



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월06일

(11) 등록번호 10-2297747

(24) 등록일자 2021년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7003290

(22) 출원일자(국제) 2014년07월09일

심사청구일자 2019년04월25일

(85) 번역문제출일자 2016년02월04일

(65) 공개번호 10-2016-0042884

(43) 공개일자 2016년04월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/045934

(87) 국제공개번호 WO 2015/006437

국제공개일자 2015년01월15일

(30) 우선권주장

61/844,666 2013년07월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Biol Chem. vol.284 no.1

pp.610-618(2009.01.02. 공개)*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 23 항

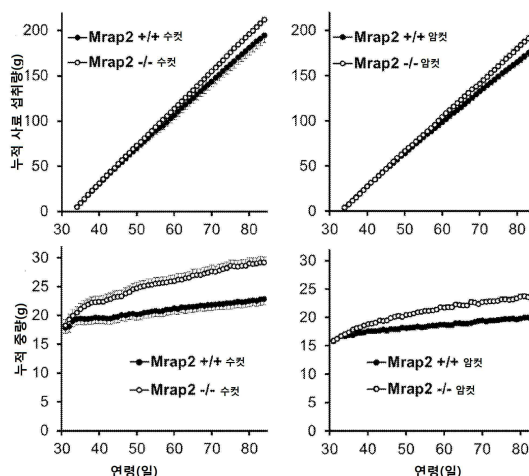
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 MRAP2 녹아웃

(57) 요약

본 명세서에서 개시되는 바와 같이, Mrap2는 동물의 중량 증가를 음성적으로 조절한다. 따라서, 본 명세서에서는 세포 및/또는 동물, 예를 들어 축산물의 생성을 향상시키기 위해, Mrap2를 포함하는 동물의 성장률을 증가시키기 위한 Mrap2 억제와 관련된 세포, 동물 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A01K 2227/108 (2013.01)

A01K 2267/02 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

J Biol Chem. vol.284 no.34

pp.22641-22648(2009.08.21. 공개)*

J Biol Chem. vol.284 no.34 pp.22641-8 2009.

PNAS vol.108 no.29 pp.12013-7 2011.

Eur J Pharmacol. vol.660 no.1 pp.119-24 2011.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

Mrap2 유전자의 변형을 포함하는 비인간 척추동물 세포로서, 상기 세포가 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 것이며, 상기 변형이 상기 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실, 상기 Mrap2 유전자의 막횡단 도메인의 결실 또는 상기 Mrap2 유전자의 세포내 도메인의 결실을 포함하는 것인 비인간 척추동물 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함하는 것인 세포.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변형이 서열번호 1 내에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 세포.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포가 상기 변형에 있어서 이형 접합 (heterozygous)인 세포.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포가 상기 변형에 있어서 동형 접합인 세포.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 비인간 척추동물 세포가 비인간 포유동물, 돼지, 소, 양, 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 종인 세포.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변형이 CRISPR, TALEN 또는 ZFN 뉴클레아제의 작용에 의해 생성되는 것인 세포.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변형이 재조합효소의 작용에 의해 생성되고, 상기 재조합효소가 뉴런 또는 뇌 조직에 특이적인 프로모터의 조절 하에 있는 것인 세포.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 재조합효소가 cre 재조합효소인 세포.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 프로모터가 Sim1 프로모터인 세포.

청구항 16

제1항의 세포를 포함하는 비인간 척추동물.

청구항 17

제1항의 세포로 이루어진 비인간 척추동물.

청구항 18

Mrap2 유전자의 변형을 포함하는 녹아웃 비인간 척추동물로서, 상기 척추동물이 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 것이며, 상기 변형이 상기 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실, 상기 Mrap2 유전자의 막횡단 도메인의 결실 또는 상기 Mrap2 유전자의 세포내 도메인의 결실을 포함하는 것인, 녹아웃 비인간 척추동물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함하는 것인 척추동물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 변형이 서열번호 1 내에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 척추동물.

청구항 24

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 척추동물이 상기 변형에 있어서 이형 접합인 척추동물.

청구항 25

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 척추동물이 상기 변형에 있어서 동형 접합인 척추동물.

청구항 26

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 비인간 척추동물이 비인간 포유동물, 돼지, 소, 양, 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 종인 척추동물.

청구항 27

사체의 이용을 위해 척추동물을 생성하는 방법으로서,

비인간 척추동물에 종-적합 사료를 제공하는 단계, 여기서 상기 비인간 척추동물이 Mrap2 유전자의 변형을 포

함하는 비인간 척추동물 세포를 포함하고, 상기 세포가 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 것인, 단계;

이용하기 위해 목적한 크기에 도달한 경우, 상기 척추동물을 도축하는 단계;를 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 척추동물이 야생형 척추동물 보다 80% 조기에 도축되는 것인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 척추동물이 야생형 척추동물 보다 50% 조기에 도축되는 것인 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 척추동물에 실질적으로 무제한으로 (ad libitum) 사료가 공급되는 것인 방법.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 척추동물이 비인간 포유동물 또는 돼지인 방법.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호참조
- [0002] 본 출원은 2013년 7월 10일자로 출원된 미국가출원 제 61/844,666에 대한 35 U.S.C. § 119(e)에 따른 이익을 주장하며, 그의 전문은 본 명세서에서 참조로서 포함된다.
- [0003] 정부 지원
- [0004] 본 발명은 미국국립보건원에 의해 수여된 승인 번호 T32DK07699 및 NIHP30-HD18655 하의 연방 자금 지원에 의해 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.
- [0005] 서열 목록
- [0006] 본 출원은, ASCII 포맷으로 전자문서로 제출되고, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2014년 6월 27일자에 생성된 상기 ASCII 복사본의 파일명은 068570-078611-PCT_SL.txt이며, 그 크기는 25,182 바이트이다.
- [0007] 기술 분야
- [0008] 본 명세서에 개시되는 기술은 녹아웃 (knockout) 및 형질전환 동물에 관련된 것이다.

배경 기술

- [0009] 식품 또는 육종과 같은 목적을 위한 동물의 사육시, 관련 비용에 대한 상당한 기여 인자는 동물을 필요한 크기 및/또는 중량으로 성숙시키는데 걸리는 시간이다. 동물을 필요한 크기 및/또는 중량에 더 빨리 도달시킬수록, 동물의 사육 관련 비용이 절감되고, 기능성 동물의 생성에 소모되는 자원이 절약된다. 축산업의 경우 종종, 빠른 성장의 독려와 같은 방식의 사료, 환경 및 가축병 치료에 의한 이러한 기간의 최소화가 요구된다. 또한, 동물의 사료는 동물을 시장에 내놓는 과정의 주요 비용이며, 따라서, '사료 효율 (동물 성장 중량/소비 사료 중량)'의 증가는 가축 비용의 절감으로 이어진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 본 발명자들은, 동물의 경우, Mrap2의 수준 및/또는 활성의 억제에 의해, 야생형 동물에 비해, 동물의 중량이 빠른 속도로 증가된다는 것을 발견하였다. 실질적으로, 이러한 동물은 야생형 동물보다 50% 빠른 속도로 성숙 동물 크기 (adult animal size)에 도달할 수 있다. 또한, Mrap2 활성 결핍 동물은 더욱 소량의 사료로 제한시, 단지 야생형 동물과 같은 속도로 빠르게 성장할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서는, Mrap2가 변형된 세포, 이들 세포를 포함하는 동물 및, 더욱 효율적인 축산물 생성을 제공하기 위한 이러한 동물의 이용 방법이 개시된다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 측면에서, 본 명세서에서는, Mrap2 유전자 변형을 포함하는 비인간 포유동물 세포로서, 상기 세포가 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 비인간 포유동물 세포가 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함한다.
- [0012] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2의 막횡단 도메인의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2의 세포내 도메인의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 서열번호 1의 적어도 하나의 아미노산 (또는 이러한 아미노산, 예를 들어, 점 돌연변이, SNP 등을 인코딩하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드)의 돌연변이를 포함한다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 변형에 있어서 이형 접합 (heterozygous)이다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 변형에 있어서 동형 접합이다. 일부 실시형태에서, 상기 비인간 포유동물 세포는 돼지; 소; 양; 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 종이다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 CRISPR, TALEN 또는 ZFN 뉴클레아제의 작용에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 재조합효소의 작용에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 재조합효소는 cre 재조합효소이다. 일부 실시형태에서, 상기 재조합효소는 조직-특이적 프로모터의 조절 하에 있다. 일부 실시형태에서, 상기 프로모터는 뉴런 또는 뇌 조직에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 상기 프로모터는 Sim1 프로모터이다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 조작된 변형, 예를 들어 자연 발생하지 않는 변형이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "조작"(engineered)은 인간의 손에 의해 다루어진 측면에 관한 것이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는, 자연적 순서로 함께 연결되어 있지 않은 2개 또는 그 이상의 서열이, 인간의 손에 의해, 조작된 폴리뉴클레오타이드에서 서로 직접 연결되도록 다루어지는 경우, "조작"된 것으로 간주될 수 있다. 추가적 예시 방식으로, 폴리뉴클레오타이드의 서열이 (예를 들어, 결실에 의해) 자연에서 발견되는 것과 다르게 변경되는 경우, 상기 폴리뉴클레오타이드는 "조작"된 것으로 간주될 수 있다. 통상적으로 실시되는 것으로서, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 조작된 폴리뉴클레오타이드의 자손 및 카피(copy)는 일반적으로, 이전체 (prior entity)에 실질적인 공작이 수행된 경우에도, 여전히 "조작"된 것으로서 언급된다.
- [0016] 일 측면에서, 본 명세서에서는 본 명세서에 개시된 바와 같은 세포를 포함하는 비인간 포유동물이 개시된다. 일 측면에서, 본 명세서에서는 본 명세서에 개시된 바와 같은 세포로 이루어진 비인간 포유동물이 개시된다.
- [0017] 일 측면에서, 본 명세서에서는 Mrap2 유전자 변형을 포함하는 녹아웃 비인간 포유동물로서, 상기 포유동물이 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 녹아웃 비인간 포유동물이 개시된다.
- [0018] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2의 막횡단 도메인의 결실을 포함한다.

다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2의 세포내 도메인의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 서열번호 1의 적어도 하나의 아미노산 (또는 이러한 아미노산, 예를 들어, 점 돌연변이, SNP 등을 인코딩하는 적어도 하나의 뉴클레오타이드)의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 변형에 있어서 이형 접합이다. 일부 실시형태에서, 상기 세포는 상기 변형에 있어서 동형 접합이다. 일부 실시형태에서, 상기 비인간 포유동물 세포는 돼지, 소, 들소, 말, 양, 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 중이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 CRISPR, TALEN 또는 ZFN 뉴클레아제의 작용에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 재조합효소의 작용에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 재조합효소는 cre 재조합효소이다. 일부 실시형태에서, 상기 재조합효소는 조직-특이적 프로모터의 조절 하에 있다. 일부 실시형태에서, 상기 프로모터는 뉴런 또는 뇌 조직에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 상기 프로모터는 Sim1 프로모터이다.

[0020] 일 측면에서, 본 명세서에서는 사체의 이용을 위해 포유동물을 생성하는 방법으로서, 본 명세서에 개시된 포유동물에 종-적합 사료를 제공하는 단계, 이용하기에 바람직한 크기에 도달한 경우, 상기 포유동물을 도축하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 야생형 포유동물 보다 80% 조기에 도축된다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 야생형 포유동물 보다 50% 조기에 도축된다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물에 무제한으로 (ad libitum) 사료가 지속적으로 공급된다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 돼지이다. 본 명세서에 개시되는 방법에서 이용하기 위한 포유동물의 기타 비제한적인 예로는 소, 말, 양, 염소, 토끼, 들소 등이 포함된다.

[0021] 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 약 75일 내지 약 125일령에서 도축된다. 기타 실시형태에서, 상기 포유동물은 4-8 개월령 사이 (예를 들어, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월째 또는 기간 내 임의의 시점)에 도축된다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물에 제한된 수준의 사료가 공급된다. 일부 실시형태에서, 상기 제한된 수준의 사료는 야생형 포유동물에 공급되는 수준의 약 60% 내지 약 95%이다. 일부 실시형태에서, 상기 제한된 수준의 사료는 야생형 포유동물에 공급되는 수준의 약 80% 내지 약 95%이다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 돼지이다. 대안적 실시형태에서, 상기 포유동물은 소, 말, 양, 토끼, 염소, 들소 등이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a-1b는 Mrap2^{-/-} 마우스의 표현형을 도시한다. 도 1a는 표준 음식 (음식 (Chow), 상단 패널: 수컷 n= 9 대 28 대 15, 암컷 n=12 대 18 대 10) 또는 고지방 식품 (HFD, 56-95일령, 하단 패널, 표준 음식 곡선에 겹쳐짐: 수컷 n= 10 대 8 대 10, 암컷 n=7 대 12 대 7)의 경우, Mrap^{+/+} 대 Mrap^{+/-} 대 Mrap2^{-/-} 마우스의 중량 곡선을 도시한다. 암컷 및 수컷에 있어서, 표준 사료식의 Mrap^{+/+} 및 Mrap^{+/-} 마우스의 중량 곡선은 더 고연령 (161-175일령)에서 현저하게 상이하며, 고지방식의 경우, 더 저연령 (56-95일령)에서 현저하게 상이하다. *p=.02, **p=.001, ***p=.0003. 도 1b는 표준 사료식의 지방 저장 그래프를 도시한다. 상단 패널: Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} (각각 수컷 및 암컷, 117-122일령, n=5 대 4)의 백색 지방 조직 (WAT) 중량. 하단 좌측 패널: Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 마우스 (수컷 및 암컷, 117-122일령, n=5 대 4)의 BAT 중량. 하단 우측 패널: Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 마우스 (암컷, 각 마우스의 세포 50 개)의 WAT 세포 크기. *p=.009, **p=.003, ***p=.0003, ****p<.00001.

도 2a-2b는 Mrap2^{-/-} 마우스의 에너지 밸런스를 도시한다. 도 2a는 무제한으로 사료가 제공된 Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=10 대 11) 및 암컷 (n=11 대 8)의 누적 사료 섭취량 (상단 패널) 및 중량 (하단 패널)의 그래프를 도시한다. 도 2b는 무제한으로 사료가 제공된 Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 마우스의 에너지 소비 그래프를 도시한다. 상단 패널, 3일령, 수컷 (n=3 대 4), 암컷 (n=4 대 3), 30-34일령의 연속 측정치. 하단 패널: 수컷 (n=18 대 14, 30-45일령), 암컷 (n=16 대 11, 30-42일령)에서, 24시간 동안 통합된 체중 대 에너지 소비. ANCOVA에 의한 분석은 유전자형에 차이가 없음을 보여준다 (수컷, p=.38, 암컷, p=.67).

도 3a-3c는 Mrap2 및 Mc4r 사이의 상호작용을 도시한다. 도 3a는 Sim1 뉴런에서, Mrap2의 조건부 결실을 입증하는 전기이동 겔을 도시한다. 상단 우측, PCR에 의한 Cre DNA 분석. Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 마우스의 HT DNA는 Cre (374 bp)를 포함하나, Mrap2^{f/f} 마우스는 그러하지 않다. 우측 (bp), 분자량 마커 (M). 상단 좌측, PCR에 의한 Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 및 Mrap2^{f/f} 마우스의 Mrap2 DNA 분석. 두 유전자형 모두 CX, FIT, 및 BS에서, floxed, 무손상 Mrap2 DNA를 포함한다 (상단 전기이동 자료, 314 bp, 및 하단 전기이동 자료, 1013 bp, 분자량 마커, 좌측).

형광 리포터 데이터와 일관된 것으로서, $Sim1^{CreBAC}::Map2^{f/f}$ 마우스만이 단지 HT 및 BS에서, $Map2^{Del}$ (400 bp, 하단 전기이동 자료)을 포함하나, CX에서는 그렇지 않다 (도 S3A). PCR 생성물은 DNA (H_2O)의 첨가 없이는 존재하지 않는다. 하단, RT-PCR에 의한 $Sim1^{CreBAC}::Map2^{f/f}$ 및 $Map2^{f/f}$ 마우스의 $Map2$ mRNA 발현. 두 유전자형 모두 CX, HT, 및 BS에서, floxed, 무손상 $Map2$ mRNA를 발현한다 (247 bp). $Sim1^{CreBAC}::Map2^{f/f}$ 마우스만이 단지 HT에서 $Map2^{Del}$ mRNA (147 bp)를 발현한다. 전영역 $Map2^{Del/Del}$ 마우스는 3개의 위치 모두에서, $Map2^{Del}$ mRNA를 발현한다. 도 3b는 모두 133일령의 것으로서, $Map2^{+/+}$ (수컷 n=6, 암컷 n=11), $Map2^{-/-}$ (수컷 n=11, 암컷 n=7), $Map2^{f/f}$ (수컷 n=8, 암컷 n=12) 및 조건부 $Sim1^{CreBAC}::Map2^{f/f}$ (수컷 n=8, 암컷 n=7) 마우스의 체중 그래프를 도시한다. *p=.04, **p=.007, ***p=.0002, ****p<.0001. 도 3c는 Mc4r 신호전달에 대한 $Map2$ 의 영향의 그래프를 도시한다. 좌측 패널: 0-10 nM α MSH에 노출 5시간 후, $Map2$ 또는 $Map2$ 녹아웃 작제물, $Map2^{delE3}$ 의 존재 또는 부재하에, Mc4r로 공동형질주입되거나 또는 단독의 CHO 세포에서, cAMP 리포터 활성 (CRELuc)의 수준 (n=3/그룹). 우측 패널: 0 nM α MSH와 비교하여, 0-10 nM α MSH 이후, 유도 백분율로서 표현된, 이들 동일한 작제물의 cAMP 활성. *p<.0001, 동일한 [α MSH]에서의 Mc4r+ $Map2$ 대 Mc4r (ANOVA). 대부분의 데이터 점에 있어서, 오차 막대는 기호에 의해 가려진다.

도 4a-4k는 $Map2$ mRNA 발현 및 $Map2^{-/-}$ 마우스의 생성을 입증한다. 도 4a는 RT-PCR에 의한 것으로서, 수컷 (M) 및 암컷 (F) 마우스의 뇌 및 말초 조직의 $Map2$ (150 염기쌍 (bp), 상단 패널) 및 Mc4r (171 bp, 하단 패널) mRNA 겔 이미지를 도시한다. 도 4b는 18S rRNA에 대한 qRT-PCR에 의한 것으로서, 시상하부의 그 양에 대하여, 수컷 마우스 조직의 $Map2$ mRNA 및 Mc4r mRNA의 그래프 비교를 도시한다. 도 4c는 중간 전핵 (MPN), 시상하부의 실방핵 (PVN), 뇌교, 외측망상체핵, 확대세포성 영역 (magnocellular region)(LRNm), 및 소뇌 전역이 주요 발현 위치인, 현장 혼성화에 의한 마우스 뇌의 관상면의 $Map2$ mRNA 발현 이미지를 도시한다. 도 4d는 야생형 마우스의 시상하부에서, 145 bp 엑손 1a를 포함하는 마이너 $Map2$ mRNA 변이체의 검출을 도시한다. 도 4e는 $Map2^{-/-}$ (널) 마우스 생성 전략 도식을 도시한다. loxP 위치 (흑색 삼각형)에 의해 플랭킹된 $Map2$ 엑손 3과 함께, 티미딘 키나아제 (TK) 유전자 및 FRT 위치 (백색 삼각형)에 의해 플랭킹된 네오마이신 내성 (neo) 유전자 카세트를 포함하는 표적 벡터를, 129Sv 배아 줄기 세포의 게놈 $Map2$ 유전자좌로 상동 재조합에 의해 혼입시켰다. 시험관 내에서, Cre-매개 작제를 이용하여, 엑손 3 및 neo 카세트를 제거하여, $Map2$ 널 ES 세포를 생성시키고, 시험관 내에서, Flpe-매개 작제를 이용하여, neo 카세트만을 제거하여, $Map2$ floxed ES 세포를 생성시켰다. ES 세포를 C56BL/6J 위임신 마우스 (pseudopregnant mouse)에 이식시키고, 수컷 자손을 129S6/SvEvTac 암컷과 교배하여, 순수 129 백그라운드에서 $Map2$ 널 또는 $Map2$ floxed 마우스를 생성시켰다. 도 4f는 $Map2^{-/-}$ 마우스의 시상하부 $Map2$ mRNA를 도시한다. 상단 좌측 패널, Stra 및 $Map2^{-/-}$ 마우스의 $Map2$ 유전자 및 mRNA 도표. $Map2^{-/-}$ 마우스에서, (막횡단 도메인을 인코딩하는) 100-염기쌍 (bp) 엑손 3을 LoxP 위치 (삼각형)로 대체하여, $Map2^{-/-}$ mRNA ($Map2^{del}$ mRNA)를 $Map2^{+/+}$ mRNA 보다 짧은 100개의 뉴클레오티드가 되도록 하였다. 상단 우측 패널, 역전사효소의 존재 (RT+) 또는 부재 (RT-) 하에, RNA 비조절 (물) 또는 $Map2^{+/+}$ 또는 $Map2^{-/-}$ 마우스의 시상하부 $Map2$ mRNA의 RT-PCR. $Map2^{-/-}$ 마우스 시상하부 RNA로부터 역전사된 cDNA의 RT-PCR은 147 bp 대 247 bp 길이다. 하단 패널, $Map2^{-/-}$ 마우스의 엑손 2-엑손 4 접합부 (우측) 또는 $Map2^{+/+}$ 마우스의 엑손 2-엑손 3 접합부 (좌측)의 시상하부 $Map2$ mRNA 서열. 전자의 경우, 엑손 3의 막횡단 도메인은 종결 코돈 옆의 11개의 비정상적인 아미노산을 인코딩하는 프레임 외부 엑손 4에 의해 대체된다. 서열은 나열 순서로, 각각 서열번호 S 67, 69, 66 및 68로서 개시된다. 도 4g는 $Map2^{-/-}$ 마우스가 정상적인 양의 돌연변이 시상하부 $Map2$ mRNA를 발현한다는 것을 입증하는 것이다. ($Map2^{-/-}$ mRNA에서, 엑손 3의 결실이 검출되지 않는 것으로서) 엑손 1 및 2 내의 프라이머 (P1F, P1R)를 이용한 반정량적 RT-PCR은 $Map2^{+/+}$ 및 $Map2^{-/-}$ 마우스 시상하부에서, (주요 변이체 1 및 마이너 변이체 2를 포함함) $Map2$ mRNA의 유사량을 나타낸다. 도 4h는 HE 293 세포의 $Map2$ RNA 및 단백질 수준을 도시한다. 무 (nothing) [TF(-)], 빈 벡터, $Map2$, 또는 $Map2^{delE3}$ 발현 작제물을 이용하여, 세포를 형질주입하고, 각각 $Map2$ mRNA 및 18S rRNA의 RTPCR (좌측 패널), 또는 $Map2$ 단백질의 웨스턴 블롯 (중앙 및 우측 패널)을 수행하였다. WT $Map2$ cDNA, 247 bp, 돌연변이 $Map2^{delE3}$ cDNA, 147 bp (도 1a). 중앙 패널, 아미노 말단에 대한, $Map2$ mAb-NH2에 의해 프로빙 (probing)된 웨스턴 블롯, 우측 패널, 카복실 말단에 대한, $Map2$ rAb-COOH에 의해 프로빙된 웨스턴 블롯. $Map2$ 단백질 예상 크기, 23.7 kD, 돌연변이 $Map2^{delE3}$

단백질 예상 크기, 5.9 kD. 별표는 Mrap2의 이동 위치를 나타내고, 수평 방향 화살표는 돌연변이 Mrap2delE3의 예상 이동 위치를 나타낸다. 분자량 마커 (kD), 각 블롯의 우측. Mrap2 및 Mrap2delE3 mRNA로부터 전사된 cDNA는 역전사효소의 존재 [RT(+)] 하에, 각 작제물의 형질주입에 의해서만 검출된다. Mrap2delE3 단백질 이외의 Mrap2는 두 항체 모두에 의해 검출된다. 도 4i는, (윗방향 화살표) 21일령에 이유를 시작한 어린 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=6 대 3) 및 암컷 (n=3 대 6) 마우스의 체중 (상단 패널, 0-32일령) 및 누적 사료 섭취 (하단 패널, 23-32일령) 그래프를 도시한다. Mrap2^{-/-} 수컷 마우스의 연령이 증가함에 따라, 중량 및 사료 섭취량이 증가하는 추세에 있게된다 할지라도, 암컷 또는 수컷의 체중 또는 사료 섭취량에 있어서, 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않는다. 도 4j는 Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} (84일령, 수컷 n=9 대 15, 암컷 n=12 대 10)의 신장 그래프를 도시한다. *p=.015, **p=.01 도 4k는 Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} (수컷 n=35 대 33, 암컷 n=34 대 40) 마우스의 지방 질량 백분율 (mass percentage) (상단 패널) 및 체지방 백분율 (mass percentage) (하단 패널)을 도시한다. *p=.001, **p=.0001.

도 5a-5s는 Mrap2^{-/-} 마우스의 표현형을 입증한다. 도 5a는 수컷 및 암컷 Mrap^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 마우스의 외형 이미지를 도시한다. 좌측 패널: 표준 사료시 외형 (175일령). 상단 우측: 암컷 Mrap^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 마우스 (175일령)의 상방 장간막 지방. 하단 우측: 암컷 Mrap^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 마우스 (175일령)의 갈색 지방 조직 (BAT). 도 5b는 Mrap^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 마우스의 혈청 렙틴 수준을 도시한다. 좌측 패널: 무제한으로 사료가 제공된 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=4 대 6) 및 암컷 (n=8 대 4) 마우스 (302-349일령). 우측 패널: 사료가 제한된 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 중량-적합 수컷 (n=4 대 6, 중량=27.4±0.6 대 24.8±0.2 g), 및 암컷 (n=4 대 6, 중량=21.5±0.6 대 20.8±0.2 g) 마우스 (135-151일령). *p=.005, **p<.00001. 도 5c는 Mrap2^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=4 대 6) 및 암컷 (n=6 대 8) 마우스 (88-194일령)의 공복시 혈청 인슐린 수준을 도시한다. 암컷 또는 수컷의 유전자형 사이에 현저한 차이는 없었다. 도 5d는 Mrap2^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=4 대 6) 및 암컷 (n=6 대 8) 마우스 (88-194일령)의 당부하검사 (복강내) 결과를 도시한다. 암컷 또는 수컷의 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. 도 5e는 Mrap2^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=4 대 3) 및 암컷 (n=6 대 7) 마우스 (124-178일령)에서, 아침, 저녁 및 억제 스트레스 (억제 스트레스) 30 분 후의 코르티코스테론의 혈중 수준을 도시한다. 3 가지 조건 모두에서, 암컷 또는 수컷의 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. (G) Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=8 대 8) 및 암컷 (n=9 대 10) 마우스 (90일령)의 소변 카테콜아민 분비. 암컷을 제외한 수컷에서, 에피네프린 및 노르에피네프린은 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. *p=.02, **p<.006. 도 5f는 22°C (수컷 n=4 대 4, 암컷 n=6 대 3) 및 4°C에서 18시간 후 (수컷 n=8 대 7, 암컷 n=7 대 5), Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 마우스 (3-9 개월령)의 BAT의 비커폴딩 단백질 (Ucp1) mRNA 함량을 도시한다. *p=.1, **p=.02, ***p=.003. 도 5h는 1600 h에서 수집된 것으로서, 무제한의 표준 사료식이 제공된 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 마우스 (40일령, n=5 대 6)의 시상하부의 Agrp 및 Pome mRNA 함량을 도시한다. Pome mRNA를 제외한 Agrp는 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. *p=.03. 도 5i는 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=9 대 7) 및 암컷 (n=13 대 11) 마우스 (42일령)에서, 4일 기간의 평균으로서, 사료 섭취량 (상단 패널) 및 체중 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 암컷 및 수컷 둘 모두에 있어서, 사료 섭취량 이외의 중량은 두 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. *p=.01, **p=.004. 도 5j는 Mrap2^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=14 대 19) 및 암컷 (n=18 대 15) 마우스 (84일령)에서, 4일 기간의 평균으로서, 사료 섭취량 (상단 패널) 및 체중 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 암컷 및 수컷 둘 모두에 있어서, 사료 섭취량 이외의 중량은 두 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. *p<.00001. 도 5k는 42 및 84일령의 Mrap2^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 수컷 (좌측 패널, n=5 대 4) 및 암컷 (우측 패널, n=7 대 5) 마우스의 배설물 에너지 함량 (fecal energy content) 그래프를 도시한다. 두 연령 모두에서, 암컷 또는 수컷의 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. 도 5l은 무제한으로 사료가 제공된 Mrap^{+/+} 대 Mrap2^{-/-} 수컷 (n=10 대 11) 및 암컷 (n=11 대 8)의 34-44일령의 누적 사료 섭취량 (상단 패널) 및 중량 증가량 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 하단 패널의 도표는 Mrap2^{-/-} 대 Mrap^{+/+} 마우스에서, 중량 증가량이 현저히 크다는 것을 입증한다. 도 5m은 무제한으로 사료가 제공된 Mrap^{+/+} 대 한 쌍으로 사료가 제공된 (한 쌍으로 제공된) (PF) Mrap2^{-/-} 마우스 수

컷 (n=10 대 11) 및 암컷 (n=11 대 10)의 누적 사료 섭취량 (상단 패널) 및 중량 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 도 5n은 한 쌍으로 사료가 제공된 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 (n=10 대 11) 및 암컷 (n=11 대 10)에서, 50-72 일령의 누적 사료 섭취량 (상단 패널) 및 중량 증가량 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 하단 패널의 도표는 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 대 $\text{Mrap}^{+/+}$ 마우스에서, 중량 증가량이 현저히 크다는 것을 입증한다. 도 5o는 무제한으로 사료가 제공된 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 제한적 사료가 제공된 (RF) $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 (n=16 대 21) 및 암컷 (n=16 대 21)의 누적 사료 섭취량 (상단 패널) 및 중량 (하단 패널) 그래프를 도시한다. 69일령의 (윗방향 화살표) 10 RF $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 및 7 RF $\text{Mrap2}^{-/-}$ 암컷은 무제한의 사료 제공에 적용되었고, 나머지는 RF로 지속하였다. 도 5p는 38-45일령의 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 (n=4 대 4) 및 암컷 (n=6 대 7)에서, 염수 또는 MTII ($2 \mu\text{g/g}$ 체중, 복강내) 후, 사료 섭취량 그래프를 도시한다. *p=.056, **p=.019, ***p=.016, ****p<.008. 도 5q는 27-31일령의 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 (n=3 대 5) 및 암컷 (n=4 대 3)의 호흡 교환 비율 (RER) 그래프를 도시한다. 상단 패널, 3일 동안의 연속 측정치. 하단 패널, 주간 대 야간의 12 h 기간 동안의 통합 측정치. 도 5r은 31-43일령의 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 수컷 (n=18 대 14) 및 암컷 (n=20 대 22)의 운동 활성 (locomotor activity) 그래프를 도시한다. 상단 패널, 3일 동안의 연속 측정치. 하단 패널, 주간 대 야간의 12 h 기간 동안의 통합 측정치. 암컷 또는 수컷 둘 모두에 있어서, 유전자형 사이에 현저한 차이가 존재하지 않았다. 도 5s는 $\text{Mrap}^{+/+}$ 대 $\text{Mrap2}^{-/-}$ 마우스 (243-261일령)의 중심부 체온 (core body temperature) 그래프를 도시한다. 상단 패널: 수컷 (n=7 대 5) 및 암컷 (n=5 대 5) 마우스에서, 22°C의 일주 온도 리듬 (Diurnal temperature rhythm). 하단 패널: 16:00 h, 22°C (수컷 n=7 대 14, 암컷 n=8 대 10) 및 4°C 배치 후 (아래 방향 화살표, 수컷 n=3 대 4, 암컷 n=2 대 2)의 체온. 암컷 또는 수컷 둘 모두에 있어서, 일주 리듬 또는 4°C에 대한 반응에서, 유전자형 사이에 현저한 온도 차이가 존재하지 않았다.

도 6a-6d는 Mrap2 와 Mc4r 사이의 상호작용을 입증한다. 도 6a는 암컷 $\text{Mrap2}^{\text{flox/flox}}$ 대 $\text{Sim1}^{\text{Cre}}::\text{Mrap2}^{\text{flox/flox}}$ 마우스의 사료 섭취량 (좌측 패널) 및 체중 (우측 패널) 그래프를 도시한다. $\text{Sim1}^{\text{Cre}}::\text{Mrap2}^{\text{flox/flox}}$ 마우스는 70일령 (윗방향 화살표)에서, 무제한으로 사료가 제공된 $\text{Mrap2}^{\text{flox/flox}}$ 마우스에 한 쌍으로 사료가 제공되거나 또는 무제한으로 사료가 제공되었다. 3개의 조건 전체 사이에 현저한 체중 차이는 없었다. *p<.001 (ANOVA). 도 6b는 Mrap2 및 Mc4r 의 재조합 녹아웃 마우스의 체중 그래프를 도시한다. 상단 패널: 혼합 $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/-}$ 유전자형 (수컷 $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/-}$, n=10; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/-}$, n=10; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=8; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=9; 암컷 $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/-}$, n=9; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/-}$, n=12; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=8; $\text{Mrap}^{+/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=8)의 체중. 하단 패널: 혼합 $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{-/-}$ 유전자형 (수컷 $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{-/-}$, n=9; $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{-/-}$, n=8; $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=8; $\text{Mrap}^{+/+}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=9; 암컷 $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{-/-}$, n=7; $\text{Mrap}^{+/+}::\text{Mc4r}^{-/-}$, n=8; $\text{Mrap}^{-/-}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=9; $\text{Mrap}^{+/+}::\text{Mc4r}^{+/+}$, n=8)의 체중. *p<.05, **p<.001 (ANOVA). 도 6c는 Mrap2 와 Mc4r 사이의 공동-면역침강 분석 결과를 도시한다. Myc-태그 Mrap2 및 GFP-태그 Mc4r 의 CHO 세포로의 형질주입을 항-Myc 면역침강 및 항-GFP 면역블로팅 후 실시하였다. L: 주입 용해물; IP: 면역침강. 64 kD Mc4r -GFP는, 단지, 두 작제물 모두 형질주입된 면역침강의 경우 및 단지, Mc4r -GFP 형질주입된 세포 용해물에만 존재한다. 좌측 분자량 마커 (kD). 도 6d는 Mc3r 신호전달 상의 Mrap2 의 영향 그래프를 도시한다. 0-10 nM αMSH 에 노출 5시간 후, Mrap2 또는 Mrap2 녹아웃 작제물, Mrap2deIE3 의 존재 또는 부재하에, Mc3r 로 공동형질주입되거나 또는 단독의 CHO 세포에서, cAMP 리포터 활성 (CRELuc)의 수준 (n=3/그룹). 우측 패널: 0 nM αMSH 와 비교하여, 0-10 nM αMSH 이후, 유도 백분율로서 표현된, 이들 동일한 작제물의 cAMP 활성. *p<.0001, 동일한 [αMSH]에서의 $\text{Mc3r}+\text{Mrap2}$ 대 Mc3r (ANOVA). 대부분의 데이터 점에 있어서, 오차 막대는 기호에 의해 가려진다.

도 7는 인간의 비만과 관련된 MRAP2 의 돌연변이를 도시한다. 4 MRAP2 엑손은 박스 안에 도시되고, 코딩 영역은 흑색이다. 중증 비만과 관련된 4 미스센스 변이체는 엑손 2 및 4에 존재한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 본 발명자들은 Mrap2 의 녹아웃이, 녹아웃 동물이 발달 과정 동안 중량 증가의 상승을 나타내어, 야생형 동물 보다 더욱더 빠르게 성숙 중량에 도달되도록 뇌에서 멜라노코르틴 수용체 신호전달 (signaling)을 조절한다는 것을 발견하였다. 본 명세서에서는 감소되고/거나 검출불가능한 수준의 Mrap2

[0023]

및/또는 Mrap2 활성의 세포 및 동물이 제공된다. 이러한 동물은 더욱 단기간 동안 성숙 중량에 도달하고, 따라서, 야생형 동물 보다 더욱 소량의 자원 소비에 의해, 다양한 축산물 (예를 들어, 고기, 섬유, 우유 및 기타 생산물)의 더욱 효율적인 생성을 가능하게 할 것이다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "Mrap2" 또는 "멜라노코르틴 수용체 부착 단백질 2 (melanocortin receptor accessory protein 2)"는 그의 신호전달을 조절하기 위해, 5개의 멜라노코르틴 수용체 (MCR)와 상호작용하는 것으로서, 뇌, 부신 및 시상하부에서 발현되는 막투과 (transmembrane)를 의미한다. Mrap2 유전자는 N-말단 (특히 N9)에서 N-연결 글리코실화의 단백질 대상체를 인코딩하는 3 엑손을 포함한다. Mrap2는 N-말단 도메인 (서열번호 1의 아미노산 1-44), 막횡단 도메인 (서열번호 1의 아미노산 45-67), 및 C-말단 도메인 (서열번호 1의 아미노산 68-205)을 포함한다. 다양한 종류의 Mrap2, 예를 들어 인간 Mrap2 (NCBI 유전자 ID No: 112609; 폴리펩티드 (NCBI Ref Seq: NP 612418, 서열번호 1); mRNA (NCBI Ref Seq: NMJ38409; 서열번호 2)) 및 돼지 Mrap2 (porcine Mrap2) (NCBI 유전자 ID No: 100515980; 폴리펩티드 (NCBI Ref Seq: XP 003353296, 서열번호 3); mRNA (NCBI Ref Seq: XM 003353248; 서열번호 4))가 공지되어 있다. Mrap2의 구조 및 기능에 대한 추가적 상세는, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Chan et al. PNAS 2009 106:6146-6151 및 Holland et al. J Clin Endocrinol Metab 2012 97:E747-E754]에서 발견할 수 있다.

[0025] Mrap2 유전자는 Mrap2 유전자좌에 연결된 임의의 서열로 여겨진다. 따라서, 이적은 적어도, Mrap2, 예를 들어 인트론, 엑손, Mrap2 코딩 및 비코딩 서열이 포함된 5' 상류 서열 및 Mrap2 코딩 및 비코딩 서열이 포함된 3' 하류 서열을 발현시키는 임의의 유기체 내에 포함된 염색체 핵산을 포함할 것이다. Mrap2의 엑손은 서열번호 2의 위치 1-183에 해당하는 뉴클레오티드로 이루어지고; Mrap2의 엑손 2는 서열번호 2의 위치 184-317에 해당하는 뉴클레오티드로 이루어지며; Mrap2의 엑손 3는 서열번호 2의 위치 318-417에 해당하는 뉴클레오티드로 이루어지고, Mrap2의 엑손 4는 서열번호 2의 위치 418-2214에 해당하는 뉴클레오티드로 이루어진다. Mrap2의 코딩 서열은 서열번호 2의 위치 191-808에 해당하는 뉴클레오티드로 이루어진다.

[0026] Mrap2는 뇌에서, 멜라노코르틴 수용체, 특히 Mc4r과 상호작용함으로써 기능한다. 이러한 상호작용을 통해, 이것은 Mc4r에 의해 매개되는 시클릭 AMP (cAMP)의 발생을 증강시킨다. 일부 실시형태에서, Mrap2의 기능성은 Mc4r 활성의 생검을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들어, Mc4r를 발현하는 세포는 α -멜라노사이트 자극 호르몬과 접촉될 수 있다. α -멜라노사이트 자극 호르몬의 첨가는, 기능성 Mc4r 및 기능성 Mrap2가 존재하는 경우, PKA 활성 (예를 들어, cAMP의 수준을 직접 분석하거나 또는, cAMP 생성에 대한 반응으로 유도되는 pCRE-LUC와 같은 수용체의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있음)을 유도할 것이다. 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2가 결핍된 세포는, α -멜라노사이트 자극 호르몬의 첨가 이전의 활성 수준 보다 더욱 큰 PKA 활성 유도 수준, 예를 들어 상기 호르몬의 첨가 이전의 수준 보다 3x 이하, 2x 이하 또는 1.5x 이하의 유도 수준을 나타내지 않을 것이다.

[0027] Mrap2의 변경된 버전을 이용하여 세포를 형질주입시키고, α -멜라노사이트 자극 호르몬에 의한 PKA 활성의 유도를 측정함으로써, Mrap2가 비기능성이 되도록 하는 변형으로 변형이 이루어졌는지를 측정할 수 있다.

[0028] 일부 실시형태에서, Mrap2가 비기능성이 되도록 하는 변형은 본 명세서의 임의의 부분에서 개시된 바와 같이, Mrap2의 발현의 억제 또는 기능성에 요구되는 도메인이 결핍된 Mrap2의 발현의 억제를 야기하는 변형이다. Mrap2 발현의 수준은, 이로 제한되는 것은 아니나, 당업계에 공지된 RT-PCR, qRT-PCR, 노던 블로팅, 웨스턴 블로팅, 면역화학 등을 비롯한 핵산 및/또는 폴리펩티드 발현의 수준을 측정하는 방법에 의해 측정할 수 있다. Mrap2 발현 생성물의 증폭에 적합한 프라이머가 본 명세서의 표 4에서 제공된다. 다양한 Mrap2 도메인의 검출에 적합한 항체는 본 명세서의 실시예에 개시된다. 일부 실시형태에서, 상업적 Mrap2 항체, 예를 들어 Mrap2의 막투과 및/또는 C-말단 도메인에 특이적인 항체는 본 명세서에 개시된 방법에 의해 이용될 수 있다 (ab129397 from Abcam, Cambridge, MA).

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "기능성"(functional)은, 그로부터 유도되는 기본 폴리펩티드의 최소 검출 가능한 수준의 활성을 보유하는 폴리펩티드의 일부 및/또는 변이체를 의미한다. 예를 들어 Mrap2 활성 및/또는 기능성의 검출 방법은 본 명세서의 다른 부분에서 개시된다. 일부 실시형태에서, 기능성 단편은 기본 폴리펩티드의 적어도 50% 활성, 예를 들어 기본 폴리펩티드의 활성의 50% 이상, 활성의 60% 이상, 활성의 75% 이상, 활성의 90% 이상을 보유할 수 있다. 본 명세서에서 언급되는 바와 같이, "변이체"는 기본 또는 참조 폴리펩티드에 실질적으로 상동이나, 하나의 또는 복수의 결실, 삽입 또는 치환에 의해 기본 또는 참조 폴리펩티드와 상이한 아미노산 서열을 가지는 폴리펩티드이다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "검출 가능한"(detectable)은, 통계적으로 유의한 량에 의해, 백그라운드 또는 음성 조절 수준과 구별될 수 있는 수준 (예를 들어, 농도 또는 활성)을 의미한다. 일부 실시형태에서,

Mrap2 및/또는 Mrap2 활성의 저하된 수준은 동일한 유형의 야생형 세포 및/또는 동물에서 발견되는 수준의 10% 이하, 예를 들어 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 2% 이하 또는 1% 이하이다.

[0031] "변형"(modification)은, 자손 동물에 전달되는 동물의 유전 물질의 검출가능한 변화이다. 변형은 일반적으로, 예를 들어 뉴클레오티드의 첨가, 결실, 전환 (inverting) 또는 치환에 의해 얻어지는 변형으로서, 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드의 변화이다. 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, Mrap2의 변형은, "녹아웃" 동물을 생성시키는 것으로서, 최소 일부 환경 하에서, Mrap2 유전자가 비기능성이 되도록 한다. 일부 실시형태에서, Mrap2는 이러한 변형을 포함하는 임의의 세포에서 비기능성이 되고, 일부 실시형태에서, Mrap2는, 예를 들어 본 명세서의 하기에서 개시되는 바와 같이, 조직 특이적 재조합 효소 변형의 경우, 이러한 변형을 포함하는 특이적 세포 유형에서 비기능성이 된다.

[0032] 일부 실시형태에서, 세포 및/또는 동물의 게놈은, 세포 및/또는 동물에서, 검출가능한 수준의 Mrap2가 생성되지 않는 Mrap2의 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 및/또는 동물의 게놈은 Mrap2의 하나 이상의 엑손의 하나 이상의 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 및/또는 동물의 게놈은, 예를 들어 막형단 도메인 및/또는 C-말단 도메인이 번역되기 전에, 펩티드의 번역이 일찍 종결되도록 하기 위해, Mrap2로 삽입된 종결 코돈을 포함할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 녹아웃 세포 또는 동물은 하나 또는 양쪽의 Mrap2 카피에 Mrap2의 변형이 존재할 수 있다. 동형 접합 변형이 존재하는 후자의 경우, 이 돌연변이는 "널" 돌연변이(null mutation)라 한다. Mrap2의 한쪽 카피만이 변형된 경우, 이러한 녹아웃 동물은 "이형 접합 녹아웃 동물"이라 한다. 본 발명의 녹아웃 동물은 양쪽 Mrap2 카피의 파괴(disruption)에 있어서 일반적으로 동형 접합이다.

[0034] 일부 실시형태에서, 형질전환 비인간 동물의 게놈은, 이형 접합 선택 마커 유전자, 예를 들어, Mrap2의 변형에 의해 게놈 내로 도입되는 마커를 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 세포 또는 동물은, 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 임의의 비인간 종, 예를 들어 포유동물 종일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 동물은 농업 목적, 예를 들어 동물에 의해 생성되는 생성물 (예를 들어, 우유 또는 섬유)의 이용 또는 사체 (예를 들어, 소비용 고기)의 이용을 위해, 사육되는 종일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 동물은 사육된 종 및/또는 변종일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 동물은, 예를 들어 어류, 조류 또는 파충류일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 동물은 비인간 포유동물일 수 있다. 포유동물의 비제한 예로는 돼지, 소, 양, 염소, 토끼, 알파카, 버팔로, 들소, 낙타, 고양이, 사슴, 당나귀, 개, 가알, 기니아피그, 말, 라마, 노새, 사슴, 엘크, 야크가 포함될 수 있다.

[0036] 세포는, 본 명세서에서 개시되는 바와 같이, 이로 제한되는 것은 아니나, 배아 줄기 세포, 배아 세포, 생식 세포, 체세포, 뇌 세포, 뉴런, 배양 가능 세포 (예를 들어, ES 세포), 전구 세포, 줄기 세포 등을 비롯한 임의의 유형의 세포일 수 있다.

[0037] 일부 측면에서, 본 명세서에서는, 형질전환 Mrap2 녹아웃 세포 및/또는 동물, 예를 들어 Mrap2 코딩 서열이 변형되지 않았으나, 기능성 Mrap2의 발현이 검출되지 않는 세포 및/또는 동물이 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 변형은 Mrap2 유전자 외의 다른 위치에서 게놈 내로 도입될 수 있다. 이러한 형질전환 Mrap2 녹아웃은 Mrap2 유전자를 표적으로 하는 안티센스 분자를 포함할 수 있다.

[0038] 일부 실시형태에서, 변형된 Mrap2 유전자는, 예를 들어 그 위치가 lox 위치이고, 재조합효소가 cre 재조합효소인 재조합 효소에 의한 재조합 위치를 포함한다. 재조합효소가 존재하는 경우, 재조합효소 위치 사이의 핵산 서열이 게놈으로부터 삭제되어, 예를 들어, 본 명세서의 임의의 부분에서 개시된 바와 같이, 비기능성이 되도록 하는 Mrap2의 일부의 결실이 발생할 수 있다.

[0039] 일부 실시형태에서, 상기 변형은 재조합효소의 작용에 의해 생성된다. 일부 실시형태에서, 재조합효소는 cre 재조합효소이다. 일부 실시형태에서, 재조합효소는 조직 특이적 프로모터의 조절 하에 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 뉴런 또는 뇌 조직, 예를 들어 Sim1 프로모터에 특이적이다. 뉴런 및/또는 뇌 조직에 특이적인 프로모터는 당업계에 공지된 것으로서, 예를 들어 수초 염기성 단백질, 프로락틴, GFAP, NSE, 네스틴, 시냅신 I, 프레프로엔케팔린 및 도파민 베타-수산화효소의 프로모터이다. 예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Papadakis et al. Current Gene Therapy 2004 4:89-113]을 참조한다.

[0040] 일부 측면에서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 세포로 이루어지거나 또는 이를 포함하는 동물이 본 명세서

에 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 비인간 포유동물이다.

- [0041] 일 측면에서, 본 명세서에서는, Mrap2 유전자의 변형을 포함하는 동물로서, 상기 포유동물이 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현하지 않는 동물이 개시된다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 비인간 포유동물이다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 형질전환 동물이다. 일부 실시형태에서, 상기 동물은 녹아웃 동물이다.
- [0042] 본 명세서에 개시되는 세포 및/또는 동물을 얻을 수 있는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 세포 및/또는 동물의 게놈 내의 변형의 도입 방법에 대한 비제한적 예로는 미세 주입, 바이러스성 전달, 재조합효소 기술, 상동 재조합, TALENS, CRISPR, 및/또는 ZFN이 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Clark and Whitelaw Nature Reviews Genetics 2003 4:825-833]을 참조한다.
- [0043] 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), Cas9/ CRISPR 시스템 및 전사 활성화 인자 유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN)는 메가뉴클레아제이다. 메가뉴클레아제는 미생물 중에서 일반적으로 발견되며, 매우 긴 인식 서열 (>14bp)을 가지고, 이에 따라 자연적으로, 목적 위치에서의 절단에 매우 특이적이 되도록 하는 고유 특성을 갖는다. 예를 들어 게놈 내의 위치 특이적 이중 가닥 절단 (site-specific double-stranded break)의 제조가 이용될 수 있다. 이들 뉴클레아제는 게놈 내의 목적 위치에서, 그 후, 상동 재조합 (HR), 상동성 유도 복구 (homology directed repair) (HDR) 및 비상동성 말단-접합 (nonhomologous end-joining) (NHEJ)과 같은 세포성 내인성 과정에 의해 복구되는 특이적인 이중 가닥 절단을 자르고 생성할 수 있다. NHEJ는 이중 가닥 절단에서 DNA 말단에 직접 접합되고, HDR은 절단 지점에서 누락 DNA 서열의 재생을 위한 주형으로서 상동서열을 이용한다. 따라서, Mrap2에 특이적인 ZFN, CRISPR, 및/또는 TALEN의 세포로의 도입에 의해, 적어도 하나의 이중 가닥 절단이 Mrap2에 생성될 수 있고, 적어도 일부의 Mrap2 유전자의 삭제 (즉, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 변형의 도입)가 초래될 수 있다 (예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Gaj et al. Trends in Biotechnology 2013 31 :397-405; Carlson et al. PNAS 2012 109:17382-7; 및 Wang et al. 세포 2013 153:910-8]을 참조한다). 대안적으로, 예를 들어 ZFN과의 조합에서, 특이적으로 설계된 상동 공여체 DNA가 제공되는 경우, DSB의 복구가 내인성 위치에서 변화된 소수의 뉴클레오타이드 또는 절단 위치에서 신규의 및/또는 변형된 유전자의 첨가를 포함할 수 있기 때문에, 이러한 주형은 유전자 수집 또는 삽입을 초래할 수 있다. 당업자는 이들 자연 발생 메가뉴클레아제를 이용할 수 있을 것이나, 이러한 자연 발생 메가뉴클레아제의 수는 제한적이다.
- [0044] 이러한 문제를 극복하기 위해, 돌연변이 유발 및 고속 대량 스크리닝 방법 (high throughput screening method)이, 고유 서열을 인식하는 메가뉴클레아제 변이체의 생성에 이용되어 왔다. 예를 들어, 다양한 메가뉴클레아제는 신규의 서열을 인식하는 혼성 효소의 생성을 위해 융합된다.
- [0045] 대안적으로, 메가뉴클레아제의 DNA 상호작용 아미노산이 서열 특이적 메가뉴클레아제의 설계를 위해 변경될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 8,021,867호를 참조한다). 예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Certo, MT et al. Nature Methods (2012) 9:073-975; 미국특허 제 8,304,222호; 제 8,021,867호; 제 8,119,381호; 제 8,124,369호; 제 8,129,134호; 제 8,133,697호; 제 8,143,015호; 제 8,143,016호; 제 8,148,098호; 또는 제 8,163,514호]에 개시된 방법을 이용하여, 메가뉴클레아제가 설계될 수 있다. 대안적으로, 위치 특이적 절단 특성의 메가뉴클레아제는 상업적으로 구할 수 있는 기술, 예를 들어, Precision Biosciences' Directed Nuclease Editor™ 게놈 편집 기술을 이용하여 얻을 수 있다.
- [0046] ZFN 및 TALEN 제한 엔도뉴클레아제 기술은 아연 핑거 및 전사 활성화 인자 유사 효과기 (TALE)와 같은 특이적 DNA 서열 인식 펩티드(들)에 연결되는 비특이적 DNA 절단 효소를 이용한다. 일반적으로 DNA 인식 위치 및 절개 위치가 서로 분리되어 있는 엔도뉴클레아제가 선택되고, 그 절개 부분은 분리되며, 그 후 서열 인식 펩티드에 연결되고, 결과적으로 목적 서열에 매우 고품위적인 엔도뉴클레아제가 생성된다. 이러한 특성을 가진 예시적 제한 효소는 FokI이다. 또한, FokI은 뉴클레아제 활성을 가지는 필요한 이량체화의 이점을 가지며, 이것은, 각각의 뉴클레아제 파트너가 고유 DNA 서열을 인식함에 따라, 이러한 특이성이 급격하게 증가된다는 것을 의미한다. 이러한 효과를 향상시키기 위해, 헤테로다имер로서의 기능만을 할 수 있고, 촉매 활성이 증가된 FokI 뉴클레아제가 작제되었다. 헤테로다имер 기능 뉴클레아제는 원치않는 호모다имер 활성의 가능성을 회피하며, 따라서 이중 가닥 브레이크의 특이성이 증가된다.
- [0047] ZFN 및 TALEN 양자의 뉴클레아제 부분이 유사한 특성을 가진다 할지라도, 이러한 작제 뉴클레아제 사이의 차이는 그들의 DNA 인식 펩티드에 있다. ZFN는 Cys2-His2 아연 핑거에 의존적이며, TALEN은 TALE에 의존적이다. 이들 DNA 인식 펩티드 도메인 둘 모두는, 이들이 그들의 단백질 조합에서 자연적으로 발견된다는 특성을 갖는다. Cys2-His2 아연 핑거는 일반적으로, 3 bp 간격의 반복 인자에서 발생하고, 전사 인자와 같은 다양한 핵산 상호

작용 단백질의 다양한 조합에서 발견된다. 다른 한편으로, TALE는 아미노산과 그 인식 뉴클레오타이드 쌍 사이에, 일 대 일 인식을 가지는 반복 인자에서 발견된다. 아연 핑거 및 TALE 둘 모두 반복 패턴에서 발생하기 때문에, 광범위한 서열 특이성의 생성을 위해, 상이한 조합이 시도될 수 있다. 위치 특이적 아연 핑거 엔도뉴클레아제의 제조를 위한 접근법에는 이들 중, 예를 들어 모듈식 조립 (modular assembly) (삼중 서열과 연관된 아연 핑거는 필요한 서열을 포괄하기 위해, 열 (row) 내로 부착됨), OPEN (세균계 (bacterial system)에서, 펩티드 도메인 대 삼중 뉴클레오타이드의 저엄격성 선택 (low-stringency selection) 후, 펩티드 조합 대 최종 표적의 고엄격성 선택) 및 아연 핑거 라이브러리의 세균성 일 혼성체 스크리닝 (bacterial one-hybrid screening)이 포함된다. 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 이용하기 위한 ZFN는, 예를 들어 Sangamo Biosciences™ (Richmond, CA)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0048] 일부 실시형태에서, Cas9/ CRISPR 시스템이 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 Mrap2 유전자 변형의 생성에 이용될 수 있다. 일정간격으로 규칙적으로 모여있는 작은 문회 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat) (CRISPR)/CRISPR-부착 (Cas) 시스템은, 예를 들어 RNA-프로그램 게놈 편집 (RNA-programmable 게놈 editing)에 유용하다 (예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Marraffini and Sontheimer. Nature Reviews Genetics 2010 11 : 181-190; Sorek et al. Nature Reviews Microbiology 2008 6: 181-6; Karginov and Hannon. Mol Cell 2010 1 :7-19; Hale et al. Mol Cell 2010:45:292-302; Jinek et al. Science 2012 337:815-820; Bikard and Marraffini Curr Opin Immunol 2012 24:15-20; Bikard et al. 세포 Host & Microbe 2012 12: 177-186]을 참조한다). 이중 가닥 브레이크를 발생시키는 게놈 내 목적 위치로 Cas 효소를 표적화할 수 있는 CRISPR 가이드 RNA가 이용된다. 이러한 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Mali et al. Science 2013 339:823-6]에 개시되어 있으며, PRECISION X CAS9 SMART 뉴클레아제™ System (Cat No. CAS900A-1) (System Biosciences, Mountain View, CA)와 같은, 이 설계를 위한 키트 및 CRISPR-매개 게놈 편집의 이용법은 상업적으로 입수할 수 있다.

[0049] 일부 실시형태에서, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자 (예를 들어 펩티드 및/또는 펩티드/핵산 복합체)는, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자의 존재가 일시적이고, 상기 세포로부터 유래하는 동물 또는 그 자손에서 검출 불가능하도록 하는 방식으로, 배양 ES 세포와 같은 세포로 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자를 인코딩하는 핵산 (예를 들어, 펩티드/핵산 복합체 일부를 인코딩하는 펩티드 및/또는 다중 핵산)은, 세포 내에서 상기 핵산이 일시적으로 존재하고, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자 자체뿐 아니라, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자를 인코딩하는 핵산이 상기 세포로부터 유래하는 동물 또는 그 자손에서 검출 불가능하도록 하는 방식으로, 배양 ES 세포와 같은 세포로 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자를 인코딩하는 핵산 (예를 들어, 펩티드/핵산 복합체 일부를 인코딩하는 펩티드 및/또는 다중 핵산)은, 상기 핵산이 세포 내에서 유지 (예를 들어, 게놈 내로 혼입)되고, CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자를 인코딩하는 핵산 및/또는 CRISPR, TALEN 또는 ZFN 분자가 상기 세포로부터 유래하는 동물 또는 그 자손에서 검출 불가능하도록 하는 방식으로, 배양 ES 세포와 같은 세포로 도입될 수 있다.

[0050] 비제한적인 예로서, Mrap2의 엑손 3의 5' 말단을 표적화하는 TALEN 및 Mrap2의 엑손 3의 3' 말단을 표적화하는 TALEN이 세포로 도입되어, 엑손 3이 결실된 Mrap2의 변형이 초래될 수 있다.

[0051] 대안적으로, Mrap2의 변형은, 살아 있는 포유동물 세포로의 DNA 서열의 삽입, 결실 또는 치환을 가능하게 하는 rAAV 벡터의 이용을 중심으로 하는 게놈-편집 플랫폼인 재조합 아데노-부착 바이러스 (rAAV) 기반 게놈 공학을 이용하여, 세포의 게놈 내로 도입될 수 있다. rAAV 게놈은 약 4.7 킬로베이스 길이의, 양성 또는 음성-센스 단일 가닥 테옥시리보핵산 (ssDNA) 분자이다. 이들 단일 가닥 DNA 바이러스 벡터는 높은 형질도입율을 가지며, 게놈 내의 이중 가닥 DNA 절단의 야기 없이, 내인성 상동 재조합 자극의 고유 특성을 갖는다. 당업자는 목적 게놈 유전자좌를 표적화하는 rAAV 벡터를 설계할 수 있으며, 결실과 같은, 중대하고/거나 미묘한 내인성 유전자 변형 둘 모두를 수행할 수 있다. rAAV 게놈 편집은, 이것이 단일 대립 유전자를 표적화하고, 임의의 비표적 게놈 변형을 초래하지 않는다는 이점을 갖는다. rAAV 게놈 편집 기술은 상업적으로 구할 수 있다 (예를 들어, rAAV GENESIS™ 시스템 (Horizon™ (영국 캠브리지)).

[0052] 본 명세서에 개시되는 다양한 측면의 일부 실시형태에서, 표적화 벡터가 Mrap2의 변형 도입을 위해 이용될 수 있다. "표적화 벡터"는, 예를 들어 상동 재조합에 의해 분열되는 유전자 내로 삽입될 수 있는 서열을 포함하는 벡터이다. 표적화 벡터는 일반적으로, 유전자 내로 삽입되는 외래 DNA 서열 및/또는 변형을 포함하는 DNA 서열 주변에, 대상 유전자의 단편에 상동인 5' 플랭킹 영역 및 3' 플랭킹 영역을 갖는다. 예를 들어, 외래 DNA 서열은 항생 물질 내성 유전자와 같은 선택 마커를 인코딩할 수 있다. 적절한 선택 마커의 예로는 네오마이신 내성

유전자 (NEO) 및 히그로마이신 β -포스포트랜스포라아제 유전자가 있다. 5' 플랭킹 영역 및 3' 플랭킹 영역은, 비관련 DNA 서열로 대체되는 유전자 부분 주위의 유전자 내의 영역에 상동이다. 일부 실시형태에서, 표적화 벡터는 선택 마커를 포함하지 않는다. 표적화 벡터 및 대상 고유 유전자를 포함하는 DNA는, 상동 재조합을 선호하는 조건 하에서 접촉된다. 예를 들어, 표적화 벡터는, 주후 상동 재조합에 적용될 수 있는 배아 줄기 (ES) 세포의 변환 (transforming)에 이용될 수 있다.

[0053] 일반적인 표적화 벡터는 변형되는 유전자 (예를 들어 Mrap2)를 인코딩하는 게놈 유전자좌의 5' 및 3' 말단 둘 모두로부터 약 0.5 kb 이상, 약 10.0 kb 이하의 핵산 단편을 포함한다. 이들 두 단편은 도입되는 변형을 인코딩하는 핵산의 중재 단편에 의해 분리된다. 이 유전자좌에서, 생성된 작제물의 염색체와의 상동 재조합시, 종결 코돈의 삽입 또는 엑손의 결실과 같은 변형의 도입이 초래된다.

[0054] 전술된 표적화 벡터의 상동 재조합은 때때로 예외적이고, 이러한 작제물은, 결실 표적의 유전자에 영향이 없고, 그 외에는 변경이 의도되지 않은 다른 유전자의 파괴를 위해, 재조합 가능성이 있는 게놈 내의 무작위 영역으로 비상동 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 비상동 재조합 사건은 (특히, 당업계에 잘 공지되어 있는 적절한 조직 배양 배지, 즉 5-브로모데옥시우리딘과 같은 약물을 포함하는 배지 중에서, 세포주의 발현에 의해 선택될 수 있는 폴리펩티드 생성물인 티미딘 키나아제 유전자의 두 대립 유전자 변이체의 이용을 통해), 다른 쪽 말단에서, 음성 선택 마커에 의해 플랭킹되도록, 전술된 표적화 벡터를 변형함으로써, 선택될 수 있다. 게놈 및 음성 선택 마커를 포함하는 생성된 표적화 벡터 사이의 비상동 재조합은 일반적으로, 이들 선택 마커 유전자 중 하나 또는 둘 모두의 적절한 통합을 초래할 것이며, 따라서, 비상동 재조합에 적용되는 세포는 적절한 선택 배지 (예를 들어, 5-브로모데옥시우리딘과 같은 약물을 포함하는 배지)에서의 성장에 의해 선택될 수 있다. 양성 선택 마커 및 음성 선택 마커에 대한 동시 선택은, 변이되는 유전자의 유전자좌에서, 표적화 벡터가 상동 재조합되는 클론의 방대한 강화를 초래할 것이다.

[0055] 일부 실시형태에서, 세포로 삽입되는 각각의 표적화 벡터는 선형화 (linearizing) 된다. 선형화는, 변형 영역 또는 5' 또는 3' 상동 영역이 아닌 벡터 서열 내에서만 절단되도록 선택된 적절한 제한 엔도뉴클레아제에 의한 DNA 분해 (digesting)에 의해 정립된다.

[0056] 따라서, 표적화 벡터는, 세포에서 내인성 DNA 서열에 의해 인코딩되는 단백질의 발현을 저하 또는 억제시키는데 이용될 수 있는 핵산을 의미한다. 간단한 예시로서, 녹아웃 작제물은, 그로부터 기능성 Mrap2가 발현될 수 없도록 하는 것으로서, 폴리뉴클레오티드의 주요 부분 (예를 들어, 막횡단 도메인)이 결실된 Mrap2 폴리뉴클레오티드로 구성된다. 대안적으로, 다수의 종결 코돈이, 단백질의 조기 종결의 초래를 위해, 음성 폴리뉴클레오티드에 첨가될 수 있거나, 인트론 접합 (intron junction)이 불활성화될 수 있다. 프로브로서, 유전자의 비변형 영역을 이용하여, 제한 엔도뉴클레아제 분해 DNA의 서던 블롯 분석에 의해, 적절한 상동 재조합을 확인할 수 있다. 음성 유전자는 파괴된 유전자와는 다른 제한 패턴을 나타낼 것이므로, 프로브에 혼성화되는 제한 단편의 크기에 의해, 파괴 유전자의 존재가 측정될 수 있다.

[0057] 표적화 벡터는 Mrap2의 게놈 서열 전체 또는 단편 및 임의적으로 선택 마커, 예를 들어 양성 선택 마커를 포함할 수 있다. 비변형 플랭킹 DNA의 수 킬로베이스 (5' 및 3' 말단 양쪽)가 벡터 내에 포함될 수 있다 (예를 들어, 상동 재조합 벡터에 대한 개시로서, 문헌 [Thomas and Capechi, (1987) Cell, 51:503]을 참조한다). 본 발명의 일 측면에서, Mrap2 유전자의 게놈 서열은 적어도 일부의 Mrap2 엑손을 포함한다.

[0058] 본 발명의 선택 마커는 양성 선택 마커, 음성 선택 마커를 포함할 수 있고, 양성 및 음성 선택 마커 둘 모두를 포함할 수 있다. 양성 선택 마커의 예로는, 이로 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 네오마이신 내성 유전자 (neo), 히그로마이신 내성 유전자 등이 포함된다. 일 실시형태에서, 양성 선택 마커는 네오마이신 내성 유전자이다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 게놈 서열은 음성 선택 마커를 추가로 포함한다. 음성 선택 마커의 예로는, 이로 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 디프테리아 독소 유전자, HSV-티미딘 키나아제 유전자 (HSV-TK) 등이 포함된다.

[0059] 용어 "변형 인자 (modifier)"는 본 명세서에서, Mrap2의 변형에 영향을 줄 수 있는 임의의 분자, 예를 들어 표적화 벡터 또는 TALEN, CRISPR 또는 ZFN 분자, 복합체 및/또는, 이러한 분자 또는 이러한 복합체의 일부를 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 의미하는 것으로, 총칭하여 사용된다.

[0060] 변형 인자는, 세포, 핵막 또는 기타 존재하는 세포 또는 유전자 구조로 파괴되지 않는 한, 될 수 있는 핵 유전 물질 내로의 외인성 유전 물질의 첨가를 가능하게 하는 기술에 의해, 세포 내로 도입될 수 있다. 이러한 기술에는, 이로 제한되는 것은 아니나, 형질주입, 스크랩-로딩 (scrape-loading) 또는 벡터 감염, 수정관 미세주입법

(미국특허 제 4,873,191호, 제 4,736,866호 및 제 4,870,009호); 생식 계열로의 레트로바이러스 매개 전달 (Putten, et al, Proa Natl. Acad. Set, USA, 82:6148-6152 (1985)); 배아 줄기 세포에서의 유전자 표적화 (Thompson, et al., Cell, 56:313-321 (1989)); 유전자 트랩 벡터를 이용한 비특이적 삽입 불활성화 (미국특허 제 6,436,707호); 배아 전기천공법 (Lo, Mol. 세포. Biol., 3: 1803-1 814 (1983)); 리포펙션; 및 정자 매개 유전자 전달 (Lavitrano, et al., Cell, 57:717-723 (1989)) (본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함됨)이 포함된다. 이들 방법 및 조성물은 크게 2 가지 분류: 바이러스 기반 전달 시스템 및 비바이러스 기반 전달 시스템으로 분류될 수 있다. 예를 들어, 변형 인자는 다수의 직접 전달 시스템, 예를 들어 전기 천공법, 리포펙션, 인산 칼슘 침전, 플라스미드, 바이러스 벡터, 바이러스 핵산, 파지 핵산, 파지, 코스미드를 통하거나 또는, 양이온성 리포솜과 같은 담체 또는 세포 내 물질의 전달을 통해 전달될 수 있다. DAN의 직접 보급 및 전기 천공과 같은 물리-기계적 방법 또는 화학적 형질 주입물, 바이러스 벡터를 포함한 적절한 형질주입 수단이, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Wolff, J . A., et al, Science, 247, 1465-1468, (1990); 및 Wolff, J. A. Nature, 352, 815-818, (1991)]에 개시되어 있다. 이러한 방법들은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법의 이용에 용이하게 적용가능하다. 본 명세서에 개시된 방법은 임의의 세포 유형, 예를 들어 생식 세포, 수정란, 배아 또는 체세포로 변형 인자를 전달하는데 이용될 수 있다. 세포는 시험관 내에서 배양되거나 또는 생체 내에 존재할 수 있다. 비제한적인 실시예가 하기에 제공된다.

[0061] 일 실시예에서, 변형 인자는 미세주입에 의해 핵 유전 물질로 삽입된다. 세포 및 세포성 구조의 미세주입은 당업계에 공지 및 이용되고 있다. 전이유전자 뉴클레오티드 서열의 배아로의 도입 후, 배아는 다양한 시간 동안 시험관 내에서 인큐베이션될 수 있거나 또는 대체 숙주 (surrogate host)로 재이식되거나 또는 두 과정 모두 이루어질 수 있다. 성숙기까지의 시험관 내 인큐베이션은 본 발명의 범위 내이다. 한 가지 통상적 방법은 종류에 따라 약 1 내지 7일 동안 시험관 내에서 배아를 인큐베이션한 다음, 대체 숙주로 이들을 재이식하는 것이다. 일부 실시형태에서, 접합체가 미세주입된다. 숙주 유전자의 변형을 위한 표적으로서 접합체를 이용하는 것은, 주입 DNA가 제1 난할 (cleavage) 전에, 숙주 유전자로 혼입되는 대부분의 경우, 이점을 갖는다 (Brinster et al. (1985) PNAS 82:4438-4442). 결과적으로, 형질전환 동물의 모든 세포는 표적화 벡터의 혼입 핵산을 보유할 것이다. 이것은 또한 일반적으로, 50%의 생식 세포에 변형이 잠복되어 있을 것이므로, 최초 인자 (founder)의 자손으로의 충분한 전달로 반영될 것이다. 외래 DNA를 생식 계열로 도입시키는 한 가지 경로는 1-세포 수정란 (fertilized one-cell egg)의 전핵으로의 선형 DNA 분자의 직접 미세주입을 수반한다. 미세주입된 난자는 추후 위임신 양모 (pseudopregnant foster mother)의 수란관으로 전달되고, 발달 과정이 진행된다. 약 25%의 자손이 미세주입된 DNA의 하나 이상의 카피를 물려받는다. 형질전환 동물의 획득에 적합한 기술은 상세하게 개시되어 있다. 완전한 ES 세포 유래 형질전환 비인간 동물의 획득에 적합한 기술은 WO 98/06834에 개시되어 있다.

[0062] 일부 실시형태에서, 변형 인자는 전기 천공에 의해 세포로 도입될 수 있다. 세포 및 표적화 벡터는 제조자의 사용 지침에 따라, 전기 천공 기구를 이용하여, 전기 펄스에 노출시킬 수 있다. 전기 천공 후, 세포는 일반적으로 적절한 인큐베이션 조건 하에 회복시킨다. 그후, 본 명세서에서 설명된 바와 같이, 표적화 벡터의 존재에 대해, 세포를 스크리닝한다.

[0063] 또한, 비인간 동물 세포와 같은 세포로, 핵산 변형 인자 (예를 들어, 표적화 벡터) 또는, 변형 인자를 인코딩하는 핵산의 도입을 위해, 레트로바이러스 감염이 이용될 수 있다.

[0064] 일부 실시형태에서, 한개의 세포 또는 세포들, 예를 들어 배아로, Mrap2 변형을 도입하기 위해, 레트로바이러스가 이용될 수 있다. 예를 들어, 발달중인 비인간 배아는 시험관 내에서 포배기로 배양될 수 있다. 이 기간 동안, 난할구(blastmeres)는 레트로바이러스 감염을 위한 표적일 수 있다 (Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:1260-1264 (1976)). 난할구의 충분한 감염은 투명대 제거를 위한 효소 처리에 의해 획득될 수 있다 (Manipulating the Mouse Embryo, Hogan, ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)). 변형 인자의 도입에 이용되는 바이러스 벡터 시스템은 일반적으로, 전이유전자를 보유하는 복제결손 레트로바이러스이다 (Jahner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6972-6931 (1985); 및 Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 6148-6152 (1985)). 형질주입은 바이러스 생성 세포의 단층상에서의 난할구 배양에 의해 용이하고 충분하게 획득된다 (Van der Putten et al., supra; 및 Stewart et al., EMBO J., 6: 383-388 (1987)). 대안적으로, 감염은 후기 단계에서 수행될 수 있다. 바이러스 또는 바이러스 생성 세포는 포배강으로 주입될 수 있다 (Jahner et al., Nature, 298: 623-628(1982)). 형질전환 비인간 동물을 형성하는 세포의 서브세트에서만 혼입이 발생하므로, 대부분의 최초 인자는 전이유전자의 모자이크 (mosaic)일 것이다. 또한, 임신 중기 배아의 레트로바이러스 자궁내 감염에 의해, 생식 계통으로의 전이유전자의 도입이 또한 가능하다 (Jahner et al. (1982), supra).

- [0065] 그 밖의 바이러스 벡터에는, 이로 제한되는 것은 아니나, 아데노바이러스 벡터 (Mitani et al., Hum. Gene Ther. 5:941 - 948, 1994), 아데노-부착 바이러스 (AAV) 벡터 (Goodman et al., Blood 84:1492-1500, 1994), 렌티바이러스 벡터 (Naidini et al, Science 272:263 -267, 1996), 위험 레트로바이러스 벡터 (Agrawal et al., Exper. Hematol. 24:738-747, 1996)가 포함된다.
- [0066] 일부 실시형태에서, 변형 인자는 양이온성 리포솜 (예를 들어, DOTMA, DOPE, DC-콜레스테롤) 또는 음이온성 리포솜과 같은 리포솜을 이용함으로써, 세포로 도입될 수 있다. 리포솜은, 바람직한 경우, 특정 세포의 표적화를 용이하게 하기 위한 단백질을 추가로 포함할 수 있다. 리포솜과 관련하여, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Brigham et al. Am. j. Resp. Ceil. Mol Biol. 1 :95-100 (1989); Feigner et al. Proc. Natl. Acad. Sci LISA 84:7413-7417 (1987); 미국 특허 제4, 897, 355호]을 참조한다. 상업적으로 구할 수 있는 리포솜 제조물에는, 예를 들어 LIPOFECTI, LIPOFECT AMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Germany) 및 TRANSFECTAM (Promega Biotec, inc., Madison, WI)뿐만 아니라, 당업계의 표준 과정에 따라 개발된 기타 리포솜이 포함된다.
- [0067] 세포에 첨가되는 변형 인자 (예를 들어, 표적화 벡터 또는 TALEN 분자)의 카피 수는 첨가되는 외인성 유전 물질의 총량에 따라 다르고, 유전적 형질전환의 발생을 가능하게 하는 양일 것이다. 이론적으로, 단지 하나의 카피만 필요하다; 그러나, 일반적으로, 하나의 카피가 기능성인 것을 보장하기 위해, 표적화 벡터의 다수 카피, 예를 들어, 1,000-20,000 카피가 사용된다.
- [0068] 일부 실시형태에서, 변형 인자와 접촉되는 세포는 추후, Mrap2 유전자좌에서 적절히 변형된 것의 확인 및 분리를 위한 정확한 표적화를 위해 스크리닝된다.
- [0069] Mrap2의 변형을 포함하는 세포가 본 명세서에 개시된 방법을 통해 생성되는 경우, 줄기 세포 기술 또는 클로닝 기술을 통해, 이 세포로부터 동물이 발생될 수 있다. 예를 들어, 핵산이 형질주입된 세포가 유기체의 줄기 세포 (예를 들어, 배아 줄기 세포)인 경우, 그후, 이 세포는 형질주입 및 배양 후, 생식 계통 세포 내에 유전자 변형을 포함하는 유기체의 생성에 이용될 수 있고, 이것은 추후, 유전자 변형을 포함하는 동물의 발생 또는 그의 모든 세포의 파괴를 위한 기타 방법에서, 모든 세포 내에 유전자 변형 또는 파괴를 포함하는 다른 동물의 발생에 이용되며, 클로닝 기술이 사용될 수 있다. 이들 기술은 일반적으로 형질주입 세포의 핵을 취하고, 그후 동물 발생을 위해 조작될 수 있는 난모세포와 형질주입 핵을 융합 또는 대체를 통해 융합시킨다. ES 기술 대신 클로닝을 이용하는 과정의 이점은 ES 세포 외의 세포가 형질주입될 수 있다는 것이다. 예를 들어, 배양이 매우 용이한 섬유아세포가, 형질주입되는 세포로서 이용될 수 있고, Mrap2 변형 사건이 일어난 다음, 이 세포로부터 유래되는 세포가 전체 동물의 클로닝에 이용될 수 있다.
- [0070] 일반적으로, 녹아웃 동물의 발생에 이용되는 세포 (예를 들어, ES 세포)는 생성되는 녹아웃 동물과 동일한 종일 것이다. 따라서 예를 들어, 돼지 배아 줄기 세포는 일반적으로 녹아웃 돼지의 생성에 이용될 것이다. 다양한 세포 유형의 분리, 배양 및 조작 방법이 당업계에 공지되어 있다. 비제한적 예시로서, 배아 줄기 세포가 생성되고, 문헌 [Doetschman et al. (1985) J. Embryol. Exp. Moi. Biol. 87:27-45]]에 개시된 것과 같이, 당업자에 잘 공지된 방법을 이용하여 유지된다. 문헌 [Robertson in: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. IRI. Press, Washington, D.C. [1987]]; Bradley et al. (1986) Current Topics in Devel. Biol. 20:357-371; 및 Hogan et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1986))]에 개시된 것과 같이, 당업자에게 잘 공지된 방법을 이용하여, 녹아웃 작제물 삽입을 위해, 세포는 배양 및 준비된다.
- [0071] 일부 실시형태에서, Mrap2의 변형을 포함하는 세포의 생성 및 임의적으로 선택 후, 세포는 배아 내로 삽입될 수 있다. 삽입은 당업자에 공지된 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있으나, 일반적 방법은 미세주입이다. 미세주입의 경우, 약 10-30 세포를 마이크로피펫으로 수집하고, Mrap2 변형을 포함하는 ES 세포의 발달 중 배아로의 통합을 가능하게 하기 위해, 적절한 발달 단계의 배아로 주입한다. 예를 들어, ES 세포는 배반포 (blastocyte)로 미세주입될 수 있다. ES 세포의 삽입에 이용되는 배아의 적절한 발달 단계는 매우 종 의존적이지만, 마우스의 경우, 약 3.5일이다. 배아는 임신 중 암컷의 자궁의 관류 (perfusing)에 의해 획득한다. 그의 수립을 위한 적절한 방법은 당업자에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 비기능성이 되도록 하는 Mrap2의 변형은 재조합 효소에 의해 유발될 수 있다. 예를 들어, 재조합효소의 위치는, 이들이, Mrap2를 비기능성이 되도록 하기 위해 결실될 수 있는 영역 (예를 들어, 엑손 3)을 플랭킹하도록, 기본 Mrap2 유전자로 삽입될 수 있다. 재조합효소의 존재 하에, Mrap2의 플랭킹 영역은 결실될 것이다. 이것은 Mrap2의 유도성 또는 조직-특이적 변형 (예를 들어, 뇌에서만)을 가능하게 한다.

- [0072] 광범위하게 이용되는 위치-특이적 DNA 재조합 시스템은, 동물에서 사용하기 위해 적용된 것으로서, 예를 들어 S.세레비시아의 F1p 재조합효소 또는 박테리오파지 P1의 Cre 재조합효소를 이용한다. loxP-Cre 시스템은, 플랭킹 lox 위치 사이에 위치한 DNA의 삭제를 촉매하는 PI 파지 Cre 재조합효소의 발현을 이용한다. 조직-특이적 프로모터의 조절 하에 발현되는 Cre 또는 F1p 재조합효소에 의해 작용될 수 있는 변형된 내인성 유전자를 이용하여, 이중 전이유전자 동물 (binary transgene animal)을 발생시키기 위해, 유전자-표적화 기술을 이용함으로써, 공간적으로 또는 시간 조절 방식의 내인성 유전자 불활성화에, 위치-특이적 재조합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국특허 제 6,080,576호, 제 5,434,066호 및 제 4,959,317호; 및 문헌 [Joyner, A. L., et al. Laboratory Protocols for Conditional Gene Targeting, Oxford University Press, New York (1997)]을 참조한다. 예를 들어, loxP 위치라는 반복 인자에 의해, 34 사이의 재조합을 촉진하는 것으로서, 박테리오파지 Cre 유전자를 보유하는 형질전환 마우스의 능력을 기반으로 하는 접근법인 cre-lox 시스템은, 조직 특이적인 발달 제어 방식의 지정 유전자의 절제 (ablation)를 가능하게 한다 (Orban et al. (1992) PNAS 89:6861-6865). Cre-lox 시스템은, "녹인 (knock-in)" 방법에 의한 유전자 서열의 교환 및 위치 특이적 유전자 표적화를 위한 조직-특이적 전이유전자 발현 (Orban PC, Chui D, Marth ID. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):6861-5.)에 성공적으로 적용되었다 (Aguzzi A, Brandner S, Isentmann S, Steinbach JP, Sure U. Glia. 1995 Nov;15(3):348-64. Review).
- [0073] 재조합효소는 상이한 단계에서 전달될 수 있다. 예를 들어, 재조합효소는, 동물로의 이식 또는 키메라 생성 전에, 파괴 유전자를 포함하는 배아 줄기 세포에 첨가될 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 재조합효소는, 도입된 재조합효소 위치의 적어도 하나의 유전자 대립 유전자를 포함하는 동물의 발생 후, 전달된다. 예를 들어, 재조합효소는, 상기 재조합효소를 발현하는 동물을 이용하여, 재조합효소 위치의 유전자를 포함하는 동물을 교잡육종 (cross breeding)함으로써, 전달된다. 재조합효소를 발현하는 동물은, 예를 들어 어디에서나, 조직-제한적 방식 또는 시기-제한적 방식으로 재조합효소를 발현할 수 있다. 또한, Cre/Flp 활성은, 바이러스 벡터에서, cre/FLP-인코딩 전이유전자를 전달하거나, 변이된 리간드-결합 도메인에 융합된 cre 유전자로 이루어진 키메라 전이유전자를 보유하는 동물에 외인성 스테로이드를 투여하거나 또는, cre/FLP 발현의 조절을 위해, 전사 촉진 (transcriptional transactivation)을 이용함으로써, 일시적으로 조절될 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 변이된 재조합효소 위치가 이용될 수 있다. 예를 들어, Cre 재조합효소의 발현의 조절을 위한, 조직 특이적인 시기-제어 유도성 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 비제한적 예시로서, Cre 재조합효소의 뇌-특이적 발현을 가능하게 하는 것으로서, Sim1 프로모터 조절 Cre가 본 명세서의 실시예에 개시된다.
- [0074] 목적 변형을 포함하는 생식 계열 세포의 동물은, 예를 들어 생식 계열 세포 및/또는 자손에서, Mrap2 수준 또는 활성의 유전자형 확정 (genotyping) 또는 분석에 의해, 선택될 수 있다. 이러한 유전자형 확정 또는 분석 방법의 비제한적 예에는 RNA 분석 (qRT-PCR을 포함한 RT-PCR 또는 노던 블로팅), 본 명세서의 임의의 부분에서 개시된 바와 같은 Mrap2 활성의 측정 분석, 단백질 분석 (예를 들어, 웨스턴 블로팅), 조직학적 염색 (histological stain), 유동 혈구 계산 분석 (flow cytometric analysis) 등이 포함된다. 또한, 본 명세서에 개시된 동물에서, 변형 세포의 기여 정도는, 변형 세포 (예를 들어, 변형되는 ES 세포) 및, 상이한 외피 색 (coat color)을 가지는 배반포에 대해, 동물 종류 (animal strain)를 선택함으로써, 시각적으로 평가될 수 있다.
- [0075] 형질전환 자손은 임의의 적절한 방법에 의해, 전이유전자의 존재 및/또는 발현에 대해 스크리닝될 수 있다. 스크리닝은 종종, 전이유전자의 적어도 일부에 상보적인 프로브를 이용한 서던 블롯 또는 노던 블롯 분석에 의해 달성된다. 일반적으로, 예를 들어 꼬리 조직으로부터 DNA를 제조하고, 전이유전자에 대한 서던 분석 또는 PCR에 의해 분석한다. 대안적으로, 임의의 조직 또는 세포 유형이 이 분석에서 이용될 수 있다 할지라도, 서던 분석 또는 PCR을 이용한 변형 Mrap2의 존재 및 발현에 대해, Mrap2의 변형을 가질 것으로 생각되는 조직 또는 세포를 시험한다. 예를 들어, 서던 혼성화. (Southern J. Mol. Biol. 98:503-517 (1975)), 노던 혼성화 (예를 들어, Freeman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4094-4098 (1983)), 제한 엔도뉴클레아제 맵핑 (Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning, Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), RNase 보호 분석 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 및 Sons, New York, 1997), DNA 서열 분석, 및 중합효소 연쇄 반응 증폭 (PCR; 미국 특허 제 4,683,202호, 제 4,683,195호, 및 제 4,889,818호; Gyllenstein et al. Proc Natl. Acad. Sci. USA 85:7652-7657 (1988); Ochman et al. Genetics 120:621-623 (1988); and, Loh et al. Science 243:217-220 (1989))을 참조한다. 당업계에 통상적으로 공지된 기타 증폭 방법이 사용될 수 있다. 노던 또는 서던 블롯 분석의 혼성화 조건의 엄격성은, 사용되는 특이적 프로브와 바람직한 관련성도를 가지는 핵산의 검출을 보장하기 위해, 조정될 수 있다. 또한, 세포 또는 조직 샘플에서 유전자의 발현은, 예를 들어 문헌 [Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1997]의 Current

Protocol에 따른 현장 혼성화 기술 (in situ hybridization technique)을 이용하여, 검출 및 정량화될 수 있다.

[0076] 단백질 수준은, 단백질에 특이적인 항체를 이용한 면역분석에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 전이유전자 생성물의 존재에 대한 스크리닝의 대안적 또는 추가적 방법으로서, 전이유전자에 의해 인코딩되는 Mrap2 또는 변형 Mrap2에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석이 사용될 수 있다. 이로 제한되는 것은 아니나, 방사면역측정법, ELISA (효소 결합 면역 흡착제 분석), "샌드위치" 면역분석, 면역방사계측법, 겔내화산침강반응, 면역확산 분석, 현장 면역분석 (콜로이드 금, 효소 또는 방사성 동위 원소 표지를 사용함), 웨스턴 블롯 분석, 침전 반응, 응집 분석 (예를 들어, 겔 응집 분석, 혈구 응집 분석), 보체 고정 분석, 면역형광법, 단백질 A 분석, 면역 전기 분석 등과 같은 기술을 이용한 경쟁적 및 비경쟁적 분석 시스템을 비롯하여, 당업계에 공지된 다양한 면역분석법이 이용될 수 있다. 일 실시형태에서, 일차 항체 상의 표지 검출에 의해, 항체 결합을 검출한다. 또 다른 실시형태에서, 이차 항체 또는 일차 항체에 대한 시약의 결합 검출에 의해, 일차 항체를 검출한다. 또 다른 실시형태에서, 이차 항체는 표지된다. 면역분석에서, 결합 검출을 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 이는 본 발명의 범위 내이다.

[0077] 형질전환 동물의 자손은, 형질전환 동물의 적절한 배우자와의 짝짓기 또는 형질전환 동물로부터 얻어진 난자 및/또는 정자의 시험관 내 수정에 의해, 얻어질 수 있다. 배우자와의 짝짓기가 수행되는 경우, 배우자는 형질전환 및/또는 녹아웃이거나 또는 그렇지 않을 수 있으며, 형질전환인 경우, 동일하거나 또는 상이한 녹아웃 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 대안적으로, 배우자는 친계통 (parental line)일 수 있다. 시험관 내 수정이 이용되는 경우, 수정된 배아는 대체 숙주로 이식되거나 또는 시험관 내에서 인큐베이션되거나 또는 두 과정 모두 진행될 수 있다. 이중 하나의 방법을 이용하는 경우, 전술된 방법 또는 다른 적절한 방법을 이용하여, 그 자손을 평가할 수 있다.

[0078] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 세포 및/또는 동물은 하나 이상의 추가적 변형 또는 전이유전자 (예를 들어, Mrap2 이외의 유전자를 표적화하는 제2 녹아웃 및/또는 추가적 전이유전자)를 포함할 수 있다. 하나의 녹아웃 작제물 및/또는 하나 이상의 전이유전자 발현 작제물을 포함하는 세포 및/또는 동물은 여러 가지 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 통상의 제조 방법은, 각각이 목적 형질전환 표현형 중 하나를 포함하는 일련의 포유동물을 발생시키는 것이다. 이러한 동물은, 모든 목적 녹아웃 작제물 및/또는 발현 작제물을 포함하는 단일 동물의 궁극적 발생을 위해, 일련의 교잡, 역교잡 (backcross) 및 선택을 통해, 함께 사육되며, 상기 동물들은 달리, 녹아웃 작제물(들) 및/또는 전이유전자(들)를 제외하고, 야생형에 대해 유사유전자형 (congenic)(유전적으로 동일함)이다.

[0079] 본 명세서에서는, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 Mrap2 변형을 포함하는 핵산 분자, 예를 들어, 본 명세서에 개시되는 실시형태에 따른 Mrap2의 변형된 변이체를 포함하는 표적화 벡터가 개시된다. 본 명세서에서는, 개시된 임의의 핵산에 의해 세포를 형질전환시키는 과정에 의해 생성되는 세포가 개시된다. 본 명세서에서는, 임의의 비자연발생 개시 핵산에 의해 세포를 형질전환시키는 과정에 의해 생성되는 세포가 개시된다. 본 명세서에서는, 임의의 개시 핵산을 발현하는 과정에 의해 생성되는 펩티드가 개시된다. 본 명세서에서는, 임의의 개시 핵산을 발현하는 과정에 의해 생성되는 임의의 비자연발생 펩티드가 개시된다. 본 명세서에서는, 임의의 비자연발생 개시 핵산을 발현하는 과정에 의해 생성되는 임의의 개시 펩티드가 개시된다. 본 명세서에서는, 본 명세서에 개시된 임의의 핵산 분자를 이용한 동물 내 세포의 형질주입 과정에 의해 생성되는 동물이 개시된다. 본 명세서에서는, 본 명세서에 개시된 임의의 핵산 분자를 이용한 것으로서, 포유동물인 동물 내의 세포의 형질주입 과정에 의해 생성되는 동물이 개시된다. 본 명세서에서는, 본 명세서에 개시된 임의의 세포를 상기 동물에 첨가하는 과정에 의해 생성되는 동물이 개시된다.

[0080] 일 측면에서, 본 명세서에서는, 이용 목적의 동물의 생성 방법이 개시된다. 예를 들어, 경쟁, 사육, 살아있는 동물로부터 얻어지는 생성물 (예를 들어, 낙농 동물의 우유 또는, 예를 들어 양 또는 알파카의 섬유) 또는 작업 (예를 들어, 역용동물 (draft animal))을 위해, 동물이 이용될 수 있다. 이용하고자 하는 동물의 기능과 관계없이, 상기 동물은, 이용 전에 달성되어야 하는 바람직한 최소 크기일 것이다. 동물을 상기 크기로 성장시키는데 걸리는 시간을 최소화함으로써, 자원 및 시간이 절감되고, 유용한 동물의 생성 비용이 절감된다.

[0081] 일부 실시형태에서, 동물의 사체가 이용되어야 한다. 동물의 사체는 기타 목적 (예를 들어, 가죽, 비료, 화장품, 의약품, 헤어 제품, 향료, 젤라틴, 아교 등의 생성 목적)을 위한 것뿐만 아니라, 인간 소비용으로 이용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서는, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물에, 중-적합 사료를 제공하는 단계 및 원하는 크기에 도달된 경우, 상기 동물을 도축하는 단계를 포함하는, 사체 이용을 위한 동물

의 생성 방법이 개시된다. 예를 들어, 본 명세서에 개시되는 임의의 동물의 종-적합 사료 및 바람직한 이용 크기는, 예를 들어 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Pond et al. "Basic Animal Nutrition and Feeding" 5th Edition, Wiley, Hoboken, NJ, 2004 또는 Marshall et al. "Animal Feeding and Nutrition" 11th Edition, Kendall Hunt Publishing 2012]을 참조한다. 동물의 도축 (butchering) (즉, "도살 (slaughtering)")시, 바람직한 크기는 당업계에서, "도살시 중량" 또는 "최종 중량"으로서 언급될 수 있다. 비제한적 예시로서, 돼지는 일반적으로, 약 240 내지 280 파운드의 중량일 경우, 도축되며, 식이 섭취 권장량은 당업계, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 문헌 [Albrecht et al. "Swine Feeding Suggestions" Circular 509; Clemson Extension; (1995)]에 공지되어 있다. 대안적으로, 종-적합 사료는 상업적으로, 예를 들어 PURINA MILLS™ NATURE'S MATCH™ Sow 및 Pig Complete Feed, Cat No. 0034068; Purina, St. Louis, MO에서 구입할 수 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물은 야생형 동물 보다 80% 조기, 예를 들어 10% 조기, 20% 조기, 30% 조기, 40% 조기, 50% 조기, 60% 조기, 70% 조기 또는 80% 조기에, 바람직한 이용 크기에 도달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물은 야생형 동물 보다 50% 조기에, 바람직한 이용 크기에 도달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물은 야생형 동물 보다 80% 조기, 예를 들어 10% 조기, 20% 조기, 30% 조기, 40% 조기, 50% 조기, 60% 조기, 70% 조기 또는 80% 조기에, 도축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물은 야생형 동물 보다 50% 조기에 도축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동물은 무제한으로 (ad libitum) 사료가 지속적으로 공급될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동물은 비인간 포유동물이다. 일부 실시형태에서, 상기 포유동물은 돼지이다.

[0083] 일부 실시형태에서, 돼지는 약 50 내지 약 150일령에 도축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 돼지는 약 75 내지 약 125일령에 도축될 수 있다. 일부 실시형태에서, 돼지는 75 내지 125일령에 도축될 수 있다.

[0084] 일부 실시형태에서, 동물, 예를 들어 포유동물 및/또는 돼지는 야생형 동물 보다 제한된 수준의 사료가 제공될 수 있다. 제한된 사료 제공시, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 동물은 야생형 동물과 동일한 기간에 바람직한 사용 지정 크기에 도달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 제한된 사료 수준은 야생형 포유동물에 제공되는 수준의 약 60% 내지 약 95%이다. 일부 실시형태에서, 상기 제한된 사료 수준은 야생형 포유동물에 제공되는 수준의 약 80% 내지 약 95%이다.

[0085] 편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에 사용되는 일부 용어 및 문구들은 하기에서 수록된다. 달리 언급되거나 또는 문맥상 제시되지 않는 한, 하기 용어 및 문구들은 하기에서 제공되는 의미를 포함한다. 상기 정의는 특정 실시형태의 개시 목적으로 제공되는 것이며, 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서만 제한되는 것이므로, 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 과학적 용어는 본 발명의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 당업계에서 사용되는 용어와 본 명세서에서 제공되는 정의 사이에 명백한 차이가 존재하는 경우, 본 명세서 내에 제공되는 정의가 우선한다.

[0086] 편의상, 본 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 특정 용어가 본문에 수록된다.

[0087] 용어 "감소", "저하", "절감" 또는 "억제"는 본 명세서에서 모두, 통계적 상당량의 감소를 의미하는 것으로 사용된다. 일부 실시형태에서, "저하", "절감" 또는 "감소" 또는 "억제"는 일반적으로, 참조 수준 (예를 들어, 지정 처리의 부제시)과 비교하여, 적어도 10%의 감소를 의미하며, 예를 들어 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 그 이상의 감소를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "절감" 또는 "억제"는 참조 수준과 비교하여, 완전한 억제 또는 절감을 포함하는 것이 아니다. "완전한 억제"는 참조 수준과 비교하여, 100% 억제를 말한다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "형질전환 동물"은, 외인성 DNA가 도입되는 동물을 의미한다. 대부분의 경우, 형질전환 접근법은, 예를 들어, 기존의 세포 유전자의 상향 또는 하향 조절 또는, 전체 전사 단위의 게놈 내 도입에 의한, 게놈의 특이적 변형을 목표로 한다. 무작위 돌연변이가 화학적 돌연변이원의 투여 또는 이온화 용액 처리와 같은, 이들 과정 중 일부의 목표 특성이 생식 계열에 부여된다.

[0089] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "녹아웃"은 세포에서 내인성 DNA 서열에 의해 인코딩되는 단백질의 발현의 부분적 또는 완전한 억제를 의미한다. "녹아웃"은 세포에서 단백질을 인코딩하는 유전자의 전체 또는 그 일부의

표적 결실에 의해 영향을 받을 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 결실은, 이것이 정상적으로 발현되는 전체 동물의 임의의 세포에서, 기능성 단백질의 발현을 억제 또는 저하시킬 수 있다. 예를 들어, "Mrap2 녹아웃 동물"은, 기능성 Mrap2의 발현이, Mrap2 유전자 서열에 변형을 도입시키는 재조합 변형 인자의 도입에 의해, 저하 또는 억제된 동물을 의미한다. 녹아웃 동물은 형질전환 동물일 수 있거나, 예를 들어 게놈 내로의 외인성 DNA의 도입 없이, 전체 또는 일부 Mrap2 유전자의 결실이 유발시키는 것으로서, TALEN 분자의 일시적 도입에 의해, 형질전환 방법 없이 제조될 수 있다.

[0090] 용어 "동물"은 본 명세서에서, 인간 이외의 모든 척추동물을 포함하는 것으로 사용된다. 또한, 배아 및 태아 단계를 포함한 발달 중 모든 단계의 개별 동물을 포함한다. 용어 "생식 세포 계열 형질전환 동물"은, 유전적 변형 또는 유전자 정보가 생식 계열 세포에 도입되어, 상기 유전자 정보를 자손에 전달하는 능력이 부여된 형질전환 동물을 의미한다. 실질적으로, 이러한 자손이 이러한 변형 또는 유전자 정보의 일부 또는 전부를 보유하는 경우, 이들이 또한 형질전환 동물이다. 용어 "키메라", "모자이크", "키메라 동물" 등은 게놈-함유 세포의 일부에, 외인성 DNA 및/또는 Mrap2의 변형을 가지는 형질전환 및/또는 녹아웃 동물을 의미한다.

[0091] 용어 "이형접합체", "이형 접합 포유 동물" 등은, 모든 게놈-함유 세포의 염색체 쌍 중 하나에, 외인성 DNA 및/또는 Mrap2의 변형을 가지는 형질전환 및/또는 녹아웃 동물을 의미한다. 용어 "동형접합체", "동형 접합 포유 동물" 등은, 모든 게놈-함유 세포의 염색체 쌍 구성원 둘 모두에, 외인성 DNA 및/또는 Mrap2의 변형을 가지는 형질전환 포유동물을 의미한다.

[0092] 용어 "상동 재조합"은, 상동 뉴클레오타이드 서열의 위치의 2개의 DNA 분자 또는 염색 분체 사이에, DNA 단편의 교환을 의미한다. 용어 "유전자 표적화"는, 게놈 DNA의 단편이 포유동물 세포로 도입되는 경우 발생하고, 내인성 상동 서열에 의해 재조합되는 상동 재조합의 유형을 의미한다. 상동 재조합에 의한 유전자 표적화에는, 변형된 서열 및/또는 특정 디자인의 외인성 DNA에 의해, 특이적 게놈 서열을 대체시키는 재조합 DNA 기술이 이용된다.

[0093] 용어 "기본 발현"은, 야생형 세포 및/또는 동물에 존재하는 발현 수준에서, Mrap2 유전자와 같은 유전자에 의해 인코딩되는 전장 폴리펩티드의 발현을 의미한다. 따라서, 내인성 유전자, 예를 들어 Mrap2 유전자의 "비기본 발현"의 파괴는, 동물의 단일 세포, 선택 세포들 또는 모든 세포의 내인성 유전자, 예를 들어, 내인성 Mrap2 유전자에 의해 인코딩되는 폴리펩티드의 적어도 일부의 발현의 부분적 또는 완전한 저하를 의미한다.

[0094] 발현 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체의 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 원핵생물에 적합한 조절 서열은, 예를 들어 프로모터, 작동가능한 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 위치를 포함한다. 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서 (enhancer)의 사용을 위한 진핵생물 세포가 공지되어 있다. 핵산은, 다른 핵산 서열과의 기능성 관계에 적용되는 경우, "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 전서열 (presequence) 또는 분비 리더 (secretory leader)의 DNA는, 폴리펩티드의 분비에 관여하는 프리프로테인 (preprotein)으로서 발현되는 경우, 폴리펩티드의 DNA에 작동가능하게 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는, 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 또는 리보솜 결합 위치는, 전사 촉진을 위해 배치되는 경우, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결됨"은, 연결되는 DNA 서열이 인접되며, 분비 리더의 경우, 인접하여, 판독 단계 (reading phase)라는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접해서는 안된다. 편리한 제한 위치에서의 절찰 (ligation)에 의해, 연결이 이루어진다. 이러한 위치가 존재하지 않는 경우, 통상의 실행 방법에 따라, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "마커"는 리포터, 양성 선택 마커, 및 음성 선택 마커를 의미한다. 리포터는, 세포 내에서 발현되어, 검출가능한 신호, 예를 들어 발광과 같은 검출가능한 신호를 생성하는 임의의 분자를 의미한다. 예시적 마커는, 예를 들어 문헌 [Sambrook, J., et al., (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 및, 미국 특허 제 5,464,764호 및 제 5,625,048호]에 개시되어 있다. 선택 및 검출 마커의 다수 과정이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Joyner, A. L., (2000) Gene Targeting: A Practical Approach, 2nd ed., Oxford University Press, New York, N.Y.]을 참조한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "선택 마커" 및 "위치 선택 마커"는, 발현되어, 유전자를 포함하는 세포의 확인을 가능하게 하는 유전자, 예를 들어 항생제 내성 유전자 및 검출가능한 것으로서, 예를 들어 형광 분자를 의미한다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 생성물을 인코딩하는 유전자는, 상기 유전자를 보유하는 세포만이 특정 조건 하에서 생존 및/또는 성장 가능하도록 한다. 예를 들어, 도입된 네오마이신 내성 (Neo^r) 유전자를 발현하는 식물 및 동물 세포는 화합물 G418에 대해 내성이다. Neo^r 유전자 마커를 보유하지 않은 세포는 G418에 의해 사멸된다. 그 밖의 양성 선택 마커는 당업자에

공지되어 있거나, 당업자의 이해범위 내이다. "음성 선택 마커"는, 발현되어, 유전자를 포함하는 세포의 확인을 억제하는 유전자, 예를 들어, HSV-tk 유전자를 의미한다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서, 인접 잔기의 알파-아미노기와 카르복시기 사이의 펩티드 결합에 의해, 서로 연결된 일련의 아미노산 잔기를 가리키는 것으로 혼용된다. 용어 "단백질", 및 "폴리펩티드"는 그 크기 또는 기능에 관계없이, 변형된 아미노산 (예를 들어, 인산화, 당화 (glycation), 글리코실화 (glycosylation) 등) 및 아미노산 유사체를 포함한 아미노산 중합체를 의미한다. "단백질" 및 "폴리펩티드"는 종종 비교적 큰 폴리펩티드에 대한 참조로 사용되고, 용어 "펩티드"는 종종 작은 폴리펩티드에 대한 참조로 사용되나, 당업계에서의 이들 용어의 용도와 공통된다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서 유전자 생성물 및 그의 단편을 의미하는 것으로서 혼용된다. 따라서, 예시적 폴리펩티드 또는 단백질은 유전자 생성물, 자연 발생 단백질, 이들의 상동체, 오솔로그 (ortholog), 파라로그 (paralog), 단편 및 그 밖의 균등물, 변이체, 단편, 및 유사체를 포함한다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "핵산" 또는 "핵산 서열"은, 리보핵산, 데옥시리보핵산 단위 또는 그의 유사체가 혼입된 임의의 분자, 바람직하게는 중합체 분자를 의미한다. 상기 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 가닥 핵산은 변성된 이중 가닥 DNA의 핵산 가닥 중 하나일 수 있다. 대안적으로, 이것은 임의의 이중 가닥 DNA로부터 유래하지 않은 단일 가닥 핵산일 수 있다. 일 측면에서, 상기 핵산은 DNA일 수 있다. 또 다른 측면에서, 상기 핵산은 RNA일 수 있다. 적절한 핵산 분자는 게놈 DNA 또는 cDNA를 포함한 DNA이다. 기타 적절한 핵산 분자는 mRNA를 포함한 RNA이다.

[0098] "분리된" 핵산 분자는, 일반적으로 핵산의 자연적 공급원에 결합된 적어도 하나의 오염물질로부터 확인 및 구별된 핵산 분자이다. 분리된 핵산 분자는, 자연에서 발견되는 형태 또는 세팅 이외의 것이다. 따라서, 분리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 것과 같은 핵산 분자와 구별된다.

[0099] 용어 "유전자"는 (a) Mrap2와 같은 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는 유전자; (b) Mrap2 아미노산 서열과 같은 단백질을 인코딩하는 임의의 DNA 서열, 및/또는; (c) 단백질의 코딩 서열의 상보체에 혼성화된 임의의 DNA 서열을 의미한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 코딩 및 비코딩 영역을 포함하며, 바람직하게는 정상적인 유전자 발현에 필요한 모든 서열을 포함한다.

[0100] 용어 "표적 유전자" (대안적으로, "표적 유전자 서열" 또는 "표적 DNA 서열"을 의미함)는, 예를 들어 상동 재조합 또는 메가뉴클레아제-매개 변형 방법에 의해 변형되는 임의의 핵산 분자, 폴리뉴클레오티드 또는 유전자를 의미한다. 표적 서열은, 예를 들어 무손상 유전자, 엑손 또는 인트론, 조절 서열 또는 유전자 사이의 임의의 영역을 포함할 수 있다. 표적 유전자는 개별 게놈 DNA 내의 특정 유전자 또는 유전자좌의 일부를 포함할 수 있다.

[0101] 용어 "통계적으로 유의한" 또는 "유의적으로"는 통계적 유의성을 의미하며, 일반적으로 2 표준편차 (two standard deviation) (2SD) 또는 더 큰 차이를 의미한다.

[0102] 작동예 외에 또는 달리 제시되지 않은 경우, 본 명세서에 사용된 성분 또는 반응 조건의 양을 표현하는 모든 수치는 용어 "약"에 의해, 모든 예에서 변동되는 것으로 이해되어야 한다. 백분율과 연관되어 사용되는 경우, 용어 "약"은 $\pm 1\%$ 를 의미할 수 있다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "~를 포함하는" 또는 "~를 포함하다"는 조성물, 방법 및, 종종, 필수 여부와 상관없이, 명시되지 않은 구성 요소를 포함하는 것으로서, 상기 방법 또는 조성물에 필수적인 그의 각각의 성분(들)에 대한 참조로서 사용된다.

[0104] 용어 "~로 이루어진"은, 실시형태의 개시 내용에 인용되지 않은 임의의 구성 요소를 배제하지 않는 것으로서, 본 명세서에서 개시되는 바와 같은 조성물, 방법 및 그의 성분을 의미한다.

[0105] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "~로 필수적으로 이루어진"은 지정 실시형태에 필요한 그의 구성 요소를 의미한다. 상기 용어는 이러한 실시형태의 기본적인 것으로서, 신규하거나 또는 기능성인 특성(들)에 실질적으로 영향을 미치지 DKG는 구성 요소의 존재를 허용한다.

[0106] 단수 "하나 (a, an)" 및 "상기 (the)"는 문맥상 달리 분명하게 명시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 유사하게, 용어 "또는"은 문맥상 달리 분명하게 명시되지 않는 한, "및"을 포함하는 것이다. 본 명세서에서 개시되는 것과 유사하거나 또는 균등한 방법이 본 개시 내용의 실행 또는 시험시 사용될 수 있다 할지라도, 적합한 방법 및 물질이 하기에서 개시된다. 약어 "예를 들어 (e.g.)"는 라틴어 *exempli gratia*에서 유래된 것으로서, 본 명세서의 경우, 비제한적인 예시를 가리키는 것으로 사용된다. 따라서, 상기 약어 "예를 들어"는

용어 "예를 들어"와 동의어이다.

- [0107] 세포 생물학 및 분자 생물학에서의 통상적 용어의 정의는 Blackwell Science Ltd에서 발행된 [Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd), 1994 (ISBN 0-632-02182-9; Benjamin Lewin, Genes X, published by Jones & Bartlett Publishing, 2009 (ISBN-10: 0763766321); Kendrew et al. (eds.), Molecular Biology 및 Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference (VCH Publishers, Inc.), 1995 (ISBN 1 -56081-569-8) 및 Current Protocols (Protein Sciences 2009, Wiley Intersciences, Coligan et al., eds)]에서 찾아볼 수 있다.
- [0108] 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은, 예를 들어 본 명세서에서 그 전문이 참조로서 포함되는 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2001); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (1995); Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, et. al., ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Cell Biology (CPCB) (Juan S. Bonifacino et. al. ed., John Wiley and Sons, Inc.), 및 Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique by R. Ian Freshney, Publisher: Wiley-Liss; 5th edition (2005), Animal Cell Culture Methods (Methods in Cell Biology, Vol. 57, Jennie P. Mather and David Barnes editors, Academic Press, 1st edition, 1998)]에 개시된 바와 같이, 표준 과정을 이용하여 수행되었다.
- [0109] 그 밖의 용어는 본 명세서의 다양한 본 발명의 측면에 대한 개시 내용에서, 정의된다.
- [0110] 본 출원에서 인용된 참조 문헌, 발행된 특허, 공개 특허 출원 및 계류 중인 특허 출원을 포함한 모든 특허 및 기타 문헌은, 예를 들어 본 명세서에서 개시되는 기술과 관련하여 사용될 수 있는, 이러한 문헌에 개시된 방법론을 개시 및 설명할 목적으로, 본 명세서에서 참조로서 명시적으로 포함된다. 이들 문헌들은 본 출원의 출원일자 전에, 단지 그의 상세한 설명을 위해 제공된다. 이와 관련하여, 그 어떤 것도, 본 발명자들이, 임의의 다른 이유로 또는 종래 발명의 관점에서, 그러한 개시물들에 선행할 자격을 갖지 않았다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안된다. 이들 문헌의 내용에 대한 표현 또는 일자에 대한 모든 명시 사항은 해당 출원인에게 입수할 수 있는 정보에 기초한 것이며, 이들 문헌의 일자 또는 내용에 대한 단정으로서, 어떠한 인정도 구성하지 않는다.
- [0111] 본 발명의 실시형태에 대한 기재 내용은, 개시된 정확한 형태로서, 본 발명을 제한하거나 또는 완전한 것이라는 의도는 아니다. 본 명세서에서, 본 발명의 구체적 실시형태 및 실시예가 설명 목적으로 개시되나, 당업자에 의해 인지될 수 있는 것으로서, 다수의 균등한 변형이 본 발명의 범위 내에서 가능하다. 예를 들어, 방법 단계 또는 기능들이 지정된 순서로 제공되나, 대안적 실시형태는 상이한 순서로 기능들을 수행할 수 있거나, 또는 실질적으로 동시에 기능들을 수행할 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 본 발명의 기술들은 적절한 경우, 그 밖의 과정 또는 방법에 적용될 수 있다. 본 명세서에 개시되는 다양한 실시형태는 추가적 실시형태의 제공을 위해 조합될 수 있다. 본 발명의 측면들은, 필요한 경우, 본 발명의 추가적 실시형태의 제공을 위해, 상기 참조 및 출원들의 조성물, 기능 및 내용을 사용하는 것으로 변형될 수 있다. 또한, 생물학적 기능성 균등 사항으로 인해, 종류 또는 양적 측면에서, 생물학적 또는 화학적 작용에 대한 영향 없이, 단백질 구조에 대해 일부 변화가 이루어질 수 있다. 본 상세한 설명의 관점에서, 본 발명에 있어서, 이들 및 그 밖의 변화가 이루어질 수 있다. 모든 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함되는 것이다.
- [0112] 임의의 상기 실시형태의 구체적 구성요소는 기타 실시형태에서, 구성요소에 있어서, 조합 또는 치환될 수 있다. 또한 본 발명의 특정 실시형태와 관련된 이점들이 이들 실시형태의 맥락 내에서 설명되나, 또한 그 밖의 실시형태가 이러한 이점을 나타낼 수 있으며, 모든 실시형태가, 본 발명의 범위 내에서, 이러한 이점을 반드시 나타내야 하는 것은 아니다.
- [0113] 본 명세서에 개시되는 기술은 하기 실시예에 의해 추가로 기술되며, 어떤 식으로든 추가로 제한되는 것으로 해석되어서는 아니된다.
- [0114] 본 명세서에 개시되는 기술의 일부 실시형태는 임의의 하기 항목에 따라 정의될 수 있다:
- [0115] 1. Mrap2 유전자의 변형을 포함하는 비인간 포유동물 세포로서, 상기 세포가 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 것인 비인간 포유동물 세포.
- [0116] 2. 제1항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함하는 것인 세포.

- [0117] 3. 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실을 포함하는 것인 세포.
- [0118] 4. 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2의 막횡단 도메인의 결실을 포함하는 것인 세포.
- [0119] 5. 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2의 세포내 도메인의 결실을 포함하는 것인 세포.
- [0120] 6. 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 서열번호 1 내에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 세포.
- [0121] 7. 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 상기 변형에 있어서 이형 접합 (heterozygous)인 세포.
- [0122] 8. 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 상기 변형에 있어서 동형 접합인 세포.
- [0123] 9. 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비인간 포유동물 세포가 돼지; 소; 양; 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 종인 세포.
- [0124] 10. 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 CRISPR, TALEN 또는 ZFN 뉴클레아제의 작용에 의해 생성되는 것인 세포.
- [0125] 11. 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 재조합효소의 작용에 의해 생성되는 것인 세포.
- [0126] 12. 제11항에 있어서, 상기 재조합효소가 cre 재조합효소인 세포.
- [0127] 13. 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 재조합효소가 조직-특이적 프로모터의 조절 하에 있는 것인 세포.
- [0128] 14. 제13항에 있어서, 상기 프로모터가 뉴런 또는 뇌 조직에 특이적인 것인 세포.
- [0129] 15. 제14항에 있어서, 상기 프로모터가 Sim1 프로모터인 세포.
- [0130] 16. 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 세포를 포함하는 비인간 포유동물.
- [0131] 17. 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 세포로 이루어진 비인간 포유동물.
- [0132] 18. Mrap2 유전자의 변형을 포함하는 녹아웃 비인간 포유동물 (knockout non-human mammal)로서, 검출가능한 수준의 기능성 Mrap2를 발현시키지 않는 녹아웃 비인간 포유동물.
- [0133] 19. 제18항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 코딩 서열의 결실을 포함하는 것인 포유동물.
- [0134] 20. 제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2 유전자의 엑손 3의 결실을 포함하는 것인 포유동물.
- [0135] 21. 제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2의 막횡단 도메인의 결실을 포함하는 것인 포유동물.
- [0136] 22. 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 Mrap2의 세포내 도메인의 결실을 포함하는 것인 포유동물.
- [0137] 23. 제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 서열번호 1 내에 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 포유동물.
- [0138] 24. 제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 상기 변형에 있어서 이형 접합인 포유동물.
- [0139] 25. 제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 상기 변형에 있어서 동형 접합인 포유동물.
- [0140] 26. 제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비인간 포유동물이 돼지, 소, 양, 토끼 및 염소로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 종인 포유동물.
- [0141] 27. 사체의 이용을 위해 포유동물을 생성하는 방법으로서, 제16항 내지 제26항 중 어느 한 항의 포유동물에 종-적합 사료를 제공하는 단계, 이용하기 위해 목절한 크기에 도달한 경우, 상기 포유동물을 도축하는 단계를 포함하는 방법.
- [0142] 28. 제28항에 있어서, 제16항 내지 제26항 중 어느 한 항의 포유동물이 야생형 포유동물 보다 80% 조기에 도축되는 것인 방법.

- [0143] 29. 제27항에 있어서, 제16항 내지 제26항 중 어느 한 항의 포유동물이 야생형 포유동물 보다 50% 조기에 도축되는 것인 방법.
- [0144] 30. 제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물에 실질적으로 무제한으로 (ad libitum) 사료가 공급되는 것인 방법.
- [0145] 31. 제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 돼지인 방법.
- [0146] 32. 제31항에 있어서, 상기 포유동물이 약 75일 내지 약 125일령에서 도축되는 것인 방법.
- [0147] 33. 제27항에 있어서, 상기 포유동물에 제한된 수준의 사료가 공급되는 것인 방법.
- [0148] 34. 제33항에 있어서, 상기 제한된 수준의 사료가 야생형 포유동물에 공급되는 수준의 약 60% 내지 약 95%인 방법.
- [0149] 35. 제33항에 있어서, 상기 제한된 수준의 사료가 야생형 포유동물에 공급되는 수준의 약 80% 내지 약 95%인 방법.
- [0150] 36. 제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유동물이 돼지인 방법.
- [0151] 실시예
- [0152] 실시예 1: 멜라노코르틴 2 수용체 부착 단백질 2의 기능의 손실은 포유동물의 비만과 관련된다.
- [0153] 멜라노코르틴 수용체 부착 단백질 (MRAP)은 시험관 내에서 멜라노코르틴 수용체의 신호전달을 조절한다. 뇌 발현 멜라노코르틴 2 수용체 부착 단백질 2 (MRAP2)의 생리학적 역할을 조사하기 위해, 둘 모두 어린 연령에 심각한 비만이 발생한 것으로서, Mrap2가 전신 및 뇌 특이적으로 표적 결실된 마우스를 특성화하였다. Mrap2는, 그 이전에 포유동물 비만에 관여하는 단백질인 멜라노코르틴 4 수용체 (Mc4r)와 직접적으로 상호작용하고, 제2 메신저 시클릭 AMP의 Mc4r-매개 생성을 증진시키며, 이는 Mc4r 신호전달에서의 변경이 Mrap2 파괴와 비만 사이의 관계에 기본이 되는 하나의 메커니즘일 수 있다는 것을 시사하는 것이다. 조기 발생 중증 비만 인간의 연구에서, MRAP2의 4개의 희귀 잠재가능성 병원성 유전 변이체가 발견되었으며, 이는 상기 유전자가 또한 인간의 체중 조절에 기여할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0154] 막 발현 G 단백질-커플링 수용체 (GPCR)는 다수의 생리적 자극원에 대한 세포성 반응을 조절한다. 멜라노코르틴 수용체 (MCR)는 프로피오멜라노코르틴-유래 펩티드, 부신피질자극 호르몬 (ACTH) 및 α -멜라노사이트-자극 호르몬 (α MSH) 및 경쟁적 길항제, 아구티 (agouti) 및 아구티-관련 단백질에 대한 반응의 신호전달을 매개하는 GPCR의 아과 (subfamily)이다. MCR은 광범위한 생리적 기능을 매개하며, MC1R은 피부 색소 침착에 관여하고, MC2R는 시상하부-뇌하수체-부신 축에서 주요 역할을 담당하며, MC3R 및 MC4R은 에너지 항상성에 관여하고, MC5R은 외분비 기능에 연계된다 (1).
- [0155] 상기 부착 단백질이 리간드 결합 및 신호전달뿐만 아니라, GPCR 수송을 조절할 수 있다는 점에 대한 인식이 증가되고 있다. MC2R의 부착 단백질인 MC2R 부착 단백질 (MRAP)은 아드레날 세포 (adrenal cell) 표면으로의 MC2R의 수송 및 ACTH에 대한 반응의 신호전달에 필요하다 (3, 4). 인간에서, MC2R 또는 MRAP의 손실은 글루코코티코이드 결핍을 초래하는 것으로서, ACTH에 대한 심각한 내성을 야기한다 (5, 6).
- [0156] 모든 포유동물은, MC3R 및 MC4R과 같이, 시상 하부 및 뇌간과 같은 에너지 항상성에 포함되는 영역을 제외한 것으로서, 뇌에서 주로 발현되고 (7), 뇌교 및 소뇌에서 가장 현저하게 발현되는 파라로그 유전자 MRAP2를 갖는다 (도 4a-4c). 시상 하부 (PVN)의 뇌실 핵 내에서, Mrap2 및 Mc4r mRNA는 많은 세포에서 공동 발현된다 (테이타미제시). 본 발명자들은, Mrap2가 멜라노코르틴 수용체를 통해 신호전달을 조절하고, 에너지 항상성에 강력한 영향을 준다고 가정하였다. 마우스에서, 100 bp 엑손 3 (고보존 막형단 도메인을 인코딩함 (7))의 Cre-lox-매개 삭제를 이용하여, Mrap2의 표적 결실을 수행하여, 종결 코돈으로 이어지는 것으로서, 프레임 외부 엑손 4 (out-of-frame exon 4)에 의해 특정되는 11개의 비정상적인 아미노산에 의해 대체된 막형단 도메인을 가지는 Mrap2의 처음 55개의 아미노산을 포함하는 말단이 잘린 단백질을 인코딩하는 것으로 예측되는 정상 수준 mRNA를 가지는 마우스를 생성시켰다 (도 4d-4g). 단백질은 아닌 돌연변이 Mrap2 mRNA가, 널 마우스 (null mouse)의 생성에 이용되는 것과 동일한 Mrap2 돌연변이 작제물이 형질주입된 세포에 존재하므로, Mrap2-함유 뉴런이 예상 돌연변이 단백질을 발현할 수 없다 할지라도, 정상 수준의 돌연변이 mRNA는 널 마우스에서, Mrap2-함유 뉴런의 보존을 시사한다 (도 4h).

- [0157] 어린 $\text{Mrp2}^{-/-}$ 수컷 마우스의 연령이 증가함에 따라, 중량 및 사료 섭취량이 증가하는 추세에 있다 할지라도, Mrp2 널 마우스는 출생시 정상으로 나타나며, 초기 연령 (각각 0-32일 및 23-32일) 동안, 정상적인 중량 증가 및 이유후 사료 섭취량 (post-weaning food intake)을 나타낸다 (도 41). 그러나, 일반적으로, 암컷 및 수컷 널 마우스 둘 모두는, 주기적인 임의 사료 섭취시, 극도로 비만하게 된다 (도 1a, 5A).
- [0158] 이형 접합 마우스는 표준 사료 섭취시, 야생형 동물 보다 현저히 고체중이 되며 (160-175일령; 수컷, $\text{Mrp2}^{+/+}$ 26.0 ± 0.4 g, $\text{Mrp2}^{+/-}$ 29.9 ± 0.9 g; 암컷 $\text{Mrp2}^{+/+}$ 24.5 ± 0.9 g, $\text{Mrp2}^{+/-}$ 28.1 ± 0.7 g), 고지방식의 경우, 더 어린 연령 (56-95일령)에 현저히 고체중이 된다 (도 1a). 또한, $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스는 지방에 의해, 중량 센티 당 길이가 증가하며 (도 4j), 제지방 (lean mass)에 의해, 중량 센티 당 길이가 감소한다 (도 4k). 암컷 및 수컷 $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스 둘 모두는 주기적 사료식의 경우, 내장 지방과다증이 증가하고, 정상적인 백색 지방 조직의 세포 크기가 두배가 되었으며, 갈색 지방 조직 축적이 증가하고, 정상적인 간 연혁 (liver histology)을 가지나, 고지방식의 경우, 야생형 마우스와 비교하여, 간지방증이 증가하였다 (도 1b, 도 5a).
- [0159] 예측된 바와 같이, 성숙 Mrp2 널 마우스는 그의 증가된 지방량에 해당하는 것으로서, 랩틴 농도가 증가하였고, 이는 사료식-유도 중량 정상화에 의해 정상화된다 (도 5b). 비만 성숙 마우스는 정상적인 공복시 인슐린 (도 5c) 및, 복강내 포도당 주입에 대한 정상적인 내성 (도 5d)을 가졌다. Mrp2 가 ACTH에 대한 아드레날 반응에서 일정한 역할을 담당한다고 상정하였다 (8). 부식 축의 주간 리듬 (Diurnal rhythmicity) 및 스트레스 반응성 (stress responsiveness)을 Mrp2 널 마우스에서 측정하였고, 이는 정상이었다 (도 5e). 갑상선 호르몬 수준 역시 정상이었다 (표 2). 단지 수컷 $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스의 경우에만, 에피네프린 및 노르에피네프린 분비가 감소하였으나 (도 5f), Ucp1 mRNA 농도는 18h 동안 4°C에 노출 후, 암컷 및 수컷 널 마우스 둘 모두에서, 적절히 증가하였다 (도 5g). Mrp2 널 마우스의 경우, 시상하부 Agrp mRNA 농도는 감소하였으나, Pome mRNA는 정상이었다 (도 5h).
- [0160] 이들 마우스에서, 비만 메커니즘을 특성화하기 위해, 다양한 조건 하에서, 사료 섭취량을 측정하였다. $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스가 명백히 과중량인 42일령 (도 5i) 및 84일령 (도 5j)에서, 4 일 간격으로 분석시, 2개의 유전자형 사이의 사료 섭취량의 차이가 검출되지 않았다. 널 마우스의 경우, 더욱 충분한 칼로리 섭취에 의해, 비만이 초래되지 않았다 (도 5k). 단지, 50일 동안 매일 모니터링시 (34-84일령), 널 동물의 경우, 누적 사료 섭취량에서, 미세한 증가가 식별되었고 (도 2a), 비만 선행 이상 식욕 항진증이 발병하였다 (도 2a 및 도 5l). $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스에서, 이상 식욕 항진증의 비만 기여도를 추가로 이해하기 위해, 그의 사료 섭취량을 그의 정상적인 형제에 의해 소비되는 양으로 제한하였다 (한 쌍으로 사료 제공). 심지어, 동량의 사료의 제공시에도, 널 마우스의 경우, 야생형 마우스의 경우 보다 더 많은 중량이 증가하였다 (도 5m-5N). 단지, 널 마우스의 사료 섭취량을 야생형 마우스 보다 10% (암컷) 및 13% (수컷) 적게 제한하는 경우, 2 가지 유전자형에서, 균등하게 중량이 증가하였다. $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스 (도 2a)의 후발성 이상 식욕 항진이 단지, 개별적 대사 결함에 의해 야기되는 것으로서, 이와 같은 고 연령에서의 체중 증가의 결과일 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 널 마우스에서, 제한 사료 공급 40일 후, 임의 사료 접근으로 대체하였다. 무제한의 사료 공급 후 처음 24시간 동안, 널 마우스에서, 사료 섭취량이 거의 2배로 증가하였고 (2.9 ± 0.1 내지 5.6 ± 0.5 g/d (수컷), 및 2.8 ± 0.1 내지 5.3 ± 0.2 g/d (암컷)), 이에 따라, 체중이 뚜렷하게 증가하였다. 따라서, 이상 식욕 항진은, 체중과 무관하게, 더 고 연령의 마우스에서, 연령-의존적 방식으로 발생한다. 이에 일관된 것으로, 저 연령 (38-45일령) $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스는 멜라노코르틴 수용체 (Mc4r 및 Mc3r) 작용 물질, MTII에 대해 무손상 식욕 감퇴 반응을 나타내었으며, 이는 이 연령의 정상적인 임의 사료 섭취량에 해당하는 것이다.
- [0161] 무제한의 사료 공급 기간 동안, 이상 식욕 항진의 발병 전에, 비만이 조기 발생하고, 정상적인 사료 섭취량이 한 쌍으로 제공되는 돌연변이 마우스에서 지속되며, 단지 저영양사육에 의해, 제거되므로, 저 연령의 $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스가 비정상적인 에너지 소비를 나타낼 것이라고 가정하였다. 이를 탐구하기 위해, 그의 중량이 막 나뉘기 시작하는 때에, 저 연령의 (30-45일령) 야생형 및 Mrp2 널 마우스에서, 운동 활성 및 중심부 체온뿐만 아니라, 간접적 열량측정법에 의해, 에너지 소비 (energy expenditure) 및 호흡 교환 비율 (respiratory exchange ratio)(RER)을 측정하였다 (도 2a). 놀랍게도, 야생형 및 돌연변이 마우스는, ANCOVA에 의해 분석된 바와 같이, 분명하지 않은 24h 총 에너지 소비를 나타내었다 (9)(도 2b). 또한, RER (도 5q), 운동 활성(도 5r), 또는 22°C에서의 중심부 체온 (도 5s)에서, $\text{Mrp2}^{+/+}$ 및 $\text{Mrp2}^{-/-}$ 마우스 사이에 차이가 없었으며, 두 유전자형 모두 활동

적인 야간 시간 동안, 3가지 파라미터 모두에서, 예상 증가치를 나타내었다. 18시간 동안, 4℃에의 노출 후, 널 및 야생형 마우스는 동일한 정도의 현저한 저체온증을 나타내었다 (도 5s).

[0162] 1) MRAP가 MC2R (3, 4)을 통한 신호전달에 필수적이고, 2) MRAP의 파라로그, Mrap2는 뇌에서 주로 발현되며, 3) Mc2r의 파라로그, Mc4r는 Sim1-포함 뉴런 (10)의 에너지 밸런스에서, 주요 역할을 하므로, Mrap2의 결실이, 중심적으로 발현되는 Mc4r을 통한 신호전달의 변경에 의해, 일부 비만을 야기하는지 여부에 대해, 의문을 가졌다. 본 발명자들은, 대뇌 피질 또는 뇌간을 제외하고, 시상하부에서만, Mrap2^{Del} mRNA가 발현되고, 배타적으로 이들 뉴런에서, Mrap2가 조건부 결실된 Sim1^{Cre}::Mrap2^{flox/flox} 마우스를 생성시켰다 (도 3a). 전영역 널 마우스와 같이, 조건부 돌연변이는 그 비만도가 유사하였고 (도 3b), 정상적인 사료 섭취식으로 한 쌍으로 사료 제공된 경우, 단지 그의 비만도 일부만이 반전되었다 (도 6a).

[0163] Mrap2가 Mc4r의 작용을 촉진시키는 경우, 그후 Mc4r 결함은, Mc4r 기능의 Mrap2에 의한 방해 정도에 따라, Mrap2 결함의 경우 보다 더욱 심각하거나 또는 균등한 비만 표현형을 생성시켜야 한다. 이를 뒷받침하는 것으로서, Mrap2^{+/-} 마우스 암컷 및 수컷 둘 모두는 Mc4r^{+/-} 또는 이중 이형 접합 마우스 보다 그 비만도가 낮았다 (도 6b). 이중 이형 접합 마우스의 중량이 더 큰 경향이 있으나, Mc4r^{+/-}와 이중 이형 접합 마우스 사이의 차이는 통계적으로 현저하지 않았다. 동형 접합 녹아웃 중에서, Mc4r 결함만을 가진 것이 Mrap2 결함만을 가진 것 보다 더욱 비만했다 (도 6b). Mc4r 녹아웃 마우스는 Mc4r 및 Mrap2 둘 모두의 결실을 가진 마우스 보다 더욱 비만했으며 (암컷에서의 동향을 가진 수컷), 이는 Mrap2가 Mc4r-의존적 및 Mc4r-비의존적 작용 둘 모두를 통한 중량 증가를 촉진할 수 있다는 것을 시사한다.

[0164] 마우스 Mrap2 및 Mc4r이 직접적으로 상호작용할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 일시적으로 발현된 N-말단 Myc-태그 Mrap2 및 N-말단 GFP-태그 Mc4r을 (내인성 Mrap, Mrap2 및 멜라노코르틴 수용체가 결핍된) CHO 세포에서, 공동-면역침강시켰다. 종전의 데이터에 일관된 것으로서 (7), 마우스 Mrap2 및 Mc4r이 상호작용한다는 것 (도 6c)을 발견하였다. Mc4r (도 3c) 및 Mc3r (도 6d) 신호전달에 대한 Mrap2의 영향을 조사하였다. CHO 세포에서, Mc4r 및 Mrap2의 조합 발현은, 인간 오르토로그에서의 종전에 보고된 바와 같이 (7), Mc4r 단독의 경우 (도 3c, 좌측 패널)와 비교하여, 기초 PKA 신호전달을 억제하였다. 그러나, 이러한 보고 내용 (NDP-MSH를 이용한 경우)과 반대로, αMSH가, Mc4r 단독 또는 Mc4r + Mrap2 널 작제물, Mrap2deIE3 (Mrap1의 생체 내 파괴용 시험관 내 모델)에 의한 2배 이하의 증가율과 비교하여, 기초 PKA 활성에서, 5배의 증가율을 초래하였다 (도 3c, 우측 패널). Mrap2의 존재는 2개의 αMSH 최고 투여량에서, Mc3r을 통한 신호전달을 증가시켰다 (도 6c). 이러한 발견은, Mrap2가 Mc4r 및 어쩌면 다른 수용체를 통한 신호전달을 변경시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0165] MRAP2의 변경이 인간 비만도와 관련이 있는지를 조사하기 위해, 비만도 연구 (GOOS) 집단 (11) 및 스웨덴의 비만 어린이 집단 (12)의 유전학으로부터의 비만 및 대조군 개체의 MRAP2의 코딩 영역 및 인트론/엑손 경계를 서열분석하였다. 4개의 회귀 이형 접합 변이체가 비관련된 비증상 중증 비만 개체에서 발견되었고 (표 1), 집단-특이적 대조군 및 1000개의 개체에는 존재하지 않았으며, 하나를 제외한 모두는 상기 단백질의 C-말단 영역에 존재하였다 (도 7). 이들 대상체 중 3개의 집단의 경우, 공지된 모든 비증상 인간 비만 유전자의 코딩 영역 또는 인트론/엑손 경계에서, 병원성 변이체가 발견되지 않았다 (표 3). 변이체 중 단지 하나 (E24X)만이 분명하게 파괴되고, 비회귀 변이체 전체가 비만 집단에서 발견되었으며, 이는, 인간의 중증 비만에 기여하는 경우, MRAP2 돌연변이가 회귀하지 않다는 것을 시사한다.

[0166] 요약하면, 본 명세서에서, Mrap2의 전영역 또는 뇌-특이적 불활성화가 마우스의 비만을 초래하고, MRAP2의 회귀 이형 접합 변이체가 인간의 조기 발생 중증 비만과 관련된다는 것이 입증된다. 체중 조절에 있어서, Mrap2에 의한 영향이 부가되는 메커니즘은 확실하게 성립되었으나, Mc4r 및 어쩌면 다른 멜라노코르틴 수용체를 통한 변경된 신호전달이 포함될 수 있다.

[0167] 참조 및 주석:

[0168] 1. R. D. Cone, Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine reviews* 27, 736 (Dec, 2006).

[0169] 2. D. L. Hay, D. R. Poyner, P. M. Sexton, GPCR modulation by RAMPs. *Pharmacology & therapeutics* 109, 173 (Jan, 2006).

[0170] 3. P. M. Hinkle, J. A. Sebg, Structure and function of the melanocortin2 receptor accessory protein

(MRAP). *Molecular and cellular endocrinology* 300, 25 (Mar 5, 2009).

- [0171] 4. S. N. Cooray, A. J. Clark, Melanocortin receptors and their accessory proteins. *Molecular and cellular endocrinology* 331, 215 (Jan 15, 2011).
- [0172] 5. L. A. Metherell *et al.*, Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nature genetics* 37, 166 (Feb, 2005).
- [0173] 6. L. F. Chan, L. A. Metherell, A. J. Clark, Effects of melanocortins on adrenal gland physiology. *Eur J Pharmacol* 660, 171 (Jun 11, 2011).
- [0174] 7. L. F. Chan *et al.*, MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6146 (Apr 14, 2009).
- [0175] 8. J. A. Sebag, P. M. Hinkle, Regulation of G protein-coupled receptor signaling: specific dominant-negative effects of melanocortin 2 receptor accessory protein 2. *Science signalling* 3, ra28 (2010).
- [0176] 9. M. H. Tschop *et al.*, A guide to analysis of mouse energy metabolism. *Nature methods* 9, 57 (Jan, 2012).
- [0177] 10. N. Balthasar *et al.*, Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493 (Nov 4, 2005).
- [0178] 11. S. Farooqi, S. O'Rahilly, Genetics of obesity in humans. *Endocrine reviews* 27, 710 (Dec, 2006).
- [0179] 12. L. E. Johansson *et al.*, Genetic variance in the adiponutrin gene family and childhood obesity. *PLoS One* 4, e5327 (2009).
- [0180] 13. J. Y. Altarejos *et al.*, The Creb1 coactivator Crtcl is required for energy balance and fertility. *Nature medicine* 14, 1112 (Oct, 2008).
- [0181] 14. J. T. Halley, T. S. Nelson, L. K. Kirby, Z. B. Johnson, Relationship between dry matter digestion and metabolizable energy. *Poultry science* 64, 1934 (Oct, 1985).
- [0182] 15. D. J. Adams *et al.*, A genome-wide, end-sequenced 129Sv BAC library resource for targeting vector construction. *Genomics* 86, 753 (Dec, 2005).
- [0183] 16. P. Liu, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome research* 13, 476 (Mar, 2003).
- [0184] 17. T. D. Schmittgen, K. J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* 3, 1101 (2008).
- [0185] 18. H. Liu *et al.*, Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23, 7143 (Aug 6, 2003).

[0186] 표 1. 비만 대상체 및 대조군에서 검출된 MRAP2 변이체

MRAP2 변이체	변이체를 가진 대상체	* 대상체 성별/ 나이/BMI/ BMI SDS	변이체를 가진 대조군	**MAF: 유럽인 미국인	**MAF: 아프리카인 미국인	***Polyphen 예측
E24X	1/488	M/19/63/4.7	0/488	0.000% (0/8600)	0.000% (0/4406)	손상
N88Y	1/376	M/11/29.6/3.3	0/376	0.000% (0/8600)	0.000% (0/4406)	손상 가능
LI 15V	1/488	M/5/24/4.2	0/488	0.012% (1/8600)	0.000% (0/4406)	양성
R125C	1/488	F/8/29/3.5	0/488	0.047% (4/8600)	0.045% (2/4406)	손상 가능

[0187]

- [0188] *대상체 성별 (남성[M], 여성[F])/연령 (y)/BMI (kg/m^3)/SDS (표준 편차 점수)
- [0189] **MAF (마이너 대립 유전자 빈도, NHLBI 엑손 변이체 서버 <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)
- [0190] ***Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)
- [0191] 실시예 2: 재료 및 방법
- [0192] 동물. 달리 적시되지 않는 한, 0700의 광을 이용하여, 12 h:12 h 명암 주기로, 22°C에서 마우스를 수용하였다. 표준 설사류 사료 (Isopro RMH 3000, PMI Nutrition International, St. Louis, MO) 또는 고지방 사료 (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ)를 마우스에 제공하였다. 4일에 걸쳐 그룹-수용 마우스 (4/동성 (same gender) 사육장)에서 또는 최장 55일 동안 매일 측정된 것으로서, 그 다음날, 사육장 바닥의 사료 유출량으로 인해, 구비된 사료 폐기통 내의 사료 사이의 중량 차로서, 개별-수용 마우스에서, 임의 사료 섭취량을 측정하였다. 한 쌍으로 사료가 제공된 개별-수용 마우스에 있어서, 매일 야생형 마우스에 의해 소비되는 사료의 평균량을 다음날 동성의 실험 유전자형에 제공하였다. 사료 섭취와 동시에, 체중을 측정하였다. 제한적 사료 제공에 있어서, 2개의 그룹 사이에 동일한 체중을 유지시키기 위해, 야생형 마우스에 의해 매일 소비되는 사료의 평균량 보다 10 내지 15% 작은 양을 다음날에 동성의 실험 유전자형에 제공하였다. 멜라노탄 II (melanotan II) (MTII: 아세틸-(Nle⁴, Asp⁵, D-Phe⁷, Lys¹⁰)-시클로-□-MSH (4-10) 아마이드 아세테이트 염, Bachem Americas, Torrance, CA)의 사료 섭취량에 대한 효과를 개별-수용 마우스에서, 개시된 바 (13)와 같이 수행하였다. 1800에, 마우스로부터 사료를 제거하였다. 1830에, 복강내 주입에 의해, 염수 또는 MTII (2 $\mu\text{g/g}$ 체중)를 투여하였다. 1900에, 사전-측정된 사료를 제공하고, 2030에, 재측정하였다. 개별-수용 마우스의 사육장 바닥으로부터, (에너지측정을 위한) 배설물을 24시간 동안 수집하고, 배설물 중량이 안정될 때까지, 16 내지 24시간 동안 22°C에 동결건조하였다. 동일한 결과로서, 실험실 (University of Arkansas and North Carolina State University) 및 2개의 개별 동물 그룹에서, Parr Adiabatic Calorimeter (14)를 이용하여, 배설물 및 사료의 에너지를 측정하였다. 24시간에 걸쳐, 대사 사육장 (metabolic cage)에 개별-수용된 마우스로부터, (카테콜아민 측정을 위한) 소변을 드라이 아이스에서 냉각된 튜브에 수집하였다. 임상 혈당 측정기를 이용하여, 꼬리 정맥혈을 측정함으로써, 1900 내지 0700에서, 12 시간 공복 후, 오전 시간대에, 포도당 (2 g/kg 체중)의 복강내 주입에 대한 반응을 수행하였다. 22°C에 노출되는 동안, 주간 온도 리듬의 측정을 위해, 피하-이식 마이크로칩 트랜스폰더 (DAS-5002, BioMedic Data Systems, Seaford, DE) 또는 4°C에 노출시킨 후, 의식이 있는 마우스에서, 1분 동안 항문 1 cm 아래에 삽입된 휴대용 직장 프로브 (시리즈 500 프로브가 구비된 YSI 모델 43 원격온도계, Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH)를 이용하여, 중심부 체온을 측정하였다. OxyMax Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS, Columbus Instruments, Columbus, OH)을 이용한 간접적 열량 측정에 의해, 무제한으로 사료가 제공되거나 또는 사료-제한된 마우스의 총 에너지 소비 및 호흡 교환 비율을 측정하였다. 운동 활성이 또한 빛 광전지 회로의 차단율에 의해 측정 (1회 샘플링/분)된 열량 측정 사육장의 경우, 24 h의 적응 기간이 48 h의 측정 (1회 샘플링/17분)에 앞서 선행되었다. 이중 에너지 X선 흡수 (dual energy xray absorptiometry) (DEXA, Lunar PIXImus Densitometer, Fitchburg, WI)에 의해, 체지방 및 지방량을 측정하였다. 마우스 사육장과 접촉 사이에 일정한 간격을 유지하면서, 마취 없이, 레트로-오비탈 정맥천자 (retro-orbital venipuncture)에 의해, 사혈을 수행하였다. 고지방식이 제공된 마우스에서, 0830에서 역제 스트레스 30분 후, 1900, 0800에서, 연속 사혈에 의해, 혈중 코티코스테론의 주간 리듬 및 스트레스 반응성을 수행하였다. 모든 마우스 프로토콜은 보스턴 어린이 병원 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인된 것이다.
- [0193] Mrap2^{-/-} 및 Mrap2^{flox/flox} 마우스의 생성.
- [0194] Mrap2^{-/-} 및 Mrap2^{flox/flox} 마우스 둘 모두 통상의 표적 벡터 및 재조합 (15, 16)을 이용하여 생성시켰다. 모든 필요한 플라스미드 (PL253, PL452, 및 PL451) 및 재조합 박테리아 균주 (EL350)는 David Conner (Harvard Medical School Department of Genetics)로부터 제공받았다. DH10B의 Mrap2 (수탁번호: XM_147017, NM_001101482에 의해 대체됨)를 포함하는 129Sv BAC 클론 (bMQ-392015)을 Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk/>)로부터 제공받았다. 하류 FRT-Neo-FRT-LoxP 삽입용 PL451 미니암 및 상류 LoxP 삽입용 PL452 미니암, Mrap2 게놈 영역의 검색을 위한 PL253 미니암의 생성을 위한 프라이머를 설계하였다. 최종 표적 벡터를 NotI로 선형화하였고, 129Sv ES 세포로 전기천공하고, G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 선택하였다. G418-내성 ES 세포주를 분리하고, 적절한 Mrap2 게놈 유전자좌로의 작제물의 정확한 5' 및 3' 혼입의 DNA 서열 분석에 의한 확인을 위해, 5' 및 3' 양 말단의 외부 Mrap2 게놈 프라이머 및 내부 벡터 프라이머 +

LA TaqTM (TAKARA, Otsu, Japan)를 이용한 원거리 PCR에 의해 분석하였다. Mrap2^{+/-} ES 세포의 생성을 위해, CMV-Cre를 인코딩하는 pOG231을 이용하여, 클론에 형질주입하였다. Mrap2^{+/-flox} ES 세포의 생성을 위해, pCAGGS-F1pe를 이용하여, 클론에 형질주입하였다. 검증 ES 세포의 핵형을 분석하고, 이를 C57BL/6 위임신 암컷 마우스에 이식 수술하였다. 수컷 키메라 동물을 획득하고, 129S6/SvEvTac 암컷 마우스 (Taconic, Hudson, NY)와 교잡시켰다. F1 이형 접합 수컷 마우스를 F1 이형 접합 암컷 마우스와 교잡시켜, 순수 129 백그라운드에서 F2 클론을 생성시켰다. 그 후, 이들 마우스를 사육하여, 1:2:1의 예측 빈도로, 추후 연구를 위한 야생형 (Mrap2^{+/+}), 이형 접합 (Mrap2^{+/-}) 및 널 (Mrap2^{-/-}) 마우스를 생성시켰다. C57BL/6J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) 백그라운드 상에, 10 세대를 위해, Mrap2 널 대립 유전자를 역교잡시켰다. Mrap2 널 마우스는 정상적인 생식능을 갖는다.

[0195] Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 마우스의 생성.

[0196] Mrap2^{flox/flox} 마우스를 Sim1^{CreBAC} 마우스 (006451, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)와 교배시켜, Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 마우스를 생성시켰다. 이들 마우스를, 뇌에서 Sim1-Cre 발현의 맵핑을 위해, Cre-매개 재조합에 의해, tdTomato 발현이 유도되는 R26^{flox-stop-tdTomato} 리포터 마우스 (007576, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)로 사육하였다. 또한, 뇌에서, Mrap2 엑손 3의 위치-특이적 결실을, 두정엽 피질, 시상 하부, 및 뇌간에서의 게놈 DNA의 Mrap2-특이적 PCR 및 RNA의 RT-PCR에 의해 평가하였다 (표 2). Mrap2^{flox/flox} 및 Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 형제의 체중 및 사료 섭취량을 35 내지 89 연령에 매일 측정하였다. Sim1^{CreBAC}::Mrap2^{f/f} 마우스 중 1/2이, 무제한으로 사료가 제공되는 Mrap2^{flox/flox} 마우스의 사료 섭취량이 한 쌍으로 제공되는 것으로 대체되는 때인 70일령까지, 마우스에 무제한의 사료를 제공하였다.

[0197] 조합 Mrap2 및 Mc4r 결함을 가지는 마우스의 생성.

[0198] Mc4r 널 마우스 (006414, 혼합 C57BL/6-129 백그라운드, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)를 Mrap2 널 마우스와 교배시켜, 두 유전자의 녹아웃의 이형 접합 및 동형 접합 재조합을 가지는 마우스를 생성시켰다. 전술된 바와 같이, 한배 형제 (littermate sibling)에서, 28-84일령에, 체중을 매일 측정하였다.

[0199] 조직학.

[0200] 조직을 수집하고, 4% 파라포름알데하이드에 담가두었다. 파라핀-포매 조직의 절편 (5-7 μ m)을 절개하고, 헤마톡시린 및 에오신으로 염색하였다. Nikon Eclipse 800TM 현미경을 이용하여, 이미지를 포착하였다. 지정 조직의 모든 이미지를 후속 조작 없이, 동일한 배율 및 노출 조건에서 기록하였다.

[0201] RT-PCR.

[0202] TRIzolTM Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여, 대략 50 mg 조직/세포로부터 전체 RNA를 분리하였다. 게놈 DNA의 오염을 제거하기 위해, RNA 샘플을 DNase (6.8 Kunitz 단위/샘플) (Qiagen, Valencia, CA)로 처리하고, 제조자의 프로토콜에 따라, RNeasyTM 미니 키트 (Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA 샘플을 iScriptTM cDNA 합성 키트 (Biorad, Hercules, CA)를 이용하여, 역전사에 적용시켰다. 통상의 RT-PCR로서, 50 ng RNA 등가-cDNA를 하기 프로그램에 따라, 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여, 35 사이클로 PCR-증폭시켰다: 94 $^{\circ}$ C 2분, (94 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 30초) x 35 사이클, 72 $^{\circ}$ C 7분. PCR 생성물을 브롬화 에티듐으로 염색된 2.0% 아가로스 겔 상에서 전기이동시켰다. $\Delta\Delta$ CT 방법 (17) 및 하기 프로그램에 따라, iQ SYBR 그린 Supermix (Biorad) 및 동일한 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여, 실시간 qPCR을 실시하였다: 95 $^{\circ}$ C 3분, (95 $^{\circ}$ C 10초, 60 $^{\circ}$ C 40 sec) x 45 사이클. 유전자-특이적 프라이머 세트는 표 4에서 제시된다.

[0203] 현장 혼성화의 이중 표지 35S/디곡시게닌 (DIG).

[0204] 조직 절편 (10 μ m)을 SuperFrostTM 슬라이드 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 상에, 해동-장착 (thaw-mounting)시키고, -20 $^{\circ}$ C에 저장하였다. 혼성화 전에, 얼음에서 15분 동안, 인산염 완충 염수 (PBS) 중 4 % 포름알데하이드에 절편들을 고정시켰다. 현장 혼성화의 521 bp Mc4r 주형 (18) 및 cRNA를 ³⁵S-UTP (Perkin Elmer, Waltham, MA)로 표지하였다. Mrap2 프로브 주형에 있어서, 443 bp-Mrap2 cDNA PCR 단편 (표 S1)을 PCRII TOPOTM

(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 클로닝하고, cRNA 안티센스 프로브를 제조자의 프로토콜에 따라, T7 RNA 중합효소 (Roche) 및 DIG RNA Labeling MixTM (Roche)를 이용하여, 디옥시게닌 (DIG)으로 표지하였다. cRNA 프로브를, 50 % 탈이온 포름아미드, 10 % 텍스트란 황산, 0.5 M NaCl, 1x Denhardt 용액, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8), 500 µg/ml 효모 tRNA, 10mM DTT를 포함하는 혼성화 용액에 첨가하기 전에, 3분 동안 90℃에서 변성시켰다. 2분 동안, 2x SSC (0.3 M 염화 나트륨, 0.03 M 시트르산 나트륨), 2분 동안 0.1 M 트리에탄올아민 (TEA), 10분 동안, 0.1 M TEA 중의 0.25% 아세트산 무수물, 2분 동안 2x SSC의 순서로, 모두 실온 (RT)에서, 절편들을 사전처리하였다. 절편들을 증가된 농도의 에탄올에서 탈수시키고, 5분 동안 클로로포름에서 탈지 과정에 적용시켰다. 절편들을 2분 동안 95 % 에탄올에서 세정하고, 공기-건조시켰다. 대략 150 µl의 혼성화 용액을 절편 상으로 확산시키고, 65℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 혼성화 후, 22℃에서 15분 동안 2x SSC/1 mM 디티오 프레이틀 (DTT)에 2번 담근 후, 37℃에서, 30분 동안, RNase 가수분해 용액 (20 µg/ml RNAase A (Roche), 0.5 M NaCl, 10 mM Tris (pH8), 및 1 mM EDTA)에 담갔다. 22℃에서 10분 동안 2x SSC/1 mM DTT에서, 실온에서, 10분 동안 SSC/1 mM DTT에서 3회, 65℃에서 30분 동안 0.5x SSC/1 mM DTT에서, 22℃에서 2분 동안 2x SSC에서, 절편들을 세척하였다. 절편들을 22℃에서, 2시간 동안, 블로킹 용액 (blocking 용액) (2x SSC, 2 % 정상 면양 혈청 (normal sheep serum), 0.05 % Triton X-100)에서 인큐베이션시키고, 5분 동안, GB1 완충액 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)에서 2번 세정한 후, 항-DIG-알칼린 포스파타아제 항체 용액 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % 정상 면양 혈청, 0.3 % Triton X-100, 항-DIG-알칼린 포스파타아제, Roche, Indianapolis, IN)에서 밤새 인큐베이션시켰다. 절편들을 10분 동안, GB1, 10분 동안, GB3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂-6H₂O)로 세척한 후, 5분 동안, 250 ml GB3 중의 레바미솔 용액 (250 mg 레바미솔 히드로클로라이드 (Sigma, St. Louis, MO)에 인큐베이션시켰다. 7.5 ml GB3, 2.5 ml 레바미솔 용액, 33.8 ml의 100 mg/ml 니트로블루 테트라졸륨 (Nitroblue tetrazolium) (NBT) 염화물 용액 (Roche), 및 35 ml의 50 mg/ml 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-포스페이트 (BCIP) 용액 (Roche)을 혼합함으로써, 크로마젠 용액을 제조하였다. 섹션들을 48시간 동안, 알루미늄 포일로 권취된 유리 커플링 자 (glass Coplin jar)의 크로마젠 용액에 담갔다. pH 8.0의 10 mM Tris-HCl, pH 8.0의 1 mM EDTA로 2회, 1x PBS 중의 4 % PFA 및 증류수로의 세정에 의해, 정색 반응 (color reaction)을 중지시켰다. 절편들을 완전히 공기 건조시키고, 아밀 아세테이트 중의 2 % Parlodion (SPI Supplies, West Chester, PA)으로 코팅시킨 후, 공기 건조시켰다. 절편들을 42℃에서, 증류수에 의해 1:1로 희석된 예열 실버 에멀션 NTB2 (Kodak, Rochester, NY)에 디핑 (dipping)시켰다. 디핑된 공기 건조 절편을, 알루미늄 포일로 권취된 슬라이드 박스에 배치한 후, 4℃에서 1개월 동안 저장하였다. 4분 동안 현상액 (developer) D-19 (Kodak, Rochester, NY)에 슬라이드를 담그고, 10초 동안, 증류수로 세정한 후, 5분 동안, Professional Fixer (Kodak)로 고정시킴으로써, 절편들을 현상 (developing)시켰다. 절편들을 증류수에 세정하고, 건조시킨 후, 커버슬리핑 (coverslipping) 하였다.

[0205] 호르몬 측정.

[0206] 제조자의 프로토콜을 이용하여, ELISA (Crystal Chem, Downers Grove, IL)에 의해, 랩틴 및 인슐린을 측정하였다. 코티코스테론을 방사면역측정법 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA)에 의해 측정하였다. 소변 및 노르에피네프린을 C-18 역상을 이용한 HPLC 후, 전기화학적 검출법에 의해, 측정하였다.

[0207] 공동-면역침강 및 웨스턴 블로팅.

[0208] 10% 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 F12 배지에서, CHO 세포 (ATCC, Manassas, VA)를 성장시켰다. 플라스미드 (Mrap2-pCDNA-Myc-His 및 Mc4r-pEGFP-N1)를 FuGENE 6TM (Promega, Madison, WI)을 이용한 일시적 형질주입 (transient transfection)에 의해, CHO 세포로 도입시켰다. 인간염-완충 염수에서 세포를 세척한 후, RIPA 완충액 (40mM Hepes pH 7.4, 2mM EDTA, 10mM 피로인산 나트륨, 10mM 글리세로인산 나트륨, 1% 소듐 디옥시콜레이트, 0.3% CHAPS, 0.1% SDS/프로테아제 억제제)에서 초음파처리함으로써, 형질주입 24시간 후, 용해물을 제조하였다. 면역침강에 있어서, 용해물을 항-GFP (290, Abeam, Cambridge, MA) 또는 항-Myc (9106, Abeam, Cambridge, MA) 항체로 4℃에서, 밤새 인큐베이션시켰다. 단백질을 A 세파로오스 비드 (CL-4B17-0963-03, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA)를 첨가한 후, 4℃에서, 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 고염 (150mM NaCl) 용해 완충액으로 비드를 세척한 후, 상청액을 제거하고, 비드를 SDS 부하 완충액 (Laemmle)에 재현탁시켰다. Myc 에피토프의 검출을 위해, 샘플을 100℃에서 5분 동안 가열시켰다. Mc4r-GFP의 검출을 위해, 샘플을 가열하지 않았다. SDS-PAGE에 의해, 단백질을 재용해시켰다. 항-GFP 또는 항-Myc 일차 항체 및 HRP-결합 단백질 A 이차 항체 (NA9120, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA)를 이용하여, 웨스턴 블로팅을 수행하였다.

- [0209] Mrap2 영향에 대한 Mc4r 생검.
- [0210] 마우스 Mrap2 및 Mc4r의 코딩 서열을 cDNA {Mrap2} 또는 게놈 DNA (Mc4r)의 PCR에 의해 분리하고 (표 S4), TOPO-pCRII™ (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 서브클로닝시키고, 서열 검증한 후, pRC/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 결찰시켰다. Mrap2^{-/-} 마우스의 생성물과 동일한 Mrap2delE3을 또한 생성시키고, pRC/CMV에 결찰시켰다. 20 µL FuGENE HD™ (Promega)를 이용하여, 1 µg pCRE-Luc, (Clontech, Mountain View, CA) 및 0.5 µg의 pRL-TK (renilla luciferase, Promega, Madison, WI)를 따라, 60mm 디쉬에서, 6:1 비율의 Mrap2:Mc4r DNA (3 µg Mrap2:0.5 µg Mc4r)를 0.5x10⁶ CHO 세포 (ATCC, Manassas, VA)로 형질주입시켰다. 그 다음날, 형질주입 세포 (0.12x10⁶ 세포/웰)를 12 웰 플레이트에 접종시켰다. 7시간의 혈청기아 (serum starvation) 후, 24시간 후, 5시간 동안, α-멜라노사이트 자극 호르몬 (αMSH, M4135-1MG, Sigma, St. Louis, MO), 0-10 nM로 처리한 후, 발광효소 분석을 수행하였다.
- [0211] HEK293 세포에서의 마우스 Mrap2의 발현.
- [0212] 무 (nothing), 빈 벡터, Mrap2, 또는 Mrap2delE3 발현 작제물을 이용하여, HEK293 세포 (ECACC, DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan)를 형질주입한 다음, 카복실-말단 (아미노산 LLENKPVSQTARTDLD (서열번호 65))에 대한 항-랫트 Mrap2¹⁸⁹⁻²⁰⁴ 래빗 다중클론성 항체 (Mrap2 rAb-COOH) 또는 아미노-말단 (아미노산 MSAQRLASNR (서열번호 64))에 대한 항-마우스 Mrap2³⁻¹² 마우스 다중클론성 항체 (Mrap2 mAb-NH₂)를 이용한 Mrap2 단백질의 웨스턴 블로팅 또는, Mrap2 mRNA의 RT-PCR (도 1a에서 이용된 것과 동일한 Mrap2-특이적 RTPCR 프라이머 이용)을 수행하였다 (7). 그후, 웨스턴 블롯을 스트리핑 (stripping)하고, 1:5,000의 희석의 항-베타 액틴 항체 (Sigma, A1978)로 재프로빙 (reprobing)하였다.
- [0213] 인간 연구.
- [0214] 비만 연구의 유전학 (GOOS) (11) 프로토콜은 앵글리아 및 옥스포드 다지역 윤리위원회에 의해 승인되었다. 각각의 대상체 또는 부모 (어린이 <16년)는 사전 서면 동의를 제공하였다 (미성년자로부터 그 자신의 구두 동의를 제공받았다). 임상 연구는 헬싱키 선언 원칙에 따라 수행하였다. 스웨덴 비만 어린이 집단의 경우, 이전에 개시되었고 (12), 카롤린스카 대학 병원 및 카롤린스카 학회의 국립 소아 비만 센터의 376명의 비만 어린이 및 청소년 (6-21년, BMI >30 kg/m² 또는 +3 SDS) 및, 학교 간호사에 의해 참여 여부가 문의되고, 인종 및 사회 경제적 지위 측면에서 비만 그룹과 부합되는, 스톡홀름 주변의 17개의 상위 중학교로부터 모집된 376명의 비비만 청소년 (15-20년, BMI 20-25 kg/m²) 그룹으로 구성된다. 상기 연구는 스톡홀름 지역 윤리 위원회에 의해 승인되었으며, 모든 대상체는 사전동의하였다. MRAP2 및 중증 비만과 관련된 9 종의 기타 유전자 {LEP, LEPR, POMC, MC4R, PC1/3, BDNF, TRKB, SIM1, 및 SH2B1}의 DNA 서열 분석을 디데옥시뉴클레오타이드 (Sanger) 방법론을 이용하여 수행하였다.
- [0215] 통계 분석.
- [0216] 각각 2개 이상의 샘플 또는 비교용으로 적절한 것으로서, 데이터를 스튜던트 t-검정 또는 ANOVA에 의해 분석한 다음, 본프로니의 사후 검정 (Bonferroni's post hoc test)에 의해 분석하였다 (Statview 5.0, SAS Institute Inc.). 에너지 소비에 있어서, 각 성별의 Mrap2^{+/+} 및 Mrap2^{-/-} 마우스에서, 총 에너지 소비에 대한 체중의 영향을 공분산 분석 (SAS, SAS Institute Inc.)에 의해 비교하였다 (9). 모든 데이터는 평균±SEM으로 제시되었으며, p< 0.05의 경우, 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.
- [0217] 표 2. Mrap^{+/+} 및 Mrap2^{+/-} 마우스의 갑상선 호르몬 농도

[0218]

	수컷		암컷	
	Mrap2 ^{+/+}	Mrap2 ^{-/-}	Mrap2 ^{+/+}	Mrap2 ^{-/-}
T4 [µg/dL]	3.3±0.3	3.2±0.6	2.5±0.3	3.2±0.4
T3 [ng/dL]	8.5±1.1	10.5±1.6	11.7±4.8	11.1±4.4

[0219] 표 3. 희귀 MRAP2를 가지는 비만 대상체의 기타 비만-관련 유전자의 변이체

	E24X (het)	L115V (het)	R125C (het)
LEP	WT	WT	WT
LEPR	c.668A>G, p.Q223R (het), rs1137101; c.1029T>C, p.S343S (het), rs1805134	c.668A>G, p.Q223R (het), rs1137101	c.668A>G, p.Q223R (het), rs1137101; c.3057G>A, p.P1019P (het), rs1805096
POMC	WT	WT	WT
MC4R	WT	WT	WT
PC1/3	c. 1650 T>C, p. N550N, rs6233 (hom)	WT	c. 1650 T>C, p. N550N, rs6233 (Het); c. 1993 C>G, p. Q665E, rs6234 (Het); c. 2069 G>C, p. S690T, rs6235 (Het)
BDNF	c. 196 G>A, p. V66M (het) rs6265; c. 450 A>G, p. A150A, (hom) rs2353512	c. 196 G>A, p. V66M (het), rs6265	c. 450 A>G, p. A150A (hom) rs2353512
TRKB	WT	WT	WT
SIM1	c.1054C>A, p.P352T (het), rs3734354; c.1112C>T, p.A371V (het), rs3734355	WT	WT
SH2B1	c. 1450 A>G, p. T484A (hom), rs7498665	c. 1450 A>G, p. T484A (hom), rs7498665	WT

[0220]

[0221]

표 4. 본 연구에 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

올리고뉴클레오타이드의 기능	DNA 서열	서열번호
<i>1. Mrp2</i> 널 및 <i>flox</i> 마우스 생성		
<i>1.1 검색 벡터</i>		
PL253 미니암 1 F	5'-GCGGCCGCCAAACAAAAAAGGTATTTGG-3'	5
PL253 미니암 1R	5'-ACT AGTCTACAGTATGTATT AC-3'	6
PL253 미니암 2 F	5'-ACTAGTTACTATAGTATCATT-3'	7
PL253 미니암 2 R	5'-GGAT CC GTT CTT GGT CTTGCT C AGAAA-3'	8
<i>1.2 상류 loxP 삽입</i>		
PL452 미니암 1F	5'-GTCGACAT GTGAAGCGTGGACCAAAA-3'	9
PL452 미니암 1R	5'-GAATTC ATT CAT GTT CAT GIT GAC AC-3'	10
PL452 미니암 2 F	5'-GGATCCGAAGTGGAGTAAATTCATC-3'	11
PL452 미니암 R	5'-GCGGCCGCGCACAGGTGCCCCGCCACC-3'	12
<i>1.3 하류 loxP 삽입</i>		
PL451 미니암 1F	5'-GTCGACCGCGATGTTTCTTTAGCATA-3'	13
PL451 미니암 R	5'-GAATTCCTACGAGGGCAAAAACCAGG-3'	14
PL451 미니암 2 F	5'-GGAT CCAATTAGGTGTTTGGTT CTT-3'	15
PL451 미니암 2 R	5'-GCGGCCGCCTTTCTTACTATTAAAAAT-3'	16
<i>1.4 PL253 다중 클로닝 부위 (MCS) 서열분석</i>		
PL253 MCS seq F	5'-GCAAGGCGATTAAGTT GGG-3'	17
PL253 MCS seq R	5'-GGAAACATT CCAGGCCTGG-3'	18
<i>1.5 Neo ES 세포 장기 PCR 검증</i>		
<i>1.5.1 5'-말단 (7109 bp)</i>		
5P 외부 F	5'-CTTAGCTGTCCCTGTGGCTGTCCCTAAAGTTGGC-3'	19
5P PL452 내부 R	5'-GGATCCCCTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCAT ACATTATACGAAGTTATATTAAAGGTTATTGAATATG ATCGGAATT GGGCT GCAGGAATT C-3'	20
<i>1.5.2 3'-말단 (8954 bp)</i>		
3P Neo 내부 F	5'-TGCCACTCCCACTGTCC11TCCTAATAAAATGAGGAA ATTGCAT-3'	21
3P 외부 R	5'-ACCAACATCCCT GTGATGCACCT GTAGCCTGCT GGAC TGGCTGAACAGAA-3'	22
<i>1.6 널 마우스 스크리닝 PCR (1200 bp WT 대립유전자 및 789 bp 널 대립유전자)</i>		
널 스크린 F	5'-ATGT GAAGCGT GGACCAAAAT GCT GAGA-3'	23
널 스크린 R	5'-TT CTCT AGCT CCGGAC AT CT CAAGC ACA-3'	24
<i>1.7 Flox 마우스 스크리닝 PCR</i>		
<i>1.7.1 상류 loxP (814 bp r WT 대립유전자 및 912 bp flox 대립유전자)</i>		
Flox 스크린 업 F	5'-GTCGACATGTGAAGCGTGGACCAAAA-3'	25
Flox 스크린 업 R	5'-GCGGCCGCGCACAGGTGCCCCGCCACC-3'	26
<i>1.7.2 하류 loxP (814 bp WT 대립유전자, 및 918 bp flox 대립유전자)</i>		
Flox 스크리닝 다운 F	5'-GTCGACCGCGATGTTTCTTTAGCATA-3'	27
Flox 스크리닝 다운 R	5'-GCGGCCGCCTTTTCTTACTATTAAAAAT-3'	28

[0222]

1.8 <i>넬</i> 마우스 장기 PCR 검증		
1.8.1 5'-말단 (7100 bp)		
5P 외부 F	5'-CTTAGCTGTCCCTGTGGCTGTCCCCTAAAGTTGGC-3'	29
5P 넬 내부 R	5'-GGATCCACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATATTAAGGGTTATTGAATATGATCGGAATTGGCT GCAGGAATTC-3'	30
1.8.2 3'-말단 (8734 bp)		
3P 넬 내부 F	5'-GAATTCCTGCAGCCCAATTCGATCATATTCAATAACCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTAGGT GGAT CC-3'	31
3P 외부 R	5'-ACCAACAT CCCT GTGATGCACCT GTAGCCTGCT GGACTGGCTGAACAGAA-3'	32
1.9 <i>Flox</i> 마우스 장기 PCR 검증		
1.9.1 5'-말단 (7109 bp)		
5P 외부 F	5'-CTTAGCTGTCCCTGTGGCTGTCCCCTAAAGTTGGC-3'	33
5P PL452 내부 R	5'-GGATCCCCCTCGAGGGACCTAATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTAAGGGTTATTGAATATATCGGAATTGGGCTGCAGGAATTC-3'	34
1.9.2 3'-말단 (8745 bp)		
3P PL451 내부 F	5'-GAATTCGAAGTTCCTATTCCTAGAAAGTATAGGAACCTCAT C AGT C AGGT AC AT AAT AT AACTT CGT AT AAGTATGCTATACGAAGTATTAGGTGGATCC-3'	35
3P 외부 R	5'-ACCAACAT CCCT GTGATGCACCT GTAGCCTGCT GGACTGGCTGAACAGAA-3'	36
1.10 <i>넬</i> / <i>Flox</i> 마우스 유전자형 확정 (210 bp WT 대립유전자, 314 bp flox, 및 400 bp 넬)		
Mrp2 유전자형 F1	5'-TCAGCCTCCGTGTCAGAGCTGG-3'	37
Mrp2 유전자형 F2	5'-GGCATGGATTGCTACCCAGATGCAGGT-3'	38
Mrp2 유전자형 R	5'-GGCTCAACTCTGCAAACACGTCAGCGT-3'	39
2. <i>Mrp2</i> / <i>Mc4r</i> RT-PCR 및 qRT-PCR		
2.1 <i>Mrp2</i> and <i>Mc4r</i>		
마우스 <i>Mrp2</i> (엑손 4-5 스패닝), 앰플리콘 150 bp, 수탁번호 NM 001101482.2		
Mrp2 e4-5 F	5'-TGCT GACTTT GCT GAC GAAGAC AGGT G-3'	40
Mrp2 e4-5 R	5'-TGGACTCCTCGTTGCCCTGACG-3' TAGGCCATGAGGCCCATCCAGT	41
마우스 <i>Mc4r</i> , 171 bp, NM 016977.3		
Mc4r F	5'-AGGCGGGTCGGGATCATCATAAGTTGTA-3'	42
Mc4r R	5'-CCTCGCCATCAGGAACATGTGGACATAGA -3'	43
마우스/인간 18S 리보솜 RNA, 70 bp, NR 003278		
18SF	5'-AGTCCCTGCCCTTGTACACA-3'	44
18SR	5'-CGAT CCGAGGGCCT CACTA-3'	45
2.2 <i>Mrp2</i> 넬 검증 (도 1C)		
마우스 <i>Mrp2</i> (엑손 3-4), 247 bp WT, 147 bp 넬, NM 001101482.2		

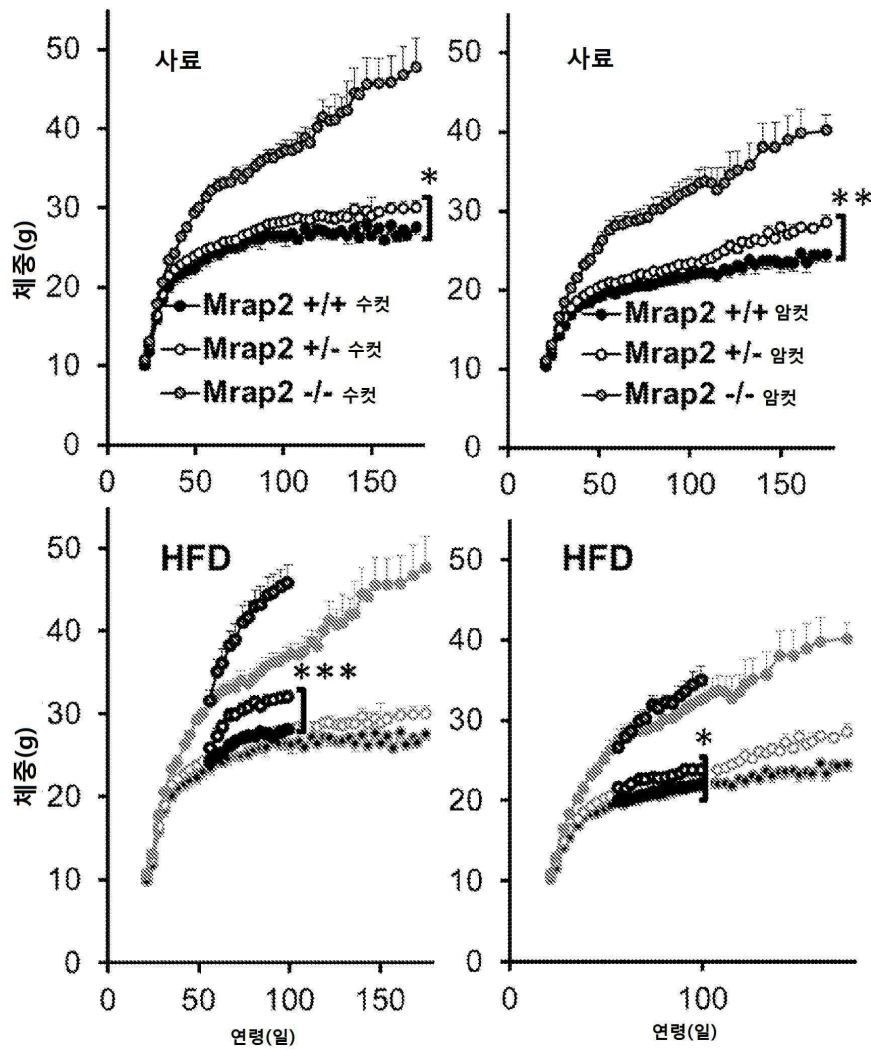
[0223]

Mrp2 nul val F	5' - GT CTGC CC AGAGGCT GGCTT -3'	46
Mrp2 nul val R	5' -CCTCTCTGAGGACTCCGCGT-3'	47
2.3 Mrp2 엑손 la 확인		
마우스 Mrp2 (엑손 1-2), 175 bp 변이체 1, NM 001101482.2		
Mrp2 el a F	5' -AGCACCGGAGGAGCTGAACC-3'	48
Mrp2 el a R	5' -CAGT CCTT CAAAGGAACTGGTCCG-3'	49
3. Ucpl, Agrp, Pome qRT-PCR		
3.1 마우스 비커플링 단백질 1 (Ucpl), 89 bp, NM 009463.3		
Ucpl F	5'- GGATTGGCCTCTACGACTCA -3'	50
Ucpl R	5'- TAAGCCGGCTGAGAICTTGT -3'	51
3.2 마우스 아구티 관련 단백질 (Agrp), 100 bp, NM 007427.3		
Agrp F	5' -TGT GT AAGGCT GC AC GAGTC -3'	52
Agrp R	5'- GGCAGTAGCAAAAGGCATTG -3'	53
3.3 마우스 프로오피오멜라노코르틴 (Pome), 150 bp, NM 008895		
Pome F	5'- GAGTTCAAGAGGGAGCTGGA -3'	54
Pome R	5'- GGTCAATGAAGCCACCGTAAC -3'	55
4. Mrp2 /Mc4r 현상 혼성화		
Mrp2 비방사 프로브 주형 플라스마 ISH: 443 bp-Mrp2 cDNA:		
Mrp2 ISH 프로브 F	5' -TTTGCTGACGAAGACAGGTG-3'	56
Mrp2 ISH 프로브 R	5' -CAGTCCAGGTCTATGCGTGA-3'	57
5. 마우스 Mrp2 발광효소분석		
4.1 마우스 Mrp2 분석		
마우스 Mrp2 야생형, NM 001101482.2		
Mrp2 exp F	5' -AAGCTT GCCACCATGGAGAT GTCT GCCCAGAG-3'	58
Mrp2 exp R	5' -GCGGCCGCT CAGT CCAGGTCTATGCGT G-3'	59
마우스 Mrp2 del 엑손 3 돌연변이		
Mrp2 delE3 F	5'- TTTCCTTTGAAGGACTGAAGGCTCATAAATCAACGCG GAGTCCT CAGAG-3'	60
Mrp2 delE3 R	5'- CT CT GAGGACT C CGC GTT GA1TT AT GAGC CTT CAGT C CTT CAAAGGAAA-3'	61
마우스 Mc4r, NM 016977.3		
Mc4r exp F	5' - AAGCTTGCCACCATGAACTCCACCCACCA-3'	62
Mc4r exp R	5' -GCGGCCGCTTAATACCTGCTAGACAACT-3'	63

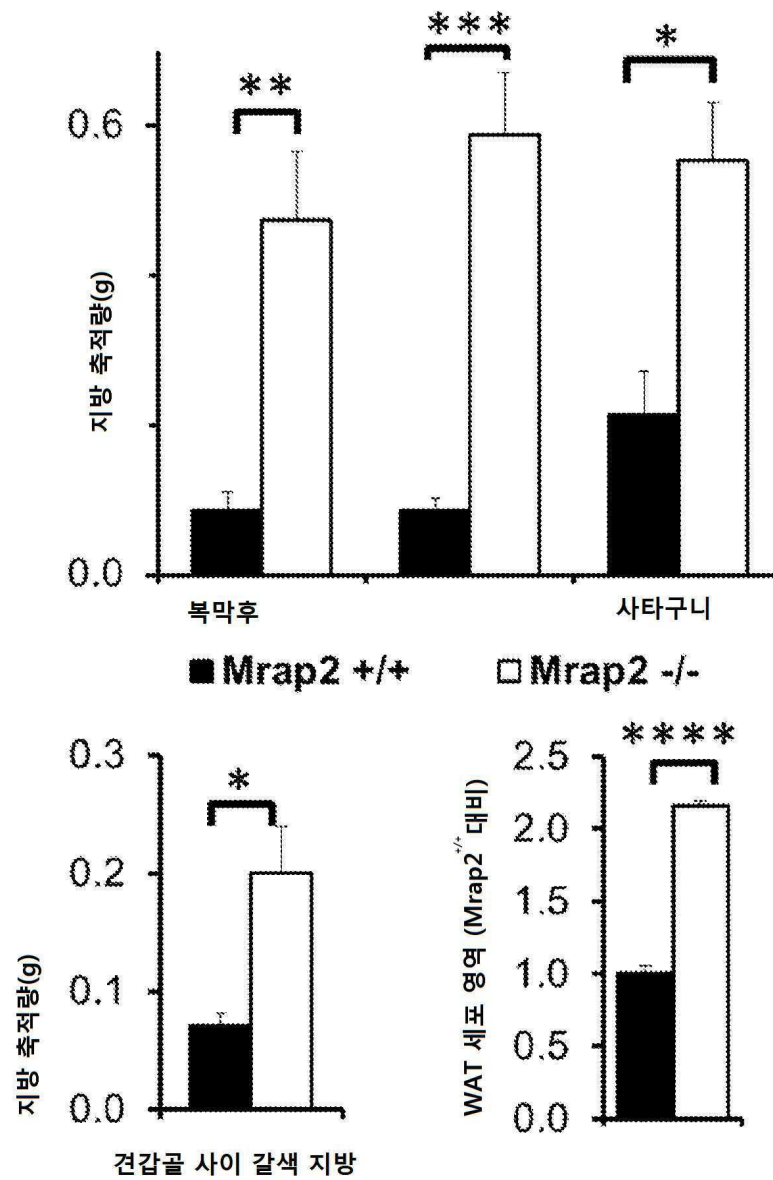
[0224]

도면

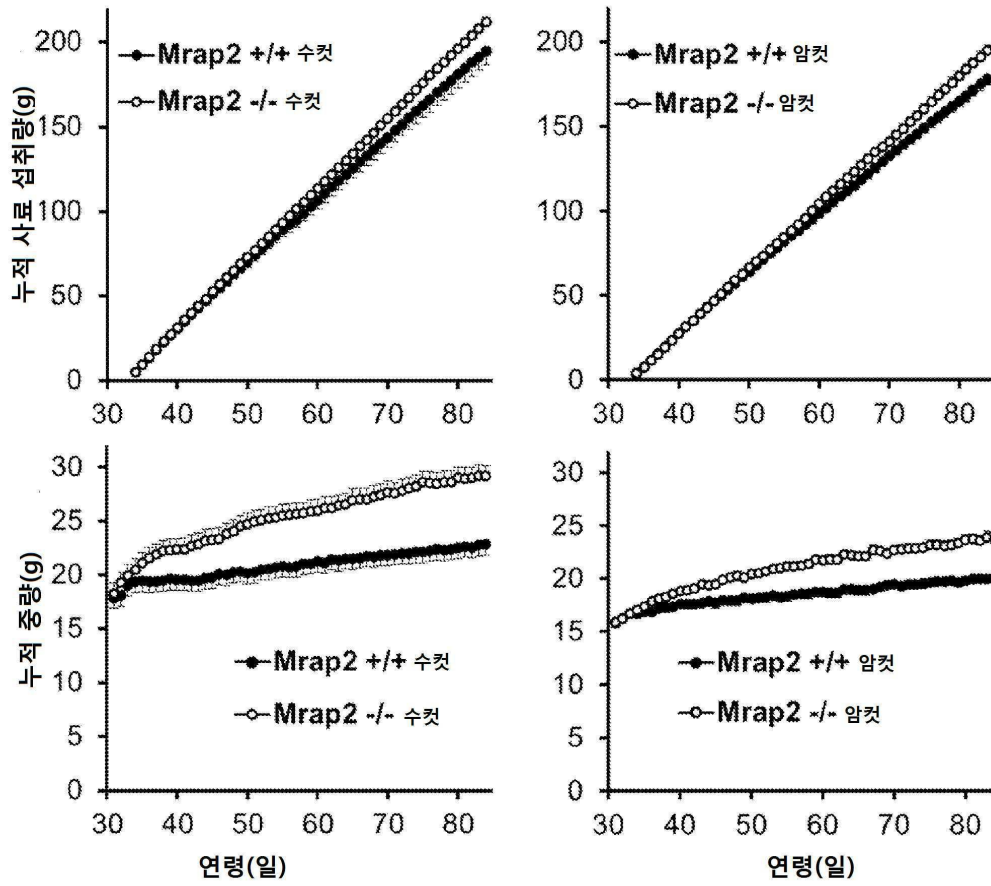
도면1a



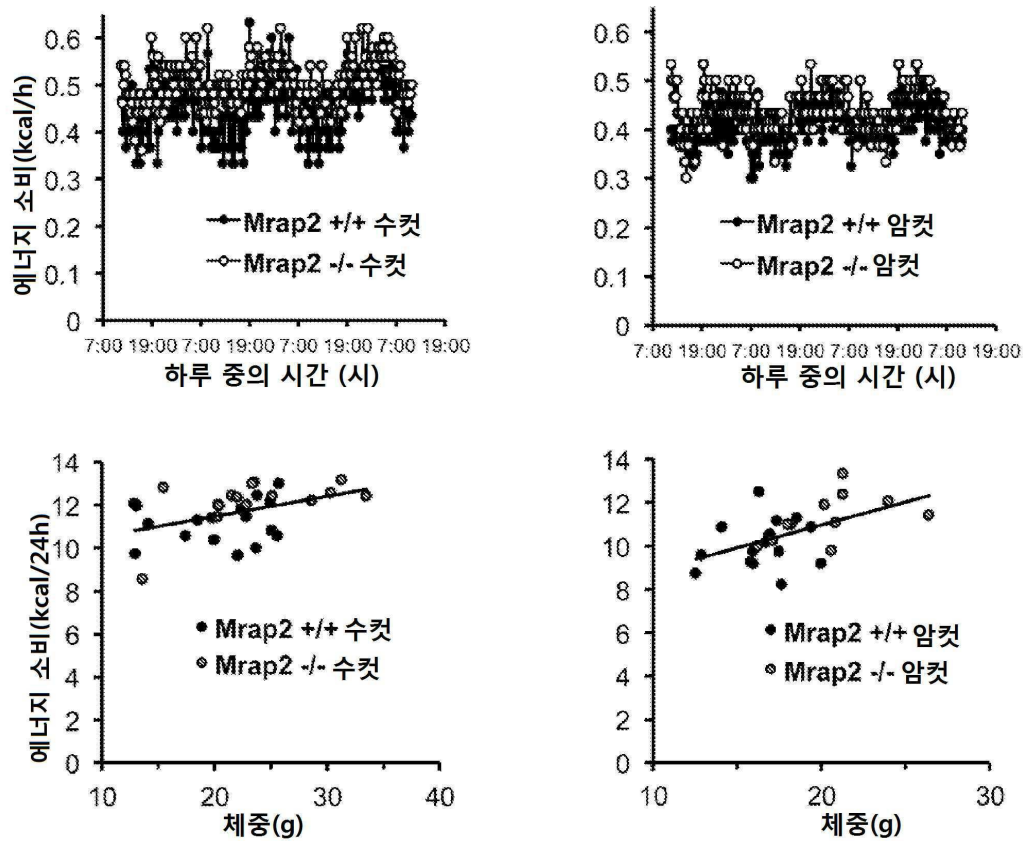
도면1b



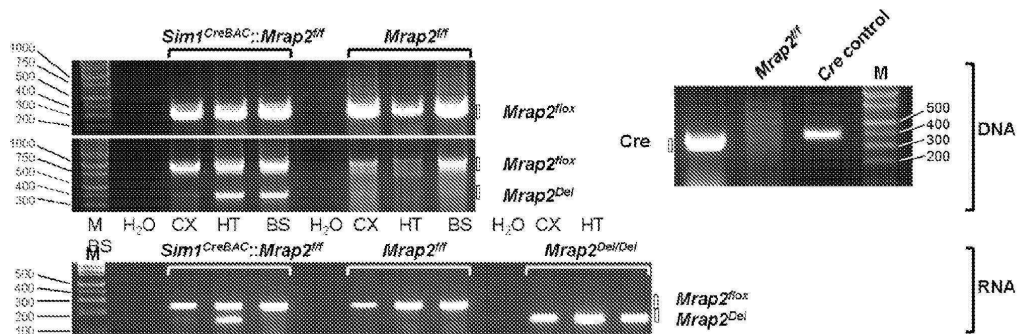
도면2a



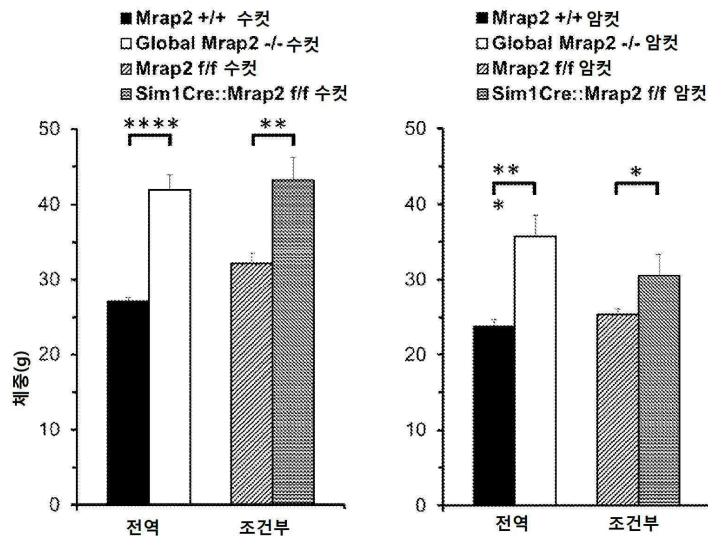
도면2b



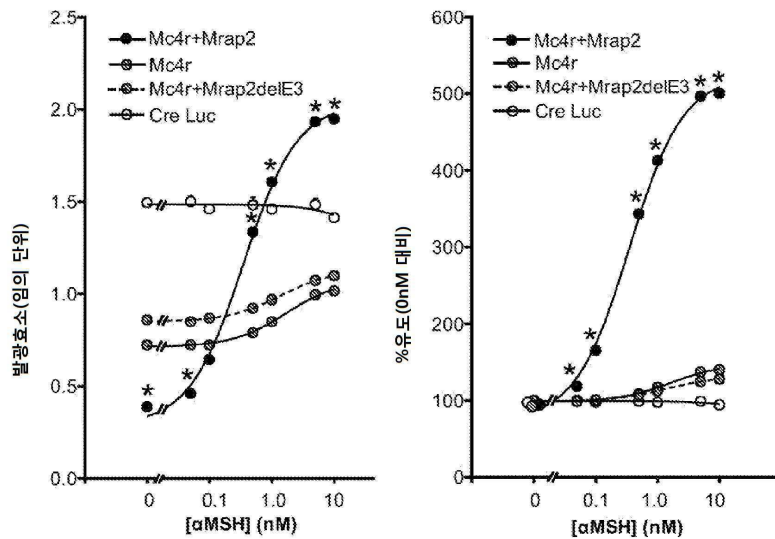
도면3a



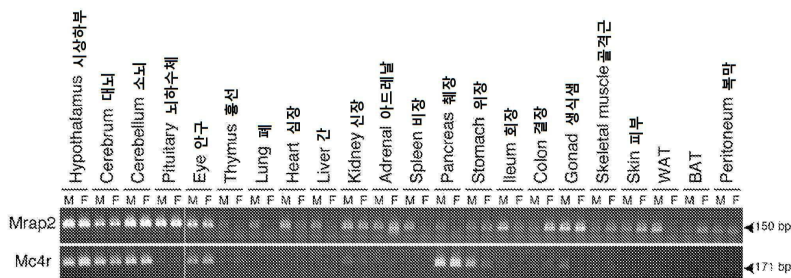
도면3b



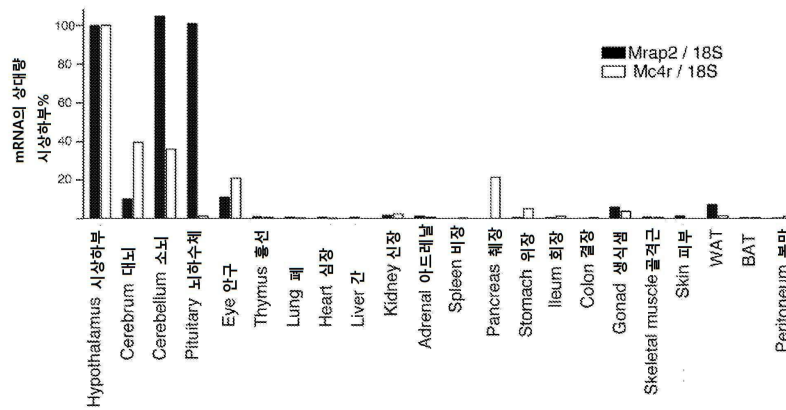
도면3c



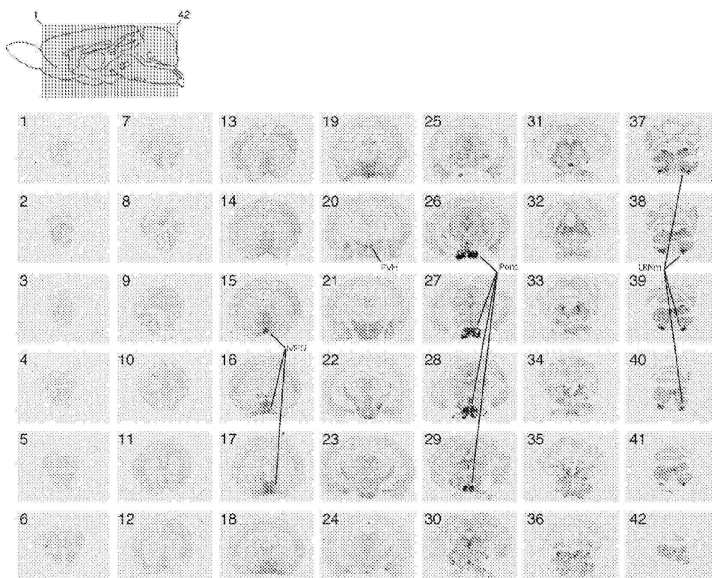
도면4a



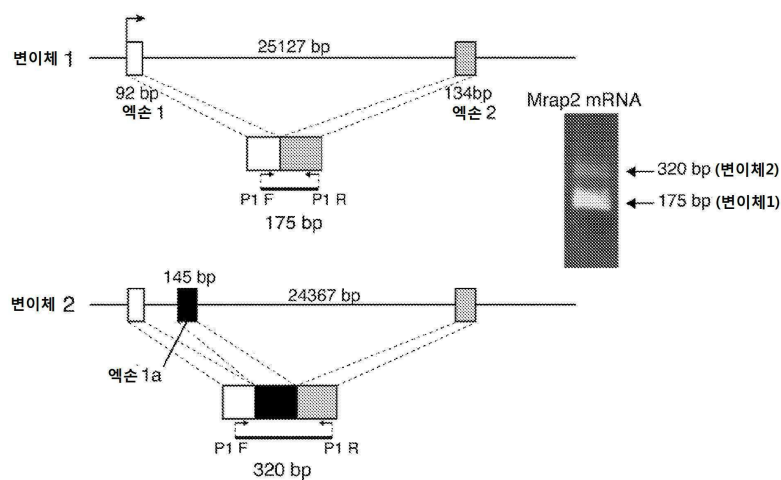
도면4b



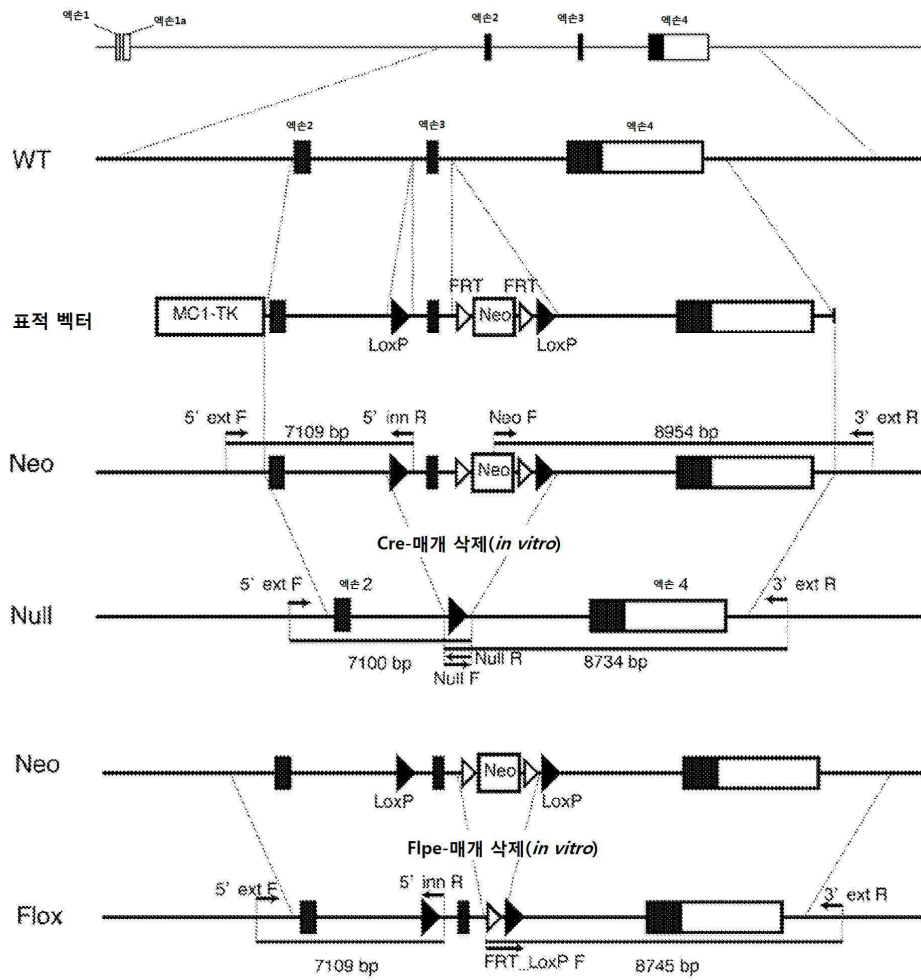
도면4c



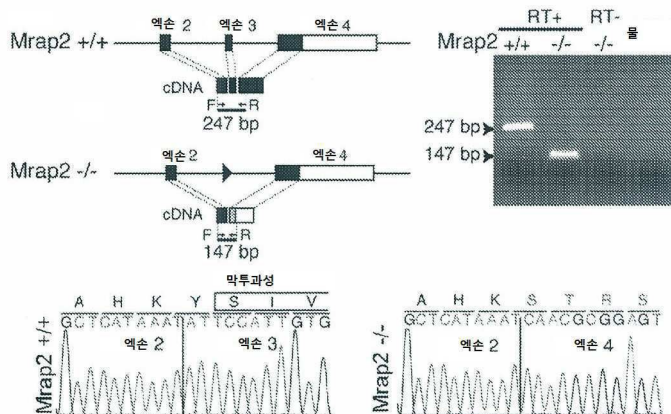
도면4d



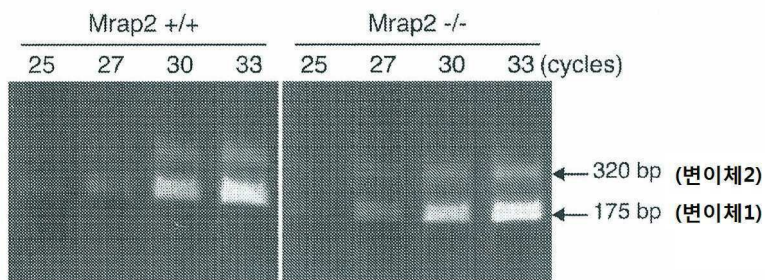
도면4e



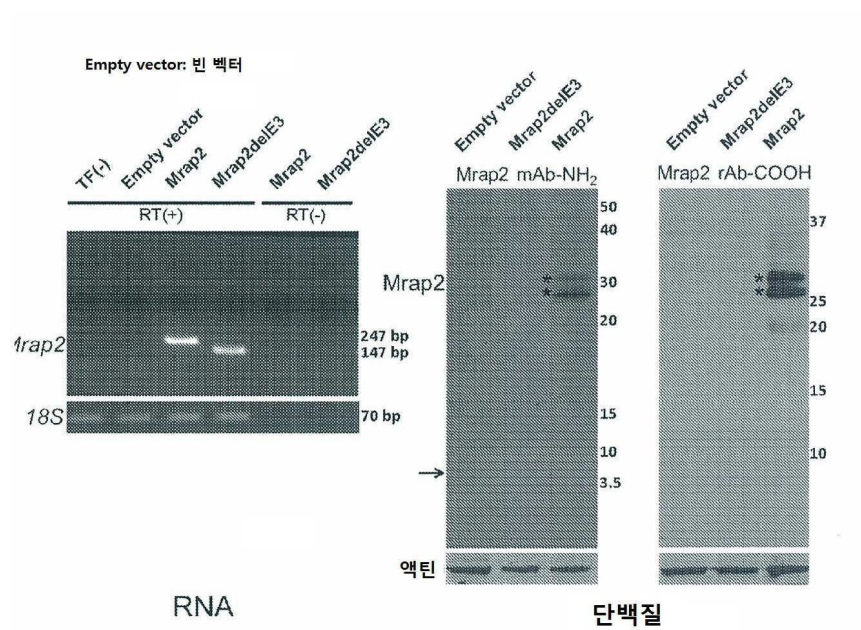
도면4f



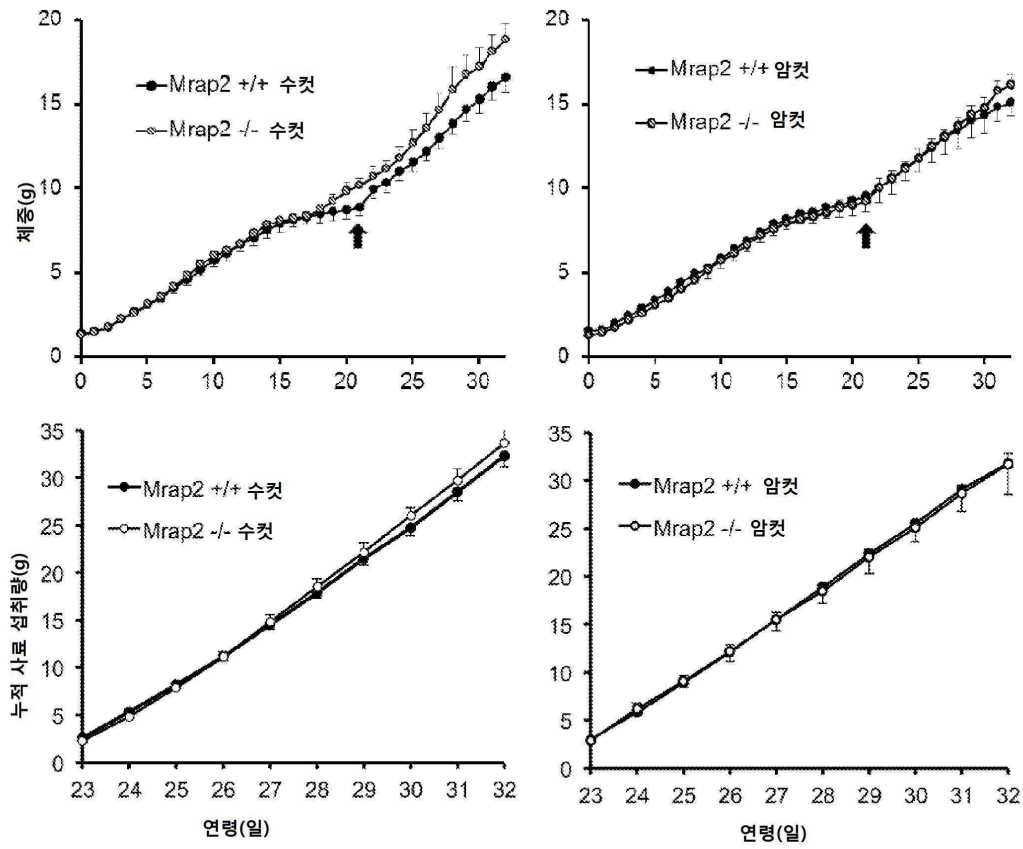
도면4g



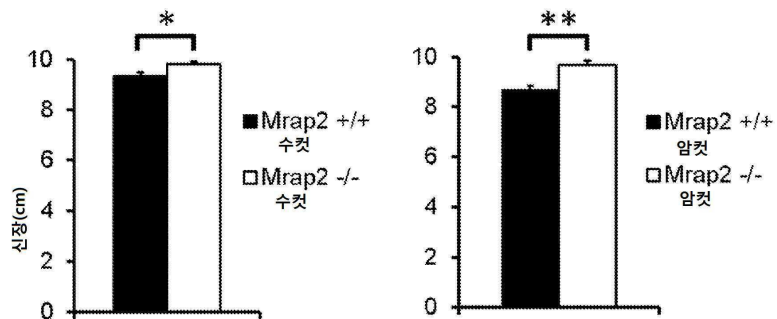
도면4h



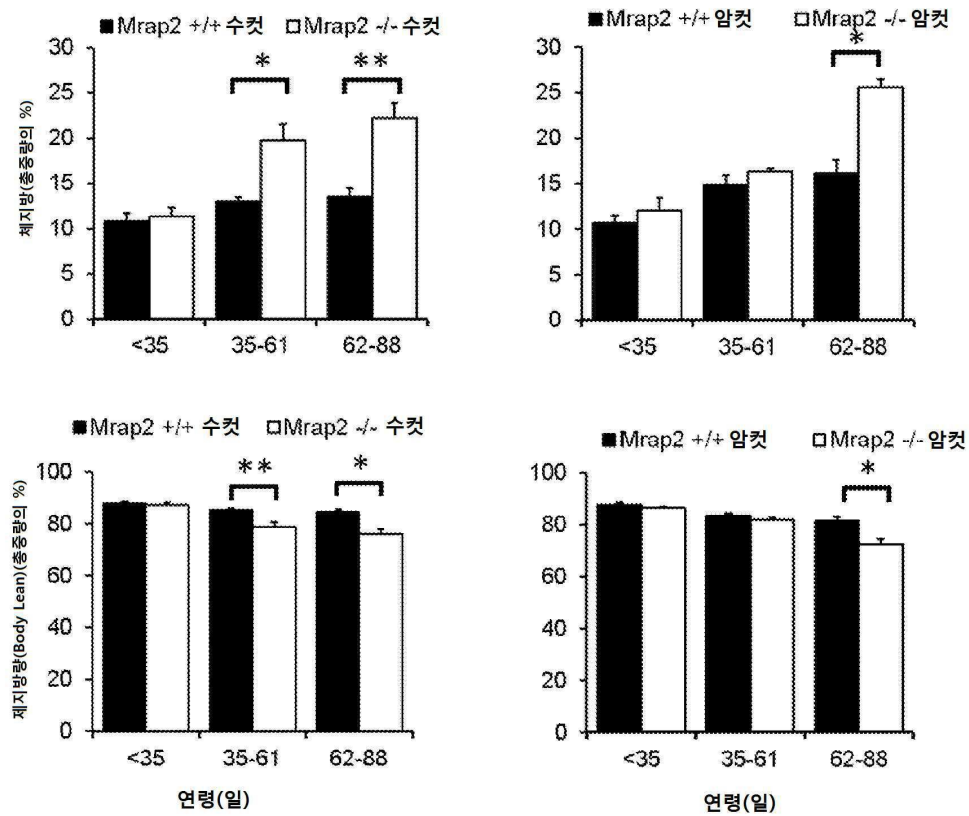
도면4i



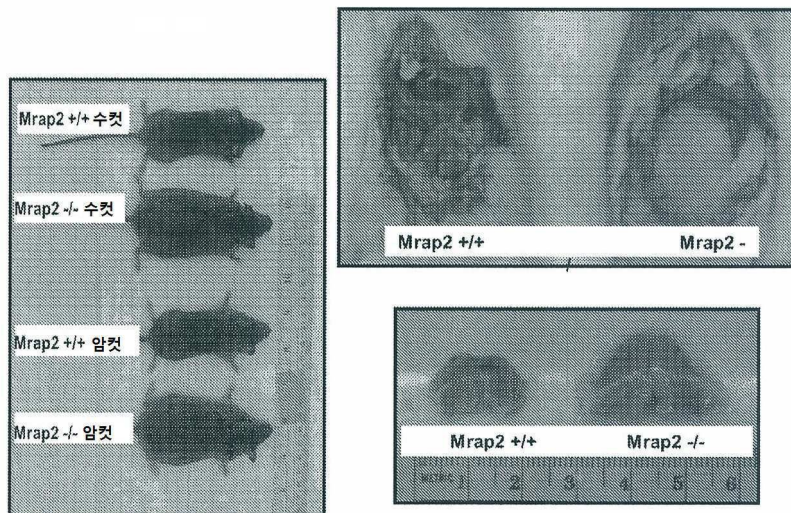
도면4j



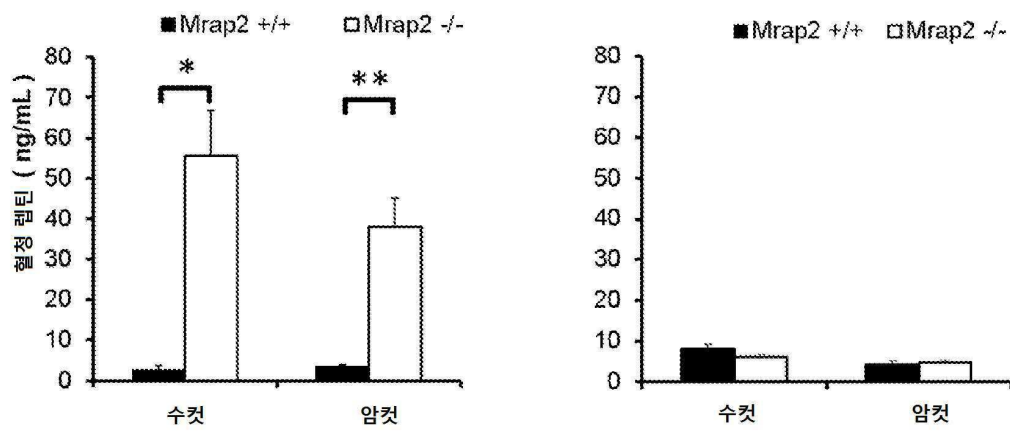
도면4k



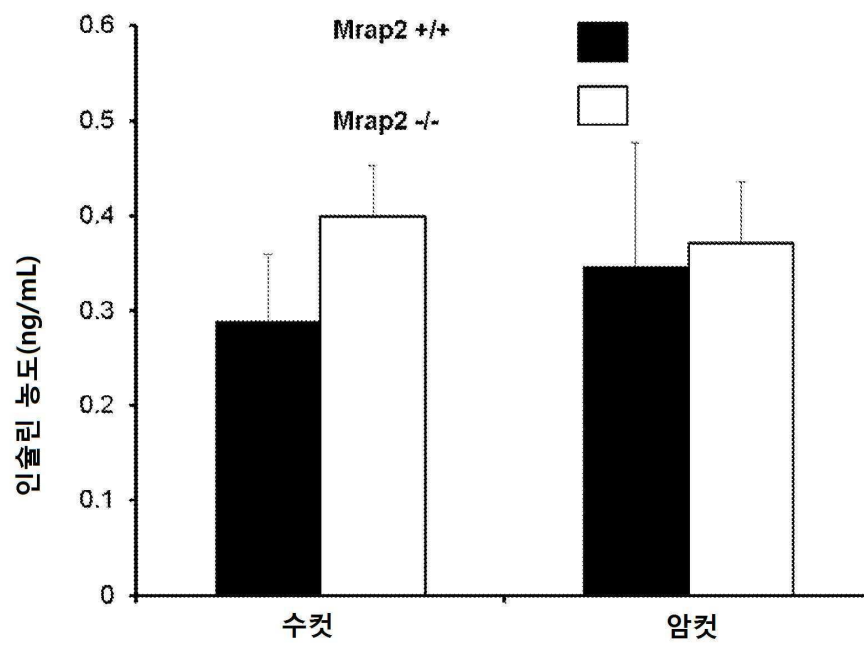
도면5a



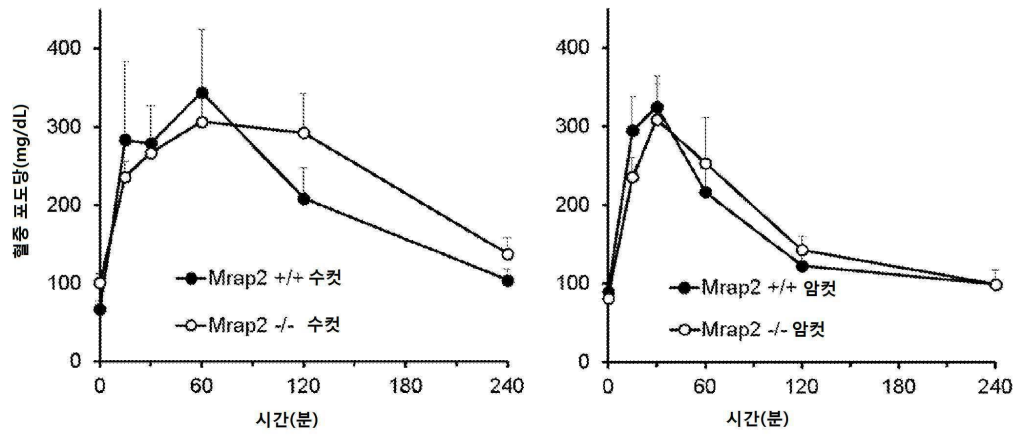
도면5b



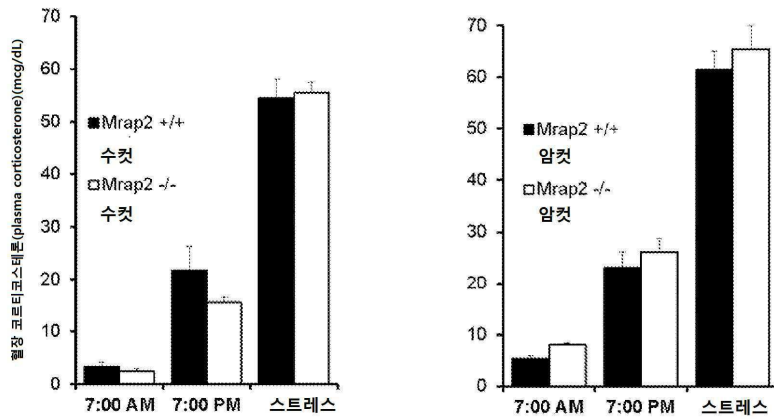
도면5c



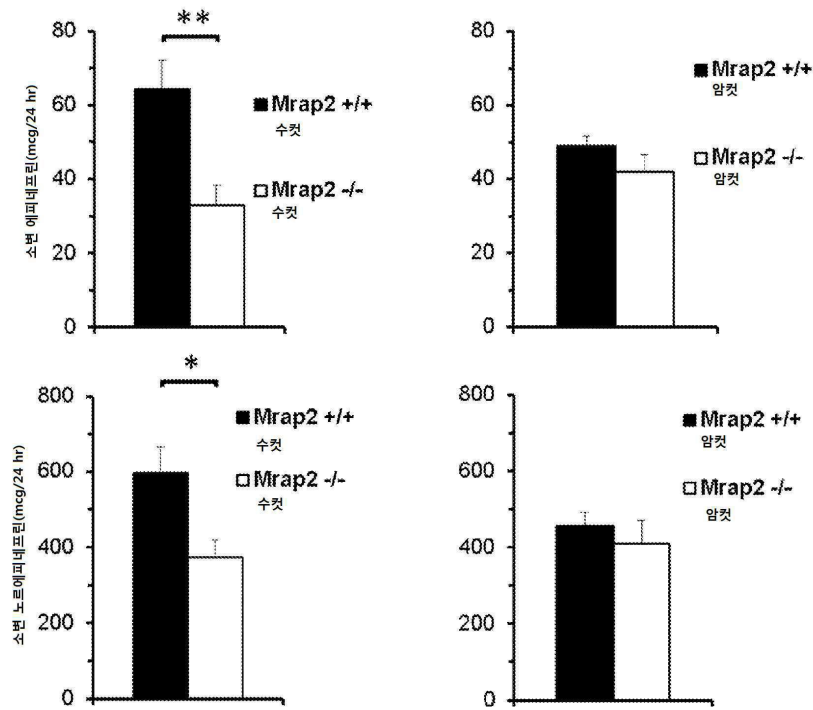
도면5d



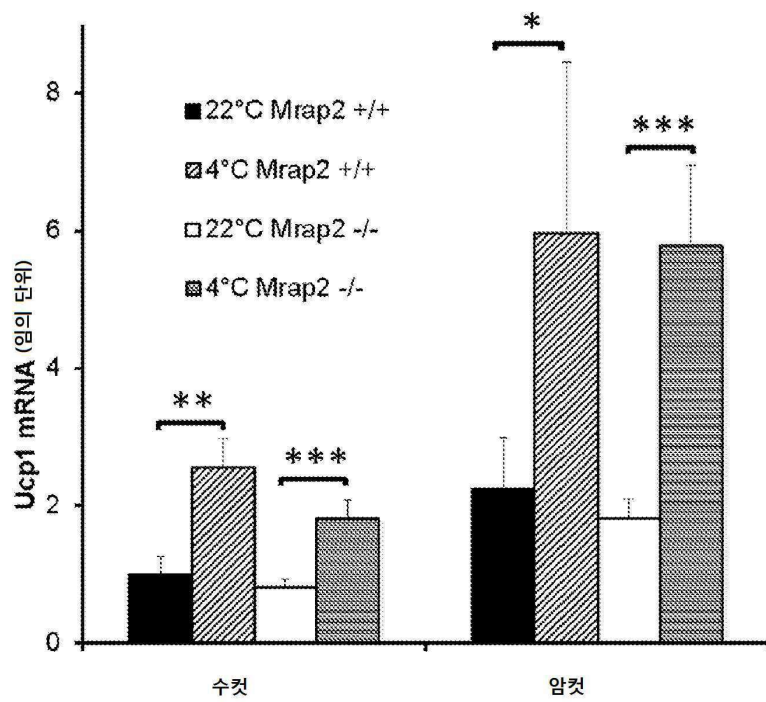
도면5e



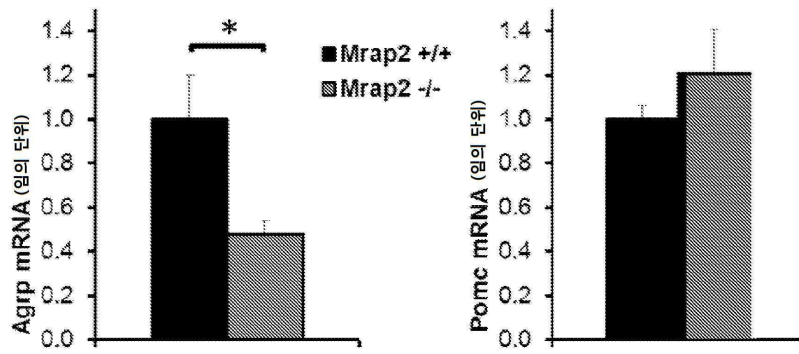
도면5f



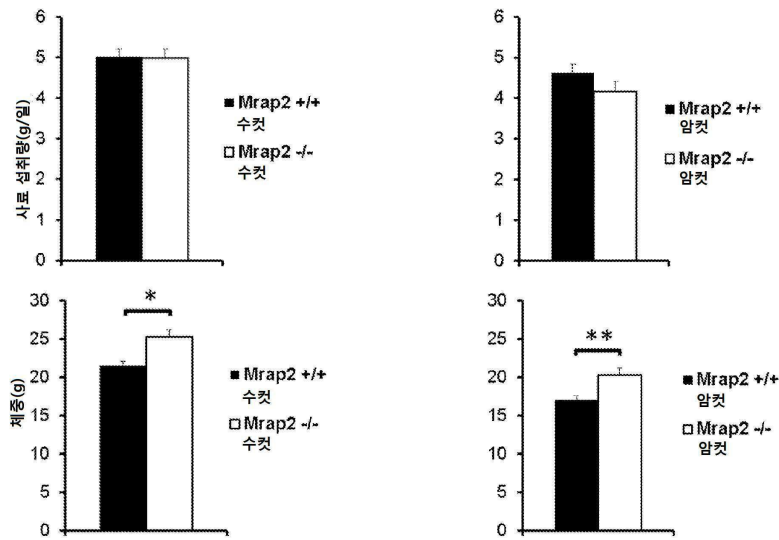
도면5g



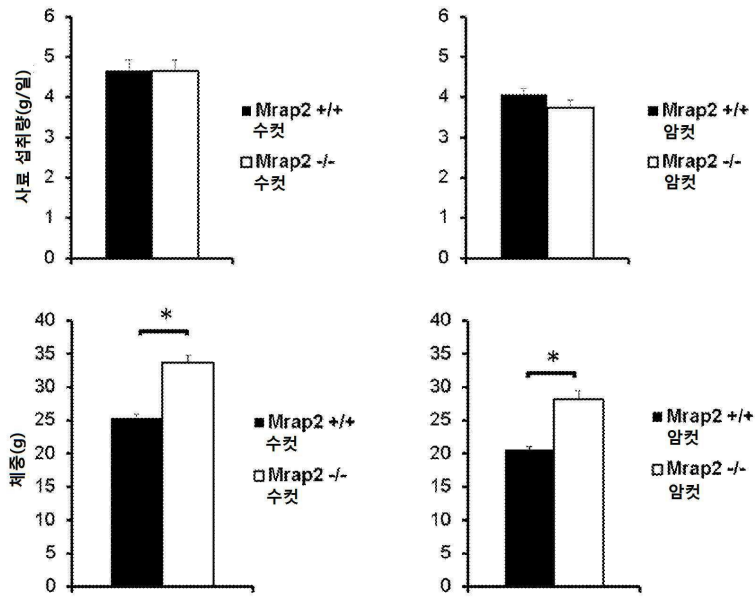
도면5h



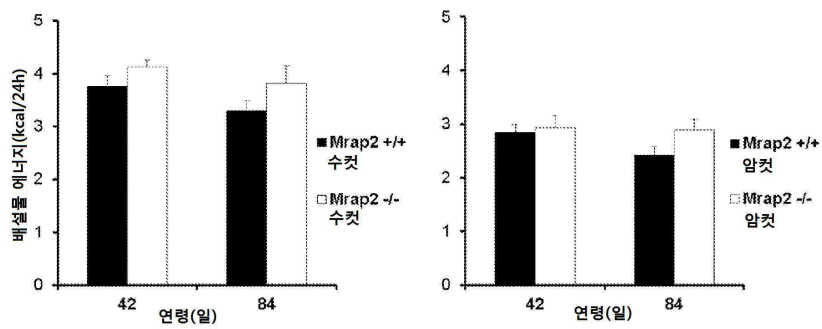
도면5i



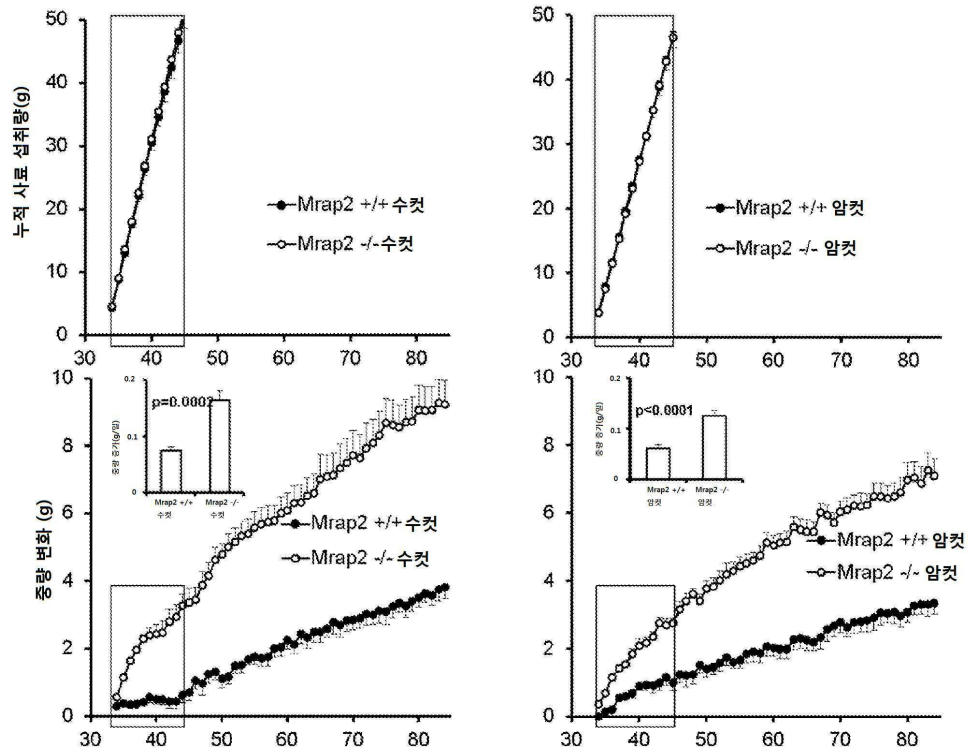
도면5j



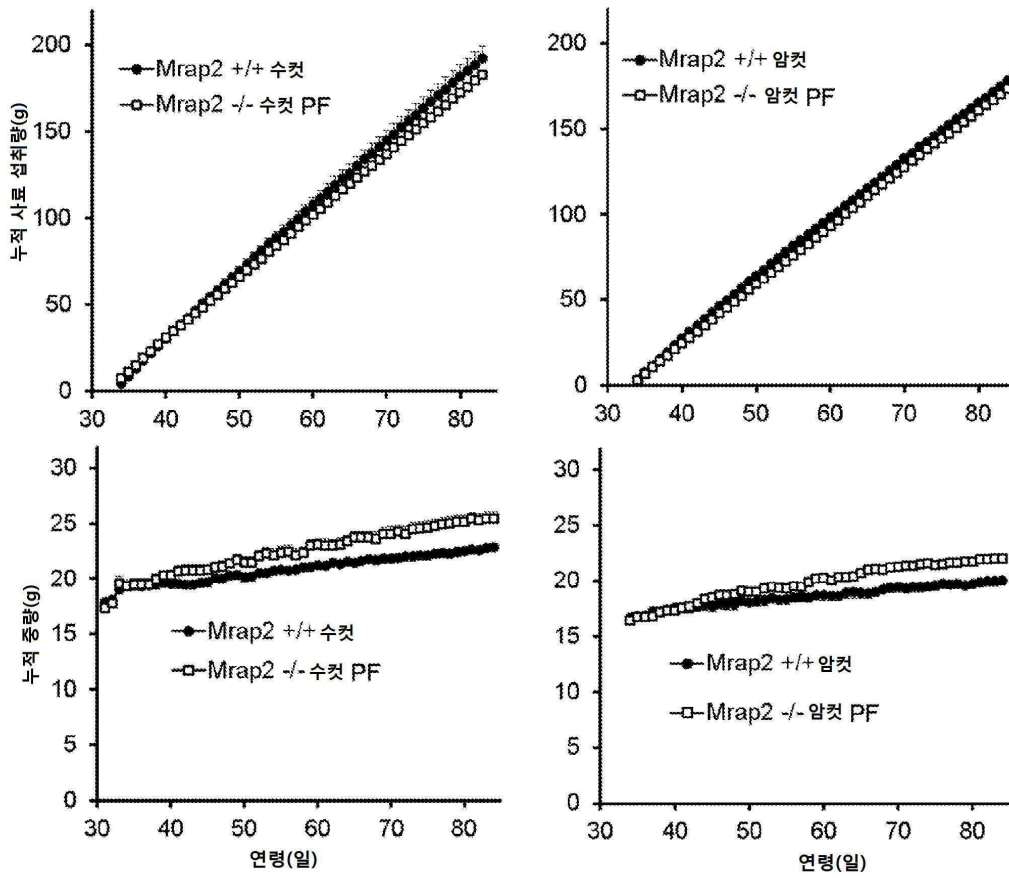
도면5k



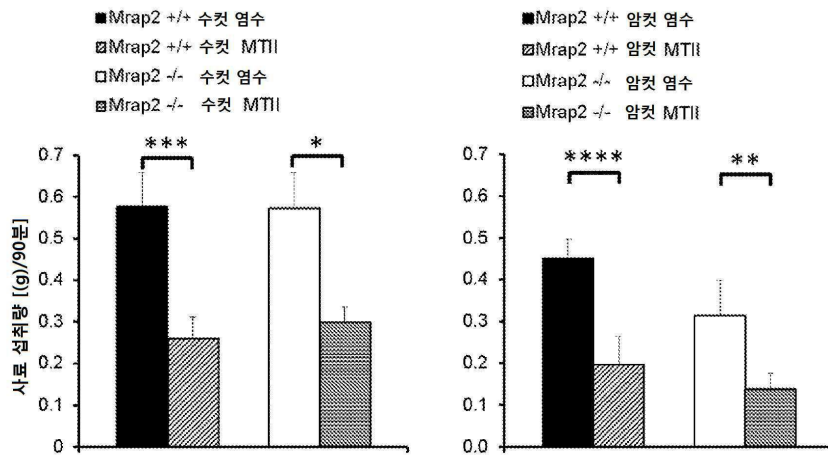
도면51



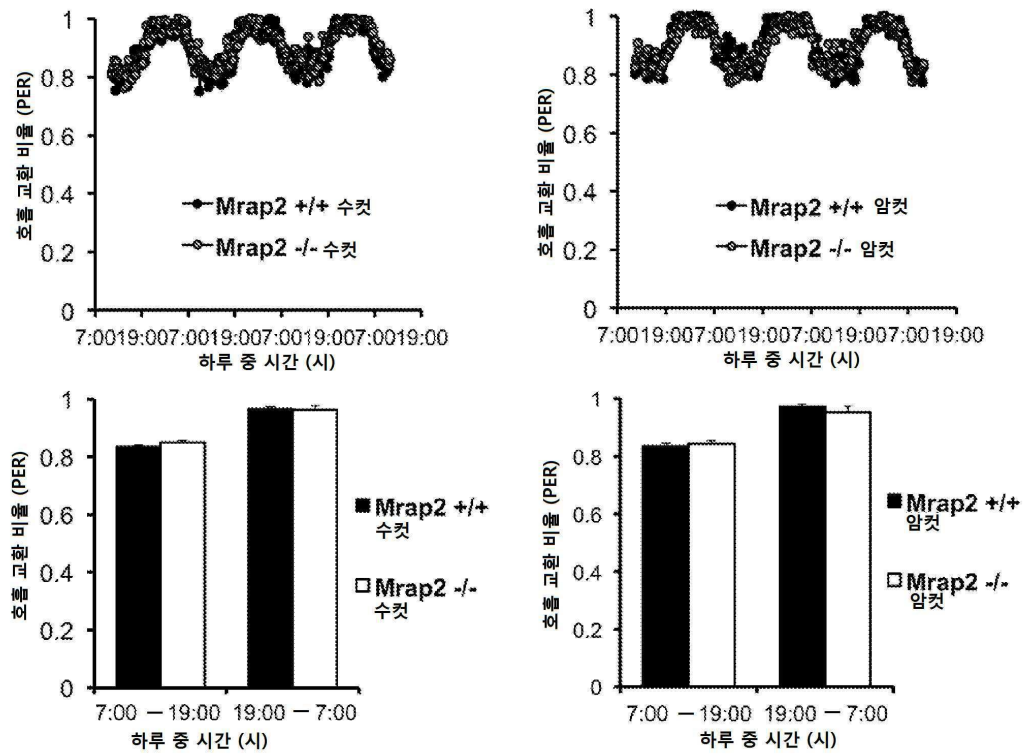
도면5m



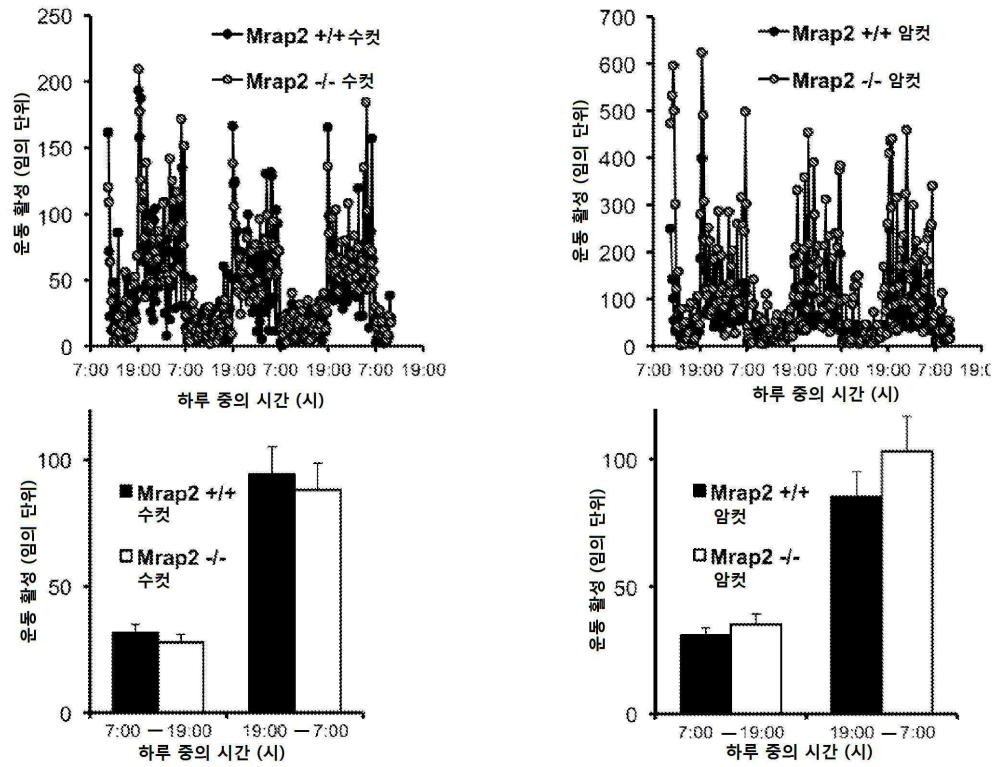
도면5p



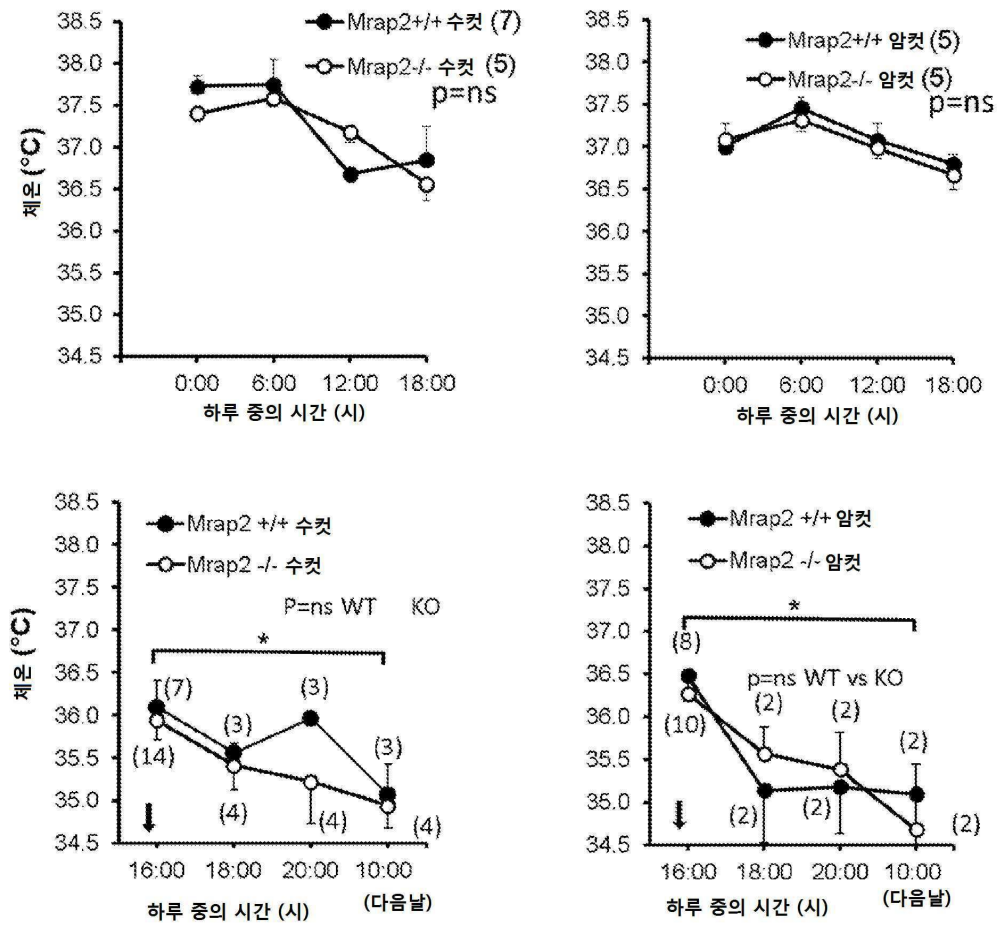
도면5q



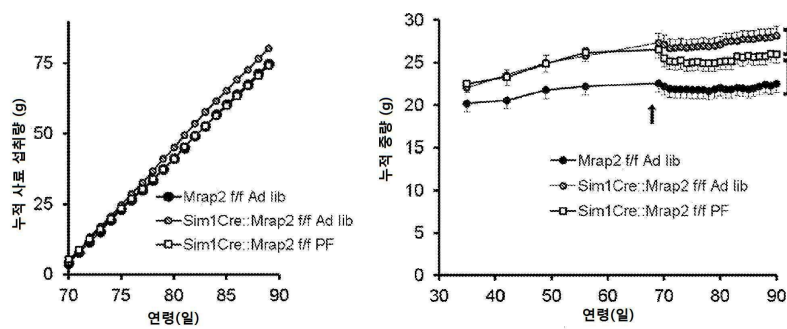
도면5r



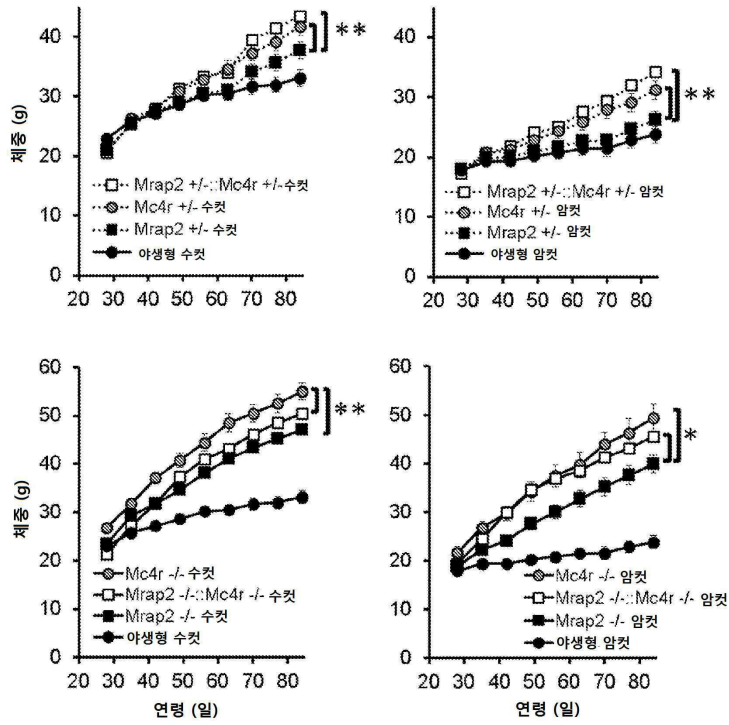
도면5s



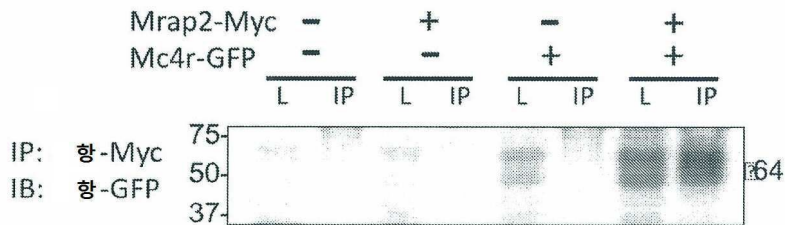
도면6a



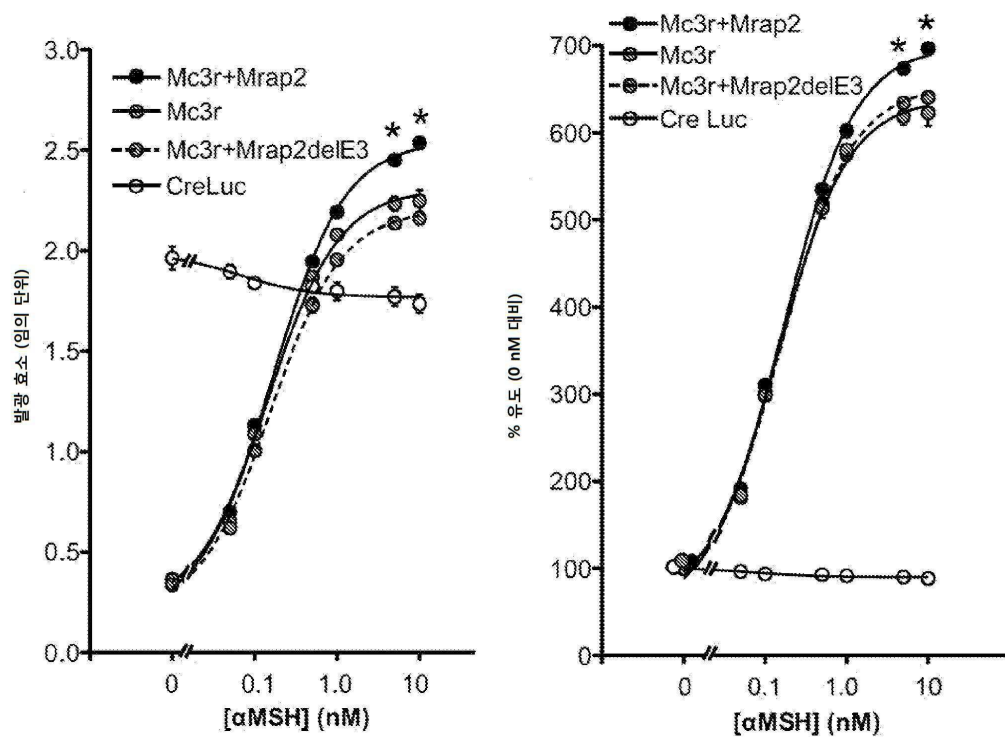
도면6b



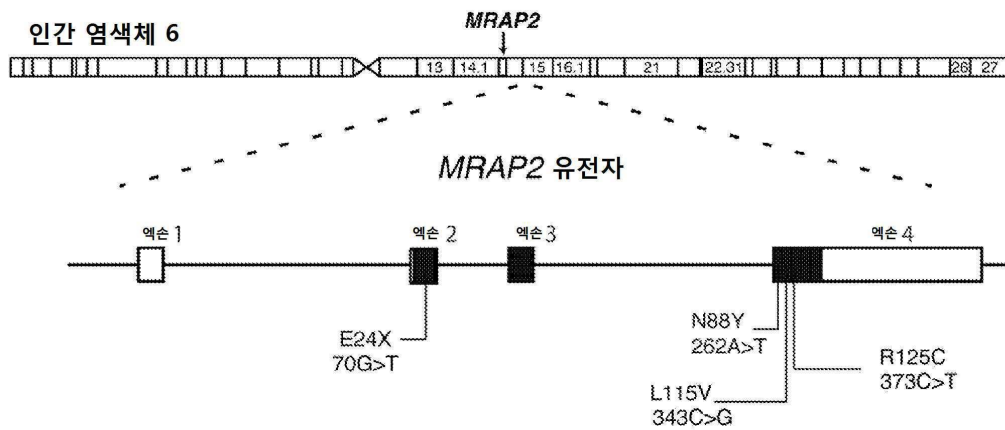
도면6c



도면 6d



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MAJZOUN, JOSEPH A.

ASAI, MASATO

<120> MRAP2 KNOCKOUTS

<130> 068570-078611-PCT

<140><141><150> 61/844,666

<151> 2013-07-10

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Ala Gln Arg Leu Ile Ser Asn Arg Thr Ser Gln Gln Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asn Ser Asp Tyr Thr Trp Glu Tyr Glu Tyr Tyr Glu Ile Gly Pro

20 25 30

Val Ser Phe Glu Gly Leu Lys Ala His Lys Tyr Ser Ile Val Ile Gly

35 40 45

Phe Trp Val Gly Leu Ala Val Phe Val Ile Phe Met Phe Phe Val Leu

50 55 60

Thr Leu Leu Thr Lys Thr Gly Ala Pro His Gln Asp Asn Ala Glu Ser

65 70 75 80

Ser Glu Lys Arg Phe Arg Met Asn Ser Phe Val Ser Asp Phe Gly Arg

85 90 95

Pro Leu Glu Pro Asp Lys Val Phe Ser Arg Gln Gly Asn Glu Glu Ser

100 105 110

Arg Ser Leu Phe His Cys Tyr Ile Asn Glu Val Glu Arg Leu Asp Arg

115 120 125

Ala Lys Ala Cys His Gln Thr Thr Ala Leu Asp Ser Asp Val Gln Leu

130 135 140

Gln Glu Ala Ile Arg Ser Ser Gly Gln Pro Glu Glu Glu Leu Asn Arg

145 150 155 160

Leu Met Lys Phe Asp Ile Pro Asn Phe Val Asn Thr Asp Gln Asn Tyr

165 170 175

Phe Gly Glu Asp Asp Leu Leu Ile Ser Glu Pro Pro Ile Val Leu Glu

180 185 190

Thr Lys Pro Leu Ser Gln Thr Ser His Lys Asp Leu Asp

195

200

205

<210> 2

<211> 2229

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tccggcgccc cgcgccgcct ccgctgcggg tcgggagcgc gcgtctccgc cgcacctcgg 60

atctaggagc tactcgcccc gccctgggcg gtgggaggcg gcggcggcgg cggcgctcgc 120

gcacctcggg ggagccagga gccggaacca gggccgagcc cgcggggccgg ggctagccag 180

ccggtcggag atgtccgcc agaggttaat ttctaacaga acctccagc aatcggcac 240

taattctgat tacacctggg aatatgaata ttatgagatt ggaccagttt ctttgaagg 300

actgaaggct cataaatatt ccattgtgat tggattttgg gttggtcttg cagtcttcgt 360

gatttttatg tttttgtgc tgaccttgct gaccaagaca ggagccccac accaagacaa 420

tgcagagtcc tcagagaaga gattcagaat gaacagcttt gtgtcagact ttggaagacc 480

tctggagcca gataaagtat tttctcgcca aggcaacgag gaggccaggt ctctctttca 540

ctgtacatc aatgaggtgg aacgcttggg cagagccaaa gcttgtcacc agaccacagc 600

ccttgacagt gacgtccaac tccaggaagc catcagaagc agtgggcagc cagaggagga 660

gctgaacagg ctcatgaagt ttgacatccc caactttgtg aacacagacc agaactactt 720

tggggaggat gatctttctga tttctgaacc acctattgtt ctggaaacta agccactttc 780

ccagacctca cacaagacc tggattgaga aacatgctct gtaaagggtc ttcctgaaga 840

tgtggattct atctttatgt agcaagaaat ctacatccac caaaattgtg tgtgtttggg 900

ggagagagag acatagagat agagacagag aggcagagaa gagaccctt tagaagagag 960

ctgagctgat taagctgagt ggttttttgt tttgttttgt ttttctttt taatacattt 1020

ggagctttgg gattattaaa gtatttacac caagcttgct caaccctgg catgtgtccc 1080

aggacagctt tgaatgtggc ccaatacaaa ttttaactt tattaaaaca tgagttttgt 1140

ttttttttt gctattttt ttaaagctcg tcagctatcg ttagtgtag tgaactttat 1200

gtgtggccca agacaactct tcttcagtg tggcacaggg aagctaaaag attggacacc 1260

tctgatttat actagctcgt tttgcttgtt gaaaaatttg gccaaatacc tattgtcagc 1320

attcttgggt gaggattagc ctaccatgtt ctaatctggc cctgccacta ctatgtctta 1380

ccttttgtga gttgctttac ctctctgggc tgccccattt ttaactgtag gttgacaggt 1440

ctagagtgat ccatcccacc tctaataattt tgtgaattta tgactttgcc ttcagatgag 1500
gctgagctat acataaaaca gtataaacta gggtagctgcc tcgtatctct ttaggctct 1560
ctcaaattctc tgtaccttcc acttaaccct aattgagcca agctttagtc aggggatctg 1620
gttgtctacc agaattgtcag gagactcatc ttacacagtc atgggtggcca atgtttctgg 1680
tgggttgtgc tgaacacagct cttctgagaa cttccaacca cccatgctct aacctggaga 1740

cagccatccc ctgcctcaga ataagtacca attcgtagta catgtatggt actcttgtec 1800
ccaagaaatg ttaggaagct tgtcagctga atgagaggag gtgccttctg ggtatctctg 1860
tgtttggtgta tctgtgccat tggctacaga acaagaaaaa tactatttgc catgctatta 1920
ccttggcaga tgtgtaggatg atagtcattt ggctttgagc tgagatggtc agtgggttgt 1980
aaattcccca ctagcagata ttcagggtgg cctgagttat gtaacaagt gagcaacaca 2040
gctttaattt catggaggaa tcaaagctgc aactggtat taaaacaact tgattttgcg 2100
cacacagtgt catgcatggc aagctgttaa cctctgggtg gcattttcat tatgaatttg 2160

ttcaccacct gtcttgctta agctacaaaa taaatgcatt tgactgcaca gaaaaaaaaa 2220
aaaaaaaaa 2229

<210> 3

<211> 206

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 3

Met Ser Ser Gln Arg Leu Ile Ser Asn Arg Thr Ser Gln Gln Ser Thr

1 5 10 15

Ser Asn Ser Asp Tyr Thr Trp Glu Tyr Glu His Tyr Glu Ile Gly Pro

20 25 30

Val Ser Phe Glu Gly Leu Lys Ala His Lys Tyr Ser Ile Val Ile Gly

35 40 45

Phe Trp Val Gly Leu Ala Val Phe Val Ile Phe Met Phe Phe Val Leu

50 55 60

Thr Leu Leu Thr Lys Thr Gly Ala Pro His Gln Asp Asn Ala Glu Ser

65 70 75 80

Ser Glu Lys Arg Phe Arg Met Asn Ser Phe Val Ser Asp Phe Gly Arg

85 90 95

Pro Leu Glu Pro Asp Lys Val Phe Ser Arg Gln Gly Asn Glu Glu Ser

100 105 110
Arg Ser Leu Phe His Cys Tyr Ile Asn Glu Val Asp Gln Leu Asp Lys
115 120 125
Ala Lys Ala Cys Phe Gln Thr Thr Ala Leu Asp Ser Asn Val Gln Leu
130 135 140
Gln Glu Ala Ile Arg Arg Ser Gly Gln Pro Glu Glu Glu Leu Asn Arg
145 150 155 160
Leu Met Lys Phe Asp Ile Pro Asn Phe Val Asn Thr Asp Gln Asn Ser

165 170 175
Ser Phe Gly Glu Asp Asp Leu Leu Ile Ser Glu Pro Pro Ile Val Leu
180 185 190
Glu Asn Lys Pro Val Ala Gln Thr Pro His Lys Asp Leu Asp
195 200 205

<210> 4

<211> 2180

<212> DNA

<213> Sus scrofa

<400> 4

ttgaactcga agccattgct gaggatTTTT cctaattcccc atcaatgctg cctcactccc	60
tcttgctcag ccctttgggc tctgtcacc caaagttggc cagagagacg cactgctcag	120
ccgagaggac aaacaattct ccccatccct ttcctttctt cgcggcaggc tctccttcag	180
acggtgactg agcgccacgt gggcacagag ggttcgcag agctcgctc ctcccggccc	240
ccgcgccctg ggactgggga ggcagccgcc tccgccgcgg gtggggaacg cgcgtccccg	300
ccgcgtgca gcgccgggag cgaccagccg gcagggtgc tgaaagcggc ggtggcggcg	360
ctcacgcacc tcgcaggagc tggcggaaat gtcttcccag aggttaattt ctaacagaac	420
atcccagcaa tctacatcta attctgatta cacctgggaa tatgagcatt atgagattgg	480
acctgtttcc ttgaaggac taaaggctca caaatattcc attgtaattg gatTTTgggt	540
tggctttgcg gtcttcgiga ttttcatgtt ttttgtgctg accttgctga ccaagacagg	600
agctccacac caagacaatg cagagtcttc agagaagaga ttccgaatga acagctttgt	660
gtcagatttt ggaagaccac tggagccaga caaggtgttt tctcgacagg gcaatgagga	720

atccagggtcc ctcttttcatt gttacattaa tgaagtggac cagttggaca aggccaaagc 780
 ttgtttccag accacggccc tcgatagtaa tgttcagctc caagaagcca tcagacgcag 840
 tgggcagccg gaggaggagc tcaacaggct catgaaattt gacattccca actttgtcaa 900
 cacagaccag aactcctcct ttggggaaga cgatctcctg atatcggaac cacctattgt 960

tctagaaaat aagccagttg cccagacccc acacaaagac ttggattgag aagcatgttt 1020
 tgtaaagtg atacctgaag aggctgggtc gtctttgtat agtacgaaat ctccattcac 1080
 caaaattgtg tgcgtttgta tatgagagac agagacagag agacaaaaag gcaaatgac 1140
 agagaagaga gccccctggg aagagagctg attcagctgt ttttacgccc tcaaacacat 1200
 atggggcttt tgggaggggg agaaccaagt agttacactg tctcatcttc ctgtgtgttg 1260
 aagaacttgg ccacatactc ggcatcatca ctcttgaatg gggttgacat atggccttcc 1320
 tgtctgccac tgctatgctc ttcattagtg agttgctttt tctctctggg ctgccgtctt 1380

ttttactgta aggagaggag tatggagtag atgatttgtc tcaactcgaa taatttgccg 1440
 atttatgact gtgttcagat gaggtggga tatacccaaa ggagtataaa ctagggcacc 1500
 gtatcctagc tcttctata agatccceca gttgactttc cattcaacce ttaactgagc 1560
 ccagcttttg tcagggtccc ggtgtctatc aggatgtcag gagactcatc tctcatggtt 1620
 tctgtggcaa cttttctatt ggttgggctg aaatggctct tctgagacce tccagccacc 1680
 cacgtcaaaa gctgaggaca gccctgcccc tctctcctg ggatgagtac caatecacia 1740
 tacatttgtg gacagtcttg ttcccagaaa catatggaag gtcacagcc gcgtgaggag 1800

agggtgccttc tgtgtctctc tgttgggtga actgtgtctg gtcacactgc tatagtattg 1860
 gctagtgaac aagaaaagca ctatttgcca tgctttctgt tcacttggca gatgtgtagg 1920
 tgatgggtgt gtggcttatg tgtgggcttt gagctgggat gttgaatgag ttagaattac 1980
 tccatatgca aatattcaga gtggcctggc acaacacaga gctgattcat gaatcaaaac 2040
 tgcattgtgt ttggaaaca acttggtttt gcagtcatgt ggcatgcatg gccagctgct 2100
 aatctctggt tgggtgtttc attatggatt tcattatgtc ttgcttaagc tgaaaaataa 2160
 atgcatttat tgcaccagaa 2180

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer

<400> 5
gcggccgccca aacaaaaaaaa ggtatttgg 29
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 6
actagtctac agtatgtatt ac 22
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223>
> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 7
actagttact atagtatcat ta 22
<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 8
ggatccgttc ttggtcttgc tcagaaa 27
<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400>
> 9

gtcgacatgt gaagcgtgga ccaaaa 26

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

gaattcattc atgttcattg tgacac 26

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

ggatccgaag tggagtaaatt tcaatc 26

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

gcggccgcgc acaggtgccc cgcccacc 28

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 13

gtcgaccgcg atgtttcttt agcata 26

<210> 14

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 14
 gaattctcac gagggcaaaa accagg 26
 <210> 15
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 15
 ggatccaatt aggtgttttg gttctt 26
 <210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 16
 gcggcgcct tttcttacta ttaaaaat 28
 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 17
 gcaaggcgat taagttggg 19
 <210> 18
 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 18

ggaaacattc caggcctgg 19

<210> 19

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 19

cttagctgtc cctgtggtg tcccctaaag ttggc 35

<210> 20

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 20

ggatccctc gagggaccta ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatattaag 60

ggttattgaa tatgatcgga attgggctgc aggaattc 98

<210> 21

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 21

tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcat 44

<210> 22

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 22

accaacatcc ctgtgatgca cctgtagcct gctggactgg ctgaacagaa 50

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 23

atgtgaagcg tggaccaaaa tgctgaga 28

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 24

ttctctagct ccggacatct caagcaca 28

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 25

gtcgacatgt gaagcgtgga ccaaaa 26

<210> 26

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 26

gcggccgcgc acaggtgccc cgcccacc

28

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 27

gtcgaccgcg atgtttcttt agcata

26

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 28

gcggccgcct tttcttacta ttaaaaat

28

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 29

cttagctgtc cctgtggctg tcccctaaag ttggc

35

<210> 30

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 30

ggatccacct aataacttcg tatagcatatc attatacgaa gttatattaa gggttattga 60

atatgatcgg aattgggctg caggaattc 89

<210> 31

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 31

gaattcctgc agcccaattc cgatcatatt caataaccct taatataact tcgtataatg 60

tatgctatac gaagttatta ggtgatcc 89

<210> 32

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 32

accaacatcc ctgtgatgca cctgtagcct gctggactgg ctgaacagaa 50

<210> 33

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 33

cttagctgtc cctgtggctg tcccctaaag ttggc 35

<210> 34

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 34

ggatcccctc gagggaccta ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatattaag 60

ggttattgaa tatatcggaa ttgggctgca ggaattc 97

<210> 35

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 35

gaattccgaa gttcctattc tctagaaagt ataggaactt catcagtcag gtacataata 60

taacttcgta taagtatgct atacgaagtt attaggtgga tcc 103

<210> 36

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 36

accaacatcc ctgtgatgca cctgtagcct gctggactgg ctgaacagaa 50

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 37

tcagcctccg tgcagagct gg 22

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 38

ggcatggatt gctaccaga tgcaggt 27

<210> 39

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 39

ggctcaactc tgcaaacacg tcagcgt 27

<210> 40

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 40

tgctgacttt gctgacgaag acaggtg 27

<210> 41

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 41

tggactctc gttgccctga cgtaggcat gaggccatc cagt 44

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 42
 aggcgggtcg ggatcatcat aagttgta 28

<210> 43
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 43
 cctcgccatc aggaacatgt ggacataga 29

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 44
 agtcctgcc cttgtacac a 21

<210> 45
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 45
 cgatccgagg gcctcacta 19

<210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 46

gtctgcccag aggctggctt 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 47

cctctctgag gactccgct 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 48

agcaccggag gagctgaacc 20

<210> 49

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 49

cagtccttca aaggaaactg gtccg 25

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 50
ggattggcct ctacgactca 20
<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 51
taagccggct gagatcttgt 20
<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 52
tgtgtaaggc tgcacgagtc 20
<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 53
ggcagtagca aaaggcattg 20
<210> 54
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer
<400> 54

gagttcaaga gggagctgga 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 55

ggtcatgaag ccaccgtaac 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe

<400> 56

tttgctgacg aagacaggtg 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

probe

<400> 57

cagtcaggt ctatgcgtga 20

<210> 58

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 58

aagcttgcca ccatggagat gtctgcccag ag 32

<210> 59

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 59
 gcggccgctc agtccaggtc tatgcgtg 28
 <210> 60
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 60
 ttctctttga aggactgaag gctcataaat caacgcggag tcctcagag 49
 <210> 61
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 61
 ctctgaggac tccgcgttga tttatgagcc ttcagtcctt caaaggaaa 49
 <210> 62
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 62
 aagcttgcca ccatgaactc caccaccac ca 32
 <210> 63
 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 63

gcggccgctt aatacctgct agacaact

28

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Met Ser Ala Gln Arg Leu Ala Ser Asn Arg

1 5 10

<210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 65

Leu Leu Glu Asn Lys Pro Val Ser Gln Thr Ala Arg Thr Asp Leu Asp

1 5 10 15

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> CDS

<222

> (1)..(21)

<400> 66

gct cat aaa tat tcc att gtg

21

Ala His Lys Tyr Ser Ile Val

1 5

<210> 67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 67

Ala His Lys Tyr Ser Ile Val

1 5

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 68

gct cat aaa tca acg cgg agt

21

Ala His Lys Ser Thr Arg Ser

1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 69

Ala His Lys Ser Thr Arg Ser

1 5