

동물 모델을 이용한 c-myc, Mxi1 및 telomerase의 세포
주기와 발생 조절 및 전립선 암에서의 분자 생물학적
기능에 관한 연구

Molecular Genetic Analysis of c-myc, Mxi1 and telomerase
in vivo using animal models

성균관대학교 의과대학

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 동물 모델을 이용한 *c-myc*, *Mxil* 및 telomerase의 세포 주기와 발생 조절 및 전립선 암에서의 분자 생물학적 기능에 관한 연구 ”의 보고서로 제출합니다.

20 . . .

주관연구기관명 : 성균관 의과대학

주관연구책임자 : 이 한 응

연 구 원 : 성 영 훈

“ : 최 윤 식

“ : 장 영 순

요 약 문

동물 모델을 이용한 *c-myc*, *Mxi1* 및 telomerase의 세포 주기와 발생 조절 및 전립선 암에서의 분자 생물학적 기능에 관한 연구

Myc/Max 패밀리의 유전자인 *c-myc*과 *Mxi-1*은 세포주기 조절과 암의 발생에서 다양한 역할을 한다고 알려져 왔다. 최근에 텔로머라제효소의 Catalytic Subunit인 TERT가 *c-myc*에 의해 직접 조절된다고 밝혀졌다. 특히 이러한 *c-myc*에 의한 조절은 전사 조절이었다. 생체 내에서 Myc/Max 패밀리의 유전자에 의한 telomerase의 조절 기작을 직접 살피기 위해 *c-myc* KO 생쥐와 *Mxi-1* KO 생쥐로부터 Mouse Embryonic Fibroblast의 확립을 시작하였다. *Mxi-1*에서는 성공적으로 MEF를 확립하였으나, *c-myc* KO생쥐로부터 *c-myc*이 결손된 MEF의 확립은 실패하였다. 기존의 보고서처럼 혼합된 유전적 배경이 아닌, FVB나 C57B6와 같은 inbred와의 지속적인 역교배를 통해 E9.5Day 이전에 태아가 죽고만 것이다. 즉 혼합 유전적 환경에서 존재했던 Modifier 효과가 없어져서 좀더 빨리 죽고만 것이다. *Mxi-1* KO 생쥐는 전립선에서 전립선암의 초기단계로 보이는 변화가 발견되었다. 이를 바탕으로 *Mxi-1* KO 생쥐와 mTERC KO 생쥐의 전립선을 조사하였으나 기존에 밝혀진 이상 외에 전립선에 특별한 이상은 없었다. *c-myc*의 cofactor 인 TRRAP의 마우스 homolog를 클로닝하기위한 작업은 휴먼 게놈 프로젝트의 결과에서 TRRAP의 약 100k정도의 엄청나게 큰 유전자이고, 초기에 사용하였다 휴먼의 cDNA probe는 최근 발표된 마우스의 cDNA 정보와 비교해 볼 때 유사성이 매우 낮아 스크리닝은 불가능했던 것으로 사료된다. 따라서 본 연구를 통해 확립된 *c-myc* KO, *Mxi-1* KO, mTERC KO등은 앞으로 p53 KO, pRB KO와 같은 또다른 암 억제 유전자의 KO 생쥐와의 교배를 통한 연구에 효과적으로 응용될 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

Title: Molecular Genetic analysis of *c-myc*, *Mxi1* and telomerase in vivo using animal models.

Myc/*max* family genes such as *c-myc* and *Mxi-1* have been known to play diverse roles in cell cycle regulation and tumorigenesis. Recently catalytic subunit of telomerase was reported as a direct target gene of *c-myc*. It was known that telomerase upregulation by *c-myc* is transcriptional control. To further dissect role of *c-myc* and *myc* family genes in telomerase regulation, we tried to establish *c-myc* null MEFs in two inbred mouse such as FVB and C57BL6. Previous report (Davis et al, 1993) showed that majority of *c-myc* null embryos dies at E10.5. This result lead us to try to make *c-myc* null MEFs. Because there are several reports which show establishment of MEFs with embryos of E9.5~E10.5. However, we could not establish *c-myc* null MEFs. Previous report on *c-myc* null embryo are based on mixed genetic background. However our *c-myc* KO mice with FVB or C57B6 background are backcrossed more than 8 times, thus we could not get any viable *c-myc* null embryo near E9.5 . We further analysed *c-myc* null embryos from E8.5 to E9.5 . Even E8.5 day, we could not get *c-myc* null embryos. These results strongly suggest that near inbred *c-myc* KO mice which we have lack modifier effects of mixed backgrounds of *c-myc* KO.

Alteration of *Mxi-1* function in prostate cancer prompted us to examine prostate of *Mxi-1* KO mice. Hyperplasia was observed in prostate of *Mxi-1* KO but the telomerase null mice(*mTER* KO) seems normal histologically. Genomic and cDNA cloning of mouse *TRRAP* , an essential cofactor was not successful. The genomic structure of human *TRRAP* gene revealed that the ORF spans near 100kb. Recently we found N terminal region of mouse and human *TRRAP* has less similarity, further suggesting human cDNA probe of N-terminal region is not appropriate for genomic and cDNA cloning. In brief, We established 3 KO mice (*c-myc*, *Mxi-1*, *mTER*) near inbred for further research. Results from our research also were published. Established mice and research results will be valuable for future research.

CONTENTS

CHAPTER I : Introduction1
CHAPTER II : Current Status of Technological Development.....	3
CHAPTER III : Specific Aim and Results	5
CHAPTER IV :Achievement and Contribution	20
CHAPTER VI :Future Study and Suggestion.....	22
CHAPTER VII :Reference	23

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	5
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	20
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	22
제 6 장 참고문헌	23

제 1 장 서론

연구개발의 목적 및 연구 개발의 필요성

기술적 측면

사람의 암 유전자의 연구를 가장 정확하고 폭 넓게 연구하기 위한 필수적이며 강력한 수단인 *in vivo* 유전자 적중 동물 모델의 개발은 1992년 미국에서 정립되어 지금까지 수많은 논문들이 발표되고 있으나 국내에서는 포항공대의 신희섭 박사 팀 이외에는 실질적으로 전무한 실정이다. 국내의 여러 기관 및 연구소에서 이러한 기술을 개발 및 정립하는 사업은 분자 의과학 연구에 필수적인 것으로 국내의 몇몇 연구자들은 이미 그 중요성을 인식하여 준비중에 있다. 그러나 그 사업의 규모와 경제성 및 시간과 막대한 노력을 고려할 때 결코 선불리 시작하기가 어려운 것이 사실이다. 본인은 지난 14년 간 생쥐와 관련된 의과학 연구에 종사해 왔으며, 지난 8년 여 간 집중적으로 미국 Albert Einstein 의과대학의 embryonic stem cell facility를 setup 하여 1994년 이래 지금까지 7 종의 knockout mouse 생산을 주도하여 커다란 성과를 걷은 바 있다 (3편의 Cell, 2편의 Nature, 등). 또한 지난 2월 말 국내에 귀국할 때, 미국과의 공동연구 가능성의 조건부 협약 하에 여러 종의 knockout mice를 가져올 수 있게 되었다. 현재 소유하고 있는 knockout mouse들은 모두 암과 노화 및 발생 분화의 연구에 가장 중요한 동물 모델들로서 이를 바탕으로 이와 관련된 *in vivo* 연구가 놀라울 만큼 촉진될 것을 확신하는 바이다. 이 들 중 *c-myc*, *Mx11* 및 telomerase RNA component knockout mice는 그 기능이 사람의 암, Lymphoma, prostate cancer, plasmacytoma, carcinoma, myeloma 등의 발병에 중요한 유전자로 알려져 있다 (Potter & Melchers, 1998; Schreiber-Agus, et al, 1998). *Myc* family 유전자 들 중 가장 중요한 *c-myc*의 기능을 *in vivo*에서 증명하기 위하여 1993년 Alan Bradley 팀은 *c-myc* 유전자를 파괴시킨 생쥐를 제작하였으나 그 이 후 전혀 그 생쥐를 이용한 논문이 발표되지 않았으며 여러 연구자들이 그 팀으로부터 heterozygous knockout ES cell을 얻어 유전자 적중생쥐를 제작하는데 노력하였지만 실패하였다. 본인은 직접 독립적으로 genomic library로부터 유전자를 얻어 지난 1995년 *c-myc*, 1996년 *INK4a*, 1997년 telomerase, 1998년 *Mx11* knockout mouse를 제작하는 데 성공하였으며 국내에 가져올 수 있었다. 이와 관련하여 본인은 국내에서 이러한 특이한 기술을 개발, 정립하고 이로써 (가) *c-myc* 기능의 분자 및 발생 유전학적 기전을 밝히기 위한 *myc* family (*Mx11*, *Mad*, 및 다른 *myc* 유전자들)의 세포주기와 태아 발생과의 연관성 연구 (나) 최근 발표된 TRRAP (McMahon, et al., 1998) 이 *c-myc*을 통하여, 혹은 함께 어떻게 telomerase의 기능을 조절하는 지에 관한 신호 전달 체계에 관한 연구, (다) *c-myc*의 조절에 중요한 기능을 하는 것으로 알려졌으며 사람의 염색체에서 prostate cancer hotspot에 위치하는 것으로 발견된 두 가지 tumor suppressor, *Mx11* (Schreiber-Agus, et al., 1998)과 PTEN (Stambolic, et al., 1998), 그리고 *Myc* family protein의 binding partner인 Max를 파괴시킨 생쥐의 표현형 관찰을 통하여 prostate cancer의 분자유전학적 기전 규명을 시도하고자 한다.

경제, 산업, 사회, 문화적 측면

현대 사회가 고령화됨에 따라 급속도로 증가 추세에 있는 노인의 인구 비례에 따라 노인병의 비율도 동시에 증가하고 있으며 그 원인 및 증상도 다양해지고 있다. 그 대표적인 질환으로서 전립선암을 들 수 있는데 지금까지 수많은 연구에도 불구하고 아직 단 한 종류의 암도 그 발생 기전과 치료 방법이 100% 밝혀진 예가 없다. 그러므로 암의 원인의 규명과 그 치료 방법의 개발은 두 말할 나위 없이 그 중요성이 재확인되고 있는 실정이다. 그러나 이러한 문제의 심각성에도 불구하고 암을 유발하는 유전자의 그 분열, 발생, 분화 및 apoptosis의 작용 기전에 관한 연구는 시험관내(in vitro)의 실험 혹은 cell line을 이용한 ex vivo 실험으로 밝혀진 결과들이 그 주류를 이루고 있으며 단지 몇몇 transgenic mouse를 이용한 연구들이 최근 서구에서 발표되고 있다. 이러한 추세의 원인은 인간을 대상으로는 그 in vivo 실험이 한계에 도달해 있고 그 대신 수행할 수 있는 cell line으로의 실험은 그 염색체의 이상이 거의 항상 예상되므로 그 결과의 판독에 또한 한계가 있기 때문이다. 따라서 암 질환에 관련된 동물 모델의 확립은 병리학적, 분자 생물학적 기전 규명 및 치료법 개발에 보다 획기적인 전기를 마련할 뿐 아니라 암 질환에 대한 보다 많은 관심과 사회자본 투자를 유도하게 될 것이다. 이미 선진국에서는 이러한 동물 모델의 확립에 대한 지적 및 물적 재산권이 급속도로 증가하는 추세이며 이러한 추세는 결국 인간 질환에 관한 모델 동물 산업이라는 새로운 산업 형태로까지 발전될 수 있다. 선진국에서 서서히 이미 이루어지고 있는 독점적 지배 체제에 대비하고, 경쟁력 있는 사업을 추진하기 위하여 국내에서도 이러한 동물 모델의 개발 및 이를 이용한 연구에 많은 지원이 시급하다.

제 2 장 국내 외 기술 개발 현황

지금까지 c-myc의 암 발생 기전에 관한 연구는 5,000 여 편이 넘는 출간된 논문(SCI 등재)의 수가 말해 주듯이 아주 활발하게 진행되어 왔다. c-myc은 sequence-specific DNA binding protein, transcription factor, oncogene, apoptosis-regulating gene 및 differentiation-regulator 등으로 이미 알려져 있으며, 그 작용 기전으로서, Max와 heterodimer를 이루어 E box (CACGTG)를 promoter에 가지고 있는 target 유전자들의 transcription을 activation시킨다(Blackwell, et al., 1990). 이 과정에서 세포 내에 존재하는 MAX 단백질의 양은 거의 항상 일정하며(constitutive) 그 한계가 있으며 다른, basic helix-loop-helix를 함유하는 단백질인 Mxi1을 비롯한 Mad family protein들과 결합을 하여 Myc-Max heterodimer의 형성을 경쟁적으로 억제한다(Blackwood and Eisenman, 1991).

1. c-myc의 in vivo 기능을 밝히기 위하여 만들어진 knockout mouse는 E10.5 이전에 태아가 거의 전 장기의 이상을 보이며 embryonic resorption을 보였다(Davis, et al., 1993). 그러나 이러한 embryonic lethality가 c-myc의 어떠한 기능의 결함으로 생겨난 현상인지 전혀 그 특정 발생 시기에서 가능성 있는 다른 유전자들과의 연관된 연구가 발표되어 있지 않다. 본인은 1993년에 발표된 knockout mouse와 거의 같은 방법으로 c-myc 유전자를 파괴시키는데 성공하여 (Lee and DePinho, unpublished result) 지난 2월 귀국 시 그 생쥐를 국내에 반입하였다. 본 연구 과제에서는 이 knockout mouse를 이용하여 c-myc의 결손이 발생분화조절의 측면에서 어떻게 생쥐의 다른 myc family 유전자들 및 세포주기의 조절 단백질들과 연관하여 embryonic lethality를 부여하는지 그 분자 생물학적 기전을 밝히고자 한다.

2. 지금까지 발견된 c-myc의 다양한 기능 중, 최근 telomerase가 그 promoter에 myc target sequence인 E-box를 함유하고 있으며 그 E-box를 통하여 c-myc이 telomerase를 activation 한다는 보고가 발표되었다(Greenberg and DePinho, unpublished result; Wang, et al., 1998). 또한 지난 8월 처음 발견된 TRRAP 유전자는 c-myc의 N-terminal에 결합하여 c-myc의 oncogenic transcription factor 기능을 억제한다는 것이 알려졌다(McMahon, et al., 1998). 그러므로 TRRAP이 c-myc을 경유하여, 혹은 협력하여 telomerase의 기능을 조절하는 지 그 작용 기전을 밝히는 것은, 전체 사람의 암의 90% 이상을 차지하고 있는 telomerase activation과 가장 강력한 oncogene인 c-myc의 조절을 하나의 유전자로서 가능한 지를 추론, 증명하는 중요한 과제가 될 것이다. 이를 증명하기 위하여 본 과제에서는 c-myc- 과/혹은 telomerase-deficient mouse embryonic fibroblast를 knockout mouse에서 분리하여 ex vivo에서 그 분자 생물학적 및 세포 생물학적 기전을 연구하고자 한다. 또한 TRRAP의 in vivo 기능을 밝히며 가정된 pathway를 규명하기 위하여 이 유전자가 결핍된 생쥐를 제작하고자 한다.

3. 본인은 또 다른 Myc의 조절에 필요한 Mad family protein의 하나인 Mxi1의 in vivo 기능을 밝히기 위하여 그 기능을 파괴시킨 생쥐의 생산에 성공하였으며 그 표현형질을 연구하여 최근 발표하였다(Schreiber-Agus, et al., 1998). 즉, Mxi1은

지금까지 염색체 상에서 사람의 prostate cancer의 hot spot로 잘 알려진 10q24 - 26에 위치하고 있으며, 또한 myc의 antagonist로서의 기능을 가진다는 in vitro 결과로 추론할 때 Mx1 knockout mouse는 prostate cancer를 유발시킬 가능성을 예상하였으나 mitotic figure를 함유한 dysplasia 만을 보이는 결과를 얻었다. 이것은 Mx1의 결손이 혼자서는 prostate cancer를 유발시킬 수 없지만 그 전 단계, preneoplastic condition까지 진행시키며, 다른 어떤 유전자의 노화에 따른 결함으로 인한 협력에 의해서 암을 유발하게 될 것이라는 가정을 할 수 있게 하였다. 같은 염색체의 부위에서 최근 발견되어 prostate cancer와 밀접한 관계가 있는 것으로 예상되는 Pten은 최근 두 그룹에서 그 knockout mouse를 생산하여 그 표현형질을 발표하였다(Di Cristofano, et al., 1998; Stambolic, et al., 1998). Pten knockout mouse 역시 prostate cancer를 유발시키지 않았으며, heterozygous knockout mouse가 hyperplasia 및 dysplasia를 보였다. 그러므로 본 과제에서는 이 두 가지 tumor suppressor 유전자들이 서로 협력하여 prostate cancer를 유발할 수 있는 지 그 가능성을 판단하고 교배를 통하여 prostate cancer 동물 모델을 확립하고 그 분자 생물학적 기전을 밝히고자 한다.

위에서 언급한 바와 같이 지금까지의 분자의과학적 연구의 가장 큰 취약성은 그 연구의 대상이 in vitro 혹은 ex vivo에 그치고 있다는 점이다. 분자의 과학의 모든 분야에서 이러한 제약은 단지 특정 유전자를 적중 파괴시켜 그로 인한 정확한 표현형질을 나타내는 동물모델의 사용으로서만이 그 장래 및 국제경쟁력이 보장된다. 이러한 하나의 접근 방식으로서 본인은 지금까지 이미 생산되어 소유하고 있는 동물 모델들을 이용하고 새로운 유전자 적중 생쥐를 생산 및 지속적인 교배를 통하여 특정 질환의 동물 모델을 정립하고자한다. 즉, 암의 치료 방법으로 최근 전세계에서 가장 주목을 받고 있는 telomerase와, 지금까지 가장 강력한 oncogene의 하나로 많은 연구가 되어 온 myc oncogene은 최근 그 분자 생물학적 기전의 연구로서 서로 그 작용 조절이 밀접하게 연관되어 있다는 결과가 발표되었다(Greenberg, et al., unpublished result; Wang, et al., 1998). c-myc 유전자는 특히 그 정상적인 기능이 태아의 발생에도 밀접하게 연관되어 있으므로, myc, telomerase 및 Mx1 등의 myc을 조절하는 여러 유전자들과 telomerase의 관계를 분자 생물학적 및 분자 유전학적으로 규명하는 것은 앞으로 50세 이상의 성인의 10%가 넘는 환자 발생률을 보이는 prostate cancer와 같은 암 질환의 기전 연구 및 치료에 많은 기여를 할 것이다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

가. 연구개발 수행 내용

1. c-myc의 Heterozygous knockout 생쥐의 역교배와 대량 확보

- c-myc의 기능 규명을 위해 필요한 c-myc(+/-) 생쥐의 대량확보를 위해 FVB와 C57B6와의 역교배를 수행하여 각각 FVB와 C57B6의 유전적 배경을 지니는 c-myc KO 생쥐를 확보한다.

2. c-myc의 Heterozygous 생쥐끼리의 교배를 통한 homozygous null embryo의 확보 및 MEF cell의 배양

- c-myc을 제외한 나머지 유전자는 전혀 손상이 없는 c-myc(-/-) Primary 세포를 배양하기 위해 FVB와 C57B6의 유전적 배경으로 역교배된 c-myc(+/-)마우스 암수를 대량 확보한후, 교배를 통해 얻은 Embryo로부터 MEF 세포를 배양한다.

3. TRRAP 유전자의 cDNA 절편 확보 및 Genomic Library Screening

Human에서 c-myc 유전자의 Essential cofactor로 알려진 TRRAP유전자의 마우스 homolog를 찾기 위해서 human의 N-terminal 부위의 cDNA를 통해 Mouse cDNA Library를 Screening하고 또한 Genomic Library를 Screening하여 Mouse의 Genomic Structure를 결정한다.

4. Max knockout 생쥐의 표현형 분석

c-myc의 전사 조절에 반드시 필요한 Max를 결손 시킨 생쥐의 표현형을 분석한다.

5. Telomerase결손 생쥐(mTERC(-/-))와 Mxi-1결손 생쥐에서의 기능 분석: prostate의 이상 조사

이미 Mxi-1 결손 생쥐에서는 Prostate에서 Hyperplasia가 나타났으므로, Mxi-1과 telomerase 결손 생쥐와의 조직학적 비교를 통하여 Prostate의 이상을 조사한다.

나. 연구 개발 결과

1. c-myc의 Heterozygous knockout 생쥐의 역교배와 대량 확보

c-myc KO 생쥐는 FVB와 C57B6로 각기 12번까지 역교배가 되어 거의 inbred화 되었다고 할수 있으며, 다양한 실험에 필요한 충분한 수를 확보하였다.

2. c-myc의 Heterozygous 생쥐끼리의 교배를 통한 homozygous null embryo의 확보 및 MEF cell의 배양

c-myc(-/-) Embryo는 발생 9.5 Day에서 죽으므로, 8.5 Day의 embryo를 꺼내어 MEF 세포 배양 시도. 정상 생쥐의 9.5 Day의 embryo에서 MEF를 성공적으로 수행한 후, c-myc 생쥐로 MEF Culture를 시도하였음. Microisolation의 기술을 확보함. 세포 배양의 결과 Passage 1 이후 모두 죽었음. 현재 feeder cell layer를 이용한 재시도를 수행하여 약 40일 간의 배양에 성공하였음. 이러한 과정중에 c-myc은 FVB와 C57B6로의 역교배가 점점더 이루어져 E9.5 이전에 죽게되었다. 즉 Mixed Background에서 E9.5day 까지 생존 하던 c-myc KO embryo는 FVB나 C57B6로 Inbred화 되어 감에 따라 더욱더 빠른 embryonic lethality를 나타낸 것이다. 따라서 본 실험실에서 확립한 c-myc KO를 이용한 Mouse Embryonic Fibroblast의 확립은 현 단계에서는 불가능하다.

Genotype of E9.5 embryos from c-Myc heterozygous matings						
	+/+	+/-	-/- (dead)	ND* (dead)	Total	Generation
CB157	1	6	0	0	7	C57BLX8
CB155	1	5	0	1 (1)	7	C57BLX8
CB219	2	2	2 (1)	2	8	C57BLX8
CB246	1	6	0	1	8	C57BLX10
CB250	0	7	0	0	7	C57BLX10
CB259	1	6	1 (1)	0	8	C57BLX10
Subtotal	6	32	3 (2)	4 (1)	45	
CF176	0	3	2	3	8	FVBX8
CF260	3	4	0	1	8	FVBX9
CF297	2	4	0	0	6	FVBX10
CF319	3	3	0	3 (3)	9	FVBX11
Subtotal	8	14	2	7 (3)	31	
Total (%)	14 [18]	46 [81]	5 [7] (2)	11 [14] (4)	76 [100]	

*ND; Result not determined

그림 1 발생 9.5Day의 c-myc Embryo분석

Genotype of E8.5 embryos from c-Myc heterozygous matings						
	+/+	+/-	-/- (dead)	ND* (dead)	Total	Generation
CB202	1	4	0	2	7	C57BLX9
CB248	0	5	3	0	8	C57BLX10
CF304	2	4	1	1	8	FVBX10
Total (%)	3 [13]	13 [57]	4 [17]	3 [13]	23 [100]	

*ND; Result not determined

그림 2 발생 8.5day에서의 c-myc Embryo 분석

3. TRRAP 유전자의 cDNA 절편 확보 및 Genomic Library Screening

TRRAP 유전자와 높은 상동성을 지니는 cDNA EST 클론을 확보하였고 이를 이용하여 Genomic Library의 Screening하고 4개의 Positive 클론을 확보하였다. 그중 initiation site를 Neomycin^R 유전자로 치환하기 위해 그 부분을 찾았으나 실패하였다. 그때 사람의 genomic clone의 일부 clone의 정보를 입수하였는데 최소한 100kb 이상이 되며 100bp 정도의 작은 exon들이 무려 40개 이상 존재한다는 것을 알게되었다. 이러한 정보로부터

다시 200bp 이하의 probe를 제작하여 ATG site를 포함하고 있는 clone을 screening 하고 있다. 따라서 최초로 사용한 Probe를 통한 Screening은 도저히 성공할 수가 없는 방법이었다.

4. Max knockout 생쥐의 표현형 분석

Myc은 Max와 Heterodimer를 이루어 Target 유전자의 전사조절을 수행함이 알려져있다. 따라서 Max의 기능을 Knockout을 통해 살펴보는 것은 아주 의미있는 일이다. 이러한 Max의 KO는 c-myc과 마찬가지로 Embryonic Lethality를 나타내었으며, 그 결과는 Genes. Dev. 에 발표하였다.

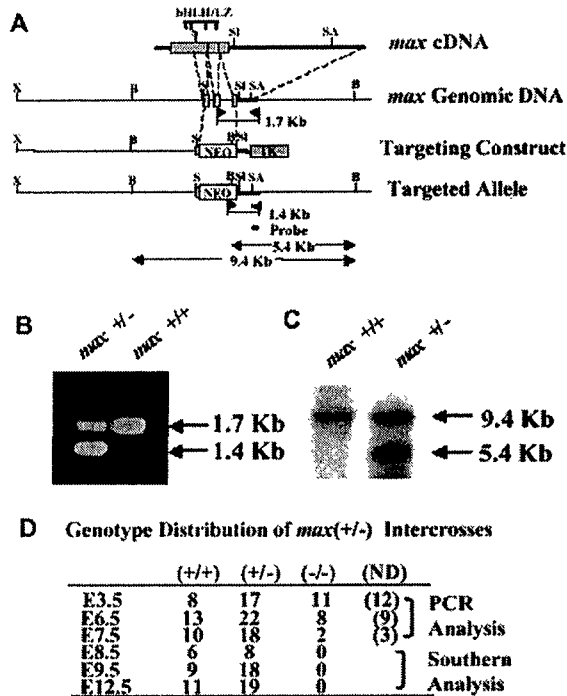


그림 3 Max KO strategy and Embryonic Genotype distribution

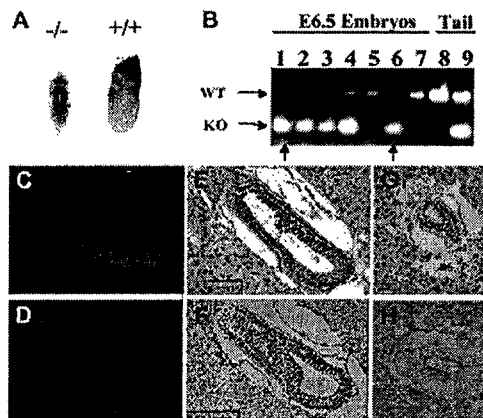


그림 4 Max embryo의 조직학적 분석

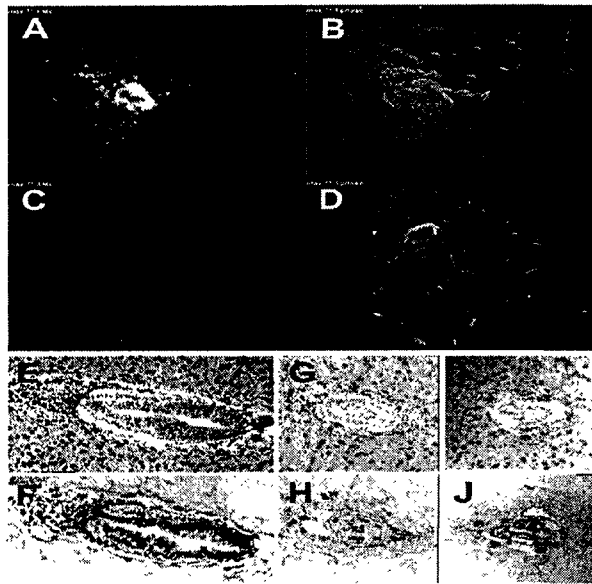


그림 5 Blastocyst outgrowth, proliferation, and apoptosis assays. (A,B) Max immunofluorescence and appearance of a normal blastocyst outgrowth with phase-contrast view revealing a growing inner cell mass node and a single layer of trophoctoderm cells. (C,D) Max immunofluorescence and appearance of a stunted blastocyst outgrowth showing reduced size of inner cell mass and diminished Max expression. (E-J) In vivo proliferation in E6.5 embryos. (E,F) Adjacent sections of a wild-type E6.5 embryo with hematoxylin and eosin (H&E) staining (E) and BrdU incorporation (F). (G-J) Adjacent sections of two putative Max-deficient E6.5 embryos with H&E staining (G,I) and BrdU incorporation (H,J).

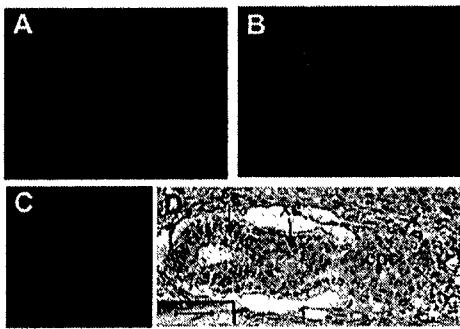


그림 7 Max expression in early development (A) Oviduct sections containing one-cell stage embryos; (B) oviduct sections containing unfertilized eggs; (C) whole-mount immunofluorescence of a E3.5 blastocyst (D) E5.5 embryo section (bar, 40 μ m);

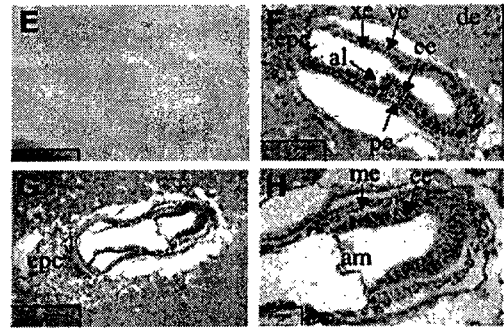


그림 6 Max expression in early development (E) E6.5 embryo section exposed to excess immunogen peptide (bar, 40 μ m); (F) E6.5 embryo section (bar, 40 μ m); (G,H) E7.5 embryo sections (G), (bar, 100 μ m), (H) (bar, 25 μ m). (de) Deciduum; (al) allantois; (am) amnion; (ee) embryonic ectoderm; (xe) extraembryonic ectoderm; (ve) visceral endoderm; (me) mesoderm; (pe) parietal endoderm; (epc) ectoplacental cone.

5. Telomerase결손 생쥐(mTRC(-/-))와 Mxi-1결손 생쥐에서의 기능 분석: prostate의 이상 조사

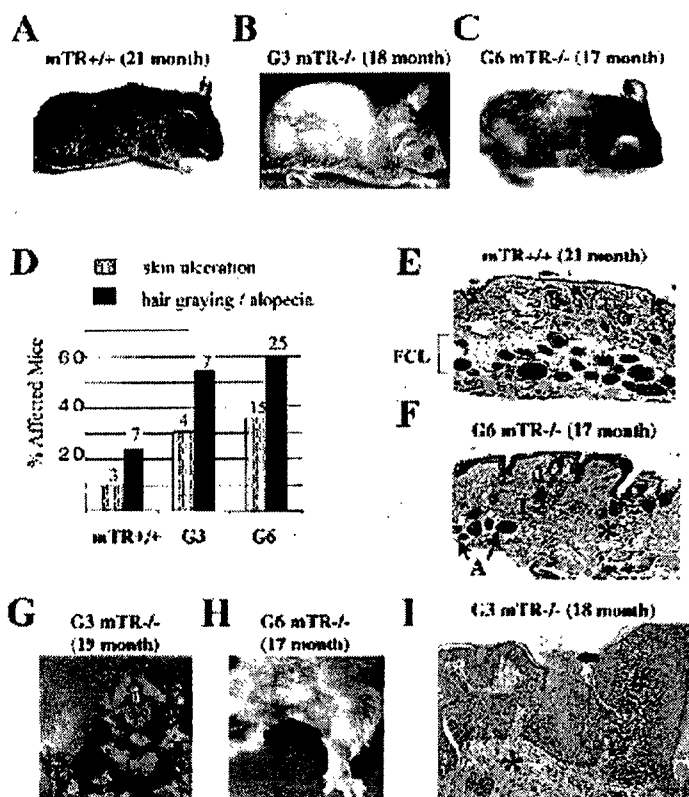


그림 8 Increased Incidence of Skin Lesions, Alopecia, and Hair Graying in Aging mTR^{-/-} Mice

(A-C) Representative examples of alopecia and hair graying in mTR^{+/+} and mTR^{-/-} mice.

(D) Incidence of ulcerative skin lesions and hair graying/alopecia in aged mTR^{+/+}, G3, and G6 mice.

(E and F) Histologic appearance of representative H&E-stained skin sections from a 21-month-old mTR^{+/+} mouse and a 17-month-old G6 mouse. Compared to the mTR^{+/+} skin, in which nearly all hair follicles are in anagen (A, arrow), the G6 skin exhibited an increased frequency of hair follicles in telogen (T, arrows). In G6 skin, the subcutaneous fat cell layer (FCL) was replaced by dense, fibrous tissue (asterisk; 10× objective).

(G-H). Perioral, neck, and hind limb ulcerative skin lesions in G3 and G6 mice.

(I) H&E-stained section of an area of chronic injury in the vicinity of an ulcerative skin lesion in an 18-month-old G3 mouse (40× objective) showing marked epidermal hyperplasia (#), hyperkeratosis (arrow), and a dense dermal fibrosis (*).

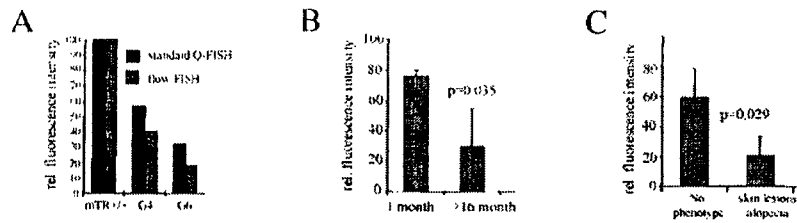


그림 9 Telomere Length Decreases with Increasing Age and Correlates with the Skin Phenotype

(A) Relative telomere length of mouse embryo fibroblasts (MEF) derived from mTR^{+/+}, G4, and G6 mice, comparing data obtained by flow-FISH and Q-FISH analysis (Greenberg and R. A. D., unpublished data). Fluorescence intensities of mTR^{+/+} cells were set at 100%, and the relative intensity of G4 and G6 cells was calculated.

(B) Relative telomere length of peripheral WBC of 1-month-old and >16-month-old G3 mice.

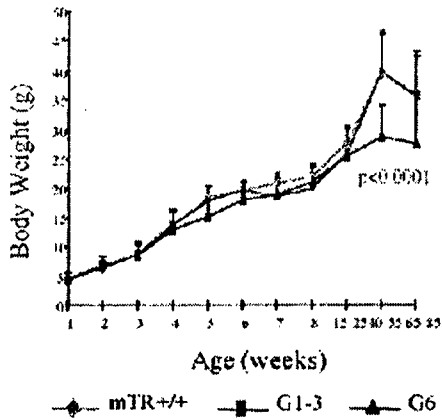
(C) Relative telomere length of age-matched (15- to 24-month-old) G3 animals with and without skin lesions, alopecia, and hair graying.

Table 1. Summary of Phenotypic Analysis in Aging Mice

	mTR ^{+/+}	G3 mTR ^{-/-}	G6 mTR ^{-/-}
Body weight	Normal	Normal	20%-25% decreased in >6-month-old mice
Diabetes	Normal GTT	Normal GTT	Normal GTT
Osteoporosis	Normal X-ray	Normal X-ray	Normal X-ray
Artherosclerosis	None	None	None
Peripheral RBC & WBC counts	Normal	Normal	Normal
Blood chemistry	Normal profile	Normal profile	Normal profile
Cataract	15%	20%	10%
Male fecundity	12-15 months	6.5 months	Normally infertile, rarely successful in generating offspring
Hair graying and alopecia	25%	54%	60%
Skin histology	Normal	Decrease of hair follicles in anagen, increase in telogen	Decrease of hair follicles in anagen, increase in telogen, loss of subcutaneous fat
Ulcerative skin lesions	10%	31%	37%
Wound healing	Normal	Delayed reepithelialization	Delayed reepithelialization
Cancer incidence	3.3%	13%	19%
Life span (50% mortality mark)	24 months	24 months	18 months

그림 10 Summary of Phenotypic Analysis in Aging Mice

A



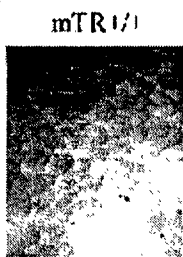
B



C



D



E

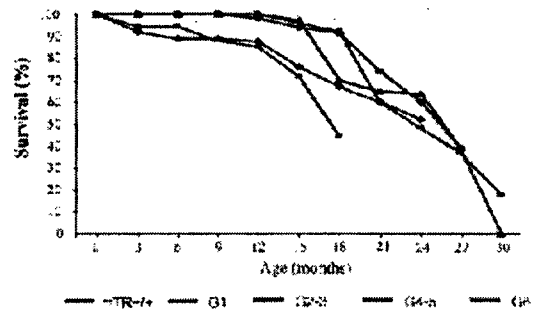
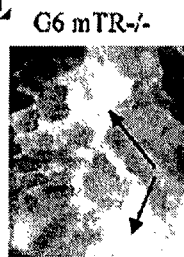


그림 12 Loss of Telomere Ends Correlates with a Shortened Life Span

Survival curves of mTR+/+, G1, G2-3, G4-5, and G6 mice, with percent of surviving animals plotted at 3-month intervals.

그림 11 Reduced Body Weight and Villi Atrophy of the Small Intestine in Aged G6 mTR-/- Mice

(A) Body weights in mTR+/+ and mTR-/- mice plotted as a function of age. Old G6 animals showed 20%~25% decrease in body weights.

(B and C) H&E-stained cross sections of mTR+/+ and G6 duodenum at 18 months of age, showing blunted, markedly atrophic villi (20× objective).

(D and E) Whole-mount preparations of mTR+/+ and G6 duodenum stained with methylene blue. Prominent areas of disorganized villi are present in the G6 duodenum (arrows).

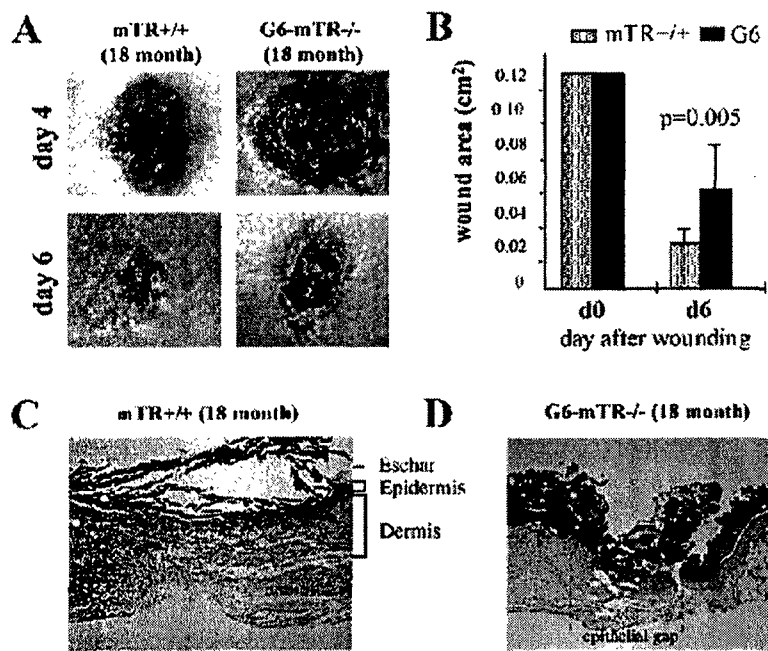


그림 13 Delayed Wound Healing in Aged mTR^{-/-} Mice

(A) Gross appearance of healing wounds of mTR^{+/+} and G6 mice 4 and 6 days after wounding (2× objective).

(B) Wound areas at day 0 and 6 post wounding.

(C and D) Midtransverse sections (5 μm) through healing skin wounds at day 4 post wounding (H&E). Near complete reepithelization was detected in mTR^{+/+} controls, in contrast to the prominent epithelial gap seen in G6 wounds (40× objective).

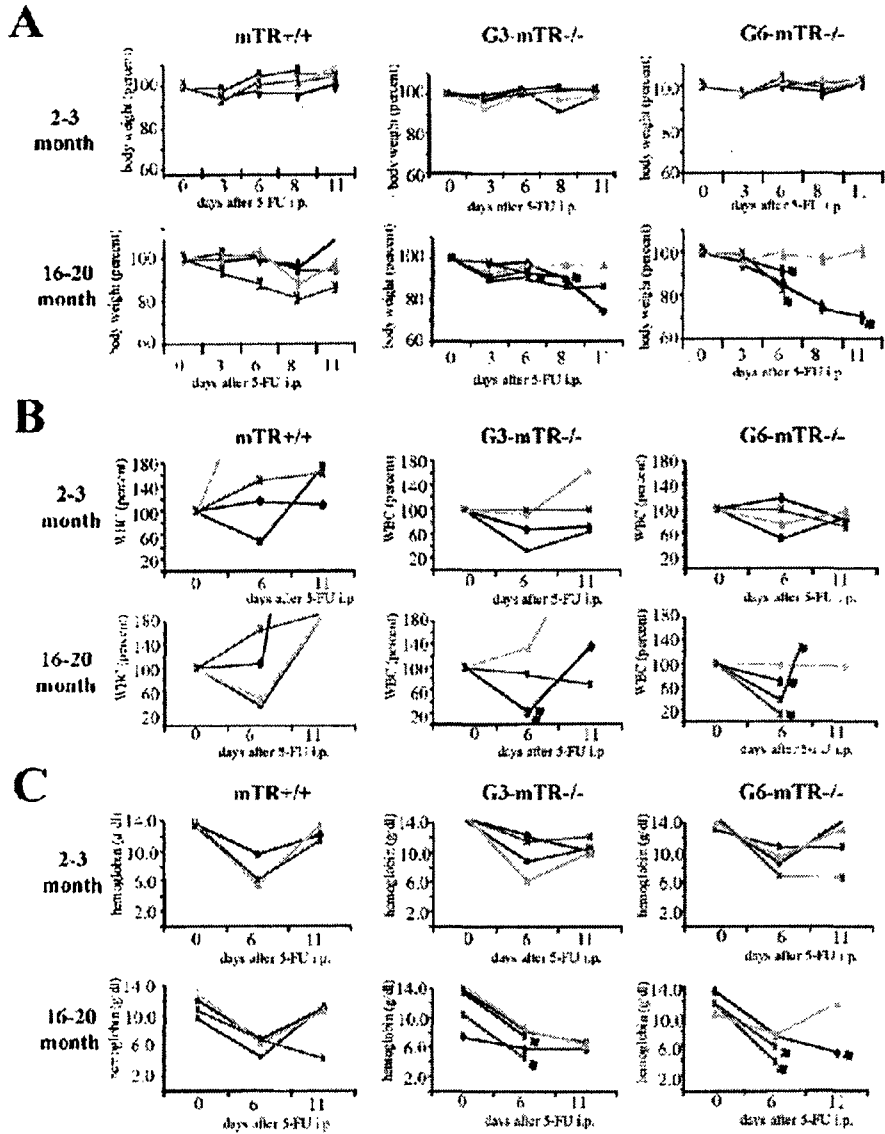


그림 14 Age and Telomere Shortening Cooperate to Diminish Hematopoietic Reserve

Stress response to 5-FU treatment in young (2/3 months) and old (16/20 months) mTR^{+/+}, G3, and G6 mice.

(A) Body weight, (B) peripheral WBC, and (C) hemoglobin levels (g/dl) plotted against days after 5-FU treatment; all parameters showed a dramatic reduction 6 days after treatment in old but not in young animals, with eventual recovery in mTR^{+/+} animals. Asterisks indicate animal death: 0/4 in mTR^{+/+}, 2/5 in G3, and 3/4 in G6 mice.

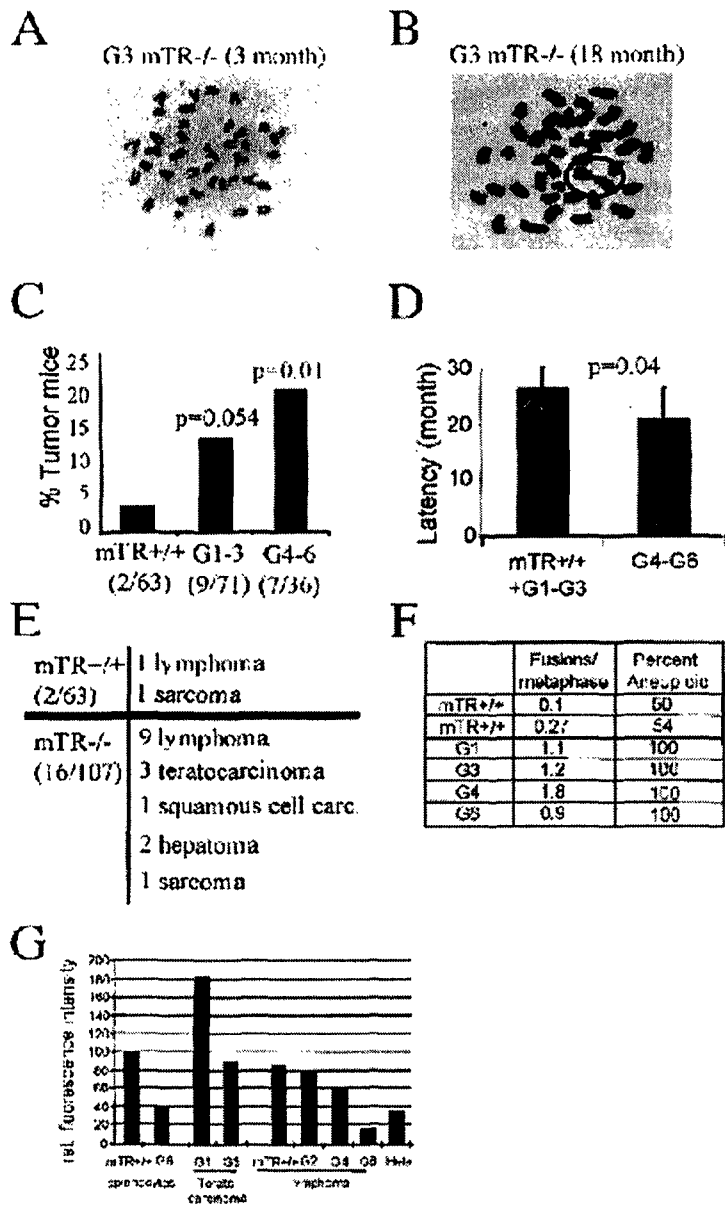


그림 15 Genomic Instability and an Increased Incidence of Spontaneous Cancer in Aging mTR^{-/-} Mice

(A and B) Representative metaphase spreads of lymphocytes. Circled area in (B) denotes chromosomal p-arm fusion in old G3 mouse.

(C) Incidence of macroscopically visible and clinically apparent spontaneous cancers.

(D) Age of onset of spontaneous cancers.

(E) Histological classification of spontaneous tumors.

(F) Cytogenetic analysis of representative spontaneously arising tumors.

(G) Telomere length in splenocytes of 18-month-old WT and G6 mice, and in teratocarcinomas and lymphomas derived from WT and mTR^{-/-} mice. A human telomerase positive cervical carcinoma cell line (HeLa) is included for comparison of telomere lengths.

a. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice
(*Cell* 96: 701, 1999).

※Telomerase RNA component가 결손된 생쥐를 생산하였으며, prostate gland의 이상을 점검하여 이상이 없음을 조직학적으로 발견하였고, 다른 표현형질로서는 수명이 짧아짐과 노화, stress 및 암에 더욱 민감함과 splenic atropy 등을 발견, 발표한 논문이다. 이 실험은 본인이 입국 전에 미국에서 대부분의 실험을 끝냈고 정리 및 마무리를 국내에서 수행하였다.

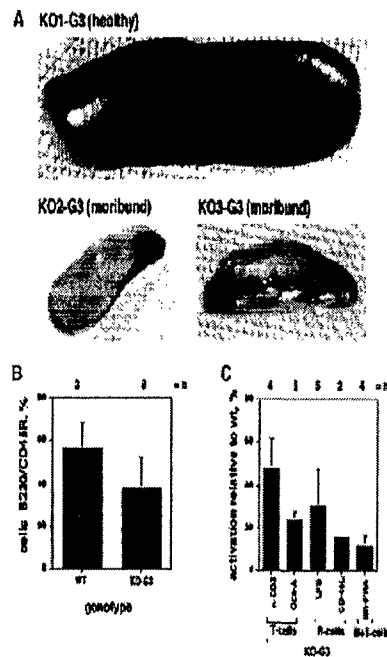


그림 16 Spleen dysfunction in G3 mTR^{-/-} B6 mice. (A) Images of spleens from two moribund G3 mTR^{-/-} mice (KO2-G3 and KO3-G3) and one healthy G3 mTR^{-/-} mouse (KO1-G3). (B) Percentage of total spleen cells positive for the B220/CD45R surface marker. Wt, wild-type splenocytes; KO-G3, splenocytes derived from G3 mTR^{-/-} B6 mice. The total number of mice used for each study is indicated above the graph (n). Standard deviation bars are shown. (C) Relative activation with respect to the wild-type following mitogen stimulation of splenocytes from G3 mTR^{-/-} mice. -CD3 and Con-A, T cell-specific mitogens; LPS and CD-40L, B cell-specific mitogens; Ion-PMA, B + T cell mitogens. The total number of mice used for each experiment is indicated above the graph. Standard deviation bars are shown.

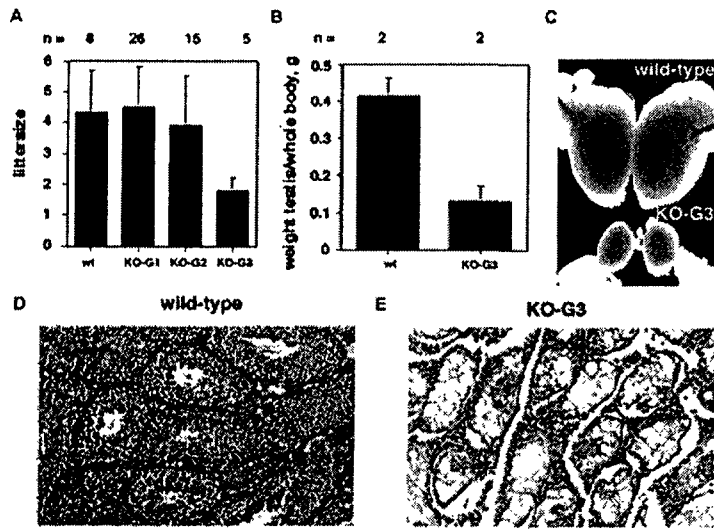


그림 17 mTR^{-/-} mice in a C57BL6 background are viable for only four generations. (A) The average progeny per litter of different generations of wild-type or mTR^{-/-} crosses is shown with bars. The total number of crosses of each genotype used for the analysis is indicated at the top of the graph. Wt, wild-type; G1 to G3 indicate the generations of the mTR^{-/-} mice used in the crosses. Standard deviation bars are shown. (B) The average weight of testes relative to body weight is plotted for wild-type (wt) and G3 mTR^{-/-} (B6) testes (KO-G3). The total numbers of mice used in the study are indicated above the graph. Standard deviation bars are shown. (C) Representative images of testes from an age-matched wild-type and a G3 mTR^{-/-} B6 mouse (7 months old). (D and E) Histology of a wild-type (D) and a G3 mTR^{-/-} B6 (E) testis. The figure shows the abnormal histology of the G3 testis compared with that of the wild-type. No precursor cells or spermatids were detected in the G3 B6 testis.

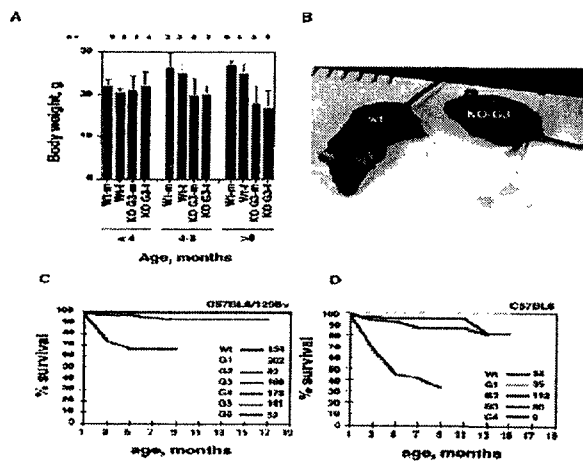


그림 18 Reduced body size of G3 mTR^{-/-} B6 mice

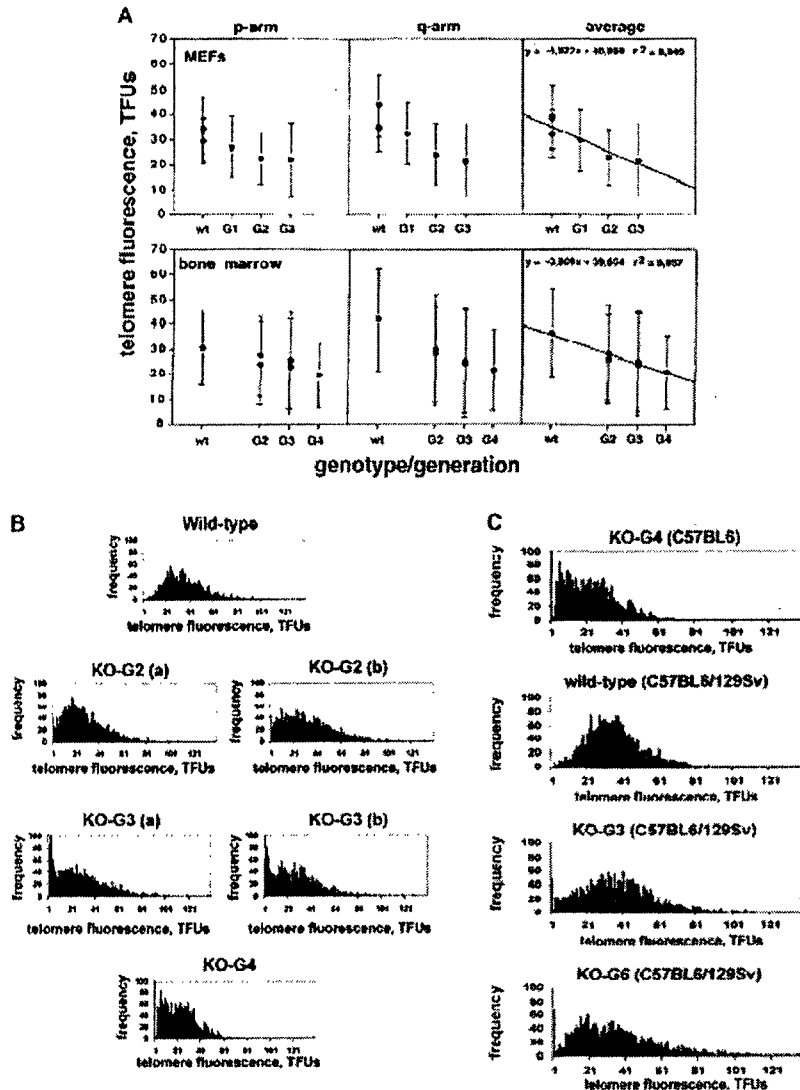


그림 19 Telomere shortening in mTR^{-/-} mice on two different genetic backgrounds. (A) Separate telomere fluorescence of the p-arm and q-arm, and that of the average of both, from primary MEFs and bone marrow cells derived from wild-type and mTR^{-/-} B6 mice of the indicated generations. Fluorescence is expressed in telomere fluorescence units (TFU), where 1 TFU corresponds to 1 kb of TTAGGG repeats in plasmid DNA (Martens et al., 1998). Each value represents the mean of 10-15 metaphases. Primary MEFs and B6 bone marrow cells from wild-type (wt) and several mTR^{-/-} B6 embryos from the first (G1), second (G2) and third generation (G3) were used (see Table I for Q-FISH data). (B) Frequency of telomere fluorescence intensity values of the average of p- and q-telomeres (black bars) in bone marrow cells derived from wild-type and several B6 mTR^{-/-} mice from the second (KO-G2a and KO-G2b), third (KO-G3a and KO-G3b) and fourth generation (KO-G4). The frequency of chromosomes with short telomeres increases with the increasing generations. (C) Frequency of telomere fluorescence intensity values of the average of p- and q-telomeres (black bars) in bone marrow cells derived from wild-type and mixed background mTR^{-/-} mice from the third (KO-G3) and sixth generation (KO-G6).

b. 다음의 논문을 발표하였다.

Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres(*EMBO J.* 18: 2950, 1999).

※Telomerase RNA component가 결손이 보여주는 표현형이 C57BL6/129Sv의 잡종에서 보다 근교계 생쥐에서 더 강하게 나타남을 보여주는 논문이다. 이 실험은 본인이 입국 전에 미국에서 대부분의 실험을 끝냈고 정리 및 마무리를 국내에서 수행하였다.

제4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

번호	세부연구개발목표 (선정시 계획서상의 연구목표)	달성내용 및 기여도	달성 도(%)
1	c-myc homozygous knockout mouse의 생산	현재 30마리 이상의 c-myc+/- 생쥐를 확보하였고, 각기 C57BL/6와 FVB로 각기 Generation 12까지 역교배가 성공적으로 수행되었다.	100%
2	c-myc Knockout 생쥐로부터 MEF 세포 배양	c-Myc homozygous knockout 생쥐의 Mouse Embryonic Fibroblast(MEF)의 확립 시에 첫 번째 배양 시에만 feeder cell을 사용하였는데 이때는 약 40일 간의 배양이 가능하였다. 다음 시도로 계속하여 feeder가 있는 상태로 MEF를 배양한 결과 2달 동안의 유지가 가능하였으나 실험하기에 충분한 양으로 늘리는데 실패하였다. 해결책으로 그 발현을 인위적으로 ON/OFF 시킬 수 있는 Vector System을 이용한 유전자 재도입으로 c-Myc Rescue를 시도하고 있다. 이 과제의 연구비로서는 재원조달이 어려우므로 다른 과제에서 연계수행할 계획이다.	80%
3	Mxil homozygous knockout mouse의 생산	현재 30마리 이상의 Mxil(+/-) 생쥐를 확보하였고, 각기 C57BL/6와 FVB로 각기 Generation 12까지 역교배가 성공적으로 수행되었다.	100%
4	Mxil Knockout 생쥐로부터 MEF 세포 배양	이것은 Embryonic lethality를 보이지 않으므로 손쉽게 충분한 양의 MEF를 배양하였다.	100%
5	mTR homozygous knockout mouse의 생산	현재 30마리의 mTR(+/-) 생쥐를 확보하였고, 각기 C57BL/6와 FVB로 각기 Generation 12까지 역교배가 성공적으로 수행되었다.	100%
6	mTR Knockout 생쥐로부터 MEF 세포 배양	이것은 Embryonic lethality를 보이지 않으므로 손쉽게 충분한 양의 MEF를 배양하였다.	100%
7	임신된 c-Myc Knockout 생쥐로부터 8.5 및 9.5 dpc embryo의 확보	embryo가 죽기 전인 8.5dpc와 9.5dpc에 BrdU injection후 embryo를 분리하였다. 이 때 embryonic sac을 이용하여 genotyping을 PCR로 확인하였다. 각각의 embryo는 Tissue Processing으로 paraffin block을 제조하여 실험에 사용하였다.	100%

8	c-Myc null mouse embryo를 이용한 Immunohistochemical assay	c-Myc null embryo의 lethality의 원인을 규명하기 위해 cell proliferation, apoptosis, 그리고 다양한 cell cycle regulator의 발현 양상을 조사하기 위한 Immunohistochemical method를 확립하였다.	100%
9	Max 유전자의 knockout 생쥐의 표현형 분석	c-myc의 기능에 필수적인 Max 유전자가 생쥐의 embryonic development에서 약 4-5일 경에 필수적인 기능을 함을 밝혔음 (<i>Genes & Development</i> 14: 17, 2000).	100%
10	Telomerase 결핍 생쥐의 표현형질 규명	Telomerase RNA component가 결손된 근교계 생쥐를 생산하였으며, prostate gland의 이상을 점검하여 이상이 없음을 조직학적으로 발견하였고, 다른 표현형질로서는 수명이 짧아짐과 노화, stress 및 암에 더욱 민감함과 splenic atropy 등을 발견, 발표하였다(<i>Cell</i> 96: 701, 1999; <i>EMBO J.</i> 18: 2950, 1999).	100%
11	생쥐 TRRAP의 cDNA를 확보 및 Genomic Clone의 확보	TRRAP 유전자와 높은 상동성을 지니는 cDNA EST 클론을 확보하였고 이를 이용하여 Genomic Library의 Screening하고 4개의 Positive 클론을 확보하였다. 그러나 예상 보다 genomic structure가 훨씬 복잡 하고 크다는 것을 발견하였다. 즉 cDNA만의 크기도 12 kb 이상이며, 이에 대응하는 Genomic DNA는 최소 100 bp 정도 크기의 exon 43개 이상으로 구성된 매우 복잡한 구조와 적어도 100 kb 이상의 크기를 갖고 있음을 알게 되었다. 이 정보는 이 유전자가 발현 시에 상당한 alternatively spliced form으로 나타나게 될 가능성이 매우 높다. 따라서 어떤 exon을 공략해야 gene expression이 완전히 차단되는지 그 확실한 정보를 얻기 위해서는 막대한 노력과 시간을 들여야만 한다. 현재로서는 이러한 이유로 실험을 중단한 상태이다.	50%

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

본인이 제작한 Mx11 knockout mice(*Nature*, 393:483, 1998), c-Myc knockout mice, mTR knockout mice(*Cell* 96: 701, 1999; *EMBO J.* 18: 2950, 1999), 그리고 Max knockout mice(*Genes & Development* 14: 17, 2000) 등 현재 구축되어 있는 Knockout Mouse를 다른 종류의 genetically modified mice와 교배함으로써 Cancer의 발생에 어떤 영향을 주는지 또는 그렇게 정의된 Genotype에서 보이는 개체의 새로운 Drug에 대한 반응성 등을 알아볼 수 있는 도구로서 매우 유익한 역할을 할 것이라 여겨진다. Drug Development에 있어 인체에서의 시험에 선행되는 모델로서 사용될 수 있으리라 예상된다. 이를 위해 다양한 Transgenic mouse의 제작과 Knockout mouse의 확보를 타진하고 있다.

제 6장 참고문헌

- Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science*. 250(4984):1149-51. 1990
- Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science*. 251(4998):1211-7. 1991
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*. 91(1):25-34. 1997
- Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev*. 7(4):671-82. 1993
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*. 19(4):348-55. 1998
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*. 392(6676):569-74. 1998
- McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell*. 94(3):363-74. 1998
- Rudolph KL, Chang S, Lee HW, Blasco M, Gottlieb GJ, Greider C, DePinho RA. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*. 96(5):701-12. 1999
- Schreiber-Agus N, Meng Y, Hoang T, Hou H Jr, Chen K, Greenberg R, Cordon-Cardo C, Lee HW, DePinho RA. Role of Mx11 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. *Nature*. 393(6684):483-7. 1998
- Shen-Li H, O'Hagan RC, Hou H Jr, Horner JW 2nd, Lee HW, DePinho RA. Essential role for Max in early embryonic growth and development. *Genes Dev*. 14(1):17-22. 2000

Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 95(1):29-39. 1998

Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev*. 12(12):1769-74. 1998