

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 0810070)

연구과제명 (국문): 변이형 EGFR에 의한 세포 증식의 기전 연구 및
저해제 탐색을 위한 꼬마선충 모델 개발

연구과제명 (영문): Development of C. elegans model for the mutated
EGFR induced cell proliferative mechanism and EGFR inhibitor screen

과제책임자 : 심 재 갈

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1140 1123 1704" data-label="List-Group"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.<p>(14 pont, 고딕체)</p></div>	<p>변이형 EGFR 에 의한 세포 증식의 기전 연구 및 저해제 탐색을 위한 꼬마 선충 모델 개발</p> <p>국립암센터</p>
---	---

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “변이형 EGFR에 의한 세포 증식의 기전 연구 및 저해제 탐색을 위한 꼬마선충 모델 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12. 30

국립암센터

과제책임자 : 심재갈

연구원 : 김태훈

” : 김소희

” : 유범호

목 차

< 요약 문 > -----	1
(한글) -----	1
(영문) -----	3
1. 연구의 최종목표 -----	5
2. 연구의 내용 및 결과 -----	5
3. 연구결과 고찰 및 결론 -----	31
4. 연구성과 및 목표달성도 -----	33
5. 연구결과의 활용계획 -----	37
6. 참고문헌 -----	37
7. 첨부서류 -----	39

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

연구분야(코드)	기초실용화연구(B-4)	과제번호	0810070	
과제명	변이형 EGFR에 의한 세포 증식의 기전 연구 및 저해제 탐색을 위한 꼬마선충 모델 개발			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2008년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	330,000	
	1차년도	2008년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일	110,000	
	2차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	110,000	
	3차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일	110,000	
과제책임자	성명	심재갈	주민등록번호	710605-*****
	전화번호	031-920-2262	전자우편	jaegal@ncc.re.kr
색인단어	국문	꼬마선충, 변이형 EGFR, 세포 증식		
	영문	C. elegans, Mutant EGFR, Cell proliferation, Inhibitor screen		

◆ 연구목표

<최종목표>

인간의 돌연변이형 EGFR의 발현에 의한 꼬마선충(*C. elegans*) 과형성(Hyperplasia) 모델을 제작하고, 이 모델을 통해 세포 증식의 신호전달을 조절하는 유전자를 발굴하고, 변이형 EGFR 신호전달계의 저해제 탐색 가능성 검증.

<당해년도 목표>

화합물의 효능 평가를 통해 적합한 Hit을 선정하고, SURO-1과 SURO-4의 세포증식에 대한 조절 규명

1. 7개 화합물의 유도체 244종과 1280종에 대한 구매 화합물 스크린 결과를 종합하여 세포배양실험에서 효능을 평가
2. SURO-1이 실제 작용하는 표적을 찾고 그 표적의 세포 증식에 대한 영향 분석
3. SURO-4를 비롯한 다양한 collagen들이 세포증식에 미치는 영향에 대해 분석

◆ 연구내용 및 방법

(1) 7개 화합물의 유도체 244종과 1280종에 대한 구매 화합물 스크린 결과를 종합하여 세포배양실험에서 효능을 평가

- 추가적 화합물 스크린 : 시그마에서 구입한 1280종의 화합물이 확보되어 있음. 이에 더해서 화합물이 확보되는 대로 스크린을 수행할 것임.

- 7개 화합물의 유도체 244종에 대한 활성 평가 : 화학연구원에서 반출 가능한 후보 물질의 유도체가 244종임. 이들 244종의 EGFR 저해 정도를 jgIs6 strain을 이용하여 평가할 것임.

- EGFR [L858R:: T790M]과 EGFR[Δ⁷⁴⁷⁻⁷⁵²]에 의한 hyperplasia 모델에서 저해물질의 비교 실험을 수행할 것임.

- EGFR 하위에 있는 인간의 돌연변이형 Ras를 이용한 hyperplasia model을 제작하여 후보 물질의 EGFR 선택성을 검증할 것임.

- EGFR 발현 세포 배양 실험을 통한 효능 평가 : EGFR을 과발현하는 A431등의 EGFR 관련 세포를 이용하여 Iressa와 후보 물질들 간의 효능을 평가하고, EGFR을 발현하지 않는 세포를 이용하여 세포 독성을 평가하여 최종적인 Hit을 선정할 것임.

- (2) SURO-1이 실제 작용하는 표적을 찾고, 그 표적의 세포 증식에 대한 영향 분석
- SURO-1의 표적 선정 : 꼬마선충에 존재하는 rol-9, sqt-3와 같은 rol mutant들을 suro-1 mutation이 suppression할 수 있는지 확인하여 그 중에서 SURO-1의 표적이 될 수 있는 것을 선정할 것임.
 - 선정된 collagen의 carboxypeptidase의 표적 서열을 가진 peptide를 제작하여 SURO-1에 의해 잘려지는지, 반응물의 질량을 분석하여 확인할 것임.
 - SURO-1의 subcellular localization 확인 : SURO-1의 항체를 제작하여 항체 염색을 통해 SURO-1의 실질적인 분포를 확인할 것임. 다른 방법으로 SURO-1::GFP를 동물 세포 배양을 통해 간접적으로 확인할 것임.
 - Mutant SURO-1 단백질의 확인 : 야생형과 suro-1 mutant들을 단백질을 추출하여 western blotting을 수행하여, suro-1 mutant들에서 단백질의 발현량과 크기 등을 비교할 것임.
- (3) SURO-4를 비롯한 다양한 collagen들이 세포증식에 미치는 영향에 대해 분석
- jgIs6와 suro-4;jgIs6에서 EGFR receptor의 발현량을 let-23 항체로 western blotting을 이용하여 비교할 것임.
 - jgIs6와 suro-4;jgIs6에서 EGFR의 localization의 변화가 있는지 let-23 항체를 이용한 whole-mount staining으로 확인할 것임.
 - let-23(sa62) gain-of-function mutant에 suro-4 RNAi를 해서 HIN phenotype의 변화를 확인할 것임.
 - let-60, lin-15ts에 suro-4 RNAi를 하여 HIN phenotype의 변화를 확인할 것임.
 - rol-6, suro-4 등의 collagen mutant와 vulval development에 관여하는 다양한 mutant들을 교배하여 이들 간의 유전학적 상호관계를 분석할 것임.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	비고
SCI 논문 편수	7/6	117	과제종료 1년내 100% 이상 예정
IF 합	16.4/24	68.3	
기타 성과			

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- 인간의 activated EGFR mutation을 발현하는 C. elegans Muv model을 제작하고, 이 모델을 이용하여 억제제 개발이 가능하다는 것을 drug screen을 통해 증명함.

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성 명

심재갈, 김태훈, 김소희, 유범호

주민등록번호

*****-*****, *****-*****, *****-*****,
*****-*****

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Development of <i>C. elegans</i> model for the mutated EGFR induced cell proliferative mechanism and EGFR inhibitor screen
Key Words	<i>C. elegans</i> , Mutant EGFR, Cell proliferation, Inhibitor screen
Project Leader	Jaegal Shim
Associated Company	
<p>Epidermal growth factor receptor (EGFR) is well established target for cancer treatment and EGFR tyrosine kinase (TK) inhibitors such as gefitinib and erlotinib have been developed as anti-cancer drugs. Although non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with activating EGFR mutant L858R responded well to gefitinib and erlotinib, tumors with double mutated EGFR T709M-L858R developed acquired resistance to those drugs. The <i>C.elegans</i> EGFR homolog LET-23 and its downstream signaling pathway have been studied extensively to provide insight into regulatory mechanisms conserved from worms to humans. To develop an <i>in vivo</i> screening system for potential cancer drugs targeting specific EGFR mutants we expressed three LET-23 chimeras where its tyrosine kinase (TK) domain was replaced with either human wild-type TK domain (LET-23::hEGFR-TK), TK domain with L858R mutation:LET-23::hEGFR-TK[L858R] (<i>gIs6</i>), or TK domain with T790M-L858R mutations:LET-23::hEGFR-TK[T790M-L858R] (<i>gIs25</i>) in <i>C.elegans</i> vulval cells. The wild-type EGFR-TK chimeric receptors rescued <i>let-23</i> mutant phenotypes and the activating mutant TK chimeras induced a multivulva (Muv) phenotype in a wild-type background. The anticancer drugs gefitinib and erlotinib can suppress the Muv phenotype in <i>gIs6</i> expressing transgenic animals, but not in <i>gIs25</i> transgenic animals.</p> <p>We screened inhibitors suppressing the Muv phenotype of <i>gIs6</i> using 400 natural compounds extracted from plants. We treated 50ug/ml concentration of plant extracts to the synchronized L1 larvae using 96 well plates. As a result, 12 plant extracts inhibited the Muv phenotype of <i>gIs6</i> more than 20%. Among 12 plants, <i>Eurycoma longifolia</i> is known to induce apoptosis of the breast cancer cell line and have cytotoxicity for the lung cancer cell line. We further tested 12 plant extracts using two breast and one prostate cancer cell lines, and 8 plant extracts inhibited cell proliferation. Therefore, <i>gIs6</i> is proven to be acceptable for screening anti-cancer agent.</p>	

Next, we also screened using 7,680 chemical library, of which target and mechanism are not known. Finally, 7 chemicals inhibited the Muv phenotype of jgIs6 well, and they have the same basic structures. We continue to test using 244 derivatives of these 7 chemicals, and found that 15 chemicals are more effective than gefitinib. However, no chemicals suppressed the Muv phenotype of the EGFR-TKI resistant model jgIs25.

We tried to screen using 1,280 small chemicals of which target and mechanism are known. AG1478 (an EGFR-TK inhibitor) and U0126 (a MEK inhibitor) were identified as potential inhibitors for EGFR-mediated biological function. Both chemicals inhibited the Muv phenotype of jgIs6, but only U0126 could inhibit the Muv phenotype of jgIs25. In conclusion, transgenic *C.elegans* expressing chimeric LET-23::EGFR-TK proteins provide a model system that can be utilized in mutation-specific screens for new anticancer drugs.

We also tried to apply jgIs6 which is developed for screening the anticancer drug to reveal the interaction and relationship between the cell proliferation from the activated EGFR and extracellular matrix(ECM) molecules. We planed to screen mutants which are involved in the components or organization of the cuticle, then tested the change of hyperplasia in that mutants by mating with jgIs6. For this purpose, we screened suppressors of transgenic worms expressing dominant ROL-6 collagen proteins. We named these Rol suppressor mutants as suro mutant. Most mutants enhance the Muv phenotype of jgIs6, but only one mutant inhibited the Muv phenotype of jgIs6. We first cloned the suro-4 mutant, and found a mutation in the sqt-1 gene. SQT-1 is a famous collagen protein, and it is closely related to ROL-6. We further tested the suro-4 mutant by mating with jgIs25 and jgIs26 which express EGFR-TKI resistant LET-23::EGFR[T790M L858R]. The suro-4 mutation also increased the Muv phenotype of jgIs25 and jgIs26. In particular, suro-4 increased the Muv phenotype of jgIs26 dramatically.

The suro-1 mutant inhibited the Muv phenotype of jgIs6 and exhibited a different ROL-6::GFP localization pattern compared to other Dpy mutants. We identified mutations in R11A5.7, which encodes a zinc-carboxypeptidase homologue. The expression pattern in the hypodermis and genetic interaction with other collagen modifying enzyme mutants imply that the regulatory role of this novel carboxypeptidase for collagen processing and cuticle organization. This result helps further understanding of the cuticle formation during larval development and the relationship between epithelial cell proliferation and ECM.

In summary, we made in vivo screening model targeting the EGFR pathway using *C. elegans* vulval development pathway and the activating mutant form of human EGFR. We characterized and evaluated this model by the molecular genetic analysis and pilot screens with 400 natural compounds and approximately 9,000 small chemicals. In addition, we tried to elucidate the relationship of the epithelial cell proliferation from the activated EGFR signal and ECM using this model. As a result, we found a novel zinc-carboxypeptidase A homolog and reported the function of this CPA.

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표 : 인간의 돌연변이형 EGFR의 발현에 의한 꼬마선충(*C. elegans*) 과형성(Hyperplasia) 모델을 제작하고, 이 모델을 통해 세포 증식의 신호전달을 조절하는 유전자를 발굴하고, 변이형 EGFR 신호전달계의 저해제 탐색 가능성 검증.

(2) 연차별 목표 및 내용

구분	목표	내용 및 범위	연구비
1차년도 (2008)	변이형 hEGFR 형질전환 꼬마선충 제작/검증	1. 변이형 hEGFR 발현 꼬마선충 제작 2. 형질전환 개체의 hEGFR활성을 비교 3. 기존의 EGFR 저해제에 의한 반응 분석	110,000
2차년도 (2009)	변이형 hEGFR 신호전달에 의한 세포증식에 관련된 새로운 유전자 탐색	1. Iressa와 EGFR 억제제를 이용한 hEGFR 에 의한 hyperplasia 모델 분석 2. Natural compound를 이용한 EGFR 경 로의 저해제 스크린 3. EGFR 신호전달의 negative regulator로 예상되는 rs48 돌연변이의 원인 유전자 기 능 분석	110,000
3차년도 (2010)	화합물의 효능 평가를 통해 적합한 Hit을 선정하고, SURO-1과 SURO-4의 세포증식에 대한 조절 규명	1. 7개 화합물의 유도체 244종과 1280종에 대한 구매 화합물 스크린 결과를 종합하여 세포배양실험에서 효능을 평가 2. SURO-1이 실제 작용하는 표적을 찾고 그 표적의 세포 증식에 대한 영향 분석 3. SURO-4를 비롯한 다양한 collagen들이 세포증식에 미치는 영향에 대해 분석	110,000

2. 연구의 내용 및 결과

<EGFR경로 저해제 탐색을 위한 선충 모델 제작과 특성 연구>

(1) EGFR의 다양한 돌연변이 형을 발현하는 형질전환 꼬마선충 제작
Epidermal growth factor receptor (EGFR) 는 유방암, 자궁암, 비소세포폐암(non-small-cell lung cancer, NSCLC) 등의 여러 암에서 과발현되어 있거나 과활성화된 돌연변이를 가짐[1]. EGFR는 발암(tumorigenesis), 침윤(invasion), 전이(metastasis), 그리고 신생혈관형성(angiogenesis) 등의

암 발생과 성장의 다양한 단계에 관여함 . 이러한 특성으로 인해 EGFR은 항암제 개발의 유력한 표적이 되고 있음[2]. Gefitinib (Commercial name: Iressa)는 첫 번째 EGFR-TK inhibitor drug 으로 개발되어 NSCLC와 같은 epithelial cancer를 치료하는데 사용되고 있음[3]. EGFR tyrosine kinase (TK) domain의 mutation은 일부 폐암에서 gefitinib에 대한 반응성과 밀접한 연관을 가지며, anti-apoptotic pathways를 활성화한다는 보고가 있음[4, 5].

NSCLC에서 활성화된 EGFR의 변이는 주로 exon 19에서의 결실과 exon 21에서 L858R과 같은 point mutation이 90% 이상을 차지함[6, 7]. 이러한 EGFR의 과활성 변이를 가진 NSCLC는 gefitinib과 erlotinib(상품명:Tarceva)와 같은 EGFR-TK inhibitor(EGFR-TKI)에 대해 아주 잘 반응하여 억제됨[6, 8]. 하지만 암세포는 EGFR-TKI에 대한 내성을 원천적으로 가지거나 획득함으로써 EGFR-TKI에 대한 치료 효과가 없어짐. EGFR-TKI의 내성 원인으로 IGF의 과발현, cMet 과 KRas의 변이, EGFR의 또 다른 변이등에 의함. 그 중에서 EGFR의 새로운 변이에 의한 EGFR-TKI에 대한 내성이 잘 연구되어 있음. 한 예로 EGFR[L858R] 은 gefitinib에 민감하나, EGFR[T790M L858R]의 이중 변이 형은 내성을 보임[8]. 따라서 한가지 항암제에 의한 치료 효과는 한계가 있으며, 개인별 맞춤 치료를 위해서도 각각의 변이에 잘 반응하는 항암제 개발이 필요함.

C. elegans vulval development는 EGFR signaling pathway가 작동하는 아주 잘 연구되고 확립된 모델임[9-11]. 6개의 vulval precursor cells (VPCs) 중에서 P5.p, P6.p와 P7.p 가 각기 2^o-1^o-2^o cell fates로 결정되어 분열을 지속하고 완전한 생식기를 형성함. 1^o cell fate는 P6.p 세포에서 EGFR-Ras-MAPK 신호 전달에 의해 결정되고, 2^o cell fate는 P5.p와 P7.p 세포에서 LIN-12/Notch 신호 전달 경로에 의해 결정됨. EGFR, RAS, RAF, MEK와 MAPK를 포함한 대부분의 EGFR 경로의 구성 요소들은 아주 잘 보존되어 있음[10].

NSCLC에서 EGFR의 변이에 따른 EGFR-TKI 반응성과 선충의 vulval development pathway를 이용하면, EGFR 경로를 표적으로 하는 효율적인 새로운 항암제 스크린 시스템 개발이 가능할 것임. 따라서 본 연구의 시작은 기존의 EGFR-TKI의 내성을 극복할 수 있는 EGFR 경로에 특이적인 신규 항암 물질의 발굴을 위한 in vivo screening model을 개발하는 것을 목적으로 인간의 EGFR을 선충에서 발현시키는 것을 계획함. 선충에서 *let-23* mutant들은 대부분 larval lethal인데 *let-23(sy1)*의 경우 C-terminal 일부 아미노산의 결실로 인해 vulvaless(Vul) phenotype을 보임 [12].

Human EGFR (hEGFR)을 선충에 발현하기 위해, 우선적으로 hEGFR의 cDNA를 폐암 세포 주에서 RT-PCR을 통해 확보하였음. 다음으로 선충에 가장 효율적이고 EGFR 경로 특이적으로 발현시키기 위해, 꼬마선충의 EGFR ortholog인 *let-23* 유전자의 promoter를 genomic DNA에서 PCR을 통해 5kb 정도 길이를 확보함. 선충의 LET-23과 hEGFR은 TK 도메인은 40% 이상의 유사성을 보이거나(그림 1A), 다른 부위는 대체로 20% 이하의 유사성을 보이므로, hEGFR의 extracellular domain대신에 LET-23의 extracellular domain을 swapping한 construct를 제작하였음. 우선 LET-23::hEGFR-C construct는 LET-23의 C-terminal PDZ interactin motif인 6개 아미노산을 추가하여 선충의 VPC에서 baso-lateral localization에 문제가 없도록 제작하였음. 그리고 각종 hEGFR의 돌연변이 형은 보다 TK 도메인에 특이적으로 hEGFR-TK만을 선충의 LET-23의 TK 도메인을 대체하여 제작하였음(그림 1B, 그림 2A).

LET-23::hEGFR-C(wild-type hEGFR의 C-terminal 도메인 전체가 포함)이 선충에서 정상적인 기

능을 수행할 수 있는지를 알아 보기 위해, 선충의 EGFR *lf* mutant인 *let-23(sy1)*의 vulvaless phenotype을 rescue하는 실험을 수행하였음. 그림 2B에서처럼 LET-23::hEGFR-C을 발현하는

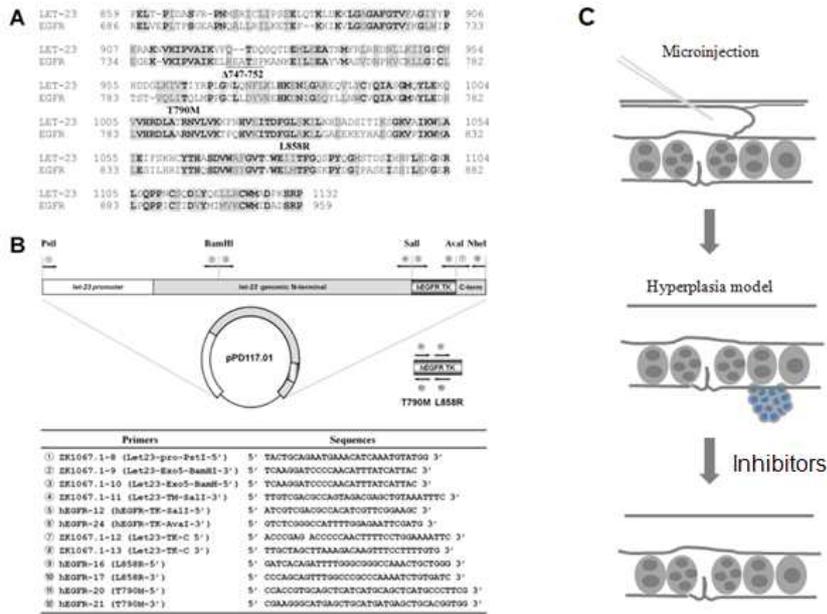


그림 1. Human EGFR과 *C. elegans* LET-23의 fusion gene 발현을 통한 Hyperplasia model의 확립과 EGFR경로를 표적으로 하는 저해제 탐색을 위한 형질전환 선충 제작. (A) 인간의 EGFR과 선충의 EGFR ortholog인 LET-23의 tyrosine kinase domain 아미노산 비교. (B) LET-23::hEGFR 발현 플라스미드 제작 방법 및 사용된 프라이머들. (C) DNA 미세주입을 통한 형질전환 개체 제작과 예상되는 multivulva phenotype과 이를 억제하는 저해제의 관계 모델

let-23(sy1) mutant는 정상적으로 vulva가 형성됨을 확인하였음. 또한 null mutant인 *let-23(sy15)*의 lethality를 rescue하는 것을 확인하였음. 따라서 LET-23과 hEGFR의 chimeric receptor가 선충의 유충 발생과 생식기 발생 모두에 정상적으로 기능하여, 내재적인 LET-23의 변이에 의한 기능 상실을 대체할 수 있다는 것을 확인하였음.

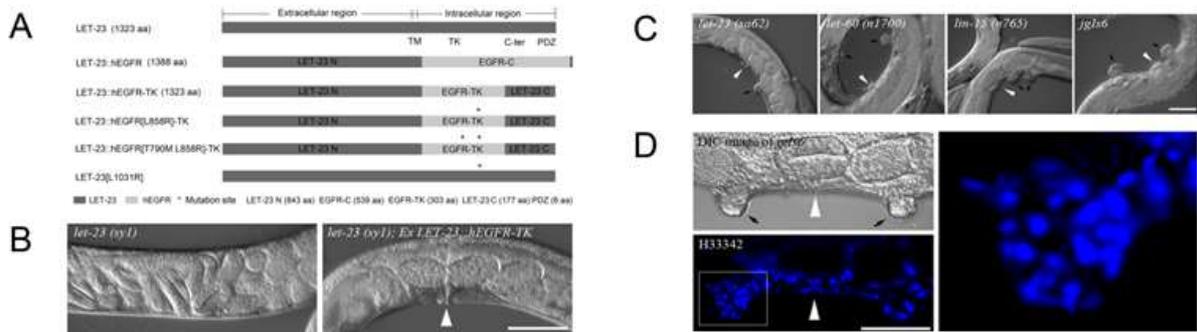


그림 2. 선충에서 LET-23::hEGFR fusion gene의 정상적인 기능 확인 및 *jgl66* strain에서의 Hyperplasia 형성. (A) 실험에 사용된 여러 종류의 LET-23::hEGFR fusion construct들. (B) LET-23::hEGFR 발현에 의한 *let-23(sy1)* vulvaless mutant의 rescue 실험. (C) 기존의 *C. elegans* Muv mutant와 *jgl66*의 비교. (D) Hyperplasia가 형성된 부위에서 세포 수가 증가된 것을 확인. Hoechst33342로 핵을 염색한 것임.

다음으로 과활성화된 hEGFR-TK 도메인을 포함하는 LET-23::hEGFR-TK[L858]을 발현하는 형질 전환 개체에서 multivulva(Muv) phenotype을 관찰하였음. 기존의 선충에 존재하는 Muv mutant들과 비교해 보면, 기존의 Muv mutant들 보다 pseudovulva의 형성이 더 뚜렷하다는 것을

알 수 있었음(그림 2C). LET-23::hEGFR-TK[L858R]을 발현하는 형질 전환 개체에서 Muv이 세포의 증식으로 인한 것인지를 확인하기 위해, Hoechst33342로 세포 핵을 염색해 보았음. 그 결과 몇몇 pseudovulva region에서 세포의 수가 20개 이상 관찰되는 것을 확인하였음(그림 2D). 정상적인 vulva 발생에서 3개의 VPC에서 최종적으로 22개의 세포로 구성된 vulva를 만드는데 비해, 하나의 pseudovulva에서 20개 이상의 세포가 만들어졌다는 것은 세포 증식이 과도하게 일어났다는 증거임. 실제로 어느 정도까지 세포 수가 늘어 나는지는 정확히 알 수 없으나, pseudovulva가 커지면 결국 그 부위가 터져서 일찍 죽게 되고, 고배율 현미경에서 관찰이 불가능함. 과도한 EGFR 신호에 의한 과도한 세포 증식 현상은 초기 발암 과정에서 과형성(hyperplasia) 현상과 유사하다고 판단됨.

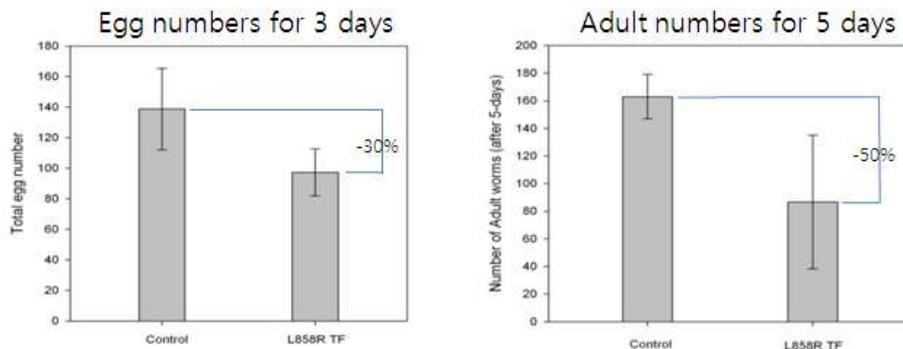


그림 3. hEGFR[L858R] integration line의 특성 분석. 변이형 hEGFR[L858R]을 발현하는 꼬마선충은 정상 개체에 비해 약 30% 정도의 알을 적게 낳으며, 알에서 깨어나 성체가 되는 수가 50% 정도 감소함. 과도한 EGFR 신호 전달이 개체 수준에서는 정상적인 개체 발생과 성장에 역기능을 함을 알 수 있음.

LET-23::hEGFR-TK[L858R]을 발현하는 형질 전환 개체는 야생형 선충에 비해 느리게 자라고, 알을 적게 낳으며, 유충 발생단계에서도 많은 수가 사망하는 것으로 나타남(그림 3). 이러한 phenotype은 다른 연구자 그룹에서 LIN-3/EGF를 과발현 시킨 개체에서 나타나는 특징과 유사하며[13], 이것으로 보아 과도한 EGFR의 신호 전달은 정상적인 개체 성장을 저해한다는 것을 알 수 있음.

(2) 돌연변이형 hEGFR의 활성을 비교 분석

그림 2A에서처럼 여러 종류의 LET-23::hEGFR의 chimeric construct를 제작하였고, 각각의 플라스미드를 선충에 미세주입하여 형질전환 개체를 제작하였음. 각 형질전환 개체의 Muv 형성 여부

Name	Hyperinduction	let-23(sy1) rescue	Insertion line
LET-23::hEGFR	No	Yes	
LET-23::hEGFR[L858R]	Yes	Yes	<i>jgIs6</i>
LET-23::hEGFR[T790M]	No	N/D	
LET-23::hEGFR[Δ ⁷⁴⁷⁻⁷⁵²]	Yes	N/D	
LET-23::hEGFR[T790ML858R]	Yes	N/D	<i>jgIs25, jgIs26, jgIs27</i>
LET-23[L1031R]	Yes	N/D	

표 1. 다양한 LET-23::hEGFR fusion gene의 Hyperplasia 형성 결과. 후속 실험을 위해 두 종류의 형질전환 개체는 UV 조사에 의한 integration line으로 제작함. *jg* (lab initial), *Is* (insertion line).

를 비교해 보면, 표1과 같이 정상적 EGFR을 포함하는 것과 EGFR[T790M]을 포함하는 것은 Muv

형성을 하지 않음. 반면에, 활성화된 EGFR 변이형은 모두 Muv을 잘 형성하였음. 이후 실험을 위해 LET-23 ::hEGFR[L858R]과 LET-23 ::hEGFR[T790M L858R]을 발현하는 두 종류의 형질전환 개체는 UV 조사에 의해 integration line을 제작하였음.

LET-23 ::hEGFR[L858R]의 형질전환 개체에서는 약 50% 정도의 Muv 비율을 보였는데, 이것의 integration line(*cgIs6*라 명명)은 90% 이상의 비율로 Muv 비율이 증가하였음. LET-23 ::hEGFR[T790M L858R]의 경우에는 3종의 Is line (*cgIs25, 26, 27*)이 만들어졌는데, 마찬가지로 integration 후에 Muv 비율이 증가함.

(3) *cgIs6*에서 vulval cell fate 변화

C. elegans vulval development는 6개의 VPC가 크게 3종류의 cell fate를 갖는 것으로 구분되며, 각 발생 단계별로 특이적으로 발현하는 유전자들이 보고 되었음(그림 4A). 이러한 cell fate marker를 이용하여 *cgIs6*에서 생식기 발생 및 hyperplasia 부위에서의 cell fate 변화를 관찰하였음. *cgIs6*에서 Muv 형성이 과도한 EGFR 신호에 의한 것이라면, 정상적으로 3° fate를 가지는 세포가 hyperplasia에서는 1° 또는 2° 로 바뀔 가능성이 있음. 정상적인 3° fate 세포들은 더 이상 분열을 하지 않고, hypodermis의 Hyp7 세포와 fusion을 하게 되는 반면, 1° 또는 2° 는 여러번 세포 분열을 더 하는 특성이 있음.

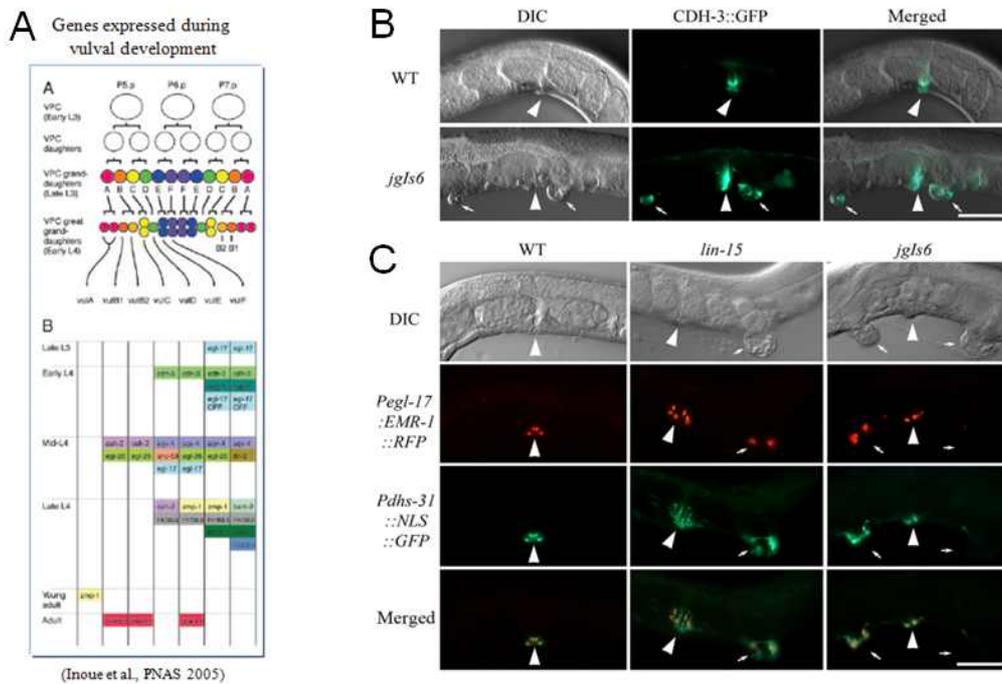


그림 4. Vulval cell fate marker를 통한 *cgIs6*의 Hyperplasia 부위의 분석. (A) 정상적인 선종의 생식기 발생에서 각 세포의 계보에 따른 특이적 발현 유전자의 도표. (B) 생식기 발생의 제1 운명 세포 표지자인 cadherin-3의 발현을 *cgIs6*에서 관찰함. (C) 생식기 발생의 제2 운명 세포 표지자인 *egl-17*과 *dhs-31*의 발현을 *cgIs6*와 가장 강력한 Muv mutant인 *lin-15*에서 관찰함. EMR-1 (emerin homolog ; 핵막에서 발현됨), NLS (nuclear localization signal of SV40 ; 핵 안에서 발현됨).

hEGFR[L858R]에 의해 과다 증식된 세포의 정확한 특성을 알기 위해, 정상적인 꼬마선충 생식기 발생에서 발현되는 유전자들의 promoter들을 이용한 cell specific reporter가 필요함. 세포의 특성은 EGFR 신호 뿐만 아니라, WNT와 Notch 신호들이 관여하여 결정되는 것이므로 과형성된 세포의 fate가 1°, 2°, 3° cell fate 중에서 어느 것이냐에 따라 많은 정보를 얻을 수 있음. 이러한 cell fate specific marker

들은 세포핵 또는 세포질에 발현시켜 증식된 세포의 수를 세는데도 유용하고, 세포의 형태를 구분하는데 유용할 것임.

그림 4B는 이미 존재하는 1° cell marker인 cadherin-3의 GFP reporter를 marker를 *jpgIs6*에서 발현시켜 보았음. 그 결과 야생형 선충에서는 vulva의 중앙 부위에서만 GFP가 나타나는데, *jpgIs6*에서는 vulva와 hyperplasia가 형성된 부위에서도 강하게 발현되는 GFP를 확인할 수 있음.

우리는 또한 2° cell marker의 발현을 *jpgIs6*에서 확인하고자 하였음. 이를 위하여 *dhs-31*과 *egl-17*을 선정하였음. *dhs-31* 유전자는 성체의 2° fate cell 중에서 Vul C를 제외한 Vul B1, B2, D에서 발현한다고 알려져 있는데, *dhs-31*의 프로모터를 이용하여 NLS-GFP를 발현시킨 개체에서 정확하게 핵에서 녹색형광이 잘 관찰되는 것을 확인할 수 있었음. *egl-17* 유전자는 L3 유충에서 1°, 2° fate에서만 발현되고, L4 이후에는 2° fate에서만 발현된다고 알려짐, EMR-1은 선충의 emerlin 상동체로 핵막에서 발현되므로 *egl-17* 프로모터를 이용하여 EMR-1::RFP를 발현시킨 결과 성체의 2° fate 세포의 핵막에서만 잘 발현된다는 것을 관찰함. *lin-15*는 선충의 Muv mutant 중에서 가장 센 phenotype을 보이므로, *lin-15*와 *jpgIs6*에서 2° cell marker의 발현을 주로 비교 관찰하였음. 야생형 선충과 달리 *lin-15*와 *jpgIs6* 모두에서 2° cell marker의 발현도 vulva 세포 외에 hyperplasia가 일어난 부위에서도 관찰이 되었음(그림 4C). Ras의 dominant mutant인 *let-60*에서도 cell fate marker의 발현은 *jpgIs6*와 동일 하였음. 따라서 *jpgIs6*에서도 다른 Muv mutant와 마찬가지로 과활성화된 EGFR 신호 전달이 세포의 운명을 바꾸어 과도한 세포 증식을 유도한 것으로 판명됨.

(4) *jpgIs6*에서 junction protein의 발현

Epithelial cell proliferation이 일어날 때, junction protein들이 많이 만들어지는데, 꼬마선충의 생식기 발생에서도 잘 알려져 있음. Epithelial cell은 특징적으로 세포와 세포 사이에 junction이 형성되어 있고, polarity를 가짐. 꼬마선충의 epithelial junction은 apical junction이라고 불리는데, 이것은 상대적 위치와 구성에 따라 CCC(catenin-cadherin complex)와 DAC(*dlg-1-ajm-1* complex)로 구분됨.

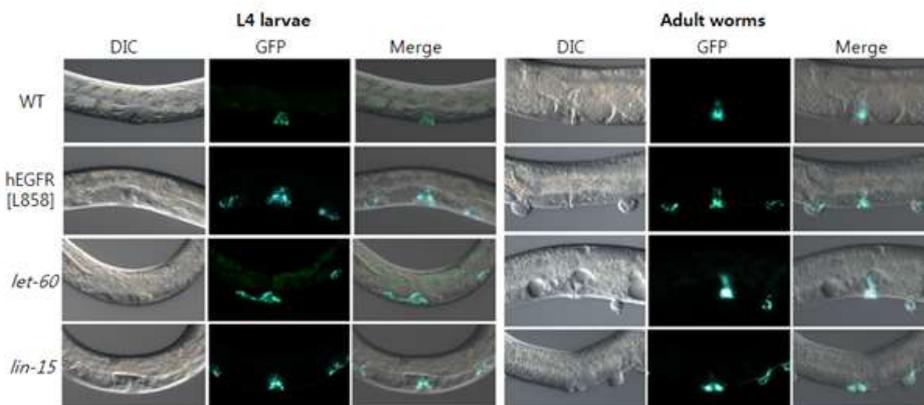


그림 5. Epithelial junction marker인 AJM-1::GFP의 발현을 여러 Muv mutant와 *jpgIs6*에서 비교 관찰. L4 stage와 adult stage 모두에서 *jpgIs6*와 *let-60*, *lin-15*는 유사한 발현을 보임. AJM-1은 DAG complex에 속하는 단백질임.

*jpgIs6*의 과형성 부위에서도 junction protein들이 잘 발현되는지 알기 위해, 꼬마선충의 대표적인 apical junction marker인 AJM-1의 발현을 AJM-1::GFP를 통해 다른 Muv mutant들과 비교해 보았음.

그림 5는 *lin-15*와 *let-60*(RAS의 gain-of-function) mutants와 *jpgIs6*에서 AJM-1::GFP의 발현이 정상적인 생식기 발생 부위와 과형성 부위에서 강하게 일어나는 것을 보여주고 있음. 과형성이 일어나는 부위에서 AJM-1::GFP는 L4 유충에서는 몸 안쪽으로 함입이 일어난 부위에서 나타나며, 성체에서는 주로 과형성이 일어난 세포 덩어리와 몸체의 경계에서 발현됨.

다음으로 또 다른 junction marker인 alpha-catenin의 발현을 *jpgIs6*에서 확인해 보았음. HMP-1은 선충의 alpha-catenin homolog이며, HMP-1::GFP는 야생형 L4 유충과 성체에서 vulval cell과 seam cell에서 발현됨. 이에 비해 *jpgIs6*에서는 vulval 뿐만 아니라, hyperplasia 부위에서도 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있음(그림 6).

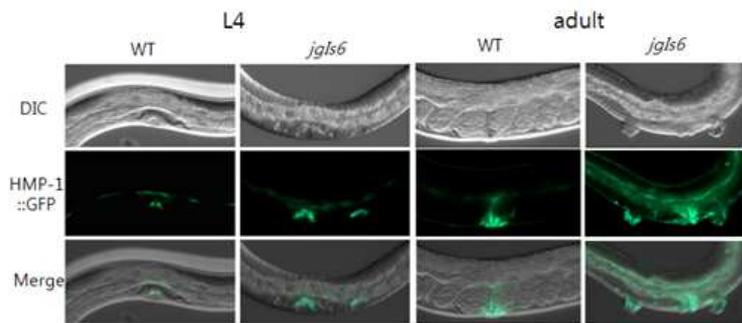


그림 6. *jpgIs6* strain에서의 epithelial junction marker인 HMP-1::GFP의 발현 관찰. HMP-1은 CCC complex에 속하는 α -catenin임.

AJM-1::GFP와 HMP-1::GFP의 *jpgIs6*에서의 발현 결과로 보아, 다른 Muv mutant와 마찬가지로 *jpgIs6*의 hyperplasia 부위에서 epithelial cell의 증식이 활발하다는 것이 확인되었음.

(5) hEGFR[L858R]에 의해 유도된 과형성은 EGFR의 경로의 활성화에 의한 것임.

*jpgIs6*에서 Muv phenotype이 우리가 도입한 hEGFR-TK[L858R] chimera에 의한 EGFR 경로의 활성화에 의한 것인지 검증하기 위해, EGFR 신호 전달 경로에 존재하는 여러 유전자들의 RNAi 실험을 수행하였음.

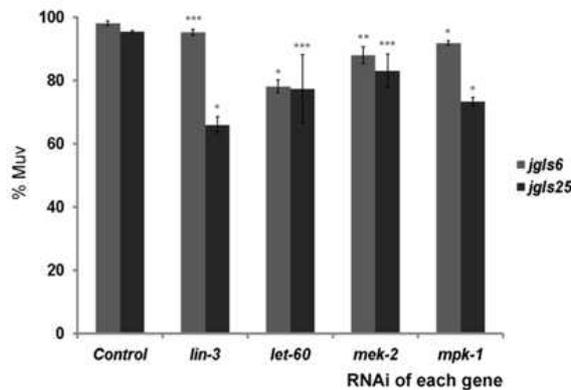


그림 7. *jpgIs6* 과 *jpgIs25* 에서 Hyperplasia가 EGFR 경로의 과다 활성화에 의한 것인지 알기 위한 EGFR 경로의 유전자의 RNAi에 의한 발현 억제 실험. 두 스트레인 모두에서 EGFR 경로에 존재하는 유전자들의 RNAi결과 Muv phenotype이 줄어드는 것을 확인됨. *jpgIs6* (LET-23::hEGFR-TK[L858R]), *jpgIs25* (LET-23::hEGFR-TK[T790M L858R]).

그림 7에서 *lin-3*는 선충의 EGF, *let-60*는 Ras, *mek-2*는 MEK, *mpk-1*은 MAPK의 homolog임. *lgIs6*와 *lgIs25*를 이러한 유전자의 RNAi에 의한 발현 억제에 의해 일정 부분 Muv phenotype이 감소함을 알 수 있음. LET-23/EGFR 하위에 존재하는 *let-60*, *mek-2*, *mpk-1*에 존재하는 유전자들의 RNAi phenotype은 심할 경우 lethality를 보이므로, vulval phenotype을 보기 위해서는 성체까지 성장한 개체만을 파악해야 하기 때문에, 비교적 약하게 RNAi가 작동한 개체만을 관찰하게 되는 이유로 Muv phenotype의 감소가 적은 것 같음.

이상의 결과들에서 LET-23 ::hEGFR[L858R]를 발현하는 *lgIs6*에서 일어나는 hyperplasia는 EGFR 신호 경로의 과도한 활성화에 의한 것임을 확신할 수 있음.

(6) EGFR-TKI에 의한 *lgIs6*와 *lgIs25* 모델 비교 분석

우리의 목표는 실질적으로 새로운 EGFR 경로에 대한 특이적 항암제 개발을 위한 스크린 모델을 개발하는 것이기 때문에, 앞서 확인한 *lgIs6*와 *lgIs25* 모델에 대한 기존의 EGFR-TKI에 의한 반응성을 비교 분석할 필요가 있음. NSCLC의 EGFR-TKI에 대한 반응성은 EGFR의 활성화된 변이에 민감하고, 또 다른 gate keeper mutation인 T790M에 의해 내성이 생김. 따라서 우리는 이미 상용화된 EGFR-TKI 항암제인 gefitinib와 erlotinib를 이용하여, LET-23 ::hEGFR[L858R]를 발현하는 *lgIs6*과 LET-23 ::hEGFR [T790M L858R]를 발현하는 *lgIs25*의 Muv phenotype에 대한 효과를 확인하였음.

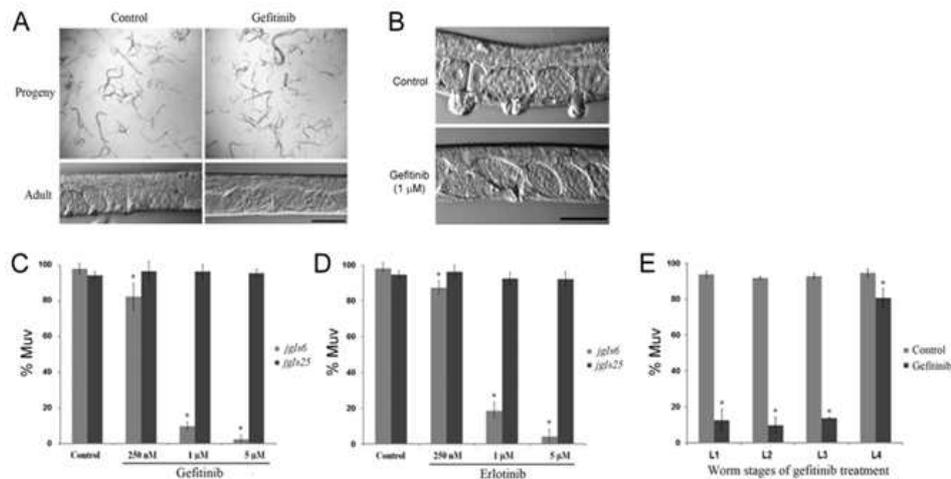


그림 8. EGFR-TKI에 의한 *lgIs6* strain의 Hyperplasia 형성 억제. (A) gefitinib은 야생형 선충의 배발생과 생식기 발생 등에는 영향을 주지 않음(40uM 농도 처리). (B) gefitinib에 의한 *lgIs6*의 Muv phenotype이 억제된 모습. (C) 농도에 따른 gefitinib에 의한 *lgIs6*의 Muv phenotype의 억제와 *lgIs25*의 gefitinib resistance. (D) 농도에 따른 erlotinib에 의한 *lgIs6*의 Muv phenotype의 억제와 *lgIs25*의 erlotinib resistance. (E) 유충 단계에 따른 gefitinib의 *lgIs6*의 Muv phenotype의 억제 효과.

가장 먼저 EGFR-TKI의 야생형 선충에 대한 독성을 보기 위해, 40uM 농도의 gefitinib을 L4 유충에 처리하여 보았음. 그 결과 대조군과 마찬가지로 자손들이 알에서 잘 깨어나 잘 성장하고, 성체에서 생식기 발생도 정상적임을 알 수 있음(그림 8A). 따라서, gefitinib이 선충의 다른 essential pathway를 저해하지 않고, 특히 LET-23에 대해 별로 저해하지 않는다는 것을 확인함. 선충의 EGFR인 LET-23은 hEGFR과 유사성이 떨어져서 이러한 결과를 낼 수도 있고, gefitinib이 활성화된 EGFR 변이형에만 높은 반응성

을 보인다는 이유가 더 클 것임.

다음으로 gefitinib를 jgIs6에 처리한 결과, 1uM 농도에서도 Muv phenotype을 잘 억제하는 것을 확인 하였음(그림 8B). gefitinib는 농도에 따라 jgIs6의 Muv phenotype을 잘 억제하는 반면에, jgIs25의 Muv phenotype은 전혀 억제하지 못하는 현상을 보임(그림 8C). 이러한 결과는 인간의 NSCLC에서의 EGFR mutation과 gefitinib의 반응성과 동일함. 또 다른 EGFR-TKI인 erlotinib도 gefitinib과 동일한 결과를 나타냄(그림 8D). 이러한 결과로 보아, LET-23 ::hEGFR[L858R]를 발현하는 jgIs6과 LET-23 ::hEGFR [T790M L858R]를 발현하는 jgIs25 모델이 인간의 비소세포폐암이 EGFR-TKI 반응성을 잘 반영하는 모델이라는 것을 확인할 수 있었음.

선충에서 vulval development는 유충의 발생 단계와 밀접한 연관을 가짐. 생식기 발생은 LIN-3/EGF 신호가 L3 molt 단계에서 anchor cell (AC)에서 나오게 되면, 그 이후 VPC의 cell fate가 결정됨. 따라서 jgIs6 모델에서 gefitinib에 의한 Muv 형성 저해가 유충 발생 단계와 관련성이 있는지 확인하고, 특히 실질적인 스크린에 들어갈 때, 어느 유충 단계에 화합물을 처리해야 하는지를 알기 위해, 각 유충 단계 별로 gefitinib을 처리하여 Muv phenotype의 억제 정도를 보았음. jgIs6의 자손들을 L1에서 L4 단계까지 synchronize한 다음, gefitinib을 처리하고, 성체에서 Muv을 관찰하였음. 그 결과, L1에서 L3까지는 gefitinib이 효과적으로 작동하여 Muv을 잘 억제하는 반면에, L4에서는 억제 정도가 현저히 감소함(그림 8E). 따라서, jgIs6의 Muv phenotype은 정상적인 생식기 발생과 밀접한 연관이 있고, 화합물 스크린을 위해서는 L1에서 L3 단계의 유충을 이용하면 된다는 것을 확인함.

<야생형 선충과 과활성화된 hEGFR 발현 선충를 이용한 항암제 탐색>

(1) 꼬마선충의 항암제 탐색 시스템으로서의 가능성 및 유용성 연구

Doxorubicin과 Farnesyl transferase inhibitor 등의 처리에 의해 꼬마선충의 정상적인 발생과 성장이 억제

된다는 보고가 있었음[14]. 본 실험실에서도 5-FU와 같은 pyrimidine antagonist의 처리 결과로 꼬마선충의 성장을 억제함을 알 수 있었음[15]. 따라서 꼬마선충의 성장을 억제하는 물질을 탐색하는 것이 새로운 항암제 발굴에 유용한지를 알아보기 위해 EGFR 신호 전달과 같은 특정 경로를 표적으로 하는 것과 별도로 연구를 진행하였음.

그림 9는 생명공학연구원의 자생식물사업단에서 가져온 400개의 식물 추출물을 이용하여 야생형 선충의 성장을 저해하는 물질을 스크린한 과정을 설명함. 선충 배양 배지에서 알들이 많을 때, 버퍼로 성체와 유충을 씻어 내고, 남은 알들을 12시간 이상 두면 대부분 L1 유충으로 동일하게 됨(그림 9A). 이 유충들을 M9 buffer로 모아서 식물 추출물이 담겨있는 96 well plate에 분주함(그림 9B). 이후 3-4일 배양하면, 실제 현미경으로 선충의 성장이 저해된 것을 관찰할 수 있음(그림 9C).

표 2는 선충에서 찾은 식물 추출물 13종을 MDA-MB-231, MCF-7 유방암 세포주와 PC-3 전립선암 세포주에 처리하여 8개의 공통적인 효과를 보이는 후보 물질을 찾은 결과임. 현재까지 공동 연구자인 박대훈 박사(안정성 평가 연구소)가 그 중에서 *Stephania delavayi* Diels.의 추출물이

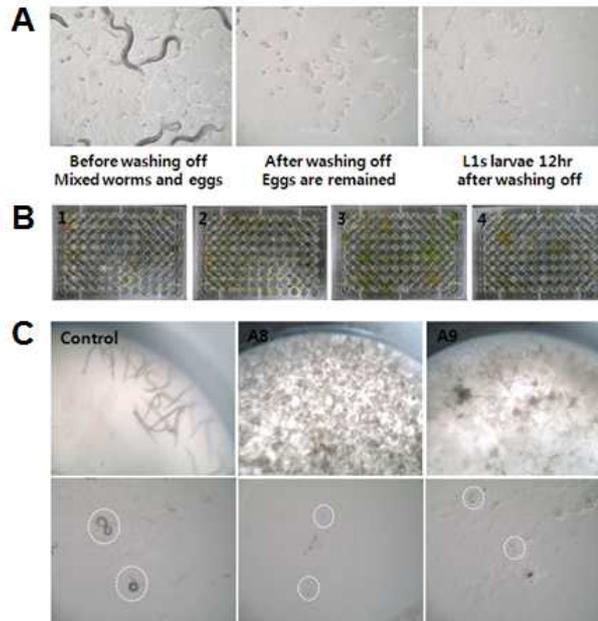


그림 9. 야생형 선충의 성장을 억제하는 천연물질 스크린. (A) 선충 배양 배지에서 선충의 발생 단계를 동일하게 맞추는 방법. (B) 96 well plate에 식물 추출물과 L1 단계 선충을 분주한 모습. (C) A8과 A9에 들어있는 식물추출물이 선충의 성장을 억제하는 현미경 사진.

NFkB와 COX-2를 저해하여 암 세포 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도하는 등의 기작을 분석하고 있음. *S. delavayi* Diels.는 꼬마선충에서는 유충의 성장을 느리게 하는 효과를 보임.

No	학명	Serial N.	MDA-MB-231	MCF-7	PC-3	일치
1	<i>Ardisia japonica</i>	PBCN10408	-	+	-	+
2	<i>Cynanchum atratum</i>	PBCN10422	-	+	+	++
3	<i>Polygonum paleaceum</i>	PBCN10469	N/D	+	+	++
4	<i>Tetragium hypoglaucum</i>	PBCN10492	N/D	+	-	+
5	<i>Santhoxylum dimorphyllum var-sp. inifolium</i>	PBCN10499	N/D	+	-	+
6	<i>Milletia ichtyochtona</i>	PBVN10174	-	+	N/D	+
7	<i>Swietenia macrophylla</i>	PBVN10192	-	+	N/D	+
8	<i>Uvaria microcarpa</i>	PBVN10126	-	+	N/D	+
9	<i>Anacardium occidentale</i>	PBUS10102	-	+	N/D	+
10	<i>Bombax glabra</i>	PBUS10078	+	+	N/D	++
11	<i>Ceiba pentandra</i>	PBUS10008	-	+	N/D	+
12	<i>Ficus septica</i>	PBUS10115	+	+	N/D	++
13	<i>Sanguinaria canadensis</i>	PBUS10092	+	+	N/D	++

표 2. 선충의 성장을 억제하는 천연물질의 여러 암 세포주에서의 효과

꼬마선충의 유충 성장 억제 물질의 스크린을 위해서는 우선적으로 동일한 발생 단계의 많은 수의 꼬마선충을 얻어야 함. 일반적으로 이를 위해서는 Gravid adult를 모아서 Bleaching solution을 처리하여, 성체의 자궁 속에 있는 알들을 모으는 것임. 이 경우에는 bleaching solution에 의해 알들이 어느 정도 영향을 받으므로 건강하다고 보장할 수 없음. 이를 대체하기 위해서 꼬마선충 배양 플레이트에서 M9 buffer로 성체와 유충들을 씻어 내는 방법을 사용하였음. 성체와 유충은 계속해서 움직이기 때문에 buffer를 주면 쉽게 떠 오르게 되는 반면에, 알들은 Agar 또는 E. coli lawn에 붙어 있어 비교적 덜 떨어지게 됨. 완전히 알들만 남긴 플레이트를 8시간 정도 두면, 모두 알

에서 깨어나 L1 유충이 되고, 이러한 L1유충에 다시 M9 buffer를 넣어 다채널 피펫으로 96 well plate에 100ul 정도로 분주하여 30-50 개체가 한 well에 들어가게 조절함. 400개 이상의 식물 추출물을 동시에 진행 시키는데도 무리가 없었음(그림 9A).

(2) 꼬마선충의 항암제 탐색 시스템으로서의 가능성 및 유용성 연구

기존의 EGFR 저해제에 비해 향상된 EGFR 경로 저해제의 탐색 가능성을 확인하기 위해, 식물 추출물과 jgIs6 모델을 이용한 스크린을 실시하였음. 생명공학연구원의 자생식물 사업단에서 분양 받은 400종의 식물 추출물을 이용하여 다양한 농도에서 스크린을 하였음.

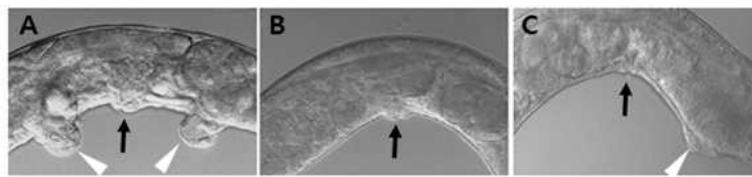


그림 10. FBM017-037에 의한 *jgIs6*의 Muv phenotype 억제 효과. 400종의 식물 추출물을 50ug/ml 농도로 처리한 결과 모두 12 종이 hyperplasia를 잘 억제하는 것으로 나타남. 그 중 FBM017-037 (*Eurycoma longifolia*)가 가장 잘 억제하는 것으로 나타남. (A) Control, (B-C) FBM017-037처리에 의한 hyperplasia 억제

그림 10은 식물 추출물 중 FBM017-037에 의한 jgIs6의 Muv 억제 효과를 보이는 것임. FBM017-037은 *Eurycoma longifolia*로 확인되었고, 억제 효과는 50ug/ml 농도에서 45%에 이를 정도로 뛰어남.

표 3은 400종의 식물 추출물과 jgIs6 과형성 모델을 이용한 스크린 결과, Muv phenotype의 저해 정도가 20% 이상인 12개의 후보 식물 추출물에 대한 내용을 정리한 것임.

분양번호	학명	결과	주요연구분야 또는 민속의학정보
PBCN10445	<i>Lespedeza cuneata</i>	38%	Diabetes, chronic bronchitis, acute gastritis, diarrhea
PBCN10459	<i>Mucuna birdwoodiana</i>	26%	anti-inflammatory effect, treat for the stagnant blood
FBM017-037	<i>Eurycoma longifolia</i>	45%	testosterone-enhancing properties, induce apoptosis in breast-cancer cells and cytotoxic to lung-cancer cells.
FBM017-081	<i>Sloanea hemsleyana</i>	34%	Root treat dysentery.
FBM024-046	<i>Ficus septica</i>	21%	Decoction as diuretic; poultice for headache and anti-rheumatic
FBM024-070	<i>Nauclea califolia</i>	27%	for the treatment of malaria.
FBM024-074	<i>Euphorbia hirta</i>	27%	anti-asthma herbs, bronchitic asthma and laryngeal spasm
FBM028-028	<i>Cnestis ferruginea</i>	27%	Cough Anaemia
FBM028-030	<i>Cyathea cooperi</i>	34%	Treatment of eye diseases, skin disease, wound, venereal diseases. Anthelmintic
FBM028-057	<i>Microsorium scolopendrium</i>	24%	Ulcers, skin sores, builds strength after an illness, purgative, seizures, headaches, wounds, bruises
FBM028-072	<i>Pycnanthus angolensis</i>	21%	Anaemia, chest pains, thrush, threatened abortion, scabies, headache
FBM028-091	<i>Tapinanthus globiferus</i>	20%	Dysmenorrhoea, menorrhagia

표 3. *jgIs6*의 Muv phenotype을 억제하는 천연물질 스크린 결과

12종의 식물들 가운데, *Eurycoma longifolia*와 같이 어느 정도 항암 효과가 알려져 있는 것이 존재하는 것으로 보아 jgIs6 모델의 가능성을 충분히 보여준 결과라 할 수 있음.

다음으로 꼬마선충의 다른 Muv mutant들에 이 식물 추출물들이 영향을 주는지, 그리고 EGFR 경로의 어느 단계에서 작용하는지 알아 보기 위해, *lin-15ts*와 *let-60d* Muv mutant들에 처리해 보았음.

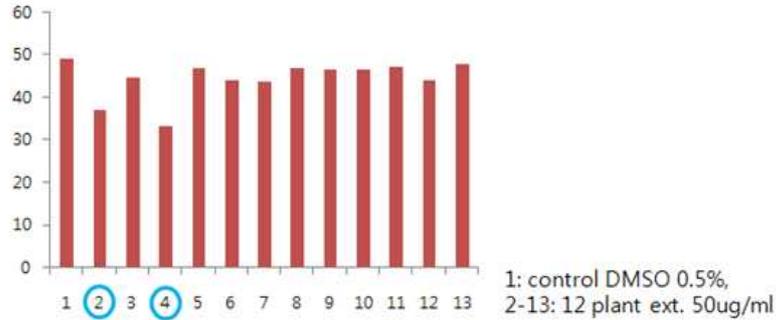


그림 11. *jgIs6*의 Muv phenotype을 억제하는 천연물질의 *let-60* Muv phenotype 억제 효과. LET-60는 선충의 RAS 상동체임. 이 결과 2,4 번 물질은 *let-60* 또는 그 downstream에서 작용하는 것을 알 수 있음.

그 결과 *lin-15*에 대해서는 12종 모두 아무런 저해 효과를 보이지 않았으며, 위 그림과 같이 *let-60*에서 두 종의 물질이 Muv phenotype을 저해하는 것을 확인할 수 있음. 이 두 물질은 *jgIs6*에서도 다른 물질들에 비해 저해 정도가 높았는데, EGFR 경로에서 *let-60/Ras*나 그 이하 단계에 작용하거나, 식물 추출물은 여러 물질들을 함유하고 있기 때문에 다른 경로를 일부 저해할 가능성도 배제할 수 없음. 최종적으로 이들 12 종의 식물 추출물을 EGFR을 과발현하는 A431 세포에 처리해 본 결과, 3종의 식물 추출물이 유효한 수준에서 세포 증식을 억제하는 것을 확인하였음.

이로써, *jgIs6*를 이용한 항암물질 스크린이 가능하다는 것을 확인하였고, 스크린의 방법과 과정을 최적화 시킬 수 있었음. 천연물의 경우 새로운 물질을 찾을 가능성은 높지만, 여러 화합물이 섞여 있어 분리를 해야 하는 과정이 필요하고, 많은 양을 확보하기가 어려운 점이 있음.

(3) 7,680종의 화합물 스크린의 결과

새로운 EGFR 경로의 저해제를 찾기 위해, 화학연구원의 화합물 은행에서 대표화합물 7680종의 화합물을 이용하여 스크린을 하였음. 이 화합물 라이브러리는 화합물의 표적이나 작용 경로 등이 알려져 있지 않음.

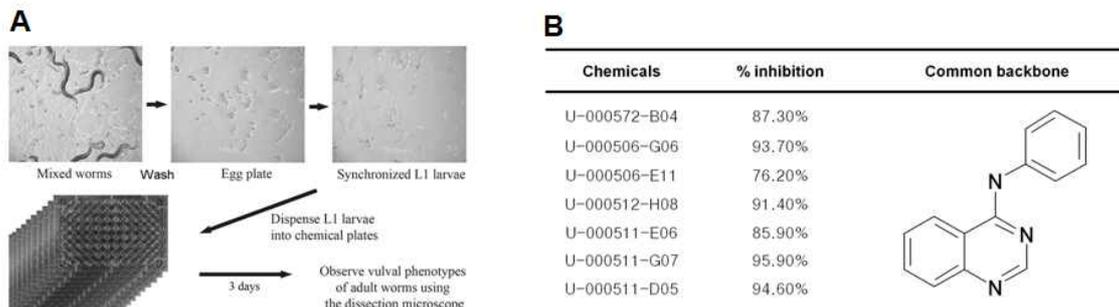


그림 12. 7,680개의 화합물 은행의 대표 화합물 라이브러리를 이용한 *jgIs6*의 Muv phenotype 억제 물질 스크린. (A) 전체 스크린 진행 방법. (B) 2uM의 농도에서 스크린 한 결과 최종 7개의 물질을 얻음. 이들은 모두 quinazoline 계열로 구조가 유사함.

화합물 스크린 과정은 식물 추출물을 이용한 스크린 과정과 유사하나, 수적으로 20배 정도로 스케일이 큼(그림 12A). 모든 화합물을 5uM의 농도로 스크린을 한 결과, 7개의 화합물이 jgIs6의 Muv phenotype을 아주 잘 억제하는 것으로 나타났음(그림 12B). 이들 화합물들은 3개의 링을 가진 Quinazoline 계열로 gefitinib, erlotinib와 기본 구조는 동일함. jgIs6의 Muv을 저해되는 정도는 대부분 90% 이상으로 높지만, gefitinib는 5uM에서 거의 100% inhibition하므로 이들 화합물은 효과가 낮다고 판단됨.

다음 단계로 화합물 은행에서 이용 가능한 7개 화합물의 유사 화합물 244개를 분양 받아 각기 2uM 농도로 jgIs6에 처리해 보았음.

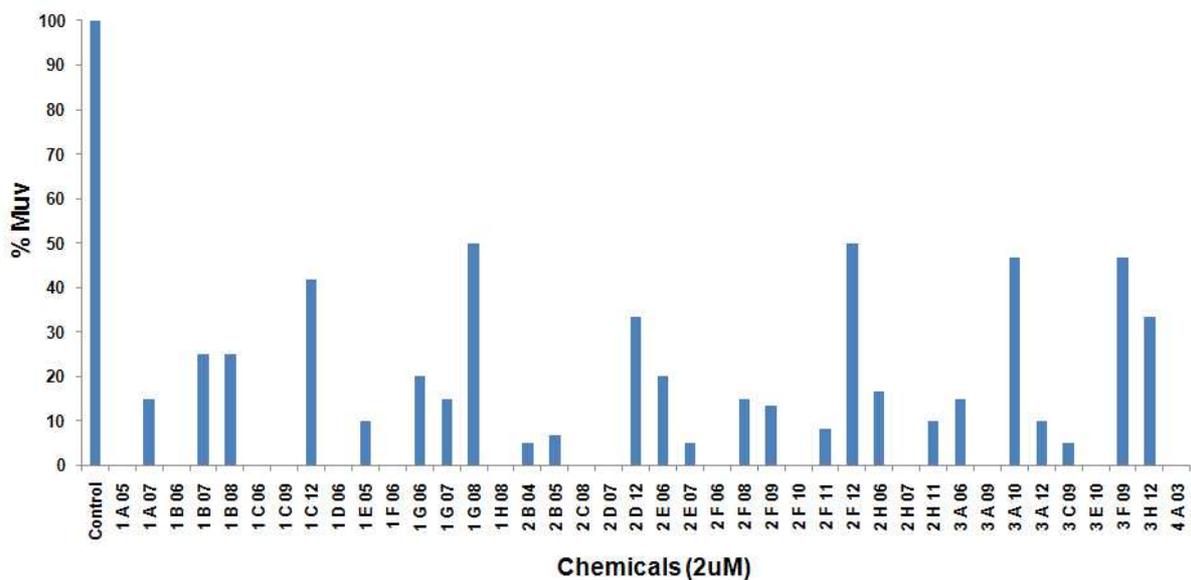


그림 13. 화합물 은행에서 가용한 244개의 quinazoline 계열 화합물들의 효과 비교. 15개 물질은 gefitinib와 비교할 때, 유사하거나 더 나은 억제 효과를 보임.

그림 13은 244개 화합물 중에서 jgIs6의 Muv을 50% 이상 저해하는 물질 40종의 효과를 비교한 것임. 처리 농도가 2uM이므로, 100% 저해하는 15개의 물질은 gefitinib의 효능과 동등하거나 그 이상임을 알 수 있음.

이 화합물들이 gefitinib 내성 EGFR 변이형에 대한 효과를 알아 보기 위해, 40종의 화합물들을 5uM 농도로 jgIs25에 처리하였음. 그 결과 모두 jgIs25의 Muv phenotype은 억제하지 못하는 것으로 나타남. 따라서 quinazoline 계열의 화합물이 가지는 한계를 증명하는 실험에 그치고 말았음.

(4) 1,280종의 작용 기전이 알려진 화합물 스크린의 결과

작용 경로를 모르는 7,680 화합물 라이브러리의 스크린 결과는 jgIs6 모델이 대단위 화합물 스크린이 가능하다는 부분적인 목표만 달성하였음. 새로운 물질이 나오지 않는 이유는 화합물 라이브러리가 좋지 않은 이유도 있을 수 있겠지만, 스크린 조건이 최적화되지 않았을 가능성이 더 크다고 생각됨. 따라서, 작용 기전을 모르는 화합물 라이브러리 보다는 작용 기전이 알려진 라이브러

리를 가지고 스크린하여 조건을 잡는 것이 유리하다고 판단되었음. 발암원 연구과 김선신 박사가 시그마에서 구입한 1,280개 화합물 라이브러리를 주셔서, 이것을 가지고 jgIs6에 5uM 농도로 스크린을 하였음. 그 결과, 두 가지 화합물이 jgIs6의 Muv phenotype을 잘 억제하는 것으로 나타남. 하나는 AG1478로 quinazoline 구조를 가지고, 이미 in vitro 실험에서 널리 사용되는 EGFR-TKI 임. 또 다른 하나는 U0126으로 MEK inhibitor(MEKI)로 알려져 있음. 그 구조는 그림 14A에 있음.

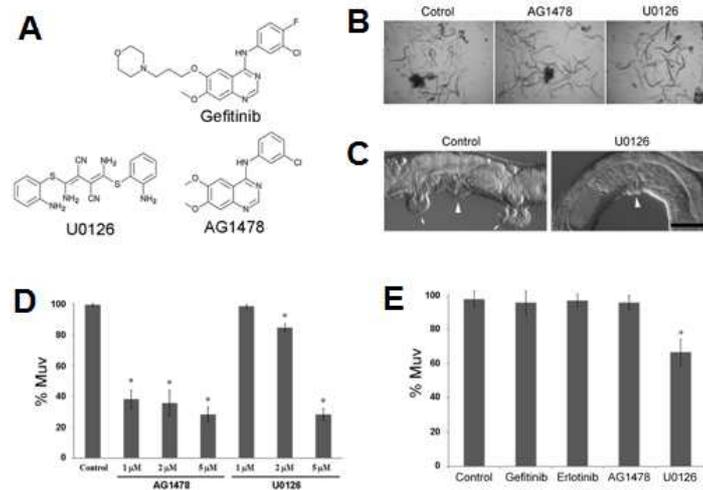


그림 14. 1,280개의 작용 경로가 알려진 화합물 라이브러리를 이용한 스크린 결과. (A) gefitinib, AG1478, U0126의 화합물 구조. (B) AG1478, U0126의 야생형 선종의 발생에 대한 영향이 없음 (40uM 처리). (C) U0126은 *jgIs25*의 Muv phenotype도 잘 억제함. (D) AG1478, U0126의 용량에 따른 *jgIs6*의 Muv phenotype 억제효과. (E) 여러 화합물에 의한 *jgIs25*의 Muv phenotype 억제 효과 실험 결과. 유일하게 U0126이 억제를 함(5uM 농도로 처리).

AG1478과 U0126을 40uM의 고농도로 야생형에 처리하면, gefitinib의 경우와 마찬가지로 선종의 발생을 방해하지 않음(그림 14B). AG1478은 다른 quinazoline 계열의 화합물과 비슷한 특성을 가질 것이므로 관심이 기울지 않았으며, U0126은 EGFR의 하위 단계인 MEK에 작용하니, EGFR-TKI 내성 모델에도 작용할 가능성이 있을 것으로 판단되었음. 실제로 U0126을 jgIs25에 처리하면 Muv을 잘 억제한다는 것을 알 수 있음(그림 14C). AG1478과 U0126 모두 용량에 의존적으로 jgIs6의 Muv을 잘 억제함. AG1478의 경우 낮은 농도에서도 잘 억제하나, U0126은 5uM 정도에서 잘 억제되는 것을 확인할 수 있음(그림 14D). 여러 EGFR-TKI와 U0126을 5uM 농도로 jgIs25에 처리했을 때, 예상대로 U0126만 jgIs25의 Muv을 억제하는 것을 확인할 수 있음(그림 14E). U0126의 5uM 농도도 충분히 jgIs25의 Muv을 억제하지는 못하므로 더 높은 농도가 필요할 것으로 생각됨. 1,280개의 라이브러리에는 기존에 알려진 EGFR inhibitor와 MEKI 들이 여러 개가 포함되어 있음에도 불구하고, AG1478과 U0126만이 스크린에서 나왔다는 것은 이 두 물질이 과활성화된 EGFR에 의한 Muv phenotype을 억제할 수 있다고 생각됨. 농도를 아주 높이면 다른 물질들도 나올 가능성이 있지만, U0126의 경우에만 한정지어 생각하면, U0126은 EGFR의 과활성에 의한 MEK의 활성을 억제하는데 특이성을 가질 가능성이 있음. 여기까지 결과로 보아 기존의 EGFR-TKI에 내성을 보이는 암세포를 억제하기 위해서는 특정 MEKI가 효과적일 수 있다는 결론을 유도할 수 있음.

MEKI의 EGFR-TKI 내성 모델에 대한 효과를 분석하기 위해, U0126과 새로이 개발되고 있는 또 다른 MEKI인 PD0325901, BRAF의 mutant form의 억제제인 AZD6244, 그리고 gate keeper

mutant EGFR[T790M]에 대한 억제제인 WZ4002를 *jpgIs6*와 *jpgIs25*에 처리하는 실험을 수행하였음. *jpgIs6*에 각 화합물을 1uM과 5uM로 처리했을 때, 유일하게 U0126이 Muv phenotype을 잘 억제하는 것으로 나타남(그림 15A). PD0325901은 5uM 농도에서 아주 조금 억제하는 것처럼 보이므로 더 높은 농도에서 처리하는 실험이 필요 했음. 다음으로 *jpgIs25*에 각 화합물을 5uM과 20uM 농도로 처리하였음. 그 결과 MEKI인 U0126과 PD0325901이 Muv phenotype을 억제하는 것을 확인됨(그림 15B). WZ4002는 20uM 농도일 때, 아주 미약하게 억제하는 것으로 보아 더 높은 농도로 처리하는 실험이 필요하다고 판단됨.

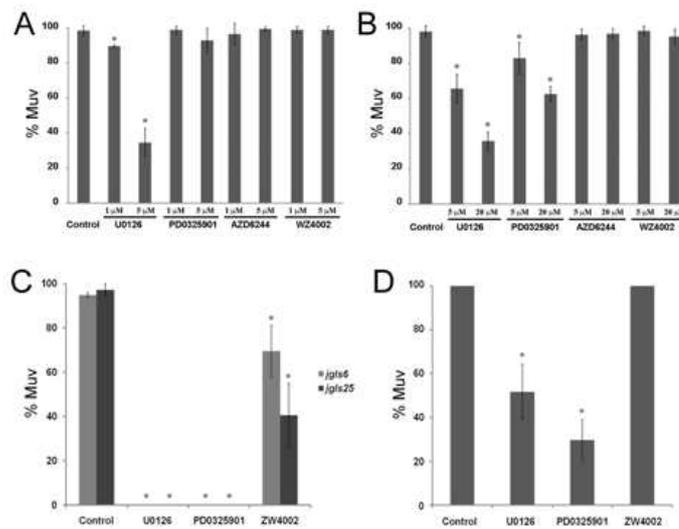


그림 15. EGFR 경로의 다른 단백질을 표적으로 하는 여러 항암 물질의 효과 비교. (A) U0126과 또 다른 MEKI인 PD0325901, mutant RAF의 저해제인 AZD6244와 EGFR[T790M]의 새로운 억제제인 WZ4002의 *jpgIs6*의 Muv phenotype 억제효과. (B) U0126, PD0325901, AZD6244와 WZ4002의 *jpgIs25*의 Muv phenotype 억제효과. (C) 100uM 농도의 화합물 처리에 의한 *jpgIs6*와 *jpgIs25*의 Muv phenotype 억제효과. AG1478, U0126의 용량에 따른 *jpgIs6*의 Muv phenotype 억제효과. (D) MEKI 예외한 *lin-5*의 Muv phenotype 억제 효과(100uM 농도).

따라서, 100uM이라는 과도한 농도로 U0126, PD0325901, WZ4002를 *jpgIs6*와 *jpgIs25*에 처리해 보았음. 그 결과 두 MEKI는 확실하게 100% 두 모델의 Muv을 억제하고, WZ4002는 어느 정도 억제하는 것으로 확인됨(그림 15C). 이러한 결과로 보아, 새로이 EGFR-TKI 내성을 극복하기 위해 새로이 개발된 EGFR[T790M] inhibitor인 WZ4002에 비해 MEKI가 훨씬 효과적이라는 것을 알 수 있음.

U0126과 같은 MEKI가 *jpgIs6*와 *jpgIs25* 모델의 Muv을 억제하는 것은 LET-23/EGFR의 하위에 존재하는 *C. elegans* MEK를 억제할 가능성이 높음. 선충의 MEK homolog로 *mek-1*과 *mek-2*가 존재함. 이중에서 vulval development와 연관된 것은 *mek-2*임. 따라서 U0126과 PD0325901이 *mek-2*를 억제하는 것을 알아보기 위해, 선충의 Muv mutant 가운데, EGFR 신호 전달 경로가 가장 활성화되어 있는 *lin-15*에 100uM 농도로 처리해 보았음. 그 결과 U0126과 PD0325901은 모두 효과적으로 *lin-15*의 Muv 형성을 잘 억제하는 것으로 나타남(그림 15D). 실제로 *jpgIs6*와 *jpgIs25* 모델에서 Muv는 *lin-15* 보다 더 잘 나오므로, U0126의 저해 효과는 EGFR 경로의 활성 정도에 비례하는 결과로 나타남. 따라서 선충 모델에서 U0126의 실험 결과를 종합해서 고려하면, U0126이 정상적인 상태의 MEK 활성은 잘 억제하지 못하지만, 과도한 EGFR 신호에 의한 MEK 활성을 잘 억제하므로, 적어도 EGFR의 활성화된 변이형을 발현하는 NSCLC에 응용 가능성이 높다는 것을 알 수 있음.

*jpgIs6*과 *jpgIs25* 모델은 앞서도 설명했듯이, 아주 느리게 자라는 phenotype을 보임. 이 모델에서 성장이 저해되는 원인은 chimeric EGFR이 vulval cell 이외의 세포에서 발현되어 나타나는 현상일 것임. 따라서 *jpgIs6*와 *jpgIs25*의 Muv 형성 저해 물질이 느린 성장 현상을 suppression해서 정상적인 성장 속도를 회복하는지가 의문임. 이것을 확인하기 위해, *jpgIs6*와 *jpgIs25*에 몇 종의 화합물을 처리해 보았음. 확실함 효과를 보기 위해 50uM의 고농도로 처리한 후, 4일 후 새 배지에 회복을 시켜서 크기를 관찰하였음. 야생형 선충의 경우에는 어떤 약물 처리에 상관없이 고른 성장 속도를 보였으나, *jpgIs6*의 경우에는 Muv을 저해하는 gefitinib, AG1478, U0126, PD0325901 모두에서 성장 속도가 회복되는 것을 확인하였음. *jpgIs25*의 경우에는 Muv을 억제하는 U0126과 PD0325901에서만 성장 속도가 회복되었고, gefitinib와 AG1478의 경우에는 대조군과 동일하게 느린 성장 속도를 suppression하지 못했음(그림 16).

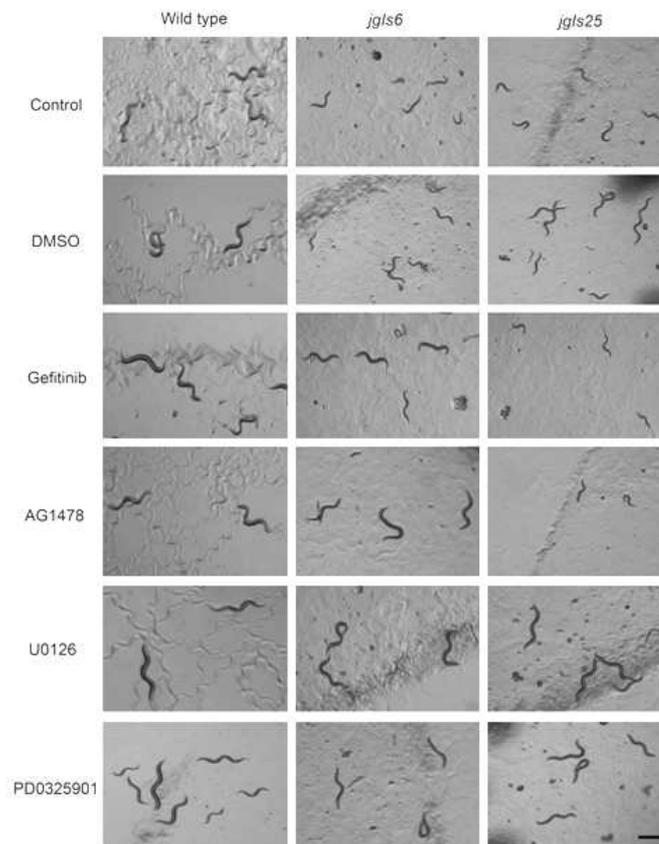


그림 16. EGFR 경로 저해물질에 의한 *jpgIs6*과 *jpgIs25*의 느린 성장 속도 suppression 효과 비교. *jpgIs6*과 *jpgIs25*은 아주 느리게 성장하는데, 이러한 growth phenotype은 각각의 저해제들에 의해 suppression 됨.

이러한 결과는 각 약제들이 EGFR-TKI sensitive *jpgIs6*와 resistant *jpgIs25* 모델에서 나타나는 Muv 억제 효과와 성장 속도에 대한 영향이 동일한 기전으로 일어나고 있다는 것을 의미함. 이제 까지 스크린은 Muv phenotype의 억제 현상에 집중해서 보았는데, 이것은 40-50배 배율에서 관찰이 필요하므로 실질적인 HTS를 하기에는 부적합함. 따라서, 이후의 스크린은 *jpgIs25*의 느린 성장 속도를 suppression하는 물질을 먼저 찾은 후에 Muv phenotype의 억제를 이차적으로 확인하는 스크린 방법을 고안할 것임. 이 방법을 이용하면, 현 상태의 스크린 속도에 비해 최소 10배 이상의 향상을 기대할 수 있을 것이므로, 보다 많은 수의 화합물 라이브러리를 이용하여 보다 짧은 시간 내에 스크린을 수행할 수 있을 것임.

이상의 결과들을 간단히 요약하면, EGFR 신호 전달 경로를 표적으로 하는 선충 모델을 제작하여, 그 EGFR-TKI에 대한 반응성 및 여러 특성이 인간의 NSCLC와 유사함을 알 수 있고, 이 모델을 이용하여 실질적으로 실험실 수준의 화합물 스크린을 여러 방법으로 증명하였음.

끝으로 LET-23::hEGFR-TK[L858R]을 발현하는 *jpgIs6*에서의 신호 전달 특성 및 저해제에 대한 반응성을 그림 17에서 간단히 요약해 보았음.

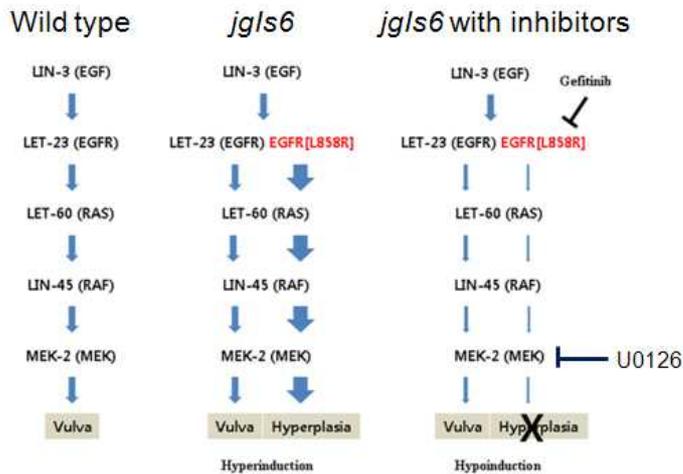


그림 17. *jpgIs6*의 EGFR 신호 전달 경로 모델

야생형 선충에서 vulval development는 LIN-3/LET-23/LET-60/LIN-45/MEK-2/MPK-1 등의 신호 전달에 의해 이루어지며, *jpgIs6* 모델에서는 이 경로에 추가적으로 hEGFR-TK[L858R]에 의한 과도한 신호 전달이 이루어져 hyperplasia 또는 Muv이 형성됨. *jpgIs6*에 의한 hyperplasia는 기존의 EGFR-TKI인 gefitinib 등에 의해 잘 억제되며, 하위 단계에 존재하는 MEK의 저해제인 U0126에 의해서도 잘 억제됨. 특히 EGFR-TKI 내성 모델인 *jpgIs25*의 hyperplasia도 U0126은 잘 억제함으로써 향후 MEK의 새로운 항암제 개발 가능성을 더욱 밝게하고 있음.

<hEGFR에 의한 세포 증식과 Collagen의 조절과의 상호관계 연구 모델로의 응용>

(1) Epithelial cancer와 ECM과의 관계 연구 모델로서의 *jpgIs6*

*C. elegans*의 vulva precursor cell (VPC)는 hypodermis와 같은 origin으로 포유동물의 epithelial cell에 해당함. *jpgIs6*에 의한 hyperplasia model은 *C. elegans*의 Muv mutant와 여러 면에서 유사한 특징을 가짐을 앞서 밝혔음. 따라서 *jpgIs6* model을 이용하여 기존의 방식으로 EGFR의 경로 조절에 관여하는 새로운 유전자를 찾는 것은 가능성이 아주 낮음. Epithelial cancer의 proliferation, invasion, metastasis는 cell to cell interaction이 중요함을 알 수 있음. 특히 초파리에서 cell polarity와 epithelial cell junction의 여러 단백질들이 중요하다고 밝혀져 있음. 우리는 *jpgIs6* 모델에서 hyperplasia가 일어난 부위의 세포 분열이 결국에는 cuticle 층을 뚫고 나와 터져서 꼬마선충이 죽는 것을 보고, 세포의 과다 증식과 세포를 둘러싼 microenvironment인 ECM의 관계의 중요성을 확신하였음. 실제로 *jpgIs6*에서 cuticle collagen인 ROL-6의 GFP 리포터를 이용하여 관찰한 결과, 몸통에서는 정상적으로 ROL-6::GFP 배열이 규칙적으로 나타나지만, 여러 초점에서 hyperplasia region을 관찰한 결과 ROL-6::GFP의 규칙적인 배열을 관

찰하였음(그림 18). 이것은 정상적인 발생 과정에서 조절되지 않는 부분은 정상적인 구조를 형성하지 못해 결국 개체 사망으로 귀결되는 점에서 암환자가 보이는 현상과 유사함.

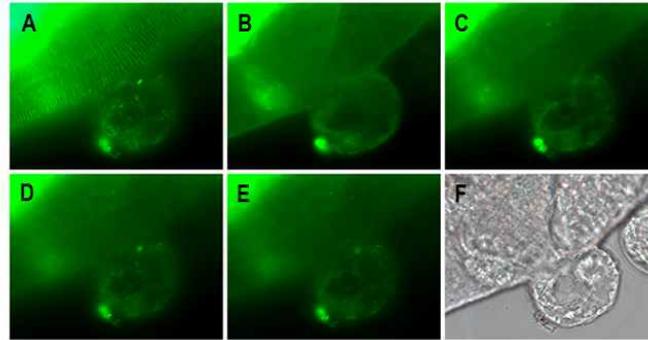


그림 18. *jgIs6*의 hyperplasia 부위 cuticle 구조. (A) 정상적인 몸통 부위에서는 ROL-6::GFP의 규칙적인 배열이 관찰되나 hyperplasia region에서는 규칙적인 배열을 볼 수 없으며, 발현도 낮음. A-E는 각기 다른 초점으로 사진을 찍은 것임. (F) DIC image of A.

세포의 증식이 ECM의 조성이나 구조에 의해 일정 정도 조절될 것이며, 이러한 조절 작용은 세포배양 실험보다 꼬마선충과 같이 개체 모델에서 규명하는 것이 실질적인 방법이 될 것임. 그림 19에서 정상적인 생식기 발생에서 cell to cell 및 cell to matrix 간의 상호 작용이 정확한 생식기 구조 발생을 유도할

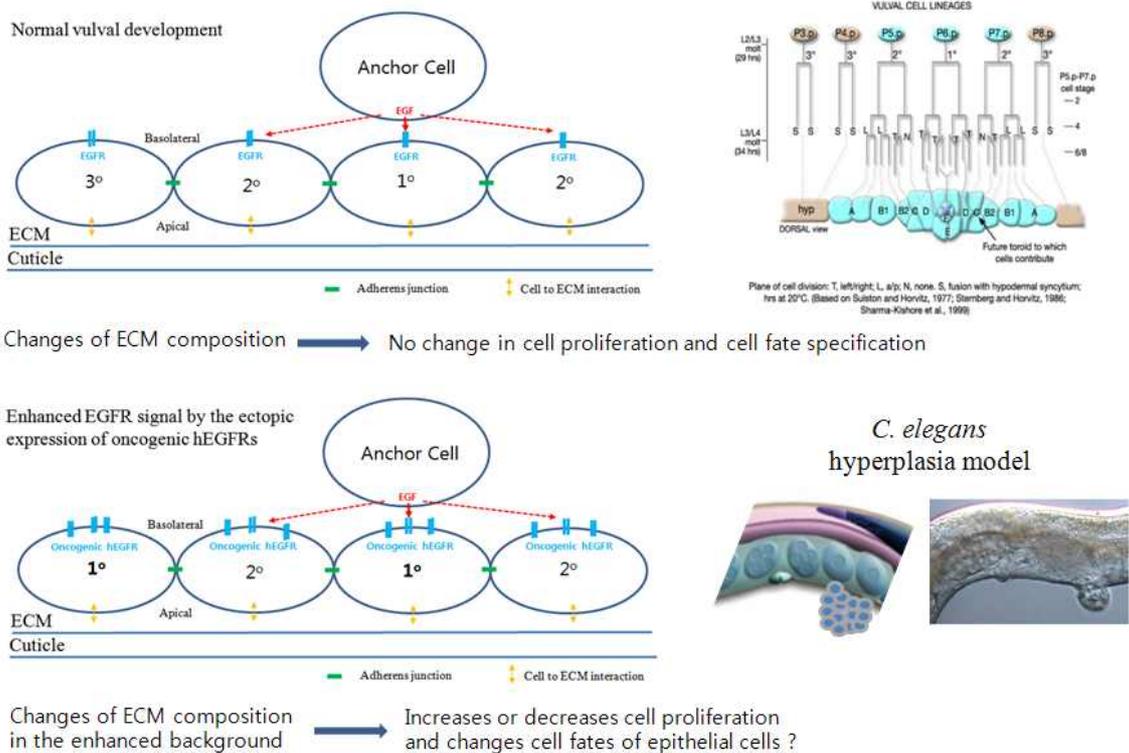


그림 19. 과도한 EGFR 신호 전달에 의한 hyperplasia와 그것을 둘러싼 ECM 구조와의 관련 가설.

것이며, 과도한 EGFR 신호 전달에 의한 세포의 과다 증식 상황에서 cell to cell 또는 cell to matrix의 역할은 더욱 중요할 것임. 따라서 *jgIs6* 과형성 모델에서 ECM의 조성이나 구조에 영향을 주는 유전자가 세포의 증식에 어떠한 영향을 주는지 테스트할 수 있을 것임.

(2) ECM 구조나 조성에 영향을 주는 새로운 유전자 발굴

꼬마선충의 생식기 발생 모델을 이용하여 EGFR 신호에 영향을 주거나 세포 증식을 조절하는 유전자들은 전통적인 유전학적인 방법에 의해 이미 많이 발굴되었음. 생식기 발생에 영향을 주는 유전자들을 찾는 유전학적 방법은 Muv phenotype이 같은 돌연변이 개체라도 다양하게 나타나므로 영향력이 아주 큰 유전자들을 대상으로 가능함. 따라서 epithelial cell의 tumorigenesis가 oncogene에 의해 선행되고, 그 이후 세포 증식을 조절하는 유전자를 찾기 위해서, 특히 그 대상이 ECM의 조성과 구조에 제한하기 위해 간접적인 방법을 고안하였음.

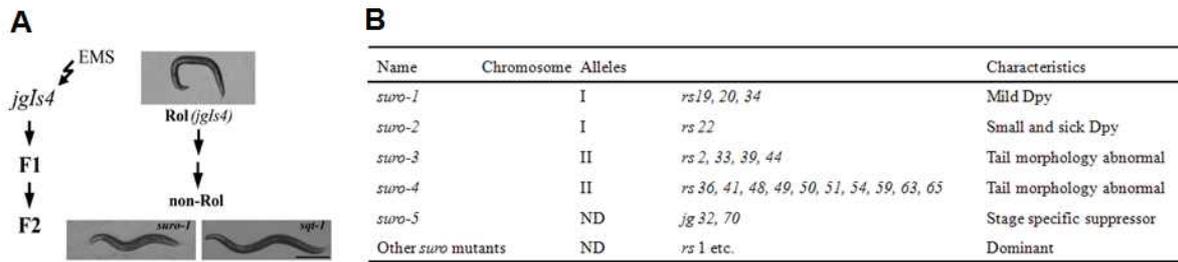


그림 20. 새로운 cuticle 형성 관련 mutant의 스크린. (A) 우성 형질의 ROL-6 mutant 단백질을 발현하는 *jgIs4*는 Rol(rolling) phenotype을 보임. 이 개체를 이용하여 Rol phenotype의 suppressor를 쉽게 찾을 수 있음. (B) *jgIs4*의 Rol suppressor screen 결과. 모두 47종의 mutant를 찾음. 그들 중 대부분은 우성임.

꼬마선충의 hypodermis는 한 층의 세포로 되어 있으며, 바로 꼬마선충을 둘러싼 cuticle 층과 닿아 있음. Hypodermal cell에서 cuticle을 이루는 대부분의 단백질이 합성되어 분비됨. 우선적으로 꼬마선충의 epithelial cell인 hypodermis의 ECM인 cuticle의 조성과 구조에 영향을 주는 유전자를 찾기 위해 Rol suppressor를 찾는 스크린을 실시하였음(그림 20A). ROL-6는 대표적인 cuticle collagen으로 그것의 일부 mutant phenotype이 rolling하며, 20년 전에 suppressor screen을 통해 intragenic suppressor들이 이미 분석되었음[16]. *rol-6* null mutant의 phenotype은 거의 야생형과 동일하므로, *rol-6*의 Rol phenotype은 neomorph라고 생각되어, 스크린 방법을 달리하면, ROL-6의 분비와 ROL-6와 상호작용하는 다른 collagen들을 제어하는 유전자들을 찾을 수 있을 것이라 가정함. ROL-6gf 단백질을 여러 copy로 과발현하는 형질전환 개체를 만들어 mutant screen을 실시하게 되면, intragenic suppressor를 피하고 extragenic suppressor를 찾을 수 있을 것이라 생각함. 5만 F2 screen의 결과 모두 40 종이 넘는 Rol suppressor mutant들을 발굴하였음(그림 20B). Rol suppressor mutant들은 recessive mutant와 dominant mutant가 각기 절반 정도로 나왔고, recessive mutant들의 complementation test 결과, 5종의 group으로 나누어졌음. 우리는 이들 mutant들을 *suro*(suppressor of rol-6) 라고 명명하였고, 임시로 allele name을 *rs*(rol suppressor)로 정했음. *suro-1* mutant는 모두 3개의 mutant를 가지고 1번 염색체에 위치하고 있음. *suro-2*는 단 하나의 mutant만 존재하고, 1번 염색체에 위치함. *suro-3*은 꼬리의 모양이 이상하게 형성되는데, 모두 4개의 mutant로 구성되고, 2번 염색체에 존재함. *suro-4*는 가장 많은 mutant들을 포함하며, 역시 2번 염색체에 존재하는 것을 염색체 맵핑을 통해서 확인하였음. *suro-5*는 두 mutant를 가지며, 특징적으로 유충 단계에서는 Rol을 suppression 못하지만, 성체에서는 suppression 함. 아직 염색체를 확인하지 못했음. 나머지 돌연변이들은 모두 dominant mutant이므로 염색체 맵핑과 complementation test를 수행하지 못하고, 단지 back-cross만 1-2회 실시하였음.

ROL-6gf 단백질 발현 개체(*jgIs4*)는 Rol phenotype을 보여 주고, EMS라는 mutagen을 처리하여 F2에서 rolling하지 않는 돌연변이들의 예를 보여 주고 있음(그림 20A). 이렇게 찾은 *suro* mutant들이 *jgIs6*의 hyperplasia에 영향을 주는지 알아보기 위해, 우선 recessive *suro* mutant들과 *jgIs6*를 교배하였음.

그 결과 *suro-3*과 4 mutation은 *jpgIs6*의 hyperplasia를 증가시키는 것을 알 수 있었으면, *suro-1*은 오히려 감소시키는 것을 확인하였음(그림 21A). *jpgIs6*의 Muv phenotype의 빈도는 94.6%이고, *suro-3;jpgIs6*과 *suro-4;jpgIs6*에서는 각기 99.3%, 97.2%로 증가했음. *suro-1;jpgIs6*에서는 Muv이 88.5%로 감소하였음. 이러한 결과로 cuticle formation에 영향을 주는 유전자들이 EGFR의 과도한 신호 전달에 의한 epithelial cell의 증식에 영향을 준다는 것을 선충에서 확인할 수 있었음.

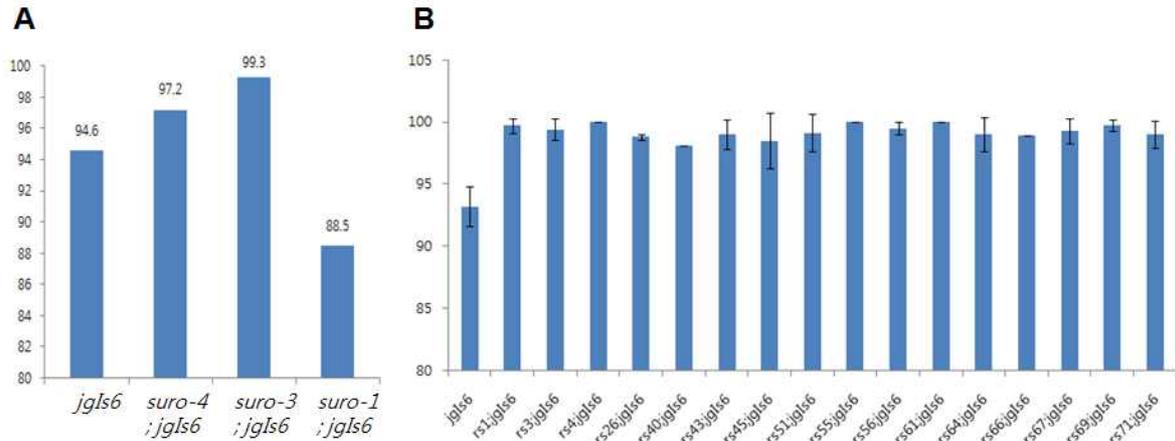


그림 21. cuticle 구조 관련 mutant들에 의한 *jpgIs6*의 Muv phenotype의 변화. (A) *suro-3*과 *suro-4* mutant는 *jpgIs6*의 Muv phenotype을 증가시키는 반면, *suro-1* mutant는 감소시킴. (B) 대부분의 우성 mutant들은 *jpgIs6*의 Muv phenotype을 증가시킴.

다음으로 나머지 dominant mutant들은 어떤 영향을 주는지 알아 보기 위해 16 종의 rs mutant들과 *jpgIs6*를 교배하였음. 그 결과 모든 dominant mutant들이 *jpgIs6*의 Muv phenotype을 증가시키는 것을 확인하였음(그림 21B). 이러한 점으로 보아 cuticle의 조성이나 구조에 영향을 주는 유전자들이 hyperplasia를 일정 정도 조절할 수 있다는 것을 확인하였음.

(3) *sqt-1*으로 밝혀진 *suro-4*는 Muv 형성을 증가시킴

다음으로 Rol suppressor의 원인유전자를 찾기 위해, 우선적으로 많은 mutant들 가운데 선택이 필요하였음. Recessive mutant를 우선적으로 선택하였고, 그 중에서 가장 높은 빈도로 나온 *suro-4*를 선택하였음.

suro-4 mutant는 Rol suppressor mutant들 중에서 가장 높은 빈도로 나타났고(그림 20B), EGFR 신호 전달에 의한 hyperplasia를 증가시킴(그림 20A). *suro-4*의 원인 유전자를 찾기 위해, 그림 22A와 같이 SNP를 이용하여 mapping을 하여, 2번 염색체의 3.14에서 3.5 사이에 존재한다는 것을 알았음. 다음으로 그 사이에 있는 12개 fosmid clone을 미세주입하여 Rol phenotype을 회복하는 clone을 찾은 결과, WRM0630cG11이라는 fosmid가 rescue함을 알게됨. 이 fosmid에는 유전자가 8개 존재하며, 그 중에서 *sqt-1*이라는 collagen gene이 가능성이 가장 높아 보였음. *sqt-1*은 *rol-6*와 더불어 잘 알려진 collagen이며 두 유전자 간의 유전학적 상호작용이 가장 비번하게 보고되었음[16]. *suro-4* mutant는 *sqt-1*에 의해 rescue되어, SURO-4는 SQT-1 collagen으로 밝혀짐.

suro-4 mutant는 cuticle 형성 또는 구조에 영향을 주는 mutant임으로 직접적으로 ROL-6::GFP 발현이 어떻게 변하는지 확인해 보았음. 정상적인 야생형 선충과 달리 큐티클에서 ROL-6::GFP의 배열이 불규칙적이나 나타남을 알 수 있었음(그림 22B). 그 이외에 *suro-4* mutant의 phenotype은 약간 길이가 길 뿐, 야생형과 별 다른 차이를 보이지 않음. 따라서, 앞서 EGFR 경로를 표적으로 한 항암제 스크린을

위한 jgIs6와 jgIs25 model은 rol-6d 유전자를 transgenic marker로 이용하여 스크린에 부적합하였기에, *suro-4* mutation을 이용하여 jgIs6와 jgIs25의 Rol phenotype을 suppression하는 모델을 실제 스크린에 이용하였음.

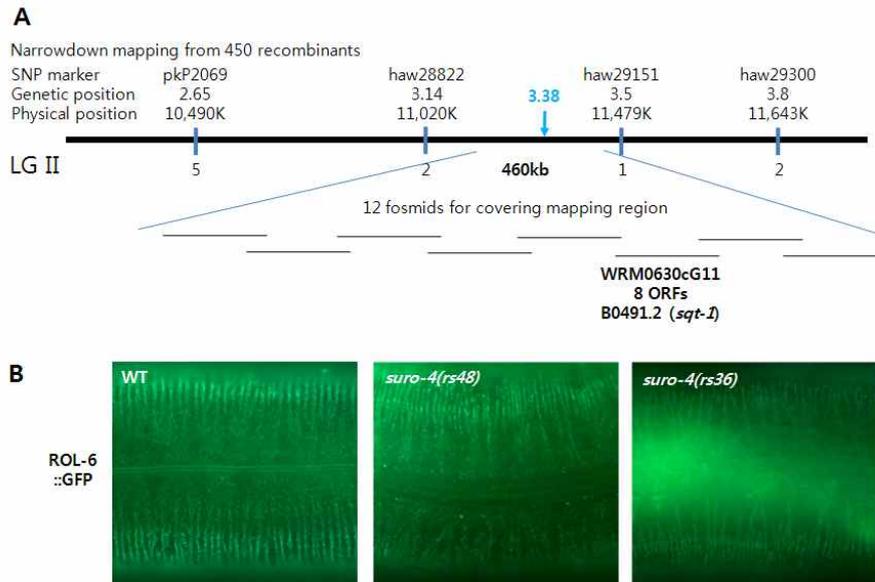


그림 22. *suro-4* mutant의 mapping과 cloning. (A) SNP mapping을 이용한 *suro-4* mutant의 mutation 위치 파악. 최종적으로 WRM0630cG11 fosmid로 rescue되고, 그 다음 *sqt-1*에 의해 rescue됨. (B) *suro-4* mutant는 cuticle에서 ROL-6::GFP의 규칙적인 배열이 흐트러짐.

sqt-1 mutation에 의해 jgIs6의 Muv은 약간 증가하는 경향을 보이고, jgIs25는 거의 변화가 없음(표 4). Rol을 suppression하는 정도의 phenotype 변화밖에 없으며, 소폭 Muv 형성을 상승하는 것은 보다 jgIs6와 jgIs25 모델의 적합성을 높이는 결과를 가져옴. 따라서 cuticle 구조나 형성에 영향을 주는 *sqt-1*의 mutant은 jgIs6와 jgIs25 모델에서는 큰 영향이 없음을 확인 하였음.

Strain	Transgene product	% Muv (n)
<i>jgIs6</i>	LET-23 ::hEGFR-TK [L858R]	94.6 ± 2.27 (1465)
<i>sqt-1; jgIs6</i>	LET-23 ::hEGFR-TK [L858R]	97.4 ± 0.95 (2012)
<i>jgIs25</i>	LET-23 ::hEGFR-TK [T790ML858R]	94.9 ± 0.36 (410)
<i>sqt-1; jgIs25</i>	LET-23 ::hEGFR-TK [T790ML858R]	95.1 ± 0.21 (593)

표 4. *sqt-1* mutant에 의한 *jgIs6*와 *jgIs25*의 Muv phenotype의 소폭 증가와 Rol phenotype 억제. All transgenes are expressed by the *let-23* promoter, and transgenic worms were integrated by UV irradiation. Since a dominant *rol-6* mutant construct was used for a transgenic marker, *sqt-1* was introduced to suppress the Rol phenotype for an experimental advantage.

실질적으로 Muv 또는 정상으로 구분하는 방식은 방법적으로는 쉽지만, 질적인 측면에서는 상당히 부적절한 계량 방법임. 같은 jgIs6 스트레인에에서도 개인차가 있어, pseudovulva가 하나인 것과 둘, 셋인 것은 분명히 다름(그림 23A). 또한 pseudovulva의 크기도 고려해야 하겠지만, 측정하기가 어렵기 때문에 pseudovulva의 숫자(HIN number)만으로 *sqt-1*에 의한 jgIs6, jgIs25, jgIs26에 대해 자세히 관찰하였음. 그 결과 jgIs6와 jgIs25에서 Muv의 증가는 미미한 수준이었지만(표 4), pseudovulva의 수가 2개 이상인 개체의 증가가 더 높다는 것을 알 수 있음(그림 23B). jgIs6에서 HIN 2개 이상은 62.5%이지만,

*sqt-1;jgIs6*에서는 71.5%로 9%나 증가하는 것을 알 수 있음. 특히, *jgIs25*와 같은 LET-23::hEGFR-TK [T790M L858R]을 발현하는 Is line인 *jgIs26*의 경우, Muv의 비율도 51.2%에서 94.6%로 급격히 증가하고, pseudovulva의 수가 2개 이상인 개체의 증가도 21%에서 69%로 48%나 증가하는 것을 보였음. 이러한 결과로 보아, *sqt-1*에 의한 세포 증식의 변화는 상황에 따라 다르지만, 오히려 약한 hyperplasia 모델에서 더 높이는 경향성이 있음을 알 수 있음. 따라서 이러한 선충에서의 결과를 암세포에 적용하면, EGFR의 신호가 비교적 덜 활성화된 암세포에서 ECM의 변화가 더 중요하다는 것을 알 수 있음.

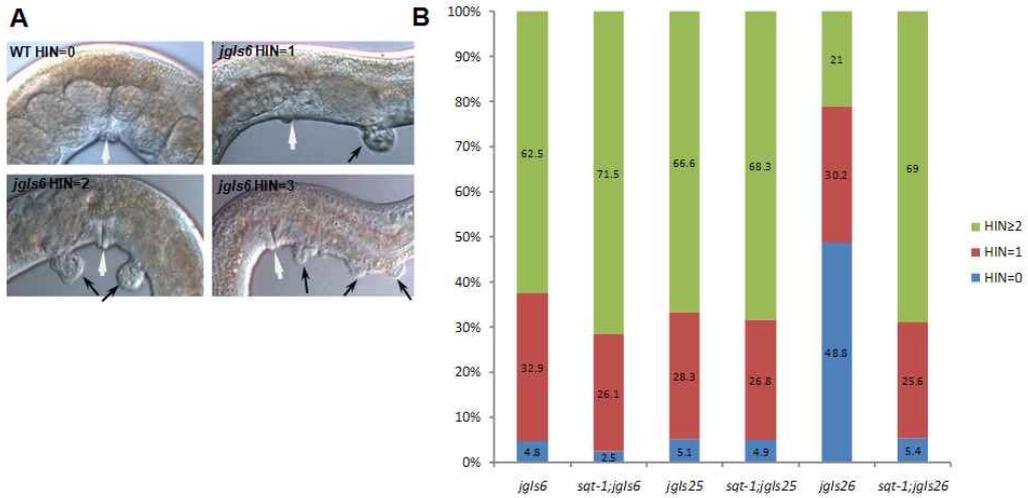


그림 23. *sqt-1* mutant에 의한 *jgIs6*, *jgIs25*와 *jgIs26*의 Muv phenotype의 증가. (A) *jgIs6*의 Hyperplasia number (HIN). (B) *sqt-1* mutant background에서 EGFR의 과도한 신호 전달에 의한 hyperplasia가 증가함. 특히 *jgIs26*에서는 급격히 증가함.

(4) 새로운 zinc-carboxypeptidase인 SURO-1의 기능

suro-1 mutant는 mild Dpy phenotype을 보이며, *jgIs6* 모델에서 다른 *suro* mutant들과 달리 Muv 형성을 저해하는 결과를 보였음(그림 21A). 따라서 그 다음 우선 순위로 연구를 시작하였음.

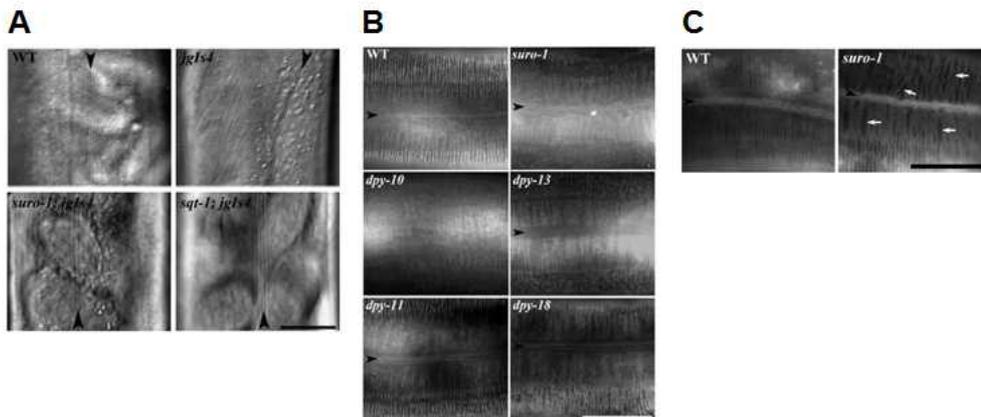


그림 24. *suro-1* mutant의 cuticle phenotype. (A) *suro-1*과 *suro-4* mutant에 의해 alae가 정상적으로 suppression됨. (B) 여러 Dpy mutant들과 *suro-1*에서 ROL-6::GFP 배열의 변화. (C) *suro-1* mutant의 cuticle에서 COL-19::GFP의 규칙적인 배열도 달라짐.

우선적으로 *suro-1*의 cuticle 구조와 형성에 미치는 영향을 알아 보기 위해, alae의 방향성을 확인해 보았음. *suro-1*도 *sqt-1*과 마찬가지로 *jgIs4*에서 몸 길이 방향과 비틀어진 alae가 정상적으로 평행하게 위치하는 것을 확인하였음(그림 24A). 다음으로 Dpy phenotype을 보이는 기존의 mutant들과

ROL-6::GFP pattern을 비교해 보았음. *suro-1*을 비롯한 *Dpy* mutant들은 각각의 고유한 ROL-6::GFP pattern을 보이는 것으로 확인되었음(그림 24B). 다른 collagen인 COL-19::GFP를 *suro-1*에서 발현시켜 본 결과, 이 역시도 야생형과 달리 배열이 불규칙적으로 변하는 것을 알 수 있었음(그림 24C). 이러한 결과들을 종합해 보면, *suro-1*은 전반적인 cuticle 구조나 형성에 영향을 mild하게 준다는 것임.

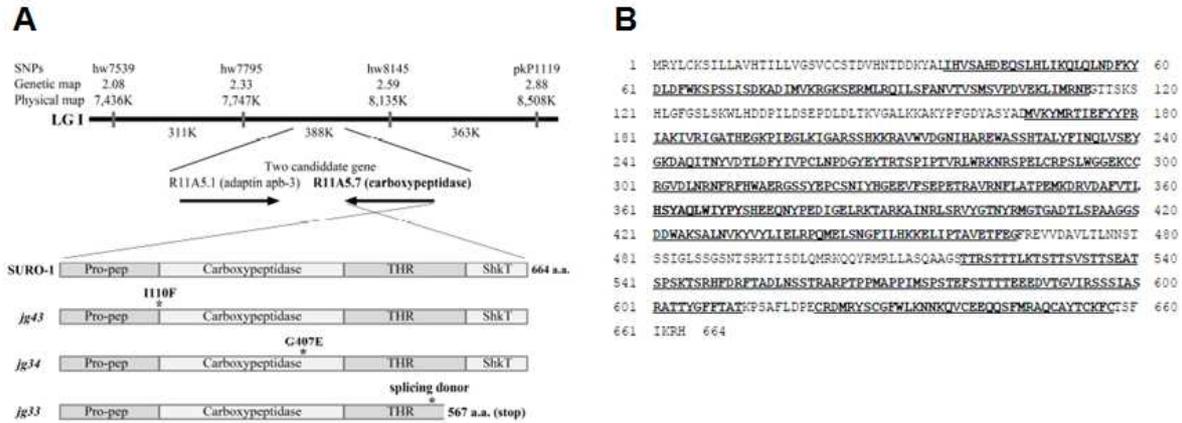


그림 25. *suro-1* mutant의 mapping, cloning과 아미노산 서열. (A) *suro-1*은 1번 염색체의 2.33과 2.59 사이에 위치하며, R11A5.7에 의해 레스 큐팅. 3종의 *suro-1* mutant genomic DNA 염기서열 분석 결과 그림과 같은 위치에 mutation이 확인됨. (B) SURO-1은 propeptidase domain (Pro-pep), carboxypeptidase domain, threonine rich domain(THR)과 Shk toxin domain (ShkT)를 가지는 zinc-Carboxypeptidase A (CPA) 임.

suro-1 mutant의 원인 유전자를 규명하기 위해, single nucleotide polymorphism(SNP) 방법을 이용하여 genetic mapping을 수행하였음. *suro-1* mutant를 CB4856(Hawaiian strain)과 교배하여 F2에서 그 homozygote *suro-1* mutant를 고르고, 적당한 SNP primer를 이용하여 PCR한 다음, 제한효소로 자른 뒤, 아가로스 젤 전기영동을 실시하였음. 야생형 N2와 CB4856의 band pattern에 의해 원인 유전자의 위치를 결정하였음.

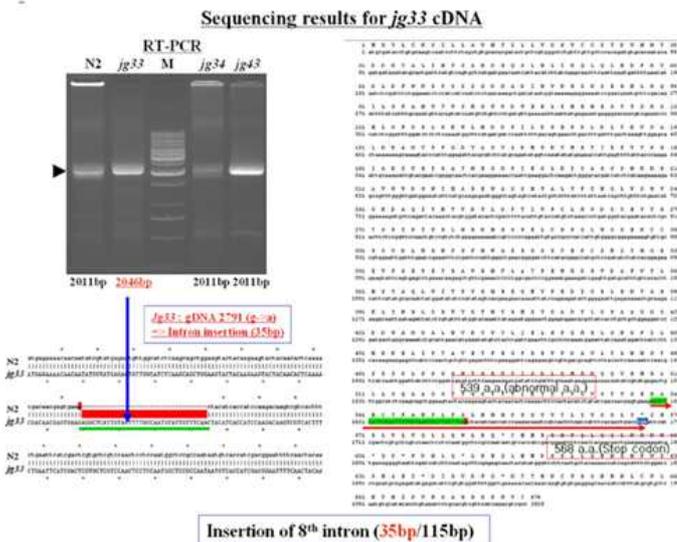


그림 26. *suro-1*(*jg33*) mutant의 RT-PCR과 cDNA 염기서열 분석. 3종의 *suro-1* mutant에서 mRNA의 발현은 다 잘 되고 있음이 RT-PCR로 확인됨. *jg33*의 경우에는 splicing donor site에 mutation이 있어 cDNA의 sequence를 분석해 본 결과, cryptic splicing이 일어나 early stop codon이 생겨 THR 도메인의 일부와 ShkT 도메인 전체가 잘린 형태의 단백질을 생성할 것으로 예측됨.

그림 25의 A는 최종적인 *suro-1* mutant의 mapping 결과임. 약 388kb 내에서 *suro-1*이 좁혀졌는데, 그 안에서 가능성이 있는 유전자는 몇 개 없었으며, Wormbase(www.wormbase.org)에서 RNAi data들을 분석한 결과 *Dpy* phenotype을 보이는 것 중에서 R11A5.7이 가장 가능성 높아 보였음. 이후 R11A5.7 ORF를 포함하는 genomic PCR을 수행하여, 그 유전자를 *suro-1* mutant에 미세주입하여 rescue되는 것을 확인하였음. R11A5.7은 zinc-carboxypeptidase A(CPA) homolog를 발현할 것으로 예상되는 유전자임(그림 25B).

suro-1 mutant들의 sequencing 결과 *ig33*은 splicing donor site에 point mutation이 있어 early stop이 잡혀 있어 THR(threonine rich domain)의 일부와 ShkT domain이 만들어지지 않게 됨(그림 26). *ig34*의 경우는 carboxypeptidase domain에 point mutation이 있어 효소활성이 떨어진 돌연변이로 추정됨. *ig43*의 경우는 propeptide domain과 carboxypeptidase domain 사이의 cleavage가 일어나는 LI site가 LF로 바뀐 돌연변이였음(그림 25A).

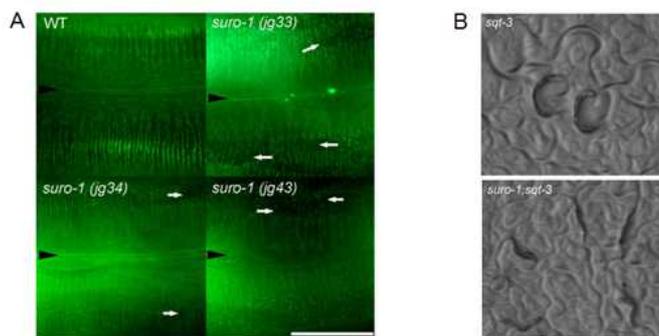


그림 27. 3종류 *suro-1* mutant 들 사이의 큐티클 구조 비교 및 다른 Rol mutant의 suppression. (A) 3종의 *suro-1* mutant에서 ROL-6::GFP pattern을 비교해 보면, 거의 비슷함. (B) *suro-1*은 다른 Rol mutant인 *sqt-3*의 Rol phenotype도 잘 suppression함.

3종의 *suro-1* mutant의 cuticle 형성에 대한 영향을 비교하기 위해, ROL-6::GFP 발현 차이를 비교해 보았음. 그 결과 3종의 차이는 거의 없었음(그림 27A). *suro-1*이 dominant ROL-6 발현 개체인 *igIs4* 이외에 다른 Rol mutant들을 suppression할 수 있는지 알아 보기 위해, recessive *rol-6(e187)*과 *rol-9*, *sqt-3*등과 *suro-1*을 교배하여 double mutant를 만들었음. 그 결과 *suro-1*은 다른 Rol mutant들도 suppression할 수 있음을 확인하였음. 그림 27B는 *suro-1*이 *sqt-3*의 Rol phenotype을 suppression한 것을 보여줌.

SURO-1 carboxypeptidase가 cuticle formation 또는 collagen의 modification에 중요한지 알기 위해서, hypodermis에서 발현되는지 확인하였음. 그림 27A는 *suro-1* 프로모터에 NLS::GFP 리포터를 결합시켜 간접적으로 발현을 확인한 것임. *Psuro-1::NLS::GFP*는 3-fold의 embryo에서부터 발현되어 young adult 까지 발현됨. 이러한 점은 꼬마선충의 발생 단계에서 4번의 molting 과정이 존재하는데, 처음 cuticle 형성을 포함해서 molting이 끝난 시점까지 발현된다는 것으로 새로운 cuticle의 합성에 관여할 가능성이 아주 높음. 어린 시기에는 intestine에서도 발현이 되나, 대체로 hypodermis에서 발현이 고르게 되는 것을 알 수 있음. *Psuro-1::NLS::GFP*의 발현이 hypodermis에서 일어나는지 정확하게 재확인하기 위해, *rol-6* promoter에 의해 발현되는 EMR-1::RFP인 *Prol-6::EMR-1::RFP*를 *Psuro-1::NLS::GFP*과 동시에 발현시키는 형질전환 개체를 제작하였음. 이 개체에서 모든 EMR-RFP 발현 세포 핵에서 NLS::GFP가 동시에 발현됨을 확인하였음(그림 27B).

다음으로 *suro-1*의 subcellular localization을 알아보기 위해, 3가지 종류의 SURO-1::GFP 플라스미드를

제작하여 형질전환 개체를 만들었지만, 발현을 확인할 수 없었음. 다른 방법으로 SURO-1::FRP를 발현하는 형질전환 개체를 만든 뒤, UV 조사에 의한 integration을 유도하여 jgIs32 strain을 얻었음. 이 개체에서 SURO-1::RFP의 발현을 구체적으로 확인할 수 있었음. SURO-1::RFP는 jgIs32를 starvation 시킨 뒤에, 새 배지에 회복시키면, 강하게 발현됨. 따라서 평상 조건에서는 기저 수준의 발현만 유지되므

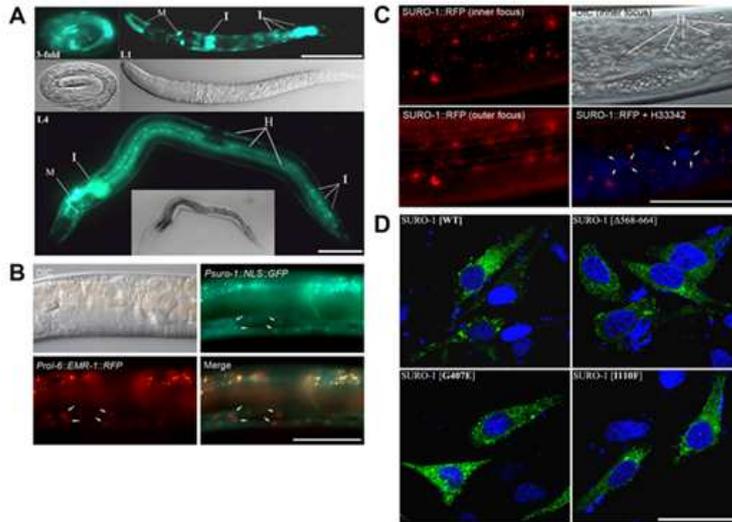


그림 27. SURO-1의 발현. (A) Psuro-1::NLS::GFP 형질전환 개체. SURO-1은 3-fold embryo 시기에서 부터, 성체에 이르기 까지 발현되며, 특히 Intestine과 hypodermis에서 발현됨. M (ttx-3::gfp transgenic marker), I (intestine), H (hypodermis). (B) Psuro-1::NLS::GFP와 Prol-6::EMR-1::RFP의 발현은 hypodermis에서 정확하게 일치함. (C) SURO-1::RFP expression pattern. SURO-1::RFP는 몇몇 시기에만 hypodermis에서 secretory granule과 유사한 모양으로 만들어져 cuticle로 분비됨. H333342(Hoechst33342). (D) SURO-1::GFP의 HeLa cell에서의 발현 양상. 정상적인 SURO-1과 3종류 mutant SURO-1::GFP 사이의 발현 차이는 볼 수 없음. 세포질에 점점이 보임.

로 발현을 확인할 수 없으며, 굶주린 후에 영양분이 들어오면 전사적인 조절이 강하게 되는 것으로 예상됨. 이것은 food signal에 의해 조절되므로 암세포의 증식에 대한 연관성이 있을 것으로 예상됨. SURO-1::RFP는 처음에는 세포질에서 점점이 발현이 나타나고, 시간이 지남에 따라 cuticle에서 규칙적인 배열을 이룸(그림 27C). SURO-1::RFP가 발현되는 세포가 hypodermis인지를 확인하기 위해 DIC와 Hoechst33342 염색을 통해 검증하였음. 또한 HeLa cell에서 SURO-1::GFP의 발현을 통해, 인간의 암세포에서도 SURO-1의 발현이 세포질에 점점이 나타나는 것을 확인하였음(그림 27D).

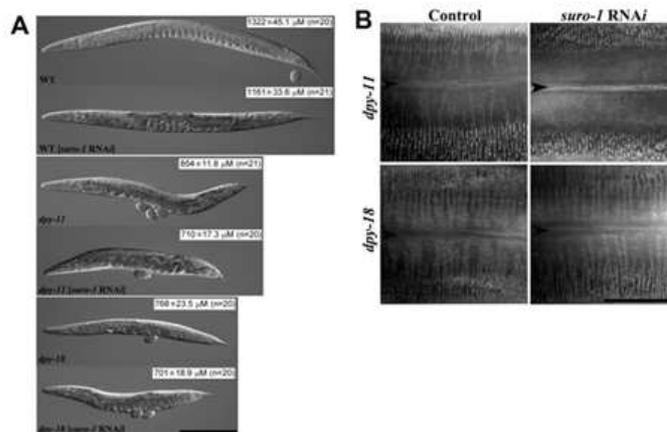


그림 28. SURO-1과 다른 collagen 조절 mutant들 사이의 유전학적 상호관계. (A) suro-1 mutant는 mild Dpy phenotype을 보이고, 몸 길이가 야생형에 비해 아주 조금 짧음. suro-1과 dpy-11 또는 dpy-18의 이중 돌연변이 개체는 각각 몸 길이에서 additive phenotype을 보임. (B) suro-1과 dpy-11 또는 dpy-18의 이중 돌연변이 개체에서는 ROL-6::GFP의 cuticle에서 발현도 달라짐.

SURO-1이 cuticle형성과 collagen 조절에 관여하는지를 알기 위해, 기존에 알려진 collagen 조절 효소인 DPY-11과 DPY-18의 mutant들과의 유전학적 상호 작용을 살펴 보았음. DPY-11은 membrane-associated thioredoxin-like protein이며, DPY-18 은 propyl-4-hydroxylase의 alpha subunit임. *suro-1* mutant 자체로는 mild Dpy phenotype을 보이며, *dpy-11*과 *dpy-18*은 확실한 Dpy mutant임. 따라서 이들 간의 double mutant를 제작하여, 20개체 정도에서 길이를 재어 통계 처리하였음. *suro-1;dpy-11* 또는 *suro-1;dpy-18*은 각각의 single mutant인 *dpy-11*과 *dpy-18*에 비해 몸 길이가 유의한 정도에서 조금 더 짧아지므로(그림 28A), 서로 다른 경로를 통해 collagen을 조절할 가능성이 있다고 생각됨. 또한 이들 double mutant에서 ROL-6::GFP의 발현을 비교해 보면, *dpy-11*, *dpy-18* single mutant에 비해 *suro-1*과의 double mutant에서 급격한 변화가 있다는 것을 알 수 있음(그림 28B). 이 결과들을 종합해 보면, *suro-1*은 *dpy-11* 또는 *dpy-18*과 다른 경로를 통해 cuticle 형성에 영향을 준다고 판단됨.

다음으로 그림 27A에서 3종의 *suro-1* mutant들이 유사한 ROL-6::GFP pattern을 보여 주었기 때문에, 이들 mutation이 SURO-1의 기능을 얼마나 상실했는지 알아보기 위해, 각각의 mutant cDNA를 발현하는 플라스미드를 제작하여 가장 null에 가까울 것이라 생각되는 *suro-1(jg33)*에 과발현시켜 보았음. 그 결과 야생형 SURO-1 발현 플라스미드만이 rescue 되는 것을 확인하였음(그림 29A). 이 결과와 그림 27A의 결과를 종합하면, 3종의 mutant들이 거의 null에 가깝다는 것을 짐작할 수 있음.

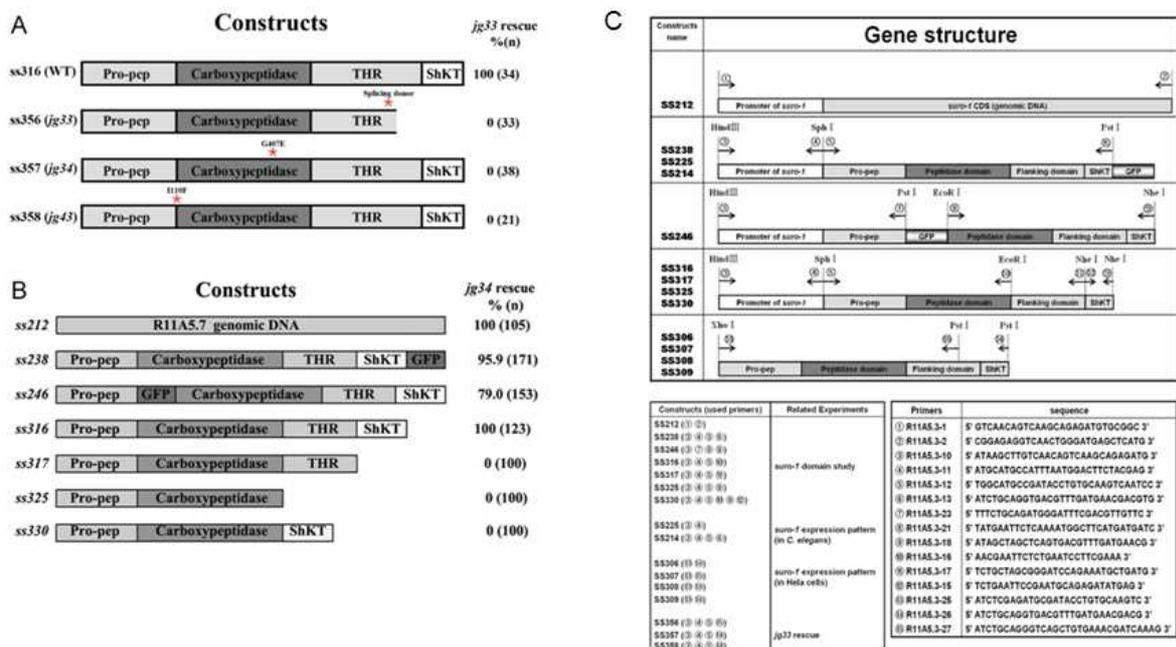


그림 29. mutant SURO-1의 과발현에 의한 rescue 결과 및 suro-1 domain study. (A) 3종의 mutant SURO-1을 과발현시켜 *suro-1(jg33)* mutant를 rescue한 결과 모두 실패했음. (B) 여러 도메인을 날린 SURO-1을 발현시켜 *suro-1(jg34)* mutant를 rescue 한 결과, 오직 완전한 SURO-1 단백질이 발현될 때만 rescue 가 됨을 확인함. (C) *suro-1* 실험에 사용된 DNA construct의 개요와 프라이머들.

SURO-1은 전형적인 propeptide domain(Pro-pep)과 carboxypeptidase A domain(CPA) 이외에 threonine rich domain(THR)과 Shk toxin domain(ShkT)을 가짐. 이러한 domain들이 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위해서 각 domain의 deletion series를 만들어 SURO-1의 function에 중요한지 알아 보았음. 그림 29B와 같이 여러 종류의 플라스미드를 제작하여 *suro-1* mutant에 주입하여 형질전환체가 rescue되어 Rol을 하는지 확인하였음. 이 실험 결과, GFP의 위치에 따른 효과는 없으며, GFP fusion

protein도 suro-1 mutant를 잘 rescue함을 알 수 있었음. 이 실험 결과 오직 full-length cDNA 또는 genomic DNA를 포함하는 플라스미드를 가진 형질전환 개체만 rescue되었음(그림 29B). 따라서, 모든 SURO-1의 도메인이 SURO-1의 기능에 중요하고 필요하다는 것을 알 수 있었음.

이상에서 선충의 유전학적 방법을 이용한 새로운 유전자 발굴과 앞서 제작한 jgIs6 모델을 이용한 cuticle 구조나 형성이 비정상적인 epithelial cell의 증식에 미치는 영향을 현상 중심으로 살펴 보았음.

3. 연구결과 고찰 및 결론

(1) C. elegans를 이용한 항암제 스크린 모델의 가치

그 동안 선충을 이용한 신약 개발은 유럽의 Devgen이라는 회사에서 임상 시험에 들어간 2종의 물질이 있다고 보고 되었음. 하지만, 항암제 개발 분야에서 선충의 이용은 단지 실험실 수준에서 이미 개발된 물질이 선충에 대한 효과를 실험하는 정도에 머물고 있음. 따라서 항암제 개발을 위한 실용적 스크린 모델로서는 본 연구에서 제시된 jgIs6와 jgIs25 등의 모델이 기존의 어떠한 연구에 비해 비교 우위에 있음. 특히 인간의 발암 유전자를 도입한 실험은 cMet을 도입한 형질전환 개체의 phenotype을 보고하는 수준의 연구 정도는 있었지만, 이 모델의 한계는 아주 제한적인 (5% 미만) Muv phenotype을 보이므로 실질적인 이용 가치는 없음. 이에 비해 우리가 제작한 모델은 95% 이상의 Muv phenotype을 보이며, 이 모델을 이용해 저해제 탐색이 가능하다는 것을 확인하였음. 또한 우리 모델은 상용화된 항암제 gefitinib와 erlotinib와 같은 EGFR-TKI에 대한 반응성이 활성 변이형 EGFR을 발현하는 NSCLC의 특성과 매우 유사함을 확인하였으므로, 이 모델을 이용하면 EGFR-TKI에 대한 내성을 극복할 수 있는 새로운 항암제 스크린이 가능성이 높음. 그럼에도 불구하고 본 연구의 한계는 제한된 인원과 연구비 및 연구 기간으로 인해 충분한 화합물 라이브러리의 구매와 테스트가 불가능하여, 제한된 연구 성과만을 이루었음.

선충의 EGFR ortholog인 let-23의 promoter를 사용하여 LET-23::hEGFR을 발현시킨 jgIs6와 jgIs25 모델에서 hyperplasia phenotype이 vulval phenotype에만 나타나는지가 중대한 의문임. let-23 유전자의 경우, 발생상에서 대부분의 epithelial cell에서 발현될 것이고, 대부분의 let-23 mutant들이 lethality를 보이는 것으로 보아 vulval development 이외의 다른 tissue와 organ development에도 중요함을 알 수 있음. 그럼에도 불구하고 과활성화된 EGFR의 발현이 과도한 세포증식으로 나타나는 것은 VPC에 국한된다는 것임. let-23이 발현되는 다른 세포에서는 과도한 EGFR 신호 전달이 오히려 세포의 성장을 억제하는 것처럼 나타나고, VPC에서는 세포 증식을 촉진하는 것은 궁극적으로 이들 세포 간의 competence의 차이에 의한 것이라 생각됨. 선충의 생식기 발생에서 6개의 VPC는 발생상으로 동등한 potential을 가진 equivalent group을 형성하여 다른 세포들과 차별화됨. 선충의 생식기 발생에서 EGFR 신호 전달 경로가 6개의 VPC 상에서 교란이 생기면, 신호가 약할 때는 hypoinduction을 유도하고, 신호가 강하면 hyperinduction을 유도함. 정상적인 생식기 발생은 3개의 VPC가 22개의 세포로 분열하여 하나의 vulva를 형성하게 되나, 기존의 Muv mutant들과 jgIs6, jgIs25 모델에서는 추가적인 VPC의 세포증식이 유도되어 hyperplasia를 형성하게 됨. Cell fate marker를 이용한 우리의 실험 결과도 기존의 Muv mutant들과 마찬가지로, 정상적인 vulva에서 벗어난 곳에서 1차, 2차 운명을 가진 세포들이 나타나는 것으로 보아, 과도한 EGFR 신호 전달에 의해 3차 운명을 가진 세포가 증식하여 1차 또는 2차 운명을 가진 세

포를 만들어 내거나, 아니면 3차 운명을 가진 세포의 운명이 1차 또는 2차 운명으로 바뀌어 세포의 증식이 활발히 일어나는 것으로 생각됨. 이러한 특성은 모든 인간 세포에 과활성 변이를 가진 EGFR을 발현시킨다고, 암으로 발전하는 것이 아니고, NSCLC와 같은 몇몇 암종에서 EGFR의 활성화된 변이가 중요한 현상과 일치함.

(2) MEKI의 항암제 개발 전망

U0126은 이미 MEKI로 in vitro 실험에 많이 이용되고 있으나, 임상에는 실패한 경우임. U0126이 일반적인 세포 배양 실험에 사용되는 농도는 10uM로 비교적 높다는 것을 알 수 있음. 개체 수준의 *C. elegans* 모델에 사용될 경우, jgIs6와 jgIs25 모델의 경우 5-20uM이면 충분히 Muv phenotype을 잘 억제하는 것으로 보아, 우리 연구 결과를 확대 해석하여 적용하면 일반적인 암보다 NSCLC의 치료에 U0126은 충분한 응용할 가능성이 있음. 이를 위해, mutant EGFR을 발현하는 폐암 세포주를 이용하여 U0126과 gefitinib의 효과를 비교하는 실험을 진행 중에 있음. 이미 새로운 MEKI가 임상 시험에 여러 개 진행 중인 것으로 보아, 우리 실험 결과는 MEKI의 미래가 긍정적임을 알 수 있음.

개인별 맞춤 치료가 next genome sequencing (NGS)의 방법의 개발과 동시에 향후 의료 시장에서 대세를 형성할 것으로 예상됨. 기존의 항암제 EGFR-TKI에 대한 내성을 극복하기 위해 EGFR[T790M]를 표적으로 한 항암 물질의 개발도 그것의 일환임. 최근에 개발된 WZ4002는 EGFR-TKI에 내성을 보이는 EGFR[T790M L858R] 암 세포주에 효과를 보임[17]. 하지만, 우리의 실험결과로는 WZ4002가 jgIs25의 Muv을 저해하는 정도는 U0126이나 다른 MEKI인 PD0325901에 훨씬 못 미치는 효과를 보임. 따라서 EGFR의 개개의 mutation에 맞추어 저해제를 개발하는 것에 비해 downstream인 MEKI를 개발하는 것이 치료에 효과적일 가능성이 높음. 한가지 우려되는 점은 MEKI의 경우 정상세포의 MEK 작용도 방해할 것으로 예상되므로, 부작용을 고려해야 함. 하지만, 우리의 선충 모델에서 실험 결과는 정상적인 MEK의 기능을 저해하는 U0126의 농도는 100uM까지도 확인이 되지 않는데 비해, jgIs25에서 과활성될 것으로 예상되는 MEK의 저해는 20uM 이하에서도 충분함으로 NSCLC와 같은 EGFR의 과활성화된 mutation에 의한 암 세포의 치료에는 문제가 없을 것으로 생각됨. 이후에 다양한 암 세포주에서 실험이 먼저 확인되어야 할 것이고, 선충에서도 유전학적인 분석에서 벗어나 분자 수준에서 EGFR과 MEK등의 활성이 증가하거나 감소되는 현상을 증명해야 할 것임.

(3) 선충 모델을 이용한 EGFR에 의한 epithelial cell 증식과 ECM 간의 상호관계 모델의 한계

선충의 표면을 둘러싼 epithelial cell로 구성된 hypodermis는 바깥으로 basement membrane과 cuticle로 보호되어 있음. 선충의 hydroskeleton을 유지하는 만큼 cuticle은 아주 내구성이 강한 구조를 이루고 있음. 이것은 정상적인 세포의 증식과 분화를 제한하고, 개체의 형태를 정상적으로 유지하는데 핵심적인 역할을 수행하고 있음. 이것은 포유동물에서 세포간의 결합 조직이 존재하여 각각의 영역을 정하고, 세포의 이동과 증식을 억제하는 역할과 유사함. 따라서 EGFR 경로를 표적으로 하는 항암제 스크린 모델로 개발된 jgIs6와 jgIs25는 선충의 기존 Muv mutant들에 비해 phenotype이 분명하므로, 이 모델을 이용하여 epithelial cell의 과도한 증식과 ECM간의 관계를 분석하는데 이용하고자 하였음. Rol suppressor를 찾은 뒤, jgIs6와 교배를 통해 세포 증식을 영향을 주는 mutant를 찾는, 간접적이고 손쉬운 스크린 방법을 이용하여 새로운 mutant들을 찾을 수 있었음. 또한 이중 두 mutant를 cloning하여 원인 유전자를 찾았음. 특히 새로운 CPA는 mutant에서

jgIs6의 Muv phenotype을 감소시키므로, 정상 기능은 과도한 EGFR 신호전달에 의한 세포 증식을 증진시키는 역할을 수행할 것으로 예상됨. 우리는 이 CPA가 선충의 collagen 조절을 통해서 cuticle의 구조 형성에 영향을 주고, 유충 발생과 개체 형태에 중요한 영향을 준다는 결과를 얻었음. 암과 관련해서 human CPA의 과발현은 prostate cancer의 전이를 촉진한다는 보고가 있으므로, 선충에서 CPA 결과와 어느 정도 연관성을 가짐. 하지만, CPA의 연구의 한계는 너무나 많은 종류의 CPA가 인간과 선충에 존재하므로, 어느 것이 어느 것의 ortholog인지 구분하기가 어렵다는 것이고, 특히 SURO-1 CPA는 선충과 일부 동물에만 존재하는 C-terminal ShkT 도메인을 가지고 있다는 점에서 human CPA와 다름. 이러한 이유로 CPA의 세포 증식에 대한 연구 모델로 선충의 한계가 있음. 이와 마찬가지로 sqt-1의 mutation이 EGFR에 의한 세포 증식을 증가 시키는데, sqt-1은 collagen이고, 선충에만 140개 이상의 collagen이 존재하며 인간도 많은 수의 collagen을 가진다는 점에서 깊이 있는 연구를 하기 어려움. 따라서 이러한 한계를 극복하기 위해, 간접적인 스크린에 의한 방법 보다는 jgIs6의 느린 성장 속도를 suppression하는 mutant를 스크린하는 방법을 이후에는 시도할 것임.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
A novel zinc-carboxypeptidase SURO-1 regulates cuticle formation and body morphogenesis in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	심재갈 (교신)	FEBS letters (3.2)	2010.11 [Epub ahead of print]	국외 SCI	0810070
UEV-1 Is an Ubiquitin-Conjugating Enzyme Variant That Regulates Glutamate Receptor Trafficking in <i>C. elegans</i> Neurons	심재갈 (공동)	PLoS one (4.7)	2010; 5(12): e14291	국외 SCI	없음
Tyrosylprotein Sulfotransferase Regulates Collagen Secretion in <i>Caenorhabditis elegans</i>	심재갈 (교신)	Molecules and Cell (1.8)	2010; 29(4):413-8	국내 SCI	0810070
Functional analysis of pyrimidine biosynthesis enzymes using the anticancer drug 5-fluorouracil in <i>Caenorhabditis elegans</i>	심재갈 (교신)	FEBS Journal (3.1)	2009; 276:4715-4726	국외 SCI	0810070
Biological Safety and B Cells Activation Effects of <i>Stephania delavayi</i> Diels.	심재갈 (공동)	MCT	2009; 5(1): 93-98	국내 SCIE	없음

Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Levels Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	심재갈 (교신)	Molecules and Cell (1.9)	2008; 26(4):344-9	국내 SCI	0810070
A forward genetic approach for analyzing the mechanism of resistance to the anti-cancer drug, 5-fluorouracil, using <i>Caenorhabditis elegans</i> .	심재갈 (교신)	Molecules and Cell (1.9)	2008; 29:25(1):119-23	국내 SCI	0510583

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
 - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
An <i>in vivo</i> <i>C. elegans</i> model system for screening EGFR-inhibiting anticancer drugs	심재갈	제3회 동물모델연합심포지움 (2010.12)	국내	0810070
SURO-1, a zinc-carboxypeptidase functions in body morphogenesis by regulating cuticle formation	김태훈, 심재갈	한국예쁜꼬마선충연구회 (2010.2)	국내	0810070
Characterization of pyrimidine biosynthesis enzymes using the anti-cancerdrug 5-fluorouracil in <i>Caenorhabditiselegans</i>	김성섭, 김태훈, 황무각, 심재갈	한국세포생물학회 하계발표회(2009.8)	국내	0810070
Development and characterization of hyperplasia models induced by the ectopic expression of the activated human EGFR in <i>C.elegans</i>	황무각, 심재갈	한국예쁜꼬마선충연구회 (2009.2)	국내	0810070
Forward genetics for understanding <i>C.elegans</i> cuticle formation by the rol-6 suppressor analysis	김태훈, 심재갈	한국세포생물학회 하계발표회(2008.8)	국내	0810070
Development of <i>C. elegans</i> hyperplasia model induced by the ectopic expression of the activated human EGFR	황무각, 심재갈	International Congress of Cell Biology (2008.10)	국내	0810070

1) 지역 : 국내, 국외

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
인간의 돌연변이형 EGFR의 발현에 의한 꼬마선충 (<i>C. elegans</i>) 과형성 (Hyperplasia) 모델을 제작하고, 이 모델을 통해 세포 증식의 신호전달을 조절하는 유전자를 발굴하고, 변이형 EGFR 신호전달계의 저해제 탐색 가능성 검증	1차년도	변이형 hEGFR 발현 꼬마선충 제작	야생형과 변이형 hEGFR을 발현하는 꼬마선충 5종 제작	100	40
		형질전환 개체의 hEGFR 활성을 비교	L858R 변이가 높은 활성을 보이는 것을 확인함	100	
		기존의 EGFR 저해제에 의한 반응 분석	기존의 EGFR 저해제에 의한 반응은 별로 영향을 받지 않음	100	
	2차년도	Iressa와 EGFR 억제제를 이용한 hEGFR에 의한 hyperplasia 모델 분석	Iressa, cell fate marker, junction protein marker, lin-3 RNAi로 분석	100	70
		Natural compound를 이용한 EGFR 경로의 저해제 스크린	500종 식물추출물 스크린(3개 확보), 7600종 화합물 스크린(7개 확보)	100	
		EGFR 신호 전달의 negative regulator로 예상되는 rs48 돌연변이의 원인 유전자 기능 분석	suro-4(rs48), suro-1(rs19) mutant cloning하여 2개 유전자를 찾음.	100	
	3차년도	7개 화합물의 유도체 244종과 1280종에 대한 구매 화합물 스크린 결과를 종합하여 세포배양실험에서 효능을 평가	연구소 내 공동 연구를 통해 Iressa, AG1478, U0126을 L858R, T790M-L858R을 발현하는 폐암세포주에서 효능 확인한 결과 U0126이 모든 세포에서 효과를 보이는 것을 확인함.	100	100
		SURO-1이 실제 작용하는 표적을 찾고 그 표적의 세포 증식에 대한 영향 분석	SURO-1의 collagen 단백질 조절에 의한 cuticle 형성에 대한 영향을 확인하고, activated EGFR 신호에 의한 Muv 형성을 억제함을 확인함.	100	
		SURO-4를 비롯한 다양한 collagen들이 세포증식에 미치는 영향에 대해 분석	suro-4 mutant에서 과도한 EGFR 활성화에 의한 Muv 형성이 증가한다는 것을 확인하였고, 20종 이상의 collagen 관련 gf mutant들에서도 Muv 형성이 증가함을 확인함.	100	

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
형질전환 개체의 제작 수(>4)	6종의 형질전환 개체 제작(3종 완료, 2종은 11월 중 완료 예정)으로 목표를 충분히 달성
사용한 저해제의 수(>3)와 처리 방법의 적절성 및 수(>3)	예상과 다르게 기존의 EGFR 저해제가 꼬마선충 모델에 적절한 영향을 주지 않아서 그 원인과 해결책을 파악 중임. 그 대안으로 400 종의 천연물을 이용하여 과형성 억제 후보 물질 한 종을 확보하였음.
후보 물질 최소 5종 이상 발굴	식물추출물 3종과 화합물 7종의 총 10종 발굴함. (매우 우수)
3종의 모델에서 Iressa 효과 비교	야생형, sy1;ExhEGFR, jgIs6, lin-15, let-60 등에서 Iressa 효과를 확인하고, cell fate marker, junction protein marker, lin-3 RNAi 등의 여러 방법으로 모델을 분석함. (매우 우수)
Iressa보다 높은 효능을 보이거나 Iressa 내성을 극복하는 물질 발굴 최소 1종의 Hit을 선정	U0126이 Iressa 내성을 극복할 수 있는 물질로 선정됨. (우수)
SURO 유전자들의 cuticle 형성 또는 세포 증식에서의 기능을 분석 SCI 논문 1편 이상으로 정리	새로운 유전자인 suro-1의 cuticle 형성에 관한 내용의 논문을 투고하여 Febs letters에 1편 accepted. (우수)

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1건	PNAS (IF=10.0)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

인간의 EGFR을 발현시킨 선충 모델을 이용하여, 항암제 스크린이 가능하다는 것을 보임으로써, 향후 새로운 항암제 후보 물질을 찾기 위한 스크린을 실시할 계획임. 현재의 스크린 방법은 선충의 vulval phenotype (Muv suppression)을 보고 판단해야 하기 때문에 실질적인 HTS가 어려움. 따라서 후속적으로 보다 쉽게 phenotype을 판별할 수 있는 시스템으로 개발이 필요함. 그 가능성은 hEGFR을 발현하는 선충이 느리게 자라고, 항암제를 처리하면, 다시 성장 속도가 회복되는 점에 착안하여, 먼저 성장 속도에 기준을 두고 스크린한 다음, vulval phenotype을 보아 판단하면 HTS가 실질적으로 가능하게 될 것임. 원활한 연구비의 지원과 다양한 chemical library가 확보된다면, 6개월 이내에 새로운 물질의 발굴과 in vitro test를 마칠 수 있을 것으로 기대함.

이러사나 타세바에 대한 내성은 EGFR 자체의 돌연변이에 한정되어 있지 않으므로, 다른 원인에 의한 내성 극복을 위해, IGFR 또는 cMet 등을 동시에 도입한 모델을 이용한 스크린 방법도 고안할 필요가 있음. 이로써 개인별 맞춤 치료에 적합한 EGFR 경로를 표적으로 한 항암제 스크린 선충 모델을 확립하게 될 것임.

6. 참고문헌

- [1] Hynes, N.E. and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-54.
- [2] Gschwind, A., Fischer, O.M. and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 361-70.
- [3] Muhsin, M., Graham, J. and Kirkpatrick, P. (2003). Gefitinib. *Nat Rev Drug Discov* 2, 515-6.
- [4] Pao, W. et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13306-11.
- [5] Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A. and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305, 1163-7.
- [6] Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J. and Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 169-81.
- [7] Gazdar, A.F. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 28 Suppl 1, S24-31.
- [8] Kobayashi, S. et al. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352, 786-92.
- [9] Sternberg, P.W. (2005). Vulval development. *WormBook*, 1-28.
- [10] Chang, C. and Sternberg, P.W. (1999). *C. elegans* vulval development as a model system to

- study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev* 18, 203-13.
- [11] Moghal, N. and Sternberg, P.W. (2003). The epidermal growth factor system in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Cell Res* 284, 150-9.
- [12] Kaech, S.M., Whitfield, C.W. and Kim, S.K. (1998). The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94, 761-71.
- [13] Van Buskirk, C. and Sternberg, P.W. (2007). Epidermal growth factor signaling induces behavioral quiescence in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 10, 1300-7.
- [14] Lackner, M.R. et al. (2005). Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors. *Cancer Cell* 7, 325-36.
- [15] Kim, S. and Shim, J. (2008). A forward genetic approach for analyzing the mechanism of resistance to the anti-cancer drug, 5-fluorouracil, using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 25, 119-23.
- [16] Kramer, J.M., French, R.P., Park, E.C. and Johnson, J.J. (1990). The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Mol Cell Biol* 10, 2081-9.
- [17] Zhou, W. et al. (2009). Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* 462, 1070-4.



A novel zinc-carboxypeptidase SURO-1 regulates cuticle formation and body morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*

Tai Hoon Kim^a, Yeon Jung Kim^b, Jin Won Cho^{a,c,*}, Jaegal Shim^{a,*}

^aCancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, 323 Yonsei-ro, Yeongdeungpo-gu, Gyeonggi-do 410-740, Republic of Korea

^bDepartment of Biology, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea

^cDepartment of Biomedical Science, World Class University Program, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 15 July 2010
 Revised 10 November 2010
 Accepted 12 November 2010
 Available online xxx

Edited by Ned Mantel

Keywords:
 Cuticle
 Collagen
 rol-6
 Carboxypeptidase
 suro-1
Caenorhabditis elegans

ABSTRACT

Cuticle formation and molting are critical for the development of *Caenorhabditis elegans*. To understand cuticle formation more clearly, we screened for suppressors in transgenic worms that expressed dominant ROL-6 collagen proteins. The *suro-1* mutant, which is mild dumpy, exhibited a different ROL-6::GFP localization pattern compared to other *Dpy* mutants. We identified mutations in three *suro-1* mutants, and found that *suro-1* (ORF R11A57) encodes a putative zinc-carboxypeptidase homologue. The expression of this enzyme in the hypodermis and the genetic interactions between this enzyme and other collagen-modifying enzyme mutants suggest a regulatory role in collagen processing and cuticle organization for this novel carboxypeptidase. These findings aid our understanding of cuticle formation during worm development.

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Extracellular matrix (ECM) is important in many biological processes, including cell-cell interactions, signal transduction, cell adhesion, and cancer metastasis. As a major component of ECM, collagens and collagen-like proteins comprise superfamilies in various species. Collagen synthesis requires eight specific post-translational enzymes, some of which are attractive targets for the development of drugs to inhibit collagen accumulation in fibrotic diseases [1]. To date, more than 1300 mutations have been characterized in the human collagen genes in various diseases [2], including osteogenesis imperfecta (OI), many chondrodysplasias, several subtypes of Ehlers-Danlos syndrome, Alport syndrome, Bethlem myopathy, certain subtypes of epidermolysis bullosa, Knobloch syndrome, osteoporosis, arterial aneurysms, osteoarthritis, and intervertebral disc disease [1]. Collagen IV is directly involved in a number of genetic and acquired disease such as Alport's and Goodpasture's syndromes [3]. Knobloch syndrome is caused by pathogenic mutations in the COL18A1 gene [4]. Mutations in COL11A2 cause a non-ocular Stickler syndrome by affecting

chondrogenic tissues [5]. OI is a generalized disorder of connective tissue characterized by fragile bones, and most cases of OI are caused by mutations in type I collagen [6].

Caenorhabditis elegans is a powerful model to study ECM organization because development of the worm includes four molting processes from L1 larva to adult, and each molting stage involves destruction and synthesis of cuticles [7]. Mutations in collagen and modifying enzyme genes result in defects ranging from abnormal morphology such as *Dpy* (dumpy), *Lon* (long), and *Bli* (blister) to lethality. *C. elegans* has approximately 175 cuticle collagens and two basement membrane type IV collagens [2]. Most collagens are synthesized by hypodermal cells and seam cells, except for two basement membrane collagens which are synthesized by body wall muscle cells [8]. These proteins are then secreted and assembled on the apical surface of the hypodermis to form a complex multi-layered structure [9,10]. The cuticle collagens are most similar to the vertebrate non-fibrillar FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) collagens [11]. The collagen-modifying enzymes in *C. elegans* include three hydroxylases, two glycosyltransferases, two proteinases to cleave the N and C propeptides, oxidase to initiate crosslink formation, and protein disulfide isomerase (PDI) [12]. The identification of new collagen-modifying enzymes and their functions is in progress. Here, we identified a novel carboxypeptidase that functions in cuticle formation and body morphogenesis in *C. elegans*, possibly through collagen processing.

* Corresponding authors. Address: Department of Biology, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea. Fax: +82 2 393 4863 (J.W. Cho). Fax: +82 31 920 2002 (J. Shim).
 E-mail addresses: chojw311@yonsei.ac.kr (J.W. Cho), jaegal@yocore.kr (J. Shim).

UEV-1 Is an Ubiquitin-Conjugating Enzyme Variant That Regulates Glutamate Receptor Trafficking in *C. elegans* Neurons

Lawrence B. Kramer^{1,4}, Jaegal Shim², Michelle L. Previtera^{3,4}, Nora R. Isack¹, Ming-Chih Lee¹, Bonnie L. Firestein³, Christopher Rongo^{1*}

1 The Waksman Institute, Department of Genetics, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, United States of America, **2** Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Goyang, Korea, **3** Department of Cell Biology and Neuroscience, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, United States of America, **4** Graduate Program in Molecular Biosciences, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, United States of America

Abstract

The regulation of AMPA-type glutamate receptor (AMPA) membrane trafficking is a key mechanism by which neurons regulate synaptic strength and plasticity. AMPAR trafficking is modulated through a combination of receptor phosphorylation, ubiquitination, endocytosis, and recycling, yet the factors that mediate these processes are just beginning to be uncovered. Here we identify the ubiquitin-conjugating enzyme variant UEV-1 as a regulator of AMPAR trafficking *in vivo*. We identified mutations in *uev-1* in a genetic screen for mutants with altered trafficking of the AMPAR subunit GLR-1 in *C. elegans* interneurons. Loss of *uev-1* activity results in the accumulation of GLR-1 in elongated accretions in neuron cell bodies and along the ventral cord neurites. Mutants also have a corresponding behavioral defect—a decrease in spontaneous reversals in locomotion—consistent with diminished GLR-1 function. The localization of other synaptic proteins in *uev-1* mutant interneurons appears normal, indicating that the GLR-1 trafficking defects are not due to gross deficiencies in synapse formation or overall protein trafficking. We provide evidence that GLR-1 accumulates at RAB-10-containing endosomes in *uev-1* mutants, and that receptors arrive at these endosomes independent of clathrin-mediated endocytosis. UEV-1 homologs in other species bind to the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 to create K63-linked polyubiquitin chains on substrate proteins. We find that whereas UEV-1 can interact with *C. elegans* UBC-13, global levels of K63-linked ubiquitination throughout nematodes appear to be unaffected in *uev-1* mutants, even though UEV-1 is broadly expressed in most tissues. Nevertheless, *ubc-13* mutants are similar in phenotype to *uev-1* mutants, suggesting that the two proteins do work together to regulate GLR-1 trafficking. Our results suggest that UEV-1 could regulate a small subset of K63-linked ubiquitination events in nematodes, at least one of which is critical in regulating GLR-1 trafficking.

Citation: Kramer LB, Shim J, Previtera ML, Isack NR, Lee MC, et al. (2010) UEV-1 is an Ubiquitin-Conjugating Enzyme Variant That Regulates Glutamate Receptor Trafficking in *C. elegans* Neurons. PLoS ONE 5(12): e14291. doi:10.1371/journal.pone.0014291

Editor: Brian D. McCabe, Columbia University, United States of America

Received: June 2, 2010; **Accepted:** November 18, 2010; **Published:** December 13, 2010

Copyright: © 2010 Kramer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The manuscript was funded by a grant from the National Institutes of Health (R01 NS42023) to CGR and a grant from the National Science Foundation (IBN-0548343) to BLF. MFP was supported by the IGERT Program on Biointerfaces, by National Science Foundation grant DGE-0333196, and by a Louis Bevier Dissertation Fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: rongo@waksman.rutgers.edu

Introduction

Excitatory synaptic communication in the central nervous system is mediated by the neurotransmitter glutamate and the glutamate receptor ion channels that receive and propagate glutamatergic signaling at the postsynaptic membrane [1]. Glutamatergic synapses show substantial plasticity, becoming dynamically weakened or strengthened in an activity dependent manner [2–6]. The trafficking of glutamate receptors, particularly AMPA-type receptors (AMPA), in and out of the postsynaptic membrane is emerging as a key mechanism underlying synaptic and behavioral plasticity [5,7]. Thus, robust molecular and cellular models for learning and memory will require a full understanding of the various mechanisms and molecules that regulate AMPAR trafficking.

AMPA trafficking involves several steps, including initial delivery to the synaptic membrane, anchoring, endocytosis, and

finally sorting either to the lysosomal pathway for degradation or to the synaptic membrane via various recycling pathways [8,9]. AMPARs are tetrameric [10], and each subunit has cytoplasmic tail sequences that determine its subcellular trafficking [11–16]. These tail sequences direct both AMPAR endocytosis and exocytosis in response to neural activity by interacting with kinases and phosphatases, PDZ scaffolding molecules, and the endocytosis machinery [2,17,18].

The Ubiquitin Proteasome System (UPS) also regulates AMPAR trafficking [18–20]. AMPARs, like many membrane proteins, can be post-translationally modified by the addition of single ubiquitin molecules (monoubiquitination) [21]. Monoubiquitination often serves as a signal for their internalization [19,22,23]. In addition, polyubiquitination can occur through the addition of new ubiquitin molecules to the final ubiquitin molecule in a growing polyubiquitin chain that is initially attached

Tyrosylprotein Sulfotransferase Regulates Collagen Secretion in *Caenorhabditis elegans*

Tai Hoon Kim^{1,2}, Do Hyun Kim^{1,3}, Hyung Wook Nam³, Sang Yoon Park^{1,3}, Jaegal Shim^{2,*}, and Jin Won Cho^{1,3,4,*}

The sulfation of tyrosine residues is an important post-translational modification involved in the regulation of protein function. We examined the activity of worm tyrosylprotein sulfotransferase (TPST-1) on a typical cuticle collagen, ROL-6, in *C. elegans*. We verified that TPST-1 sulfates three tyrosine residues of ROL-6 *in vitro*. We found that these tyrosine residues are important for the secretion of ROL-6::GFP. Mutant ROL-6::GFP proteins that contain more than two substitutions of the target tyrosine residues are severely deficient in cuticle localization. Consistently, knock down of *tpst-1* blocked the cuticle localization of ROL-6::GFP. Therefore, the sulfation of ROL-6 by TPST-1 is critical for the proper localization of ROL-6. We also confirmed that worm TPST-1 is localized to the trans-Golgi network (TGN). Our results indicate that TPST-1 regulates cuticle organization by promoting the transport of ROL-6 from the TGN to the cuticle.

INTRODUCTION

Post-translational modifications are important mediators of protein function. Recently, protein sulfation has been recognized as a widespread post-translational modification in multicellular organisms. The sulfation of tyrosine residues occurs almost exclusively on secreted and transmembrane spanning proteins (Hutner, 1988). This modification occurs on the luminal side of the trans-Golgi network (TGN). Two tyrosylprotein sulfotransferases (TPST1 and TPST2), which catalyze tyrosine sulfation, have been identified in humans. Both human TPST enzymes contain a highly conserved sulfotransferase domain (Marchler-Bauer and Bryant, 2004).

Tyrosine sulfation is a determinant of protein-protein interactions and is involved in leukocyte adhesion, hemostasis, and chemokine signaling (Kehoe and Bertozzi, 2000). Tyrosine sulfation has been studied in secretory proteins, such as gastrin, cholecystokinin (CCK), and neuropeptides, which are regulated by multiple post-translational modifications. Progastrin is partially sulfated at the TGN, and the tyrosine sulfation

promotes the proteolytic process (Bundgaard et al., 1995). Pro-CCK also passes through the regulated secretory pathway and undergoes tyrosine sulfation (Beinfeld, 2003). Recently, functional studies of TPST at the organism level have been conducted in mice. TPST1-deficient mice exhibit reduced body weight and increased frequencies of post-implantation fetal death (Ouyang et al., 2002), while TPST2-deficient mice exhibit male infertility (Borghel et al., 2006). A mutation in TPST2 causes the dwarfism associated with hypothyroidism (Sasaki et al., 2007) and a double deficiency of TPST1 and TPST2 results in early postnatal pulmonary failure and primary hypothyroidism in mice (Westmuckett et al., 2008). Thus, tyrosine sulfation facilitates a myriad of diverse biological processes.

To further elucidate the biological roles of TPST and protein sulfation, we employed *Caenorhabditis elegans*. The major phenotype of *tpst* knock down by RNAi in *C. elegans* is a molting defect (Kim et al., 2005). Since *C. elegans* cuticle formation involves many post-translational modifications of collagens and *tpst-1* RNAi suppressed the *rol-6* phenotype of the *rol-6* mutant, we hypothesized that ROL-6 is a likely target of protein sulfation by TPST-1. In the present study, we demonstrate that ROL-6 sulfation by TPST-1 is important for cuticle formation, as it regulates the secretion and function of ROL-6.

MATERIALS AND METHODS

Analysis of protein sulfations by *C. elegans* TPST-1

A TPST-1 cDNA excluding the transmembrane region was cloned into the pcDNA3.1 (+) vector. The following primers were used to amplify *tpst-1* cDNA: 5'-GGAATTCGACGACCGTACTACAGTAAA-3' and 5'-ATCTAGACTATAATTTTCGACTTTCATTATC-3'. His-TPST-1 fusion proteins were expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and purified on Ni-NTA agarose beads (NEB, USA). The lysate of untransfected HEK 293 cells was used as a control. Western blot analysis using anti-His antibodies produced a single band of approximately 50 kDa. Treating the purified protein with N-glycosidase-F resulted in a band of 47 kDa, which indicated

¹Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ²Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Goyang 411-769, Korea, ³Protein Network Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ⁴World Class University Program, Department of Biomedical Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*Correspondence: Jaegal Shim (jshim@ncrc.re.kr) (JS); chojw311@yonsei.ac.kr (JWC)

Received December 7, 2009; accepted December 17, 2009; published online March 8, 2010

Keywords: *C. elegans*, collagen, protein sulfation, ROL-6, TPST-1



Functional analysis of pyrimidine biosynthesis enzymes using the anticancer drug 5-fluorouracil in *Caenorhabditis elegans*

Seongseop Kim^{1,*}, Dae-Hun Park^{2,*}, Tai Hoon Kim¹, Moogak Hwang¹ and Jaegal Shim¹

¹Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Gyeonggi-do, Korea

²College of Pharmacy, Kangwon National University, Gangwon-do, Korea

Keywords

5-fluorouracil; *C. elegans*; UMPK; UMPS; uridine phosphorylase

Correspondence

J. Shim, Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, 309 Madu 1-dong, Goyang-si, Gyeonggi-do, 411-768, Korea

Fax: +82 31 920 2002

Tel: +82 31 920 2282

E-mail: jega@ncc.re.kr

*These authors contributed equally to this work

(Received 19 May 2008, revised 22 June 2008, accepted 24 June 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.07168.x

Pyrimidine biosynthesis enzymes function in many cellular processes and are closely associated with pyrimidine antagonists used in cancer chemotherapy. These enzymes are well characterized from bacteria to mammals, but not in a simple metazoan. To study the pyrimidine biosynthesis pathway in *Caenorhabditis elegans*, we screened for mutants exhibiting resistance to the anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU). In several strains, mutations were identified in ZK783.2, the worm homolog of human uridine phosphorylase (UP). UP is a member of the pyrimidine biosynthesis family of enzymes and is a key regulator of uridine homeostasis. *C. elegans* UP homologous protein (UPP-1) exhibited both uridine and thymidine phosphorylase activity *in vitro*. Knockdown of other pyrimidine biosynthesis enzyme homologs, such as uridine monophosphate kinase and uridine monophosphate synthetase, also resulted in 5-FU resistance. Uridine monophosphate kinase and uridine monophosphate synthetase proteins are redundant, and show different, tissue-specific expression patterns in *C. elegans*. Whereas pyrimidine biosynthesis pathways are highly conserved between worms and humans, no human thymidine phosphorylase homolog has been identified in *C. elegans*. UPP-1 functions as a key regulator of the pyrimidine salvage pathway in *C. elegans*, as mutation of *upp-1* results in strong 5-FU resistance.

Introduction

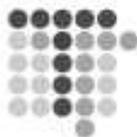
Enzymes responsible for pyrimidine biosynthesis play critical roles in cellular metabolism, because they provide the pyrimidine nucleosides that are key components of many biomolecules, such as RNA and DNA. Pyrimidine metabolism disorders can cause diseases such as orotic aciduria, which results from uridine monophosphate synthetase (UMPS) deficiency [1].

There are two routes for synthesizing pyrimidines: *de novo* and salvage pathways. Many genes encoding pyrimidine salvage pathway enzymes are genetic factors influencing pyrimidine antagonist-based cancer chemotherapy [2].

5-Fluorouracil (5-FU) is a major pyrimidine antagonist that has been used for more than 40 years in

Abbreviations

5dFUR, 5'-deoxy-5-fluorouridine; 5-FU, 5-fluorouracil; DPD, dihydropyrimidine dehydrogenase; dRib1P, 2-deoxy-4-oxoribose 1-phosphate; GFP, green fluorescent protein; MBP, maltose-binding protein; DMPDC, orotate monophosphate decarboxylase; DPRT, orotate phosphoribosyl transferase; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate; RNAi, RNA interference; SEM, standard error of the mean; SNP, single-nucleotide polymorphism; TK, thymidine kinase; TP, thymidine phosphorylase; TS, thymidylate synthase; UMPK, uridine monophosphate kinase; UMPS, uridine monophosphate synthetase; UP, uridine phosphorylase.



Biological Safety and B Cells Activation Effects of *Stephania delavayi* Diels.

Dae-Hun Park^{1,*}, Yong-Chun Li^{1,2,*}, Jaegal Shim³,
Hong De Xu², Lan LF, Min-Jae Lee²
& Myung-Sang Kwon^{2,4}

¹Korea Institute of Oriental Medicine, 461-24, Jeonmin-dong,
Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Korea

²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University,
192-1 Myoja-dong, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, Korea

³Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center,
809 Medu-dong, Goyang-si, Gyeonggi-do 411-789, Korea

⁴Korea Institute of Toxicology, Sinseongno 19 Yuseong-gu,
Daejeon 305-343, Korea

*These authors contributed equally to this work

Correspondence and requests for materials should be addressed
to M. J. Lee (mjlee@kangwon.ac.kr),
and M. S. Kwon (sangkwon@kitox.re.kr)

Accepted 30 January 2009

Abstract

Stephania delavayi Diels. has been used as an immune activator or an anti-inflammatory drug in China. We examined the immune modulation effect and 7-days repeated-dose toxicity to validate its biological safety and efficiency. Mice were repeatedly administered with 50 mg/kg *S. delavayi* Diels. daily by I.P for 7 days. *S. delavayi* Diels. induced B cell activation but had no effect on other immune cells such as T cell, natural killer (NK) cell, and macrophage (M ϕ). *S. delavayi* Diels.-treated group exhibited no statistical significance from the control group in physical conditions; body weight, complete blood count (CBC), serum biochemical indexes etc. There was no difference between the control group and *S. delavayi* Diels.-treated group in gross findings such as histopathological alteration. In conclusion, *S. delavayi* Diels. is safe above the dose of immune modulation.

Keywords: *Stephania delavayi* Diels., Biological safety, Mice, Immunomodulation

Stephania genus is a herb which belong to in Menispermaceae family Dicotylendons classes and includes

several species having various pharmacological effects. *Stephania cepharantha* Hayata (*S. cepharantha* Hayata) suppressed arachidonic acid-induced inflammation¹ and *Stephania delavayi* Diels. (*S. delavayi* Diels.) is and has been used for relieving pain and curing acute gastroenteritis in China². *S. cepharantha* Hayata was fractionated into several molecules, but *S. delavayi* Diels. was not. Nevertheless, *S. delavayi* Diels. is a component of Immunsan[®] which is an immune stimulator and an element of PC-SPEs which is a drug for prostate cancer treatment^{3,4}. Although it has been used for a long time, biological safety and the mode of action are not clear. Thus, we confirmed immunity-related action mechanism and 7-days repeated-dose toxicity.

Immune response consists of humoral immune response and cell-mediated immune response; humoral immune response is governed by B cells and cell-mediated is done by T cells⁵. B cells play a role of making antibodies against antigens and then they take charges of adaptive immunity. In traditional medicine, there are many prescriptions for modulating the immune system such as Gamipaemo-tang⁶ and Cocheon-gryong-tang⁷. Recently researches for elucidating the action mechanism and confirming biological safety are increased.

We confirmed the biological safety of *S. delavayi* Diels. through the appearance judge, the change of body weight, CRC, serum biological indexes, histopathological signs etc.

S. delavayi Diels. Reduces Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated B Cell Proliferation and Induces CD19 Activation

In *S. delavayi* Diels.-treated mice, the immune response was suppressed by treating LPS as a B-cell mitogen in a time-dependent manner (Figure 1A). *S. delavayi* Diels. impaired LPS-induced B cell stimulation. LPS-induced B cell proliferation was enhanced at 48 hr than at 24 hr ($P < 0.05$ vs. corresponding vehicle). Neither a T cell stimulator concanavalin A (ConA) nor a poke weed mitogen (PWM) helping T and B cell stimulation, affects the proliferation of lymphocytes in the presence of *S. delavayi* Diels. (Figure 1B).

Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase Levels Are Associated with Response to 5-Fluorouracil in *Caenorhabditis elegans*

Seongseop Kim^{1,3}, Dae-Hun Park^{1,2,3}, and Jaegal Shim^{1,*}

5-Fluorouracil (5-FU), a pyrimidine antagonist, has a long history in cancer treatment. The targeted pyrimidine biosynthesis pathway includes dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), which converts 5-FU to an inactive metabolite, and thymidylate synthase (TS), which is a major target of 5-FU. Using *Caenorhabditis elegans* as a model system to study the functional and resistance mechanisms of anti-cancer drugs, we examined these two genes in order to determine the extent of molecular conservation between *C. elegans* and humans. Overexpression of the worm DPD and TS homologs (DPYD-1 and Y110A7A.4, respectively) suppressed germ cell death following 5-FU exposure. In addition, DPYD-1 depletion by RNAi resulted in 5-FU sensitivity, while treatment with Y110A7A.4 RNAi and 5-FU resulted in similar patterns of embryonic death. Thus, the pathway of 5-FU function appears to be highly conserved between *C. elegans* and humans at the molecular level.

INTRODUCTION

The anti-cancer drug, 5-fluorouracil (5-FU), has been used for more than 40 years as a cancer therapy for colorectal, stomach, ovarian, and head and neck cancers. In fact, 5-FU is still a mainstay drug for the treatment of colorectal cancer. 5-FU induces cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells by inhibiting both RNA function and DNA synthesis. Like other pyrimidine antagonists, 5-FU is a pro-drug and is converted to an active drug via the pyrimidine biosynthesis pathway. Therefore, the function of this drug is depended on the activities of the pyrimidine synthesis enzymes including dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidylate synthase (TS), uridine phosphorylase (UP), thymidine phosphorylase (TP), uridine monophosphate kinase (UMPK), and orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) (Mating et al., 2005).

Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), one of the first responding enzymes, is a rate-limiting enzyme for 5-FU catabo-

lism and is related to tumor sensitivity (Beck et al., 1994). The expression and activity of this enzyme are very high in the liver. DPD converts 5-FU to the inactive metabolite 5, 8-dihydrofluorouracil (DHFU). About 80 to 90 percent of the 5-FU dose is catalyzed by DPD in the liver. Expression levels of DPD in cancer cells are closely related to 5-FU sensitivity (Ishikawa et al., 1999). As a result, 5-FU toxicity is accompanied by suppression of bone marrow, diarrhea, alopecia, and nausea, and these side effects are more severe in patients exhibiting low DPD expression (Katona et al., 1998). Indeed, in patients with a DPD enzyme deficiency, 5-FU chemotherapy is associated with severe, life-threatening toxicity (Hooiveld et al., 2004).

On the other hand, high expression of thymidylate synthase (TS), which is the major target enzyme of 5-FU, in cancer cells leads to resistance to 5-fluorouracil (Habara et al., 2001). Recently, single nucleotide polymorphisms in the tandem repeats in the 5' upstream region of the TS gene were found to affect TS expression. Interestingly, cancer cells that express low levels of TS exhibit 5-FU sensitivity (Morganti et al., 2005). Expression of TS is induced by 5-FU and is regulated by the cell cycle-specific transcription factor E2F (Ohtama et al., 2002). TS has been shown to function as a translational regulator of cellular gene expression and to interact with several cellular proteins including p53 (Liu et al., 2002; Wu et al., 2004). As a result, TS has been implicated as a biomarker for prognosis in pyrimidine antagonist therapy. Other reports, however, have indicated an incongruity between viability and TS expression level (Nita et al., 1998) as well as a discrepancy between TS mRNA and protein levels (Miyamoto et al., 2001). Nevertheless, the expression levels of TS are closely related to 5-FU function and resistance in general. Therefore, many trials have been conducted to develop direct TS inhibitors such as raltitrexed (Rustum et al., 1997).

In this study, we examined the anti-cancer drug resistance mechanism in cancer cells using *C. elegans* as a genetic model. Although *C. elegans* has been used as a model system in pharmacogenetics and chemical genetics, this organism has

¹Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Goyang 411-769, Korea, ²Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea, ³These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: jaegal@ncc.re.kr

Received February 18, 2008; revised June 25, 2008; accepted June 30 2008; published online July 9, 2008

Keywords: 5-fluorouracil, *C. elegans*, dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase

A Forward Genetic Approach for Analyzing the Mechanism of Resistance to the Anti-Cancer Drug, 5-Fluorouracil, Using *Caenorhabditis elegans*

Seongseop Kim and Jaegal Shim*

Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Goyang 411-769, Korea.

(Received August 27, 2007; Accepted September 13, 2007)

Pyrimidine antagonists including 5-Fluorouracil (5-FU) have been used in chemotherapy for cancer patients for over 40 years. 5-FU, especially, is a mainstay treatment for colorectal cancer. It is a pro-drug that is converted to the active drug via the nucleic acid biosynthetic pathway. The metabolites of 5-FU inhibit normal RNA and DNA function, and induce apoptosis of cancer cells. One of the major obstacles to successful chemotherapy is the resistance of cancer cells to anti-cancer drugs. Therefore, it is important to elucidate resistance mechanisms to improve the efficacy of chemotherapy. We have used *C. elegans* as a model system to investigate the mechanism of resistance to 5-FU, which induces germ cell death and inhibits larval development in *C. elegans*. We screened 5-FU resistant mutants no longer arrested as larvae by 5-FU. We obtained 18 mutants out of 72,000 F1 individuals screened, and mapped them into three complementation groups. We propose that *C. elegans* could be a useful model system for studying mechanisms of resistance to anti-cancer drugs.

Keywords: 5-Fluorouracil; Anti-Cancer Drug; *C. elegans*; Mutant Screen; Resistance.

Introduction

5-Fluorouracil (5-FU) has been used for over 40 years for treating various cancers including colorectal, stomach, ovarian, head and neck cancers. It is a classical pyrimidine antagonist. Various other pyrimidine antagonists, such as Capecitabine and Tegafur, have been developed and are now used in cancer chemotherapy (Maring et al., 2005). 5-

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-920-2262; Fax: 82-31-920-2002
E-mail: jaegal@ncc.re.kr

FU-based chemotherapy improves the overall and disease-free survival of patients, but response rates as a first-line treatment for advanced colorectal cancer are not high. The combination of 5-FU with newer chemotherapies such as Irinotecan and Oxaliplatin has improved response rates for advanced colorectal cancer (Longley et al., 2003).

5-FU is a pro-drug converted to the active drug by metabolism. The efficacy of 5-FU differs depending on dosage and administration schedule. For example, 5-FU inhibits RNA function when it is administered by bolus; when it is administered by continuous infusion, it binds to thymidylate synthase and inhibits DNA synthesis. 5-FU is also bio-modified by other materials such as Leucovorin that increase its efficacy. Leucovorin slows the catabolism of 5-FU via the TS-FU-FdUMP complex (Rich et al., 2004). The major pathway by which 5-FU induces apoptosis of cancer cells is via the active metabolite of 5-FU, fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), which binds Thymidylate Synthase (TS) to form a stable ternary complex. TS converts dUMP to dTMP by methylation and regulates the balance of these two nucleic acid precursors. Inactivation of TS by FdUMP increases dUTP and promotes the mis-incorporation of dUMP into DNA. The resulting DNA damage induces cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells (Maring et al., 2005; Peters et al., 2002).

Anti-cancer drug resistance is a major problem in chemotherapy; it is classified into intrinsic and acquired resistance. Anti-cancer drug resistance can result from various causes including alteration of drug influx and efflux, enhancement of drug inactivation and mutation of the drug target (Longley and Johnston, 2005). 5-FU resistance mechanisms are relatively well understood. The enzymes of the pyrimidine salvage pathway including

Abbreviations: dTMP, deoxy thymidine monophosphate; dUTP, deoxy uridine triphosphate; SNP, single nucleotide polymorphism.