증 환자로부터 수득한 고삐핵 조직에서 6종의 콜린성 유전자의 발현을 나타낸 도이다. A는 인간 고삐핵 시료의 분리를 나타낸 도이다. 고삐핵은 뇌의 송과샘(pineal gland)에 인접해 있으며 11번째 평판

(slab)에 존재한다(slab 1, 전두엽(frontal lobe); slab 18, 후두엽(occipital lobe)).; B는 일반적인 콜린성 시냅스의 개략도로, Ca^{2+} -자극성 도킹(docking), 융합 및 콜린성 전시냅스 신경 말단 막(cholinergic presynaptic nerve terminal membrane)에서의 분열을 통해 일어나는 ACh(acetylcholine) 신경전달(neurotransmission)을 나타낸다.; C는 6종의 콜린성 유전자인 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 및 *CHRNA4*의 mRNA 발현을 나타낸 도이다. *CAMK2B*는 대조구이다. 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM(CON, 대조구, n = 11; MDD, n = 12 subjects; * P < 0.05, Mann-Whitney U -test).

도 2는 랫트의 고삐핵에서 콜린성 유전자의 발현에 대한 만성 구속 스트레스(CRS)의 영향을 나타낸 도이다. A는 스트레스 실험 및 조직 시료 추출의 단계를 나타내는 개략도이다.; B는 스트레스 실험 기간 동안의 체중 변화를 나타낸 도이다. CRS는 Day 8부터 가해졌다. NS, non-stressed, n = 4; CRS, n = 4.; C 및 D는 CRS로 인해 혈장 코르티코스테론의 수준이 증가하고 부신이 비대해진 것을 나타낸 도이다. 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM. * P < 0.05, ** P < 0.01, Student's t -test.; E 및 F는 CRS에 노출된 랫트가 우울증적 행동을 하는 것을 나타낸 도이다(자당 선호 실험(SPT)에서의 무쾌감증, 강제 수영 실험(FST)에서의 정적인 태도). 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM. NS, n = 20; CRS, n = 20 rats, ** P < 0.01, Mann-Whitney U -test.; G는 CRS에 노출된 랫트의 고삐핵에서 6종의 콜린성 유전자인 *CHAT*, *VACHT*, *CHT*, *CHRNA3*, *CHRNA3* 및 *CHRNA4*의 mRNA 발현을 나타낸 도이다. *CAMK2B*는 대조구이다. 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM. NS, n = 4; CRS, n = 4; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, Mann-Whitney U -test.; H는 CRS에 노출된 랫트의 뇌 조직을 6종의 콜린성 유전자 및 *CAMK2B*에 대한 프로브와 혼성화하여 나타낸 도이다. 프로브는 붉은색, 뇌 조직은 푸른색(Hoechst)으로 대비 염색하였다. 삽입된 상자는 원본 이미지를 확대하여 나타낸 이미지이다. 스케일 바는 50 μ m; inset, 5 μ m.

도 3은 우울증적 행동에 대한 내측 고삐핵(MHb) 내 *CHAT* 녹다운(Knock-down)의 영향을 나타낸 도이다. A 위는 *CHAT* 녹다운을 유도할 수 있도록 설계한 AAV 벡터(AAV-*CHAT* shRNA 또는 AAV-sh-*CHAT*)의 모식도이며, A 아래는 바이러스에 감염된 랫트의 행동 실험을 위한 실험 패러다임을 나타낸 개략도이다. B는 AAV-sh-SCR(대조구) 또는 AAV-sh-*CHAT*(*CHAT* 녹다운)가 주입된 랫트 유래 고삐핵 조직의 현미경 사진이다. *CHAT* 단백질 발현은 붉은색 면역형광, 세포 핵은 푸른색(Hoechst), 바이러스 감염은 초록색(GFP)로 나타났다. 삽입된 상자는 감염된 내측 고삐핵 부분을 확대하여 나타낸 이미지이다. 스케일 바는 50 μ m; C는 *VACHT* 발현이 AAV-sh-*CHAT*에 의해 영향받지 않음을 나타낸 도이다. AAV-sh-*CHAT*가 주입된 고삐핵 신경들은 *VACHT*(붉은색) 및 EGFP(초록색)으로 면역염색되었다. 스케일 바는 50 μ m; D 및 E는 AAV-sh-SCR(대조구) 또는 AAV-sh-*CHAT*가 주입된 랫트의 고삐핵 유래 *CHAT* 및 *VACHT*의 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸 도이다. 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM(sh-SCR, n = 4 rats; sh-*CHAT*, n = 4; * P < 0.05, Student's t -test).

도 4는 내측 고삐핵(MHb) 내 *CHAT* 녹다운 동물모델에서 항우울제 치료불응성을 나타낸 도이다. A는 *CHAT* 녹다운 동물모델에서 항우울제 치료불응성을 실험하기 위한 패러다임을 나타낸 개략도이다. B는 *CHAT* 녹다운 동물모델의 자당 선호 실험에서의 자당 선호도, C는 자당 선호 실험에서의 총 용액 섭취량, D는 강제 수영 실험(FST)에서의 부동 시간이다. 그래프 내 데이터는 평균 $\pm$ SEM(sh-SCR + Sal, AAV-sh-SCR + 식염수, n = 9 쥐, sh-*CHAT* + Flx, AAV-sh-*CHAT* + fluoxetine, n = 15, ** P < 0.01, Student's t -테스트).

도 5는 고삐핵 신경세포 활성화가 복측외개영역 도파민 신경세포에 미치는 영향을 나타낸 도이다. A는 Cre-dependent hM3Dq 바이러스(AAV-hM3Dq-mCherry)를 *CHAT*-cre 마우스에 주입하는 것을 나타낸 모식도이다. B는 mCherry 융합 hM3Dq 단백질은 *CHAT* 양성 고삐핵 콜린성 뉴런에서 발현된 것을 나타낸 도이다. C-D는 hM3Dq-mCherry(적색)를 발현하는 고삐핵 콜린성 뉴런에서 c-Fos 발현(녹색)이 유도된 것을 나타낸 도이다. E-H는 CNO 투여에 따라 TH-양성 세포(즉, 도파민 뉴런; 백색) 또는 TH-음성 세포에서 c-Fos 면역 반응성(녹색)을 나타낸 도이다. 노란색 화살표 머리는 TH- 양성 및 c-Fos 양성 세포를 나타낸다. I는 CNO 주사 DREADD 마우스에서, 도파민 뉴런(2 마리의 마우스로부터 세포 n = 49)의 64.5 % 및 비도파민 세포의 35.5 %가 c-Fos 양성임을 나타낸 도이다. 대조적으로, 식염수 주입 DREADD 마우스, 도파민 뉴런 (n = 10 세포 2 마리) 및 비 도파민 세포의 88.9 %는 c-Fos 양성이었다. 스케일 바는 B-F, 100 μ m; G 및 H, 10 μ m.

도 6은 고삐핵 신경세포 활성화가 술기핵 세로토닌 신경세포에 미치는 영향을 나타낸 도이다. A-B는 Cre 의존 hM3Dq를 발현하는 DREADD 마우스에서의 세포핵(청색) 및 5-HT(적색)를 각각 시각화한 도이다. C-D는 *CHAT* 녹다운 동물모델에서 세포핵(청색) 및 5-HT(적색)를 각각 시각화한 도이다. 평균 $\pm$ SEM(sh-SCR, n = 5 쥐, sh-*CHAT*, n = 5, ** P < 0.01, Student's t -test). 스케일 바는 100 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0080] <실시예 1> 인간 뇌 시료 준비 및 고삐핵(Habenula) 절개

[0081] 인간 뇌 조직은 DBCBB(Douglas Bell Canada Brain Bank; Douglas Mental Health University Institute, Canada)로부터 공급받았으며, 시험구로 우울증을 진단받은 12명의 자살자(나이, 41.5 ± 4.02 세; 성별, 남성; 사후 간격(PMI, postmortem intervals), 37.36 ± 4.23 시간; pH, 6.48 ± 0.09)와 대조구로 정신의학적으로 건강한 11명의 정상인(나이, 44 ± 3.04 세; 성별, 남성; 사후 간격(PMI, postmortem intervals), 25.78 ± 4.52 시간; pH, 6.67 ± 0.04)의 뇌로부터 고삐핵(Habenula) 조직을 수득하였다. 시험구와 대조구에는 나이, 성별, 사후 간격, pH에서 유의미한 차이가 없었다. 구체적으로, 뇌간(brain stem)의 중심을 절개하여 좌반구(left hemisphere)와 우반구(right hemisphere)로 나누고, 소뇌(cerebellum) 및 각 반구의 뇌막(meninges)을 제거하였다. 유두체(mammillary body)와 상구(superior colliculus) 사이의, 반구로부터 유래하는 신경관(nerve trunk)은 메스(scalpel)를 이용하여 분리하였다. 시료의 pH는 소뇌를 이용하여 측정하였다. 평판(slabs)을 만들기 위해, 뇌 반구를 중심면(median face)이 아래로 향하도록 절단용 플레이트(cutting plate)에 놓은 후 화관상(coronally)을 형성하도록 18-20 조각으로 절단하여 평판을 제작하고, 각각 동결하였다(도 1A). 고삐핵은 11 또는 12번째의 평판(slab, 뇌를 두껍게 썬 조각)에 존재하였으며, 둥근 모양의 팁(tip)이 있는 끌(burin)을 이용하여 동결된 평판으로부터 부드럽게 제거하였다.

[0082] <실시예 2> qRT-PCR을 통한 고삐핵(Habenula) 유래 콜린성(Cholinergic) 유전자의 mRNA 발현을 분석

[0083] 실시예 1로부터 수득한 인간 뇌 시료를 대상으로 고삐핵 유래 콜린성 유전자의 mRNA 발현을 분석하기 위하여, TaqMan 프로브를 기반으로 한 qRT-PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction) 분석을 수행하였다. 총 RNA 시료(500 ng)를 역전사효소(Invitrogen, USA) 및 랜덤 프라이머(random primer)를 이용하여 역전사하였다. RNA 무결성(integrity)은 분석기(Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석하였다. 28S 리보솜 DNA의 안정성은 PCR을 통해 규정하였으며, 시험구(자살자) 및 대조구(정상인)에서 변화는 없었다(28S rDNA의 발현 안정성: 대조구, 6.123 ± 0.1487 ; 시험구, 6.154 ± 0.0728 ; 만-윌트니 유 검정(Mann-Whitney U-test), $P = 0.4235$).

[0084] GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), TBP(TATA-binding protein) 및 CYC1(cytochrome c-1)와 같은 하우스키핑 레퍼런스 유전자(housekeeping reference genes)를 확인한 결과, 표 1과 같이 시험구 및 대조구 사이에 차이는 없었다.

표 1

Gene symbol	Slope	R^2	Efficiency (%)
GAPDH	-3.309475	0.9978	100
TBP	-3.3670	0.99617	99.3
CYC1	-3.33036	0.99617	98.6

[0086] 반응율(reaction efficiency) 값은 방정식 $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ 로부터 계산하였다. 상기 E는 효율이며, 기울기(slope)는 최적선의 경사이다.

[0087] qRT-PCR 반응은 cDNA 2 μ l, 각 정량 유전자에 특이적인 TaqMan 발현 어레이(TaqMan Expression Assay) 1 μ l 및 분석기(LightCycler 1.5 Instrument, Roche, 스위스)을 사용하여 제조업자의 방법에 따른 TaqMan 마스터믹스(TaqMan Mastermix, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 표준 곡선은 모든 개체로부터 유래한 cDNAs의 풀(pool)로 나타내었다. 발현 수준은 GAPDH를 사용한 절대정량 표준 곡선법(Absolute Quantification standard curve method)을 이용하여 측정하였다. PCR 수행 시 95°C에서 5분, 95°C에서 10초간 50회, 60°C에서 30분 조건으로 수행하였다. 하기 표 2에서 Context sequence(프로브가 결합하는 부위 주변의 뉴클레오티드 서열)로 표기되어 있는 것은 TaqMan 어레이를 위해 프로브로 제작되어 판매되는 염기서열로, Thermo Fisher SCIENTIFIC에서 주문하여 사용하였다. CHT는 프라이머를 제작하고 이에 대한 프로브 제작을 Thermo Fisher SCIENTIFIC에 의뢰하여 제작, 사용하였다. 프라이머 및 프로브는 <http://www.appliedbiosystems.com>에

서 열람할 수 있다. F는 정방향 프라이머(forward primer), R은 역방향 프라이머(reverse primer)이다.

표 2

Gene symbol	TaqMan assay ID	Primer sequence 5' → 3'	Context sequence
SLC18A3 (VACHT)	Hs00268179_s1	-	GTCATCGTGCCCATAGTGCCCGACT (서열번호 13)
SLC5A7 (CHT)	Custom	F: GAACATCTACCAGCTTTCCTTCAGA (서열번호 14) R: TGATTCGCATAACCCAAACGATTTC (서열번호 15)	-
CHAT	Hs00252848_m1	-	AGTGAGGAGTCTGGGCTGCCCAAAC (서열번호 16)
CHRNA3	Hs01088199_m1	-	ACCTGTGGCTCAAGCAAATCTGGAA (서열번호 17)
CHRNA3	Hs00181269_m1	-	TTGAAAATGCTGACGGCGCTTCGA (서열번호 18)
CHRNA4	Hs00609520_m1	-	CCTTTGCGGGCGCGGAAGTCCGC (서열번호 19)
CAMK2B	Hs00365799_m1	-	AGCATTCGAACATCGTGGCTCTCCA (서열번호 20)
GAPDH	Hs99999905_m1	-	GGGCGCTGTGTCACAGGGCTGCTT (서열번호 21)
TBP	Hs99999910_m1	-	GCAGCTGCAAAATATTGTATCCACA (서열번호 22)
CYC1	Hs00357717_m1	-	TCTTAGAGTTTGACGATGGCACCCC (서열번호 23)

그 결과, 콜린성 유전자인 CHT(choline transporter)(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.237 vs. 0.460 ± 0.117 , $P = 0.025$) 및 CHRNA3(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.308 vs. 0.394 ± 0.126 , $P = 0.046$)의 mRNA 발현율은 대조구에 비해 시험구에서 현저히 감소하였으며, CHAT(choline acetyltransferase)(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.509 vs. 0.436 ± 0.188 , $P = 0.559$), VACHT(vesicular acetylcholine transporter)(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.227 vs. 0.833 ± 0.216 , $P = 0.186$), CHRNA3(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.475 vs. 0.488 ± 0.154 , $P = 0.442$) 및 CHRNA4(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.450 vs. 0.489 ± 0.257 , $P = 0.207$)에서는 시험구에서 발현율이 감소하는 경향이 나타났으나, 유의미한 변화는 없었다(도 1C). 또한, 음성대조구로 사용된 흥분성 신경 마커인 CAMK2B(β CaMKII)는 변화가 나타나지 않았다(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.099 vs. 1.268 ± 0.160 , $P = 0.282$).

<실시예 3> 스트레스 노출에 따른 실험동물의 생체 및 행동 변화 분석

<3-1> 만성 구속 스트레스(chronic restraint stress, CRS) 유도

동물을 이용한 모든 실험 절차는 고려대학교 동물 관리 및 사용 위원회의 승인과 고려대학교의 지침에 따라 수행되었다. 실험동물은 스틸만-폴리(Sprague-Dawley, SD) 수컷 랫트(rats)(Japan SLC, Inc., 일본)를 사용하였으며, 만성 구속 스트레스(chronic restraint stress, CRS)를 유도하기 위한 프로토콜(protocol) 과정은 이전 연구(Andrus BM., et al., Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models., Mol Psychiatry., 2012;17(1):49-61.)의 방법에 따라 수행하였다. 실험동물을 실험 전 일주일간 길들인 후, 임의로 시험구(만성 구속 스트레스(chronic restraint stress, CRS))와 대조구(비스트레스(non-stressed, NS))로 나누었다. 시험구는 도 2A와 같이 2 주 동안 매일 하루에 2 시간씩 구속 스트레스에 노출시키고, 대조구는 홈 케이지(home cage)에 방치하고 하루에 5 분 손을 대었다. 구속하는 동안, 랫트는 통기성의 플라스틱 원뿔(DC 200, DecapiCones, Baintree Scientific, USA)에 방치하였으며, 스트레스 기간의 마지막 날에 마지막으로 스트레스에 노출시킨 후 즉시 희생하였다.

- [0093] <3-2> 체중 측정
- [0094] 실험동물의 체중을 실험기간 동안 측정한 결과, 2 주간 만성 구속 스트레스에 노출된 시험구(CRS)의 체중 증가는 50.400 ± 10.289 g으로, 대조구(NS)의 체중인 97.667 ± 3.989 g에 비해 급격한 감소가 나타남을 확인하였다($P = 0.001$)(도 2B).
- [0095] <3-3> 혈장 코르티코스테론(corticosterone) 수준 측정
- [0096] 실시예 3-1에서 희생한 실험동물의 목을 절단한 직후 대혈관의 혈액을 수집하고 $10,000 \times g$, 4°C 에서 10 분간 원심분리하였다. 혈장을 분리한 후 순환성 코르티코스테론(circulating corticosterone)의 수준을 키트(Coat-a-Count Rat Corticosterone kit, TKRC1, Siemens Healthcare Diagnostics, USA)를 이용한 방사선면역검정(radioimmunoassay)을 통해 측정하였다.
- [0097] 그 결과, 대조구(NS)는 125.771 ± 46.434 mg/mL, 시험구(CRS)는 591.466 ± 99.732 mg/mL으로 시험구에서 현저히 높음을 확인하였다($P = 0.002$)(도 2C).
- [0098] <3-4> 부신(adrenal gland) 무게 측정
- [0099] 실시예 3-1에서 희생한 실험동물의 부신을 분리한 후 무게를 측정한 결과, 대조구(NS)는 127.661 ± 8.783 $\mu\text{g/g}$ (체중), 시험구(CRS)는 180.106 ± 12.075 $\mu\text{g/g}$ (체중)으로 현저한 차이가 있음을 확인하였다($P = 0.006$)(도 2D).
- [0100]
- [0101] <3-5> 자당 선호 실험(sucrose preference test, SPT)
- [0102] 동물 행동 실험은 자당 선호 실험(sucrose preference test, SPT) 및 강제 수영 실험(forced swim test, FST)을 포함하여 수행하였다.
- [0103] 자당 선호 실험의 경우, 모든 쥐를 개별 케이지에 단독으로 수용한 후 실험 시작 전 2일 동안 1% 자당 수용액과 수돗물의 두 음료용기로 길들였다. 특정 음료에 대한 선호를 줄이기 위해 두 음료용기의 위치는 매일 전환하였다. 실험 당일, 12 시간 동안 물을 주지 않은 다음 두 개의 동일한 음료용기에 1 시간 동안 노출시킨 후, 실험 전 측정된 용기의 무게와 실험 후 측정된 용기의 무게를 비교하여 자당 수용액 및 물 섭취량을 기록하였다. 자당 선호는 상대 비율(자당 수용액 섭취량/총 용액 섭취량, %)로 계산하였다.
- [0104] 그 결과, 대조구(NS)는 85.083 ± 2.379 , 시험구(CRS)는 61.875 ± 5.991 %로 시험구에서 자당 수용액 섭취량이 현저히 낮아, 우울증의 CRS 모델에서 무쾌감증적(anhedonia-like) 표현형을 나타냄을 확인하였다($P = 0.002$)(도 2E).
- [0105] <3-6> 강제 수영 실험(forced swim test, FST)
- [0106] 강제 수영 실험의 경우, 랫트를 실험 24 시간 전 $24 - 25^{\circ}\text{C}$ 물로 채워진 실린더(cylinder)에 15 분 동안 노출시켰다. 실험은 24 시간 후 수행하고 동물의 행동은 적외선 카메라를 이용하여 5분간 녹화하였다. 실린더의 지름은 45 cm, 높이는 60 cm였으며, 물의 깊이는 실험동물의 사지가 바닥에 닿지 않은 상태에서 활동적(수영 및 기어오르기) 또는 정적(부동) 행동을 측정할 수 있도록 설정하였다.
- [0107] 그 결과, 부동 상태의 시간이 대조구(NS)는 120.00 ± 12.429 초, 시험구(CRS)는 170.00 ± 14.500 초로 시험구에서 길어, 시험구가 절망(despair)과 같은 행동을 나타냄을 확인하였다($P = 0.002$)(도 2F).
- [0108] <실시예 4> 실험동물의 고삿핵(Habenula) 유래 콜린성(Cholinergic) 유전자의 mRNA 발현을 및 분석
- [0109] 실시예 3-1에 따른 랫트를 RNA 안정화 용액(RNAlater RNA Stabilization Solution, AM7020, Ambion, USA) 내에서 목을 절단한 직후 뇌로부터 고삿핵을 분리하였다. 트리졸 시약(TRIZol reagent, Invitrogen, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA 시료($1 \mu\text{l}$)를 역전사효소(Promega, USA) 및 올리고 (dT) 프라이머(oligo (dT) primer)를 이용하여 역전사하였다. 이후 특이적 프라이머 세트 및 분석기(LightCycler 1.5 Instrument, Roche, 스위스)을 사용한 qPCR 마스터믹스(Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2 $\times$), #K0251, Fermentas, USA) 하에서 역전사된 산물 $0.25 \mu\text{g}$ 을 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 사용된 특이적 프라이머 세트는 표 3과 같았다.

표 3

Gene symbol	Primer sequence 5' →3'		Size (bps)
	Forward primer	Reverse primer	
SLC18A3 (VACHT)	AAACATCGTCCACTGGTCC (서열번호 24)	CTTCCCTAAGATGCCTCCAC (서열번호 25)	213
SLC5A7 (CHT)	TTTCCAGATCCCAAGACCAAG (서열번호 26)	ATGCTCCAAACACAAACACAG (서열번호 27)	253
CHAT	TCCAAGACACCAATGACCAG (서열번호 28)	GGACGCCATTTTGACTATCTTTC (서열번호 29)	350
CHRNA3	TTCTACCTGCCCTCCGACTGT (서열번호 30)	AATCCCGCGTTCCTAAAATG (서열번호 31)	594
CHRNA3	GAAAGGAGAGTGATACAGCCG (서열번호 32)	AGAAAGAGCCACAGGAAGATG (서열번호 33)	223
CHRNA4	CTATCACTGTCCAGCTCATC (서열번호 34)	AGAACCATGTCAATCTCCGTG (서열번호 35)	377
CAMK2B	CAGAAGCTGAGGGCCTCCCA (서열번호 36)	GGTCACAGATTTTCGCATAGG (서열번호 37)	167
GAPDH	CCTTCATTGACCTCAACTACAT (서열번호 38)	CAAAGTTGTCATGGATGACC (서열번호 39)	497

[0110] qPCR의 최종 산물은 2%의 아가로스 겔(agarose gel)에서 전기영동하고 핵산염색(View Nucleic Acid Stain, G108, Applied Biological Materials, 캐나다)하여 가시화하였다. 각 유전자에서 백그라운드(background)를 초과하는 형광 신호에 대한 임계점의 사이클 횟수(cycle numbers, C_t)는 qRT-PCR을 통해 측정하였으며, 이어서 각 유전자의 발현값은 각 시료 내의 내인성 대조군인 GAPDH의 발현값으로 표준화하였다. 시험구 및 대조구 간의 배수 차이를 계산하기 위한 상대적 정량은 비교 C_t 방법(comparative C_t method, DDC_t)을 이용하여 수행하였다.

[0112] 그 결과, 시험구(CRS)의 고배핵에서 CHAT, VACHT, CHT, CHRNA3, CHRNA3 및 CHRNA4 유전자의 mRNA 발현율이 대조구(NS)에 비해 모두 감소한 것을 확인하였다(fold change, 대조구 vs. 시험구: CHAT, 1.000 ± 0.087 vs. 0.579 ± 0.024 , $P = 0.0004$; VACHT, 1.000 ± 0.085 vs. 0.686 ± 0.027 , $P = 0.0033$; CHT, 1.000 ± 0.069 vs. 0.624 ± 0.025 , $P = 0.0002$; CHRNA3, 1.000 ± 0.070 vs. 0.649 ± 0.031 , $P = 0.0004$; CHRNA3, 1.000 ± 0.025 vs. 0.638 ± 0.049 , $P = 0.0001$; CHRNA4, 1.000 ± 0.085 vs. 0.611 ± 0.033 , $P = 0.0008$)(도 2G). 음성대조구인 CAMK2B에서는 변화가 없었다(fold change, 대조구 vs. 시험구: 1.000 ± 0.048 vs. 1.136 ± 0.075 , $P = 0.1484$).

[0113] 이는 우울증 자살자에서 나타난 유전자 발현율과 일치하였다.

[0114] <실시예 5> 실험동물의 내측 고배핵(Medial Habenula, MHb) 유래 콜린성(Cholinergic) 유전자의 mRNA 발현율 및 분석

[0115] 실시예 3-1에 따른 랫트의 MHb 유래 콜린성 유전자의 mRNA 발현율을 분석하기 위하여, 이전 연구(Stempel AJ.. et al., Simultaneous visualization and cell-specific confirmation of RNA and protein in the mouse retina, Mol Vis., 2014;20:1366-73.)의 방법에 따라 in situ 혼성화 조직화학법(In situ hybridization histochemistry)을 수행하였다. 구체적으로, 실시예 4에 따라 분리된 랫트의 뇌를 실시예 1과 동일한 방법으로 고배핵 조직이 보이도록 $14 \mu\text{m}$ 두께로 관상단면을 절단하였다. 뇌 섹션을 해동한 후 현미경 슬라이드(superfrost Plus Microscope Slides, Fisher Scientific, USA) 위에 위치시키고 4% 포름알데히드(formaldehyde)에 10 분간 고정시켰다. 이후 에탄올(ethanol)의 농도를 점차 증가시키면서 5 분간 탈수시키고 자연건조하였다. 건조된 조직은 상온에서 10 분간 단백질분해효소(protease)로 전처리하였다. RNA 검출을 위해, 40°C 의 혼성화 오븐(HybEZ hybridization oven, Advanced Cell Diagnostics, USA)에서 증폭 용액(amplifier solutions)인 Amplifier 1-FL, Amplifier 2-FL, Amplifier 3-FL, Amplifier 4 Alt B-FL의 혼합물을 처리하여 인큐베이션하였다. 표지된 프로브는 형광성 표지(Altto 550)와 결합되었다. 뇌 섹션은 표지된 프로브 혼합물을 이용하여 40°C 에서 슬라이드당 2 시간 동안 혼성화되었다. 비특이적인 혼성화 프로브는 세척을 통해 제거되었으며, 상온에서 1×세척 버퍼(wash buffer)로 각 2 분씩 3 번, 40°C 에서 증폭 용액 1-FL으로 30 분, 증폭 용액

2-FL으로 15 분, 증폭 용액 3-FL으로 30분, 증폭 용액 4 Alt B-FL 로 15분 수행하였다. 각 증폭 용액은 상온에서 1×세척 버퍼로 2 분간 세척하여 제거하였다. 슬라이드를 관찰하고 분석하였으며 현미경(LSM 700 microscope, Zeiss, 독일)으로 촬영하였다. 이미지 분석은 이미지 J 프로그램(image J program)을 이용하였다. 프로브를 생산하기 위해 사용한 염기서열은 다음과 같았다: *CHAT*(choline acetyltransferase), 259-1141 of NM_001170593.1(NCBI Gene accession number); *VACHT*(vesicular acetylcholine transporter), 1693-2837 of NM_031663.2; *CHT*(choline transporter), 123-998 of NM_053521.1; *CHRNA3*, 984-2228 of NM_052805.2; *CHRNA3*, 255-1336 of NM_133597.1; *CHRNA4*, 1139-2433 of NM_052806.2; *CAMK2B*, 1439-3560 of NM_001042354.1(Advanced Cell Diagnostics, USA).

[0116] 그 결과, 시험구(CRS)의 복측 MHb에서 콜린성 유전자의 mRNA의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 음성대조구인 *CAMK2B*에서는 변화가 없었다(도 2H).

[0117] <실시예 6> 내측 고삐핵(Medial Habenula, MHb) 내 *CHAT* 유전자 녹다운(knock-down)을 위한 RNAi(RNA interference) 제작 및 *CHAT* 유전자 녹다운(knock-down) 유도

[0118] MHb에서 콜린성 뉴런(cholinergic neuron)의 활성을 억제시키기 위하여, *CHAT*의 발현을 녹다운하는 RNAi(RNA interference)를 제작하였다. 구체적으로, 바이러스 벡터인 AAV2/9(adenovirus-associated virus 2/9)를 제작하고 EGFP를 발현하는 PGK 프로모터 및 shRNA를 발현하는 U6 프로모터를 포함하는 pAAV-U6-GFP 벡터(Cell Biolabs, Inc., USA)를 이용하여 AAV-CHAT-RNAi를 제작하였다(도 3A 위). 제작된 AAV-CHAT-RNAi는 *CHAT* 유전자에 대한 RNAi를 전달하므로, AAV-CHAT shRNA 또는 AAV-sh-CHAT로 명명하고 그래프 내에서는 sh-CHAT로 표기하였다(도 3). *CHAT* shRNA의 염기서열은 5'-GAGCGAGCCTGTGACAT-3'(서열번호 40)이었으며, *CHAT*의 발현 억제 기능이 없는 대조구인 스크램블된 RNAi(shRNA)의 염기서열은 5'-TCGTCATAGCGTCATAGG-3'(서열번호 41)이었다. AAV(Adeno-Associated Virus) 바이러스 패키징(packaging)은 펜실베이니아 대학교(University of Pennsylvania)의 펜 벡터 코어(Penn Vector Core)로부터 지원받았다.

[0119] 바이러스 주입(viral injection)을 위해 8주령의 SD 랫트에 복강내주사(Intraperitoneal injection, i.p. injection)로 펜토바르비탈(pentobarbital)을 체중당 50 mg/kg 투여하여 마취시킨 후 뇌고정장치(stereotaxic apparatus)에 위치시켰다. 이후 저속(50 nl/min)의 마이크로인젝션 캐놀라(microinjection cannula, 30 gauge, Plastics One, USA)를 이용하여 MHb 양측(브레그마(bregma)에 위치: -3.0 mm 전부/후부(anterior/posterior), ±2.75 mm 내부/측부(medial/lateral), -5.28 mm 배부/복부(dorsal/ventral), 관상면(coronal plane) 내 중간선 방향으로 26° 각도)에 농축된 AAV 1 µl를 주사하였다. 마이크로인젝션 캐놀라는 바이러스 주입 후 20분 뒤 천천히 회수하였다.

[0120] <실시예 7> 내측 고삐핵(Medial Habenula, MHb) 내 *CHAT* 사일렌싱(silencing) 여부 검증

[0121] 실시예 6에 따른 AAV-매개 *CHAT* 사일렌싱을 확인하기 위하여, PBS(phosphate buffer saline)에 0.3% 트리톤(Triton) X-100을 첨가한 용액으로 투과성을 부여한 화관상의 랫트 뇌 섹션(30 µm)을 ChAT(1:100, abcam, 영국), EGFP(1:500, abcam, 영국) 및 VACHT(1:500, synaptic system, 독일)에 대한 1차 항체(primary antibody)로 인큐베이션한 후, Cy3 및 Alexa 488이 결합된 이차 항체(secondary antibody)(Jackson ImmunoResearch, USA)로 인큐베이션하였다. 핵은 호크스트(Hoechst)(1:1000, Invitrogen, USA) 염색을 이용하여 가시화하였다. 형광 이미지는 공초점 현미경(confocal microscope, LSM710, Zeiss, 독일)을 사용하여 획득하였다.

[0122] 웨스턴 블로팅(western blotting)을 수행하기 위하여, 실시예 6에 따른 외과 처리(주사) 뒤 3 주(21 일) 후 고삐핵 유래 조직 용해물을 획득하여, 15 µg의 고삐핵 유래 단백질을 획득하였다. 고삐핵 유래 단백질은 SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)을 이용하여 분리한 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(GE Healthcare, 영국)에 트랜스퍼(transfer)하였다. 멤브레인은 5% (w/v) 스킵 밀크, 0.25% (v/v) tween-20을 포함하는 PBS에서 1 시간 동안 블로킹(blocking)한 후 염소 항-ChAT(goat anti-ChAT, 1:1000, abcam, 영국), 마우스 항-β-액틴(mouse anti-β-actin, 1:5000, Sigma-Aldrich, USA) 및 토끼 항-VACHT(rabbit anti-VACHT, 1:1000, synaptic system, 독일) 항체를 투입하고 4℃에서 하룻밤 배양한 뒤, 겨자 무과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체(Life Technologies, USA)로 반응시켰다. 단백질은 키트(ECL chemiluminescence detection kit)(GE Healthcare, 영국)를 이용하여 탐지하였다. β-액틴에 대한 면역블롯을 통해 동량의 단백질이 분석되었음을 확인하였다.

[0123] 그 결과, 실시예 6에서 제조한 *CHAT* 전사물을 특이적으로 타겟하는 siRNA(sh-CHAT)는 대조구인 스크램블된(scrambled) siRNA 타겟 염기서열을 포함하는 siRNA(sh-SCR)에 비하여 *CHAT* 단백질 발현을 효과적으로 저해하였

다(sh-SCR vs. sh-CHAT: 1.000 ± 0.208 vs. 0.414 ± 0.142 , $P = 0.043$)(도 3B, D 및 E). *VACHT* 유전자는 *CHAT* 유전자의 첫번째 인트론(intron)에 위치하고 있으나, *VACHT* 발현은 sh-CHAT으로부터 영향을 받지 않았다(sh-SCR vs. sh-CHAT: 1.000 ± 0.106 vs. 1.175 ± 0.027 , $P = 0.386$)(도 3C-E). 이로부터 sh-CHAT은 *CHAT* 단백질 발현만을 특이적으로 저해함을 확인하였다.

[0124] <실시예 8> 내측 고삐핵(Medial Habenula, MHb) 내 *CHAT* 유전자 녹다운(knock-down)으로 인한 동물 행동 변화 검증

[0125] 동물 행동 실험은 실시예 6에 따른 외과 처리(주사) 후 적어도 21일 후에 실시하였으며, 자당 선호 실험(sucrose preference test, SPT) 및 강제 수영 실험(forced swim test, FST)을 포함하여 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다(도 3A 아래). 모든 행동 실험의 말미에 주사 부위를 조사하였으며, 주사가 정확하게 이루어진 실험동물의 데이터만을 포함하였다.

[0126] 그 결과, *CHAT*의 발현이 감소된 랫트(sh-CHAT)와 *CHAT*의 발현이 감소되지 않은 대조군 랫트(sh-SCR)의 총 용액 섭취량은 차이가 없으나, *CHAT*의 발현이 감소된 랫트에서 자당 수용액 섭취량이 감소하였다(sh-SCR vs. sh-CHAT: 82.400 ± 3.916 % vs. 64.148 ± 4.726 %, $P = 0.007$).

[0127] 또한, 강제 수영 실험에서 부동 상태인 시간에는 영향이 나타나지 않았다(sh-SCR vs. sh-CHAT: 174.25 ± 19.636 s vs. 147.963 ± 13.197 s, $P = 0.255$).

[0128] 이는 고삐핵 내 콜린성 신호의 불활성화는 무쾌감증적 행동은 유도하나 절망은 유도하지 않음을 시사하였다.

[0129] <실시예 9> 내측 고삐핵(Medial Habenula, MHb) 내 *CHAT* 유전자 녹다운(knock-down) 생쥐 모델의 항우울 치료제 장기간 투입에 의한 약물 치료불응성(drug treatment-refractory) 검증

[0130] 실시예 6에 따라 외과 처리(주사)하여 *CHAT* 유전자 녹다운(knock-down)된 생쥐 모델에 현행 대표적인 항우울제인 플루옥세틴(Fluoxetine, 상품명 Prozac, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제, selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI, Sigma-Aldrich)을 PBS에 희석하여 주사가 가능한 플루옥세틴 용액을 제조하고 이를 2주 이상 하루에 한번 복강내 주사(i.p., intraperitoneal injection; 10 mg/kg)를 통해 주입한 후 대조군(scrambled siRNA, saline 투여)에 대해서 자당 선호 실험(sucrose preference test, SPT) 및 강제 수영 실험(forced swim test, FST)을 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다(도 4A).

[0131] 그 결과, 플루옥세틴을 투여한 동물 그룹에서 자당 선호도가 감소하여 무쾌감증의 완화효과가 전혀 나타나지 않았으며, 앞선 결과와 동일하게 절망감에 대한 표현형도 변하지 않았다(도 4B-D).

[0132] 따라서, 고삐핵 콜린성 신경세포 특이적으로 *CHAT*의 발현 억제 동물모델이 보이는 무쾌감증은 플루옥세틴에 의한 치료반응성을 보이지 않으며, 이러한 결과는 뇌의 특정 영역에 위치한 특정 신경세포의 특정 분자물질을 제어함으로써 치료불응성을 나타낼 수 있음을 시사하였다.

[0133] 현재 우울증 치료를 위한 난제를 극복하기 위하여 여러 연구진들이 치료불응성 동물모델을 개발하고 있는 추세에 비춰 볼 때 본 발명은 우울증의 핵심 증상인 무쾌감증을 보이는 동물모델의 개발과 더불어 치료불응성 모델을 개발하였으며. 이와 같은 결과는 기존의 임상연구에서 무쾌감증이 플루옥세틴에 의해서 치료가 힘들다는 결과와 일치한다.

[0134] <실시예 10> DREADD 시스템을 활용한 고삐핵(Habenula) 내 콜린성 신경세포의 활성화에 의한 모노아민 신경세포의 활성 변화 검증

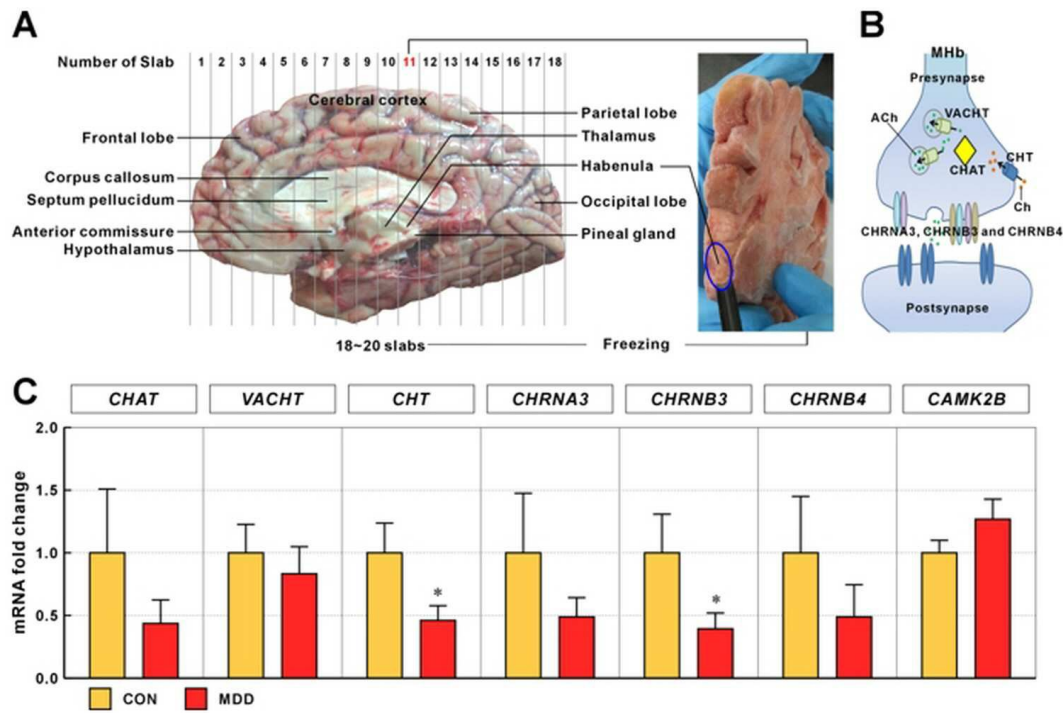
[0135] 최근 광유전학을 대체할 수 있는 방법으로 고안된, 실험자가 인위적으로 특정한 세포의 활성 정도를 마음대로 조절할 수 있는 기술인 DREADD(Designer receptors exclusively activated by designer drug)를 활용하여, 고삐핵 내 콜린성 신경세포와 모노아민 신경세포와의 관련성을 확인하였다.

[0136] 인위적으로 만들어낸 G단백질 결합 수용체의 일종인 hM3Dq를 Cre 단백질 의존적으로 발현할 수 있는 바이러스(AAV-DIO-hSyn-hM3Dq-mCherry, 도 5A) 1 μ l를 브레그마(bregma)에서 조정하여 MHb에 양측으로 주입하여 감염시켰다: -3.14 mm 전부/후부, ± 0.83 mm 내부/측부, -3.05 mm 등부/복부, 관상면(coronal plane)에서 중간선(midline)쪽으로 10° 각도. 4 주 후, ChAT-cre 형질 전환 생쥐에서 고삐핵 내 콜린성 신경세포 특이적으로 hM3Dq-mCherry가 발현하고 있음을 ChAT 단백질에 대한 특이적인 항체를 이용하여 면역조직화학법(immunohistochemistry)으로 검증하였다(도 5B). 이 수용체에 특이적으로 반응하는 약물인 CNO(clozapine N-oxide, 5 mg/kg, Enzo Life Sciences, NY, USA)를 복강내주사법으로 주입하고 대조군에는 PBS를 주입하였다.

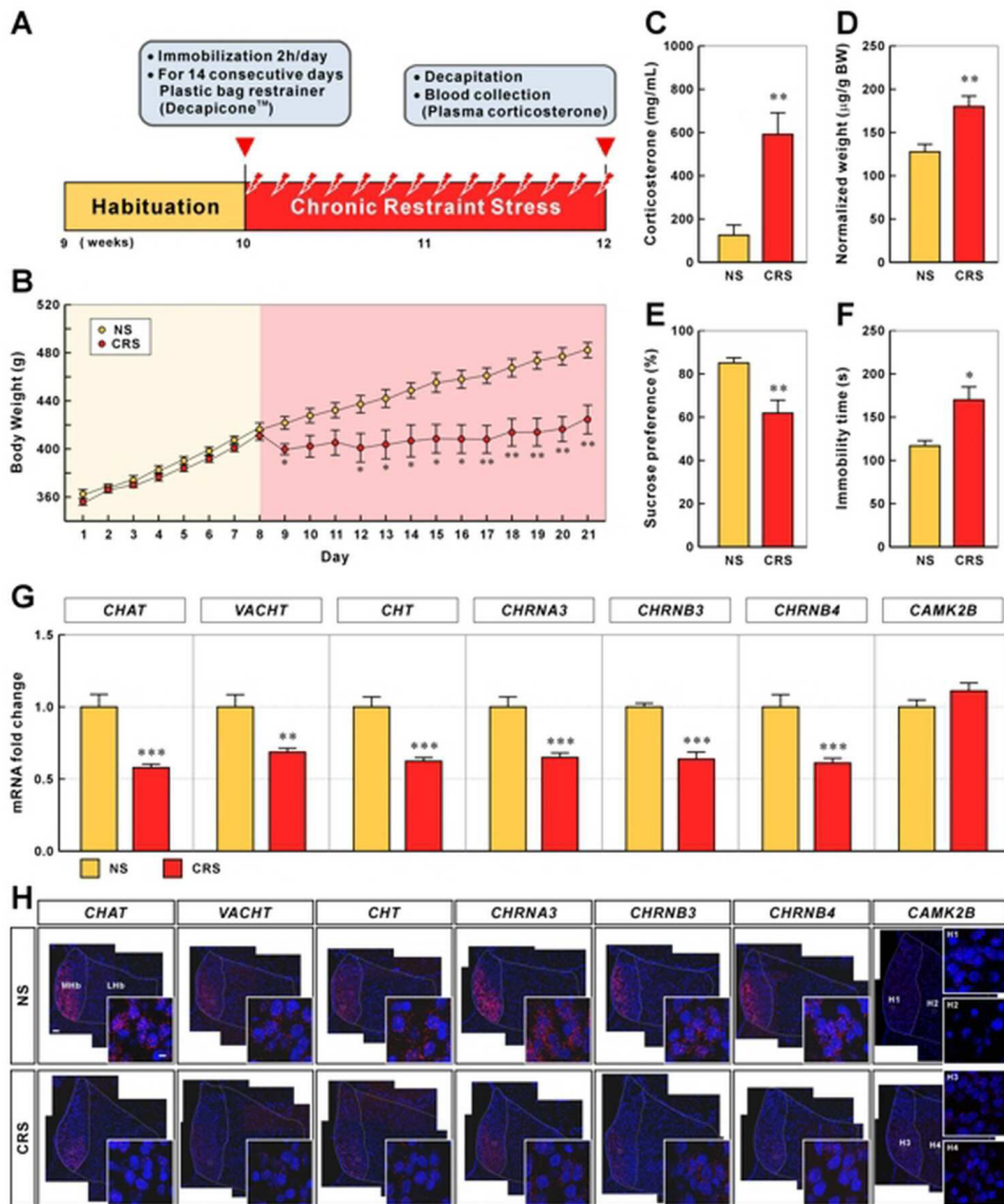
- [0137] 면역조직화학법은 구체적으로, 생쥐 뇌 두정(coronal) 절편(30 μ m)을 CHAT (1:100, abcam), EGFP (1:500, abcam), VACHT (1:500, synaptic system) 및 5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonin, 1:2000, ImmunoStar)에 대한 1차 항체를 포함하는 0.3% Triton X-100 PBS에 침지한 후 Cy3- 및 Alexa 488-가 결합된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch)와 반응시켰다. Hoechst(1:1000, Invitrogen)를 사용하여 핵을 시각화하였다. 형광 이미지는 공초점현미경(LSM710)을 사용하여 획득하였다.
- [0138] CNO에 대한 hM3Dq 수용체는 세포의 활성을 증진하므로 세포활성 분자마커인 c-Fos의 발현양상을 확인한 바, CNO를 주입한 고삐핵에서 급격한 c-Fos의 발현 증가가 나타났다(도 5C-D).
- [0139] 도파민 분비 신경세포가 밀집되어 있는 복측피개영역(ventral tegmental area)에서 세포활성 분자마커인 c-Fos의 발현 변화를 관찰한 결과, 도파민 신경세포(TH-positive cells)의 c-Fos는 증가한 반면, 비도파민 신경세포(TH-negative cells)의 c-Fos는 감소되었다(도 5E-I). 이를 통해 고삐핵 콜린성 신경세포 특이적으로 인위적인 활성화가 복측피개영역 도파민 신경세포의 활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0140] 또한, 세로토닌 분비 신경세포가 존재하고 있는 솔기핵(raphe nucleus)에서의 세로토닌 신경세포를 대상으로 세포 내 세로토닌을 직접 확인할 수 있는 항체(anti-5-HT antibodies)를 이용하여 면역조직화합법으로 분석한 결과, CNO를 처리하여 고삐핵 콜린성 신경세포를 활성화시킨 경우, 세포 내 세로토닌의 함량이 감소되어 있음을 확인하였다(도 6A-B). 반대로 고삐핵 콜린성 신경세포 특이적으로 *CHAT* 발현을 억제시킨 동물모델에는 대조군에 비해 세로토닌 신경세포 내 세로토닌 함량이 증가되어 있음을 확인하였다(도 6C-D). 따라서 세로토닌 신경세포 내 세로토닌 함량의 감소와 증가는 세포 밖으로의 세로토닌 분비의 증가와 감소에 각각 관련성이 있을 것으로 보였다.
- [0141] 위 결과와 같이 고삐핵 콜린성 신경세포의 활성 변화는 도파민 및 세로토닌 신경세포의 활성과 밀접하게 관련되어 있음을 통해, 고삐핵 콜린성 신경세포는 주요 모노아민 신경조절물질인 도파민과 세로토닌의 뇌 분비 조절에 핵심적인 역할을 하는 뇌 부위임을 확인하였다.
- [0142] 본 실시예에 따른 통계 분석은 윈도우(Windows, IBM corp., USA)를 이용한 SPSS v. 22을 사용하여 수행하였다. 데이터 세트(data set)가 정규 분포로 모델링된 경우 스튜던트 티 검정(Student's *t*-test)을 적용하였으며, 정규 분포되지 않은 데이터 세트는 비모수적 만-위트니 유 검정(non-parametric Mann-Whitney *U*-test)을 적용하였다. $P < 0.05$ 는 유의한 것으로 고려하였으며, 수치는 평균 $\pm$ SEM(Standard error of the mean)으로 표현하였다.

도면

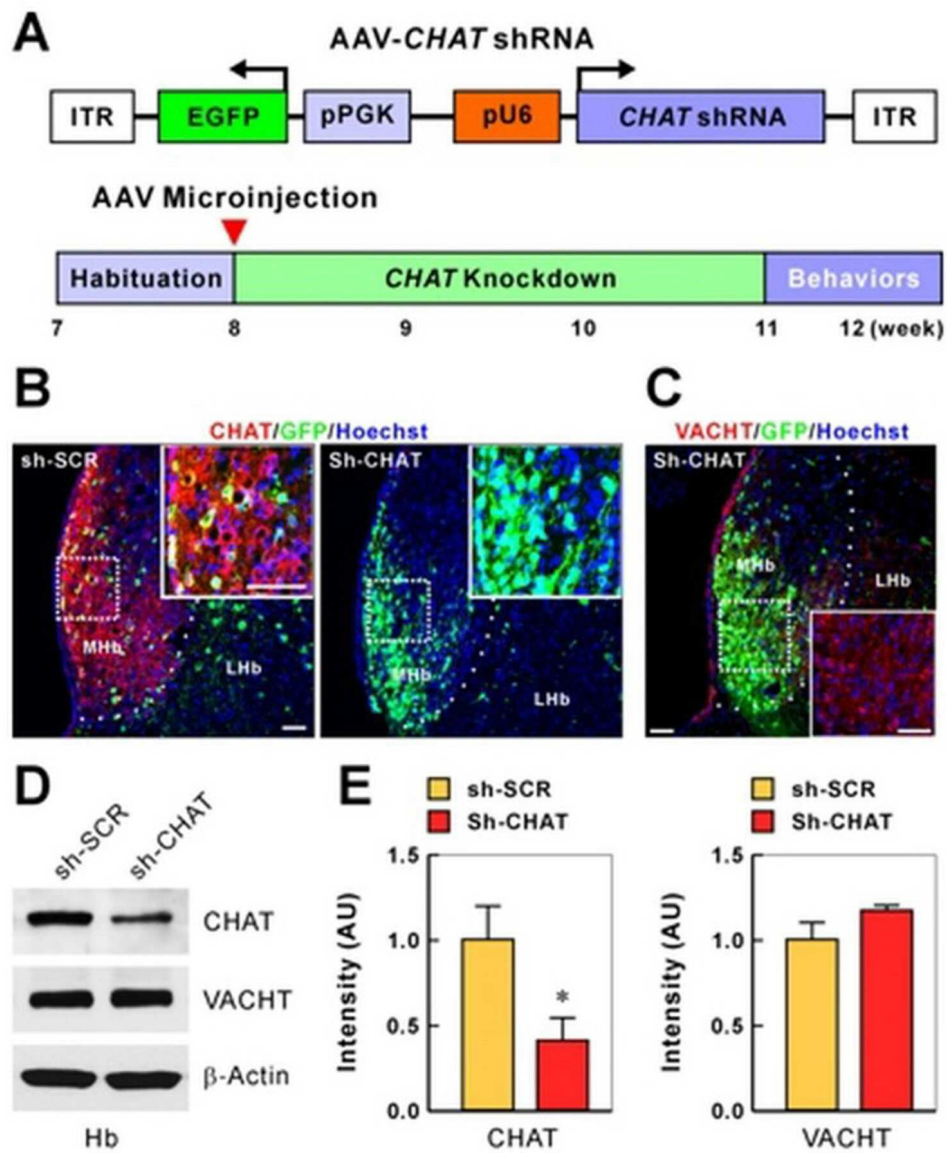
도면1



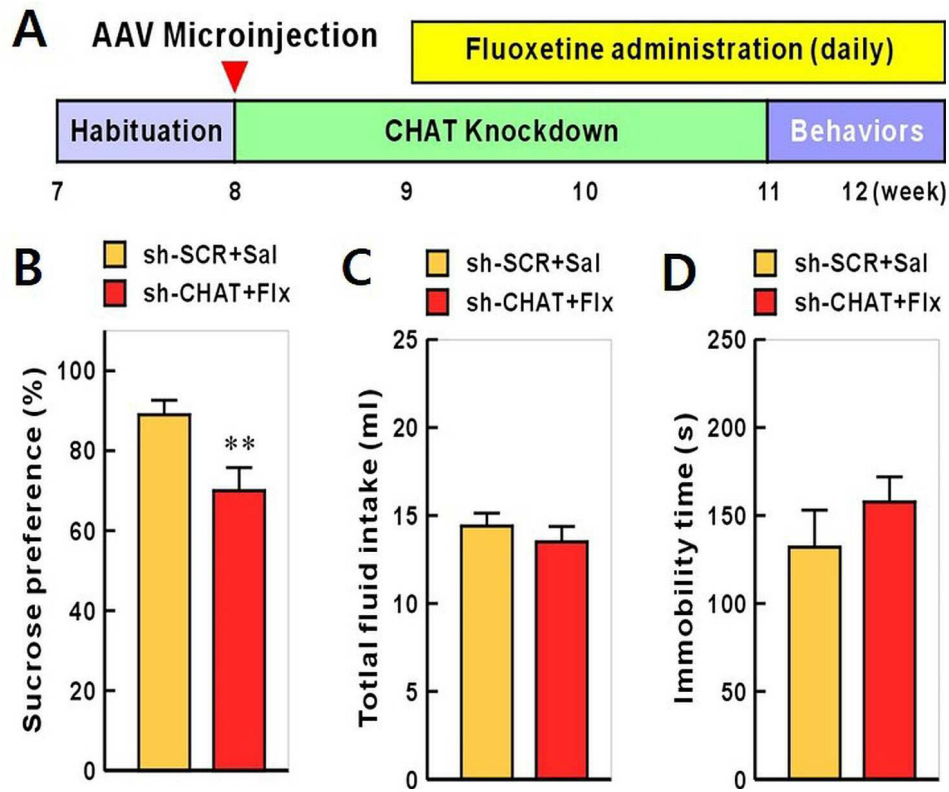
도면2



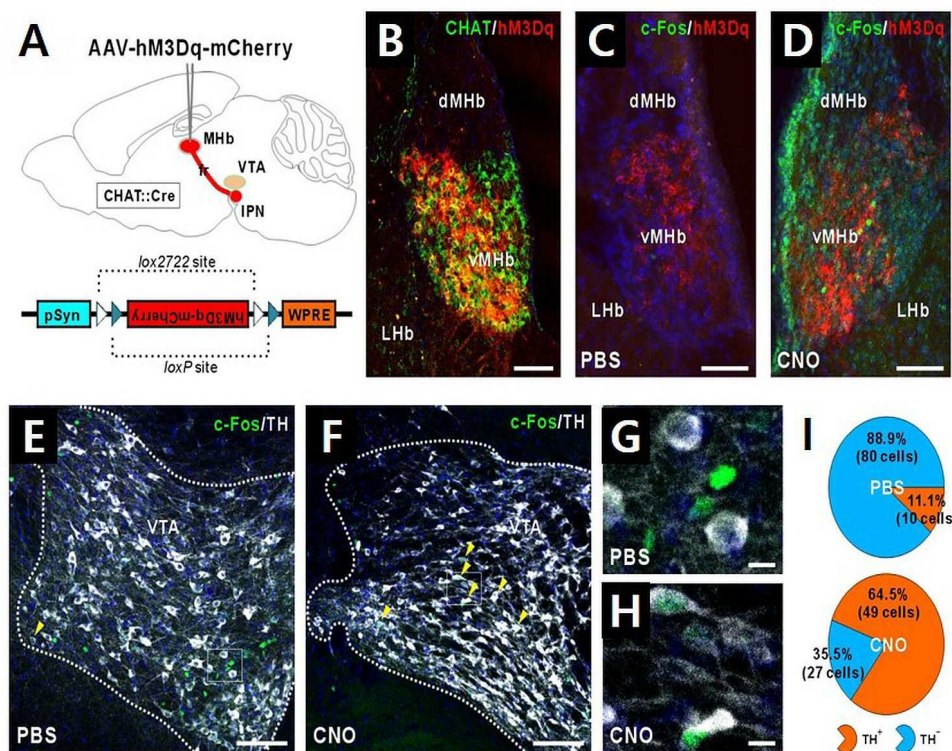
도면3



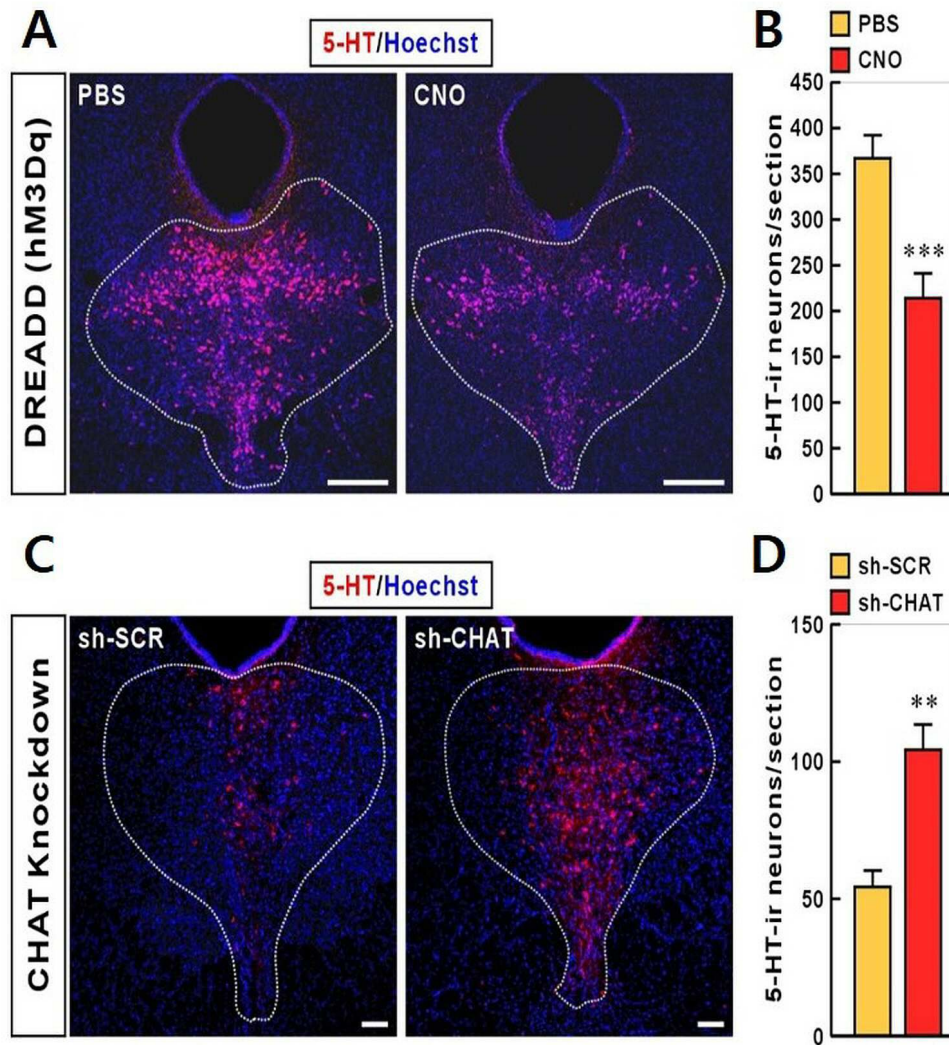
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Use of Cholinergic genes for treating depressive disorder
- <130> DHP16-588
- <160> 41
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1893
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

atggcagcaa aaactccag cagtgaggag tctgggctgc ccaaactgcc cgtgcccccg	60
ctgcagcaga ccttgccac gtacctgcag tgcattgcac acttggtgtc tgaggagcag	120
ttcaggaaga gccaggccat tgtgcagcag ttggggcccc ctggtggcct cggcgagacc	180

ctgcagcaga aactcctgga gcggcaggag aagacagcca actgggtgtc tgagtactgg 240

ctgaatgaca tgtatctcaa caaccgctg gccctgcctg tcaactccag ccctgccgtg 300

atctttgtct ggcagcactt ccctggcacc gatgaccagc tgaggtttgc agccagcctc 360

atctctggtg tactcagcta caaggccctg ctggacagcc actccattcc cactgactgt 420

gccaaaggcc agctgtcagg gcagccctt tgcatgaagc aatactatgg gctcttctcc 480

tcctaccggc tccccggcca taccaggac acgctggtgg ctcagaacag cagcatcatg 540

ccggagcctg agcacgtcat cgtagcctgc tgcaatcagt tctttgtctt ggatgttgtc 600

attaatttcc gccgtctcag tgaggggat ctgttctctc agttgagaaa gatagtcaaa 660

atggcttcca acgaggacga gcgtttgcct ccaattggcc tgctgacgtc tgacgggagg 720

agcgagtggg ccgaggccag gacgttctc gtgaaagact ccaccaaccg ggactcgctg 780

gacatgattg agcgctgcat ctgccttgta tgcttgacg cgccaggagg cgtggagctc 840

agcgacacc acagggcact ccagctcctt cacggcggag gctacagcaa gaacggggcc 900

aatcgctggt acgacaagtc cctgcagttt gtggtgggccc gagacggcac ctgcggtgtg 960

gtgtgcgaac actccccatt cgatggcatc gtcctggtgc agtgactga gcatctgtc 1020

aagcacatga cgcagagcag caggaagctg atccgagcag actccgtcag cgagctcccc 1080

gcccccgga ggctgcggtg gaaatgctcc ccggaaattc aaggccactt agcctcctcg 1140

gcagaaaaac ttcaacgaat agtaagaac ctgtacttca ttgtctataa gtttgacaac 1200

tatgggaaaa cattcattaa gaagcagaaa tgcagccctg atgccttcat ccaggtggcc 1260

ctccagctgg ctttctacag gctccatcga agactggtgc ccacctacga gagcgctcc 1320

atccgccgat tccaggaggg acgctggtgac aacatcagat cggccactcc agaggcactg 1380

gcttttgtga gagccgtgac tgaccacaag gctgctgtgc cagcttctga gaagcttctg 1440

ctcctgaagg atgccatccg tgcccagact gcatacacag tcatggccat aacagggatg 1500

gccattgaca accacctgct ggcactgcgg gagctggccc gggccatgtg caaggagctg 1560

cccagatgt tcatggatga aacctacctg atgagcaacc ggtttgcct ctccactagc 1620

caggtgcccc caaccacgga gatgttctgc tgctatggtc ctgtgggtccc aatgggtat 1680

ggtgcctgct acaaccccc gccagagacc atccttttct gcatctctag ctttcacagc 1740

tgcaaagaga ctcttcttag caagtttgca aaagctgtgg aagaaagcct cattgacatg 1800

agagacctct gcagtctgct gccgcctact gagagcaagc cattggcaac aaaggaaaaa 1860

gccacgaggc ccagccaggg acaccaacct tga 1893

<211> 1935

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

atgcccatcc tggaaaaggc tccccaaaag atgcctgtaa aggccttctag ctgggaggag	60
ctggacttac ctaaattacc agtgcccccg ctgcagcaaa ccctggccac ctacctacag	120
tgcattgcagc atctgggtacc tgaagagcag ttcaggaaga gccaggccat tgtgaagcgg	180
tttggggccc ctggtggcct ggggtgagacc ctgcaggaaa agctcttgga gagacaggag	240
aagacagcca attgggtctc tgaatactgg ctgaatgaca tgtacctgaa caaccgcctg	300
gccctgccag tcaactccag ccctgctgtg atctttgctc ggcagcactt ccaagacacc	360
aatgaccagc taagatttgc agcctgcctc atctctggtg tgcttagcta caaaactctg	420
ctggacagcc aticccctcc cactgactgg gccaaggggc agctctcagg gcagccctc	480
tgtatgaagc aatattacag actcttctcc tcttaccggc ttcctggcca taccaggac	540
acactggtgg ccagaagag cagtatcatg ccgagcctg agcatgtcat cgtggcctgc	600
tgcaaccagt tctttgtctt ggatgttgc attaatctcc gccgtctcag tgagggtgat	660
ctgttcactc agttgagaaa gatagtcaaa atggcgcca acgaggatga acgcctgcct	720
ccaatcgcc tgctgacgtc agacgggagg agcgagtggg ccaaggccag gacggctctc	780
ttaaaagact ccaccaaccg ggactccctg gacatgatcg agcgctgcat ctgcctggta	840
tgcttgatg gtccaggcac aggagagctc agtgacaccc acagggcct ccaactcctt	900
cacggtggag gctgcagcct gaacggagcc aatcgctggt atgacaagtc cctgcagttc	960
gtggtggccc gagatggcac ctgcggtgtg gtgtgtgagc attctccatt tgatggcatc	1020
gtcctggtgc agtgacaga gcacctgctg aaacatatga tgacaagcaa caagaagctc	1080
gtcagggtg actcagtgag tgagctccct gccccagaa ggctgagggt gaaatgttcc	1140
ccagaaacc aaggccatct cgcctcctca gcagagaaac ttcaaagaat agtaagaat	1200
ctggatttca ttgtttacaa gtttgacaac tatggaaaaa catttatcaa gaagcagaaa	1260
tacagccccg acggcttcat ccagggtggc ctccagctgg ctactacag gctttaccag	1320
agactggtgc ccacctatga gagcgcatcc atccgccgt tccaggaagg tcgggtggac	1380
aacatcagat cagccactcc agaggctctg gcttttgtgc aagccatgac tgaccacaag	1440
gctgccatgc cggcttctga gaaactgcag ctgctgcaga cagccatgca ggcccagact	1500
gagtacacag tcatggccat aaccggcatg gccattgaca accatcttct ggcactgagg	1560
gagctggccc gagacctgtg caaagagcca cctgagatgt tcatggatga aacatacctg	1620

atgagcaacc ggtttgcct ctccaccagc caggtgccca caaccatgga gatgttctgc 1680
 tgttatggac ccgtgggtccc caatggctat ggagcctgct acaaccccca gcccgaggcc 1740
 atcaccttct gcatctccag ttttcacagc tgcaaagaga cctcgtctgt ggagtttgcg 1800
 gaagctgtgg gagcgagcct tgttgacatg agagacctct gcagttcaag gcagcctgct 1860
 gacagcaagc caccagcacc caaggaaaaa gctaggggcc caaccaagcc aagcaatctt 1920
 gactccagcc actag 1935

<210> 3
 <211> 1599
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggaatccg cggaacctgc gggccaggcc cgggcggcgg ccaccaagct gtcggaggct 60
 gtgggcgcgg cgctgcagga gccccggcgg cagaggcgcc tggctgttgt tatcgtgtgc 120
 gtggcgctgt tactggacaa catgctgtac atggctcatg tgcccatagt gcccgaactac 180
 atcgcccaca tgcgcggggg cggcgagggc cccaccgga ctcccaggt gtgggagccc 240
 accctgccgc tgcccactcc ggccaatgcc agcgctaca cggccaacac ctcggcgtcc 300
 ccgacagctg cgtggccagc gggctcagcc cttcggcccc gctaccctac ggagagcgaa 360
 gacgtgaaga tcgggggtgct gtttgcttcc aaggctatcc tgcagctgct agtgaacccc 420

ttgagcgggc ctttcatcga ccgcatgagc tacgacgtgc cgctgctgat cggcctgggc 480
 gtcattgttc cctctacagt cctgttcgcc ttcgccgagg actacgccac gctgttcgcg 540
 gcgcgcagcc tgcagggcct gggctcagcc ttcgccgaca cgtctggcat agccatgac 600
 gccgataagt acccggagga gccggagcgc agtcgtgcac tgggcgtggc gctggccttc 660
 attagcttcg gaagcctagt ggccccgcc ttcgggggca tcctctatga gttcgccggc 720
 aagcgcgtgc ctttcttggg gctagctgcc gtgtcgtctt ttgacgcgt gttgctgctg 780
 gcagtggcca aacccttctc ggcggtgca cgggctcggg ccaacctgcc agtgggcact 840

cccatccacc gcctcatgct agaccctac attgccgtgg tggccggcgc gtcaccacc 900
 tgtaacattc ccttcgctt cctcgaacc accattgcca cgtggatgaa gcatacgatg 960
 gcggcttccg agtgggagat gggcatggcc tggctgccgg ccttcgtgcc tcatgtgctg 1020
 ggcgcttacc tcaccgtgcg cctggcggcg cgctaccac acctgcagt gctgtacggc 1080
 gcgcttgggc tggtgtgat gggcgccagc tcgtgcatg tgcccgctg ccgtccttc 1140
 gcgccgctag tggctcact atgcggcctc tgttttggca tagccctagt cgacacagca 1200

ctgctgcccc cgctcgccctt cctgggtggac gtgcgccatg tctcagtcta tggcagcgtc 1260

tacgccatcg ccgacatctc ctattcgggtg gcctacgcgc tcggggcccat agtggcaggc 1320

cacattgtgc actcgtcggg ctttgagcag ctacagccttg gcatgggact ggccaacctg 1380

ctctatgctc ccgtcttgct gctgctccgc aacgtgggcc tcctgacgcg ctcccgttcc 1440

gagcgcgatg tgctgcttga tgagccaccg caaggtctgt acgatgcggt ggcctgcgt 1500

gagcgtcctg tgctggcca ggacggcgag cctcgcagcc cgctggccc ttttgatgcg 1560

tgcgaggacg actacaacta ctactacacc cgcagctag 1599

<210> 4

<211> 1593

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

atggaaccca ccgcgccaac cggtcaggcc cgggcggcgg ccaccaaact gtcggaagcg 60

gtgggagccg cgctacaaga gccccagagg cagcggcgcc tggctgtgtg catcgtgtgc 120

gttgactgt tactggacaa catgtgttac atggtcatcg tgccattgt tccgactat 180

atgcccaca tgcgcggggg cagcgagggc ccgacctgg tctctgaggt gtgggaaccc 240

actctgccg cgccactct ggctaatacc agtgcctact tggccaacac gtcggcgtec 300

ccgacggctg ccgggtcgcc tcggtcaatc ctgcgacctc gctacccac agaaagcgaa 360

gatgtgaaga taggtgtgct gtttgccctc aaggctatcc tgcagcttct ggtgaacccc 420

ttaagcgggc ctttcattga tcgcatgagc tacgacgtgc cgctgcttat aggcctgggc 480

gtcatgttcg cctccacagt catgtttgcc ttgacagaag actatgccac gctcttcgct 540

gcgcgcagtc tacaaggcct gggctcggcc ttgcgggaca cgtctggcat tgccatgac 600

gccgacaagt atcccagga gcctgagcgc agtcgtgccc tgggcgtggc gctagccttt 660

attagctttg gaagcctagt ggcgccaccg ttggggggca tcctctacga gttcgcgggc 720

aagcgtgtac cttttctagt gctcgccgct gtgtcccttt tcgacgcgt cctgctcctg 780

gcggtggcta agcccttctc ggctcggct cgggcgcgag ccaacctgcc ggtgggcaca 840

cctatccatc gccatcatgt agacccttac atcgtgtgg tagccggcgc gctaccact 900

tgtaacattc cccttgcgtt cctcgagccc accatagcca cgtggatgaa gcacacaatg 960

gccgcatccg agtgggagat gggcatggtt tggtgccgg ctttcgtgcc acacgtgtta 1020

ggcgtctacc tcaccgtcgc cctggcggcg cgttatccac acctgcagtg gctgtacggc 1080

gctctcgggc tagcggtaat tggagttagc tcttgctcg tacctgcctg tcgtcattc 1140

gcgccgttag tggctctcgt ctgcggactc tgcttcggca tcgcgttagt ggacacagcg	1200
ctctaccca cgctcgctt tctggtggac gtgcgccacg tatccgtcta tggcagtgtc	1260
tatgccatag ctgacatctc ctattctgtg gcctacgcgc tcgggcccac agtggcaggc	1320
cacatcggtc acitctcttg ctttgagcag ctacgcctgg gcatgggcct ggccaacctg	1380
ctctacgcac cagtccttct tcttttgcgc aatgtaggcc tccttacacg ctgcggttcg	1440
gagcgcgatg tgttgcttga tgaaccgccg cagggtctgt acgacgcggt gcgcctgcgt	1500
gaggtgcagg gcaaggatgg cggcgaacct ttagcccccac ctggcccttt tgacgggtgc	1560
gaggacgact acaactatta ctcccgcagc tag	1593
<210> 5	
<211> 1743	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 5	
atggctttcc atgtggaagg actgatagct atcatcgtgt tctaccttct aattttgctg	60
gttgaatat gggctgcctg gagaacaaa aacagtggca gcgcagaaga gcgcagcgaa	120
gccatcatag ttggtggccg agatatgggt ttattggttg gtggatttac catgacagct	180
acctgggtcg gaggagggtat tatcaatggc acagctgaag cagtttatgt accaggttat	240
ggcctagctt gggctcaggc accaattgga tattctctta gtctgatttt aggtggcctg	300
ttctttgcaa aacctatcg ttcaaagggg tatgtgacca tgttagacce gtctcagcaa	360
atctatggaa aacgcatggg cggactcctg ttatttcttg cactgatggg agaaatgttc	420
tgggtgcag caattttctc tgctttggga gccaccatca gcgtgatcat cgatgtggat	480
atgcacattt ctgtcatcat ctctgcactc attgccactc tgtacacact ggtgggaggg	540
ctctattctg tggcctacac tgatgtcgtt cagctctttt gcatttttgt agggctgttg	600
atcagcgtcc ctttgcatt gtcacatcct gcagtcgcag acatcgggtt cactgctgtg	660
catgccaat accaaaagcc gtggttggga actgttgact catctgaagt ctactcttgg	720
cttgatagtt ttctgttgtt gatgtctgggt ggaatcccat ggcaagcata ctttcagagg	780
gttctctctt ctctctcagc cacctatgct caagtgtgtt ccttcttggc agctttcggg	840
tgcttggatg tggccatccc agccatactc attggggcca ttggagcatc aacagactgg	900
aaccagactg catatgggtc tccagatccc aagactacag aagaggcaga catgatttta	960
ccaattgttc tgcagtatct ctgccctgtg tatatttctt tcttttgtct tgggtgcagtt	1020
tctgtctgtg ttatgtcatc agcagattct tccatcttgt cagcaagttc catgtttgca	1080

cggaacatct accagctttc cttcagacaa aatgcttcgg acaaagaaat cgtttgggtt	1140
atgcgaatca cagtgtttgt gtttggagca tctgcaacag ccatggcctt gctgacgaaa	1200
actgtgtatg ggcctctggtta cctcagttct gacctgtttt acatcgttat cttccccag	1260
ctgctttgtg tactctttgt taagggaacc aacacctatg gggccgtggc aggttatgtt	1320
tctggcctct tctgagaat aactggaggg gagccatct tgtatcttca gcccttgatc	1380
ttctacctg gctattacce tgatgataat ggtatatata atcagaaatt tccatttaa	1440
acacttgcca tggttacatc attcttaacc aacatttgca tctcctatct agccaagtat	1500
ctatttgaaa gtggaacctt gccacctaaa ttagatgtat ttgatgctgt tgttgcaaga	1560
cacagtgaag aaaacatgga taagacaatt cttgtcaaaa atgaaaatat taaattagat	1620
gaacttgcac ttgtgaagcc acgacagagc atgacctca gctcaacttt caccaataaa	1680
gaggccttcc ttgatgttga ttccagtcga gaagggtctg ggactgaaga taatttacag	1740
tga	1743
<210> 6	
<211> 1428	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 6	
atgcgttcta agggatatgt gactatgtta gacctgttc aacagatcta tggaaagcgc	60
atgggtgggc tgcgtttcat cctgcactg atgggagaga tgttctgggc tgcagcgatt	120
ttctctgcat taggggttac catcagcgta atcattgatg tggatgtgaa catatcggtc	180
attgtctccg cactcattgc cattctttat accctcgtgg gagggctcta ctctgtggca	240
tatactgatg ttgtacagct attctgcatt tttataggat tgtggatcag tgtccattt	300
gccctgtcac atcctgcagt caccgacatt ggattcactg ctgtgcatgc taaataccag	360
agtccttggc tgggaacctt tgaatcaatt gaagtctaca cctggcttga taattttctg	420
ttgttgatgc tgggtggaat accatggcaa gcctacttcc agagggtcct ctcttcateg	480
tcagcgacct atgctcaggt gctgtccttc ctggcagctt ttgggtgcct ggtgatggct	540
ctaccagcca tatgcattgg ggccattgga gcctccacag actggaacca aactgcatat	600
gggtttccag atcccaagac caaggaggaa gcagacatga ttctcccgat tgttctacag	660
tacctctgcc ctgtgtacat ttctttcttt gggtttgggtg ctgtttctgc tgctgtcatg	720
tcctcggctg atcctccat cctatcagca agttccatgt ttgctcggaa tatctaccag	780
ctttccttca gacaaaatgc atcagacaag gaaatttgtt gggtcatgag gatcactgtg	840

tttgtgtttg gagcatctgc aacagccatg gccttgctca cgaagactgt gtatgggctc	900
tggtagctga gctctgacct tgtctacatc atcatcttcc cacagctgct ctgtgtactc	960
ttcacaaag gaaccaacac ttatggggca gttgctgggt atatttttgg acttttcctg	1020
agaattaccg gaggagagcc atatctatac ttgcagccct taatcttcta ccttggttat	1080
taccctgaca agaatgggtat atacaatcag aggttcccat ttaaaactct ctccatggtt	1140
acctcattct ttaccaacat ttgtgtttcc tatctagcca agtatctatt tgaaagtgga	1200
accttgccct caaaattaga tataattgat gctgttgtct caaggcacag tgaagagaac	1260
atggacaaga ccattctagt cagaaatgaa aacatcaaat taaatgaact tgcacctgta	1320
aagcctcgac agagcctaac cctcagttca actttcacca ataaagaggc tctccttgat	1380
gttgattcca gtccagaggg atctgggact gaagataact tacaatga	1428
<210> 7	
<211> 1518	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 7	
atgggctctg gcccgtcttc gctgcccctg gcgctgtcgc cgccgcggct gctgctgctg	60
ctgctgctgt ctctgctgcc agtggccagg gcctcagagg ctgagcacgc tctatttgag	120
cggctgtttg aagattacaa tgagatcatc cggcctgtag ccaacgtgtc tgaccagtc	180
atcatccatt tcgagggtgc catgtctcag ctggtgaagg tggatgaagt aaaccagatc	240
atggagacca acctgtggct caagcaaatc tggaatgact acaagctgaa atggaacccc	300
tctgactatg gtggggcaga gttcatgcgt gtcctgcac agaagatctg gaagccagac	360
attgtgctgt ataacaatgc tgttggggat ttccaggtgg acgacaagac caaagcctta	420
ctcaagtaca ctggggaggt gacttggata cctccggcca tctttaagag ctctgtaaa	480
atcgactga cctacttccc gtttgattac caaaactgta ccatgaagtt cggttcctgg	540
tcctacgata aggcgaaaat cgatctggtc ctgatcggct cttccatgaa cctcaaggac	600
tattgggaga gcggcgagtg ggccatcatc aaagccccag gctacaaaca cgacatcaag	660
tacaactgct gcgaggagat ctaccccgac atcacatact cgctgtacat ccggcgccctg	720
cccttgttct acaccatcaa cctcatcatc cctgcctgc tcattctctt cctcactgtg	780
ctcgtcttct acctgcctc cgactgcggt gagaaggtga ccctgtgcat ttctgtcctc	840
ctctccctga cgggtgttct cctggtgac actgagacca tcccttcac ctgctggtc	900
atccccctga ttggagagta cctcctgttc accatgattt ttgtaacctt gtccatcgtc	960

atcacgctct tcgtgctcaa cgtgcactac agaaccgccg cgacacacac aatgccctca	1020
tgggtgaaga ctgtattctt gaacctgtc cccagggtca tgttcattgac caggccaaca	1080
agcaacgagg gcaacgctca gaagccgagg cccctctacg gtgccgagct ctcaaactg	1140
aattgcttca gccgcgcaga gtccaaaggc tgcaaggagg gctaccctg ccaggacggg	1200
atgtgtggtt actgccacca ccgcaggata aaaatctcca atttcagtgc taacctcacg	1260
agaagctcta gttctgaatc tgttgatgct gtgctgtccc tctctgcttt gtcaccagaa	1320
atcaaagaag ccatccaaag tgtcaagtat attgctgaaa atatgaaagc acaaaatgaa	1380
gccaaagaga ttcaagatga ttggaagtat gttgccatgg tgattgatcg tatttttctg	1440
tgggttttca ccctggtgtg cattctaggg acagcaggat tgtttctgca acccctgatg	1500
gccagggaag atgcataa	1518
<210> 8	
<211> 1500	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 8	
atgggtgttg tgctgtccc gccgccgtg tccatgtga tgctggtgct gatgtgtctg	60
ccagcgccca gtgcctcaga agctgagcac cgcctgttcc agtacctgtt cgaagattac	120
aacgagatca tccggccagt ggctaattgtg tcccatccag tcattcatcca gtttgagggtg	180
tccatgtctc agctggtgaa ggtggatgaa gtaaaccaga tcattgaaac caacctgtgg	240
ctgaagcaaa tctggaatga ctacaagctg aaatggaaac cctctgacta ccaaggggtg	300
gagttcatgc gtgttcctgc agagaagatc tggaaaccag acatcgtact gtacaacaac	360
gctgatgggg atttccaggt ggatgacaag accaaagctc tactcaagta cacaggagaa	420
gtgacttga tcccgcggc catctttaag agctcatgca aaatcgactg gacctacttc	480
ccattcgact accaaaactg caccatgaag ttcggctcct ggtctctacg caaggcaaag	540
atcgacctgg tctcatcgg ctctccatg aacctcaagg actactggga gaggggcag	600
tgggctatca ttaaagcccc gggctacaaa catgaaatca agtacaactg ctgtgaggag	660
atctaccaag acatcacgta ctgcgtgtac atccgtcgcc tgccgtgtt ctacaccatc	720
aacctcatca tcccctgct gctcatctcc ttctcactg tgcttgtctt ctacctgcc	780
tccgactgtg gggagaaggt gacctctgc atctctgtgc tctctccct gactgtcttt	840
ctctggtga tcaccgagac cattcttcc acctcgtgg tcattccccct gattggggag	900
tacctctct tcatatgat tttgtcacc ttgtccattg tcattcacgt ctttgtctc	960

aatgtgcaact atagaactcc aaccacacac accatgccca cttgggtcaa ggccgtgttc	1020
ttgaacctgc tccccagggc catgtttatg actaggccga ccagtggtga gggggacact	1080
cctaagacga ggaccttcta cggcgctgag ctctcaaacc tgaactgctt cagccgtgca	1140
gactccaaaa gcigcaagga aggctacccc tgccaagatg ggacctgtgg ctactgccac	1200
caccgtaggg taaaaatctc aaatttcagt gccaacctca caagaagctc cagttctgag	1260
tctgtcgacg ctgtgttgtc cctctctgcc ctgtcaccag aaatcaaaga agccatccaa	1320
agtgtgaagt acattgccga aaacatgaaa gcacagaatg tagccaaaga gattcaagat	1380
gattggaagt acgttgccat ggtgattgat cgcacttttc tctgggtttt catcctggtg	1440
tgcatttttag gaacggcggg attattttctg caacccttga tggccagaga tgacacatag	1500
	1500
<210> 9	
<211> 1377	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 9	
atgtccccag attttatgct ggtttctcctc gtccttggca tcccttctc agccaccaca	60
ggtttcaact caatcgccga aaatgaagat gccctctca gacatttgtt ccaaggttat	120
cagaaatggg tccgccctgt attacattct aatgacacca taaaagtata ttttgattg	180
aaaatatccc agctttaga tgtggatgaa aagaatcagc tgatgacaac caatgtgtgg	240
ctcaaacagg aatggacaga ccacaagtta cgttggaatc ctgatgatta tggtaggac	300
cattccatta aagttccatc agaattcttg tggcttcttg acatagttct ctttgaaat	360
gctgacggcc gcttcgaagg ctccctgatg accaaggtca tcgtgaaatc aaacggaact	420
gttgtctgga cccctccgc cagctacaaa agtcctgca ccatggacgt cacgtttttc	480
ccgttcgacc gacagaactg ctccatgaag ttggatcct ggacttatga tggcaccatg	540
gttgacctca ttttgatcaa tgaaaatgtc gacagaaaag acttcttcga taacggagaa	600
tgggaaatac tgaacgcaaa ggggatgaag gggaacagaa gggacggcgt gtactcctat	660
ccctttatca cgtattcctt cgtcttgaga cgcctgcctt tattctatac cctctttctc	720
atcatccctt gcctggggct gtctttccia acagttcttg tgttctatct accctcgat	780
gaaggagaaa aactttcatt atccacatcg gtcttggttt ctctgacagt tttcctttta	840
gtgattgaag aaatcatccc atcgtcttcc aaagtcattc ctctcattgg agagtacctg	900
ctgttcacat tgatttttgt gacctgtcc atcattgtta ccgtgtttgt cattaacgtt	960

caccacagat ctcttccac gtaccacccc atggccccct gggttaagag gctcttctg	1020
cagaaacttc caaaattact ttgcatgaaa gatcatgtgg atcgctactc atccccagag	1080
aaagaggaga gtcaaccagt agtgaaaggc aaagtcctcg aaaaaaagaa acagaaacag	1140
cttagtgatg gagaaaaagt tctagtgtct tttttggaaa aagctgctga ttccattaga	1200
tacatttcga gacatgtgaa gaaagaacat tttatcagcc aggtagtaca agactggaaa	1260
ttttagctc aagtcttga ccgaatcttc ctgtggctct ttctgatagt gtcagtaaca	1320
ggctcggttc tgatttttac ccctgctttg aagatgtggc tacatagtta ccattag	1377
<210> 10	
<211> 1395	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 10	
atgacaggct tcctaagggt cttcttgggt ctcagtcca ctctctcagg ttcttgggtg	60
actcttacgg ccactgcagg actcagctca gtggctgaac acgaagacgc actcctcaga	120
catttgttcc aaggttacca gaaatgggtc cgccctgtgt tgaattccag tgacatcata	180
aaagtgtatt ttggattaaa aatatcccag ctgttgatg tggatgaaaa gaatcagctg	240
atgacgacaa atgtgtgggt gaagcaggaa tggacagacc aaaaattacg ctggaatccg	300
gaagaatatg gtggaattaa ttcgataaag gttccatcag aatcgctctg gctgccggac	360
atagtctctt ttgaaatgc tgacggacgt tttaggggt cctcatgac caaggccatt	420
gtgaagtcca gtggaaccgt cagctggact cctcccgcca gctacaagag ttctgcacc	480
atggatgtca catttttccc gttcgacagg cagaactgct cgtgaagtt tggatcctgg	540
acttacgacg gtaccatggt tgacctcatt ctaatcaatg aaaacgttga ccggaagac	600
ttttttgata acggagagtg ggagatactc aacgcaaagg ggatgaaggg caacagaaga	660
gaaggctttt actcctatcc gtttgttacc tactcttttg tctgagacg cctgcccttg	720
ttttacacgc tctttttgat aatcccctgc ctgggttgt cttttctcac ggtcctggtg	780
ttctacctac cctcgacga aggggaaaaa ctctcattat ccacctccgt ttgggtctct	840
ttgacggtgt ttcttttagt gattgaagaa ataatcccgt cctcttcgaa ggtcatcccc	900
ctcattggcg agtacctct cttcattatg atttttgtca cgctgtctat tatcgtcacg	960
gtttttgtaa ttaatgtcca ccacagatct tcctcaacgt accatcccat ggccccctgg	1020
gtgaagaggc tgtttctaca aagactcccg agatggcttt gcatgaagga ccccatggac	1080
cgcttctctt tcccgatgg aaaggagagt gatacagccg tgagggggaa agtctcaggc	1140

aaaaggaaac agactccgc cagcgatgga gaaagagttc tggtcgcttt cctcgagaag	1200
gcctccgagt ccatcagata catttcgagg catgtgaaaa aggaacactt catcagccag	1260
gtagtcaag actggaaatt tgtggctcaa gttctggacc gcatcttcct gtggctcttt	1320
ctgatagctt ctgtgttggg ttccattctg atttttattc cagccttgaa gatgtggata	1380
catcgtttcc actag	1395
<210> 11	
<211> 1497	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
atgaggcgcg cgccttccct ggtccttttc ttcttggtcg cctttgcgg gcgcgggaac	60
tgccgcgtgg ccaatgcgga ggaaaagctg atggacgacc ttctgaacaa aacccgttac	120
aataacctga tccgccccagc caccagctcc tcacagctca tctccatcaa gctgcagctc	180
ttcctggccc agcttatcag cgtgaatgag cgagagcaga tcatgaccac caatgtctgg	240
ctgaaacagg aatggactga ttaccgcctg acctggaaca gctcccgtta cgagggtgtg	300
aacatcctga ggatccctgc aaagcgcac tggttgcctg acatcgtgct ttacaacaac	360
gccgacggga cctatgaggt gtctgtctac accaacttga tagtccggtc caacggcagc	420
gtcctgtggc tgccccctgc catctacaag agcgcctgca agattgaggt gaagtacttt	480
cccttcgacc agcagaactg caccctcaag ttccgctcct ggacctatga ccacacggag	540
atagacatgg tctcatgac gccacagcc agcatggatg actttactcc cagtggtag	600
tgggacatag tggccctccc agggagaagg acagtgaacc cacaagacc cagctacgtg	660
gacgtgactt acgacttcat catcaagcgc aagcctctgt tctacacat caacctcatc	720
atccctgcg tgctcaccac ctgtctggcc atcctcgtct tctacctgcc atccgactgc	780
ggcgagaaga tgacactgtg catctcagt ctgctggcac tgacattctt cctgtctctc	840
atctccaaga tegtgcacc cactccctc gatgtgctc tcacggcaa gtacctcatg	900
ttcaccatgg tgctggtcac cttctccatc gtcaccagcg tctgtgtgct caatgtgcac	960
caccgtctgc ccagcaccca caccatggca cctgggtca agcgtgctt cctgcacaag	1020
ctgectacct tctcttcat gaagcgccct ggccccgaca gcagcccggc cagagccttc	1080
ccgccagca agtcatgctg gaccaagccc gaggccaccg ccacctccac cagccctcc	1140
aacttctatg ggaactccat gtactttgtg aacccgcct ctgcagcttc caagtctcca	1200
gccggctcta ccccggtggc tatccccagg gatttctggc tgcggtctc tgggaggttc	1260

cgacaggatg tgcaggaggc attagaaggt gtcagcttca tcgcccagca catgaagaat	1320
gacgatgaag accagagtggt cgttgaggac tggaagtacg tggctatggt ggtggaccgg	1380
ctgttcctgt ggggtgttcat gtttgtgtgc gtcttgggca ctgtggggct ctctctaccg	1440
ccccctctcc agacccatgc agcttctgag gggccctacg ctgcccagcg tgactga	1497
<210> 12	
<211> 1488	
<212> DNA	
<213> Rattus norvegicus	
<400> 12	
atgaggggta cgccccctgt cctcgtctct ctgttctctc tgcttcagga cggggactgc	60
cgcttgcca acgcagagga gaagctgatg gatgacctcc tgaacaaaac ccggtacaac	120
aacctgatcc gccagccac cagctcctct cagctcatct ccatccgct ggagctatca	180
ctgtcccagc tcatcagtg gaatgagcga gaacagatca tgaccaccag catctggctg	240
aaacaggaat ggactgacta ccgcttgcc tggaacagct cctgtatga aggggtgaac	300
attctgagga tccccgaaa gcgtgtctgg ttgcctgaca tcgtgttgta caacaatgcc	360
gatggcacct atgaggtgtc tgtctacacc aacgtgattg tgcgttcaa tggcagcatc	420
cagtggctgc cccctgtat ctacaagagt gctgcaaga ttgaggtgaa gcactttccc	480
ttcgaccagc agaactgcac cctcaaattc cgctcctgga cctatgacca cacggagatt	540
gacatggttc ttaagtcgcc caggccatc atggatgact tcacccccag tggatgaatgg	600
gacattgtgg cctcccagg acggaggacg gtgaaccctc aggaccccag ctacgtggac	660
gtgacctatg acttcatcat caagcgcaag ccgtcttct acaccatcaa tcttattatt	720
ccttgtgtgc tcatcacctc gctggctatc ctggtcttct acctgccctc cgactgtggg	780
gagaagatga cgctctgcat ctctgtgtct ctggcactca cgttcttct gctgctcatc	840
tccaagatcg tgctccac ctcccttgac ataccgtca ttggcaagta cctcttgctc	900
accatggtgc tggtcacctt ttccatctc accactgtgt gtgtcctcaa tgtgcaccac	960
cgctcaccca gcactcacac catggcatcc tgggtcaagg agtgcttct gcacaaactg	1020
cccaccttcc tcttcatgaa gcgtcccggt ctggaagtc gctggctcag ggtccctcat	1080
cccagccagc tgcaattggc cacagctgat actgcagcca cctctgctt agggcccacc	1140
agcccatcca acctctatgg gatttccatg tactttgtga accctgtccc tgccgtcct	1200
aagtctcgag tcagctccca cacagcaggc ctccccaggg atgccgtct gaggtctctc	1260
gggaggttcc gggaagatct acaggaagca ttagagggtg tcagcttcat cgcccagcat	1320

ctggagagcg atgaccgaga tcaaagtgic atcgaggact ggaagttcgt cgcgatggtt 1380

gttgaccgcc tgttcctgtg ggtgttcgtg tttgtgtgta ttctgggcac catggggctc 1440

ttcctgccac cccctttcca gatccacgca cctccaagg actcctag 1488

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human VACHT Probe

<400> 13

gtcatcgtgc ccatagtgcc cgact 25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CHT Primer_Forward

<400> 14

gaacatctac cagctttcct tcaga 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CHT Primer_Reverse

<400> 15

tgattcgcac aacccaaacg atttc 25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human CHAT Probe

<400> 16

agtgaggagt ctgggctgcc caaac 25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CHRNA3 Probe

<400> 17
 acctgtggct caagcaaadc tggaa 25

<210> 18
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CHRNB3 Probe

<400> 18
 ttgaaaatgc tgacggccgc ttcga 25

<210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CHRNB4 Probe

<400> 19
 cctttgcggg cgcggaact gccgc 25

<210> 20
 <211>
 > 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CAMK2B Probe

<400> 20
 agcattccaa catcgtgcgt ctcca 25

<210> 21
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human GAPDH Probe

<400> 21
 gggcgcctgg tcaccagggc tgctt 25

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human TBP Probe
 <400> 22
 gcagctgcaa aatattgtat ccaca 25

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CYC1 Probe
 <400> 23
 tcttagagtt tgacgatggc acccc 25

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse VACHT Primer_Forward
 <400> 24
 aaacatcgtc cactggtcc 19

<210> 25
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse VACHT Primer_Reverse

<400> 25
 ctttcctaa gatgcctcca c 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CHT Primer_Forward

<400> 26
 tttccagatc ccaagaccaa g 21

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CHT Primer_Reverse
 <400> 27
 atgctccaaa cacaaacaca g 21

<210>
 > 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CHAT Primer_Forward
 <400> 28
 tccaagacac caatgaccag 20

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CHAT Primer_Reverse
 <400> 29
 ggacgccatt ttgactatct ttc 23

<210> 30
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CHRNA3 Primer_Forward

<400> 30
 ttctacctgc cctccgactg t 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CHRNA3 Primer_Reverse

<400> 31

aatcccgccg ttcctaaaat g 21

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CHRNB3 Primer_Forward

<400> 32

gaaaggagag tgatacagcc g 21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CHRNB3 Primer_Reverse

<400> 33

agaaagagcc acaggaagat g 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CHRNB4 Primer_Forward

<400> 34

ctatcactgt cccagtcac c 21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse CHRNB4 Primer_Reverse

<400> 35

agaacatgt caatctccgt g 21

<210> 36

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CAMK2B Primer_Forward
 <400> 36
 cagaagctga ggcctccca 20
 <210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse CAMK2B Primer_Reverse
 <400> 37
 ggtcacagat tttgcatag g 21

 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse GAPDH Primer_Forward
 <400> 38
 ccttcattga cctcaactac at 22
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse GAPDH Primer_Reverse
 <400> 39
 caaagttgtc atggatgacc 20
 <210> 40
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CHAT shRNA

 <400> 40

gagcgagcct tgttgacat	19
<210> 41	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> scrambled RNAi	
<400> 41	
tcgtcatagc gtgcatagg	19