

(과제번호 : 0510030 )

항암제 내성 대장암 세포주에서 내성 관련 단백질들의  
동정 및 기능 연구(II)

Identification and verification of chemoresistance-related  
proteins in colorectal cancer cell lines  
with induced drug resistance (II)

과제책임자 : 유 병 철

국 립 암 셴 터

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “항암제 내성 대장암 세포주에서 내성 관련 단백질들의 동정 및 기능 연구(II)” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2007. 12. 31.

국립암센터

과 제 책 임 자 : 유 병 철

연 구 원 : 장 희 진

” : 임 석 병

” : 신 영 경

” : 장 상 근

” : 김 근

” : 안 선 아

# 목 차

## < 요약 문 >

|                        |    |
|------------------------|----|
| (한글) -----             | 1  |
| (영문) -----             | 3  |
| 1. 연구사업의 최종목표 -----    | 5  |
| 2. 연구사업의 내용 및 결과 ----- | 5  |
| 3. 연구결과 고찰 및 결론 -----  | 43 |
| 4. 연구성과 및 목표달성도 -----  | 44 |
| 5. 연구결과의 활용계획 -----    | 50 |
| 6. 첨부서류 -----          | 50 |

## < 요약 문 >

|                  |   |  |         |                   |
|------------------|---|--|---------|-------------------|
| 연구분야(코드)         |   |  | 과제번호    | 0510030           |
| 과제명              | 항암제 내성 대장암 세포주에서 내성 관련 단백질들의 동정 및 기능 연구(II) |  |         |                   |
| 연구기간/연구비<br>(천원) | 합계  | 2005년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일                    | 550,000 |                   |
|                  | 1차년도  | 2005년 1월 1일 ~ 2005년 12월 31일                    | 170,000 |                   |
|                  | 2차년도  | 2006년 1월 1일 ~ 2006년 12월 31일                    | 200,000 |                   |
|                  | 3차년도  | 2007년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일                    | 180,000 |                   |
| 과제책임자            | 성명  | 유병철  | 주민등록번호  |                   |
|                  | 전화번호  | 031-920-2342                                   | 전자우편    | yoo_akh@ncc.re.kr |
| 색인단어             | 국문  | 항암제 내성, 대장암, 단백질체학                             |         |                   |
|                  | 영문  | Drug Resistance, Colorectal Cancer, Proteomics |         |                   |

### ◆ 연구목표

#### <최종목표>

- 항암제 내성 인체 대장암 세포주를 이용한 유전체 및 단백질체 연구를 통하여 내성 관련 유전자 및 단백질들을 발굴하고 그 역할을 규명함으로써 새로운 내성 관련 기작의 이해를 확대
- 임상적으로 적용이 가능한 항암제 내성 예측인자나 항암보조제 개발의 토대를 마련

#### <당해연도목표>

- 항암제 내성에 큰 차이를 보이는 대장암 세포주들간의 단백질체 분석을 통한 내성 관련 단백질들의 동정
- 기존 연구를 통하여 얻어진 내성 관련 후보 단백질의 발현 조절과 활성 조절이 대장암 세포주의 항암제 내성에 미치는 효과 분석
- 내성 관련 단백질의 효과적인 임상 적용 고찰
- iCPL (Isotope Coded Protein Labelling) 방법을 LC-MALDI system에 접목 2-DE gel independent한 새로운 고감도 대용량 단백질체 분석 방법 토대 마련

### ◆ 연구내용 및 방법

- 인체 대장암 세포주, SNU-C4, SNU-C5, SNU-769A, SNU-769B 로부터 얻어진 5-FU 내성 세포주들의 비교 단백질체학(comparative proteomics)을 계속하여 수행함

- ① 세포주로부터 얻어진 단백질들의 분획(sub-fractionation: subcellular fractionation, phosphoprotein isolation, glycoprotein isolation etc)을 통한 proteome 분석의 효율을 증대시킴
  - ② iCPL 과 LC-MALDI system 구축을 통한 2-DE independent proteomics 실현 및 high-throughput automatic MS/MS analysis를 통한 효율적 protein-protein interaction 분석
- 기존 연구를 통하여 얻어진 내성 관련 후보 단백질의 발현 조절과 활성 조절이 대장암 세포주의 항암제 내성에 미치는 효과 분석
- ① siRNA system을 이용한 효과적 유전자 발현 억제 방법 확립을 통해 내성관련 후보 단백질들이 내성 억제 및 증진에 미치는 영향을 효과적으로 분석
  - ② 내성관련 후보 단백질의 항체를 이용한 immunoprecipitate 내의 단백질 분석을 통해 내성 후보 단백질과 interaction 하는 단백질을 동정하여 내성 단백질의 세포내 내성과 관련한 역할을 이해할 수 있는 자료를 획득함

◆ 연구성과

-정량적 성과

| 구분          | 달성치/ 목표치 <sup>1)</sup> | 달성도 (%) | 비고   |
|-------------|------------------------|---------|--|
| SCI 논문 IF 합 | 35.539/46              | 77.2    | 제1저자 2편 (IF 13.833) + 공저자 8편 (IF 21.706) = 총 IF 35.539   |
| 기타 성과       |                        |         | * 제1저자 1편 (IF 2.442) + 교신저자 1편 (3.277) = 총 IF 5.719 under review<br>* 제 1저자 4편 = 예상 총 IF 약 27 preparing to submit in a month |

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- iCPL을 이용한 LC-MALDI MS/MS system 확립
- 임상적 항암제 내성 예측을 위한 secretome (in vitro) data 구축

◆ 참여연구원

(최종연도 참여인원)

성 명 유병철, 장희진, 임석병, 신영경, 장상근, 김 근, 안선아

주민등록번호

## Project Summary

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Title of Project</b>   | Identification and verification of chemoresistance-related proteins in colorectal cancer cell lines with induced drug resistance (II) |
| <b>Key Words</b>          | Drug Resistance, Colorectal Cancer, Proteomics  |
| <b>Project Leader</b>     | Byong Chul Yoo  |
| <b>Associated Company</b> | None  |

5-Fluorouracil (5-FU) is one of the most widely used chemotherapeutic agents in treating advanced colorectal cancer. However, partial or complete responses of colorectal cancer to 5-FU are generally followed by eventual tumor re-growth. Numerous studies have focused on identifying the mechanisms and key molecules involved to overcome natural or acquired 5-FU resistance. However, our knowledge on the subject is currently limited, and further investigation is necessary. To date, we have identified several proteins associated with 5-FU resistance by comparative proteome assessment, and their specific roles for 5-FU resistance have been studied. The followings are the summary of our recent findings

1. Decreased galectin-3 expression is significantly associated with elevated 5-FU resistance. Galectin-3 suppression results in diminished human colon cancer cell proliferation. However, galectin-3 suppression in the presence of 5-FU does not affect the proliferation rate, and slightly augments apoptosis. Suppression of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) interacting with galectin-3 has similar effects as galectin-3 on colon cancer cell proliferation, both in the absence and presence of 5-FU. Interestingly, while galectin-3 protein is not affected by the hnRNP Q level, its suppression is accompanied by a decrease in hnRNP Q expression. Furthermore, the hnRNP Q protein becomes unstable in the presence of 5-FU. The results demonstrate that galectin-3 may regulate hnRNP Q-mediated 5-FU resistance.
2. Galectin-3 interacted with the d-subunit of the F<sub>0</sub> complex, but not the alpha-subunit of the F<sub>1</sub> complex. Galectin-3 was co-purified with ATP synthase until mitochondrial inner membrane vesicle fraction. Interestingly, ATP synthase activity decreased in the presence of galectin-3. However, after suppression of galectin-3 activity by siRNA transfection, the pattern of total intracellular ATP content in human colon cancer cells remained similar to that of the control. Interestingly, galectin-3 suppression is accompanied by a decrease in ATP synthase d-subunit expression. In conclusion, galectin-3 co-localized with ATP synthase in mitochondria of human colon cancer cells possibly inhibits enzyme activity by interacting with the F<sub>0</sub> complex, however, its interaction may stabilize ATP synthase protein itself.

3. Comparative assessment of secretome obtained from human colon cancer cell line SNU-C4 and its 5-FU resistant derivative cells has been performed using iCPL and LC-MALDI-MS/MS. From this assessment 235 secreted proteins have been identified. Among the proteins dysregulated in secretome of 5-FU resistant cells, most up-regulated proteins were the enzymes involved in glycolysis, and the level of pyruvate kinase - rate determining enzyme of glycolysis - was 1.7 fold higher compared to that in the secretome from parent cells. To investigate whether level of pyruvate kinase in serum from colorectal cancer patient can be the predictive marker for the response of 5-FU-based chemotherapy, 16 patients with previously untreated mCRC were enrolled. Serum samples have been obtained before chemotherapy, and the chemotherapy response of 12 patients was stable disease (SD), and 3 were partial response (PR). Only one patient's response was defined as progress disease (PD). Interestingly, level of pyruvate kinase was about 3 times higher in sera from chemotherapy non-responders (SD and PD) compared to that in sera from chemotherapy responders (PR). Our present results show a successful example that in vitro information of secretome of human colon cancer cell line with induced 5-FU resistance can be valuable for the clinical application to predict 5-FU-based chemotherapy response.
4. Based on comparing the ToF-SIMS spectra of low mass ions in normal and patients' sera, we has been establishing the protocol for the chemotherapy response prediction.
5. From the comparative proteome assessment of Her2-positive SK-BR-3 cells and its Herceptin-resistant SK-BR-3 (SK-BR-3 HR), heat-shock protein 27 (HSP27) expression was shown to be upregulated in SK-BR-3 HR cells. Suppression of HSP27 by specific siRNA transfection increased both Herceptin susceptibility of SK-BR-3 HR cells. HSP27 can bind to Her2. In the absence of Herceptin, HSP27 expression is suppressed and Her2 expression is reduced, indicating that downregulation of Her2 by Herceptin can be obstructed by formation of a Her2HSP27 complex. The present results demonstrate that upregulated HSP27 in human breast cancer cells may reduce Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability.



## 1. 연구사업의 최종목표

본 연구의 목표는 항암제 내성 인체 대장암 세포주를 이용한 프로테오믹 연구를 통하여 내성 관련 단백질들의 발굴하고 그 역할을 규명함으로써 새로운 내성 관련 기작의 이해를 확보해 나가는 것이 1차적인 목적이며, 이러한 연구 목적의 달성을 통하여 임상적으로 적용이 가능한 항암제 내성 예측인자나 항암보조제 개발의 토대를 마련하는 것이 본 연구의 최종 목적임.

## 2. 연구사업의 내용 및 결과

### 1) Down-regulated Galectin-3 in Human Colon Cancer Cells with Induced 5-Fluorouracil Resistance

- SNU-769B와 5-FU 내성이 유도된 SNU-769BR의 whole proteome으로부터 glycoproteome을 lectin chromatography로 분리하였음. 그 후, 1-D SDS-PAGE와 MALDI-MS 분석을 통하여 galectin-3가 5-FU 내성이 유도된 SNU-769BR에서 down-regulation 되어 있음을 확인하였음 (그림 1A).
- MADL-MS 분석 결과(그림 1B)의 검증을 위하여 glycoproteome, nucleus, cytoplasm, whole proteome 내에 존재하는 galectin-3의 발현정도를 western blot analysis를 통하여 확인하였음 (그림 1C). Glycoproteome와 whole homogenate 내에 존재하는 galectin-3의 발현은 SNU-769BR 외의 다른 대장암 세포주(SNU-C5, 769A)로부터 유래한 5-FU 내성세포주(SNU-C4R, C5R, 769AR)에서도 down-regulation 되고 있음이 확인되었음 (그림 1C).
- 5-FU 내성이 유도된 세포주가 아닌 다른 대장암 모세포주에서 galectin-3 발현정도와 5-FU에 대한 susceptibility와의 관계를 조사하였고, galectin-3 발현정도는 5-FU susceptibility와 positive correlation이 있음을 확인하였음 (그림 1D).
- 대장암세포주 중 galectin-3의 발현과 5-FU에 대한 susceptibility가 높은 SNU-81을 선택하여 galectin-3의 발현을 siRNA transfection을 통해 인위적으로 억제 하고, 5-FU에 대한 반응성을 관찰하였음 (그림 2). Galectin-3에 specific한 siRNA transfection 이후 galectin-3의 발현은 최소 96시간까지 지속적으로 감소하였음 (그림 2A). Galectin-3의 인위적 발현 억제는 대장암 세포의 성장을 지속적으로 감소 시켰으나 (그림 2B), 5-FU 가 존재하는 상태에서는 galectin-3의 발현 억제가 대조군과 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았음 (그림 2C). 오히려 5-FU에 의한 apoptosis는 증가하였고 (그림 2F). 5-FU uptake 율을 증가시켰음 (그림 2E). 그러나 galectin-3의 발현 억제를 통해 발생하는 세포 성장률의 차이는 galectin-3에 의해 5-FU에 대한 상대적 내성을 유발될 수 있음을 보여줌 (그림 2B, C, D).

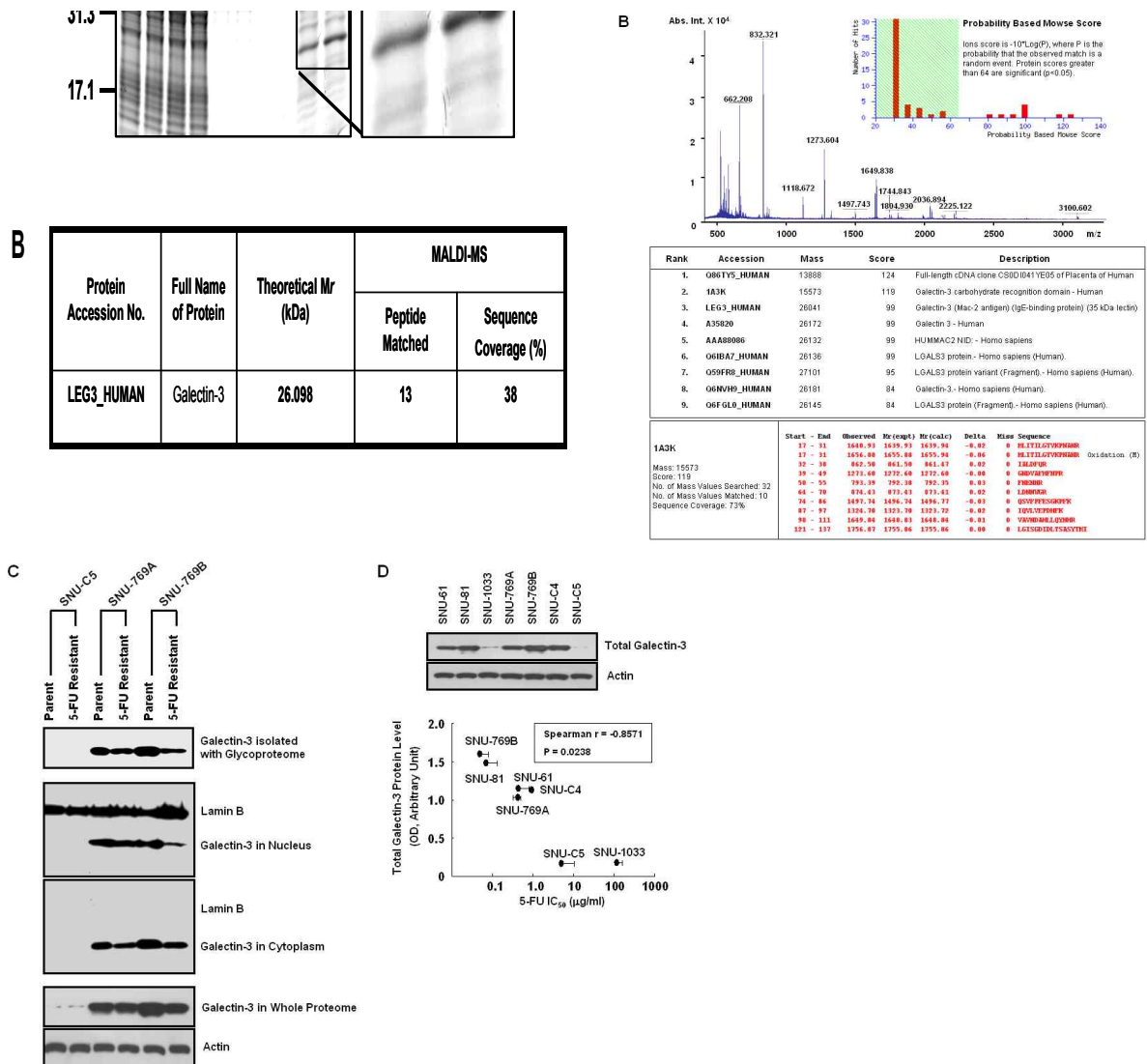


그림 1. 5-FU 내성이 유도된 인체 대장암 세포주 SNU-769B에서 down-regulation 되고 있는 galectin-3 단백질의 동정 (A, B)과 galectin-3 발현과 5-FU 내성과의 연관성 (C, D)

- Galectin-3와 5-FU 약제 내성과 관련된 세포 내부의 주요 kinase 의 activity를 측정하였으나 두드러진 변화는 관찰되어지지 않았음 (그림 3).
- Galectin-3의 인위적인 발현 억제에 의해 유도되는 세포성장율의 저하를 이해하기 위해 galectin-3 와 interaction하는 단백질들을 galectin-3 antibody를 이용한 immunoprecipitate 내에서 조사하였음 (그림 4 A, B).
- Galectin-3와 interaction하는 단백질들 중, 세포생장에 영향을 미칠 수 있는 hnRNP Q 단백질이 동정되었음 (그림 4 A, B).

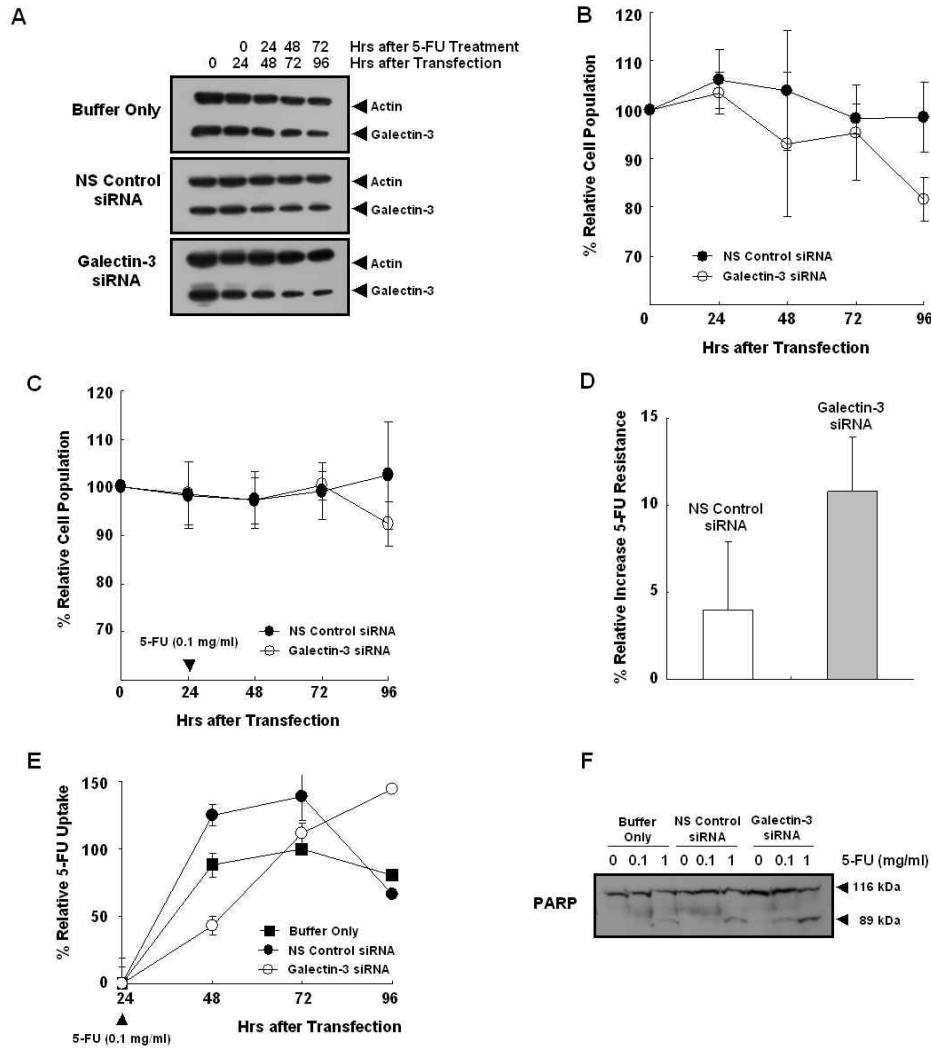


그림 2. Galectin-3의 인위적 발현 억제를 통한 5-FU 감수성의 변화 관찰.

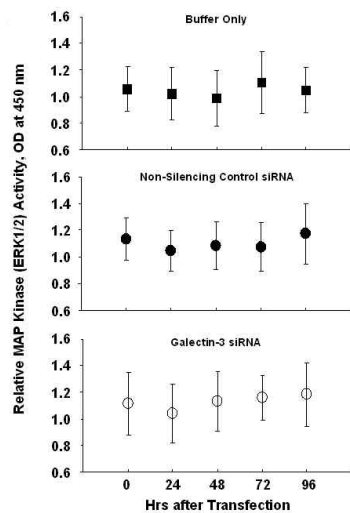


그림 3. Galectin-3의 발현억제가 미치는 MAP kinase 활성도의 영향.

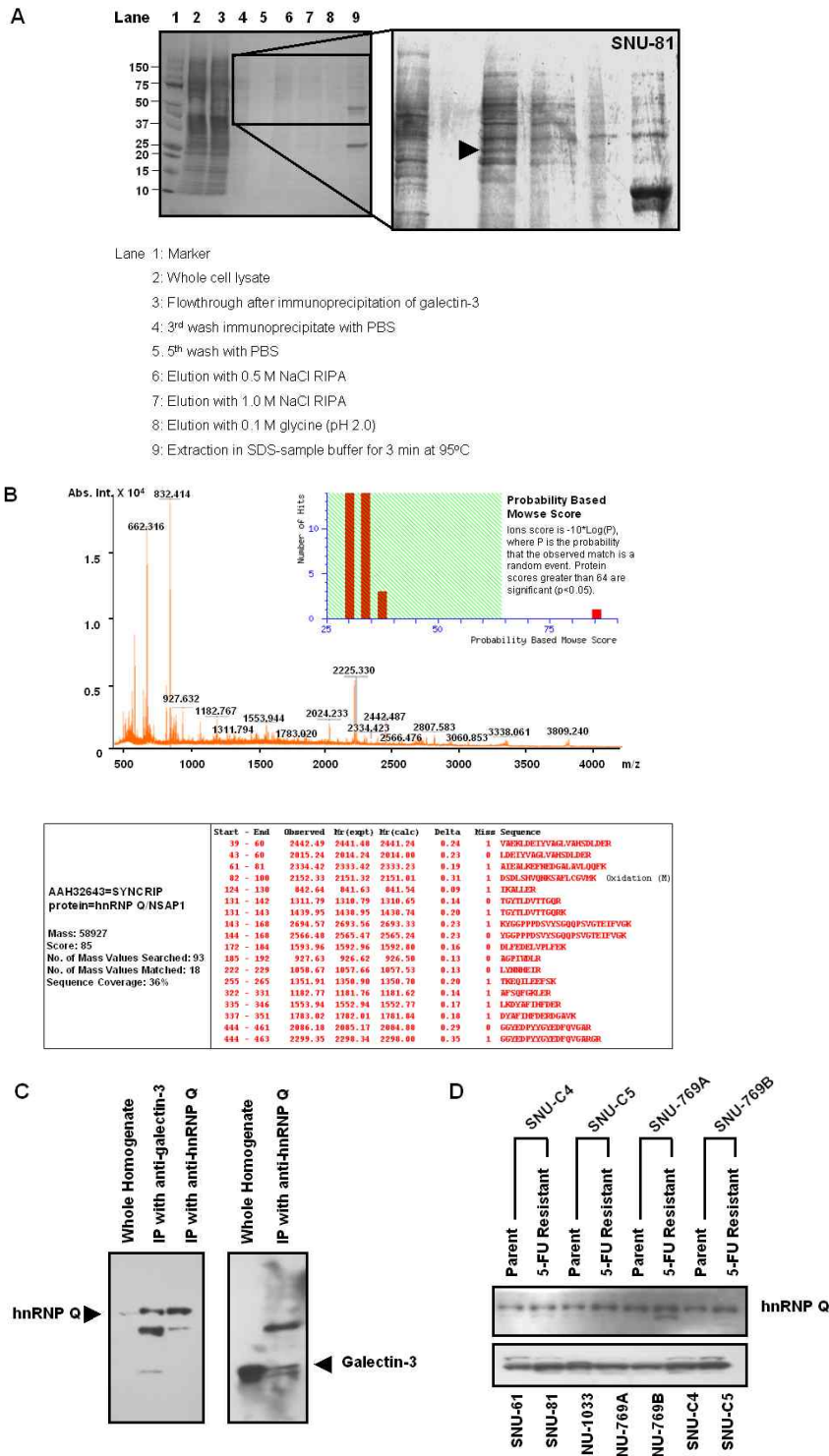


그림 4. Galectin-3와 interaction하는hnRNP Q 단백질의 동정 및 대장암 모세포주의 5-FU 감수성과 hnRNP Q 단백질 발현의 연관성 관찰.

- hnRNP Q 단백질은 galectin-3와 interaction 하는 것이 immunoprecipitation을 통하여 검증 되었으나 (그림 4 C), 대장암 모세포주의 5-FU 감수성과 hnRNP Q 단백질 발현의 연관성은 없었음 (그림 4 D)

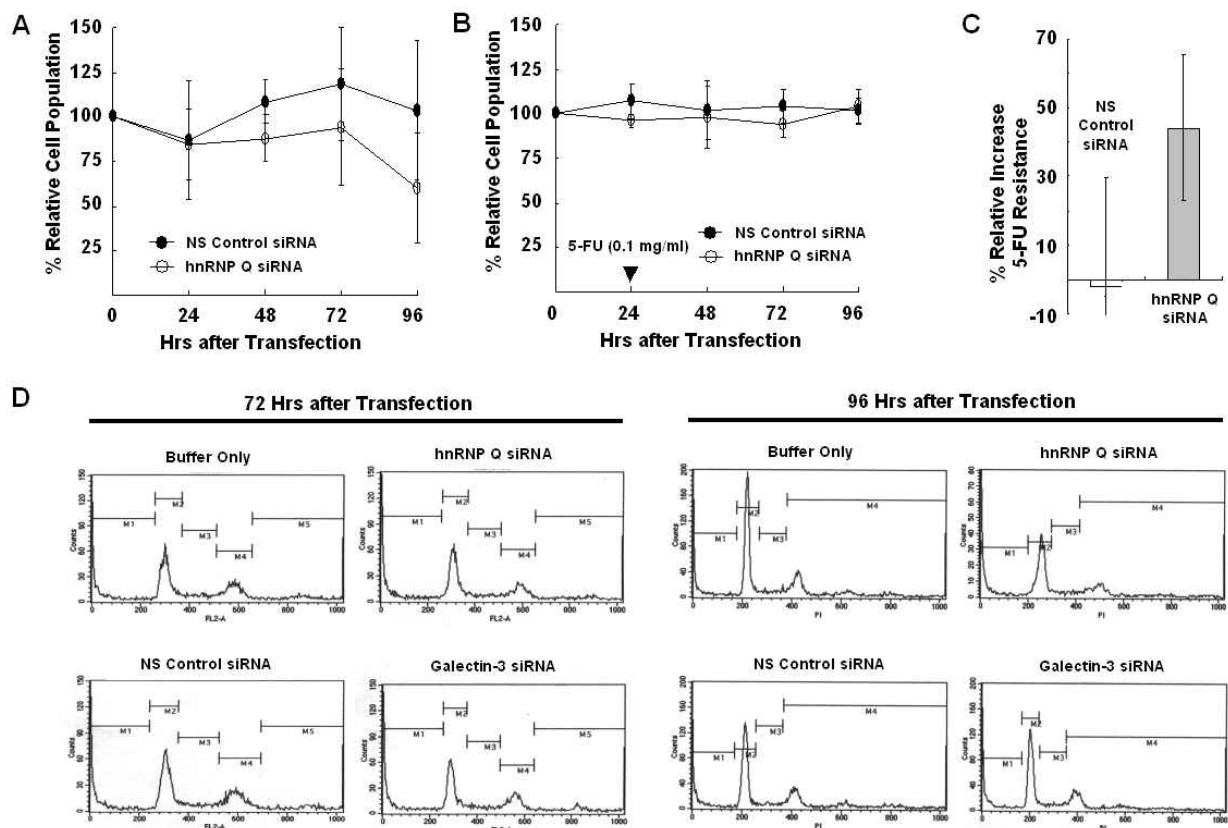
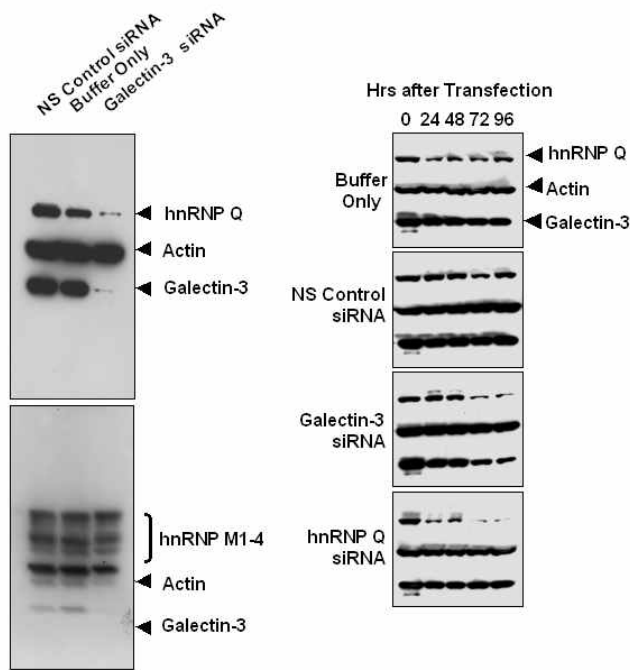


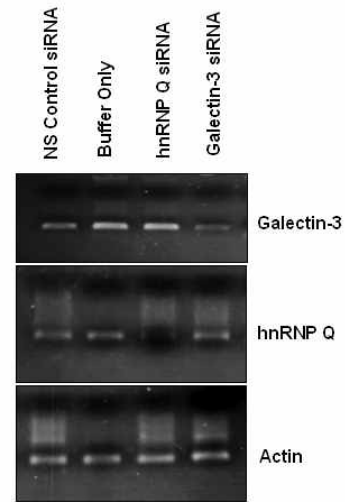
그림 5. hnRNP Q의 인위적 발현 억제제가 5-FU 내성과 세포주기에 미치는 영향

- Galectin-3의 인위적 발현억제때와 같은 양상으로 hnRNP Q의 인위적 발현 억제는 5-FU가 없는 상태에서 대조군에 비해 세포 성장률을 크게 감소 시켰으나 (그림 5 A), 5-FU가 존재하는 상태에서는 대조군과의 큰 차이를 보이지 않았음 (그림 5 B). hnRNP Q의 발현 억제를 통한 5-FU의 내성 증가는 약 40%로 나타났으나 특이한 세포 주기의 영향, apoptosis의 증가는 관찰 되지 않았음 (그림 5 C, D).
- 흥미롭게도 hnRNP Q 단백질은 galectin-3의 인위적 발현 억제에 의해 감소하였으며 (그림 6 A) 이는 RNA 단계에서의 억제가 아닌 단백질 안정성의 감소에 따른 결과로 유추됨 (그림 6 B, C).
- 세포질 및 핵 내에 위치한 hnRNP Q 단백질은 5-FU에 의해 감소, 절편화 되어짐 (그림 6 D).

**A**



**B**



**C**

| Expression Report     | Buffer Only | NS Control siRNA | Galectin-3 siRNA | hnRNP Q siRNA |
|-----------------------|-------------|------------------|------------------|---------------|
| Total Probe Sets      | 22283       | 22283            | 22283            | 22283         |
| No. of mRNA Present   | 11361       | 11281            | 11473            | 11054         |
| Presentation Call (%) | 51.0        | 50.6             | 51.5             | 49.6          |

|                                 | Gene Symbol | Affymetrix Identification | Description   | Function   | F.C. <sup>2</sup>             |                                    |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|---|--|-------------------------------|------------------------------------|
|                                 |             |                           |   |  | Buffer only vs. hnRNP Q siRNA | NS Control siRNA vs. hnRNP Q siRNA |
| After<br>hnRNP Q<br>Suppression | Down        | SYNCRIP                   | Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein, hnRNP Q | Nuclear mRNA splicing via spliceosome, RNA splicing, mRNA processing, RNA processing   | -1.37                         | -1.31                              |
|                                 |             | IL18                      | Interleukin 18 (Interferon-gamma-inducing factor)                   | Angiogenesis, immune response, cell-cell signaling, induction of apoptosis via death domain receptors, regulation of cell adhesion | -1.86                         | -1.10                              |
|                                 |             | SYNCRIP                   | Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein, hnRNP Q | Nuclear mRNA splicing via spliceosome, RNA splicing, mRNA processing, RNA processing   | -1.25                         | -1.15                              |
|                                 |             | FLJ10357                  | Hypothetical protein FLJ10357                                       | Regulation of Rho protein signal transduction  | -1.01                         | -1.21                              |
|                                 | Up          | CACNA1G                   | Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1G subunit                | Cation transport, calcium ion transport  | 2.73                          | 4.49                               |
|                                 |             | FRMD4B                    | FERM domain containing 4B   |  | 2.99                          | 2.95                               |
|                                 |             | KL                        | Klotho  | Carbohydrate metabolism  | 1.78                          | 2.13                               |
|                                 |             | CYP21A2                   | Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2              | Electron transport, C21-steroid hormone biosynthesis   | 1.93                          | 3.64                               |
|                                 |             | CDC42SE2                  | CDC42 small effector 2  | Signal transduction  | 4.90                          | 1.93                               |
|                                 |             | KLF13                     | Kruppel-like factor 13  | Transcription, regulation of transcription, DNA-dependent transcription from RNA pol II promoter                                   | 2.52                          | 1.21                               |

C (continue)

|                              | Gene Symbol | Affymetric Identification  | Description  | Function   | F.C. <sup>a</sup>                |                                       |
|------------------------------|-------------|----------------------------|--|--|----------------------------------|---------------------------------------|
|                              |             |                            |  |  | Buffer only vs. Galectin-3 siRNA | NS Control siRNA vs. Galectin-3 siRNA |
| After Galectin-3 Suppression | Down        | LIMK2, 202193_at           | LIM domain kinase 2  | Protein amino acid phosphorylation   | -1.21                            | -1.05                                 |
|                              |             | C9orf150, 216769_x_at      | Chromosome 9 open reading frame 150                            |  | -4.21                            | -2.40                                 |
|                              |             | CACNA1A, 214933_at         | Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit | Cation transport, calcium ion transport, elevation of cytosolic calcium ion concentration, synaptic transmission, cell death | -3.28                            | -3.81                                 |
|                              |             | LGALS3, GALIG, 208949_s_at | Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)           |  | -0.87 <sup>b</sup>               | -1.11                                 |
|                              | Up          | UBD, GABBR1, 205890_s_at   | Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1, ubiquitin D       | Signal transduction, negative regulation of adenylate cyclase activity, gamma-aminobutyric acid signaling pathway            | 3.17                             | 4.14                                  |
|                              |             | AKAP12, 210517_s_at        | A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12                     | Protein targeting, signal transduction, G-protein coupled receptor protein signaling pathway                                 | 1.59                             | 1.67                                  |
|                              |             | SEC14L1, 202083_s_at       | SEC14-like 1 (S.cerevisiae)                                    | Transport  | 2.01                             | 3.82                                  |
|                              |             | RABEP1, 203223_at          | Rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1                | Transport, endocytosis, apoptosis, protein transport, endocytosis, membrane fusion   | 3.91                             | 1.58                                  |
|                              |             | SCG5, 203889_at            | Secretogranin V (7B2 protein)                                  | Protein folding, transport, neuropeptide signaling pathway, peptide hormone processing, regulation of hormone secretion      | 1.04                             | 1.21                                  |
|                              |             |                            |  |  |                                  |                                       |

<sup>a</sup> Fold Change, 2<sup>n</sup>

<sup>b</sup> The table contains the list of genes showing more than 2-fold change in the transcriptional level, compared to two controls transfected with buffer only or non-silencing control siRNA. Galectin-3 expression level was significantly decreased after galectin-3 siRNA transfection compared to both controls, but the decrease was less than 2-fold compared to the buffer-transfected control.

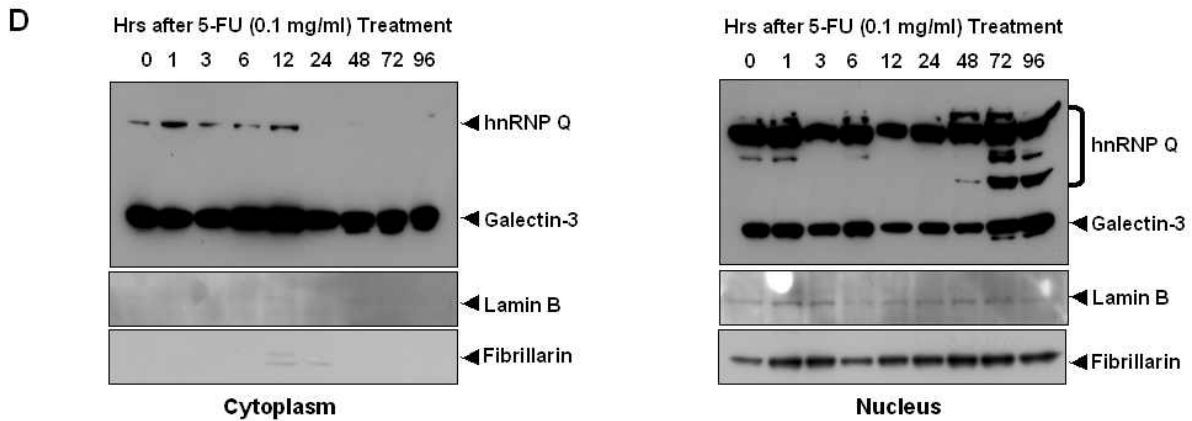


그림 6. Galectin-3 발현 억제에 의한 hnRNP Q 단백질의 안정도 감소와 5-FU 에 의한 hnRNP Q 단백질의 절편화

- Galectin-3의 인위적 발현 억제로 인한 세포생장의 억제를 설명하기 위해, galectin-3 발현 억제 후의 유전자 변화를 microarray 분석을 통해 관찰 하였음 (표 1). Galectin-3 발현 억제를 통해 발현이 증가되는 유전자들을 중심으로 실제 mRNA 발현정도와 단백질의 발현 정도가 일치하는가에 대한 분석이 진행 중임.

☒ 1. List of the genes showing increased expression after transfection of siRNA against galectin-3

|             | Gal3 VS NC | Gal3 VS NC | Gal3 VS NC       | Gal3 VS NC |             |   |
|-------------|------------|------------|------------------|------------|-------------|---|
|             | Signal     | Detection  | Signal Log Ratio | Change     | Gene Symbol | Full Name of Gene   |
| 216505_x_at | 3734.1     | P          | 1                | I          | RPS10       | ribosomal protein S10                                     |
| 220547_s_at | 1540.3     | P          | 1                | I          | FAM35A      | family with sequence similarity 35, member A              |
| 214953_s_at | 2514.3     | P          | 1.02             | I          | APP         | amyloid beta (A4) precursor protein                       |
| 200978_at   | 6279.3     | P          | 1.04             | I          | MDH1        | malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)                     |
| 217491_x_at | 6302.9     | P          | 1.05             | I          | COX7C       | cytochrome c oxidase subunit VIIc??                       |
| 208684_at   | 1488.5     | P          | 1.06             | I          | COPA        | coatamer protein complex, subunit alpha?                  |
| 211937_at   | 3180       | P          | 1.06             | I          | EIF4B       | eukaryotic translation initiation factor 4B?              |
| 218258_at   | 1963.4     | P          | 1.09             | I          | POLR1D      | polymerase (RNA) I polypeptide D, 16kDa?                  |
| 208872_s_at | 1549.5     | P          | 1.1              | I          | C5orf18     | chromosome 5 open reading frame 18?                       |
| 214359_s_at | 3061.6     | P          | 1.1              | I          | HSPCB       | heat shock 90kDa protein 1, beta?                         |
| 218830_at   | 3047       | P          | 1.13             | I          | RPL26L1     | ribosomal protein L26-like 1?                             |
| 210338_s_at | 13434.8    | P          | 1.15             | I          | HSPA8       | heat shock 70kDa protein 8                                |
| 200064_at   | 7379       | P          | 1.18             | I          | HSPCB       | heat shock 90kDa protein 1, beta?                         |
| 201416_at   | 1424.8     | P          | 1.21             | I          | SOX4        | ?SRY (sex determining region Y)-box 4                     |
| 206059_at   | 2364.1     | P          | 1.25             | I          | ZNF91       | zinc finger protein 91 (HPF7, HTF10)                      |
| 201339_s_at | 2071.9     | P          | 1.26             | I          | SCP2        | sterol carrier protein 2?                                 |
| 202520_s_at | 1541.2     | P          | 1.26             | I          | MLH1        | mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2         |
| 201410_at   | 2271.6     | P          | 1.33             | I          | PLEKHB2     | pleckstrin homology domain containing, family B member 2? |
| 201477_s_at | 2252.9     | P          | 1.33             | I          | RRM1        | ribonucleotide reductase M1 polypeptide?                  |
| 200041_s_at | 4269.3     | P          | 1.37             | I          | BAT1        | HLA-B associated transcript 1?                            |
| 218819_at   | 1552.6     | P          | 1.37             | I          | DDX26       | DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26?          |
| 203214_x_at | 1819.6     | P          | 1.38             | I          | CDC2        | cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M?               |
| 208739_x_at | 2745.3     | P          | 1.41             | I          | SUMO2       | SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast)?           |
| 201070_x_at | 2890.1     | P          | 1.44             | I          | SF3B1       | splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa                     |
| 214305_s_at | 3288.6     | P          | 1.45             | I          | SF3B1       | splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa                     |
| 201946_s_at | 1777.3     | P          | 1.46             | I          | CCT2        | chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)?             |
| 212018_s_at | 2511.2     | P          | 1.55             | I          | RSL1D1      | ribosomal L1 domain containing 1                          |
| 222234_s_at | 398.2      | P          | 1.67             | I          | MGC3101     | hypothetical protein MGC3101?                             |
| 221648_s_at | 1530.9     | P          | 1.68             | I          | C1orf121    | chromosome 1 open reading frame 121?                      |
| 201930_at   | 1284.2     | P          | 1.97             | I          | MCM6        | MCM6 minichromosome maintenance deficient 6               |
| 203831_at   | 969.2      | P          | 2                | I          | KIAA1002    | KIAA1002 protein?   |
| 200045_at   | 1343.2     | P          | 2.05             | I          | ABCF1       | ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1?     |
| 201079_at   | 1183.7     | P          | 2.69             | I          | SYNGR2      | synaptogyrin 2  |
| 211571_s_at | 678.9      | P          | 2.9              | I          | CSPG2       | chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)             |
| 202841_x_at | 968.2      | P          | 2.93             | I          | OGFR        | opioid growth factor receptor                             |
| 204099_at   | 899.8      | P          | 2.97             | I          | SMARCD3     | SWI/SNF related, matrix associated regulator              |
| 217117_x_at | 1047.7     | P          | 2.97             | I          | MUC3A       | mucin 3A, intestinal??                                    |
| 220277_at   | 956.2      | P          | 3.03             | I          | CXXC4       | CXXC finger 4?  |
| 218078_s_at | 1114.5     | P          | 3.06             | I          | ZDHHC3      | zinc finger, DHHC-type containing 3?                      |
| 209565_at   | 1155.3     | P          | 3.09             | I          | RNF113A     | ring finger protein 113A                                  |
| 212186_at   | 1156.5     | P          | 3.25             | I          | ACACA       | acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha                       |
| 201164_s_at | 1309       | P          | 3.28             | I          | PUM1        | pumilio homolog 1 (Drosophila)                            |
| 212005_at   | 1230.2     | P          | 3.32             | I          | C1orf144    | chromosome 1 open reading frame 144?                      |
| 201083_s_at | 867.3      | P          | 3.98             | I          | BCLAF1      | BCL2-associated transcription factor 1???                 |
| 204571_x_at | 2400.8     | P          | 4.32             | I          | PIN4        | parvulin?   |
| 216207_x_at | 756.4      | P          | 4.44             | I          | IGKV1D-13   | immunoglobulin kappa variable 1D-13??                     |
| 211519_s_at | 1471.3     | P          | 4.83             | I          | KIF2C       | kinesin family member 2C                                  |



## 2) Interactions between Galectin-3 with Mitochondrial F1F0-ATP Synthase

- Galectin-3와 interaction하는 단백질들 중, mitochondrial F0F1-ATP synthase b-subunit 단백질이 동정되었음 (그림 7 A, B).
- Mitochondrial F0F1-ATP synthase b-subunit에 대한 antibody를 상업적으로 구입할 수 없었기 때문에 b-subunit에 대한 antibody를 준비하는 동안 ATP synthase의 F0 complex의 d-subunit과 F1 complex의 alpha-subunit에 대한 antibody를 이용하여 galectin-3와의 interaction을 실험하였음. ATP synthase d-subunit만이 Galectin-3와 interaction하였음 (그림 7 C).

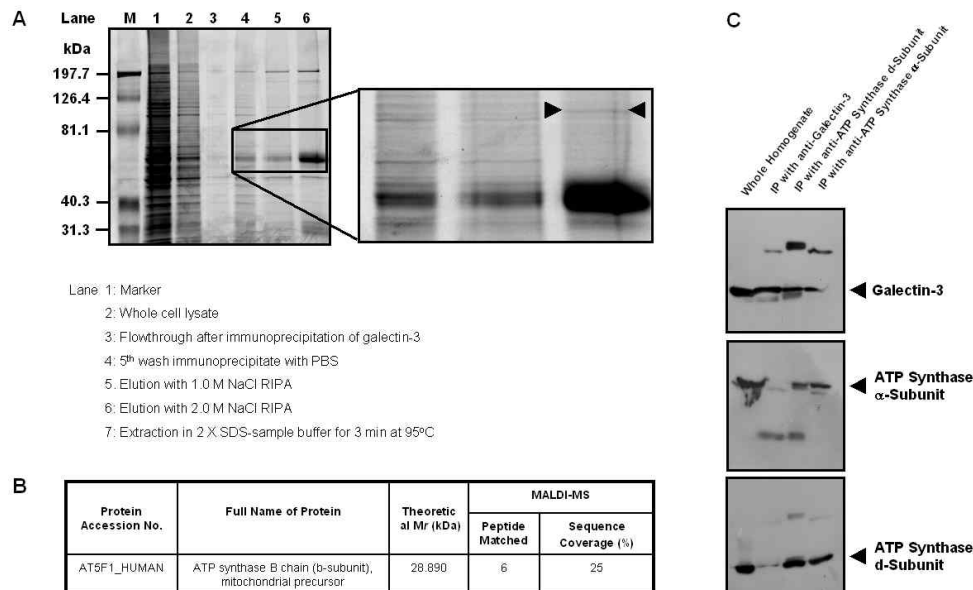


그림 7. Galectin-3와 interaction하는 mitochondrial F0F1-ATP synthase b-subunit 단백질 동정

- Galectin-3의 mitochondria내에서의 존재는 5-FU에 대한 내성과의 연관성을 찾을 수 없었으나, galectin-3는 mitochondria의 inner membrane vesicles에도 존재하고 있음이 확인되었음 (그림 8 A).
- Galectin-3의 ATP synthase F0 complex와의 interaction 및 mitochondria 내의 ATP synthase와의 co-localization은 galectin-3가 ATP synthase activity에도 영향을 줄 수 있는 가능성을 제시하였음. 실제 두 번의 반복실험을 통해 galectin-3가 존재하는 상태에서 ATP synthase activity는 감소하는 양상을 보였음 (그림 8 B).

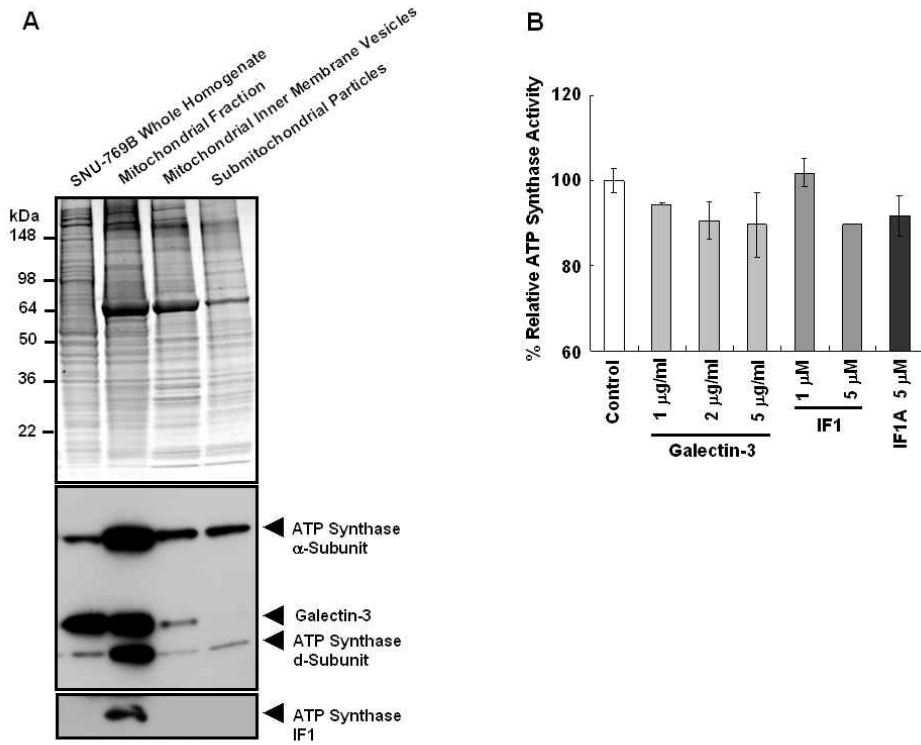


그림 8. Galectin-3의 mitochondrial inner membrane vesicles 내의 존재 및 galectin-3에 의한 ATP synthase 효소 활성도의 감소

- Galectin-3의 ATP synthase activity에 대한 영향에도 불구하고, 실제 galectin-3 발현 억제 후의 세포내에 존재하는 전체 ATP 양은 변화가 없었음 (그림 9).

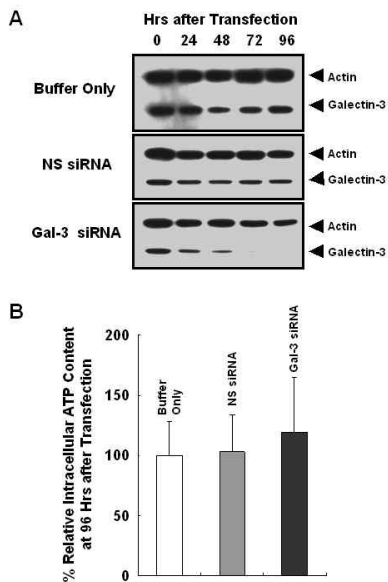


그림 9. Galectin-3의 인위적 발현억제 이후 대장암 세포주 내의 ATP 양 측정

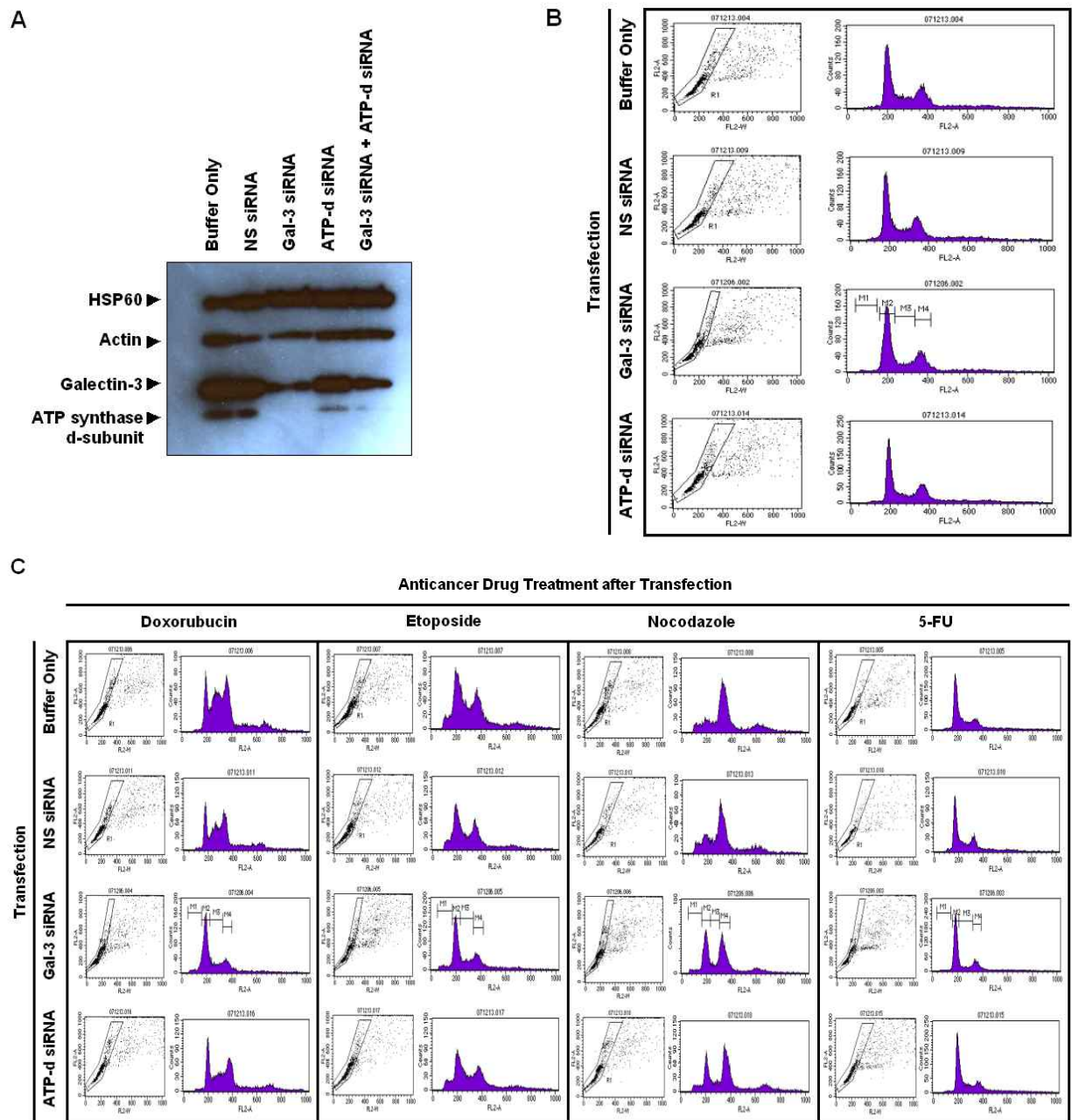


그림 10. Galectin-3의 인위적 발현억제와 동반된 ATP synthase d-subunit의 감소 및 여러 약제에 대한 galectin-3 발현 억제 효과

- 흥미롭게도 galectin-3의 인위적 발현 억제는 ATP synthase d-subunit의 발현 감소를 동반하였음 (그림 10 A).
- 세포주기에 영향을 미치는 다양한 약제를 처리한 후 galectin-3를 인위적으로 억제하였을 때, 다양한 약제의 효과가 galectin-3의 인위적 억제에 의해 변화되는 것을 관찰함 (그림 10 B, C).

### 3) Up-regulated Alpha-enolase in Human Colorectal Cancer Cells with 5-Fluorouracil Resistance

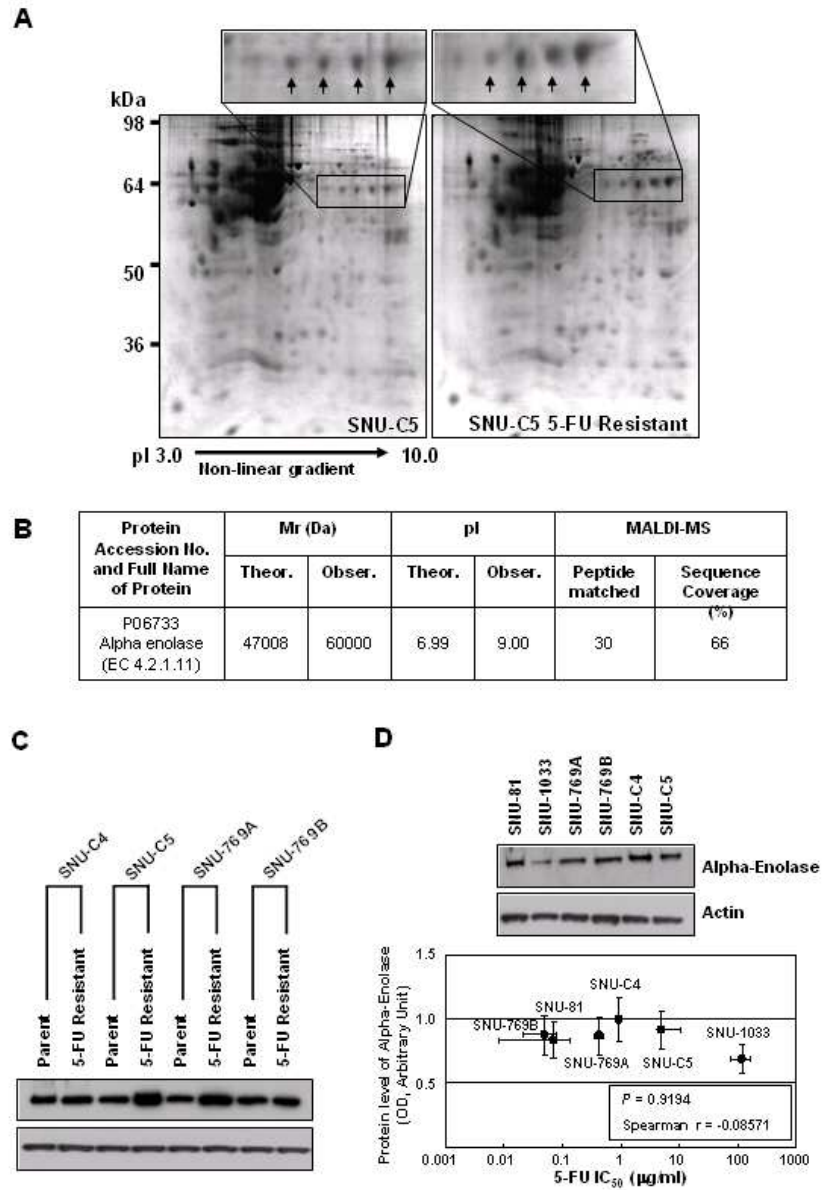


그림 11. 5-FU 내성이 유도된 인체대장암세포주내에서의 alpha-enolase의 과발현

- 5-FU 내성이 유도된 인체대장암세포주 SNU-C5의 단백질체 분석을 통하여 alpha-enolase가 5-FU 내성 세포주에서 과발현 되고 있음을 확인함 (그림 11 A, B). 이와 같은 과발현은 다른 5-FU 내성세포주에서도 공통적인 현상이었으나 (그림 11 C) 일반 대장암 모세포주들의 5-FU 민감도와 alpha-enolase 발현의 정도는 어떠한 연관성을 보이지 않았음 (그림 11 D).

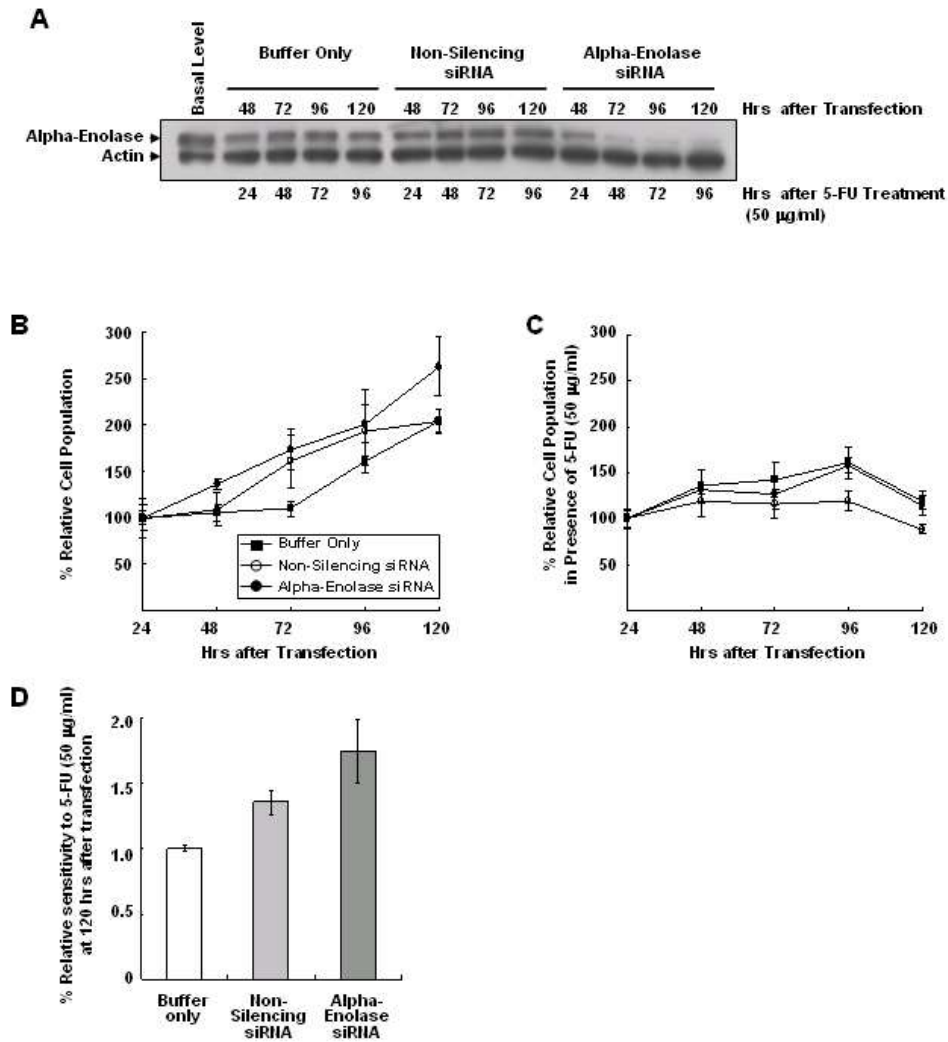


그림 12. Alpha-enolase suppression을 통한 5-FU 내성의 증가

- 모세포주에 비해 alpha-enolase를 과발현하고 있는 5-FU 내성 SNU-C5 세포주의 alpha-enolase의 발현을 siRNA 도입을 통해 인위적으로 발현 억제 시켰을 때 (그림 12 A) 5-FU 민감도를 증가시킬 수 있었으며, 이는 alpha-enolase의 발현의 조절이 세포주 성장과 직접적인 연관을 가지고 있음에 기인함을 확인함 (그림 12 B, C, D).

#### 4) Glycolytic Enzymes Up-regulated in Proteins Secreted from Colorectal Cancer Cells with 5-Fluorouracil Resistance

- 5-FU 항암제 내성을 가진 SNU-C4와 모세포주의 분비단백질들을 iCPL을 통해 표지하고 LC-MALDI-MS/MS 분석을 통하여 정성, 정량 분석함 (그림 13 A, 표 2-5).
- 5-FU 내성 세포주의 분비 단백질에서 총 44종의 발현 증가 단백질 (표 2), 82종의 변화가 없는 단백질 (표 3), 35종의 발현 저하 단백질(표 4)을 정성, 정량 분석하였으며, 추가로 총 74종의 분비 단백질 (표 5)이 동정되었음.
- 5-FU 내성 세포주의 과분비 단백질 중 두드러지게 glycolysis에 관여하는 단백질들이 비정상적 과분비 되고 있음을 확인 함 (그림 13 B)

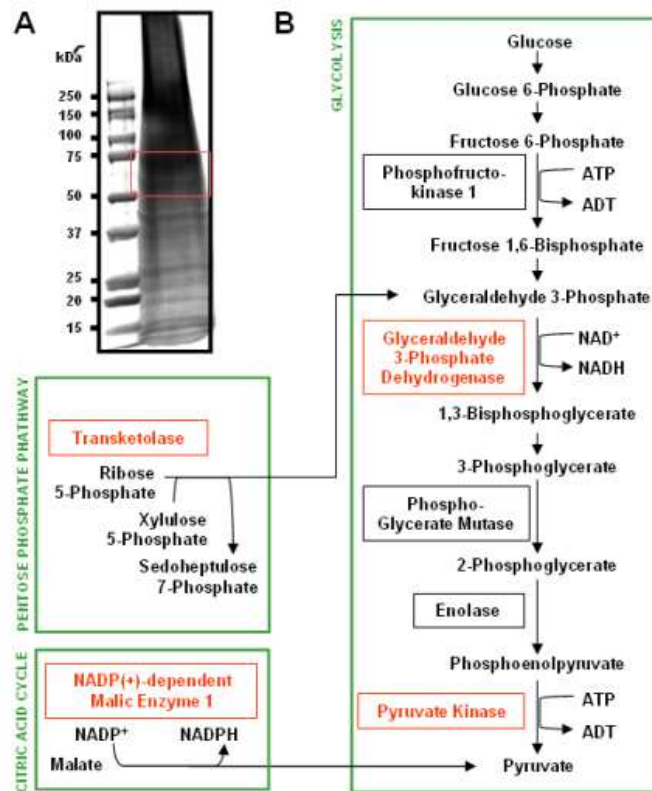


그림 13. 5-FU 내성을 가진 대장암세포주 SNU-C4와 모세포주의 분비단백질에 대한 iCPL LC-MALDI-MS/MS 정성 및 정량 분석

☒ 2. Up-Regulated Proteins in Secretome of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (I)

| Protein ID | Protein Name and Species  | Score    | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|---|----------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| P27797     | Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60) (grp60)                         | 66.35    | 48.28289 | 4.139 | 2.39808 | 3       | 2                   | 4.51 | 5.98                      | 187.28                   | 2.12546                  |
| P04908     | Histone H2A type 1-B  | 89.52    | 14.03294 | 11.52 | 23.2558 | 4       | 1                   | 2.74 | 0                         | 0                        | 2.73781                  |
| O43776     | Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.22) (Asparagine-tRNA ligase) (AsnRS)     | 512.98   | 63.75784 | 5.864 | 18.7956 | 11      | 7                   | 2.62 | 0.18                      | 18.346                   | 2.57742                  |
| P11413     | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) (G6PD)                                    | 323.66   | 59.55312 | 6.451 | 15.5642 | 8       | 1                   | 2.51 | 0                         | 0                        | 2.50573                  |
| P55209     | Nucleosome assembly protein 1-like 1 (NAP-1-related protein) (hNRP)                         | 86.55    | 45.63104 | 4.209 | 7.67263 | 2       | 1                   | 2.35 | 0                         | 0                        | 2.35337                  |
| Q01082     | Spectrin beta chain, brain 1 (Spectrin, non-erythroid beta chain 1) (Beta-II spectrin) (Fo) | 185.042  | 275.259  | 5.307 | 4.01861 | 10      | 1                   | 2.25 | 0                         | 0                        | 2.25377                  |
| Q96KP4     | Cytosolic nonspecific dipeptidase (Glutamate carboxypeptidase-like protein 1) (CNDP dipept) | 41.38    | 53.18704 | 5.591 | 1.89474 | 2       | 1                   | 2.21 | 0                         | 0                        | 2.2054                   |
| P54578     | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 14) (Ubiqu) | 227.42   | 56.35815 | 5.059 | 13.3874 | 5       | 3                   | 2.18 | 0.16                      | 12.496                   | 2.16215                  |
| P48163     | NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40) (NADP-ME) (Malic enzyme 1)                        | 376.73   | 64.67928 | 5.74  | 22.9021 | 8       | 4                   | 2.12 | 0.01                      | 1.147                    | 2.11649                  |
| P49591     | Seryl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.11) (Serine-tRNA ligase) (SerRS)                            | 90.73    | 59.1222  | 6.024 | 3.89864 | 2       | 1                   | 2.07 | 0                         | 0                        | 2.06647                  |
| Q02790     | FK506-binding protein 4 (EC 5.2.1.8) (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) (PPIase) (Rotam) | 141.6935 | 51.92614 | 5.224 | 15.0655 | 4       | 2                   | 2    | 0.16                      | 11.244                   | 1.98379                  |
| Q99733     | Nucleosome assembly protein 1-like 4 (Nucleosome assembly protein 2) (NAP2)                 | 54.88    | 42.96795 | 4.448 | 5.6     | 2       | 1                   | 1.96 | 0                         | 0                        | 1.96253                  |
| P07437     | Tubulin beta-2 chain  | 448.92   | 50.09514 | 4.636 | 20.4955 | 10      | 2                   | 1.93 | 0.17                      | 12.662                   | 1.91386                  |
| P08243     | Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] (EC 6.3.5.4) (Glutamine-dependent asparagine  | 116.74   | 64.7678  | 6.41  | 3.39286 | 2       | 1                   | 1.89 | 0                         | 0                        | 1.89019                  |
| Q02487     | Desmocollin-2 precursor (Desmosomal glycoprotein II and III) (Desmocollin-3)                | 732.76   | 101.3243 | 5.06  | 14.0954 | 15      | 4                   | 1.88 | 0.17                      | 18.531                   | 1.8504                   |
| O60506     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (hnRNP Q) (hnRNP-Q) (Synaptotagmin-binding, cyto  | 312.4435 | 69.78768 | 9.148 | 13.3226 | 7       | 4                   | 1.88 | 0.12                      | 12.44                    | 1.86681                  |
| Q9UN86     | Ras-GTPase-activating protein-binding protein 2 (GAP SH3-domain-binding protein 2) (G3BP-2) | 67.69243 | 54.13481 | 5.299 | 4.56432 | 2       | 1                   | 1.82 | 0                         | 0                        | 1.81705                  |
| P68104     | Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) (Elongation  | 116.22   | 50.45124 | 9.721 | 4.11255 | 2       | 1                   | 1.81 | 0                         | 0                        | 1.81199                  |
| Q9BZZ5     | Apoptosis inhibitor 5 (API-5) (Fibroblast growth factor 2-interacting factor) (FIF) (XAGL   | 109.82   | 57.86727 | 5.762 | 7.2549  | 3       | 1                   | 1.81 | 0                         | 0                        | 1.81462                  |
| Q9NSD9     | Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (EC 6.1.1.20) (Phenylalanine-tRNA ligase beta cha   | 37.35    | 66.7148  | 6.419 | 1.86757 | 1       | 1                   | 1.81 | 0                         | 0                        | 1.80856                  |
| Q92841     | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (EC 3.6.1.-) (DEAD box protein 17) (RNA-dependen  | 87.68    | 72.9532  | 9.494 | 5.84615 | 3       | 1                   | 1.78 | 0                         | 0                        | 1.77824                  |
| O43390     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R)   | 134.48   | 71.18435 | 8.799 | 6.16114 | 4       | 1                   | 1.77 | 0                         | 0                        | 1.76939                  |
| P68363     | Tubulin alpha-ubiquitous chain (Alpha-tubulin ubiquitous) (Tubulin K-alpha-1)               | 889.93   | 50.80386 | 4.806 | 29.2683 | 14      | 4                   | 1.76 | 0.1                       | 10.889                   | 1.74516                  |
| P49321     | Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)  | 111.78   | 85.47118 | 4.109 | 2.41117 | 3       | 2                   | 1.73 | 0.19                      | 15.855                   | 1.70602                  |

표 2. Up-Regulated Proteins in Secretome of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (II)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score    | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|--|----------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q99538     | Legumain precursor (EC 3.4.22.34) (Asparaginyl endopeptidase) (Protease, cysteine 1)       | 555.89   | 49.77856 | 6.077 | 28.6374 | 14      | 3                   | 1.72 | 0.03                      | 3.1343                   | 1.72238                  |
| P14618     | Pyruvate kinase isozymes M1/M2 (EC 2.7.1.40) (Pyruvate kinase muscle isozyme) (Cytosolic t | 1224.362 | 58.3392  | 8.959 | 43.0189 | 25      | 9                   | 1.71 | 0.12                      | 21.353                   | 1.67211                  |
| P31948     | Stress-induced-phosphoprotein 1 (ST11) (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop) (Transformat | 489.3449 | 63.22664 | 6.419 | 27.9926 | 19      | 6                   | 1.7  | 0.12                      | 17.352                   | 1.67136                  |
| P26639     | Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (EC 6.1.1.3) (Threonine--tRNA ligase) (ThrRS)        | 229.9    | 84.29421 | 6.233 | 7.7455  | 5       | 2                   | 1.67 | 0.04                      | 3.5998                   | 1.67118                  |
| P31939     | Bifunctional purine biosynthesis protein PURH [Includes: Phosphoribosylaminoimidazolecarbo | 190.17   | 65.08853 | 6.279 | 9.7973  | 6       | 3                   | 1.67 | 0.06                      | 6.3777                   | 1.67038                  |
| Q93081     | Histone H3/b   | 106.19   | 15.31547 | 12.01 | 25.9259 | 4       | 1                   | 1.66 | 0                         | 0                        | 1.66209                  |
| P50991     | T-complex protein 1 subunit delta (TCP-1-delta) (CCT-delta) (Stimulator of TAR RNA-binding | 274.19   | 58.26991 | 9.083 | 15.6134 | 10      | 3                   | 1.65 | 0.05                      | 5.0471                   | 1.64921                  |
| P68371     | Tubulin beta-2C chain (Tubulin beta-2 chain)   | 425.19   | 50.25517 | 4.648 | 17.0787 | 9       | 2                   | 1.62 | 0.05                      | 4.0151                   | 1.62072                  |
| P50990     | T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT-theta)                                | 68.58    | 60.02168 | 5.307 | 2.3766  | 2       | 1                   | 1.61 | 0                         | 0                        | 1.61483                  |
| O60701     | UDP-glucose 6-dehydrogenase (EC 1.1.1.22) (UDP-Glc dehydrogenase) (UDP-GlcDH) (UDPGDH)     | 285.66   | 55.6735  | 6.893 | 15.587  | 7       | 3                   | 1.6  | 0.19                      | 20.119                   | 1.57245                  |
| P06748     | Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38)     | 76.92    | 32.72591 | 4.489 | 8.16327 | 3       | 1                   | 1.6  | 0                         | 0                        | 1.59725                  |
| P48643     | T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon)                          | 332.4235 | 60.08898 | 5.339 | 16.451  | 6       | 1                   | 1.58 | 0                         | 0                        | 1.58208                  |
| P29401     | Transketolase (EC 2.2.1.1) (TK)  | 556.6473 | 68.51898 | 8.536 | 22.3114 | 17      | 7                   | 1.57 | 0.05                      | 7.7687                   | 1.5661                   |
| P62937     | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (EC 5.2.1.8) (PPIase) (Rotamase) (Cyclophilin A) (Cy | 117.11   | 18.09793 | 9.141 | 21.9512 | 3       | 1                   | 1.57 | 0                         | 0                        | 1.56545                  |
| P26038     | Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)                                       | 233.4535 | 67.76079 | 6.031 | 12.1528 | 10      | 5                   | 1.56 | 0.14                      | 19.672                   | 1.53241                  |
| P06865     | Beta-hexosaminidase alpha chain precursor (EC 3.2.1.52) (N-acetyl-beta-glucosaminidase) (B | 151.32   | 61.10643 | 4.901 | 7.3724  | 5       | 1                   | 1.56 | 0                         | 0                        | 1.5625                   |
| P04406     | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (GAPDH)                             | 109.96   | 36.07042 | 9.297 | 7.78443 | 5       | 2                   | 1.55 | 0.05                      | 4.2794                   | 1.54447                  |
| Q14126     | Desmoglein-2 precursor (HDGC)  | 1073.305 | 123.0501 | 5.022 | 13.6974 | 23      | 9                   | 1.54 | 0.03                      | 6.8125                   | 1.53457                  |
| P41250     | Glycyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.14) (Glycine--tRNA ligase) (GlyRS)                        | 246.45   | 83.82787 | 6.659 | 9.06631 | 6       | 2                   | 1.53 | 0.06                      | 5.3831                   | 1.52544                  |
| Q14697     | Neutral alpha-glucosidase AB precursor (EC 3.2.1.84) (Glucosidase II alpha subunit)        | 236.83   | 107.2628 | 5.702 | 7.62712 | 6       | 1                   | 1.53 | 0                         | 0                        | 1.53059                  |
| P60709     | Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)  | 379.05   | 42.05186 | 5.179 | 26.9333 | 10      | 3                   | 1.5  | 0.02                      | 2.7917                   | 1.50397                  |



### 표 3. Proteins Not Altered in Secretome of Human Colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (I)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score    | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|--|----------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q99832     | T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta) (HIV-1 Nef-interacting protein)            | 139.27   | 59.84212 | 8.604 | 5.52486 | 4       | 2                   | 1.49 | 0.09                      | 8.3272                   | 1.48035                  |
| Q16630     | Cleavage and polyadenylation specificity factor 6 (Cleavage and polyadenylation specificit       | 84.11    | 59.34448 | 6.739 | 5.44465 | 5       | 2                   | 1.49 | 0.08                      | 7.4836                   | 1.48371                  |
| O15371     | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7 (eIF-3 zeta) (eIF3 p66) (eIF3d)             | 63.35243 | 64.55967 | 5.711 | 4.19708 | 2       | 2                   | 1.49 | 0.09                      | 8.2296                   | 1.48185                  |
| Q9UNW1     | Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 precursor (EC 3.1.3.62) (Inositol (1,3,4,5)-       | 214.2    | 55.64332 | 8.88  | 7.59754 | 6       | 1                   | 1.48 | 0                         | 0                        | 1.47864                  |
| P11940     | Polyadenylate-binding protein 1 (Poly(A)-binding protein 1) (PABP 1)                             | 422.4424 | 70.85395 | 9.992 | 20.283  | 15      | 4                   | 1.47 | 0.08                      | 11.463                   | 1.46341                  |
| P15586     | N-acetylglucosamine-6-sulfatase precursor (EC 3.1.6.14) (G6S) (Glucosamine-6-sulfatase)          | 95.39    | 62.84034 | 9.409 | 7.6087  | 3       | 1                   | 1.47 | 0                         | 0                        | 1.46664                  |
| P06733     | Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non-neural enolase) (NNE)       | 359.51   | 47.35041 | 7.697 | 21.709  | 10      | 4                   | 1.46 | 0.15                      | 20.6                     | 1.43176                  |
| P20700     | Lamin-B1   | 91.72    | 66.52169 | 4.962 | 5.64103 | 4       | 1                   | 1.45 | 0                         | 0                        | 1.45249                  |
| P00352     | Retinal dehydrogenase 1 (EC 1.2.1.36) (RaldH1) (RALDH 1) (Aldehyde dehydrogenase family 1        | 502.2224 | 55.32314 | 6.317 | 18.2    | 12      | 3                   | 1.43 | 0.07                      | 7.9309                   | 1.42448                  |
| P40227     | T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta) (CCT-zeta) (CCT-zeta-1) (Tcp20) (HTR3) (Acut       | 223.08   | 58.31273 | 6.24  | 8.67925 | 10      | 3                   | 1.43 | 0.04                      | 5.2656                   | 1.43219                  |
| P15311     | Ezrin (p81) (Cytovillin) (Villin-2)  | 880.7017 | 69.33872 | 5.892 | 35.3846 | 32      | 13                  | 1.42 | 0.07                      | 16.881                   | 1.40331                  |
| P12956     | ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 (EC 3.6.1.-) (ATP-dependent DNA helicase II 70 kDa        | 443.84   | 69.95312 | 6.219 | 17.4342 | 12      | 4                   | 1.42 | 0.09                      | 12.153                   | 1.4123                   |
| P14923     | Junction plakoglobin (Desmoplakin-3) (Desmoplakin III)   | 192.98   | 82.24493 | 5.933 | 7.53701 | 4       | 2                   | 1.42 | 0.05                      | 4.8438                   | 1.41776                  |
| Q9BRK5     | 45 kDa calcium-binding protein precursor (Cab45) (Stromal cell-derived factor 4) (SDF-4)         | 156.4324 | 41.8945  | 4.614 | 19.6133 | 4       | 1                   | 1.41 | 0                         | 0                        | 1.41495                  |
| Q9HAT2     | Sialate O-acetyltransferase precursor (EC 3.1.1.53) (Sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase) | 121.49   | 58.9614  | 7.148 | 3.82409 | 3       | 1                   | 1.41 | 0                         | 0                        | 1.41458                  |
| P49588     | Alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7) (Alanine-tRNA ligase) (AlaRS)                                | 50.43    | 107.4755 | 5.187 | 1.7562  | 2       | 1                   | 1.4  | 0                         | 0                        | 1.40232                  |
| P15170     | G1 to S phase transition protein 1 homolog (GTP-binding protein GST1-HS)                         | 124.22   | 56.34753 | 5.343 | 5.61122 | 4       | 2                   | 1.39 | 0.1                       | 9.937                    | 1.38731                  |
| Q04446     | 1,4-alpha-glucan branching enzyme (EC 2.4.1.18) (Glycogen branching enzyme) (Brancher enzy       | 31.62    | 80.86479 | 5.862 | 1.56695 | 1       | 1                   | 1.38 | 0                         | 0                        | 1.38336                  |
| Q9P258     | Protein RCC2 (Telophase disk protein of 60 kDa) (RCC1-like protein TD-60)                        | 244.7349 | 56.79048 | 9.873 | 12.2605 | 7       | 3                   | 1.36 | 0.13                      | 16.43                    | 1.34538                  |
| P22392     | Nucleoside diphosphate kinase B (EC 2.7.4.6) (NDK B) (NDP kinase B) (nm23-H2) (C-myc purin       | 103.5    | 17.40098 | 9.351 | 20.3947 | 6       | 1                   | 1.36 | 0                         | 0                        | 1.36454                  |
| P53396     | ATP-citrate synthase (EC 2.3.3.8) (ATP-citrate (pro-S-)-lyase) (Citrate cleavage enzyme)         | 77.50243 | 121.6602 | 7.078 | 2.7248  | 2       | 1                   | 1.36 | 0                         | 0                        | 1.35986                  |
| Q13263     | Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta) (Tripartite motif protein 28) (Nuclea       | 73.87    | 90.26108 | 5.442 | 3.11377 | 3       | 1                   | 1.36 | 0                         | 0                        | 1.3555                   |

표 3. Proteins Not Altered in Secretome of Human Colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (II)

| Protein ID | Protein Name and Species  | Score    | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|---|----------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q96MM7     | Heparan-sulfate 6-O-sulfotransferase 2 (EC 2.8.2.-) (HS6ST-2)   | 50.39    | 70.05545 | 10.74 | 1.32231 | 2       | 1                   | 1.35 | 0                         | 0                        | 1.3538                   |
| P07900     | Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)  | 967.2573 | 84.8888  | 4.793 | 25.0342 | 24      | 9                   | 1.34 | 0.11                      | 24.915                   | 1.30309                  |
| P17987     | T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha)   | 454.91   | 60.81877 | 5.738 | 16.7266 | 8       | 4                   | 1.34 | 0.08                      | 11.258                   | 1.33583                  |
| O15355     | Protein phosphatase 2C isoform gamma (EC 3.1.3.16) (PP2C-gamma) (Protein phosphatase magne)           | 49.24243 | 59.91894 | 4.117 | 5.67766 | 2       | 1                   | 1.34 | 0                         | 0                        | 1.34046                  |
| Q02809     | Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 precursor (EC 1.14.11.4) (Lysyl hydroxyl)          | 928.667  | 84.0676  | 6.49  | 34.5254 | 23      | 4                   | 1.33 | 0.06                      | 9.3843                   | 1.32072                  |
| P16278     | Beta-galactosidase precursor (EC 3.2.1.23) (Lactase) (Acid beta-galactosidase)                        | 99.85    | 76.49877 | 6.106 | 5.31758 | 4       | 1                   | 1.33 | 0                         | 0                        | 1.326                    |
| P36871     | Phosphoglucomutase-1 (EC 5.4.2.2) (Glucose phosphomutase 1) (PGM 1)                                   | 159.96   | 61.56459 | 6.32  | 10.5169 | 6       | 2                   | 1.31 | 0.14                      | 15.166                   | 1.29233                  |
| Q8NBP7     | Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 precursor (EC 3.4.21.-) (Proprotein converta)           | 2244.07  | 75.80772 | 6.092 | 46.3873 | 39      | 9                   | 1.3  | 0.02                      | 4.4542                   | 1.29592                  |
| P08238     | Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (HSP 90)  | 1248.757 | 83.42319 | 4.819 | 30.2905 | 26      | 9                   | 1.3  | 0.11                      | 24.632                   | 1.26446                  |
| Q92820     | Gamma-glutamyl hydrolase precursor (EC 3.4.19.9) (Gamma-Glu-X carboxypeptidase) (Conjugase)           | 81.14    | 36.34032 | 6.81  | 8.1761  | 2       | 1                   | 1.3  | 0                         | 0                        | 1.29844                  |
| P09211     | Glutathione S-transferase P (EC 2.5.1.18) (GST class-pi) (GSTP1-1)                                    | 57.86    | 23.43807 | 5.321 | 5.26316 | 3       | 1                   | 1.3  | 0                         | 0                        | 1.29933                  |
| P11142     | Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)                                       | 1401.76  | 71.08231 | 5.241 | 39.7833 | 40      | 13                  | 1.28 | 0.08                      | 21.294                   | 1.25282                  |
| P17858     | 6-phosphofructokinase, liver type (EC 2.7.1.11) (Phosphofructokinase 1) (Phosphohexokinase)           | 102.55   | 85.6614  | 7.239 | 2.43902 | 3       | 1                   | 1.28 | 0                         | 0                        | 1.27548                  |
| P23246     | Splicing factor, proline- and glutamine-rich (Polypyrimidine tract-binding protein-associa)           | 488.4522 | 76.21567 | 9.901 | 19.2362 | 13      | 3                   | 1.27 | 0.08                      | 10.813                   | 1.26381                  |
| P06744     | Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9) (GPI) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phospho)           | 762.0349 | 63.20429 | 9.141 | 25.8528 | 27      | 12                  | 1.26 | 0.03                      | 7.8668                   | 1.2585                   |
| P23528     | Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform) (18 kDa phosphoprotein) (p18)                                 | 37.36    | 18.5877  | 9.193 | 6.66667 | 1       | 1                   | 1.26 | 0                         | 0                        | 1.26358                  |
| P49368     | T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma) (hTRiC5)                                  | 353.87   | 61.06553 | 6.079 | 16.8807 | 10      | 3                   | 1.24 | 0.06                      | 9.0325                   | 1.23414                  |
| P06396     | Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin) (AGEL)                                | 270.2    | 86.04334 | 5.859 | 11.1253 | 12      | 4                   | 1.24 | 0.09                      | 13.732                   | 1.23098                  |
| Q10472     | P o l y p e p t i d e N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (EC 2.4.1.41) (Protein-UDP acetylgalactosa) | 185.37   | 65.08975 | 8.864 | 8.76565 | 6       | 1                   | 1.24 | 0                         | 0                        | 1.24264                  |
| P35222     | Beta-catenin  | 94.55    | 86.06945 | 5.469 | 2.94494 | 3       | 1                   | 1.24 | 0                         | 0                        | 1.2373                   |
| Q99985     | Semaphorin-3C precursor (Semaphorin E) (Sema E)   | 80.93    | 86.46409 | 9.828 | 2.66312 | 4       | 1                   | 1.24 | 0                         | 0                        | 1.23564                  |
| Q9UMS4     | Pre-mRNA-splicing factor 19 (PRP19/PSO4 homolog) (Nuclear matrix protein 200) (hPso4)                 | 40.16    | 55.60251 | 6.149 | 3.57143 | 2       | 1                   | 1.24 | 0                         | 0                        | 1.23996                  |
| P61978     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear p            | 460.17   | 51.22951 | 5.262 | 22.2462 | 10      | 4                   | 1.23 | 0.06                      | 9.9715                   | 1.22373                  |
| Q15233     | Non-POU domain-containing octamer-binding protein (NonO protein) (54 kDa nuclear RNA- and             | 243.9724 | 54.31132 | 9.607 | 15.4989 | 7       | 3                   | 1.23 | 0.15                      | 20.875                   | 1.2064                   |

### 표 3. Proteins Not Altered in Secretome of Human Colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (III)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|--|--------------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q12906     | Interleukin enhancer-binding factor 3 (Nuclear factor of activated T-cells 90 kDa) (NF-AT- | 108.99       | 95.67822 | 9.349 | 2.57271 | 3       | 1                   | 1.22 | 0                         | 0                        | 1.21702                  |
| P10619     | Lysosomal protective protein precursor (EC 3.4.16.5) (Cathepsin A) (Carboxypeptidase C) (P | 98.62        | 54.94431 | 6.173 | 7.5     | 3       | 1                   | 1.21 | 0                         | 0                        | 1.20652                  |
| Q92743     | Serine protease HTRA1 precursor (EC 3.4.21.-) (L56)  | 117.78       | 52.16696 | 9.287 | 8.75    | 5       | 1                   | 1.2  | 0                         | 0                        | 1.20266                  |
| P00441     | Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)   | 33.73        | 16.02295 | 5.678 | 6.53595 | 2       | 1                   | 1.19 | 0                         | 0                        | 1.18542                  |
| Q969P0     | Immunoglobulin superfamily member 8 precursor (CD81 partner 3) (Glu-Trp-Ile EWI motif cont | 470.97<br>24 | 65.62075 | 9.148 | 27.5693 | 15      | 1                   | 1.17 | 0                         | 0                        | 1.16713                  |
| Q9NY33     | Dipeptidyl-peptidase 3 (EC 3.4.14.4) (Dipeptidyl-peptidase III) (DPP III) (Dipeptidyl amin | 195.74<br>24 | 82.87992 | 4.873 | 10.1764 | 7       | 1                   | 1.17 | 0                         | 0                        | 1.16678                  |
| P02786     | Transferrin receptor protein 1 (TfR1) (TR) (TfR) (Trfr) (CD71 antigen) (T9) (p90)          | 542.16<br>49 | 85.30412 | 6.179 | 12.8947 | 13      | 4                   | 1.16 | 0.17                      | 29.819                   | 1.11294                  |
| P08107     | Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1) (HSP70-1/HSP70-2)                                    | 979.58<br>73 | 70.29414 | 5.358 | 29.3292 | 29      | 11                  | 1.13 | 0.06                      | 17.2                     | 1.11077                  |
| Q9Y262     | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-interacting protein                   | 108.69       | 66.91249 | 5.907 | 6.38298 | 3       | 1                   | 1.13 | 0                         | 0                        | 1.12755                  |
| P13010     | ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2 (EC 3.6.1.-) (ATP-dependent DNA helicase II 80 kDa  | 315.99       | 83.09145 | 5.465 | 11.4911 | 10      | 3                   | 1.11 | 0.1                       | 14.962                   | 1.09886                  |
| P38646     | Stress-70 protein, mitochondrial precursor (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP 75) (Pe | 150.03<br>24 | 73.91988 | 5.805 | 6.62739 | 6       | 2                   | 1.11 | 0.06                      | 7.8775                   | 1.10562                  |
| P14314     | Glucosidase II beta subunit precursor (Protein kinase C substrate, 60.1 kDa protein, heavy | 126.98       | 60.22814 | 4.184 | 6.07211 | 6       | 3                   | 1.1  | 0.12                      | 18.701                   | 1.0851                   |
| Q96QK1     | Vacuolar protein sorting 35 (Vesicle protein sorting 35) (hVPS35) (Maternal-embryonic 3)   | 94.04        | 92.44723 | 5.205 | 3.76884 | 4       | 1                   | 1.09 | 0                         | 0                        | 1.09319                  |
| P07237     | Protein disulfide-isomerase precursor (EC 5.3.4.1) (PDI) (Prolyl 4-hydroxylase beta subuni | 673.86       | 57.47982 | 4.61  | 21.2598 | 15      | 7                   | 1.08 | 0.05                      | 11.62                    | 1.07118                  |
| O75083     | WD-repeat protein 1 (Actin-interacting protein 1) (AIP1) (NORI-1)                          | 266.96       | 66.70508 | 6.185 | 7.43802 | 8       | 2                   | 1.08 | 0.15                      | 19.917                   | 1.05678                  |
| Q9UKV3     | Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus (Acinus)                           | 62.55        | 152.196  | 6.034 | 1.49142 | 2       | 1                   | 1.08 | 0                         | 0                        | 1.08493                  |
| P02545     | Lamin-A/C (70 kDa lamin)   | 1340.6<br>17 | 74.37981 | 6.604 | 51.2048 | 34      | 12                  | 1.07 | 0.05                      | 16.769                   | 1.05402                  |
| P13639     | Elongation factor 2 (EF-2)   | 802.85<br>84 | 96.11527 | 6.422 | 25.7876 | 26      | 9                   | 1.07 | 0.06                      | 17.583                   | 1.05684                  |
| Q16881     | Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic precursor (EC 1.8.1.9) (TR) (TR1)                     | 328.12<br>24 | 55.47018 | 6.06  | 16.0321 | 9       | 4                   | 1.06 | 0.09                      | 16.987                   | 1.04913                  |
| P26599     | Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) ( | 227.12       | 57.3567  | 9.761 | 13.936  | 5       | 2                   | 1.06 | 0.19                      | 25.67                    | 1.02821                  |
| Q06210     | Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1 (EC 2.6.1.16) (Hexoseph | 452.06<br>24 | 79.42358 | 6.709 | 19.7708 | 12      | 3                   | 1.04 | 0.09                      | 14.338                   | 1.03303                  |

### Figure 3. Proteins Not Altered in Secretome of Human Colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (IV)

| Protein ID | Protein Name and Species  | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|---|--------------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| P10809     | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor (Hsp60) (60 kDa chaperonin) (CPN60) (He  | 527.39       | 61.18744 | 5.59  | 23.2112 | 11      | 5                   | 1.03 | 0.06                      | 12.339                   | 1.01806                  |
| Q01518     | Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)   | 140.81       | 51.79471 | 8.945 | 7.59494 | 4       | 2                   | 1.03 | 0.15                      | 20.603                   | 1.00394                  |
| P15291     | Beta-1,4-galactosyltransferase 1 (EC 2.4.1.-) (Beta-1,4-GalTase 1) (Beta4Gal-T1) (b4Gal-T1) | 41.78        | 44.20445 | 9.599 | 2.51889 | 2       | 1                   | 1.03 | 0                         | 0                        | 1.03306                  |
| P55072     | Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Va  | 87.284<br>87 | 89.81893 | 4.999 | 7.32919 | 4       | 1                   | 1.01 | 0                         | 0                        | 1.01434                  |
| P30101     | Protein disulfide-isomerase A3 precursor (EC 5.3.4.1) (Disulfide isomerase ER-60) (ERp60)   | 910.60<br>73 | 57.1459  | 5.95  | 31.4851 | 18      | 7                   | 1    | 0.05                      | 12.654                   | 0.99202                  |
| P12277     | Creatine kinase B-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase, B chain) (B-CK)                       | 62.43        | 42.90242 | 5.249 | 8.92388 | 2       | 1                   | 1    | 0                         | 0                        | 0.99838                  |
| Q9Y2A9     | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3 (EC 2.4.1.-) (Beta3Gn-T3) (B  | 227.39       | 43.00109 | 9.802 | 14.2473 | 5       | 1                   | 0.97 | 0                         | 0                        | 0.97449                  |
| O75369     | Filamin-B (FLN-B) (Beta-filamin) (Actin-binding-like protein) (Thyroid autoantigen) (Trunc  | 145.52       | 280.1879 | 5.403 | 2.38278 | 7       | 2                   | 0.97 | 0.16                      | 23.128                   | 0.94665                  |
| P04075     | Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Muscle-type aldolase) (Lung cancer antigen  | 228.9        | 39.72044 | 9.244 | 17.9063 | 5       | 2                   | 0.94 | 0.12                      | 17.481                   | 0.92201                  |
| P18669     | Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.1) (EC 5.4.2.4) (EC 3.1.3.13) (Phosphoglycerate mutase  | 81.19        | 28.76884 | 6.817 | 11.4625 | 3       | 1                   | 0.93 | 0                         | 0                        | 0.92823                  |
| Q9NYF8     | Bcl-2-associated transcription factor 1 (Btf)   | 54.3         | 106.1728 | 10.42 | 1.52174 | 2       | 1                   | 0.93 | 0                         | 0                        | 0.92637                  |
| P05787     | Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin-8) (CK-8) (Keratin-8) (K8)                     | 945.25<br>33 | 53.51008 | 5.385 | 38.7967 | 19      | 8                   | 0.92 | 0.06                      | 19.199                   | 0.90141                  |
| P19338     | Nucleolin (Protein C23)   | 249.37       | 76.49434 | 4.447 | 7.19323 | 5       | 2                   | 0.91 | 0.04                      | 6.0704                   | 0.90434                  |
| O14672     | ADAM 10 precursor (EC 3.4.24.81) (A disintegrin and metalloproteinase domain 10) (Mammalia  | 209.31<br>24 | 86.14046 | 9.119 | 8.95722 | 6       | 2                   | 0.91 | 0.1                       | 15.921                   | 0.89591                  |
| P23588     | Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B)  | 108.59<br>71 | 69.24026 | 5.348 | 8.51064 | 6       | 1                   | 0.91 | 0                         | 0                        | 0.91005                  |

☒ 4. Down-Regulated Proteins in Secretome of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (I)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|--|--------------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q8NBJ4     | Golgi phosphoprotein 2 (Golgi membrane protein GP73)   | 1160.3       | 45.47683 | 4.765 | 37.9052 | 24      | 6                   | 0.89 | 0.04                      | 12.012                   | 0.88592                  |
| P15151     | Poliovirus receptor precursor (Nectin-like protein 5) (Nectl-5) (CD155 antigen)                | 87.89        | 45.78702 | 6.075 | 9.35252 | 3       | 1                   | 0.89 | 0                         | 0                        | 0.88592                  |
| Q86SF2     | N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (EC 2.4.1.-) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase) | 55.26        | 76.02528 | 6.736 | 2.89193 | 3       | 1                   | 0.88 | 0                         | 0                        | 0.88219                  |
| P35579     | Myosin-9 (Myosin heavy chain, nonmuscle IIa) (Nonmuscle myosin heavy chain IIa) (NMMHC II-)    | 198.36<br>65 | 227.515  | 5.377 | 4.49209 | 9       | 2                   | 0.87 | 0.04                      | 6.0645                   | 0.87104                  |
| Q13740     | CD166 antigen precursor (Activated leukocyte-cell adhesion molecule) (ALCAM)                   | 104.52       | 65.77535 | 5.872 | 3.08748 | 2       | 1                   | 0.87 | 0                         | 0                        | 0.86501                  |
| Q14247     | Src substrate cortactin (Amplixin) (Oncogene EMS1)   | 67.44        | 61.76957 | 5.116 | 6       | 2       | 1                   | 0.87 | 0                         | 0                        | 0.87093                  |
| P47897     | Glutaminyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.18) (Glutamine-tRNA ligase) (GlnRS)                       | 39.64        | 88.65521 | 6.771 | 1.54839 | 1       | 1                   | 0.87 | 0                         | 0                        | 0.86592                  |
| P13667     | Protein disulfide-isomerase A4 precursor (EC 5.3.4.1) (Protein ERp-72) (ERp72)                 | 387.43       | 73.2291  | 4.813 | 14.4186 | 14      | 6                   | 0.86 | 0.04                      | 10.031                   | 0.85663                  |
| Q08345     | Epithelial discoidin domain-containing receptor 1 precursor (EC 2.7.1.112) (Epithelial dis)    | 226.40<br>24 | 102.0325 | 6.394 | 5.36692 | 7       | 1                   | 0.86 | 0                         | 0                        | 0.85833                  |
| Q9H173     | Nucleotide exchange factor SIL1 precursor (BIP-associated protein) (BAP)                       | 75.05        | 52.33712 | 5.149 | 4.98915 | 3       | 1                   | 0.85 | 0                         | 0                        | 0.85025                  |
| P07384     | Calpain-1 catalytic subunit (EC 3.4.22.52) (Calpain-1 large subunit) (Calcium-activated ne     | 51.64        | 82.46542 | 5.379 | 4.06162 | 3       | 1                   | 0.85 | 0                         | 0                        | 0.85186                  |
| P62988     | Ubiquitin  | 145.66       | 8.55962  | 7.578 | 39.4737 | 4       | 2                   | 0.84 | 0.15                      | 25.434                   | 0.81769                  |
| P08581     | Hepatocyte growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112) (HGF receptor) (Scatter factor      | 58.29        | 157.7653 | 7.163 | 0.71942 | 2       | 1                   | 0.82 | 0                         | 0                        | 0.82237                  |
| P09429     | High mobility group protein 1 (HMG-1) (High mobility group protein B1)                         | 35.82        | 24.91818 | 5.487 | 4.20561 | 2       | 1                   | 0.82 | 0                         | 0                        | 0.81789                  |
| Q9Y5Y6     | Suppressor of tumorigenicity 14 (EC 3.4.21.-) (Matriptase) (Membrane-type serine protease      | 569.32       | 96.98965 | 6.113 | 11.345  | 9       | 1                   | 0.81 | 0                         | 0                        | 0.81008                  |
| O43707     | Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4) (F-actin cross linking protein)                   | 647.84<br>49 | 105.2446 | 5.158 | 16.4654 | 17      | 6                   | 0.79 | 0.04                      | 12.645                   | 0.7885                   |
| P23284     | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor (EC 5.2.1.8) (PPIase) (Rotamase) (Cyclophi     | 42.38        | 22.78503 | 9.851 | 4.80769 | 1       | 1                   | 0.78 | 0                         | 0                        | 0.78166                  |
| Q14393     | Growth-arrest-specific protein 6 precursor (GAS-6)   | 345.15<br>24 | 81.67794 | 5.805 | 12.344  | 7       | 1                   | 0.77 | 0                         | 0                        | 0.77027                  |
| Q02818     | Nucleobindin-1 precursor (CALNUC)  | 883.37<br>73 | 53.84633 | 5.021 | 28.8503 | 18      | 4                   | 0.76 | 0.03                      | 7.4949                   | 0.76109                  |
| Q8WUM4     | Programmed cell death 6-interacting protein (PDCC6-interacting protein) (ALG-2-interacting     | 580.41<br>49 | 96.59035 | 6.107 | 18.318  | 15      | 4                   | 0.75 | 0.03                      | 7.9328                   | 0.74833                  |

#### ☒ 4. Down-Regulated Proteins in Secretome of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 with Induced 5-FU Resistance (II)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. | # (treated/control) | Avg. | Avg. SD (treated/control) | CV [%] (treated/control) | Median (treated/control) |
|------------|--|--------------|----------|-------|---------|---------|---------------------|------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| P15529     | Membrane cofactor protein precursor (Trophoblast leukocyte common antigen) (TLX) (CD46 ant | 78.09        | 44.74507 | 6.389 | 4.59184 | 3       | 1                   | 0.75 | 0                         | 0                        | 0.75318                  |
| O00468     | Agrin precursor  | 414.05<br>24 | 222.9035 | 6.036 | 5.33007 | 13      | 2                   | 0.75 | 0.004                     | 0.8509                   | 0.74764                  |
| P05067     | Amyloid beta A4 protein precursor (APP) (ABPP) (Alzheimer disease amyloid protein) (Cerebr | 354.81<br>73 | 87.91444 | 4.586 | 12.5974 | 14      | 4                   | 0.74 | 0.05                      | 12.875                   | 0.7292                   |
| P11021     | 78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain-binding pr | 1031.7<br>35 | 72.40248 | 4.921 | 28.2875 | 26      | 10                  | 0.73 | 0.05                      | 19.853                   | 0.71693                  |
| P14625     | Endoplasmic precursor (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94) (gp96 homolog) (Tumor rej | 394.2        | 92.69645 | 4.611 | 14.0722 | 13      | 5                   | 0.73 | 0.14                      | 43.958                   | 0.66947                  |
| Q12864     | Cadherin-17 precursor (Liver-intestine-cadherin) (LI-cadherin) (Intestinal peptide-associa | 233.13       | 92.49    | 4.818 | 7.09135 | 5       | 1                   | 0.7  | 0                         | 0                        | 0.69585                  |
| P23229     | Integrin alpha-6 precursor (VLA-6) (CD49f antigen) [Contains: Integrin alpha-6 heavy chain | 102.28<br>24 | 127.7367 | 6.402 | 3.00885 | 4       | 2                   | 0.7  | 0.05                      | 9.6484                   | 0.69823                  |
| P55809     | Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, mitochondrial precursor (EC 2.8.3.5) (So | 119.55       | 56.5781  | 7.805 | 5.19231 | 3       | 1                   | 0.68 | 0                         | 0                        | 0.68438                  |
| Q13217     | DnaJ homolog subfamily C member 3 (Interferon-induced, double-stranded RNA-activated prote | 299.79       | 58.00034 | 5.774 | 15.2778 | 10      | 4                   | 0.65 | 0.04                      | 11.581                   | 0.64938                  |
| Q06481     | Amyloid-like protein 2 precursor (Amyloid protein homolog) (APPH) (CDEI box-binding protei | 134.54<br>24 | 87.92657 | 4.58  | 5.89777 | 6       | 2                   | 0.62 | 0.03                      | 6.4737                   | 0.61925                  |
| O43405     | Cochlin precursor (COCH-5B2)   | 473          | 60.07246 | 9.13  | 15.0909 | 7       | 2                   | 0.61 | 0.13                      | 29.061                   | 0.58972                  |
| O94985     | Calsyntenin-1 precursor  | 641.41       | 110.9782 | 4.67  | 9.88787 | 13      | 4                   | 0.59 | 0.06                      | 20.077                   | 0.58138                  |
| Q15424     | Scaffold attachment factor B (Scaffold attachment factor B1) (SAF-B) (HSP27 estrogen respo | 100.12<br>35 | 103.0337 | 5.195 | 2.40437 | 2       | 1                   | 0.56 | 0                         | 0                        | 0.55977                  |
| P19801     | Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing] precursor (EC 1.4.3.6) (Diamine oxid | 272.42       | 85.6868  | 6.55  | 12.1172 | 7       | 2                   | 0.49 | 0.04                      | 11.989                   | 0.48427                  |
| P16070     | CD44 antigen precursor (Phagocytic glycoprotein I) (PGP-1) (HUTCH-I) (Extracellular matrix | 81.09        | 82.01659 | 5.021 | 2.69542 | 3       | 1                   | 0.45 | 0                         | 0                        | 0.44538                  |

☒ 5. Proteins identified in Secretomes of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 and 5-FU Resistant SNU-C4 (I)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. |
|------------|--|--------------|----------|-------|---------|---------|
| O14773     | Tripeptidyl-peptidase I precursor (EC 3.4.14.9) (TPP-I) (Tripeptidyl aminopeptidase) (Lyso | 420          | 61.70378 | 5.976 | 21.492  | 8       |
| Q9H4A4     | Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6) (Ap-B) (Arginyl aminopeptidase) (Arginine aminopeptidase)   | 373.63       | 73.23372 | 5.425 | 13.5385 | 7       |
| P49327     | Fatty acid synthase (EC 2.3.1.85) [Includes: [Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase (E | 340.22       | 275.8502 | 5.975 | 3.82318 | 7       |
| P07996     | Thrombospondin-1 precursor   | 248.53<br>49 | 133.3211 | 4.569 | 7.69231 | 6       |
| P35527     | Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9) (CK-9) (Keratin-9) (K9)                     | 231.92       | 62.31999 | 5.057 | 5.77849 | 2       |
| P12814     | Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform) (Non-muscle alpha-actinin-1) (F-actin | 209.61<br>24 | 103.5628 | 5.132 | 5.26906 | 5       |
| Q12931     | Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor (HSP 75) (Tumor necrosis factor type 1  | 202.7        | 80.3448  | 8.955 | 4.82955 | 4       |
| P01024     | Complement C3 precursor [Contains: Complement C3 beta chain; Complement C3 alpha chain; C3 | 185.83<br>24 | 188.5855 | 5.984 | 1.74384 | 2       |
| O60568     | Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 precursor (EC 1.14.11.4) (Lysyl hydroxyl | 183.1        | 85.30169 | 5.642 | 9.21409 | 5       |
| P04264     | Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (67 kDa cytoke     | 145.73       | 66.01801 | 8.821 | 8.55365 | 2       |
| P04004     | Vitronectin precursor (Serum spreading factor) (S-protein) (V75) [Contains: Vitronectin V6 | 131.06       | 55.06947 | 5.464 | 3.13808 | 1       |
| Q9P2E9     | Ribosome-binding protein 1 (Ribosome receptor protein) (180 kDa ribosome receptor homolog) | 116.35<br>49 | 152.7798 | 9.286 | 3.12057 | 3       |
| O43143     | Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (EC 3.6.1.-) (DEAH box  | 116.21<br>24 | 91.67346 | 7.363 | 5.40881 | 5       |
| P78371     | T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta) (CCT-beta)                                   | 107.8        | 57.66322 | 6.002 | 6.92884 | 3       |
| Q9Y4L1     | 150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150) (Hypoxia up-regulated 1)               | 105.39       | 111.4943 | 5.017 | 2.7027  | 3       |
| P00338     | L-lactate dehydrogenase A chain (EC 1.1.1.27) (LDH-A) (LDH muscle subunit) (LDH-M) (Prolif | 105.21       | 36.81943 | 9.306 | 5.43807 | 2       |
| P18065     | Insulin-like growth factor-binding protein 2 precursor (IGFBP-2) (IBP-2) (IGF-binding prot | 99.05        | 36.1978  | 8.924 | 11.5854 | 3       |
| P54136     | Arginyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.19) (Arginine--tRNA ligase) (ArgRS)                      | 96.68        | 76.12916 | 6.258 | 5.15152 | 3       |
| O43852     | Calumenin precursor (Crococalbin) (IEF SSP 9302)   | 92.96        | 37.19758 | 4.321 | 4.7619  | 2       |
| Q15046     | Lysyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.6) (Lysine--tRNA ligase) (LysRS)                           | 90.46        | 68.46076 | 5.919 | 4.85762 | 5       |
| P48147     | Prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26) (Post-proline cleaving enzyme) (PE)                    | 89.22        | 81.62433 | 5.412 | 3.66197 | 2       |
| Q92945     | Far upstream element-binding protein 2 (FUSE-binding protein 2) (KH type splicing regulato | 85.5         | 73.06305 | 8.839 | 2.68741 | 2       |

표 5. Proteins identified in Secretomes of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 and 5-FU Resistant SNU-C4 (II)

| Protein ID | Protein Name and Species  | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. |
|------------|---|--------------|----------|-------|---------|---------|
| P43251     | Biotinidase precursor (EC 3.5.1.12)   | 84.61        | 59.73039 | 5.447 | 3.25048 | 1       |
| Q13813     | Spectrin alpha chain, brain (Spectrin, non-erythroid alpha chain) (Alpha-II spectrin) (Fod) | 84.412<br>43 | 285.1505 | 5.093 | 1.05178 | 3       |
| Q08945     | Structure-specific recognition protein 1 (SSRP1) (Recombination signal sequence recognitio  | 79.85        | 81.36655 | 6.457 | 3.66714 | 2       |
| P12830     | Epithelial-cadherin precursor (E-cadherin) (Uvomorulin) (Cadherin-1) (CAM 120/80) (CD324 a  | 79.7         | 97.85203 | 4.425 | 3.40136 | 3       |
| Q06203     | Amidophosphoribosyltransferase precursor (EC 2.4.2.14) (Glutamine phosphoribosylpyrophosph  | 77.81        | 58.16066 | 6.32  | 7.15667 | 3       |
| P27695     | DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase (EC 4.2.99.18) (AP endonuclease 1) (APEX nucleas  | 77.4         | 35.80028 | 9.238 | 10.4101 | 2       |
| P62805     | Histone H4  | 76.12        | 11.22934 | 11.85 | 36.2745 | 4       |
| P53634     | Dipeptidyl-peptidase 1 precursor (EC 3.4.14.1) (Dipeptidyl-peptidase I) (DPP-I) (DPPI) (Ca  | 75.59        | 52.60655 | 6.592 | 2.59179 | 1       |
| P10586     | Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F precursor (EC 3.1.3.48) (LAR protein) (Leukoc  | 73.283<br>54 | 212.9084 | 5.906 | 0.79072 | 1       |
| P05546     | Heparin cofactor II precursor (HC-II) (Protease inhibitor leuserpin 2) (HLS2)               | 73.17        | 57.20527 | 6.442 | 4.20842 | 2       |
| Q96HE7     | ERO1-like protein alpha precursor (EC 1.8.4.-) (ERO1-Lalpha) (Oxidoreductin-1-Lalpha) (End  | 71.49        | 55.21337 | 5.387 | 2.5641  | 2       |
| P45974     | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 5) (Ubiquit  | 68.822<br>43 | 96.63767 | 4.765 | 3.84615 | 2       |
| P02788     | Lactotransferrin precursor (EC 3.4.21.-) (Lactoferrin) [Contains: Kaliocin-1; Lactoferroxi  | 67.95        | 80.01362 | 9.605 | 1.26761 | 1       |
| P34932     | Heat shock 70 kDa protein 4 (Heat shock 70-related protein APG-2) (HSP70RY)                 | 66.91        | 95.09561 | 5.033 | 4.52381 | 2       |
| Q14152     | Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10 (eIF-3 theta) (eIF3 p167) (eIF3 p180  | 64.15        | 166.8675 | 6.361 | 1.73661 | 2       |
| P14866     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L)   | 63.95        | 60.71943 | 6.721 | 1.79211 | 1       |
| Q96TA1     | Niban-like protein (Meg-3)  | 61.89        | 83.14412 | 5.762 | 1.50068 | 1       |
| P78504     | Jagged-1 precursor (Jagged1) (hJ1) (CD339 antigen)  | 57.45        | 141.1785 | 5.658 | 0.90312 | 1       |
| P02765     | Alpha-2-HS-glycoprotein precursor (Fetuin-A) (Alpha-2-Z-globulin) (Ba-alpha-2-glycoprotein  | 56.95        | 40.09801 | 5.358 | 1.63488 | 1       |
| Q86SQ6     | Probable G-protein coupled receptor 123   | 56.51        | 139.8677 | 10.41 | 1.48438 | 2       |
| Q92804     | TATA-binding protein-associated factor 2N (RNA-binding protein 56) (TAFII68) (TAF(II)68)    | 55.38        | 62.02119 | 8.598 | 2.02703 | 1       |
| O95622     | Adenylate cyclase type V (EC 4.6.1.1) (ATP pyrophosphate-lyase 5) (Adenyl cyclase 5) (Fr    | 54.45        | 102.4074 | 6.029 | 1.90157 | 2       |
| P04066     | Tissue alpha-L-fucosidase precursor (EC 3.2.1.51) (Alpha-L-fucosidase I) (Alpha-L-fucoside  | 54.22        | 53.42758 | 6.258 | 2.38612 | 1       |
| O43278     | Kunitz-type protease inhibitor 1 precursor (Hepatocyte growth factor activator inhibitor t  | 52.96        | 60.12788 | 5.872 | 3.21361 | 2       |



표 5. Proteins identified in Secretomes of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 and 5-FU Resistant SNU-C4 (III)

| Protein ID | Protein Name and Species  | Score        | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. |
|------------|---|--------------|----------|-------|---------|---------|
| O75874     | Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic (EC 1.1.1.42) (Oxalosuccinate decarboxylase) (  | 52.84        | 46.91462 | 6.597 | 4.10628 | 2       |
| P52799     | Ephrin-B2 precursor (EPH-related receptor tyrosine kinase ligand 5) (LERK-5) (HTK ligand)   | 51.99        | 37.35596 | 9.749 | 9.30931 | 2       |
| Q92769     | Histone deacetylase 2 (HD2)   | 51.61        | 55.899   | 5.531 | 2.86885 | 2       |
| P46940     | Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 (p195)  | 50.702<br>43 | 189.761  | 6.055 | 1.26735 | 2       |
| Q15437     | Protein transport protein Sec23B (SEC23-related protein B)                                  | 50.16        | 87.39288 | 6.46  | 1.56454 | 1       |
| O15230     | Laminin alpha-5 chain precursor   | 48.682<br>43 | 411.9971 | 6.622 | 0.43302 | 1       |
| Q16762     | Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (Rhodanese)                                      | 47.95        | 33.50488 | 6.932 | 5.40541 | 2       |
| O75144     | ICOS ligand precursor (B7 homolog 2) (B7-H2) (B7-like protein G150) (B7-related protein 1)  | 47.79        | 33.84087 | 5.026 | 3.31126 | 1       |
| Q95604     | HLA class I histocompatibility antigen, Cw-17 alpha chain precursor (MHC class I antigen C) | 47.592<br>43 | 41.61176 | 6.365 | 3.49462 | 2       |
| Q9GZM7     | Tubulointerstitial nephritis antigen-like precursor (Tubulointerstitial nephritis antigen-  | 47.48        | 53.72147 | 6.597 | 3.85439 | 2       |
| Q8WU76     | Sec1 family domain-containing protein 2 (Syntaxin-binding protein 1-like 1)                 | 45.98        | 75.87742 | 6.224 | 2.48538 | 2       |
| O94923     | D-glucuronyl C5-epimerase (EC 5.1.3.-) (Heparin/heparan sulfate:glucuronic acid C5 epimera  | 45.572<br>43 | 70.41281 | 9.536 | 4.86224 | 2       |
| P00558     | Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) (Primer recognition protein 2) (PRP 2)               | 44.32        | 44.85423 | 9.208 | 6.73077 | 1       |
| Q9H3P7     | Golgi resident protein GCP60 (Acyl-CoA-binding domain-containing protein 3) (Golgi phospho  | 44.28        | 60.71004 | 4.881 | 4.55408 | 1       |
| Q93052     | Lipoma-preferred partner (LIM domain-containing preferred translocation partner in lipoma)  | 41.81        | 67.12937 | 7.839 | 2.45098 | 1       |
| Q9NQW7     | Xaa-Pro aminopeptidase 1 (EC 3.4.11.9) (X-Pro aminopeptidase 1) (X-prolyl aminopeptidase 1  | 40.9         | 70.42645 | 5.335 | 1.44695 | 1       |
| O00571     | ATP-dependent RNA helicase DDX3X (EC 3.6.1.-) (DEAD box protein 3, X-chromosomal) (Helicas  | 38.9         | 73.46611 | 6.82  | 1.66415 | 1       |
| Q14118     | Dystroglycan precursor (Dystrophin-associated glycoprotein 1) [Contains: Alpha-dystroglyca  | 38.49        | 97.86187 | 9.356 | 0.67039 | 1       |
| P09622     | Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial precursor (EC 1.8.1.4) (Dihydrolipoamide dehydr  | 37.11        | 54.68614 | 8.631 | 2.55403 | 1       |
| P52597     | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP F) (Nucleolin-like protein mcs94-1)        | 36.64        | 45.85394 | 5.274 | 2.41546 | 1       |
| P17931     | Galectin-3 (Galactose-specific lectin 3) (Mac-2 antigen) (IgE-binding protein) (35 kDa lec  | 35.73        | 26.09804 | 9.199 | 2.81124 | 1       |
| Q92485     | Acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor (EC 3.1.4.-) (ASM-like phosphodi  | 33.33        | 51.23734 | 5.272 | 3.51648 | 1       |
| Q9H4M9     | EH-domain-containing protein 1 (Testilin) (hPAST1)  | 32.03        | 60.64569 | 6.363 | 2.62172 | 1       |
| P35613     | Basigin precursor (Leukocyte activation antigen M6) (Collagenase stimulatory factor) (Extr  | 31.49        | 42.57321 | 5.311 | 2.33766 | 1       |

## 표 5. Proteins identified in Secretomes of Human colon Cancer Cell Line SNU-C4 and 5-FU Resistant SNU-C4 (IV)

| Protein ID | Protein Name and Species   | Score | MW [kDa] | pI    | SC [%]  | # Pept. |
|------------|--|-------|----------|-------|---------|---------|
| Q16610     | Extracellular matrix protein 1 precursor (Secretory component p85)                         | 31.17 | 62.23187 | 6.263 | 1.85185 | 1       |
| O14662     | Syntaxin-16 (Syn16)  | 31.06 | 37.17931 | 5.705 | 2.46154 | 1       |
| Q9UJV9     | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 (EC 3.6.1.-) (DEAD box protein 41) (DEAD box pro | 30.47 | 70.47725 | 6.414 | 1.60772 | 1       |

Protein Name and Species: Contains name and species of the detected proteins.

Accession: Designation delivered from Mascot for a protein.

Score: Shows the Mascot score of the protein identification.

MW [kDa]: Molecular weight in kDa of the respective protein.

pI: Isoelectric point (pI) of the protein, calculated from its amino acid sequence.

SC [%]: Sequence coverage in percent, calculated from the identified peptides of the respective protein.

# Pept.: Number of identified peptides obtained for a particular protein.

# (regulation ratio name): Number of relevant peptides with a valid regulation for the regulation ratio with the specified name. (ICPL labeling 되어있는 수)

Avg. +/- SD (regulation ratio name): Average regulation value and the standard deviation of the average.

CV [%] (regulation ratio name): Coefficient of variance in percent derived from the average regulation and the standard deviation of the peptide regulations.

Median (regulation ratio name): Median regulation value.

RMS [ppm]: The RMS value of the deltas between the calculated and experimental masses of the peptides, which belong to a particular protein.

Abs. Inten.: Sum of all absolute intensity values of the peptides, which belong to a particular protein. This column is available for ESI based workflows and the LC-ESI-MALDI workflow.

Area: Sum of all area values related to 100 laser shots for all peptides, which belong to a particular protein. This column is available for MALDI based workflows.

Inten.: Sum of all intensity values related to 100 laser shots for all peptides, which belong to a particular protein. This column is available for LC-MALDI und LC-MALDI SILE workflows.

S/N: Sum of all S/N-values for all peptides, which belong to a particular protein.

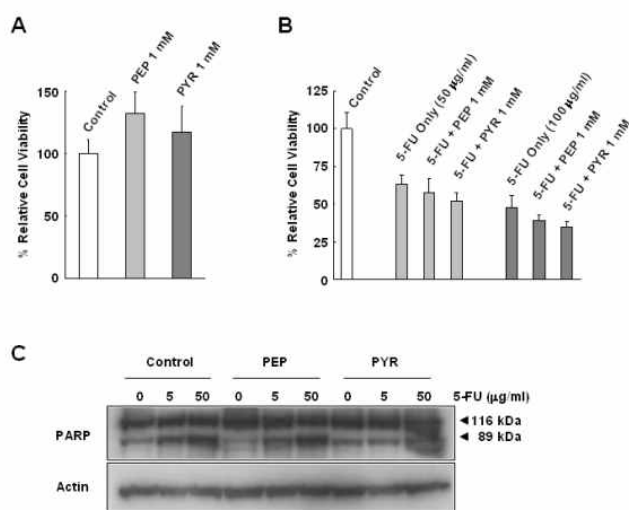


그림 14. Alpha-enolase의 substrate인 phosphoenolpyruvate와 pyruvate kinase의 substrate인 pyruvate의 5-FU 감수성에 미치는 영향

- Alpha-enolase의 substrate인 phosphoenolpyruvate와 pyruvate kinase의 substrate인 pyruvate는 대장암세포주의 세포증식을 촉진시킬 수 있었으나 5-FU가 존재하는 상태에서는 오히려 세포 증식을 억제하는 방향의 효과를 보여 줌 (그림 14).

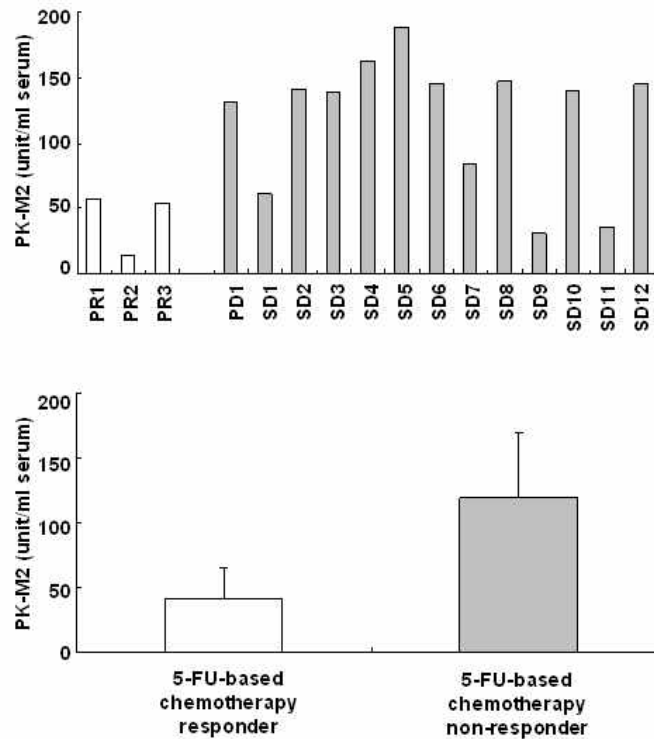


그림 15. 5-FU를 기본으로 하는 항암화학요법을 받은 대장암환자의 혈청 단백질 내의 pyruvate kinase 양과 항암제 반응성의 관계

- 5-FU 내성이 유도된 대장암세포주의 분비단백질 분석을 통해 동정된 여러 glycolysis 관여 효소 중 rate determining step의 효소인 pyruvate kinase의 양을 실제 5-FU를 투여 받은 대장암 환자의 혈청 단백질내에 측정하였음 (그림 15). 흥미롭게도 5-FU 내성 대장암세포주의 분비 단백질내에 많은 양이 존재하였던 pyruvate kinase는 실제 임상 대장암환자 중 5-FU에 대한 반응성이 적었던 환자의 혈청 단백질 내에 대조군에 비해 많은 양으로 존재하고 있음이 확인 되었음 (그림 15).

## 5) Analysis of Low Mass Metabolites in Serum using ToF-SIMS and GC-MS for the Prediction for Chemotherapy Response of Colorectal Cancer Patient

- 기존의 MALDI, LC-MS/MS를 이용한 분석은 주로 단백질체 그 자체에 한정되어져 있었음. 그러나 단백질체가 가지는 생물학적인 정보의 양보다는 대사체가 가지고 있는 정보의 양이 훨씬 방대할 것이 예상됨. 새로운 시도로서 기존에 반도체 표면 처리 상태를 검증하기 위해 사용되었던 SIMS (이차이온질량분석기)를 이용 저분자량의 대사체 또는 고분자의 절편화 양상을 연구하기 시작하였음.
- 5-FU를 주축으로 하는 항암화학요법에 대한 서로 다른 반응성을 보인 대장암환자들로부터 얻은 혈청을 슬라이드 글라스에서 말린 후 SIMS를 통해 분석된 질량 스펙트럼을 분석하였음 (그림 16). 서로 다른 항암제 반응성을 보인 환자(그림 16 A)의 혈청으로부터 얻어진 질량 스펙트럼상의 질량값들은 PCA의 통계적 방법에 의해 분류하였고 항암제 반응성이 있는 세명 (PR: partial response)의 경우 2명은 대장암 환자의 일반 그룹과 분리되었으나 1명은 분리가 되지 않았음 (그림 16 B).

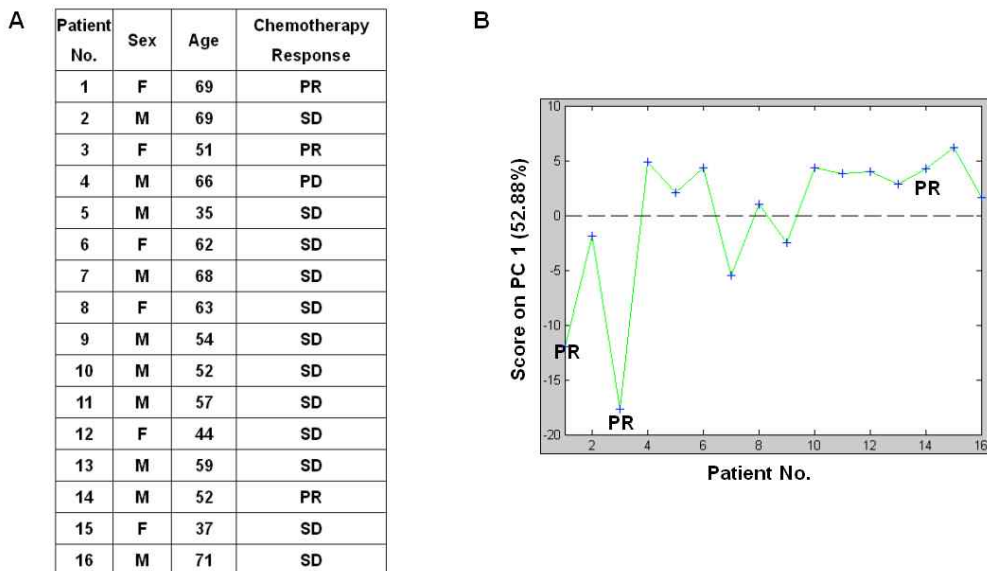
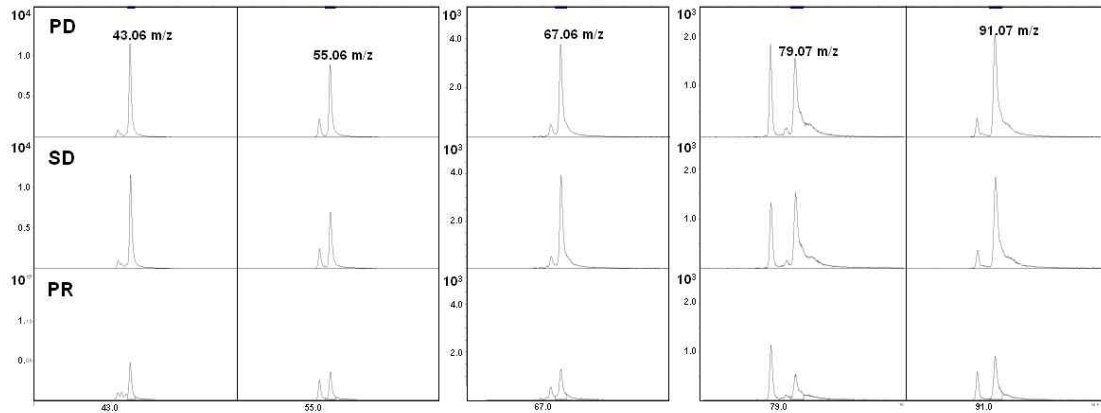


그림 16. 5-FU를 주축으로 하는 화학항암요법에 대해 서로 다른 반응성을 보이는 환자의 혈청에 대한 SIMS 분석과 SIMS 분석을 통해 얻어진 각각의 질량값을 이용한 PCA 분석 결과

A



B

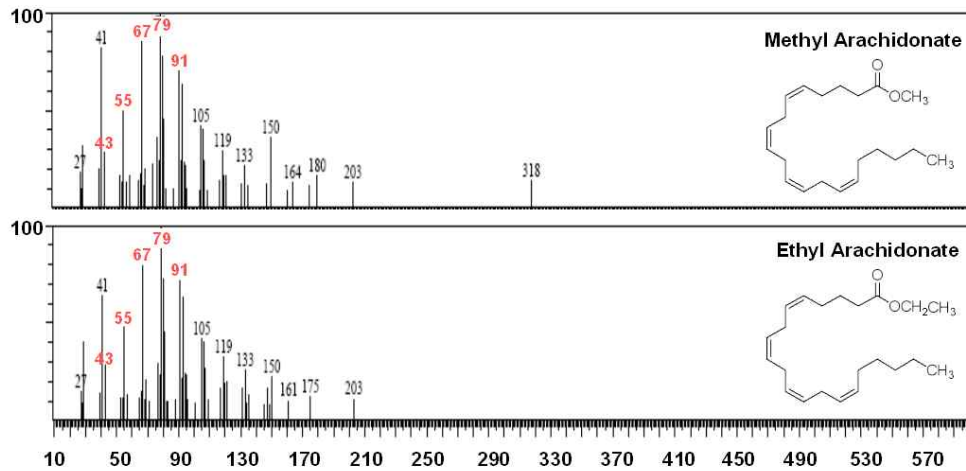


그림 17. 5-FU를 주축으로 하는 화학항암요법에 대해 서로 다른 반응성을 보이는 환자의 혈청에 대한 SIMS 질량 스펙트럼과 GC-MS를 통해 동정되어진 혈청 내의 대사체 중 methyl arachidonate, ethyl arachidonate 의 GC-MS 질량 분석 양상

- 5-FU를 주축으로 하는 화학항암요법에 대해 서로 다른 반응성을 보이는 환자의 혈청에 대한 SIMS 질량 스펙트럼을 비교한 결과 항암제 반응성에 따른 특정 질량값의 intensity 변화가 관찰됨 (그림 17 A).
- GC-MS를 통해 동정되어진 혈청 내의 대사체 중 (표 6) methyl arachidonate, ethyl arachidonate의 GC-MS 질량분석값과 SIMS 분석을 통해 얻어진 각각의 질량분석값 간의 일치가 관찰됨 (그림 17 B)

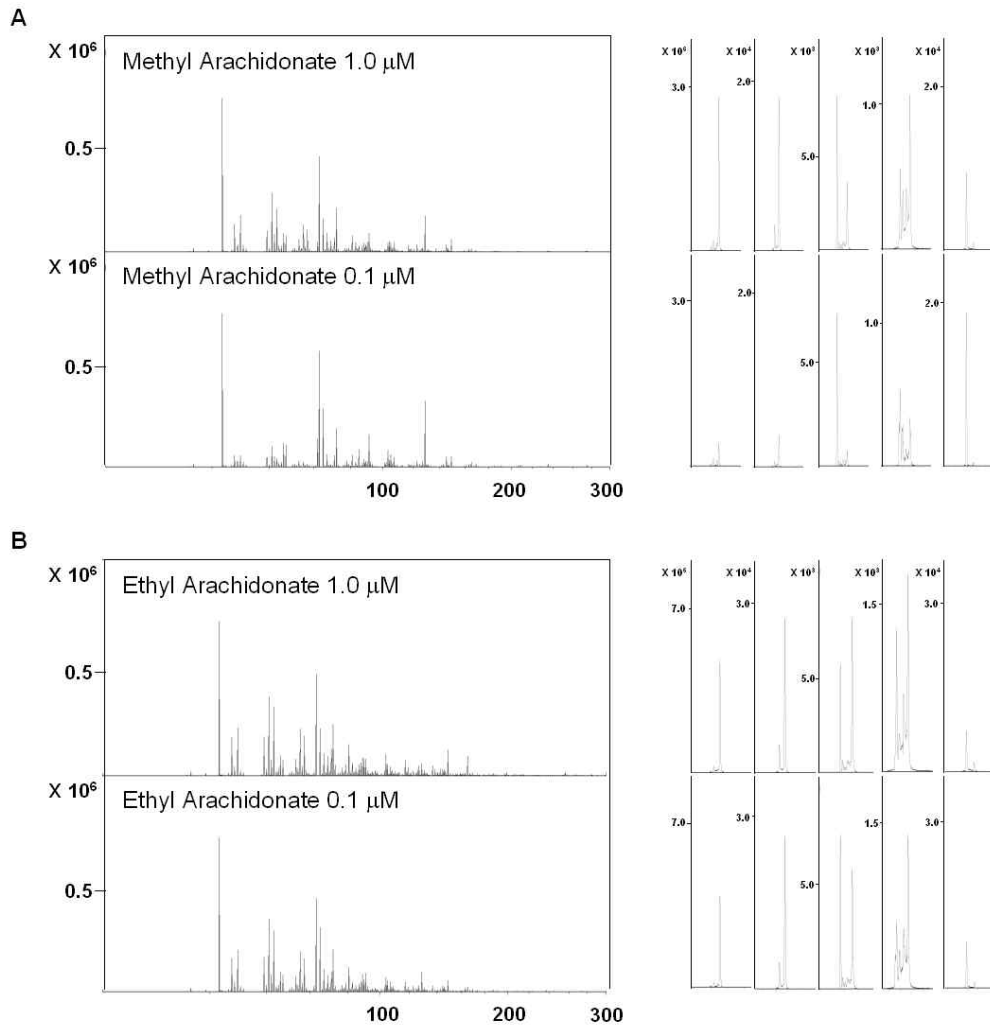


그림 18. Methyl arachidonate와 ethyl arachidonate의 농도에 따른 SIMS 질량분석 결과

- SIMS 분석결과와 GC-MS 분석결과와의 일치를 확인하기 위해 서로 다른 두 농도의 methyl arachidonate, ethyl arachidonate를 슬라이드 위에서 건조한 후 SIMS 로 분석하였음. 이때 두 대사체 모두 농도가 증가함에 따라 그림 17 A에서 확인되었던 질량 peak의 intensity가 증가함을 확인할 수 있었음 (그림 18).
- 현재는 5-FU를 주축으로 하는 화학항암요법에 대해 서로 다른 반응성을 보이는 16명의 대장암 환자의 혈청내에 존재한 arachidonate의 양을 COX enzyme activity 측정을 통해 간접적으로 정량하고 있으며, 이와 동시에 arachidonate에 상대적인 methyl arachidonate, ethyl arachidonate의 COX substrate activity를 측정하고 있음.

## ☿ 6. GC-MS Analysis of Serum from Colorectal Cancer Patient

| Molecular Weight | CAS No.    | Name of Chemical Compound Identified   |
|------------------|------------|--|
| 216              | 0-0-0      | TRICYCLO[8.6.0.0(2,9)]HEXADECA-3,15-DIENE,TRANS-2,9-TRANSOID-9,10-TRANS-1,10         |
| 220              | 61177-15-9 | Cyclobuta[1,2:3,4]dicyclooctene  |
| 222              | 17151-9-6  | 1,2-Bis(trimethylsilyl)benzene   |
|                  | 1873-88-7  | 1,1,1,3,5,5,5-Heptamethyltrisiloxane   |
|                  | 13183-70-5 | Silane, 1,4-phenylenebis(trimethyl- (CAS) 1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene             |
|                  | 0-0-0      | BENZENE  |
| 224              | 4674-22-0  | Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl-4,6-dinitro- (CAS) Dinitroisodurene                     |
| 227              | 638-58-4   | Tetradecanamide  |
|                  | 0-0-0      | N-TETRADECANOIC ACID AMIDE   |
| 236              | 52-31-3    | 2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione, 5-(1-cyclohexen-1-yl)-5-ethyl- (CAS) Cyclobarbital |
| 242              | 124-10-7   | Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl myristate                              |
|                  | 0-0-0      | ADAMANTANE-1-(3,3-DICHLOROPROPYN-1-YL)   |
| 243              | 74421-44-6 | 1H-Purin-6-amine   |
| 252              | 123-69-3   | Oxacycloheptadec-8-en-2-one (CAS) Ambrettolide                                       |
| 255              | 629-54-9   | Hexadecanamide (CAS) Amide 16  |
| 263              | 0-0-0      | UNDECANSAEUREAMID  |
| 264              | 17364-31-7 | 4,7,10-Hexadecatrienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL 4,7,10-HEXADECATRIENOATE     |
| 266              | 1577-52-2  | 9,12-Octadecadien-1-ol (CAS) OCTADEC-9,12-DIEN-1-OL                                  |
|                  | 2462-80-8  | 9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL-9,12-HEXADECADIENOATE           |
| 266              | 1577-52-2  | 9,12-Octadecadien-1-ol (CAS) OCTADEC-9,12-DIEN-1-OL                                  |
|                  | 2462-80-8  | 9,12-Hexadecadienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL-9,12-HEXADECADIENOATE           |
| 268              | 1120-25-8  | 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl palmitoleate                    |
|                  | 56875-67-3 | 7-Hexadecenoic acid  |
| 270              | 112-39-0   | Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl palmitate                               |
|                  | 5129-60-2  | Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester   |
| 272              | 0-0-0      | BICYCLO[10.8.0]EICOSA-1(12),14,18-TRIEN  |
| 278              | 22117-8-4  | 5,8,11-Heptadecatrienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL HEPTADEC-5,8,11-TRIENOATE   |

| Molecular Weight | CAS No.    | Name of Chemical Compound Identified   |
|------------------|------------|--|
| 281              | 301-2-0    | 9-Octadecenamamide, (Z)- (CAS) OLEOAMIDE   |
| 282              | 30262-98-7 | 1,3-Diphenyl-3-trimethylsilyl-1-propanone  |
| 283              | 124-26-5   | Octadecanamide (CAS) Stearamide  |
| 284              | 1731-92-6  | Heptadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl heptadecanoate                     |
|                  | 6929-4-0   | Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester (CAS) METHYL-15-METHYL HEXADECANOATE |
| 290              | 18202-24-9 | 10,13-Octadecadiynoic acid, methyl ester (CAS) METHYL 10,13 OCTADECADIYNOATE     |
| 294              | 2462-85-3  | OCTADEC-9,12-DIENOIC ACID METHYL ESTER   |
|                  | 112-63-0   | 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS) Methyl linoleate            |
|                  | 2566-97-4  | 9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-                                  |

|     |             |   |
|-----|-------------|---|
|     | 26543-36-2  | 10-Octadecynoic acid, methyl ester (CAS) METHYL-10-OCTADECYNOATE                      |
|     | 56554-62-2  | 10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester  |
|     | 1120-32-7   | 9-Octadecynoic acid, methyl ester (CAS) METHYL OCTADEC-9-YNOATE                       |
|     | 56599-58-7  | 8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester (CAS) METHYL<br>8,11-OCTADECADIENOATE         |
|     | 119043-14-0 | 1-bromo-3-(epoxymethylene)-4-[[t-butyl]dimethylsilyloxy]butane                        |
| 296 | 112-62-9    | 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS) Methyl oleate                            |
|     | 57396-98-2  | 7-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) METHYL OCTADEC-7-ENOATE                       |
|     | 2345-29-1   | 8-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) METHYL OCTADEC-8-ENOATE                       |
|     | 2777-58-4   | 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl petroselinate                    |
|     | 52355-31-4  | 6-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) Methyl 6-octadecenoate                        |
|     | 2462-84-2   | 9-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) METHYL OCTADEC-9-ENOATE                       |
| 297 | 58185-32-3  | NONADECANAMIDE  |
| 298 | 112-61-8    | Octadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl stearate                                 |
|     | 5129-61-3   | Heptadecanoic acid, 16-methyl-, methyl ester (CAS) Methyl isostearate                 |
| 301 | 7236-36-4   | Erythrinan-16-ol, 1,6-didehydro-3,15-dimethoxy-, (3.beta.)- (CAS)<br>Dihydroerysodine |
| 308 | 544-35-4    | Ethyl linoleate   |
| 312 | 0-0-0       | 3,3-DIMETHYL-4-METHYLENE-1,2-BIS(TRIMETHYLSILYLOXYMETHYL)-CY<br>CLOPENTENE            |
| 318 | 2566-89-4   | Methyl arachidonate   |
| 319 | 0-0-0       | PENTADECANSAEUREAMID, 15-BROMO-   |

| Molecular Weight | CAS No.    | Name of Chemical Compound Identified  |
|------------------|------------|---|
| 322              | 2463-2-7   | 11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester (CAS)<br>METHYL-11,14-EICOSADIENOATE   |
| 324              | 98540-95-5 | 10-hydroxy-10-acetylanthrone trimethylsilyl ether   |
| 332              | 1808-26-0  | 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, ethyl ester, (all-Z)- (CAS) Ethyl<br>arachidonate  |
| 342              | 0-0-0      | PENTAMETHYLCYCLOPENTADIENYL-(N,N,N'-TRIMETHYL)-O-PHENYLEN<br>DIAMINE-N'-O-NICKEL  |
| 344              | 6068-80-0  | QUERCETIN 7,3',4'-TRIMETHOXY  |
| 348              | 25536-74-7 | Benz[e]azulene-3,8-dione,<br>5-[(acetyloxy)methyl]-3a,4,6a,7,9,10,10a,10b-octahydro-3a,10a-dihydroxy-2,10<br>-dimethyl-, (3 |
|                  | 3618-20-0  | Benzoic acid, 2,5-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester (CAS) GENTISIC<br>ACID-TRITMS                               |
| 370              | 3782-85-2  | 2,6-DIHYDROXYBENZOIC ACID 3TMS  |
|                  | 3618-20-0  | Benzoic acid, 2,5-bis(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester (CAS) GENTISIC<br>ACID-TRITMS                               |
| 374              | 566-78-9   | Pregn-5-en-20-one, 21-(acetyloxy)-3-hydroxy-, (3.beta.)-  |
|                  | 55282-68-3 | 1,1':3',1"-Tercyclopentane, 2'-dodecyl- (CAS)<br>1,3-DICYCLOPENTYL-2-DODECYLCYCLOPENTANE                                    |
|                  | 61103-5-7  | Androst-4-ene-3,17-dione  |
| 386              | 57-88-5    | Cholest-5-en-3-ol (3.beta.)- (CAS) Lanol  |
|                  | 0-0-0      | 17-(1,5-DIMETHYL-HEXYL)-10,13-DIMETHYL-2,3,4,5,8,9,10,11,12,13,14,15,1<br>6,17-TETRA  |
|                  | 20780-35-2 | Cholest-14-en-3-ol, (3.beta.,5.alpha.)-   |



|     |            |   |
|-----|------------|---|
|     | 22033-82-5 | Cholestan-6-one   |
| 398 | 17608-76-3 | Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)- (CAS) 5,6-Dihydroergosterol  |
| 401 | 57397-3-2  | Androsta-1,4-dien-3-one   |
| 404 | 0-0-0      | Methyl ester of<br>(1Z,2S,3E,7E,11Z,13R)-13-Acetoxy-2,16-epoxy-16-oxocembra-1(15),3,7,11,16-tetraen-20-oic acid |
| 414 | 83-47-6    | Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) Clionasterol   |
| 415 | 54548-14-0 | Cholestan-2-amine   |
|     | 55331-90-3 | Cholestan-2-amine, N,N-dimethyl- (CAS)<br>2.ALPHA.-DIMETHYLAMINOCHOLESTANE                                      |
| 416 | 0-0-0      | ACETIC ACID<br>17-ACETOXY-4,4,10,13-TETRAMETHYL-7-OXO-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15                             |

| Molecular Weight | CAS No.     | Name of Chemical Compound Identified  |
|------------------|-------------|---|
| 418              | 10588-87-1  | Hexadecanoic acid   |
| 430              | 0-0-0       | 3,17-bis(trimethylsilyloxy)-5.alpha.-androsta-1,3,16-triene   |
|                  | 59-2-9      | Vitamin E   |
|                  | 4707-85-1   | CHOLEST-4-ENE, 3.BETA.-(METHOXYMETHOXY)-  |
|                  | 54498-52-1  | Cholestan-7-one   |
|                  | 75023-18-6  | A-Norcholestane-3-carboxylic acid, 2-oxo-, methyl ester   |
|                  | 80955-71-1  | 4-[p-pentyl-p-(p-propylcyclohexyl)]cyclohexyl-1,1'-biphenyl   |
|                  | 71724-73-7  | 2,2'-Oxy bis(3-phenyl-1-2H-benzopyran)  |
| 438              | 109007-87-6 | Iron, monocarbonyl-(1,3-butadiene-1,4-dicarbonyl acid, diethyl ester) a,a'-dipyridyl                          |
| 440              | 511-61-5    | 9,19-Cyclolanost-25-en-3-ol, 24-methyl-, (3.beta.,24S)- (CAS) Cyclolaudenol                                   |
|                  | 1449-9-8    | 9,19-Cyclolanostan-3-ol, 24-methylene-, (3.beta.)- (CAS)<br>24-Methylenecycloartanol                          |
| 445              | 56196-76-0  | Phosphonic acid, [1-(acetylamino)-2-[4-(acetyloxy)phenyl]ethyl]-, bis(trimethylsilyl) ester                   |
| 446              | 41721-93-1  | CHOLESTANE-3,5-DIOL, 5-ACETATE  |
|                  | 57156-79-3  | Cholestane, 3-(2-methoxyethoxy)-, (3.beta.,5.alpha.)- (CAS)<br>3.beta.-(1'-Methoxyethoxy)-5.alpha.-cholestane |
| 458              | 56114-62-6  | Silane  |
| 467              | 0-0-0       | ACETIC ACID<br>10,13-DIMETHYL-17-(1-METHYL-4-OXO-4-[1,2,4]TRIAZOL-1-YL-BUTYL)-2,3,4                           |
| 472              | 7695-91-2   | ALPHA-TOCOPHEROL-ACETAT (VITAMIN E ACETAT)  |
|                  | 37148-65-5  | Benzeneacetic acid, .alpha.,3,4-tris[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester                              |
| 474              | 69833-71-2  | Pregn-4-ene-3,20-dione  |
| 475              | 0-0-0       | 3-HYDROXYBROMAZEPAM 2TMS PK   |
| 476              | 22393-97-1  | 9-Hexadecenoic acid, 9-hexadecenyl ester, (Z,Z)- (CAS)<br>9-CIS-HEXADECENYL-9-CIS-HEXADECENOATE               |
|                  | 0-0-0       | 25,26,27-TRISNOR-3.BETA.-ACETOXY-24-CHLORO-4,4,14.ALPHA.-TRIMETHYL-9,19-CYCLO-5.ALPHA.                        |
| 477              | 0-0-0       | 5-(4'-Acetamidobutyl)-1-acetyl-1,5-diazabicyclo[15.4.0]hencosane-6,15-dione                                   |
| 478              | 5211-17-6   | Cholestan-3-ol, methyl carbonodithioate   |

| Molecular Weight | CAS No. | Name of Chemical Compound Identified |
|------------------|---------|--------------------------------------|
|------------------|---------|--------------------------------------|

|     |             |   |
|-----|-------------|---|
|     | 0-0-0       | 3,10-DIHYDROXYDODECANOIC 4TMS   |
| 521 | 56211-33-7  | Pregnane-11,20-dione  |
| 522 | 129456-83-3 | 12-chloromercuriototara-8,11,13-trien-13-ol   |
| 525 | 0-0-0       | 26-ACETAMIDO-3-ACETOXY-16-ETHYLFUROSTA-5,20-DIENE   |
| 527 | 54623-29-9  | Adenosine   |
| 532 | 109629-49-4 | (5e/z,7e/z,11e/z)-8-[(tert-butyl)dimethylsilyl]-10-[(tert-butyl)dimethylsilyloxy]-2,6,12,16-tetramethyl-9-oxaheptadeca-2, |
|     | 541-1-5     | Heptasiloxane, hexadecamethyl- (CAS) Hexadecamethylheptasiloxane  |
| 537 | 56247-57-5  | ETHYLIDENEPHTHIDIOLONE A  |
| 538 | 119110-38-2 | PROPANEDIAMIDE  |
| 541 | 54623-30-2  | Adenosine   |
| 546 | 69822-60-2  | Muco-inositol tri-N-octaneboronate  |
|     | 69814-45-5  | Myo-inositol tri-N-octaneboronate   |
| 548 | 4410-33-7   | BENZENEACETAMIDE  |
| 549 | 55622-38-3  | Benzenepropanamide,<br>N-[4-[acetyl-1-propenylamino]butyl]-4-methoxy-N-[3-[[3-(4-methoxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]         |
| 551 | 32352-57-1  | Adenosine   |
| 554 | 22261-14-9  | Molybdenum  |
| 556 | 0-0-0       | TETRATRIACONTAN   |
| 560 | 130932-15-9 | (1'RS,2'RS)-3-[(t-butyl)dimethylsilyl]-1-[(t-butyl)dimethylsilyloxy]-10-methyl-6-methylidene-1-[2'-methyl-2'-(4"-meth     |
| 562 | 0-0-0       | (-) O-Acetyl-N-benzoyl Buxidienine  |
|     | 72439-79-3  | 3-Ethoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane  |
| 564 | 15093-99-9  | 5.beta.-Cholan-24-oic acid, 3-oxo-7.alpha.,12.alpha.-bis(trimethylsiloxy)-, methyl ester                                  |
|     | 0-0-0       | (+)-Semperviraminol   |
| 565 | 0-0-0       | cyano 2-(4-methylphenylsulfide)-3,4,6-tri-O-benzyl-beta-D-glucoside   |
| 574 | 56484-75-4  | Benzyl 2'-O-methylphysodate   |
| 576 | 118227-59-1 | (2R,4S,5S,6S,8R)-5-[(tert-Butyldimethylsilyloxy]-4,6-dimethoxy-8-(1,3-dithian-2-yl)-1-iodo-2-methylnonane                 |
|     | 71579-69-6  | 3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane  |
|     | 17909-39-6  | Bis(heptamethylcyclotetrasiloxyl)siloxane   |

| Molecular Weight | CAS No.    | Name of Chemical Compound Identified   |
|------------------|------------|--|
| 582              | 81827-2-3  | ent-1.alpha.,13-Diacetoxy-10-hydroxy-3.beta.-thiobenzoyloxy-20-norgibberell-16-ene-7,19-dioic acid 7-methyl ester 19       |
| 584              | 0-0-0      | methyl 11,12,19-tri(triperdeuteriomethylsiloxy)eicosan-5(Z),8(Z),14(Z)-trienoate   |
| 586              | 0-0-0      | 2-TERT-BUTYL-4,6-BIS(3,5-DI-TERT-BUTYL-4-HYDROXYBENZYL)PHENOL  |
|                  | 0-0-0      | tert-butyl<br>3d(3,5/4)-3,4,5-o-triethylsilyl-3,4,5-trihydroxy-6-oxocyclohex-1-enecarboxylate                              |
| 592              | 556-68-3   | HEXADECAMETHYLCYCLOOCTASILOXANE  |
|                  | 30384-40-8 | 7H-9,11B-EPOXY-5A,13A-PROPANOPHENANTHRO[2,1-F][1,4]OXAZEPIN-3(4H)-ONE, 12-(ACETY   |
| 595              | 32206-68-1 | Pregnan-20-one, 3,11,21-tris[(trimethylsilyloxy]-, O-methyl oxime, (3.alpha.,5.beta.,11.beta.)-                            |
| 597              | 0-0-0      | [(3S,4S,(1'R))-3-[1-(tert-Butyldimethylsilyloxy)ethyl]-1-[(phenylselenenyl)(tert-butylloxycarbonyl)methyl]-4-[(vinyl)dimet |
|                  | 0-0-0      | 2-METHOXY-4-[2,2,3,3,3-PENTAFLUORO-1,1-BIS(TRIFLUOROMETHYL)PR  |

|     |             |  |
|-----|-------------|--|
|     |             | OPYL]-6-   |
| 598 | 14917-72-7  | BETA.-D-ALLOPYRANOSIDE   |
|     | 54142-23-3  | 15-METHYL PGF2A ME ESTER 3TMS  |
| 604 | 104370-25-4 | MILBEMYCIN B   |
| 605 | 55320-13-3  | Tetracosane, 12-decyl-12-nonyl- (CAS)<br>12-N-NONYL-12-N-DECYLTETRACOSANE  |
| 607 | 57325-73-2  | 3-Methyloxime, tris(trimethylsilyl) derivative<br>of 17.alpha.,20.beta.,21-Trihydroxy-4-pregnene-3,11-dione        |
|     | 57325-72-1  | Pregn-4-ene-3  |
| 610 | 0-0-0       | 4-HYDROXYANTIPYRINEGLUCURONIC METHYLESTER (TMS<br>DERIVATIVE)  |
| 629 | 59403-25-7  | 6-OXO-PGF1A MOX ME 3TMS  |
| 638 | 131226-66-9 | (+)-(2S,4'R,6'R)-1-(10-tert-Butyl-dimethylsilyloxy-1-trimethylsilyloxy-4,6-diphenyl-5-decyldeneamino)-2-methoxymet |
|     | 32221-73-1  | Silane   |
| 658 | 34141-0-9   | .ALPHA.-D-GALACTOPYRANOSYL-(1 TO<br>6)-.ALPHA.-D-GLUCOPYRANOSYL(1 TO 2)-.BETA.-D-FRUCTOFU                          |

| Molecular Weight | CAS No.     | Name of Chemical Compound Identified   |
|------------------|-------------|--|
| 662              | 77369-55-2  | Bis(heptafluorobutyl)-N(eps)-cyclohexyllysine propyl ester   |
| 666              | 556-71-8    | OCTADECAMETHYLCYCLONONASILOXANE  |
| 565              | 0-0-0       | cyano 2-(4-methylphenylsulfide)-3,4,6-tri-O-benzyl-b-C-glucoside   |
| 574              | 56484-75-4  | Benzyl 2'-O-methylphysodate  |
| 576              | 118227-59-1 | (2R,4S,5S,6S,8R)-5-[(tert-Butyldimethylsilyloxy)-4,6-dimethoxy-8-(1,3-dithian-2-yl)-1-iodo-2-methylnonane              |
|                  | 71579-69-6  | 3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane   |
|                  | 17909-39-6  | Bis(heptamethylcyclotetrasiloxyl)siloxane  |
| 682              | 56772-21-5  | L-Phenylalanine,<br>N-[N-[N2,N5-bis(trifluoroacetyl)-L-ornithyl]-O-(trifluoroacetyl)-D-allothreonyl]-,<br>methyl ester |
| 695              | 57326-16-6  | GLYCOCHOLIC ACID METHYL ESTER TMS  |
| 703              | 55256-9-2   | Triacontane, 11,20-didecyl- (CAS) 11,20-Di-n-decyltriacontane  |
|                  | 55256-7-0   | Tetratriacontane, 17-hexadecyl- (CAS) 17-n-Hexadecyltetratriacontane   |
| 724              | 56053-1-1   | Ergostane-5,25-diol, 3,6,12-tris[(trimethylsilyloxy)-, 25-acetate,   |
| 728              | 57326-11-1  | Silane   |
| 740              | 18772-36-6  | EICOSAMETHYLCYCLODECASILOXANE  |
| 800              | 71449-67-7  | Bis(heptamethylcyclotetrasiloxyl)hexamethyltrisiloxane   |
| 805              | 71641-45-7  | D-Glucose, O-(phenylmethyl)oxime, 2,3,4,5,6-pentabenzoate (CAS)  |
| 806              | 21238-34-6  | Iditol, hexabenzoate,  |
| 811              | 0-0-0       | 2-{2-(4-TERT-BUTYL-BENZYL)-3-(4-TERT-BUTYL-PHENYL)-2-[(DICYCLOHEXYLCARBAMOYL)-ME                                       |
| 850              | 0-0-0       | D-GLUCOSE-N-PERBENZOYL O-BENZYLOXIME   |
| 888              | 18919-94-3  | TETRACOSAMETHYLCYCLODODECASILOXANE   |
| 980              | 0-0-0       | [HAPTO-5-(1,3-DI-TERT.BUTYLCYCLOPENTADIENYL RHODIUM)-TRIS(PEN<br>TACARBONYL CHROMIUM)]                                 |
| 1215             | 0-0-0       | nickel (II)-bis[2-(heptafluorobutanoyl)-(+)]cholest-4-en-2-onate]  |
| 9999             | 0-0-0       | Silicone grease  |
|                  | 0-0-0       | SILIKONFETT SE30 (GREVELS)   |

## 6) Up-regulated HSP27 in Human Breast Cancer Cell Line SK-BR-3 with Herceptin Resistance

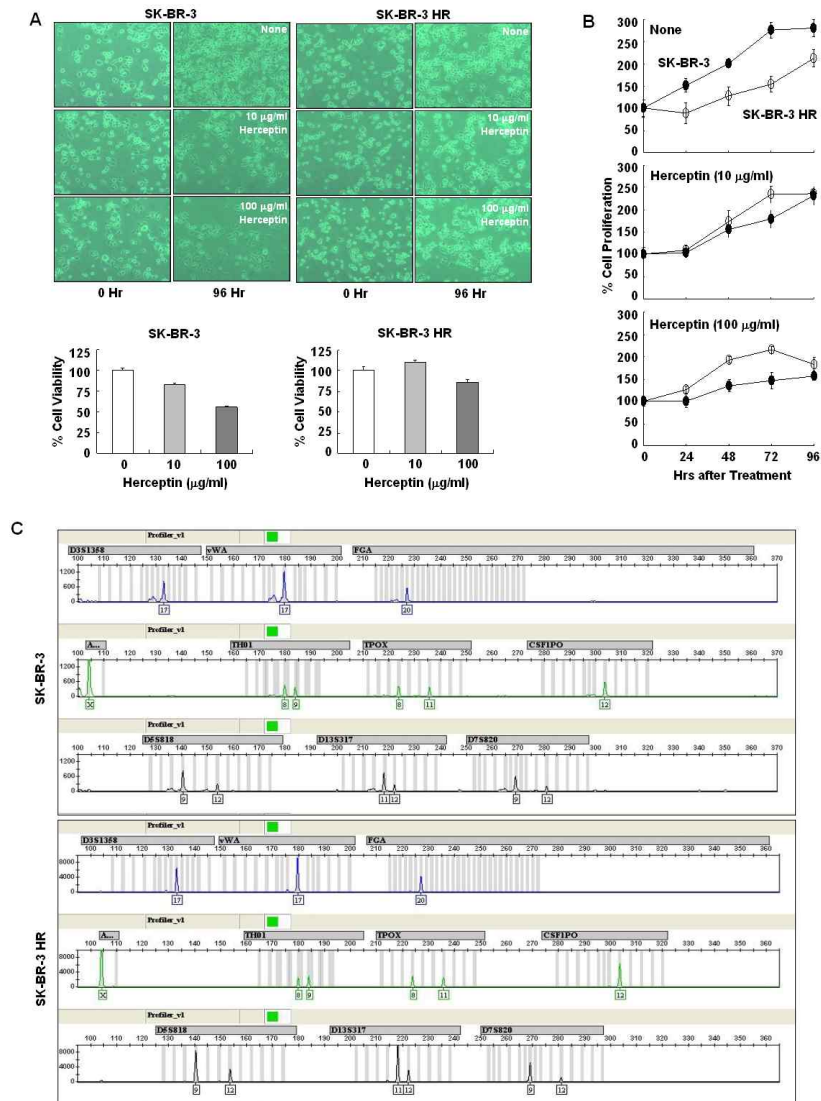
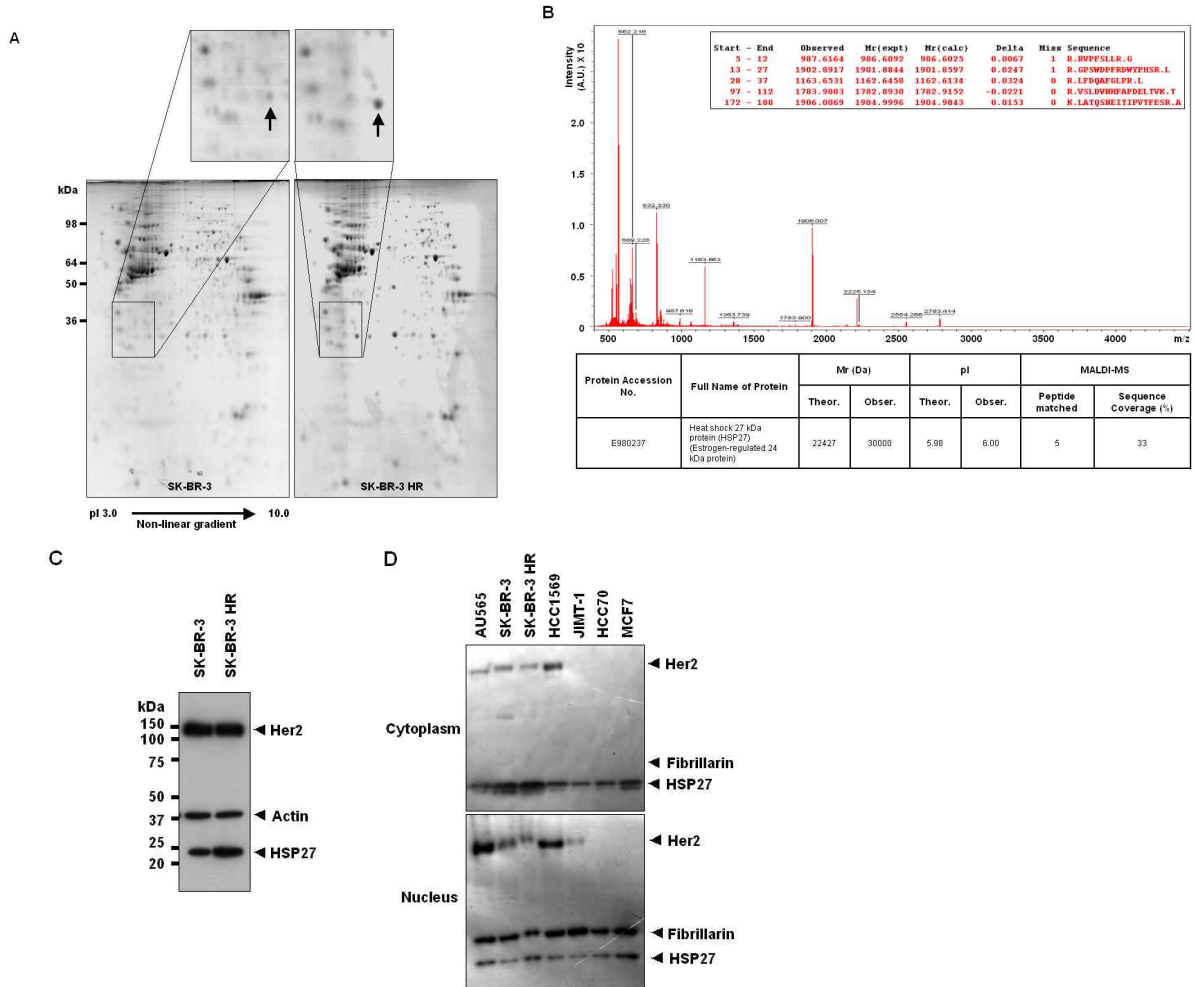


그림 19. Herceptin 내성이 유도된 유방암세포주 SK-BR-3의 확립

- 대장암세포주내의 5-FU 내성관련 단백질의 동정 및 연구와 더불어 다른 고형암에서의 항암제 내성 모델에 대한 연구가 병행되었음. 유방암세포주의 항암화학제가 아닌 humanized monoclonal antibody인 Herceptin에 대한 내성 연구를 모델로 선택하였음.
- 대장암세포주를 통한 in vitro 연구모델과 같이 일차적으로 Her2 발현이 높고 Herceptin에 감수

성이 높은 SK-BR-3로부터 새로운 Herceptin 내성 세포주를 확립하였음 (그림 19). 새로운 Herceptin 내성 세포주는 Herceptin이 존재하는 상태에서도 그 내성이 유지되었으며 (그림 19 A, B) 모세포주와는 유전적으로 동일한 세포주임이 입증됨 (그림 19 C)



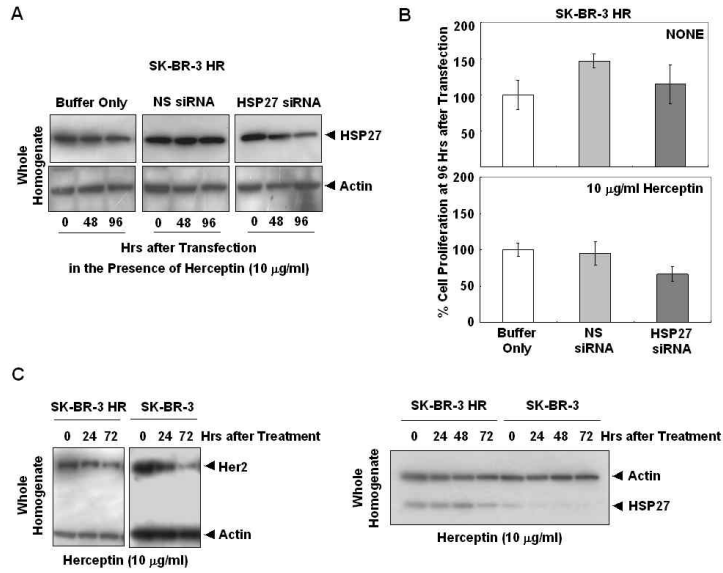


그림 21. Herceptin 내성 세포주 SK-BR-3에서 발현되고 있는 HSP27의 인위적 발현 감소를 통한 Herceptin 감수성의 증가 및 Herceptin 처리에 의한 세포내 Her2와 HSP27 단백질 발현의 감소

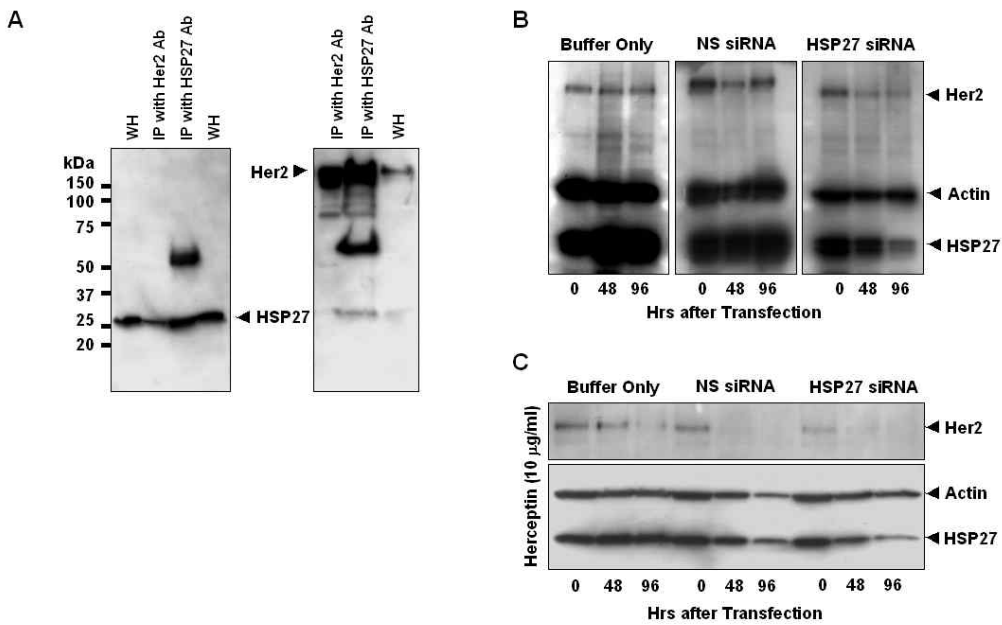


그림 22. HSP27과 Her2 단백질의 interaction 및 HSP27의 인위적 발현 억제와 동반된 Her2 단백질의 동반 감소

- 흥미롭게도 HSP27 단백질은 Her2와 interaction 하고 있는 것이 입증되었으며 (그림 22 A), 인위적인 HSP27 단백질 발현의 감소는 Her2 단백질의 감소를 동반함을 확인함 (그림 22 B, C)

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

항암제에 대한 반응성의 예측은 효율이 떨어지는 항암치료를 받는 기간 동안 발생할 수 있는 여러 부작용들을 줄임으로써 환자치료의 효율을 높이고, 환자의 경제적인 부담까지도 동시에 낮출 수 있음. 이러한 이유로 항암제 반응성 예측에 대한 연구는 국내뿐 아니라 국외의 많은 연구자들에 의해 진행되어져 왔으나, 현재까지 임상에서 사용되어지고 있는 항암제 반응성의 예측인자는 존재하지 않음. 다만 receptor로부터 시작되는 signal을 차단함으로써 항암 효과를 보이는 몇몇 항암제의 경우, 환자의 암 조직이 그 receptor를 발현하는가, 발현한다면 얼마나 발현을 하는가가 항암제 반응성의 주요 인자로 인식되고 있으나 이를 제외한 경우에는 안타깝게도 확실한 임상적 항암제 예측인자가 존재하지 않는다고 해도 과언이 아님.

새로이 개발되어진 차세대 항암제들이 치료의 전면에 대두되면서 진행성 대장암의 항암치료에 있어 5-FU의 중요성이 많이 감소하고 있으며 5-FU의 반응성 예측에 대한 연구방향은 새로운 세대의 항암제에 대한 반응성 예측으로 초점이 이동되어가고 있는 현실임. 그러나 5-FU는 아직까지도 진행성 대장암의 combinational chemotherapy의 중요 구성 약제로서 자리매김을 하고 있으며, 실제로 5-FU 내성과 관련된 단백질들이 다른 다양한 약제의 내성과도 연결되는 특징을 보이기에 5-FU 반응성, 내성의 연구는 아직도 중요한 기초, 임상적 과제로 남아있음.

5-FU 내성 관련 단백질로서 많은 단백질들이 동정되어졌으나, 각각의 단백질들을 개별적으로 기능연구에 들어가거나 병리 임상적 적용을 하기에는 여러 물적 인적 시간적 제한이 존재하였음. 따라서 가장 높은 연구 가치를 가지고 있다고 판단된 한 개의 내성 후보 단백질인 galectin-3를 중심으로 심화된 연구를 진행하였음. 심화된 연구를 통하여 기존에 다른 연구자들에 의해 발표되어진 단백질의 세포내에 존재하고 있는 위치 또는 인산화에 따른 내성 유도 기작이 대장암 세포주에서는 적용되고 있지 않음을 확인하였고, 이 단백질이 다른 단백질들(hnRNPQ, ATP synthase 등)과의 상호작용을 통해 단백질의 stability를 조절함은 물론 이를 통해 항암제의 내성을 유발시킬 수 있다는 새로운 근거를 확립함.

기존의 항암제 내성을 세포주에서 연구하기 위한 기반으로 내성 세포주의 유도와 확립이 반드시 필요하였음. 이를 통하여 내성 세포주의 확립에 대한 지식과 노하우를 축적함으로써 5-FU가 아닌 다른 항암제 Herceptin에 대한 내성 유방암 세포주의 유도가 가능하였으며, 5-FU 내성 관련 단백질체 screening 에 이용되었던 단백질체 기술을 이용하여 쉽게 Herceptin 내성 관련 단백질에도 성공을 하였음. 이는 기존에 축적된 5-FU 내성 세포주의 확립, 5-FU 내성 관련 단백질의 확보 기술을 다른 다양한 항암제 및 다양한 암세포주로 확대 응용할 수 있다는 근거를 제시함.

전체 단백질체에 대한 연구에서 분비 단백질체에 대한 연구로의 전환을 통해 항암제 내성을 가진 암세포에서 분비되어 나오는 항암제 내성관련 단백질들을 임상적 대장암 환자의 혈액 내에서 검출할 수 있는 시스템을 확립함. 더불어 본 연구에 적용된 iCPL과 LC-MALDI-MS/MS를 이용한 분비 단백질의 대용량 분석 방법은 그 효율이 매우 우수함을 검증함.

새로운 연구 방법(SIMS)의 도입은 항암제 내성 관련 단백질뿐만이 아니라 다양한 정보를 가지고 있는 대사체 분석을 가능케 하였음. SIMS와 GC-MS, MALDI-MS를 이용한 저분자량 대사체 연구는 앞으로 새로운 바이오 마커의 개발에 매우 유리한 기술적 접목이 될 것으로 판단됨.

#### 4. 연구성과 및 목표달성도

##### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재

| 논문명  | 저자<br>(저자구분) | 저널명(I.F.)                        | Vol(No)Page       | 구분         | 과제<br>관련성 |
|--|--------------|----------------------------------|-------------------|------------|-----------|
| Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance  | 제1           | Cancer Res. (7.656)              | 65(8):3<br>162-70 | 국외<br>SCI  | 상         |
| Metabotropic glutamate receptor 4 expression in colorectal carcinoma and its prognostic significance   | 제1           | Clin Cancer Res. (6.177)         | 11(9):3<br>288-95 | 국외<br>SCI  | 상         |
| Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma  | 공동           | Hum Pathol. (2.810)              | 36(4):3<br>64-71  | 국외<br>SCI  | 상         |
| Familial gastric cancers with Li-Fraumeni Syndrome: a case repast  | 공동           | World J Gastro enterol.          | 11(26):<br>4124-6 | 국외<br>SCIE | 중         |
| Mutation spectrum of the APC gene in 83 Korean FAP families  | 공동           | Hum Mutat.( 6.743)               | 26(3):2<br>81.    | 국외<br>SCI  | 중         |
| 5-(4-chlorophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-3-trifluoromethylpyrazole acts in a reactive oxygen species-dependent manner to suppress human lung cancer growth       | 공동           | J Cancer Res Clin Oncol. (2.469) | 132(4):<br>223-33 | 국외<br>SCI  | 중         |
| Regulation of MDK expression in human cancer cells modulates sensitivities to various anticancer drugs: MDK overexpression confers to a multi-drug resistance. | 공동           | Cancer Lett. (3.277)             | 247(1):<br>40-7.  | 국외<br>SCI  | 상         |
| Clinical significance of metabotropic glutamate receptor 5   | 공동           | Oncol Rep.                       | 17(1):8<br>1-7.   | 국외<br>SCI  | 중         |



|   |    |                            |                   |        |   |
|---|----|----------------------------|-------------------|--------|---|
| expression in oral squamous cell carcinoma  |    | (1.567)                    |                   |        |   |
| Identification of mitochondrial FoF1-ATP synthase involved in liver metastasis of colorectal cancer | 공동 | Cancer Sci . (3.869)       | 98(8):1<br>184-91 | 국외 SCI | 중 |
| Significance of PML and p53 Protein as Molecular Prognostic Markers of Gallbladder Carcinomas       | 공동 | Pathol Oncol Res . (1.241) | 13(4):3<br>26-35. | 국외 SCI | 중 |

※저자구분 : 교신, 제1, 공동

※구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

※과제관련성 : 상(Acknowledgement 가 있는 경우), 중, 하

나. 국내 및 국제 전문학술지 논문 신청

| 논문명   | 저자<br>(저자구분) | 저널명(I.F.)                                      | Vol(No)Page  | 구분        | 과제<br>관련성 |
|---|--------------|--|--|-----------|-----------|
| Up-regulated HSP27 in Human Breast Cancer Cell Line SK-BR-3 with Herceptin Resistance                 | 교신           | Cancer Lett . (3.277)                          | u n d e r<br>r e v i e w                           | 국외<br>SCI | 상         |
| Evaluation of Calgranulin B in Stools from the Patients with Colorectal Cancer                        | 제1           | D i s .<br>C o l o n<br>R e c t u m<br>(2.442) | u n d e r<br>r e v i e w                           | 국외<br>SCI | 중         |
| Interactions between Galectin-3 with Mitochondrial F1F0-ATP Synthase                                  | 제1           | Cancer Res . (7.656)                           | t o b e<br>s u b m i t t e d<br>i n a<br>m o n t h | 국외<br>SCI | 상         |
| Down-regulated Galectin-3 in Human Colon Cancer Cells with Induced 5-Fluorouracil Resistance          | 제1           | Cancer Res . (7.656)                           | t o b e<br>s u b m i t t e d<br>i n a<br>m o n t h | 국외<br>SCI | 상         |
| Glycolytic Enzymes Up-regulated in Proteins Secreted from Colorectal Cancer Cells with 5-Fluorouracil | 제1           | C l i n<br>C a n c e r                         | t o b e<br>s u b m i t t e d                       | 국외<br>SCI | 상         |

|  |    |                                 |                                     |           |   |
|--|----|---------------------------------|-------------------------------------|-----------|---|
| Resistanc  |    | R e s .<br>(6.177)              | in a<br>month                       |           |   |
| Analysis of Low Mass Metabolites in Serum using ToF-SIMS and GC-MS for the Prediction for Chemotherapy Response of Colorectal Cancer Patient | 제1 | A n a l .<br>C h e m<br>(5.646) | to be<br>submitted<br>in a<br>month | 국외<br>SCI | 상 |

※저자구분 : 교신, 제1, 공동

※구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

※과제관련성 : 상(Acknowledgement 가 있는 경우), 중, 하

다. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

| 논문명  | 저자        | 학술대회명  | 지역                     | 과제<br>관련성 |
|--|-----------|--|------------------------|-----------|
| Proteome Approaches to Further Understanding of 5-Fluorouracil Resistance in Cancer Chemotherapy                                 | 제1,<br>교신 | 10th Korea-Japan<br>Cancer Research<br>Workshop (2005) | 국외<br>(일본)             | 상         |
| Decreased Proliferation of Human Colon Cancer Cells caused by Galectin-3 Suppression and Its Effect on 5-Fluorouracil Resistance | 제1        | 2006 AACR  | 국외 (미국,<br>워싱턴<br>DC)  | 상         |
| Calgranulin in stools from colorectal cancer patients  | 공동        | 2007 Proteomics<br>Europe                              | 국외<br>(네덜란드,<br>암스테르담) | 중         |

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

| 최종목표  | 연차별목표 | 달성내용  | 달성도(%) |    |  |
|---|-------|---|--------|----|--|
|   |       |   | 연차     | 최종 |  |
| <p>항암제 내성 인체 대장암 세포주를 이용한 프로테옴 연구를 통하여 내성 관련 단백질들을 발굴하고 그 역할을 규명함으로써 새로운 내성 관련 기작의 이해를 확대</p> <p>임상적으로 적용 가능한 항암제 내성 예측인자나 항암보조제 개발의 토대를 마련</p> | 1차년도  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항암제 내성에 큰 차이를 보이는 대장암세포주들간의 프로테옴 분석을 통한 내성 관련 예상 단백질들의 동정</li> </ul>   | 80     | 25 |  |
|   |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Galectin-3 외 다수의 5-FU 내성 관련 후보 단백질 동정</li> </ul>   |        |    |  |
|   |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 연구를 통하여 얻어진 내성 관련 후보 단백질의 발현 조절과 활성 조절이 대장암 세포주의 항암제 내성에 미치는 효과 분석</li> </ul>   |        |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Galectin-3의 발현이 5-FU 내성에 미치는 영향 고찰</li> <li>- Galectin-3와 interaction 하는 ATP synthase와 hnRNP Q 동정 및 상호 연관성 연구 진행</li> </ul> |
|   |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 내성 억제제의 효과적인 임상 적용 고찰</li> </ul>   |        |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Galectin-3의 발현 양상과 대장암환자의 5-FU에 대한 반응성 및 예후에 대한 연관성 연구</li> </ul>   |
|   |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-MALDI system의 활용을 통한 고감도 대용량 프로테옴 분석 방법 토대 마련</li> </ul>  |        |    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-MALDI system 확립</li> </ul>   |
|   |       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5-FU와 더불어 실질적으로 임상에서 combination chemotherapy 로 이용되고 있는 oxaliplatin의 내성에 대한 연구를 점진적으로 확대하며, 5-FU, oxaliplatin, cancer cell type 에 공통적으로 적용될 수 있는 내성 기작의 발견을 목표로</li> </ul> |        |    |  |

|      |   |  |   |    |    |
|------|---|--|---|----|----|
|      |   | 연구의 초점을 맞춤.  |   |    |    |
| 2차년도 | - 새로운 내성 단백질의 동정  | - 동정된 내성관련 단백질의 기능연구   | - 내성 관련 단백질의 발현 조절에 따른 대장암 세포의 내성변화 관찰 및 내성 관련 단백질과 다른 단백질간의 interaction 분석을 통한 내성 관련 단백질의 세포내 내성 관련 역할에 대한 이해 확대 | 80 | 50 |
|      | - 내성관련 단백질의 임상적 고찰  | - 5-FU & oxaliplatin 내성 세포주의 확립  | - 내성 관련 단백질의 발현과 대장암환자의 항암제 반응성 및 예후에 대한 연관성 고찰   |    |    |
|      | - Galectin-3 발현억제에 따른 항암제 반응성 동물실험  | - Galectin-3 발현억제 대장암세포를 이용한 nude mouse 내의 tumor 형성 및 5-FU 투여에 따른 tumor의 변화 관찰 | - 2개 이상의 세포주 확립   |    |    |
|      |   |  |   |    |    |
|      |   |  |   |    |    |
| 3차년도 | - 항암제 내성 인체 대장암 세포주를 이용한 프로테옴 연구를 통하여 내성 관련 단백질들을 발굴하고 이들의 내성관련 역할을 규명함으로써 새로운 내성 관련 기작의 이해를 확대 | - 항암제 내성에 큰 차이를 보이는 대장암 세포주들간의 유전체 및 프로테옴 분석을 통한 내성 관련 단백질 동정                  | - 기존 연구를 통하여 얻어진 내성 관련 후보 단백질의 발현 조절과 활성 조절이 대장암 세포주의 항암제 내성에 미치는 효과 분석   | 90 | 85 |
|      | - 임상적으로 적용이 가능한 항암제 내성 예측 인자나 항암보조제 개발의 토대를 마련  | - 내성 관련 유전자 및 단백질의 임상 적용 고찰  | - LC-MALDI system과 iCPL 방법의 접목을 통한 고감도 대용량 단백질체 분석 방법 토대 마련   |    |    |

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

| 평가의 착안점           | 자 체 평 가   |
|-------------------|---|
| 내성 관련 단백질의 동정     | 다수의 내성 관련 단백질의 동정<br>전체 단백질체 분석과 더불어 분비 단백질 분석이<br>함께 병행 되어짐  |
|                   | 한 개의 내성 세포주에서 동정된 내성 단백질이<br>다른 내성 세포주에서는 발현의 큰 차이를 보이지 않는<br>경우를 확인함 /<br>단일 세포주에서 변화된 내성 관련 단백질이 아닌<br>다수의 내성 세포주에서 공통적 발현 변화를 보이는<br>내성 관련 단백질들을 확보함   |
| 동정된 단백질의 기능연구     | 동정된 단백질 수에 비해 소수의 단백질에 대한<br>기능 연구 수행   |
|                   | 발현 억제를 통한 단백질 기능 연구에 비해<br>인위적 과발현 시스템을 정착시키지 못함<br>내성 관련 단백질과 상호 작용하는 단백질의 추가 분석을<br>통한 내성 관련 기작의 이해를 확대   |
| 임상적 고찰            | 병리학적 고찰을 통해 내성 관련 단백질의 발현과<br>대장암 환자의 항암제 반응성 예측의 상호 연관성 연구<br>5-FU 단일 항암제 처방이 아닌   |
|                   | 5-FU-based combination chemotherapy,<br>또는 5-FU/radiation therapy를 처방받은 환자의<br>임상 sample에서 세포주 연구를 통해 얻어진<br>내성 관련 후보 단백질의 임상적 의의를 검증하는데에는<br>확실한 한계가 존재함   |
| 새로운 단백질체 분석기술의 적용 | 세포주 연구를 통해 얻어진 내성 관련 단백질들은<br>임상에서 5-FU 내성을 예측할 수 있는 단백질이 아닌<br>전이, DFS 등의 clinicopathological factor들과의<br>연관되어진 단백질들로 밝혀짐   |
|                   | LC-MALDI-MS system의 실질적인 set up으로<br>복잡한 단백질체 분석의 효율성 증대<br>LC-MALDI-MS system에 iCPL 분석 방법의 접목<br>LC-MS/MS system 의 기본 정비를 통한 단백질체<br>코어 랩의 정착 시간을 단축 시킴<br>저분자량을 가진 대사체를 분석하기 위한<br>새로운 분석 방법을 시도함 |

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

| 구 분       | 건 수  | 비 고  |
|-----------|--|--|
| 학술지 논문 게재 | 6<br>(under reivew<br>2편 + drafts<br>in preparation<br>4편) | SCI급 학술지 Impact Factor 총합 30 이상<br>[4. 연구성과 및 목표달성도 (1) 연구성과<br>나. 국내 및 국제 전문학술지 논문 신청 기준] |
| 산업재산권 등록  | 1  | 미국, EU<br>(저분자 대사체 분석방법)   |

### (2) 연구성과의 활용계획

#### 가. 임상적인 측면

- 본 연구의 결과는 궁극적으로는 효과적인 화학 항암 치료를 임상에 적용하기 위함이나 이 이후의 2-3년에 걸친 동물 실험과 실제 환자의 치료효과와 부작용에 대한 연구가 최소한 추가 요구됨

#### 나. 지식 및 기술적 측면

- 항암제 내성 관련 단백질을 동정하기 위해 이용되어진 LC-MALDI, LC-MS/MS - high throughput proteomics는 내성관련 단백질의 동정뿐 아니라 다른 암 표지제 개발 등 다양한 분야에 적극 활용되어질 기술의 축적임

#### 다. 산업적 측면

- 본 연구와 추가적인 연구를 통해 개발 되어질 수 있는 항암 내성 예측인자는 항암제 반응성의 예측뿐만이 아니라 항암화학요법의 효과를 증진시키거나 내성을 제거할 수 있는 adjuvant 의 개발의 토대가 되어질 것으로 예상됨. 이를 통한 의학 산업적 부가가치가 매우 크리라 예상됨

## 6. 첨부서류

- 1) 연구기간내의 발표된 논문 10편의 첨부는 제외
- 2) [연구과제 관련성 “상”. 저자구분 “제1” 또는 “교신”의 경우]

연구기간 내 신청 1편 및 최종 편집중인 신청 예정 논문 4편의 draft를 첨부함.