

<붙임 4>

기관고유연구사업 결과 보고

결 재	과제책임자	과 장	부 장

※ 협조 :

- 사업단 소속 연구직의 경우 국가암관리사업단장
- 연구(의사직), 의사직, 의학물리학직의 경우 소속 센터장

본인이 수행한 2009 ~ 2010년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를
붙임과 같이 보고합니다.

과제명	PTEN에 의한 종양 마이크로RNA의 전사 후 조절기전 연구
과제책임자 (소속, 성명)	특수암연구과 박 종 배
총연구비	240,000천원 (2009년: 120,000천원, 2010년: 120,000천원)
총연구기간	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010년 12월 31일

과제책임자 박 종 배

보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 0910280)

PTEN에 의한 종양 마이크로RNA의 전사 후 조절기전 연구

Post-transcriptional regulation of oncomiR processing by PTEN

과제책임자 : 박 중 배

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="252 1142 1125 1704"><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>↑ 5cm ↓</p> <p>과 제 명</p> <p>국 립 암 센 터</p> <p>↑ 3cm ↓</p>
---	---

↑
6cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “PTEN에 의한 종양 마이크로RNA의 전사 후 조절기전 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 12. 31

국립암센터

과 제 책 임 자 : 박 종 배

연 구 원 : 김 종 현

” : 김 연 재

” : 최 은 영

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

< 요약문 >

연구분야(코드)	T-3		과제번호	0910280
과제명	PTEN에 의한 종양 마이크로RNA의 전사 후 조절기전 연구			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2009년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일		240,000
	1차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일		120,000
	2차년도	2010년 1월 1일 ~ 2010년 12월 31일		120,000
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일		
과제책임자	성명	박종배	주민등록번호	
	전화번호	031-920-2450	전자우편	jbp@ncc.re.kr
색인단어	국문	PTEN, 종양마이크로RNA, 전사후조절		
	영문	PTEN, OncomiR, Post-transcriptional control		

◆ 연구목표

<최종목표>

대표적인 종양억제 유전자인 PTEN에 의한 종양 마이크로RNA 조절기전 규명 및 암화과정에서의 역할 규명

<당해연도목표>

동정된 PTEN Interactome과 마이크로RNA processing 과정에서의 관련성 규명 및 PTEN에 의한 마이크로RNA의 정확한 조절기전 규명

◆ 연구내용 및 방법

1. 뇌신경교종 환자에서 종양 miR-21의 발현이 전사후 단계에서 조절됨.
-qRT-PCR 기법을 이용하여 환자군에서 primary, precursor, mature 형태의 종양 miR-21의 발현을 조사, 성숙한 형태의 종양 miR-21의 발현이 전사단계의 primary 형태에 비해 증가되어있는 것을 관찰.
2. 암 미세환경 변화에 의해 발현되는 종양 마이크로RNA의 발현이 PTEN에 의해 전사후 조절됨.
- 뇌신경교종에서의 대표적인 종양 마이크로RNA인 miR-21의 발현이 저산소상태에서 증가함으로써 다른 미세 환경 변화에 따른 발현 조절 및 PTEN 의존성 확인.
3. In vitro 마이크로RNA processing assay을 통한 PTEN의 마이크로RNA processing 단계에서의 역할 규명
- 마이크로RNA의 processing 과정을 in vitro 상에서 모방할 수 있는 방법을 이용 뇌신경교종에서 PTEN의 소실과 마이크로RNA의 가공과의 관련성 검증.
- PTEN이 소실되어있는 뇌신경교종 세포주인 U373-MG의 경우 종양 마이크로RNA의 processing이 PTEN이 야생형으로 존재하는 LN229에 비해 가속화되고 증대되어 있음을 확인.

4. Tandem affinity purification 방법을 이용한 PTEN의 새로운 마이크로RNA processing 관련 Interactome의 분리동정

- PTEN의 특이적 전사 후 조절 Interactome (Ago2, RNH1, hnRNPL, NOB1, ARIP4, DDX5, DDX18, DDX23, DUB3)을 분리동정하였으며 종양 마이크로RNA processing의 관련가능성을 탐색.

5. 기존의 마이크로RNA processing 기구의 주요 분자들과 PTEN의 연관성 검증

- Drosha, Dicer, Ago2 등의 기존에 마이크로RNA processing에 관여하는 분자들과 PTEN과의 결합을 검증.

6. PTEN의 돌연변이체를 확립을 통한 PTEN의 마이크로RNA processing 단계에서 역할 규명

- PTEN의 효소활성, 세포 내 위치 돌연변이체 제작하고 lenti-virus를 통해 뇌신경교종 세포주에서 과발현시켜 PTEN의 어떠한 기능이 마이크로RNA의 processing에 영향을 미치는지 조사.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

1. PTEN Interactome과 PTEN에 의한 마이크로RNA processing의 정확한 조절기전 규명
2. 암의 proliferation, angiogenesis, invasion, metastasis 등에 있어 PTEN에 의한 마이크로RNA 조절의 역할 규명

**◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)**

성 명

박중배, 김종헌, 김연재, 최은영

주민등록번호

Project Summary

Title of Project	Post-transcriptional regulation of oncomiR processing by PTEN
Key Words	PTEN, OncomiR, Post-transcriptional control
Project Leader	Jong Bae Park (Specific organ's branch)
Associated Company	
<p>MicroRNAs are short non-coding RNA molecules that play important roles in almost all kinds of cancer where they modulate key processes during tumorigenesis such as metastasis, apoptosis, proliferation, or angiogenesis. Multiple links between microRNA biogenesis and cancer highlight its significance for tumor diseases. Especially, post-transcriptional regulation of microRNA processing has been observed as major regulatory event of its biogenesis during tumor progression. However, mechanisms of microRNA processing are only beginning to emerge. Here, we demonstrated the microRNA-processing pathway can be regulated by PTEN in a post-transcriptional regulation.</p> <p>To address the relationship between PTEN and microRNA processing, we compared expression level of microRNAs in glioma cell lines with or without PTEN mutation. Interestingly, miR-21, one of the most well-known oncoMIR, was highly up-regulated by PTEN mutation under hypoxic environment. The regulation of miR-21 expression was not affected by actinomycin D treatment, a blocker of mRNA transcription, and PTEN-mutated cancer cell extracts increased precursor and mature form of miR-21, which further support regulation of microRNA-processing by PTEN. Moreover, the interaction of PTEN with other microprocessors of microRNA such as Drosha, Dicer, and Ago was observed by co-immunoprecipitation assay. Furthermore, we also identified other RNA processing molecules such as DDX family proteins, hnRNPs, and RNH1 by tandem affinity purification. These results suggest the possibility of microRNA processing by PTEN and implicates clinical importance of microRNA processing in cancer progression.</p>	

편집순서 6 : 연구결과

<최종목표>

대표적인 종양억제 유전자인 PTEN에 의한 종양 마이크로RNA 특이적 조절기전 규명 및 암화과정에서의 역할 규명

<기관고유연구사업 선행 연구결과 및 성과>

가. 뇌종양 세포주들에서 암 미세환경변화에 의해 발현되는 마이크로RNA의 발현 패턴이 PTEN의 의해 조절됨

- 뇌신경교종세포는 저산소상태에서 암세포의 형질이 악성으로 변환되어 신생혈관 형성이 촉진되고 침윤이 증가함으로 알려져 있음.
- 저산소 상태에서 변화하는 마이크로RNA의 패턴을 연구한 결과, 정상세포인 astrocyte와는 달리 뇌신경교종 세포는 일정 군의 마이크로RNA의 변화를 확인할 수 있음 이러한 패턴은 PTEN과 굉장히 중요한 연관성을 가짐을 확인 (그림 1).

증거-1) 패널 A, 와 C에서 보듯이 PTEN이 없는 세포주와 PTEN이 있는 세포주에서 마이크로RNA 패턴이 다름.

증거-2) 오른쪽 그림 U87 MG와 같은 PTEN이 없는 세포주에 PTEN을 다시 넣어 주었을 때, LN229와 같이 PTEN이 존재하는 세포주에 siRNA를 처리하였을때 마이크로RNA의 패턴 변화관찰.

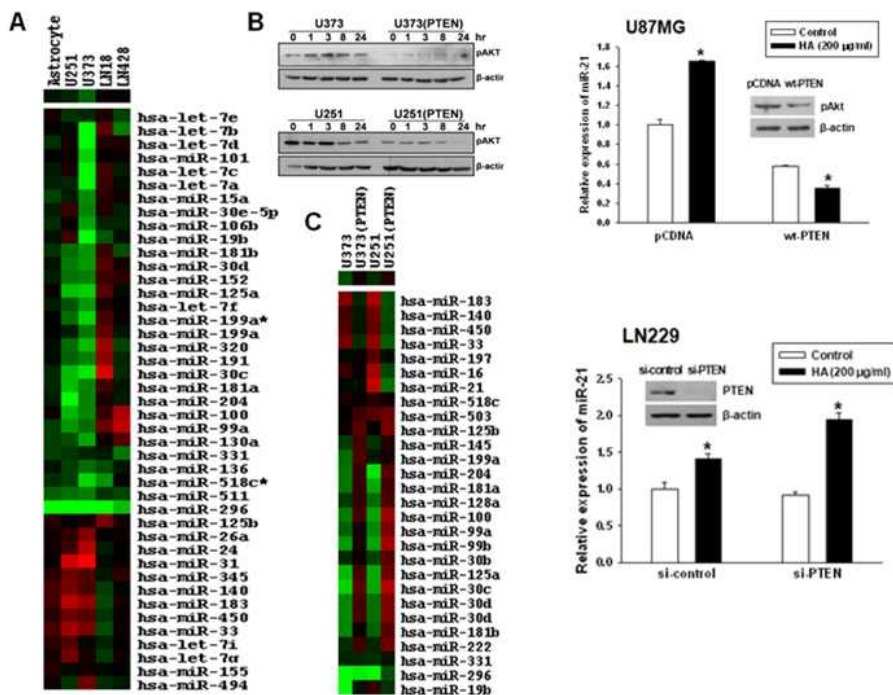


그림 1. PTEN에 의한 마이크로 RNA의 global regulation. (A), (C) 저산소상황에서 악성뇌신경교종세포주 마이크로 RNA 발현의 Microarray를 통한 분석. 뇌신경교종세포주에 PTEN을 재도입하거나 siRNA를 이용 제거하였을때 대표 종양 마이크로RNA miR-21의 발현분석(우).

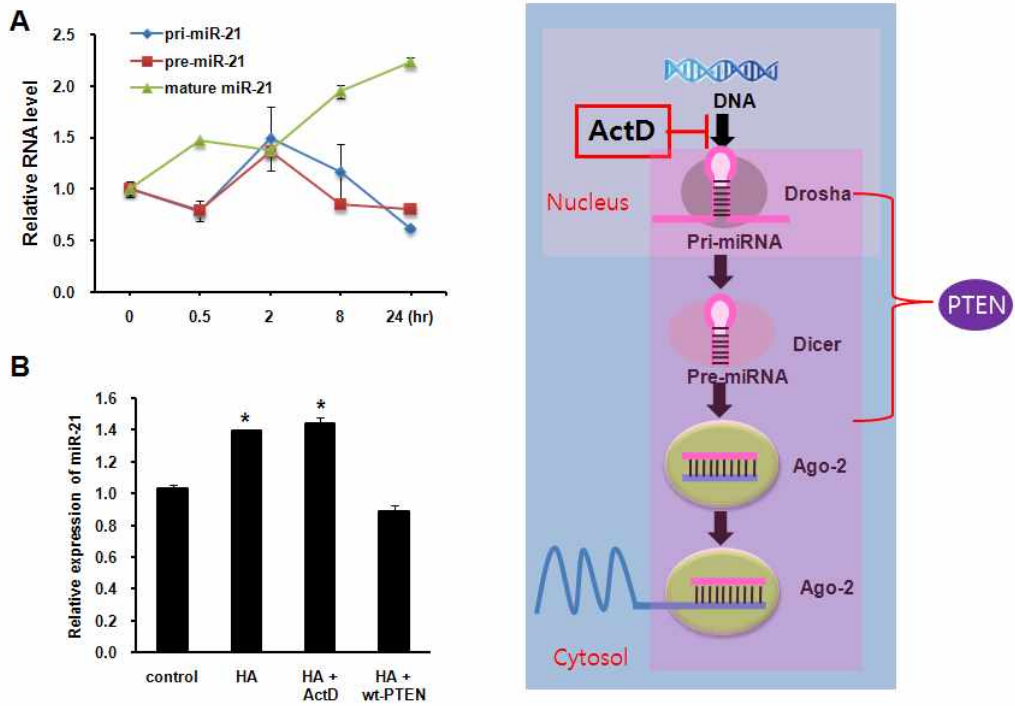


그림 2. PTEN에 의한 miR-21 생합성의 전사후 조절 (A) HA처리 후 U87MG에서 pri-, pre-, or mature miR-21의 발현확인 (B) U87MG에서 HA와 ActD 또는 HA와 wt-PTEN을 과발현시킨 뒤 mature miR-21의 발현확인.

나. 뇌신경교종환자에서 종양 마이크로RNA-21의 발현이 전사후 단계에서 조절됨

- 종양 마이크로RNA의 가공과정이 실질적으로 뇌신경교종환자의 조직에서 어떻게 이루어지고 있는지 여부를 조사하기 위해서 44명의 악성뇌신경교종 환자에 대해서 대표적인 종양 마이크로RNA인 마이크로RNA-21의 발현을 조사하였음.

- qRT-PCR 기법을 이용하여 각각의 환자에서 primary, precursor, mature 형태의 종양 마이크로RNA-21의 발현을 조사하였을 때 매우 흥미롭게도 전사 이후단계에서의 조절가능성을 발견함 즉 성숙한 형태의 종양 마이크로RNA-21의 발현이 전사단계의 primary 형태에 비해 상당히 증가되어 있는 것을 관찰함수 있음 (그림 2).

- 환자의 조직에서 얻어진 종양 마이크로RNA-21의 발현의 전사후 조절의 가능성은 뇌신경교종의 생성과 악성화에 중요한 세포내 인자들과의 연관성을 조사할 필요성을 제시하게 됨.

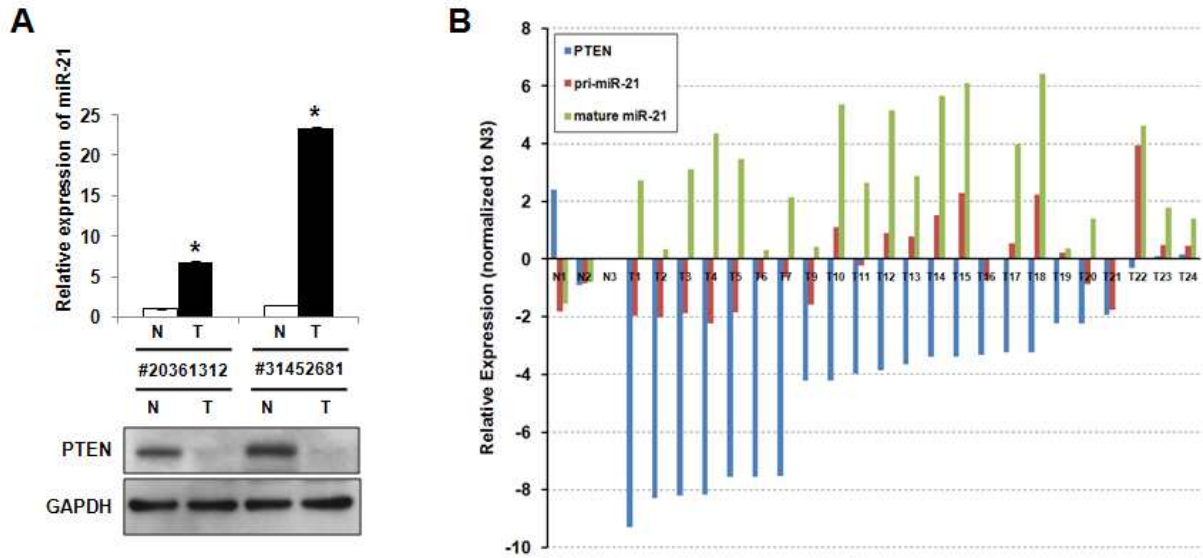


그림 3. 악성뇌신경교종환자의 정상조직과 암조직에서의 PTEN의 발현의 조사 (A) 마이크로 RNA processing 과정의 전구체와 최종산물인 성숙 마이크로RNA의 발현변화에 대한 정량적인 RT-PCR 결과 (B).

다. 암세포주의 extract를 이용한 마이크로RNA의 in vitro processing assay의 확립 및 PTEN이 결손되어있는 세포주에서 마이크로RNA processing의 증가.

- 마이크로RNA는 일반적인 mRNA와 같이 긴 형태로 합성이 개시되어 (primary miRNA = pri-miRNA)되어 핵안에서 Drosha/DGCR8에 의해 cropping이라는 가공과정을 통해 precursor 마이크로RNA (60-80 nt)로 전환되어 핵밖으로 수송됨.

- 수송된 precursor 마이크로RNA는 세포질에서 Dicer에 의해서 다시 절단되는 dicing 과정을 겪게 되고 최종적으로 miRISC에 loading되어 표적유전자의 발현을 번역억제나 deadenylation과정을 통해 조절하게 됨.

- 정교한 과정인 마이크로RNA의 processing 과정에 PTEN의 관여여부를 검증하기위해서 암세포주의 extract를 이용한 마이크로RNA의 in vitro processing assay의 확립하였음.

- 매우 놀랍게도 PTEN이 소실되어있는 뇌신경교종 세포주인 U373-MG의 경우 종양 마이크로RNA의 processing PTEN이 야생형으로 존재하는 LN229에 비해 가속화되고 증대되어 있음을 확인할 수 있음 (그림 4).

- 종합적으로 PTEN은 in vitro, in vivo, 환자에서 모두 공히 종양 마이크로RNA의 processing에 직간접적으로 관여한다고 결론 내릴 수 있으며 processing의 주요 결정자로 작용함을 파악할 수 있음.

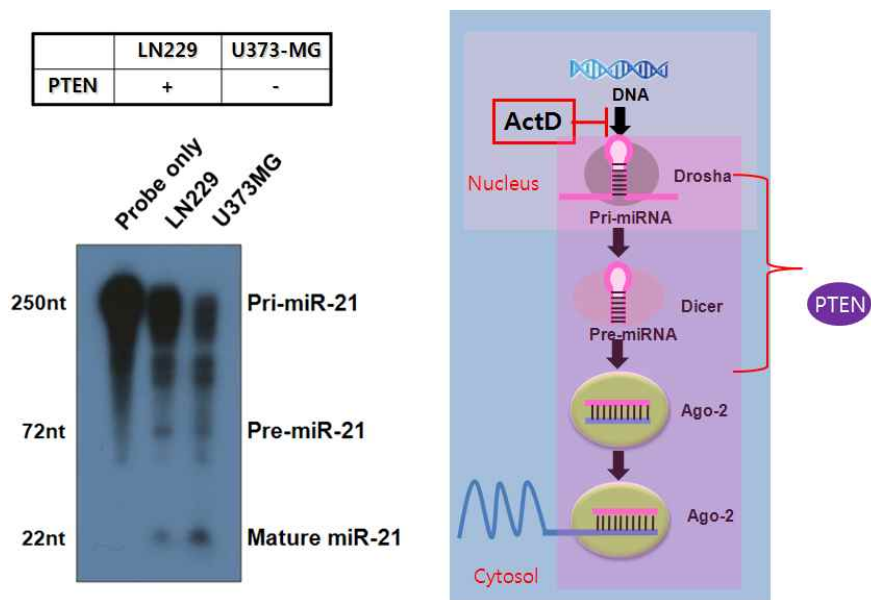


그림 4. PTEN이 결손되어있는 뇌신경교종 세포주에서 마이크로 RNA processing의 증가.

라. PTEN은 마이크로 RNA processing 핵심기구인 Drosha, Dicer와 마이크로 RNA-induced silencing complex 상의 핵심 catalytic engine인 Ago2와 결합함.

- PTEN의 마이크로RNA processing 기구와의 교류의 가능성을 검증하기 위해서 기존에 알려진 중요 miRISC 안의 각각의 분자들과의 결합 가능성 탐색하였음.

- 전술한 in vitro processing assay결과를 볼 때 PTEN의 소실은 마이크로 RNA 가공기구에 영향을 미치는 것으로 판단되며 실질적으로 PTEN이 이러한 기구들과의 교류의 가능성을 예측할 수 있음.

- 이를 확인하기 위해서 co-immunoprecipitation 기법을 통해 마이크로RNA processing 핵심기구인 Drosha, Dicer와 PTEN과의 결합 가능성을 검증하였으며 매우 놀랍게도 PTEN이 두 분자 모두와 결합함을 확인할 수 있었음.

- 추가적으로 PTEN분자와 Ago2 분자를 과발현시킨 암세포주에서 co-immunoprecipitation을 수행하였을 때 Ago2 분자가 PTEN에 대해서 특이적으로 침강되는 결과를 도출함. 이는 PTEN이 마이크로 RNA-induced silencing complex의 일원으로 작용하는 가능성을 제시한 결과로서 중요한 관찰로 판단됨.

- Ago family는 Ago1-4 네 종류의 분자가 존재하며 매우 높은 homology를 가지고 있음. 하지만 이 중에서 Ago2 만이 유일하게 마이크로RNA-induced silencing complex상에서 catalytic engine으로 작용함이 알려져 있음. 이들 family중에서 가장 유사성이 높은 Ago2와 Ago1간의 결합차이를 조사하였을 때 Ago2만이 특이적으로 침강되는 것을 관찰할 수 있었음.

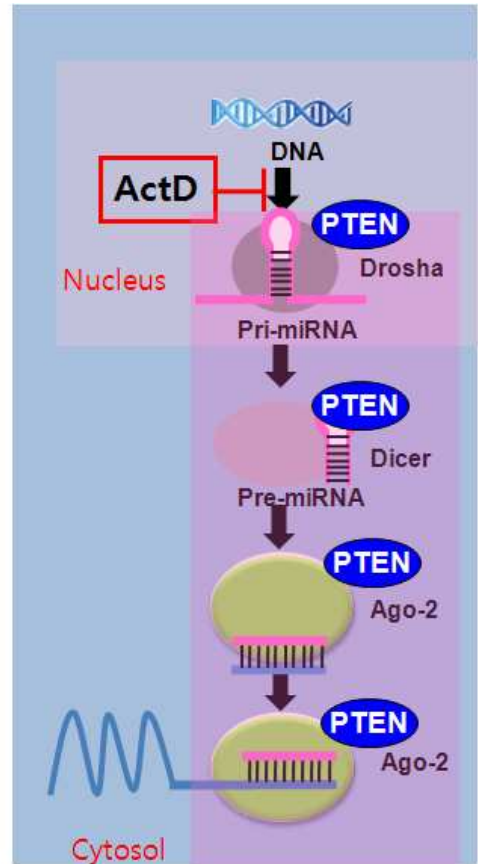
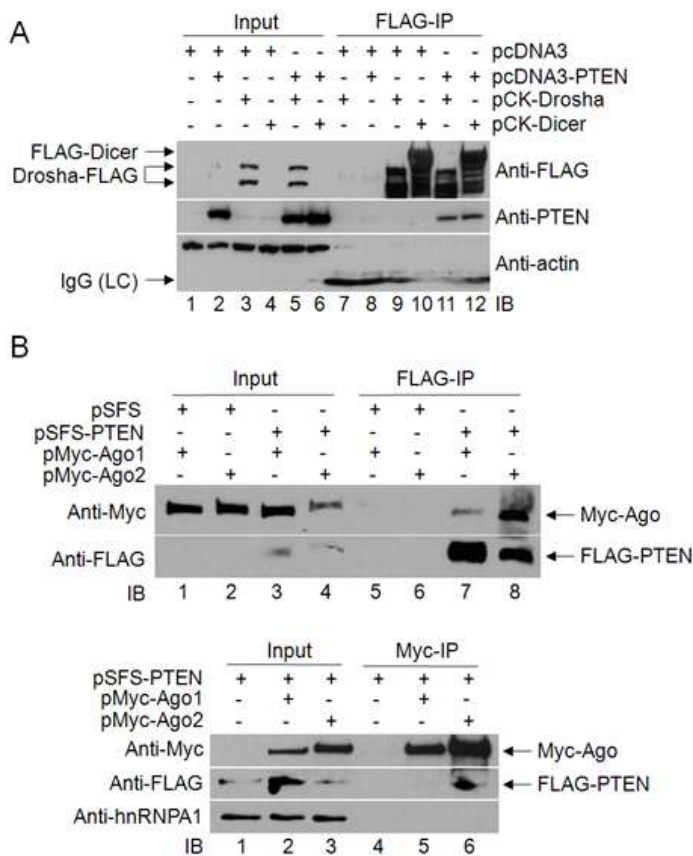
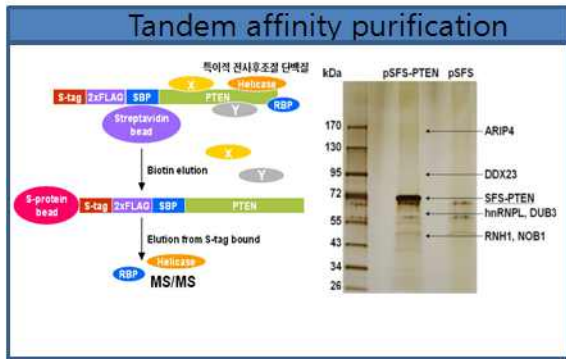


그림 5. PTEN은 마이크로 RNA processing core machinery인 Drosha, Dicer와 마이크로 RNA-induced silencing complex 상의 핵심 catalytic engine인 Ago2와 결합함.

마. PTEN Interactome의 확장: tandem affinity purification method를 이용한 PTEN의 Interactome의 조직적 분석

- PTEN과 결합가능성이 있는 특이적 전사후 조절인자분석을 위해 PTEN에 대한 tandem affinity purification이 가능한 stable cell line을 제작하였으며 이를 이용하여 MALDI-TOF, Ion Trap등의 프로테오믹스 방법을 통해 특이적 전사후 조절 분자들을 분석하였음.

- 놀랍게도 다양한 RNA helicase, RNA결합단백질, RNase inhibitor, deubiquitination enzyme등 특이적 전사후 조절에 관여하는 다수의 분자들이 검출되어 나옴 (Ago2, RNH1, hnRNPL, NOB1, ARIP4, DDX5, DDX18, DDX23, DUB3; 표 참조). 따라서 이러한 분자들이 PTEN과 결합을 통해서 마이크로RNA processing의 일원으로 작용할 수 있는 가능성을 시사하는 매우 중요한 결과라고 판단할 수 있음.



Protein name	Main function
Ago2	RNA-mediated gene silencing
DDX18	RNA-dependent helicase
DDX23	pre-mRNA splicing
hnRNPL	mRNA processing
NOB1	mRNA degradation
RNH1	Ribonuclease inhibitor
DUB3	Deubiquitinating

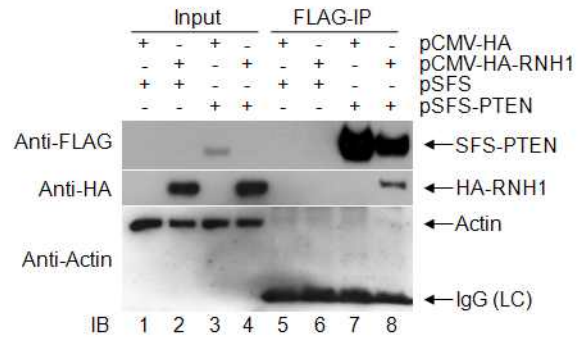
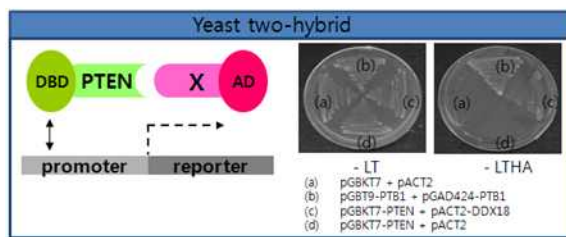


그림 6. PTEN의 Interactome의 조직적 분석. Tandem affinity purification과 yeast two-hybrid 방법을 통한 새로운 PTEN의 Interactome의 조직적 분석. Interactome의 핵심분자인 RNH1과 PTEN과의 특이적 결합확인.

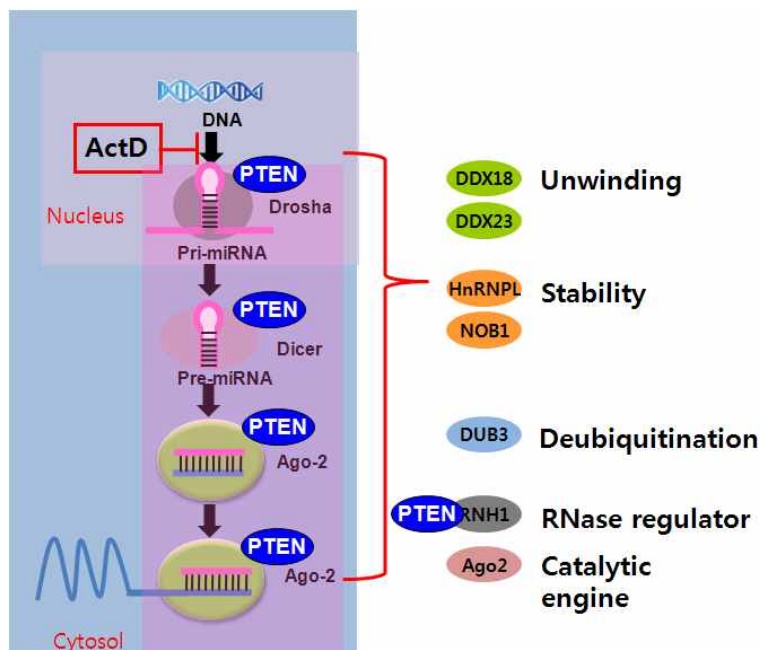


그림 7. 마이크로RNA processing에 관여하는 새로운 PTEN Interactome의 예상기능. 바. PTEN의 특이적 localization 기능을 증폭한 돌연변이체의 제작 및 발현검증

- 최근 보고에 의하면 PTEN이 핵에 존재하며 핵에 localize하는 기능은 암화과정과 밀접한 관련을 지니는 것으로 보고되어지고 있음.

- 이러한 PTEN의 기능적 localization에 대한 분석과 마이크로 RNA의 가공과정에서의 역할을 분석하기 위해서 PTEN에 NLS 또는 NES 서열을 결합시켜 그 기능과 발현을 검증하였음.

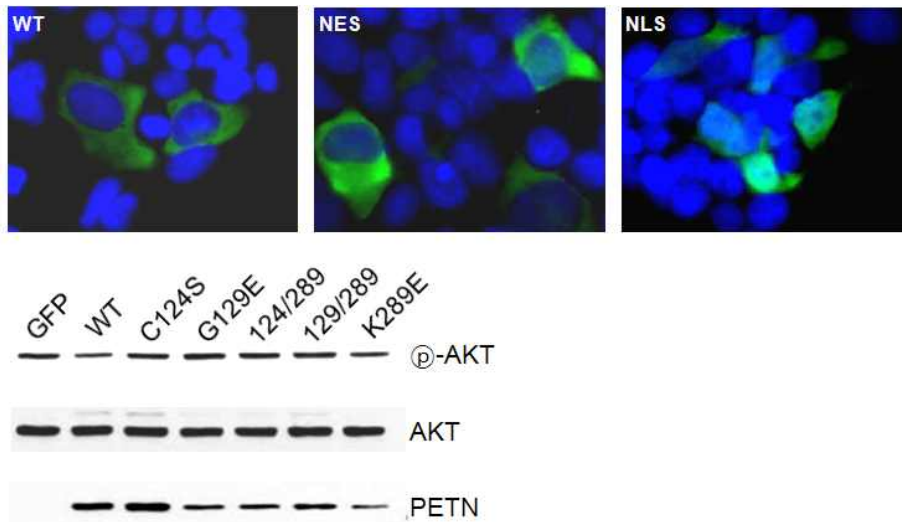


그림 8. PTEN의 NES 그리고 NLS 돌연변이체의 제작 및 발현확인.

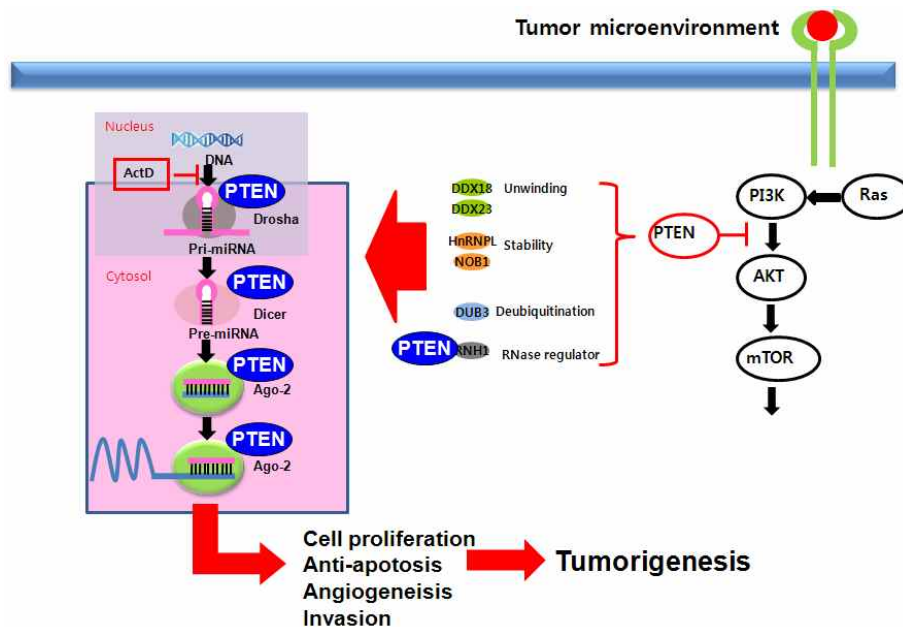


그림 9. 암화미세환경에서 PTEN에 의한 마이크로RNA 가공조절, Interactome과의 관련성에 따른 암화과정에서의 모델.

3. 연구결과 고찰 및 결론

<국내외 연구동향>

- 최근 microRNA연구의 가장 큰 화두는 이들이 세포 외부환경 혹은 유전적 요인에 의해 일어나는 변이를 관찰하거나 그 분자기전을 밝히는 일임.
- 김빛내리 교수를 비롯한 국내 연구진과 우수한 외국 실험실에서 새로운 microRNA processor를 찾아내고 있음.

Protein	Motifs	Functions	References
DGCR8	dsRBD	Stabilize Drosha	Han et al. 2009 <i>Cell</i>
hnRNP A1	RRM, M9	Chaperone for Drosha	Guil & Caceres 2007 <i>Nat Struct Mol Biol</i>
p68/p72	DEAD-box	Promote Drosha	Fukuda et al. 2007 <i>Nat Cell Biol</i>
p53	DNA binding	Promote Drosha	Suzuki et al. 2009 <i>Nature</i>
SMADs	DNA binding	Promote Drosha	Davis et al. 2008 <i>Nature</i>
ER α	DNA binding	Inhibit Drosha	Yamagata et al. 2009 <i>Mol Cell</i>
ARS2	Plant SEERRATE	Promote Drosha	Gruber et al. 2009 <i>Cell</i>
TRBP	dsRBD	Stabilize Dicer	Paroo et al. 2009 <i>Cell</i>
TUT4	zinc finger	Inhibit Dicer	Heo et al. 2009 <i>Cell</i>
ADARs	dsRBD	Inhibit Drosha & Dicer	Kawahara et al. 2007 <i>Science</i>
Lin-28	zinc finger	Inhibit Drosha & Dicer	Heo et al. 2008 <i>Cell</i>
KSRP	KH	Promote Drosha & Dicer	Trabucchi et al. 2009 <i>Nature</i>
mLin41	RING finger	Degrade Ago2	Rybak et al. 2009 <i>Nat Cell Biol</i>
TRIM32	RING finger	Promote miRNA activity	Hammell et al. 2009 <i>Cell</i>
NHL-2	RING finger	Promote miRNA activity	Schwamborn et al. 2009 <i>Cell</i>
Mei-P26	RING finger	Inhibit miRNA activity	Neumuller et al. 2008 <i>Nature</i>

- 위 Table에서 정리된 결과와 같이 매우 많은 새로운 분자들이 대두되고 있고 그 결과들은 high profile journal에서 출판되고 있음.
- 하지만, 아직까지 암세포에서의 특이적인 조절기전에 관한 연구는 미진함.

<연구결과가 국내·외 기술개발 분야에서 차지하는 위치>

- 현재 국내 연구진과 외국연구진의 microRNA processor를 밝히기 위한 연구가 매우 활발히 진행되고 있음.
- 본 연구진은 기존 연구진들의 연구방법 및 연구재료를 모두 확보하고 있고 이들보다 한 단계 앞선 암화과정에서의 구체적인 연구를 통해 새로운 패러다임을 제시하고자 함.

<연구결과 해석>

- 본과제를 통해 뇌종양에서 가장 중요한 유전적 요인인 PTEN의 mutation과 microRNA processing이 밀접한 연관관계가 있음을 밝힘.
- 특히 PTEN에 의한 processing이 기존에 알려진 microRNA processor뿐만 아니라 새로운 processor를 통한 조절기전이 존재함을 밝힘.
- 본 연구결과는 암화과정에서 microRNA processing이 중요한 역할을 함을 제시함으로써 새로운 암 연구의 방향을 제시하고 진단 및 치료의 근거를 제시함.

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⁾
Down-regulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas	박종배 (교신저자)	ONCOGENE (7.4)	accepted		0910280
Measuring CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation-deadenylation in <i>Xenopus laevis</i> oocytes and egg extracts.	<u>Jong Heon Kim</u> and Joel D. Richter. (교신, 제 1)	<i>Methods Enzymol.</i> (2.186)	2008 ; 448, 119-138	국외 SCI	0210140
An RNA-binding protein hnRNP D modulates IRES-dependent translation of HCV RNA.	Ki Young Paek, Chon Saeng Kim, Sung Mi Park, <u>Jong Heon Kim</u> , and Sung Key Jang. (공동)	<i>J.Virol.</i> (5.127)	2008; 82, 12082-12093.	국외 SCI	없음

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
microRNA and hypoxic cancer progression	박종배	한국 생화학, 분자생물학회	국내	0910280
Down-regulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas	박종배	세포생물학회	국내	0910280

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	마이크로RNA-21 저해제를 포함하는 방사선 민감성 증진용 조성물	국립암센터	미국, 일본,중국, 대한민국	PCT/KR2008 /004431

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)
Signaling to Cytoplasmic Polyadenylation and Translation	김종현, Joel D. Richter (제 1저자)	Elsevier (USA)		2009, Chapter 278

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
대표적인 종양억제 유전자인 PTEN에 의한 종양 마이크로RNA 조절기전 규명 및 암화과정에서의 역할 규명	1차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. 종양 마이크로RNA의 processing 과정 중 PTEN의 관여규명. 2. PTEN이 포함된 종양 microRNA 복합체 동정. 	<ul style="list-style-type: none"> - 암 미세환경 변화에 의해 발현되는 종양 마이크로RNA의 발현이 PTEN에 의해 전사후 조절됨. - In vitro 마이크로RNA processing assay을 통한 PTEN의 마이크로RNA processing 단계에서의 역할 규명. - Tandem affinity purification 방법을 이용한 PTEN의 새로운 마이크로RNA processing 관련 Interactome의 분리동정. 	85	45
	2차년도	<ol style="list-style-type: none"> 1. 암환자군에서 마이크로RNA의 가공조절과 PTEN의 관련성 연구. 2. 기존 마이크로RNA 가공 핵심기구와 PTEN의 결합-조절가능성 검증 3. PTEN 활성 돌연변이 제작을 통한 마이크로RNA 가공단계에서의 기능연구 	<ul style="list-style-type: none"> - 뇌신경교종 환자에서 종양 miR-21의 발현이 전사후 단계에서 조절됨. - 기존의 마이크로RNA processing 기구의 주요 분자(Drosha, Dicer, Ago2등)들과 PTEN의 연관성 검증. - PTEN의 효소활성, 세포 내 위치 돌연변이체 제작하고 lentivirus를 통해 뇌신경교종 세포주에서 과발현시켜 PTEN의 어떠한 기능이 마이크로RNA의 processing에 영향을 미치는지 조사 시도. 	85	85

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
<ul style="list-style-type: none"> - 암 미세환경 변화에 의해 발현되는 종양 마이크로RNA의 발현이 PTEN에 의해 전사후 조절됨을 검증한 여부. - In vitro 마이크로RNA processing assay을 통한 PTEN의 마이크로RNA processing 단계에서의 역할 규명 여부. - Tandem affinity purification 방법을 이용한 PTEN의 새로운 마이크로RNA processing 관련 Interactome의 분리동정한 여부. 	<ul style="list-style-type: none"> - 저산소 상태에서 변화하는 마이크로RNA의 패턴을 연구한 결과, 정상세포인 astrocyte와는 달리 뇌신경교종 세포는 일정한 마이크로RNA의 변화를 확인할 수 있음 이러한 패턴은 PTEN과 굉장히 중요한 연관성을 가짐을 확인. - 마이크로RNA의 가공 과정에 PTEN의 관여여부 검증하기 위해서 암세포주의 extract를 이용한 마이크로RNA의 in vitro processing assay의 확립하였고 매우 놀랍게도 PTEN이 소실되어있는 뇌신경교종 세포주인 U373-MG의 경우 종양 마이크로RNA의 가공과정이 PTEN이 야생형으로 존재하는 LN229에 비해 가속화되고 증대되어 있음을 확인할 수 있었음. - PTEN에 대한 tandem affinity purification이 가능한 stable cell line을 제작하였으며 프로테오믹스 방법을 통해 특이적 전사후 조절 분자들을 분석하였으며 다양한 RNA helicase, RNA결합단백질, RNase inhibitor, deubiquitination enzyme등 특이적 전사후 조절에 관여하는 다수의 분자들이 검출됨 (RNH1, hnRNPL, NOB1, ARIP4, DDX5, DDX18, DDX23, DUB3). 따라서 이러한 분자들이 PTEN과 결합을 통해서 마이크로RNA processing의 일원으로 작용할 수 있는 가능성을 시사하는 매우 중요한 결과임.
<ul style="list-style-type: none"> - 뇌신경교종 환자에서 종양 miR-21의 발현이 전사후 단계에서 조절됨을 밝힌 여부 - 기존의 마이크로RNA processing 기구의 주요 분자(Drosha, Dicer, Ago2등)들과 PTEN의 연관성 검증여부. - PTEN의 효소활성, 세포 내 위치 돌연변이체 제작하고 lentivirus를 통해 뇌신경교종 세포주에서 과발현시켜 PTEN의 어떠한 기능이 마이크로RNA의 processing에 영향을 미치는지 조사 시도 여부. 	<ul style="list-style-type: none"> - 44명의 악성뇌신경교종 환자에 대해서 대표적인 종양 마이크로RNA인 마이크로RNA-21의 발현을 조사하였으며 qRT-PCR 기법을 이용하여 각각의 환자에서 primary, precursor, mature 형태의 종양 마이크로RNA-21의 발현을 조사하였을 때 매우 흥미롭게도 전사 이후단계에서의 조절가능성을 발견함. 환자의 조직에서 얻어진 종양 마이크로RNA-21의 발현의 전사후 조절의 가능성은 뇌신경교종의 생성과 악성화에 중요한 세포내 인자들과의 연관성을 조사할 필요성을 제시하게 됨. - Co-immunoprecipitation 기법을 통해 마이크로RNA processing 핵심기구인 Drosha, Dicer와 PTEN과의 결합 가능성을 검증하였으며 PTEN이 두 분자 모두와 결합함을 확인할 수 있었음. PTEN분자와 Ago2 분자를 과발현시킨 암세포주에서 co-immunoprecipitation을 수행하였을 때 Ago2 분자가 PTEN에 대해서 특이적으로 침강되는 결과를 도출함. 이는 PTEN이 마이크로RNA-induced silencing complex의 일원으로 작용하는 가능성을 제시한 결과로서 중요한 관찰로 판단됨. - 최근 보고에 의하면 PTEN이 핵에 존재하며 핵에 localize 하는 기능은 암화과정과 밀접한 관련을 지니는 것으로 보고되어지고 있음. PTEN의 기능적 localization에 대한 분석과 마이크로 RNA의 가공과정에서의 역할을 분석하기 위해서 PTEN에 NLS 또는 NES 서열을 결합시켜 그 기능과 발현 검증을 시도.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Molecular and Cellular Biology (IF 4.8)
산업재산권 등록		
기 타		

<후속연구 수행 필요성>

- 진단계 연구를 통해서 발굴 또는 확정된 PTEN에 의한 종양 마이크로RNA processing과 암화 과정에서 분자생물학적 기전에 대한 좀 더 심층적인 이해가 필요하며 새롭게 검출된 종양 마이크로 RNA processing 관련 PTEN의 Interactome에 대한 추가적인 분석이 필요함. 이러한 분자생물학적인 이해를 통해 본 과제를 통해 검증된 발암과정의 주요 후보 표적분자에 대한 추후 연구에 있어 저해제 타겟으로서 설정이 가능함.

6. 참고문헌

1. Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor microRNA. *Mol Cell*. 2008;32(2):276-84.
2. Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell*. 2009;138(4):696-708.
3. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicciato S, Piccolo S. A. MicroRNA targeting Dicer for metastasis control. *Cell*. 2010;141(7):1195-207.
4. Richter JD. CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(6):279-85.
11. Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, Nitsch R, Krappmann D, Wulczyn FG. The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1411-20.
5. Su X, Chakravarti D, Cho MS, Liu L, Gi YJ, Lin YL, Leung ML, El-Naggar A, Creighton CJ, Suraokar MB, Wistuba I, Flores ER. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature*. 2010;467(7318):986-90.
6. Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature*. 2009;459(7249):1010-4.
7. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008;320(5872):97-100.
8. Viswanathan SR, Powers JT, Einhorn W, Hoshida Y, Ng TL, Toffanin S, O'Sullivan M, Lu

J, Phillips LA, Lockhart VL, Shah SP, Tanwar PS, Mermel CH, Beroukhir R, Azam M, Teixeira J, Meyerson M, Hughes TP, Llovet JM, Radich J, Mullighan CG, Golub TR, Sorensen PH, Daley GQ. Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nat Genet.* 2009;41(7):843-8.

9. West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature.* 2009;460(7257):909-13.