

미래원천의공학기술개발사업
테라그노시스: CATS (Complex Adaptive
Therapeutic Strategy)

Theragnosis: CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy)

2017. 3

한국과학기술연구원

Korea Institute of Science and Technology

제 출 문

한국과학기술연구원 원장 귀하

본 보고서를 “미래원천의공학기술개발사업”의 세부(단위)과제 “테라그노시스: CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy)” 보고서로 제출합니다.

2017. 03. 30

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 이 철 주

연 구 원	: 권 익 찬
"	: 양 은 경
"	: 유 명 희
"	: 김 은 경
"	: 김 인 산
"	: 김 광 명
"	: 안 대 로
"	: 안 형 준
"	: 김 세 훈
"	: 이 상 엽
"	: 정 학 숙
"	: 이 지 은
"	: 김 선 화
"	: 정 철 현
"	: 김 소 연
"	: 한 기 철
"	: 류 주 희
"	: 양 유 수
"	: 장 미 희
"	: 김 영 선

보고서 초록

과제관리번호	2E26360	해당단계 연구기간	2014.01.01 ~2016.12.31	단계 구분	2 / 2		
연구사업명	미래원천의공학기술개발사업						
연구과제명	중 과 제 명						
	세부(단위)과제명	테라그노시스: CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy)					
연구책임자	이 철 주	해당단계 참여연구원수	총 : 113 명 내부 : 21 명 외부 : 92 명	해당단계 연구비	정부: 6,314,615 천원 기업: 천원 계: 6,314,615 천원		
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 테라그노시스연구단		참여기업명				
국제공동연구							
위 탁 연 구							
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	191		
<p>○ 대장암 이질성의 이해 및 문자진단 콘텐츠 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전이성 대장암 단백체 분석을 통한 암 진단 및 치료용 표적 단백질 발굴 - HIF와 상호작용하는 단백체의 생화학적, 구조적, 세포 생물학적 기능연구 및 신호전달 체계 연구를 통한 HIF 활성의 능동적 조절 인자 발굴 - 종양 이질성의 면역표현형 검색을 통한 항암제 내성암 진단법 개발 - 대장암의 이질성 분석을 위한 DNA 메틸화 다중 검지 기술 개발 - 세포전이 관련 단백질 작용기작 연구 및 조절단백질 상호작용을 기반으로 한 억제인자 발굴 							
<p>○ 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대장암 조직의 세포외 기질 및 다양성 극복을 위한 테라그노시스 원천기술 개발 - 유도표현형 및 대장암 기질 표적 진단·치료용 나노바이오 소재 개발 - Image-guided surgery 구현을 위한 대장암 이질성 추적 프로브 개발 - 단백질 기반 융합나노소재를 이용한 종양 이질성 제어용 나노-면역 치료 플랫폼 개발 							
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	대장암, 종양 이질성, 나노/바이오 융합 기술, 문자영상, 테라그노시스					
	영 어	colorectal cancer, cancer heterogeneity, nano/bio fusion technology, molecular imaging, theragnosis					

요 약 문

I. 제 목

테라그노시스: CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

암 조직을 둘러싼 미세환경의 차이에 기인한 종양 이질성 (tumor heterogeneity)을 이해하고, 종양이질성을 타겟할 수 있는 분자진단 콘텐츠들을 개발하고, 종양이질성을 극복하기 위한 신개념의 테라그노시스 융합 원천 기술을 개발하여 실용화하는 것이 연구개발 최종 목표임.

- 융합연구 기반 세계 초일류 혁신기술 개발 및 원천 특허 확보
 - 고부가가치 진단/치료용 원천소재 기술선점
 - 신개념 융합 원천기술을 이용한 21세기 글로벌 경쟁력 확보
- ‘CATS’ 기반 미래 지향적 환자 맞춤형 진단·치료 기술 개발
 - 신개념 난치성 질환 조기진단/환자 맞춤형 진단/치료기술 개발
 - 인류 복지 증진 및 국민의 건강한 삶 추구 목표 달성
- ‘CATS’ 기술 구현을 통한 인류 복지 기여 및 혁신 의약품 산업 창출
 - 21세기 지식기반 보건/의료/생명 선진산업 창출
 - 고 부가가치의 보건/의료/생명 신성장 동력 창출

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 대장암 이질성의 이해 및 분자진단 콘텐츠 개발
 - 전이성 대장암 단백체 분석을 통한 암 진단 및 치료용 표적 단백질 발굴
 - 저산소증 관련 네트워크 연구를 통한 대장암 이질성의 이해 및 이에 기반한 치료전략 모색
 - 대장암 이질성의 비유전형 검색을 통한 진단 방법 연구
 - 대장암의 이질성 분석을 위한 DNA 메틸화 다중 검지 기술 개발
 - 세포전이 관련 단백질 작용기작 연구 및 조절단백질 상호작용을 기반으로 한 억제

인자 발굴

- 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발
 - 대장암 조직의 세포외 기질 및 다양성 극복을 위한 테라그노시스 원천기술 개발
 - 유도표현형 및 대장암 기질 표적 진단·치료용 나노바이오 소재 개발
 - Image-guided surgery 구현을 위한 대장암 이질성 추적 프로브 개발
 - 단백질 기반 융합나노소재를 이용한 종양 이질성 제어용 나노-면역 치료 플랫폼 개발

IV. 연구개발결과

- 대장암 이질성의 이해 및 분자진단 콘텐츠 개발
 - 전이성 대장암 표적 단백질 발굴을 위한 세포 표면막 단백체 분석법 확립
 - SILAC을 통한 차등발현 단백질 후보 62개 선별 및 EV 분리방법 확립
 - 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용한 차등 발현되는 세포막 단백질 후보군 발굴
 - MMP 저해세포주로부터 분리한 EV 단백체에서 질량분석법을 이용하여 차등발현 단백질 후보군 선별 및 검증 및 localization 확인
 - 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용하여 발굴된 차등발현 후보군들에 대한 웨스턴 블랏을 통한 검증 및 대장암 조직에서의 발현 검증
 - PKM2, PHD3, HIF3 α 단백체의 대장균내 과발현 실험과 분리 기법 확립: 순도 >95%, 10 mg
 - 대장암 세포주 내 HIF-3 α 의 산소에 따른 발현 정도 및 HIF-1 α , HIF-2 α 와의 연관성 검증
 - 형광 PKM2 및 oligomerization에 영향을 주는 것으로 알려진 PKM2 돌연변이 5종 이상 확보
 - 생체 내 PKM2 oligomerization 상태 모니터링을 위한 shRNA 내성을 갖는 PKM2 전달 및 endogenous PKM2 depletion 확립
 - 대장암세포 HT29, HCT116의 저산소환경에 따른 PKM2 발현 및 분비량 조절 확인
 - 대장암 세포에서의 PKM2와 HIF, PHD 단백체의 상호작용에 의한 PKM2의 핵으로의 이동 관측
 - 세포 투과 웨타이드 기반 및 양이온성 지질 기반 단백질 전달기술을 활용하여, Cas9/sgRNA 단백질-RNA 복합체의 항암제 내성 세포 전달 기술 확보.
 - 단백질 내성 유전자 편집 단백질 전달효율 및 이에 따른 세포주 내성 감소와 암세포 사멸 효능 평가 완료.
 - 유전자 가위의 세포 내 및 암조직 내 전달을 위한 나노입자화 기술 확보

- 종양 동물 모델 상에서 나노입자화 된 유전자 가위의 유전자 편집 효능 평가 완료
 - DNA 메틸화 및 메틸사이트 형광표지 프로토콜 및 Anti-biofouling 코팅된 100nm 금 나노채널 공정 확립
 - 여기 과장 이하(170 nm)의 여기파틴 형성을 위한 광학계 개발
 - 암세포 전이 관련단백질 플라스미드 7종 확보
 - Muskelin 포함 상기 단백질들의 수용화 테스트 완료 및 수용성 단백질 construct 총 50 종 이상 확보 및 수용화 테스트 완료
 - 90% 이상 순도를 갖는 full-length Muskelin, Twa1, ARMC8α/β 4종 및 이외 3 종 단백질 construct를 포함하는 총 20종 이상의 단백질 정제조건 확보
 - Muskelin과 DIC & GABA Receptor 복합체 단백질 확보
 - 포항가속기를 이용한 4.0 Å resolution data 확보 & 데이터프로세싱 완료
- 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발
- 암 축적 효능과 ECM, 혈관, pH 분포간의 상관관계 검증
 - 대사체 개질을 통한 대장암 표적형 대사체 전달 기술 개발
 - 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발
 - ECM 구성성분인 collagen, 히알루론산을 분해할 수 있는 효소를 이용한 ECM 리모델링 기술 확립.
 - 집속초음파(HIFU)를 이용한 물리적 ECM 리모델링 기술 확립.
 - 효소 특이적 비천연 당 전구체의 암 조직직접 투여 또는 정맥 투여법을 이용한 인공 표적 수용체 발현 기술 확립.
 - 생물직교성을 학습화학을 이용한 인공 표적 수용체의 생체내 표지 조건 및 영상 기술 확립.
 - 암 조직 내에서 형광 활성/광역학 치료가 가능한 활성화 iRGD (형광-iRGD-ケンチ) 프로브 개발
 - 암 조직 내에서 형광이 활성화되는 형광 켄치 조합의 활성화 iRGD (형광-iRGD-ケンチ) 프로브 개발 및 광역학 치료 효과 확인
 - 과산화수소 감응 화학발광 신호 발생 및 암세포 사멸이 가능한 진단·치료용 나노항암제 개발: 과산화수소 감도 10^{-5} M 과산화수소 유도 50% 세포사멸
 - 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달 및 유전자 치료가 동시에 가능한 다기능성 RCT 나노입자 제조 플랫폼 기술 개발
 - imaging과 유전자 치료가 동시에 가능한 RCT 나노입자의 암 추적 영상화 및 유전자 억제를 in vitro 세포모델과 in vivo 질병모델에서 구현함
 - 다중 유전자 억제가 가능한 imaging probe를 개발하여 항암내성 암세포의 영상화 및 항암내성 극복 기술을 개발함으로써 항암내성 암세포의 항암제 반응성을 개선하고 치료법 제시.
 - 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달이 가능한 DNA 기반의 다기능성 RCA 나노입자 제조 플랫폼 기술 개발 및 치료효과 검증

- RCT 나노입자를 이용한 면역체크포인트 억제 및 이를 이용한 항암면역치료 개법 제시
- Cytotoxic KSP 유전자 억제를 통해 암치료 유의성을 평가하고 암선택적 치료 구현
- 다양한 암세포 표면에 과발현되어 "Don't kill me signal"을 활성화 시킨다고 알려진 Immune Checkpoint Blocker (ICB)을 Blocking 할 수 있는 분자를 발굴하고, 이를 단백질 나노케이지 표면에 고직접도로 표출시킨 나노케이지 플랫폼 설계 및 암세포주 표면 결합 효능 증가 확인.
- 암세포의 apoptosis를 일으키는 trimer 구조의 단백질을 탑재한 나노케이지 1종 개발
- 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노소재 플랫폼의 암세포 결합능, 암세포 사멸 유도 능, 항암 효능 검증
- IDP 탑재 단백질 기반 나노케이지의 세포내 안정성 증가 여부를 ex vivo biodistribution과 pharmacokinetics 분석을 통해 검증: 기존 나노케이지의 반감기를 10배 이상 증가시키는 나노케이지 개발 완료
- 암세포의 면역 회피 기작을 억제하기 위한 물질이 표출된 단백질 기반 나노케이지 디자인 및 개발

V. 연구개발결과의 활용계획

- CATS 시스템은 바이오/나노 융합기술을 기반으로 현재까지 시행되어 오고 있는 고전적인 항암 치료 요법들의 가장 큰 문제점으로 지적되고 있는 종양 미세환경 및 암 자체의 불균질성을 극복하기 위한 암치료의 새로운 패러다임 제시.
- CATS 시스템의 원천 기술은 국내외 많은 연구팀들로부터 기개발된, 우수하지만 임상에서 실패하여 사장된 다수의 항암제, 표적 지향 바이오마커 등의 재평가와 성공을 유도할 수 있음.
- CATS 시스템을 통한 바이오/나노 융합 소재를 이용한 진단/치료 소재 개발은 국가 융합기술 개발의 대표적 성공사례의 창출이 가능하며, 고부가가치의 의약품 및 질병 진단의 신산업 창출, 융합 연구 전문 인력 배출, 다학제적 연구 인프라 구축 등의 다양한 분야에 활용이 가능함.

S U M M A R Y

I. TITLE

Theragnosis: CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy)

II. PURPOSE AND NECESSITY

To understand the tumor heterogeneity caused by the difference in the microenvironment surrounding the cancerous tissue, to develop molecular diagnostic contents that can target tumor heterogeneity, and to develop new concept of teraginosis fusion technology to overcome tumor heterogeneity.

- Development of world-class innovation technology based on fusion research and securing source patent
 - Preemption of source material technology for high value-added diagnosis/therapy
 - Securing Global Competitiveness in the 21st Century by Using New Concept Fusion Technology
- Development of 'CATS'-based future-oriented patient-specific diagnosis and therapy technology
 - Early diagnosis of intractable diseases / development of patient-specific diagnosis/therapy technology
 - Achievement of humanity welfare promotion goal and healthy life pursuit of the people
- Contribution of human welfare through creation of 'CATS' technology and creation of innovative pharmaceutical industry
 - 21st Century Knowledge-based Health/Medical/Life Creating Advanced Industry
 - Creation of high value-added health/medical/life new growth engine

III. CONTENTS AND SCOPE

- Understanding of colon cancer heterogeneity and development of molecular diagnosis contents
 - Detection of target proteins for cancer diagnosis and treatment through analysis of metastatic colorectal cancer protein
 - Understanding of colorectal cancer heterogeneity through hypoxic-related network research and seeking treatment strategy based on it
 - A Study on Diagnosis Method by Diatomic Search of Colorectal Heterosis
 - DNA methylation detection technique for heterogeneity of colorectal cancer
 - Study of cell-mediated protein mechanism and discovery of inhibitors based on regulatory protein interactions
- Development of CATS nano fusion platform technology to overcome colorectal cancer heterogeneity
 - Development of teraginosis platform technology to overcome extracellular matrix and diversity of colorectal cancer tissue
 - Development of nano-bio materials for diagnosis and therapy of inducible phenotype and colorectal cancer target
 - Development of colon cancer heterogeneity tracking probe for image-guided surgery implementation
 - Development of a nano-immune therapeutic platform for controlling tumor heterogeneity using protein-based fusion nanomaterials

IV. RESULTS

- Understanding of colon cancer heterogeneity and development of molecular diagnosis contents
 - Establishment of cell surface membrane protein assay for the detection of metastatic colon cancer target protein
 - Selection of 62 differentially expressed protein candidates through SILAC and establishment of EV separation method
 - Identification of differentially expressed cell membrane protein candidates using mass spectrometry in metastatic colorectal cancer cell line and MMP inhibitory cell line
 - Screening and validation of differential expression protein candidates using

- mass spectrometry and localization confirmation of EV protease isolated from MMP inhibitory cell line
- Western blot analysis of differential expression candidates identified using mass spectrometry in metastatic colorectal cancer cell lines and MMP inhibitory cell lines and expression assays in colorectal cancer tissues
 - Overexpression experiments of PKM2, PHD3, and HIF3 α in Escherichia coli and establishment of separation techniques: Purity > 95%, 10 mg
 - Expression of HIF-3 α by Oxygen in Colorectal Cancer Cell Line and Relationship between HIF-1 α and HIF-2 α
 - More than five PKM2 mutations known to affect fluorescence PKM2 and oligomerization
 - Establishment of PKM2 delivery and endogenous PKM2 depletion with shRNA resistance for in vivo monitoring of PKM2 oligomerization status
 - Identification of PKM2 expression and regulation of secretion according to hypoxic environment of colon cancer cells HT29 and HCT116
 - Observation of transfer of PKM2 to nucleus by interaction of PKM2, HIF, and PHD protein in colon cancer cells
 - Securing anticancer drug resistant cell delivery technology of Cas9 / sgRNA protein-RNA complex using cell-permeable peptide-based and cationic lipid-based protein delivery technology.
 - Protein resistance gene editing protein delivery efficiency and consequent reduction of cell line resistance and evaluation of cancer cell death effect.
 - Securing nanoparticle technology for intracellular and intracellular delivery of gene scissors
 - Completion of genetic editing efficacy of nanoparticle gene scissors on tumor animal models
 - Establishment of DNA methylation and methylation fluorescence labeling protocol and anti-biofouling coated 100 nm nanochannel process
 - Development of an optical system for the excitation pattern formation at excitation wavelengths (170 nm)
 - Obtain 7 kinds of protein plasmids related to cancer cell metastasis
 - Completed the test for the acceptance of the above proteins including Muskelin,
 - More than 20 protein purification conditions including full-length Muskelin, Twa1, ARMC8 α / β and other three protein constructs with more than 90% purity.
 - Securing Muskelin and DIC & GABA receptor complex protein
 - Acquisition of 4.0 Å resolution data using Pohang Accelerator and data

processing completed

- Development of CATS nano fusion platform technology to overcome colorectal cancer heterogeneity
 - Verification on the correlation between cancer accumulation efficacy, ECM, blood vessel and pH distribution
 - Development of metabolic transfer technology for colon cancer target through metabolite modification
 - Development of nanoprobe-based spray type fluorescent contrast agent for colorectal cancer diagnosis
 - Establishment of ECM remodeling technology using ECM component collagen and enzyme capable of degrading hyaluronic acid.
 - Establishment of physical ECM remodeling technology using focused ultrasound (HIFU).
 - Establishment of artificial target receptor expression technique by direct administration of cancer tissue or intravenous administration of enzyme-specific non-native sugar precursor.
 - Establishment of biological marking conditions and imaging techniques for artificial target receptors using biological orthogonal click chemistry.
 - Development of iRGD-based (fluorophore-iRGD-quencher) probe capable of fluorescence activation / photodynamic therapy in cancer tissue
 - Development of diagnostic/therapeutic nano-anticancer drug capable of hydrogen peroxide-sensitized chemiluminescent signal generation and cancer cell death diagnosis
 - Development of multifunctional RCT nanoparticle manufacturing platform technology capable of simultaneous transfer of cancer chemotherapy and gene therapy as cancer tracking imaging probe
 - Cancer tracking imaging and gene suppression of RCT nanoparticles capable of both imaging and gene therapy in vitro and in vivo disease models
 - Development of imaging probe capable of suppressing multiple genes and development of anti-cancer immunoregulatory imaging and anti-cancer tolerance technology to improve anti-cancer drug reactivity and treatment of cancer-resistant cancer cells.
 - DNA-based multi-functional RCA nanoparticle manufacturing platform technology capable of delivering chemotherapeutic agent as a cancer-tracking imaging probe
 - Suppression of immune checkpoints using RCT nanoparticles and the introduction of anti-cancer immunotherapy

- Cytotoxic KSP gene inhibition to assess cancer treatment significance and to achieve cancer-selective treatment
- Development of nanocage platform designed to identify molecules capable of blocking Immune Checkpoint Blocker (ICB), which is known to over-express on the surface of various cancer cells and activate the "Do not kill me signal", and display them directly on the protein nanocage surface and confirmation of increased cancer cell surface binding efficiency.
- Development of one type of nanocage with trimer structure protein that causes apoptosis of cancer cells
- Cancer cell binding ability, cancer cell death induction ability, anticancer efficacy verification of a nanomaterial platform equipped with a protein multi-structure structure
- Verification of increased intracellular stability of IDP-loaded protein-based nanocage through ex vivo biodistribution and pharmacokinetics analysis: Development of a nanocage that increases the half-life of existing nanocage by more than 10 times
- Design and development of protein-based nanocage expressing substance to suppress immune avoidance mechanism of cancer cells

V. PLAN TO UTILIZE R&D RESULTS

- The CATS system presents a new paradigm of cancer therapy to overcome the heterogeneity of tumor microenvironment and cancer itself, which has been pointed out as the biggest problem of classical chemotherapy therapies that have been implemented based on bio/nano fusion technology.
- The source technology of CATS system can induce reevaluation and success of many anticancer drugs and target biomarkers that have been developed by many research teams both at home and abroad but have failed in clinical trials.
- Development of diagnostic/therapeutic materials using bio/nano fusion material through CATS system can create representative success cases of national convergence technology development, create new industries of high value added medicine and disease diagnosis, emit specialized manpower for fusion research, It can be used in various fields such as building research infrastructure.

C O N T E N T S

Chapter 1 Abstract

Chapter 2 Technology and Development Status

 Section 1 International level

 Section 2 Domestic level

 Section 3 Research status at domestic and abroad

Chapter 3 Research and Development Results

 Section 1 Understanding of colon cancer heterogeneity and development of molecular diagnosis contents

 Section 2 Development of CATS nano fusion platform technology to overcome colorectal cancer heterogeneity

Chapter 4 Achievement and Contributions

Chapter 5 Plans for Practical Applications

 Section 1 Utilization of R&D results

 Section 2 Practicalization and technology commercialization strategy

Chapter 6 Overseas Science and Technology Information Collected During R & D

Chapter 7 References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세계적 수준

제 2 절 국내수준

제 3 절 국내외 연구현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 대장암 이질성의 이해 및 문자진단 콘텐츠 개발

제 2 절 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발

제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발결과의 활용방안

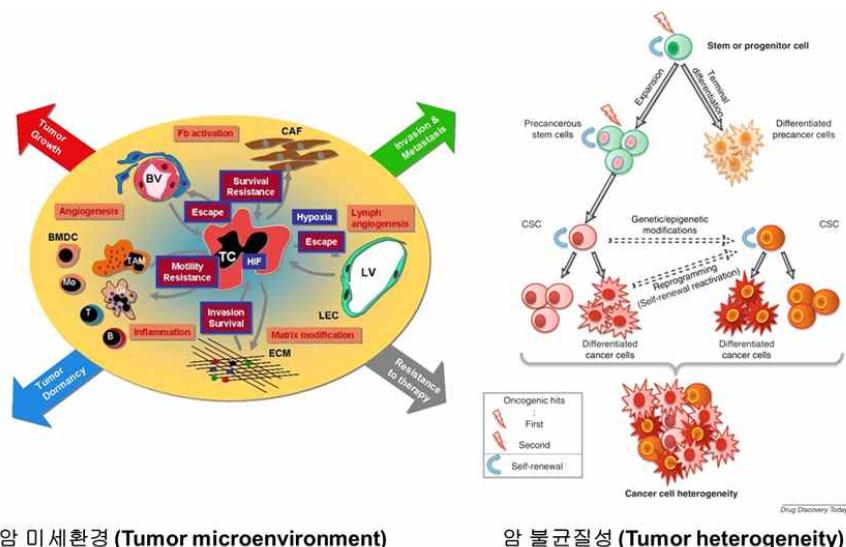
제 2 절 실용화 및 기술사업화 전략

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

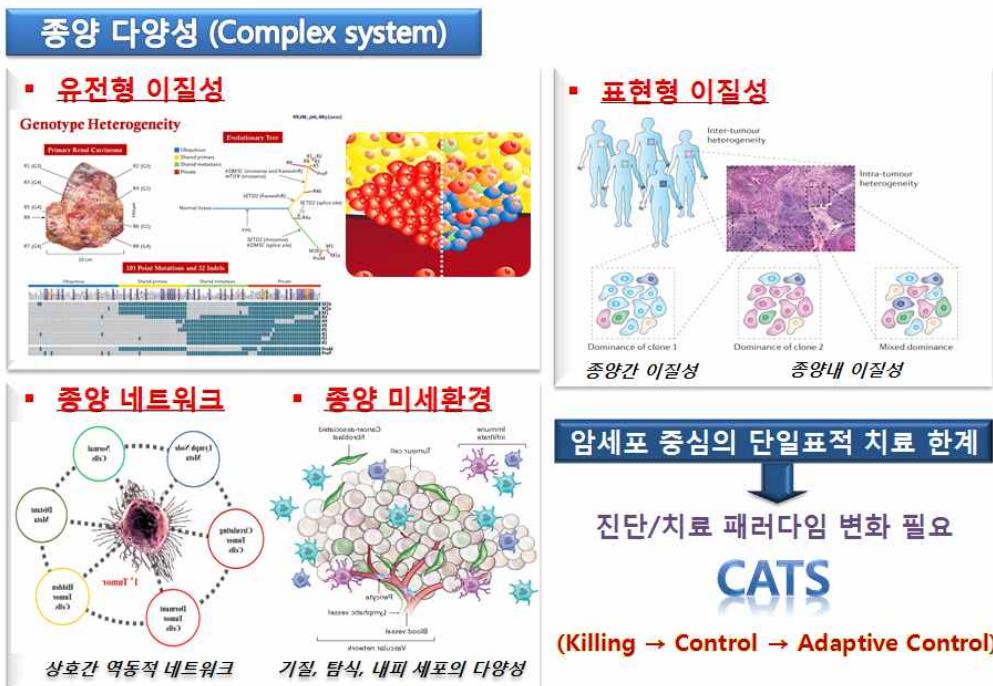
제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 현재의 대중 진단·치료 기술은 난치성 질환의 조기진단이 어려워 질병이 일정 상태 이상 진행 된 후 진단할 수 있으며, 약물 치료 후 치료효과 예후 판별에 오랜 시간이 걸리고 불분명하여 난치성 질환 환자의 호전 및 완전 치료 확률이 높지 않은 실정임.
- “테라그노시스 (Theragnosis = Therapy + Diagnosis)” 기술은 난치성 질환의 질병 조기진단 및 효과적인 치료를 동시에 수행하여 환자 맞춤의료를 구현할 수 있는 신 개념의 미래 지향적 진단·치료 기술로서, 기존 해부학적 진단을 통한 조기 진단의 어려움을 극복함과 동시에 환자 개개인의 선택성이 없는 치료 기술의 심각한 부작용을 최소화 할 수 있음.
- ‘분자영상 (Molecular Imaging)’ 및 ‘나노의학(Nanomedicine)’ 기술의 복합·융합 기술인 “테라그노시스” 기술은 21세기 최첨단 융합기술로써 인체 내에서 비침습/실시간 분자영상과 치료가 동시에 가능한 나노 융합 원천 소재를 기반으로, 궁극적으로 효과적인 개인별 맞춤의료를 위한 신개념 원천기술을 개발하는 것임.
- 본 과제의 1 단계인 “테라그노시스” 과제의 수행을 통해서 ‘분자영상’ 및 ‘나노의학’이 융합된 질환 맞춤형 세포기반 진단/치료 기술 개발 및 고감도 분자영상과 고효율 테라그노시스를 위한 원천/응용소재를 개발하였음.
- 최근, 다양한 “테라그노시스” 기술 개발을 위한 나노융합소재가 활발하게 개발되고 있지만, 실제 임상 시험에서 나노융합소재의 진단·치료 효과가 미미한 경우가 많음. 이는 실험실 수준의 *in vitro* 모델과 *in vivo* 상황에서 암 조직의 미세환경 (microenvironment, 예를 들면, 세포 성장속도, 단백질 분비, 대사기능, 세포외기질 등)의 차이성이 매우 크기 때문임.
- 정상세포가 신생종양, 암세포 등으로 변화되는 현상에 대한 연구 결과, 암세포 단일 요소가 아닌 암조직을 미루는 특이적 미세환경이 진행 및 치료에 매우 중요한 요소로서 인식됨.



- 대부분의 진단/치료용 나노소재 및 나노약물전달시스템의 제한적인 임상효과는 암 조직의 미세환경 및 이에 따른 종양 이질성 (tumor heterogeneity)에 대해 효과적으로 이해하고 대처하지 못한 결과임.
- 기존의 암세포 고사에 초점을 둔 암 치료 전략은, 암세포처럼 빠르게 분열·증식하는 골수 혈액세포나 생식세포 등의 정상세포에 독성을 발현하는 부작용을 나타내어 특이적 암치료에 있어 한계를 드러냄.
- 2세대 전략으로 대두된 암세포 성장에 관여하는 특정 물질을 선택적으로 공격하는 표적 치료방법 또한 유전적 또는 개인별 차이와 장기, 세포조직 등 여러 갈래로 구분되는 수많은 종류의 표적 인자에 따른 개별적인 치료제를 필요로 하므로, 막대한 투자와 노력이 필요로 함.
- 개발된 표적 치료제는 임상에서 초기의 효과는 매우 뛰어났지만 2, 3년 후 암세포의 자가 진화에 따른 약물 내성으로 인해 암세포가 재생성 되는 것으로 밝혀져 치료 성공률이 5%에도 미치지 못하였음.
- 암세포의 높은 유전형, 표현형의 이질성, 종양간 이질성뿐만 아니라 종양내 이질성에 따른 기존 치료 방법의 한계가 드러남에 따라, 종양 다양성 (complex system)의 극복을 위한 단일한 표현형 유도 및 이를 표적하는 새로운 패러다임의 치료전략 고안이 요구됨.



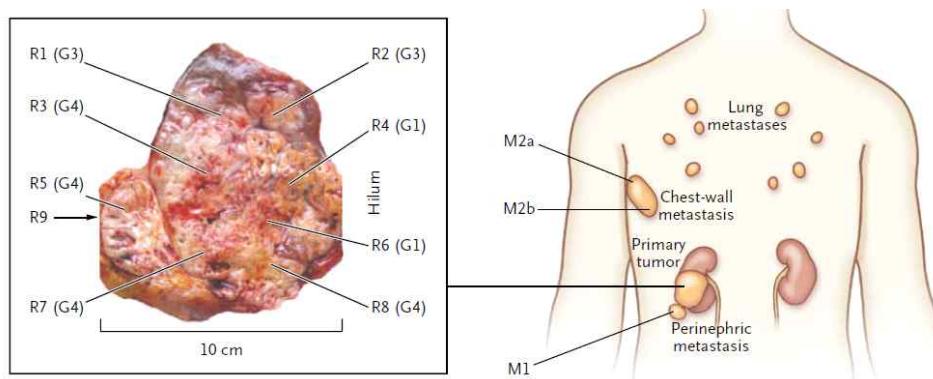
- 현재 종양이질성 및 다양성 극복을 위한 진단/치료 기술개발에 관한 연구가 매우 부족한 상황이며, 종양기질·미세환경·종양네트워크 등 치료표적 다변화와 유도표현형·치료증폭 등 치료전략 다변화를 통하여 종양이질성과 치료적응성을 극복할 수 있을 것으로 기대됨.
- 이에, 본 “테라그노시스” 과제의 2 단계에서는 CATS (Complex Adaptive Therapeutic Strategy, 복잡적응치료전략)“시스템을 통해 인체 내 종양의 미세환경의 장벽을 극복하여 치료효율을 증진하고 궁극적으로 환자별 개별 의학 (individualized medicine)를 목표로 하는 신개념 나노·바이오 융합 원천기술을 개발하고자 함.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 세계적 수준

- “테라그노시스 (Theragnosis = Therapy + Diagnosis)” 기술은 ‘분자영상 (Molecular Imaging)’ 및 ‘나노의학 (Nanomedicine)’의 복합·융합 기술로, 난치성 질환의 질병 조기진단 및 효과적인 치료를 동시에 수행하여 환자 맞춤의료를 구현할 수 있는 신 개념의 미래지향적 진단·치료 기술임.
- 1990년대 이후부터 나노소재를 이용한 분자수준의 영상기술의 개념이 소개되면서 각종 유무기 나노입자를 활용한 세포수준 및 생체 내 분자영상 분야는 급속한 발전을 이루어 왔음.
- 이러한 분자영상 기술은 나노/바이오 소재 기반의 나노의학과 융합되면서 2000년부터 미국, 유럽, 일본 등 선진국 정부와 거대 다국적 제약회사의 지원을 바탕으로 설립된 대형 연구센터들을 펼두로 하여 본격적인 질병 진단·치료를 위한 분자영상 및 나노의학 연구가 진행됨.
- 나노약물전달체를 이용한 종양 표적 전달은 ‘수동적인 표적 (passive targeting)’과 ‘능동적인 표적 (active targeting)’으로 구분됨. 그러나 능동적 표적이 이루어지려면, 먼저 종양 내에서 수동적 표적으로 인한 축적이 일어나야 하기 때문에 현재 임상허가를 받은 대부분의 나노약물전달체들은 수동적인 표적 방법을 이용한 물질들이 대부분임.
- 암 조직 환경은 촘촘한 기질로 구성되어 있기 때문에 물리적으로도 약물을 전달하는데 어려움이 있음. 높은 밀도의 콜라겐 기질로 이루어진 암조직으로는 약물 전달율이 낮음. 이러한 암조직으로의 낮은 투과성은 항암제 치료효율을 낮추는 원인이 됨. 따라서, 종양조직으로 약물의 침투효과를 높이고 암 주위에 균일하게 약물을 전달할 수 있는 핵심기술을 개발하기 위하여, 투과성을 높일 수 있는 나노전달체에 대한 연구가 진행되고 있음.
- 급속도로 발전된 나노융합소재와 영상·의료기술에도 불구하고 실제 암 환자 치료를 통한 생존율은 크게 향상되지 않은 실정임.
- 치료 대상 개체에서 오는 암의 종류의 유전적 차이 뿐 아니라 단일 암 조직 검사체에서 발견된 종양내 불균일성 (Intratumor Heterogeneity)이 기존 암 진단 치료 기법의 기술적 한계로 지적되었음 (New England Journal of Medicine, 366 (10), 883-892, 2012).



- 2008년 설립된 International Cancer Genome Consortium은 미국, 영국, 중국 등의 암 관련 유전체 정보를 취합하여 암치료와 분석 방법을 표준화하기 위한 것으로, 임상적·사회적 중요성이 높은 50여가지 종양에 대하여 유전체, 전사체 및 후성유전체의 변화를 데이터베이스화하여 종양 다양성에 대한 접근 방법이 시도되었음.
- 기존에 암조직만을 고려한 전달기술에 대한 연구에서 벗어나, 최근 암조직과 주변조직과의 상호작용을 이용한 암조직으로의 전달기술에 대한 연구가 나타나고 있음. 최근 Harvard의 Bhatia 교수 연구팀의 신체의 혈액응고시스템을 이용한 항암 약물전달법 (2011, Nature Materials)이나, Ruoslahti 연구팀의 조직내 투과율 증가를 위한 RGD를 이용 종양 진단 치료 (2009, Cancer Cells) 등 암조직과 주변조직과의 상호작용을 이용한 항암치료의 전략이 보고되고 있음.

제 2 절 국내수준

- KIST 테라그노시스연구단은 ‘분자영상’ 및 ‘나노의학’ 분야에서 핵심 나노·바이오 소재 개발의 원천기술을 확보하였으며 한국생명공학연구원, 서울대학교, GIST, 연세대학교 등에서 도 질환 진단·치료용 나노소재 개발 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 암 주변조직에 대한 통합적인 제어와 같은 새로운 개념의 전략기술 개발은 세계적으로도 본격적인 연구가 진행되지 않았음. 국내에서도 이에 대한 개념이 새롭게 나타나고 있는 단계임.
- 국내에서도 종양의 불균일성으로 인한 항암치료의 어려움을 인식하고, 기술적인 극복에 대한 움직임이 시작됨. 대부분이 복합약물 처방 등의 단순한 접근으로 불균일성을 극복하는 통합적인 종양 제어 기술개발 필요성에 대한 인식은 부족함.
- 궁극적인 개인 맞춤의학의 목표를 두고 바이오인포매틱스 인프라 구축 및 관련 기업의 역량 등의 면에서도 선진기업과 국가에 비해 경쟁력이 떨어지는 상황이며, 최근에 들어서야 삼성, CJ 등의 대기업이 관련 사업을 시작하는 상태임.

제 3 절 국내외 연구현황

연구수행기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of Queensland, Australia	종양 내 이질성 연구기반으로 암전이 진행 메카니즘 규명 연구 수행	활용 미정
NIH (Center for Interventional Oncology), USA	HIFU를 이용한 종양환경변화를 통한 항암 약물 치료	항암치료 효과를 높이는 연구에 활용됨
UCSB (Developmental Biology), USA	약물의 Deep Penetration을 통한 암치료	항암치료 효과를 높이는 연구에 활용됨
Max Plank Institute, Germany	활성화된 면역세포에서 direct 질량분석법 용하여 secretome을 분석.	다양한 종류의 세포를 secretome의 신호전달 뿐만이 아니라 항 면역 분야 등의 여러 분야에서 질량분석법을 이용 중
University Medical center Utrecht, Holland	cancer stem cell에서의 drug metabolizing 효소를 분석.	cancer stem cell을 선별하고 분화세포와의 구별하는 특징적인 단백질을 발굴 중.
University of British Columbia, Canada	positional roteomics방법론을 protease-substrate의 degradation signal 연구에 널리 활용	암진행과 matrix-metalloprotease 와의 상관관계 연구로 암 바이오마커 개발 중
La Trobe University, Australia	Epithelial-Mesenchymal transition (EMT) 과정에서의 exosome 신호전달 가능성 제시	exosome을 포함한 extracellular vesicle의 발암과 전이과정에서의 신호전달 과정 연구진행중
Max Planck Institute of Biochemistry, Germany	질량분석기반의 프로테오믹스 분석 소프트웨어인 MaxQuant 개발	현재 MaxQuant를 사용한 연구 논문이 PNAS 등 우수 저널에 게재되고 있음.
Harvard University, USA	SCX/IMAC을 접목한 인산화 웹타이드 시료 농축 전처리 과정 확립	질량분석 기반의 인산화 단백질체 분석을 통한 각종 세포 신호전달체계 분석에 사용되고 있음.
National University of Singapore, Singapore	정상 세포주와 위암 세포주에서 차등 발현되는 세포표면막 단백질들을 발굴함.	질병진단용 바이오마커 발굴에 궁극적으로 활용 가능
University of Southern Denmark, Denmark	유용한 세포막 단백체를 enrich하는 기술 개발	약물 개발을 위한 표적들을 찾는데 활용 가능

Department of Chemistry, University of California, USA	primary cancer와 metastatic cancer에서 차등 발현되는 세포막 단백질 발굴	전이성 암 세포주에 차등 발현된 단백질들을 전이성 암 바이오마커로 궁극적으로 활용 가능
UT southwestern, USA	용액상태의 NMR을 이용한 HIF-2α와 HIF-1β의 결합 스크리닝	In vitro HTS를 이용한 screening 방법 개발
Stanford University, USA	HIF-2α와 당뇨병과의 연관성 규명	HIF-2α의 활성을 조절하는 PHD3의 중요성 부각
University of Oulu, Finland	HIF-3α의 발현정도 관측 및 과발현에 의한 역할 규명	HIF-3α의 중요성 부각
University of Edinburgh, UK	세포 증식에 관여하는 PKM2의 활성 비활성 저분자 스크리닝	암세포의 타겟으로의 저분자 확보
Agios Pharmaceuticals, USA	PKM2 활성제로 작용하는 새로운 N-[4-(azetidine-1-carbonyl)phenyl]-(hetero-)arylsulfonamide 유도체를 특허출원하고 공개	새로운 항암표적으로 주목
Harvard University, USA	당분해 효소인 PKM2의 활성 정도가 암세포 대사의 가속화 여부를 결정하는데 중요한 역할을 한다는 것을 밝힘	PKM2를 활성화시키는 약물이 암 치료제가 될 수 있다는 것을 시사
Harvard University & Beth Israel Deaconess Medical Center	암세포에서 PKM2 활성을 낮게 유지 함으로 활성 산소 종 (reactive oxygen species, ROS)의 발생과 산화적 스트레스에 의한 손상에 저항성을 보임을 밝힘	PKM2를 활성화시키는 소분자 약물이 암 세포의 이 과정을 방해할 수 있어, 종양의 성장을 막을 수 있는 방법이 될 수 있음을 제시.
Georgia State University, USA	PKM2의 dimer 형태가 단백질 인산화과정에 중요한 역할을 하며 암세포의 핵속에서 중요한 대사로 작용함을 보여줌.	PKM2의 dimer, tetramer 형태의 변이 기전이 항암 표적 및 항암제 개발에 중요한 역할을 할 것임을 제시.
Johns Hopkins University, USA	PKM2 단백질이 HIF-1α의 coactivator로 작용함을 밝히고 HIF1α에 의해 발현이 증가되는 Feedback loop의 관계에 있음을 보임.	암세포의 대사작용을 리프로그래밍하는 전사인자 HIF1α와의 상관관계를 통해 HIF-1α/PKM2 상호작용이 항암표적이 될수 있음을 제시

University of Sydney, Australia	CD 항체 어레이를 사용하여 대장암 세포 표면 분자의 다중 분석 수행	활용 미정
Epigenomics, Germany	Septin 9 유전자 메틸화 분석을 통한 대장암 조기 진단	DNA methylation: 혈액 내 DNA를 사용하여 Septin 9이라는 유전자의 메틸화 여부를 조사함으로써 대장암 조기진단
Weissleder Lab, Harvard University, USA	항암치료동안 암조직에서의 정량적 세포분석을 통한 치료효과 모니터링	MMPsense, ProSense 프로브 상업화
Brand Lab, Heidelberg University, Germany	대장암으로부터 유래된 liver metastases에서의 TIMP-1의 invasion front-specific overexpression	colorectal liver metastasis에서 TIMP를 이용하여 MMP를 저해함으로써 tumor invasion을 제어하려는 응용기술 개발

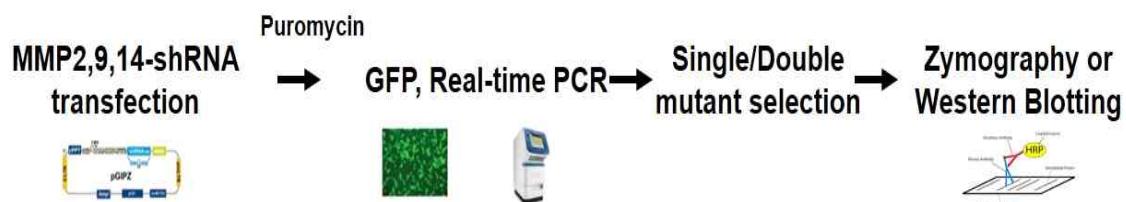
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 대장암 이질성의 이해 및 분자진단 콘텐츠 개발

1. 전이성 대장암 단백체 분석을 통한 암 진단 및 치료용 표적 단백질 발굴

가. MMP 저해 세포주 개발

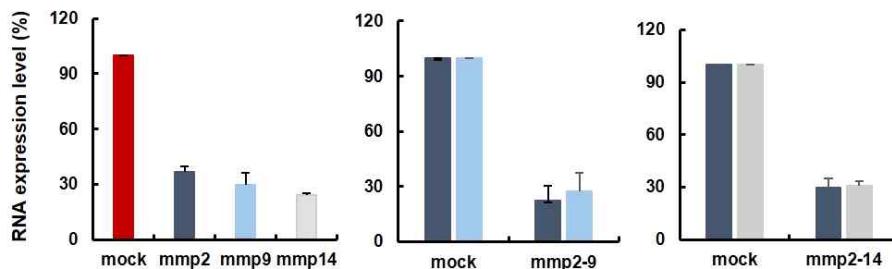
- 본 연구진에서는 대장암 환자 조직 시료에서 MMP-2와 MMP-9 단백질 발현이 증가함을 확인 (Kang et al, 2012)
- 세포 외부 기질의 (Extracellular matrix, ECM) 미세환경 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 MMP를 RNAi를 이용하여 발현저해
- 안정적인 발현 저해를 유지하기 위해 small hairpin RNA (shRNA) vector insertion 방법을 이용하고, 전이성이 높은 대장암 세포주인 HCT-116에 transfection.
- Real-time PCR, GFP, zymography를 이용하여 mRNA 발현양과 enzyme activity의 감소를 확인함.



<그림. MMPs 저해세포주 제작 및 확인>

- 선별된 single mutant (mmp2, 9, 14), double mutant (mmp2-9, mmp2-14)의 mRNA 발현 정도는 평균적으로 control 대비 70%이상 감소하였음.

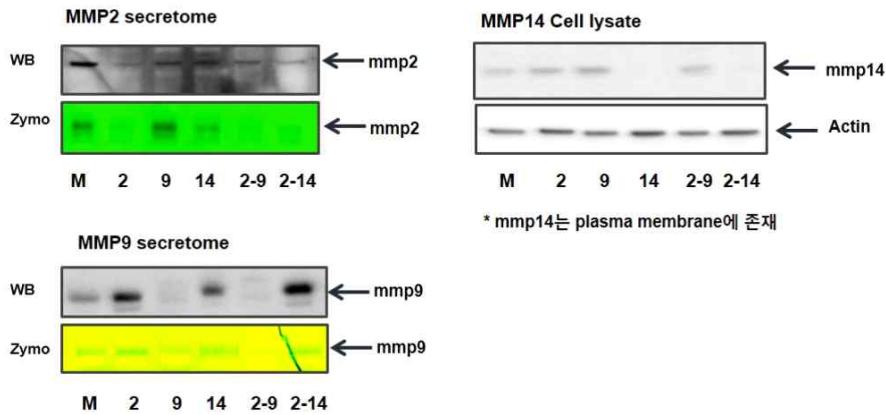
Real-Time PCR



<그림. 돌연변이 세포주에서 각 MMP mRNA 발현 정도>

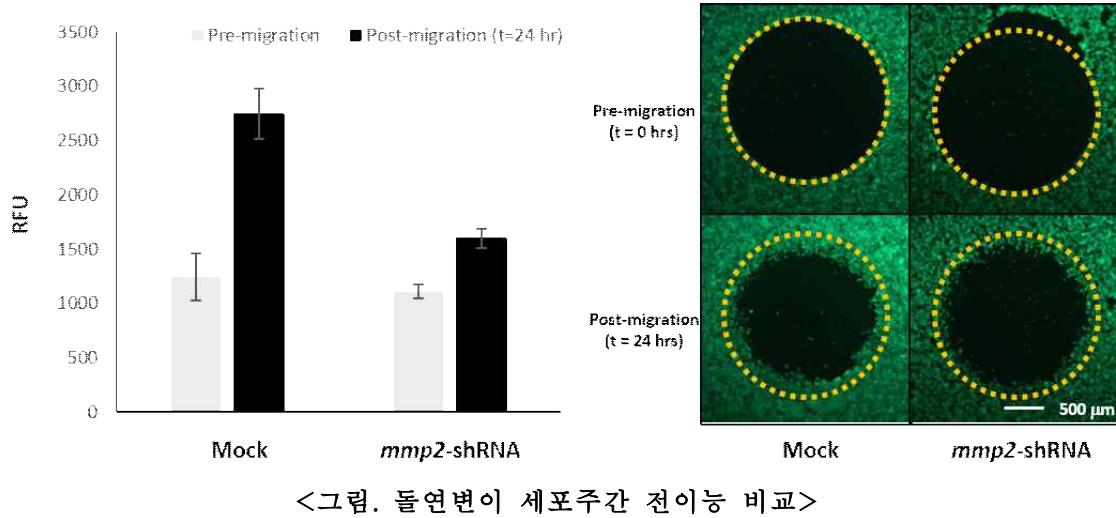
- mRNA 발현양 및 protein activity의 감소를 western blotting 방법과 zymography로 확인

Western & zymography



<그림. 돌연변이 세포주에서 각 MMP 단백질 발현 및 활성>

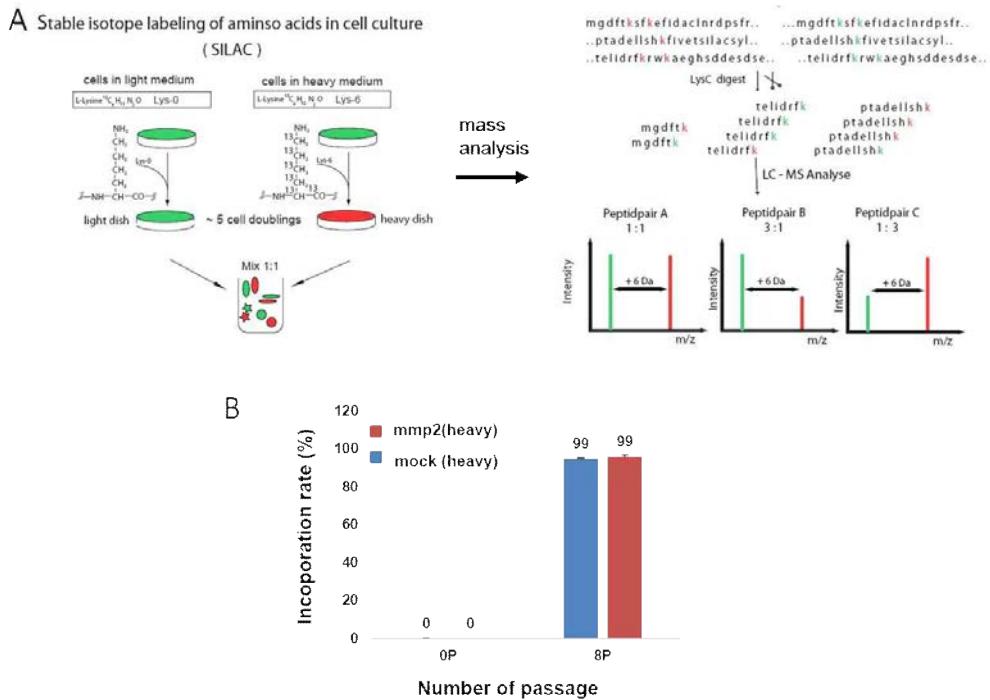
- Migration assay를 통하여 mmp-2 저해 세포주에서 전이능이 감소하는 것을 관찰



<그림. 돌연변이 세포주간 전이능 비교>

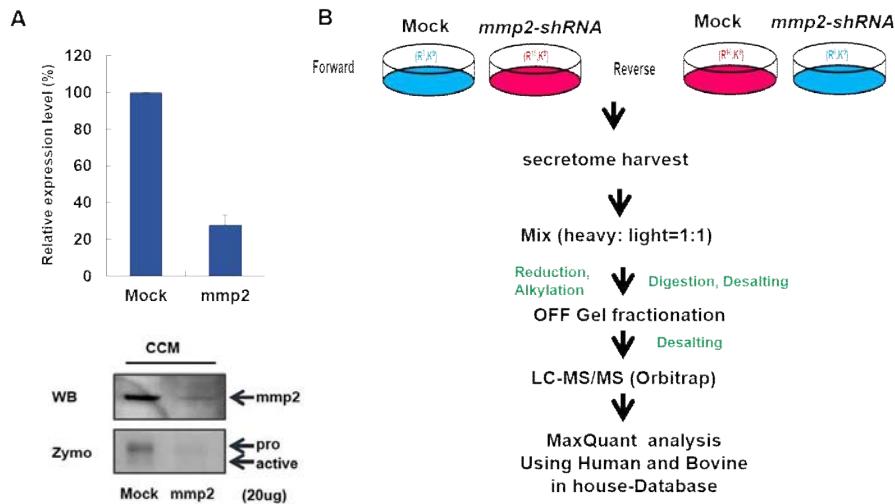
나. SILAC 방법을 통한 MMP-2 저해 세포주 분비단백체 질량분석 및 차등발현 단백질 선별

- 질량분석법을 바탕으로 하여 발현차이를 보이는 단백질을 선별하기 위하여 세포배양 배지에 stable isotope arginine, lysine을 첨가하는 stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) 방법을 이용함.
- 세포주 및 stable heavy isotope 아미노산의 종류별로 labeling 효율의 차이가 있기 때문에 세포 배양 passage에 따른 labeling 효율을 질량분석법을 이용하여 확인.
- 본 실험에서는 8-passage 일 때 질량분석법에 의해 확인된 peptide들의 99%이상 labeling 되었음을 확인.



<그림. SILAC의 기본개념 및 stable heavy isotope 아미노산 labeling 효율>

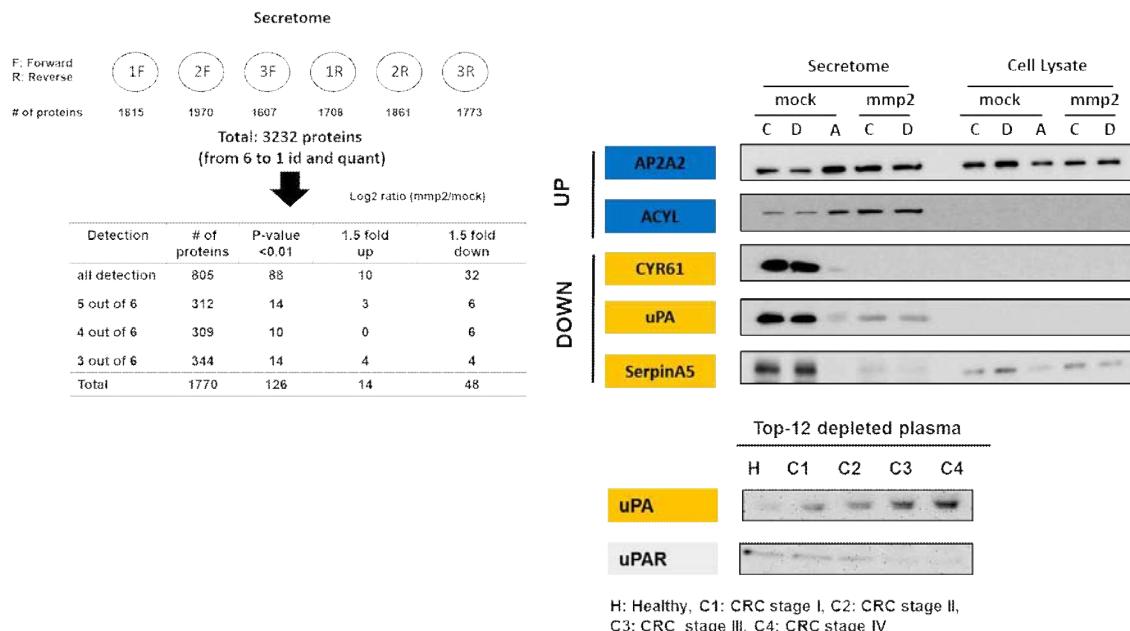
- MOCK, *mmp-2* 저해세포주를 SILAC 방법으로 8-passage 이상 계대하여 incorporation 후 분비 단백체를 수득하고 분획하여 질량분석을 수행.



<그림. SILAC 방법을 이용한 분비 단백체 질량분석 모식도>

- 총 6회의 질량분석을 통하여 3232개의 분비단백질이 동정되었음. 6번의 biological 실험에서 3번 이상 동정된 단백질은 1770개이며 통계분석을 통하여 126개 ($p\text{-value}<0.01$)의 단백질을 선별함.

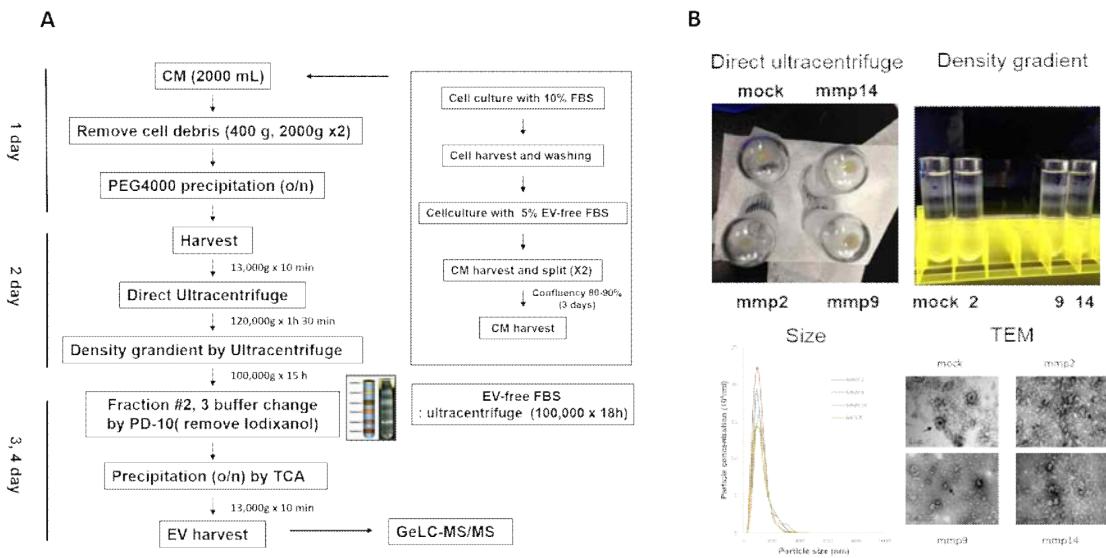
- SILAC 기반의 질량분석법은 상대정량이 가능하므로, 선별된 126개 단백질에서 차등발현(1.5 배 이상)을 보이는 단백질 62개를 (up: 14, down: 48, mmp2/mock ratio) 선별함.
- 차등발현 단백질 중 MMP-2와 관련하여 같이 보고된 바가 있는 단백질에 대하여 MMP-2 inhibitor인 ARP-100을 처리하였을 때 분비단백체내 발현양상을 western blot으로 검증한 결과 질량분석결과와 같은 결과를 보임.
- 실제 대장암 환자 혈액 시료에서도 기수별로 차등발현 단백질의 발현양상 차이를 확인.



<그림. 차등발현 단백질 선별 및 검증>

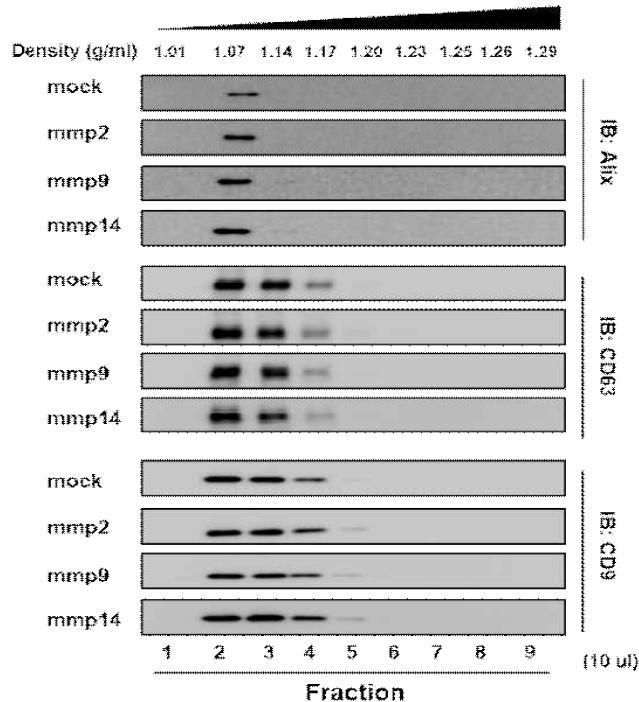
다. MMPs 저해세포주에서 Extracellular vesicle (EV) 분리방법 확립

- 최근 들어 암세포의 외부환경 조절인자에 관한 연구가 extracellular vesicle (EV)에 다량으로 포함되어 있는 신호물질 (DNA, RNA 및 단백질)을 통하여 이루어지고 있음. 이에 MMP 저해세포주에서 EV에 의한 외부환경 조절 메커니즘을 연구하고자 EV 분리 방법을 확립하고 질량분석으로 동정하는 연구를 수행함.
- 다양한 EV 분리방법들이 알려져 있지만 본 팀에서는 density gradient를 이용한 ultracentrifugation 방법을 사용함. 세포주를 EV free FBS를 함유한 배지에서 배양한 후 배지를 수득하고 centrifugation과 Optiprep density gradient 방법을 이용하여 EV를 수득함.
- 이렇게 수득된 EV를 nano tracking analysis 및 TEM를 이용하여 EV의 quality를 확인하였음.



<그림. EV purification 방법>

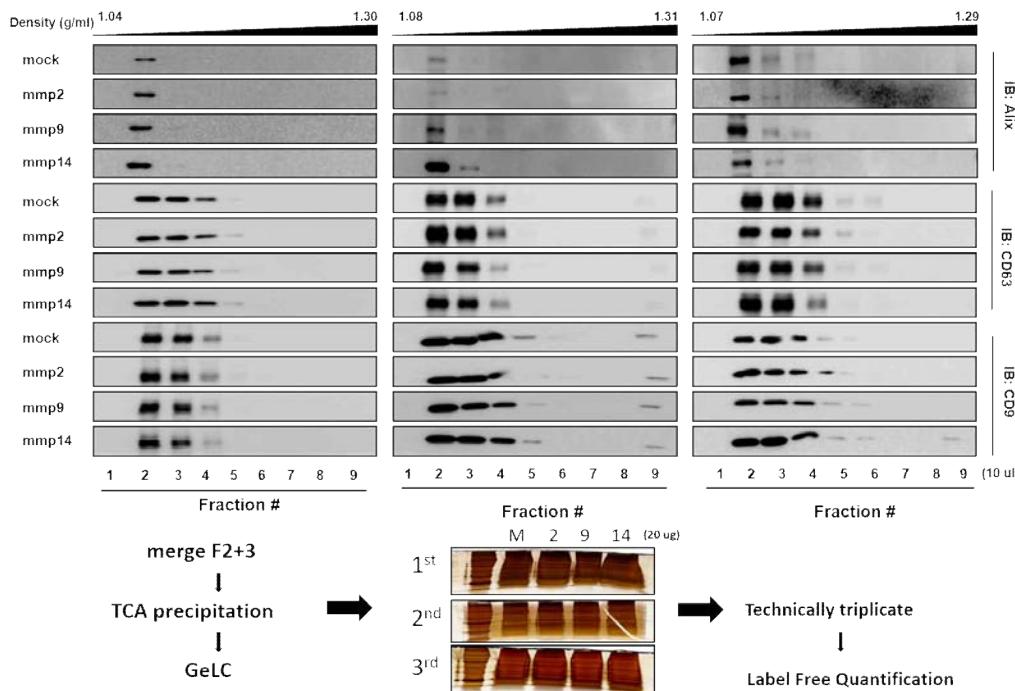
- Density gradient 분획을 통해 얻은 EV를 EV marker인 Alix, CD9, CD63에 대한 western blot으로 density 1.07 - 1.15 g/ml 분획구간에서 수득됨을 확인함.



<그림. EV 분획화 확인>

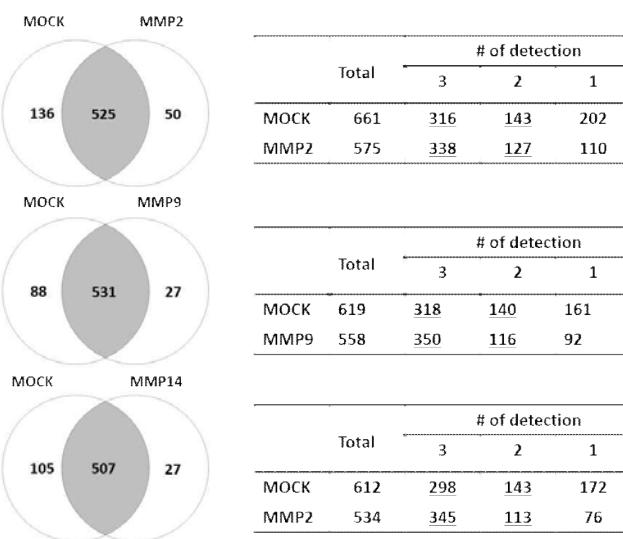
라. Label-free Quantification (LFQ) 방법을 통한 MMPs 저해 세포주의 EV 단백체의 질량분석 및 차등발현 단백질 선별

- MMPs 저해 세포주로부터 분리한 EV 단백체 분석을 위해 각 샘플 별 총 9회 (biological replicate*3, technical replicate*3)의 질량분석을 수행함



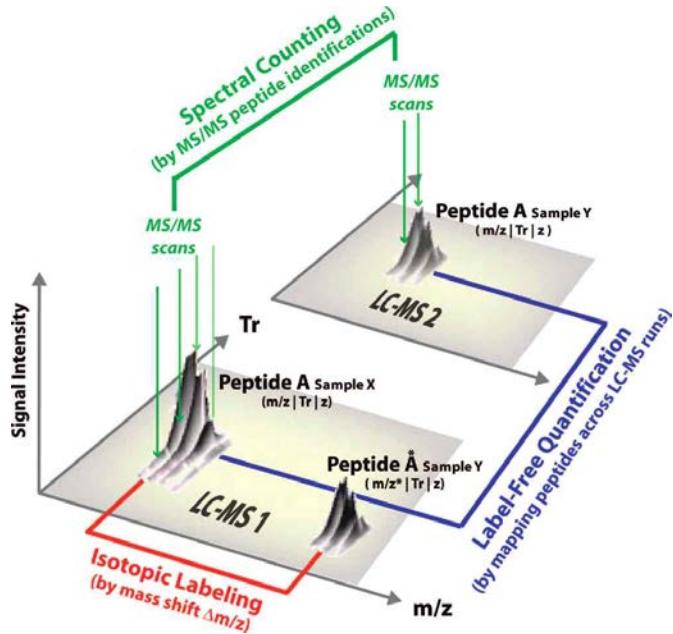
<그림. 각 샘플의 EV 분획화 확인 및 단백체 질량분석 모식도>

- 각 샘플 별 총 9회의 질량분석을 통해 600여 개의 EV 단백질을 동정하였고. 반복실험에서 3회 이상 동정된 단백질의 통계분석을 통하여 ($p\text{-value} < 0.05$) 차등 단백질을 선별함.



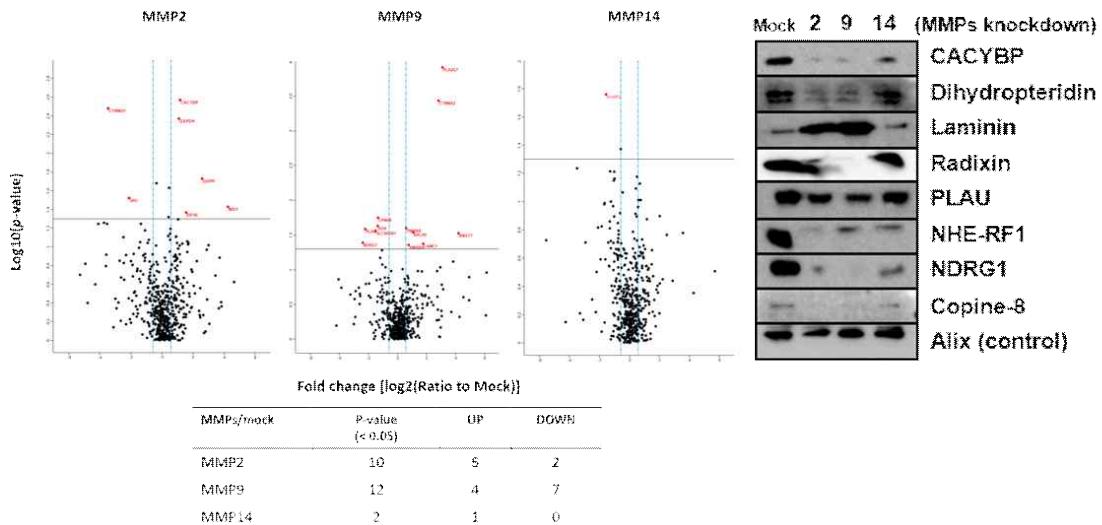
<그림. 각 샘플 별 동정된 단백질의 개수>

- 각 세포주 간 EV 내의 차등발현 단백질을 선별하기 위해 label-free quantification (LFQ) 을 수행



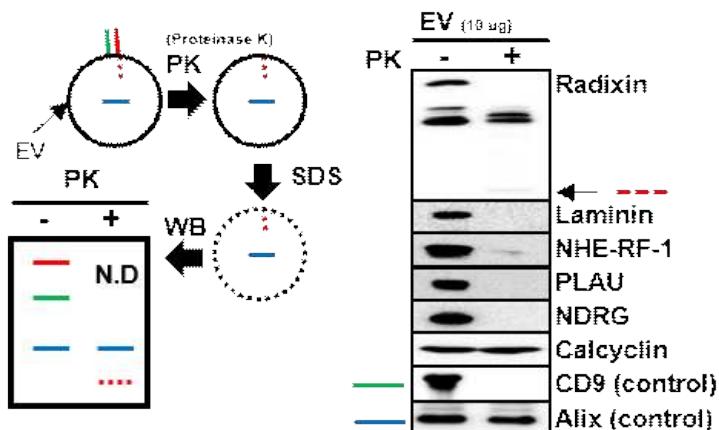
<그림. LFQ의 기본 개념 및 labeling 방법과의 분석방법 비교 (Mueller et al, 2008)>

- LFQ기반의 상대정량분석법을 통하여 1.5 배이상 차등발현 차이가 나타나는 단백질 중 기존에 EV와 관련하여 보고된 바가 있는 단백질에 대하여 western blot 방법을 통해 차등발현 검증.



<그림. MMPs 돌연변이 세포주 EV 단백체내 차등발현 단백질 선별 및 검증>

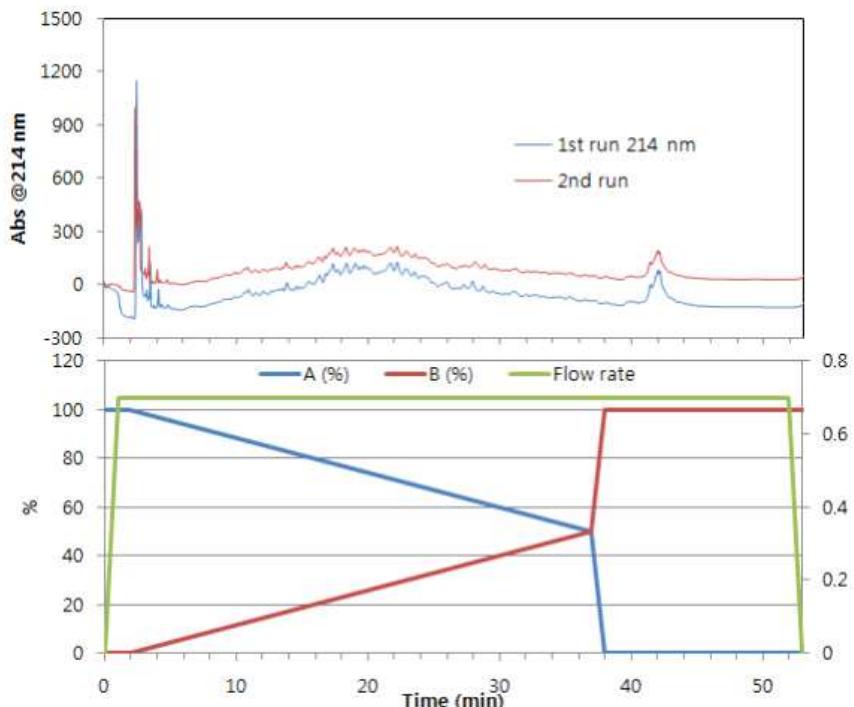
- 검증된 차등발현 단백질에 대하여 Proteinase K assay를 통해 EV 내 localization 검증



<그림. Proteinase K assay의 개념 모식도 및 결과>

마. 세포 내 신호전달 체계 분석법 확립

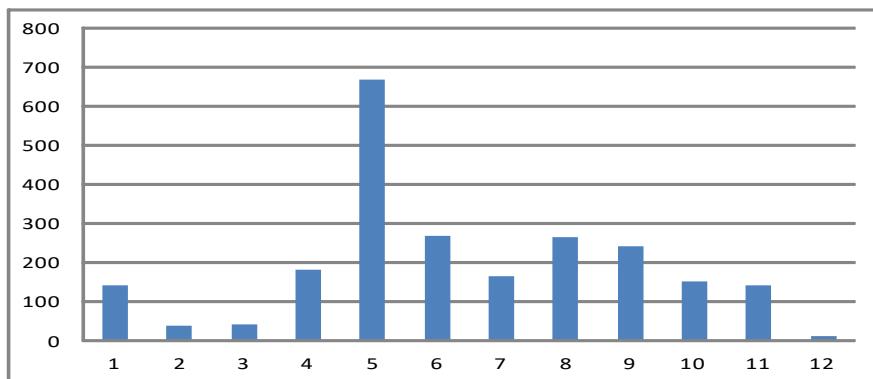
- SILAC 배지에서 배양한 HCT116(light)과 MMP2shRNA HCT-116 (heavy) 세포로부터 단백체를 분리하여 각각 1 mg씩 혼합하여 트립신 처리를 한 후 SCX (strong cation exchange) 크로마토그래피로 분획하는 조건을 확립함.



<그림. SCX 크로마토그래피 분석>

- Buffer A : 7 mM KH₂PO₄, pH 2.67, 30% ACN
- Buffer B : 7 mM KH₂PO₄, pH 2.67, 30% ACN, 500 mM KCl

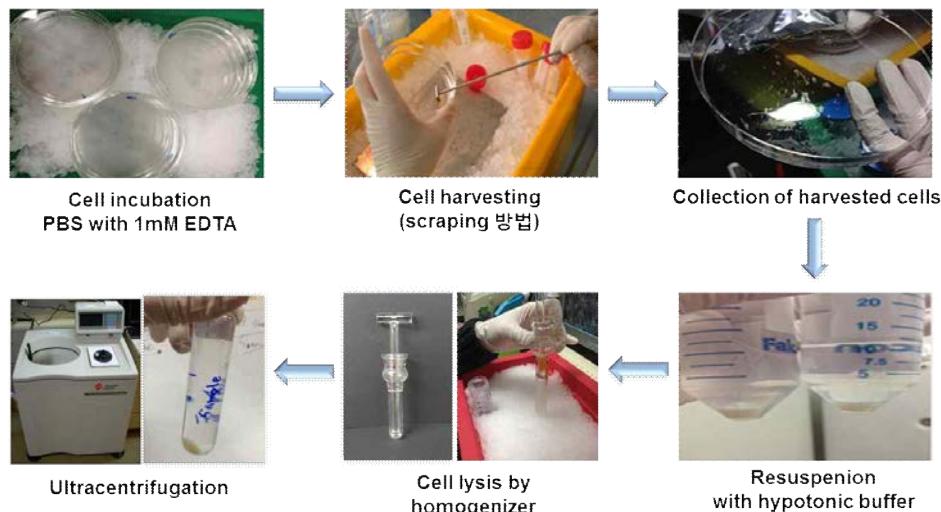
- 상기의 조건으로 크로마토그래피를 수행하여 시료를 12개로 분획한 후 TiO₂ resin을 이용하여 인산화펩타이드를 정제하여 질량분석기로 분석함.
- 질량 분석기로 분석한 data를 MaxQuant 프로그램을 이용하여 단백체 database로부터 펩타이드 및 단백질 동정을 수행함. SCX 크로마토그래피의 각 분획별로 분석한 결과 아래 그림과 같은 분포를 보임. 이로부터 총 2,296개의 인산화 펩타이드를 동정하였고 이는 1,191개의 단백질에 해당함. 이 결과를 이용하여 MMP에 의한 세포 내 신호전달 변화를 분석할 수 있음.



<그림. SCX 크로마토그래피의 각 분획으로부터 동정된 인산화 펩타이드 개수>

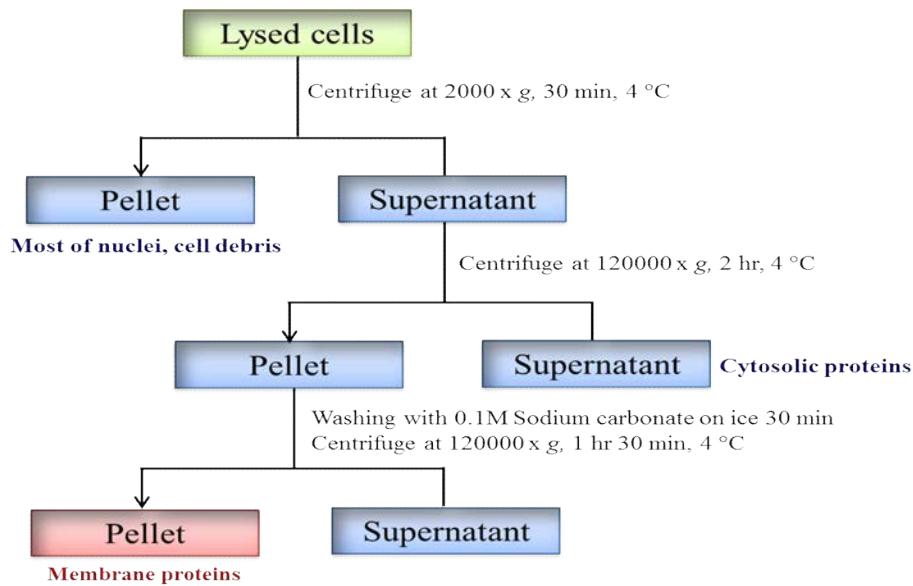
바. 전이성 대장암 표적 단백질 발굴을 위한 세포 표면막 단백체 분리법 확립

- Ultracentrifugation에 의해, 세포 표면막 (plasma membrane)을 분리하는 방법을 최적화 하였음. 우선, 세포 표면막 단백체들이 분리 되어지는 효율을 최대화 시키기 위해서, 보통의 trypsin을 써서, cell plate로부터 harvest 하는 방법을 사용하지 않고, 아래의 그림에서처럼, cell들을 1 mM EDTA를 포함한 PBS(Phosphate-buffered saline)에 incubation 시켜서 cell 을 culture plate로부터 harvest 했고, harvest된 cell들을 hypotonic buffer에 resuspend 시켜서, 다시 10분간 incubation 시킨 후에, homogenizer를 이용해서, lysis 하였음. Lysis된 cell들을 ultracentrifugation에 의해서 최종적으로 세포막을 분리하였다.



<그림. 세포 표면막 분리를 위한 cell lysis 방법>

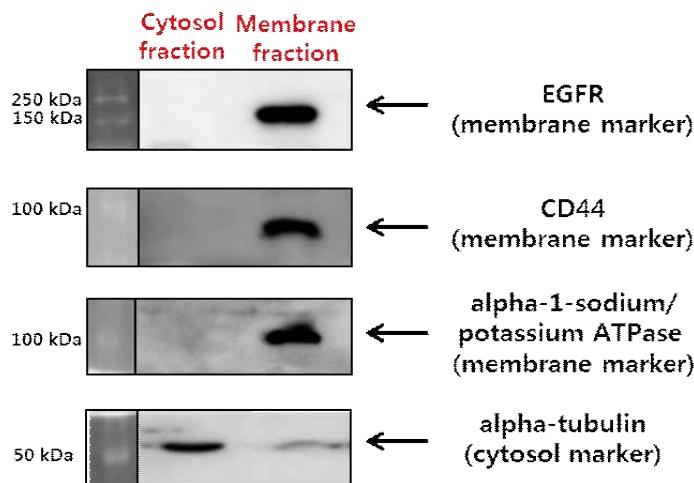
- Lysis된 cell들은 아래의 differential centrifugation 방법에 의해서 membrane pellet을 isolation 하였음. 즉, Lysis된 cell들을 2000 x g로 30분간 4 °C에서 centrifuge 시켜서 cell nucleus를 pellet으로 분리시키고, supernatant를 120000 x g로 4 °C에서 2시간을 centrifuge 시켜서 membrane 단백질들이 포함된 pellet을 얻은 후에, membrane 단백질들의 purity를 높이기 위해서 membrane pellet을 high pH (pH 11.5)를 가지는 0.1 M sodium carbonate로 washing을 한 후에, 다시 ultracentrifuge 해서 최종적으로 세포 표면막을 분리하였음.



<그림. Ultracentrifugation을 이용한 세포막 단백체 분리에 대한 workflow>

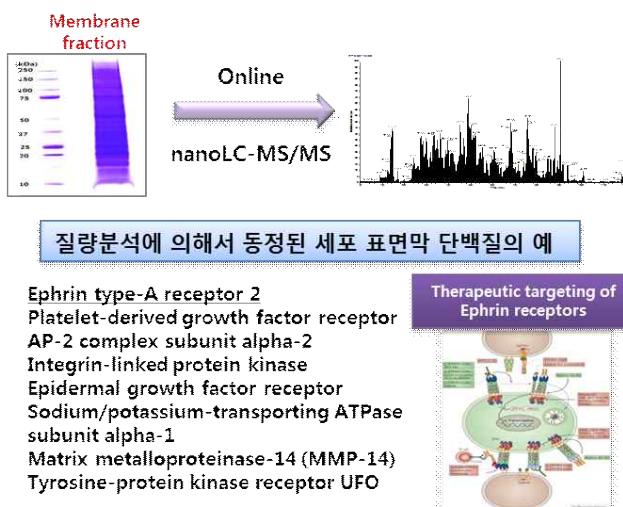
- Ultracentrifugation에 의해서 분리한 plasma membrane은 1차적으로 웨스턴 블랏(western blotting) 방법으로 세포 표면막에 존재한다고 알려진 항체를 이용해서, membrane fraction

에서 잘 발현됨을 확인할 수 있었음.



<그림. 웨스턴 블랏을 이용한 membrane fraction에서 세포막 단백질 확인>

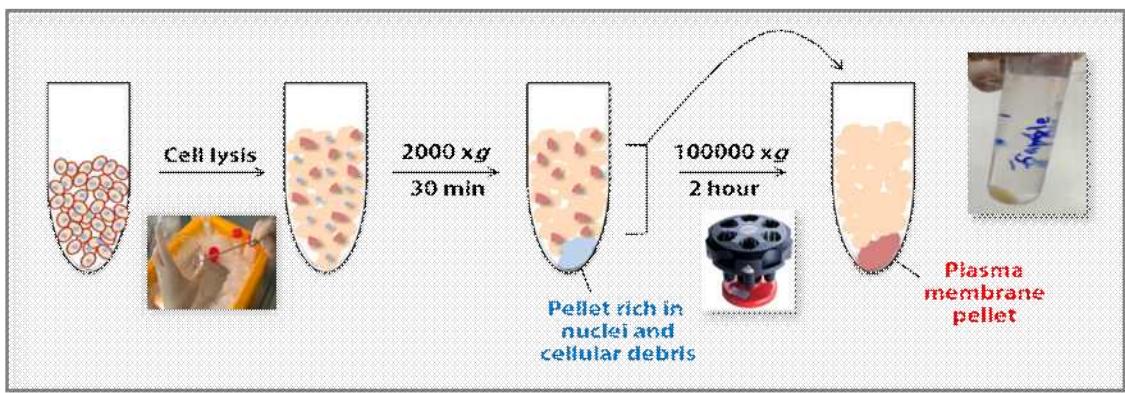
- 분리된 세포막에 존재하는 단백질들을 질량분석법에 의해서 동정을 하여서 확인하였음. 즉, membrane fraction을 SDS-PAGE로 분리한 후에, in-gel digestion을 진행한 후에, 온라인으로 nanoLC-MS/MS를 이용하여서 동정하였고, 동정된 많은 단백질들이 plasma membrane에 존재하는 단백질들임을 확인할 수 있었음. 아래의 그림은 질량분석법에 의해서 동정된 세포막 단백질들의 예를 보여주고 있음. 특히, 동정된 단백질들 중의 하나인 ephrin receptor는 tumor growth와 invasion에 관련되어 있다고 알려져 있으며, ephrin receptor들에 대한 therapeutic targeting에 대한 방법들이 연구되어지고 있음. 향후, 확립된 세포 표면막 단백체 분리법을 이용해서 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용한 차등 발현되는 세포 표면막 단백질 후보군들을 발굴할 예정임.



<그림. 질량분석법을 이용한 세포 표면막 단백체 동정>

사. 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주 분석을 통한 차등 발현되는 세포막 단백질
후보군 발굴

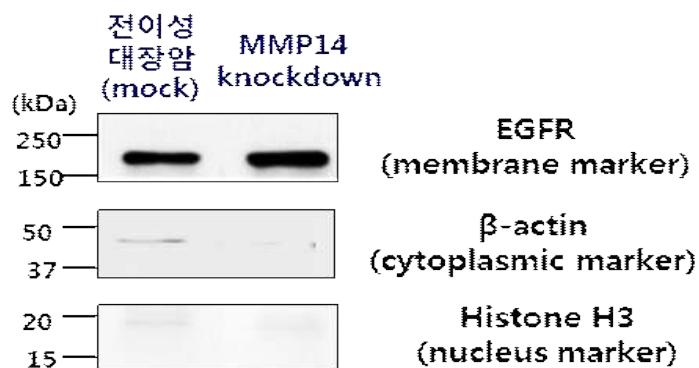
- 전이성 대장암과 MMP14 저해 세포주에서 아래 그림의 ultracentrifugation(초고속 원심분리법) 기반의 세포표면막 분리 방법을 이용하여 각각 세포표면막 단백질들을 분리하였음.



<그림. Ultracentrifugation을 이용한 세포표면막(plasma membrane) 분리>

- 분리된 세포표면막을 세포표면막과 사이토졸 및 뉴클레오스에 존재한다고 알려지는 epidermal growth factor receptor (EGFR), beta-actin 및 histone H3 단백질들의 항체를 이용해서 웨스턴 블랏(western blotting)으로 세포 표면막이 분리된 것을 확인하였음.

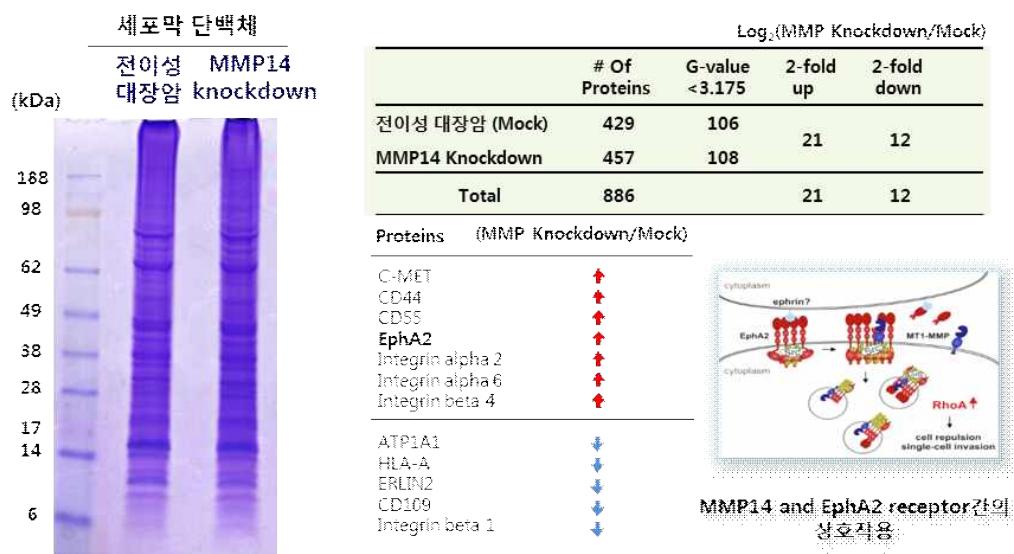
분리된 세포막 단백체



<그림. 분리된 세포막에서 세포 표면막 단백질 발현 확인>

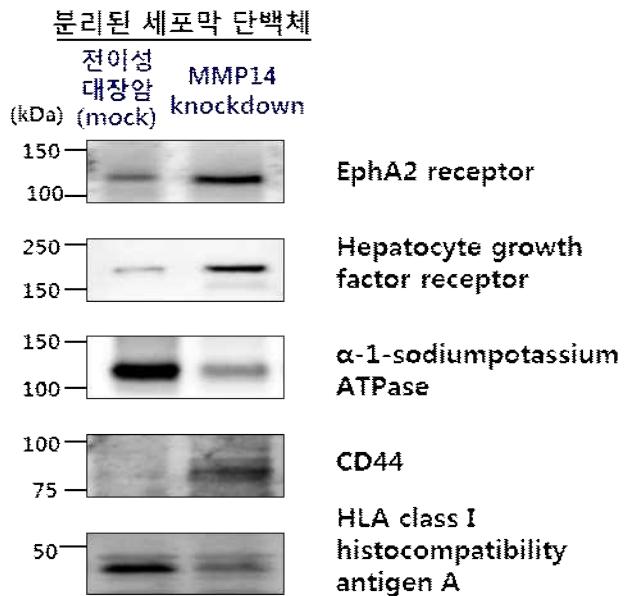
- 전이성 대장암과 MMP14 저해 세포주에서 각각 분리된 세포표면막에서 존재하는 단백질들을 질량분석법에 의해서 동정하고, spectral counting에 기반한 label-free quantification에 의해서 두 세포주에서 차등 발현되는 단백질들을 발굴하고자 하였음. 두 세포주에서 각각 분리된 같은 양의 세포막 단백질들을 SDS-PAGE로 분리한 후에, 22개의 fraction으로 나누어서, in-gel digestion을 수행하였음. In-gel digestion을 통해 펩타이드 형태로 얻어진 샘플

들은 고분해능 질량분석기에 도입하여 분석한 결과, 전이성 대장암 세포주에서 429개, MMP14 저해 세포주에서 457개의 단백질들을 동정할 수 있었으며, spectral counting 기반의 label-free quantification에 의해, $P-value >0.05$ 이상의 신뢰도를 갖는 G-value >3.841 의 단백질을 분석해본 결과 전이성 대장암 세포주에서 106개, MMP14 Knock down 대장암 세포주에서 108개의 단백질을 동정할 수 있었고, MMP14 저해 세포주에서 전이성 대장암 세포주에 비해 2배 이상 차등발현을 나타내는 단백질을 분석한 결과 33개의 후보군을 얻을 수 있었음.



<그림. 질량분석법을 통한 차등발현 세포표면막 단백질 후보군 발굴>

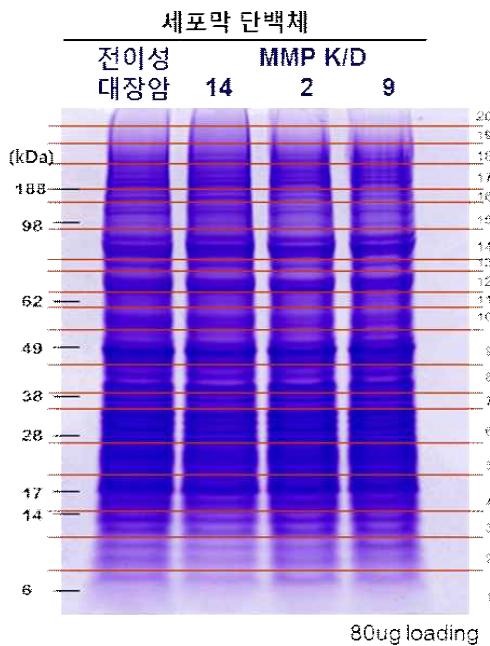
- 33개의 차등발현 단백질 후보군 중 우선적으로 5개의 단백질을 선정하여, 웨스턴블랏을 통해 검증을 수행한 결과, EphA2 receptor, hepatocyte growth factor receptor, CD44는 전이성 대장암 세포주에 비해 MMP14 저해 세포주에서 높게 발현되는 것을 확인 할 수 있었고, alpha-1-sodium potassium ATPase, HLA class I histocompatibility antigen A의 경우, 전이성 대장암 세포주에서 MMP14 전해 세포주보다 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었음.



<그림. 전이성 대장암과 MMP 저해 세포주에서 차등 발현되는 단백질들의 예>

아. Label-free Quantification (LFQ) 방법을 통한 다양한 MMP 저해 세포주들의 세포 표면막 단백질 차등 발현 후보군 선정

- 전이성 대장암 세포주와 다양한 MMP 저해 세포주들 (MMP 14, 2, 9 저해 세포주들)의 세포 표면막 단백질들을 SDS-PAGE gel을 이용하여 분자량에 따라 20개의 fraction으로 분리하여 in gel digestion을 수행하여 질량분석기에 도입함.
- 질량분석 결과, 4종의 MMP 저해 세포주에서 총 3240개의 단백질들을 동정하였고, 전이성 대장암 세포주와 비교하였을 때, p-value < 0.05 의 신뢰도를 갖는 G-value < 3.841의 단백질을 MMP14 저해 세포주에서 343개, MMP2 저해 세포주에서 405개, MMP9 저해 세포주에서 407개 동정하였으며, 그 중에서 2배 이상 증가되거나 감소하는 단백질을 MMP14 저해 세포주에서 263개, MMP2 저해 세포주에서 338개, MMP9 저해 세포주에서 345개 동정하였음.



<그림. 세포 표면막 단백질의 SDS page gel을 이용한 fractionation>

세포막 단백체 분석 결과

(MMP Knockdown/Mock)

	# Of Proteins	G-value <3.841	2-fold up	2-fold down
전이성 대장암 (Mock)	2473			
MMP14 Knockdown	2512	343	167	96
MMP2 Knockdown	2409	405	196	142
MMP9 Knockdown	2423	407	192	153
Total	3240		354	255

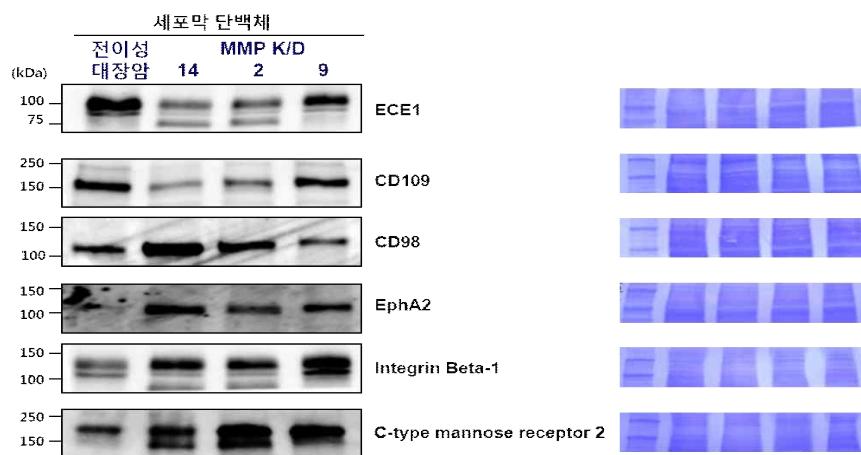
Proteins	(MMP Knockdown/Mock)	MMP14	MMP2	MMP9
Plexin B2		↓	↑	↓
ECE1		↓	↑	↓
CD109		↓	↓	↓
EphA2		↑	↑	↑
Integrin beta 1		↑	↑	↑
CD280		↑	↑	↑

<그림. 전이성 대장암 세포주와 MMPs 저해 세포주에서의 질량분석 결과>

자. 항체를 이용한 차등발현 세포막 단백질들에 대한 세포주 및 대장암 조직에서의 검증

- 질량분석 결과 차등발현을 확인한 Plexin B2, ECE1, CD109, EphA2, Integrin beta 1, C-type mannose receptor 2 (CD280)에 대해 항체를 이용하여, 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주들에서의 차등 발현을 확인하였음.

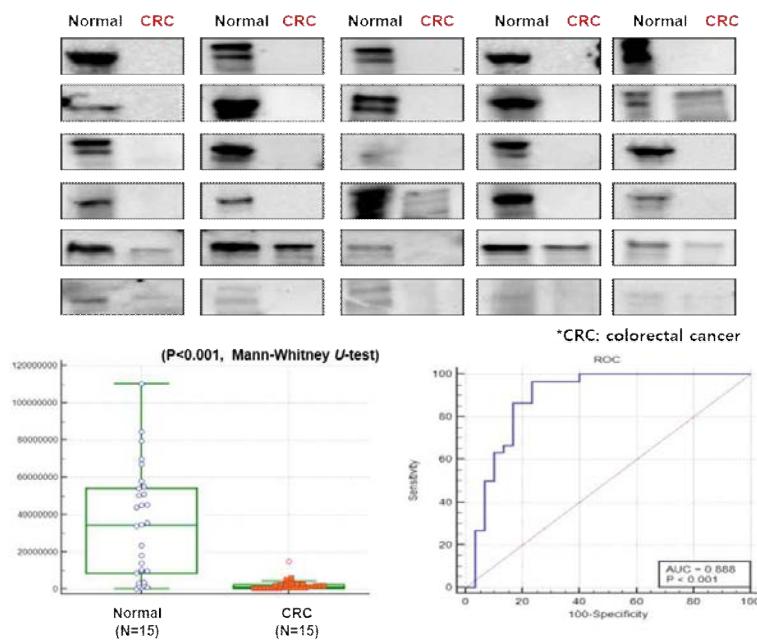
Accession	Description	GENE	Mock PSM	MMP14 PSM	MMP2 PSM	MMP9 PSM	# AAs	MW [kDa]
O15031	Plexin-B2	PLXNB2	56	37	49	65	1838	205
P29317	Ephrin type-A receptor 2	EPHA2	48	126	86	69	976	108.2
P42892	Endothelin-converting enzyme 1	ECE1	45	4	5	21	770	87.1
Q6YHK3	CD109 antigen	CD109	43	14	18	27	1445	161.6
P00533	Epidermal growth factor receptor	EGFR	40	73	65	53	1210	134.2
P05556	Integrin beta-1	ITGB1	76	90	85	117	798	88.4
Q9UBG0	C-type mannose receptor 2 (CD280)	MRC2	5	12	20	7	1479	166.6



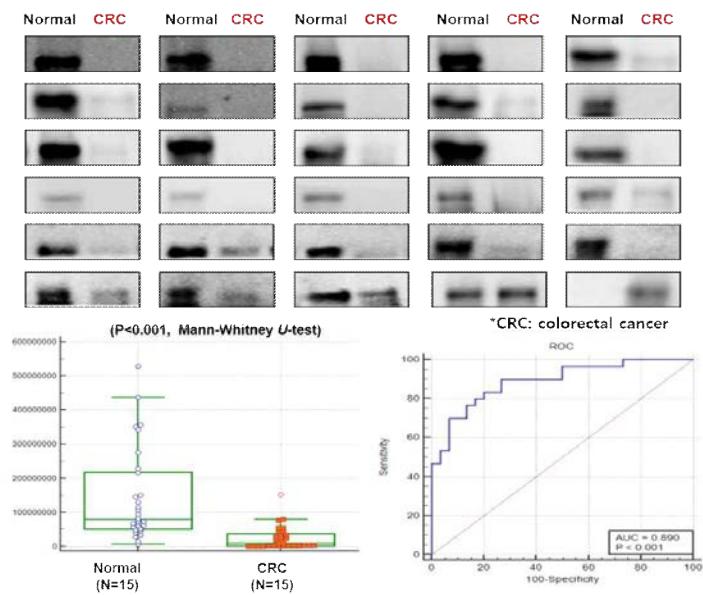
<그림. 항체를 이용한 차등발현 세포막 단백질 후보군들의 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주들에서의 발현 검증>

- 또한, 정상 조직과 전이성 대장암 세포주에서 MMP들에 의해 ECM (extracellular matrix) remodeling과 관련하여 알려진 세포 표면막 단백질인 Integrin beta 1과 C-type mannose receptor 2 (CD280)에 대해서 웨스턴블랏 실험에 의해서 대장암 조직에서 차등발현되는 것을 확인할 수 있었음. 향후, 대량 시료의 검증을 통해서 정상 조직과 (전이성) 대장암 조직을 구분할 수 있는 마커로 사용될 수 있는 가능성을 제시할 수 있었음.

CD280의 대장암 조직에서의 발현패턴



Integrin beta 1의 대장암 조직에서의 발현패턴

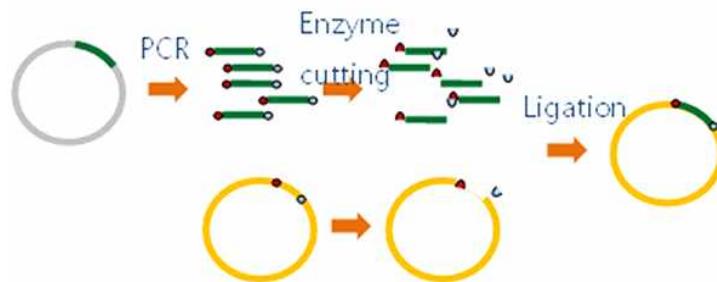


<그림. CD280과 Integrin beta 1의 대장암 조직에서의 발현패턴>

2. HIF와 상호작용하는 단백체의 생화학적, 구조적, 세포 생물학적 기능연구 및 신호전달 체계 연구를 통한 HIF 활성의 능동적 조절 인자 발굴

가. HIF와 상호작용하는 단백체의 구조적, 생화학적 연구

단백체간의 상호작용을 *in vivo* (FRET) 실험과 생화학적 성질 규명을 위한 다양한 플라스미드 확보하고자 함. 플라스미드 제작을 위해서는 기본적인 분자생물학적 기법들 (PCR, site-directed mutagenesis, fusion PCR, restriction and ligation, clony PCR 등)이 사용됨. 또한 모든 제작된 플라스미드들은 시컨싱 (마크로젠, 한국)을 통해 확인됨.



<그림. PCR과 제한효소를 이용한 플라스미드 제작 기법>

(1) 세포나 대장균에서 발현 가능한 HIF 및 상호 작용 단백체들 (PHD2, PHD3, PKM2)의 발현 플라스미드 제작

- 모든 HIF3 α -4는 플라스미드 제작의 용이성을 위해 HIF3 α -4에 있는 NdeI (catatg) 제한효소 인식사이트를 아래 프라이머를 이용해 아미노산의 변화 없이 caCatg로 변이 시켰다.

3a_4_T582C-F 5'- ACT GCT CTG GAC ACA TGA GGG CCT ACA -3'

3a_4_T582C-R 5'- TGT AGG CCC TCA TGT GTC CAG AGC AGT -3'

- 암세포에서 발현 가능한 HIF3 α -4는 XhoI과 EcoRI 제한효소를 이용하여 pcDNA3.1를 기본으로 제작함

3a-4F 5'- GCAG CTCGAG CT ATG GCG CTG GGG CTG -3'

3a-4R 5'- C GCA G GAATTCTCA GGG CCA CCA AGG G -3'

- 대장균에서 발현 가능한 HIF3 α -4는 아래의 프라이머를 이용하여 N말단 혹은 C말단에 His-tag^o 있는 형태로 pET28b 혹은 pET21b를 기본으로 제작됨

NdeI-3a-4-F 5'- GGCGCAG CATATG ATG GCG CTG GGG CTG -3'

3a-4-stop-HindIII-R 5'-GCAG AAGCTT TCA GGG CCA CCA AGG G -3'

3a-4-HindIII-R 5'-GCAG AAGCTT GGG CCA CCA AGG GG -3'

- PKM2 과 발현과 정제를 위한 플라스미드는 N말단에 His-tag^o 도입되게 pET28b를 기본으

로 제작됨

NdeI-PKM2-5' 5'- GGCGCAG CATATG TCG AAG CCC CAT AGT GAA GC -3'
XhoI-PKM2-3' 5'- GCAG CTCGAG TCA CGG CAC AGG AAC AAC A -3'

- *In vivo, in vitro* PKM2 oligomerization method를 small molecular probe를 이용해 연구하기 위한 flash-PKM2 (CCPGCC motif를 가진)를 site-directed mutagenesis method를 이용해 위에서 제작된 플라스미드를 template로 제작함

PKM2-Flash-F 5` -GCC TCC TTC AAG TGC TGC CCA GGG TGC TGC ATC
GTC CTC ACC AAG GGC

PKM2-Flash-R 5'- GCC CTT GGT GAG GAC GAT GCA GCA CCC TGG GCA
GCA CTT GAA GGA GGC

- PHD3 과 발현을 위해서 N 말단에 His-, TRX-, GST-, Nus-, MBP-tag 의 도입된 플라스미드들을 제작함

His-tag 된 pET28b를 기본으로 제작함

NdeI-PHD3-5' 5'- GGCGCAG CATATG AT GCC CCT GGG ACA CAT C -5'
HindIII-PHD3-3' 5'- GCAG AAGCTT TCA GTC TTC AGT GAG GGC AGA -3'

GST- 그리고 Nus-tag 은 pET41b와 pET42b, 그리고 pET43.1을 기본으로 제작함

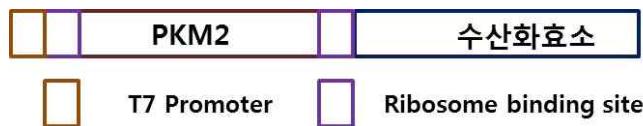
EcoRI-PHD3-Tadd-5' 5'- GGCGCAG GAATTCT AT GCC CCT GGG ACA CAT C -5'
HindIII-PHD3-3' 5'- GCAG AAGCTT TCA GTC TTC AGT GAG GGC AGA -3'

TRX- 그리고 MBP은 pET32a와 pMal c2x를 기본으로 제작함

EcoRI-PHD3-5' 5'- GGCGCAG GAATTCT AT GCC CCT GGG ACA CAT C -5'
HindIII-PHD3-3' 5'- GCAG AAGCTT TCA GTC TTC AGT GAG GGC AGA -3'

(2) 수산화된 PKM2 확보를 위한 플라스미드 제작

- 대장균내에서 직접적인 PKM2의 수산화가 가능한지 알아보고자 PKM2와 제안되어진 PKM2 수산화 효소인 PHD3 및 PHD2 그리고 PKM2와 상호작용하는 것으로 알려진 JMJD5를 같은 T7 promoter를 사용해 같은 mRNA로부터 단백체가 독립적으로 합성되게 플라스미드 제작함.



<그림. 기본적 플라스미드 구성 >

두 단백체를 동시 발현하는 플라스미드는 아래의 프라이머들을 사용하여 pET28b를 기본으로 제작됨

- 모든 PHD2는 플라스미드 제작의 용이성을 위해 PHD2에 있는 NdeI (catatg) 제한효소 인식사이트를 아래 프라이머를 이용해 아미노산의 변화 없이 cGtatg로 변이 시킴.

PHD2-A1138G-5' 5'-TGAAGTACAACCAGCGTATGCTACAAGGTAC-3'

PHD2-A1138G-3' 5'-GTACCTTGTAGCATACGCTGGTTGTACTTCA-3'

PKM2-PHD2

NdeI-PKM2-5'	5'- GGCGCAG CATATG TCG AAG CCC CAT AGT GAA GC -3'
PKM2-PHD2-5'	5'- GTG CCG TGA TAA GAA GGA GAT ATA CCA ATG GCC AAT GAC AGC GGC -3'
PKM2-PHD2-3'	5'- GCC GCT GTC ATT GGC CAT TGG TAT ATC TCC TTC TTA TCA CGG CAC -3'
EcoRI-stop-PHD2-3'	5'- C GCA G GAATTCTA GAA GAC GTC TTT ACC GAC CGA -3'

PKM2-PHD3

NdeI-PKM2-5'	5'- GGCGCAG CATATG TCG AAG CCC CAT AGT GAA GC -3'
PKM2-PHD3-5'	5'- TGT TGT TCC TGT GCC GTG ATA AGA AGG AGA TAT ACC AAT GCC CCT GGG ACA CAT C -3'
PKM2-PHD3-3'	5'- GAT GTG TCC CAG GGG CAT TGG TAT ATC TCC TTC TTA TCA CGG CAC AGG AAC AAC A -3'
XhoI-PHD3-3'	5'- GCAG CTCGAG TCA GTC TTC AGT GAG GGC AGA -3'

PKM2-JMJD2

NdeI-PKM2-5'	5'- GGCGCAG CATATG TCG AAG CCC CAT AGT GAA GC -3'
PKM2-JMJD5-5'	5'- GTG CCG TGA TAA GAA GGA GAT ATA CCA ATG GCT GGA GAC ACC CAC -3'
PKM2-JMJD5-3'	5'- GTG GGT GTC TCC AGC CAT TGG TAT ATC TCC TTC TTA TCA CGG CAC -3'
XhoI-JMJD5-3'	5'- GCAG CTCGAG CTA CGA CCA CCA GAA GCT GAC -3'

(3) 형광 단백질 발현 및 확보를 위한 플라스미드 제작

- 형광단백체 발현 플라스미드를 확보하기 위해 pmCerulean은 아미노산 S72A Y145A H148D A206K 기준 pECFP-C1과 pECFP-N1에서 타깃된 돌연변이를, pmCitrine은 아미노산 Q69M, A206K을 pEYEP-C1과 pEYEP-N1 돌연변이를 시켜 제작함
- 사용 프라이머들

ECFP_S72A-5' 5'- TGC AGT GCT TCG CCC GCT ACC C -3'

ECFP_S72A-3' 5'- GGG TAG CGG GCG AAG CAC TGC A -3'

ECFP_Y145AH148D-5' 5'- AGC TGG AGT ACA ACG CCA TCA GCG ACA ACG TCT
ATA TC -3'

ECFP_Y145AH148D-3' 5'- GAT ATA GAC GTT GTC GCT GAT GGC GTT GTA CTC

	CAG CT -3'
ECFP_A206K-5'	5'- GAG CAC CCA GTC CAA GCT GAG CAA AGA CCC -3'
ECFP_A206K-3'	5'- GGG TCT TTG CTC AGC TTG GAC TGG GTG CTC -3'
EYFP_Q69M-5'	5'- GCT ACG GCC TGA TGT GCT TCG CCC -3'
EYFP_Q69M-3'	5'- GGG CGA AGC ACA TCA GGC CGT AGC -3'
EYFP_A206K_5'	5'- CTG AGC TAC CAG TCC AAG CTG AGC AAA GAC CC -3'
EYFP_A206K_3'	5'- GGG TCT TTG CTC AGC TTG GAC TGG TAG CTC AG -3'

- 이렇게 만들어진 플라스미드에 HIF1 β 는 BamH1과 HindIII 제한효소를 이용해 pmCerulean-C1, pmCerulean-N1, pmCitrine-C1, pmCitrine-N1에 넣어 4종의 플라스미드 확보함

1b-F	5'-GCAG AAGCTT CG ATG GCG GCG ACT ACT GC -3'
1b-nostop-R	5'- GCAG GGATCC CG TTC TGA AAA GGG GGG AAA CAT AGT -3'
1b-R	5'- GCAG GGATCC TCA TTC TGA AAA GGG GGG AAA CAT A -3'

- HIF2 α 는 BamH1과 HindIII 제한효소를 이용해 pmCitrine-C1, pmCitrine-N1에 넣어 2종의 플라스미드 확보

2a-F	5'- GCAG AAGCTT CG ATG ACA GCT GAC AAG GAG AAG AAA AG -3'
2a-nostop-R	5'- GCAG GGATCC CG GGT GGC CTG GTC CAG G -3'
2a-R	5'- GCAG GGATCC TCA GGT GGC CTG GTC CA -3'

- HIF3 α -2와 HIF3 α -4는 XhoI 과 EcoRI 제한효소를 이용해 pmCherry-C1에 넣어 각각 1종의 플라스미드 확보

3a-2F	5'- GCAG CTCGAG CT ATG GAC TGG CAA GAC CAC AG -3'
3a-2R	5'- C GCA G GAATTCTCA GTC AGC CTG GGC TGA GC -3'
3a-4F	5'- GCAG CTCGAG CT ATG GCG CTG GGG CTG -3'
3a-4R	5'- C GCA G GAATTCTCA GGG CCA CCA AGG G -3'

- HIF1 β 와 HIF2 α 의 상호작용연구를 위한 negative control로 사용될수 있는 HIF2 α 돌연변이 mCitrine-HIF2 α (Q322E, M338E, Y342T)를 연속적인 quik change PCR을 이용하여 제작

2a-Q322E-F	5'- TGT GGC TGG AGA CCG AGG GGA CGG TCA T -3'
2a-Q322E-R	5'- ATG ACC GTC CCC TCG GTC TCC AGC CAC A -3'
2a-M338EY342T-F	5'- GCC CCA GTG CAT CGA GTG TGT CAA CAC CGT CCT GAG TGA G -3'

2a-M338EY342T-R 5'- CTC ACT CAG GAC GGT GTT GAC ACA CTC GAT GCA CTG
 GGG C -3'

- PKM2의 oligomerization 동역학을 연구하기 위한 mCherry-PKM2는 XhoI 과 EcoRI 제한효소와 아래 프라이머를 이용하여 제작함

Xho1-PKM2-5' 5'- GCAG CTCGAG CT ATG TCG AAG CCC CAT AGT GAA
 GC-3'
PKM2-stop-EcoRI-3' 5'- C GCA G GAATTCA CGG CAC AGG AAC AAC A -3'

(4) PKM2, PHD3, HIF-3 α 단백체 의 대장균내 과 발현 실험과 분리 기법 확립 I

(가). PKM2발현 및 정제법 확립

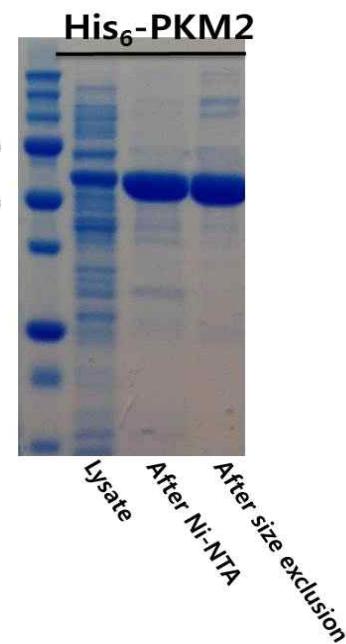
- PKM2 과발현 및 정제법: His-PKM2는 C41(DE3) 대장균에서 18도에서 1 mM IPTG로 20시간동안 유도함 (200 mL small scale)
- Ni-NTA affinity chromatography와 Size-exclusion chromatography 방법을 통해 정제하여 95 % 이상 순도를 가진 PKM2를 정제함.

(나). 정제된 PKM2의 oligomerization 변화 관찰

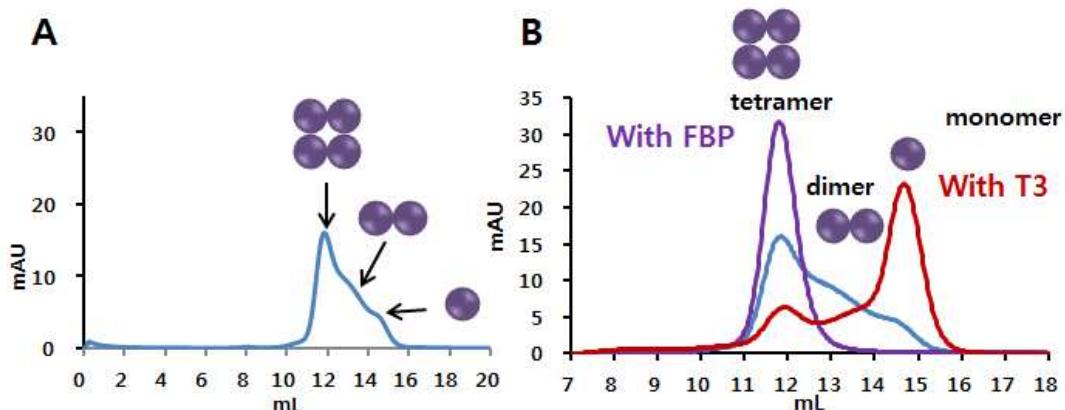
- 정제된 PKM2의 oligomerization 상태와 metabolite나 호르몬에 의한 변화를 size-exclusion column을 통해 확인함으로서 대장균에서 정제된 단백체의 성질을 규명함.
- 정제된 PKM2는 문현에서 보고된바와 같이 Fructose 1,6-bisphosphate와 결합해 tetramer로 T3 호르몬과 결합해서는 monomer로서 존재함.

(다). PHD3의 과발현을 위한 발현조건 screening.

- 기존 C말단에 His-tag된 PHD3 단백체의 발현이 매우 극미한 관계로 PHD3 과발현을 위해서 N 말단에 His-, TRX-, GST-, Nus-, MBP-tag 이 도입된 플라스미드들을 이용하여 과발현을 점검하여 과량의 순도 높은 PHD3 확보를 위해 TRX-PHD3와 MBP-PHD3를 선정함. 다만 가장 짧은 TRX tag (약 109 아미노산)을 우선 정제 순위로 결정.



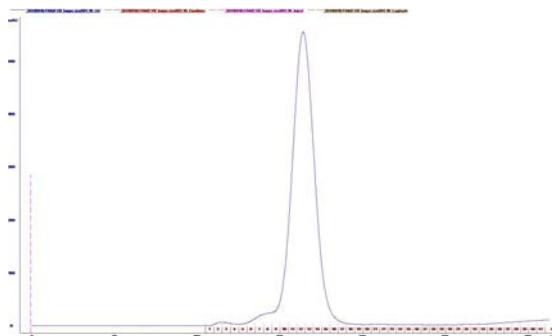
<그림. PKM2의
정제과정을 탐색한
SDS-PAGE gel>



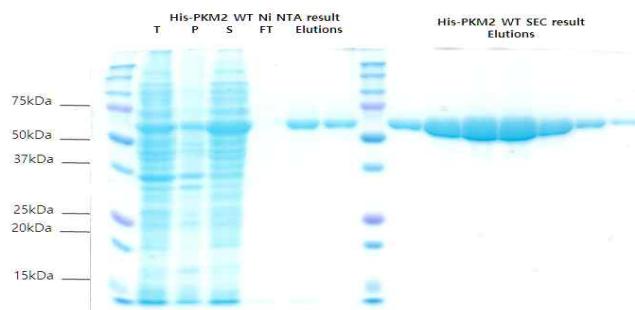
<그림. 정제된 PKM2의 oligomerization 상태와 FBP와 T3에 의한 변화>

(5) 단백체 (PKM2, PHD3, HIF-3 α) 의 대량생산 및 분리기법 확립 II 과 생화학적 성질 규명
(가). PKM2 대량 생산을 위한 발현 및 정제법 확립

- PKM2 과발현 및 정제법: His-PKM2는 C41(DE3) 대장균에서 18 °C에서 1 mM IPTG로 20시간동안 유도함 (2 L scale)
- Ni-NAT affinity chromatography와 Size-exclusion chromatography 방법을 통해 정제하여 95 % 이상 순도를 가진 PKM2를 정제함.



<그림. His-PKM2 WT의 Size-exclusion chromatography 결과>



<그림. PKM2 WT의 정제 결과(SDS-PAGE 결과, 4~20% gradient gel)>

(나). PHD3의 과발현을 위한 발현조건 screening 및 과발현 및 정제

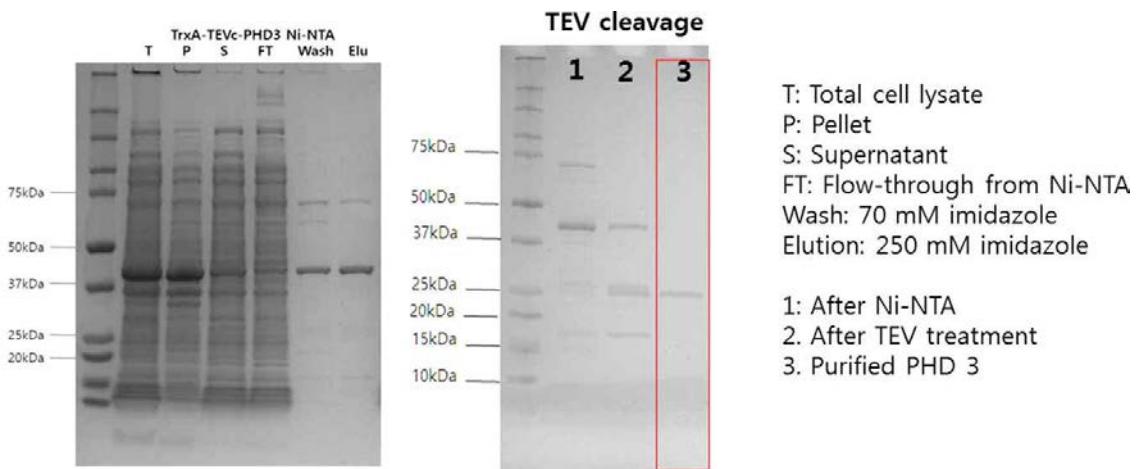
- 기존 C말단에 His-tag된 PHD3 단백체의 발현이 매우 극미한 관계로 PHD3 과발현을 위해서 N 말단에 His-, TRX-, GST-, Nus-, MBP-tag 이 도입된 플라스미드들을 이용하여 과발현을 점검하여 과량의 순도 높은 PHD3 확보를 위해 TRX-PHD3와 MBP-PHD3를 선정함. 다만 가장 짧은 TRX tag (약 109 아미노산)을 우선 정제 순위로 결정.
- pET32a_(TRX-His6-TEV-PHD3) 플라스미드를 C41(DE3)로 옮긴후 1.0 mM의 IPTG로 18 °C에서 과발현 시켰음
- 과발현된 TRX-PHD3는 Ni-NTA chromatography를 통하여 분리한 후 TEV protease를 처리 한 후 TEV tag을 제거 한 후 dialysis를 통해 imidazole을 제거 한수 다시 Ni-NTA를 통과 시켜 PHD3를 정제 하였음.

(6) 형광 PKM2 및 돌연변이 플라스미드 제작

- 플라스미드 제작을 위해서는 기본적인 분자생물학적 기법들 (PCR, site-directed mutagenesis, fusion PCR, restriction and ligation, clony PCR 등)이 사용됨. 또한 모든 제작된 플라스미드들은 시컨싱 (마크로젠, 한국)을 통해 확인됨.

(가). PKM2 돌연변이종 제작

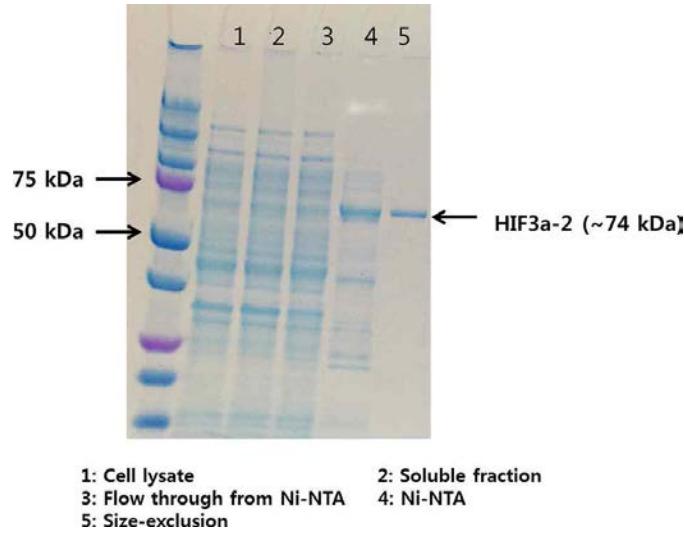
- 기존 pET28b-PKM2 를 다음의 프라이머를 이용하여 quikchange mutagenesis 기술로 원하는 돌연변이 플라스미드 제작



<그림. TrxA-PHD3의 Ni-NTA 정제 결과와 TEV-protease를 이용한 Tag제거 실험 결과>

(다). HIF3a 과발현 및 정제

- C말단에 His-tag된 Hif3a-2 단백체는 C41(DE3) 대장균에서 18 °C에서 1 mM IPTG로 18시간동안 유도함 (2 L scale)
- Ni-NTA 흡착 컬럼과 size-exclusion chromatography방법을 통해 정제함 (그림)



<그림. Hif3a 과발현 및 정제>

PKM2-R399E

Forward: 5'- CTTGCAATTATTTGAGGAACCTCGAACGCCCTGGCGCCCA -3'

Reverse: 5'- TGGGCGCCAGGCCTTCGAGTTCCTCAAATAATTGCAAG -3'

PKM2-K433Q

Forward: 5'- TCCTCACCCAGTCTGGCA -3'

Reverse: 5'- TGCCAGACTGGGTGAGGA -3'

PKM2-R399A

Forward: 5'- CTTGCAATTATTTGAGGAACCTCGCCCCGCCTGGCGCC -3'

Reverse: 5'- GGCGCCAGGCCGGCGAGTTCTCAAATAATTGCAAG -3'

PKM2-E418A

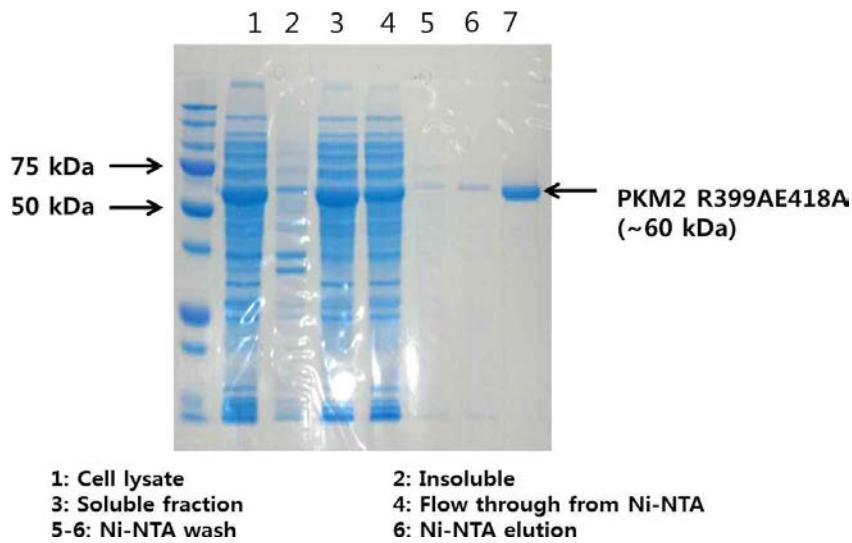
Forward: 5'- CGTGGGTGCCGTGGCGGCCCTCCTCAAGTGC -3'

Reverse: 5'- GCACTTGAAGGAGGCCACGGCACCCACG -3'

PKM2-R399A_E418A double mutant

*PKM2-R399A*를 주형으로 *PKM2-E418A* 프라이머로 quickchang mutagenesis 방법을 통해 플라스미드 제작

(나). PKM2 돌연변이종 과발현 및 정제

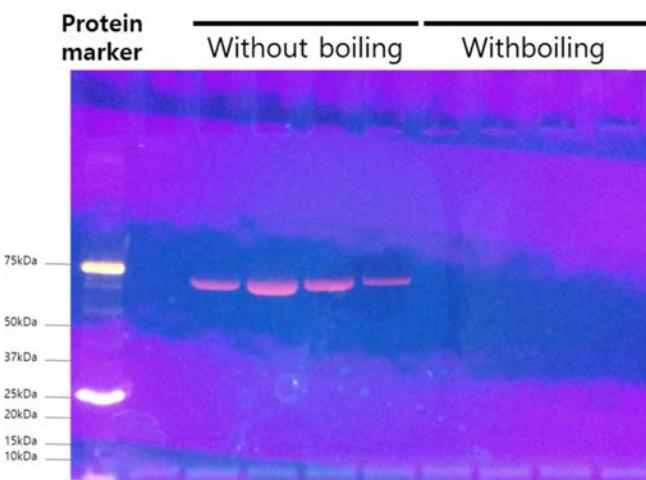


<그림. PKM2-R399A_E418A mutant 과발현 및 정제>

- PKM2의 oligomerization에 영향을 많이 미칠 것으로 예상되는 PKM2-R399A_E418A를 C41(DE3)에서 과발현 시켜 wild type PKM2와 동일한 방법으로 정제함

(다). 형광 PKM2 플라스미드 제작 및 발현 정제

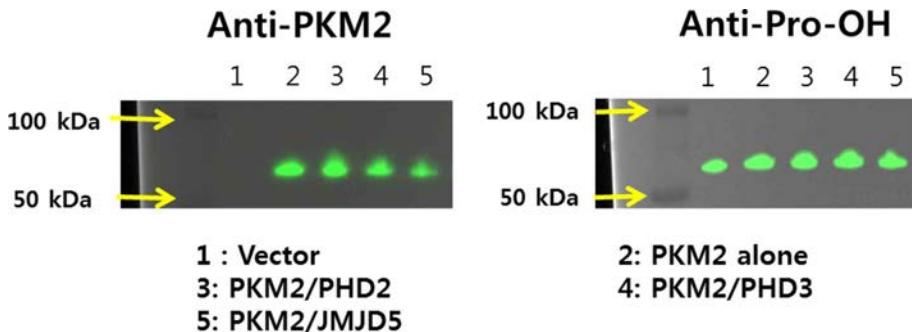
- His-mCherry-PKM2/pET28b 플라스미드 제작 후 C41(DE3)에서 발현 및 정제 실시. OD 0.6에서 1 mM IPTG Induction 후 lysis하여 Ni-NTA 정제후 size exclusion chromatography로 정제함.
- 정제된 단백체는 mCherry의 발현에 의해 붉은색을 띠며 끓이지 않은 sample은 UV 하에서 형광을 보이고 끓인 sample은 m-Cherry의 형광 chromophore가 파괴되어 형광이 사라짐을 관측함 (그림)

Purified His-mCherry-PKM2

<그림. 정제된 His-mCherry-PKM2의 SDS-PAGE 결과 (mCherry의 형광을 UV로 확인한 결과)>

(7) PKM2 수산화 반응 탐색

- 수산화된 PKM2 확보를 위해 기존 (1차년도) 제작된 플라스미드, pET28b_PKM2-PHD2, pET28b_PKM2-PHD3, pET28b_PKM2-JMJD2를 C41(DE3)에서 과발현 시킨 후 lysate에서 판매중인 Pro-OH 항체를 이용하여 Western blotting을 통해 확인 (그림)



<그림. Prolyl hydroxylase에 의한 PKM2의 수산화 연구>

- 그림에서 보여진 바와 같이 벡터를 제외한 모든 세포에서 PKM2가 발현된 것을 anti-PKM2 항체를 이용해 탐지 함
- Anti-hydroxylated Proline (Anti-Pro-OH) 항체는 벡터와 모든 sample에서 동일한 위치에서 하나의 단백체를 탐지하며 이러한 신호는 PHD2, PHD3, 혹은 JMJD5의 과발현 여부에 관계없이 탐지되는 신호임으로 비록 논문에 PHD3가 PKM2를 수산화시키는 효소로 제안되어 졌어나 (*Cell.* 2011 May 27;145(5):732-44.) 대장균에서 PHD2, PHD3, JMJD5에 의한 PKM2의 수산화는 탐지 할 수 없음
- 대장균에서 정제한 PHD2, PHD3는 HIF-1a의 ODD domain을 수산화 시킴 (*Chem Commun (Camb).* 2015 Jul 7;51(53):10730-3)

(8) PKM2와 PKM2 저해제인 T3 및 Shikonin complex를 얻기 위한 결정화 조건 탐색

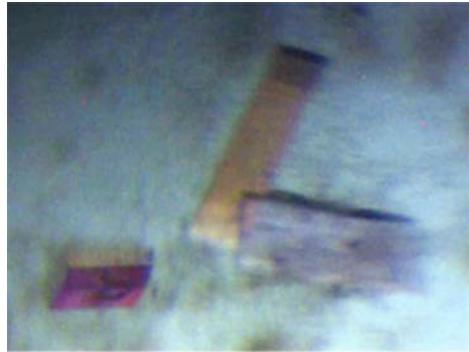
- T3 는 PKM2와 결합하여 PKM2의 oligomerization 상태를 단량체로 만들어 pyruvate kinase 활성을 저해하는 것으로 알려져 있음. Shikonin 또한 PKM2의 활성을 저해하는 분자로 알려짐.
- 분리 정제된 PKM2를 기존 문헌에 알려진 결정화 조건을 이용하여 결정화함



<그림. PKM2 결정>

- 그리고 결정화된 PKM2에 T3와 Shikonin을 soaking 시킴
- Shikonin은 붉은색을 띤 저분자 물질로서 soaking을 시키면 결정이 붉은색으로 변화며 shikonin

이 결정에 흡수/흡착되는 것이 관찰됨



<그림. PKM2 결정에 shikonin을 soaking 시킴>

- 결정으로 포항 가속기 연구소에서 2.4 Å, 2.9 Å, 2.3 Å 회절 data를 얻음
- 얻은 회절 data로부터 구조 분석을 수행하였으나 결정 속에 Shikonin이 포함되어 있지 않았음.
- T3 soaking 결정 또한 가속기 연구소에서 회절 data를 얻어 구조를 분석하였으나 T3가 포함되어 있지 않았음



<그림. PKM-2/T3 soaking crystal>

- PKM2/T3 및 PKM2/Shikonin 복합체 결정을 만들기 위해 soaking이 아닌 PKM2과 T3 혹은 Shikonin를 pre-incubation시킨 후 결정화 조건을 탐색함 (결정화 조건 탐색 kits MGSG-1 (96 조건), MGSG-2 (96 조건), MGSG-3 (96 조건), MGSG-4 (96 조건), HR2-144 Index (96 조건), HR2-082 PEGRx (96 조건) at 14 °C 그리고 19 °C, protein:mother liquor ratio = 2:1, 1:1, 96 x 6 x 2x2 = ~ 2300 조건)
- PKM2/T3 복합체 결정화 조건에서 결정화된 조건을 최적화 시도 중

(9) PKM2/PHD3복합체 구조 결정화 조건 탐색

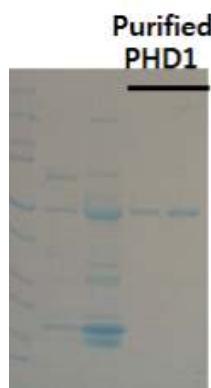
- 위에서 표기한 결정화 조건 탐색 키트들을 이용하여 ~2300 조건 탐색 함
- 이중 초기 결정화 조건을 획득하고 구조 분석을 위한 최적화 중



<그림. PKM2/PHD3 초기 결정화 조건 탐색>

(10) PHD1 정제 및 결정화 조건 탐색

- PHD1를 pET28b 백터에 삽입하여 과발현 시킨 후 NI-NTA affinity chromatography를 실시한 후 size exclusion chromatography를 통해 정제함



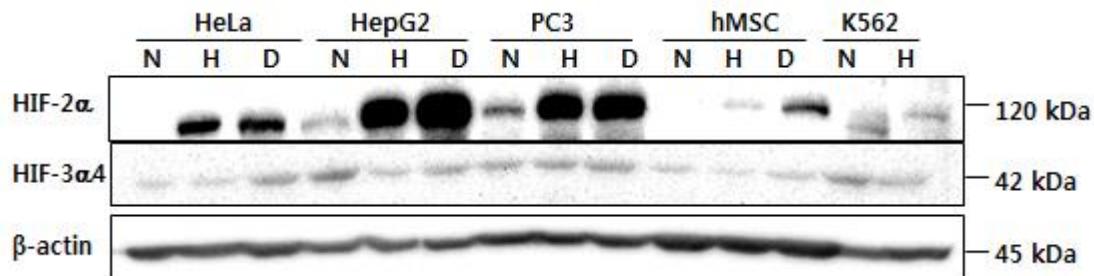
<그림. 정제된 PHD1>

- 정제된 PHD1의 결정화 조건 탐색을 위해 ~2300 조건 이상 탐색하였으나 결정화 되지 않음

나. HIF와 상호작용하는 단백체의 세포 생물학적 연구

(1) 대장암을 비롯한 다양한 세포주 내 HIF-3 α 의 산소에 따른 발현 정도 및 HIF-1 α , HIF-2 α 와의 연관성 탐색

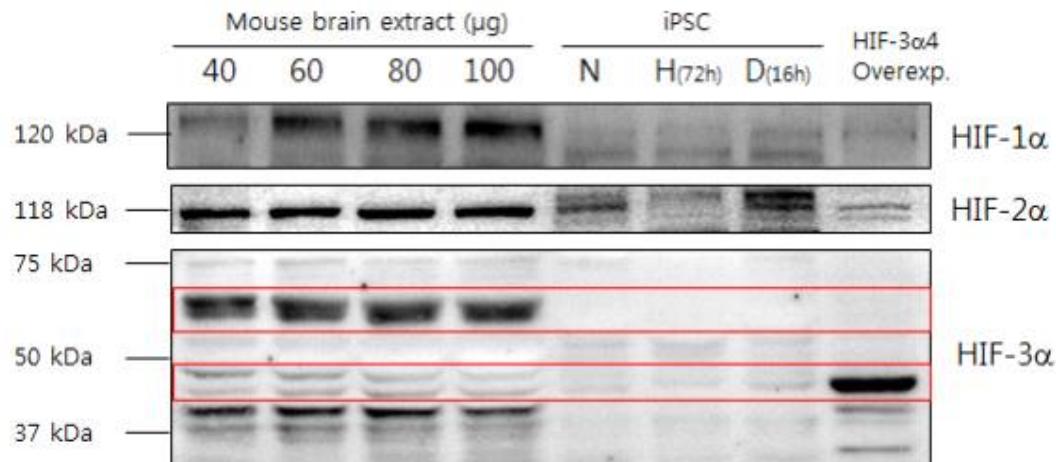
- 저산소증 관련 단백질 이성질체 중 상대적으로 연구가 많이 진행되지 않은 HIF-2 α , 와 HIF-3 α 의 발현 정도를 살펴봄. 이들 중 HeLa, HepG2, PC3 와 같은 암세포와 hMSC 줄기 세포, 그리고 부유암세포 K562 또한 포함시킴. HIF-2 α 의 경우, 세포에 따라 정상산소에서 도 발현 정도가 다름. 특히 저산소조건에서는 모두 발현양이 증가하는 현상을 보임. 그러나 HIF-3 α 의 경우 산소 농도에 민감한 ODD 도메인을 갖고 있지 않아서인지, 대부분의 경우 산소 농도와 관계없이 일정하게 항상 발현되는 것으로 나타남.
- 발현된 HIF-3 α 를 siRNA로 knock down을 시도한 후 이에 따른 HIF 이성질체들의 관계를 살펴보고자 하는 과정에서, 위에 검출한 HIF-3 α 의 경우 비특이적인 밴드인 것으로 판단하게 됨. siRNA의 특이성을 확인하고자 HIF-3 α 를 과발현시킨 후 siRNA로 silencing 되는 것을 확인하였는데, 과발현된 HIF-3 α 의 경우에는 효과적으로 knock down 됨에도 불구하고.



<그림. 여러 가지 세포주에서 HIF-2a, HIF-3a4의 발현 양상>

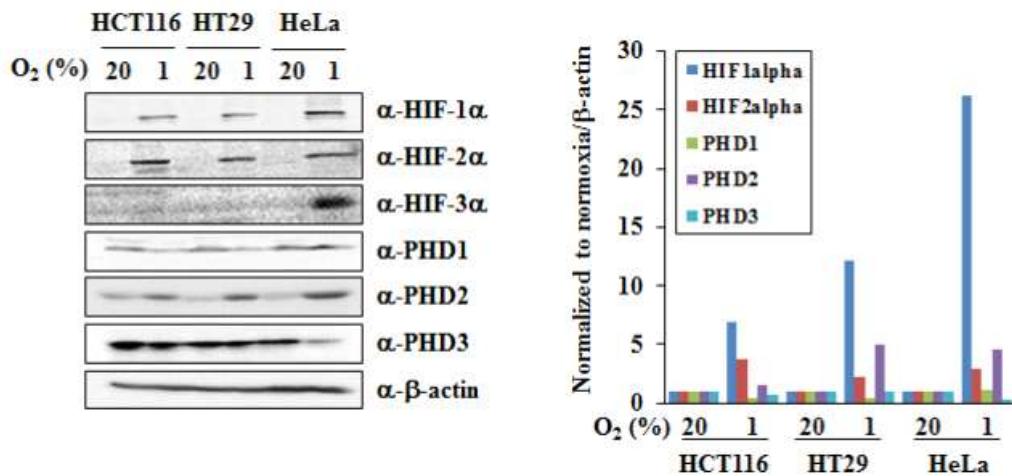
위에서 검출된 HIF-3 α 의 경우에는 knock down이 되지 않음을 확인함으로써 알 수 있었음.

- 기존의 문헌에서 HIF-3 α 의 경우 쥐의 뇌조직에서 많이 발견된다고 보고되어 있어, 이를 positive control로 사용하고자 하였음. 쥐의 뇌조직에서 각 HIF의 이성질체에 해당하는 부분에 강한 밴드들이 검출되었으나, 이에 반해 iPS의 경우 HIF-1 α , HIF-2 α 는 희미하게 검출이 되고, HIF-3 α 는 거의 검출되지 않음을 확인하였다.



<그림. mouse brain, mouse iPS에서 HIF 이성질체들의 발현 양상>

- 마지막으로 대장암 조직에서 HIF이성질체들의 발현양을 확인함. HCT116은 대표적인 후기 발암세포이며, HT29는 초기의 암세포로 알려져 있음. 상대적인 양을 비교하기 위해 HIF의 이성질체와 PHD 이성질체들의 발현 양상이 잘 알려진 HeLa 세포를 함께 살펴봄.
- 그림에서 보듯이 HIF-1 α , HIF-2 α 의 경우 대장암 세포에서 모두 저산소증일 경우에만 발현되는 양상을 보였음. HIF-3 α ,의 경우에는 HeLa 세포에서 저산소증일 경우에만 관측되었고, 대장암세포는 초기, 후기와 관계없이 항상 관측되지 않는 양상을 보임.
- 따라서 기존에 알려진 바와 비슷하게 HIF-3 α 의 경우 대부분의 암세포에서는 존재하지 않는 것으로 결론을 내림. 또한 기존에 강하게 발현된다고 알려진 iPS hMSC 같은 줄기세포에서도 발현되지 않음을 확인함.
- 이러한 단백질 발현 양상은 여러 가지 다른 회사의 항체를 이용한 실험에서도 비슷한 결과를 얻음.

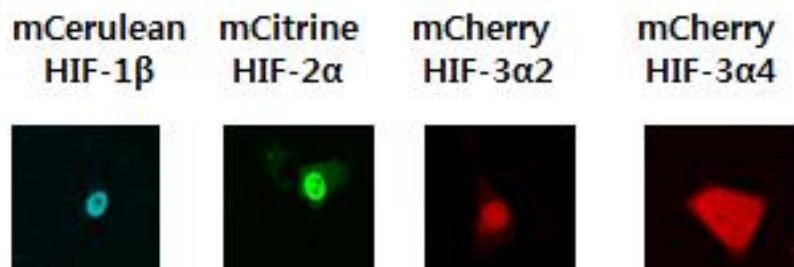


<그림. 대장암 세포에서 HIF 이성질체와 PHD 이성질체들의 발현 양상>

- 결국 HIF-3α의 독립적인 역할에 관한 논문이 많이 보고되어지고 있음에도 불구하고, 이들 중 항체를 이용한 단백질 수준의 검출을 이용한 실험 결과는 믿기 어려운 것으로 판단됨.

(2) HIF 이성질체들의 발현 및 세포내 위치탐색

- HIF 이성질체들 간의 결합을 형광 에너지 전달 현상으로 측정하기 위해 형광 단백질을 표지한 HIF 이성질체들을 발현하는 플라스미드를 제작하였고, 이를 실제 세포내에서 발현함으로써 발현 정도 및 발현 양상을 확인함.
- HIF-1β의 경우 산소조건과 관계없이 항상 핵내에만 존재하는 것을 확인.
- HIF-2α의 경우 PC3, HepG2 등의 세포에서 정상산소 조건에서도 발현되는 것을 확인하였고, 이를 실제 세포에서 관찰한 결과, 핵 안과 세포질 동시에 관찰되다가 저산소 조건에서 핵으로 이동하는 것을 확인함.
- HIF-3α의 경우 산소에 의존하는 ODD 도메인이 있는 HIF-3α2인 경우 HIF-2α와 마찬가지로 핵과 세포질에 존재하던 HIF-3α2가 저산소 조건일 때 핵으로 이동하는 것을 확인하였고. HIF-3α4인 경우에는 산소농도에 관계없이 핵과 세포질에 고루 퍼져서 존재함을 확인하였음.
- 이를 기반으로 HIF-2α와 HIF-1β의 결합을 실시간으로 확인하고, HIF-3α 이성질체들이 이들의 결합에 어떠한 영향을 끼치는지 여부를 FRET으로 실험 할 계획임.



<그림. PC3 세포내 저산소 조건일때 HIF 이성질체들의 세포내 localization>

(3) 세포내에서 PKM2 단량체/ 다량체 구분 방법 모색

- PKM2의 세포내 단량체-다량체 변화 동력학을 살펴보는 형광학적인 도구를 만들고자 방법을 모색함.
- 그 중에서도 세포내에서 특정 아미노산 서열에 반응하는 FlAsH 염료를 사용하기로 계획하고, FlAsH와 반응할 수 있는 Tetracysteine motif을 갖는 PKM2 돌연변이를 제조함. 이 때 tetracysteine motif는 PKM2의 tetramer 형성시 dimeric interface에 존재하게 됨. 따라서 PKM2의 단량체, 혹은 다량체로의 변화에 따라 FlAsH의 염색정도도 다를 수 있기를 기대함. 이렇게 된다면 PKM2의 단량체 혹은 다량체만을 선택적으로 염색할 수 있으므로 세포내 위치 및 단량체-다량체 동력학을 실시간으로 확인할 수 있는 획기적인 방법이 될 것으로 기대함.

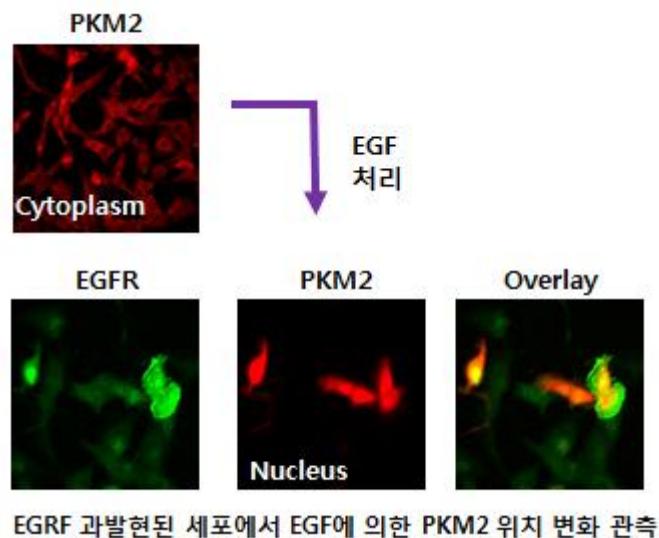


<그림. FlAsH 구조 및, 염색된 PKM2의 native gel 사진>

- 우선 대장균에서 FlAsH에 반응하는 tetracysteine을 포함한 PKM2 돌연변이를 과량으로 제조, 정제 후, 이를 *in vitro*에서 FlAsH에 반응시켜봄.
- 이때 단량체-다량체 변화를 위해 단량체로 존재하게 하는 T3 호르몬과 FBP를 함께 처리한 PKM2와 그렇지 않은 PKM2를 함께 비교함.
- 실험결과 control에 비해 T3를 넣은 경우 단량체 (monomer)로 존재하여 native gel에서 running 정도가 다른 것을 확인하였고, control과 FBP는 다량체 (tetrameric) 상태로 존재하는 것을 확인함.
- 이때 FlAsH를 처리한 경우 모든 밴드에서 FlAsH의 형광을 나타냄. 즉, PKM2의 단량체 혹은 다량체로써의 변화와 상관없이 FlAsH가 항상 염색되는 것을 확인함. 따라서 원래 계획하였던 세포내에서 단량체, 다량체 변화를 확인하는 도구로 사용될 수는 없음.
- 그러나, *in vitro*에서 PKM2를 선택적으로 염색할 수 있으므로, 이를 이용하여 단분자 형광으로 단량체-다량체 변화를 모색하는데 사용할 수 있으리라 기대함.

(4) 세포 신호에 따른 PKM2의 세포 내 위치 변화 추적

- 세포 신호에 따른 PKM2의 단량체, 다량체 등의 변화가 생기고 이에 따라 세포질 혹은 핵으로의 이동이 달라진다고 보고되어 있음. 예를 들면 EGF signaling에 의해 PKM2의 인산화가 이루어지면, 세포질에서 tetramer로 존재하던 PKM2가 dimer로 바뀌면서 핵으로 들어가는 것으로 알려짐.
- 이러한 세포내 위치 추적이 가능한지 여부를 PKM2-mCherry로 확인하고자 하였음.
- 우선 EGFR를 과량으로 발현시킨 세포에서 EGF를 처리하기 전 PKM2의 분포를 살펴보면 대부분 세포질에 존재하는 것을 확인 할 수 있었음.
- 그러나, EGF를 처리하게 되면 EGFR이 과발현되어 초록색 형광으로 나타나는 세포에서만 PKM2의 형광이 핵으로 이동하는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서 EGF 세포신호에 따른 PKM2의 위치추적이 가능함을 확인하였고, 이를 이용하여 PKM2의 위치변화를 좀 더 용이하게 관측하고자 하여, 현재 EGFR를 과량으로 발현하는 세포를 stable cell line으로 구축하고 있음.



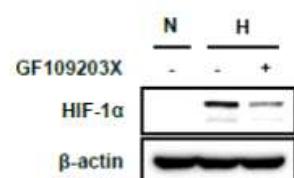
<그림. 세포신호에 따른 PKM2 위치변화 추적>

(5) siRNA kinase/ phosphatase assay screening test 결과를 기반으로 HIF-1 α regulator candidate 선택 및 확인 실험

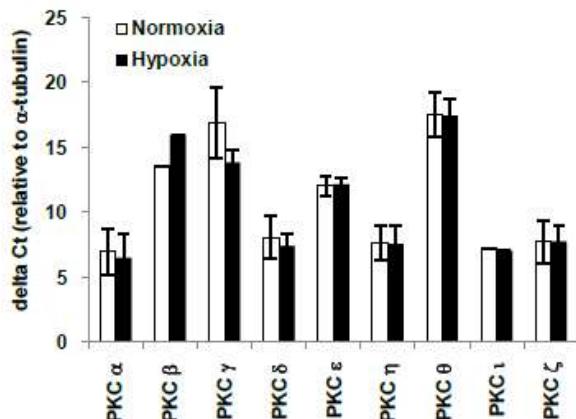
- 세포에 715개의 키나아제에 대한 siRNA를 처리한 후 저산소 상태에서의 HIF1- α 의 활성 변화를 확인한 결과로 HIF1- α 의 활성을 30%이상 증가 또는 감소시키는 키나아제를 확인한 후 그중에서도 PKC family에 주목함

(가) HIF-1 α 의 활성에 있어서 protein kinase C의 역할분석

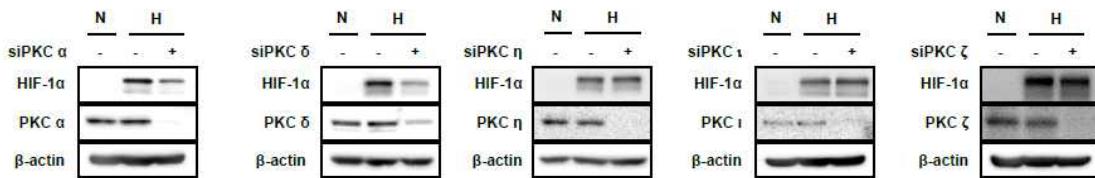
- Serine-threonine kinase인 protein kinase C family (PKC)는 mitogenic stimuli, inflammatory stimuli와 같은 다양한 자극에 의해 활성화 되며 세포의 성장 억제, 분화, 사멸에 관여함.
- PKC inhibitor인 GF109203X는 HeLa cell에서 저산소 상태 (37°C, 1 % O₂에서 18 시간 처리)에서 HIF-1 α 의 발현을 억제시킴. 이를 통하여 저산소 상태에서 PKC가 중요한 신호 매개체로 작용하여 HIF-1 α 의 발현을 조절한다고 사료됨.
- PKC isoform들은 각기 다른 조직과 세포에서 다양한 세포 신호로 반응하기에 HeLa cell에서 PKC isoform들의 발현 정도와 저산소 상태에서 PKC isoform들의 발현 변화를



<그림. GF109203X에 의한 저산소 상태에서의 HIF-1 α 의 발현 변화>

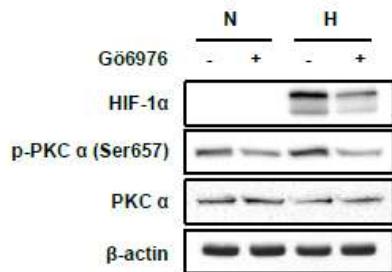


<그림. PKC isoform들의 발현 변화>

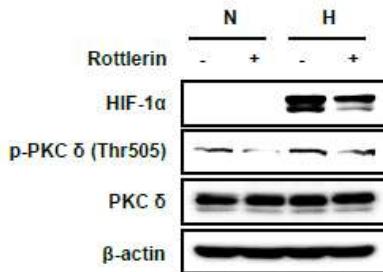


<그림. PKCα, δ, η, ι, ζ 각각의 siRNA에 의한 저산소 상태에서의 HIF-1α의 발현 변화>

A



B



<그림. PKCα, δ inhibitor들에 의한 PKC 활성 억제 및 HIF-1α의 발현 억제>

가 증가함을 통하여 확인하였으며, 저산소 상태에서 증가한 PKC의 활성이 각각의 inhibitor들을 처리하였을 때 감소하는 것을 확인함. 그리고 저산소 상태에서 증가한 HIF-1α의 발현이 각각의 inhibitor에 의하여 감소하는 것을 확인함.

- PKCα, δ의 발현 억제가 저산소 상태에서 HIF-1α의 활성 또한 억제시킴을 HRE reporter gene assay 및 HIF-1α의 target 유전자인 VEGF의 발현 억제를 통하여 확인함.
- PKCα, δ가 저산소 상태에서 HIF-1α의 전사에 영향을 주는지 알아봄. 그 결과 PKCα의 억제는 HIF-1α의 전사에 영향을 주지 않았으며, PKCδ siRNA 및 Rottlerin을 처리하였을 때 HIF-1α의 mRNA level이 억제되는 것을 확인하였음. 이를 통하여 PKCα, δ는 각각 다른 신

- HeLa cell에서 발현이 높은 PKCα, δ, η, ι, ζ의 siRNA를 이용하여 저산소 상태에서 HIF-1α의 발현에 영향을 미치는지 PKC isoform을 확인한 결과 PKCα, δ의 발현 억제에 의해서만 저산소 상태에서 HIF-1α의 발현이 감소되는 것을 확인함.

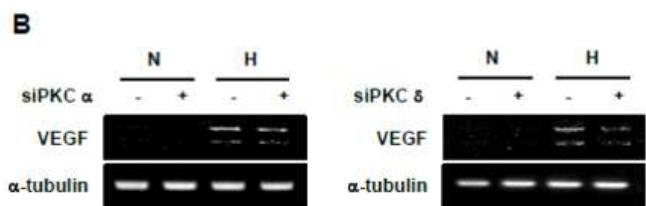
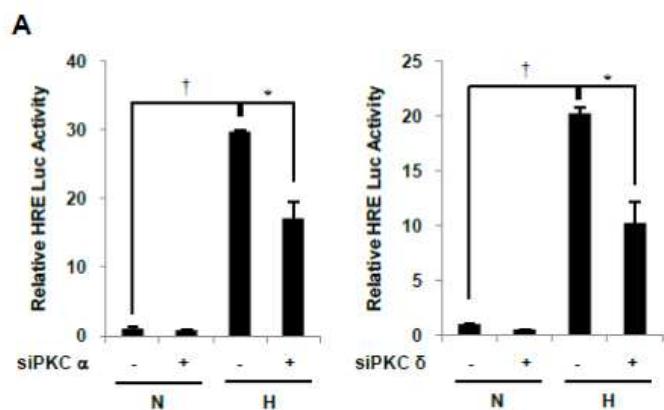
- PKCα, δ의 활성이 저산소 상태에서의 HIF-1α의 발현에 중요한지 확인하기 위하여 PKCα, β inhibitor (Gö6976)와 PKCδ inhibitor (Rottlerin)를 각각 처리하여 확인 함. 그 결과 저산소 상태에서 PKCα, δ의 활성이 약하게 증가함을 PKCα, δ의 인산화

호기작을 통하여 HIF-1 α 의 발현에 관여함을 알 수 있음.

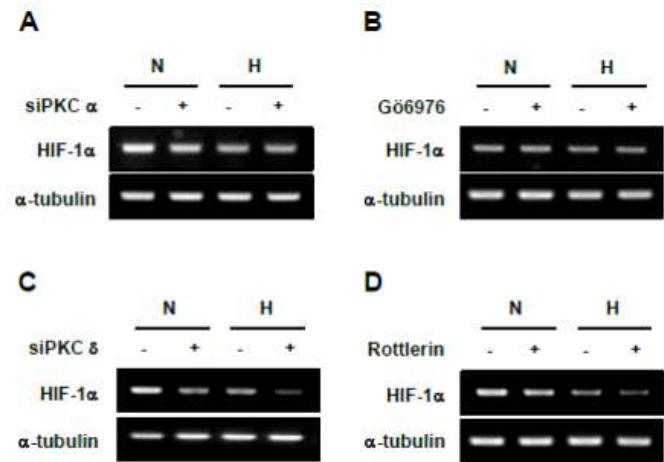
(나) HIF-1 α 의 발현에 영향을 미치는 PKC α 와 PKC δ 의 신호기전 연구

PKC α 는 PI3K-AKT-mTOR-p70S6K 신호기전을 통해서 HIF-1 α 의 translation에 관여함

- PKC α 가 HIF-1 α 의 degradation과 관련이 있는지 확인하기 위하여 proeasome 억제제인 MG132를 처리 해 본 결과 PKC α 는 HIF-1 α 의 degradation에는 영향이 없었음.
- PKC α 가 PI3K-AKT-mTOR-p70S6K 신호기전을 통해서 HIF-1 α 의 translation에 영향을 주는지 확인해 보았음. 그 결과 PKC α 억제에 의하여 저산소 상태에서 증가된 AKT의 활성이 감소되는 것을 확인하였으며, mTOR-p70S6K 신호기전 또한 감소하는 것을 관찰하였음.
- PI3K 억제제인 LY255283을 처리하였을 때 mTOR-p70S6K의 활성이 감소하였고, 이 때 HIF-1 α 의 발현 level이 감소하는 것을 확인함.
- LY255283은 HIF-1 α 의 mRNA level에는 영향을 주지 않음.
- PI3K 억제제인 LY255283이 PKC α 의 활성에 영향을 주지 않는 것으로 보아 PKC α 가 PI3K-AKT의 상위에 존재함을 알 수 있음.



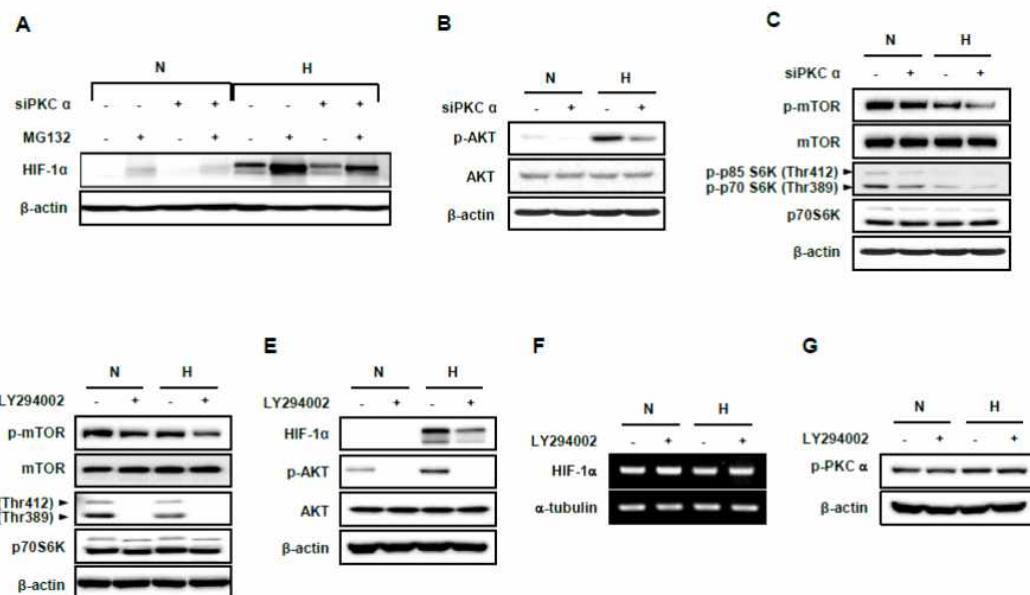
<그림. PKC α , δ 각각의 siRNA에 의한 저산소 상태에서의 HIF-1 α 의 활성 변화 및 VEGF의 mRNA level 변화>



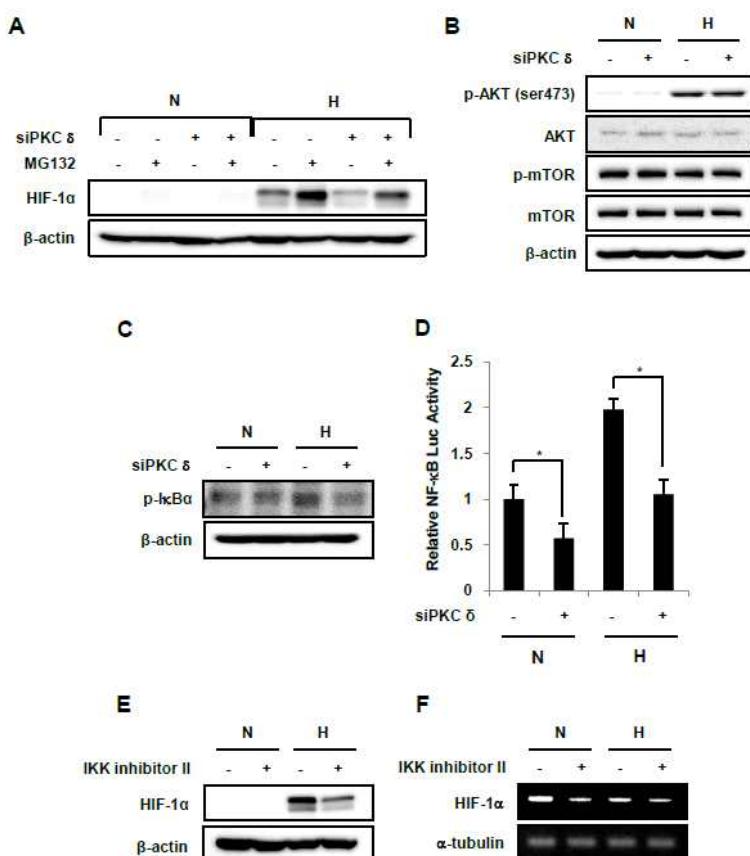
<그림. PKC α 혹은 PKC δ 억제에 의한 HIF-1 α mRNA level 변화 양상>

PKC δ 는 NF- κ B의 활성조절을 통하여 HIF-1 α 의 transcription을 조절함

- PKC δ 가 HIF-1 α 의 degradation과 관련이 있는지 확인하기 위하여 proeasome 억제제인 MG132를 처리 해 본 결과 PKC δ 는 HIF-1 α 의 degradation에는 영향이 없었음.
- PKC δ 가 PKC α 처럼 PI3K-AKT-mTOR 신호기전을 통해서 HIF-1 α 의 translation에 영향을 주는지 확인본 결과 PKC δ 는 저산소 상태에서 PI3K-AKT-mTOR의 활성에는 영향을 주지 않았음.



<그림. PKC α -PI3K-AKT-mTOR-p70S6K 신호기전을 통한 HIF-1 α 의 translation 조절>



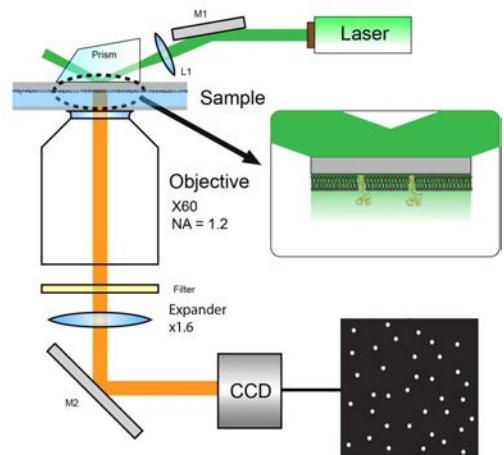
<PKC δ -PNF-κB 신호기전을 통한 HIF-1 α 의 transcription 조절>

- PKC δ 억제시 HIF-1 α 의 전사인자로 알려져 있는 NF-κB의 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, NF-κB reporter gene assay를 통하여 재확인 함.

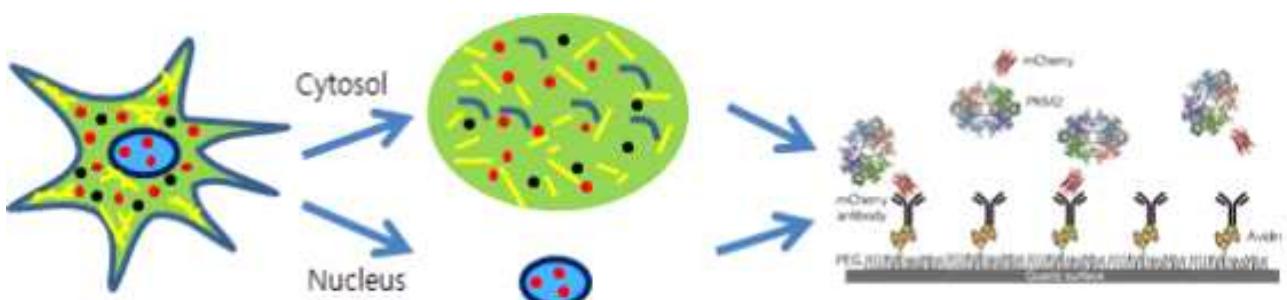
- IKK inhibitor 처리를 통한 NF-κB의 활성 억제시 HIF-1α의 발현이 감소하고, HIF-1α mRNA level 또한 감소하는 것을 확인함으로써 PKCδ에 의한 NF-κB의 활성 조절이 저산소 상태에서 HIF-1α의 발현에 영향을 주는 것을 확인함.

(6) PKM2의 단량체/다량체 변화 관측을 위한 단분자 분광학

- 정제되지 않은 단백질의 단분자 상호작용을 관찰하기 위해 저노이즈 전반사 형광 현미경 (Total Internal Resonance Fluorescence Microscope: TIRF 현미경)를 셋업하고 세포질(Cell lysate) 상태의 단백질 샘플을 적용하여 새로운 비정제 단백질을 위한 단분자 관측 플랫폼을 개발함.
- 개발된 세포 발현 단백질의 단분자 관측 플랫폼의 경우 형광 단백질이 부착되고, 발현된 타겟 단백질을 형광 단백질의 항체를 이용하여 관측하고자 하는 유리기판에 고정하여 저노이즈 TIRF 현미경을 이용하여 단분자 수준에서 관측하는 방법임.
- PKM2 단백질에 형광 단백질인 mCherry가 부탁된 단백질을 세포에 미리 발현하여 준비함.
- PKM2 단백질을 관측하기 위해 non-specific binding을 최소로 하는 PEG표면 처리된 마이크로 채널을 제작. 이때 PKM2-mCherry 단백질을 표면에 고정하기 위해 mCherry antibody를 표면에 고정함.
- PKM2-mCherry가 발현된 세포를 그림과 같이 cell lysate 상태로 준비하여 mCherry antibody와 binding함. 이때 항원 항체 반응을 통해 mCherry 형광단백질 이외의 기타 세포 물질들의 nonspecific binding은 최소로 함.



<그림. 전반사 형광 현미경의 셋업과 그 모식도>

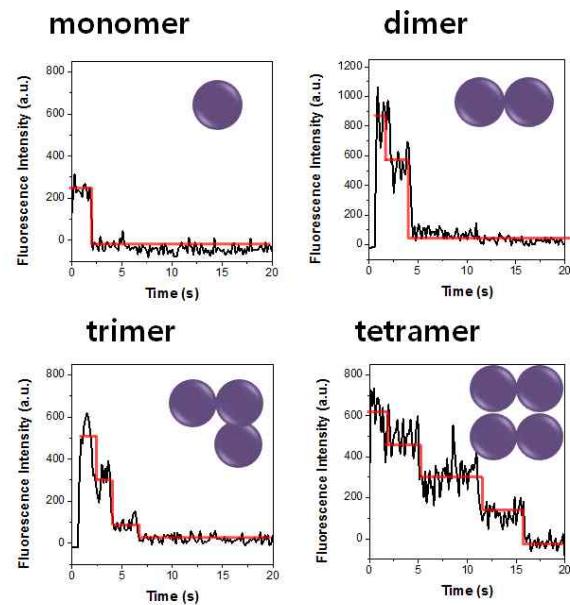


<그림. 단분자 co_IP방법을 이용한 관측 방법>

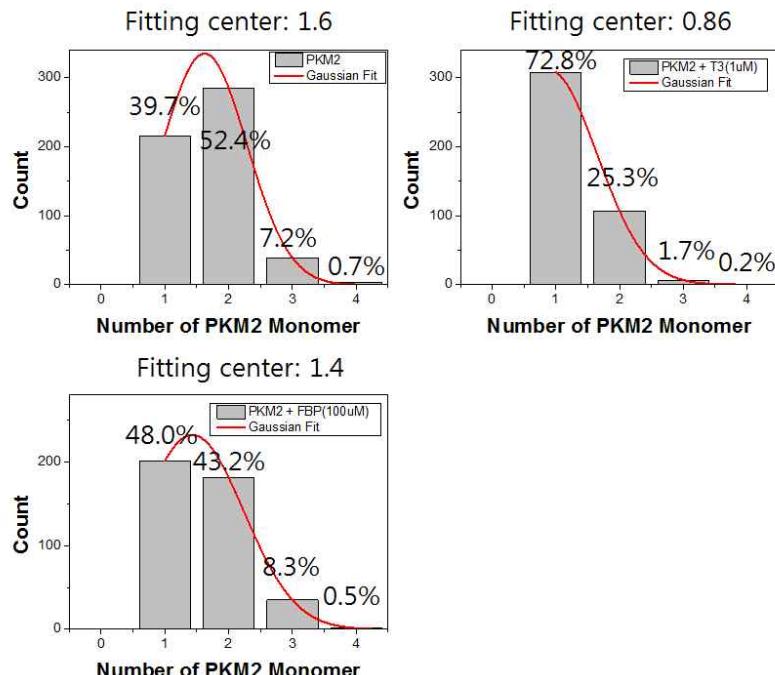
- 표면에 고정된 PKM2-mCherry 단백질을 TIRF 현미경을 이용하여 실시간으로 형광 신호를 관측. 단일 형광 단백질의 경우 bleaching이 일어날 때 한 개의 step으로 표현되므로 bleaching step의 개수를 측정할 경우 PKM2 단백질이 Oligomerization이 일어난 정도를 정량화 할 수 있음.
- 이 방법을 이용하여 PKM2에 작용한 metabolic effector에 의한 PKM2의 oligomerization을

관측함. 사용된 effector는 thyroid hormone activator(fructose-1,6-bisphosphate, F16BP)임.

(triiodo-L-thyronine, T3)과 allosteric



<그림. Bleaching test를 통한 PKM2의 oligomerization 구분>



<그림. Cytosol에서 Metabolic effector인 T3와 FBP와의 상호작용으로 인한 PKM2의 Oligomerization 변화 관찰>

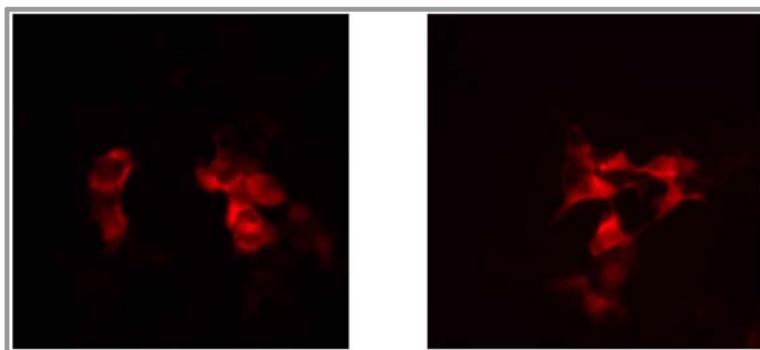
- 아무런 effector가 없을 경우에는 약 40%정도가 한 개의 PKM2 monomer를 갖고 0.7%의 PKM2 monomer가 tetramer를 이룸. 이를 gaussian fitting을 통해 중심값을 구하면 평균값

1.6을 갖는 분포도를 갖음. 일반적으로 PKM2 단백질은 환경에 따라 dimer 또는 tetramer를 이루다는 보고가 있음.

- 이에 반해 T3 처리할 경우 PKM2의 oligomerization이 풀어져 대부분이 (70% 이상) monomer로 존재함을 관측할 수 있음.
- F16BP의 경우에는 아무 처리도 하지 않은 경우와 마찬가지의 결과를 보임. 이는 기존의 결과와 일치함.
- 개발된 platform을 이용하여 저산소증 관련 단백질들과의 상호작용을 단분자 수준에서 관찰 할 예정임.

(7) 생체 내 PKM2 oligomerization 상태 모니터링을 위한 shRNA 내성을 갖는 PKM2 전달 및 endogenous PKM2 depletion 확립

- 1차년도에 PKM2의 oligomerization 상태를 단분자 수준에서 검출하기 위한 실험을 수행한 결과 tetramer를 이뤄야 하는 조건임에도 실제로 분석한 단분자 결과는 tetramer가 아닌 dimer 혹은 monomer로 존재하는 것처럼 보임.



<그림. HEK293T 세포 내 RNAi 저항성 mCherry-rPKM2의 발현>

- 이는 분자의 개수를 mCherry로 세어나가기 때문에 내제된 (endogenous) PKM2 단백질과 mCherry 형광으로 표지된 PKM2 단백질이 함께 dimer 혹은 tetramer를 이루는 경우, 정확한 분석이 어렵기 때문이라고 여겨짐.
- 따라서 내제된 단백질의 발현을 억제하면서 형광이 달린 PKM2만 발현을 유도하는 세포주의 확립이 필수적임.
- Endogenous PKM2를 억제하기 위해 shPKM2 플라스미드 제작을 제작하기 위해 pGFP-c-shLenti vector (Origene, 미국)에 PKM2의 Exon10 부분과 상보적인 shRNA를 형성하는 시퀀스를 pGFP-c-shLenti vector에 삽입 함.

shRNA Targeting sequence : CATCTACCAC TTGCAATT A (Exon10)

- 삽입 방법 아래의 두 프라이머와 pGFP-c-shLenti vector를 주형으로 quikchange mutagenesis PCR을 통해 삽입함.

Primers

Forward : 5'-GGA AAG GAC GCG GGA TCG **CAT CTA CCA CTT GCA ATT ATC AAG AGT**

AAT TGC AAG TGG TAG ATG TTT TTT GAA GCT TGT CGA CCC TGT GGA AT-3'

Reverse : 5'-ATT CCA CAG GGT CGA CAA GCT TCA AAA AAC **ATC TAC CAC TTG CAA TTA**
CTC TTG ATA ATT GCA AGT GGT AGA TGC GAT CCC GCG TCC TTT CC-3'

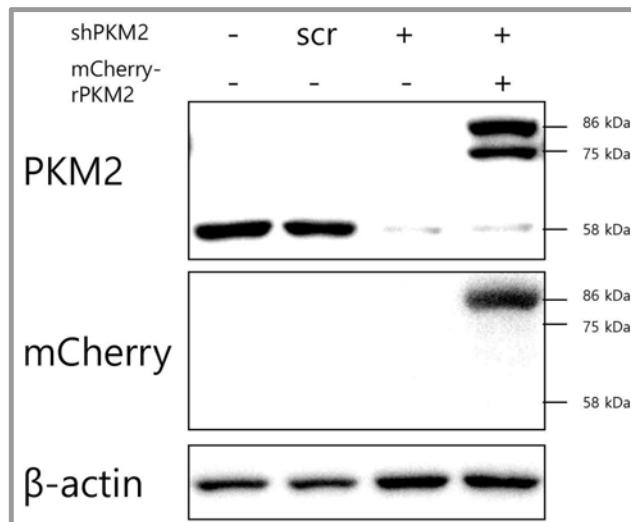
- 또한 제작된 shPKM2에 내성을 갖는 rPKM2 플라스미드 제작을 위해 기존의 mCherry-PKM2 플라스미드를 주형으로 아래 프라이머를 이용해 Site-directed mutagenesis를 통해서 제작 함.

rPKM2 primers

Forward : 5'-CAG AGG CTG CCA TCT ACC ATC TCC AAT TAT TTG AGG AAC TCC GC-3'

Reverse : 5'-GCG GAG TTC CTC AAA TAA TTG GAG ATG GTA GAT GGC AGC CTC TG-3'

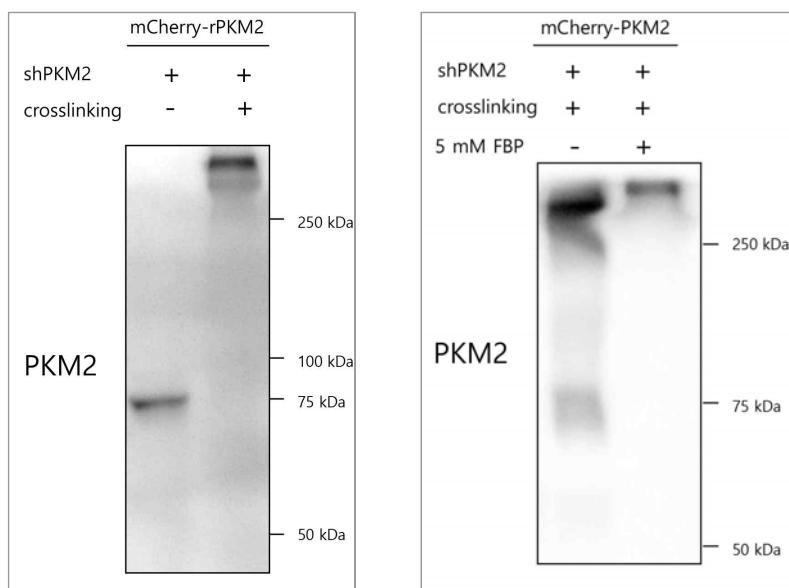
- Mutagenesis 후 시컨싱(마크로젠,한국)을 통하여 플라스미드를 확인함.
- 당해연도에는 이와같은 필요성에 의하여 PKM2를 형광으로 검출하기 위하여 형광 단백질 mCherry로 표지된 PKM2를 대장암 세포주에서 발현하고자 함.
- 이때 형광단백질이 없는 내재된 PKM2의 발현을 억제하기 위해 제작된 shRNA를 바이러스를 이용하여 세포에 주입함.



<그림. shRNA를 이용하여 내재된 PKM2를 없앤 대장암 세포주 (HT29, HCT116) stable cell line 구축>

- 위에서 발현되는 mCherry-rPKM2는 shRNA에 의해 영향을 받지 않도록 아미노산 서열은 갖지만 DNA 서열이 다른 저항성이 있는 rPKM2를 이용하였음.
- 위의 mCherry-rPKM2를 세포에 발현시킨 경우 이미 보고된 다른 일반적 세포와 유사하게 주로 세포질에만 위치하였고, 단백질 뭉침 등의 현상은 보이지 않았음.

- shRNA을 이용하여 내제된 PKM2의 발현을 억제하면서 형광 단백질이 연결된 RNAi 저항성이 있는 mCherry-rPKM2를 발현시킨 경우를 western blot으로 확인하였음. 이 때 내제 PKM2의 분자량 58 kDa 부근에서는 PKM2가 거의 효과적으로 knock-down 된 것을 확인 하였음. 또한 mCherry에 의해 증가된 분자량 85 kDa에서 mCherry-rPKM2의 과발현 정도를 확인 할 수 있었음. 이러한 세포를 특정 항생제를 이용하여 세포를 지속적으로 배양하면서 선별하여 stable cell line을 구축하였음.
- 이러한 세포에 발현된 mCherry-PKM2 단백질이 형광이 표지되지 않은 내제된 단백질과 같이 oligomerization 상태가 변화되는지 확인하기 위하여, 세포를 용해한 후 tetramer로 존재한다고 알려진 조건에서 cross-linking시켜 western blot을 수행함. 5mM의 FBP 존재하에서는 모두 tetramer로 존재하는 것으로 알려져 있는데, 실제 실험에서도 세포 용해 전 혹은 세포 용해 후 cross-linking을 하여도 5mM FBP 존재하에서는 모두 tetramer로 존재함.



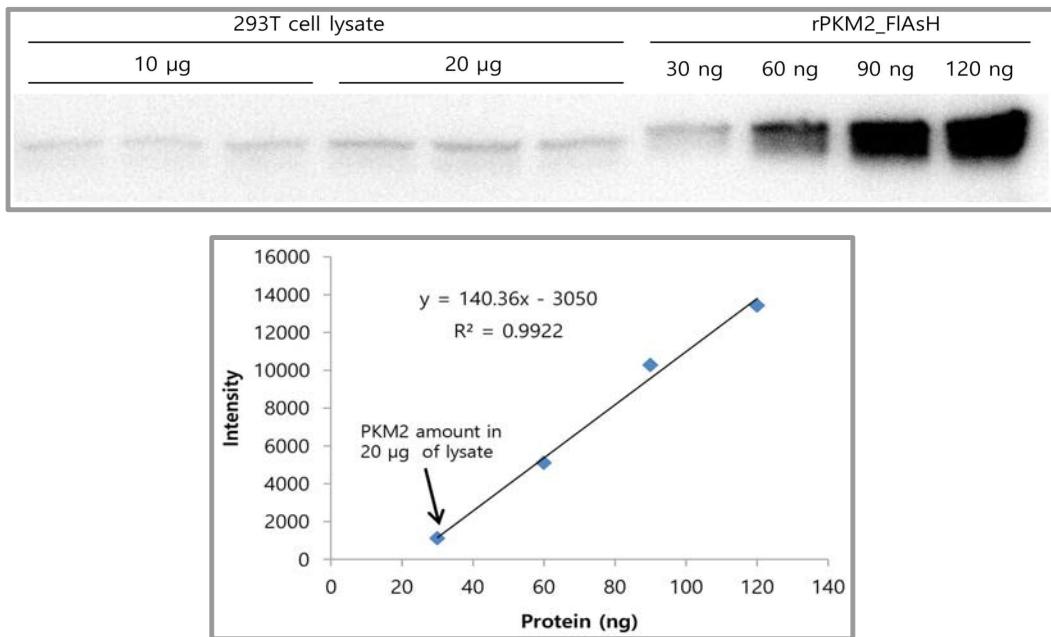
<그림. HEK293T 세포 내 RNAi 저항성 mCherry-PKM2를 crosslinking 한 후 세포를 용해한 경우(왼쪽)와 세포 용해 후 crosslinking 한 경우>

- 세포 내에서 존재하는 PKM2의 대략적인 양을 구하기 위하여 *E. Coli*에서 재조합 하여 만든 PKM2 단백질과 세포 용해물을 western blot 하여 농도에 따른 blot 세기 표준 직선을 얻었고, 세포의 용해물을 이용하여 정량한 결과 PKM2의 세포내 농도는 전체 단백질 양 대비 1-2 ng/ug 정도인 것으로 파악하였음.

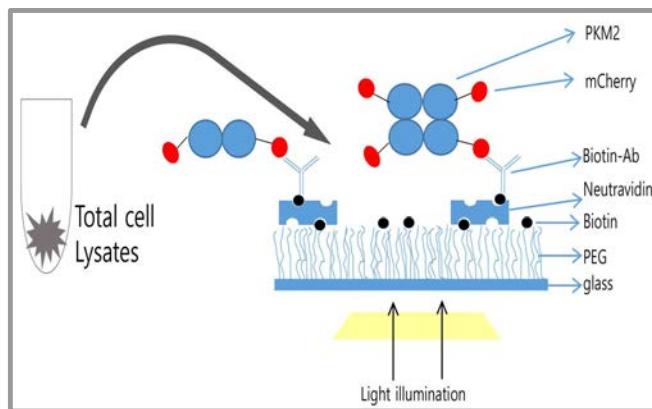
(8) 화합물을 이용한 PKM2 oligomerization 변화를 단분자 수준으로 관측

- 실제로 세포에서 발현된 mCherry-rPKM2 단백질의 대략적인 양을 구한 후 용해물의 농도를 단분자를 검출할 만큼의 수준으로 낮춘 후 mCherry-rPKM2 단분자 검출을 시도하였음. 이때 단분자 분석을 위하여 단분자 면역 침강법을 이용함. 우선 glass 위에 비특이적인 단백질의 흡착을 막기 위하여 PEG으로 코팅을 하고 아주 극 소수부분만 PEG-biotin으로 코팅하였음. 표면의 biotin을 이용하여 avidin을 결합시킨 후 biotin으로 활성화 된 RFP 항체

를 표면에 결합시킴으로써 나중에 mCherry 단백질이 포함된 mCherry-rPKM2 및 mCherry 자체를 표면에 결합하도록 설계함.



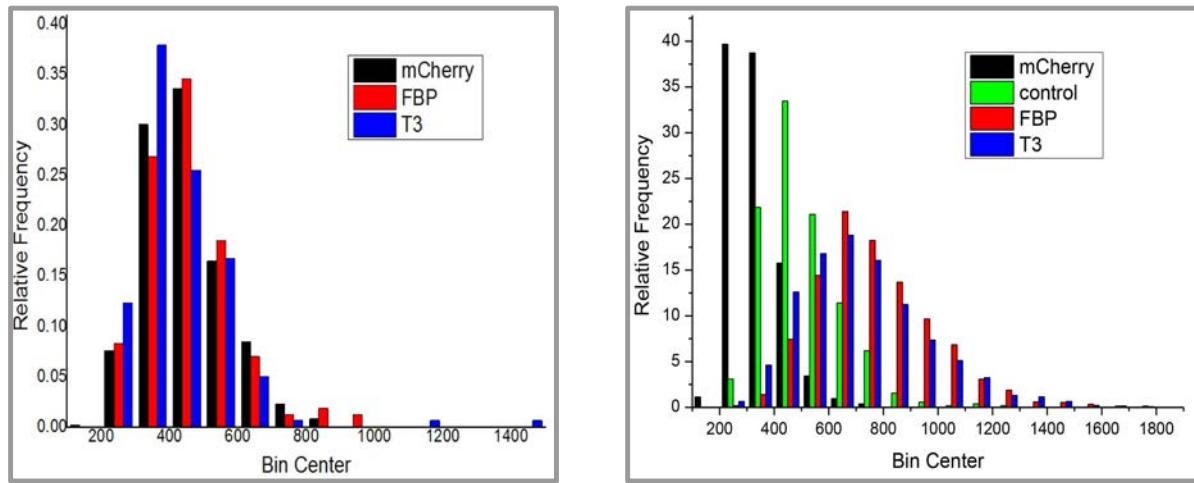
<그림. HEK293T 세포의 내재된 PKM2 정량(위)과 이에 대한 표준곡선 그래프 (아래)>



<그림. 단분자 면역침강법을 이용한 PKM2의 올리고머화 분석 방법 설명도>

- 단분자 이미징을 위해 용해물의 농도를 수 백 pM로 희석하였음. 이때 mCherry-rPKM2의 농도는 약 200 pM이었는데, 이러한 조건에서 mCherry, mCherry-rPKM2를 T3 혹은 FBP로 처리한 경우, 화합물의 처리와는 상관없이 모두 mCherry와 유사한 형광 세기를 갖는 것으로 분석되었음. 즉 이러한 낮은 농도에선 화합물의 처리와 무관하게 mCherry-rPKM2 가 monomer로 존재하는 것을 의미함.
- 이는 PKM2 tetramer의 해리상수와 관련이 있는데, 예를 들어 해리상수가 nM보다 크면 200 pM에서는 모두 monomer로 존재할 것이라 예상할 수 있음. 실제 PKM2의 tetramer의 해리상수는 보고된 바가 없지만 단분자 실험결과로 보아 pM보다는 높을 것이라는 추측이

가능함.



<그림. PKM2의 올리고머화 분석 - 내재된 PKM2 포함하지 않은 버퍼로 세포 용해물을 회석한 경우(왼쪽), 내재된 PKM2 1 nM 포함한 버퍼로 회석한 경우(오른쪽)>

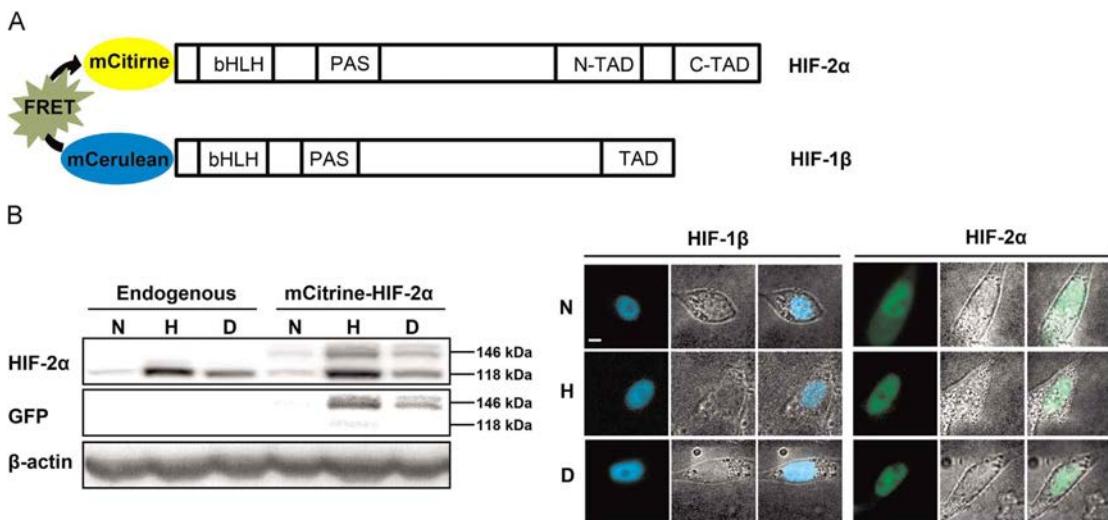
- 낮은 PKM2의 해리상수를 극복하기 위해서 mCherry-rPKM2의 농도를 뚫히는 대신 일반적인 세포 용해물과 함께 있는 내재된 PKM2 혹은 E. Coli에서 발현되는 재조합 PKM2를 이용하여 농도를 뚫혀줌. 즉 mCherry 가 달려있지 않은 PKM2 1 nM를 포함하는 버퍼로 mCherry-rPKM2를 뚫혀주면서 화합물의 침가 여부에 따를 PKM2 oligomerization 상태의 변화를 관찰하고자 함.
- 1 nM의 PKM2를 넣어서 농도를 뚫혀준 경우 mCherry만 있는 경우의 형광 세기 보다 약 1.5배 - 2배 이상으로 증가한 세기의 형광을 보이는 것으로 나타남. 즉 mCherry-rPKM2가 적어도 dimer 이상으로 존재하는 것으로 생각됨. 그러나 위의 경우에서 FBP 혹은 T3에 의한 oligomerization 상태의 변화를 확인할 수는 없었음.
- 이는 PKM2의 해리상수가 여전히 1 nM 보다 클 수 있다는 것을 시사함.
- 따라서 이를 극복하기 위해서는 PKM2의 농도를 최대한 높여서 실험을 할 필요가 있음.
- 이를 위해서 TIRF 현미경으로 조건을 바꾸고, 단백질 결합을 위한 표면 처리 과정에서 biotin의 농도를 뚫혀서 표면에 붙을 수 있는 mCherry-rPKM2의 농도를 조절하고자 함.
- 농도를 높여가면서 mCherry-rPKM2의 tetramer 형성을 볼 수 있는 조건을 확립할 예정임.

(9) HIF-2α와 HIF-1β FRET실험을 이용한 결합 측정 및 이의 변화 관측

- HIF-2α 와 HIF-1β 간의 결합을 FRET을 이용하여 살아있는 세포내에서 실시간으로 측정하고, 이들간의 결합이 다른 HIF-α isoform에 의해 어떻게 변화하는지를 살펴보고자 함. 이를 위하여 HIF-2α 와 HIF-1β에 각각 mCitrine 과 mCerulean 형광 단백질을 표지하도록 그림과 같은 플라스미드를 제조하여 이를 PC3 세포에 주입하였음.
- 이러한 형광단백질은 상대적으로 pH에 영향을 덜 받는 것으로 알려져 있어, 저산소증에 따른 pH 변화에도 광학적 성질을 유지할 것으로 기대함.
- mCitrine으로 표지한 HIF-2α 의 경우 형광단백질로 표지하더라도 단백질 고유의 성질을 유

지하는 것을 확인하기 위해 저산소 혹은 DFO에 노출하여 HIF-2 α 가 안정화되는지 살펴보았음. 그림과 같이 저산소(H)에 노출되거나 저산소와 유사하게 PHD의 활성을 막도록 DFO를 처리하게 되면 HIF-2 α 가 안정화되어 발현되는 것을 확인하였음.

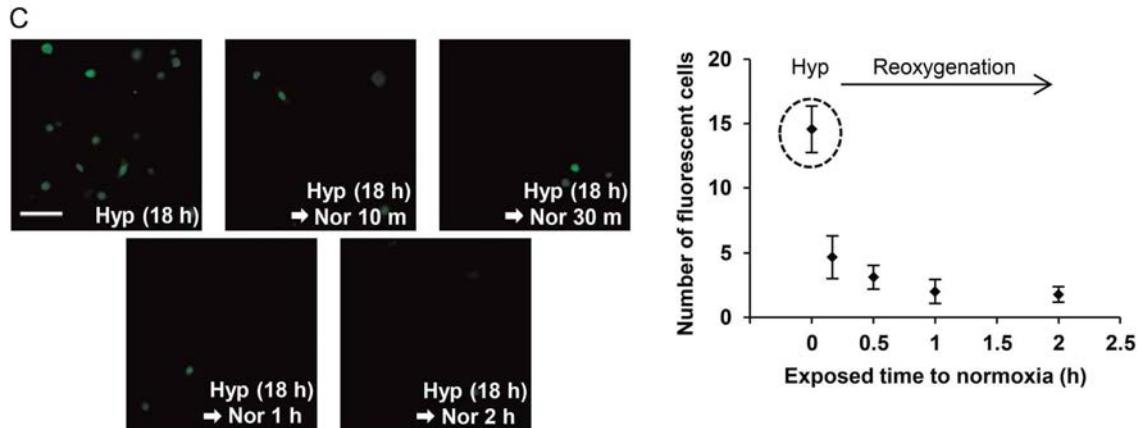
- 특히 mCitrine은 GFP의 변형이므로 GFP 항체를 이용하여 HIF-2 α 를 검출한 경우에도 mCitrine-HIF-2 α 에 해당하는 분자량에서 단백질이 검출되었고, mCitrine만 홀로 존재하는 28 kDa 분자량의 단백질은 검출되지 않는 것으로 보아, 모든 형광 단백질이 HIF-2 α 에 intact하게 표지되어 있음을 확인함.
- 또한 저산소 혹은 DFO에 노출한 경우 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 세포내 위치 단백질 분포 및 안정화 여부를 확인하고자 형광 현미경을 이용하여 확인하였음. 그림과 같이 HIF-1 β 의 경우 저산소 혹은 DFO 처리와 관계없이 항상 핵에 존재하는 것을 확인하였고 저산소 혹은 DFO를 처리하는 경우에는 모두 핵에서 안정하게 발현되는 것을 확인하였음. 이는 mCitrine을 표지하지 않은 내제 단백질과 같은 결과임.



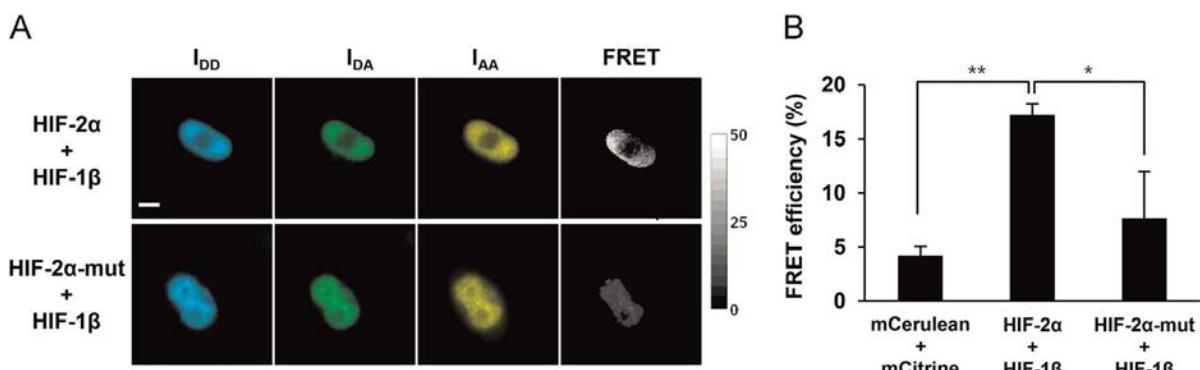
<그림. 위: 형광 단백질로 표지한 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 단백질 개요, 아래: 형광단백질로 표지한 HIF-2 α 의 산소농도에 따른 발현 정도 및 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 산소 농도에 따른 세포의 위치 변화 여부 확인>

- 마지막으로 mCitrine의 표지가 HIF-2 α 의 degradation에 영향을 주지 않음을 확인하기 위하여 저산소에서 정상산소 조건으로 변화시키면서 HIF-2 α 의 degradation kinetics를 측정하였음. 형광 현미경을 이용하여 HIF-2 α 를 발현하는 세포의 개수를 일정한 영역에서 세어보면서 확인한 결과, 표지하지 않은 내제된 단백질과 유사하게 HIF-2 α 가 degradation 하는 것을 확인하였음.
- 위의 실험 결과들을 종합하면 표지된 단백질들이 내제된 단백질과 똑같이 산소 농도에 반응하여 발현되고 조절되는 것을 보여줌.
- HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합여부를 측정하기 위하여 FRET 효율을 계산하였음. 이 때 FRET 효율은 $I_{DA} - (\alpha_D I_{DD}) - (\alpha_A I_{AA})$ 로 계산하였음. I_{DA} 는 형광 주계 (donor, mcitrine-HIF-1 β)를 여

기시켰을 때 형광 받게 (acceptor, mCitrine-HIF-2 α)의 형광세기, I_{AA} 는 형광 받게를 여기시켰을 때 형광 받게의 형광세기를 나타내며, a_D 는 형광주게의 형광 받게 파장으로의 leakage, a_A 는 형광받게의 형광 주게 파장으로의 leakage를 의미함.



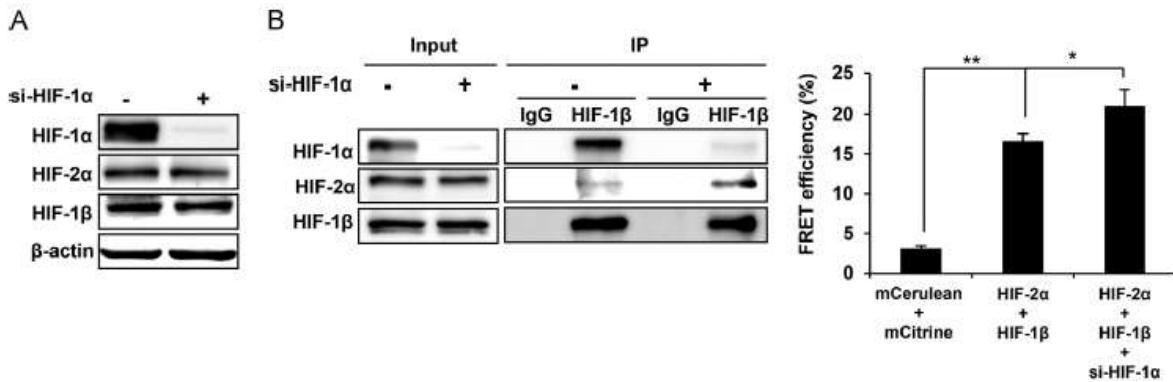
<그림. 저산소에서 정상산소로 변화함에 따라 mCitrine이 표지된 HIF-2 α 의 degradation kinetics 측정>



<그림. HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 FRET 측정을 위한 형광 세기 관측 및 이들간의 FRET효율 측정>

- HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 FRET 효율은 약 18% 정도로 이를 기준으로 두 단백질간의 거리를 계산하면 약 6.9 nm로 예상됨.
- 한편 HIF-1 β 와 결합력이 매우 낮게 나타나는 돌연변이를 재조하여 이와 HIF-1 β 의 결합을 FRET으로 측정한 결과, 약 8%로 나타남. FRET이 전혀 존재하지 않는 mCitrine-mCerulean의 경우보다 약간 높은 값으로 이들의 결합이 미약하나마 존재하는 것으로 생각됨.
- 위의 결과를 종합하면, FRET 효율 측정으로 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합정도를 확인할 수 있음을 확인함.
- 다음으로 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합이 HIF-1 α 의 존재 여부에 따라 어떻게 영향을 받는지 살펴보고자 하였음. 이를 위하여 HIF-1 α siRNA를 처리하여 HIF-1 α 의 발현양을 조절하면서 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합을 immunoprecipitation (IP)과 FRET 효율로 동시에 확인하였음.

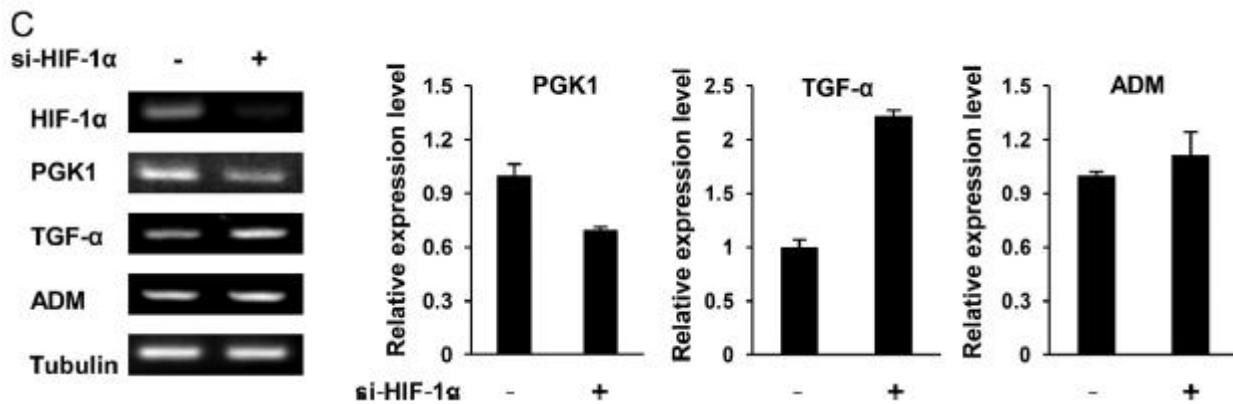
- 우선 HIF-1 α 의 발현이 siRNA 처리에 따라 억제되는지 여부를 확인하고자 siRNA를 처리하고 각각의 HIF isoform들의 발현 정도를 확인하였음. HIF-1 α 의 siRNA는 다른 HIF isoform의 발현을 간섭하지 않으면서 HIF-1 α 만 상대적으로 발현을 억제함을 확인함.



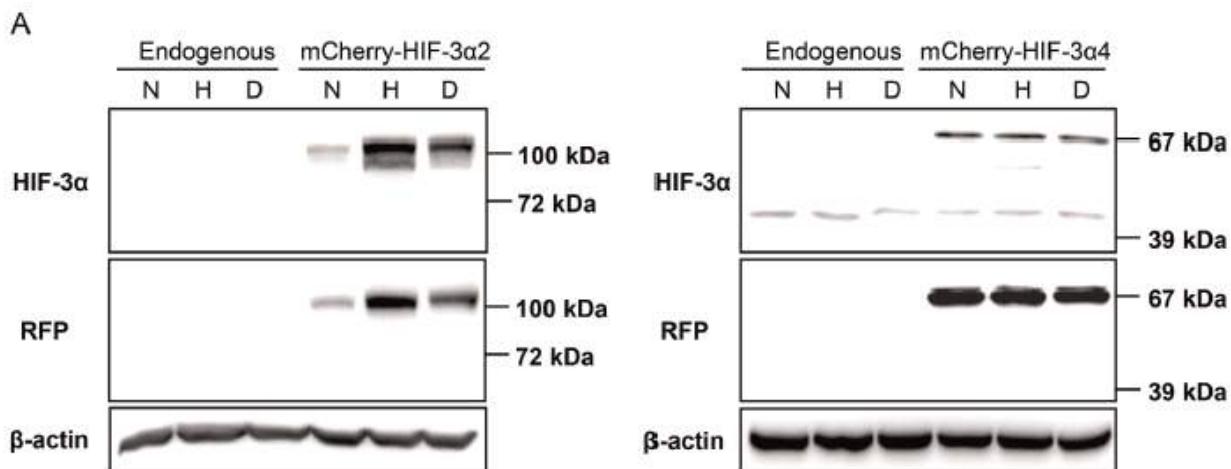
<그림. 왼쪽:HIF-1 α 의 siRNA 처리에 따른 HIF isoform의 발현 변화, 가운데: HIF-1 α siRNA를 처리한 경우 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합과 HIF-1 α 와 HIF-1 β 의 결합정도 변화, 오른쪽: 이 때의 FRET 효율 측정>

- HIF-1 α siRNA를 처리하지 않은 경우 HIF-1 α 와 HIF-1 β 의 결합시 상대적으로 강하고, HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합은 상대적으로 약한 것을 IP로 확인할 수 있었음. HIF-1 α siRNA를 처리하여 HIF-1 α 의 발현양을 줄이게 되면 상대적으로 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합이 증가함을 확인하였음.
- 또한 FRET 효율을 측정한 결과 HIF-1 α siRNA를 처리하여 HIF-1 α 의 발현을 저해하게 되면 FRET 효율이 약 22%로 증가함을 확인하였음.
- 이러한 결과는 HIF-1 β 는 HIF-2 α 와 HIF-1 α 사이에서 경쟁적으로 결합할 수 있으며 HIF-1 β 가 limiting factor로써 작용할 수 있음을 보여줌. 또한 HIF-1 α 와 HIF-1 β 간의 결합이 HIF-2 α 와 HIF-1 β 간의 결합보다 강하여, HIF-2 α 와 HIF-1 α 가 동시에 존재하는 경우 HIF-1 α 와 먼저 결합함으로써 HIF-1 α 에 의해 조절되는 유전자들의 발현이 먼저 진행될 수 있음을 시사함.
- 이를 실제로 확인하고자, HIF-1 α 에 의해서 발현이 조절되는 것으로 알려진 유전자 PGK2, HIF-2 α 에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려진 유전자 TGF- α , 그리고 HIF-1 α 와 HIF-2 α 에 의해서 동시에 영향을 받는 것으로 알려진 ADM 유전자의 발현 여부를 HIF-1 α siRNA를 처리하고 살펴보았음. 그림과 같이 PGK1의 발현은 줄어들고 TGF- α 의 발현은 늘어나며, ADM의 발현은 그다지 변화하지 않음을 확인함.
- 또다른 HIF- α isoform으로 HIF-3 α 가 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합에 어떠한 영향을 주는지 확인하고자 함. HIF-3 α 는 9개의 또다른 isoform을 갖는데 그 중에서 HIF-1 α 와 유사하게 ODD (oxygen-dependent degradation) domain을 갖는 Full-length 길이의 HIF-3 α 2 와 TAD domain이 없는 HIF-3 α 4를 선택하였음.
- PC3 세포에는 HIF-3 α 의 isoform이 존재하지 않으므로 HIF-3 α 2 와 HIF-3 α 4를 과발현 시켜 그 영향을 살펴보고자 함. 이때 과발현 된 세포를 선택하기 위해 mCherry 단백질을 표

지시킨 mCherry-HIF-3 α 2 와 mCherry-HIF-3 α 4를 이용하였음.



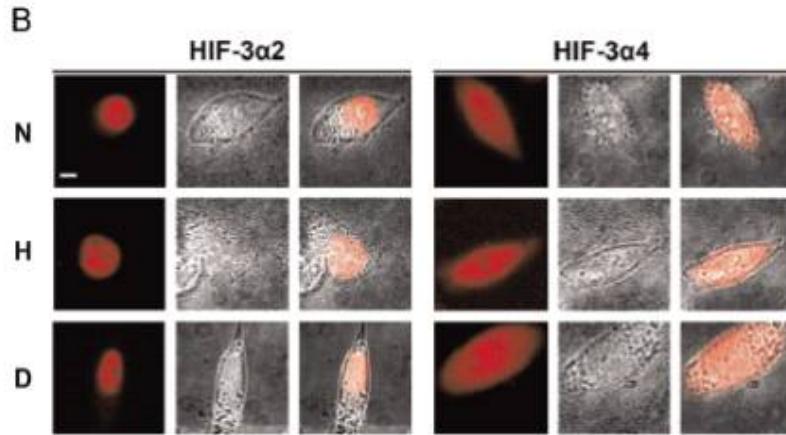
<그림. HIF-1 α siRNA 처리에 따른 PGK, TGF- α , ADM 유전자 발현 정도의 변화>



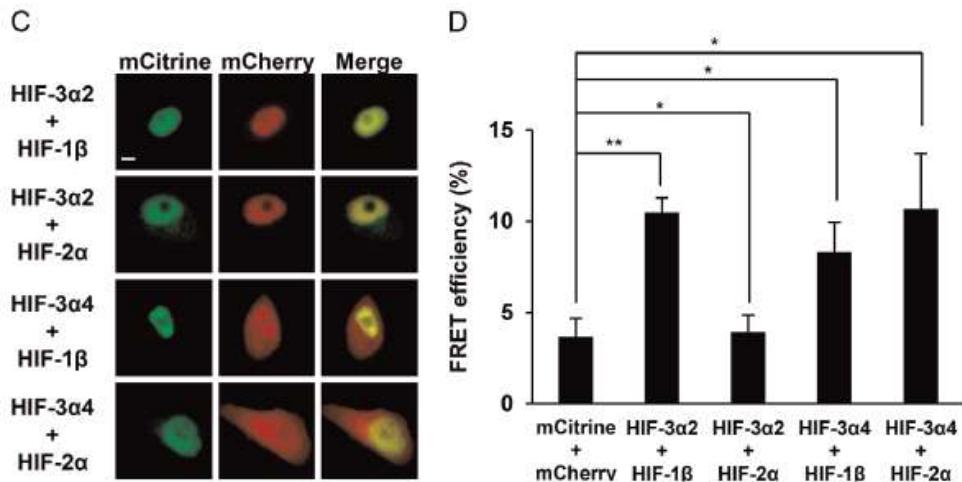
<그림. 산소 농도에 따른 mCherry-HIF-3 α 2 와 mCherry HIF-3 α 4의 세포내 발현 양>

- 이들을 과발현 시킨 세포에서 산소의 농도에 따라 발현양을 살펴본 결과 HIF-3 α 2의 경우 ODD domain을 가지므로 저산소에서 훨씬 안정화 되어 발현양이 증가하는 것을 확인하였음. DFO를 처리하여도 마찬가지의 결과를 얻음.
- 그러나 HIF-3 α 4의 경우 산소농도와 무관하게 항상 일정하게 발현되는 것을 확인함.
- 이들의 세포내 위치를 확인하기 위해 발현된 세포를 형광 현미경으로 살펴본 결과 HIF-3 α 2의 경우 다른 HIF- α isoform과 유사하게 세포핵에만 존재하는데 비해 HIF-3 α 4 의 경우 세포핵, 세포질 동시에 존재하는 것을 확인하였음.
- HIF-3 α 2와 HIF-3 α 4를 과발현 시키면서 HIF-2 α 와 HIF-3 α 간 homodimer를 이루는지 여부와 HIF-3 α 와 HIF-1 β 간의 heterodimer를 이루는지 여부를 우선적으로 살펴봄. 이들의 결합 여부를 FRET 효율로 측정하여 계산한 결과 HIF-3 α 2 의 경우 HIF-1 β 와 결합하는 heterodimer를 훨씬 잘 만드는 것으로 나타난 반면 HIF-3 α 4의 경우 HIF-2 α 와 HIF-1 β 와 모두 유사한 정도로 결합을 하는 것으로 나타남. 즉 HIF-3 α 2의 경우 HIF-1 α 와 유사한 경향성을 보이면서 heterodimer생성을 선호하나, HIF-3 α 4의 경우엔 그렇지 않음을 확인할 수

있었음.



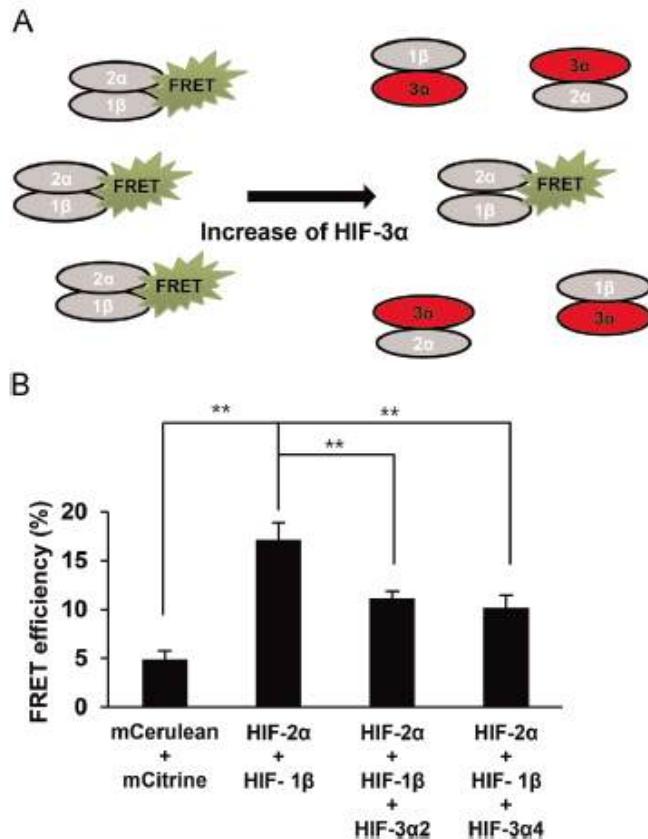
<그림. mCherry-HIF-3 α 2 와 mCherry HIF-3 α 4의 세포내 위치>



<그림. 왼쪽: HIF-3 α , HIF-2 α 및 HIF-1 β 를 발현한 세포내 각각의 단백질의 위치 확인, 오른쪽: HIF-3 α 와 HIF-2 α 간의 FRET 효율 혹은 HIF-3 α 와 HIF-1 β 간의 FRET 효율 측정.>

- 또한 이들의 결합정도가 세포내 특정 단백질의 위치에 영향을 주는지 여부를 살펴보기 위하여 발현된 단백질의 세포 위치를 확인한 결과, 결합정도와 상관없이 HIF isoform들의 위치가 변화되지 않음을 확인하였음.
- 이는 기존의 HIF-3 α 4의 경우 저산소에서 발현되는 경우 HIF-1 α 의 세포내 위치를 변화시킨다는 기존의 실험 결과와는 다른 양상임.
- 마지막으로 HIF-2 α 와 HIF-1 β 간의 결합에 HIF-3 α 가 어떠한 영향을 미치는지 살펴보고자 HIF-2 α 와 HIF-1 β 간 FRET 효율을 HIF-3 α 존재 여부에 따라 측정하였음.
- HIF-3 α 의 종류에 관계없이 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 FRET 효율이 일정하게 감소하는 것을 확인함.
- 이러한 결과로 미루어 볼 때 모든 HIF- α isoform들이 HIF-1 β 와 경쟁적으로 결합할 수 있으며, 이 때 결합의 세기 정도는 HIF-1 α > HIF-2 α 로 생각되며, HIF-1 α 의 활성을 저해한

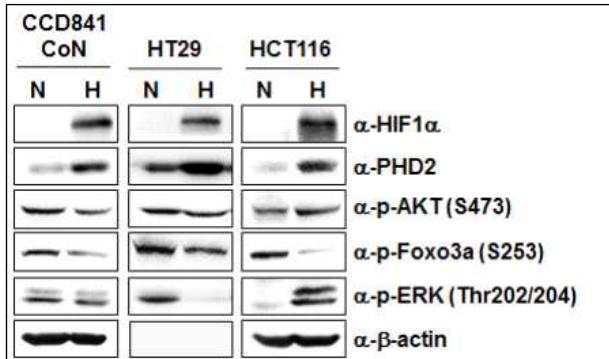
다고 알려진 HIF-3 α 또한 HIF-2 α 와 결합하여 HIF-2 α 의 활성을 저해할 수 있음을 확인하였다. 즉, 산소 존재 여부뿐 아니라 HIF- α 와 HIF-1 β 간의 결합력 그리고 HIF- α isoform 의 상대적인 발현 정도에 따라 HIF- α 의 활성 정도가 바뀔 수 있음을 시사함.



<그림. HIF-3 α 존재 여부에 따른 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 FRET효율 변화>

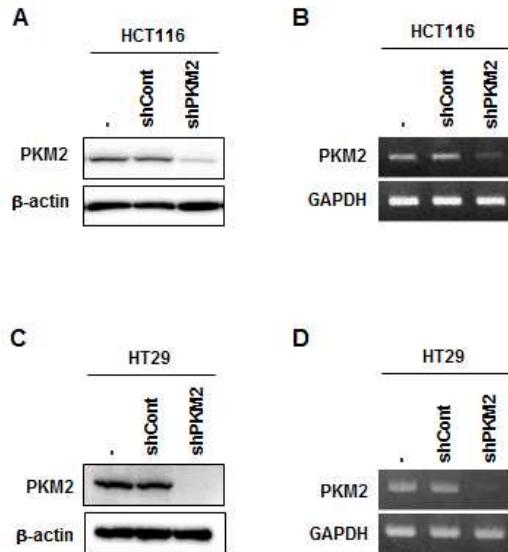
(10) 대장 정상세포 및 대장암세포의 저산소 환경에 따른 PKM2 발현 및 분비

- 대장암 발암단계를 모사하기 위해서 정상 대장 세포주 CCD841 CoN과 대장암 세포주 HT29, HCT116을 이용함. 이 때 대장암 세포주 HT29는 well-differentiated된 adenocarcinoma에 해당하고, HCT116 cell은 poorly-differentiated carcinoma 세포주로써, HT29가 좀 더 benign한 경우로 생각할 수 있음. 특히 정상상태와 저산소 상태의 HIF 및 인산화 단백질의 활성을 웨스턴 블롯으로 측정한 결과, 세포신호에 관여하는 인산화 단백질들의 활성이 HCT116의 경우 나머지 두 세포주와 반대되는 경향을 나타내는 것으로 나타남. 즉 발암과정에 따라 세포의 신호체계가 달라짐을 확인함. (그림)
- 특히 대장암 세포주의 경우 PKM2 의 발현양 또한 차이가 나는 것으로 나타남. 즉 HT29 세포의 경우 PKM2의 발현양은 훨씬 많은 것으로 나타났으나, 세포 밖으로 분비되는 PKM2의 양은 적은 것으로 나타났음 (그림). 즉 암이 진행될수록 세포내 존재하는 PKM2의 양은 감소하나 세포 밖으로 분비되는 PKM2의 양이 증가하는 것으로 보임.



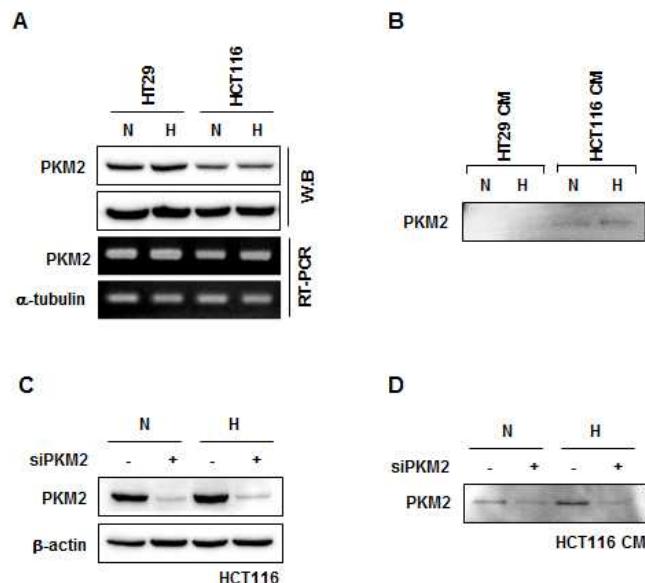
<그림. 정상산소와(N) 저산소(H)에 의한 HIF 및 관련 인산화 단백질의 활성을 각기 다른 대장 세포주에 따라 살펴봄.>

- 분비된 PKM2의 역할을 좀 더 자세하게 살펴보기 위해 PKM2가 knock down 된 대장암 세포주를 확립하였음 (그림). 즉 shRNA를 처리한 후 적절한 항생제로 PKM2가 발현되지 않는 세포들만 선별하여 PKM2의 발현 저해를 확인함.

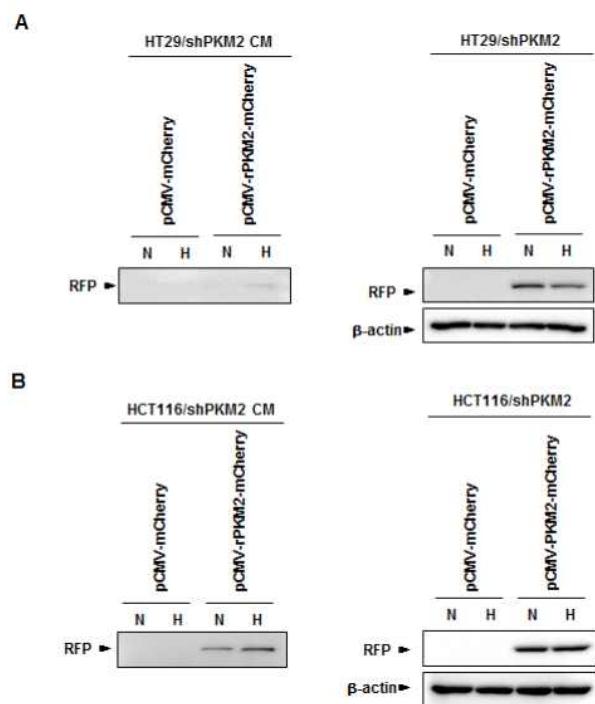


<그림. PKM2의 발현이 저해된 대장암 세포주 확립>

- 이러한 대장암 세포주를 이용하여 외부에서 주입된 PKM2의 영향을 살펴보기로 함. 이를 위하여 외부에서 주입하는 PKM2를 mcherry 형광 단백질로 표지하였음. mcherry-PKM2가 발현되는 세포를 이용하여 세포밖으로 분비되는 PKM2 및 세포 내 PKM2의 발현양을 확인하였음. PKM2의 발현양은 산소 조건에 영향을 받지 않는 것으로 보이나, 세포 밖으로 분비되는 PKM2의 경우 저산소 조건일 경우 증가하는 것을 확인하였음 (그림).



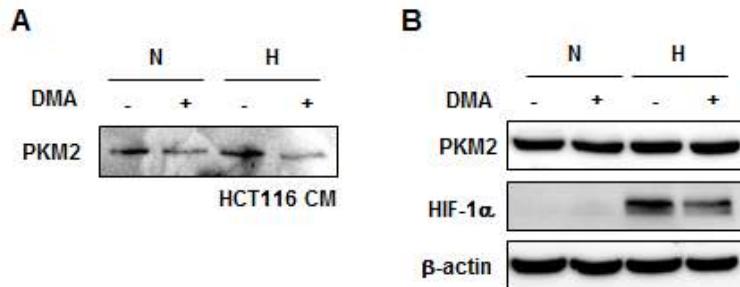
<그림. 두가지 대장암 세포내 PKM2 발현 및 분비량 측정>



<그림. 세포내, 세포밖 mCherry-PKM2 측정>

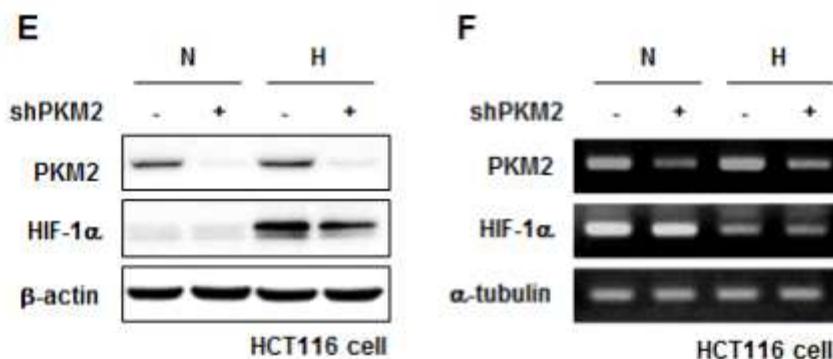
(11) 대장암세포에서 저산소 환경에 따른 PKM2가 HIF 발현에 미치는 영향

- 이러한 PKM2의 세포밖으로의 분비는 exosome에 의한 것임을 밝힘 (그림). 즉, exosome secretion을 막는 DMA를 처리한 경우 세포밖으로 분비되는 PKM2의 양이 감소한 것을 관찰함.



<그림. HCT116 세포에서 exosome 분비를 저해한 경우 분비되는 PKM2 양 감소>

- 이로부터, 암이 진행될수록 exosome을 통해 PKM2의 분비가 증가되며, 저산소 환경에서 PKM2의 분비가 더욱 더 활발함을 확인함.
- 또한 PKM2의 분비가 저해된 경우 HIF-1 α 의 발현양 또한 감소하는 것으로 보아 PKM2의 분비 정도가 HIF-1 α 활성에도 관여하는 것으로 나타남.
- PKM2 가 HIF-1 α 의 활성에 관여하는 것을 좀 더 확인하기 위해서 siRNA를 이용하여 PKM2의 발현을 저해한 후 HIF-1 α 의 발현양을 확인함 (그림). PKM2 발현이 저해되면 HIF-1 α 의 발현양 또한 감소하는 것으로 보아, PKM2 가 HIF-1 α 의 positive regulator임을 확인함.

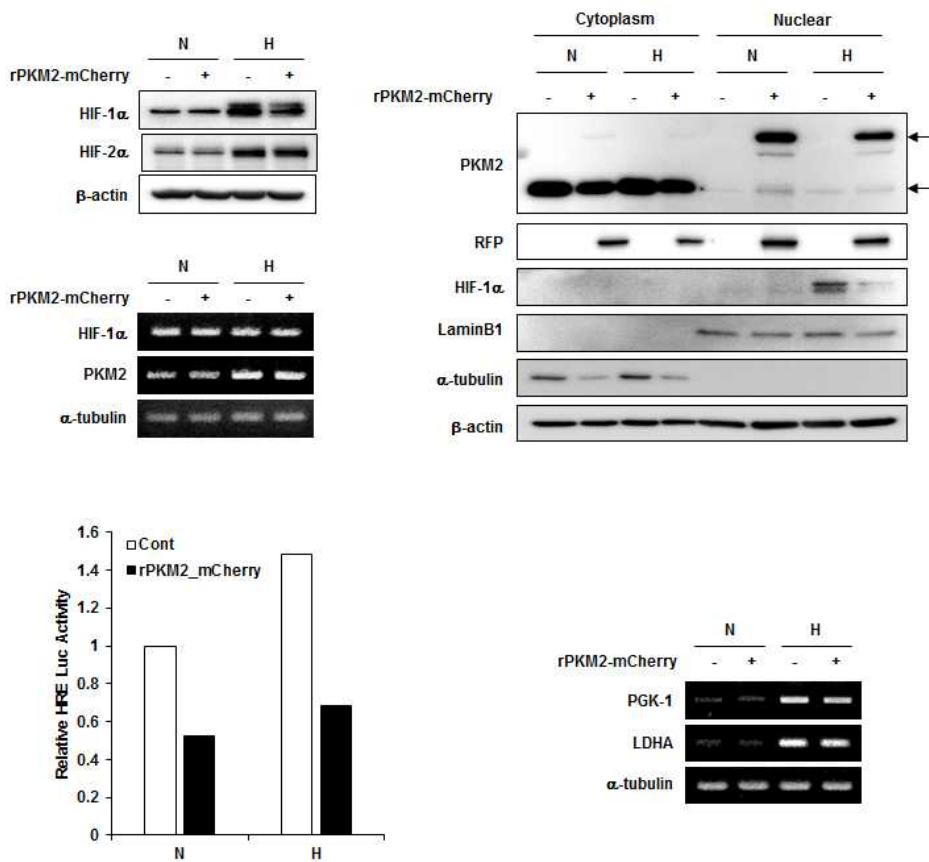


<그림. HCT 세포내에서 PKM2에 의한 HIF 발현양 조절>

(12) 대장암 세포 유래, 분비된 PKM2가 정상 세포에 미치는 영향

- 위에서 언급한대로 대장암 세포는 저산소 상태에서 PKM2의 분비가 늘어나며, 암세포 내의 HIF를 과발현 시키는 positive regulator로써의 역할을 하는 것으로 나타났음.
- 한편 분비된 PKM2가 정상세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해서 mCherry로 표지된

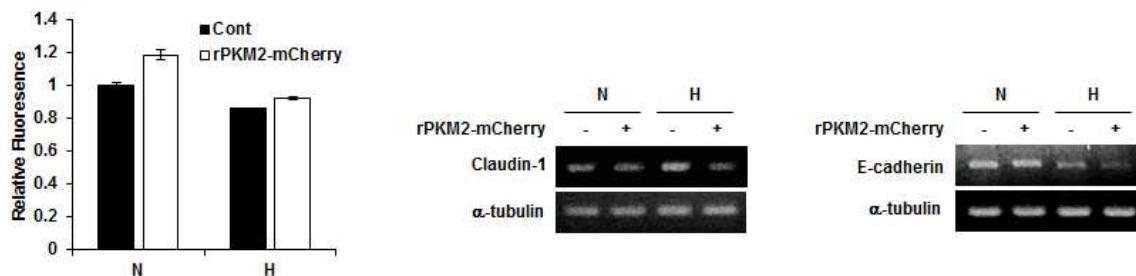
PKM2를 세포 배양액에 함께 넣고 처리한 후, HIF의 발현 양 및 활성을 측정하기로 함.



<그림. 외부에서 넣어준 PKM2가 HIF 발현에 미치는 영향>

- 그림에서 보듯이, 외부에서 주입한 PKM2는 정상세포의 핵으로 이동하여 존재하는 것을 확인함. 반대로 정상세포내 존재하는 PKM2의 대부분은 산소 조건에 관계없이 대부분이 세포질에 존재함. 특히 외부에서 주입한 PKM2가 핵에서 HIF-1α의 발현을 저해하는 것으로 보임. 즉 HIF-1α 단백질이 감소하고, HIF-1α의 활성화 또한 감소하였으며, HIF-1α에 의해 발현이 조절되는 PGK-1 단백질 양 또한 감소함을 확인하였음. 이는 대장암 세포에서의 결과와 반대되는 경향으로 PKM2가 오히려 HIF의 발현을 저해하는 negative regulator로써 역할을 하는 것을 의미함.
- 다음으로 HIF-1α의 활성 저해가 정상 세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 대장 세포간 정션에 관여하는 단백질을 살펴봄. 기존 연구에 의하면 대장은 조직 특성상 정상 조건에서 산소가 낮은 상태로 존재하므로 HIF-1α의 발현이 오히려 정상 세포들간의 tight junction 유지에 도움을 주는 것으로 알려져 있음. 따라서 HIF-1α의 발현 감소는 세포들간의 tight junction 유지를 방해하는 결과를 가져 올 수 있다는 가설을 세움.
- 실제로 PKM2를 처리하여 HIF-1α의 발현을 저해한 경우 세포간 junction이 약해져서 fluoresceine-dextran 물질이 더 잘 투과하는 것으로 나타났으며, tight junction에 관여하는

claudin-1 및 e-cadherin 발현 또한 저해되는 것으로 확인됨 (그림).



<그림. 외부에서 넣어준 PKM2가 세포간 tight junction 유지에 끼치는 영향>

(13) 단분자 수준에서 mCherry-PKM2의 단량체/다량체 확인

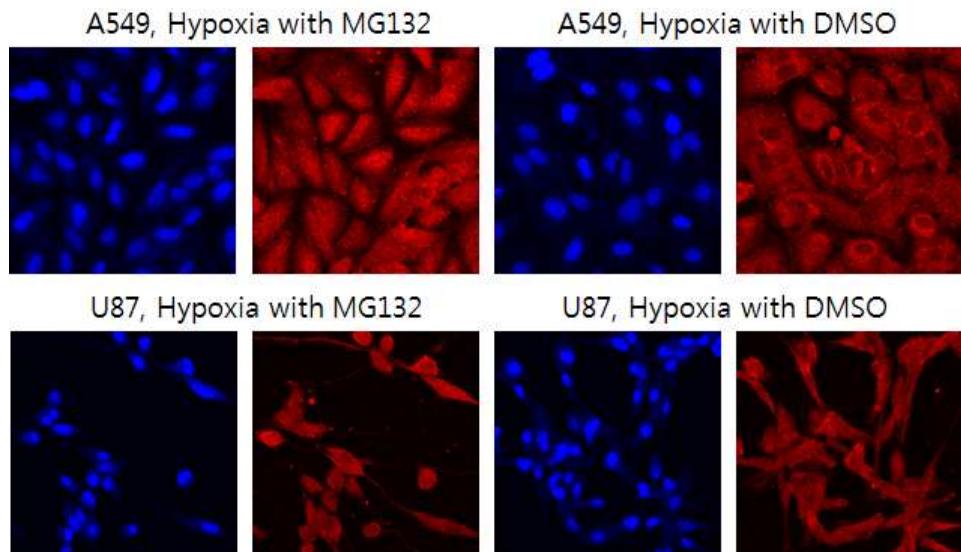
- mCherry-PKM2의 낮은 해리상수를 극복하고자 Total internal reflection microscope (TIRF) 를 셋업함. 이러한 상태에서는 형광단백질에 의한 높은 background로부터 단분자를 용이하게 검출할 수 있다는 장점이 있음.
- 외부에서 recombinant PKM2를 이용하지 않고, 50-100 nM의 높은농도의 PKM2를 이용하여 단분자 실험을 수행하였음.
- 그림에서 보는 바와 같이 높은 농도의 PKM2를 그대로 이용하여 분석한 결과 monomeric mcherry에 비해 형광 세기가 3-4배 큰 상태의 PKM2 tetramer 상태의 분자들을 확인할 수 있었음.

(14) 저산소 조건에서 PKM2의 핵이로의 이동 확인

- 암세포가 빠르게 증식, 성장하기 위해서 필요한 여러 가지 생물질들의 합성을 위해서

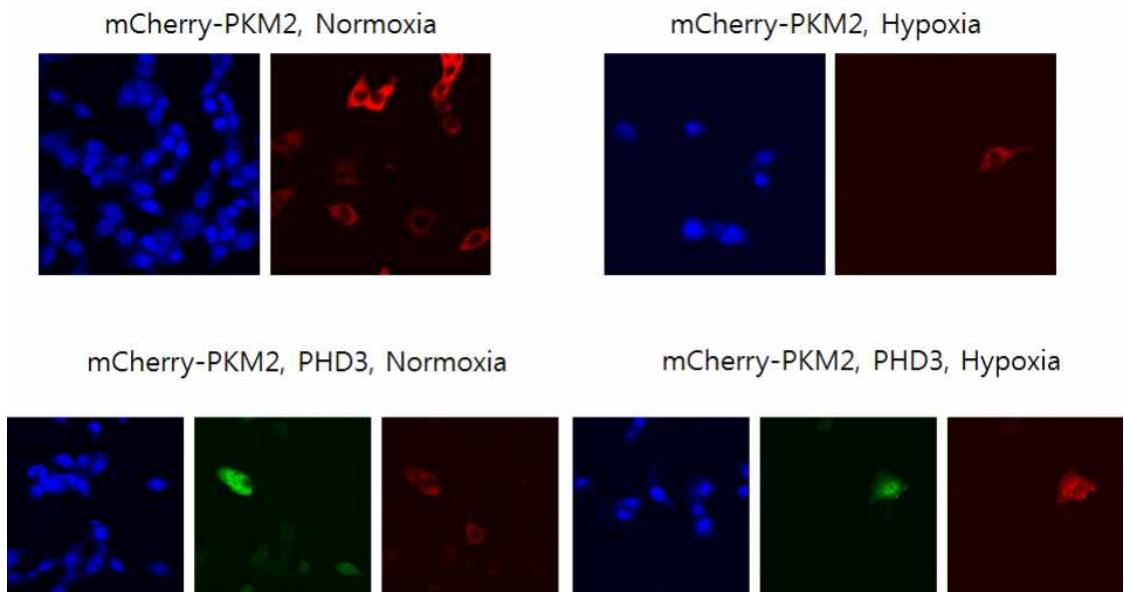
glycolysis가 일어나는 과정을 warburg effect라고 하는데, PKM2는 이러한 glycolysis 과정에서 중요한 역할을 하는 인산화효소임.

- 특히, tetramer 형태의 인산화효소 역할 뿐 아니라 dimer 형태의 전사 보조 인자로써의 PKM2의 역할이 밝혀지고, 이들이 핵에서 암세포의 성장 사멸에 중요한 단백질의 발현에 관여하는 것으로 나타나, 핵 내에서의 PKM2의 역할이 주목받고 있음.
- 따라서 PKM2가 핵으로 가서 암세포를 활성화 시키는 과정을 저해하고자, PKM2가 핵으로 가는 조건을 형광 현미경으로 확인하고, 다양한 약물을 처리하여 PKM2가 핵으로 가지 못하게 하는 약물을 스크리닝 하는 시스템을 개발하고자 하였음.
- 폐암세포인 A549, 뇌암세포인 U87에서 MG132로 proteasome에 의한 단백질 분해를 막은 상태에서 저산소에 노출 시켰을 때 PKM2의 세포내 위치를 immunostaining을 통해 확인하였음.
- 그림에서 보는 바와 같이, hypoxia, MG132의 여부와 관계없이 대부분 핵이 아닌 세포질에 존재하는 것으로 보임.



<그림. A549, U87 세포의 핵 염색 (파랑) 및 PKM2 염색 (빨강) 결과>

- 또한, PHD3가 과발현 된 상태에서는 PKM2가 핵으로 들어가 전사 보조인자로써의 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 이를 실제 형광현미경에서 확인하고자 하였음. HeLa 세포에 EGFP-PHD3 및 mCherry-PKM2를 함께 trasnfection한 후 저산소 조건에 노출시킨 경우, PHD3가 과발현 되면 PKM2가 핵으로 이동한 것처럼 보이는 세포들의 population이 증가하는 것으로 보임.
- 이러한 실험을 반복하여, 대부분의 세포 내 PKM2가 핵으로 가는 조건을 확실하게 확립한 후, 이미 FDA 승인을 받은 bioactive drug을 이용하여 drug 스크리닝 실험을 함으로써, PKM2의 핵 이동을 억제하는 약물을 찾을 예정임.

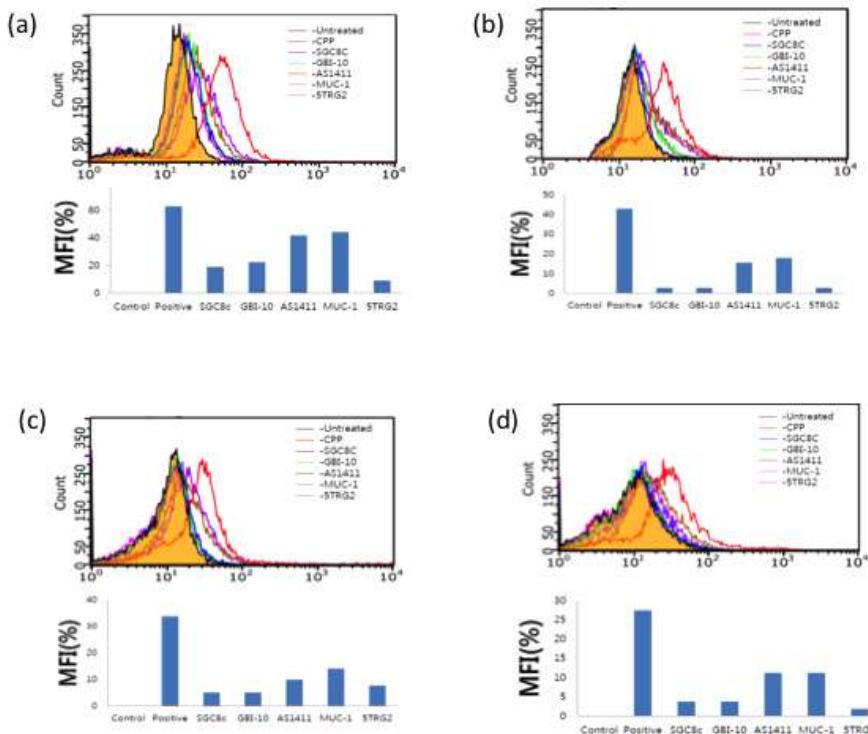


<그림. mCherry-PKM2 및 PHD3를 처리한 상태에서의 HeLa 세포, 핵(파랑), PHD3 (녹색), 및 PKM2 (빨강) 결과>

3. 종양 이질성의 면역표현형 검색을 통한 항암제 내성암 진단법 개발

가. 앱타머를 이용한 면역표현형 검색

- 면역표현형 검색을 위하여 암세포 표면에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 사용하는 대신 암세포와 선별적으로 결합하는 것으로 알려진 앱타머 5종(scg8c, gbi-10, as1411, muc-1, 5trg1)을 암세포 4개주 (PC3, HeLa, HCT116, MCF7)에 결합시켜 각 앱타머와의 상호작용을 프로파일링함으로써 앱타머 기반 세포주 구분법을 구축하려고 하였음.
- 하지만, cytometry분석 결과, 세포주 간 앱타머 결합력이 뚜렷하게 차이가 나지 않아 앱타머 기반 특정 세포주를 구분하는 방법의 확립이 어려움을 확인하였음.
- 이에 따라, 이후 연구 주제에 대한 변경을 시도하였음.



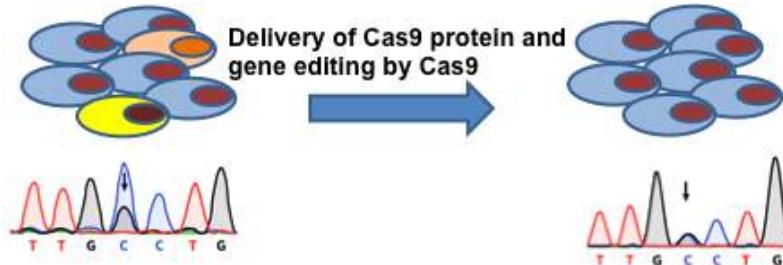
<그림. 암세포에 결합하는 것으로 알려진 앱타머들을 이용하여 다양한 암세포주의 앱타머 결합 효율을 분석함. (a) PC3, (b) HeLa, (c) HCT116, (d) MCF-7>

나. 유전자 가위의 세포 내 전달을 위한 cell-penetrating peptide (CPP) 발굴

- 이를 위하여 종양 이질성에 의해 항암제 내성이 생성됨을 염두에 두고 항암제 내성에 관여하는 유전자를 편집하는 기술과 항암제 처리 기술을 접목하여 항암제 내성을 극복하고, 이를 바탕으로 종양 이질성 문제를 해결하는 주제로 연구의 방향을 변경하였음.
- 최근 유전자 편집이 비교적 손쉽게 가능한 방법으로 Cas9이나 Cre-recombinase 단백질을

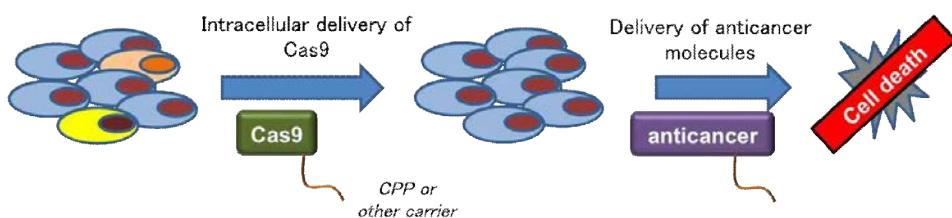
이용하는 기술이 있음.

- 특히, Cas9단백질에 편집하고자 하는 유전자에 상보적인 RNA를 결합시켜 세포 내로 주입하



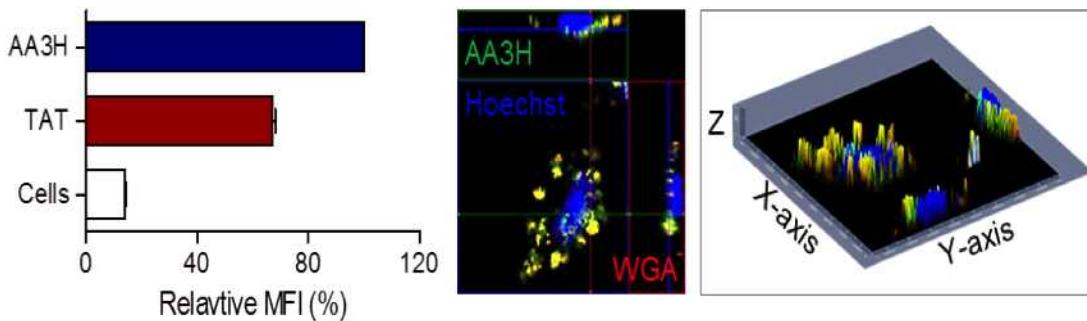
<그림. 유전자 조작 단백질을 이용한 내성 유전자 편집>

면 대상 유전자를 Cas9이 절단, 삽입, 재조합등을 통해 손쉽게 편집하여 대상 유전자(내성 유전자)를 무력화 시킬 수 있음.



<그림. 항암제와 유전자 편집 단백질 전달의 접목을 통한 내성 극복 기술>

- 이를 위해서는 Cas9단백질을 세포에 전달이 필요하고, 이를 위해 현재는 Cas9 유전자를 전달하는 방법을 사용하고 있으나, 보다 높은 효율을 위해 단백질 자체를 전달하는 방법이 연구 개발 되고 있음.
- 따라서, Cas9의 세포 내 전달을 위해 당해에 세포 투과 웨بت아이드(cell penetrating peptide, CPP)를 신규 발굴하였음.

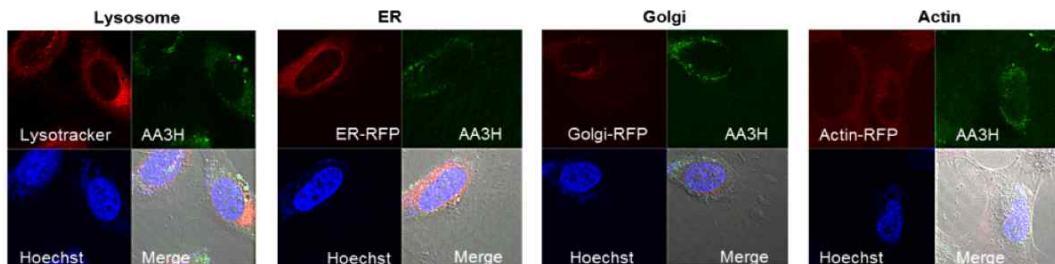


<그림. AA3H와 TAT의 세포 투과능 비교 (왼쪽) 및 공초점 형광 현미경을 통한 AA3H의 세포 투과능 확인 (오른쪽)>

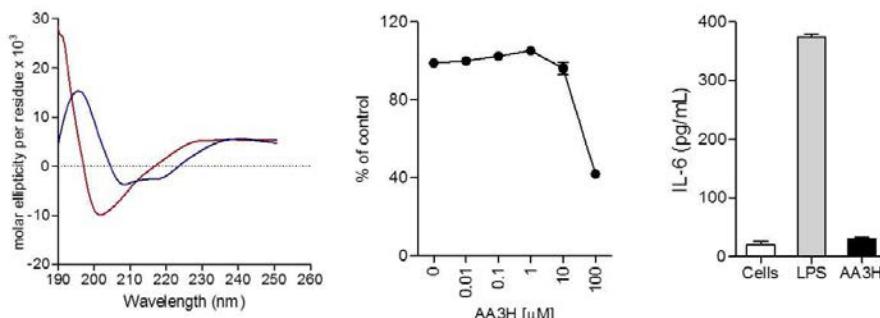
- 신규 CPP(AA3H)의 이차 구조를 분석하였을 때, 기존 CPP와는 구별 되게 특이적으로

beta-sheet형태의 구조를 가지는 것으로 확인하였음.

- 또한, 세포 내 투과 후, 세포 질 내 소기관 중 도달하는 위치를 확인하였음.

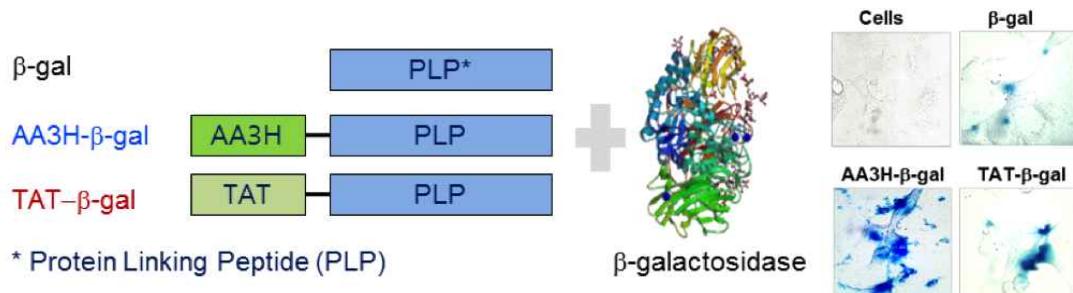


<그림. AA3H의 세포 질 내 소기관 도달 정도 확인>



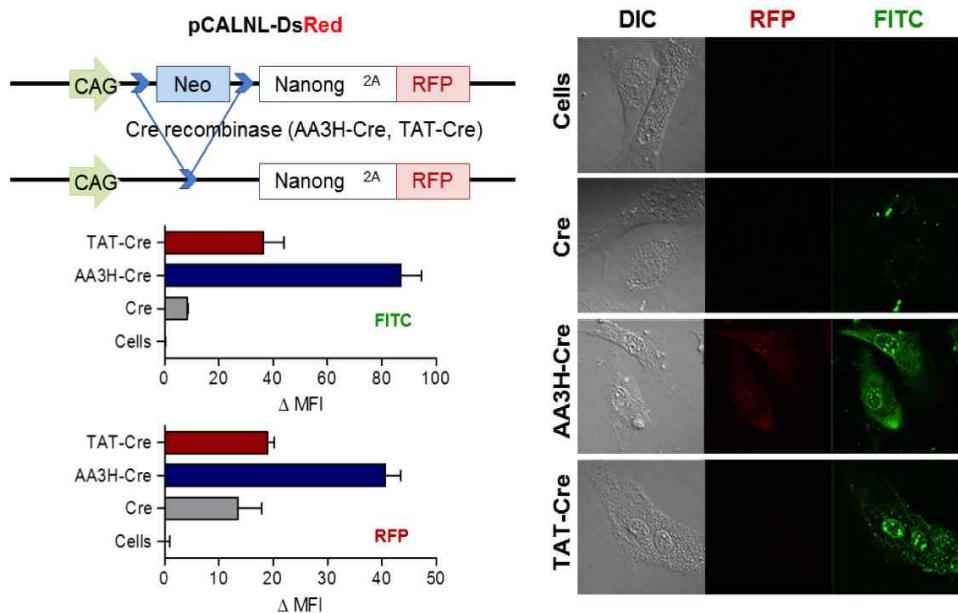
<그림. CPP들의 CD 스펙트럼 (왼쪽, AA3H:파란선, TAT: 빨간선), AA3H의 독성(중간)과 면역원성 검사 (오른쪽)>

- AA3H는 본시 annexin 3 단백질에서 발굴되었고, 이의 기본적 세포 투과능은 공초점 형광 현미경으로 확인하였으며, AA3H의 세포 투과능의 평가를 위하여 현재 널리 사용되는 CPP인 TAT 웨بت아이드와 비교하였음.
- 결과로, CPP는 TAT대비 세포 투과능이 높았고, 면역원성이나 독성등도 없는 것으로 확인되었음.



<그림. CPP를 이용한 베타-galactosidase의 세포 내 전달>

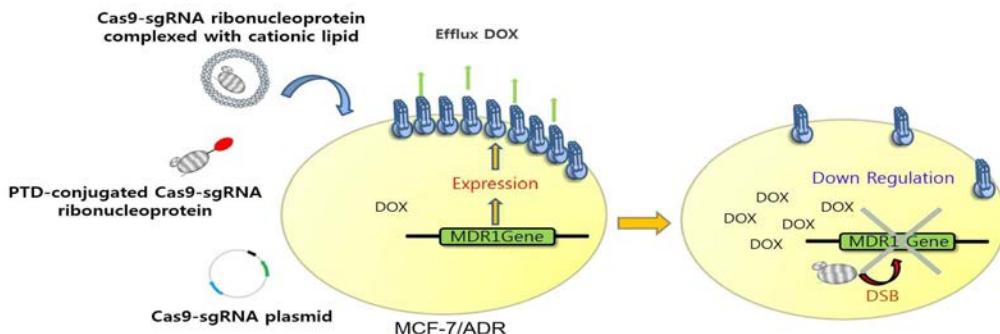
- 모델 단백질인 beta-galactosidase와 유전자 편집 단백질의 일종인 Cre-recombinase를 세포 내로 전달하여 단백질 기능이 작동하는 것을 시도하였고, 결과로 세포 내에서 신규 발굴 된 CPP에 의해 대상 단백질의 세포 내 전달이 이루어져 세포 내에서 전달 된 단백질의 활성을 확인할 수 있었음.



<그림. CPP를 이용한 유전자 편집 단백질 (Cre-recombinase)의 세포 내 전달 (위쪽 바 그래프와 오른쪽 세포 이미지의 녹색) 및 전달 된 단백질의 활성 테스트 (아래 쪽 바 그래프와 오른쪽 세포 이미지의 붉은 색). 유전자 편집에 의해서 억제 되어 있던 RFP단백질의 발현이 시작 됨.>

다. 유전자 가위의 세포 내 전달을 통한 항암제 내성유전자 편집

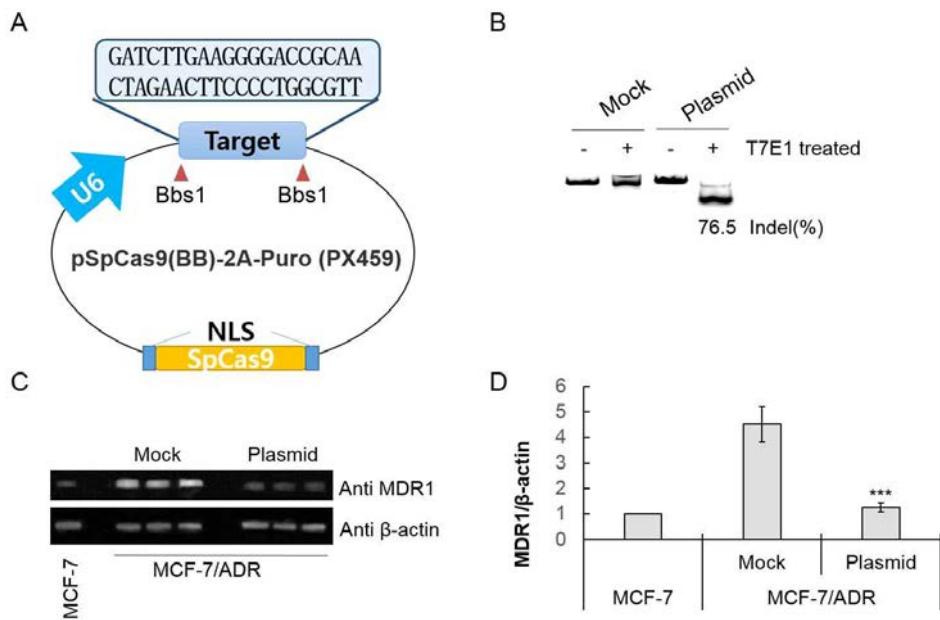
- 1차년도에 개발 된 세포 투과 펩타이드에 기반한 단백질 전달 기술과 양이온성 지질을 이용한 단백질 전달기술을 각각 사용하여 Cas9/sgRNA 단백질-RNA 복합체를 항암제 내성 세포에 전달 한 뒤, 전달 효율을 기존 방법인 플라스미드 유전자를 이용한 전달 기술과 비교하였음.



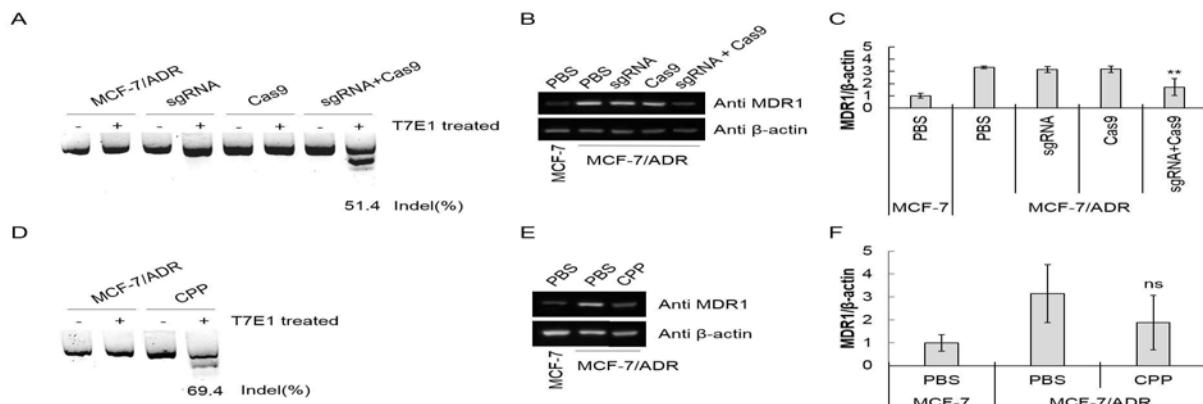
<그림. 유전자 가위(Cas9/sgRNA)의 세포 내 전달을 통하여 내성 유전자 (mdr1) 발현을 감소시킴으로써 내성을 극복하는 방법에 대한 개략도>

- 먼저, 독소루비신 항암제에 내성을 보이는 유방암 세포인 MCF7/ADR 세포주에 단백질인 P-gp(MDR1)의 유전자를 타겟하는 Cas9/sgRNA 유전자가 포함 된 플라스미드를

Lipofectamine 3000 (LF3K)을 이용하여 세포에 처리하였음.



<그림. A. Cas9/sgRNA 플라스미드 유전자, B. 표적 유전자인 mdr1의 방해 정도를 확인하는 T7E1 어세이, C. MDR1 단백질 발현을 알아보는 Western blot, D. Western blot의 정량적 비교>

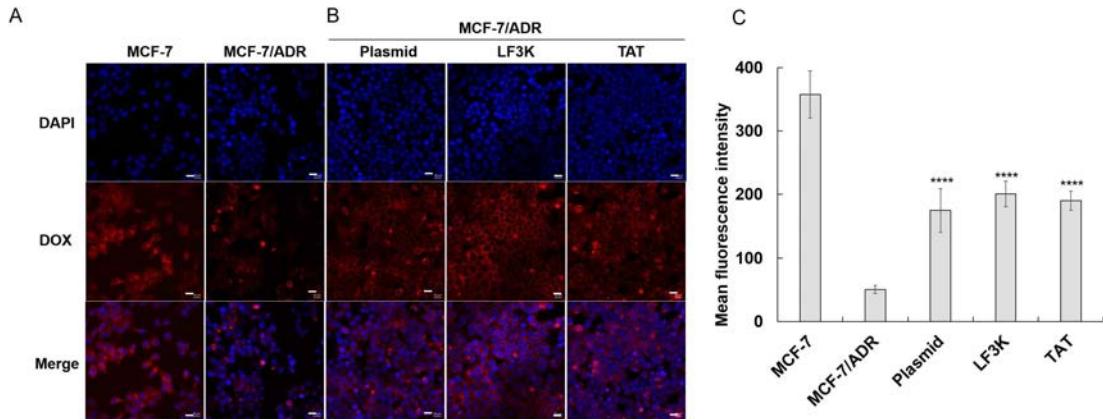


<그림. A. 양이온 지질에 의해 전달 된 Cas9/sgRNA에 의해 표적 유전자인 mdr1가 방해 된 정도를 확인하는 T7E1 어세이, B. 양이온 지질에 의해 전달 된 Cas9/sgRNA에 의해 감소 된 MDR1 단백질 발현 정도를 알아보는 Western blot, C. Western blot의 정량적 비교, D. CPP에 의해 전달 된 Cas9/sgRNA에 의해 표적 유전자인 mdr1가 방해 된 정도를 확인하는 T7E1 어세이, E. CPP에 의해 전달 된 Cas9/sgRNA에 의해 감소 된 MDR1 단백질 발현 정도를 알아보는 Western blot, F. Western blot의 정량적 비교 >

- 결과로, 약 76.6%(T7E1 어세이 기준) mdr1 유전자가 저해되었고, 이에 따라 MDR1 단백질의 발현도 감소하였다.
- CPP나 LF3K를 이용하여 Cas9/sgRNA 단백질 복합체를 항암제 내성 세포 내로 직접 전달

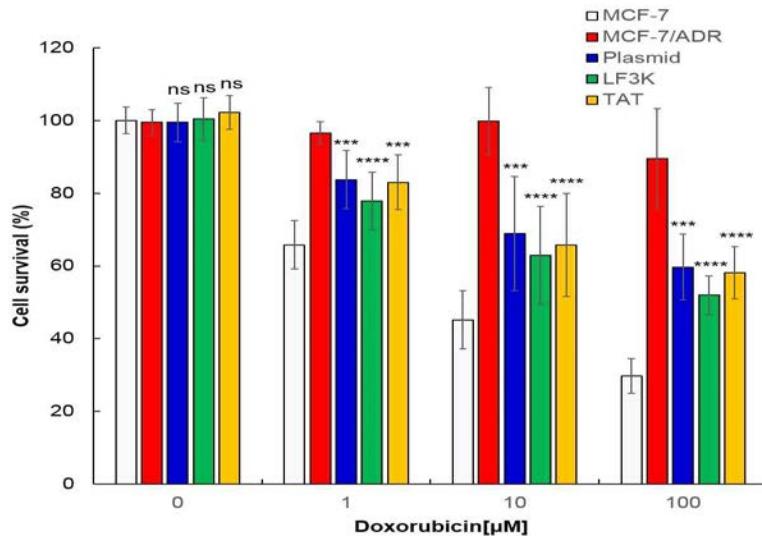
하여 내성유전자 저해 효율도 평가하였음.

- 결과로, CPP의 경우, 약 51.4%, T7E1의 경우 약 69.4%의 mdr1 유전자가 저해되었고 (T7E1 어세이 기준), 이에 따라 MDR1 단백질의 발현도 감소하였음.



<그림. A. 독소루비신에 내성이 없는 유방암 세포주(MCF7)와 내성이 있는 세포주(MCF7/ADR)에서 독소루비신의 세포 내 누적 정도를 나타내는 형광현미경 이미지, B. Cas9/sgRNA가 처리 된 MCF7/ADR 세포 내 누적 된 독소루비신 정도를 나타내는 형광현미경 이미지, C. 형광현미경의 결과를 flow cytometer로 정량 평가한 데이터>

- 이러한 MDR1 단백질은 독소루비신 항암제가 세포에 들어올 때 포획하여 세포 밖으로 방출하는 펌프 역할을 하는데, 이를 저해하는 Cas9/sgRNA에 의해 독소루비신에 대한 내성이 감소하여 세포 내에 전달 되는 효율이 증가하는지를 알아보았음.



<그림. Cas9/sgRNA 처리에 의해 내성이 감소한 MCF7/ADR 세포주의 독소루비신에 의한 사멸 정도>

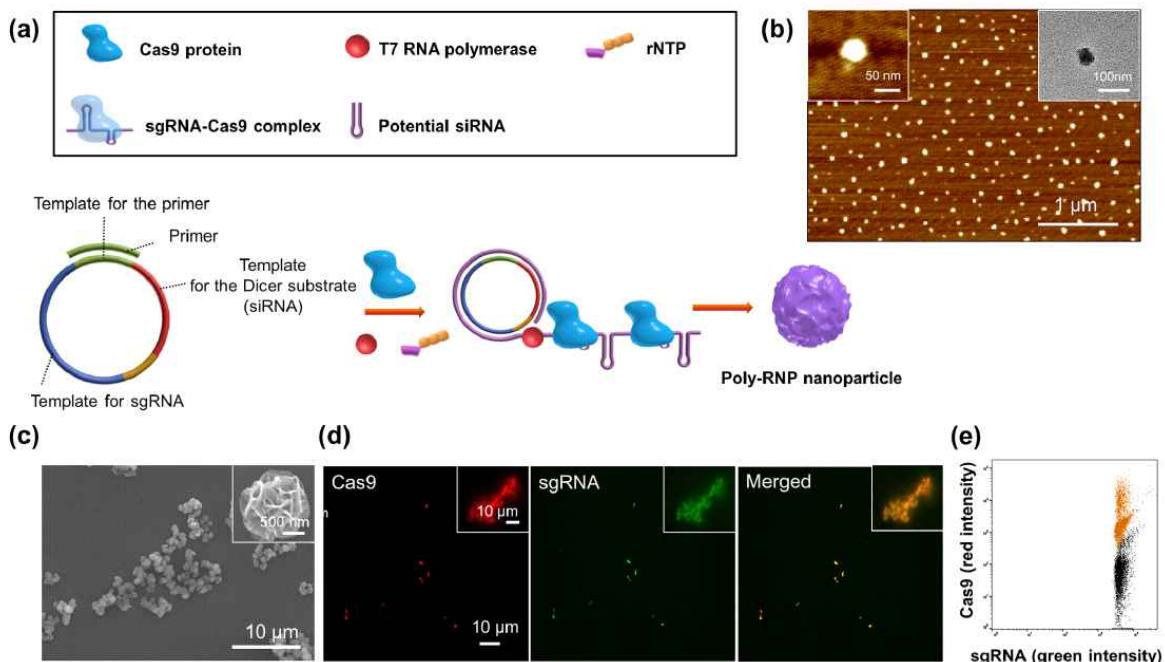
- 결과로, Cas9/sgRNA를 처리하진 내성 세포주에 비해 처리한 세포주는 상당한 효율로 내성이 사라져, 세포 내에 독소루비신이 누적되는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 현상은 전달

기술의 종류와 상관 없이 비슷하게 나타났음.

- 마지막으로, Cas9/sgRNA가 처리되어 MDR1에 의한 내성이 감소한 암세포주가 실제로 독소루비신에 의해 잘 사멸 되는지를 cell viability 어세이를 통해 확인하였음.
- 결과로, 내성이 전혀 없는 세포보다는 약간 덜 사멸되지만, 상당수준의 암세포 사멸 효능을 회복하였음.

라. 유전자 가위 나노입자 개발 및 이의 동물 모델에서의 유전자 편집 효능 검증

- 2차 년도에 개발한 양이온성 지질을 통한 세포 내 유전자 가위 전달 기술을 동물 모델에서 구현하기 위하여, 유전자 가위를 구성하는 sgRNA가 중합된 형태의 고분자형 sgRNA를 제조하고 이에 Cas9를 탑재하여 나노입자 형태의 Cas9-sgRNA ribonucleoprotein (RNP)를 제조하였음.

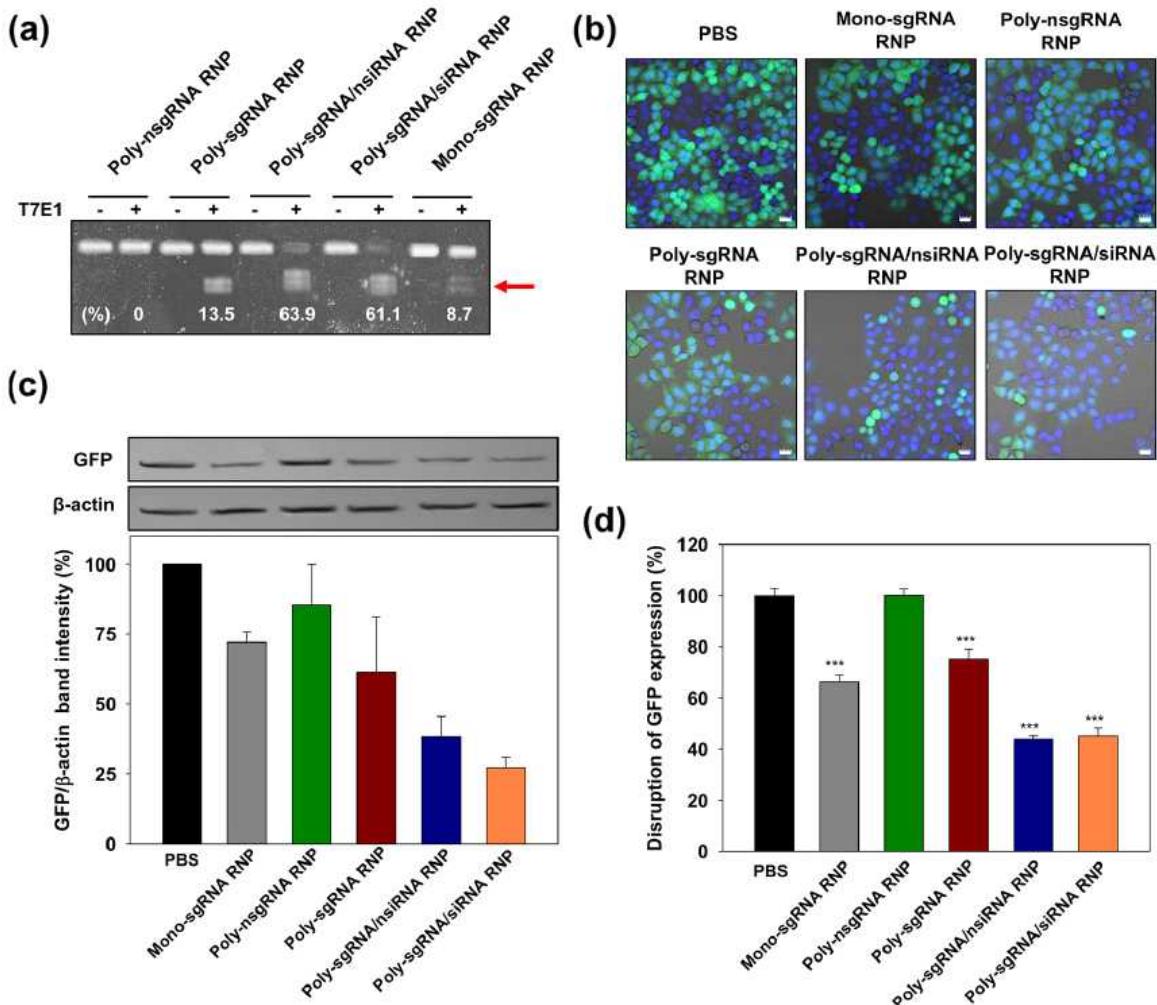


<그림. (a) 회전환 증폭을 통한 Cas9/sgRNA 유전자 가위의 나노입자화 모식도. (b) RNP 나노입자의 AFM 이미지. (c) sgRNA 고분자 중합체의 SEM 이미지. (d) 형광 표지 된 RNP 나노입자의 형광 이미지와 이의 (e) 이의 분석>

- 이 RNP 나노입자를 양이온성 지질을 활용하여 세포 내 및 암조직 내로 전달하여 전달 된 유전자 가위의 모델 유전자(GFP)에 대한 편집 효능을 검증하였다.
- 고분자형 sgRNA를 회전환 증폭반응에서 제조하고, 증폭반응 시 Cas9 단백질을 첨가하여 단백질과 RNA가 복합체를 형성하여 나노입자화 된 RNP 나노입자를 제조하였고, 입자의 모양 및 사이즈를 AFM과 SEM을 통하여 분석하였다.
- 유전자 가위의 중합체 RNP 나노입자가 세포 내 전달 되었을 때 단량체로 잘 분리되어 활

성을 지니도록 하기 위하여 회전환 증폭에 의한 sgRNA 중합체 제조 시, Dicer에 의해 절단되어 단량체로 분리 될 수 있게하는 siRNA 부위를 첨가하였음.

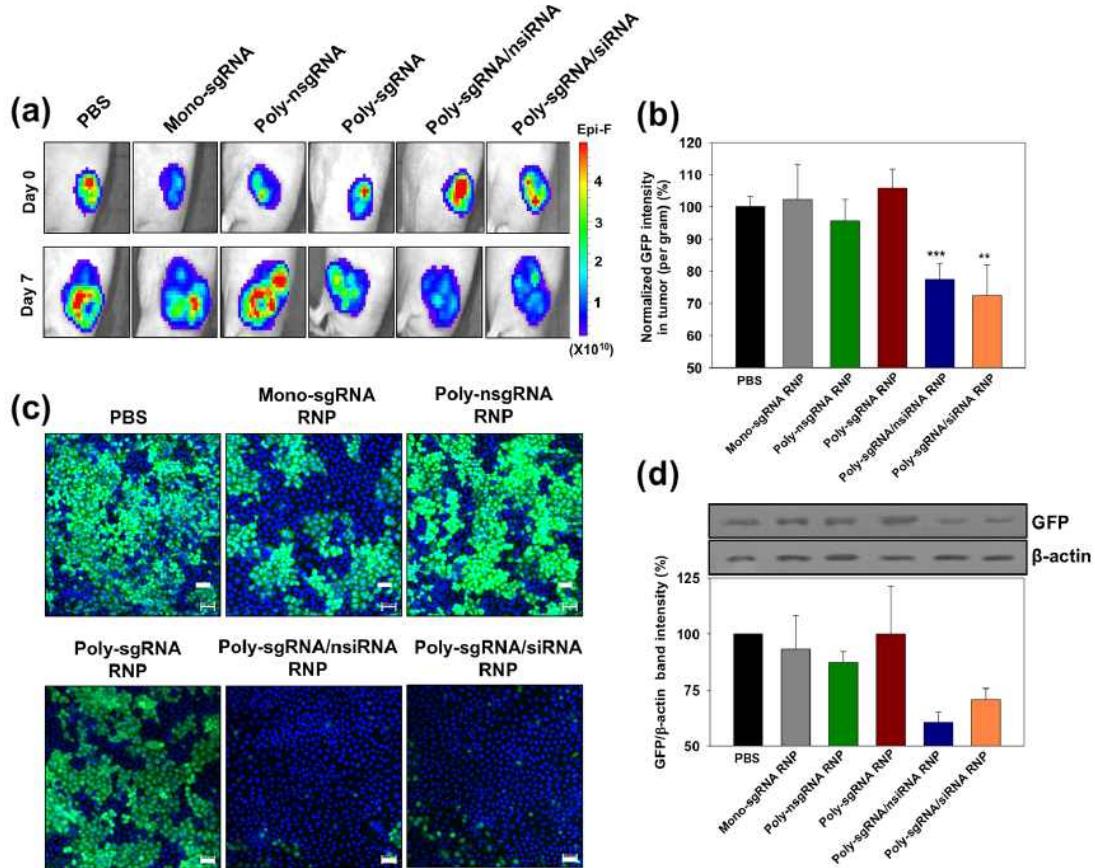
- RNP를 세포 내 전달하기 위하여 양이온성 지질 분자인 Stemfect를 RNP와 같이 섞어서 세포에 처리하였고, 이에 따라 처리 된 세포 내 표적 유전자인 GFP 유전자의 교란 편집(disruption) 정도와 이에 따른 GFP 단백질의 발현양 감소 정도를 형광 현미경에 의한 세포들의 형광 세기 분석과 Western blot에 의한 단백질 발현량 분석을 통하여 측정하였음.



<그림. (a) RNP 나노입자 유전자 가위의 유전자 편집률 분석. (b) 형광 현미경을 통한 유전자 편집에 의한 표적 단백질 (GFP) 발현의 감소 분석. (c) Western을 통한 표적 단백질 발현량 분석. (d) flow cytometer를 통한 표적 단백질 발현량 분석>

- 결과적으로 siRNA 부위가 첨가 된 RNP 나노입자가 그렇지 않은 RNP 나노입자 또는 단량체 RNP보다 높은 유전자 편집률과 더 많은 단백질 발현 감소를 유발하였음.
- 종양 조직을 지니는 마우스 동물 모델에서도 RNP 나노입자 기반 유전자 가위 전달과 이에 따른 유전자 편집 효능을 측정하였음.
- 결과로, 동물 모델에서도 siRNA 부위가 첨가 된 RNP 나노입자에 의해 가장 높은 효능의 유전자 편집이 이루어지고 이에 따라 해당 단백질의 감소도 가장 현저하게 나타나는 것을

확인하였음.



<그림. (a) RNP 나노입자 유전자 가위의 동물 모델의 종양 조직 상 유전자 편집 효능 분석 *in vivo* 이미지와 (b) 조직 lysate 형광 분석. (c) 형광 현미경을 통한 유전자 편집에 의한 종양 조직 절단면 상 표적 단백질 (GFP) 발현의 감소 분석. (d) Western을 통한 종양 조직 내 표적 단백질 발현량 분석>

- 이러한 RNP 나노입자 기반 유전자 가위를 활용할 경우 세포뿐 만 아니라 동물 모델에서도 효과적으로 유전자 가위를 전달하여 높은 유전자 편집률을 달성할 수 있음.

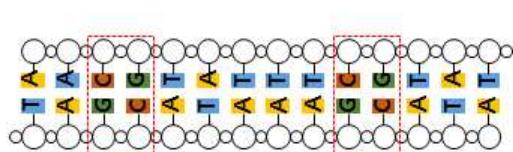
4. 대장암의 이질성 분석을 위한 DNA 메틸화 다중 검지 기술 개발

가. 메틸화된 DNA에 형광물질 표지

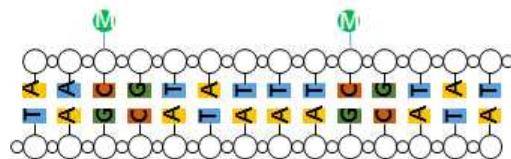
- 메틸화된 DNA에 형광표지를 하기 위한 프로토콜 확립 및 조건 최적화를 위해 Lambda phage DNA (λ -DNA, 48502 bp, New England Biolab.) 샘플을 메틸화 효소를 이용하여 메틸화를 시킨 후 실험을 수행하음.
- 메틸화를 위해 CpG methyltransferase와 BamHI methyltransferase를 사용하였으며, 효소 처리시 λ -DNA의 염기서열중 CG 와 GGATCC의 Cytosine에 각각 메틸화가 이루어짐.

- 메틸화된 CpG site에만 형광을 labeling 하기 위해 메틸화 특이 결합 단백질인 MBD-biotin (methylation binding domain, Invitrogen)을 사용하였고, 형광물질로 Cy5-streptavidin (Excitation: 640 nm, Emission: 700, Invitrogen)와 QD605 (Excitation: 540 nm, Emission: 605, Invitrogen)를 사용하였다.

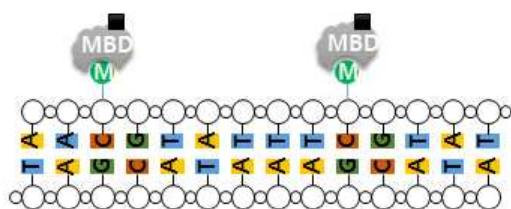
(1) DNA with CpG sites



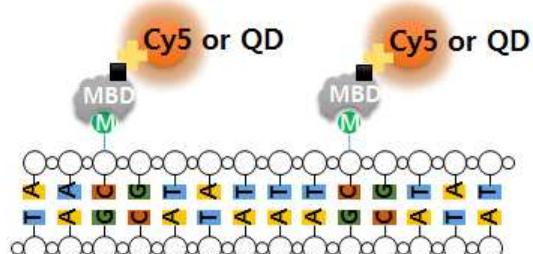
(2) Methylated DNA



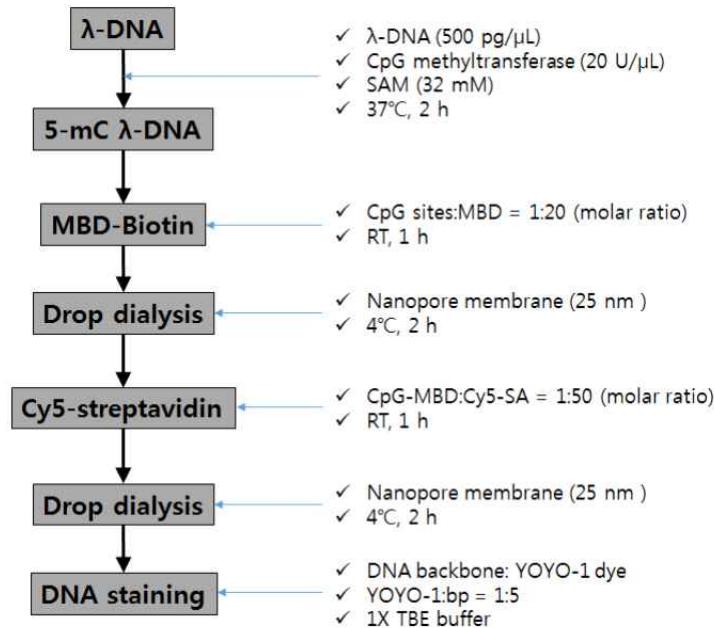
(2) MBD-biotin binding



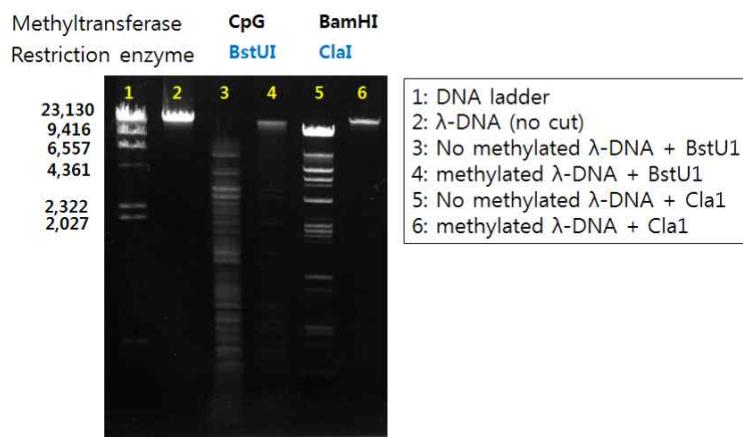
(4) Cy5 or QD-streptavidin labelling



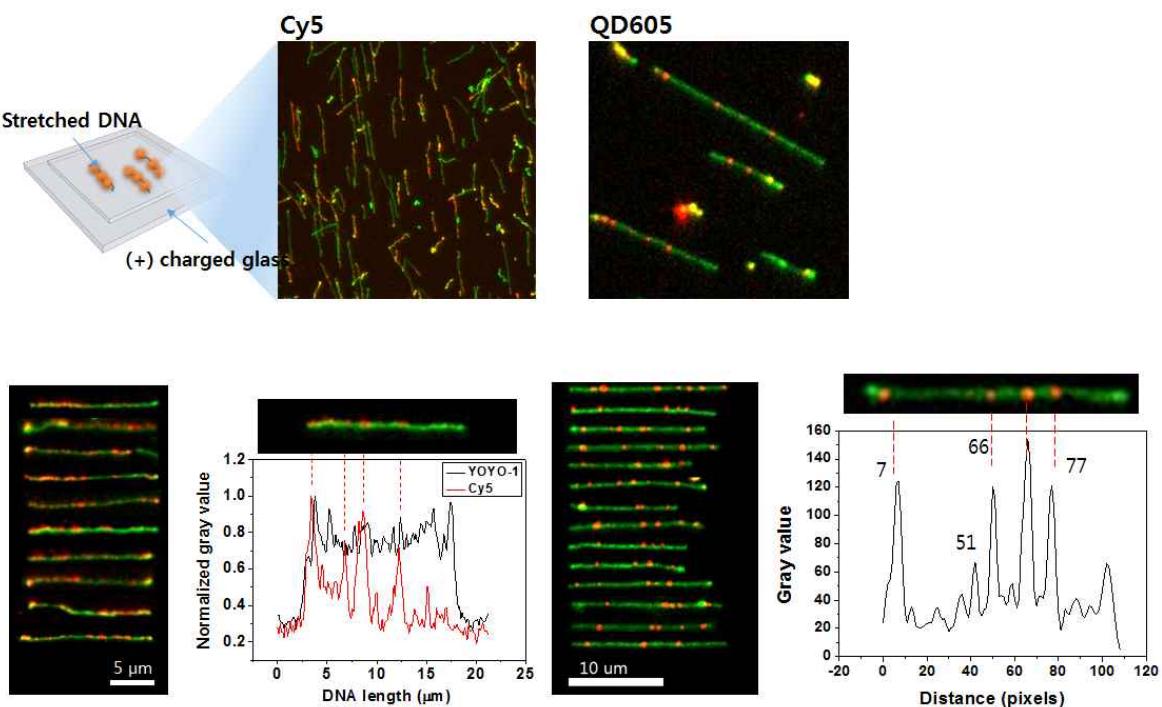
- 다양한 반응 조건을 통해 최종 형광표지 프로토콜 및 각 단계별 조건들을 최적화하였다. 먼저 500 pg/uL 농도의 λ-DNA에 CpG methyltransferase와 S-adenosylmethionine을 첨가하여, λ-DNA의 CpG site를 메틸화하였다.
- MBD-biotin을 첨가하여 메틸화된 cytosine에 MBD-biotin이 특이적으로 결합시켰음. 이 때 CpG site와 MBD-biotin의 반응 몰비는 1:20이며, 상온에서 한 시간 동안 가볍게 흔들면서 반응시킴. 반응이 끝난 후 λ-DNA 이외의 단백질들을 제거하기 위해 포어크기가 25 nm인 nitrocellulose membrane을 이용해 drop dialysis를 4도씨에서 2시간동안 수행하였다.
- Drop dialysis 후에 남은 λ-DNA 용액은 회수되었으며, 즉시 Cy5-streptavidin을 첨가하여 MBD-biotin에 결합시킴. 이 때 MBD-biotin과 Cy5-streptavidin의 몰비는 1: 50이며, 빛을 차단한 상태에서 상온에서 한 시간 동안 가볍게 흔들면서 반응시킴. 그 후 반응하지 않고 남아있는 Cy5-streptavidin를 동일한 조건에서 drop dialysis를 통해 제거하여 최종적으로 Cy5가 표지된 λ-DNA 시료를 준비하였다.



- CpG methyltransferase에 의해 λ-DNA의 메틸화가 정상적으로 이루어졌는지 확인하기 위해 제한효소 (restriction enzyme) 처리 후 아가로스겔 전기영동 (agarose gel electrophoresis)를 수행하였음. 제한효소인 BstU1은 염기서열 중 5'--CGCG--3'를 인식하여 CG/GC 사이를 절단하는 제한효소이며, ClaI는 염기서열 중 5'--GATC--3'를 인식하여 GA/TC 사이를 절단하는 제한효소임.
- λ-DNA의 전체 염기서열에서 CGCG는 총 151개가 존재하며, BstU1 처리시 152 조각으로 잘려지게 되며, ClaI 처리시 6 조각으로 잘려지게 됨. 하지만 이 효소는 메틸화된 cytosine에 의해 효소활성이 제한되는 methylation sensitive 특성을 가지고 있기 때문에 BstU1을 처리한 후 전기영동을 했을 때 잘려진 조각이 없다면 메틸화가 정상적으로 이루어졌다는 것을 알 수 있음. 위의 그림에서처럼 전기영동 확인 결과 메틸화된 λ-DNA는 하나의 랜드만을 관찰할 수 있고, 메틸화되지 않은 λ-DNA는 여러 조각으로 잘려져서 다수의 랜드를 보이고 있음.



- 형광 표지된 λ-DNA를 확인하기 위해 Cy5 표지된 λ-DNA의 backbone을 YOYO1 형광 (Excitation: 491 nm, Emission: 509, Invitrogen)으로 염색을 하였음. 이 때 YOYO1과 염기의 반응 비율은 1:5이며, 빛에 의한 photoblinking 현상을 억제하기 위해 4% mercaptoethanol을 첨가하였음.
- 염색된 λ-DNA는 (+) charged glass 위에서 길게 편 후 EM CCD를 통해 각각의 형광 이미지를 관찰하였다. 각 형광의 관찰 조건은 다음과 같고, Cy5-EM gain: 300, exposure time: 500 ms, YOYO1-EM gain: 100, exposure time: 100 ms, 캡쳐된 각각의 이미지는 ImageJ를 통해 하나의 이미지로 합친 후 최종적으로 형광 이미지를 확인하였다.
- 그 결과 15 um 정도 펴진 λ-DNA 상에 Cy5 및 QD605 형광이 관찰이 되었으며, 형광세기에 대한 line profile을 통해 표지된 Cy5와 QD605의 개수와 위치를 확인할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 형광 표지 방법을 이용하여 실제 대장암 조직에서 추출한 메틸화된 DNA에 형광 표지가 가능할 것으로 예상함.

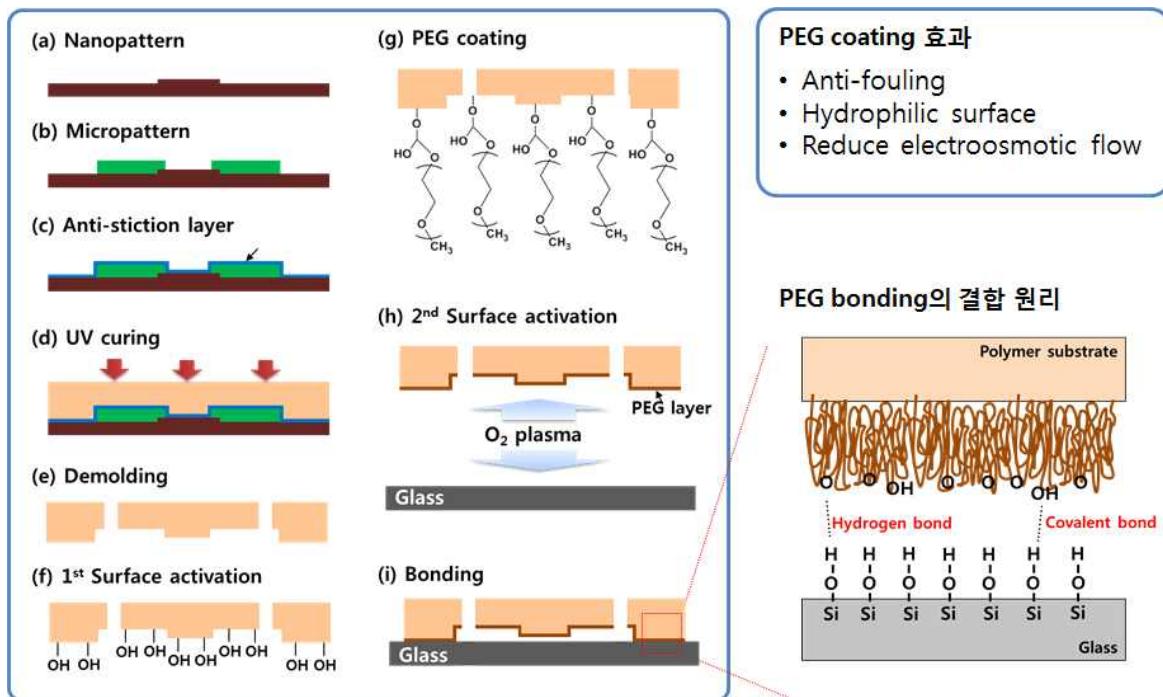


나. 나노임프린트를 이용한 100 nm 급 나노채널 디바이스 제작

- 나노채널은 나노임프린트 공정(nano imprint lithography)을 이용하여 제작하였다. 우선 E-beam lithography를 통해 나노채널 패턴을 100 nm x 100 nm 높이로 형성시킨 다음 마이크로 패턴을 위해 photo-lithography로 SU-8을 2 um 높이로 형성시킴. 그 후 고분자 물질의 분리가 잘 되도록 표면에 thin PDMS layer를 코팅함.
- 고분자 물질을 mold위에 놓고 UV를 조사하여 경화시킨 후 mold로부터 조심스럽게 분리하

고 입구 (inlet)와 출구 (outlet)를 드릴로 제작함. 그리고 유리기판과 결합할 면을 산소플라즈마처리를 하여 하이드록실기 (-OH)를 형성시킨다. 에폭시기로 변형된 PEG (polyethylene glycol)을 처리하여 표면에 올린 다음 최종적으로 glass와 결합하여 단위칩을 완성함.

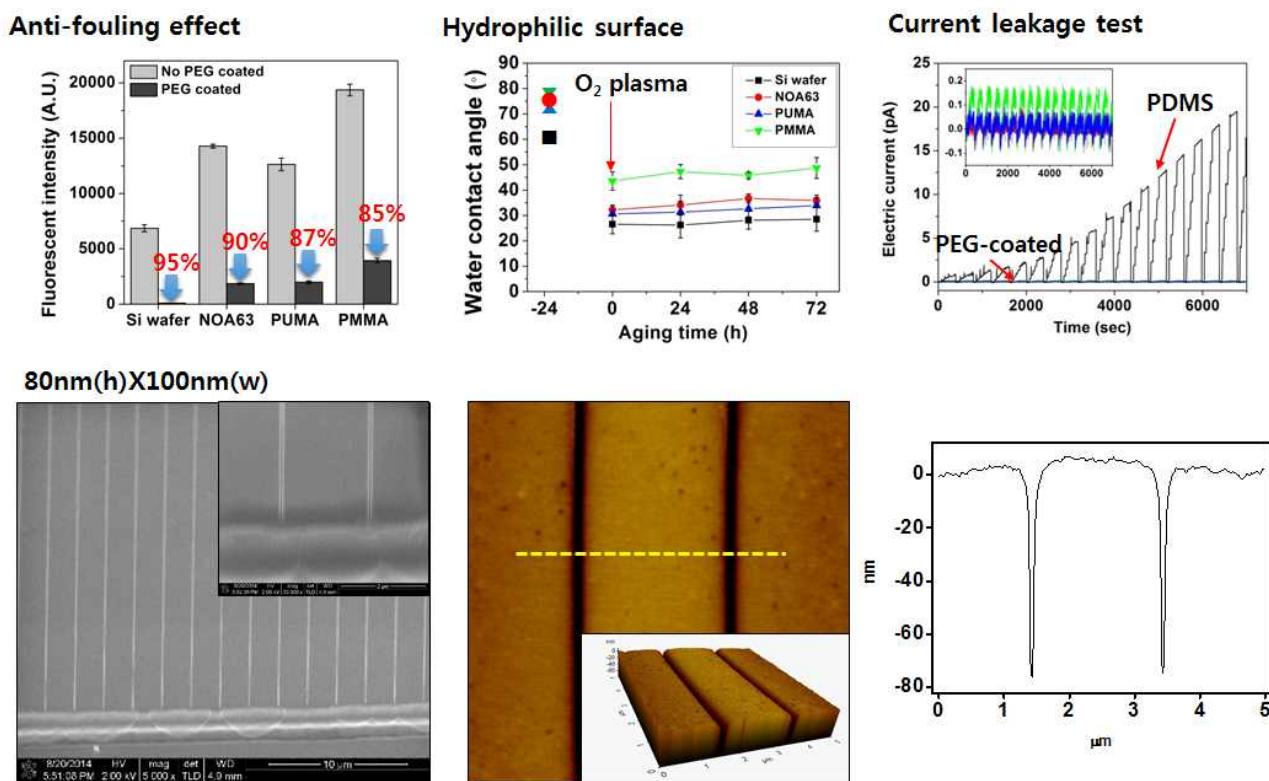
- PEG는 친수성 고분자 물질로써 마이크로 또는 나노채널의 표면처리에 많이 쓰임. PEG는 단백질이나 혁산의 비특이적 흡착을 방지하며, 표면을 친수성으로 유지시키며, 표면전하를 중성으로 만들어주기 때문에 전기삼투흐름을 감소시킬 수 있음.



- PEG 한쪽 끝에 epoxide기는 hydroxyl 기와 반응을 하여 covalent bonding을 형성시키며 쉽게 표면에 PEG를 코팅할 수 있음. PEG가 코팅된 기판과 유리기판을 산소플라즈마처리를 하여 활성화시킨 후 70도에서 결합하여 최종적으로 칩을 완성함.
- 나노채널을 구성하는 폴리머의 PEG 표면 처리 효과를 검증하기 위해서 다양한 부가 실험들을 추가적으로 수행함. PEG는 비특이 흡착하는 고분자로 잘 알려져 있으며, 이를 위해 alexa 597 형광이 붙은 fibrinogen을 2시간동안 반응시키고 표면을 DI water로 씻은 후 표면에 남아있는 잔류 형광 세기를 측정함. 그 결과 PEG가 코팅된 모든 폴리머의 표면에서 약 85% 이상 형광세기가 감소한 것을 확인할 수 있었음.
- PEG는 소수성 표면을 친수성으로 바꿔주는 역할을 하는 고분자 물질이기 때문에 친수성으로의 표면개질을 확인함. 표면개질은 물의 접촉각 변화를 통해 평가하였으며, 3일 동안 진행됨. 그 결과 PEG 처리하기 전에는 모든 폴리머 및 Si wafer의 접촉각은 60도 이상이었음. 하지만 PEG를 처리하고 나서 접촉각은 30도까지 감소하였으며, 3일이 지나도 거의 변화가 없이 유지되었음. 이를 통해 PEG에 의한 표면개질로 소수성 표면이 친수성 표면으로 바뀌었으며, 장시간 유지되는 것을 확인 하였음.
- 코팅된 PEG 층을 통해 전류가 새는지 확인하기 위해 고감도 전류측정기를 이용하여 2시간

동안 전류를 측정하였음. 대조군으로 사용된 PDMS-glass는 시간이 지남에 따라 전류가 점차 증가하였음. 이는 PDMS와 glass 간의 결합면 또는 PDMS 매질내로 전해질 용액의 누수가 발생하여 전류가 점차 흐르게 되는 것으로 설명할 수 있음. 하지만 이에 반해 PEG 코팅된 테스트칩은 전류의 크기가 ± 0.1 pA 범위내에서 거의 변함이 없음을 확인할 수 있었음. 이는 PEG 층이 전류의 누수를 방지할 수 있는 절연층으로의 역할을 할 수 있음을 의미함.

- 나노임프린트를 통해 제작된 폴리머 나노채널의 형상 및 전사된 dimension을 SEM (scanning electron microscopy)과 AFM (atomic force microscopy)을 이용하여 확인하였음. 그 결과 실제 실리콘 몰드 크기와 유사한 100 nm x 100 nm 크기의 나노채널이 제작되었음을 확인 할 수 있으며, 매끄러운 표면의 나노채널이 성공적으로 제작됨.

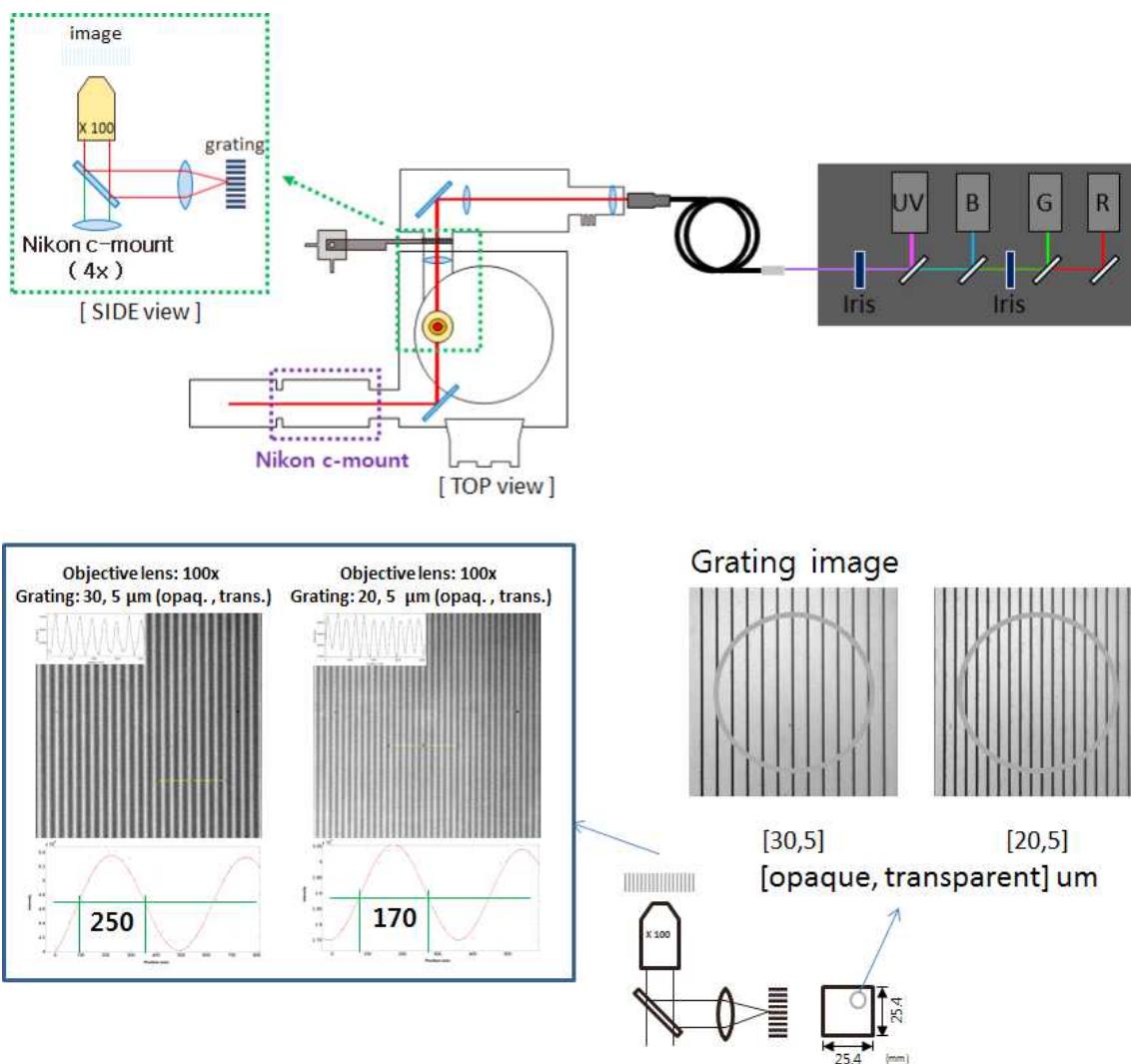


다. 나노광학기반의 메틸화 형광 검출 시스템 구축

- 나노광학기반을 이용한 DNA 메틸화 분석을 위해서는 ~300 nm 이하의 광학분해능이 요구되며, 이러한 분해능을 얻기 위해서는 나노크기의 슬릿을 기존 박막 공정을 이용한 보급형 간섭필터를 제작하여 기존 광학현미경에도 적용되어 저비용, 고분해능의 형광검출시스템을 개발하였음.
- 수백나노 사이즈의 형광 여기를 위한 프린지 패턴(illumination fringe pattern)을 만들기 위해서 레이저 빔을 이용한 간섭현상을 이용함. 예를 들어, 두개의 빔을 이용한 간섭계 구조를 적용하면, 450nm파장의 레이저와 1.45의 개구수(numerical aperture, NA)를 가지는 대물

렌즈(oil-immersion objective lens)를 사용하여 약 235nm 주기의 패턴 무늬를 만들 수 있음. (최소 프린지 주기 = $\lambda/2\sin(\alpha)$, $\alpha=\sin^{-1}(1.45/1.515)$, 1.515는 오일 굴절률)

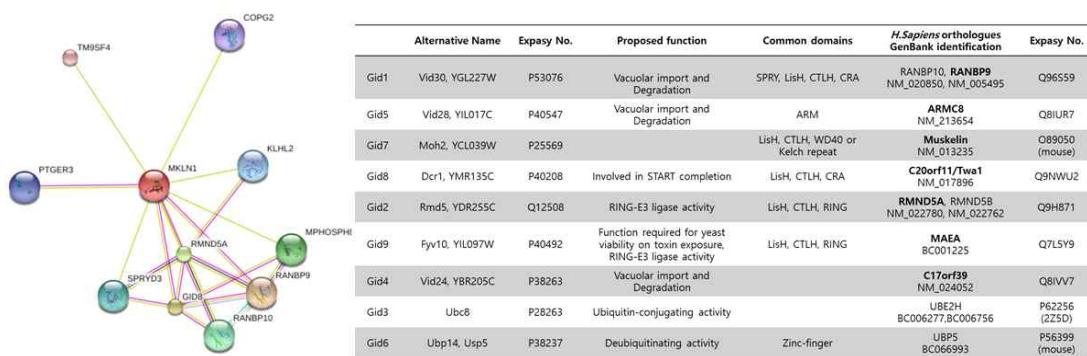
- 본 연구에서는 격자 구조 필터(diffraction grating)를 이용한 프로젝션 방법을 이용하면 회절한계 수준의 프린지 패턴을 만드는 것이 가능함. 이 경우, 샘플에 투사된 회절격자 (diffraction grating) 무늬는 회절한계에 의해 제시된 값이 한계치임. 앞에서 언급한 조건과 동일한 조건($\lambda=450\text{nm}$, $\text{NA}=1.45$)에서 약 189 nm의 패턴 주기가 이론적으로 가능함. (최소 프린지 주기 = $0.61\lambda/\text{NA}$)
- 너비와 간격이 30 um, 5 um와 20 um, 5 um의 회절 격자와 355 nm 파장의 레이저 및 수은 램프를 이용하여 실험을 진행함. 회절격자가 현미경의 field diaphragm 위치에 정확하게 놓여야 격자의 이미지가 대물렌즈에 의해 샘플에 투사됨. 이를 위해 회절 격자를 정교하게 위치시키기 위한 모듈을 제작함. 100x ($\text{NA}=1.45$)를 이용하였으며, 아래 그림에서 확인할 수 있듯이 밝은 부분이 약 250 nm 와 170 nm 간격의 나노광학 패턴을 획득함.



5. 세포전이 관련 단백질 작용기작 연구 및 조절단백질 상호작용을 기반으로 한 억제인자 발굴

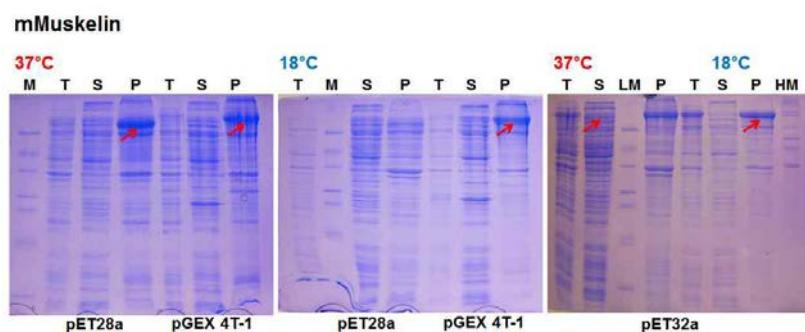
가. 세포전이단백질 Muskelin과 이에 결합하는 고순도 수용성 단백질들의 construction 확보

- 단백질 상호작용 database인 STRING 및 기존 연구결과들을 통해 Muskelin과 상호작용하는 총 10종의 단백질을 탐색함. 이들 중, Muskelin의 세포전이능과 관련될 것으로 보고된 Muskelin 외 6종의 단백질 Muskelin, RanBPM, Twal1, RMND5A, MAEA, ARMC8 α , ARMC8 β 를 선별하였음.



<그림. STRING 기반 Muskelin interactome(좌), 최종선별된 관련단백질(우)>

- 대장균주를 이용한 발현시스템을 위하여 대장균주에 적합한 벡터 플라스미드에 접합시킴. 이때 *in vitro* 상에서의 단백질 정제과정을 위해 N-terminal histidine-fusion, C-terminal histidine-fusion, GST-fusion, Trx-fusion, NusA-fusion 된 형태의 벡터를 이용함. 총 7종의 full-length 단백질을 벡터 내 접합시켜 여러 variant 확보를 위한 클론으로 이용함.

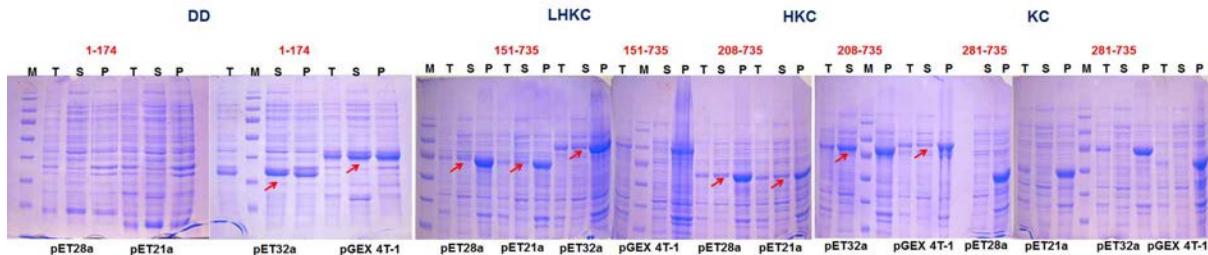


<그림. Full-length Muskelin의 수용화테스트>

- 먼저 확보된 full-length 단백질의 수용화 여부를 5ml test tube를 이용하여 small scale의 LB broth에서 OD600nm에서 0.6까지 cell density가 도달하도록 배양 후 IPTG-induction system을 이용하여 발현을 유도함. 이때 18°C/37°C 온도에서 배양하여 최적화된 수용화 온도를 탐색하였음. 결과 18°C, pET32a vector에 encoding 되어있는 Muskelin에서 일부 수용

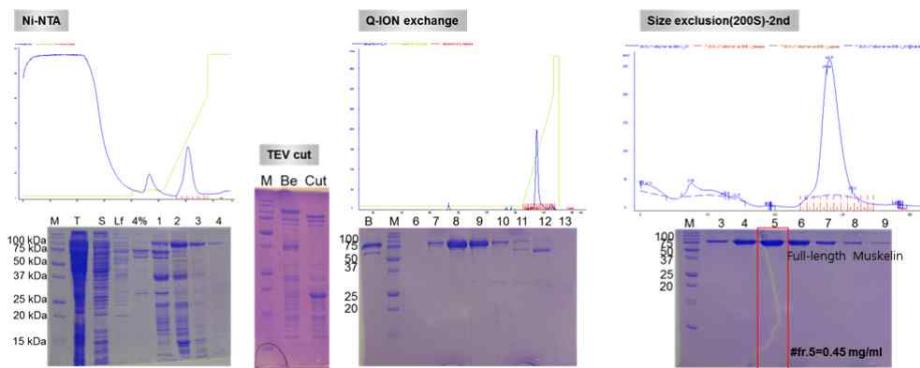
화된 형태로 단백질이 발현되는 것을 확인하였음.

- Muskelin은 다양한 도메인, DD(discoidin domain), LisH(Lissencephaly), CTLH(C-terminal to LisH), Kelch-repeat domain, Unique C-terminal domain, 으로 구성되어져 있는 단백질로 각 도메인의 기능 및 구조연구를 위해 각 도메인을 포함한 단백질 construct를 encoding 한 약 30종 이상의 재조합 플라스미드를 제작함. 상기 기술되어 있는 수용화 방법을 통하여 25°C의 온도에서 각 construct의 수용화도를 테스트하였음. 각 도메인을 포함한 construct 모두 20% 이상의 수용화도를 갖는 것으로 파악됨.



<그림. Muskelin을 구성하는 각 도메인, DD, LHCK, HKC, KC를 포함하는 단백질 construct의 수용화 테스트>

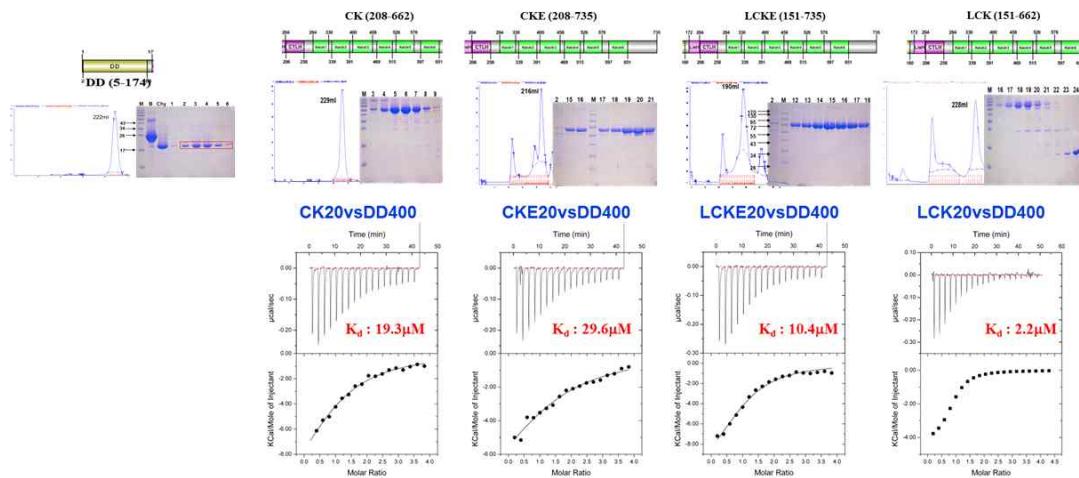
- 확보된 construct 모두 고순도의 단백질을 얻기위해 진핵생물의 codon usage에 최적화된 대장균주인 E.coli Rosetta(DE3) 균주에서 배양과정을 거침. 배양된 대장균주는 sonicator를 통한 세포벽 파쇄과정을 거친 후, high speed centrifugation을 통하여 cell debri를 분리하였음. 수용성 분리층은 Ni-NTA, GST column, Q, SP Ion exchange, Desalting, Gel filtration 등의 여러단계의 정제과정을 통하여 95% 이상의 순도로 분리됨. 특히 Full-length Muskelin의 경우, impurity 제거를 위해 ion exchange 과정이 필수적이며, pH7.4 이하 혹은 6mg/ml 이상의 농축 시 심하게 침전되는 경향을 보임. 최종적으로 0.5mg/L의 full-length 단백질을 확보하였음.



<그림. Full-length Muskelin 정제단계>

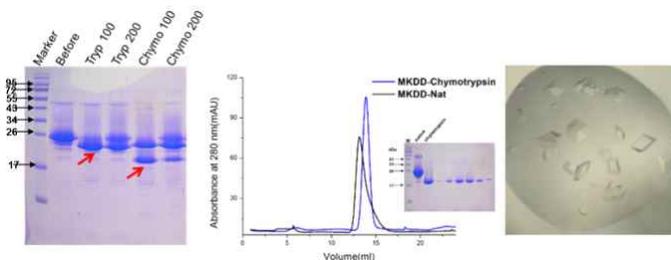
- Muskelin 단백질의 생화학적 성상 연구를 위하여 각 도메인 construct의 단백질을 수~mg 확보함. 정제과정은 상기방법과 동일함. 단백질의 self-assembly 기작을 알아보기 위해 단백질 내 도메인간의 상호작용을 Isothermal Titration Calorimetry(ITC)를 이용하여 측정하였음. 결과 Discoidin domain(DD)과 CTLH-Kelch domain은 직접적으로 상호작용하며 친화

도는 약 $\sim 2\mu\text{M}$ 임. 이들간의 상호작용은 LisH에 의한 dimerization과 Unique C-terminal domain이 없을 때 촉진되는 것으로 확인됨. DD와 Kelch의 상호작용은 최종적으로 Tetramer unit을 가지는 self-assembly 과정을 매개하는 것으로 보임.



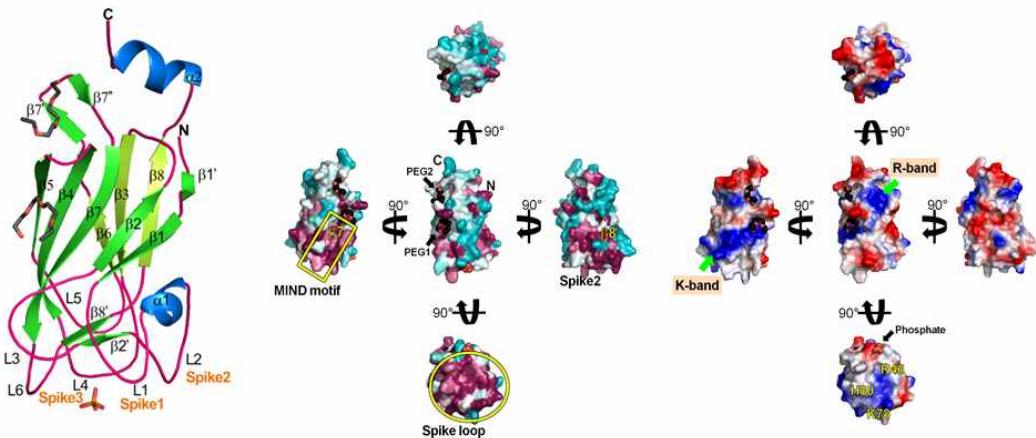
<그림. 등온적정열량계를 통한 도메인간의 상호작용 측정>

- 단백질의 구조연구를 위해 각 단백질들의 결정화를 유도하였으나 Discoidin domain 만이 결정화 됨. diffraction quality의 결정을 얻기위해 결정 최적화를 시행하였음. 온도, 베퍼, salt, 침전제, 단백질의 농도 모두 영향을 미치지 못함. 추가적으로 proteolytic enzyme(Chymotrypsin, Trypsin)을 이용한 Limited proteolysis를 시도하였음. 최종적으로 Chymotrypsin을 이용한 discoidin domain의 결정화에 성공하였으며 1.55 Å의 해상도에서 단백질 결정의 회절데이터를 수집하였음.

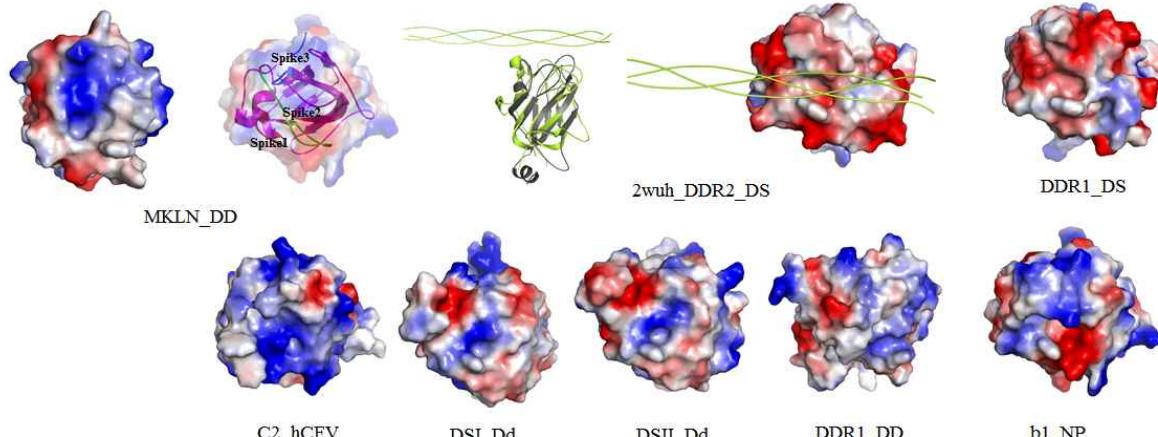


<그림. Discoidin domain의 limited proteolysis 과정과 정제단계 및 결정>

- Muskelin의 Discoidin domain의 구조를 single-wavelength anomalous dispersion (SAD) phasing 방법을 통하여 세계 최초로 규명하였으며, 이는 두 개의 PEG 분자와 한 개의 인산화기를 포함하고 있었음. 또한 여러 종의 진핵생물의 Muskelin 단백질에서 폭넓게 보존되어 있는 MIND motif와 K-band, R-band의 자리 및 특성을 구조적으로 설명하였음. 추가적으로 Muskelin의 Discoidin domain과 유사한 fold를 갖는 세포막 결합단백질들과의 구조비교·분석을 통하여 위 단백질의 세포막 결합 가능성을 추가적으로 제시하였음.

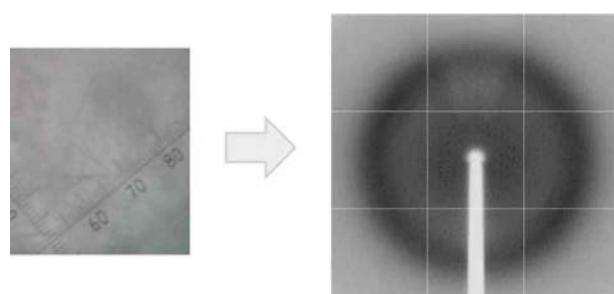


<그림. Muskelin DD의 overall structure, 인산화기 및 PEG 결합 부위와 MIND 모티프, K-band, R-band 부위>



<그림. Discoidin domain 유사단백질들과의 구조비교>

- 고순도의 Muskelin과 DIC & GABA Receptor의 복합체 단백질을 확보하였으며, 결정화 조건을 탐색해 최적화 한 결과 4.0 Å resolution까지 회절 가능한 결정을 얻었음. 포항 가속기를 이용해 data를 수집해 프로세싱 완료하였으며 현재는 구조 규명을 시도하고 있음. 하지만, 추가 optimization이 필요할 것으로 보임.
- 아래는 확보한 결정과 회절 패턴임.



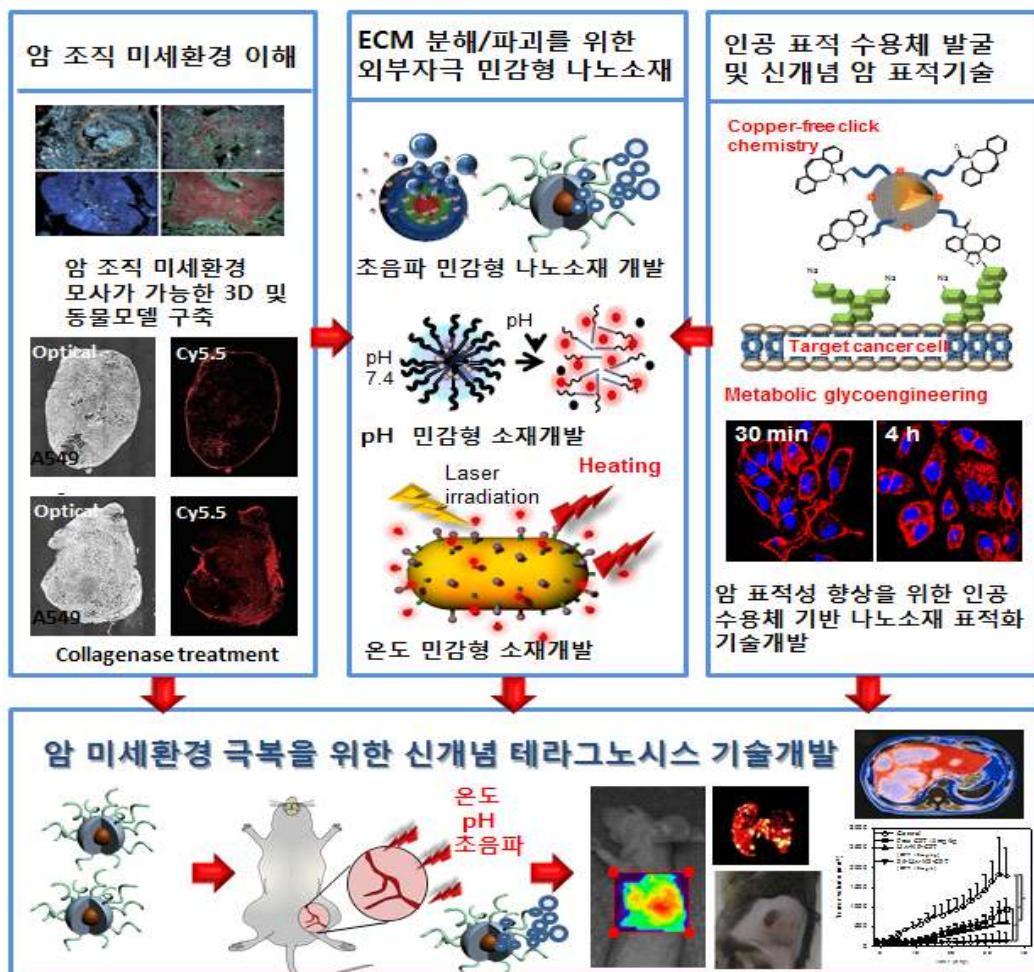
<그림. 복합체 결정과 회절패턴 >

제 2 절 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발

1. 대장암 조직의 세포외 기질 및 다양성 극복을 위한 테라그노시스 원천기술 개발

암 조직 미세환경 극복을 위한 테라그노시스 융합원천기술 개발

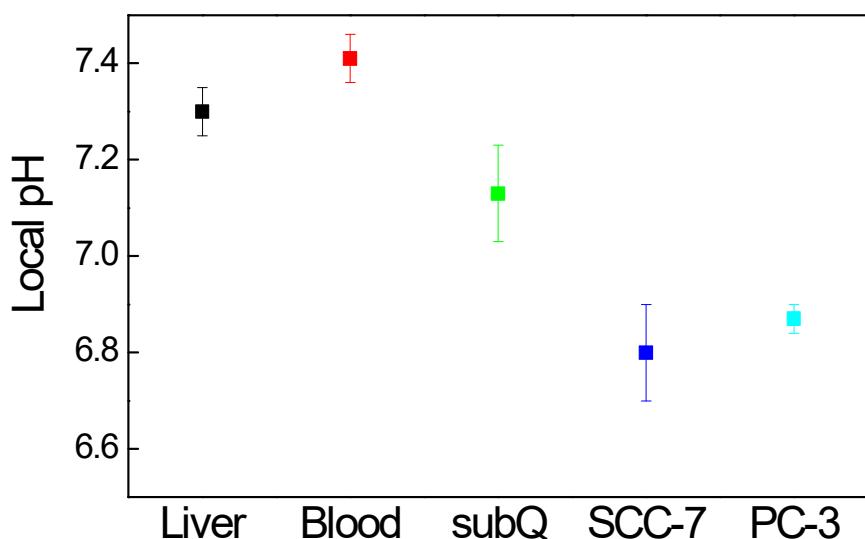
- 암 조직의 미세환경 이해: 암의 ECM 조직 및 다양성 생리학적 원리 규명
- 암 조직 ECM 분해/파괴가 가능한 외부자극 민감형 나노소재 개발
- 암 조직의 다양성 극복을 위한 인공 표적 수용체 기반 나노소재 표적기술 개발



<그림. 생체 암조직의 이질성 극복을 위한 정밀 진단·치료기술개발 개요>

가. 대장암 조직 미세 환경의 이해

- 현재 대부분의 나노약물전달시스템이 인체의 종양 조직 전달에 실패하는 원인은 인체 종양의 특이한 미세환경(cancer microenvironment) 및 종양의 이질성 (cancer heterogeneity)의 영향으로 알려져 있음. 종양 치료에서의 중요한 요소는 암세포 단일 적인 요소가 아닌 암 조직을 이루는 미세환경이 암 질환의 진행 및 치료에 매우 중요한 요소임이 밝혀졌음. 또한 기존의 약물전달시스템과 같이 단순히 암세포를 표적화하여 전달하기 보다는 암세포 뿐 아니라 암 조직의 미세환경 특성을 고려한 나노전달체 개발의 중요성이 대두되고 있음. 특히 암 미세환경에서 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 존재는 기존 나노약물전달체를 종양 조직 내로 전달하는 효율을 저하시키는 문제로 인식되고 있음.
- 대장암 조직 역시 특징적인 미세환경 및 이질성의 성질을 가지고 있음. 따라서 대장암 모델과 다른 종양의 미세환경을 비교함으로써, 대장암의 미세환경을 이해하고자 함. 다양한 종양의 ECM 조직 평가를 위해서 대장암세포 HT29를 포함하여 A549, SCC7, MCF-7, MDA-MB468, PC3, U87 세포를 이용하여 7가지 종양 동물 모델을 만듬.
- 종양에서의 pH를 측정하여 종양별로 미세환경의 세포외 기질의 특성을 간접적으로 확인하고자 하였음.

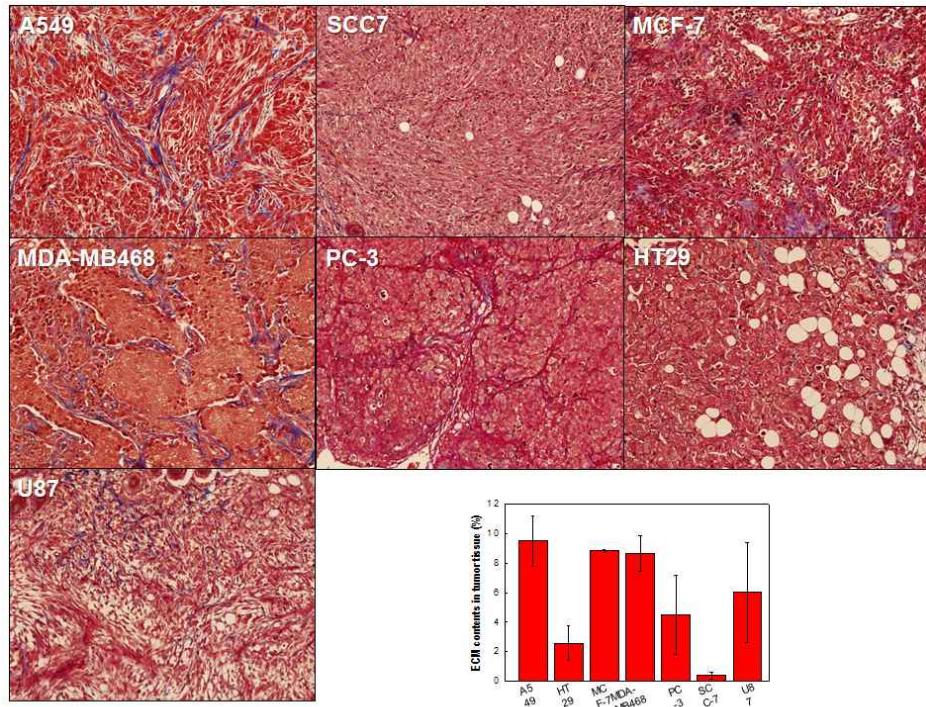


<그림. 다양한 종양에서의 pH 그래프>

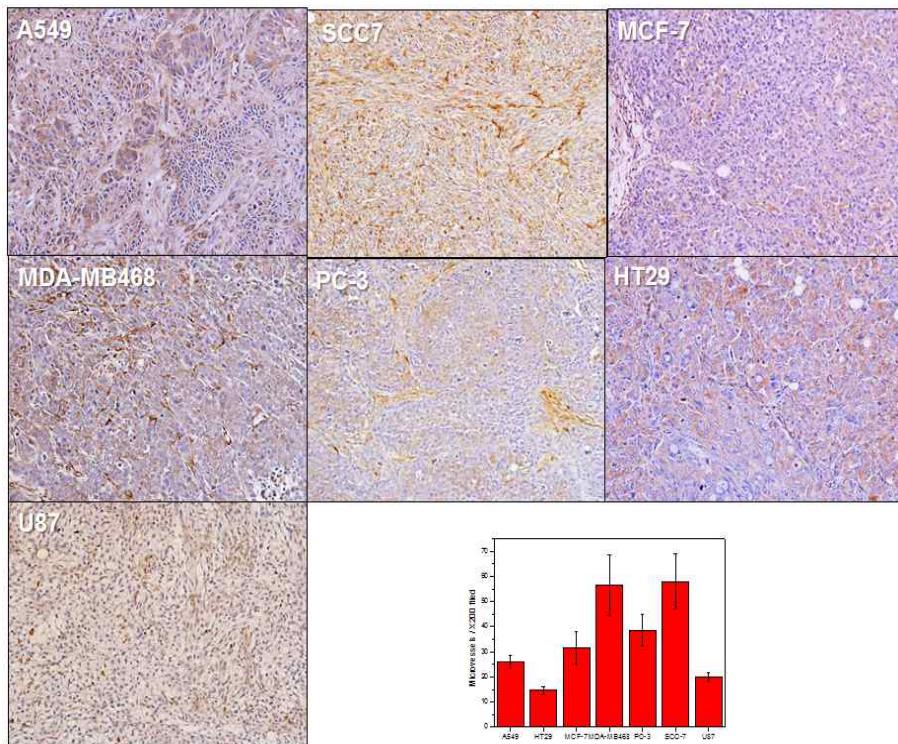
- pH 측정 결과 종양은 정상 pH보다 낮게 측정되는 것을 확인하였음. 이는 종양 조직 주변의 혈관내피형성세포가 (Endothelial progenitor cells, EPCs) 빠른 신생혈관형성을 위한 효율적인 대사 작용으로 산소가 매우 적은 환경을 필요로 하게 되며, 이러한 대사성 환경은

직접적으로 혈관의 산소 부족에 관여하여 저산소증(hypoxia) 환경을 조성함을 확인함.

- 대장암세포 HT29를 포함하여 A549, SCC7, MCF-7, MDA-MB468, PC3, U87 세포를 이용하여 7가지 종양 동물 모델의 종양을 적출하여 ECM 평가와 혈관분포를 확인하였음.



<그림. 종양에 따른 세포외기질인 콜라겐의 분포>

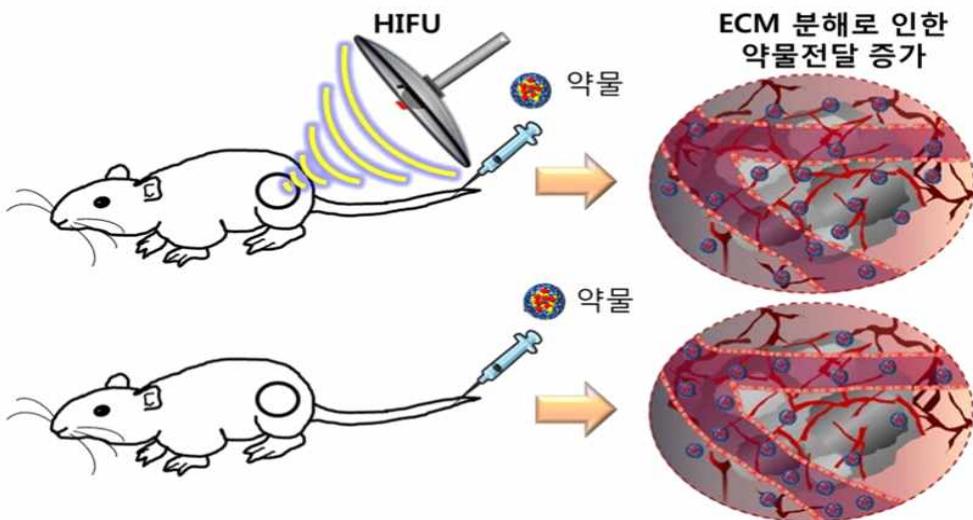


<그림. 종양에 따른 혈관의 분포>

- 대장암세포인 HT29로 만들어진 종양의 경우 다른 종류의 종양에 비해 세포외기질인 콜라겐의 분포가 적고, 혈관의 분포도 적었음.

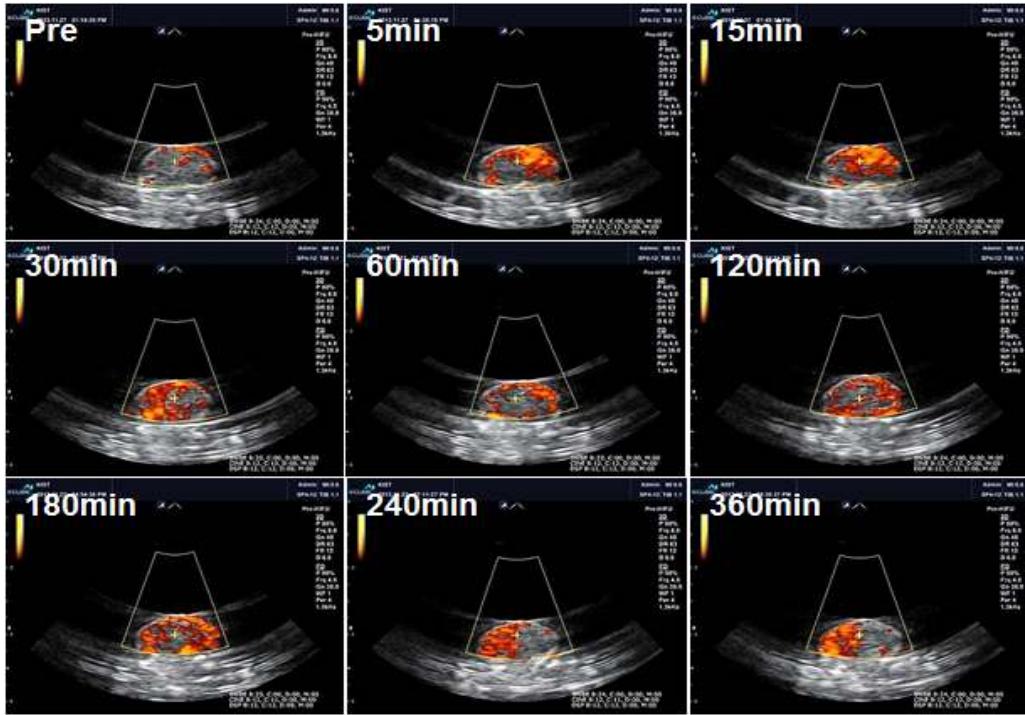
나. 암 조직 ECM 분해/파괴가 가능한 외부자극 민감형 나노소재 개발

- 임상에서 이미 사용중인 high-intensity focused ultrasound (HIFU) 방법을 이용하여 암 조직 내 extracellular matrix (ECM)을 분해/파괴할 수 있는지 연구함.

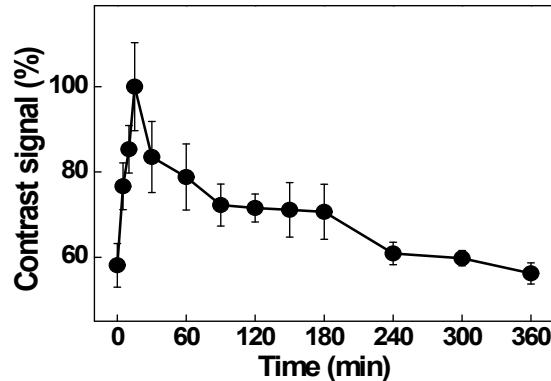


<그림. HIFU를 이용한 ECM 분해/파괴로 인하여 약물의 조직 내 전달 향상>

- HIFU에 의한 암 조직 내 혈류량 변화 확인: PC-3 cancer cell을 심어서 유도한 종양 마우스를 마취시킨 후 HIFU를 암 조직에 5W/cm² 의 세기로 가해줌. 직후에 HIFU 장비에 달려 있는 초음파 장비의 Power Doppler Mode를 이용하여 HIFU가 가해진 암 조직 내 혈관의 혈류량을 측정함. Power Doppler Mode는 혈류와 같은 구조체가 초음파 장비의 probe로부터 멀어지거나 혹은 가까워지는 여부를 판별하고 그 상대적인 속도를 측정하는 방식으로 보통 혈류량을 측정하는 데 사용됨. 이 Mode를 통해 암 조직 내 혈류량을 측정한 결과 HIFU를 가해주기 전에 비해 15, 30분에 혈류량이 증가하고 시간이 지남에 따라 감소하는 추세를 보이는 것을 알 수 있음. 6시간이 되었을 때 HIFU 처리 전으로 혈류량이 돌아오는 결과를 확인함.
- 위의 시간에 따른 암 조직 내 혈류량 결과를 정량화 한 결과로 HIFU를 가해주기 전에 비해 시간에 따라 혈류량이 30분에 최고치를 기록하고 점차 감소하다가 6시간 째 가해주기 전으로 복귀하는 것을 알 수 있음.
- 이러한 결과를 통해 HIFU를 암 조직에 가해주었을 때 증가된 혈류량으로 인해 정맥 주사된 나노입자의 더 많은 양이 암 조직 내 혈관을 지나 축적될 수 있다는 결론을 내림.



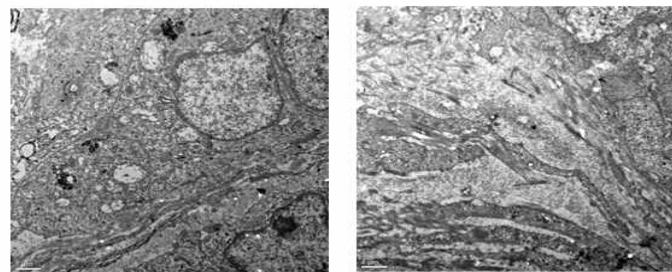
<그림. HIFU 처리 이후 시간에 따른 암 조직 내 혈관의 혈류량 변화 양상>



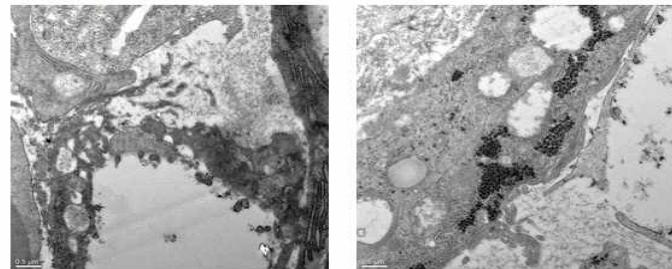
<그림. 암 조직 내 혈관의 혈류량 변화 정량화 결과>

- HIFU에 의한 암 조직 내 미세 구조 변화 관찰: A549 암이 심어진 마우스에 HIFU를 5, 10, 20W/cm²의 세기로 각각 가해준 뒤 전자현미경 (TEM) 분석에 용이한 Iron oxide가 적재된 Chitosan 나노입자를 정맥 주사함. 주사한 지 24시간 경과 후에 마우스를 안락사 후 암을 적출한 뒤 급속 동결 고정함. 이후에 절편을 만들어 전자현미경으로 암 조직 내 미세 구조를 관찰함. 5W/cm² 세기로 가해준 경우 HIFU를 가하지 않은 암 조직과 비교하여 암 조직 내의 혈관 등의 미세 구조에 큰 변화가 없었지만 10, 20W/cm² 세기로 가해준 경우 암 조직 내의 혈관이 파괴되어 적혈구가 조직 내에서 돌아다니고 조직이 파괴되는 등의 손상이 발견됨.

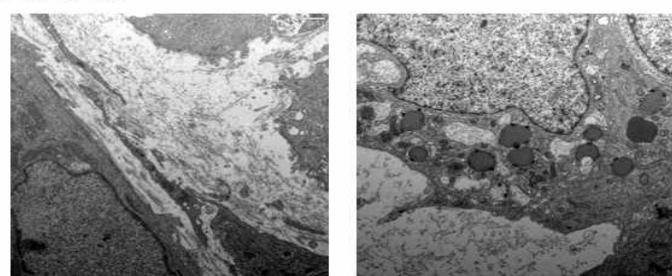
5W HIFU-CNP



10W HIFU-CNP

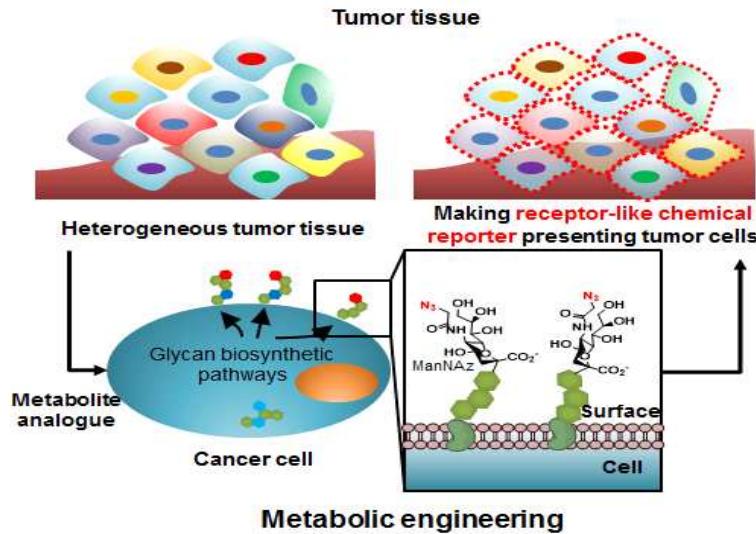


20W HIFU-CNP



<그림. 전자현미경을 통한 HIFU의 영향에 따른 암 조직 내 미세 구조 변화>

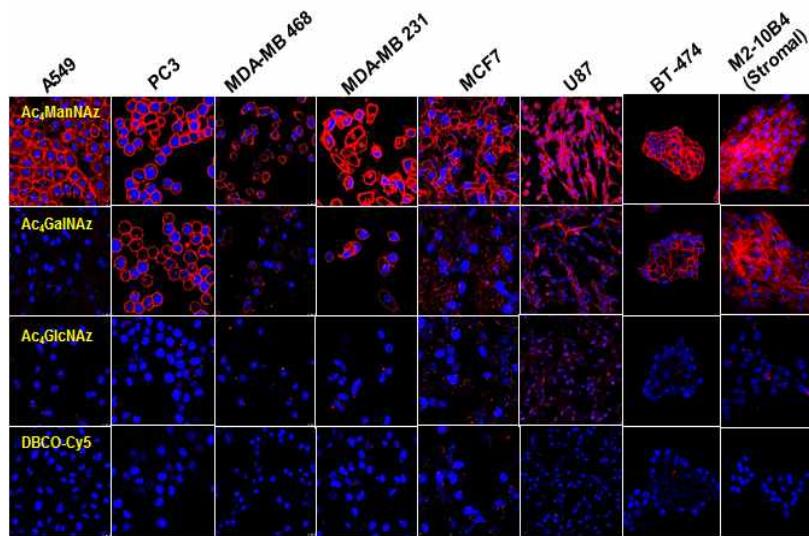
다. 암 조직의 다양성 극복을 위한 인공 표적 수용체 기반 나노소재 표적기술 개발



<그림. 인공표적 수용체인 아자이드기가 도입된 당 전구체를 이용한 대사체공학기술>

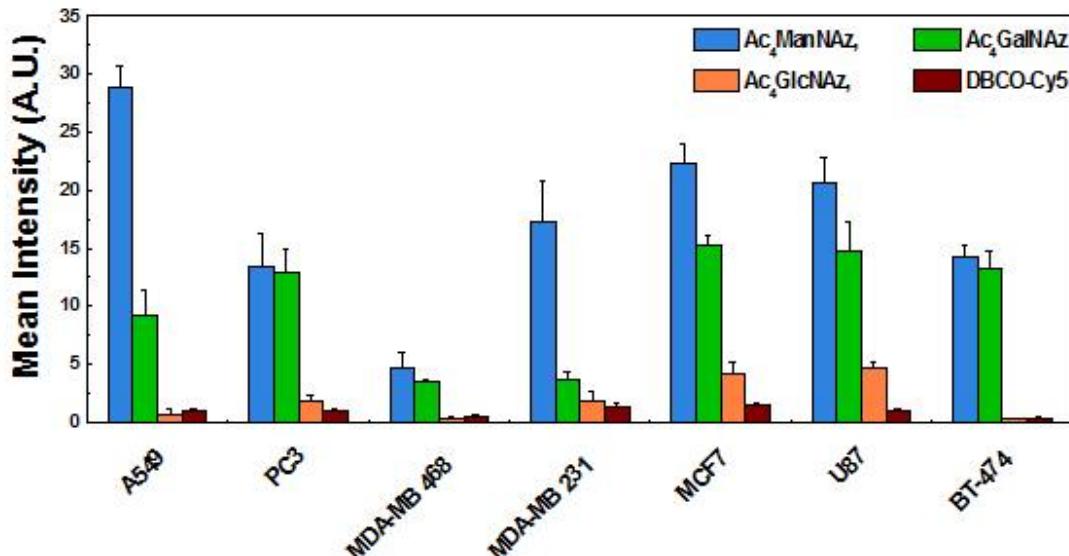
- 암 세포의 당 대사메커니즘을 이용하여 암 세포 표면에 인공표적 수용체를 발현시키고 이를 표적화 할 수 있는 기술을 개발함.
- 본 연구에서 사용한 당 대사체공학기술은 인공표적 수용체로써 클릭반응이 가능한 아자이드(azide)기를 도입한 당 전구체를 암 조직에 제공하고, 이를 이용하여 암 세포가 세포 표면에 아자이드기가 포함된 시알릭산(sialic acid)을 생성하도록 함. 최종적으로 아자이드기와 클릭반응으로 결합할 수 있는 BCN(bicyclononyne) 또는 DBCO(dibenzylcyclooctyne)이 수식된 나노입자 또는 나노프로브를 이용하여 암 세포를 표적화 할 수 있도록 함.
- A549 (폐암), PC3 (전립선 암), MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7, BT-474 (유방암), U87 (신경 모세포종), M2-10B4 (스트로마 세포)에 대하여 당 대사 전구체인 tetra acetylated N-acetylazidomannosamine (Ac₄ManNAz), tetra acetylated N-acetylazidoglucosamine (Ac₄GlcNAz), tetra acetylated N-acetylazidogalactosamine (Ac₄GalNAz)를 이용하여 세포표면의 아자이드 발현 효율을 조사함. 향후 다양한 대장암 세포에 대해서도 실험을 실시할 계획임. 실험방법은 다음과 같음.
- 1x10⁵개의 A549 (폐암), PC3 (전립선 암), MDA-MB-231, MCF7, BT-474 (유방암), U87 (신경 모세포종), M2-10B4 (스트로마 세포)를 각각 10% FBS(fatal bovine serum), 1% antibiotics, 50μM Ac₄ManNAz, Ac₄GlcNAz, Ac₄GalNAz가 함유된 RPMI1640 배지에 분산 시킨 뒤, 35mm cover glass bottom dish에 넣고, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 안정화시킴.
- 세포 표면의 아자이드 발현양을 관찰하기 위하여, 각각의 세포를 DPBS를 이용하여 2회씩 세척하고, 200nM DBCO-Cy5가 함유된 RPMI1640 배지에서 1시간 동안 배양함. 배양이 끝난 세포는 DPBS를 이용하여 2회 세척 후 4% 파라포름알데히드-글루타알데히드 고정액으로 10분간 고정하고, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 마운팅을 실시하였음.
- 405nm 다이오드, 458, 488, 514, 633nm 레이저가 장착된 공초점 현미경을 이용하여 세포 표

면에 결합된 Cy5 형광 및 세포핵내 형광을 관찰하였음 .



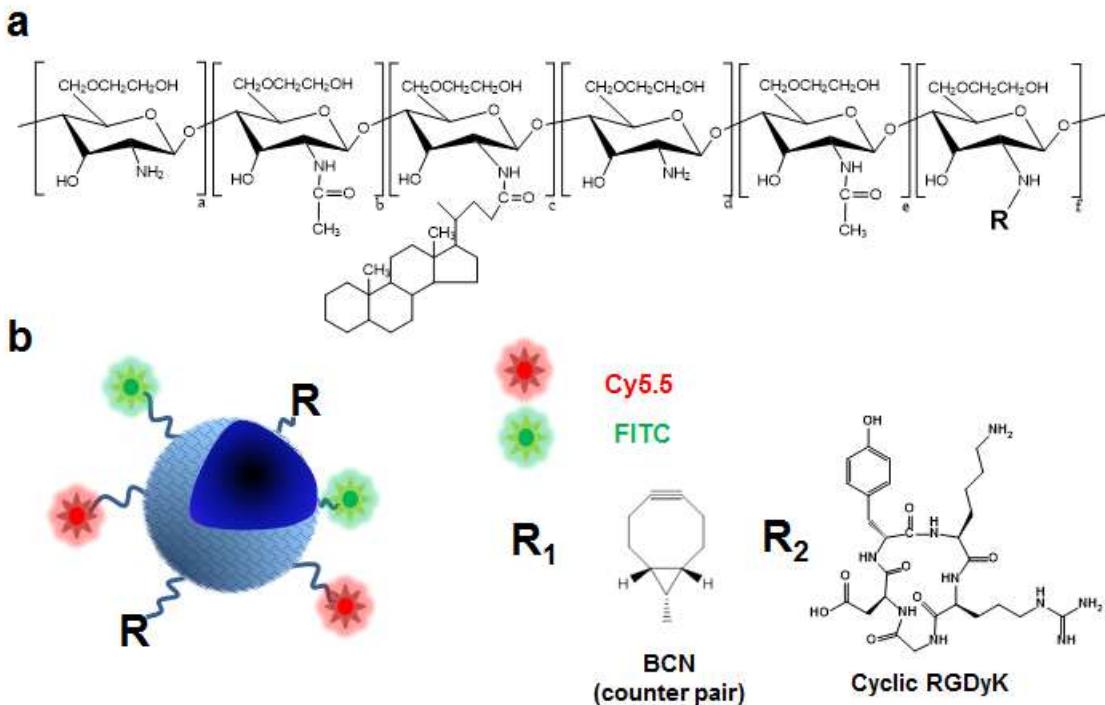
<그림. 암 세포표면에 발현된 아자이드를 형광체로 염색한 암 세포의 공초점 현미경 이미지>

- 위의 결과를 바탕으로, Ac_4ManNAz 를 이용한 경우 A549, PC3, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF7, BT-474, U87, M2-10B4의 모든 세포에서 아자이드기가 효과적으로 발현되고 이를 표적화 할 수 있음을 확인함. 그러나 Ac_4GalNAz , Ac_4GlcNAz 를 이용하는 경우 균일한 표적화가 이루어지지 않는 것으로 보이며, 이러한 특성은 Glycobiology vol.19 no.12 pp.1382-1401 (2009)에 보고된 바와 같이 암 세포 표면에 존재하는 당단백질 중 시알릭산이 구조상 최외각에 존재하며 특히 시알릭산 말단에 mannosamine이 위치함과 동시에 galactosamine, glucosamine이 하단부에 위치함으로써 발생하는 구조적 방해(steric hindrance)에 의해 나타나는 것으로 판단됨.
- 위 공초점 현미경 이미지의 형광량을 정량화하기 위하여, 각 이미지 펜드의 형광량을 image J 프로그램을 이용하여 수치화함.



<그림. Image J 프로그램을 이용한 형광량 정량 그래프>

- Ac_4ManNAz 을 이용하여 암 세포에 대사체공학기술을 적용하면 Ac_4GalNAz 을 이용한 경우 보다 1-3배 이상, Ac_4GlcNAz 을 이용한 경우보다 4-6배 이상 그리고 대사체공학기술을 적용하지 않은 그룹에 비해 10-15배 이상 표적화 효율이 증가하는 것으로 분석됨. 상기 결과들을 바탕으로 대사체공학기술을 적용하여 암 세포의 표적화 능력을 향상시킬 수 있을 것으로 기대 되며, 이후 실험에는 가장 높은 표적화 효율을 나타내는 Ac_4ManNAz 을 이용한 대사체공학기술을 적용하여 실험을 진행함.
- 암 세포의 대사체공학기술을 이용한 표적화 기술의 효율을 평가하기 위하여 본 연구에서는 글리콜키토산(glycol chitosan)나노입자(CNP)에 아자이드기와 클릭 반응이 가능한 BCN을 수식하여 BCN-CNP를 제조하고, 암 표적화에 가장 널리 사용되는 cyclic RGDyK(cRGD) 단백질을 수식한 RGD-CNP와 비교분석을 실시하였음.



<그림. BCN-CNP 및 cRGD-CNP의 구조도 (a) 및 모식도 (b)>

- 암 세포의 대사체공학기술을 이용한 표적화 기술의 효율을 평가하기 위하여 사용한 CNP 제조법은 다음과 같음. 250mg의 GC(1 μmol)를 62.5ml의 물/메탄올 혼합용액에 녹임. 75mg의 5 β -cholanic acid(208 μmol)을 62.5 ml 메탄올에 녹이고, 60mg의 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carboiimide hydrochloride (EDC)와 36mg의 N-hydroxysuccinimide (NHS)를 혼합한 뒤 30분간 교반함.
- 5 β -cholanic acid 용액에 GC용액을 천천히 적하하고 아미드 결합이 형성될 수 있도록 24시간 동안 상온에서 교반한다.
- 반응이 종료된 용액은 물/메탄올 혼합액 (부피비 1:0, 1:1, 0:1)에서 반투과성 맴브레인 (MWCO=12 - 14,000 Da)을 이용하여 촉매 및 미 반응물을 제거하고 정제된 CNP용액을 동결건조하여 백색 가루형태의 CNP를 얻음.
- 상기 CNP의 광학영상화를 위하여 FITC, TRITC, Cy5.5, IR800CW의 형광체를 수식함. 반응 방법은 다음과 같음. 100mg의 CNP (391 μmol NH₂)을 20ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹임. 아민 몰 수 대비 1% (3.91 μmol NH₂)에 해당하는 FITC, TRITC, Cy5.5, IR800CW를 각각 CNP용액에 천천히 적하하고 24시간동안 상온에서 교반함.
- 반응이 종료된 용액은 물/DMSO 혼합액 (부피비 1:0, 1:1, 0:1)에서 반투과성 맴브레인 (MWCO=12 - 14,000 Da)을 이용하여 미 반응물을 제거하고 정제된 CNP용액을 동결건조하여 황색 가루형태의 FITC-CNP, 적색 가루형태의 TRITC-CNP, 청색 가루형태의 Cy5.5-CNP 그리고 녹색 가루형태의 IR800CW-CNP를 얻음.

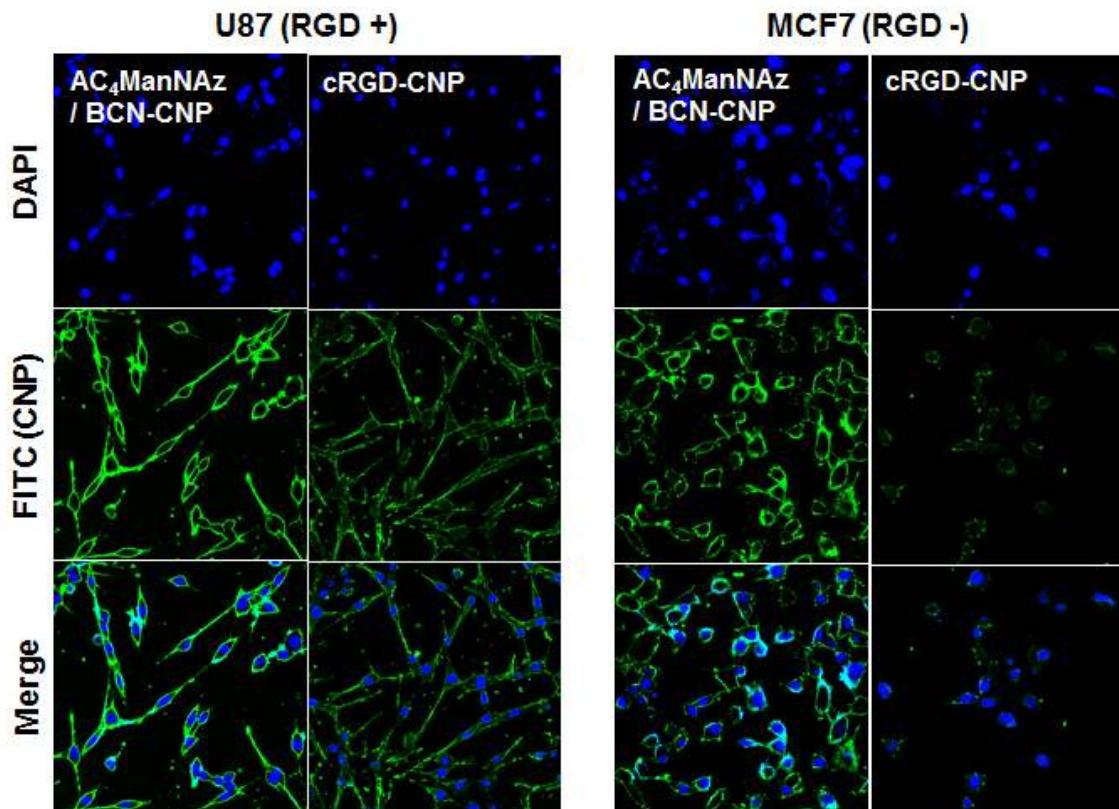
- 형광체가 수식된 CNP의 암 세포 표적화를 위하여 BCN 및 cRGD를 수식함. 반응 방법은 다음과 같음. 50mg의 CNP (195.5 μmol NH₂)을 10ml의 DMSO에 녹임. 아민 몰 수 대비 1% - 10% (1.95 μmol - 19.5 μmol NH₂)에 해당하는 BCN을 각각 CNP용액에 천천히 적하하고 24시간동안 상온에서 교반함.
- 반응이 종료된 용액은 물/DMSO 혼합액 (부피비 1:0, 1:1, 0:1)에서 반투과성 맴브레인 (MWCO=12 - 14,000 Da)을 이용하여 미 반응물을 제거하고 정제된 CNP용액을 동결건조하여 형광체가 수식된 BCN-CNP를 얻음.
- cRGD를 수식하기 위하여 25mg의 형광체가 수식된 BCN-CNP을 5ml DMSO에 녹인 뒤 cRGD-azide (30 μmol)을 천천히 적하한 후 37°C에서 6시간동안 교반함.
- 반응이 종료된 용액은 물/DMSO 혼합액 (부피비 1:0, 1:1, 0:1)에서 반투과성 맴브레인 (MWCO=12 - 14,000 Da)을 이용하여 미 반응물을 제거하고 정제된 CNP용액을 동결건조하여 형광체가 수식된 cRGD-CNP를 얻음.
- 제조된 CNP, cRGD-CNP, BCN-CNP의 물리화학적 특성을 분석하기 위하여 각각의 CNP 나노입자를 1mg/ml의 농도로 증류수에 분산시킨 뒤, 동적광산란장치 (dynamic laser scattering, DLS)를 이용하여 입자의 크기 및 표면전하를 측정하였음.

	Diameter (nm)	Zeta-potential (mV)
CNP	258.5 \pm 14.14	13.8 \pm 0.17
cRGD-CNP	285.8 \pm 3.96	15.3 \pm 0.30
BCN-CNP	266.8 \pm 11.96	5.08 \pm 1.22

<표. CNP, cRGD-CNP, BCN-CNP의 물리화학적 특성분석>

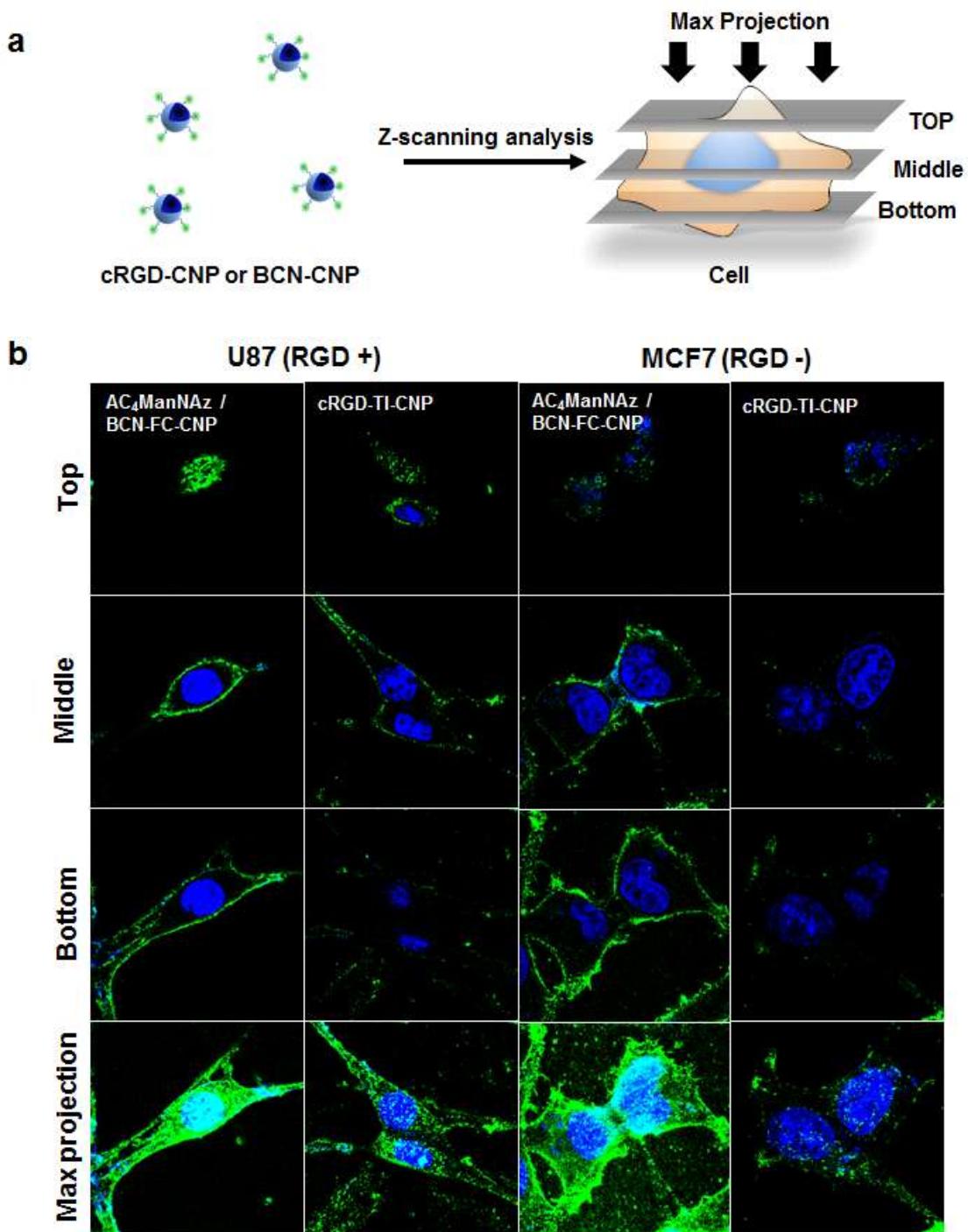
- 제조된 CNP, cRGD-CNP, BCN-CNP는 각각 258.5nm, 285.8nm, 266.8nm의 크기를 가지며, 표면전하는 각각 13.8mV, 15.3mV, 5.08mV로 측정되었음. 이때 GC의 아민기를 치환했음에도 불구하고 cRGD의 표면전하가 증가하는 것은 cRGD에 존재하는 아민에 의한 현상으로 판단됨.
- cRGD-CNP와 BCN-CNP를 이용하여, U87 세포와 MCF7 세포에서의 대사체공학기술을 이용한 암 세포 표적화 효과를 관찰함. 실험 방법은 다음과 같음.
- 1x10⁵개의 U87, MCF7 세포를 각각 10% FBS(fatal bovine serum), 1% antibiotics, 50 μM Ac₄ManNAz가 함유된 RPMI1640 배지 및 Ac₄ManNAz가 함유되지 않은 RPMI1640 배지에 분산시킨 뒤, 35mm cover glass bottom dish에 넣고, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 안정화시킴.

- cRGD-CNP와 BCN-CNP의 암 세포의 표적화를 관찰하기 위하여, 각각의 세포를 DPBS를 이용하여 2회씩 세척하고, 1mg/ml의 cRGD-CNP 또는 BCN-CNP가 함유된 RPMI1640 배지에서 1시간 동안 배양함. 배양이 끝난 세포는 DPBS를 이용하여 2회 세척 후 4% 파라포름알데히드-글루타알데히드 고정액으로 10분간 고정하고, 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 마운팅을 실시하였음.
- 405nm 다이오드, 458, 488, 514, 633nm 레이저가 장착된 공초점 현미경을 이용하여 세포 표면에 결합된 나노입자의 형광 및 세포핵내 형광을 관찰하였음.



<그림. U87, MCF7 세포를 이용한 cRGD-CNP와 BCN-CNP의 암 세포 표적화 이미지>

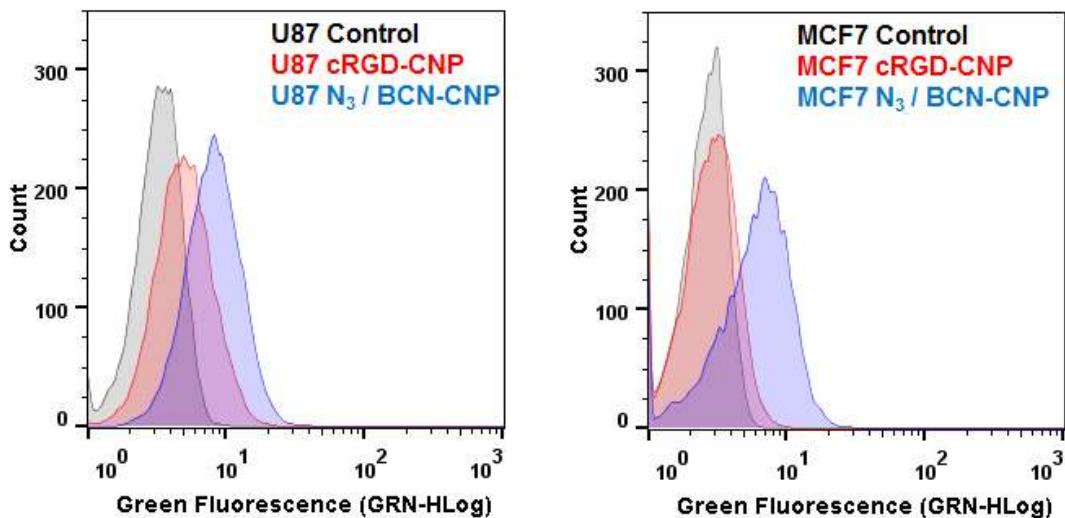
- 또한 각각의 세포를 고배율로 확대하여 세포의 높이에 따른 나노입자의 분포도를 분석하는 Z-scanning analysis를 실시함.



<그림. U87, MCF7 세포의 Z-scanning analysis 모식도 (a) 및 이미지 (b)>

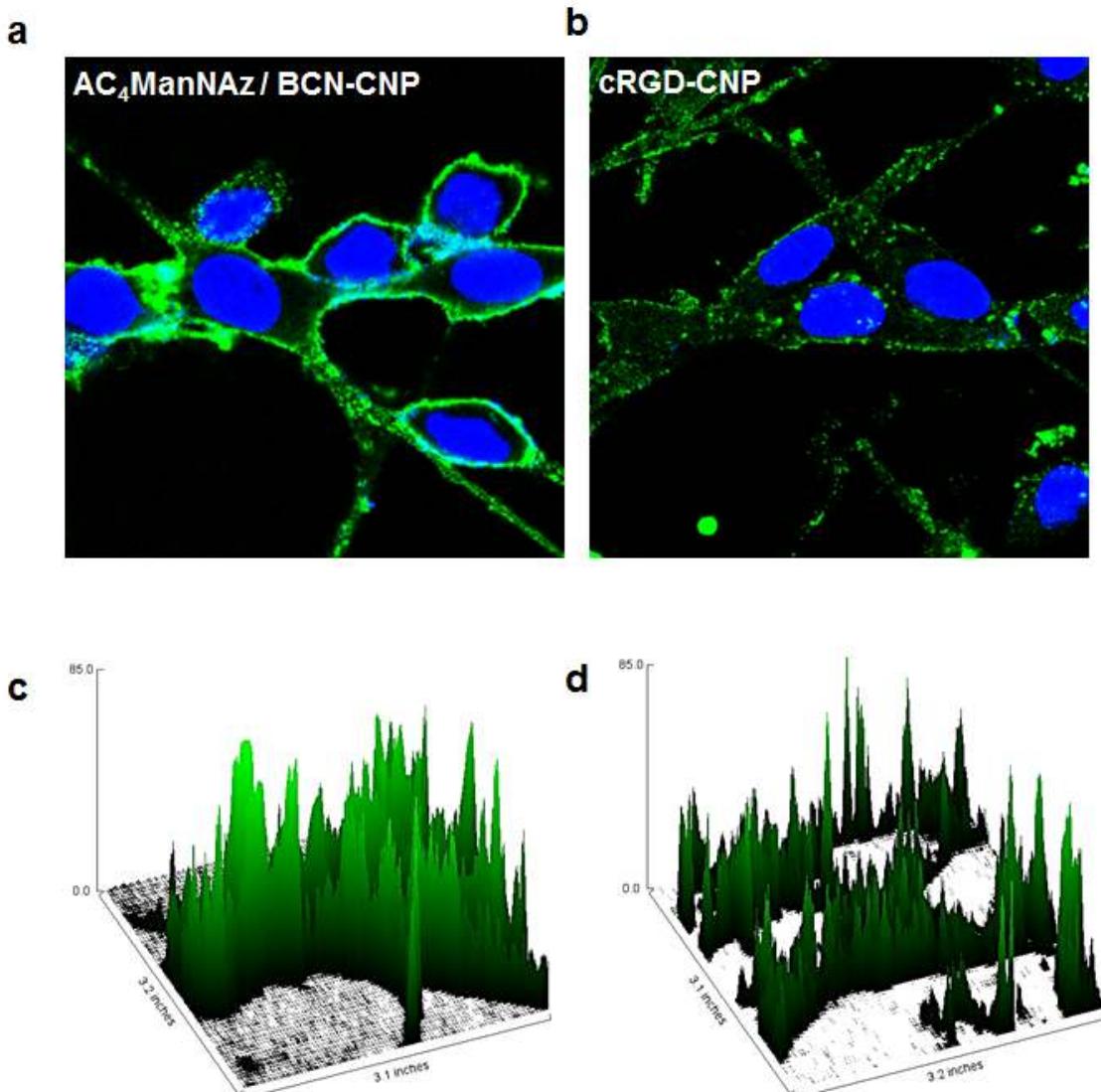
- 그리고 세포에 결합된 나노입자의 형광량을 정량하기 위하여 flow cytometer를 이용하여 정량분석을 실시함. 분석 방법은 다음과 같음.
- 1x105개의 U87, MCF7 세포를 각각 10% FBS(fatal bovine serum), 1% antibiotics, 50μM Ac₄ManNAz가 함유된 RPMI1640 배지 및 Ac₄ManNAz가 함유되지 않은 RPMI1640 배지에 분산시킨 뒤, 6well plate에 넣고, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 안정화시킴.

- cRGD-CNP와 BCN-CNP의 암 세포의 표적화를 정량하기 위하여, 각각의 세포를 DPBS를 이용하여 2회씩 세척하고, 1mg/ml의 cRGD-CNP 또는 BCN-CNP가 함유된 RPMI1640 배지에서 1시간 동안 배양함. 배양이 끝난 세포는 DPBS를 이용하여 2회 세척 후 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 수화 후 flow cytometer를 이용하여 나노입자의 형광을 정량 분석함.



<그림. U87, MCF7 세포에 결합된 cRGD-CNP와 BCN-CNP의 형광 정량화 그래프>

- Ac₄ManNAz을 이용하여 암 세포에 대사체공학기술을 적용한 경우 U87, MCF7 세포 모두 BCN-CNP가 효과적으로 세포 표면에 결합되어 있음을 확인함. 그러나 cRGD-CNP는 U87 세포에는 표적화가 가능하였지만 MCF7 세포에는 결합된 나노입자의 양이 현저히 감소된 것을 확인함.
- 이는 cRGD와 결합할 수 있는 수용체인 integrin αvβ3의 과발현이 U87 세포에서만 발생하는 현상에 기인한 것으로, 상기 결과들을 바탕으로 유전학적 특성에 따라 발현되는 수용체를 표적화 하는 기존의 표적화 전략은 다양한 유전학적 정보에 따른 암 세포의 특성에 의해 나노입자의 표적화가 균일하지 못한 단점이 나타날 수 있을 것으로 판단됨.
- 그러나 대사체공학기술을 이용한 인공표적 수용체를 암 세포에 적용하는 경우, 암 세포의 유전학적 특성과 무관하게 세포 표면에 인공표적 수용체를 도입할 수 있고, 이를 이용하여 다양한 종류의 암 세포를 균일하게 표적화 할 수 있을 것으로 예상됨.



<그림. Ac₄ManNAz/BCN-CNP (a) 및 cRGD-CNP (b)를 처리한 U87(cRGD +) 세포의 나노입자 분포 관찰 이미지. BCN-CNP의 분포도 (c) 및 cRGD-CNP의 분포도 (d)>

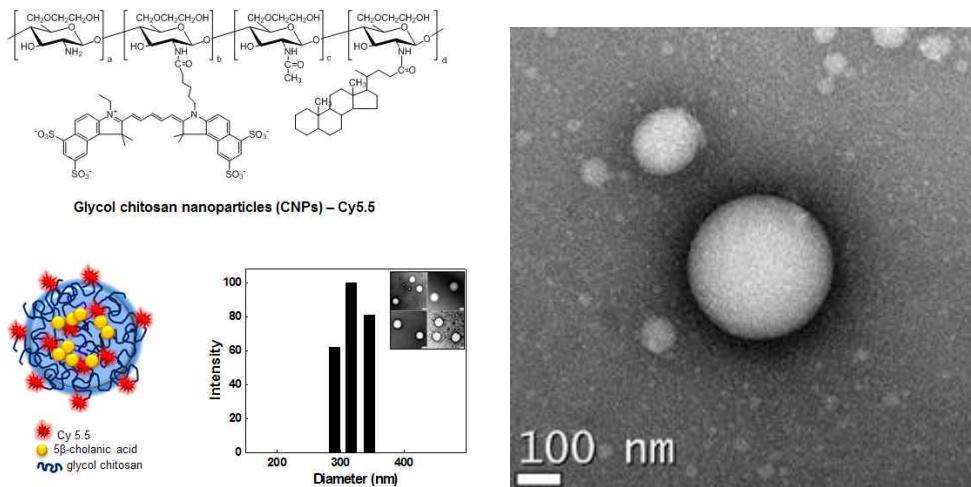
- U87 세포를 이용하여 cRGD-CNP 및 BCNP-CNP의 암 세포 내 분포를 공초점 현미경을 이용하여 분석하였음 .
- 인공표적 수용체를 표적화 하는 경우 기존의 유전학적 수용체를 표적화 하는 것보다 균일한 표적화가 가능한 것으로 확인할 수 있으며 암 세포에 전달된 나노입자의 양도 증가하는 것이 확인됨.

라. 다양한 암 세포를 이용한 종양 동물 모델 확립

- 실험에 포함될 세포주로 각 종양 모델의 암 조직 중 임상에서 예후가 불량하고 발병율이 높은 종양으로 선정하였음. 사람 폐암 세포주(A549), 유방암 세포주(MDA-MB468, MCF-7), 직결장암 세포주(HT-29), 전립선암 세포주(PC-3), 신경세포악성종양 (U-87)을 포함하였으며, murine 유래의 종양세포주인 편평상피암종(SCC-7) 세포주를 추가하였음.
- 종양세포주의 종류에 따라, $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 개의 세포를 $60 \sim 100 \mu\text{L}$ 멀균 생리식염수에 suspension하여 왼쪽 flank에 주입하여 2 ~ 6주 이내에 각 종양 모델을 제작하였음. 각 종양 유도 마우스 확립을 위해 사용된 종양세포주의 수는 두당 아래와 같음.
- A549, MDA-MB468, MCF-7: 1×10^7 개, HT-29, PC-3: 5×10^6 개, U-87: 2×10^6 개. 단 MCF-7 세포주는 50% volume의 matrigel을 사용하여 implant하였음. 동물 모델은 같은 종(balb-c/nude), 같은 연령(5주령), 같은 성별의 실험용 마우스를 사용하였으며, 좌측 flank 부위에 암세포 단순 inoculation방법을 통해 수립되어 유사한 암 크기에서 실험에 사용하였음.
- 각 mouse는 10일~6주가 지난 후 50mm^3 volume의 종양이 관찰되기 시작하였음.

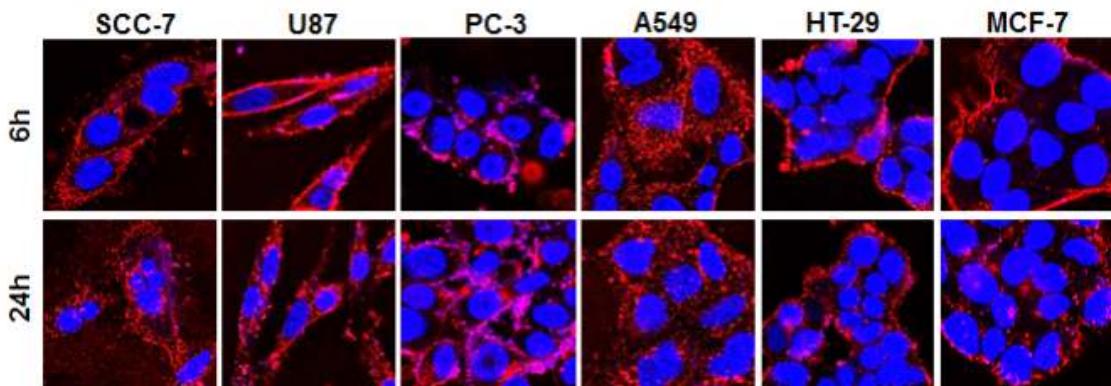
마. 글라이콜 키토산 모델 나노입자를 이용한 종양 미세환경의 차이에 따른 암 축적 거동 비교 평가

- 암 표적성이 우수하고 생체내 안정성이 높은 글라이콜 키토산 나노입자를 모델 나노입자로 이용하여, 다양한 종양동물모델에서의 암 표적성 및 세포외 기질의 특성과의 연관성을 확인하고자 함.
- 합성한 키토산 나노입자(CNP)의 아민기에 균적외선 형광체인 Cy5.5-NHS를 결합하여 CNP-Cy5.5를 제조함.



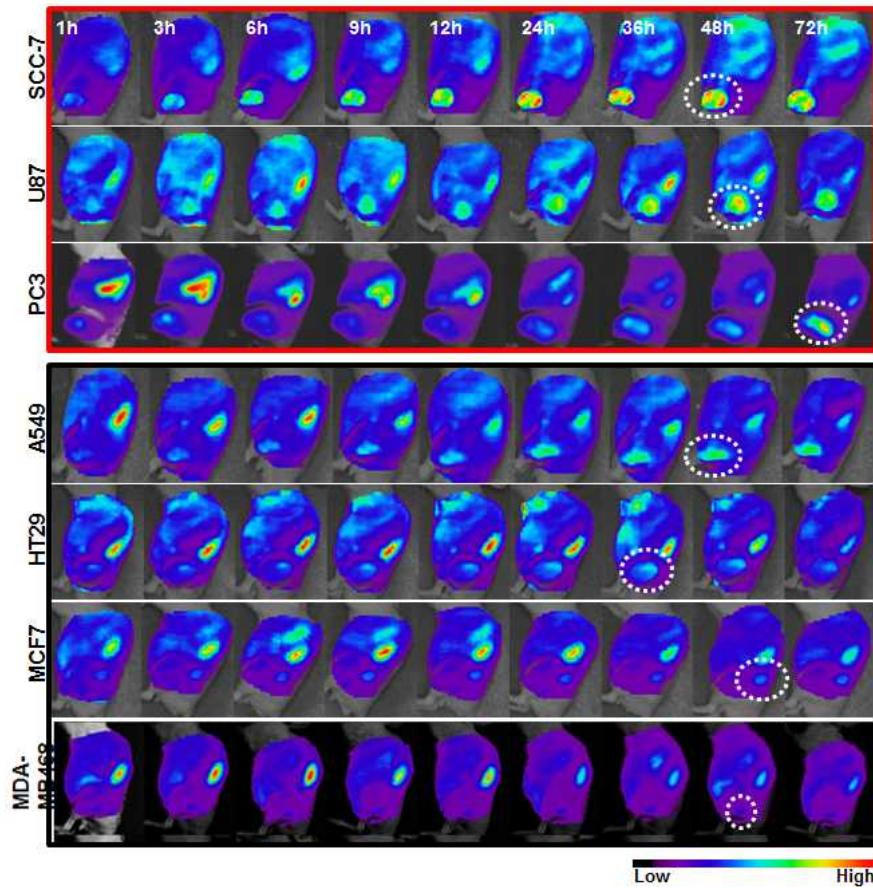
<그림. CNP-Cy 5.5의 구조도 및 크기 분석>

- 상기 합성한 해당 모델 나노입자인 CNP는 평균 285nm 직경의 비교적 균일한 hydrodynamic diamter 분포를 나타내었으며, TEM 상에서 2% uranyl acetate를 이용한 negative stain 상에서 구형의 입자로 관찰되었음.



<그림. CNP-Cy 5.5의 배양 상태에서의 세포 내 유입 비교>

- 다양한 세포주의 in vitro 세포 배양 상태에서 해당 나노입자는 6시간과 24시간에서 다양한 종양세포주에서 유의한 차이가 없는 비교적 고르고 favorable한 세포내 uptake 양상을 확인 할 수 있었음.



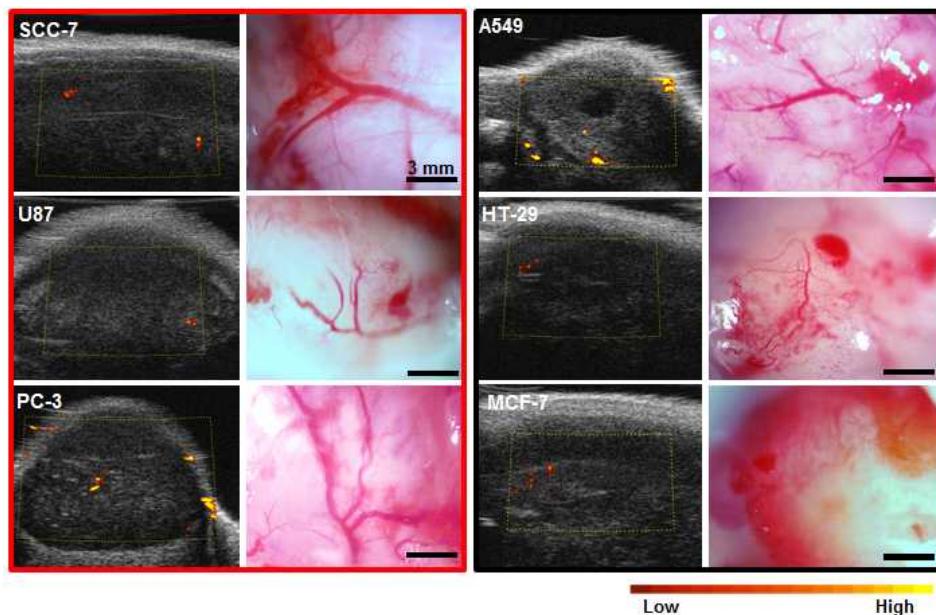
<그림. CNP-Cy 5.5의 종양 동물 모델 내에서의 생체 내 분포 비교>

- 그러나, 동물 모델에 CNP를 적용함에 있어서, 광학 영상장비를 이용한 다양한 암 모델내 나노입자의 암 축적 거동은 뚜렷하게 다른 양상을 나타내었음. CNP-Cy5.5 1 mg/ml로 200 ul 씩 꼬리로 정맥 주사하였음. 이후 시간에 따라서 근적외선 형광영상 장비인 Otix를 통하여 종양별로 종양에 CNP-Cy5.5가 축적되는 경향을 관찰함. 일부 종양 모델에서는 매우 높은 종양 표적성을 나타낸 데에 반해(SCC-7, U87, PC-3 종양: Group A; 그림 내 red Box), 대장암 모델을 포함한 일부 종양 모델에서는 비교적 낮은 종양 표적성을 나타내었음(A549, HT29, MCF-7, MDA-MB468종양: Group B, 그림 내 Black Box)
- 상기 결과와 같이 CNP-Cy 5.5를 다양한 종양 동물 모델에서 체내 분포 거동을 평가하였을 때, 모델 나노입자로 활용한 CNP는 *in vitro* 상에서는 종양세포별 전달 효율에 유의한 차이를 나타내지 않았으나, *in vivo* 상태의 종양의 종류에 따라서 체내 분포 거동이 달라짐을 확인함. 이는 각각의 종양이 갖는 ECM의 특이성에 기인한 것으로 판단됨. 따라서 각 종류의 암 조직에 대하여 혈관 분포 및 조직학적 분석을 실시함.

바. 초음파 파워도플러 모드를 활용한 종양 내 혈류 비교 분석

- 1차적으로 종양 내 혈류량을 평가하기 위해 종양의 크기가 200mm³ 정도로 자랐을 때,

Vivo 770TM Imaging system 초음파 장비의 Power Doppler 모드를 사용하여 종괴 내 큰 혈류의 흐름에 유의한 차이가 있는지 확인하고자 하였음. Group A(종양 표적성이 좋은 종양모델)와 B(종양 표적성이 비교적 낮은 종양 모델)를 단순 비교하였을 때 종괴 표면의 혈관 직경에 있어서는 Group A가 비교적 큰 혈관들을 많이 포함하고 있었으나 종괴 내의 미세 혈류량에 있어서는 유의한 차이를 나타내지 않았음. 특히 major blood flow에서 활발한 흐름을 나타낸 종양인 PC-3와 A549 종양은 각각 group A와 B에 나누어 포진되어 있었음(그림).

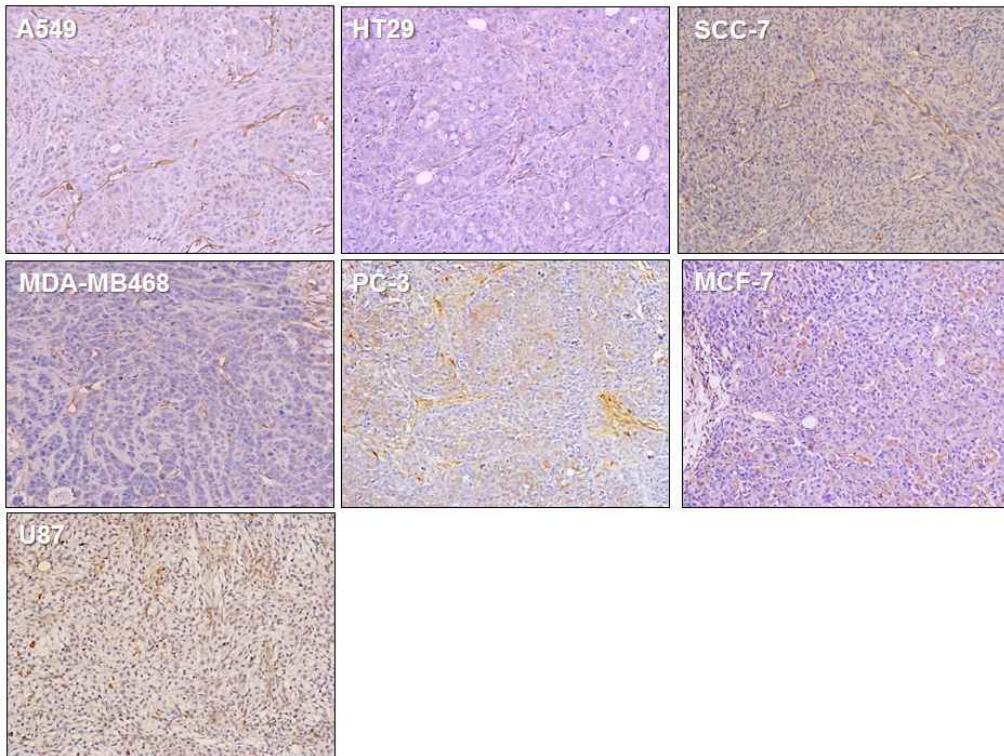


<그림. 다양한 종양에서의 조직 초음파 도플러 이미지 및 혈관 분포>

- 또한, 추가적으로 각각의 종양 동물모델을 OV-100 현미경을 사용하여 종양 바깥쪽의 혈관 분포를 가시적으로 확인하였음.
- 나노입자의 암 축적거동과의 연관성이 뚜렷하게 나타나지 않았음. 이는 도플러 장비의 측정 범위의 한계 및 조직 표면에 존재하는 혈관의 분포 뿐만 아니라 조직 전반에 분포되어있는 미세혈관의 분포를 함께 고려해야 할 것으로 판단됨.

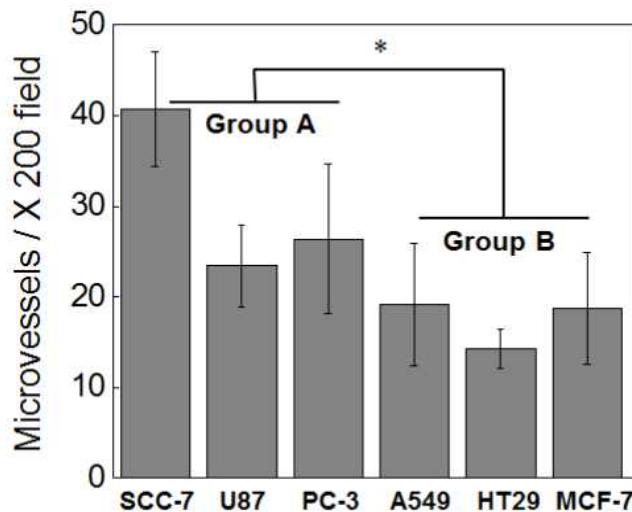
사. 다양한 종양의 조직학적 차이

- 나노입자의 생체 내 거동의 차이를 보다 미시적인 수준으로 관찰하기 위해 종양 조직을 절제하여 paraffin 포메하여 미세혈관밀집도(microvessel density, MVD) 및 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)에 초점을 맞춰 각각의 종양 별 특징을 파악하였음.



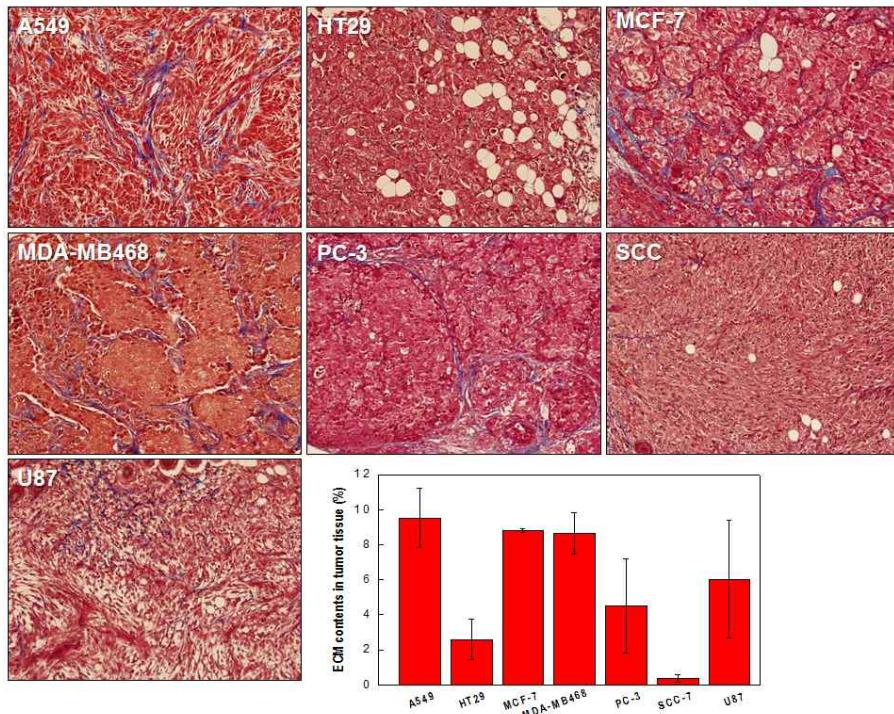
<그림. 7종의 종양에서의 종양 내 미세혈관의 분포>

- 종양 조직 내 혈관 분포를 정밀하게 관찰하기 위하여 CD31 항체를 이용하여 조직 내 혈관 내피 세포를 labeling하였으며, 염색된 세포가 tube 형태의 혈관 구조를 나타내는 것을 하나의 혈관으로 count 하였음. 객관적인 정량을 위해 image 분석 프로그램인 Image Pro-Plus 소프트 웨어를 활용하여 x200 배 시야에서 촬영된 혈관의 개수를 세어 비교, 통계 분석하였다. 각 종양은 서로 다른 수준의 MVD value를 나타내었으며, CNP의 종양 표적형 전달성이 가장 높게 나타난 SCC-7에서는 특히 많은 수의 종양 내 모세혈관의 수가, 종양 표적형 전달성이 비교적 낮게 나타난 종양인 대장암 (HT-29) 종양에서는 특히 적은 수의 종양 내 모세혈관의 수가 counting 되었음.
- 특히 종양 내 미세혈관의 밀집도(MVD)는 광학현미경 X200배 시야 내에서 20개를 기점으로 20보다 높은 수의 MVD를 나타내는 종양과 그 이하의 종양에서 CNP의 종양 표적성 전달 효율이 현저하게 차이가 나는 것으로 나타났으며, 이러한 경향은 group A와 B 종양군으로 나눈 student-t test에 의해 통계적으로 유의미함을 확인함.
- 또한, 혈관 수 뿐 아니라 혈관의 직경 및 모양 역시 모델 나노입자의 종양 표적성과 연관되어 있는 것으로 판단할 수 있었음. 혈관의 모양이 안정적인 HT-29, MCF-7, MDA-MB468 세포주로 확립한 종양 모델에 있어서는 CNP가 비교적 낮은 종양 표적형 전달 경향이 나타났으나, 혈관 구조가 안정되지 못하고 불규칙한 모양으로 여러 개의 혈관이 뭉쳐져 있는 것과 같이 나타난 PC-3, SCC-7 종양과 같은 경우에 있어서 CNP는 비교적 높은 종양 표적형 전달경향을 나타냄.



<그림. CNP의 종양 표적성 전달 효율과 종양 내 미세혈관의 분포의 연관성>

- 이러한 경향과 함께 종양 내 ECM의 양을 알아보기 위하여 종양 조직을 Masson's trichrome 염색법을 활용하여 종양 내 collagen의 분포를 확인하였음. 실험에 활용된 7개의 종양 조직은 각기 다른 collagen matrix의 양을 나타내었으며 SCC-7, HT-29, PC-3에서는 비교적 낮은 (전체 면적의 평균 4% 이내) collagen 함량이, 이외의 종양에서는 평균 6% 이상의 비교적 높은 collagen 함량이 나타났음. 종양 내 ECM 함량은 CNP의 종양 표적형 전달 효율에 반비례하는 것으로 나타났으나 group 간의 차이를 통계적으로 검증하였을 때에는 significance를 확인할 수는 없었음 ($p < .05$).

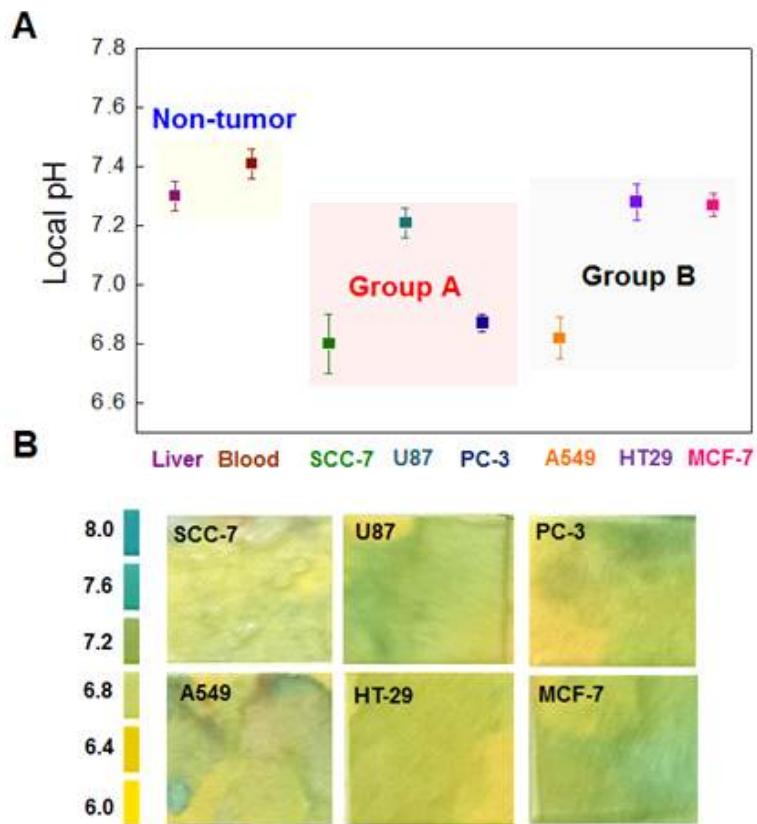


<그림. 7종의 종양에서의 세포의 기질의 분포 및 정량>

- 특히 대장암 (HT-29)과 같은 종양에 있어서는 극단적으로 낮은 함량의 ECM을 나타내었으나 종양 표적형 전달 효율이 낮은 예외적인 종양으로 관찰되었음. MVD와 ECM factor를 함께 고려하였을 때, 종양 내 collagen은 물리적으로 약물의 확산 및 deep tissue penetration을 저해할 수 있는 물리적인 barrier로 CNP와 같은 나노약물 전달체의 종양 표적성을 떨어뜨릴 수 있는 요인으로 작용할 것으로 생각되나 두 가지 요인 중 보다 결정적인 factor는 종양 내 미세 혈관이 우세한 것으로 판단됨.

아. 종양 조직 내 pH condition

- pH 측정 시험지를 이용하여 종양 내 pH를 mapping한 결과, 종양의 출혈부위는 중성(pH 7.0–7.4) 이외의 부위에서는 7.0 이하의 pH가 나타났으며, 종양의 core 와 주변부에서 다소 다른 그라데이션을 나타내는 pH 맵이 관찰되었음. 출혈 부를 제외하고 무작위로 3부분의 pH를 semi-solid type 측정 프로브/측정기를 이용하여 측정한 결과, 종양은 정상 조직 및 혈액의 pH보다 낮게 측정되는 것을 확인하였음. 이는 종양 조직 주변의 혈관내피형성세포가 (Endothelial progenitor cells, EPCs) 빠른 신생혈관형성을 위한 효율적인 대사 작용으로 산소가 매우 적은 환경을 필요로 하게 되며, 이러한 대사성 환경은 직접적으로 혈관의 산소 부족에 관여하여 저산소증(hypoxia) 환경을 조성함을 확인함.



<그림. 종양 별 평균 pH 및 종양 조직의 pH mapping>

- 이러한 측정은 CNP의 pH condition에 따른 표면 전하의 transition의 특성에 따라 고려되었음. 글라이콜 키토산의 pKa는 6.5 부근으로 약산성의 환경에 노출되는 경우, 표면이 양전하를 띠게 됨으로써 음전하를 띠는 세포 표면에 달라붙을 수 있는 전기적 성질을 보다 강하게 띠게 될 수 있음. 실제 종양의 pH는 정상 조직(간)이나 혈액에 비해 0.5가량 낮은 pH를 나타내었으나 글라이콜 키토산의 pKa보다는 다소 높은 6.7 이상을 나타내었음. 종양의 pH는 CNP의 종양 표적성과 뚜렷한 상관 관계를 나타내지는 않았으며, 이러한 인자는 앞서 조직학적으로 파악된 MVD나 ECM에 비해 종양 표적성에 영향을 미칠 수 있는 minor한 종양 미세환경 인자로 분류될 수 있을 것으로 보임.
- 또한 앞서 분석된 종양 모델 별 미세환경 인자의 상대적인 분석은 다음 표와 같이 요약될 수 있음.

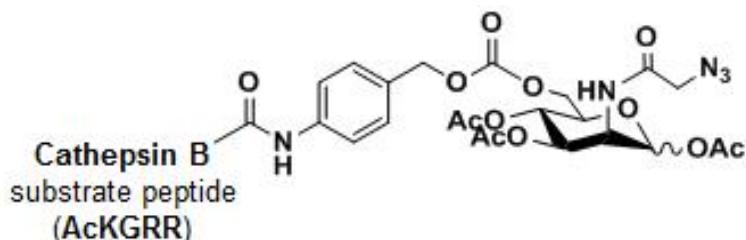
종양세포주	유래	성장속도	혈류/큰혈관	MVD	ECM	pH
PC-3	정소	빠름	good	high	mid	low
SCC-7	상피(피부)	빠름	good	high	low	low
U87	뇌(신경)	중간	poor	high	low	relatively high
A549	폐	중간	good	mid	high	low
HT29	직결장	중간	poor	low	low	relatively high
MCF-7	유선	느림	poor	low	high	relatively high
MDA-MB468	유선	느림	poor	low	high	relatively high

<표. 종양 모델별 MVD, ECM, pH library, 평균 대비>

- 해당 실험결과들을 기반으로, MVD value 별/ECM 함량 별 종양의 순위에 따른 다양한 종양 모델의 종양 미세환경 분석 자료의 라이브러리화가 완료되었으며, 향후 이를 이용한 적절한 생체 내 실험 모델을 활용할 수 있도록 데이터베이스 구축하였음.
- 종양을 적출하여 실시한 각 종양에 대한 ECM 함량 및 혈관분포 평가는 종양 미세환경이 갖는 문제점인 종양 조직 내의 불균질한 환경 (heterogeneity)의 존재를 뒷받침 함. 이러한 암 조직의 다양성을 확인하고, 이를 극복하여 대장암 효과적인 진단/치료를 위한 다양한 물리화학적 특성을 지닌 나노소재의 개발을 진행해야 할 것으로 판단됨.

자. 대사체 개질을 통한 암 표적형 대사체 전달 기술 개발 및 대사체 전달체의 생체 외/생체 내 대사체 전달 효능 평가

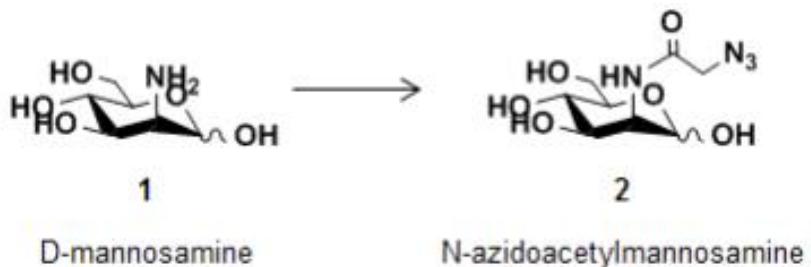
- 암 세포에서 많이 발현된다고 알려져 있는 효소인 Cathepsin B에 의해 끊어지는 웨타이드 서열(AcKGRR)을 대사물질(Ac₃ManNAz)에 도입하여, 기존의 모든 세포에 N₃를 발현했던 Ac₄ManNAz (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 11836 - 11840)보다 암 세포에 선택적으로 아자이드 (N₃)를 발현 시킬 수 있는 Acetyl-mannosamine 기반의 대사 물질을 만들었음.



<그림. Cathepsin B 기질 단백질을 치환한 대사체>

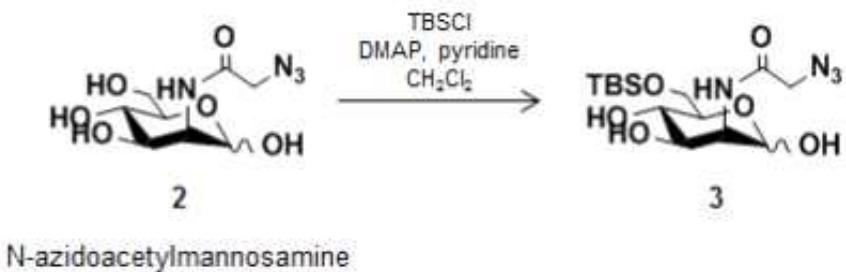
- 합성은 먼저 mannosamine에 azidoacetyl기를 달고 3개의 OH기를 acetylation 시키는 과정 ([합성 과정 1] ~ [합성 과정 4]) 과 이 과정을 통해 합성 된 mannosamine에 cathepsin B 기질 웨타이드서열을 붙이는 과정 ([합성 과정 5] ~ [합성 과정 7])을 통해 최종 물질을 만들 수 있음.

- Mannosamine hydrochloride (250mg, 1.16 mmol) 과 sodium methoxide (1.16 mmol)을 MeOH (10ml) 에 녹이고 상온에서 1시간 정도 반응을 진행함. 그리고 chloroacetic anhydride (991mg, 5.80mmol)을 가하고 하루 동안 반응 시킨 뒤, NaHCO₃로 중화 시킨 후 DMSO (10ml) 과 NaN₃ (78mg 1.39mmol)을 가해 가열하면서 하루 반응 시킴. 마지막으로 silica gel chromatography(50:1 CHCl₃ : MeOH)를 통해 정제 하여 compound 2 (N-azidoacetylmannosamine) 179mg를 제조함.



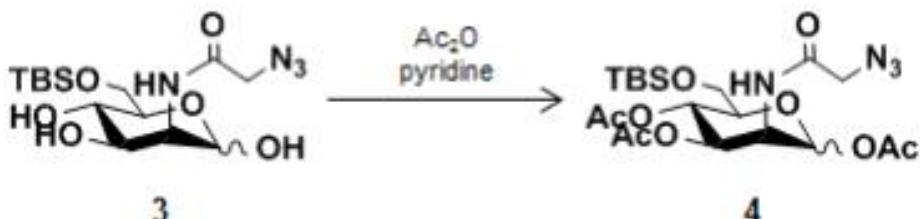
<그림. 합성 과정 1>

- Pyridine 과 CH_2Cl_2 를 1:1 로 섞은 용매 (46ml)에 compound 2 (1.20 g, 4.58mmol)을 녹인 후, Tert-butylidimethylsilyl chloride (1.03 g, 6.87 mmol)과 dimethylaminopyridine (30.2mg 0.247mmol)을 가하여 22시간 동안 반응시킴. 그리고 silica gel chromatography (95:5 CH_2Cl_2 : CH_3OH)를 통해 compound 3 (1.15g)을 제조 함. [합성 과정 2]



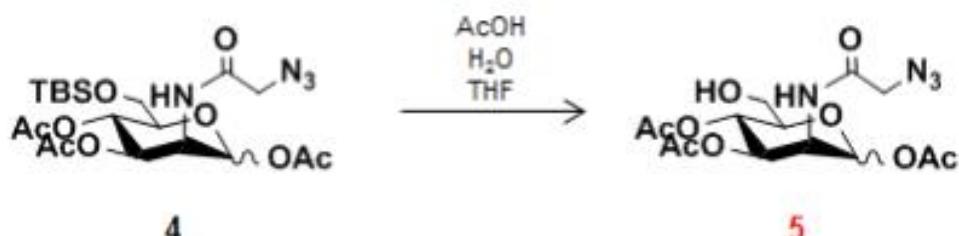
<그림. 합성 과정 2>

- compound 3 (9.20g, 24.4mmol)을 pyridine (139ml)에 녹인 뒤 acetic anhydride (69.3ml, 0.733mol)을 가한 뒤 16시간 반응 후 진공에서 concentration 시킴. 그 뒤, silica gel chromatography (2:1 hexane : ethyl acetate to 1:1 hexane : ethyl acetate)를 통해 정제함.



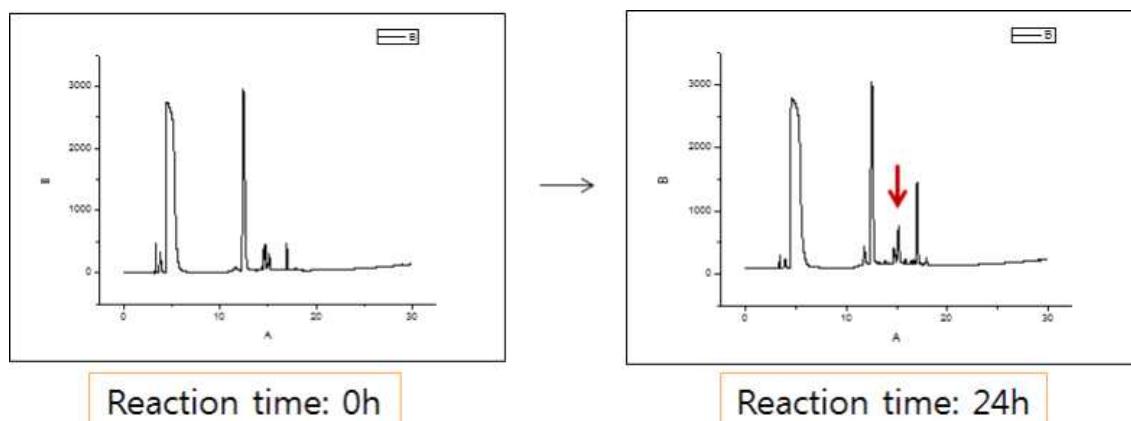
<그림. 합성 과정 3>

- compound 4 (1.10g, 2.20mmol)을 acetic acid (14ml)에 녹인 뒤 THF 와 H₂O를 1:1 비율로 섞은 용매 (9.6ml)에 녹인 뒤 24시간 동안 반응 시킨다. 반응 후 NaHCO₃로 중화 하면 ethyl acetate (75ml)에 crude drug 이 용출 됨. 유기용매층을 brine (75ml)로 제거하고 Na₂SO₄로 dry 시킨다. 그런 뒤 silica gel chromatography (1:2 hexane : ethyl acetate)를 통해 compound 5를 제조함.



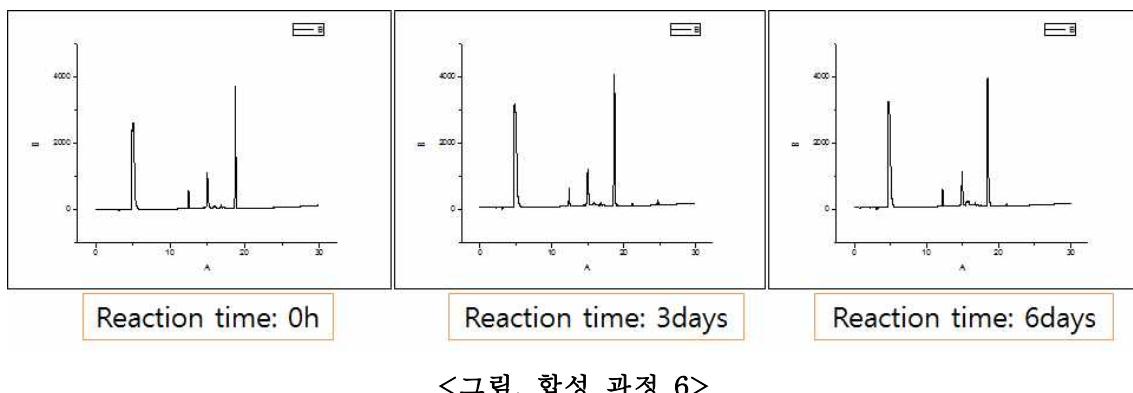
<그림. 합성 과정 4>

- Cathepsin B mediated Ac₃ManNAz의 합성 방법은 peptide (0.921mmol) 와 4-Aminobenzyl alcohol (1.842mmol), EEDQ (1.842mmol)을 anhydrous DMF에 녹여 RT에서 2시간 stirring 하며, 1시간 째에 4-aminobenzyl alcohol 과 EEDQ를 100mg 씩 가함. 그리고, 반응을 하면서 sampling 하여 HPLC를 찍고, 반응이 진행이 된 후에는 HPLC를 이용해 분리/정제 하여 AcKGRR-PAB-OH를 제조함.



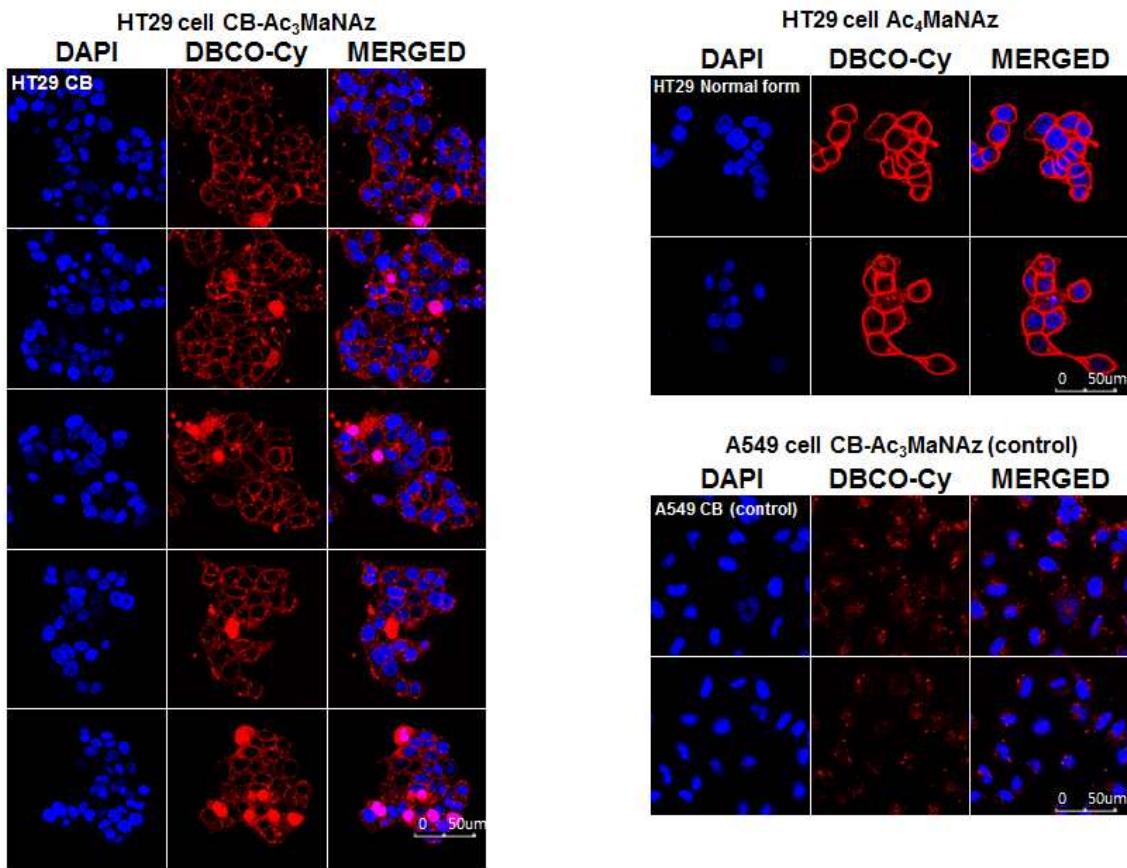
<그림. 합성 과정 5>

- AcKGRR-PAB-OH (0.134mmol) 와 4-nitrophenyl chloroformate (0.161mmol)를 DCM에 녹임. 그리고 2,6-lutidine (0.402mmol)을 가하고 하루 반응을 진행하면서 HPLC로 모니터링 하여 [합성 과정1] 과 마찬가지로 HPLC로 찍어 보니 합성해야 할 side 물질이 합성 된 후에 AcKGRR-PAB-OH의 peak로 들어가 증가 하였고, TLC를 찍어보니 아래 부분에 spot 이 생기는 것을 확인, 약 6일 정도 reaction을 통해 AcKGRR-PNC를 제조하였고, 다음 합성 과정으로 넘어 갈 수 있음.

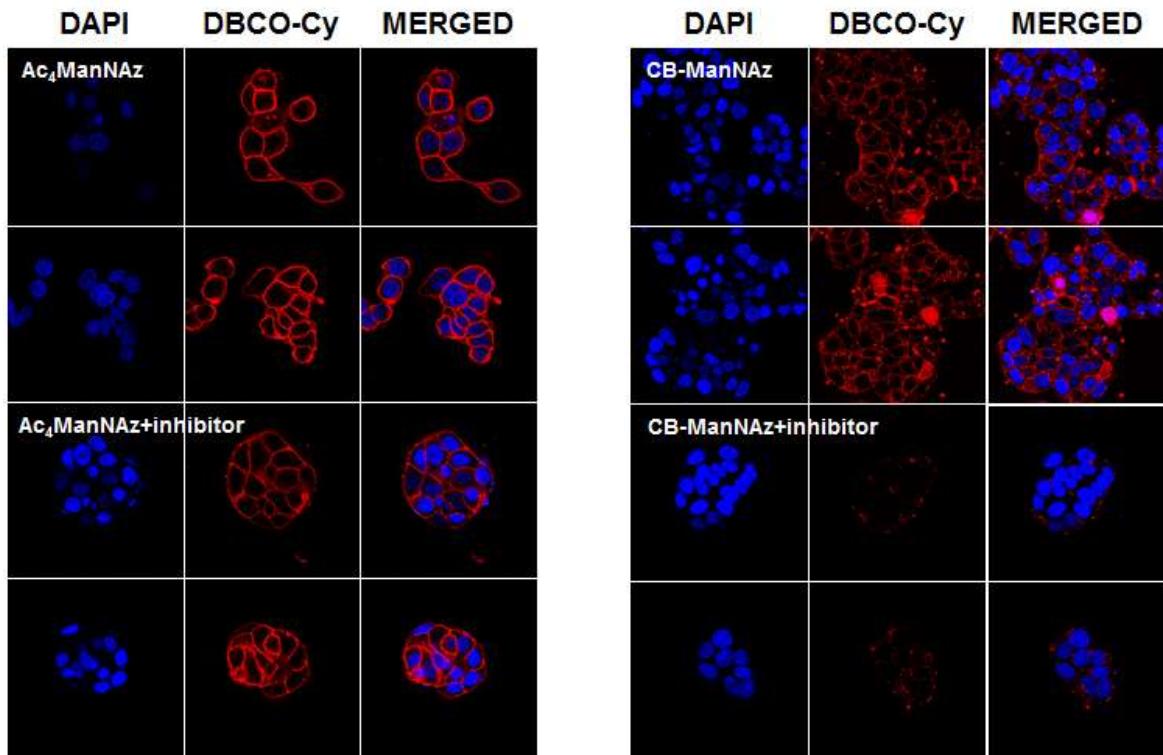


<그림. 합성 과정 6>

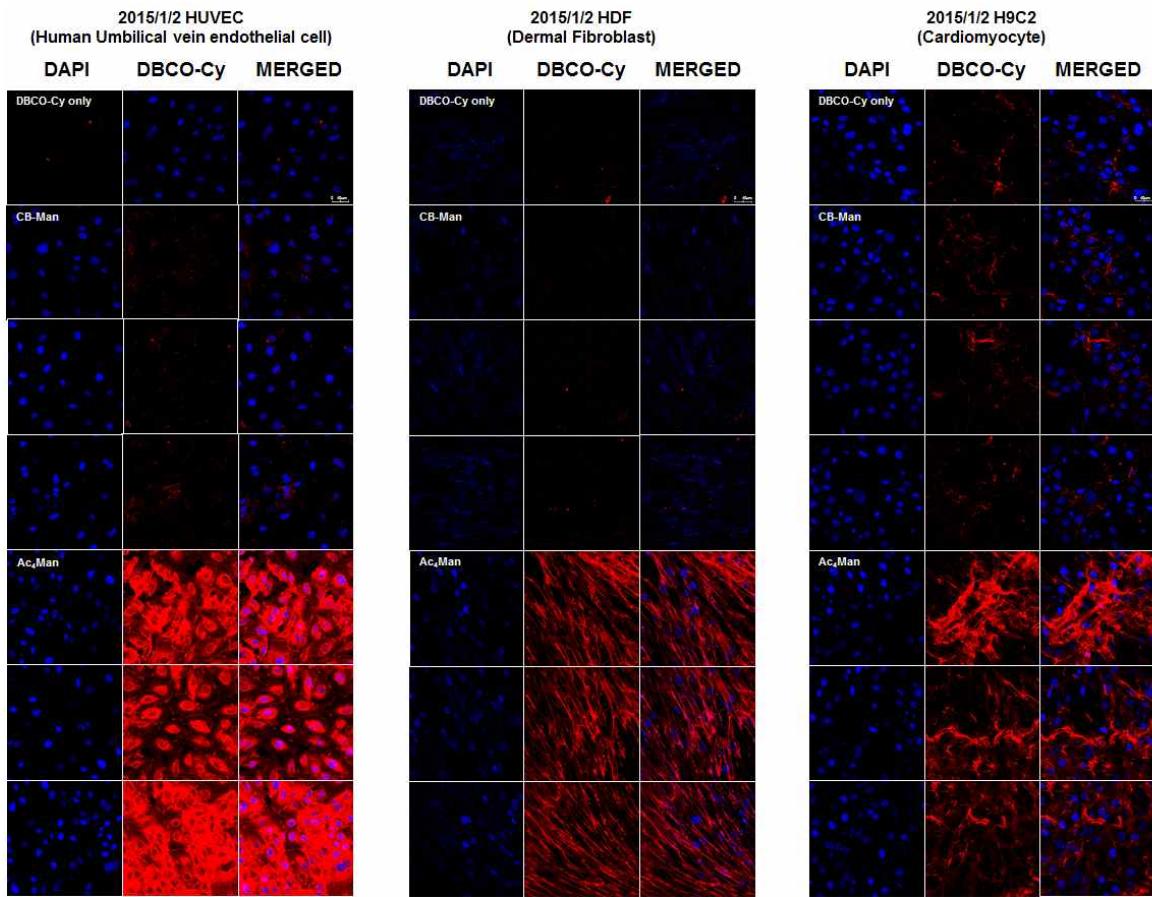
- AcKGRR-PNC (3.84×10^{-3} mmol) 과 Ac_3ManNAz (4.23×10^{-3} mmol)을 anhydrous DMF에 녹이고 DIEA (0.21×10^{-2} mmol)을 넣고 하루 동안 반응 시켜 최종 수득을 하고 in vitro에서 N_3 발현량 비교 실험을 진행함.
- Cathepsin B 에 의해서 활성화 되어야만 아자이드를 발현 시키는 물질과 Cathepsin B와 상관없이 모든 세포에 아자이드를 발현 시키는 물질을 비교하여 합성을 진행한 물질이 세포 표면에 아자이드를 발현 시킬 수 있는지 실험해 보기 위해 HT29 세포를 confocal dish에 2.0×10^4 씩 seeding 한 뒤 Cathepsin B mediated acetyl mannosamine (이하 CB-Man) 과 기존의 논문에 발표 된(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 11836 .11840) normal form (이하 Ac_4ManNAz)를 50uM 으로 처리하여 72시간 incubation함.
- DBCO-Cy 10uM 으로 2시간 staining 후 세포 고정액 (37% formaldehyde 55.6 ml 50% glutaraldehyde 0.556ml DPBS(ca,mg with) 500ml 조성 이하 동일) 2ml에 20분, DAPI (DAPI powder 0.2mg DMSO 40ul DPBS (ca,mg without) 500ml 조성 이하 동일) 2ml에 10분 처리 한뒤 DPBS (ca,mg with 이하 동일) 2ml을 넣어 confocal 현미경으로 관찰하여 N_3 발현 량을 확인한 결과 Ac_4ManNAz 보다 약한 signal 이지만 Cathepsin B에 의해 activation 돼야만 N_3 를 발현할 수 있는 CB-Man이 cell의 surface에 N_3 를 발현 시키는 것을 확인 할 수 있었음.



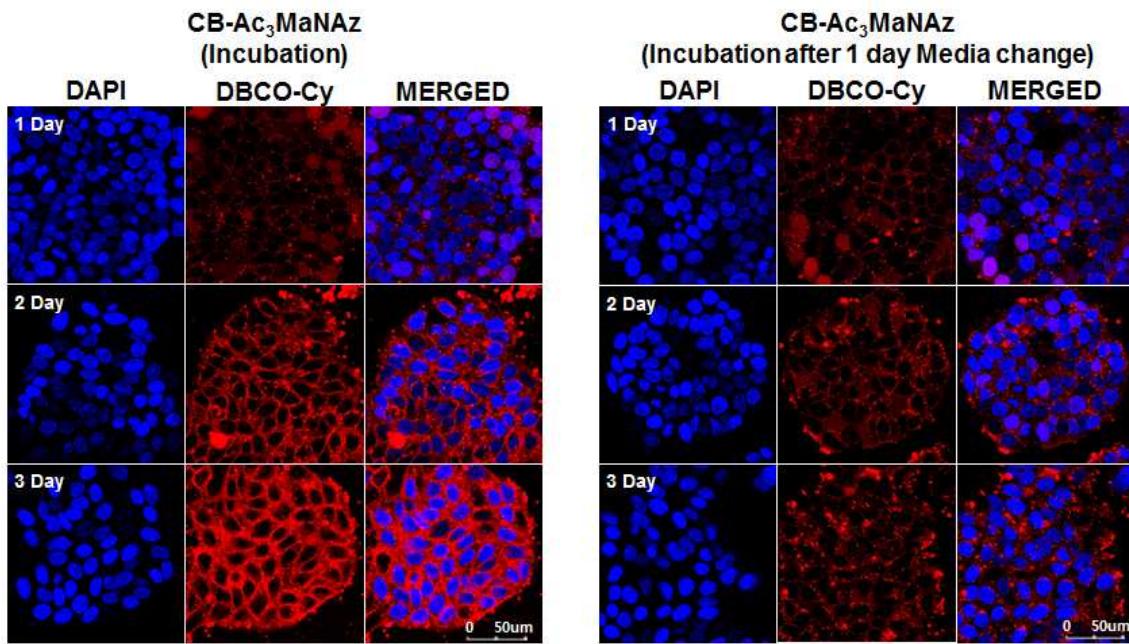
- Cathepsin B을 억제하는 물질을 처리한 세포에 CB-Man 과 Ac₄ManNAz를 처리하여, CB-Man을 처리한 세포에만 억제물질이 특이적으로 아자이드 발현을 억제시키는 것을 실험 해 보기 위해 HT29 세포를 confocal dish에 2.0x10⁴씩 seeding 한 뒤 Cathepsin B mediated acetyl mannosamine과 기존의 논문에 발표 된 Ac₄ManNAz를 50uM으로 처리하여 72시간 incubation함. 그리고, DBCO-Cy 10uM으로 2시간 staining 후 세포 고정액 2ml에 20분, DAPI 2ml에 10분 처리 한 뒤 DPBS 2ml에 넣어 confocal 현미경으로 관찰하여 N₃ 발현 량을 확인하고 inhibitor 가 CB-Man에만 특이적으로 N₃ 발현을 억제시키는 것을 확인하여, CB-Man이 cathepsin B 에 의해 activation 된다는 것을 확인했음.



- Cathepsin B가 암 세포보다 상대적으로 적은 normal cell에서 CB-Man의 발현이 안 되는 것을 실험하기 위하여 HT29 세포를 confocal dish에 5.0x10⁴ 개씩 seeding 하여 CB-Man과 Ac₄Man을 50uM 농도로 72시간 incubation한 뒤, DBCO-Cy 10uM에 2시간, 세포 고정 액 2ml에 20분, DAPI 2ml에 10분 처리 한 뒤, DPBS 2ml에 넣어 confocal 현미경으로 관찰하여 CB-Man 이 Cathepsin B가 없는 환경에서는 N₃를 발현 시키지 않는다는 것을 확인하였다.

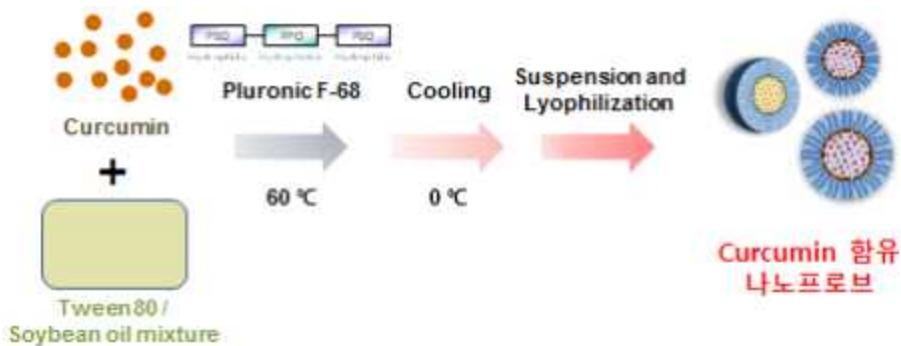


- CB-Man의 uptake 속도와 양을 알아 보기 위해 HT29 cell을 confocal dish에 2.0×10^4 씩 seeding 한 뒤 CB-Man을 50uM농도로 72시간 동안 incubation한 cell과 24시간 incubation 후 물질이 처리된 배지를 제거하고 물질을 처리하지 않은 배지로 갈아 준 뒤, 3일 째 돼는 날에 DBCO-Cy 10uM 농도로 2시간, 세포 고정액 2ml에 20분, DAPI 2ml에 10분 처리한 뒤 DPBS 2ml에 넣어 confocal 현미경으로 관찰함. 그 결과, N₃ 발현 량을 확인 하여 uptake가 되는 시간을 확인. 그리고, 1일차에는 발현 량이 비슷하고 그 뒤로 배지를 갈아주지 않은 cell이 더 많이 N₃를 발현시키는 것을 볼 때 2~3일차 까지 uptake가 되고 있는 것을 볼 때, uptake 시간이 조금 느리다는 것을 알 수 있음.



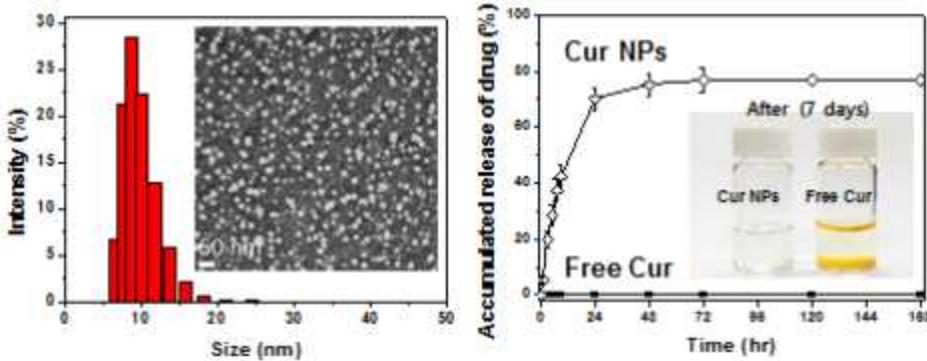
차. 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발

- 대장암 이질성 추적을 위한 조영제인 Curcumin을 효과적으로 함유할 수 있는 고분자 기반 나노프로브를 제조하였음. Pluronic F-68고분자를 상전이 현상을 이용하여 나노입자 형태의 Curcumin 함유 나노프로브를 합성함.



<그림. 고분자 상전이 현상을 이용한 나노프로브 제조 모식도>

- DLS장을 이용하여 제조된 나노프로브의 특성 분석한 결과, 약 10nm 의 사이즈를 보이며 표면 전위는 약 -10mV를 띠었음. 실제 로딩량은 고분자 질량 대비 2 wt% 로 나타났으며 이는 99% 로딩 효율을 보임. 로딩된 curcumin은 in vitro 생리학적 환경에서 일주일간 서방적 방출 거동이 확인됨.



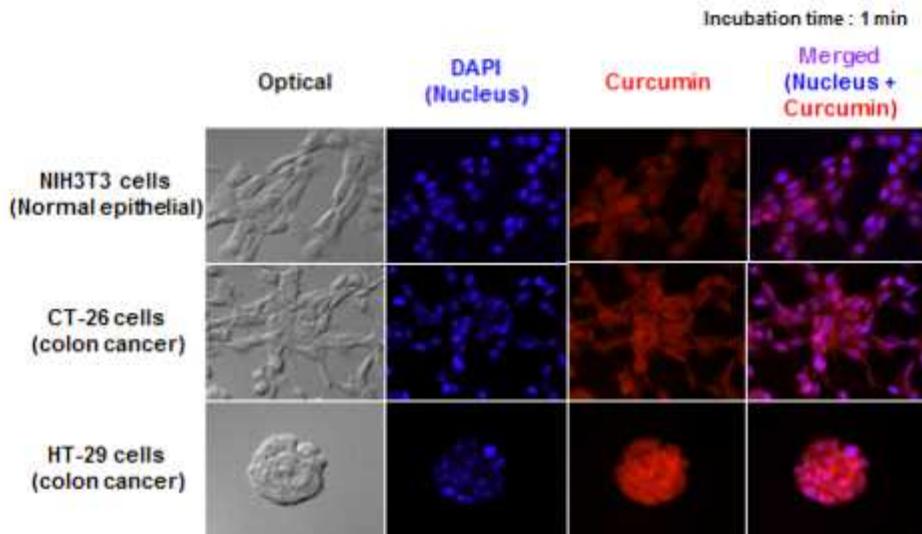
<그림. 나노프로브의 입자 분포도와 형태 및 수용액 내 방출 거동>

- 개발된 나노프로브의 세포 독성 및 세포 내 유입 거동 평가를 정상세포 1종 그리고 대장암 세포 2종에서 실시함. 정상 세포에서 curcumin 자체의 독성이 보이는 반면, 나노프로브에 함유시켰을 때, 비교적 세포 생존률이 향상됨을 확인함. 이와 대비해서 대장암 세포에서는 free한 curcumin과 유사한 세포 사멸 효과를 확인할 수 있었음.

		NIH3T3 cells	HT-29 cells	CT-26 cells
Bare NPs	3 hrs	-	-	-
	6 hrs	-	-	-
	24 hrs	-	-	-
Free Cur	3 hrs	-	146.35	99.92
	6 hrs	-	52.74	79.63
	24 hrs	29.97	47.16	43.95
Cur NPs	3 hrs	-	-	-
	6 hrs	-	-	-
	24 hrs	88.12	47.06	72.19

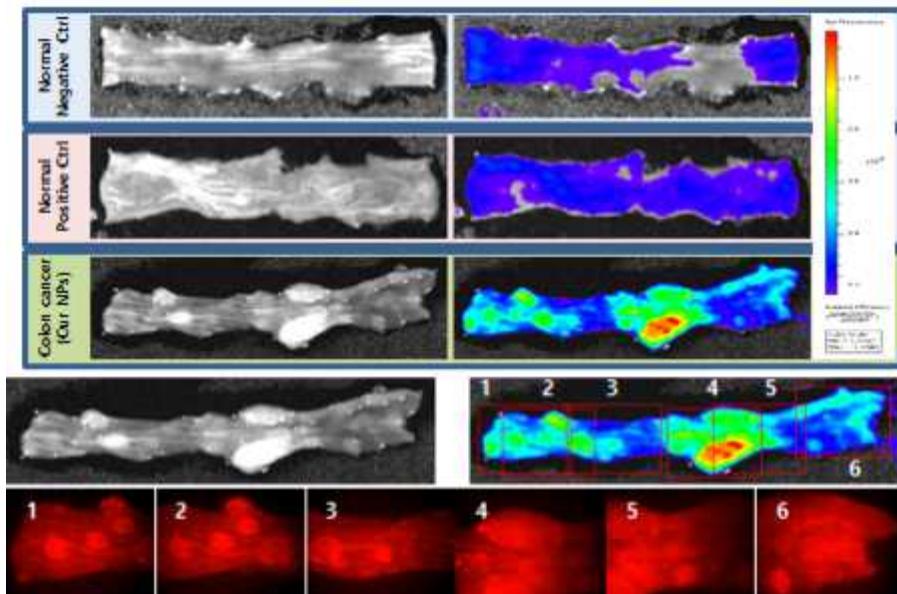
<표. 나노프로브의 세포 독성 비교>

- 나노프로브의 대장암 선택적 이입 거동을 통해 해당 나노프로브의 암세포 특이적 전달능을 확인할 수 있었음. 이에 실제 대장암 동물 모델에서 암 특이적 영상능 평가를 진행함.

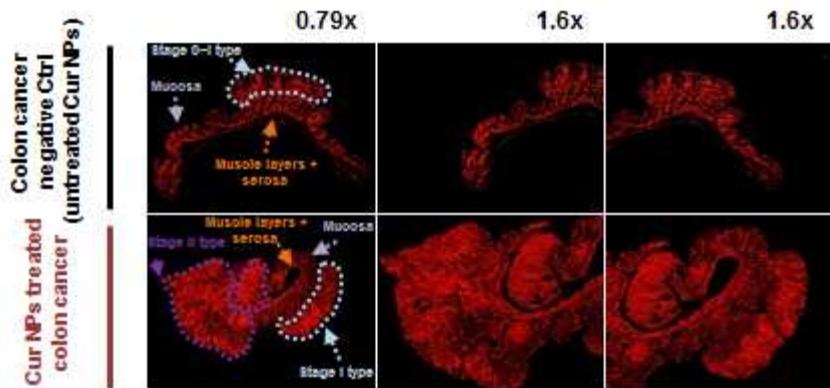


<그림. 나노프로브의 세포 내 유입 거동 비교>

- AOM 유래 대장암 동물 모델에 상기 나노프로브를 적용함에 있어서, 광학 영상장비를 이용한 암 조직내 나노프로브의 축적은 뚜렷하게 나타남. 나노프로브를 대장 조직 내부에 스프레이 하여 IVIS 영상 장비를 이용하여 curcumin 형광 신호를 획득하였음. 흡수된 나노프로브는 정상 조직 내에서는 빠르게 제거되는 반면, 암 조직 위치에서는 유의적인 retention 효과를 확인되었음. 이 암 조직에 대하여 조직학적 분석을 실시하여, 해당 나노프로브가 암 조직 코어 부분까지 충분히 침투되었음을 확인함.



<그림. 대장 정상 또는 암 조직 별 나노프로브 처리에 따른 형광 비교>

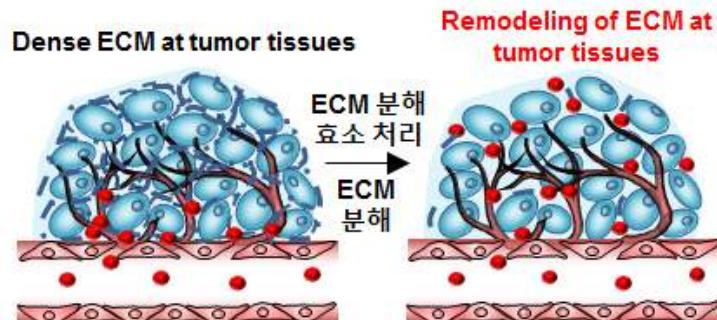


<그림. 나노프로브의 처리 유무에 따른 종양 조직의 단면 형광 영상>

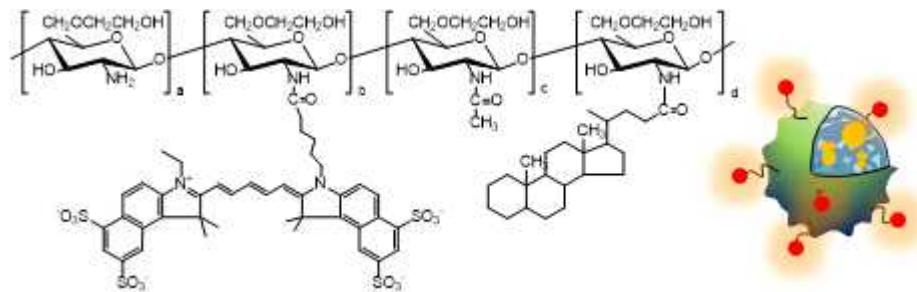
- 이러한 국소 스프레이를 통해 빠르고 주변조직 대비 강한 형광 신호 획득은 대장내시경과 함께 암종 유무 및 진행 경과를 판단하는 형광 조영제로의 활용 기대가 매우 높음
- 나아가 대장암 전이성 여부와 관련된 다양한 표적 protease들을 추가로 도입하여 “multi-target-single cell cytometry” 진단법을 구현할 수 있는 연구를 향후 진행하고자 함.

타. 세포외 기질 (ECM) 분해/파괴를 통한 ECM 리모델링 및 약물전달 효능 평가

- 기존의 연구들에서 보고된 ECM이 나노의약품의 암 조직 전달 효율을 감소 시켜 진단 조영제 또는 치료용 약물의 효능이 감소시키는 단점이 보고됨. 따라서 많은 연구팀에서 ECM의 장벽을 극복하고자 multistage nanoparticle, charge-convertable nanoparticle등의 다양한 나노소재를 이용한 나노의약품 전달 기술을 연구하고 있으나, ECM의 주요 성분인 콜라겐 또는 히알루론산의 구성 성분을 직접 리모델링하여 암 조직내 나노의약품 전달 효능을 분석한 연구 결과는 보고된 바 없음. 따라서 본 연구에서는 효소 또는 외부 자극을 이용한 ECM의 직접적인 리모델링을 통해 ECM 성분을 감소시키고, ECM 파괴율에 따른 나노의약품의 전달 효율을 분석하고 이를 바탕으로 최적화된 약물전달 시스템 효능을 향상시키고자 함.

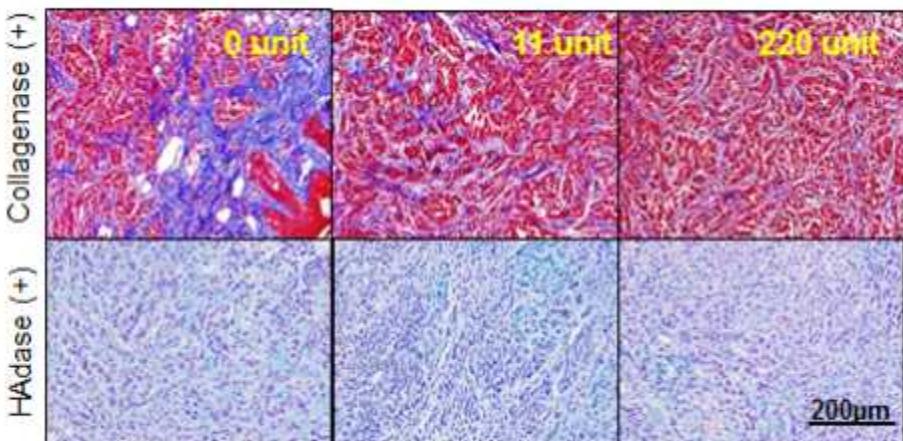


<그림. ECM 분해효소 또는 초음파 처리를 통한 암 조직 ECM 리모델링 모식도>



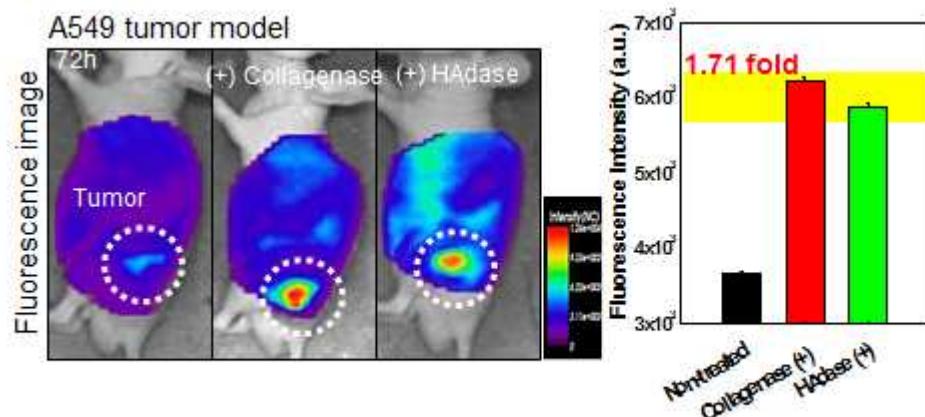
<그림. 항암제 함유 글리콜 키토산 나노입자의 구조 모식도>

- 본 연구에서는 글리콜 키토산 나노입자를 이용하여 항암제인 독소루비신을 무게비 30%로 봉입한 나노입자를 사용함.
- 암 조직의 세포외 기질을 구성하는 대표적인 구성 성분으로 collagen 및 히알루론산이 보고되고 있음. ECM은 조직을 지지하는 지지체로서의 기능 뿐만 아니라 세포 생장에 필요한 다양한 요소들을 제공하는 특성을 지님.
- 최근 다양한 연구 논문들에서 암 조직의 ECM은 다양한 나노약물전달체 뿐만 아니라 저분자 약물의 암 조직 전달 효능을 감소시키는 요인 중 한가지로 보고되고 있음. 따라서 암 조직의 ECM을 제거하거나 또는 함유량을 변화 시킬 수 있는 새로운 기술 개발이 필요함.
- 본 연구에서는 ECM의 주요 성분인 collagen 및 히알루론산을 분해 할 수 있는 collagenase, HAdase를 암 조직에 처리 후 ECM 함유량의 변화 및 이에 따른 나노약물전달체의 암 조직 축적 효능을 평가함.



<그림. ECM 분해 효소 처리 후 조직내 ECM 성분 염색 이미지>

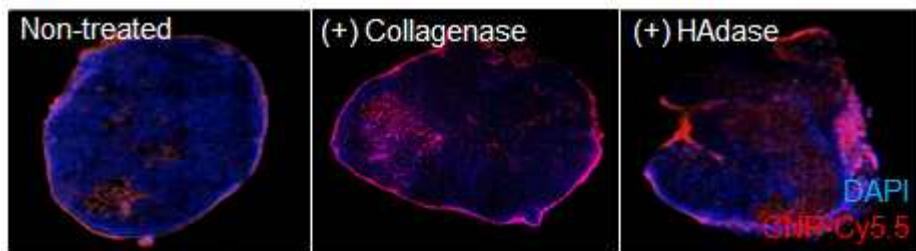
- Collagenase를 처리한 암 조직의 collagen 함유량을 Masson's trichrom stain을 통해 확인함. 아무것도 처리하지 않은 A549 암 조직 대비 collagenase 11 unit을 처리한 경우 약 30.6 %의 collagen 감소량을 보였으며, 처리량을 220 unit으로 증가시키는 경우 조직내 32.3 %의 collagen이 감소되는 것을 확인함.
- 히알루론산 분해 효소인 HAdase를 처리한 경우 조직내 히알루론산의 함유량은 아무것도 처리하지 않은 대조군 대비 32.1 % (11 unit), 32.6 % (220 unit) 까지 감소되는 것을 확인 할 수 있음.



<ECM 분해 효소 처리 후 글리콜 키토산 나노프로브의 암 조직 축적 효능 평가>

- Collagenase 및 HAdase를 처리한 암 동물 모델에서 글리콜 키토산 나노입자의 암 조직 축적 효율이 향상되는 것을 근적외선 형광 이미지를 통해 확인 할 수 있음. 특히 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 약 1.71배 이상 향상된 글리콜 키토산 나노입자의 암 조직 축적 효능이 확인되었음.
- 또한 collagenase를 처리한 암 조직의 형광은 HAdase를 처리한 암 조직보다 높은 경향을

나타내었으며 이는 ECM의 구성 성분 중 collagen이 차지하는 비율이 히알루론산보다 높기 때문인 것으로 판단됨.

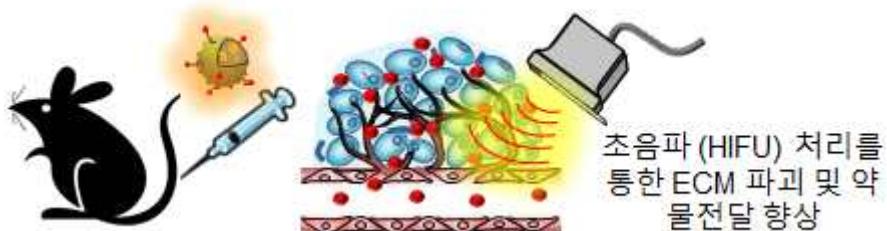


<그림. ECM 분해 효소 처리 후 글리콜 키토산 나노프로브의 암 조직 형광 이미지>

- Collagenase 또는 HAdase을 이용하여 암 조직 ECM을 리모델링한 암 동물 모델에 글리콜 키토산 나노입자를 정맥 투여한 후 72시간에 암 조직을 적출하여 암 조직내 분포된 글리콜 키토산 나노입자의 형광을 관찰함.
- ECM을 리모델링 하지 않은 암 조직 대비 collagenase 또는 HAdase를 처리한 경우 암 조직의 내부까지 글리콜 키토산 나노입자의 형광이 분포되어 있는 것을 확인 할 수 있으며, 암 조직 내부로의 효과적인 약물전달이 가능할 것으로 판단됨.

파. 고강도 집속초음파 (HIFU) 기반 암 조직 ECM 리모델링 및 약물전달 효능 평가

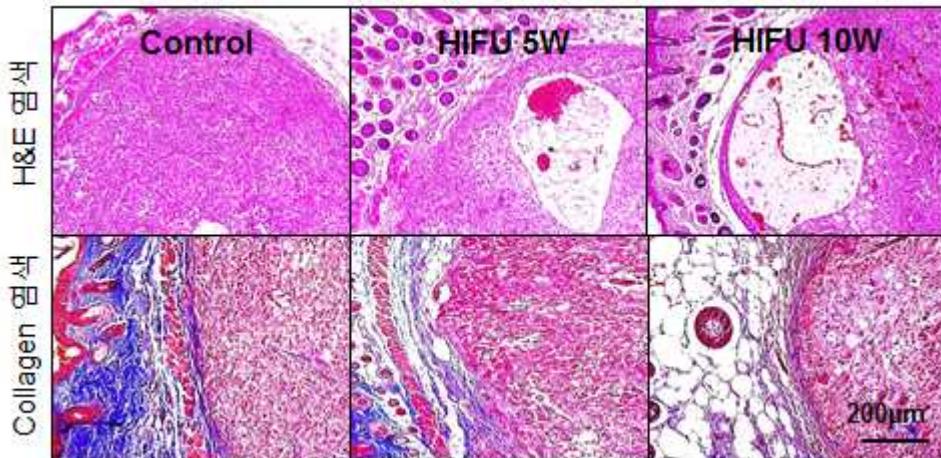
- 암 조직의 ECM 구성 성분은 효소에 의해 쉽게 파괴하여 나노입자의 암 조직 전달효율을 증가시킬 수 있지만, 동시에 정상조직에 존재하는 ECM을 분해 할 수 있는 단점을 지님. 따라서 암 조직에 특이적으로 ECM을 분해 시킬 수 있는 기술이 필요하며 본 연구팀은 외부의 물리적인 자극에 의해 ECM을 물리적으로 제어할 수 있는 시스템을 고안함.



<그림. 고강도 집속초음파 (HIFU) 기반 암 조직 ECM 리모델링 및 약물전달 효능 평가 모식도>

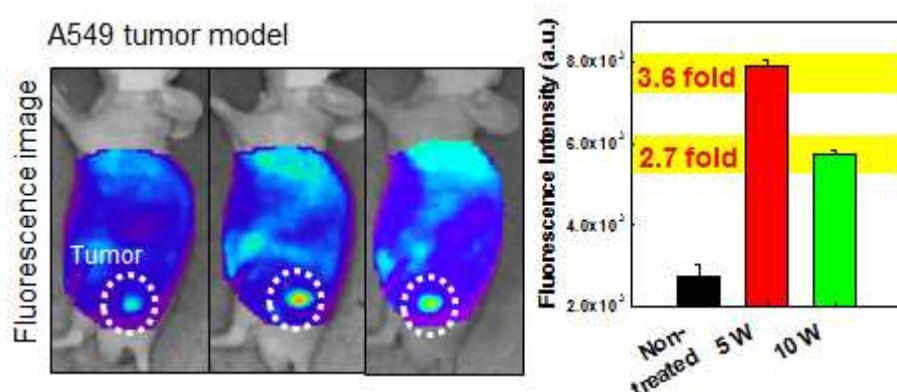
- 본 연구에서 사용하는 고강도 집속초음파 (HIFU)는 발생되는 초음파를 한점에 집속시켜 암 조직의 괴사를 유도하거나 처리한 초음파 민감형 나노소재를 자극하여 암 세포 사멸을 유도할 수 있는 장점을 지님.

- 특히 최근에는 HIFU를 이용한 다양한 나노소재의 암 조직으로의 효과적인 전달을 위하여 조직내 혈관의 tight junction을 개폐하거나 암 조직내 열을 발생시킴으로써 조직내 ECM을 제거하려는 시도들이 활발히 연구되고 있음.
- 본 연구에서는 HIFU를 이용하여 암 조직내 ECM을 리모델링 하고자 함. 최적화된 HIFU 처리 조건을 확립하기 위하여 0, 5, 10와트의 강도로 HIFU를 암 조직에 처리하여 조직학적 분석을 실시함.



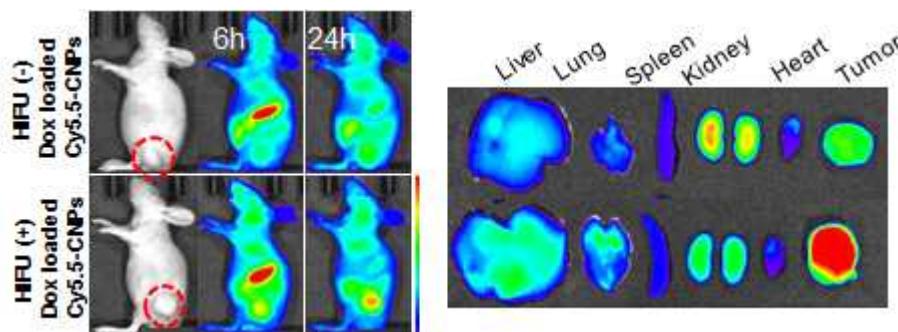
<그림. HIFU 처리 후 ECM 리모델링 효능 평가>

- HIFU를 5와트로 10분간 처리한 암 조직의 MT stain 이미지를 바탕으로 조직의 collagen 함유량이 35.3 % 까지 감소하는 것을 확인 할 수 있음. 또한 HIFU의 강도를 10와트로 증가 시켜 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 조직 대비 37.4 %의 collagen이 감소하는 것을 확인 할 수 있음. 이는 HIFU에 의한 조직내 collagen의 용해작용이 발생하는 것으로 판단되며 다양한 강도의 HIFU 처리를 통해 ECM 구조를 리모델링 할 수 있음을 확인함.
- 그러나 10와트의 HIFU 처리 조건에서는 조직의 부종 및 혈관 조직의 변형이 관찰됨.



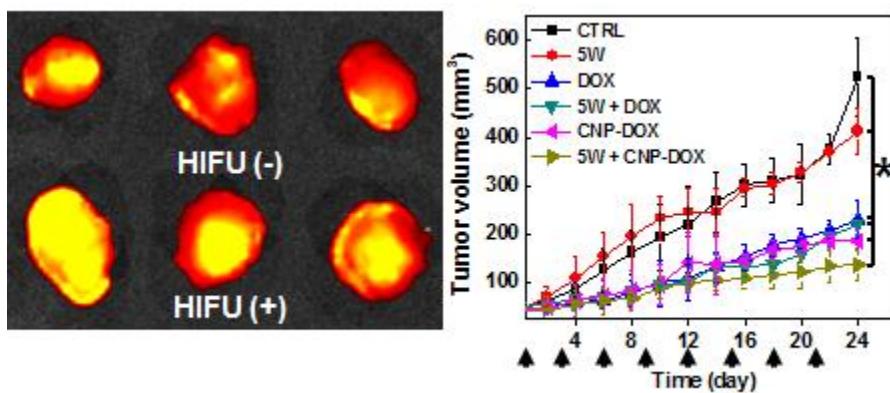
<그림. HIFU 처리 후 ECM 리모델링에 의한 나노입자 축적 효율 평가>

- A549 암 동물 모델에 각각 5와트 10와트의 HIFU를 처리한 뒤 글리콜 키토산 나노입자를 정맥 투여 하여 근적외선 형광 영상화를 실시함. 상기 결과와 같이 5와트, 10와트의 HIFU를 처리한 경우 암 조직에서 강한 근적외선 형광이 관찰되는 것을 확인 할 수 있으며, 이는 HIFU를 처리하지 않은 대조군 대비 5와트 HIFU 처리 시 3.6배, 10와트 HIFU 처리 시 2.7배 높은 수치임.
- 그러나 10와트를 처리하는 경우 암 조직내 부종 및 혈관 조직의 변형에 따른 나노입자의 축적 효율이 다시 감소하는 것을 확인함에 따라 최적화된 HIFU 처리 조건으로 5와트의 강도를 설정함.



<그림. HIFU 처리 후 ECM 리모델링에 의한 약물전달 효율 평가>

- A549 암 동물 모델에 항암제인 독소루비신이 봉입된 글리콜 키토산 나노입자를 처리 후 6시간, 24시간에 HIFU를 처리하여 암 조직에 축적되는 글리콜 키토산 나노입자 및 약물전달 효율을 근적외선 형광 영상 기법을 이용하여 평가함.
- HIFU를 처리한 경우 암 조직에서 시간에 따라 독소루비신의 형광이 증가되는 것을 확인 할 수 있으며 24시간째 주요 장기인 간, 폐, 비장, 신장, 심장, 암 조직을 적출하여 획득한 근적외선 형광 이미지에서도 강한 암 조직내 독소루비신 형광을 관찰 할 수 있음.



<그림. HIFU를 이용한 암 조직내 항암제 전달 효능 향상 수준 확인>

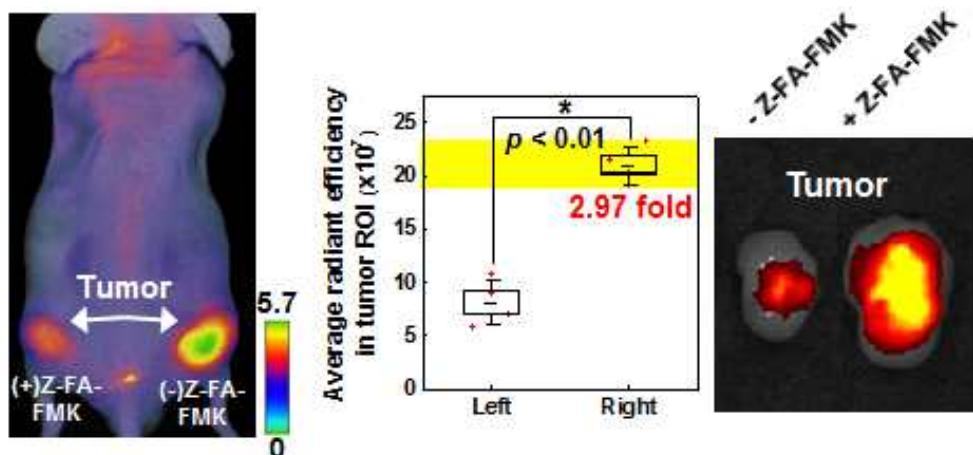
- 또한 적출된 암 조직의 절단면을 근적외선 형광으로 영상화 한 경우, HIFU를 처리한 암 조

직에서 암 조직 내부까지 강한 독소루비신 형광이 관찰 되는 것을 확인 할 수 있음. 따라서 HIFU를 이용하여 암 조직의 ECM을 리모델링 하는 경우 약물의 암 조직내 효과적인 전달이 가능할 것으로 판단됨.

- 최종적으로 A549 암 동물 모델을 이용하여 HIFU 처리를 통한 독소루비신 함유 글리콜 키토산 나노입자의 암 조직 성장 억제 효능을 평가함. 아무것도 처리하지 않은 대조군 대비 5 와트의 HIFU와 독소루비신 함유 글리콜 키토산 나노입자를 처리한 암 동물 모델은 5배 이상의 암 조직 성장 억제 효능이 나타나는 것을 확인함.

하. 생체내 인공 표적 수용체 도입을 통한 약물전달 향상 수준 확인

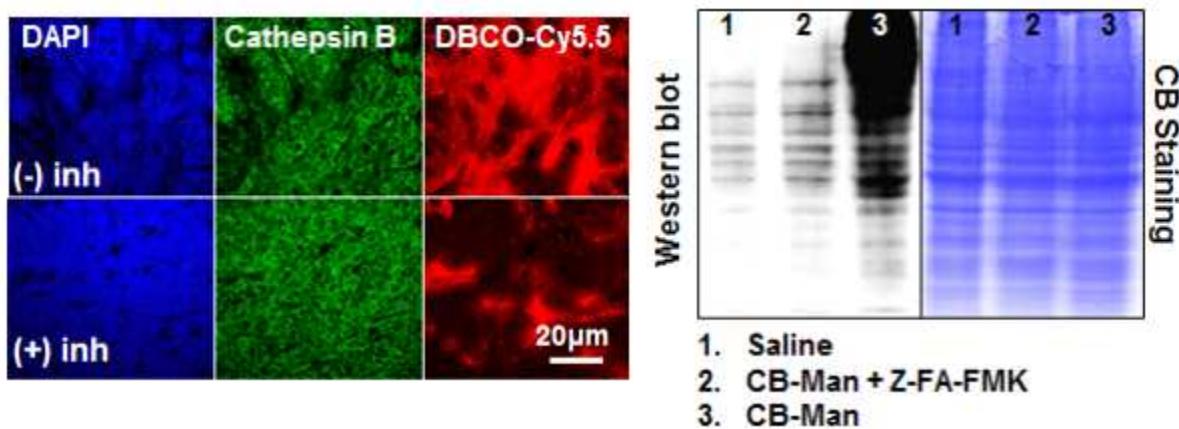
- 이전 연구를 통해 본 연구팀은 암 조직에 과발현되는 카냅신 B 효소에 특이적으로 절단되어 암 세포 표면에 인공 표적 수용체를 도입할 수 있는 비천연 당 전구체를 개발한 바 있음.
- 본 연구에서는 카냅신 B 효소 특이적 비천연 당 전구체 (CB-Man)을 이용하여 생체내에서 인공 표적 수용체를 이용한 약물전달 향상 수준을 확인하고 이를 이용한 영상 기술 및 치료전략을 개발하고자 함.



<그림. CB-Man을 암 조직에 직접 주입 후 생체내 인공 표적 수용체 도입을 통한 약물전달 향상 수준 평가>

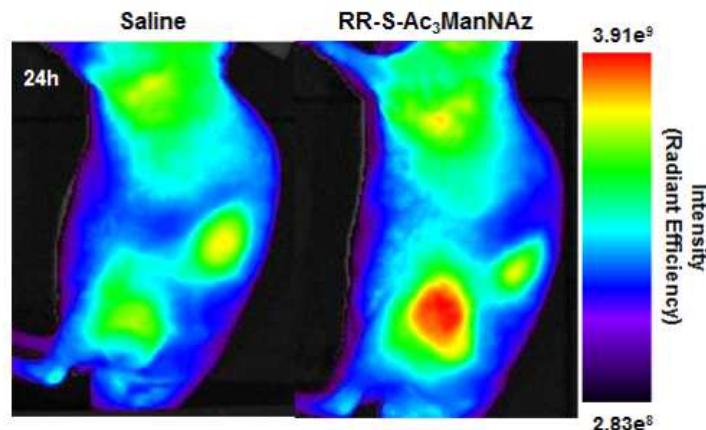
- 개발한 CB-Man을 대장암 세포주인 HT-29가 접종된 종양 동물모델의 원쪽 암 조직에 카냅신 B 효소 억제제를 처리한 뒤, 조직에 3일간 총 3회 투여함. 그리고 아자이드와 생물적 교성클릭화학으로 결합 가능한 ADIBO-Cy5.5를 정맥 투여 한 후 근적외선 형광 영상 장비로 암 표적성을 평가함.
- ADIBO-Cy5.5 투여 후 24시간 뒤 근적외선 형광 이미지를 분석한 결과, 카냅신 B 억제제를 처리한 암 조직 보다 처리하지 않은 암 조직에서 약 2.97배 높은 형광이 관찰되는 것을

확인하였음. 또한 암 조직을 적출하여 얻은 근적외선 형광 이미지 또한 카냅신 B 억제제를 처리하지 않은 암 조직에서 높은 형광이 관찰됨에 따라 CB-Man이 암 조직에 성공적으로 인공 표적 수용체를 발현하고 이를 생물학적 특성을 통해 효과적으로 표적화 할 수 있는 것으로 판단됨.



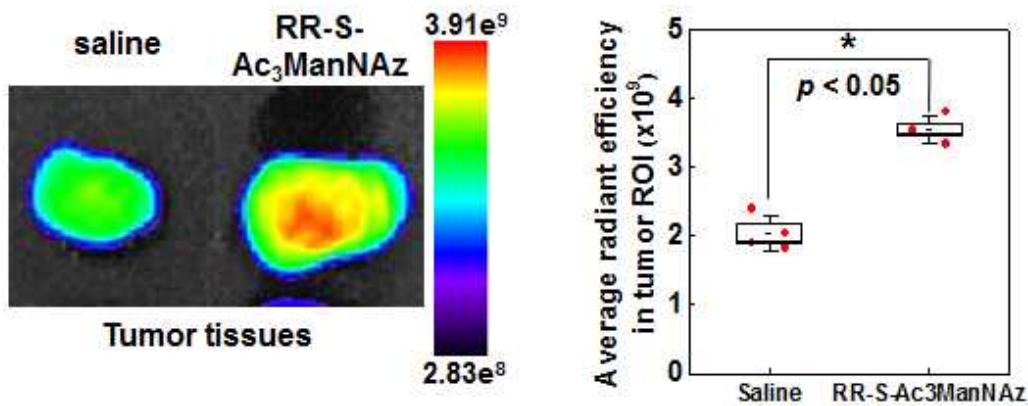
<그림. 조직학적 분석을 통한 인공 표적 수용체 도입 확인 및 약물전달 효능 평가>

- 상기 동물 모델 실험에서 적출한 암 조직을 면역조직염색을 통하여, 암 조직내 카냅신 B의 양과 카냅신 B 효소 억제제의 유무에 따라 유의하게 인공 표적 수용체의 발현이 나타나는 것을 확인함.
- 또한 적출한 암 조직에서 단백질을 분리하여 western blot 기법을 통해 암 세포에 표현된 인공 표적 수용체를 분석함. 카냅신 B 억제제를 처리하지 않은 암 조직에서 강한 아자이드 그룹의 밴드가 관찰되었으며, 카넵신 B 억제제를 처리한 경우 대조군과 유의한 인공 표적 수용체의 밴드가 나타나는 것을 확인 할 수 있음. 따라서 본 연구에서 개발한 CB-Man이 암 조직에 성공적으로 인공 표적 수용체를 발현 시킬 수 있는 것으로 사료됨.



<그림. CB-Man을 정맥 투여 후 생체내 인공 표적 수용체 도입을 통한 암 표적 효능 평가>

- CB-Man을 HT29 종양 동물모델의 꼬리정맥을 통하여 3일간 총 3회 투여한 뒤, 4일째, ADIBO-Cy5.5 를 정맥 투여 하여 근적외선 형광 영상장비로 암 표적성을 평가함. ADIBO-Cy5.5 투여 후 24시간 뒤 근적외선 형광 이미지를 분석한 결과, CB-Man을 투여 한 쥐에서 투여하지 않은 쥐에 비해 약 2배 많은 양의 ADIBO-Cy5.5가 있음을 확인함.



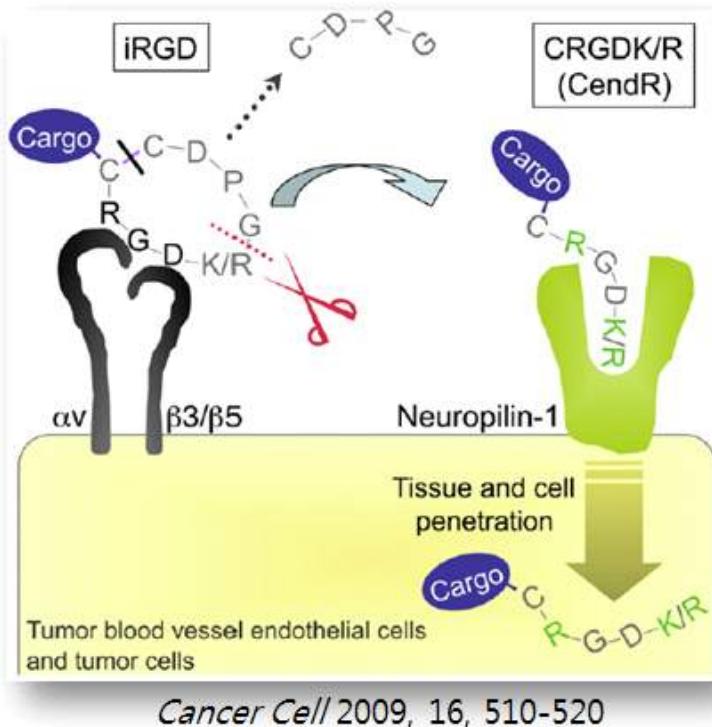
<그림. CB-Man을 정맥 투여 후 생체내 인공 표적 수용체 도입을 통한 약물전달 향상 수준 평가>

- 상기 결과들을 바탕으로 본 연구에서 개발한 CB-Man은 일반 세포에 비해 암 세포에서 과 발현 되는 효소인 카냅신 B에 의하여, 특이적으로 활성화 될 수 있고, 이를 이용하여 암 조직 특이적으로 인공 표적 수용체를 도입 시킬 수 있으며, 생체 내 조건에서 생물직교성클릭화학 반응을 이용하여 도입된 인공 표적 수용체를 균일하게 표적화 할 수 있는 것을 확인 함으로써 대장암뿐만 아니라 다양성 및 복잡성을 갖는 다양한 암 세포의 특성을 극복하기 위한 대안으로 응용가능 할 것으로 사료됨.

2. 유도표현형 및 대장암 기질 표적 진단·치료용 나노바이오 소재 개발

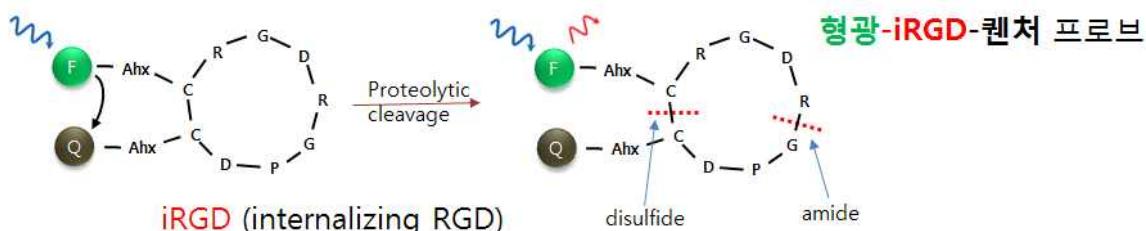
가. 대장암 표적형 광역학 치료 분자 depot 개발

- RGD 서열을 포함한 iRGD (internalizing RGD, c(CRGDK/RGPD/EC)) 웨타이드는 최근 암 조직 또는 혈관에 표적성이 높을 뿐 아니라 조직 투과성도 높다고 보고됨.
- 암조직으로 투과되는 과정은 세 단계로 진행되며, 첫 번째로 암 조직에 과 발현된 av integrins 에 iRGD가 표적화되고, 이때 여러 효소에 의해 웨타이드가 절단되어 CendR motif가 노출됨.
- 이 CendR motif가 포함된 웨타이드 단편은 암 조직에 과발현되어 있는 NRP-1에 의해 암 조직 내로 투과될 수 있음 (그림).



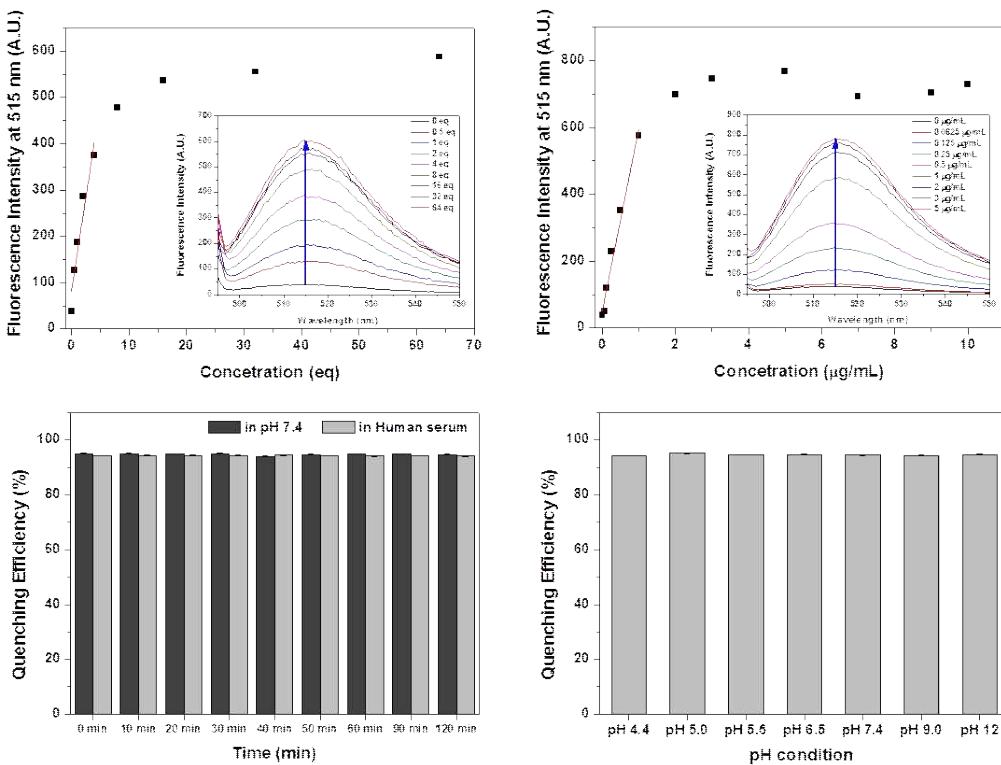
<그림. iRGD의 암 조직에 대한 표적과 침투의 과정>

- 이 과정을 이용하여 본 연구에서 웹타이드가 암 조직 내로 들어갈 때만 형광이 활성화될 수 있는 형광 켄처 조합의 활성화 iRGD (형광-iRGD-켄처) 프로브를 개발함 (그림).



<그림. 형광 켄처 조합의 iRGD 설계 및 형광 재생 과정>

- 이 웹타이드를 합성하기 위해 iRGD의 CendR motif 가 포함된 N-terminal에 형광을 접합하고 C-terminal에 켄처를 접합하였음.
- 효소에 의한 형광의 활성화 테스트를 위해 DTT와 트립신을 농도별로 처리해본 결과, DTT와 트립신 모두 존재하에서만 형광이 활성화 되었고 농도에 따른 활성화도를 보여줌 (그림).
- 또한 웹타이드 안정성 테스트를 위해 생체내 환경과 비슷한 조건인 혈청용액과 다양한 pH에서 형광을 관찰해 보았고, 2시간 내로 형광이 활성되지 않고 형광 켄칭이 유지됨을 볼 수 있었음 (그림).



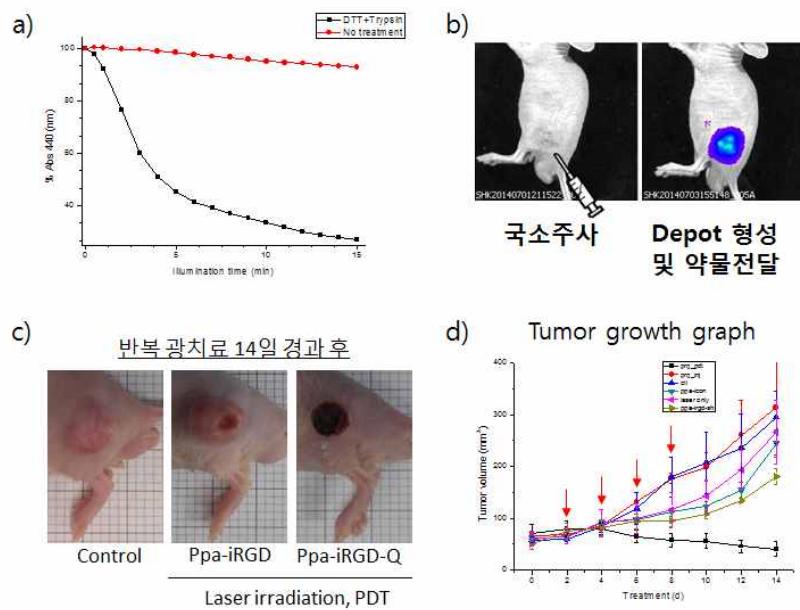
<그림. 형광-iRGD-캔처 프로브의 효소절단에 의한 형광재생 및 안정성 테스트>

- 이를 바탕으로 iRGD 웹타이드를 활성화 광역학치료에 적용하기 위해 형광-캔처iRGD 웹타이드의 형광체 자리에 pheophobide-a 광감작제 (photosensitizer)를 접합시켜서 암 조직에 침투되었을 때만 광감작제가 활성화되는 효과를 구현하고자 함.
- 광역학 치료의 선택성을 확인하기 위해RNO탈색을 통한 활성산소 확인법을 Ppa-iRGD-캔처에 적용하였으며, 캔처 존재 하에서는 활성산소발생이 거의 없으며 효소 존재 하에서 활성산소가 발생되는것으로 보아, 암 조직 침투 후 선택적으로 광감작제가 활성화될 수 있는 가능성을 확인함 (그림).
- 생체내 실험을 위해U-87 MG암세포 이식된 쥐를 사용하였으며, U-87 MG 세포는 대장암 세포조직에 (HT-2, HCT-116) 많이 발현되어 있는 αvβ3 integrin 과 NRP1 receptor의 발현도가 높은 것으로 알려져 있음.
- 생체내에서 효과적인 광역학치료를 위해Ppa의 소수성 성질과 웹타이드의 친수성 성질을 이용하여 생체내에 국부주사를 통한Ppa-iRGD-캔처로 이루어진 depot을 제조함 (그림).
- 이러한 depot에서 방출된 Ppa-iRGD-캔처는 암 조직으로 표적되어 안쪽으로 침투되어 광감작제가 활성화 될 수 있을 뿐만 아니라 depot에서Ppa-iRGD-캔처가 서서히 방출되기 때문에 한번 투여로 여러번 광역학치료를 할 수 있는 장점이 있음.
- 레이저 치료도중 depot안에서는 광감작제가 소광상태로 존재하기 때문에 백화현상이 최소화될 수 있음.
- 따라서 한번 depot형성시킨후 14일 동안 4번의 광역학치료를 시행하였을때 Ppa-iRGD-캔처는 캔처 없는 Ppa-iRGD 보다 훨씬 높은 암 치료효과를 보였음 (그림).

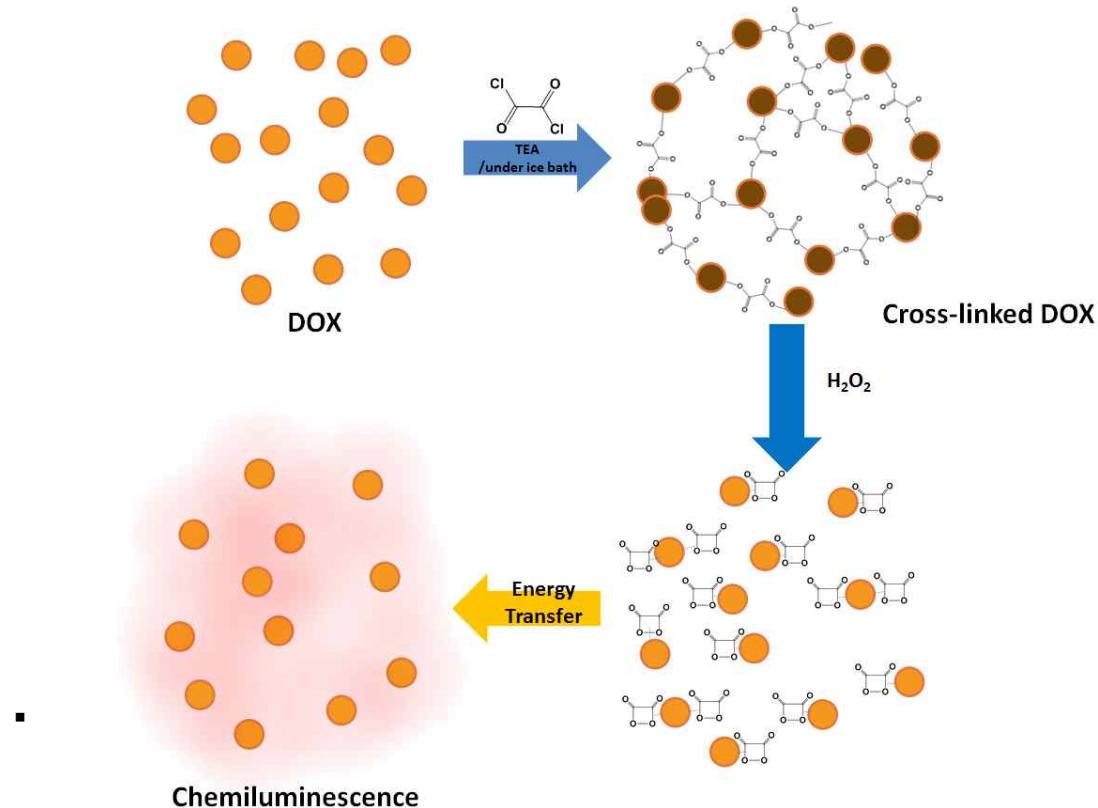
- 시간에 따른 암크기의 변화도 다른 컨트롤 실험군들에 비해 암 성장이 억제 및 축소됨을 확인함.

나. 유도표현형(H_2O_2) 표적형 drug bomb 개발

- 항암제(Dox), 유기연료를 cross-linking하여 유도된 과산화수소에 감응하는 고성능 화학발광 및 약물 방출 drug bomb 나노파티클을 설계 및 제조함.
- 항암제(Dox)의 형광특성과 Energy Transfer현상을 활용하여 분자영상 및 약물 방출에 의한 치료효과를 기대함.



<그림. a) 효소 존재하에서 활성산소 생성 측정. b) 국소주사로 Ppa-iRGD-ҡ遍及 depot 형성과 약물전달 이미지 관측. c) 반복 광치료 14일 경과 후 암 치료된 사진. d) 시간에 따른 암 크기 변화>



<그림. 항암제(Dox), 유기연료를 포함하는 화학발광 유도표현형 표적형 drug bomb 나노파티클의 모식도>

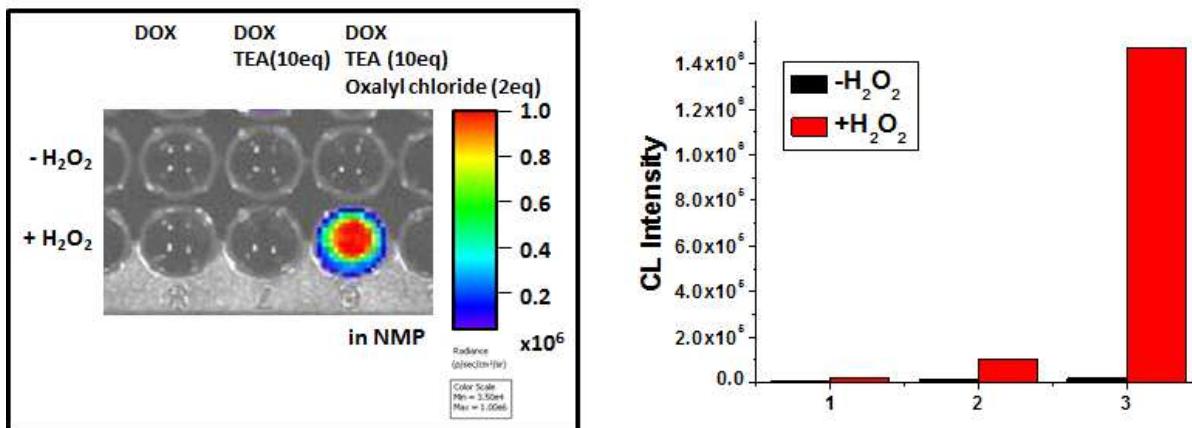
- cross-link된 drug bomb의 형광 특성변화로 약물(dox)의 응집 상태를 간접적으로 확인함.
- cross-link된 drug bomb의 형광효율이 free dox보다 상대적으로 낮아 과산화수소에 의한 약물의 방출을 형광특성으로 확인 가능함.



1. DOX
2. DOX + TEA (10eq)
3. DOX + TEA (10eq) + Oxalyl chloride (2eq)

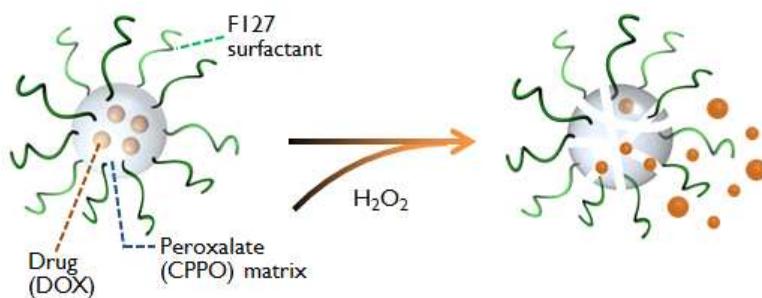
<그림. 항암제(Dox)와 유기연료의 cross-link에 의한 형광특성변화 사진. 가시광(좌), 자외선(365 nm, 우). 각 샘플은 원쪽에서 순서대로 1. dox, 2. dox+TEA, 3. dox cross-link를 나타냄>

- 과산화수소에 감응하여 drug bomb이 분해 및 약물 방출되어 화학발광에 의한 생체 외 검출 능력을 평가함.
- 과산화수소에 의해 cross-link된 drug bomb에서만 강한 화학발광을 나타냄.
- 방사선 치료 시 과산화수소가 발생한다고 알려져있음.
- 방사선 치료 시 발생하는 과산화수소에 의해 방사선 감응 drug bomb 나노파티클을 제조 및 그 특성을 확인함.
- 최소 방사선량으로 발생된 과산화수소에 감응하는 고효율 항암 치료법을 제시함.



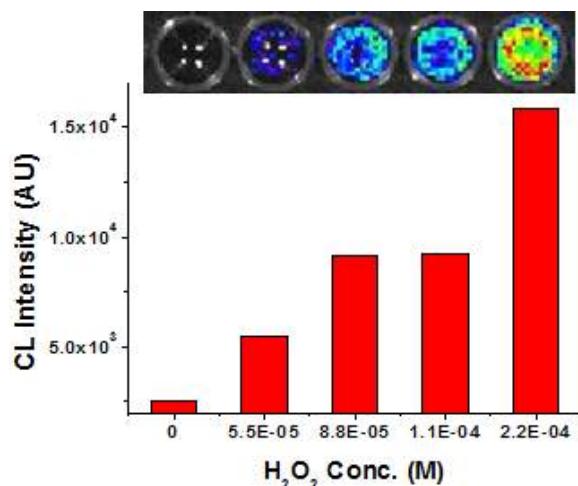
<그림. Drug bomb의 과산화수소 감응 화학발광 영상 (좌) 및 신호 세기 (우)>

- 방사선 치료 시 발생하는 유도표현형 과산화수소에 감응하여, 화학발광 영상신호(진단) 및 항암제 방출(치료)이 활성화되는 나노소재를 개발함.
- 최소 방사선량으로 발생된 과산화수소에 감응하는 고효율 항암 치료법을 제시하고자 함.
- 해당 나노소재는 소수성의 약물(hydrophobicized doxorubicin)을 과산화수소 감응형 화학발광 연료인 peroxalate로 구성된 매트릭스 내에 집적하고, 고분자 계면활성제(Pluronic F-127)를 통화 수계 나노입자화가 가능하도록 설계되었음.



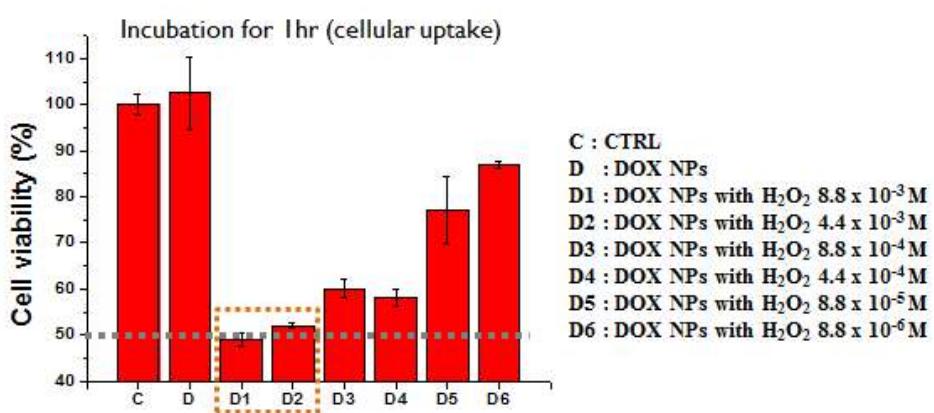
<그림. 유도표현형(H_2O_2) 표적형 나노항암제 모식도>

- 제조된 나노항암제의 진단 유효성을 평가하기 위하여, 외부 과산화수소에 의한 화학발광 발생 특성을 평가함.
- 나노입자 내부의 perxalate 매트릭스가 과산화수소와 반응하여 energy transfer를 통해 doxorubicin으로부터 화학발광 영상신호가 발생하는 것을 확인하였으며, 10^{-5} M 수준의 과산화수소 감도를 확보하였음.



<그림. 과산화수소 농도에 따른 나노항암제의 화학발광 세기>

- 나노항암제의 과산화수소 감응 약물방출에 따른 치료효과를 검증하기 위해 세포 수준에서 암세포의 사멸 정도를 MTT assay를 통해 평가함.
- HeLa 세포에 나노항암제를 1시간 uptake 후, control 및 나노항암제 단독 처리 대비 과산화수소 유도 세포사멸도가 과산화수소 농도에 따라 감소하는 것을 확인하였으며 10^{-3} M 범위의 과산화수소 하에서 50% 수준의 암세포사멸이 진행되었음.



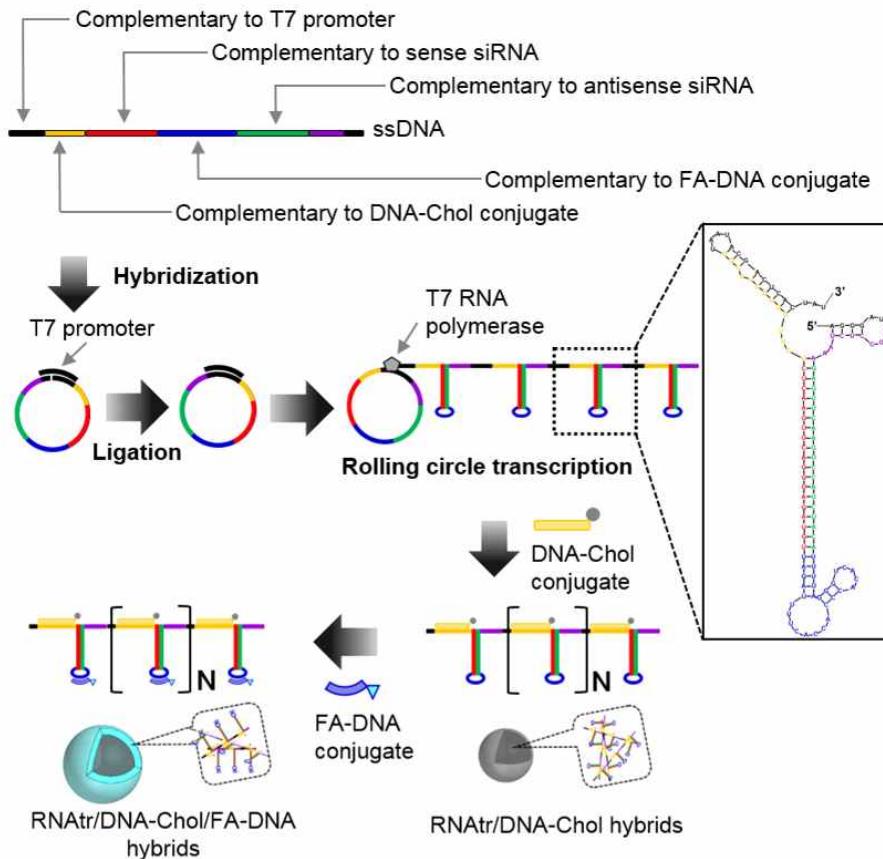
<그림. 과산화수소 농도에 따른 나노항암제의 약물 방출 거동 및 세포 사멸>

3. Image-guided surgery 구현을 위한 대장암 이질성 추적 프로브 개발

가. RCT 나노입자를 이용한 분자영상 및 유전자 억제 기술 개발

(1) Rolling Circle Transcription (RCT)을 이용한 다기능성 RCT 나노입자의 디자인 및 제조 플랫폼 기술 개발

- RNA hairpin의 다중 반복체의 제조가 가능한 rolling circle transcription (RCT) 반응을 활용하여 optical imaging probe뿐만 아니라 약물전달 및 유전자 치료제로의 적용확장이 가능한 RCT 나노입자 제조 플랫폼기술을 개발함.
- 이러한 RCT 기반 RNA hairpin 다중체 제조공정은 이질성 암세포에 대한 표적 리간드 표지가 간편하고 고효율의 유전자 치료용 siRNA loading이 가능할 뿐만 아니라, anthracycline 계열의 항암화학제의 탑제가 가능함으로써 이질성 암조직의 영상화, 유전자 치료 및 항암화학약물 전달을 동시에 수행할 수 있는 다기능성 나노입자를 제공할 수 있음. 또한 화학적 RNA 합성법에 비해 낮은 생산단가를 가지면서 다품종이지만 소량생산이 필요한 실험실 규모의 연구에 적합한 제조공정을 제공함.
- 전신주입 (intravenous administration) 및 고형암 타겟팅이 가능함으로써 암 추적기술 및 암 치료기술 적용에 유리하고 2종 이상의 다중 유전자 제어가 가능한 유전자 치료제로서의 기능을 동시에 수행할 수 있음.
- 면역반응을 유도하고 생체적합성 문제를 가지고 있는 다중 양이온 폴리머를 사용하지 않음으로써 임상적용의 가능성성이 높다는 장점을 지님.

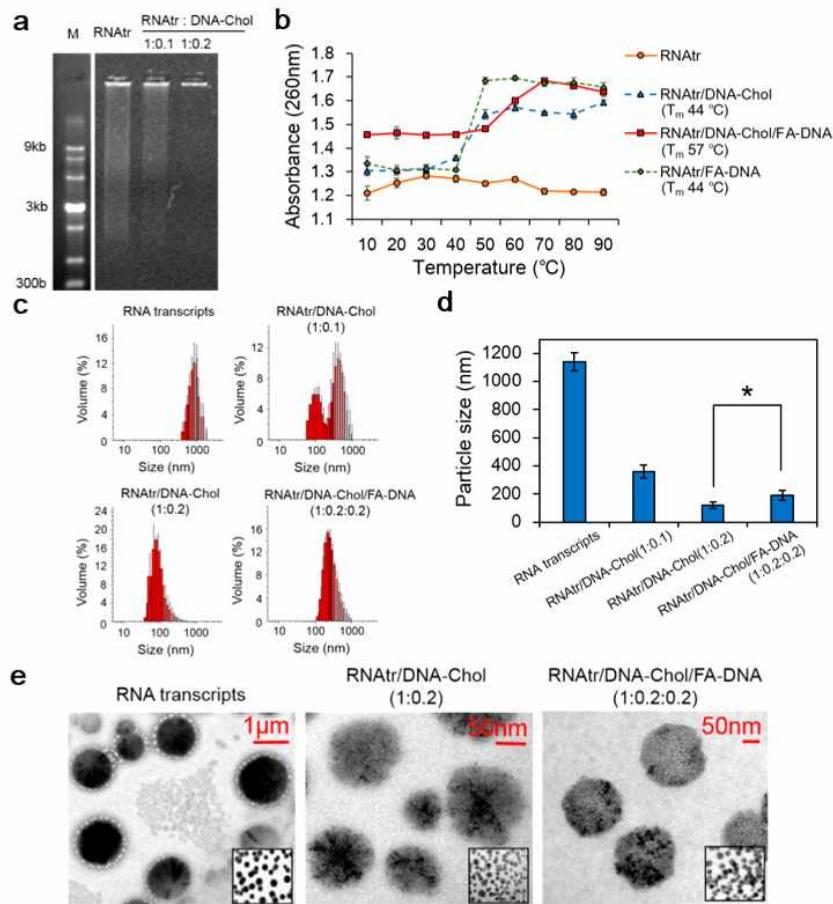


<그림. RCT 반응을 이용한 다기능성 RCT 나노입자의 모식도>

(2) DNA-cholesterol의 hydrophobicity를 응용한 RNA 중합체의 나노 사이즈 조절 및 암선택성 기능 부여를 위한 folate-DNA 코팅 방법 개발

- 고밀도의 RNA 제조가 가능하고 낮은 생산단가 등의 장점에도 불구하고 높은 음이온 밀도 및 거대분자량 때문에 바이오소재 적용에 제한을 받아온 RCT 반응물의 크기를 마이크로 사이즈에서 나노사이즈로 획기적으로 조절할 수 있는 제조공정을 개발함. 또한 암선택적 전달에 필수적인 리간드 코팅을 RNA/DNA base pairing을 응용하여 가능하게 함으로써 효율적인 암세포 전달이 가능한 RCT 나노입자의 물리화학적 성질을 규명하였음.
- RNA/DNA base pairing에 의한 RNA transcripts/DNA-cholesterol 복합체의 우수한 결합 특성을 전기영동 분석을 통하여 확인함 (a).
- thermal denaturation 분석에서 RNA transcripts/DNA-cholesterol/folate-DNA 복합체의 우수한 결합특성으로 인한 melting temperature의 증가를 통해 나노입자의 안정성을 확인함 (b).
- RNA transcripts/DNA-cholesterol/folate-DNA 복합체의 나노사이즈 파티클 형성을 dynamic light scattering을 이용하여 확인함 (c,d).

- 전자顯微鏡 (TEM) 분석을 통한 RCT 나노입자의 나노사이즈 파티클 형성 검증 (e).

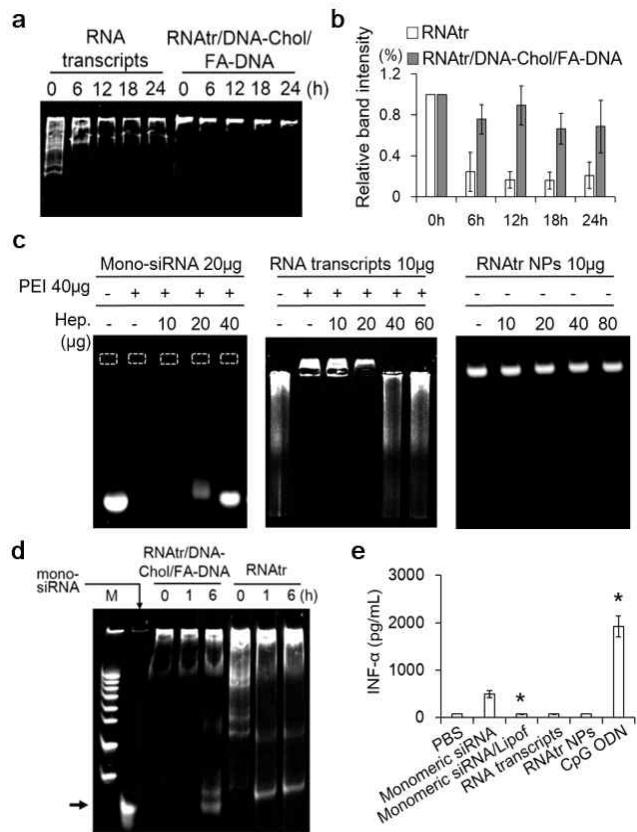


<그림. RCT 나노입자의 물리화학적 특성분석 결과>

(3) 고밀도 RCT 나노입자의 핵산분해효소로부터의 안정성, extracellular matrix의 다중음이온 분자 간섭으로부터의 안정성, dicer 효소에 의한 RCT 나노입자의 active siRNA로의 변환 검증 및 면역반응으로부터의 안정성 검증

- RCT 나노입자가 가지는 고밀도 packing 성질은 혈액안에 존재하는 각종 핵산분해효소의 공격으로부터 siRNA를 효과적으로 보호함을 검증함 (a, b). 또한 extracellular matrix에 존재하는 sulfated glycosaminoglycans과 같은 각종 다중음이온분자의 간섭으로부터 siRNA의 해리가 일어나지 않음을 확인함 (c).
- 기존 siRNA 전달체와 비교해서 매우 우수한 혈액내 및 세포막 외부환경에서의 안정성을 관찰하였으며, 전신주입을 통한 RCT 나노입자의 주입이 가능함을 보여주는 후속연구결과와 일치하였음.
- dicer에 의하여 RNA hairpin이 active siRNA 형태로 변환될 가능함을 검증하였고 약 53.3%의 RNA hairpin이 잘려서 active siRNA로 변환됨을 확인함 (d).
- human peripheral blood mononuclear cells에서의 면역반응 자극을 통해 인터페론-알파의

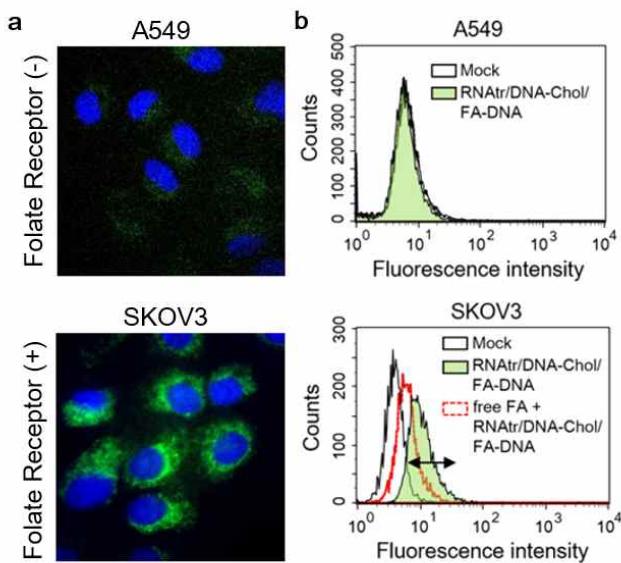
유도 여부를 확인한 결과 RCT 나노입자가 면역자극원으로 작용하지 않음을 확인하였음 (e). 또한 TNF-alpha의 유도여부를 확인한 결과 역시 면역자극원으로 작용하지 않음을 확인하였음.



<그림. RCT 나노입자의 우수한 생체안정성 및 면역안정성>

(4) folate 수용체에 의존적인 RCT 나노입자의 세포투과 성질 검증

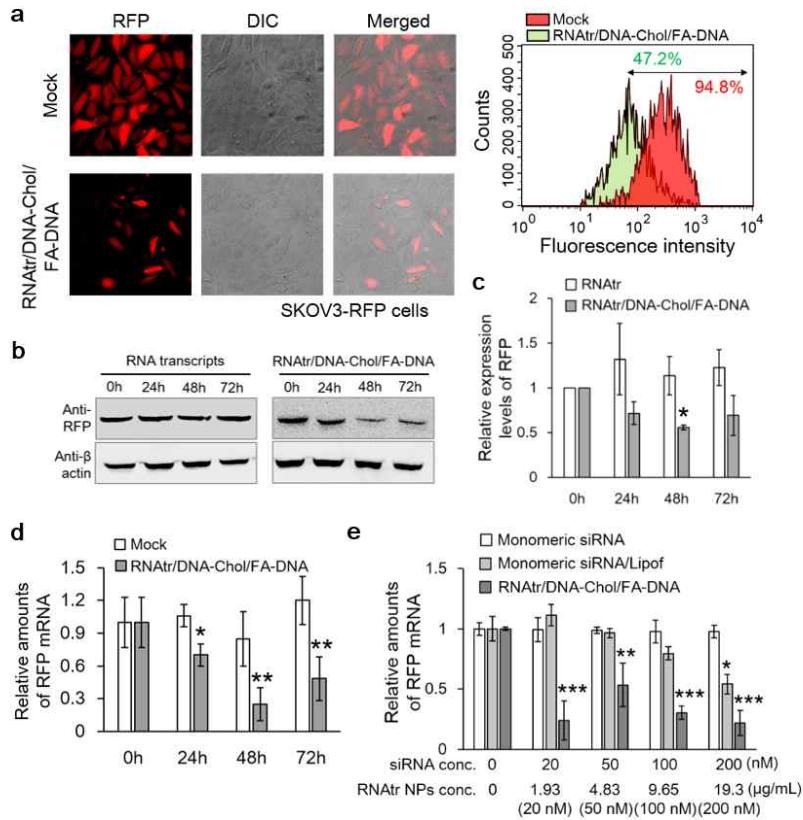
- RNA folate 수용체가 과발현되어 있는 SKOV3 인간 난소암 세포와 RNA folate 수용체 발현이 매우 낮은 A549 인간 폐암 세포를 이용하여 RCT 나노입자의 수용체-선택적인 세포 투과를 검증하였음 (a). flow cytometry 분석을 이용하여 수용체-선택적 세포 결합 및 투과 성질을 조사한 결과 현광현미경 결과와 일치함을 확인함 (b).
- SKOV3 세포를 folate로 선처리하여 세포막의 folate 수용체를 포화시킨 후 RCT 나노입자를 처리한 결과, 세포투과율이 40% 정도 감소함을 확인하였고 이것은 RCT 나노입자가 folate 수용체에 의하여 세포안으로 투과됨을 나타냄.



<그림. folate 수용체에 의존적인 세포투과력>

(5) SKOV3-RFP 세포에서의 RFP 유전자 선택적 사일런싱 검증

- Red Fluorescence Protein (RFP)이 과발현되는 SKOV3-RFP 난소암 세포에서 RFP 유전자의 발현을 선택적으로 억제할 수 있음을 현광현미경을 통해 확인하였고 flow cytometry 정량적 분석은 약 48%의 RFP 유전자 발현 감소를 보여주고 있음 (a). RFP 항체를 이용한 Western blot 실험에서 시간에 따른 RFP 유전자 발현의 감소를 확인하였고 RNAi 처리 후 약 48시간에서 최고의 유전자 발현 감소를 관찰함 (b, c). 또한, qRT-PCR 검사를 통해 RFP mRNA의 정량분석을 시행하였을 때 시간에 따른 mRNA 양의 감소를 마찬가지로 관찰함 (d).
- 기존의 대표적 siRNA 전달체인 lipofectamine과의 유전자 사일런싱을 비교하였을 때, 동일한 siRNA 농도에서 RCT 나노입자가 훨씬 많은 양의 유전자 사일런싱을 일으킴을 관찰하였으며, lipofectamine이 사일런싱을 일으키지 못하는 매우 낮은 농도의 siRNA에서도 RCT 나노입자는 사일런싱이 가능함을 보여줌 (e).



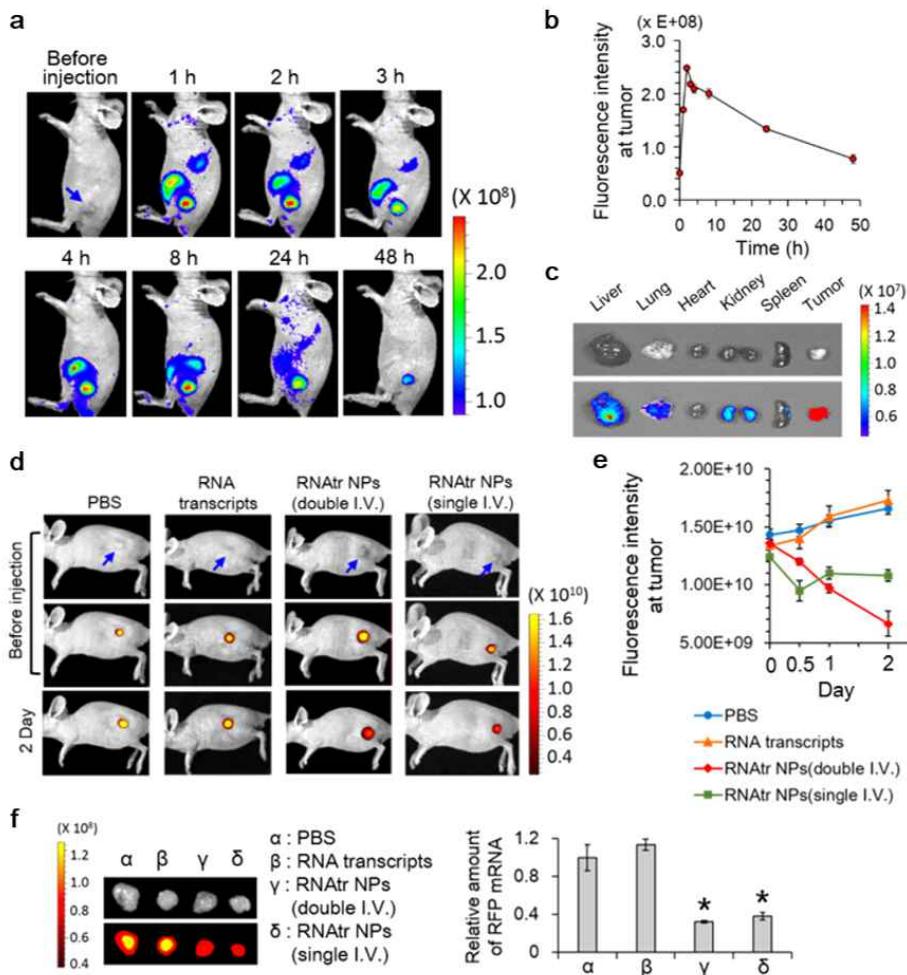
<그림. SKOV3-RFP 세포에서의 RFP 유전자의 사일런싱을 통한 우수한 유전자 발현 억제 능력 검증>

(6) *in vivo* 난소암 마우스 모델에서의 우수한 암 선택적 축적성 및 효과적인 *in vivo* 유전자 사일런싱 검증

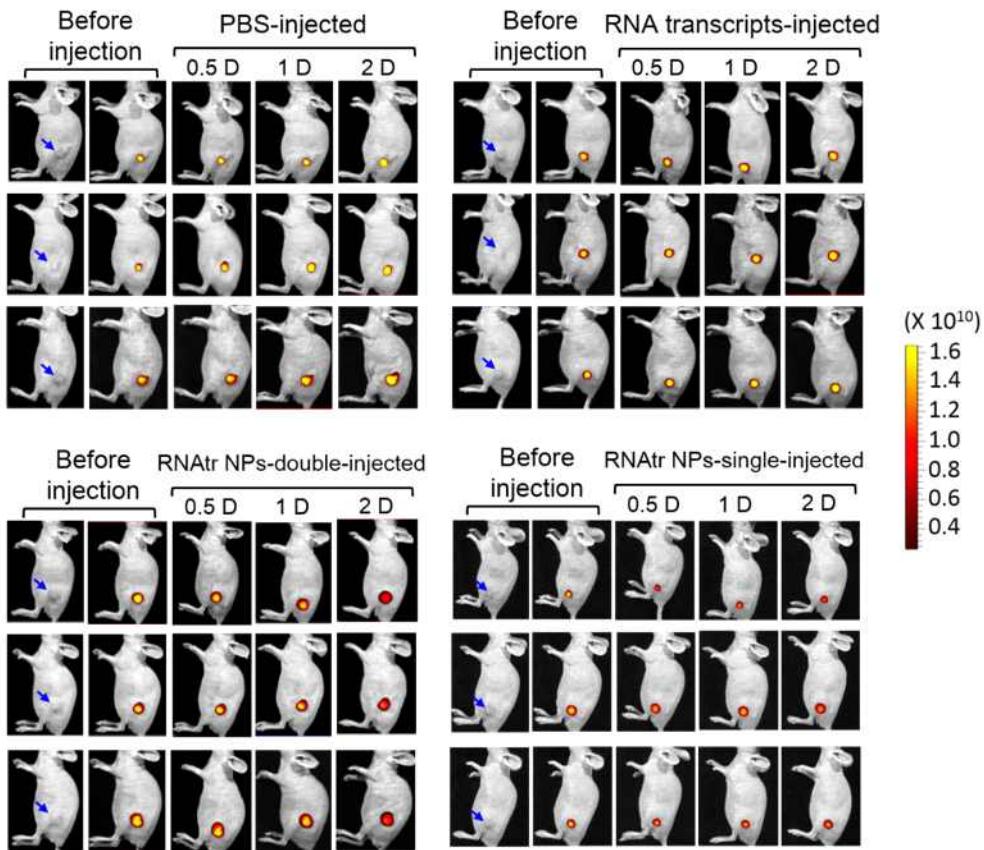
- SKOV3 난소암세포가 이식된 마우스 모델에서의 우수한 암선택적 축적성을 확인하였고 SKOV3-RFP 난소암세포가 이식된 마우스 모델에서의 우수한 RFP 유전자 발현억제 효과를 확인하였음. 이러한 결과는 RCT 나노입자가 전신주입이 가능하면서 난소암 선택적으로 전달이 가능하고 효과적으로 유전자를 사일런싱 할 수 있는 RNAi 플랫폼 기술로서의 가능성을 보여주고 있음.
- 형광표지된 RCT 나노입자를 꼬리혈관을 이용한 전신주입을 한 결과 시간에 따라 선택적으로 난소암 조직에 축적되는 것을 형광 CCD 카메라를 이용하여 관찰하였음 (a, b). 난소암 조직에서의 형광세기를 정량화한 결과 전신주입 후 2시간에서 최대의 암축적성을 관찰하였고, 이후 약 48시간까지 난소암 조직에서의 RCT 나노입자를 관찰할 수 있었음. 48시간 이후 적출된 장기 및 암조직의 형광분석 결과 난소 암조직에서의 선택적인 축적성을 관찰하였음 (c).
- SKOV3-RFP 난소암세포를 이식한 마우스 모델에서의 시간에 따른 유전자 사일런싱을 형광 CCD 카메라를 이용하여 관찰함 (d). PBS 버퍼를 주입한 컨트롤 마우스 및 RNA

transcript를 주입한 마우스와 비교할 때, RCT 나노입자를 주입한 마우스에서만이 유전자 사일런싱이 월등히 많이 증가하였음을 확인함 (e).

- 48시간 후 암 조직을 적출하였을 때 실시간 형광 라이브 데이터와 일치하는 유전자 사일런싱 결과를 확인하였고 이후 실시된 qRT-PCR 분석도 동일하게 사일런싱 결과를 뒷받침함 (f).



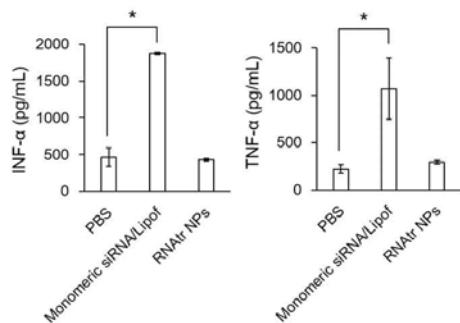
<그림. SKOV3난소암 마우스 모델에서의 우수한 암선택적 축적성 및 SKOV3-RFP 난소암 모델에서의 우수한 RFP 유전자 발현억제 능력>



<그림. in vivo RFP 유전자 사일런싱의 효과 비교. (PBS-처리된 마우스 군, RNA transcripts-처리된 마우스 군, RCT 나노입자-처리된 마우스 군(double I.V.), RCT 나노입자-처리된 마우스 군(single I.V.)>

(7) in vivo 마우스 모델에서의 immune response를 일으키지 않는 면역안정성 검증

- RCT 나노입자를 전신주입한 마우스에서 혈액을 샘플링한 후 인터페론-알파와 TNF-알파의 배출유도 여부를 검사한 결과 기존 siRNA 전달체인 리포펙타민의 높은 면역반응과는 다르게, 면역반응을 유도하지 않음을 확인함으로써 기존 전달체의 면역자극 문제를 해결하였음.

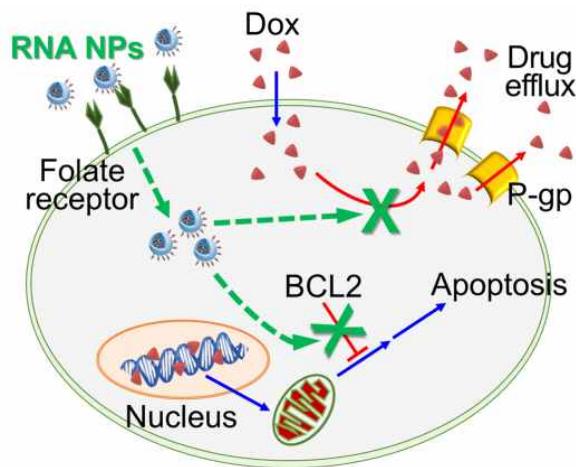


<그림. in vivo 마우스 모델에서의 RCT 나노입자의 immune response 분석>

나. RCT 나노입자를 이용한 분자영상 및 항암내성 조절 기술 개발

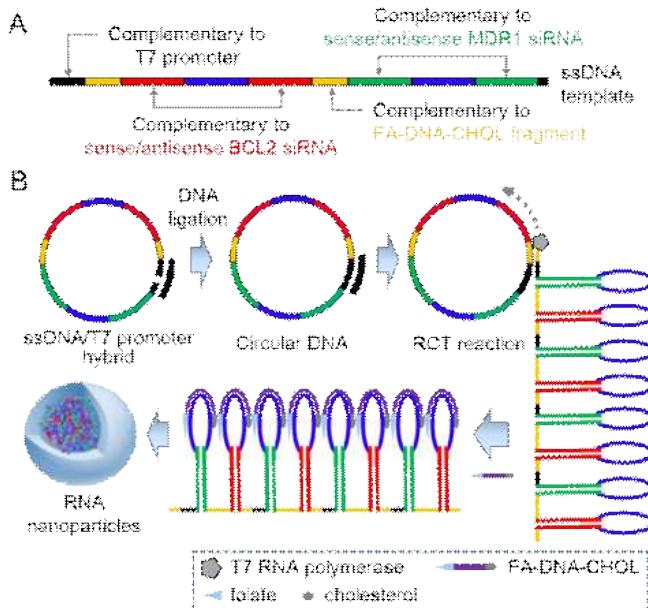
(1) 이중 유전자 억제가 가능한 RCT 나노입자 (two-in-one RCT 나노입자)를 이용한 항암내성 조절 기술 개발

- 항암화학제 내성 유전자 후보군으로 MDR-1 유전자를 선정하고, 이와 병렬적으로 doxorubicin의 항암효과를 극대화할 수 있는 BCL2 유전자를 동시에 사일런싱하는 다중 유전자 억제용 RNA 나노입자의 디자인 및 제조공정을 구축함으로써 다중 유전자 억제를 통해 시너지 효과가 가능한 항암화학제 내성 조절 기술을 개발함.
- 단일 유전자 억제로는 항암내성 암세포의 항암제 반응성 증가를 기대하기 어렵다는 현존 기술의 한계점을 개선하기 위하여 2가지 이상의 유전자를 동시에 탑재 및 억제할 수 있는 ‘two-in-one’ RNA 나노입자의 개발이 필요함. RCT 반응을 확장 및 응용함으로써 이러한 목적의 RCT 나노입자 제조기술이 가능하며 항암내성 암세포에서 기존의 항암제로는 치료가 불가능했던 한계점을 해결하였다는 의의를 지님.



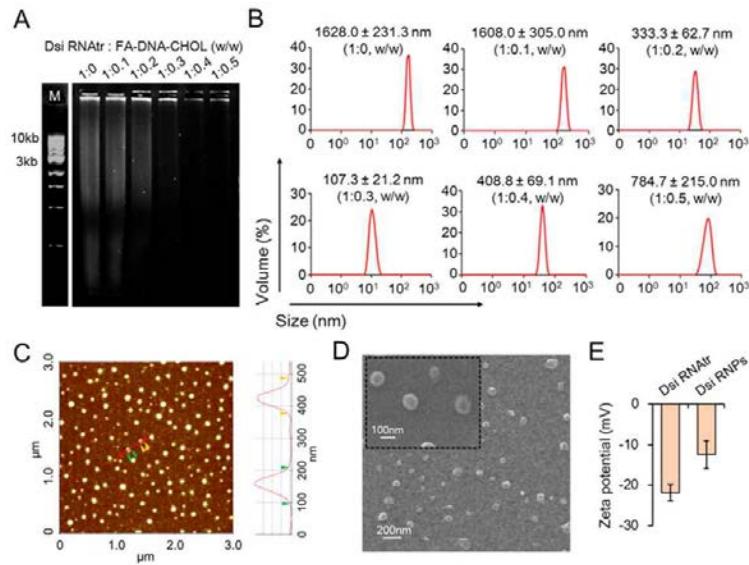
<그림. 이중 유전자 억제가 가능한 RCT 나노입자 (two-in-one RCT 나노입자)를 이용한 항암내성 조절 기술 모식도>

- 항암내성 유전자 MDR1 및 BCL2 동시 억제가 가능한 RNA 나노입자 제조를 위한 DNA template 디자인.
- 최적의 사일런싱 효과를 내는 MDR1, BCL2 siRNA 서열을 포함하는 단일 DNA template 설계 (RCT 반응을 위한 전제조건 확립)



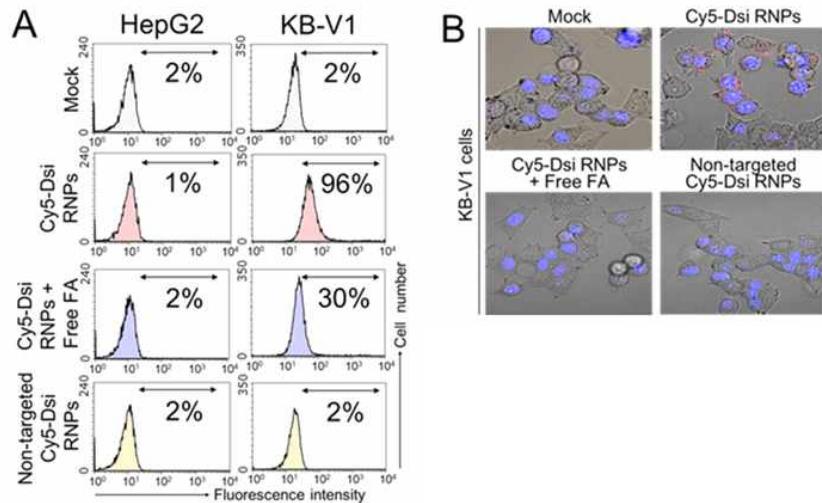
<그림. 이중 유전자 억제 siRNA 서열이 포함된 RCT 나노입자의 제조 모식도>

- RNA 압축 및 folate 표지가 동시에 가능한 단일 프로세스 개발을 통해 제조 공정을 효율화 함.
- 단일 RNA 나노입자에 두 종류의 siRNA 서열 탑재가 가능함으로써 다중 유전자 동시 억제 가 가능한 프로토콜 확립.
- 항암내성 유전자 억제 two-in-one RCT 나노입자의 물리화학적 특성 분석
- agarose gel electrophoresis를 이용하여 RNA transcripts와 folate-DNA-cholesterol의 결합 비율 결정(최적 조건 1:0.3 이상).
- Dynamic light scattering을 이용하여 다양한 folate-DNA-cholesterol 결합비율에서의 파티클 사이즈 측정 (최적의 결합조건 1:0.3에서 107 nm 파티클 형성).



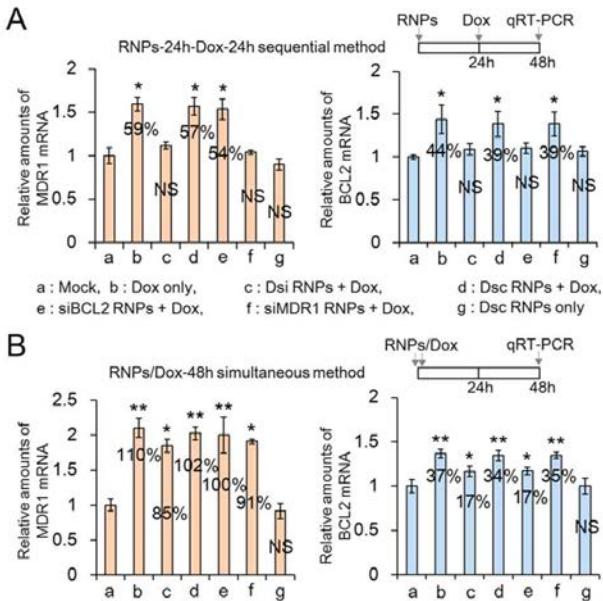
<그림. two-in-one RCT 나노입자의 물리화학적 특성 평가>

- two-in-one RCT 나노입자의 folate receptor 선택적인 암 표적 기능 검증
- folate receptor가 과발현된 KB-V1 암세포에서의 우수한 세포 결합 성질 확인.



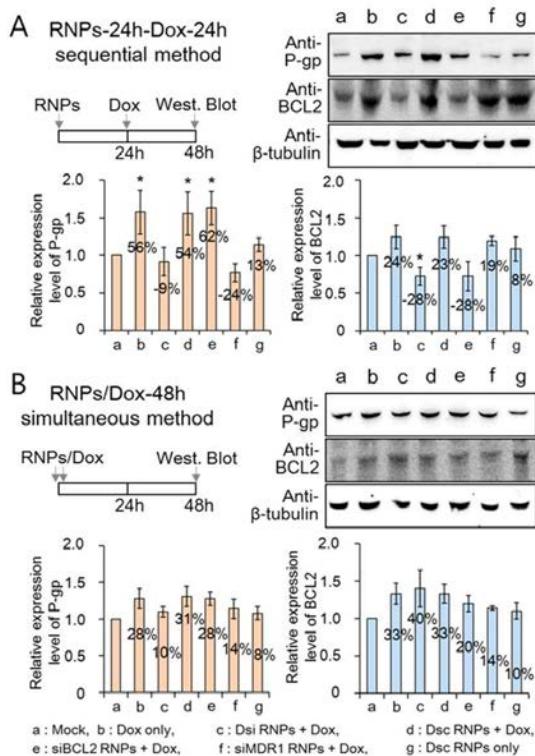
<그림. flow cytometry와 형광현미경을 이용한 two-in-one RCT 나노입자의 folate 수용체 의존적 암 선택적 결합성능 및 세포투과 능력>

- two-in-one RCT 나노입자의 항암내성 유전자 MDR1 및 BCL2의 동시 억제 효과 검증 (qRT-PCR을 이용한 정량)



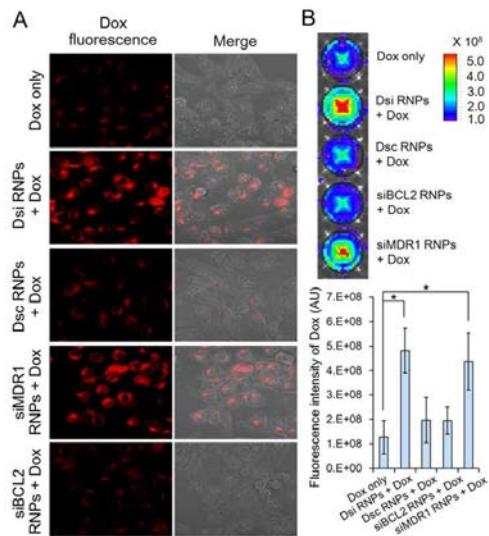
<그림. 순차적인 two-in-one RCT 나노입자와 Dox 처리를 받은 항암내성 암세포에서의 항암내성 관련 유전자 MDR1 및 BCL2의 mRNA 증가 억제를 보여주는 qRT-PCR 결과>

- two-in-one RCT 나노입자의 항암내성 유전자 MDR1 및 BCL2의 동시 억제 효과 검증 (Western-blot을 이용한 정량)



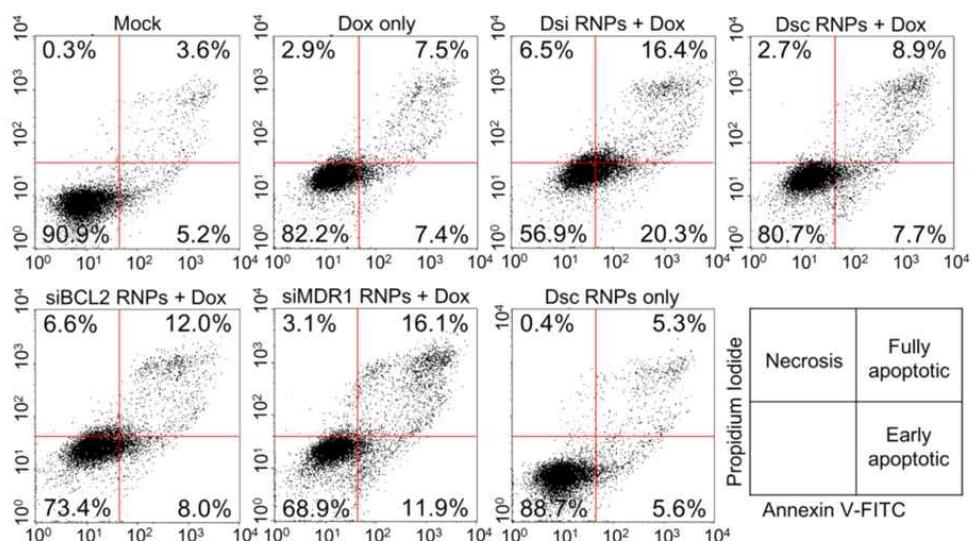
<그림. 순차적인 two-in-one RCT 나노입자와 Dox 처리를 받은 항암내성 암세포에서의 항암내성 관련 유전자 MDR1 및 BCL2의 단백질 증가 억제를 보여주는 Western blotting 결과>

- two-in-one RCT 나노입자의 항암내성 유전자 억제 효과로 항암제의 세포내 농도 증가 검증



<그림. 순차적인 two-in-one RCT 나노입자와 Dox 처리를 한 항암내성 암세포에서의 세포내 항암제 농도 감소 억제를 보여주는 현광현미경 결과 및 형광영상분석 시스템 결과>

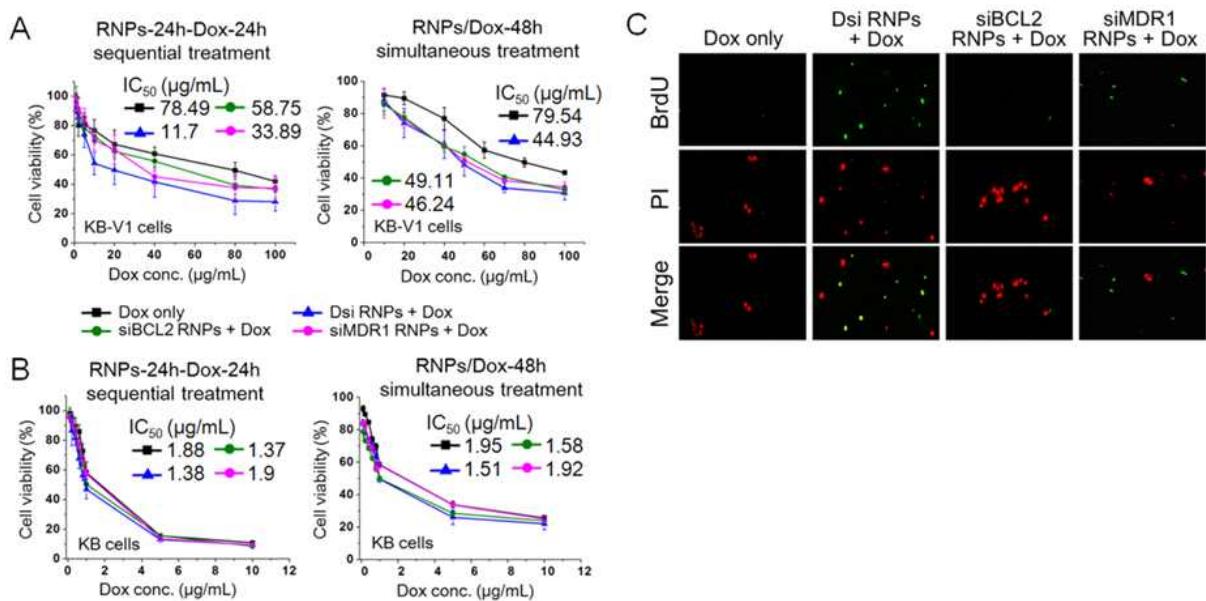
- two-in-one RCT 나노입자의 항암내성 유전자 억제 후 항암제의 효과적인 세포사멸 유도 검증



<그림. 순차적인 two-in-one RCT 나노입자와 Dox 처리를 한 항암내성 암세포에서의 세포사멸 및 세포괴사 유도의 증가. 대조군으로 항암제 단독처리.>

- two-in-one RCT 나노입자를 선처리한 항암내성 암세포에서의 doxorubicin의 IC50 값 측정

- 그림 A: 항암내성 KB-V1 암세포의 doxorubicin IC₅₀ 값은 약 79 μg/mL이지만 항암내성 유전자 억제 후에는 11.7 μg/mL으로 약 1/7 수준으로 감소하였음. 즉, 항암내성 암세포의 항암제 치료반응성이 약 7배 증가하였음을 확인하였음. 반면, RNA prodrug을 항암제와 동시에 처리한 경우에는 44.93 μg/mL으로 그 치료반응성의 증가가 미약하였음.
- 그림 B: 대조군으로 선택된 항암제 반응성이 우수한 KB 암세포의 경우, 항암내성 유전자의 억제가 항암제 치료반응성 증가에 별로 효과가 없었음.
- 그림 C: TUNEL assay를 이용하여 항암제 치료반응성 증가와 세포사멸의 연관성을 검증함.



<그림. 순차적인 two-in-one RCT 나노입자와 Dox 처리를 한 항암내성 암세포에서의 항암제 민감성 증가 검증>

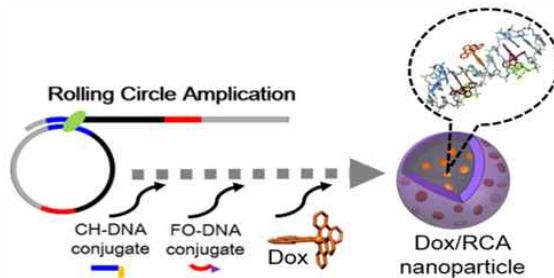
다. RCT 나노입자를 이용한 분자영상 및 암선택적 항암제 전달 기술 개발

(1) 항암화학약제 탑제가 가능한 RCA 나노입자를 이용한 암 억제 기술 개발

- Rolling Circle Amplification (RCA)를 이용하여 hairpin DNA가 무수히 반복적으로 나타나는 DNA 폴리머을 제조한 후 hairpin 사이사이의 링커 서열과 상보적인 서열을 지니는 콜레스테롤-DNA을 base-pairing을 이용하여 결합함으로써 세포투과가 가능한 DNA 나노파티클을 개발하였음.
- 이러한 DNA 나노입자는 hairpin loop 서열과 상보적 서열을 가지는 폴레이트-DNA를 결합함으로써 난소암에 선택적으로 세포투과가 되는 성질을 가지게 되었음. DNA에 intercalation되는 anthracycline 계열 항암제인 doxorubicin을 DNA 나노파티클에 봉입한 후

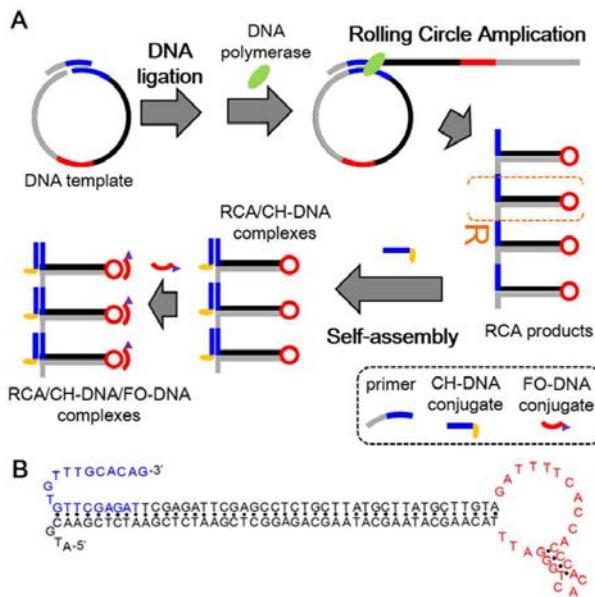
난소암 선택적으로 암세포를 억제할 수 있음을 검증하였고, 생체적합성이 우수한 DNA를 구성성분으로 함으로써 기존 약물전달체가 가지는 면역독성을 비롯한 각종 부작용 문제로부터 자유로울 수 있었음.

- 이러한 우수한 약물전달체 기술은 향후 고형암 선택적인 항암제 개발에 원천기술로 활용이 가능함. 본 기술은 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달 및 유전자 치료가 동시에 가능한 다기능성 RCT 나노입자 제조 플랫폼 기술을 개발하였다는 의의를 지님.



<그림. 항암화학약제 탑재가 가능한 RCA 나노입자를 이용한 암 억제 기술 모식도>

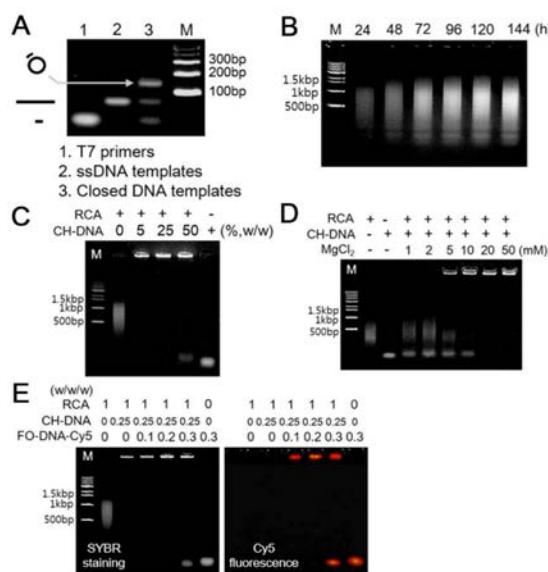
- DNA 기반의 RCA 나노입자 제조가 가능한 DNA template 디자인. 콜레스테롤-DNA 및 폴레이트-DNA와의 base-pairing이 가능한 loop 및 linker 서열의 디자인 및 hairpin DNA의 2차원 구조 시뮬레이션.



<그림. A. DNA 나노입자가 가능한 RCA 반응용 DNA template 및 DNA 나노입자 제조공정 모식도, B. hairpin DNA의 2차원 구조 시뮬레이션>

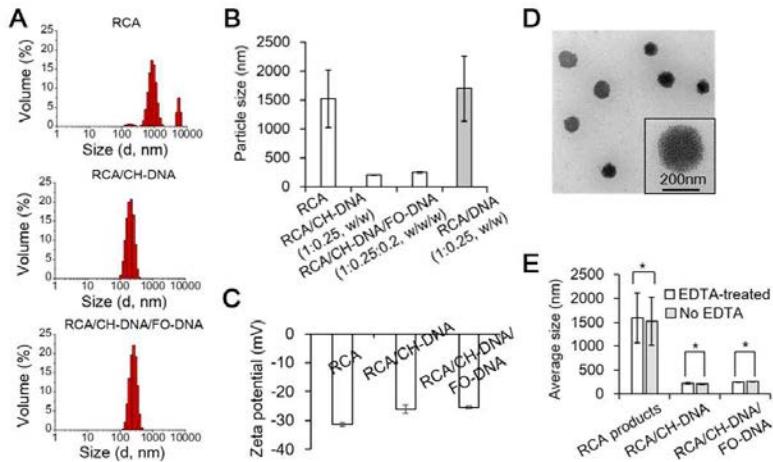
- RCA 나노입자 제조공정의 최적화 과정
- 그림 A: RCA 반응을 위한 circular DNA 합성

- 그림 B: Phi29 DNA polymerase에 의한 다중 DNA 헤어핀 합성. 반응시간에 비례하는 DNA 폴리머량.
- 그림 C: RCA 반응물과 콜레스테롤-DNA을 표시된 비율에 따라 base-pairing을 시행하였을 때 보여지는 RCA/콜레스테롤-DNA complex. 최소 weight ratio가 1:0.25일 때 대부분의 RCA 반응물이 콜레스테롤-DNA과 결합함을 확인함.
- 그림 D: RCA 반응물과 콜레스테롤-DNA이 complex를 형성할 수 있는 최적의 Mg²⁺농도를 찾기 위한 최적화 과정. 최소 20mM 이상의 Mg²⁺농도가 필요함을 확인함.
- 그림 E: RCA/콜레스테롤-DNA/풀레이트-DNA의 최적의 weight ratio를 찾기 위한 최적화 실험. 1:0.25:0.2 조건에서 최적의 complex 형성을 확인함.



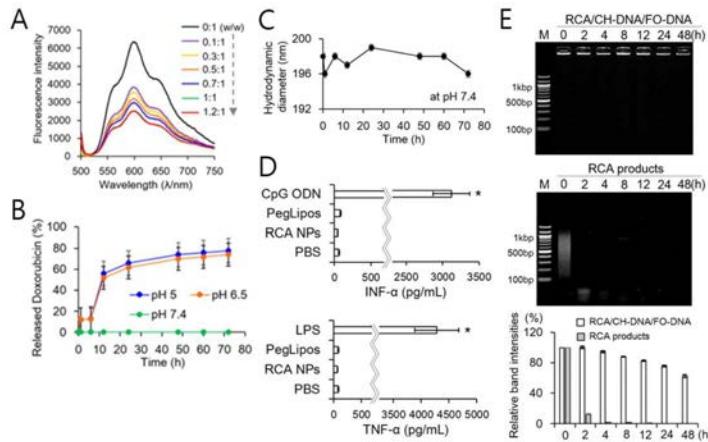
<그림. RCA 나노입자 제조 과정의 최적화 과정>

- RCA 나노입자의 물리화학적 특성 분석 결과
- 그림 A, B: RCA/CH-DNA complexes 및 RCA/CH-DNA/FO-DNA complexes의 DLS 측정을 통한 size distribution 결과
- 그림 C: RCA products, RCA/CH-DNA complexes 및 RCA/CH-DNA/FO-DNA complexes의 zeta potential 측정
- 그림 D: RCA/CH-DNA/FO-DNA complexes (RCA 나노입자)의 TEM (Transmission Electron Microscopy) 이미지
- 그림 E: EDTA 존재하에서의 RCA products, RCA/CH-DNA complexes 및 RCA/CH-DNA/FO-DNA complexes의 DLS 측정을 통한 파티클 사이즈 측정. RCA 나노입자 형성이 magnesium pyrophosphate aggregation의 결과가 아님을 확인함.



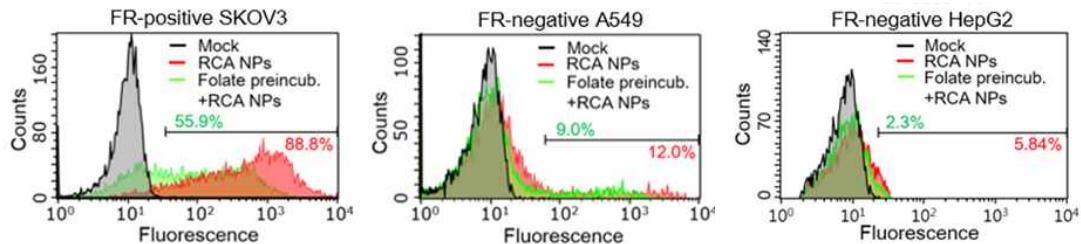
<그림. DNA 나노입자 제조 과정 중의 물리화학적 특성 분석>

- RCA 나노입자와 결합하는 Dox의 탑재량을 정량화
- 그림 A: Dox의 형광 시그널을 이용하여 다양한 RCA 나노입자:Dox weight ratio에서의 최대 결합비율을 조사함. 최적의 weight ratio는 1:1임을 확인함.
- 그림 B: Dox/RCA NPs complexes에서의 pH 영향을 조사함. pH에 따른 Dox의 해리는 형광 분광기를 이용하여 측정하였고 pH=7.4와 같은 중성조건에서는 해리되는 Dox이 없었으나 pH=6.5와 pH=5와 같은 산성 조건에서는 시간에 비례하여 Dox의 해리가 증가함을 확인함. 이것은 RCA 나노입자에 결합된 Dox는 endosome과 같은 약산성 조건에서 해리가 가능하다는 것을 보여주는 것으로 세포투과 후의 Dox의 RCA 나노입자로부터의 해리과정을 설명해 줄 수 있음.
- 그림 C: 오랜 시간에도 중성조건에서 보여지는 RCA 나노입자의 안정성
- 그림 D: 인간 PBMC 세포에서의 RCA 나노입자의 proinflammatory cytokine 유도 여부를 조사함. 대표적 cytokine인 INF- α 혹은 TNF- α 유도를 조사한 결과 RCA 나노입자가 innate 면역반응을 유발하지 않음을 확인함.
- 그림 E: 혈액내 안정성 확인을 위한 FBS 조건하에서의 RCA 나노입자 안정성 평가는 핵산 분해효소로부터의 우수한 안정성을 보여줌.



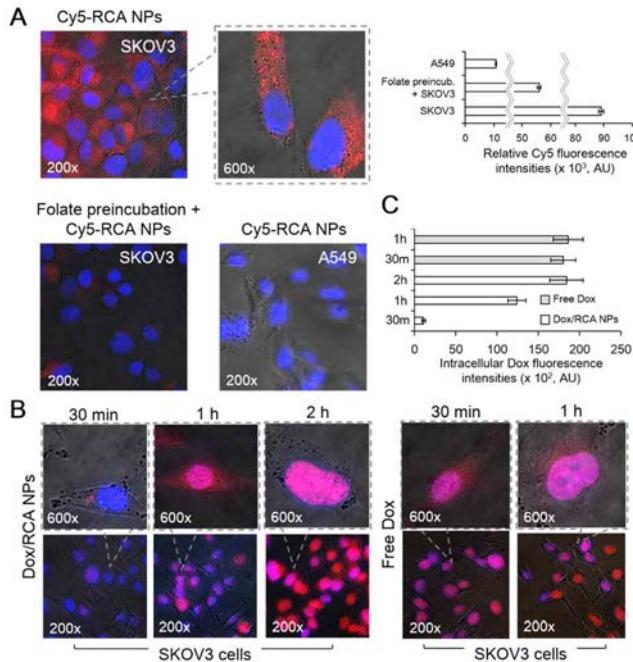
<그림. Dox/RCA NPs complexes의 물리화학적 및 면역학적 특성 분석>

- RCA 나노입자의 폴레이트 수용체-의존적인 고형암 선택적 결합성질
- 폴레이트 리간드를 이용한 competition 실험을 통해 RCA 나노입자의 암세포 결합이 폴레이트 수용체-폴레이트 상호작용 기전을 활용함을 확인함.



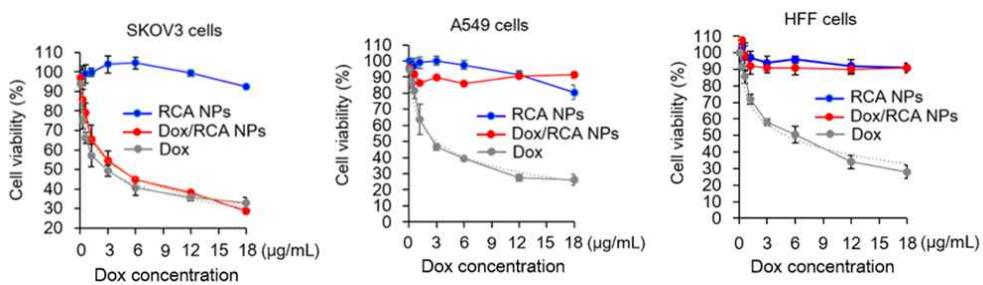
<그림. flow cytometry를 이용한 암 선택적 결합성질 비교. 폴레이트 수용체(+) vs 폴레이트 수용체(-) 암세포>

- RCA 나노입자의 폴레이트 수용체-의존적인 세포투과 성질 검증
- 그림 A: Cy5-labeled RCA 나노입자의 현광현미경 이미지. 핵에서는 관찰되지 않으면서 세포질에 균등하게 분포하고 있음을 통해 RCA 나노입자의 세포투과가 우수함을 확인함. 그러나 폴레이트 수용체가 없거나 낮은 암세포(A549)에서는 RCA 나노입자의 세포투과를 관찰할 수 없었음. 특히 폴레이트 수용체를 폴레이트로 포화시킨 후에는 RCA 나노입자의 세포투과가 급격히 감소함을 확인하였음.
- 그림 B, C: 시간에 따른 Dox/RCA 나노입자의 세포내 형광 이미지. 시간이 증가함에 따라 RCA 나노입자내의 Dox가 해리되어 핵으로 이동함을 확인할 수 있었음.



<그림. Dox/RCA 나노입자의 암 세포내 투과 이미지 및 시간에 따른 Dox의 핵 이동 형광 이미지>

- 폴레이트 수용체-의존적인 Dox/RCA 나노입자의 항암효과 평가
- MTT 에세이를 이용하여 폴레이트 수용체(+) 폴레이트 수용체(-) 암세포에서의 IC50 값을 측정함. 폴레이트 수용체(+) 암세포 (SKOV3)에서는 free Dox와 비슷한 IC50 값을 보였고 폴레이트 수용체(-) 암세포 (A549) 혹은 정상세포 (HFF)에서는 세포독성을 보이지 않음을 확인함. 이러한 결과는 정상세포에서의 세포독성을 최소화하면서 암세포에서만 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있음을 보여주고 있음.

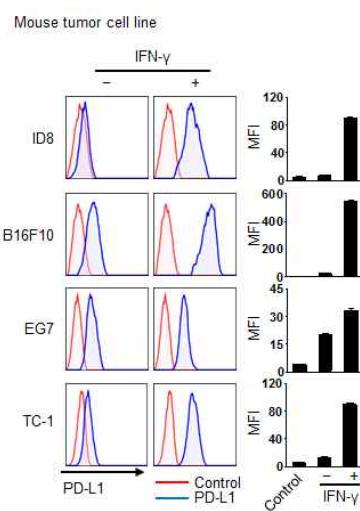


<그림. Dox/RCA 나노입자의 우수한 난소암 선택적 항암 효과>

라. 면역체크포인트 억제를 통한 항암면역치료 기술 개발

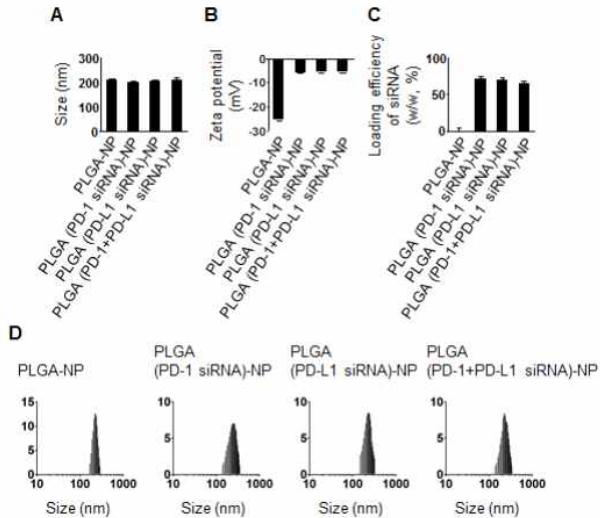
(1) 마우스 종양 세포주에서 PD-L1 발현 확인

- 마우스 종양 세포주에서 PD-L1의 발현을 확인하였음. PD-L1의 발현을 확인하기 위하여 마우스 종양 세포주를 사용하였으며, 종양미세환경에서 PD-L1이 IFN- γ 자극에 의하여 발현이 증가되는 환경을 제공하기 위하여 IFN- γ 자극의 유무에 대한 PD-L1의 발현율을 확인하였음. IFN- γ 에 종양세포가 노출되었을 때, 종양세포의 표면에서 PD-L1이 유의적으로 증가하였으며, 이로 인하여 PD-L1의 억제에 따른 항암효과를 확인하기 위한 종양 모델을 선별하였음.



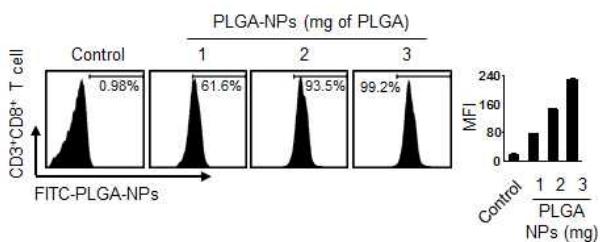
(2) PD-1과 PD-L1 유전자 억제를 위한 siRNA가 탑재된 나노입자 제작.

- Immune check-point에 관련하는 PD-1과 PD-L1의 유전자를 억제시키기 위하여 PD-1과 PD-L1이 동시에 탑재된 PLGA 나노입자를 제작하였음. PLGA 나노입자는 입자의 크기가 200 nm이고 입자표면은 -10 mV로 음전하를 띠고 있음. 또한 각각 PD-1, PD-L1 siRNA의 로딩효율은 70% 이상으로 나타났음. 나노입자의 사이즈 분포는 좁은 범위에서 나타났으므로, 입자의 크기가 비교적 균일한 것으로 판단됨. 따라서, PD-1과 PD-L1을 효과적으로 억제할 수 있는 제형을 개발하였으며, 이를 통하여 면역항암 백신으로 활용이 가능하리라 판단됨.



(3) T 세포 내부로 나노입자의 이입률 확인.

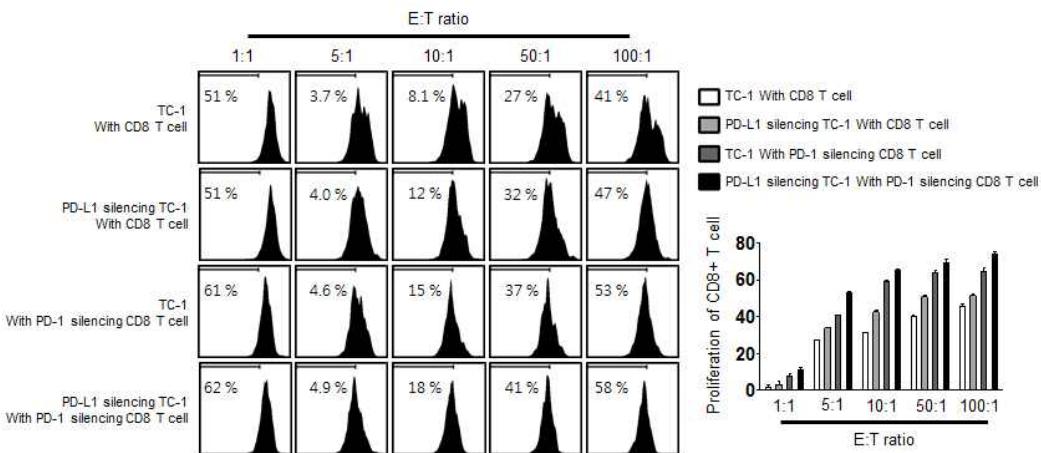
- T 세포의 표면에서 발현하는 PD-1의 억제를 위하여 PD-1 siRNA가 로딩되어 있는 PLGA 나노입자를 제작하였음. 나노입자에 의한 T 세포 내부 이입률을 확인하기 위하여, 마우스의 비장에서 T 세포를 분리하였음. T 세포 내부로 나노입자의 이입은 flow cytometry를 이용하여 확인하였으며, 나노입자는 FITC의 형광으로 표지하였음. 나노입자는 양에 의존적으로 비례하여 T 세포 내부로 이입이 되는 것을 확인하였다. 이를 통하여 나노입자를 이용하여 T 세포 내부로 siRNA를 전달이 가능하리라 판단됨.



(4) CD8 T 세포의 증식 확인.

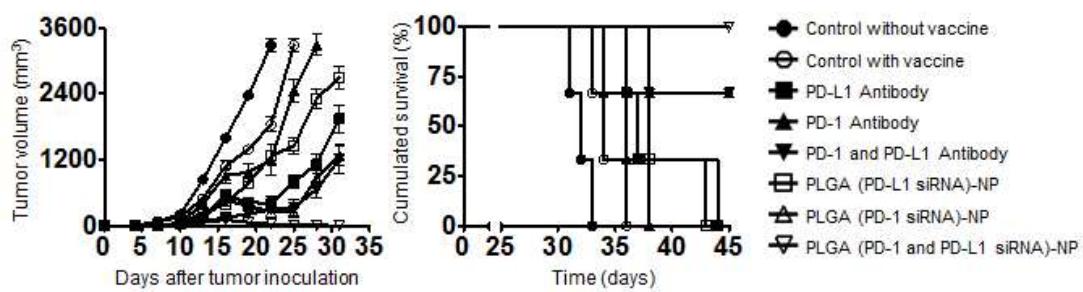
- PD-1 억제에 의한 CD8 T 세포의 세포증식 변화를 확인하였음. 나노입자에 의한 CD8 T 세포의 PD-1 유전자를 침묵시키기 위하여, 마우스 비장에서 CD8 T 세포를 분리하였음. 분리한 CD8 T 세포는 세포증식을 확인하기 위하여 Carboxyfluorescein succinimidyl ester(CFSE)로 표지하였음. 나노입자를 이용하여 CD8 T 세포와 마우스 종양세포에 각각 처리한 후 두 세포를 같이 배양하였음. CD8 T 세포와 마우스 종양세포를 각각의 비율로 같이 배양 후 24시간 뒤에 CD8 T 세포의 세포증식을 flow cytometry를 이용하여 확인하였으며, CFSE의 치수를 측정하였음. PD-1이 억제된 CD8 T 세포와 PD-L1이 억제된 마우스 종양세포를 같이 배양한 그룹에서 CD8 T 세포의 세포증식이 가장 많이 이루어진 것을 확인하였다. 나노입자를 이용하여 PD-1과 PD-L1을 효과적으로 억제함으로 두 수용체 간의

상호작용이 억제되어 그 효과로 CD8 T 세포의 세포 증식 효과가 증진됨을 확인하였음.



(5) 종양세포 성장 억제 효과 확인 (복강주사)

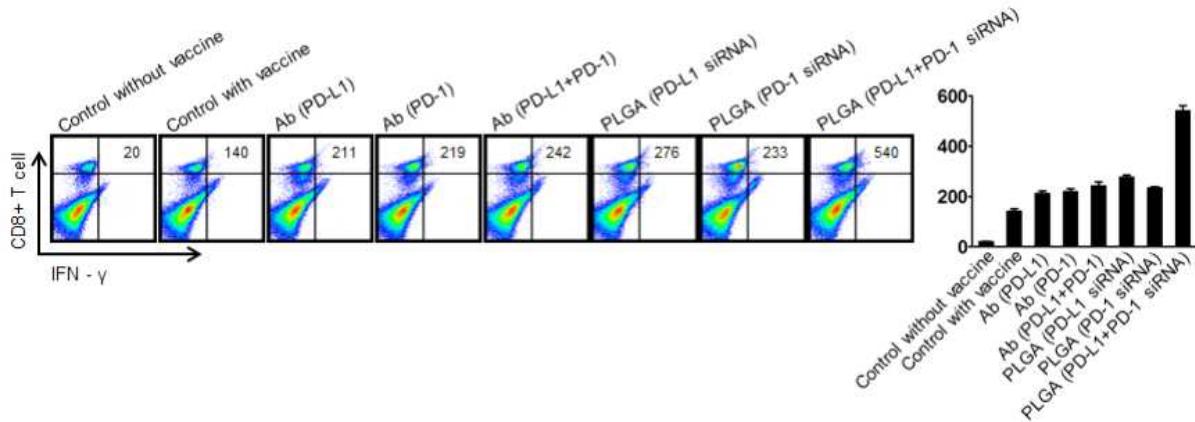
- PD-1 및 PD-L1의 억제로 인한 종양치료효능을 평가하였음. 종양치료효능을 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스에 EG7 종양세포를 퍼하주사 (S.Q) 하여 EG7 종양이 성장하는 동물모델을 제작하였음. EG7 종양세포 주사 1주일 후에 면역반응의 유도를 위하여 항원과 에쥬번트가 탑제된 나노입자를 이용하여 백신을 하였음. 동시에 PD-1과 PD-L1의 siRNA가 탑제된 나노입자를 복강주사 (I.P)를 하여 CD8 T 세포의 PD-1과 종양세포의 PD-L1을 억제하였다. 현재 효과적으로 활용되고 있는 항체제제와 본연구의 siRNA 제제의 효과를 비교하기 위하여 항체제제를 비교 그룹으로 첨부하였음. PD-1과 PD-L1 siRNA가 동시 탑제된 나노입자를 주사한 그룹에서 종양성장이 유의적으로 억제되었고 마우스의 생존율 또한 증가하였다.



(6) 항원 특이적인 CD8 T 세포의 확인.

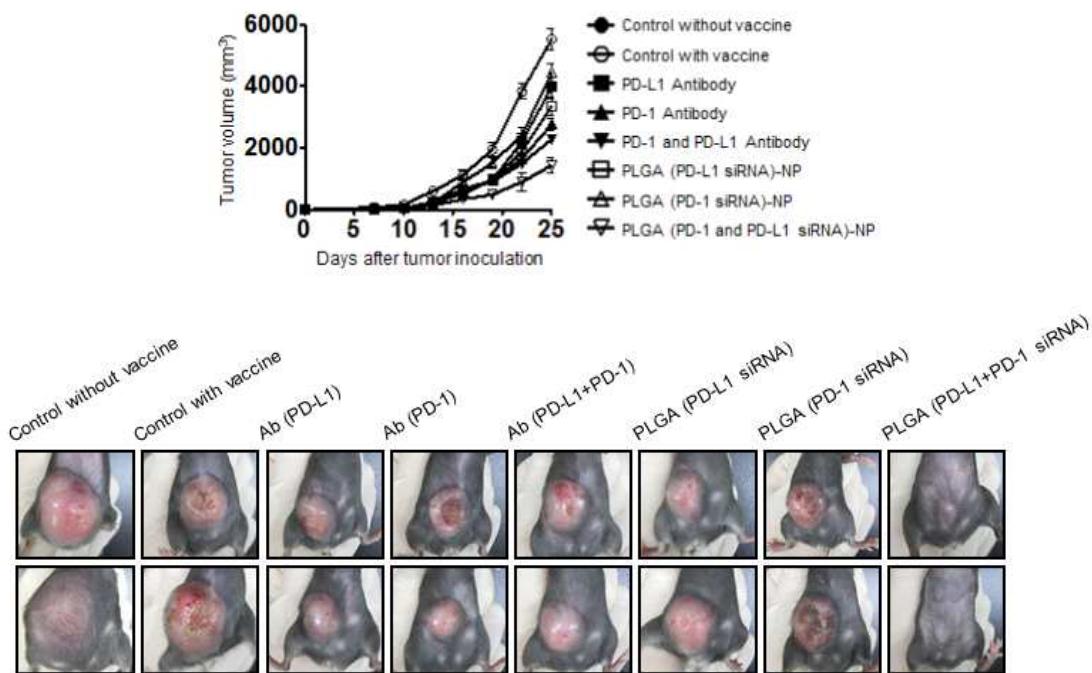
- PD-1 및 PD-L1의 억제로 인하여 체내에서 활성화된 CD8 T 세포를 확인하였음. 활성화된 CD8 T 세포를 확인하기 위하여, 마우스 비장에서 CD8 T 세포를 분리하였음, 분리한 CD8 T 세포는 활성화된 T 세포임을 확인하기 위하여 OVA 항원으로 쟈 자극 후 IFN-γ로 표지 하였음. 표지된 IFN-γ는 flow cytometry를 이용하여 확인하였음. 나노입자를 이용하여 PD-1과 PD-L1을 억제한 그룹에서 IFN-γ를 분비하는 활성화된 CD8 T 세포가 가장 많이

증가한 것을 확인하였음. 이를 통하여 나노입자에 의해 면역반응이 더 효과적으로 유도됨을 확인하였다.



(7) PD-1 및 PD-L1의 억제로 인한 종양치료효능 평가 (정맥주사 투여).

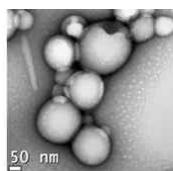
- PD-1 및 PD-L1의 억제로 인한 종양치료효능을 평가하였다. 종양치료효능을 평가하기 위하여 C57BL/6 마우스에 EG7 종양세포를 S.Q를 통하여 주사하였다. EG7 종양세포 주사 1주일 후에 면역반응의 유도를 위하여 항원과 에쥬번트가 탑재된 나노입자를 이용하여 백신주사를 처리하였다. 동시에 PD-1과 PD-L1의 siRNA가 탑재된 나노입자를 I.V 주사 경로를 이용하여 CD8 T 세포의 PD-1과 종양세포의 PD-L1을 억제하였다. PD-1과 PD-L1 siRNA가 동시에 탑재된 나노입자를 주사한 그룹에서 종양세포성장이 가장 효과적으로 억제되었음. 항체제제와 비교하여 siRNA로 PD-1과 PD-L1이 억제된 그룹에서 종양성장 억제 효과가 가장 큰 것을 확인하였다. 이를 통하여 I.V 주사 경로를 통하여도 PD-1과 PD-L1이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.



마. PLGA/KSP NPs 전달시스템을 이용한 cytotoxic 표적유전자 제어기술 개발

(1) KSP(kinesin spindle protein) 표적 PLGA NPs 전달 시스템 최적화 및 물리화학적 특성 분석

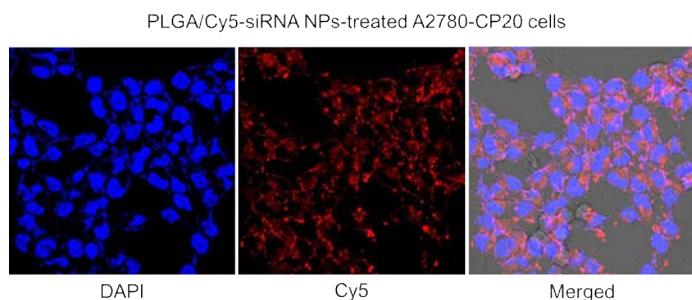
- KSP siRNA 봉입 후 물리화학적 특성 분석
- TEM (Transmission Electron Microscopete) 이미지 분석
- averaged diameter of KSP PLGA/siRNA NPs = 180 nm particle shape = spherical



<그림. KSP PLGA/siRNA NPs EM 이미지>

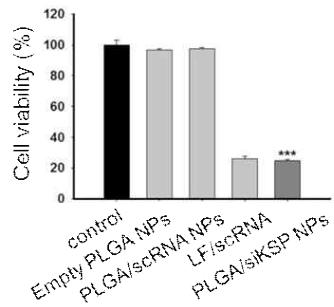
(2) in vitro 세포실험을 통한 생화학적 특성 분석

- 항암내성 난소암세포주 A2780-CP20에서의 세포투과성
- PLGA/Cy5-siRNA NPs을 이용하여 A2780-CP20 cell에서의 세포투과 테스트
- confocal microscopic images 4 h post-transfection; 우수한 세포투과성 확인



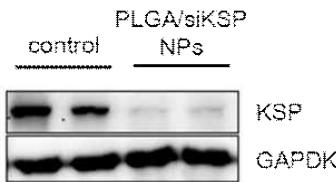
<그림. DAPI staining for nucleus, Cy5 fluorescence for PLGA/siRNA NPs, and merged images>

- 난소암 세포주 A2780-CP20의 KSP PLAGE/siRNA NPs의 cytotoxicity test PLGA/siKSP NPs의 target-specific cell death 검증



<그림. target-specific silencing of PLGA/siKSP NPs led to cell death>

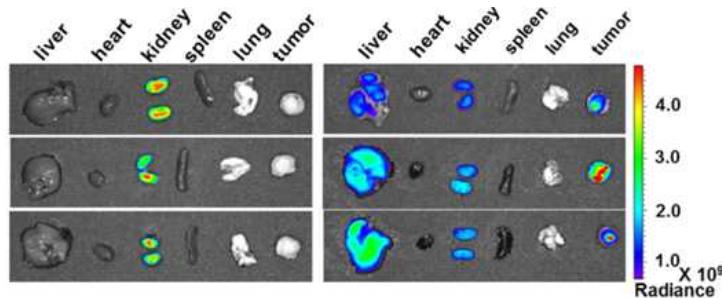
- Western blot 분석을 이용한 단백질 발현감소 검증 PLGA/siKSP NPs에 의한 효과적인 타겟 유전자 사일런싱이 KSP 단백질의 감소로 이어짐을 검증



<그림. Western blot of PLGA/siKSP-treated A2780-CP20 cells for measuring the residual levels of KSP protein>

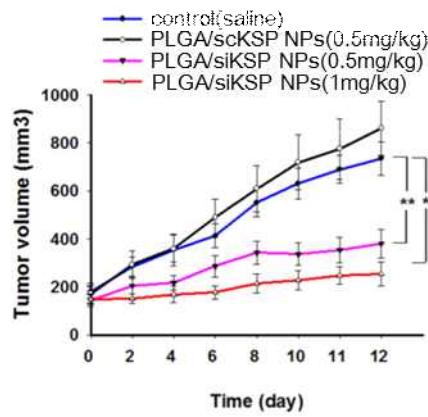
(3) in vivo mouse 모델에서의 우수한 PLGA/siKSP NPs 항암효과 검증

- in vivo mouse 모델에서 PLGA/siKSP NPs의 난소암 A2780-CP20 표적 기능 검증 PLGA/Cy5-siKSP NPs를 이용하여 tail vein을 통한 I.V. 주입으로부터 하루 경과한 후 장기 적출한 Ex vivo 형광 이미지 분석을 통해 우수한 난소암 표적 효과 확인



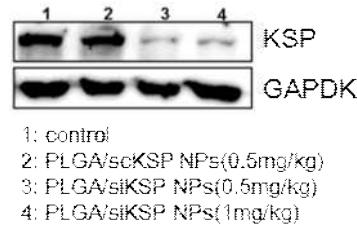
<그림. Ex vivo fluorescence images for tumor-specific targeting of PLGA/Cy-5-siKSP NPs (n=3)>

- in vivo mouse 모델(A2780-CP20 cell line)에서의 항암효과 검증 PLGA/siKSP NPs를 I.V. 주사한 마우스에서 우수한 antitumor activity 확인 (n=5 mice/group)



<그림. antitumor activity of PLGA/siKSP NPs in A2780-CP20-bearing nude mice>

- PLGA/siKSP NPs를 주사한 마우스 tumor 조직을 적출한 후 tumor 조직에서의 KSP 단백질 감소 검증 Western blot을 이용하여 KSP 단백질 감소가 antitumor activity를 일으켰음을 확인

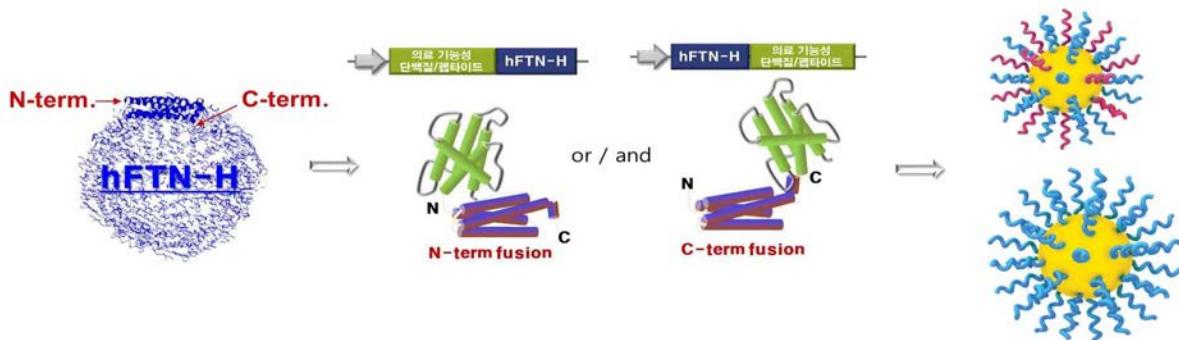


<그림. Western blotting of KSP protein expression in the tumor tissues>

4. 단백질 기반 융합나노소재를 이용한 종양 이질성 제어용 나노-면역 치료 플랫폼 개발

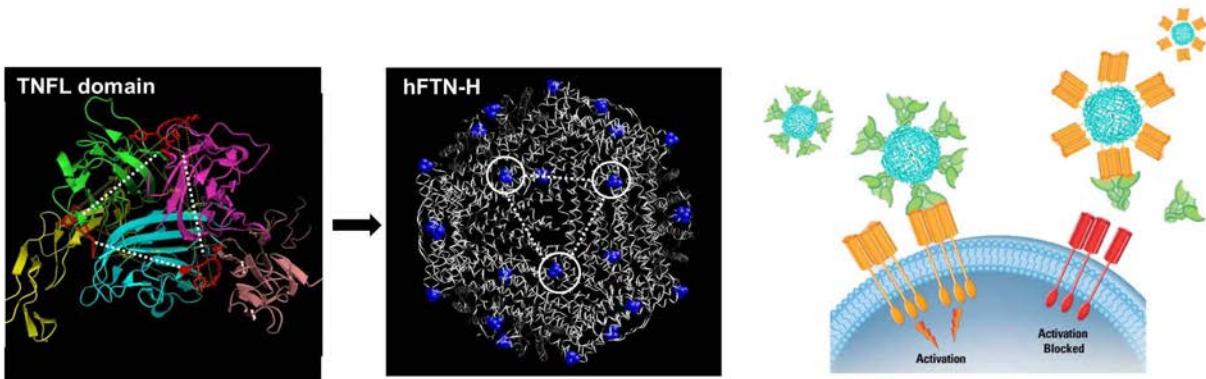
가. 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼 설계 및 제조

- 암세포의 자가세포 사멸을 일으키는 단백질 중 trimeric 구조를 가진 단백질을 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지에 탑재시켜, 단백질의 다중체 구조를 유지할 수 있도록 설계 하였음.
- 본 연구에서 이용하고자 하는 나노 소재는 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지 (nanocage)임. Ferritin heavy chain은 자가조립을 통해 24 subunit으로 구성된 multimer를 이루어 12nm 구형 파티클을 형성함.
- 단백질 소재 기반의 나노케이지는 세포내 독성이 낮고, biocompatible하며, 특히 surface engineering을 통해 다양한 기능을 탑재할 수 있다는 장점을 가지고 있어, 나노전달제로서 각광받고 있음.



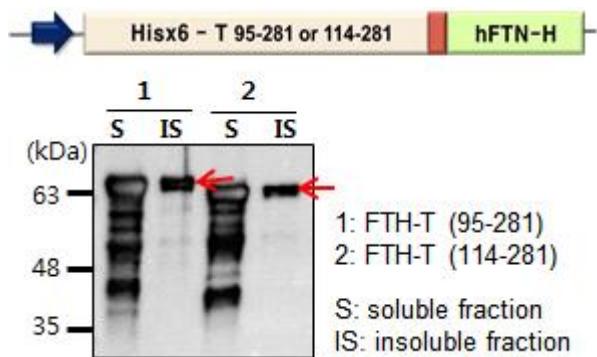
<그림. 나노케이지 surface engineering>

- 본 연구에서는 나노케이지를 기반으로한 다양한 기능의 항암 나노치료기술을 개발하고, 이 나노케이지의 세포내 항상성 유지를 위한 독자적 엔지니어링 기술을 개발하였음.
- 많은 단백질은 다중체 (multimer)를 이루어 그 기능을 수행함. 특히 TNF (종양괴사인자) superfamily (27개 ligand) 는 target 세포 수용체의 TNF homology domain (THD)와 결합하여 homotrimer (삼중체)를 이룸. 잘 알려진 TNF ligand로는 TNF- α / FasL / TRAIL / CD40L / 41BBL / OX40L 등이 있으며, 이들은 각각 TNFR / Fas / TRAILR / CD40 / 41BB / OX40 수용체에 결합하여 세포내 특이적 신호전달 과정을 조절함.
- TNF는 pro-inflammatory, antiparasitic, immunomodulator, cachectin, fibroblast growth factor, antiviral activity 등 매우 다양한 생리활성을 나타는데, 특히 이 구조 간 결합은 종양 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하기에, 최근, TNF 계열의 ligand/receptor를 타겟팅하는 항암 면역 치료기술이 주목받고 있음.
- 본 연구에서는, 특히 TNF superfamily 의 삼중체 구조를 구현하고 이 구조가 mimic된 나노 플랫폼을 개발하고자 하였음.



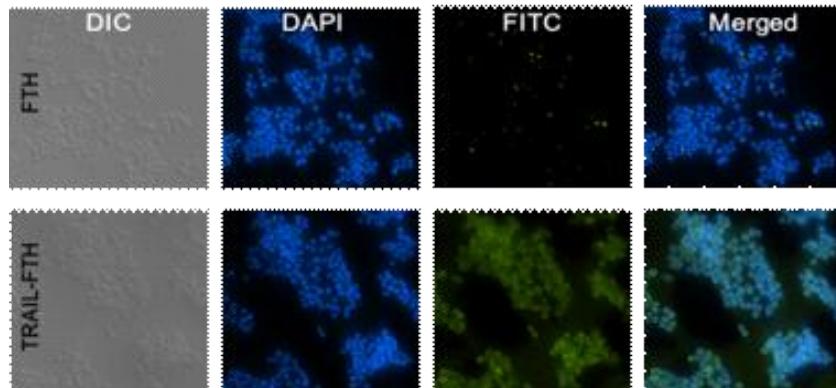
<그림. 나노케이지 표면에 TNF 삼중체 (trimer) 구조 구현 및 암 표적치료 모식도>

- 위와 같이 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼을 설계 및 제조하였음. 특히, 암세포의 자가세포 사멸을 일으키는 단백질 중 trimeric 구조를 가진 단백질을 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지에 탑재시켜, 단백질의 다중체 구조를 유지할 수 있도록 설계함.



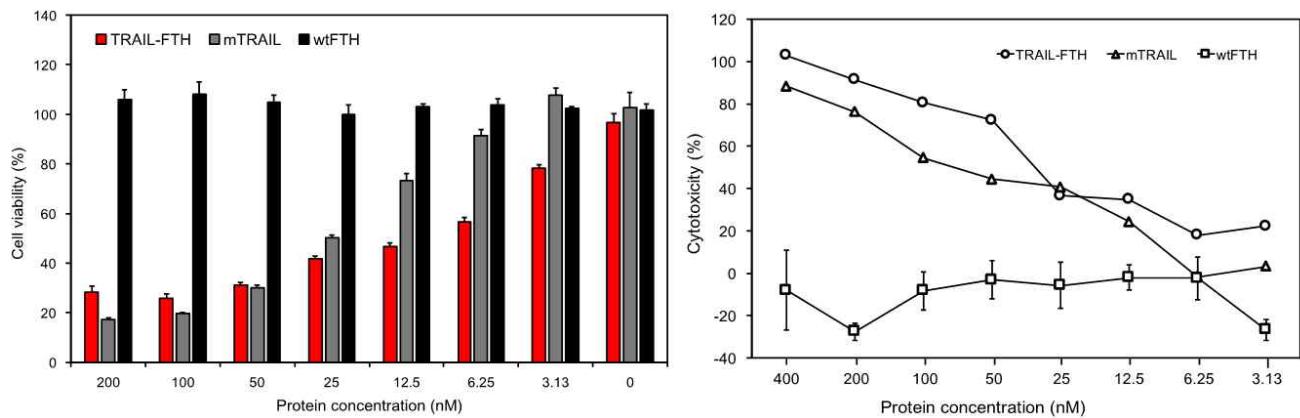
<그림. 단백질의 삼중체 구조가 탑재된 나노케이지 설계 및 대장균 내 발현 확인>

- 위 그림과 같이 단백질 삼중체 구조가 탑재된 나노케이지가 대장균 내에서 발현됨을 Western blot을 통해서 확인하였음.



<그림. 암세포 전달효율을 측정한 형광 이미징 결과>

- Trimer 구조가 탑재된 나노케이지가 암세포 표면에 효과적으로 바인딩 하는 것을 형광 이미징을 통해 확인함.

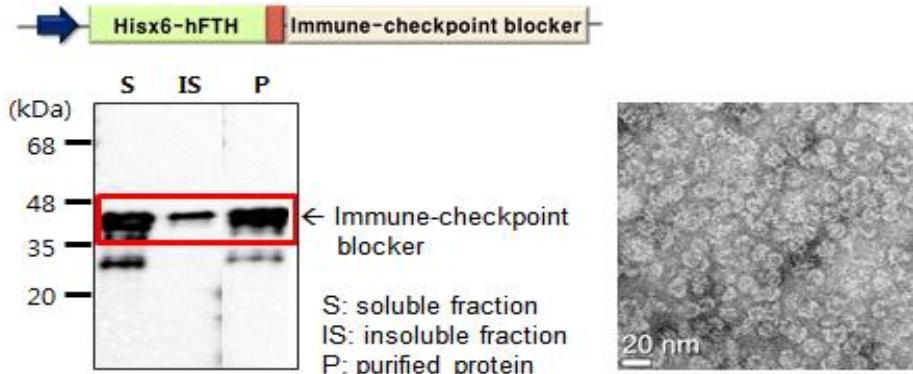


<그림. 암세포 사멸 효능 측정: CCK assay, LDH analysis>

- CCK assay를 통해서 단백질 농도별 암세포 사멸 효능을 측정한 결과 나노케이지에 결합된 TRAIL이 단일 단백질에 비해 암세포 사멸 효능이 뛰어남을 확인하였음.

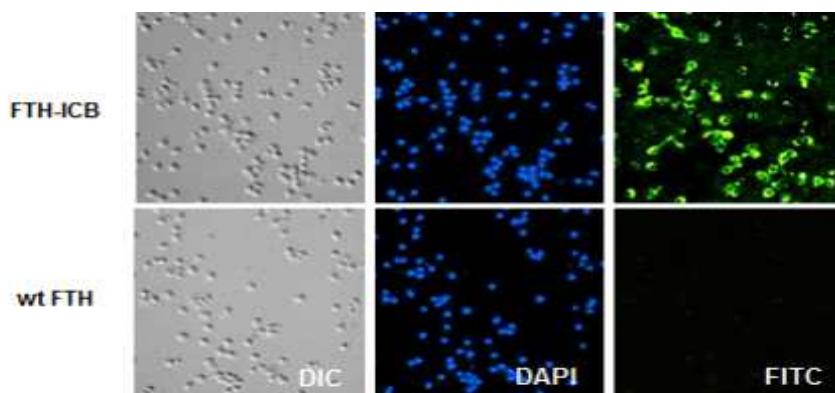
나. 암세포의 면역회피 차단용 나노-면역 치료 플랫폼 개발

- 면역검문작용(immune checkpoint)이란 본래 self-tolerance와 부수적인 조식손상을 최소화하기 위한 필수적인 면역 체계의 다양한 억제적 신호 전달 체계임. 하지만 암세포의 경우, 면역세포의 검문을 피하기 위해 "Don't kill me signal" 단백질 (programmed cell death protein ligand, PDL1 또는 PDL2) 등과 같은 면역검문작용을 피하는 단백질들을 과발현 시킨다고 알려짐. 따라서 최근 PDL1/PD1, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4(CTLA4) 등과 같은 면역검문 단백질들을 차단하여 항암 면역 치료에 이용하고자 하는 연구들이 시도되고 있음.
- 본 연구에서는, 암세포의 면역검문작용을 효과적으로 차단할 수 있는 단백질이 나노케이지 표면에 고직접도로 표출된 나노구조 cage를 개발하여 이를 암세포에 효과적으로 전달함으로써, 체내 면역시스템을 제어할 수 있는 나노-면역치료 원천기술을 개발하고자 하였음.



<그림. ICB가 표출된 나노케이지 설계 및 발현 확인>

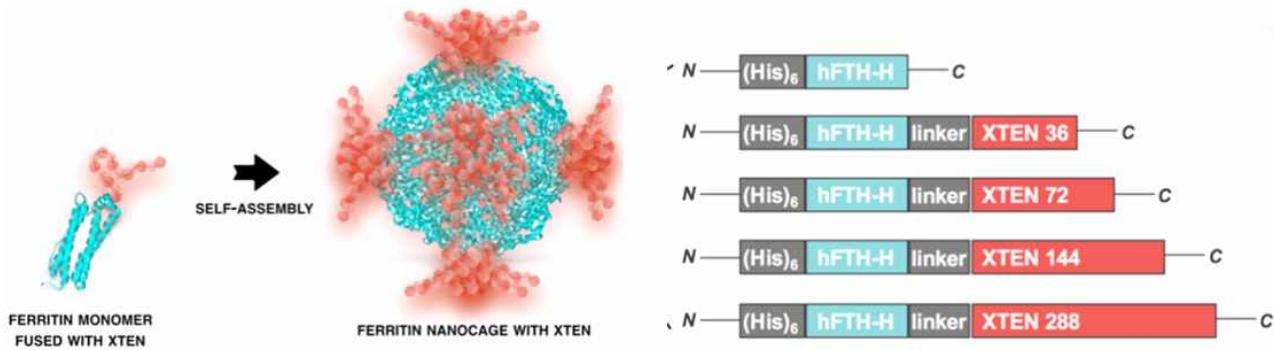
- 뿐만 아니라, 위와 같이 설계한 나노케이지 플랫폼의 암세포 결합능력을 분석하였음. ICB가 표출되도록 설계한 나노케이지가 일반 나노케이지에 비해, 암세포주 표면에 binding 효능이 높음을 형광현미경으로 확인함.



<그림. 개발된 나노플랫폼이 암세포에 binding하여 의
면역회피기작을 blocking함을 형광현미경으로 분석>

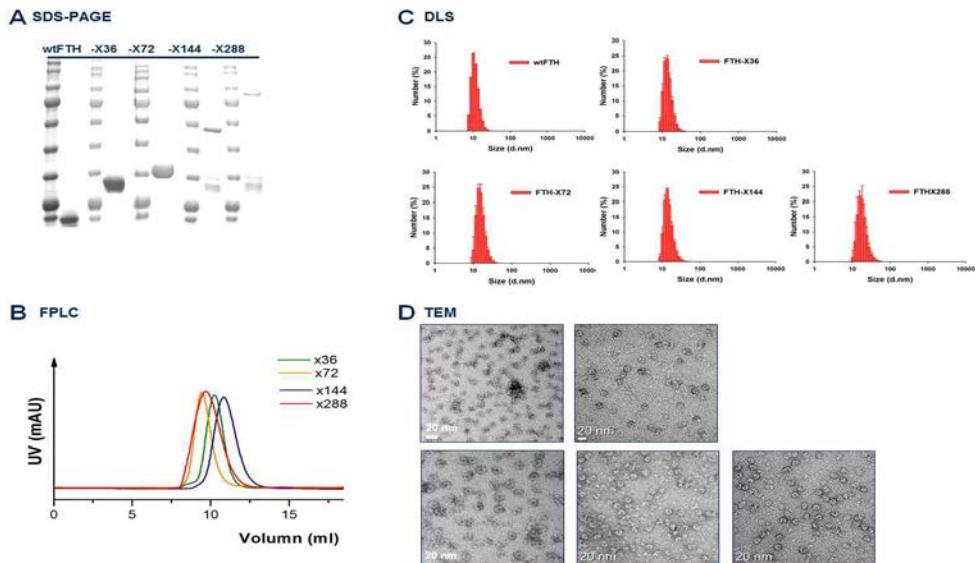
다. 단백질 기반 나노소재의 세포내 안정성 증가를 위한 IDP 후보 서열 스크리닝 및 설계

- IDP는 자연적으로 구조가 없는 protein (natively unfolded protein)으로 생체 내 다른 고분자들의 3차원적 구조를 지탱/고정해주는 중요한 역할을 담당함.
- IDP의 특성을 protein drug에 활용한 XTEN (artificial IDP)이 기개발되어 있음. XTEN을 단백질 치료제에 융합시킬 경우, 기존 약물보다 긴 half-life가 유지됨이 관찰되어 IDP의 약물 이용 가능성에 대한 기대가 높아짐.



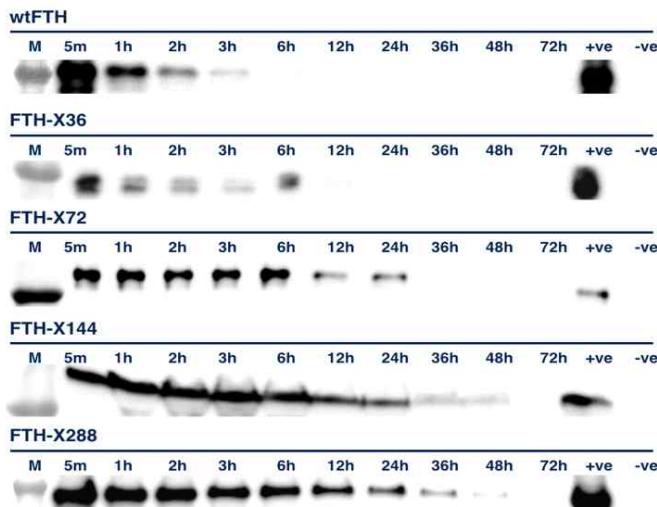
<그림. IDP 서열이 탑재된 나노케이지 구조 모형 및 다양한 길이의 XTN을 가진 나노케이지 설계도>

- 본 연구에서는 natural protein, artificial protein으로부터 IDP 서열을 스크리닝하고, 선정된 최적의 IDP 서열을 나노케이지에 탑재하였으며, 작된 나노플랫폼의 구조를 FPLC, DLS, TEM 등의 다양한 방법들을 통해서 확인하였음.



<그림. IDP 서열이 탑재된 나노케이지의 특성분석 결과 (FPLC, DLS, TEM)>

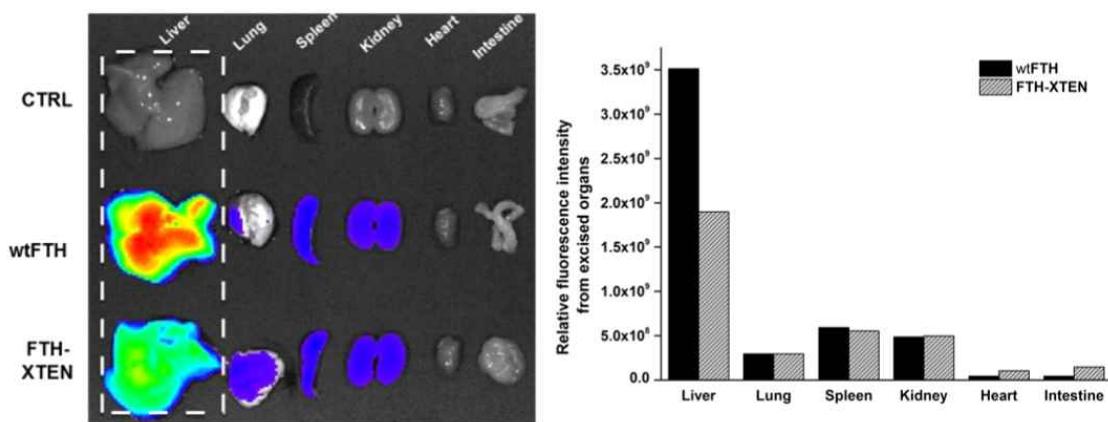
- 제작된 나노플랫폼이 표면에 표출된 IDP 서열에 의해서 세포내 안정성이 더 증가 하는지 ex vivo biodistribution (BD) 과 pharmacokinetics (PK)를 이용하여 분석함.



Parameter	Administration 50 mg.kg ⁻¹ (i.v.)				
	wtFTH	FTH-X36	FTH-X72	FTH-X144	FTH-X288
t _{1/2} (hr)	1.0	3.2	5.4	11.8	10.1
MRT (hr)	0.8	5.2	6.3	10.8	10.7
V _d (ml.kg ⁻¹)	370.2	334.4	82.5	114.4	107.4
Cl (ml.hr ⁻¹ .kg ⁻¹)	254.8	72.8	10.6	6.73	7.38

<그림. Pharmacokinetics (PK) 분석>

- Pharmacokinetics (PK) 분석을 통해서 나노케이지의 반감기를 측정한 결과 기존 나노케이지에 비해서 IDP 서열을 표출시킨 나노케이지의 반감기가 최대 10이상 증가되는 것을 확인하였음. 또한 ex vivo Biodistribution 분석을 통해서 기존 나노케이지에 비해 IDP-탑재 나노케이지가 상대적으로 간에 덜 축적됨을 확인하였음.



<그림. Ex vivo Biodistribution 분석>

- 본 연구를 통해 개발된 IDP 탑재 나노케이지는 세포내 안정성이 현저하게 향상되었으므로, 약물 전달체로서의 활용 가능성이 매우 높다고 사료됨.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

년도	세부연구목표	달성도 (%)	관련 분야 기여 사항
1. 대장암 이질성의 이해 및 분자진단 콘텐츠 개발			
1-1. 전이성 대장암 단백체 분석을 통한 암 진단 및 치료용 표적 단백질 발굴			
1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMPs 저해 세포주 개발 (RNAi) ▪ 저해 세포주 전이능 확인 ▪ 죄적화된 세포막 표면 단백체 분리법 확립 ▪ 세포 내 신호 전달 체계 분석 법 확립 	20	<ul style="list-style-type: none"> ▪ RNAi 방법을 이용한 MMPs 저해 세포주 6종 제작 및 레이블링 효율 확인 ▪ 전이성 대장암 표적 단백질 발굴을 위한 세포 표면막 단백체 분석법 확립 ▪ 세포 내 인산화 웹타이드를 분리 정제 및 질량분석기로 분석법을 확립하여 2,000개 이상의 인산화 웹타이드를 동정함.
2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ labeling/label-free 방법과 exosome 분리를 통해 선별된 의한 ECM 조절인자선별 ▪ 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용한 차등 발현되는 세포막 단백질 후보군 발굴 	50	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SILAC을 통한 차등발현 단백질 후보 62개 선별 및 EV 분리방법 확립 ▪ 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용한 차등 발현되는 세포막 단백질 후보군 발굴
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포내. 외부에서 MMP에 의한 암 이질성과 전이능 조절 인자 연구 ▪ 대장암 전이능과 관련된 세포막 표면 단백질에 대한 발굴 및 검증 ▪ 암 전이관련 표적단백질 후보군에 대한 암 조직에서의 검증 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ MMP 저해세포주로부터 분리한 EV 단백체에서 질량분석법을 이용하여 차등발현 단백질 후보군 선별 및 검증 및 localization 확인 ▪ 전이성 대장암 세포주와 MMP 저해 세포주에서 질량분석법을 이용하여 발굴된 차등발현 후보군들에 대한 웨스턴 블랏을 통한 검증 및 대장암 조직에서의 발현 검증
	계	100	
1-2. HIF와 상호작용하는 단백체의 생화학적, 구조적, 세포 생물학적 기능연구 및 신호전달 체계 연구를 통한 HIF 활성의 능동적 조절 인자 발굴			
1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포와 대장균에서 발현가능한 HIF 및 상호작용 단백체들 (PHD2, PHD3, PKM2)의 발현 플라스미드 제작 ▪ 수산화된 PKM2 확보를 위한 플라스미드 제작 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포와 대장균에서 발현가능한 HIF 및 상호작용 단백체들 (PHD2, PHD3, PKM2)의 발현 플라스미드 제작 ▪ 수산화된 PKM2 확보를 위한 플라스미드 제작

	<p>플라스미드 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 형광 단백질 발현 및 확보를 위한 플라스미드 제작 ▪ PKM2, PHD3, HIF3α 단백체의 대장균내 과발현 실험과 분리 기법 확립 I ▪ 대장암 세포주 내 HIF-3α의 산소에 따른 발현 정도 및 HIF-1α, HIF-2α와의 연관성 ▪ siRNA kinase/ phosphatase assay screening test 결과를 기반으로 HIF-1α regulator candidate 선택 및 확인 실험 		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 형광 단백질 발현 및 확보를 위한 플라스미드 제작 ▪ PKM2, PHD3, HIF3α 단백체의 대장균내 과발현 실험과 분리 기법 확립 I ▪ 대장암 세포주 내 HIF-3α의 산소에 따른 발현 정도 및 HIF-1α, HIF-2α와의 연관성 ▪ siRNA kinase/ phosphatase assay screening test 결과를 기반으로 HIF-1α regulator candidate 선택 및 확인 실험
2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PKM2, PHD3, HIF-3α 단백체의 대량생산 및 분리기법 확립 II 과 생화학적 성질 규명 ▪ PKM2의 oligomerization 상태 모니터링 이미징 도구 확보 ▪ 소분자 및 단백질 활성제 또는 저해제를 이용한 PKM2 및 수산화된 PKM2의 활성 및 oligomerization 동역학 연구 ▪ HIF-2α와 HIF-1β의 결합을 촉진, 저해하는 단백질 효과 확인 	40	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 순도 >95% 이상 PKM2, PHD3, HIF-3α 10 mg 이상 확보 ▪ 형광 PKM2 및 oligomerization에 영향을 주는 것으로 알려진 PKM2 돌연변이 5종 이상 확보 ▪ 정제된 PKM2와 정제된 PHD2, PHD3를 이용하여 in vitro 수산화 반응 확인 ▪ 생체 내 PKM2 oligomerization 상태 모니터링을 위한 shRNA 내성을 갖는 PKM2 전달 및 endogenous PKM2 depletion 확립 ▪ 화합물을 이용한 PKM2 oligomerization dynamics 변화 단분자 레벨에서 관측 ▪ HIF-2α와 HIF-1β FRET 실험을 이용한 결합 측정, 및 이의 변화 관측
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PKM2, PHD 단백질 구조 연구 ▪ 대장암 세포에서의 PKM2 모니터링 형광 시스템 개발 ▪ 대장암 세포의 environmental stress에 따른 PKM2 기능 연구 ▪ 대장암 세포에서의 PKM2와 HIF, 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PKM2/T3 (oligomer를 monomer로 변화시키는 것으로 알려짐), PKM2/Shikonin (PKM2 활성을 저해하는 것으로 알려짐) complex 구조를 풀기위한 각각 결정화 조건 2000 조건 이상 탐색 및 초기 결정화 조건을 최

	PHD 단백체의 상호작용 연구		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 적화하여 x-ray회절 데이터를 얻음 ▪ 정제된 PHD1, PHD3을 확보하고 결정화 조건 각 2000 조건 탐색 초기 결정화 조건 획득 ▪ 대장암세포 HT29, HCT116의 저산소 환경에 따른 PKM2 발현 및 분비량 조절 확인 ▪ 대장암 세포를 이용하여 형광 단백질이 표지된 PKM2를 이용, PKM2 분비 검출 여부함 ▪ 대장암 세포 및 정상 대장 세포에서 PKM2에의한 HIF의 발현 조절 관찰 여부 ▪ PKM2 단분자 실험 조건 확립 ▪ 대장암 세포에서의 PKM2와 HIF, PHD 단백체의 상호작용에 의한 PKM2의 핵으로의 이동 관측
	계	100	
1-3. 종양 이질성의 면역표현형 검색을 통한 항암제 내성암 진단법 개발			
1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대장암 유래 이종 세포주 확보 검색 대상 노출 단백질 설정 ▪ 다양한 세포주별 세포 표면 노출 단백질에 대한 항체 스크리닝 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 기존 주제로부터 변경 된 주제로 연구 진행하였으며 이에 따라, 내성 유전자 편집 단백질 전달을 위한 세포 투과 웹타이드 발굴 및 이의 성능 평가 완료
2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포 투과 웹타이드 기반 내성 종양 세포의 내성 유전자 편집을 위한 유전자 변형 효소의 세포 내 전달 ▪ 세포 투과 핵산체 기반 내성 종양 세포의 내성 유전자 편집을 위한 유전자 변형 효소의 세포 내 전달 	40	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포 투과 웹타이드 기반 및 양잉온성 지질 기반 단백질 전달기술을 활용하여, Cas9/sgRNA 단백질-RNA 복합체의 항암제 내성 세포 전달 기술 확보. ▪ 단백질 내성 유전자 편집 단백질 전달 효율 및 이에 따른 세포주 내성 감소와 암세포 사멸 효능 평가 완료.
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내성 유전자의 편집을 통한 세포 사멸 기술 개발 ▪ 내성 유전자 변형기술과 항암제 처리의 조합을 통한 종양 내성 극복 기술 개발 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 유전자 가위의 세포 내 및 암조직 내 전달을 위한 나노입자화 기술 확보 ▪ 종양 동물 모델 상에서 나노입자화 된 유전자 가위의 유전자 편집 효능 평가 완료
	계	100	

1-4. 대장암의 이질성 분석을 위한 DNA 메틸화 다중 검지 기술 개발

1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 간접계 기반의 형광 측정시스 템 개발 (공간 분해능 300 nm 급) ▪ 나노임프린트를 이용한 나노채 널 개발 (100 nm급) ▪ 메틸화사이트 표지 프로토콜 확립 (~10kbp genomic DNA) ▪ 종양 조직으로부터의 DNA 추출 및 정제 프로토콜 확립 ▪ 한개의 종양 영역으로부터 얻 어진 여러 종류의 단일 세포로 부터의 DNA 추출 및 정제 프 로토콜 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DNA 메틸화 및 메틸사이트 형광표지 프로토콜 확립 ▪ Anti-biofouling 코팅된 100nm 급 나 노채널 공정 확립 ▪ 여기 과장 이하(170 nm)의 여기파턴 형성을 위한 광학계 개발

1-5. 세포전이 관련 단백질 작용기작 연구 및 조절단백질 상호작용을 기반으로 한 억제인자
발굴

2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 수용성 단백질 생산을 위한 재 조합 유전자 제작 ▪ 고순도 수용성 단백질 생산 및 대량생산 과정 구축 ▪ 구조 및 작용기작 연구를 위한 단백질 결정화 및 단백질 복합 체 확보 ▪ 분리된 단백질의 생화학적·생 물리적 성상연구 	50	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포 전이 관련단백질 플라스미드 확보 (Muskelin, RanBPM, Twa1, RMND5A, MAEA, ARMC8α, ARMC8β 총 7종 플라스미드) ▪ Muskelin 포함 상기 단백질들의 수용 화 테스트 완료 및 수용성 단백질 construct 총 50 종 이상 확보 및 수용 화 테스트 완료 ▪ 90% 이상 순도를 갖는 full-length Muskelin, Twa1, ARMC8α/β 4종 및 이외 3종 단백질 construct를 포함하는 총 20종 이상의 단백질 정제조건 확보
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muskelin 및 복합체의 분자지 도화를 통한 구조적 이해 ▪ 분자 복합체의 상호작용·친화 도 측정 및 mutation 실험을 통한 작용부위 맵핑 ▪ 생체근접 모델 구축 및 상호작 용부위를 모사하는 분자 디자 인 	50	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Muskelin과 DIC & GABA Receptor 복합체 단백질 확보; ▪ 복합체 결정화조건 탐색 및 최적화; ▪ 포항가속기를 이용한 4.0 Å resolution data 확보 & 데이터프로세싱 완료; ▪ MR을 이용한 초기구조 규명 시도 중

2. 대장암 이질성 극복을 위한 CATS 나노융합 원천 기술 개발

2-1. 대장암 조직의 세포외 기질 및 다양성 극복을 위한 테라그노시스 원천기술 개발

1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암조직의 ECM 및 불균일성 극복을 위하여 약물전달을 저해하는 ECM 타겟 발굴 ▪ ECM 타겟에 반응할 수 있는 나노소재 개발 ▪ 인체 암조직과 같은 불균일성을 포함/극복하는 암모델 확립 ▪ 세포수준에서 암세포 표면에 인공 표적 수용체 도입 기술 확립 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대장암 조직을 포함한 다양한 암조직의 미세환경 (pH,콜라겐 분포, 혈관분포) 이해 ▪ HIFU를 이용한 암조직 내 세포외기질의 분해/파괴되는 정도 확인 ▪ 세포수준에서 당 대사메커니즘을 이용하여 암세포 표면에 인공표적 수용체를 발현시키고 이를 표적화하는 기술 개발
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 및 혈관 분포가 상이한 암종 모델을 확립함. ▪ 모델 클라이콜 키토산 나노입자를 이용하여 암종에 따른 암 축적 거동 평가 ▪ 암 축적 효능과 ECM, 혈관, pH 분포 간의 상관관계 검증 ▪ 대사체 개질을 통한 대장암 표적형 대사체 전달 기술 개발
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대사체 전달체의 생체 외/내 대사체 전달 효능 평가를 통해 우수한 대장암 특이적 결합능을 확인 ▪ 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발 ▪ 함유된 Curcumin의 대장암 세포 특이적 유입 및 세포 독성을 확인함. ▪ 실제 대장암 동물 모델을 확립하여 개발된 나노프로브의 대장암 조직 특이적 영상 효능을 검증함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 분해/파괴를 통한 약물전달 향상 수준 확인 ▪ 생체내에서 인공표적 수용체 도입으로 인한 약물전달 향상 수준 확인 ▪ 인공표적 수용체를 이용한 영상 기술 및 치료전략 개발
2차년도 (2015)		40	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 및 혈관 분포가 상이한 암종 모델을 확립함. ▪ 모델 클라이콜 키토산 나노입자를 이용하여 암종에 따른 암 축적 거동 평가 ▪ 암 축적 효능과 ECM, 혈관, pH 분포 간의 상관관계 검증 ▪ 대사체 개질을 통한 대장암 표적형 대사체 전달 기술 개발 ▪ 대사체 전달체의 생체 외/내 대사체 전달 효능 평가를 통해 우수한 대장암 특이적 결합능을 확인 ▪ 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발 ▪ 함유된 Curcumin의 대장암 세포 특이적 유입 및 세포 독성을 확인함. ▪ 실제 대장암 동물 모델을 확립하여 개발된 나노프로브의 대장암 조직 특이적 영상 효능을 검증함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대사체 전달체의 생체 외/내 대사체 전달 효능 평가를 통해 우수한 대장암 특이적 결합능을 확인 ▪ 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발 ▪ 함유된 Curcumin의 대장암 세포 특이적 유입 및 세포 독성을 확인함. ▪ 실제 대장암 동물 모델을 확립하여 개발된 나노프로브의 대장암 조직 특이적 영상 효능을 검증함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대사체 전달체의 생체 외/내 대사체 전달 효능 평가를 통해 우수한 대장암 특이적 결합능을 확인 ▪ 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발 ▪ 함유된 Curcumin의 대장암 세포 특이적 유입 및 세포 독성을 확인함. ▪ 실제 대장암 동물 모델을 확립하여 개발된 나노프로브의 대장암 조직 특이적 영상 효능을 검증함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대사체 전달체의 생체 외/내 대사체 전달 효능 평가를 통해 우수한 대장암 특이적 결합능을 확인 ▪ 대장암 진단을 위한 나노프로브 기반 스프레이형 형광 조영제 개발 ▪ 함유된 Curcumin의 대장암 세포 특이적 유입 및 세포 독성을 확인함. ▪ 실제 대장암 동물 모델을 확립하여 개발된 나노프로브의 대장암 조직 특이적 영상 효능을 검증함
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 분해/파괴를 통한 약물전달 향상 수준 확인 ▪ 생체내에서 인공표적 수용체 도입으로 인한 약물전달 향상 수준 확인 ▪ 인공표적 수용체를 이용한 영상 기술 및 치료전략 개발 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 구성을 collagen, 히알루론산을 분해할 수 있는 효소를 이용한 ECM 리모델링 기술 확립. ▪ 다양한 ECM 리모델링 효소 처리 조건에 따른 ECM 리모델링 효능 분석. ▪ 집속초음파(HIFU)를 이용한 물리적 ECM 리모델링 기술 확립.
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 구성을 collagen, 히알루론산을 분해할 수 있는 효소를 이용한 ECM 리모델링 기술 확립. ▪ 다양한 ECM 리모델링 효소 처리 조건에 따른 ECM 리모델링 효능 분석. ▪ 집속초음파(HIFU)를 이용한 물리적 ECM 리모델링 기술 확립.
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 구성을 collagen, 히알루론산을 분해할 수 있는 효소를 이용한 ECM 리모델링 기술 확립. ▪ 다양한 ECM 리모델링 효소 처리 조건에 따른 ECM 리모델링 효능 분석. ▪ 집속초음파(HIFU)를 이용한 물리적 ECM 리모델링 기술 확립.
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ ECM 구성을 collagen, 히알루론산을 분해할 수 있는 효소를 이용한 ECM 리모델링 기술 확립. ▪ 다양한 ECM 리모델링 효소 처리 조건에 따른 ECM 리모델링 효능 분석. ▪ 집속초음파(HIFU)를 이용한 물리적 ECM 리모델링 기술 확립.

			<ul style="list-style-type: none"> ■ HIFU를 이용한 모델 글리콜 키토산 나노입자의 암 조직 전달 효율 향상 확인. ■ HIFU를 이용한 독소루비신의 암 조직 전달 효율 향상 확인. ■ 생체 내 인공 표적 수용체의 암 조직 특이적 도입 효능 확인. ■ 인공 표적 수용체 도입을 통한 대장암 조직의 형광 표지자 전달 효율 향상 확인. ■ 효소 특이적 비천연 당 전구체의 암 조직직접 투여 또는 정맥 투여법을 이용한 인공 표적 수용체 발현 기술 확립. ■ 생물직교성클릭화학을 이용한 인공 표적 수용체의 생체내 표지 조건 및 영상 기술 확립.
	계	100	
2-2. 유도표현형 및 대장암 기질 표적 진단·치료용 나노바이오 소재 개발			
1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ■ TAMs 및 CAFs 표적성 나노 입자 설계 및 제조 ■ 폴리머닷 기반 prodrug bomb 설계 및 제조 	50	<ul style="list-style-type: none"> ■ 암 조직 내에서 형광이 활성화되는 형광-IRGD-케чу 조합의 활성화 iRGD (형광-iRGD-케чу) 프로브 개발 및 광역학 치료 효과 확인 ■ 방사선 치료 시 발생하는 유도표현형 과산화수소 감응형 화학발광/항암제 방출 재료의 과산화수소 감응 특성 확인
2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ■ TAMs 및 CAFs 표적성 나노 입자를 이용한 prodrug bomb 탑재 및 전달 기술 개발 ■ 폴리머닷 기반 prodrug bomb 의 유도표현형 감응 암세포 표적 진단-치료 성능 구현 	50	<ul style="list-style-type: none"> ■ 과산화수소 감응 화학발광 신호 발생 및 암세포 사멸이 가능한 진단·치료용 나노항암제 개발 ■ 화학발광 신호화가 가능한 과산화수소 감도 10~5 M 확보 ■ 나노항암제 단독 대비 과산화수소 유도 50% 세포사멸도 검증
	계	100	

2-3. Image-guided surgery 구현을 위한 대장암 이질성 추적 플랫폼 개발

1차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포막 삽입 activatable fluorescence probe 설계 및 제조 ▪ 각종 물성테스트 및 in vitro 영상화 최적화 ▪ 전이성 대장암세포, 비전이성 대장암세포에서의 대비 영상 구현 	30	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달 및 유전자 치료가 동시에 가능한 다기능성 RCT 나노입자 제조 플랫폼 기술을 개발함 ▪ imaging과 유전자 치료가 동시에 가능한 RCT 나노입자의 암 추적 영상화 및 유전자 억제를 in vitro 세포모델과 in vivo 질병모델에서 구현함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다중 유전자 억제가 가능한 imaging probe를 개발하여 항암내성 암세포의 영상화 및 항암내성 극복 기술을 개발함으로써 항암내성 암세포의 항암제 반응성을 개선하고 치료법 제시.
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달이 가능한 DNA 기반의 다기능성 RCA 나노입자 제조 플랫폼 기술 개발 및 치료효과 검증을 완료함
2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 압타머 표지 기술을 이용한 RCT 나노입자의 표적기능 다양화 ▪ 항암화학약제 탑재가 가능한 RCT 나노입자 개발 ▪ 다중 유전자 치료가 가능한 RCT 나노입자 개발 	40	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 다중 유전자 억제가 가능한 imaging probe를 개발하여 항암내성 암세포의 영상화 및 항암내성 극복 기술을 개발함으로써 항암내성 암세포의 항암제 반응성을 개선하고 치료법 제시. ▪ 암추적 imaging probe로서 항암화학제 전달이 가능한 DNA 기반의 다기능성 RCA 나노입자 제조 플랫폼 기술 개발 및 치료효과 검증을 완료함
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ RCT 나노입자를 이용한 면역체크포인트 억제 및 이를 이용한 항암면역치료 개법 제시
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cytotoxic KSP 유전자 억제를 통해 암치료 유의성을 평가하고 암선택적 치료 구현
	계	100	

2-4. 단백질 기반 융합나노소재를 이용한 종양 이질성 제어용 나노-면역 치료 플랫폼 개발

2차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 단백질의 다중체 (multimer) 구조가 탑재된 나노플랫폼 설계 및 제조 ▪ 암세포의 면역검문작용 차단용 나노-면역 치료 플랫폼 개발 ▪ 단백질기반 나노 소재의 세포 내 안정성 증가를 위한 IDP 후보 서열 스크리닝 및 설계 ▪ 개발된 나노 플랫폼의 성능 규명을 위한 이미징 기술 확보 	50	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼을 설계 및 제조: 암세포의 자가 세포 사멸을 일으키는 단백질 중 trimeric 구조를 가진 단백질을 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지에 탑재시켜, 단백질의 다중체 구조를 유지할 수 있도록 설계. ▪ 다양한 암세포 표면에 과발현되어 "Don't kill me signal"을 활성화 시킨다고 알려진 Immune Checkpoint Blocker (ICB)을 Blocking 할 수 있는 분자를 발굴하고, 이를 단백질 나노케이지 표면에 고직접도로 표출시킨 나
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼을 설계 및 제조: 암세포의 자가 세포 사멸을 일으키는 단백질 중 trimeric 구조를 가진 단백질을 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지에 탑재시켜, 단백질의 다중체 구조를 유지할 수 있도록 설계. ▪ 다양한 암세포 표면에 과발현되어 "Don't kill me signal"을 활성화 시킨다고 알려진 Immune Checkpoint Blocker (ICB)을 Blocking 할 수 있는 분자를 발굴하고, 이를 단백질 나노케이지 표면에 고직접도로 표출시킨 나
			<ul style="list-style-type: none"> ▪ 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼을 설계 및 제조: 암세포의 자가 세포 사멸을 일으키는 단백질 중 trimeric 구조를 가진 단백질을 human ferritin heavy chain 기반 나노케이지에 탑재시켜, 단백질의 다중체 구조를 유지할 수 있도록 설계. ▪ 다양한 암세포 표면에 과발현되어 "Don't kill me signal"을 활성화 시킨다고 알려진 Immune Checkpoint Blocker (ICB)을 Blocking 할 수 있는 분자를 발굴하고, 이를 단백질 나노케이지 표면에 고직접도로 표출시킨 나

			<p>노케이지 플랫폼 설계 및 암세포주 표면 결합 효능 증가 확인.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ natural protein, artificial protein으로부터 Intrinsically disordered protein (IDP) 서열 스크리닝 및 그 서열의 상관관계 분석. ▪ 나노케이지에 탑재할 최적의 서열 선정 및 IDP서열을 나노케이지에 탑재하여 제작된 나노플랫폼의 구조 확인.
3차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 세포막 표면의 막단백질 receptor와 나노케이지에 탑재된 multimer 리간드 사이의 결합능 측정 및 효능 향상성 확인 ▪ IDP 탑재 나노케이지 제조 기술 최적화 및 세포내 안정성 측정 ▪ 나노케이지 기반 항암용 나노-면역 치료 플랫폼의 원천기술 개발 	50	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 암세포의 apoptosis를 일으키는 trimer 구조의 단백질을 탑재한 나노케이지 1종 개발 ▪ 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노소재 플랫폼의 암세포 결합능, 암세포 사멸 유도능, 항암 효능 검증 ▪ IDP 탑재 단백질 기반 나노케이지의 세포내 안정성 증가 여부를 ex vivo biodistribution과 pharmacokinetics 분석을 통해 검증: 기존 나노케이지의 반감기를 10배 이상 증가시키는 나노케이지 개발 완료 ▪ 암세포의 면역 회피 기작을 억제하기 위한 물질이 표출된 단백질 기반 나노케이지 디자인 및 개발
	계	100	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구에서 발굴 된 전이성 대장암 특이적 분비 단백질들은 전이성 대장암을 진단하기 위한 혈액 마커 후보군으로 활용 가능함.
- 본 연구에서 발굴 된 MMPs 돌연변이 세포주 차등발현 분비 단백질은 MMP 단백질에 의한 전이성 암세포 미세환경 조절 연구에 활용 가능함.
- 본 연구에서 사용 된 EV 분리방법과 MMPs 돌연변이 세포주에서 차등발현되는 EV 단백질 후보군은 EV에 의한 전이성 암세포 미세환경 조절 연구에 활용 가능함.
- 본 연구에서 발굴 된 전이성 대장암 특이적인 세포 표면막 단백질들은 대장암 조직에서의 검증을 통해 전이성 대장암을 진단하기 위한 마커 후보군으로 활용 가능함.
- 사용된 세포 표면막 단백질 분리방법과 MMPs 돌연변이 세포주에서 차등 발현되는 세포 표면막 단백질 후보군은 암 세포의 미세 환경 remodeling에 의한 암세포의 migration이나 invasion에 대한 signaling 연구에 활용 가능함.
- 본연구에서 도출가능한 PKM2/PHD3복합체 구조를 바탕으로 PKM2와 PHD3의 상호작용을 저해하는 방안을 통한 암성장 억제가 가능함.
- 대장 조직의 저산소 특이적 성질에 의한 HIF 발현과 PKM2에 의한 HIF 발현 조절을 정상세포 및 암세포를 동시에 관측하므로써, 정상세포와 암세포에서 세포 생화학적 변화를 확인하였음. 특히 암세포가 분비하는 PKM2가 정상 대장세포에 미치는 영향을 살펴봄으로써, 암이 진행되면서 일어날 수 있는 신호전달체계의 변화를 밝힘. 이러한 신호전달체계를 적절히 조절할 수 있는 생물질 혹은 화합물을 발굴하면 암세포에 의한 환경 변화 및 정상세포의 변이 또한 억제할 수 있으리라 기대함.
- 암세포의 대사과정 및 성장에 중요하다고 알려진 인자 PKM2의 단량체/다량체를 단분자 수준에서 구분할 수 있는 에세이 기술을 확립하였음. PKM2의 이합체가 암세포의 성장 유지에 중요함으로, 이러한 기술을 이용하여 향후 이를 저해할 수 있는 생물질 혹은 화합물을 발굴할 예정임.
- 본 연구에서 발굴한 CPP는 여러 단백질 및 펩타이드에 부착하여 세포 내로 이들을 수송하는 것이 필수적인 연구에 활용이 가능함.
- 본 연구를 통해 확인 바와 같이 유전자 가위를 통한 항암제 내성 유전자의 편집은 항암제 감수성을 증대시켜 보다 효과적인 암세포 사멸을 유도할 수 있으므로, 해당 방법은 항암제 내성을 지니는 암질환의 치료 기술 개발에 활용 가능함.
- 본 연구를 통해 개발 된 RNP 나노입자 형 유전자 가위는 세포 뿐 만 아니라 동물 모델에서도 유전자 가위를 효과적으로 전달하여 표적 유전자를 편집할 수 있는 기술로 다양한 *in vivo* 상에서 유전자 가위의 적용성을 높이는 데 활용 가능함.
- 본 연구에서 확인한 암 미세환경 및 다양성은 기존의 나노의약품의 암 조직 전달 효율을 향상시키고 효과적인 암 치료를 위한 새로운 나노의약품 개발에 활용 가능함.
- ECM 리모델링 기술을 이용하여 기존의 나노의약품이 갖는 낮은 약물전달 효율의 기술

적 장벽을 극복할 수 있는 새로운 암 치료 기술개발에 활용 가능함.

- 암 조직내 인공 표적 수용체 도입 및 생물 직교성 클릭화학을 이용한 인공 표적 수용체 표지기술은 복잡성, 다양성을 갖는 암 세포의 특성을 단일화하여 효과적인 암 표적 영상화 및 약물 전달이 가능함에 따라 차세대 나노의약품 개발에 활용 가능함.
- RCT 나노입자는 항암제 전달체, 암선택적 문자영상프로브, 유전자 억제기반의 치료제로 활용이 가능하며, 하나 이상의 이러한 기능성을 동시에 수행할 수 있다는 점에서 다중기능 나노입자로서의 활용성이 높음.
- 본 연구에서 개발한 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼은 기존 bivalent 구조를 갖는 치료용 항체보다 리간드/수용체간 결합능이 뛰어남. 이를 통해 cancer therapeutic platform에 대한 원천기술 확보 가능.
- 본 연구에서 개발한 단백질 기반 나노소재의 세포내 안정성 증가를 위한 기술은 내부에 약물을 탑재하여 다양한 약물전달을 위한 안정적인 약물 전달체로 활용 가능함.

제 2 절 실용화 및 기술사업화 전략

- 본 연구에서 발굴 된 차등발현 단백질을 대장암 진단을 위한 혈액 기반의 ELISA kit로 개발 가능성 있음.
- 본 연구에서 발굴 된 세포 표면막 단백질은 대장암 치료를 위한 drug target으로 연구 가능성이 있음.
- 본 연구를 통해 확보 한 CPP 기반 단백질 전달 기술은 국내 특허가 등록 되었고 이를 활용하여 생리 활성을 지니나 세포 내에 전달이 어려운 다양한 단백질/펩타이드 분자를 치료제로 개발하는 국내 회사에 라이센싱을 추진할 수 있을 것을 사료 됨.
- RNP 나노입자를 통한 유전자 가위 전달 기술은 국내와 미국 특허 출원 중이며, 이후 확보되는 특허권을 바탕으로 병원과의 중개연구를 통하여 유전자 가위 적용 질환인 유전성 질환을 치료하기 위한 치료 기술로 실용화를 추진할 수 있을 것으로 사료 됨.
- RCT 나노입자를 이용한 문자영상, 약물전달, 유전자 치료제 분야에서의 실용화를 가능 하기 위하여 임상의가 포함된 임상적용 기술 개발을 추후 보완한 후 기술이전협의를 진행할 계획임.
- 암세포의 면역 회피 차단용 나노-면역 치료 플랫폼은 다른 항암제와의 병용 요법을 통해서 항암 효과를 더욱 향상 시킬 수 있음. 여러 병용 요법의 동물 실험 결과를 비교하여 실용화를 추진할 계획임.
- 본 연구에서 설계한 단백질 다중체 구조가 탑재된 나노플랫폼에 대한 특허 획득을 시도 할 계획임.
- 본 연구에서 설계한 단백질 기반 나노소재의 세포내 안정성 증가 방법은 나노 캐리어의 다양한 약물전달에 광범위하게 적용가능하므로, 상업적 활용 가치가 높음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- MMP 단백질은 대장암 진단마커와 치료 표적물질로서 연구가 많이 되어 왔으나, 진단마커로서 정확도가 높지 않고 MMP 저해물질 역시 off-target effect로 높은 효과를 보이지 못하고 있다. (Said AH et al, 2014, Shay et al, 2015)
- MMP 단백질은 세포 외부 기질 (Extracellular Matrix, ECM) 및 Extracellular vesicle (EV)와 같은 암조직 미세환경 조절에 중요한 인자로 알려져 있음.
- 현재까지 Extracellular vesicle의 연구는 주로 그 기능 분석에 집중되어 있었으나 최근 EV에서 질병 진단마커 발굴에 관한 연구가 증가하고 있음. (Van Deun, J. et al, 2014)
- UT southwestern, Stnaford 대학에서는 HIF-2 α 에 대한 연구를 수행함. 특히 HIF-2 α 와 HIF-1 β 의 결합을 저해하는 화합물을 발굴하였고, 암 뿐 아니라 HIF-2 α 가 당뇨병에도 연관이 있음을 발표함.
- University of Oulu에서는 HIF-3 α 에 대한 연구를 수행하였음. 아직 잘 밝혀지지 않은 HIF-3 α 의 역할과, 조직내 발현 정도를 관측함으로써 HIF-3 α 의 중요성을 부각시킴.
- PKM2에 대한 연구 동향은, 최근들어 기존에 알고 있던 PKM2의 역할 뿐 아니라 핵에서 전사 보조역할 기능 및 인산화 효소로써의 역할이 부각되면서 전세계 다양한 그룹에서 급격히 많은 연구가 진행되고 있는 실정임.
- 특히 Harvard University, Georgia state University, Johns Hopkins University 등 미국 저명한 대학에서 PKM2의 활성 조절이 암세포의 유지 및 성장에 중요한 역할을 할 수 있음을 보이는 연구결과들을 발표하였음
- PKM2의 활성 저해제 혹은 활성 증강제를 발굴하려는 노력이 University of Edinburgh, Agios Pharmaceuticals 등의 회사에서 이루어지고 있으며, 이는 암세포 치료제 혹은 새로운 항암 표적제로 사용 가능할 것으로 예상됨.
- PHD3의 새로운 역할에 대한 연구가 다양한 그룹에서 진행되고 있음. 그 예로 PHD3가 종양에서의 EGFR 신호전달 체제를 저하하는 효과가 있고, 장내의 epithelial barrier기능을 유지함이 밝혀졌고. PHD3 과발현이 Accute myeloid leukemia 성장을 저해하는 것으로 나타남으로써, 암세포 성장 및 전이에 PHD3가 중요한 역할을 할 수 있음을 시사함.
- 독일제약기업 바이엘리 스위스 바이오벤처 ‘CRISPR Therapeutics’에 5년간 3억유로투자 결정 (혈우병, 선천성심장질환 치료제 개발)하였고, 노바티스는 ‘Intellia Therapeutics’에 1500만 달러투자 (세포에서 질병의 원인이 되는 유전자 교정)하였고, 아스트라제네카는 영/미국연구소 4곳과 관련기술 개발 체결 (규모미공개)한 것에서 볼 수 있듯이, 유전자 가위 (CRISPR/Cas9)에 대한 다국적 제약회사의 대규모 투자가 잇따르고 있는데, 이는 향후 10년 뒤 유전자 교정 기술을 확보하지 못할 경우 신약 개발 경쟁에서 뒤쳐질수 있다는 판단 때문임.

- 현재 유전병 치료, 광우병내성소, 인간화장기 생산용 돼지, 근육강화돼지 등 뿐 아니라, 농업 및 작물 산업에도 GMO를 회피할 수 있는 유전자 편집 기술로 인식될 수 있는 가능성도 열려 있으므로, 관련 시장이 광범위하고 급격하게 확대되고 있는 추세임.
- TNF는 pro-inflammatory, antiparasitic, immunomodulator, cachectin, fibroblast growth factor, antiviral activity 등 매우 다양한 생리활성을 나타냄. TNF를 타겟팅하는 치료용 항체 (재조합 TRAIL, CD40 agonistic mAbs 등)가 현재 임상개발 중이며, 이들 치료용 항체는 긴 half-life를 갖는다는 장점이 있으나, 실제 구조인 삼중체 (trimeric ligand)를 모방하지 않는 bivalent 구조라는 한계점을 가지고 있음.

제 7 장 참고문헌

- Kang, U.-B. B. et al. Expression profiling of more than 3500 proteins of MSS-type colorectal cancer by stable isotope labeling and mass spectrometry. *J Proteomics* 75, 10, 3050 - 62 (2012)
- Mueller, L. N. et al. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res* 7, 1, 51 - 61 (2008)
- Van Deun, J. et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods* 14, 3, 228 - 232 (2017)
- Said, A. H. et al. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers* 6: 366 - 375 (2014)
- Shay, G. et al. Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol* 44-46: 200 - 206 (2015)
- Georgia, M. et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase activity is regulated by the endocytic collagen receptor Endo180. *Journal of Cell Science* 122: 4042-4048 (2009)
- Garvalov, B. K. et al. PHD3 regulates EGFR internalization and signalling in tumours. *Nat Commun* 5, 5577 (2014).
- Haja Mohideen, A. M. et al. Examining the polymorphisms in the hypoxia pathway genes in relation to outcome in colorectal cancer. *PLoS One* 9, e113513 (2014)
- Henze, A. T. et al. Loss of PHD3 allows tumours to overcome hypoxic growth inhibition and sustain proliferation through EGFR. *Nat Commun* 5, 5582 (2014)
- Jiang, Y. et al. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Mol Cell* 53, 75-87 (2014)
- Jiang, Y. et al. PKM2 phosphorylates MLC2 and regulates cytokinesis of tumour cells. *Nat Commun* 5, 5566 (2014)
- Keller, K. E. et al. SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol Cell* 53, 700-709 (2014)
- Yang, L. et al. PKM2 regulates the Warburg effect and promotes HMGB1 release in sepsis. *Nat Commun* 5, 4436 (2014)
- Chen, Y. et al. PHD3 Stabilizes the Tight Junction Protein Occludin and Protects Intestinal Epithelial Barrier Function. *J Biol Chem* 290, 20580-20589 (2015)

- Deschoemaeker, S. et al. PHD1 regulates p53-mediated colorectal cancer chemoresistance. *EMBO Mol Med* 7, 1350–1365 (2015)
- Lunt, S. Y. et al. Pyruvate kinase isoform expression alters nucleotide synthesis to impact cell proliferation. *Mol Cell* 57, 95–107 (2015)
- Wang, P., Sun, C., Zhu, T. T. & Xu, Y. H. Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2. *Protein Cell* 6, 275–287 (2015)
- Wu, D., Potluri, N., Lu, J., Kim, Y. & Rastinejad, F. Structural integration in hypoxia-inducible factors. *Nature* 524, 303–308 (2015)
- Briggs, K. J. et al. Paracrine Induction of HIF by Glutamate in Breast Cancer: EglN1 Senses Cysteine. *Cell* 166, 126–139 (2016)
- German, N. J. et al. PHD3 Loss in Cancer Enables Metabolic Reliance on Fatty Acid Oxidation via Deactivation of ACC2. *Mol Cell* 63, 1006–1020 (2016)
- Guo, J. et al. pVHL suppresses kinase activity of Akt in a proline-hydroxylation-dependent manner. *Science* 353, 929–932 (2016)
- Hsu, M. C. et al. Extracellular PKM2 induces cancer proliferation by activating the EGFR signaling pathway. *Am J Cancer Res* 6, 628–638 (2016)
- Jeffery, J., Sinha, D., Srihari, S., Kalimutho, M. & Khanna, K. K. Beyond cytokinesis: the emerging roles of CEP55 in tumorigenesis. *Oncogene* 35, 683–690 (2016)
- Matsuda, S. et al. Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res* 44, 636–647 (2016)
- Park, Y. S. et al. AKT-induced PKM2 phosphorylation signals for IGF-1-stimulated cancer cell growth. *Oncotarget* 7, 48155–48167 (2016)

주 의

1. 이 보고서는 한국과학기술연구원에서 시행한 기관고유사업 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국과학기술연구원의 기관고유사업 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.