



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년01월03일
 (11) 등록번호 10-1347280
 (24) 등록일자 2013년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0086456
 (22) 출원일자 2012년08월07일
 심사청구일자 2012년08월07일
 (56) 선행기술조사문헌
 US7432052 B2
 US8084220 B2
 김강영 외 3명, 생명과학회지. 9(6):704-708.
 Willemsen R et al., Lancet. 1995 May.

(73) 특허권자
건국대학교 산학협력단
 서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
 (72) 발명자
신찬영
 서울특별시 양천구 목동동로 350 목동5단지아파트 532-1305
전세진
 서울특별시 강남구 학동로8길 11 동현빌라 201호
 (74) 대리인
한양특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

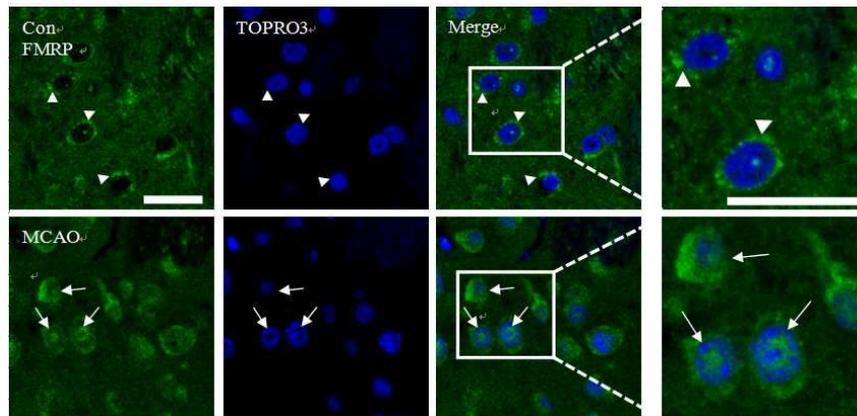
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **프레자일 엑스 정신 지체 단백질에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 진단용 조성물 및 키트**

(57) 요약

본 발명은 프레자일 엑스 정신 지체 단백질에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 진단용 조성물 및 키트에 관한 것으로, 본 발명을 통해, FMRP 단백질 발현변동이 뇌졸중의 조기 진단과 이후 치료 타겟 제시 및 신약개발 연구의 토대를 확립하는데 도움을 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

프래자일 엑스 정신 지체 단백질(Fragile x mental retardation protein ;FMRP)에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 뇌졸중 진단용 조성물.

청구항 3

프래자일 엑스 정신 지체 단백질(Fragile x mental retardation protein ;FMRP)에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 모니터링, 및 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 구성된 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 단백질은 정상인에 비해 뇌졸중 환자에서 발현량이 증가하는 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 항체는 고체기질(solid substrate)에 결합되는 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 고체기질은 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 8

제 3항에 있어서, 상기 키트는 검출용 항체를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 검출용 항체는 리간드, 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 및 콜로이드로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 검출체가 부착된 접합체인 것을 특징으로 하는 뇌졸중 모니터링 및 진단용 키트.

청구항 10

- a) 환자의 시료로부터 프래자일 엑스 정신 지체 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및
- b) 단계 a)의 상기 단백질의 발현량이 정상인의 발현량 보다 높은 개체를 선별하는 단계를 포함하는 뇌졸중 모니터링, 진단 및 스크리닝을 위한 상기 단백질의 검출 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 단계 a)의 측정은 2차원 전기영동, 바이오칩 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 이용하여 측정되는 것을 특징으로 하는 검출 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 단계 b)의 선별은 바이오인포매틱스 및 통계적 분석방법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 검출 방법.

청구항 13

프레자일 엑스 정신 지체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체들이 고형기질에 집적된 뇌졸중 모니터링, 진단 및 스크리닝용 바이오칩.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 프레자일 엑스 정신 지체 단백질에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 진단용 조성물 및 키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 뇌혈관동맥의 폐색으로 발생하는 허혈성 뇌졸중은 전체 뇌졸중 발병원인의 80%를 차지하고 있으나 (Liu and McCullough 2011), 아직까지 뚜렷한 진단 시약이나 치료법이 확립되지 못했다. 특히, 허혈성 뇌졸중은 허혈과 재관류로 인한 다양한 신경세포의 손상을 보이는데, 이는 산소/양분 공급 차단에 의한 흥분성 신경세포 손상, 활성 산소종의 증가, 세포사멸 신호전달경로의 활성화 등을 통해 나타나는데 이들의 작용기전이 다르기에, 뇌졸중의 발병 시기 및 부위에 따른 특이적인 맞춤형 치료 전략이 필요하다.

[0003] FMRP(Fragile x mental retardation protein)는 결핍 시, 자폐 스펙트럼 장애의 일종인 Fragile X Syndrome을 유발한다고 알려져 있으며, FMR1 유전자로부터 발현이 나타난다. FMRP는 구조적으로 RNA 결합 단백질의 특성인 K homology (KH) 도메인과 arginine/glycine region (RGG) 도메인을 지니고 있기에, 뇌 안의 4% mRNA와 결합이 일어날 수 있다. 특히, 결합된 RNA의 이동, 안정성, 번역 등을 조절함으로써, 세포 내 homeostasis 를 유지하는데 도움을 준다 (Liu-Yesucevitz, Bassell et al. 2011).

[0004] 뇌졸중은 현재 전세계 인구의 사망원인 2위의 질환으로, 진단과 치료용 타겟을 밝히기 위한 많은 연구가 진행되어왔다. 하지만, 아직까지는 이의 유효 지표가 제시되지 못하고 있는 실정이다. 현재 우리나라를 비롯한 전 세계적으로, 노인 인구의 증가에 따른 고령화 사회로 접어들고 있기에, 뇌졸중에 대한 사회적 관심, 연구의 중요도가 급증하고 있다. 따라서 본 발명에서는 이와 같은 사회적 요구에 맞추어, 특이적인 단백질 발현양상의 변화 관찰에 따른 뇌졸중의 빠르고 정확한 진단 키트 및 매뉴얼을 제안하고자 한다.

[0005] 관련 선행특허로 대한민국 특허 공개번호 제1020000073128호는 근경련성-간질 락트산성증 및 뇌졸중을 검출하기 위한 진단용 키트에 관한 것으로, 5' 말단만 표식된 5'-GTTTAAAGTTTATGCGATT-3'로 구성된 프라이머, 데옥시뉴클레오티드(deoxynucleotide) 및 디데옥시뉴클레오티드(dideoxynucleotide), PCR 반응혼합물을 포함하여 미토콘드리아 DNA의 점돌연변이(3243 bp 위치)에 의해 유발되는 근경련성-간질 락트산성증 및 뇌졸중(Lactic acidosis and stroke-like episodes: 이하 MELAS)을 진단할 수 있는 키트를 제공하는 뛰어난 효과가 있다고 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 빠르고 정확한 뇌졸중 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 빠르고 정확한 뇌졸중 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 빠르고 정확한 뇌졸중 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 프래자일 엑스 정신 지체 단백질(Fragile x mental retardation protein ;FMRP)에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 진단용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 가지는 것이 바람직하나 이 서열에 하나 이상의 치환, 결손, 역위 또는 전좌 등돌연변이를 유발하여 본 발명의 목적하고자 하는 효과를 달성하는 경우에 그 돌연변이체도 본 발명의 보호범위에 포함된다.
- [0011] 또 본 발명은 프래자일 엑스 정신 지체 단백질(Fragile x mental retardation protein ;FMRP)에 대한 항체를 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 모니터링, 및 진단용 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질은 정상인에 비해 뇌졸중 환자에서 발현량이 증가하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0013] 또 본 발명은 a) 환자의 시료로부터 프래자일 엑스 정신 지체 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및 b) 단계 a)의 상기 단백질의 발현량이 정상인의 발현량 보다 높거나 혹은 낮은 개체를 선별하는 단계를 포함하는 뇌졸중 모니터링, 진단 및 스크리를 위한 상기 단백질의 검출 방법을 제공한다.
- [0014] 또 본 발명은 프래자일 엑스 정신 지체 단백질에 특이적으로 결합하는 생물분자들이 고형기질에 집적된 뇌졸중 모니터링, 진단 및 스크리닝용 바이오칩을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 키트는 환자가 뇌졸중인지 아닌지를 구별하여 의사 등 진료 행위자가 뇌졸중을 진단 및 스크리닝하는 것을 가능하게 할 뿐 아니라, 치료에 대한 환자의 반응을 모니터링하여 그 결과에 따라 치료를 변경하는 것을 가능하게 한다. 또한, 뇌졸중 모델(예: 마우스, 랫트 등의 동물모델)의 생체 내 또는 생체 외에서 하나 이상의 마커의 발현을 조절하는 화합물을 동정하는데 사용될 수 있다.
- [0016] 이에, 본 발명의 마커는 표준 물질로 상기 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 키트에 사용될 수 있는 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [0018] 다클론 항체는 상기 마커 단백질 중 어느 하나를 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에서 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다.
- [0019] 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G et al., Nature 256:495-497, 1975; Kozbor D et al., J Immunol Methods 81:31-42, 1985; Cote RJ et al., Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP et al., Mol Cell Biol 62:109-120, 1984).
- [0020] 또한, 상기 마커 단백질 중 어느 하나에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작제하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD et al., Science 254: 1275-1281, 1989).
- [0021] 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다. 본 발명에서, 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 고형 기질에 결합시키기 위해, 미세구체를 현탁한 후 마이크로튜브(microtube)에 옮겨 원심분리로 상층액을 제거한 후 재현탁하고, N-하이드록시-설포숙시나미드(N-hydroxy-sulfosuccinimide) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride)를 차례로 처리한 후 원심분리로 상층액을 제거한 후 세척하여 보관하였다.
- [0022] 또한, 환자로부터 수득된 시료를 고형 기질에 결합된 본 발명의 마커 단백질 중 어느 하나의 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시키는 경우, 시료는 항체와 접촉 전에 알맞은 정도로 희석될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 키트는 추가로 상기 마커에 특이적으로 결합하는 검출용 항체를 포함할 수 있다. 상기 검출용 항체는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있고, 바람직하게는 상기 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체일 것이다. 예를 들어, 상기 발색효소는 퍼옥시다제(peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 또는 산성 포스파타제(acid phosphatase)(예: 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase))일 수 있고; 형광물질인 경우, 플루오레신카복실산(FCA), 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC), 플루오레신 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 등을 사용하는 것이 가능하다.
- [0024] 또한, 본 발명의 키트는 추가로 (1) 상기 마커에 특이적으로 결합하는 검출용 항체 및 (2) 상기 검출용 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드에는 단백질 A 또는 검출용 항체에 특이적으로 결합하는 2차 항체 등이 있다. 또한 상기 리간드는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지한 접합체(conjugate)일 수 있다. 상기 검출용 항체는 상기 리간드를 위해, 바이오틴화(biotinylation) 또는 다이곡시제닌(digoxigenin) 처리한 1차 항체를 이용하는 것이 바람직하나, 상기 검출용 항체의 처리방법은 이에 한정되지 않는다. 또한 상기 리간드로는 상기 검출용 항체에 결합하기 위해, 스트렙타비딘 또는 아비딘 등이 사용되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서 상기 검출체로 형광물질을 부착한 스트렙타비딘(streptavidin)을 리간드로 사용하였으며, 상기 리간드를 위해 바이오틴화(biotinylation)시킨 검출용 항체를 이용하였다.
- [0026] 본 발명의 키트는 상기 항체 및 마커 복합체에 검출용 항체를 처리한 후 검출용 항체의 양을 탐색함으로써 뇌졸중을 모니터링, 진단 및 스크리닝할 수 있다. 또는 상기 항체 및 마커 복합체에 검출용 항체 및 리간드를 순차적으로 처리한 후, 검출용 항체의 양을 탐색함으로써 뇌졸중을 진단 및 스크리닝할 수 있다. 본 발명에서, 검출용 항체를 세척된 항체-마커 복합체와 정온배치한 후 세척하여 검출용 항체를 측정함으로써 상기 마커의 양을 측정할 수 있다. 검출용 항체의 양 측정이나 존재 검출은 형광, 발광, 화학발광(chemiluminescence), 흡광도, 방사 또는 투과를 통해 이루어질 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 검출용 항체 또는 리간드의 양을 탐색하는 방법으로는 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 이용하는 것이 바람직하고, 여기에는 검출체로 형광물질이 부착되어 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로 방사선 동위원소가 부착되어 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법; 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0028] 예를 들어 상기 형광법은 형광 스캐너 프로그램을 이용하여 상기 검출용 항체를 형광물질로 라벨링한 후 스포팅하여 신호를 확인하는 방법으로, 이 방법을 적용하여 결합 정도를 확인할 수 있다. 상기 형광물질은 Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate, FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(rhodamine-B-isothiocyanate, RITC), 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 SPR 시스템은 형광법과는 달리 시료를 형광물질로 표지할 필요가 없이 항체의 결합 정도를 실시간으로 분석하는 것이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다. SPRI의 경우에는 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 키트는 효소와 발색 반응할 기질 및 결합되지 않은 단백질 등은 제거하고 결합된 마커만을 보유할 수 있는 세척액 또는 용리액을 추가로 포함할 수 있다. 분석을 위해 사용되는 시료는 혈청, 뇨, 눈물 타액 등 정상적인 상태와 구별될 수 있는 질환 특이적 폴리펩타이드를 확인할 수 있는 생체 시료를 포함한다.
- [0030] 시료는 마커의 탐지감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데 예를 들어 환자로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명은 a) 환자의 시료로부터 (FMRP) 단백질의 발현량을 측정하는 단계; 및 b) 단계 a)의 상기 단백

질의 발현량이 정상인의 발현량 보다 높거나 혹은 낮은 개체를 선별하는 단계를 포함하는 뇌졸중 모니터링, 진단 및 스크리닝을 위한 상기 단백질의 검출 방법을 제공한다.

- [0032] 상기 마커 단백질을 이용하면, 뇌졸중 질환의 발병 여부를 확인하고자 하는 분석 대상 혈청 프로테오믹스 샘플을 입력받아 상기한 바와 같이 바이오인포매틱스 및 통계적 분석방법에 의해 분석하여 질환 특이적 마커 단백질의 패턴을 가진 표본과 비교하거나 혈청 내 본 발명의 마커 단백질의 양과 정상 표본의 단백질 양을 수치화한 후 비교하여, 비교 결과에 따라 분석 대상 혈청 프로테오믹스 패턴이 정상인지 뇌졸중 질환 상태인지 확인하는 모니터링, 진단 및 스크리닝이 가능하다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 a)의 발현량은 2차원 전기영동, 바이오칩 또는 상기 마커 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 이용하여 측정될 수 있으며, 상기 바이오칩은 바람직하게는 단백질칩 또는 핵산 어레이 등이 있다. 또한, 상기 마커 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 이용하여 측정하는 방법에는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법 등이 있을 수 있다.
- [0034] 상기 통계적 분석방법은 LDA(linear discriminant analysis), SVM(support vector machine), tree 또는 random forest에 의해 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0035] SVM[Support Vector Machine, 서포트 벡터 머신(V. N. Vapnik et. al., Technical Report CSD-TR-96-17, Univ. of London, 1996.)]은 패턴 인식에 유용하게 사용되는 학습용 알고리즘으로서, 결정되는 표면이 서포트 벡터 및 그에 대응하는 가중치의 집합으로 이루어지는 변수에 의해 결정되며, 다수의 변수를 각각 따로 취급하지 않고 동시에 처리하는 방법을 제시한 것을 의미하고, 이는 백터를 분류하는 유용한 도구로 사용될 수 있다.
- [0036] 서포트 벡터 머신에 의하면 입력 공간의 비선형적인 높은 차수를 특징면(feature space)에서 선형적으로 투영하여 해석할 수 있도록 하며, 각 특징 사이의 최적의 경계(최적 분리면)를 제시한다. 서포트 벡터 머신은 크게 훈련 과정(training)과 평가 과정(testing)의 두 부분으로 이루어진다. 훈련 과정에서는 서포트 벡터가 생성되며 평가 과정에서는 특정 규칙에 의한 판단이 수행된다(대한민국 특허 제 10-2002-0067298호 참조).
- [0037] LDA(linear discriminant analysis, 선형 판별 분석)는 변수들의 선형 결합을 통해 집단들(class) 사이의 특성을 가장 잘 분류하는 판별함수를 찾아내는 분석기법으로서 1936년 R. A. Fisher 에 의해 제안된 방법이다. 판별 분석은 독립적인 변수들의 선형결합을 통해 집단간 차이를 가장 크게 하고 집단 내 차이를 가장 작게 하는 새로운 변수 Y를 정의하고 이 Y값의 크기를 통해 집단을 선택하는 고전적인 방법이다.
- [0038] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0039] 본 발명은 신경세포에 다량으로 존재하며 RNA 결합 단백질로 널리 알려진 Fragile x mental retardation protein (FMRP)가 뇌졸중에서 신경세포 손상 및 염증반응에 중요한 역할을 수행함으로써, 뇌졸중의 새로운 치료 타겟으로 작용할 수 있음을 제안하고자 한다. 이는 바이오 신약 타겟을 검색하는 후속 연구의 매뉴얼로 적용될 수 있을 것으로 사료된다.
- [0040] 본 발명자들은 배양된 일차신경세포에 글루타메이트를 처리해, excitotoxic 한 조건 하에서, FMRP 단백질 발현이 일시적으로 증가하고, 실제로 중뇌동맥폐색술 (MCAO)을 이용해 허혈성 뇌졸중을 유발한 흰쥐의 뇌조직에서 FMRP단백질의 발현이 빠르게 증가함을 확인하였다. 이처럼 증가된 FMRP는 PI3-K 와 Akt의 활성 증가와 이들의 하위단계에 있는 Bcl-xL의 발현을 증가시킴으로, 신경세포에 보호작용을 할 수 있음을 보여주었다. 또한 FMRP 발현을 감소시킨 후, PI3-K, Akt 신호전달의 활성 및 신경세포의 생존의 차이를 확인함으로써, FMRP 발현조절을 통해 신경세포의 보호작용이 매개될 수 있음을 시사하였다.
- [0041] 본 발명은 뇌졸중의 흰쥐동물모델에서 Fragile x mental retardation protein (FMRP)가 뇌 조직 특히, 선조체에서의 발현이 변동되는 지를 확인하고 그에 따른 신경세포의 생존 및 사멸기전을 보여준다. 이는 기존에 신경 세포 및 일반 세포의 생존조절에 관여한다고 보고된 단백질군 (PI3K-Akt-Bcl-xL)의 활성 혹은 발현변화를 통해 확인하고자 한다.
- [0042] 본 발명자들은 300g (9-10주령)의 Wistar 수컷 흰쥐를 이용해 중뇌동맥폐색술인 middle cerebral artery occlusion (MCAO)을 시행하여, 뇌졸중 모델을 만들고 뇌를 section한 후, 면역조직화학염색법을 이용하여

Fragile x mental retardation (FMRP)의 발현을 관찰하였다. 그 결과 정상 대조군에 비해 선조체에서 FMRP의 발현이 유의적으로 증가됨을 확인할 수 있었다 (도 1). 특히 흥미로운 사실은 핵 내의 FMRP 발현이 증가한 사실이다. 이는 신경세포 특히, 핵 안의 FMRP 발현양상을 비교함으로써 쉽게 뇌졸중 발병을 검출할 수 있음을 제시한다.

[0043] MCAO 시행 후, 시간에 따른 FMRP의 발현증가를 확인하고자 MCAO 시행 후 1, 3, 6, 24 시간째의 뇌조직을 이용해 Western blotting을 수행하였다. 그 결과, MCAO 이후 1시간부터 빠르게 FMRP의 발현이 증가하며, 이는 6시간까지 유지되나, 24 시간에는 감소됨을 확인할 수 있었다 (도 2). 이를 통해, FMRP 발현이 뇌졸중의 발병단계에 따라 다르게 조절될 수 있으며, 초기 진단에 더욱 유용할 수 있음을 간접적으로 시사한다.

[0044] 이후, FMRP 발현을 일시적으로 감소시킬 수 있는 small hairpin Fmr1 RNA 바이러스를 이용해, 뇌조직에서 FMRP 발현을 억제하였다. 뇌조직에서 small hairpin RNA 바이러스 발현은 p24 viral core protein를 이용해 초록색 fluorescence로 확인하였으며, FMRP 발현은 빨간색 fluorescence를 이용해 면역조직화학염색법으로 관찰하였다 (도 3A). 흥미롭게도, FMRP 발현이 감소된 경우, 세포사멸의 지표로 사용되는 TUNEL positive 세포의 숫자가 증가하였다 (도 3B). 이는 FMRP 발현에 따라 세포의 생존 및 사멸이 조절될 수 있는 가능성을 제시해주는 결과이기에, 일차신경세포를 배양 후, 세포 단위에서의 FMRP 발현과 세포보호작용기전을 확인하였다.

[0045] 배양된 일차신경세포에서 글루타메이트 처리에 의해 FMRP 단백질 발현이 일시적으로 증가함을 확인하였다 (도 4). 이는 뇌졸중에서 폐색과 재관류에 의한 신경세포의 손상 시, 글루타메이트에 의한 excitotoxicity 증가에 따른 현상을 세포 수준에서 재현한 모델이다.

[0046] Small hairpin Fmr1 RNA 바이러스를 이용해, 일차신경세포에서 FMRP 단백질 발현을 저하시킨 경우 (도 5A), 역시 TUNEL positive 세포의 수가 증가함을 확인할 수 있었다 (도 5B). 세포생존을 측정하는데 사용되는 MTT assay를 통해서도 같은 결과를 얻을 수 있었다 (도 5C). 또한 eGFP-tagged FMRP overexpression vector를 이용해 배양된 일차신경세포에 FMRP를 과발현시킨 경우 (도 5D), 글루타메이트 자극에 반응하는 PI positive cell의 숫자가 감소하는 것을 확인하였다 (도 5E). 이상의 결과들은 in vitro 상이나 in vivo 상에서 허혈성 뇌졸중 자극 조건을 유도시킨 경우, FMRP 단백질의 발현이 빠르게 증가되며, 이를 통해 신경세포의 자극에 대한 저항성이 조절됨을 알 수 있다.

[0047] 이러한 신경세포의 보호작용기전을 이해하기 위해, 세포생존조절에 관여한다고 알려진 PI3K signaling pathway를 확인하였다. FMRP 발현이 감소된 신경세포에서, PI3K와 Akt의 활성의 감소 (도 6A)와 그 하위조절인자인 Bcl-xL의 발현이 감소됨을 살펴볼 수 있었다 (도 6A). MTT assay 역시 비슷한 결과를 나타내었다 (도 6B).

[0048] 본 발명자는 MCAO 시행 후, 신경세포에서 FMRP 단백질 발현이 증가되며 이는 PI3K-Akt의 활성을 증가시키고 이후 Bcl-xL의 발현증가를 통해 일시적으로 신경세포의 보호작용기전을 매개시킬 수 있음을 실험적으로 증명하였다. 이상의 결과들을 바탕으로 본 발명은 FMRP가 뇌졸중과 같은 뇌질환의 진단시약 및 치료후보검색물질로 적용가능함을 시사한다.

발명의 효과

[0049] 본 발명은 신경세포에 다량 분포하고 있는 FMRP가 뇌졸중 상황에서, 일시적으로 발현이 일어나며, 이러한 발현증가가 신경세포를 보호하는데 중요한 역할을 수행함을 확인한 것이다. 이는 FMRP 발현변동을 관찰함으로써, 간단하게 분자 수준에서 뇌졸중 진단을 확인할 수 있고, 하위 세포 신호 전달시스템을 이용해, 뇌졸중의 치료 및 세포보호작용에 작용하는 기전을 이용한 치료 타겟 확립 및 바이오 신약을 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 뇌졸중 동물유도모델인 MCAO 수술에 의해 선조체에서 Fragile x mental retardation protein (FMRP) 발현이 증가됨을 확인한 결과이다 (N=3). FMRP는 green fluorescence를 통해 확인하고, 핵은 TOPRO3 (blue fluorescence)를 통해 관찰하였다. Arrowheads는 FMRP 발현을 표시한 것이고, 맨 오른쪽은 확대한 이미지를 보여준다.

도 2는 MCAO 처리 후, 재관류 시간에 따른 FMRP 단백질 발현의 변동을 살펴본 것이다. *는 대조군과의 유의적인 차이를 나타낸다 (p<0.01, N=3).

도 3은 sh Fmr1 RNA virus 를 이용해 FMRP 발현을 감소시킨 흰쥐의 선조체에서 신경세포의 사멸이 증가함을 면역염색법으로 확인한 것이다. 3A 는 sh Fmr1 RNA virus 주입 후, 흰쥐 선조체에서 FMRP 발현을 면역조직염색법으로 확인한 결과이다 (N=3). FMRP는 red fluorescence를 보이며, shRNA virus 는 p24 virus core 단백질 (green fluorescence) 로 발현을 확인하였다. con 은 아무 처리 안 한 정상 대조군을 나타내며, CV는 control shRNA virus 를 주입한 샘플, FV는 shFmr1 RNA virus 를 주입한 샘플을 보여준다. FMRP 와 p24 단백질이 같이 발현되는 세포는 yellow fluorescence (흰색 채워진 화살표) 로, FMRP 발현은 없으나 p24 단백질은 발현된 세포는 green fluorescence (흰색의 비워진 화살표) 로 표시하였다. 3B 에서는 FMRP 가 없을 경우, TUNEL staining 으로 신경세포의 사멸여부 및 정도를 나타내는 결과이다. * 는 대조군과 MCAO 처리 그룹간의 비교를, # 는 대조군과 FMRP 발현이 감소된 그룹간의 비교를 나타내었다 (p<0.01, N=4).

도 4에서는 일차신경세포를 배양한 후, 글루타메이트 자극에 의한 FMRP 단백질의 발현을 Western blotting 으로 확인한 것이다 (도4A, p<0.01, N=4). 동일한 시간대에 PI3-K, Akt 의 phospho-form 과 total-form 발현을 비교 측정함으로써 이들 단백질의 활성을 살펴보았다. * 는 대조군과의 유의적인 차이를 나타낸다 (도4B, p<0.01, N=4).

도 5는 sh Fmr1 RNA virus 를 처리한 일차신경세포에서 FMRP 발현변동을 Western blotting으로 살펴보고, 그에 따른 세포의 사멸에 미치는 영향을 Propidium iodide (PI) staining 과 MTT assay 로 확인한 것이다. 5A 에서 FMRP 발현이 감소된 것을 확인할 수 있다. # 는 대조군과의 유의적인 차이를 나타낸다 (p<0.01, N=4). FMRP 발현이 감소된 일차신경세포의 사멸이 증가함을 생존이 감소함을 PI staining (5B) 과 MTT assay (5C) 결과 확인되었다. PI 는 red fluorescence, DAPI 는 blue fluorescence, FMRP 는 green fluorescence 를 통해 관찰하였으며, 화살촉은 PI positive 세포, 화살표는 FMRP 발현된 세포를 대표적으로 나타내준다. * 는 대조군과 글루타메이트 처리 그룹간의 비교를, # 는 대조군과 FMRP 발현이 감소된 그룹간의 비교를 나타내었다 (p<0.01, N=3). con 은 아무 처리 안 한 정상 대조군을 나타내며, CV는 control shRNA virus 를 처리한 샘플, FV는 shFmr1 RNA virus 를 처리한 샘플을 보여준다. 5D에서는 eGFP 가 tagged 된 FMRP vector 를 이용해, 신경세포에서 FMRP 발현을 증가시킨 후, Western blotting 을 이용해 확인하였다 (N=3). 5E는 green fluorescence 를 보이는 eGFP 발현을 통해 transfected cell 을 확인하였고, 세포의 사멸은 propidium iodide staining (red fluorescence) 를 통해 보여주었다. * 는 대조군과 글루타메이트 처리 그룹간의 비교를, # 는 대조군과 FMRP 발현이 증가된 그룹간의 비교를 나타내었다 (p<0.01, N=3).

도 6에서는 배양된 일차신경세포에서 FMRP 발현에 따른 PI3-K signaling pathway 의 활성과 발현을 Western blotting 으로 나타낸 결과이다. 6A에서는 shRNA 를 이용해 FMRP 발현이 억제된 신경세포에서 글루타메이트를 처리한 후, 세포를 걷어내어 PI3-K signaling pathway 의 단백질의 활성과 발현을 Western blotting 으로 확인한 것이다. * 는 대조군과 글루타메이트 처리 그룹간의 비교를, # 는 대조군과 FMRP 발현이 감소된 그룹간의 비교를 나타내었다 (p<0.01, N=4). con 은 아무 처리 안 한 정상 대조군을 나타내며, CV는 control shRNA virus 를 처리한 샘플, FV는 shFmr1 RNA virus 를 처리한 샘플을 보여준다. 6B 는 eGFP 가 tagged 된 FMRP vector 를 이용해, 신경세포에서 FMRP 발현을 증가시킨 후, 글루타메이트 처리에 의한 PI3-K signaling pathway 단백질의 활성과 발현을 Western blotting 으로 확인한 것이다. * 는 대조군과 글루타메이트 처리 그룹간의 비교를, # 는 대조군과 FMRP 발현이 증가된 그룹간의 비교를 나타내었다 (p<0.01, N=4). Con 은 정상 대조군, GFP 는 eGFP-empty vector 대조군, FMRP 는 eGFP-FMRP vector 처리한 샘플을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 실시예 1: 뇌졸중유도에 따른 FMRP 단백질 발현변동
- [0053] 9-10주령의 Wistar 수컷 흰쥐 (300g)에 중뇌동맥폐색술 (MCAO)로 뇌졸중을 유도한 뒤, 뇌조직을 section하여 Fragile x mental retardation protein (FMRP) 발현이 변화되는지를 다음과 같은 방법으로 확인하였다.
- [0054] <1-1> 뇌졸중 동물모델을 확립하기 위한 중뇌동맥폐색술 (MCAO)
- [0055] 9-10주령의 Wistar 수컷 흰쥐 (300g)를 Rompun/ketamine (1:2, 2 ml/kg, i.p.)로 마취하였으며, 수술이 진행되는 동안, 체온은 37℃±1℃를 유지하였다. 우경동맥 (carotid artery) 중, 외경동맥 (external carotid artery) 을 묶고, 내경동맥 (internal carotid artery) 은 익구개신경절 (pterygopalatine branch) 를 따라 노출시킨 후, 4-0 nylon suture를 내경동맥에 삽입하여 중뇌동맥을 폐색하였다. 1시간 허혈 후, nylon suture를

제거한 뒤 다시 1시간동안 재관류 후 추후 실험에 사용하였다.

[0056] <1-2> MCAO 시행 후 뇌조직에서의 FMRP 발현확인: 면역조직화학적 검색

[0057] MCAO 시행 후 FMRP 발현에 변동이 있는지를 확인하기 위해, FMRP 항체를 이용한 면역 조직화학방법으로 발현 여부를 검색하였다. MCAO 처리 후, 흰쥐를 마취하고 심장 박동이 멈추기 전 PBS 와 4% Paraformaldehyde (PFA) 를 이용해 순차적으로 perfusion을 실시해서, 조직 안에서의 혈액제거 및 고정을 시킨 후, 뇌를 적출한다. 적출한 뇌는 4% PFA를 이용해 고정시킨 후, section한다. 조직 절편은 microtome (microme, Walldorf, Germany)을 이용해 coronal 방향으로 자르고(두께 40 μ m), 슬라이드에 고정시킨 후 블로킹을 실시한다. 상온에서 10% normal horse serum (Lfe Tech., California, U.S.A.)으로 2시간 동안 블로킹 후, 특이적인 일차항체를 (FMRP) 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 반응시켰다. 다음날 PBS-Triton X-100 (PBST) 로 10분간 3번 워싱 후, 형광이 붙어있는 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시킨다. 이후 다시 PBS-Triton X-100 (PBST) 로 씻어낸 후, mounting 한 다음 형광현미경을 이용해 단백질의 발현양상을 확인하였다. 관찰결과, MCAO 처리한 뇌의 선조체에서 정상 대조군에 비해 FMRP 발현이 증가된 것을 확인하였다 (도 1, N=3).

[0058] <1-3> MCAO 시행 후 뇌조직에서의 FMRP 발현확인: Western blot

[0059] MCAO 시행 후 재관류 시간에 따른 뇌조직 상에서의 FMRP 발현변화를 Western blotting 을 이용해 확인하였다. 뇌조직 중 선조체로부터 단백질을 추출하여 BCA 단백질 정량법을 이용하여, 각각 30 μ g의 단백질을 10 %의 SDS-pomyacrylamide gel에 전기영동하였다. 전기영동한 단백질은 nitrocellulose membrane 에 전기적으로 transfer 후, 5% Skim-milk를 이용해 블로킹한다. 특이적인 일차항체를 (FMRP)를 반응시키고 다음날 horse radish peroxidase (HRP)가 결합되어 있는 이차항체를 반응시킨다. PBST로 워싱한 다음 Enhanced chemilumnescence (ECL) 방법을 이용하여 단백질의 발현을 확인하고, 이후 그 양을 Image J 프로그램을 통해, 정량해서 도식화한다 (도 2). MCAO 처리에 의해 흰쥐의 선조체에서 FMRP 발현이 재관류 1시간부터 6시간까지 지속되며, 24시간 이후 발현이 저하됨을 확인하였다 (도 2, N=3).

[0060] 실시에 2: FMRP 단백질 발현감소에 따른 신경세포사멸증가

[0061] MCAO 처리에 의해 발현이 증가된 FMRP가 신경세포의 생존/사멸에 미치는 영향을 알아보기와, 흰쥐의 뇌조직(선조체)에 FMRP 발현을 억제시킬 수 있는 small hairpin RNA virus를 주입시킨 후, 신경세포의 생존/사멸 여부를 확인하였다.

[0062] <2-1> Small hairpin RNA virus 를 이용한 FMRP의 발현조절

[0063] Small hairpin RNA (shRNA) 바이러스는 Fmr1 유전자 정보 (NM_002024) 에 기초해, Sigma 제품을 이용해 glycerol stock으로부터 vector plasmid를 제조하였다 (Sigma, SHGLY TRCN0000059759). 수컷 흰쥐의 선조체에 Fmr1 shRNA(Fmr1 gene (NM_002024);서열번호 3 및 control, non-target shRNA virus (Sigma, SHC002:4)를 microinjection 한 후, 5일째 뇌를 고정하여 선조체 부위에서의 FMRP 발현을 면역염색방법으로 확인하였다 (도 3A). Stereotaxic microinjection 은 Wistar 수컷 흰쥐를 (300g, 9-10주령) Rompun/ketamine (1:2, 2 ml/kg, i.p.) 으로 마취한 후 stereotaxic frame (Stoelting, Wood Dale, IL)에 넣고, ear bar 로 고정시켰다. shRNA (1.5 μ l, 0.5 μ l/min)를 선조체 (anterior (A), + 0.7 mm; lateral (L), + 2.1 mm; ventral (V), - 5.0 mm)에 주입 후, PBS 주입한 대조군과 FMRP 발현을 비교하였다. 그 결과, 대조군에 비해 Fmr1 shRNA injection한 흰쥐의 선조체에서 FMRP 발현이 유의적으로 감소함을 확인하였다 (도 3A, N=3).

[0064] <2-2> FMRP 발현이 감소된 흰쥐에서의 신경세포 생존 조절 변동 확인

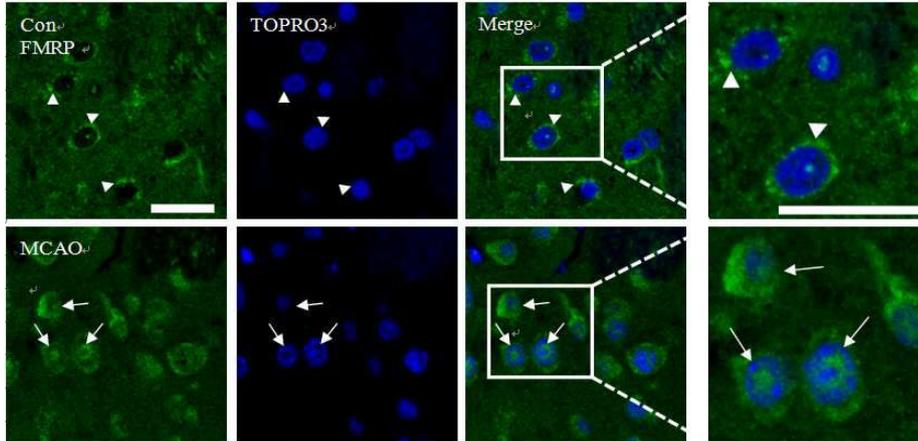
[0065] Fmr1 sh RNA 바이러스에 의해 FMRP 발현이 유의적으로 감소된 흰쥐의 선조체에서 세포사멸의 지표로 사용되는 TUNEL positive 세포의 숫자가 증가하였다. 이는 면역조직염색방법으로 확인하였으며, 이러한 증가는 MCAO 수술이 시행된 흰쥐의 선조체에서 더 크게 나타났다 (도 3B, p<0.01, N=4).

- [0066] 실시예 3: 신경세포배양모델에서 글루타메이트 처리에 의한 FMRP 발현변동
- [0067] FMRP에 의한 신경세포의 생존/사멸조절을 유발하는 세포신호전달회로를 검색하기 위해, 일차 신경세포를 배양 후 글루타메이트 자극으로 FMRP의 발현을 유도하였다. 이는 Western blotting 으로 확인하였다.
- [0068] <3-1> 글루타메이트 자극에 의한 FMRP 발현증가
- [0069] 임신한 흰쥐로부터 뇌를 적출해 일차신경세포를 배양한 후, 글루타메이트 자극을 주었고 이는 신경세포에서 FMRP 단백질의 발현을 일시적으로 증가시키는 결과를 보여주었다 (도 4A, $p < 0.01$, $N=4$). 흥미로운 점은 세포의 생존과 사멸조절에 중요한 작용을 한다고 알려진 PI3-K signaling pathway 역시 FMRP 발현과 유사하게 발현이 나타났다 (도 4B, $p < 0.01$, $N=4$).
- [0070] 실시예 4: FMRP 발현조절에 따른 일차신경세포의 글루타메이트 자극에 의한 사멸변동
- [0071] 글루타메이트 처리에 의해 발현이 증가된 FMRP가 신경세포의 생존/사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해, 배양한 일차 신경세포에 FMRP 발현을 인위적으로 결핍 혹은 과다 조절한 다음, 글루타메이트 자극에 의한 신경세포의 손상/사멸 정도를 PI staining 과 MTT assay로 확인하였다. 또한 이때 작용하는 신호 기전을 알아보기 위해, PI3-K, Akt, Bcl-xL 등의 활성과 발현을 Western blotting으로 측정하였다.
- [0072] <4-1> 일차신경세포에서 FMRP 발현조절
- [0073] 임신한 흰쥐로부터 뇌를 적출해 일차 신경세포를 배양한 후, shRNA virus 를 이용해 FMRP 발현을 억제한 후 mRNA 와 단백질 발현 정도를 real time PCR 과 Western blotting 으로 확인하였다 (도 5A). 또한 eGFP-FMRP vector 를 이용해 일차신경세포에서 exogenous 하게 FMRP 발현을 조절하였고 이를 Western blotting 으로 살펴 보았다 (도 5D).
- [0074]
- [0075] <4-2> FMRP 발현변동에 따른 글루타메이트 자극에 손상된 신경세포보호작용에 미치는 영향
- [0076] 일차 신경세포에서 FMRP 발현을 억제한 경우, TUNEL positive 세포 숫자가 증가하였다 (도 5B). 글루타메이트 처리에 의해 그 숫자가 2.5 배 정도 더욱 증가함을 알 수 있었다 (도 5B). 세포사멸을 정량적으로 측정할 수 있는 MTT assay 결과, FMRP 가 없을 경우, 세포사멸이 나타나며 이는 글루타메이트 처리에 의해 더욱 증가하는 것을 확인하였다 (도 5C).
- [0077] 반면, FMRP 발현을 증가시킨 경우에는 FMRP 발현이 일어나는 세포 (GFP fluorescence positive)에서 글루타메이트 처리에 의해 대조군에 비해 PI positive (red fluorescence) 인 세포의 숫자 (yellow fluorescence)가 감소됨을 보여준다 (도 5E).
- [0078] 위의 결과들을 종합해 살펴보면, FMRP단백질 양을 조절함으로써, 외부자극으로부터 신경세포를 보호할 수 있음을 시사한다. 따라서 본 발명자는 FMRP 에 의한 신경세포보호작용에 관여하는 기전을 알아보기 위해 아래와 같은 실험을 진행하였다.
- [0079] <4-3> FMRP 에 의한 신경세포의 사멸조절에 작용하는 신호기전: PI3-K pathway
- [0080] 일차 신경세포에서 FMRP 발현을 감소시킨 후, 글루타메이트 처리를 하였고 세포를 걷어내 단백질 발현과 활성을 검색하였다. 글루타메이트 처리는 신경세포에서 PI3-K 와 Akt 단백질의 활성을 증가시켰고, Akt의 활성은 하위 단계인 Bcl-2 family 의 일종인 Bcl-xL의 발현을 증가시켜 exotic insult 에 대한 세포의 생존기전에 도움을 준다고 알려져 있으나, 이러한 증가는 FMRP 발현억제로 인해 사라졌다 (도 6A). FMRP 발현이 감소된 경우에는 PI3-K 와 Akt의 활성이 감소하며, 이는 순차적으로 Bcl-xL 의 발현 역시 감소시키며 (도 6A), 세포보호작용이 줄어드는 것으로 사료된다 (도5C). 반면 FMRP 발현을 증가시킨 신경세포에서는 글루타메이트 처리에 의한 PI3-K 와 Akt 단백질 활성이 대조군에 비해 1.42배 증가함을 보여주었다 (도6B). Bcl-xL의 발현 역시 유의적으로 증가

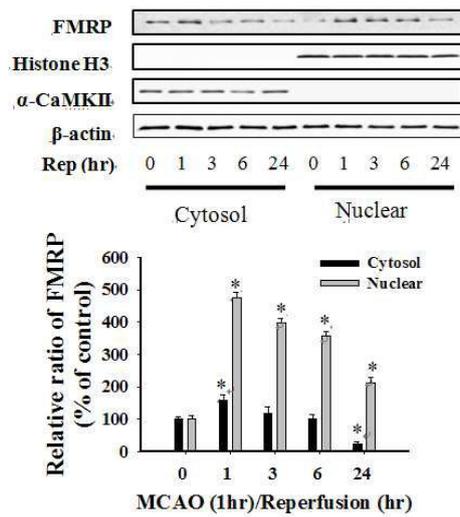
함을 확인할 수 있었다 (도 6B). 이상의 결과들은 FMRP의 발현을 증가시킴으로써, 글루타메이트와 같은 신경손상 자극에 보호효과를 나타낼 수 있으며, 이러한 작용을 수행하는 데 있어서, PI3-K 신호기전이 중요하게 작용함을 나타낸다. FMRP에 의해 PI3-K 와 Akt의 증가된 활성은 세포의 생존조절에 중요한 역할을 담당하는 Bcl-XL 과 같은 단백질의 발현을 증가시키고 결과적으로 insult에 대한 보호작용을 수행하는 것으로 사료된다.

도면

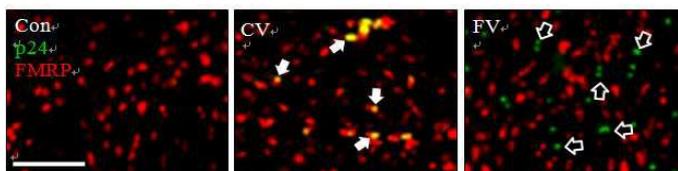
도면1



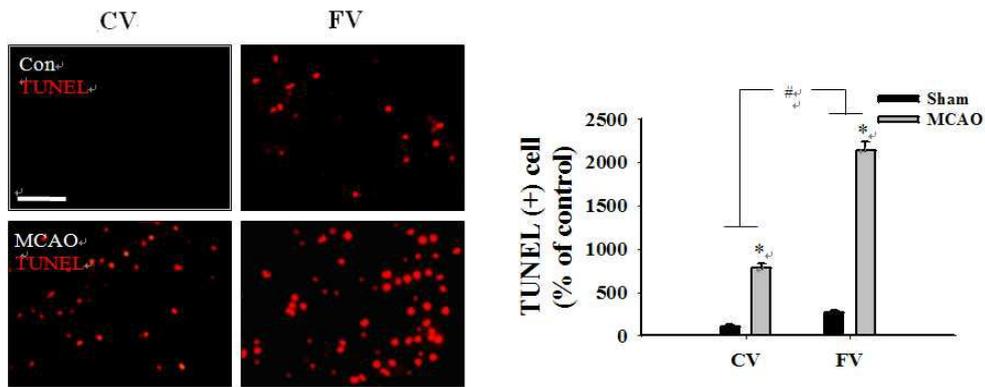
도면2



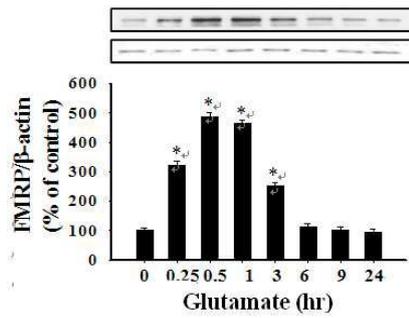
도면3a



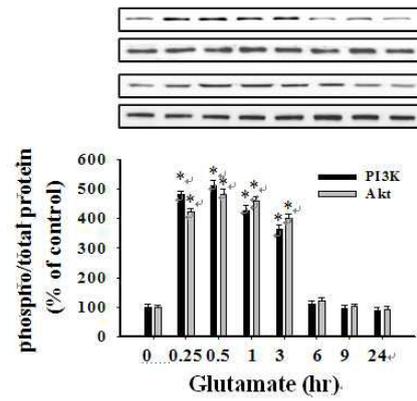
도면3b



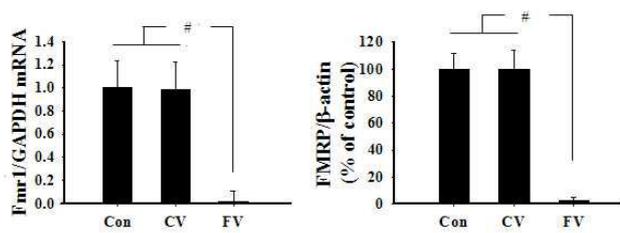
도면4a



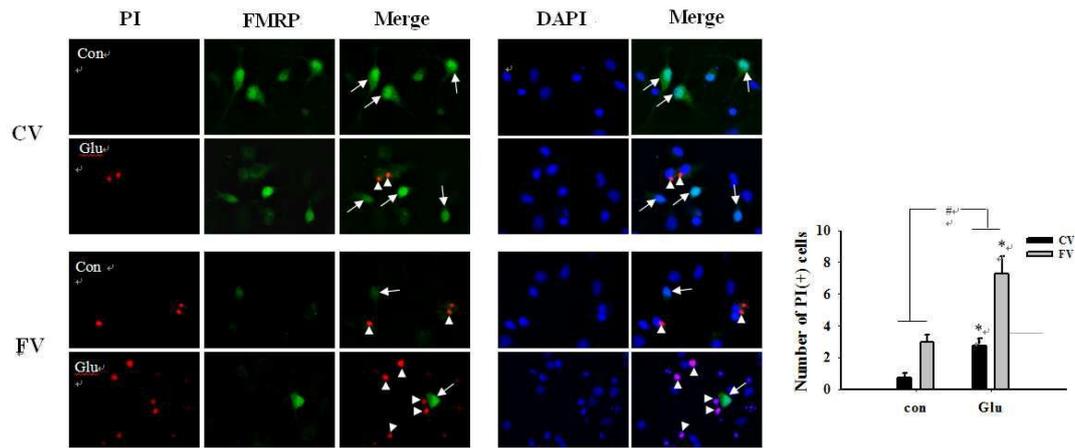
도면4b



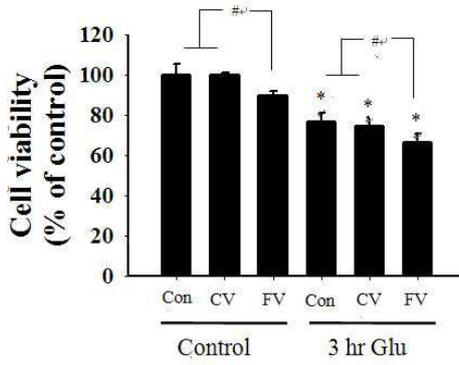
도면5a



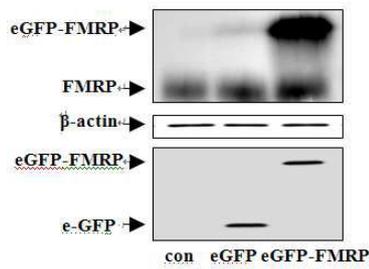
도면5b



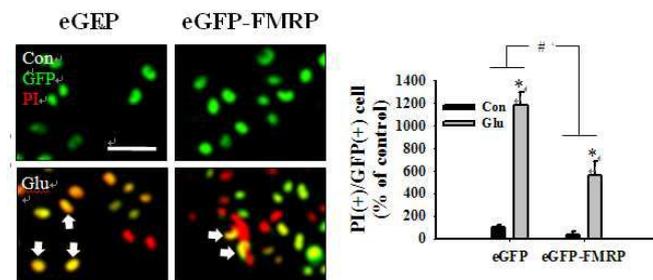
도면5c



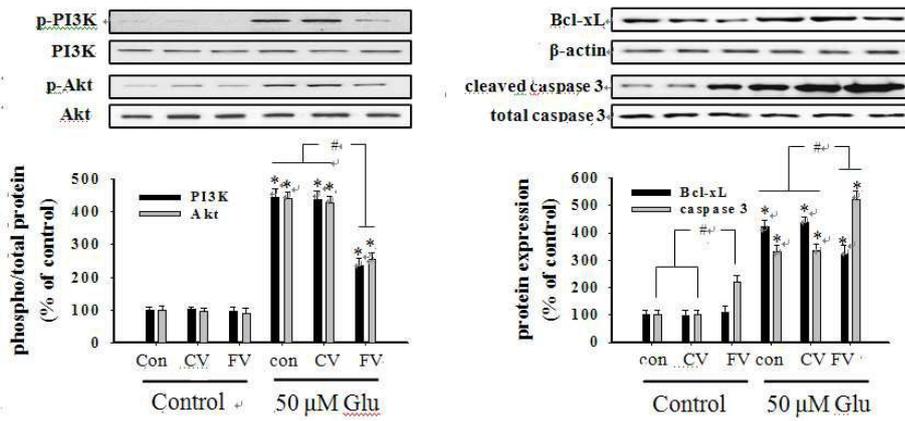
도면5d



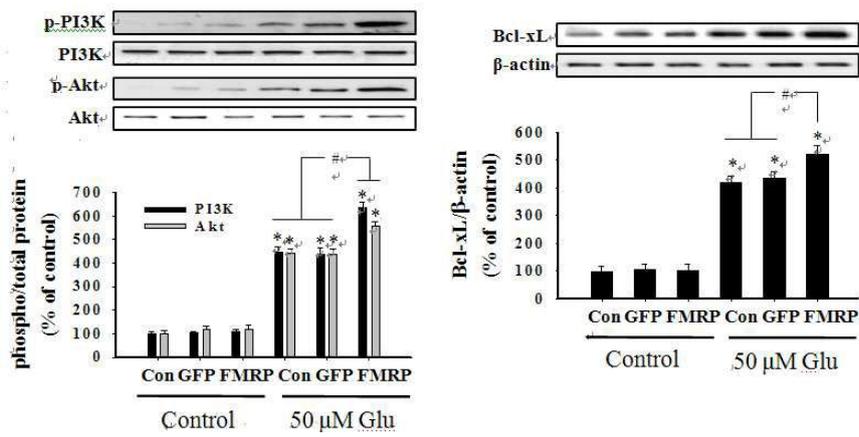
도면5e



도면6a



도면6b



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)