결과보고서

(과제번호 : 0510370)

새로운 암억제유전자 *LLC-1*의 폐암발생 과정에서의 역할구명

The role of *LLC-1*, a new candidate tumor suppressor gene, during lung carcinogenesis

과제책임자 : 홍 경 만

국 립 암 센 터

↑
5cm
↓
새로운 암억제 유전자 *LLC-1*의 폐암발생 과정에서의 역할구명

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 결과보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

국립암센터

↑
3cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “ 새로운 암억제유전자 *LLC-1*의 폐암발생 과정에서의 역할구명 ” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2007. 12. 31

국 립 암 센 터

과 제 책 임 자 : 홍경만

연 구 원 : 최용복

〃 : 이정화

〃 : 김현경

목 차

< 요 약 문 >

(한글)

(영문)

1. 연구사업의 최종목표 ---- 5

2. 연구사업의 내용 및 결과 ---- 5

3. 연구결과 고찰 및 결론 ---- 17

4. 연구성과 및 목표달성도 ---- 23

5. 연구결과의 활용계획 ---- 23

6. 참고문헌 ---- 24

7. 첨부서류 ---- 25

1) 논문: Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer. Int J Cancer. 2007

2) 논문: Increased lysine N-methylation of a 23-kDa protein during hepatic regeneration. Exp Mol Med. 2005

3) 논문: Phosphorylation of TMAP/CKAP2 at T596 during metaphase and it's dephosphorylation during anaphase/telophase. BBRC 투고중

4) 논문: Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele. Exp Mol Med Revision

5) 특허결정 통지서: 이위적 에스엔피 서열의 동시증폭을 이용한 염색체, 유전자 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피수 측정방법

6) 보고서: 신암정복10개년계획수립 표지

7) 저서: 최신 의학용어사전 표지

< 요 약 문 >

SAGE (serial analysis of gene expression)연구를 통해 정상적인 폐에는 발현하지만 대부분의 비소세포폐암과 세포주에서 발현되지 않는 아직까지 보고되지 않았던 유전자인 c20orf85를 발견하게 되었음. 이 유전자의 이름을 LLC1 (Low in Lung Cancer 1)으로 명명하였는데, 염색체의 20q13.3에 위치하였으며, 4개의 exon과 137개 아미노산으로 구성된 유전자임. RNA *in situ* hybridization 연구에서 LLC1이 폐 상피세포에 국한되어 발현됨을 확인하였고, 비소세포폐암에서는 거의 발현되지 않는다는 것을 확인하였음. 이러한 사실은 단클론 항체를 이용한 조직면역화학염색연구를 통하여 다시 한번 확인하였는데, LLC1이 폐 상피세포의 cilia에서 주로 발현된다는 것을 발견하였고, salpinx의 cilia에서 역시 발현되어 motile cilia의 기능에 관여할 것으로 여겨지고 있으며, 폐 상피세포의 air lift culture에서 cilia의 발생과 관련이 있다고 보고된 foxj1과 함께 발현이 유도됨을 확인하였음. Cilia이외에는 피부의 기저세포에서 발현되는데 cilia에서와는 다른 기능을 할 것으로 여겨짐. 유전자의 promoter 부위의 GC content가 70%였으며, 폐암세포주와 폐암조직에서 promoter 부위가 methylation되어 있음을 확인하였고 5-aza deoxycitidine을 처리하여 promoter methylation이 LLC1의 발현과 관련이 있음을 확인하였음. LLC1을 과발현시킨 비소세포폐암세포에서 성장속도와 세포의 이동속도에는 아무런 차이가 없었음. 이상과 같은 결과로 LLC1은 폐 상피세포의 마지막 분화의 표지자로 생각할 수 있으며, 폐와 salpinx에 있는 cilia의 기능에 관여하며, 공기에 노출되어 있는 피부에서는 또다른 기능이 있을 것으로 생각할 수 있음.

연구분야(코드)			과제번호	0510370	
과 제 명	새로운 암억제유전자 *LLC-1*의 폐암발생 과정에서의 역할구명				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2005년 6월 1일 ~ 2007년 12월 31일			400,000
	1차년도	2005년 6월 1일 ~ 2005년 12월 31일			130,000
	2차년도	2006년 1월 1일 ~ 2006년 12월 31일			140,000
	3차년도	2007년 1월 1일 ~ 2007년 12월 31일			130,000
과제책임자	성 명	홍경만	주민등록번호		
	전화번호	010-3321-9734	전 자 우 편	kmhong@ncc.re.kr	
색인단어	국문	암억제유전자, 폐암, 세포사멸, *LLC-1*			
	영문	tumor suppressor gene, lung cancer, apoptosis, *LLC-1*			

◆ 연구목표

<최종목표>

단클론 항체 생산, 세포사멸 세포주 연구를 통한 새로운 후보 암억제유전자 *LLC1*의 역할 구명.

<당해년도 목표>

LLC1항체를 이용한 면역조직화학염색과 세포증식에서의 LLC1의 역할구명
- LLC1을 이용한 폐암조직에서의 면역조직화학염색
- immortalized cell line에서의 세포증식억제 기전연구
- LLC1과 결합하는 단백질을 yeast two-hybrid 로 탐색

◆ 연구내용 및 방법

- LLC1 단클론 항체의 생산: 재조합 LLC1을 박테리아에서 발현하고 His-tag affinity chromatography, DEAE chromatography, gel filtration chromatography, PAGE gel purification을 거쳐 단일 단백질로 정제한 후 생쥐에 5-9번 면역한 후 spleen cell을 얻어 hybridoma를 만들고 1차로 박테리아의 recombinant LLC1 단백질을 이용 ELISA방법으로 스크린함. 2차로 adenovirus를 이용하여 LLC1을 폐암세포주 H1703세포에 과발현시키고 그 lysate를 이용하여 Western blot에서 LLC1에 특이적으로 반응하는 단클론 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 클로닝함.
- LLC1 단클론 항체를 이용한 면역조직화학염색: LLC1 단클론 항체 3종으로 조직면역화학염색을 시행하였고, 결과는 모두 동일하였으며 이후 한 종의 LLC1 단클론 항체만을 사용하여 실험을 지속하였음. 1) 사람의 정상적인 조직 40종류로 구성된 tissue array를 이용하여 조직면역화학염색을 시행하여 LLC1의 조직분포를 확인하였으며, 2) 폐암조직 59개와 50개로 각각 구성된 tissue array를 이용하여 폐암에서의 LLC1 발현을 연구하였고, 3) 폐의 발달과정에 따라 10가지 조직이 있는 tissue array를 이용하여 발달과정에서 LLC1의 발현에 관해 연구하였음. 사람의 조직에서는 폐 상피세포의 cilia와 salpinx의 cilia등 motile cilia가 있는 부위에서 LLC1의 발현을 관찰하였고, 피부조직에서 basal layer에 있는 keratinocyte에서 발현을 관찰하였음. 또한 폐의 발달과정에서 14-15주에 이미 cilia가 형성되기 시작했으며 이때부터 LLC1의 발현이 관찰되었음. 폐암조직에서는 어떤 암조직에서도 LLC1의 발현을 관찰할 수 없었음.
- 폐 상피세포의 air-lift culture model에서 LLC1 발현이 유도: 폐 상피세포를 공기에 노출되도록 배양하면 cilia형성이 유도됨. foxj1은 airway와 salpinx의 cilia형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, air-lift culture에서 foxj1의 유도와 함께 LLC1이 유도된다는 것을 확인함.

- Immortalized cell line에서의 세포증식억제 연구: 초기 LLC1의 과발현에 의해 증식이 저해되는 결과를 얻은 적이 있으나, transfection efficiency를 확인하면서 LLC1의 과발현과 세포증식에 관한 관련성을 비교한 연구에서 LLC1을 과발현하더라도 A549, H1299등 비소세포폐암세포주와 WI26과 같은 non-transformed 세포주에서 세포증식에 어떠한 영향도 미치지 않는다는 결론을 내리게 되었음.
- 세포의 migration에 대한 연구: time-lapse microscopy를 이용하여 LLC1을 과발현한 세포주와 vector만을 transfection한 세포주의 이동정도를 비교하였는데, LLC1을 과발현한 세포는 control에 비해 세포의 이동이 동일하다는 결론을 내리게 되었음.
- LLC1과 결합하는 단백질의 스크리닝: pBCTK vector에 LLC1을 클로닝하고, ovary, thymus, embryo등 cDNA를 이용한 세가지 library에서 yeast two hybrid 방법으로 LLC1과 결합하는 단백질을 연구하였으나 특이적인 클론을 찾는데 실패하였음.
- LLC1 knockout mouse chimera 암수를 만드는데 성공하였고, 현재 strain을 확립하기위해 breeding 중임.

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치[1)	달성도(%)
SCI 논문 편수	5/5 (투고중인 논문포함)	100%
IF 합	15/15 (투고중인 논문포함)	100%
기타 성과		

* 발간된 2편의 논문이외에 현재 논문 3 편을 투고 중이며 한편은 revision중임. 이외에 Nature Genetics를 포함한 3편의 논문을 준비중임.

1) TMAP/CKAP2 is transiently phosphorylated at T596 specifically during early phases of mitosis. BBRC (Corresponding author) IF: 2.855

2) Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele: EMM (Corresponding author), revision IF: 2.296

3) Uridine and thymidine phosphorylase plays a key role in mediating the function of the anti-cancer drug 5-fluorouracil in Caenorhabditis elegans. NAR (참여), IF: 6.575

* 특허: 1개 특허결정, 3개 진행 중

1) 인위적 SNP 서열의 동시증폭을 이용한 염색체, 유전자 뉴클레오티드의 카피수 측정방법: 특허결정 (첨부)

2) LLC1 단클론항체 특허 출원 진행중

3) T596에인산화되어 있지 않은 생쥐 TMAP/CKAP2에 대한 단클론항체를 생산하는 Hybridoma 세포주: 특허 출원 진행중

4) SNP array를 이용한 copy number variation 측정법: 특허 출원 진행중

- 정성적 성과: 본 연구를 통하여 LLC1의 발현이 폐암에서 감소되어 있으며 inactivation기전이 promoter methylation되어 일어난다는 사실을 처음 보고하였고, LLC1의 단클론 항체를 생산하여 LLC1단백질의 분포와 폐암에서 발현이 감소되어 있다는 사실을 조직면역화학염색에서 확인하였으며, air-lift culture 모델에서 LLC1이 유도됨을 확인하였음. LLC1 knockout mouse chimera 암 수를 확립하였음.

◆ 참여연구원	성 명	최용복, 이정화, 김현경
(최종연도 참여인원)	주민등록번호	

Project Summary

Title of Project	The role of *LLC-1*, a new candidate tumor suppressor gene, during lung carcinogenesis
Key Words	tumor suppressor gene, lung cancer, apoptosis, *LLC-1*
Project Leader	Hong, Kyeong Man
Associated Company	

Serial analysis of gene expression(SAGE) studies led us to identify a previously unknown gene, c20orf85, that is present in the normal lung epithelium but absent or down regulated in most primary non-small cell lung cancers and lung cancer cell lines. We named this gene LLC1 for Low in Lung Cancer 1 that is located on chromosome 20q13.3 and has 4 exons and encodes a protein containing 137 amino acids. By *in situ* hybridization, we observed that LLC1 message is localized in normal lung bronchial epithelial cells but absent in most of nonsmall cell lung cancer tissues. This is confirmed again by immunohistochemical staining with monoclonal antibody against human LLC1 showing that LLC1 is localized at lung epithelial cilia but is not expressed in lung cancers. LLC1 is also localized another motile cilia of saplinx suggesting a role in cilia function. In air-lift culture differentiation model of lung epithelial cell, LLC1 is induced along with foxj1 which has a key role in inducing motile cilia. In addition to motile cilia, LLC1 is expressed in basal layer of skin epidermis, suggesting another function of LLC1. The LLC1 promoter has GC content of 70%, and the methylation of LLC1 promoter was confirmed in lung cancer cell lines and primary lung cancer tissues. The correlation of promoter methylation and expression was confirmed by the treatment of 5-aza deoxycitidine. The growth and migration patterns were not changed in nonsmall cell lung cancer cell lines after LLC1 overexpression. These results suggest that LLC1 be a final differentiation marker of lung epithelial cell and that the failure of differentiation by lung tumorigenesis led to downregulation of LLC1 in nonsmall cell lung cancer. LLC1 might be involved in cilia function of airway and salpinx.

※ 연구사업의 목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

1. 연구사업의 최종목표

최종목표: 단클론 항체 생산, 세포사멸 세포주 연구를 통한 새로운 후보 암억제유전자 *LLC-1*의 역할 구명

전년도 목표: LLC1 항체를 이용한 면역조직화학염색과 세포증식에서의 LLC1의 역할구명

- LLC1을 이용한 폐암조직에서의 면역조직화학염색
- immortalized cell line에서의 세포증식억제 기전연구
- LLC1과 결합하는 단백질을 yeast two-hybrid로 탐색

2. 연구사업의 내용 및 결과

전년도 LLC1에 대한 단클론항체가 Western blot에서 박테리아에서 발현한 재조합 단백질과는 반응하지만 사람세포주에서 과발현한 단백질과는 반응성이 아주 약하거나 거의 없으며 비 특이적인 반응이 많았으며, 조직면역화학염색에서 특이적으로 검출되지 않고 비특이적인 반응들이 많아서 특이항체생산에 관한 연구를 올해에도 지속하였음. 그 결과 Western blot에서 이전에 비해 훨씬 특이성이 증가되었고, 조직면역화학염색에서도 비특이적인 염색이 없이 여러번의 실험에서 항상 같은 결과를 보이는 항체들을 생산할 수 있었음. 이는 LLC1을 Hig-Tag과 GST가 fusion된 두 가지 서로 다른 vector construct에 발현시키고 각각의 재조합 단백질을 chromatography방법들을 사용하여 순수정제하고 난 후 면역함으로써 특이항체를 생산할 수 있었음.

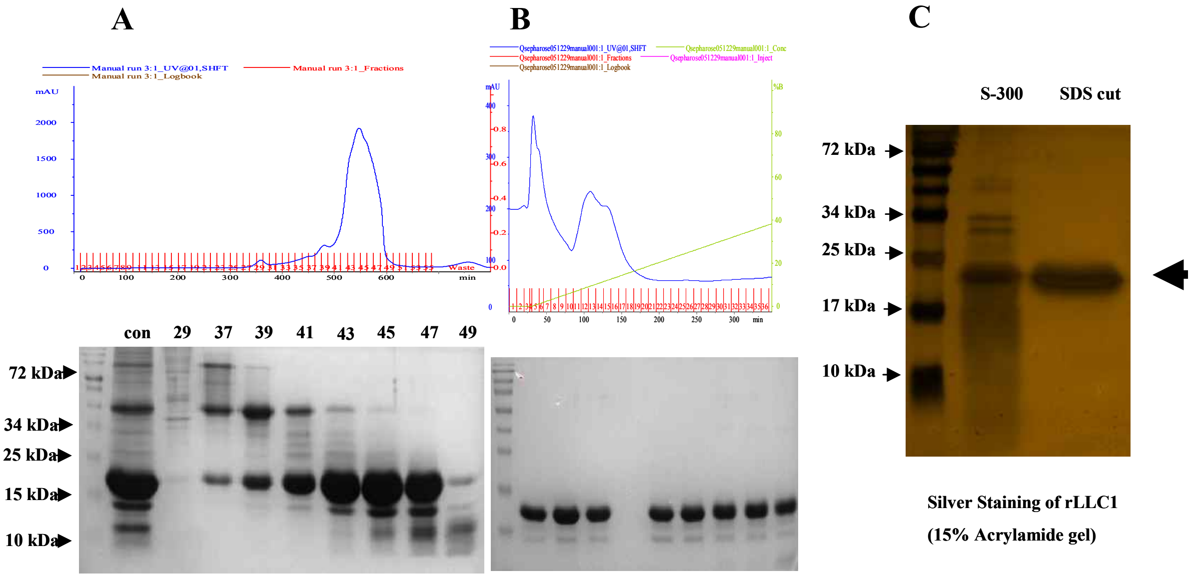


그림 1. 재조합단백질 정제의 과정. 박테리아에서 과발현한 두 종류 재조합단백질은 gel filtration chromatography (A), MonoQ chromatography (B), SDS-PAGE gel purification (C)과정을 거쳐 단일 band를 얻을 수 있었고 이를 Balb/c mouse에 면역하여 단클론항체 제작에 사용하였음.

그림 1에서 예시한 바와 같이 재조합 단백질은 여러 chromatography과정과 마지막단계에서 SDS-PAGE gel에서 정제하는 과정을 거침으로써 순수한 단백질을 얻고 이를 생쥐에 면역함으로써 비 특이적인 항체가 screening되는 것으로 방지하였음. 최종적으로 얻은 재조합단백질의 순수도는 silver staining으로 확인하였음.

이렇게 정제한 재조합단백질을 사용하여 면역한 생쥐의 비장세포와 myeloma 세포를 융합하여 hybridoma세포를 만들고 순수 정제한 LLC1 재조합 단백질을 coating한 ELISA plate를 사용하여 일차로 반응성을 test하였고, 스크리닝에서 양성인 hybridoma들은 다시 LLC1을 과발현한 세포주의 lysate를 이용한 Western blot방법으로 다시 스크리닝함으로써 mammalian expression된 LLC1을 인지할 수 있는 항체만을 선별하였음.

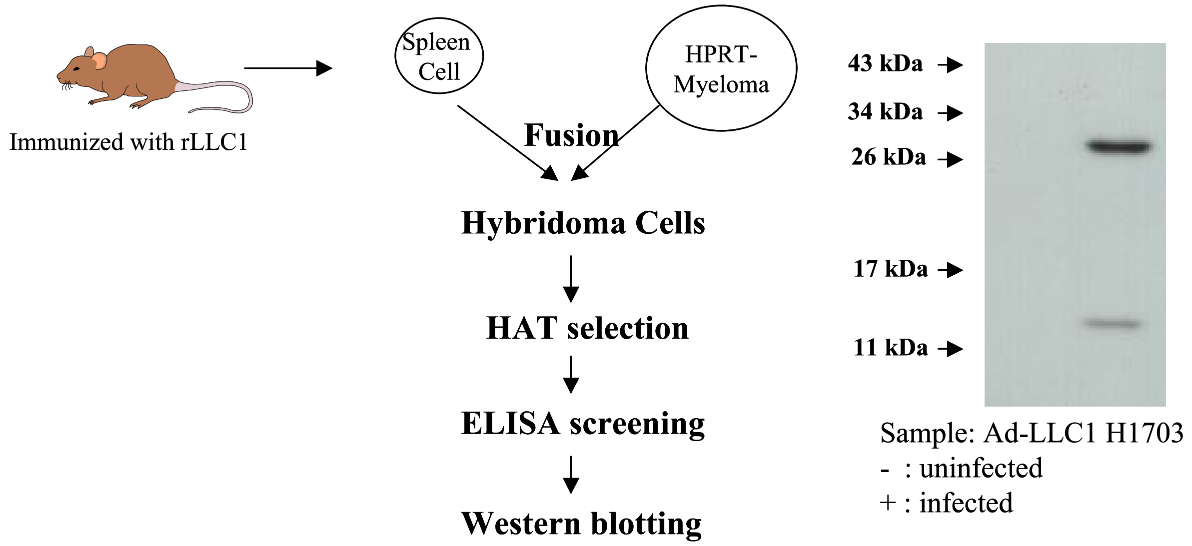


그림 2. LLC1 단클론항체생산과 Western blotting. LLC1을 생쥐에 면역하고 HPRT(-) myeloma 세포와 융합한 후 HAT selection을 하고 ELISA와 Western blot으로 LLC1특이 항체들을 얻을 수 있었음.

Mammalian expression된 LLC1을 얻기 위하여 LLC1을 발현하도록 한 Adenovirus를 H1703세포에 감염시키고, 감염시키지 않은 H1703세포와 함께 그림 2에서와 같이 hybridoma 세포의 배양액을 이용하여 Western blot을 시행하였음. Western blot상에서 두개의 특이적인 band를 검출하였으며 약 14 kDa정도의 band는 monomer이고 28kDa정도의 band는 dimer일 것으로 추정하였음. 이상과 같은 결과는 4가지의 서로 다른 hybridoma 배양액을 이용한 Western blot에서 동일한 결과를 얻을 수 있었음.

이렇게 얻은 단클론 항체를 이용하여 LLC1의 세포내 분포를 확인하기 위하여 LLC1이 과발현하도록 한 plasmid DNA를 tranfection한 비소세포폐암 세포주 A549와 암화되지 않은 폐 상피세포주를 이용하여 그림 3과 같이 면역화학염색과 면역형광염색을 시행하였음. 그림 3의 결과에서 확인할 수 있듯이 과발현된 LLC1은 세포질에서 발현된다는 것을 확인하였음.

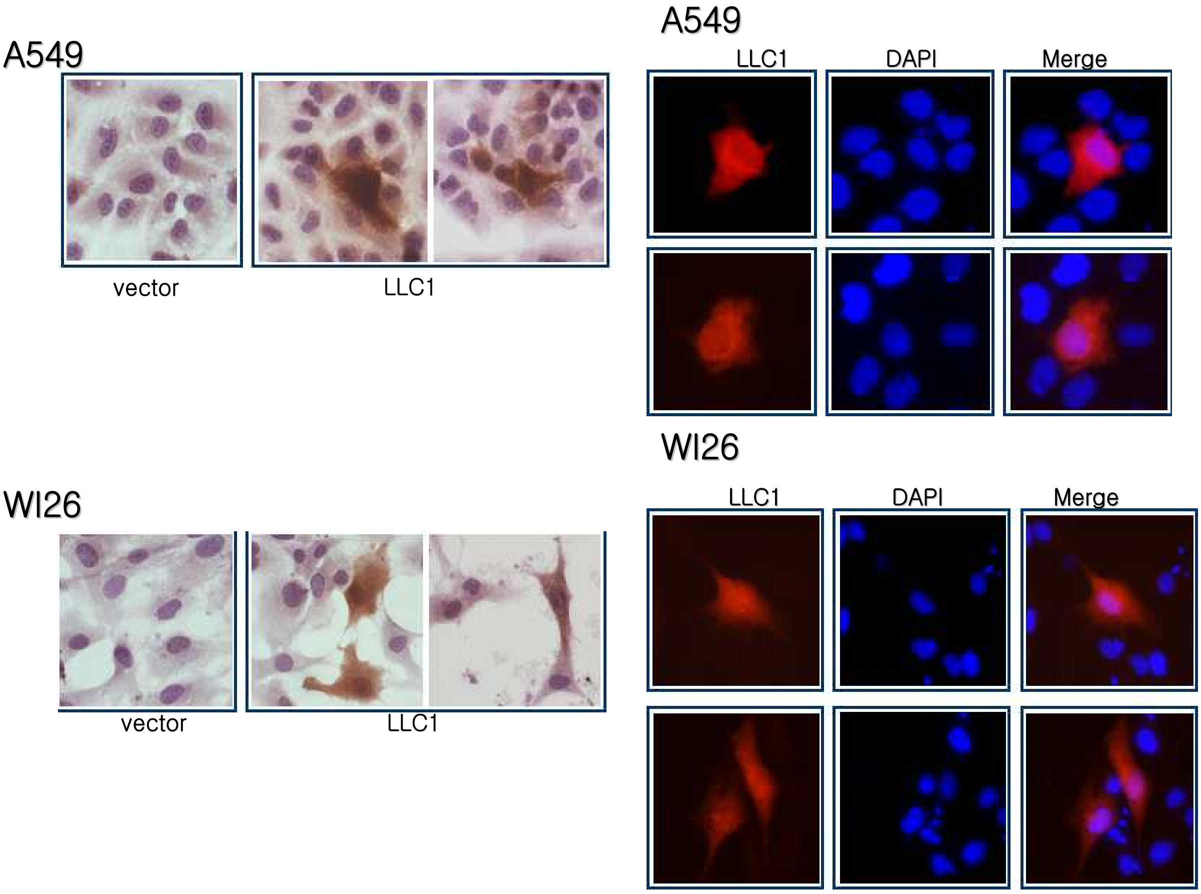


그림 3. LLC1을 과발현하도록 한 비소세포폐암 세포주 A549과 암화되지 않은 폐 상피세포주 WI26에서 단클론항체를 이용하여 면역화학염색과 면역형광염색을 시행하였음. 염역형광염색에서 핵을 DAPI로 counter staining하였음.

LLC1의 실제 사람조직에서의 분포와 세포내 분포를 확인하기위하여 사람의 여러 정상적인 조직이 포함되어 있는 조직 array를 사용하여 조직면역화학염색을 시행하였음. 사람의 피부, 유방세포, spleen, lymph node, skeletal muscle, lung, bronchus, heart, salivary gland, liver, gallbladder, pancreas, tonsil, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, appendix, colon, kidney cortex, medullam urinary bladder, prostate, seminal vesicle, testis, endometrium, myomrtrium, uterine cervix, salpinx, ovary 등의 조직에서 검사하였음. Bronchus와 nasal epithelial cell과 salpinx의 cilia에서 LLC1이 발현되었고, 피부에서는 epidermis의 basal keratinocyte의 세포질에서 발현되었음 (그림 4). 이들 조직이외에는 LLC1의 발현이 거의 없었음.

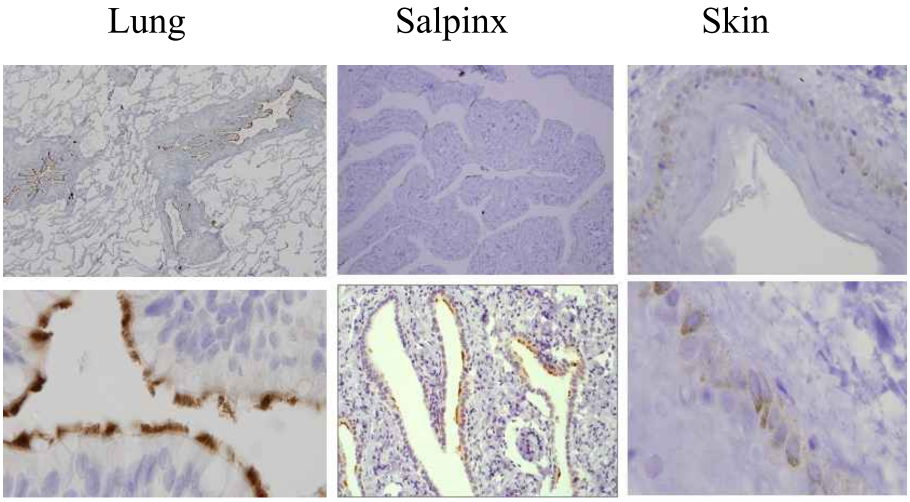


그림 4. LLC1 단클론항체를 이용한 조직면역화학염색. 폐의 상피세포와 salpinx의 상피세포에 존재하는 cilia에만 특이적으로 발현했으며, 피부에서는 epidermis의 basal layer에 있는 keratinocyte 세포질에서 특이하게 발현한다는 것을 알 수 있음.

정상적인 폐 상피세포의 cilia에서 LLC1이 발현된다는 것을 확인하였고, 사람의 폐 발생과정 중 어느 단계에서부터 LLC1이 발현하는 지 확인하기 위해 폐 발생과정의 조직들이 들어있는 조직 array를 이용하여 조직면역화학염색을 시행하였는데, 이미 발생 14-16주에 cilia가 발견되었는데 이 cilia에서 LLC1이 특이하게 발현함을 확인할 수 있었음 (그림 5).

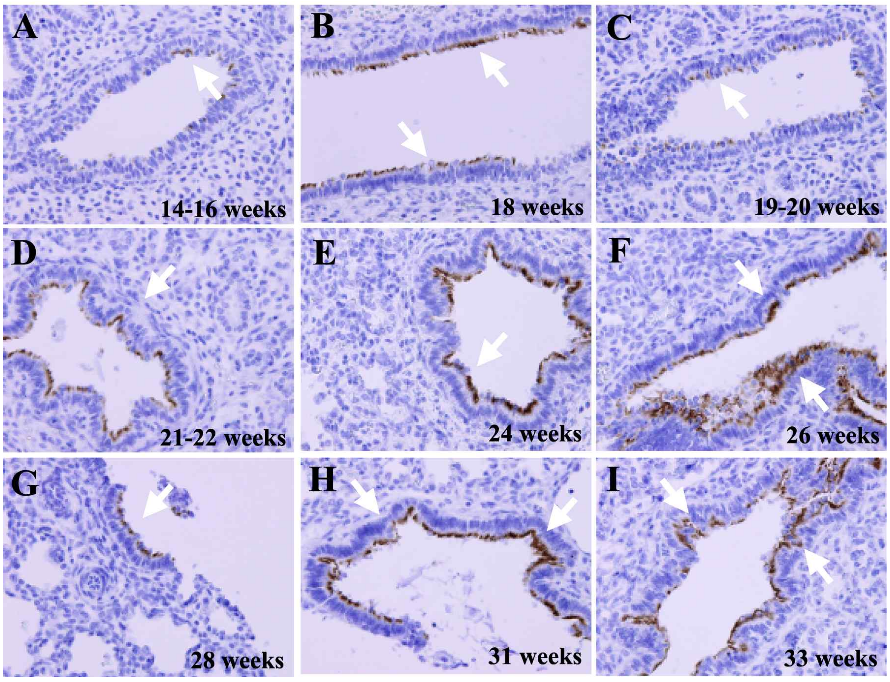
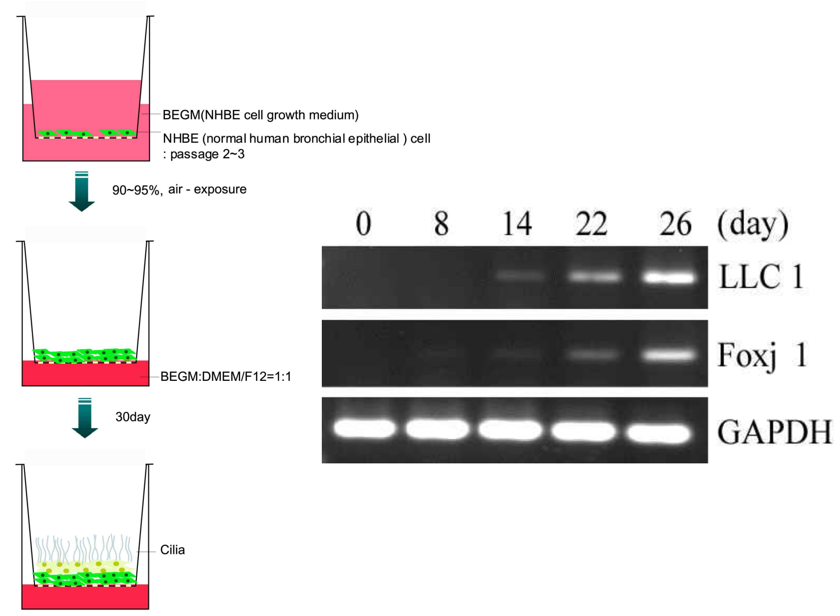


그림 5. 사람 폐 조직 발생과정에서 LLC1의 발현. 발생 14-16주에 일부 폐 상피세포에서 cilia를 발견할 수 있었는데 LLC1도 발현된다는 것을 알 수 있다.



<ALI culture of human bronchial epithelial cell>

그림 6. 폐 상피세포를 이용한 분화모델에서 LLC1의 발현.

폐 상피세포를 그림 6에서와 같이 공기중에 노출되도록 배양하면 상피세포의 분화가 유도되며 이때 cilia의 발생과 관련된 foxj1 유전자의 발현이 유도된다는 것이 알려져 있음. 이러한 폐 상피세포의 air-lift culture에서 시기별로 유전자발현을 확인하였는데 foxj1이 일주일 정도부터 발현이 유도되기 시작하였으며, LLC1도 14일정도에서는 확연히 발현을 확인할 수 있었음. 그러나 비소세포폐암에서 foxj1을 과발현시켰을 때 LLC1의 발현은 유도되지 않았으며, LLC1을 과발현할 때에도 foxj1의 발현을 관찰할 수 없었다. 비록 암세포에서의 실험이었지만 foxj1에 의해 LLC1의 발현이 직접 유도되지 않는다는 결론을 얻을 수 있음.

다음은 LLC1의 발현이 세포의 성장과 이동에 미치는 영향을 연구하기 위한 실험을 진행하였음. 전년도 adenovirus를 이용한 LLC1과발현 실험에서 그림 7과 같이 약간의 성장억제효과를 얻었음을 보고한 바 있음 (그림 7).

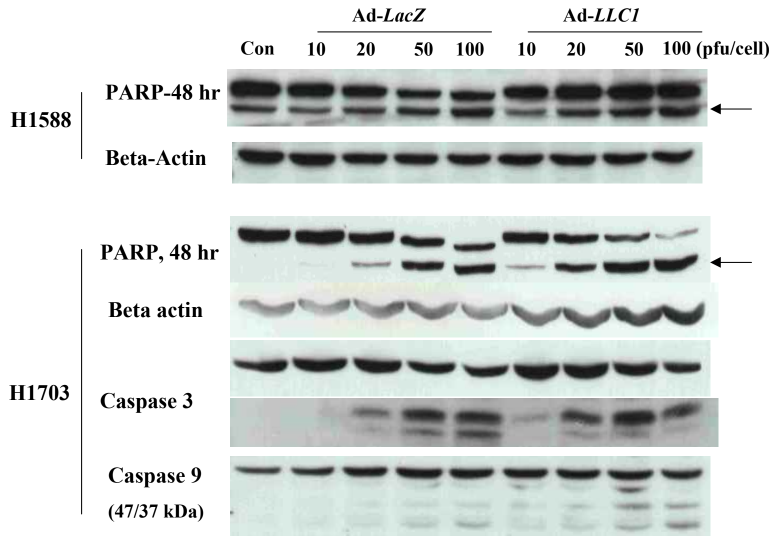


그림 7. Adenovirus를 이용한 LLC1의 세포성장억제 실험. Adenovirus에 LLC1이 들어있는 바이러스와 들어있지 않은 control virus를 비소세포폐암세포주 H1703과 H1588에 감염시킨 후 48시간이 지난 후 세포의 lyste에서 PARP 항체를 이용하여 세포의 apoptosis정도를 확인하였는데, 두 세포주에서 약간의 apoptosis 조장효과를 얻을 수 있었음.

그러나 이러한 결과가 control adenovirus와 LLC1이 들어있는 adenovirus를 각각 따로 preparation하고 보관하는 과정, 그리고 virus particle을 각각의 세포주에 넣어주는 과정에서의 차이로 인해 약간의 apoptosis 조장효과가 있었는지 판단하기 힘들어 GFP가 동시에 발현하도록 한 adenovirus를 다시 제작하여 H1703, H1588, H1833 비소세포폐암 세포에서 MTT assay를 이용하여 그림 8과 같이 실험을 진행하였음.

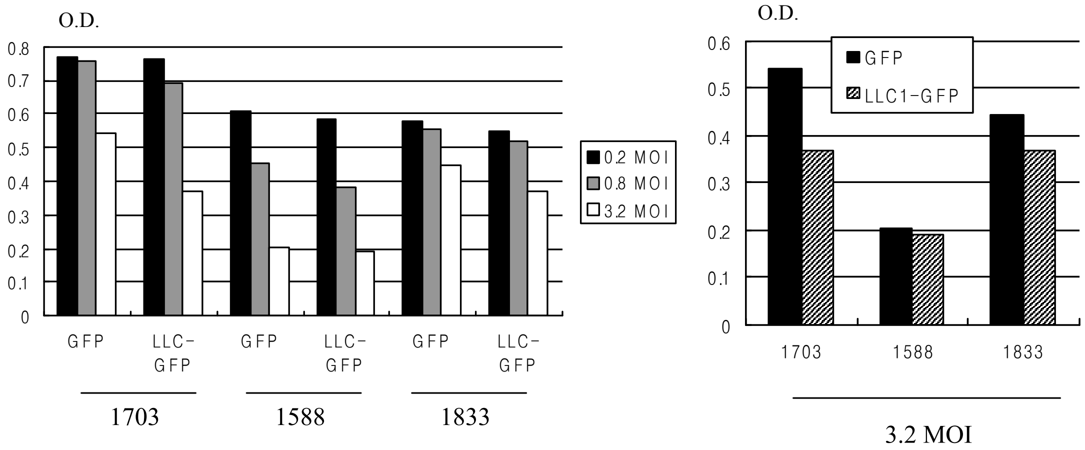


그림 8. Adenovirus 를 이용한 비소세포폐암에서의 세포성장억제효과 연구.

그림 8에서 보는 바와 같이 LLC1의 세포성장억제효과가 확실하지 않았음. 따라서 LLC1을 plasmid vector (pcDNA3.1+)에 클로닝하고 비소세포폐암 세포주에 transfection시키고 G418로 selection하여 2주일정도 selection하여 생긴 colony를 count하여 LLC1의 세포성장억제효과를 연구하였음.

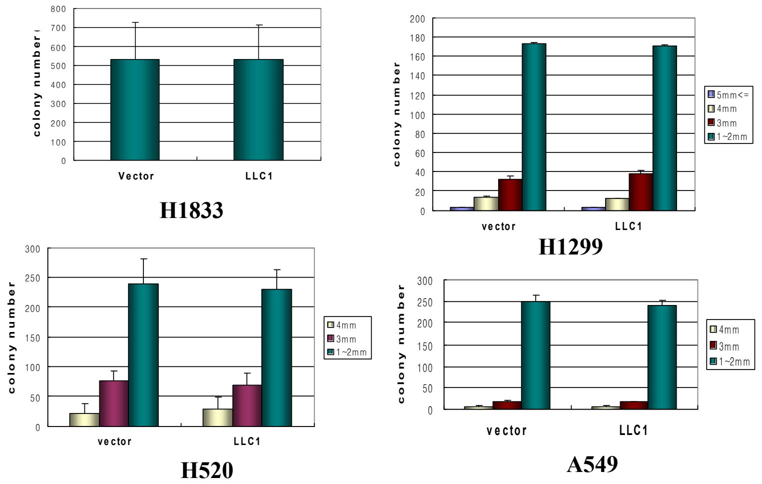


그림 9. Colony forming assay. LLC1의 세포성장억제효과 여부를 판정하기 위해 네가지 비소세포폐암세포주에 LLC1을 클로닝한 mammalian expression vector를 transfection한 후 생긴 colony를 크기별로 count하여 세 번 실험을 반복하였음.

그런데 colony forming assay에서 LLC1이 H1833, H1299, H520, A549 등 비소세포폐암 세포의 성장에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었으며, 다시 암화되지 않은 폐 상피세포주인 WI26에서도 영향이 없다는 것을 확인하였음 (그림 10). 또한 A549 비소세포폐암세포주를 이용한 soft agar assay에서도 colony생성에 차이가 없다는 것을 다시 확인하였음 (그림 11).

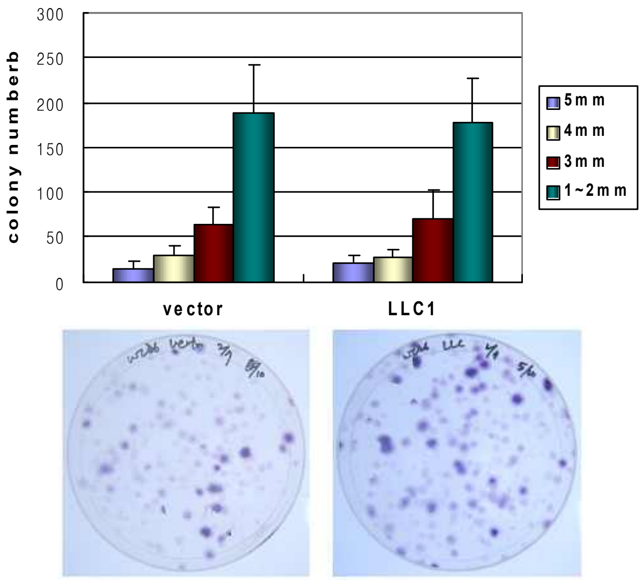


그림 10. LLC1이 암화되지 않은 폐 상피세포 WI26에 대한 세포성장효과.

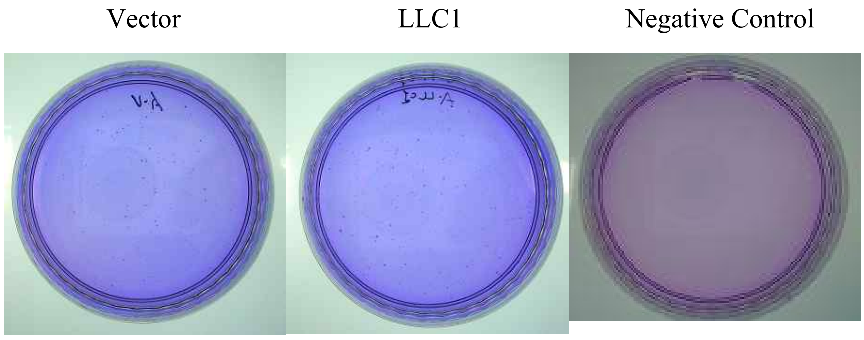


그림 11. Soft agar assay를 이용한 LLC1의 세포성장효과

LLC1이 세포의 이동에 미치는 영향을 알아보기 위해 LLC1을 transfection시킨 세포를 vector만을 transfection시킨 세포와 이동속도를 비교하였음 (그림 12). LLC1은 두가지 비소세포폐암 세포주에서 세포의 이동속도에 어떠한 영향도 미치지 않는 다는 것을 알 수 있었음.

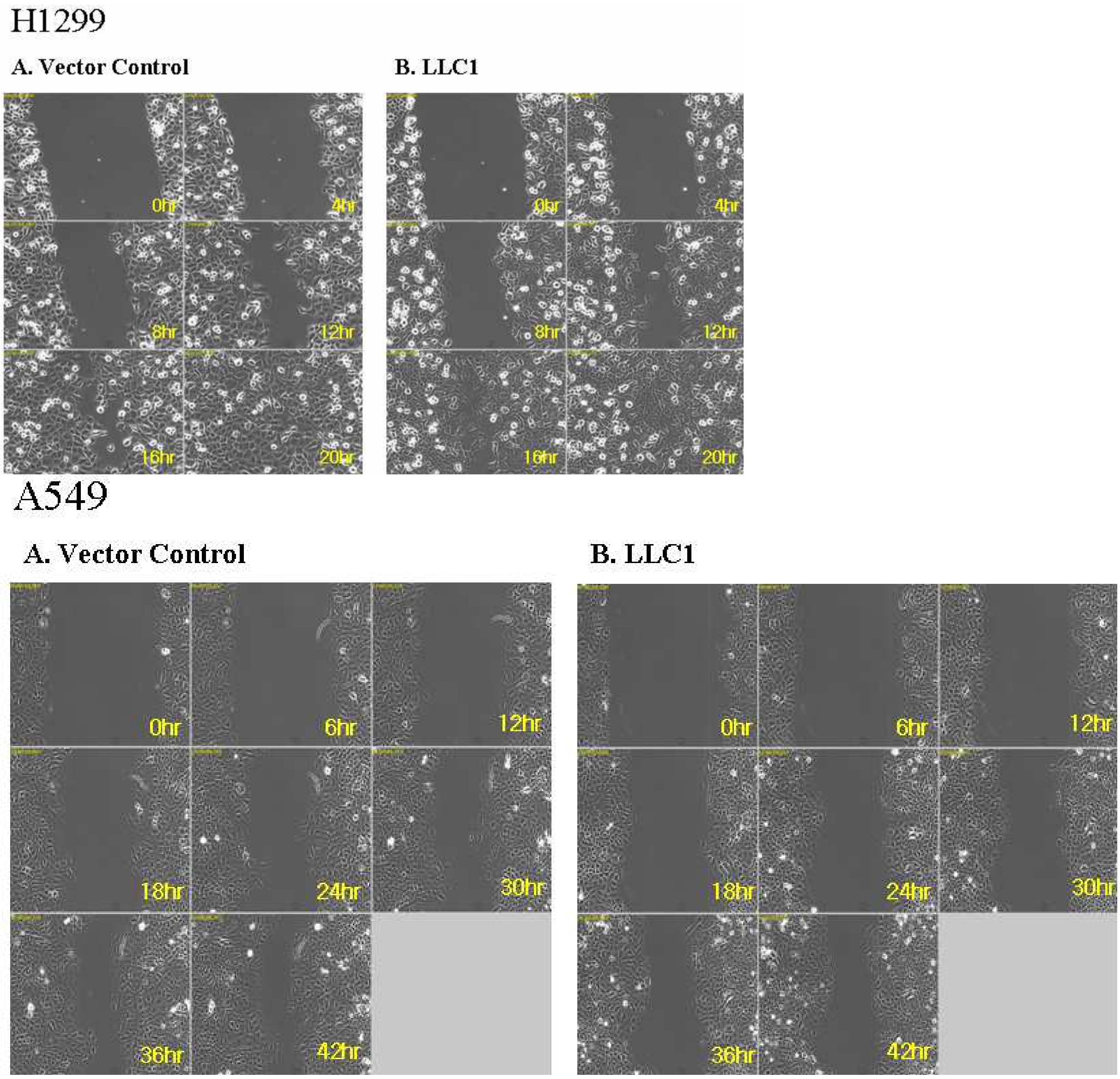
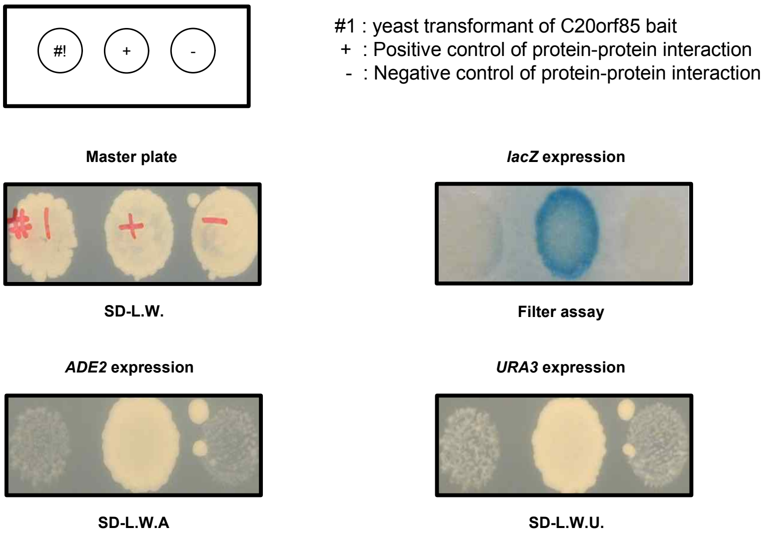


그림 12. Cell migration assay. LLC1을 과발현하도록 한 H1299, A549 비소세포폐암 세포주를 Vector만을 trasnfection시킨 control 세포주와 함께 배양한 후 가운데 부분을 긁어내어 time lapse microscopy로 시간 별로 관찰하여 세포의 이동의 차이 여부를 판정하였음.

LLC1과 결합하는 단백질을 검색하기 위하여 yeast two hybrid 방법으로 스크리닝하였음. Bait로 사용하기 위하여 LLC1 유전자를 EcoRI/BamHI site를 통하여 pBCTK vector에 클로닝하였고 염기서열 결정으로 유전자의 reading frame을 확인하였음.Yeast two hybrid 시스템은 기본적으로 GAL4 transcriptional activator의 전사활성에 가반을 둔 방법으로 bait자체는 전사활성이 없어야 하므로 self activity test를 시행하여 활성이 없다는 것을 확인하였음 (그림 13).



The PBN204 yeast strain has *lacZ*, *URA3* and *ADE2* as reporters.

그림 13. Test for self-transcriptional activator activity. To test transcriptional activity of the LLC1 bait, the bait plasmid was introduced with an empty prey vector into yeast strain (PBN204). The negative control prey vector was pACT2 which contains GAL4 transcriptional activation domain, LEU2 as a selection marker in yeast, Ampr marker for E. coli selection, and replication origin of 2μ plasmid for replication in yeast. Yeast strain PBN204 has ADE2, URA3 and lacZ genes as reporters. These reporters are under the different contexts of various gal promoters. Yeast transformant was selected on a SD minimal medium lacking leucine and tryptophan (SD-LW). Transformant was replica plated onto various SD selection media, such as medium lacking leucine, tryptophan and uracil (SD-LWU), and medium lacking leucine, tryptophan and adenine (SD-LWA). Yeast transformant containing LLC1 bait did not grow on SD selection media. Moreover it did not show beta-galactosidase activity in X-gal filter assay. This indicates that the LLC1 bait does not have transcriptional activator function.

그림 13과 같은 결과를 얻어 bait construct가 self activity가 없다는 것을 확인하고 사람의 ovary library, human thymus library, mouse embryo library에서 yeast two hybrid를 시행하였음. 스크리닝은 URA3, lacZ, ADE2 등과 같이 세가지 reporter를 가진 PBN204 strain를 사용하였으며, yeast transformant는 leucine, tryptophan, uracil이 결핍된 SD-LWU 혹은 leucine, tryptophan, adenine이 결핍된 SD-LWA 배지를 사용하였음. 선택배지에서 yeast를 배양하여 선택한 후 beta-galactosidase 활성을 특정하였고, Ura+ colony들이 adenosine deficient 배지에서도 자라는지 확인하였음. 또한 단백질-단백질 상호장용이 있다는 것을 세가지 다른 reporter system으로 확인함으로써 false positive가 생기는 것을 방지하였음. 이렇게 스크린하여 positive로 얻은 colony의 DNA를 PCR로 증폭하여 다시 bait plasmid에 넣어 다시한번 real positive인지를 확인하였음. ovary cDNA library에서는 총 8.18 x 10^6개의 colony를 스크린하였고, thymus library에서는 총 6.94 x 10^6개의 colony를 스크린하였으며, mouse embryo cDNA library에서는 3.17 x 10^6개의 colony와 3.78 x 10^6개의 colony를 각각 두 번에 걸쳐 스크린하였음 (그림 14). 그러나 마지막까지 real positive로 나온 colony는 하나도 없었음 (표 I).

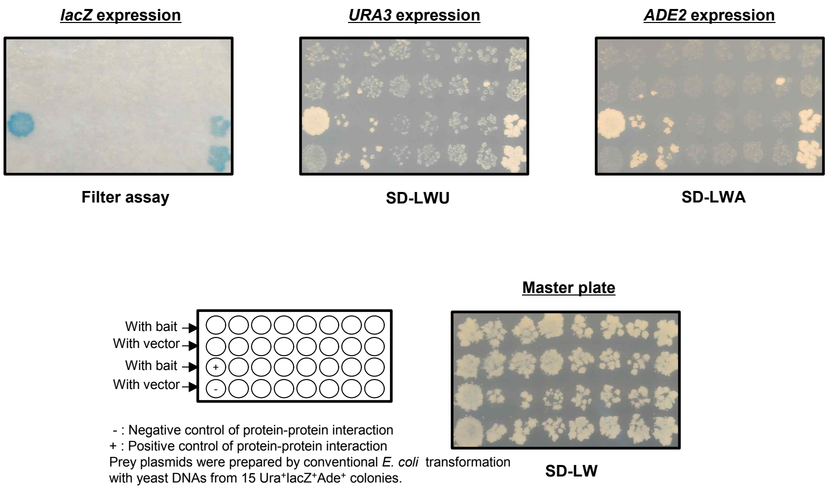
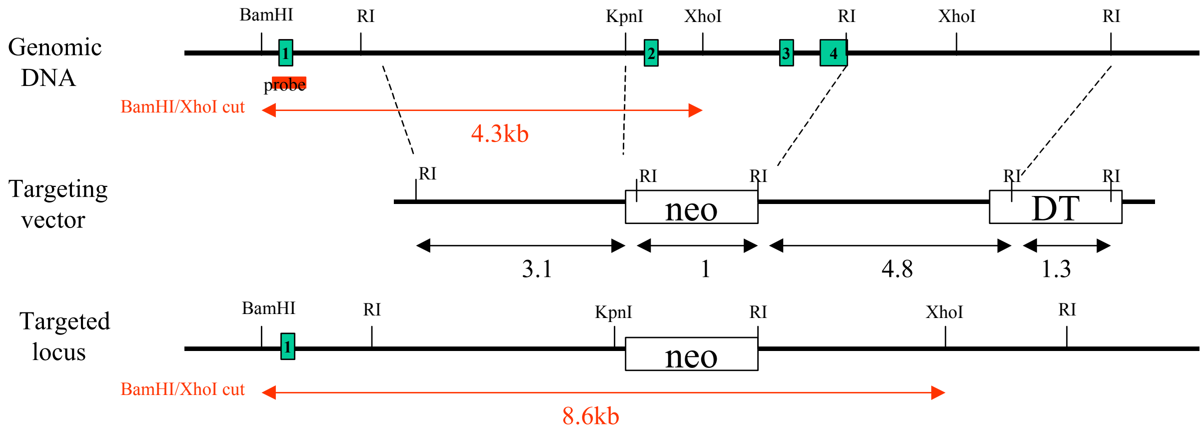


그림 14. Ovary cDNA library에서 yeast two hybird system을 통한 screening 과정 중 reporter expression 양상.

	Number of Colonies			
	Library A	Library B	Library C	
			1st	2nd
Reporter I (*URA3*)	64	45	23	18
Reporter II (*lacZ*)	22	29	1	2
Reporter III (*ADE2*)	15	17	1	1
Real Positives	0	0	0	0

표 I. Yeast two hybrid 스크리닝 결과. Library A는 ovary cDNA library이고, library B는 thymus, library C는 mouse embryo cDNA library임.

LLC1이 결여되어 있는 knock out mouse를 제작하기 위하여 그림과 같은 construct를 제작하여 mouse embryonic stem cell에 transfection하고 스크리닝하여 homologous recombination이 일어나도록 하였음. 이렇게 제작된 재조합 embryonic stem cell을 쥐의 배반포에 넣어 키메라마우스를 제작하였음. 현재 암 수 각각 1마리의 키메라를 얻었으며, 이로부터 knockout strain을 얻기위해 breeding 중에 있음.



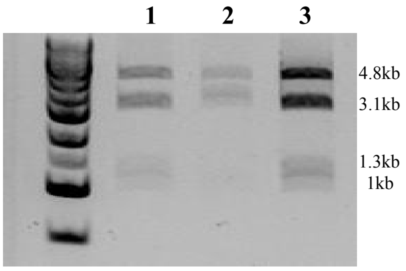


그림 15 . LLC1 knockout mouse 제작을 위한 scheme.

위 실험을 진행하는 동안 특이적인 단클론항체의 제작을 통한 공동연구제안이 와서 동 연구비로 TMAP/CKAP2 (Hong et al., 2007b)에 대한 단클론 항체를 제작하였고 이러한 단클론항체들의 항원성이 서로 다름을 발견하고 이러한 차이가 TMAP/CKAP2의 phosphorylation에 기인할 수 있다는 가정하에 epitope mapping과 peptide합성을 이용한 실험을 진행하여 TMAP/CKAP2에 특이적인 phosphorylation이 일어나며, 면역형광염색을 시행하여 TMAP/CKAP2의 phosphorylation이 prophase와 metaphase에서 일어났다가 anaphase에서 완전히 없어진다는 것을 발견하여 논문에 투고중임.

또한 GCH1 mutant allele에 의해 유전자의 발현이 50%정도 줄어든다는 것을 발견하였고, SNP에 의한 발현양의 moderate decrease가 susceptible한 사람들에서 유전질환을 가져올 수도 있다는 결과를 얻어 논문에 투고하였고 revision 중에 있음.

또한 미국 NCI와의 공동연구로 early onset lung cancer환자에서 특이적으로 나타나는 LOH를 분석하여 그 부위의 유전자들을 스크리닝하고 그 부위가 renal cell carcinoma에서 telomerase의 repressor부위와 일치하다는 것을 알아내고 원인 염색체 부위를 좁혀들어가서 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자를 발견하고 telomerase repressor activity를 확인하였으며, 이 유전자의 SNP들이 early onset lung cancer 환자들에서 특이하게 많이 발견된다는 것을 발견하였음. 또한 이유전자의 promoter CpG island에 많은 비소세포폐암 세포주와 조직에서 methylation이 되어 있다는 것을 발견하고 논문을 준비중임.

또한 그동안 본 연구자는 protein에 methyl group을 전달하는 효소인 lysine methyltransferase의

활성이 간재생동안 특이하게 증가되어 있음을 발견하였고 이의 효소와 기질에 관한 연구를 진행하고 있었는데 특이효소가 epigenetic regulation에 중요하다고 알려져 있는 SET7/9 유전자임을 rat brain과 liver에서 효소를 chromatography방법으로 정제하고 MALDI-TOF분석을 통하여 밝혀내었으며, recombinant SET7/9효소가 23 kDa methyl acceptor protein에 특이하게 methylation시킨다는 것을 확인하였음. 또한 이러한 methylation이 간 재생에서 뿐 아니라 HepG2와 H4IIE와 같은 간세포 (liver cell)혹은 간암세포의 성장에서도 특이하게 증가한다는 것을 발견하고 세포주기와 lysine methylation과의 연관성에 관한 연구를 진행중에 있음.

이외에도 본 연구진은 gene specific하게 CNV (copy number variation)을 측정할 수 있는 새로운 assay방법을 개발하여 특허를 진행하고 있으며, 특허청에서 특허가 가능하다는 통보를 이번에 받게 되었음. 또한 SNP array를 통한 CNV의 측정방법이 최근 논문에 소개되었는데 이의 단점들을 보완한 새로운 SNP array의 제작방법에 관한 특허를 진행 중에 있음.

3. 연구결과 고찰 및 결론

LLC1은 비소세포폐암 조직과 세포주 그리고 폐 상피세포의 SAGE (serial analysis of gene expression) library를 분석하여 (Hibi et al., 1998; 그림 16) 발견한 유전자로 대부분의 비소세포폐암 조직과 세포주에서 발현양이 현저히 감소되어 있으며 (그림 17), RNA in situ hybridization 방법으로 LLC1의 발현 부위를 추적하여 폐 상피세포에서 특이적으로 발현된다는 것으로 확인하였음 (그림 18).

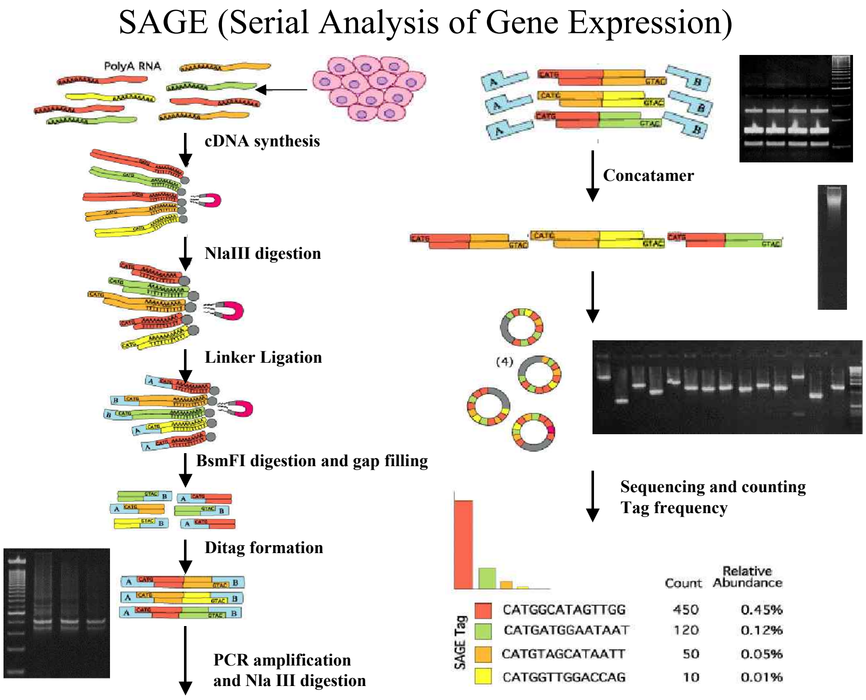


그림 16. Serial analysis of gene expression (SAGE)의 원리

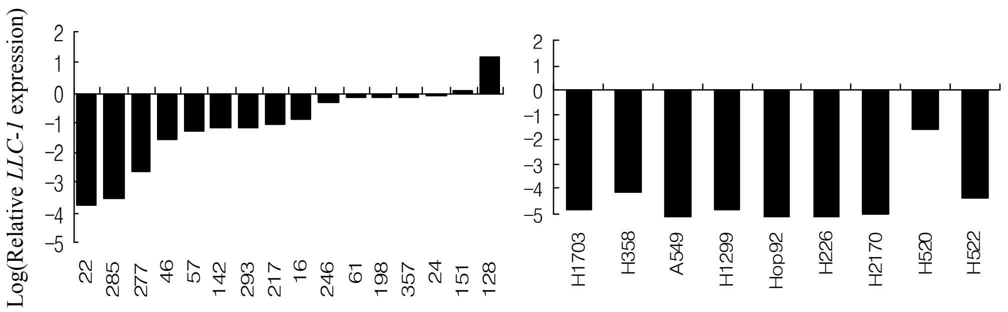
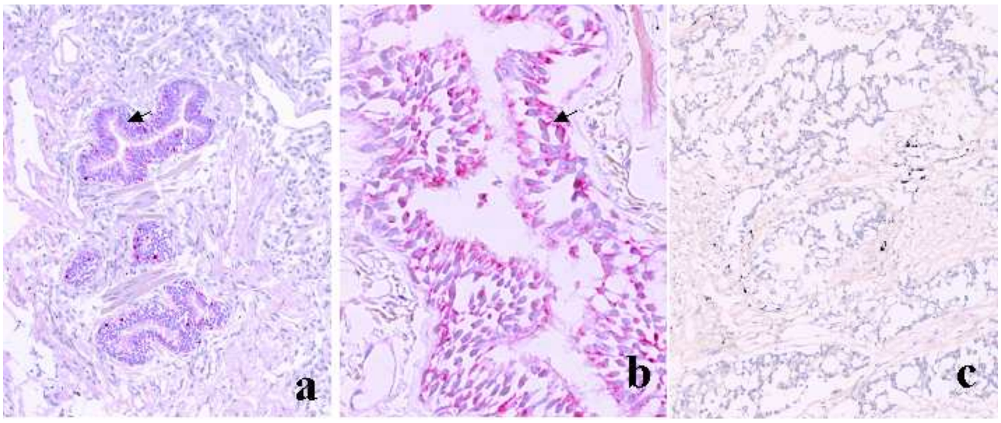


그림 17. 비소세포폐암 조직과 세포주에서 LLC1의 발현을 real-time PCR방법으로 확인. 비소세포폐암조직에서는 정상적인 조직에 비해 10분의 1이하로 발현이 감소되어 있는 경우가 절반 이상이었으며 세포주에서는 거의 대부분에서 LLC1의 발현을 관찰할 수 없었음.



13 adenocarcinoma, 9 squamous carcinoma: no expression
1 squamous and 1 adeno-carcinoma: weak and diffuse staining

그림 18. RNA *in situ* hybridization analysis of LLC1. LLC1이 폐 상피세포에서 특이적으로 발현함을 알 수 있으며, 대부분의 비소세포폐암 조직에서는 발현되지 않는 다는 것을 알 수 있었음.

또한 LLC1의 promoter CpG island에 methylation되어 있으며 (그림 19), 이러한 methylation이 demethylating agent인 5-aza deoxycitidine의 처리에 의해 LLC1의 발현이 증가된다는 것을 확인하였음 (Hong et al., 2007; 결과 생략).

GATGAGCAAATGGGCCTAGAGGTGGACAAAGGGCCCAGAC*GTGAGCAAAGGATGGCAGCAAGCCC*GG
ACCCAAGC*GAC*GC*GGC*GAAAGCACAGC*GACCCCACCCTC*GCCAGGTGCAGAGCCATTTCC*GCCTC
C*GAGTCCTGC*GTTGCCTGGCAACC*GGTCTCCCAGGAGAC*GC*GAGAC*GCTGAGCCCAGGGCCAGAG
CTTGC*GGGGCGCACAGAGCCCCCAGGCCTCATGGCGCAGAAACCTCTCAGCACCGCGGCGGCTGAACGC

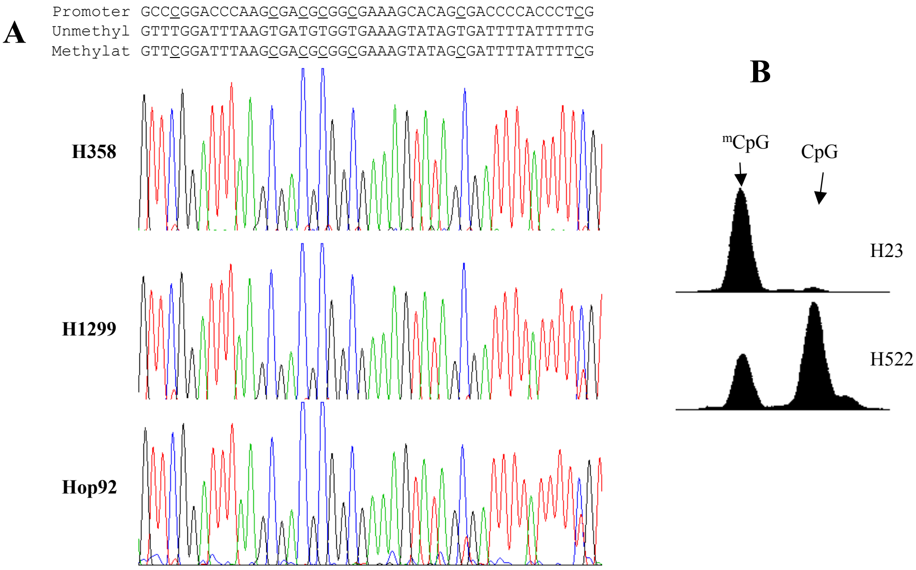


그림 19. LLC1의 promoter site에 해당하는 염기서열에서 CpG island를 표시하였으며, sodium metasulfite 처리후 sequencing한 결과에서 대부분의 CpG island에 methylation되어 있음을 확인할 수 있었으며, methylation정도를 MSBE방법으로 정량할 수 있었음 (Hong et al., 2005).

이상의 결과는 올해 Internation Journal of Cancer (Hong et al., 2007)에 논문으로 출간하였으며,

대부분이 LLC1 단클론항체를 사용하여 얻은 결과에서 확인되었음. 우선 LLC1의 발현부위가 RNA *in situ* hybridization에서 폐 상피세포에서 발현된다는 결과를 얻었었는데, 단클론항체를 이용한 조직면역화학염색에서 폐 상피세포의 cilia에서 발현된다는 것이 확인되었음. 또한 RNA *in situ* hybridization에서 대부분의 비소세포폐암에서 LLC1이 발현되지 않는 결과를 얻었었는데, 조직면역화학염색에서 LLC1이 발현되는 비소세포폐암조직은 없었으며, 조직에 남아있는 정상적인 상피조직의 cilia에서만 LLC1이 발현된다는 것을 확인함으로써 RNA *in situ* hybridization결과와 단클론항체를 이용한 결과가 대부분 일치한다는 것을 알 수 있었음.

암조직에서 발현이 감소되어 있으며, 유전자의 promoter에 methylation되어 있는 결과는 LLC1이 암억제유전자일 가능성을 시사하고 있어서 LLC1이 세포증식과 세포이동에 미치는 영향을 연구하였는데, 전년도 adenovirus를 이용한 실험에서는 확실한 결론을 이끌어 낼 수 없었음. 이러한 이유로는 LLC1을 발현하도록하는 adenovirus와 control로 사용하는 adenovirus를 각각 따로 preparation하여 보관하는데, preparation하는 과정을 동일하게 하여야하며, 특히 보관하는 과정 중 activity가 많이 달라진다는 것을 나중에 발견하게 되었음. Dry ice를 adenovirus가 들어있는 deep freezer에 같이 보관하는 경우 adenovirus의 infectivity가 급격히 감소하였으며, 얼려져 있는 adenovirus를 사용하기위해 한번 녹일때 마다 infectivity의 감소가 있었음. 이러한 error를 최소한 하기위해 aliquot로 만들어 보관하였으나 aliquote volume에 따른 activity의 차이도 확인할 수 있었음. 또한 처음 preparation한 LLC1 adenovirus와 control adenovirus의 titer가 차이나는 경우 dilution error에 의해 infectivity차이의 변수가 상존하고 있어서 30% 정도의 차이가 LLC1에 의한 차이인지 실험과정의 오류에 의한 것인지 정확히 판단할 수 없었음. 이에 따라 mammalian expression vector에 LLC1을 clone하여 vctor와 동시에 DNA를 같은 방법으로 preparation한 후 colony forming assay를 시행한 결과 adenovirus를 사용한 경우에 비해 훨씬 정확하게 LLC1에 의한 세포성장에 미치는 영향을 판단할 수 있었음. 이 실험으로 LLC1이 적어도 네가지 비소세포폐암세포주와 암화되지 않은 한가지 폐 상피세포의 세포성장에 아무런 영향을 주지 않는 다는 것을 확인할 수 있었음 (그림 9-10). 또한 soft agar assay에서도 역시 LLC1에 의한 성장억제효과는 관찰할 수 없었음 (그림 11).

세포의 이동에 미치는 LLC1의 영향을 알아보기 위해 LLC1을 과발현시킨 비소세포폐암세포주를 배양한 후 같은 넓이의 세포를 긁어내고 이 gap을 채우는 속도를 time lapse microscope으로 관찰한 결과에서 LLC1이 세포의 이동에 영향을 미친다는 어떠한 결과도 얻을 수 없었음 (그림 12). 이러한 결과는 LLC1이 비소세포폐암에서 inactivation되는 것이 원인이기보다는 암화의 결과일 가능성을 제시하고 있다고 하겠음. 이러한 가능성은 LLC1 단클론항체를 이용한 조직면역화학염색실험에서 더 확실해졌음. 사람의 여러 조직이 있는 tissue array를 이용한 조직면역화학염색에서 LLC1은 폐와 salpinx의 상피세포 cilia에 특이적으로 염색되었으며 이 이외에는 피부 epidermis basal layer의 keratinocyte cytosol에서 특이적으로 염색되었음 (그림 4). 폐의 상피세포 cilia는 상피세포의 마지막 분화과정에서 생긴 산물이며 이곳에 특이적으로 염색된 것은 LLC1이 분화의 마지막단계에서 발현하는 단백질 즉 분화의 표지자일 가능성을 시사하는 것이라 하겠다. 폐의 상피세포가 분화하는 것은 이미 태아기때 시작하는데 이를 관찰하기 위해 여러 가지 폐 발달단계가 있는 tissue array를 이용한 조직면역화학염색에서 이미 14-16주에 폐 상피세포에 cilia가 관찰되었으며 동시에 LLC1의 발현이 관찰되었음 (그림 5). foxj1 유전자는 cilia의 형성에 중요한 역할을 하며 foxj1이 결핍된 knockout mouse에서는 폐와 salpinx의 cilia가 형성되지 않는다는 것이 잘 알려져 있음 (Brody et al., 2000). foxj1에 GFP가 fusion되어 발현하도록 한 생쥐실험에서 일단 cilia가 형성되면 세포가 분열하지 않는다는 것이 보고되었는데 (Rawlins et al., 2007), 이러한 결과도 LLC1이 분화과정의 산물일 가능성을 시사한다고 할 수 있음.

Foxj1의 null mouse는 cilia형성이 없는 것 이외에 randomized left-right asymmetry를 보였음 (Brody et al., 2000). 이는 foxj1이 cell migration에 관여할 것이라는 것을 시사한다 하겠음. 비록 LLC1을 과발현한 비소세포폐암세포주에서 세포의 이동에 어떠한 영향을 준다는 결과를 얻지는 못했지만 (그림 12), LLC1의 knockout mouse에서 foxj1 null mouse에서와 같이 randomized left-right asymmetry를 보일 가능성을 배제할 수는 없음. 왜냐하면 이러한 태아기때 cell migration이 cilia의 형성과 관련이 있을 가능성이 있기 때문임. 그러한 의미에서 LLC1 knockout mouse에서의 phenotype관찰이 과연 foxj1에서와 마찬가지의 left-right asymmetry phenotype을 보일지 여부에 관한 결과를 주목할 필요가 있음. 현재 LLC1 knockout mouse는 암 수 chimera를 확보하여 breeding 중이며 이후의 연구에서 LLC1 knockout phenotype에 관한 결과가 나올 수 있을 것으로 기대됨.

또한 LLC1의 발현이 cilia이외에 피부의 epidermis basal layer의 keratinocyte에서 일어나는데, 이는 cytosol에서 발현되어 cilia에서의 기능이외에 또다른 기능이 있을 가능성을 시사하는 것임. 본 연구자들은 이러한 가능성을 두고 여러 가지 피부질환에서 LLC1의 발현양상을 비교하는 연구를 계획중이며 keratinocyte의 air-lift culture를 통한 LLC1의 induction에 관한 연구를 같이 진행중에 있음.

본 연구로 인해 LLC1이 비소세포폐암의 형성과정에서 promoter methylation등의 inactivation과정에 의해 발현이 현저히 감소되거나 발현되지 않는다는 것을 알게 되었고, LLC1이 정상적인 폐 상피세포와 salpinx 상피세포의 cilia에 특이적으로 발현되는 것으로 보아 분화과정의 마지막단계에 관여하는 분화표지자 단백질로서 cilia의 기능에 관여할 것으로 여겨짐. 또한 피부의 epidermis basal layer의 keratinocyte cytosol에 발현하는데 이는 LLC1이 또다른 기능을 가지고 있을 수 있다는 시사라 하겠음.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

○ 사업시작시점부터 사업종료시점까지의 연구성과(학술지 게재, 학회발표, 학위논문, 산업재산권 출원·등록, 워크샵 또는 심포지움 개최, 전시회 참가, 임상응용, 기술성과 이전, 벤처 창업 등의 실적) 기재

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(I.F.)	Vol(No)Page	구분	과제 관련성
Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer.	제1저자	Int J Cancer (4.7)	67: 378-384	국외 SCI	상
TMAP/CKAP2 is transiently phosphorylated at Thr596 specifically during early phases of mitosi	교신저자	BBRC (2.8)	submit	국외 SCI	상
Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele	교신저자	EMM (2.3)	revision	국내 SCI	상
Increased lysine N-methylation of a 23-kDa protein during hepatic regeneration	공동	EMM (2.3)	37: 155-160	국내 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 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역	과제 관련성
A new molecular method to measure the copy number of chromosomes or genes	교신	The American Society of Human Genetics	국외	중
Activation of LLC1 during human airway epithelial differentiation	교신	대한생화학분자생물학회	국내	상
Two novel recessive muations of GCH1 in a patient with dopa-responsive dystonia	교신	대한생화학분자생물학회	국내	하
The memtyhylation of 23 kDa protein in a primary hepatocyte, H4IIE, increases during cell proliferation	교신	대한생화학분자생물학회	국내	중
Generation and characterization of mouse monoclonal antibodies against TMAP/CKAP2	공동	대한생화학분자생물학회	국내	중

※지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호

발명특허	이위적 에스엔피 서열의 동시증폭을 이용한 염색체, 유전자 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피수 측정방법	홍경만외 1인	대한민국	2005-66736 (특허결정 2007. 11.28)
발명특허	T596에 인산화되어 있지 않은 생쥐 TMAP/CKAP2에 대한 단클론항체를 생산하는 Hybridoma 세포주	홍경만외 5인	대한민국	특허 준비중
발명특허	SNP array를 이용한 copy number variation 측정법	홍경만	대한민국	특허 준비중

※구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)
최신 의학용어사전	김용일등	주식회사 녹십자 (대한민국, 서울)	491	

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용
신암정복10개년계획수립	보건복지부 암정복추진연구개발사업최종보고서 (0420250)	IX 연구개발 (pp233-251) 내용정리 및 계획수립에 관여

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

○ 사업목표에 대한 달성내용 및 관련분야 기술발전에의 공헌도 등을 기술
○ 달성도(%)는 연차별목표대비 당해연도 달성도 및 최종목표대비 당해연도까지의 누적 달성도를 반드시 기입

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%) 연차	달성도(%) 최종
단클론 항체 생산, 세포사멸 세포주 연구를 통한 새로운 후보 암억제유전자 *LLC-1*의 역할 구명	1차년도	*LLC1*의 과발현에 의해 사멸하는 세포주와 그렇지 않은 세포주를 둘 이상씩 확립하고 cDNA array분석	LLC1 과발현에 의해 사멸하는 세포주와 그렇지 않은 세포주 각각 둘이상씩 확립.	30%	30%
		재조합 *LLC1*의 과발현 및 정제	재조합 단백질의 과발현과 정제 완료 후 단클론항체 생산 (Cross reaction)		
		knock-out mouse 생산을 위한 *LLC1* gDNA의 cloning과 서열 확인	knock mouse model을 만들기 위한 BAC clone의 확보와 BamHI clone 확보		
	2차년도	LLC1의 과발현에 따른 비소세포폐암 세포주에서의 세포사멸 기전연구	두가지 Adenovirus construct를 사용해서 일부 cancer cell에서 30% 정도 성장억제.	70%	65%
		LLC1의 단클론 항체생산	Western blot가능한 단클론항체 제작. 조직면역염색으로 특이도는 낮지만 LLC1이 bronchial epi. cell에서 발현한다는 RNA in situ hybridization 결과를 확인함.		
		LLC1 KnockOut mouse 생산을 위한 유전자의 transfer와 ES cell 구축	Knockout ES cell을 만들기 위한 전단계인 LLC1의 cloning을 마침		
		SAGE library 분석을 통한 후보 암유전자의 발굴	후보 유전자들에 대한 screening을 하고 있으며, 두개 유전자를 cloning하는 중임. 또한 7개 폐유래 세포주의 microarray database를 구축하였음.		
	3차년도	LLC1을 이용한 폐암조직에서의 면역조직화학염색	조직면역화학염색을 시행하여 정상적인 조직과 암조직에서 LLC1의 발현분포를 확인하였음	100%	100%
		immortalized cell	비소세포폐암세포주에서 성장억제		

		line에서의 세포증식억제 기전연구	효과가 없음을 확인하였고, 세포의 이동에도 영향이 없음을 확인함.		
		LLC1과 결합하는 단백질을 yeast two-hybrid 로 탐색	사람의 ovary와 thymus 그리고 생쥐의 embryo cDNA library에서 yeast two hybrid를 시행하였음.		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
LLC1 특이 단클론항체의 생산과 조직면역화학염색을 통한 LLC1의 발현 양상확인	LLC1의 발현이 폐 상피세포의 cilia에 발현됨을 발견하여 LLC1의 기능을 추정하는데 결정적인 역할을 함.
LLC1의 세포성장과 세포이동에 대한 연구에서 영향을 준다는 결과를 얻을 수 없었음	LLC1이 세포성장이나 이동에 관여하기보다는 폐 상피세포의 마지막 분화표지자일 가능성을 제시함.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

○ 연구종료 2년후까지 연구사업 결과로 발생할 것으로 예상되는 성과, 즉 학술지 게재, 산업재산권 등을 단계별로 다음의 양식에 의거하여 작성함. 학술지 게재는 게재 예상 학술지 명과 Impact Factor 등을 기재함

○ 연구사업의 내용이 논문이나 산업재산권과 연결되기 힘든 과제의 경우, 자유 형식으로 예상연구성과 및 활용정도를 기재하되 최대한 계량화할 것

예) DB 몇 건 구축완료. OOO 시스템 구축 및 OO사업 완료

구　　분	건　　수	비　　　　고
학술지 논문 게재	4	BBRC (2.8), EMM (2.3), Journal of Biological Chemistry (6.5), Clinical Chemistry (8.5)
산업재산권 등록	4	1. SNP array를 이용한 copy number variation 측정법 (국내 국제특허 예정) 2. 태아기 염색체 이상 스크리닝을 위한 aSNP kit (국내 국제 특허 예정) 3. Monoclonal antibody against LLC1 (국내특허) 4. T596에인산화되어 있지 않은 생쥐 TMAP/CKAP2에 대한 단클론항체를 생산하는 Hybridoma 세포주 (국내특허)
기　　타		LLC1 knockout mosue의 암 수 chimera 확립

(2) 연구성과의 활용계획

○ 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위 등을 구체적(특히 시간적 구체성, 예를 들어 몇 년 안에 치료기술 실용화 등)으로 기술하되, 참여기업이 포함되어 있는 과제의 경우 기업과 연계한 활용방안에 대해서도 기술함

○ 추가연구의 필요성에 대해서도 간략하게 기술함

1. LLC1의 단클론 항체를 이용하여 여러 가지 피부질환에서 발현양상의 변화에 따른 진단제로 활용예정.

2. LLC1 knockout mouse를 확립하여 phenotype을 관찰하고 발암과의 관련성과 cilia에 이상이 있는 질환등의 연구에 활용.

6. 참고문헌

Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000 Jul;23(1):45-51.

Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL.Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage.Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jan 9;104(2):410-7. Epub 2006 Dec 28.

Hong KM, Yang SH, Chowdhuri SR, Player A, Hames M, Fukuoka J, Meerzaman D, Dracheva T, Sun Z, Yang P, Jen J. Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer. Int J Cancer. 2007 Jun 1;120(11):2353-8.

Hibi K, Liu Q, Beaudry GA, Madden SL, Westra WH, Wehage SL, Yang SC, Heitmiller RF, Bertelsen AH, Sidransky D, Jen J. Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. Cancer Res. 1998 Dec 15;58(24):5690-4.

Hong KM, Yang SH, Guo M, Herman JG, Jen J. Semiautomatic detection of DNA methylation at CpG islands.Biotechniques. 2005 Mar;38(3):354, 356, 358.

Hong KU, Park YS, Seong YS, Kang D, Bae CD, Park J. Functional importance of the anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated degradation of TMAP/CKAP2 in regulation of spindle function and cytokinesis. Mol Cell Biol. 2007 May;27(10):3667-81. Epub 2007 Mar 5.

7. 첨부서류

○ 본 연구사업의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함

1. 논문: Hong KM, Yang SH, Chowdhuri SR, Player A, Hames M, Fukuoka J, Meerzaman D, Dracheva T, Sun Z, Yang P, Jen J. Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer. Int J Cancer. 2007 Jun 1;120(11):2353-8.

2. 논문: Choi YB, Ko MH, Shin CH, Kim KS, Hong KM, Paik MK, Park DE.Increased lysine N-methylation of a 23-kDa protein during hepatic regeneration. Exp Mol Med. 2005 Jun 30;37(3):155-60.

3. 논문: Kyung-Uk Hong, Yong-Bock Choi, Jung-Hwa Lee, Joobae Park, Chang-Dae Bae, Kyeong-Man Hong. Phosphorylation of TMAP/CKAP2 at T596 during metaphase and it's dephosphorylation during anaphase/telophase BBRC 투고중

4. 논문: Yo-Sik Kim, Yong-Bock Choi, Jeong-Hwa Lee, Sei-Hoon Yang, Ji-Hyun Cho, Chang-Ho Shin, Sang-Do Lee, Moon-Kee Paik, Kyeong-Man Hong. Predisposition of genetic disease by modestly decreased expression of GCH1 mutant allele Exp Mol Med Revision

5. 특허결정 통지서: 이위적 에스엔피 서열의 동시증폭을 이용한 염색체, 유전자 혹은 특정 뉴클레오티드 서열의 카피수 측정방법

6. 보고서: 신암정복10개년계획수립 표지

7. 저서: 최신 의학용어사전 표지