

생명 해석의 신기술 시스템 생물학 (Systems Biology)



한국기초과학지원연구원 정규열 박사

1. 서론

생물체의 다양한 기능을 산업적으로 활용하고자 하는 생물공학은 생명체의 기능을 경제성이 있는 방향으로 개선하고자 하는 노력을 계속해 왔다. 그러나, 여타의 공학 기술이 대상이 되는 시스템을 공학자 스스로 직접 설계, 진단 및 수정에 참여한 것에 비해, 생물공학의 대상 시스템인 생명체는 지구의 역사와 더불어 자연의 의해서 설계되었으며, 생물공학자는 단지 진단과 수정에만 참여하였다. 따라서, 다른 분야의 공학기술자들은 스스로 설계한 시스템에 대한 정확한 설계도를 바탕으로 손쉬운 방법으로 진단과 수정이 가능하지만, 정확하게 이해하지 못하는 시스템에 대한 진단 및 수정을 해야 하므로 이른바 “블랙박스 접근법 (Black-box approach)” 에 의한 방법이 생물공학 방법론의 대부분을 차지하였다.

최근 수년간의 생명과학 분야 전반에 있어서의 다양한 발전을 가능하게 한 High-throughput 분석 기술의 진보들, 즉, 인간 지놈 프로젝트의 기술적 핵심인 High-throughput 유전자 서열 분석 기술, DNA chip 으로 대표되는 다양한 Microarray 기술들의 발전, 그리고, 이러한 분석 기술들로부터 얻어진 많은 데이터로부터 생명현상을 설명할 수 있는 의미 있는 정보를 추출해 주는 생물정보학 기술들의 발전은 자연이 만들어 낸 생물시스템의 좀 더 정확한 설계도면을 가능하게 해 주며, 나아가 응용 기술로서 생물공학이 신약 개발, 진단 및 치료 기술 개발, 환경 및 유용물질 생산 등에 획기적인 발전을 가져다 줄 것으로 기대하고 있다.

생물 시스템을 시스템 자체로서 분석하고 해석하며 기능을 개선하는 기술로서 시스템 생물학 (Systems Biology) 은 1) 생물 시스템을 유전자 수준에서 그리고 발현단계에서 다양하게 교란시킬 수 있는 방법, 2) 다양하게 교란된 생물 시스템을 여러 단계에서 분석할 수 있는 분석 기술, 3) 분석된 많은 종류의 데이터로부터 생물 시스템에 대한 정보를 추출하는 기술, 4) 생물 시스템의 일부를 설계하고 합성하는 기술 등으로 구성되어 있으며, 각 기술

Design new perturbation(s) to maximize information gain

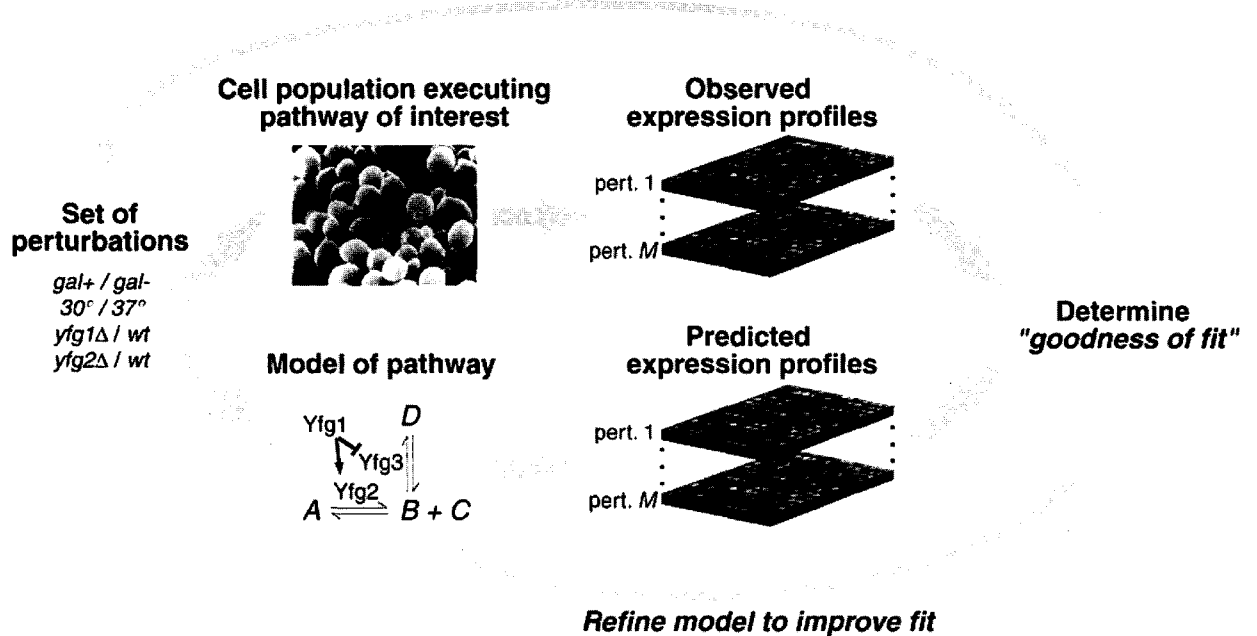


Figure 1. Overview of the systems biology approach, involving pathway verification and refinement through systematic, successive perturbations. The pathway of interest is perturbed genetically by gene deletion or overexpression and/or biologically by modulation of metabolite levels, temperature, or other pathway components. Gene expression profiles measured in response to each perturbation, obtained using microarrays or related technologies, are compared to those predicted by a model of the pathway mechanism. Perturbations are initially selected to target known pathway components and are thereafter chosen to distinguish between alternative models that are consistent with the present set of observations. All aspects of the process are amenable to automation (laboratory or computational), including model refinement and choice of perturbations.

에 대한 현황과 전망을 다루고자 한다 (Fig. 1).

2. 생물 시스템의 교란 기술

생물 시스템의 교란은 유전적 혹은 발현 단계에서의 교란으로 이루어진다. 시스템 생물학적 기법으로서 교란 기술의 전제조건은 짧은 시간 내에 빠른 속도로 시스템의 변이를 유발시킬 수 있어야 함과 동시에 교란된 부위를 바로 탐지할 수 있는 기술이어야 한다. 이러한 기술들로는 i) 고성능 유전자 조작 기술, ii) 체계적인 유전자 돌연변이 기술 iii) in trans 유전자 억제 기술들이 개발되어 있으며, 이에 대해 살펴보고자 한다.

2.1 고성능 유전자 조작 기술

(High-throughput genetic manipulation)

유전자 조작을 빠른 속도로 체계적으로 수행할 수 있는

다양한 기술들에 대한 연구가 현재 진행 중에 있으며, 몇몇의 경우는 실질적으로 많은 응용 사례를 보여주고 있다. 대표적인 것으로 PCR 기술을 이용한 *Saccharomyces* 속 유전자 치환 기술들이 있다 (Longtine et al. 1998, Wach et al. 1997). 이들 다양한 종류의 벡터들은 유전자 삽입 과정을 매우 손쉽고 간단하게 하며, 어떤 종류의 유전자에도 적용될 수 있도록 정형화되어 있다. 먼저, 순방향과 역방향 PCR primer는 목표 유전자와 homologous한 약 40 bp와 plasmid 모듈을 flanking 할 수 있는 약 20 bp의 부분으로 구성되어 있다.

이들 primer를 이용하여 plasmid template로부터 모듈을 PCR 증폭을 하며, 생산된 PCR product는 바로 효모 세포에 transform하여 원하는 유전자 부위에 아주 높은 효율로 homologous recombination 된다. 이러한 방법을 통하여 유전자 제거, 치환, 삽입 등의 다양한 목적으로 모듈을 설계할 수 있으며, 따라서, gene knockout, promoter

fusion, protein fusion, epitope tag 등의 모듈을 사용할 수 있다. 이러한 방법은 또한, 동일한 primer를 이용하여 서로 다른 여러 종류의 모듈을 포함하는 다양한 구조를 만들 수 있도록 해 준다. 원치 않는 recombination과 성공적인 recombination을 구별하기 위하여 효모에 대해서 non-native한 표지 유전자를 포함하도록 설계한다.

서로 다른 다양한 종류의 construct와 다양한 유전자 조작을 통해 많은 균주에서 동시에 다양한 유전자 조작 결과를 관찰하기 위하여, 좀 더 간편하고 효율적이며, 표준화된 plasmid-construction이 필요한데, 이러한 예로 GATEWAY recombinational-cloning system을 들 수 있다 (Walhout et al. 2000). 이것은 관심있는 유전자로부터 무제한의 array를 High-throughput으로 얻을 수 있게 해준다. 이러한 방법은 서로 다른 서열의 많은 종류의 유전자를 무제한적으로 분리되었지만, 동일한 *in vitro* reaction에서 탐색할 수 있다는 장점이 있다. PCR을 기반으로 한 클로닝 기술은 제한 효소의 사용 없이 하나의 표준화된 방법으로 매우 효율적으로 다양한 종류의 유전자를 클로닝할 수 있다는 장점이 있으며, 클론 분리 및 확인 과정에 필요한 비용을 최소화할 수 있다는 장점이 있다.

2.2 체계적인 유전자 돌연변이 기술

(Systematic gene mutation)

유전자의 돌연변이 기술의 전통적인 방법은 유전자의 무차별적인 돌연변이로 많은 종류의 다양한 돌연변이를 유발할 수 있지만, 돌연변이에 따른 생리적 특성 파악과, 돌연변이의 부위를 탐지하는 데 많은 시간과 노력이 필요하다는 단점이 있다. 이에 따라, 돌연변이의 결과를 빠른 속도로 탐색할 수 있고 이에 따른 생리적인 특성을 고성능으로 분석할 수 있으며, 또한, 돌연변이의 부위도 쉽게 분석할 수 있는 새로운 방법이 필요하다.

예를 들면, 최근에 거의 모든 효모의 유전자가 제거된 돌연변이의 library를 얻을 수 있었는데 (Shoemaker et al. 1996, Winzeler et al. 1999), 이렇게 얻어진 돌연변이 주의 컬렉션은 다양한 종류의 High-throughput screening 기법들과 함께, 체계적인 돌연변이 검색이 가능하다. 특히, 이들 돌연변이주들은 각각의 유전형에 대해서

특이적인 약 20 bp 정도의 바코드 유전자를 포함하고 있으므로, 특정한 생리적 특성을 보이는 돌연변이주의 군집 분포를 바코드 유전자에 대한 정량적인 검색만으로도 분석할 수 있어 유용하게 쓰일 수 있다. 그러나, 여러 유전자가 동시에 상승작용에 의한 생리적인 영향을 보이는 경우, 이것을 적절히 분석할 수 있는 방법론이 없다는 것이 한계로 되어 있다.

2.3 In trans 유전자 억제 기술 (gene disruption in trans)

많은 유전적 변이 기술들이 개발되어 왔으나, 이러한 기술들은 대부분 짧은 시간 범위 내에서 비가역적인 유전적 변형 기술들이다. 그러나, 많은, 특히 고등생물에 있어서 유전적 발현 조절 기작들은 발현 단계의 유전적 변형에 의한 동적 변이가 주류를 이루고 있어, 이러한 발현 조절 기작의 응용이 생물학적 시스템을 해석하고 응용하는 데에 중요할 것으로 생각된다. 대표적인 동적 발현 조절 시스템으로 in trans로 작용하는 RNA-mediated interference (RNAi)가 있다. 이러한 예로, 몇 개의 수식된 oligonucleotide가 mRNA의 translation에 있어서 매우 효과적인 저해제로 사용될 수 있다는 보고가 된 바가 있다 (Faria et al. 2001, Nasevicius and Ekker 2000). Nuclease에 대해서 저항성을 주는 방향으로 수정된 oligonucleotide를 microinjection 또는 transfection으로 세포주에 주입하였다.

최근에 trypanosome으로 부터 쥐에 이르는 광범위한 생물체에서 발견되는 또다른 RNAi의 작용기작이 보고되었는데 (Bass 2000), 특정한 mRNA와 관련된 double-stranded RNA (dsRNA)를 도입하였을 경우, 이것이 세포 내에서 mRNA를 빠른 속도로 파괴시킨다는 것이다. 따라서, 다양한 종류의 dsRNA를 발현하는 클론 라이브러리를 보유하였을 경우, 많은 종류의 유전자와 기능과의 상관관계를 밝혀내는 데에 기여를 할 것으로 생각된다.

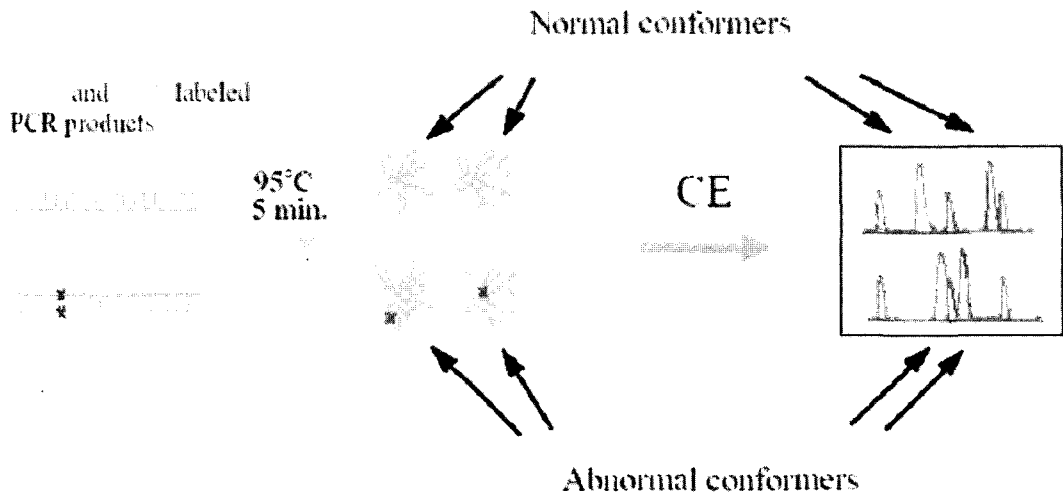


Figure 2. Principle of capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism.

3. 고성능 생물학적 정량기술 (Quantitative High-Throughput Biological Tools) 및 computation 기술

인간 지놈 프로젝트에서 드러나듯, High-throughput 분석기술의 발전은 생물학 분야에 있어서 발전을 주도해 왔다. 생물 시스템을 분석하는 데 있어서 High-throughput 분석기술의 필요성은 유전적 변이 또는 발현 단계에서의 조절인자의 변이에 의해 유발된 생리학적 변이가 또다른 유전적 또는 발현 조절적 변이의 요인이 된다는 점에서 다양한 레벨에서의 아주 복잡한 네트워크를 구성하고 있으며, 이들 간의 보다 정확한 연관성을 이해하기 위해서는 앞 장에서 언급한 다양한 변이 기술들에 의해서 유발된 유전적 변이가 생물 시스템에 어떠한 변화를 유발하는지 다양하게 분석해야 한다는 점에 있다. 고성능 분석 시스템의 기본 요건은 적은 양의 시료로부터 많은 종류의 분석을 동시에 빠르게 할 수 있어야 한다는 점에 있다.

생물 시스템에 대한 분석은 유전적 변이를 분석하는 single nucleotide polymorphism (SNP) 등 다양한 유전자 분석 기술, 발현단계에서의 차이를 구별하는 발현 분석 기술, 그리고 생물 시스템의 대사적 변이를 분석하는 대사 분석 기술 등을 포함한다. 하나의 염기 서열의 변화에 의한 유전적 기능 변화를 탐색하고자 하는 SNP는 High-throughput DNA 서열 분석 장치의 발전과 더불어 시작된

다. 유전자의 염기서열의 변이가 유발하는 생리적 변화를 분석하기 위해서는 많은 유전자 서열의 변화를 효율적으로 탐지할 필요가 있다 (Brenner et al. 2000). 그러나, 현재의 분석 기술이 많은 종류의 생리적 특성을 보이는 세포들로부터 그 서열적 변화를 추적해 내는 데에는 한계가 있다. 이러한 한계를 뛰어 넘기 위한 몇 가지 대안들이 제시되었는데, 염기서열의 변화에 따른 conformation 차이를 이용한 single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Andersen et al. 2003) (Fig. 2), microsatellite 분석을 위한 denaturing HPLC (Lilleberg 2003) 등등 많은 분석 기술들이 제시되었으나, 유전적 변이를 분석하기 위한 기술로서 한계가 있는 실정이다.

발현 단계에서의 High-throughput 분석기술로서는 transcript를 정량적으로 분석하는 DNA microarray (Chittur 2004)와 단백질의 양을 직접 정량적으로 분석하고 기술로 각종 proteomic analysis 기술들이 있다 (de Hoog and Mann 2004). 생물 시스템의 여러 단계의 High-throughput 분석기술 중 가장 대중화된 분석 도구로서 다양한 분야에 있어서 생리적 특성과 시스템 레벨에서의 발현 profile의 분석에 많은 결과를 보여주고 있으나, 다른 레벨과의 interaction을 분석하는 데에는 한계가 있다.

High-throughput 대사분석 기술을 기반으로 하는 metabolomics는 특히 복잡한 대사과정을 가진 고등 생명체, 즉, 동물 식물체에서의 대사 profiling 기술을 기반으로

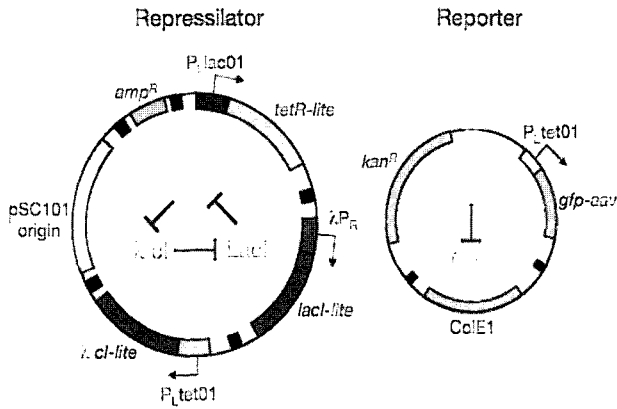


Figure 3. A synthetic, three-protein oscillatory network. The "repressilator" plasmid encodes three synthetic proteins, each fused to a heterologous promoter such that one protein represses the transcription of the next in a closed negative-feedback loop (TetR represses *cl*, *cl* represses *LacI*, and *LacI* represses *TetR*). A reporter plasmid is used to track oscillations in TetR concentration: it contains the TetR-binding sequence upstream of the gene encoding for green fluorescent protein.

발전하였다 (Kell 2004, Weckwerth 2003). 유전자나 단백질과는 달리 훨씬 다양한 분자구조로 되어있으므로 보다 정밀하고 다양한 화학적 특성을 가진 물질들을 분석할 수 있는 도구가 필요하다. 특히, 고성능의 LC-NMR, LC-MS 등등의 다양한 분석 도구들을 활용한 연구를 통하여, 다양한 종류의 2차 대사산물을 생산하는 식물의 대사체 분석 또는 진단이나 치료의 표지 물질을 찾아내는 데에 기여하고자 하고 있다. 분석 대상의 다양성만큼이나 다양한 분석 기술을 필요로 하므로 좀 더 고성능 분석 기술의 개발이 필수적이다.

다양한 분석 기술들을 통해서 얻어진 데이터들의 데이터베이스 구축 및 그러한 데이터로부터 필요한 생물학적 정보를 얻어내기 위한 알고리즘의 개발 등이 있다. 특히 시스템 레벨에서의 접근방법으로 DNA microarray 데이터 및 proteomic 데이터를 이용한 연구결과로 동물세포에서의 postregulatory mechanism 및 interaction analysis를

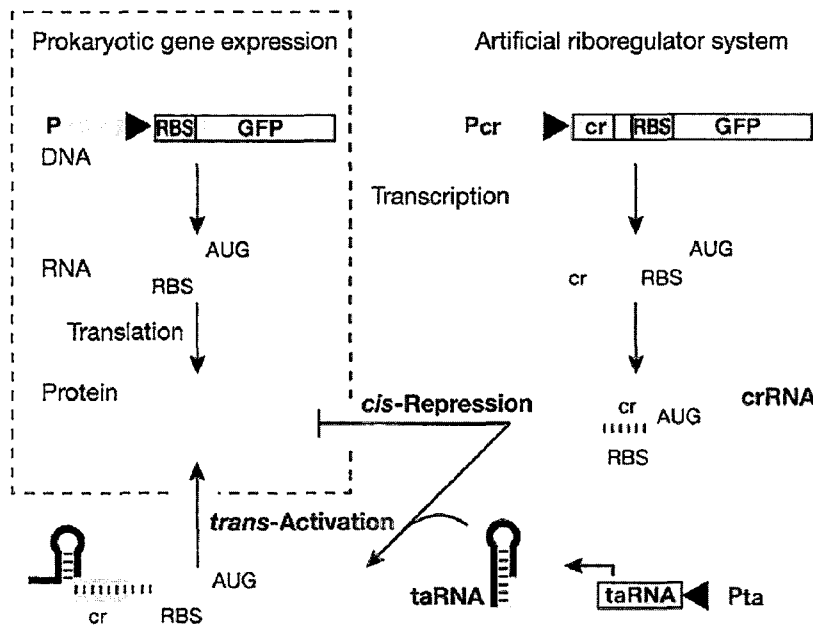


Figure 4. The artificial riboregulator system used to control post-transcriptional gene regulation. Basic steps of native prokaryotic gene expression are illustrated in the box. A promoter, *P*, drives the expression of a gene (*GFP*). After transcription, mRNA is present with a ribosome binding site (*RBS*) available for ribosome docking. After ribosome binding, translation of a functional protein occurs. In the artificial riboregulator, a small sequence (*cr*), complementary to the *RBS*, is inserted downstream from a promoter (*Pcr*) and upstream from the *RBS*. After transcription, a stem-loop is formed at the 5' end of the mRNA, which blocks ribosome docking and translation (*cis* repression). The resulting mRNA is referred to as *cis*-repressed RNA (*crRNA*). A second promoter, *Pta*, expresses a small, noncoding RNA (*trans*-activating RNA, *taRNA*) that targets the *crRNA* with high specificity. The *taRNA* and *crRNA* undergo a linear-loop interaction that exposes the obstructed *RBS* and activates expression. Different variants of *crRNA* and *taRNA* were constructed. Two riboregulator variants using different promoters were also studied to test the generality of the system.

한 결과가 있으며 (Tian et al. 2004), 대사적 교란에 대한 효모의 시스템 레벨에서의 변화를 분석한 결과가 보고된 바가 있다 (Ideker et al. 2001). 그 외에도 효모에서의 각종 유전 인자를 기능적으로 mapping하는 연구 결과 (Tong et al. 2004) 등 다양한 생물 시스템에 대한 다양한 분석 데이터들을 이용한 시스템의 기능을 분석하는 예로 연구된 바가 있다. Computation 도구는 무엇보다도 분석을 위한 대상 시스템과 그것의 데이터의 속성과 아주 연동되어야 하며, 수학적, 통계학적 분석 기술자들의 생물 시스템에 대한 전문가들과의 Communication이 무엇보다도 중요하다 할 것이다.

4. 생물 시스템의 합성 기술 (Synthetic biology: Forward engineering of the biological system)

이미 완성된 생물 시스템의 개별적인 요소에 대한 교란을 유발하고 그것에 따른 시스템의 변화를 관찰함으로써 개별적인 요소의 시스템에서의 역할을 파악하며, 그러한 상관관계에 대한 축적된 데이터를 이용하여 전체 시스템의 구성을 이해하고자 하는 것이 앞서 보였던 시스템 생물학의 일반적인 접근방법이라고 한다. 이러한 생물 시스템의 동적 특성을 단순화된 모델 시스템을 합성함으로써 파악하고자 하는 노력이 합성 생물학 (synthetic biology) 이다. 이러한 연구의 선구자적 결과로서, Elowitz 등은 세가지 종류의 서로 다른 repressor를 서로 다른 promoter 하에서 발현하도록 하고, 발현 조절의 결과가 green fluorescence protein (GFP)의 활성에 의해서 측정될 수 있도록 한 하나의 plasmid를 설계하여 대장균에서 발현하였다 (Elowitz and Leibler 2000). 지극히 단순화된 발현 조절 구조임에도 불구하고 실제 발현에 있어서의 동적 특성은 deterministic model로 예측한 결과와는 판이한 결과를 얻을 수 있었으며, 겉보기로 숙주인 대장균과는 독립적인 것처럼 보이는 시스템이 훨씬 복잡한 발현 양상을 보인다는 사실을 알 수 있었다 (Fig. 3).

한편, trans-activating RNA와 cis-repressor를 이용하여 유전자의 발현을 다이내믹하게 제어할 수 있는

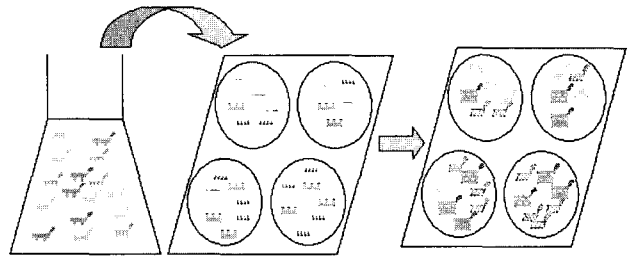


Figure 5. Illustration of the method employed in the construction of functional protein chips using mRNA-enzyme fusion chimeras and their homologous capture DNA molecules. A mixture of mRNA-enzyme fusion molecules is synthesized in a single vial by in vitro translation. The relative amounts of capture DNA molecules immobilized on the surface of the wells determine the relative activity of the enzymes in the well.

riboregulator (RNA switch)를 설계하여 인위적으로 발현 조절을 효과적으로 설계할 수 있는 모델을 보여준 바가 있으며 (Isaacs et al. 2004) (Fig. 4), mRNA-protein fusion을 이용한 새로운 단백질 칩 위에서 인공적으로 설계된 대사경로를 구현하고 개별 요소의 변화에 따른 동적 특성을 관찰한 연구결과 (Jung and Stephanopoulos 2004)가 잇달아 발표되어, 실제 생물 시스템에 좀 더 가까운 모델을 구현할 수 있게 되었으며, 완성된 생물 시스템에서 볼 수 없었던 다양한 동적 특성을 관찰하고 시스템에 대한 보다 많은 정보를 얻는데 도움을 줄 것으로 기대된다 (Fig. 5).

5. 결론

다양한 분석 기술과 해석 기술을 바탕으로 한 시스템 생물학은 기본적으로 생물학, 의학, 생명공학, 재료 및 화학, 물리학, 수학 등 다양한 학문 분야 간의 포괄적인 노력이 필요한 분야이며, 시스템을 좀 더 잘 분석할 수 있는 분석 도구의 개발과 그것으로부터 얻어진 데이터의 정확한 해석, 또한 이를 뒷받침할 수 있는 모델 시스템의 구축 등등의 다양한 노력들이 시스템 생물학을 발전하는 원동력이라 할 수 있을 것이다. 응용분야로서의 생명공학을 선도해온 생물공학자들은 이 분야의 중심축을 이루어야 할 것이며, 생물공학회는 21세기 시스템 생물학을 이끄는 주역이 될 것임을 믿어 의심치 않는다. ㉞

참 고 문 헌

- Andersen, P. S., C. Jespersgaard, J. Vuust, M. Christiansen, and L. A. Larsen. 2003. Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening. *Hum Mutat* 21: 455-65.
- Bass, B. L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101: 235-8.
- Brenner, S., M. Johnson, J. Bridgham, G. Golda, D. H. Lloyd, D. Johnson, S. Luo, S. McCurdy, M. Foy, M. Ewan, R. Roth, D. George, S. Eletr, G. Albrecht, E. Vermaas, S. R. Williams, K. Moon, T. Burcham, M. Pallas, R. B. DuBridge, J. Kirchner, K. Fearon, J. Mao, and K. Corcoran. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 18: 630-4.
- Chittur, S. V. 2004. DNA microarrays: tools for the 21st Century. *Comb Chem High Throughput Screen* 7: 531-7.
- de Hoog, C. L., and M. Mann. 2004. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5: 267-93.
- Elowitz, M. B., and S. Leibler. 2000. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* 403: 335-8.
- Faria, M., D. G. Spiller, C. Dubertret, J. S. Nelson, M. R. White, D. Scherman, C. Helene, and C. Giovannangeli. 2001. Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo. *Nat Biotechnol* 19: 40-4.
- Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and L. Hood. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292: 929-34.
- Isaacs, F. J., D. J. Dwyer, C. Ding, D. D. Pervouchine, C. R. Cantor, and J. J. Collins. 2004. Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol* 22: 841-7.
- Jung, G. Y., and G. Stephanopoulos. 2004. A functional protein chip for pathway optimization and in vitro metabolic engineering. *Science* 304: 428-31.
- Kell, D. B. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* 7: 296-307.
- Lilleberg, S. L. 2003. In-depth mutation and SNP discovery using DHPLC gene scanning. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6: 237-52.
- Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953-61.
- Nasevicius, A., and S. C. Ekker. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26: 216-20.
- Shoemaker, D. D., D. A. Lashkari, D. Morris, M. Mittmann, and R. W. Davis. 1996. Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat Genet* 14: 450-6.
- Tian, Q., S. B. Stepaniants, M. Mao, L. Weng, M. C. Feetham, M. J. Doyle, E. C. Yi, H. Dai, V. Thorsson, J. Eng, D. Goodlett, J. P. Berger, B. Gunter, P. S. Linseley, R. B. Stoughton, R. Aebersold, S. J. Collins, W. A. Hanlon, and L. E. Hood. 2004. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3: 960-9.
- Tong, A. H., G. Lesage, G. D. Bader, H. Ding, H. Xu, X. Xin, J. Young, G. F. Berriz, R. L. Brost, M. Chang, Y. Chen, X. Cheng, G. Chua, H. Friesen, D. S. Goldberg, J. Haynes, C. Humphries, G. He, S. Hussein, L. Ke, N. Krogan, Z. Li, J. N. Levinson, H. Lu, P. Menard, C. Munyana, A. B. Parsons, O. Ryan, R. Tonikian, T. Roberts, A. M. Sdicu, J. Shapiro, B. Sheikh, B. Suter, S. L. Wong, L. V. Zhang, H. Zhu, C. G. Burd, S. Munro, C. Sander, J. Rine, J. Greenblatt, M. Peter, A. Bretscher, G. Bell, F. P. Roth, G. W. Brown, B. Andrews, H. Bussey, and C. Boone. 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303: 808-13.
- Wach, A., A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung, and P. Philippsen. 1997. Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 1065-75.
- Walhout, A. J., G. F. Temple, M. A. Brasch, J. L. Hartley, M. A. Lorson, S. van den Heuvel, and M. Vidal. 2000. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* 328: 575-92.
- Weckwerth, W. 2003. Metabolomics in systems biology. *Annu Rev Plant Biol* 54: 669-89.
- Winzler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, R. W. Davis, and et al. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-6.