

## 생쥐 정원줄기세포에서 Interleukin-1 system 발현 및 Egr1에 의한 조절

박선정, 계명찬

한양대학교 생명과학과

**목적 :** Interleukin-1 (IL-1) system은 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor 1 (IL-1R1), IL-1 receptor 2 (IL-1R2), IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra), IL-1 Receptor accessory protein (IL-1RAcP), Toll interacting protein (TOLLIP)을 통해 면역 및 염증반응 신호 전달이 일어난다. 또한 IL-1Ra는 경쟁적 저해제로써 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 의 작용을 저해한다. IL-1 receptor에는 2가지 타입이 있으며, IL-1R1에 결합하는 경우 수용체 부속단백질인 IL-1RAcP와 TOLLIP과 결합하여 신호전달이 일어나고, IL-1R2에 결합하는 경우 정상적인 신호전달이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다. Zinc-finger transcription factor인 Early growth response 1 (Egr1)은 다양한 kinase pathway에 의해 발현이 유도되며, 암 발생, 세포 생존, 사멸, 성장, 분화에 필요한 유전자 발현을 조절한다. 세정관의 혈액정소장벽 외곽에 존재하는 정원줄기세포는 혈액 및 Sertoli cell에서 기원한 GDNF, FGF2 등의 성장인자의 영향을 받아 생존 및 자가증식을 하며 이때 egr-1이 유도된다. Egr1은 다양한 세포에서 다양한 스트레스 및 IL-1에 의해 유도되어 염증반응의 주요한 유전자발현을 유도하며 세포사멸을 유도한다. 또한 호중구에서 IL-1 $\beta$ 의 promoter에 결합하여 유전자발현을 유도한다. 정원줄기세포는 생애주기 동안 생존하므로 염증반응에 적절히 저항할 수 있는 기전을 필요로 한다. 본 연구에서는 정원줄기세포에서 일어나는 염증성사이토카인의 신호전달에 관여하는 egr-1의 기능규명의 일환으로 생쥐 정원줄기세포에서 IL system 발현을 분석하였고, Egr1 KO 정원줄기세포에서 GDNF 신호전달 하위에서 일어나는 IL-1 system 발현의 변화를 분석하였다.

**연구방법 :** 생후 1, 7, 14, 28, 56일령 생쥐 정소에서 면역세포화학염색을 통해 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, TOLLIP의 발현을 분석하였다. 6일령 Egr1 KO 생쥐 정소에서 THY1항체를 이용한 MACS로 획득한 정원줄기세포에 GDNF 처리 후 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, TOLLIP의 mRNA 발현 변화를 real time RT-PCR을 통해 분석하였다.

**결과 :** 면역세포화학염색 결과 정원줄기세포에서 IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1Ra이 발현하였으며 THY1항체를 이용한 MACS로 분리한 정원줄기세포에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, TOLLIP의 mRNA가 다량 발현함을 확인하였다. WT에 비해 Egr1 KO 정원줄기세포에서는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra의 mRNA 발현이 낮은 반면 IL-1R1B (variant form)은 높았고 IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, TOLLIP는 차이가 없었다. 정원줄기세포에 GDNF 처리 시 IL-1 $\beta$ 가 유의하게 감소하고 IL-1R1B (variant form)는 유의하게 증가하였다. Egr1 KO 정원줄기세포에 GDNF 처리 시 WT에 비해 IL-1 $\beta$ 가 유의하게 감소하였으며, IL-1R1B (variant form)는 유의하게 증가하였고 IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, TOLLIP는 차이가 없었다.

**결론 :** 정원줄기세포에서 GDNF는 IL-1 $\beta$  발현을 감소시켜 염증반응에 따른 세포사멸을 완화하며, Egr1은 IL-1 $\beta$ 을 양성적으로 조절하여 정원줄기세포의 염증반응을 매개하는 것으로 사료된다.

## IL-1이 정자 운동성과 침체반응, GSK3 인산화와 타이로신단백질 인산화에 미치는 영향

박승현, 계명찬

한양대학교 생명과학과

**배경 :** Interleukin-1 (IL-1)은 주로 면역세포에 의해 생산되는 염증성사이토카인으로 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  2개의 isoform이 존재하며, IL-1 receptor type 1 (IL-1R1)과 IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP)에 결합하여 작용 한다. 이 신호전달은 Toll interacting protein (TOLLIP)을 필요로 하며 IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)에 의해 억제된다. 최근 연구에서 염증반응으로 인해 증가된 IL-1은 불임을 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 사람과 생쥐 정자에서 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-1R1, IL-1RAcP, TOLLIP의 발현을 확인하고 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra가 생쥐 정자의 운동성과 침체반응, GSK3의 억제성 (ser) 및 활성화(Tyr) 인산화, 수정능획득 지표인 타이로신프로테오미에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

**연구방법 :** 생쥐 부정소 정자와 정액검사에 사용된 사람의 잉여 정자를 대상으로 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1RAcP, TOLLIP의 단백질 발현을 Western blot, Immunocytochemistry (ICC)를 통해 확인하였다. 또한 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra를 생쥐 정자에 처리한 뒤 GSK3의 활성화 및 억제성(Ser) 인산화와 활성화(Tyr) 인산화 및 phosphotyrosine proteome을 Western blot을 통해 확인하였다. IL-1이 정자 침체반응에 미치는 영향은 ICC와 Computer-assisted sperm analysis (CASA)를 이용하여 확인하였다.

**결과 :** Western blot결과 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-1R1, IL-1RAcP, TOLLIP이 사람과 생쥐 정자에서 발현함을 확인하였다. 사람 정자에서 생쥐 정자보다 premature IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, TOLLIP의 발현이 높았으며 mature IL-1 $\beta$ 와 IL-1Ra는 생쥐 정자에서 발현이 더 높았다. ICC결과 생쥐 정자에서 IL-1 system이 두부, 중편, 꼬리에서 발현 하였으며 사람 정자에서는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1RAcP, TOLLIP이 두부, 중편, 꼬리에 발현 하였으며 IL-1Ra는 두부와 중편에서 주로 발현하였다. 생쥐 정자에 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 를 처리 시 GSK3의 억제성(Ser)인산화가 조금 증가했지만 활성화(Tyr)인산화는 많이 증가하였h phospho-tyrosine protein가 감소했다. IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  처리시 progressive motility가 감소하며 IL-1 $\beta$ 는 침체반응을 저해하였지만 IL-1Ra를 같이 처리 시 대조군과 차이가 없었다.

**결론 :** 사람과 생쥐의 정자는 IL-1 system을 모두 발현하며, IL-1은 정자의 GSK3의 활성화(Tyr)인산화를 억제성(Ser)인산화 보다 더 많이 유도하기 때문에 운동성과 수정능획득 지표인 tyrosine protein 인산화를 감소시켜 침체반응을 저해하는 것으로 사료된다.

**연구비 :** 본 연구는 보건복지부의 질환극복기술개발사업의 지원에 의하여 의한 것임 (과제고유번호H14C0106).

## 사람의 정자형성 차이에 따른 혈액정소장벽 밀착결합 단백질 Claudin-11 Isoform의 발현분석

수영, 계명찬, 서주태

한양대학교 생명과학과, 제일병원 비뇨기과

정소는 여러 시기의 germ cells, Sertoli cells, Leydig cells, peritubular cells 등 많은 종류의 세포를 포함하는 기관이다. Sertoli cell이 형성하는 Blood Testis Barrier (BTB)는 면역학적 특권지역의 형성을 통해 세정관에서 생식세포가 분열하고 분화하여 정자형성 환경을 조성한다. BTB는 여러 종류의 단백질들로 구성되며 Claudin-11 (CLDN11)은 핵심적 분자이다. BTB에서 CLDN11가 결핍되면 불임을 초래하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 human CLDN11의 alternative splicing variants를 동정하고 deduced amino acid 분석을 통해 variants가 암호화하고 있는 단백질 isoforms들의 기능을 추론하고 정상 및 Sertoli cell only syndrome (SCO) 환자의 정소조직에서 이들의 발현패턴을 분석하였다. SCO 정소조직에서 전체 CLDN11 mRNA 발현이 많고 CLDN11 transcript variant 1, 3의 발현은 차이가 없지만 CLDN11 transcript variant 2 발현이 많았다. WB 결과 22 kDa 및 13 kD CLDN11 발현이 SCO 조직에서 높았다. 각각의 CLDN11 transcript variants들이 암호화하고 있는 CLDN11 isoform 들의 amino acid 서열에 대한 in silico 분석결과 CLDN11 transcript variant 1, 3은 동일한 CLDN11 isoform을 암호화하며 4개의 transmembrane region과 3-9 a.a.으로 구성된 5 개의 protein binding region을 가지고 있다. 반면 CLDN11 transcript variant 2가 암호화는 CLDN11 isoform 2는 3개의 transmembrane region을 가지며 5개의 protein binding region을 갖는것으로 확인되었다. CLDN11 isoform 1은 56 및 14 a.a.로 구성된 2개의 extracellular loop를 형성하는 반면 CLDN11 isoform 2는 3개의 aa로 구성된 불완전한 loop 1개와 14 a.a.로 구성된 loop 2를 형성하였다. CLDN11 isoform 1, 2 사이에는 C 말단 protein binding region에 큰 차이가 있었다. IHC 결과 정상 세정관 조직의 Sertoli cell에서는 CLDN11이 전형적인 BTB에서 발현하지만 SCO 세정관 조직에서는 Sertoli cell의 세포질 기저부 (basal)에 위치하였다. 이러한 차이는 Sertoli cell에서 발현하는 CLDN11 isoform의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. CLDN11 isoform의 차이는 BTB를 약화시켜 세정관의 면역학적 특권에 변화를 유발하는 것으로 사료된다.

## Interleukin-1, receptor, antagonist developing Leydig cell in mouse testis

옥승석, 임예지, 계명찬

한양대학교 생명과학과

**연구목적** : 다양한 family member로 구성된 Interleukin은 T 림프구에 의해 만들어져 분비되는 Cytokine으로써, NK 세포와 T와 B 림프구, 조혈모세포의 발생과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 생체 내에서 Interleukin은 염증 및 면역반응에 관여하는 것으로 알려져 있다.

Interleukin-1 system은 Interleukin-1 $\alpha$ ,  $\beta$ 과 수용체 또는 수용체와 상호작용하는 단백질인 IL-1R1, IL-1RA, IL-1RAcP, Tollip으로 구성되어있다.

정소 내에서 Interleukin-1 $\alpha$ 는 leptotene spermatocyte가 Blood testis barrier를 통과하는 데 중요한 역할을 하며, Interleukin-1 $\beta$ 는 Leydig cell의 스테로이드 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다.

하지만 기존의 연구에서는 Leydig cell 내의 Interleukin-1 $\alpha$ , $\beta$ 를 제외한 IL-1R1, IL-1RA, IL-1RAcP, Tollip과 같은 Receptor 및 antagonist등 전반적인 IL-1 system의 발현 및 기능에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 Leydig cell 내의 IL-1 system의 발현양상을 발생시기별로 분석함으로써 정소 내 Leydig cell에서 IL-1 system에 대해 알아보고자 하였다

**재료 및 방법** : 생후 발생중인 생쥐의 정소를 적출 후 RT-PCR 및 Immunohistochemistry를 이용하여 Leydig cell 내의 Interleukin-1 $\alpha$ ,  $\beta$  및 IL-1R1, IL-1Ra, IL-1RAcP, Tollip과 같은 IL-1 system 등의 유전자 및 단백질의 발현 양상을 확인하였다.

**결과** : 생쥐의 Leydig cell에서 IL-1 $\alpha$ 의 경우 생후 14일부터 발현이 증가하였고 이후 성체가 될수록 조금씩 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1RA, Tollip은 생후 28일 이후 발현이 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Leydig cell에서는 세정관 내 세포들에 비해 negative regulator인 Tollip의 발현이 낮았으며, IL-1RA와 IL-1R1의 발현이 상대적으로 높았다.

**요약 및 결론** : Leydig cell의 IL-1 system은 세정관 내의 세포들과 비교했을 때, Interleukin-1 자체보다는 Tollip, IL-1R1, IL-1RA와 같은 Receptor 및 antagonist의 발현이 높음으로 보아 IL-1의 autocrine effect보다는 paracrine effect의 영향을 더 크게 받는 세포인 것으로 사료되며, Receptor 및 antagonist의 발현이 성체로 갈수록 증가함으로 보아 Adult Leydig cell의 스테로이드 합성에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## Regulation of Claudin11 by miR-25-3p in mouse Sertoli cell

임예지, 계명찬\*

한양대학교 생명과학과

Claudin family 단백질은 Occludin과 함께 밀착결합 (tight junction)을 형성하는 중요한 단백질이다. Sertoli 세포에서 발현하는 Claudin11(cldn11)은 밀착결합의 일종인 혈액정소장벽 (blood testis barrier)를 형성하여 세정관 내부를 면역학적 특권지대로 만들며 이는 정자형성에 필수적인 장치이다. Cldn11의 전사는 testosterone에 의해 양성적으로 조절된다 (Gye, 2003). 최근 에피제네틱 수준의 유전자 기능조절 기전의 하나로 비암호화 유전자의 산물인 microRNA에 대한 연구가 활발하다. microRNA는 표적 mRNA의 3'-UTR에 결합하여 mRNA를 분해하거나 단백질로의 번역을 억제한다. 최근 Sertoli 세포에서 발현하는 miR-25가 안드로겐에 의해 음성적으로 조절되는 것으로 보고된 바 있다 (Panneerdoss, 2012). 본 연구에서는 Sertoli 세포에서 cldn11 mRNA를 표적으로 하는 miRNA를 규명하고자 하였다. In silico 분석을 통해 cldn11을 표적으로 하는 microRNA를 예측한 결과 miR-25-3p를 포함한 다수의 miRNA가 확인되었다. 실제로 miR-25-3p가 Sertoli 세포에서 cldn11 mRNA를 표적으로 하는지의 여부를 확인하기 위한 실험연구를 진행하였다. 15일령의 수컷 생쥐의 Sertoli cell을 분리하여 negative control과 miR-25 mimic을 Lipofectamine 2000과 함께 20pmole 형질 주입 시켜 배양한 후 6시간 뒤 10% Charcoal stripped FBS과 항생제 없이 48시간 배양하였다. 실험군에 100nM testosterone을, 대조군에는 동일 양의 DMSO를 24시간 처리하였다. qRT-PCR을 통해 cldn11, AR 및 miR-25-3p의 발현을 확인하고, Western blot을 통해 cldn11 protein level을 확인하였다. Cldn11 mRNA 발현은 miR-25 mimic에 의해 저하되었으며, testosterone이 고농도 일 때 높았다. Androgen receptor mRNA는 실험군 간에 차이가 없다. miR-25-3p 발현은 miR-25 mimic 형질주입 했을 때 높았고 testosterone 농도가 증가함에 따라 유의하게 감소하였다. Western blot에서 cldn11 단백질 양은 miR-25 mimic에 의해 감소하였고 testosterone 100nM 처리 시 증가하였다. miR-25-3p 발현이 증가함에 따라 cldn11 mRNA 발현이 감소하는 것으로 보아 miR-25-3p가 cldn11 mRNA를 분해하는 것으로 사료되며, testosterone은 miR-25-3p를 감소시켜 cldn11 단백질 발현을 증가시키는 것으로 사료된다. 결론적으로 Sertoli cell에서 testosterone은 CLDN11 mRNA의 전사를 증가시키고 miR-25-3p 발현의 감소를 초래하여 CLDN11 단백질 증가를 유발하며, 이는 BTB 형성에 기여하는 것으로 사료된다.

## 초기 배아 발생 단계 핵 수용체 발현 양상의 분석

차순영<sup>1</sup>, 한헌중<sup>2</sup>, 이인석<sup>2</sup>, 전용필<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>성신여자대학교 생물학과, <sup>2</sup>연세대학교 기계공학과

성숙한 난자가 수정하여 전발생능력을 가지게 되고 이후 초기배아의 발생은 내제적 요인과 외제적 요인의 상호 조절에 의하여 발생한다. 환경 변화에 대한 반응조절 개념이 일정 부분 성립되어 있다. 핵 수용체는 전사인자로서 활성을 가질 수 있기 때문에 이 연구에서는 핵 수용체의 발현 변화를 RNA-seq과 microarray 방법으로 얻은 결과 분석을 수행하여 어떤 전사인자가 발현하는가를 real-time PCR 방법으로 확인하였다. 7 subfamily 핵 수용체 발현 양상을 정한 기준에 따라 4 분류 또는 3 분류로 나눌 수 있었고 이를 real-time PCR 방법으로 확인할 수 있었다. 예를 들면 Esr1 mRNA과 Esr2가 MII 난자에서 검출되나 난할 단계에서는 8-세포기를 제외하고는 검출되지 않았다. Glucocorticoid receptor mRNA의 경우 MII 난자와 1-세포와 2-세포시기에 검출되었고 이후 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 현재까지 외부 인자에 의한 유전자 발현 조절 가능성에 대하여 논란의 대상이 되고 있으나 핵 수용체가 배아 시기 특이적 유형으로 발현함을 의미한다.

**핵심 단어** : 전사체, 핵수용체, 초기배아

**감사의 글** : 이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF-2015M3A9D7067365)의 지원을 받았음

Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: H16C1085)

## 생쥐 초기 임신 기간동안 P283000의 발현의 조직 특이성

황연정<sup>1</sup>, 류종석<sup>2</sup>, 전용필<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>성신여자대학교 생물학과, <sup>2</sup>한양대학교 에리카 약학대학 약학과

탈락막 형성은 자궁내막 세포의 증식과 분화과정을 통한 생리적 반응으로 세포외 기질의 조성변화가 보고되고 있다. 사전 연구에서 P28300 이라는 구리 의존적인 단아민 산화효소가 착상시기 특이적 발현이 있음을 예측하였고 이 유전자 산물은 기존에 콜라젠 또는 엘라스틴의 중합을 조절하는 것으로 알려져 있었다. 본 연구에서는 에스트로겐에 의한 P28300의 발현 유도와 조직 특이적 발현 여부를 초기 임신기간의 자궁을 대상으로 알아보았다. Real-time PCR과 면역조직화학법, Western blot 을 이용하였고, 난소적출술을 한 생쥐 자궁에 에스프로젠 길항제인 ICI 182,780을 처리하여 발현 정도를 살펴보았다. 또한 지연착상 생쥐 모델을 이용하여 다시 확인하였다. 지연착상 모델에서 에스트라디올에 의해 해당 유전자 발현이 유도되었다. 한편 탈락막 반응이 시작되면서 발현이 증가하였다. P28300 단백질은 탈락막에서 기질세포에 표지되었다. 이러한 결과는 P28300이 탈락막에서 에스트로겐에 의해 발현이 유도되는 것 중의 하나임을 의미한다.

**핵심 단어** : P28300, 탈락막, 에스트로겐

**감사의 글** : 이 연구는 Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : H16C1085 )의 지원을 받았음

## 저온 대기압 플라즈마 (atmospheric-pressure non-thermal plasma)의 Nitric Oxide gas 생성을 통한 항암효과연구

조한태

아주대학교 생명과학과 통합과정, (주)페미존 선임연구원

저온 대기압 플라즈마를 통한 세포 치료 및 항암기전 연구는 기초 연구단계에 있다. 이 연구에서는 저온 대기압 플라즈마를 통해 Nitric Oxide gas의 생성을 조절하고 생성된 Nitric Oxide gas의 항암효과를 연구하였다. Nitric Oxide gas의 생성량을 Nitric Oxide gas 계측기를 통해 공기 중에 발생하는 농도를 측정하였다. 또한 세포배양배지에 Nitric Oxide gas를 노출 후 세포배양배지에 녹은 농도를 Griess solution을 통하여 농도를 측정하였다. 측정 결과 Nitric Oxide gas는 분당 질소 10L당 산소의 농도의 혼합에 따라 농도의존적으로 대기에 발생하였고, 배지에도 Nitric Oxide gas 노출양에 따라 농도가 증가하였다. 이와 같은 Nitric Oxide gas를 자궁내막암세포주 (Endometrial cancer cell line)와 자궁내막세포 (Endometrial stroma cells) 노출 시켜 MTT assay를 통해 세포분열과 생리활성을 확인한 결과 정상세포인 자궁내막세포에 비해 자궁내막암 세포주에서 NO gas에 의해 세포분열 및 생리활성이 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해 Nitric Oxide gas의 항암효과를 기대할 수 있었다. 이 연구를 통해 Nitric Oxide gas를 통한 항암기전에 대한 상세한 연구가 필요하다.