



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0019038
(43) 공개일자 2017년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) B05D 1/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
B05D 1/283 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0112875
(22) 출원일자 2015년08월11일
심사청구일자 2015년08월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
선웅
서울특별시 노원구 덕릉로71길 30, 205동 1501호 (중계동, 양지대림아파트)
유재연
서울특별시 성북구 종암로23길 35, 206동 1801호 (종암동, 래미안세레니티아파트)
조유화
경기도 수원시 장안구 조원로111번길 14, 301호(조원동, 평화빌라)
(74) 대리인
특허법인다나

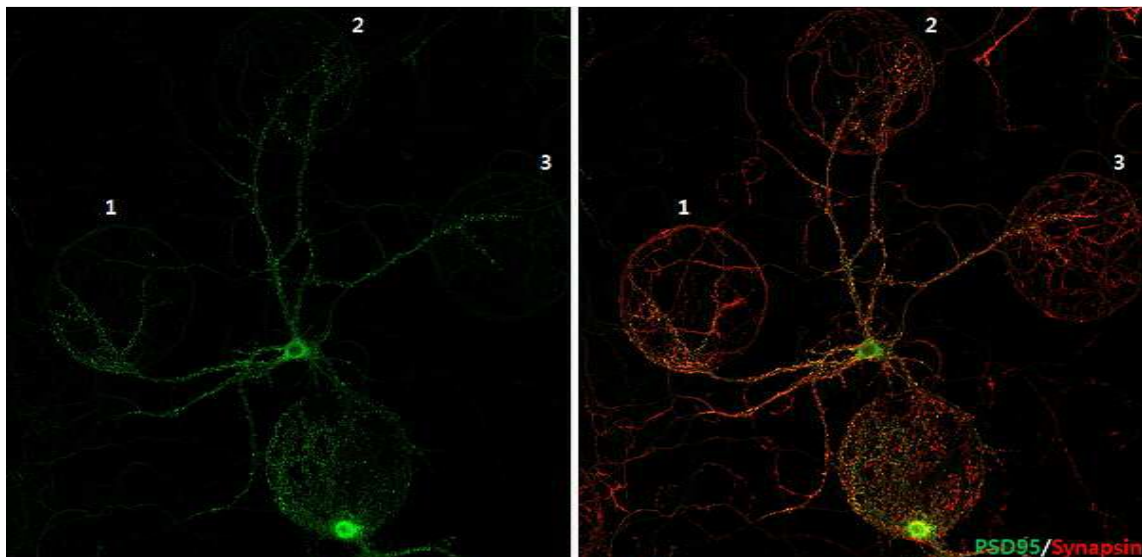
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 시냅스 패턴링 방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 시냅스 패턴링 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 축색돌기와 수상돌기에 의해 형성된 시냅스를 국소적으로 집중시키고, 일정 패턴을 형성할 수 있게 함으로써, 시냅스 형성에 관련된 분자들 및 그 기전 연구를 좀 더 용이하게 할 수 있다. 또한, 시냅스로 연결된 개별 세포들의 위치 파악이 가능해지므로 세포들 간의 네트워크 형성의 패턴을 파악할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/76 (2013.01)

C12N 2535/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 시냅스 패터닝 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판에 기질을 코팅한 단면을 커버글라스 상에서 프린팅하여 음각 도트 패턴을 형성시키는 단계; 및

상기 음각 도트 패턴의 커버글라스에 신경세포를 배양하여 시냅스를 패터닝하는 단계;

를 포함하는 시냅스 패터닝 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판은 도트의 지름이 5 내지 150 μm 인 시냅스 패터닝 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판은 도트의 간격이 10 내지 300 μm 인 시냅스 패터닝 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 기판은 PDMS(polydimethylsiloxane), 아가로스젤 또는 POP(poly-olefin-plastomers)인 시냅스 패터닝 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

기질은 BSA(bovine serum albumin), 라미닌(Laminin), PLG(poly-L-glutamic acid) 및 PLO(poly-L-ornithine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 시냅스 패터닝 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 신경세포는 14 내지 42일 동안 배양하는 시냅스 패터닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 시냅스 패터닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 인 비트로(In vitro) 상에서 세포의 성장 및 그 조절 기전을 규명하고자, 세포 외적인 물리, 화학적인 환경을 정확하고 미세하게 조절할 수 있는 다양한 방법의 미세가공(microfabrication) 기술들이 시도되어 왔다.
- [0004] 스트라이프 어세이(Stripe assay), 미소유체 장비(microfluidic device), 레이저 관련 패터닝(laser-assisted patterning)과 마이크로 컨택트 프린팅(microcontact printing) 등이 그 대표적인 예인데, 각각의 방법은 그 적용에 있어서 장단점을 가지고 있다.
- [0005] 특히, 신경세포는 축색돌기와 수상돌기라는 형태학적, 기능적으로 특별한 구조들을 가지고 있으며, 이들은 신경세포가 성숙함에 따라 신경망(네트워크) 형성에 기본이 되는 시냅스라는 신경세포 고유의 구조를 형성한다.
- [0006] 따라서 이러한 복잡하고 고유한 구조를 가진 신경세포 연구를 위해서 마이크로 레벨에서 세포 외적인 환경을 조절, 변화시킬 수 있는 in vitro 신경세포 배양 시스템들이 개발되고 있다.
- [0007] In vitro 상의 장기간 신경세포 배양 시스템[비특허문헌 1]에서는 세포들 간에 축색돌기와 수상돌기가 시냅스를 형성하게 되면서 신경세포는 형태학적, 기능적으로 매우 복잡해진다. 따라서, in vivo 상에서 일어나는 현상인 국소적으로 위치한 특정 분자들에 대한 축색돌기의 반응 양상과 축색돌기가 목표 지점을 정확하게 찾아갈 수 있도록 해 주는 세포학적, 분자적 기전을 규명하는 것이 일반적인 세포 배양 시스템에서는 용이하지 않다. 이러한 단점을 극복하기 위해, 특정 분자들을 다양한 방법을 통해 국소적으로 고착시킨 후 이러한 분자들에 대한 축색돌기들의 반응을 미성숙한 초기 배양 단계에서 연구하거나, 축색돌기와 수상돌기를 공간적으로 분리시켜 배양하는 microfluidics 시스템을 사용하고 있다[비특허문헌 2]. 이러한 시스템은 주로 축색돌기의 반응성 및 그 성장 기전을 규명하는 데 활용되어 왔으나, 장기간의 배양을 필요로 하는 시냅스 연구에는 부적합하다.
- [0008] 시냅스 연구를 위한 장기간 세포 배양 시스템은 다음 조건들을 필요로 한다.
- [0009] 첫째, 수상돌기와 축색돌기가 자유롭게 시냅스를 형성할 수 있어야 하고, 둘째, 이러한 시냅스들이 국소적으로 집중 분포되며, 셋째, 이웃 세포들에 의해 형성되는 시냅스들과는 공간적으로 분리될 수 있도록 조절할 수 있어야 한다.
- [0010] 시냅스 형성은 신경세포 고유의 특징인 신경세포 네트워크 형성에 필수적이며, 학습 및 기억 등의 뇌기능, 퇴행성 뇌질환 유발 등에 중요한 기여를 하고 있는 바, 이들에 대한 대량 약물 스크리닝을 위한 연구 시스템의 개발 또한 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Basarsky TA, Parpura V, Haydon PG. Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution. J. Neurosci., 1994, 14 (11):6402-11
- (비특허문헌 0002) Millet LJ and Gillette MU. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. Trends in Neurosci., 2012, 35(12):752-761

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 이에, 본 발명자는 상기 배양 시스템의 조건들을 모두 만족할만한 시냅스 형성방법을 연구한 결과, 마이크로컨

택트 프린팅법을 이용하여 축색돌기와 수상돌기에 의해 형성된 시냅스를 국소적으로 집중시키고, 일정 패턴을 형성함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 따라서, 본 발명은 마이크로 콘택트 프린팅을 이용한 시냅스 패턴링 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 마이크로 콘택트 프린팅을 이용한 시냅스 패턴링 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 시냅스 패턴링방법은 축색돌기와 수상돌기에 의해 형성된 시냅스를 국소적으로 집중시키고, 일정 패턴을 형성할 수 있게 함으로써, 시냅스 형성에 관련된 분자들 및 그 기전 연구를 좀 더 용이하게 할 수 있다. 또한, 시냅스로 연결된 개별 세포들의 위치 파악이 가능해지므로 세포들 간의 네트워크 형성의 패턴을 파악할 수 있다. 나아가 현재 신경세포의 사멸로 야기되는 퇴행성 뇌질환 치료제 개발이 활발히 진행되고 있는 바, 이러한 약물들의 대량 스크리닝 시스템으로 발전시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 마이크로 콘택트 프린팅한 패턴 문양 및 기질 종류를 나타낸 것이다.

도 2는 양각 도트 어레이(Positive dot array)에 형성된 신경세포 축색돌기 패턴을 축색돌기 마커인 pPPI2(phosphor-protein phosphatase inhibitor2)와 전시냅스 마커인 SV2(synaptic vesicle2)로 확인한 사진이다(좌: pPPI2 항체를 사용한 세포 염색 이미지, 우: SV2 항체를 사용한 세포 염색 이미지).

도 3은 5 μm 지름 및 20 μm 간격의 음각 도트 어레이(negative dot array)에 형성된 시냅스 패턴을 전시냅스 마커인 synapsin과 SV2로 확인한 사진이다(좌: synapsin 항체를 사용한 세포 염색 이미지, 중: SV2 항체를 사용한 세포 염색 이미지, 우: synapsin과 SV2의 중첩 이미지).

도 4는 40 μm 지름 및 100 μm 간격의 음각 도트 어레이에 형성된 시냅스 패턴을 synapsin과 신경세포 마커인 Tuj1으로 확인한 사진이다(좌: synapsin과 Tuj1의 중첩 이미지, 우: synapsin과 Tuj1의 중첩 고배율 이미지).

도 5는 100 μm 지름 및 100 μm 간격의 음각 도트 어레이에 형성된 전시냅스(presynapse)와 후시냅스(postsynapse)의 시그널을 분석한 결과이다(좌: PSD95와 synapsin의 중첩 이미지, 우상: 정량 분석한 PSD95 시그널, 우하: 정량 분석한 synapsin 시그널).

도 6은 100 μm 지름 및 100 μm 간격의 음각 도트 어레이에 형성된 시냅스 패턴을 PSD95와 synapsin에 대한 항체로 세포 염색으로 확인한 사진이다(좌: PSD95 항체를 사용한 세포 염색 이미지, 우: PSD95와 synapsin의 중첩 이미지).

도 7은 패턴 기질에 따른 시냅스 형성의 차이를 나타낸 것이다(좌: Fc 패턴에서 성장한 신경세포를 PSD95와 synapsin에 대한 항체로 세포 염색한 이미지, 중: Semaphorin 3F-Fc 패턴에서 성장한 신경세포를 PSD95와 synapsin에 대한 항체로 세포 염색한 이미지, 우상: 정량 분석한 PSD95 시그널, 우하: 정량 분석한 synapsin 시그널)

도 8은 기질의 종류 및 도트 크기에 따른 시냅스 형성의 차이를 나타낸 것이다(좌: 100 μm 지름을 가진 음각 도트 어레이로 실험한 경우, 우: 40 μm 지름을 가진 음각 도트 어레이로 실험한 경우).

도 9는 약물 스크리닝 적용 예를 나타낸 것이다(좌상: synapsin과 PSD95에 대한 항체로 세포 염색한 DMSO 처리군, 좌하: synapsin과 PSD95에 대한 항체로 세포 염색한 50 μM EHT1864 처리군, 우: 정량 분석한 시냅스에 대한 EHT1864의 효과).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 마이크로 컨택트 프린팅을 이용한 시냅스 패터닝 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명은 마이크로 컨택트 프린팅을 이용하여 시냅스를 일정한 패턴으로 형성시킬 수 있다.
- [0022] 마이크로 컨택트 프린팅으로 신경세포를 형성시킬 경우, 프린팅된 패턴 모양은 크게 도트(dot) 내부가 기질로 코팅된 양각 도트 어레이(positive dot array)와 도트 외부가 기질로 코팅된 음각 도트 어레이(negative dot array)로 구성될 수 있다. 특히, 양각 도트 어레이로 마이크로 컨택트 프린팅법을 적용할 경우, 축색돌기 패터닝이 가능하며, 음각 도트 어레이로 마이크로 컨택트 프린팅법을 적용할 경우, 시냅스 패터닝이 가능함을 확인하였다.
- [0023] 또한, 어레이 도트의 지름(크기)와 도트(dot) 사이의 간격을 다양하게 조절할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 구체적으로,
- [0025] 음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판에 기질을 코팅한 단면을 커버글라스 상에서 프린팅하여 음각 도트 패턴을 형성시키는 단계; 및
- [0026] 상기 음각 도트 패턴의 커버글라스에 신경세포를 배양하여 시냅스를 패터닝하는 단계;
- [0027] 를 포함하는 시냅스 패터닝 방법을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 시냅스 패터닝 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0029] 먼저, 음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판에 기질을 코팅한 단면을 커버글라스 상에서 프린팅하여 음각 도트 패턴을 형성시킨다(제 1 단계).
- [0030] 상기 음각 도트(negative dot) 어레이(array)에서 도트의 지름이 5 내지 150 μm 인 것이 바람직하다. 도트의 지름에 따라 시냅스 형성의 양이 달라지므로, 그 적용점을 달리할 수 있다. 도트의 지름이 5 내지 10 μm 인 경우, 개개 시냅스 레벨의 연구에 사용될 수 있다. 도트의 지름이 10 내지 150 μm 인 경우는 시냅스 클러스터의 연구에 사용될 수 있다. 도트 지름 150 μm 을 초과하면 신경 세포를 도포할 시 과량의 신경 세포가 도트 안으로 들어갈 문제가 있다.
- [0031] 또한, 상기 음각 도트(negative dot)가 어레이(array)된 기판의 도트들 간의 간격이 10 내지 300 μm 인 것이 바람직하며, 15 내지 200 μm 인 것이 보다 바람직하고, 20 내지 150 μm 인 것이 가장 바람직하다. 상기 도트 간격이 10 μm 미만이면 도트 사이의 간격이 너무 짧아서 개별 도트를 구별하는 것이 어렵고, 300 μm 을 초과하면 도트 사이에서 시냅스를 형성할 확률이 커져서 시냅스 패터닝 효과가 미미해지는 문제가 있다.
- [0032] 상기 기판은 PDMS(polydimethoxysilane), 아가로스젤, POP (poly-olefin-plastomers) 등의 재질로 이루어진 스텝프로 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 시냅스 형성 방법에서 사용될 수 있는 기질로는 BSA(bovine serum albumin), 라미닌(Laminin), PLG(poly-L-glutamic acid) 및 PLO(poly-L-ornithine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 추가로 커버글라스 상에 신경세포를 고정시키기 위하여, + (플러스) 전하를 가진 기질을 코팅할 수 있으며, 상기 기질로는 폴리-L-라이신(PLL), 폴리-디-라이신(PDL) 등일 수 있다.
- [0035] 상기 제 1 단계에서 형성된 음각 도트 패턴의 커버글라스에 신경세포를 배양하여 시냅스를 패터닝한다(제 2 단계).
- [0036] 상기 신경세포는 14일 내지 42일 동안(바람직하게는 21일 내지 30일 동안) 배양하며, 14일 미만으로 배양하면 시냅스가 완전히 형성되지 못하거나, 성숙하지 못하는 문제가 있으며, 42일을 초과하면 장기간 배양으로 인해 신경세포가 건강하지 못한 문제가 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 시냅스 패터닝방법은 축색돌기와 수상돌기에 의해 형성된 시냅스를 국소적으로 집중시키고, 일정 패턴을 형성할 수 있게 한다.
- [0038] 또한, 시냅스로 연결된 개별 세포들의 위치 파악이 가능해지므로 세포들 간의 네트워크 형성의 패턴을 파악할 수 있다.
- [0039] 나아가 신경세포의 사멸로 야기되는 퇴행성 뇌질환(ex, 알츠하이머, 파킨슨병, 근위축성 측색 경화증 등) 치료

약물들의 대량 스크리닝 시스템으로도 발전시킬 수 있으리라 기대한다.

[0040]

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] [실시예]

[0044] 실시예 1: 마이크로컨택트 프린팅법을 이용한 시냅스 형성방법

[0045] 첨부도면 도 1과 같이 마이크로컨택트 프린팅법을 이용한 시냅스 형성방법은 다음과 같다.

[0046] 세포 배양을 위한 커버글라스(coverglass)는 우선, PLL(poly-L-lysine) 1 mg/ml 용액으로 4 °C에서 18시간 코팅한 후, PDMS (polydimethoxysilane) 마이크로스탬프를 이용하여 다양한 기질들을 프린팅하였다. 이를 위해, 마이크로스탬프 위에 기질 용액 50 ml를 끌고루 잘 퍼질 수 있도록 가한 후, 30분 실온에서 코팅하였다. 이후 기질 용액을 제거하고, 마이크로스탬프를 잘 세척하고, 건조시켰다. 마이크로스탬프의 코팅이 된 단면을 커버글라스에 올려놓고 10분 동안 스탬프에 20 g의 추를 가하여 프린팅하였다. 프린팅된 패턴 문양은 크게 도트 내부가 기질로 코팅된 양각 도트 어레이와 도트 외부가 기질로 코팅된 음각 도트 어레이로 구성되었고, 도트의 크기와 도트 사이의 간격을 다양하게 조절하였다.

[0047] 프린팅 기질로서는, 신경세포 돌기에 repulsive cue로 작용하는 분자들의 하나인 Semaphorin 3F와 폴리-L-라이신의 positive charge를 매스킹할 수 있는 단백질 및 펩타이드를 사용하였다(도 1).

[0049] 실시예 2: 양각 도트 어레이(지름 5 mm, 간격 2 mm)에 형성된 신경세포 축색돌기 패턴

[0050] 프린팅된 패턴 및 기질에 따른 신경 세포 돌기들의 성장 및 시냅스 형성의 패턴을 알아보기 위해, 일차 해마 신경세포 50,000개를 기질(라미닌)이 마이크로컨택트 프린팅된 커버슬립(coverglass)에서 배양하였다. 신경세포를 배양하기 위해서, 18일된 정상 쥐의 배아의 뇌에서 해마를 분리하였다. 분리된 해마에 papain을 처리하여 단일 세포로 만들고, 18 mm 지름의 커버슬립의 경우, 50,000개의 세포를 가하고 B27이 추가된 Neurobasal media에서 21일 배양하였다. 21일 배양된 신경 세포를 4% 파라포름알데하이드가 포함된 Tris 완충식염수로 고정하고, 세포면역 염색을 시도하기 위해 우선 3% 소혈청 알부민이 포함된 TBS-T(0.2% triton X-100이 포함된 Tris 완충식염수)를 처리하여 비특이성 결합을 억제하였다. 이후 각종 신경세포 표지 물질들에 대한 항체를 이용하여 일차항체 반응을 수행하였고, 형광 물질이 부착된 이차항체를 가하여 반응시킨 후, 세척하고 슬라이드글라스 위에 crystal mount 용액을 이용하여 마운팅하였다. 준비된 표본은 형광 표지 신호를 레이저공초점 현미경(Cal Zeiss LSM 700 microscope)을 이용하여 관찰하였다. 신경세포의 축색돌기(axon)는 pPPI2(phospho-Protein Phosphatase Inhibitor2)에 대한 항체로 표지하였고, 전시냅스(presynapse)는 SV2(Synaptic Vesicle2)에 대한 항체로 표지하였다. 양각 도트 어레이(지름 5 μ m, 간격 2 μ m)가 마이크로컨택트 프린팅된 경우, 신경세포의 축색돌기가 양각 도트들을 피하여 격자 무늬 패턴을 형성하면서 성장하는 것을 관찰할 수 있었다(도 2).

[0051] 도 1 및 도 2에서, 도트의 기질 프린팅 유무에 따라 신경세포 돌기의 성장 패턴을 조절할 수 있음을 보여주고 있다.

[0053] 실시예 3: 음각 도트 어레이(지름 5 μ m, 간격 20 μ m)에 형성된 시냅스 패턴

[0054] 5 μ m 지름, 20 μ m 간격을 가진 음각 도트 어레이(기질: 라미닌)가 마이크로컨택트 프린팅된 커버슬립(coverglass)에 쥐의 태아 해마에서 분리한 신경세포 50,000개를 21일 배양하고, 전시냅스를 표지하는 시냅신과 SV2에 대한 항체들을 이용하여 동시 면역세포 화학법을 수행하였다.

[0055] 일반적으로 패턴이 없는 곳에서 배양된 신경세포들의 전시냅스가 축색돌기 전체에 걸쳐 무작위적으로 위치하고 있는 것과는 달리, 음각 도트 어레이에서 배양된 신경세포들의 전시냅스는 기질이 프린팅되어 있지 않은 음각 도트 내에 집중적으로 위치하고 있는 것을 관찰할 수 있었다 (도 3).

[0056] 도 3의 결과는 신경세포의 성장 양상을 마이크로컨택트 프린팅 패턴을 이용하여 공간적으로 제어할 수 있음을

보여주고 있다.

[0058] **실시예 4: 음각 도트 어레이(지름 40 μm , 간격 100 μm)에 형성된 시냅스 패턴**

[0059] 음각 도트의 지름을 증가시켰을 경우에도, 도 3과 같은 신경 세포 성장 패턴이 관찰되는지 여부를 알아보기 위해, 40 μm 지름을 가진 음각 도트가 100 μm 간격으로 위치한 음각 도트 어레이(기질: 라미닌)를 마이크로컨택트 프린팅한 커버슬립(cover slip)에 쥐의 태아 해마에서 분리한 신경세포 50,000개를 21일 배양하고, 신경돌기를 표지하는 Tuj1와 전시냅스를 표지하는 시냅신에 대한 항체들을 사용하여 동시 면역세포화학법을 수행하였다.

[0060] Tuj1에 의해 표지된 신경돌기(적색)는 기질이 프린팅 (도트 어레이를 가시화하기 위해 프린팅시 로다민 다이(rhodamin dye)를 사용하여 도트 외부가 밝은 적색으로 보임)되어 있는 도트 외부보다는 기질이 프린팅되어 있지 않은 음각 도트 내부를 더 선호하는 것을 관찰할 수 있었으며, 음각 도트 내부에 시냅신으로 표지된 전시냅스(녹색)가 집중적으로 위치하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(도 4).

[0061] 이러한 결과는 도트 패턴에 의해 공간적으로 제어되는 신경세포의 성장 패턴이 도트 지름의 길이에 상관 없이 일관되게 관찰됨을 보여주고 있다.

[0063] **실시예 5: 음각 도트 어레이(지름 100 μm , 간격 100 μm)에 형성된 전시냅스와 후시냅스의 시그널 분석**

[0064] 신경세포의 전시냅스뿐만 아니라 후시냅스도 도트 패턴에 의해 제어될 수 있는지 여부를 알아보기 위해, 100 μm 지름을 가진 음각 도트가 100 μm 간격으로 위치한 음각 도트 어레이 (기질: 라미닌)를 마이크로컨택트 프린팅하고 신경세포를 21일 배양한 후, 신경세포의 시냅스를 후시냅스 표지자인 PSD95와 전시냅스 표지자인 시냅신(synapsin)에 대한 항체들을 이용하여 동시 면역화학법을 수행하였다. PSD95와 시냅신으로 표지된 신경세포의 전시냅스와 후시냅스는 둘 다 음각 도트 내부에 집중적으로 위치하고 있었다(도 5의 좌측 도면). 이를 정량적으로 분석하기 위해, PSD95와 시냅신에 대한 각각의 시그널 세기를 동일 면적의 음각 도트 내부와 외부에서 측정하였다. PSD95와 시냅신 시그널 모두 음각 도트 내부에서 도트 외부에 비해 통계학적으로 유의성 있게 증가되어 있음을 알 수 있었다(도 5의 우측 도면).

[0065] 이러한 결과는 신경세포의 후시냅스도 전시냅스와 마찬가지로 마이크로컨택트 프린팅에 의해 공간적으로 제어될 수 있음을 보여주고 있다.

[0067] **실시예 6: 음각 도트 어레이(지름 100 μm , 간격 100 μm)에 형성된 시냅스 패턴**

[0068] 도 5의 정량 분석에 사용된 신경세포들 중에서, 세포체가 도트 외부에 위치하고 있는 경우, 세포체에서 뻗어나간 각각의 수상돌기들이 인접한 네 개의 음각 도트 내부로 위치해 들어가 성장하고, 그 내부에서 각각 다른 신경세포들과 시냅스를 형성한 경우를 관찰할 수 있었다(도 6). 이러한 형태의 시냅스의 분리는 패턴이 없는 상태에서 배양한 세포에서는 관찰하기가 거의 불가능하며, 이와 같이 마이크로컨택트 프린팅된 음각 도트 패턴에서만 관찰될 수 있는 특수한 경우로 보인다. 이러한 형태의 시냅스 형성 패턴 제어는 신경세포의 시냅스 형성 연구에 다양하게 응용될 수 있는 것으로 보인다.

[0070] **실시예 7: 패턴 기질에 따른 시냅스 형성의 차이**

[0071] 마이크로컨택트 프린팅된 기질에 따른 시냅스 형성의 차이를 알아보기 위해, axon guidance 분자 중의 하나인 Semaphorin 3F-Fc(Fc에 결합된 semaphorin 3F)와 Fc를 100 μm 지름을 가진 음각 도트가 100 μm 간격으로 위치한 음각 도트 어레이로 각각 프린팅한 후, 쥐의 태아 해마에서 분리한 신경세포 50,000개를 21일간 배양하고, 전, 후시냅스를 PSD95와 시냅신으로 각각 면역 염색하였다.

[0072] Semaphorin 3F-Fc로 프린팅하였을 경우, Fc로 프린팅한 경우보다 음각 도트 내부에 전, 후시냅스가 더 집중적으로 분포하는 것을 관찰할 수 있었다(도 7). PSD95와 Synapsin 시그널을 도트 내부와 도트 외부에서 비교한 도 7 우의 그래프에서 보여지듯이, Fc 프린팅 그룹과 비교했을 때, Semaphorin 3F-Fc 프린팅 그룹에서 전, 후 시냅스의 도트 내부와 도트 외부의 시그널 ratio (in/out ratio)가 통계학적으로 유의성있게 높음을 보여주고 있다.

[0073] 이러한 결과는 마이크로컨택트 프린팅된 기질의 종류에 따라 신경세포의 시냅스 형성 정도를 제어할 수 있음을

보여주고 있다.

[0075] 실시예 8: 기질의 종류 및 도트 크기에 따른 시냅스 형성의 차이

[0076] 도트 크기에 따른 시냅스 형성의 차이를 알아보기 위해, 도트 지름 100 μm , 도트 간격 100 μm 을 가진 음각 도트 어레이 및 도트 지름 40 μm , 도트 간격 100 μm 을 가진 음각 도트 어레이 각각을 프린팅한 후 각각의 어레이에 쥐의 태아 해마에서 분리한 신경세포 50,000개를 배양하고 21일 후에 전, 후시냅스를 PSD95와 시냅신으로 면역 염색하였다. 100 μm 지름의 음각 도트를 프린팅한 경우, 40 μm 지름의 음각 도트를 프린팅한 것보다 대부분의 기질에서 도트 내부에 전, 후 시냅스가 더 집중적으로 위치하고 있는 것을 관찰할 수 있었다(도 8). 또한, 도트 지름 100 μm 내에서 라미닌(Laminin)이 다른 기질들 보다 시냅스를 공간적으로 제어하는 능력이 우수함을 관찰할 수 있었다 (도 8의 좌측 도면). 이러한 결과는 라미닌이 마이크로컨택트 프린팅된 100 μm 지름의 음각 도트 어레이가 시냅스 형성의 공간적 제어에 최적 조건임을 보여주고 있다.

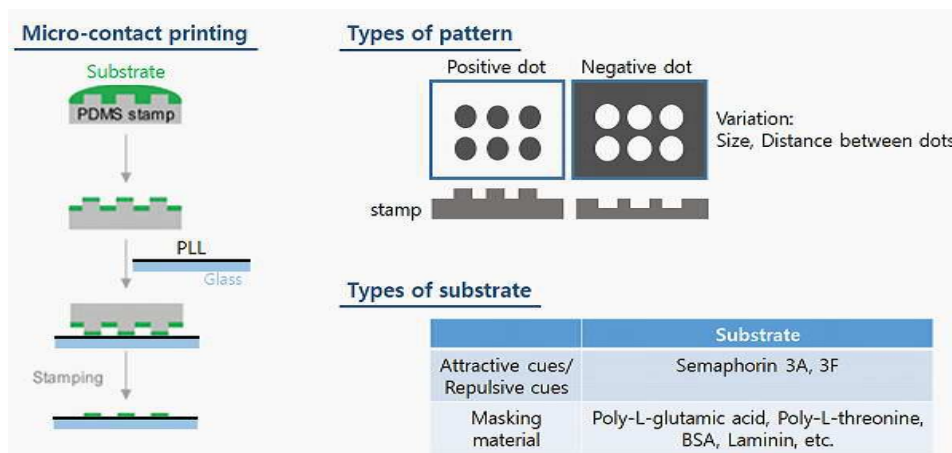
[0078] 실시예 9: 약물 스크리닝 적용의 예

[0079] 상기 실시예들에서 보여지듯이 마이크로컨택트 프린팅된 도트 어레이는 신경세포의 전, 후시냅스를 공간적으로 제어할 수 있는 장점이 있다. 이 시스템을 시냅스에 영향을 미치는 새로운 약물의 스크리닝에 활용할 수 있는지 여부를 알아보기 위해, 기존에 시냅스 형성에 영향을 미치는 약물로 알려진 Rac 억제제 EHT1864를 처리한 후, PSD95와 시냅신으로 면역 염색된 전, 후시냅스 시그널을 대조군과 비교하였다. 약물은 21일 배양된 쥐의 태아 해마 신경 세포에 1시간 처리하였으며, 대조군에는 약물을 녹인 DMSO를 가하였다. 100 μm 지름을 가진 음각 도트가 100 μm 간격으로 위치한 음각 도트 어레이 (기질: BSA)에서 도트 내부에 위치한 전, 후 시냅스 시그널을 분석한 결과, EHT1864로 처리한 실험군에서 대조군에 비해 PSD95 시그널이 통계학적으로 유의적으로 감소한 것을 관찰할 수 있었다(도 9).

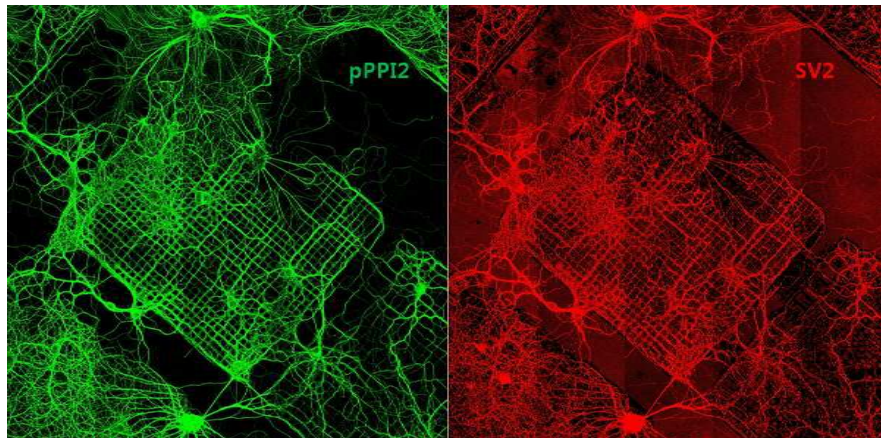
[0080] 이러한 결과는 마이크로컨택트 프린팅에 의한 음각 도트 어레이가 시냅스 형성에 영향을 미치는 새로운 약물을 스크리닝에 응용될 수 있음을 보여주고 있다.

도면

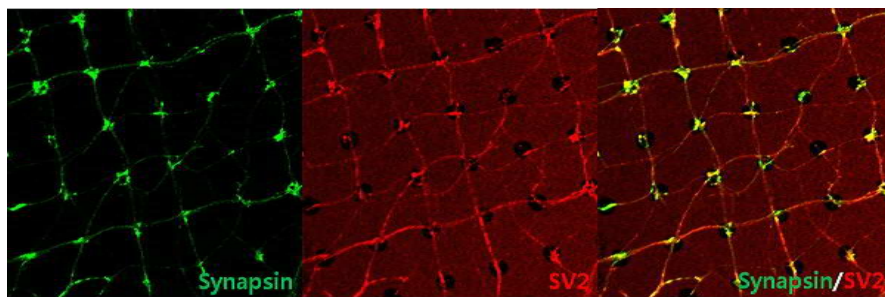
도면1



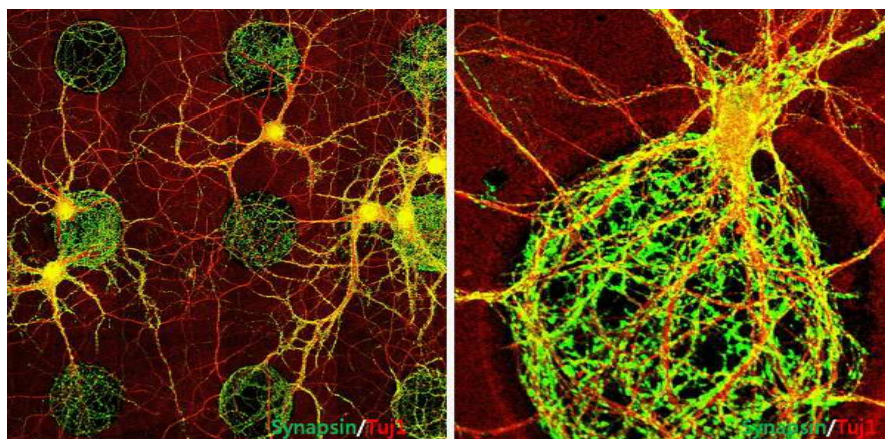
도면2



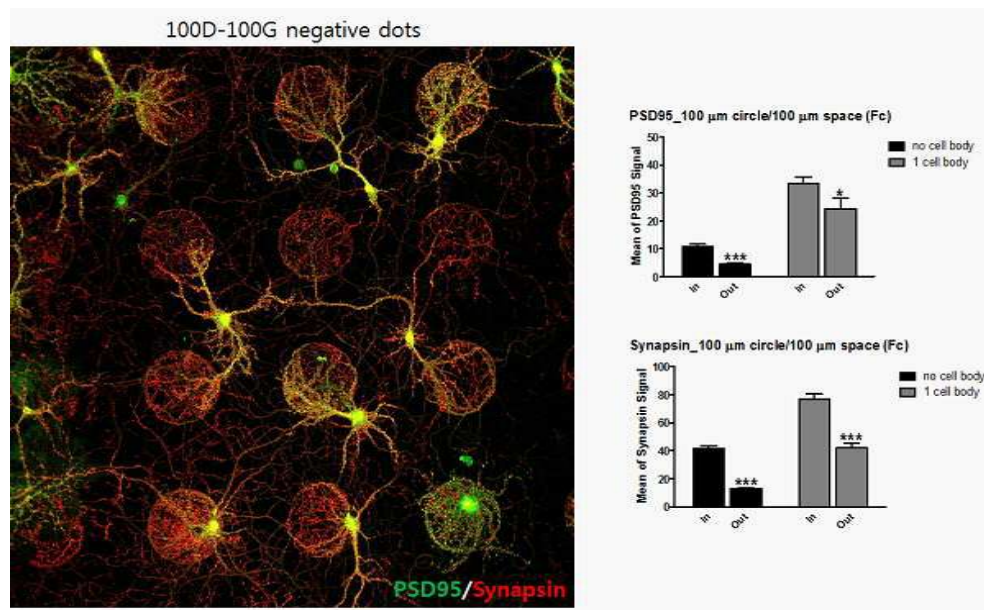
도면3



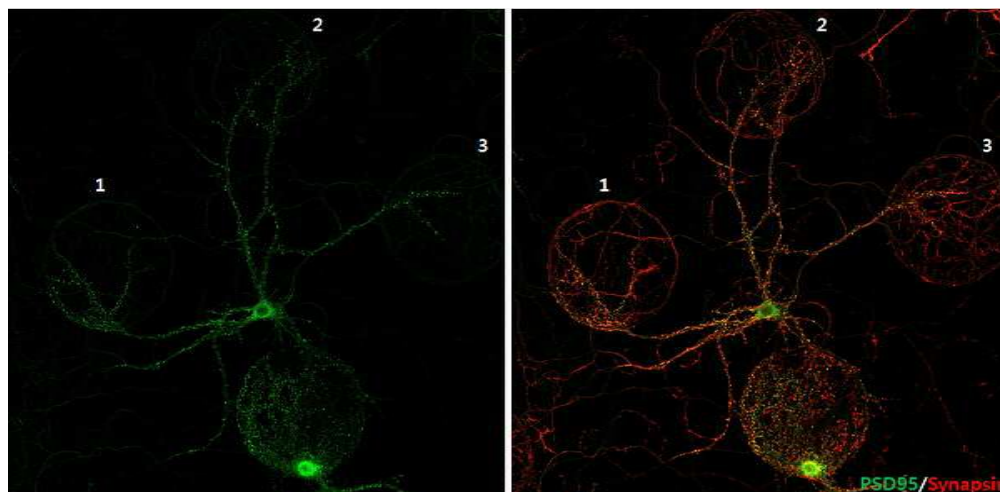
도면4



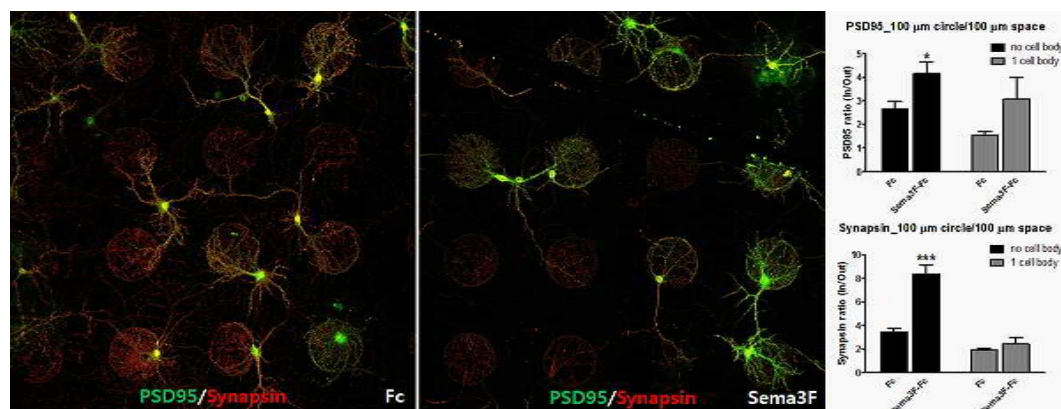
도면5



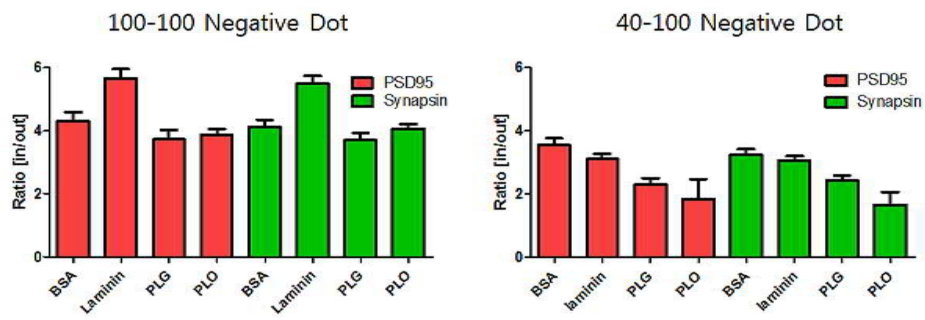
도면6



도면7



도면8



도면9

