

기관고유연구사업 결과보고서

(과제번호 : 0610660)

연구과제명 (국문): Knockout 마우스를 이용한 Brca1과 Chk2 돌연변이에 의한 부인암 발생에서 radioresistant DNA synthesis (RDS)의 기전에 관한 연구

연구과제명 (영문): The study of genetic interaction of Brca1 and Chk2 mutation in gynecological cancer formation by radioresistant DNA synthesis (RDS) through knockout mice model

과제책임자 : 김상수

국립암센터

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="248 1088 1125 1653" data-label="List-Group"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구 사업 결과보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.</div> <div data-bbox="638 1780 726 1870" data-label="Text"><p>↑ 6cm ↓</p></div>	<div data-bbox="1204 385 1332 537" data-label="Text"><p>↑ 5cm ↓</p></div> <div data-bbox="1204 627 1332 1209" data-label="Text"><p>Knockout 마우스를 이용한 Brcal과 Chk2 동연변이에 의한 부인암 발생에서 radioresis- tant DNA synthesis (RDS)의 기전에 관한 연구</p></div> <div data-bbox="1204 1489 1252 1736" data-label="Text"><p>국 립 암 센 터</p></div> <div data-bbox="1204 1792 1332 1937" data-label="Text"><p>↑ 3cm ↓</p></div>
---	--

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “Knockout 마우스를 이용한 Brca1과 Chk2 돌연변이에 의한 부인암 발생에서 radioresistant DNA synthesis (RDS) 의 기전에 관한 연구” 과제의 결과보고서로 제출합니다.

2008. 12. 31

국립암센터

과제책임자 : 김상수

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

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

< 요약 문 >

연구분야(코드)		과제번호	0610660			
과제명	Knockout 마우스를 이용한 Brca1 과 Chk2 돌연변이에 의한 부인암 발생에서 radioresistant DNA synthesis (RDS) 의 기전에 관한 연구					
연구기간/연구비 (천원)	합계	년	월	일 ~ 년	월	일
	1차년도	년	월	일 ~ 년	월	일
	2차년도	년	월	일 ~ 년	월	일
	3차년도	년	월	일 ~ 년	월	일
과제책임자	성명	김상수	주민등록번호			
	전화번호	031-920-24911	전자우편	sangsookim@ncc.re.kr		
색인단어	국문	Brca1, Chk2, RDS, 에스트로젠				
	영문	Brca1, Chk2, RDS, estrogen				
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Brca1과 Chk2의 변이에 의해 발생하는 자궁과 난소조직의 비정상적 증식현상에서 estrogen의 역할을 규명하며 이의 작용기전을 분자적 수준에서 분석하고 향후연구에 유용하게 사용될 Brca1-의존적 난소/자궁암 마우스모델의 제조및 분석. 2. Brca1이나 Chk2와 같은 방사선 반응유전자의 돌연변이에서 발견되는 radioresistant DNA synthesis (RDS)의 획득과정 규명. 3. 항에스트로겐의 처리에 의한 암의 예방적 효과와 치료효과 증대의 여부 규명. <p><당해연도목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 각 세포주를 이용하여 에스트로겐의 암 발생에서의 역할 규명. 2. <i>in vivo</i> model을 확보된 돌연변이 마우스교배를 통해 만들고 이 그룹에서 에스트로겐과 이의 저해제 투여를 통한 암발생의 변화 추적. 3. 세포 실험을 통해 얻어진 결과를 <i>in vivo</i>실험을 통해 얻어진 조직을 통하여 분석. 4. 위의 가정이 동일 동물 모델에 있어서 에스트로겐 저해제 투여를 통한 암발생에 영향을 주는지 조사. 						
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>A. Knockout 마우스를 이용하여 얻어진 Brca1과 Chk2의 돌연변이에 의해 발생하는 자궁조직의 비정상적 증식현상 (주로 endometrial type hyperplasia)에서 estrogen의 역할과 암 생성 과정중에 연관된 DNA damage repair pathway의 동정에 대하여 연구.</p> <p>B. 기존에 확보된 Brca1^{S1152A/S1152A}와 Brca1^{FL/FL} 마우스의 비정상적 증식 자궁/난소조직에 대하여 조직 면역학적 염색기법을 사용하여 Brca1/Chk2 비활성화에 따른 에스트로겐 신호전달 과정에 대한 분석및 민감도 여부 조사.</p> <p>C. Brca1^{D11/D11} 와 Chk2^{-/-}등 유전자 돌연변이된 마우스의 교배를 통해 wild type와 mutant 마우스의 배에서 대조군과 실험군으로 사용할 세포의 제조. 세포에 에스트로겐을 처리한 후 세포의 DNA damage repair, 세포생장과 세포사를 정량적으로 측정. 이를 위해 BrdU</p>						

incorporation, 시간에 따른 세포수의 변화, Annexin-V, TUNEL, Comet 혹은 DNA fragmentation을 통해 반응도를 정량화 하고 세포생장과 세포사에 대한 각 유전자의 반응을 분석하기위해 세포추출물로 부터 p53, p21, Brca1, Bax, Bcl-2, ATM, Chk2, mdm2, cdk, cyclin 및 해당 phosphorylated protein을 antibody를 이용하여 추적.

D. *In vivo* 실험을 통해 두 유전자의 부인암발생에서의 역할을 알아보기 위해 Brca1 돌연변이 마우스에 Chk2의 돌연변이 마우스 혹은 조직 특이적 유전자 변이를 유발하는 마우스와 교배해 tumor prone 마우스를 제작. 암컷의 각 유전형의 wild type 마우스 혹은 MMTV-Erb2를 transgene 시킨 마우스를 대조군으로 함. 제작된 Brca1^{mut}MMVT-cre, Brca1^{MDM1} Chk2^{-/-} double homozygous 마우스는 각 strain 당 최소 40마리 정도로 grouping하여 약 1년의 기간 동안 암의 발생상황을 육안 혹은 imaging장비를 이용하여 검사. 각 mice에서 암 또는 이상이 발견되면 해부를 통해 이상의 원인을 파악하고 암을 포함한 각 조직을 적출. 암조각인 경우 조직을 적당한 크기로 잘라 세포주를 확립하고, 나머지는 조직절편을 만들거나 냉동보관.

E. 각 조직은 파라핀으로 고형화 시킨후 section하여 병리학적 분석, 조직 면역학적 염색기법에 의한 분석, 필요시 동일 개체의 조직절편내에서 변이조직과 정상조직을 laser microdissection하여 microsatellite instability 분석, microarray등을 통하여 분자생물학적 분석.

F. 사용 knockout 마우스는 미국 NIH의 mouse model of human cancer consortium, Jackson Lab (USA), Dr. Motoyama (Japan), Dr. Chuxia Deng (NIH)에게서 도입되어 교배 중.

◆ 연구성과

-정량적 성과

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

-정성적 성과

- 본 연구를 통해 구축된 *in vivo* 시스템을 이용하여 Brca1과 Chk2의 돌연변이에 의한 부인암의 발생기전을 다각도로 연구하여 향후 이에 의한 기술과 지식 축적.
- 방사선 반응단백질의 돌연변이는 방사선 반응을 결정하는 중요한 요소라 생각되며 이의 억제제를 통해 방사선 치료의 효과 증대를 기대함. 이는 향후 개별 환자의 암의 유전적 변이상에 따른 맞춤형 치료에 최적의 조건을 제공함으로써 치료 효과의 극대화를 추구함.
- 다양한 수준에서의 에스트로겐에 의한 부인암 발생의 과정 규명
- 에스트로겐 저해제 투여를 통한 암발생에 영향 확인과 효용도 조사.

◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)

성 명 김상수, 추동완

주민등록번호

Project Summary

Title of Project	The study of genetic interaction of Brcal and Chk2 mutation in gynecological cancer formation by radioresistant DNA synthesis (RDS) through knockout mice model
Key Words	Brcal, Chk2, RDS, estrogen
Project Leader	Kim, Sang Soo
Associated Company	Radiation Medicine Branch, National Cancer Center
<p><u>Purpose</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Investigation of the effect of estrogen on the uterus hyperplasia from the mutation of BRCA1 and Chk2. Investigation of molecular mechanism and production of Brcal-mutant mice model for uterus hyperplasia. Investigation of molecular mechanism of radioresistant DNA synthesis (RDS) caused by BRCA1 or CHK2 mutation. Evaluation of anti-estrogen reagent in prevention and treatment of cancer. <p><u>Experimental approach</u></p> <ol style="list-style-type: none"> Investigation of the role of estrogen and its effect on DNA damage repair pathway in uterus hyperplasia from the Brcal and Chk2 knockout mice. Measurement of estrogen receptor activation and its downstream effector in uterus tissues of Brcal^{S1152A/S1152A} and Brcal^{FL/FL} mice by immunohistochemical staining. Generation of Brcal-chk2 double mutant mice and measurement of estrogen effect in DNA damage repair, cell proliferation, and apoptosis by measuring BrdU incorporation, cell number, Annexin-V, TUNEL, Comet, or DNA fragmentation. The tissues of mice were embedded in paraffin and subjected to immunohistochemical and pathological analysis. The knockout mice of this study were obtained from mouse model of human cancer consortium in NIH, USA, Jackson Lab (USA), Taconic (USA), Dr. Motoyama (Japan), and Dr. Chuxia Deng (NIH). <p><u>Conclusion and perspective</u></p> <ol style="list-style-type: none"> This study provides the information in several aspects of uterus cancer from BRCA1 and CHK2 mutation. The mutations of the genes responsible for radiation response will be effective to the outcome of radiation therapy. Thus, this study will provide the connection between the status of these proteins and response to radiation therapy. 	

1. 연구사업의 최종목표

1. Brca1과 Chk2의 변이에 의해 발생하는 자궁과 난소조직의 비정상적 증식현상에서 estrogen의 역할을 규명하며 이의 작용기전을 분자적 수준에서 분석하고 향후연구에 유용하게 사용될 Brca1-의존적 난소/자궁암 마우스모델의 제조및 분석.
2. Brca1이나 Chk2와 같은 방사선 반응유전자의 돌연변이에서 발견되는 radioresistant DNA synthesis (RDS)의 획득과정 규명.

2. 연구사업의 내용 및 결과

A. 연구사업의 필요성

Familial tumor suppressor로 알려진 *BRCA1*은 genome integrity를 유지하며 이의 손실은 checkpoint와 DNA damage repair의 결함을 유발함 (Deng and Wang, (2003) Human Mol Genet, **12**, R113-R123, Deng (2006) Nucleic acids Res, **34**, 1416-1426). 정상적인 상황에서는 *BRCA1*을 포함한 대부분의 tumor suppressor gene의 돌연변이는 p53을 활성화 시켜 세포사를 유발함으로써 암의 발생이 억제되나, 암에서 가장 높은 빈도 (약 50%의 빈도로 이상이 발견되고 있음)로 돌연변이 되는 p53에 의해 이러한 정상작용이 작동이 되지 못하며 암이 발생된다고 생각됨 (Olivier et al (2002) Hum Mutat, **19**, 607-614). 사람에게서 나타나는 *BRCA1*의 돌연변이는 그 변이를 지닌 사람, 특히 여성에게서 매우 높은 확률로 암발병을 보임. 대개 *BRCA1*이 돌연변이된 carrier 여성의 경우 일생중에 45-87%의 확률로 유방암이, 36-66%의 확률로 난소암에 걸리는 것으로 알려짐 (Thompson and Easton (2002) J Natl Cancer Inst, **94**, 1358-1365). 하지만 *BRCA1*의 발현이 ubiquitous하게 나타나는데 비해서 암이 위의 두 조직에서 빈번하게 나타나는 지에 대한 이유는 잘 알려지지 않음. *BRCA1*-의존적 암의 조직특이적 분포에 대해 여러가지 가설이 가능한데 그 중 하나는 다른 조직에 비해 유방과 난소에서 *BRCA1* locus의 loss-of-heterozygosity (LOH)가 높게 나타난다는 것이고 (Monteiro (2003) Trends Genet, **19**, 312-315), 또 다른 하나는 *BRCA1*과 hormonal action과의 직접 연관성으로 이는 *BRCA1*이 estrogen-receptor와 결합하여 이의 작용을 억제하는 기능에 의해 나타난다고 생각함 (Fan et al (2001) Oncogene **20**, 77-87.; Zheng et al (2001) Proc Natl Acad Sci USA, **98**, 9587-9592). 또한 여기에 에스트로겐의 antiapoptotic action이 이 조직들의 *BRCA1*-돌연변이 세포의 survival을 연장함으로써 이 세포들이 암으로 전환될 가능성을 높일 수 있다는 가설도 제시됨 (Elledge and Amon (2002) Cancer Cell, **1**, 129-132). 하지만 아직도 *BRCA1*의 조직특이적 암발생의 기전은 아직 많은 점들이 명확히 연구되어야 하며 이의 규명이 향후 *BRCA1*-의존적 암의 발생 억제에 중요한 기초가 되리라 봄.

a. 암발생과 치료에서 *BRCA1*과 이의 연관 단백질의 역할

정상적인 세포는 DNA damage나 oncogenic activation과 같은 비정상적인 growth signal에 반응하여 성장을 멈추는 것이 다세포 생물이 암 생성과 같은 malignancy로부터 개체를 보호하는 방법임. 따라서 암의 발생 전 oncogene에 의한 과다성장은 성장억제나 세포사와 같은 방어 작용에 의해 억제됨. 이 뒷받침으로 암초기 지역은 p53-의존적인 DNA damage response가 나타나며 이에 의해 암의 진행이 늦추어지거나 저해됨 (Bartkova et al, (2005) Nature, **434**, 864-870., Gorgoulis et al, (2005) Nature, **434**, 907-913.). p53-의존적인 DNA damage response는 DNA 복제과정 중에 DNA에 만들어져 있는 비정상적 DNA구조를 인식하며 activation되어 cell cycle를 정지시키거나 apoptosis를 유발하는 과정이 비정상적 일 때 암초기 세포들을 계속 성장시켜 정착 확 함으로써 genomic instability를 증가시켜 암의 발생을 진행.

ATM-Chk2-Brcal-p53 pathway는 genotoxic stress에서 유발된 DNA damage나 cell cycle event error등에 의해 활성화되어 DNA repair와 apoptosis를 조절 함 (Deng (2006) Nucleic Acids Res, **34**, 1416-1426.). ATM은 p53의 ser-15을 직접 phosphorylation하고 chk2의 thr-68을 activation시켜 p53의 ser-20을 phosphorylation 하도록 조절하며 이에 의해 DNA repair와 apoptosis를 조절 함 (Matsuoka et al (1998) Science, **282**, 1893-1897., Hirao et al, (2000) Science, **287**, 1824-1827.). ATM과 Chk2는 ATM-Chk2-Brcal-p53 pathway의 조절자이면서 동시에 사람에게서 Ataxia-Telangiectasia나 Li-Fraumeni syndrome을 일으키는 tumor suppressor 로 알려짐 (Bell et al, (1999) Science, **286**, 2528-2531., Fig. 1).

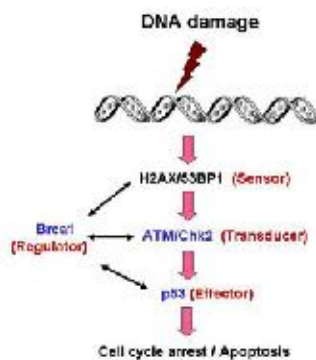


Fig. 1. Model of the Brca1-ATM-Chk2 -p53 signaling pathway upon DNA damage including irradiation. ATM-Chk2 -p53 signaling pathway senses DNA damage/genomic instability and acts as a gatekeeper to eliminate mutations, but, as a side effect, it may also lead to premature aging.

대개의 암에서 돌연변이되는 것으로 알려진 p53 단백질의 가장 중요한 조절 방법은 stress-signalling 혹은 growth-signalling kinases (CKI, CKII, Chk2, ATM, ATR, PRKC, JNK, MAPK) 와 p300/CBP 나 pCAF와 같은 histone acetyl transferases에 의해 phosphorylation 혹은 acetylation되는 것임. 일반적으로 정상세포에서는 p53이 매우 소량으로 존재하며 이는 p53이 mdm-2라는 ubiquitin ligase에 의해 ubiquitination된 후 proteasome이라는 단백질 분해효소에 의해 degradation되기 때문 (Momand et al (1992) Cell **69**, 1237-1245.). 하지만 p53은 여러 가지 세포자극에 의해 post-translational modification되면 mdm-2에 대한 susceptibility가 약해지면서 안정화 되어 activation됨. 특히 방사선을 포함한 DNA double strand breakage에 관여하는 p53 stabilizing signal은 ATM과 Chk에 의해 조절되고 이 두 kinase에 의한

p53의 phosphorylation은 DNA damage 직후 바로 나타나고 p53의 half-life를 증가.

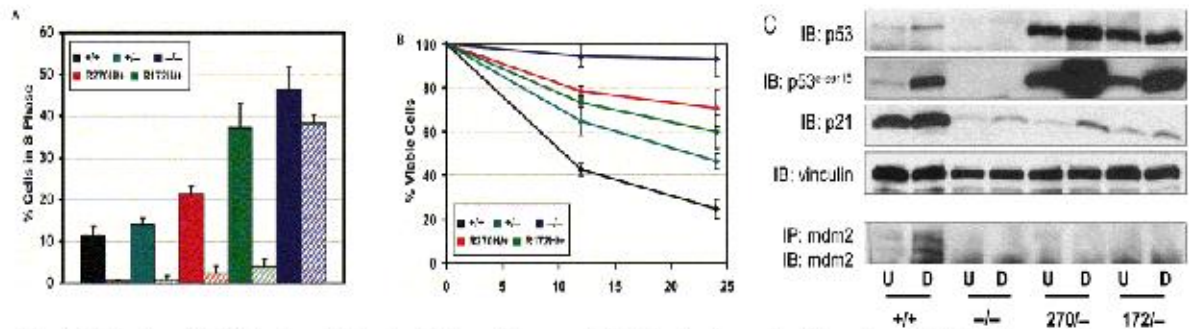
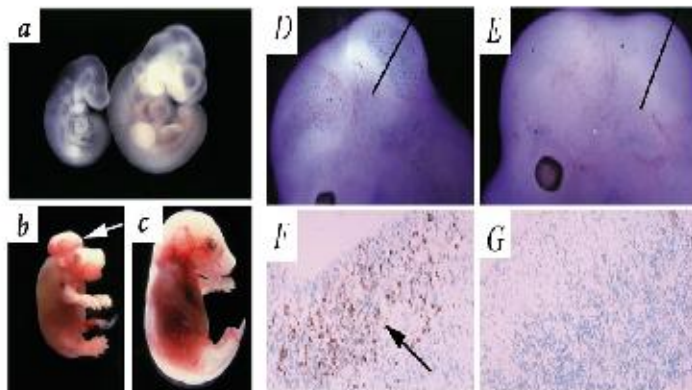


Fig. 2. Dominant Effects by Mutant p53 in Primary Cells(A) S phase fraction in $p53^{M/M}$ MEFs, Cell cycle analysis was performed on exponentially growing MEFs. Histograms show the percent of untreated cells (solid bars) or doxorubicin-treated cells (hashed bars-0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 12 hr) in S phase as measured by FACS analysis of bromo-deoxyuridine and propidium iodide incorporation, (B) Apoptosis in thymocytes from $p53^{M/M}$ mice. Thymocytes were isolated from 6- to 9-week-old mice and treated with 5Gy of γ radiation. Apoptosis was measured by FACS analysis of Annexin-V expression and propidium iodide exclusion, (C) $p53$ Target Gene Expression in Mutant $p53$ Cells. Immunoblots for p53, s15-p53, and p21 on MEF whole-cell lysates are shown.

b. knockout mice 연구 성과

Tumor suppressor의 돌연변이 후 일어날 수 있는 암 형성 과정을 재현해 보는 연구가 다각도로 시행되었고 그 중 homologous recombination을 통한 knockout mice의 연구는 tumor suppressor의 돌연변이가 어떤 기능에 defect가 있으며 어떻게 암이 진행되는 가를 쉽게 보여줌. Mice연구를 통한 Brca1의 deletion은 genome instability를 일으켜 checkpoint를 activation시키며 DNA damage repair의 결함을 유발함 (Deng (2006) Nucl. Acids Res, **34**, 1416-1426). Brca1이 knockout된 mice는 developmental 과정에서 apoptosis증가에 의한 embryonic lethality를 보이며, mammary gland 에만 특이적인 Brca1의 deletion은 mammary gland developmental defect와 더불어 mammary tumor를 발생함 (Xu et al. (1999) Nat Genet, **22**, 37-43, Fig. 3). 또한 whole body의 Brca1 mutation은 다른 radiation response 유전자의 deficiency를 교배를 통해 획득하면 embryonic lethality가 rescued 됨 (Hakem et al. (1997) Nat Genet, **16**, 298-302., Ludwig et al. (1997) Genes Dev, **11**, 1226-1241., Shen et al. (1998) Oncogene, **17**, 3115-3124, Xu et al. (2001) Nat Genet, **28**, 266-271., Cao et al. (2006) EMBO J, **25**, 2167-2177.). 또한 이렇게 생성된



암컷의 Brca1-deletion에 의한 암은 p53의 loss를 수반하며 이는 human에서도 매우 높은 경우에서 보임 (Schuyer and Berns (1999) Mol Cell Endocrinol, **155**, 143-152., Xu et al. (2001) Nat Genet, **28**, 266-271.).

Fig. 3. Developmental defect of $Brca1^{tm1/m2}$

mice. Morphological and histological analyses of *Brcal*^{D11/D11} embryos at E10.5 embryos (a), E16.5 mutant embryos (b) and E16.5 control (c). Cell death in mutant embryos at E12.5 mutant (d) and control (e) embryos were stained with Nile Blue sulfate to view dead cells. There is substantial staining in the brain of mutant but not control embryos. Lines indicate levels of cross-sections shown in f,g. Large numbers of apoptotic cells (arrows) are shown by TUNEL assay in mutant (f) but not control (g) embryos.

Mice에서 ATM locus를 변이시킨 마우스 모델은 1990년대 중반에 발표되었고 이 돌연변이 마우스는 성장저하, 불임, 면역저해, 방사선 과다민감과 같은 다양한 이상성을 보임 (Balow et al (1996) Cell, **86**, 159-171., Elson et al (1996) Proc Nat Acad Sci, **93**, 13084-13089., Xu and Baltimore (1996) Genes Dev, **10**, 2401-2410., Fig. 4). 한편 Chk2 돌연변이 마우스의 경우 ATM 과 달리 돌연변이 마우스에서 premature aging phenotype은 보이지 않고 오히려 방사선 저항성을 보임 (Hirao et al (2002) Mol Cell Biol, **22**, 6521-653.). 하나 ATM과 Chk2 돌연변이 마우스는 방사선에 대한 양상은 다르지만 모두 genetic instability를 증가시켜 암의 발생을 증가시킴.

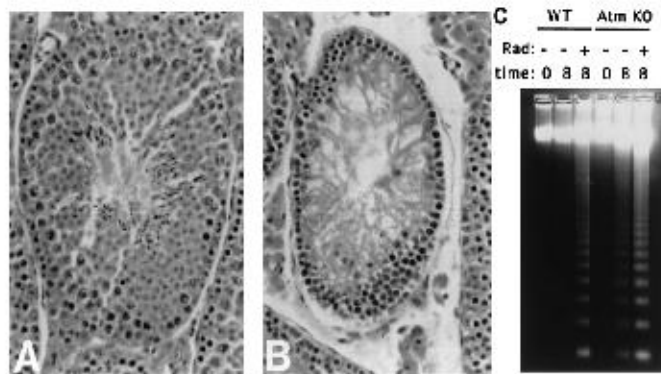


Fig. 4. Phenotype of *Atrm*-mutant mice. Cross section through a seminiferous tubule of a wild-type (A) and an *Atrm*-deficient (B) adult mouse. Note that the developing sperm present in A is replaced by debris in B. ($\times 200$). (C) DNA laddering in thymocytes of wild-type and *Atrm*-deficient mice. Freshly isolated thymocytes were plated after either no irradiation (-) or irradiation at 3.5 Gy (+). DNA was prepared either immediately afterward "0" or after "8" hr incubation, and 10 μ g was electrophoresed through a 1% agarose gel.

*Brcal*이 knockout된 mice의 embryo는 발생과정 중에서 7-8일 사이(E7-E8)에 embryonic lethality를 보이며 이 mice에 동시에 p53나 p21의 deficiency를 일으키면 partially rescued 됨 (Hakem et al (1997) Nat Genet, **16**, 298-302., Ludwig et al (1997) Genes Dev, **11**, 1226-1241., Shen et al (1998) Oncogene, **17**, 3115-3124.). 또한 이는 후에 *Brcal*의 hypomorphic mutation of *Brcal* (*Brcal*^{D11/D11})을 사용하면 p53의 haploid loss에 의해 delayed mutant embryonic lethality (died at E12-E18)가 완전히 극복됨 (Xu et al (2001) Nat Genet, **28**, 266-271.). 이렇게 생성된 암컷의 *Brcal*^{D11/D11}p53^{+/-} mice는 p53의 loss of heterozygosity (LOH)를 보이며 multiple organ에서 tumor를 나타냄. 암에서의 p53의 mutation은 매우 높은 확률 (50%)로 존재하지만 BRCA1-associated된 mammary tumor에서는 그보다 높은 90%의 tumor에서 p53의 mutation이 나타남 (Schuyer and Berns (1999) Mol Cell Endocrinol, **155**, 143-152.). 이러한 사실은 p53의 mutation이 *Brcal*의 genetic altered cell을 survival시켜 결국은 tumor가 생기게 하리라 사료됨.

c. BRCA1과 에스트로겐의 연관성 접근

본 연구가 기존의 연구와 차별되는 점은 1990년대부터 축적이 되기 시작한 유전자 조작을

이용해 제작된 knockout mice를 사용하여 특정 유전자만이 돌연 변이된 mice에서 유래된 fibroblast, tumor, tumor cell line, tumored mice와 같은 다양한 시료를 이용하여 각 유전자의 mutation 혹은 조합된 mutation들의 조합에서 여러가지 자극에 대한 반응을 다단계에서 분석함으로써 자료의 신뢰도를 높임. 본 연구에서 Brca1/Chk2 단백질을 최초의 연구대상으로 결정한 이유는 이 단백질들의 변이나 결실이 cell proliferation, apoptosis에 영향을 주어 동물모델에서의 암 발생에 직접 관여함을 보았고, 본 연구팀이 Brca1-D11 homozygous mutant mice의 과도한 apoptosis에 의한 embryonic lethality가 Chk2를 교배를 통해 double-knock할 때 완전히 회복되어 성숙한 성체로의 발달을 보이며 이러한 복합 돌연 변이를 가진 mice의 모든 mice가 2년 안에 일반적인 BRCA1 손실에 의한 tumor pattern과 가장 유사한 tumor spectrum을 가짐 (Xu et al, (2001) Nat Genet, 28, 266-271, Cao et al (2006) EMBO J, 25, 2167-2177).

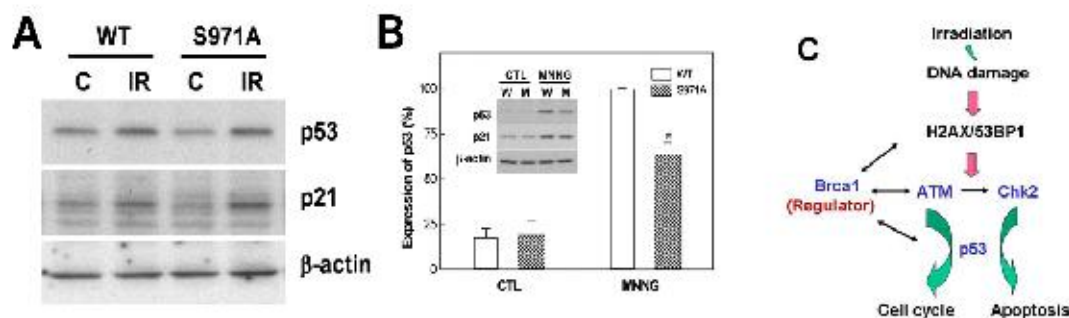


Fig. 5. Response to gamma-irradiation and MNNG in Brca1^{S971A/S971A} MEFs and tumor cells. (A) Expression patterns of p53 and p21 after treatment with gamma-irradiation (10 Gy). C and IR, unirradiated and irradiated MEFs, respectively. (B) p53 expression levels in wild-type (W) and Brca1^{S971A/S971A} cells in the absence (CTL) and presence (MNNG). (C) Expected scheme.

또 한가지 흥미로운 사실은 한 단백질의 유전적 변이에서도 p53의 activation이 다른 종류의 DNA damaging reagent에 따라 다른 양상의 activation을 보임. Brca1의 mutation중에서 S971을 alanine으로 치환하여 Chk2의 control을 받지 못하는 상황에서 동일 세포를 두 가지 서로 다른 자극인 irradiation과 MNNG를 처리 하였을 때 일반적인 p53 activation의 강한 자극으로 작용했던 irradiation의 경우 효과가 없는 반면 MNNG의 처리는 p53의 activation이 돌연변이세포에서 저해되어 genetic instability가 증가하게 되어 쉽게 암발생이 되게 됨 (Kim et al, (2004) Mol Cell

Mice	Phenotype	Mammary	Uterus	Inducer	Ref
Brca1 ^{-/-}	Embryonic Lethal				Avr et al (1995)
Chk2 ^{-/-}	None (?)	No	Yes		Tak et al (2002)
ATM ^{-/-}	Tumor/Aging	Yes	No		Chen et al (1998)
Brca1 ^{FLN}	Hyperplasia	Yes	Yes		Kim et al (2004)
Brca1 ^{S971A/S971A} Chk2 ^{+/+} (control)	Hyperplasia	Yes	Yes	IRMNNG	Xu et al (2004)
Brca1 ^{S971A/S971A} Chk2 ^{-/-}	Hyperplasia	Yes	No	R	Xu et al (in press)

Biol 24, 9498-9507., Fig. 5). 이러한 결과는 세포가 다양한 외부자극에 다양한 반응을 보이는 좋은 설명임과 동시에 이에 대한 다양한 수준의 연구가 계속 되어야 하는 이유임.

두 가지의 한 pathway에 존재하는

tumor suppressor의 돌연변이는 그의 결과가 사뭇 다른데 familial BRCA1 mutation의 경우 유방암과 난소암에 대해 비교적 높은 penetration을 보이는 반면 CHK2의 경우 전자의 경우에 비해 tissue specific한 양상이 비교적 낮게 나타남. 하지만 Brca1에서 Chk2의 조절부분이 abnormal한 mice의 경우, 그의 phenotype이 Chk2와 매우 유사하게 나오는 양상을 보임. Table 1은 이 pathway의 knockout mice를 통한 연관 유전자 돌연변이와 여러 가지 Brca1의 다른 knockin mice의 phenotype을 정리한 것임.

Table 2. Summary of Brca1-FL mice

Mice	Age of Death	Abnormal organ	Uterus Hyperplasia	Secondary Ovary			Overall
				Ductal Hyperplasia	Lobular Hyperplasia	cytin E	
R187	5M	Kidney	SPH, EH	+++	Yes	No	MC, DCB
8222	13M		GCH, DI	++		Yes	MC
8223	15M	Ovary	SEH	++		Yes	MC
R279	13M	Reovirus	AD	++		Yes	MC, AFM
8231	23M	Lymphoma, Ovary	GCH	++	Yes	Yes	MC
8243	18M	Ovary	No	+++		Yes	DC
R284	23M	Lymphoma, Ovary	SPH, EH	++	Yes	Yes	MC
8299*	13M	Lymph Node					
8344	17M	Lymphoma, Lung	SEH, EH	+		Yes	MC, DCB, AFM, SP, DC
8358	18M	Mesovary, Blood, Ovary	SEH, EH	++++	Yes	Yes	MC, DCB, AFM, SP, DC

*SPH: Squamous Pyloric Hyperplasia, EH: Endometrial Hyperplasia, AD: Adrenocortical Dysplasia, DCB: Ductal Carcinoma in Situ, AFM: Atypical Follicular Hyperplasia, SEH: Squamous Epithelial Hyperplasia, GCH: Glandular Carcinoma, AD: end adenocarcinoma

*8299 died for lymph node tumor and no fresh tissues could be collected for further analysis.

여기서 또한 매우 흥미로운 사실은 Brca1의 mutation에 의해 발생하는 uterus hyperplasia는 병리학적으로 다수의 endometrial hyperplasia를 보임 (Brca1-FL mutation에 의해 발생하는 uterus abnormality의 경우 50%가 endometrial hyperplasia로 등정됨.) (Table 2).

이 mutant mice의 uterus에 대한 종합적인 병리학적인 소견은 이러한 abnormality는 estrogenic stimulation이 지속적으로 과다 분비가 되었을 때 빈번하게 나타나는 현상임 (Fig. 6). 이 후 이 mutant mice의 estrogen의 synthesis가 증가 하였는지를 뇌에서 선구 물질을 통해 알아 보았을 때 분비를 담당하는 brain pituitary의 구조나 합성 및 분비를 담당하는 세포와 조직에서 특이 할 만 한 변화는 보이지 않음. 따라서 본 연구는 기존에 만들어져 보유하고 있는 mutant

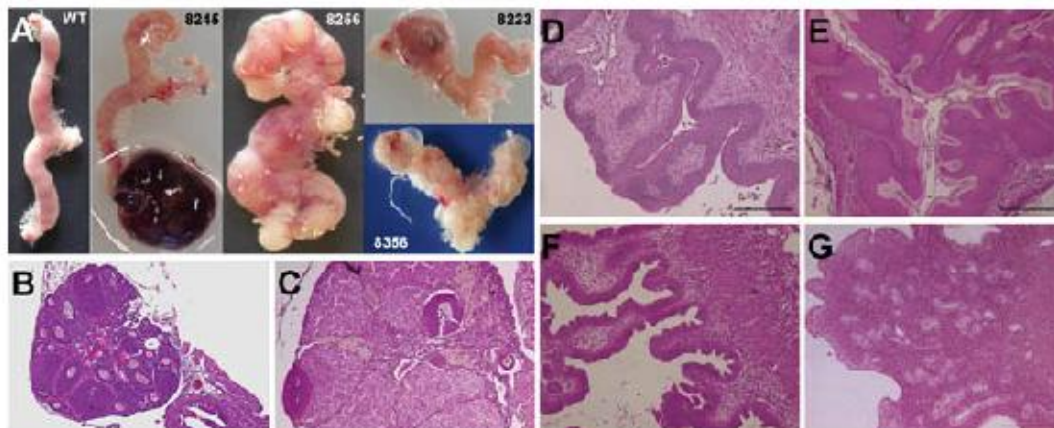


Fig. 6. *Brca1^{FL/FL}* mice develop a variety of gynecologic lesions. (A) Uteri and ovaries from wild type (WT) and *Brca1^{FL/FL}* mice. Examples of histological sections of ovaries (B, and C), cervix (D, and E), and endometrium (F, and G) from *Brca1^{FL/FL}* mice (C, E, and G) and age matched wild type mice (B, D, and F). The epithelium of mutant uterine cervix is significantly increased (E) compared with the control (D). Bars: 100 μ m.

mice의 조직절편을 사용하여 uterus에서 estrogen에 의한 downstream의 over-activation에 대해 조사하고 동시에 위의 mice의 mammary gland tissue 적출 시 uterus, ovary도 같이 preparation 하여 이를 분석.

또한 Brcal과 Chk2의 상호 작용에 의한 gynecologic system에서의 alteration의 원인을 알아보기 위한 연구가 일부 수행됨. 이전의 연구에서 radioresistant DNA synthesis (RDS)가 ataxia-telangiectasia의 중요 phenotype중에 하나이며, 이는 Chk2에 의한 S-checkpoint activation, mismatch repair system이 중요한 역할을 한다고 알려짐 (Brown et al (2003) Nat Genet 33, 80-84). 따라서 위의 gynecologic abnormality를 보이는 mice가 이에 의한 영향을 받는지 알아보기 위해 mismatch repair를 모니터 할 수 있는 Microsatellite instability를 조사해 보았을 때 3개의 다른 개체에서 나온 abnormal tissue에서 instability가 관찰 됨 (Fig. 7).

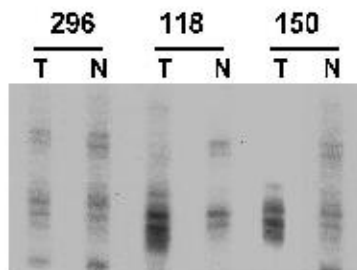


Fig. 7. Microsatellite analysis of tumors of *Brcal*^{S972A/S972A} mice. T and N represent the DNA from tumor and normal tissue, respectively.

또한 같은 mice에서 DNA를 메틸레이션시켜 mismatch repair에 의한 DNA repair정도를 측정해 보았을 때 이 mice의 경우 대조군에 비해 높은 전반적인 암 발생과 gynecologic abnormality를 보임 (Kim et al, (2004) Mol Cell Biol 24, 9498-9507). 최근의 본 연구자에 의한 Brcal mutation하에서 p53과 Chk2의 mutation을 추가 하였을 경우 tumor spectrum에서 Chk2추가 mice (28%) 에서는 대조군인 p53 mice (0%)에서 나타나지 않던 gynecologic abnormality가 나타남 (Cao et al (2006) EMBO J 25, 2167-2177., Fig. 8).

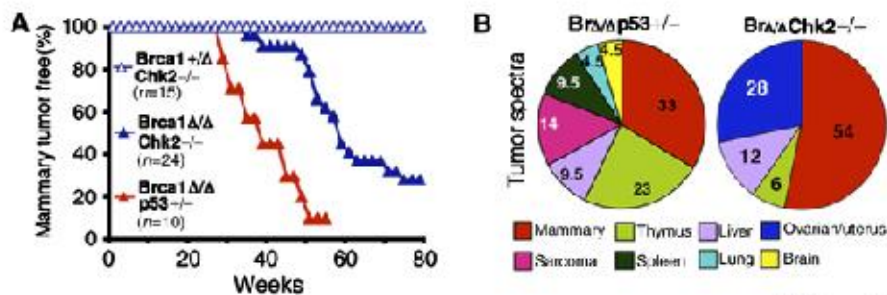


Fig. 8. Incidence, latency and spectrum in tumors from *Brcal*^{m2/m2}*p53*^{-/-} and *Brcal*^{m2/m2}*Chk2*^{-/-} female mice. (A) Onset of Brcal-associated mammary tumors of *Brcal*^{m2/m2}*Chk2*^{-/-}, *Brcal*^{m2/m2}*Chk2*^{-/-} and *Brcal*^{m2/m2}*p53*^{-/-} female mice. (B) Tumor spectra of *Brcal*^{m2/m2}*p53*^{-/-} and *Brcal*^{m2/m2}*Chk2*^{-/-} female mice.

이에 대한 완벽한 이해는 왜 Brcal의 mutation에 의한 tumor formation이 여자에게서 높게

나타나는 이유와 이들 방사선 반응 유전자가 돌연변이 되었을 때 radioresistant 한 DNA synthesis의 기전 규명에 기여 하게 됨. 따라서 본 연구의 성공적인 수행은 특정한 genetic defect 를 가지고 있는 mice model을 이용하여 기초연구로써 RDS의 기전 규명과 translational study에 사용될 다양한 living library 구축을 통한 방사선 치료의 향상에 기여 하고자 함.

B. 연구사업 특성 및 추진전략

이 연구계획의 방법의 가장 중요한 핵심은 특정 유전자변이를 통해 만들어진 knockout mice에서 추출된 재료를 사용해서 돌연변이가 조절된 상태에서 방사선 처치 반응을 각 유전자 혹은 그 조합에 대해 정확한 정보를 수집 가능. 반면 기존에 널리 사용되어온 환자의 암에서 정립된 cancer cell line의 경우 그의 변이 유전자들이 파악을 할 수 없어 각 유전자에 대한 특이적 처치 확립이 어려움. 이에 반해 본 연구는 mouse embryonic fibroblast (MEF)와 같은 형질변환 되지 않은 정상세포부터 이 mice를 오랜 기간 동안 사육하면서 자연적으로 발생된 암 조직 혹은 암 조직에서 만들어진 세포주 등 같은 유전형질에서 기인한 다른 상태의 세포나 조직의 취득이 용이하여 각기 다른 상태의 재료를 통해 정확한 정보 분석 가능. 이를 통해 각 대조군에서 유의 할만한 marker 혹은 oncogene을 분자생물학적, 생화학적 array를 통하여 selection. 이 중 특히 저해제가 사용 가능한 ATM과 Chk2을 target으로 selection하여 inhibitor에 의한 downregulation을 통해 *in vivo*에서 방사선 효과 증진 검색. 이와 같은 접근 방법은 방사선 처치 targeting 뿐만 아니라 화학적 요법에도 응용 가능.

C. 연구사업의 방법

a. **조사 대상 재료의 확보:** 위에서 언급된 유전자 혹은 조합의 교배로 wild type, homozygous mice의 embryo를 만들고 이를 통해 세포를 제조. 이렇게 제조된 세포를 wild type, homozygous의 pair를 대조군과 실험군으로 하여 estrogen 처치 후 아태와 같은 세포반응에 분석. 또한 반응 유전자의 상태를 western blot을 통해 측정하여 처리 결과와 비교, 검토.

b. **분석방법 :** 각 실험은 대조군과 실험군에서 세포의 성장과 세포사를 수치적으로 측정하기 위해 BrdU incorporation, 시간에 따른 세포수의 변화, Annexin-V, TUNEL, Comet 혹은 DNA fragmentation을 통해 수치화 함. 또한 동시에 분자생물학적 변화를 알아보기 위해 세포의 extract를 추출하여 p53의 조절인자인 p21, Bax, Bcl-2, ATM, Chk2, mdm2와 p53의 phosphorylation residue-specific antibody를 사용하여 western blot을 시행 (Fig. 11). 이와 같이 각 조건에서 세포주기 조절을 FACS를 통해 분석하며 interaction의 변화 추적. 이러한 결과들이 각 단백질들의 위치변화와 세포구조에 영향을 주는지 알아보기 위해 각 세포를 배양후 에스트로젠 처리 한 후 각 단백질에 대한 특이적인 항체와 구조단백질에 대한 항체를 사용하여 위치추적및 세포의 형태 관찰.

c. **In vivo 실험 :** *In vivo*실험을 통해 두 유전자의 부인암 발생에서의 역할을 알아보기 위해

Brcal 돌연변이 마우스에 Chk2의 돌연변이 마우스 혹은 조직 특이적 유전자 변이를 유발하는 마우스와 교배해 tumor prone 마우스를 제작, 암컷의 각 유전형의 wild type 마우스 혹은 MMTV-Erb2를 transgene 시킨 마우스를 대조군으로 함. 제작된 Brcal^{co/co}MMVT-cre, Brcal^{co/co}PR-cre mice, Brcal^{D1/D1} Chk2^{-/-} double homozygous 마우스는 각 strain 당 최소 40마리 정도로 grouping하여 약 1년의 기간 동안 암의 발생상황을 육안 혹은 imaging장비를 이용하여 검사, 각 mice에서 암 또는 이상이 발견되면 해부를 통해 이상의 원인을 파악하고 암을 포함한 각 조직을 적출, 암조직인 경우 조직을 적당한 크기로 잘라 세포주를 확립하고, 나머지는 조직절편을 만들거나 냉동보관.

d. 시료의 분석: 각 조직은 파라핀으로 고정화 시킨후 section하여 병리학적 분석, 조직 면역학적 염색기법에 의한 분석, 필요시 동일 개체의 조직절편내에서 변이조직과 정상조직을 laser micordissection 하여 microsatellite instability 분석, microarray 등을 통하여 분자생물학적 분석.

e. Target selection: Brcal이나 Chk2의 돌연변이는 방사선에 대한 직접반응을 감소시키고 이에 의한 처치의 효과를 저해하는 RDS를 보임. 따라서 이들, 특히 Chk2의 손실은 ATM을 활성화 시키며 방사선 조사에 대한 저항성을 보임. 따라서 이 두 방사선 반응 단백질의 억제는 방사선 처치에 대한 민감도를 변화시켜 치료효과를 증가 혹은 정상조직 보호의 영향을 주리라 예상. 또한 ATM과 Chk2는 효소이기 때문에 이의 저해가 다른 전사조절 암 억제 단백질보다 용이 하므로 이들의 저해제의 암치료 보조제로서의 유용성을 검사해보자 함. 현재까지 밝혀진 ATM/Chk2의 저해제를 세포와 암발생 쥐에 처리하여 방사선 조사후의 반응양상을 관찰/분석하여 처치의 유용도 검사.

3. 연구결과 고찰 및 결론

A. Brcal 돌연변이 마우스에서의 에스트로젠 의존적 이상증식

방사선 조사에 대한 반응에 연관된 BRCA1과 CHK2는 tumor suppressor로도 알려져 있으며 이들의 돌연변이는 유방암과 난소암을 포함해 다양한 암의 발생과 연관 되어 있다. 특히 본 연구자에 의해 밝혀진 Brcal에서 Chk2의 인산화 조절부분을 돌연변이 시킨 mice의 경우, 그의 phenotype에서 높은 빈도의 자궁조직의 이상증식이 발견되었다 (Kim *et al.* (2004) Mol Cell Biol, **24**, 9498-9507). 이 mutant mice의 uterus에 대한 종합적인 병리학적인 소견은 이러한 abnormality는 estrogenic stimulation이 지속적으로 과다 분비가 되었을 때 빈번하게 나타나는 현상과 유사성이 관찰 되었다. 이러한 현상은 본 연구팀의 다른 유전변이 Brcal^{all/all},chk2^{-/-}인 double mutant mice에서 gynecologic abnormality가 높게 나타는 (28%)것으로도 확인되었다. (Cao *et al.* (2006) EMBO J **25**, 2167-2177). 이와 같은 증상은 본 연구자가 제조하였던 Brcal-FL mice에서도 반복적으로 발현되는 것을 밝힌바 있다 (Kim *et al.* (2006) Mol Cell Biol, **26**,

6983-6992). 이러한 *Brcal*의 돌연변이가 반복적으로 나타나는 자궁조직의 이상 현상을 분자적으로 규명하기 위해 이상증식을 보인 자궁조직을 여러 가지 항체를 사용하여 에스트로겐과의 연관성을 조사하여 보았다.

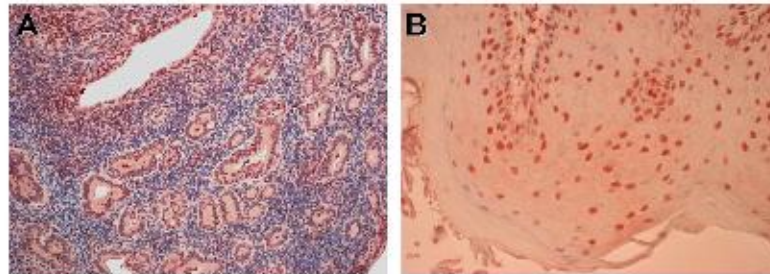


Fig. 1. Over expression of phospho-ER-alpha in hyperplastic uterus of *Brcal*^{FL/FL} mice. Immunohistochemical staining of uterus sections from aged *Brcal*^{FL/FL} mice in endometria (A) and cervix (B) region. Images of sections were detected by primary antibodies against phospho-ER-alpha.

Estrogen receptor-alpha (ER-alpha)는 steroid receptor superfamily종의 하나로 highly conserved DNA binding과 ligand binding domains을 가지며 에스트로겐-의존적 단백질의 전사를 유도한다 (Mangelsdorf, D.J. *et al.* (1995) *Cell* **83**, 835-839). 이 receptor의 인산화는 ligand와 결합 후 나타나는 중요한 ER-alpha의 활성을 조절하는 방법으로 알려져 있다. 일반적으로 BRCA1 돌연변이에 의한 유방암은 이 표지에 대해 음성반응을 보이는 것으로 보고되었다. 따라서 앞서 말한 *Brcal*의 돌연변이에 의한 자궁의 이상 증식조직에서는 위의 그림 1과 같이 자궁내의 cervix, endometria에서 모두 phospho-ER-alpha가 detection되는 것을 통하여 이 조직에서 estrogen의 활성이 높게 나타나고 이 조직의 이상 증식은 일반적으로 estrogen의 활성증가가 세포증식에 기여하는 성질을 통해 유도 되리라 생각된다.

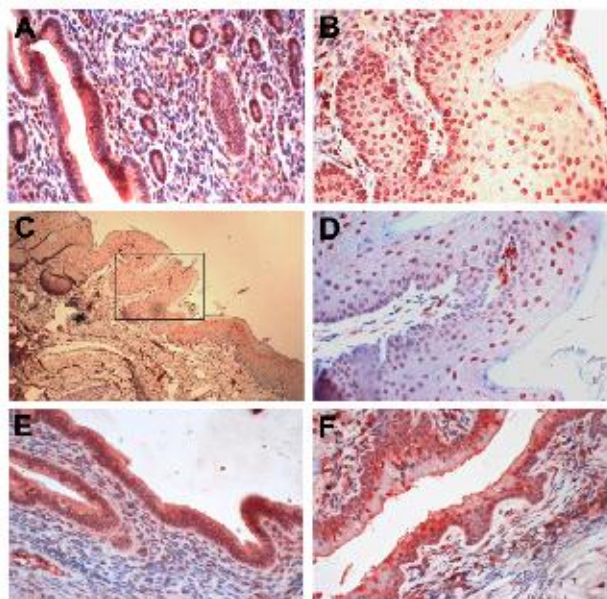


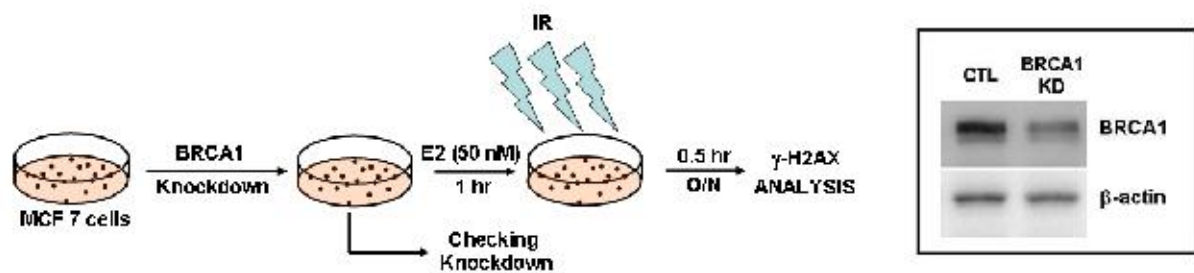
Fig. 2. Over expression of growth signals in hyperplastic uterus of *Brcal*^{FL/FL} mice. Immunohistochemical staining of phospho-EGFR (A, and B), phospho-AKT (C, and D) and phospho-Erk (E, and F) in uterus sections from aged *Brcal*^{FL/FL} mice in endometria (A, and E) and cervix (B, C, D, and F) region.

이 과정이 estrogen에 의한 효과에 의한 결과인지를 알아보기 위해 이 hormone에 의해 활성이 유도 된다고 알려진 여러가지의 다른 downstream에 존재하는 세포 활성 조절인자의 활성을 동일 조직에서 측정해 보았다. 대상은 p42/p44 MAP kinase, GSK-3alpha, AKT, EGF receptor에 대한 활성을 이의 activation 되는 경우에 나타나는 phosphorylation을 측정하여 알아보았는데, 이 중에서 EGF 수용체 (Fig.

2A, and 2B) 와 AKT (Fig. 2C, and 2D) 의 높은 활성이 측정된 모든 조직의 상피세포에서 관찰되었다. 그러나 p42/p44 MAP kinase (Fig. 2E, and 2F) 의 경우 일부의 시료의 endometrium에서 만 이의 활성이 관찰되었다. 반면 GSK-3의 활성은 보이지 않았다.

B. 에스트로겐에 의한 Brca1-deficiency상태에서의 genetic instability

위의 현상의 원인을 알아보기 위해 Brca1이 돌연변이 상태에서 에스트로겐이 어떠한 영향을 주는지 알아보았다. 실험은 아래와 같이 mammary gland adenocarcinoma에서 유래된 MCF7을 사용하여 먼저 Brca1을 siRNA oligomer를 사용하여 knockdown시키고 에스트로겐을 처리한 후 방사선을 조사하여 이에 대한 반응 양상을 살펴보았다.



먼저 방사선 조사는 일반적으로 DNA에 손상을 주어 DNA손상을 표지하고 이에 의한 DNA damage repair 혹은 apoptosis가 일어나는 잘 알려진 반응이 진행되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Brca1의 결실이 일어난 상태에서 estrogen이 이 반응에 영향을 주는지 알아보기 위해 DNA 손상 후 손상의 인식과 손상의 초기단계에서 이에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 H2AX 단백질의 이동을 추적해 보았다. H2AX는 DNA 손상에 의해 139번째 아미노산이 인산화 되어 gamma-H2AX로 전환 되는데 이는 손상부위에 집중적으로 위치해 foci를 형성하게 된다. 따라서 위의 실험군 간에 이를 측정해 보아 이 과정이 유지되는지 알아보았다.

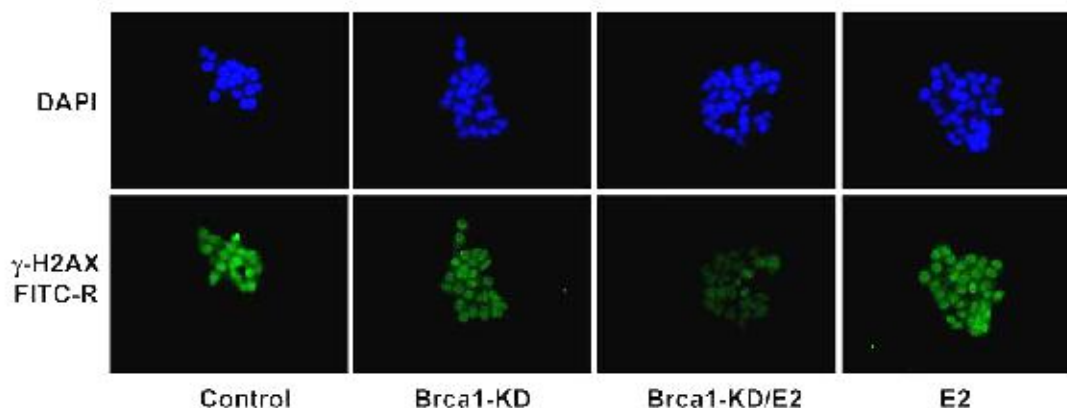


Fig. 3. gamma-H2AX formation upon 0.1 Gy irradiation in MCF7 cell. The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50nM), and irradiated at 0.1 Gy. The cells were fixed 30 min after the irradiation and stained the antibody against-gamma-H2AX antibody. Upper images represent the nuclear stained by DAPI.

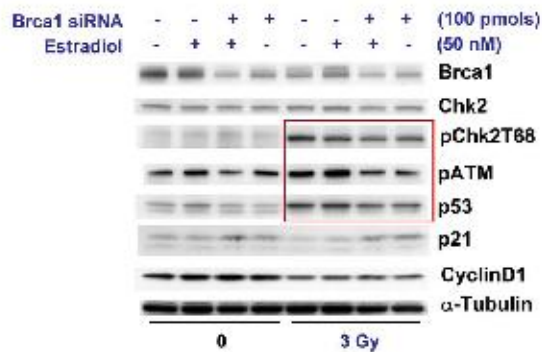


Fig. 4. Alteration of cell cycle checkpoint proteins in BRCA1 knockdown and estrogen treatment upon irradiation. The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50 nM), and irradiated at 3 Gy. The cells were harvested 30 min after the irradiation and subjected to western blot using the antibodies as indicated.

아울러 같은 상태의 세포를 western blot을 통해 확인해 보았을 때 아래 그림과 같이 BRCA1의 knockdown은 pChk2T68, pATM, p53과 정상적 방사선 반응이 억제 되어 이 같은 정상적인 DNA damage response가 억제 되어 있는 것을 볼 수 있다 (Fig. 4). 이러한 억제는 estrogen의 여부와는 무관하게 한 것으로 관찰 되었다.

위의 acute response와 달리 late response를 western blot으로 조사해 보았을 때 estrogen의 처리는 BRCA1의 돌연변이에 의한 cell growth arrest를 탈출하여 세포 성장을 재시작 하며 이에 의한 DNA damage가 accumulation되는 것으로 보인다 (Fig. 5).

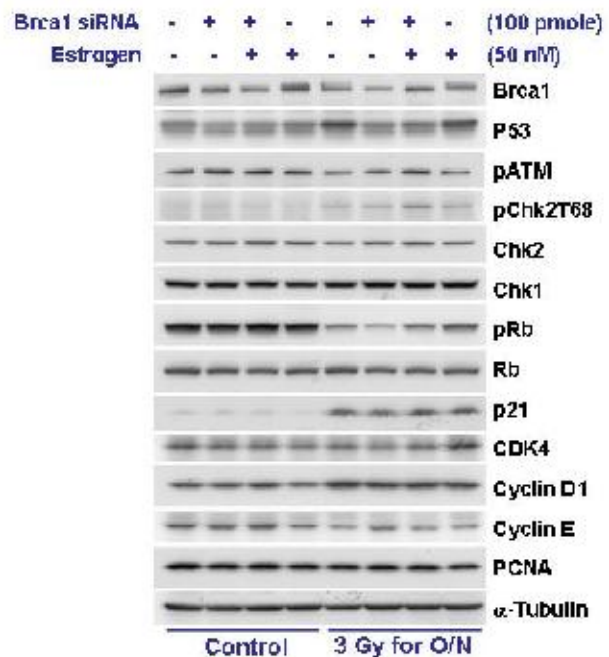


Fig. 5. Late response of cell cycle checkpoint proteins in BRCA1 knockdown and estrogen treatment upon irradiation. The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50 nM), and irradiated at 3 Gy. The cells were harvested 30 min after the irradiation and subjected to western blot using the antibodies as indicated.

여기에 항체면역조직염색에 양성으로 반응을 보인 AKT와 그의 다음 작용 단계인 GSK의 변화 양상을 살펴본 결과 BRCA1의 결실과 estrogen의 처리가 같이 이루어진 그룹에서만 특이적으로 높은 반응을 보인다 (Fig. 6).

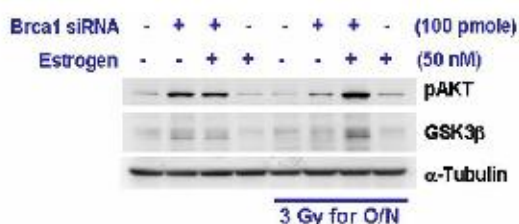
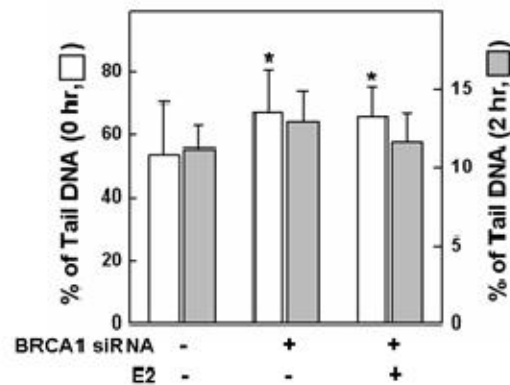


Fig. 6. Alteration of pAKT/GSK-beta proteins in BRCA1 knockdown and estrogen treatment upon irradiation. The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50 nM), and irradiated at 3 Gy. The cells were harvested 30 min after the irradiation and subjected to western blot using the antibodies as indicated.

Brca-1이 부족한 상태에서 발생하는 손상이 estrogen의 존재 유무와 연관이 있는지 알아보기 위해 DNA의 손상정도를 Comet assay를 통하여 측정하여 보았다 (Fig. 7). DNA손상의 정도는 Brca1이 부족한 경우에 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었고 이 정도가 estrogen에 의해 증가하지는 않았다. 하지만 일정시간을 반응하여 손상된 DNA를 recombination시켰을 때 손상의 회복정도는 정상이 가장 빨랐고 Brca1-부족 상태가 가장 느렸다. 하지만 Brca1이 부족하더라도 estrogen이 처리된 경우 정상과 유사한 결과를 보였고 이는 estrogen에 의한 효과로 생각된다. 이 각기 다른 상태에서 recombination의 방식에 차이가 있는지 알아보고 있다.

Fig. 7. Increased DNA damage by BRCA1-insufficiency but not estrogen.

The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50 nM), and irradiated at 10 Gy. The cells were harvested immediate or 2 hr after the irradiation, denatured at alkaline condition, and subjected to Comet assay. Results were calculated 50 different cells of each conditions.



그리고 이러한 DNA의 손상이 생존에 어떠한 영향이 있는지를 알아보았을때 estrogen은 MTT assay를 통해 생존을 측정해본 결과 생존을 증가시킨다 (Fig. 8). 하지만 Brca-1의 발현이 부족한 상태에서는 오히려 생존을 억제시키는데 이는 brca1과 같은 genetic stability에 관여하는 유전자가 활성화 되어있지 않은 경우에 오히려 estrogen과 같은 성장신호는 DNA의 손상을 증가시킬 수 있음을 보여준다. 따라서 이와 같은 세포를 통한 분석이 Brca1의 돌연변이, estrogen에 의한 성장촉진과 같은 임상적으로 생기는 두가지 경우의 조합에 의해 암의 생성을 촉진시킬 가능성을 보여주며 이 가설은 동물실험을 통해 검증하고자 한다.

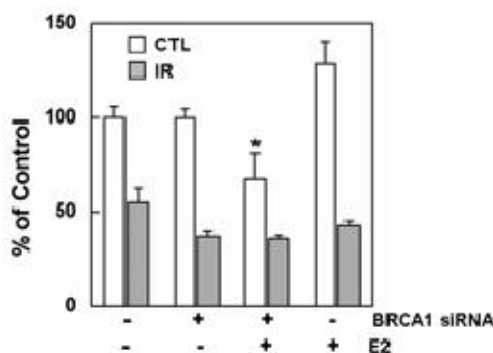


Fig. 8. Survival of MCF-7 on BRCA1 siRNA and estrogen treatment.

The MCF7 cells were downregulated the level of BRCA1 by transfection of BRCA1-specific siRNA, treated estrogen (50 nM), and irradiated at 3 Gy. The cells were incubated further around 5 days for the MTT assay. Results were calculated the four different samples in each

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분)	저널명(I.P.)	Vol(No)Page	구분	과제 관련성
ATM is required for rapid degradation of cyclin D1 in response to gamma-irradiatio.	교신	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> (2,749)	378, 847- 850	국외 SCI	상
Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice	공동	<i>Cancer Cell</i> (23,858)	14, 312- 323	국외 SCI	중
Hepatocellular cancer arises from loss of TGF-beta signaling adaptor protein ELF through abnormal angiogenesis	교신	<i>Hepatology</i> (10,734)	48, 1128- 1137	국외 SCI	상
Radiobiological Characterization of Proton Beam at the National Cancer Center in Korea	교신	<i>J Radiat Res</i> (1,260)	49, 509- 515	국외 SCI	상
CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis of immature thymocytes are directly regulated by NF-kappa B upon T-cell activation	공동	<i>Biochem Biophys Res Commun</i> (2,749)	370, 149- 153	국외 SCI	중
Disruption of transforming growth factor-beta signaling through beta-spectrin ELF leads to hepatocellular cancer through cyclin D1 activation	공동	<i>Oncogene</i> (6,440)	26, 7103- 7110	국외 SCI	중
Absence of full-length Brcal sensitizes mice to oxidative stress and carcinogen-induced tumorigenesis in the esophagus and forestomach	공동	<i>Carcinogenesis</i> (5,406)	28, 1401- 1407	국외 SCI	중
Hyperplasia and spontaneous tumor development in the gynecologic system in mice lacking the BRCA1-D11 isoform	제1	<i>Mol Cell Biol</i> (6,420)	26, 6983- 6992	국외 SCI	중

나. 저 서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (금지일 경우)
Transforming growth factor-beta in cancer therapy	Kim, SS, Shuman, C, Mishra, L,	Humana Press (USA, New Jersey)	91 - 103	Interaction of Smad4 and Embryonic Liver Fodrin (ELF)-beta-spectrin in Hyperplasia, Neoplasia, and Tumor Suppression

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
	연차	최종		연차	최종
Knockout 마우스를 이용한 Brcal과 Chk2 돌연변이에 의한 부인암 발생에서	1차년도	재료 선정 및 도입및 교배	달성		
		Mice 조직 절편 분석	달성		
	2차년도	재료 도입및 교배	달성		
		mice grouping in vitro 실험 분석	달성		

radioresistant DNA synthesis (RDS)의 기전에 관한 연구	3차년도	실험 mice group의 형성과 처리 완료	달성		
		마우스를 통한 acute response 분석	진행중		
		실험마우스의 이상 기록 및 분석	진행중		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
실험 mice group의 형성과 처리 완료	실험 mice group의 형성과 처리 완료
마우스를 통한 acute response 분석	x-선 조사 추가 필요
실험마우스의 이상 기록 및 분석	진행중

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	4	Hepatology, Oncogene 외
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

A. 진료적인 측면: 본 연구과제의 성공적인 수행은 부인암 발생에서 호르몬의 역할을 밝힘으로 향후 이의 예방과 치료에 기초를 제공함. 또한 접근이 어려웠던 방사선치료에 저항성을 가지는 암 종에 대해 새로운 접근법을 시도하여 이의 성공적인 수행은 치료 효과 증대를 꾀할 수 있고, 이 방법은 동시에 방사선을 제외한 화학적 요법에서도 사용될 수 있음.

B. 지식 및 기술적 측면: 현재 까지 밝혀지지 않은 커다란 의문점 중에 하나인 남자, 여자에게 공히 존재하는 Brca1의 mutation에 의한 tumor formation이 여자에게서 높게 나타나는 이유에 대한 설명을 제공할 수 있음. 또한 방사선 반응 유전자가 돌연변이 되었을 때 radioresistant 한 DNA synthesis의 기전 규명에 기여 하게 됨. 따라서 본 연구의 성공적인 수행은 특정한 genetic defect를 가지고 있는 mice model을 이용하여 기초연구로써 RDS의 기전 규명과 translational study에 사용될 다양한 living library 구축을 통한 방사선 치료의 향상에 기여 하고자 함.

이러한 유전자 특이적인 in vitro, in vivo monitoring system은 방사선 반응 유전자들이 방

사선 처치 이외에 대개의 화학적 요법에서도 cell cycle regulation과 apoptosis를 통해 영향을 주는 요인이므로 다양한 기술적 접근을 위한 기초 자료로 매우 유용. 또한 이 유전자들의 DNA damage에서의 상호 작용은 아직도 기초연구가 필요한 분야로 이 연구를 mice,와 human에 대해 in vitro와 in vivo수준에서 동시에 접근하는 것은 국립 암 센터에서만 할 수 있는 독창적임 것으로 생각됨.

6. 첨부서류

- 이하 첨부