

### 기관고유연구사업 최종보고서

#### 편집순서 1 : 결표지 (앞면)

(과제번호 : 1110060 )

연구과제명 : TMEM39 유전자의 세포 주기 및 증식에서 역할 규명

Functional analysis of TMEM39 in the cell cycle and proliferation

과제책임자 : 심 재 갈

## 국 립 암 셴 터

#### 편집순서 1 : 결표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

	↑ 5cm ↓
	과 제 명
<p>1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.</p> <p>2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.</p> <p>(14 pont, 고딕체)</p>	국 립 암 셴 터
↑ 6cm ↓	↑ 3cm ↓

편집순서 2 : 제출문

# 제 출 문

# 목 차

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “TMEM39 유전자의 세포 주기 및 증식에  
서 역할 규명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 12. 14

국립암센터

과 제 책 임 자 : 심재갈

연 구 원 : 조성관

” : 최정화

” : 이기호

< 요약 문 > ----- 1

(한글)

(영문)

1. 연구의 최종목표 ----- 5

2. 연구의 내용 및 결과 ----- 5

3. 연구결과 고찰 및 결론 ----- 20

4. 연구성과 및 목표달성도 ----- 22

5. 연구결과의 활용계획 ----- 24

6. 참고문헌 ----- 25

7. 첨부서류 ----- 27

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함  
(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

연구분야(코드)	T1		과제번호	1110060
과제명	TMEM39 유전자의 세포 주기 및 증식에서 역할 규명			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 1월 1일 ~ 2011년 1월 1일	210,000	
	1차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일	110,000	
	2차년도	2012년 1월 1일 ~ 2012년 12월 31일	100,000	
과제책임자	성명	심재갈		
	소속	비교생명의학연구소		
색인단어	국문	TMEM39, 세포 주기, 증식, 핵공, 예쁜꼬마선충		
	영문	TMEM39, Cell cycle, Proliferation, NPC, <i>C. elegans</i>		
<p><b>◆ 연구목표</b>                  &lt;최종목표&gt;                  TMEM39의 세포 주기, 증식 및 개체 발생에서의 기능을 규명하고 새로운 표적 가능성 확인</p> <p>&lt;당해년도 목표&gt;                  TMEM39와 NPC와의 상호작용 규명                  - TMEM39와 NPC의 SEC13과의 생화학적 작용 관계 규명                  - TMEM39와 NPC의 SEC13과의 유전학적 작용 관계 규명</p>				
<p><b>◆ 연구내용 및 방법</b></p> <p>- TMEM39A의 발현을 확인한 결과, 유방암에서 높게 나타남.</p> <p>1) Human protein atlas등의 database의 검색을 통해 <i>TMEM39A</i>의 발현이 많은 암종을 찾음. 주로 유방암과 전립선암 등에서 발현이 증가된 것으로 확인됨.</p> <p>2) 유방암 환자에서 정상 조직과 암 조직에서의 실제 TMEM39A 발현 정도를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하여 mRNA 발현 정도를 비교함: 그 결과 암 조직에서 과발현을 확인함.</p> <p>3) ER+와 ER-인 몇 가지 유방암 세포 주에서도 RT-PCR을 수행함: ER-세포에서 발현 높음.</p> <p>- TMEM39의 발현 규명: 선충에서 <i>suro-2/TMEM39</i>는 대부분의 세포에서 발현됨.</p> <p>1) 선충에서 TMEM-39의 발현을 규명하기 위해, <i>suro-2/TMEM-39</i> promoter와 GFP를 이용하여 발현을 관찰: hypodermis를 비롯한 대부분의 세포에서 발현된다는 것을 확인하였음.</p> <p>2) 선충에서 TMEM-39와 GFP를 이용한 여러 Reporter gene construct를 제작하여 형질전환 선충을 제작함 : 그 결과 TMEM39의 발현이 세포질에서 넓게 발현되는 것을 확인함.</p> <p>3) TMEM39A에 대한 항체를 구입하여 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서 세포 주기에 따른 면역화학염색을 통해 TMEM39A의 발현을 관찰함: TMEM39A는 세포 주기에 따라 동적인 발현 변화를 보임.</p>				

<p>-TMEM39 mutant 표현형 분석: 초기 배발생의 문제와 collagen 분비의 문제가 발견됨.</p> <p>1) 선충에서 TMEM-39의 돌연변이 개체인 <i>suro-2</i> mutant에서 초기 배발생의 문제점을 파악하기 위해, 630x 배율의 고해상도 간섭차 현미경에서 세포 분열의 양상을 비교 관찰함.</p> <p>2) 선충 초기 배에서 세포 분열의 문제점을 자세히 파악하기 위해 <i>suro-2</i> mutant에서 histone-2B::GFP (H2B::GFP)를 관찰함: 그 결과 aneuploidy가 생기는 것을 확인함.</p> <p>3) TMEM-39의 cuticle formation에서의 기능을 확인하기 위해, <i>suro-2</i> mutant에서 ROL-6::GFP와 COL-19::GFP의 발현 변화를 관찰함: collagen 분비가 심각하게 영향을 받음.</p> <p>-SURO-2/TMEM39A와 NPP-20/SEC13의 관련성: 동일 complex에 존재하며 기능이 유사함.</p> <p>1) <i>suro-2</i>와 상호작용할 것으로 예상되는 유전자는 SEC13의 상동체인 <i>npp-20</i> RNAi를 수행함: Rol phenotype을 suppression하는 것을 관찰하였음.</p> <p>2) TMEM39A 항체로 IP를 수행하였음: SEC13이 같은 complex에 존재하는 것을 확인함.</p> <p>3) SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 동시 발현하는 선충에서 각각의 유전자에 대한 RNAi 수행: SURO-2와 NPP-20 두 단백질의 발현은 서로에게 의존적임을 확인함.</p>																			
<p><b>◆ 연구성과</b></p> <p>-정량적 성과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치<sup>1)</sup></th> <th>달성도(%)</th> <th>비고</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>4/4</td> <td>100</td> <td></td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>14.2/16</td> <td>88.8</td> <td>최종 마무리 논문 투고 예정</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td colspan="3">학회발표 3건</td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값                  * 내년에 최종 논문을 투고하여 앞으로 2년 내에 목표치를 초과할 것임.                  * 발표한 논문 목록                  PLoS one(교신저자, IF=4.1)                  Biochemical Pharmacology(제1저자, IF=4.8)                  Febs letters(교신저자, IF=3.6)                  Oncology Report(제1저자, IF=1.7)</p> <p>-정성적 성과</p> <p>최초로 TMEM39의 기능을 선충을 이용해 밝힘: 선충의 TMEM39 homolog인 <i>suro-2</i> 유전자를 클로닝하였고, mutant의 분석을 결과로 <i>suro-2</i>가 배발생과 대단위 단백질 분비에 중요한 역할을 한다는 것을 규명하고 있음. 이 내용은 내년에 논문을 준비하여 투고할 것임.</p>				구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)	비고	SCI 논문 편수	4/4	100		IF 합	14.2/16	88.8	최종 마무리 논문 투고 예정	기타 성과	학회발표 3건		
구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)	비고																
SCI 논문 편수	4/4	100																	
IF 합	14.2/16	88.8	최종 마무리 논문 투고 예정																
기타 성과	학회발표 3건																		
<p><b>◆ 참여연구원</b> (최종연도 참여인원)</p>	성명	심재갈, 이기호, 조성관, 최정화																	

\* 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

편집순서 5 : 요약문 (영문)

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Functional analysis of TMEM39 in the cell cycle and proliferation
<b>Key Words</b>	TMEM39, cell cycle, cell proliferation, NPC, <i>C. elegans</i>
<b>Project Leader</b>	Jaegal Shim
<b>Associated Company</b>	
<p>Our purpose is to elucidate functions of TMEM39 in mitosis, cell proliferation and organism development for the examination of TMEM39 as a novel cancer target.</p> <p>Background: Extracellular matrix (ECM) is important in many biological processes including cell-cell interaction, signal transduction, cell adhesions and cancer metastasis. As a major component of ECM, collagens and collagen-like proteins compose superfamilies in various species. Collagen synthesis requires eight specific post-translational enzymes, some of which are attractive targets for the development of drugs to inhibit collagen accumulation in fibrotic diseases. <i>C. elegans</i> is a powerful research model to study ECM organization because development of worm includes 4 molting processes from L1 larva to adult. We mutagenized <i>jpgIs4</i>, which expresses mutant ROL-6 collagens and shows a rolling phenotype, and screened <i>Suppressor-of-ROI (suro)</i> mutants to identify new ECM regulators. We initially identified <i>suro-1</i> mutant in the ORF R11A5.7 which encodes a putative zinc-carboxypeptidaseA (CPA). SURO-1/CPA is involved in cuticle organization and expressed in the hypodermis. The <i>suro-1</i> transcription seems to be occurred at the basal level in the intestine and hypodermis normally. However, <i>suro-1</i> is highly induced at L1/L2d molt when worms are starved. Further genetic analysis reveals that <i>suro-1</i> expression at L1/L2d molt is depended on DAF-16/FOXO transcription factor, which is involved in many important biological processes such as stress response, dauer formation, longevity and innate immunity. Next, we identified <i>suro-2</i> which is very interesting because it shows defects both in embryogenesis and in cuticle formation. The <i>suro-2</i> mutant has a nonsense mutation in D1007.5 which encodes a putative transmembrane protein39A(TMEM39A).</p>	

Methods: Our main tool is genetic analysis using *suro-2* mutant and RNAi. We made many fusion gene construct and performed microinjection to get transgenic worms. We also used mammalian cell culture system to prove that *suro-2*/TMEM39 and *npp-20*/SEC13 are in the same COPII complex. We almost used fluorescent microscopy to observe the local change of some fusion proteins. In addition, we observed the cuticle structure of the *suro-2* mutant by electron microscopy.

Results: The expression level of TMEM39A is high in several cancer cell lines, and its expression pattern seems to be highly associated with cell cycle. SEC13 and TMEM39 participate in the same COPII complex. SURO-2::GFP and NPP-20::DsRed were also co-localized in the hypodermal cells of *C. elegans*. The physical interaction and the similar knockdown phenotype of *npp-20/SEC13* and *suro-2* suggest that *TMEM39A* play critical roles in the early embryogenesis by regulating mitosis and the cuticle formation through the secretory pathway.

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

## 1. 연구의 최종목표

TMEM39의 세포 주기, 증식 및 개체 발생에서의 기능을 규명하고 새로운 표적 가능성 확인

구분	목표	내용 및 범위
1차년도 (2011)	TMEM39의 발현과 세포 주기 조절 단계 규명	- TMEM39의 세포 내에서 정확한 발현 위치와 세포 주기에서의 발현 변화를 관찰 - TMEM39의 돌연변이 개체에서의 세포 증식과 개체 발생에서의 표현형을 규명
2차년도 (2012)	TMEM39와 NPC와의 상호작용 규명	-TMEM39와 NPC의 SEC13과의 생화학적 작용 관계 규명 - TMEM39와 NPC의 SEC13과의 유전학적 작용 관계 규명

## 2. 연구의 내용 및 결과

### (1) TMEM39를 발현하는 D1007.5가 *suro-2* mutant의 원인 유전자임.

- *suro-2* mutant는 자손을 적게 낳고, 생식기 발생이 비정상적임.

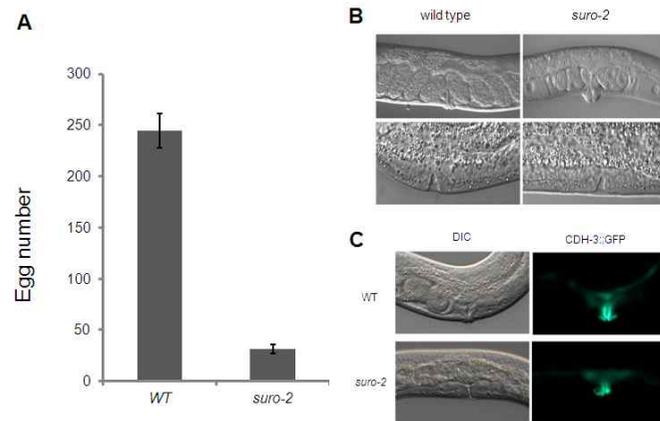


그림 1. *suro-2* mutant의 표현형 : (A) Progeny number is reduced in *suro-2*. (B) Pvl phenotype in *suro-2*. (C) Asymmetric cadherin-3 expression in *suro-2*

*suro*는 *suppressor-of-rol-6*의 돌연변이, *suro-2* mutant는 변이형 콜라겐(collagen)인 ROL-6를 발현하는 형질전환 개체의 Rol phenotype을 suppression하는 스크린에서 동정되었음. *suro-2* mutant는 특이하게도 큐티클 형성에 관여하는 phenotype이 주된 것이 아니라, 배발생(embryogenesis)에서 문제가 되거나 생식기 발생에서 문제가 됨. 그림1A는 정상 개체에 비해 *suro-2* mutant가 알을 낳는 개수가 현저

하게 줄어드는 것(250개 vs 30개)을 보여줌. 그림1B는 성체에서 생식기 발생이 이상하게 되어 성체에서 protruding vulva가 된 모습과 L4 유충에서 vulval invagination이 비대칭적으로 일어나는 것을 보여줌. 그림1C는 vulval cell marker인 cadherin(CDH-3::GFP)의 발현이 *suro-2* mutant의 생식기 오른쪽 부위 일부가 나타나지 않는 것을 보여줌. 이러한 관찰 결과는 SURO-2가 초기 배발생 단계의 세포 분열과 후기 유충 발생 단계에서 생식기를 구성하기 위한 세포 분열에 중요한 역할을 하는 것을 나타냄.

- *suro-2* mutant의 원인 유전자는 D1007.5임.

*suro-2* mutant의 원인 유전자를 규명하기 위해서, *suro-2* mutant를 CB4857 strain과 교배하여, 1600 개체의 F2에서 PCR을 이용해 SNP를 확인하는 방식으로 mapping을 진행하였음. 그 결과 최종적으로 1 번 염색체의 -1.12와 -0.9 사이에 위치하며, Physical map상으로는 194kb 정도에 영역에 위치한다는 것을 확인함(그림2A). *suro-2* mutant는 느리게 자라고 자손의 수가 너무 적기 때문에, 직접적으로 후보 fosmid를 microinjection하여 형질전환 개체를 제작하는 레스큐(rescue) 방법을 사용하기 부적합함. 대안으로 선충의 게놈 데이터베이스([www.wormbase.org](http://www.wormbase.org))에서 mapping 영역에 있는 모든 유전자를 검색하여, 그 중 12개의 후보 유전자를 선정하여 ROL-6 transgenic line인 *lgIs4*에 RNAi를 먹여 Rol phenotype을 suppression하는 유전자를 찾음. 유일하게 D1007.5 RNAi만이 *suro* phenotype을 나타내는 것을 확인하였음(그림2B).

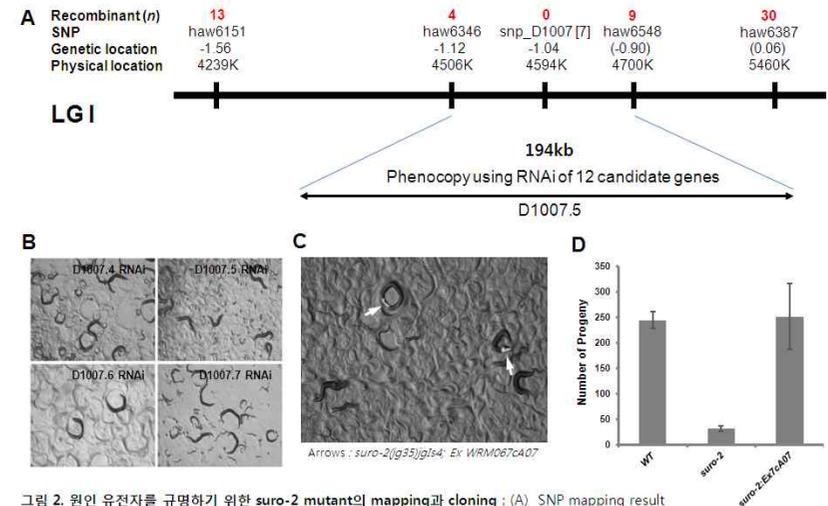


그림 2. 원인 유전자를 규명하기 위한 *suro-2* mutant의 mapping과 cloning : (A) SNP mapping result of *suro-2*. (B) RNAi phenocopy of candidate genes. (C) Rescue with a fosmid including D1007.5 ORF. (D) Progeny number is also recovered by the WRM067cA07 fosmid.

다음 단계로 D1007.5를 포함하는 fosmid인 WRM067cA07을 야생형 N2 strain에 microinjection하여 형질전환 개체를 얻고, 이 개체를 *suro-2;lgIs4*와 교배하여 최종적으로 *suro-2;lgIs4;ExWRM067cA07* 개체에서 정상적인 Rol phenotype을 관찰하였음(그림2C). 그림에서 화살표는 transgenic marker인 pCFJ90(myo-2p::mCherry)를 가리킴. 이 레스큐된 개체에서 배발생의 문제도 해결되었는지 알기 위해 자손의 수를 비교해 본 결과, 온전히 야생형의 자손 수만큼 회복된 것을 확인할 수 있었음(그림2D).

- *suro-2* mutant는 D1007.5/TMEM39에 nonsense mutation을 가지는 것으로 확인됨.

D1007.5는 인간의 transmembrane protein 39(TM39)의 상동체를 발현할 것으로 예상되며, 유전자 수준에서 직접적인 돌연변이를 확인하기 위해 *suro-2* mutant의 genomic DNA를 준비하여 DNA 염기서

**A**

```

MPFRRRVFAPPPQAPSVPASIPRASGVTLSVHP IWPDIQFTQGELEFFECT 50
LFLYSVLALFLQYLNLYKTLWVLPKSYWHYSLKFHLINPYFLSCVGLLLG 100
WRVTVCFWKTTITEVIATISANQSQFIQSSIMIVEYAAIKTPVMTLIITSF 150
LFSFNRVCHDFPSSRSLVWELFPILFYAFIFRSEIIGWLGFRFREIQKWR 200
RELEFSDVCEERLSESPPAQIDLESVLHMCSDSPAQIREEIQVLIDDLVLR 250
VKKSI FAGVSTAPFLS IMLPCI FVPFKTSQGIPIQKILINEVWECQLAIVVG 300
LTAFLSYVAYLSPLNYDLLHFAAIHLGSHWQIEGPRIGHTGSMSSAPT 350
WSEFCLYNDGETVQMPDGRGRYAKSSNSIRTVAAHPESRRHNTFFKVLRK 400
PNNLINMCSFEFLLIIFIQFWMLVLTNDWQHIVTFVLLMFANYLLFAKLF 450
KDKIILSRIVEPSQEDLLLMHQLOQER
  
```

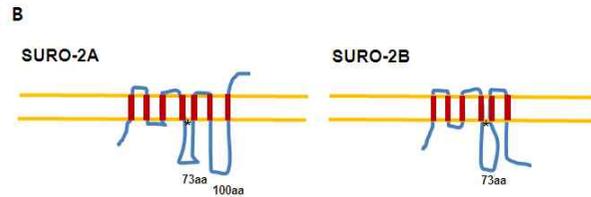


그림 3. SURO-2의 아미노산 배열과 구조 (A) Amino acid sequence of SURO-2 and W187\* mutation. (B) Alternative splicing products of *suro-2*

열을 분석하였음. 그 결과 W187이 stop codon으로 바뀐 것을 확인할 수 있었음(그림3A). SURO-2는 여러 개의 transmembrane(TM) domain을 가지는 것으로 예상되는데, 선충에서 *suro-2*는 alternative splicing에 의해 두 개의 유전자 산물을 발현함. 편의상 *suro-2a*와 *suro-2b*로 명명하였는데, SURO-2A는 8개의 TM을 SURO-2B는 6개의 TM을 가지는 것으로 예측됨.

진화적으로 흥미로운 사실은 TMEM39가 단세포인 효모에는 존재하지 않고, 다세포 동물에만 존재한다는 점임. 무척추 동물인 선충에는 유일하게 하나의 TMEM39인 SURO-2가 존재하고, 척추동물인 제브라피쉬부터 TMEM39A와 TMEM39B 두 개가 존재함. SURO-2는 인간의 TMEM39A와 TMEM39B 각 단백질에 대해 27%의 아미노산 배열의 동질성(identity)을 가짐. TMEM39A와 TMEM39B는 아미노산 배열에서 52%의 동질성을 가짐. 이러한 점에서 *TMEM39* 유전자는 다세포 동물에 특화된 역할을 수행하고, 복잡한 고등동물에서 필요성이 증대되어 유전자가 duplication된 것임을 추측할 수 있음.

## (2) TMEM39A의 암에서 과발현되어 있음

- TMEM39A의 발현이 유방암 환자 조직에서 높음

SURO-2가 특히 선충의 초기 embryogenesis에 필요하다는 것은 암세포의 빠른 증식에도 필요할 가능성이 높다고 생각됨. The Human Protein Atlas Project (<http://www.proteinatlas.org/>)에서 TMEM39A와 TMEM39B의 발현을 찾아본 결과 TMEM39A의 발현이 정상세포에 비해 유방암, 전립선암, 폐암 세포에서 높다는 것을 알 수 있었음. 실제로 TMEM39A의 발현이 암세포에서 높은지 알기 위해 유방암 환자의 정상 조직과 암 조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였음.

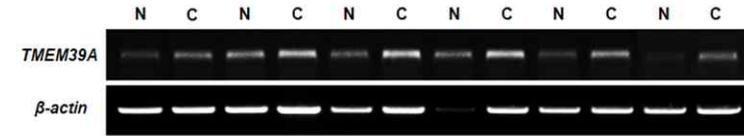


그림 4. 유방암 환자 조직 샘플에서 TMEM39A의 발현: 정상(N)과 암(C) 조직에서 mRNA의 발현 비교

그림4는 RT-PCR 결과를 보여주는 것으로, *TMEM39A*의 mRNA 발현이 대부분의 유방암 조직에서 높다는 것을 확인하였음.

- 유방암 세포 주에서 TMEM39A의 발현은 세포 주기에 따라 동적으로 변화됨.

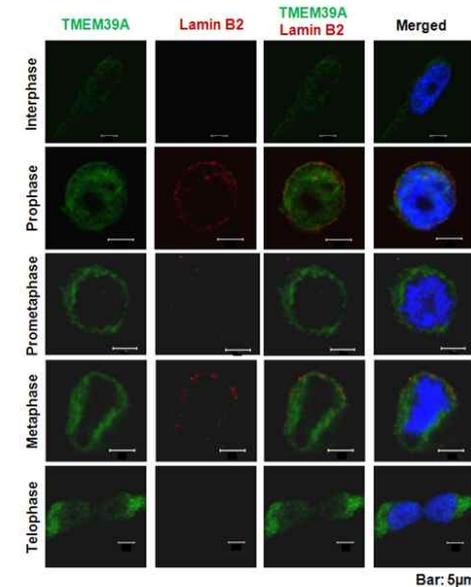


그림 5. 유방암 세포주(MDA-MB-231)에서 세포분열 각 단계별 TMEM39A의 발현: TMEM39A의 발현은 mitosis와 밀접한 연관관계를 가짐

TMEM39A에 대한 세포 주기에 따른 발현 양상을 알아보기 위해, TMEM39A에 대한 항체를 이용하여 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서 면역염색을 수행함. TMEM39A와 핵막에 위치하는 Lamin2에 대한 항체를 이용한 동시 염색의 결과, TMEM39A는 세포 간기(Interphase)에는 세포질(Cytoplasm)과 핵 안에 존재하나, Mitosis가 시작되는 전기(Prophase)에는 핵 안에만 존재하며, 일부는 Lamin2와 동시에 존재함. Prometaphase와 중기(Metaphase)에는 염색체를 둘러싸고 있는 형태이며, 말기(Telophase)에는 분리되는 두 염색체 군을 둘러싼 채로 이동함(그림5). TMEM39A의 유방암 조직에서의 높은 발현과 세포분열에 따른 특이적 발현 변화의 관찰 결과로 TMEM39A가 암 세포의 분열에 중

요한 기능을 수행할 것으로 예상됨.

### (3) 선충에서 SURO-2/TMEM39A는 배발생과 collagen 분비에 중요함.

- 선충의 배발생 과정에서 SURO-2/TMEM39A는 염색체 응축과 분리에 역할을 함.

*suro-2* mutant에서 나타나는 초기 배발생의 문제는 간섭차(DIC) 현미경으로 관찰한 결과, 대부분 세포질 분리(cytokinesis)가 잘 이루어지지 않아, 한 세포질 내에 여러 개의 핵이 존재함. 세포 분열의 연구는 한 가지 문제가 발생하면, 계속해서 다른 문제점이 생겨서 분석하기 어려운 점이 있음. 따라서 분자표지자를 이용한 분석 방법이 필요하여, H2B::GFP(histone 2B::GFP)를 발현하는 RW10006과 *suro-2* mutant를 교배하여 *suro-2;RW10006* strain을 제작하였음. 그림6에서 정상 개체의 embryo의 경우 2세포기에서 4세포기로 넘어가는 과정에서 두 세포의 분열이 약간의 시차를 두면서 일어나며, 그 과정에서 먼저 상동 염색체가 응축(condensation)되었다가 후기로 가면서 분리되는 과정과 세포질 분리 후 응축된 염색체가 풀리는 것이 잘 관찰됨. 이와 달리 *suro-2* mutant에서는 상동 염색체의 응축과 분리가 제대로 일어나지 않으며, 세포질의 분리도 잘 일어나지 않아, 염색질이 조각나거나 한 핵 안에서 염색체 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있음. 앞서 관찰한 유방암 세포주에서 TMEM39A의 발현이 세포 분열기에 염색체와 움직임을 같이 하는 것과 연관지어 생각해 보면, TMEM39A의 기능이 세포 분열 과정에서 염색체의 응축에 우선적으로 기능할 것으로 판단됨.

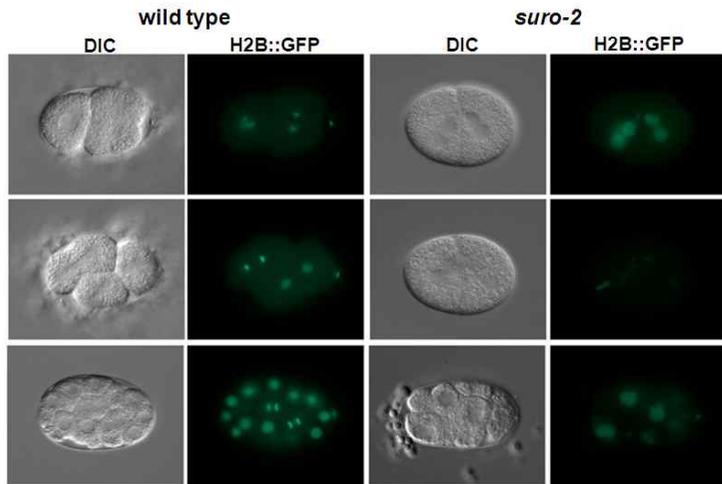


그림 6. *suro-2* mutant에서 초기 배발생의 세포 분열이 비정상적으로 일어남: H2B::GFP를 발현하는 RW10006 선충의 초기 배아를 관찰한 결과, *suro-2* mutant에서는 aneuploidy가 생기고 배발생이 멈추게 되어 죽음

- SURO-2/TMEM39A는 선충에서 collagen 분비 조절을 통한 큐티클 형성 중요함.

SURO-2의 역할이 초기 배발생의 세포 분열에서 가장 잘 나타나지만, *suro-2* mutant는 Rol suppressor

screen에서 찾아진 것이므로, 선충의 큐티클(cuticle) 형성과 조절에 밀접한 관련성이 있을 것으로 예상된다. 선충에서 큐티클은 외부의 환경적 스트레스로부터 선충을 보호하는 역할을 하며, 선충 발생 단계에서 4차례의 허를 벗는 과정(molting)이 존재하여 매 유충 단계에서 재조직(reorganization)됨. 또한 매우 복잡한 구조를 가진 큐티클 층은 선충에서 가장 외곽에 존재하는 epithelial cell로 구성된 hypodermis와 맞닿아 있음. 이러한 구조적 특성은 epithelial cancer의 발생과정에서 cancer cell의 성장과 extracellular matrix(ECM)의 관계 모델이 될 수 있음. 이러한 관점에서 SURO-2/TMEM39A의 cuticle 형성에서의 역할을 규명하고자 함. *suro-2* mutant에서는 간섭차 현미경의 관찰만으로도 큐티클 표면의 뚜렷한 변화를 확인할 수 있었으나, 보다 정확한 분석을 위해 cuticle을 구성하는 collagen의 GFP 리포터 유전자의 발현을 비교 관찰하였음.

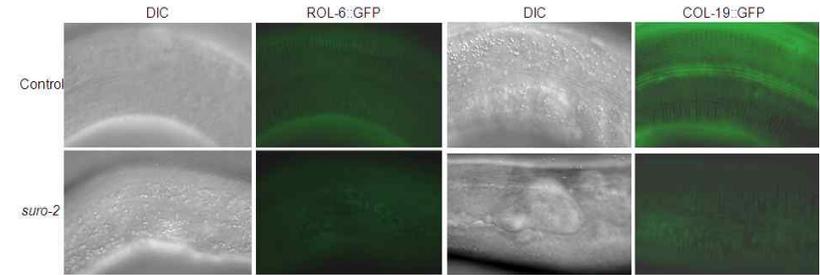


그림 7. *suro-2* mutant에서 collagen 분비가 제대로 되지 않음: ROL-6::GFP와 COL-19::GFP의 발현은 정상적으로 cuticle에서 규칙적인 선 모양으로 배열되나, *suro-2* mutant에서는 ROL-6::GFP와 COL-19::GFP의 cuticle에서 발현이 급격하고, 그 배열이 불규칙적으로 됨.

그림7에서 ROL-6는 type IV collagen으로 선충의 성체 큐티클 4개의 층 중에서 가장 외곽인 cortical layer의 furrow 부분에 발현되며, COL-19은 성체 특이적 collagen으로 ROL-6와 마찬가지로 cortical layer에서 발현되나 annulus에서 발현되는 차이가 있음. 왼쪽의 그림은 정상 개체와 *suro-2* mutant에서 ROL-6::GFP의 발현을 본 것으로, 정상 개체에서는 몸통을 가로지르는 alae를 중심으로 ROL-6::GFP가 직각을 이루며 외곽으로 선 모양으로 뻗어 나가는 모습임. 하지만, *suro-2* mutant에서는 ROL-6::GFP의 cuticle 발현이 줄어들고, 규칙적인 배열을 관찰할 수 없었음. COL-19::GFP의 발현도 정상 개체에서는 alae를 중심으로 직각의 선을 이루는 규칙적인 발현 양상을 보이나, *suro-2* mutant에서는 COL-19::GFP의 cuticle에서의 발현이 감소하고, 배열이 일정하지 않게 나타남. 간섭차(DIC) 현미경 사진에서 보는 것처럼, *suro-2* mutant에서는 alae를 관찰할 수 없음. 따라서 SURO-2/TMEM39A는 선충의 큐티클 형성에서 alae를 만들고, 규칙적인 콜라겐의 배열에 중요한 기능을 수행함을 확인하였음.

Cuticle에서 Collagen의 배열이 이상해진다는 것은 collagen 분비가 감소한 것과는 다른 문제로 생각되어, collagen을 분해하는데 관여할 것으로 생각되는 SURO-1/CPA(a zinc carboxypeptidase A)의 발현을 비교해 보았음. SURO-1은 본 실험실에서 선충의 cuticle formation에 관여하는 첫 번째 mutant로 찾아진 것임[Kim et al., Febs letters 2011]. SURO-1의 발현은 정상 상태에서 거의 관찰되지 않고, 굶주린 상황에서 dauer로 전환되는 molting worm(L1/L2d)에서 강하게 발현됨. 따라서 SURO-1::DsRed를 발현하는 정상 개체와 *suro-2* mutant를 10일 정도 굶주린 배지에서 발현을 비교하였음. 그 결과 정상 개체에서는 SURO-1::DsRed가 잘 발현되어 cuticle에 위치할 반면, *suro-2* mutant에서는 거의 SURO-1::DsRed 발현을 관찰할 수가 없었음(그림 8). 이러한 결과는 SURO-2가 collagen 뿐만 아니라,

collagen을 분해하는 효소의 분비에도 중요한 역할을 한다는 것임.

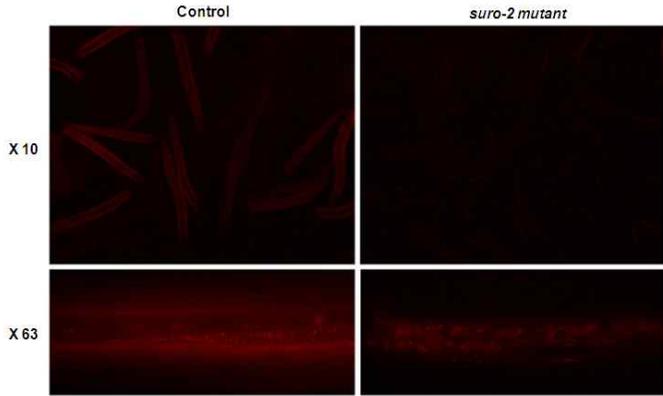


그림 8. *suro-2* mutant에서 SURO-1/CPA의 분비가 제대로 되지 않음: SURO-1, a zinc carboxypeptidase A homolog는 굼주린 상황에서 dauer가 되기 직전 잘 발현되어 cuticle로 분비됨. SURO-1::DsRed의 발현은 정상적으로 cuticle에서 규칙적인 선 모양으로 배열되나, *suro-2* mutant에서는 SURO-1::DsRed의 cuticle 발현이 거의 이루어지지 않음. 10일을 굼진 조건에서 사진을 찍음.

(4) SURO-2/TMEM39는 대부분의 세포들에서 발현되며 주로 세포질에 위치함

앞서 암세포에서 TMEM39A의 발현을 확인하였으나, 정상 개체에서 TMEM39의 발현이 어떻게 되는지 알기 위해, *suro-2* 유전자의 promoter를 이용한 GFP 발현을 관찰하였음.

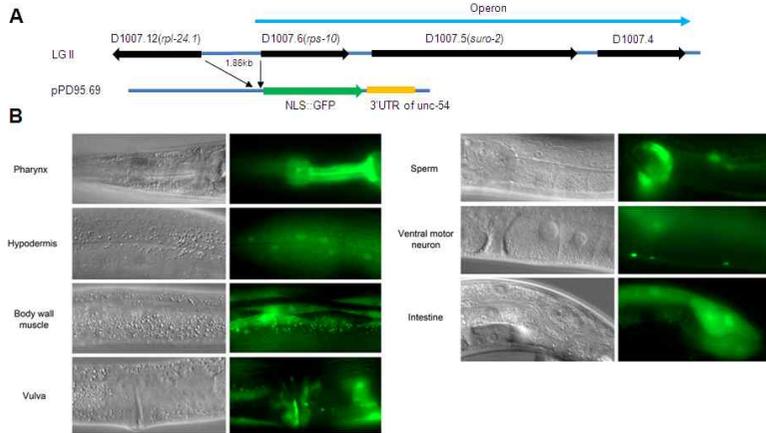


그림 9. *suro-2* 유전자의 개체 수준에서의 발현: (A) *suro-2p::NLS::GFP* construct의 제작과 구조. (B) *suro-2* promoter에 의해 발현되는 GFP는 선충의 대부분의 세포에서 발현되는 것을 확인함.

*suro-2* 유전자의 ORF는 3개의 유전자 오페론(operon)의 가운데 위치하므로, genomic DNA 상에 위치하는 promoter를 찾기 위해 여러 부분을 cloning하여 발현을 살펴 본 결과, *rps-10*의 앞 쪽 부위만 유전자 발현을 유도할 수 있었음. 그림 9에서처럼, *suro-2p::NLS::GFP*는 선충에서 pharynx, hypodermis,

muscle, vulva, sperm, intestine과 일부 neuronal cell에서 발현됨을 관찰하였음.

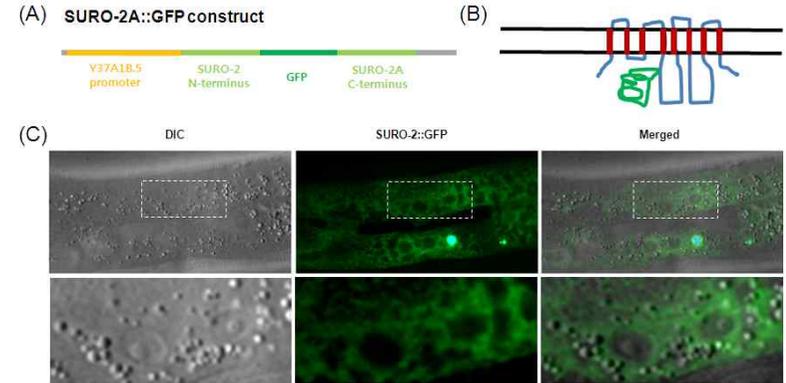


그림 10. SURO-2 단백질의 hypodermal cell 내에서의 발현: (A) SURO-2::GFP construct의 제작과 구조. (B) SURO-2::GFP의 막에서의 2차 구조 예상. (C) SURO-2::GFP는 세포의 핵 주변에서 세포질로 퍼져서 발현됨.

다음으로 SURO-2의 세포 내 발현 위치는 어디인가를 알기 위해, GFP를 *suro-2* 유전자의 전체 coding region과 결합하여 hypodermis에 특이적으로 발현하는 Y37A1B.5 유전자의 promoter를 이용하여 발현시켰음. 이를 위해, GFP를 SURO-2의 N-terminus에 결합시키거나, C-terminus에 결합시키는 등의 여러 플라스미드를 제작하였음. 결국, 그림 10에서처럼, GFP를 SURO-2 coding region의 가운데 부위에 결합시킨 플라스미드 2종류 중, 한 종류에서 SURO-2::GFP의 발현을 관찰할 수 있었음. SURO-2::GFP는 hypodermal cell의 핵 주위에서 세포질로 퍼져 보이나, 전체에 고르게 퍼져 있지는 않았음.

(5) NPP-20/SEC13과 SURO-2/TMEM39A의 기능적 연관성을 가짐

- NPP-20/SEC13는 핵막과 세포질에 발현되면, Golgi에는 거의 발현되지 않음.

SURO-2/TMEM39A의 기능을 규명하기 위해서는 다른 단백질과의 관계를 확인하는 것이 필요하나, 기존의 TMEM39A에 대한 기능적 연구가 전혀 없어 단서를 찾기가 어려움. 유일하게 선충에서 대규모 Yeast two-hybrid screening의 결과로 SURO-2와 SEC13의 상동체인 NPP-20가 직접적인 상호작용을 한다는 것을 발견할 수 있었음. *npp-20*의 RNAi 결과들을 보면, *suro-2* mutant와 유사한 점이 많아 SURO-2와 NPP-20의 상호작용 가능성이 높음. 선충에서 SURO-2와 NPP-20의 기능적인 연관성을 규명하기 위해, 우선적으로 GFP::NPP-20를 Intestine과 Hypodermis에서 강하게 발현하는 유전자인 *umpk-1*의 promoter를 이용하여 발현 시켜 보았음.

그림11에서 SEC13은 COPII의 구성단백질로 secretory pathway에서 주로 연구되었고, 이후 nucleopore

complex의 구성단백질이 밝혀져 세포 분열에서 nuclear envelope의 reassembly에 기능한다고 보고됨. 선충에서 NPP-20::GFP의 발현은 오른쪽 그림과 같이 Intestine의 핵 외곽에서 가장 잘 발현되고, 세포

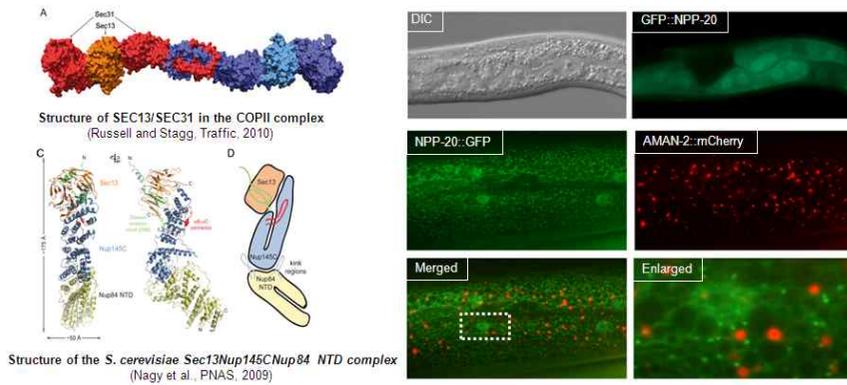


그림 11. NPP-20/SEC13의 세포 내에서의 발현 위치: NPP-20::GFP의 intestine에서 발현(우상 2개의 그림)과 hypodermis에서 발현(우하 4개의 그림) 질에 퍼져 있는 것으로 확인됨. 이러한 선충에서 NPP-20의 발현은 예상과 일치하며, 앞서 확인한 간기의 유방암 세포주에서 TMEM39A의 발현과 유사함을 확인함.

추가적으로 NPP-20의 hypodermis에서 발현 위치를 알기 위해, Golgi marker인 TGN38의 리포터 유전자 발현 플라스미드(AMAN-2::mCherry)와 NPP-20::GFP를 선충의 hypodermis에서 동시 발현시켰음. 그 결과 대부분의 mCherry와 GFP가 겹치지 않고, 극히 일부에서 겹치는 것으로 보아, NPP-20는 Golgi에 있지 않고, COPII의 component이므로 ER 또는 ER과 ERGIC 사이에 위치할 가능성이 큼. 현재는 hypodermis에서 발현하는 ER marker::mCherry 플라스미드를 제작하였고, 가까운 시일 안에 NPP-20::GFP가 ER과 겹치는지를 확인할 것임.

- RNAi를 이용한 *npp-20* 발현 억제 결과 *suro-2* mutant와 유사한 결과를 보임.

SURO-2/TMEM39A와 NPP-20/SEC13의 연관성을 기능적으로 확인하기 위해 *npp-20* RNAi 실험을 수행하였음. 그림12A에서는 *jpgIs4* strain에 *npp-20* RNAi를 수행하여 *npp-20*의 발현 억제가 *suro-2* mutant와 유사하게 *jpgIs4*의 Rol phenotype을 suppression하는 것과 형태적으로도 유사하게 일부 Dpy가 되는 것을 확인하였음. 그림12B는 H2B::GFP를 발현하는 RW10006 strain에 *npp-20* RNAi를 수행한 결과임. 그 결과 세포질 분리가 안 되어 여러 개의 핵을 가지는 polyploidy가 형성되는 것을 관찰할 수 있었음. 그림12C에서는 야생형과 *suro-2* mutant, *npp-20* RNAi한 것을 비교한 것임. *suro-2* mutant와 *npp-20* RNAi의 결과 polyploidy가 형성되는 점에서 유사하나, *npp-20* RNAi 효과가 보다 심각하게 나타남. 이들 결과에서 *npp-20*와 *suro-2*가 선충의 초기 발생과 cuticle 형성에서 같은 경로에서 작용할 가능성이 높다는 것을 알 수 있음.

#### (6) NPP-20/SEC13과 SURO-2/TMEM39A의 물리적 유전학 상호작용을 탐

- SEC13과 TMEM39A가 동일 complex에 존재하는 것을 확인됨.

NPP-20/SEC13과 SURO-2/TMEM39의 기능이 유사한 결과로 짐작해 보면, SEC13이 ER-to-Golgi(정확하게는 ERGIC; ER to Golgi intermediate compartment)로의 vesicle 이동에 관여하는 COPII의

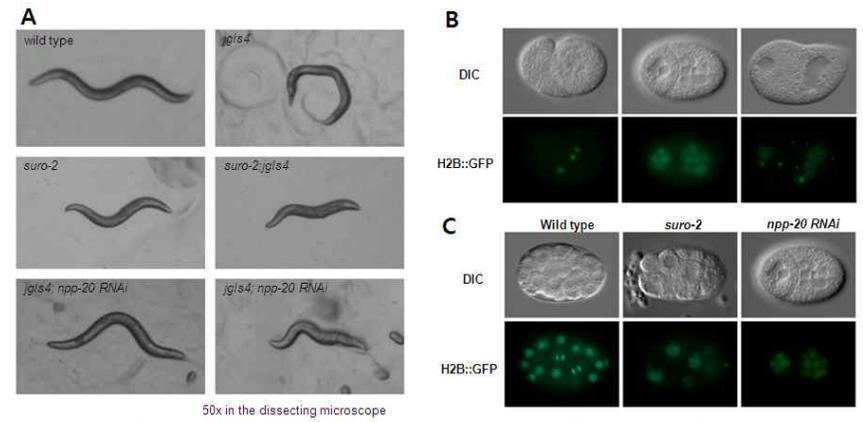


그림 12. *npp-20* RNAi에 의한 결과: (A) Rol suppression by *npp-20* RNAi. (B) Embryos of *npp-20* RNAi treated worms. (C) Comparison of embryos from the wild-type, *suro-2* mutant and *npp-20* RNAi treated worms subunit이므로, SURO-2도 마찬가지로 COPII의 한 subunit으로 참여할 가능성이 높음. 따라서 이를 확인하기 위해 A549 암 세포주에서 TMEM39A 항체를 이용해 면역침전(Immunoprecipitation, IP)을 실시하고, SEC13 항체를 이용해 Western Blot 실험을 수행하였음.

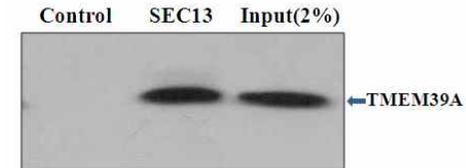


그림 13. A549 cell에서 SEC13과 TMEM39A의 동일한 복합체에 존재함: SEC13 항체를 이용해 면역침전을 한 결과임

그 결과, SEC13과 TMEM39A는 동일한 complex에 존재한다는 것을 확인하였음. TMEM39A 항체로 IP를 했을 때, SEC13 밴드도 확인되었지만, 데이터가 깨끗하지 않아서 현 결과 보고서에는 제외하였고, 추가적 실험을 통해 데이터화할 것임.

- 선충의 hypodermal cell 내부에서 SURO-2와 NPP-20의 co-localization이 확인됨.

앞의 IP 실험결과를 선충에서도 확인하기 위해, SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 hypodermis에 동시 발현시켜 보았음. 그림 14A에서, DsRed가 강하게 묻히는 경향이 있어 NPP-20::GFP와 같은 모양이 나오지 않았음. 하지만, NPP-20::DsRed가 묻치니 SURO-2::GFP가 따라서 묻치는 것처럼 관찰되는 것으로 보아, 생체 내에서 SURO-2와 NPP-20가 강력하게 결합한다는 것을 짐작할 수 있음. 화살표는 일부 묻치지 않고, 따로 떨어져 있는 spot에서 GFP와 DsRed가 겹쳐 노랗게 보이는 것을 나타냄.

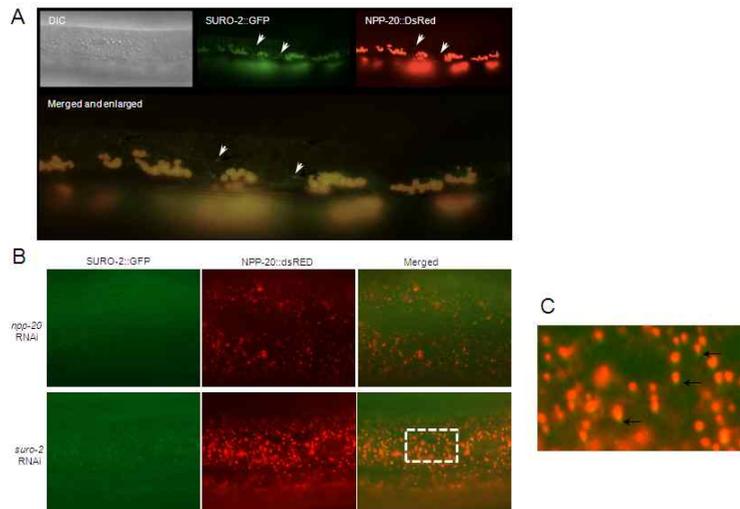


그림 14. *suro-2*와 *npp-20*의 발현은 세포 내에서 같이 위치하고 상호 의존적임: (A) SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed의 hypodermis에서의 발현. (B) SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 동시 발현하는 선충에 *npp-20* 또는 *suro-2* RNAi를 수행한 결과. (C) 왼쪽 B 그림의 흰 사각형 부분을 확대한 사진(화살표는 녹색과 붉은색이 일부만 겹치는 것을 가리킴)

- SURO-2/TMEM39와 NPP-20/SEC13의 발현이 상호 의존적임.

선충에서 SURO-2와 NPP-20가 co-localization하는데, 이 두 단백질의 발현에 대한 상호 작용이 어떠한지를 알기 위해, SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 동시 발현하는 선충에 *npp-20* RNAi 또는 *suro-2* RNAi를 처리해 보았음. *npp-20* RNAi는 전 세대(P0)에서부터 처리하면 다음 세대(F1)에서 embryonic lethality를 보여 성체에서 관찰이 불가능하므로, 어린 유충(L1-L2) 단계의 선충에 RNAi를 먹이기 시작해서 2-3일 뒤에 성체가 되었을 때 관찰하였음. 이런 영향인지 *npp-20* RNAi에 의한 NPP-20::DsRed의 발현 억제는 완벽하게 되지 않았음. 하지만 적어도 그림14A에서 보이는 아주 심각하게 뭉쳐지는 현상이 완전히 사라지고, 발현이 상당히 감소됨. 이러한 발현 감소의 영향으로 NPP-20::DsRed의 발현은 *npp-20* RNAi에 의해 그림11의 NPP-20::GFP 발현 패턴과 유사하게 나타난다. 이 경우에 놀라게도 SURO-2::GFP의 발현이 완전히 사라지는 것이 확인되었음(그림14B의 상단). 다음으로 SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 동시 발현하는 선충에 *suro-2* RNAi를 실시한 결과, 마찬가지로 *suro-2* RNAi도 SURO-2::GFP 발현을 완벽하게 억제하지는 못했지만, 상당한 정도로 감소시켰음. 이 경우 NPP-20::DsRed의 발현도 동시에 줄어드는 것으로 확인됨(그림14B의 하단 패널). 더욱 흥미로운 점은 *suro-2* RNAi에 의해 SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed co-localization도 영향을 받아 그림14C에서 보이는 것처럼, SURO-2::GFP(작은 녹색 점)와 NPP-20::DsRed(큰 적색 점)이 일부만 겹쳐 노란색 점(화살표)을 만드는 것이 관찰됨. 이러한 결과는 SURO-2와 NPP-20의 발현이 상호 의존적이고, 두 단백질의 co-localization도 서로의 발현에 의존한다는 것임.

그림14A에서 hypodermis 특이적 발현을 하는 Y37A1B.5 유전자의 promoter를 사용하였으므로, SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed의 발현이 강력한 promoter 때문에 과다하게 발현 되었고, 이로 인해 DsRed의 특성상 심각하게 뭉치는 현상이 발생함. 더불어 SURO-2와 NPP-20의 강력한 상호작용에 의

해 SURO-2::GFP도 따라서 뭉치게 됨. 또한, 그림14B에서 SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed의 발현이 어느 정도 양적인 비례를 갖는 것을 알 수 있음. 이 결과들을 토대로 세포 내 단백질 발현의 양적 측면을 고려해 보면, SURO-2의 발현에 비해 NPP-20의 발현이 상대적으로 높는데, NPP-20의 경우 SURO-2와 다른 complex의 구성이 가능할 것으로 생각됨. SEC13의 경우 nucleopore complex에도 참여하고, 선충에서도 그림11에서처럼 NPP-20::GFP가 핵막에서도 발현되므로 NPP-20의 발현이 SURO-2의 발현보다 포괄적이라 추측됨.

#### (7) Collagen 분비에 있어 SURO-2와 COPII는 유사한 기능을 수행함

SURO-2/TMEM39와 NPP-20/SEC13의 밀접한 상호작용과 각각의 기능적 관점에서 분석해 보면, NPP-20는 ER-to-ERGIC의 막이동을 담당하는 COPII의 핵심적인 요소이고, SURO-2는 collagen과 collagen 분해 효소의 분비에 관여하므로, 이들의 세포 내 기능은 ER에서 Golgi 사이의 collagen 이동에 중요한 것임. 이를 확인하기 위해, COL-19::GFP를 발현하는 선충에 *suro-2* 또는 *npp-20* RNAi를 처리하여 hypodermal cell 내부에서 COL-19::GFP의 분비 경로를 관찰하였음.

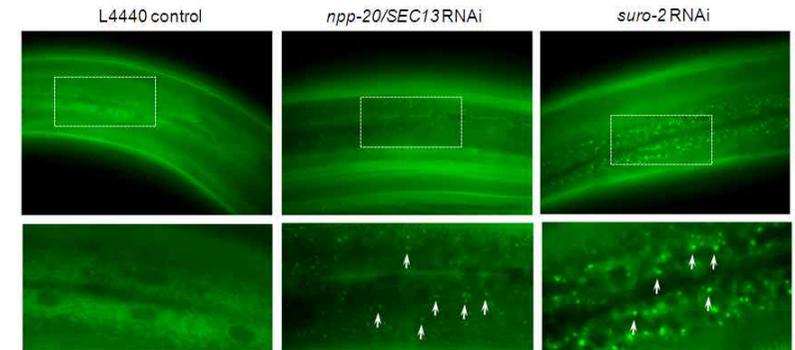
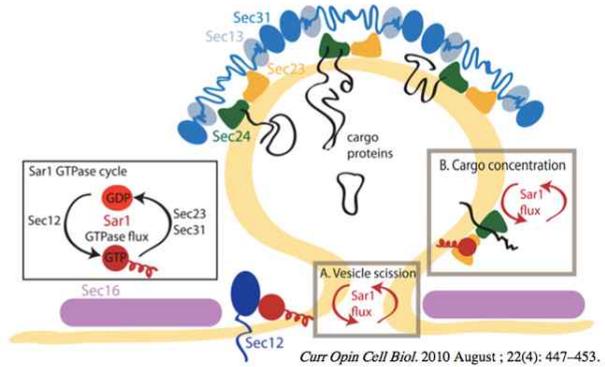


그림 15. *suro-2*와 *npp-20* RNAi의 결과 Hypodermal cell 내에서 COL-19::GFP의 aggregation이 발생: 정상적으로 COL-19::GFP가 세포질에 퍼져서 보이나, COL-19::GFP를 발현하는 선충에 *suro-2* 또는 *npp-20*를 RNAi로 knockdown 한 결과 COL-19::GFP가 뭉쳐져 보임(화살표)

정상 개체에서 COL-19::GFP는 세포핵의 주변에서부터 세포질로 퍼져 나오는 발현을 보이나, *suro-2*와 *npp-20* RNAi를 처리한 개체에서는 COL-19::GFP가 세포질에서 특정 부위에서 뭉쳐서 발현되고, 전체적으로 불균일하게 분포함(그림15). 이러한 실험 결과는 SURO-2와 NPP-20가 COL-19의 분비에 유사하게 작용하고, 아마도 특정 단계에서 이동이 막혀 aggregate가 형성되는 것 같음. 이렇게 COL-19::GFP가 뭉치는 세포 내 위치는 ER이라고 추측되는데, 이를 확인하기 위해 hypodermis에서 발현하는 ER marker::mCherry를 COL-19::GFP와 동시 발현하는 선충을 제작하는 중임. 이 선충에 *suro-2* 또는 *npp-20* RNAi를 처리해 aggregation이 생기는 세포 내 위치가 ER인지 아닌지 확인할 것임.

- SEC24를 제외한 COPII subunit들은 collagen 분비 중요한 역할을 함.

NPP-20/SEC13는 COPII complex에서 SEC31과 dimer를 이루어 vesicle 외곽을 감싸는 역할을 하고, SEC16이 vesicle formation을 시작함. SEC23과 SEC24가 dimer를 이루고 cargo selection과



*Curr Opin Cell Biol.* 2010 August ; 22(4): 447-453.

그림 16. COPII vesicle의 형성과 구성요소들

SEC13-SEC31 dimer를 recruit하는 SAR1과 결합함. SURO-2와 SEC13의 기능이 밀접히 연관되어 있으므로 다른 COPII subunit들과도 기능적 관련될 것으로 예상됨.

SURO-2와 COPII subunit들간의 기능적 연관 관계를 파악하기 위해, 우선적으로 collagen 분비를 살펴

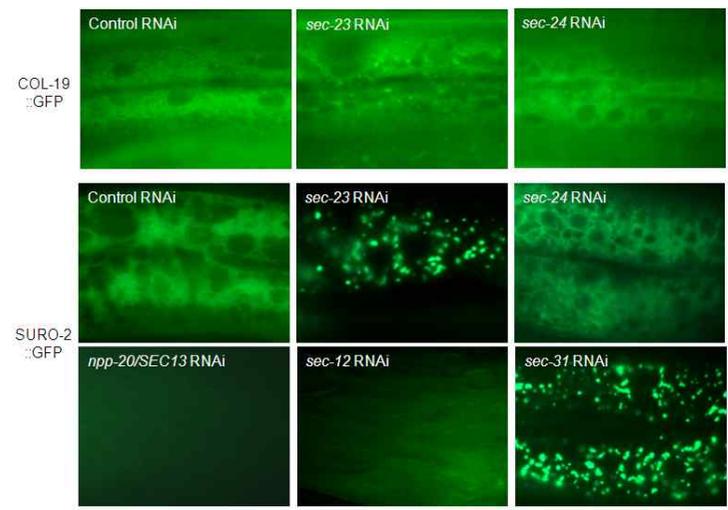


그림 17. COPII subunit gene들의 RNAi의 결과: COL-19::GFP를 발현하는 선충과 SURO-2::GFP를 발현하는 선충에 COPII의 subunit gene들에 대한 RNAi를 수행하여, *suro-2*와 여러 COPII gene들간의 기능을 비교함. 보았음. COL-19::GFP를 발현하는 선충에 각 COPII subunit gene RNAi를 실시한 결과, 그림17의 상단 패널처럼 *sec-23* RNAi는 *suro-2*와 *npp-20* RNAi와 유사하게 세포 내에서 COL-19::GFP의 aggregate를 형성함. 이와 달리, *sec-24* RNAi 결과는 정상 개체에서 COL-19::GFP 발현과 차이가 전혀 없었음.

그림에서 나타내지는 않았지만, 다른 COPII subunit인 *sec-12*, *sec-16*, *sec-31*의 RNAi에 의해서도 COL-19::GFP의 aggregation이 생김. 따라서 SURO-2와 COPII의 대부분 subunit들은 collagen 분비에 유사한 역할을 수행하며, 아마도 같은 COPII vesicle을 구성하는데 관여할 것이라 추측할 수 있음. 앞으로는 SEC-24의 역할이 차이가 나는 원인을 규명할 것임.

다음으로 COPII subunit들이 SURO-2의 발현에 미치는 영향을 조사하였음. SURO-2::GFP를 발현하는 선충에 각 COPII subunit gene들의 RNAi를 실시한 결과, 세 그룹으로 분류됨. *sec-24* RNAi는 SURO-2::GFP 발현에 아무런 영향이 없었으며, *sec-12*와 *sec-16*은 *npp-20*처럼 RNAi를 했을 때, SURO-2::GFP가 완전히 사라졌고, *sec-23*과 *sec-31*의 RNAi에 의해서는 SURO-2::GFP가 세포 내에서 aggregation을 형성하였음(그림17의 하단).

이러한 결과를 종합해 보면, *sec-24*를 제외한 COPII component들이 collagen 분비와 SURO-2 발현과 밀접한 관계를 가짐을 알 수 있음. SEC12, SEC13과 SEC23, SEC31이 SURO-2의 발현에 다르게 영향을 주는 것에 대해서 추가적인 연구를 수행할 것임.

- TFG-1은 collagen 분비와 SURO-2 발현에 영향을 줌

발암현상에 관여한다고 알려진 TFG-1은 최근 선충의 연구에서 단백질의 분비에 기능한다는 것이 규명되었음(Witte et al., Nat.Cell Biol., 2011). Audhya 그룹에서는 COPII의 subunit인 SEC-16의 항체를 이용한 IP 실험에서 TFG-1이 같은 complex에 존재한다는 것을 찾았음. 새로운 COPII 연관 단백질인 TFG-1의 기능이 SURO-2와 어떠한 관련성이 있는지 알기 위해 COL-19::GFP 또는 SURO-2::GFP를 발현하는 선충에 *tfg-1* RNAi 실험을 수행하였음.

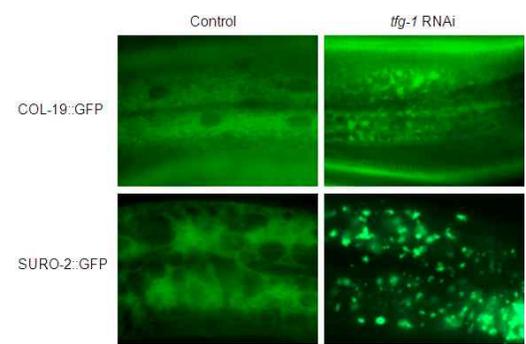


그림 18. TFG-1과 SURO-2의 기능적 연관성: COL-19::GFP를 발현하는 선충과 SURO-2::GFP를 발현하는 선충에 *tfg-1* RNAi를 수행한 결과

*tfg-1* RNAi 결과는 COL-19::GFP이 *suro-2*와 대부분의 COPII subunit들의 knockdown 결과와 마찬가지로 aggregation되는 것으로 나타남. 특히 SUO-2::GFP의 발현은 *sec-23*와 *sec-31*과 유사하게 되는 것을 관찰하였음. 이러한 결과로 TFG-1과 SURO-2는 단백질 분비와 COPII와의 연관성을 보이므로 매우 밀접한 기능적 연관성을 가진다는 것을 알 수 있음.

### 3. 연구결과 고찰 및 결론

#### (1) 국내의 관련분야의 기술 개발 현황

단백질과 지질의 분비에서 ER에서 Golgi로의 이동을 early secretion이라고 명명하는데, 이것은 진핵세포의 세포 구조와 구성의 핵심적인 역할을 수행함. 초기의 연구들은 효모를 중심으로 COPII vesicle의 구성과 cargo molecule의 분비에 대한 기능을 중심으로 연구되었고, 효모에서 찾아진 COPII 구성 단백질들에 대한 포유동물 상동체들에 대한 연구가 세포 배양 시스템에서 연구되었음. 이후 점차 식물과 동물 모델에서 연구가 되면서 조직과 기관 형성에서의 역할과 여러 질병 관련성등이 연구되고 있음. 최근의 관심 연구 주제는 COPII의 구조와 Ubiquitination을 통해 COPII vesicle의 크기 조절, COPII vesicle로의 cargo selection과 packaging, ER exit site(ERES)의 결정, COPII의 각 subunit들의 특이적 기능, COPII를 통한 cargo 분비 조절에 관여하는 새로운 유전자의 발굴과 구체적 기능 연구 등임.

- COPII의 구조와 Ubiquitination을 통해 COPII vesicle의 크기 조절은 최근의 리뷰논문들에서 잘 설명해 주고 있음. SEC13-SEC31 COPII coat cage의 구조가 밝혀졌고(Stagg et al., Nature. 2006), Sec23의 deubiquitination이 COPII vesicle의 조절에 중요함(Cohen et al., J Biol Chem. 2003). 최근의 가장 대표적인 연구 논문은 Ubiquitination이 COPII coat size와 기능을 조절한다는 것임(Jin et al., Nature. 2012).

- COPII vesicle로의 cargo selection과 packaging: Soluble protein receptor에 의한 sorting signal의 인식이 cargo selection에 중요함(Otte and Barlowe, Nat Cell Biol. 2004). Tango1이 cargo의 효율적인 packaging 관여하고 collagen secretion에 중요한 기능을 수행(Wilson et al., JCB. 2011, Saito et al., Cell 2009). Sec24b가 Vangl2의 sorting에 중요한 기능을 하여 mouse에서 neural tube의 closure에 중요함(Nature. 2010). Erv14에 의한 cargo selection 기전 연구(Herzig et al., PLoS Biol. 2012) 등이 있음.

- ER exit site(ERES)의 결정: COPII dynactin의 직접적인 결합에 의해 ER exit이 가능함(Watson et al., Nat Cell Biol. 2004). Sterol이 ts-045-G의 ER export의 조절에 중요함(Runz et al., EMBO J. 2006). Sec24p와 Sec16p이 함께 COPII vesicle의 GTP cycle을 조절함(Kunz et al., EMBO J.2011). ER cargo의 특성이 Sec13p에 의해 매개되는 COPII coat rigidity를 결정함(Copic et al., Science. 2012) 등의 연구 보고가 있음.

- COPII를 통한 cargo 분비 조절에 관여하는 새로운 유전자의 발굴 및 기능연구: 초기 분비 경로에서 인간의 단백질 분비를 조절하는 유전자를 찾기 위한 genome-wide RNAi screen이 수행되었음(Jeremy et al., Nature. 2012). Sedlin이라는 새로운 COPII 관련 유전자가 Sar1을 통해 procollagen의 분비를 조절함(Venditti et al., Science. 2012).

- COPII와 질병과의 연관관계 연구: Cargo specific ER-Golgi shuttle의 파괴가 factor V와 VIII의 분비를 막아 혈액응고를 방해함(Zhang et al., Nat Genetics. 2003). Sec23A mutation이 Cranio-lenticulo-strural dysplasia의 원인(Boyadjiev et al., Nat Genetics 2006)이며, Craniofacial chondrocyte maturation에 Sec23a가 관여됨(Lang et al., Nat Genetics 2006). Congenital dyserythropoietic anemia typeII(CDA II)에 sec23B mutation이 주요 원인임(Schwarz et al., Nat Genetics. 2009). CTFR mutation form의 이동에 GRASP에 의한 unconventional secretion pathway가 관여함(Gee et al., Cell. 2011). Cystic-fibrosis-associated mutation이 선충에서 ABC transporter PGP-3의 번역 후 안정성에 관여함(He et al., Dis Model Mech. 2012).

- 암과 COPII에 관련된 연구는 Pubmed 조사를 통해 겨우 40편의 논문이 존재하는데, 대부분이 암과 직접적인 관련성이 없음. 그러나 최근의 두 연구 논문은 어느 정도 암과의 연관성을 보임. 암과 COPII에 관련된 대표적 연구는 새롭게 COPII complex에 존재하는 단백질로 찾아진 TFG-1이 단백질 분비와 발암현상에 관련되어 있다는 보고(Witte et al., Nat Cell Biol. 2011)와 Akt가 Sec24를 인산화시킨다는 연구 결과(Sharpe et al., Traffic. 2011)임. 따라서 COPII의 암 관련성 연구는 새롭게 주목받을 가능성이 큰 연구 분야임.

- 연구결과가 국내의 기술개발 분야에서 차지하는 위치: 본 과제의 연구 결과는 collagen 분비에 관여하는 새로운 조절 유전자인 TMEM39가 선충에서 cuticle 형성과 초기 배발생에서 세포 분열에 중요한 기능을 수행하고 있다 것을 보임. 특히 collagen 분비와 관여하여 선충의 epithelial cell인 hypodermis에서 COPII와 기능적으로 밀접하다는 것을 보임. 아직 논문을 내기까지는 1년 이상의 시간이 걸릴 것으로 예상되므로, 앞에서 국내외의 다른 비슷한 연구에 비해 몇 년이 늦음. 특히 최근의 연구들은 규모의 크기에서 본 연구를 압도함. 그럼에도 불구하고 본 연구가 가지는 장점은 첫째, 단백질 분비에 관여하는 새로운 유전자를 찾을 수 있는 선충 시스템을 확보하고 있으며, 이를 이용하여 현재 많은 종류의 mutant를 확보하고 있고, 현재까지 suro-5라는 새로운 분비 조절 유전자를 찾아 그 기능을 연구 중임. 둘째, SURO-2/TMEM39의 연구 결과는 early secretion의 주요한 연구 주제에 부합되고, 아직까지 전혀 기능 연구가 이루어지지 않은 단백질이므로 신규성이 있음. 셋째, TMEM39가 단백질 분비에 중요한 기능을 한다는 것이 Multiple Sclerosis의 원인 유전자로써의 발병의 기전을 밝히고, Cancer관련성에서도 EGFR과 같은 RTK의 이동 조절에 관여할 가능성이 큼.

#### (2) 연구결과 해석 및 다른 결과와의 비교분석 등에 대한 고찰과 결론

- TMEM39가 선충에서 collagen 분비를 조절하여 cuticle 형성에 중요한 기능을 수행한다는 것은 다른 matrix protein들의 분비 조절에도 관여할 가능성이 크므로, 암에서 세포 증식에서 기능을 연구하기 보다는 침윤과 전이에 대한 연구를 수행할 필요가 있음.

- 본 연구는 현재까지 2년이라는 짧은 연구 기간으로 인해 선충에서 주로 유전학적 실험 방법으로 TMEM39의 기능을 규명하는데 집중하였으므로, 보다 직접적이고 구체적 결과를 내기 위해서는 배양 세포를 이용한 생화학적 방법의 연구가 추가되어야 할 것임.

- 암세포에서 TMEM39A의 기능을 연구하기 위해, 여러 차례 siRNA를 주문하여 knockdown을 실시하여 TMEM39A의 발현을 억제하려고 시도하였으나 실패를 거듭하였음. 이로 인해 암세포 증식에서 기능적인 부분의 연구를 진행하지 못했음. 향후 TALEN이라는 gene editing 방법을 이용하여 암세포에서 직접 TMEM39A를 knockout시켜 기능 연구를 진행할 것임.

- 본 연구 결과에 있어 가장 흥미로운 점은 COPII subunit들의 기능들이 제각기 다르다는 것임. collagen secretion에 있어 sec-24가 불필요하다는 결과는 효모에서 Sec24p가 glycoprotein Hsp150의 ER exit에 불필요하고(Traffic. 2007), Sec24p 없이도 soluble cargo의 분비는 잘 됨(J Cell Sci. 2004), 그리고 Sec13p 없는 vesicle이 ER에서 Golgi로 이동(Mol Cell Biol. 2002)된다는 보고들과 유사한 맥락임. 하지만 다세포 동물에서는 Sec24의 homolog가 여러 개 존재하는데, 특히 사람은 Sec24a,b,c,d 4개를 가진다는 점에서 차이가 큼. 선충에서도 Sec24.1과 Sec24.2 두 개의 Sec24가 존재하므로, 이 두 유전자 간의 redundancy 또는 tissue-specificity가 영향을 줄 가능성도 있음. 이번 연구에서 sec-24.1과 sec-24.2 모두 RNAi에서 collagen secretion에 문제가 없었다는 것과

sec-24.1은 hypodermis에서 발현된다는 보고가 없다는 점에서 이러한 문제는 아닌 것 같음. 본 연구 결과가 나타내는 점은 구체적으로 TMEM39가 SEC24를 제외하고 다른 COPII component들과 complex를 구성한다는 것임. 이것은 생화학적 방법에 의한 추가적인 증명이 요구됨.

**4. 연구성과 및 목표달성도**

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
A novel zinc-carboxypeptidase SURO-1 regulates cuticle formation and body morphogenesis in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	심재갈 (교신)	Febs letters (3.6)	2011 585:121 - 27.	국외 SCI	0810070
<i>Stephania delavayi</i> Diels. inhibits breast carcinoma proliferation through the p38 MAPK/NF-κB/COX-2 pathway	심재갈 (제1)	Oncology report (1.7)	2011 26:833-841	국외 SCI	1110060
3-(4-(tert-Octyl)phenoxy)propane-1,2-diol pp: xxx - .xxx suppresses inflammatory responses via inhibition of multiple kinases	심재갈 (제1)	Biochemical Pharmacology (4.8)	2012.6 83(11):(1540-5 1)	국외 SCI	없음
An In Vivo <i>C. elegans</i> Model System for Screening EGFR Inhibiting Anti-Cancer Drugs	심재갈 (교신)	PLoS one (4.1)	2012.9 7(9):1-9	국외 SCI	1110060

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

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호
A transmembrane protein 39A homolog SURO-2 plays a critical role for embryogenesis and larval development in <i>C. elegans</i>	박계령, 심재갈	한국분자세포생물학회	국내	1110060
<i>C. elegans</i> as a model for matrix biology	김승현, 심재갈	한국에쁜꼬마선충연구회 학술발표회	국내	1110060
Genetic approach for the matrix biology using <i>C.elegans</i>	심재갈	한국세포생물학회 하계학술대회	국내	1110060

1) 지역 : 국내, 국외

- 다. 산업재산권
- 라. 저서
- 마. 연구성과의 정부정책 기여
- 바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
TMEM39의 세포 주기, 증식 및 개체 발생에서의 기능을 규명	1차년도	TMEM39의 세포 내에서 정확한 발현 위치와 세포 주기에서의 발현 변화를 관찰	TMEM39A와 B의 항체를 이용한 면역염색을 수행함. 유방암 세포에서 TMEM39A의 항체를 이용하여 세포 주기 단계별 발현을 확인함.	100	100
		TMEM39의 돌연변이 개체에서의 세포 증식과 개체 발생에서의 표현형을 규명	선충의 TMEM39 돌연변이 개체에서 embryo lethality와 배발생 단계에서 aneuploidy가 형성되는 것을 관찰함.	100	100
	2차년도	TMEM39와 SEC13의 직접적 상호작용 검증	A549 암세포주에서 IP 실험을 이용해 TMEM39A와 SEC13이 동일한 complex에 존재한다는 것을 확인함.	100	100
		TMEM39와 SEC13의 유전학적 상호작용 검증	TMEM39와 SEC13이 세포 내에서 동일 위치에서 발현하고, RNAi 실험으로 상호 발현에 영향을 준다는 것을 확인함.	100	100

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
항체 염색과 리포터 발현 개체 제작	유방암세포에서 항체염색은 잘 이루어졌음. 여러 가지 리포터 발현 개체의 제작을 수행하였음.
세포 증식 및 개체 발생과 관련된 표현형 분석을 잘 했는가?	배발생에서 염색체 응축과 분리에서 문제점 발견하여 앞으로의 기전연구의 실마리를 찾음
생화학적 방법에 의한 상호작용의 분석 수행을 했는가?	Mammalian Cell line에서 TMEM39A 항체로 immunoprecipitation를 한 결과 SEC13과 동일한 COPII complex에 존재함을 밝힘.
유전학적 방법에 의한 상호작용의 분석 수행을 잘 했는가?	SURO-2::GFP와 NPP-20::DsRed를 동시에 발현하는 선충에 suro-1 또는 npp-20 RNAi를 한 결과 두 단백질의 발현이 서로에 의존적임을 알 수 있었음. 또한 각 COPII subunit gene들을 RNAi를 이용해 COL-19::GFP의 분비에 문제가 있는지 확인하였음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	SURO-2, a transmembrane protein 39 plays critical roles in mitosis and cuticle formation of <i>C. elegans</i> . EMBO J(10.0)에 투고 예정
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 연구성과물의 활용분야 및 활용방법, 활용범위

최근 암에서 단백질 분비가 새로운 연구 분야로 관심을 받고 있는데, 본 연구에서 새로운 COPII 관련 유전자인 TMEM39가 기본적 수준에서 단백질 분비에는 관여하지 않고, 다량의 단백질 분비를 촉진한다는 점과 몇몇 암세포에서 발현이 높다는 결과는 새로운 항암 표적으로 활용할 가능성이 높음.

Multiple Sclerosis(다발성 경화증)는 자가면역질환(autoimmune disease)으로 알려져 있으며, 질병의 진행과정은 잘 밝혀져 있지만, 발병과정이 전혀 알려져 있지 않은 질환임. TMEM39가 multiple sclerosis의 원인 유전자임이 human GWAS study를 통해서 보고되었으므로(Hum Mol Genet. 2010), 선충의 homolog를 통한 본 연구는 구체적으로 TMEM39가 COPII와 함께 collagen 분비를 촉진한다는 점에서 단백질 분비의 문제가 multiple sclerosis의 발병 기전에 관련성을 간접적으로 보여줌. 따라서 multiple sclerosis를 치료하거나 예방하기 위한 기반 지식으로 활용할 수 있음.

- 추가 후속연구의 필요성

새로운 유전자의 기능을 2년 안에 전반적으로 연구한다는 것은 힘든 일이고, 그 동안 선충 모델에서 주로 유전학적인 방법을 이용하여 연구하였으므로, 보다 직접적인 결과 도출을 위해서 배양된 세포에서 세포생물학적 및 생화학적인 방법을 이용한 연구가 필요함.

암 연구에서 TMEM39가 새로운 표적이 될 수 있는지를 확실히 하기 위해서는 암세포주에서 knockdown이 필요함. 이미 기술한 내용처럼 TMEM39의 암세포에서 역할을 확실히 하기 위해 TALEN을 이용하여 TMEM39의 발현이 높은 암세포에서 Knockout을 진행할 것임.

상피세포암에서 EGFR의 과발현과 분포와 이동 조절이 중요한 문제인데, 선충의 발암모델에서 TMEM39가 정상적인 EGFR의 이동 조절에는 관여하지 않고, 과발현된 EGFR의 이동에 관여하는 것처럼 보임. 또한 EGFR 발현이 높은 암세포일수록 TMEM39의 발현이 높다는 것을 확인(미발표 결과임)하였으므로 향후, TMEM39가 EGFR를 비롯한 여러 RTK의 발현과 이동 조절에 관여하는 지 연구하여 직접적으로 암 관련 연구를 수행할 수 있음.

## 6. 참고문헌

TFG-1 function in protein secretion and oncogenesis. Witte K, Schuh AL, Hegermann J, Sarkeshik A, Mayers JR, Schwarze K, Yates JR 3rd, Eimer S, Audhya A. *Nat Cell Biol.* 2011 May;13(5):550-8.

Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. Stagg SM, Gürkan C, Fowler DM, LaPointe P, Foss TR, Potter CS, Carragher B, Balch WE. *Nature.* 2006 Jan 12;439(7073):234-8.

Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport. Cohen M, Stutz F, Dargemont C. *J Biol Chem.* 2003 Dec 26;278(52):51989-92. Epub 2003 Oct 30.

Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. Jin L, Pahuja KB, Wickliffe KE, Gorur A, Baumgärtel C, Schekman R, Rape M. *Nature.* 2012 Feb 22;482(7386):495-500.

Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. Otte S, Barlowe C. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1189-94.

TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. Saito K, Chen M, Bard F, Chen S, Zhou H, Woodley D, Polischuk R, Schekman R, Malhotra V. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):891-902.

Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. Wilson DG, Phamluong K, Li L, Sun M, Cao TC, Liu PS, Modrusan Z, Sandoval WN, Rangell L, Carano RA, Peterson AS, Solloway MJ. *J Cell Biol.* 2011 May 30;193(5):935-51.

A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. Herzig Y, Sharpe HJ, Elbaz Y, Munro S, Schuldiner M. *PLoS Biol.* 2012;10(5):e1001329.

Coupling of ER exit to microtubules through direct interaction of COPII with dynactin. Watson P, Forster R, Palmer KJ, Pepperkok R, Stephens DJ. *Nat Cell Biol.* 2005 Jan;7(1):48-55.

Sterols regulate ER-export dynamics of secretory cargo protein ts-O45-G. Runz H, Miura K, Weiss M, Pepperkok R. *EMBO J.* 2006 Jul 12;25(13):2953-65.

Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. Kung LF, Pagant S, Futai E, D'Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, Reid RJ, Rothstein R, Hamamoto S, Snapp EL, Schekman R, Miller EA. *EMBO J.* 2011 Dec 9;31(4):1014-27.

ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. Copic A, Latham CF, Horlbeck MA, D'Arcangelo JG, Miller EA. *Science.* 2012 Mar 16;335(6074):1359-62.

Genome-wide RNAi screening identifies human proteins with a regulatory function in the early secretory pathway. Simpson JC, Joggerst B, Laketa V, Verissimo F, Cetin C, Erfle H, Bexiga MG, Singan VR, Hériché JK, Neumann B, Mateos A, Blake J, Bechtel S, Benes V, Wiemann S, Ellenberg J, Pepperkok R. *Nat Cell Biol.* 2012 Jun 3;14(7):764-74.

Secdin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle. Venditti R, Scanu T, Santoro M, Di Tullio G, Spaar A, Gaibisso R, Beznoussenko GV, Mironov AA, Mironov A Jr, Zelante L, Piemontese MR, Notarangelo A, Malhotra V, Vertel BM, Wilson C, De Matteis MA. *Science.* 2012 Sep 28;337(6102):1668-72.

Bleeding due to disruption of a cargo-specific ER-to-Golgi transport complex. Zhang B, Cunningham MA, Nichols WC, Bernat JA, Seligsohn U, Pipe SW, McVey JH, Schulte-Overberg U, de Bosch NB, Ruiz-Saez A, White GC, Tuddenham EG, Kaufman RJ, Ginsburg D. *Nat Genet.* 2003 Jun;34(2):220-5.

Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a SEC23A mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-Golgi trafficking. Boyadjev SA, Fromme JC, Ben J, Chong SS, Nauta C, Hur DJ, Zhang G, Hamamoto S, Schekman R, Ravazzola M, Orci L, Eyaid W. *Nat Genet.* 2006 Oct;38(10):1192-7.

Secretory COPII coat component Sec23a is essential for craniofacial chondrocyte maturation. Lang MR, Lapierre LA, Frotscher M, Goldenring JR, Knapik EW. *Nat Genet.* 2006 Oct;38(10):1198-203.

Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. Schwarz K, Iolascon A, Verissimo F, Trede NS, Horsley W, Chen W, Paw BH, Hopfner KP, Holzmann K, Russo R, Esposito MR, Spano D, De Falco L, Heinrich K, Joggerst B, Rojewski MT, Perrotta S, Denecke J, Pannicke U, Delaunay J, Pepperkok R, Heimpel H. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):936-40.

Rescue of ΔF508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. *Cell.* 2011 Sep 2;146(5):746-60.

The cystic-fibrosis-associated (Δ)F508 mutation confers post-transcriptional destabilization on the C. elegans ABC transporter PGP-3. He L, Skirkanich J, Moronetti L, Lewis R, Lamitina T. *Dis Model Mech.* 2012 Nov;5(6):930-9.

Akt phosphorylates Sec24: new clues into the regulation of ER-to-Golgi trafficking. Sharpe LJ, Luu W, Brown AJ. *Traffic.* 2011 Jan;12(1):19-27.

Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). *Hum Mol Genet.* 2010 Mar 1;19(5):953-62.

## 7. 첨부서류

## An *In Vivo C. elegans* Model System for Screening EGFR-Inhibiting Anti-Cancer Drugs

Young-Ki Bae<sup>1</sup>, Jee Young Sung<sup>2</sup>, Yong-Nyun Kim<sup>1</sup>, Sunshin Kim<sup>3</sup>, Kyeong Man Hong<sup>4</sup>, Heung Tae Kim<sup>5</sup>, Min Sung Choi<sup>6</sup>, Jae Young Kwon<sup>6</sup>, Jaegal Shim<sup>1\*</sup>

**1** Comparative Biomedicine Research Branch, National Cancer Center, Ilсандong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea, **2** Pediatric Oncology Research Branch, National Cancer Center, Ilсандong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea, **3** New Experimental Therapeutics Branch, National Cancer Center, Ilсандong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea, **4** Cancer Cell and Molecular Biology Branch, National Cancer Center, Ilсандong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea, **5** Center for Lung Cancer, National Cancer Center, Ilсандong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Korea, **6** Department of Biological Sciences, Sungkyunkwan University, Suwon, Gyeonggi-do, Korea

### Abstract

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a well-established target for cancer treatment. EGFR tyrosine kinase (TK) inhibitors, such as gefitinib and erlotinib, have been developed as anti-cancer drugs. Although non-small cell lung carcinoma with an activating EGFR mutation, L858R, responds well to gefitinib and erlotinib, tumors with a doubly mutated EGFR, T790M-L858R, acquire resistance to these drugs. The *C. elegans* EGFR homolog LET-23 and its downstream signaling pathway have been studied extensively to provide insight into regulatory mechanisms conserved from *C. elegans* to humans. To develop an *in vivo* screening system for potential cancer drugs targeting specific EGFR mutants, we expressed three LET-23 chimeras in which the TK domain was replaced with either the human wild-type TK domain (LET-23:hEGFR-TK), a TK domain with the L858R mutation (LET-23:hEGFR-TK(L858R)), or a TK domain with the T790M-L858R mutations (LET-23:hEGFR-TK(T790M-L858R)) in *C. elegans* vulval cells using the *let-23* promoter. The wild-type hEGFR-TK chimeric protein rescued the *let-23* mutant phenotype, and the activating mutant hEGFR-TK chimeras induced a multivulva (Muv) phenotype in a wild-type *C. elegans* background. The anti-cancer drugs gefitinib and erlotinib suppressed the Muv phenotype in LET-23:hEGFR-TK(L858R)-expressing transgenic animals, but not in LET-23:hEGFR-TK(T790M-L858R) transgenic animals. As a pilot screen, 8,960 small chemicals were tested for Muv suppression, and AG1478 (an EGFR-TK inhibitor) and U0126 (a MEK inhibitor) were identified as potential inhibitors of EGFR-mediated biological function. In conclusion, transgenic *C. elegans* expressing chimeric LET-23:hEGFR-TK proteins are a model system that can be used in mutation-specific screens for new anti-cancer drugs.

**Citation:** Bae Y-K, Sung JY, Kim Y-N, Kim S, Hong KM, et al. (2012) An *In Vivo C. elegans* Model System for Screening EGFR-Inhibiting Anti-Cancer Drugs. *PLoS ONE* 7(9): e42441. doi:10.1371/journal.pone.0042441

**Editor:** Anne C. Hart, Brown University, United States of America

**Received:** March 20, 2012; **Accepted:** July 9, 2012; **Published:** September 5, 2012

**Copyright:** © 2012 Bae et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was solely supported by a research grant from the National Cancer Center (NCC-1110060) of South Korea (www.ncc.ac.kr). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

\* E-mail: jaegal@ncc.re.kr

### Introduction

Development of a high-throughput, low-cost *in vivo* screening system for small molecule anti-cancer reagents would ideally be able to overcome the major problems of conventional *in vitro* screening methods. Due to fast generation time, high progeny numbers, low cost, and well established genetic tools, the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an attractive candidate for an animal model screening system, with many of the advantages of *in vitro* screening systems and animal models [1].

EGFR is overexpressed or aberrantly activated in various types of human cancer, such as breast, ovarian, and non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) [2]. EGFR is involved in various steps of cancer development including tumorigenesis, invasion, metastasis, and angiogenesis [3], and thus provides an attractive target for cancer drug development. Gefitinib (Commercial name: Iressa) was the first EGFR-TK inhibitor drug developed for the treatment of epithelial cancers such as NSCLC [4]. Mutations in the EGFR-TK domain have been linked to gefitinib sensitivity in a subset of lung cancers, and have also been found to activate anti-apoptotic pathways [5,6].

*C. elegans* vulval development is a well-established model system used to study the EGFR signaling pathway [7–9]. Among the six vulval precursor cells (VPCs), P5.p, P6.p, and P7.p adopt the 2<sup>o</sup>-1<sup>o</sup>-2<sup>o</sup> cell fates, respectively, and continue dividing to form the mature vulva. The 1<sup>o</sup> cell fate is determined as a result of EGFR-Ras-MAPK signaling in P6.p, whereas the 2<sup>o</sup> cell fate is determined by LIN-12/Notch signaling in P5.p and P7.p, which is activated as a result of EGFR-Ras-MAPK signaling in the neighboring cell. Components of the EGFR pathway, including EGFR, Ras, Raf, MEK, and MAPK, are highly conserved between humans and *C. elegans* [8]. A limited number of chemical compounds that target the EGFR pathway have been tested using *C. elegans* vulval development as a model. Farnesyltransferase inhibitors, which inhibit Ras activity, and MCP compounds, which disrupt Ras-Raf interactions were found to act specifically on the orthologous proteins in the *C. elegans* EGFR-Ras pathway [10–12]. The toxicity of the EGFR kinase inhibitors BIBU1561 and BIBX1382 was also evaluated in *C. elegans* [13]. These studies suggest the potential for using *C. elegans* as a tool for anti-EGFR pathway drug screening.



## 3-(4-(tert-Octyl)phenoxy)propane-1,2-diol suppresses inflammatory responses via inhibition of multiple kinases

Tao Yu<sup>a,1</sup>, Jaegal Shim<sup>b,1</sup>, Yanyan Yang<sup>a</sup>, Se Eun Byeon<sup>a</sup>, Ji Hye Kim<sup>a</sup>, Ho Sik Rho<sup>c</sup>, Haeil Park<sup>d,\*\*</sup>, Gi-Ho Sung<sup>e</sup>, Tae Woong Kim<sup>f</sup>, Man Hee Rhee<sup>g</sup>, Jae Youl Cho<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Republic of Korea

<sup>b</sup> Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Goyang 443-721, Gyeonggi-do, Republic of Korea

<sup>c</sup> Medical Beauty Research Institute, AmorePacific R&D Center, Yongin 446-728, Republic of Korea

<sup>d</sup> College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

<sup>e</sup> Maehroom Research Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 404-707, Republic of Korea

<sup>f</sup> Department of Biochemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

<sup>g</sup> College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 January 2012

Accepted 21 February 2012

Available online 1 March 2012

#### Keywords:

3-(4-(tert-Octyl)phenoxy)propane-1,2-diol

Anti-inflammatory effect

Inflammatory mediator

Syk

p38

IKK kinase

### ABSTRACT

Novel anti-inflammatory compounds were synthesized by derivatization of militarin, a compound isolated from *Cordyceps militaris* that is an ethnopharmacologically well-known herbal medicine with multiple benefits such as anti-cancer, anti-inflammatory, anti-obesity, and anti-diabetic properties. In this study, we explored the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory potencies of these compounds during inflammatory responses, their inhibitory mechanisms, and acute toxicity profiles. To do this, we studied inflammatory conditions using *in vitro* lipopolysaccharide-treated macrophages and several *in vivo* inflammatory models such as dextran sodium sulphate (DSS)-induced colitis, ETOH/HCl-induced gastritis, and arachidonic acid-induced ear oedema. Methods used included real-time PCR, immunoblotting analysis, immunoprecipitation, reporter gene assays, and direct kinase assays. Of the tested compounds, compound III showed the highest nitric oxide (NO) inhibitory activity. This compound also inhibited the production of prostaglandin (PG)<sub>E2</sub> at the transcriptional level by suppression of Syk/NF- $\kappa$ B, IKK $\beta$ /IRF-3, and p38/AP-1 pathways in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages. Consistent with these findings, compound III strongly ameliorated inflammatory symptoms in colitis, gastritis, and ear oedema models. In acute toxicity tests, there were no significant differences in body and organ weights, serum parameters, and stomach lesions between the untreated and compound III-treated mice. Therefore, this compound has the potential to be served as a lead chemical for developing a promising anti-inflammatory drug candidate with multiple kinase targets.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The deregulated or exacerbated inflammation may cause a range of serious diseases, such as cancer, vascular disorders, and

diabetes [1,2]. Even though the molecular pathophysiological mechanisms by which inflammation induces disease are not fully understood, inflammatory molecules such as toxic radicals [e.g., reactive oxygen species, and nitric oxide (NO)], pro-inflammatory cytokines [e.g., tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, interferon (IFN)- $\beta$ ], and lipid inflammatory mediators [e.g., prostaglandin (PG)<sub>E2</sub>, and leukotrienes] have been identified as critical factors in stimulating macrophages and cytotoxic T cells, which in turn are involved in tissue destruction and the subsequent induction of pathological phenomena [3–5].

Recent research results have additionally highlighted the functional significance of tissue-associated macrophages in inflammatory responses. These cells infiltrate into chronically inflamed organs to aggressively manage the production of various inflammatory molecules and facilitate the tissue damage in inflammation [6]. Many research efforts have led to an understanding of how macrophages can be activated by interaction

Abbreviations: Na-CMC, sodium carboxyl methylcellulose; EIA, enzyme immunoassay; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; MTI, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; IRF-3, interferon regulatory factor-3; p38, phosphoinositide 3-kinase; STAT-1, signal transducer and activator of transcription; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; LDH, lactate dehydrogenase.

\* Corresponding author at: Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, 300 Chuncheon-Dong, Suwon 440-746, Republic of Korea. Tel.: +82 31 290 7868; fax: +82 31 290 7870.

\*\* Corresponding author at: College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea. Tel.: +82 33 250 6920; fax: +82 33 255 7865.

E-mail addresses: haeilp@kangwon.ac.kr (H. Park), jaecho@skku.edu (J.Y. Cho).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

0006-2952/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bcp.2012.02.018



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

Tai Hoon Kim<sup>a</sup>, Yeon Jung Kim<sup>b</sup>, Jin Won Cho<sup>b,c,\*</sup>, Jaegal Shim<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, 323 Ilan-ro, Ilan-dong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 410-749, Republic of Korea

<sup>b</sup>Department of Biology, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea

<sup>c</sup>Department of Biomedical Science, World Class University Program, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 July 2010

Revised 10 November 2010

Accepted 12 November 2010

Available online 19 November 2010

Edited by Ned Mante

#### Keywords:

Cuticle

Collagen

rol-6

Carboxypeptidase

suro-1

*Caenorhabditis elegans*

### ABSTRACT

Cuticle formation and molting are critical for the development of *Caenorhabditis elegans*. To understand cuticle formation more clearly, we screened for suppressors in transgenic worms that expressed dominant ROL-6 collagen proteins. The *suro-1* mutant, which is mild dumpy, exhibited a different ROL-6::GFP localization pattern compared to other Dpy mutants. We identified mutations in three *suro-1* mutants, and found that *suro-1* (ORF R11A5.7) encodes a putative zinc-carboxypeptidase homologue. The expression of this enzyme in the hypodermis and the genetic interactions between this enzyme and other collagen-modifying enzyme mutants suggest a regulatory role in collagen processing and cuticle organization for this novel carboxypeptidase. These findings aid our understanding of cuticle formation during worm development.

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

### 1. Introduction

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

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

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

## *Stephania delavayi* Diels. inhibits breast carcinoma proliferation through the p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/COX-2 pathway

DAE-HUN PARK<sup>1\*</sup>, HONG DE XU<sup>2\*</sup>, JAE GAL SHIM<sup>3\*</sup>, YONG-CHUN LI<sup>4</sup>, JONG-HWA LEE<sup>1</sup>, SOON-CHANG CHO<sup>5</sup>, SANG-SEOP HAN<sup>6</sup>, YUN LYUL LEE<sup>7</sup>, MIN-JAE LEE<sup>8</sup> and SUNG-WON KWON<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Toxicology Center, Korea Institute of Toxicology, Yuseong, Daejeon 305-343, Republic of Korea; <sup>2</sup>School of Pharmaceutical Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 4500001, P.R. China; <sup>3</sup>Cancer Experimental Resources Branch, National Cancer Center, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do 410-769; <sup>4</sup>School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701; <sup>5</sup>Center for Senior Industry, Youngdong University, Yeongdong-gun, Chungnam 370-701; <sup>6</sup>Hoseo University, Baebang-myun, Asan-si, Chungnam 336-79; <sup>7</sup>Department of Physiology, College of Medicine, Hallym University, Chuncheon-si, Gangwon-do, 200-70; <sup>8</sup>CHA Bundang Medical Center, CHA University, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-712, Republic of Korea

Received March 4, 2011; Accepted April 20, 2011

DOI: 10.3892/or.2011.1364

**Abstract.** The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/inhibitor of  $\kappa$  kinase- $\beta$  (IKK $\beta$ ) signaling pathway is important in tumor promotion and progression. MDA-MB-231 human breast carcinoma cells express COX-2 and show a constitutive phosphorylation of NF- $\kappa$ B. Many non-specific inhibitors of IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B are used to inhibit tumor promotion and progression. The *Stephania delavayi* Diels. (*S. delavayi* Diels.) extract has been reported to safely activate B cell immunity and there is evidence suggesting that it may be a promising new anticancer therapeutic agent. *S. delavayi* Diels. extract suppressed proliferation of the breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 by inducing cell death. To aid in the development of the *S. delavayi* Diels. extract as a therapeutic agent, its mechanisms of action were investigated, in particular its effects on p38 MAPK, NF- $\kappa$ B and COX-2, which play important roles in inflammation and cancer. *S. delavayi* Diels. stimulated p38 MAPK phosphorylation but reduced NF- $\kappa$ B phosphorylation and COX-2 expression in a dose- and time-dependent manner. Thus, *S. delavayi* Diels., which appears to

act primarily through p38 MAPK/NF- $\kappa$ B/COX-2 signaling in breast carcinomas, may be a potent anticancer agent with target specificity and low toxicity.

### Introduction

MAPKs play key roles in mediating the effects of various extracellular stimuli and intracellular responses. Three MAPKs have been identified in mammalian cells: ERKs, JNKs, and p38 kinase (p38 MAPK). Each MAPK is activated by different stimuli and regulates different downstream targets (1). In particular, p38 MAPK is stimulated by UV irradiation, osmotic stress, and cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (1,2).

The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/inhibitor of  $\kappa$  kinase- $\beta$  (IKK $\beta$ ) signaling pathway is important in tumor promotion and progression (3). When activated, the transcription factor NF- $\kappa$ B inhibits apoptosis (4), induces G1/S phase transition by up-regulating the expression of cyclin D1 (5) and COX-2 (6). In MDA-MB-231 human breast carcinoma cells, NF- $\kappa$ B and inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) are constitutively phosphorylated (7) and COX-2 expression is observed (8). Many non-specific inhibitors of IKK $\beta$  and NF- $\kappa$ B are used to inhibit tumor promotion and progression. These agents include anti-inflammatory drugs, such as sulphasalazine and trans-resveratrol, and non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as aspirin, sulindac sulphide, cyclopentenone prostaglandins, proteasome inhibitors, and glucocorticoids (9–11). Similarly, COX-2 inhibitors have also been used to slow the progression of cancer (12,13).

Species of the *Stephania* family are known to exert pharmacological actions. For example, the *Stephania delavayi* Diels. (*S. delavayi* Diels.) extract has been reported to safely activate B cell immunity (14), and bisoclaurine alkaloid cepharanthine isolated from *Stephania cepharantha* Hayata (*S. cepharantha* Hayata) induces apoptosis and G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase arrest through p15<sup>Ink4b</sup> and p21<sup>Waf1/Cip1</sup> in KMS-12-PE myeloma cells (15). Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated

**Correspondence to:** Dr Min-Jae Lee, School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, Republic of Korea  
E-mail: mjlee@kangwon.ac.kr

Dr Sung-Won Kwon, CHA Bundang Medical Center, CHA University, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-712, Republic of Korea  
E-mail: wizard95@cha.ac.kr

\*Contributed equally

**Key words:** *Stephania delavayi* Diels., breast carcinomas, apoptosis, nuclear factor  $\kappa$ B, COX-2

\* Corresponding authors. Address: Department of Biology, Yonsei University, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Republic of Korea. Fax: +82 2 363 4083 (J.W. Cho). Fax: +82 31 920 2002 (J. Shim).

E-mail addresses: chojw311@yonsei.ac.kr (J.W. Cho), jaegal@ncc.re.kr (J. Shim).