(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085319
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6896 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0178233
(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 2019년12월30일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7 102동 303호 (호탄동, 대동아파트)
(74) 대리인
이원희

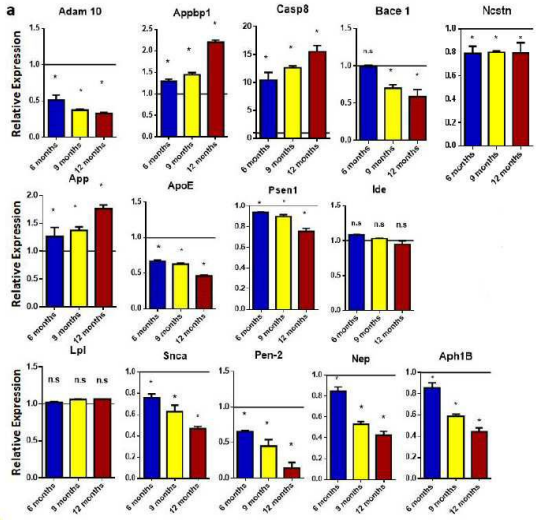
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **알츠하이머 병기 예측용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 예측 키트**

(57) 요 약

본 발명의 Nos1(Nitric oxide synthase 1), Aph1B(Anterior pharynx defective 1 homolog B), Ryr3(Ryanodine receptor 3), Atf6(Activating transcriptional factor 6), Ip3r(Inositol trisphosphate receptor), Nep(Neprilysin), Cdk5(cyclin dependent kinase 5) 및 Abad(Amyloid beta-binding alcohol dehydrogenase)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 검출시약을 포함하는 알츠하이머의 예후 예측용 조성물, 키트 및 예후 예측의 정보를 제공하는 방법은 알츠하이머의 예후를 신속하고 정확하게 예측하고, 약물 투여 전후의 발현 수준을 비교하여 약물에 대한 예후를 판정할 수 있으므로 예측된 예후에 따른 적절한 치료방향을 결정할 수 있다. 따라서 알츠하이머로 인한 사망률의 감소에 크게 기여할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/56 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 중기 또는 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 4

Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 7

Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 10

제 1항, 제 4항 또는 제 7항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 11

제 1항, 제 4항 또는 제 7항에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앱타머를 포함하는 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 키트.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인, 알츠하이머의 병기 예측용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알츠하이머 질환에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소 되는 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 병기 예측용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 알츠하이머 질환(Alzheimer's Disease, AD)은 노화에 관련된 대표적인 신경 퇴행성 질환이다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 전두엽 및 측두엽에서 시작하여 뇌의 다른 부위로 점차적으로 퍼지며 병이 진행된다. 알츠하이머 질환의 주요한 병리학적 특징은 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 인한 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 미세소관(microtubule)에 관련된 타우 단백질(tau protein)이 신경세포에서 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)을 형성하는 것이다. 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)의 형성은 신경퇴행, 시냅스 기능 장애 및 치매(dementia)로 이어진다.

[0004] 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)는 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)에 의해 생성된다. 아밀로이드 전구체 단백질은 신경 세포의 세포막을 관통하는 막전이 단백질로, 신경 세포의 성장, 생존 및 손상 후 복구에 매우 중요하다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)이 γ- 세크레타아제(secretase) 및 β- 세크레타아제(secretase) 효소에 의해 분해, 절단되면서 39~43개의 아미노산으로 이루어진 아밀로이드 베타(amyloid beta)가 생성되고, 이는 신경 세포의 외부에 고밀도로 축적된 덩어리인 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)를 형성한다.

[0005] 또한, 알츠하이머가 발병한 환자에게서 타우 단백질의 이상 응집이 관찰된다. 타우 단백질(tau protein)은 신경

세포에서 세포 물질을 수송하는 튜브 형태의 구조물인 미세소관에 관련된 단백질이다. 인산화된 타우 단백질은 미세소관을 결합시키고 붕괴를 막아 신경세포를 안정화시키는 작용을 한다. 알츠하이머 질환이 발병한 경우, 타우 단백질은 과인산화(hyper phosphorylation)되어 미세소관에서 타우 단백질이 떨어져 나가고 이에 미세소관은 구조적 안정성이 저하되어 신경세포에서 신호전달이 제대로 이루어지지 않는다. 미세소관에서 떨어져 나간 과인산화된 타우 단백질은 응집되어 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)을 형성한다.

[0006] 아밀로이드 플라크(amyloid plaque) 및 신경섬유다발(neurofibrillary tangle, NFT)의 형성은 알츠하이머 발병의 주된 원인이며, 현재 알츠하이머를 진단하기 위해 침착된 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)와 과인산화된 타우 단백질(tau protein)을 진단 마커로 사용하고 있다. 아밀로이드 베타를 타겟으로 하는 뇌영상 법으로 아밀로이드-PET(positron emission tomography)가 개발되었으나, 이는 인지기능이 정상인 노인에게서도 아밀로이드 플라크가 관찰될 수 있어, 약 35%의 환자가 잘못 진단되고 있다. 또한, 비교적 최근 타우-PET가 도입되기 시작하였으나, 아직까지 널리 사용되지는 못하고 있으며, 현재까지 사후 부검을 통한 검증만이 알츠하이머를 확정적으로 진단할 수 있는 수단으로 여겨지고 있다.

[0007] 알츠하이머 질환에서는 초기 전구증상이 나타나는 시기 뿐 아니라 치매(dementia) 단계에서 질환을 진단하는 것이 중요하다. 알츠하이머와 같은 연령에 관련된 질환은 질병을 명확하게 진단하기 더욱 어려운 특성이 있어 질병의 경과 수준에 따른 생물학적 진단도구가 절실하게 요구되고 있다. 최근 알츠하이머에서 특이적으로 발현되는 유전자 마커의 발현수준을 측정함으로써 알츠하이머를 진단하려는 연구가 이루어지고 있으나, 알츠하이머 환자의 예후를 예측하기 위한 유전자 마커에 대한 연구는 상대적으로 덜 이루어지고 있다. 그러나 같은 병기로 진단된 알츠하이머라도 그 예후는 환자마다 차이가 있으므로, 알츠하이머의 효과적인 치료를 위해서는 알츠하이머의 예후를 정확하게 예측하는 것이 무엇보다 중요하다. 알츠하이머와 같은 여러 유전자가 관련된 다인성 질병을 정확하게 진단하기 위해서는 유전자 발현 분석이 가장 적절한 도구이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 알츠하이머 질환 동물 모델을 이용하여 여러 유전자들의 발현을 분석한 결과 특징적으로 발현이 증가 또는 감소하는 유전자를 선별하고, 이를 이용하여 알츠하이머 병기를 예측할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 dk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예

측용 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머의 병기 예측용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 알츠하이머 질환에서 특징적으로 발현이 증가 또는 감소 되는 유전자 조합은 알츠하이머 질환 마우스 모델에서 정상 대조군에 비해 발현이 유의하게 증가 또는 감소하기 때문에, 상기 유전자 조합의 발현 수준을 측정하면 알츠하이머 질환의 병기를 정확하게 진단 또는 예측할 수 있으며 발병 유무를 빠르게 진단하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 APP 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 1b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 APP 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 1c는 알츠하이머 발병 월령별로 APP 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

도 2a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 타우 단백질 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 2b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 타우 단백질 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 2c 알츠하이머 발병 월령별로 타우 단백질 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

도 3a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 소포체 스트레스 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 3b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 소포체 스트레스 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 3c는 알츠하이머 발병 월령별로 소포체 스트레스 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

도 4a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 4b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 4c는 알츠하이머 발병 월령별로 칼슘 신호 붕괴 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

도 5a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 5b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여

정상 대조군 보다 높게 발현하는 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 5c는 알츠하이머 발병 월령별로 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

도 6a는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 1.0으로 나타내고 이에 대한 염증반응과 세포사멸 관련 유전자의 상대적인 발현도를 나타낸 도이다.

도 6b는 정상 대조군 마우스의 유전자 발현도를 기준으로 fold change 값을 구하고, 이 값에 log2값을 취하여 정상 대조군 보다 높게 발현하는 염증반응과 세포사멸 관련 유전자는 양의 값으로, 낮게 발현하는 유전자는 음의 값으로 나타낸 도이다.

도 6c는 알츠하이머 발병 월령별로 염증반응과 세포사멸 관련 유전자의 발현도를 나타낸 산점도(scattered dot plot)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 '병기(disease stage)'란 질병의 경과를 그 특징에 따라 구분한 시기를 의미한다. 알츠하이머의 병기는 불용성 과인산화 타우 단백질의 세포 내 엉킴 및 뉴런 사이의 아밀로이드 베타(Aβ) 펩타이드로 구성된 비정상 단백질 침착물의 축적 정도로 표시된다. 이러한 타우 단백질의 세포 내 엉킴과 아밀로이드 베타 플라크의 생성은 기억 상실과 학습 장애 증상이 나타나기 전에도 알츠하이머 초기 단계에서부터 나타난다. 알츠하이머가 진행됨에 따라 뇌의 더 넓은 영역이 이러한 엉킴과 플라크에 의해 영향을 받을 때 기억 상실과 학습 결손이 증가한다. 말기 알츠하이머는 광범위한 뇌의 부위에서 신경 변성, 신경 사멸 및 뇌 수축이 나타난다.

[0027] 알츠하이머의 병기는 초기 알츠하이머, 중기 알츠하이머 및 말기 알츠하이머로 구분할 수 있다. 아밀로이드 베타 플라크가 뇌의 isocortex에서만 보이거나, 선조체(striatum)와 entorhinal cortex에서 보이며, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 경내후각 피질(transentorhinal)에서 관찰되면 초기 알츠하이머로, 아밀로이드 베타 플라크가 선조체(striatum)와 간뇌(diencephalon)에서 보이고, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 대뇌변연계(limbic)에서 관찰되면 중기 알츠하이머로, 아밀로이드 베타 플라크가 다양한 뇌간(brainstem)의 신경핵에서 보이거나, 소뇌에서 보이며, 타우 단백질의 세포 내 엉킴이 대뇌피질(subcortical)에 넓게 분포한 경우 말기 알츠하이머로 진단할 수 있다.

[0028] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.

[0029] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 중기 또는 말기로 진단할 수 있다.

[0030] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0031] 상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스

뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앱타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0035] 또한, 본 발명은 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자 조합의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단할 수 있다.

[0037] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0039] 상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앱타머를 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앱타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명은 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자의 mRNA 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 알츠하이머의 병기 예측용 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 증가하면 알츠하이머의 병기 중 초기로 진단하는 것일 수 있다.

[0045] 상기 유전자의 mRNA 발현량이 정상 개체로부터 분리된 mRNA 발현량보다 감소하면 알츠하이머의 병기 중 말기로 진단하는 것일 수 있다.

[0046] 상기 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Realtime RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소 연쇄반응(competitive RT-PCR), Rnase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블랏팅(Western blotting), 효소면역분석법(Enzyme-linked immunosorbent assay), 및 방사능면역분석법(RIA) 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0047] 상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체, 또는 앱타머를 포함하는 것일 수 있다.

[0048] 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자와 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브, 안티센스 뉴클레오티드(anti-sense nucleotide), 항체, 항체 단편 또는 앱타머로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 알츠하이머 병기 예측용 키트를 제공한다.

[0051] 상기 키트는 RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[0053] 따라서, 본 발명의 Erk/Mapk2(extracellular signal-related kinase/mitogen-activated protein kinase 1), Ide(insulin degrading enzyme), Il1b(interleukin beta) 및 Vdcc(voltage-dependent calcium channel) 유전자의 조합은 알츠하이머 질환 환자에서 정상 대조군에 비해 초기에는 발현이 유의하게 감소하나 중기 또는 말기에는 발현이 유의하게 증가하고, Cdk5(cyclin-dependent kinase 5) 및 Serca1(sarco/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1) 유전자 조합은 알츠하이머 질환 환자에서 정상 대조군에 비해 초기에는 발현이 유의하게 증가하나, 말기에는 발현이 유의하게 감소하므로 본 발명의 조성물 및 키트를 이용할 경우 알츠하이머 질환의 병기를 예측하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[0055] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0056] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0058] **<실시예 1> 알츠하이머 질환 마우스 모델의 준비**

[0059] 알츠하이머 질환 마우스 모델(AD)은 Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입한 B6.Cg-Tg(APPswe,PSEN1dE9)85Dbo/Mmjax 이중 형질전환 마우스(double transgenic mouse)를 사용하였다. 이 마우스는 중추신경계의 신경세포에서 Swedish mutation(Mo/HuAPP695swe) 및 돌연변이 인간 presenilin 1 단백질(PS1-dE9)을 갖는 chimeric mouse-human amyloid precursor protein(APP)을 발현한다. 정상 대조군 마우스(wild type, WT)는 C57BL/6J 마우스로 샘타코 코리아(SAMTAKO Korea, 대한민국)에서 구입하여 25℃에서 12 시간 명암 주기 및 임의 섭식 조건으로 사육하였다. 모든 실험 과정은 경상대학교 동물 윤리 위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[0061] **<실험예 1> 정상 대조군 마우스와 알츠하이머 발병 마우스의 유전자 발현 비교**

[0062] **<1-1> APP 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[0063] 신경퇴행의 가장 큰 특징 중 하나인 아밀로이드 베타 단백질의 축적은 APP로부터 유발되므로, Adam10, App, Lpl, ApoE, Appbp1, Snca, Casp8, Psen1, Pen-2, Ide, Nep, Base1, Ncstn, Aph1b 유전자의 발현을 정상 대조군(WT)과 알츠하이머 발병 마우스(AD)에서 비교하였다(도 1a 및 도 1b).

[0064] 6, 9, 및 12개월령의 알츠하이머 질환 마우스 모델과 정상 대조군 마우스에서 TRIzol 시약(Thermofisher)를 사용하여 마우스 뇌 해마 부위에서 RNA를 분리하였다. 뇌 조직을 균질화(Homogenization)시키기 전에 TRIzol 시약 100㎕를 첨가하여 실온에서 5분간 배양하였다. 그 후 20㎕의 클로로포름을 첨가하여 혼합한 후 실온에서 2분간 추가 배양하였다. 혼합물을 4℃ 13000 rpm의 조건에서 10분간 원심분리 하고, 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 250㎍의 무수 이소프로판올(absolute isopropanol)을 첨가하고 실온에서 10분간 배양하였다. 그 후 혼합물을 4℃ 13000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 얻은 RNA 펠렛(pellet)을 75% 에탄올 250㎍을 사용하여 세척하였다. 세척 후 RNA 펠렛(pellet)을 실온에서 건조 시키고 RNase 없는 물 50㎕에 현탁하였다. 분리된 총 RNA 중 2㎍의 RNA를 cDNA 합성에 이용하였다. 반응 튜브에서 RNA를 65℃, 10분간 변성시킨 후, 얼음에서 급속 냉각하였다. 반응 튜브에 4㎕, 5 ×250mM의 Tris-HCl에 375mM의 KCl과 15mM의 $MgCl_2$ 를 첨가한 pH 8.3의 PCR 완충액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2㎕의 100mM dithiothreitol(DTT)(Invitrogen)을 첨가하고 실온에서 2분간 배양한 후, 200 유닛(unit)의 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen)을 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시켜 최종적으로 cDNA를 수득하였다. dNTP가 포함된 PCR mixture가 사용되었지만, 일반적으로 200nM의 농도로 사용된다. 프라이머농도는 0.1㎛로 사용되었다.

[0065] 수득한 cDNA 5㎕, 각 유전자 특이 프라이머 0.1 ㎛(표 1, 서열번호 1 내지 102), 및 Amplitaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 최종부피가 25㎕가 되도록 증류수를 첨가하여 PCR 반응용액을 조성한 다음, 상기 PCR 반응 용액을 94℃에서 최초 5분간 열변성(denaturation) 후, 94℃에서 45초간 열변성(denaturation), 55℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72℃에서 45초간 중합반응(extension)을 총 25 사이클을 반복하고, 최종 중합반응으로서 72℃에서 7분의 조건으로 수행하였다(표 2).

[0066] 증폭된 PCR 생성물 20㎕를 에티디움 브로마이드(ethidium bromide, EtBr)가 함유된 1.5% TAE 젤에서 전기영동

을 수행한 후, Gel Doc XR+ Molecular Imager System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) densitometry를 사용하여 GADPH 유전자의 발현량과 상대적 비교를 통해 정량화하였다.

[0067] 그 결과, App, Appbp1, Casp8은 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Adam10, ApoE, Psen1, Pen-2, Nep, Bace1, Aph1b, Snca는 발현이 유의하게 감소하였으며 Ide는 발현의 차이가 없었다(도 1a 및 도 1b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nep 및 Aph1b 유전자를 선별하였다.

표 1

Gene Name	Reverse Primer Sequence 5′ to 3′	Forward Primer Sequence 5′ to 3′
Adam10	atcgaatcctgccatttcac	agccagagttgtgcgttttt
Abad	gacttccagcgggttatcaa	cagtgtcatgcccactatgc
Aph1B	gctgttcaggctcgcatatt	aatcaccatgaatgcccact
Apo-E	gtgctgttggtcacattgct	cagtgccgtcagttcttgtg
App	ggccctcgagaattacatca	gttcatgcgctcgtagatca
Atf6	ggccagactgttttgctctc	cccatacttctggtggcact
Serca1	tggccgatgataacttctcc	gagcccatcagtcaccaagt
Bace1	tttgtggagatggtggacaa	tacacacccttcggaggtc
Bad	gggatggaggaggagcttag	cccaccaggactggataatg
Bid	tcacagacctgctggtgttc	gtctggcaatgttgtggatg
Vdcc	cgttctcatcctgctcaaca	tatgctcccaatgacgatga
Calm1	actgggtcagaacccaacag	gttctgccgcactgatgtaa
Caln	cagagggtgcttcgattctc	aaggcccacaaatacagcac
Casp12	ttcccaggaacagctgagtt	tcacgtggacaaagcttcag
Casp3	tgtcatctcgctctggtacg	tcccataaatgacccccttca
Casp7	tttgcttactccacggttcc	cacgggatctgcttcttctc
Casp8	ggcctccatctatgacctga	gcagaaagtctgcctcatcc
Casp9	aagaccatggctttgaggtg	aagtccctttcgcagaaaca
Cdk5	gtccatcgacatgtggtcag	acgacgttcaccaaggatgt
P25	cgtccactagtgagctgctg	cccacctcagaggagatgac
Cxi	ctctccccagtaccctcgac	gggagtgggcctgaaattag
Cxii	cctttgggaaccacagctaa	tcaaagttcccaggaagcag
Cxiii	gttcgcagtcatagccacag	tagggccgcgataataaatg
Cxiv	gtgtccccactgatgaggag	cagccaaaaccagatgacag
Cxv	gaaactggaccaggtggaga	gataccctgggtgttgccta
Cycs	gggaggcaagcataagactg	tctgccctttctcccttctt
Perk	tggtgactgctatggaccaa	gttccatctgggtgctgaat
Fadd	acaatgtggggagagactgg	aggtcagccaccagattcag
Fas	ttgcaagacatgtcggaaag	cctgcatggcagttacacac
Appbp1	gcagccagggaagatactca	tcttctccgctgaccagatt
Gapdh	aagggctcatgaccacagtc	acacattgggggtaggaaca
Gq	cacgctcaagatcccataca	ggctacacggtccaagtcat
Nmdar	cagcaggactggtcacagaa	tttgttccccaagagtttgc
Gsk3b	gaggagagcccaatgtttca	aatttgctcccttgttggtg
Ide	gaggcgttccaaaaacacat	gacagccaacatttcctggt
Il1b	gaccttccaggatgaggaca	tccattgaggtggagagctt
Ip3r	gaatttccttcgttgccaaa	cgatgcagttctggttctca
Ire1a	cccaaatgtgatccgctact	agaatgttgtggggcttcag
Lpl	ttttctgggactgaggatgg	gtcaggccagctgaagtagg
Lrp1	gacagcaaacgaggcctaag	acaggggttggtcacttcag
Erk	tccttttgagcaccagacct	agcagatgtggtcattgctg
Mapt	gtggccaggtggaagtaaaa	gtggagatgtgtccccagac
Ncstn	ctgaccactctggctccttc	gctgctgaagttggttcctc
Nep	aggcggacaacctctactca	cgaggctggtcaaaatgaat
Nos1	agcacctaccagctcaagga	atagtgatggccgacctgag
Plcb1	catccaggaggtggttcagt	ccctttcatggcttcctgta
Psen1	cctcatggccctggtattta	tcagccatattcaccaacca
Pen-2	cgggtatccaatgaggagaa	gcgagaatgatcacccagaa
Ryr3	gtgcagcctctactcccttg	atgtcctccaccttgtctgg
Snca	ggagtgacaacagtggctga	caggcatgtcttccaggatt
Tnf	cgtcagccgatttgctatct	cggactccgcaaagtctaag

[0068]

표 2

[0069]

온도(℃)	시간	사이클 수
94	5분	1
94	45초	25
55	30초	25
72	45초	25
72	7분	1

[0071] **<1-2> 타우 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[0072] 타우 단백질은 미세소관의 안정화에 관련된 단백질로, 알츠하이머가 발병하면 타우 단백질의 과인산화는 미세소관의 구조적 안정성을 저해한다. 이는 신경세포에서 신호전달과 기억력을 감퇴시키므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[0073] 구체적으로, 타우 단백질의 과인산화에 관련된 Caln, Nos1, Gsk3b, Mapt/tau, P25, Cdk5 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[0074] 그 결과, Nos1, Gsk3b, Mapk/tau, Cdk5는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Caln은 발현이 유의하게 감소하였으며 P25는 발현의 차이가 없었다(도 2a 및 도 2b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 및 Cdk5 유전자를 선별하였다.

[0076] **<1-3> 소포체 스트레스에 관련된 유전자 발현 비교**

[0077] 소포체 스트레스로 인한 소포체 기능장애는 알츠하이머 질환의 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, presenilin 1 및 presenilin 2 단백질의 돌연변이, 아밀로이드 베타의 생성, 타우 단백질의 과인산화 및 세포사멸에 관련이 있다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[0078] 구체적으로, 소포체 스트레스에 관련된 Ryr3, Ip3r, Psen1, Serca1, Perk, Ire1a, Atf6, Gq, Plcb1 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 3a 및 도 3b에 나타내었다.

[0079] 그 결과, Ryr3, Ip3R, Ire1a, Plcb1는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Perk, Psen1, Serca1, Atf6는 발현이 유의하게 감소하였으며 Gq는 발현의 차이가 없었다(도 3a 및 도 3b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Atf6, Ip3R 및 Ryr3 유전자를 선별하였다.

[0081] **<1-4> 칼슘 신호 붕괴에 관련된 유전자 발현 비교**

[0082] 아밀로이드 베타 단백질에 의한 칼슘 신호의 붕괴는 기억 장애와 연관되는데, 이는 칼슘 수준의 지속적인 증가는 신경전달과 장기기억의 강화를 일으키기 때문이다. 따라서 칼슘 신호전달과 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[0083] 구체적으로, 칼슘 신호에 관련된 Nmdar, Vdcc, Ryr3, Ip3r, Calm1, Erk/Mapk2, Bad 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[0084] 그 결과, Nmdar, Ryr3, Ip3r, Erk/Mapk2는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Calm1, Snca는 발현이 유의하게 감소하였으며, Vdcc, Bad는 발현의 차이가 없었다(도 4a 및 도 4b).

[0085]

[0086] **<1-5> 미토콘드리아 기능 장애에 관련된 유전자 발현 비교**

[0087] 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서는 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 미토콘드리아의 기능에 장애가 생긴다. 이는 신경 퇴행과 세포사멸을 일으키는 활성산소(ROS)와 염증을 생성한다. 따라서 미토콘드리아 기능장애와 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[0088] 구체적으로, 미토콘드리아 기능에 관련된 Abad, Nmdar, Cx 1-5, Cycs의 유전자의 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 5a 및 도 5b에 나타내었다.

[0089] 그 결과, Abad와 Nmdar, Cycs는 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였고, Cx3, Cx4 및 Cx5는 발현이 유의하게 감소하였으며 Cx1 및 Cx2는 발현의 차이가 없었다(도 5a 및 도 5b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Abad 유전자를 선별하였다.

[0091] **<1-6> 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자 발현 비교**

[0092] 염증 반응와 세포사멸은 알츠하이머 질환의 발병 후 가장 마지막에 나타나는 증상이다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 정상 대조군과 알츠하이머 발병 마우스에서 비교하였다.

[0093] 구체적으로, 염증 반응에 관련된 Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycs, Nos1, Bid의 유전자의 발현을 상기 실험예 1의 방법으로 정상 대조군에 대한 상대적인 발현도로 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

[0094] 그 결과, Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycs, Nos1, Bid 모두 정상 대조군에 비해 알츠하이머 발병 마우스에서 발현이 유의하게 증가하였다(도 6a 및 도 6b). 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 유전자를 선별하였다.

[0095]

[0096] **<실험예 2> 알츠하이머 발병 마우스의 월령별(6개월, 9개월 및 12개월) 유전자 발현 비교**

[0097] **<2-1> APP 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[0098] 신경퇴행의 가장 큰 특징중 하나인 아밀로이드 베타 단백질의 축적은 APP로부터 유발되므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0099] 구체적으로, APP 단백질에 관련된 Adam10, App, Lpl, ApoE, Appbp1, Snca, Casp8, Psen1, Pen-2, Ide, Nep, Bace1, Ncstn, Aph1b 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 1a 및 도 1c에 나타내었다.

[0100] 그 결과, Adam10, Bace1, ApoE, Psen1, Snca, Pen-2, Nep, Aph1B는 질환이 진행될 수록 점점 발현이 감소했고, Appbp1, Casp8. App는 발현이 점점 증가했다. Lpl과 Ide는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 1a). 또한 APP 단백질에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 감소하는 추세임을 확인할 수 있었다(도 1c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nep 및 Aph1b 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0102] **<2-2> 타우 단백질에 관련된 유전자 발현 비교**

[0103] 타우 단백질은 미세소관의 안정화에 관련된 단백질로, 알츠하이머가 발병하면 타우 단백질의 과인산화는 미세소관의 구조적 안정성을 저해한다. 이는 신경세포에서 신호전달과 기억력을 감퇴시키므로, 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0104] 구체적으로, 타우 단백질의 과인산화에 관련된 Caln, Nos1, Gsk3b, Mapt/tau, P25, Cdk5 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 2a 및 도 2c에 나타내었다.

[0105] 그 결과, Nos1, Gsk3b, Mapk/tau, Cdk5는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Caln은 발현이 점점 감소하였다. P25는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 2a). 또한 타우 단백질에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세임을 확인할 수 있었다(도 2c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 및 Cdk5 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0107] **<2-3> 소포체 스트레스에 관련된 유전자 발현 비교**

[0108] 소포체 스트레스로 인한 소포체 기능장애는 알츠하이머 질환의 유발에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, presenilin 1 및 presenilin 2 단백질의 돌연변이, 아밀로이드 베타의 생성, 타우 단백질의 과인산화 및 세포사멸에 관련이 있다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0109] 구체적으로, 소포체 스트레스에 관련된 Ryr3, Ip3r, Psen1, Serca1, Perk, Ire1a, Atf6, Gq, Plcb1 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 3a 및 도 3c에 나타내었다.

[0110] 그 결과, Ryr3, Ip3R, Ire1a, Plcb1, Perk, Plcb1는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Psen1, Serca1, Atf6는 발현이 점점 감소하였다. Gq는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 3a). 또한 소포체 스트레

스에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세임을 확인할 수 있었다(도 3c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Ryr3, Ip3R 및 Atf6 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0112] **<2-4> 칼슘 신호 붕괴에 관련된 유전자 발현 비교**

[0113] 아밀로이드 베타 단백질에 의한 칼슘 신호의 붕괴는 기억 장애와 연관되는데, 이는 칼슘 수준의 지속적인 증가는 신경전달과 장기기억의 강화를 일으키기 때문이다. 따라서 칼슘 신호전달과 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0114] 구체적으로, 칼슘 신호에 관련된 Nmdar, Vdcc, Ryr3, Ip3r, Calm1, Erk/Mapk2, Bad 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 4a 및 도 4c에 나타내었다.

[0115] 그 결과, Nmdar, Ryr3, Ip3r, Erk는 질환이 진행될수록 발현이 점점 증가하였고, Calm1, Snca는 발현이 점점 감소하였으며, Vdcc, Bad는 발현의 변화가 없는것으로 나타났다(도 4a).

[0117] **<2-5> 미토콘드리아 기능 장애에 관련된 유전자 발현 비교**

[0118] 알츠하이머 질환 환자의 뇌에서는 아밀로이드 베타 단백질의 축적으로 미토콘드리아의 기능에 장애가 생긴다. 이는 신경 퇴행과 세포사멸을 일으키는 활성산소(ROS)와 염증을 생성한다. 따라서 미토콘드리아 기능장애와 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0119] 구체적으로, 미토콘드리아 기능에 관련된 Abad, Nmdar, Cx 1-5, Cycs의 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 5a 및 도 5c에 나타내었다.

[0120] 그 결과, Abad와 Nmdar는 질환이 진행됨에 따라 발현이 점점 증가하였고, Cx3, Cx4 및 Cx5는 발현이 점점 감소하였다. Cx1 및 Cx2는 발현의 변화가 없는 것으로 나타났다(도 5a). 또한 미토콘드리아 기능에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 감소하는 추세임을 확인할 수 있었다(도 5c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Abad 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

[0122] **<2-6> 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자 발현 비교**

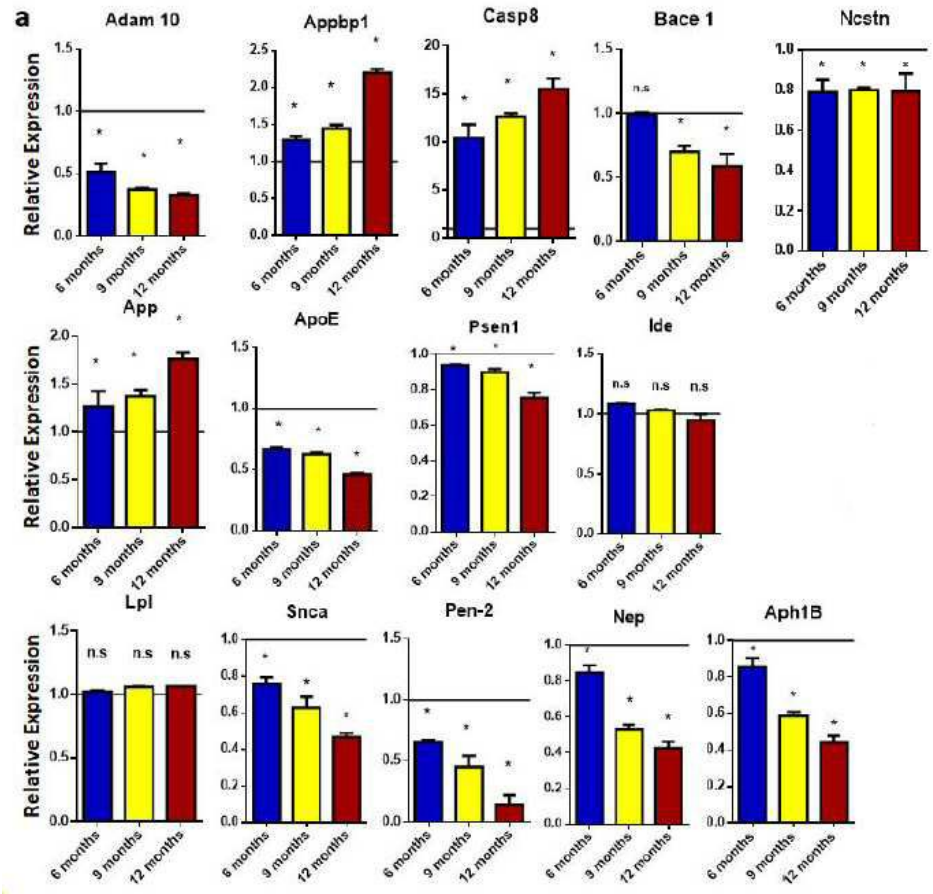
[0123] 염증반응과 세포사멸은 알츠하이머 질환의 발병 후 가장 마지막에 나타나는 증상이다. 따라서 이에 관련된 유전자의 발현을 알츠하이머 발병 마우스에서 월령별로 비교하였다.

[0124] 구체적으로, 염증 반응 및 세포사멸에 관련된 Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycs, Nos1, Bid의 유전자의 월령별 발현을 상기 실험예 1-1에 기재된 RT-PCR을 수행하여 도 6a 및 도 6c에 나타내었다.

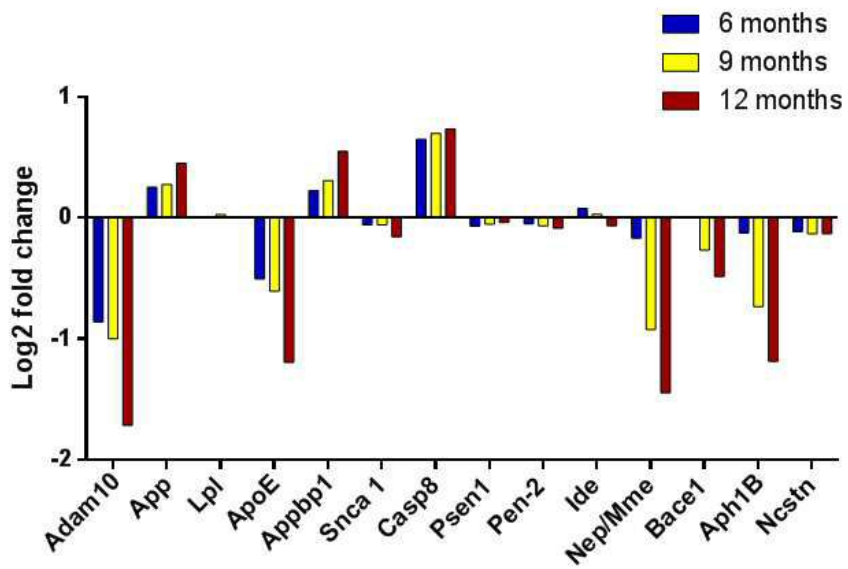
[0125] 그 결과, Tnf, Il1b, Casp12, Casp3, Casp7, Casp9, Cycs, Nos1, Bid는 질환이 진행됨에 따라 발현이 점점 증가하였다(도 6a). 또한 염증반응 및 세포사멸에 관련된 유전자는 알츠하이머 질환이 진행될수록 발현이 증가하는 추세임을 확인할 수 있었다(도 6c). 이에 따라 이 중 통계적으로 발현이 가장 유의하게 변화한 Nos1 유전자는 알츠하이머의 예후를 예측할 수 있음을 확인하였다.

도면

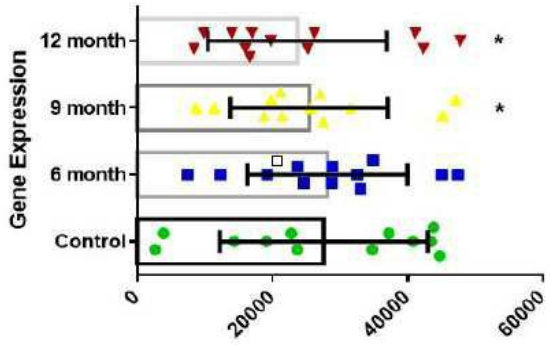
도면1a


a
Adam 10
Appbp1
Casp8
Bace 1
Ncstn
App
ApoE
Psen1
Ide
Lpl
Snca
Pen-2
Nep
Aph1B
Relative Expression
6 months
9 months
12 months
n.s

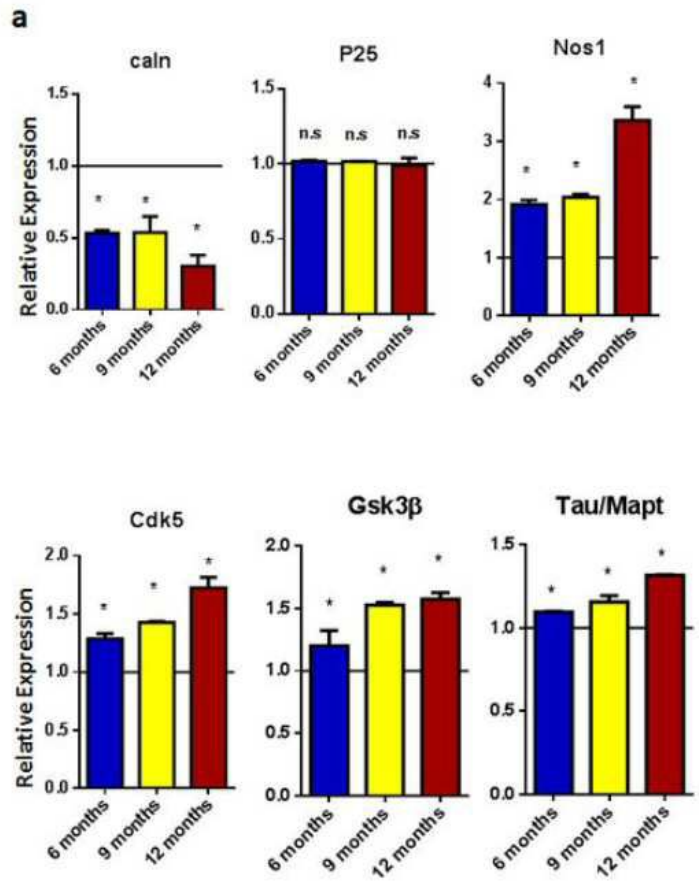
도면1b


6 months
9 months
12 months
Log2 fold change
1
0
-1
-2
Adam10
App
Lpl
ApoE
Appbp1
Snca 1
Casp8
Psen1
Pen-2
Ide
Nep/Mme
Bace1
Aph1B
Ncstn

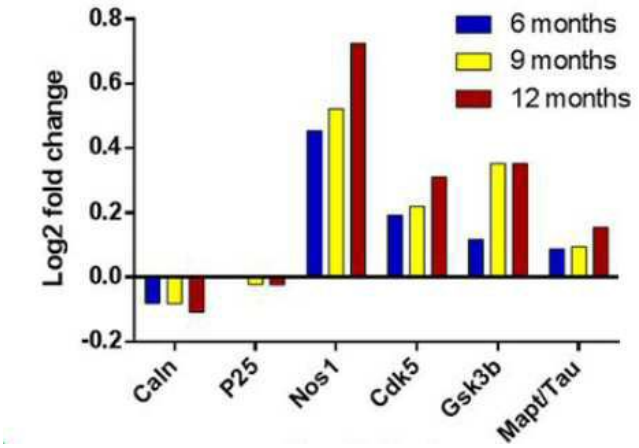
도면1c


12 month
9 month
6 month
Control
Gene Expression
0
20000
40000
60000
*
*

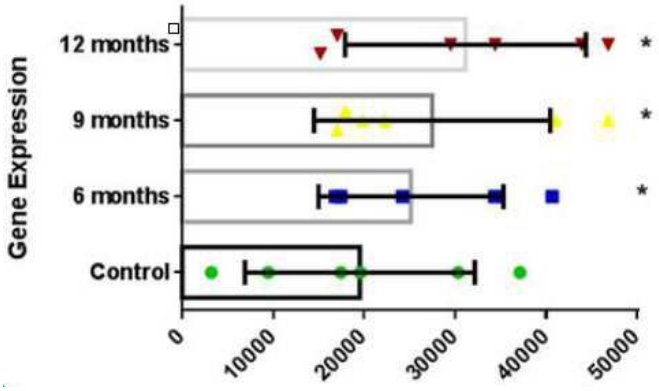
도면2a


a
caln
P25
Nos1
Cdk5
Gsk3β
Tau/Mapt
Relative Expression
n.s
6 months
9 months
12 months

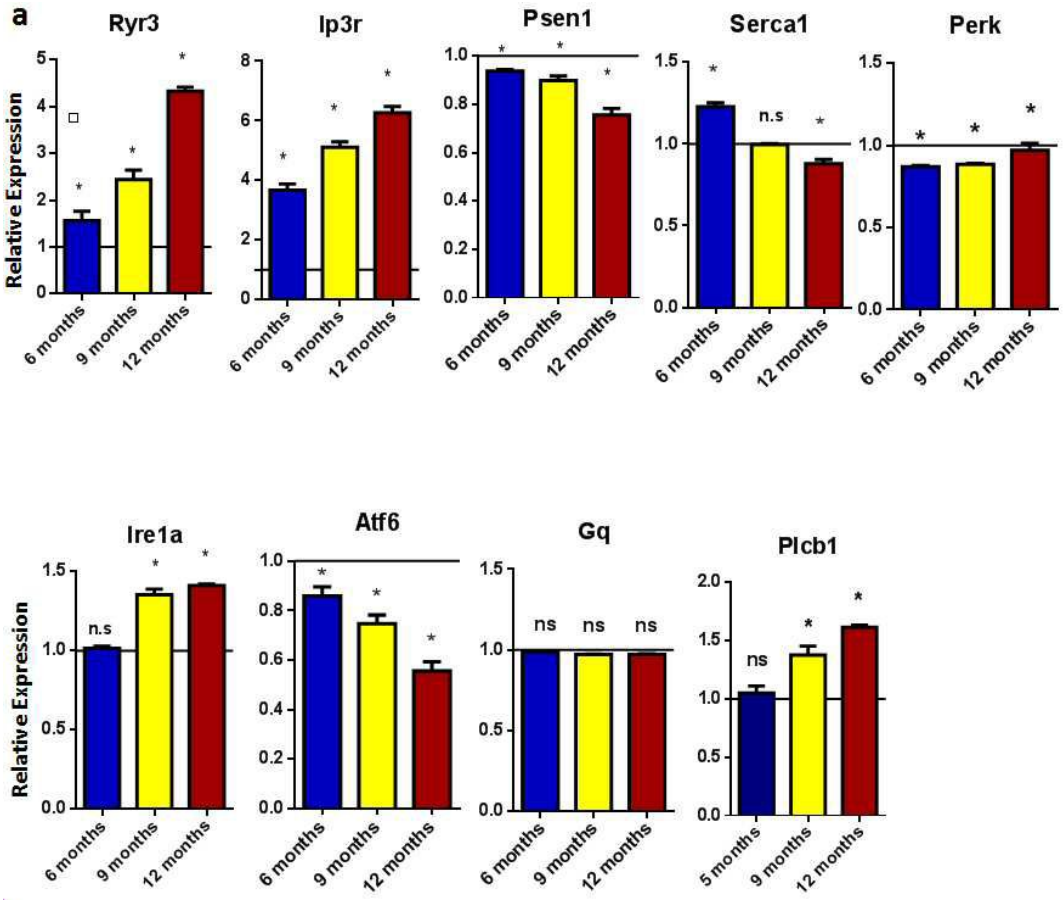
도면2b


0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
Log2 fold change
6 months
9 months
12 months
Caln
P25
Nos1
Cdk5
Gsk3b
Mapt/Tau

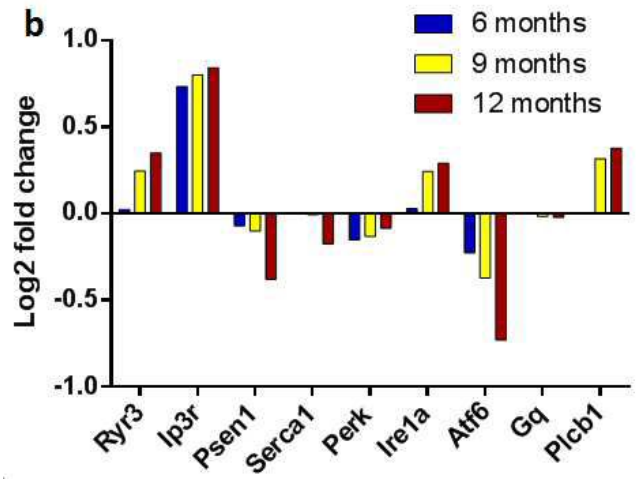
도면2c


Gene Expression
12 months
9 months
6 months
Control
*
*
*
0
10000
20000
30000
40000
50000

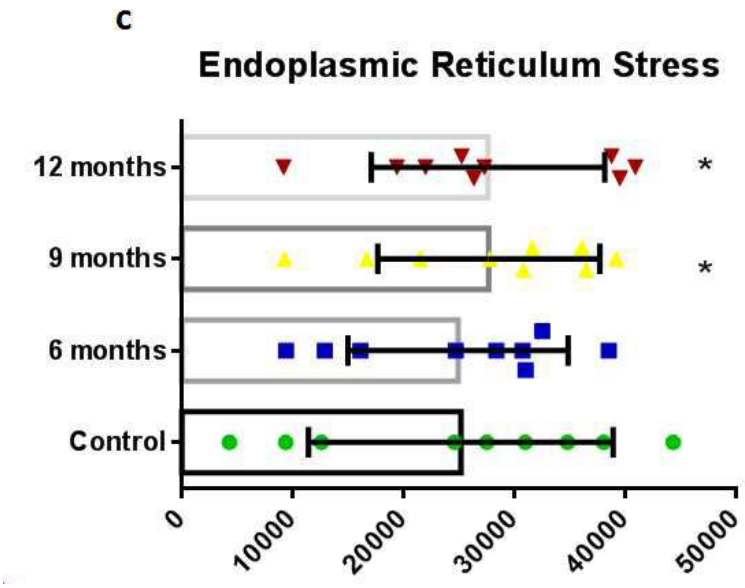
도면3a


a
Ryr3
Ip3r
Psen1
Serca1
Perk
Ire1a
Atf6
Gq
Plcb1
Relative Expression
6 months
9 months
12 months
5 months
n.s
ns

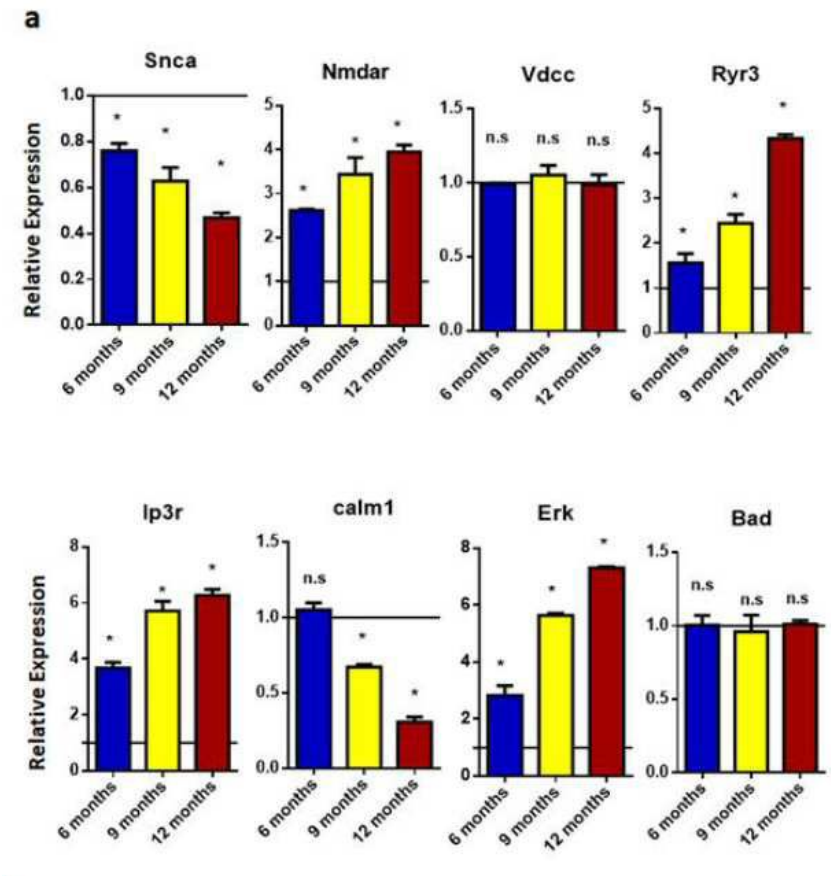
도면3b


b
6 months
9 months
12 months
Log2 fold change
Ryr3
Ip3r
Psen1
Serca1
Perk
Ire1a
Atf6
Gq
Plcb1

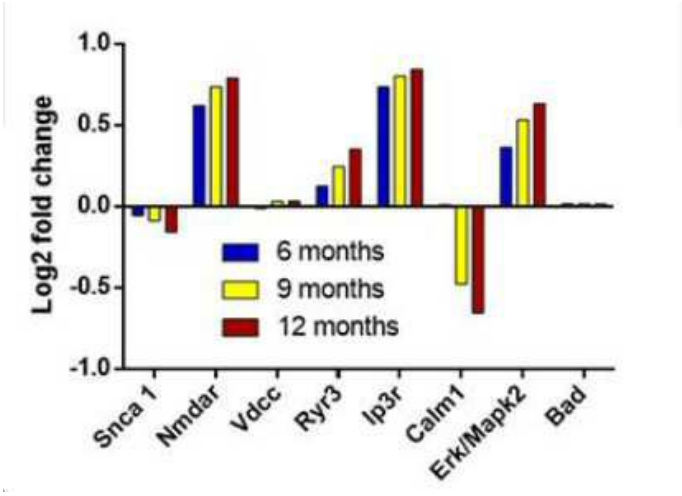
도면3c


c
Endoplasmic Reticulum Stress
12 months
9 months
6 months
Control
*
*
0
10000
20000
30000
40000
50000

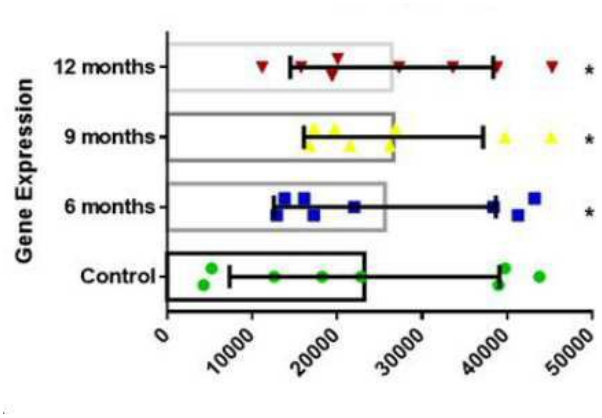
도면4a


a
Snca
Nmdar
Vdcc
Ryr3
Ip3r
calm1
Erk
Bad
Relative Expression
n.s
6 months
9 months
12 months

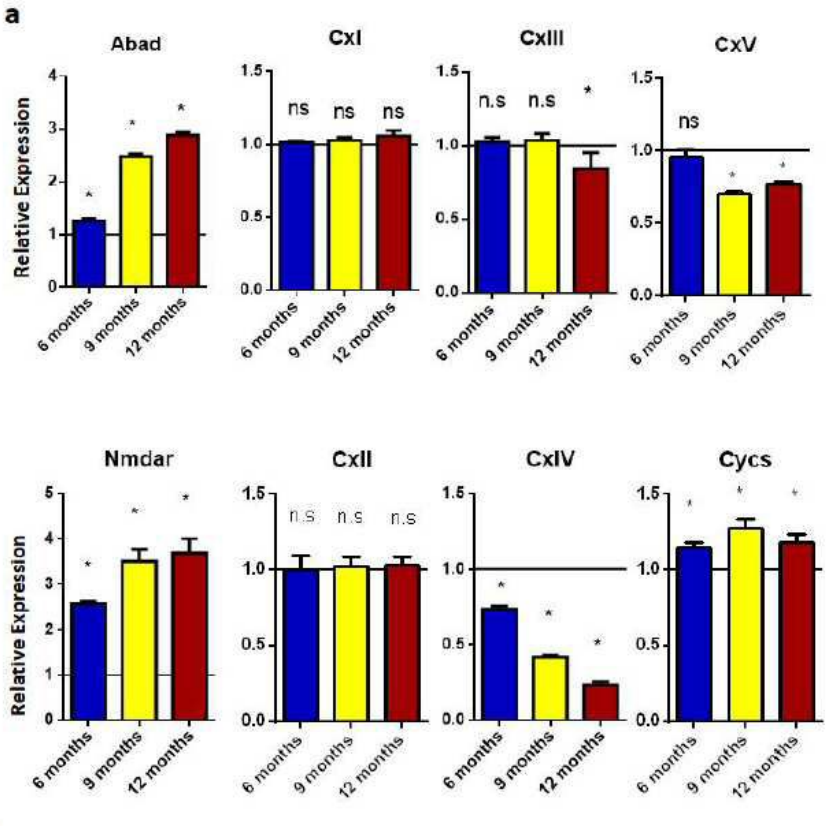
도면4b


1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Log2 fold change
6 months
9 months
12 months
Snca 1
Nmdar
Vdcc
Ryr3
Ip3r
Calm1
Erk/Mapk2
Bad

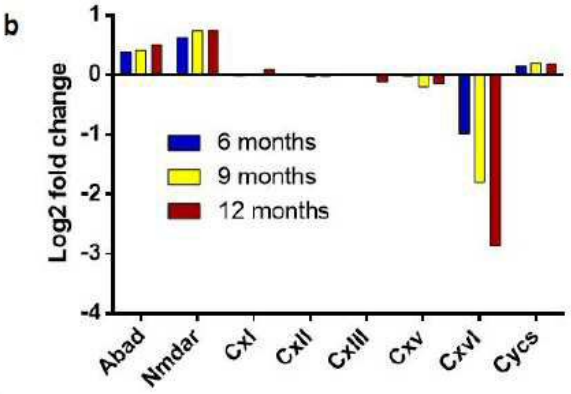
도면4c


Gene Expression
12 months
9 months
6 months
Control
0
10000
20000
30000
40000
50000
*
*
*

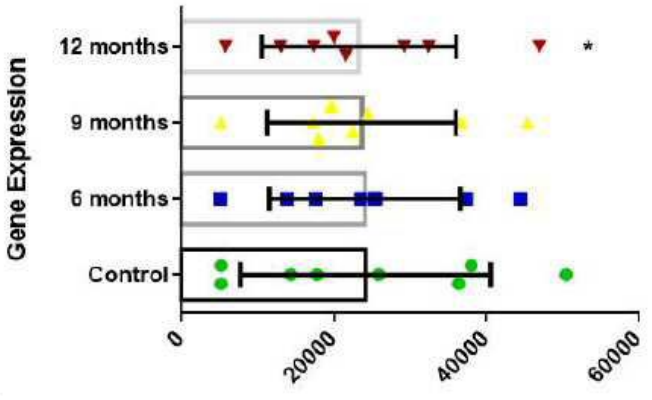
도면5a


a
Abad
CxI
CxIII
CxV
Nmdar
CxII
CxIV
Cycs
Relative Expression
6 months
9 months
12 months
ns
n.s

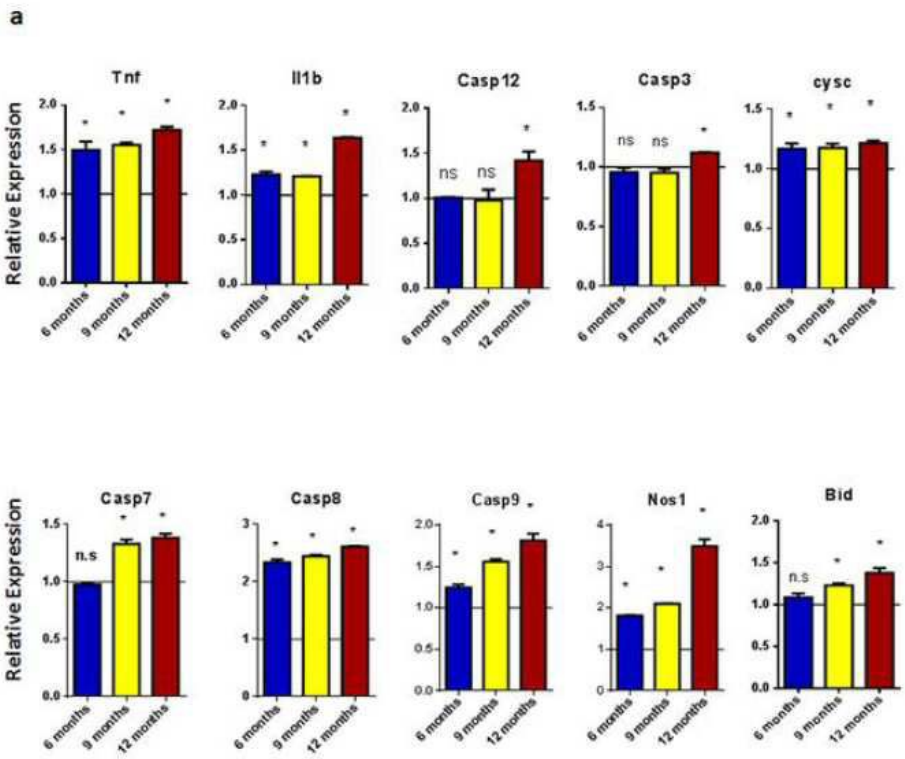
도면5b


b
Log2 fold change
6 months
9 months
12 months
Abad
Nmdar
CxI
CxII
CxIII
CxV
CxVI
Cycs

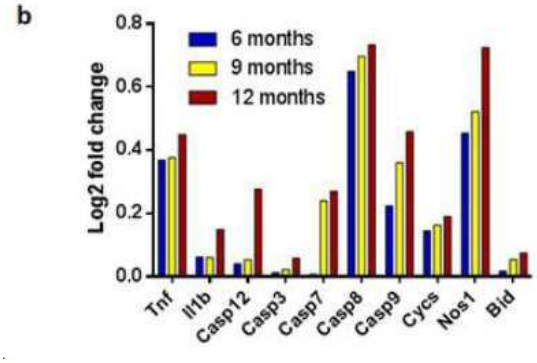
도면5c


Gene Expression
12 months
9 months
6 months
Control
*
0
20000
40000
60000

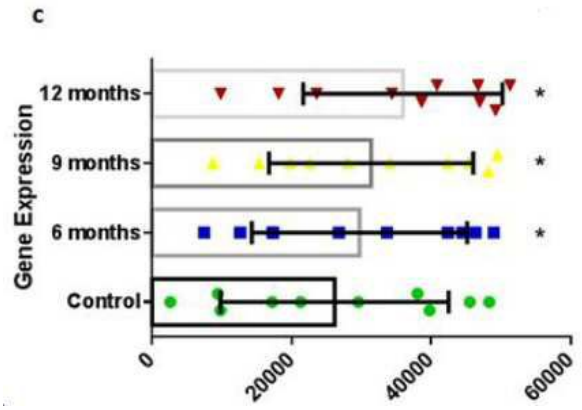
도면6a


a
Tnf
Il1b
Casp12
Casp3
cysc
Relative Expression
ns
n.s
Casp7
Casp8
Casp9
Nos1
Bid
6 months
9 months
12 months

도면6b



도면6c



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for predicting clinical stage of Alzheimer's disease and kit using the same

<130> 2019P-04-004

<160> 102

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adam10 forward primer

<400> 1

agccagagtt gtgcgttttt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adam10 reverse primer

<400> 2

atcgaatcct gccatttcac 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Abad forward primer

<400> 3

cagtgtcatg cccactatgc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Abad reverse primer

<400> 4

gacttccagc gggttatcaa 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aph1B forward primer

<400> 5

aatcaccatg aatgcccact 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aph1B reverse primer

<400> 6

gctgttcagg ctcgcatatt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apo-E forward primer

<400> 7

cagtgccgtc agttcttgtg 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apo-E reverse primer

<400> 8

gtgctgttgg tcacattgct 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> App forward primer

<400> 9

gttcatgcgc tcgtagatca 20

<210> 10

<211>

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> App reverse primer

<400> 10

ggccctcgag aattacatca 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atf6 forward primer

<400> 11

cccatacttc tggtggcact 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Atf6 reverse primer

<400> 12

ggccagactg ttttgctctc 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sercal forward primer

<400> 13

gagcccatca gtcaccaagt 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sercal reverse primer

<400> 14

tggccgatga taacttctcc 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bacel forward primer

<400> 15

tacacaccct ttcggaggtc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bace1 reverse primer

<400> 16

tttgtggaga tggtggacaa 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bad forward primer

<400> 17

cccaccagga ctggataatg 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bad reverse primer

<400> 18

gggatggagg aggagcttag 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bid forward primer

<400> 19

gtctggcaat gttgtggatg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bid reverse primer

<400> 20

tcacagacct gctggtgttc 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vdcc forward primer

<400> 21

tatgctccca atgacgatga 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vdcc reverse primer

<400> 22

cgttctcatc ctgctcaaca 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Calm1 forward primer

<400> 23

gttctgccgc actgatgtaa 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Calm1 reverse primer

<400> 24

actgggtcag aacccaacag 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caln forward primer

<400> 25

aaggcccaca aatacagcac 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caln reverse primer

<400> 26

cagagggtgc ttcgattctc 20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp12 forward primer

<400> 27

tcacgtggac aaagcttcag 20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp12 reverse primer

<400> 28

ttcccaggaa cagctgagtt 20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp3 forward primer

<400> 29

tcccataaat gacccttca 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp3 reverse primer

<400> 30

tgtcatctcg ctctggtacg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp7 forward primer

<400> 31

cacgggatct gcttcttctc 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp7 reverse primer

<400> 32

tttgcttact ccacggttcc 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp8 forward primer

<400> 33

gcagaaagtc tgcctcatcc 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp8 reverse primer

<400> 34

ggcctccatc tatgacctga 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp9 forward primer

<400> 35

aagtcccttt cgcagaaaca 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casp9 reverse primer

<400> 36

aagaccatgg ctttgaggtg 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cdk5 forward primer

<400> 37

acgacgttca ccaaggatgt 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cdk5 reverse primer

<400> 38

gtccatcgac atgtggtcag 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P25 forward primer

<400> 39

cccacctcag aggagatgac 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P25 reverse primer

<400> 40

cgtccactag tgagctgctg 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxi forward primer

<400> 41

gggagtgggc ctgaaattag 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxi reverse primer

<400> 42

ctctccccag taccctcgac 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxii forward primer

<400> 43

tcaaagttcc caggaagcag 20

<210> 44

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxii reverse primer

<400> 44

cctttgggaa ccacagctaa 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxiii forward primer

<400> 45

tagggccgcg ataataaatg 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxiii reverse primer

<400> 46

gttcgcagtc atagccacag 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxiv forward primer

<400> 47

cagccaaaac cagatgacag 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxiv reverse primer

<400> 48

gtgtccccac tgatgaggag 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxv forward primer

<400> 49

gataccctgg gtgttgccta 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cxv reverse primer

<400> 50

gaaactggac caggtggaga 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cycs forward primer

<400> 51

tctgcccttt ctcccttctt 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cycs reverse primer

<400> 52

gggaggcaag cataagactg 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Perk forward primer

<400> 53

gttccatctg ggtgctgaat 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Perk reverse primer

<400> 54

tggtgactgc tatggaccaa 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fadd forward primer

<400> 55

aggtcagcca ccagattcag 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fadd reverse primer

<400> 56

acaatgtggg gagagactgg 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fas forward primer

<400> 57

cctgcatggc agttacacac 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fas reverse primer

<400> 58

ttgcaagaca tgtcggaaag 20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Appbp1 forward primer

<400> 59

tcttctccgc tgaccagatt 20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Appbp1 reverse primer

<400> 60

gcagccaggg aagatactca 20

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh forward primer

<400> 61

acacattggg ggtaggaaca 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gapdh reverse primer

<400> 62

aagggctcat gaccacagtc 20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gq forward primer

<400> 63

ggctacacgg tccaagtcat 20

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gq reverse primer

<400> 64

cacgctcaag atcccataca 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nmdar forward primer

<400> 65

tttgttcccc aagagtttgc 20

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nmdar reverse primer

<400> 66

cagcaggact ggtcacagaa 20

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gsk3b forward primer

<400> 67

aatttgctcc cttgttggtg 20

<210> 68

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gsk3b reverse primer

<400> 68

gaggagagcc caatgtttca 20

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ide forward primer

<400> 69

gacagccaac atttcctggt 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ide reverse primer

<400> 70

gaggcgttcc aaaaacacat 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Il1b forward primer

<400> 71

tccattgagg tggagagctt 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Il1b reverse primer

<400> 72

gaccttccag gatgaggaca 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ip3r forward primer

<400> 73

cgatgcagtt ctggttctca 20

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ip3r reverse primer

<400> 74

gaatttcctt cgttgccaaa 20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Irela forward primer

<400> 75

agaatgttgt ggggcttcag 20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Irela reverse primer

<400> 76

cccaaatgtg atccgctact 20

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lp1 forward primer

<400> 77

gtcaggccag ctgaagtagg 20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lp1 reverse primer

<400> 78

ttttctggga ctgaggatgg 20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lrp1 forward primer

<400> 79

acaggggttg gtcacttcag 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lrp1 reverse primer

<400> 80

gacagcaaac gaggcctaag 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Erk forward primer

<400> 81

agcagatgtg gtcattgctg 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Erk reverse primer

<400> 82

tccttttgag caccagacct 20

<210> 83

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mapt forward primer

<400> 83

gtggagatgt gtccccagac 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mapt reverse primer

<400> 84

gtggccaggt ggaagtaaaa 20

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ncstn forward primer

<400> 85

gctgctgaag ttggttcctc 20

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ncstn reverse primer

<400> 86

ctgaccactc tggctccttc 20

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nep forward primer

<400> 87

cgaggctggt caaaatgaat 20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nep reverse primer

<400> 88

aggcggacaa cctctactca 20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nos1 forward primer

<400> 89

atagtgatgg ccgacctgag 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nos1 reverse primer

<400> 90

agcacctacc agctcaagga 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plcb1 forward primer

<400> 91

ccctttcatg gcttcctgta 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plcb1 reverse primer

<400> 92

catccaggag gtggttcagt 20

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Psen1 forward primer

<400> 93

tcagccatat tcaccaacca 20

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Psen1 reverse primer

<400> 94

cctcatggcc ctggtattta 20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pen-2 forward primer

<400> 95

gcgagaatga tcacccagaa 20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pen-2 reverse primer

<400> 96

cgggtatcca atgaggagaa 20

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ryr3 forward primer

<400> 97

atgtcctcca ccttgtctgg 20

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ryr3 reverse primer

<400> 98

gtgcagcctc tactcccttg 20

<210> 99

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snca forward primer

<400> 99

caggcatgtc ttccaggatt 20

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snca reverse primer

<400> 100

ggagtgacaa cagtggctga 20

<210> 101

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tnf forward primer

<400> 101

cggactccgc aaagtctaag 20

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tnf reverse primer

<400> 102

cgtcagccga tttgctatct 20