

목 차

< 요약 문 >

(한글) 발굴 및 개발”단계를 중심으로 한 항암신약개발 프로세스 기반 구축
 (영문) Focus on “discovery and development” **phases** of anti-cancer drug development processing

1. 연구의 필요성
2. 연구의 목표, 범위 및 내용

- 연구의 목표
- 연구의 범위 및 내용
- Strategic planning of “Personalized Medicine”
- Definition of discovery and development
- Establishment of convergence programs

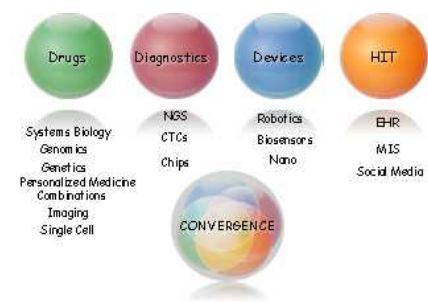
Projects of Interest:

1. Integrative High-throughput Cell-Based Target Assessment Core
2. Cell-based high contents screening을 이용하여 DNA 손상반응을 저해함으로써 종양세포를 감작시키는 항암물질 탐색 및 제어 기전 연구 and application of nanostructured substrates as an efficient platform for cell growth
3. 핵산 암타머-항체 복합 항암제 플랫폼 기술 개발
4. Functions of alternative splice variant genes on tumorigenesis and regulation

기관고유연구사업 기획과제계획서					
연구분야(코드)					
연구과제명	발굴 및 개발”단계를 중심으로 한항암신약개발 프로세스 기반 구축				
	Focus on “discovery and development” phases of anti-cancer drug development processing				
과제책임자	소 속			직 위	
	성 명			전 공	
신청연구비			연구기간	2012.03.01. ~ 2012.11.30. (9 개월)	
참여연구원수 (단위: 명, MY)	계	과제책임자	원내정규직원	외부연구원	원외공동연구자
기관고유연구사업관리규칙 제7조의 규정에 따라 위와 같이 과제계획서를 제출합니다. 2011년 12월 01일 과제책임자 (서명)					
국립암센터원장 귀하					
(첨부서류)					

< 요약 문 >

연구분야(코드)				과제번호	
과제명					
연구기간/연구비 (천원)	합계	2012년 03월 01일 ~ 2012년 11월 30일			
	1차년도	2012년 03월 01일 ~ 2012년 11월 30일			
	2차년도	년 월 일 ~ 년 월 일			
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일			
과제책임자	성명				
	소속				
책임단어	국문	발굴 및 개발" 단계를 중심으로 한 항암신약개발 프로세스 기반 구축			
	영문	Focus on "discovery and development" phases of anti-cancer drug development processing			
<p>◆ 연구목표</p> <p>Strategic Inflection Point: Discovery and Development-Drug, Device and Diagnostic. Project Mission and Vision: 1)Strategic planning of "Personalized Medicine"- hypothesize tumor molecular analysis and use of targeted therapy to counteract the effects of specific aberrations to improve the outcomes of affected patients. 2)Maximize value creation through collaboration- lead the effort to coordinate all the stages of developing and testing new anti-cancer drugs. 3)Cancer convergence- inter-connecting programs to offer integrative opportunity for innovative research. 4)Strategic inflection point: Translational research to drug development- patients benefit through new treatments, personalized medicine research and support overall research mission of institution.</p>					
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>미래의 개인맞춤의약과 2013년도 국립암센터 로드맵 프로젝트의 목표 및 중점적 고려사항 우선적으로 프로젝트의 목표를 암에 의한 사망률을 보다 현격하게 감소시키는 동시에 생존하는 환자의 비율을 높이며, 많은 수의 암이 예방되는 것에 목표를 두어야 함. 또한, 새로운 의과적인 방법 개발과 더불어 새로운 항암제와 혁신적인 치료법의 개발을 통하여 지역적 특성을 갖는 암종에 대한 치료향상에 기여하는 것을 목표로 한다.</p> <p>연구자 중심의 신약발굴 및 개발 프로세스 전임상 신약개발: 새로운 컴파운드의 개발</p> <p>항암신약개발 프로그램내에서 융합접점의 도출</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Cell-based high contents screening을 이용하여 DNA 손상반응을 지해함으로써 종양세포를 감작시키는 항암물질 탐색 및 제어 기전 연구 2. Nanostructured substrates as an efficient platform for cell growth 3. 핵산 aptamer-항체 복합 항암제 플랫폼 기술 개발 4. Functions of alternative splice variant genes on tumorigenesis and regulation <p>신약개발과정을 위한 이행성연구 급속한 기술발전과 암의 유전체연구가 접목되면서 암의 진단과 임상시험 (디자인과 치료)에 중요한 요인이 되고 있다.</p>					
<p>◆ 연구성과</p>					

-정량적 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수		
IF 합		
기타 성과	기획보고서	100
<p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한</p> <p>-정성적 성과</p> <p>Development of "convergence" to identify new innovative technologies and tools!</p> 		
<p>◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)</p>	성명	

Project Summary

Title of Project	Focus on “discovery and development” phases of anti-cancer drug development processing
Key Words	discovery and development-drug, device and diagnostic, personalized medicine, drug discovery development processing, translational research
Project Leader	
Associated Company	National Cancer Center
Project Planning:	
<p>I. Personalized Medicine of the future and NCC Roadmap for 2013 Taking Steps: Specific steps should be taken to ensure that cancer death decrease more rapidly, the ranks of survivors swell and an even greater number of cancers are prevented in the first place. In addition to new surgical methods, novel drugs and innovative treatments should be devoted to regional specific diseases.</p>	
<p>II. Investigator initiated drug discovery development processing. Preclinical drug development proposal: development of a new compound</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Major analytical system- establishment of a suitable analytical assay that will permit determination of drug and drug metabolite concentration in biological matrices 2. Pharmacokinetics system- to determine relative oral bioavailability in animals prior to a proposed clinical trial of a compound to be administered by this route. This basically defines the relationship between dosing and achieved plasma drug concentration. 3. Animal research system- animal research component of a preclinical drug development program should support early drug efficacy and dose range finding studies, pharmacokinetic/dynamic studies, and preclinical toxicology. The facility and practices must be compliant with Good Laboratory Practices in order to meet FDA guidelines for Investigational New Drug applications. 4. Imaging system- focused on the development of in vivo imaging agents targeted to cancer for early detection and monitoring. 5. Biomarker implementation system- purpose of the system is to implement known makers into clinical trials. Discovery of markers would require a different design, such as DNA copy number detection with FISH, mutation detection using a SNP based approach, sequencing for confirmation and genes without hot spot mutations and immunohistochemistry. 	
<p>III. Creating a convergences within anti-cancer drug development program Knowledge about protein coding genes, noncoding-RNAs, single-nucleotide polymorphisms and their behavior in the human organisms has been achieved by analysis of data generated by array-based and DNA sequencing technologies, it is rapidly growing and improving in the understanding of the biology of cancer. The new innovative technologies and tools have been developed to predict disease recurrence and progression, response to treatment, as well as new insights into a various form of the anti-cancer drug development programs. But challenges are still being placed within the technical usage and processing.</p>	
<p>IV. Translational research to drug development processing- Fast progress in technology and cancer genome biology strongly interacts and adds strong factors for transformation in oncology diagnosis and clinical trial development (design and treatment).</p>	

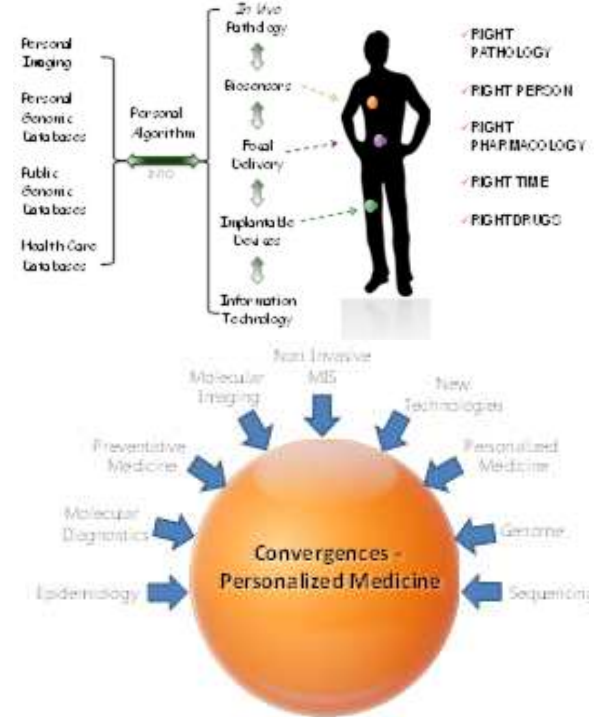
※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

Project Proposal

I. 미래의 개인맞춤의약과 2013년도 국립암센터 로드맵

프로젝트의 목표 및 중점적 고려사항

우선적으로 프로젝트의 목표를 암에 의한 사망률을 보다 현격하게 감소시키는 동시에 생존하는 환자의 비율을 높이며, 많은 수의 암이 예방되는 것에 목표를 두어야 함. 또한, 새로운 외과적인 방법 개발과 더불어 새로운 항암제와 혁신적인 치료법의 개발을 통하여 지역적 특성을 갖는 암종에 대한 치료향상에 기여하는 것을 목표로 한다.



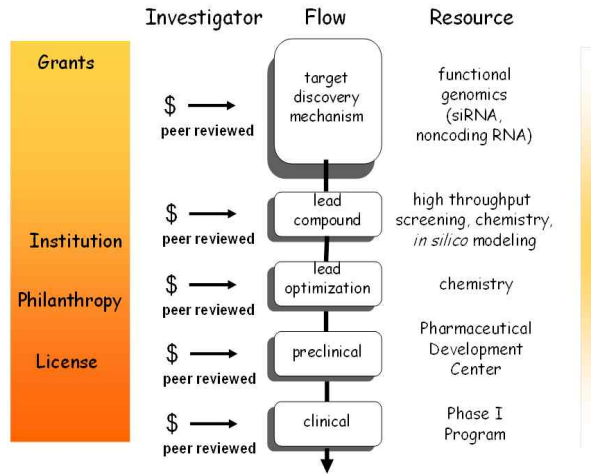
II. 연구자 중심의 신약개발 및 개발 프로세스

전임상 신약개발: 새로운 컴파운드의 개발

1. 중점 분석 시스템 - 세포 및 모델생물 등의 생체수준의 분석매트릭스를 기반으로 하여 신약과 신약의 대사산물의 농도를 측정할 수 있는 적합한 분석기법의 확립
2. 약물동력학시스템 - 임상시험을 실시하기 전에 모델동물들을 이용하여 경구투약에 의한 효과를 결정하기 위한 시스템의 확립이 필요하며 이를 기반으로 투약용량과 투약된 신약의 혈청농도를 결정하게 된다.
3. 동물모델시스템 - 전임상 단계에서의 신약개발에 필수적인 구성요소로써, 초기약물의 효

과분석 및 투약범위의 설정, 약물동력학연구, 전임상 독성테스트에 이용된다. 동물실험시 설과 시행방법은 미국 FDA의 Investigational New Drug application을 통과하기 위해 GLP (Good Laboratory Practice)에 부합하는 적합성 테스트를 통과해야 한다.

4. 영상시스템 - 암의 조기진단과 더불어 발생된 암의 모니터링을 위하여, 암을 표적으로 하는 영상 물질 (imaging agent)의 개발을 필요로 한다.
5. 바이오마커의 체계적인 임상적용 시스템 - 기존에 보고된 바이오마커들을 체계적으로 정리함으로써 임상에 적용한다. 또한 새로운 바이오마커의 발굴을 위하여 FISH (Fluorecence in situ hybridization)을 통한 유전자 반복변이탐색, SNP (Single nucleotide polymorphism)기반의 돌연변이 탐색, 그리고 이러한 변이의 검증을 위한 염기 절열 결정 및 면역화학염색 (immunohistochemistry)등을 수행한다.



이미징시스템개발

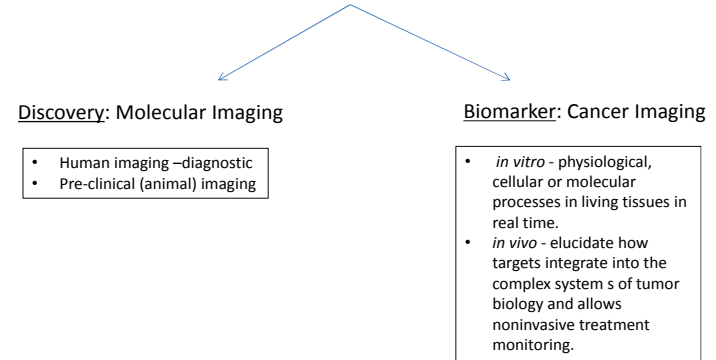
현대의 신약개발기술은 사람에 있어서 치료 자체 뿐 아니라, 치료효과와 독성에 의한 부작용을 치료과정의 초기에 모니터링 할 수 있도록 하는 이미징 기술을 포함한 기법들을 접목시키고 있다.

III. 항암신약개발 프로그램내에서 융합접점의 도출

마이크로어레이와 고속염기서열 기술을 기반으로 하여 생성된 데이터의 분석을 통하여 protein coding gene, non-coding RNA, single-nucleotide polymorphism과 사람에서 이들의 작용양상에 대한 정보가 급속도로 축적되고 있으며, 이러한 정보는 암의 생물학적인 이해를 돕는데 기여하고 있다.

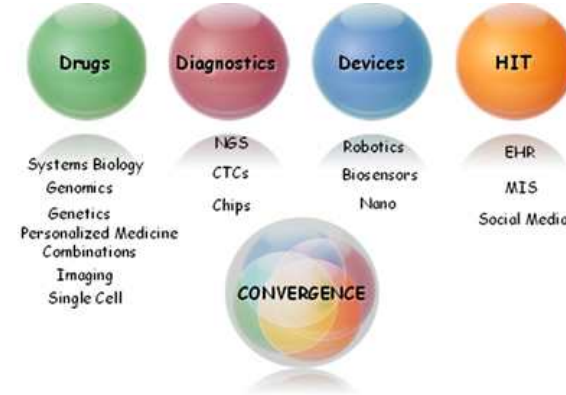
이에 따라 질병의 재발과 진행, 치료에 대한 반응을 예측하기 위해 혁신적이고 새로운 기술과 기법들이 개발되어오고 있을뿐 아니라, 이를 통한 새로운 견해들이 다양한 항암신약 개발 프로그램의 형태로 접근되고 있다. 그러나, 기술적인 제한점과 프로세스 운용의 한계로 인하여 아직 극복해야 할 부분이 존재하고 있으며 이러한 점들은 프로세스간의 융합접점을 도출함으로써 해결해야 한다.

“Views of the Cancer” (NCC)



- Strategy: 1. 2013 Emerging Technology- Biomolecular imaging
2. NCC will high impact facility to identify.....

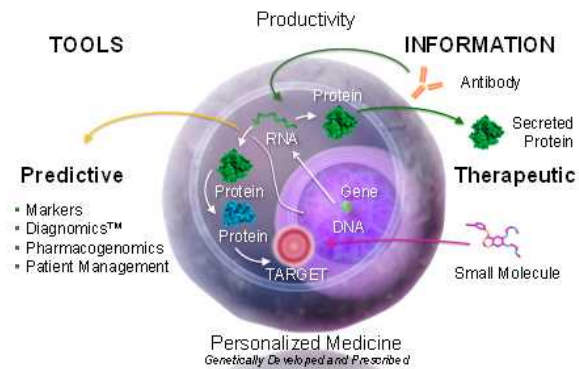
새롭고 혁신적인 기술과 기법을 발굴하기 위한 “융합점”의 개발



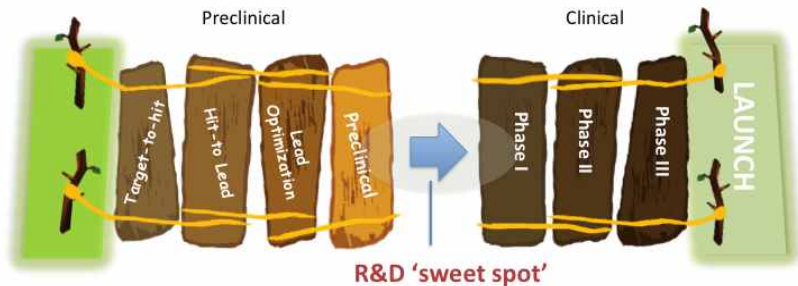
IV. 신약개발과정을 위한 이행성연구

급속한 기술발전과 암의 유전체연구가 접목되면서 암의 진단과 임상시험 (디자인과 치료)에 중요한 요인이 되고 있다.

유전체정보의 해석: “발굴 및 개발”에 주안점을 둔 항암신약 개발과정은 암의 관리에 대한 전반적인 효율성 향상을 제고하게 된다.



항암신약개발의 패러다임: “연구를 개발단계로 연결하기 위한 취약포인트”의 극복



PROJECT PROPOSALS: 융합기술연구부 NExT연구과

**I. “세포생리중심의 총체적 초고속 신약타겟 분석코어”
Integrative High-throughput Cell-Based Target Assessment Core
새로운 항암신약개발과제와 관련한 연구 환경의 실제¹**

<세계동향>

- 생체현상의 총체적인 이해를 위한 통합적 분석 연구확산: 1000 genome project (미, 영, 중 2,500명), ICGC (International Cancer Genome Consortium, 10개국 25,000개 암 조직)
- 시스템 생물학 기반의 맞춤형 치료표적 발굴 및 검증 활발: 미국 NIH 산하 NCI 및 NHGRI 주도로 TCGA (The Cancer Genome Atlas) 프로젝트를 2005년부터 시작
- 주요국은 오믹스 기반 툴의 융합으로 생체분자 상호작용 이해 및 실용화 연구의 가속화: 오믹스 연구로부터 발굴된 타겟 및 바이오마커는 신약개발의 생산성 제고 및 획기적 진단 기술 개발로 연계되고 있음
- 세포기능조절 등에 기반을 둔 의약품 개발을 추진: 세포기능조절에 필수적으로 작용하는 kinase, phosphatase 등의 집단을 형성하는 단백질의 경우 다양한 생명현상에 관여함을 통한 약효 예측 및 합리적 의약 디자인이 가능
- Harvard의대와 Novartis를 중심으로 항암신약의 민감성 테스트를 위한 Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)설립^{2,3}

<국내상황>

- 전주기 (기술예측-연구개발-실용화/산업화) 고려한 중장기적인 과제수행의 부재
- 국내 유전체 연구 육성 및 기술개발은 꾸준히 지원되고 있으나 최근 3년간 ('09-'11) 증가하는 경향 보이지 않고 정체 추세
- 대부분의 유전체 연구는 단편적인 기능연구에 집중되어, 정보 생산 및 분석을 위한 국가 인프라 및 원천기술개발을 위한 지원이 저조한 상황
- 2009년 유전체 관련 정부 R&D 투자비중: 유전체 생산 7%, 분석 3%, 기능 80%, 응용 및 기타 10%
- 질환동물모델에 대한 국가적 인프라 미비

국립암센터의 New Experimental Therapeutics개발을 위한 해결방안

- 유전체 및 단백질체 분석 코어를 이용하여 대용량의 데이터가 생산되고 있음에도 불구하고, 이 candidates를 validation하는 과정에서 발생하는 문제는 개별 연구책임자의 연구자원 및 연구원 인력 풀을 이용하는 것으로 제한되는 throughput capacity임
- 국립암센터가 목표로 하고 있는 선도적 신성장동력창출의 전략과제인 글로벌항암신약 개발의 중심축이 되기 위하여 중장기적으로 “세포생리기반의 총체적 초고속 타겟분석 코어”의 설립이 요구됨.



Integrative High-throughput Cell-Based Target Assessment Core의 Components

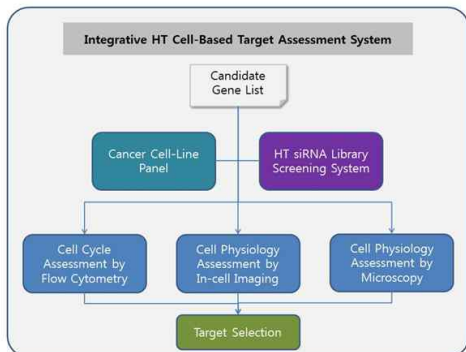


그림 1. Integrative HT Cell-based target assessment system의 모식도

A. High-throughput cancer cell line panel

- a) 필요성
 - i) 세계적으로 Cell line에 기반한 항암신약의 테스트를 high-throughput으로 수행하는 움직임 발생
 - ii) Integrative HT assessment에서 이용되는 다양한 암 세포주 들을 panel화하여 원할한 HT assay system완성의 기반
- iii) 기존에 국립암센터에서 운영하고 있는 시설이나 장비가 부재함

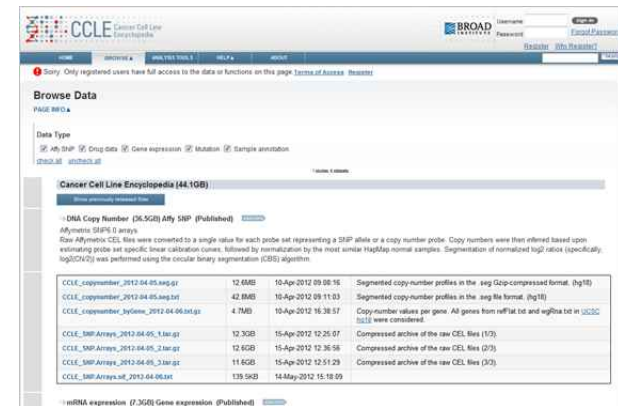


그림 2. CCLE 웹사이트화면 (<http://www.broadinstitute.org/ccle/>)

- b) 필요장비 - 그림과 간단한 설명으로 - (Cell culture system, Cell storage system)
 - c) 샘플 - 환자 조직, 구매하거나 분양받을 수 있는 세포주 -
 - d) 운용인력
 - 연간 운용인원 - 2명
 - e) 예산 - 설치단계와 운용단계 (연간예산액?) 각각 -
 - 설치비: Cell culture system (2억), Cell storage system (1억)
 - 운용비: 연간 2억
- B. High-throughput siRNA screening system**
- a) 필요성
 - i) 유전체, 단백질체 연구를 통하여 선정된 candidate gene들의 활성이 항암작용에 미치는 생물학적인 영향을 판단하기 위하여 필수불가결한 과정이며, 유전자의 발현을 mRNA수준에서 차단시키는 과정에서 유전체 수준에서의 loss-of-function study를 수행하므로써 표적선택의 폭을 확대시킴⁴
 - ii) 다양한 암세포주에서 타겟유전자의 불활성으로 인한 생물학적인 예상효과를 신속하게 파악하며 세포주기의 영향 및 형광현미경영상 기반의 세포생리분석의 첫 기준을 제공

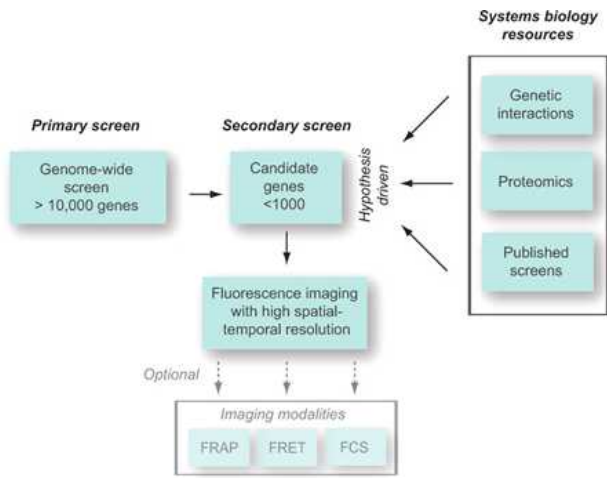


그림 3. 초고속 스크리닝 전략의 예⁵

- b) 필요장비 및 시약
 - i) High-throughput liquid handler



그림 4. 초고속 liquid handler system의 예 - Tecan HID EVOLUTION

- ii) siRNA library: pan-genome or cancer-related gene oriented siRNA library
- c) 운용인력
 - 연간 1명
- d) 운용예산

- i) 장비구매: 1억 5천만원
- ii) 운용예산: 연간 5천만원~1억원 (실험 양에 따라 변동)

C. Automated microscopy for high-throughput target screening

- a) 필요성
 - i) 타겟 유전자의 스크리닝 시 세포수준에서의 imaging은 생물학적인 근거마련에 중요한 자료마련⁵
 - ii) 새로운 치료제가 세포의 외부 혹은 내부의 어떤 소기관에 영향을 주는지 파악하는 것은 치료제의 효능 및 치료범위 결정에 근거가 됨
 - iii) 기존에 국립암센터에 설치된 confocal microscopy 및 in cell analyzer에 장비를 보강하여 설치가 용이
- b) 필요장비
 - i) IN Cell Analyzer (기보유)
 - ii) Long Term live cell imaging system (IncuCyte)



그림 5. Cell culture incubator mounted live cell imaging system.

- c) 운용인력
 - 연간 1명
- d) 운용예산
 - i) 장비 구입: 2억원 (IncuCyte)
 - ii) 운영예산: 연간 5천만원 (실험양에 따라 변동)

D. Florescence activated cell sorter for cell cycle analysis

- a) 필요성
- 항암신약의 대부분은 세포독성을 가져오는 결과를 유도함
 - 세포독성으로 인한 효과의 검증은 세포주기의 sub G0/G1 stage에서의 정지로 나타나는 세포사멸 혹은 기타 phase에서의 정지로 나타남
 - 국립암센터에서 기존에 운용되고 있는 BD FACS Caliber system을 이용하여 Integrative assessment system에 편입하기에 용이함
- b) 필요장비
- BD FACSCalibur (기보유)
- c) 운용인원
- 연간 1명 (현재 FACS 전담 operator가 있음: 특수암연구과 김태식 연구원)
- d) 운용예산
- 연간 3천만원 (실험양에 따라 변동)

참고문헌

- Bio-Vision 2016 제2차 생명공학육성기본계획 2단계 계획 ('12-'16), 교육과학기술부 2012.
- Berretina J. et al. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-607. 28 March 2012
- Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>)
- Echeverri CJ & Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nature Review Genetics* 7: 373-384. May 2006
- Conrad C & Gerlich DW. Automated microscopy for high-content RNAi screening. *J. Cell Biol.* 188: 453-461. 22 February 2010.

II. Development of cell-based screening

Cell-based high contents screening을 이용하여 DNA 손상반응을 저해함으로써 종양세포를 감작시키는 항암물질 탐색 및 제어 기전 연구

연구의 필요성

- 세포 기반 (cell-based) high contents screening 방식은 세포수준에서 표적물질을 단시간에 고효율로 스크리닝 할 수 있는 방법으로 약물의 세포투과성이나 독성등의 문제를 배제할 수 있는 장점이 있으며 현재 high content screening의 사례는 연 50% 이상 증가할 것으로 예상됨.
- 대표적 항암요법인 방사선 치료요법과 많은 화학 치료요법(Etoposide, CPT, doxorubicin...)은 종양세포의 DNA에 손상을 유도함. DNA 손상에 대해 종양세포는 apoptosis가 일어나거나 cell

cycle arrest 되면서 자체적으로 손상된 DNA를 복구하려는 반응이 유도됨. 자체적 DNA 복구 기전은 항암제의 종양세포 사멸기능을 저해하며 항암제에 대한 내성 유도에도 관련이 있을 것으로 보고되어짐. cell cycle arrest 나 DNA 복구반응을 포함한 DNA 손상반응을 저해함으로써 종양세포를 감작시켜 항암제에 대한 내성을 극복될 수 있을 것으로 기대됨.

- 항암 치료시 생성되어 DNA 손상을 일으키고 세포사멸을 유도하는 것으로 알려진 활성산소(ROS)의 조절 기전 연구는 항암치료에 하나의 전략으로서 연구되고 있음.

Cell-based high contents screening의 유용성 및 전망

기존의 약물 스크리닝 방식은 시험관에서 표적 단백질의 활성을 측정하는 방식으로 이루어짐. 이 방법이 신속하고 간편하나 in vitro에서 나온 결과들이 일부 작위적일 수 있고 실제적으로 약물로 응용되는데 있어서 세포투과성이나 세포 독성 유발등 부적합한 경우가 많음. 이러한 약물 스크리닝의 단점을 보완하기 위하여 다양한 세포내 단백질들이 공존하고 생리적으로 유사한 환경에서 스크리닝을 진행하는 cell-based assay 방법을 최근 신약개발의 주요 전략으로 삼고 있음. 그 중에서도 하이컨텐츠 스크리닝(High Contents Screening)은 살아있는 세포내의 다양한 표적을 분해능이 높은 형광 현미경에서 얻어진 영상을 기반으로 분석하여 정량화 할 수 있는 스크리닝 방식임.(Table 1. Steven A. Haney (2006) High-contents screening moves to the front of the line. *Drug Discov. Today* 11(19-20), 889-894).

TABLE 1

A comparison of high-throughput screening technologies

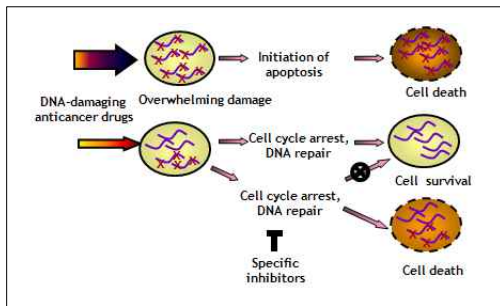
Technology	Target specific?	Pathway specific?	Integrated counterscreen?	Limitations
HCS	Yes - specific hits can be identified if the assay uses a substrate of the target used as the assay endpoint	Yes - transcription factors and other proteins that respond to the activation of a pathway can be used as assay endpoints	Yes- toxic effects can be identified directly and identified pathways or targets can be multiplexed	Data intensive Specific reagents may not be available or robust enough for screening
Cell-based (transcriptional) reporter assays	No - transcriptional reporters respond to compounds that affect any step in the pathway	Yes	Yes - secondary reporters can be developed into a cell line	Promoters are often activated by multiple pathways (even for a single transcription factor); Spurious activation (such as from chromatin structure) can occur
Binding assays (in vitro assays including fluorescence polarization and scintillation proximity assays)	Yes - the target is screened directly	No	No	Gross toxicity, cell permeability and other biological liabilities are not assessed directly

Drug Discov. Today (2006) 11: 889-894

High Contents Screening 가 응용되는 분야는 세포사멸, 표적분자 이동, 세포 생활성, 세포분열, 수용체-리간드 상호작용, 유전자 발현, 단백질 국제와 활성, 효소 활성, 수용체 내입등 다양함. High Contents Screening의 응용사례는 매년 50% 이상 증가할 것을 예상되고 있음. (Comley, J. (2005) High content screening. *Drug Discov World* 6(30), 31-53). 따라서 적절한 목표 물질과 제어기전의 이해를 기반으로 High Contents Screening을 이용하여 얻어진 정보를 효율적 분석함에 따라 약물 스크리닝은 효과적인 결과물을 얻을 것으로 기대됨.

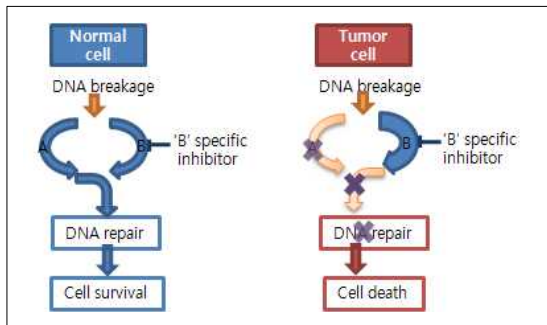
항암제 표적으로서 DNA 손상 반응 기전의 중요성

- 세포내 대사작용이나 세포분열과 같은 내부적(endogenous) 자극 혹은 UV, 화합물과 같은 외부적(exogenous) 자극에 의해 세포당 매일 수만개의 DNA가 손상 받고 있으나 손상된 DNA는 적절한 DNA repair 기전에 의해 복구되어 genetic 정보가 안정되게 유지되고 있음. 자극을 받



항암제와 병행 처리시 기대 효과

역활을 하고 있음 (Mills et al., Immunological reviews 2003;194:77). 방사선 요법이나 화학 약물요법등 대부분의 항암치료는 DNA 손상을 유도하여 종양세포의 사멸을 유도하는 것을 기반으로 하고 있음. 항암제에 의한 DNA 손상은 세포내 cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis의 반응을 유도함. 이러한 DNA 손상에 대한 세포내 반응 기전은 전략적으로 항암제의 표적이 되고 있음.



DNA 손상 반응 저해제의 단독 처리시의 기대 효과

손실된 DNA 손상 반응 기전외의 유지되고 있는 intact DNA 복구 기전에 과도하게 의존하는 경향을 보임. 따라서 유지되고 있는 intact DNA 복구 기전의 특이적 저해제를 처리하면 정상 세포는 저해되지 않은 DNA 복구 과정을 이용하여 생존이 가능하지만 저해된 DNA 복구과정에 의존적인 종양 세포는 선택적으로 사멸시키는 효과를 기대할 수 있음. (Helleday et al, Nature reviews 2008;8:193) 2005년 Nature지에 DNA 손상 기전 관련 분자인 PARP1의 특이적 저해제가 BRCA 결핍 종양세포주를 선택적으로 사멸시킨다는 보고가 되었고, 임상시험에서도 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되고 있음. (Bryant et al, Nature 2005 434:913, Farmer et al, Nature 2005 434:917, Fong et al NEJM 2009 361:123)

- DNA 복구과정은 진화적으로 conserved 시스템으로서 많은 redundant 기전을 가지고 있음. 현

은 세포는 일련의 분자적 신호과정을 통해 손상된 DNA 부위를 인지하고 cell cycle arrest와 DNA repair machinery를 이용해 손상된 DNA를 복구하여 세포의 생존을 유지함. 그러나 DNA 손상이 과도하여 복구가 불가능한 세포는 apoptosis를 유도하여 세포를 제거함. 이러한 일련의 DNA 손상 반응은 잘못된 유전정보가 전달되는 것을 방지하는 유전체의 안정성(genetic stability) 유지와 mutated gene에 의한 종양 억제(tumor suppression)에 중요한

손상된 DNA 복구는 genomic stability 유지 및 생존에 필수적이므로 정상 세포에서는 손상된 DNA를 다양한 기전을 이용해 복구함. 그러나 실제로 많은 종양세포에서 DNA damage response gene들의 변이 (mutation)가 발견되고 있으며, 이런 gene들의 mutation은 종양세포에서 정상적인 DNA damage response 기전을 재배치하고 비정상적인 DNA 손상 반응 기전이 작동됨. 종양세포는

제 보고된 바에 의하면 DNA 복구 과정에 관련된 분자들이 항암제로서 표적이 되고 있음 (그림 3)

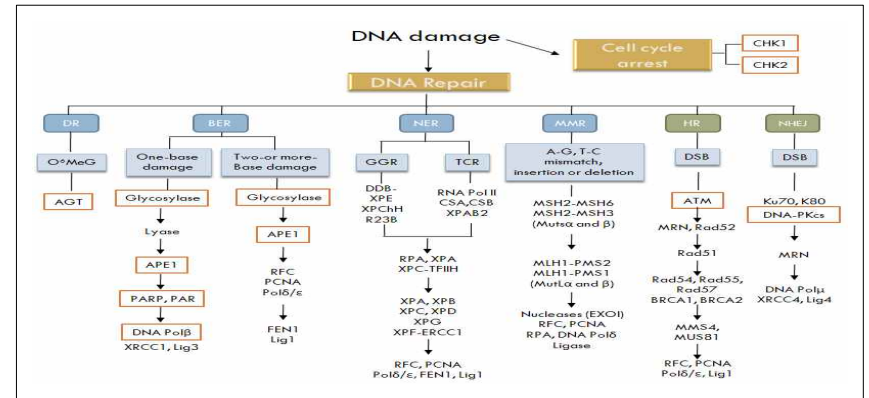
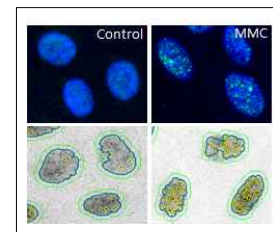


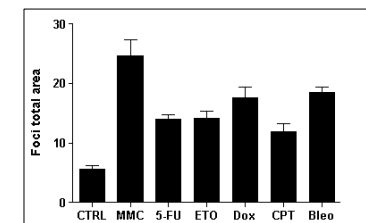
그림 3 항암제로서 표적이 된 DNA 복구 기전과 분자.

Cell-based assay research STRATEGY

High contents screening 기기를 이용한 FA-BRCA 측정-선행 과제에서 수립된 세포 기반 high contents screening을 이용하여 DNA 손상에 의해 FA-BRCA 기전이 활성화되면서 FANCD2가 ubiquitination 되고 손상된 DNA 부위로 이동하여 foci를 형성하는 것을 marker로 이용하여 FA-BRCA 기전을 측정하고자 함.



FANCD2 foci 분석



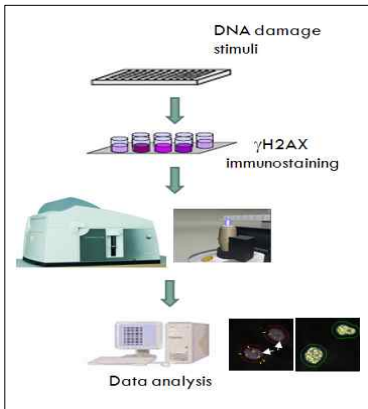
항암제에 따른 FANCD2 foci 형성

DNA 손상 반응 저해제의 선형연구 결과

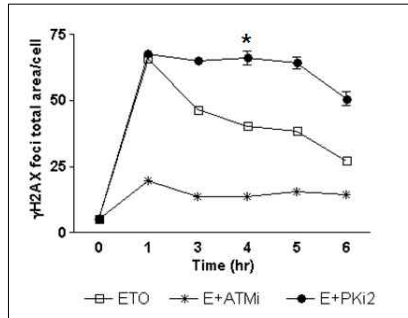
- DNA 손상 반응 저해제는 기존의 항암제와 병행 처치로 항암 효과를 증대시키는 효과를 기대할 수 있으며 단독 처치로 종양세포를 선택적으로 사멸시키는 효과를 기대할 수 있음.
- 본 연구자는 선형 연구를 통하여 DNA 손상에 의하여 유도된 γH2AX foci 형성을 손상 반응 maker

로 이용하여 DNA 손상 반응을 스크리닝 할 수 있는 측정방법을 확립하였고이 스크리닝 방법을 이용하여 DNA 손상 반응의 초기 단계 저해제뿐 아니라 DNA repair 저해를 동시에 스크리닝 할 수 있음을 증명함.

- 또한 확립된 assay system을 이용하여 한국 화합물은행에서 받은 6,800개의 화합물 라이브러리를 스크리닝 하였음. 결과 DNA 손상반응 초기 단계에서의 저해제 12종과 DNA repair 단계 저해제 9종을 탐색하였음.



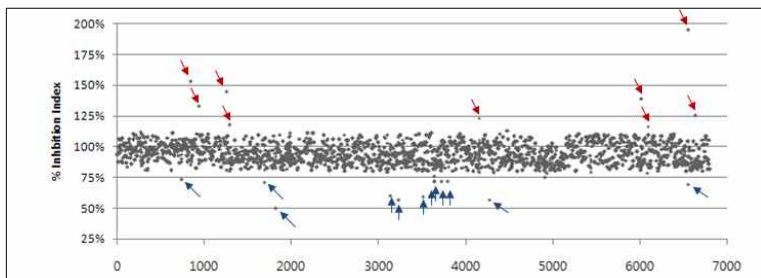
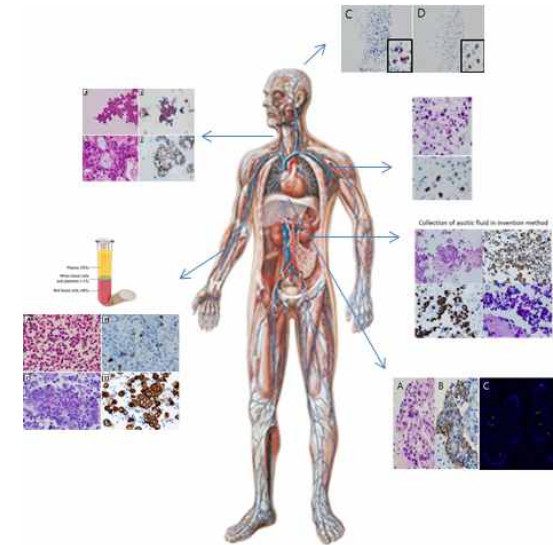
Scheme of analysis procedure



Alteration of γ H2AX foci by small molecular inhibitors.

matrix (ECM)) by mediating cell-cell and cell-ECM substrate that subsequently trigger a series of biochemical signaling pathways. As the engineered nanostructures mimic the nano-architecture of the natural ECM, the interests in cell-substrate interactions have been stimulated and the attempts to engineer the surface adapted into traditional cell biological work have been made. Significant efforts have been devoted for the fabrication of nanostructured materials due to their unique properties including nanosize, high surface area-to-volume ratio, high porosity, and tunable physicochemical properties. Such nanostructured materials analogous to the components of ECM actively regulate cellular responses by creating artificial microenvironments which resemble the micro/nano-structure and chemical composition in the body.

Key aspects and needs for conductive nanostructure-based cell capture/release platform: 1) the separation and capture of cancer cells from various tumor tissues such as surgical tumor tissues and ascites and circulating tumor cells in blood to enable culture of primary tumors. 2) the isolation of gastric/breast cancer stem cells and 3) the purified cancer cells can be used for molecular biology analysis and for cancer immunotherapy.

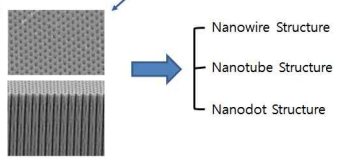
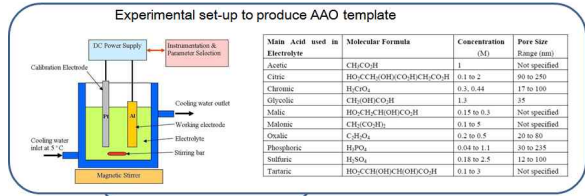


Chemical library screening 결과

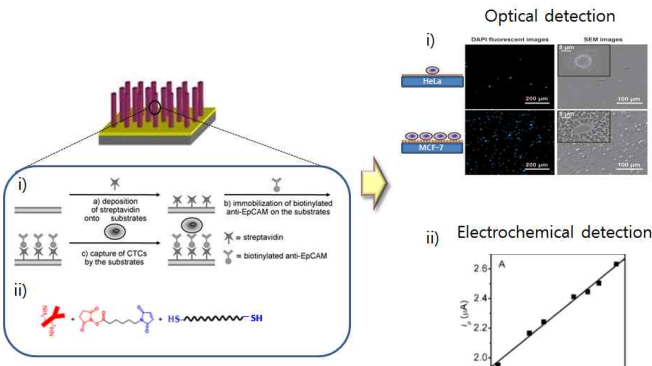
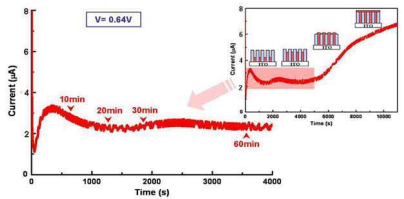
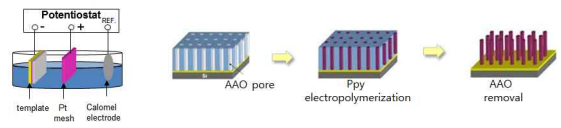
Nanostructured substrates as an efficient platform for cell growth

Numerous cellular processes including survival, proliferation, differentiation and migration are initially manipulated by the formation of cell adhesions to underlying substrate (i.e., extracellular

Designing 3D conductive nanostructure to develop cell capture/release platform strategy:

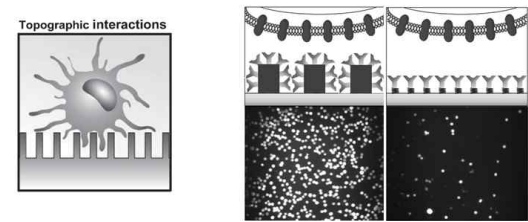


AAO template-assisted approach



Highly efficient capture of cancer cells

- i) Enhanced local topographic interactions with nanoscale cellular surfaces
- ii) Better orientation, adhesion and proliferation with increasing "roughness"
- iii) A high-density of nanoparticles for a large amount of antibody conjugation



III. 핵산 압타머-항체 복합 항암제 플랫폼 기술 개발

Aptamers are single stranded folded oligonucleotides that bind to molecular (protein) targets with high affinity and specificity.

Apto- "to fit" and **mer-** "smallest unit of repeating structure"

Aptamer structure is unique tertiary structures allow aptamers to fold into stable scaffolds for carrying out molecular recognition with van der Waals, hydrogen bonding, and electrostatic interactions drive high affinity target binding. Designed to block protein-protein interactions and share properties of both small molecules and biologics.

Advantages of aptamer:

- Aptamers specifically bind a target of interest ($K_D = \text{pM} \sim \text{nM}$)
- Aptamers are produced by chemically process (*in vitro*)
- Non-immunogenic
- Smaller size allows more efficient entry into biological compartments (typically 10 ~ 20 kDa for aptamers vs. 150 kDa for antibodies)
- Able to select for and against specific targets and to select against cell-surface targets, ions, small molecules, etc.
- Conjugation chemistries for the attachment of dyes or functional groups and can be readily introduced during synthesis.

압타머-항체 융합형 바이오소재를 이용, 분자표적 지향 항암제를 신속, 저비용, 고집적(quick, low-cost, high-throughput)으로 개발하는 플랫폼 기술(platform technology)의 개발 및 산업화 시도

추진배경 및 필요성

- ▶ 단백질 의약품과 항체약품이 최근 바이오산업을 주도해왔지만, 점차 성숙기 기술로 진입하면서 제품 간의 차별성이 사라지는 범용화가 진행되고 있음.
- ▶ 현재까지 확립된 제조항체 기반의 분자표적 지향 항암제 개발 기술은, 저분자 화합물 항암

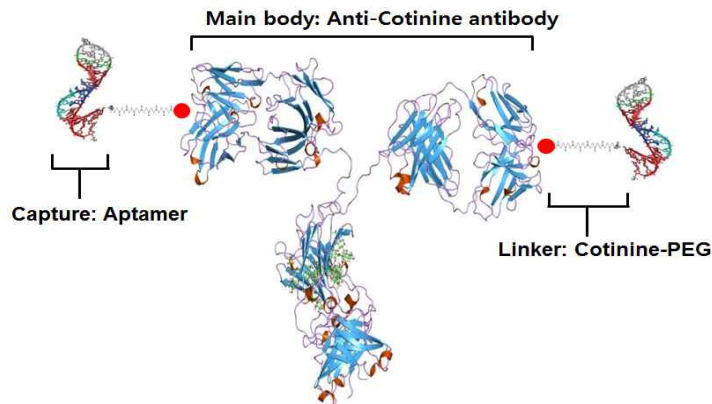
제에 비하여 부작용이 현저히 작고 안전하면서도 치료효과가 좋은 항암제 개발의 성공 가능성은 높였지만, 복잡한 제조공정, 값비싼 원료, 거액의 연구개발 투자비와 절대적으로 긴 연구 기간이 소요되므로 메이저 기업을 제외한 소규모 바이오 기업의 신규 진입이 난항이 예상되고, 다수의 항암 표적분자를 대상으로 한 각각의 항체를 개발, 생산하고 검증하는 것은 현실적으로 어려운 상황임.

▶ 핵산 압타머는, 표적분자 대상 친화도가 높으면서도 항체 항암제에 비하여 신속, 저비용, 고집적 개발이 가능하다는 점에서 병합치료를 목표로 하는 항암제 개발 플랫폼으로 매우 유리한 측면이 있는 반면, 치료효능 및 생체내 안정성 확보를 위한 공정개발 측면에서는 어려움이 많음.

Properties	Requirements	Candidates
Targets specificity & Binding affinity	Low nM ~ pM	Antibody, Peptide, Nucleic acid (Aptamer)
Screening & Production Efforts	Screening: <i>in vitro</i> Time, Cost	Peptide, Nucleic Acid
Immunogenicity	Low	Humanized antibody, Nucleic acid
Modification	Easy to conjugation	Small molecule, Peptide, Nucleic acid
Stability	Reduced renal clearance and degradation during blood circulation	Antibody

그림) Considering points for successful cancer therapeutics overcoming limitation of antibody

- ▶ 이들에 대해, 핵산 압타머와 지주 항체를 융합함으로써, 핵산 압타머와 항체의 장점을 모두 지닌 신개념의 바이오소재 분자표적 지향 항암제 개발의 유용한 플랫폼 기술을 확립할 수 있음.
- ▶ 특히 핵산 압타머-항체 복합 항암제는, 핵산기반 압타머의 장점인 표적분자와의 신속하고 효율적인 인지능을 지니는 동시에 항체가 가지는 세포 및 보체 매개 암세포 살해능(ADCC: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), 높은 생체내 안정성(*in vivo* stability)을 확보할 수 있으므로 표적인지 및 치료효능을 동시에 극대화할 수 있음.
- ▶ 따라서 핵산 압타머-항체 복합 항암제 기술에 대한 선행 투자를 통하여 원천 기술 및 지적권



확보를 시도하는 노력이 절실히 요구됨.

그림) 핵산 압타머-항체 복합 항암제 구조

국내의 동향

- ▶ 마켓 리서치사의 최신 보고서를 보면 치료용 항체 의약품 시장은 2011년 447억달러에서 2016년 577억달러로 연평균 5.3%의 성장을 지속할 것으로 예상되는 전 세계에서 매출 규모로 바이오 파마 제품의 가장 빠른 성장을 하는 계열 중 하나이고 신약개발의 새로운 패러다임으로 자리잡고 있음.
- ▶ 현재 FDA 허가를 받은 치료용 항체 약품은 31가지 정도며, 2014년을 기준으로 매출액 10위 약품 중 5개가 항체 약품이 될 전망이다.

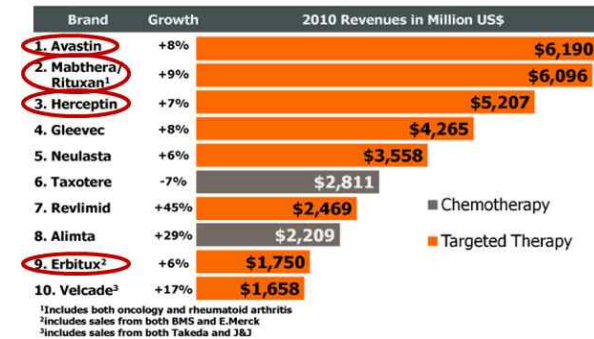


그림) The world's top 10 oncology brands and their sales (ref. Annual company reports, 2010)

- ▶ 셀트리온, 삼성바이오로직스, 동아제약 등 국내의 다수 제약사는 독자적 신약개발을 하기 보다는 항체 항암제 개발에 있어서 특허가 만료된 오리지널 의약품의 복제약인 제네릭(Generic) 제조에 주력하고 있음.
- ▶ 하지만, 다국적 제약사 및 중국/인도 등에 의한 제네릭 경쟁으로 국산 제네릭이 위협 받고 있음.
- ▶ 2004년 압타머 치료제인 Macugen은 FDA로부터 신약 승인을 받았고, Pfizer가 2005년 출시, 출시 이듬해인 2006년 \$103M의 매출을 기록함으로써 압타머의 시장 가능성을 확인함.
- ▶ 핵산 압타머의 글로벌 시장은 2010년 2억 3600만 달러에 불과하지만 4년 동안 연 67.5% 성장하여 2014년 19억 달러 규모로 예측함. 가장 큰 분야는 치료제로 4년간 54.6% 급성장 하여 2014년 12억 달러로 추산함. (2010; BCC research)
- ▶ 2010년 특허청과 국립암센터가 공동으로 “지재권 중심의 기술획득전략 사업”으로 특허동향을 분석한 결과, 압타머 기술분야는 발전기 단계의 기술로서 판단되며, 소수의 특정 출원인에 의해 핵심기술이 독점된 상태로, 강력한 원천기술의 확보에 의한 돌파구가 마련될 수 있는 기회로 사료됨.

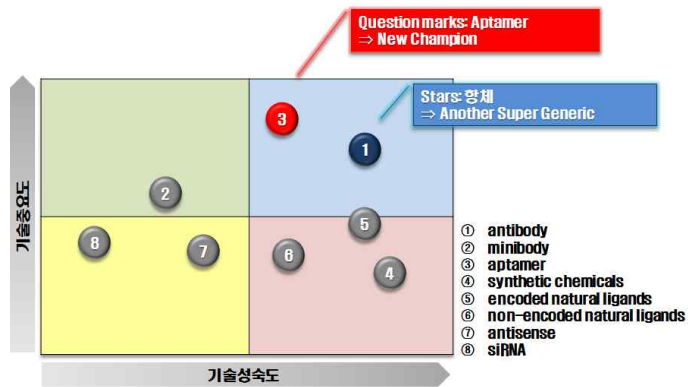


그림) Targeted therapy의 특허동향 분석 (ref. 지재권 중심의 기술획득전략 사업, 2010)

연구내용

기관과유연연구사업 Druggable Target 발굴사업의 1단계 수행 결과로 aptamer-항체 융합형 바이오소재의 개념 증명(Proof Of Concept)이 확립되었음.

2단계 사업 기간에서는 암 특이적 단백질에 대한 aptamer를 개발하고 aptamer-항체 복합 항암제 제조 공정 개발 및 비임상 진입을 목표로 함.

○ 연구 추진 내용

- ▶ 시험관 기반 SELEX (Systematic Evolution of Ligands of Exponential enrichment)를 통한 세포막 및 세포 분비단백질 특이적 핵산 aptamer 개발
- ▶ Cell-SELEX 기반 기술을 이용한 암 표적분자 및 aptamer 발굴
- ▶ 시험관 및 세포 수준에서의 aptamer 특이성 확인
- ▶ aptamer 결합용 지주 항체(anchor antibody) 개발 및 최적화
- ▶ aptamer-항체 복합 항암제 제조 공정 개발
- ▶ aptamer-항체 복합 항암제의 동물 효능 검증
- ▶ aptamer-항체 복합 항암제의 비임상 진입

기대효과

○ 기술적 측면

- ▶ 개발기간이 길고 고비용이 드는 항체를 항암 표적분자에 맞춰 매번 개발할 필요 없이 지주항체를 기반으로 하므로 고효율-저비용의 차세대 분자표적 지향 항암제 개발이 용이함.
- ▶ 다수의 목표 분자에 대한 항암제 개발, 복수의 항체 복합 항암제를 투여하는 치료, 환자 맞춤형 치료(personalized medicine)에 쉽게 적용이 가능함.
- ▶ aptamer에 분자 영상용 화합물이 결합된 분자영상 진단제 개발 및 동시-다기능(multi-specific multivalent) 핵산 aptamer-항체 복합 항암제 개발에 쉽게 응용될 수 있음.

- ▶ 개발된 항체의 임상 허가를 최초로 취득하면, 동일한 항체는 다양한 물질과의 복합 항암제 개발에 임상 허가 절차 없이 반복적으로 쓸 수 있을 가능성이 높음.

○ 경제, 산업적 측면

- ▶ 전세계 약품 시장에서 7% 이상 차지하며 Global top 20종 중 6종이 포함될 정도로 항암제 시장에서 큰 주목을 받고 있는 항체 치료제의 대체 혹은 병행요법으로 활용되어, 비용과 효율 면에서 매우 효과적이고 저렴한 치료용 aptamer 산업의 발전을 유도함.

- ▶ 현재 항체 및 aptamer의 효과/안정성은 검증되었으므로, 개발하고자 하는 융합형 분자표적 항암제는 therapeutic agent로 전환될 가능성이 매우 높고, 실용화될 경우 많은 부가가치를 창출할 수 있음.

- ▶ 핵산 aptamer 및 항체 항암제 국내 관련 연구진 간의 효과적인 공동 개발 발안 및 산업화 방안 확립.

IV. Alternative splice variant 유전자의 발암기전관련 기능 및 조절에 대한 연구 (Functions of alternative splice variant genes on tumorigenesis and regulation)

A. 연구의 배경

가. Alternative splicing과 genome complexity

다양한 생물 종들의 genome project가 수행되고 완결되면서 밝혀진 충격적인 사실 중의 하나는 한 종에서 밝혀진 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 숫자(complexity)가 실제 우리가 관찰할 수 있는 세포수준에서의 complexity와 일치하지 않는다는 사실이다. 이러한 불일치는 단백질 코딩유전자의 complexity가 일반적으로 cellular complexity보다 낮은 결과로 나타난다. 예를 들어 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 경우 gene complexity가 약 14,000으로 19,000인 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)보다 낮으며, 식물인 아가장대(*Arabidopsis thaliana*)의 complexity는 약 25,000으로 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 6,000의 4배를 약간 상회하는 정도의 수준이다. 사람의 경우에도 약 150,000개에 이르는 유전자가 있을 것으로 예상되었으나, 충격적이게도 2001년 Human genome project의 initial sequencing이 끝났을 때는 약 32,000개의 유전자가 있는 것으로 보고되었으며, 2005년 HGP가 완결되면서는 이보다 더 적은 25,000개의 protein coding 유전자가 존재하는 것으로 보고되었다. 그러나 실제로 데이터베이스에 축적된 mRNA나 ESTs (expressed sequence tags)의 종류는 밝혀진 유전자의 숫자보다 훨씬 많으며, 이는 alternative splicing에 의해 complexity가 커졌을 것이라는 가설에 힘을 실어주게 된다.

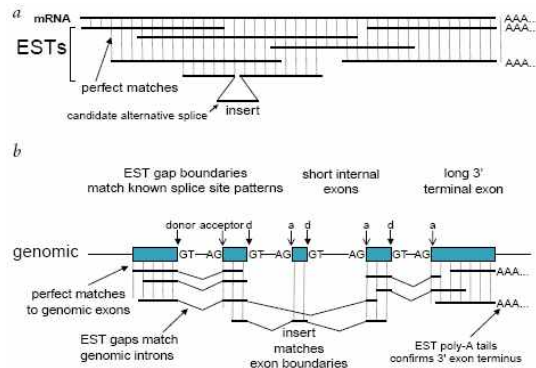


그림 1. Computational identification of alternative splicing (Moderek and Lee, 2002, *Nature Genetics* **30**: 13-19)

분자생물학의 발전과정에 있어서 alternative splicing에 관한 연구는 새로운 유전자 자체의 발견이나 transcriptional regulation등의 연구에 비하여 지금까지 그다지 많은 관심을 받지 못하였으나, alternative splicing의 개념은 1978년 Walter Gilbert에 의해 제안되었다. Gilbert는 1977년 adenovirus의 hexon 유전자에서 exon과 intron이 나뉘어 진 보고에 근거하여 서로 다른 exon들의 조합으로 서로 다른 isoform의 mRNA를 만들어낼 수 있음을 제안하게 된다 (Why genes in pieces? *Nature* **271**:501, 1978). 이후, alternative splicing에 의한 유전자 다양성이 몇몇 유전자들에서 밝혀지게 되고 1990년대 초반에는 고등한 진핵생물의 경우 약 5% 정도의 유전자들에서 alternative splicing이 일어날 것으로 추정하게 된다. 그러나 1990년대 말부터, 대량의 유전자 염기서열결정기술의 발달하면서 많은 연구그룹에서 human genome project와 더불어 다양한 생물 종과 각 생물 종의 서로 다른 조직과 각 조직에서의 발생분화단계별로 EST sequencing을 하고 그 데이터베이스화하게 된다. 이에, 생물정보학 분야에서는 축적된 ESTs를 상호간에 비교하거나 그림 1과 같이 EST들을 genomic DNA에 align함으로써 각각 38%와 42-59%의 human genes에서 alternative splicing이 발생할 것으로 추정하였다. 이에 최근에는 exon을 유전자 발현의 최소단위로 여기고, 발현조절 기작으로서 alternative splicing을 연구하는 "exonomics"라는 용어가 탄생되었다 (Stockheim & Nees, 2007, *Int. J. Biochem & Cell Biol.* **39**: 1432-1449).

나. 새로운 genome annotation에 의하여 부각되는 alternative splicing의 variation

2007년 사람 유전체를 새롭게 annotation하는 ENCODE project의 첫 결과로 전체 genome의 1%에 해당하는 부분에 대한 GENCODE annotation이 공개되었으며, 현재는 그 범위가 확대되어 2006년에 발표된 hg18 버전의 human genome에 GENCODE annotation과 여러 가지 조절부위 정보들이 공개되어 있다. 기존의 annotation에서도 multi-exon gene의 경우 평균 5.4 종 이상의 transcript를 생성하는 것으로 알려졌는데 (Harrow *et al.*, 2006 *Genome Biol.* supplement **1**:S4.1-9), ENCODE project의 GENCODE annotation을 통하여 분석된 보고에 의하면 단백질을 암호화하는 유전자들의 절반 이상에서 조직에 특이적이면서도 기존에

annotation되지 않은 exon의 set들이 기존에 알려진 유전자의 경계 밖에서 이용됨이 밝혀졌다 (Denoué *et al.*, 2007 *Genome Res.* **17**: 746-759). 열 두 종의 조직을 대상으로 RACE를 수행한 결과 stomach의 경우 기존에 알려지지 않은 새로운 5' 혹은 3'쪽의 transcribed fragment가 나타나는 빈도가 다른 어떤 조직보다도 많아서 그 비율이 52.6%의 loci에서 발견되고 있다 (Denoué *et al.*, 2007 *Genome Res.* **17**: 746-759). 이는 stomach의 경우 다른 조직에 비하여 alternative exon usage에 의한 발암기전이 보다 다양하게 분포할 것임을 시사한다.

또한 어떤 RACE반응의 결과로는 5'쪽의 extension이 인접한 유전자에 연결되어진 현상이 관찰되는데, 약 56%의 이미 annotation된 loci에서 이러한 현상이 나타난다. 이 현상은 histone protein의 acetylation/deacetylation이나 methylation에 의한 chromatin opening과도 관련되어 있을 것으로 사료된다. 이렇게 두 loci를 연결하는 transcript의 발현은 실제로 tiling array를 통하여 확인되었다.

다. Splicing mechanism과 alternative splicing의 요인들

Splicing의 가장 대표적인 형태는 일단의 단백질들과 ribonucleoprotein (RNP)들이 spliceosome이라는 구조물을 형성하여 RNA polymerase II에 의해 전사된 mRNA에서 intron의 경계가 되는 염기서열을 인식하므로써 일어나게 되며 GU로 시작하는 5' donor site와 AG로 끝나는 3' acceptor site를 인식하여 일어난다(그림 2). 5' splice site, branch site, 그리고 3' splice site는 각각 U1 snRNP와 U2 snRNP, U2AF에 의해 인식되며, U4, U5, U6 snRNP가 참여하게 되면서 splicing reaction이 완성된다(그림 2). Major case의 경우 GU-AG rule에 의하여 (그림 3A) 5' splice donor site와 3' splice acceptor site가 결정되며, 이외에도 GU-AG대신 non-canonical 한 donor-acceptor site인 AU-AC를 인식하여 splicing이 일어나는 minor한 case도 존재한다. Alternative splicing이 이러한 과정에서 발생할 수 있는 가능성은 그림 3C에서와 같이, splice site의 염기서열이 canonical form에서 변함으로써 spliceosome protein에 대한 affinity가 약해지는 경우, 그리고 그림 3D에서처럼 exon이나 intron내부에 이러한 weak site들에 대하여 이들이 보다 잘 이용되게 하거나 이용되어지는 것을 저해하는 enhancer (ESE: exonic splice enhancer, ISE: intronic splice enhancer)나 silencer(ESS: exonic splice silencer, ISS: intronic splice silencer)가 존재하고 이들이 특정 SR (Ser-Arg rich) protein을 splice site에 binding하게 하거나 binding하는 것을 방해하므로써 splicing의 변화를 가져오게 된다고 알려져 있다.

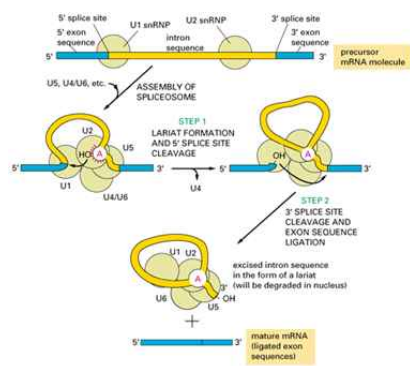


그림 2. Splicing의 진행과정.

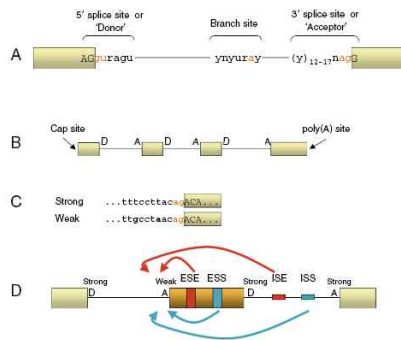


그림 3. Splicing을 조절하는 cis-acting sequences.

또한 이와 더불어 최근에는 RNA polymerase II promoter의 구조와 여기에 어떠한 transcription factor와 결합하는가의 여부에 따라 alternative splicing을 조절한다는 연구결과가 나오고 있다. 그림 4와 같이 PolIII의 promoter가 강력하여 elongation rate, 즉 processivity가 빠른 경우 weak splice site를 갖는 exon boundary는 skip되나, promoter가 약한 경우 polIII의 processivity가 느려져서 transcript가 천천히 만들어지게 되고 이 경우 weak splice site에도 SR protein들이 인식하여 binding할 수 있는 기회를 충분히 제공하여 이 exon이 포함된 transcript가 만들어진다는 것이다. Chromatin의 구조 또한 splicing에 영향을 끼치는데, histone acetylation이나 DNA methylation에 의해 chromatin이 open 혹은 closed structure를 취하는 양상이 달라지므로써 polII elongation의 efficiency가 달라져 alternative splicing을 유발할 수 있다. 또한 진핵생물의 유전자에 있어서는 하나 이상의 promoter가 존재하므로써 각 생리적 상황에 맞는 promoter가 이용되고, 그에 따라 서로 다른 first exon이 선택되므로써(그림 5B) 다양한 transcript들을 만들어 낼 수 있다.

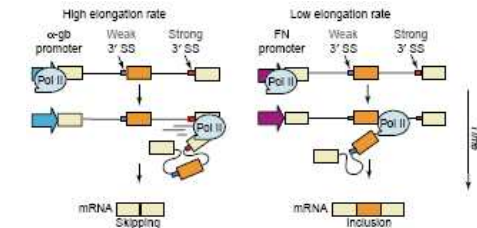


그림 4. PolIII promoter의 elongation rate에 의한 alternative splicing. 강력한 alpha-globin promoter의 경우 weak splice site를 갖는 exon의 skipping이 일어나며, 약한 promoter를 갖는 경우 polIII의 processivity가 줄어들어 spliceosome이 weak splice site에 binding할 충분한 시간이 확보되어 exon inclusion이 일어난다.

이러한 결과로 다음 그림 5A와 같이 여러 종류의 alternative splicing이 발생하며 그림 5B와 같이 promoter의 선택에 의해 첫 번째 exon의 사용이 달라지는 것이다.

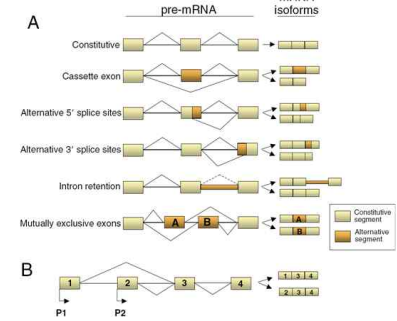


그림 5. A. 다양한 모드의 alternative splicing결과. B. 첫 번째 exon의 사용이 달라지는 경우.

이렇게 alternative splicing이라는 결과를 가져오는 데는 위에서 언급한 요인들뿐만 아니라, CELF (CUG-BP and ETR3-like factors)처럼 splice site의 선택을 조절하는 단백질이나 세포 신호전달과 alternative splicing을 연계하는 STAR family (Signal transduction and activation of RNA) 같은 RNA binding protein들이 발견됨에 따라 더욱 복잡하고 미묘한 메커니즘이 존재함이 속속 밝혀지고 있다.

최근 들어 nucleosome에 의한 genomic DNA의 packaging이 exon과 intron의 경계와 관련이 있다는 보고들이 등장하였는데, 아래의 그림과 같이 intron에 해당하는 부분에 비하여 exon에 해당하는 genomic DNA부위는 nucleosome에 의한 occupancy가 높게 나타난다. 이것은 exon의 평균길이가 genomic DNA가 nucleosome을 두 바퀴 감싸고 나오는 길이인 146 bp와

비슷하다는 점에서 신빙성을 더해주고 있다.

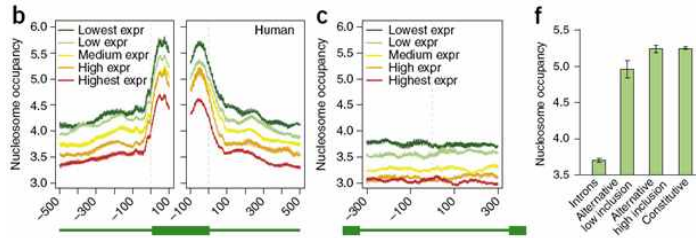


그림 6. Exon과 intron에 해당하는 genomic DNA부위에 따른 nucleosome occupancy의 차이. Constitutive exon이 가장 높은 occupancy를 보이며 alternative exon의 경우에도 high inclusion을 보이는 exon이 lower inclusion의 경우에 비하여 높은 occupancy를 나타낸다. (Schwartz *et al.* 2009 *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **13**: 990–995)

이와 더불어 histone 3의 특정 lysine residue의 methylation status와 exon usage사이 관련이 있음이 보고되었다. 아래의 그림과 같이 transcription start site와 관련이 있는 H3K4me3나 silent gene과 관련이 있는 H3K9me3는 alternative exon usage와 무관하게 일정한 수준을 유지하는데 반하여, internal gene body와 관련된 H3K36me3는 exon의 alternative usage에 비례하여 그 methylation정도가 달라짐을 알 수 있다.

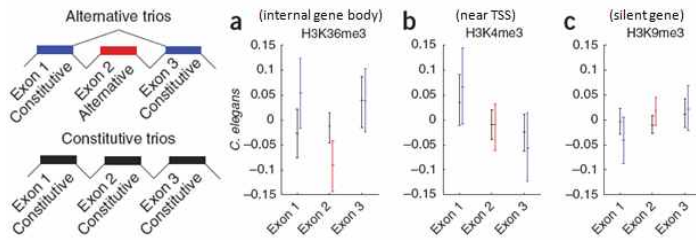


그림 7. Constitutive exon과 alternative exon에서 internal gene body와 관련된 H3K36me3의 분포를 비교한 결과. Alternative exon의 경우 H3K36me3의 비율이 낮은 반면 internal gene body와 관련없는 TSS부위에 해당하는 H3K4me3나 silent gene에 해당하는 H3K9me3의 경우 constitutive exon과 유의한 차이를 보이지 않고 있다. (Kolansinka-Zwierz *et al.* 2009 *Nature Genetics* **41**: 376–381)

라. Alternative splicing의 screening 방법 및 platform의 발전

Human genome project이전에는 의심이 되는 유전자의 변이에 대하여 Northern blot이나 PCR을 이용하여 detection하는 것이 전부였으며, genome wide alternative splicing survey는 human genome과 transcriptome의 정보가 축적되어가고 bioinformatics의 협력이 이루어

어지면서 급격하게 증가하면서 microarray를 기반으로 한 platform이 개발된다. Microarray를 이용한 연구는 fiber optic array에 alternative splicing을 profiling한 Yeakley를 필두로 (2002, *Nat. Biotech* **20**:353–358), ink-jet spotted exon-junction microarray에 (그림 6) 52개 human tissue로부터 alternative splicing을 연구한 결과가 발표되며 (Johnson *et al.*, 2003 *Science* **302**:2141–2144), 뒤를 이어 chemically synthesized oligonucleotide와 (Pan *et al.* 2004 *Mol. Cell* **16**:929–941) ink-jet oligonucleotide synthesizer를 이용한 연구가 (Frey *et al.* 2005 *Nat. Genet.* **37**:991–996) 보고되었다. 이러한 개발에 이어 현재 상업적으로 이용가능한 한 microarray chip은 Affymetrix사에서 제조하는 Gene Chip Human Exon 1.0ST이 유일하며, 이 칩은 NCBI의 RefSeq와 full-length mRNA로 구성된 17,800 "Core" transcript cluster를 포함한 총 262,000 transcript clusters에 대하여 1,500,000 이상의 data point로부터 정보를 수집하여 alternative splicing을 분석하게 된다. 이 platform을 이용하여 10개의 colon cancer pair로부터 alternative splicing의 연구결과가 (Gardina *et al.* 2006 *BMC Genomics* **7**:325) 보고되었다. 물론 microarray를 기반으로 하지 않은 방법들도 최근까지 보고되고 있으나 (Zhang C. *et al.* 2005 *BMC Bioinfo.* **7**:202 DASL exon-junction microarray; Zhu J. *et al.* 2003 *Science* **301**:836–838, Splice variants amplified in parallel on solid phase; Thill G. *et al.* 2006 *Genome Res.* **16**:776–786, ASEtrap; Venables J.P. & Burn J. 2006 *Nucl. Acids Res.* **34**:e103, EASI-Enrichment of alternatively spliced isoform) 아직까지 상업화 된 platform은 없다. 또한 최근 수 년내에 급격하게 보급되고 있는 next generation sequencing의 경우 transcriptome 분석을 통하여 splice variation을 감지할 수는 있으나 이 경우 한 번에 읽어낼 수 있는 read-length가 150bp이하로 짧으며, transcriptome을 분석하는 대부분의 알고리즘이 splicing에 의한 variant를 detect하는 것 보다는 expression regulation을 측정하는데 주안점을 두고 있어 아직 loci전체에 대해서 exon usage의 차이를 보는 데는 미흡한 점이 존재하고 있다.

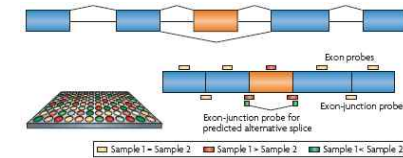


그림 8. Microarray 기반의 alternative splicing detection 방법. Exon 내부의 unique sequence를 probe로 디자인하는 경우와 exon간의 경계를 probe로 design하여 사용하는 방법이 각각 보고되어 있다.

다. Exon expression study가 기존의 gene expression profiling과 다른 점

Alternative splicing을 detection하기 위해 개발된 exon array의 경우 축적된 실제 데이터를 바탕으로 알려지거나 prediction에 의해 등록된 모든 exon들에 대하여 probe가 디자인 되고 이용된다. 기본적으로 gene chip에 의한 expression profiling은 한 유전자의 발현에 있어서 mRNA의 3' region내지는 3' untranslated region을 중심으로 probe가 design된다. 따라서 5' region이나 middle region에 splice variant가 생겨 missing되었을 경우에도, gene expression array로는 앞부분에 이상이 있음에도 불구하고 같은 level의 expression을 보이는

것으로 report할 수 있다. 그러나 그림 7에서와 같이 exon array에서는 이 부분의 차별적인 발현을 고스란히 report할 수 있는 장점이 있다.

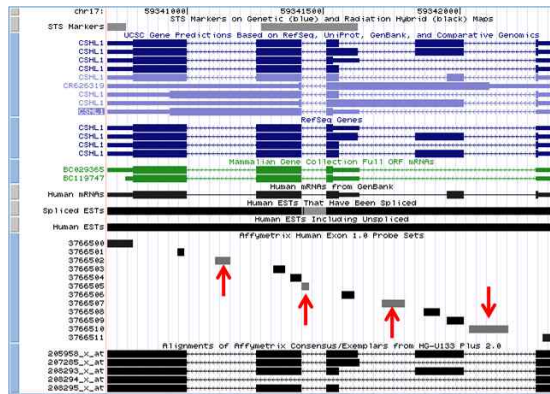


그림 9. Genome Browser에서 splice variant가 밝혀진 CSHL1 유전자에 대하여 Exon array와 Gene expression array의 probe가 cover하는 유전자의 영역을 표시하고 있다. Exon array에서는 존재하나 gene expression array에서는 cover하지 못하는 probe를 화살표로 표시하였다.

(2) Cancer에서의 alternative splicing연구의 필요성

가. Alternative splicing과 cancer에 대한 기존의 연구결과

Alternative splicing은 다양한 질병과 관련이 있음이 보고되어왔는데, 여기에는 growth hormone deficiency, parkinson's disease, cystic fibrosis, retinitis pigmentosa, myotonic dystrophy 등의 질병을 포함한다. Cancer의 발생에 있어서 핵심이 되는 유전자들의 alternative splicing은 표 1 (Venables 2004 *Cancer Res.* **64**:7647-7654)에 제시된 바와 같이 apoptosis, proliferation, cell cycle/division의 조절, 세포신호전달, cell adhesion, angiogenesis, invasion과 motility, chromatin remodeling, proteolysis 그리고 metastasis에 이르는 분야에 다양한 cancer에서 다양한 기능에 해당하는 여러 유전자에서 alternative splicing이 발생함을 알 수 있다.

이러한 alternative splicing과 cancer에 관한 연구가 어느 정도로 진행되고 있는지 NCBI의 PubMed에서 두 가지 검색어를 투입하여 검색해보면 총 2,100건의 보고가 되어있으며, 표 2와 같이 2004-2006년의 검색결과만 500건에 달한다 (Skotheim & Nees 2007 *IJBCB* **39**:1432-1449). 또한 2007년 동안 140건의 논문이 발표되었다. 이 보고들에 의하면 다양한 유전자들의 alternative splicing이 다양한 type의 cancer tissue에서 나타나며 이 보고들이 최근 들어 증가하고 있음을 알 수 있다. 이렇게 다양한 생물학적 기능에 관련된 alternative splice variant중 signal transduction의 조절에 의해 apoptosis에 영향을 주는 것에는

BCL-X와 Fas를 비롯한 많은 molecule에 대하여 보고되었다 (그림 10, Shin C. & Manley J.L. 2004 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 727-738). 이외 에도 splicing control에 영향을 받는 apoptosis관련 유전자에는 metastasis의 suppressor인 CC3 (pro-apoptotic) vs TC3 (anti-apoptotic), caspase-1, 2, 6, 7, 8, 9, caspase regulator인 FLIP 등이 보고되어있다.

표 1. Selected examples of cancer-specific alternative splicing.

Cancer tissue	Gene	Function	Transacting factor
Leukemia	Fyn	Tyrosine kinase	Rex
Leukemia	Caspase 8	Apoptosis	
Leukemia	PASG	Chromatin modelling	
Thyroid	MUC1	Adhesion, metastasis	
Thyroid, colon	Insulin receptor	Tyrosine kinase	
Colorectal	Rac1	Signalling GTPase	
Gastric	KAI1/CD82	Metastasis	
Gastric	WISP1	Invasion	
Pancreas	Secretin receptor	Growth inhibitor	
Pancreas	Gastrin receptor	Proliferation	U2AF
Liver	DNMT3b4	Chromatin modelling	
Liver	SVH	Novel	
Lung	NRSF	Transcription factor	
Lung	C-CAM	Adhesion	
Lung	VEGF	Angiogenesis	
Lung	Actinin-4	Adhesion, metastasis	
Endometrium	SHBG	Hormone signalling	
Endometrium	Integrin β 1C	Adhesion	
Breast	AIB1	Hormone signalling	
Breast	Androgen receptor	Transcription Factor	
Breast	Estrogen receptor	Transcription Factor	
Breast	Syk	Metastasis	
Breast	uPAR	Adhesion, proteolysis	
Breast, brain	FGFR1	Growth signalling	PTB
Brain	Crk	Migration, invasion	
Brain	NF1	Signalling GTPase	
Many	TSG101	Proteolysis	
Many	MDM2	Proteolysis	
Many	CD44	Proliferation, angiogenesis	9G8, SAM68
Many	Tenascin-C	Adhesion inhibitor	
Many	Fibronectin	Angiogenesis	SRp40

표 2. Alternative splicing과 cancer를 검색어로 한 NCBI database의 2004-2006년 검색결과

Query: "alternative splicing" and "cancer" 500 most recent publications (time frame 2004-2006)

1. Hits sorted by candidate genes	Reports	2. Hits sorted by diseases/cancer type	Reports
Total	500	Total	500
p53 tumor suppressor	27	Breast cancer	67
Survivin, DeltaEx3	20	Prostate cancer	26
CTNBN1, beta-catenin	17	Melanoma, melanocytes	23
CD44 antigen	17	Myeloid leukemia	21
Cyclin D1 polymorphism	15	Thyroid neoplasms	17
VEGF, vascular-endothelial growth factor	10	Ovarian cancer	16
BRCA1, breast cancer 1, early onset	9	Colorectal cancer	14
Telomerase reverse transcriptase hTERT	8	Lung cancer	12
WT1, Wilms' tumor 1	7		
TCF, Wnt pathway	5	Glioma	9
Bcl-X protein	5	Gastric cancer	9
Insulin receptor	4	Lymphoblastic leukemia	8
GHRH, growth hormone-releasing H.	4		
Tau proteins	4	Multiple myeloma	5
BCR-ABL 1, fusion transcript	4	Cancer diagnosis, treatment	3
c-Myc, proto-oncogene	4	Germ cell cancer	3
HIF-1a, Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	4	Cervical cancer	2
Tenascin-C	3	Colon and pancreatic cancer	2
Patched receptors	3	Osteosarcoma tumor	2
KLK3, prostate specific antigen	3		
APC, adenomatosis polyposis coli	3		
PRLR, Prolactin receptor	3		

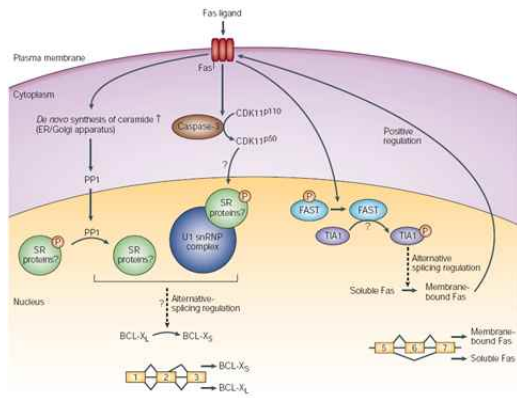


Figure 2 | Fas-mediated signalling regulates the alternative splicing of transcripts that encode apoptotic regulators.

그림 10. Alternative splicing에 의한 pro-apoptotic form과 anti-apoptotic form의 선택. (Shin and Manley, 2004 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 727-738)

위의 표 2에서 언급된 p53과 더불어 p63, 073의 alternative spliced variant역시 cancer와 연관되어있고 그 p63/p73의 존재 없이 p53이 apoptosis에 관여할 수 없는 것과 관련하여

p63/73의 variant가 p53 activity에 alteration을 가져오는 사실이 밝혀졌다 (Murray-Zmijewski *et al.* 2006 *Cell Death and Diff.* **13**: 962-972). 같은 해인 2006년에는 Knudsen 등에 의해 cancer에서 과 발현되는 cell cycle 조절유전자인 cyclin D1의 intron retention variant인 cyclin D1b가 발견되었으며, 이 cyclinD1b가 잠재적으로 cell proliferation, transcription factor action, 그리고 cellular transformation의 조절에 있어 지금까지 알려진 cyclin D1과는 다른 mechanism을 사용할 것으로 보임에 따라 새로운 therapeutic의 개발 가능성도 엿보이고 있다.

이렇듯 cancer에서 다양한 유전자의 splice variant가 발견되는 것에 미루어 볼 때 cancer에 있어서의 splicing은 정상조직의 splicing보다 매우 왜곡되어 있음을 짐작할 수 있는데, 그림 9에서와 같이 129개 정상 조직과 60개 cancer tissue의 proteome data로부터 splicing의 trans-acting factor인 spliceosome component의 발현 양을 비교해본 보고에서 정상과 cancer 조직 간에 splicing regulator의 발현차이를 뚜렷하게 확인할 수 있다. 또한, cancer에서 나타나는 cis-acting factor인 splice site의 mutation은 somatic mutation중 10-15%를 차지한다고 보고되어있다 (Beroud *et al.* 2005 *Hum. Mut.* **26**:184-191).

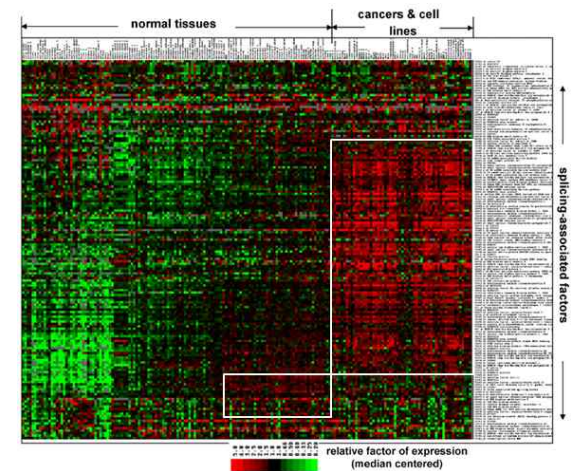


그림 11. Normal tissue와 cancer 및 cancer cell line에서 splicing factor의 발현의 비교. 많은 splicing associated factor들의 발현이 normal tissue에 비해 현저히 증가한 것을 볼 수 있다. (Skotheim R.I. & Nees M. 2007 *IJBCB* **39**: 1432-1449)

Cancer에서 alternative splicing의 genome wide study는 사실 human genome project가 끝나기 이전부터 시작되었는데, 2003년 미국 National Cancer Institute의 Wang 등은 (*Cancer Res.* **63**:655-657) 생물정보학적인 방법으로 약 350만개의 human EST와 1만1천개의 RefSeq를 비교하여 이중 845개의 cancer associated variant를 찾아내었고 여기에서 54개

는 liver cancer와 연관이 있음을 밝혀내었다. 같은 해 Xu와 Lee는 (*Nucl. Acids Res.* **31**: 5635-5643) 6,900여개의 human EST library로부터 2백만 개의 EST를 비교분석하여 316개의 cancer-specific splice variant를 발견하였다. 최근에는 fiber-optics를 기반으로 DASL이라는 platform을 이용하여 prostate cancer의 alternative splicing isoform연구가 보고되어 있으며 (Zhang *et al.* 2006 *BMC Bioinformatics* **7**:202), Affymetrix의 Exon 1.0ST를 기반으로 colon cancer에서의 splice variant profiling이 (Gardina *et al.* 2006 *BMC Genomics* **7**:325)보고되어 있는 상태이다.

따라서 현재까지 whole genome exon을 대상으로 alternative splice variant를 profiling하는 연구는 아직 초기단계라 할 수 있다.

나. Cancer에서 alternative splicing 연구의 중요성

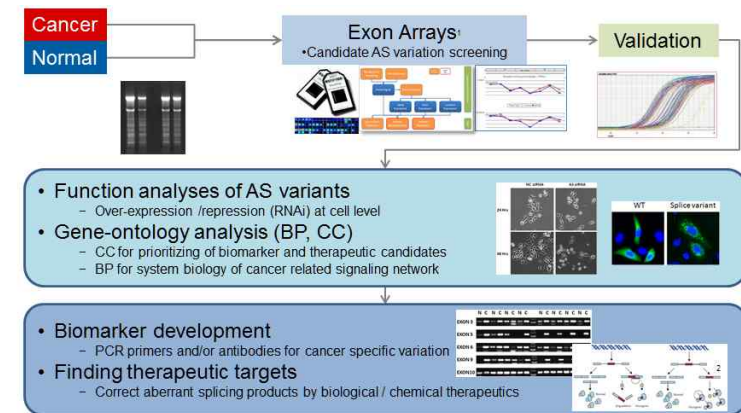
앞에서 언급한 바와 같이 사람에서 전체 유전자들 중 38-59%의 유전자들에서 alternative splicing을 나타내며, cancer에서는 somatic mutation중 splice site에 관여한 비율은 15%에 달하는 등, carcinogenesis에는 유전자 발현의 정량적인 차이뿐만 아니라 유전자의 변이에도 비중 있는 요인이 있음이 밝혀지고 있다. 따라서 전통적인 발현양의 차이만을 연구하는 microarray기반 연구로부터 splice variant의 발현을 tumor나 stromal cell에 연관시키는 연구로 전향하므로써, exon수준에서 유전자발현의 차이를 알아내게 되어 매우 유용한 정보를 획득하게 되며, cancer와 연관된 alternative splice variant의 생물학적 기능에 대한 이해가 증진될 것이다. 이렇게 얻어진 정보들은 cancer와 연관된 cell division regulation, apoptosis, metastasis, signal transduction 등 각 분야에 커다란 영향을 미치리라 사료된다. 또한 밝혀진 alternative splice variant의 정보들은 각 cancer type과 stage 및 cancer metastasis의 진단 및 예후 판정을 위한 unique한 biomarker의 개발과 더 나아가서는 therapeutic의 개발의 근거가 될 것임이 자명하다고 할 수 있다.

이와 더불어 기존의 targeted therapy에서 나타났던 cancer-drug resistance의 원인을 분석한 결과, 상당수의 경우 drug이 관련하거나 혹은 무관할 것으로 생각되어졌던 유전자의 alternative splicing에 의한 것임이 밝혀졌다. 따라서 표적치료에서 부작용 내지는 약제의 치료 효과를 높이기 위해서는 해당되는 약제의 작용과 관련된 pathway에서의 유전자들의 alternative splicing에 관한 연구가 필요하다.

표.3. 표적항암치료의 저항성과 관련된 유전자들의 alternative splicing

Tissue/Cell	Resistant Treatment	Genes w/ AS
Small cell lung cancer	Etoposide	TAp73alpha
Pancreatic cancer	Gemcitabine	Tenascin-C, Annexin-A2
Colon cancer/HT-29	Staurosporine	CD133
Endometrial cancer cell	Tamoxifen	ERalpha26
B-cell	Rituximab	delta CD20
Ovarian cancer	Cisplatin	ERCC1
Breast cancer	5-FU/Epirubicin/Cyclophosphamide	ErbB-4/HER4
	Docetaxel/Epirubicin	Survivin2-alpha
CML	Imatinib	Survivin delta
AML	Daunorubicin cAMP	BCR-ABL
Gastric cancer cell line (SGC7901)	Vincristine, Adriamycin	LEDGF/p75
		MAD2beta

따라서 본 연구는 아래와 같은 흐름을 통해 tumorigenicity에 관련된 유전자들의 alternative splice variant를 탐색하고 그 기능을 밝히는 연구를 수행한다.



1. Technical Note GeneChip® Exon Array Design Part No. 702026 Rev. 1, Affymetrix, INC.
2. Pajares M.J. *et al.* (2007) *Lancet Oncol.* **8**:349-357

그림 12. 발암기전에 관계된 유전자의 alternative splice variant를 발굴분석하기 위한 연구의 흐름도.

B. 선행연구결과

가. Candidate alternative splice variants의 validation

Affymetrix human exon array를 이용한 실험결과로부터 선정된 총 347개 gene에 해당하는 432개의 probeset들은 우선적으로 6가지의 stomach cancer cell의 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으며, stomach cancer cell line들 사이에서 splice variant가 나타나는 probeset에 해당하는 43개 유전자들을 환자의 normal-tumor tissue pair의 cDNA를 이용하여 RT-PCR 혹은 RT-qPCR을 수행하였다. 다음은 본 연구의 결과로부터 후속연구를 수행할 대상인 후보 splice variant gene의 분석결과에 대한 설명이다.

1) GPNMB

- glycoprotein NMB
- Osteoactivin, HGFIN이라는 이름으로도 불리며, breast cancer와 관련이 있음이 밝혀졌음.

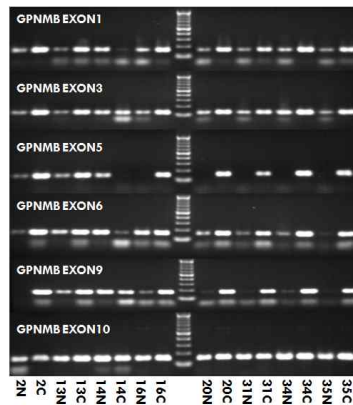
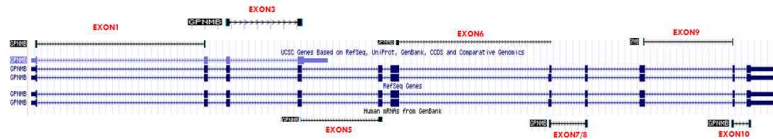


그림 13. Genome browser에서 mapping된 GPNMB와 splice variant를 detect하기 위해 design한 primer들의 위치와 GPNMB의 splice variant를 validation하기 위한 stomach cancer patient의 exon specific RT-PCR. 3'쪽의 exon10의 경우 발현량의 차이가 보이지 않으나, exon5, 6, 9에서는 normal과 tumor간의 차이를 볼 수 있다.

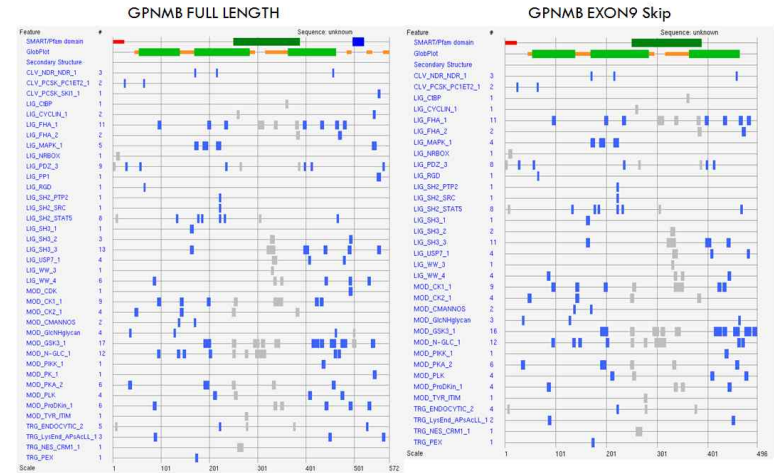
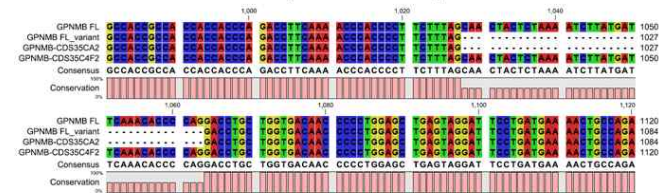


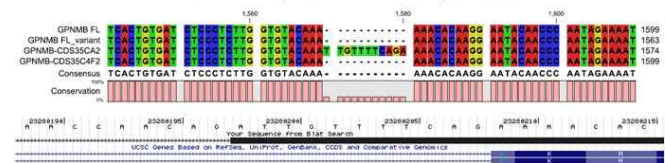
그림 14 Full length의 GPNMB와 exon 9 이 skip되는 경우의 protein domain 변화비교

A

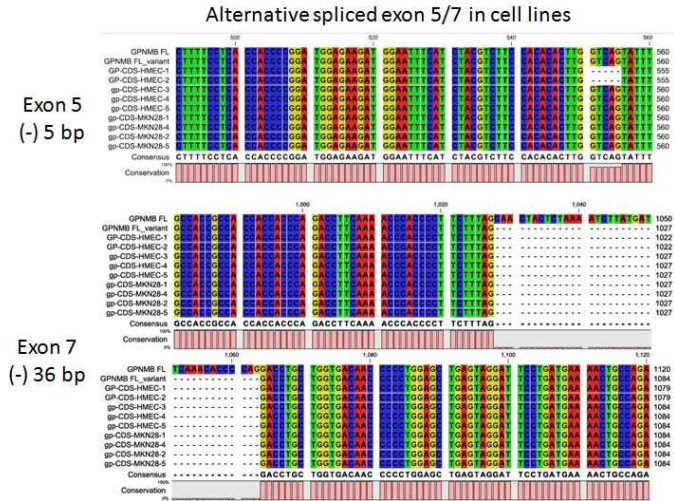
Alternative spliced exon 7 in patients



Alternative spliced exon 11 in patients



B



C

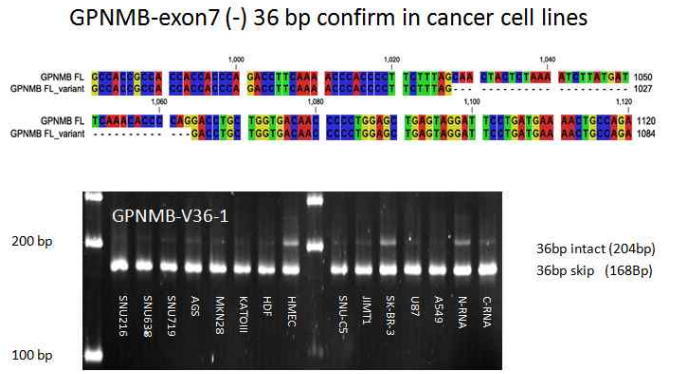


그림 15. Patient sample과 (A) stomach cancer cell line에서 (B) 확인된 splice variant의 sequencing 결과를 wild type과 비교하여 alignment한 결과와 cell line에서 밝혀진 36 bp missing을 다른 cancer cell line에서 동일한 splice site variation이 있는 지 확인한 결과 대부분의 cancer cell line에서 36 bp missing이 발견되었다.

2) FLJ22374

-hypothetical protein FLJ22374

FLJ22374는 hypothetical gene으로 annotation되어있으나 실제로 transcript들은 존재하며 여러 가지 variant또한 보고되어있다. 본 연구에서는 그림 31과 같은 probe set에서 variation이 나타났고, 중앙 세포주에서 그림 16와 같이 차별적인 발현이 관찰하므로써 이 결과를 validation하게되었다.

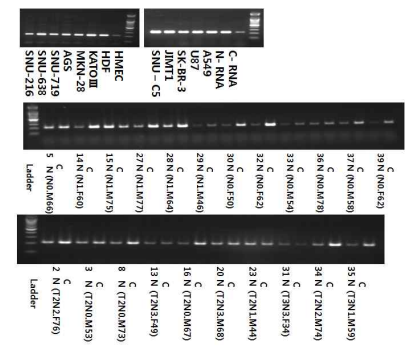


그림 16. FLJ22374의 splice variation을 RT-PCR로 validation한 결과. Normal cell (HMEC)에서는 cancer cell line에 비해 현저하게 줄어든 signal을 관찰할 수 있으며, 환자의 normal-tumor비교에서도 normal에서 상대적으로 낮은 signal을 관찰할 수 있다.

실제로 FLJ22374에 해당하는 splice variants를 모두 cloning하려는 시도에서 보고된 variant가 protein으로 translation될 때 나타나는 protein상의 변이는 그림 17과 같이 나타나며, 이들 중 wildtype과 AS1 form은 그림 18과 같이 GFP로 tagging된 pAcGFP expression vector에 클로닝하였다.

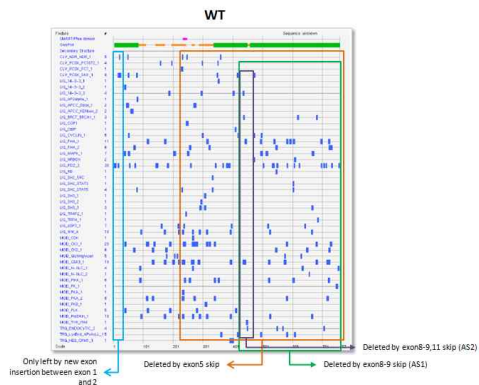


그림 17. FLJ22374의 alternative splicing에 의한 full-length로부터 splice variant에서의 domain의 변화.

다음으로 그림 20과 같이 FLJ22374에서 exon에 특이적인 siRNA를 이용하여 FLJ22374의 발현을 억제하므로써 FLJ22374가 AGS 위암 세포주에서 어떠한 생물학적 기능을 하는지 살펴보았다.

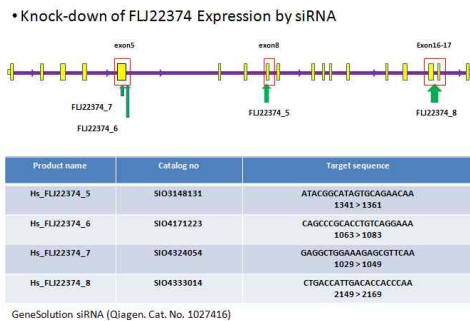
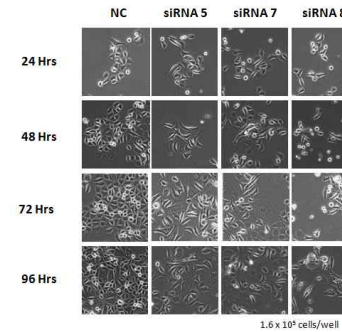


그림 18. FLJ22374의 발현을 knock-down하기 위하여 사용한 siRNA의 유전자상 분포.

위에 보이는 3가지 siRNA를 AGS에 처리하고 4일간 매 24시간마다 관찰한 결과 아래 그림21와 같이 세포분열을 저해하는 현상이 나타났다. 또한, siRNA-8에 의하여 세포분열이 감소하는 현상은 그림 40과 같이 MTT assay에 의해 확인하였는데, 관찰이 지속된 4일동안 siRNA-8에 의하여 cell proliferation이 지속적으로 저해됨을 알 수 있다.

A



B

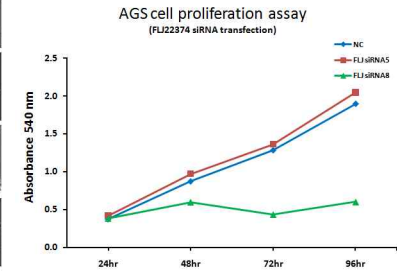


그림 19. (A) 세가지 FLJ22374 특이적 siRNA에 의한 cell proliferation에 대한 영향을 96시간 동안 24시간 간격으로 현미경하에서 관찰한 결과. Negative control siRNA에 비교하여 FLJ22374의 siRNA들은 cell proliferation을 감소시키는 현상을 볼 수 있으며 특히 siRNA-8은 현격한 감소를 가져옴을 볼 수 있다. (B) FLJ22374 siRNA-5, siRNA-8 처리 시 AGS cell line의 proliferation에 미치는 영향을 MTT assay를 통하여 측정된 결과.

이러한 결과를 바탕으로 siRNA-8을 동일하게 AGS cell line에 처리시 cell cycle의 변화를 관찰하였다. 그 결과 NC와 비교하여 siRNA-8에 의해 FLJ22374의 발현이 suppress될 때 cell death를 의미하는 sub G0/G1 population이 증가함이 관찰되었다.

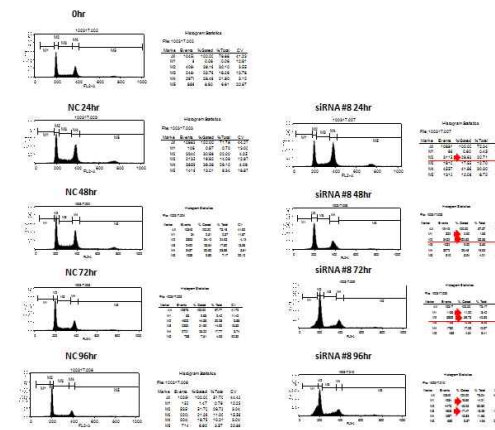


그림 20. FLJ22374 siRNA-8을 AGS cell line에 처리시 나타나는 cell cycle의 변화를 flow

또한 siRNA에 의해 발현이 억제되는 경우 tumorigenicity에 관련된 cell migration과 invasion이 유의하게 감소하는 것을 알 수 있다.

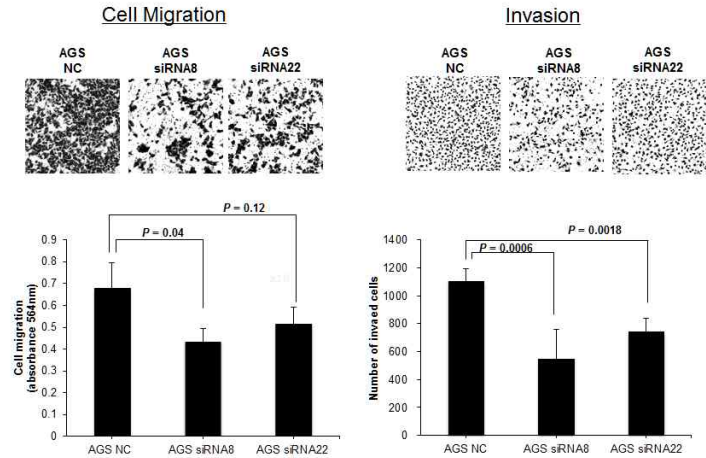


그림 21. FLJ22374의 발현에 따른 cell migration과 invasion에 대한 영향을 관찰한 결과.

이상의 결과와 같이 세포주기 및 세포의 이동, 침윤이라는 발암에 영향을 주는 현상에 관계된 FLJ22374의 alternative splice variant에 따른 차별적인 tumorigenic effect의 원인을 밝히기 하였으나, FLJ22374의 경우 그 기능을 모르는 경우이므로 기능에 관한 단서를 파악하기 위하여, 발현하는 단백질에 binding하여 상호작용하는 단백질들이 무엇인지 파악하므로써 tumorigenicity를 알아내고자 하였다. 아래와 같이 FLJ22374의 WT 및 AS1, AS2 type의 단백질을 세포에서 발현시키고 이들을 mild condition으로 immunoprecipitate하여 상호작용하는 단백질을 LC/MS-MS 방법을 이용하여 분석하였다.

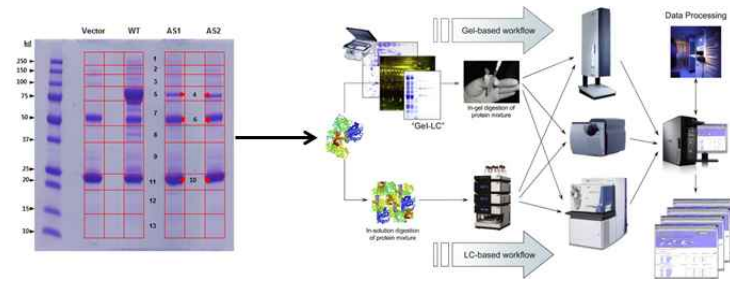


그림 22. 후보유전자의 wild-type과 alternative splice form사이의 상호작용하는 단백질을 동정하기 위한 LC/MS-MS방법의 적용과 분석에 대한 모식도.

이렇게 분석된 단백질은 총 278종에 달하며 WT, AS1, AS2 각각에 해당하는 단백질의 리스트를 String-DB에 검색을 하여 다음과 같은 단백질 상호작용관계를 얻어내었음.

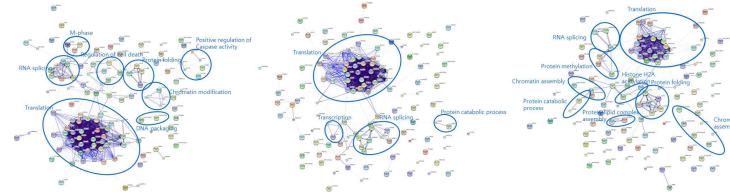


그림 23. FLJ22374의 WT, AS1, AS2에 대한 binding partner를 LC/MS-MS로 분석하여, String-DB 검색을 통해 mapping한 결과. Alternative splicing에 의한 protein domain변화에 의하여 binding하는 protein들의 종류가 변화한다.

이렇게 얻어진 상호작용결과를 바탕으로, 실제로 tumorigenesis에 관련된 단백질들의 차별적인 binding을 western blotting을 통하여 확인하였음. 그림 27에서는 tumor suppressive한 작용을 한다고 알려진 PAF1c의 component 들에 대하여 각각의 splice variant들에 대한 binding을 확인한 결과 WT에 비하여 AS type에서는 현격하게 감소하는 binding을 확인할 수 있었음.

FLJ22374 WT specific

PAF1 complex implicated in tumor

- Parafibromin (CDC73), a tumor suppressor encoded by HRPT2/CDC73, binds to RNA pol II and suppress proliferation
- Loss of CDC73 function leads to neoplastic transformation
- Paf1 over-expression leads to enhanced growth and tumor formation
- Involved in histone modification: H2B-Ub, H3K4me3

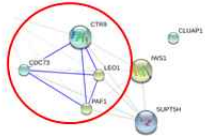
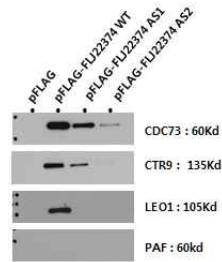


그림 24. FLJ22374와 상호작용하는 단백질들의 alternative splicing 특이적인 결합의 확인. PAF1 complex는 tumor suppressive 기능을 가진 것으로 알려져 있으며, FLJ22374는 그 splicing에 따라 PAF1c의 component들에 대한 binding이 달라진다.



C. 연구추진전략

가.. Alternative exon usage를 보이는 expression open-reading frame의 동정 및 세포수준에서의 생물학적 기능분석을 통한 tumorigenesis mechanism연구

- 1) Wildtype gene 및 splice variant의 expression construct를 통한 세포수준에서의 기능 및 조절연구
- 2) Variant의 biological function을 보기위한 over-expression experiment 및 gene-silencing experiment
 - Variant에 의한 영향은 tumorigenesis가 일어나는데 기본적으로 관찰되는 생물학적 기능인, cell proliferation, cell cycle regulation, cell motility에 대하여 다음과 같은 우선순위에 입각하여 분석하고, 이러한 현상과 해당유전자의 variant와 관련된 추가적인 생물학적 기능을 분석한다.
 - 이상의 방법을 통한 세포수준에서의 차이가 관찰되는 경우, protein interaction map과 metabolic pathway를 검색하여 관련된 유전자를 찾아내고 interacting protein의 존재를 co-immunoprecipitation의 방법으로 확인하며, alternative splice variant에 의한 tumorigenesis의 mechanism의 evidence를 탐색한다.

나. Alternative transcript variant의 발생에 관련한 위암 특이적 조절인자의 확인

- Alternative splicing이 일어나는 유전자의 cis-element 분석

Usage차이가 나는 exon과 intron의 경계부위 서열에 대하여 SNP database 검색을 통하여 기존에 밝혀진 종양에 특이적인 somatic mutation이 있는지 screening하고 정상 조직에 대비하여 종양에 대한 연관정도를 분석한다.

- 전사수준에서 발현의 차이가 나는 splicing factor들의 validation을 RT-PCR과 western blot 기반으로 수행한다.
- Promoter strength에 따른 alternative 1st exon usage의 분석

First exon이 shift되는 경우는 promoter의 strength에 따라서 exon skipping이 발생하기 때문이라고 알려져 있다. 이러한 1st exon usage의 차이를 보이는 유전자에 대해서는 transcription factor binding site에 대하여 조사한다.
- Histone modification과 관련된 alternative promoter usage의 분석

앞에서 기술한 바와 같이 5'-RACE를 통하여 loci밖으로의 extended exon usage가 발견되는 경우 alternative promoter usage가 예측되므로, 이 경우 새로운 promoter의 조절을 위해 transcription factor binding site 뿐만 아니라, histone 3의 4번 lysine residue의 tri-methylation에 특이적인 antibody를 이용하여 immunoprecipitate하므로써 위암세포주 혹은 환자 시료로부터 H3K4me3와 interaction하고 있는 chromatin 부위를 확보하고, 이들의 염기서열을 확인하므로써 새로운 1st exon usage와 연관되어있는 genomic DNA상의 조절부위를 밝혀도록한다.

다. 후보유전자 splice variant의 암종 특이적 연관성 검증

1) 후보유전자의 alternative splice variant의 비교분석

- 암의 진행도와 관련하여 특이적인 변이를 보이는 경우, validation을 위한 추가 시료를 확보하여 RT-PCR의 방법으로 확인하고, 유전자전사수준에서 환자의 진단을 위해 쓰일 수 있는 robust한 조건을 확립한다. 또한, 환자의 임상정보와의 correlation을 통계적으로 분석한다.

2) Splice variant단백질의 검출을 위한 항체제작

- Alternative splice variant가 단백질로 발현되는 경우, 정상적인 형태를 갖는 단백질에 대한 항체만이 존재하고 variant에 대한 항체가 없으므로 variant에 특이적인 peptide sequence 혹은 variant의 whole protein을 항원으로 이용하여 wild type으로부터 variant를 detect할 수 있는 항체를 raise한다.

Alternative splice variant 유전자의 발암기전관련 기능 및 조절에 관한 연구

- AS variant의 발암기전과 관련한 기능, 조절, 암종 특이성의 종합적 분석
- 기초연구결과와 임상정보의 연관분석을 통한 신뢰도 높은 바이오마커 확립
- 암종 특이적 splice variant 유전자 조절방법의 획득 및 특허 출원

