



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월15일

(11) 등록번호 10-1482908

(24) 등록일자 2015년01월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0094624

(22) 출원일자 2014년07월25일

심사청구일자 2014년07월25일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120051744 A

US20100143374 A1

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동운

대전광역시 서구 둔산북로 160, 7-1003 (둔산동, 한마루아파트)

박진봉

대전광역시 서구 둔산남로 127, 204-902 (둔산동, 목련아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김승오

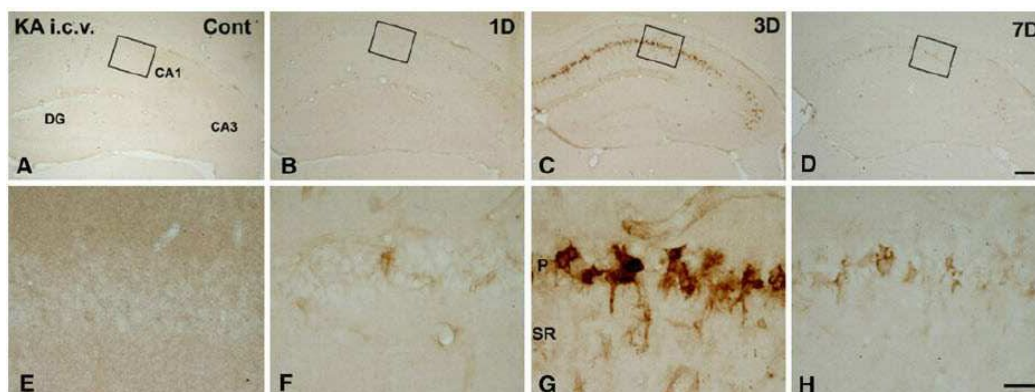
(54) 발명의 명칭 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 IQGAP1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물, 상기 IQGAP1에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 간질중첩증 진단용 키트, 및 상기 IQGAP1의 발현 측정을 이용한 간질중첩증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, IQGAP1은 정상 조직 또는 세포에 비해 간질중첩증 질환의 해마내 조직 또는 세포에서 발현양이 증가되는 것으로 확인됨에 따라, IQGAP1 단백질 또는 유전자를 간질중첩증 질환 진단용 마커로 사용할 경우 간질중첩증 질환을 조기에 신속하고 정확하게 진단 및 예측할 수 있으며, 간질중첩증 질환 치료제의 개발을 위한 표적으로 활용할 수 있다.

대표도



(72) 발명자

강준원

대전광역시 중구 유등천동로 428, 304-2003 (태평동, 파라곤아파트)

이민희

대전광역시 유성구 진잠로149번길 30 한승미메이드아파트, 205-504 (교촌동)

특허청구의 범위

청구항 1

IQGAP1(IQ-domain GTPase-activating protein 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 IQGAP1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

IQGAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 간질중첩증 진단용 키트.

청구항 5

IQGAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 프라이머는 IQGAP1의 mRNA를 검출하기 위한 RT-PCR용 프라이머인 것을 특징으로 하는 간질중첩증 진단용 키트.

청구항 7

- a) 시험관내에서 IQGAP1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- b) 상기 세포에서 IQGAP1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- c) 상기 IQGAP1의 발현 또는 활성이 억제되면 상기 후보물질을 간질중첩증 예방 또는 치료용 물질로 판단하는 단계를 포함하는 간질중첩증 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 IQGAP1의 발현 또는 활성을 측정은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유세포측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 IQGAP1(IQ-domain GTPase-activating protein 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물, 상기 IQGAP1에 특이적으로 결합하는 물질을 포함하는 간질중첩증 진단용 키트, 및 상기 IQGAP1의 발현 측정을 이용한 간질중첩증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 내측두엽 간질(mesial temporal lobe epilepsy)은 간질의 가장 흔한 의학적으로 난치성 형태 중 하나이며, 중기 저부 측두엽(mediobasal temporal lobe) 구조, 특히 해마(hippocampus)에서 기원한 발작(seizures)으로 특징된다. 사례의 40% 이상에서, 이러한 질환은 약물로 조절될 수 없어, 일부 환자에서 발작 조절을 위해 해마절제술(hippocampectomy)을 이용한 전내측두엽절제(anteromedial temporal lobectomy)가 필요하다. 절제된 해마의 약 70%는 특히 CA1, CA3 및 치상문(dentate hilus)에서 뚜렷한 신경세포 소실 및 성상교세포(astroglial) 증식으로 특징된다 (Spencer DD, et al. 1984 *Neurosurgery* 15:667-671). 재발하거나 장기적인 부분적-발병 발작은 변연계의 경로(limbic pathway)의 발아(sprouting)와 재구성(reorganization), 그리고 사람의 대뇌변연계(limbic system)와 간질 동물 모델에서 지속적인 세포 과민감성(cellular hyperexcitability)을 유도한다 (Morimoto K, et al. 2004 *Prog Neurobiol* 73:1-60). 새롭게 발아되고 재발하는 흥분성 시냅스(excitatory synapses)가 있는 간질성 회로(epileptic circuitry)의 재구성은 적어도 부분적으로, 난치성 부분적-발병 간질(intractable partial-onset epilepsy)에서 관찰되는 세포 과민감성을 설명하는 추정 메커니즘이다. 따라서 장기적인 신경세포 소실이 해마경화증(hippocampal sclerosis)의 특징이고, 과민감성의 원인은 살아남은 신경세포(sparing neuron)에서 생화학적 변화에 기인한 시냅스 강화(synaptic strengthening)일 수 있다. 그러나 이러한 신경화학적 변화를 설명하는 정확한 세포 메커니즘은 아직 명확하지 않다. 또한 해마의 CA1 또는 CA3에서 발생하는 세포 변화도 많이 연구되어 있지 않다.

[0003] IQGAPs(IQ-domain GTPase-activating proteins)는 세포 부착, 세포 이동, 세포외 신호, 및 세포질분열을 포함하는 서로 다른 세포 과정들을 조절하는 다중-도메인 단백질들의 진화론적으로 보존된 패밀리아 (Brown MD, et al. 2006 *Trends Cell Biol* 16:242-249). 세포골격 조절자인 IQGAP1은 세포 이동을 촉진하기 위한 카데린(cadherin)-매개된 세포:세포 부착, 세포 극성화(polarization), 및 액틴 재구성을 조정하는데 도움이 된다. 또한 IQGAP1은 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 캐스케이드 및 발생형 Wnt 경로를 포함하여, 세포 증식과 분화에 영향을 미치는 신호전달 경로를 조절한다 (Noritake J, et al. 2005 *J Cell Sci* 118:2085-2092). 본 발명에서는, 카인산(kainic acid, KA) 처리를 통한 흥분독성(excitotoxicity)-유도된 신경세포 사멸 후 살아남은 신경세포에서 IQGAP1의 위치화(localization)에 대한 강력한 증거를 제공하는 일련의 실험을 수행하였다. 또한 IQGAP1은 형태학적 변화에 대한 일정한 기여(modest contribution)와 상관관계가 있었다. 이러한 예상치 못한 위치화 패턴은 간질발생 시 초기에 관찰된 간질성 회로의 재구성에 중요하다.

[0004] 이에 본 발명자들은 IQGAP1의 발현 패턴 및 위치화 패턴을 분석함으로써 간질성 질환 중, 특히 간질중첩증 질환의 진단에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서 본 발명의 목적은, IQGAP1 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은, IQGAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은, IQGAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 시험관내에서 IQGAP1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리한 후 IQGAP1의 발현 또는 활성을 측정함으로써 간질중첩증 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 IQGAP1(IQ-domain GTPase-activating protein 1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 간질중첩증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명에서, 상기 용어 ‘간질중첩증(status epilepticus, SE)’은 의식이 회복되지 않은 채 새로운 발작이 여러 번(2번 이상) 연달아 발생되거나 간질 발작이 10분 이상 지속되는 상태를 말한다. 간질중첩증은 신경과적 응급질환 중의 하나이며, 지난 30여년 동안 간질중첩증의 치료에 대한 발전이 있었음에도 불구하고, 사망률과 이환율이 높아 집중적인 치료를 요하는 경우가 많았으며, 사망률은 간질중첩증이 오래 지속될수록 증가한다고 하나 단순히 간질이 오랫동안 지속되어 생긴 것인지 아니면 간질을 유발하는 이미 존재하는 다른 병리학적 변화 때문인지는 아직까지 분명하지 않다.
- [0011] 한편, 신경병리학적 연구들에서 중추신경계의 지속적인 전기활동이 영구적인 뇌손상을 가져왔다고 알려져 있으며, 지속적인 전기활동의 기간이 길어짐에 따라 비가역적인 신경세포 사멸이 관찰되었다. 이런 기초적인 관찰이 임상에도 적용되어 간질발작의 기간이 사망률과 관계가 있을 것이라는 이론적인 바탕이 되었다. 하지만 보다 궁극적인 의문점은 신경세포의 사멸이 관찰되는 데 반하여 신경흥분성이 증가한다는 점은 이율배반적이다. 본 발명은 간질중첩증 동물모델에서 신경세포의 사멸이 관찰되는 과정에서 살아남은 신경세포의 흥분성이 변할 가능성이 높은 신경세포를 표지할 수 있는 진단용 마커로서의 가능성을 제시하고자 한다.
- [0012] 또한, 뇌전증(epilepsy) 중에서 해마의 병변이 관찰되는 경우가 많은데 이러한 병변을 해마경화증(hippocampal sclerosis)이라 하며 신경세포의 사멸을 주요한 특징으로 하고 있다. 이러한 해마경화증이 관찰되는 병변 부위에서 간질과 발생하여 전두엽을 포함한 뇌전체로 파급되는 경향이 있다. 따라서 간질중첩증을 포함한 뇌전증에서 해마내에서 발작을 유도되는 과정을 이해하는 것은 뇌전증치료에 기본이 되고 있다.
- [0013] 뇌전증내 해마에서 신경세포의 사멸에도 불구하고 신경세포의 흥분성이 증가하는 원인으로서는 GS(glutathion synthase), EAAT, AQP4 등 여러 단백질의 변화가 기존에 제시되고 있다. 하지만 정작 살아남아 흥분성이 변화된 신경세포만 선택적으로 표지할 수 있는 방법은 현재로서 전무하다.
- [0014] 따라서 본 발명은, 간질중첩증 모델에서 신경세포의 사멸에도 불구하고 살아남은(sparing) 신경세포를 선택적으로 표지할 수 있는 IQGAP1의 용도에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 실시예에 따르면, 흥분독성-유도된 동물모델에서 카인산(KA) 자극이 정상세포 또는 성숙한 신경세포가 아니라, 해마의 신경세포 사멸 후 살아남은 신경세포(preexisted sparing neurons)에서 상기 IQGAP1 발현을 상향조절함을 밝혀내었다 (도 5 참조). 그러므로 이러한 살아남은 신경세포에서 증가된 IQGAP1 발현을 검출함으로써 간질중첩증을 매우 효과적으로 진단해낼 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바이오마커 조성물에서, 상기 IQGAP1은 IQGAPs(IQ-domain GTPase-activating proteins)의 패밀리 중 하나로서 세포 증식과 분화에 영향을 미치는 신호전달 경로를 조절하는 단백질이다 (Noritake J, et al. 2005 *J Cell Sci* 118:2085-2092). 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 IQGAP1 단백질은 포유동물에서 유래된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 IQGAP1 단백질은 인간, 원숭이 및 설치류로 구성된 군에서 유래된 것일 수 있다.
- [0017] 하나의 예로서, 상기 IQGAP1 단백질은 인간에서 유래된 서열번호 1 (GenBank accession No. NM_003870.3, L33075.1)의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 염기서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 어떠한 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2(GenBank accession No. NM_003870.3)의 염기서열일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IQGAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명에서, 상기 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조하거나, 또는 상업적으로 이용가능한 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 예를 들어, anti-IQGAP1 항체(#SC10792)는 SantaCruz사로부터 입수하여 사용할 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and

Lane, D., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다.

[0020] 폴리클로날 항체는 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0021] 또한 본 발명에서 앵타머(aptamer)는, IQGAP1 단백질에 특이적으로 결합하는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0022] 본 발명의 진단용 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트일 수 있다.

[0023] 상기 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유세포 측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 상기 키트는 또한 마이크로 어레이일 수 있으며, 이때 마이크로어레이의 고상 표면에 항체 또는 앵타머가 고정화 되어 있을 수 있다.

[0025] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 IQGAP1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 간질중첩증 진단용 키트를 제공한다.

[0027] 본 발명에서 상기 IQGAP1 단백질의 발현량 또는 그 패턴은, 상기 단백질 자체를 검출하는 방법을 사용하는 것 외에도, 조직 내에서 해당 단백질을 코딩하는 유전자의 발현량 또는 발현 패턴을 검출함으로써 단백질의 양을 유추하는 방법을 사용할 수도 있다.

[0028] 여기서 유전자의 발현량 또는 발현 패턴의 검출은 통상적으로 해당 유전자의 전사로 인해 생성된 mRNA의 양 또는 패턴을 확인하는 과정으로써 수행될 수 있다. 이러한 mRNA의 양 또는 패턴을 확인하기 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RTPCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던 블롯, DNA 칩 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0029] 이 분석 방법들을 통하여, 정상 개체의 생물학적 시료에서의 mRNA의 양 또는 패턴을 간질중첩증이 의심되는 개체의 생물학적 시료에서의 mRNA의 양 또는 패턴과 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 IQGAP1을 코딩하는 유전자의 발현량 또는 발현 패턴의 차이를 판단하며, 궁극적으로 간질중첩증이 의심되는 환자의 조직에서 간질중첩증의 발병 여부를 진단하는 것이 가능하게 된다.

[0030] 본 발명의 상기 프라이머는, IQGAP1의 mRNA를 검출하기 위한 RT-PCR용 프라이머일 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 템플레이트(template)와 상보적으로 결합할 수 있고 역전사효소 또는 DNA 중합효소가 템플레이트의 복제를 개시할 수 있도록 하는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 특정 유전자의 핵산 서열에 상보적인 서열을 가지는 뉴클레오티드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이가 사용될 수 있다. 그 외 RT-PCR 키트는 구체적인 실시 양상에 따라 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머라제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수 (DEPCwater), 멸균수 등을

포함할 수 있다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시시킬 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 다른 염기 서열을 포함할 수도 있다. 프라이머는 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 시험관내에서 IQGAP1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; b) 상기 세포에서 IQGAP1의 발현 또는 활성을 측정하는 단계; 및 c) 상기 IQGAP1의 발현 또는 활성이 억제되면 상기 후보물질을 간질중첩증 예방 또는 치료용 물질로 판단하는 단계를 포함하는 간질중첩증 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 IQGAP1의 발현 또는 활성을 측정하는 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블롯팅, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 유세포측정법(flow cytometry), 형광활성화 세포분류법(FACS), 효소기질발색법 및 항원-항체 응집법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 따른 간질중첩증 진단용 바이오 마커는 간질중첩증 개체의 해마에서 변화 양상이 두드러지는 것이기 때문에 간질중첩증의 발병에 직접 관여하는 단백질일 가능성이 있으며, 따라서 간질중첩증 발병의 메커니즘을 연구하거나 간질중첩증의 치료제의 개발을 위한 표적 단백질로서도 유용하게 사용될 수 있는 것이다. 즉, 본 발명의 간질중첩증 진단용 바이오마커는 간질중첩증의 치료제 개발의 중요한 전제를 해결한 것이므로, 따라서 이 단백질을 이용하여 간질중첩증의 치료제를 스크리닝하는 방법도 본 발명의 범주에 속한다.

[0035] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ‘후보물질’은 IQGAP1 단백질을 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하여, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 생물학적 활성물질(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNA 기반 효소(RNAzyme) 및 DNA 기반 효소(DNAzyme)), 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 또한 상기 후보물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 후보물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 구입 가능하다.

[0036] 이하, 본 발명에 따른 IQGAP1 단백질과 간질중첩증 사이의 관련성에 대하여 좀 더 자세히 설명한다.

[0037] KA의 ICV 투여는 대부분의 CA3 피라미드 신경세포 및 치상문 신경세포(dentate hilar neurons)의 주요 분획의 변성을 초래한다. 그러나 CA1 피라미드 신경세포와 치상문의 과립세포 모두 ICV KA 투여로 살아 남아있다(Shetty AK, et al. 1999 *J Comp Neurol* 414:238-254). CA3 피라미드 신경세포의 변성은 CA1 피라미드 신경세포의 수상돌기(dendrites)의 현저한 구심로차단(deafferentation)을 유도하고, 치상문 신경세포의 변성은 치상문의 과립세포의 수상돌기의 구심로차단을 유도한다. 따라서 분산되고, 퍼져있는 시냅스 재구성(synaptic reorganization) 및 과민감성은 ICV KA 유도된 CA3 병변 후 해마의 CA1 서브필드(subfield)와 DG 모두에서 발생한다.

[0038] 본 발명에서는, IQGAP1이 ICV KA 주사 후 해마의 CA1 영역에서만 발현됨을 밝혀내었다. 그러나 분산되고, 퍼져있는 시냅스 재구성 또한 DG에서 발생하였다. 이러한 불일치(discrepancy)는 자극 후 과립세포의 독특한 특성, 그들의 기본적인 증식 능력, 및 흥분성 신경세포로의 증가된 증식과 분화에 기인한 것으로 보인다. DG는 성숙한 CNS에서 좀 더 유사 분열적으로(mitotically) 활성 영역 중 하나이며, 여기서 과립세포는 설치류에서 일생동안 계속해서 생성되고(Altman J, et al. 1965 *J Comp Neurol* 124:319-335) 과립세포의 증식은 발작 후 설치류에서 현저하게 증가되었다(Parent JM, et al. 2006 *Hippocampus* 16:321-328).

[0039] 최근의 데이터는 성체 설치류의 꼬리모양 SVZ(caudal SVZ)에서 신경 전구세포가 허혈성 해마 손상의 영역으로 이동하고 손상된 CA1 피라미드 신경세포를 대체하는 것으로 보고되어 있다 (Lichtenwalner RJ, et al. 2006 *Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metabol* 26:1-20). 또한 성체 래트에서 일시적 전뇌허혈(global ischemia)로 유도된 지연된 해마 CA1 피라미드 세포사멸은 손상된 CA1 피라미드 신경세포를 내생성 신경전구세포로의 대체를 유도하였다. 그러나 최근 연구는 신경세포 대체가 발작-유도된 손상 후 해마의 피라미드 세포층에서 일어나지 않음을 증명하였다 (Parent JM, et al. 2006 *Hippocampus* 16:321-328). 꼬리모양 SVZ(cSVZ)는 성체에서 세 번째 발아성 영역(germinative zone)인데, 부리모양(rostral) SVZ와 DG에서도 존재하며, 필로카르핀-유도된 간질 중첩(SE)에 의해 활성화된다. DG 및 부리모양 SVZ-후각신경구(olfactory bulb) 경로와 유사하게, 지속된 발작은 cSVZ 세포 증식을 증가시키고 신경전구세포 이동을 변화시킨다. 뇌량(corpus callosum)으로만 이동하는 대신, 대조군 성체 래트에서 확인된 바와 같이, 배측 해마(dorsal hippocampal) 수준에서 cSVZ 전구체의 일부분은 손상된 해마로 전용되었다. 온전한 또는 SE 후 뇌에서 거의 신경세포로만 분화되는 부리모양의 SVZ 및 DG에서 신경전구세포와 달리, cSVZ 전구체는 뇌량으로 이동하고 해마는 신경교세포(glia)로 분화한다. 따라서 신경세포의 대체는 성체에서 발작-유도된 손상 후 해마의 피라미드 세포층에 존재하지 않는 것으로 보인다 (Parent JM, et al. 2006 *Hippocampus* 16:321-328). 또한 본 발명은 증식하는 BrdU+ 세포가 대부분의 IQGAP1+ 세포와 공동 위치하지 않음을 증명하였다. 또한, IQGAP+ 세포는 성상세포 또는 NG2+ 세포로부터 기원하지 않았다. 따라서 흥분 독성의 CA3 신경세포 사멸 후 피라미드 세포층에서 살아남은 신경세포 소집단(subpopulation)에서 IQGAP+ 세포가 CA1에서 사전-존재하는 피라미드 신경세포로부터 기원하였다고 간주하는 것이 합리적이다.

[0040] IQGAP1은 그 기능이 다양한 파트너와 상호작용할 수 있는 능력으로 특징되는 다중기능성 스캐폴드 단백질로서 알려져 있다. 이 다중-도메인 단백질은 이동, 부착 증식, 및 더욱 최근에 밝혀진, 신경세포 발달 및 시냅스 가소성과 관련된 다중 시그널링 경로를 조절하는 것을 포함하는 핵심 기능을 갖는다 (Gonzalez-Billault C, et al. 2012 *Cytoskeleton* (Hoboken) 69:464-485). 수상돌기 발달과 유지에 미세소관(microtubule) 및 액틴 세포 골격의 광범위한 재배열 뿐만 아니라 Rho GTPase 활성을 포함한다 (Jan YN, et al. 2010 *Nat Rev Neurosci* 11:316-328). B-Raf, ERK, Cdc42, Rac, N-cadherin 및 Lis-1을 포함하여, IQGAP1과 상호작용하는 몇몇 파트너들은, 정신질환에서 뚜렷한 이상을 나타내는 척추 형태 발생(spine morphogenesis), 모양 및 밀도를 조절한다 (Gao C, et al. 2011 *J Neurosci* 31:8533-8542). 또한 IQGAP1은 β -카테닌과 직접적으로 상호작용할 수 있고 세포:세포 부착에서 역할을 하며 Wnt 경로와 다양한 타입의 암에서 핵 시그널링의 조절자로서 다기능 단백질이다 (Sharma M, et al. 2007 *J Biol Chem* 282:8545-8556). β -카테닌의 상향조절은 세포 증식 및 분화에 관련된 유전자들의 지속적인 활성화를 통해 세포 형질전환(cell transformation)을 유발하는데 충분하다 (Polakis P. 2001 *Cell* 105:563-566). 앞서, 본 발명자들은 β -카테닌이 KA 투여 3일 후 동물모델에서 상향조절됨을 보고하였다 (Lee HN, et al. 2010 *Neurochem Res* 35:114-121). 본 발명에서는, IQGAP1이 APC와 공동 위치하고 Cdc42 활성화가 IQGAP의 보충에 이어 일어남을 확인하였다. 종합하면, 이러한 데이터는 IQGAP이 흥분독성 CA3 신경세포 사멸 후 피라미드 세포층에서 살아남은 신경세포의 소집단에서 형태학적 변화를 조절하는데 중요함을 의미한다.

[0041] 본 발명은 IQGAP이 성상세포, 새로이 분열된 신경전구세포 또는 NG2 세포가 아니라, 흥분독성-유도된 해마의 CA3 신경세포 사멸 후 형태학적 변화가 일어나는 CA1 층의 사전-존재하는, 살아남은 신경세포에서 발현됨을 밝혀내었다. 본 발명은 살아남은 신경세포에서 IQGAP1 상향조절이 간질중첩 후 초기에 존재하는, 시냅스 재구성의 근본적인 메커니즘임을 시사한다. 본 발명은 수지상 형성, 척추 형성 및 시냅스 가소성에서 그 상호작용 파트너와 결합하는 이 단백질의 역할을 제시하고 살아남은 신경세포에 대한 잠재적 마커로서 IQGAP1의 유용성을 보여주며 간질발생(epileptogenesis)에서 병인학적 역할을 할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따르면, IQGAP1은 정상 조직 또는 세포에 비해 간질중첩증 질환의 해마내 조직 또는 세포에서 발현양이 증가되는 것으로 확인됨에 따라, IQGAP1 단백질 또는 유전자를 간질중첩증 질환 진단용 마커로 사용할 경우 간질중첩증 질환을 초기에 신속하고 정확하게 진단 및 예측할 수 있는 효과가 있으며, 간질중첩증 질환 치료제의 개발을 위한 표적으로 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 대조군 마우스(a, e) 및 카인산(KA)-처리된 마우스 KA 투여 후 1일째(b, f), 3일째(c, g), 및 7일째(d, h)의 해마에서 IQGAP1 면역반응성(IR)을 나타낸다. 스케일 바 = a-d에서 100 μ m, e-h에서 20 μ m.
- 도 2는 KA 처리 후 해마에서 IQGAP과 Sox2, 네스틴, 및 NeuN에 대한 이중 면역형광 염색 결과이다. 스케일 바 = a-1에서 20 μ m.
- 도 3은 KA 처리 후 해마에서 IQGAP1 및 GFAP에 대한 이중 면역형광 염색 결과이다. 스케일 바 = a-c에서 100 μ m, d-g에서 20 μ m.
- 도 4는 KA 처리 후 해마에서 IQGAP1 및 BrdU에 대한 이중 면역형광 염색 결과이다. 스케일 바 = a-c에서 100 μ m, d-f에서 20 μ m.
- 도 5는 KA 처리 후 해마에서 IQGAP1 및 NG2에 대한 이중 면역형광 염색 결과이다. 스케일 바 = a-d에서 20 μ m.
- 도 6은 KA 처리 후 해마에서 IQGAP1 및 APC에 대한 이중 면역형광 염색 결과(A), 및 KA 처리 후 해마에서 Cdc42 및 IQGAP1의 일시적 패턴을 보여주는 웨스턴 블롯 분석 결과(B)이다. *PW0.01 vs control, **PW0.001 vs control.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 실시예 1. 실험동물 및 병변

- [0046] 체중 23-25 g의 수컷 ICR(imprinting control region) 마우스(Samtako, Korea)를 본 발명에 사용하였다. 동물들은 23℃, 조절된 밤/낮 사이클(12 h light/12 h dark)로 조절된 실내에서 사육하였다. 음식과 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 동물-관련 절차는 충남대학교 동물관리위원회의 가이드라인(CNU-00151)에 따라 수행하였다. KA (Sigma, MO, USA)는 살균한 0.1 M PBS(pH 7.4)에 녹인 5 mg/ml로 스톱 용액으로서 제조하였고; 앨리쿼트(aliquots)는 필요시까지 -20℃에 보관하였다. KA 주사(0.1 μ g/5 μ l volume in PBS, i.c.v.)는 이전에 공지된 방법(Laursen SE, et al. 1986 *J Pharmacol Methods* 16:355-357)에 따라 수행하였다.

- [0047] 간략히 설명하면, KA는 2.4 mm 길이까지 삽입된 26 게이지 바늘이 고정된 50 μ l 해밀턴 마이크로실린지를 이용하여 브레그마(bregma)에 주사하였다. 대조군 마우스는 동량의 식염수를 주입하였다. 동물들을 관찰하여 Racine scale에 따라 분류하였다: 단계 1, 부동상태(immobility); 단계 2, 앞다리 및/또는 꼬리 뻗음(extension), 뻗뻗한 자세(rigid posture); 단계 3, 반복 행동, 헤드보빙(head bobbing); 단계 4, 일어섬(rearing)과 넘어짐(falling); 단계 5, 지속적인 일어섬과 넘어짐; 및 단계 6, 심각한 강직-강대 발작(tonic-clonic seizures). 적어도 단계 4에 도달한 동물들만 실험 대상으로 간주하였다. 발작의 지속시간은 30분에서 2시간까지 다양하였고 사망률은 ~20%였다. 비교적 소강기 이후, KA-주사된 동물들(n = 8/group) 및 식염수-주사된 대조군 동물 (n = 6)은 4 그룹으로 나누었으며, 이들을 KA 투여 후 사전에 설정된 시간에 희생하였다.

[0048] 실시예 2. 조직 준비

- [0049] KA 또는 식염수 주사 후 1, 3, 7일째에, 마우스를 소듐 펜토바르비탈(sodium pentobarbital, 50 mg/kg i.p.)로 마취시키고, 해파린 처리된 PBS로 심장을 통해 관류시킨 다음, PBS에 녹인 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 동물들의 뇌를 떼어내어, 4시간 동안 동일한 고정액에 담근 후, 30% 수크로오스 용액에서 동결보호(cryoprotected) 하였다. 그것들을 조직 동결 배지(OCT 화합물)에 포매시킨 다음, 액체 질소로 동결 시까지 2-메틸 부탄에서 신속하게 예비냉각(precooled)하였다. 동결된 관상절편(coronal sections, 40 μ l 두께)은 Leica cryostat를 이용하여 얻었다. 절편 하나씩(alternate sections)을 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려놓거나 항동결 버퍼에 부유상태(free-floating)로 보관하였다. 젤라틴-코팅된 슬라이드에 올린 절편들은 통상적인 조직학적 시험을 위한 크레일 바이올렛으로 염색하였다. 보관된 부유상태 절편들은 면역조직화학 기법을 이용하여 처리하였다.

[0050]

실시예 3. 면역조직화학 및 이중 면역형광 분석

[0051]

나란히 놓은 부유상태 절편들을 PBS에 녹인 1% H₂O₂와 함께 내생성 페록시다아제 블로킹에 제공한 다음, 블로킹 버퍼(30분 동안 PBS에 녹인 1 % FBS(fetal bovine serum) 및 0.3 % Triton X-100)로 처리하고, 일차 IQGAP1 (1:100, #SC10792, Santa Cruz)로 반응시켰다. 조직 절편의 면역조직화학 염색은 이전에 공지된 아비딘-바이오티딘 페록시다아제 복합체(avidin-biotin peroxidase complex, ABC) 방법을 이용하여 수행하였다 (Kim DW, et al. 2007 *Neurochem Res* 32:1460-1468). 한 쌍의 항원을 동시에 설명하기 위하여, 동일한 절편에서, 토끼 IQGAP1을 항체들 중 하나와 함께 사용하였다: glial fibrillary acidic protein; (GFAP, 1:1000, #AM020, Biogenex), Sox2 (1:100, #MAB2018, R&D systems), Nestin (1:100, #ab18102, Abcam), NeuN (1:100, #MAB377, Millipore), NG2 (1:100, #AB5320, Chemicon), adenomatous polyposis coli (APC, 1:200, #OP80, Calbiochem). 부유상태 절편은 상술한 바와 같이 IQGAP1에 대해 면역반응 시켰으나, Cy3-콘주게이트된 항-토끼 이차 항체를 사용하였다 (1:500, Amersham, UK). 그 후, 절편들은 다른 항체들 및 Cy2-콘주게이트된 항-마우스 이차 항체에 대해 추가적으로 처리하였다 (1:200; Amersham). 이중-염색된 절편은 Zeiss Axiophot 현미경으로 분석하였다.

[0052]

실시예 4. BrdU 라벨링

[0053]

BrdU (50 mg/kg, #B5002, Sigma-Aldrich) 라벨링은 증식이 일어나는 세포를 표지하고 추적하기 위해 발작 유도 의 동일한 일자에 수행되었다. 본 발명에서 모든 마우스들은 초기 KA 처리 후 8시간 간격으로 BrdU (50 mg/kg, i.p.) 3회 주사를 받았다. 동물들을 발작 유도 후 1, 3, 7일째에 희생시켰다. BrdU 면역형광 염색을 위해, 절편 들을 50% 포르마이드/50% 2X SSC 버퍼 (0.3 M NaCl and 0.03 M sodium citrate)에서 2시간 동안 65℃로 반응 시키고 2X SSC 버퍼로 10분간 행구어 내었다. 그런 다음 37℃, 2 N HCl에서 30분간 반응시키고 0.1 M 붕산(pH 8.5)에서 15분간 행구어 내었다. PBS 세척 후, 4℃에서 1시간 동안 블로킹 버퍼 및 밤새 항-BrdU 항체(1:200, #RNN202, Abcam) 용액에서 반응시키고 상술한 이중 면역형광과 같이 IQGAP1로 추가 처리하였다.

[0054]

실시예 5. 웨스턴 블로팅

[0055]

KA-처리된 그룹(그룹에서 4, 12시간 및 1, 3, 7일, n=6-8) 및 대조군 마우스로부터 얻은 해마를 절개하고 용해 버퍼(50 mM TrisCl, 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 100 µg/ml phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 및 1% Triton X-100)에서 균질화하였다. 원심분리 후, 단백질 농도는 Micro BCA 단백질 분석 키트를 이용하여 상층액에서 측정하였다; BSA(bovine serum albumin)를 표준으로 사용하였다 (Pierce Chemical, USA). 배양된 정상세포(astrocytes)를 끊어서 수집하고, 펠렛을 단백질 분해효소 저해제 카테일과 함께 PRO-PREP 시약(Intron Biotechnology, Korea)을 이용하여 용해 버퍼에서 녹였다. 각 샘플에서 단백질 함량의 정규화 후, 각 샘플의 총 세포 분획 30 mg을 8 또는 12% SDS-PAGE로 분리한 후 니트로셀룰로오스 막상에 트랜스블로팅 하였다. 상기 블롯을 일차 항체들; IQGAP1 (1:1000) 및 cdc42 (1:1000, #sc8401, Santa Cruz)로 탐침하였다. 면역 복합체들은 화학발광(enhanced chemiluminescence, ECL) 검출시스템(Amersham)을 이용하여 확인하였다.

[0056]

실험결과 1. IQGAP1 발현은 KA-주사된 마우스 해마의 피라미드 층에서 상향조절된다.

[0057]

이전에 공지된 바에 따라 (Kim DW, et al. 2007 *Neurochem Res* 32:1460-1468), 크레실 바이올렛 염색은 KA-처리된 마우스의 해마 영역에서 선별적인 병변을 나타내었다 (테이터 미도시). 식염수-처리된 대조군 마우스와 비교하여, KA-처리된 마우스는 주사 후(PI) 1일 째에 CA3 영역에서 피라미드 세포 변성(pyramidal cell degeneration)을 나타내었다. PI 3 및 7일째에서, 피라미드 세포 소실 및 신경교(glial) 반응성은 CA3 영역에서 분명하였다.

[0058]

KA-유도된 해마 흥분독성에서 IQGAP1의 관련성을 시험하기 위해, 우선 KA-처리된 마우스의 동측성 해마 (ipsilateral hippocampus)에서 IQGAP1 발현을 측정하였다. 대조군 마우스에서, IQGAP1 면역반응성 (immunoreactivity, IR)은 CA1, CA3 및 DG를 포함한 해마의 부분들에서는 없었다 (도 1의 a). KA-처리된 해마의 CA1 층에서, IQGAP1 IR은 1일째에 관찰되었고 3일째에 최대에 도달하였으며, KA 처리 후 감소하였다 (도 1의 b-d). IQGAP1 IR은 CA1 층의 흩어진 세포들에서 1일부터 관찰되었다. 그 후에, 이는 CA1 층에 확산되면서, 정도

는 덜하지만, CA3 층에까지, IQGAP1 면역반응성 세포들을 다시 나타내었다. 최대 IQGAP1 발현은 3일째에 관찰되었으며, 이 때 뿔뿔하게 채워진 IQGAP1 면역반응성 세포들이 CA1 층에 축적되었다. 더 긴 생존시간에서, IQGAP1 IR은 감소하였다 (도 1의 e-h). 면역반응성 IQGAP1 세포들은 CA1의 방사층(stratum radiatum) 및 피라미드 층에서 대부분 위족생물성(pseudopodic)/아메바성(ameboid) 형태학을 나타내었다.

[0059] **실험결과 2. IQGAP1+ 세포는 KA-주사된 해마에서 일부 Sox2+ 및 모든 Nestin+ 세포와 공동 위치하지만 NeuN+ 세포와는 공동 위치하지 않는다.**

[0060] 이중 면역형광 염색을 수행하여 KA 처리 후 해마에서 IQGAP1+ 세포를 확인하였다. IQGAP1 IR은 PI 3일 피라미드 층에서 관찰되기 때문에 (도 2의 a, e, i), 발달중인 신경세포-특이적 마커 Sox2, 네스틴(nestin) 및 NeuN으로 면역염색을 수행하였다. HMG 박스 전사인자인 Sox2는 마우스 개체발생의 모든 단계에서 다분화능(multipotent) 신경 줄기세포에서 발현된다 (Ellis P, et al. 2004 *Dev Neurosci* 26:148-165). 본 발명에서는 IQGAP1+ 세포가 일부 Sox2+ 세포와 공동 위치함을 확인하였다 (도 2의 a-d). 네스틴은 중추신경계(CNS)의 줄기세포에서 우성적으로 발현되기 때문에 유용한 신경줄기세포 마커인 반면, 대부분의 모든 성숙한 CNS 세포에는 존재하지 않는다. 따라서 네스틴은 분화여부가 결정되지 않은(uncommitted) 신경줄기세포 마커로도 불린다 (Michalczyk K, et al. 2005 *Histol Histopathol* 20:665-671). 강한 IQGAP1 IR은 CA1 영역에서 네스틴과 공동 위치하였다 (도 2의 e-h). 그러나 성숙한 신경세포 마커인 NeuN과 IQGAP1 면역라벨링은 CA1 영역에서 관찰되지 않았다 (도 2의 i-l). 이러한 결과는 KA 자극이 해마의 미성숙 신경 전구세포에서 IQGAP1을 상향조절함을 의미한다.

[0061] **실험결과 3. IQGAP1은 KA-유도된 흥분독성 후 성상세포 마커인 GFAP와 공동 위치하지 않는다.**

[0062] 네스틴은 중추신경계, 말초신경계(PNS), 근원성(myogenic) 조직, 및 다른 조직들에서 발달 초기 단계 동안 분열하는 세포들에서 발현되는 중간섬유단백질(intermediate filament protein)이다. 분화 시에, 네스틴은 하향조절되어 조직-특이적 중간섬유단백질로 대체된다 (Michalczyk K, et al. 2005 *Histol Histopathol* 20:665-671). 신경줄기세포 마커인 네스틴은 발달 동안 GFAP(glial fibrillary acidic protein)와 일시적으로 공동 발현되고 뇌 손상 후 반응성 성상세포에서 유도된다 (Sergent-Tanguy S, et al. 2006 *J Neurosci Res* 83:1515-1524). 따라서 본 발명에서는 DAPI, IQGAP1, 및 성상세포 마커로서 GFAP이 포함된 3중 형광 라벨링을 수행함으로써 IQGAP1+ 세포가 성상세포인지를 조사하였다. KA-처리된 해마에서, IQGAP1 IR은 피라미드 층에서 관찰된 반면, IQGAP1과 GFAP IR은 KA 3일 후 CA1 영역에서 공동 위치하지 않았다 (도 3). 앞서의 결과(도 1, 2)와 결합시켜 보면, 이러한 데이터는 KA 자극이 성상세포 또는 성숙한 신경세포가 아닌 분화여부가 결정되지 않은(uncommitted) 신경줄기세포에서 IQGAP1 발현을 상향조절함을 의미한다.

[0063] **실험결과 4. IQGAP1은 KA-유도된 흥분독성에서 증식 또는 분화와 상관관계가 없다.**

[0064] 증가된 신경 전구체의 증식 및 흥분성 신경세포로의 분화는 필로카르핀(pilocarpine)- 및 KA-유도된 간질중첩(status epilepticus, SE) 모델에서 보고된 바 있다. 해마의 DG에서 세포 변화는 서로 다른 간질 모델에서 충분하게 연구되어 있다 (Indulekha CL, et al. 2010 *Biochem Biophys Res Commun* 393:864-871). 그러나 해마의 CA1 또는 CA3 영역과 같은 특이적 영역에서 세포 변화는 많이 연구되어 있지 않다. 본 발명에서, IQGAP1 발현은 CA3 층 또는 DG에서가 아닌, CA1 층에서만 확인되었다.

[0065] 다음으로, IQGAP1+ 세포가 내생성 줄기세포 개체 증식 또는 다른 영역으로부터 증식하는 세포들의 이동에 기인한 것인지를 확인하였다. 본 발명자들은 IQGAP1+ 세포가 KA 처리 후 해마에서 BrdU를 라벨링함으로써 증식에 관련되어 있는지를 조사하였다. KA-처리된 해마에서, IQGAP1 IR은 병변 3일 후 피라미드 층에서 관찰되었다 (도 4의 a, d). 강한 BrdU IR은 측뇌실(lateral ventricle)의 벽 및 DG의 과립하 영역(subgranular zone)에서 확인되었다 (도 4의 b, c에서 화살촉). 그러나 IQGAP1+/BrdU+의 몇몇 경우를 제외하고는, 대부분의 IQGAP1 IR은 CA1 영역에서 BrdU와 공동 위치하지 않았다 (도 4의 d-f). 이러한 데이터는 KA-유도된 발작이 성숙한 DG에서 세포 증식을 유도하고, 그 결과로서 CA1 피라미드 층의 IQGAP1+ 세포가 아닌 망상 신경생성(net neurogenesis)에서 안정된 증가를 나타냄을 의미한다.

[0066] **실험결과 5. IQGAP1은 NG2 신경교 전구세포에 존재하지 않는다.**

[0067] NG2 세포는 뇌실하 영역(subventricular zone, SVZ)에서 기원한 실질의 이동세포(parenchymal migratory cells)와 대뇌피질(cortex)에 존재하는 국소전구세포(resident local precursor cells) 둘 다이다. 또한 NG2 세포는 성숙한 신경생성에 중요하다 (Morrens J, et al. 2012 *Glia* 60:159-174). 본 발명에서는 IQGAP1+ 세포가 KA 처리 후 해마에서 NG2+ 세포로부터 기원하거나 이동되었는지를 조사하였다. KA-처리된 해마에서, IQGAP1 및 NG2 IR은 병변 3일 후 피라미드 층에서 관찰되었다 (도 5의 a, b). 그러나 병변 후 3일째 해마에서, IQGAP1+/NG2+ 세포들은 CA1 영역에서 관찰되지 않았다 (도 5의 c, d). 이러한 데이터는 IQGAP1+ 세포가 해마에 존재하는 국소전구세포인 NG2+ 세포로부터 기원하거나 이동하지 않았음을 의미한다. 앞서의 결과(도 1 내지 5)와 결합시켜 보면, 이러한 데이터는 KA 자극이 정상세포, 새롭게 분열된 신경 전구세포 또는 NG2 세포가 아니라, 흥분독성-유도된 해마의 CA3 신경세포 사멸 후 형태학적 변화를 겪은 CA1 층의 사전에 존재하는 살아남은 신경세포(preexisted sparing neurons)에서 IQGAP1 발현을 상향조절함을 의미한다.

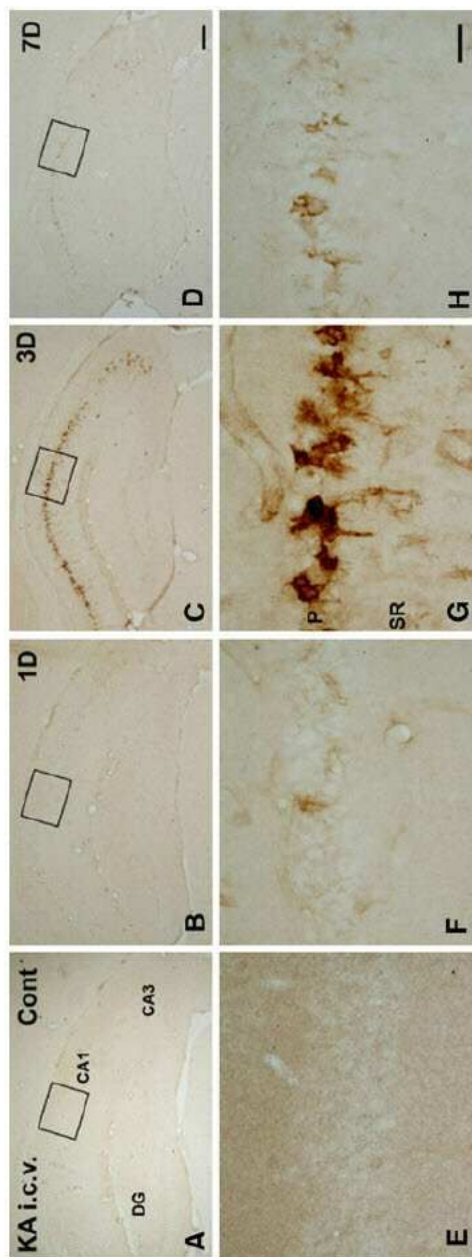
[0068] **실험결과 6. IQGAP1은 KA-처리된 마우스 해마의 CA1 영역에서 APC와 공동 위치한다.**

[0069] IQGAP1 IR은 KA 처리 후 해마의 CA1 영역에서 네스틴과 강하게 공동 위치하였다. 네스틴은 분화여부가 결정되지 않은 신경줄기세포 마커 중 하나이며 또한 축삭(axon)의 방사성 생장(radial growth)에 관련된, 타입 VI 중간섬 유단백질이다. 흥미롭게도, IQGAP1은 액틴 필라멘트(actin filaments), Cdc42, Rac, 칼모듈린(calmodulin), 카데린(cadherins), β -카테닌(β -catenin), ERK(extracellular signal-regulated kinases), APC(adenomatous polyposis coli), 및 plus-end tracking proteins, EB-1(end-binding 1)과 CLIP-170을 포함하는, 다중결합파트너들을 가지는데, 이들 모두는 세포 극성화, 운동성, 증식 및 부착의 핵심 조절자(master regulator)이다. Rho 패밀리의 GTPases, 특히 Rac1과 Cdc42는 세포 극성화 및 지향성 이동(directional migration)의 핵심 조절자이다. 또한 APC는 극성화된 세포 이동에서 중심이 되는 것으로 생각된다. Rac1과 Cdc42의 작동인자(effector)로서, IQGAP1은 APC와 직접적으로 상호작용한다 (Watanabe T, et al. 2004 *Dev Cell* 7:871883). 따라서 본 발명은 KA-처리된 흥분독성의 CA3 신경세포 사멸 후 CA1 살아남은 신경세포에서 IQGAP1 발현이 그것의 결합 파트너인 APC와 형태학적 변화에 관련되어 있는지를 조사하였다. IQGAP1 발현은 KA-처리된 해마의 병변 3일 후에서 CA1 피라미드 세포층에서 APC와 공동 위치하였다. 또한 본 발명은 Cdc42에 대한 면역조직화학을 시도하였다. Cdc42는 운동성 섬유아세포의 IQGAP1 및 선단부(leading edge)와 상호작용한다. IQGAP1은 활성 상태에서 GTP-Cdc42를 안정화시키기 위해 결합할 수 있다 (Swart-Mataraza JM, et al. 2002 *J Biol Chem* 277:24753-24763). 본 발명에서는 일시적으로 면역블로팅을 수행하여 KA-처리된 해마에서 Cdc42 및 IQGAP1 사이의 관련성을 확인하였다. KA 처리 후, Cdc42 발현은 12-24시간 후 증가하였으며, 이후 IQGAP1 발현은 1일 및 3일째에 최대치(peaks)에 도달하였다 (도 6의 b). 이러한 데이터는 Cdc42 활성화가 IQGAP1의 보충을 촉발하여 형태학적 변화를 유도하는 액틴 세포골격과 상호작용하는 시그널링 복합체를 형성한다는 것을 의미한다.

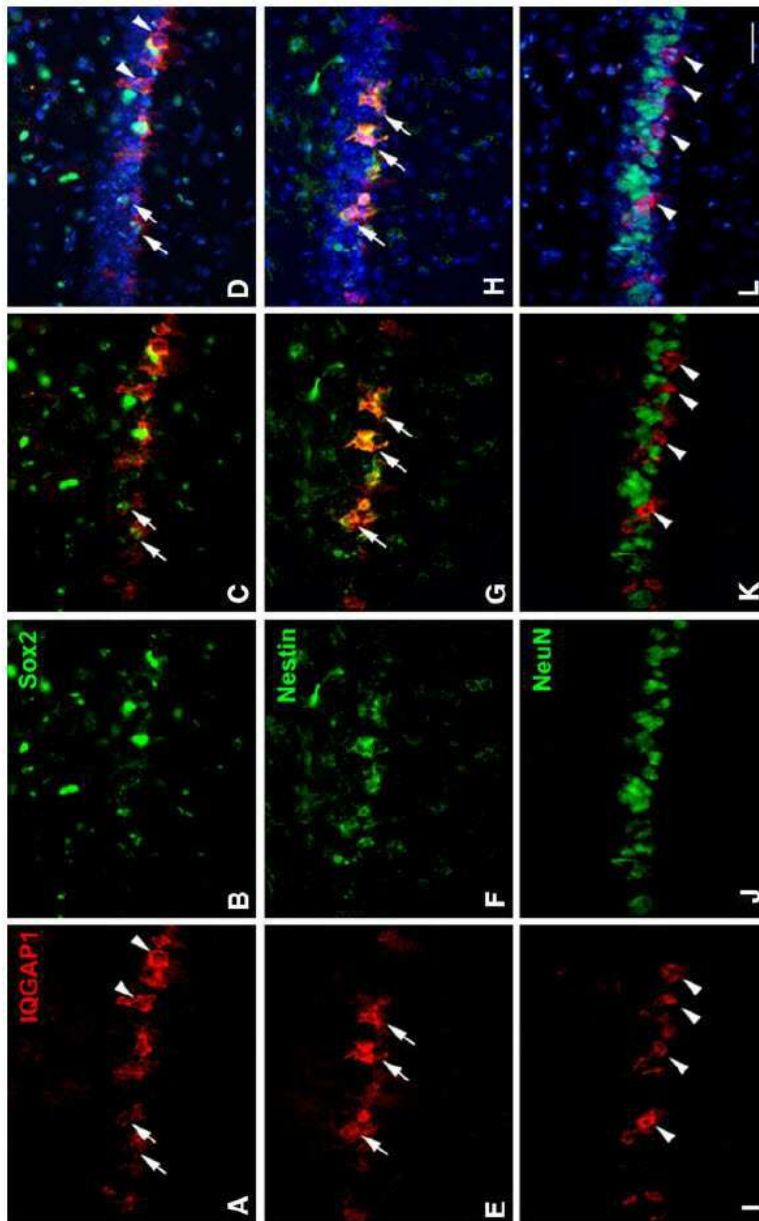
[0070] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

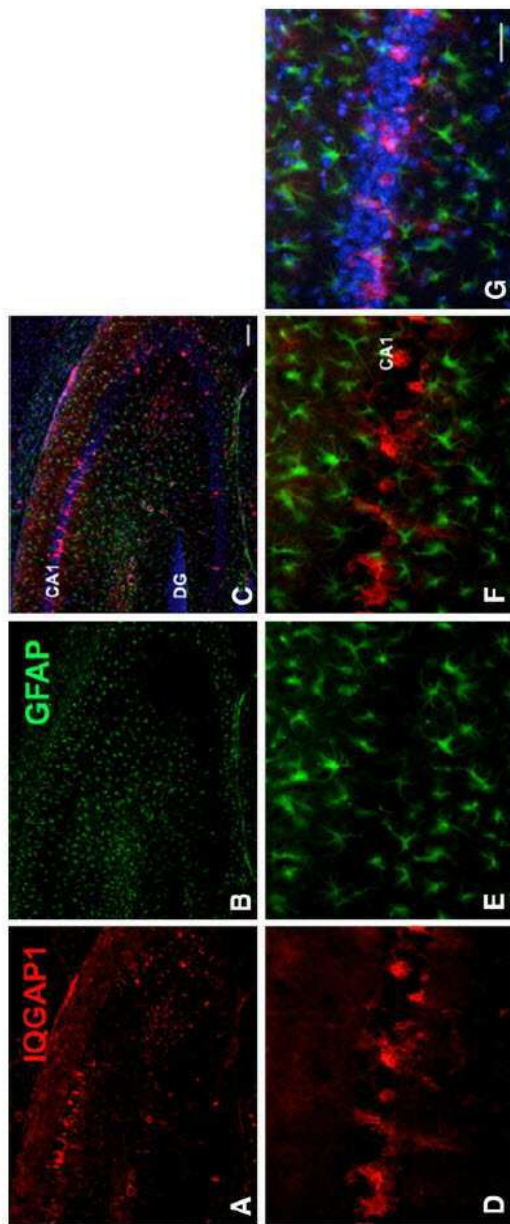
도면1



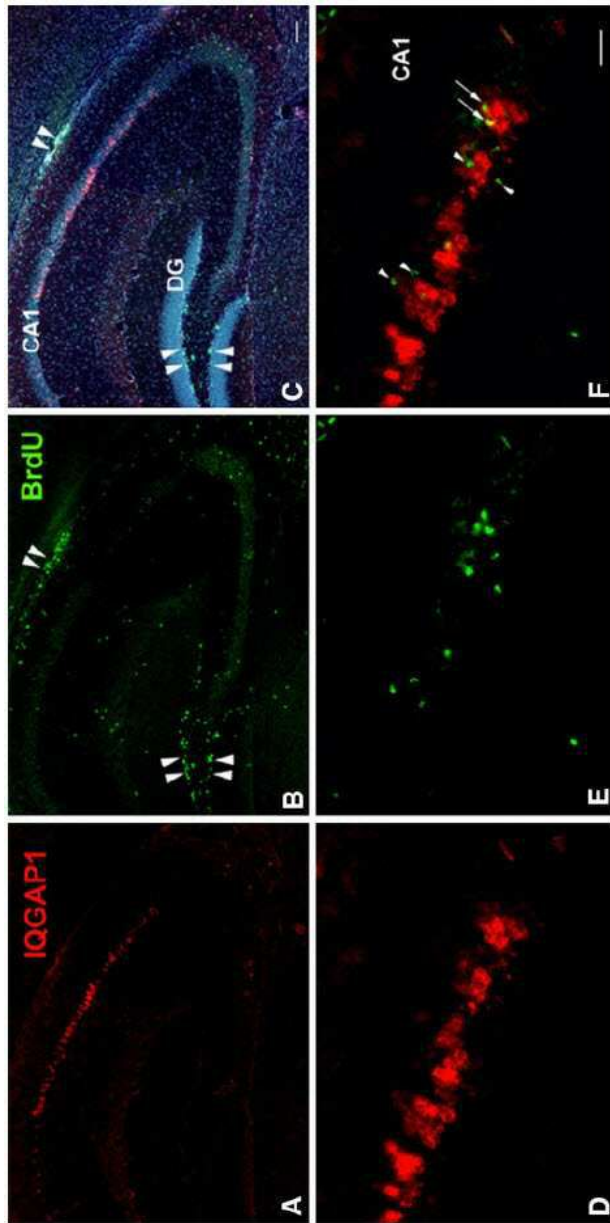
도면2



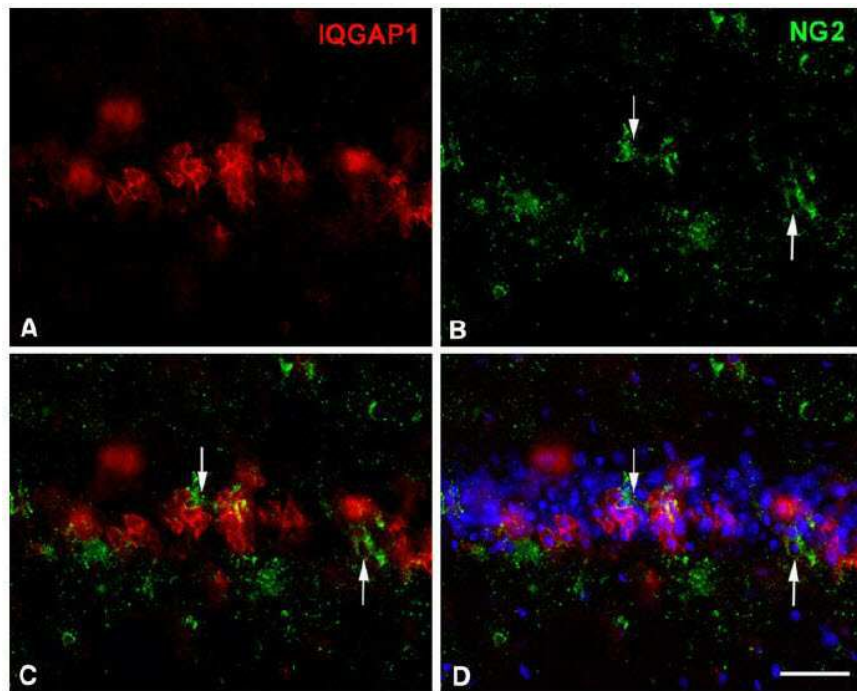
도면3



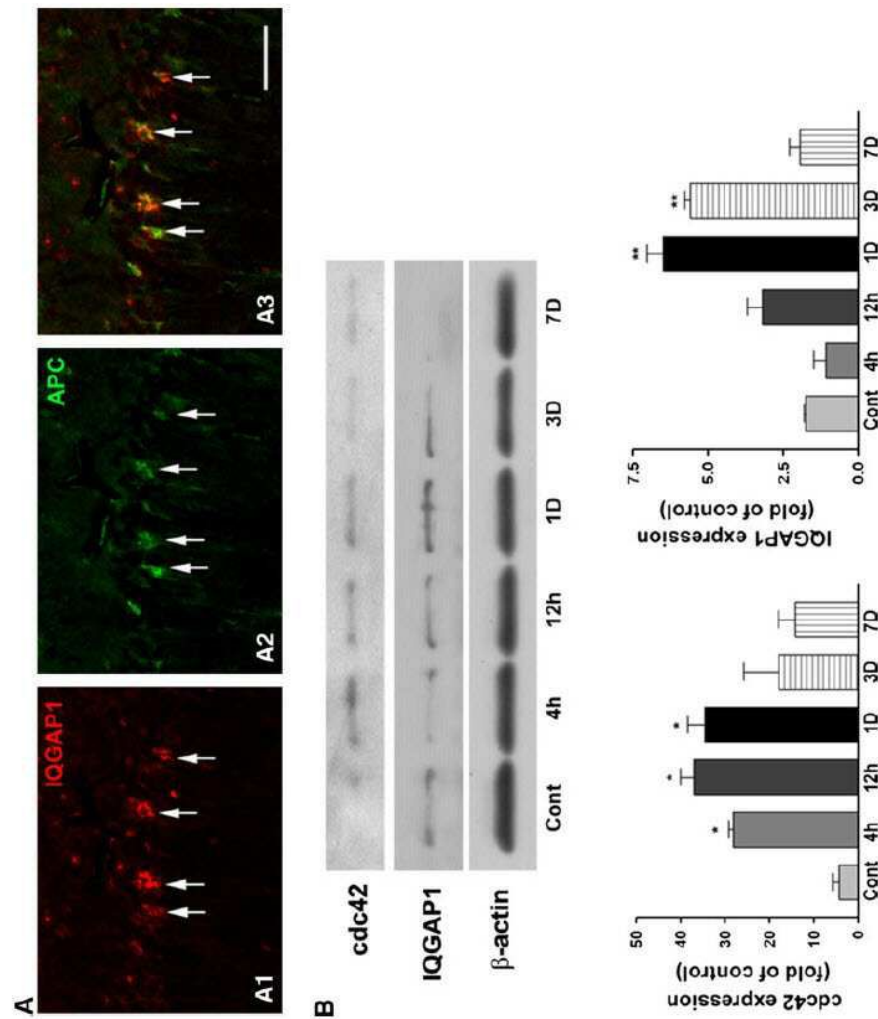
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Biomaker composition for diagnosing status epilepticus

<130> NP14-1185

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1657

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Ser Ala Ala Asp Glu Val Asp Gly Leu Gly Val Ala Arg Pro His

1

5

10

15

Tyr Gly Ser Val Leu Asp Asn Glu Arg Leu Thr Ala Glu Glu Met Asp
20 25 30

Glu Arg Arg Arg Gln Asn Val Ala Tyr Glu Tyr Leu Cys His Leu Glu
35 40 45

Glu Ala Lys Arg Trp Met Glu Ala Cys Leu Gly Glu Asp Leu Pro Pro
50 55 60

Thr Thr Glu Leu Glu Glu Gly Leu Arg Asn Gly Val Tyr Leu Ala Lys
65 70 75 80

Leu Gly Asn Phe Phe Ser Pro Lys Val Val Ser Leu Lys Lys Ile Tyr
85 90 95

Asp Arg Glu Gln Thr Arg Tyr Lys Ala Thr Gly Leu His Phe Arg His

100 105 110

Thr Asp Asn Val Ile Gln Trp Leu Asn Ala Met Asp Glu Ile Gly Leu
115 120 125

Pro Lys Ile Phe Tyr Pro Glu Thr Thr Asp Ile Tyr Asp Arg Lys Asn
130 135 140

Met Pro Arg Cys Ile Tyr Cys Ile His Ala Leu Ser Leu Tyr Leu Phe
145 150 155 160

Lys Leu Gly Leu Ala Pro Gln Ile Gln Asp Leu Tyr Gly Lys Val Asp
165 170 175

Phe Thr Glu Glu Glu Ile Asn Asn Met Lys Thr Glu Leu Glu Lys Tyr
180 185 190

Gly Ile Gln Met Pro Ala Phe Ser Lys Ile Gly Gly Ile Leu Ala Asn
195 200 205

Glu Leu Ser Val Asp Glu Ala Ala Leu His Ala Ala Val Ile Ala Ile
210 215 220

Asn Glu Ala Ile Asp Arg Arg Ile Pro Ala Asp Thr Phe Ala Ala Leu
225 230 235 240

Lys Asn Pro Asn Ala Met Leu Val Asn Leu Glu Glu Pro Leu Ala Ser

245 250 255

Thr Tyr Gln Asp Ile Leu Tyr Gln Ala Lys Gln Asp Lys Met Thr Asn

260	265	270
Ala Lys Asn Arg Thr Glu Asn Ser Glu Arg Glu Arg Asp Val Tyr Glu		
275	280	285
Glu Leu Leu Thr Gln Ala Glu Ile Gln Gly Asn Ile Asn Lys Val Asn		
290	295	300
Thr Phe Ser Ala Leu Ala Asn Ile Asp Leu Ala Leu Glu Gln Gly Asp		
305	310	315
		320
Ala Leu Ala Leu Phe Arg Ala Leu Gln Ser Pro Ala Leu Gly Leu Arg		
325	330	335
Gly Leu Gln Gln Gln Asn Ser Asp Trp Tyr Leu Lys Gln Leu Leu Ser		
340	345	350
Asp Lys Gln Gln Lys Arg Gln Ser Gly Gln Thr Asp Pro Leu Gln Lys		
355	360	365
Glu Glu Leu Gln Ser Gly Val Asp Ala Ala Asn Ser Ala Ala Gln Gln		
370	375	380
Tyr Gln Arg Arg Leu Ala Ala Val Ala Leu Ile Asn Ala Ala Ile Gln		
385	390	395
		400
Lys Gly Val Ala Glu Lys Thr Val Leu Glu Leu Met Asn Pro Glu Ala		
405	410	415
Gln Leu Pro Gln Val Tyr Pro Phe Ala Ala Asp Leu Tyr Gln Lys Glu		
420	425	430
Leu Ala Thr Leu Gln Arg Gln Ser Pro Glu His Asn Leu Thr His Pro		
435	440	445
Glu Leu Ser Val Ala Val Glu Met Leu Ser Ser Val Ala Leu Ile Asn		
450	455	460
Arg Ala Leu Glu Ser Gly Asp Val Asn Thr Val Trp Lys Gln Leu Ser		
465	470	475
		480
Ser Ser Val Thr Gly Leu Thr Asn Ile Glu Glu Glu Asn Cys Gln Arg		
485	490	495
Tyr Leu Asp Glu Leu Met Lys Leu Lys Ala Gln Ala His Ala Glu Asn		
500	505	510
Asn Glu Phe Ile Thr Trp Asn Asp Ile Gln Ala Cys Val Asp His Val		

515 520 525
 Asn Leu Val Val Gln Glu Glu His Glu Arg Ile Leu Ala Ile Gly Leu

 530 535 540
 Ile Asn Glu Ala Leu Asp Glu Gly Asp Ala Gln Lys Thr Leu Gln Ala
 545 550 555 560
 Leu Gln Ile Pro Ala Ala Lys Leu Glu Gly Val Leu Ala Glu Val Ala

 565 570 575
 Gln His Tyr Gln Asp Thr Leu Ile Arg Ala Lys Arg Glu Lys Ala Gln

 580 585 590
 Glu Ile Gln Asp Glu Ser Ala Val Leu Trp Leu Asp Glu Ile Gln Gly

 595 600 605

 Gly Ile Trp Gln Ser Asn Lys Asp Thr Gln Glu Ala Gln Lys Phe Ala
 610 615 620
 Leu Gly Ile Phe Ala Ile Asn Glu Ala Val Glu Ser Gly Asp Val Gly
 625 630 635 640
 Lys Thr Leu Ser Ala Leu Arg Ser Pro Asp Val Gly Leu Tyr Gly Val

 645 650 655
 Ile Pro Glu Cys Gly Glu Thr Tyr His Ser Asp Leu Ala Glu Ala Lys

 660 665 670
 Lys Lys Lys Leu Ala Val Gly Asp Asn Asn Ser Lys Trp Val Lys His

 675 680 685
 Trp Val Lys Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr His Asn Leu Glu Thr Gln Glu
 690 695 700
 Gly Gly Trp Asp Glu Pro Pro Asn Phe Val Gln Asn Ser Met Gln Leu
 705 710 715 720
 Ser Arg Glu Glu Ile Gln Ser Ser Ile Ser Gly Val Thr Ala Ala Tyr

 725 730 735
 Asn Arg Glu Gln Leu Trp Leu Ala Asn Glu Gly Leu Ile Thr Arg Leu

 740 745 750

 Gln Ala Arg Cys Arg Gly Tyr Leu Val Arg Gln Glu Phe Arg Ser Arg
 755 760 765

Met Asn Phe Leu Lys Lys Gln Ile Pro Ala Ile Thr Cys Ile Gln Ser
770 775 780

Gln Trp Arg Gly Tyr Lys Gln Lys Lys Ala Tyr Gln Asp Arg Leu Ala
785 790 795 800

Tyr Leu Arg Ser His Lys Asp Glu Val Val Lys Ile Gln Ser Leu Ala
805 810 815

Arg Met His Gln Ala Arg Lys Arg Tyr Arg Asp Arg Leu Gln Tyr Phe
820 825 830

Arg Asp His Ile Asn Asp Ile Ile Lys Ile Gln Ala Phe Ile Arg Ala
835 840 845

Asn Lys Ala Arg Asp Asp Tyr Lys Thr Leu Ile Asn Ala Glu Asp Pro
850 855 860

Pro Met Val Val Val Arg Lys Phe Val His Leu Leu Asp Gln Ser Asp
865 870 875 880

Gln Asp Phe Gln Glu Glu Leu Asp Leu Met Lys Met Arg Glu Glu Val
885 890 895

Ile Thr Leu Ile Arg Ser Asn Gln Gln Leu Glu Asn Asp Leu Asn Leu
900 905 910

Met Asp Ile Lys Ile Gly Leu Leu Val Lys Asn Lys Ile Thr Leu Gln
915 920 925

Asp Val Val Ser His Ser Lys Lys Leu Thr Lys Lys Asn Lys Glu Gln
930 935 940

Leu Ser Asp Met Met Met Ile Asn Lys Gln Lys Gly Gly Leu Lys Ala
945 950 955 960

Leu Ser Lys Glu Lys Arg Glu Lys Leu Glu Ala Tyr Gln His Leu Phe
965 970 975

Tyr Leu Leu Gln Thr Asn Pro Thr Tyr Leu Ala Lys Leu Ile Phe Gln
980 985 990

Met Pro Gln Asn Lys Ser Thr Lys Phe Met Asp Ser Val Ile Phe Thr
995 1000 1005

Leu Tyr Asn Tyr Ala Ser Asn Gln Arg Glu Glu Tyr Leu Leu Leu Arg
1010 1015 1020

Leu Phe Lys Thr Ala Leu Gln Glu Glu Ile Lys Ser Lys Val Asp Gln
1025 1030 1035 1040

Ile Gln Glu Ile Val Thr Gly Asn Pro Thr Val Ile Lys Met Val Val
1045 1050 1055

Ser Phe Asn Arg Gly Ala Arg Gly Gln Asn Ala Leu Arg Gln Ile Leu
1060 1065 1070

Ala Pro Val Val Lys Glu Ile Met Asp Asp Lys Ser Leu Asn Ile Lys
1075 1080 1085

Thr Asp Pro Val Asp Ile Tyr Lys Ser Trp Val Asn Gln Met Glu Ser
1090 1095 1100

Gln Thr Gly Glu Ala Ser Lys Leu Pro Tyr Asp Val Thr Pro Glu Gln

1105 1110 1115 1120

Ala Leu Ala His Glu Glu Val Lys Thr Arg Leu Asp Ser Ser Ile Arg
1125 1130 1135

Asn Met Arg Ala Val Thr Asp Lys Phe Leu Ser Ala Ile Val Ser Ser
1140 1145 1150

Val Asp Lys Ile Pro Tyr Gly Met Arg Phe Ile Ala Lys Val Leu Lys
1155 1160 1165

Asp Ser Leu His Glu Lys Phe Pro Asp Ala Gly Glu Asp Glu Leu Leu
1170 1175 1180

Lys Ile Ile Gly Asn Leu Leu Tyr Tyr Arg Tyr Met Asn Pro Ala Ile
1185 1190 1195 1200

Val Ala Pro Asp Ala Phe Asp Ile Ile Asp Leu Ser Ala Gly Gly Gln
1205 1210 1215

Leu Thr Thr Asp Gln Arg Arg Asn Leu Gly Ser Ile Ala Lys Met Leu
1220 1225 1230

Gln His Ala Ala Ser Asn Lys Met Phe Leu Gly Asp Asn Ala His Leu
1235 1240 1245

Ser Ile Ile Asn Glu Tyr Leu Ser Gln Ser Tyr Gln Lys Phe Arg Arg

1250 1255 1260

Phe Phe Gln Thr Ala Cys Asp Val Pro Glu Leu Gln Asp Lys Phe Asn

1265 1270 1275 1280
 Val Asp Glu Tyr Ser Asp Leu Val Thr Leu Thr Lys Pro Val Ile Tyr
 1285 1290 1295
 Ile Ser Ile Gly Glu Ile Ile Asn Thr His Thr Leu Leu Leu Asp His
 1300 1305 1310
 Gln Asp Ala Ile Ala Pro Glu His Asn Asp Pro Ile His Glu Leu Leu
 1315 1320 1325

 Asp Asp Leu Gly Glu Val Pro Thr Ile Glu Ser Leu Ile Gly Glu Ser
 1330 1335 1340
 Ser Gly Asn Leu Asn Asp Pro Asn Lys Glu Ala Leu Ala Lys Thr Glu
 1345 1350 1355 1360
 Val Ser Leu Thr Leu Thr Asn Lys Phe Asp Val Pro Gly Asp Glu Asn
 1365 1370 1375
 Ala Glu Met Asp Ala Arg Thr Ile Leu Leu Asn Thr Lys Arg Leu Ile
 1380 1385 1390
 Val Asp Val Ile Arg Phe Gln Pro Gly Glu Thr Leu Thr Glu Ile Leu

 1395 1400 1405
 Glu Thr Pro Ala Thr Ser Glu Gln Glu Ala Glu His Gln Arg Ala Met
 1410 1415 1420
 Gln Arg Arg Ala Ile Arg Asp Ala Lys Thr Pro Asp Lys Met Lys Lys
 1425 1430 1435 1440
 Ser Lys Ser Val Lys Glu Asp Ser Asn Leu Thr Leu Gln Glu Lys Lys
 1445 1450 1455
 Glu Lys Ile Gln Thr Gly Leu Lys Lys Leu Thr Glu Leu Gly Thr Val
 1460 1465 1470

 Asp Pro Lys Asn Lys Tyr Gln Glu Leu Ile Asn Asp Ile Ala Arg Asp
 1475 1480 1485
 Ile Arg Asn Gln Arg Arg Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Ala Glu Leu Val
 1490 1495 1500
 Lys Leu Gln Gln Thr Tyr Ala Ala Leu Asn Ser Lys Ala Thr Phe Tyr
 1505 1510 1515 1520
 Gly Glu Gln Val Asp Tyr Tyr Lys Ser Tyr Ile Lys Thr Cys Leu Asp

1525 1530 1535
Asn Leu Ala Ser Lys Gly Lys Val Ser Lys Lys Pro Arg Glu Met Lys

1540 1545 1550
Gly Lys Lys Ser Lys Lys Ile Ser Leu Lys Tyr Thr Ala Ala Arg Leu

1555 1560 1565
His Glu Lys Gly Val Leu Leu Glu Ile Glu Asp Leu Gln Val Asn Gln

1570 1575 1580
Phe Lys Asn Val Ile Phe Glu Ile Ser Pro Thr Glu Glu Val Gly Asp

1585 1590 1595 1600
Phe Glu Val Lys Ala Lys Phe Met Gly Val Gln Met Glu Thr Phe Met

1605 1610 1615

Leu His Tyr Gln Asp Leu Leu Gln Leu Gln Tyr Glu Gly Val Ala Val

1620 1625 1630
Met Lys Leu Phe Asp Arg Ala Lys Val Asn Val Asn Leu Leu Ile Phe

1635 1640 1645
Leu Leu Asn Lys Lys Phe Tyr Gly Lys

1650 1655

<210> 2

<211> 7219

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

ggaccccggc aagcccgcg acttggcagg agctgtagct accgccgtcc gcgcctccaa 60

ggtttcacgg cttcctcagc agagactcgg gctcgtccgc catgtccgcc gcagacgagg 120

ttgacgggct gggcgtggcc cggccgcact atggctctgt cctggataat gaaagactta 180

ctgcagagga gatggatgaa aggagacgtc agaactgggc ttatgagtac ctttgtcatt 240

tggaagaagc gaagaggtgg atggaagcat gcctagggga agatctgcct cccaccacag 300

aactggagga ggggcttagg aatgggtctt accttgccaa actggggaac ttcttctctc 360

ccaaagtagt gtccttgaaa aaaatctatg atcgagaaca gaccagatac aaggcgactg 420

gcctccactt tagacacact gataatgtga ttcagtgggtt gaatgccatg gatgagattg 480

gattgcctaa gattttttac ccagaaacta cagatatcta tgatcgaaag aacatgccaa 540

gatgtatcta ctgtatccat gcactcagtt tgtacctgtt caagctaggc ctggcccctc	600
agattcaaga cctatatgga aaggttgact tcacagaaga agaaatcaac aacatgaaga	660
ctgagttgga gaagtatggc atccagatgc ctgcccttag caagattggg ggcatcttgg	720
ctaataaact gtcagtggat gaagccgcat tacatgctgc tgttattgct attaatgaag	780
ctattgaccg tagaattcca gccgacacat ttgcagcttt gaaaaatccg aatgccatgc	840
ttgtaaatct tgaagagccc ttggcatcca cttaccagga tatactttac caggctaagc	900
aggacaaaat gacaaatgct aaaaacagga cagaaaactc agagagagaa agagatgttt	960
atgaggagct gctcacgcaa gctgaaattc aaggcaatat aaacaaagtc aatacatttt	1020
ctgcattagc aaatatcgac ctggctttag aacaaggaga tgcactggcc ttgttcaggg	1080
ctctgcagtc accagccctg gggtctcgag gactgcagca acagaatagc gactgggtact	1140
tgaagcagct cctgagtgat aaacagcaga agagacagag tggtcagact gaccccctgc	1200
agaaggagga gctgcagctt ggagtggatg ctgcaaacag tgctgccag caatatcaga	1260
gaagattggc agcagtagca ctgattaatg ctgcaatcca gaagggtgtt gctgagaaga	1320
ctgttttggg actgatgaat cccgaagccc agctgcccc ggtgtatcca tttgccgccg	1380
atctctatca gaaggagctg gctaccctgc agcgacaaag tcctgaacat aatctaccc	1440
accagagct ctctgtcgca gtggagatgt tgtcatcggg ggccctgac aacagggcat	1500
tggaatcagg agatgtgaat acagtgtgga agcaattgag cagttcagtt actggtctta	1560
ccaatatgga ggaagaaaac tgtcagaggt atctcgatga gttgatgaaa ctgaaggctc	1620
aggcacatgc agagaataat gaattcatta catggaatga tatccaagct tgcgtggacc	1680
atgtgaacct ggtgggtgcaa gaggaacatg agaggatttt agccattggt ttaattaatg	1740
aagccctgga tgaaggatg gcccaaaaaga ctctgcaggc cctacagatt cctgcagcta	1800
aacttgaggg agtccttgca gaagtggccc agcattacca agacacgctg attagagcga	1860
agagagagaa agcccaggaa atccaggatg agtcagctgt gttatggttg gatgaaattc	1920
aaggtggaat ctggcagtc aacaaagaca cccaagaagc acagaagttt gccttaggaa	1980
tctttgcat taatgaggca gtagaaagtg gtgatgttgg caaaacactg agtgccttc	2040
gctcccctga tgttggttg tatggagtca tcctgagtg tggtgaaact taccacagtg	2100
atcttgctga agccaagaag aaaaaactgg cagtaggaga taataacagc aagtgggtga	2160
agcactgggt aaaaggtgga tattattatt accacaatct ggagaccag gaaggaggat	2220
gggatgaacc tccaaatttt gtgcaaaatt ctatgcagct ttctcgggag gagatccaga	2280
gttctatctc tggggtgact gccgcatata accgagaaca gctgtggctg gccaatgaag	2340
gcctgatcac caggctgcag gctcgctgcc gtggatactt agttcgacag gaattccgat	2400

ccaggatgaa tttcctgaag aaacaaatcc ctgccatcac ctgcattcag tcacagtgga	2460
gaggatacaa gcagaagaag gcatatcaag atcgggttagc ttacctgcgc tcccacaaag	2520
atgaagtgtt aaagattcag tccctggcaa ggatgcacca agctcgaaag cgctatcgag	2580
atgcctgca gtacttccgg gaccatataa atgacattat caaaatccag gcttttattc	2640
gggcaaacaa agctcgggat gactacaaga ctctcatcaa tgctgaggat cctcctatgg	2700
tttgtgtccg aaaatttgc cacctgtcgg accaaagtga ccaggatttt caggaggagc	2760
ttgaccttat gaagatgcgg gaagaggtta tcacctcat tcgttctaac cagcagctgg	2820
agaatgacct caatctcatg gatataaaaa ttggactgct agtgaaaaat aagattacgt	2880
tgcaggatgt ggtttccac agtaaaaaac ttacaaaaaa aaataaggaa cagttgtctg	2940
atatgatgat gataaataaa cagaaggagag gtctcaaggc tttgagcaag gagaagagag	3000
agaagtggga agcttaccag cacctgtttt atttattgca aaccaatccc acctatctgg	3060
ccaagctcat ttttcagatg cccagaaca agtccaccaa gttcatggac tctgtaatct	3120
tcacactcta caactacgcg tccaaccagc gagaggagta cctgctcctg cggctcttta	3180
agacagcact ccaagaggaa atcaagtcga aggtagatca gattcaagag attgtgacag	3240
gaaatcctac ggttattaaa atggttgtaa gtttcaaccg tgggtcccgt ggccagaatg	3300
ccctgagaca gatcttgccc ccagtcgtga aggaaattat ggatgacaaa tctctcaaca	3360
tcaaaactga ccctgtggat atttacaat cttgggttaa tcagatggag tctcagacag	3420
gagaggcaag caaactgccc tatgatgtga cccctgagca ggcgctagct catgaagaag	3480
tgaagacacg gctagacagc tccatcagga acatgcgggc tgtgacagac aagtttctct	3540
cagccattgt cagctctgtg gacaaaatcc cttatgggat gcgcttcatt gccaaagtgc	3600
tgaaggactc gttgcatgag aagttccctg atgctgggtga ggatgagctg ctgaagatta	3660
ttggtaactt gctttattat cgatacatga atccagccat tgttgctcct gatgcctttg	3720
acatcattga cctgtcagca ggaggccagc ttaccacaga ccaacgccga aatctgggct	3780
ccattgcaaa aatgcttcag catgctgctt ccaataagat gtttctggga gataatgccc	3840
acttaagcat cattaatgaa tatctttccc agtcctacca gaaattcaga cggtttttcc	3900
aaactgcttg tgatgtccca gagcttcagg ataaatttaa tgtggatgag tactctgatt	3960
tagtaacctt caccacaa gtaatctaca ttccattgg tgaaatcatc aacaccacac	4020
ctctcctgtt ggatcaccag gatgccattg ctccggagca caatgatcca atccacgaac	4080
tgctggacga cctcggcgag gtgcccacca tcgagtcctt gataggggaa agctctggca	4140
atttaaatga cccaaataag gaggcactgg ctaagacgga agtgtctctc accctgacca	4200
acaagttcga cgtgcctgga gatgagaatg cagaaatgga tgctcgaacc atcttactga	4260

atacaaaacg ttttaattgtg gatgtcatcc ggttcagacc aggagagacc ttgactgaaa	4320
tcctagaaac accagccacc agtgaacagg aagcagaaca tcagagagcc atgcagagac	4380
gtgctatccg tgatgccaaa acacctgaca agatgaaaaa gtcaaatct gtaaaggaag	4440
acagcaacct cactcttcaa gagaagaag agaagatcca gacaggttta aagaagctaa	4500
cagagcttgg aaccgtggac ccaaagaaca aataccagga actgatcaac gacattgcc	4560
gggatattcg gaatcagcgg aggtaccgac agaggagaaa ggccgaacta gtgaaactgc	4620
aacagacata cgctgctctg aactctaagg ccacctttta tggggagcag gtggattact	4680
ataaaagcta tatcaaaacc tgcttgata acttagccag caagggcaaa gtctcaaaa	4740
agcctagga aatgaaagga aagaaaagca aaaagatttc tctgaaatat acagcagcaa	4800
gactacatga aaaaggagtt cttctggaaa ttgaggacct gcaagtgaat cagtttaaaa	4860
atgttatatt tgaatcagt ccaacagaag aagttggaga cttcgaagtg aaagccaaat	4920
tcatgggagt tcaaatggag acttttatgt tacattatca ggacctgctg cagctacagt	4980
atgaaggagt tgcagtcagt aaattatttg atagagctaa agtaaatgac aacctcctga	5040
tcttcttct caacaaaaag ttctacggga agtaattgat cgtttgctgc cagcccagaa	5100
ggatgaagga aagaagcacc tcacagctcc ttctaggtc cttctttcct cattggaagc	5160
aaagacctag ccaacaacag cacctcaatc tgataactc ccgatgccac atttttaact	5220
cctctcgctc tgatgggaca ttgtttacc tttttcata gtgaaattgt gtttcaggct	5280
tagtctgacc tttctggttt cttcattttc ttccattact taggaaagag tggaaactcc	5340
actaaaattt ctctgtgttg ttacagctct agagggtgca gtactatatt gtaagctttg	5400
gtgtttgttt aattagcaat agggatggta ggattcaaat gtgtgtcatt tagaagtgga	5460
agctattagc accaatgaca taaatacata caagacacac aactaaaatg tcatgttatt	5520
aacagttatt aggttgtcat ttaaaaataa agttccttta tatttctgtc ccatcaggaa	5580
aactgaagga tatggggaat cattgggtat cttccattgt gtttttcttt atggacagga	5640
gctaattggaa gtgacagtca tgttcaaagg aagcatttct agaaaaagg agataatgtt	5700
tttaaatttc attatcaaac ttgggcaatt ctgtttgtgt aactccccga ctagtggaatg	5760
ggagagtccc attgctaaaa ttcagctact cagataaatt cagaatgggt caaggcacct	5820
gcctgttttt gttgtgac agagattgac ttgattcaga gagacaattc actccatccc	5880
tatggcagag gaatgggtta gccctaattgt agaattgcat tgtttttaa actgttttat	5940
atcttaagag tgccttatta aagtatagat gtatgtctta aaatgtgggt gataggaatt	6000

ttaaagattt atataatgca tcaaaagcct tagaataaga aaagcttttt ttaaattgct	6060
ttatctgtat atctgaactc ttgaaactta tagctaaaac actaggattt atctgcagtg	6120
ttcagggaga taattctgcc ttttaattgc taaaacaaaa acaaaaccag ccaacctatg	6180
ttacacgtga gattaaaacc aattttttcc ccattttttc tccttttttc tcttgctgcc	6240
cacattgtgc ctttatttta tgagccccag ttttctgggc ttagttttaa aaaaaaatca	6300
agtctaaaca ttgcatttag aaagcttttg ttcttggata aaaagtcata cactttaaaa	6360
aaaaaaaaa cttttccag gaaaatatat tgaaatcatg ctgctgagcc tctattttct	6420
ttctttgatg ttttgattca gtattctttt atcataaatt tttagcattt aaaaattcac	6480
tgatgtacat taagccaata aactgcttta atgaataaca aactatgtag tgtgtcccta	6540
ttataaatgc attggagaag tatttttatg agactcttta ctacaggtgca tggttacagc	6600
ccacaggag gcatggagtg ccatggaagg attcgccact acccagacct tgtttttgt	6660
tgtattttgg aagacaggtt ttttaaagaa acattttcct cagattaaaa gatgatgcta	6720
ttacaactag cattgcctca aaaactggga ccaaccaaag tgtgtcaacc ctgtttcctt	6780
aaaagaggct atgaatccca aaggccacat ccaagacagg caataatgag cagagtttac	6840
agtccttta ataaaatgtg tcagtaattt taaggtttat agttccctca acacaattgc	6900
taatgcagaa tagtgtaaaa tgcgcttcaa gaatgttgat gatgatgata tagaattgtg	6960
gcttttagtag cacagaggat gcccacaaca actcatggcg ttgaaaccac acagttctca	7020
ttactgttat ttattagctg tagcattctc tgtctcctct ctctcctcct ttgaccttct	7080
cctcgaccag ccatcatgac atttaccatg aatttacttc ctccaagag tttggactgc	7140
ccgtcagatt gttgctgcac atagtggcct ttgtatctct gtatgaaata aaaggtcatt	7200
tgttcatgtt aaaaaaaaa	7219