

## 장환형 단일가닥 DNA를 이용한 암세포 성장 억제 유전자 발굴

배윤위 · 문익재<sup>1</sup> · 서영배<sup>2</sup> · 도경오\*

영남대학교 의과대학 생리학교실, <sup>1</sup>웰진, <sup>2</sup>경북대학교 생명공학부

**Large-Circular Single-stranded Sense and Antisense DNA for Identification of Cancer-Related Genes.** Bae, Yun-Ui, Ik-Jae Moon<sup>1</sup>, Young-Bae Seu<sup>2</sup>, and Kyung-Oh Doh\*. Department of Physiology, Yeungnam University School of Medicine, Daegu 705-717, Korea, <sup>1</sup>WelGENE Inc., Daegu 704-230, Korea, <sup>2</sup>School of Life Sciences & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea - The single-stranded large circular (LC)-sense DNA were utilized as probes for DNA chip experiments. The microarray experiment using LC-sense DNA probes found differentially expressed genes in A549 cells as compared to WI38VA13 cells, and microarray data were well-correlated with data acquired from quantitative real-time RT-PCR. A 5K LC-sense DNA microarray was prepared, and the repeated experiments and dye swap test showed consistent expression patterns. Subsequent functional analysis using LC-antisense library of overexpressed genes identified several genes involved in A549 cell growth. These experiments demonstrated proper feature of LC-sense molecules as probe DNA for microarray and the potential utility of the combination of LC-sense microarray and antisense libraries for an effective functional validation of genes.

**Key words:** Microarray, expression profiling, microarray, antisense, lung cancer

### 서 론

최근의 DNA 마이크로어레이 기술의 발전으로 유전자 발현의 상대적 정도를 대량으로 측정할 수 있게 하였다[6, 15, 21]. 이러한 마이크로어레이 기술은 수천 내지 수만의 유전자 발현을 동시에 측정함으로써 세포의 생리적 변화에 대한 체계적인 분석을 제공할 뿐 아니라 질병의 진단, 신약개발, 독성연구 등에 응용되고 있다[2, 8, 17]. 이와 같이 마이크로어레이는 다양한 분야에서 중요한 역할을 하고 있지만 교차-혼성화, 염기서열분석 오류, 클론의 오염, 불균일 혼성화 등으로 인한 결과의 불일치성이 문제가 되고 있다[13]. 또한, 실험의 신호강도 또한 마이크로어레이 결과의 해석에 중요한 요인으로 알려져 있다[3]. 이중가닥 DNA를 프로브로 사용하는 마이크로어레이 실험 시 프로브 DNA를 표지된 cDNA와 결합시키기 위해 DNA를 열처리로 변성 시키는데 이때 상보가닥의 복원으로 인해 신호강도가 약해질 수 있다. M13 페이지미드는 유전자의 센스 혹은 안티센스 부분을 가지는 장환형 단일가닥 DNA 분자를 생산할 수 있는 기능을 가지고 있다. 이 DNA는 길이가 긴 유전자서열도 정확하게 복제할 수 있고 상보가닥 복원의 우려가 없으며 *Escherichia coli*를 통해 유전자 재조합 및 대량생산이 가능하다. 최근 이러한 장환형 단일가닥 센스 DNA의 특성을 이용한 마이크

로어레이를 제작하여 그 사용 가능성을 제시한 바 있다[19]. 이 연구를 통해 장환형 단일가닥 센스 DNA 마이크로어레이가 cDNA 마이크로어레이보다 높은 신호강도를 나타냄을 확인하였다. 하지만, 이 연구에서는 신호강도와 실제 유전자 발현 정도의 상관관계를 비교하지 못하였고, 대량유전자 분석을 위한 대규모 마이크로어레이 제작 및 재현성 확인을 시행하지 못하였다.

한편 빠른 속도로 측정되는 유전자 서열 정보와 발현 정보에 비하여 이를 해석하고 그 결과를 바탕으로 유효한 신약 개발의 목표를 찾아내는 데에는 많은 시간과 노력이 필요하다. 이러한 목표 유전자를 찾아내기 위한 방법으로는 안티센스[23]와, decoy[1] 및 siRNA[18, 22] 등을 통해 목표 유전자의 발현을 억제하여 그 기능을 유추하는 방법 등이 사용되어 왔는데 최근에는 장환형 단일가닥 안티센스 DNA를 이용하여 암세포의 성장과 관련된 유전자를 대량분석방법으로 찾을 수 있는 기능적 유전체학 기법이 제시된 바 있다 [14].

이에 본 연구에서는 장환형 단일가닥 센스 DNA를 이용하여 마이크로어레이를 제작하고 유전자 발현을 분석하여 결과의 재현성을 실시간 RT-PCR를 이용하여 검증하였고, 5K 마이크로어레이를 제작하여 반복실험 및 dye-swap 실험으로 그 재현성을 관찰하였다. 나아가 과발현된 유전자에 대한 장환형 단일가닥 안티센스 DNA를 제작하여 암세포의 성장에 관여하는지도 알아보았다.

\*Corresponding author

Tel: 82-53-620-4335, Fax: 82-53-651-3651

E-mail: kodoh@ynu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 세포 배양 및 RNA 추출

A549(lung cancer cell line)와 WI38VA13(lung normal cell line)를 한국세포주은행(KCLB, Korea)으로부터 분양받아 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 또는 DMEM 배지(Welgene, Korea)로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. RNA 추출을 위해 세포를 phosphate-buffered saline으로 세척한 후 적정량의 트리졸(GibcoBRL, USA)을 넣고 제조사의 지침에 따라 total RNA를 분리하였고 mRNA 정제를 위해서는 Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit(Stratagene, USA)를 사용하였다.

### 장환형 단일가닥 센스 DNA의 제조

헬퍼 페이지 M13K07(New England Biolabs, USA)을 미리 감염해 놓은 XL-1 Blue competent *E. coli*(Stratagene, USA)에 Human EST를 포함한 페이지미드를 형질전환 한 후, 암피실린(최종농도 50 µg/mL)을 함유한 고체배지로 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 다음날, 형성된 단일 균집을 100 mL의 LB 액체배지(50 µg/mL 암피실린, 70 µg/mL 카나마이신 함유)에 접종하고, 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 배양액을 6,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 얻어진 약 100 mL의 배양 상청액에 20 mL의 PEG/NaCl (20% PEG 8000, 2.5 M NaCl)을 첨가하고 상온에서 10분간 배양하였다. 정제한 LC-sense DNA들을 ethanol 침전으로 농축한 후 양을 확인하기 위해 1% 아가로스 겔 전기영동을 수행하였고 기타 자세한 과정은 이전과 같다[10, 14].

### LC-sense 칩 제작 및 마이크로어레이 실험

Affymetrix 417 Arrayer(Affymetrix, USA)를 이용하여 장환형 단일가닥 센스 DNA는 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드 클래스에 점적하였다. 정제한 2 µg의 poly(A)<sup>+</sup> mRNA를 각각 Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP의 존재하에서 oligo-dT primer로 역전사시켰다. 표식한 cDNA를 column으로 정제한 후 80 µL의 혼성화 용액(3×SSC, 0.3% SDS)으로 재용해 하였다. 표식한 target cDNA를 65°C의 습윤기 내에서 16시간 동안 혼성화 하였다. 이어서 2×SSC/0.2% SDS 용액으로 55°C에서 5분 65°C에서 5분간 세정한 후, 2×SSC 용액으로 실온에서 5분, 0.05×SSC 용액으로 실온에서 5분간 각 1회씩 세정하여 건조한 후 스캐닝에 사용하였다.

마이크로어레이에서 결합된 형광 강도를 Affymetrix 428 Array Scanner(Affymetrix, USA)로 측정하였고, 수집한 이미지들을 ImaGene Ver.4.2 software(BioDiscovery, USA)로 분석하였다. 신호 강도는 각 spot의 강도 중간값에서 배경 중간값을 제하여 결정하였다.

### 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용한 유전자 발현분석

Total RNA 1 µg을 역전사(Promega, USA)시켜 cDNA를 만들고 DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit(Finzymes, Finland)와 DNA Engine Opticon 2 System(MJ Research, USA)를 이용하여 증폭시켰다. 실험에 사용된 RNA 양을 보정하기 위해 b-actin도 동시에 증폭시켜 그 값을 비교하였다.

### 장환형 단일가닥 안티센스 DNA의 transfection을 이용한 기능분석

A549세포와 WI38VA13세포에 5K 장환형 단일가닥 센스 DNA 마이크로어레이 실험에서 과발현된 유전자에 대한 안티센스를 제작하였다. 1×10<sup>3</sup>개의 세포를 96 well plate에 분주하고 그 다음 날 안티센스를 transfection 하였다. 장환형 단일가닥 안티센스 DNA 0.1 µg을 0.3 µg Enhancer Q(Welgene, Korea) 및 0.5 µg WelFect Ex(Welgene, Korea)와 섞은 뒤 transfection하였다. cDNA insert가 없는 대조군 장환형 단일가닥 센스 DNA와 DNA를 세포에 전달시키기 위해 사용한 양이온성 리포좀만을 사용한 군을 포함시켜 비교하였다. 세포의 성장 정도는 현미경을 통해 관찰하고 MTT 법을 사용하여 정량화하였다.

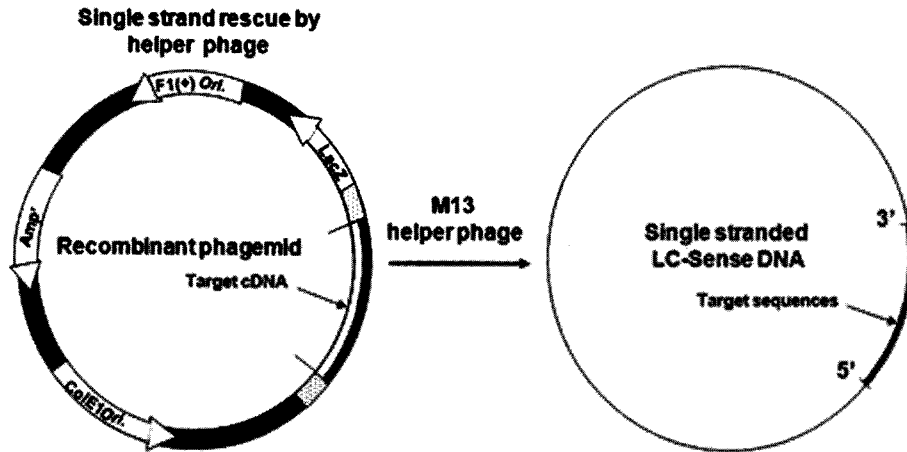
## 결과 및 고찰

### 장환형 단일가닥 센스 DNA 생산

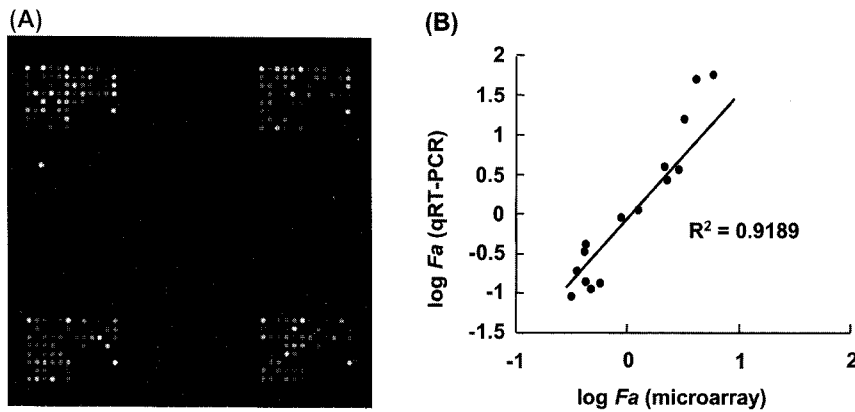
원하는 cDNA insert를 pBluescript SK(+) 벡터에 클로닝하고 M13K07가 감염된 competent *E. coli*에 재조합시켜 장환형 단일가닥 센스 DNA가 생산되게 하였다(Fig. 1) 100 mL의 배양상청액에서 약 150 µg의 장환형 단일가닥 센스 DNA를 생산하였다.

### 장환형 단일가닥 센스 DNA와 cDNA를 이용한 마이크로어레이

장환형 단일가닥 센스 DNA로 암관련 유전자로 알려진 284개의 유전자에 대한 마이크로어레이를 만들어 WI38VA13 및 A549의 RNA에 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP를 각각 표지시킨 뒤 유전자 발현정도를 측정하였다(Fig. 2A). 측정결과 6개의 유전자가 과발현되고(AI814383, H07878, NM000214, AA598517, NM021102, AA464849) 7개의 유전자 발현이 낮은 것을(AA136983, R62603, AA59874, N72115, AA862371, AA156802, AA447797) 알게 되었다. 과발현된 유전자 중 일부는 기존 연구에서 폐암 등에서 과발현되는 것으로 보고되었고[4, 7, 12], 저발현된 유전자 일부도 기존 연구에서 저발현됨이 보고되었다[5, 16, 20]. 이러한 마이크로어레이 결과로 얻어진 유전자 발현의 증감이 실제 유전자 발현의 증감과 비례하는지를 비교하기 위해 발굴된 과발현 유전자, 저발현 유전자 및 변화 없는 유전자(NM000404.2, NM004964.2)



**Fig. 1.** A schematic diagram of the production of single-stranded LC-sense DNA by the directional cloning of a human cDNA fragment. A cDNA insert of the target gene is cloned into the multiple cloning site of an vector containing an f1 replication origin. This construct allows the circular sense DNA of the target gene to be rescued from the culture supernatant of bacterial transformants that were previously infected with the helper phage, M13KO7.



**Fig. 2.** Comparison of microarray data with real-time PCR results. (A) The labeled target cDNAs from the WI38VA13 (Cy3) and A549 (Cy5) cells were mixed together and hybridized to an LC-sense DNA microarray. (B) Correlation of log transformed fold-change measurements ( $Fa$ ) for 15 genes (13 up- or down-regulated + 2 unchanged genes) was determined by LC-sense DNA microarray and real-time RT-PCR.

에 대해 real-time PCR를 시행하였고 그 결과 두 실험의 증감이 훌륭한 상관관계를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 2B).

**5K 마이크로어레이를 통한 유전자 발현분석**

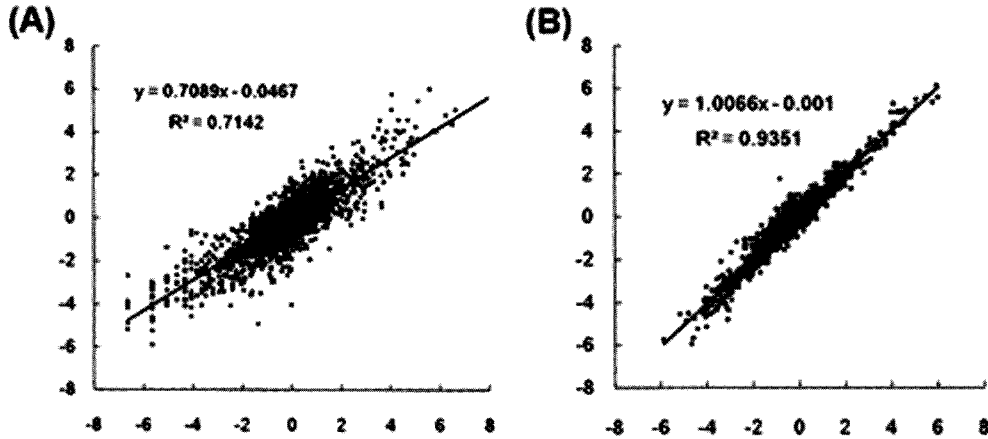
장환형 단일가닥 센스 DNA로 대량 유전자분석이 가능한 지를 알아보기 위해 5079개의 인간유전자를 탑재한 칩을 제작하였다. WI38VA13과 A549의 RNA에 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP를 각각 표지시킨 뒤 유전자 발현정도를 비교하였다. 마이크로어레이의 재현성을 알아보기 위해 반복 실험을 수행하였고, Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP를 바꾸는 dye-swap 테스트를 시행하였다. 반복 실험(Fig. 3A)과 dye-swap(Fig. 3B) 모두 신뢰할 만한 상관관계를 나타내었다.

이러한 좋은 상관관계를 나타내는 이유 중의 하나는 장환형 단일가닥 센스 DNA가 강한 신호강도를 나타내기 때문으로 생각되며 이는 혼성화시 cDNA에서처럼 상보가닥 복원에 의한 효과가 없고 충분히 긴 구조를 가지기 때문으로

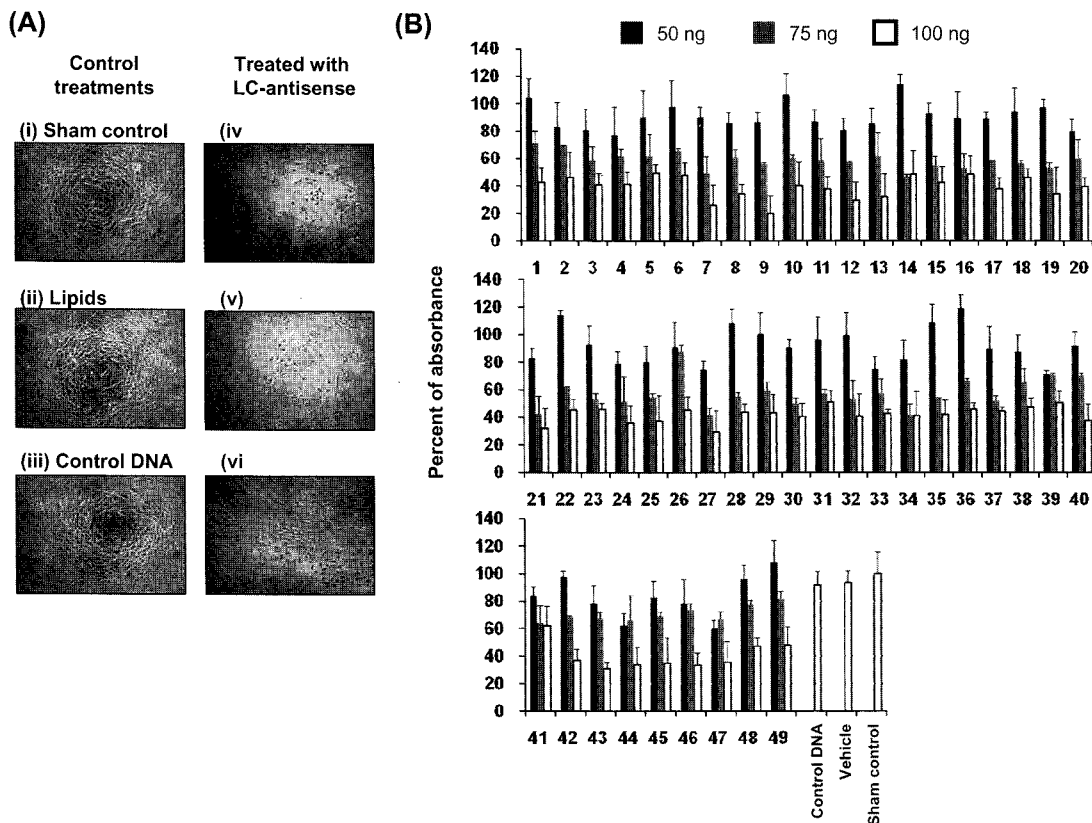
생각된다. 또한 장환형 단일가닥 센스 DNA를 이용한 마이크로어레이는 보다 강한 신호강도를 보이기 때문에 보다 적은 양의 Cy3 및 Cy5가 필요할 것이고 보다 적은 양의 RNA 샘플을 이용하여 유전자 발현 분석이 가능할 것이다. 장환형 단일가닥 센스 DNA를 이용한 마이크로어레이는 박테리아 배양 상청액에서 상대적으로 저렴한 비용으로 대량생산이 가능하고 이중가닥의 cDNA보다 신호강도가 높아 실용성이 있을 것으로 사료된다.

**장환형 단일가닥 안티센스 DNA를 이용한 기능적 유전자 분석**

장환형 단일가닥 센스 DNA를 이용한 유전자 분석에서 과발현되는 유전자를 클로닝을 통해 pBluescript SK(-)에 옮겨 장환형 단일가닥 안티센스 DNA를 만들었다. 이들을 A549 세포와 WI38VA13에 transfection하여 암세포의 성장에 어떠한 영향을 미치는지 관찰하였다. 암세포의 성장을 현미경으



**Fig. 3. Validation of of large-scale expression profiling using a 5K LC-sense DNA microarray.** (A) Correlation analysis of two different microarray experiments using LC-sense chip. LC-sense DNA probes to 5,079 human unigenes were prepared and arrayed on a glass slide. The microarray slide was preheated and hybridized with a mixture of labeled target cDNAs. Scanned image was analyzed and displayed on a bivariate scatter-plot. (B) A swap test was conducted for quality control, and correlation of the swap test is shown in the scatter-plot.



**Fig. 4. High-throughput functional analysis to validate genes involved in the growth of lung cancer cells.** (A) Growth inhibition of A549 cells after transfection with the LC-antisense library were assessed via light microscopy 3days after transfection(200X). (i)-(iii); control treatments as indicated, (iv)-(vi); A549 cells treated with different LC-antisense molecules. The data acquired from treatments with three of LC-antisense library are shown as representative examples. (B) LC-antisense species of 360 genes were transfected into A549 cells, and the growth rates were assessed via MTT assays in triplicate. 49 LC-antisense from the LC-antisense library showed dose dependent (50 ng, 75 ng, 100 ng) inhibition of growth in A549 as compared to sham control. Each bar value represents the mean±S.D. of triplicate experiments.

로 관찰하고(Fig. 4) MTT assay 를 통해 성장정도를 정량적으로 측정하였다. 360개의 안티센스 가운데 49개의 안티센스가 용량 의존적으로 A549 암세포의 성장을 억제하였고 이

안티센스들은 WI38VA13의 성장을 거의(>80%) 저해하지 않았다(Table 1). 본 실험에서 발굴한 유전자 가운데 XIAP (AI628066)는 이미 siRNA를 이용한 항암치료제로 개발 중

**Table 1. List of 49 LC-antisenses which showed dose dependent response and remarkable inhibition of growth in A549 as compared to WI38VA13.**

No.	Representative RNA	Description
1	AA458982	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha
2	AA936586	Tektin 2 (testicular)
3	R83837	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
4	R38619	Fucose-1-phosphate guanylyltransferase
5	AI095013	Histone 1, H2am
6	N74284	Zinc finger protein 324
7	AA877213	Cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1
8	NM_152999.2	six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2
9	NM_007289.1	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10) (MME), transcript variant 2b,
10	AA490471	SPARC-like 1 (mast9, hevin)
11	AA894577	Nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat)
12	AA490911	CD99 antigen-like 2
13	H61726	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
14	R71691	TNF receptor-associated factor 1
15	AA455272	Chromosome X open reading frame 12
16	AA490209	Actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa
17	AA454570	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3F
18	AA044267	Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5
19	AI739498	Peroxisome proliferative activated receptor, alpha
20	AA426053	Calpain 3, (p94)
21	AA700054	Adipose differentiation-related protein
22	AA625628	accessory proteins BAP31/BAP29
23	AA455505	Unc-51-like kinase 1 (C. elegans)
24	R61289	L(3)mbt-like (Drosophila)
25	N47445	Ependymin related protein 1 (zebrafish)
26	N51614	Formin-like 1
27	AA774619	Hypothetical protein FLJ10241
28	R42159	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
29	AI357236	Protamine 1
30	BC058011	cDNA clone IMAGE:4714628
31	NM_012236.1	sex comb on midleg homolog 1
32	AA149095	dual specificity phosphatase 1
33	NM_005603.2	ATPase, Class I, type 8B, member 1,
34	AI628066	Baculoviral IAP repeat-containing 4
35	AI760844	homeo box B3
36	NM_006942.1	SRY(sexdeterminingregionY)-box15(SOX15),
37	H82442	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
38	AA418395	Dipeptidylpeptidase 7
39	AA419015	Annexin A4
40	NM_006808.2	Sec61betasubunit(SEC61B),
41	H22445	Neuronal pentraxin I
42	AA458849	Serine protease inhibitor, Kunitz type, 2
43	AA282134	Glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)
44	AA625666	Lipopolysaccharide-induced TNF factor
45	AA402891	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2
46	AA430524	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
47	AA702487	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G5C
48	N45129	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
49	AA026120	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2

이고[11], Lyn(R83837) 유전자의 발현을 억제하는 siRNA도 암세포의 성장과 전이를 억제하는 것으로 보고되었다[9]. 앞으로 다른 유전자에 대하여도 그 가치를 증명해야 할 것이다.

암세포에서 과발현된 유전자가 있다면 이는 암조직의 병리적 성장에 중요한 역할을 할 가능성이 있고 이는 치료제 개발의 목표가 될 수 있다. 이를 증명하기 위해서는 개별적으로 안티센스 올리고핵산체[23]나 siRNA[18] 등으로 각각의 유전자의 발현을 저해하여 세포의 성장을 관찰하여야 한다. 암조직이나 암세포의 유전자 발현분석을 통해 의미 있는 결과를 도출하는 것은 진단 마커 개발이나 치료제의 개발을 위해 매우 중요한 일이지만 또한 시간과 비용이 드는 일이기도 하다. 본 연구에서는 과발현된 유전자를 클로닝을 통해 대량으로 안티센스를 제작하여 동시에 여러 개의 관련 유전자를 발굴할 수 있었다. 하지만, 이러한 연구는 세포주를 이용한 실험으로 그 한계가 있으므로, 보다 의미 있는 결과를 얻기 위한 *in vivo* 실험 등의 후속연구가 필요할 것이다.

결론적으로 장환형 단일가닥 센스 DNA로 제작한 마이크로어레이는 실제 유전자 발현 정도와 잘 일치하는 신뢰할 만한 결과를 보여주었고 대량 유전자 분석에서도 재현성 있는 결과를 나타내었다. 또한 장환형 단일가닥 센스 DNA와 안티센스 DNA를 이용하면 단시간에 대량으로 효과적인 목표 유전자를 발굴할 수 있음을 보여주었다.

### 감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2006-331-E00043).

### REFERENCES

1. Ahn, J. D., R. Morishita, Y. Kaneda, S. J. Lee, K. Y. Kwon, S. Y. Choi, K. U. Lee, J. Y. Park, I. J. Moon, J. G. Park, M. Yoshizumi, Y. Ouchi, and I. K. Lee. 2002. Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation *in vivo*. *Circ Res*. **90**: 1325-1332.
2. Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, Jr., L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, and L. M. Staudt. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. **403**: 503-511.
3. Asyali, M. H., M. M. Shoukri, O. Demirkaya, and K. S.

- Khabar. 2004. Assessment of reliability of microarray data and estimation of signal thresholds using mixture modeling. *Nucleic Acids Res*. **32**: 2323-2335.
4. Busto, R., J. C. Prieto, G. Bodega, J. Zapatero, L. Fogue, and I. Carrero. 2003. VIP and PACAP receptors coupled to adenylyl cyclase in human lung cancer: a study in biopsy specimens. *Peptides*. **24**: 429-436.
5. Chang, C. C., J. Y. Shih, Y. M. Jeng, J. L. Su, B. Z. Lin, S. T. Chen, Y. P. Chau, P. C. Yang, and M. L. Kuo. 2004. Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**: 364-375.
6. DeRisi, J. L., V. R. Iyer, and P. O. Brown. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. **278**: 680-686.
7. Fukunaga, Y., S. Bandoh, J. Fujita, Y. Yang, Y. Ueda, S. Hojo, K. Dohmoto, Y. Tojo, J. Takahara, and T. Ishida. 2002. Expression of cytokeratin 8 in lung cancer cell lines and measurement of serum cytokeratin 8 in lung cancer patients. *Lung Cancer*. **38**: 31-38.
8. Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield, and E. S. Lander. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. **286**: 531-537.
9. Guan, H., Z. Zhou, G. E. Gallick, J. S. F., J. Morales, A. K. Sood, S. J. Corey, and E. S. Kleinerman. 2008. Targeting Lyn inhibits tumor growth and metastasis in Ewing's sarcoma. *Mol Cancer Ther*. **7**: 1807-1816.
10. Jupin, I. and B. Gronenborn. 1995. Abundant, easy and reproducible production of single-stranded DNA from phagemids using helper phage-infected competent cells. *Nucleic Acids Res*. **23**: 535-536.
11. Kunze, D., D. Wuttig, S. Fuessel, K. Kraemer, M. Kotzsch, A. Meye, M. O. Grimm, O. W. Hakenberg, and M. P. Wirth. 2008. Multitarget siRNA inhibition of antiapoptotic genes (XIAP, BCL2, BCL-X(L)) in bladder cancer cells. *Anti-cancer Res*. **28**: 2259-2263.
12. Ledakis, P., W. T. Tester, N. Rosenberg, D. Romero-Fischmann, I. Daskal, and T. T. Lah. 1996. Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue. *Clin Cancer Res*. **2**: 561-568.
13. Lee, J. K., K. J. Bussey, F. G. Gwadry, W. Reinhold, G. Riddick, S. L. Pelletier, S. Nishizuka, G. Szakacs, J. P. Annereau, U. Shankavaram, S. Lababidi, L. H. Smith, M. M. Gottesman, and J. N. Weinstein. 2003. Comparing cDNA and oligonucleotide array data: concordance of gene expression across platforms for the NCI-60 cancer cells. *Genome Biol*. **4**: R82.
14. Lee, Y. H., I. J. Moon, B. Hur, J. H. Park, K. H. Han, S. Y. Uhm, Y. J. Kim, K. J. Kang, J. W. Park, Y. B. Seu, Y. H. Kim, and J. G. Park. 2005. Gene knockdown by large circular antisense for high-throughput functional genomics. *Nat Biotechnol*. **23**: 591-599.

15. Lockhart, D. J., H. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, and E. L. Brown. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.* **14**: 1675-1680.
16. Nagayama, M., A. Sato, H. Hayakawa, T. Urano, Y. Takada, and A. Takada. 1994. Plasminogen activators and their inhibitors in non-small cell lung cancer. Low content of type 2 plasminogen activator inhibitor associated with tumor dissemination. *Cancer.* **73**: 1398-1405.
17. Nuwaysir, E. F., M. Bittner, J. Trent, J. C. Barrett, and C. A. Afshari. 1999. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog.* **24**: 153-159.
18. Paddison, P. J., J. M. Silva, D. S. Conklin, M. Schlabach, M. Li, S. Aruleba, V. Balija, A. O'Shaughnessy, L. Gnoj, K. Scobie, K. Chang, T. Westbrook, M. Cleary, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, S. J. Elledge, and G. J. Hannon. 2004. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature.* **428**: 427-431.
19. Park, J. G. 2004. DNA chip using single stranded large circular DNA: Low background and stronger signal intensity. *J Biomed Lab Sci.* **10**: 75-84.
20. Sathyanarayana, U. G., S. Toyooka, A. Padar, T. Takahashi, E. Brambilla, J. D. Minna, and A. F. Gazdar. 2003. Epigenetic inactivation of laminin-5-encoding genes in lung cancers. *Clin Cancer Res.* **9**: 2665-2672.
21. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* **270**: 467-470.
22. Silva, J. M., M. Z. Li, K. Chang, W. Ge, M. C. Golding, R. J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P. J. Paddison, M. R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W. R. McCombie, M. A. Cleary, S. J. Elledge, and G. J. Hannon. 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet.* **37**: 1281-1288.
23. Zeng, J. Z., H. Y. Wang, Z. J. Chen, A. Ullrich, and M. C. Wu. 2002. Molecular cloning and characterization of a novel gene which is highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* **21**: 4932-4943.

(Received Dec. 2, 2009/Accepted Feb. 23, 2010)