

과제번호: FG09-21-04

인간유전체기능연구

*ZFP91*의 발암유전자로서의 기능연구 및 항암제개발의
표적타당성 검증에 관한 연구

Study on the Molecular function of ZFP91 & validation as
a molecular target for cancer therapy

한국생명공학연구원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ZFP91의 발암유전자로서의 기능연구 및 항암제개발의 표적타당성 검증에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010. 4 .

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 이 정 준

연 구 원 : 김 학 군

” : 김 홍 일

” : 정 행 선

” : 이 세 정

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 정 형

보고서 초록

과제관리번호	FG09-21-04	해당단계 연구기간	2006.09.01~20 10.03.31	단계 구분	(해당단계) /3단계 (총단계)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우 기재 (단위과제일 경우 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	ZFP91의 발암유전자로서의 기능연구 및 항암제개발의 표적타당성 검증			
연구책임자	이 정 준	해당단계 참여연구원수	총 : 41 명 내부 : 9 명 외부 : 32 명	해당단계 연구비	정부: 760,000 천원 기업: 천원 계: 760,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 강원대학교		연구책임자 : 이 정 형		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>○ 전사인자 NF-κB의 p50 단백질의 DNA 결합을 특이적으로 저해하는 화합물의 세포내 effector molecule을 검색하는 연구에서 ZFP91 (human homologue of mouse zinc finger protein 91)을 동정하였고, promotor 분석, gel shift assay, NF-κB activator를 처리하여 NF-κB에 의해 발현이 조절되는 유전자임과 동시에 NF-κB를 활성화시킴을 알았다.</p> <p>○ ZFP91의 NF-κB 활성화는 canonical 경로에 중요한 p50 발현에는 영향이 없고 noncanonical 경로에 중요한 p52의 발현을 유도하는 활성으로부터 noncanonical 경로의 kinase와의 관계를 알았다.</p> <p>○ ZFP91은 NF-κB 경로의 noncanonical pathway의 활성화에 중요한 kinase 인 NF-κB-inducing kinase (NIK)를 Lys63-specific polyubiquitination하여 안정화시키고 autophosphorylation을 유도하여 kinase 로서 활성화시켜 NIK의 target인 downstream kinase인 IKKα를 활성화하여 noncanonical 경로에 중요한 NF-κB2 (p100)를 활성화형인 p52로 절단을 촉진하여 noncanonical NF-κB signal경로를 장시간 활성화시키는 기능을 갖는 ubiquitin E3 ligase 임을 알았다.</p> <p>○ ZFP91의 발현 양상은 위암, 간암, 유방암과 전립선암 tissue array에서 유사함을 알았고, ZFP91 siRNA 실험에서 암세포주에서 ZFP91의 발현을 억제하면 암세포주들의 현저한 사멸효과가 관찰되어 ZFP91은 암세포의 생존에 중요한 단백질임을 알았다.</p> <p>○ ZFP91이 nude mouse의 xenograft 실험을 통하여 과발현된 세포는 대조군에 비하여 tumor growth가 현저히 증가되고, ZFP91발현은 NIK, p52 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 세포의 사멸을 억제하고 암의 형성 및 증식에 중요한 역할을 하는 oncogenic 단백질임을 확인할 수 있었다.</p>					82
색인어 (각 5개 이상)	한 글	징크핑거단백질 91, 전사인자 NF-κB, NFκB-유도 카이네이스,유비퀴틴,암세포증식, CD40리셉터			
	영 어	ZFP91, NF-κB, NIK, ubiquitination, tumor cell surviavl, CD40			

I. 제 목

ZFP91의 발암유전자로서의 기능연구 및 항암제개발의 표적타당성 검증에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

NF- κ B 저해제 kamebakaurin에 의해 조절되는 유전자 ZFP91 (Zinc finger Protein 91)의 과발현 및 knock-down에서 보이는 현상을 신호전달 네트워크상에서 해석/검증하고 동시에 생화학적인 기능분석연구를 통하여 작용기전을 연구하고 검증하여 ZFP91이 새로운 암유전자 (oncogene)임과 항암신약개발의 표적분자로서의 타당성을 제시함.

2. 연구개발의 필요성

NF- κ B 저해제 kamebakaurin은 NF- κ B1 (p50/p100)가 DNA에 결합하는데 중요한 Cys62를 수식하여 p50를 포함하는 NF- κ B complex가 target 유전자의 promoter region의 κ B-binding consensus sequences에 결합을 p50 선택적으로 저해하는 특성을 갖는 최초의 화합물인데, 이 화합물에 의해 조절되는 target 유전자로 zfp91를 발견하였으며, 이 유전자의 과발현이나 knock-down 실험에서 ZFP91이 cancer-cell의 증식 및 전이에 중요한 전사인자 NF- κ B와 HIF-1의 활성을 조절하는 현상을 발견하였다. 이러한 현상을 발현하는 ZFP91 (Zinc Finger Protein 91)의 기능을 알기위하여,

- ① NF- κ B transient활성이 persistent활성으로 변환되는 기전을 NF- κ B canonical pathway와 noncanonical pathway 신호전달 네트워크상에서 검증하고,
- ② ZFP91단백질의 작용기전을 연구하며,
- ③ 암조직에서 ZFP91의 발현과 병리조직학적 분석을 통하여 임상적인 유의성을 검증하며,
- ④ ZFP91이 암유전자 (oncogene)임과 항암제의 표적분자로서의 타당성을 제시한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

-연구수행 내용:

- ZFP91 단백질의 발현/정제/생화학적 기능 분석
- ZFP91와 NIK 간의 상세한 상호 ubiquitination 조절기전 분석/ZFP91-NIK-TRAF 간의 상세한 조절기전 분석과 또 다른 조절인자 cIAP1/2에 대한 기능분석
- 암세포에서 ZFP91 knock-down/과발현을 통한 기능분석
- TNF receptor family인 CD40 신호전달경로에서의 NF- κ B 활성화 효과분석
- ZFP91의 HIF-1 활성화조절기전 연구
- 위암, 유방암, 간암등의 암조직에서 ZFP91 발현 분석 및 임상적 유의성 분석
- ZFP91의 활성화조절 검색시스템을 수립

IV. 연구개발결과

- NF- κ B 저해제 kamebakaurin은 NF- κ B1 (p50/p100)가 DNA에 결합하는데 중요한 Cys62를 수식하여 p50를 포함하는 NF- κ B complex가 target 유전자의 promoter region의 κ B-binding consensus sequences에 결합을 p50 선택적으로 저해하는 특성을 갖는 최초의 화합물인데, 이 화합물에 의해 조절되는 target 유전자로 zfp91를 발견하여, 이 유전자의 promoter 분석, gel shift assay, NF- κ B activator를 처리하여 NF- κ B에 의해 발현이 조절되는 유전자임과 동시에 NF- κ B를 활성화시킴을 알았다.
- ZFP91의 NF- κ B 활성화 기전을 분석하기 위하여 ZFP91이 canonical signaling에 중요한 NF- κ B1/p50 나 noncanonical signaling에 주요한 NF- κ B2/p52 의 발현에 영향을 주는지를 조사한 결과 canonical NF- κ B 경로에 중요한 p65나 p50에는 영향이 없고, noncanonical 경로에 중요한 단백질인 p52가 ZFP91 농도 의존적으로 증가되었다.
- ZFP91이 농도 의존적으로 p100을 p52로 전환시키는 활성화는 아마도 noncanonical pathway의 중요한 kinase인 NIK와 IKKa의 활성화와 관련되어 있음을 시사하기 때문에 noncanonical 경로의 kinase 들인 NIK-IKK활성화와 관련이 있는지를 조사한 결과 ZFP91 는 NIK와 상호작용을 하며, 유비퀴틴과 ZFP91발현하에서 NIK의 안정성이 크게 증가함을 알았다.
- NIK가 ZFP91과 유비퀴틴에 의해 안정화되기 때문에, HEK293 cell에서 NIK는 ZFP91의존

적으로 유비퀴틴화되는지를 조사하였는데, ZFP91은 cell에서 NIK를 K63-specific 유비퀴틴화하고 K48-linked ubiquitination은 유도하지 못함을 알았다. 또한 ZFP91에 의한 NIK 유비퀴틴 반응은 ZFP91 siRNA를 발현하면 억제되었기 때문에 ZFP91이 NIK의 ubiquitin E3 ligase일 가능성이 있음을 알았다.

○ ZFP91을 E. coli에서는 ZnF domain만 발현한 단백질, HEK293 cell에서는 IP 정제한 단백질, insect cell (sf21 cell)에서 발현한 단백질을 이용하여 in vitro ubiquitination 반응을 통하여 ZFP91이 NIK의 Lys-63-linked polyubiquitination의 E3 ubiquitin ligase임을 증명하였으며, ZFP91의 auto-ubiquitination 반응에서 ZFP91은 K-63-specific polyubiquitination활성을 보유하며, UbcH13/Mms2을 E2로 요구하는 E3 ubiquitin ligase로 NIK를 K63-specific polyubiquitination시켜 활성화하는 효소임을 발견하였다.

○ NIK활성화의 negative regulator인 TRAF2와 TRAF3가 ZFP91과 NIK사이에서 선택적 상호작용을 통하여 TRAF2는 NIK와는 직접 결합하지 않고 TRAF3를 통하여 NIK 분해와 관련된 E3 ligase인 cIAP1과 NIK 상호작용을 매개 함을 알았고,

○ ZFP91는 TRAF2나 TRAF3와 직접 결합하지 않고 cIAP1/2를 통하여 TRAF2와 NIK통하여는 TRAF3와 결합함을 발견하였으며, CD40를 발현하는 MDA-MB231 세포에 CD40 ligand인 CD154를 처리하면, ZFP91과 NIK의 발현은 증가되고 noncanonical NF- κ B 경로의 negative regulator들인 cIAP1/2, TRAF2/3가 발현이 억제됨을 알았다.

○ 또한 cIAP1/2는 TRAF2에 의해 ubiquitination되어 활성화되는데, 이 cIAP1/2가 ZFP91를 K63-specific ubiquitination으로 활성화시킴을 발견하였다. 이때 kinase활성과 무관하게 NIK가 필요한데, 이는 NIK가 ZFP91이 TRAF3와 잘 association할 수 있는 adaptor로 기능하여 TNFRSF ligand 시그날이 주어지면 TRAF3를 포함한 ZFP91 complex가 membrane TNFRSF receptor에 결합하도록 유도하며, TRAF2는 cIAP1/2를 polyubiquitination-dependent하게 활성화하고, 다음에 cIAP1/2는 역시 ZFP91를 polyubiquitination-dependent하게 활성화하며, 활성화된 ZFP91은 NIK를 K63-specific polyubiquitination하여 활성화하는 작용기전을 제안 할 수 있게 되었다. 한편 cIAP1/2가 TRAF3를 K48-linked ubiquitination 반응으로 분해되고, cIAP1/2와 TRAF2도 분해되는데, 이 과정에 ZFP91이 필요함을 알았지만 기능은 더 연구할 필요가 있다.

○ ZFP91의 발현 양상은 위암, 간암, 유방암과 전립선암 tissue array에서 유사함을 알았고, NF- κ B가 활성화된 암에서 공통적인 현상임을 알았다.○ ZFP91 siRNA를 이용한 Knock-down 실험에서 위암세포주인 AGS세포와 MKN-45 세포, 유방암세포주

MDA-MB231세포에서 ZFP91의 발현을 억제하면 암세포주들의 현저한 사멸효과가 관찰되어 ZFP91은 암세포의 생존에 중요한 단백질임을 알았다.

○ ZFP91이 in vivo에서 tumor growth에 대한 영향을 nude mouse의 xenograft 실험을 통하여 조사하였는데 ZFP91이 과발현된 세포는 대조군에 비하여 tumor growth가 현저히 증가되고 또한 혈중의 VEGF의 양도 증가되어 있음을 알 수 있었고, ZFP91발현은 NIK, p52 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 세포의 사멸을 억제하고 암의 형성 및 증식에 중요한 역할을 하는 oncogenic 단백질을 확인할 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 신규한 단백질 ZFP91이세포의 암세포의 증식 및 전이에 중요한 NF- κ B 신호경로를 장시간에 걸쳐서 활성화시키는 noncanonical pathway에 중요한 kinase인 NIK를 안정화하고 활성화하는 Lys63-specific polyubiquitination시키는 효소임을 발견하였기 때문에
- 암세포증식 및 전이 기전 연구에 방법으로 이용할 수 있으며, 면역세포의 분화, 증식, 활성화연구에 활용하고,
- Cell-based assay, protein-protein interaction 조절, reporter assay, E3 ubiquitin ligase assay 등을 최적화를 통하여,
- 타겟단백질의 기능을 조절하는 활성검색기술을 수립하고, 천연물/화합물라이브리리를 검색하여 hit 화합물 도출하고,
- Hit 화합물의 화학적 약리적 검증을 통한 선도화합물 도출 및 화합물 구조의 최적화를 통한 항암제 후보물질 개발 - ZFP91의 NIK를 활성화를 통한 NF- κ B의 지속적인 활성을 유지하는 기전을 ZFP91의 효소활성과 시그널경로의 조절단백질 TRAF2, TRAF3, cIAP1, cIAP2의 조절기전을 해석하였기 때문에 암의 악성화조절연구와 항암제개발에 활용성이 높음.

S U M M A R Y

NF- κ B plays a central role in immune responses, development and cell growth. Although the regulatory mechanism of various kinases involved in NF- κ B signaling is well documented, the molecular mechanism by which stimuli of non-canonical NF- κ B stimuli stabilize and activate NIK remains incompletely understood. NF- κ B-inducing kinase (NIK) is a specific kinase inducing the processing of p100 to generate p52 through the phosphorylation of IKK α . It is known that TNFRSF ligands stabilize NIK, however, the mechanisms by which the non-canonical NF- κ B stimuli stabilize NIK protein remain unknown except ubiquitination-dependent proteasomal degradation by TRAF3 and cIAP. We have identified a novel NF- κ B target zinc-finger protein ZFP91, as a target of a diterpenoid kamebakaurin, which inhibits DNA-binding of p50 subunit of NF- κ B, as an atypical E3 ubiquitin ligase for ubiquitination-dependent NIK stabilization and activation. ZFP91 was originally identified to be overexpressed in most acute myelogenous leukemia cases. We demonstrated the molecular mechanism by which ZFP91, that is ubiquitinated by cIAP1 in K63-linked ubiquitin-chain-dependent manner, not only functions as an E3 ubiquitin ligase catalyzing K63-linked NIK polyubiquitination but also induces degradation of cIAP1/2. It appears that NIK is required as a scaffold for cIAP1-dependent K63-linked ZFP91 polyubiquitination. The reciprocal activation between ZFP91 and NIK induces not only p100 processing to p52 but also degradation of TRAF2, TRAF3, cIAP1 and cIAP2 negative regulators in non-canonical NF- κ B signaling pathway in CD40 ligand treated MDA-MB231 cells. These studies also uncovered the importance of a ubiquitin-driven NF- κ B signaling pathway, in which ZFP91 activates non-canonical NF- κ B signaling through ubiquitin-dependent NIK activation and cIAP1/2 degradation.

Moreover, attenuation of the ZFP91 expression by siRNA in various cancer cell lines not only inhibits NF- κ B processing through the NIK down-regulation but also induces growth arrest and apoptosis. Collectively, our data reveal that ZFP91 is a key posttranslational regulator of NIK, which modulates its effector functions involved in noncanonical NF- κ B signalling pathways. ZFP91 is likely a molecular switch to divert transient canonical NF- κ B activation to persistent noncanonical NF- κ B activation in which observed in a variety of pathological process such as in autoimmune diseases and tumors, particularly lymphoid malignancies.

CONTENTS

Chapter 1. An outline of project	15
Chapter 2. Current status of research	23
Chapter 3. Results	28
1. Molecular Function of an Oncogenic Protein ZFP91	33
2. Regulatory Function of ZFP91 on HIF-1 Activity	63
3. Effect of MDA9 on Epithelial-Mesenchymal Transition	72
Chapter 4. Achievement and Contributions	76
Chapter 5. Application of results	78
Chapter 6. Information obtained from foreign countries	80
Chapter 7. References	81

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
1. 발암관련 유전자 ZFP91의 기능연구	33
2. ZFP91의 HIF (hypoxia inducible factor) 조절활성 검증	63
3. ZFP91의 표적단백질 MDA9의 EMT 조절활성 분석	72
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	76
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	78
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	80
제 7 장 참고문헌	81

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성 및 목적

NF- κ B 저해제 kamebakaurin에 의해 조절되는 유전자 ZFP91 (Zinc finger Protein 91)의 과발현 및 knock-down에서 보이는 현상을 신호전달 네트워크상에서 해석/검증하고 동시에 생화학적 기능분석연구를 통하여 작용기전을 연구하고 검증하여 ZFP91이 새로운 암유전자 (oncogene)임과 항암신약개발의 표적분자로서의 타당성을 제시함이 본 연구의 목적이다.

정상세포에서 암으로 진행되는 암화 과정은 유전자가 변형되는 종양 초기단계, 세포의 증식이 증가하고 세포사멸이 감소되는 종양 진행단계 그리고 암세포의 침윤과 전이에 의해 다른 조직에 자리를 잡고 종양의 크기가 커지는 종양 악성화 단계로 나눌 수 있다. 이러한 과정은 염증반응과 자가 면역에 의해 촉진되며, 특히 염증은 종양 형성에 중요한 역할을 한다. 이 때, Interleukin-1(IL-1), interleukin-6(IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 pro-inflammatory 사이토카인이나 CXC-chemokine ligand 8 (CXCL8)과 같은 케모카인들은 종양의 성장과 악성화를 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

이러한 사이토카인이나 케모카인은 전사인자인 NF- κ B (Nuclear factor kappa B)에 의해 발현이 조절되는 유전자들으로써, 이들은 다시 NF- κ B를 활성화 시킬 수 있는데 활성화된 NF- κ B는 세포의 증식, 사멸, 혈관 형성과 전이 등에 관련된 유전자들의 발현을 조절함으로써 암의 발생과 진행을 촉진한다 (M Karin & FR Greten, Nat Rev Immunology 5, 749-759, 2005). 그 예로, 유방암이나 전립선암, 대장암, 자궁암 또는 백혈병이나 림프종 등에서 NF- κ B의 활성이 암세포의 악성화과정에 따라 증가한다는 사실이 보고되었다 (LT Amundadottir and P Leder, Oncogene 16, 737-756, 1998; Nakshatri *et al.*, Mol Cell Biol 7,3629-3639, 1997). 따라서 NF- κ B는 단순한 면역 염증반응 뿐만 아니라 만성염증과 암의 발생을 연결시키는 중요한 분자으로써 암의 악성화에 영향을 미치는 중요한 전사인자로 밝혀져 있다 (Karin *et al.*, Nat Rev Cancer 2,301-310, 2002).

NF- κ B는 포유류에서 p65(RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1(p50), NF- κ B2(p52)등 5가지 subunit로 구성되는데, 이들은 homo- 또는 hetero- complex를 형성하여 활성화되기 전에는 억제 단백질인 I κ B family와 결합되어 세포질 존재하게 된다. 그러다가 I κ B가 IKC (I

kappa B kinase complex)에 의해서 인산화 된 후 유비퀴틴화 되어 분해되면, NF- κ B가 유리되고 활성화되어 핵으로 이동하여 그 기능을 하게 된다. NF- κ B1과 NF- κ B2의 전구체인 p105와 p100 또한 다른 NF- κ B 단백질들과 결합하여 이들의 활성화를 저해할 수 있다. 이들은 C-말단 부분에 I κ B 상동 억제 부위를 포함하고 있어서, 이들 단백질들과 결합하고 있는 NF- κ B complex는 이러한 I κ B 상동 억제 부위의 기능에 의해 세포질 내에만 존재하고 있다. 그러나 세포에 자극이 가해지면 p105와 p100의 I κ B 상동억제부위의 분해되어 활성형 p50와 p52가 만들어지고, NF- κ B complex는 핵 내로 이동할 수 있게 된다 (S Gosh and M Karin, Cell 109, 81-96, 2002).

NF- κ B 활성화 경로는 크게 canonical pathway (또는 classical pathway), noncanonical pathway (또는 alternative pathway)로 나눌 수 있다. 이러한 경로들은 활성화되는 kinase의 종류에 의해 다르게 조절되는 것으로 알려져 있다 (Viatour *et al.*, Trends Biochem Sci 1, 43-52, 2005). 이 두 가지 경로 중 가장 많이 알려지고 연구되어 있는 canonical pathway는 TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory 사이토카인들에 의해 활성화되며, canonical pathway에 의해 활성화되는 가장 대표적인 NF- κ B의 형태는 p65 (RelA)/p50이다. 이 경로는 외부자극이 왔을 때 세포내 수용체막에 TNF-receptor-associated death domain protein (TRADD), receptor interacting protein(RIP), TNF-receptor-associated factor2 (TRAF2)와 같은 접합 단백질들이 (adaptor protein)이 유인되어 결합되고 (Hsu *et al.*, Cell 81, 495-504, 1995), 이어서 kinase, IKK들의 complex를 활성화시킨다. 특히, 이 신호경로는 IKK β 에 의존적인 것으로 알려져 있다. IKK β 는 또 다른 kinase인 IKK α 와 regulatory subunit인 IKK γ (NEMO)와 함께 IKK complex를 구성하고 있다.

IKK β 는 I κ B의 인산화를 시킴으로서 I κ B의 유비퀴틴화를 유도하고 프로테아좀에 의해 I κ B를 분해시키며 I κ B와 결합되어있던 NF- κ B complex는 I κ B에서 유리되어 핵 내로 들어가 특정한 NF- κ B 표적유전자들의 발현을 유도한다.

Lymphotoxin β (Dejardin *et al.*, Immunity 17,525-535, 2002) B-cell activating factor (BAFF) (Claudio *et al.*, Nat Immunol 3, 958-965, 2002) 또는 CD40 ligand (Coope *et al.*, EMBO J 21, 5375-5385, 2002)와 Epstein - Barr virus (Xiao *et al.*, Mol Cell 7, 401-409, 2001), human T-cell leukaemia virus (Elipous *et al.*, Oncogene 22, 7557-7569, 2003; Solan *et al.*, J Biol Chem 277, 1405-1418, 2002; Kayagaki *et al.*, Immunity 17, 515-524, 2002; Hatada *et al.*, J Immunol 171, 761-768, 2003)들에 의해 활성화 되는 noncanonical pathway는 NF- κ B-inducing kinase (NIK/MAP3K14) 와 IKK α 에 의존적이며 p100의 절단되고 RelB/p52 complex가 형성되어 핵으로의 이동이 특징이라 할 수 있다. 세포에 자극이 가해지면 수용체에 TNF receptor associated factor (TRAF) 단백질과 NIK가 결합되어

NIK가 활성화 되고 IKK α dimer가 인산화 되며, 이어서 p100이 인산화 됨으로써 p100 내의 I κ B 상동억제부위가 분해되어 p52가 생성되게 된다. 생성된 p52는 주로 RelB단백질과 결합하여 핵으로 이동 한다 (Senftleben *et al.*, Science 293, 1495-1499, 2001; Solan *et al.*, J Biol Chem 277, 1405-1418, 2002; Kayagaki *et al.*, Immunity 17, 515-524, 2002 2002; Hatada *et al.*, J Immunol 171, 761-768, 2003). 그리고 이러한 두가지 경로 모두 NF- κ B를 활성화시키기위해 억제 단백질의 인산화가 필수적이다.

과학기술의 발전에 따른 의료수준의 급진적인 향상에도 불구하고 암은 여전히 인류가 극복해야할 난치병중의 하나로 여전히 남아있다. 이러한 주된 원인은 암의 발생 및 악성화 기전이 분자수준에서 완전히 밝혀지지 않기 때문이다. 특히 암세포가 악성종양으로 진행하여 전이능을 획득하여 같은 조직(local invasion) 이나 다른 조직으로 이동하여 성장하는 전이(metastasis)는 암을 성공적으로 치료할 수 없는 이유 중의 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 따라서, 암의 전이기구를 분자수준에서 밝혀내고 그 기전을 이해하는 것은 암의 새로운 효과적인 암의 치료법개발을 위하여 절실히 요구된다.

현재 우리나라의 인구 4명중 1명이 암으로 사망하여 한국인의 사망원인 중 1위를 지하고 있으며, 암의 발병률은 환자의 연령증가와 함께 기하급수적으로 증가하고 있으며, 고령화 사회와 서구화된 식생활, 환경요인 등에 의해 해마다 큰 폭으로 증가되고 있다. 특히, 위암은 한국인의 암으로 인한 사망 중 폐암 (20.6%) 다음으로 높은 비율 (17.4%)을 차지하고 있는 한국인 호발암이다. 암을 성공적으로 치료할 수 없는 가장 큰 이유는 암이 같은 조직이나 다른 조직으로 이동하여 성장하는 전이 (metastasis)하는 성질 때문이며 위암도 다른 고형암과 마찬가지로 primary tumor에 의한 것보다 전이에 의해 대부분의 암환자를 사망에 이르게 한다. 암세포의 전이는 매우 복잡하고 연속적인 반응을 성공적으로 수행하여야하는 다단계의 반응으로 암종특이적인 다양한 유전적 또는 비유전적인 유전자의 발현변화가 일어나 단백질분해능 증가, 침윤능 증가, 세포사멸능의 저하, 면역회피능의 증가 등의 악성화 (malignant progression)가 되고 결국 전이성암세포로 진행하게 된다. 지난 30여 년 동안 암에 대한 연구는 급속한 진보를 거듭하여 많은 암종특이적 발암유전자들이나 암억제유전자들이 동정되었고 이들 유전자들의 기능/기전연구를 통하여 새로운 치료법을 제시하고 있으나 암은 여전히 인류가 넘어야 할 큰 숙제로 남아있다.

최근에 개발된 Gleevec (Novartis), Herceptin (Genentech/Roche), Iressa (Astrazeneca), Tarceva (Genetech) 등의 항암제에서 볼 수 있듯이 독성이 감소되고, 보다 선택적으로 암을 치료할 수 있는 특정암 표적분자를 대상으로 한 표적치료제개발에 관심이 집중되어 있다. 특히, 이러한 표적치료제의 대부분이 전이성암이나 난치성암을 대상으로 하여 항암제로 허가를 취득한 예에서 볼 수 있듯이 전이성암을 치료할 수 있는 항암제의 중요성을

집작할 수 있다. 따라서 이러한 선택적이며 경쟁력을 갖춘 항암제의 개발을 위해서 필수 요소는 암의 발생 및 전이를 조절하는 유전자를 발굴하고 이들의 기전/기능연구를 통하여 새로운 항암제개발을 위한 독창적인 표적분자를 개발하는 것에 달려있다고 할 수 있다. 특히, post-genome시대에는 항암제개발을 위한 새로운 표적분자들이 급격히 늘어날 것으로 예상되고 있으며, 더구나 위암과 같은 한국인 호발암에 대한 표적분자의 발굴은 새로운 위암치료법의 개발을 위해 절실히 요구된다.

지난 세기 말부터 시작된 인간과 다양한 실험동물의 게놈 서열규명과 분자세포생물학, 기능유전체학 등의 학문의 급속한 발전으로 암 연구의 패러다임에 혁신적인 변화를 가져왔다. 암 연구, 특히 암세포의 진행 및 전이의 연구를 암세포에서만 일어나는 유전적/비유전적인 변화뿐만 아니라 암 조직을 구성하고 있는 다양한 세포들 간의 상호작용을 통합적으로 이해를 추구함으로써 암의 진행 및 전이의 분자기전 규명을 획기적인 진전을 거듭하고 있다.

암세포의 전이는 다단계의 연속적인 반응으로 암세포가 전이능을 획득하기 위해서는 다양한 유전자의 발현변화가 일어나 ① "공격성 표현형"의 획득, ②, epithelial-mesenchymal transition (EMT), ③ 세포-세포 또는 세포-세포외 기질 간의 접착능의 변화, ④ death signal에 대한 내성, ⑤ 기저막의 분해 및 혈관내로 유출, ⑥ 면역회피능 획득, ⑦ 표적장기로의 이동, ⑧ extravasation, ⑨ 표적장기에서의 성장 등의 다단계의 과정을 성공적으로 수행하여야 한다. 따라서 암세포는 이 모든 능력을 획득해야만 전이를 할 수 있으므로 악성화 (malignant progression)의 모든 단계가 암 전이를 일으키는 중요한 요소이다[1]. 암세포가 이러한 능력을 갖는 세포로 악성화하기 위해서는 많은 유전적(genetic) 또는 후생학적 (epigenetic) 변화의 축적에 의해 일어나므로 이에 관여하는 유전자도 다양하고 복잡하다. 위암이나 간암도 다른 고형암과 마찬가지로 암세포가 형성되게 되면 특이적인 유전적 변화와 후생학적 변화에 의해 다양한 유전자의 발현을 변화시켜 전이성암세포로 악성화하게 되는데, 이러한 위암/간암세포의 악성화기구에 대하여서는 아직 분자수준에서 자세히 밝혀지지 않고 있다.

암 조직을 구성하고 있는 macrophages, neutrophils, lymphocytes 등의 면역세포, 혈관내피세포, fibroblast 등의 기저세포 (stromal cell)들은 암세포와 복잡한 상호작용을 통하여 암세포의 증식, extracellular matrix의 재구성, 면역회피, 이동 및 침윤 등을 증가시켜 혈류내로 암세포의 유출 (cancer cell dissemination)을 촉진시킴이 최근의 연구를 통하여 규명되고 있다. 예를 들어 초기 종양세포에서 분비된 prostaglandins (PGs)은 종양 부위로 면역세포를 불러들여 면역세포의 분화와 활성을 조절하여 만성 염증성 미세환경을 조성하여 종양세포와 면역세포의 상호작용 결과 암세포의 증식, 이동, 침윤, 면역회피 등

이 증가하는 것으로 알려져 있다 [3]. 예를 들어, PGE2는 T 림프구의 분화를 항종양성 Th1으로부터 염증성 Th17 또는 Th2 세포 방향으로 유도함이 밝혀지고 있다. 이와 같이 염증이 암, 특히 암세포의 악성화를 조절한다는 가설이 1860년대에 제안된 이래 만성염증과 다양한 종류의 암과의 상관성이 있음이 제시되고 있다. 예를 들어, 위암의 경우 Helicobacter pylori의 감염과 관계되어 있다든지, 간암의 경우 HBV, HCV의 감염과 밀접한 상관관계가 있다든지 하는 경우이다. 그러나 어떤 분자기구로 염증이 암의 악성화를 조절하는지는 자세히 알려져 있지 않다. 이러한 암과 염증을 연결하는 연결고리 분자로서 전사인자 NF- κ B의 역할이 대두되고 있다. 예를 들어, 감염이나 염증성 사이토카인 등에 의해 활성화된 염증성세포에서 전사인자 NF- κ B가 활성화되면 싸이토카인, 성장인자, 혈관신생인자 등이 분비되고, 이러한 인자들은 암세포의 다양한 신호전달 경로를 활성화시켜 침윤능, 혈관신생, 성장 및 생존능력을 촉진할 뿐만 아니라, 암세포에서 전사인자 NF- κ B를 다시 활성화시켜 세포주기조절유전자, 세포사멸조절유전자, protease 등의 발현을 증가시켜 암세포의 악성화를 유도하는 것으로 알려져 있다[2]. 뿐만 아니라 전사인자 NF- κ B는 위암, 유방암, 림프종 등 많은 암종에서 항시적으로 활성화되어있다.

이와 같이 암세포는 종양조직의 다양한 종류의 기질세포(macrophage, lymphocyte, neutrophil 등의 면역세포 fibroblast, 혈관세포 등)와 상호작용을 통하여 암세포의 성장, 증식 및 혈관내 유출 등이 조절될 뿐만 아니라, 전이 표적 조직의 기질세포와 상호작용을 통하여 암 전이의 선택성 및 전이암의 성장 및 증식을 유도함이 최근의 연구를 통해 규명되고 있으나 이에 대한 연구는 아직 초보 단계이다.

한편, 항암제 개발경향도 최근에 개발된 Gleevec(Norvatis), Tarceva(Genentech) Herceptin (Genentech/Roche), Iressa(Astrazeneca) 등의 항암제에서 볼 수 있듯이 기존의 전통적인 화학 요법제에서 벗어나 독성이 감소되고, 보다 선택적으로 암을 치료할 수 있는 특정 암표적분자를 대상으로 한 표적치료제개발에 관심이 집중되어 있다. 특히, 2004년 Datamonitor사의 동향분석자료에 의하면 앞으로 항암제시장에서 가장 바람직한 항암제는 독성이 감소되고 부작용이 적은 표적치료제와 전이암을 효과적으로 치료할 수 있는 표적항암제라고 결론을 내리고 있다 (Pipeline Insight: Cancer Overview, Datamonitor, 10/2004). 따라서, 이러한 선택적이며 경쟁력을 갖춘 항암제의 개발을 위해서 필수적인 요건은 암관련 유전자를 기전/기능연구를 통하여 항암제개발을 위한 독창적인 표적분자로 개발하는 것에 달려있다고 할 수 있다.

본 과제에서는 전사인자 NF- κ B의 활성화에 의해 발현이 조절되며, 위암세포에서 과발현되어 있는 유전자 ZFP91 (Zinc finger Protein 91) 발현 및 기능을 분자수준에서 검증하여 항암제개발의 표적분자로서의 타당성을 제시하고자 한다.

위에 언급한 경로들에 의해 활성화된 NF- κ B는 세포의 증식에 관련된 유전자인 Cyclin D1 이나 c-Myc, 항-세포사멸을 유도하는 유전자인 cIAPs, BCL-X_L, c-FLIP 등과, 면역, 염증과 관련된 다양한 케모카인이나 사이토카인, 부착 분자들과 같은 특정 유전자의 발현을 조절하게 된다. 이렇듯 NF- κ B는 암, 염증반응 등과 밀접하게 관련이 되어있으며 (Karin *et al.*, Nat Rev Cancer 2, 301-310, 2002), NF- κ B의 저해제는 항염증물질, 항암물질로 오랫동안 사용되어왔고 지금도 활발히 연구되고 있다 (M Karin *et al.*, Nature Rev. Drug Discovery 3, 17-26, 2004; Nakanishi C & Toi M, Nature Rev. Cancer 5, 297-309, 2005)

전사인자 NF- κ B의 p50 단백질의 DNA 결합을 특이적으로 저해하는 화합물의 세포내 effector molecule을 검색하는 연구에서 ZFP91 (human homologue of mouse zinc finger protein 91)을 동정하였는데 ZFP91는 장시간의 NF- κ B 활성화를 유도하는 noncanonical 경로에 중요한 p52의 발현을 유도하는 활성이 있음을 알았고 이로부터 noncanonical 경로를 활성화시키는 ZFP91의 작용기전이 이 경로의 중요한 kinase인 NF- κ B-inducing kinase (NIK)의 안정화 및 활성화를 유도와 관련이 있기 때문에 이들 사이의 상호조절작용과 그 기전을 연구하여 암의 성장 및 악성화와의 관련성을 연구할 필요성이 제기되었다.

제 2절 연구개발의 내용 및 범위

○ 암을 성공적으로 치료할 수 없는 가장 큰 이유는 암이 같은 조직이나 다른 조직으로 이동하여 성장하는 전이 (metastasis) 성 때문이며 위암도 다른 고형암과 마찬가지로 primary tumor 에 의한 것보다 전이에 의해 대부분의 암환자를 사망에 이르게 한다.

○ 암세포는 암종 특이적인 다양한 유전적 또는 비유전적인 유전자의 발현변화가 일어나 단백질분해능 증가, 침윤능 증가, 세포사멸능의 저하, 면역회피능의 증가를 수반하는 악성화 (malignant progression)과정을 거쳐, 결국 전이성암세포로 진행하게 된다.. 지난 30여 년동안 암에 대한 연구는 급속한 진보를 이루어 많은 암종특이적 발암유전자들이나 암억제유전자들이 동정되었고 이들 유전자들의 기능/기전연구를 통하여 새로운 치료법을 제시하고 있으나 암은 여전히 인류가 넘어야 할 큰 숙제로 남아있다.

○ 항암제 개발경향도 최근에 개발된 Gleevec (Novartis), Herceptin (Genentech/Roche), Iressa (Astrazeneca), Tarceva (Genetech) 등의 항암제에서 볼 수 있듯이 기존의 전통적인 화학요법제에서 벗어나 독성이 감소되고, 보다 선택적으로 암을 치료할 수 있는 특정 암 표적분자를 대상으로 한 표적치료제개발에 관심이 집중되어 있다. 특히, 2004년 Datamonitor사의 동향분석자료에 의하면 앞으로 항암제시장에서 가장 바람직한 항암제는 독성이 감소되고 부작용이 적은 표적치료제와 전이암을 효과적으로 치료할 수 있는 표적 항암제라고 결론을 내리고 있다 (Pipeline Insight: Cancer Overview, Datamonitor, 10/2004). 따라서, 이러한 선택적이며 경쟁력을 갖춘 항암제의 개발을 위해서 필수적인 요건은 암관련 유전자를 기전/기능연구을 것이다.

○ 한편, 염증이 암, 특히 암세포의 악성화를 조절한다는 가설이 1860년대에 제안된 이래 만성염증이 다양한 암과의 상관성이 있음이 제시되었다. 예를 들어, 위암의 경우 *Helicobacter pylori*의 감염과 관계되어 있다든지, 간암의 경우 HBV, HCV의 감염과 밀접한 상관관계가 있다든지 하는 경우가 염증과 암과의 관련성을 강하게 뒷받침하고 있다.

○ 그러나 어떤 분자기구로 염증이 암의 악성화를 조절하는지는 최근에 서서히 밝혀지고 있으며 이러한 연결고리 분자로서 전사인자 NF- κ B의 역할이 대두되고 있다. [*Nature* **420**, 860 (2002), *Cell* **118**, 671 (2004), *Nature Reviews Immunology* **5**, 749 (2005), *Cell* **118**, 285 (2004), *Nature* **431**, 461 (2004), *Cancer Cell* **6**, 297 (2004), *Cancer Cell* **7**, 411 (2005), *Science* **306**, 1568 (2004), *Nature* **441**, 431 (2006)]. 뿐만 아니라 전사인자 NF- κ B는 위암, 유방암, 림프종 등 많은 암종에서 항시적으로 활성화 되어있는 것도 주지의 사실이다.

○ 정상세포에서 갖고 있지 않은 암세포의 특징은 1) self-sufficiency in growth signals, 2) insensitivity to growth inhibitory signals, 3) evasion of apoptosis, 4) limitless replicative potential, 5) invasion and metastasis, 6) sustained angiogenesis 로 요약할 수 있는데 (*Cell* **100**, 57, 2000), 염증과 암세포에서 활성화되는 전사인자 NF- κ B는 이러한 암세포의 특징을 대부분 설명할 수 있음. 예를 들어, 감염이나 염증성 사이토카인 등에 의해 활성화된 염증성세포에서 전사인자 NF- κ B가 활성화되면 싸이토카인, 성장인자, angiogenic factors 등이 분비되고, 이러한 인자들이 암세포의 혈관신생, 성장 및 생존능력을 촉진할 뿐만 아니라, 암세포에서 전사인자 NF- κ B를 다시 활성화시켜 세포주기조절 유전자, 세포사멸조절유전자, protease등의 발현을 증가시켜 암세포의 악성화를 유도하는 것으로 알려져 있다. (*Nature* **441**, 431, 2006).

○ 또한 전사인자 NF- κ B는 아직 그 분자기전이 밝혀지지 않고 있지만 IL-1, TNF- α 등과 같은 염증성 사이토카인에 의해 유도되는 HIF (hypoxia inducible factor)의 활성화를 조

절하는 것으로도 알려져 있다. [*Blood* **94**, 1561, (1999), *FASEB J* **14**, 2115, (2003), *Molecular Biology of the Cell* **14**, 2216 (2003), *Biochem J* **370**, 1011 (2003), *Cancer Res* **65**, 4690 (2005)].

○ 따라서, 본 과제에서는 전사인자 NF-κB의 활성화에 의해 발현이 조절되며, 위암세포에서 과발현되어 있는 유전자 ZFP91 (Zinc finger Protein 91) 발현 및 기능을 검증하고, 항암제개발의 표적분자임을 증명하고자 한다.

이를 위해 ① 위암조직에서의 발현을 분석하여 임상적 유의성을 검증하고 ② 기능을 세포분자생물학적 방법으로 분석하고, 항암제 표적으로서의 유의성을 검증하는 한편, ③ ZFP91의 활성조절물질 검색을 통한 화학적 검증 (chemical validation)으로 새로운 oncogene임을 밝히고, 표적으로서의 타당성을 증명하여 궁극적으로 이들을 활용한 새로운 항암제개발을 위한 표적분자로 이용하고 이를 조절하는 선도물질을 제시하는 항암제 개발에 활용하고자 한다.

○ 연구 범위:

NF-κB 저해제 kamebakaurin은 NF-κB1(p50/p100)가 DNA에 결합하는데 중요한 Cys62를 수식하여 p50를 포함하는 NF-κB complex가 target 유전자의 promoter region의 κB-binding consensus sequences에 결합을 p50 선택적으로 저해하는 특성을 갖는 최초의 화합물인데, 이 화합물에 의해 조절되는 target 유전자로 zfp91를 발견하였으며, 이 유전자의 과발현이나 knock-down 실험에서 ZFP91이 cancer-cell의 악성화 및 전이에 중요한 전사인자 NF-κB 와 HIF-1의 활성을 조절하는 현상을 발견하였다. 이러한 현상을 발현하는 ZFP91 (Zinc Finger Protein 91)의 기능을 알기위하여,

- ① NF-κB transient활성이 persistent활성으로 변환되는 기전을 NF-κB canonical pathway와 noncanonical pathway신호전달 네트워크상에서 검증하고,
- ② ZFP91단백질의 작용기전을 연구하며,
- ③ 암조직에서 ZFP91의 발현과 병리조직학적 분석을 통하여 임상적인 유의성을 검증하며, 저해제 검색계를 구축하고, 저해제를 검색하여 세포 및 동물모델을 이용한 화학적, 약리적 검증 방법을 종합하여
- ④ ZFP91이 암유전자 (oncogene)임과 항암제의 표적분자로서의 타당성을 제시한다.
- ⑤ 전사인자 NF-κB의 활성화에 의해 발현이 조절되며, 위암세포에서 과발현되어 있고 새로운 암 유전자의 가능성을 시사하는 ZFP91 (Zinc finger Protein 91)의 기능을 종양신호전달 네트워크 상에서 HIF (hypoxia inducible factor)의 활성조절기전을 분자수준에서 규명하려한다.
- ⑥ 궁극적으로 ZFP91이 새로운 oncogene임을 밝혀 향후 ZFP91의 신호전달 네트워크를 표적으로 한 표적지향 항암제의 개발에 활용하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국외의 연구개발 동향

○ 본 과제에서 연구하고 있는 ZFP91에 대한 보고는 acute myelogenous leukemia에 과발현되는 유전자로 보고 (Internat J Oncol 22: 1217-1223, 2003년)된 이후 후속 연구에 대한 보고는 아직 없다. 본 연구에서 ZFP91의 Ser/Thr kinase인 NIK와 상호 관련성을 발견하여 연구하는 과정에서 ZFP91이 조절하는 NF- κ B의 noncanonical pathway의 활성화에 있어서 핵심 인산화 효소인 NIK가 어떠한 기전으로 활성이 억제되는지에 대한 연구결과가 최근 항암제개발의 중요한 타겟인 세포사 억제단백질인 cIAP1의 antagonist를 처리하면 NIK 분해를 유도하는 E-3 활성이 있는 cIAP1/2를 분해하여 NIK의 안정성이 증가된다는 논문이 Cell (131, 669-681, 682-693, 2007년)에 발표되었고, noncanonical NF- κ B 경로를 억제하는 TRAF2/3의 NIK-dependent NF- κ B signaling에서 cIAP1/2와 관련된 역할이 Nature Immunology 2008년 12월 (9, 1364-1370, 1371-1378)에 보고되었다.

○ NF- κ B와 HIF-1의 관련성은 제안된 바 있으나 이들을 연결하는 단백질에 대한 연구도 아직 보고되지 않았으며, NF- κ B와 HIF와의 상관성은 계속 보고 있는데, HIF-1의 promoter에 존재하는 kB binding site에 대한 연구들이 전부이다.

○ 염증이 암, 특히 암세포의 악성화를 조절한다는 가설이 1860년대에 제안된 이래 만성 염증이 위암 등의 다양한 암과의 상관성이 있음이 제시되면서 전사인자 NF- κ B의 암 악성화과정에서의 역할이 구체적으로 밝혀지고 있다 [Nature 420, 860 (2002), Cell 118, 671 (2004), Nature Reviews Immunology 5, 749 (2005), Cell 118, 285 (2004), Nature 431, 461 (2004), Cancer Cell 6, 297(2004), Cancer Cell 7, 411 (2005), Science 306, 1568 (2004), Nature 441, 431 (2006), J Clin Invest 117, 60 (2007), Nature 466, 690-694 (2007)].

○ 암의 전이/악성화에 대한 연구는 그 중요성 때문에 세계적으로 매우 활발히 진행되고 있는 연구 분야 중 하나이다. 그러나 위암의 전이/악성화에 대한 연구는 서구형 암이 아닌 관계로 일본, 유럽, 중국 등을 중심으로 활발히 진행되고 있으나 유방암이나 전립선암과 같이 서구형 고형암에 비하여 매우 미진한 실정이다. 최근에 진보된 기술을 이용하여 전이/악성화에 대한 기전연구 및 이에 관련된 유전자들이 계속 보고되고 있는 실정이다. 예를 들어 새로운 metastasis기전으로 암세포가 VEGFR-positive bone marrow cell을 전이하고자 하는 특정장기로 이동시킴으로써 특정장기의 미세환경을 변화시켜 암세포가 전

이하다는 새로운 기전을 보고하였고 (Nature 438, 820-827, 2005), 또한 RTK인 TrkB가 anoikis를 저해하여 metastasis을 유도한다고 보고되었다 (Nature 430, 1034-1039, 2004). 또한 오랫동안 암의 발생 및 악성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있던 염증과의 관계를 연결하는 분자기전이 서서히 밝혀지고 있다 (Nature Reviews immunology 5, 749-759, 2005). 예를 들어 IKK β -dependent NF- κ B 활성화가 암과 염증의 연결고리 분자로서 작용한다는 사실이 보고되었다 (Nature 431, 461-466, 2004, Cell 121, 977-990, 2005). MIC-1에 대한 연구는 유방암, 대장암, 전립선암, 위암, 췌장암 등의 암에서 암세포가 악성화 될수록 발현이 증가되어 암진단마커로서의 가능성이 시사된 이래 (Cancer Res 63:5034-40,2003; Clin Cancer Res 10, 2386-2392, 2004; J Natl Cancer Inst 96,1248-1254, 2004; Cancer Res 63, 4648-4655, 2003; PNAS 100, 3410-3415,2003), MIC-1의 cancer 및 생리학적 역할에 대한 역할을 분석하기 위한 연구가 진행되어 왔으나 아직 MIC-1의 receptor를 포함한 신호전달계에 대한 해석이 되지 않고 있는 실정이다. 최근에 MIC-1이 심근세포에서 ischemia/reperfusion에 대한 injury를 PI3K pathway를 활성화시켜 cell death 보호한다고 보고되었다 (Circ Res 98, 351-360, 2006).

○ 한편, 항암제개발경향도 기존의 전통적인 세포독성치료제에서 벗어나 암세포의 특성표적으로 하는 항암제가 속속 등장하고 있다. 예를 들어 EGFR을 표적으로 하는 Tarceva (저분자화합물), Erbitux (EGFR중화항제), VEGF의 중화항제인 Avastin, multiple kinase저해제인 Sutent 등이 전이성암의 치료제로 개발되어 시판되고 있다. 특히, Datamonitor (R&D Focus, IMS Health, 2004)의 분석 자료에 의하면 현재 임상 3상에서 연구되는 항암제 중 표적치료제 약물이 전체에서 차지하는 비율은 64%이며, 이들 중 신호전달 조절물질이 가장 높은 비율(43%)을 차지하고 있고, 또한 임상 1상에서는 표적치료제 약물의 비율은 92%를 할 정도로 암세포의 특정분자를 활용한 표적치료제 개발이 주류를 이루고 있음을 알 수 있다.

○ 국내의 암전이에 대한 연구, 특히 위암의 전이 및 progression에 관한 연구는 몇 개의 기관에서 활발히 진행하고 있으나, 그 규모나 연구인력은 아직 선진국수준에 비교하여 극히 미약한 실정이다. 국내에서는 암에 대한 연구는 비하여 활발히 연구가 진행되어 서울대 김성훈 교수팀의 p18 tumor suppressor gene (Cell 120, 209, 2005)을 발견 보고하였고, 서울대 백성희 교수팀은 전립선암의 전이억제유전자인 KAI1/CD82가 전립선암세포가 악성화되면서 발현이 감소되는 전사조절기전을 밝혔다 (Nature 434, 921-926, 2005). 항암제개발도 쉐플라(주) 개발이래 종근당에서 캄프토테신계 (Topoisomerase-1저해제) 항암제인 캄토벨 개발하여 시판하고 있다.

암의 전이에 대한 연구는 그 중요성 때문에 세계적으로 매우 활발히 진행되고 있는 연구 분야 중의 하나이다. 예를 들어 전이억제유전자들은 발굴하려는 연구가 1990년대 이후에 활발히 진행되어 nm23H1[4], KiSS-1[5], Kai-1/CD82[6], BRMS-1[7], RHOGDI2[8], CRSP3[9], VDUP1[9] 등이 보고되었고, 또한 이들 유전자에 대한 기능연구도 활발히 진행되어 KiSS-1의 경우 G-protein coupled receptor의 ligand [9]라는 사실과 nm23H1이 CTL-mediated apoptosis 과정 중 granzyme A-activated DNase [10]이라는 사실이 밝혀지고 있다. 또한 최근에 진보된 기술을 이용하여 전이에 대한 기전연구 및 이에 관련된 유전자들이 계속 보고되고 있는 실정이다. 또한 오래 동안 암전이의 "seed and soil"이론을 증명할 수 있는 연구결과가 보고되고 있으며 특히 암세포의 악성화 및 전이에서의 종양미세환경(tumor microenvironment)의 중요성이 부각되고 있다. 예를 들어 암세포에서 분비한 colony stimulating factor (CSF)에 반응하여 종양조직으로 들어온 macrophage는 epidermal growth factor (EGF)를 분비하여 암세포의 성장을 유도할 뿐만 아니라 macrophage쪽으로 암세포의 이동을 유발하여 결국, 암세포의 혈관내로의 유출을 유도한다. 전이부위에서 종양 미세환경은 암세포가 표적장기로 이동(seeding)한 후 표적 장기에 전이암세포가 성장하는데 핵심적인 역할을 함이 밝혀지고 있다. 예를 들어 유방암세포의 뼈 전이의 경우 SDF-1의 수용체인 CXCR4의 발현이 높은 유방암세포가 SDF-1의 발현이 높은 뼈 기질에 반응하여 선택적으로 뼈로 homing하게 되어 전이암을 형성한다. 따라서 암세포가 전이할 표적장기에 도달한 후 조직에 형성된 미세환경에 따라 사멸, 잠복, 또는 증식이 결정되어 지게 됨이 밝혀지고 있다 [11, 12].

○ 한편, 항암제개발경향도 기존의 전통적인 세포독성치료제에서 벗어나 암세포의 특성표적으로 하는 항암제가 속속 등장하고 있다. 예를 들어 EGFR을 표적으로 하는 Tarceva (저분자화합물), Erbitux(EGFR중화항체), VEGF의 중화항체인 Avastin, multiple kinase저해제인 Sutent 등이 전이성암의 치료제로 개발되어 시판되고 있다. 특히, Datamonitor의 분석 자료에 의하면 임상 3상에서 연구되는 항암제 중 표적치료제 약물이 전체에서 차지하는 비율은 64%이며, 이들 중 신호전달 조절물질이 가장 높은 비율(43%)을 차지하고 있고, 또한 임상 1상에서는 표적치료제 약물의 비율은 92%를 할 정도로 암세포의 특정분자를 활용한 표적치료제 개발이 주류를 이루고 있음을 알 수 있다. 이러한 항암제 개발의 R&D가 표적치료제로 집중되고 있는 것은 기존의 항암제의 문제점, 즉 독성 및 부작용을 감소시키고 말기암이나 전이암을 치료할 수 있는 표적지향 항암제에 대한 시장의 unmet need가 높은 것으로 분석 되어 진다. 최근에 종양표적치료제로서 개발된 항암제는 아래의 표와 같다.

항암제	작용점	성상	적용암
Gleevec (imatinib)	Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR tyrosine kinase	저분자화합물	CML GIST
Iressa (gefitinib)	EGFR (HER1) tyrosine kinase	저분자화합물	NSCLC
Tarceva (erlotinib)	EGFR (HER1) tyrosine kinase	저분자화합물	전이성NSCLC Pancreatic
Valcade (bortezomib)	proteasome 저해제 (NF-kB)	저분자화합물	Myeloma
Trastuzumab (Herceptin)	ErbB2 (HER2) 저해제	항체	전이성유방암
Erbix (cetuximab)	EGFR 저해제	항체	전이성대장암
Avastin (bevacitumab)	VEGF 중화항체	항체	전이성 대장암 (5-FU와 병용)
Sutent (sunitinib)	VEGFR, Kit, PDGFR, Flt3 tyrosine kinase	저분자화합물	전이성신장암 GIST
Nexavar (sorafenib)	Raf-1 inhibitor	저분자화합물	전이성신장암

특히 2006년 1월에 FDA에서 gastrointestinal stromal tumors (GIST)와 metastatic kidney cancer의 항암제로 승인을 받은 Sutent의 경우는 조그만 바이오벤처회사인 SUGEN (후에 Pharmacia에서 인수하고 pharmacia는 2003년도에 Pfizer에 합병됨)에서 1999년 SU11248로 명명된 저분자화합물의 VEGFR저해제로 대기업에 기술이 이전되어 단시간내에 제품화에 성공한 경우이다. 또한 ErbB family의 위암, 폐암 등 많은 암세포에서 과발현되어 있어, EGFR, ErbB2항암제 개발의 중요한 표적분자로 되어있으나 최근의 연구결과에서 그동안 관심을 끌지 못했던 ErbB3가 암세포에서 중요성이 부각되면서 이에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

이와 같이 최근의 항암제개발경향은 종양표적치료제 개발이 주류를 이루고 있으며 2010년 이후의 항암제 시장은 표적지향제를 중심으로 한 혁신적 항암제의 급속한 성장을 예측하고 있으며, 암진단기술의 발전과 더불어 암환자의 유전적 배경에 따라 치료할 수 있는 “맞춤의약 (gene-specific treatment or personalized treatments)”를 하게 될 수 있을 것이라고 예상되고 있어 세계적으로 종양표적치료제 개발을 위한 연구가 매우 활발히 지속될 것이다.

제 2절 국내의 연구개발 동향

국내의 NF- κ B 연구는 그 대부분이 저해제 연구가 대학 중심으로 진행되고 다수의 논문이 보고되고 있으나 NF- κ B 신호전달경로나 이의 조절에 대한 연구는 그 규모나 연구인력면에서 극히 제한되어 있다

국내의 암전이에 대한 연구, 특히 위암의 전이 및 progression에 관한 연구는 몇 개의 기관에서 활발히 진행하고 있으나, 그 규모나 연구인력은 아직 선진국수준에 극히 미약한 실정이다. 아직까지는 국내에서 위암/간암으로부터 직접 발굴된 전이/progression조절 유전자는 보고되지 않고 있으며 대부분의 경우가 다른 암종에서 발굴한 유전자를 이용하여 위암에서의 관련성을 검토한 연구가 대부분이다. 그러므로 위암/간암은 전립선암, 유방암 등의 미국이나 서구형 암에 비해 상대적으로 연구가 미진하므로 그 만큼 발전이 기대되는 분야이기도하다.

국내의 경우 항암제 개발연구가 대학/기업 등을 중심으로 활발히 진행되고 있으나 암세포의 특정표적을 대상으로 하는 종양표적치료제의 개발연구는 아직 미흡한 실정이다. SK케미칼(주)에서 개발한 프라티니움제제인 썬플라(주)와 종근당에서 개발한 캠프토테신유도체 캠프토벨이 개발되어 국내에서 시판되고 있다. 또한 녹십자의 angiogenesis저해제인 greenstatin이 미국 MD Anderson에서 임상에 들어간 것으로 알려져 있으며 2014년 시판을 목표로 하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구방법

1. Cell culture, Transfection, Luciferase Reporter Assay.

실험한 사용한 cell lines (HEK293, MDA-MB231, MCF-7, T47D, AGS, MKN-45, SNU-638) 은 DMEM or RPMI-1640 with penicillin (100 nits/ml)-streptomycin(100 units/ml) (Invitrogen) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone)에서 , 배양하였다. Transfections 은 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 을 사용하여 제조사의 실험법에 따라서 하였다. NF-κB luciferase activity 는 Dual Luciferase Reporter Assay system을 이용하여 측정하였다.

2. ZFP91 발현 vector의 구축

ZFP91의 cDNA를 얻기 위해 MDA-MB-435, SNU-638 cDNA library를 주형으로 하여 Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech, CA, U.S.A.)를 이용하여 PCR을 수행하였다. ZFP91의 특정 primer는 GenebankTM accession number NM_053023에 보고된 염기서열에 근거하여 BamH I 과 Xho I 자리를 포함하게 제작하였다; sense 5'-AAG GAT CCA TGC CGG GGG AGA CGG AAG A-3', antisense 5'-CCT CGA GCT AAG GTC CGG CAG AGT CT-3'. PCR조건은 94°C에서 5분 동안 초기 변성시킨 후 94°C 40초, 60°C 30초, 72°C 3분을 30 cycles로 하여 증폭하였다. 이 PCR 산물을 pCMV-Tag2B (Stratagene) vector에 frame을 맞추어 cloning하여 N-말단이 FLAG-tagging된 ZFP91 발현 vector (Tag2B-FLAG-ZFP91)을 만들었다. 이 발현 vector내의 frame 및 ZFP91 서열은 DNA sequencing (제노텍)을 통해 다시 한번 확인하였다.

3. Plasmids and reagents

ZFP91 cDNA 는 human gastric cancer cell line SNU-638 cDNA library에서 PCR로 cloning하였고, pFlag-ZFP91, pMyc-ZFP91, pEntr-ZFP91 은 ZFP91을 pCMV-Tag2B (Stratagene), pCMV-Myc (Clontech) and pEntr-BHRNX (Newgex, Seoul, Korea)에 각 각 PCR subcloning하여 제조하였다.. ZFP91 deletion mutants들은 standard PCR methods로 제작하였고, point mutants 들은 Quikchange Kit (Stratagene) 를 이용하여 제작하였다. ZFP91의 promoter region은 human genome database에서 디자인한

primers를 이용하여 SNU-638 genomic DNA에서 PCR cloning하여, PCR products 는 PCR[®]2.1-TOPO vector (Invitrogen) subcloning하여 sequencing하여 genome database와 비교하였다. 길이가 다른 ZFP91 promoter regions (-2000 to +10, -1409 to +10 and -729 to +10) 들은 pGL3-basic reporter (Promega)에 subcloning하여 각각의 plasmids 들은 ZFP91 PFL, ZFP91 PM1, ZFP91 PM2로 명명하였다. 본 연구에 이용한 mammalian expression constructs들은 다음과 같다: Myc-NIK, Myc-NIK (KK429/430AA) and p65 (M. Jung, Georgetown University), Flag-cIAP1 and -cIAP2 (M. Naito, Tokyo University), HA-IKK α and -IKK β (M. Karin, University of California, San Diego), HA-Ub, HA-UbK48R, HA-UbK63R, HA-Ub48K and HA-Ub63K(C.H. Chung, Seoul National University). HA-TRAF2 and NIK (T559A) 는 본 연구에서 제작하였다. 본 연구에 사용한 항체들은 다음과 같다: anti-Flag (Sigma; F3165) and Flag affinity gel (Sigma; A2220), anti- α -Tubulin (Sigma; T5168), anti-HA (Roche; 12CA5), anti-Myc (Roche; 9E10), anti-NIK (Santa Cruz; sc-7211 or Cell Signaling; 4994), anti-phosphorylated NIK (Santa Cruz; sc-12957), anti-Ub (Santa Cruz; sc-8017 or Covance; MMS-264R), Polyubiquitin K63-linkage-specific monoclonal antibody (BIOMOL, clone HWA4C4), anti-p52 (Santa Cruz; sc-848 or Cell Signaling; 4882), anti-phosphorylated IKK α / β (Cell Signaling; 2681), anti-I κ B- α (Cell Signaling; 9242), anti-cIAP1 (Cell Signaling; 4952), anti-cIAP2 (Cell Signaling; 3130), anti-pan cIAPs (R&D Systems; MAB3400). Recombinant human TNF- α , IL-1 β , CD40 ligand CD154 and GST-NIK (aa381-947)는 Invitrogen, R&D Systems, and BPS Bioscience에서 각각 구입하였고, PMA는 Calbiochem. Ubiquitin, K48^{only} and K63^{only} ubiquitin은 BostonBiochem에서 구입하였다. anti-ZFP91 polyclonal antibody는 Sf21 insect cells에서 발현 정제한 full-length ZFP91를 mouse에 immunizing하여 제작하였다.

4. RT-PCR analysis

MDA-MB231 cells에서 total RNA를 RNA Mini kit (Qiagen)로 정제하여 RNA (2 μ g)을 이용하여 RT-PCR kit (Invitrogen) 를 이용하여 reverse transcription-PCR (RT-PCR) 을 수행하였다. 사용한 PCR primers 들은 다음과 같다: SPIN (Spindlin), forward (5'-TACCACATGGTCTCCCAGTTT-3') and reverse (5'-CATTTGCTTCACCAGTGCAT-3'); ECT2 (Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene), forward (5'-AGCTTTGCAACCCTGATAGAG-3') and reverse (5'-CCACAATTTTCCCATGGTCT-3'); EWSR1 (Ewing sarcoma breakpoint region 1), forward (5'-GAGCTGGAGACTGGCAGTGT-3') and reverse (5'-TAGCACCAGGAAGCTGAGGG-3'); MLLT4 (Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4), forward

(5'-CTCAAGCACAGCTGTCACTCA-3') and reverse (5'-CAAGCAAGCAAATCCTTCCT-3'); PTPN11 (Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11), forward (5'-AAAGAATATGGCGTCATGCG-3') and reverse (5'-CGTCTGGTCCGCTAGAGAAT-3'); MAGEA4 (Melanoma antigen family A, 4), forward (5'-AAGGAGCTGGTCACAAAGGC-3') and reverse (5'-ACCCTGACCACATGCTCCA-3'); TNFAIP3 (Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3), forward (5'-GTTTTCTGGTTGTTGTTGGGG-3') and reverse (5'-AATACCAGGGTACCATGGGAT-3'); ZFP91 (Zinc finger protein 91 homolog), Forward (5'-TCAGAGTGTTCAGATTTGCC-3') and reverse (5'-GGGAAACGGCTGAGATAGTTT-3'); GAPDH, forward (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3') and reverse (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3').

5. Northern blot

MDA-MB-231세포에 DMSO와 Kamebakaurin ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 5시간 배양하였다. 차가운 PBS로 3회 세척 후 FastTrack[®] 2.0 kit (Invitrogen)를 이용하여 poly(A)⁺ RNA를 분리하였다. 이중 $2\mu\text{g}$ 의 poly(A)⁺ RNA를 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동하고 nylon membranes (Roche, Mannheim, Germany)에 transfer하였다. 선발된 후보유전자의 발현을 알아보기 위해 PCR 산물을 Wizard[®] PCR Preps DNA Purification Systems (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 정제한 후 probe로 사용하였다. 각 probes는 Rediprime[™] II random prime labelling system (Amersham Biosciences)을 이용하여 [α -³²P]dCTP로 labeling하고 spin column (ProbeQuant[™] G-50 Micro Columns; Amersham Biosciences)을 이용하여 unincorporated ³²P를 제거한 후 이 cDNA를 probe로 하여 membrane과 hybridization을 수행하였다. Hybridization후 membrane을 2X SSC/0.1% SDS로 세척하고 -80°C에서 intensifying screen을 함께 넣어 X-ray film에 노출시켰다.

6. Immunoprecipitation and Immunoblotting.

Cells lysates 는 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitors cocktail)에서 15,000 rpm , 30 min, 4 °C,에서 침전물 제거하고, 1 mg protein of cleared lysates를 immunoprecipitation에 사용하였다.. Cell lysates 4 °C에서 primary antibodies와 rotation하면서 밤새 반응시킨 후에 30 μl protein A/G PLUS-agarose beads (Santa Cruz) 가하여 4도에서 1시간 rotation한 후 beads를 15,000 rpm for 5 min 원심분리러 회수하고 3회 cold lysis buffer로

세척하였다. 단백질은 SDS-PAGE sample buffer에서 가열하여 회수한 후 SDS-PAGE로 분리 한후에 PVDF membrane (Amersham)에 transfer하였다.

7. RNA Interference.

ZFP91 RNA interference 실험은 HEK293 AGS, MKN45, MDA-MB231 cells에서 . ZFP91-specific double-stranded siRNA oligonucleotides (Quiagen Inc.)를 이용하여 수행하였다. siRNA duplexes는 diethyl pyrocarbonate-treated water에 20 μ M 농도로 제조하여 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 를 이용하여 subconfluent cells에 transfection 하고 24~48시간 배양 후 분석하였다.

8. *In Vitro* Ubiquitination Assay.

Autoubiquitination assays 는 1 μ g HA-Ubiquitin, HA-UbK48^{only}, or HA-UbK63^{only} (Boston Biochem), 50 nM E1 (Biomol), 1.0 μ g E2 (Biomol), 100 ng E3 ZFP91, and 5 μ l 10 reaction buffer (500 mM Tris, pH 7.5, 20 mM ATP, 50 mM MgCl₂, 2 mM DTT) 를 포함하는 50 μ l reaction volumes에서 실시하였다. 반응액은 37 °C for 1 h incubation하고 immunoblot analysis를 준비하였다. ZFP91에 의한 *in vitro* NIK ubiquitination 반응은 1 μ g recombinant NIK를 이용하여 동일한 방법으로 수행하였다. 총 반응액은 200 μ l이고, 반응후 50 μ l는 immunoblotting에 이용하고, 150 μ l 는 washing buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, pH 7.4 and protease inhibitors cocktail)로 final volume 1 ml로 희석한 후에 3 μ g anti-NIK antibody 를 가해주고 12 h, 4 °C에서 회전하여 반응시켜서 50 μ l protein A/G Plus-agarose beads (Santa Cruz) 가해주었다. 1시간 더 회전하면서 반응 후에 면역침강물을 buffer로 3회 세척하여 immunoblot 을 수행하였다.

9. Electrophoretic mobility shift assay.

SNU638 cells을 TNF- α (20 ng/ml)로 30분 처리한 후 회수하여 2회 cold phosphate-buffered saline로 세척하고 NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE)를 이용하여 nuclear extracts를 얻었다. A double-stranded oligonucleotide for NF- κ B (Promega) or AP-1 (Promega) 를 p32-ATP로 end-label하여 G-25 spin column (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)으로 정제하였다. Nuclear extracts (10 μ g)을 gel-shift binding buffer (5% glycerol, 1mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, PH 7.5, 50 μ g/ml poly(dI-dC)/poly(dI-dC))에서 ³²P-labeled oligonucleotide와 실온에서 20 min간 반응하였다. DNA-protein complex는 4% native polyacrylamide gels에서 분리하여,

Whatman 3 MM paper에 transfer하고, 건조한 후에 film에 노출하였다. Competitors는 두개의 complementary oligonucleotides를 annealing하여 제작하였다. The sequences of the upper strands of the competitors 다음과 같다: κ B1, 5'-TGCAACGGAAATTCCTTTGA-3' and κ B2, 5'-AAAGTAGGAAAAACCCTCCCA-3'. Binding specificity는 과량의 unlabeled oligonucleotides와 반응하여 조사하였고 Supershift assay는 p65 와 p50 (Santa Cruz)에 대한 항체와 실온에서 20분간 반응한 후 실시하였다.

10. Invasion assays.

Modified Boyden chamber filters의 아래 부분을 chemoattractant로서 6.5 μ g의 fibronectin으로 coating하였고 위 부분에는 matrigel 20 μ g으로 coating하였다. Transwell의 아래 구획에 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640배지를 800 μ l을 넣은 후 각각의 세포 (AGS, AGS-vector, AGS-ZFP91, MCF-7, MCF-7-vector, MCF-7-ZFP91 transfectants)를 10% FBS을 포함하고 있는 RPMI 1640 배지에 5 \times 10⁴cells/ml 정도의 밀도로 transwell의 위 구획에 도포하였다. 24시간 동안 배양한 후 완전히 filters로 침투하지 못한 세포들은 면봉으로 닦아 내고 filters의 아래 부분으로 이동한 세포들은 methanol로 고정 시켰다. 그런 후 세포들은 hematoxylin과 eosin (Sigma)으로 염색시킨 후, filters당 임의적으로 5군데의 microscopic fields (100)을 고른 후 세포의 수를 센다. 데이터는 3번의 독립적인 실험의 평균으로 나타낸 것이다. 통계적인 분석은 t-test를 이용하여 만들었다. P 값이 0.001이하로 매우 유의하다.

11. Colony formation in soft agar.

1% Hard-아가로스과 RPMI1640 무혈청 배지를 1:1로 섞어 0.5% 아가로스가 되도록 하여 6-well plate의 각각의 well마다 2 ml씩 넣어주었다. 그런 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분, 상온에서 10분간 굳혔다. 1% PSG, 20% 혈청이 포함된 RPMI1640배양액에 ZFP91이 안정하게 과발현시켰거나 그렇지 않은 1X10³개의 AGS세포들을 부유시킨 후 0.3% low-melting 아가로스 (GIBCOTM Invitrogen Corporation)를 잘 섞어 4 ml이 되게 하여 Hard-아가로스위에 얹었다. 이를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 4주간 배양한 후 40% 메탄올을 이용하여 0.1% crystal violet을 만들어 염색한 후 1 mm이상의 콜로니수를 측정하였다.

12. Nude mouse 실험

생후 4주된 흉선이 없는 nude 생쥐 (암컷)를 구입하여 1주일 후 실험을 수행하였다. 사람의 위암 세포주인 MKN45 세포에 empty vector 또는 ZFP91을 안정하게 발현시킨 각각의 transfectant 세포들을 trypsin-EDTA를 처리하여 배양접시에서 떼어낸 후 무균한 PBS로 2번 세척하였다. 그런 다음 0.1 ml 당 1×10^7 개의 세포가 포함되도록 무균한 생리 식염수로 부유시킨 후 각각의 transfectant를 6마리의 흉선이 없는 nude 생쥐의 피하에 1×10^7 개씩 주사하였다. 종양의 발생과 크기 측정은 세포를 주입하고 2주후부터 시작하였으며, 종양의 크기는 5일마다 vernier calipers 자를 이용하여 측정하였다. 측정은 3번 수행했다. 종양의 발생과 크기 측정이 끝난 후 쥐의 눈에서 혈청을 얻어서 Quantikine human VEGF kit (R&D)를 이용하여 Sandwich ELISA 방법으로 VEGF양을 정량하였다.

제2절 연구결과

1. 발암관련 유전자 ZFP91의 기능연구

가. Identification of a novel gene, *ZFP91*, as a target of kamebakaurin, which inhibits DNA-binding of the p50 subunit of NF- κ B.

(1) cDNA microarray

ZFP91은 NF- κ B 저해제 kamebakaurin에 의해 조절되는 유전자로 동정하였으며 (A), promoter 영역에 두 개의 kB-binding sequences를 갖고 있는 NF- κ B target 유전자로 (B), 이들 promoter를 이용한 reporter gene assay에서 NF- κ B activator나 signaling molecules에 의해 발현이 조절되며 (C), EMSA 실험을 통하여 이들 kB-binding 부위에 p65/p50와 p50/p50가 결합함을 알았다(D).

NF- κ B 저해제 KA의 세포내 작용인자(effector)를 찾는 연구에서 KA에 의해 발현이 변화하는 유전자를 찾기 위하여 cDNA 마이크로어레이(Eisen MB & Brown PO, Methods Enzymol 303, 179-205, 1999)를 수행하였다. 사람의 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 각각 DMSO와 카메바카우린(kamebakaurin, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 후 5시간 배양하였다. 차가운 PBS로 3회 세척 후 RNeasy Mini kits(Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)를 이용하여 전체 RNA를 분리한 후 (주) GenomicTree에 17K human cDNA 마이크로어레이를 의뢰하였다. 그 결과, 사람의 유방암 세포주인MDA-MB-231 세포에서 발현이 증가한 유

전자 333여 개, 발현이 감소한 유전자 295여 개를 확인하고, 이중 50여 유전자에 대하여 cDNA들이 KA에 의해 발현이 저해된다는 것을 다시 한번 확인하기 위해 하기와 같이 역전사-중합 효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행하였다.

사람의 유방암 세포주인 MDA-MB-231세포에 각각 DMSO와 카메바카우린($10\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 후 5시간 배양하였다. 차가운 PBS로 3회 세척 후 RNeasy Mini kits(Qiagen, Santa Clarita, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였고, 이중 $5\mu\text{g}$ 을 Invitrogen kit Access RT-PCR Kit(Promega, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 cDNA를 만들었다. ZFP91의 특정 primer는 Genebank accession number NM_05023에 보고된 염기서열을 근거로 제작하였고, 후보유전자들의 특정 primer는 이미 알려진 염기서열에 근거하여 제작하였다(표 1). 이렇게 합성된 cDNA를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95°C 에서 5분 동안 초기 변성시킨 후 94°C 에서 1분, 50°C - 60°C 에서 2분, 70°C 에서 1분을 30 cycles로 하여 증폭시켰다. PCR 산물은 1% 아가로즈 젤에 전기영동 후 EtBr 염색을 통해 확인하였다 (도 1).

그 결과 KA를 처리하였을 때 그 발현이 2배 이상 감소한 유전자 8개를(PTPN11, SPIN, ECT2, EWSR1, MLLT4, MAGEA4, TNFAIP3, ZFP91) 선정하여 노던블랏을 실시하였다 (도 2) MDA-MB-231세포에 DMSO와 카메바카우린($10\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하여 5시간 배양하였다. 차가운 PBS로 3회 세척 후 FastTrack 2.0 kit(Invitrogen)를 이용하여 poly(A)⁺ RNA를 분리하였다. 이중 $2\mu\text{g}$ 의 poly(A)⁺ RNA를 1% 아가로즈-포름알데히드 젤에 전기영동하고 나일론 막(Roche, Mannheim, Germany)에 트랜스퍼하였다. 선발된 후보유전자의 발현을 알아보기 위해 PCR 산물을 Wizard PCR PrepsDNA Purification Systems(Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 정제한 후 탐침으로 사용하였다. 각 탐침은 RediprimeTM II random prime labelling system(Amersham Biosciences)을 이용하여 [α -³²P]dCTP로 표지하고 스핀 컬럼(ProbeQuantTM G-50 Micro Columns; Amersham Biosciences)을 이용하여 삽입되지 않은 ³²P를 제거한 후 이 cDNA를 탐침으로 하여 막과 혼성화를 수행하였다. 혼성화후 막을 2X SSC/0.1% SDS로 세척하고 -80°C 에서 강화 스크린(intensifying screen)을 함께 넣어 X-ray 필름에 노출시켰다.

노던 블랏 결과에서 MAGEA4, TNFAIP3, ZFP91에서 큰 발현차이를 확인할 수 있었다(도 2). 그 중 MAGEA4, TNFAIP3에 대해서는 연구가 결과가 많이 보고된 반면 (Gillespie *et al.*, 1999; Hillig *et al.*, 2001) ZFP91은 아직 그 기능이 밝혀지지 않았으며, NF- κ B와의 관련성도 보고된 바가 없어서 본 발명자들은 ZFP91 유전자의 기능 및 기능을 연구하였다.

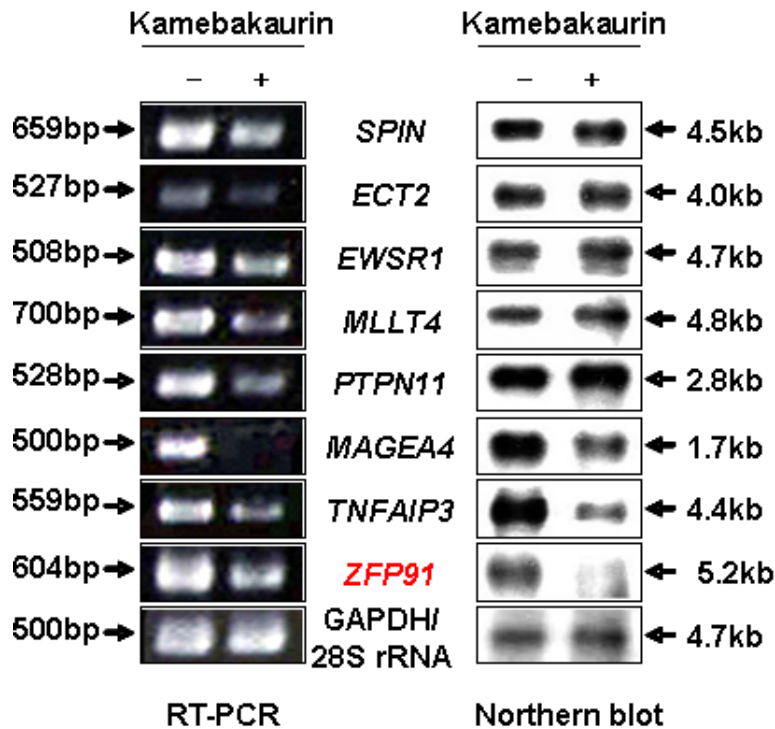


그림 1. NF- κ B 저해제 kamebakaurin에 의해 조절되는 유전자들

(2) ZFP91의 아미노산 서열 및 모티프·프로모터 부위 분석

ZFP91은 570개의 아미노산으로 구성되어 있으며 예상되는 단백질의 크기는 63kDa 정도이다(세포에서는 실제 크기는 91kDa으로 나타남 Unoki *et al.*, Int J Oncol 22, 1217-1223, 2003). ZFP91 유전자에 대한 데이터 분석을 통해 ZFP91은 5개의 징크 핑거 도메인(Zinc finger domain)을 가지고 있으며 한 부분의 코일드 코일(coiled coil), 루신 지퍼 패턴(leucine zipper pattern)을 가지고 있음을 알 수 있었고 5' 상위부위의 -1105, -1664 부위에 2개의 NF- κ B 보존 서열(consensus sequences)을 가지고 있음을 추정할 수 있었다(Ensembl Genome Browser; <http://www.ensembl.org>, MOTIF: Searching Protein and Nucleic Acid Sequence Motifs; <http://motif.genome.ad.jp>). 또한, 4 부분의 핵 국소화 서열(nuclear localization sequences)을 가지고 있을 것이라 여겨지며 핵내에 위치할 확률이 87%로 추정되었다

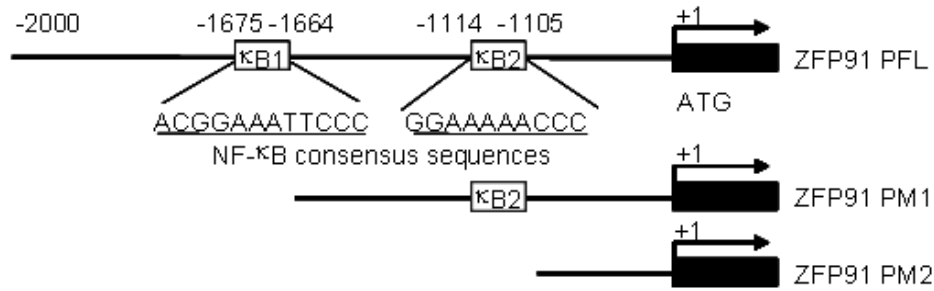


그림 2. ZFP91의 promoter영역의 분석 및 deletion mutants의 조제

(3) ZFP91의 promoter분석 및 발현조절

ZFP91의 발현조절기전을 연구하기 위하여 promoter영역(-3,000)을 cloning하여 분석하여 보았다. 염기서열분석결과 cloning한 promoter에 그림 14)에 보인바와 같이 2개의 NF-κB consensus sequence (κB1:-1675~-1664, κB2: -1114~-1105)를 발견할 수 있었다. 따라서 이 두개의 NF-κB consensus sequence들이 실제로 NF-κB와 관련되어 있는지 자세히 알아보기 위하여 아래의 그림 같이 deletion mutants을 조제하여 pGL3-basic vector에 cloning하여 NF-κB와의 관련성을 reporter assay로 검토하여 보았다.

그림 15)에 보인바와 같이 κB1과 κB2가 포함된 ZFP-pro에서는 NF-κB activator로 알려진 PMA, TNF-α IL-1β 등에 의하여 promoter활성이 유도되는 반면, κB1과 κB2가 제거된 Mut(2)에서는 promoter의 활성이 유도되지 않음을 알 수 있었다. 또한, 그림 15B, 15C, 15D)에 보인바와 같이 RelA, IKKα 또는 IKKβ를 과발현시켜 NF-κB을 활성화시켜 각 mutants 들의 promoter의 활성을 검토한 결과 κB1과 κB2가 포함된 ZFP-pro에서는 RelA, IKKα 또는 IKKβ의 과발현에 의해 promoter의 활성이 유도되는데 비하여 κB1과 κB2가 제거된 Mut(2)에서는 promoter의 활성이 유도되지 않음을 알 수 있어 ZFP91 promoter에서 동정된 κB sites, 특히 κB1이 NF-κB activator에 의해 유도되는 ZFP91의 발현조절에 중요한 역할을 알 수 있었다.

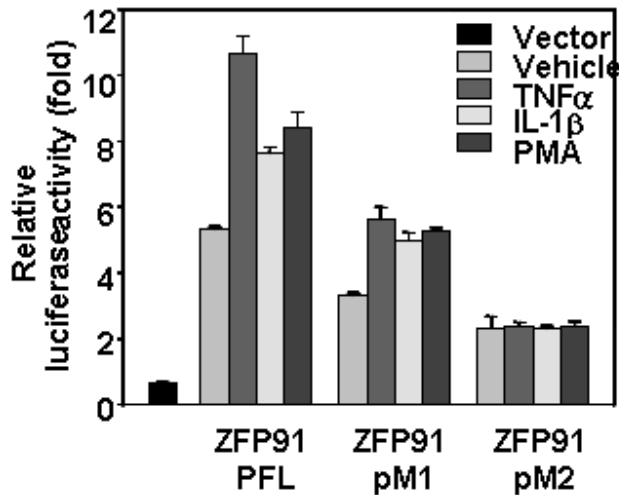


그림 3. ZFP91 promoter mutants의 NF- κ B reporter assay

따라서 상기에서 동정한 두개의 κ B sites, κ B1과 κ B2가 실제로 NF- κ B와 결합하는지 알아보기 위하여 gel shift assay (EMSA)를 통하여 확인하여 보았다. 그림 16)에 보인바와 같이 κ B1 sequence을 합성하고 probe로 사용하고 위암세포주인 SNU-638세포의 핵추출물을 얻어 EMSA을 수행하였다. κ B1의 sequence에 결합한 NF- κ B는 p65/p50과 p50/p50으로 구성되어 있음을 알 수 있었으며, p65 및 p50 항체로 각각 처리하면 supershift band가 관찰되는 동시에 해당되는 band가 소실됨을 알 수 있었다. 또한 competitor로 과량의 κ B1과 Promega사로부터 구입한 NF- κ B oligonucleotide (NF- κ B)을 넣을 경우 NF- κ B의 specific band가 모두 소실되는 것으로 미루어 κ B1이 실제로 NF- κ B와 결합함을 알 수 있어 ZFP91이 NF- κ B에 의해 발현이 조절됨을 알 수 있었다.

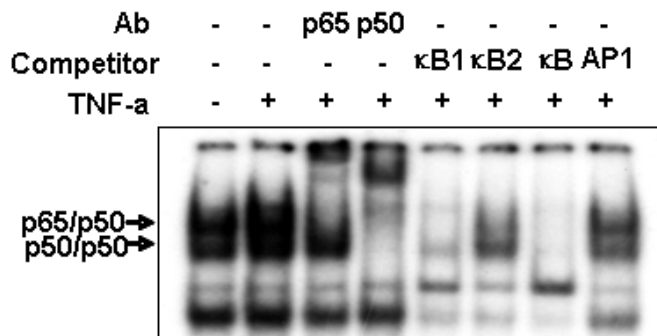


그림 4. EMSA를 통한 ZFP91 promoter내의 κ B site동정

상기에서 서술한 바와 같이 ZFP91유전자가 NF- κ B에 의해 조절되는 유전자이므로 실제로 위암세포주에서 TNF α , IL-1 β , PMA 등과 같은 자극에 의해 단백질의 발현이 유도되는지 Western blot으로 조사하였다. 여기에 사용한 ZFP91항체는 대장균에서 GST-ZFP91을 발현시켜 정제하여 mouse에 주사한 후 얻은 anti-serum을 사용하였다. 그림 16)에 보인바와 같이 ZFP91의 발현은 mRNA 수준에서는 큰 증가는 관찰할 수 없지만 단백질 수준에서는 자극이 가해진 시간에 의존적으로 그 발현이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 MCF-7 세포에 NF- κ B를 활성화시키는 p65, IKK α , IKK β , NIK를 각각 발현시키고 48시간 후 ZFP91의 발현이 증가되었는지를 확인해 본 경우에도 mRNA 수준에서 큰 증가는 없었지만 ZFP91 단백질 발현은 현저히 증가되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 NF- κ B가 활성화됨에 따라 발현이 증가하는 유전자임을 알 수 있었다.

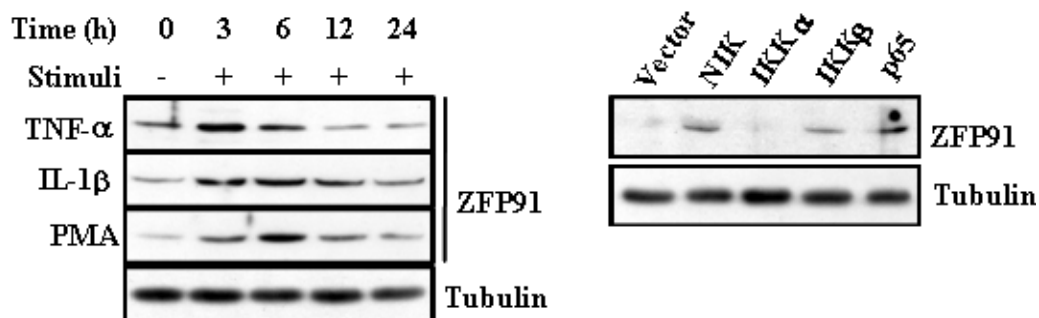


그림 5. ZFP91발현에 대한 NF- κ B activator, TNF, IL-1, PMA의 효과 및 NF- κ B 신호전달 단백질들의 효과

또한, ZFP91이 Hypoxia나 oxidative stress 등과 같은 stress에 의해 발현이 유도되는지 여부를 조사하였다. 우선, pGL3-ZFP91 promoter(-2,000)을 조제한 후 위암세포주에 transfection시킨 후, H₂O₂, DFO, CoCl₂ 등으로 자극한 후 promoter활성을 측정된 결과 그림 17)에 보인바와 같이 hypoxia나 oxidative stress에 의해 promoter활성이 현저히 증가함을 확인할 수 있었고, 또한 promoter의 활성과 비례하여 ZFP91 단백질의 발현양도 현저히 증가됨을 알 수 있어 ZFP91의 발현이 hypoxia나 oxidative stress에 의해 조절됨을 알 수 있었다. 따라서 ZFP91의 발현이 TNF, IL-1, PMA, hypoxia, H₂O₂와 같은 다양한 자극에 발현이 유도됨을 알 수 있어 ZFP91은 stress에 의해 유도되는 단백질임을 알 수 있었다.

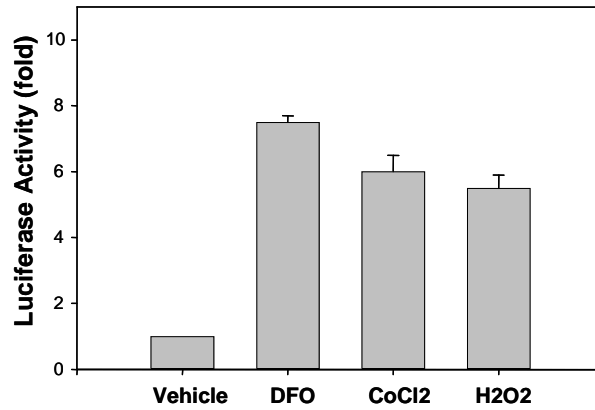


그림 6. ZFP91의 promoter활성이 미치는 DFO, CoCl2, H2O2의 영향

나. ZFP91 Activates Noncanonical NF- κ B Signaling.

ZFP91 은 NF-KB 저해제에 의해 발현이 억제되기 때문에 ZFP 91이 NF-kB activator일 가능성에 대하여 조사하였다. 놀랍게도 NF-kB activating cytokine이나 NF-kB signaling에 참여하는 단백질에 의해 발현이 조절되는 ZFP91단백질이 그 농도 의존적으로 NF-kB를 활성화함을 NF-kB-dependent reporter assay로 확인할 수 있었다.

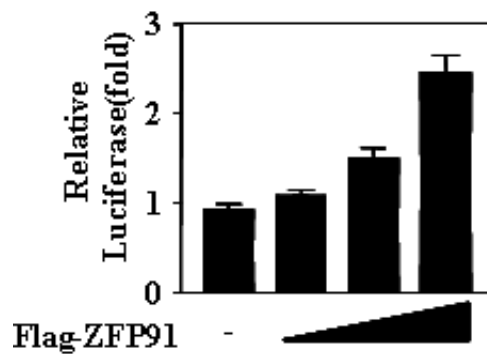


그림7. ZFP91의 농도의존적 NF-kB 활성화 효과

ZFP91의 NF-kB 활성화 기전을 분석하기 위하여 ZFP91이 canonical signaling에 중요한 NF-kB1/p50 나 noncanonical signaling 에 주요한 NF-kB2/p52 의 발현에 영향을 주는지를 조사하였다.

이 실험에서 canonical NF-kB 경로의 NF-kB complex 구성 단백질 p65나 p50에는 영향이 없

고, noncanonical 경로에 중요한 단백질인 p52가 ZFP91 농도 의존적으로 증가되었다.

NF- κ B 활성화 경로는 크게 canonical pathway와 noncanonical pathway)로 나눌 수 있다. 이러한 경로들은 활성화되는 kinase의 종류에 의해 다르게 조절되는 것으로 알려져 있다(Viatour *et al.*, Trends Biochem Sci 1, 43-52, 2005). 이 세 가지 경로 중 가장 많이 알려지고 연구되어 있는 canonical pathway는 TNF- α 나 IL-1 β 와 같은 pro-inflammatory 사이토카인들에 의해 활성화되며, 정통 경로에 의해 활성화되는 가장 대표적인 NF- κ B의 형태는 p65(RelA)/p50이다. 이 경로는 외부자극이 왔을 때 세포내 수용체막에 TNF-receptor-associated death domain protein(TRADD), receptor interacting protein(RIP), TNF-receptor-associated factor2(TRAF2)와 같은 접합 단백질들이(adaptor protein)이 유인 결합되고(Hsu *et al.*, Cell 81, 495-504, 1995), 이어서 IKK 복합체를 활성화시킨다. 특히, 이 신호경로는 IKK β 에 의존적인 것으로 알려져 있다. IKK β 는 또 다른 촉매 소단위체인 IKK α 와 조절 소단위체인 IKK γ (NEMO)와 함께 IKK 복합체를 구성하고 있다. IKK β 는 I κ B의 인산화를 시킴으로서 I κ B의 유비퀴틴화를 유도하고 프로테아좀에 의해 I κ B를 분해시키며 I κ B와 결합되어있던 NF- κ B 이합체는 I κ B에서 유리되어 핵 내로 들어가 특정한 NF- κ B 표적유전자들의 발현을 유도한다.

Lymphotoxin β (Dejardin *et al.*, Immunity 17,525-535, 2002) B-cell activating factor(BAFF)(Claudio *et al.*, Nat Immunol 3, 958-965, 2002) 또는 CD40 ligand (Coope *et al.*, EMBO J 21, 5375-5385, 2002)와 Epstein - Barr virus(Xiao *et al.*, Mol Cell 7, 401-409, 2001), human T-cell leukaemia virus(Elipous *et al.*,Oncogene 22, 7557-7569, 2003; Solan *et al.*,J Biol Chem 277, 1405-1418, 2002; Kayagaki *et al.*, Immunity 17, 515-524, 2002; Hatada *et al.*,J Immunol 171, 761-768, 2003)들에 의해 활성화 되는 대체 경로는 NF- κ B-inducing kinase(NIK/MAP3K14) 와 IKK α 에 의존적이며 p100의 절단되고 RelB/p52 이합체의 형성되어 핵으로의 이동이 특징이라 할 수 있다. 세포에 자극이 가해지면 수용체에 TNF receptor associated factor(TRAF) 단백질과 NIK가 유인결합되어 NIK가 활성화 되고 IKK α 동형이합체가 인산화되며, 이어서 p100이 인산화됨으로써 p100 내의 I κ B 상동억제부위가 분해되어 p52가 생성되게 된다. 생성된 p52는 주로, RelB 단백질과 결합하여 핵으로 이동 한다(Senftleben *et al.*, Science 293, 1495-1499, 2001; Solan *et al.*,J Biol Chem 277, 1405-1418, 2002; Kayagaki *et al.*,Immunity 17, 515-524, 2002 2002; Hatada *et al.*,J Immunol 171, 761-768, 2003). 그리고 이러한 두가지 경로 모두 NF- κ B를 활성화시키기위해 억제 단백질의 인산화가 필수적이다.

따라서 ZFP91이 농도 의존적으로 p100을 p52로 전환시키는 활성은 아마도 noncanonical pathway의 중요한 kinase인 NIK와 IKK α 의 활성화와 관련되어 있음을 시사한다.

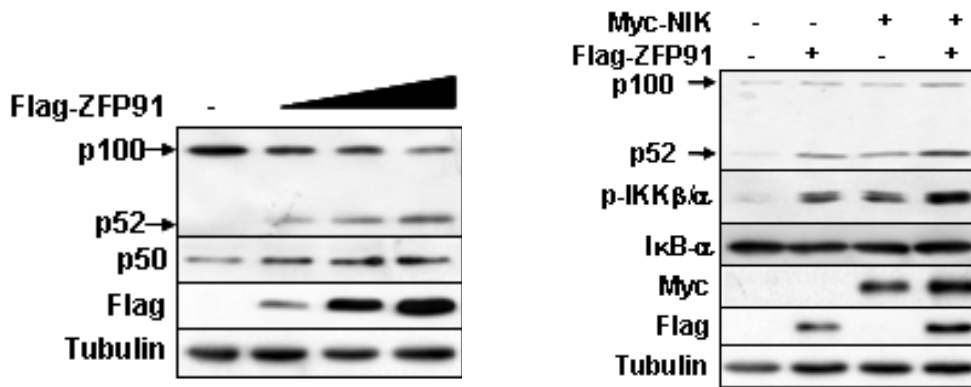


그림8. ZFP91의 noncanonical NF-κB signaling molecules의 활성화

ZFP91의 P100 processing을 증가시키는 효과가 noncanonical 경로의 kinase 들인 NIK-IKK활성화와 관련이 있는지를 조사하였다. NIK는 resting cell에서 proteasome에 의한 분해로 확인하기가 어렵기 때문에 단독으로 또는 ZFP91과 같이 발현한 조건에서 p100 processing을 증가시키고, 또한 IKKα의 인산화도 증가시킴을 알았다. 그러나 canonical signaling을 저해하는 IκBα 발현에는 영향이 없었다.

다. ZFP91 Interacts with NIK: ZFP91-ZnF2 interacts with the Kinase-Domain of NIK and ubiquitin.

ZFP91이 NIK와 관련성을 알았 때문에 이 두 단백질 사이에 상호작용을 조사하였다. ZFP91은 NIK와 과발현 조건에서 상호 interaction하였으며, 또한 endogenous level에서도 interaction함을 MG132 처리한 실험조건에서 확인할 수 있었다.

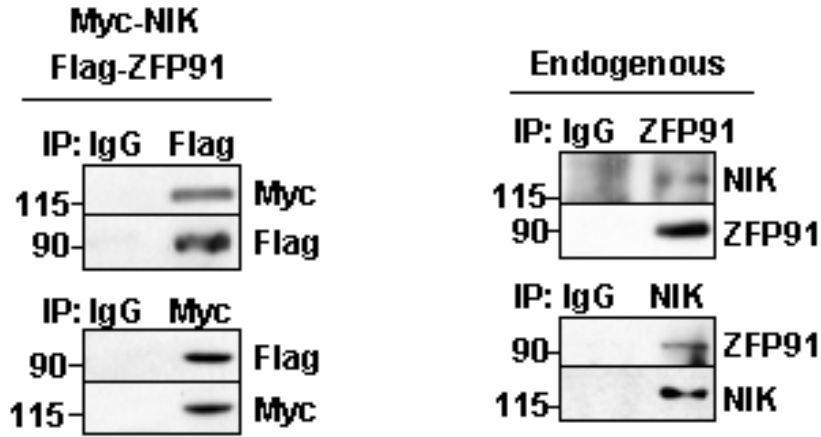


그림9. ZFP91과 NIK의 상호작용

이들 단백질의 interaction 부위를 ZFP91과 NIK의 deletion mutants들을 이용하여 실험한 결과 ZFP91의 zin finger domain 2와 NIK의 kinase domain이 상호작용에 필요한 domain임을 알았다.

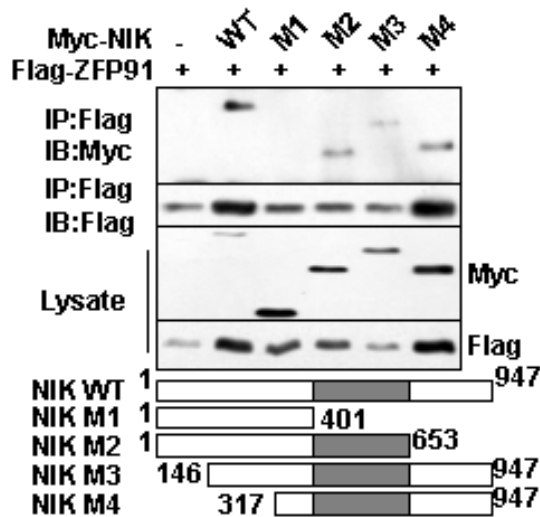


그림 10. NIK의 ZFP91상호작용 부위 분석

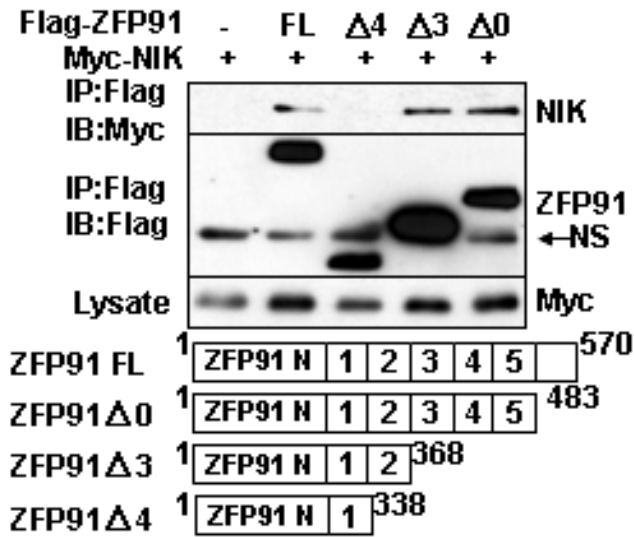


그림11. ZFP91의 NIK와 상호작용 부위 분석

ZFP91과 NIK의 세포내 분포하는 위치를 조사한 결과 두 단백질도 모두 핵에 많이 분포하나 세포질에도 존재함을 알 수 있었다.

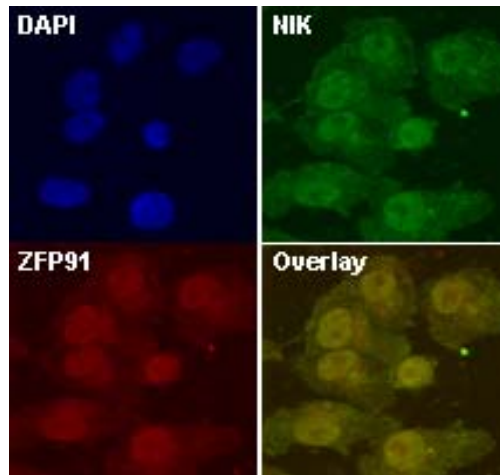


그림 12. ZFP91과 NIK의 localization 분석

라. ZFP91 Stabilizes NIK in an Ubiquitin-Dependent Manner.

NIK는 resting cell에서 mRNA는 안정하게 발현되나 단백질은 proteasome에 의해 분해되어 확인이 어려운 단백질이기 때문에 NIK의 활성화와 안정성에 미치는 유비퀴틴의 발현효과를 조사하였다. ZFP91이나 NIK에 의한 NF- κ B 활성화는 유비퀴틴을 같이 발현하면 더 증가되고 (A), ZFP91과 유비퀴틴을 같이 발현하면 endogenous NIK와 p52 발현이 증가되어 어렵지 않게 immunoblotting으로 확인할 수 있었다.

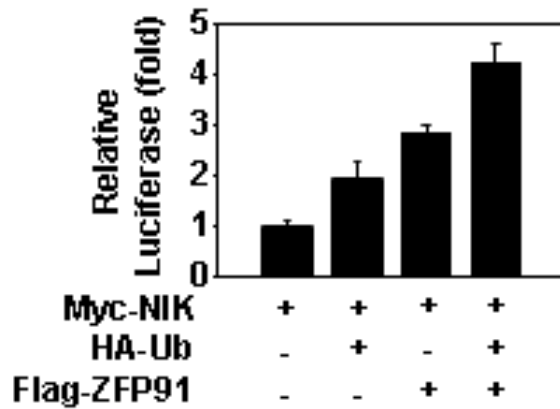


그림 13. ZFP91과 ubiquitin 발현의 NF- κ B 활성화 효과

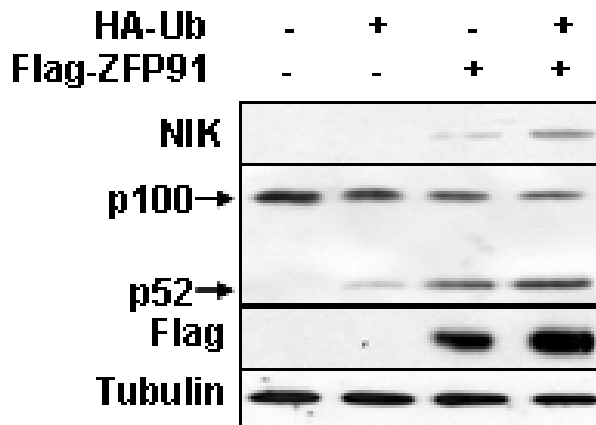


그림 14. ZFP91과 ubiquitin 발현이 NIK 발현과 p100 processing에 미치는 효과

마. ZFP91 Promotes NIK Ubiquitination in a K63-Linked Ubiquitin Chains Dependent Manner In Vivo.

NIK가 ZFP91과 유비퀴틴에 의해 안정화되기 때문에, HEK293 cell에서 NIK는 ZFP91의존적으로 유비퀴틴화되는지를 조사하였는데, ZFP91은 cell에서 NIK를 K63-specific 유비퀴틴화하고 K48-linked ubiquitination은 유도하지 못함을 알았다. 또한 ZFP91에 의한 NIK유비퀴틴 반응은 ZFP91 siRNA를 발현하면 억제되었다.

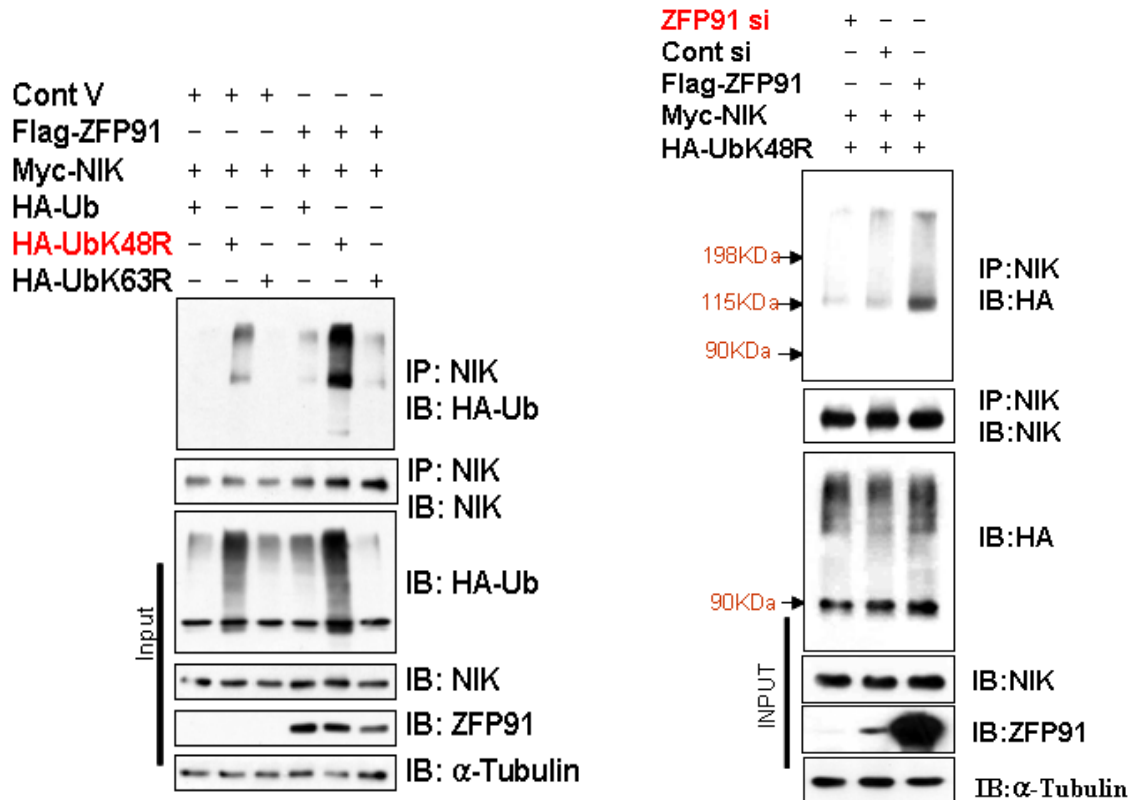


그림 15. ZFP91의 Lys63-specific NIK ubiquitination

ZFP91의 유비퀴틴화 활성 (E3 ligase 활성)이 있는 domain을 알기 위하여 ZFP91 deletion mutants를 제작하여 HEK293 cell에서 분석하였다. 그 결과 NIK의 유비퀴틴화는 NIK를 ZFP91 full length 나 ZFP91-C terminal (aa 242-570) co-expression 하면 일어나지만 ZFP91-N terminal (aa 1-242)과 coexpression하면 일어나지 않았다. 이 결과는 ZFP91의 zinc finger domain들이 NIK의 k63-linked ubiquitination에 중요함을 시사한다.

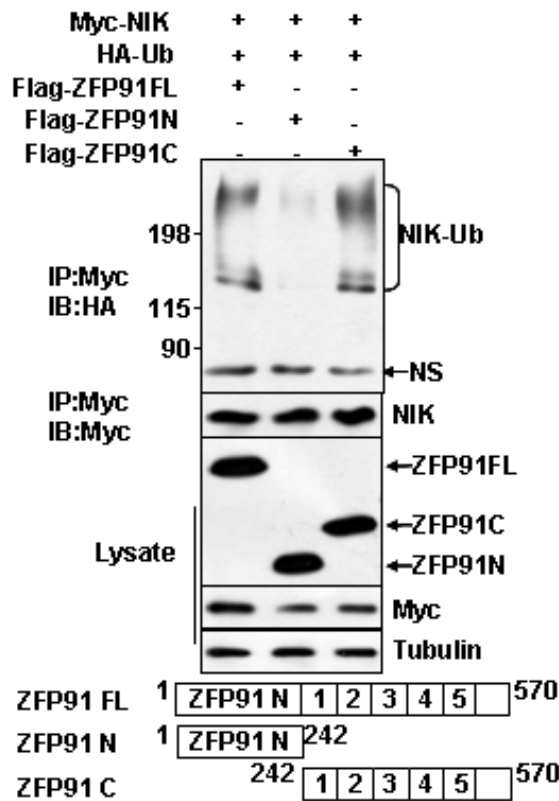
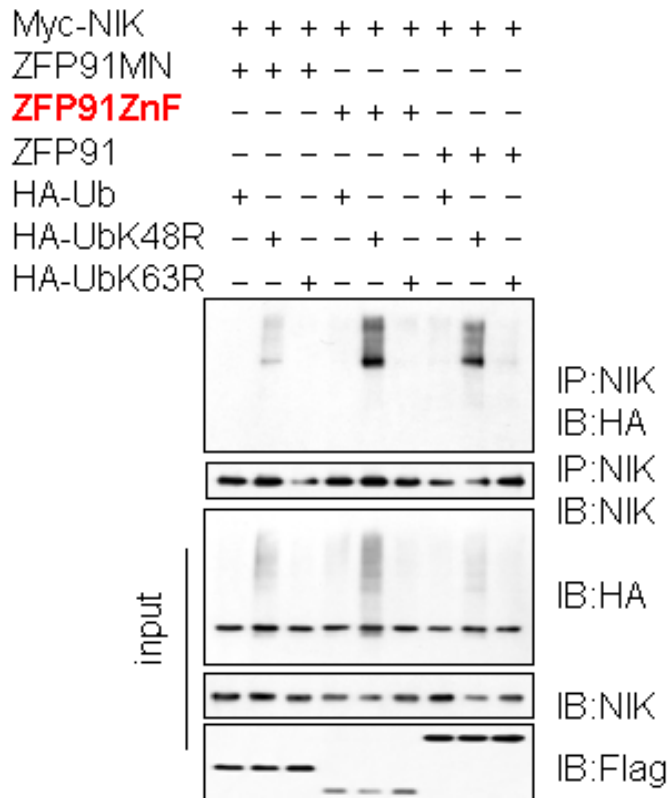


그림 16. ZFP91의 ubiquitin E3 ligase domain 분석

그래서 Zinc finger domain을 순차적으로 deletion 한 mutants 들을 이용한 in cell ubiquitin 반응에서 zinc finger domain 2가 deletion 된 mutants들은 E3 ligase 활성이 소실되었기 때문에 zinc finger domain 2가 ZFP91의 E3 ligase 활성화에 중요함을 알았다.

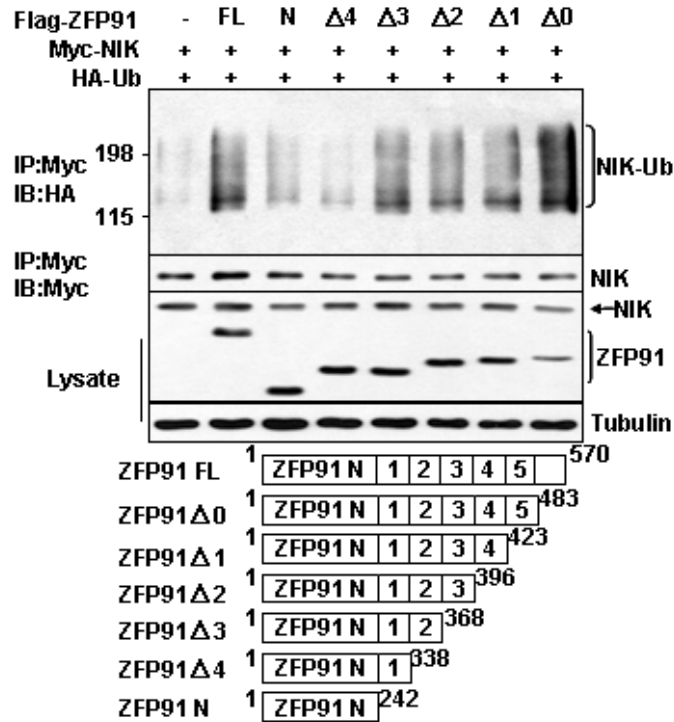


그림 17. ZFP91 E3 ligase 활성화에 미치는 zinc finger domain 분석

다음에 zinc finger domain에 conserved cysteines들을 alanine으로 치환한 point mutants들을 이용한 실험에서 ZnF2 (CC344/349AA) mutant를 NIK와 같이 발현할 경우에는 NIK ubiquitination이 거의 일어나지 않았다. 이상의 결과들로부터 ZFP91은 NIK의 K63-specific 유비퀴틴화 하는 단백질임을 알 수 있었다.

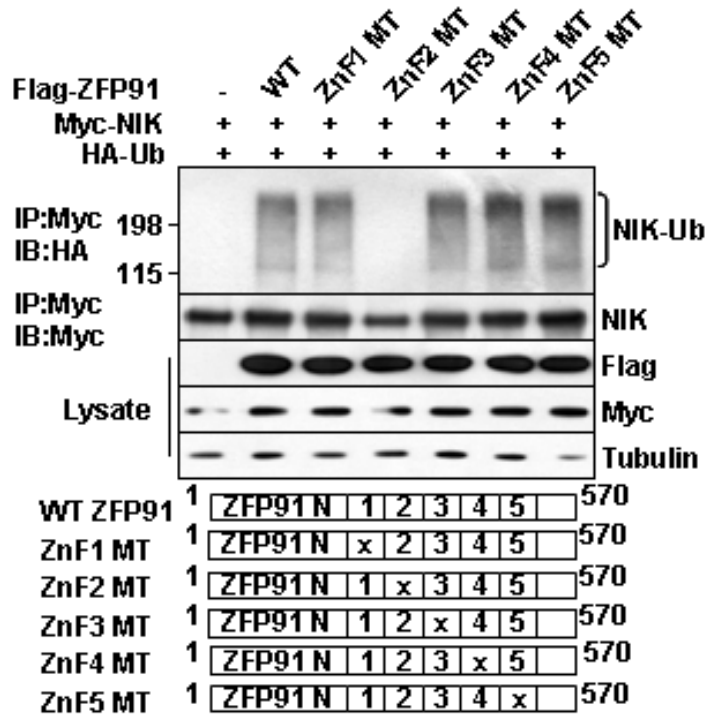


그림 18. ZFP91 E3 ligase 활성화에 미치는 zinc finger domain 분석

최근의 연구보고에 의하면 NIK는 E3 ligase인 cIAP1이나 cIAP2에 의해 constitutive proteasome-mediated degradation된다고 하였고, 이들 cIAP1/2는 TRAF2에 의해 유비퀴틴 의존적으로 활성화 된다.(7,19-21). 따라서 우리는 cIAP1이나 TRAF2가 ZFP91-mediated NIK K63-linked ubiquitination에 영향을 주는지를 조사하였다. 이전 보고된 것처럼 (20,21), TRAF2 과 cIAP1 promoted NIK의 K48-linked ubiquitination을 촉진하였지만 그러나 ZFP91는 K48-only ubiquitin에 의한 NIK K48-linked ubiquitination은 유도하지 못했다 (Fig. 19, lane 4) 또한 cIAP1와 TRAF2 에 의해 유도되는 K48-linked NIK ubiquitination에 영향을 주지 않았다(Fig. 19, lane 3). cIAP1과 TRAF2가 ZFP91에 의한 NIK의 K63-linked ubiquitination 에 영향을 주는지를 조사하였다. (Fig. 19, lane 8), cIAP1 과 TRAF2 는 NIK의 K63-linked ubiquitination을 유도하지 않았으며, (Fig. 19, lane 6) ZFP91-mediated NIK의 K63-linked ubiquitination 에 영향을 주지도 않았다 (Fig. 19, lane 7). 따라서 ZFP91에 의한 NIK의 K63-linked ubiquitination은 cIAP1와 TRAF2와는 독립적인 반응임을 알 수 있었다.

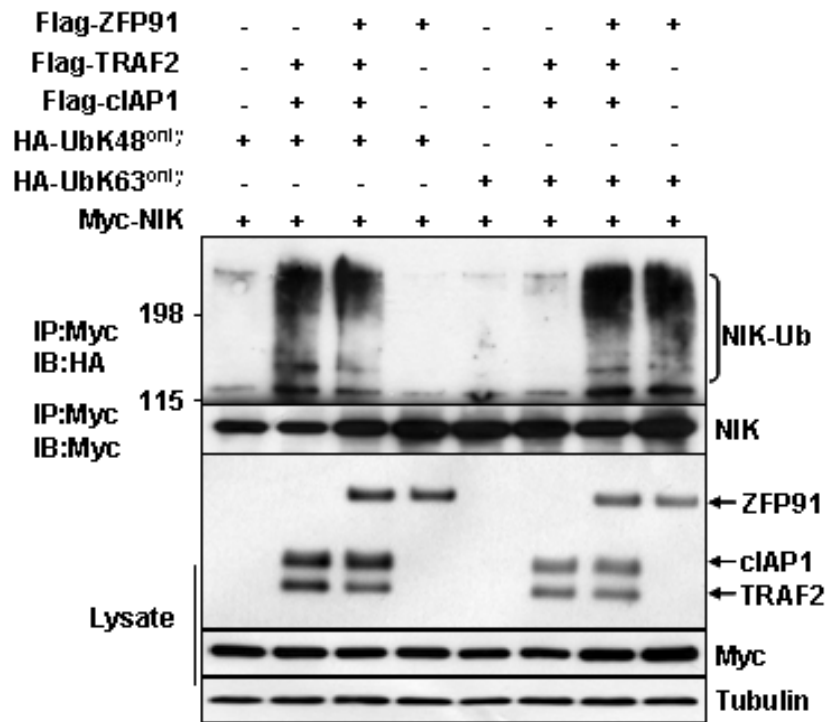


그림 19. ZFP91의 NIK ubiquitination에 미치는 cIAP1과 TRAF2의 효과 분석

바. ZFP91 is an E3 Ligase for NIK Ubiquitination with K63-Linked Ubiquitin Chains.

ZFP91이 *in vivo*에서 NIK의 K63-linked ubiquitination 반응에 E3 ligase일 가능성을 알았기 때문에 *in vitro* 반응에서 이를 확인하려하였다. 먼저 다양한 E2 ubiquitin-conjugating enzyme 중에서 특이적 선택성이 있는지를 곤충세포에서 발현하여 정제한 ZFP91 단백질과 UbcH13을 포함한 10종의 E2 효소에 대한 특이성을 *in vitro* 반응에서 조사한 결과 ZFP91은 UbcH13/Mms2 와 E1 enzyme 그리고 ATP등 반응에 필요한 시약을 첨가했을 때만 E3 ubiquitin ligase들의 특징인 autoubiquitination 반응이 일어남을 알았다.

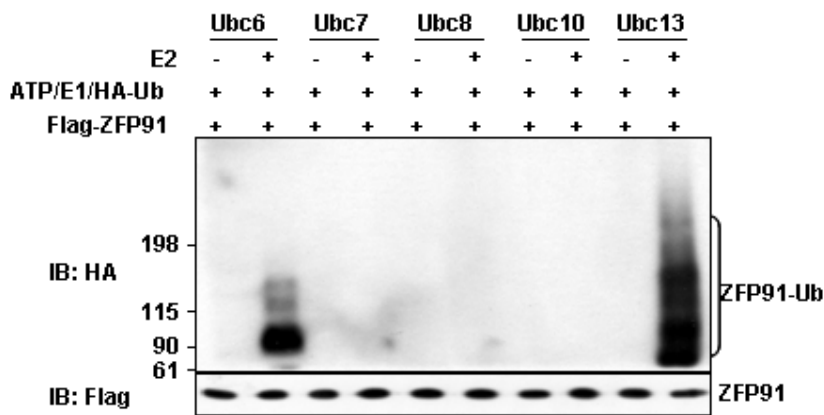


그림 20. ZFP91의 ubiquitination에 필요한 E2 ubiquitin-conjugating enzyme분석

다음에 ZFP91이 K63-linked ubiquitination 반응을 촉매하는지를 UbK48-only ubiquitin과 UbK63-only ubiquitin을 이용하여 실험한 결과 *in vivo* ubiquitination 실험에서와 같이 ZFP91은 UbK63-only ubiquitin만을 선택적으로 이용함을 알 수 있었다.

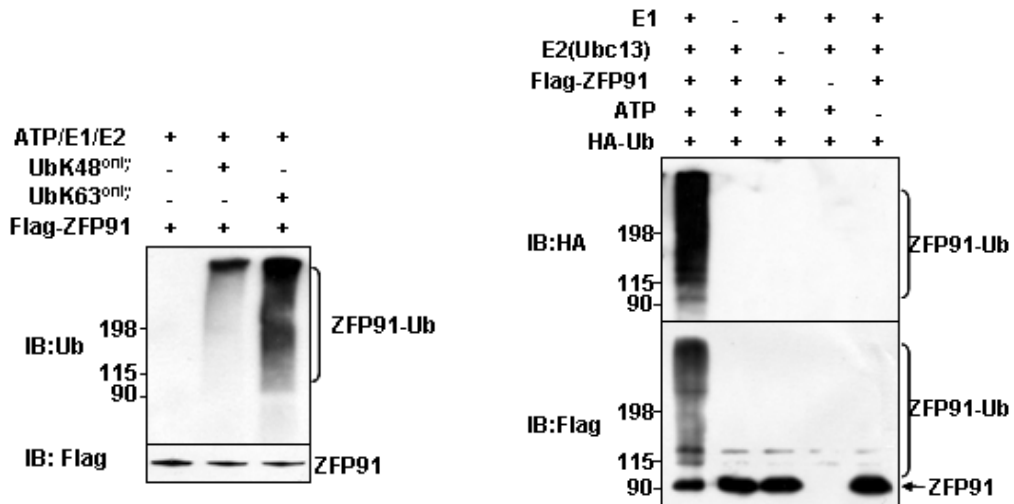


그림 21. ZFP91의 autoubiquitination 활성 분석

다음에, 우리는 ZFP91이 직접적으로 NIK를 K63-only ubiquitin chains으로 ubiquitination하는지를 UbcH13/Mms2 와 모든 반응에 필요한 시약을 가해준 in vitro 반응에서 확인한 결과 NIK는 ZFP91에 의해 K63-only ubiquitin chains으로 ubiquitination됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 ZFP91은 E3 ubiquitin ligase 특징적인 효소활성 domain이 없지만 E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 단백질임을 알 수 있었다.

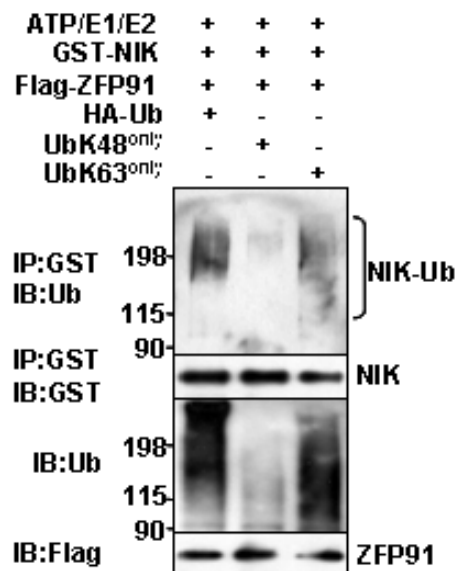


그림 22. ZFP91의 in vitro NIK ubiquitination 분석

사. ZFP91 Is Required for Ubiquitination and Phosphorylation of NIK in CD40

Signaling.

최근의 연구보고에 의하면 NIK는 E3 ligase인 cIAP1이나 cIAP2에 의해 constitutive proteasome-mediated degradation된다고 하였고, TNF α 나 IL-2 같은 canonicalNF-kB signaling 을 활성화하는 분자와는 무관하게, BAFF, CD40, TWEAK같은 noncanonical NF-kB signaling ligand들에 의해 안정화된다고 하였다. 한편 NIK의 mutantKK429/430AA and T559A는 dominant negative 기능을 한다고 보고되었다(16, 17).

ZFP91에 의한 NIK K63-specific 유비퀴틴화가 NIK의 활성화와 관련되는지를 알아 보기위하여 NIK의 wild type과 dominant negative mutant들을 발현하여 in vivo에서 ZFP91에 의한 NIK의 ubiquitination을 비교하였다. 흥미롭게도 NIK dominant negative mutant들을 ZFP91에 의해 ubiquitination 반응이 일어나지 않았다. 놀랍게도 NIK wild type의 유비퀴틴화는 autophosphorylation site인 Thr559 인산화와 p52발현과 직접적으로 관련되어 있지만 NIK의 dominant negative mutant KK429/430AA와 T559A는 Thr559 인산화와 p100의 p52 processing도 일어나지 않았다. 이로서 ZFP91에 의한 NIK ubiquitination은 NIK의 안정화와 동시에 활성화와 관련되어 있음을 알 수 있었다.

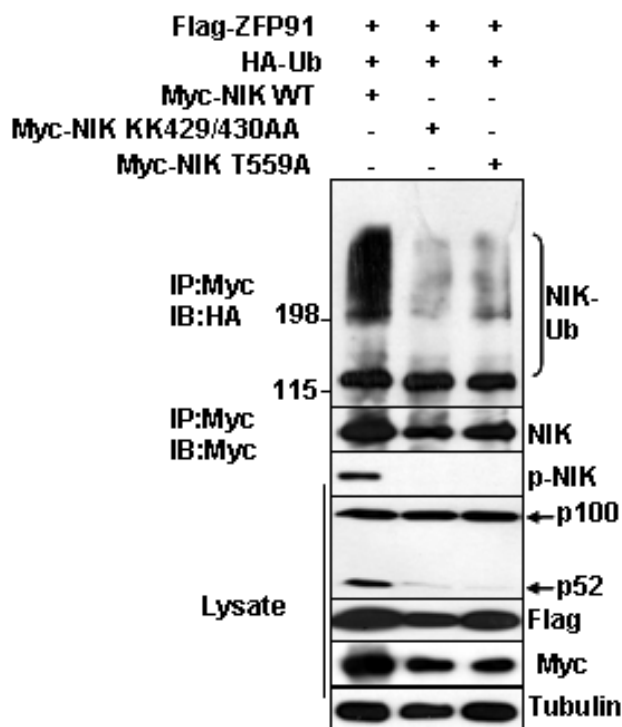


그림 23. NIK ubiquitination 의 NIK의 활성화 관련성 분석

다음에 UbK48-only ubiquitin과 UbK63-only ubiquitin이 in vivo NIK활성화에서 기능적 차이를 분석하였다. 예상한 것 처럼 K63-only 유비퀴틴을 같이 발현할 때만 NIK가 인산화되고 p52도 증가하며, NF-kB도 활성화 됨을 알았다.

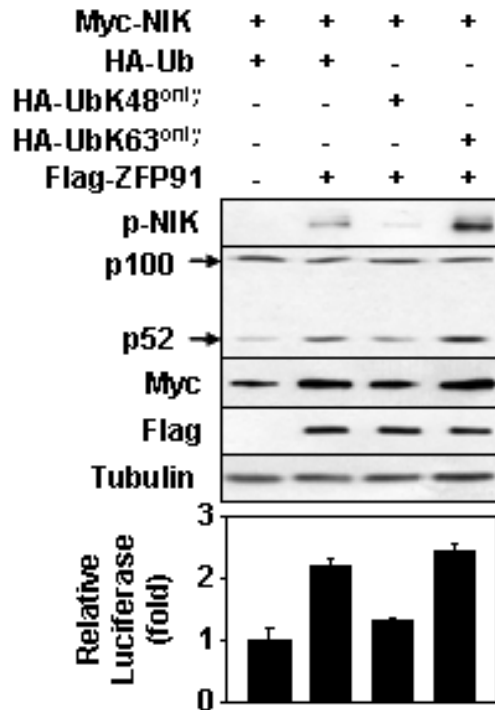


그림 24. NIK Lys63-specific ubiquitination과 NIK 활성화의 영향

NIK는 BAFF, CD40, TWEAK같은 noncanonical NF-kB signaling ligand들에 의해 안정화된다고 하였기 때문에 CD40 ligand에 의해 NIK가 안정화되고 활성화되는지를 조사하였다.

CD40 발현되는 MDA-MB231 cell에 CD154를 처리하니 시간 의존적으로 NIK발현이 증가하였고, 동시에 p100의 p52 로 processing도 증가함을 알았다. 그러나 ZFP91 siRNA로 ZFP91를 knock-down하면 CD40 activation에 의한 noncanonical NF-kB signaling이 억제되었다.

이 결과는 ZFP91이 CD40를 통한 NF-kB 활성화에 중요한 조절 단백질을 맡아주는 것이다.

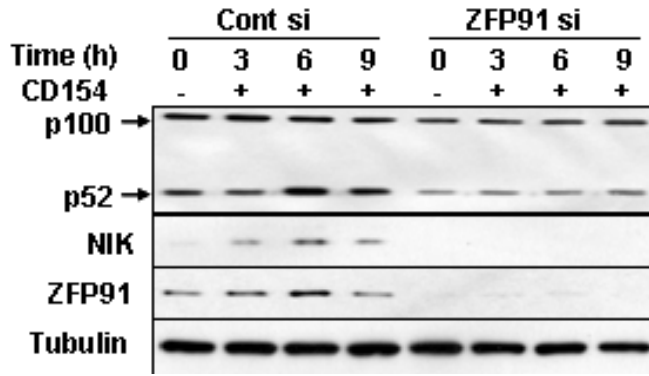


그림 25. CD40 신호경로의 ZFP91의 영향

또한 CD40 활성화는 *in vivo*에서 NIK의 K63-specific ubiquitination과 직접관련 관련되어 있음을 K63-linked ubiquitin-chain-specific antibody를 이용하여 확인할 수 있었다. 이상의 결과들은 CD40를 통한 NF- κ B signaling에서 ZFP91이 NIK의 K63-specific ubiquitination, T559 phosphorylation, 그리고 noncanonical NF- κ B signaling에 중요한 p100 processing에 필수적인 E3 ubiquitin ligase임을 증명하는 것이다.

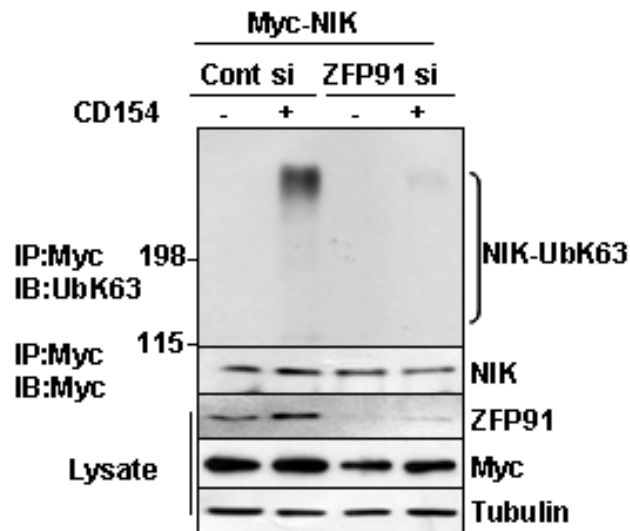


그림 26. CD40 경로에서 NIK ubiquitination에 ZFP91 siRNA 영향

아. ZFP91 Induces cIAP1/2 Degradation.

ZFP91이 NIK를 안정화하고 활성화하기 때문에 NIK의 proteasome-의존적 분해를 유도하는 E3 ubiquitin ligase인 cIAP1/2와 ZFP91의 상호간에 어떠한 조절작용이 있는지를 조사하였다. TWEAK에 의한 cIAP1이 분해된다는 보고가 있기 때문에 (11, 12) ZFP91의 발현이 cIAP1이나 cIAP2의 발현에 영향을 있는지 보았다. 그림에서 보인 것 처럼 cIAP1과 2는 ZFP91의 농도의존적으로 발현이 감소됨을 알았고, 이러한 효과는 proteasome inhibitor인 MG132를 처리하면 억제되었다. 이 결과는 ZFP91이 cIAP1/2의 proteasome 의존적 분해와 관련되어 있음을 의미한다.

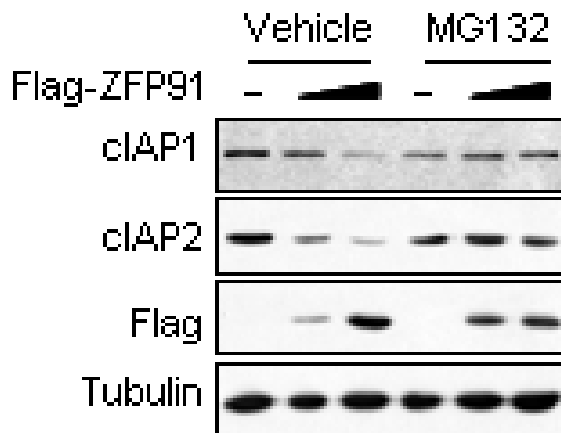


그림 27. cIAP1/2 분해에 대한 ZFP91의 영향

다음에 ZFP91과 cIAP1/2가 상호 interaction하는지를 조사하였다. 그 결과로 두 단백질은 endogenous level에서 상호작용함을 알 수 있었다.

cIAP1/2는 TRAF2에 의해 ubiquitination 의존적으로 활성화되기 때문에 다음에는 TRAF2에 의한 cIAP1/과 2의 ubiquitination에 ZFP91의 효과를 분석하였다. 먼저 cIAP1/2의 ubiquitination은 ZFP91을 같이 발현시키는 조건에서는 강하게 억제됨을 알았다.

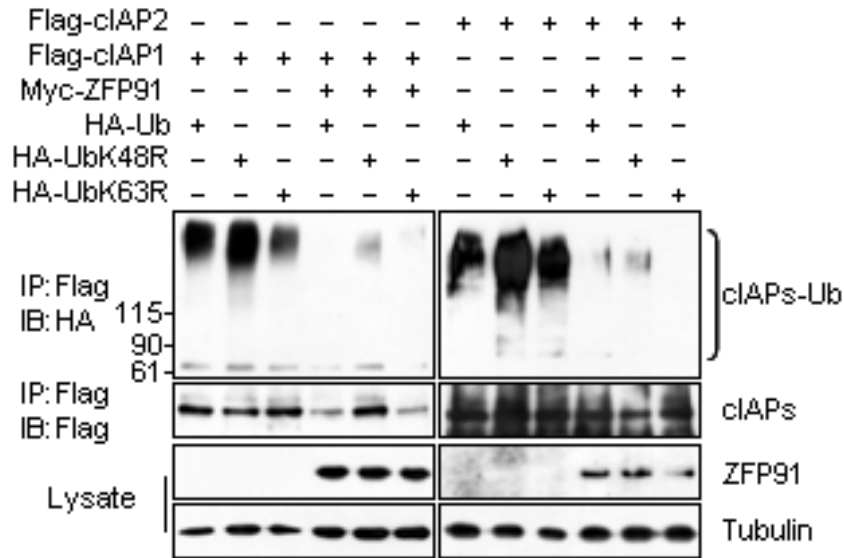


그림 28. cIAPs ubiquitination에 대한 ZFP91의 영향

이러한 ZFP91에 의한 cIAP1/2 ubiquitination 저해효과는 TRAF2를 동시에 발현시킨 조건에서 분석하니 더욱 강하게 나타남을 알 수 있었다.

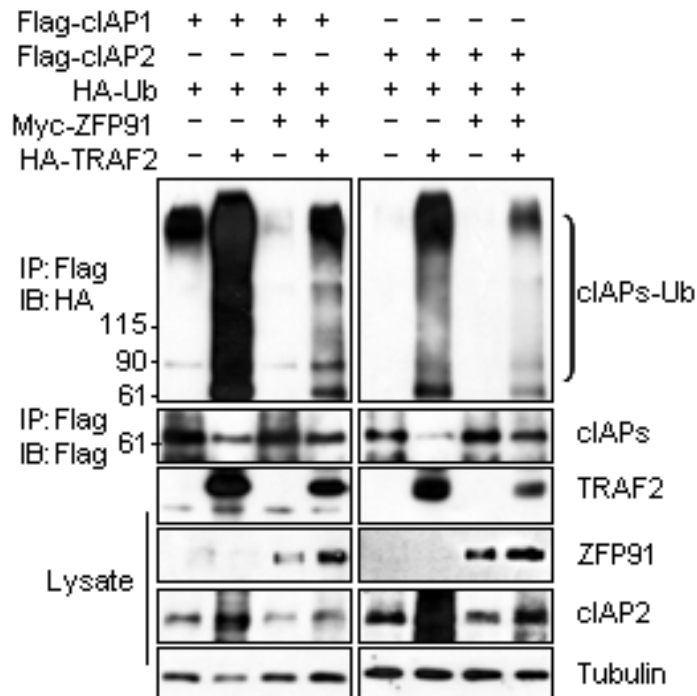


그림 29. TRAF2의 cIAPs ubiquitination에 대한 ZFP91의 영향

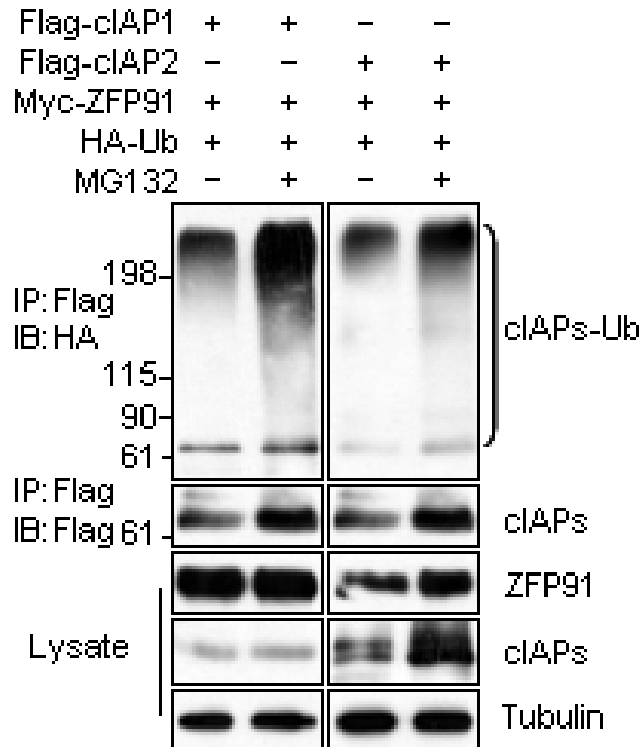


그림 30. cIAPs분해에 대한 ZFP91의 영향

실제로 ZFP91에 의해 유도되는 cIAP1/2의 ubiquitination 의존적 분해반응에 MG132를 처리하면 ubiquitin의 강도가 증가되기 때문에 ZFP91은 cIAP 1/2의 ubiquitination 의존적 분해와 관련됨을 알 수 있었다.

자. ZFP91 Is Required for Cancer Cell Survival.

NF- κ B noncanonical 경로는 활성이 일시적인 canonical 경로와 달리 활성이 장기간 유지되어 암세포의 증식 및 전이에 중요하기 때문에 ZFP91의 암세포 사멸, 증식, 침윤성에 미치는 효과를 실험한 결과 위암이나 유방암세포에 ZFP91을 knockdown하면 암세포가 죽고 (A), ZFP91을 과발현한 암세포는 soft agar에서 colony 형성과 (B), Boyden chamber assay에서 침윤성이 (C) 크게 증가하였으며, ZFP91을 안정하게 발현시킨 암세포의 nude mouse 이식 실험에서 암의 성장이 크게 증가하였다 (D).

(1) 암세포 및 암조직에서의 ZFP91의 발현

ZFP91은 NF- κ B에 의해 발현이 조절되는 유전자로 동정되었고 NF- κ B의 활성을 저해하

면 발현이 저해되고 NF-κB가 활성화되면 발현이 유도되는 기능이 알려지지 않은 유전자이다. 우선 ZFP91이 위암세포주 및 위암조직에서의 발현을 Northern blot으로 조사하여 보았다. 그림 31)에 보인바와 같이 ZFP91의 위암세포주에서 발현은 SNU-5, -216, -620 등의 세포에서 발현되고 있으며, 특히 전이능이 높은 SNU-638

세포주에서 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

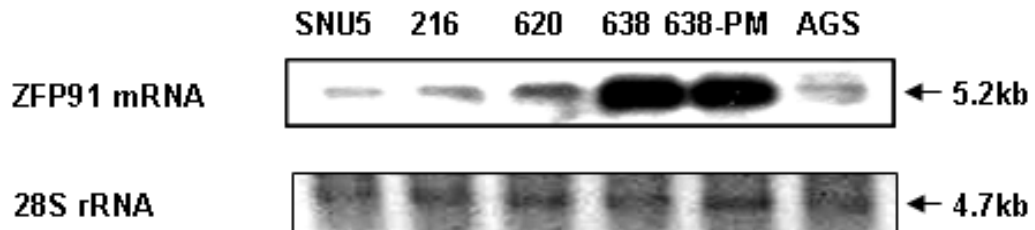


그림 31. 위암세포주에서의 ZFP91 mRNA의 발현

또한 다양한 위암 및 유방암세포주에 ZFP91 단백질 발현을 확인 할 수 있었다.

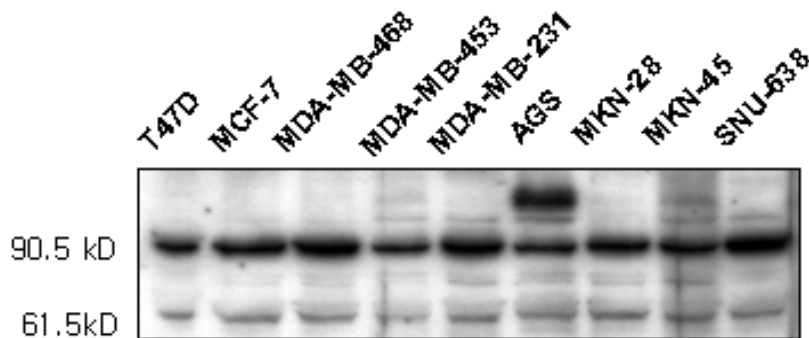


그림32. 위암 유방암세포주에서 ZFP91의 발현

또한 위암조직에서 in situ hybridization으로 ZFP91의 발현을 검토한 결과 그림 33)에 보인 바와 같이 정상조직보다는 poorly differentiated type과 well differentiated type 위암조직 모두에서 ZFP91의 발현이 증가되어 있음을 알 수 있었다.

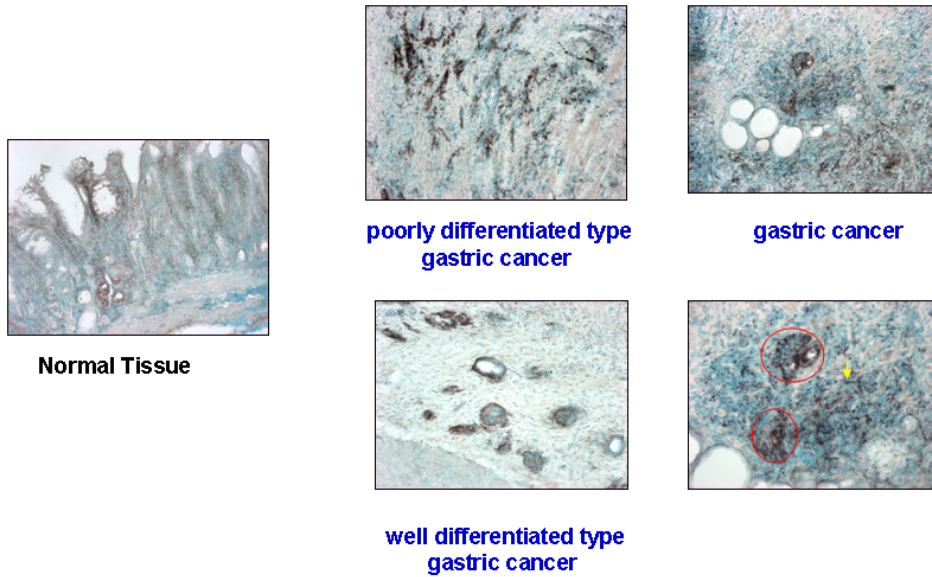


그림 33. 위암조직에서의 ZFP91의 발현

(2) Metastatic phenotype에 ZFP91의 영향

ZFP91의 발현이 위암세포주의 metastatic phenotype에 영향을 주는지 알아보기 위하여 ZFP91의 발현이 낮은 위암세포주 AGS세포에 ZFP91을 안정하게 과발현시킨 세포주를 제작한 후, invasion, migration, adhesion, anoikis, colony형성능 등 다양한 in vitro metastasis assay 실시하였다. 그 결과 그림 34)에 보인바와 같이 ZFP91을 과발현시킨 세포는 대주군의 세포에 비하여 soft agar (0.3%)에서의 colony형성능 및 Matrigel invasion 능이 현저히 증가됨을 알 수 있어 ZFP91이 oncogenic활성을 갖는 유전자임을 알 수 있었다.

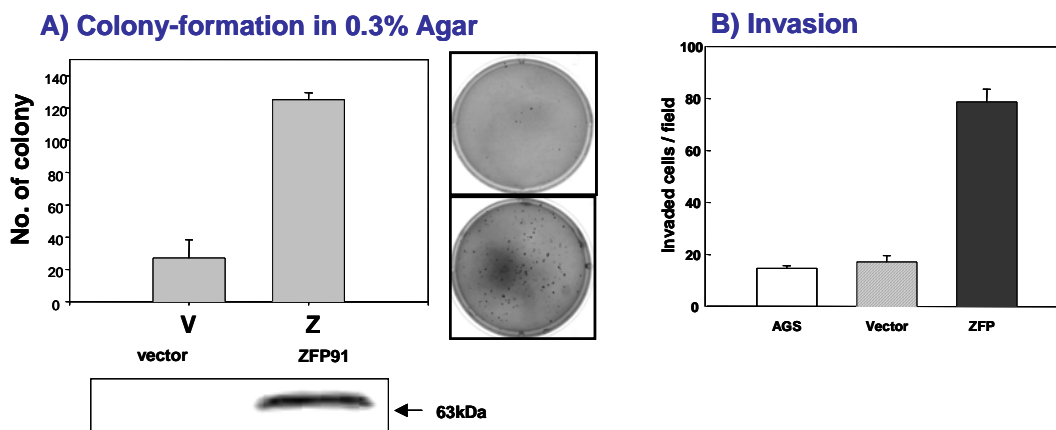
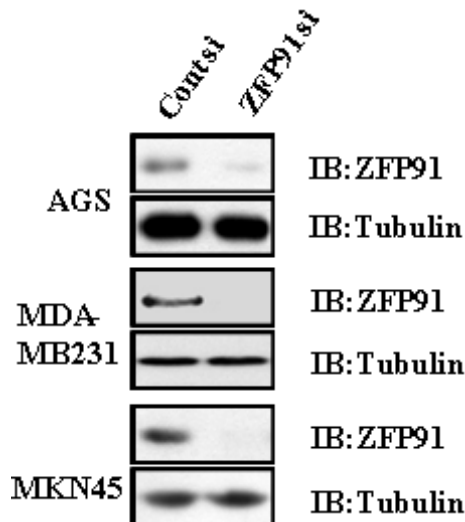


그림34. Invasion 및 colony형성능에 미치는 ZFP91의 효과.

(3) 암세포의 생존에 미치는 ZFP91의 영향

ZFP91 이 위암 및 유방암의 생존에 영향을 주는 지를 알아보기 위하여 ZFP91의 siRNA를 조제하여 위암세포주인 AGS세포와 MKN-45 세포, 유방암세포주 MDA-MB231 세포에 하여 transfection시킨 결과 siRNA에 의해 ZFP91의 발현이 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었다. 이에 일치하게 암세포주들의 현저한 사멸효과가 관찰되어 ZFP91은 암세포의 생존에 중요한 단백질을 알았다.

ZFP91이 세포사멸에 미치는 영향을 검토하기 위해 사람의 유방암 세포주인 MCF-7세포에 ZFP91 siRNA 를 세포에 transfection하고 ZFP91의 발현을 48시간 동안 억제시킨 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 ZFP91의 발현이 세포내에서 억제되었을 때 세포의 사멸이 유도되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 35-B). 또한 사람의 위암세포인 AGS 세포내에 siRNA 발현 48시간 후 현미경을 통해 세포를 관찰했을 때도 세포의 형태가 변하였으며, 대부분의 세포가 떠서 죽어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 35-C). AGS세포에서 ZFP91 siRNA 소중합체에 의해 ZFP91의 발현이 억제되었음을 Western blot을 통해 확인하였다 (Fig. 35-A).



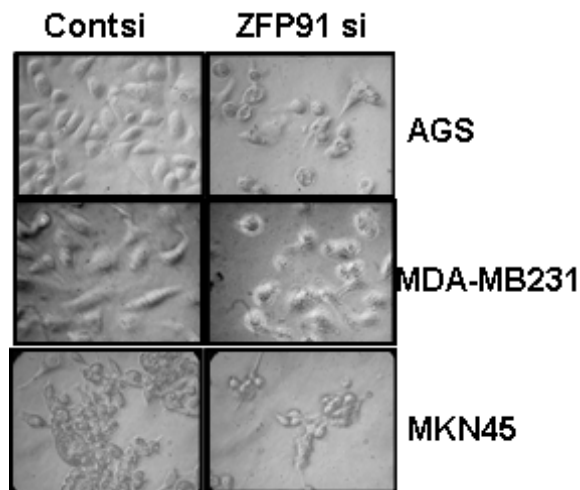
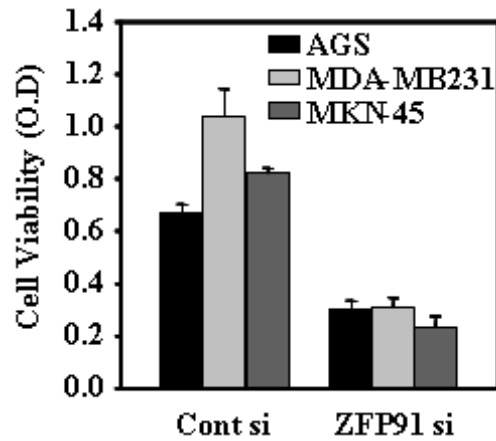


그림 35. 암세포주에서 ZFP91 siRNA의 세포사멸에 대한 영향

(4) Xenograft model에서 위암세포주의 성장에 미치는 ZFP91의 효과

ZFP91이 *in vivo*에서 위암세포주의 tumor growth 영향을 주는지 알아보기 위해 MKN-45세포에 ZFP91 과발현세포주를 만들어 athymic nude mouse에 이식하였다. 아래의 그림 36)에 보인바와 같이 과발현된 세포는 대조군에 비하여 tumor growth가 현저히 증가됨을 알 수 있었고 또한 혈중의 VEGF의 양도 증가되어 있음을 알 수 있었고, ZFP91발현은 NIK, p52 발현을 증가시킴을 확인하였다.

그 결과, ZFP91을 과발현 시키지 않은 MKN45세포를 주입한 6개의 nude 생쥐 중 5마리에서 종양이 형성되었으며 ZFP91이 과발현된 MKN45세포를 주입한 6마리의 생쥐에서는 모두 종양이 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다. ZFP91이 과발현된 세포를 주입한 nude 생쥐의 종양의 크기는 ZFP91이 과발현 되지 않은 세포를 주입한 nude 생쥐와 비

교하였을 때 종양의 크기가 훨씬 컸으며, 종양의 형성속도도 무척 빠른 것을 알 수 있었다 (Fig. 36-A, B). 또한 종양을 형성했던 nude 생쥐의 눈에서 혈청을 얻어 R&D사의 Quantikine VEGF kit를 이용하여 혈청 내 VEGF의 양을 측정하였다. 그 결과 ZFP91이 과발현된 MKN45세포를 주입한 nude 생쥐 내에 VEGF의 양이 대조군과 비교했을 때 훨씬 증가되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 36-C). 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 세포의 사멸을 억제하고 암의 형성 및 증식에 중요한 역할을 하는 oncogenic 단백질을 확인할 수 있었다.

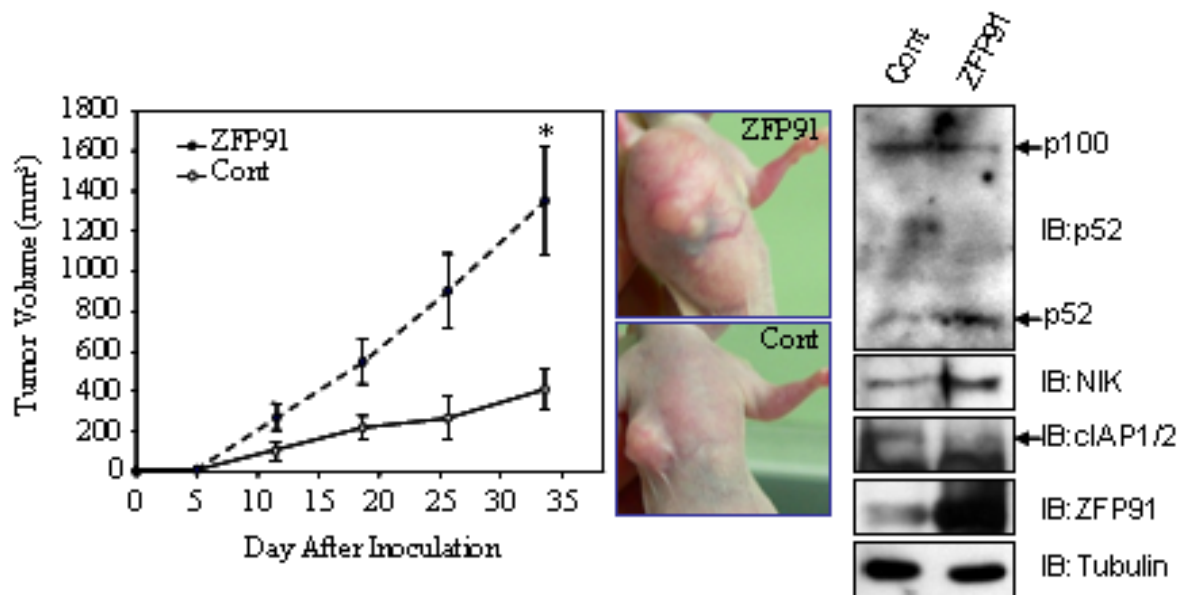


그림 36. Athymic nude mouse에서 MKN-45세포의 성장에 미치는 ZFP91의 효과

2. ZFP91의 HIF (hypoxia inducible factor) 조절활성 검증

가. ZFP91의 과발현에 의한 HIF활성 및 단백질 발현에 대한 효과

ZFP91이 전사인자 HIF (hypoxia inducible factor)의 발현과 안정성을 증가시키는지 알아보기 위해 reporter assay 수행하였다. 위암(AGS), 대장암(HT-29), 간암(Hep3B) 등의 세포주에 pHRE 플라스미드와 ZFP91 발현 플라스미드 pCMV-Tag2B-ZFP로 형질전환하고, 산소농도 (1% O₂와 20% O₂의 산소분압)을 달리하여 HIF-1의 활성을 측정하였다. 그 결과 ZFP91에 의해 HIF-1의 활성이 현저히 증가하였음(그림 38A1, 38A2, 38A3). 또한, AGS세포에 ZFP91의 양에 비례하여 농도 의존적으로 HIF증가하는 것을 알 수 있었고(그림 38B), 세포 추출물을 얻어 HIF-1 α 단백질 발현을 확인한 결과 또한 ZFP91농도 의존적으로 HIF-1 α 단백질의 발현이 증가하였다(그림 38C). 노던 블롯으로 HIF-1 α 의 표적유전자인 VEGF의 mRNA의 발현을 확인한 결과 ZFP91에 의해 VEGF (vascular endothelial growth factor) 발현이 현저히 증가함을 확인하였다(그림 38D).

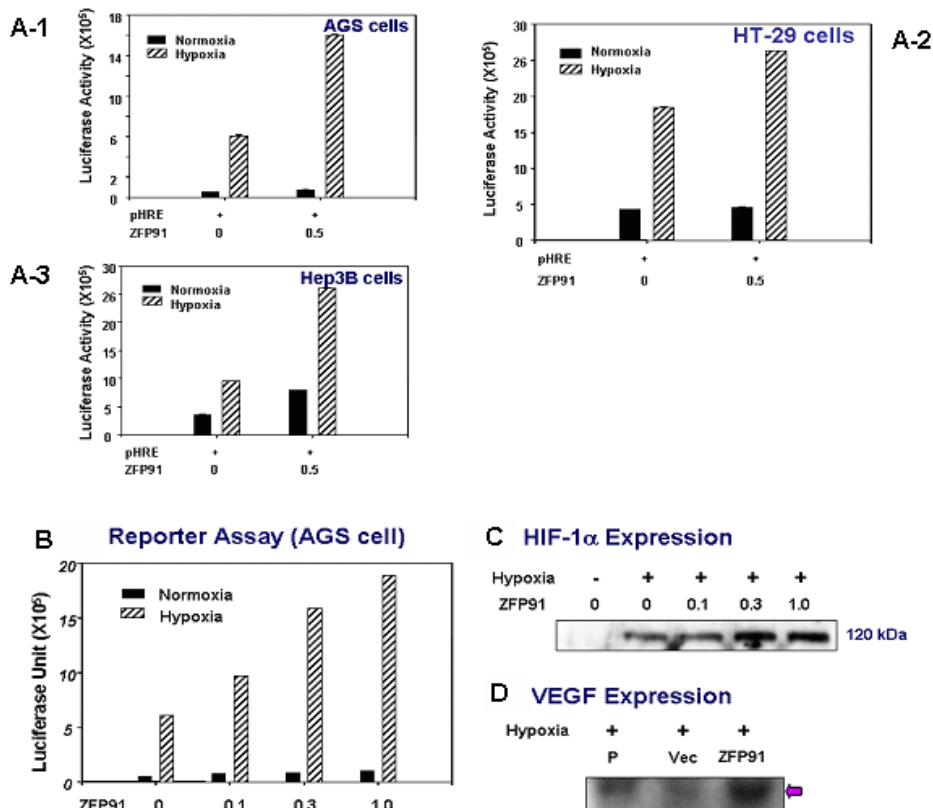


그림 38. HIF의 활성화에 대한 ZFP91의 효과

다. ZFP91 siRNA에 의한 HIF활성 및 단백질 발현에 대한 효과

ZFP91이 HIF-1 α 를 발현과 활성을 증가시키는 효과를 siRNA를 이용하여 ZFP91의 발현을 저해한 후 다시 확인하였다. 위암세포주인 AGS세포와 ZFP91를 안정하게 과발현시킨 AGS-ZFP세포에 각각 ZFP91의 siRNA를 조제하여 도입시킨 결과 HIF 활성(그림 39A, 39B)과 HIF-1 α 의 단백질 발현(그림 39C)이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 ZFP91은 발암단백질인 HIF의 활성 및 발현을 조절함을 알 수 있었다.

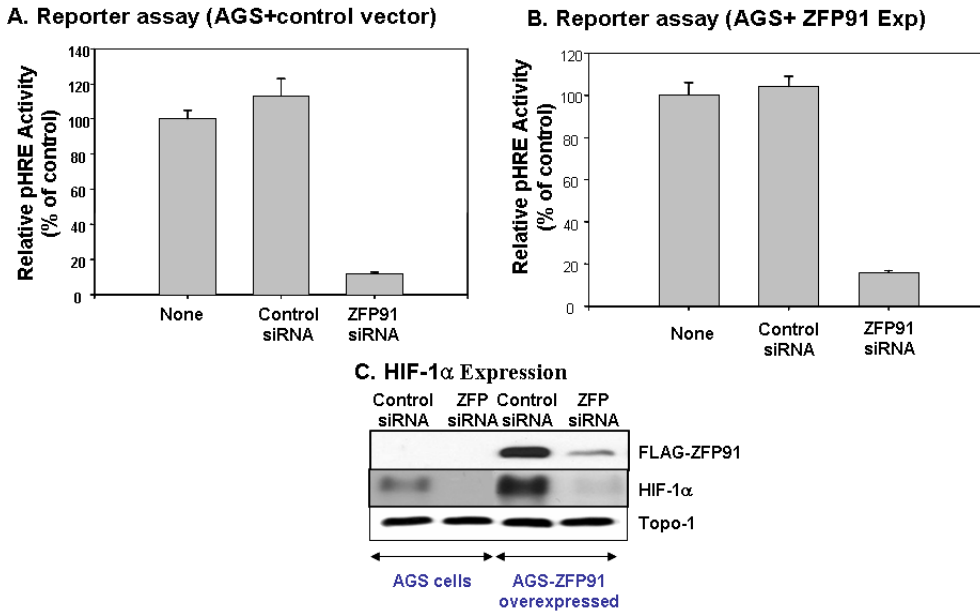


그림 39. ZFP91의 siRNA에 의한 HIF의 저해활성

라. Hypoxia와 프로테아좀 저해 조건에서 ZFP91의 HIF단백질 활성 및 발현에 대한 영향

ZFP91이 안정하게 발현된 세포와 대조세포를 이용하여 hypoxia 시간에 따른, 또는 프로테아좀 저해제 MG-132에 의한 HIF1 α 단백질의 발현을 검토하였다. ZFP91이 과발현된 세포에서 hypoxia (1% O₂) 시간에 비례하여 HIF1 α 단백질의 발현이 현저히 증가하였다(그림 40A). 또한 정상산소조건에서 프로테아좀 저해제인 MG-132의 존재 하에 ZFP91이 과발현된 세포에서 HIF1 α 의 발현이 현저히 증가하였고(그림 40B), ZFP91 siRNA에 의해 hypoxia에 유도되는 HIF1 α 단백질의 발현이 현저히 감소하였다(그림 40C). 따라서 ZFP91은 HIF단백질의 안정성/합성을 증가시켜 HIF단백질의 발현을 유도함을 알 수 있

었다.

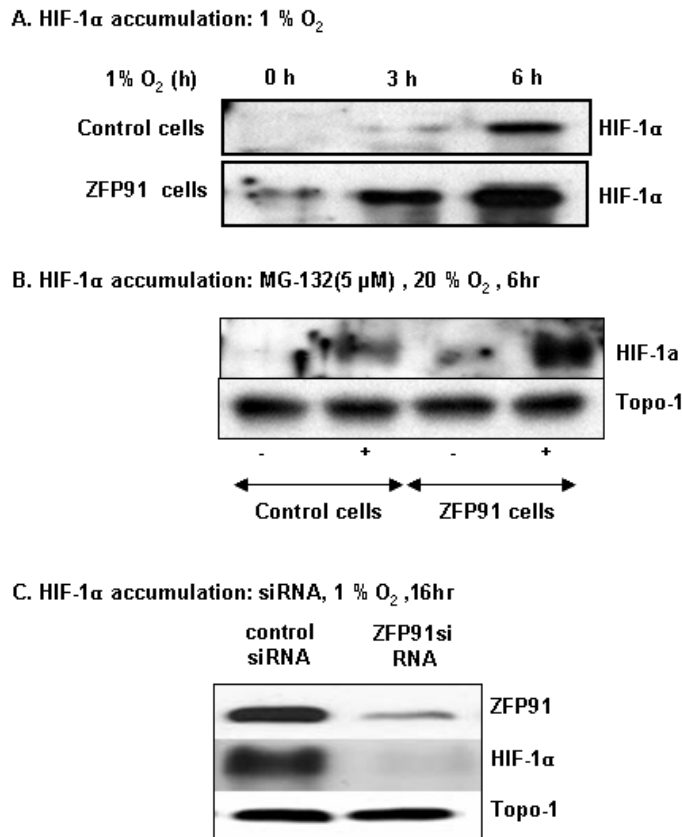


그림 40. Hypoxia에 의해 유도되는 HIF1 α 의 축적에 미치는 ZFP91의 효과

마. ZFP91의 전사인자 HIF 표적유전자의 발현에 대한 영향

ZFP91의 HIF-1 α 표적유전자 발현에 대한 효과를 AGS세포, ZFP91이 과발현된 AGS-ZFP 세포에서 비교하였다. AGS세포와 AGS-ZFP 세포를 정상산소분압 조건과 1% 산소분압 조건에서 각각 배양하고 total RNA를 분리하여, 이중 5 μ g으로 1st strand cDNA를 조제하여 RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) 실험을 수행한 결과 AGS 세포와 비교하여 AGS-ZFP 세포에서 HIF-1 α 단백질 표적유전자인 VEGF, c-MET, EPO (erythropoietin) 등의 mRNA 발현이 정상산소분압 조건과 1%산소분압 조건 모두에서 증가하였다(그림 41A). 이와 반대로 ZFP91의 siRNA에 의해 그 발현을 저해하면 VEGF, c-MET, EPO 발현이 현저히 저해되었다(그림 41B).

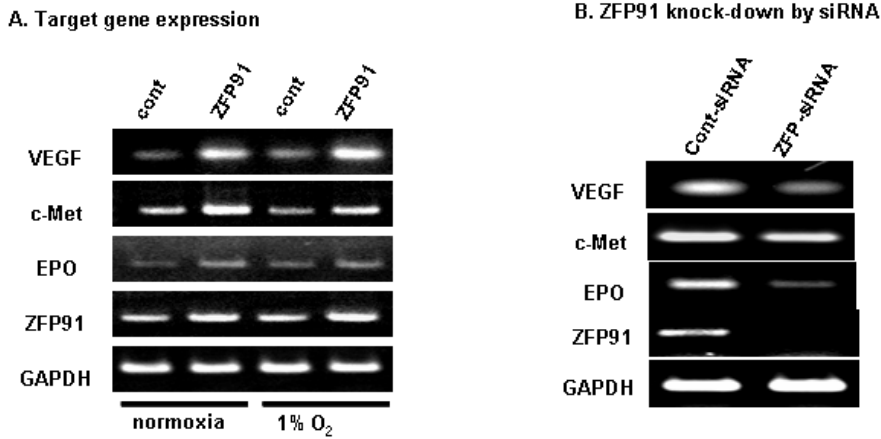


그림 41. HIF 표적유전자발현에 대한 ZFP91의 효과

바. AKT/mTOR pathway에 대한 ZFP91의 영향

ZFP91이 HIF단백질의 합성에 중요한 mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway에 대한 영향을 검토하기 위하여 우선, 위암세포주인 AGS세포와 ZFP91로 형질 전환 된 AGS세포에서 phospho-specific 항체를 이용하여 AKT, mTOR, S6K, 4EBP 등의 활성을 검토하여 보았다(그림 42). 그 결과 ZFP91이 발현된 세포에서는 AKT의 활성이 증가하였고, mTOR 및 mTOR의 기질인 S6K, 4EBP의 인산화가 증가함을 알 수 있었다(그림 42A). 또한 HEK293T세포에 농도별로 ZFP91을 도입하면 농도 의존적으로 mTOR, S6K, 4EBP의 활성이 증가함을 알 수 있었다(그림 42B). ZFP91의 AKT유도 효과를 확인하기 위하여 ZFP91이 과발현된 세포와 대조세포에 insulin like growth factor (IGF)를 처리하여 활성화되는 AKT 양을 측정된 결과 ZFP91이 과발현된 세포에서 AKT의 활성화가 현저히 증가됨을 확인하였다(그림 42C).

또한, ZFP91이 과발현된 세포에서는 7-methyl GTP에 결합된 4EBP (eIF4E binding protein)의 양이 현저히 줄어든 반면, 7-methyl GTP에 결합된 eIF4E의 양이 현저히 증가됨을 확인할 수 있어(그림 42D), ZFP91이 AKT/mTOR pathway을 활성화시켜 4EBP를 인산화시킴으로써 자유로운 eIF4E의 양이 증가하여 HIF단백질의 translation을 증가시킴을 시사하고 있다.

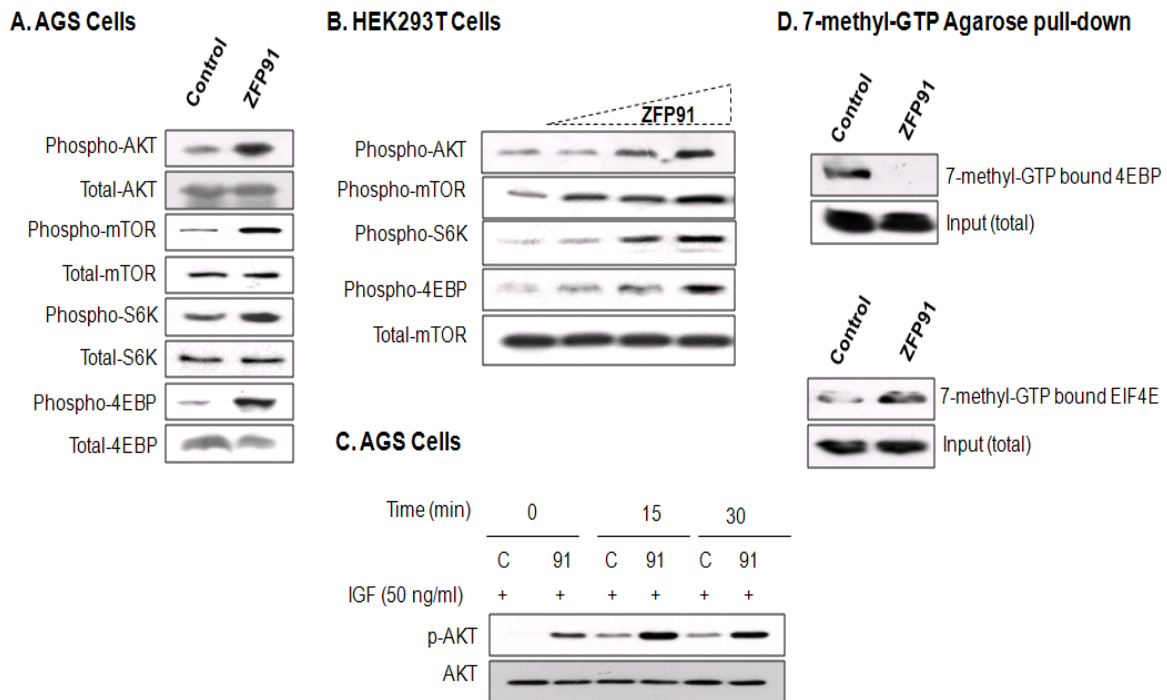


그림42. ZFP91이 AKT/mTOR경로에 미치는 영향

사. ZFP91의 pVHL의 발현에 대한 영향.

ZFP91이 HIF 단백질의 발현을 증가시켰으므로 우선 위암세포주인 AGS세포와 ZFP91이 과발현된 세포를 이용하여 HIF 단백질을 분해시키는 ubiquitin E3 ligase인 pVHL (von Hippel-Lindau protein)의 발현을 웨스턴 브릿 및 형광면역염색으로 검출하여 본 결과, ZFP91이 과발현된 세포에서는 pVHL 단백질발현이 웨스턴 브릿 및 형광면역염색에서 모두 현저히 감소함을 알 수 있었다(그림 43A, 43B). 이를 다시 확인하기 위하여 위암세포주인 AGS 세포주에 ZFP91을 농도별로 도입시키고 pVHL의 발현을 Western으로 검출한 결과 ZFP91 농도의존적으로 pVHL 단백질의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었음(그림 43C). 또한 AGS세포에서 ZFP91을 siRNA로 발현을 저해시키면 pVHL의 발현이 증가와 더불어 HIF단백질의 발현 감소를 확인할 수 있어 ZFP91이 pVHL의 단백질의 발현을 저해함을 시사하고 있다(그림 43D).

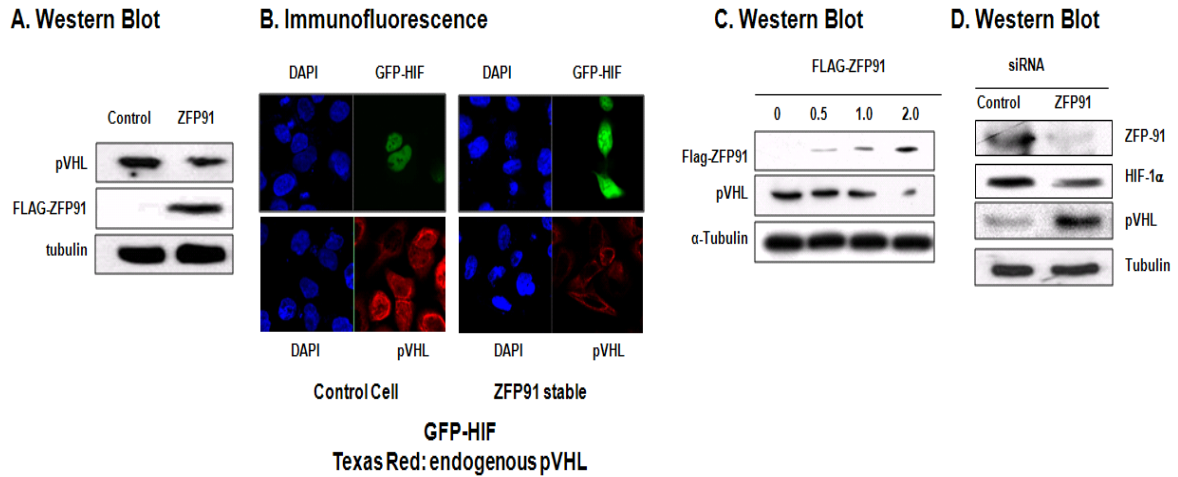


그림 43. VHL 및 HIF발현에 미치는 ZFP91의 효과

아. ZFP91의 암전이 유전자 MDA-9 발현 유도 효과

연구하는 과정 중에 ZFP91의 암전이 유전자로 알려진 MDA9의 발현을 조절하는 결과를 얻었다. 암전이 유전자 MDA9는 위암, 유방암 등에서 암의 악성화 정도에 비례하여 발현이 증가되어 아직 어떠한 기능으로 암세포의 악성화를 촉진하는지 그 기전은 밝혀지지 않았지만 암세포의 이동성 및 침윤능과 anchorage-independent growth를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이전의 연구에서 ZFP91의 과발현에 의한 암세포의 특징적인 표현형의 변화는 암세포의 침윤능의 증가와 anchorage-independent growth를 촉진하는 결과를 보였으므로 ZFP91과 MDA9와의 관련성을 검토하여 보았다 (그림 44). 우선 ZFP91에 의해 MDA9의 발현이 조절되는지 알아보기 위해 ZFP91의 발현이 낮고 MDA9의 발현이 낮은 MCF-7세포에 ZFP91를 농도별로 transfection을 시킬 경우 ZFP91의 발현에 농도 의존적으로 MDA9의 단백질 발현이 현저히 증가됨을 확인하였다(그림 44A). 또한 ZFP91의 발현이 높고 MDA9의 발현이 높은 MDA-MB-231세포에 ZFP91 특이 siRNA를 transfection을 시키면 ZFP91의 발현저해와 동시에 MDA9의 단백질 발현이 현저히 저해됨을 알 수 있었다(그림 44B). ZFP91의 siRNA에 의해 ZFP91의 단백질 및 mRNA의 발현이 모두 저해되는 반면, MDA9의 경우 단백질의 발현은 저해되나 mRNA의 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 확인되어 ZFP91은 MDA9의 발현을 post-transcriptional level에서 조절함을 알 수 있었음(그림 44C). ZFP91의 발현이 높은 MDA-MB-231 및 MDA-MB-435 세포주에서 MDA9의 발현이 높은 동시에 AKT의 S473의 인산화가 현저히 증가되어 있음을 확인하였다(그림 44D).

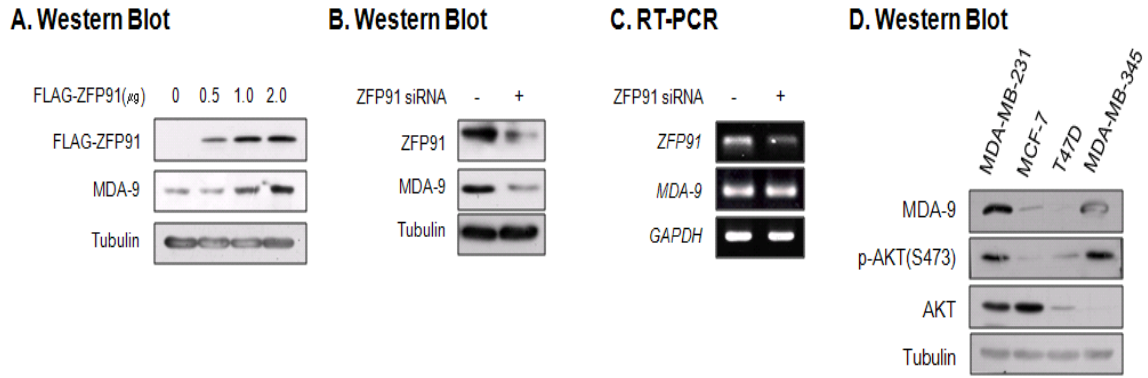


그림 44. ZFP91의 암전이유전자 MDA9의 발현에 대한 영향

자. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 ILK/AKT/mTOR신호전달경로 활성화

상기의 연구결과에서 ZFP91의 표적단백질로 MDA9가 동정되었고 MDA9에 의해 AKT/mTOR pathway를 조절할 가능성을 검토하였음. ZFP91에 의해 AKT/mTOR pathway가 활성화되는 것과 마찬가지로(그림 45A), MDA9의 발현이 낮은 MCF-7세포에 MDA9를 과발현시키면 AKT의 활성화와 더불어 mTOR의 하위신호경로는 S6K, 및 4EBP의 인산화가 현저히 증가됨을 확인하였다(그림 45B). 반대로 MDA9의 발현이 높은 MDA-MB-231세포에서 siRNA로 MDA9의 발현을 저해하면 AKT의 활성화의 저해와 더불어 mTOR의 하위신호경로는 S6K, 및 4EBP의 인산화가 현저히 억제됨을 확인할 수 있었음(그림 45C). MDA9에 의해 AKT의 upstream kinase 중의 하나로 알려진 ILK (integrin-linked kinase)의 활성을 조절하는지 조사하기 위해 MDA9의 발현이 낮은 MCF-7세포에 MDA9를 과발현시킨 후 ILK의 kinase활성을 측정한 결과 ILK의 활성이 현저히 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 45D). 반대로 ZFP91과 MDA9의 발현이 높은 MDA-MB-231세포에 MDA9의 siRNA로 MDA9의 발현을 저해하면 ILK의 활성이 현저히 저해됨을 확인할 수 있어(그림 45E), ZFP91의 MDA9의 발현유도에 의해 AKT의 upstream kinase 중의 하나인 ILK 활성을 증가시켜 AKT의 활성화를 유도할 가능성을 시사하고 있음. 따라서 ZFP91의 mTOR활성화기작에는 ZFP91이 MDA9의 발현을 유도하여 MDA9에 의해 ILK-AKT-mTOR경로를 활성화시킴을 알 수 있었다.

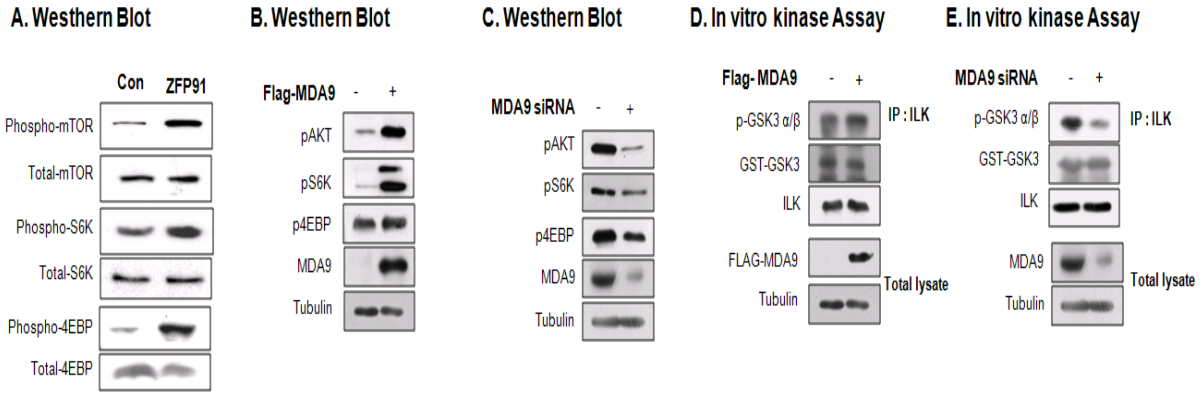


그림 45. ZFP91의 표적유전자 MDA9에 의한 ILK-AKT-mTOR신호전달경로 조절효과

차. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 ILK/Pinch complex형성에 대한 영향

ILK의 kinase의 활성화에는 Pinch와의 결합이 중요한 것으로 알려져 있음. 우선 MDA9과 ILK의 결합을 면역침강으로 확인하였고(그림 46A), MDA9의 발현에 따라 ILK/Pinch/parvin 복합체형성이 증가하는 것면역침강으로 확인하였음 (그림 46B). 따라서 MDA9에 의한 ILK kinase 활성화 증가는 MDA9에 의해 ILK/Pinch complex형성 증가가 중요한 기작임을 알 수 있었다.

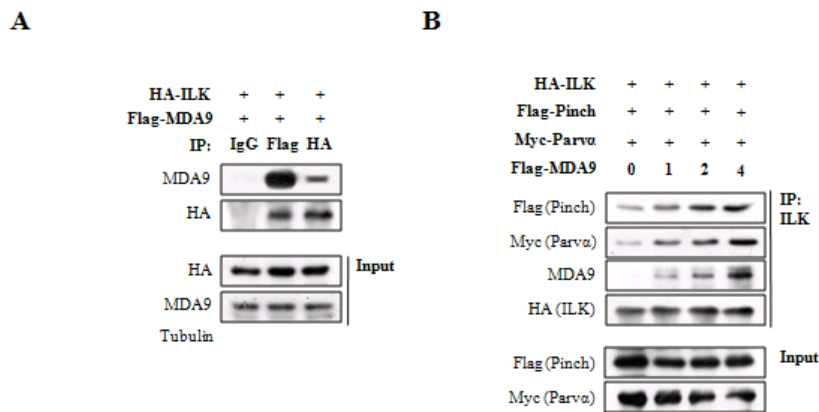


그림 46. ZFP91의 표적유전자 MDA9에 의한 ILK/Pinch 복합체형성 조절효과

카. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 HIF 활성화

ZFP91의 표적유전자인 MDA9에 의해 활성화된 mTOR경로가 HIF단백질의 발현 및 HIF의 표적유전자의 발현을 증가시키는지 검토하였다(그림 47). 그 결과 MCF-7세포에 MDA9를 과발현시키면 HIF1 α 의 단백질의 발현이 현저히 증가됨을 확인하였고 (그림 47A, 47B), 또한 ZFP91의 경우와 마찬가지로 pVHL단백질의 발현감소를 확인하였다(그림 47C). 또한 MDA9의 과발현에 의해 HIF의 표적유전자인 chemokine receptor CXCR4 및 VEGF (vascular endothelial growth factor)의 발현이 현저히 증가함을 확인하였고(그림 47D). 반대로 MDA-MB-231세포에 MDA9의 발현을 siRNA로 저해시키면 HIF의 표적유전자의 CXCR4 및 VEGF의 발현이 현저히 억제됨을 확인할 수 있었다(그림 47E). 따라서, ZFP91에 의한 mTOR-HIF경로의 활성화는 ZFP91이 MDA9의 발현을 단백질수준에서 유도하여 MDA9가 ILK를 활성화시켜, ILK-AKT-mTOR-HIF경로가 활성화될 수 있는 가능성을 확인하였다.

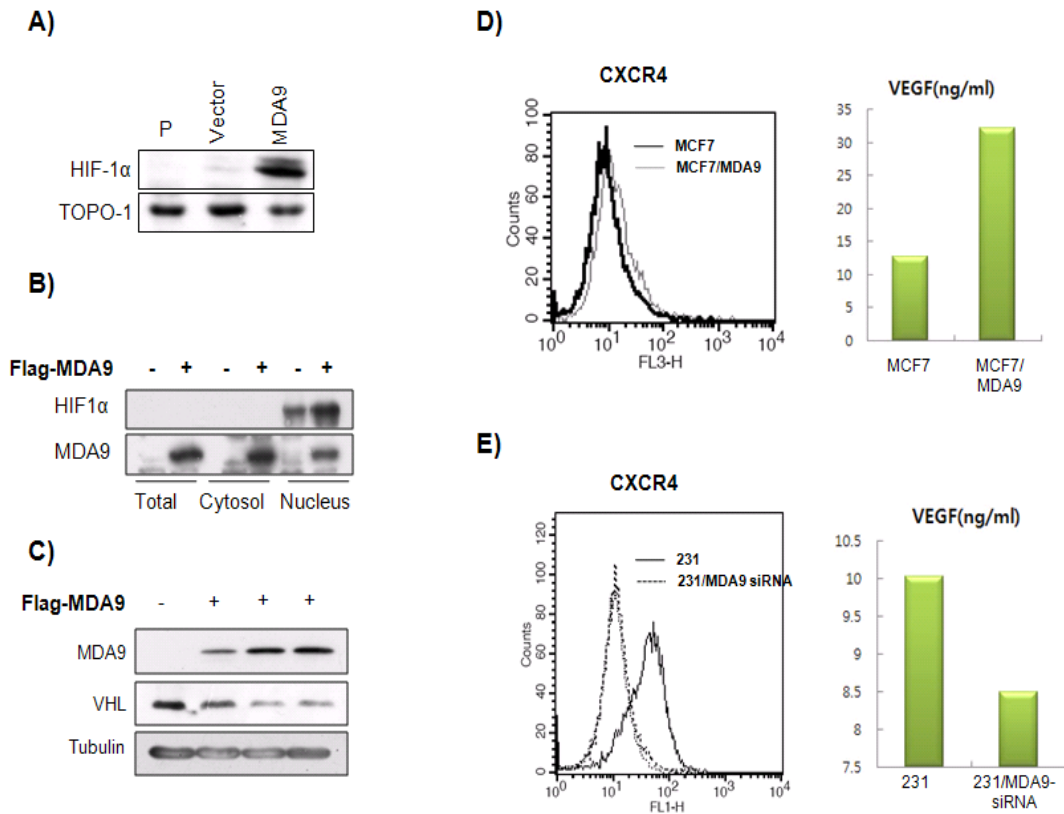


그림 47. ZFP91의 표적유전자 MDA9에 의한 HIF 활성화에 대한 효과

3. ZFP91의 표적단백질암전이유전자 MDA9의 EMT조절활성 분석

가. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 E-cadherin발현 유도 효과

암 세포의 악성화과정에서 EMT (epithelial-mesenchymal transition)는 암세포가 이동성을 획득하여 악성화하는 과정에서 필수적인 현상으로 알려져 있다. 따라서 ZFP91의 표적 유전자인 MDA9이 EMT에 관여하는지 조사하여 보았다. 우선 잘 확립된 폐암세포주인 A549세포에서 TGF β (transforming growth factor-beta)에 유도되는 EMT에 대한 MDA9의 효과를 관찰하였다. A549세포주를 TGF β 로 처리하여 EMT를 유도하고 EMT 과정 중에 MDA9 발현 유도여부를 검토하였다. A549세포를 TGF β 로 EMT를 유도하면 E-cadherin 발현 감소와 더불어 MDA9의 발현이 유도되며(그림 48A), MDA9의 과발현에 의해 E-cadherin promoter 활성 감소와 함께 E-cadherin 단백질 발현이 증가함을 확인하였다(그림 48B). 반대로, siRNA로 MDA9의 발현을 저해하면 E-cadherin promoter 활성 증가와 함께 발현이 증가하고(그림 48C). 또한 MDA9의 발현 변화에 의해 A549폐암세포주의 세포이동성이 조절됨을 알 수 있어(그림 48D), MDA9이 EMT 과정에 관여함을 알 수 있었다..

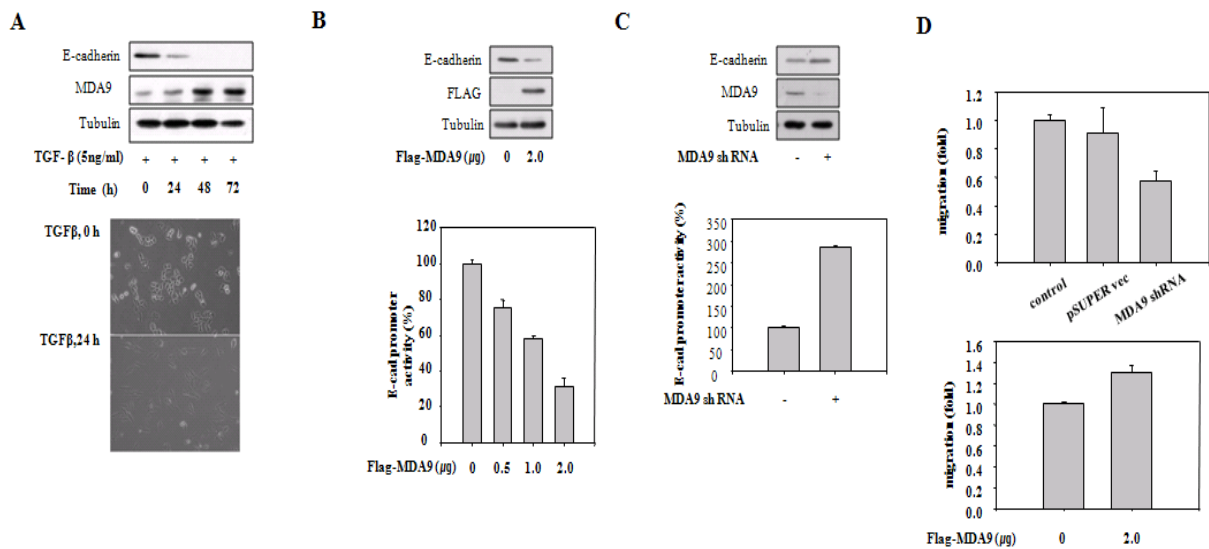


그림 48. E-cadherin발현에 대한 MDA9의 영향

나. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 TGFβ 유도 E-cadherin 발현 저해와 세포이동성 매개효과

siRNA로 MDA9의 발현을 저해하면 TGFβ에 의한 E-cadherin의 발현 감소가 저해되고(그림 49A), TGFβ에 유도되는 EMT (epithelial mesenchymal transition)를 저해함을 알 수 있었다(그림 49B). 또한 MDA9의 발현을 저해하면 TGFβ에 의해 유도되는 E-cadherin promoter의 활성 감소가 억제되며(그림 49C), 또한 TGFβ에 의해 유도되는 세포 이동성 증가가 저해됨을 알 수 있어(그림 49D), MDA9은 TGFβ에 의해 유도되는 EMT에 관여함을 알 수 있었다.

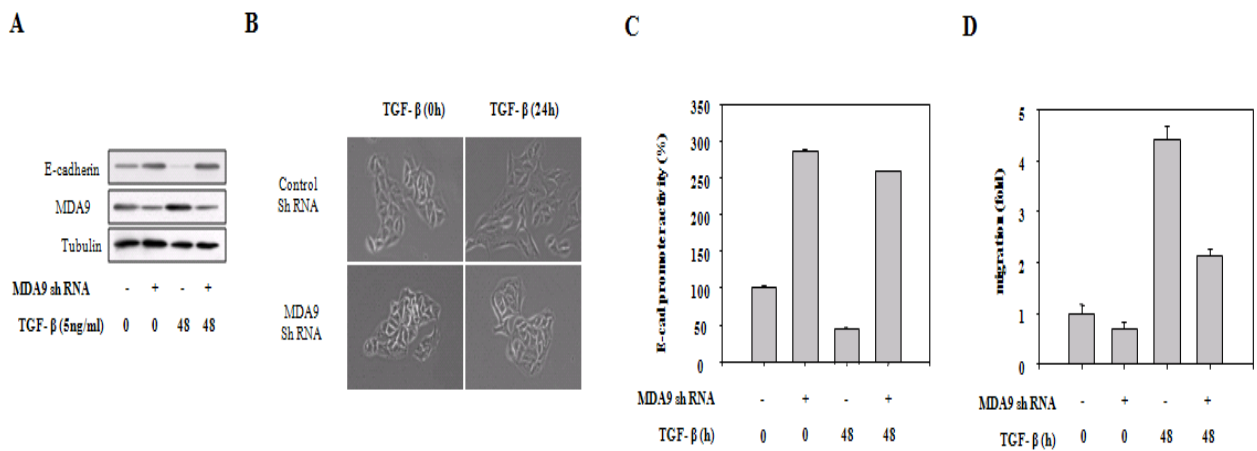


그림 49. TGFβ유도되는 E-cadherin발현과 세포이동성에 대한 MDA9의 영향

다. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 전사억제제 Snail발현 유도 효과

MDA9을 과발현시키면 Snail발현이 증가하고 반대로 siRNA로 그 발현을 저해하면 Snail발현이 저해됨을 확인하였다 (그림 50A, 그림 50C). 또한, MDA9의 발현을 저해하면 TGFβ에 의해 유도되는 Snail발현 증가가 억제됨(그림 50B)을 알 수 있어 MDA9은 폐암 세포주에서 TGFβ에 유도되는 EMT에 관여함을 알 수 있었다.

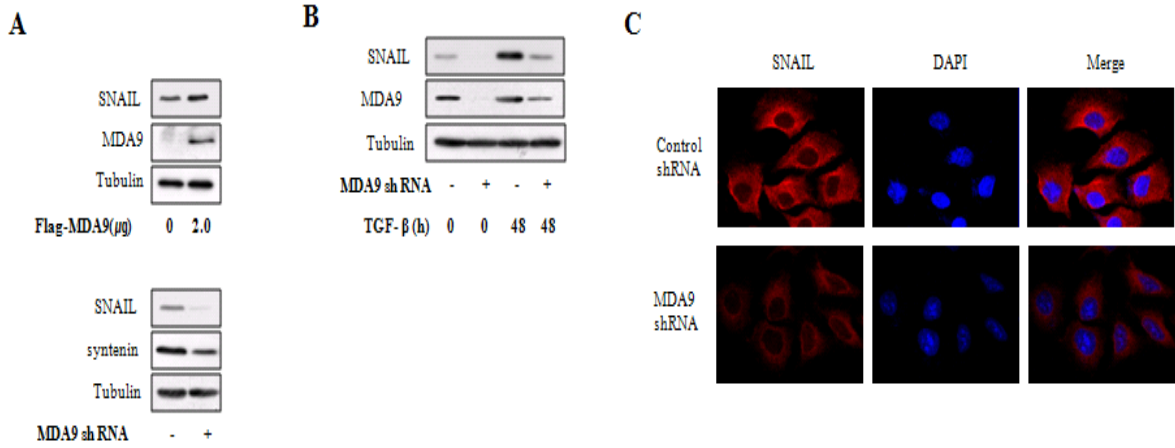


그림 50. Snail발현에 대한 MDA9의 영향

라. ZFP91의 표적단백질 MDA9에 의한 TGF-β유도 AKT활성화를 조절 효과

이전 결과에서 ZFP과 그 표적단백질인 MDA9에 의해 AKT의 활성화를 조절함을 밝히었다. 따라서, MDA9을 과발현시키면 AKT의 인산화가 증가하고(그림 51A), 반대로 siRNA로 MDA9발현을 저해하면 AKT의 인산화가 저해됨(그림 51B). 또한, MDA9의 발현을 저해하면 TGFβ에 유도되는 AKT활성화(그림 51C)와 EGF에 유도되는 AKT활성화가 저해됨(그림 51D)을 알 수 있었다. 따라서 ZFP91 표적단백질인 MDA9는 AKT활성화를 조절하여 암세포의 EMT을 조절할 가능성을 시사하고 있다.

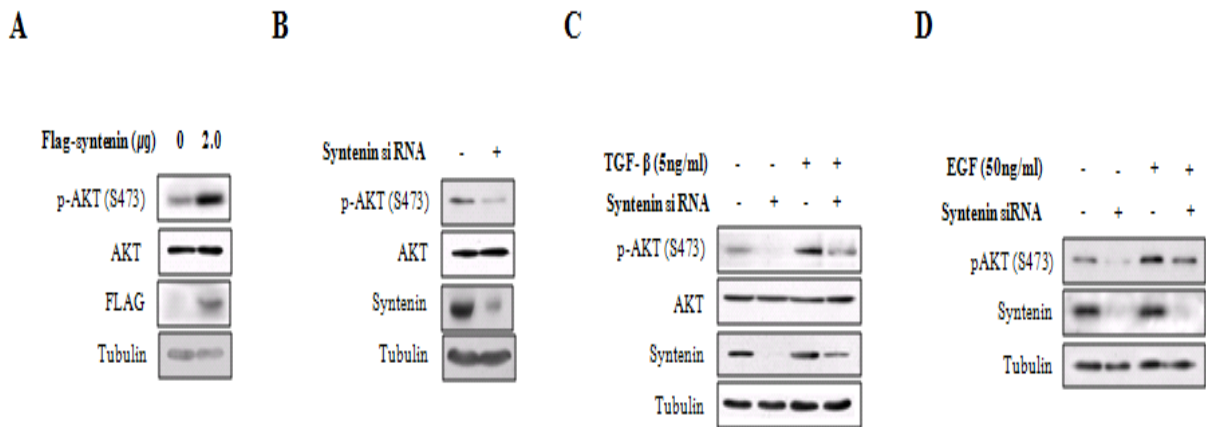


그림 51. AKT활성화에 대한 MDA9의 영향

마. 결과 요약

본 과제의 결과를 요약하면(그림 52) ZFP91은 암전이유전자인 MDA9의 단백질 발현을 유도하여 ILK (integrin-linked kinase)를 활성화시킨 후 ILK의 하위 신호전달 단백질인 AKT를 활성화시킴으로서 AKT-mTOR-S6K/4EBP경로에 의해 HIF단백질의 발현을 유도하여 HIF 표적 유전자인 CXCR4, VEGF 등의 발현을 유도함을 알았다. 다른 한편으로는 활성화된 AKT는 전자억제제인 Snail을 활성화시켜 종양억제유전자인 E-cadherin의 발현을 억제하고 MDA9은 TGFβ에 의해 유도되어 TGFβ에 의한 EMT을 조절함을 알 수 있었다. 따라서 ZFP91은 ILK의 활성화를 조절하여 AKT 신호전달경로를 활성화시킴으로써 암 전이를 유도하는 VEGF, CXCR4 등과 같은 암 전이유도 단백질들의 발현을 유도하고 E-cadherin과 같은 암 억제유전자의 발현을 저해하여 암세포의 악성화를 유도하는 기능을 수행함을 알 수 있었다.

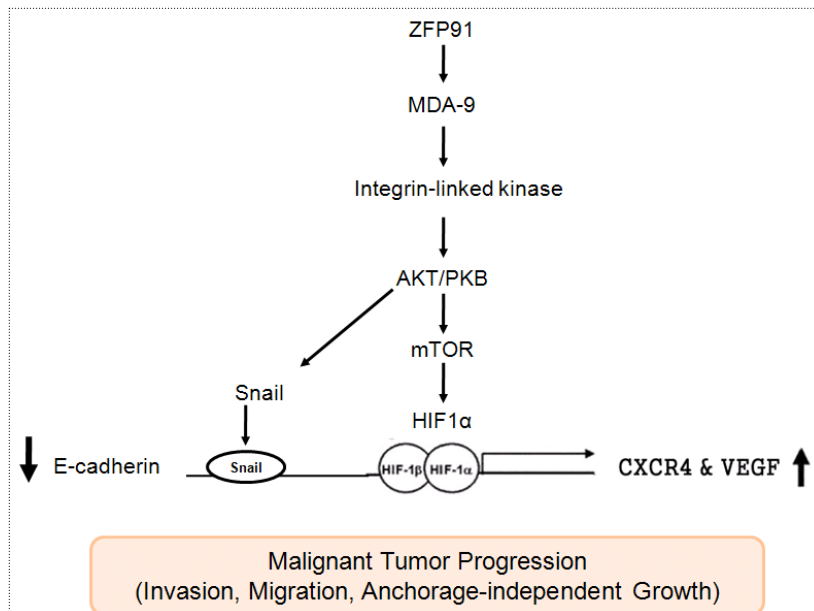


그림 52. ZFP91의 HIF활성화 및 EMT 유도 조절 모델

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ ZFP91은 본 과제의 주관과제에서 NF- κ B의 표적유전자로 동정되었으며 acute myelogenous leukemia (AML)환자에서 과발현되어 있음이 보고되었으나 그 기능이 알려지지 않은 유전자이다.

○ ZFP91에 대한 분자수준에서의 기능연구는 아직 세계적으로 보고된 바 없으며, 이 신규한 단백질의 기능연구에서 NIK를 기질로 이용하는 Ubiquitin Ligase (E-3) 활성을 갖는 단백질을 증명하였고, 특히 ZFP91은 NIK을 K63 polyubiquitination시켜 NIK의 활성화를 조절하는 새로운 기능을 밝혀냈다. 따라서 분자기전 차원에서 NF- κ B 활성화경로에서 보고된 기존의 기전을 새롭게 조명하는 결과들을 발견하였다.

○ NF- κ B noncanonical pathway의 활성화에 중요한 TNFRSF중에서CD40를 활성화하기 위해 CD40 ligand 처리하면 NIK의 ubiquitination과 autophosphorylation통해 활성화되고, NF- κ B2 (p100) processing으로 p52 증가되며, NIK분해 E3인 cIAP1/2의 발현이 저하되는데, ZFP91 siRNA발현하면 상기한 phenotype을 볼 수 없음을 알았다. 이는 ZFP91이 CD40 signaling을 포함한 TNF Receptor Super Family signaling에서 NF- κ B 활성화에 중요한 단백질을 제시하는 결과이다.

○ ZFP91이 nude mouse의 xenograft 실험을 통하여 과발현된 세포는 대조군에 비하여 tumor growth가 현저히 증가되고, ZFP91발현은 NIK, p52 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 세포의 사멸을 억제하고 암의 형성 및 증식에 중요한 역할을 하는 oncogenic 단백질을 확인할 수 있었다.

○ 본 과제 제안당시 ZFP91의 세포활성 중 HIF단백질의 활성을 조절하는 새로운 활성을 찾아 그 기전을 밝히는 연구가 위탁과제의 주된 목표이었다. 위탁과제 연구를 통하여 ZFP91이 AKT/mTOR 신호전달 경로를 통하여 HIF단백질의 발현과 그 표적유전자들의 발현을 유도함을 확인하였고, 또한 ZFP91에 단백질 발현이 조절되는 표적단백질로 암전이유전자인 MDA9임을 밝혀 내었다. ZFP91의 표적단백질로 동정된 MDA9은 ZFP91과 비슷하게 AKT-mTOR신호전달경로를 활성화시킬 뿐만 아니라 AKT의 upstream kinase중의 하나로 알려진 ILK (integrin-linked kinase)을 활성화시킴을 확인할 수 있었다. 따라서 ZFP91에 의한 HIF 단백질의 활성화기전은 ZFP91-MDA9-ILK-AKT-mTOR 신호전달경로 축이 관여한다는 결론을 지었다. 또한 ZFP91의 표적 단백질인 MDA9은 또한 TGF β 에 의해 유도되는 단백질이며 AKT활성을 유도하여 Snail발현을 증

가시켜 암 억제유전자인 E-cadherin 발현을 억제하고 TGF β 에 의해 유도되는 EMT를 매개함도 밝혔었다.

○ 이러한 연구를 통해 본 연구는 다단계의 복잡한 과정으로 진행되는 암 전이를 조절하는 핵심 분자를 규명하려는 제반 연구들과 암의 악성화를 초기단계에서 제어할 수 있는 표적 분자를 찾고자 하는 노력들에 단서를 제공함과 아울러 기능이 자세히 밝혀지지 않은 ubiquitin E3 ligase 활성을 갖는 ZFP91의 암 전이에서의 역할에 대한 새로운 정보를 제공하였다. 아울러, ZFP91의 핵심 표적단백질 중의 하나는 암전이유전자 MDA9임을 밝힘으로써 향후 이에 대한 자세한 연구와, 또한 MDA9에 의한 종양신호전달경로의 핵심 분자인 AKT 활성화 기전이 밝혀질 경우, 또한 ZFP91-MDA9축이 종양미세환경을 구성하고 있는 TGF β , PGs, cytokines, chemokines 등에 의해 반응하여 암세포의 악성화를 조절에 대한 기전이 밝혀질 경우 암 세포의 악성화 및 전이를 제어할 수 있는 새로운 방법을 제공할 수 있다.

○ ZFP91-NIK를 통한 NF- κ B 활성화경로와 NF- κ B와 HIF 조절기전을 밝힘으로써 ZFP91의 기능뿐만 아니라 NF- κ B와 HIF 연결경로를 밝힘으로써 암관련 연구분야에 기여할 것이다

○ ZFP91-NIK를 통한 NF- κ B 활성화경로와 HIF 조절기전을 밝힘으로써 항암제개발의 새로운 타겟을 제시하고 항암제 개발의 새로운 분자타겟으로 활용이 가능하다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ ZFP91은 NF- κ B 경로의 noncanonical pathway의 활성화에 중요한 kinase 인 NF- κ B-inducing kinase (NIK)를 Lys63-specific polyubiquitination하여 안정화시키고 autophosphorylation을 유도하여 kinase 로서 활성화시켜 NIK의 target인 downstream kinase인 IKKa를 활성화하여 noncanonical 경로에 중요한 NF- κ B2 (p100)를 활성형인 p52로 절단을 촉진하여 noncanonical NF- κ B signal경로를 장시간 활성화시키는 기능을 갖는 ubiquitin E3 ligase 인데, ZFP91의 발현 양상은 위암, 간암, 유방암과 전립선암 tissue array에서 유사함을 알았고, ZFP91 siRNA 실험에서 암세포주에서 ZFP91의 발현을 억제하면 암세포주들의 현저한 사멸효과가 관찰되어 ZFP91은 암세포의 생존에 중요한 단백질임을 알았다.

○또한 ZFP91이 nude mouse의 xenograft 실험을 통하여 과발현된 세포는 대조군에 비하여 tumor growth가 현저히 증가되고, ZFP91발현은 NIK, p52 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이러한 결과들을 통해 ZFP91이 세포의 사멸을 억제하고 암의 형성 및 증식에 중요한 역할을 하는 oncogenic 단백질임을 확인할 수 있었다.

○ ZFP91에 대한 Cell-based assay, protein-protein interaction 조절, reporter assay, E3 ubiquitin ligase assay등을 최적화를 통하여, 타겟단백질의 기능을 조절하는 활성검색기술을 수립하고, 천연물/화합물라이브러리 검색하여 hit 화합물 도출하고, hit 화합물의 화학적 약리적 검증을 통한 선도화합물 도출 및 화합물 구조의 최적화를 통한 항암제 후보물질 개발에 활용이 가능하고,

○ ZFP91의 NIK를 활성화를 통한 NF- κ B의 지속적인 활성을 유지하는 기전을 ZFP91의 효소활성과 시그널경로의 조절단백질 TRAF2, TRAF3, cIAP1, cIAP2의 조절기전을 해석할 수 있기 때문에 암의 악성화과정을 연구하는 중요한 표적으로 활용이 가능하다.

○ ZFP91의 표적단백질로 암전이유전자 MDA9를 발굴하였는데 ZFP91이 MDA9의 mRNA의 발현에는 영향 없이 단백질 발현을 유도함을 밝히었다. 주관 연구과제에서 ZFP91이 K63 ubiquitin E3 ligase활성을 증명하였으므로 ZFP91이 MDA9의 유비퀴틴화시켜 단백질의 안정화에 관여하는지에 대한 추가 연구를 실시할 계획이며 이를 통하여 ZFP91과 MDA9의 상호조절기전을 밝혀 향후 새로운 지적재산권을 획득하고자 한다.

○ ZFP91의 표적단백질은 MDA9은 AKT의 활성화에 관여하는 단백질로 추측됨. 최근의 연구결과에 의하면 AKT의 membrane targeting에 TRAF6가 관여하여 TRAF6에 의한 AKT의 유비퀴틴화가 AKT의 membrane targeting을 조절함이 밝혀지었다. 본 연구결과

MDA9은 TRAF6와 결합하여 AKT의 유비퀴틴화를 조절함이 밝혀졌으므로 ZFP91-MDA9-TRAF6-AKT 축으로 하는 경로가 AKT의 membrane targeting을 조절할 가능성을 시사하고 있어 이에 대한 추가연구를 통하여 AKT의 membrane targeting을 조절하는 핵심 조절자로 밝혀질 경우 항암제개발을 위한 새로운 타아겟으로 활용이 가능하다.

○ 또한 종양 미세환경은 암 조직을 구성하고 있는 다양한 종류의 세포 간 신호전달을 통하여 암세포의 악성화 및 전이를 조절하는 핵심적인 역할을 함이 밝혀지고 있다. 본 연구를 통하여 밝혀낸 결과를 토대로, ZFP91-MDA9축이 종양미세환경을 구성하고 있는 TGF β , PGs, cytokines, chemokines 등에 의해 반응하여 암세포의 악성화를 조절하지에 대한 추가연구를 통하여 ZFP91-MDA9 신호전달축이 종양미세환경의 조절자로서 증명될 경우 이를 통한 새로운 암의 진단 및 치료법에 대한 원천기술을 확보하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 염증이 암, 특히 암세포의 악성화를 조절한다는 가설이 1860년대에 제안된 이래 만성 염증이 위암 등의 다양한 암과의 상관성이 있음이 제시되면서 전사인자 NF- κ B의 암 악성화과정에서의 역할이 구체적으로 밝혀지고 있음[Nature **420**, 860 (2002), Cell **118**, 671 (2004), Nature Reviews Immunology **5**, 749 (2005), Cell **118**, 285 (2004), Nature **431**, 461 (2004), Cancer Cell **6**, 297(2004), Cancer Cell **7**, 411 (2005), Science **306**, 1568 (2004), Nature **441**, 431 (2006), J Clin Invest **117**, 60 (2007), Nature **466**, 690-694 (2007)].
- 본 과제에서 연구하고 있는 ZFP91에 대한 보고는 아직 없으나 ZFP91이 조절하는 NF- κ B의 alternative pathway의 핵심 인산화효소인 NIK가 어떠한 기전으로 활성이 억제되는지에 대한 연구결과가 최근 항암제개발의 중요한 타겟인 IAP1의 antagonist를 처리하면 NIK 분해를 유도하는 E-3 활성이 있는 cIAP1/2를 분해하여 NIK의 안정성이 증가된다는 논문이 Cell (131, 669-681, 682-693, 2007년)에 발표되었고, non-canonical Nf- κ B 경로를 억제하는 TRAF2/3가 협동으로 NIK가 cIAP에 의해 분해시키는 기전이 Nature Immunology 2008년 12월 (9, 1364-1370, 1371-1378)에 보고됨.
- AKT의 ubiquitin E3인 TRAF6에 의한 K-63 polyubiquitin화가 AKT의 세포막으로 이동을 조절하여 AKT의 활성화기전에 핵심적인 역할을 함이 밝혀지었다 (Science **325**:1134-38, 2009).
- 암전이에서 종양미세환경의 중요성이 더욱 강조되고 있다(Nat Rev Cancer 9(4):239-52, 2009). 2010년 제101차 미국암학회 참석결과 종양미세환경과 세포 간 신호전달이 암 연구의 새로운 분야로 부각되고 있음을 알 수 있었다.
- 최근에 암 전이 관련 유전자들이 동정되고 있고 이를 통해 복잡한 암 전이 과정의 분자적 기전을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Cell **127**:679-695, 2006; Lancet **369**:1742-1757, 2007).
- 신호전달에서 scaffold단백질 세포신호회로의 핵심 조절자로 그 중요성이 강조되고 있다(Nat Rev Immunol **9**:47-56, 2009; Science **311**:789-90, 2006; Trends Cell Biol **19**:364-74, 2009)

제 7 장 참고문헌

1. Vallabhapurapu S & Karin M (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27:693-733.
2. Karin M & Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5(10):749-759.
3. Senftleben U, *et al.* (2001) Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293(5534):1495-1499.
4. Pomerantz JL & Baltimore D (2002) Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10(4):693-695.
5. Ramakrishnan P, Wang W, & Wallach D (2004) Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. *Immunity*21(4):477-489.
6. Dejardin E, *et al.* (2002) The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17(4):525-535.
7. Saitoh T, *et al.* (2003) TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem*278(38):36005-36012.
8. Dejardin E (2006) The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* 72(9):1161-1179.
9. Baud V & Karin M (2009) Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8(1):33-40.
10. Qing G, Qu Z, & Xiao G (2005) Stabilization of basally translated NF-kappaB-inducing kinase (NIK) protein functions as a molecular switch of

processing of NF-kappaB2 p100. *J Biol Chem* 280(49):40578-40582.

11. Vince JE, *et al.* (2008) TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol* 182(1):171-184.
12. Varfolomeev E, *et al.* (2007) IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131(4):669-681.
13. Vince JE, *et al.* (2007) IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* 131(4):682-693.
14. Vallabhapurapu S, *et al.* (2008) Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* 9(12):1364-1370.
15. Zarnegar BJ, *et al.* (2008) Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 9(12):1371-1378.
16. Lin X, *et al.* (1998) Molecular determinants of NF-kappaB-inducing kinase action. *Mol Cell Biol* 18(10):5899-5907.
17. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, & Wallach D (1997) MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385(6616):540-544.
18. Lee JH, Koo TH, Hwang BY, & Lee JJ (2002) Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF-kappa B target genes. *J Biol Chem* 277(21):18411-18420.
19. Unoki M, Okutsu J, & Nakamura Y (2003) Identification of a novel human gene, ZFP91, involved in acute myelogenous leukemia. *Int J Oncol* 22(6):1217-1223.

20. Chen ZJ & Sun LJ (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* 33(3):275-286.
21. Gallagher E, *et al.* (2007) Kinase MEKK1 is required for CD40-dependent activation of the kinases Jnk and p38, germinal center formation, B cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol* 8(1):57-63.
22. Xia ZP, *et al.* (2009) Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461(7260):114-119.
23. Ganoth D, *et al.* (2001) The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3(3):321-324.
24. Csomos RA, Brady GF, & Duckett CS (2009) Enhanced Cytoprotective Effects of the Inhibitor of Apoptosis Protein Cellular IAP1 through Stabilization with TRAF2. *J Biol Chem* 284(31):20531-20539.
25. Vaux DL & Silke J (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4):287-297.
26. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, & Ashwell JD (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288(5467):874-877.
27. Csomos RA, Wright CW, Galban S, Oetjen KA, & Duckett CS (2009) Two distinct signalling cascades target the NF-kappaB regulatory factor c-IAP1 for degradation. *Biochem J* 420(1):83-91.
28. Basseres DS & Baldwin AS (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25(51):6817-6830.
29. Jost PJ & Ruland J (2007) Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109(7):2700-2707.

30. Bertrand MJ, *et al.* (2008) cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*30(6):689-700.
31. Mahoney DJ, *et al.* (2008) Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(33):11778-11783.
32. Eckelman BP, Salvesen GS, & Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*7(10):988-994.
33. Du C, Fang M, Li Y, Li L, & Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*102(1):33-42.
34. Chai J, *et al.* (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*406(6798):855-862.
35. Srinivasula SM & Ashwell JD (2008) IAPs: what's in a name? *Mol Cell* 30(2):123-135.
36. Vucic D (2008) Targeting IAP (inhibitor of apoptosis) proteins for therapeutic intervention in tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 8(2):110-117.
37. Bai L, Chen W, Wang X, Tang H, & Lin Y (2009) IKKbeta-mediated nuclear factor-kappaB activation attenuates smac mimetic-induced apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Ther*8(6):1636-1645.
38. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 127(4):679-95, 2006.
39. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 441(7092):431-6, 2006.
40. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*. 10(3):181-93, 2010.

41. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst.* 80(3):200-4, 1988.
42. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, Welch DR. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 88(23):1731-7, 1996.
43. Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC. KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* 268(5212):884-6, 1995
44. Seraj MJ, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res.* 60(11):2764-9, 2000.
45. Gildea JJ, Seraj MJ, Oxford G, Harding MA, Hampton GM, Moskaluk CA, Frierson HF, Conaway MR, Theodorescu D. RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. *Cancer Res.* 62(22):6418-23, 2002.
46. Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, Welch DR. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res.* 63(2):432-40, 2003.
47. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 411(6837):613-7, 2001.
48. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. *Cell.* 2003 Mar 7;112(5):659-72. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell.* 112(5):659-72, 2003.

49. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*.9(4):239-52, 2009.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.