creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264162

2 014년 2월
석사학위 논문

MTD에 의한 세포괴사 유도 유전자 발굴

조선대학교 대학원

의 학 과

박 정 희

MTD에 의한 세포괴사 유도 유전자 발굴

Identification of the genes responsible for MTD-induced necrosis

2014년 2월 25 일

조선대학교 대학원

의 학 과

박 정 희

MTD에 의한 세포괴사 유도 유전자 발굴

지도교수 김 태 형

이 논문을 의학석사 학위신청 논문으로 제출함.

2013년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

박 정 희

박정희의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 병 래 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 태 형 (인)

위 원 조선대학교 교수 송 희 상 (인)

2013년 11월

조선대학교 대학원

목차

국문초록 ---------- 1

ABSTRACT ---------- 2

서론 ---------- 4

실험재료 및 방법 ---------- 7

시약과 배지 ---------- 7

세포배양조건 ---------- 7

Lentiviral shRNA libraries의 제작 ---------- 7

Virus infection ---------- 8

MTD 유도 세포괴사에 저항성을 갖는 세포주 확립 ---------- 9

Genomic DNA의 분리 ---------- 9

Polymerase chain reaction ---------- 9

Transformation ---------- 10

Plasmid DNA의 분리 ---------- 10

결과 ---------- 12

Transfection test ---------- 12

MTD 유도 세포괴사에 저항성을 갖는 세포주 확립 ---------- 15

Polymerase chain reaction ---------- 17

Sequencing result ---------- 24

고찰 ---------- 26

참고문헌 ---------- 28

사진 목차

Fig. 1 The 1st transfection test

Fig. 2 The 2nd transfection test

Fig. 3 HeLa cell lines resistant to MTD-induced necrosis

Fig. 4 PCR primer design

Fig. 5 The 1st PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

Fig. 6 The 2nd PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

Fig. 7 The 3rd PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

Fig. 8 PCR with genomic DNA

Fig. 9 Sequencing result (Barcode)

국문초록

MTD에 의한 세포 괴사 유도 유전자 발굴

박 정 희

지도교수 : 김 태 형

조선대학교 대학원 의학과

세포의 죽음은 여러 질병의 발생에 중요한 역할을 하며, 이에 대한 이해는 곧 질병의 이해, 극복과 맞닿아 있다. 근 20년여 동안 세포의 죽음에 대한 연구는 세포괴사와 세포사멸 중 후자에 초점이 맞추어져 있었으나, 최근 몇 년 동안 세포괴사의 신호전달 체계가 하나씩 밝혀져 가면서 이에 대한 인식이 바뀌어가고 있다. 본 논문에서는 강력한 세포괴사 유도물질인 MTD 펩타이드(Bcl-2 family protein인 Noxa 단백질의 C-terminal에 존재하는 10개의 아미노산으로 구성)가 어떻게 세포괴사를 일으키는지 알아내기 위한 그 첫 단계로, 어떠한 유전자들이 MTD에 의해 유발되는 세포괴사에 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 먼저 Lentiviral shRNA library system을 이용하여 MTD에 의한 세포괴사가 일어나지 않는 세포주를 확립하였고, 이들에게서 genomic DNA를 분리하였다. 이를 특정 primer를 사용하여 PCR하는 방법을 통해 어떤 유전자의 발현이 억제되었을 때 MTD에 의한 세포괴사가 일어나지 않는지를 알아보았는데, 실험결과 Neutrophil cytosolic factor 1(NCF1) 유전자를 찾아내었다. 이는 NADPH oxidase의 subunit으로 만성육아종증에서 이 유전자의 돌연변이가 관찰된다고 한다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 MTD에 의해 유도되는 세포괴사는 NCF1 유전자가 영향을 미치는 신호체계를 가진 것으로 보이며, 이에 대한 연구는 새로운 세포괴사의 모형을 만드는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 보인다.

ABSTRACT

Identification of the genes responsible for MTD-induced necrosis

Park, Junghee MD.

Advisor: Prof. Kim, Tae-hyoung, Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Cell death plays an important role in various disease developments. Thus, the understanding of cell death is really helpful for understanding of disease, and overcoming it. For recent 20 years, the research mainly focused on apoptosis, but not necrosis because necrosis has been regarded as a passive form of cell death. But nowadays, some studies have begun to reveal the signal pathways of necrosis and the focus has been moving to it. In this paper, I have used a model system, MTD (10 amino acids on the c-terminal of Noxa protein) induced necrosis to dissect the molecular mechanism of necrosis. To do so, the lentivirus-infected HeLa cells expressing shRNA libraries were generated, and were treated with R8:MTD; then the dead cells were removed. This process was repeated three times to establish the MTD-resistance cells. From the MTD-resistant cells, genomic DNA was extracted and used as templates for PCR to identify the shRNA expressed in MTD-resistant cells. The PCR products were cloned into pGEM-T easy cloning vector, and obtained 5 clones. From the sequencing results, 4 clones contained identical shRNA barcodes to knock-down NCF1 expression. NCF1 is a cytosolic subunit of neutrophil NADPH oxidase that has known to be activated to

produce superoxide anion, and mutations of this gene are associated with chronic granulomatous disease. Together, the result suggests that the necrosis induced by MTD peptides has a signaling pathway influenced by NCF1 gene expression.

서론

세포의 삶과 죽음은 우리의 삶과 매우 직접적으로 연관이 되어 있다. 특히 세포의 죽음은 여러 질병의 발생에 매우 중요한 역할을 하며, 이에 대한 이해는 곧 질병의 이해, 극복과 맞닿아 있다. 이와 같은 이유로 세포의 죽음에 대한 연구는 국내 뿐만이 아니라 국외에서도 활발하게 이루어지고 있다.

세포사 명명 위원회(the Nomenclature Committee on Cell Death)에서는 2012년도에 세포사의 생화학적 신호전달체계에 따라 세포사를 구분하였는데, 기본적인 세포사로는 Extrinsic apoptosis, Caspase-dependent and Caspase-independent intrinsic Apoptosis, Regulated necrosis, Autophagic cell death, Mitotic catastrophe가 있으며, Anoikis, Entosis, Parthanatos, Pyroptosis, Netosis 등의 세포사 형태도 제안하고 있다(*1*).

세포의 죽음을 세포의 형태에 따라서 구분해보면 크게 세포사멸(apoptosis), 세포괴사(Necrosis), 자가포식(Autophagy)이 있는데 자가포식은 그 의미를 세포의 죽음이 아닌 세포의 생존을 위한 방어기전으로 보는 견해들이 있어서 세포사의 한 종류로 인정하기엔 아직 논란의 여지가 있다(*2*).

근 20여년 동안 세포의 죽음에 대한 연구는 주로 세포사멸에 대해 이루어져 왔으며, 그 결과로 세포사멸에 대한 상당히 많은 부분이 밝혀져 있다(*1*). 반면에 세포괴사에 대한 연구는 이제 겨우 걸음마 수준이며, 신호전달체계에 대한 연구도 매우 제한적인 부분만 이루어져왔는데, 그 이유는 세포사멸은 외부의 신호에 따라 능동적으로 일어나는 현상으로 인식되고 있는데 반해 세포괴사는 단순히 물리적 충격이나 환경의 변화에 의한 수동적인 세포사의 형태로 인식되어 있었기 때문이다(*2*).

최근에는 이러한 널리 알려진 수동적인 accidental necrosis라는 개념에

regulated necrosis(Necroptosis)라는 개념이 더해지고 있는데, 현재 알려진 이러한 세포사의 예로, TNF-α에 의한 세포괴사 신호전달, Alkylating DNA damage에 의한 세포괴사, 세포사멸이 억제된 상황에서 일어나는 death ligand에 의한 세포괴사 등이 있다(*1*). 하지만 앞서 말했듯이 이들의 신호전달체계에 대한 연구는 매우 제한적으로 이루어졌으며, 최근에서야 TNF-α에 의한 세포괴사 신호체계의 일부분만이 밝혀졌을 뿐이다(*3, 4*).

MTD는 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있는 Noxa 단백질의 C-terminal에 존재하는 10개의 아미노산으로 구성되어 있는데 이는 Noxa가 미토콘드리아로 이동하는 것을 돕는다고 알려져 있었다(*5*). 그런데 최근 MTD가 단독적으로 세포괴사를 유도하며, 이는 10분 이내에 80%이상의 세포를 죽일 정도로 강력하다는 것이 알려졌다(*6*). 아직 어떠한 신호전달체계를 통해 이러한 현상이 일어나는지는 알려진 바가 없다. 하지만 어떠한 신호전달체계를 가지던 간에 이는, 이러한 세포괴사가 수동적으로 일어나는 것이 아니라 능동적인 신호전달에 의해서 일어나는 것이라는 개념을 더욱 지지하는 결과일 뿐만 아니라, 새로운 세포괴사 모델을 찾아낼 수 있는 가능성을 제시하고 있는 것으로 볼 수 있다.

이 논문에서는 MTD에 의한 세포괴사가 어떠한 신호전달체계를 통해서 이루어지는지 알아보기 위한 그 첫 단계로, 어떤 유전자가 MTD에 의해서 유발되는 세포괴사에 영향을 미치는지를 찾아내고자 하였다. 먼저 shRNA library screening system을 만들었는데 이는 Lentivirus를 이용한 것으로 감염시킨 세포가 shRNA를 갖게하여 유전자를 무작위적으로 억제시킬 수 있다(*7, 8*). 이렇게 만들어진 바이러스를 HeLa세포에 감염시켰고, Puromycin을 사용하여 shRNA를 가진 세포들만 살아남게 하였으며, 여기에 MTD를 여러번 처리하여 죽은 세포들을

제거하는 방법으로 MTD에 의한 세포괴사에 저항성을 가지는 세포주를 확립하였다. 이렇게 만들어진 세포주에서 genomic DNA를 추출하였으며 shRNA에 존재하는 특정 primer set을 이용하여 PCR을 시행하였다. 얻어진 DNA의 염기서열의 분석을 통해 NCF1이라는 유전자가 억제되어 있는 HeLa세포에서는 MTD에 의해 유도되는 세포괴사가 억제되는 사실을 관찰하였다. NCF1은 NADPH oxidase의 subunit으로 만성육아종증에서 이 유전자의 돌연변이가 관찰된다고 하며 이외의 특별한 연구결과는 보이지 않았다(*9, 10*). NCF1유전자가 어떠한 방법으로 세포괴사에 영향을 미치는지 아직은 알 수 없지만, 아직 알려지지 않은 신호전달체계를 통해서 세포괴사에 관여한다는 점은 확실한 것으로 보인다.

실험재료 및 방법

시약과 배지

Dulbecco’s modified Eagle's medium (DMEM)과 Fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin은 Gendepot에서 묶음으로 구매했으며 G418(Santa cruz)을 제외한 나머지 시약은 Sigma에서 구매하였다.

세포 배양 조건

자궁경부암세포인 HeLa 세포를 10% FBS, penicillin(100U/mL), streptomycin (100μg/mL)이 포함된 DMEM에서, 사람태아신장세포인 293GPG 세포를 10% FBS, penicillin(100U/mL), streptomycin(100μg/mL), tetracycline(1μg/mL), puromycin(2μg/mL), G418(0.3mg/mL)이 포함된 DMEM에서 37℃, 5% CO_2가 있는 조건으로 배양하였다. Tetracycline은 빛에 의해 분해되므로 293GPG 배양시에는 최대한 어두운 상태를 유지하였다.

Lentiviral shRNA libraries의 제작

- shRNA module의 구매

Cellecta를 통하여 DECIPER™ library를 구매하였다. 이들은 총 3개의 Human module로 구성되어 있으며, 각각 5043, 5412, 4922개의 유전자를 억제시킬 수 있다. 이들은 pRSI9-U6-(sh)-HTS3-UbiC-TagRFP-2A-puro에 클로닝되어 있으며, psPAX2와 pMD2.G와 함께 2nd generation lentiviral packaging system을 이용할 수 있다(*11*).

- Transfection과 바이러스 수확

Transfection을 할 세포는 293GPG 세포를 선택하였다. 이는 GAG와 POL 유전자가 이미 transfection되어있는 세포주이므로 Lentivirus를 만드는 데에 효율을 더 늘려줄 것으로 판단되었다. Transfection 방법은 $CaCl_2$를 이용하는 방법을 사용하였는데 HBS buffer(NaCl 8g, KCl 0.38g, Na_2HPO_4 0.1g, HEPES 5g, glucose 1g for 2XHBS 500mL)의 이상적인 pH를 찾기 위해 여러가지 pH의 HBS를 만든 후(6.5~7.2), pEGFP를 시험적으로 transfection해 보았다. 실험결과 pH 6.8인 HBS에서 가장 transfection이 잘되는 것으로 나타났으므로 이를 본 실험에 적용하였다. 먼저 shRNA library의 Human module 1 60μg, $psPAX_2$ 240μg, pMD2.G 60μg을 섞은 후 D.W를 이용하여 부피를 5mL에 맞춘 뒤 준비한 2X HBS 5mL을 섞었다. 여기에 600μL의 2M $CaCl_2$를 가한뒤 즉시 충분히 흔들어 섞어주었고 상온에서 20~25분 정도 놓아두었다. 293 GPG 세포는 100π dish의 70~80%정도 자랐을 때 사용하였는데 transfection 직전에 배지를 tetracycline이 없는 배지로 교체해 주었다. 시간이 지난 후 100π dish에 만들어진 HBS-DNA 용액 1mL를 천천히 골고루 섞어가면서 뿌려주었으며 다시 잘 섞은뒤 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후에 다시 새로운 tetracycline이 없는 배지로 갈아주었으며 48시간이 더 지난 후 배지를 50mL conical tube에 모았다. 이를 0.2μm 필터를 통해 거른 후 1mL EP(Eppendorf) tube에 분주하고 -80℃에 보관하였다. Human module 2,3 바이러스도 같은 방법으로 만든 후 냉동실에 보관하였다.

Virus infection

HeLa를 100π dish에 70%정도 키운 후에 infection을 시행하였다. Infection의 효율을 높이기 위해 Polybrene을 5μg/mL의 농도가 되도록 배지에 섞어 교체한 후 미리 꺼내놓은 바이러스 배양액을 천천히 떨어트리며 섞어주었다. 24시간이 지난 후

새로운 배지로 교체해 주었으며 48시간이 지난 후 selection을 시행하였다.

MTD 유도 세포괴사에 저항성을 갖는 세포주 확립

MTD에 의해 유도되는 세포괴사에 저항성을 가지는 세포주를 만들기 위해 약 2주간 MTD(8R:MTD-8개의 arginine을 붙여 미토콘드리아로 가게 만든 MTD)를 반복적으로 처리했으며(20μM 1회, 30μM 2회) , shRNA를 가지고 있는 세포들을 골라내기 위해 puromycin을 처리한 후(3μg/mL) 죽은 세포들을 제거하였다.

Genomic DNA의 분리

MTD에 의해 유도되는 세포괴사에 저항성을 갖는 세포를 Trypsin-EDTA를 이용하여 culture dish에서 분리하였고 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 이를 2mL의 Qiagen buffer P1으로 부유시킨 뒤 0.1mL의 10% SDS용액을 더하고 이를 5분간 상온에 유지시킨 뒤 총 5초간 Sonication(amplitude 20%, sonication 1sec, rest 9sec X5)하였다. 여기에 2mL의 Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v)을 가하고 vortexing 한 후 20분간 원심분리하였고 약 1.5mL의 수용액층을 얻어 내었다. DNA를 침강시키기 위해 isopropanol을 1.5mL 섞은 후 30분간 15000g로 원심분리하였으며 얻어진 DNA는 70% 에탄올로 세척 후 다시 원심분리하여 pellet을 얻어내었다. 얻어낸 DNA는 100μL의 증류수에 녹여 냉장보관하였다.

Polymerase chain reaction

- Primer design

원래 Lentiviral shRNA screening에 쓰이는 primer가 이미 만들어져 있지만 sequencing을 위해 만들어지지 않아서 얻고자 하는 DNA의 길이가 너무 짧은

이유로(106bp) 새로운 primer를 디자인하게 되었다. 단순히 길이를 늘리는 이유로는 한쌍의 primer를 모두 바꿀 필요가 없었으므로 역방향 primer만 수정하여 design하게 되었다. Primer 수정 후 예상되는 DNA의 길이는 각각 첫번째 PCR에서 507bp, 두번째 PCR에서 400bp가 되었다.

- Primer에 맞는 PCR환경 찾기

Primer를 새로 만들었으므로 이에 맞는 PCR 환경을 찾기위해 shRNA DNA를 주형 DNA로 이용하였다. 실험결과로 찾아낸 이상적인 PCR조건은 첫번째 PCR과 두번째 PCR에서 모두 1) 95℃ 5분 2) 94℃ 30초, 65℃ 30초 72℃ 30초 총20회 반복 3) 68℃ 2분 으로 나타났다.

- Sequencing

PCR을 통해 얻어진 DNA는 Promega 사의 T-easy vector를 이용하여 클로닝 한 후 DH5α에 transformation 한 후에 50개의 colony를 골라내고 plasmid DNA를 분리하여 sequencing 하였다.

Transformation

100μL의 DH5α에 1μL의 DNA를 넣고 섞어준 다음 얼음에 30분간 놓아두었다. 42℃에서 90초 동안 heat shock을 준 뒤 다시 얼음에 2분 정도 놓아둔 뒤, Tube에 1mL의 LB 배지를 첨가하여 37℃ 에서 45분 동안 배양시키고 이를 ampicillin을 첨가하여 만든 LB고체배지에 도말하여 37℃ 에서 밤새 배양하였다.

Plasmid DNA의 분리

37℃에서 배양한 세포를 1.5mL EP tube에 넣고 원심분리하여 침전시킨 뒤 상층액을 완전히 제거했다. Pellet에 Alkaline lysis solution 1(50mM glucose, 25mM Tris-Cl, 10mM EDTA) 100μL를 첨가하여 부유시키고 Alkaline lysis

solution 2 (0.2N NaOH, 1% SDS) 200μL를 넣고 5차례 조심스레 섞어준 뒤 1~2분간 얼음에 놓아두었다. 여기에 Alkaline lysis solution 3 (5M Potassium acetate, glacial acetic acid) 150μL를 넣고 얼음에서 5분간 정치하였다. 이를 15000g 에서 15분동안 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액 2배 부피의 100% Ethanol을 넣고 다시 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 상층액을 제거하고 실온에 보관된 70% Ethanol 500μL를 첨가한 후 원심분리하여 상층액을 완전히 제거하고 실온에서 건조시켰다. Ethanol이 모두 제거된 후 멸균된 증류수 50μL로 DNA를 녹였다.

결과

Transfection test

Transfection시의 이상적인 HBS buffer의 pH를 찾기 위해 293GPG 세포주에 pEGFP를 transfection해 보았다. 1차 실험에서 pH가 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2인 HBS를 각각 사용하였다. 실험결과 가장자리 값인 pH6.8의 HBS가 가장 좋은 효율을 보였으므로 2차 실험을 실시하였다. 2차 실험에서는 pH가 각각 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0인 HBS를 사용하였는데, 이 실험에서도 역시 pH 6.8의 HBS가 가장 효율적으로 나타났으므로 이후의 실험에서도 transfection시에 pH 6.8의 HBS를 사용하였다.

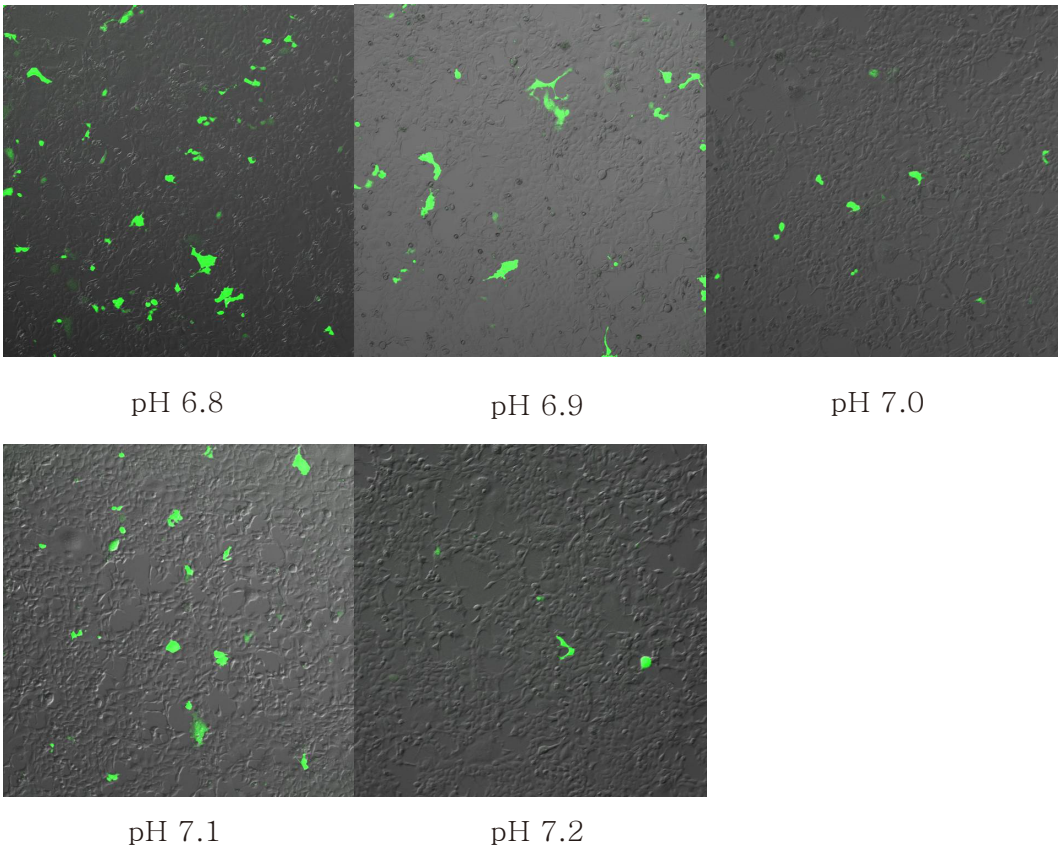


Fig. 1 The 1st transfection test

pEGFP vector was transfected on 293GPG cell line with different pH HBS buffers.

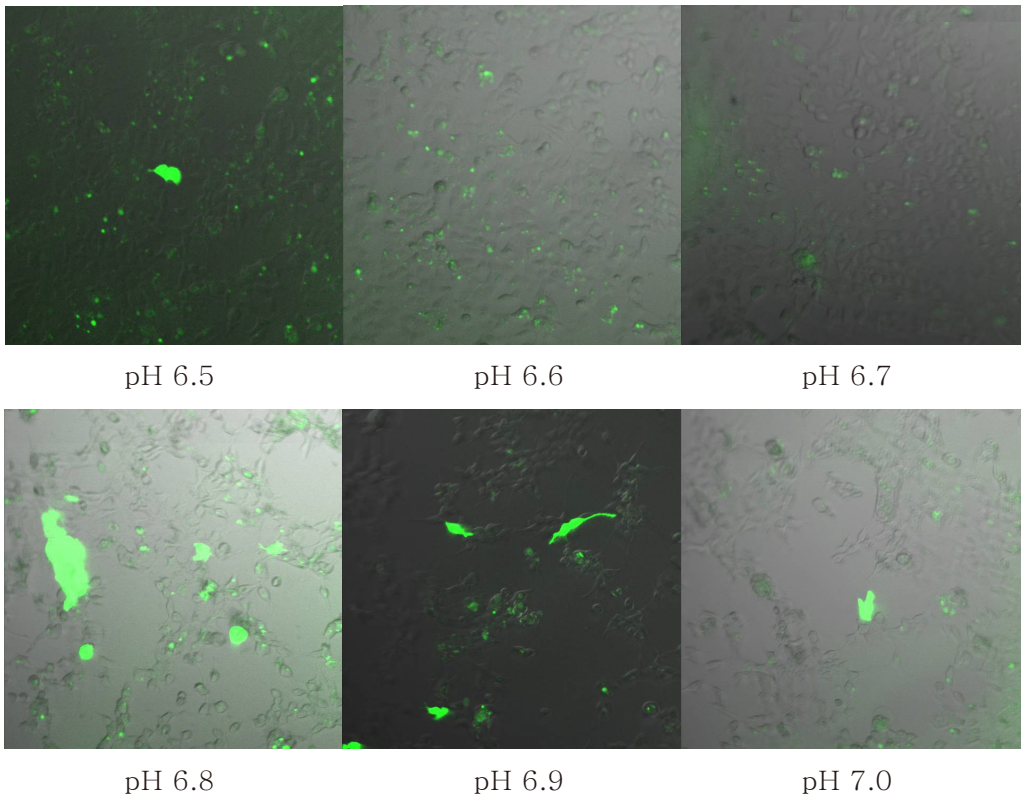


Fig.2 The 2nd transfection test

pEGFP vector was transfected on 293GPG cell line with different pH HBS buffers.

MTD 유도 세포괴사에 저항성을 갖는 세포주 확립

Preparation of lentiviral shRNA library.

앞의 실험으로 만든 pH 6.8의 HBS를 이용하여 293GPG 세포에 psPAX$_2$, pMD2.G 플라스미드와 shRNA library 플라스미드를 Transfection 하였다. 24시간 후에 배지를 교체해 주었으며, 48시간이 더 지난 후 배지를 수확하여 80℃에 보관하였다.

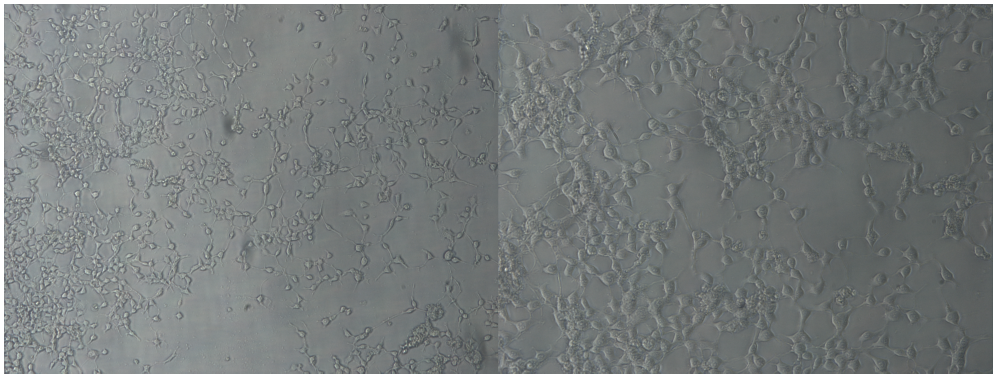
Virus infection

만들어진 바이러스는 HeLa세포에 감염시켰는데 selection을 시행하기 전에 Human module 2를 이용하여 만든 바이러스를 감염시킨 HeLa세포들이 모두 죽어버렸다. Human module 2를 이용하여 만든 바이러스의 감염능력이 너무 강해서 너무 많은 유전자들이 억제되어 생존하지 못한 것으로 생각되었다. 살아남은 Module 1과 3를 감염시킨 HeLa세포주를 이용하여 이후의 실험을 진행하였다.

MTD에 저항성을 갖는 세포주 확립

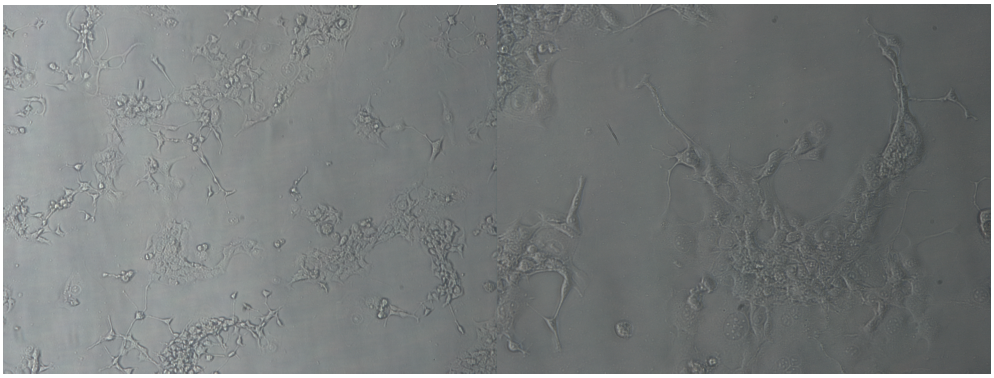
HeLa세포에 바이러스를 감염시킨지 72시간 후부터 selection을 시작하였다. 약 2주에서 3주에 걸쳐 MTD가 반복적으로 처리되었으며(20μM 1회, 30μM 2회), shRNA를 가지고 있는 세포들을 골라내기 위해 puromycin(3μg/mL)을 처리하였다.

(A) Human module 1



100X 200X

(B) Human module 3



100X 200X

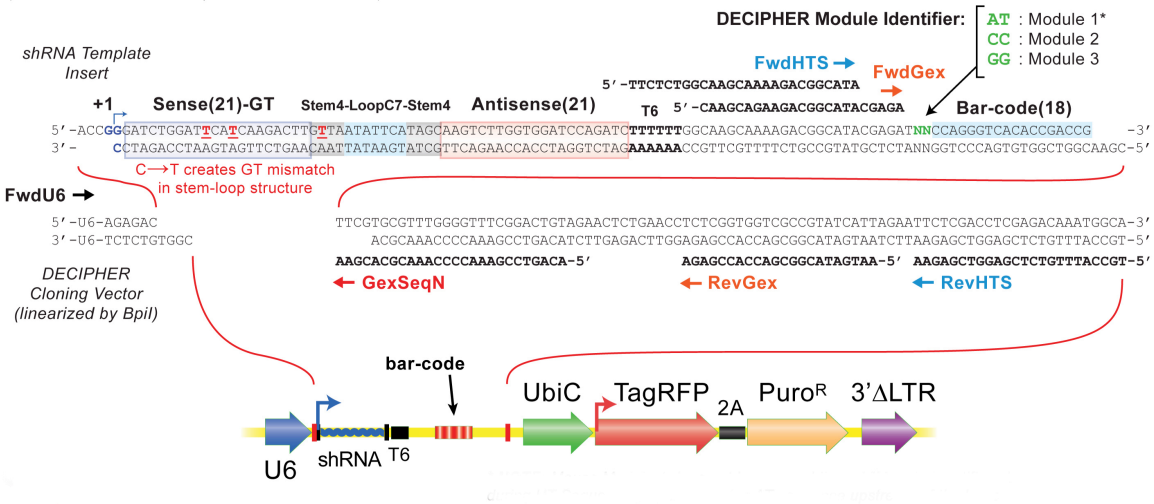
Fig.3 HeLa cell lines resistant to MTD-induced necrosis

HeLa cells were selected with MTD and puromycin. HeLa cells infected with human module 2 died before selection.

Polymerase chain reaction

MTD 유도 세포괴사에 저항성을 갖는 세포주를 만든 후 어떤 유전자가 억제되어 있는지를 알아보기 위해 genomic DNA를 분리하였다. 이를 PCR하기 위해 primer를 design하였고, shRNA가 클로닝 되어있는 플라스미드를 이용하여 PCR조건을 잡았다. 잡은 조건을 이용하여 PCR한 결과로 module 3 에서만 PCR된 DNA를 얻을 수 있었다.

(A)



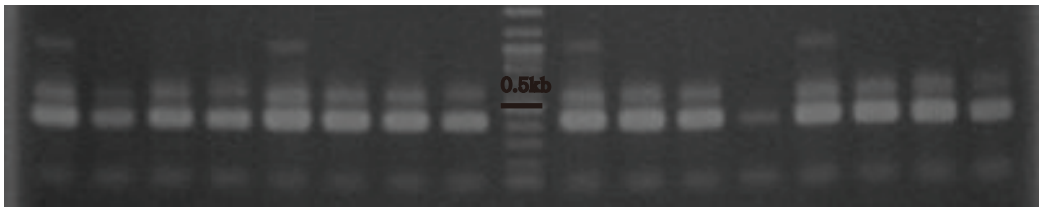
(B)

1851	gcatatacga	ta[caaggctg	ttagagagat	aattggaa]tt	aatttgactg	1900
1901	taaacacaaa	gatattagta	caaaatacgt	gacgtagaaa	gtaataattt	1950
1951	cttgggtagt	ttgcagtttt	aaaattatgt	tttaaaatgg	actatcatat	2000
2001	gcttaccgta	acttgaaagt	atttcgattt	cttggcttta	tatatcttgt	2050
2051	ggaaaggacg	aaacaccgga	gtcttctttt	tt{gaagac}ac	ttcgtgcgtt	2100
2101	tggggtttcg	gactgtagaa	ctctgaacct	ctcggtggtc	gccgtatcat	2150
2151	tagaattctc	gacctcgaga	caaatggcag	tattcatcca	caattttaaa	2200
2201	agaaaagggg	ggattggggg	gtacagtgca	ggggaaagaa	tagtagacat	2250
2251	aatagcaaca	gacatacaaa	ctaaagaatt	acaaaaacaa	attacaaaaa	2300
2301	ttcaaaattt	tcgggtttat	tacagggaca	gcagagatcc	actttggccg	2350
2351	ccgttcgaag	gcctccgcgc	cgggttttgg	cgcctcccgc	gggcgccccc	2400
2401	ctcctcacgg	cgagcgctgc	cacgt(cagac	gaagggcgca	gcgag)cgtcc	2450
2451	tgatccttcc	gcccggacgc	tcaggacagc	ggcccgctgc	tcataagact	2500
2501	cggccttaga	accccagtat	cagcagaa<gg	acattttagg	acgggacttg	2550
2551	gg>tgactcta	gggcactggt	tttctttcca	gagagcggaa	caggcgagga	2600

Fig.4 PCR primer design

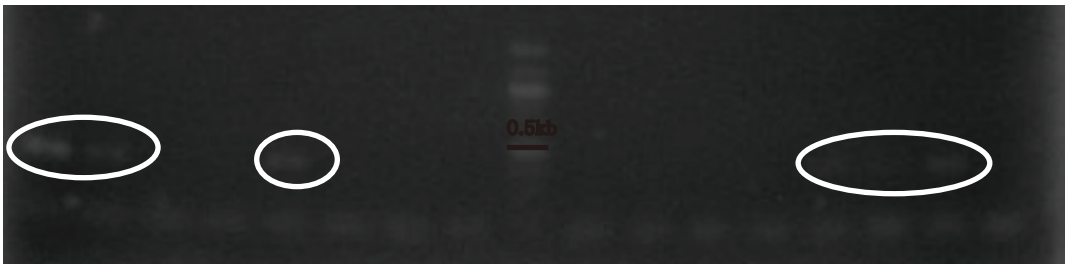
(A) shRNA was inserted with BpiI. Because the expecting DNA was too short (106bp) to check with gel electrophoresis, Only forward primers were used. (B) The sequence of pRSI-U6-(sh)-Ubic-TagRFP-2A-puro. Reverse primers were designed for longer PCR products. [] : hU6 primer cite {} : BpiI cloning cite () : primer for the 2nd round PCR <> : primer for 1st round PCR

(A)



5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 (pg)

58℃ 60℃ 62℃ 64℃



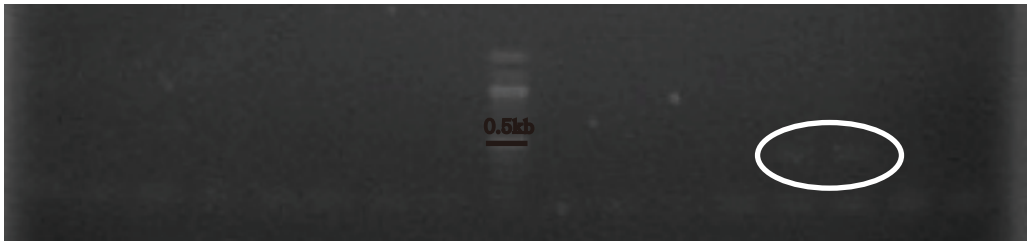
20 10 2 1 20 10 2 1 20 10 2 1 20 10 2 1 (fg)

58℃ 60℃ 62℃ 64℃

(B)

5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 5 1 0.5 0.1 (pg)

58℃ 60℃ 62℃ 64℃



20 10 2 1 20 10 2 1 20 10 2 1 20 10 2 1 (fg)

58℃ 60℃ 62℃ 64℃

Fig. 5 The 1st PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

There are the vector masses (pg,fg) for template and annealing temperatures of the 1st round PCR. Other conditions of the 1st round PCR : (A) 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles. (B) 1) denaturing in 94℃ for 1min 2) annealing for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles.

The conditions of the 2nd round PCR : (A) 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing in 65℃ for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles. (B) 1) denaturing in 94℃ for 1min 2) annealing in 65℃ for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles.

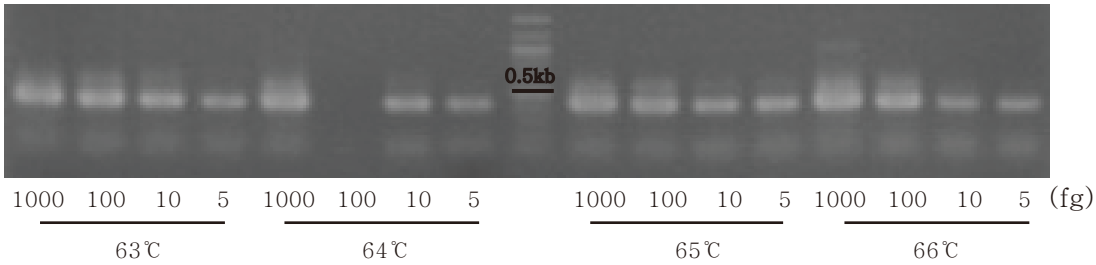


Fig.6 The 2nd PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

There are the vector masses (pg,fg) for template and annealing temperatures of the 1st round PCR. Other condition of the 1st round PCR is 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles. The condition of the 2nd round PCR is 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing in 65℃ for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles.

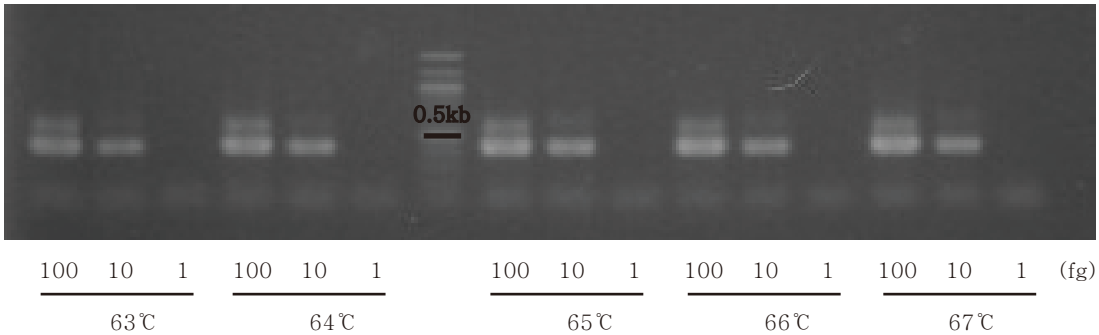


Fig.7 The 3rd PCR for ideal condition (2nd round PCR products)

There are the vector masses (pg,fg) for template(1st round) and annealing temperatures of the 2nd round PCR. The 1st round PCR condition is 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing in 65℃ for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles. The 2nd round condition is 1) denaturing in 94℃ for 30sec 2) annealing for 30sec 3) elongation in 72℃ for 30sec for 20cycles.

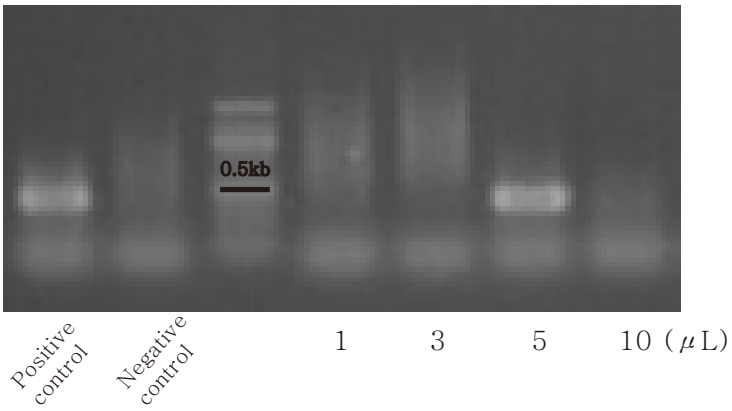
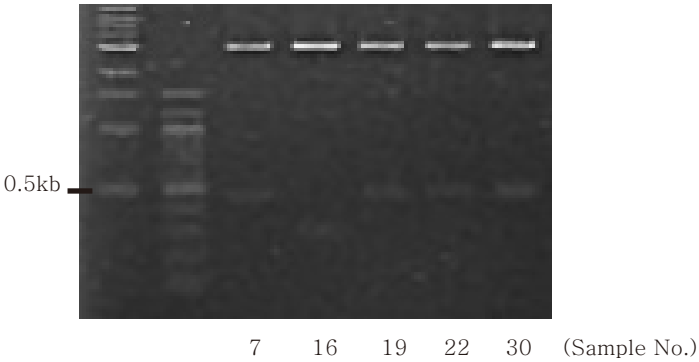


Fig. 8 PCR with genomic DNA

Only a band from Human module 3 was appeared. There was no band with human module1. (not displayed).

Sequencing result

PCR 후에 나온 DNA를 T-easy vector에 클로닝하였으며, 이를 transformation하여 50개의 colony를 골라내었다. 제한효소를 이용하여 확인해 본 결과 이중 5개 clone을 얻어낼 수 있었는데, 이들을 sequencing한 결과 4개의 clone에서 NCF1 유전자를 나타내고 있었고 나머지 하나는 특정한 유전자를 나타내지 못하고 있었다.



7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(***GGGTGTTGACGTTGCATGCA)***TTCGTG
16	TTCTCTGGCAAGCAAAAGACGGCATACTTCCTGCGGGACTTGGGGGACAT
19	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(***GGGTGTTGACGTTGCATGCA)***TTCGTG
22	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(***GGGTGTTGACGTTGCATGCA)***TTCGTG
30	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT(***GGGTGTTGACGTTGCATGCA)***TTCGTG

- 7, 19, 22, 30 : GGGTGTTGACGTTGCATGCA

=> NCF1C

- 16 : Non-specific

Fig. 9 Sequencing result (Barcode)

5 clones in T-easy vector got the bands. The sequencing result indicated that NCF1 gene is suppressed in the cells resistant to MTD-induced necrosis.

고찰

세포의 죽음에 대한 이해가 질병의 이해, 극복과 매우 밀접한 관련이 있음은 더이상 의심할 수 없는 사실이다. 세포의 죽음이 활발히 연구되던 최근 20년간은 세포사멸 연구의 기간이라고 말할 수 있을 정도로 세포사멸에 대해 집중적으로 활발한 연구가 이루어져 왔다. 하지만 세포괴사가 더이상 수동적인 세포의 죽음이 아닌 세포사멸과 같은 능동적인 신호에 의해 이루어지는 세포의 죽음이라는 증거가 하나둘씩 나타나고 있고 그 신호전달 체계에 대한 연구도 서서히 이루어지고 있는 단계이다. 우리는 세포사멸 연구를 진행하던 중 우연히 MTD라는 펩타이드가 targeting의 기능 외에 세포괴사를 강력히 유도하는 기능을 가진다는 사실을 알게 되었다. 이 역시 세포괴사가 능동적 신호전달 체계를 가진다는 커다란 증거 중에 하나이나, 그 전달체계 역시 전혀 연구된 바가 없었으므로 이를 수행하기 위한 첫 단계로 본 연구를 시행하게 되었다.

본 연구의 가장 큰 목적은 과연 어떤 유전자들이 MTD에 의해 유도되는 세포괴사에 영향을 미치는지 알아보는 것이었으며 이를 위해 임의의 특정유전자를 억제시킬 수 있는 shRNA library를 이용하였다. 이는 Lentivirus를 만들어 감염시키는 방법으로 HeLa 세포주에 적용되었고 그 결과로 MTD에 의한 세포괴사가 잘 일어나지 않는 HeLa 세포주에서는 NCF1이라는 유전자가 억제되어 있다는 사실을 알게 되었다.

NCF1유전자는 neutrophil NADPH oxidase의 subunit(47kDa) 단백질을 발현시킨다고 알려져 있으며 이 유전자의 돌연변이는 만성육아종증에서 나타난다고 한다. 만성육아종증은 식세포 작용으로 침입한 세균을 파괴시키는 백혈구 능력의 결함으로 생기는 병이며 특히 포도상구균과 대장균형 세균에 특히 민감해지게 된다. 이 외의 다른 특별한 기능이 보고된 바가 없는 것으로 보아 지금까지 세포의 죽음에 대해 연관되어 연구된 적은 없는 것으로 보인다. 여기서 추론해 볼 수 있는 점은 NCF1유전자가

세포괴사에 영향을 미치는 방법이 ROS를 형성하는 것과 어떤 관련이 있을까 하는 것인데 이를 확실히 하기 위해서는 더 많은 실험과 연구가 필요할 것으로 보인다. 만약 ROS의 형성과 세포괴사를 유도하는 신호체계가 서로 연관이 없는 다른 체계라고 할지라도 그 신호체계의 중요성이 감소하지는 않을 것이며 그럴경우 오히려 더 새로운 국면의 연구를 진행할 수 있을 것으로 보인다.

실험방법 상의 아쉬운 점은 MTD에 의한 세포괴사에 내성을 가지는 세포주에 임의의 유전자가 억제된 clone들이 섞여있다는 점이다. 이 논문의 실험 상에서는 어떠한 clone이 우세하게 살아남아 세포개수에서 우위를 점하고 있을 때 그렇지 못한 세포에 억제되어 있는 유전자가 어떤 것인지를 알아낼 수 없는 단점이 있다. 클로닝하여 나온 결과에서 4개의 clone이 모두 같은 유전자를 나타내고 있었다는 것으로도 이를 뒷받침 할 수 있다. 이를 극복하기 위하여 확보한 세포주를 세포 하나씩 분리하여 single colony로 만들어 클로닝을 진행한다면 위의 단점을 극복할 수 있을 것으로 보이며 영향을 미치는 유전자를 더 많이 찾아낼 수 있을 것으로 보인다.

앞으로 더 진행될 수 있는 연구로는 찾아낸 NCF1 유전자가 과연 MTD에 의해 유도되는 세포괴사에 어떻게 영향을 미치는 지에 대한 연구와, 위에 이야기한 대로 이 논문의 실험방법을 개량한 더 다양한 유전자를 찾기 위한 연구가 시행될 수 있을 것이다. 두 연구 모두 거의 연구된 바 없는 세포괴사의 신호체계에 대해 밝히고 그 예를 제시할 수 있다는 점에서 큰 의미가 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. L. Galluzzi *et al.*, Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* 19, 107 (Jan, 2012).
2. D. Denton, S. Nicolson, S. Kumar, Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell death and differentiation* 19, 87 (Jan, 2012).
3. W. J. Kaiser *et al.*, RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature* 471, 368 (Mar, 2011).
4. Y. Cho *et al.*, Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* 137, 1112 (Jun, 2009).
5. Y. W. Seo *et al.*, The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death. *The Journal of biological chemistry* 278, 48292 (Nov 28, 2003).
6. S. YW *et al.*, - The cell death-inducing activity of the peptide containing Noxa. *D - 2984705r*, T
7. C. J. Echeverri, N. Perrimon, High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nature reviews. Genetics* 7, 373 (May, 2006).
8. S. E. Martin, N. J. Caplen, Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annual review of genomics and human genetics* 8, 81 (2007).

9. O. Sareila, N. Jaakkola, P. Olofsson, T. Kelkka, R. Holmdahl, Identification of a region in p47phox/NCF1 crucial for phagocytic NADPH oxidase (NOX2) activation. *Journal of leukocyte biology* 93, 427 (Mar, 2013).

10. H. K. Gill *et al.*, Defining p47-phox deficient Chronic Granulomatous Disease in a Malay family. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 30, 313 (Dec, 2012).

11. J. Moffat *et al.*, A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283 (Mar 24, 2006).