

칼슘대사시스템생물학연구
Systems biological studies on calcium homeostasis

근소포체의 칼슘대사와 심비대증의 시스템생물학연구
Systems biology for sarcoplasmic reticulum
and cardiac hypertrophy

광 주 과 학 기 술 원

국 가 과 학 기 술 위 원 회

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

이 보고서를 "칼슘대사시스템생물학" 과제 (세부과제 "근소포체의 칼슘 대사와 심비대증의 시스템생물학 연구")의 보고서로 제출합니다.

2012 년 5 월 일

주관연구기관명 : 광주과학기술원

주관연구책임자 : 김 도 한

연 구 원 : 엄 수 현

연 구 원 : 조 정 희

연 구 원 : 박 지 용

위탁연구기관명 : 한국생명공학연구원

위탁연구책임자 : 엄 영 일

위탁연구기관명 : KAIST

위탁연구책임자 : 조 광 현

위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 우 선 희

보고서 요약서

| | | | | | |
|---|-------------------------|--|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| 과제고유번호 | 2011-0002144 | 해당단계 연구기간 | 2010.04~2012.03 | 단계구분 | 4/2 |
| 연구사업명 | 중사업명 | 바이오·의료기술개발사업 | | | |
| | 세부사업명 | 시스템인포메틱스사업 | | | |
| 연구과제명 | 대과제명 | 칼슘대사시스템생물학연구 | | | |
| | 세부과제명 | 근소포체의 칼슘 대사와 심비대증의 시스템생물학 연구 | | | |
| 연구책임자 | 김도한 | 해당단계 참여 연구원수 | 총 : 63 명 내부: 7 명 외부: 56 명 | 해당단계 연구비 | 정부: 2,372,000 천원 계: 2,372,000 천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원수 | 총: 명 내부: 명 외부: 명 | 총연구비 | 정부: 천원 기업: 천원 계: 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 광주과학기술원 시스템생물학연구소 | | | 참여기업명: | |
| 국제공동연구 | 상대국명: | | | 상대국 연구기관명: | |
| 위탁연구 | 한국과학기술원, 충남대, 한국생명공학연구원 | | | 연구책임자: 조광현, 우선희, 엄영일 | |
| 요약 | | | | 보고서 면수: 74 | |
| <p>▶ 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명 ○ 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석 ○ RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립 <p>▶ 수학 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생메커니즘 심화연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동력학 분석 ○ Calcineurin/NFAT 네트워크의 수학적 모델에 기반한 심근비대증 기전 분석 <p>▶ 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석 ○ 심근비대증의 단백질체 네트워크 분석 ○ 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명 | | | | | |
| 색인어 (각 5개 이상) | 한글 | 시스템생물학, 칼슘, 심장, 네트워크, 모델링 | | | |
| | 영어 | Systems biology, Calcium, Heart, Network, Modeling | | | |

요약문

I. 제목

근소포체의 칼슘 대사와 심비대증의 시스템생물학 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최종 목표: 근소포체 칼슘대사 네트워크의 규명과 칼슘대사 이상 심장질환의 동역학 및 모델링 연구

4단계 연구개발 목표: 근소포체 칼슘대사의 특성을 규명하고 질환 시 네트워크의 동역학 변화 분석과 모델링을 통한 미래형 심장 치료제 개발 기반 구축

연구 개발의 필요성: 칼슘대사 시스템생물학 연구는 심장 기능에 주요한 칼슘대사를 시스템 차원에서 이해함으로써 심장 질환에 대한 보다 효율적인 약물 개발에 이바지할 것임

III. 연구개발의 내용 및 범위

- ▶ 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석
 - 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명
 - 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석
 - RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립
- ▶ 수학 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생 메커니즘 심화연구
 - 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동역학 분석
 - Calcineurin/NFAT 네트워크의 수학적 모델에 기반한 심근비대증 기전 분석
- ▶ 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석
 - 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석
 - 심근비대증의 단백질체 네트워크 분석
 - 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명

IV. 연구개발결과

▶ 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석

○ 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명

- VDAC2, HRC, HLP 등 근소포체 내 핵심 구성인자의 상호작용 네트워크를 규명함
- VDAC2와 RyR2를 매개로 한 근소포체와 미토콘드리아의 상호 연관성을 규명함
- HRC 발현 억제에 의한 심장 기능 악화 및 세포 사멸 기작을 분석함
- 심근비대 시그널에 의한 CREB 인산화 조절을 분석함
- 기계적 자극과 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger와의 상관성을 규명함

○ 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석

- 마우스 심근 신규유전자들의 심근비대 네트워크 연관성을 분석함
- 신규유전자들 중 칼슘관련 유전자에 대한 심층 연구를 통해 세포 형태 및 구조 관련 유전자 1종 및 splicing 관련 유전자 1종의 기능을 새롭게 규명함

○ RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립

- RyR 복합체 및 CLM, SERCA2, CSQ 등의 RyR 상호작용 단백질들의 구조를 분석함
- RyR의 EM map을 기반으로 상호작용하는 단백질의 위치를 모델링하고 혹은 기존에 밝혀진 구조를 이용하여 상호작용 맵을 제공하였음

▶ 수학 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생 메커니즘 심화연구

○ 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동역학 분석

- 심근비대발생에 관련된 대규모 신호전달네트워크를 확장, 보완하는 한편 이에 대한 수학적 모델을 정립함
- 정립된 심근비대모델에 생리학적 또는 병리학적 심근비대 실험데이터를 반영하여 조건 특이적 심근비대모델을 확립함.
- 확립된 생리학적 및 병리학적 심근비대모델을 정성적으로 검증하고 심근비대발생에 있어서 특이적인 조절메커니즘을 비교분석함

○ Calcineurin/NFAT 네트워크의 수학적 모델에 기반한 심근비대증 기전 분석

- 3단계 연구를 통해 정립된 calcineurin-NFAT 신호전달네트워크를 확장, 보완하는 한편 이에 대한 수학 모델을 정립함
- 정립된 수학모델에 대한 동역학을 분석하고, 이를 토대로 심근비대의 발생메커니즘을 탐구함
- 실험생물학자와의 긴밀한 공동연구를 통해 생성된 가설을 세포 또는 동물모델 수준에서 검증함

▶ 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석

○ 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석

- 차세대 염기서열 분석법 (Next generation sequencing, NGS)를 통해 생리학적 및 병리학적 심근비대증에 대한 전사체 정보를 확보하고 이로부터 주요 유전자를 동정하는 동시에 각 데이터를 융합 분

석하여 두 기전의 차이를 분석함

- NGS를 통해 얻어진 정보를 통해 생리학적 및 병리학적 심근비대증에 대한 alternative splicing에 의한 정성적인 전사체 정보를 총체적으로 분석하였음
- 심근비대증에 주요 miRNA 네트워크를 분석하였음
- ChIP-on-Chip을 통한 전사 조절인자 분석하였음

○ 심근비대증의 단백질 네트워크 분석

- 근소포체 칼슘대사 주요 단백질들의 절대 정량 분석시스템을 구축하고 실제 심근조직을 대상으로 이들의 절대량을 측정
- 구축된 절대 정량 분석시스템을 기반으로 칼슘대사관련 주요 단백질들의 역동성을 분석
- 질량 분석기술에 기반한 단백질 동정 수준의 개선을 위해 이온성 계면활성제 및 유기용매를 이용한 효과적인 단백질 추출방법을 확립

○ 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명

- 오믹스 데이터를 융합 분석하기 위한 웹 솔루션인 CIDMS를 구축, 배포하였음
- CIDMS내 자체적으로 구축한 118개 pathway 중 하나인 ER stress 맵에 대해 심근비대증에서의 pathway 변화를 실험적으로 검증함

V. 연구개발결과의 활용계획

▶ 전사체 정보 활용 계획

- 칼슘대사 이상 모델로부터 확보한 전사체 정보는 다양한 오믹스 데이터와의 비교 분석을 통해 칼슘대사시스템의 종합적인 이해의 바탕이 될 것임
- 특히, NGS 기술로 확보한 전사체는 마이크로어레이 유래 전사체와는 달리 alternative splicing, novel transcript 등의 분석이 가능하므로 앞으로의 연구에도 용이하게 활용가능함
- 뉴질랜드 Hunter 교수 그룹에서 확립한 cardiome이 이후 고혈압 치료제 개발에 활용된 사례에서 볼 수 있듯이 본 연구의 결과로 확보한 심근비대 관련 분자표적 및 바이오마커는 추가 연구를 통한 심근비대의 분자진단 및 치료법 개발에 활용가능함 [1].
- 심근비대 유전자 네트워크와 그 동력학적 특성의 분석 결과는 심근비대 관련 생체기능의 거시적인 연구 및 질병의 진단/치료 연구의 기초자료로써 활용할 수 있음
- 마우스 심장 내 신규유전자 연구는 기존에 밝혀지지 않았던 유전자들의 기능에 대한 결과를 최초로 제시함에 따라 후속연구의 기틀을 마련하였음. 이러한 결과들은 기존의 개별적, 산발적 연구에서는 달성하기 어려운 것으로써, 관련 연구분야에 학술적으로 매우 중요한 전환점이 될 것이고 나아가 타 생명시스템 연구의 모델이 될 것임

▶ 단백질 정보 활용 계획

- RyR 복합체의 삼차원공간상의 상호작용 네트워크 연구결과는 생체기능 연구 및 칼슘대사 이상 질병의 진단 및 치료기술의 개발의 기초자료로서 활용할 수 있음
- 심근비대 마우스 모델을 대상으로 한 대규모 단백질 인산화 비교 정량분석 결과는 질량분

석 기술에 기반한 심근 단백질체 분석 범위의 증가 뿐 아니라 심근비대 및 심장 질환의 기전에 관여하는 중요한 단백질들을 발굴해냄으로서 생체기능 연구 및 칼슘대사 이상 질병의 진단 및 치료기술 개발의 기초자료로 활용할 수 있음

- 심장 근육의 칼슘대사 신호전달에 관련된 주요 단백질들을 대상으로 정상 및 질환 조건에서의 절대 정량 분석 연구를 통해 생성되는 보다 정확한 동력학적 데이터들은 생체 신호 전달체계의 네트워크 분석과 정밀한 심장 근육 운동 모델의 구축에 기여할 것임

▶ 모델링 및 동역학 기술의 활용 계획

- 본 연구 과제를 통해 개발된 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크 모델은 심근비대의 발생메커니즘을 시스템 수준에서 통합적으로 분석하고 탐구하는데 활용할 계획임
- 또한, 이를 계속 지속적으로 확장 및 보완하여 궁극적으로 병리학적 심근비대의 최적치료 전략수립과 더불어 신약후보물질의 발굴 및 평가에 활용함으로써 제약 산업 및 관련학문 분야의 기술적 발전에 상당한 기여를 할 수 있을 것으로 예상됨
- 신호전달시스템에 대한 도식화모델 작성기법과 이를 이용한 수학적 모델링기법은 여러 생체신호전달시스템에 보편적으로 적용될 수 있는 기술이므로, 이 기법을 지금까지 알려지지 않은 다양한 생명현상을 이해하기 위한 도구로 널리 활용할 계획임.
- 또한, 시뮬레이션을 통한 모델의 분석기법은 실험을 예측하고 분석할 수 있는 방법을 제공함으로써 관련된 실험을 계획하는 데 활용될 수 있으므로, 실험방법론 측면에서도 상당한 기여를 할 것으로 예상됨

▶ 통합 웹 솔루션의 배포 및 활용 계획

- 다양한 층위에서 생산되는 대규모 데이터를 효율적으로 관리, 분석하기 위해 본 사업단에서 구축한 웹 솔루션인 CIDMS 데이터베이스는 고가 상용 프로그램인 Ingenuity Pathway Analysis (IPA), PathwayStudio등을 대체하는 한편, 보다 심장 맞춤형 콘텐츠를 제공함으로써 전세계 심장연구자들에게 높은 수준의 연구 환경을 제공할 것임

▶ 실험 동물 및 기술의 활용 계획

- 본 연구에서 개발된 다양한 실험 동물 및 세포주는 향후 심장 질환 연구에도 유용하게 활용 가능함
- 신규유전자 연구를 위해 제장된 총 8종의 항체는 관련 분야 연구에 매우 필수적이고도 귀중한 자원으로써, 본 연구사업이 창출한 것임. 칼슘 관련 연구분야, 미토콘드리아 관련 연구분야에 다양하게 사용될 것이며 국내·외 타 연구자들과의 공유를 통해서 향후 후속 응용연구에 활용할 계획임
- 본 연구에서 확립된 NGS 분석 기술을 응용하여 보다 다양한 실험 동물에서의 빠르고 효율적인 분석이 용이할 수 있음

SUMMARY

I. Title

Systems biology for sarcoplasmic reticulum and cardiac hypertrophy

II. Research Aim and Motivation

Final goals: The aims of this project are to examine sarcoplasmic reticulum protein network and to study Ca^{2+} signaling-associated cardiac disease focusing on the dynamic modeling of the hypertrophic process.

Goals of Research Step 4:

- Investigation of cardiac sarcoplasmic reticulum systems
- Network dynamics analyses in cardiac pathogenesis
- Gaining of foothold in development of next generation drug through a modeling

III. Research Contents and Proposed for the Studies

- ▶ In-depth study on the principle components in cardiac sarcoplasmic reticulum (SR) and calcium signaling systems
 - Investigation of pharmacological and physiological functions of the principle components in cardiac SR
 - Characterization of new mouse cardiac genes
 - Imaging of RyR complexes and interactions
- ▶ Investigations into the regulatory mechanism of cardiac hypertrophy development based on mathematical modeling and dynamical analysis
 - Investigation of regulatory mechanism of physiological or pathological cardiac hypertrophy
 - Development of an extended mathematical model for the calcineurin/NFAT signaling network
- ▶ Integrative analysis of the multilateral omics data on cardiac hypertrophy
 - Investigation of the transcriptional network in cardiac hypertrophy
 - Investigation of proteomic network in cardiac hypertrophy
 - Identification of the principle network for cardiac hypertrophy through an integrative analysis of the multilateral omics data

IV. Results

- ▶ In-depth study on the principle components in cardiac SR and calcium signaling systems
 - In-depth study on the biological functions of the principle components in SR
 - Network analyses for interaction among the principle components such as VDAC2, HRC and HLP in SR
 - Investigation of inter-relationship between SR and mitochondria by the interaction between VDAC2 and RyR2
 - Investigation of exacerbated cardiac function and apoptosis by the expressional suppression of HRC
 - Investigation of phosphorylation of CREB by cardiac hypertrophic signals
 - Investigation of relationship between mechanical stress and $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger
 - Network analyses for cardiac novel genes
 - Network analyses of cardiac novel genes on cardiac hypertrophic signals
 - Investigation of cardiac novel genes involved in cell structure and splicing
 - Construction of 3D map for RyR complexes and their interactions
 - Structure analyses of RyR complexes with CLM, SERCA2, CSQ2
 - Investigation of interaction map for RyR complexes based on EM map
- ▶ Investigations into the regulatory mechanism of cardiac hypertrophy development based on mathematical modeling and dynamical analysis
 - Mathematical modeling and dynamic analysis of the signaling pathways for cardiac hypertrophy
 - Construction of extended network for cardiac hypertrophy and the mathematical models for this network
 - Establishment of mathematical modeling for physiological and pathological cardiac hypertrophy
 - Comparative analyses for physiological and pathological cardiac hypertrophy using the mathematical models.
 - Investigation of mechanism of cardiac hypertrophy based on the model of calcineurin/NFAT
 - Establishment of mathematical modeling for calcineurin-NFAT
 - Investigation of the mechanism of cardiac hypertrophy using the model
 - Experimental confirmation of the predicted mechanism

► Integrative analysis of the multilateral omics data on cardiac hypertrophy

○ Transcriptomic network analyses for cardiac hypertrophy

- Investigation of quantitative differences between physiological and pathological cardiac hypertrophy using transcriptome by NGS
- Investigation of qualitative difference (i.e., alternative splicing) between physiological and pathological cardiac hypertrophy
- Investigation of the important microRNA networks in cardiac hypertrophy
- Investigation of transcriptional regulators using ChIP-on-Chip

○ Proteomic network analyses for cardiac hypertrophy

- Absolute quantification of the principle proteins in SR
- Analyses for dynamics of the principle proteins in SR
- Establishment of the method for the efficient isolation of protein using surfactant and organic solvents

○ Integrative analyses for the multilateral data for cardiac hypertrophy

- Establishment and release of web-solution CIMDS for the integration of the various omics data
- Experimental confirmation of ER stress network derived by CIMDS on hypertrophic signal

V. Applications

- Establishment of knowledge infrastructure through the systems biological analyses for calcium signaling systems
- Possible new drugs development based on the integrative understanding of cardiac pathogenesis
- Building technology infrastructure for systems biological analyses which could be applicable to other model systems
- The transcriptomic data by Next Generation Sequencing (NGS) can give more significant insight for mechanism of cardiac hypertrophy
- The mathematical modelings could help increase the efficacy of the therapeutic drugs, since quantitative analyses could be possible
- CIMDS, web solution for the comparative and integrative analyses of the various omics data can be the alternative for the expensive softwares such as IPA and PathwayStudio.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chapter 1. Introduction | 12 |
| Section 1. Objectives of the proposed research | 12 |
| Section 2. Necessity of the proposed research | 12 |
| Section 3. Scope of the proposed research | 13 |
| Chapter 2. The Current Status of the Relevant Studies | 14 |
| Section 1. Global | 14 |
| Section 2. Domestic | 15 |
| Chapter 3. Project Descriptions and the Results | 17 |
| Section 1. In-depth analysis for the principle components in sarcoplasmic reticulum | 17 |
| 1. In-depth study on the biological functions of the principle components in SR | 17 |
| 2. Network analyses for cardiac novel genes | 34 |
| 3. Construction of 3D map for RyR complexes and their interactions | 38 |
| Section 2. Modeling of the signaling pathways for cardiac hypertrophy | 42 |
| 1. Mathematical modeling of the signaling pathways for cardiac hypertrophy | 42 |
| 2. Investigation of cardiac hypertrophy based on the model of calcineurin/NFAT | 45 |
| Section 3. Comprehensive analysis of multilateral data for cardiac hypertrophy | 48 |
| 1. Transcriptomic network analyses for cardiac hypertrophy | 48 |
| 2. Proteomic network analyses for cardiac hypertrophy | 61 |
| 3. Integrative analyses for the multilateral data for cardiac hypertrophy | 67 |
| Chapter 4. Achievement of the proposed work | 69 |
| Chapter 5. Utilization of the current work for applications | 70 |
| Chapter 6. Foreign information obtained during the process of the proposed study | 72 |
| Chapter 7. Research facilities and equipment | 73 |
| Chapter 8. References | 74 |

목 차

| | |
|---|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 12 |
| 제 1 절 연구 개발의 목표 | 12 |
| 제 2 절 연구 개발의 필요성 | 12 |
| 제 3 절 연구 개발의 범위 | 13 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 14 |
| 제 1 절 국외 연구 현황 | 14 |
| 제 2 절 국내 연구 현황 | 15 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 17 |
| 제 1 절. 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석 | 17 |
| 1. 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명 | 17 |
| 2. 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석 | 34 |
| 3. RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립 | 38 |
| 제 2 절. 수학 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생 메커니즘 심화연구 | 42 |
| 1. 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동력학 분석 | 42 |
| 2. Calcineurin-NFAT 신호전달시스템을 통한 심근비대 조절 기전 탐구 | 45 |
| 제 3 절. 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석 | 48 |
| 1. 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석 | 48 |
| 2. 심근비대증의 단백질체 네트워크 분석 | 61 |
| 3. 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명 | 67 |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 69 |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 70 |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 72 |
| 제 7 장 연구시설·장비 현황 | 73 |
| 제 8 장 참고문헌 | 74 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목표

최종 목표: 근소포체 칼슘대사 네트워크의 규명과 칼슘대사 이상 심장질환의 동역학 및 모델링 연구

4단계 연구개발 목표: 근소포체 칼슘대사의 특성을 규명하고 질환 시 네트워크의 동역학 변화 분석과 모델링을 통한 미래형 심장 치료제 개발 기반 구축

제 2 절 연구 개발의 필요성

1. 연구개발의 과학기술적 필요성

- 칼슘대사시스템은 국소빈혈, 근이영양증, 심근비대증, 알츠하이머 등 다양한 인간질환의 원인으로 작용하므로 칼슘대사에 대한 시스템 차원 연구는 반드시 필요함 [2].
- 칼슘대사시스템의 이상으로 나타나는 심근비대증은 단일 또는 소규모 유전자에 의한 단순 현상이 아니라 외부 스트레스에 의해 복합적으로 나타나는 현상이므로 시스템 차원의 입체적인 이해가 필요함
- 심근비대증에 대한 시스템 수준의 이해를 위해서는 다양한 오믹스 데이터를 활용한 접근이 중요하며 또한 전사체, 단백질체, 대사체 등의 다양한 층위의 데이터를 융합하여 총체적인 규명을 도모하는 것이 중요함
- 또한, 심근비대증과 같은 질병메커니즘이 복잡한 심장질환의 발병원인을 탐구하기 위해서는 세포 내외의 신호전달경로, 특히 심근세포의 수축이완 기작에 중요한 역할을 하는 칼슘대사시스템에 대한 수학적 모델링 및 동역학 분석이 요구됨
- 이러한 총체적 연구는 병리적 현상에 대한 기초 연구뿐만 아니라 형질 특성과 관련된 표식자의 발굴, 관련 질병 치료법 개발을 위한 표적유전자 발굴을 통한 신약개발, 독성검사 등 응용연구에도 폭넓게 활용될 것임
- 심근비대증에 대한 보다 정확한 이해를 위해서는 오믹스 데이터 뿐만 아니라 미시적인 칼슘신호의 전달을 이해하고 관련 분자의 조절기능을 알아내기 위한 심층 연구 역시 반드시 필요함
- 이를 위해 본 연구는 광학기술과 전기생리학 기술의 접목을 시도하고 있으며 특히 심장세포의 전기적 흥분성을 재현하며, 작은 칼슘 분자의 빠른 이동을 관찰하기 위해, 시공간적 고해상도 기술을 개발하여 사용하였음
- 현재 국내의 경우, 이러한 세포수준에서의 첨단 나노바이오 기술은 매우 뒤떨어져 있고, 칼슘신호전달과 직접 관련되어 있는 심장기능 및 질환에 대한 이해 및 치료제의 개발을 위해 국내연구개발이 절실히 요구되는 실정임

2. 연구개발의 경제, 산업적 필요성

- 심장 질환에 의한 사망자는 전세계적으로 연간 1700만명에 이르며 성인 3명 중 1명이 심혈관 질환을 겪는 것으로 알려져 있음. 이에 따른 시장 규모는 고혈압 510억달러, 이상지혈증 340달러, 심장마비 및 뇌졸중 190억 달러 등에 이룸
- 심장 질환에 대한 시스템 생물학 연구는 주요 심장 질환에서의 주요 유전자 발현에 대한 입체적인 정보를 제공하므로 진단과 치료의 효과적인 타겟 유전자를 규명하고 관련 지적 재산을 확보할 수 있게 함
- 이는 국내 제약 산업의 국제적인 도약에 일조할 것으로 예상되며 이후 세포 시스템의 모델이 창출되면, 많은 약물 후보물질의 약효를 전임상시험 전에 예측 가능하게 하여 임상시험비용의 절감을 가져올 것임

3. 연구개발의 사회, 문화적 필요성

- 심근 내 칼슘 신호전달 조절에 대한 시스템 수준의 이해는 학문적 가치 뿐만 아니라 심장병 진단용 기술 개발과 효과적인 치료제 개발의 이론적 바탕 마련은 물론 궁극적으로는 미래 고령화 사회에 증가할 심장 질환에 의한 사망률을 감소시키는데 기여할 것이므로 반드시 필요함
- 시스템생물학은 공학, 생물학, 의학 및 전산학 등의 학제간 학문으로 여러 다른 분야 연구원들의 정보 및 지식 교류가 이루어져 전 세계 과학계의 새로운 패러다임인 융합 과학에 합류하는 계기가 될 것으로 사료됨
- 또한 본 연구에서 수행한 시스템 생물학적 분석 기술은 후속 세대 교육의 질적 향상과 국내 고급 과학 인력 양성에 기여하여 국가 과학 기술의 경쟁력을 향상시키는데 기여할 것임

제 3 절 연구 개발의 범위

1. 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석

- 가. 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명
- 나. 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석
- 다. RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립

2. 수학적 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생 메커니즘 심화연구

- 가. 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동역학 분석
- 나. Calcineurin/NFAT 네트워크의 수학적 모델에 기반한 심근비대증 기전 분석

3. 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석

- 가. 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석
- 나. 심근비대증의 단백질 네트워크 분석
- 다. 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 연구 현황

1. 국외 유전체 연구 현황

- 최근 들어 한 사람의 염기서열을 1주일이면 분석할 수 있는 차세대 염기서열 분석법 (Next generation sequencing, NGS) 등이 개발됨. Illumina의 HiSeq series, Roche의 454 FLX Titanium, Applied Biosystems 의 SOLiD 4.0 등이 대표적임
- 이들은 100만개 이상의 DNA 가닥들을 1개의 chip 위에서 parallel sequencing 할 수 있도록 한 platform으로써 대용량의 염기서열 데이터 분석이 가능함. 또한 NGS 기술을 이용해 ChIP-Seq, MeSeq, RNA-Seq 등 hybridization 기반의 microarray 수준으로 다양화 된 platform들이 개발됨에 따라 유전자 단위가 아닌 염기서열 단위로 유전체를 섬세하게 분석가능하게 됨. 따라서 정성적 뿐만 아니라 정량적으로 대단위 유전체분석을 가능케 되므로 시스템생물학 연구를 위한 새로운 방법론이 대두될 전망이다
- 2008년 시작된 1,000 Genome project의 1차 분석 결과가 2010년 10월 Nature 지에 게재 되었음. 결과적으로 1,500만 개 이상의 SNPs, 100만개 정도의 짧은 insertion/deletion, 2만 개 이상의 CNV (copy number variation)등이 보고되었음 [3]
- 마이크로어레이의 보편화와 NGS의 보급에 따라 시스템 생물학 연구를 통해 생성되는 데이터의 양이 엄청나게 증가함. 특히, NGS 데이터의 경우 1개의 샘플당 수백기가바이트 이상의 텍스트가 결과로 생산됨에 따라 생물정보학 분석기법이 크게 발전하고 있음
- 2010년 Cell 저널에 병리학적 심근비대증에 C/EBP β 가 주요 역할을 담당함을 규명하였 음. 특히 175개의 유전자를 비교분석한 결과 생리학적 및 병리학적 심근비대증 관련 유전자간 상호 negative-correlation이 있음을 보고하였음 [4]
- 최근 ChIP-on-Chip이나 ChIP-Seq 등의 기술을 통해 전자조절인자와 유전자간의 관계를 분석하는 연구들이 다수 보고되고 있음. Blow MJ는 embryonic day 11.5인 심장 조직에서 p300에 대한 ChIP-Seq 연구를 수행하여 Nat Genet 지에 게재하였음 [5]

2. 국외 단백질 및 동역학의 연구 현황

- Entelos사는 천식, 당뇨병, 류마티스 등에 대한 바이오시물레이션 IT 플랫폼인 'RealLab' 을 개발하여 신약개발과정의 동물실험을 대체함으로써 연간 100억원 이상의 매출을 기록하고 있으며, 또한 맞춤형 바이오시물레이션 IT 플랫폼인 'PhysioLab'의 개발을 통해 다수의 거대제약회사들과 공동으로 신약개발에 참여하고 있음
- 일본은 시스템생물학연구소를 설립하여 암 관련 주요 신호전달경로인 EGFR 신호전달 경로를 컴퓨터 모델로 재구성하고 있으며, 또한 단세포 생물인 M. genitalium를 대상으로 생존 가능한 최소 유전자 127개에 대한 E-Cell 프로젝트를 진행하고 있음

- 2010년 Molecular and Cellular Proteomics저널에서는 SILAC 방법을 응용하여 DNA 손상이 일어난 HCT116 세포주와 정상세포주의 sub-fractionation으로 얻은 단백질에 각각 13C, 15N과 같은 heavy isotope를 표식 하여 단백질의 공간적 분포도를 정량하는 방법을 개발하였음 [6]

3. 국외 시스템생물학연구 현황

- 국제적으로는 이미 유럽, 미국, 일본 등을 주축으로 시스템생물학 연구소, 대학, 관련 학과들이 설립되어 대규모 국제적 연구과제들이 도입되는 등, 시스템생물학, 즉 생명과학과 시스템과학의 학제 간 교류연구가 활발히 이루어지고 있는 상황임 (예: EU Framework Program 7 <2007~2013>의 핵심주제로 시스템생물학이 선정됨)
- 2009년 이후 GlaxoSmithKline, Pfizer, Novartis 등 거대 다국적 제약회사들도 시스템생물학 기반 접근방법을 통한 신약개발에 점점 더 많은 자본을 투자하고 있는 추세임
- IBM은 생명과학사업부를 새로이 설립하여 신약 후보물질 발굴 소프트웨어 개발, 컴퓨터 시뮬레이션을 통한 사이버 임상시험시스템 개발에 앞장서고 있음
- 'IET Systems Biology', Nature 출판사의 'Molecular Systems Biology', 'Systems and Synthetic Biology', 'BMC Systems Biology' 등 시스템생물학 관련 국제저널들이 계속 출간되고 있으며, 시스템생물학 관련 국제학술회의들도 그 규모가 지속적으로 커지고 있음
- 특히, 시스템생물학 관련 가장 큰 규모의 학회인 '국제 시스템생물학 학술회의 (ICSB)' 참가자의 수는 해마다 급증하여 2008년부터 1000명을 넘어서기에 이르렀고, 2010년 및 2011년에는 바이오 시뮬레이션 연구에 관한 특별 세션과 워크숍들이 개최된 바 있음

제 2 절 국내 연구 현황

1. 국내 시스템생물학 현황

- 진핵세포를 대상으로 한 본격적인 시스템생물학 연구는 2003년도부터 과기부의 국책연구사업으로 시스템생물학연구사업이 추진되어 옴. 이 사업은 심근세포의 기능조절에서 중요한 역할을 하는 칼슘대사과정을 시스템생물학적으로 규명하고자 하는 것임
- 현재는 보급된 많은 분석 기법들을 통해 생산된 유전체, 전사체, 단백질체, 대사체에 대한 정보들을 단일 플랫폼에서의 분석에서 만족하지 않고 다양한 형태의 정보를 집적하고 융합하는 시도들이 있으며, 이는 세계적인 추세임. 상기한 교과부의 시스템생물학연구사업에서도 이런 연구를 지원하고 있음
- 본 칼슘대사시스템생물학 연구사업의 4단계연구가 마무리 되는 2012년 현재, 국내 시스템생물학 연구는 외형적으로 상당한 수준까지 성장한 것으로 평가됨
- 하지만 실험데이터를 기반으로 한 수학적 모델을 활용하여 생명현상의 궁극적인 원리를 규명하고, 이를 토대로 신약후보물질을 발굴하며 최적치료전략을 개발하려는 학제 간 '융합연구'는 본 사업단의 연구를 통하여 본격적인 성장기를 맞이하고 그 성과를 도출하기 시작한 것으로 판단됨

2. 국내 유전체 연구 현황

- 지난 수년간 국내의 시스템생물학은 실험방법과 분석방법 모두 높은 성장을 보여왔음. Affymetrix, Illumina 등의 해외 우수 기업에서 만들어진 높은 정확성을 자랑하는 마이크로 어레이들이 국내에 보급되어 유전체 수준의 연구들을 활발하게 하였고, 최근에는 한 사람의 염기서열을 분석할 수 있는 NGS가 국내에 도입되기 시작하여 그 연구결과들이 나오기 시작함
- 2009년 NGS 기술을 사용하여 한국인 전체 게놈의 특징을 밝혀 Nature지에 게재된 것을 시작으로 [7] 2011년에는 서울의대 유전체의학연구소는 마크로젠 생명과학연구소와의 공동 연구에서 한국인 18명의 DNA와 RNA를 동시 분석한 논문을 7월 Nature Genetics에 게재함 [8]
- 또한 이들은 최근 NGS기반 폐암 환자의 유전체 분석을 통해 현재까지 알려지지 않았던 새로운 종류의 유전자 변이를 세계 최초로 밝혀 2011년 12월 Genome research에 게재하기도 하였음 [9]

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 근소포체 중심 칼슘대사 시스템의 구성인자 심층 분석

1. 근소포체 내 구성인자의 생리약리학적 기능 및 상호작용 네트워크 규명

가. Voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2)의 기능 규명

(1) VDAC2의 심근세포 내 공간적 위치 및 RyR2 단백질과의 세포내 공존 조사

- VDAC2 특이적인 항체를 이용 심근세포 내에서의 subsarcolemmal region에 존재하며 RyR2와 공존하는 것을 확인하였음 (그림 1, 2)

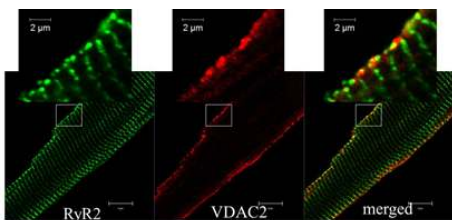
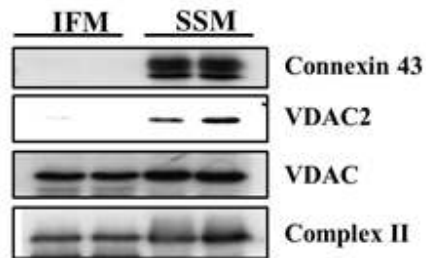


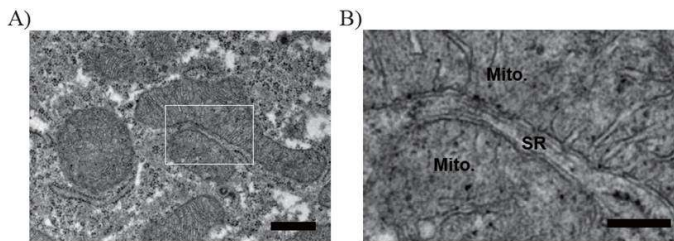
그림 1. 심근세포에서 VDAC2와 RyR2의 공존



* IFM : interfibrillar mitochondria
SSM : subsarcolemmal mitochondria

그림 2. 심근 세포내에서 공간적으로 서로 다른 위치에 존재하는 미토콘드리아를 분리 후 각 단백질의 존재 확인.

HL-1 세포에서 근소포체와 미토콘드리아 위치



RyR2와 VDAC2의 상호공존확인

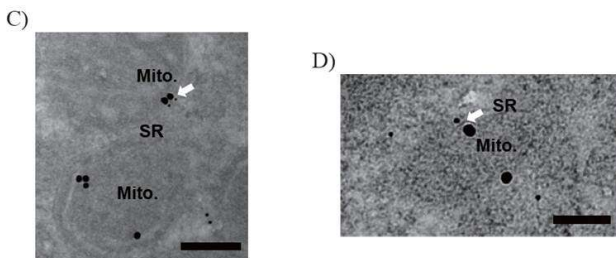


그림 3. 전자현미경을 이용한 HL-1세포 이미징

- 실제 세포 내 소기관을 관찰할 수 있는 고해상력의 전자현미경을 이용하여 근소포체와 미토콘드리아가 상호 근접하여 존재하는 것을 확인함 (그림 3-A, B)
- Immuno-gold 표지 기법을 이용하여 칼슘대사 구성인자인 RyR2와 VDAC2의 위치를 조사하였으며, 각각 근소포체와 미토콘드리아에 존재하면서 상호공존하는 것을 확인함 (그림 3-C, D)

(2) VDAC2의 칼슘 관련 기능 규명

① 심근세포와 HL-1 세포에서 VDAC2 단백질의 발현

- 성체 쥐 심근세포와 자율박동성 심방세포군인 HL-1 세포에서 western blot을 통해 VDAC2 발현을 분석한 결과 심방근, 심방실세포, HL-1 세포에서 모두 높은 VDAC2 발현이 발견되었으며 (그림 4), VDAC2를 표적으로 한 렌티바이러스를 이용하여 녹다운시킨 결과 상당히 낮은 양 (약 10%)의 VDAC2 발현이 나타남 (그림 4)

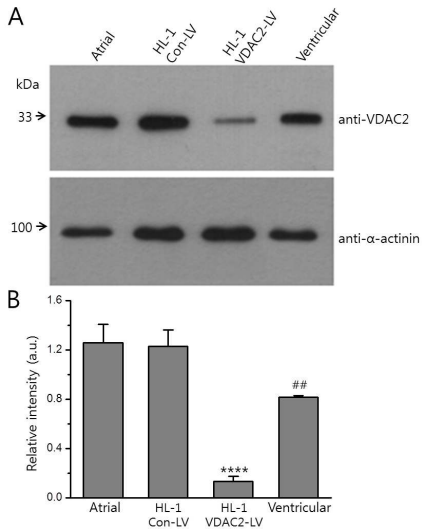


그림 4. 심근세포와 렌티 바이러스를 이용해 VDAC2를 녹 다운시킨 세포에서 VDAC2의 발현. Western blot을 이용한 VDAC2의 발현 정도 측정 (A). VDAC2는 심근세포와 HL-1세포에서 높게 발현되었으나 VDAC2 mRNA를 표적으로 한 렌티 바이러스 감염 HL-1 세포에서는 VDAC2 단백질의 발현이 현저하게 감소함(B).

② 비감염군과 렌티바이러스 감염 (WT) HL-1세포에서의 칼슘 시그널

- WT VDAC를 감염시킨 군과 비감염군 모두에서 모두 자율박동성 칼슘 transient를 관찰할 수 있었으며 그 magnitude($\Delta F/F_0$)와 반감기($T_{1/2}$)는 비감염군(WT; 각각 0.35 ± 0.03 , 0.30 ± 0.01 초, $n = 50$)과 감염군(0.35 ± 0.03 , 0.32 ± 0.02 초, $n = 40$)에서 유사했음 (그림. 5-B, C)

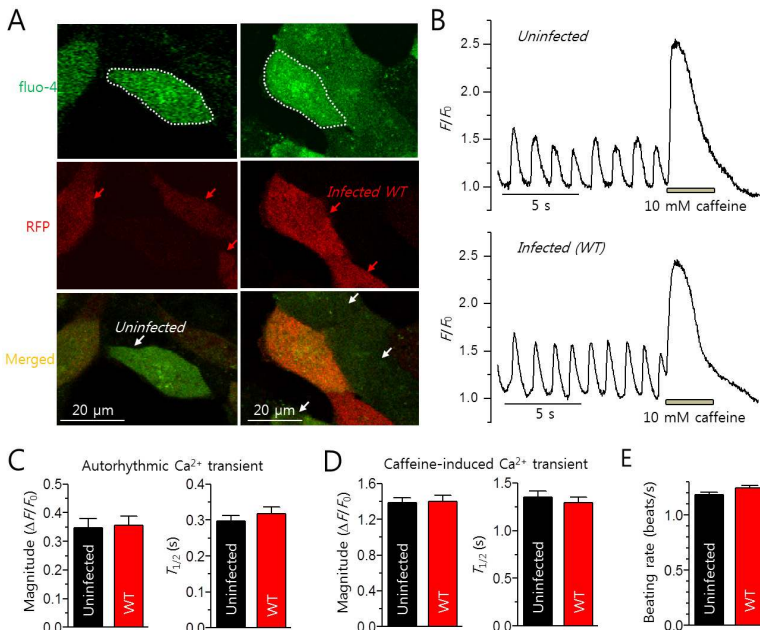


그림 5. 비감염 군과 렌티 바이러스 감염(WT) HL-1 세포군에서의 자율박동성, 카페인 유도성 칼슘 transient. HL-1 세포는 fluo-4로 염색되었으며 렌티 바이러스 감염(WT) HL-1세포는 RFP에 의해 붉게 나타남 (A). 그림 A에 점선으로 표시된 ROI (regions-of-interest) 에서 측정된 자율박동성, 칼슘 유도성 칼슘 transient (B). 자율박동성 칼슘 transient의 magnitude($\Delta F/F_0$)와 반감기($T_{1/2}$)는 두 군에서 거의 차이가 없었음 (C). 카페인 유도성 칼슘 transient의 magnitude와 반감기 역시 차이가 거의 없었음 (D). 초당 평균 박동수 역시 차이를 보이지 않음 (E)

③ 렌티바이러스 감염 (WT)군과 VDAC2 KD HL-1 세포에서의 칼슘 시그널

- 자율박동성 칼슘 transient와 카페인 유도성 칼슘 transient를 WT (n = 40)과 VDAC2 KD 세포(n = 21)에서 기록하여 비교한 결과, 자율박동성 칼슘 transient의 magnitude와 반감기는 VDAC2 KD 세포(0.39 ± 0.08 , 0.34 ± 0.03 초)와 WT 세포(0.36 ± 0.03 , 0.32 ± 0.02 초)에서 유의한 차이가 나타나지 않았음 (그림 6-B, C).
- 카페인 유도성 칼슘 transient도 WT (1.40 ± 0.07 , 1.29 ± 0.06 초)와 VDAC2 KD (1.44 ± 0.09 , 1.35 ± 0.08 초) 세포에서 비슷했으며($P > 0.05$; 그림 7-B, D), 초당 박동수 역시 VDAC2 KD에 의해 변화되지 않았음 ($P > 0.05$; 그림. 6-B, E).
- 이러한 결과는 VDAC2가 박동하는 심방근세포의 global 칼슘 transient나 SR 칼슘양의 조절에 관여하지 않음을 나타냄

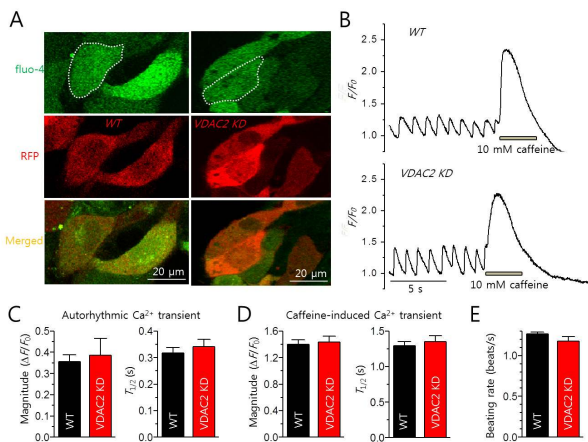


그림 6. 렌티 바이러스 감염(WT)군과 VDAC2 KD HL-1 세포군에서의 자율박동성, 카페인 유도성 칼슘 transient. 자율박동성 칼슘 transient의 magnitude ($\Delta F/F_0$)와 반감기 ($T_{1/2}$)는 두 군에서 거의 차이가 없었음(C). 카페인 유도성 칼슘 transient의 magnitude와 반감기도 두 군이 유사함 (D). 초당 평균박동수도 두 군에서 차이가 없었음 (E).

④ HL-1 세포에서의 VDAC2에 의한 칼슘 스파크 빈도 및 특성의 변화

- 칼슘 스파크를 기록하기 위해 0.05 mM 칼슘을 포함한 외부용액을 흘려줌으로써 HL-1 세포에서의 bulk 칼슘 transient를 억제시킨 결과, 그림. 4-A는 비감염, WT, VDAC2 KD HL-1 세포의 순차적인 2차원 공초점 칼슘이미지로 칼슘 스파크의 발달과 소멸을 보여줌
- 자발적인 칼슘 스파크는 대부분 세포 periphery에서 관찰되었는데 이는 세포막과 SR domain의 peripheral junction이 있는 부분으로 HL-1 세포에는 t-tubule구조가 없기 때문으로 사료됨
- 칼슘 스파크 빈도는 비감염 (1.29 ± 0.22 , n = 8), WT(1.33 ± 0.72 , n = 5), VDAC2 KD(1.49 ± 0.24 , n = 5) HL-1 세포에서 큰 차이를 보이지 않았음(그림. 7; $P > 0.05$, 비감염 vs. WT; $P > 0.05$, WT vs. KD)

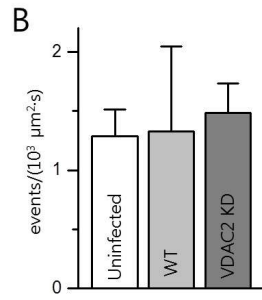
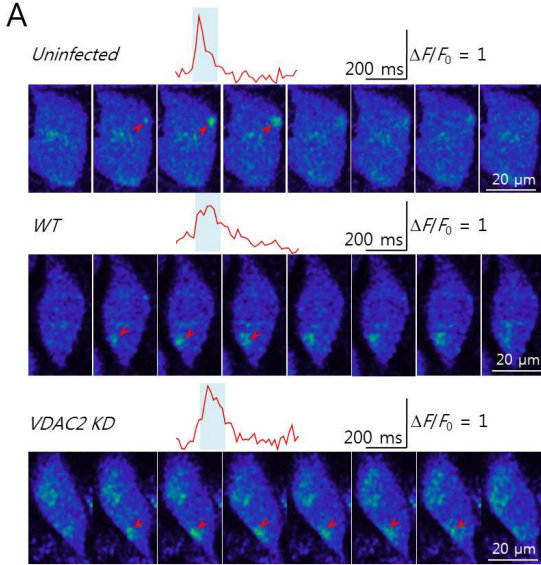


그림 7. 비감염, WT, VDAC2 KD HL-1 세포에서 칼슘 스파크 빈도 비교. 60Hz로 기록된 연속적인 2차원 칼슘 이미징과 각각의 스파크에서의 칼슘 transient (A). 평균 칼슘 스파크 빈도는 세 군에서 유의한 차이를 보이지 않음 (B). 수치 및 n 값은 본문참조.

- 단일 스파크의 2차원 공초점 이미지는 amplitude(F_1/F_r), FWHM 측정을 위해 Gaussian function으로 fitting 되었으며 FDHM을 평가하기 위해 스파크 한가운데의 시간에 따른 형광신호 강도를 기록하였음
- 그림 8-A, B, C에서 비감염, WT, VDAC2 KD HL-1 세포에서 스파크 면적이 최대일 때의 스파크 peak amplitude, FWHM, 그리고 FDHM을 비교했다. 비감염 세포와 WT 세포에서의 칼슘 스파크 intensity(F_1/F_r)와 FDHM은 차이가 없었음 (그림 8-A, C, 위의 두 그래프).
- WT 세포와 비교했을 때 비감염 세포에서 공간적으로 스파크가 더 좁았다 (그림 8-B, 위의 두 그래프). 흥미롭게도 스파크 amplitude, FWHM, FDHM은 WT 세포에서보다 VDAC2 KD 세포에서 상당히 크게 나타남 (그림 8-A, B, C, 아래의 두 그래프).
- 이는 VDAC2의 부재 시 칼슘 스파크가 더 크고 오래 지속됨을 뜻한다. 이러한 결과들은 VDAC2가 칼슘 스파크의 확장을 직접적으로, 혹은 간접적으로 제한함을 의미함

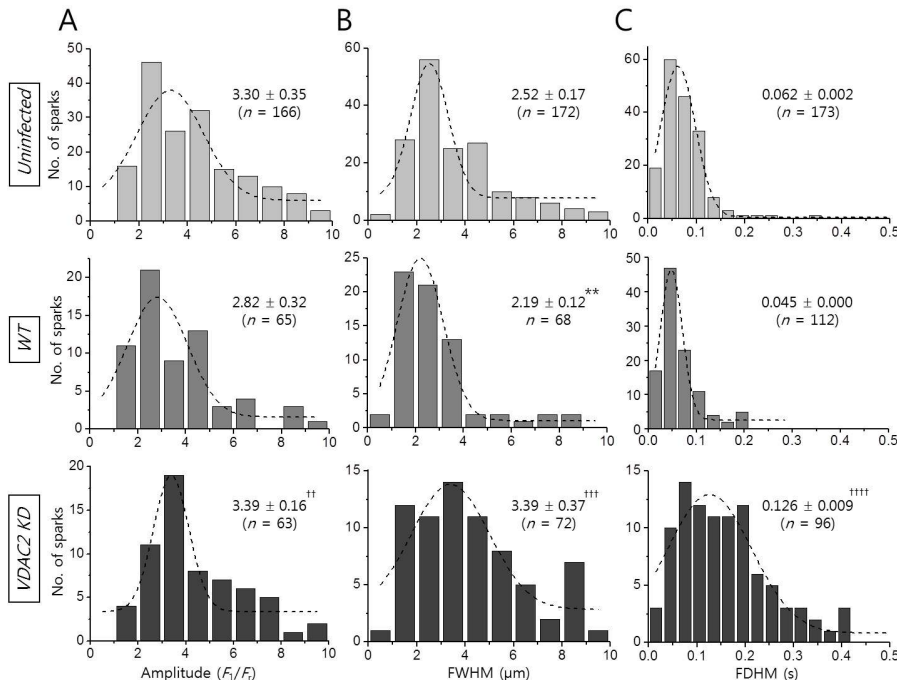


그림 8. 비감염, WT, VDAC2 KD HL-1 세포에서 칼슘의 unitary properties. 칼슘 스파크의 amplitude (A), FWHM (B), FDHM (C)은 WT 세포에서보다 VDAC2 KD 세포에서 상대적으로 크게 나타남. 각 그래프에 쓰인 수치는 평균±표준오차이며 괄호안에는 분석한 스파크의 개수임. **P<0.01 vs. uninfected. P<0.0001, +++P<0.001, ++++P<0.001, ††P<0.01 vs. WT.

(3) VDAC에 의한 미토콘드리아 및 세포질 칼슘 신호 조절 규명

① 미토콘드리아 칼슘 uptake의 측정

- 렌티바이러스로 감염된 WT, VDAC KD 세포는 공초점현미경 하에서 붉은색 형광으로 식별할 수 있음. 따라서 칼슘은 초록색 형광을 나타낼 fluo-4 AM으로 측정하였으며 또한 같은 이유로 세포질의 칼슘 신호는 동시에 측정할 수 없음
- Fluo-4 AM 20 μ M을 한 시간 loading 한 후 세포막을 digitonin (20 μ M)을 포함한 칼슘-free internal 용액으로 permeabilize 시킴. 그 후 미토콘드리아 외액의 칼슘 농도를 변화 시키며, 미토콘드리아 칼슘 농도의 변화를 기록하였음.
- Fluo-4로 형광 지시된 HL-1 세포에 digitonin(20 μ M)을 처리하였을 때 형광이 극적으로 감소하였다가 500 nM의 칼슘을 처리하였을 때 다시 증가하였음 (그림 9)

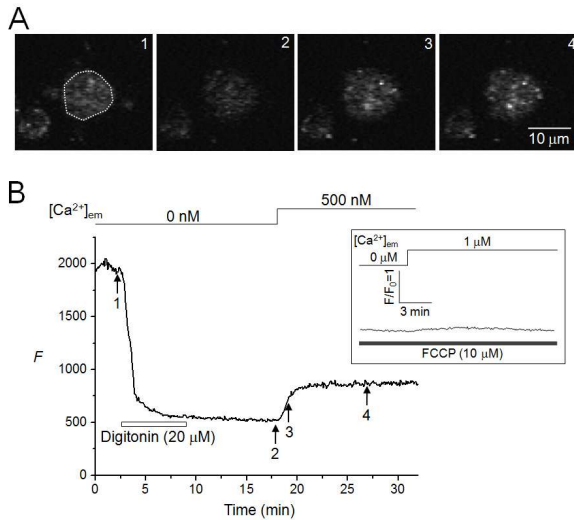


그림 9 Permeabilize한 HL-1 세포에서 fluo-4를 사용하여 측정한 미토콘드리아 칼슘. (A) 아래 B 패널에 표기된 시점에서 기록한 confocal 이미지. (B) 미토콘드리아 외액의 칼슘 유입에 따라 변화한 칼슘 형광의 time course. 삽입그림, FCCP(10 μ M) 전처리 후 연속적으로 유입된 칼슘에 따라 변화한 형광의 time course.

- 칼슘 유입에 의한 형광 증가는 세포의 형태로 관찰되었고, FCCP(10 μ M)를 처리한 후 칼슘 증가는 관찰되지 않았다(그림 9B-삽입그림). 이는 증가한 칼슘이 미토콘드리아로 흡수된 칼슘임을 의미함
- 칼슘 이미징 후 동일한 영역에서 MitoTracker green을 이용하여 미토콘드리아를 염색하여 그 위치를 파악하였음. MitoTracker green은 fluo-4 보다 매우 강한 형광을 나타내기 때문에, fluo-4를 사용한 칼슘 측정 후 세포를 MitoTracker로 염색하면 fluo-4 형광으로부터 미토콘드리아를 구분할 수 있었음

② 미토콘드리아 칼슘 uptake 시 VDAC2의 역할 고찰

- 그림 10 에서 보이는 바대로 미토콘드리아 칼슘 농도는 미토콘드리아 외부 칼슘의 증가 시 서서히 증가하였음. 농도를 더 올릴수록 증가 속도 및 양은 증가하였으며 WT 세포에 비해 VDAC2 KD 세포에서는 증가되는 속도가 느리게 나타났음 (그림 10-C, 오른쪽). 그러나 총 증가량은 두 그룹에서 유사하였음 (그림 10-C, 왼쪽)

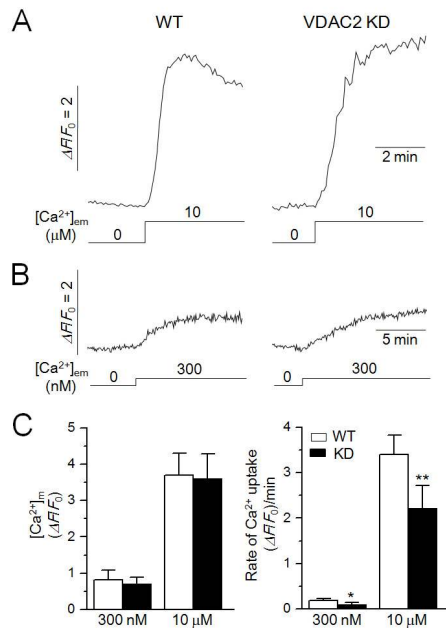


그림 10 Permeabilize한 렌티 바이러스 감염(WT)군과 VDAC2 KD HL-1 세포군에서의 미토콘드리아 칼슘 흡수. Ppermeablize한 WT군(A와 B, 왼쪽)과 VDAC2 KD HL-1 세포군(A와 B, 오른쪽)에서, 300 nM과 10 μM의 칼슘 유입에 의한 미토콘드리아 칼슘 신호 변화 time course. WT군(n=45)과 VDAC2 KD HL-1 세포군(n=34)에서 300 nM과 10 μM의 칼슘 유입에 의한 칼슘의 흡수율은 각각 유의성 있는 차이(C, 오른쪽)를 보였으나, 미토콘드리아 간질내 총 칼슘 변화량은 유사함(C, 왼쪽). *P<0.05, **P<0.01 vs. WT.

나. Histidine-Rich Ca²⁺ binding protein (HRC) 의 생리약리학적 기능 규명

(1) HRC 발현억제 또는 결핍으로 인한 마우스 심부전 모델의 악화

① HRC 발현억제 모델에서의 칼슘대사 분석

- HL-1 세포주에서 siRNA oligo를 이용한 HRC 발현 억제가 칼슘대사에 미치는 영향을 western blot과 IonOptix, [³H]ryanodine binding assay, oxalate supported Ca²⁺ uptake assay 등의 실험으로 분석함
- HRC의 발현이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었으며 근소포체로 부터의 칼슘대사가 유의하게 증가하였음. 하지만, HRC의 발현이 감소하였음에도 다른 칼슘대사 관련 단백질의 발현양에는 변화가 없었음 (그림 11)

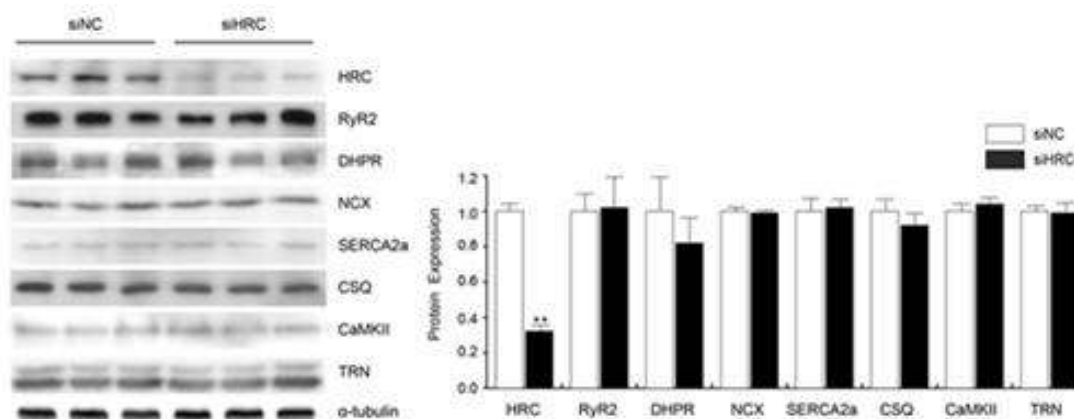


그림 11 HRC 발현 억제 모델에서의 다른 칼슘대사 관련 단백질의 발현양

- 3H ryanodine binding assay 결과 HRC의 발현량이 감소한 세포주에서 RyR2의 활성이 증가하였으며 oxalate supported Ca^{2+} uptake assay 결과 HRC의 발현량이 감소한 세포주에서 SERCA2의 활성이 증가하였음 (그림 12)

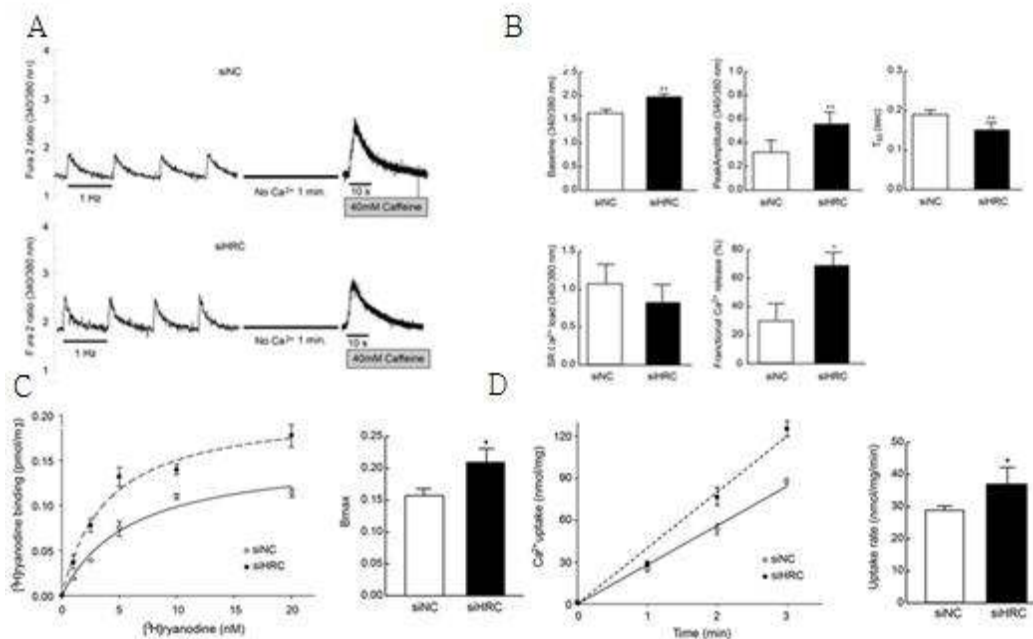


그림 12 HRC 발현억제 모델에서의 칼슘대사 분석 (A) 정상 (위) 및 HRC 발현을 억제한 세포 모델 (아래) 에서의 칼슘대사 비교 및 (B) 수치화 (C) 3H ryanodine binding assay 결과 (D) oxalate supported Ca^{2+} uptake assay 결과

② HRC 발현억제 모델에서의 심장 기능 악화

- HL-1 세포주에서 HRC의 발현을 억제한 경우, 근소포체에서의 칼슘대사가 향상되는 것을 관찰. 이는 HRC의 발현을 억제함으로써 심근기능을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시함
- 이에 마우스 심부전 모델에 대해 Adeno-associated virus (AAV)를 통해 HRC의 발현을 억제시킨 다음 심초음파를 통해 심장의 기능을 관찰한 결과 심부전 모델에서 심장의 수축력이 더 떨어지는 것을 관찰하였음 (그림 13)

③ HRC 발현결핍 모델에서의 심장 기능 악화

- HRC 발현결핍 모델에 심근비대를 유도한 경우 HRC KO 마우스에서 심각한 심근비대가 관찰되었음 (HW/BW, HW/TL ratio) (그림 14-A)
- 또한 심근비대를 유도한 경우 HRC KO 마우스의 심장 기능이 현저하게 감소하였으며 심근비대의 표지단백질 (ANF, β -MHC, SKA)의 발현 (그림 14-B) 및 심부전의 표지단백질인 TGF- β 의 발현이 HRC 결핍 심근비대 마우스 모델에서 현저하게 증가하였음 (그림 14-C)

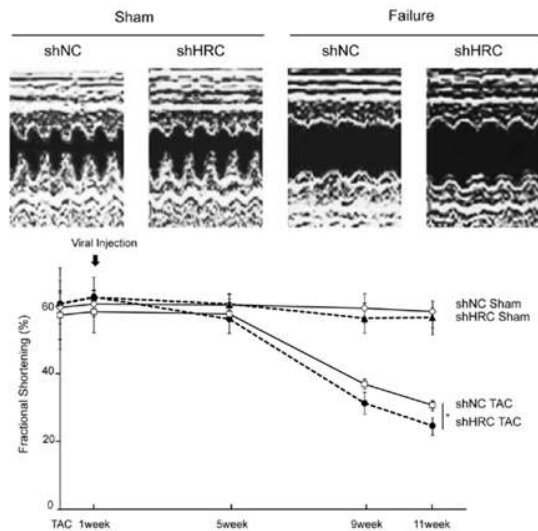


그림 13 HRC 발현억제에 의한 심장 기능의 변화

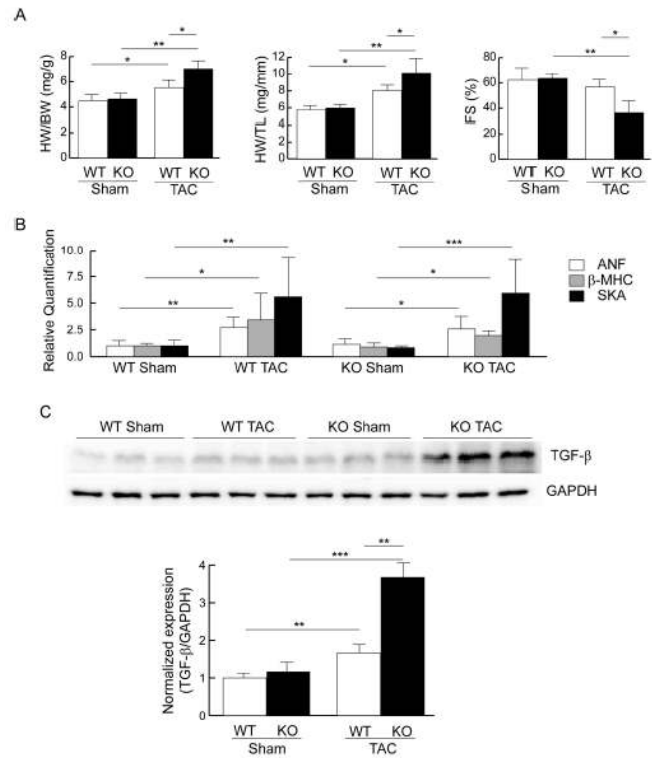


그림 14 HRC 발현 결핍에 의한 심근비대증 악화 (A) HW/BW로 측정된 심근비대 정도 (B) 심근비대 유전자 마커로 확인한 심근비대 정도 (C) TGFβ 발현 정보

(2) HRC 발현억제 또는 결핍으로 인한 심근 섬유증과 세포괴사

① HRC 발현억제에 의한 심근섬유증과 세포괴사

- 심부전의 대표적인 증상인 심근섬유증의 정도를 측정하기 위해 Trichrome 염색한 결과 HRC의 발현이 억제된 심부전 모델에서 가장 심각한 심근 섬유화가 관찰되었음 (그림 15)
- 심각한 심근 섬유화의 원인이 심근세포의 괴사로 인한 것임을 살펴보기 위해 TUNEL assay와 Western blot을 실시한 결과, HRC 발현이 억제된 심부전 모델에서 세포괴사의 정도가 가장 심하였고, 심근괴사의 표지단백질인 cleaved caspase 3의 발현이 가장 많이 증가하였음 (그림 15)
- 항세포괴사 단백질인 Bcl-2의 발현량이 HRC 발현이 억제된 심부전 모델에서 현저히 감소됨 (그림 15)

② HRC 발현결핍에 의한 심근섬유증 악화 및 생존율 감소

- 심부전의 표지단백질인 TGF-β의 발현이 HRC 결핍 심근비대 마우스 모델에서 현저하게 증가한 것이 심근섬유증 악화를 시사하는 것임, trichrome 염색법으로 살펴본 결과, HRC 결핍 심근비대 마우스 모델에서 심근 섬유증 현저하게 증가한 것을 알 수 있었음 (그림 16)

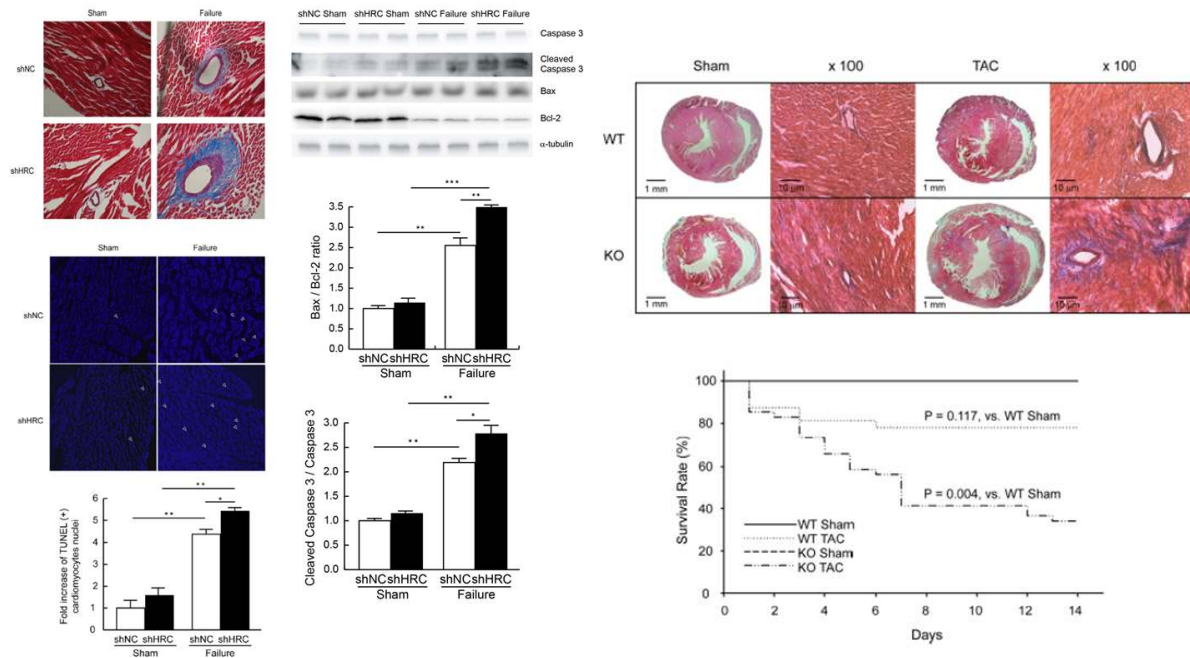


그림 15 HRC 발현 억제에 의한 심근 섬유증 및 세포 괴사 그림 16 HRC 발현 결핍에 의한 심근섬유증 및 생존도 조사

- 이를 토대로 관상동맥의 결착으로 심근비대증을 유도한 마우스모델에서의 생존율을 관찰한 결과 HRC의 결핍 마우스의 생존율이 현저하게 줄어들었으며 (그림 16), 이는 HRC의 결핍이 관상동맥의 결착에 대해 반응하는 정도가 현저히 증가한 것을 의미함

(3) HRC 발현억제 또는 결핍으로 인한 심근세포 괴사 신호전달

① HRC 발현억제로 인한 심근세포 괴사 신호전달

- 마우스 심부전 모델에서 HRC의 발현을 억제한 경우 심근세포의 괴사가 증가하는 기전을 연구하기 위해 관련 신호전달단백질을 western blot을 통해 관찰함 (그림 17)
- HRC의 발현을 억제한 경우 세포내 칼슘이온의 농도가 증가하는 것을 관찰하였으며, 따라서 세포내 칼슘이온의 농도에 따라 활성이 변할 수 있는 단백질인 CaMKII의 인산화 정도를 살펴본 결과 phospho-CaMKII \rightarrow phospho-p38 MAPK 신호전달이 증가한 것을 알 수 있었음

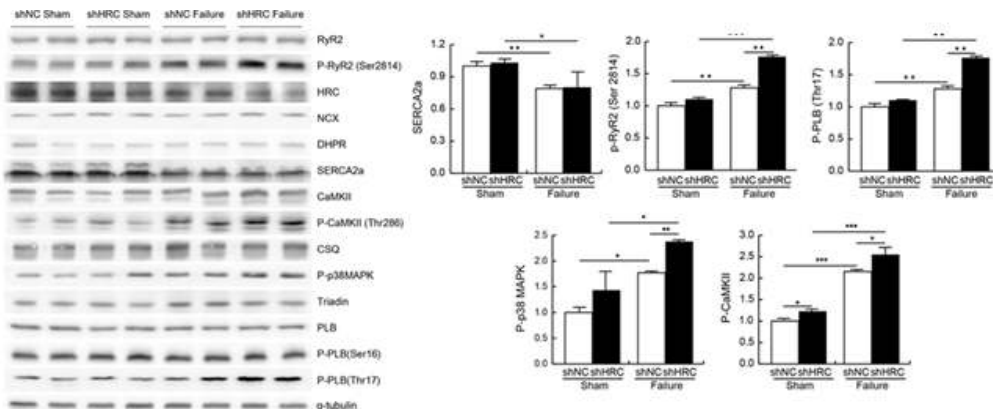


그림 17 HRC 발현 억제에 의한 심근세포 괴사 신호전달 경로

② HRC 발현결핍에 의한 심근세포 사멸의 증가

- 심근섬유증의 원인 중 하나인 심근세포소멸의 정도를 측정하기 위해 TUNEL assay를 실시한 결과, HRC 결핍 심근비대 마우스모델에서 TUNEL 양성반응이 가장 높게 나타나 심근세포 사멸이 심화됨이 관찰됨 (그림 18)
- HRC의 발현이 감소될 경우 심근세포 내의 칼슘신호전달에 이상에 의해 세포내 칼슘이온의 농도가 증가하고, 증가한 칼슘에 의해 CaMKII-p38MAPK 신호전달에 의한 심근세포의 소멸이 유도될 것으로 사료됨

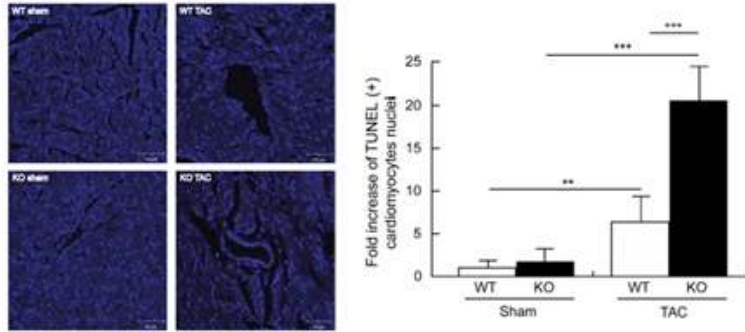


그림 18 TUNEL assay를 통한 HRC 발현 결핍 모델에서의 세포 사멸 조사

(4) HRC의 칼슘신호전달 작용기전 연구

① TRN의 RyR, HRC, CSQ에 대한 상호결합부위 동정

- 앞선 연구결과에서 HRC가 칼슘대사의 조절자로서의 역할을 수행할 것이라는 예측이 있었지만, 정확하게 어떻게 조절하는지에 대한 결과는 보고된 바 없음. 따라서 본 실험을 통해 근소포체에서의 칼슘이온의 분비가 어떻게 조절되는지 GST-pulldown assay를 통해 상호결합 부위를 검증한 결과 (그림 19-A), TRN의 202~215번 아미노산이 RyR, HRC, CSQ에 대한 상호결합에 필수임을 규명함 (그림 19-B)
- 근소포체 내의 칼슘이온 농도의 변화에 따라 TRN의 상호결합이 어떻게 변화하는지 면역침강법을 통해 검증한 결과, RyR의 경우는 pCa 3에서 TRN과의 결합이 가장 강했고, HRC는 pCa 4에서 가장 강했음. 하지만, CSQ의 경우는 pCa4에서 그 결합력이 가장 약하여 이는 RyR은 서로 경쟁적으로 TRN과 상호결합을 할 수 있다는 것을 의미함 (그림 19-C, D)

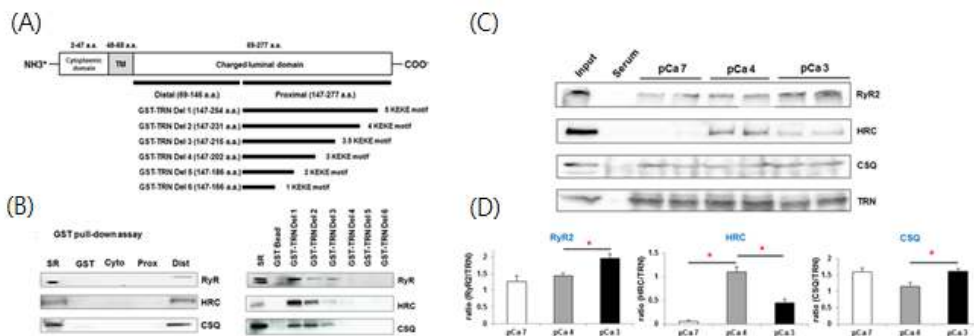


그림 19 TRN의 RyR, HRC, CSQ에 대한 상호결합부위 동정 (A) 서로 다른 C 말단을 가진 construct 제작 (B) GST pull-down assay로 TRN의 결합 단백질 조사 (C) TRN와 결합 단백질 간의 칼슘의존도 조사 및 (D) 수치화

② HRC의 TRN에 대한 경쟁적 상호결합 연구

- HRC가 RyR2, CSQ, TRN과 경쟁적으로 상호결합을 하는지 알아보기 위해 합성펩타이드를 사용하여 면역침강법을 실시한 결과, HRC의 경우 RyR2의 loop2 부분을 합성한 펩타이드의 농도를 증가시켰을 때 TRN과의 결합력이 약해지는 것을 관찰함. 즉, HRC는 TRN과의 상호결합에서 RyR2와 경쟁을 한다는 것을 알 수 있음 (그림 20-A)
- 하지만, CSQ의 경우 RyR2의 loop2 부분을 합성한 펩타이드의 농도를 증가시켜도 TRN과의 상호결합에서 RyR2와 경쟁하지 않는 것을 관찰하였음 (그림 20-B)
- 즉, HRC-TRN-RyR2의 경우는 경쟁적 상호결합이지만, CSQ-TRN-RyR2의 경우는 비경쟁적 결합임을 알 수 있음

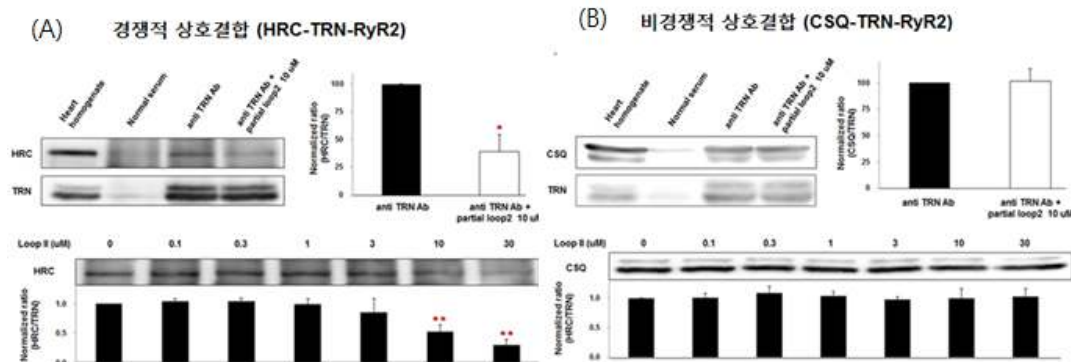


그림 20 HRC의 TRN에 대한 상호 결합 연구 (A) TRN 관련 경쟁적 상호결합 단백질 연구 (B) TRN 관련 비경쟁적 상호결합 단백질 연구

다. Heart Lim Protein (HLP)의 상호작용 및 심장 질환 관련성 규명

(1) HLP와 RyR2의 상호작용 규명

- Mammalian세포내 발현을 위한 HLP 돌연변이 유전자 제작함
- 대장균 내 발현을 위한 RyR2 돌연변이 유전자 제작 후 GST-pull down assay를 통한 상호작용 부위 발견하였음 (그림 21)

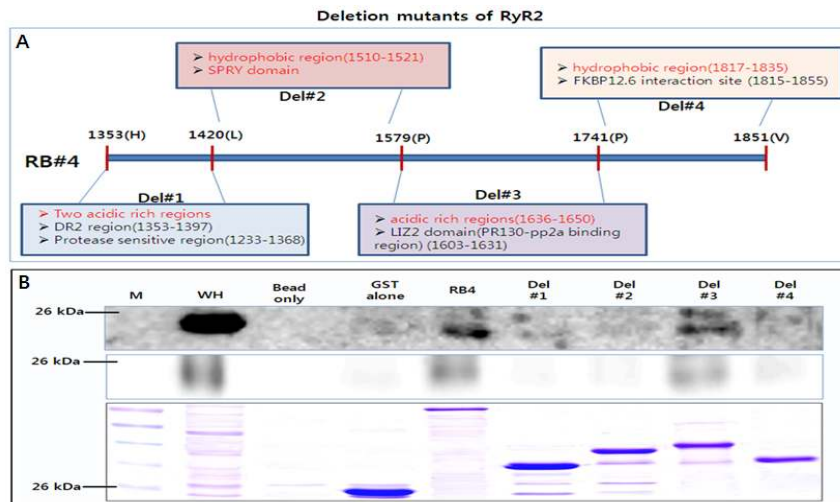


그림 21 (A). RyR2내 돌연변이 제작 디자인. 명시되어 있는 특정도메인을 중심으로 4개의 돌연변이로 제작됨. (B) 대장균 내 돌연변이의 발현결과와 GST-pull down assay 결과. 세번째 돌연변이(Del#3)에서 특징적으로 HLP와 상호작용 함.

(2) HLP와 Caveolin3 (Cav3)의 상호작용 규명

- 마우스 심장 조직에서 면역침강법을 이용한 생화학적 방법으로 HLP와 Cav3의 상호작용 확인하였음 (그림 22)
- Mammalian세포 내 발현을 위한 HLP와 Cav3 유전자 제조 후, mammalian세포 내에서의 직접적인 상호작용 확인하였음 (그림 22)

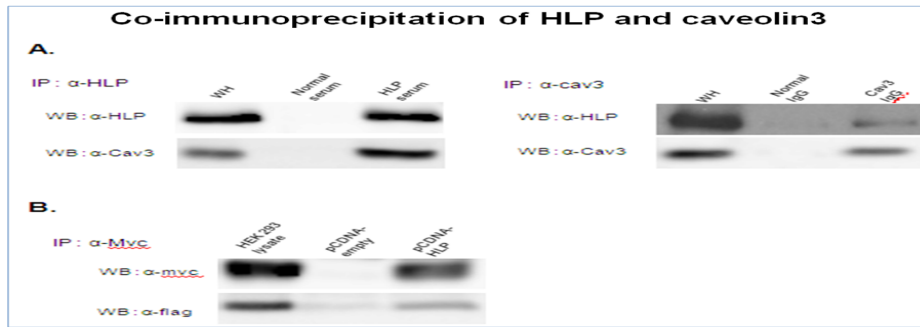


그림 22 (A) 마우스 심장조직에서의 면역침강법 결과. HLP 특정 항체 (왼쪽) 또는 Cav3 특정 항체 (오른쪽)를 이용하여 면역침강 후 각각 Cav3 (왼쪽)와 HLP (오른쪽)가 상호작용함을 western blot 기법으로 확인함. (B) HEK293 세포내 myc-HLP와 Flag-Cav3를 발현시킨 후, myc 특정 항체를 이용하여 면역침강하여 HLP-Cav3의 상호작용을 확인함.

(3) HLP와 RyR2 및 Cav3와의 공동발현위치 조사

- 항체를 이용한 면역염색법과 공초점 현미경을 이용하여 HLP-Cav3 및 HLP-RyR2의 공동발현 위치 조사하였음 (그림 23)

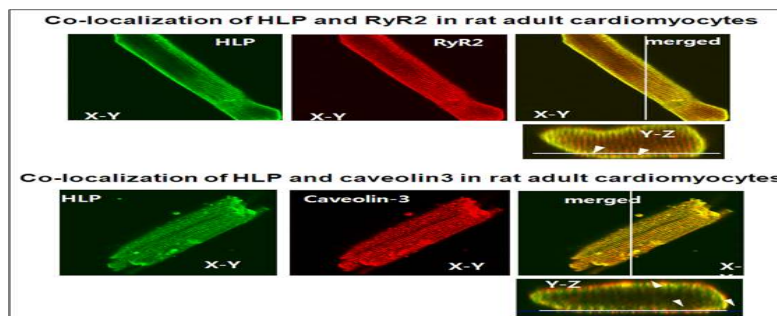


그림 23. HLP 특정항체와 RyR2 특정항체를 이용한 면역염색법 (위)과 HLP 특정항체와 Cav3 특정항체를 이용한 면역염색법 (아래). Rat 성체 심근 세포내에서의 HLP-RyR2(위)와 HLP-Cav3(아래)의 공동발현이 세포의 근섬유막(sarcolemma)부분에서 특징적으로 일어남

라. Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)를 생성, 조절하는 기전 연구

(1) IP₃를 생산하고 심근비대를 유발하는 호르몬들에 의한 핵 CREB 인산화 조절 고찰

○ ET-1 (10 nM)과 PE (10 μM)은 CREB 인산화를 세포 외부에 정상 농도의 칼슘이 있을 때 증가시킴 (그림 24, 오른쪽). 그러나 이 효과는 세포 외 칼슘 농도가 낮을 때 현저히 기록되지 않았음 (그림 24, 왼쪽). 즉, 이 호르몬들에 의한 CREB 인산화에 칼슘이 필요함을 나타냄

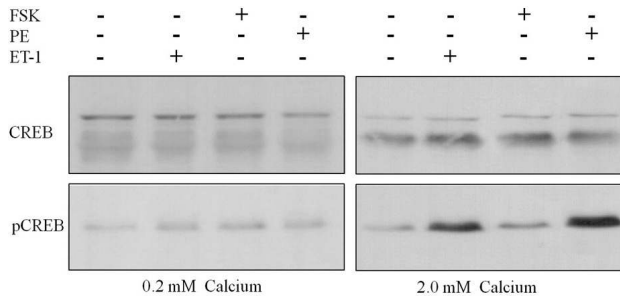


그림 24. Western blot을 통한 세포 외 칼슘 농도에 따른 CREB 인산화 측정. 세포 외 칼슘 농도가 0.2 mM일 때 (왼쪽)는 ET-1이나 PE에 의한 CERB의 인산화가 나타나지 않았으나 2.0 mM일 때(오른쪽)는 CREB의 인산화가 관찰됨. (FSK: forskolin, 50 μM)

○ BAPTA-AM은 세포질 내 칼슘 킬레이트제로 비교적 빠른 속도로 세포질의 칼슘과 결합함. 10 μM의 BAPTA-AM이 처리되었을 때 ET-1과 PE 유도성 CREB 인산화는 상당히 감소함 (그림 25). 이는 CREB 인산화가 세포질 내 칼슘 농도에 의존적임을 나타냄

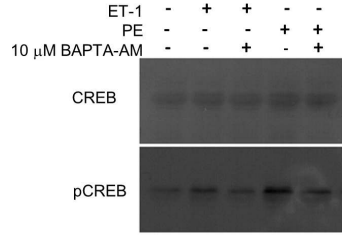


그림 25. 세포질 칼슘 킬레이트제인 BAPTA-AM을 10 μM 농도로 처리했을 때 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화가 모두 저해됨

(2) 호르몬에 의한 CREB 인산화에서 IP₃의 역할 고찰

○ IP₃R 차단제인 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate, 3 μM)와 XeC (xestosponsin C, 10 μM)를 처리했을 때 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화는 상당히 감소함 (그림 26, 27). 이 결과는 CREB 인산화가 IP₃R의 활성화에 의해 일어남을 의미함

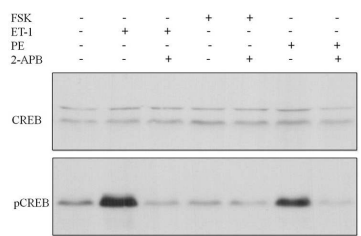


그림 26. IP₃R 차단제인 2-APB 를 처리했을 때 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화가 모두 저해됨

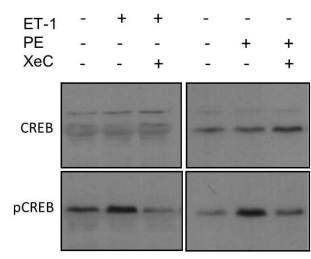


그림 27. IP₃R 차단제인 XeC 를 처리했을 때 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화가 모두 저해됨

(3) 호르몬에 의한 CREB 인산화의 분자적 기전 고찰

① ET-1, PE에 의한 유도성 CREB 인산화에 대한 CaMK II와 PLC의 역할

○ ET-1 유도성 CREB 인산화는 KN93(30 μM), PD98059(10 μM), U73122(20 μM)에 의해 저해되었으나 GF109203X(5 μM)에 의한 저해는 거의 일어나지 않았음 (그림 28). 이는 ET-1 유도성 CREB 인산화에 CaMK II, ERK1/2, PLC가 관여함을 의미함

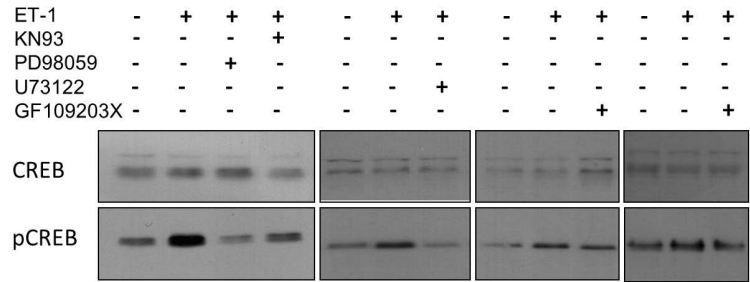


그림 28. KN93, PD98059, U73122, GF109203X(각 각 CaMK II, ERK1/2, PLC, PKC 저해제)처리시 Westwrn blot을 통한 ET-1 유도성 CREB 인산화 측정. KN93, PD98059, U73122에 의해 ET-1 유도성 CREB 인산화가 상당히 감소됨. PKC 저해제인 GF109203X에 의한 CREB 인산화 억제는 미미함.

○ PE 유도성 CREB 인산화는 H89, KN93, U73122에 의해 모두 저해되었고 (그림 29) 이는 PE 유도성 인산화에 MSK1, PKA, CaMK II, PLC가 관여함을 나타냄

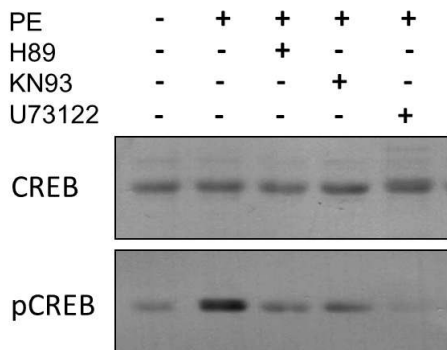


그림 29. H89, KN93, U73122 (각 각 MSK1 & PKA, CaMK II, PLC 저해제)처리 시 PE 유도성 CREB 인산화의 측정. PE 유도성 CREB 인산화는 세 가지 저해제에 의해 모두 감소하였고, 특히 U73122에 의한 감소가 뚜렷함.

② ET-1, PE에 유도성 CREB 인산화에 대한 MSK1과 ERK1/2의 역할

○ ET-1 유도성 CREB 인산화와 PE 유도성 CREB 인산화는 H89(25 μM)와 PD98059에 의해 저해되었음. 특히 ET-1 유도성 CREB 인산화에서 H89와 PE 유도성 CREB 인산화에서 PD98059에 의한 저해 효과가 두드러짐 (그림 30). 이는 CREB 인산화에 MSK1과 ERK1/2가 관련 있음을 의미함

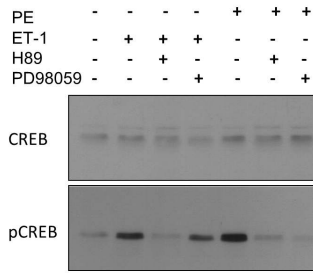


그림 30. H89와 PD98059(각 각 MSK1 & PKA, ERK 1/2 저해제)에 의한 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화의 저해.

③ ET-1, PE에 유도성 CREB 인산화에 대한 PKC의 역할

○ PI₃ kinase 저해제인 LY294002(25 μM)는 ET-1 유도성 CREB 인산화에 아무런 영향을 나타내지 않았으며 PKC 저해제인 GF109203X는 인산화를 감소시킴. 하지만 PE 유도성 CREB 인산화는 두 저해제에 의해 변하지 않았음 (그림 31).

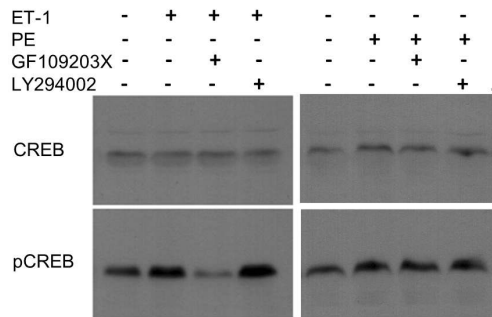


그림 31 GF109203X와 LY294002 (각 각 PKC, PI₃ kinase 저해제) 처리시 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화의 측정. GF109203X에 의해 ET-1 유도성 CREB 인산화는 상당히 감소하였으나 LY294002에 의해서는 그렇지 않음. PE 유도성 CREB 인산화는 GF109203X와 LY294002에 의한 변화를 보이지 않음.

④ 부분적으로 IP₃R를 통해 ERK1/2 경로를 활성화 시키는 PE와 ET-1

○ PE와 ET-1 유도성 ERK1/2 인산화는 IP₃R 차단제인 2-APB와 XeC에 의해 저해됨. 하지만 XeC에 의해서는 상대적으로 저해 효과가 작았음 (그림 32). 이는 ET-1과 PE에 의한 ERK1/2 경로 활성화가 부분적으로 IP₃R와 관련 있음을 의미함

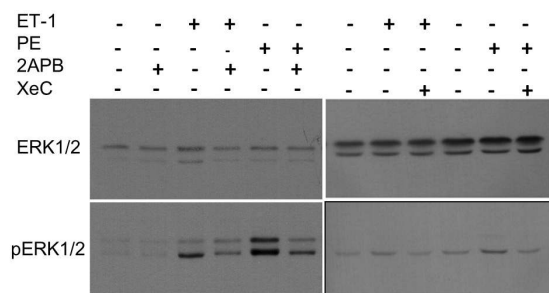


그림 32. IP₃R 차단제인 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate), XeC (xestosponin C)에 의한 ET-1, PE 유도성 ERK1/2 인산화의 측정. ET-1, PE 유도성 ERK1/2 인산화는 2-APB에 의해 모두 저해되었음. 하지만 XeC에 의한 저해 효과는 미미함

⑤ PLC를 통해 ERK1/2를 활성화시키는 ET-1 (CaMK II 비의존성)

○ ET-1 유도성 ERK1/2 인산화에서 H89와 U73122는 인산화를 뚜렷하게 저해시켰으나 CaMK II 저해제인 KN93은 효과가 없었음 (그림 33). 이는 ET-1 유도성 ERK1/2 인산화가 CaMK II와는 무관하고 PLC에 의존적임을 나타냄

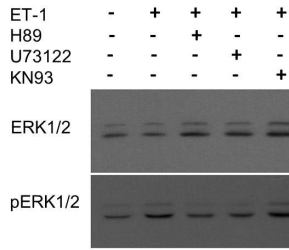


그림 33. H89, U73122, KN93(각 각 MSK1 & PKA, PLC, CaMKII 저해제) 에 의한 ET-1 유도성 ERK1/2 인산화의 측정. H89와 U73122는 ET-1 유도성 ERK1/2 인산화를 저해했으나 KN93는 그렇지 않음

⑥ Global 칼슘 증가와 독립적인 PE, ET-1 유도성 ERK1/2 활성화

- 10 μ M의 BAPTA-AM 처리시 ET-1, PE 유도성 ERK1/2 인산화는 변하지 않았음 (그림 34). 이는 ET-1, PE 유도성 CREB 인산화와 다른 양상이다. ERK 1/2의 활성화에는 global 칼슘 농도가 무관함을 뜻함

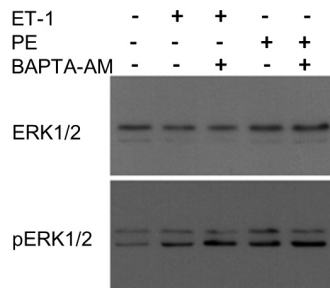


그림 34. BAPTA-AM에 의한 ET-1, PE 유도성 ERK1/2 인산화의 측정. 세포질 칼슘 킬레이트제인 BAPTA-AM은 ET-1, PE 유도성 ERK1/2 인산화를 변화시키지 않음.

마. 기계적 자극과 $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger 와의 상관성 연구

기계적 자극은 심장의 비대를 일으킨다고 알려져 있다. 분리한 쥐 심실세포에서 기계적 자극으로 유체압력(16 dyne/cm²)을 가하였다. 유체압력이 심실근세포 pH에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 먼저 세포 내 H⁺의 측정방법을 setting 하였다.

(1) pH 보정

- Carboxy-SNARF-1 AM을 10 μ M 농도로 10분간 세포에 loading 한 후 540 nm의 beam을 Ar/Kr 레이저를 이용하여 excitation 시킴. emission은 590 \pm 5 nm, 640 \pm 5 nm에서 측정하였고, 두 형광의 비를(590 nm/640 nm) 구하여 pH로 보정하였음
- 그림 20에 나온 식을 이용하여 기록된 R 값을 pH로 전환하였음. 이를 위해 R_{min}, R_{max}를 구하고 각 파장에서의 형광을 이용하게 되는데, R_{min}은 pH 5.5 용액 및 0.01 mM nigericin을 이용하여 기록된 형광 비이며, R_{max}값은 pH 9.5 용액 및 동일농도 nigericin을 처리하였을 때 세포에서 기록된 형광 비이임. pH 5.5 용액에는 20 mM Mes, 140 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA를 더 첨가하였으며, pH 9.5 용액에는 20 mM Tris를 buffer로 대신 사용함

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log((R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)) - \log F_{640, \text{max}/\text{min}} \quad (2.56 \text{ f/s})$$

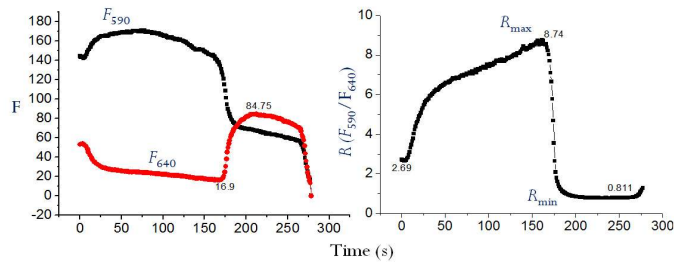
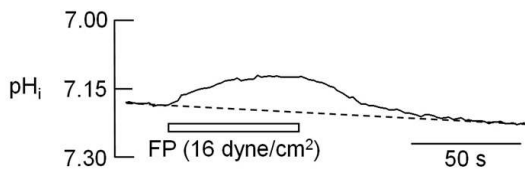


그림 35. Carboxy SNARF-1을 이용한 형광강도의 pH로의 보정절차. (설명은 본문참조)

(2) 유체 압력에 의한 세포내 H⁺ 농도 증가

- 심실근세포에서 세포내 pH가 유체 압력에 의해 가역적으로 감소하였음 (그림 36). 감소 정도는 0.07±0.01(n=16, P<0.001) pH unit 임



Decrease of 0.07 ± 0.10 pH unit (n=6, P<0.001)

그림 36. 백서 심실근세포에서 유체 압력의 세포내 pH (pHi)에 대한 효과. 단일 심실근세포에 유체 압력(16 dyne/cm²)을 가하였을 때 변화되는 pHi의 time course. 유체압력은 pHi를 가역적으로 감소시킴.

- 세포내 H⁺ 농도가 증가하면 증가된 H⁺을 세포 외로 제거하는 기전이 작동할 가능성이 큼. 이러한 기전에는 세포막에 존재하는 Na⁺-H⁺ 교환체와 Na⁺-HCO₃⁻ 교환체가 있으나, 본 실험에서는 HCO₃⁻ 완충액을 사용하지 않고 대신 HEPES 완충액을 사용하였기 때문에, 이 두 기전 중 Na⁺-H⁺ 교환체가 작동할 것으로 예상됨
- 유체 압력에 의해 발생한 세포내 H⁺ 농도 증가가 Na⁺-H⁺ 교환체의 활성화에 영향을 미치는지 알아보고자, Na⁺-H⁺ 교환체에 대한 선택적인 억제제 HOE642를 사용하여 실험을 진행하였음

(3) 유체 압력에 의해 증가한 세포내 H⁺은 Na⁺-H⁺ 교환체에 의해 일부 제거됨

- HOE642(10 μM)는 단독으로는 심실근세포 pH에 영향이 없었으나, 유체 압력에 의해 심실근세포 pH가 감소된 후, 유체 압력이 계속 존재하는 상태에서 HOE642를 처리 하였을 때에는 pH가 보다 현저히 더 감소하였음 (감소량: 0.12±0.01 pH unit, n=14, P<0.001; 그림 37-A)
- HOE642를 약 8분간 처리한 후, 동일한 강도의 유체 압력을 가하였을 때 측정된 pH가 HOE642를 전처리 하지 않은 세포에서 보다 약 2배 더 크게 나타남 (P<0.01; 그림 37-B)
- 이는 유체 압력 시 증가된 세포내 H⁺들이 Na⁺-H⁺ 교환체에 의해 세포 외부로 제거되었을 가능성을 보여줌 (그림 37-C).

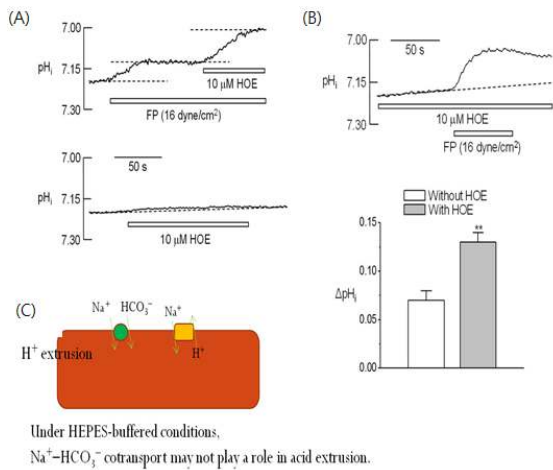


그림 37. Na⁺-H⁺ 교환체 억제제 HOE642의 유체압력에 의한 pH 변화에 대한 효과. (A) 유체 압력에 의해 심실근세포 pH가 감소한 후, 유체 압력이 존재하는 상태에서 HOE642를 처리하였을 때는 pH가 보다 현저히 감소. (B) HOE642를 전처리한 후, 유체 압력을 가하였을 때 측정된 pH가 전처리하지 않은 세포에서 보다 약 2배 증가. (C) Na⁺-H⁺ 교환체와 Na⁺-HCO₃⁻ 교환체에 의해 H⁺이 세포외로 제거되는 기전을 보여주는 모식도

2. 심근 신규유전자와 심근비대증 네트워크 분석

가. 칼슘관련 신규 유전자 분석

(1) 칼슘관련 신규유전자 Mm.261329 knockdown 세포모델 분석

- 마우스 칼슘관련 신규유전자들의 세포 수준에서의 네트워크적, 기능적 특성을 분석하고자 knockdown 세포모델 연구를 수행함.
- 칼슘 결합단백질인 Mm.261329는 myosin regulatory light chain (Myl2b)인 것으로 판명됨. Myl2b는 Myl2a와 homology가 매우 높음. Myl2a와 Myl2b (Mm.261329)가 knockdown된 NIH3T3 세포모델을 구축함. 이러한 Mm.261329 knockdown 세포모델에서 세포의 형태 및 구조에 dramatic한 변이를 관찰함. 이러한 변이는 actin stress fiber 구조의 파괴, 세포면적의 증가, 세포돌기의 수와 길이의 증가 등이었음. 더 나아가 Mm.261329 knockdown 세포에서 추가적으로 focal adhesion, contractility, migration의 감소 등을 발견함 (그림 38)
- 결론적으로 칼슘결합단백질인 Mm.261329는 세포의 구조, 지지력, 수축력, 견고성 유지에 필수적인 단백질을 새롭게 발견함

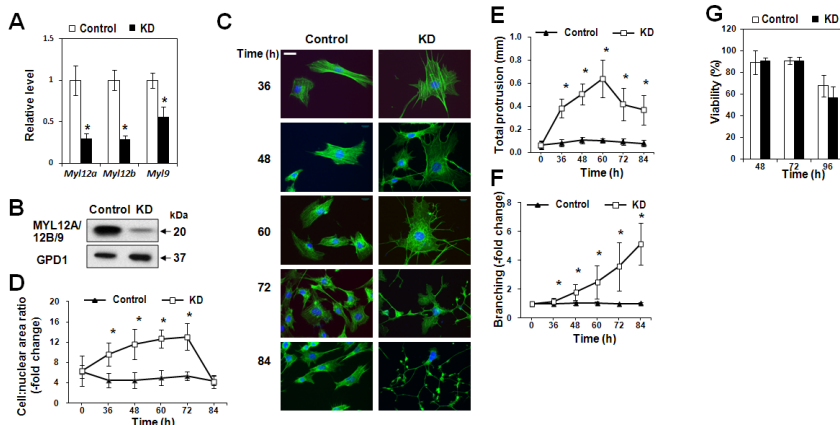


그림 38 칼슘관련유전자 Mm.261329 knockdown 세포 모델 구축 및 분석. A와B, Knockdown 확인. C-F, Knockdown세포의 비정상적 형태변화. G. 세포생존도

(2) 칼슘관련 신규유전자 Mm.261329의 단백질 네트워크 분석

- 마우스 칼슘관련 신규유전자들의 단백질 수준에서의 네트워크적, 기능적 특성을 분석하고자 질량분석법(MS), 면역침강법(IP) 등의 분석을 수행함
- 칼슘 결합단백질인 Mm.261329 (MYL2B 혹은 MRLC)의 상호작용 단백질들이 myosin heavy chain (MHC)임을 질량분석법(MS) 분석을 통해 발견함 (그림 39)
- 이러한 결과를 바탕으로 다양한 cell type (NIH3T3, HL-1, Bladder, skeletal muscle 등)에서 Mm.261329가 bind하는 MHC의 종류와 binding의 정도를 조사함. 그 결과, Mm.261329는 모든 MHC와 interaction하지만, 그중에서도 non-muscle type인 MYH9, 10, 14와 interaction이 강함을 새롭게 발견함. 이를 바탕으로 각 세포type에서의 interaction map을 작성함

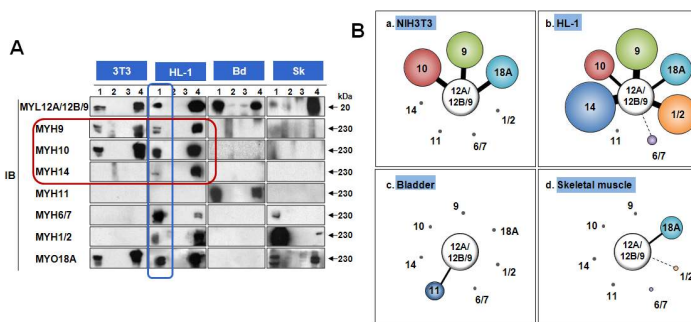


그림 39 칼슘관련유전자 Mm.261329 상호작용 단백질 발굴 및 네트워크. A, 면역침강법-western blot 결과. B, A에서의 결과를 정량화한 네트워크

(3) 칼슘관련 신규유전자들의 심비대증과의 연관성 분석

- 칼슘관련 신규유전자 Mm.261329와 Mm.20818의 발현을 pathological hypertrophy (TAC)와 physiological hypertrophy (swimming) 모델에서 NGS (next generation sequencing) 기술에 의해 측정된 본 사업단의 data를 활용하여 발현변이가 있는지 분석하였음
- Pathological hypertrophy에서 Mm.261329 (MRLC)의 발현은 약하게 증가함 (그림 40). 현재까지 myosin chain 관련 연구에 따르면 hypertrophy model에서 Myh7은 증가하고 Myh6은 감소함. 본 연구의 Mm.261329의 결과가 심비대증과 myosin light, heavy chain의 연관성에 대한 기초가 될 것임. Mm.20181의 발현은 두 모델에서 유의성있는 변화가 없는 것으로 판명됨

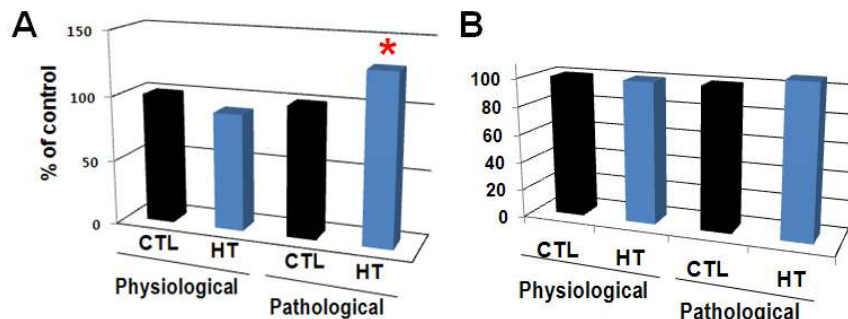
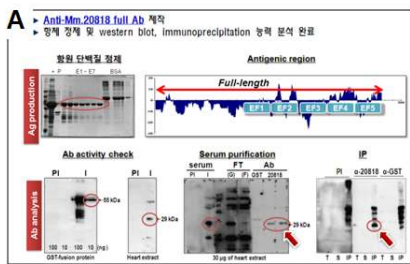


그림 40 심비대증 모델에서 칼슘관련 유전자들의 발현분석. A, Mm.261329. B, Mm.20818

(4) 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818의 항체 제작 및 상호작용 단백질 발굴

- 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818에 의해 coding되는 2종의 항체를 GST fusion 단백질을 항원으로 하여 얻어진 rabbit polyclonal sera로부터 정제하였음. 이러한 항체들은 면역침강법이 가능한 항체로 판명됨. 이러한 항체를 이용하여 마우스 심장단백질 lysate에서 상호작용하는 인자들을 함께 침강시키고 질량분석법(MS)으로 동정하였음.
- 동정된 단백질들은 SFPQ (splicing factor, proline- and glutamine-rich), NONO (non-POU-domain-containing, octamer binding protein), WDR37 (WD repeat-containing protein 37) 등 임. NONO, SFPQ 등은 유전자발현에 다양하게 관여하는 DBHS 단백질 그룹에 속함 (그림 41). DBHS (Drosophila behavior human splicing) domain에는 tandem RNA recognition motifs (RRMs)와 helix-turn-helix (HTH) DNA binding domain이 있고, 이러한 domain을 가진 인자들은 DNA repair 혹은 RNA regulation에 관여할 가능성이 있는 것으로 알려짐.



B

| | Spectrum Count | Sequence Coverage | Description |
|---|----------------|-------------------|-------------------------|
| 1 | 21 | 23% | Sfpq |
| 2 | 20 | 32% | Nono |
| 3 | 15 | 34% | Wdr37 |
| 4 | 8 | 30% | Mm.20818 (Pef1, Peflin) |
| 5 | 3 | 15% | Wbp2 |
| 6 | 1 | 8% | Gstp1 |

그림 41 칼슘관련 신규 유전자 Mm.20818의 항체제작(A) 및 상호작용 단백질 발굴(B)

(5) 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818 knockdown 세포모델 제작

- 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818의 발현을 저해하는 siRNA를 이용하여 NIH3T3세포에서 Mm.20818의 knockdown을 유도하였음. 단백질 수준이 약 80% 감소한 knockdown세포를 확보함. 이러한 세포의 관찰 결과, 주목할 만한 세포의 형태변화와 세포증식의 변화는 없었음 (그림 42)

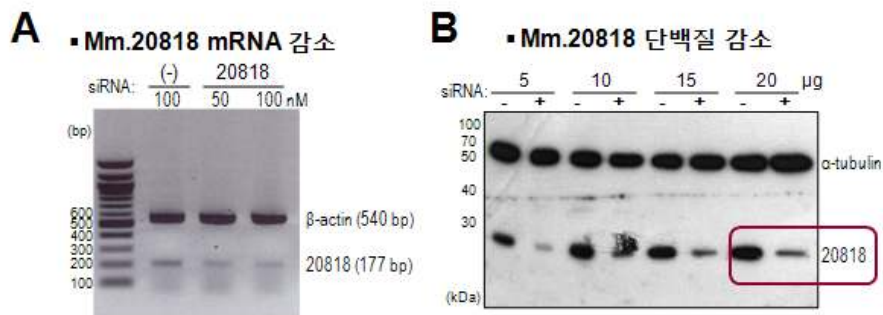


그림 42 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818 knockdown 세포 제작. A, knockdown세포에서의 transcript level (A)과 단백질 level (B)

(6) 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818과 splicing 연관성 분석

- 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818 단백질이 NONO, SFPQ와 상호작용한다는 사실에 근거하

여, RNA splicing에 관여할 가능성을 조사하였음. 이를 위해 minigene assay를 수행하였는데, 이 방법은 alternative splicing을 확인할 수 있는 DNA 서열과 대부분의 splicing factor들이 작용할 수 있는 일반적인 DNA 서열을 가지고 있는 gene으로서 테스트하고자 하는 gene의 양을 serial로 transfection시켜, splicing의 변화(exon skipping 정도)를 PCR로 확인하는 assay임. Control 실험으로, 잘 알려진 splicing factor인 ASF/SF2와 minigene을 cotransfection하여 ASF/SF2 양의 변화에 따른 minigene splicing pattern의 변화를 확인하였음 (그림 43)

- Mm.20818과 minigene을 co-transfection하여 splicing에 미치는 영향을 조사한 결과, 2종의 minigene에서 약한 변화가 관찰됨. 따라서 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818이 splicing과 관련되어 있음을 처음으로 제시함.

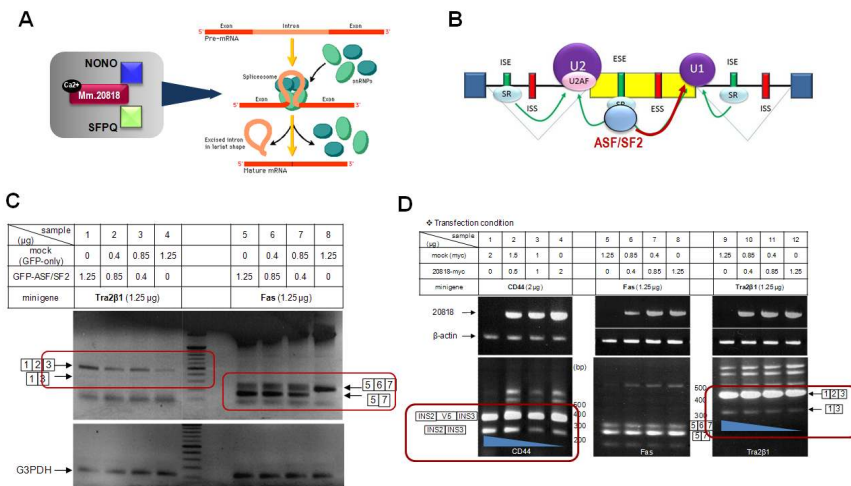


그림 43 칼슘관련 신규유전자 Mm.20818과 splicing 연관성. A, Mm.20818과 splicing 관련성 모식도. B, Minigene assay의 control실험에 쓰인 ASF/SF2의 기능 모식도. C, ASF/SF2를 이용한 minigene control 실험결과. D, Minigene assay에서 Mm.20818 activity결과)

나. 미토콘드리아 관련 유전자 분석

(1) 미토콘드리아 관련 신규유전자 항체 제작

- 심근 미토콘드리아 관련 신규유전자 11종 중 7종의 유전자에 의해 coding되는 단백질에 대한 항체를 제작하고자 하였음. 이들 7개 유전자는 Mm.41272, Mm.41622, Mm.146332, Mm.247453, Mm.301020, Mm.27886, Mm.269736임
- 7종의 유전자에서 가장 antigenicity가 높은 부분에 상응하는 peptide를 합성하고 이를 이용해 5개의 신규유전자에 대한 rabbit polyclonal serum을 확보함 (그림 44)
- 5종의 항체 중 Mm.41271 (43 kDa), Mm.269736 (7.4 kDa)은 심장 sample에서 각각 예상하는 분자량의 단백질을 detection함. 따라서 적어도 2종의 유전자에 대한 검증된 항체를 확보함

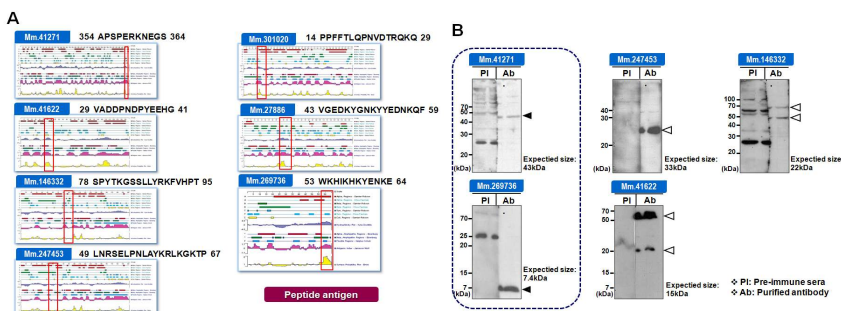


그림 44 미토콘드리아 관련 신규유전자 항체 제작. A, 항원으로 사용된 peptide부위. B, Western blotting을 이용한 항체의 심장단백질 탐지 조사

(2) 미토콘드리아 관련 신규유전자들의 심비대증과의 연관성 분석

- 미토콘드리아 관련 신규유전자 11종의 expression을 pathological hypertrophy (TAC)와 physiological hypertrophy (swimming) 모델에서 NGS 기술에 의해 측정된 본 사업단의 data를 활용하여 발현변이가 있는지 분석함 (그림 45)
- Pathological hypertrophy에서 대부분의 신규유전자들의 발현수준이 감소함을 발견함. 이는 mitochondrial protein을 coding하는 상당수 유전자들의 발현 감소가 기존에 보고된 것과 유사하며, 이를 통해 신규유전자들이 미토콘드리아와 관련되어 있음을 확인하였고 향후 각각의 신규유전자 심층연구에 활용할 수 있는 기반을 마련함

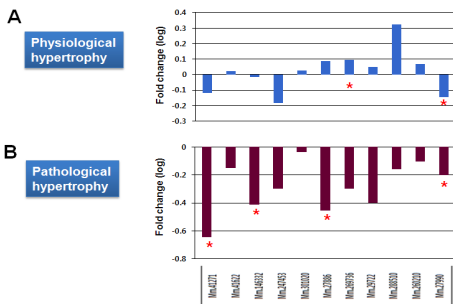


그림 45 미토콘드리아 관련 신규유전자들의 심비대 모델에서의 변이 분석. A, Physiological 심비대증에서의 변이. B, Pathological 심비대증에서의 변이

3. RyR 복합체의 EM 및 상호작용의 3차원 맵 확립

(1) Human IP₃R1 유전자 합성 및 CTD zinc finger motif로 예상되는 부분의 folding 변화 측정

- X-선 구조 분석을 위한 human IP₃R1의 합성 (그림 46)
- Human IP₃R1 construct design 및 발현 조건 검색 (그림 47)

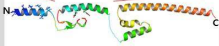
| Domain | Region | Cloning | Express | Protein purify | More |
|--|--|---|---|----------------|--|
| C-term (160 aa) | -----C-term | O | O | -ing | ▶ Detergent W/O ▶ 3Cys--3Ala mut. |
| 6TM | -----6TM-----C-term | O/-ing | O/-ing | | ▶ MBP/GST/Mistic ▶ MAKTSS (N-term hydrophilic sequence add.) |
| N-term | N-term -----linker-----C-term | -ing | | | |
| Full | N-----6TM-----C Human-IP3R1 full (2758 aa) | -ing | | | |
| C-term (48 aa) | KTT CFICGLERDKFDN KVT FEEHIKEE HNN MWHYLCFIVL VKVKDSTE  | | | | ▶ NMR |
| N-term fusion tetramer coil-coiled : GCN4/RHCC ▶ tetramer Globlar : 2FK5/2Z7B/2R8Y/3A57 | | His-TEV His-TEV-Sumo pET6His pET6His-ATS pET6His-Sumo | BL21(DE3) Codon+ Plys5 Rosetta2(DE3) Rosetta-gami SoluBL21 | | |

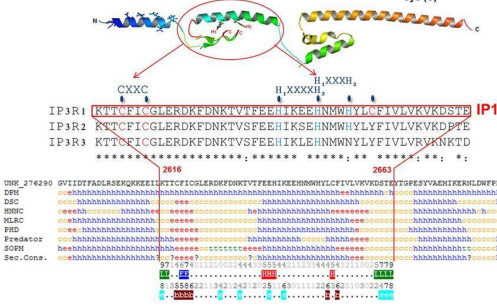
그림 46 IP₃R1 construct design

Research Aim <Hypothesis>

Biochemical and Functional study of Zinc finger Motif

: Human IP3R1-CTD 48 peptides (2616 – 2663 a.a.)

Number of amino acid : 48
 Molecular weight : 5806.6
 Theoretical PI : 5.84
 Cys (C) : 3



Folding Solution Condition

Peptide (1) : GSSG (10) : GSH (30)
 0.017 mM : 0.17 mM : 5.1 mM
 4°C Folding Reaction

| Reagent/ buffer | Experiment 1 | Experiment 2 |
|-------------------------|--------------|--------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 7.8) | 50 µl | 50 µl |
| 80% glycerol | 62.5 µl | 62.5 µl |
| 100 mM EDTA | 5 µl | X |
| 10 mM ZnCl ₂ | X | 5 µl |
| 10 mM CaCl ₂ | X | X |
| Peptide (1 mg / ml) | 50 µl | 50 µl |
| GSH (51 mM) | 50 µl | 50 µl |
| GSSG (1.7 mM) | 50 µl | 50 µl |
| D.W. | 232.5 µl | 232.5 µl |
| Total | 500 µl | 500 µl |

Solubilization of IP1 peptide

Buffer_1 : H₂O (included 0.1% TFA)
 Buffer_2 : Acetonitrile (included 0.1% TFA)
 Mix two buffers (5ml : 5ml)

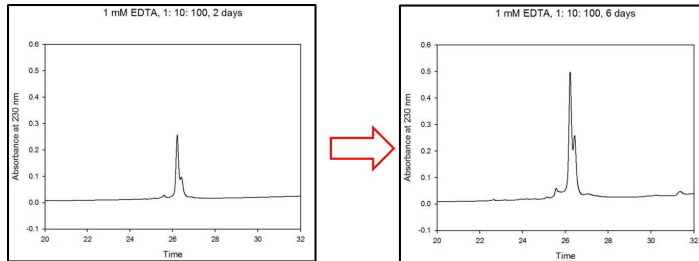
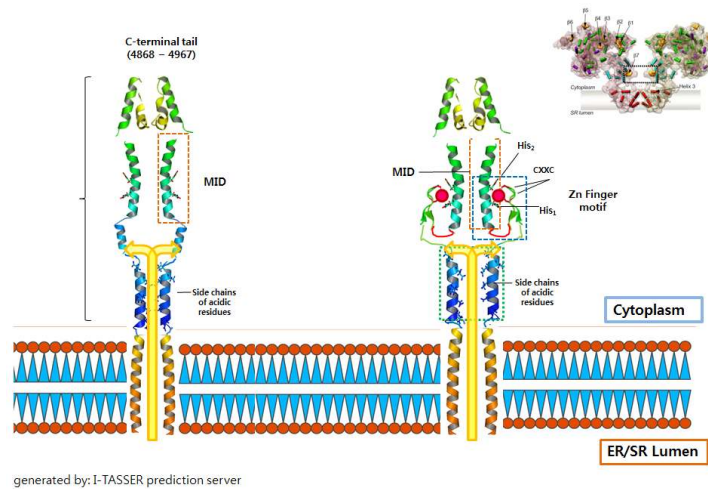


그림 47 IP₃R CTD 2816-2863 a.a. folding 변화 결과

(2) Rabbit RyR1 PFR (pore forming region)의 정제

- RyR의 PFR을 구성하고 있는 TM을 포함한 C-terminal domain은 RyR의 tetramer를 이루는데 중요한 역할을 하고 있음 (그림 48)
- X-선 구조 분석을 위해서 MISTIC tagging system을 통해 E. coli 발현 시스템을 이용하여 분리정제 함 (그림 49)



generated by: I-TASSER prediction server

그림 48 RyR 구조 모델링

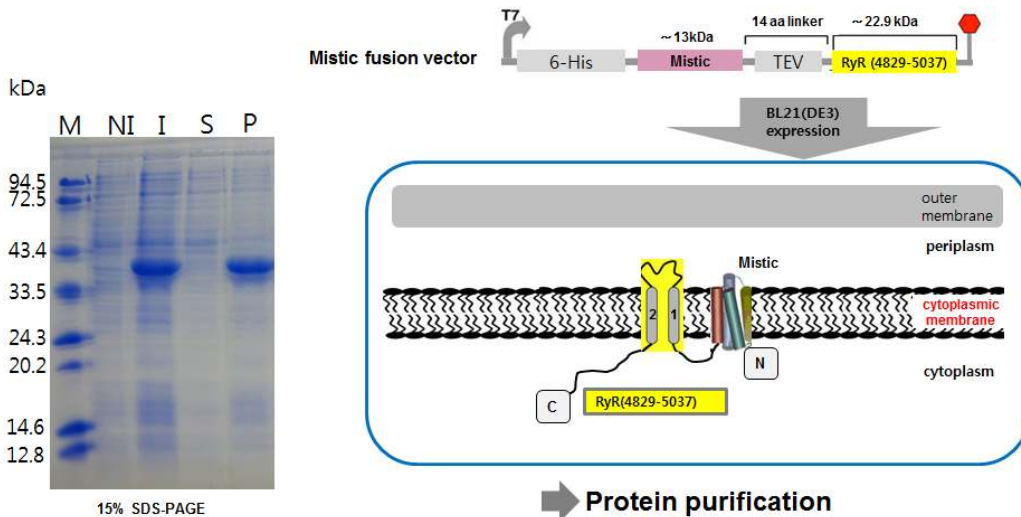


그림 49 MISTIC tagging system

(3) Mouse RyR2 CTD의 정제

- RyR의 C-terminal domain region은 tetramer를 이루는데 중요한 역할을 하고 있음
- 단백질을 정제를 하였고 결정화 시도 중
- NMR spectroscopy를 통해 RyR2 CTD-100의 folding check를 한 결과 약 12개의 아미노산이 flexible 한 것을 분석 됨 (그림 52)

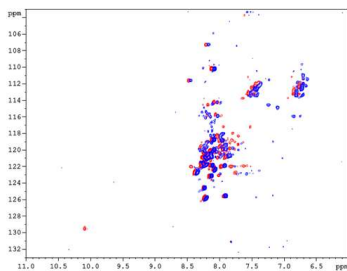
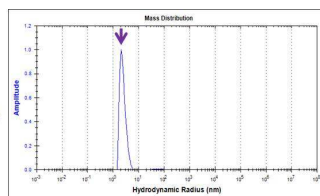
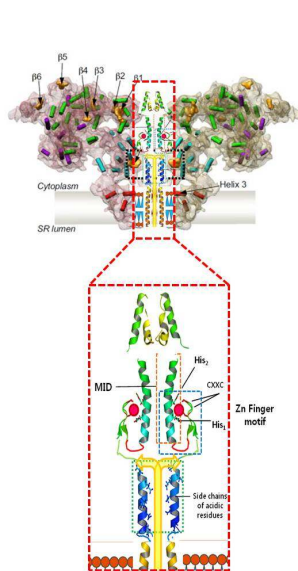
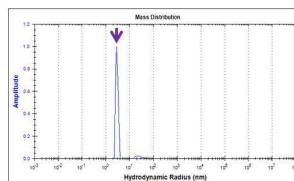


그림 50 NMR folding 확인



> pH 8.0에서는 Zn에 의한 effect가 없음
> 결정화 시도 중
(Monomer : 13 kDa)

| DLS condition | | Additives | Mean Radius (nm) | SD (nm) | Est.MW (kDa) | % Intensity | % Mass | Pdl |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------|------------------|---------|--------------|-------------|--------|-------|
| Buffer basic condition | | | | | | | | |
| 20 mM Tris, 2 mM DTT, 10 % glycerol | 1 % CHAPS pH 8.0 | 0.5 mM ZnSO ₄ | 3.28 | 1.01 | 52.796 | 8.0 | 100.0 | 2.769 |



> pH 6.0에서는 Ca²⁺ /Mg²⁺ 의 effect가 없음
> 결정화 시도 중
(Monomer : 13 kDa)

| DLS condition | | Additives | Mean Radius (nm) | SD (nm) | Est.MW (kDa) | % Intensity | % Mass | Pdl |
|------------------------|----------------------------------|--|------------------|---------|--------------|-------------|--------|-------|
| Buffer basic condition | | | | | | | | |
| 20 mM MES, 2 mM DTT | 10 % glycerol, 1 % CHAPS, pH 6.0 | 2 mM CaCl ₂ + 5 mM MgCl ₂ | 3.24 | 0.44 | 51.311 | 5.5 | 96.1 | 1.695 |

그림 51 DLS를 통한 oligomeric state 확인

(4) RyR2와 Calumenin의 상호작용 분석

- Mouse Calumenin 48-315의 결정화 중이며 Limited proteolysis 결과 flexible한 region이 발견됨
- CLM-B 도메인의 construct를 제작 중
- RyR2-L1 (4523-4569) 의 모델링 구조를 Bt_1218 (158-192)를 기반으로 MODELLER v9을 통해 모델링 구조를 만든 후 CLM-B 모델링 구조와 RyR2 L1의 복합체 모델을 ZDOCK server를 통해 docking함 (그림 52)
- Calumenin과 상호작용하는 것으로 알려진 SERCA2 loop4와 RyR2의 luminal region의 아미노산 서열을 분석한 결과 유사한 hydrophobic residue들을 확인함
- 이를 통해 복합체 docking 모델 구조를 제공 함

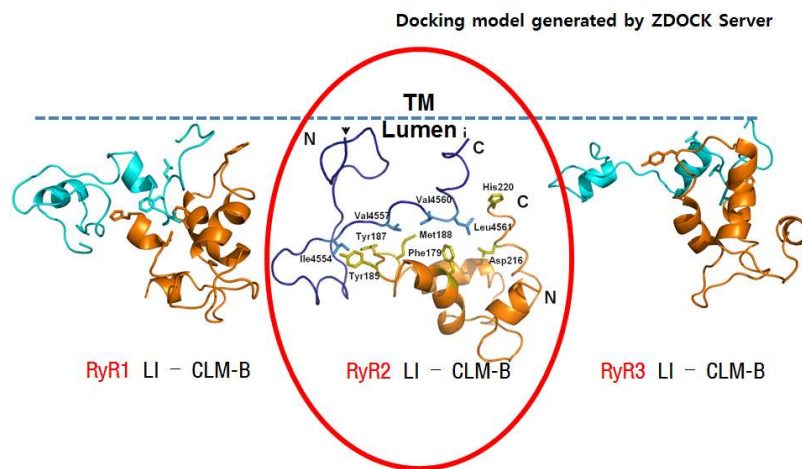


그림 52 RyR1 LI 과 CLM-B의 docking 모델

(5) RyR 상호작용 맵 제공

- 10 Å 해상도의 cryo-EM 맵을 이용하여 상호작용하는 단백질의 위치를 타냄

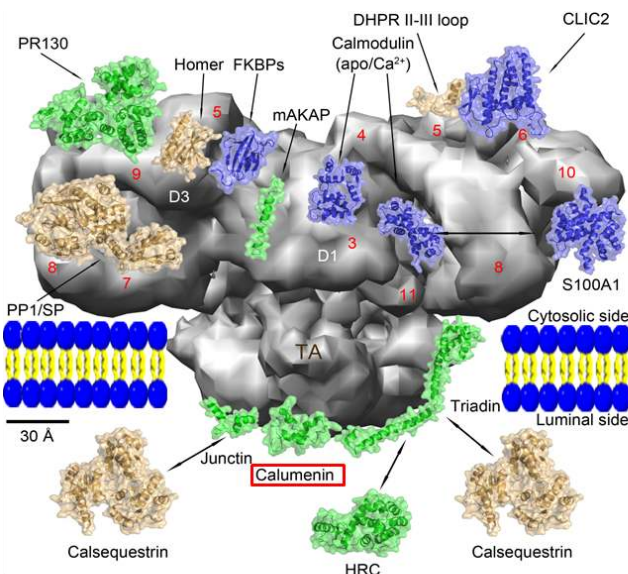


그림 53 RyR과 상호작용하는 타깃 단백질의 상호작용 위치

제 2 절. 수학적 모델링 및 동역학분석에 기반한 심근비대 발생 메커니즘 심화연구

1. 심근비대 모델에서 신호전달계 모델링 및 동역학 분석

가. 심근비대발생 관련 대규모 신호전달 네트워크 모델 정립

- 추가적인 문헌정보와 실험 자료를 바탕으로 3단계 연구를 통해 도출된 심근비대발생에 관련된 대규모 신호전달네트워크를 확장 및 보완함.
- 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크는 111개의 노드와 238개의 링크로 이루어져 있으며, 심근비대발생에 관련되어있다고 잘 알려져 있는 α/β -AR, AT1R, NPR, FGFR, EGFR, IGFR, GP130/IL 및 TGFR 신호전달경로들을 포함함 (그림 54)

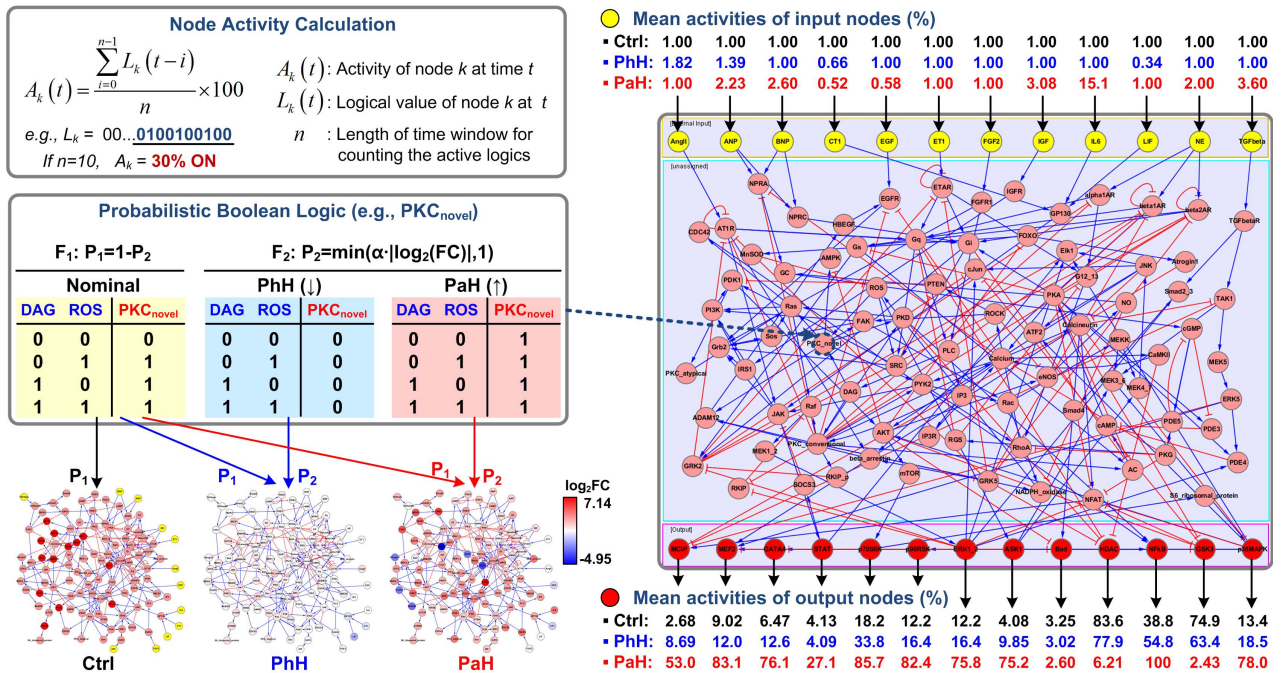


그림 54. 심근비대 관련 대규모 신호전달네트워크 모델의 시뮬레이션 개념도

- 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크에 대한 불리언모델을 정립함.
- 정립된 불리언모델에서 각 노드(단백질)의 불리언로직은 문헌정보로부터 생물학적 의미를 반영하여 추정됨.
- 정립된 불리언모델을 정량적으로 분석하기 위해 각 노드의 활성화정도를 'Percent-ON'으로 표현하는 정량적 불리언 분석기법을 도입함 (그림 54의 'Node Activity Calculation' 상자 참조)
- 이렇게 확립된 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크는 다양한 자극 조건에서 보고된 문헌정보들을 바탕으로 정성적으로 검증함 (표 1의 'GEN').

^a p<0.05 only for $\alpha=0.1$

| Type | Exp. Cond. | Effect (Activity ↓, ↑, ↔) | Ctrl | Reference | |
|-----------|---------------------------|---|--------------------------------------|--|--|
| GEN | ET1 | ERK1/2 ↑ ^{1,2,4} ; AKT ↑ ¹ ; JNK ↑ ² ; p38MAPK ↑ ^{2,3} ; GATA4 ↑ ³⁻⁵ ; CaMKII ↑ ⁴ ; NFκB ↑ ⁵ | N | <i>PNAS</i> 104(2):612-617, 2007 ¹ ; <i>Circ Res.</i> 89:882-890, 2001 ² ; <i>Genes Dev.</i> 15:2702-2719, 2001 ³ ; <i>Cardiovasc Ther.</i> 27:17-27, 2009 ⁴ ; <i>PNAS</i> 98(12):6668-6673, 2001 ⁵ | GA data |
| | AngII | NFκB ↑; GATA4 ↑ | | <i>PNAS</i> 98(12):6668-6673, 2001 | |
| | TGFβ | p38MAPK ↑; TAK1 ↑ | | <i>Nat Med.</i> 6(5):556-563, 2000 | |
| | IGF1 | p70S6K ↑ | | <i>Mol Cell Biol.</i> 24(14):6231-6240, 2004 | |
| | dnGq | DAG ↓ | | <i>Science</i> 280:574-577, 1998 | |
| | caRas | JNK ↑ | | <i>J Biol Chem.</i> 272(22):14057-4061, 1997 | |
| PAH | TAC | GATA4 ↑ ^{1,4} ; GSK3β ↓ ² ; AKT ↑ ³ ; NFAT ↑ ⁵ | N | <i>Cell</i> 97:189-198, 1999 ¹ ; <i>Science</i> 280:574-577, 1998 ² ; <i>Hypertension</i> 49:473-480, 2007 ³ ; <i>Circulation</i> 110:718-723, 2004 ⁴ ; <i>Nat Med.</i> 16(8):872-879, 2010 ⁵ | GATA4 ↔ GSK3β ↔ AKT ↓ NFAT ↑ |
| | gp130 ^{+/o} -TAC | STAT3 ↓ | TAC | <i>Cell</i> 97:189-198, 1999 | |
| | dnGq-TAC | GATA4 ↓ ³ | | <i>Science</i> 280:574-577, 1998 | |
| | gp130 ^{+/o} -TAC | GATA4 ↑ | gp130 ^{+/o} | <i>Cell</i> 97:189-198, 1999 | |
| | dnGq-TAC | GATA4 ↑ | dnGq | <i>Science</i> 280:574-577, 1998 | |
| dnRaf-TAC | GATA4 ↑ | dnRaf | <i>Circulation</i> 110:718-723, 2004 | | |
| PHH | SWIM | p38MAPK ↑ ¹ ; AKT ↑ ² ; p70S6K ↑ ³ ; GATA4 ↑ ² | N | <i>Am J Physiol Heart Circ Physiol.</i> 292:H1269-H1277, 2007 ¹ ; <i>PNAS</i> 100(21):12355-12360, 2003 ² | p38MAPK ↓; AKT ↔; p70S6K ↔ GATA4 ↑ |

표 1. 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크모델에 대한 검증.

나. 정립된 모델을 기반으로 생리학적 및 병리학적 심근비대발생의 조절 기전 분석

- 생리학적 및 병리학적 심근비대모델의 확립을 위해 확률적 불리언모델 기법을 활용하여 생리학적 및 병리학적 조건에서 측정된 유전자발현양상 데이터를 정립된 불리언모델에 반영할 수 있는 알고리즘을 개발하였음 (그림 54의 'Probabilistic Boolean Logic' 상차 참조).
- 단백질의 activation은 upstream signal 뿐만 아니라 해당 단백질의 양에 의해서도 결정된다는 점에 착안하여, NGS 데이터로부터 나타난 생리학적 (physiological hypertrophy: PhH) 및 병리학적 (pathological hypertrophy: PaH) 상황 각각의 유전자 발현양상의 차이점을 해당 단백질 양의 차이에 기여한다고 가정하고, 이를 해당 단백질의 활성화 확률에 반영함으로써 생리학적 및 병리학적 특이적 모델을 개발함.
- 이렇게 개발된 생리학적 및 병리학적 심근비대모델들은 생리학적 및 병리학적 조건에서 측정된 다양한 문헌정보들을 바탕으로 정성적으로 검증되었으며, 유전자 발현양상 수준의 차이만으로는 설명할 수 없는, 단백질의 활성화 수준에서 알려진 차이점들을 잘 보여줌 (표 1의 'PAH' 및 'PHH').
- 확립된 생리학적 및 병리학적 심근비대모델을 기반으로 심근비대발생에 있어서 서로 다른 조절메커니즘을 비교분석함 (그림 55).
- 대규모 시뮬레이션 분석을 통해 생리학적 및 병리학적 심근비대 각각에서 특이적으로 활성화되는 신호전달분자와 활성화 양상이 서로 반대인 신호전달분자들을 동정하였음 (그림 55A).

- 병리학적 심근비대에서는 **alpha1AR** 신호전달경로가 과활성화된 반면, 세포의 성장과 관련된 EGFR 및 IGFR 신호전달경로의 활성화 정도는 비교적 억제된 것을 확인할 수 있음. 한편, 생리학 적 심근비대에서는 반대로 세포의 성장과 관련된 EGFR 및 IGFR 신호전달경로가 비교적 활성화 된 것을 확인할 수 있음. 이는 생리학 적 심근비대에서는 심근세포가 커짐으로 인해 기 능적 향상을 가져오는 반면, 병리학 적 심근비대에서는 심할 경우 심근세포의 사멸을 유발한 다고 알려진 사실과도 부합하는 부분임 (그림 55B).

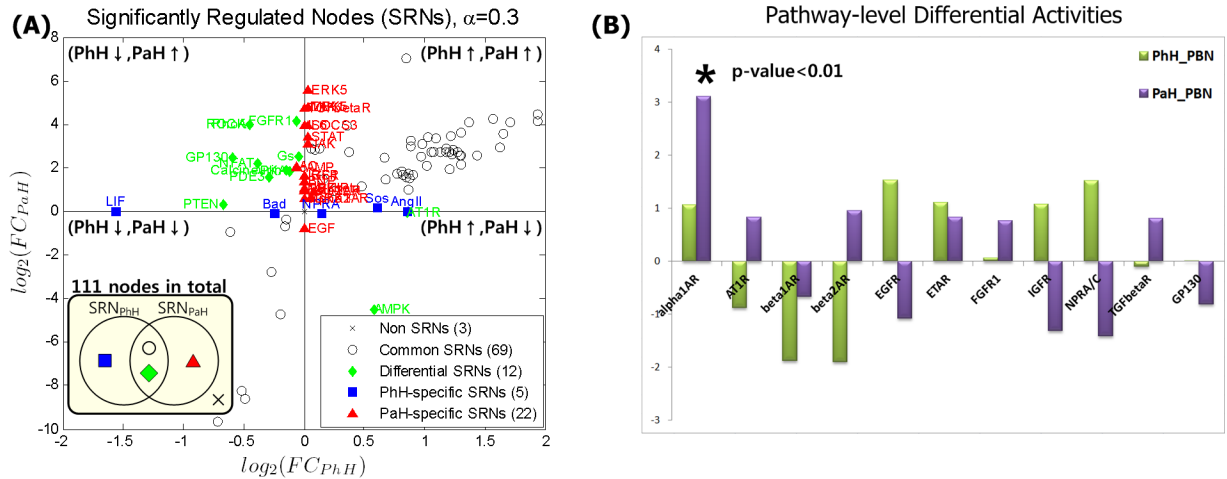


그림 55 생리학 적 및 병리학 적 심근비대에서 신호전달분자 (A) 및 신호전달경로 (B) 활성화 정도 의 차이점

- 생리학 적 심근비대 및 병리학 적 심근비대에서 나타나는 신호전달분자 활성화패턴의 차이는 심근비대네트워크의 입력으로 볼 수 있는 서로 다른 외부자극과 내부 신호전달분자들의 발현 양에 기인한 서로 다른 신호처리능력에 기인함 (그림 56A).
- 병리학 적 심근비대의 활성화패턴은 내부 신호전달분자들의 발현 양에 기인한 신호처리능력에 의한 영향이 큰 반면, 정상 및 생리학 적 심근비대의 경우 외부자극과 신호처리능력 모두 활성화패턴에 기여함 (그림 56A).
- 동일한 외부자극에 대해서 정상, 생리학 적 심근비대, 그리고 병리학 적 심근비대의 신호처리능력이 상이함을 확인함 (그림 56B).
- 생리학 적 및 병리학 적 심근비대의 주요 조절인자 발굴을 위하여 심근비대 완화관점의 민감도 (그림 57A)와 심근비대 진행관점의 민감도 (그림 57B)를 정의하고 민감도 분석을 수행함 (그림 57C). 여기서 심근비대 완화관점의 민감도는 각 노드의 발현 양을 하나씩 생리학 적 또는 병리학 적 심근비대 상태에서 정상상태로 환원시켰을 때 정해진 출력노드에 미치는 영향을 나타내며, 심근비대 진행관점의 민감도는 각 노드의 발현 양을 하나씩 정상상태에서 생리학 적 또는 병리학 적 심근비대 상태로 변화시켰을 때 출력노드에 미치는 영향을 나타냄.
- 심근비대 완화관점의 민감도 분석 결과, 어떤 한 노드의 상태만을 정상상태로 환원시켜서는 출력노드들에 큰 영향을 주지 못한다는 결과를 얻음. 이는 심근비대관련 신호전달네트워크 자체가 많은 신호전달경로들이 서로 복잡하게 얽혀있기 때문으로 생각되며, 따라서 심근비대 상황을 완화시키기 위해서는 다중인자들을 표적하여야 할 것으로 여겨짐.
- 심근비대 진행관점의 민감도 분석 결과, 생리학 적 심근비대에서는 Grb2가, 병리학 적 심근비대에서는 Gq, Gs, PYK2가 출력노드들에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 분석됨.

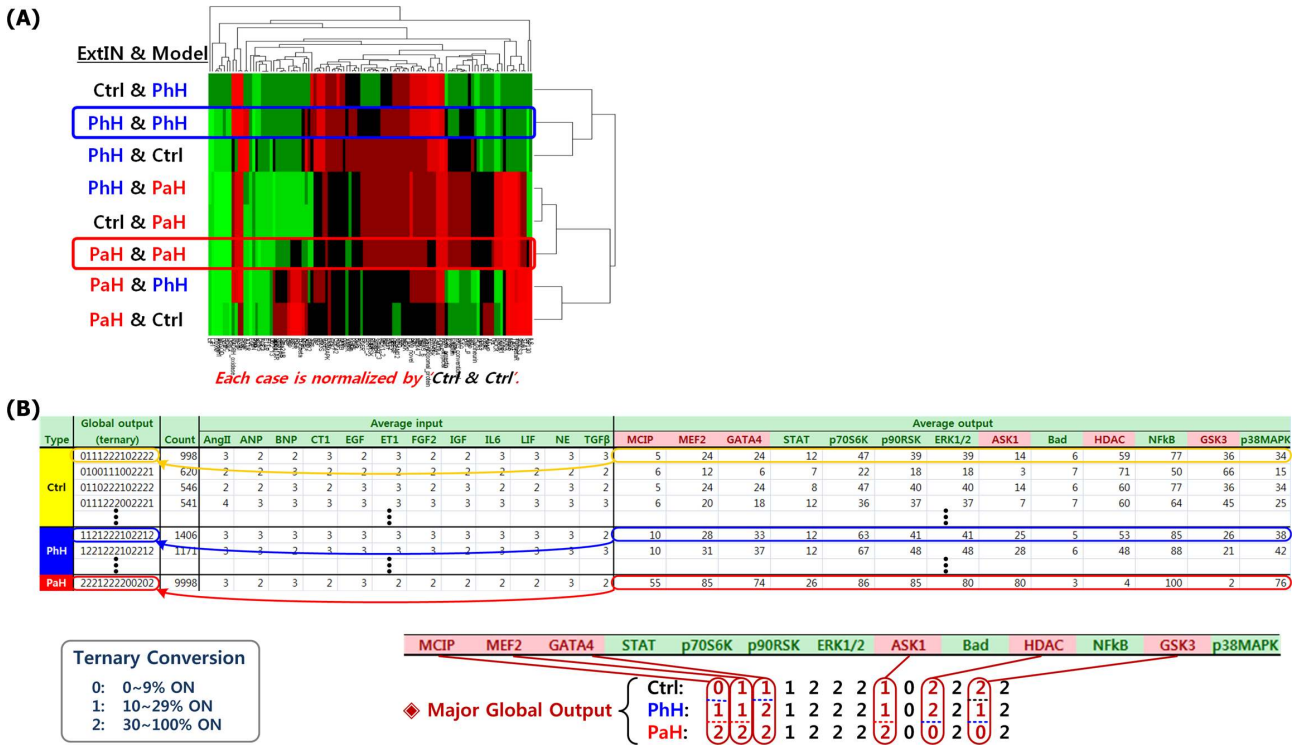


그림 56 생리학적 및 병리학적 심근비대의 서로 다른 신호처리능력.

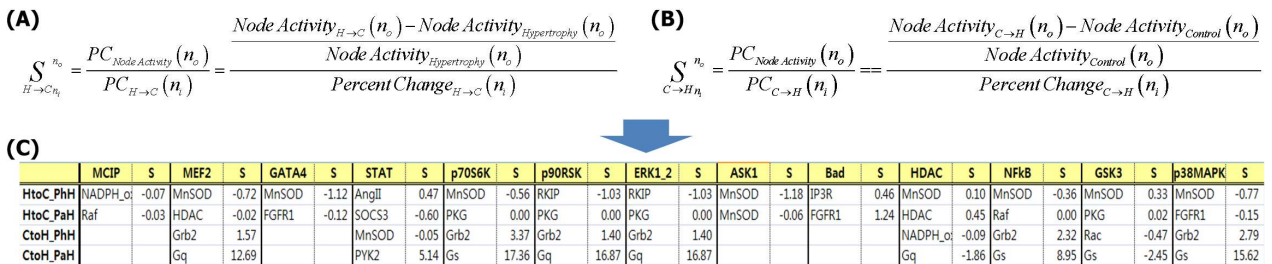


그림 57 생리학적 및 병리학적 심근비대의 주요조절인자 발굴을 위한 민감도 분석.

2. Calcineurin-NFAT 신호전달시스템을 통한 심근비대 조절 기전 탐구

- 문헌정보 및 실험데이터를 바탕으로 3단계 연구를 통해 정립된 calcineurin-NFAT 신호전달네트워크를 확장 및 보완함 (그림 58).
- 확장된 신호전달네트워크는 calcineurin-NFAT, PI3K-Akt, ERK signaling pathway를 포함함. 분자세포 생물학 실험을 통해 정립된 네트워크에 대한 검증 실험을 수행함 (그림 59)
- 재구성된 calcineurin-NFAT 신호전달네트워크에 대한 수학적 모델을 정립함. 정립된 수학적 모델은 24개의 상미분 방정식과 57개의 동역학 파라미터로 구성됨.
- 문헌 및 실험데이터를 기반으로 정립된 수학적 모델의 동역학 파라미터를 추정함 (그림 60).

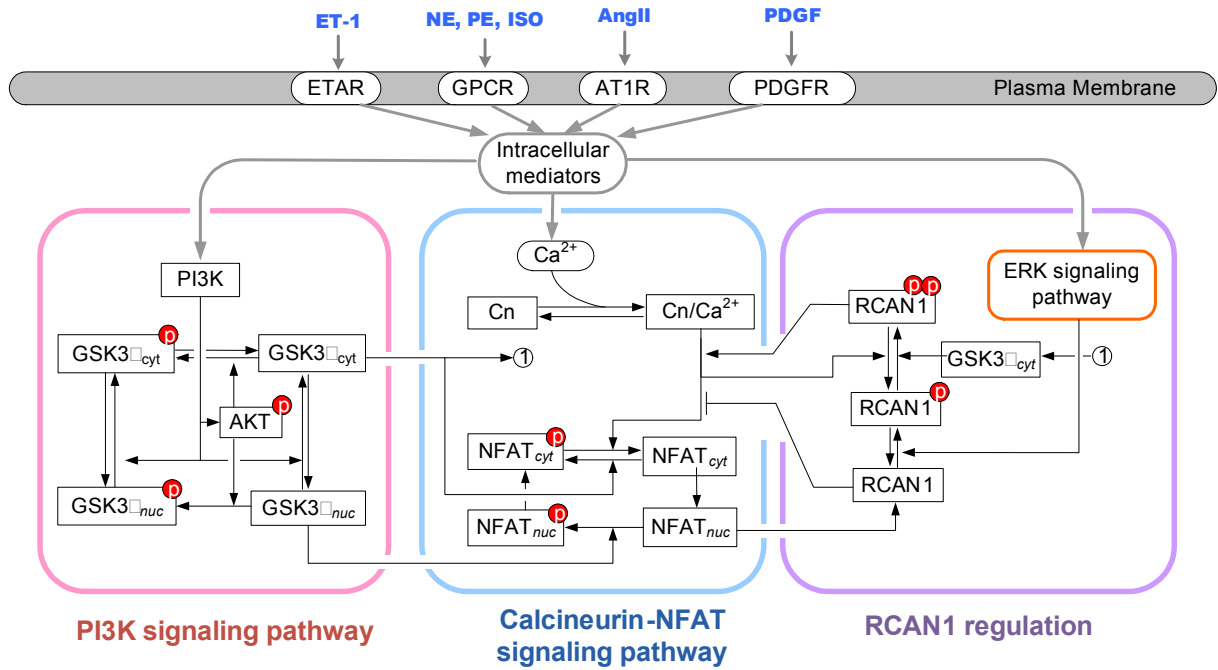


그림 58 Calcineurin-NFAT 신호전달네트워크를 확장 및 보완함.

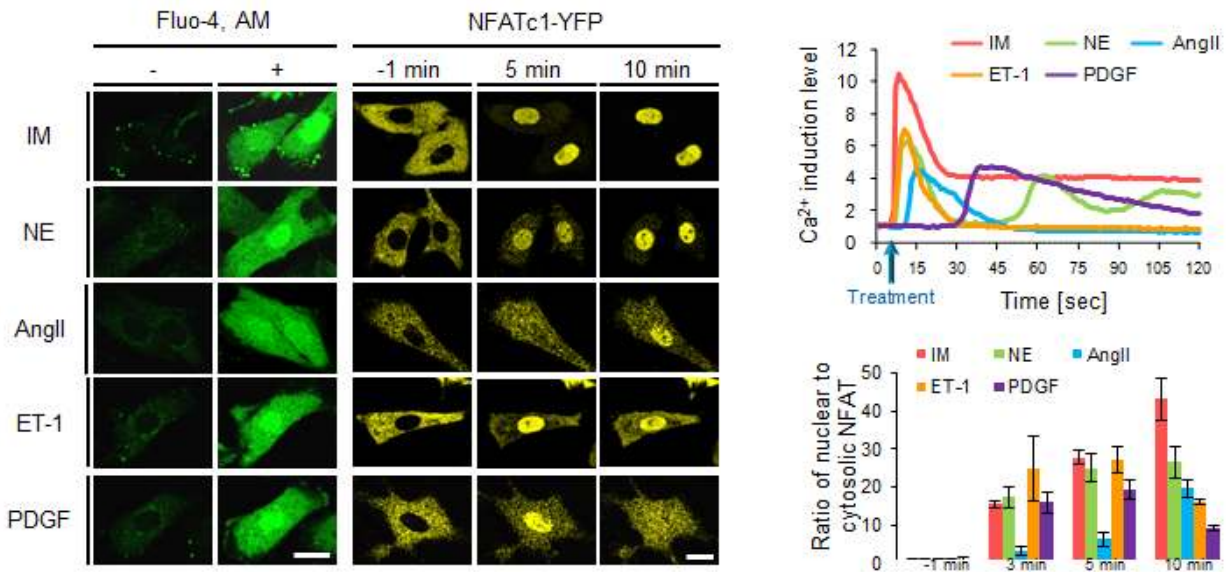


그림 59 정립된 Calcineurin-NFAT 신호전달네트워크에 대한 검증 실험.

- 수학 모델과 컴퓨터 시뮬레이션, 단일 세포의 이미징 기술을 이용하여 ERK와 GSK3로 구성된 스위칭 회로가 calcineurin-NFAT 신호전달경로를 조절한다는 것을 규명함. 즉, 농도가 낮을 때 RCAN1은 주로 calcineurin의 기능을 저해하는 억제자로서 기능하지만, RCAN1의 농도가 증가하면 ERK와 GSK3에 의한 크로스토크에 의해 calcineurin 신호를 증가시키는 촉진자로 기능하게 됨 (그림 61, 62)

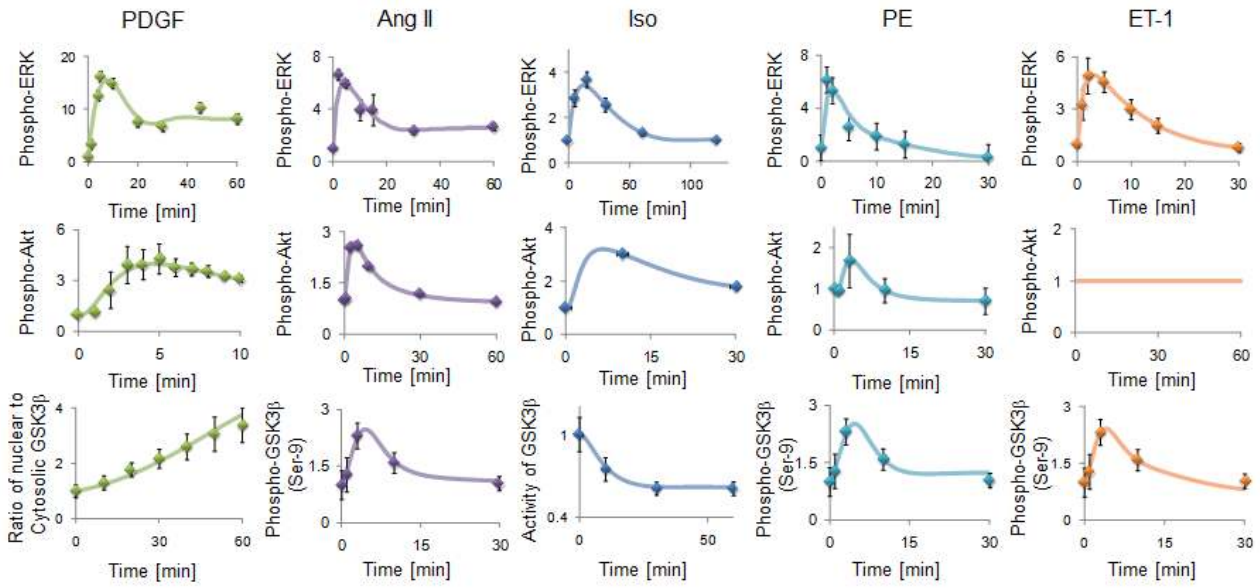


그림 60 문헌 및 실험데이터를 기반으로 정립된 수학적 모델의 동역학 파라미터를 추정함.

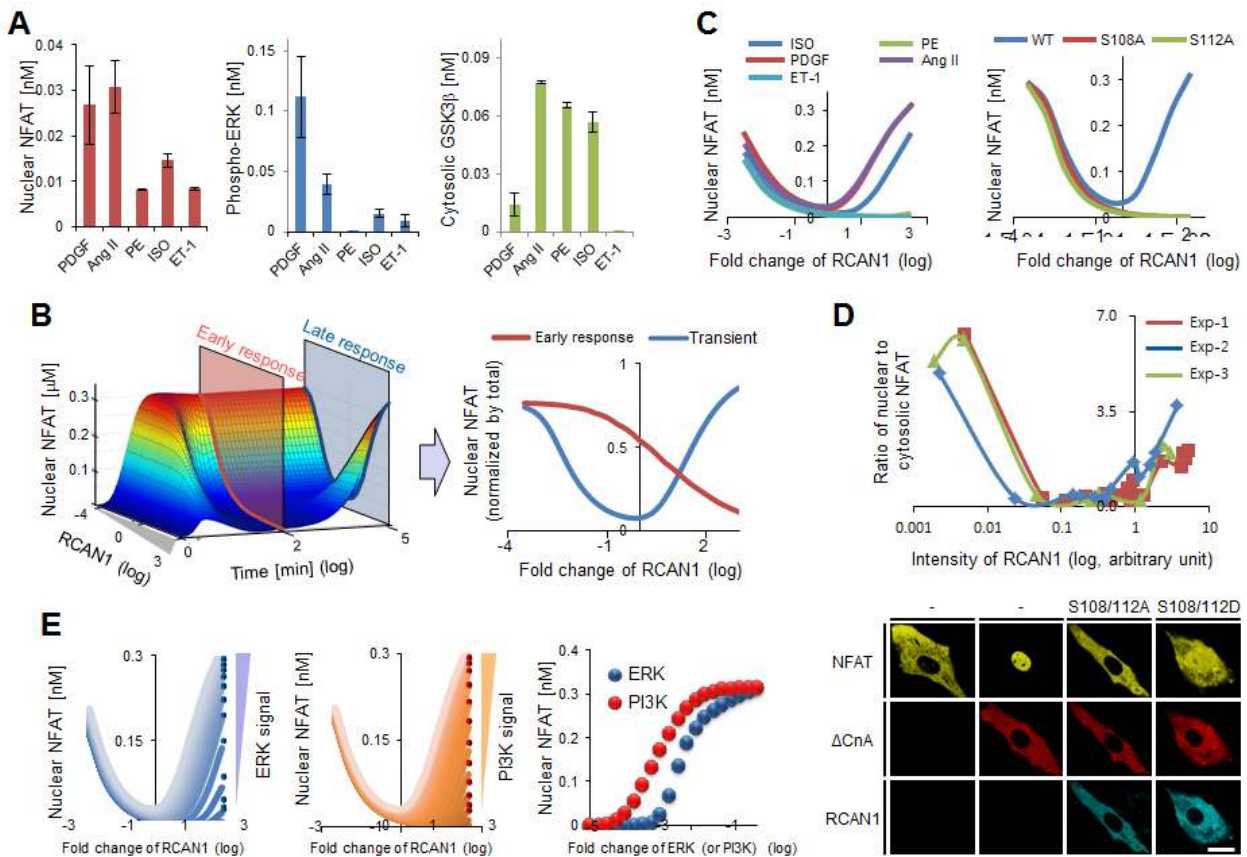


그림 61 수학적 모델과 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 RCAN의 역할을 규명함.

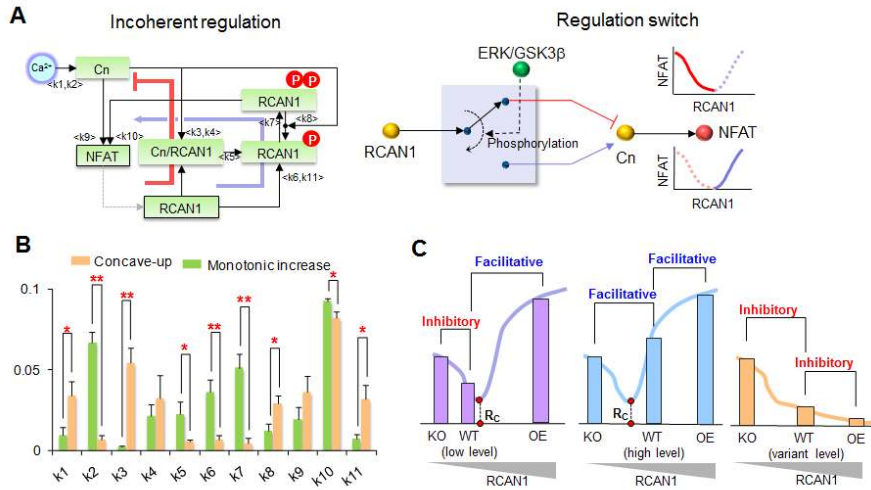


그림 62 다양한 세포환경에서 RCAN의 이중적 역할을 조절할하는 메커니즘을 규명함.

제 3 절. 심근비대증에 대한 다양한 층위 데이터 통합 분석

1. 심근비대증의 전사 조절 네트워크 분석

가. 생리학적 심근비대와 병리학적 심근비대의 전사 조절 네트워크 비교 분석

(1) 생리학적 및 병리학적 심근비대 모델 구축

- 생리학적 및 병리학적 심근비대증에 주요 유전자 및 네트워크를 분석하기 위해 동물 모델을 구축함. 생리학적 심근비대증을 유발하기 위해 4주간 수영을 시킨 마우스 모델과 병리학적 심근비대증을 유발하기 위해 대동맥 부분결찰 수술 후 1주 지난 마우스 모델의 심장을 확보함
- 두 심근비대 모델 모두 심장 크기의 유의한 증가를 관찰하였으며 *Nppa*, *Nppb*, *Myh7*, *Acta1*, *Pln* 등의 유전자의 발현도 유의하게 변화한 것을 관찰하였음. 다만, 생리학적 심근비대에서는 *Nppa*의 증가와 *Acta1*의 감소만이 발견되어 두 심근비대의 차이를 확인함

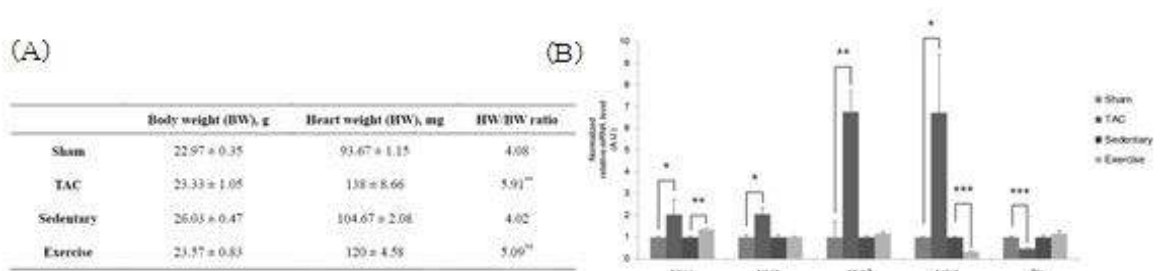


그림 63 생리학적 및 병리학적 모델 구축 (A) 구축된 모델의 심근비대 정도 조사 (B) 심근비대의 유전자 마커로 확인한 심근비대 정도

(2) 차세대 염기서열 분석기 (Next generation sequencing, NGS)를 이용한 전사체 분석

- 생리학적 및 병리학적 심근비대의 기전을 분석하고자 illumina Genome Analyzer Iix 를 이용하여 약 1,300만~2,000만에 달하는 36bp single-end read의 전사체를 획득하였음
- 최초에 얻어진 read를 마우스 유전체와 비교한 결과 최종적으로 1개 이상의 read를 갖는 유전자는 약 1.6만~1.7만 개에 이르는 것으로 나타남
- NGS에 의해 얻어진 전사체로부터 각 심근비대증에 주요한 유전자를 동정하였음. 이를 위해 각 유전자에 할당된 read의 개수를 정규화하기 위한 방법인 (Read Per Kilobase of gene model per Milion mapped reads (RPKM)을 적용한 후 Student's T-test를 수행하고 1.5배 이상의 증감을 보인 유전자를 동정하였음.
- 그 결과, 생리학적 심근비대에는 245개, 병리학적 심근비대에는 2,041개의 주요 유전자를 찾았음. 특이적 사항으로는 생리학적 심근비대에는 70%가량의 유전자가 발현 감소를 보인 반면, 병리학적 심근비대에는 70% 가량의 유전자가 발현 증가를 보였음
- 이 중, 심장에서 발현이 없는 유전자임에도 불구하고 병리학적 심근비대에 의해 그 발현이 급증하는 유전자를 417개 동정하고 유전자 네트워크를 산출하였음 (그림 64-A)

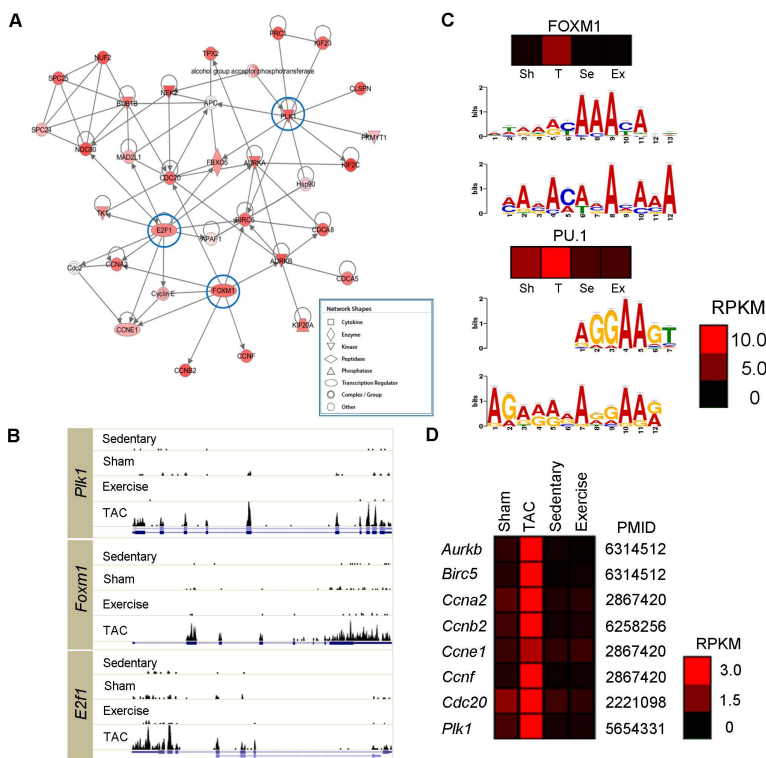


그림 64 병리학적 심근비대 특이적인 417개 유전자 분석 (A) Ingenuity Pathway Analysis로 분석한 유전자 네트워크 (B) 각 모델에서의 허브 유전자인 Plk1, Foxm1, E2F1의 발현 히스토그램 (C) 해당 유전자의 upstream 1,000에 많이 존재하는 motif 예측 (D) Foxm1의 알려진 타겟 유전자들의 발현 패턴

- 417개 유전자는 대부분 세포 주기에 관련된 유전자였으며 특히 E2F1, Plk1, Foxm1등의 유전자가 네트워크 상 중심에 위치하는 것을 발견하였음 (그림 64-B)
- 이들 417개 유전자의 발현 급증에 기여하는 전사인자를 예측하기 위해 각 유전자의 1,000bp upstream에 많이 존재하는 motif를 MEME를 통해 분석한 결과, Foxm1 및 PU.1의 motif가 다량 존재함을 발견하였음 (그림 64-C)
- 기존 보고에 알려진 Foxm1의 타겟 유전자들의 발현 역시 동일하게 증가한 것을 발견하였음

며 네트워크 및 motif 분석 등을 종합적으로 볼 때, Foxm1이 이들 유전자의 발현을 조절할 것으로 사료됨 (그림 64-D)

(3) 생리학적 및 병리학적 심근비대증 관련 alternative splicing 분석

- 전사체의 정량적 분석 뿐만 아니라 정성적 분석도 가능한 NGS의 잇점을 살려 각 심근비대 시 나타나는 alternative splicing을 분석하였음
- 이를 위해 각 rea의 exon별 mapping을 산출하고 이를 Fisher's exact test ($P < 0.05$) 및 Bayesian error rate ($e < 0.1$)를 이용하여 exon variant를 예측하였음. 결과적으로 생리학적 심근비대에서는 242개의 inclusion, 172개의 exclusion을 발견하였으며, 병리학적 심근비대에서는 317개의 inclusion와 196개의 exclusion을 발견하였음
- 발견한 exon variants 중 8개 유전자 (Fhl1, Rcan1, Ndrp2, Synpo, Tll1, Cxxc5, Egfl7, Tmpo)에 대해서 실험적으로 검증한 결과, 예측 결과와 일치하는 것을 확인함 (그림 65)

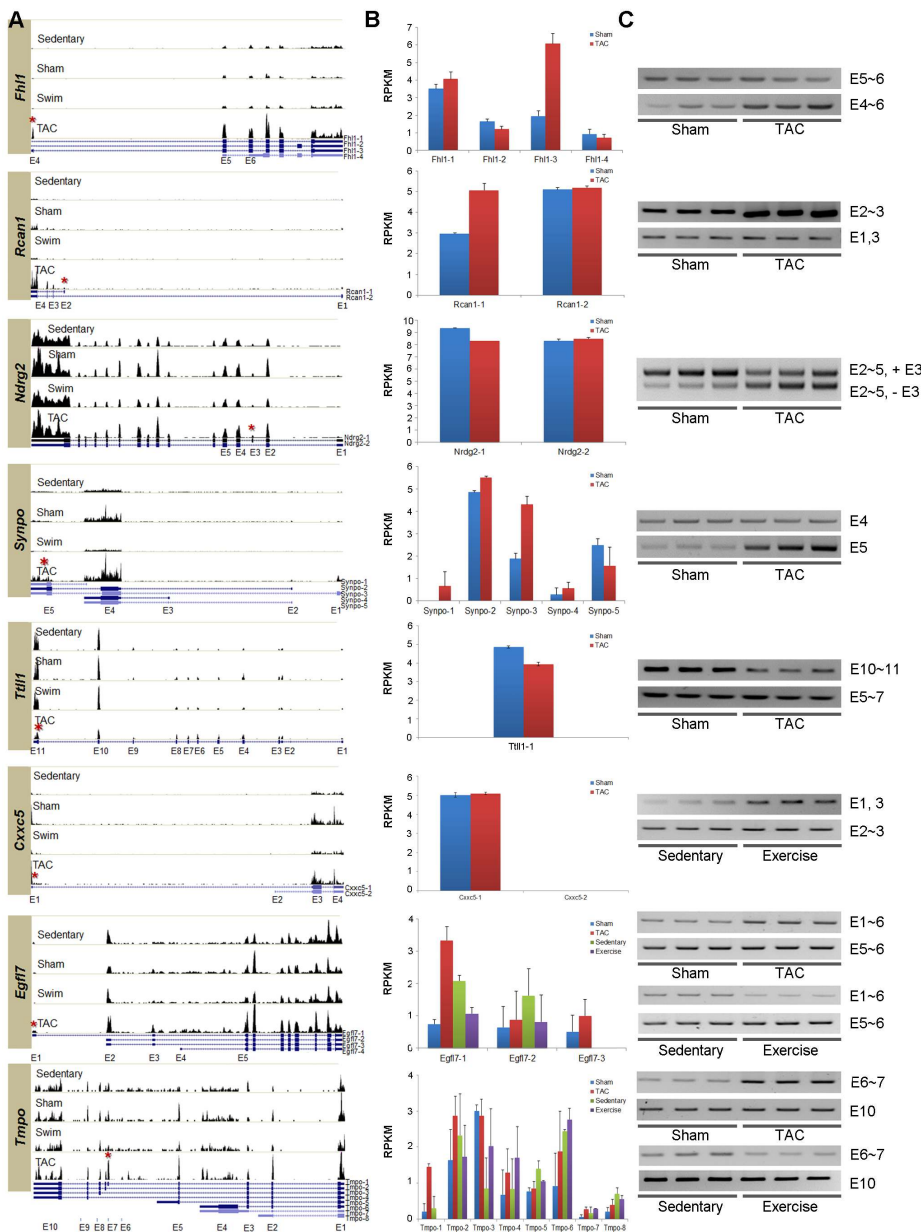


그림 65 생리학적 및 병리학적 심근비대에서 나타나는 exon variants 분석 (A) 8개 유전자의 exon 별 발현 히스토그램 (B) NEUMA로 분석한 isoform 패턴 (C) RT-PCR로 검증한 exon variants

(4) 심근비대증에 주요한 pathway 분석

- 앞서 동정한 주요 유전자들 및 alternative splicing 대상 유전자들이 심근비대증의 어떤 pathway에 주로 관련이 있는지를 분석하기 위해 194개의 KEGG pathway에 대한 Fisher's exact test ($P < 0.05$)를 수행한 후 도출된 p-value를 기반으로 Hierarchical clustering을 적용함
- 그 결과, 크게 다섯 개의 그룹의 pathways 및 조절 패턴을 얻을 수 있었음 (그림 66)
- 첫 번째 그룹은 대사 관련 pathway들로 세부적으로는 Oxidative phosphorylation, Fatty acid metabolism, TCA cycle, Pyruvate metabolism 등이 있었으며 병리학적 심근비대에서 대부분 발현이 감소하는 동시에 약간의 alternative splicing을 동반함을 확인하였음
- 두 번째 그룹은 세포주기 및 부착, p53 신호전달, leukocyte migration, phagocytosis 등에 관련된 pathway가 분포되어 있으며 그 특징으로는 병리학적 심근비대에서 발현이 크게 증가하며 alternative splicing에 의한 조절 기전도 동반하는 것으로 보임
- 세 번째 그룹은 자가면역 시스템 관련 pathway가 많이 존재하며 생리학적 심근비대에서 급격한 발현 감소 및 alternative splicing에 의한 조절이 관찰됨
- 네 번째 그룹은 많은 신호전달 pathway 및 spliceosome 등이 포함되어 있었으며 생리학적 심근비대에서 alternative splicing에 의한 조절이 동반되는 것을 확인하였음
- 다섯 번째 그룹은 심장질환 관련 pathway들이 많이 포함되어 있으며 병리학적 심근비대에서 발현 증가 및 alternative splicing에 의한 조절이 관찰되며 또한 생리학적 심근비대에서는 alternative splicing에 의한 조절이 발견되었음

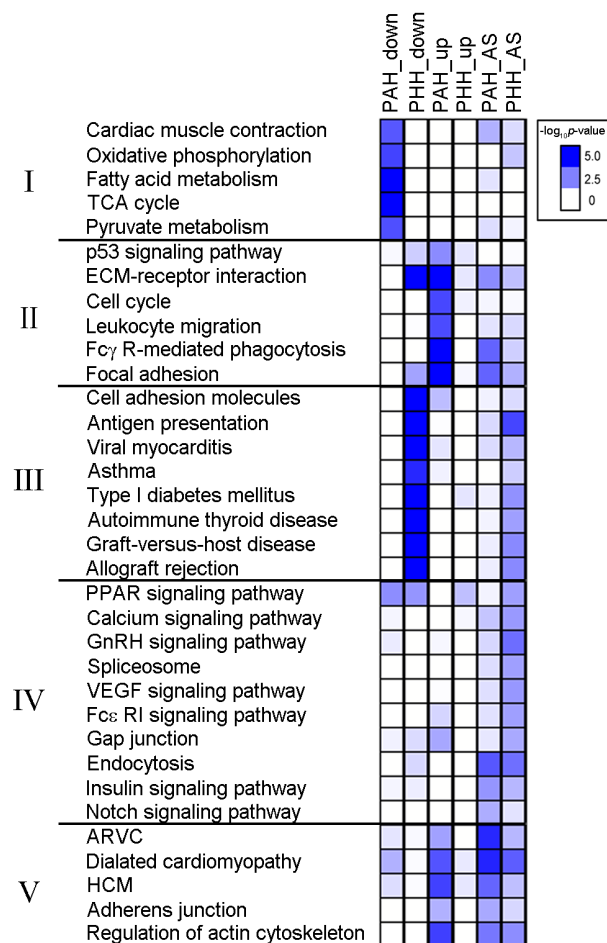


그림 66 생리학적 및 병리학적 심근비대에 주요 유전자 및 exon variants이 유의한 관련성을 보이는 pathway들. PAH: 병리학적 심근비대, PHH: 생리학적 심근비대

(5) Public 데이터베이스를 이용한 생리학적 및 병리학적 심근비대 비교 분석

① Public 데이터베이스를 이용한 생리학적 및 병리학적 심근비대 간 유전체 발현 분석

○ 생물학과 계통 정보를 제공하고 있는 NCBI의 GEO(Gene Expression Omnibus) datasets 내의 검색을 통해 심근세포 비대 모델에 대한 public DNA microarray dataset을 확보함 (그림 67). 확보된 datasets 중 GDS144 datasets은 생리학적 심근비대를 설명하기 위한 모델로, GSE1621와 GSE2459 datasets 은 병리학적 심근비대를 설명하기 위한 모델로 사용

| Species | DataSets | Platform | Samples | Physiological | Pathological | Subsets: | |
|--------------|----------|----------|---------|---------------|--------------|--|--|
| Mus musculus | GSE18801 | GPL1261 | 9 | 0 | 0 | isoproterenol-induced cardiomyopathy, exercise-induced cardiac hypertrophy | |
| | GDS144 | GPL81 | 30 | 0 | | 2 stress, 7 time sets(swum for 10 minute, 2.5 day, 1 week, 2 week, 3 week, 4 week, 4 week and then allowed 1 week of rest) | |
| | GSE12337 | GPL1261 | 16 | | 0 | Wild-type and PPARalpha -/- mice were sham-operated or subjected to TAC for 28 days | |
| | GSE5500 | GDS2316 | GPL1261 | 21 | | 0 | 2 strain, 2 stress sets(Wildtype_Sham,Wildtype_TAC,G4D_Sham,G4D_TAC) |
| | GSE2459 | GDS2258 | GPL81 | 15 | | 0 | 2 disease states, 2 gender sets(sham, TAC) |
| | GSE1621 | GDS794 | GPL81 | 26 | | 0 | 2 protocols 3 time sets(TAC group and sham group (2, 10 and 21 days)) |
| | GSE775 | GDS488 | GPL81 | 59 | | 0 | 2 disease states, 6 time, 2 tissue sets : myocardial infarction (a time series (1 hour [h], 4 hours, 24 hours, 48 hours, 1 week [w], and 8 weeks)) |
| | GDS2811 | | GPL1261 | 9 | | | 3 genotype/variation sets(E18.5 Estrogen-related Receptor gamma Knockout Mouse Heart(+/, +/-, -/-)) |

그림 67 심근비대모델 관련 public DNA microarray datasets

○ 구축된 datasets를 토대로 심근비대 전사조절 네트워크 구성을 위한 순서도를 구성함 (그림 68) 첫번째, Gazer 분석을 위한 전사조절인자 집합과 gene ontology (Biological Process) 집합을 확보함, 두번째, 두 모델의 GO에 대한 t.TEST 를 통한 GO 집합을 확보함. 마지막으로 확보된 GO 집합과 심근비대집합과 관련성이 높은 유전자집합을 조절하는 전사조절인자와 Ligands 들을 문헌정보 기반의 데이터베이스 분석 프로그램인 PathwayStudio 7.1 분석을 통해 찾았고 PathwayStudio 7.1 분석결과와 Gazer 분석결과를 병합하여 표적유전자들과 전사조절인자들 간의 네트워크를 구축하였음

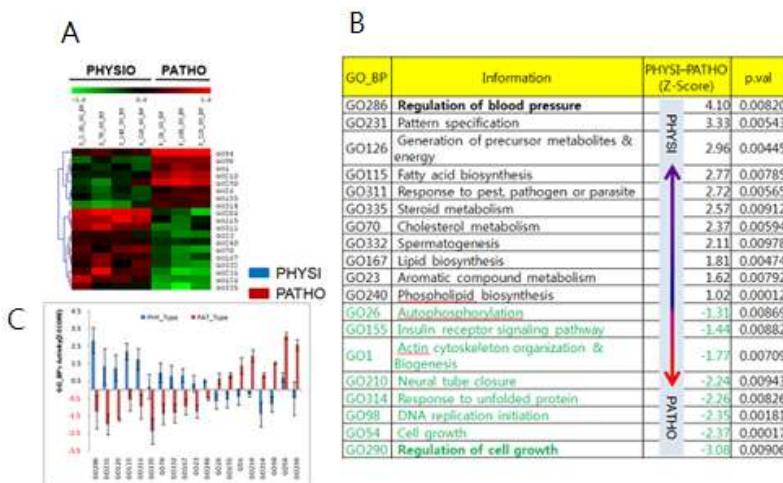


그림 68. 심근비대 관련 유전자에 대한 biological process (BP) 관련 GO 분석결과 A) PHYSIO vs PATHO's GO(BP) 표준값 HeatMap(t.TEST, p.val <0.01) B) t.TEST 결과 C) 각 일자별 GO(BP) 표준값 그래프

Gene ontology profiles of hypertrophy

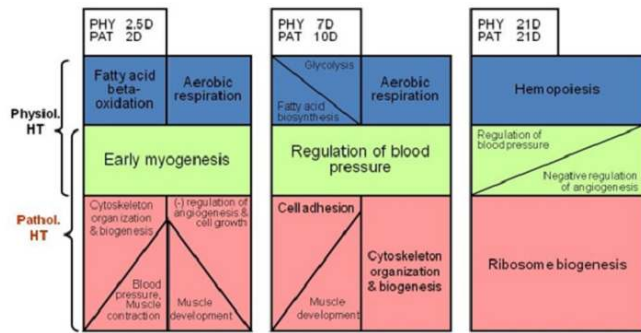
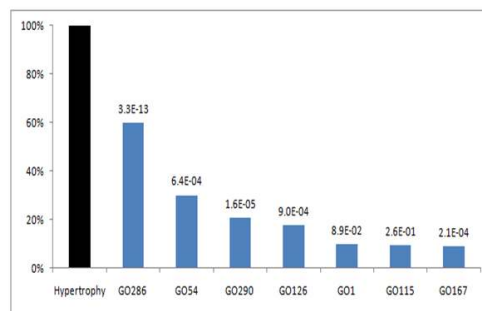


그림 69. Gazer 분석을 통한 생리학적 또는 병리학적 심근비대 모델의 gene ontology 비교분석 결과

- Gene-set analysis 프로그램인 Gazer 분석을 통해 생리학적 및 병리학적 심근비대 모델의 각 일자별 Gene Ontology (Biological Process)를 찾았고, t.TEST를 통한 대조분석에서(p.val < 0.01) "Regulation of blood pressure", "Fatty acid biosynthesis" 등의 유의한 GO(BP)를 확인할 수 있었음 (그림 69)
- Fisher's Exact Test를 통한 생리학적 및 병리학적 심근비대 모델간의 차이를 나타내는 gene ontology 중 409개의 심근비대 유전자 집합과 30개의 혈압조절 유전자 집합에서 18개의 중복이 나왔음. 이는 다른 유전자 집합과 비교해 가장 유의한 값을 가짐을 확인함 (그림 70)



| GO_BP | | Overlap w/ "Hypertrophy" genes (409) | | | | |
|-------|--|--------------------------------------|--------------------|-------|---------------------|------------|
| GO_BP | Information | Total gene # | Overlapping gene # | Rate | Fisher's Exact Test | |
| | | | | | p-value | Odds ratio |
| GO286 | Regulation of blood pressure | 30 | 18 | 60.0% | 3.3E-13 | 14.05 |
| GO290 | Regulation of cell growth | 63 | 13 | 20.6% | 1.6E-05 | 4.76 |
| GO167 | Lipid metabolism | 384 | 34 | 8.9% | 2.1E-04 | 2.08 |
| GO54 | Cell growth | 20 | 6 | 30.0% | 6.4E-04 | 6.83 |
| GO126 | Generation of precursor metabolites & energy | 51 | 9 | 17.6% | 9.0E-04 | 4.03 |
| GO1 | Actin cytoskeleton organization & biogenesis | 51 | 5 | 9.8% | 8.9E-02 | 2.22 |
| GO115 | Fatty acid biosynthesis | 21 | 2 | 9.5% | 2.6E-01 | 2.15 |

그림 70. Hypertrophy 유전자 집합과 다른 GO(BP) 유전자 집합과의 상관관계

- 생리학적 및 병리학적 심근비대 모델에 대한 비교분석한 결과로 혈압조절 유전자 집합의 표준값의 차이를 확인하였고 혈압조절유전자 집합 중 생리학적 심근비대 특이적 유전자로 Agt, Npy, Npy1r (p.val < 0.01)등의 유전자를 찾았음
- 병리학적 심근비대 특이적 유전자로 Nppa, Nppb, Kng1, Npr1 등의 유전자를 동정함 (그림 71). 이는 이전 연구와 같이 Agt는 생리학적 심근비대 모델, Nppa는 병리학적 심근비대 모델을 설명하고 있음을 확인함

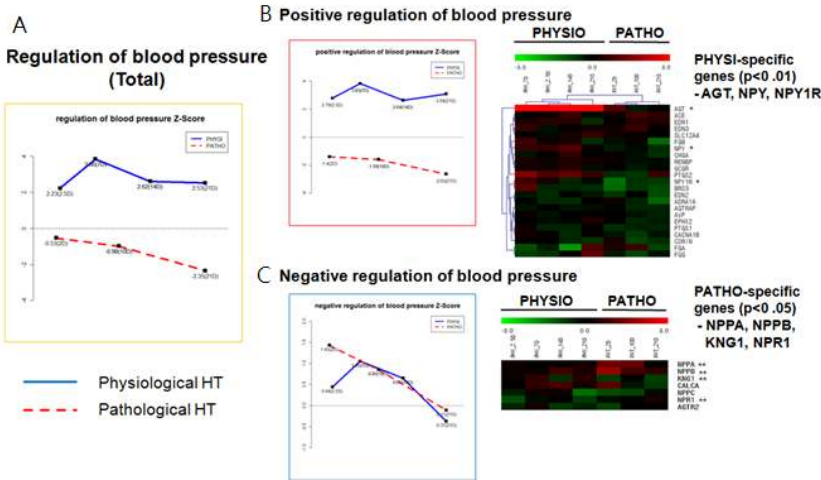


그림 71. 혈압조절유전자 집합의 표준값 그래프; Physiological vs Pathological hypertrophy
 A) 혈압조절 유전자 집합의 표준값 B) 혈압 상승 조절의 표준값 및 특이 유전자 C) 혈압 하강 조절의 표준값 및 특이 유전자

- 혈압조절자들에 대한 상위조절자를 PathwayStudio 7.1 분석을 통해 심근비대 pathway 관련 전사조절인자와 ligand들을 확인 하였으며 Gazer 분석을 통해 확보한 전사조절인자들의 표준값을 참조하여 표적유전자들(FC>=1.2)과 전사조절인자들 간의 네트워크를 구축하였음 (그림 72)

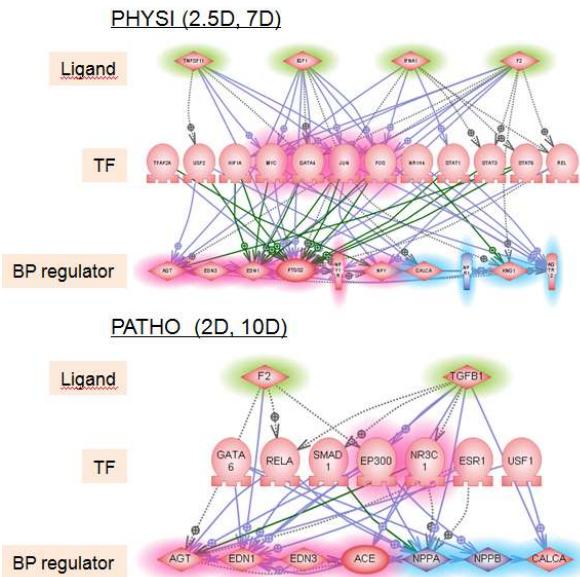


그림 72. 혈압/심근비대를 조절하는 전사조절인자, ligands 와 표적유전자들 간의 네트워크(PathwayStudio 7.1 분석)

- 생리학적 심근비대 모델에서 혈압조절자들에 대한 전사조절인자로 Myc, Ap1, Gata4, Nr1h4, Ppara, Hif1a 등을 후보군으로 찾았고 병리학적 심근비대 모델에서의 전사조절인자로 Ep300, Gata6, Esr1, Nr3c1 등을 후보군으로 동정함.
- 문헌에 근거한 검증방법 중 하나인 PathwayStudio 7.1 분석을 통해 좌심실비대를 조절하는 전사조절인자(Gata4, Myc, Ppara, Fos 등)와 일치하는 결과를 얻음 (그림 73). 혈압조절자들에 대한 ligand upstream로는 Tnfsf11, Ifna1, Igf1 등을 찾았고 병리학적 심근비대 모델에서의 ligand upstream으로 Tgfb1를 찾음 (그림 74).

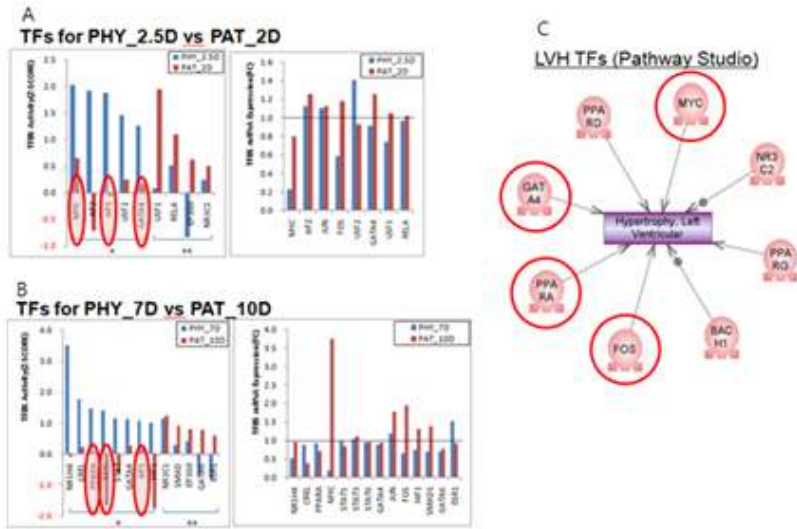


그림 73. 혈압조절자들에 대한 전사조절인자 분석결과 A) PHY_2.5일 vs PAT_2일의 전사조절인자 B) PHY_7일 vs PAT_10일의 전사조절인자 C) 좌심실비대 전사조절인자 (PathwayStudio 7.1 분석)

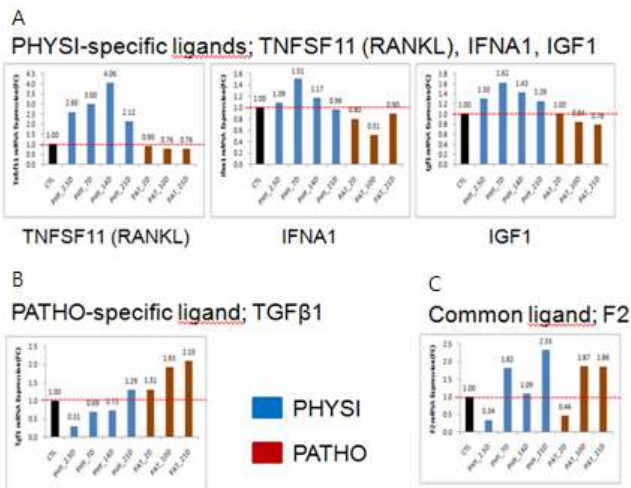


그림 74. 혈압조절자들에 대한 ligands upstream 분석 결과 A) PHYSI 특이적 ligands B) PATHO 특이적 ligands C) 공통 ligands

- 혈압을 조절하는 전사조절인자 후보군들의 다른 표적유전자들 중 FC > 2.0 인 유전자들을 PathwayStudio 7.1의 기능 중 하나인 Cell Processing으로 분석한 결과, 생리학적 심근비대 모델에서는 면역반응에 관련된 유전자들이 많이 나왔고, 병리학적 심근비대 모델에서는 섬유화에 관련된 유전자들이 다수 선별되었음 (그림 75)
- 이는 후보군에 있는 전사조절인자들이 혈압을 조절할 뿐만 아니라 생리학적 및 병리학적 심근비대의 현상들과 비슷한 양상을 나타내고 있음을 확인하였음

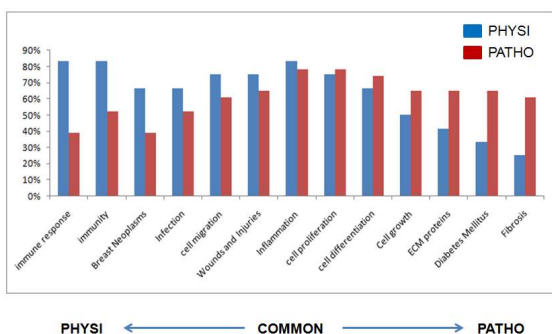


그림 75. 혈압을 조절하는 전사조절인자들에 대한 다른 표적유전자들의 PathwayStudio 7.1 분석 결과(FC>2.0)

나. 심장 내 주요 microRNA (miRNA) 조절 네트워크 분석

(1) 데이터 통합을 통한 심장 내 주요 miRNA 조절 네트워크 예측

① 심장 조직 특이적 유전자 분석을 위한 알고리즘 개발

- KEGG, MSigDB, Wikipathway, GO, HPRD, TargetScan 등 각종 생물정보데이터베이스와 NGS 기반 심장 전사체 데이터를 통합하여 심장조직 특이적 Gene Set 분석을 수행함
- Human과 mouse 두 개종을 동시 분석하여 보다 정확한 miRNA 기능예측을 도모함 (그림 76)
- 195개 심장관련 유전자세트, 143개 심장발현 miRNA, 10,451 심장발현 유전자로부터 980여개의 심장 miRNA 기능을 예측함

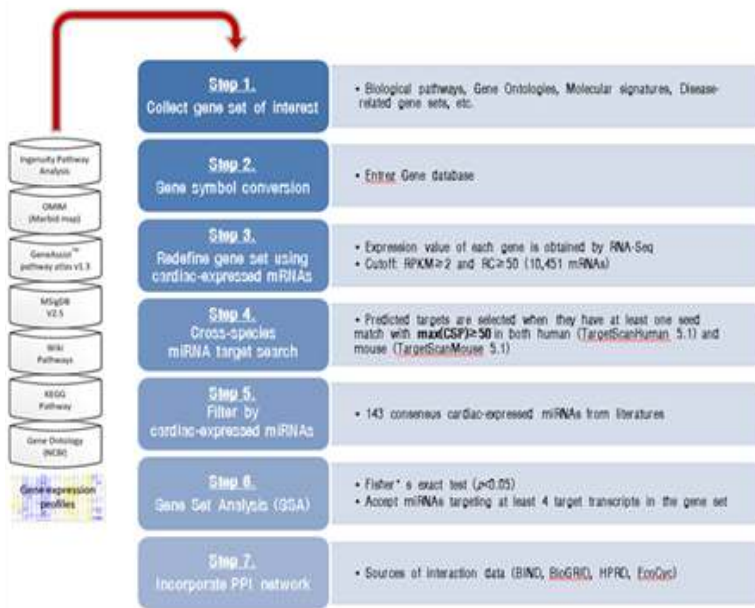


그림 76 심장 조직 특이적 miRNA를 예측하기 위한 알고리즘

② 심장섬유증과 심부전에 관한 miRNA 조절 네트워크 예측

- 심장 섬유증 및 심부전과 관련하여 기존에 보고된 miR-21, miR133, miR-29, miR-19를 성공적으로 예측함과 동시에 추가로 새로운 miRNA의 관련성을 예측함 (그림 77)

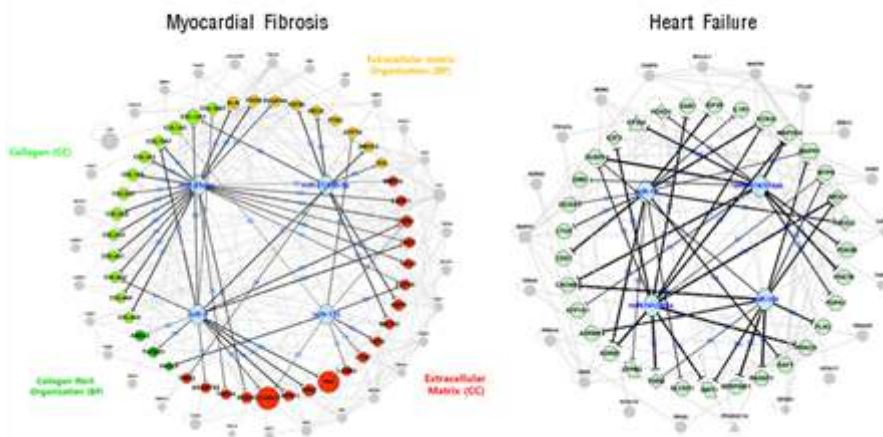


그림 77 심장 섬유증 및 심부전과 관련된 miRNA 예측

③ 다기능성에 기반한 심장 miRNA 조절 네트워크 예측

- 980여개 miRNA 기능 예측 결과를 miRNA의 다기능성(multi-functionality)에 기반하여 재분석하고 심장내 주요 miRNA를 선별함
- 분석결과 대체로 심장에서 발현양이 많은 miRNA들이 상대적으로 많은 target들을 조절할 뿐 아니라 다양한 신호전달경로에 관여하는 것으로 나타났고, 반대로 miR-127, miR-210, miR-451과 같은 miRNA는 심장발현 타겟 유전자들의 수가 극히 적기 때문에 심장에서의 기능 및 중요도가 매우 낮을 것으로 예측됨

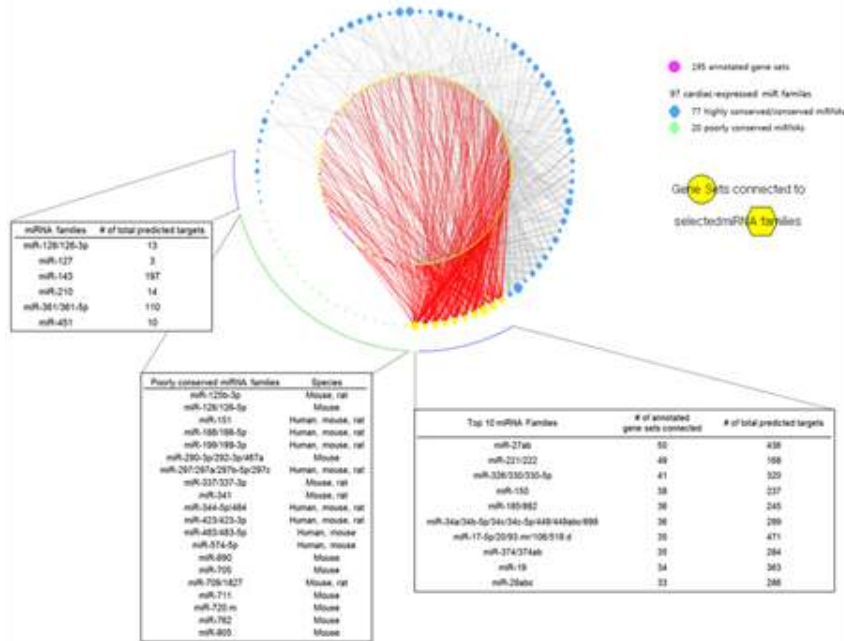


그림 78 다기능성에 기반한 심장 miRNA 조절 네트워크 예측

다. 심근비대 과정에 발생하는 hypoxia 관련 세포 분화 연구

(1) 마이크로어레이를 이용한 hypoxia 관련 전사체 분석

- 기존 여러 문헌에서 보고된 바와 같이 심장에 심근비대가 발생하는 과정에는 hypoxia가 유도됨을 기초로 하여 생쥐 근아세포 C2C12를 이용한 분화실험을 계획함 (그림 79). 분화기간 8일 동안 5% hypoxia 상태를 유지하였으며 normoxia에서 분화시킨 C2C12를 대조군으로 사용하였음



그림 79 Hypoxia 조건을 이용한 C2C12 분화 실험 계획

- 분화 기간 동안 normoxia와 hypoxia에서 분화된 C2C12의 세포 형태를 비교한 결과 두 조건 모두 세포를 분화 시킬 수 있었으며 분화 2일째까지는 비교적 형태적 차이를 보이지 않았음 (그림 80-A). 하지만 분화 4일째에는 hypoxia 쪽의 myotube의 형태가 normoxia 쪽 보다 얇아진 것을 확인할 수 있었으며 분화 6~8일째에 가장 큰 차이를 보이는 것을 확인함. 이는 hypoxia가 유도한 환경적 요인이 정상적인 C2C12의 분화에 영향을 준 결과로 사료됨.
- 각각의 상황에서 분화 유도된 C2C12 세포를 각 분화일 별로 수확한 후 Illumina BeadChip을 이용하여 전사체 분석을 실행하였음. 우선 각각의 total RNA의 상태를 전기영동을 통하여 확인하였으며 전사체 분석에 적합하다는 결론을 얻음 (그림 80-B)

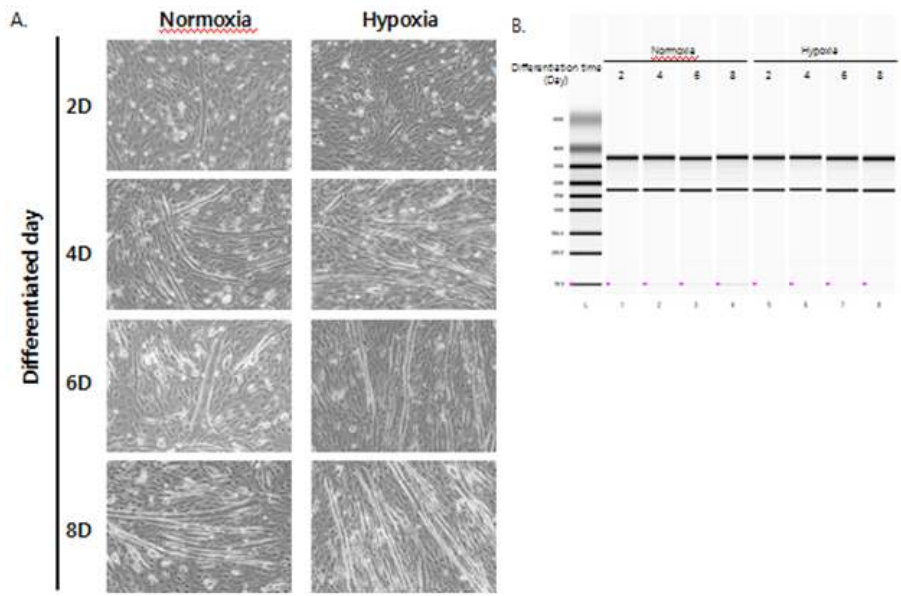


그림 80 Hypoxia와 normoxia에서 C2C12의 분화 A) 세포 형태 B) total RNA 전기영동 결과.

- 위에서 확인된 total RNA와 Illumina 사에서 제작한 MouseRef-8 ver.2 Expression BeadChip을 이용하여 전사체 분석을 한 결과, normoxia와 hypoxia에서 대부분의 유전자들이 비슷한 발현 양상을 보임
- K-Means clustering 분석 결과, 크게 두 형태의 발현 차이를 보이는 유전자 군들이 관찰되었으며 hypoxia에서 상대적으로 높게 발현되는 군과 normoxia에서 높게 발현되는 군으로 요약할 수 있었음 (그림 81-A, B)
- Hypoxia에서 높게 발현되는 유전자들 중 1번 군은 Prl2c3와 Prl2c4로 normoxia에서는 초기 발현이 감소하였다가 점점 발현변화가 사라지나 hypoxia에서는 발현 후반으로 갈수록 증가하는 유전자들이었으며, 이들은 주로 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 있음
- 또한 normoxia에서는 거의 발현 변화가 없지만 hypoxia에서는 발현이 증가하는 2, 4번 군은 주로 carbohydrate metabolic process에 관여하는 유전자들이 포함되어 있었음. 기존의 보고에 의하면 심근비대가 유도된 심장 근세포에서는 비정상적인 glucose metabolism이 증가하는 것으로 알려져 있으며 본 실험 결과에서도 같은 현상을 관찰할 수 있었음. 마지막 3번 군은 hypoxia에서는 분화기간 내내 높은 발현양을 유지하고 있으나 normoxia에서는 초기 높은 발현

에 비해 후기로 갈수록 낮아지는 양상을 보이는 군이며. 이들 중에는 Rhob, Figf 등과 같은 angiogenesis에 관련하는 유전자들은 물론 세포증식 촉진, carbohydrate metabolic process에 관여하는 유전자들이 포함되어 있음

- 위 유전자들과는 다르게 normoxia에서 상대적으로 발현이 높은 유전자들은 주로 hypoxia에서와도 비슷한 발현 증가 양상을 보이기는 하나, 발현양이 확연히 차이나는 패턴을 보임. 이들은 주로 Fas, Cd28, Cdk5같은 세포사멸을 촉진하는 유전자들 또는 ion transport에 관여하는 유전자들, insulin, Wnt, Mapk signaling pathway에 관여하는 유전자들로 구성되어 있었음

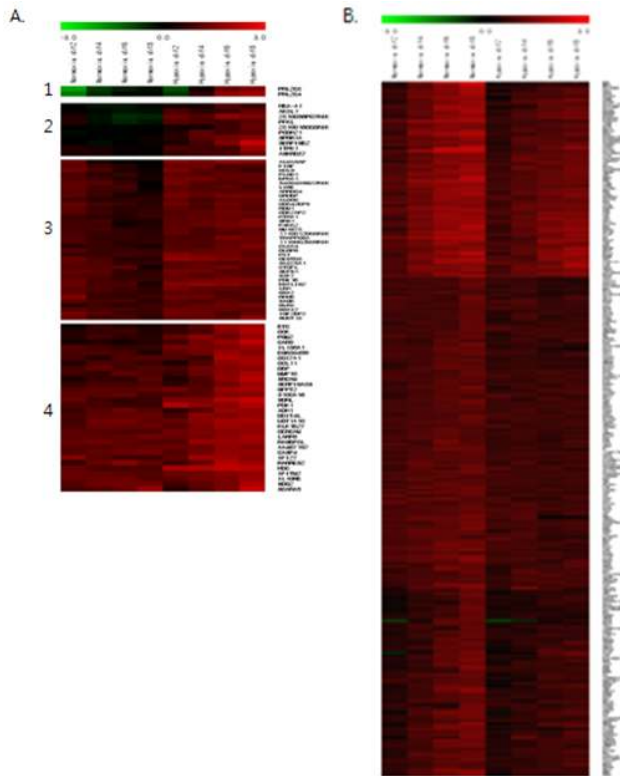


그림 81 Hypoxia와 normoxia에서 분화된 C2C12의 유전체 분석 결과.
A) hypoxia 분화에서 높은 발현 양상을 보이는 유전자,
B) normoxia 분화에서 상대적으로 높은 발현을 보이는 유전자 선별.

(2) ChIP assay를 통한 분화 관련 전사 인자 분석

- 분화를 유도한 생쥐 근아세포인 C2C12의 ChIP 실험을 위해 포름알데하이드로 cross-linking한 gDNA를 초음파 분쇄 하였으며 적당한 크기의 gDNA 조각을 얻기 위해 여러 조건을 변경하여 최적의 조건을 찾음 (그림 82).
- hypertrophic 마커 전사조절인자인 Mef2, Gata4의 항체를 이용한 ChIP 결과를 RT-PCR 결과와 비교하였고, 그 결과 Mef2의 표적유전자이자 심근비대 관련 유전자인 Acta1, Myl2, Ep300의 mRNA 발현과 Mef2 전사조절 유전자의 프로모터 결합 정도는 비교적 비슷한 패턴으로 변화하는 것을 확인함. 이들 중 Acta1은 분화 3일에서 감소하는 Myl2, Ep300과 다르게 분화기간 동안 꾸준히 증가하는 양상을 보임 (그림 82-C, D)
- 또한 Gata4의 표적이자 심근비대 관련 유전자인 Nppa, Nppb, Ankrd1의 mRNA 발현과 Gata4의 프로모터 결합을 비교한 결과, 서로 비슷한 양상으로 변화하는 것을 확인하였으며 Nppb는 분화기간 동안 점점 감소하였으나 Ankrd1은 증가함을 확인함 (그림 82-E, F)

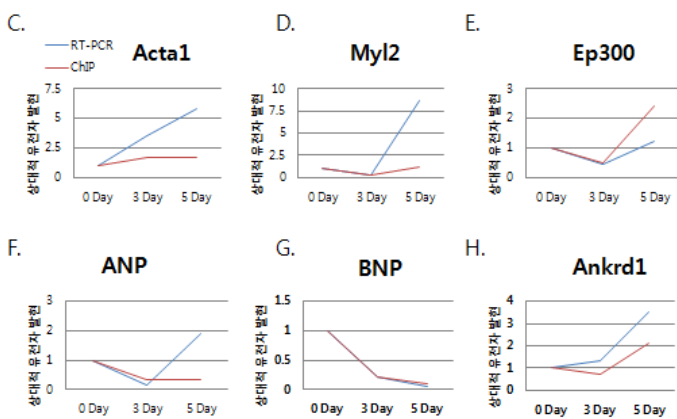
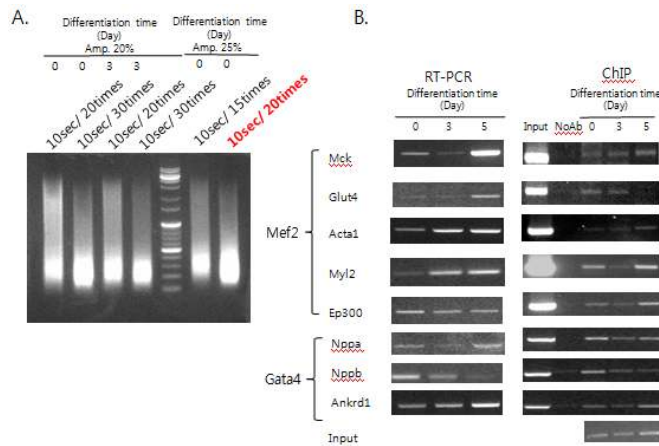
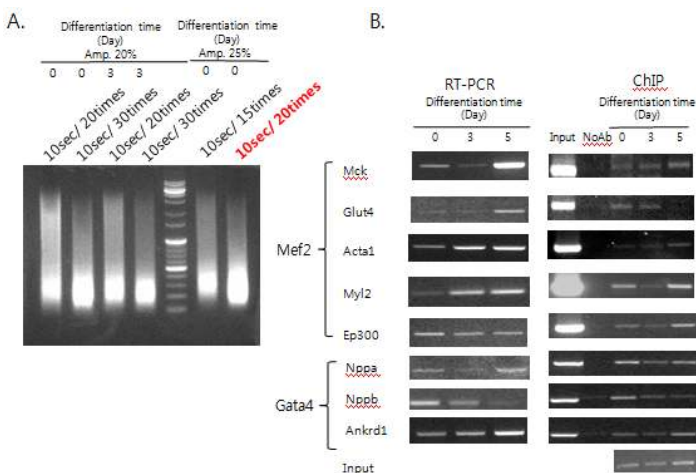


그림 82 분화 유도된 C2C12 세포의 ChIP 결과와 RT-PCR과의 비교. A) 최적의 gDNA 조각을 얻기 위한 초음파 분쇄 조건 B) 심근비대 관련 유전자들의 분화 기간별 RT-PCR과 ChIP 결과 C)~H) 위 유전자들의 mRNA 발현과 전사조절 유전자의 프로모터 결합 정도 비교.

○ C2C12 세포에서 확립한 ChIP 조건을 기반으로 생쥐의 대퇴근, 심근, 간에서 각 조직별 gDNA 초음파 분쇄 조건을 최적화하고 심근비대 관련 유전자들의 발현을 ChIP를 통하여 관찰, RT-PCR과 비교함 (그림 83). Mef2의 표적유전자인 Myl2, Glut4의 발현은 심장에서 가장 높은 것을 RT-PCR을 통하여 확인하였으며 ChIP의 결과에서도 Mef2의 프로모터 결합 또한 심장에서 가장 높은 것으로 관찰됨.



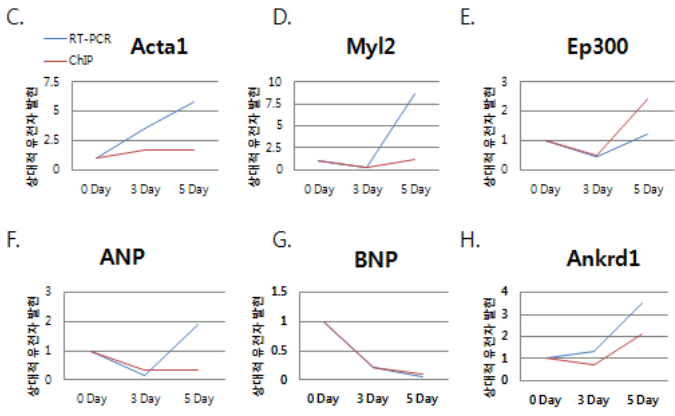


그림 83 분화 유도된 C2C12 세포의 ChIP 결과와 RT-PCR과의 비교. A) 최적의 gDNA 조각을 얻기 위한 초음파 분쇄 조건 B) 심근비대 관련 유전자들의 분화 기간별 RT-PCR과 ChIP 결과 C)~H) 위 유전자들의 mRNA 발현과 전사조절 유전자의 프로모터 결합 정도 비교.

2. 심근비대증의 단백질 네트워크 분석

가. 심근비대 모델에서 인산화 단백질의 대규모 분석

- 인산화 단백질을 특이적으로 동정하기 위하여 복잡한 단백질 시료인 마우스 뇌조직 단백질을 이용하여 TiO2와 IMAC (immobilized metal affinity chromatogram) 방법을 이용하여 인산화 단백질을 동정하는 방법을 확보하였음 (그림 84)
- 인산화 단백질의 비교정량 시스템 구축하기 위해 최적화된 인산화 펩타이드의 선택적 분리 방법을 동일한 양의 표준 단백질(alpha casein)에 적용해 인산화 된 특정 펩타이드를 가지고 4 번의 비교 정량 분석을 하였고 4번의 실험에서 재현성 있는 결과를 얻음 (그림 85)

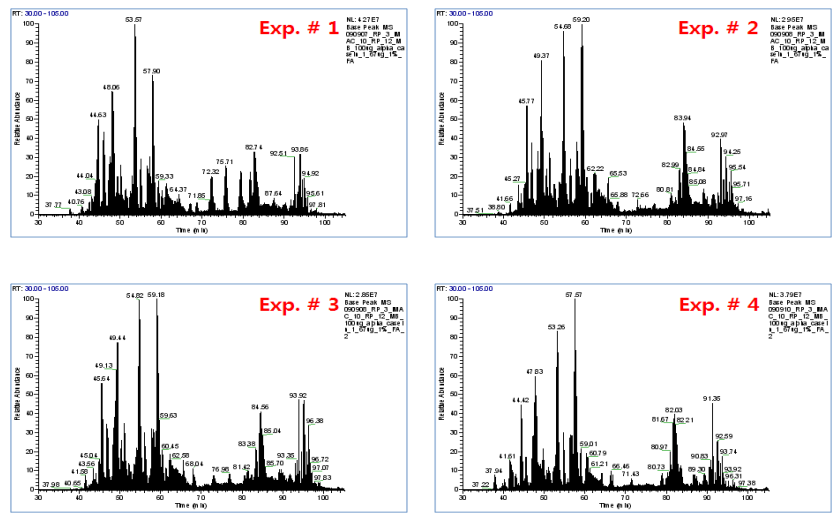


그림 84. 독립적인 반복실험을 통한 인산화 펩타이드의 선택적 분리방법의 재현성을 보인 LC-MS/MS 크로마토그램

| Peptide mass, m/z | Exp #1 | | Exp #2 | | Exp #3 | | Exp #4 | | Deviation |
|-------------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|-----------|
| | Retention time (min) | Peak Area | Retention time (min) | Peak Area | Retention time (min) | Peak Area | Retention time (min) | Peak Area | |
| TVDMEpSTEVFTK | 75.71 | 3.00×E7 | 76.6 | 2.46×E7 | 77.04 | 2.55×E7 | 75 | 3.04×E7 | 0.094 |
| EQlpSTpSEENSK | 49 | 1.60×E8 | 49.8 | 1.29×E8 | 49.9 | 1.21×E8 | 48.2 | 1.78×E8 | 0.157 |
| YKVPQLEIVNpSAEER | 82.9 | 6.80×E8 | 84 | 7.36×E8 | 84.6 | 6.51×E8 | 82 | 7.41×E8 | 0.054 |

그림 85. 독립적인 인산화 펩타이드의 선택적 분리방법을 통해 동정된 Alpha casein의 인산화 펩타이드 peak area 비교

- Junctate 유전자 과발현 심근 단백질 조직에서 인산화 특이적 단백질만을 동정하여 분석한 결과 전체 440개의 인산화 수식화를 보였음. 이들 단백질 가운데 약 55개 정도의 단백질들이 그 발현량 측면에서 유의성을 가지고 증가·감소를 보였음 (표 2)
- 심근단백질 조직에서 특이적으로 인산화 단백질을 분석하여 볼 때 그 발현량이 증가양상은 전체적으로 그 대조군에 대하여 비슷한 양상을 가지고 있는 것으로 보여짐
- 그러나 일부 심근비대에 관련된 단백질의 인산화 경우 상대적으로 발현량이 감소하거나 변화가 없는 경우에 인산화의 발현량이나 그 정도가 차이를 보이는 단백질이 존재하였음

| Gene Name | Peptide Name | Normal 1 | Normal 2 | Normal 3 | TG 1 | TG 2 | TG 3 | Fold Change | Up/Down |
|-----------|-----------------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|-------------|---------|
| Rtn4 | RRGSGpSVDETLFAL PAASEPVISSSAEK | 2.23×E7 | 2.27×E7 | 2.50×E7 | 2.16×E8 | 1.01×E8 | 1.23×E8 | 6.28 | Up |
| Hspb1 | SPpSWEFPR | 8.66×E7 | 5.56×E7 | 6.27×E7 | 3.87×E8 | 4.88×E8 | 3.61×E8 | 6.04 | Up |
| Cmya1 | LGpSRPpSIQEQSPLE LR | 3.28×E6 | 4.35×E6 | 3.87×E6 | 1.29×E7 | 1.31×E7 | 1.28×E7 | 3.38 | Up |
| Sorbs2 | KPLSVSPSTDGLRpS PpSPPPR | 1.48×E7 | 1.15×E7 | 0.92×E7 | 3.93×E7 | 4.00×E7 | 3.28×E7 | 3.15 | Up |
| Dap | DKDDQWESTpSPP KPTVFISGVIAR | 7.19×E6 | 7.96×E6 | 9.71×E6 | 2.24×E7 | 2.61×E7 | 1.41×E7 | 2.51 | Up |
| Hrc | EGGHpSLPMSQEDD EEEEKDEK | 1.54×E7 | 0.94×E6 | 1.45×E7 | 2.83×E6 | 2.11×E6 | 1.97×E6 | 0.18 | Down |
| | KEGDHSpSQEGDED PEQR | 5.22×E6 | 2.50×E6 | 3.46×E6 | - | - | - | | Down |
| | HQGHpSDDDDDDG VSTEHGQAHR | 3.54×E7 | 2.37×E6 | 2.25×E7 | - | - | - | | Down |
| Pln | RApSpTIEMPQAR | 4.50×E8 | 2.87×E8 | 3.65×E8 | 6.76×E7 | 7.61×E7 | 4.36×E7 | 0.17 | Down |

표 2. 유의성 있게 증가·감소된 단백질들의 인산화 정도의 peak area 값 비교

- Atp2a2의 경우 정상 마우스 단백질의 발현량에 비하여 약 2배 이상이 감소하였고 이와 비례하여 인산화 수식화가 일어난 동일 펩타이드의 경우 그 정량적인 정도도 2배 정도 감소하는 양상을 보였음 (그림 86).

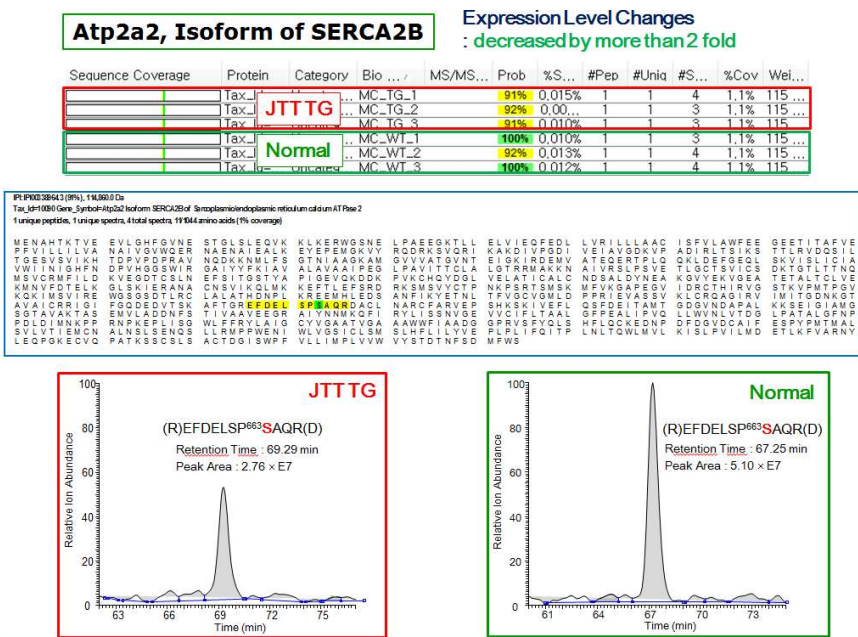


그림 86. Atp2a의 인산화 발현양상

- Tpm1의 경우는 발현량에서는 차이를 보이지 않았으나 심근비대 모델에서 인산화 수식화 정도가 2배 이상 증가하는 양상을 보였음
- 심근비대 단백질에서 인산화 특이적인 단백질에 대하여 Gene Ontology 및 KEGG Pathway 분석을 실시한 결과 이들 단백질들의 다수가 생물학적인 대사과정 중 심근 조직과 및 골격, 칼슘대사 및 심근비대 관련 대사과정에 상당수 관련되어 있음을 확인하였음 (그림 87)

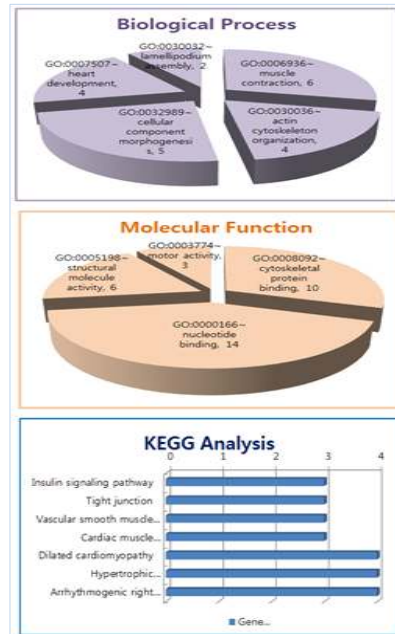


그림 87. 인산화된 심근조직 단백질의 GO 및 KEGG Pathway 분석 결과

나. 근소포체 칼슘대사 관련 단백질의 절대 정량 분석

- 주요 20여 가지 단백질들을 대상으로 제작된 동위원소가 포함된 내부 표준 펩타이드들과 selected reaction monitoring (SRM) 실험방법을 이용하여 실제 심장 근육 조직을 대상으로 절대 정량 분석을 실시하였음
- 마우스 심장 조직에서 추출한 단백질 혼합물 시료들은 2~20 µg을 각각의 분석에 사용하였으며 10~100 fmol의 각각의 단백질에 맞게 합성된 표준 펩타이드들을 펩타이드화된 단백질 혼합물 시료에 첨가하여 절대 정량 분석을 진행하였으며 3차례의 반복 분석을 통해 단백질들의 절대량을 산출하였음
- 동위원소가 포함된 표준 정량 펩타이드 (ELTEESDLLSDIFGLDLK)를 이용한 RyR2의 절대 정량 분석의 경우 평균 1.3 fmol/(µg total cardiac protein)으로 측정되었으며 펩타이드 (CLALATHDNPLKR)를 이용한 SERCA2a의 경우 평균 34.9 fmol/(µg total cardiac protein)으로 측정되었음 (그림88)

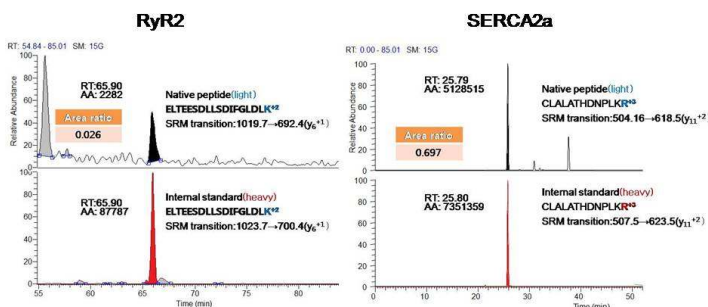


그림 88 Selected reaction monitoring 질량분석 기술을 이용한 RyR2와 SERCA2a의 절대 정량 분석 결과의 예

- 심장 근육의 이완에 있어서 중요한 역할을 담당하는 SERCA2a의 발현양을 조절하는 방법이 심장 질환의 치료제 개발의 대상으로 최근에 활발하게 진행되고 있는데 본 연구에서 심장 비대 마우스 모델과 정상 마우스의 심장 근육에서 SERCA의 발현양을 절대정량분석을 통해 측정하였으며 이전에 발표된 연구 결과들과 일치하는 것을 알수 있었음.(그림 89) [10]

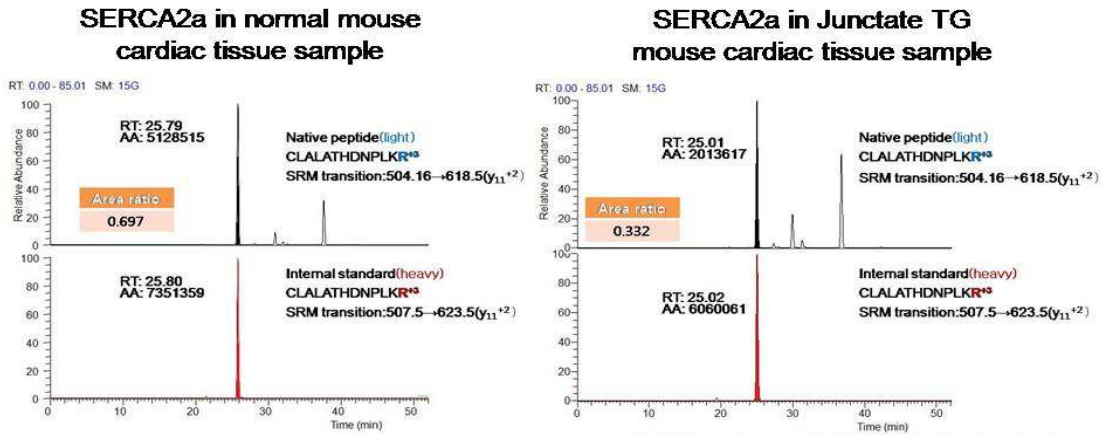


그림 89 정상 마우스와 junctate 과발현 마우스 모델 심장 근육조직 시료를 대상으로 selected reaction monitoring (SRM) 질량 분석 기술을 이용한 SERCA2a의 절대 정량분석 결과의 예

- SERCA2a와 직접적으로 상호 작용을 하는 것으로 잘 알려진 단백질들(phospholamban, histidine-rich calcium binding protein, sarcalumenin)을 대상으로 심장비대 마우스 모델과 정상마우스의 심장 근육에서 절대정량 분석을 진행하였으며(표 3) SERCA2a 상호결합 단백질들은 SERCA2a와 마찬가지로 심장 비대 모델에서 급격히 발현양이 감소함을 알 수 있었음
- 심장근육에서 SERCA2a 와 상호 결합하는 칼슘대사 관련 단백질들 중에 SERCA2a의 활성을 저해하는 역할을 하는것으로 알려진 phospholamban의 경우 기존에 보고된 결과와 달리 질환 조건하에서 절대량이 감소하는 것으로 분석되었는데 이는 phospholamban의 인산화 정도에 따라 SERCA2a의 활성을 저해하는 것이 차이가 있음을 고려해볼 때 특정 인산화 위치의 정량 분석 결과를 병합하여 결론을 유추해야 할 것임 [10]

표 3 정상 마우스와 junctate 과발현 마우스의 심근조직시료에서 SERCA2a와 상호 결합하는 칼슘 대사 관련 단백질들의 절대 정량 분석 결과

| Protein name | Average protein amount in normal heart tissue (fmol/ug) | Average protein amount in JTT TG heart tissue (fmol/ug) | Percentage of protein amount change (normal vs. JTT TG sample) |
|--------------|---|---|--|
| SERCA | 36.88±3.91 | 16.61±1.92 | -54.96% |
| PLN | 11.15±1.39 | 1.37±0.21 | -87.71% |
| HRC | 5.91±0.61 | 0.69±0.09 | -88.32% |
| Sarcalumenin | 22.87±1.93 | 11.72±0.32 | -48.75% |

다. 질량 분석 기술에 기반한 심근 조직 내 단백질 동정 수준 및 분석감도 개선

- 기존에 단백질 추출방법(4% SDS 또는 8M urea)에 비해 단백질 추출 효율이 증가된 방법을 확립하기 위해 다양한 종류의 계면활성제 및 유기 용매를 사용하여 여러 조직 시료들을 대상으로 단백질 추출 효율을 비교 분석하였으며 이중에 고농도의 formamide를 포함한 추출 방법이 심근조직 시료에 있어서 효과적임을 확인할 수 있었음 (표 4).

| | 4% SDS | 30% Fa | 50% Fa | 40% FA | 50% FA | 8M urea |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Brain | 5.6 | 7.6 | 7.2 | 8.4 | 8.4 | 7.0 |
| Heart | 7.6 | 11.1 | 10.6 | 8.0 | 7.6 | 8.4 |
| Kidney | 10.0 | 9.2 | 8.8 | 10.4 | 14.0 | 8.4 |
| Spleen | 7.0 | 9.4 | 9.0 | 7.2 | 8.8 | 7.9 |
| Liver | 3.8 | 3.4 | 4.2 | 5.2 | 5.2 | 3.8 |
| Lung | 6.0 | 5.8 | 5.8 | 6.4 | 5.8 | 7.0 |

표 4. 조직 시료별 단백질 정량 분석 결과

- FASP (filter-aided sample preparation) 방법을 이용하여 기존의 펩타이드화 방법에 비해 펩타이드화 효율이 개선된 것을 확인하였으며 실제 심근 조직 단백질들을 대상으로 다양한 추출 조건하에서 얻어진 시료들을 LC-MS/MS 분석을 통해 확인하였음 (표 5).

| | Concentration | Protein # | Peptide # | Vol. |
|-----------------|---------------|-----------|-----------|---------|
| 4% SDS | 8.8mg/ml | 794 | 2749 | 87/1.74 |
| 30% Formamide | 10.6mg/ml | 885 | 3122 | 88/1.76 |
| 50% Formamide | 12.6mg/ml | 875 | 3040 | 96/1.92 |
| 40% Formic acid | 12.4mg/ml | 840 | 2828 | 85/1.7 |
| 50% Formic acid | 11.4mg/ml | 856 | 2743 | 89/1.78 |
| 8M urea | 10.8mg/ml | 785 | 2807 | 88/1.76 |

표 5 FASP 방법과 micro LC-MS/MS 분석을 이용한 다양한 단백질 추출 조건하에서 심근 단백질 분석 결과의 예

- 질량분석 기술을 이용한 단백질체 분석에 있어서 단백질 동정 범위를 전반적으로 확대하기 위해 조직시료를 대상으로 다양한 성질을 가진 단백질들의 효율적인 추출이 선행되어야 하는데 특히 소수성을 지니고 있으며 분자량이 매우 큰 막단백질들의 경우 동정에 많은 어려움이 보고되고 있음.
- 거대한 분자량을 가진 막단백질들의 효과적인 추출을 위해 계면활성제를 이용하는 방법과 유기 용매를 사용하는 방법이 각각 사용되었으나 본 연구에서는 10여가지 이상의 각종 계면활성제들과 여러 유기용매들을 조합하여 조직 시료에서 효과적으로 단백질을 추출해내고자 함
- 이온성 계면활성제중의 하나인 sodium dodecylsulfate (SDS)와 유기 용매 중에 formamide 또는 formic acid가 같이 단백질 추출 용매에 사용되었을 때에 단백질 추출 효율이 매우 높아진다는 것을 추출 용매에 녹지않는 침전물의 확인 및 단백질 정량 실험을 통해 확인하였음 (그림90)
- 기존에 널리 사용되고 있는 단백질 추출 방법인 8M urea lysis protocol에 비해 유의성있게 상대적으로 높은 추출 효율을 보이는 것을 심장 조직을 비롯하여 뇌 조직 및 간 조직에서 그리고 3가지 조직 시료 농도 조건하에서 확인하였음.(그림 91)

Heart Tissue

| Tissue Amount | 4% SDS | 4% SDS/30% formamide | 4% SDS/50% formamide | 4% SDS/40% formic acid | 4% SDS/50% formic acid | 8M urea |
|----------------|----------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------|
| 10mg/ml | 0.8mg/ml | 1.2mg/ml | 1.1mg/ml | 1.3mg/ml | 1.4mg/ml | 0.6mg/ml |
| 20mg/ml | 2.4mg/ml | 2.7mg/ml | 2.5mg/ml | 2.7mg/ml | 2.9mg/ml | 1.9mg/ml |
| 30mg/ml | 3.5mg/ml | 3.9mg/ml | 3.8mg/ml | 3.8mg/ml | 3.9mg/ml | 3.1mg/ml |

그림 90 심장 조직 시료를 대상으로 이온성 계면활성제와 유기 용매를 동시에 포함한 단백질 추출 방법들과 기존의 단백질 추출 방법의 예

- 조직 시료에서 높은 효율로 추출된 단백질 혼합물의 경우 질량 분석에 앞서 이온성 계면활성제를 효과적으로 제거하는 방법이 필수적인데 이를 위해 수용액과 잘 섞이지 않은 ethylacetate와 같은 유기 용매를 이용하는 phase transfer 방법을 병행하여 높은 농도로 추출된 단백질들을 질량 분석 기술로 빠른 시간내에 대규모로 동정하는 protocol을 개발하였음.

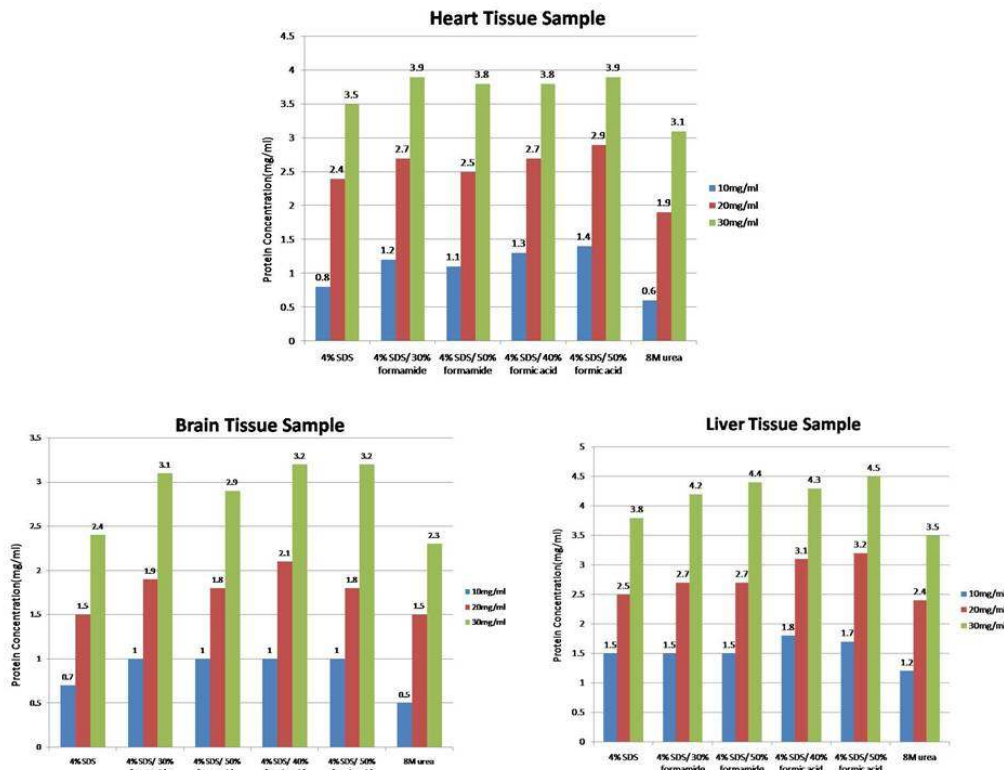


그림 91 세가지 조직 시료들을 대상으로 이온성 계면활성제와 유기용매를 동시에 사용하는 단백질 추출방법들의 비교 실험의 예

3. 다층적 데이터를 융합하여 심근비대증의 주요 네트워크 규명

가. 다양한 오믹스 데이터를 융합 분석하기 위한 웹 솔루션 CIDMS 배포

- 3단계에 구축한 다층적 데이터 통합 솔루션인 CIDMS를 확장하여 모두 541개의 pathway (독자적으로 구축된 118개 포함), 27,100개 상호결합 정보를 포함하고 있음. 2012년 1월 Nucleic Acid Research에 게재, 배포함 [11]
- web page: <http://ipavs.cidms.org/>

나. CIDMS를 기반으로 근소포체 ER stress 모델 정립

- CIDMS가 포함하고 있는 주요 pathway 중 심근비대증에 주요한 ER stress 모델을 정립함
- ER stress map은 92개의 기존 논문으로부터 정립되었으며 62개 molecule에 의한 147개 reaction으로 이루어짐 (그림 92)
- http://203.230.49.206/ipavs/pathwaysvg.do?DBID=ER_Stress_Map

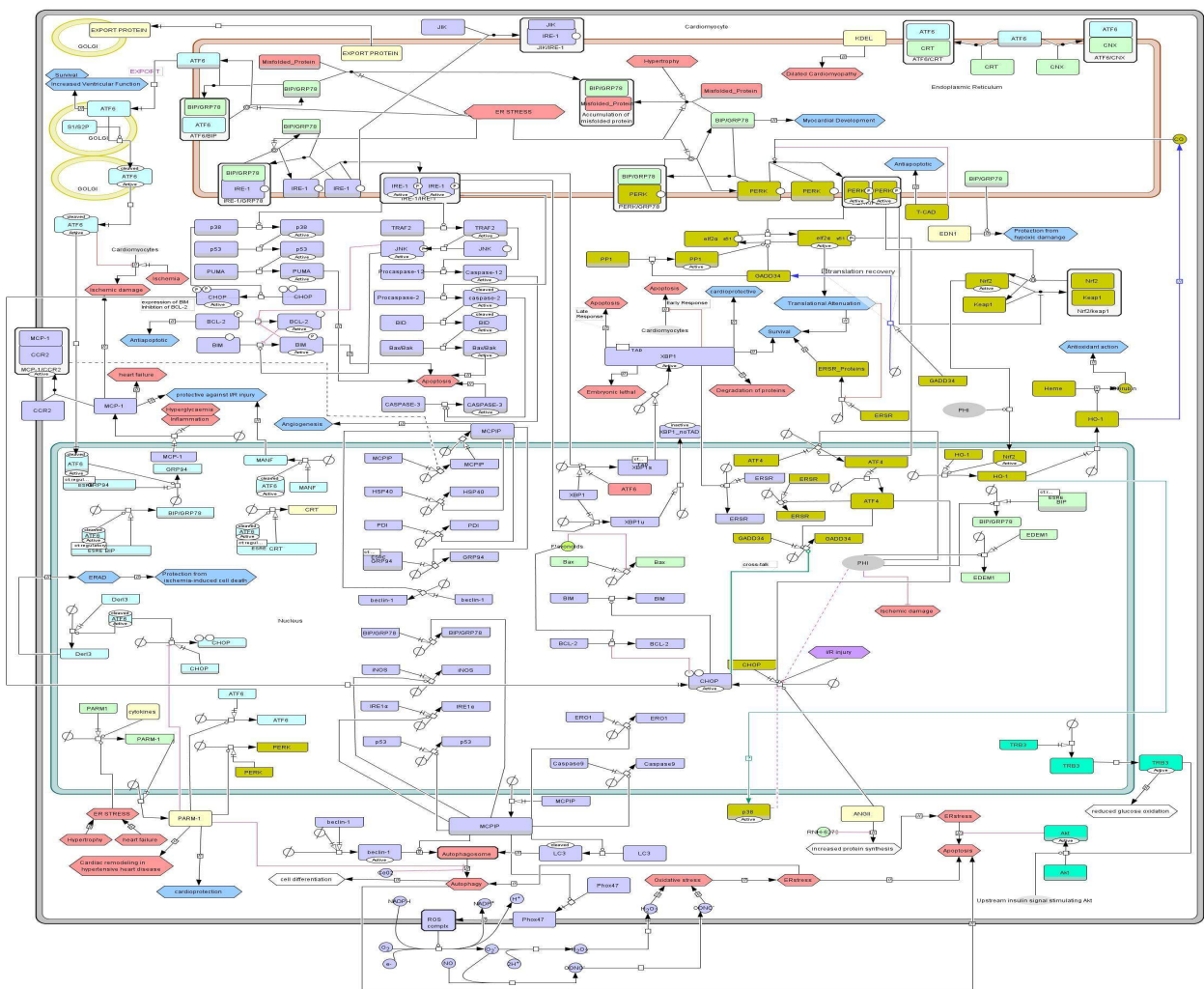


그림 92. 다층적 오믹스 데이터를 융합 분석하기 위한 웹 솔루션인 CIDMS내 ER stress map

다. 정립된 모델을 기반으로 ER stress의 심근비대증 관련성을 규명

(1) 심근비대증에서의 ER stress 정도와 chemical chaperone을 통한 ER stress 억제

- Chemical chaperone의 심근비대증에 대한 치료제로서의 가능성을 연구하기 위해 동맥결찰로 유도한 심근비대 마우스 모델에 PBA를 일정기간 경구투여한 경우, 심근비대증에서 ER stress가 증가하는 것을 관찰함 (그림 93-A)
- 심근비대증을 유도한 마우스에 PBA를 1주일간 경구투여한 결과 심근비대에 의해 증가된 ER stress의 표지단백질이 줄어드는 것을 관찰함 (그림 93-B)

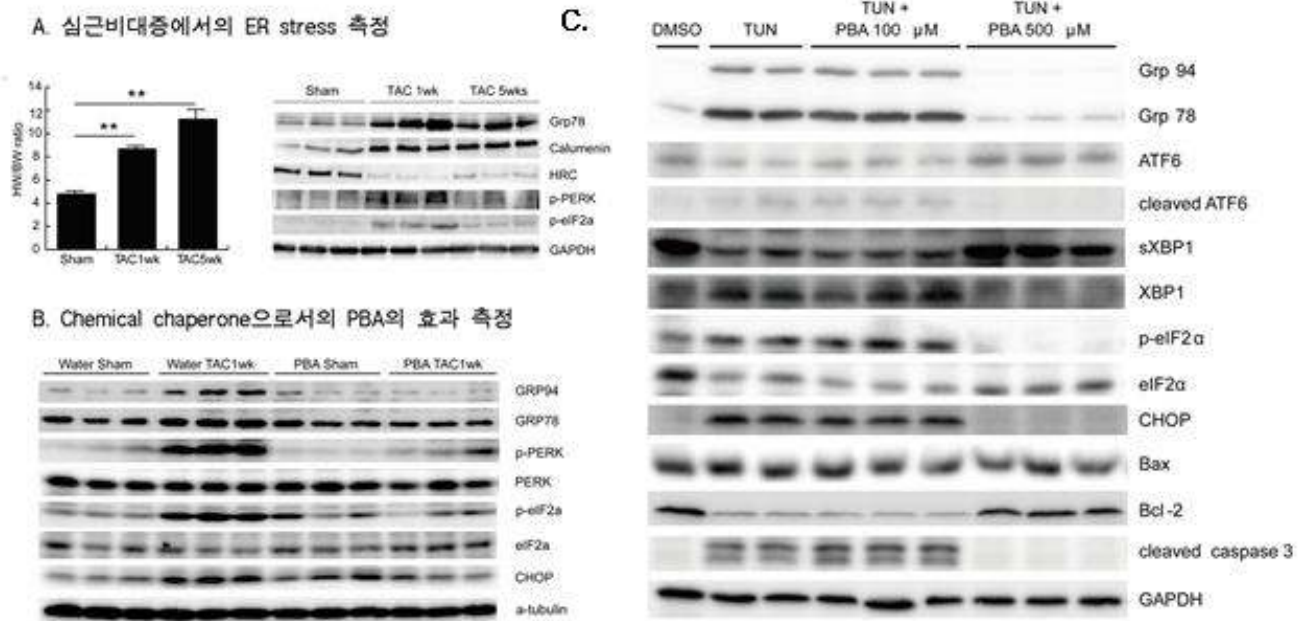


그림 93 심근비대증과 ER stress 관계성 분석 (A) 심근비대증에서 ER stress 측정 (B) chemical chaperone인 PBA의 심근비대증 및 ER stress 억제 효과 측정 (C) PBA 농도에 따른 ER stress 관련 유전자 발현 측정

(2) PBA 경구투여를 통한 ER stress 유전자 발현 억제

- 마우스 심방 유래 세포인 HL-1 세포에 tunicamycin를 처리하여 ER stress를 유도한 후 PBA를 처리한 경우, ER stress 관련 유전자의 발현이 현저하게 줄어듦을 확인함 (그림 93-C)
- 또한 ER stress에 의해 그 발현이 증가하여 세포사멸을 유도하는 단백질인 CHOP의 발현도 PBA의 처리로 현저하게 감소함
- 세포사멸을 유도하는 단백질인 Bax는 각 실험군 별로 차이가 없었지만, 세포사멸을 억제하는 단백질인 Bcl-2는 ER stress가 유도된 경우 그 발현이 현저하게 줄었다가 PBA를 처리한 경우 다시 회복되는 것을 발견함
- 세포사멸의 표지단백질인 caspase 3의 절편은 ER stress가 유도된 경우 그 발현이 증가하였다가 PBA를 처리한 경우 현저하게 감소함

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구단은 칼슘대사 시스템생물학 연구를 통해 심장 기능에 필수적인 칼슘대사에 대한 주요 인자를 확립하는 한편, 칼슘대사 시스템 내 주요 인자에 대한 다층적 수준에서의 네트워크를 구축하고 주요 네트워크에 대한 동역학을 분석, 모델링함으로써 심장 기능 및 질환 기전을 체계적, 입체적으로 분석하였음

첫째, 본 연구단은 칼슘대사시스템의 주요 구성인자를 확립하고 각각의 생물학적 기능을 구조적, 생리적, 약리적, 분자생물학적 측면에서 면밀히 분석함으로써 심층적 이해에 기여하였음

둘째, 본 연구단은 칼슘대사 이상에 의한 심장 질환의 시스템 수준의 이해를 도모하고자 심장 질환의 전사체, 단백질체, 상호작용 등의 다양한 층위에서의 정보를 수집, 분석하였으며 이를 기반으로 주요 네트워크 및 신호전달계를 도출하였음

셋째, 본 연구단은 칼슘대사시스템의 동역학을 이해하기 위해 주요 네트워크 및 신호전달계에 대한 수학적 모델을 구축하였으며 이를 통해 생리학적 및 병리학적 심근비대증의 기전을 분석하였음. 이는 심장 질환의 효율적인 치료제 개발에 중요한 기초 자료로 기여할 것임

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 유전체 정보 활용 계획

- NGS 기술로 확보한 전사체는 마이크로어레이 유래 전사체와는 달리 **alternative splicing, novel transcript** 등의 분석이 가능하므로 앞으로의 연구에도 용이하게 활용될 수 있음
- 심근비대에 중요한 기능성 유전자와 이들의 전사과정을 조절하는 전사조절인자 확인이 가능하게 되고 생리학적 및 병리학적 심근비대를 일으키는 대사시스템의 구성과 상호작용, 병리적 현상 등에 대한 체계적인 분석이 가능해지며 치료를 위한 분자표적의 동정이 가능해 질 것임
- 본 연구의 결과는 심근비대 관련 분자표적 및 바이오마커는 추가연구를 통한 심근비대의 분자진단 및 치료법 개발에 활용되고 심근비대 조절의 유전자 네트워크와 그 동력학적 특성의 분석 결과는 심근비대 관련 생체기능의 거시적인 연구 및 질병의 진단/치료 연구의 기초자료로써 활용할 수 있음
- 마우스 심장 내 신규유전자 중 칼슘관련 유전자 **Mm.261329** 분석 연구는 심근 및 비심근세포에서의 기능을 밝힘으로써 **myosin** 관련 분야의 연구 활성화에 큰 역할을 할 것임
- **Mm.20818** 연구도 이 유전자의 신기능에 대한 결과를 최초로 제시함에 따라 후속연구의 기틀을 마련하였음. 이러한 결과들은 기존의 개별적, 산발적 연구에서는 달성하기 어려웠던 것으로써, 관련 연구분야에 학술적으로 매우 중요한 전환점이 될 것이고 나아가 타 생명시스템 연구의 모델이 될 것임

2. 단백질체 정보 활용 계획

- RyR 복합체의 EM 맵 fitting을 통해서 RyR과 상호작용하는 타깃 단백질들과 구조적 상호작용 분석 및 RyR내 타깃 단백질의 위치 규명이 가능하며, 이와 같은 삼차원공간상의 상호작용 네트워크 연구결과는 생체기능 연구 및 칼슘대사 이상 질병의 진단 및 치료기술의 개발의 기초자료로서 활용할 수 있음
- 심근비대 마우스 모델을 대상으로 한 대규모 단백질 인산화 비교 정량분석 결과는 질량분석 기술에 기반한 심근 단백질체 분석 범위의 증가 뿐 아니라 심근비대 및 심장 질환의 기전에 관여하는 중요한 단백질들을 발굴해냄으로서 생체기능 연구 및 칼슘대사 이상 질병의 진단 및 치료기술 개발의 기초자료로 활용할 수 있음.
- 심장 근육의 칼슘대사 신호전달에 관련된 주요 단백질들을 대상으로 정상 및 질환 조건에서의 절대 정량 분석 연구를 통해 생성되는 보다 정확한 동력학적 데이터들은 생체 신호 전달체계의 네트워크 분석과 정밀한 심장 근육 운동 모델의 구축에 기여할 것임

3. 모델링 및 동역학 기술의 활용 계획

- 본 연구 과제를 통해 개발된 심근비대발생관련 대규모 신호전달네트워크 모델은 심근비대의 발생메커니즘을 시스템 수준에서 통합적으로 분석하고 탐구하는데 활용할 계획이며, 이를 계속 지속적으로 확장 및 보완하여 궁극적으로 병리학적 심근비대의 최적치료전략수립과 더불어 신약후보물질의 발굴 및 평가에 활용함으로써 제약 산업 및 관련학문 분야의 기술적 발전에 상당한 기여를 할 수 있을 것으로 예상됨.
- 신호전달시스템에 대한 도식화모델 작성기법과 이를 이용한 수학적 모델링기법은 여러 생체신호전달시스템에 보편적으로 적용될 수 있는 기술이므로, 이 기법을 지금까지 알려지지 않은 다양한 생명현상을 이해하기 위한 도구로 널리 활용할 계획임. 또한, 시뮬레이션을 통한 모델의 분석기법은 실험을 예측하고 분석할 수 있는 방법을 제공함으로써 관련된 실험을 계획하는 데 활용될 수 있으므로, 실험방법론 측면에서도 상당한 기여를 할 것으로 예상됨.

4. 통합 웹 솔루션의 배포 및 활용 계획

- 다양한 층위에서 생산되는 대규모 데이터를 효율적으로 관리, 분석하기 위해 본 사업단에서 구축한 웹 솔루션인 CIDMS 데이터베이스는 고가 상용 프로그램인 Ingenuity Pathway Analysis (IPA), PathwayStudio등을 대체하는 한편, 보다 심장 맞춤형 콘텐츠를 제공함으로써 전세계 심장연구자들에게 높은 수준의 연구 환경을 제공할 것임

5. 실험 동물 및 기술의 활용 계획

- 본 연구에서 개발된 다양한 실험 동물 및 세포주는 향후 심장 질환 연구에도 유용하게 활용 가능함
- 신규유전자 연구를 위해 제작된 총 8종의 항체는 관련 분야 연구에 매우 필수적이고도 귀중한 자원으로써, 본 연구사업이 창출한 것임. 칼슘 관련 연구분야, 미토콘드리아 관련 연구분야에 다양하게 사용될 것이며 국내·외 타 연구자들과의 공유를 통해서 향후 후속 응용연구에 활용할 계획임
- 본 연구에서 확립된 NGS 분석 기술을 응용하여 보다 다양한 실험 동물에서의 빠르고 효율적인 분석이 용이할 수 있음

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 유전체/전사체 분석 기술 및 정보

- NGS 분석 과정 중 유의 유전자를 동정하는 새로운 기술로 *negative binomial distribution*을 기반으로 한 DESeq등이 개발되었음 [12]. 이는 기존의 RPKM 정규화 방법보다 좀 더 안정적인 결과를 내는 것으로 알려짐
- 유전체 및 전사체를 분석하는 기술이 차세대 (NGS)를 넘어 3세대 기술이 개발되고 있음. 별도의 증폭 과정 없이 단일 분자 수준에서 유전체 및 전사체를 읽는 PacBio 및 형광을 사용하지 않는 IonTorrent 등이 개발되어 앞으로의 유전체 연구에 새로운 지평을 열 것으로 기대됨

2. 단백질 분석 기술 및 정보

- IP₃R와 RyR의 중요 도메인의 구조와 기능이 보존되어 있음이 새롭게 밝혀졌으며 각각의 N-말단 도메인의 구조가 유사하다고 알려짐. 또한 IP₃R와 RyR의 키메라 단백질 또한 채널 기능을 유지함이 밝혀짐 [13]
- SPRY2 항체와 RyR1 단백질간의 상호작용이 cryo-EM을 통해 확인되었음. RyR1의 SPRY2 domain의 항체 상호작용하는 부위를 3차원 reconstruction됨 [14]
- RyR1과 IP₃R의 N-말단 도메인의 구조 중 3개의 도메인이 구조적으로 유사함이 새롭게 밝혀짐. IP₃R의 closed state의 N-말단 3개의 도메인 구조의 모델을 제시되었으며 IP₃R과 RyR의 N-말단의 allosteric mechanism의 모델 또한 제시되었음 [15]
- RyR의 N-말단의 질병에 관련된 hotspot구조가 밝혀졌음 [16]
- 현재까지 심근비대에 관한 연구동향의 큰 방향 중의 하나는 단백질 분석 기술을 기반으로 하여 각종 metabolites에 대한 동력학 변화를 대규모로 측정하는 방향으로 이동되고 있음.
- 이는 대규모의 관련 인자들을 분석함으로써 질병치료에 효과적으로 사용될 수 있는 의학학적 biomarker 및 실제 pre-clinical drug discovery과정에 보다 효율적으로 사용될 수 있음. 이는 전통적인 방법의 biomarker 발굴이 한계 다다름에 따라 대량의 분석데이터를 통하여 이를 확보하기 위한 기술학적 변화가 진행되고 있는 추세임.
- 최근에는 stable isotope를 펩타이드 뿐만 아니라 full-length 단백질에 labeling하여 urine내에서 이를 정량 분석 함으로서 손쉽게 body-fluid내 존재하는 biomarker를 절대정량 방법으로 분석하였음. 이러한 동향은 유전체 정보와는 달리 증폭이 불가능한 단백질 시료자체를 내표단백질의 용출을 높이는 방법을 사용하거나 PTM과 같은 특이적인 단백질만을 분리 혹은 tagging하는 기술을 이용하여 단백질이 가진 성질을 보다 총체적으로 분석할 수 있는 측정범위를 보다 다각화 할 수 있으며 이를 통하여 정량적 정보를 획득하려는 방향으로 연구가 진행되고 있음 [17]
- 단백질체 분석 방법의 연속적으로 이루어지고 있는 연구 흐름은 좀 더 low abundance로 존재하는 단백질을 보다 효과적으로 분리하는 방법으로 연구 개발이 진행되고 있음. 이는 통상적으로 질량분석 시스템에서 고압액상크로마토그래피 (High performance liquid

chromatography)에 이용되는 분석 컬럼 내 resin과 샘플간의 간섭효과를 최소화 하고자 surfactant를 배제한 urea등과 같은 solution으로 시료 분석을 할 경우 통상 전체 시료의 1/10 정도만이 분리되는 것으로 알려지고 있음. 따라서 최근의 동향은 시료 내에서 보다 많은 표본 단백질을 얻기 위하여 직접적으로 surfactant를 사용하여 시료를 준비하는 방법은 물론이거니와 그 외 표본 시료의 손실을 감소하기 위한 기술방법으로 초점이 맞춰지고 있음.

- 이전에 이는 Nature Method 저널의 Matthias Mann 그룹의 FASP (Filter aid sample preparation) 방법을 시작으로 하여 [18], 질량분석 시스템에서 분석에 간섭이 없는 각종 surfactant의 개발하기도 하였으나 이는 반복분석을 필요로 하는 단백질분석에서 재연성이 완벽하지 못하기 때문에 정확한 정량적 정보를 얻으려는 데이터를 위한 분석 기법으로는 아직 한계를 보이고 있음. 따라서 이러한 단백질 분리 정제에 기초한 분석방법론적인 기술 연구가 매우 중요할 것으로 생각되나 실제적으로 복잡한 단백질을 손실없이 분리해내는 방법론 연구는 그 수용 비해 빠른 속도로 진전되고 있지는 못하고 있는 실정임.
- 2012년에는 Journal of Proteome Research 저널에서 SDS로 시료의 표본 단백질을 분리한 뒤 이를 SCX로 clean-up하는 방법을 이용하여 컬럼의 washing step에서 elution solution내 cation을 변화하여 음전하를 띤 SDS를 선택적으로 제거하는 방법을 개발하기도 하였음 [19]

3. 수학적 모델링 및 시뮬레이션 기술 및 정보

- Jim A. Rogers (University of Nebraska Medical Center) 연구팀은 불리언 모델을 정량적으로 분석할 수 있는 기법을 개발하였고, 이 기법을 활용하여 대규모의 생물학적 신호전달네트워크가 다양하게 변화하는 자극을 적절한 세포반응을 유도하는 decision-making으로 변환할 수 있도록 설계되어 있다는 것을 규명하였음 [20]
- 이 기법은 대규모 생물학적 네트워크의 불리언 모델을 정량적으로 분석을 할 수 있는 해법을 제공했다는 점에서 그 활용도가 크다고 볼 수 있음

제 7 장 연구시설 · 장비 현황

4단계에 새롭게 확보된 시설 및 장비 없음

제 8 장 참고문헌

- [1] Bassingthwaite B, Qian H, Li Z. (1999) The Cardiome Project. An integrated view of cardiac metabolism and regional mechanical function. *Adv Exp Med Biol* 471: 541-553.
- [2] Lanner T, Georgiou K, Joshi D, Hamilton L. (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003996.
- [3] 1000 Genomes Project Consortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073.
- [4] Boström P, Mann N, Wu J, Quintero A, Plovie R, et al. (2010) C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* 143: 1072-1083.
- [5] Blow J, McCulley J, Li Z, Zhang T, Akiyama A, et al. (2010) ChIP-Seq identification of weakly conserved heart enhancers. *Nat Genet* 42: 6-10
- [6] Boisvert M, Lam W, Lamont D, Lamond I. (2010) A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol Cell Proteomics* 9: 457-470
- [7] Kim JI, Ju YS, Park H, Kim S, Lee S, et al. (2009) A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual. *Nature* 460: 1011-1005
- [8] Ju YS, Kim JI, Kim S, Hong D, Park H, et al. (2011) Extensive genomic and transcriptional diversity identified through massively parallel DNA and RNA sequencing of eighteen Korean individuals. *Nat Genet* 43: 745-752
- [9] Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, et al. (2012) A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res* in press
- [10] Kho C, Lee A, Jeong D, Hajjar RJ. (2010) Refilling Intracellular Calcium Stores. *Drug Discov Today Dis Mech* 7: e145-e150
- [11] Sreenivasiah PK, Rani S, Cayetano J, Arul N, Kim DH (2012) IPA-VS: Integrated Pathway Resources, Analysis and Visualization System. *Nucleic Acids Res* 40: D803-808
- [12] Anders S, Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11: R106
- [13] Nature in press
- [14] Perálvarez-Marín A, Tae H, Board PG, Casarotto MG, Dulhunty AF, et al. (2011) 3D Mapping of the SPRY2 domain of ryanodine receptor 1 by single-particle cryo-EM. *PLoS One* 6 :e25813
- [15] Yuchi Z, Van Petegem F. (2011) Common allosteric mechanisms between ryanodine and inositol-1,4,5-trisphosphate receptors. *Channels* 5 :120-123
- [16] Tung CC, Lobo PA, Kimlicka L, Van Petegem F. (2010) The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature* 468: 585-588
- [17] Brun V, Dupuis A, Adrait A, Marcellin M, Thomas D, et al. (2007) Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 6: 2139-2149
- [18] Monetti M, Nagaraj N, Sharma K, Mann M. (2011) Large-scale phosphosite quantification in tissues by a spike-in SILAC method. *Nat Methods* 8: 655-658
- [19] Sun D, Wang N, Li L. (2012) Integrated SDS Removal and Peptide Separation by Strong-Cation Exchange Liquid Chromatography for SDS-Assisted Shotgun Proteome Analysis. *J Proteome Res* 11: 818-828
- [20] Helikar T, Konvalina J, Heidel J, Rogers JA. (2008) Emergent decision-making in biological signal transduction networks. *Proc Natl Acad Sci* 105: 1913-