(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 8 월 14 일 (14.08.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/123267 A1

(51) 국제특허분류:
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/001209

(22) 국제출원일: 2013 년 2 월 15 일 (15.02.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0013825 2013 년 2 월 7 일 (07.02.2013) KR

(71) 출원인: **광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **박철승 (PARK, Chul-Seung)**; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 생명과학부, Gwangju (KR). **이광민 (LEE, Kwang-Min)**; 500-712 광주시 북구 첨단과기로 123, 광주과학기술원 생명과학부, Gwangju (KR). **최세영 (CHOI, Se-Young)**; 138-911 서울시 송파구 올림픽로 135, 리센츠아파트 247 동 802 호, Seoul (KR). **고희연 (KO, Hui-Yeon)**; 407-773 인천시 계양구 효서로 381, 현대아파트 204 동 407 호, Incheon (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울시 관악구 인헌동 1659-2, 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

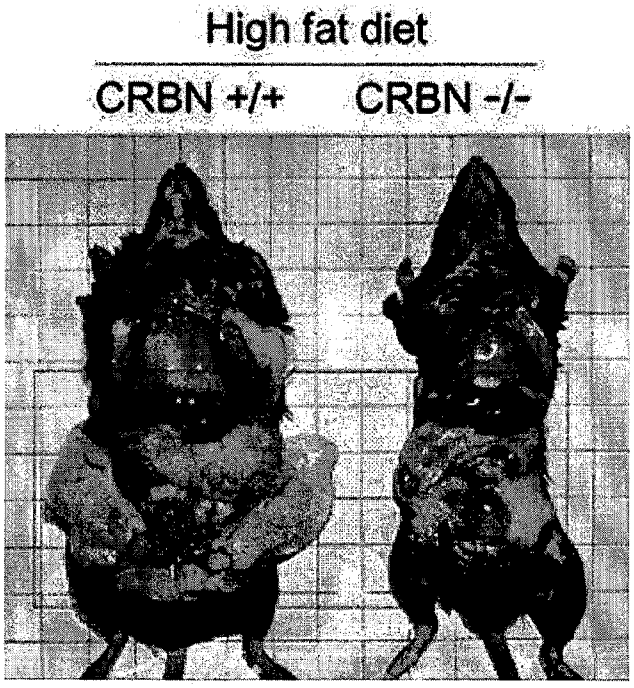
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING CRBN KO MOUSE AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭** : CRBN KO 마우스의 제조방법 및 이의 용도



(57) **Abstract**: The present invention relates to a CRBN KO mouse, a method for producing the same, an agent for treating metabolic diseases using CRBN genes, and a method for screening an AMP-activated protein kinase (AMPK) activator or an AMPK inhibitor. The CRBN KO mouse of the present invention in which AMPK is hyper-activated exhibits improved glucose homeostasis and insulin susceptibility. In addition, the CRBN KO mouse exhibits inhibitory effects for high-fat diet (HFD)-induced obesity and resistance against HFD-induced fatty liver. Therefore, the method of the present invention can be useful for researching and understanding metabolic processes of the body (especially of the liver) and energy homeostasis, and preventing and treating metabolic diseases (such as obesity, diabetes, metabolic syndromes, and the like) or cancer.

(57) **요약서**: 본 발명은 CRBN KO 마우스 및 이의 제조방법, 그리고 CRBN 유전자를 이용한 대사성 질환 치료제, 그리고 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 CRBN KO 마우스는 AMPK(AMP-activated protein kinase)가 과다-활성화(hyper-activation)되어 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 나타낸다. 또한, 본 발명의 CRBN KO 마우스는 HFD(high-fat diet)-유도된 비만에 대한 억제효과 뿐만 아니라, HFD-유도된 지방간에 대한 저항성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 방법은 몸 전체(특히, 간)의 대사과정 및 에너지 항상성에 대한 연구 및 이해에 유용하게 적용될 수 있을 뿐 아니라, 대사성 질환(예컨대, 비만, 당뇨병, 대사증후군, 등) 또는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

WO 2014/123267 A1

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

CRBN KO 마우스의 제조방법 및 이의 용도

【관련 특허출원】

본 특허출원은 2013 년 02 월 07 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0013825 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

【기술 분야】

본 발명은 CRBN KO 마우스 및 이의 제조방법, 그리고 CRBN 유전자를 이용한 대사성 질환 치료제, 그리고 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제의 스크리닝 방법에 대한 것이다.

【배경 기술】

초기에, 세레블론(*cereblon*, *CRBN*)은 인간에서 경증형 정신 지체에 관여된 타겟 유전자로서 동정되었으며(1), 이후 상기 유전자의 여러 다른 기능들에 대해 규명되었다. CRBN 은 큰 전도성을 가진 칼슘-활성화된 포타슘 채널(large-conductance calcium-activated potassium channels)과 직접적으로 상호작용하여 이들의 표면 발현을 조절한다(2). 이후에, CRBN 은 탈리도마이드(thalidomide)-유도된 최기성(teratogenicity)의 주요 타겟 및 E3 리가제 복합체의 기질 수용체로서 동정되었다(3). 보다 최근에, 본 발명자들은 CRBN 이 AMP-활성화된 단백질 키나제(AMP-activated protein kinase, AMPK)의 α_1 서브유니트와 직접적으로 상호작용하고 상기 효소의 활성화를 *인 비트로*에서 억제한다는 것을 보고하였다(4).

AMPK 는 세포 내 에너지 항상성의 변화에 대한 반응에서 대사적 마스터 스위치(master switch)로서 기능한다(5). AMPK 의 활성은 LKB1 같은 업스트림 키나제에 의한 서브유니트 내 172 번째 트레오닌 아미노산 위치(Thr172)의 인산화에 의해 조절될 수 있다(6). AMPK 는 직접적인 단백질 인산화를 통해 ACC(acetyl-CoA carboxylase)를 불활성화시키고 FAS(fatty acid synthase)를 포함하는 지방합성 유전자(lipogenic genes)의

발현을 억제시켜 지방산 합성을 억제시킨다(7, 8). AMPK 는 간에서의 글루코오스 및 지질 대사과정의 조절에 포함되어 몸 전체의 에너지 상태에 영향을 미친다(7, 9). 더욱이, AMPK 는 대사성 질환의 치료를 위한 주요 약리학적 타겟 단백질로서 동정되었다. 예를 들어, 제 2 형 당뇨병 및 비만에 대한 실험적 동물 모델들은 메트포르민(metformin) 또는 AICAR(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside)에 의한 AMPK 의 활성화는 혈중 글루코오스 레벨을 감소시키고 지질 대사과정을 개선시킨다는 것을 보여준다(10-12).

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

본 발명자들은 대사성 질환(metabolic disorders)에 대한 보다 효율적인 연구 및 이해를 위한 신규한 동물모델 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 CREN 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 타겟팅 벡터를 이용하여 CREN 유전자가 결실된 Crbn KO(knockout) 마우스를 제조하였으며, 상기 Crbn KO 마우스가 HFD(high-fat diet)-유도된 비만 및 지방간에 대한 보호 효과(예컨대, 적은 체중 증가 및 부고환 지방, 낮은 간 트리글라이세라이드 함량 및 콜레스테롤 레벨, 적은 지질봉입체, 소량의 중성지질 축적, 등)를 나타낼 뿐 아니라, 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성(예컨대, 낮은 레벨의 혈청 글루코오스, 혈청 유리지방산, 인슐린, 렙틴)을 나타낸다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 인간을 제외한 CRBN KO(cereblon knockout) 동물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 인간을 제외한 CRBN KO ES 세포(embryonic stem cells)를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상술한 제조방법에 따라 제조된 CRBN KO 동물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 비만, 당뇨병 및 대사증후군(metabolic syndrome) 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 AMPK 활성제(activators)의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 AMPK 억제제(inhibitors)의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 인간을 제외한 CRBN KO(cereblon knockout) 동물의 제조방법을 제공한다:

(a) 야생형 CRBN 유전자 결실용 선형화된 타겟팅 벡터(linearlized targeting vector)를 ES 세포(embryonic stem cells)에 형질전환(transfection)시키는 단계로, 상기 야생형 CRBN 결실용 선형화된 타겟팅 벡터는 5' to 3' 방향으로 5' 짧은 단편(short arm fragment), CRBN 유전자 결실용 목적 단편(fragment of interest) 및 3' 긴 단편(long arm fragment)을 포함하며 상기 CRBN 유전자 결실용 목적 단편은 11 개의 CRBN 엑손 중 하나 이상의 엑손을 포함하는 CRBN 유전자 타겟팅 부위(target region)를 대체할 수 있는 단편으로 선택 카세트(selection cassette)를 포함하고 상기 5' 짧은 단편(short arm fragment) 및 3' 긴 단편(long arm fragment)은 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위의 5' 업스트림 및 3' 다운스트림 뉴클레오타이드 서열이며;

(b) 상기 단계 (a)에서 얻어진 형질전환된 ES 세포를 배반포 세포(blastocyst)에 주입(injection)하고 자궁에 이식하여 이종접합성(heterozygous) F1 동물을 얻는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 얻어진 이종접합성 F1 동물과 정상 동물을 역교배(backcross)하는 단계로, 상기 역교배는 최소 10 세대 이상 실시하며; 및

(d) 상기 단계 (c)를 통해 얻어진 이종접합성 수컷 및 암컷을 교배하여 CRBN KO 동물을 얻는 단계.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 야생형 CRBN 유전자 결실용 선형화된 타겟팅 벡터(linearlized targeting vector)로 형질전환된 인간을 제외한 CRBN KO ES 세포(embryonic stem cells)를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 제조방법에 따라 CRBN KO 동물을 제공한다.

본 발명자들은 대사성 질환에 대한 보다 효율적인 연구 및 이해를 위한 신규한 동물모델 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 CREN 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 타겟팅 벡터를 이용하여 CREN 유전자가 결실된 Crbn KO 마우스를 제조하였으며, 상기 Crbn KO 마우스가 HFD-유도된 비만 및 지방간에 대한 보호 효과(예컨대, 적은 체중 증가 및 부고환 지방, 낮은 간 트리글라이세라이드 함량 및 콜레스테롤 레벨, 적은 지질봉입체, 소량의 중성지질 축적, 등)를 나타낼 뿐 아니라, 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성(예컨대, 낮은 레벨의 혈청 글루코오스, 혈청 유리지방산, 인슐린, 렙틴)을 나타낸다는 것을 확인하였다.

인간 CRBN 유전자는 염색체 3 에 위치하며 11 개의 엑손으로 구성된 30,111 뉴클레오타이드 서열로 이루어져 있고, 상기 서열로부터 442 개의 아미노산 서열로 이루어진 E3 리가제(ligase) 단백질을 생산한다. 마우스 CRBN 유전자의 프로모터는 하나의 Nrf2(NF-E2-related factor 2) 결합 위치를 포함하여 저산소 상태/재산소화 상태(hypoxia/reoxygenation)의 세포에서 현저하게 발현이 증가한다. CRBN 유전자의 명명은 뇌 발생에 있어서 이의 중추적 기능과 N-말단에 위치한 매우 높은 보존성을 지닌 ATP-의존성 Lon 프로테아제 도메인(인간의 경우, 81 번째부터 317 번째까지의 237 개의 아미노산 서열)의 존재에 기반하였으며, CRBN 단백질은 상기 도메인 외에도 많은 변형 위치들을 포함한다. 예컨대, 인간의 경우, 11 개의 카제인 키나제 II 인산화 위치, 4 개의 단백질 키나제 C 인산화 위치, 1 개의 N-연결된 당화(glycosylation) 위치, 2 개의

미리스토일화(myristoylation) 위치, 등을 포함하고, 마우스(래트)의 경우, G 단백질-시그널링-유사 도메인의 조절자 및 루이신 지퍼 모티프를 포함한다. CRBN 단백질은 세포질, 핵 및 표재성 막(peripheral membrane)에 존재하고 다양한 조직, 예를 들어 고환, 비장, 전립선, 간, 췌장, 태만, 신장, 폐, 골격근, 난소, 대장, 뇌 및 망막에서 발현된다. 또한, CRBN 단백질은 뇌의 칼슘-활성화된 칼륨 채널(Ca^{2+}-activated K^+ channel; 예컨대, 마우스 뇌의 SLO1), 전압-게이트된 클로라이드 채널(voltage-gated chloride channel; 예컨대, 망막 내 CIC-2) 및 진핵세포의 대사 경로들(metabolic pathways)을 조절하는 중추적인 센서/신호전달(sensor/transducer) 단백질인 AMP 키나제에 결합한다.

본 발명은 CRBN 의 기능을 없앤 KO(knockout) 마우스를 제작한 최초의 발명이다. 보다 상세하게는, 본 발명의 CRBN KO 마우스의 제조방법은 다음과 같은 단계에 따라 실시한다:

(pre-a) 선형화된 타겟팅 벡터의 제조;

본 발명에 따르면, 게놈 DNA 내 타겟팅 부위(targeting region)를 포함하는 타겟팅 벡터를 제조한다. 구체적으로는, 본 발명의 타겟팅 벡터는 5' to 3' 방향으로 5' 짧은 단편(short arm fragment), CRBN 유전자 결실용 목적 단편(fragment of interest) 및 3' 긴 단편(long arm fragment)을 포함한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 CRBN 유전자 결실용 목적 단편은 11 개의 CRBN 엑손 중 하나 이상의 엑손을 포함하는 CRBN 유전자 타겟팅 부위(target region)를 대체할 수 있는 단편으로 선택 카세트(selection cassette)를 포함한다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 CRBN 유전자 타겟팅 부위는 1-2 kb 의 뉴클레오타이드 서열로 이루어져 있으며, 보다 더 구체적으로는 CRBN 유전자의 엑손 1 을 필수적으로 포함한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 5' 짧은 단편 및 3' 긴 단편은 각각 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위의 5' 업스트림(upstream) 및 3' 다운스트림(downstream) 뉴클레오타이드 서열이고, 보다 구체적으로는 각각 2-4 kb 및 6-10 kb 의 뉴클레오타이드 서열이고, 보다 더

구체적으로는 각각 서열목록 제 1 서열 및 서열목록 제 2 서열로 이루어져 있다.

(a) ES 세포(embryonic stem cells)에 형질전환(transfection)시키는 단계;

본 발명의 CRBN KO 동물을 생산하기 위해, 상기 선형화된 타겟팅 벡터(linearlized targeting vector)를 ES 세포에 도입시킨다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 ES 세포는 포유동물(보다 구체적으로는, 마우스)의 ICM(inner cell mass)-유래된 ES 세포를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 ES 세포에 선형화된 타겟팅 벡터를 전이시키는 방법은 당업계에서 통상적으로 공지된 유전자 전이 방법에 따라 실시될 수 있다. 예를 들어, 전기동공법(electroporation), 리포좀-매개 전이방법(Wong, 등, 1980) 및 레트로바이러스-매개 전이방법(Chen, H.Y., et al., (1990), J. Reprod. Fert. 41:173-182; Kopchick, J.J. et al., (1991) Methods for the introduction of recombinant DNA into chicken embryos. In Transgenic Animals, ed. N.L. First & F.P. Haseltine, pp.275-293, Boston; Butterworth-Heinemann; Lee, M.-R. and Shuman, R. (1990) Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod. 16, 107-110)을 포함하며, 보다 구체적으로는 전기동공법으로 실시한다.

이후, 상기 선형화된 타겟팅 벡터가 상동재조합(homologous recombination)을 통해 목적하는 CRBN 타겟팅 부위로 삽입된 ES 세포를 선별한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 보다 안정적인 상동재조합을 위해 본 발명의 선형화된 타겟팅 벡터는 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위의 5' 업스트림의 뉴클레오타이드 서열인 5' 짧은 단편(short arm fragment)과 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위의 3' 다운스트림의 뉴클레오타이드 서열인 3' 긴 단편(long arm fragment)을 목적하는 CRBN 타겟팅 부위의 양쪽에 포함한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 선택 방법은 상술한 CRBN 유전자 타겟팅 부위(target region)를 대체할 수 있는 단편인 선택

카세트(selection cassette)를 이용한다. 보다 구체적으로는, 본 발명의 선택 카세트는 형질전환 확인용 선택 마커(selection marker)로 양성 선택 마커 및 음성 선택 마커를 포함하며, 구체적으로는 항생제 내성 유전자 및 TK(thymidine kinase)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 이용될 수 있는 선택 마커는, 진핵세포에 항생제에 대한 내성을 부여하는 어떠한 유전자도 가능하며, 예컨대, 네오마이신 또는 카나마이신 내성 유전자를 포함한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 선택 카세트는 양성 선택 마커인 네오마이신 카세트 및 음성 선택 마커인 TK 를 포함한다.

올바른 상동재조합이 발생하여 본 발명의 선형화된 타겟팅 벡터가 게놈 DNA 내로 삽입된 경우, ES 세포는 선택 카세트에 포함된 마커(양성 및 음성 선택 마커)에 의해 선택적으로 획득될 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 ES 세포는 G418(젠타마이신) 및 간시클로비르(ganciclovir)에 대한 저항성을 나타내는 ES 세포만이 선택적으로 얻어질 수 있다.

(b) 이종접합성(heterozygous) F1 동물을 얻는 단계;

줄기세포(stem cells)는 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는 세포로서, 그 특징은 반복 분열하여 자가 재생산(self-renewal) 할 수 있고, 환경에 따라 특정한 기능을 지닌 세포로 분화할 수 있는 다분화 능력을 갖는 '미분화' 세포이다. 일반적으로, 분화능력의 특성과 발달에 따라 줄기세포의 성격을 크게 3 가지로 나눌 수 있다: (a) 전능성(totipotent) 줄기세포, 예를 들어 포유동물의 배아 발달과정에서 정자와 난자에 의해 수정이 이루어진 직후의 세포; (b) 다능성 (pluripotent) 줄기세포, 예를 들어 포유동물의 수정란이 수차례의 세포분열을 거쳐 생성된 배반포(blastocyst)의 ICM(inner cell mass); 및 (c) 중복성(multipotent) 줄기세포, 예를 들어 제한된 세포분화능을 가지는 성체줄기세포(adult stem cell).

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 ES 세포는 포유동물의 ICM 에서 유래된 ES 세포이고, 보다 구체적으로는 마우스의 ES 세포이다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 포유동물은 마우스, 래트,

기니어 피그, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 및 고양이를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 명세서의 용어 "배반포(blastocyst)"는 수정 후 3-4 일령된 배반포(8 세포기)로, 이 시기의 배반포는 배아가 유체의 핵을 둘러싼 내부 세포들과 이를 보호하는 외벽 세포들(약 100 개 정도)로 이루어진 착상 직전의 배아 발달 단계에 해당한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 얻어진 본 발명의 형질전환된 ES 세포는 마이크로인젝션(microinjection)을 통해 상기 배반포 내 ICM으로 주입된 후, 대리모의 자궁에 이식된다.

이후, 대리모에서 태어난 카이메라-마우스(Chimera-mouse; F0) 중 카이메리즘(chimerizm)이 높은 수컷을 정상 C57BL/6N 마우스 암컷과 교배하여 태어난 생쥐(F1)의 모색(coat color)을 통해 생식선 전이(germline transmission)를 확인하여 이종접합성 F1 동물을 획득한다.

본 명세서의 용어 "생식선 전이(germline transmission)"는 다른 개체에 주입된 ES 세포가 세대를 따라 자손들에게 전달되는 양상을 의미하고, F1 세대의 모색을 통해 일차적으로 확인할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 정상 마우스(모색; black) 대 형질전환 마우스(모색; agouti)의 비율(chimerism ratio)을 육안으로 용이하게 확인하여 본 발명의 이종접합성 F1 마우스의 생산 효율을 계산할 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 마우스 카이메라(chimera)는 80-97%의 생식선 카이메리즘(germline chimerism)을 나타내며, 보다 구체적으로는 85-95%이고, 보다 더 구체적으로는 87.5-92.5%이며, 가장 구체적으로는 90%를 나타낸다.

또한, 상기 이종접합성 F1 동물의 확인은 야생형 CRBN 유전자 타겟팅 부위 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열, 선택 카세트(selection cassette) 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열과 5' 짧은 단편 또는 3' 긴 단편 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열을 고안하여 PCR(polymerase chain reaction), 서던 블랏팅 또는 웨스턴 블랏팅을 통해 용이하게 실시할 수 있다(예시: 도 1a-도 1c).

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다.

PCR 은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 본 명세서에 기재된 용어 "증폭 반응" 은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제 4,683,195 호, 제 4,683,202 호 및 제 4,800,159 호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 멀티플렉스 PCR(McPherson and Moller, 2000), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification, TMA; WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication; WO 90/06995), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제 6,410,276 호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction, CP-PCR; 미국 특허 제 4,437,975 호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR; 미국 특허 제 5,413,909 호 및 제 5,861,245 호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA; 미국 특허 제 5,130,238 호, 제 5,409,818 호, 제 5,554,517 호 및 제 6,063,603 호) 및 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)을 포함하나, 이에 한정되지는 않으며 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제 5,242,794 호, 제 5,494,810 호, 제 4,988,617 호 및 미국 특허 제 09/854,317 호에 기술되어 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머" 는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA

중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH 의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정된다. 용어 "어닐링" 또는 "프라이밍"은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.

본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 분석 대상의 동물(예컨대, 이종접합성 F1 동물의 꼬리)에서 게놈 DNA 를 추출하여 검출하는 것이다. 따라서, 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA 를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA 에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

mRNA 를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA 를 분리한다. 총 RNA 를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. *et al.*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. *et al.*, *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol 을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA 를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA 로부터 cDNA 를 합성하고, 이 cDNA 를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA 는 포유동물의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA 의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA 을 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, *et al.*, *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. *et al.*,

Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA 를 증폭한다.

본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

본 명세서 용어 "혼성화(hybridization)" 는 2 개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다. 용어 "어닐링" 과 "혼성화" 는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.

다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I 의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.

중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+}와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록

한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

본 발명에 있어서 어닐링은 타깃 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

따라서, 본 발명의 방법을 cDNA 를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 야생형 CRBN 유전자 타겟팅 부위 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열(예컨대, 엑손 1 내 뉴클레오타이드 서열에 대한 프라이머), 선택 카세트(selection cassette) 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열(예컨대, 프라이머 P3)과 5' 짧은 단편 또는 3' 긴 단편 내 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머 서열(예컨대, P1 또는 P2)을 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 결과물을 분석하는 단계를 포함한다.

상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 야생형 CRBN 유전자의 존재 유무를 확인할 수 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 증폭은 실시간 PCR 에 따라 실시된다.

실시간 PCR 은 PCR 증폭 산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 분석하는 기술이다(Levak KJ, *et al.*, *PCR Methods Appl.*, 4(6): 357-62(1995)). PCR 생산물의 증가가 타겟 템플레이트의 초기 양과 비례하는 지수기(exponential phase) 동안 각 사이클에서 형광 방출량을 기록하여 PCR 반응을 모니터링할 수 있다. 핵산 타겟의 출발 카피 수가 높을수록, 형광 증가가 더 빨리 관찰되고 더 낮은 C_T 값(threshold cycle)을 가지게 된다. 3-15 사이클 사이에서 측정된 기준값보다 높은 형광의 뚜렷한 증가는 축적된 PCR 생산물의 검출을 의미한다. 종래의 PCR 방법에 비해, 실시간 PCR 은 다음과 같은 장점을 가진다: (a) 종래의 PCR 은 정체 상태(plateau)에서 측정되는 반면에, 실시간 PCR 은 지수성장기(exponential growth phase) 동안 데이터를 얻을 수 있다; (b) 리포터 형광 시그널의 증가는 발생된 앰플리콘(amplicons)의 수와 직접적으로 비례한다; (c)

분해된 프로브는 앰플리콘의 영구적인 기록 증폭(record amplification)을 제공한다; (d) 검출 범위의 증가; (e) 종래 PCR 방법에 비해 1,000 배 이상 적은 핵산을 필요로 한다; (f) 전기영동을 통한 분리 없이 증폭된 DNA 의 검출이 가능하다; (g) 작은 앰플리콘 크기를 이용하여 증가된 증폭 효율을 획득할 수 있다; 및 (h) 오염 위험성이 적다.

PCR 증폭 산물량은 형광으로 검출 가능한 양에 도달하면 증폭곡선이 일어나기 시작해 지수적으로 시그널이 상승하다가 정체 상태에 도달한다. 초기 DNA 량이 많을수록 증폭 산물량이 검출 가능한 양에 달하는 cycle 수가 적어지므로 증폭곡선이 빨리 나타난다. 따라서, 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 실시간 PCR 반응을 하면 초기 DNA 량이 많은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭 곡선이 얻어진다. 여기서 적당한 지점에 한계치(threshold)를 설정하면 한계치와 증폭 곡선이 교차하는 지점 C_T 값이 산출된다.

실시간 PCR 에서는 PCR 증폭 산물을 형광을 통해 검출한다. 검출 방법은 크게 interchelating 방법(SYBR 그린 I 방법), 형광 표지 프로브를 이용하는 방법(TaqMan 프로브 방법) 등이 있다. interchelating 방법은 이중 가닥 DNA 를 모두 검출하기 때문에 유전자별 프로브를 준비할 필요하 없어 저렴한 비용으로 반응계를 구축할 수 있다. 형광 표지 프로브를 이용하는 방법은 고비용이 드는 반면에 검출 특이성이 높아 유사 서열까지도 구별해서 검출할 수 있다.

먼저, interchelating 방법은 이중 가닥 DNA 결합 다이를 이용하는 방법으로, 비-서열 특이적 형광 intercalating 시약(SYBR 그린 I 또는 ethidium bromide)을 이용하여 비-특이적 증폭 및 프라이머-다이머 복합체를 포함하는 앰플리콘 생산을 정량하는 것이다. 상기 시약은 ssDNA 와는 결합하지 않는다. SYBR 그린 I 은 이중 가닥 DNA 의 마이너 그루브(minor groove)에 결합하는 형광성 다이로, 용액 상에서는 거의 형광을 보이지 않지만 이중 가닥 DNA 와 결합하면 강한 형광을 나타내는 시약(interchelator)이다(Morrison TB, *Biotechniques.*, 24(6): 954-8, 960, 962(1998)). 따라서 SYBR 그린 I 과 이중 가닥 DNA 간의 결합을 통해 형광을 방출하기 때문에 증폭 산물의 생성량을 측정할 수 있다. SYBR 그린 실시간 PCR 은 앰플리콘 동정을 위해 융해점(melting point) 또는 해리

곡선(dissociation curve) 분석과 같은 최적화 과정을 동반한다. 정상적으로 SYBR 그린은 싱글플렉스(singleplex) 반응에 이용되지만, 융해곡선(melting curve) 분석이 동반되면 멀티플렉스(multiplex) 반응에 이용될 수 있다(Siraj AK, *et al.*, *Clin Cancer Res.*, 8(12): 3832-40(2002); 및 Vrettou C., *et al.*, *Hum Mutat.*, Vol 23(5): 513-521(2004)).

본 명세서의 용어 "C_T (threshold cycle) 값"은 반응에서 발생된 형광이 역치(threshold)를 넘어서는 사이클 수를 의미하며, 이는 초기 카피 수의 대수에 반비례한다. 그러므로, 특정 웰에 할당된 C_T 값은 반응에서 앰플리콘의 충분한 수가 축적된 사이클의 수를 반영한다. C_T 값은 ΔRn 의 증가가 처음으로 검출된 사이클이다. Rn 은 각 시점에서 PCR 동안 발생된 형광 시그널의 크기를 의미하며, ΔRn 은 레퍼런스 다이의 형광 방출 강도로 나뉘어진 리포터 다이의 형광방출 강도(표준화된 리포터 시그널)를 의미한다. C_T 값은 LightCycler 에서는 Cp(crossing point)로도 명명된다. C_T 값은 시스템이 로그-선형 단계(log-linear phase)에서 PCR 생산물의 지수성장과 관련된 형광 시그널의 증가를 검출하기 시작하는 시점을 나타낸다. 이 시기는 반응에 대한 가장 유용한 정보를 제공한다. 로그-선형 단계의 기울기는 증폭 효율(amplification efficiency, Eff)을 나타낸다(http://www.appliedbiosystems.co.kr/).

한편, TaqMan 프로브는 전형적으로 5'-말단에 형광물질 및 3'-말단에 퀀처(예컨대, TAMRA 또는 비-형광 퀀처(NFQ))를 포함하는 프라이머(예컨대, 20-30 뉴클레오타이드) 보다 더 긴 올리고뉴클레오타이드이다. 여기된 형광물질은 형광을 내기 보다는 근처의 퀀처에 에너지를 전달한다(FRET = Förster or fluorescence resonance energy transfer; Chen, X., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(20): 10756-61(1997)). 그러므로, 프로브가 정상인 경우, 어떠한 형광도 발생되지 않는다. TaqMan 프로브는 PCR 생산물의 내부 부위에 어닐링할 수 있도록 고안된다. 구체적으로는, TaqMan 프로브는 증폭될 타겟 서열 절편의 내부서열로 고안될 수 있다.

TaqMan 프로브는 어닐링 단계에서 템플레이트 DNA 에 특이적으로 혼성화하지만, 프로브 상에 퀀처에 의해 형광 발색이 억제된다. 연장 반응 시에 *Taq* DNA 폴리머라제가 갖는 5' to 3' 뉴클레아제 활성에 의해

템플레이트에 혼성화한 TaqMan 프로브가 분해되어 형광 색소가 프로브로부터 유리되면서 퀀처에 의한 억제가 해제되어 형광은 나타낸다. 이 때, TaqMan 프로브의 5' -말단은 상기 연장 프라이머의 3' -말단의 다운스트림에 위치하여야 한다. 즉, 연장 프라이머의 3' -말단이 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 연장되는 경우, 이 중합효소의 5' to 3' 뉴클레아제 활성에 의해 TaqMan 프로브의 5' -말단이 절단되어 리포터 분자의 형광 시그널이 발생하게 된다.

TaqMan 프로브에 결합되어 있는 상기 리포터 분자 및 퀀처 분자는 모두 형광성 물질이다. 본 발명에 이용될 수 있는 형광성 리포터 분자 및 퀀처 분자는 당업계에 공지되어 있는 어떠한 것도 이용할 수 있으며, 그 예는 다음과 같다(괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다): Cy2™(506), YO-PRO™-1(509), YOYO™-1(509), Calcein(517), FITC(518), FluorX™(519), Alexa™(520), Rhodamine 110(520), 5-FAM(522), Oregon Green™ 500(522), Oregon Green™ 488(524), RiboGreen™(525), Rhodamine Green™(527), Rhodamine 123(529), Magnesium Green™(531), Calcium Green™(533), TO-PRO™-1(533), TOTO1(533), JOE(548), BODIPY530/550(550), DiI(565), BODIPY TMR(568), BODIPY558/568(568), BODIPY564/570(570), Cy3™(570), Alexa™ 546(570), TRITC(572), Magnesium Orange™(575), Phycoerythrin R&B(575), Rhodamine Phalloidin(575), Calcium Orange™(576), Pyronin Y(580), Rhodamine B(580), TAMRA(582), Rhodamine Red™(590), Cy3.5™(596), ROX(608), Calcium Crimson™(615), Alexa™ 594(615), Texas Red(615), Nile Red(628), YO-PRO™-3(631), YOYO™-3(631), R-phycocyanin(642), C-Phycocyanin(648), TO-PRO™-3(660), TOTO3(660), DiD DiIC(5)(665), Cy5™(670), Thiadicarbocyanine(671) 및 Cy5.5(694).

적합한 리포터-퀀처 쌍(pairs)은 많은 문헌에 개시되어 있다: Pesce *et al.*, editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, New York, 1971); White *et al.*, FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd EDITION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES

(Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996; 미국 등록특허 번호 제 3,996,345 호 및 제 4,351,760 호.

본 발명에서 이용되는 타겟 핵산은 특별하게 제한되지 않으며, DNA(gDNA 또는 cDNA) 또는 RNA 분자를 모두 포함하며, 보다 바람직하게는 gDNA 이다. 타겟 핵산이 RNA 분자인 경우에는 cDNA 로 역전사 하여 사용한다. 타겟 핵산은 예컨대, 원핵세포 핵산, 진핵세포(예컨대, 원생동물과 기생동물, 균류, 효모, 고등 식물, 하등 동물 및 포유동물과 인간을 포함하는 고등동물) 핵산, 바이러스(예컨대, 헤르페스 바이러스, HIV, 인플루엔자 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 간염 바이러스, 폴리오바이러스 등) 핵산 또는 비로이드 핵산을 포함한다.

타겟 핵산을 연장 프라이머 및 프로브에 어닐링 또는 혼성화 시키는 방법은 당업계에 공지된 혼성화 방법에 의해 실시할 수 있다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 반응 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

본 발명에 이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 가지는 효소이다. 본 발명에 이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 바람직하게는 DNA 중합효소이다. 통상적으로 DNA 중합효소들은 5' to 3' 뉴클레아제 활성을 가지고 있다. 본 발명에

이용되는 주형-의존성 핵산 중합효소는 *E. coli* DNA 중합효소 I, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 주형-의존성 핵산 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, *Pyrococcus furiosus*(Pfu), *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* 및 *Thermosipho africanus* 의 DNA 중합효소를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 촉매되는 "주형-의존성 연장반응"은 주형의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 합성하는 반응을 의미한다.

한편, CRBN 단백질 양의 변화는 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블랏팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.

본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는

단계; (ii) 일차항체로서의 타겟에 대한 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.

상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 보다 구체적으로는 마이크로타이터 플레이트이다.

상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시퍼라아제 및 사이토크롬 P_{450} 을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2 '-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 본 발명의 타겟에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, CRBN 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P_{450}), 방사능물질((예컨대, C^{14}, I^{125}, P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 에 기재되어 있다.

상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

(c) 이종접합성 F1 동물과 정상 동물을 역교배(backcross)하는 단계;

이종접합성 F1 동물 이후의 세대에서는 모색을 통해 확인할 수 없기 때문에, 정상 동물과의 역교배를 통해 이종접합성 F1 동물을 안정적으로 얻는다. 이를 위해, 최소 10 세대 이상의 역교배를 실시한다.

간략하게는, 정상 C57BL/6N 마우스 암컷(female)과 교배하여 나온 F1 마우스는 정상 C57BL/6N 마우스의 유전형질 50%를 가진다. 상기 F1 과 정상 C57BL/6N 마우스와 교배해서 나온 F2 는 정상 C57BL/6N 마우스의 유전형질 75%를 가지게 된다. 이후, 상기 F2 와 정상 C57BL/6N 마우스와 교배해서 나온 F3 는 정상 C57BL/6N 마우스의 유전형질 87.5%를 가진다. 상술한 바와 같이, 이종접합성 동물과 정상 C57BL/6N 마우스를 교배시켜 얻게되는 F4, F5, F6, F7, F8, F9 및 F10 은 정상 C57BL/6N 마우스의 유전형질에 대해 각각 93.75, 96.875, 98.437, 99.218, 99.609, 99.804 및 99.902%의 유전형질을 포함하게 된다. 통상적으로, 95% 이상의 동일한 유전형질을 가지는 동물을 사용(예컨대, F5 동물)하나, 보다 안정적으로는

99%이상의 동일한 유전형질을 가지는 동물을 사용하여 실험을 진행한다. 따라서, 본 발명은 99.9%의 동일한 유전형질을 가지는 동물을 사용하기 위해 10 세대 이상의 역교배를 실시하였다(F10 : 99.902%).

(d) 이종접합성 수컷 및 암컷을 교배하여 CRBN KO 동물을 얻는 단계;

최종적으로, 상술한 역교배를 통해 얻어진 이종접합성 수컷(Crbn +/-) 및 암컷(Crbn +/-) 간의 교배를 통해 CRBN KO 동물을 얻는다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 제조된 CRBN KO 동물(예컨대, 마우스)은 AMPK(AMP-activated protein kinase)가 과다-활성화(hyper-activation)되어 있다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 제조된 CRBN KO 동물은 HFD(high-fat diet)-유도된 비만에 대한 억제효과를 나타내고, HFD-유도된 지방간에 대한 저항성을 나타낸다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 제조된 CRBN KO 동물은 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 나타낸다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 비만, 당뇨병 및 대사증후군(metabolic syndrome) 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 인간을 제외한 동물에 비만, 당뇨병 또는 대사증후군을 유도하는 단계; (b) 상기 동물에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 동물에서 CRBN 유전자의 발현을 분석하는 단계를 포함하는 비만, 당뇨병 및 대사증후군 치료제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 동물에서 CRBN 유전자의 발현을 억제시키면 비만, 당뇨병 및 대사증후군 치료제로 판단한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 AMPK 활성제(activators)의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 AMPK α, β 및 γ 서브유니트를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK 서브유니트들 간의 결합을 분석하는 단계를 포함하는 AMPK

활성제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK α 서브유니트 간의 결합을 억제시키거나 또는 AMPK 복합체에 대한 γ 서브유니트의 친화성을 증가시키면 AMPK 활성제로 판단한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 AMPK 억제제(inhibitors)의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 AMPK α, β 및 γ 서브유니트를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK 서브유니트들 간의 결합을 분석하는 단계를 포함하는 AMPK 억제제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK α 서브유니트 간의 결합을 촉진시키거나 또는 AMPK 복합체에 대한 γ 서브유니트의 친화성을 저해시키면 AMPK 억제제로 판단한다.

본 발명의 방법은 상술한 CRBN 의 발현량을 분석하는 과정을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명의 방법에 따르면, 우선 CRBN-인코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 처리한다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 CRBN 뉴클레오티드 서열의 발현량에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미하며, 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물을 포함하지만, 이에 한정적인 것은 아니다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 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

상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA 의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA 의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 "상보적"은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 타겟(예컨대, CRBN 또는 AMPK γ 서브유니트)에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하는 것으로 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있으며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 보다 구체적으로는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 보다 구체적으로는 8 내지 60 염기이고, 가장 구체적으로는 10 내 40 염기이다.

본 발명에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(참조: WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914). siRNA 는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 넉다운

방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA 는 식물, 벌레, 초파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA 를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(Degot S, *et al.* 2002; Degot S, *et al.* 2004; Ballut L, *et al.* 2005).

본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 센스 가닥(예를 들어, CRBN 또는 AMPK α,β 또는 γ 서브유니트 mRNA 서열에 상응하는(corresponding) 서열)과 안티센스 가닥(예를 들어, CRBN 또는 AMPK α,β 또는 γ 서브유니트 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용될 수 있는 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다.

siRNA 는 RNA 끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 구체적으로는, 전체 길이는 10 내지 100 염기, 보다 구체적으로는 15 내지 80 염기, 그리고 보다 더 구체적으로는 20 내지 70 염기이다.

본 발명에서 용어 "shRNA(small hairpin RNA 또는 short hairpin RNA)"는 견고한 헤어핀 턴을 만드는 RNA 의 서열을 나타내며, 이는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 사일런스시키는 데 이용될 수 있다. shRNA 는 세포 도입용 벡터를 이용하며 shRNA 를 발현할 수 있는 U6 프로모터를 주로 이용한다. 이러한 벡터는 항상 딸세포로 전달되어 유전자 사일런싱이 유전될 수 있도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작(machinery)인 siRNA 로 분해되어 RNA-유도 사일런싱 복합체(RNA-induced silencing complex)에 결합된다. 상술한 복합체는 이에 결합된 siRNA 에 상응하는(matched) mRNA 에 결합하여 분해시킨다. shRNA 는 RNA 폴리머라제 III 에 의해 전사되며, 포유동물 세포에서 shRNA 생산은 세포가 shRNA 를 바이러스 공격으로 인식하여 방어 수단을 찾는 것처럼 인터페론 반응을 야기시킬 수도 있다. 또한, shRNA 는 식물 및 다른 시스템에서도 이용될 수 있으며 U6 프로모터가 반드시 필요한 것은 아니다. 식물의

경우에는 매우 강력한 연속적인 발현 능력을 보유한 전통적인 프로모터인 CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터가 이용될 수 있다.

본 명세서의 용어 "마이크로 RNA(microRNA, miRNA)"는 21-25 개의 뉴클레오타이드의 단일가닥 RNA 분자로서 mRNA(messengerRNA)의 3'-UTR 에 결합하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 물질을 나타낸다(Bartel DP et al., Cell. 2004 Jan 23;116(2):281-297). miRNA 의 생성은 Drosha(RNaseⅢ type 효소)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 miRNA(pre-miRNA)로 만들어지고, 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 성숙한 miRNA 로 만들어진다[Kim VN et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 May;6(5):376-385]. 상술한 바와 같이 제조된 miRNA 는 표적단백질의 발현을 조절함으로써 발생, 세포증식 및 사멸, 지방대사, 종양형성 등에 관여한다[Wienholds E et al., Science, 309(5732): 310-311(2005); Nelson P et al., Trends Biochem Sci., 28: 534-540(2003); Lee RC et al., Cell, 75: 843-854(1993); 및 Esquela-Kerscher A et al., Nat Rev Cancer. 6: 259-269(2006)].

이어, 시험물질이 처리된 동물에서 CRBN 뉴클레오티드 서열의 발현량을 측정한다. 발현량의 측정은 상술한 바와 같이 통상적인 방법을 통해 실시한다. 측정 결과, 상술한 CRBN 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제시키면 비만, 당뇨병 및 대사증후군 치료제로서 판단한다.

한편, 상기 시험물질이 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK α 서브유니트 간의 결합을 억제시키거나 또는 AMPK 복합체에 대한 γ 서브유니트의 친화성을 증가시키면 AMPK 활성제로 판단한다.

본 명세서의 용어 "AMPK 활성제(activators)"는 AMPK 가 타겟 기질(target substrates)을 인산화시키는 과정을 활성화시키는 제제를 의미하고, 본 명세서의 용어 "AMPK 억제제(inhibitors)"는 AMPK 가 타겟 기질을 인산화시키는 과정을 억제시키는 제제를 의미한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 AMPK 활성제는 지방합성과정(lipogenesis), 콜레스테롤 합성 및 글루코오스 생산을 억제한다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 본 발명의 AMPK 활성제는 비만, 당뇨병(보다 구체적으로는, 제 2 형 당뇨병), 고혈압 또는 심혈관질환에 대한 예방 또는 치료효과를 가진다.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 심혈관질환은 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 말초혈관질환 및 급성 허혈성 심혈관질환을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제는 화학적 치료제로서 이용되는 항암제의 활성을 극대화시키기 위해 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제와 함께 사용될 수 있는 항암제는 특별하게 제한되지는 않으며, 예를 들어, 항암화학요법 치료제는 치료제의 특성에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다: (a) 레날리도마이드(lenalidomide), 싸이클로포스프아미드(cyclophosphamide) 및 니트로소우레아(Nitrosourea) 같은 알킬화제(alkylating agents); (b) 플루오우라실(Fluouracil) 및 메토트렉세이트(Methotrexate) 같은 항대사제(antimetabolites); (c) 악티노마이신디(Actinomycin-D), 독소루비신(Doxorubicin), 아드리아마이신(Adriamycin), 미토마이신씨(Mitomycin-C) 및 블레오마이신(Bleomycin) 같은 항암항생제(antibiotics); (d) 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(vinorelbine) 및 에토포시드(Etoposide) 같은 식물성 알칼로이드(vinca alkaloids); (e) 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaloplatin) 같은 백금-포함 화합물(platinum-containing compounds); 파클리탁셀(상표명: 탁솔) 및 도세탁셀(상표명 탁소테르) 같은 텍세인 화합물; 또는 보르테조밉(bortezomib) 및 탈리도마이드(thalidomide) 같은 기타 항암제.

본 발명의 어떤 구현예에 따르면, 상술한 항암제와 본 발명의 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제를 이용하여 치료될 수 있는 암은 고환암, 난소암, 폐암, 두경부암, 방광암, 위암, 자궁 경부암, 소세포성폐암, 급성백혈병, 악성흑색종, 유방암, 간암, 림프종, 다발성골수종, 대장암, 췌장암, 육종,

갑상선암, 전립선암, 각종혈액종양 및 피부암을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 CRBN KO 마우스 및 이의 제조방법, 그리고 CRBN 유전자를 이용한 대사성 질환 치료제, 그리고 AMPK 활성제 또는 AMPK 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

(b) 본 발명의 CRBN KO 마우스는 AMPK(AMP-activated protein kinase)가 과다-활성화(hyper-activation)되어 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 나타낸다.

(c) 또한, 본 발명의 CRBN KO 마우스는 HFD(high-fat diet)-유도된 비만에 대한 억제효과 뿐만 아니라, HFD-유도된 지방간에 대한 저항성을 나타낸다.

(d) 따라서, 본 발명의 방법은 몸 전체(특히, 간)의 대사과정 및 에너지 항상성에 대한 연구 및 이해에 유용하게 적용될 수 있을 뿐 아니라, 대사성 질환(예컨대, 비만, 당뇨병, 대사증후군, 등) 또는 암의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 Crbn KO 마우스의 제조를 보여주는 결과이다. 도 1a 는 Crbn KO(Crbn -/-) 마우스의 제조에 이용된 벡터 컨스트럭트를 보여준다. 유전자형 분석을 위한 프라이머쌍이 P1, P2 및 P3 로 제시되어 있다. 도 1b 는 WT(Crbn +/+), 이종접합성 KO(Crbn +/-) 및 동종접합성(homozygous) KO(Crbn -/-) 마우스의 유전자형이 꼬리 게놈 DNA 를 이용한 RT-PCR 에 의해 측정되었다. 도 1c 는 Crbn +/+ 및 Crbn -/- 마우스의 간, 골격근(SKM) 또는 WAT 로부터 얻어진 단백질 추출물을 이용한 웨스턴 블랏팅 결과이다. β-액틴을 로딩 대조군으로서 이용되었다(n = 그룹 당 4 마리). 도 1d 는 각 성(수컷 및 암컷)의 WT 및 Crbn KO 마우스에서의 체중 변화를 보여주는 결과로 21 일부터 80 일까지 매일 모니터링하였다. 도 1e 는 Crbn +/+, Crbn +/- 및 Crbn -/-의 일차 MEFs 에서 내인성 AMPK α, P-AMPK α, ACC 및 P-ACC 의 단백질 레벨을 측정한 웨스턴 블랏팅

결과이다. GAPDH 는 로딩 대조군으로서 이용되었다. 상술한 결과는 4 개의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다. 도 1f 및 도 1g 는 도 1e 의 웨스턴 블랏팅 결과들의 밀도계측 분석을 통한 상대적인 밴드 강도를 보여주는 결과이다. 오차막대는 표준오차를 나타낸다. 도 1h 및 도 1i 는 AMPK α, AMPK β 및 AMPK γ 의 단백질 레벨을 밀도계측 분석으로 상대적인 밴드 강도로 보여주는 결과이다. 상술한 결과는 4 개의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다. 오차막대는 표준오차를 나타낸다.

도 2 는 Crbn -/- 간에서 증가된 AMPK 활성화를 보여주는 결과이다. 도 2a 는 Crbn +/+ 및 Crbn -/- 마우스의 간으로부터 추출된 단백질들이 SDS-PAGE 로 분리되어 항-AMPK α, 항-P-AMPK α 및 항-β-액틴 항체로 면역블랏팅된 결과이다. 9 주령된 수컷 마우스가 이용되었다(그룹 당 9 마리). β-액틴은 동등한 단백질 로딩양을 확인하기 위해 이용되었다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다. 도 2b 는 간 용해물이 제조되어 항-AMPK α, 항-P-AMPK α 및 항-β-액틴 항체로 웨스턴 블랏팅을 실시한 결과이다. 숫자는 체중(kg) 당 150 mg 의 투여량으로 메트포르민의 복강내 주입 후 경과된 시간을 나타낸다. 9 주령된 수컷 마우스가 이용되었다(그룹 당 5 마리). β-액틴은 동등한 단백질 로딩 양을 확인하기 위해 이용되었다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다. 도 2c 는 Crbn 결핍이 내인성 AMPK 를 활성화시키는 것으로 알려진 조건 하에서 AMPK 활성을 증가시킨다는 것을 보여주는 결과이다. 일차 MEFs(Crbn+/+, WT 마우스; Crbn+/-, 이종접합성 마우스; 또는 Crbn-/-, 동종접합성 마우스)가 혈청이 제거되고 3 시간 후에 영양성분-부재 배지(Hank's Buffered Salt Solution, HBSS; Gibco)에서 지정된 시간(10 분, 30 분 및 60 분) 동안 배양되었다. 용해물은 항-AMPK α 및 항-P-AMPK α 항체로 면역블랏팅되었다. GAPDH 는 동등한 단백질 로딩 양을 확인하기 위해 이용되었다. 상술한 결과는 4 개의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다. 아래 패널은 위쪽 웨스턴 블랏팅 결과의 밀도계측 분석을 통한 상대적인 밴드 강도를 보여주는 결과이다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다.

도 3 은 Crbn 결핍이 HFD-유도된 비만을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 3a 내지 도 3d 는 14 주의 실험 기간의 끝에 얻어진 정상적인 표준 음식 또는 HFD-식이된 마우스의 대표적인 이미지들이다. 도 3e 는 14 주의 실험 기간 동안 매주 모니터링된 정상적인 표준 음식 또는 HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스에서의 체중 변화를 보여주는 그래프이다. 도 3f 는 14 주 동안 HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스에서의 누적된 음식 소모를 보여주는 그래프이다. 도 3g 는 14 주 동안의 실험 기간의 끝에 얻어진 부고환 지방의 무게를 측정한 결과이다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 12-13 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ 및 $^{****}P < 0.001$). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.005$ 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$).

도 4 는 마우스 간에서 Crbn 결핍은 지방간을 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 도 4a 는 14 주의 실험 기간 후의 정상적인 표준 음식 또는 HFD-식이된 WT 또는 Crbn KO 마우스의 간 무게를 보여주는 결과이다. 도 4b 는 간 트리글라이세라드(TG) 레벨을 보여주는 결과이고, 도 4c 는 간 콜레스테롤 레벨을 보여주는 결과이다. 도 4d 내지 도 4g 는 지시된 마우스의 간 절편이 H&E 염색된 결과이다. 크기 막대 = 50 μm. 도 4h 내지 도 4k 는 지시된 마우스의 간 절편에서 지질이 Oil Red O 로 염색된 결과이다. 크기 막대 = 50 μm. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ 및 $^{****}P < 0.001$). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.005$ 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$).

도 5 는 HFD 식이 조건 하에서 Crbn-/- 마우스의 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 보여주는 결과이다. 도 5a 내지 도 5c 는 14 주의 실험 기간 후의 정상적인 표준 음식 또는 HFD-식이된 WT 또는 Crbn KO 마우스에서 혈장 글루코오스 농도(5a), 혈장 인슐린 농도(5b) 및 혈장 렙틴 농도(5c)를 측정한 결과이다. 도 5d 는 정상적인 표준 음식 또는

HFD-식이된 WT 또는 Crbn KO 마우스에서의 복강내 글루코오스 내성 테스트(GTT; 왼쪽 패널 그래프)와 인슐린 내성 테스트(ITT, 오른쪽 패널 그래프)를 보여주는 결과이다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 및 ****P < 0.001). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P$ < 0.05, $^{\dagger\dagger}P$ < 0.01, $^{\dagger\dagger\dagger}P$ < 0.005 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P$ < 0.001).

도 6 은 HFD-식이된 Crbn KO 마우스의 간에서 AMPK 활성화 및 ACC 억제가 보여진다는 것을 나타내는 결과이다. 도 6a 는 간 조직 용해물에서 AMPK α, P-AMPK α, Crbn, ACC, P-ACC, ACC1, FAS, SCD1 및 G6Pase 단백질 레벨을 보여주는 웨스턴 블랏팅 결과이다. β-액틴은 동등한 단백질 로딩양을 확인하기 위해 이용되었다. 별표는 비특이적 밴드들을 표시한다. 도 6b 내지 도 6h 는 도 6a 의 결과에서 각각 AMPK α 에 대한 인산화된 AMPK 의 비율, β-액틴에 대한 Crbn 의 비율, 총 ACC 에 대한 인산화된 ACC 의 비율, β-액틴에 대한 ACC 의 비율, β-액틴에 대한 FAS 의 비율, β-액틴에 대한 SCD1 의 비율 및 β-액틴에 대한 G6Pase 의 비율을 나타낸다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 및 ****P < 0.001). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P$ < 0.05, $^{\dagger\dagger}P$ < 0.01, $^{\dagger\dagger\dagger}P$ < 0.005 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P$ < 0.001).

도 7 은 간에서의 AMPK 업스트림 키나제들 발현이 Crbn KO 마우스에서 변함이 없다는 것을 보여주는 결과이다. 도 7A 는 간 조직 용해물에서 LKB1 및 CaMKKβ 단백질 레벨의 웨스턴 블랏팅 분석 결과이다. β-액틴은 동등한 단백질 로딩양을 확인하기 위해 이용되었다. 도 7B 및 도 7C 는 도 7A 의 결과에서 각각 β-액틴에 대한 LKB1 의 비율 및 β-액틴에 대한 CaMKKβ 의 비율을 보여주는 결과이다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이(*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005 및 ****P

< 0.001). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.005$ 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$).

도 8 은 Crbn 의 결실이 간 글루코오스 및 지질 대사과정에 포함된 유전자들의 손상된 발현을 초래한다는 것을 보여주는 RT-PCR 결과이다. 도 8A 내지 도 8O 는 다음의 유전자들의 발현을 조사하기 위해 지시된 마우스의 간 조직으로부터 추출한 총 RNA 를 이용한 정량적 실-시간 PCR 분석 결과이다: (A) *SREBP1C*(sterol regulatory element-binding protein-1c), (B) *ChREBP*(carbohydrate-responsive element-binding protein), (C) *PPARγ*(peroxisome proliferator-activated receptor gamma), (D) *FAS*(fatty acid synthase), (E) *DGAT2*(diacylglycerolacetyltransferase 2), (F) *ACC1*(acetyl-CoA carboxylase 1), (G) *SCD1*(stearoyl-CoA desaturase 1), (H) *PEPCK*(phosphoenolpyruvate carboxykinase), (I) *G6Pase*(glucose-6-phosphatase), (J) *FGF21*(fibroblast growth factor 21), (K) *HMGCS*(3' -hydroxylmethyl glutaryl coenzyme A synthase), (L) *Dhcr24*(24-dehydrocholesterolreductase), (M) *L-PK*(liver-type pyruvate kinase), (N) *HSL*(hormone-sensitive lipase) 및 (O) *Crbn*. 유전자의 발현은 β-액틴 mRNA 레벨에 대하여 표준화되었다. 증가 배수(fold changes)는 표준 음식 식이된 WT 마우스의 mRNA 레벨(임의적으로 1.0 세팅)에 대해 상대적인 mRNA 레벨로 나타내진다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ 및 $^{****}P < 0.001$). *정상적으로 표준 음식 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.005$ 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$).

도 9 는 우성-음성 AMPK 돌연변이의 과다발현이 Crbn 결실에 따른 AMPK 의 활성화를 억제한다는 것을 보여주는 결과이다. 일차 간세포가 WT 및 Crbn KO 마우스로부터 분리되었다. 간세포가 10 또는 30 의 MOI(multiplicity of infection)의 GFP (Ad-GFP)를 포함하는 아데노바이러스 또는 우성-음성 AMPK 돌연변이(Ad-DN-AMPK)로 감염되었다.

아데노바이러스 감염 후 24 시간 째에 글루코오스 생산 어세이를 실시하였다. 상술한 결과는 4 개의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다. 오차 막대들은 SEM 을 나타낸다(n = 그룹 당 9-10 마리). *Ad-GFP 로 감염된 WT 간세포와 비교하여 유의한 통계적 차이(***P < 0.005). †Ad-GFP 로 감염된 Crbn KO 간세포와 비교하여 유의한 통계적 차이(†††P < 0.005).

도 10 은 Crbn 이 AMPK α_1 및 AMPK α_2 와 상호작용한다는 것을 보여주는 결과이다. HEK293FT 세포에 각각 HA::Crbn 또는 HA 공벡터, 또는 Myc::AMPK α_1, Myc::AMPK α_2 또는 Myc 공벡터를 일시적으로 공동-트랜스펙션시켰다. 세포를 24 시간 동안 배양시킨 후 수거하여 세포에서 항-HA 항체를 이용하여 Crbn 단백질을 면역침전시켰다. 면역침전물에 대한 웨스턴 블랏팅은 항-Myc 또는 항-HA 항체로 실시하였다. 플러스 및 마이너스 표시는 각 단백질의 존재 또는 부존재를 나타낸다. 상술한 결과는 4 개의 독립적인 실험들의 대표적인 결과이다.

【실시예】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

연구 디자인 및 실험방법

세포 배양

마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum; Hyclone)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco)에서 배양하였다. Crbn+/+, Crbn+/- 및 Crbn-/- MEFs 는 이종접합성 이종교배(intercross)로부터 유래된 E14.5 배아들로부터 분리되어 이전에 보고된 바와 같이, 3-6 패시지에서 어세이되었다(Xu, J., Preparation, culture, and immortalization of

mouse embryonic fibroblasts. Curr Protoc Mol Biol Chapter 28, Unit 28 21(2005)).

타겟팅 벡터, ES 클론 및 Crbn KO 마우스의 제작

Crbn KO(knockout) 마우스를 제조하기 위해, 이종접합성(heterozygous) F1 동물들이 넉-아웃 마우스 서비스(Macrogen Inc., Seoul, Korea)에 의해 제공되었다. Crbn 유전자의 첫 번째 엑손을 포함하는 절편(1.1 kb)을 결실시키기 위해 이용된 타겟팅 벡터는 pOsdupdel 벡터로 라이게이션(ligation)된 5' 짧은 단편(short arm fragment, 2.6 kb; 서열목록 제 1 서열) 및 3' 긴 단편(long arm fragment, 7.3 kb; 서열목록 제 2 서열)을 이용하여 구축되었다. 상기 타겟팅 벡터는 1.1 kb 게놈 절편을 네오마이신 카세트(neomycin cassette)를 대체함으로써 구축되었다. 상기 절편들의 PCR 제조과정은 다음과 같다. 상기 5' 짧은 단편의 제조에 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머 서열, 5' -gctagcccaacctctgtggaacctat-3' ; 및 안티센스 프라이머 서열, 5' -ctcgaggggccgttggaatatagca-3' . 상기 프라이머를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR 을 수행하였다: (a) 전변성 단계, 94℃에서 5 분; (b) 35 사이클의 증폭 단계, 1 사이클 당 94℃에서 1 분, 63℃에서 2 분 및 72℃에서 2 분으로 구성; (c) 최종 연장 단계, 72℃에서 10 분; 및 (d) 4℃에서 저장. 상기 3' 긴 단편은 세 개의 단편(fragment) 나누어 클로닝된 후, 순차적으로 서브-클로닝(sub-cloning)되었다. 첫 번째 단편(1.8 kb; 서열목록 제 3 서열)의 제조에 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머 서열, 5' -gtcgacacagactattgccagagcc-3' ; 및 안티센스 프라이머 서열, 5' -tgccaagggcagagatgaaag-3' . 상기 프라이머를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR 을 수행하였다: (a) 전변성 단계, 94℃에서 5 분; (b) 35 사이클의 증폭 단계, 1 사이클 당 94℃에서 1 분, 63℃에서 2 분 및 72℃에서 2 분으로 구성; (c) 최종 연장 단계, 72℃에서 10 분; 및 (d) 4℃에서 저장. 두 번째 단편(2.4 kb; 서열목록 제 4 서열)의 제조에 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머 서열, 5' -agcacagtgtgtgtaagagcc-3' ; 및 안티센스 프라이머 서열, 5' -atgctgacttcctgtgggtga-3' . 상기 프라이머를 이용하여 다음과

같은 조건에서 PCR 을 수행하였다: (a) 전변성 단계, 94℃에서 5 분; (b) 35 사이클의 증폭 단계, 1 사이클 당 94℃에서 1 분, 65℃에서 2 분 및 72℃에서 2 분으로 구성; (c) 최종 연장 단계, 72℃에서 10 분; 및 (d) 4℃에서 저장. 세 번째 단편(3.2 kb; 서열목록 제 5 서열)의 제조에 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머 서열, 5'-atcctgattcctgggcagaca-3'; 및 안티센스 프라이머 서열, 5'-gcggccgcataacctacatcccagtgg-3'. 상기 프라이머를 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR 을 수행하였다: (a) 전변성 단계, 94℃에서 5 분; (b) 35 사이클의 증폭 단계, 1 사이클 당 94℃에서 1 분, 63℃에서 2 분 및 72℃에서 2 분으로 구성; (c) 최종 연장 단계, 72℃에서 10 분; 및 (d) 4℃에서 저장.

상술한 타겟팅 벡터(50 μg)를 마우스 ES 세포에 전기동공법으로 형질전환시킨 후, 젠타마이신(Gentamycin)과 간시클로비르(ganciclovir)를 이용한 이중 선택을 통해 912 개의 ES 클론을 수득하였다. 이중, 672 개의 ES 클론에 대한 유전자형 분석을 실시하였으며, 이로부터 추출된 게놈 DNA 를 *EcoR*I 으로 절단한 후, 야생형(wild-type; 6.8 kb) 및 돌연변이형(mutant type; 5.0 kb) 프로브를 이용한 서던 블랏팅을 통해 2 개의 타겟팅된 ES 클론을 확인하였다. 서던 블랏팅을 위해 이용한 상기 프로브 부위는 5' 짧은 단편의 업스트림에 위치한 부위(830 bp; 서열목록 제 6 서열)를 이용하였으며, 이를 위해 이용된 프라이머 서열은 다음과 같다: 센스 프라이머 서열, 5'-cagtgcactgtcgtcagttgt-3'; 및 안티센스 프라이머 서열, 5'-catggtctagtccatcacacc-3'. 상기 프라이머 및 정상 C57BL/6N 마우스 꼬리로부터 추출된 게놈 DNA 를 템플레이트로 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR 을 수행하였다: (a) 전변성 단계, 94℃에서 5 분; (b) 35 사이클의 증폭 단계, 1 사이클 당 94℃에서 1 분, 64℃에서 1 분 및 72℃에서 1 분으로 구성; (c) 최종 연장 단계, 72℃에서 10 분; 및 (d) 4℃에서 저장.

상기 타겟된 ES 세포(targeted ES cell)를 마이크로인젝션(microinjection)을 통해 배반포(blastocyst) 424 개에 주입하여 대리모에 이식하여 태어난 37 마리의 카이메라-마우스(F0) 중 수컷은 총 22 마리였다. 카이메리즘(chimerizm)이 높은 17 마리의

수컷(예컨대, 100%-70%)을 각각 정상 C57BL/6N 마우스 암컷과 교배하였다. 그 결과, 본 발명의 마우스 카이메라(chimera)는 90%였으며, 상기 카이메라-마우스 교배를 통해 총 14 마리가 태어났으며, 총 7 마리의 형질전환된 마우스 F1(모색; agouti)을 확인하였다. 상기 형질전환 F1 마우스들(모색; agouti)로부터 추출된 게놈 DNA 를 제한 효소(restriction enzyme) *SphI* 으로 절단하여 서던 블랏팅(야생형, 13.4 kb; 및 돌연변이-형, 10.4 kb)을 실시한 결과, 3 마리의 이종접합성 마우스(F1)을 확인하였다.

이후, 본 연구 전에 이종접합성 F1 동물들은 C57BL/6N 마우스와 최소 10 세대 이상 역교배하였다. 이후, 이종접합성 수컷 및 암컷이 교배되어 Crbn KO 마우스를 제조하였다. WT 및 Crbn KO 마우스의 유전형은 WT 및 Crbn KO 마우스의 테일 게놈 DNA 및 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR 을 통해 결정되었다(참고: 도 1a 내 P1, P2 및 P3 프라이머).

실험 동물

마우스는 병원체-결핍 조건에서 임의적 표준 음식 식이요법(chow diet) 및 물로 유지되었으며, 12 시간의 빛-암(light-dark) 사이클의 사육실에서 사육되었다. 비만 및 인슐린-저항성 표현형을 유도하기 위해, 5 주령된 수컷 마우스(n = 그룹 당 12-13 마리)는 개별적으로 14 주 동안 HFD(Research Diet D12492)로 사육되었다. 체중 및 음식 섭취(intake)는 실험기간 동안 기록되었다. 음식 섭취는 7 일의 기간 동안 음식 무게의 차이를 측정함으로써 결정되었다. 모든 실험들은 광주과기원 동물실험윤리위원회(Gwangju Institute of Science and Technology Animal Care and Use Committee)에 의해 승인되었다.

인슐린 민감성

글루코오스 내성 테스트는 16 시간의 단식 후 마우스에 체중 당 2 g 의 투여량(2 g/kg of body weight)으로 D-글루코오스(Sigma)를 복강 내 주입을 통해 실시되었다. 인슐린 내성 테스트는 4 시간의 단식 후 마우스에 체중 당 0.75 U 의 투여량(0.75 U/kg of body weight)으로 인간 인슐린(Sigma)을 복강 내 주입을 통해 실시되었다. 혈액 시료들은 꼬리

정맥(tail vein)을 통해 수집되었으며, 혈장 글루코오스 레벨이 글루코메터(glucometer; Roche Diagnostics)를 이용하여 측정되었다.

간의 조직학적 분석

14 주째에 마우스가 희생되어 이들의 간이 10% 포르말린(Sigma-Aldrich)에 고정되어 파라핀(McCormick)에 임베드되었다. 파라핀 절편들(5 ㎛)이 H&E 염색되었다. 동결절편들(cryosections)이 Oil Red O (Sigma-Aldrich)로 염색되고 헤마톡실린(Sigma-Aldrich)으로 카운터염색되어 지질 방울들(lipid droplets)이 시각화되었다.

정량적 실-시간 PCR(qPCR) 분석

총 RNA 가 지정된 마우스의 간 조직으로부터 제조자의 프로토콜에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 추출되었다. 발현은 β-액틴 mRNA 의 레벨을 이용하여 표준화되었다. PCR 분석에 이용된 프라이머의 서열들은 표 1에 기재되어 있다.

【표 1】

PCR 분석에 이용된 프라이머의 서열들.

유전자 이름	프라이머 서열(5' ->3')	
CRBN[1)]	정방향	AGACCAGCGAACTCCCCTTA (P1)
	역방향	GGTGGCAGATCAGTACACCG (P2)
CRBN[2)]	정방향	AGACCAGCGAACTCCCCTTA (P1)
	역방향	GCGTGCAATCCATCTTGTTC (P3)
CRBN	정방향	AGCATGGTGCGGAACTTAATC
	역방향	ATCTCTGCTGTTGTCCCAAAC
β-액틴	정방향	GAAATCGTGCGTGACATCAAAG
	역방향	TGTAGTTTCATGGATGCCACAG
SREBP1C	정방향	TGCGTGGTTTCCAACATGAC
	역방향	TGGCCTCATGTAGGAATACCCT

ChREBP	정방향	CCAGCCTCAAGGTGAGCAAA
	역방향	CATGTCCCGCATCTGGTCA
FAS	정방향	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT
	역방향	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG
ACC1	정방향	ATTGGGCACCCCAGAGCTA
	역방향	CCCGCTCCTTCAACTTGCT
SCD1	정방향	AGATCTCCAGTTCTTACACGACCAC
	역방향	GACGGATGTCTTCTTCCAGGTG
PPAR γ	정방향	AAGGCGAGGGCGATCTTG
	역방향	ATCATTAAGGAATTCATGTCGTAGATGAC
DGAT2	정방향	TTCCTGGCATAAGGCCCTATT
	역방향	AGTCTATGGTGTCTCGGTTGAC
PEPCK	정방향	CTCAGCTGCATAACGGTCTG
	역방향	CTTCAGCTTGCGGATGACAC
G6Pase	정방향	TCTGTCCCGGATCTACCTTG
	역방향	GTAGAATCCAAGCGCGAAAC
FGF21	정방향	GTGTCAAAGCCTCTAGGTTTCTT
	역방향	GGTACACATTGTAACCGTCCTC
HMGCS	정방향	GCCGTGAACTGGGTCGAA
	역방향	GCATATATAGCAATGTCTCCTGCAA
Dhcr24	정방향	GGC GAG ACG CTA CGC AAG CT
	역방향	TGG GCA CAG CCA GAT GGG GT
L-PK	정방향	CTGGAACACCTCTGCCTTCTG
	역방향	CACAATTTCCACCTCCGACTC
HSL	정방향	CCGAGATGTCACAGTCAATGGA
	역방향	CCAGGCCGCAGAAAAAAG

[1]WT 대립형질의 유전자형 분석용(genotyping) 프라이머; 및 [2]타겟된 대립형질의 유전자형 분석용 프라이머. 지정되지 않은 모든 다른 프라이머들은 실-시간(real-time) PCR 실험들에 이용되었다. 모든 프라이머들은 마우스(*Mus musculus*)용으로 디자인되었다.

마우스의 유전자형 분석은 RT-PCR 을 이용하여 실시하였다. PCR 증폭은 Crbn+/+, Crbn+/- 및 Crbn-/-로부터 얻어진 DNA(0.01-100 ng)를 템플레이트로 이용하여 10 mM Tris HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 250 μM dNTPs, 1U 의 Taq 폴리머라제, 1.5 mM $MgCl_2$, 뉴클레아제-부재 물 및 10 pmole 의 각 프라이머를 포함하는 50 ㎕의 반응 용액에서 실시하였다. PCR 반응 조건은 95℃에서 5 분 동안 초기 변성한 후, 94℃에서 40 초 동안 변성하는 단계, 53℃에서 1 분 동안 어닐링하는 단계 및 72℃에서 2 분 동안 연장하는 단계를 포함하는 35 사이클을 수행하고 72℃에서 10 분 동안 추가 연장하였다. PCR 증폭은 PTC-220 DNA 엔진 다이아드 PCR 기계(MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)에서 실시하였다. 앰플리콘들을 1% SeaKem LE 아가로오스 젤(FMC Bioproducts, Philadelphia, PA, USA)에서 전기영동한 후 EtBr 염색으로 시각화하였다.

한편, qPCR 증폭은 1 ㎕의 각 템플레이트 DNA, 10 pmole 의 각 프라이머, 7 ㎕의 뉴클레아제-부재 물 및 10 ㎕의 SYBR 그린 마스터 혼합물(Finnzymes Inc., Woburn, MA, USA)를 포함하는 20 ㎕의 반응 용액에서 실시하였다. 모든 증폭은 DNA 엔진 OPTICON™ 2 시스템(MJ Research, Waltham, MA, USA)의 광학용 96-웰 플레이트에서 실시하였다. PCR 반응 조건은 95℃에서 15 분 동안 초기 변성한 후, 94℃에서 10 초 동안 변성하는 단계, 60℃에서 30 초 동안 어닐링하는 단계 및 72℃에서 30 초 동안 연장하는 단계를 포함하는 40 사이클을 수행하고 72℃에서 5 분 동안 추가 연장하였다. 95℃부터 65℃까지 0.1℃/초의 속도로 연속적인 형광 데이터를 획득하며 PCR 증폭함으로써 융해곡선(melting curve) 분석을 실시하였다. 모든 시료들은 세 번에 걸쳐서 분석되었다. 1.5% SeaKem LE 아가로오스 젤에서의 전기영동 및 EtBr 염색을 통해 qPCR 앰플리콘들을 확인하였다.

통계 분석

모든 값은 평균값±표준오차(standard error of the mean, SEM)로 표현되었다. 그룹들 간의 통계적으로 유의한 차이는 양쪽꼬리 비쌍(two-tailed unpaired) Student's t-test 를 이용하였으며, 복수의 비교는 반복측정(repeated-measures) 일원 또는 이원 분산분석(one-way or two-way ANOVA)으로 실시되었다. $P < 0.05$ 의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 고려되었으며 도면 설명에 기재되어 있다.

실험결과

Generation of Crbn KO 마우스의 제조 및 유전자형 분석

Crbn 의 *인 비보* 기능을 조사하기 위해, Crbn KO 마우스가 제조되었다(도 1a). Crbn KO 마우스의 꼬리로부터 얻은 게놈 DNA 의 PCR 분석을 통해, 야생형(WT) 유전자의 소실과 타겟팅 벡터의 존재를 확인하였다(도 1b). CRBN 단백질은 간, 골격근(skeletal muscle, SKM) 또는 백색지방조직(white adipose tissue, WAT)에서 검출되지 않았으며(도 1c), 웨스턴 블랏팅에 의해 테스트된 모든 다른 조직에서도 검출되지 않았다. 젖을 땐 시기(weaning)부터 12 주령까지 정상 식이요법으로 사육된 수컷 및 암컷 KO 마우스의 체중이 WT 마우스의 체중과 날마다 비교되었다(도 1d).

본 발명자들의 이전 연구는 CRBN(서열목록 제 7 서열, NC_000072.6; 및 서열목록 제 8 서열, NP_780566)이 AMPK 의 α_1 서브유니트(AMPK α_1)와 직접적으로 상호작용함으로써 *인 비트로*에서 AMPK 의 활성화를 억제한다는 것을 보였다(4). 따라서, 본 연구는 Crbn 결핍이 AMPK 활성화에 영향을 미치는 지 여부를 조사하였다(도 1e). 먼저, AMPK Thr172 의 인산화가 MEFs(primary mouse embryonic fibroblasts)에서 측정되었다. 인산화된 AMPK α(P-AMPK α)의 양은 Crbn +/- 및 Crbn -/- MEFs 에서 증가하였다(도 1f). ACC 는 AMPK 활성화 후 세린 79 의 인산화에 의해 불활성화된다. 이에, 본 발명자들은 인산화된 ACC(P-ACC)의 레벨을 측정하였다. P-AMPK 의 증가는 Crbn +/+ MEFs 와 비교하여 Crbn +/- 및 Crbn -/- MEFs 에서 더 높은 P-ACC 레벨과 상응하였다(도 1g). AMPK 와 내인성 CRBN 의 결합은 AMPK 복합체 내 γ 서브유니트의 양을 감소시킨다고 이전에 알려져

있었다(4). 따라서, AMPK 복합체에 대한 Crbn KO 의 효과가 MEFs 로부터 내인성 AMPK 복합체를 면역침전시켜 테스트되었다. AMPK β 밴드의 강도는 크게 변함이 없었으나(도 1h), γ1 서브유니트의 밴드 강도는 Crbn +/+ MEFs 와 비교하여 Crbn +/- 및 Crbn -/- MEFs 모두에서 현저하게 더 높았다(도 1i). 상술한 결과들은 AMPK 복합체에 대한 γ1 서브유니트의 친화성(affinity)을 감소시킴으로써 CRBN 이 AMPK 활성화를 억제한다는 가설(4)을 지지해준다.

AMPK 는 Crbn KO 마우스에서 활성화된다

Crbn 결핍이 *인 비보*에서 AMPK 의 기능에 영향을 미치는 지 여부를 테스트하기 위해, AMPK 의 효소 활성이 마우스 간에서 인산화 상태를 측정함으로써 평가되었다. AMPK 인산화는 WT 보다 Crbn KO 마우스에서 8.2 배 더 높았다(도 2a). 추가적으로, Crbn KO 의 효과가 내인성 AMPK 를 활성화시키는 것으로 알려진 조건에서 조사되었다(13, 14). 메트포르민(metformin) 주입 후, AMPK 인산화의 레벨은 WT 및 Crbn KO 마우스에서 시간-의존적으로 증가하였다. 하지만, P-AMPK α 의 레벨은 WT 보다 Crbn KO 마우스에서 더 높았다(도 2b). 유사한 결과들이 혈청-결핍된 조건 하에서 배양된 일차 MEFs 에서도 나타났다(도 2c). 전체적으로, 상술한 결과들은 AMPK 가 *인 비보*에서 Crbn 의 부재 하에서 과다활성화된다는 것을 나타내는데, 이는 Crbn 이 AMPK 의 내인성 음성 조절자로서 기능한다는 것을 의미한다.

Crbn 결핍은 HFD-유도된 비만에 대한 보호 효과를 가진다

*인 비보*에서 Crbn 의 생리학적 역할(들)을 이해하기 위해, WT 및 Crbn KO 마우스가 정상적인 표준 음식 식이요법 또는 HFD 로 사육되었다(도 3a 및 도 3b). WT 보다 Crbn KO 마우스에서 HFD-유도된 무게 증가가 더 늦었으며 체중 증가 레벨이 더 낮았다. HFD 로 식이된 WT 마우스의 체중은 2 주차부터 표준 음식 식이된 마우스의 체중보다 현저하게 더 높은 반면에, Crbn KO 마우스의 체중은 7 주차에 돼서야 유의하게 더 무거웠다(도 3e). WT 및 Crbn KO 마우스의 HFD-유도된 체중 증가 상의 차이는 이들의 음식 소모(consumption)에 기인하지 않았다(도 3f). Crbn KO 마우스의 초기

평균 체중도 WT 마우스의 평균 체중과 유의하게 다르지 않았다(도 3e 및 표 2).

【표 2】

본 연구에서 이용된 마우스의 표현형질 파라미터 및 mRNA 레벨.

파라미터	WT-Chow	CRBN KO-Chow	WT-HFD	CRBN KO-HFD
마우스의 수	12	12	12	13
시작 체중(g)	15.01±0.16	15.09±0.45	15.31±0.42	15.26±0.59
최종 체중(g)	26.05±0.25	26.79±0.65	43.01±1.03††††	33.69±1.93****††
증가된 체중(g)	11.04±0.16	11.7±0.36	27.7±0.84††††	18.43±1.96****††
부고환 지방(g)	0.6±0.03	0.32±0.02****	2.74±0.09††††	1.02±0.36****†
간 질량(g)	0.98±0.03	1.09±0.04	1.38±0.08††††	1.14±0.05*
대사 프로파일				
간 TG(mg/g)	99.32±7.43	56.97±6.99***	143.65±9.13†††	91.02±12.77***†
간 콜레스테롤(mg/g)	17.51±0.60	16.65±0.66	24.88±0.97††††	22.84±0.99††††
혈장 글루코오스(mg/dl)	71.71±3.01	74.00±5.16	118.14±6.2††††	82.75±3.54***
혈장 인슐린(ng/ml)	0.49±0.08	1.19±0.32	7.95±1.23††††	1.9±0.6*
혈장 렙틴(ng/ml)	2.03±0.66	1.04±0.38	38.26±4.81††††	8.93±3.77*†
혈장 TG(mg/dl)	45.59±4.95	63.14±6.44	54.68±3	46.63±6.6
혈장 콜레스테롤(mg/dl)	58.98±1.81	65.28±1.54	134.35±8.66††††	124.23±12.52††††
혈장 유리지방산(mmol/dl)	0.34±0.07	0.43±0.06	0.37±0.03	0.26±0.04*†
혈장 레시스틴(ng/ml)	0.83±0.08	1.06±0.07	2.73±0.22††††	2.02±0.42*†
혈장 아디포넥틴(μg/ml)	10.71±1.03	11.07±1.05	12.85±0.55	11.82±0.92
혈장 TNF-α(pg/ml)	9.12±0.45	9.39±0.18	8.66±0.18	9.19±0.16
혈장 MCP-1(pg/ml)	30.95±0.88	33.72±1.49	29.59±0.61	30.16±1.2
혈장 PAI-1(ng/ml)	0.36±0.07	0.32±0.05	0.52±0.13	0.58±0.09
간 mRNAs				
SREBPIC	1.00±0.08	0.88±0.10	1.26±0.09	1.06±0.19

ChREBP	1.00±0.06	0.83±0.05	0.92±0.05	0.89±0.05
PPARγ	1.00±0.07	0.47±0.07	1.12±0.07	0.56±0.05
FAS	1.00±0.09	0.58±0.10*	2.19±0.17††††	0.82±0.10****
DGAT2	1.00±0.04	0.77±0.07*	0.99±0.09	0.78±0.03*
ACC1	1.00±0.05	0.89±0.06	1.02±0.09	0.63±0.06***††
SCD1	1.00±0.12	0.97±0.06	1.06±0.10	0.29±0.03****††††
PEPCK	1.00±0.11	0.86±0.11	1.02±0.05	1.00±0.08
G6Pase	1.00±0.09	0.56±0.07***	1.15±0.06	0.64±0.15**
FGF21	1.00±0.20	0.81±0.16	10.28±1.53††††	3.05±0.94***
HMG-CoA synthase	1.00±0.12	1.72±0.19*	1.88±0.22††	1.42±0.24
Dhcr24	1.00±0.04	0.97±0.08	1.07±0.06	1.04±0.06
L-PK	1.00±0.12	0.90±0.04	1.77±0.08†††	0.82±0.18****
HSL	1.00±0.05	0.99±0.07	0.94±0.08	0.94±0.07
CRBN	1.00±0.05	0±6.21E-04****	1.91±0.03††††	0±6.39E-04****

데이터는 평균±표준오차로 표시된다. *동일하게 식이된 WT 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.005$ 및 $^{****}P < 0.001$). *정상적으로 식이된 동일한 유전형을 가진 마우스와 비교하여 유의한 통계적 차이($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.005$ 및 $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.001$).

WT 및 Crbn KO 마우스에 대한 부검을 실시한 결과, HFD 로 식이된 Crbn KO 마우스는 WT 보다 더 낮은 부고환 지방(epididymal fat mass)을 가진다는 것을 확인할 수 있었다(도 3c 및 도 3d). HFD 로 식이된 지 14 주 후에, WT 마우스의 평균 부고환 지방은 Crbn KO 마우스보다 2.7 배 더 증가하였다. 표준 음식으로 식이된 Crbn KO 마우스는 WT 보다 더 낮은 부고환 지방을 가졌다(도 3g). 상술한 결과들은 Crbn 이 결핍된 마우스가 고지방 섭취에 따라 야기된 체내 지방 축적 및 비만에 대해 더 우수한 보호 효과를 나타냈다는 것을 의미한다.

Crbn KO 마우스는 식이요법-유도된 지방간에 대한 저항성을 가진다

다음으로, Crbn KO 마우스에서 간의 형태 및 지질 함량에 대한 HFD 효과가 테스트되었다. HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스로부터 얻어진 간 조직을 비교한 결과, WT 간 조직이 Crbn KO 마우스의 간 조직보다 더 크고 무겁고 엷었다(도 3d 및 도 4a). 간 트리글라이세라이드(triglyceride, TG) 함량은 WT 보다 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 현저하게 더 낮았다. 또한, TG 함량은 WT 보다 표준 음식 식이된 Crbn KO 마우스에서 더 낮았다(도 4b). 간 콜레스테롤 레벨도 표준 음식 식이된 경우와 비교하여 HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스에서 더 높았다(도 4c).

상술한 결과들과 일치하게도, 간 절편(sections)에 대한 H&E(hematoxylin and eosin) 염색은 HFD-식이된 WT 마우스의 간 조직이 염색되지 않는 지질봉입체(lipid inclusions)를 포함하고 상기 지질봉입체는 HFD-식이된 Crbn KO 마우스의 간 조직에서는 덜 풍부하다는 것을 보여줬다(도 4d). 더욱이, Oil Red O 염색은 지방간의 특징(hallmark)인 중성지질의 대량 축적이 HFD-식이된 WT 마우스의 간에서 일어나고 HFD-식이된 Crbn KO 마우스의 간에서는 일어나지 않는다는 것을 추가적으로 확인시켜 주었다(도 4d). 따라서, Crbn 결핍은 부고환 및 간 조직에서 지방 축적을 억제함으로써 정상적으로는 고지방 섭취로 인해 야기되는 지방간에 대한 간의 저항성을 더욱 증진시켰다.

HFD-식이된 Crbn KO 마우스는 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 보인다

Crbn KO 마우스는 HFD-유도된 비만 및 지방간에 대해서 잘 보호되었다. 이에, 본 발명자들은 이들의 대사성 파라미터들을 조사하였다. HFD 로 식이된 경우, WT 마우스는 혈장 글루코오스, 인슐린 및 렙틴(leptin)의 레벨에서 표준 음식-식이된 마우스보다 현저하게 더 높았는데(도 5a 내지 도 5c), 이는 손상된 인슐린 민감성을 나타낸다. 하지만, HFD-식이된 Crbn KO 마우스가 HFD-식이된 WT 마우스보다는 명백하게 낮은 레벨의 혈장 글루코오스, 인슐린 및 렙틴(leptin)을 함유하였다. 또한, 다른 혈장 대사성 파라미터들도 표준 음식- 또는 HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스에서 측정되었다(표 2). 상기 2 가지

식이요법 조건 하에서, WT 및 Crbn KO 마우스는 TG, 콜레스테롤, 레지스틴(resistin), 아디포넥틴(adiponectin), TNF-α, MCP-1 및 PAI-1 의 혈청 내 레벨이 유사하였다. 이와 대조적으로, 비-에스테리화된 혈청 유리지방산(free fatty acid, FFA)의 레벨은 WT 보다 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 더 낮았는데(결과를 보이지 않음), 이는 지방간을 가진 제 2 형 당뇨병 환자들이 실질적으로 더욱 높은 인슐린-내성을 가지고 더 높은 레벨의 혈장 FFA 을 나타낸다는 이전의 보고(15)와 일치하는 결과이다. 또한, 증가된 글루코오스 내성 및 인슐린 민감성도 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 확인되었다(도 5d). 상술한 결과들은 Crbn 결핍이 정상적으로는 장기간 HFD 에 의해 유도되는 글루코오스 불내성(intolerance) 및 인슐린 저항성을 억제할 수 있다는 것을 보여준다.

Crbn 결핍은 간에서 지질 대사 및 글루코오스 대사를 변화시킨다

HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 관찰된 표현형 변화에 대한 분자적 기초를 설명하기 위해, 여러 대사성 효소들의 발현 프로파일링을 조사하고, AMPK 활성화도 모니터링하였다. 이전의 연구들(16, 17)과 동일하게도, P-AMPK 의 레벨이 HFD-식이된 마우스에서 더 낮았다(도 6a). 총 AMPK 발현 레벨은 표준 음식 또는 HFD-식이된 WT 및 Crbn KO 마우스 간에 차이가 없는 반면에, P-AMPK 는 HFD-식이된 WT 마우스보다 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 현저하게 더 높았다(도 6b). 더 나아가, 총 ACC 에 대한 P-ACC 의 비율은 AMPK α 활성화의 레벨과 일치하였다(도 6d). AMPK 의 과다-인산화(hyper-phosphorylation)에도 불구하고 AMPK 업스트림 키나제들인 LKB1 및 CaMKKβ 의 발현 레벨은 Crbn KO 마우스 및 WT 마우스에서 유사한 수준이었는데(도 7 의 A-C), 이는 상술한 키나제들이 Crbn KO 마우스에서 AMPK 활성화에 포함되지 않았다는 것을 의미한다.

지방형성 과정의 주요 조절인자인 *SREBP1C* 및 *ChREBP*(18, 19)의 발현은 모든 그룹들에서 통계적으로 차이를 나타내지 않았다(도 8 내 A 및 B). 하지만, 지방형성 전사인자인 *PPARγ*(20, 21)의 발현은 WT 마우스와 비교하여 표준 음식 또는 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 뚜렷하게 더 낮았다(도 8 내 C). 지방산 합성에 포함된 FAS 및 TG 합성의 최종 단계를 촉매하는 속도-제한 효소(rate-limiting enzyme)인 DGAT2(22, 23)의 발현은

WT 마우스와 비교하여 표준 음식 또는 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 감소되었다(도 8 내 D 및 E). 상술한 결과들은 간 TG 의 레벨이 WT 마우스와 비교하여 표준 음식 또는 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 더 낮았다는 결과(도 4b)와 일치하는 것이다. *ACC1* 및 *SCD1* mRNA 의 발현 레벨은 HFD-식이된 WT 마우스보다 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 명백히 더 낮았다(도 8 내 F 및 G). *PEPCK* 의 발현은 변함없는 것과는 대조적으로, *G6Pase* 의 발현은 WT 마우스와 비교하여 표준 음식 및 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 뚜렷하게 더 낮았다(도 8 내 H 및 I). 해당과정에 포함된 핵심 효소인 *L-PK* 의 발현은 HFD-식이된 WT 마우스에서 현저하게 더 높았다. 하지만, 이의 상향조절은 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 완전히 사라졌다(도 8 내 M). 상기 결과는 혈청 글루코오스 레벨과 일치하는데(도 5a), 이는 L-PK 유전자 전사가 글루코오스와 인슐린에 의해 양성적으로 조절되기 때문이다(24, 25). 또한, AMPK 활성화 패턴(도 6a)은 *L-PK* 및 *G6Pase* 의 상호간 mRNA 발현 패턴과 일치하는데(도 8 내 M 및 I), AMPK 활성화는 *L-PK*(25, 26) 및 *G6Pase*(27)의 발현을 억제한다. *FGF21* 의 발현은 표준 음식-식이된 WT 보다 HFD-식이된 WT 마우스에서 10.3 배 더 높았는데(도 8 내 J), 이는 비만이 FGF21-저항성 상태로 간주된다는 것을 보여주는 이전의 보고와 일치한다(28). 하지만, *FGF21* 발현은 표준 음식-식이된 Crbn KO 마우스보다 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 3.7 배 정도만 높았다. 콜레스테롤 합성에 포함되어 있는 *HMGCS* 의 mRNA 발현 레벨은 표준 음식-식이된 WT 마우스와 비교하여 HFD-식이된 WT 마우스에서 1.8 배 더 높았다(도 8 내 K). 예상밖으로, 표준 음식-식이된 Crbn KO 마우스에서의 *HMGCS* 발현은 표준 음식-식이된 WT 마우스보다 1.7 배 더 높았다. 표준 음식-식이된 Crbn KO 마우스에서의 *HMGCS* 발현 유도는 WT 및 Crbn KO 마우스의 관찰된 표현형들과 상관관계를 나타내지 않았다. 이는 간 항상성을 유지하기 위해 보상적 유전자 유도 때문인 것으로 추론할 수 있다. 콜레스테롤 합성에 포함된 *Dhcr24* 및 지방분해과정에 포함된 HSL(hormone sensitive lipase)의 발현은 변화가 없었다(도 8 내 L 및 N). ACC1, FAS, SCD1, G6Pase 및 Crbn 단백질 발현 패턴(도 6a, 6c, 및 6e-6h)은 mRNA 발현 프로파일과 일치하였다(도 8). 또한, ACC1 의 발현이 표준 음식-식이된 WT 과 비교하여 HFD-식이된 WT

마우스에서 증가하였다(도 6e). 전체적으로, 상술한 결과들은 Crbn 의 파괴가 많은 핵심 대사성 유전자들의 발현에 영향을 미친다는 것을 보여준다. HFD 에 의해 상향조절되는 여러 지방합성 및 포도당합성(gluconeogenic) 단백질들의 발현이 Crbn KO 마우스의 간에서 현저하게 더 낮았는데, 이는 AMPK 의 지속적 활성화에 의해 설명될 수 있다(23, 25-27, 29).

추가논의사항

Crbn 은 식물과 동물 간에 진화적으로 보존되어 있으며, 많은 포유동물 조직들에서 폭넓게 발현된다. AMPK 의 신규한 조절인자로서 Crbn 의 *인 비보* 기능을 확인하기 위해, Crbn KO 마우스가 제조되었다. Crbn KO 마우스는 심대한 형태 또는 기본적인 행동 상에 뚜렷한 결점을 나타내지 않으며 생존가능하였다.

배양된 세포주에서 내인성 CRBN 의 이전 넉-다운 연구(4)에서 제시된 바와 같이, 테스트된 Crbn KO 마우스의 모든 조직들에서 내인성 AMPK 가 정상 조건 하에서 지속적으로 과다활성화되었다. 따라서, 여러 파라미터들(체중, 지방간, 글루코오스 항상성, 인슐린 내성 및 대사성 파라미터들)에 대한 Crbn 결핍의 효과는 평가하기 전에 Crbn KO 마우스는 HFD 로 식이되었다. 개략적으로, HFD-식이된 Crbn KO 마우스는 HFD-식이된 WT 대조군 마우스와 비교하여 대사성 프로파일들에서 유의한 개선을 보였다. 또한, Crbn KO 마우스는 14 주의 HFD 식이 후에도 대사성 증후군의 징후를 나타내지 않았다. 부고환 조직 및 간에서의 지방 축적도 KO 마우스에서는 현저하게 감소하였다. 따라서, Crbn KO 마우스에서 AMPK 의 과다활성은 지질 및 글루코오스 항상성, 그리고 인슐린 민감성에서의 전체적인 개선에 주요한 기여자라는 것이 가설로 세워졌다. HFD-식이된 WT 마우스의 간에서 Crbn 발현이 현저하게 상향조절되었지만, P-AMPK 의 발현은 그에 상응하여 하향조절되었다는 것이 흥미로운 점이었다. 상술한 발견은 Crbn 이 인 비보에서 AMPK 의 기능적 활성을 음성적으로 조절할 수도 있다는 본 발명자들의 이전 예측과 일치하였다(4).

간이 전체적인 에너지 상태를 조절하는 데 핵심 역할을 하고 AMPK 는 탄수화물 및 지질 대사과정에 포함된 간 효소들의 변화와 상응되기 때문에,

최근 연구는 간 및 간 대사과정에서 Crbn KO 의 효과에 집중되었다. 간 AMPK 의 활성화는 지방합성과정(lipogenesis), 콜레스테롤 합성 및 글루코오스 생산을 억제한다(7, 8, 30). HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 관찰된 *FAS*, *ACC1*, *SCD1*, *PPARγ* 및 *DGAT2* 를 포함하는 지방합성 조절인자들의 더 낮은 발현은 간 지방합성과정의 억제가 지방 축적의 더 낮은 레벨에 기여할 수 있다는 것을 나타낸다. G6Pase 의 간 발현이 HFD-식이된 Crbn KO 마우스에서 더 낮았는데, 이는 더 낮은 레벨의 포도당합성을 보여준다. 상술한 발견들과 일치하게도, 글루코오스 및 인슐린 내성 테스트는 HFD-식이된 Crbn-결핍 마우스에서 정상 수준으로의 회복을 나타냈다. Ad-DN-AMPK 을 이용한 감염 결과, 일차 Crbn KO 간세포의 글루코오스 생산(output)은 Ad-GFP 로 감염된 Crbn KO 간세포와 비교하여 투여량-의존적으로 증가하였다(도 9). 종합해 보면, 상술한 결과는 간에서 Crbn KO 가 지방합성 및 포도당합성과정을 감소시키는 일차 기작은 단백질 인산화를 통해 AMPK 및 ACC 활성을 조절함으로써 기능하고 이는 전부는 아닐지라도 최소한 그 일부로서 기능한다는 것을 의미한다. 더 나아가, HFD-식이된 WT 마우스에서 P-AMPK 발현이 감소됨에 따라 Crbn 발현 레벨이 증가하였기 때문에 Crbn 단백질 및 P-AMPK 의 레벨은 *인 비보*에서 강한 상관관계(correlation)를 나타냈다.

표준 음식-식이된 Crbn KO 마우스에서 핵심 대사성 유전자들의 발현 상에 매우 현저한 변화들이 나타냈는데, 이는 정상 조건 하에서 Crbn 의 생리학적 역할을 제시해준다. 예를 들어, *FAS*, *PPARγ* 및 *DGAT2* 같은 지방합성 유전자들 및 *G6Pase* 를 포함하는 포도당합성 유전자의 발현은 현저하게 더 낮았다. 상술한 발견들과 일치하게도, 간 TG 레벨 및 부고환 지방 질량(mass)이 정상-식이된 WT 보다 정상-식이된 Crbn KO 마우스에서 더 낮았다. 하지만, 체중, 간 무게, 간 형태, 간 절편, 글루코오스 내성 및 인슐린 민감성을 포함하는 형태적 표현형은 HFD 시작 전에 WT 및 Crbn KO 마우스에서 유사하였다. 따라서, Crbn 결핍은 HFD 같은 여러 병리생리학적 조건들 하에서 대사성 증후군 표현형에 대한 더 우수한 내성을 부여하였지만, 정상 생리학적 조건들에서는 차이가 없었다.

본 발명자들의 이전 보고에서, AMPK α_1 은 CRBN-결합 단백질로서 동정되었다(4). AMPK α 서브유니트의 2 가지 이소형(isoforms)인 AMPK

α_1 및 AMPK α_2,은 포유동물에서 발견된다(31). 각 α 서브유니트 이소형을 포함하는 AMPK 복합체들은 간에서 총 AMPK 활성 측면에서 동등하게 나타났다(26). 최근 연구는 AMPK α_2 와 Crbn 간의 상호작용을 조사하였다. AMPK α_1 또는 AMPK α_2 에 대한 Crbn 의 결합 친화성에서 차이가 없었는데(도 10), 이는 AMPK α_1 내 잠재적인 Crbn-결합 위치가 394-422 번째 아미노산 서열을 포함하는 부위 내에 위치(4)하고 상기 부위가 AMPK α_2(388-417 번째 아미노산 서열을 포함하는 부위)에서도 매우 높은 보존성을 나타내기 때문이다. 상술한 결과들은 Crbn 이 아형에 상관없이 세포 내 AMPK를 조절할 수 있다는 것을 의미한다.

AMPK 의 Crbn-의존성 억제가 다른 생명체, 특히 인간에서도 보존되어 있는 지를 결정하는 것이 매우 중요하다. 본 발명자들의 이전 연구는 AMPK 활성이 인간, 래트 및 마우스 세포주에서 외인성 Crbn 의 발현에 의해 억제된다는 것을 증명하였다(4). 따라서, CRBN 에 의한 AMPK 의 음성적 조절이 인간에서도 존재할 것으로 예상된다. 최근에, 인간의 3p26-25 부위에 위치한 *CRBN* 이 비만 및 인슐린에 대한 타겟 유전자로서 동정되었다. CRBN 유전자에 인접한 여러 SNP 들(single nucleotide polymorphisms)이 인간 및 마우스에서 중심성 비만 및 고혈압과 연관되어 있는데(32), 이는 대사성 증후군에서 CRBN 의 잠재적인 임상 관련성을 보여준다.

하지만, 여러 가지 중요한 의문점들이 여전히 남아있다. 먼저, Crbn 유전자 발현의 조절이 이해되지 않고 있다. *Crbn* 발현은 장기간 HFD 에 의해 상향조절되었다(도 6c 및 도 8 내 O). 상기 관찰 결과는 *Crbn* 이 HFD 에 의해 유도되고 CRBN 은 *in vivo*에서 음성-피드백 루프(negative-feedback loop)를 통해 AMPK 활성을 조절한다는 것을 의미한다. 흥미롭게도, 적어도 3 개의 잠재적인 SRE(sterol regulatory element)와 한 개의 잠재적인 PPARγ 결합 위치가 마우스 Crbn 유전자의 -850 업스트림 프로모터 부위 안에 존재한다. 상술한 2 개의 전사인자들은 지방합성과정을 조절하는데, 이는 *Crbn* 발현의 영양성분-의존적 조절 기작에 대한 이해를 제공할 수 있다. 둘째로, AMPK 가 다른 기관(organ)에서 Crbn 에 의해 어떻게 조절되는 지는 불명확하다. AMPK 의 생리학적 역할은 지방조직 및 SKM 같은 다른 기관에서 확립되어 있지만, Crbn KO 마우스에서 대사성 표현형에 있어서 상기 기관들의 기여도를

구별하는 것이 불가능하였다. WAT 및 SKM 에서 AMPK 의 활성화는 WT 마우스와 비교하여 Crbn KO 마우스에서 더 높았다(결과를 보이지 않음). 따라서, 대사과정과 연관된 다른 기관들이 Crbn KO 마우스의 간과 유사한 방식으로 영향받을 수 있다.

간은 글루코오스 항상성 및 지질 대사과정을 유지하는 데 핵심 센터로서 간주되고 있어서 간 대사과정의 정상 생리학 및 병리생리학을 이해하는 것이 몸 전체(whole-body) 대사과정을 이해하는 데 필수적이다(7, 9, 26). 테스트된 많은 조직들 중에서, AMPK 활성은 뇌 및 SKM 에서 가장 낮고 간에서 가장 높다(33). AMPK 의 음성 조절인자인 Crbn 의 결실이 왜 Crbn KO 마우스의 간에 가장 큰 영향을 미치는 지를 용이하게 알 수 있게 해 준다. 또한, 간 기능 상의 변화는 몸 전체 대사과정에 뚜렷하게 영향을 미치고 제 2 형 당뇨병 및 대사성 증후군을 포함하는 대사성 질환들의 발병을 초래할 수 있다(7, 9). 따라서, 간 대사과정에서 Crbn 의 기능에 대한 본 발명자들의 연구는 분자생물학적 수준에서 정상 및 병적 상태 동안 Crbn 의 생리학적 기능에 대한 보다 진보된 이해를 위한 첫 번째 단계일 수 있다.

요약하면, 본 발명자들의 연구는 Crbn 이 AMPK 활성화를 음성적으로 조절하고 Crbn 결핍이 HFD 에 의해 야기된 비만, 지방간 및 인슐린 내성으로부터 마우스를 보호한다는 *인 비보* 증거를 최초로 제공한다. 따라서, CRBN 은 몸 전체 대사과정 및 에너지 항상성에 대한 신규한 조절인자일 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술 하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

1. Higgins JJ, Pucilowska J, Lombardi RQ, Rooney JP: A mutation in a novel ATP-dependent Lon protease gene in a kindred with mild mental retardation. Neurology 2004;63:1927-1931

2. Jo S, Lee KH, Song S, Jung YK, Park CS: Identification and functional characterization of cereblon as a binding protein for large-conductance calcium-activated potassium channel in rat brain. J Neurochem 2005;94:1212-1224

3. Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H: Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. Science 2010;327:1345-1350

4. Lee KM, Jo S, Kim H, Lee J, Park CS: Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon. Biochim Biophys Acta 2011;1813:448-455

5. Hardie DG: AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:774-785

6. Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG: Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. J Biol Chem 1996;271:27879-27887

7. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, Hebrard S, Lantier L, Mounier R, Andreelli F, Foretz M: AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. Acta Physiol (Oxf) 2009;196:81-98

8. Shackelford DB, Shaw RJ: The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nat Rev Cancer 2009;9:563-575

9. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F: Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. J Physiol 2006;574:41-53

10. Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR, 3rd, Young LH, Shulman GI: Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. Diabetes 2001;50:1076-1082

11. Hardie DG: AMP-activated protein kinase as a drug target. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:185-210

12. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E: Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab 2006;3:403-416

13. Dasgupta B, Milbrandt J: Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 2007;104:7217-7222

14. Ramamurthy S, Ronnett GV: Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. J Physiol 2006;574:85-93

15. Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC: Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003;285:E906-916

16. Kim EJ, Yoon YS, Hong S, Son HY, Na TY, Lee MH, Kang HJ, Park J, Cho WJ, Kim SG, Koo SH, Park HG, Lee MO: Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha-induced activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase results in attenuation of hepatic steatosis. Hepatology 2012;55:1379-1388

17. Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R, Federici M: Mice heterozygous for tumor necrosis factor-alpha converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes. Diabetes 2007;56:2541-2546

18. Shimano H: Sterol regulatory element-binding protein-1 as a dominant transcription factor for gene regulation of lipogenic enzymes in the liver. Trends Cardiovasc Med 2000;10:275-278

19. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS: SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest 2002;109:1125-1131

20. Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B: PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. Ann N Y Acad Sci 2002;967:7-18

21. Lehrke M, Lazar MA: The many faces of PPARgamma. Cell 2005;123:993-999

22. Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV, Jr.: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:13018-13023

23. Niu Y, Li S, Na L, Feng R, Liu L, Li Y, Sun C: Mangiferin decreases plasma free fatty acids through promoting its catabolism in liver by activation of AMPK. PLoS One 2012;7:e30782

24. Vaulont S, Munnich A, Decaux JF, Kahn A: Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver. J Biol Chem 1986;261:7621-7625

25. da Silva Xavier G, Leclerc I, Salt IP, Doiron B, Hardie DG, Kahn A, Rutter GA: Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:4023-4028

26. Viollet B, Athea Y, Mounier R, Guigas B, Zarrinpashneh E, Horman S, Lantier L, Hebrard S, Devin-Leclerc J, Beauloye C, Foretz M, Andreelli F, Ventura-Clapier R, Bertrand L: AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. Front Biosci 2009;14:19-44

27. Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, Saintillan Y, Grondin P, Kahn A, Thorens B, Vaulont S, Viollet B: Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. Diabetes 2005;54:1331-1339

28. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, Bina HA, Kharitonenkov A, Flier JS, Maratos-Flier E: Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. Diabetes 2010;59:2781-2789

29. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F: Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. J Physiol 2006;574:41-53

30. Fryer LG, Carling D: AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. Biochem Soc Trans 2005;33:362-366

31. Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE: Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. J Biol Chem 1996;271:611-614

32. Kraja AT, Lawson HA, Arnett DK, Borecki IB, Broeckel U, de Las Fuentes L, Hunt SC, Province MA, Cheverud J, Rao DC: Obesity-insulin targeted genes in the 3p26-25 region in human studies and LG/J and SM/J mice. Metabolism 2012;[Epub ahead of print]

33. Davies SP, Carling D, Hardie DG: Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. Eur J Biochem 1989;186:123-128

【청구의 범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 인간을 제외한 CRBN KO(cereblon knockout) 동물의 제조방법:

(a) 야생형 CRBN 유전자 결실용 선형화된 타겟팅 벡터(linearlized targeting vector)를 ES 세포(embryonic stem cells)에 형질전환(transfection)시키는 단계로,

상기 야생형 CRBN 결실용 선형화된 타겟팅 벡터는 5' to 3' 방향으로 5' 짧은 단편(short arm fragment), CRBN 유전자 결실용 목적 단편(fragment of interest) 및 3' 긴 단편(long arm fragment)을 포함하며 상기 CRBN 유전자 결실용 목적 단편은 11개의 CRBN 엑손 중 하나 이상의 엑손을 포함하는 CRBN 유전자 타겟팅 부위(targeting region)를 대체할 수 있는 단편으로 선택 카세트(selection cassette)를 포함하고 상기 5' 짧은 단편(short arm fragment) 및 3' 긴 단편(long arm fragment)은 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위의 5' 업스트림 및 3' 다운스트림 뉴클레오타이드 서열이며;

(b) 상기 단계 (a)에서 얻어진 형질전환된 ES 세포를 배반포 세포(blastocyst)에 주입(injection)하고 자궁에 이식하여 이종접합성(heterozygous) F1 동물을 얻는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 얻어진 이종접합성 F1 동물과 정상 동물을 역교배(backcross)하는 단계로, 상기 역교배는 최소 10세대 이상 실시하며; 및

(d) 상기 단계 (c)를 통해 얻어진 이종접합성 수컷 및 암컷을 교배하여 CRBN KO 동물을 얻는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 형질전환은 상기 선형화된 타겟팅 벡터가 상동 재조합(homologous recombination)을 통해 상기 ES 세포의 염색체 내로 통합되는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 CRBN 유전자 타겟팅 부위는 1-2 kb의 크기인 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 CRBN 유전자 타겟팅 부위는 CRBN 유전자의 엑손 1을 포함하는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 5' 짧은 단편 및 3' 긴 단편은 각각 2-4 kb 및 6-10 kb의 크기인 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 선택 카세트는 형질전환 확인용 선택 마커(selection marker)를 포함하는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 선택 카세트는 네오마이신 카세트(neomycin cassette)를 포함하는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 ES 세포 및 상기 단계 (b)의 배반포 세포는 포유동물로부터 수득되는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 포유동물은 마우스, 래트, 기니어 피그, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 또는 고양이를 포함하는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 10】

제 1 항에 있어서, 상기 CRBN KO 동물은 AMPK(AMP-activated protein kinase)가 과다-활성화(hyper-activation)되어 있는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 11】

제 1 항에 있어서, 상기 CRBN KO 동물은 HFD(high-fat diet)-유도된 비만에 대한 억제효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 12】

제 1 항에 있어서, 상기 CRBN KO 동물은 HFD-유도된 지방간에 대한 저항성을 나타내는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 13】

제 1 항에 있어서, 상기 CRBN KO 동물은 개선된 글루코오스 항상성 및 인슐린 민감성을 나타내는 것을 특징으로 하는 CRBN KO 동물의 제조방법.

【청구항 14】

제 1 항의 야생형 CRBN 유전자 결실용 선형화된 타겟팅 벡터(linearlized targeting vector)로 형질전환된 인간을 제외한 CRBN KO ES 세포(embryonic stem cells).

【청구항 15】

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 CRBN KO 동물.

【청구항 16】

다음의 단계를 포함하는 비만, 당뇨병 및 대사증후군(metabolic syndrome) 치료제의 스크리닝 방법:

(a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을

포함하는 동물에 비만, 당뇨병 또는 대사증후군을 유도하는 단계;

(b) 상기 동물에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및

(c) 상기 동물에서 CRBN 유전자의 발현을 분석하는 단계를 포함하는 비만, 당뇨병 및 대사증후군 치료제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 동물에서 CRBN 유전자의 발현을 억제시키면 비만, 당뇨병 및 대사증후군 치료제로 판단한다.

【청구항 17】

제 16 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 비만, 당뇨병 또는 대사증후군의 유도는 HFD(high-fat diet)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 18】

제 16 항에 있어서, 상기 시험물질은 CRBN의 발현 억제를 통해 AMPK의 과다-활성화를 유도하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 19】

제 16 항에 있어서, 상기 시험물질은 *PPARγ*, *FAS*, *DGAT2*, *G6Pase*, *L-PK* 또는 *HMGCS*의 발현을 추가적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 20】

다음의 단계를 포함하는 AMPK 활성제(activators)의 스크리닝 방법:

(a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 AMPK α, β 및 γ 서브유니트를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK 서브유니트들 간의 결합을 분석하는 단계를 포함하는 AMPK 활성제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK α 서브유니트 간의 결합을 억제시키거나 또는 AMPK 복합체에 대한 γ 서브유니트의 친화성을 증가시키면 AMPK 활성제로 판단한다.

【청구항 21】

제 20항에 있어서, 상기 AMPK 활성제는 지방합성과정(lipogenesis), 콜레스테롤 합성 및 글루코오스 생산을 억제하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 22】

제 20 항에 있어서, 상기 AMPK 활성제는 비만, 당뇨병, 고혈압 또는 심혈관질환에 대한 예방 또는 치료효과를 가지는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 23】

제 22항에 있어서, 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

【청구항 24】

제 22 항에 있어서, 상기 심혈관질환은 대사증후군, 증후군 X, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 대동맥 협착증 또는 대동맥류 같은 대동맥 질환, 말초혈관질환 또는 급성 허혈성 심혈관질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

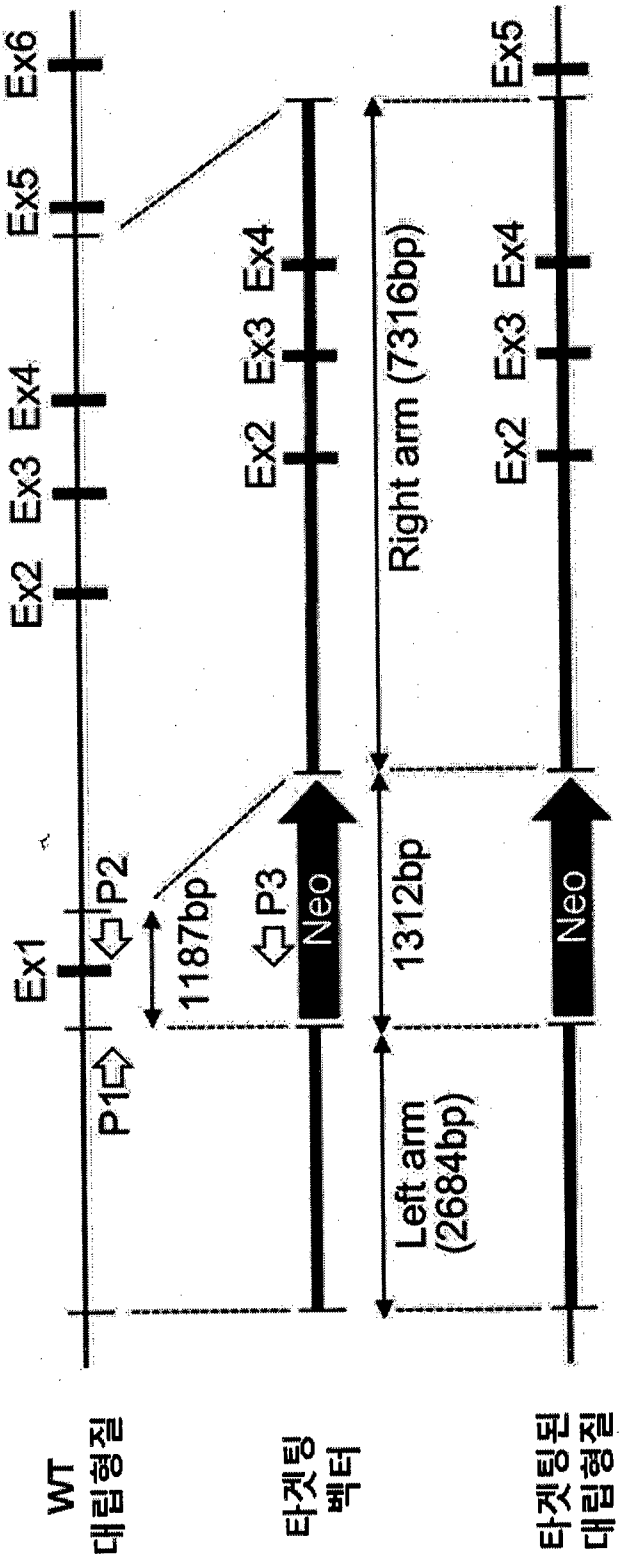
【청구항 25】

다음의 단계를 포함하는 AMPK 억제제(inhibitors)의 스크리닝 방법:

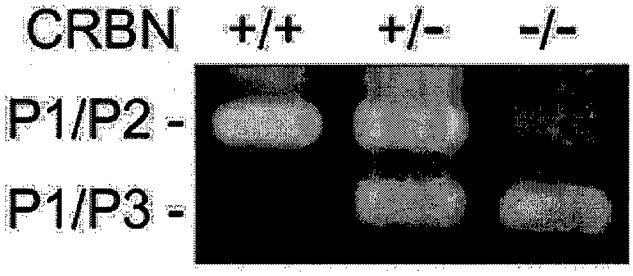
(a) CRBN(cereblon) 유전자를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 AMPK α, β 및 γ 서브유니트를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열들을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK 서브유니트들 간의 결합을 분석하는 단계를 포함하는 AMPK 억제제의 스크리닝 방법으로, 상기 시험물질이 상기 세포에서 CRBN 단백질과 AMPK α 서브유니트 간의 결합을 촉진시키거나 또는 AMPK 복합체에 대한 γ 서브유니트의 친화성을 저해시키면 AMPK 억제제로 판단한다.

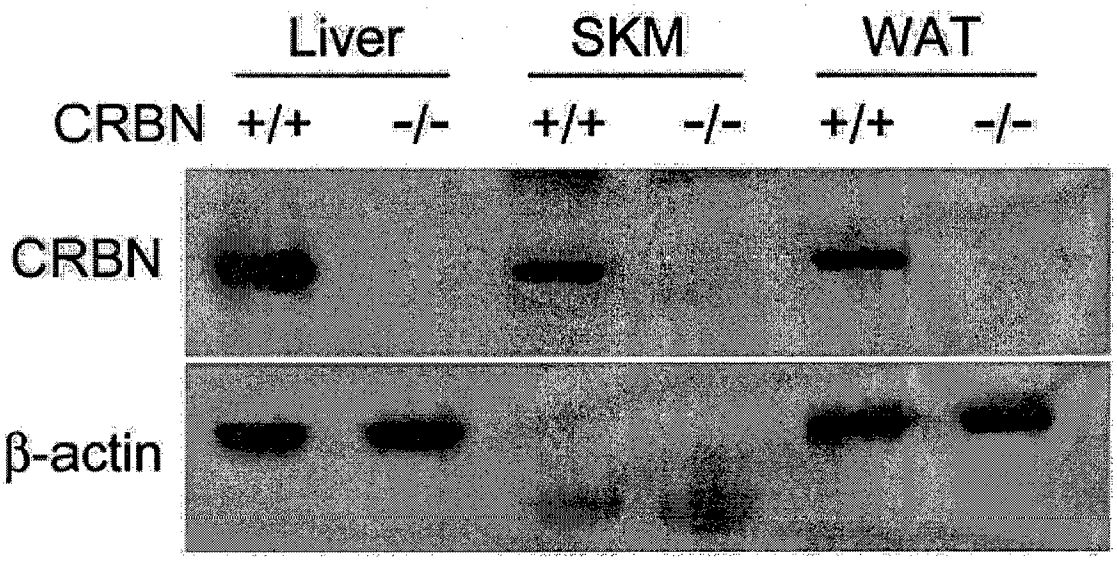
도 1a


Ex6
Ex5
Ex4
Ex3
Ex2
Ex1
P1
P2
1187bp
P3
Neo
Right arm (7316bp)
1312bp
Left arm (2684bp)
Ex5
Ex4
Ex3
Ex2
Neo
WT 대립형질
타겟팅 벡터
타겟팅된 대립형질

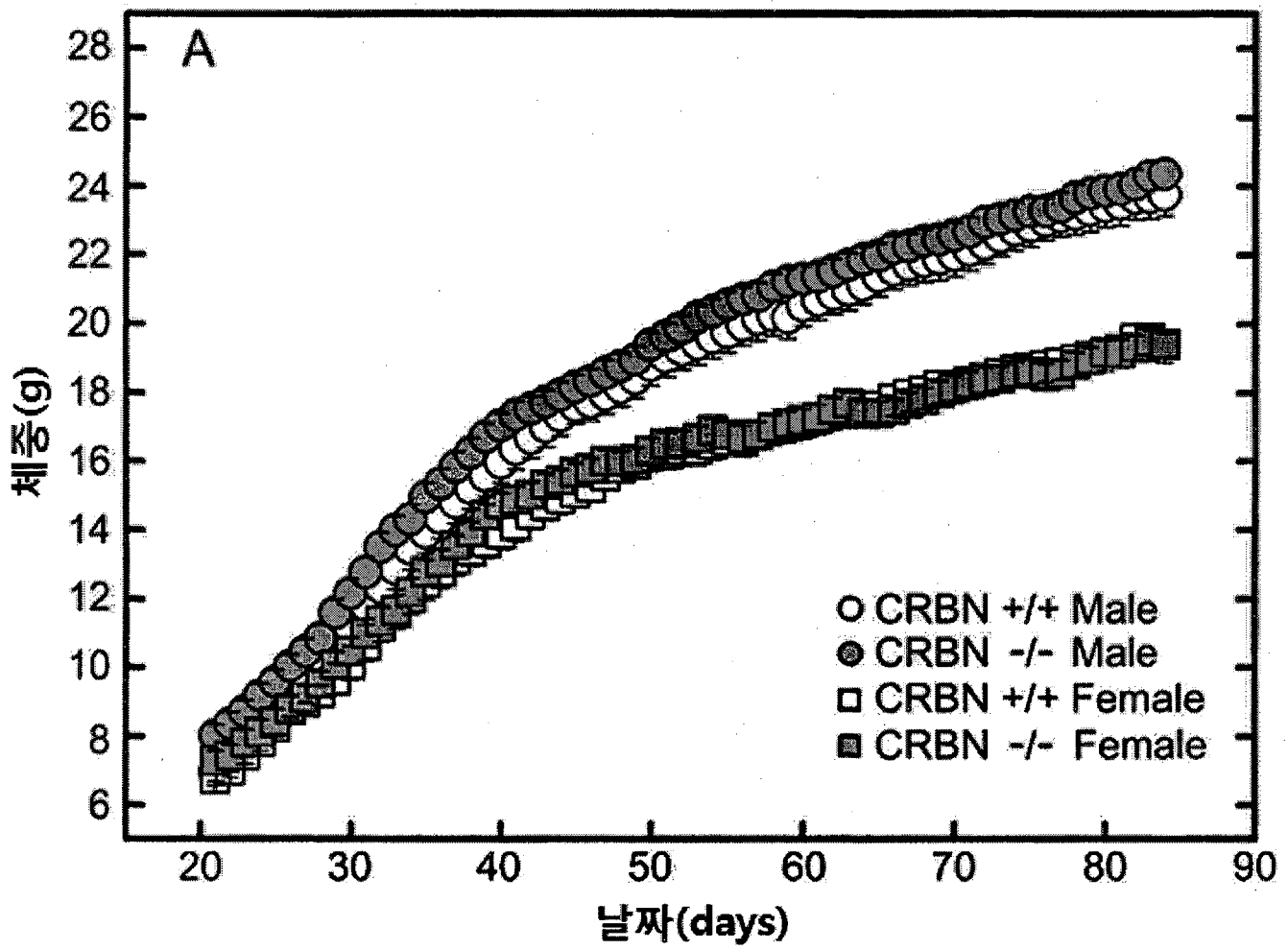
도 1b



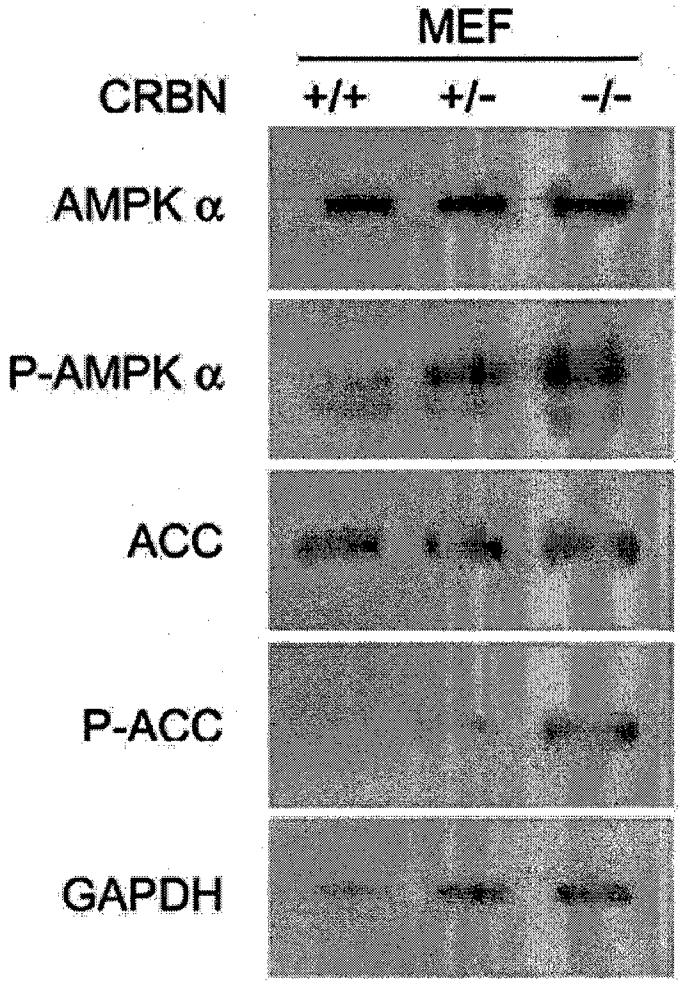
도 1c



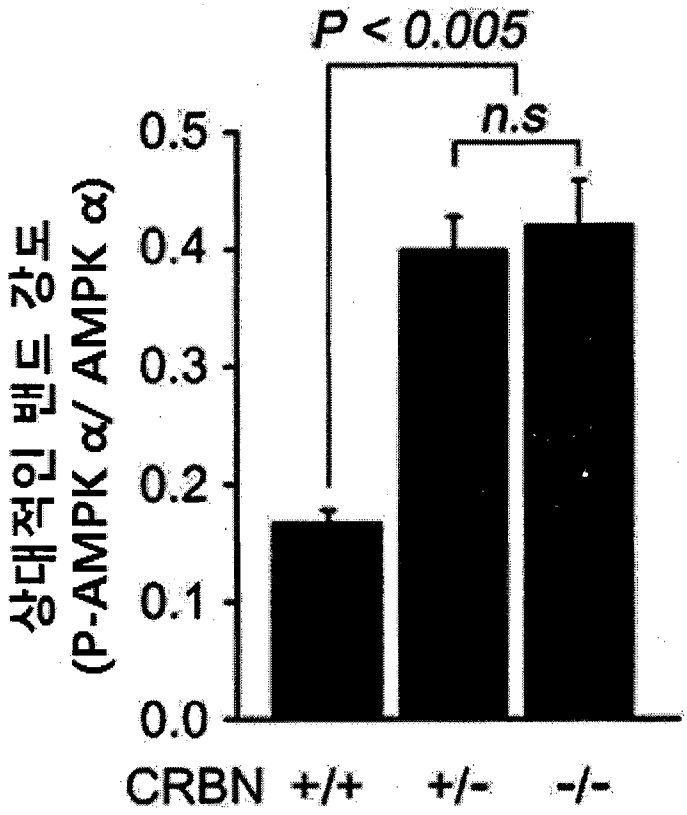
도 1d



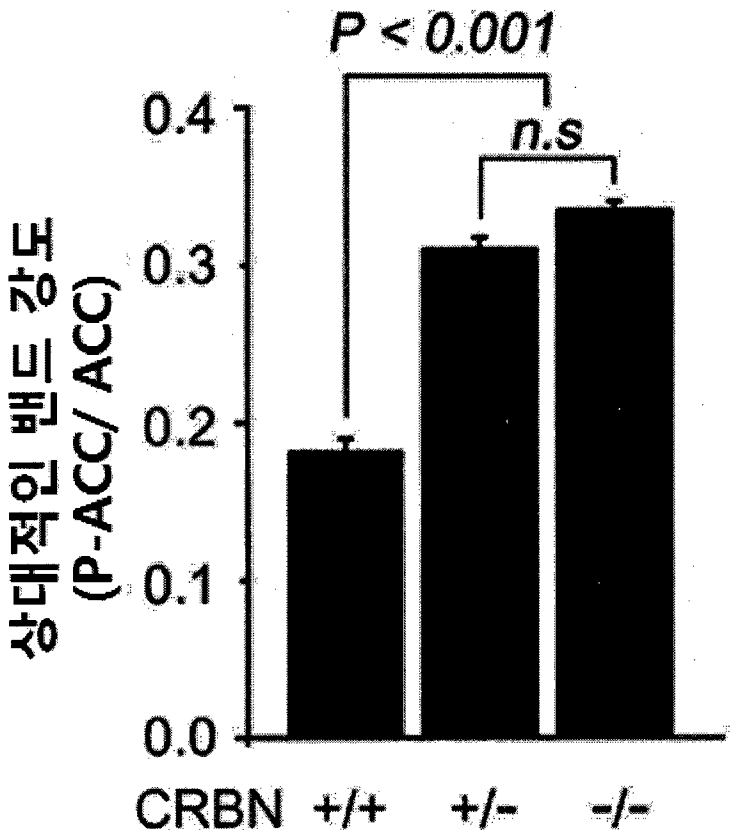
도 1e



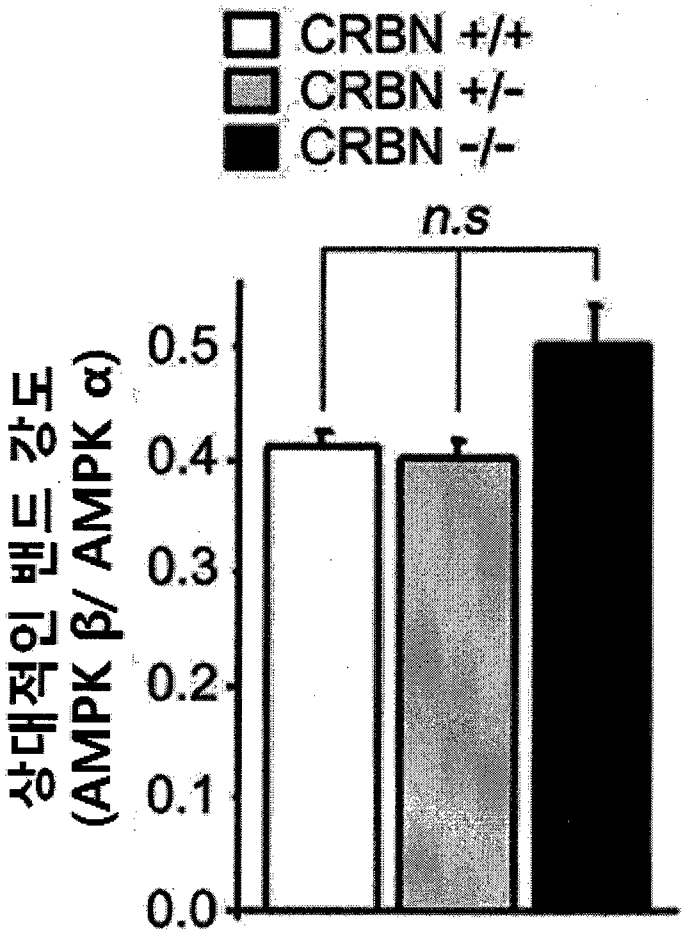
도 1f



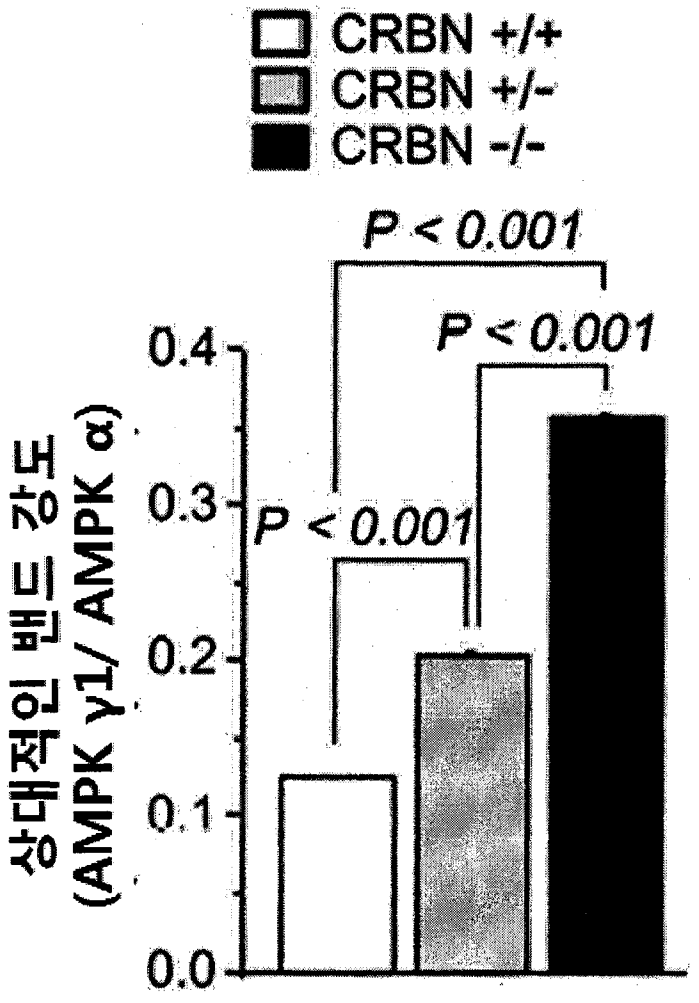
도 1g



도 1h

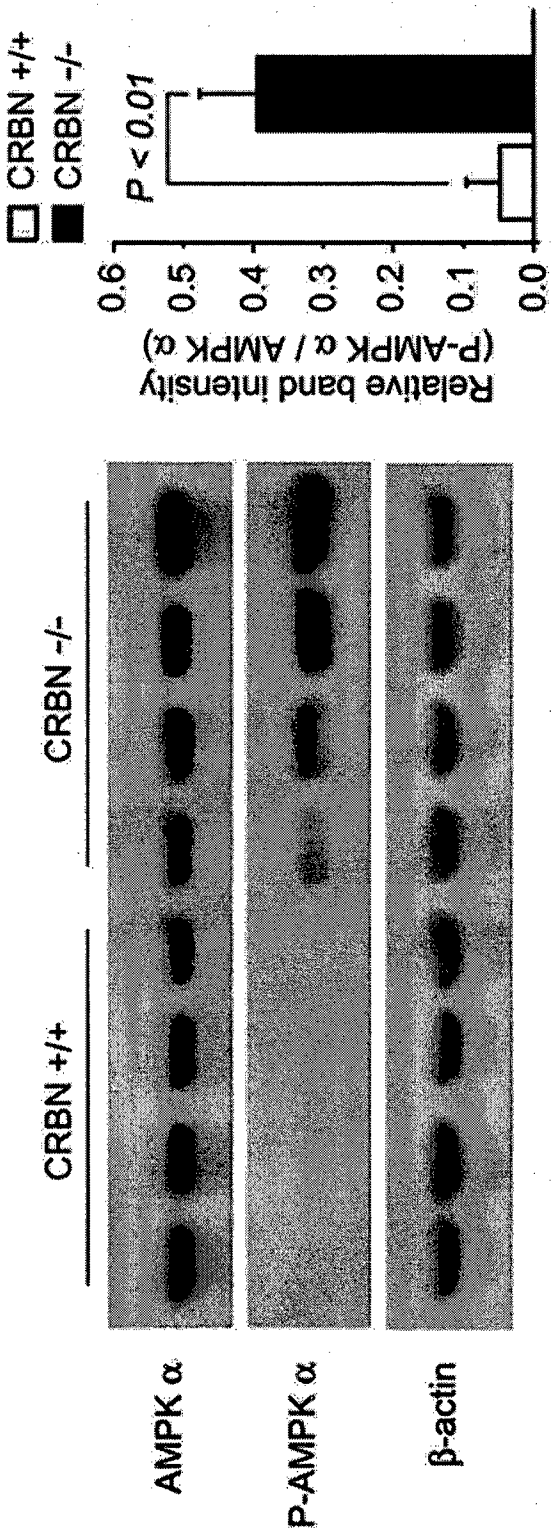


도 1i

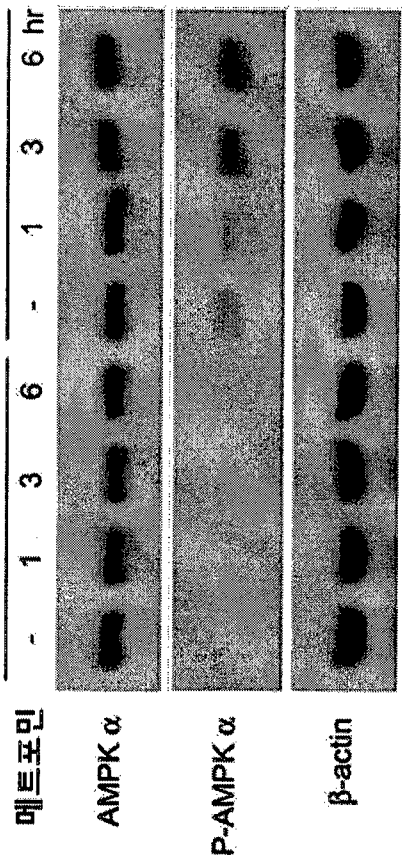

CRBN +/+
CRBN +/-
CRBN -/-
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.001
상대적인 밴드 강도
(AMPK γ1/ AMPK α)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0

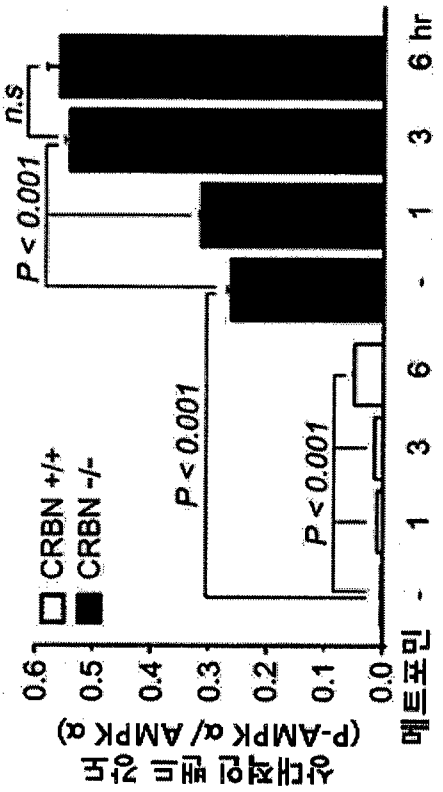
PCT/KR 2013. / 0 0 1 2 0 9

도 2a

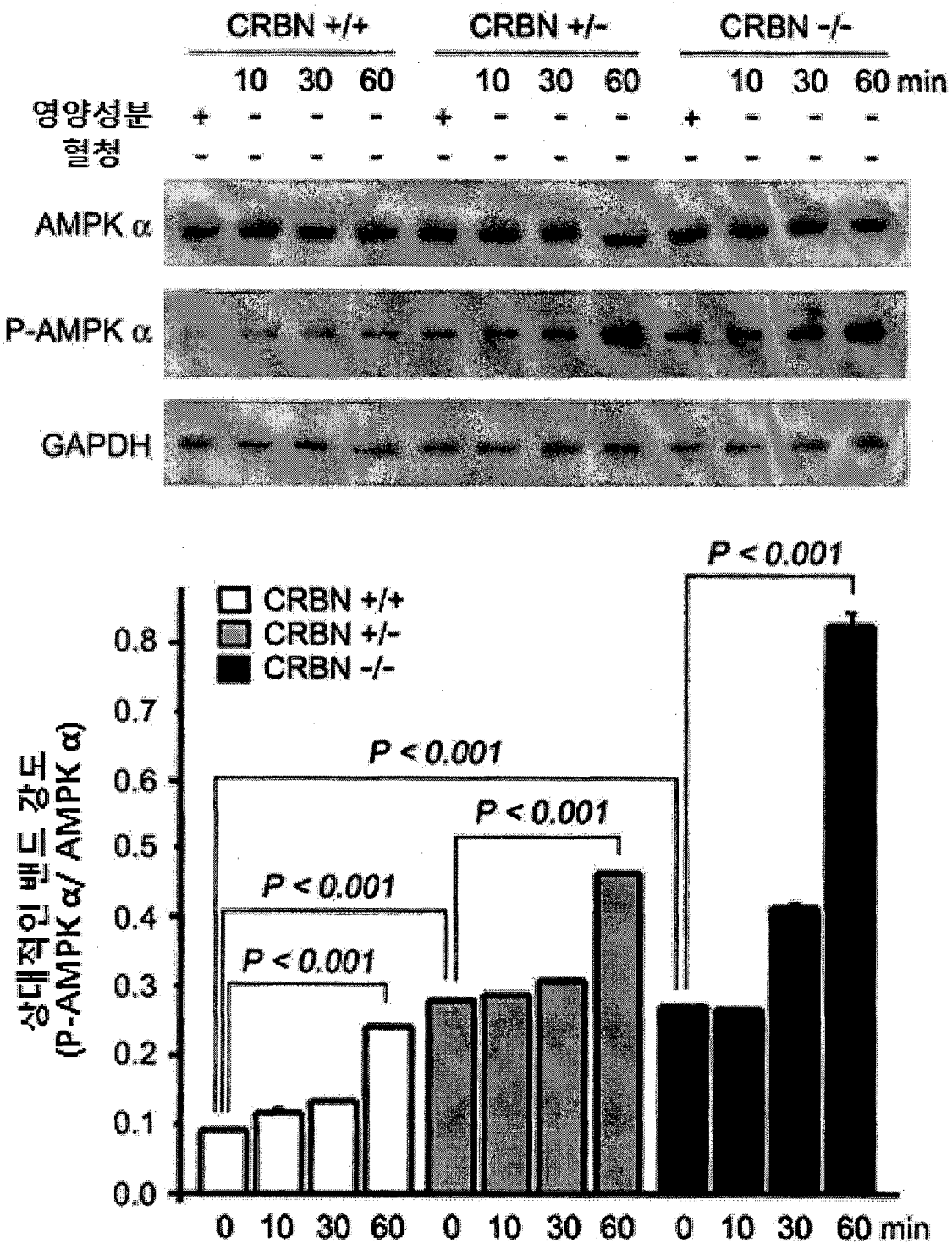


도 2b

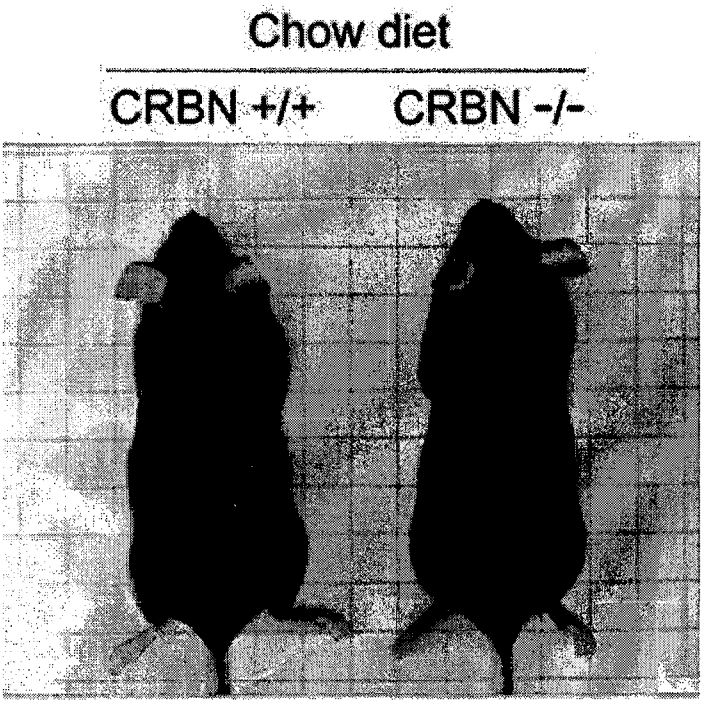

메트포민
AMPK α
P-AMPK α
β-actin
CRBN +/+
CRBN -/-
- 1 3 6 - 1 3 6 hr


상대적인 밴드 강도
(P-AMPK α/ AMPK α)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6
CRBN +/+
CRBN -/-
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.001
n.s
메트포민 - 1 3 6 - 1 3 6 hr

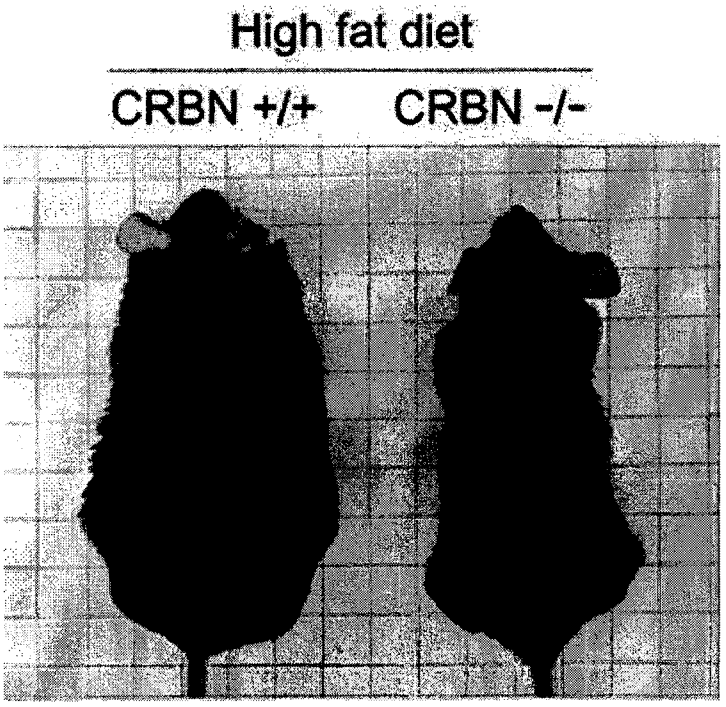
도 2c


CRBN +/+
CRBN +/-
CRBN -/-
10 30 60 10 30 60 10 30 60 min
영양성분 + - - - + - - - + - - -
혈청 - - - - - - - - - - - -
AMPK α
P-AMPK α
GAPDH
CRBN +/+
CRBN +/-
CRBN -/-
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.001
P < 0.001
상대적인 밴드 강도 (P-AMPK α/ AMPK α)
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8
0 10 30 60 0 10 30 60 0 10 30 60 min

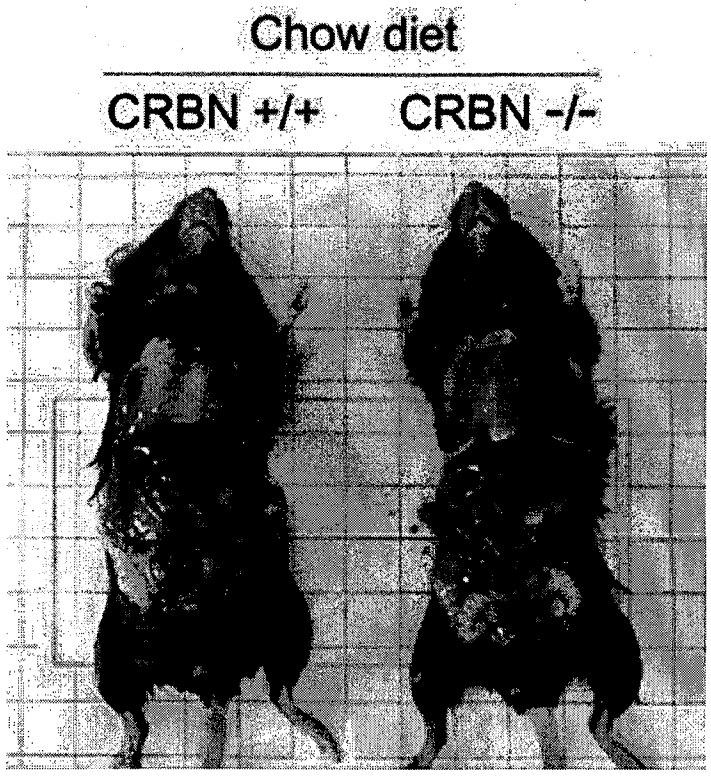
도 3a



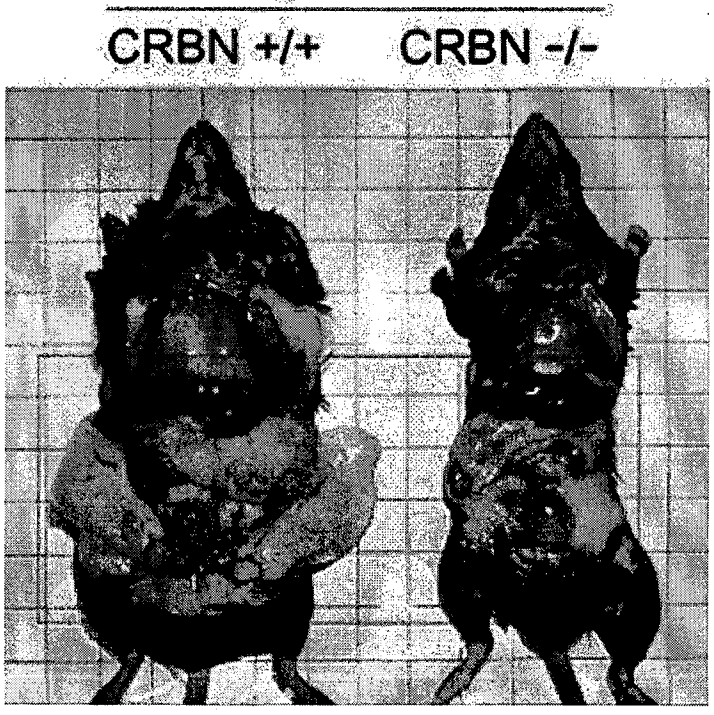
도 3b



도 3c

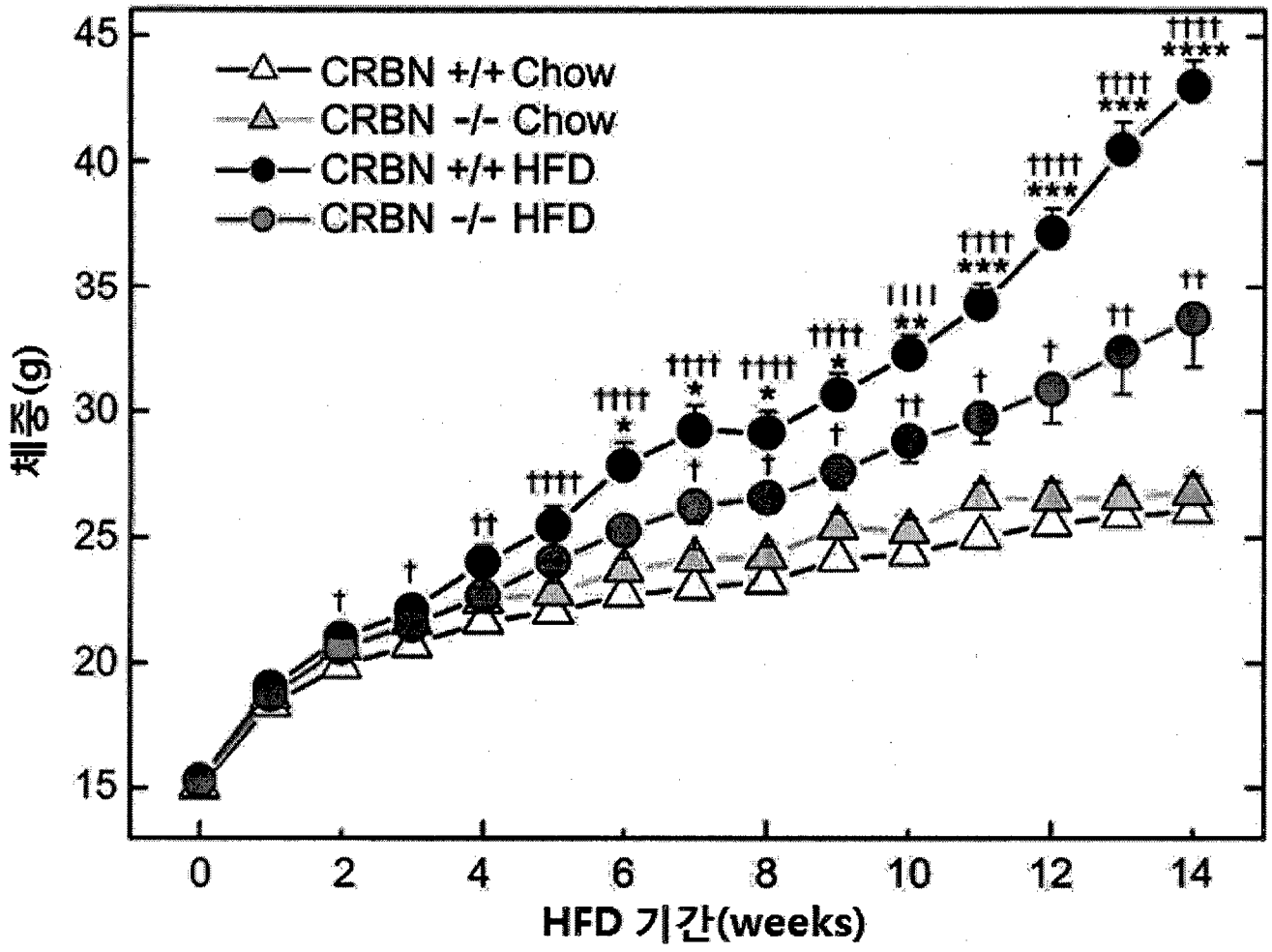


도 3d

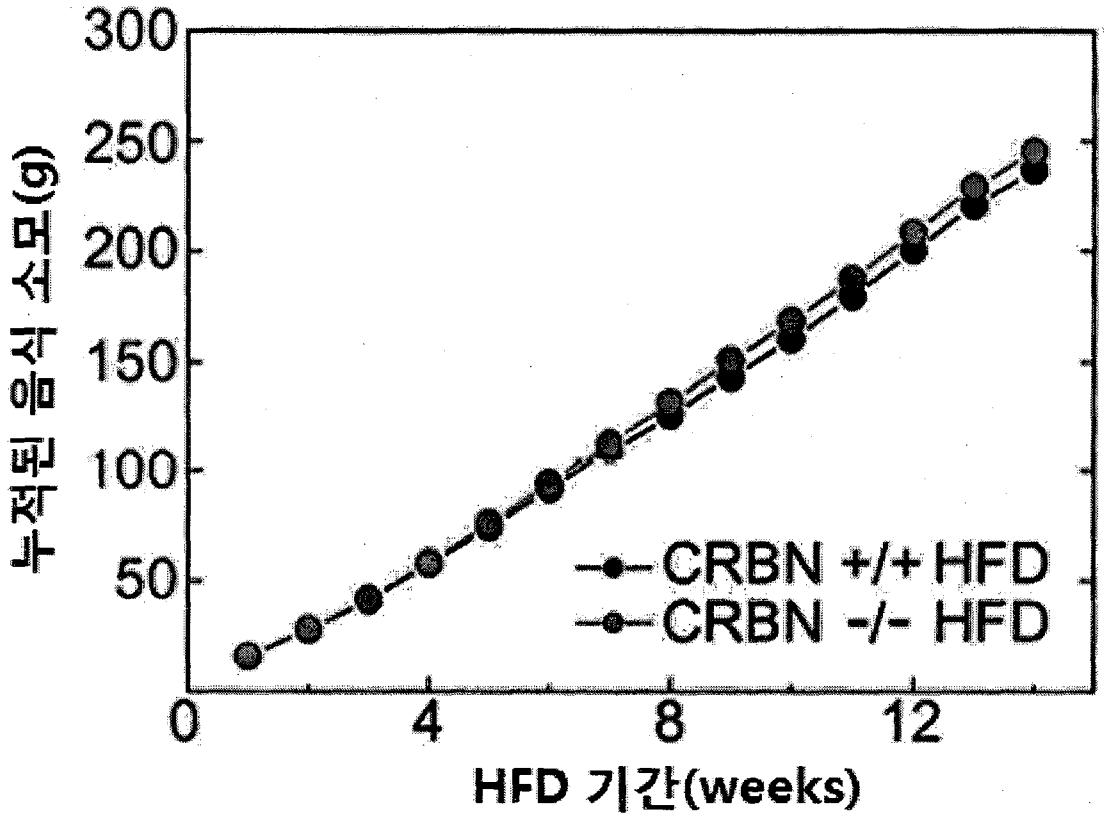


PCT/KR2013/001209

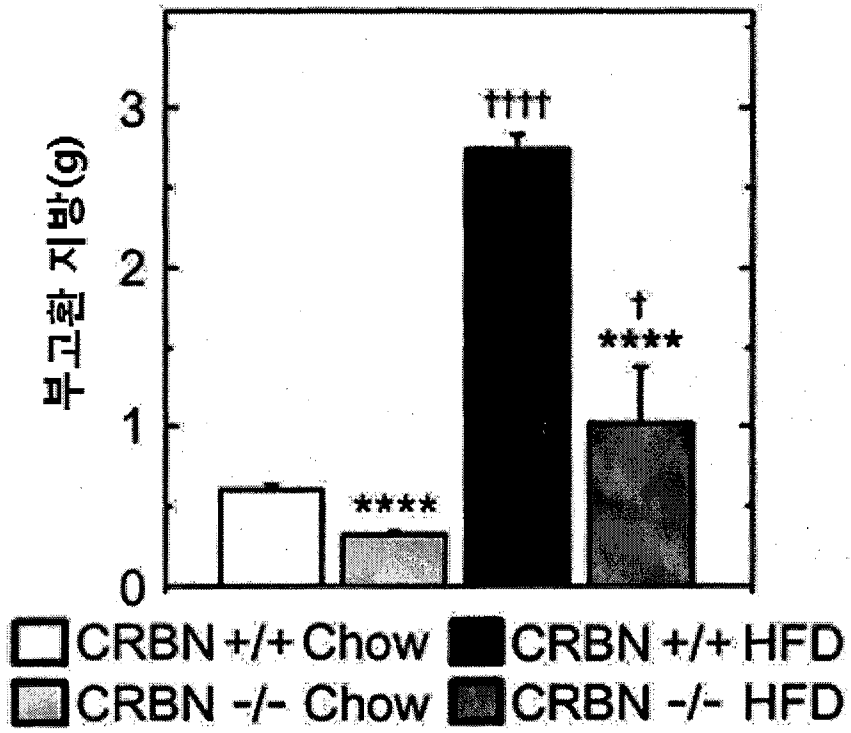
도 3e



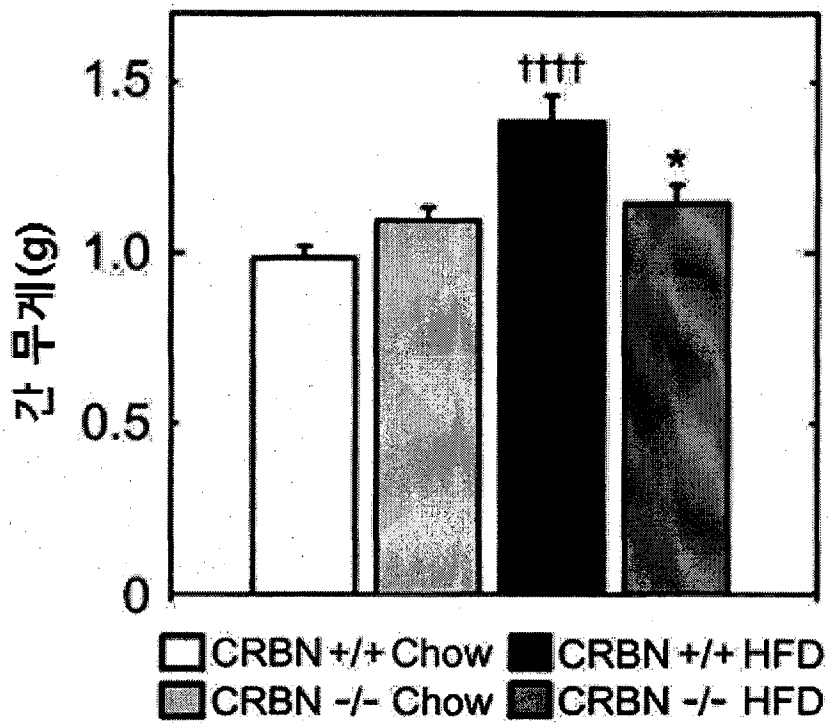
도 3f


300
250
200
150
100
50
0
4
8
12
누적된 음식 소모(g)
HFD 기간(weeks)
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- HFD

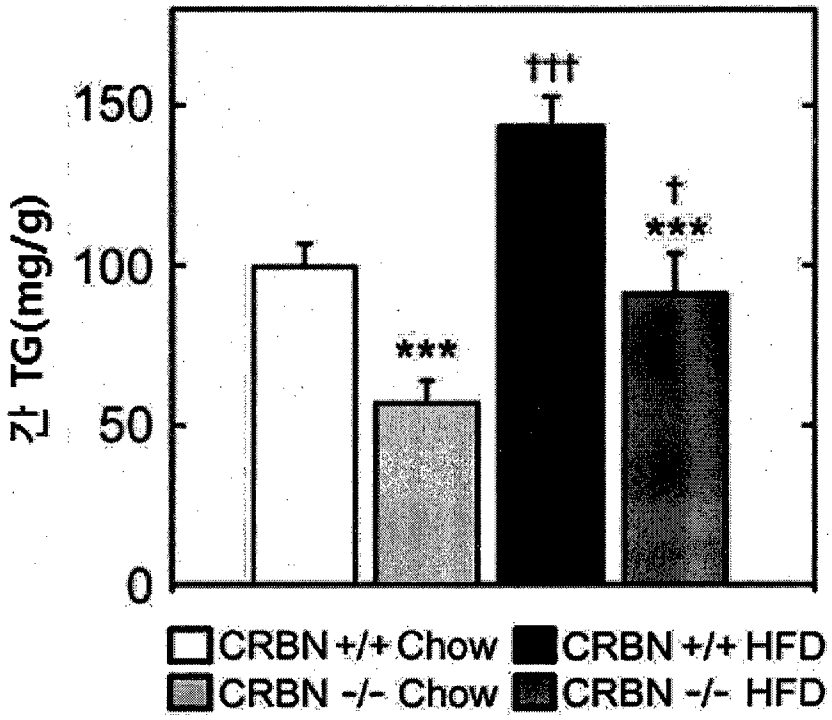
도 3g



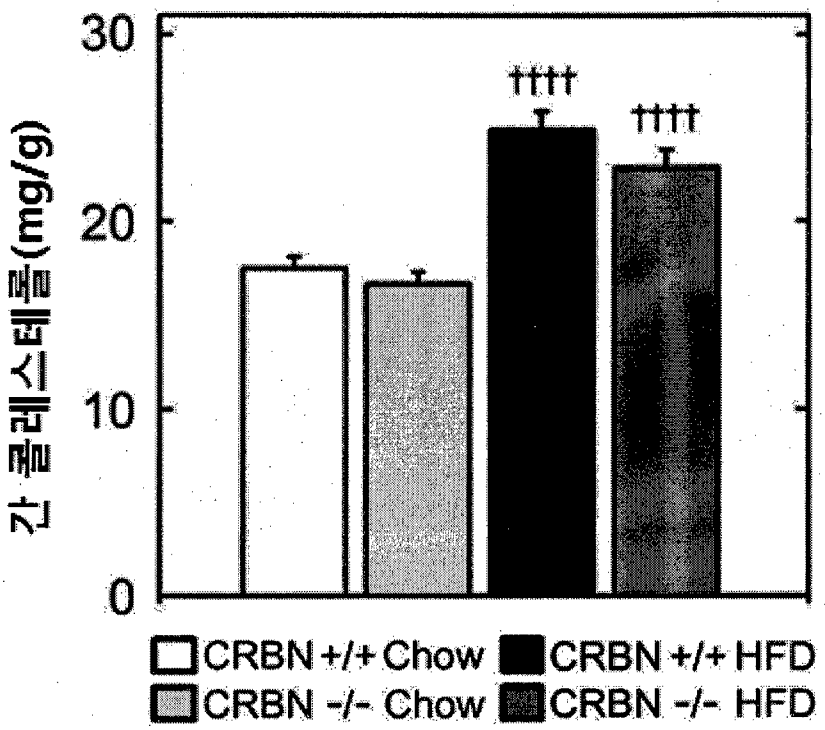
도 4a



도 4b

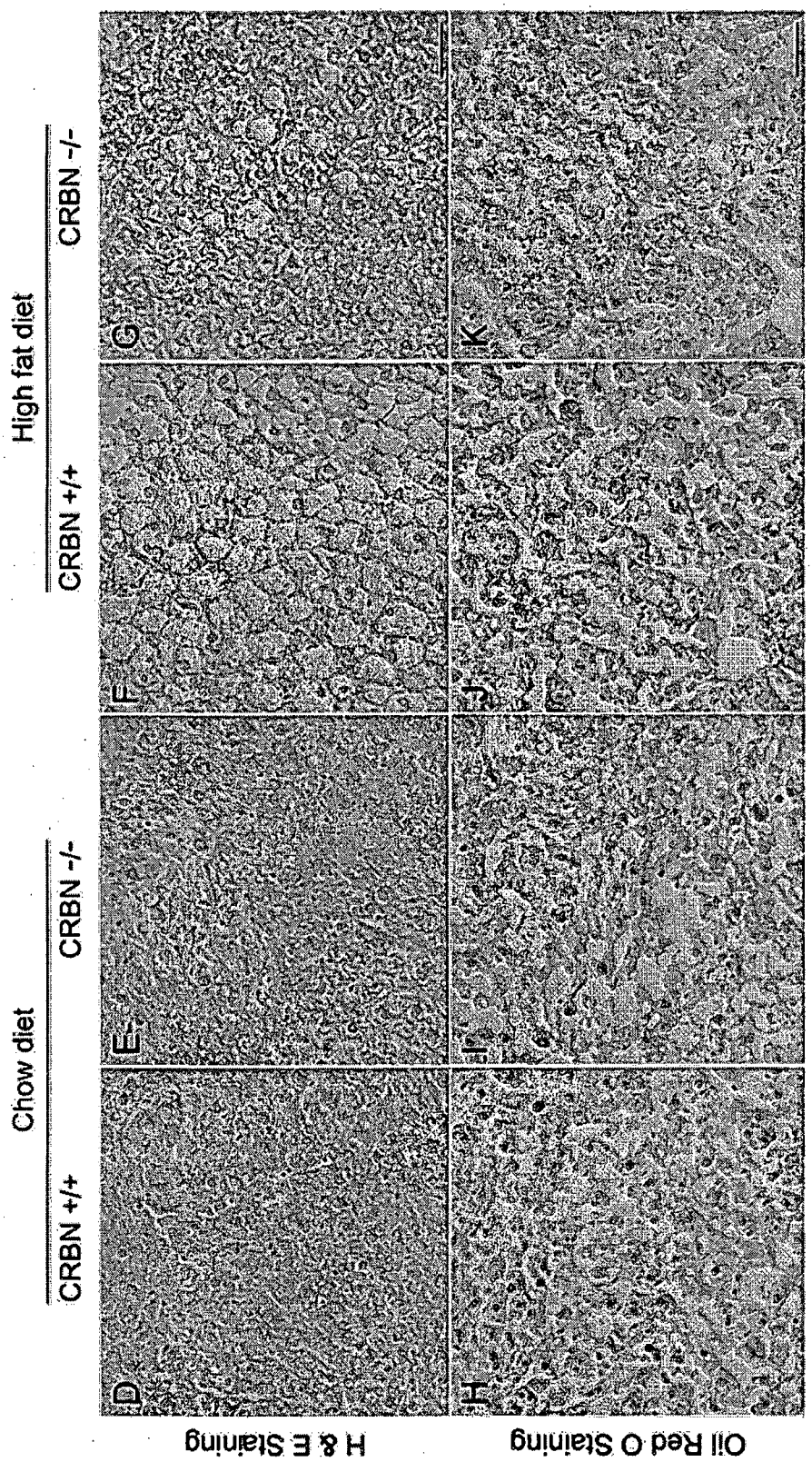


도 4c



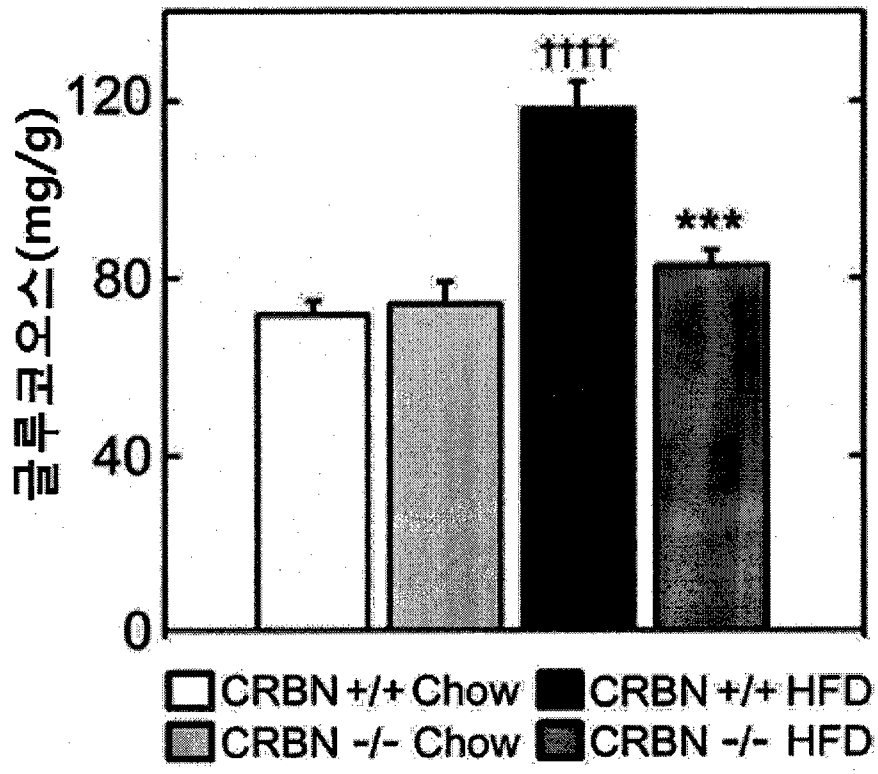
PCT/KR 2013. / 0 0 1 2 0 9

도 4d

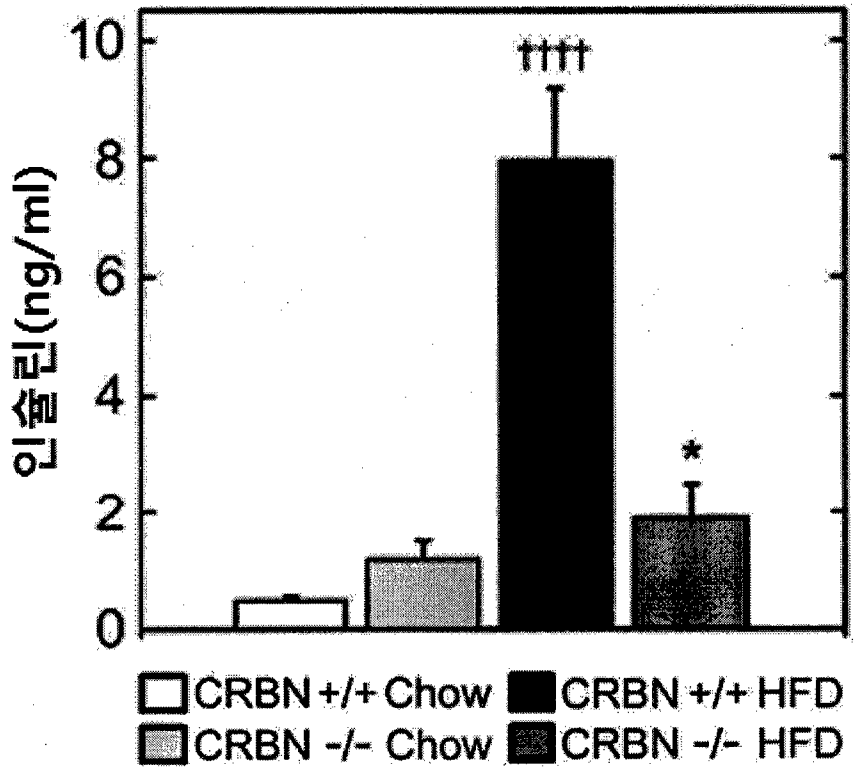


PCT/KR 2013. / 0 0 1 2 0 9

도 5a

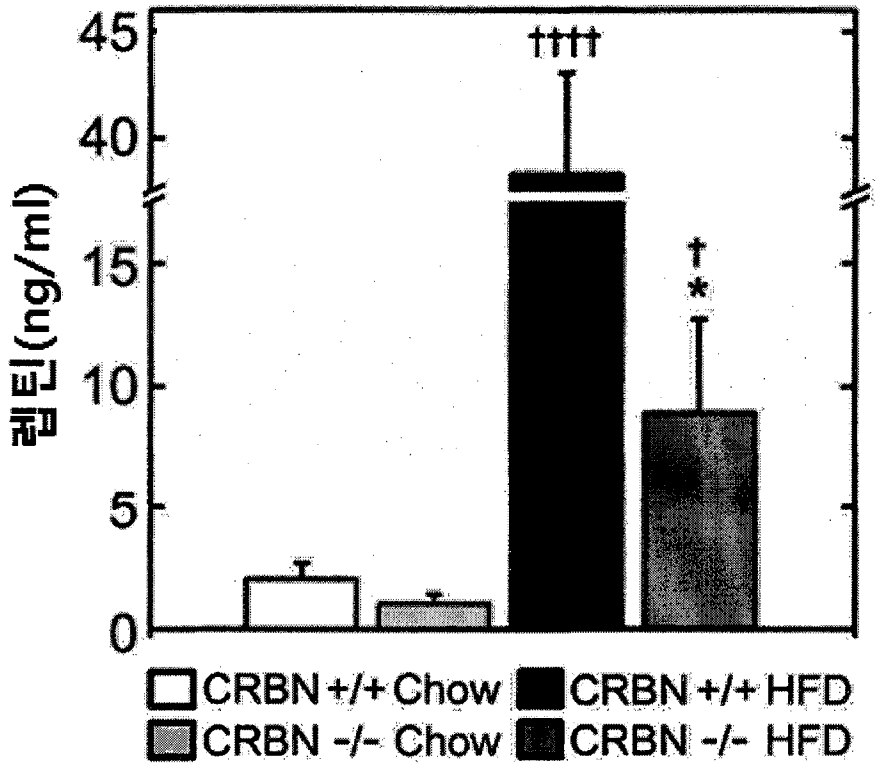


도 5b

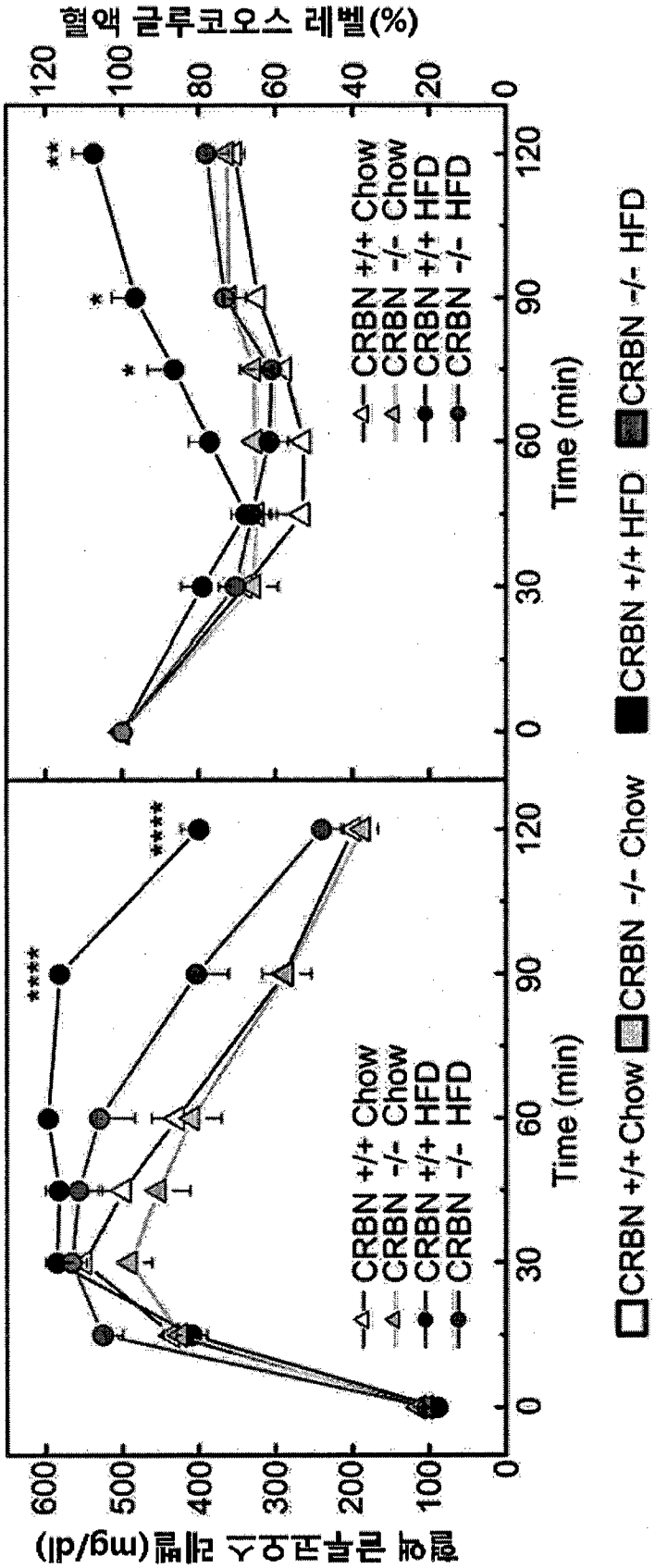


PCT/KR2013/001209

도 5c

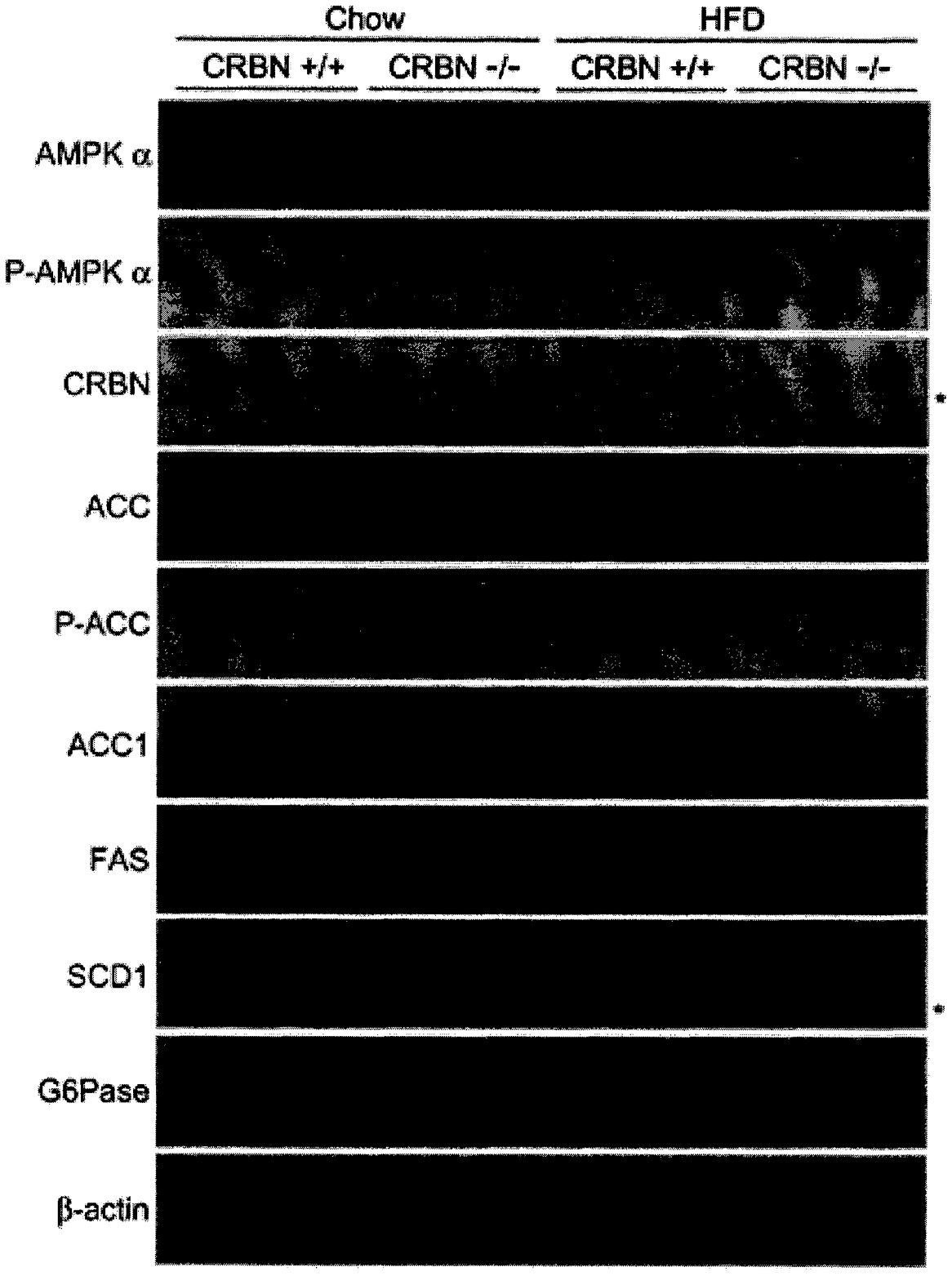


도 5d

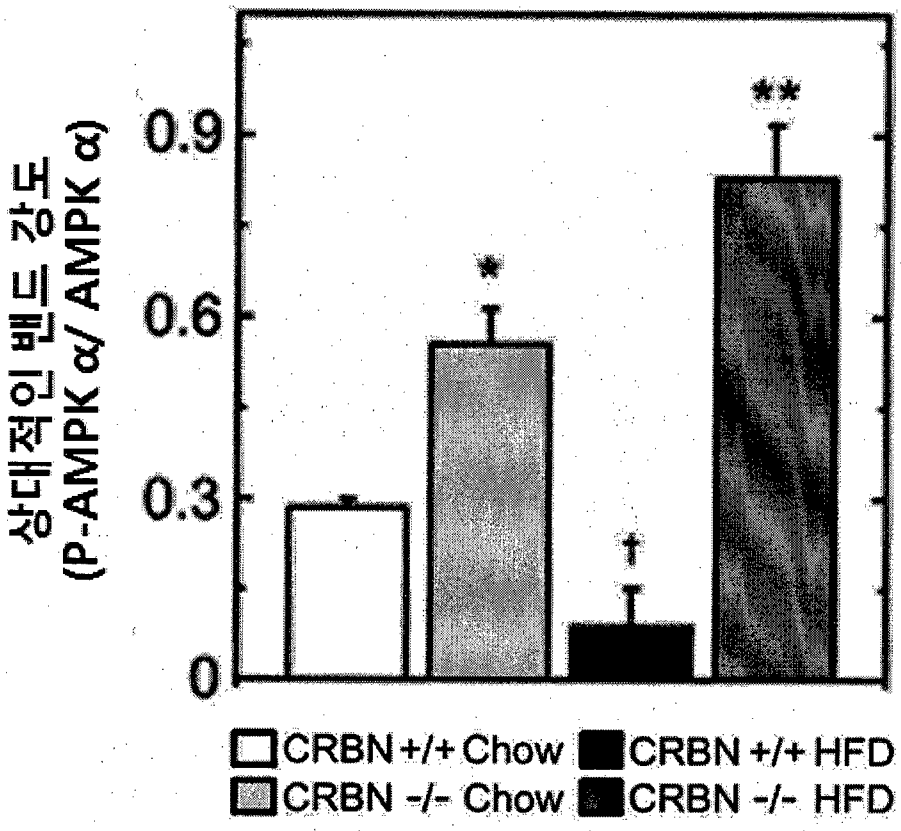

혈액 글루코오스 레벨(%)
혈액 글루코오스 레벨(mg/dl)
Time (min)
CRBN +/+ Chow
CRBN -/- Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- HFD
CRBN +/+ Chow
CRBN -/- Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- HFD

PCT/KR2013/001209

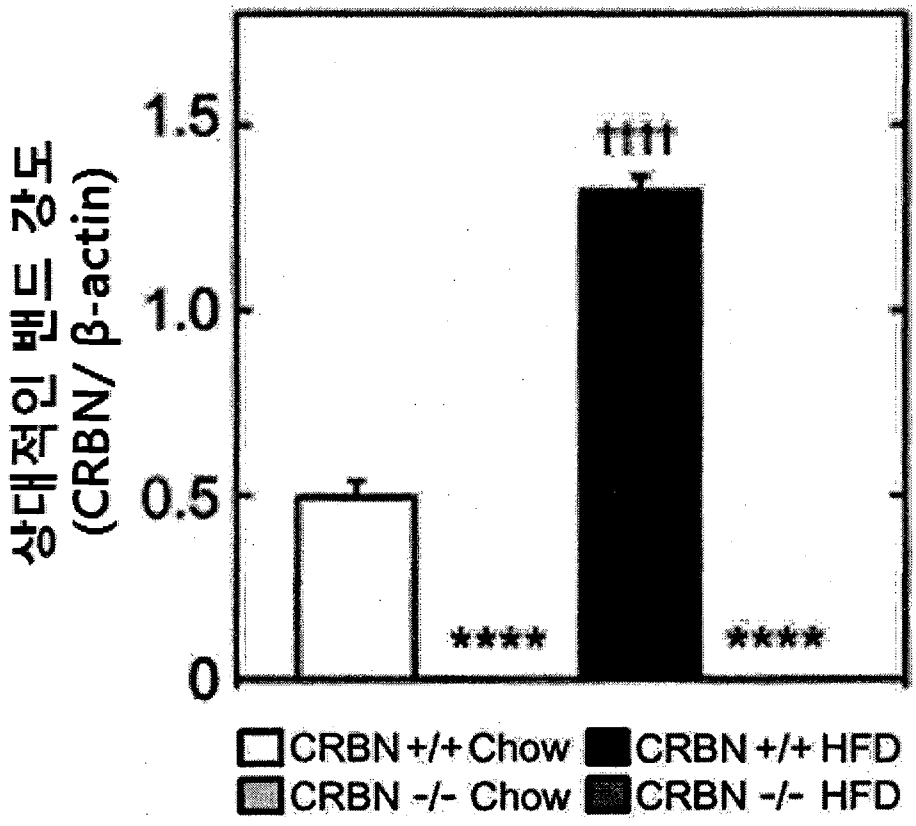
도 6a



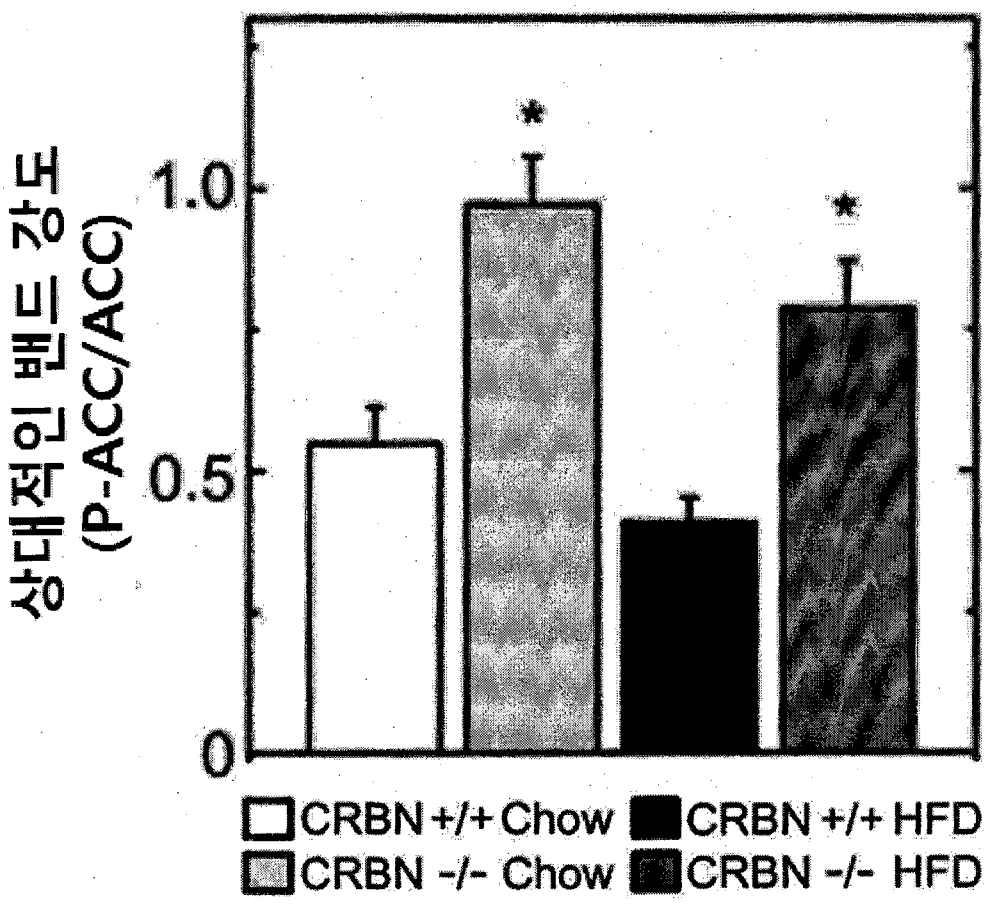
도 6b


상대적인 밴드 강도
(P-AMPK α/ AMPK α)
0.9
0.6
0.3
0
*
†
**
CRBN +/+ Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- Chow
CRBN -/- HFD

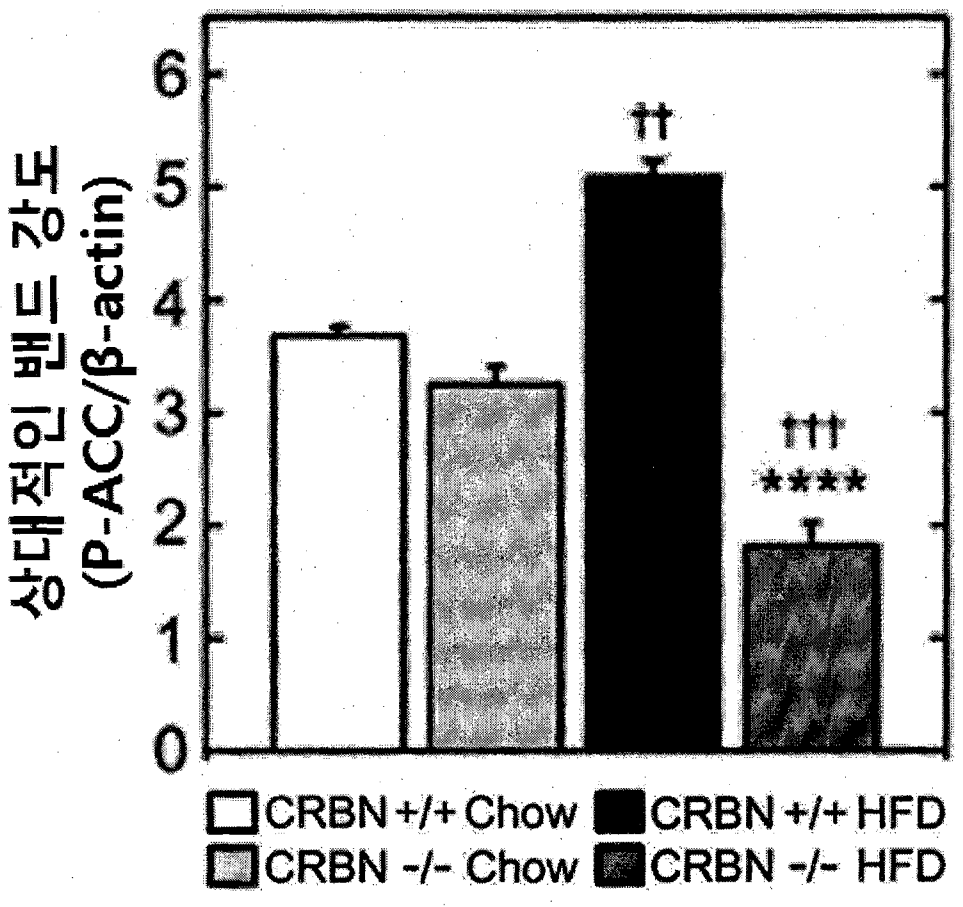
도 6c


상대적인 밴드 강도
(CRBN/ β-actin)
1.5
1.0
0.5
0
††††
****
****
CRBN +/+ Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- Chow
CRBN -/- HFD

도 6d

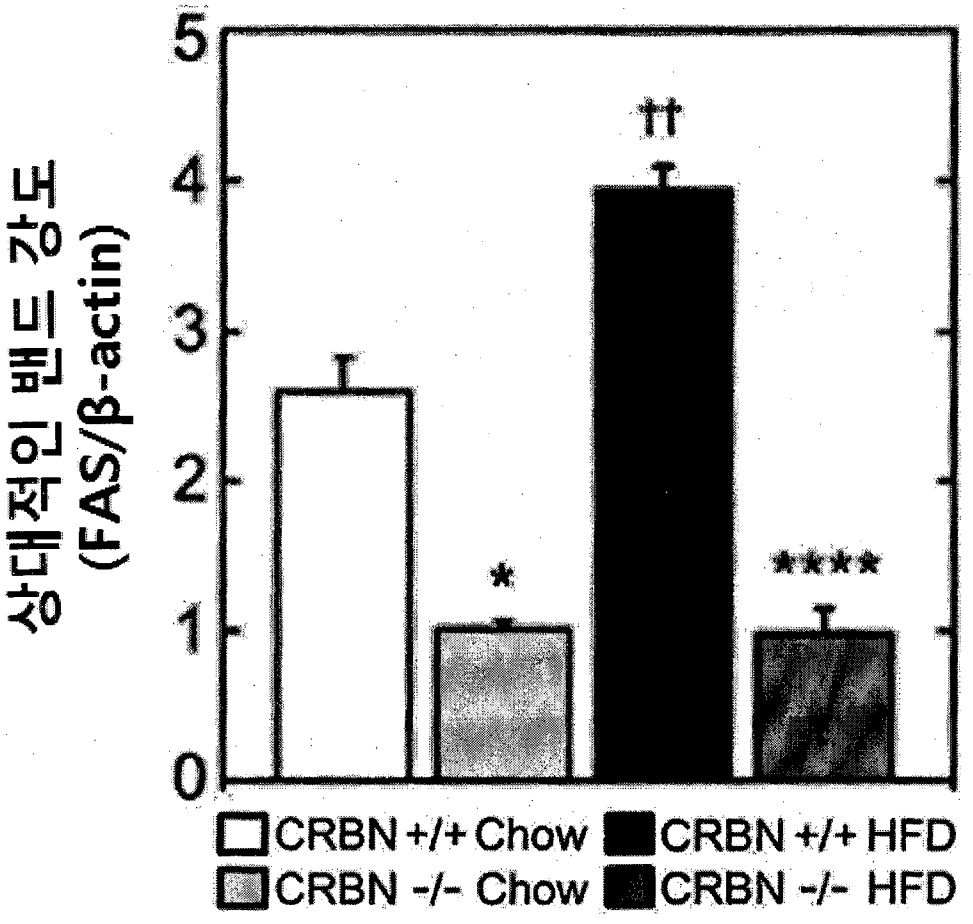

상대적인 밴드 강도
(P-ACC/ACC)
1.0
0.5
0
*
*
CRBN +/+ Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- Chow
CRBN -/- HFD

도 6e

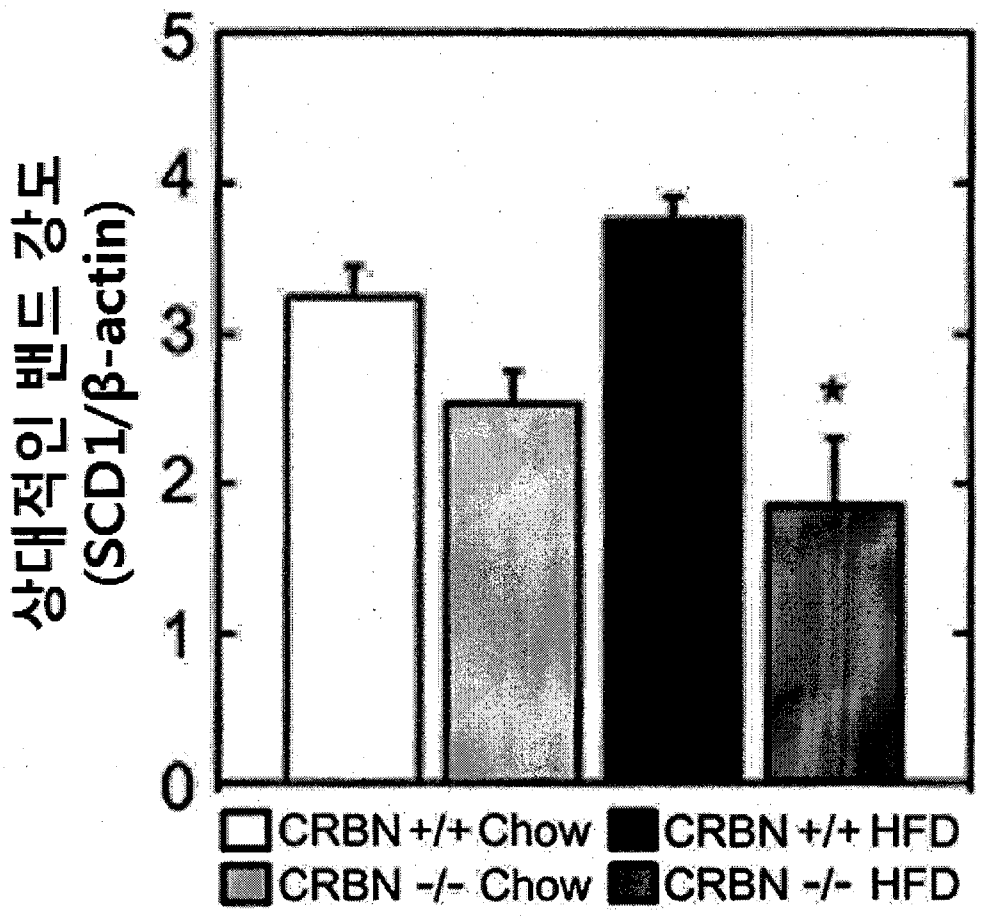

상대적인 밴드 강도
(P-ACC/β-actin)
0
1
2
3
4
5
6
††
†††
****
CRBN +/+ Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- Chow
CRBN -/- HFD

PCT/KR 2013. / 0 0 1 2 0 9

도 6f

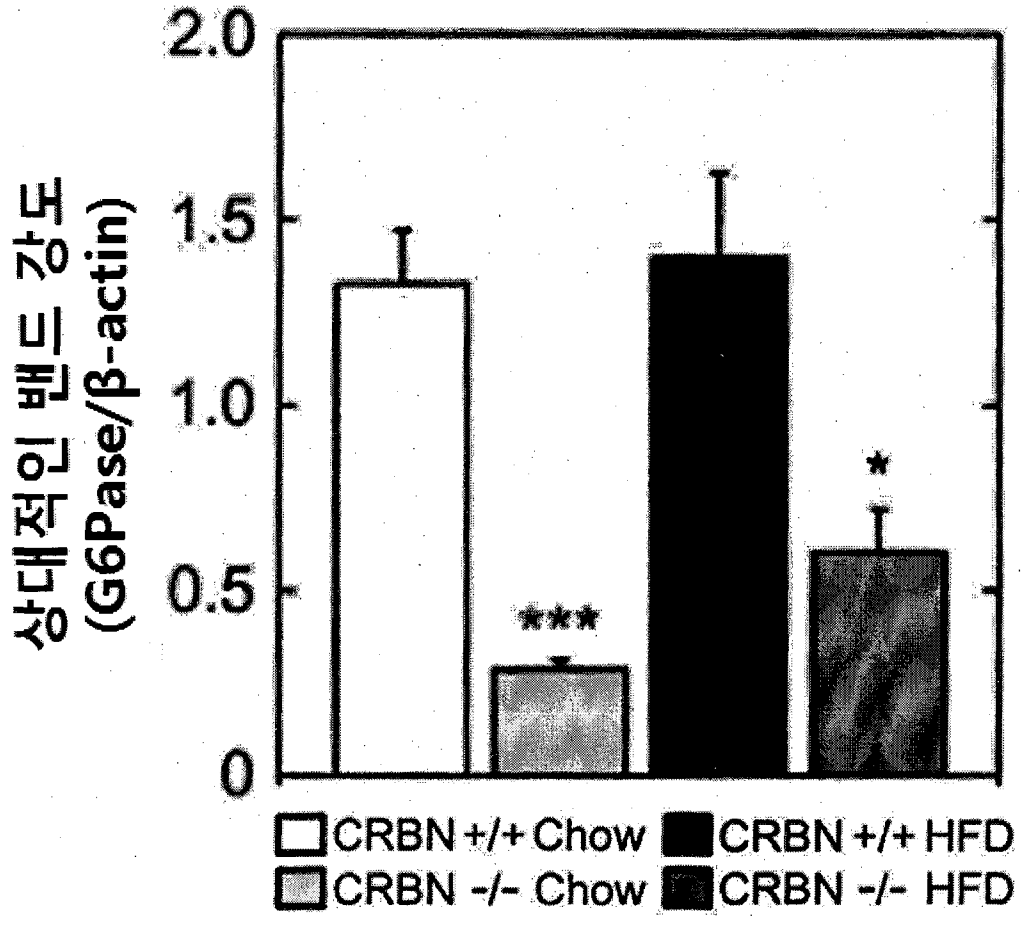


도 6g

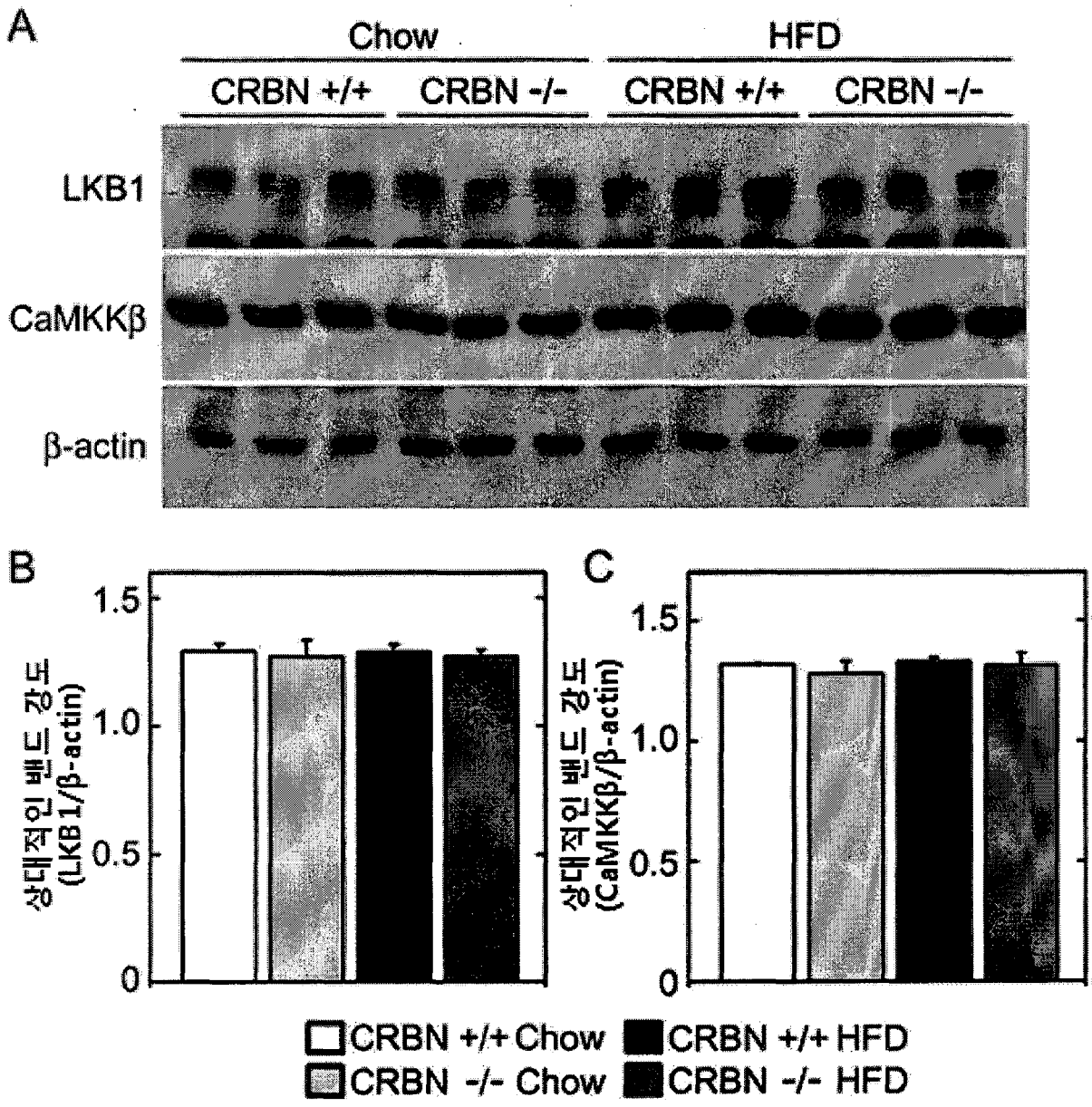

상대적인 밴드 강도
(SCD1/β-actin)
0
1
2
3
4
5
*
CRBN +/+ Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- Chow
CRBN -/- HFD

PCT/KR 2013. / 0 0 1 2 0 9

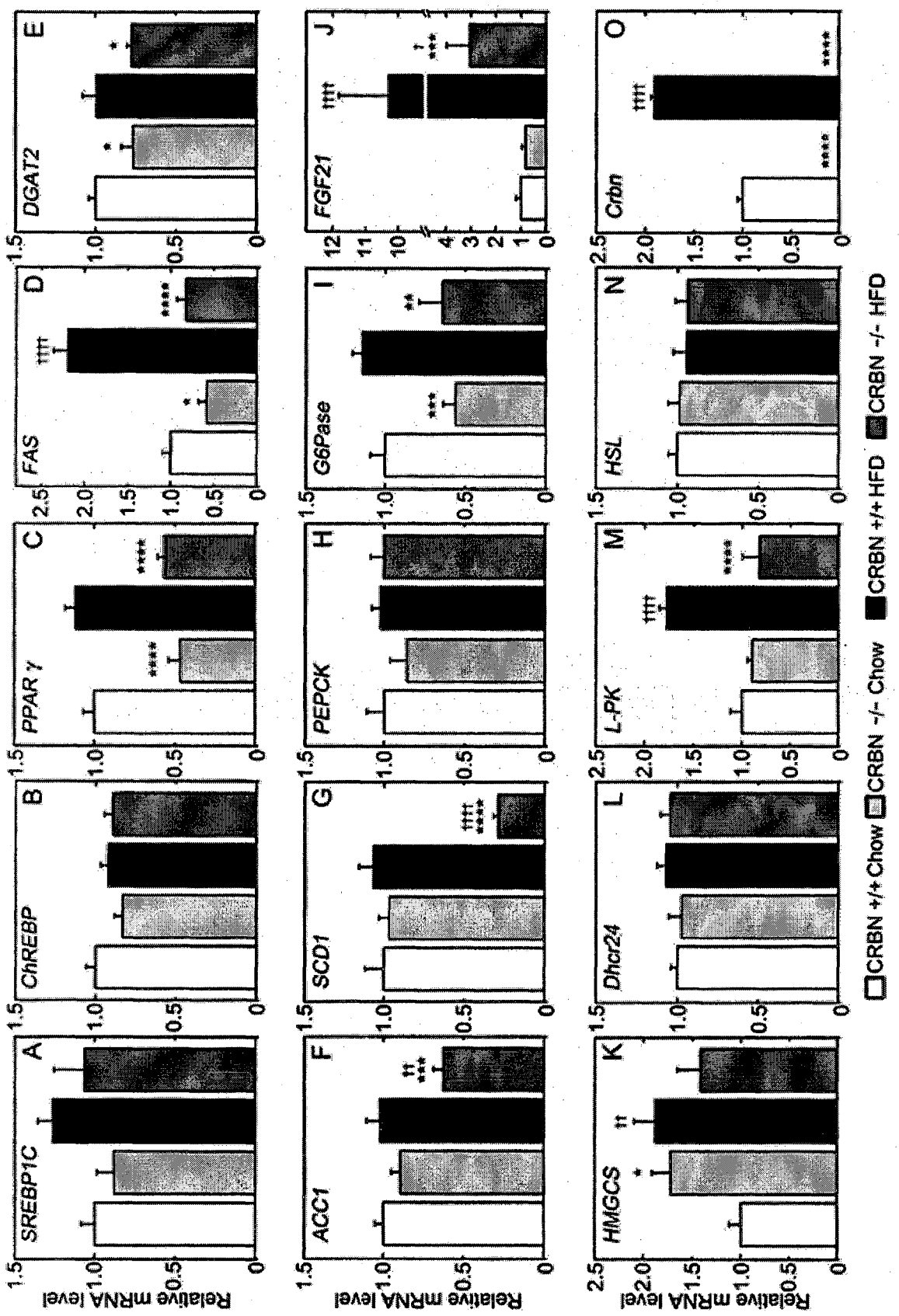
도 6h



도 7

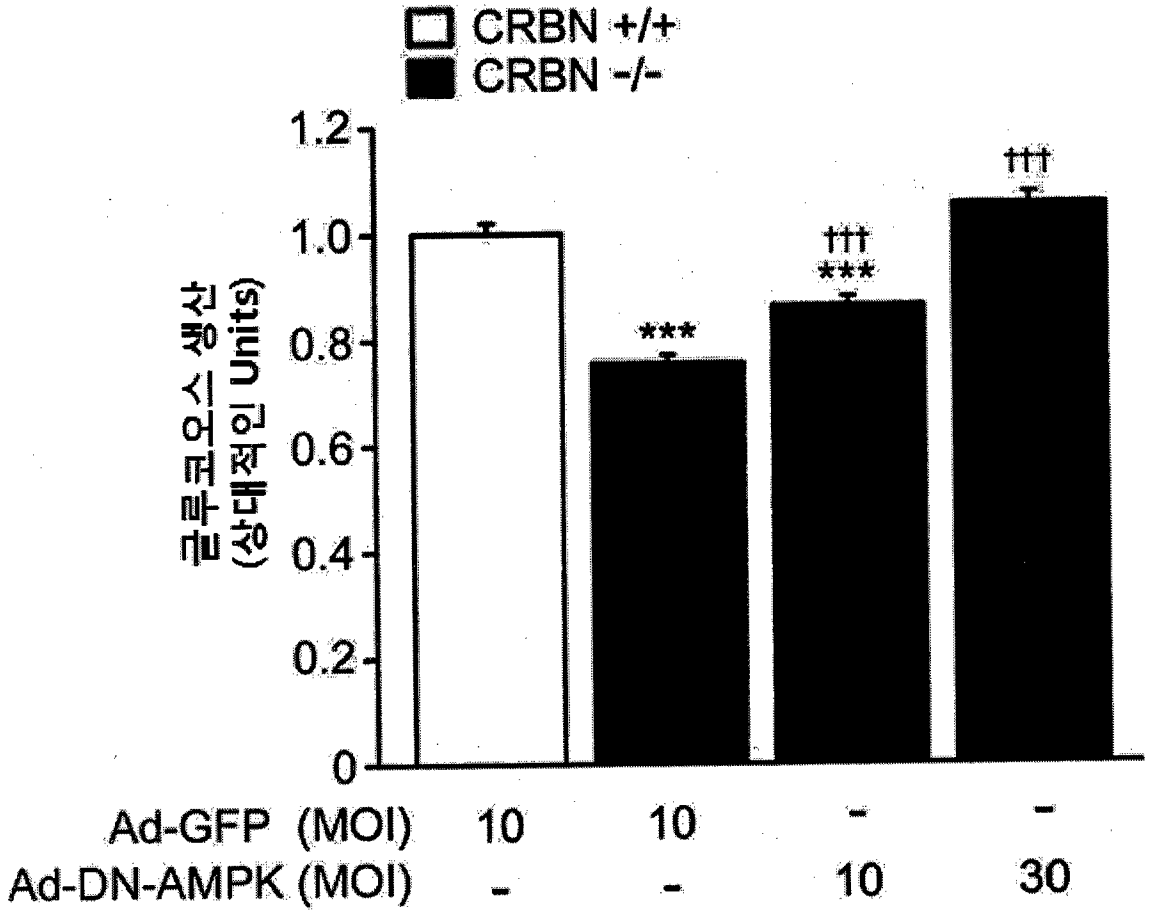

A
Chow
HFD
CRBN +/+
CRBN -/-
CRBN +/+
CRBN -/-
LKB1
CaMKKβ
β-actin
B
상대적인 밴드 강도 (LKB1/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0
C
상대적인 밴드 강도 (CaMKKβ/β-actin)
1.5
1.0
0.5
0
CRBN +/+ Chow
CRBN -/- Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- HFD

도 8

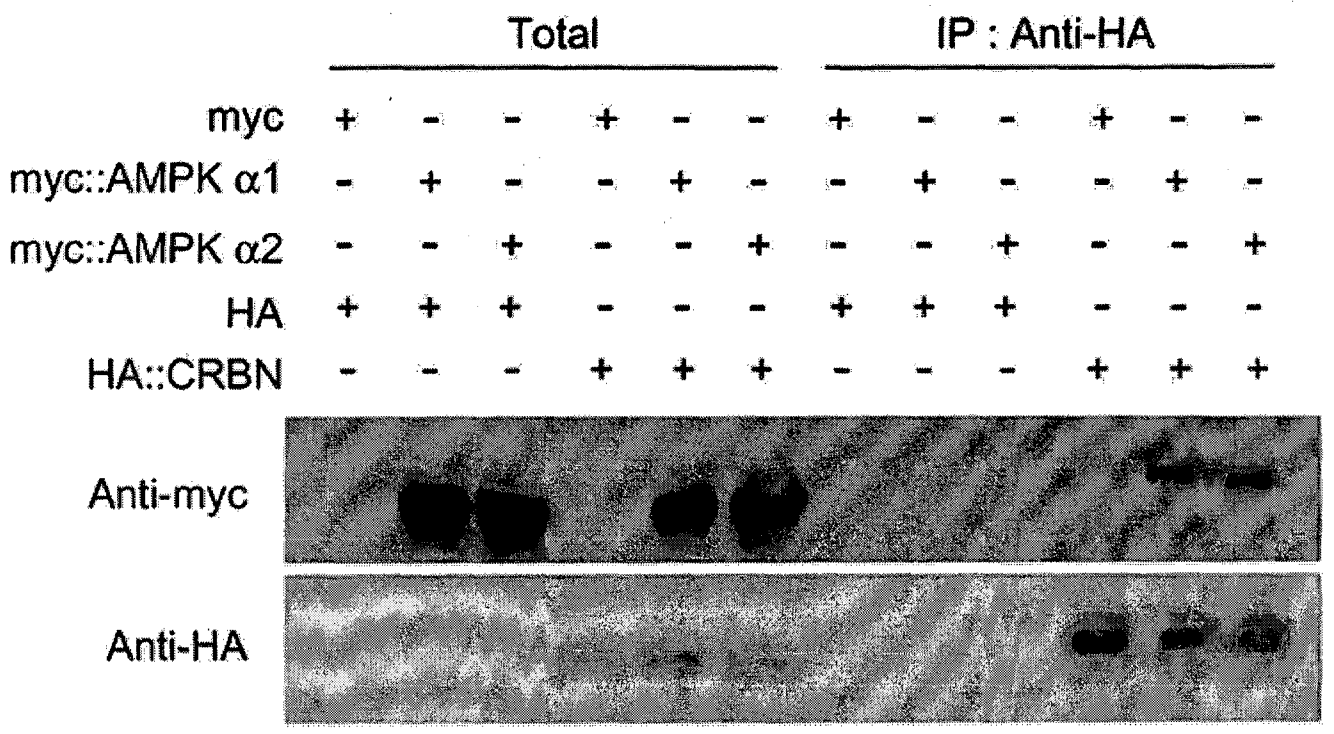

SREBP1C
ChREBP
PPAR γ
FAS
DGAT2
ACC1
SCD1
PEPCK
G6Pase
FGF21
HMGCS
Dhcr24
L-PK
HSL
Crbn
Relative mRNA level
CRBN +/+ Chow
CRBN -/- Chow
CRBN +/+ HFD
CRBN -/- HFD

PCT/KR2013/001209

도 9



도 10


Total
IP : Anti-HA
myc + - - + - - + - - + - -
myc::AMPK α1 - + - - + - - + - - + -
myc::AMPK α2 - - + - - + - - + - - +
HA + + + - - - + + + - - -
HA::CRBN - - - + + + - - - + + +
Anti-myc
Anti-HA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/001209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K 67/027; C12Q 1/00; G01N 33/15; A61K 35/12; C12N 15/12; C12N 15/00; G01N 33/68; C12N 5/10; C12N 15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: CRBN, cereblon, knockout, transfection, metabolic syndrome, AMPK

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, Kwang Min et al., "Disruption of the cereblon gene enhances hepatic AMPK activity and prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice", Diabetes, 24 January 2013, vol. 62, no. 6, pages 1855-1864. See pages 1855, 1857, 1859 and 1861.	1-15
A		16-25
X	LEE, Kwang Min et al., "Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon", Biochimica et Biophysica Acta, 11 January 2011, vol. 1813, no. 3, pages 448-455. See abstract.	20-25
A		1-19
A	KR 10-2008-0042058 A (GREEN CROSS CORPORATION) 14 May 2008 See claim 2.	1-25
A	US 2012-0134969 A1 (HANDA, Hiroshi et al.) 31 May 2012 See abstract.	1-25
A	KR 10-2012-0093852 A (FUJIMOTO PHARMACEUTICAL CORPORATION et al.) 23 August 2012 See abstract.	1-25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 OCTOBER 2013 (17.10.2013)	**18 OCTOBER 2013 (18.10.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/001209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0042058 A	14/05/2008	NONE	
US 2012-0134969 A1	31/05/2012	CN 102448472 A	09/05/2012
		EP 2436387 A1	04/04/2012
		JP WO20-101375 47A1	02/12/2010
		WO 2010-137547 A1	02/12/2010
KR 10-2012-0093852 A	23/08/2012	CA 2774871 A1	28/04/2011
		CN 102576023 A	11/07/2012
		EP 2492686 A1	29/08/2012
		US 2012-0192297 A1	26/07/2012
		WO 2011-049043 A1	28/04/2011

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/001209

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 5/10(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A01K 67/027; C12Q 1/00; G01N 33/15; A61K 35/12; C12N 15/12; C12N 15/00; G01N 33/68; C12N 5/10; C12N 15/63

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: CRBN, cereblon, knockout, transfection, metabolic syndrome, AMPK

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	이광민 외 7명, `Disruption of the cereblon gene enhances hepatic AMPK activity and prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice`, Diabetes, 2013.01.24., 62권, 6호, 1855-1864 페이지. 페이지 1855, 1857, 1859 및 1861 참조.	1-15
A		16-25
X	이광민 외 4명, `Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon`, Biochimica et Biophysica Acta, 2011.01.11., 1813권, 3호, 448-455 페이지. 요약 참조.	20-25
A		1-19
A	KR 10-2008-0042058 A (주식회사 녹십자) 2008.05.14 청구항 2 참조.	1-25
A	US 2012-0134969 A1 (HANDA, HIROSHI 외 3명) 2012.05.31 요약 참조.	1-25
A	KR 10-2012-0093852 A (후지모토 세이야쿠 가부시키가이샤) 2012.08.23 요약 참조.	1-25

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 10월 17일 (17.10.2013)	2013년 10월 18일 (18.10.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/001209

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0042058 A	2008/05/14	없음	
US 2012-0134969 A1	2012/05/31	CN 102448472 A	2012/05/09
		EP 2436387 A1	2012/04/04
		JP WO20-101375 47A1	2010/12/02
		WO 2010-137547 A1	2010/12/02
KR 10-2012-0093852 A	2012/08/23	CA 2774871 A1	2011/04/28
		CN 102576023 A	2012/07/11
		EP 2492686 A1	2012/08/29
		US 2012-0192297 A1	2012/07/26
		WO 2011-049043 A1	2011/04/28