

최종보고서 [기관고유연구사업]

과제고유번호	1310100	연구분야 (코드)	1-3	지원 프로그램	기반구축	공개가능여부 (공개, 비공개)	공개
연구사업명	국립암센터 기관고유연구사업						
연구과제명	암모델 유전자변형 마우스 개발 및 활용 II						
과제책임자	성명	이호	소속	시스템종양생물학 과	직위	부교수	
세부과제	구분	과제명			과제책임자		
		성명	소속(직위)	전공			
	(1세부)						
	(2세부)						
	(3세부)						
총연구기간	2013년 1월 ~ 2015년 12월 (총 3년)		해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발 비	연구비: 천원 민간: 천원 계: 천원	
			총연구기간 참여 연구원 수	총: 11명 내부: 8명 외부: 3명	총연구개발 비	연구비: 600,000천원 민간: 천원 계: 천원	
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립암센 터	기업부담금		
	계	2013.1.1.~2015.12.31	600,000	600,000	소계	현금	현물
	제1차	2013.1.1.~2013.12.31	200,000	200,000			
	제2차	2014.1.1.~2014.12.31	200,000	200,000			
	제3차	2015.1.1.~2015.12.31	200,000	200,000			
참여기업	참여기업명 :						
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:		
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:		

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

2015년 10월 28일

과제책임자 : 이 호 (인)

국립암센터원장 귀하

< 국문 요약문 >

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><최종목표> 항암타겟 유전자의 검증과 약효 예측을 위한 암모델 마우스 개발 및 이를 활용한 발암 기작 연구</p> <p><연구내용></p> <ul style="list-style-type: none"> • 유전자변형 마우스 개발 및 분석 총 12 종/3년 • 면역결핍 마우스 개발 및 분석 ; TopBP1 cK0, EMBO J 2014 교신저자 발표 • 배아줄기세포 조절 유전자 분석 ; Pontin cK0, Nat Commun 2015 교신저자 발표 • 간질환 조절 유전자 분석; Ssu72 cK0, Hepatology 2015 교신저자 발표 • 암모델 마우스 은행 운용 (총 60 여종) 및 분양 (총 20 여종) • 마우스 모델 정자 동결 보존 (50 여종) 																
<p>연구개발성과</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="464 857 1401 1037"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>12/3</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>95.9/24</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td>국내외 학술대회 발표</td> <td>8회</td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p> <p><정성적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> • 유전자변형 마우스 개발 및 분석 총 12 종/3년 					구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	12/3	400	IF 합	95.9/24	400	기타 성과	국내외 학술대회 발표	8회
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)															
SCI 논문 편수	12/3	400															
IF 합	95.9/24	400															
기타 성과	국내외 학술대회 발표	8회															
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p><input type="checkbox"/> 외부와의 공동연구 활성화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 현재 잘 갖추어진 국립암센터의 Tg.K0 마우스 인프라를 활용하여, 외부의 선도적인 연구를 진행하는 연구팀과 공동연구를 진행. • in vitro 연구가 활발히 진행되고 있거나 이행성 연구에 적합한 외부 연구 팀 발굴 및 공동 연구 진행. • <p><input type="checkbox"/> 국립암센터 기관 내, 암모델 마우스 연구 활성화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 환자 시료에서 도출된 신규 암유전자의 in vivo validation, drug modeling 등을 수행하는데 활용. • 암모델마우스를 자체 개발, 유지할 수 있는 시스템이 갖추어 졌기 때문에, 새로운 기능의 유전자나 타겟이 발굴 되었을 때, 자체적인 연구가 가능함. • 자체 마우스 facility에서 마우스 모델 제작이 진행되기 때문에 시간과 비용을 현격히 줄일 수 있음. 																
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>암모델 마우스</p>	<p>유전자변형마우스</p>	<p>암유전자</p>	<p>암모델마우스 은행</p>													

< 영문 요약문 >

< SUMMARY >

<p>Purpose& Contents</p>	<p><Research purpose> The aim of this project is to construct and operate the system for developing cancer models using mouse knockout system.</p> <p><Research contents></p> <ul style="list-style-type: none"> • Generation and analysis of GEM models, total 12 kinds • Analysis of immuno-deficient mouse models ; TopBP1 cK0, EMBO J 2014 corresponding author • Analysis of Pontin cK0 mouse and ES cells, Nat Commun 2015 corresponding author • Analysis of liver disease model; Ssu72 cK0, Hepatology 2015 corresponding author • Operation of mouse cancer models (about 60 kinds) • Sperm freezing of mouse models (about 50 kinds) 																
<p>Results</p>	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" data-bbox="419 898 1353 1093"> <thead> <tr> <th></th> <th>Results/goals¹⁾</th> <th>Achievement(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>The number of SCI paper</td> <td>12/3</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>Sum of IF</td> <td>95.9/24</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>Etc</td> <td>Academic presentation</td> <td>8 times</td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간 내 목표연구성과로 기 제출한 값</p> <p><정성적 성과></p> <ul style="list-style-type: none"> • Generation and analysis of GEM models, total 12 kinds 						Results/goals ¹⁾	Achievement(%)	The number of SCI paper	12/3	400	Sum of IF	95.9/24	400	Etc	Academic presentation	8 times
	Results/goals ¹⁾	Achievement(%)															
The number of SCI paper	12/3	400															
Sum of IF	95.9/24	400															
Etc	Academic presentation	8 times															
<p>Expected Contribution</p>	<p>These GEMs will be used in the functional analysis of the oncogenes and/or tumor suppressors, and are expected to be used as mouse cancer models. Collectively these mice are useful in cancer research and in revealing the gene's function. Furthermore to developing mouse models will be the technical base to developing other mouse models.</p>																
<p>Keywords</p>	<p>Mouse cancer model</p>	<p>Genetically engineered mouse</p>	<p>oncogene</p>	<p>Mouse repository</p>													

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	2
3. 연구수행 내용 및 결과	3
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	18
5. 연구결과의 활용계획 등	19
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	20
7. 연구개발과제의 대표적 연구실적	24
8. 참여연구원 현황	26
9. 기타사항	26
10. 참고문헌	27

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 항암타겟 유전자의 검증과 약효 예측을 위한 암모델 마우스 개발 및 이를 활용한 발암 기작 연구

1-2. 연구개발의 필요성

- 수 년동안 활발하게 운용되고 있는 "국립암센터 GEM facility"의 시스템과 인력을 유지하기 위해서는 지속적인 기관의 지원이 필요한 상황이며, 후속 연구 과제를 수행함으로써 현 시스템을 유지 발전시키고자 함.
- 국립암센터 기관고유사업의 지원을 받아 지난 6-7년에 걸쳐 transgenic/knockout mouse facility가 구축되었고, 인력이나 노하우 면에서 안정화 단계에 접어들었다 할 수 있음.
- 30여개의 유전자에 대해 40 여종의 targeting을 진행하였고 모두 germline transmission에 성공하였음. 이와 같은 결과에서 국립암센터 transgenic/knockout mouse facility는 안정화 단계에 접어들었다 판단할 수 있음.
- 지난 5년 동안 (2010년~2015년) Tg/KO 마우스를 이용한 논문이 총 20편 (IF 합 > 100) 발표되었으며, 평균 IF가 8.0으로 질적으로 높은 수준을 유지함.
- 그동안 기관고유사업을 통해 잘 갖추어진 현재 Tg/KO 시스템을 잘 유지하고 활용하는 것이 마우스 모델을 이용한 암연구뿐만 아니라 이행성 연구에도 필수적이다 판단됨.

1-3. 연구개발 범위

- 공공개방형 암 연구 인프라 운용; 외부 기관은 우수연구 성과 공유 및 마우스 모델을 활용한 연구 성과 도출
- 기관 내 뿐만 아니라 기관 외 연구자들과의 공동연구 추진
- 새로운 암모델 유전자변형 마우스 개발 및 분석
- 새로운 항암 유전자에 대한 유전자 변형 마우스 개발
- knockout, knockin, transgenic 마우스 모델 개발
- CRISPR/Cas9 등 신기술 도입을 위한 연구

2. 국내외 기술개발 현황

1. 국내 주요 연구기관의 연구동향 : 인간질환 모사 마우스 모델 개발

- 국내 인간질환 모사 마우스 모델을 자체적으로 개발한 연구그룹은 KAIST, KIST, 가천의대 등 몇 곳에 제한됨.
- 더욱이 이들 대학의 연구 그룹은 연구인력의 이동 등의 이유로 원천기술의 유지에 어려움을 겪고 있음.
- 또한 외부와의 공동연구 또한 진행이 거의 불가능한 상태임.
- 제한된 시설, 연구팀, 인력 등의 문제로 다양한 종류의 마우스 모델 제작이 이루어 지지 않고 있으며, 노하우 또한 축적되지 않는 상황임.

2. 국내 주요 연구 그룹 : 마우스 모델 표현형 분석

- 타 연구자의 연구를 위하여 공동연구 등의 방법으로 마우스 모델 생산한 경험이 있는 기관은 국립암센터, 한국생명공학연구원, 서울대, 연세대, 이화여대, KAIST, KIST 등 소수에 국한됨.
- 국내에서 연구에 활용되는 마우스 모델은 대부분 외국에서 들여왔거나 공동연구자에 의해 개발된 것으로, 최신 연구에 적합하게 개발되어진 마우스 모델은 한정되어 있음.
- 제한된 국내 여건 상, 최신 연구에 적합한 마우스 모델 제작 또한 여의치 않고 3-5만 불의 비용을 지급하고 외국에 의뢰하는 상황임.

3. 국립암센터 transgenic/knockout mouse facility 현황 및 결론

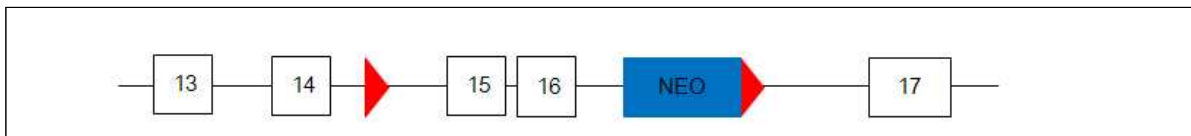
- 국립암센터 기관고유사업의 지원을 받아 지난 4-5년에 걸쳐 transgenic/knockout mouse facility가 구축되었고, 인력이나 노하우 면에서 안정화 단계에 접어들었다 할 수 있음.
- 20여개의 유전자에 대해 28종의 targeting을 진행하였고 28 종 모두 germline transmission에 성공하였음. 이와 같은 결과에서 국립암센터 transgenic/knockout mouse facility는 안정화 단계에 접어들었다 판단할 수 있음.
- 연간 4-5 개의 마우스 모델들이 신규 개발되고 있음.
- 암센터에서 신규로 개발된 마우스들이 본격적으로 표현형 분석이 진행되고 있는 상황이며, 일부 SCI 논문으로 발표되었거나 발표가 준비 중에 있음.
- 앞으로는 마우스 신규 개발 뿐만 아니라 표현형 분석에서도 더 많은 투자를 하여 impact 있는 연구를 진행하는 것이 목표임.

3. 연구수행 내용 및 결과

3.1. 유전자변형 마우스 모델 개발

3.1a. Ncapg2 cKO 마우스 개발

- Ncapg2; mitotic chromosome architecture를 구성하는 condensin-2 complex의 regulatory subunit임. Chromatid axis의 physical rigidity에 관여한다고 알려져 있음. Condensin complex는 mitotic chromosome assembly와 segregation에서 필수적인 역할을 수행하기에, Ncapg2는 chromosome instability에 영향을 줄 것으로 예상됨. 더욱이 여러 다양한 암에서 misregulation이 관찰됨.
- Exon15-16 양쪽에 loxP sequence를 삽입하여 Cre-loxP 재조합에 의해 Ncapg2 유전자 결손을 유도할 수 있음.
- 선행 연구 결과에서 확보된 ES cell clone을 microinjection하였고, 2013년 9월 chimera 마우스를 확보함.



- Ncapg2 gene targeting strategy. Exon 15-16 양쪽에 loxP sequence를 삽입하여 conditional knockout이 가능함.

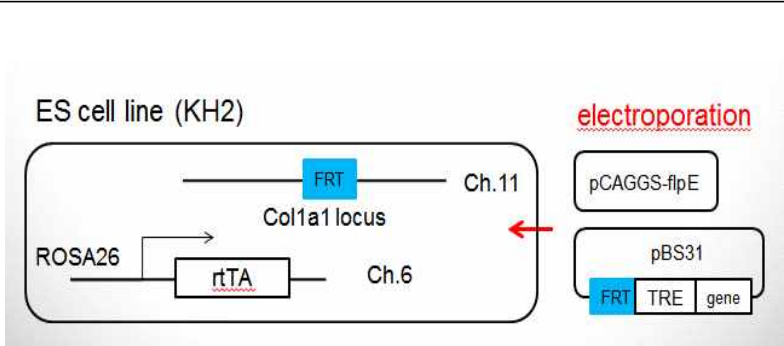
	<p>- 선행 연구 결과에서 확보된 ES cell을 microinjection하여 chimera 마우스 확보.</p>
--	---

3.2. Single-copy transgenesis 시스템 구축

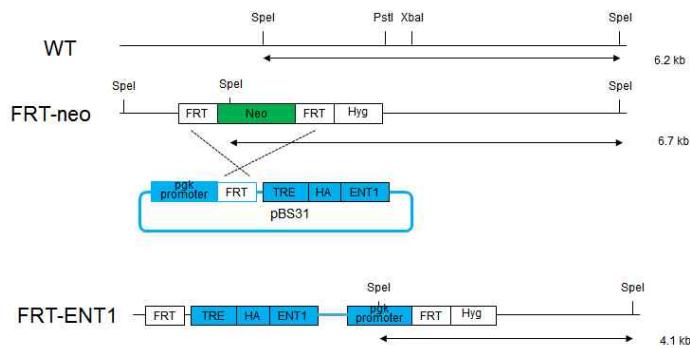
3.2a. KH2 ES cell line을 이용하여 Col1a1 locus에 Flp-mediated transgenesis 시스템 구축 (Tet-on 시스템)

- Pronuclei microinjection 방법을 이용한 transgenic 마우스 개발을 유전자 발현에 많은 제약이 따름. Random mutation, multicopy integration 등의 원인에 의해 유전자 발현이 안정적이지 않음.
- 이러한 단점을 극복하기 위해 ES cell을 활용한 single-copy transgenesis가 개발됨. 특히 MIT의 Rudolf Jaenisch 실험실에서 개발된 KH2 ES cell line을 다양한 장점을 가짐 (Cell, 2011, 145:145-158; Genesis, 2006, 44:23-28).
- KH2 ES cell line; Col1a1 3' UTR에 FRT sequence가 삽입된 ES cell line. FRT-Flp recombination에 의해 DNA를 single copy 삽입하기 때문에 매우 효율이 높고 ES cell identify가 용이함. 또한 ROSA26-rtTA를 포함하고 있기 때문에 TRE-transgene이 삽입된다면 doxycycline-dependent transgene expression을 유도할 수 있는 장점이 있음.

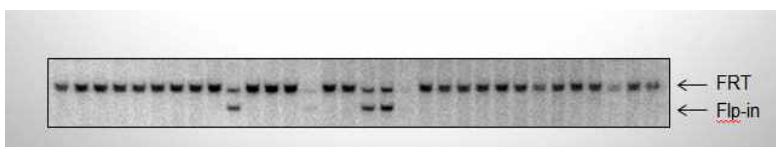
- 현재 KH2 ES cell을 취급하고 있는 미국 회사 (Mirus, 뉴욕)에서 ES cell을 도입하였음.
- 첫 시도로 TRE-transglutaminase2, TRE-ENT1, TRE-EAAT2 유전자를 KH2 ES cell의 Col1a1 locus에 넣음.



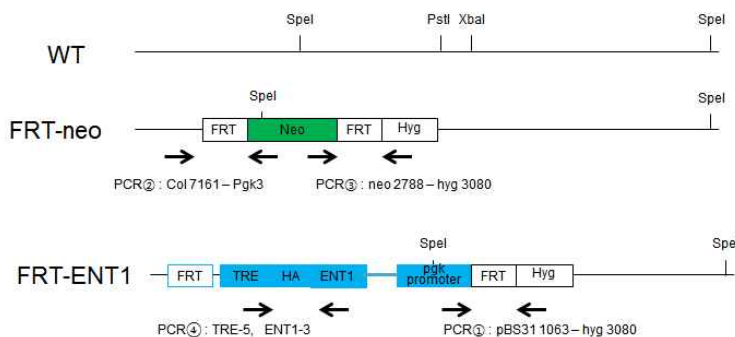
- KH2 ES cell line
- Col1a1 3' UTR에 FRT sequence가 삽입됨. Flp-FRT 재조합이 가능하기 때문에 transgene 삽입의 효율이 높음.
- 6번 염색체 ROSA26 locus에 rtTA 유전자도 가지고 있기 때문에 doxycycline dependent transgene expression도 가능함.



- pBS31 플라스미드에 FRT sequence가 포함되어 있기 때문에 FRT-Flp 재조합이 가능함. FRT-Flp 재조합이 정상적으로 일어난다면 ES cell을 hygromycin resistance 성질을 가짐.



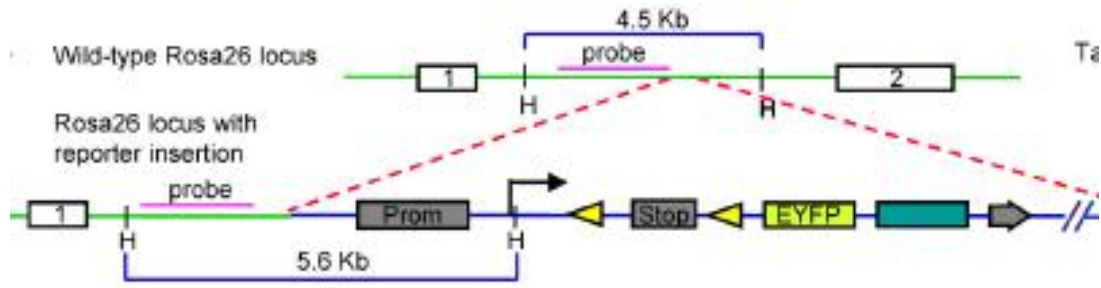
- FRT-Flp 재조합에 의해 transgene이 삽입된 것을 southern blot analysis를 통해 확인함.



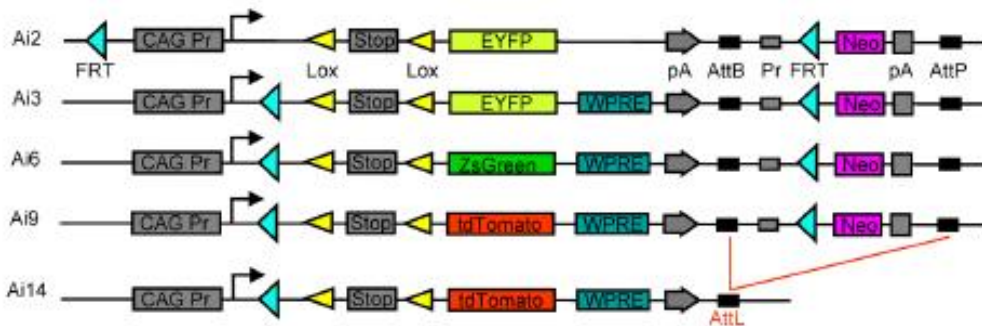
- Targeted ES cell을 확인하기 위한 PCR 방법
- 정상적으로 FRT-Flp 재조합이 일어났다면 PCR-1과 PCR-4에 해당하는 PCR product가 확인 될 것임.

- PCR에 의해 targeted ES cell 확인함.

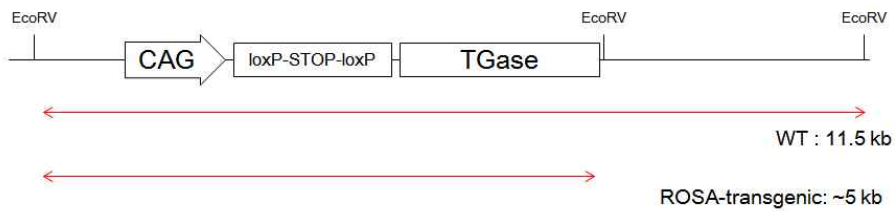
	<ul style="list-style-type: none"> • #17, #18 ES cell은 FRT-Flp 재조합이 정상적으로 일어나 PCR-1의 결과 PCR product 만들어짐. 반면 PCR-2와 PCR-3에서는 PCR product가 형성되지 않음.
	<ul style="list-style-type: none"> • Targeted ES cell을 microinjection하였고 germline transmitted F1 mouse를 얻음. • PCR-1을 통해 transgene을 가진 마우스를 확인함. • 동시에 ROSA26-rtTA도 확인함.
	<ul style="list-style-type: none"> • 위에서 확인한 마우스에서 doxycycline-dependent transgene expression을 확인함. • 실험 조건; Dox (2mg/ml in 10mg/ml sucrose, 5 days, drinking water) → RT-PCR 진행 • #3, #4 마우스에서 doxycycline-dependent gene expression을 확인함.
<p>3.2.b. Cre recombinase-mediated conditional transgene expression 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> • 위에서 언급한 바와 같이 pronuclei microinjection을 이용한 transgenic mouse 개발을 몇 가지 단점이 있음. • 이를 극복하기 위한 또 하나의 방법은 Cre recombinase를 이용하여 transgene expression을 유도하는 것임 (Nature Neuro, 2010, 13:133-140). 	



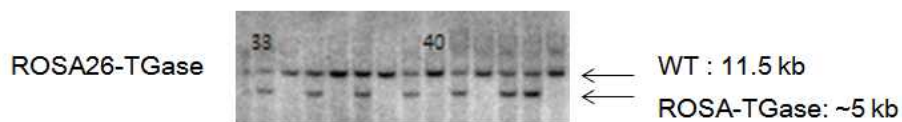
- Cre recombinase-mediated conditional transgene expression의 기본 전략
- CAG와 같은 강력한 promoter를 이용함.
- 선택적 transgene expression을 위해 promoter와 transgene 사이에 loxP-STOP-loxP sequence를 삽입함.
- 이러한 구조를 가진 DNA를 homologous recombination을 통해 ROSA26 locus에 삽입함.



- Washington 대학의 Hongkui Zeng 실험실에서 개발된 다양한 벡터 시스템. 모두 loxP-STOP-loxP sequence를 가지고 있기 때문에 Cre recombinase에 의한 conditional gene expression이 가능함.
- Ai2, Ai3, Ai6, Ai9, Ai14 등 다양한 벡터를 이용하여 다양한 transgene expression을 유도할 수 있음.

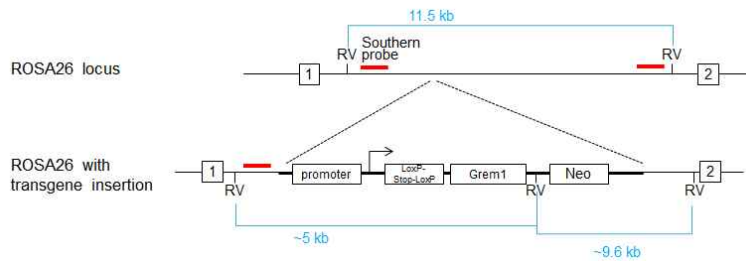


- Ai6 벡터를 이용하여 transglutaminase2 transgenic 마우스 개발을 시도함.
- ROSA26 locus에 targeted ES cell은 southern blot으로 확인함. WT은 11.5kb band가 확인되는 반면, mutant는 약 5kb의 DNA band가 확인됨.



- Southern blot을 통해 targeted ES cell을 확인함.

3-3. 신규 마우스 모델 개발; conditional transgenic 마우스 모델

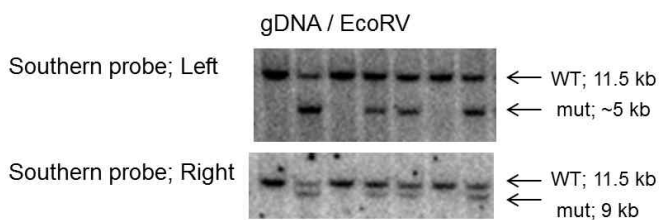


- Targeted transgenesis (single-copy transgenesis) at ROSA26 locus.
- Cre recombinase-mediated conditional transgene expression의 기본 전략
- CAG와 같은 강력한 promoter를 이용함.
- 선택적 transgene expression을 위해 promoter와 transgene 사이에 loxP-STOP-loxP sequence를 삽입함.
- 이러한 구조를 가진 DNA를 homologous recombination을 통해 ROSA26 locus에 삽입함.
- Conditional transgenic mouse, TRE mouse 모델 등 다양한 마우스 모델 개발에 활용 가능함.
- Pronuclei injection에 의해 발생하는 random integration, expression problem 등을 해결할 수 있는 방법임.

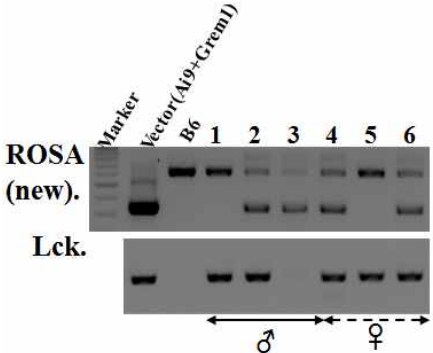
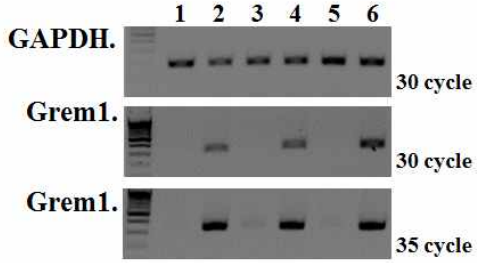
3-3a. LSL-Grem1 conditional transgenic 마우스

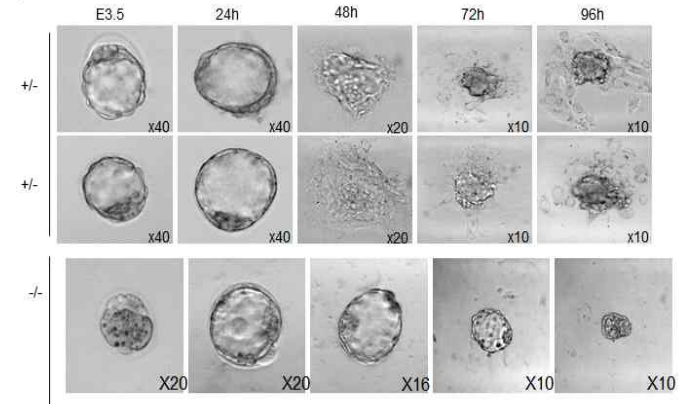
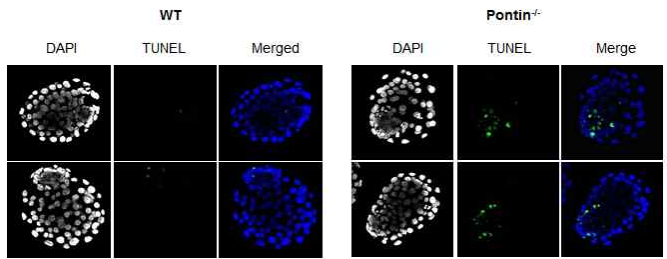
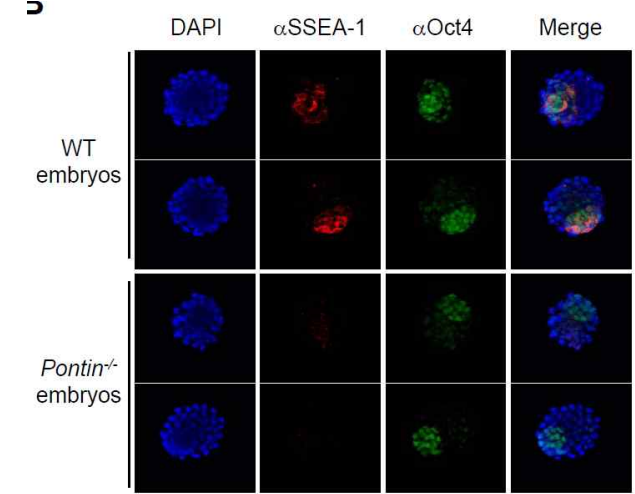
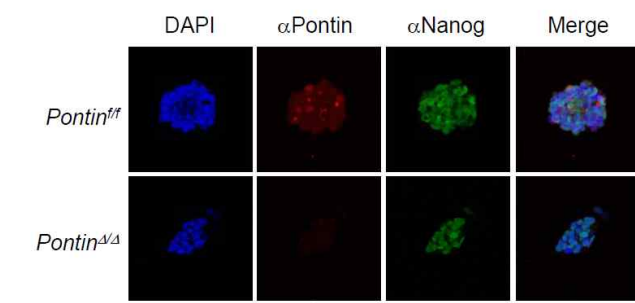
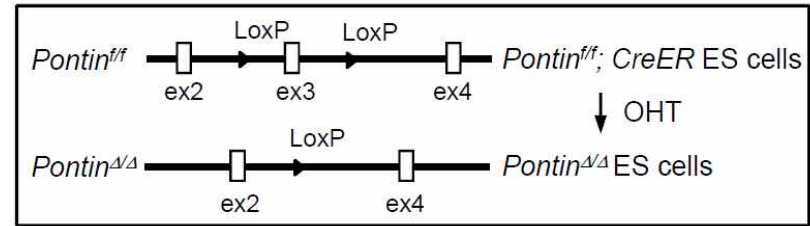
- 신규 암유전자 Grem1 in vivo 연구를 위한 마우스 모델 개발.
- Grem1은 GI cancer에서 과발현되는 것으로 발굴되어, 암모델에서 선택적으로 과발현시킬 수 있는 conditional transgenic 마우스를 개발하고자 함.
- 기본적으로 loxP-STOP-loxP cassette 때문에 Grem1 발현이 되지 않음.
- Cre recombinase가 발현되는 상황에서만 Grem 유전자가 발현되는 conditional transgenic 마우스 모델임.

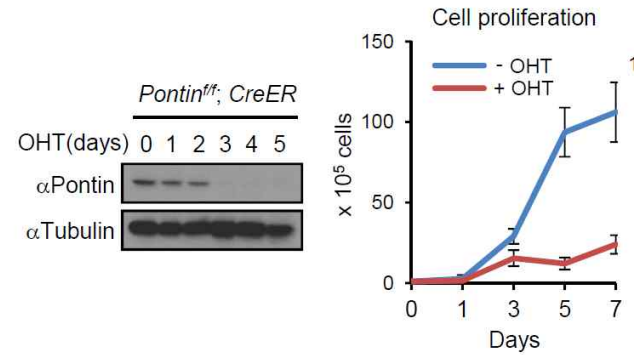
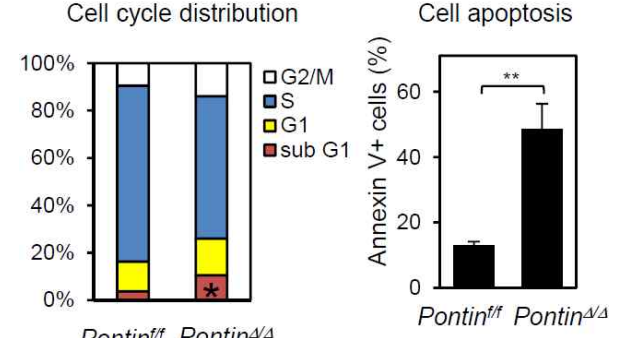
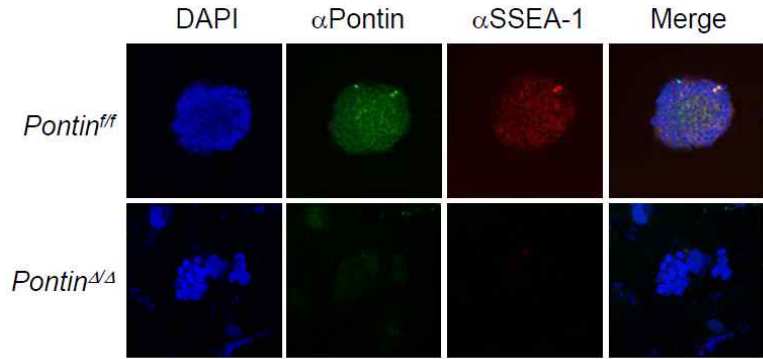
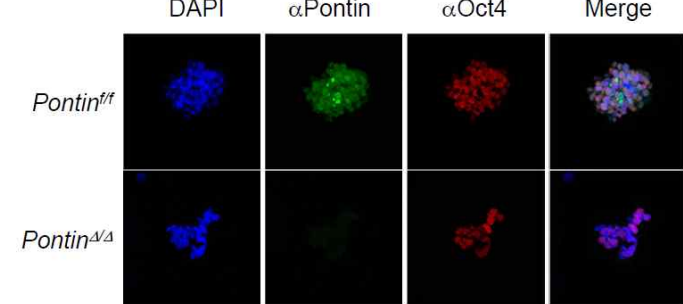
- Southern blot analysis를 통해 Grem1 유전자 cassette가 ROSA26 locus에 삽입됨이 확인됨.

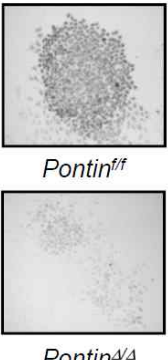
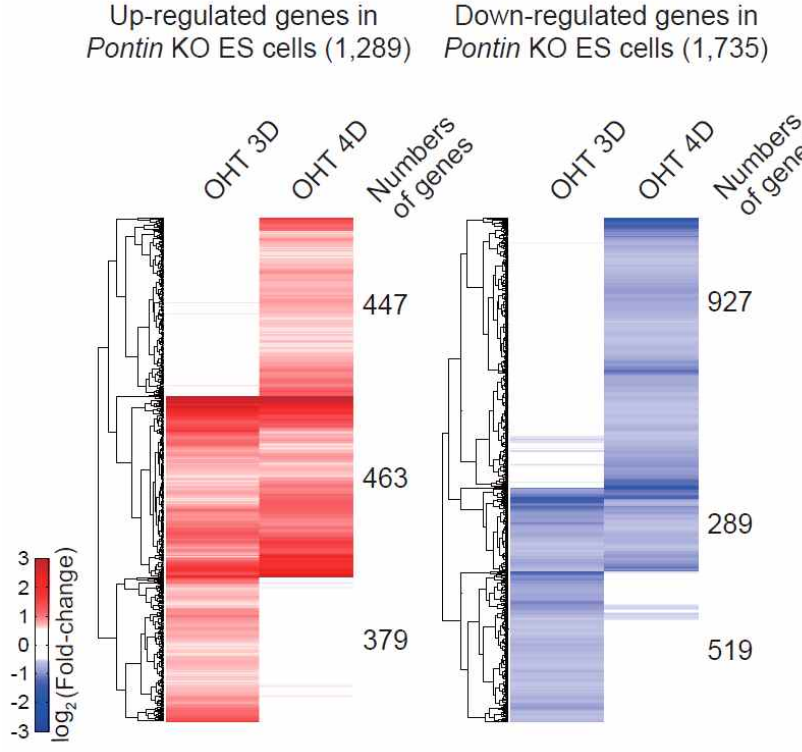


- Cre-loxP 의존적인 Grem1 발현을 보기 위해 LSL-Grem1; lck-cre 마우스를 만들.
- Genotype을 통해 2,4,6 번 마우스가 LSL-Grem1; lck-cre 마우스로 확인됨.

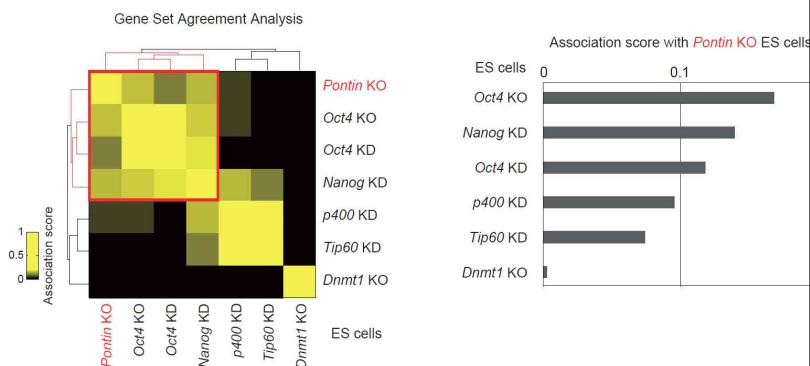
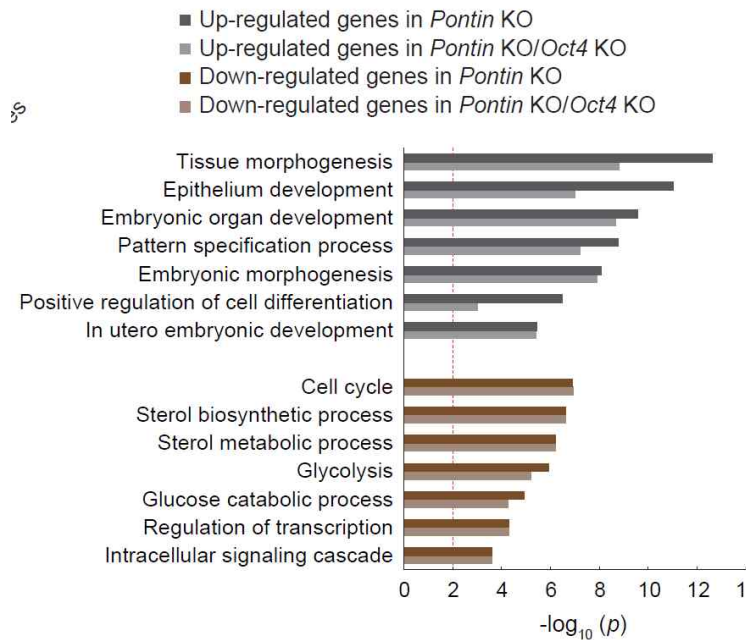
	
	<ul style="list-style-type: none"> • Thymus에서 RNA를 뽑은 다음, RT-PCR을 통해 Cre-loxP 의존적으로 Grem1이 발현되는지 확인함. • 2, 4, 6 번 마우스에서 Grem1이 과발현됨을 확인함.
<p>3-3b. LSL-Dcl1 conditional transgenic 마우스</p> <ul style="list-style-type: none"> • 신규 암유전자 Dcl1 in vivo 연구를 위한 마우스 모델 개발. • Dcl1은 GI cancer에서 과발현되는 것으로 발굴되어, 암모델에서 선택적으로 과발현시킬 수 있는 condition transgenic 마우스를 개발하고자 함. • Cre recominase dependent하게 Dcl1이 발현되는 conditional transgenic 마우스 개발. 	
<p>3-3c. TRE-TGase2 마우스 모델 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 염증, 암 등 각종 질환에서 역할을 수행함이 알려져 있는 TGase 유전자 연구를 위한 transgenic 마우스 모델 개발. • ROSA26 locus에 targeting하는 방법을 이용하여 TRE-TGase2 마우스 모델을 개발. • rtTA 마우스와 교배하여 TRE-TGase2; CAG-rtTA 마우스가 개발되면, doxyclyline 의존적으로 TGase2 유전자 발현이 유도됨. 	

 <p>E3.5 24h 48h 72h 96h</p> <p>+/- x40 x40 x20 x10 x10</p> <p>+/- x40 x40 x20 x10 x10</p> <p>-/- X20 X20 X16 X10 X10</p>	
 <p>WT Pontin^{-/-}</p> <p>DAPI TUNEL Merged DAPI TUNEL Merge</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pontin(-/-) embryo는 ICM 부위에서 cell death가 관찰됨.
 <p>DAPI αSSEA-1 αOct4 Merge</p> <p>WT embryos</p> <p>Pontin^{-/-} embryos</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pontin(-/-) embryo에서 stem cell marker인 Oct4, Nanog 단백질 양이 변화는 없음.
 <p>DAPI αPontin αNanog Merge</p> <p>Pontin^{ff}</p> <p>Pontin^{ΔΔ}</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pontin(-/-) embryo에서 stem cell marker인 Oct4, Nanog 단백질 양이 변화는 없음.
 <p><i>Pontin^{ff}</i> LoxP LoxP LoxP <i>Pontin^{ff}; CreER</i> ES cells</p> <p>ex2 ex3 ex4</p> <p>↓ OHT</p> <p><i>Pontin^{ΔΔ}</i> LoxP <i>Pontin^{ΔΔ}</i> ES cells</p> <p>ex2 ex4</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pontin(-/-) 마우스가 embryo lethality를 보이기 때문에, Pontin cK0 마우스를 제작함. Exon3 양쪽에 loxP sequence를 삽입함.

	<p>Pontin(f/f);CreER 수정란에서 ES cell을 분리함. CreER을 가지고 있기 때문에 tamoxifen-dependent gene deletion이 가능함.</p>
 <p>Cell proliferation</p> <p>— - OHT — + OHT</p> <p>x 10⁵ cells</p> <p>Days</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen을 처리한 다음, Western blot을 통해 Pontin gene deletion을 확인함. • Pontin 단백질이 없으면 ES cell proliferation이 감소함.
 <p>Cell cycle distribution</p> <p>Cell apoptosis</p> <p>Annexin V+ cells (%)</p> <p>Pontin^{ff} Pontin^{ΔΔ}</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pontin 단백질이 없으면 ES cell에서 apoptosis가 증가함.
 <p>DAPI αPontin αSSEA-1 Merge</p> <p>Pontin^{ff}</p> <p>Pontin^{ΔΔ}</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pontin 단백질이 없으면 주요 stem cell marker인 SSEA-1이 없어짐.
 <p>DAPI αPontin αOct4 Merge</p> <p>Pontin^{ff}</p> <p>Pontin^{ΔΔ}</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen을 처리한 후, immunofluorescence를 통해 Pontin 유전자 발현이 없어짐을 확인함.

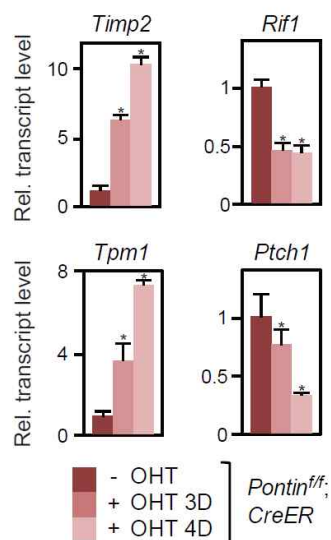
<p style="text-align: center;">AP staining</p>  <p style="text-align: center;"><i>Pontin^{f/f}</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Pontin^{Δ/Δ}</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pluripotency를 확인하는 방법 중 하나인, alkaline phosphatase assay 결과. • Pontin 단백질이 없으면 alkaline phosphatase 활성도 줄어듦이 확인됨.
<p style="text-align: center;">Up-regulated genes in <i>Pontin</i> KO ES cells (1,289) Down-regulated genes in <i>Pontin</i> KO ES cells (1,735)</p>  <p style="text-align: center;">log₂ (Fold-change)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen을 처리하기 전과 후의 gene expression을 비교하기 위해, 3일과 4일 후 RNA를 얻은 다음, microarray 분석을 수행함. • 약 1,200개의 유전자가 upregulation되었고, 약 1,700개 유전자가 downregulation됨.
	<ul style="list-style-type: none"> • Biological process를 분석한 결과, Pontin 단백질이 없으면 주로 development, differentiation 관련 유전자 발현이 높아짐이 확인됨.

B Enrichment of Gene Ontology Biological Processes



- 기존에 알려진 Oct4 KO/KD, Nanog KD의 microarray 결과와 비교함.
- Pontin KO의 결과가 Oct4 KO/KD, Nanog KO결과 상당한 상관관계를 가짐이 밝혀짐.

qRT-PCR



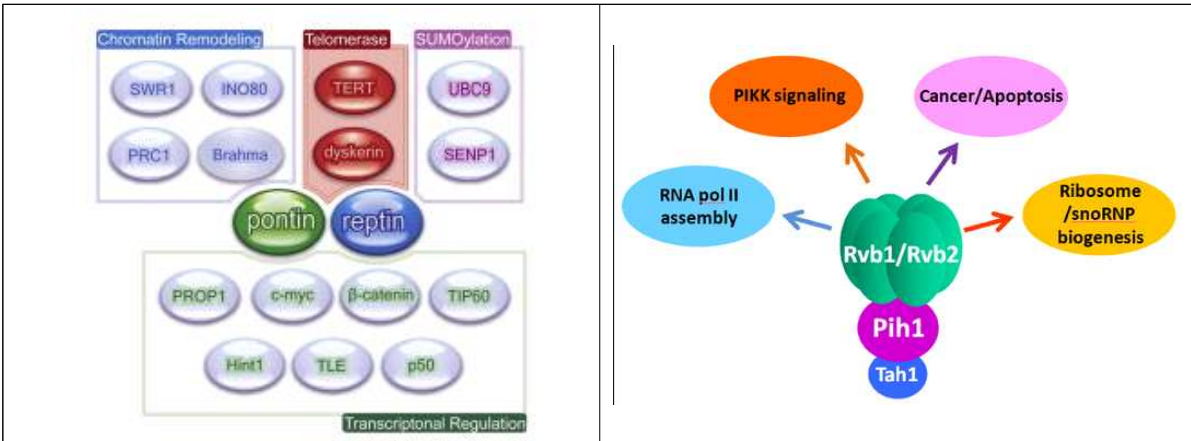
- Microarray 결과에서 확인된 *Timp2*, *Rif1*, *Tpm1*, *Ptch1* 유전자의 발현이 Pontin에 의해 조절 받음을 RT-PCR로 확인함.

- Microarray 결과 분석에서 noncoding RNA이 Linc RNA가

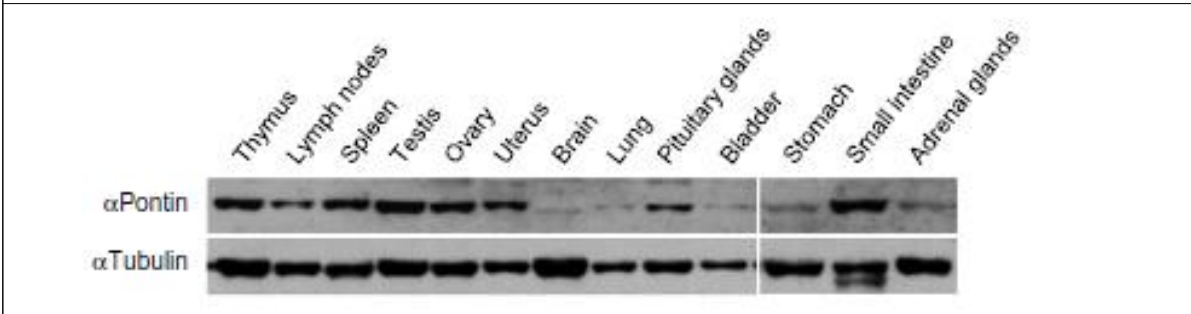
<p style="text-align: center;">Portions affected by Pontin in Oct4-regulated genes</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Count</th> <th>Percentage</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Transcription factors</td> <td>27/152</td> <td>~17.8%</td> </tr> <tr> <td>Epigenetics regulators</td> <td>14/120</td> <td>~11.7%</td> </tr> <tr> <td>Signal transducers</td> <td>134/625</td> <td>~21.4%</td> </tr> <tr> <td>LincRNAs</td> <td>16/54</td> <td>~29.6%</td> </tr> </tbody> </table>	Category	Count	Percentage	Transcription factors	27/152	~17.8%	Epigenetics regulators	14/120	~11.7%	Signal transducers	134/625	~21.4%	LincRNAs	16/54	~29.6%	<p>Pontin-Oct4 module에 의해 조절 받을 수 있음이 확인됨.</p>
Category	Count	Percentage														
Transcription factors	27/152	~17.8%														
Epigenetics regulators	14/120	~11.7%														
Signal transducers	134/625	~21.4%														
LincRNAs	16/54	~29.6%														
<p>Oct4 target genes (<i>Lefty-1</i>, <i>Otx2</i>, and <i>Rif1</i>)</p> <p>Self-renewal and pluripotency</p> <p>ES cell</p> <p>Oct4-regulated lincRNAs (<i>linc1253</i>, <i>linc1356</i>, and <i>linc1</i>)</p> <p>Differentiation</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ES cell pluripotency 유지에서 Pontin의 역할 기작. • Pontin이 Stem cell pluripotency의 master regulator인 Oct4와 결합하여 pluripotency를 유지하고 동시에 differentiation를 억제하는 역할을 수행함. 															

3-5. 마우스 모델 분석

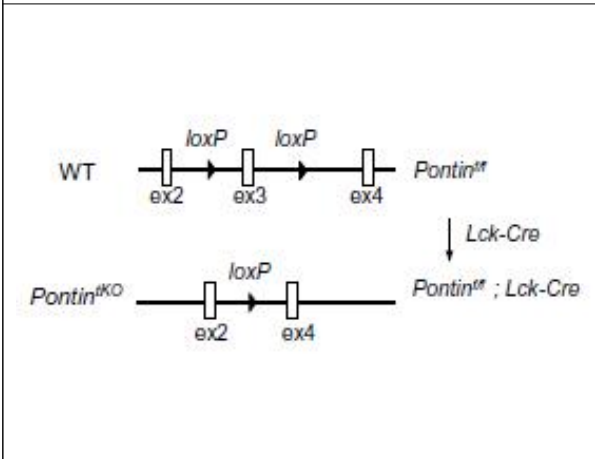
- Pontin/Ruvb1(f/f); lck-cre 마우스 분석
-



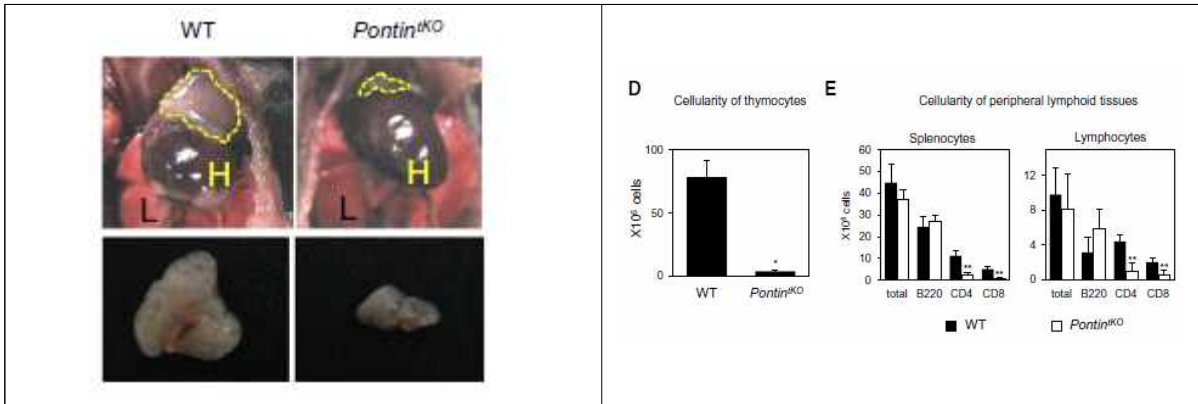
- Pontin/Ruvb1은 reptin과 더불어 다양한 chromatin remodeling factor, transcription factor들과 결합하여 다양한 cellular function을 수행함.
- transcription regulation, cancer, apoptosis, PIKK signaling, ribosome biogenesis 등에 관여함이 알려짐.



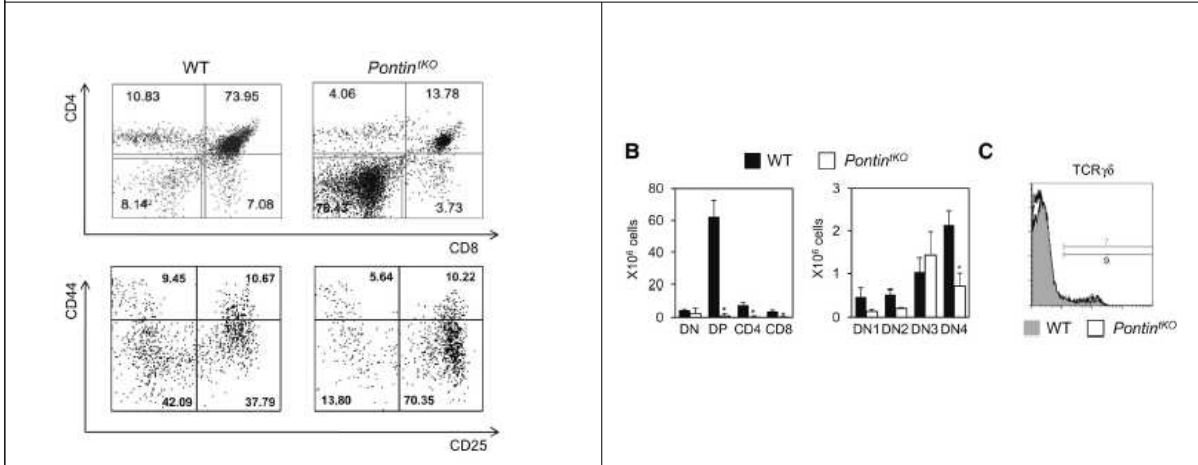
- Pontin 단백질의 in vivo function에 대한 연구를 진행하기 위해,
- 마우스 조직에서 발현 양상을 분석함.
- 다양한 조직에서 발현되었는데, 특히 thymus, spleen, lymph node 등 lymphoid organ에서 발현이 높음이 관찰됨.



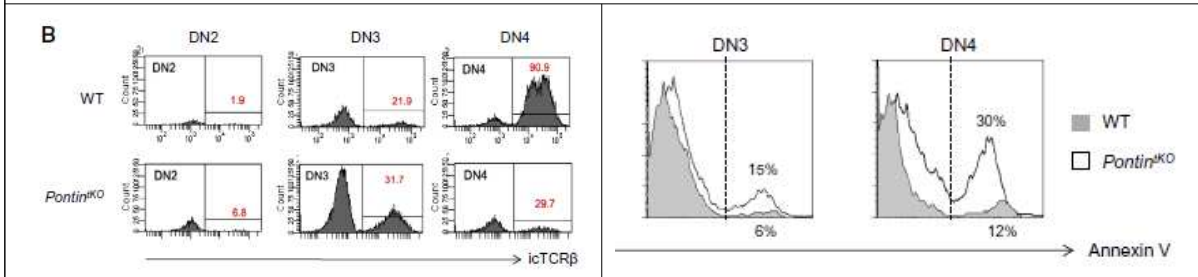
- 기존의 연구에서 pontin conditional knockout 마우스 개발을 완료하였음.
- Cre recombinase에 의해 pontin 유전자를 선택적으로 deletion할 수 있음.
- Thymus나 T cell에서 pontin의 역할을 규명하고자, thymic T cell에서 Cre recombinase가 활성화되는 lck-cre 마우스를 활용함.
- Pontin(f/f); lck-cre (Pontin tkO) 마우스는 thymic T cell에서 pontin 유전자가 deletion되게 됨.



- *Pontin* tK0 마우스는 thymus 크기가 줄어듦.
- 전체 thymocyte cellularity도 thymus 크기와 유사하게 줄어듦.
- spleen, lymph node에서 CD4, CD8 T cell 모두 줄어듦.
- B cell에는 큰 변화 없음.

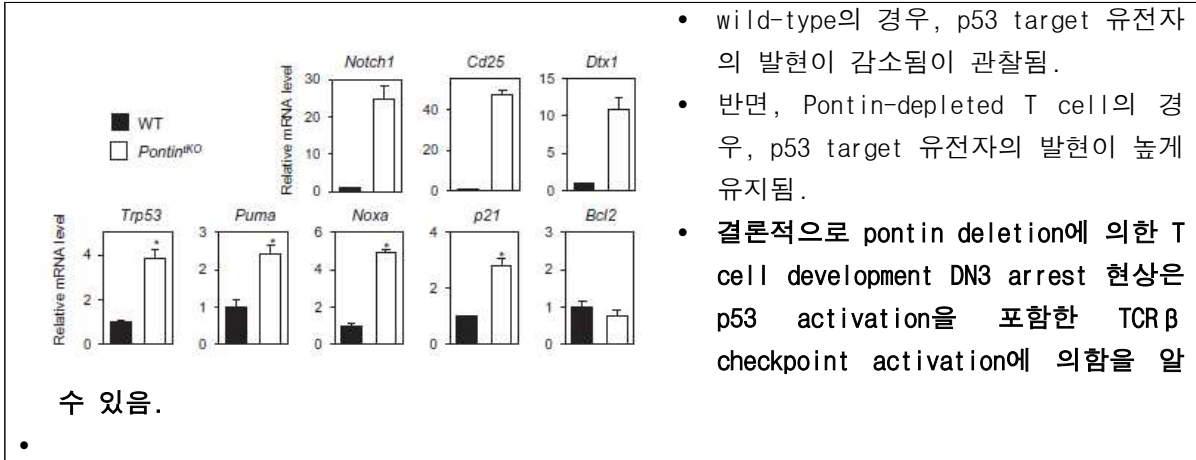


- *Pontin* tK0의 thymic T cell 분석 결과.
- *pontin*-depleted T cell은 DN 3 stage arrest를 보임
- $\gamma \delta$ T cell은 큰 변화 없음.

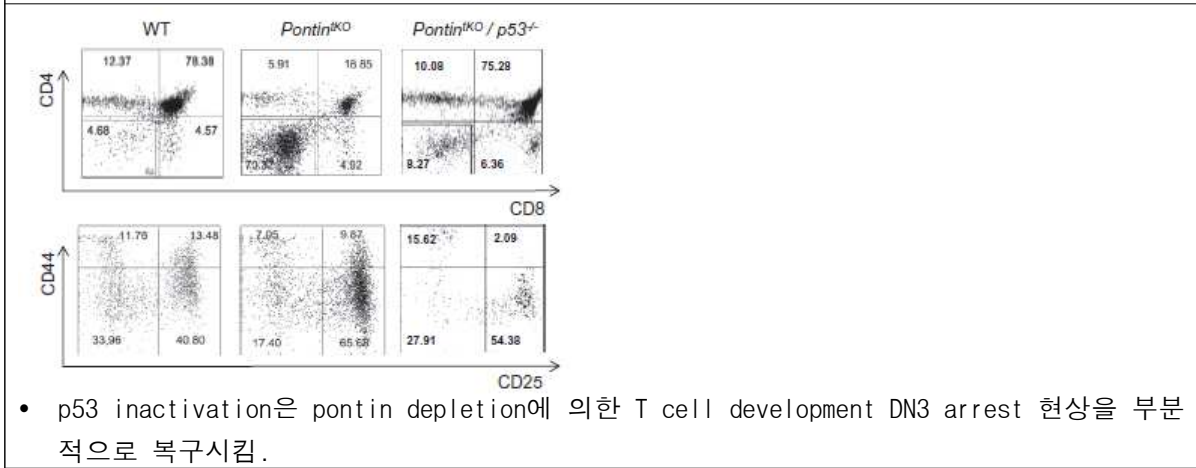


- DN3, DN4 단계에서 TCR β chain 형성을 확인함.
- intra cellular TCR β chain은 *Pontin*-depleted T cell에서도 형성됨이 확인됨.
- DN4 단계 *Pontin*-depleted T cell에서 cell death가 증가됨.
- 따라서 TCR β chain 형성 이후 단계에서 결함이 있는 것으로 판단됨.

- DN3-DN4 단계에서 TCR β 형성 이후, p53 activation에 의해 T cell development가 조절됨.
- TCR β chain 형성 이후, activated p53은 suppression 또는 downregulation 되어야 T cell development가 진행됨.
- DN3 T cell을 분리하고, p53 target gene의 발현을 분석함.



- wild-type의 경우, p53 target 유전자의 발현이 감소됨이 관찰됨.
- 반면, *Pontin*-depleted T cell의 경우, p53 target 유전자의 발현이 높게 유지됨.
- 결론적으로 *pontin* deletion에 의한 T cell development DN3 arrest 현상은 p53 activation을 포함한 TCR β checkpoint activation에 의함을 알 수 있음.



- p53 inactivation은 *pontin* depletion에 의한 T cell development DN3 arrest 현상을 부분적으로 복구시킴.

3-6. 국립암센터 암모델 마우스 repository

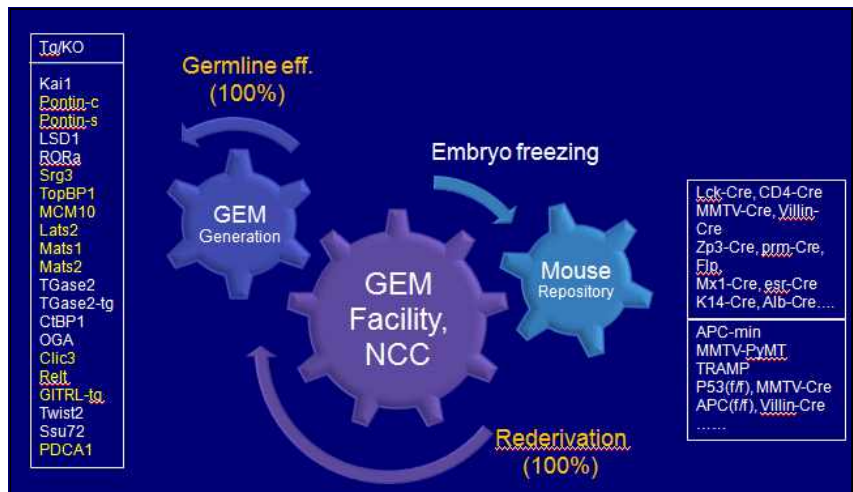
- 2005년 이후 국립암센터 기관고유사업의 꾸준한 지원을 통해 국립암센터 연구소 내 암모델 유전자변형 마우스를 자체적으로 개발할 수 있는 “transgenic/knockout mouse facility” 시스템이 갖추어짐.

- 1 차년도 연구를 통해 그동안 미흡했던 transgenic mouse 개발 시스템을 구축하여, tet-On transgenic mouse, LSL-transgenic mouse 등을 개발할 수 있게 됨.

- 100%에 가까운 germline efficiency를 보일 정도로 효율적인 시스템이 갖추어졌기 때문에 향후 유지 관리 및 효과적인 활용이 필수적인 상황임.

- 현재 60여종의 암모델 관련 마우스들이 유지 보존 되어 있음. 자체 개발 30 여종, Cre mouse, Flp mouse, 기존 암모델 마우스 20여종.

- 마우스뿐만 아니라, 수정란/정자 동결 작업도 순차적으로 진행 중. 현재 40 여종 마우스에 대한 수정란/정자가 액체질소 통해 보관 유지되고 있음.



4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

- 목표 달성도, 100% (암모델 동물 개발 및 분석, SCI 논문 발표, 암모델 동물은행 운용, 정자 동결 보존 등)
- 기관의 4개 연구분야별 코드: 공공개방형 암연구 인프라 운용-암 실험동물 개발 (1-3)에 해당하는 연구내용임.

연구내용	달성도(%)	내 용
<ul style="list-style-type: none"> • 신규 암모델 마우스 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • Ncpg2 cK0, TRE-TGase2, TRE-ENT1, LSL-TGase2 마우스 개발 완료 또는 키메라 마우스 확보 • TRE-TGase2, LSL-Grem1, LSL-Dclk1 마우스 모델 개발 완료.
<ul style="list-style-type: none"> • 기존 암모델 마우스 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> • Pontin ES cell 분석 (Nature communications, 2015) • Pontin cK0 마우스 분석 (BBRC, 2014) • TopBP1 cK0 마우스 분석 (EMBO J 2014) • Mats1/2;alb-cre, Mats1/2;vil-cre 마우스 모델 개발 진행. • Mats(f/f); Esr-Cre ES cell 개발
<ul style="list-style-type: none"> • 암모델 마우스 정자 보존 	100	<ul style="list-style-type: none"> • Pontin K0, cK0, Mats1(flox/+), Mats2(flox/+), TRE-ENT1 정자 동결. • Ncpg2(f/f), Pontin(f/f), Emp2(+/-), STK32c(+/-), LSL-Grem1 등등 유전자변형 마우스의 정자동결 완료
<ul style="list-style-type: none"> • 암모델 마우스 repository 유지 관리 및 활용 (총 60여종) 	100	<ul style="list-style-type: none"> • - 60여종의 암모델 개발 관련 마우스들이 유지 보존. 자체 개발 30여종, Cre mouse, Flp mouse, 기존 암모델 마우스 20여 종.

4-2. 관련분야 기여도

- 유전자 가위 기술 도입 등으로 마우스 개발이 신기술 시스템 구축
 - 경제적, 효율적인 mouse core facility 운영
- 암모델 유전자변형 마우스 연구의 저변 확대
 - 국립암센터 기관 내 유전자 변형 마우스 개발 시스템이 유지됨으로써 이와 관계된 연구를 자체적으로 해결 가능.
 - 고가의 제작비용으로 인한 어려움을 완화
 - 유전자변형 마우스에 관한 전문적인 분석 서비스 가능
 - 유전자 변형 마우스를 위한 인프라의 활용기반 확대로 마우스 연구의 저변 확대
- 유전자기능 정보를 활용한 국내 BT, NT, IT 관련 연구의 시너지(synergy) 창출
- 국제적인 유전자변형 마우스 연구정보의 국내 활용으로 국내 Bio 연구 및 Bio 산업계의 체질 개선 및 발전 가속화 유도

- 마우스 모델을 통한 타겟 검증을 마친 질환 타겟은 전임상과 임상 시험에서 성공률이 높일 것으로 기대됨.
- 국내 생명과학 수준을 기초 연구에서 실용화 연구로 도약시킬 수 있는 기반 구축 및 원천 특허 확보 가속화
- 유전자변형 마우스 연구 성과를 국내 호발성 질환 유전체 과제 등과 연계하여 질병의 예방 및 치료효율 증진에 의한 국민 복지 증진
- 고부가가치의 질환모델마우스 확보를 통한 외화 유출 방지 및 국가경쟁력 제고
- 내의 독자적 연구에 의한 유용유전자의 실제 (*in vivo*) 기능 연구를 완성함으로써 국가 전체의 BT R&D의 균형적 발전은 물론 투자의 효율성 도모

5. 연구결과의 활용계획

가. 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구를 통해 새로 개발되고, 유지 관리되는 “암모델 유전자변형 마우스” 들은 추가 연구와 활용을 통해 국립암센터 내부 연구자들의 연구자의 연구역량강화 및 경구경쟁력 강화에 도움이 되도록 함
- 본 연구를 통하여 제작한 유전자변형 마우스는 다른 연구기관과 공동연구를 추진하고, 이를 통해 국내 연구기관에 공급하여 바이오 관련 연구, 신 치료법/신약 target 발굴, 신약 스크리닝 등에 활용.
- 현재 갖추어진 시스템을 잘 활용할 수 있는 방안, 그리고 여러 연구자들이 혜택을 받을 수 있는 방안에 대해 지속적으로 고민/모색하겠음.
- 현재 갖추어진 시스템 유지 관리 또한 중요함으로 지속적인 투자가 필요하다 판단됨.

국립암센터 기관 내, 암모델 마우스 연구 활성화

- 암모델마우스를 자체 개발, 유지할 수 있는 시스템이 갖추어 졌기 때문에, 새로운 기능의 유전자나 타겟이 발굴 되었을 때, 자체적인 연구가 가능함.
- 환자 시료에서 도출된 신규 암유전자의 *in vivo* validation, drug modeling 등을 수행하는데 활용.
- 자체 마우스 facility에서 마우스 모델 제작이 진행되기 때문에 시간과 비용을 현격히 줄일 수 있음.

외부와의 공동연구 활성화.

- 현재 잘 갖추어진 국립암센터의 Tg.K0 마우스 인프라를 활용하여, 외부의 선도적인 연구를 진행하는 연구팀과 공동연구를 진행.
- *in vitro* 연구가 활발히 진행되고 있거나 이행성 연구에 적합한 외부 연구팀 발굴 및 공동 연구 진행.

추가 후속 연구의 필요성

- 현재 갖추어진 "국립암센터 GEM facility"의 시스템과 인력을 유지하기 위해서는 지속적인 기관의 지원이 필요한 상황이며, 후속 연구과제를 수행함으로써 현 시스템을 유지 발전시키고자 함.
- 국립암센터 기관고유사업의 지원을 받아 지난 4-5년에 걸쳐 transgenic/knockout mouse facility가 구축되었고, 인력이나 노하우 면에서 안정화 단계에 접어들었다 할 수 있음.
- 20여개의 유전자에 대해 28종의 targeting을 진행하였고 28 종 모두 germline transmission에 성공하였음. 이와 같은 결과에서 국립암센터 transgenic/knockout mouse facility는 안정화 단계에 접어들었다 판단할 수 있음.
- 지난 5년 동안 (2010년~2015년) Tg/KO 마우스를 이용한 논문이 총 11편 (IF 합= 88, 평균 =8.0) 발표되었으며, 평균 IF가 8.0으로 질적으로 높은 수준을 유지함.
- 그동안 기관고유사업을 통해 잘 갖추어진 현재 Tg/KO 시스템을 잘 유지하고 활용하는 것이 마우스 모델을 이용한 암연구 뿐만 아니라 이형성 연구에도 필수적이다 판단됨.
- 궁극적인 목표인 항암타겟 발굴/검증을 위해 transgenic mouse 모델 개발과 분석에 집중하겠음.
- 기관 내 협력 연구를 통해 inducible TGase2 transgenic, conditional Grem1 transgenic, conditional Dclk1이 자체 개발되었고, 이 모델을 활용하여 target identification/validation을 진행할 예정임.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

유전자변형 마우스 (GEM) 개발 및 분석 필요성

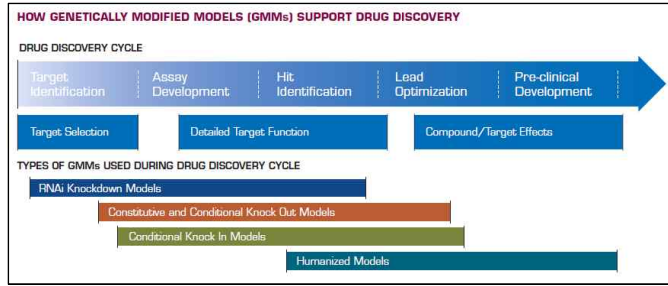
- GEM 사업은 선진국에서 이미 국제 콘소시움이 진행되고 있으며 GEM phenome의 고속화 스크리닝 기술 개발의 국내외 격차가 큼. 국내의 GEM 수요는 신약 타겟 검증과 국내 발굴 유전자의 기능 해석 등에 따른 수요가 빠르게 증가하는 데에 비하여 인프라가 매우 부족함. GEM 생산 및 보존, 연구 시설, 표현형 분석의 인프라가 부족한 실정임. GEM은 국내 프론티어 등 주요 R&D 과제에 필수적인 인프라이며 GEM 이용 검증 시스템 기반의 확보는 최근 융합 연구 및 타 분야의 산업화에도 핵심 요소임.

신약개발에서의 마우스 모델 활용

- 최근 신약개발 동향은 개발초기 단계에서부터 RNAi knockdown, constitutive or conditional knockout, conditional knock-in, humanized 생쥐모델을 적극적으로 이용함.
- 생쥐모델을 통해 타겟 검증과 약효 예측을 함으로써, 신약개발의 실패율을 최소화하는 플랫폼 중 하나로 이용됨.

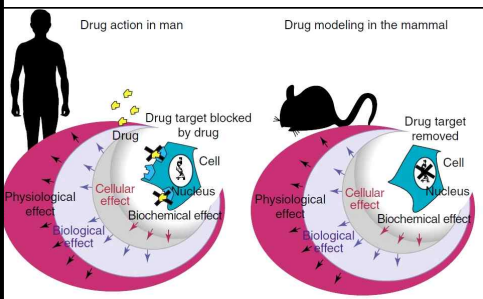
[신약개발 단계에서 질화모델 마우스의 유용성]

(from TaconicArtemis; http://www.taconicartemis.com/services/artemice_conditional.php)



□ 마우스 모델을 이용한 타겟 검증과 약효 예측

- 인간 게놈프로젝트 결과, 5,000 여개의 신약타겟이 이론적으로 예측됨. 실질적으로는 약 100-150여 개의 신규 타겟 발굴이 예상됨.
- 현재 타겟으로 이용되는 단백질은 약 120여개이고, 100위 내 약은 40여개의 단백질을 타겟으로 함. 이 중 29개 knockout mouse의 표현형이 약효와 강한 상관관계를 보임.
- 이와 같이 생쥐모델의 이용은 약효를 미리 예측할 수 있고, 신약개발의 실패율을 낮출 것으로 기대됨.



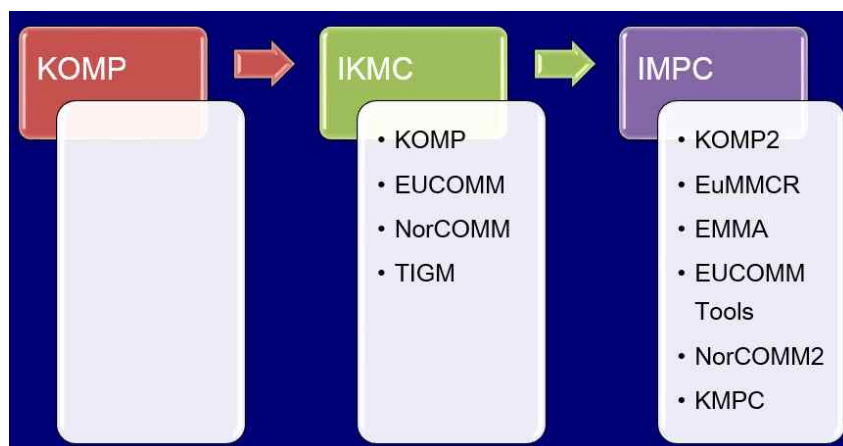
[Drug Modeling: 유전자변형 생쥐모델을 이용한 신약타겟의 약효 및 부작용 예측] (Drug Discovery Today: Targets, 2004)

□ 바이오 경쟁력 강화를 위한, 국내 유전자변형 마우스 (GEM) 기반 사업

- 다수의 국책 사업에서 GEM의 중요성을 인식하고 GEM 연구를 반영하고 있지만, 이는 소수 그룹에 제한되어 있고, 또 일시적이고 단편적인 연구일 수밖에 없어 실용화를 위한 연구 개발에 한계로 작용하고 있음.
- 실제로 국내의 GEM 생산기술은 선진국 수준에 버금가지만 환경이 뒷받침되지 않아 생산 규모와 분석 능력에서 선진국과의 격차가 커지고 있는 실정임. 현재 ‘특허’ 등의 지적 재산권 및 생물자원 확보에 힘쓰고 흩어져 있는 GEM 관련 국가역량을 결집시킬 수만 있다면 지금부터 선진국과의 격차를 줄일 수 있음.
- 국내에도 특정 연구개발사업등의 각종 연구사업을 통해 수천 종의 유용유전자를 확보하고 있으나 (인간유전체 사업단 1300여 종, 등), 현재 시험관내 (in vitro) 기능 연구에 치중되어 있어 선진국 대열에 합류하기 위해서는 더 많은 GEM 개발에 의한 생체 내 (in vivo) 기능연구가 필요함.
- 위와 같은 필요성에도 불구하고 아직 국내는 GEM 퍼실리티 및 해당 전문 인프라가 취약하여 BT 관련 우수 연구와 산업의 국제적 경쟁력이 탄력을 받지 못하고 있음
- 지금까지 후기 유전체 연구를 위한 대형 국책사업은 GEM 연구를 포기할 수 없는 실정에 현재와 같은 체계를 유지할 수밖에 없었지만, 앞으로의 국책 사업에서는 실질적이며 경쟁적인 성과를 위해서 GEM 연구 체계의 개선이 요구됨

□ 마우스 모델 국제 콘소시움: IKMC (Collins et al., 2007; Skarnes et al., 2011)

- 현재 마우스 모델 개발과 활용의 국제적인 추세는 IKMC와 IMPC의 활동을 통해 확인할 수 있음.
- 마우스모델 개발을 위한 국제 컨소시엄 (IKMC, International knockout mouse consortium)
- 마우스모델의 표현형 분석을 통해 신약타겟 후보를 선점하고자 함. 2006년 NIH 연구비로 시작되었지만 현재 EUCOMM, NorCOMM 뿐만 아니라 Regeneron 등의 회사들도 관여함.
- IKMC, international knockout mouse project; 2-3만 개로 예상되는 마우스 전 유전자에 대한 knockout mouse 제작을 목표로 함. EC의 경우, 10년간 2억5천만 유로 (약 4,000억원) 투자.
- IKMC 참여 프로그램
- Knockout Mouse Project (KOMP) (미국)
- CSD, a collaborative team at the Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI), the Wellcome Trust Sanger Institute and the University of California at Davis School of Veterinary Medicine, led by Pieter deJong, Ph.D., CHORI, along with K. C. Kent Lloyd, D.V.M., Ph.D., UC Davis; and Allan Bradley, Ph.D. FRS, and William Skarnes, Ph.D., at the Wellcome Trust Sanger Institute.
- Regeneron, a team at the VelociGene division of Regeneron Pharmaceuticals, Inc., led by David Valenzuela, Ph.D. and George D. Yancopoulos, M.D., Ph.D.
- EUCOMM; European Conditional Mouse Mutagenesis Program (유럽)
- NorCOMM; North American Conditional Mouse Mutagenesis Project (캐나다)
- TIGM; Texas A&M Institute for Genomic Medicine (미국, 텍사스)



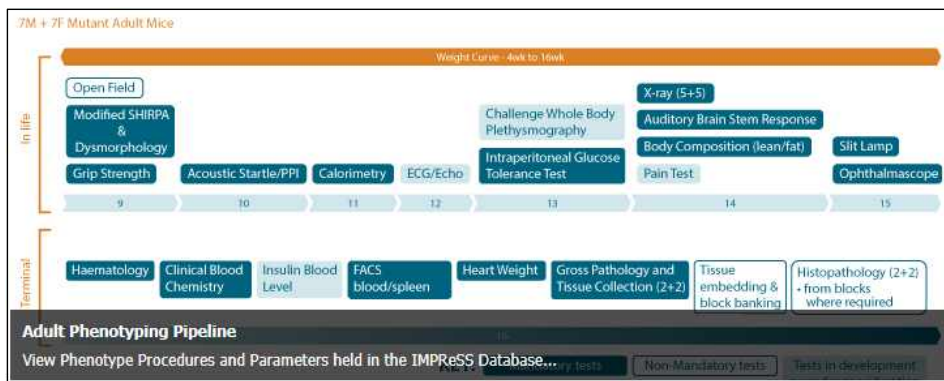
- KOMP, IKMC & IMPC. 2006년 KOMP project가 시작된 이후, 다양한 컨소시엄이 만들어졌고 2015년 현재 IMPC로 통일되어 진행되고 있음.

□ 마우스모델 분석을 위한 국제 컨소시엄 (IMPC, international mouse phenotyping consortium)

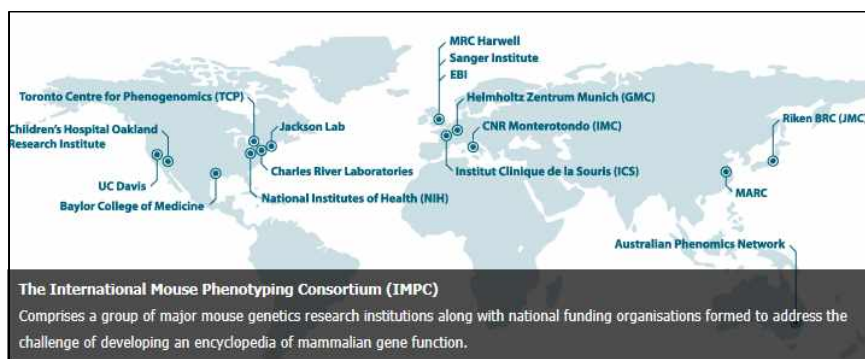
- 기존 개발된 마우스 모델뿐만 아니라 IKMC가 진행되면서 수만 종의 마우스 모델이 확보됨. 이들이 표현형을 체계적으로 분석하고 Database하려는 프로그램 (KOMP2, IMPC)들이 시작됨.
- IMPC ; knockout mouse의 표현형을 체계적으로 분석하고 DB화하여, 전유전체 연관분석 (genome-wide association study)를 통해 특정유전자와 인간질환과의 관련성을 통합적으로 분석하고자 함. EC의 경우, 10년 동안 9억달러 소요 예상.
- IMPC의 목적 : Establish a world-wide consortium of mouse centers with capacity and expertise for large-scale primary phenotyping
- Test each mutant mouse line (4,000 mouse lines in the first 5 years, and ultimately up to

20,000) through a broad based primary phenotyping pipeline in all the major adult organ systems and most areas of major human disease

- 현재 10개국의 연구그룹, 6개국의 연구비가 참여하고 있으며 이는 점점 확대되어 갈 것임. 한국도 “유전자변형마우스 기반구축 “ 사업을 통해 조만간 정식으로 참여할 예정임. The Committee's goal was to develop a plan to harness the major world-wide mouse research programmes and infrastructures in a strategic and coordinated effort to undertake a broad-based, systematic genome-wide phenotyping project of knockout mice in order to provide the wider research community with a long lasting resource of mammalian gene function information.



[IMPC의 마우스 모델 기본표현형 분석을 위한 파이프라인; <http://www.mousephenotype.org/>]



[IMPC에 참여하는 국가와 기관들. 한국도 KMPC라는 이름으로 정식 회원국으로 등록되어 있음.]

7. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Pontin functions as an essential coactivator for Oct4-dependent LincRNAs in embryonic stem cells	국립암센터	교신저자	Nature Communications	11.47	2015.04.08	중복사사	SCI
2	논문	TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development	국립암센터	교신저자	EMBO Journal	10.748	2014.02.03	중복사사	SCI
3	논문	Hepatocyte homeostasis between chromosome ploidization and liver function is regulated by Ssu72 phosphatase	국립암센터	교신저자	Hepatology	11.055	in press	x	SCI
4	논문	Pontin is required for pre-TCR signaling at the beta-selection checkpoint in T cell development	국립암센터	교신저자	Biochem. Biophys. Res. Commun.	2.281	2014.04.25	x	SCI
5	논문	Genetically Engineered Mouse Models for Drug Development and Preclinical Trials	국립암센터	교신저자	Biomolecules & Therapeutics	0.841	2014.07.31	x	SCI-E
6	논문	Pellino1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination.	국립암센터	참여저자	Journal of Clinical Invest	13.765	2014.11.03	x	SCI
7	논문	Phosphorylation of LSD1 by PKC α is crucial for circadian rhythmicity and phase resetting	국립암센터	참여저자	Molecular Cell	14.464	2014.03.06	x	SCI
8	논문	Functional interplay between Aurora B kinase and Ssu72 phosphatase regulates sister chromatid cohesion	국립암센터	참여저자	Nature Communications 302:2631	10.015	2013	x	SCI
9	논문	cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes.	국립암센터	참여저자	EMBO Journal 32:1543-1555	9.822	2013	x	SCI

10	논문	CRIg signals induce anti-intracellular bacterial phagosome activity in a chloride intracellular channel 3-dependent manner	국립암센터	참여자	European Journal of Immunology 32:1543-1555	5.103	2013	x	SCI

8. 참여연구원 현황

번호	소속기관명	직위	생년월일	전공 및 학위		연구담당 분야
	성명	과학기술인등록번호	성별	취득년도	학위(전공)	과제참여기간
1	국립암센터 이호					
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

9. 기타사항

○

10. 참고문헌

- Abe T1, Sakaue-Sawano A, Kiyonari H, Shioi G, Inoue K, Horiuchi T, Nakao K, Miyawaki A, Aizawa S, Fujimori T. Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter. *Development*. 2013 Jan 1;140(1):237-46
- Brian P. Zambrowicz and Arthur T. Sands. Modeling drug action in the mouse with knockouts and RNA interference. *DDT:TARGETS* Vol. 3, No. 5 October 2004
- Capecchi MR. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*. 2005 Jun;6(6):507-12.
- Collins FS, Finnell RH, Rossant J, Wurst W. A new partner for the international knockout mouse consortium. *Cell*. 2007 Apr 20;129(2):235.
- Guan C1, Ye C, Yang X, Gao J. A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis*. 2010 Feb;48(2):73-85.
- Howe LR, Subbaramaiah K, Patel J, Masferrer JL, Deora A, Hudis C, Thaler HT, Muller WJ, Du B, Brown AM, Dannenberg AJ. Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer. *Cancer Res*. 2002 Oct 1;62(19):5405-7.
- Osterwalder M, Gallia A, Rosen B, Skarnes WC, Zeller R, Lopez-Rios J. (2010). Dual RMCE for efficient re-engineering of mouse mutant alleles. *Nat Methods*. 7,893-895.
- Peeper D, and Berns A. Cross-species oncogenomics in cancer gene identification. *Cell*. 2006 Jun 30;125(7):1230-3.
- Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, Lloyd KC, Bradley A, Skarnes WC. (2009). Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods*. 6,493-495.
- Provenzano PP1, Inman DR, Eliceiri KW, Beggs HE, Keely PJ. Mammary epithelial-specific disruption of focal adhesion kinase retards tumor formation and metastasis in a transgenic mouse model of human breast cancer. *Am J Pathol*. 2008 Nov;173(5):1551-65.
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 474, 337-342.
- Skarnes WC1, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):337-42.
- Snippert HJ, van der Flier LG, Sato T, van Es JH, van den Born M, Kroon-Veenboer C, Barker N, Klein AM, van Rheenen J, Simons BD, Clevers H. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*. 2010 Oct 1;143(1):134-44.
- Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Frenthewey, D., Gale, N. W., Economides, A. N., Auerbach, W., Poueymirou, W. T., Adams, N. C., Rojas, J., Yasenchak, J., et al. (2003). High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 21, 652-659.
-

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	1310100		
사업구분	기관고유연구사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	기관고유연구사업				주관
총괄과제	암모델 유전자변형 마우스 개발 및 활용 2			총괄책임자	이호
과제명				과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	국립암센터			연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	연구비	민간	계
	1차년도	2013.1.1.-12.31	200,000		200,000
	2차년도	2014.1.1.-12.31	200,000		200,000
	3차년도	2015.1.1.-12.31	200,000		200,000
	계	2013.1.1.-2015.12.31	600,000		600,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2015.10.28

3. 평가자(과제책임자) :

소속	직위	성명
국립암센터	부교수	이호

4. 평가자(과제책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- Embryo manipulation 기술을 이용한 유전자변형 마우스 모델은 in vitro 시스템에서는 확인할 수 없는 in vivo 생리활성을 측정할 수 있는 중요한 수단이 될 것임. 특히 많은 암모델 마우스로 활용되고 있음.
- 신규 개발되고 분석된 마우스 모델들은 암 연구를 포함한 다양한 분야에서 활용될 수 있을 것으로 예상되며, 이러한 마우스 모델들은 in vitro에서 얻지 못한, 표적유전자의 in vivo 기능에 대한 중요한 단서와 결과들을 얻을 수 있을 것으로 기대됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 마우스 모델을 통한 타겟 검증을 마친 질환타겟은 전임상과 임상 시험에서 성공률이 높으므로 기대됨.
- 본 연구의 마우스 모델을 통한 후보유전자의 생체 내 기능 연구 및 질환타겟으로서 검증은 추후 전임상, 임상 시험에서 실패율을 낮추는 데 기여할 것임.
- 고부가가치의 질환모델마우스를 직접 개발, 확보를 통해 외화 유출 방지 및 국가경쟁력 제고
- 독자적 연구에 의한 유용유전자의 실제(*in vivo*) 기능 연구를 완성함으로써 국가 전체의 BT R&D의 균형적 발전은 물론 투자의 효율성 도모

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 신규 개발되고 분석된 모델 마우스들은 in vivo physiology 연구에 다양한 방식으로 활용될 것을 기대됨. 현재 국내 연구자 수요 중심의 유전자에 대한 유전자변형 마우스 제작을 통해 국내 마우스 연구 및 기반에 기여하고자 함.
- 새로 개발되는 다양한 마우스 모델들은 in vitro 실험에서 증명하기 못했거나, 예상하지 못했던 새로운 기능을 밝혀줄 것으로 기대됨.
- Tg/KO 마우스 모델의 신규 개발, 암모델 마우스를 기반으로 한 새로운 신호전달계 연구 등은 in vivo 기반 target validation, drug modeling의 기반이 될 것으로 기대됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 마우스 인프라가 부족하고 마우스 전문 인력이 부족한 국내 여건에도 불구하고, 성실하게 본 연구를 수행하였음.
- IF 10 이상의 논문이 다수 출간되었으며, 추후 연구 진행을 통해 더 많은 연구성과가 이루어질 것으로 예상됨.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

-
- 2013년-2015년 논문, 교신저자 논문 5편, 공동저자 논문 7편 (사사2편, IF 합 95.9)
- 교신저자
 1. Hepatology (IF 11.055) 2015 in press
 2. Nature Communications (IF 11.47) 2015 6:6810
 3. EMBO J (IF 10.748) 2014 33:217
 4. Biochim Biophys Res Commun (IF 2.281) 2014 447:44
 5. Biomolecules & Therapeutics 2014 24:1
- 공동저자
 1. Oncotarget 2014 6:12529 (IF 6.359)
 2. J Clin Invest 2014 124:4976 (IF13.765)
 3. Molecular Cell 2014 53:791 (IF 14.464)
 4. Oncogenesis 2014 3:e109
 5. Nature Communications 2013 4:2631 (IF 10.015)
 6. EMBO J 2013 32:1543 (IF 9.822)
 7. Eur J Imm 2014 43:667 (IF4.97)
- 국내외 학술대회 발표, 총 8회

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
• 신규 암모델 마우스 개발	35	100	<ul style="list-style-type: none"> • Knockout, knockin, transgenic 등 다양한 유전자변형 마우스 모델들이 개발됨. • Ncapg2 cK0, TRE-TGase2, TRE-ENT1, LSL-TGase2, TRE-TGase2, LSL-Grem1, LSL-Dclk1 등 마우스 모델 개발 완료.
• 기존 암모델 마우스 분석	35	100	<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 변형 마우스 모델을 분석한 결과를 IF가 높은 해외 저널에 발표함. • Pontin ES cell 분석 (Nature communications, 2015) • Pontin cK0 마우스 분석 (BBRC, 2014) • TopBP1 cK0 마우스 분석 (EMBO J 2014)
• 암모델 마우스 정자 보존	10	100	<ul style="list-style-type: none"> • 더 이상 live 마우스 유지할 필요 없는 마우스 모델은 정자 동결을 통해 액체질소 통에 보존 처리함. • Pontin KO, cK0, Mats1(flox/+), Mats2(flox/+), TRE-ENT1, Ncapg2(f/f), Pontin(f/f), Emp2(+/-), STK32c(+/-), LSL-Grem1 등등 유전자변형 마우스의 정자동결 완료
• 암모델 마우스 repository 유지 관리 및 활용 (총 60여종)	20	100	<ul style="list-style-type: none"> • 60여종의 암모델 개발 관련 마우스들이 유지 보존하였음. (자체 개발 30여종, Cre mouse, Flp mouse, 기존 암모델 마우스 20여 종)
합계	100점	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 수년 동안 국립암센터 기관고유사업의 꾸준한 지원을 통해, 국제경쟁력을 갖춘 transgenic/knockout 마우스 시설이 확보되었고, 활발하게 운용되고 있음.
- 과제책임자 역시 잘 갖추어진 시설을 유지할 뿐만 아니라, 널리 활용하여 질적으로 향상된 연구결과를 도출하고 있음.
- 현재 가지고 있는 마우스 모델과 인프라 꾸준히 유지되고 활용된다면 더 좋은 연구결과들이 도출될 것으로 기대됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 마우스 모델을 활용한 연구는 꾸준한 지원과 지속적인 관심이 필요한 분야임.
- 현대 생물학의 발전 방향을 고려한다면 마우스 모델을 활용할 수 있는 시설과 인력에 대한 꾸준한 지원이 필요함.
- 국립암센터 trasgenic/knockout 마우스 시설은 수년 동안의 지원을 통해 잘 갖추어져 있기 때문에, 잘 유지하면서 활용에 대한 고견이 추가되길 바람.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구 성과물인 암모델 마우스, 유전자변형 마우스모델은 공개되어 국내 여러 연구자들이 활용될 수 있도록 할 예정임.
- 정자 동결, banking 등의 과정을 거친 후, 일반 연구자들도 연구목적으로 활용할 수 있도록 공개할 예정임.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

기관고유연구사업 연구성과 확인서

과 제 명	암모델 유전자변형 마우스 개발 및 활용 II		
과제책임자	소속	직위(급)	성명
총괄	시스템종양생물학과	부교수	이호
1세부			
2세부			
3세부			
총연구기간	2013. 1. 1. ~ 2015. 12. 31.		
연구비 집행현황 (' 15년. 10월 27일 현재, 단위 : 200,000천원)	예산액	집행액	집행률(%)
	200,000천원	145,275천원	72.6%

◆ 연구성과 현황

연번	2015년도 연구목표(또는 최종연구목표)	달성여부	달성도(%)	비고
1	항암타겟 유전자의 검증과 약효 예측을 위한 암모델 마우스 개발 및 이를 활용한 발암 기작 연구	0	100	
2				
3				

◆ 논문연구성과 현황

연번	논문제목	SCI/SCIE	Impact Factor ¹⁾	paper 발간일	online 발간일	grant	기타 ²⁾
1	Pontin functions as an essential coactivator for Oct4-dependent LincRNAs in embryonic stem cells	Nat.Commun. (SCI)	11.47	2015.04.08		기관고유	
2	TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development	EMBO J (SCI)	10.748	2014.02.03		기관고유	
3	Hepatocyte homeostasis between chromosome ploidy and liver function is regulated by Ssu72 phosphatase	Hepatology (SCI)	11.055	in press		기관고유	
4	Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF-κB signaling	Oncotarget (SCI)	6.359	2014.7.1			
5	Pontin is required for pre-TCR signaling at the beta-selection checkpoint in T cell development	BBRC (SCI)	2.281	2014.04.25			
6	Genetically Engineered Mouse Models for Drug Development and Preclinical Trials	Biomol. Ther.(SCI-E)	0.841	2014.07.31			
7	Pellino1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination.	JCI (SCI)	13.765	2014.11.03			
8	Phosphorylation of LSD1 by PKCα is crucial for circadian rhythmicity and phase resetting	Mol Cell (SCI)	14.464	2014.03.06			
9	OGA heterozygosity suppresses intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice	Oncogenesis (SCI)		2014.7.7			
10	Functional interplay between Aurora B kinase and Ssu72 phosphatase regulates sister chromatid cohesion	Nat. Commun. (SCI)	10.015	2013.10.23			
11	cAMP/PKA signalling reinforces the	EMBO J	9.822	2013.5.29			

	LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes.	(SCI)					
12	CR1g signals induce anti-intracellular bacterial phagosome activity in a chloride intracellular channel 3-dependent manner	Eur J Immuno (SCI)	5.103	2013.3.1			
<p>1) IF 발간일 전년도 기준</p> <p>2) 논문게재 단계 : manuscript preparation(원고 준비, 작성), submitted(제출), revision(수정), accepted(in print)(출판허가, 승인)</p>							
<p>◆ 기타 연구성과 현황(SCI/SCIE급 이외 학술지, 특허, 기술이전 등)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 국내/국제 학술대회 발표 • 유전자변형 마우스 모델 개발 또는 분석 12종 • 암모델 마우스 은행 운용 및 분양 (약 60 여종 유지, 20 여종 분양) 							
<p>◆ 연구성과 미달성 사유</p>							

ARTICLE

Received 21 Aug 2014 | Accepted 27 Feb 2015 | Published 10 Apr 2015

DOI: 10.1038/ncomms7810

OPEN

Pontin functions as an essential coactivator for Oct4-dependent lincRNA expression in mouse embryonic stem cells

Kyungjin Boo^{1,*}, Jinhyuk Bhin^{2,*}, Yoon Jeon³, Joomyung Kim¹, Hi-Jai R. Shin¹, Jong-Eun Park⁴, Kyeongkyu Kim¹, Chang Rok Kim¹, Hyonchol Jang³, In-Hoo Kim³, V. Narry Kim⁴, Daehee Hwang^{2,5}, Ho Lee³ & Sung Hee Baek¹

The actions of transcription factors, chromatin modifiers and noncoding RNAs are crucial for the programming of cell states. Although the importance of various epigenetic machineries for controlling pluripotency of embryonic stem (ES) cells has been previously studied, how chromatin modifiers cooperate with specific transcription factors still remains largely elusive. Here, we find that Pontin chromatin remodelling factor plays an essential role as a coactivator for Oct4 for maintenance of pluripotency in mouse ES cells. Genome-wide analyses reveal that Pontin and Oct4 share a substantial set of target genes involved in ES cell maintenance. Intriguingly, we find that the Oct4-dependent coactivator function of Pontin extends to the transcription of large intergenic noncoding RNAs (lincRNAs) and in particular linc1253, a lineage programme repressing lincRNA, is a Pontin-dependent Oct4 target lincRNA. Together, our findings demonstrate that the Oct4-Pontin module plays critical roles in the regulation of genes involved in ES cell fate determination.

¹ Creative Research Initiative Center for Chromatin Dynamics, School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea.

² Department of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang 790-784, South Korea. ³ Research Institute, Graduate School of Cancer Science and Policy, National Cancer Center, Gyeonggi-do 410-769, South Korea. ⁴ Institute for Basic Science, School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea. ⁵ Department of New Biology and Center for Plant Aging Research, Institute for Basic Science, DGIST, Daegu 711-873, South Korea.

* These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.H. (email: dhwang@dgist.ac.kr) or to H.L. (email: ho25lee@ncc.re.kr) or to S.H.B. (email: sbae@snua.ac.kr).

TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development

Jieun Kim¹, Sung Kyu Lee¹, Yoon Jeon^{2,3}, Yehyun Kim¹, Changjin Lee¹, Sung Ho Jeon⁴, Jaegal Shim², In-Hoo Kim², Seokmann Hong⁵, Nayoung Kim⁶, Ho Lee^{2*} & Rho Hyun Seong^{1,*}

Abstract

TopBP1 was initially identified as a topoisomerase II- β -binding protein and it plays roles in DNA replication and repair. We found that TopBP1 is expressed at high levels in lymphoid tissues and is essential for early lymphocyte development. Specific abrogation of TopBP1 expression resulted in transitional blocks during early lymphocyte development. These defects were, in major part, due to aberrant V(D)J rearrangements in pro-B cells, double-negative and double-positive thymocytes. We also show that TopBP1 was located at sites of V(D)J rearrangement. In TopBP1-deficient cells, γ -H2AX foci were found to be increased. In addition, greater amount of γ -H2AX product was precipitated from the regions where TopBP1 was localized than from controls, indicating that TopBP1 deficiency results in inefficient DNA double-strand break repair. The developmental defects were rescued by introducing functional TCR $\alpha\beta$ transgenes. Our data demonstrate a novel role for TopBP1 as a crucial factor in V(D)J rearrangement during the development of B, T and iNKT cells.

Keywords lymphocyte development; TopBP1; V(D)J recombination

Subject Categories Immunology

DOI 10.1002/embj.201284316 | Received 23 December 2012 | Revised 12 November 2013 | Accepted 18 November 2013

Introduction

Adaptive immunity is based on the ability of B and T cells to recognize and ultimately eliminate a plethora of foreign invaders from the host. An individual has billions of B and T cells and each conventional B and T cell expresses a B-cell receptor (BCR) or T-cell receptor (TCR) that recognizes a single antigen. The combinatorial assembly of a limited number of BCR and TCR genes by rearrangement gives rise to the diversity of the BCR and $\alpha\beta$ TCR repertoire.

The processes of B-cell and T-cell development are very similar, except that T progenitor cells migrate to the thymus via the blood to acquire T-cell identities. Lymphocytes originate from multipotent stem cells in the fetal liver before, and in the bone marrow after birth. Common lymphoid progenitors (CLPs) differentiate to late pro-B cells after passing through pre-pro (Fr. A) and early-pro stages (Fr. B). Early-pro-B cells rearrange the immunoglobulin (Ig) heavy chain, and late-pro-B cells (Fr. C) express pre-B-cell receptor (pre-BCR) on the cell surface. Pre-BCR signaling results in a burst of proliferation and the differentiation of pro-B cells to pre-B cells.

The earliest thymic progenitor cells express neither CD4 nor CD8 co-receptors (the double-negative (DN) stage) (Godfrey *et al.*, 1993). DN thymocytes are briefly arrested at late DN2 stage to rearrange the TCR β locus. After a set of somatic DNA rearrangements, a functional TCR β chain associates with pT α and CD3 complex to form the pre-TCR complex (von Boehmer & Fehling, 1997; von Boehmer *et al.*, 1999). Cells that fail to produce a functional pre-TCR are eliminated by apoptosis. Therefore, pre-TCR deficient RAG^{-/-} (Mombaerts *et al.*, 1992b; Shinkai *et al.*, 1992), TCR β ^{-/-} (Mombaerts *et al.*, 1992a), pT α ^{-/-} (Fehling *et al.*, 1995) and CD3^{-/-} (Love *et al.*, 1993; Malissen *et al.*, 1993) mice have a developmental block at the DN3 stage. The pre-TCR signaling at the DN3 stage is critical for differentiation into the CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) stage. Most DP thymocytes further develop into mature CD4 or CD8 single-positive (SP) thymocytes. On the other hand, iNKT cells branch away from the conventional T-cell lineage at the DP stage and proceed through defined developmental stages (Benlagha *et al.*, 2002). Although conventional T cells express a diverse repertoire of TCR β and TCR α , iNKT cells combine only the V α 14 TCR α chain with a restricted repertoire of TCR β proteins.

Diverse and functional receptors are produced by V(D)J recombination and this process is initiated by the lymphoid-specific recombinase (RAG, composed of RAG1 and RAG2). RAG proteins create double-strand breaks (DSBs) at recombination signal sequences (RSSs) that flank each variable (V), diversity (D) and joining (J)

¹ Department of Biological Sciences, Institute of Molecular Biology and Genetics, Research Center for Functional Cellulomics, Seoul National University, Seoul, Korea

² Division of Convergence Technology, Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Korea

³ Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, Korea

⁴ Department of Life Science, Hallym University, Chuncheon, Korea

⁵ Department of Bioscience and Biotechnology, Institute of Bioscience, Sejong University, Seoul, Korea

⁶ Asan Institute for Life Sciences, Asan Medical Center, Seoul, Korea

*Corresponding author. Tel: 82 2 880 7967; Fax: 82 2 887 9984; E-mail: rhseong@snu.ac.kr

Hepatocyte homeostasis for chromosome ploidization and liver function is regulated by Ssu72 protein phosphatase

Se-Hyuk Kim¹, Yoon Jeon^{1,2}, Hyun-Soo Kim¹, Jin-Kwan Lee³, Han Jeong Lim², Donglim Kang¹, Hyeseong Cho⁴, Cheol-Keun Park⁵, Ho Lee^{2,*} and Chang-Woo Lee^{1,3,*}

¹ Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, Korea

² Graduate School of Cancer Science and Policy, Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Korea

³ Department of Health Sciences and Technology, SAIHST, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

⁵ Department of Pathology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

*Address reprint requests to Chang-Woo Lee, Ph.D., Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon 16419, Korea. , Ho Lee, Ph.D., Graduate School of Cancer Science and Policy, National Cancer Center, Goyang 10408, Korea.

Abstract

Hepatocyte chromosome polyploidization is an important feature of liver development, and seems to be required for response to liver stress and injury signals. However, the question of how polyploidization can be tightly regulated in liver growth remains to be answered. Using a conditional knock-out mouse model, the liver-specific depletion of Ssu72 protein phosphatase was found to result in impairment in regulation of polyploidization. Interestingly, the aberrant polyploidization in Ssu72-depleted mice was found to be associated with impaired liver damage response and increased markers of liver injury, and also seemed to mimic the phenotypic features of liver diseases such as fibrosis, steatosis and steatohepatitis. In addition, the depletion of Ssu72 caused deregulation of cell cycle progression by overriding the restriction-point of cell cycle and aberrantly promoting DNA endoreplication via G2/M arrest. In conclusion, our results suggest that Ssu72 plays a substantial role in maintenance of hepatic chromosome homeostasis, and would allow monitoring of liver function. This article is protected by copyright. All rights reserved.

Keywords : Ssu72 phosphatase; chromosome ploidy; liver development; conditional knock-out mouse; non alcoholic fatty liver disease

Pellino 1 promotes lymphomagenesis by deregulating BCL6 polyubiquitination

Hye-Young Park,¹ Heounjeong Go,² Ha Rim Song,³ Suhyeon Kim,¹ Geun-Hyung Ha,¹ Yoon-Kyung Jeon,⁴ Ji-Eun Kim,⁵ Ho Lee,⁶ Hyeeseong Cho,⁷ Ho Chul Kang,⁸ Hee-Young Chung,³ Chul-Woo Kim,⁴ Doo Hyun Chung,⁴ and Chang-Woo Lee^{1,3}

¹Department of Molecular Cell Biology, Samsung Biomedical Research Institute, Sungkyunkwan University School of Medicine, Suwon, Republic of Korea. ²Department of Pathology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Republic of Korea. ³Samsung Advanced Institute for Health Sciences and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon, Republic of Korea. ⁴Department of Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea. ⁵Department of Pathology, Seoul Metropolitan Boramae Medical Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea. ⁶Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Republic of Korea. ⁷Department of Biochemistry and Molecular Biology and ⁸Department of Physiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Republic of Korea. ⁹Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Republic of Korea.

The signal-responsive E3 ubiquitin ligase pellino 1 (PELI1) regulates TLR and T cell receptor (TCR) signaling and contributes to the maintenance of autoimmunity; however, little is known about the consequence of mutations that result in upregulation of PELI1. Here, we developed transgenic mice that constitutively express human *PELI1* and determined that these mice have a shorter lifespan due to tumor formation. Constitutive expression of PELI1 resulted in ligand-independent hyperactivation of B cells and facilitated the development of a wide range of lymphoid tumors, with prominent B cell infiltration observed across multiple organs. PELI1 directly interacted with the oncoprotein B cell chronic lymphocytic leukemia (BCL6) and induced lysine 63-mediated BCL6 polyubiquitination. In samples from patients with diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs), PELI1 expression levels positively correlated with BCL6 expression, and PELI1 overexpression was closely associated with poor prognosis in DLBCLs. Together, these results suggest that increased PELI1 expression and subsequent induction of BCL6 promotes lymphomagenesis and that this pathway may be a potential target for therapeutic strategies to treat B cell lymphomas.

Introduction

The pellino (PELI) protein family is highly conserved in the course of evolution and contains C3HC4 RING-like motifs in its C-terminal domains, which may serve as scaffold proteins (1). PELI proteins catalyze ubiquitin (Ub) chains of several key molecules linked to lysine 48 (K48) or lysine 63 (K63) in B and T cell signaling, such as c-Rel and IL-1 receptor-associated kinase 1, respectively (2–5). Recent evidence from PELI1-deficient mice shows that PELI1 acts as a critical mediator of TRIF-dependent NF- κ B activation in TLR3 and TLR4 pathways and is thus required for the induction of proinflammatory cytokine genes (2). Therefore, loss of PELI1 leads to hyperactivation and nuclear accumulation of c-Rel in response to T cell receptor-CD28 (TCR-CD28) signaling and facilitates the development of autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (6). In addition, evidence from PELI3-deficient mice reveals that PELI3 is not indispensable for the TLR-induced expression of proinflammatory cytokines and plays a negative regulatory role in TLR3- and virus-induced expression of type 1 IFNs and related genes (7). Overall, accumulated evidence suggests an important role for PELI proteins in regulating the proliferation and activation of B and T cells. However, their physiological roles remain unclear.

Activation of TCR-CD28-mediated signaling induces PELI1 expression (6, 8). In addition, TLR3 and TLR4 signaling activates the expression and E3 ligase activity of PELI proteins (7, 9). These observations suggest that PELI protein expression is strictly regulated by appropriate TCR or TLR signaling. Accordingly, expression of PELI proteins may be finely controlled, because their deregulation leads to diseases in murine models. Aberrant expression of these proteins may be closely associated with certain diseases, such as autoimmune diseases and cancer. Indeed, aberrant expression of receptor molecules in the immune system is frequently observed in many types of cancer in humans and is associated with cancer progression and poor outcomes (10, 11). Neoplastic and malignant B cells also show aberrant expression of receptor molecules such as TLRs (10). Notably, TLR3 and TLR4 are expressed by malignant B cells (10), which indicates that chronic active receptor-mediated signaling may facilitate the constitutive activation of PELI1 expression. In the present study, we demonstrated that PELI1 was overexpressed in numerous cells obtained from aggressive B cell lymphomas.

The transcriptional repressor BCL6 is highly expressed in germinal center (GC) B and T cells and is required for GC formation and antibody affinity maturation (12). Many B cell lymphomas originate at the GC of B cells and develop as a result of the deregulation of BCL6 expression; these include follicular lymphomas (FLs; almost 100%), Burkitt lymphomas (BLs; 100%), diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs; >80%), and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphomas (>80%) (13). Notably, deregulation of BCL6 expression in lymphoid tumors

Authorship note: Hye-Young Park and Heounjeong Go contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Submitted: February 12, 2014; **Accepted:** September 4, 2014.

Reference information: *J Clin Invest*. 2014;124(11):4976–4988. doi:10.1172/JCI75667.

Phosphorylation of LSD1 by PKC α Is Crucial for Circadian Rhythmicity and Phase Resetting

Hye Jin Nam,¹ Kyungjin Boo,¹ Dongha Kim,¹ Dong-Hee Han,² Han Kyoung Choe,³ Chang Rok Kim,¹ Woong Sun,⁴ Hyun Kim,⁴ Kyungjin Kim,³ Ho Lee,⁵ Eric Metzger,⁶ Roland Schuele,⁶ Seung-Hee Yoo,⁷ Joseph S. Takahashi,⁷ Sehyung Cho,² Gi Hoon Son,⁸ and Sung Hee Baek^{1,*}

¹Creative Research Initiatives Center for Chromatin Dynamics, School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

²Department of Neuroscience, Neurodegeneration Control Research Center, Kyung Hee University School of Medicine, Seoul 130-701, South Korea

³Brain Research Center for the 21st Frontier Program in Neuroscience, School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

⁴Department of Anatomy, Korea University College of Medicine, Seoul 136-705, South Korea

⁵Division of Basic and Applied Sciences, National Cancer Center, Gyeonggi-do 410-769, South Korea

⁶Urologische Klinik und Zentrale Klinische Forschung, Klinikum der Universität Freiburg, DKTK Standort Freiburg, BIOS Centre of Biological Signaling Studies, Albert-Ludwigs-University, 79106 Freiburg, Germany

⁷Howard Hughes Medical Institute, Department of Neuroscience, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390, USA

⁸Department of Legal Medicine, Korea University College of Medicine, Seoul 136-705, South Korea

*Correspondence: sbaek@snu.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.028>

SUMMARY

The circadian clock is a self-sustaining oscillator that controls daily rhythms. For the proper circadian gene expression, dynamic changes in chromatin structure are important. Although chromatin modifiers have been shown to play a role in circadian gene expression, the *in vivo* role of circadian signal-modulated chromatin modifiers at an organism level remains to be elucidated. Here, we provide evidence that the lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is phosphorylated by protein kinase C α (PKC α) in a circadian manner and the phosphorylated LSD1 forms a complex with CLOCK:BMAL1 to facilitate *E-box*-mediated transcriptional activation. Knockin mice bearing phosphorylation-defective *Lsd1*^{SA/SA} alleles exhibited altered circadian rhythms in locomotor behavior with attenuation of rhythmic expression of core clock genes and impaired phase resetting of circadian clock. These data demonstrate that LSD1 is a key component of the molecular circadian oscillator, which plays a pivotal role in rhythmicity and phase resetting of the circadian clock.

INTRODUCTION

The circadian clock regulates daily oscillations and controls many physiological and behavioral systems. In mammals, molecular oscillators located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) in the brain, constitute the master clock (Welsh et al.,

2010). However, the oscillators are located not only in the SCN, but also in most peripheral tissues for proper regulation of circadian rhythmicity (Mohawk et al., 2012). The core circadian system consists of an interacting transcriptional-translational feedback loop of clock genes. CLOCK and BMAL1 are basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS transcription factors and activate the transcription of *Period* (*Per1* and *Per2*) and *Cryptochrome* (*Cry1* and *Cry2*) genes through binding to *E-box* elements as heterodimers (Gekakis et al., 1998). This CLOCK:BMAL1-mediated transcription is, in turn, inhibited by PER and CRY proteins, which form a negative-feedback loop (Sheaman et al., 2000). In addition to this core loop, BMAL1 expression is rhythmically regulated by the orphan nuclear receptors including ROR α and REV-ERB α/β (Yang et al., 2006b).

Dynamic changes of chromatin structure are critical events for the proper timing and extent of circadian gene expression. Rhythmic histone modifications have been shown to be associated with the cyclic transcription of several clock-controlled genes, including *Dbp*, *Per1*, and *Per2* (Etchegaray et al., 2003). CLOCK itself has an intrinsic histone acetyltransferase activity, which is required for circadian function (Doi et al., 2006). SIRT1 histone demethylase binds CLOCK and controls the deacetylation of PER2 and BMAL1 as well as histones (Asher et al., 2008). In addition to histone acetylation, histone methylation status has been implicated in circadian clock regulation. MLL1 histone methyltransferase specifically promotes trimethylation of H3K4 for transcriptional activation of circadian target genes (Katada and Sassone-Corsi, 2010). EZH2 histone methyltransferase interacts with CLOCK:BMAL1 complexes and is recruited to the *Per* gene promoters, where it catalyzes the trimethylation of H3K27 for transcriptional repression (Etchegaray et al., 2006). Jarid1a histone demethylase inhibits histone deacetylase 1 (HDAC1) function and enhances CLOCK:BMAL1-mediated



