

사이클로포스파마이드에 의해 퇴축된 흰쥐 가슴샘의 재생과정에서 cDNA꼬리표를 이용한 발현 유전자의 특성 분석

이건호¹, 이희우², 최희정¹, 민혜진¹, 백선용¹, 윤 식¹

¹부산대학교 의학전문대학원 해부학교실, ²서울대학교 수의과대학 수의과학연구소

(2014년 9월 23일 접수, 2014년 11월 20일 수정접수, 2014년 11월 28일 게재승인, Published Online 30 December 2014)

간추림 : 가슴샘은 T 세포가 생성되는 면역계의 중추 기관이다. 가슴샘 퇴축으로 인해 감소된 면역력을 회복시키기 위해서는 가슴샘 재생과정의 분자기작을 이해하는 것이 필수적이다.

가슴샘의 재생과정에서 발현되는 유전자들을 분석하기 위해서, 재생중의 가슴샘 cDNA 라이브러리를 구축하였고, 무작위적으로 700개의 클론들을 선별하여 630개의 cDNA꼬리표를 확보하였다. 이를 분석한 결과 알려진 유전자 486개 (78%), 알려지지 않은 유전자 125개 (19%) 그리고 새로운 유전자로 추정되는 cDNA 꼬리표들을 포함하여 미확인유전자 19개 (3%) 및 그 발현 빈도수를 확인하였다. 또한, 일반적인 기능별로 크게 6개의 범주로 나누어 분류할 수 있었는데, 세포 대사에 관련된 유전자가 44%, 신호전달에 관련된 유전자가 20%, 막수송에 관련된 유전자가 7%, 그리고 세포골격, 세포분열 및 방어기전에 관련된 유전자가 각각 2%를 차지하였다.

확보된 cDNA 꼬리표들 중 putative gene 01과 putative E2IG2 gene, musculin 및 osteoactivin 유전자의 발현이 가슴샘 재생과정에서 현저하게 증가한다는 사실을 확인하였다. Putative gene 01의 유전자를 동정하기 위해 전체 길이를 cDNA의 염기서열을 분석하였고, 이에 대한 열린읽기들을 확인하였다. 열린읽기들 분석결과로 얻어진 아미노산 염기서열을 상동성 조사 및 아미노산 정렬을 실시한 결과 미토콘드리아 ribosomal protein S4와 아주 높은 상동성이 있음을 확인하였다.

따라서 본 연구의 결과는 가슴샘재생의 분자기전을 이해하는 데 유용한 정보를 제공할 뿐만 아니라 가슴샘의 재생과 관련된 유용한 유전자를 발굴하는 데 기여할 수 있을 것이다.

찾아보기 낱말 : cDNA꼬리표, 가슴샘, 유전자 발현, 사이클로포스파마이드, 재생, 흰쥐

서 론

일차면역계(primary lymphoid system) 혹은 중추면역계(central lymphoid system)로 분류되는 가슴샘(thymus)은 T 세포의 발달, 분화 및 성숙이 일어나는 매우 중요한 장소이다. T 세포는 모든 면역 반응에서 가장 핵심적이고 중추적인 역할을 수행하는 세포이기 때문에 가슴샘은 여러 가지 질병으로부터 신체를 보호하기 위한 면역계의 중추 기관으로서 큰 의의를 지닌다. 성인에서 노화가 진행함에 따라 여러 장기들의 기능이 감소되는 데, 우리 신체에서 가장 빨리 퇴축(involution)이 일어

나는 장기가 바로 가슴샘이다. 그 결과 고령층에서 면역력이 감소하여 감염 및 종양 등 여러 질환에 대한 저항력이 낮아지게 되는 주된 원인이 될 수 있다. 하지만 매우 중요한 사실은 비록 가슴샘이 나이의 증가와 더불어 조금씩 퇴축되어 간다 할 지라도 질병에 이환 되지 않은 정상적인 성인에서도 상당한 부분의 가슴샘 실질 조직이 그대로 존재할 뿐만 아니라 T 세포 생산 기능을 활발하게 수행함으로써 신체의 면역기능을 조절하는 중추적인 역할을 계속 담당하고 있으며 노인에서도 가슴샘이 여전히 기능을 수행한다는 사실이다[1].

노화와 더불어 발생하는 생리적인 가슴샘 퇴축 외에도 나이와 관계없이 여러 가지 원인에 의하여 전 연령층에서 가슴샘 퇴축이 유발될 수 있다. 특히 소아, 청소년 및 장년층 즉 가슴샘의 생리적 퇴축이 본격적으로 진행되기 이전 시기에서 발생할 수 있는 비생리적 가슴샘 퇴축은 신체의 면역력을 비정상적으로 저하시켜

*이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자: 윤식(부산대학교 의학전문대학원 해부학교실)

전자우편: sikyoon@pusan.ac.kr

여러 가지 질환에 대한 감수성을 증가시키거나 이미 유발되어 있는 질환에 대한 치유 능력을 감소시킬 수 있으므로 매우 심각한 문제가 될 수 있다[2]. 항암화학제, 심한 스트레스, 방사선 조사, 부신피질호르몬, 부신피질자극호르몬, 성호르몬, 스테로이드계 약물, 미생물 유래 혹은 기타 각종 독성인자 그리고 여러 질환 특히 종양, 감염, 만성 소모성 질환 등 많은 인자들이 가슴샘의 비생리적 퇴축을 유발시킬 수 있다.

특히 후천성면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)과 같은 치명적인 질병을 가진 환자에서 가장 중요한 사인은 이 질환을 유발하는 사람면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)에 의한 CD4⁺ T 세포의 감염으로 인해 CD4⁺ T 세포의 수가 매우 감소되는 것이다. 따라서 후천성면역결핍증 환자에서 T 세포의 증식을 촉진시킬 수 있는 방법의 개발은 이 질환의 치료법을 개발하는 데 크게 기여할 수 있을 것이다. 또한 종양 환자에서 종양의 치료를 위해 가장 널리 사용되고 있는 항암화학요법이 가슴샘의 퇴축을 유발할 수 있으므로 항암요법을 받고 있는 환자들의 면역력이 저하될 수 있다. 그 결과 인체에서 암세포를 공격하는 데 관여하는 면역계의 항암면역기능이 감소될 수 있을 뿐만 아니라 감염과 같은 다른 질환이 유발될 가능성도 증가될 수 있으며, 그 외에도 당뇨병 등 만성소모성 질환에 이환된 환자들도 가슴샘의 퇴축으로 인해 면역기능의 장애가 초래될 수 있다[2]. 따라서 가슴샘 퇴축의 진행을 막고 가슴샘의 재생을 유도하거나 촉진시켜 면역력을 회복시킬 수 있는 방법을 개발하기 위해서는 가슴샘의 재생기전에 대한 이해가 매우 중요하다. 이전의 연구를 통해 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide, CY)를 이용하여 실험적으로 가슴샘 퇴축 및 재생을 유도할 수 있는 동물모델이 개발되었는데, 이 모델에서 급성 퇴축이 유발된 가슴샘은 시간이 지남에 따라 서서히 크기가 증가하여 약 2주 후에는 거의 정상 크기로 회복되는 특징을 나타내었다[3]. 따라서, 이러한 동물모델은 가슴샘 재생과정의 특성 및 분자기작을 연구하는 데 유용하게 이용되고 있다.

가슴샘은 가슴샘세포(thymocyte) 주위의 다양한 종류의 세포 및 세포바깥바탕질(extracellular matrix) 성분들을 통칭하여 가슴샘 미세환경(thymic microenvironment)이라고 하는데, 가슴샘세포는 이러한 가슴샘 미세환경과의 상호작용에 의해 증식, 분화 및 성숙단계를 거치게 되며, 가슴샘 미세환경을 구성하는 여러 성분들 중에서도 가슴샘상피세포(thymic epithelial cell)가 가장 주된 구성요소이다. 가슴샘상피세포와 가슴샘세포 사이의 상호작용에는 직접적인 접촉과 간접적인 상호작용을 들 수 있는데, 즉 가슴샘상피세포 표면에 존재하는 주요조직적합

항원복합체(major histocompatibility complex, MHC)와 가슴샘세포 표면에 있는 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 사이의 상호작용과 가슴샘상피세포에서 분비된 여러 종류의 인자들이 관여하는 간접적인 상호작용이 그 예라 할 수 있다. 가슴샘결질상피세포에서 발현되는 주요조직적합항원-펩타이드 복합체(major histocompatibility complex [MHC]-peptide complexes)는 가슴샘세포의 양성선택(positive selection)에 중요한 역할을 수행하고, 그리고 가슴샘속질상피세포는 가슴샘세포의 음성선택(negative selection)에 관여한다. 특히 가슴샘 상피세포 및 가슴샘세포에서 분비되는 다양한 인자들과 가슴샘세포 혹은 가슴샘상피세포에서 T 세포의 발달과 관련되어 발현이 조절되는 이들 인자들의 수용체는 가슴샘 상피세포가 T 세포의 발달에 영향을 미치는 중요한 기전이 될 것으로 간주되고 있다[4]. Hinton 등은 1형 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor type I, IGF-I)이 덱사메타손에 의해 퇴축이 유발된 가슴샘의 재생을 촉진한다는 사실을 밝혔다[5]. 최근 인터루킨-7(interleukin-7, IL-7)은 골수이식 후 T 세포 및 가슴샘의 재생을 촉진할 뿐만 아니라 노화로 인해 퇴축된 가슴샘을 재생시킬 수 있다는 사실도 보고되었다[6].

생명 현상의 여러 과정에 있어 중요한 역할을 하는 유전자를 탐지하기 위하여 여러 가지 실험 방법들이 이용되고 있는데, 이 중에서 cDNA꼬리표(expressed sequence tag, EST) 분석 기술은 다양한 생물종의 특정시기 및 조직으로부터 새로운 유전자를 발굴하기 위한 가장 일반적 방법으로 널리 이용되고 있으며, 유전자 발현 프로파일 분석에 매우 유용하고 cDNA꼬리표 대량분석을 통한 데이터베이스 구축은 생물체 계층 연구를 완성하기 위한 정보 제공뿐만 아니라 유전체 기능 연구를 위한 기초정보로도 활용가치가 매우 크다[7].

그러므로 가슴샘 재생과정에 대한 기전을 이해하기 위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 가슴샘 및 T 세포가 활발히 재생되는 실험모델을 이용하여 재생중의 가슴샘 cDNA 라이브러리를 구축하고 cDNA꼬리표 분석 방법을 이용하여 가슴샘의 재생과정에서 발현되는 유전자들의 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 200~250 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 사용하였다. 생후 약 2개월된 특정병원성미생물부재(specific pathogen free; SPF) 상태의 건강한 흰쥐(Dae-

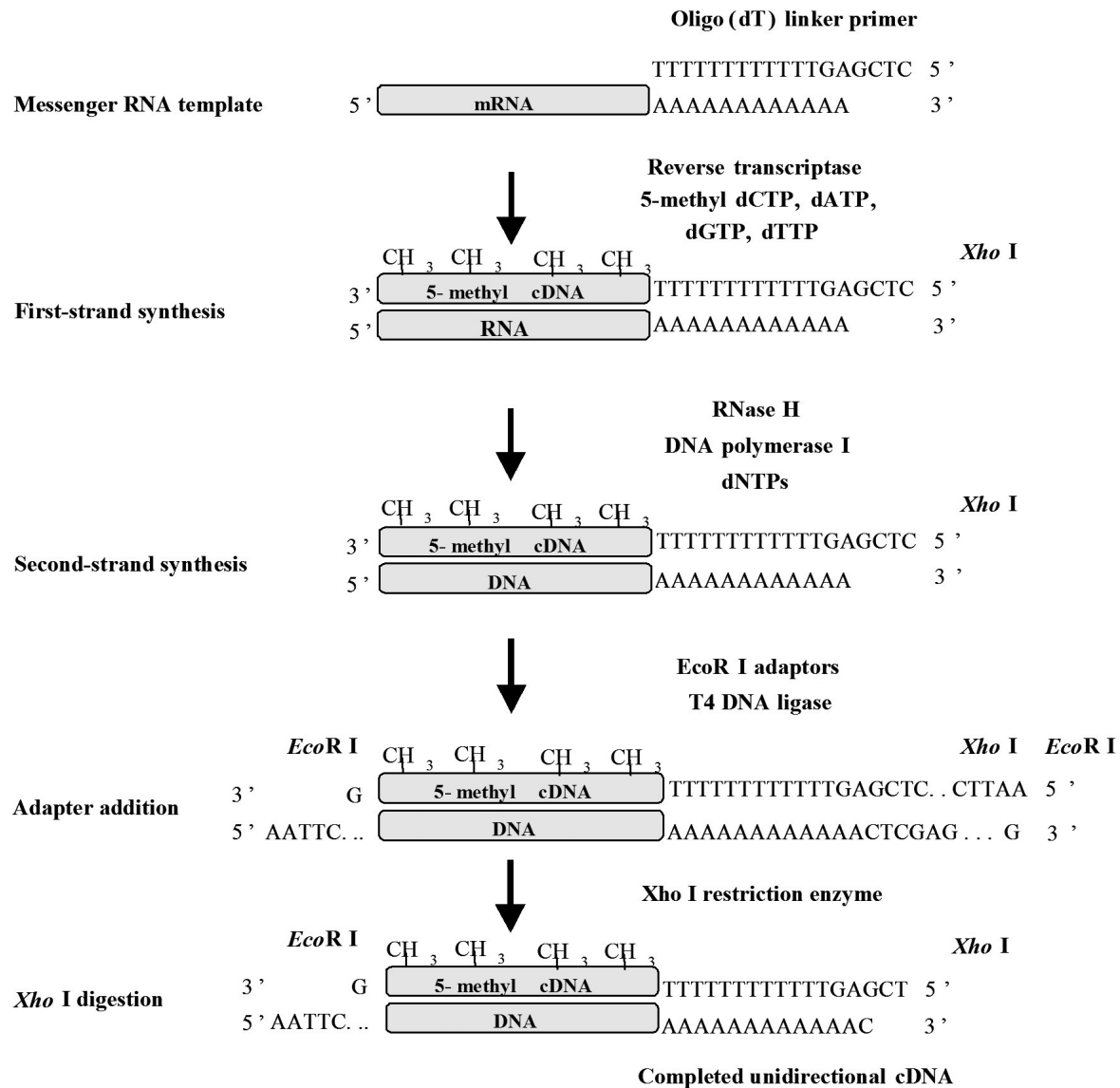


Fig. 1. Flowchart of cDNA synthesis.

han Biolink, Seoul, Korea)에 150 mg/kg 농도의 CY (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 투여하여 가슴샘의 퇴축을 유발시킨 다음 3일, 1주 및 2주 후에 가슴샘을 절취하였다. 절취한 가슴샘의 조직은 액체질소에 보관하였다.

2. 방법

1) 핵산 분리 및 cDNA 라이브러리 구축

CY 투여 후 3일 및 7일째의 재생중의 가슴샘 조직에서 위해서 RNeasy키트 (Qiagen, Valencia, MA, USA)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 그 후 mRNA 분리

키트 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 전체 RNA로부터 mRNA를 추출하였다. 모든 방법은 제조사의 권고에 따라 실시하였다. 회수한 mRNA는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. cDNA 합성은 cDNA 합성키트 (Stratagene)를 사용하였으며, cDNA 합성 과정의 원리는 Fig. 1에서 도식화하였다. 첫번째가닥 (first-strand) cDNA 합성에 사용된 프라이머는 아래의 염기서열을 가진 50염기의 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)를 사용하였고, “GAGA” 서열 (sequence)은 *Xho* I 제한효소 인식부위를 보호하기 위해 부착되었다. 뉴클레오타이드 혼합물 (nucleotide mixture)에는 dATP, dGTP, dTTP 및 5-methyl dCTP가 포함되어 있었는데, 5-methyl

dCTP는 첫번째가닥 cDNA 합성에서 각 시토신(cytosine) 염기에 메틸기(methyl group)를 형성시켜 클로닝 과정에서 제한효소로부터 cDNA를 보호하기 위하여 사용되었다. 두번째가닥(second cDNA) 합성과정에서 cDNA의 무딘말단(blunt end)에 부착시킨 *EcoR* I 어댑터의 염기서열은 5'-OH-AATTCGGCACGAGG-3'과 3'-GCCG TGCTCCp-5' 이었다.

그 후 cDNA 합성키트(Stratagene)를 이용하여 제조사의 권고 방법에 따라 제1차 및 제2차 cDNA 가닥을 합성하였고, 클로닝을 위한 말단 조작 제한효소 처리, 합성 cDNA 길이의 선택 분리(>400 bp) 및 λ -Uni-ZAP-XR 벡터(Stratagene)와의 융합 반응을 실시하였다. Gigapack III Gold packaging extract(Stratagene)를 이용하여 시험관내포장(in vitro packaging)을 수행한 후 1차 라이브러리의 역가를 측정하고 RecA-*E. coli* host strain XL1-Blue MRF'를 이용하여 증폭된 라이브러리를 구축하였다. ZAP-cDNA 합성키트에서 제공하는 ExAssist™ interference-resistant helper phage는 *E. coli* 균주인 SOLR™ 세포를 숙주균주로 사용하였다. 따라서, Gigapack III Gold packaging extract를 이용하여 pBluescript SK (-) phagemid 벡터(Stratagene)로의 생체내포장(in vivo excision)을 실시하였다. ZAP-cDNA 클론으로부터 cDNA 인서트를 확인하기 위해서, 7.5 μ L의 플라스미드(0.5 μ g), 1 μ L의 *EcoR* I (12 U/ μ L), 0.5 μ L의 *Xho* I (40 U/ μ L)와 1 μ L의 제한효소 Multi-CORE 버퍼(Stratagene)를 첨가하여 혼합하고 37°C에서 4시간 반응시켰다. 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 cDNA 인서트의 크기를 확인하였다.

2) cDNA꼬리표 분석

cDNA 인서트의 크기가 확인된 플라스미드들을 대상으로 염기서열을 분석하였다(Bioneer, Daejeon, Korea). Genebank의 블라스트 서치 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하여 상동성 조사를 통해 각각의 cDNA들을 분석하였다. Genebank 및 ORF/CDS 데이터베이스와 단백질관련 데이터베이스인 SWISS-PROT(<http://www.expasy.org>) 검색 프로그램을 이용하여 알려진 유전자(known gene)들과 알려지지 않은 유전자(unknown gene)들을 분류하였다. 데이터베이스 검색을 통해 기능이 밝혀진 유전자들을 조사하고 가슴샘 재생과 관련될 것으로 추정되는 후보 유전자와 아직 기능이 밝혀지지 않은 새로운 유전자를 선별하였다.

3) 가슴샘세포 및 가슴샘 버팀질세포의 분리

정상 및 재생중의 흰쥐 가슴샘으로부터 가슴샘을 절취하여 세포배양용 접시에 올려두고 수술용 가위로 2~3 mm 간격으로 잘게 잘랐다. 자른 조직을 30 mL의

RPMI1640 (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 배지가 첨가된 용기에 넣고 자석교반기를 이용하여 4°C에서 40~50분간 혼합하였다. 조직의 조각들을 정착시킨 후 상등액과 조직의 조각들을 분리하여 따로 회수하였다. 가슴샘세포를 분리하기 위해서, 회수한 상등액을 125, 106 및 70 μ m 메시에 순차적으로 통과시켰다. 원심분리하여 상등액을 제거하고 20 mL의 ACK lysis 용액(0.15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0.1 mM Na_2EDTA)을 첨가하여 적혈구를 제거하였고, HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution, GIBCO/BRL)에 세 번 씻어주었다. 원심분리하여 가슴샘세포를 회수한 다음 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Life Technologies) 30 mL에 부유시켜 세포수를 측정하였다. 가슴샘버팀질세포(thymic stromal cell)를 분리하기 위해서, 남겨진 조직의 조각들을 10 mL의 RPMI1640 배지가 들어있는 세포배양용 접시에 옮기고 피펫을 사용하여 여러 번 혼합하였다. 원심분리하여 조직 조각들을 정착시키고 상등액을 회수하였다. RPMI1640 배지에 0.125% (w/v) collagenase D (Roche, Mannheim, Germany)와 0.1% (w/v) DNase I(Roche)이 포함된 효소반응액 5 mL을 첨가하여 조직의 조각들과 혼합하면서 37°C에서 15분간 반응시켰다. 파스퇴르 피펫을 이용하여 여러 번의 혼합을 통해 조직의 조각들을 잘게 풀어주고, 풀리지 않은 조각들을 정착시킨 다음 상등액을 새 튜브에 회수하였다. 남아있는 응집된 조각들에 5 mL의 효소반응액을 첨가하여 혼합하면서 37°C에서 15분간 반응시켰다. 5 mL의 주사기와 18G, 21G 및 23G 주사바늘을 순차적으로 사용하여 조직을 완전히 풀어주고 원심분리하여 상등액과 침전물을 회수하였다. 2차 효소처리반응을 하기 위해서, 회수한 침전물에 다시 RPMI1640 배지에 0.125% (w/v) collagenase D와 0.1% (w/v) DNase I이 포함된 효소반응액 5 mL을 첨가하여 조직의 조각들과 혼합하면서 37°C에서 15분간 반응시켰다. 5 mL의 주사기와 18G, 21G 및 23G 주사바늘을 순차적으로 사용하여 조직을 완전히 풀어주고 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물을 회수하였다. 이러한 효소처리과정을 5차까지 실시하여 상등액을 회수하였다. 3~5차 효소처리과정에서 회수한 상등액을 106 μ m 메시에 통과시키고 HBSS에 세 번 씻어주었다. 원심분리하여 가슴샘 기질세포를 회수한 다음 DMEM 30 mL에 부유시켜 세포수를 측정하였다.

4) 역전사중합효소연쇄반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

정상 및 재생중의 흰쥐로부터 얻어진 각 가슴샘 조직 샘플에서 분리된 2 μ g의 전체 RNA를 주형으로 사용하

Table 1. The sequence of PCR primers used in this study

Symbol	Gene name	GenBank accession No.	Primer sequence	Size (bp)
	Putative gene 01		FP : 5'- CAGGACAAGACTCGCTAGGC -3' RP : 5'- TTTGCTCCTCAAGCTACGCA -3'	513
	Putative E2IG2 gene		FP : 5'- TGTCAACCTCAGTCCCACAA -3' RP : 5'- GGCTTGCTCTTCCCTCCTCT -3'	264
Msc	Musculin	NM_001191754.1	FP : 5'- GTGAGTGACCCCGAAGACTC -3' RP : 5'- CAGTCTGGAGAAGGCTTTGC -3'	360
Gpnmb	Osteoactivin	AF184983.2	FP : 5'- CCAATTACGTGGCTGGTCTT -3' RP : 5'- CTGGGACATGGTCACGAATA -3'	349
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AF106860	FP : 5'- CAACTCCCTCAAGATTGTACGC -3' RP : 5'- GGGAGTTGCTGTTGAAGTCACA -3'	449

여 0.5 μ g의 oligo (dT) 12-18 (Gibco Life Technologies)와 1 μ L의 10 mM dNTP 혼합액을 혼합하고 65°C에서 5분간 반응시켰다. 4 μ L의 5x 첫번째가닥 버퍼, 2 μ L의 0.1 M DTT와 1 μ L의 RNase 저해제 (40 U/ μ L)를 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시켰고, 1 μ L의 M-MLV 역전사 효소 (reverse transcriptase, Gibco Life Technologies, 200 U/ μ L)를 첨가하여 37°C에서 50분간 반응시켰다. 70°C에서 15분간 반응시키고 1 μ L의 RNase H (4 mg/mL)를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 본 연구에서 역전사중합효소연쇄반응 분석을 실시한 유전자는 putative gene 01, putative E2IG2 gene, musculin, osteoactivin 및 GAPDH이었으며, 이들 유전자에 특이적인 프라이머의 염기서열을 결정한 후 (Table 1), 프라이머 합성은 바이오니아사에 의뢰하여 제작하였다. 첫번째가닥 cDNA를 주형으로 사용하여 5 μ L의 10x PCR reaction 버퍼, 1 μ L의 10 mM dNTP mix, 1.5 μ L의 50 mM MgCl₂, 1 μ L의 순방향 및 역방향 프라이머 (10 pmol/ μ L)와 0.5 μ L의 Taq DNA polymerase (5 U/ μ L)를 혼합하였다. 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 다음 putative gene 01, putative E2IG2 gene, musculin 및 osteoactivin 유전자는 94°C에서 1분, 57°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간 30회 (GAPDH 유전자는 25회) 반복하고 72°C에서 10분간 반응시켰다. 1.5% 아가로즈겔 전기영동을 통해 생성된 DNA를 확인하고 이미지 분석 프로그램 (Metamorph, Nashville, TN, USA)을 이용하여 DNA 밴드의 광학적 강도 (optical intensity)를 확인하였다.

결 과

본 연구에서는 가슴샘 재생과정 동안에 발현되는 다양한 유전자를 확인하기 위해서, 흰쥐 가슴샘의 퇴축을 유발한 후 재생과정중의 가슴샘으로부터 cDNA 라이브

Table 2. Results of expressed sequence tag sequences for regenerating thymus library

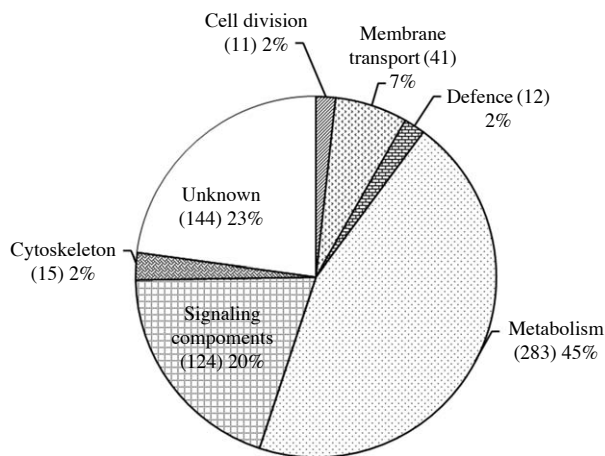
Library	Number of clones	Percentage (%)
Total number of gene cluster	630	100
Known genes	486	78
Unknown genes	125	19
Unidentified genes	19	3

러리를 제작하였고, 800여 개의 cDNA 클론들을 임의적으로 선택하여 400 bp 이상의 크기를 가진 700여 개의 cDNA 클론들만 선별하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 반응 결과, 제대로 읽을 수 없었거나 벡터의 염기서열 등을 제외한 630개의 cDNA 꼬리표들을 분석하였다. cDNA 꼬리표들의 데이터베이스 분석은 GenBank에 등록되어 있는 유전자들의 상동성 조사를 위한 프로그램으로 검색속도가 빠르고 그 결과가 통계값 (P-value: 값이 클수록 임의성 큼)으로 출력되는 블라스트 프로그램을 사용하였다. cDNA 꼬리표 염기서열의 분석결과, 알려진 유전자 (known gene)들이 486개로 전체의 78%를 차지하였고, 알려지지 않은 유전자 (unknown gene)들이 125개로 전체의 19%를 차지하였다 (Table 2). 그 외에 새로운 유전자 (novel gene)일 수도 있는 cDNA 꼬리표들을 포함하여 확인되지 않은 유전자 (unidentified gene)들이 19개로 3%를 차지하였다 (Table 2).

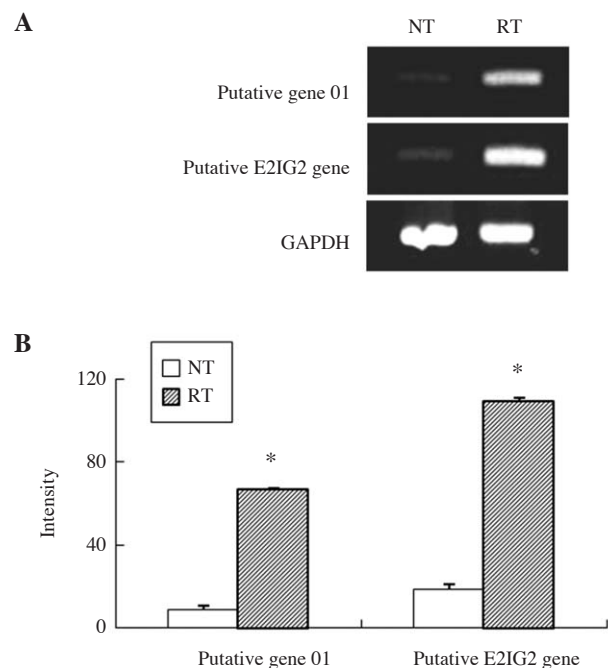
흰쥐 가슴샘 재생과정에서 발현된 cDNA 꼬리표를 분석하여 이에 대한 후보유전자를 출현빈도 순으로 Table 3에서 열거하였다. 630개의 cDNA 꼬리표들 중에서 가장 높은 빈도수를 보이는 것은 미토콘드리아 단백질인 solute carrier family 25, member 4로서 8회 나타났고, breast carcinoma amplified sequence 1이 6회, cAMP-regulated phosphoprotein 21 transcript variant 1, cyclin G1 및 heatshock protein 9가 각 5회, ring finger protein 111, NLR family apoptosis inhibitory protein 6, TM2 domain

Table 3. Abundant expressed sequence tags in regenerating thymus

Rank	Putative identification		GenBank accession No.	No. of ESTs
	Symbol	Gene name		
1	Slc25a4	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4	NM_053515.1	8
2	Bcas1	Breast carcinoma amplified sequence 1	NM_145670.4	6
3	Arpp21	cAMP-regulated phosphoprotein 21, transcript variant 1	NM_001135046.1	5
3	Ccng1	Cyclin G1	NM_012923.2	5
3	Hspa9	Heat shock protein 9	NM_001100658.2	5
6	Rnf111	Ring finger protein 111	NM_001106836.1	4
6	Naip6	NLR family, apoptosis inhibitory protein 6	XM_008760697	4
6	Tm2d2	TM2 domain containing 2	NM_001017444.1	4
6	Dhfr	Dihydrofolate reductase	NM_130400.2	4
6	Eef1a1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	NM_175838.1	4
6	LOC683463	similar to paired-Ig-like receptor B	XM_006228060.1	4
6		Putative ubiquitin specific peptidase 33		4
6	Srsf1	serine/arginine-rich splicing factor 1	NM_001109552.2	4
6	Tmsb4x	Thymosin beta-4, X chromosome	NM_031136	4
6	Dpagt1	dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1	NM_199388	4

**Fig. 2.** Functional classification of proteins encoded by the cDNAs of expressed sequence tags. The deduced proteins were grouped into 6 functional categories based on sequence similarity with proteins of known function. The fraction of the 630 expressed sequence tags corresponding to the respective categories is indicated.

containing 2, dihydrofolate reductase, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, similar to paired-Ig-like receptor B, putative ubiquitin specific peptidase 33, serine/arginine-rich splicing factor 1, thymosin beta-4 X chromosome 및 dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminephosphotransferase 1이 각 4회 나타났다 (Table 3). 또한 흰쥐 가슴샘 재생과정에서 분석한 cDNA 코리표들은 후보유전자의 동정 (putative gene identification)을 근거로 세포의 일반적인 기능별로 크게 6개의 범주로 나누어 분류하였다 (Fig. 2). 그

**Fig. 3.** Comparative RT-PCR analysis of putative genes in normal thymus (NT) and regenerating thymus (RT) of 3 and 7 days after cyclophosphamide treatment. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of co-amplified putative gene 01, putative E2IG2 genes and GAPDH. (B) The density of each band in each lane was quantitated by scanning densitometry and then expressed as mean+SD. Data are expressed as ratios of putative gene 01 and putative E2IG2 genes mRNA normalized to GAPDH mRNA. Samples from the regenerating thymus exhibit significant up-regulation of putative gene 01 and putative E2IG2 genes mRNA expression compared with those of the normal control; * $P < 0.05$ compared with the corresponding control value, as determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Scheffe's *post hoc* test.

```

GCTCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGCAACGTGCTCTCA 60
GCTTCTCGGGCTTTTCTCCATCATGGTGCAGGAAGCTTAAGTTCCATGAGCAGAAGCTGCTG 120
      M V R K L K F H E Q K L L

AAACAGGTGGACTTCCTAAACTGGGAAGTACCGACCATAACCTTCACGAGCTGCGCGTA 180
K Q V D F L N W E V T D H N L H E L R V

CTGCGACGGTACGGGCTCCAGCGGGCGGAGGAGTACACACGCTACAACCAGCTGAGCCGG 240
L R R Y G L Q R R E E Y T R Y N Q L S R

GCCGTGCGCGAGCTGGCGCGGCGCCTGCGCGACCTGCCGGAACGCGACCCGTTTCGCGTT 300
A V R E L A R R L R D L P E R D P F R V

CGCGCCTCGGCGGCGCTGTTGGACAAGTTGTACGCTCTGGGCTGGTGCCACGCGCGGC 360
R A S A A L L D K L Y A L G L V P T R G

TCACTAGAACTCTGCGACTCCGCTCTCCGCTCTGCTCTTTTGCCGCCGCCGCTTGCTACT 420
S L E L C D S V S A S S F C R R R L P T

TTGCTCCTCAAGCTACGCATGGCACAGCATCTCCAGGCTGCTGTGGCTTTTGTTGGAGCAG 480
L L L K L R M A Q H L Q A A V A F V E Q

GGTCACGTCCGCGTGGGCCCAGACGTGGTACCGATCCCGCCTTTCTGCTCACTCGCAGC 540
G H V R V G P D V V T D P A F L V T R S

ATGGAAGACTTTGTACCTGGGTGGACTCATCCAAGATGAAGCGGCACGTGTTGGAGTAC 600
M E D F V T W V D S S K M K R H V L E Y

AATGAGGAGCGCGATGACTTTGATCTTGATGCCTAGCGAGTCTTGTCTTGTTCCTCAGC 660
N E E R D D F D L D A *

TACAGGTCACTGAACCGGGGATGGGGAGAATCGCCTCTGTGTTCCGGGAAATTTTCTTAG 720
AATTTGGACTGACAATTGACTGTGTCTTGAGAGACAGTGGGAAGCAGTTTTTACTGCTCT 780
GGGACTGTTAGCTTCTTGTACCTTAACTGTGGTGTAGAAGCAGGAATGTTACCTCTTC 840
CCTTCTTTGCTTTATCATCGTGAATAGAACAGATGGAGAGTTTGAGTTTATTTATTTA 900
TACCATTAAAGAAATCCTTTCTAATGCCAATAAATGTCCCGACCACGTTGTTTAAAAAA 1020

```

Fig. 4. Nucleotide and predicted amino acid sequence of rat putative gene 01. The sequences that are underlined with a single line represent the sequences surrounding a possible translation initiation start (nucleotides 82-84) and stop signals (nucleotides 635-637).

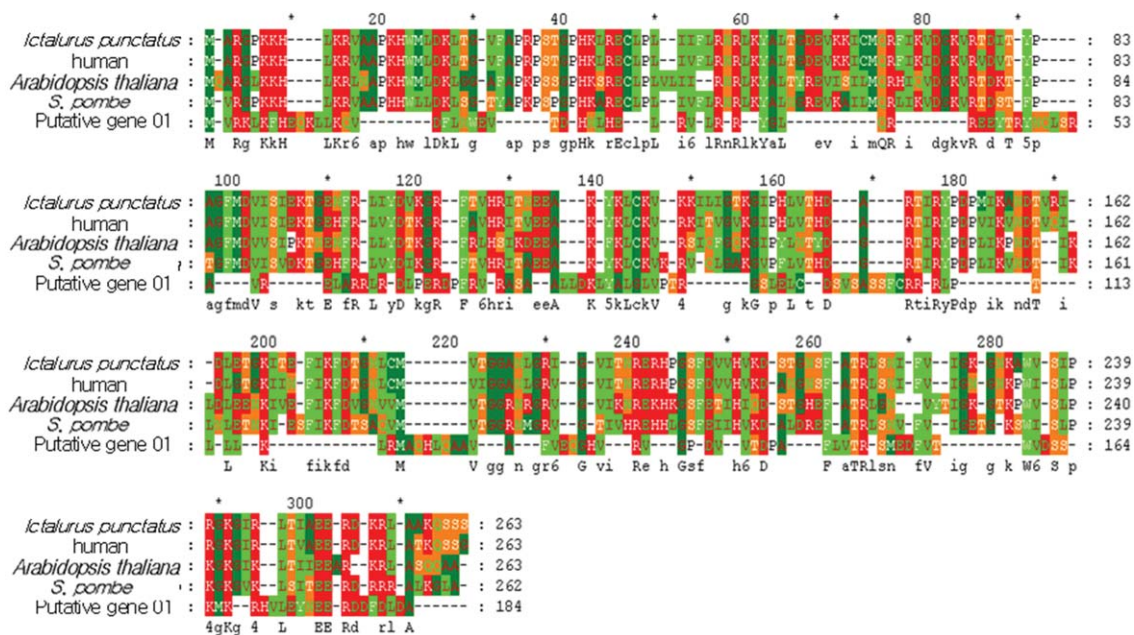


Fig. 5. Multiple alignment of putative gene 01 deduced amino acid sequence and 40S ribosomal protein S4 of *Ictalurus punctatus*, human, *Arabidopsis thaliana* and *Shizosaccharomyces pombe*. Sequences were obtained through a BLAST search and aligned using the CLUSTAL multiple-alignment program.

결과, 630개의 cDNA 꼬리표들 중에서 일반적인 세포 대사에 관련된 유전자가 44%로 가장 많은 비중을 차지하였고, 신호전달에 관련된 유전자가 20%, 막 전달수송에 관련된 유전자가 7%, 그리고 세포골격, 세포분열 및 방어기전에 관련된 유전자가 각각 2%를 차지하였다(Fig. 2).

cDNA꼬리표들 분석결과로부터 얻어진 유전자 염기서열로부터 상동성 조사를 실시하여 확인한 결과 DNA 염기서열은 Genebank에 등록되어 있지만, 그 유전자에 대해서는 전혀 알려지지 않은 두 개의 후보유전자(putative gene)인 putative gene 01과 putative E2IG2 gene의 유전자를 확인할 수 있었다. 이 두 유전자의 발현을 역전사중합효소연쇄반응 방법을 이용하여 분석한 결과 정상 가슴샘에서보다 재생과정의 가슴샘에서 발현이 현저하게 증가하였다(Fig. 3). Putative gene 01의 유전자를 동정하기 위해서, 전체 길이(full length) cDNA의 염기서열을 분석하였고, 열린읽기틀찾기프로그램(<http://darwin.bio.geneseo.edu/~yin/Webgene/protein.html>)을 이용하여 분석한 염기서열로부터 열린읽기틀(open reading frame, ORF)을 확인하였다(Fig. 4). 열린읽기틀 분석결과로 얻어진 아미노산 염기서열을 다시 단백질관련 데이터베이스를 이용해 상동성 조사 및 아미노산 서열 정렬(sequence alignment)을 실시한 결과 사람(human), 분열효모(*Schizosaccharomyces pombe*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 찬넬메기(*Ictalurus punctatus*)의 미토콘드리아 ribosomal protein S4와 아주 높은 상동성이 있음을 확인하였다(Fig. 5). 그래서, cDNA꼬리표 분석결과로 얻어진 putative gene 01을 동정한 결과 흰쥐의 후보 미토콘드리아 ribosomal protein S4 유전자에 해당될 것으로 추정할 수 있었다.

흰쥐의 가슴샘 재생과정에서 cDNA꼬리표 분석을 통해 확인된 알려진 유전자들 중 musculin 및 osteoactivin의 발현특성을 분석하였다. 먼저, 염기성 나선-고리-나선(basic helix-loop-helix, bHLH) 전사인자인 musculin의 발현 양상을 관찰하기 위하여 정상 및 CY 투여 3일, 1주 및 2주 후의 가슴샘 조직에서 RNA를 분리하여 역전사중합효소연쇄반응 분석을 실시하였다. 그 결과 musculin은 정상 가슴샘에서는 발현수준이 낮았지만, CY 투여 후 3일 및 7일째에 정상 가슴샘과 비교해서 현저하게 증가하였다(Fig. 6).

정상 및 CY 투여 3일, 1주 및 2주 후의 가슴샘에서 분리한 가슴샘 버팀질세포와 가슴샘세포에서 osteoactivin의 발현양상을 역전사중합효소연쇄반응 분석을 실시한 결과 osteoactivin의 발현은 정상 가슴샘에서 분리한 가슴샘 버팀질세포와 비교해서 CY 투여 후 3일 및 7일째의 가슴샘에서 분리한 가슴샘 버팀질세포에서 현

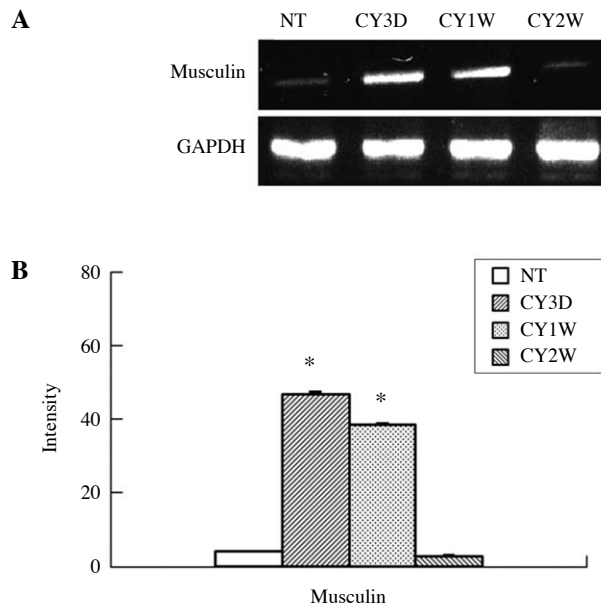


Fig. 6. RT-PCR analysis of musculin mRNA in the thymus of normal rats (NT), and 3 (CY3D), 7 (CY1W), and 14 (CY2W) days after cyclophosphamide treatment. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of co-amplified musculin and GAPDH. (B) The density of each band in each lane was quantified by scanning densitometry and then expressed as mean+SD. Data are expressed as ratios of musculin mRNA normalized to GAPDH mRNA. Samples from the regenerating thymus, especially at 3 and 7 days after cyclophosphamide treatment, exhibit significant up-regulation of musculin mRNA expression compared with that of the normal control; * $P < 0.05$ compared with the corresponding control value, as determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Scheffe's *post hoc* test.

저하게 증가하였고(Fig. 7), 정상 가슴샘세포와 비교해서 CY 투여 후 3일 및 7일째의 가슴샘세포에서 현저하게 증가하였다(Fig. 7). 따라서 osteoactivin이 가슴샘 버팀질세포 및 가슴샘세포 모두에서 발현되며, 가슴샘 재생과정 동안 그 발현이 증가한다는 사실을 보여준다.

고 찰

본 연구에서는 재생과정중의 흰쥐 가슴샘의 cDNA 라이브러리로부터 630개의 cDNA 꼬리표들을 분석하였다. cDNA 꼬리표 염기서열의 분석을 위한 데이터베이스 분석은 미국의 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 개발된 대표적인 소프트웨어인 블라스트 프로그램을 사용하였는데, 분석결과 유의성 여부는 Brown이 제시하였던 일반적인 규칙을 적용하였다[8]. 즉, 블라스트의 출력에서 가장 큰 의미를 가지는 값은 퍼센트 값보다는 P-value로 e-100보다 작은 경

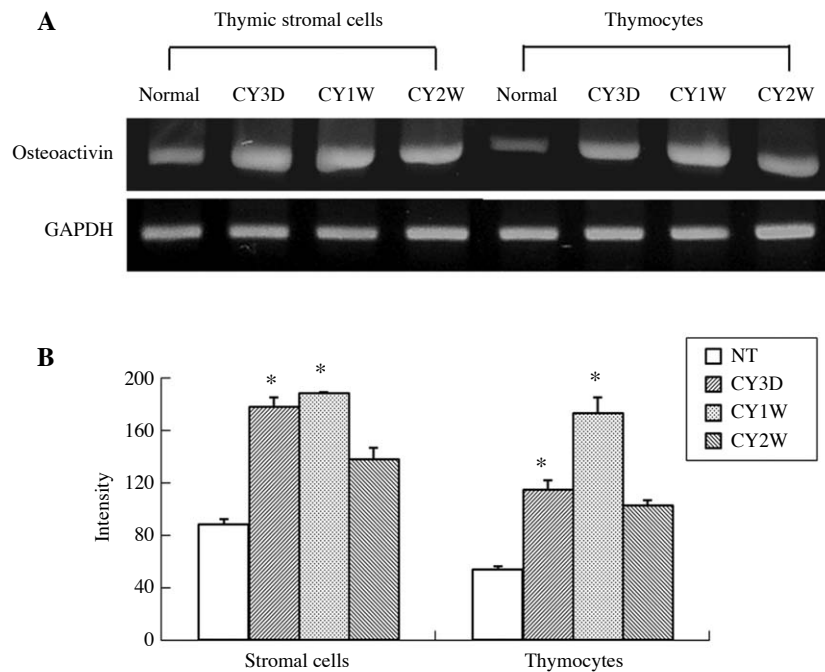


Fig. 7. RT-PCR analysis of osteoactivin mRNA in the thymic stromal cells and thymocytes of normal rats (Normal), and 3 (CY3D), 7 (CY1W), and 14 (CY2W) days after cyclophosphamide treatment. (A) Agarose gel electrophoresis showing a representative RT-PCR result of co-amplified osteoactivin and GAPDH. (B) The density of each band in each lane was quantified by scanning densitometry and then expressed as mean+SD. Data are expressed as ratios of osteoactivin mRNA normalized to GAPDH mRNA. The thymic stromal cells and thymocytes from the regenerating thymus, especially at 3 and 7 days after cyclophosphamide treatment, exhibit significant up-regulation of osteoactivin mRNA expression compared with those of the normal controls; * $P < 0.05$ compared with the corresponding control value, as determined by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Scheffe's *post hoc* test.

우는 일반적으로 같은 종의 서열, e-50에서 e-100 사이 일 때는 아주 유사한 서열, e-50에서 e-10 사이일 때는 연관된 서열, e-5에서 0.1 사이일 때는 연관성을 가질 가능성은 있으나 상당히 먼 관계를 가지고 있을 가능성이 있다고 적용되기 때문에 P-value가 e-5보다 작은 값을 보일 때 유의적으로 유사성이 있다고 판독하였다. 이 규칙을 적용하여 cDNA 꼬리표 염기서열의 분석결과 486개의 알려진 유전자, 125개의 알려지지 않은 유전자 그리고 19개의 확인되지 않은 유전자들을 분류하였다. 19개의 확인되지 않은 유전자들 중에는 새로운 유전자를 포함하고 있을 것으로 추측된다.

흰쥐 가슴샘 재생과정에서 분석한 cDNA 꼬리표는 동정된 후보유전자를 근거로 발현의 빈도수를 측정하여 Table 3에서 열거하였다. cDNA 꼬리표의 빈도수가 높을수록 가슴샘 재생과정에서 풍부하게 발현된다고 볼 수 있기 때문에 가슴샘 재생과정에서 풍부하게 발현되는 후보유전자들을 확인할 수가 있었다. 특히 가장 높은 빈도로 출현한 후보유전자인 solute carrier family 25, member 4 유전자는 세포의 미토콘드리아 단백질로 알려진 adenine nucleotide translocator, member 4 단백질을 합성하는 유전자로서, 이 단백질은 세포의 증식과정에서 세

포내의 미토콘드리아와 세포질 사이에 ADP/ATP를 전달하는 역할을 수행하는 ADP/ATP carrier 단백질군에 속하며, ADP/ATP translocase 1 protein으로도 알려져 있다 [9-11]. T 세포의 증식과 분화과정에서 림프구의 생존과 세포사멸을 조절하는 사이토카인들 중 Th1과 Th2 사이토카인들에 의해 차별적으로 조절되는 유전자들을 연구하는 과정에서 adenine nucleotide translocator가 IL-4에 의해 발현이 증가되고 IFN- γ 에 의해 발현이 감소된다고 보고되었다 [12]. 이러한 보고는 adenine nucleotide translocator가 사이토카인에 의해 매개되는 T 세포의 생존과정에서 중요한 기능적인 역할을 한다는 것을 시사한다. 따라서, 가슴샘 재생과정에서도 adenine nucleotide translocator에 해당되는 유전자의 발현 빈도수가 높게 나타난 것은 가슴샘 재생과정에서 중요한 역할을 담당하고 있기 때문이라고 생각된다.

빈도수가 4개인 cDNA 꼬리표 중의 한 종류는 thymosin beta 4 유전자와 매우 높은 유사성을 보였는데, 이 유전자는 인체 모든 장기의 조직에서 그 발현이 확인되며, 그 단백질은 액틴격리 (actin sequestration) 단백질로서 G-액틴 풀 (pool)을 조절하여 세포 분화의 기능에 관련이 있는 것으로 보고되었다 [13]. 그러나, thymosin beta

4는 조혈세포(hematopoietic cell)로 분화하는 과정에서 림프계 세포와 골수계 세포에서 상당한 발현 차이를 보이고 가슴샘종(thymoma)과 같은 가슴샘 암조직에서 그 발현이 감소하고 또한 성인 가슴샘 조직에서 그 발현이 줄어드는데, 이러한 사실은 thymosin beta 4가 액틴과 결합하는 역할 뿐만 아니라 혈관신생, 신경세포의 재생, 상처치유 및 모발성장을 촉진하며 암의 성장과 전이를 증가시키는 기능도 가지기 때문이다 [14]. 유아 가슴샘 조직을 제외한 세포 분화와 증식이 활발한 어린 조직 중 유아 뇌나 간 조직과 태아 폐에서 분리한 cDNA 꼬리표에서는 thymosin beta 4가 포함되어 있지 않거나 빈도가 높지 않다고 보고되었다 [15]. 이러한 결과는 유아 가슴샘에서 발현이 풍부한 thymosin beta 4가 특이적으로 가슴샘에서 세포 분화와 증식에 중요한 역할을 수행하기 때문이라고 생각되어지며, 가슴샘 재생과정에서도 이러한 이유로 thymosin beta 4에 해당하는 cDNA 꼬리표의 빈도가 높게 나타난 것으로 판단된다.

또한 흰쥐 가슴샘 재생과정에서 분석한 cDNA 꼬리표들 중에서 RNA 및 단백질 관련 대사를 포함한 일반적인 세포 대사에 관련된 유전자가 가장 많은 비중을 차지하였고, 신호전달에 관련된 유전자, 막수송에 관련된 유전자, 그리고 세포골격, 세포분열 및 방어기전에 관련된 유전자 순이었다. 따라서, cDNA 꼬리표 분석을 통해 가슴샘 재생과정에서 발현되는 다양한 유전자를 생물학적 역할에 따라서 세포의 일반적인 기능별로 분류할 수 있었고, 그 분포도를 확인할 수 있었다.

흰쥐의 가슴샘 재생과정에서 발현되는 유전자들의 라이브리리로부터 확인된 cDNA 꼬리표들 중 알려지지 않은 두 개의 putative gene인 putative gene 01과 putative E2IG2 gene의 유전자의 발현을 확인한 결과, 이들 유전자가 정상 가슴샘에서보다 재생과정의 가슴샘에서 발현이 현저하게 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 알려지지 않은 putative gene 01을 클로닝하여 열린읽기들을 확인하고 아미노산 상동성 조사 및 다중서열정렬(multiple alignment)을 실시하여 동정한 결과 미토콘드리아 ribosomal protein S4와 상당히 높은 유사성을 가진 것을 확인할 수 있었다. 미토콘드리아 ribosomal protein S4는 세포 분화 초기단계에 있어서 중요한 역할을 수행한다고 알려져 있으며 [16], 또한 인간에게서 기생원생동물인 리슈마니아(*Leishmania*)의 감염이 일어났을 때, 튜불린(tubulin), 히스톤(histone) H2b와 함께 풍부하게 발현하여 항원으로서 T 세포와 반응하여 T 세포를 자극함으로써 면역반응을 유도한다는 보고가 있다 [17]. 97개의 아미노산으로 이루어진 E2IG2는 다양한 조직의 발달이나 생리활성의 유지에 중요한 작용을 하는 에스트로겐의 기작 연구에서 유방암세포에 성 호르몬

인 에스트로겐을 투여한 후 발현되는 유전자들로부터 클로닝되었고, 어떤 유전자인지 그 기능이 전혀 알려지지 않는 않지만, 유방암세포주인 MCF-7에서 에스트로겐을 투여 후 3시간째에 E2IG2의 발현이 14배나 현저하게 증가한다는 사실이 밝혀졌다 [18]. 가슴샘 재생과정의 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 꼬리표를 분석한 결과 얻어진 후보 미토콘드리아 ribosomal protein S4 및 putative E2IG2 유전자의 발현이 가슴샘 재생과정에서 현저하게 증가한다는 결과는 가슴샘 재생과정에 있어서 이러한 유전자들이 중요한 역할을 수행하기 때문이라고 생각된다.

이상에서 분석된 유전자외에도 본 연구에서 발견된 유전자중에서 비록 Table 3에서 다빈도 발현 유전자에는 포함되지 않으나 생물정보학적 분석 방법을 통해 알려진 정보에 근거하여 유추해보았을 때 musculin과 osteoactivin이 가슴샘 재생과 관련될 수 있는 가능성을 가진다고 판단되었기에 이들 유전자를 분석대상 유전자로 선정하였다. 흰쥐의 가슴샘 재생과정에서 cDNA 꼬리표를 분석한 결과 얻어진 알려진 유전자들 중 musculin 및 osteoactivin의 발현특성을 분석하였을 때, 염기성 나선-고리-나선 전사인자인 musculin의 발현은 정상 가슴샘에서는 발현수준이 낮았지만, CY 투여 후 3일 및 7일째에 정상 가슴샘과 비교해서 현저하게 증가하였다. 염기성 나선-고리-나선 전사인자는 세포의 운명이 어떻게 결정되는 지에 대한 연구에서 보고되기 시작하였으며 [19], 그 이후 염기성 나선-고리-나선 전사인자 모티프(motif)를 가진 전사인자는 척추동물과 무척추동물의 다양한 조직에서 세포운명결정과 분화에 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다 [19]. 골격근세포발생에서 MyoD와 myogenin과 같은 염기성 나선-고리-나선 전사인자 [19], 혈구세포발생에서 SCL/TAL1과 같은 조혈과 관련된 기능을 가지는 염기성 나선-고리-나선 전사인자 [20], 신경세포발생에서 neurogenin과 같은 염기성 나선-고리-나선 전사인자 [21] 그리고 섬유모세포가 근세포로 분화하는데 MyoD [22]가 관여한다는 사실이 밝혀졌다. 염기성 나선-고리-나선 전사인자는 발현 양상에 따라 대략 A 및 B 두 종류로 구분될 수 있는데, A형 염기성 나선-고리-나선 전사인자는 일반적으로 폭 넓게 발현됨에 비해 B형 염기성 나선-고리-나선 전사인자는 제한적으로 발현된다. 한편, 구조적 측면에서 나선-고리-나선 부위는 A형과 B형의 동종이합체 혹은 이종이합체 형성을 매개하며, 염기성 부위는 특정 DNA와의 결합과 분화관련 유전자의 전사를 활성화하는데 관여한다 [23]. 염기성 나선-고리-나선 전사인자들은 유전자 활성 네트워크(gene activator network)에서 발현을 직접적으로 혹은 간접적으로 조절하여 세포의 운명결정과 조직분화를

수반한다[24]. Robb은 인간과 생쥐의 cDNA를 얻은 다음, consensus bHLH search motif를 이용하여 유전자 데이터베이스를 조사하였고, 두 종류의 새로운 염기성 나선-고리-나선 유전자를 발견하였다[25]. 하나는 epicardin/capsulin/Pod-1이었고[26], 다른 하나는 새로운 염기성 나선-고리-나선 유전자인 musculin이었다[25]. 생쥐의 musculin은 활성화된 B 세포에서 발현되는 human ABF-1 (activated B cell factor-1)과 86%의 동일한 상동성을 가진 202개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 생쥐의 배아 근육조직에서 발현이 확인되었다[25]. Musculin은 조직의 분화와 세포운명결정에 중요한 기능을 수행할 것이라고 생각되었으나 그 기능과 발현조절에 대한 연구는 아직 제대로 이루어져 있지 않다. 흰쥐의 가슴샘에서 염기성 나선-고리-나선 전사인자인 musculin의 발현을 확인하였을 뿐만 아니라 가슴샘 재생과정에서 musculin의 발현이 현저하게 증가한다는 본 연구의 결과는 가슴샘 재생과정에서 musculin이 직접적으로 혹은 간접적으로 가슴샘 재생과정에 관여할 것이라는 사실을 시사해준다. 이러한 결과는 가슴샘 재생과정에서 musculin의 발현특성을 이해하는데 유용한 자료가 될 수 있으며, musculin 유전자 발현의 조절기전 및 기능분석에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

Osteoactivin의 발현은 정상 가슴샘에서 분리한 가슴샘 기질세포와 비교해서 CY 투여 후 3일 및 7일째의 가슴샘 기질세포에서 현저하게 증가하였을 뿐만 아니라 가슴샘세포에서도 현저하게 증가하였다. 정상 뼈조직과 뼈형화증을 일으키는 질병인 뼈대리석증(osteopetrosis)에서 mRNA differential display 방법을 통해서 클로닝된 osteoactivin은 572개의 아미노산으로 이루어진 세포바깥바탕질 단백질로서 주로 뼈모세포와 뼈버팀질세포에서 풍부하게 발현된다고 알려져 있다[27,28]. DC-HIL (dendritic cell-associated, heparan sulfate proteoglycan-integrin ligand)로서 잘 알려진 osteoactivin은 분비단백질로도 존재할 뿐만 아니라 세포 표면이나 리소좀막에 존재하는 1형막단백질 (type I transmembrane glycoprotein)으로서 뼈모세포의 분화와 성숙에도 관여한다[29]. 가슴샘 재생과정에서 가슴샘 기질세포와 가슴샘 세포에서도 osteoactivin의 발현이 현저하게 증가한다는 결과는 osteoactivin이 가슴샘 재생과정에서 가슴샘 기질세포와 가슴샘세포의 분화와 성숙에 중요한 역할을 수행할 수 있다는 근거를 보여줄 뿐만 아니라 가슴샘 재생과정에서 osteoactivin의 기능과 기전에 대한 연구의 필요성을 제시한다.

재생중의 흰쥐 가슴샘에서 발현되는 유전자에 대한 cDNA 라이브러리를 대상으로 630개의 cDNA 코리폴드의 염기서열을 분석한 본 연구와 유사하게 재생중의

흰쥐 가슴샘에서 발현되는 유전자에 대한 cDNA 라이브러리에서 1,000개의 cDNA 코리폴드의 염기서열을 분석한 이전의 연구결과와 비교하였을 때[30], 단백질 합성 및 세포 대사에 관련된 유전자, 신호전달에 관련된 유전자, 세포의 구조와 운동에 관련된 유전자의 비율은 유사하였으나, 세포골격, 세포분열 및 방어기전과 관련된 유전자의 비율은 이전의 연구에 비해 다소 낮게 나타났다. 이러한 사실은 본 연구 및 이전 연구[30], 모두 재생중의 흰쥐 가슴샘에서 발현되는 유전자의 분석을 통계학적으로 유의있는 수준으로 시행된 연구이라는 사실을 의미한다. 또한 생물정보학적 분석을 통해 두 연구에서 발현 빈도가 높은 유전자를 비교하였을 때, 본 연구에서 0.5% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 15종이었으며, 이전 연구[30]에서 0.5% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 9종 그리고 0.4% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 21종으로서 대체로 유사한 경향을 나타내었다. 또한 본 연구에서 0.5% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 전체 유전자의 10.95%이었으며, 이전 연구[30]에서 0.5% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 전체 유전자의 5.90% 그리고 0.4% 이상의 발현빈도를 보이는 유전자는 전체 유전자의 10.70%으로서 매우 유사한 경향을 나타내었다. 본 연구에서 1% 이상의 발현빈도를 나타낸 유전자는 1종으로서 solute carrier family 25 유전자이었고 이전 연구[30]에서 1% 이상의 발현빈도를 나타낸 유전자는 1종으로 동일하였으나 그 종류는 asparaginase like 1으로 서로 다르게 나타났다. 본 연구에서 0.5~1% 사이의 발현빈도를 나타낸 유전자와 이전 연구[30]에서 0.4~1% 사이의 발현빈도를 나타낸 유전자들을 서로 비교하였을 때 solute carrier family 25, breast carcinoma amplified sequence 1, cAMP-regulated phosphoprotein 21, transcript variant 1, cyclin G1, heat shock protein 9, ring finger protein 111, TM2 domain containing 2, dihydrofolate reductase, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 및 thymosin beta-4의 10종의 유전자가 두 연구에서 공통으로 출현하였는데 이는 본 연구에서 0.5% 이상의 발현빈도를 나타낸 유전자 중의 66.67% 그리고 이전 연구[30]에서 0.4% 이상의 발현빈도를 나타낸 유전자 중의 47.62%에 해당하였다. 또한 본 연구에서 0.5% 이상 발현빈도를 나타낸 유전자 중에서 이전 연구[30]와 다르게 나타난 유전자는 NLR family, apoptosis inhibitory protein 6, similar to paired-Ig-like receptor B, putative ubiquitin specific peptidase 33, serine/arginine-rich splicing factor 1 및 dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine) N-acetylglucosaminophosphotransferase 1이었고 이전 연구[30]에서 0.4% 이상 발현빈도를 나타낸 유전자중에

서 본 연구와 다르게 나타난 유전자는 Cd74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain, asparaginase like 1, apolipoprotein E, baculoviral IAP repeat-containing 1b, cytochrome-c oxidase I, Immunoglobulin-like receptor PIRA6, ubiquitin specific peptidase 33, ribosomal protein S3a, unnamed protein product (splicing factor 3b, subunit 2, 145 kDa), metal-response element-binding transcription factor 2 isoform 1 및 Tob2 protein 이었다. 이러한 사실은 본 연구와 이전 연구 [30]에서 사용된 표본집단의 수가 모집단 전체 유전자의 경향을 분석하는데 통계학적 의의를 가지는 동시에 특이적인 유전자를 동정할 수 있는 중요한 의의를 갖는 연구라는 사실을 의미한다. 또한 이러한 사실은 앞으로도 두 연구와 비슷한 규모로 이루어지는 연구들은 가슴샘 재생과 관련된 특이적인 유전자를 발굴하는데 매우 유용할 것이라는 사실을 시사한다.

결론적으로, 본 연구에서는 재생중의 흰쥐 가슴샘에서 발현되는 유전자에 대한 cDNA 라이브러리를 제작하였고, cDNA꼬리표들에 대한 염기서열 분석과 데이터베이스 분석을 이용하여 알려진 유전자 그룹, 알려지지 않은 유전자 그룹 및 새로운 유전자들을 포함한 확인되지 않은 유전자들을 확보할 수 있었으며 발현의 빈도수도 확인할 수 있었다. 또한 일부의 유전자들을 선택하여 가슴샘 재생과정 동안에 발현양상을 분석함으로써 가슴샘 재생에 관련이 있을 것으로 추정되는 후보 유전자들을 선별할 수 있었다. 본 연구의 결과를 토대로 추가적으로 더 많은 수의 cDNA꼬리표들에 대한 대량 분석을 시행하여 이들 유전자의 발현 빈도에 따라 분류하여 재생중의 가슴샘에서 발현되는 유전자의 발현빈도에 따른 데이터베이스를 구축할 수 있을 것이며 또한 알려진 유전자에 대해서는 다시 기능별로 분류하여 데이터베이스를 구축할 수도 있을 것이다. 그 결과 가슴샘의 재생과 관련성이 높을 것으로 추정되는 유전자를 선별하고 이에 대한 유전자 및 단백질의 발현 특성 분석을 실시함으로써 이들에 대한 특성을 규명할 수 있을 것이다. 더 나아가 본 연구의 결과는 향후 가슴샘의 재생과 관련 있는 유용 유전자 및 단백질을 이용하여 가슴샘의 재생을 촉진시키고 가슴샘의 기능을 증진시킬 수 있는 방법을 개발하는데 응용할 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Cunningham CP, Kimpton WG, Holder JE, Cahill RN. Thymic export in aged sheep: a continuous role for the thymus throughout pre- and postnatal life. *Eur J Immunol.* 2001; 31:802-11.
- Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Stem Cells.* 2000; 181:10-8.
- Yoon S, Yoo YH, Kim BS. Ultrastructural alterations of the cortical epithelial cells of the rat thymus after cyclophosphamide treatment. *Histol Histopathol.* 1997; 12:401-13.
- Yoon S, Lee HW, Baek SY, Kim BS, Kim JB, Lee SA. Upregulation of TrkA neurotrophin receptor expression in the thymic subcapsular, paraseptal, perivascular, and cortical epithelial cells during thymus regeneration. *Histochem Cell Biol.* 2003; 119:55-68.
- Hinton PS, Peterson CA, Dahly EM, Ney DM. IGF-I alters lymphocyte survival and regeneration in thymus and spleen after dexamethasone treatment. *Am J Physiol.* 1998; 274: 912-20.
- Awong G, LaMotte-Mohs R, Zúñiga-Pflücker JC. Key players for t-cell regeneration. *Curr Opin Hematol.* 2010; 17: 327-32.
- Olsen M, Hood L, Cantor C, Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. *Science.* 1989; 245:1434-5.
- Brown SM. Sequence similarity searches on the world wide web. *Biotechniques.* 1998; 24:248-50.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol Cell.* 1999; 3:159-67.
- Kim EH, Koh EH, Park JY, Lee KU. Adenine Nucleotide Translocator as a Regulator of Mitochondrial Function: Implication in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome. *Korean Diabetes J.* 2010; 34:146-53.
- Gutiérrez-Aguilar M, Baines CP. Physiological and pathological roles of mitochondrial SLC25 carriers. *Biochem J.* 2013; 454:371-86.
- Jang JY, Lee CE. Mitochondrial adenine nucleotide translocator 3 is regulated by IL-4 and IFN-gamma via STAT-dependent pathways. *Cell Immunol.* 2003; 226:11-9.
- Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis.* 2007; 10:229-41.
- Sribenja S, Wongkham S, Wongkham C, Yao Q, Chen C. Roles and mechanisms of β -thymosins in cell migration and cancer metastasis: an update. *Cancer Invest.* 2013; 31:103-10.
- Choi YL, Diaz JJ, Denoroy JL, Madjar JJ, Wool IG. The primary structure of rat ribosomal protein L10: relationship to a Jun-binding protein and to a putative Wilms' tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225:952-6.
- Cunningham CP, Kimpton WG, Holder JE, Cahill RN. Thymic export in aged sheep: a continuous role for the thymus

16. Hosoya K, Amagai A, Chida J, Maeda Y. Unique behavior and function of the mitochondrial ribosomal protein S4 (RPS4) in early dictyostelium development. *Zoolog Sci.* 2003; 12:1455-65.
17. Probst P, Stromberg E, Ghalib HW, Mozel M, Badaro R, Reed SG, et al. Identification and characterization of t cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 t cell expression cloning. *J Immunol.* 2001; 166:498-505.
18. April HC, Andrzej KB, Rachael LD, Kathleen AH, Kendra JL, Sara G, et al. Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.* 2000; 60:5977-83.
19. Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993; 75:1241-4.
20. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The t cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* 1996; 86:47-57.
21. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3:517-30.
22. Molkenkin JD, Olson EN. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6: 445-53.
23. Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol.* 1998; 8:58-65.
24. Murre CC, Bain C, Van Dijk MM, Engel I, Furnari BA, Massari ME, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1218:129-35.
25. Robb L, Hartley L, Wang CC, Harvey RP, Begley CG. Myosin: a murine basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in embryonic skeletal muscle. *Mechanisms of Development.* 1998; 76:197-201.
26. Lu J, Richardson JA, Olson EN. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mechanisms of Development.* 1998; 73:23-32.
27. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010; 466:829-34.
28. Singh M, Del Carpio-Cano F, Belcher JY, Crawford K, Frara N, Owen TA, et al. Functional roles of osteocalcin in normal and disease processes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010; 20:341-57.
29. Sheng MH, Wergedal JE, Mohan S, Lau KH. Osteocalcin is a novel osteoclastic protein and plays a key role in osteoclast differentiation and activity. *FEBS Lett.* 2008; 582: 1451-8.
30. Yoon TD, Lee HW, Kim YS, Choi HJ, Moon JO, Yoon S. Identification and analysis of expressed genes using a cDNA library from rat thymus during regeneration following cyclophosphamide-induced T cell depletion. *Int J Mol Med.* 2013; 31:731-9.

Expression and Characterization of Genes by Expressed Sequence Tag Analysis in the Rat Thymus during Regeneration following Acute Thymic Involution Induced by Cyclophosphamide

Keun-Ho Lee¹, Hee-Woo Lee², Hee Jung Choi¹, Hye-jin Min¹, Sun Yong Baek¹, Sik Yoon¹

¹*Department of Medicine, Graduate School, Pusan National University*

²*Research Institute for Veterinary Science, College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

Abstract : The thymus is the central lymphoid organ for the development of bone marrow-derived precursor cells into mature T-cells. Understanding the molecular mechanism of thymic involution and regeneration is critical to develop methods to normalize or improve host immunity from the decreased immune function caused by thymic involution.

In this study, the regenerating thymus cDNA library was constructed in the rat from a model of thymic involution and regeneration induced by cyclophosphamide. Expressed sequence tags (ESTs) were obtained by partial sequencing of 700 randomly selected insert-containing clones. A total of 630 ESTs were analyzed, of which 486 ESTs (78%) matched to known genes and 125 ESTs (19%) matched to other ESTs (unknown genes). The 19 ESTs (3%) did not match with any known sequences. The ESTs were grouped into six main functional categories: metabolism (44%), signaling components (20%), membrane transport (7%), cytoskeleton (2%), cell division (2%) and defense (2%).

As a result of RT-PCR analysis, expression of putative gene 01, putative E2IG2 gene, musculin and osteocalcin significantly increased in rat thymus during regeneration. The putative gene 01 showed complete homology with mitochondrial ribosomal protein S4 by homology search and multiple alignment of amino acid.

These results provide the extensive molecular information on thymus regeneration and will be useful source to identify various genes which may play an important role in the thymus regeneration as well as to clone novel genes. Furthermore, the availability of these data will serve as a basis for further research to understand the molecular mechanism of thymus regeneration.

Keywords : Expressed sequence tag (EST), Thymus, Gene expression, Cyclophosphamide, Regeneration, Rat