

Ramos B세포의 아포토시스 과정에서 이상 발현되는 Zinc Finger 유전자의 규명

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학원 암연구소

신민선 · 김수영 · 동승명 · 나은영 · 이석형 · 박원상 · 이정용 · 유남진

Identification of Zinc Finger Genes that are Differentially Expressed upon Apoptosis of Ramos B Cells

Min Sun Shin, Su Young Kim, Seung Myung Dong, Eun Young Na,
Sug Hyung Lee, Won Sang Park, Jung Young Lee, and Nam Jin Yoo

Departments of Pathology and Cancer Research Institute, College of Medicine,
The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea

Typical programmed cell death requires de novo macromolecular synthesis and shares common morphological changes referred to as apoptosis. To elucidate the molecular mechanism of apoptosis, we isolated 13 cDNA clones of zinc finger genes that are differentially expressed in calcium ionophore-induced apoptosis of Ramos human B cell by 'targeted RNA fingerprinting' protocol (Stone & Wharton, 1993). According to DNA sequence analysis of the 13 cDNA clones, three clones are identical with ZNF7, ZNF143 and MTB-Zf, respectively, and 8 out of the other 10 clones showed partial homology to known zinc finger genes. Differential expression was confirmed in the three known zinc finger genes by ribonuclease protection assay. ZNF7 and ZNF143 are up-regulated after induction of apoptosis, and, in contrast, MTB-Zf is down-regulated. According to the previous reports on these three genes, all of the three genes have been suspected to be tumor suppressor genes, but their functions have not been identified yet. Taken together, our results suggest that many of the novel and known zinc finger genes might play important roles in regulation of apoptosis and that these findings also provide clues as to the functions of the three putative tumor suppressor genes, ZNF7, ZNF143 and MTB-Zf in terms of apoptosis. In addition, the isolation of zinc finger genes by targeted RNA fingerprinting could be a straightforward approach for the identification of novel candidate genes associated with apoptosis. (Korean J Pathol 1998; 32: 1043~1048)

Key Words: Apoptosis, Zinc finger gene, B cell

서 론

면역계를 구성하고 있는 림프구들의 발생 및 분화과정에서 보면 이들의 상당수가 아포토시스에 의해 제거

되며, 이러한 현상에 의해 불필요한 림프구들이 제거됨으로서 면역계의 평형이 유지되는 것으로 생각되고 있다.¹ 따라서 림프구의 아포토시스 기전에 대한 이해는 림프구의 발달 및 분화 기전의 규명 뿐만 아니라, 림프구 계열 종양의 발생기전 및 치료 방법과 림프구들의 아포토시스 장애로 발생하는 자가면역질환들의 기전을 규명하는데 필수적이라고 하겠다. 그러나 현재까지 이에 대한 연구는 주로 아포토시스를 유발하는 외부 인자들에 국한되어 이루어졌고, 아포토시스를 유발시키는 외부자극 이후의 현상, 즉 세포 내 신호 전달 체계 및 이로 인해 발현되는 유전자들에 대한 연구는 아직 시작

접 수: 1998년 7월 11일, 게재승인: 1998년 11월 3일

주 소: 서울시 서초구 반포동 505, 우편번호 137-701

E-mail: goldfish@cmc.cuk.ac.kr

가톨릭의과대학 병리학교실, 유남진

본 연구는 1996년도 교육부 학술연구조성비(기초의학 BM 96-013)에 의하여 연구되었음.

ISSN : 0379-1149

단계이다.

B세포의 아포토시스에 대한 최근 보고에 의하면, 사람의 배중심(germinal center) B세포 기원의 세포주인 Ramos cell에서 칼슘운반체에 의해 유도된 아포토시스에서 전사조절인자 역할을 하는 일부 유전자들의 발현이 선행된다고 하였다.^{2,3} 한편, 최근 주로 전사인자의 기능을 하는 것으로 생각되는 수백 종의 zinc finger 유전자들이 계속 밝혀지고 있는데, 이 유전자들 중에는 아포토시스의 발생에 관여하는 유전자도 보고되고 있다. T세포의 경우에는 60종이나 되는 zinc finger 유전자들이 발현되는 것으로 알려져 있다. 반면에 동일한 림프구 계열인 B세포의 경우에는 아직 이에 대한 조사가 이루어져 있지 않다. 그러나 B세포에서도 상당한 수의 zinc finger 유전자가 발현되어 전사인자로서 작용하리라 생각되며, 이들이 또한 아포토시스 발생에 관여할 가능성 또한 높다고 하겠다.

최근, 특정 조건하에서 발현되는 zinc finger 유전자들을 검색하기 위해서 소위 targeted RNA fingerprinting이라는 방법이 개발되었다.⁴ 이 방법에서는 zinc finger family 유전자들이 공통적으로 가지고 있는 염기서열을 이용하여 primer를 제작하여 arbitrary primer와 함께 RT-PCR을 시행하여, 발현된 zinc finger 유전자들을 무작위로 증폭하여 전기영동을 실시하여 서로 다른 조건하에서 발현된 유전자들을 비교 검색하는 방법으로서, 이 방법을 이용하면 아직 보고되지 않은 새로운 zinc finger 유전자들도 검색이 됨으로서 기존 방법보다 포괄적인 조사 방법이라고 할 수 있다.

본 실험의 목적은 칼슘운반체에 의해 유도되는 B세포주의 아포토시스 모델에 targeted RNA fingerprinting 방법을 적용함으로써, B세포의 아포토시스 발생에 관여하는 zinc finger 유전자들을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 아포토시스 유도²

Burkitt lymphoma 계열의 세포주인 Ramos cell을 RPMI1640 (Gibco, Life Technology Ltd., Paisley, Scotland) /10%FCS에서 배양하여 세포 밀도가 1×10^6 cells/ml이 되었을 때, 칼슘운반체인 A23187 (Sigma Chemical Co., Poole, Dorset, GB)을 500 nM 처리한 후 0, 1시간, 2시간, 4시간이 경과한 후에 세포를 수거하여 실험에 사용하였다.

아포토시스 발생의 확인은 25 μ l cell suspension에 1 μ l dyc (100 μ g/ml acridine orange (Sigma St. Louis, MO), 100 μ g/ml ethidium bromide (Sigma St. Louis, MO))를 첨가하여 잘 섞는 후 형광 현미경으로 관찰하였다 (Fig. 1).⁵

2. Cytoplasmic RNA 추출

A23187를 처리한 시간 경과에 따라 (control, 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr) 세포로부터 cytoplasmic RNA를 추출하기 위해, A23187를 처리한 세포를 모은 다음, NP-40

lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1 mM MgCl₂)를 첨가하여 얼음위에 5분간 두었다. 4°C, 14000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모은 다음, phenol-chloroform extraction을 실시한 후, ethanol로 RNA를 침전시켰다. 분리된 total RNA와 cytoplasmic RNA 각각에 10 U DNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)를 첨가하여 37°C에서 한시간 배양한 후, 다시 phenol-chloroform extraction을 실시하여 ethanol로 침전시켜, DEPC 처리된 증류수에 용해시켰다.

3. Targeted RNA fingerprinting⁴

cDNA 합성을 위한 primer로 6개의 arbitrary primer를 사용하였고, 이들의 염기서열은 다음과 같다.

AP1-GAGAGCTAGCTT(AGCT)GC(CT)TT(AG)T,
AP2-GAGAGCTAGCTTGAA(GC)GT(CT)G,
AP3-GAGACTACTTAGTT(GC)GCTG,
AP4-GAGACTAGCTTACC(GC)TACG,
AP5-GAGAGCTAGCTTATC(AT)GGACC,
AP6-GAGAGCTAGCTTAGG(GC)TCAGA

2.5 μ g RNA, 10 μ M arbitrary primer를 70°C에서 10분간 둔 후, 5x first strand buffer, 10 mM DTT, 1 mM dNTP mixture, 200 U Superscript II 역전사효소 (GIBCO-BRL, Life Technology Ltd., Paisley, Scotland)를 첨가하여 47°C에서 한시간 동안 배양하여 cDNA를 합성하였다. 역전사 효소를 불활성화 시키기 위해 70°C에서 15분간 두었다. 5' primer로 zinc finger motif의 보존적인 부위를 포

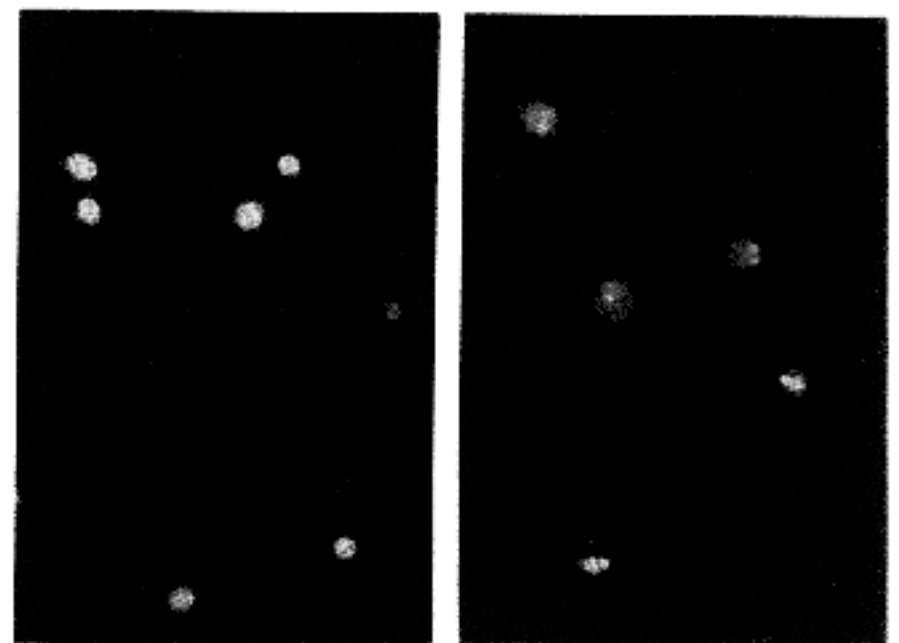


Fig. 1. Nuclear condensation of Ramos cells induced by calcium ionophore. Untreated Ramos cells (A) and cells treated with A23187 (500 nM) for 2 h (B) were stained with ethidium bromide and acridine orange, and nuclear staining of cells were examined with a fluorescence microscope. Stained nuclei were photographed at a magnification of $\times 400$. Nuclei of untreated cells showed a typically even and rounded fluorescence pattern (A) whereas cells with condensed and/or fragmented nuclei were evident in calcium ionophore treated cells (B).

합하도록 제작된 4개의 specific primer를 사용하였고, 이들의 염기서열은 다음과 같다.

Zn1-GTCGTCGAATTCCA(CT)AC(ACT)GG(AG)GAAAA ACC, Zn2-GTCGTCGAATTCCA(CT)AC(ACT)GG(AG)G AAAAGCC, Zn3-GTCGTCGAATTCCA(CT)AC(ACT)GG (AG)GAGAAACC, Zn4-GTCGTCGAATTCCA(CT)AC(A CT)GG(AG)GAGAAGCC

Specific primer와 이미 cDNA합성시 사용한 6개의 arbitrary primer를 3' primer로 PCR을 실시하였다. Arbitrary primer로 인해 생기는 비특이적인 band를 배제하기 위해 두번에 걸친 PCR를 실시하였다. cDNA 0.5 μ l, 10x reaction buffer 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 0.6 μ l, 1.25 mM dNTP mixture 0.16 μ l, 100 μ M specific primer 0.02 μ l, Taq polymerase (Promega, Madison, WI) 0.1 U를 넣고 전체 부피를 10 μ l로 하여 1st PCR (ERICOM)를 실시하였다. PCR 조건은 94°C 2분간 pre-denaturation을 실시한 후 94°C 1분, 50°C 2분, 72°C 3분으로 30 cycle 수행한 뒤 post-elongation은 72°C에서 5분으로 하였다. 1차 PCR 산물 10 μ l에 10x reaction buffer 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 0.6 μ l, 1.25 mM dNTP mixture 0.8 μ l, 100 μ M arbitrary primer 0.15 μ l, 100 μ M specific primer 0.15 μ l, 0.4 μ M [32-P]dCTP, Taq polymerase 0.1 μ l를 넣고 전체 부피가 20 μ l가 되게하여 2차 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 2분간 pre-denaturation을 실시한 후, 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분으로 하여 30 cycle을 수행한 뒤, 72°C 5분간 post-elongation을 하였다. 증폭된 cDNA를 6% DNA sequencing gel로 분리하여, autoradiography를 실시하였다. 개개의 cDNA band를 gel로부터 잘라서, DNA를 용출시킨 다음 동일한 PCR 조건으로 재증폭 하였다. 재증폭된 band를 TA cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 pCRII plasmid vector에 cloning하였다. DNA sequencing은 Sequenase version 2.0 (USB, Cleveland, Ohio)를 이용하여 실시하였고, 염기서열의 상동성 검색은 BLAST 프로그램을 이용하여 Gen Bank 데이터베이스를 검색하였다.

4. Ribonuclease protection assay (RPA)

RNA probe의 제작은 MAXIsript (Ambion, Austine, Texas)를 이용하여 in vitro transcription을 실시하였다. cDNA가 클론된 plasmid를 제한효소로 절단한 후, phenol-chloroform extraction을 실시하고, ethanol로 침전시킨 후, TE buffer로 용해시켜 1 μ g/ml의 농도가 되게 하였다. 증류수 7.9 μ l, 10x transcription buffer 2 μ l, 10 mM ATP 1 μ l, 10 mM CTP 1 μ l, 10 mM GTP 1 μ l, 10 mM UTP 0.1 μ l, [P-32]CTP 4 μ l, T7 RNA polymerase 2 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하여 In vitro transcription을 실시하였다. template DNA를 제거하기 위해 2 U DNase를 첨가하여 37°C에서 15분간 배양하였다. 6% denaturing gel상에서 합성된 RNA를 확인한 후, gel에서 분리하여 사용하였다.

RPA는 RPAII Kit (Ambion, Austine, Texas)를 이용하여 실시하였다. A23187를 시간대 별로 처리한 세포로부터 추출한 cytoplasmic RNA 30 μ g과 방사능으로 표지된 antisense RNA probe 1 ng을 함께 ethanol로 침전시켜, hybridization buffer 20 μ l에 녹였다. 90°C에서 3분간 변성시킨 다음, 42°C에서 16시간 배양하여 hybridization하였다. 200 μ l diluted RNase solution을 첨가하여 37°C에서 30분간 둔 후 침전용 용액 300 μ l를 넣어 -20°C에서 20분간 두었다. 4°C, 14000 RPM에서 15분간 원심분리해서 침전시킨 다음, gel loading buffer 8 μ l에 용해시켰다. 90°C에서 3분간 변성시켜 6% DNA sequencing gel로 분리하여, autoradiography를 실시하였다.

결 과

1. Targeted RNA fingerprinting (Fig. 2)

Arbitray primer 6가지와 zinc finger primer 4가지를 조합하여 총 24가지의 primer 조합을 사용하여 칼슘운반

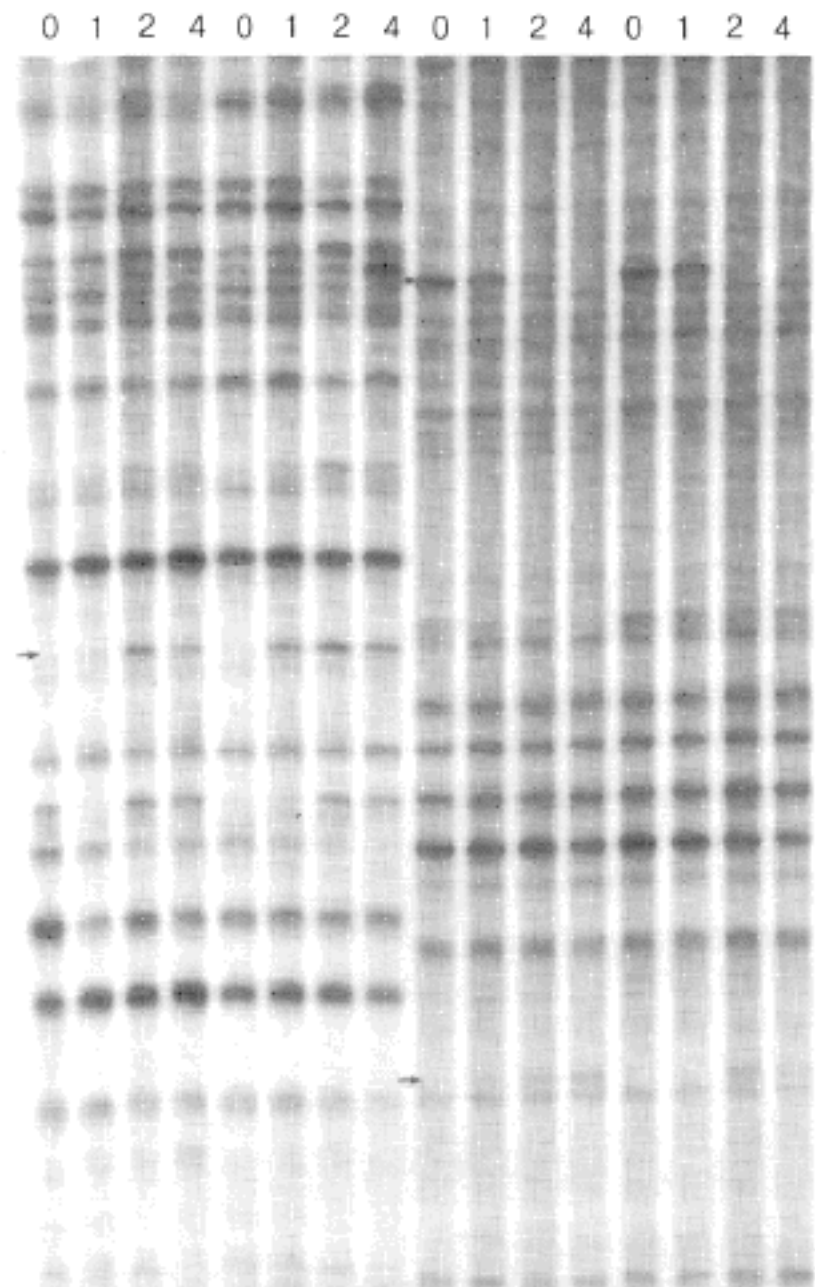


Fig. 2. Identification of differentially expressed genes by targeted RNA fingerprinting. Arrows indicate cDNA bands differentially expressed in Ramos cells treated with calcium ionophore. The number at the top of each lane indicate the hours of calcium ionophore treatment.

Table 1. Isolation of differentially expressed zinc finger genes

Clone	Expression pattern	Sequence homology
1	Increased	ZNF85 (86%)
2	Increased	ZNF7 (100%)
3	Increased	ZNF143 (100%)
4	Decreased	MTB-Zf (100%)
8	Increased	Za19d07.rl Soares Homo sapiens cDNA clone 293005 5' (91%)
10	Increased	Alu 2 region T cell receptor J delta fusion gene (52%)
11	Increased	ZNF37A (89%)
13	Increased	Zinc finger (M27877) (64%)
16	Increased	ZNF43 (82%)
17	Increased	ZNF73 (55%)
18	Increased	Finger protein 2, placental-human (106024) (48%)
20	Decreased	Krox (29%)
22	Increased	ZNF134 (83%)

체 A23187 처리로 아포토시스 유도후 시간별로 RT-PCR을 시행하였다. 전기영동후 서로 다른 시간대에서 나타나는 RNA들의 band의 강도를 기준으로 RT-PCR 산물이 균등하게 loading 되었는 지를 판단하였다. 대부분의 band들은 시간대별로 차이를 보이지 않았지만, 13개의 band가 아포토시스의 유도과정에서 발현의 변화를 보였다. 이 중에서 11개는 발현이 점차 증가하였고, 나머지 2개는 감소하였다.

2. 염기서열 분석 및 상동성 검색 (Table 1)

발현의 차이를 보이는 13개 cDNA를 gel로부터 용출시켜서, 재증폭한후 클로닝하여 염기서열분석을 한 결과 13개 모두에서 RT-PCR과정에서 사용하였던 primer의 염기서열이 발견되었다. 상동성 검색을 시행한 결과 3개의 유전자는 기존 보고된 zinc finger 유전자인 ZNF7, ZNF143 및 MTB와 동일한 염기서열을 보였고, 나머지 8개의 유전자는 기존 보고된 zinc finger 유전자와 부분적인 상동성을 보임으로서, 이것들은 기존 보고되지 않은 새로운 zinc finger 유전자로 판단되었다.

3. RPA를 이용한 ZNF7, ZNF143 및 MTB 발현의 재확인 (Fig. 3)

RPA를 이용하여 100% 상동성을 보였던 ZNF7, ZNF143 및 MTB 유전자들의 발현을 다시 확인해 본 결과 RT-PCR 결과와 일치 하였다. ZNF7은 A23187을 처리한 후 1시간 후부터 발현되어 점차 증가하였고,

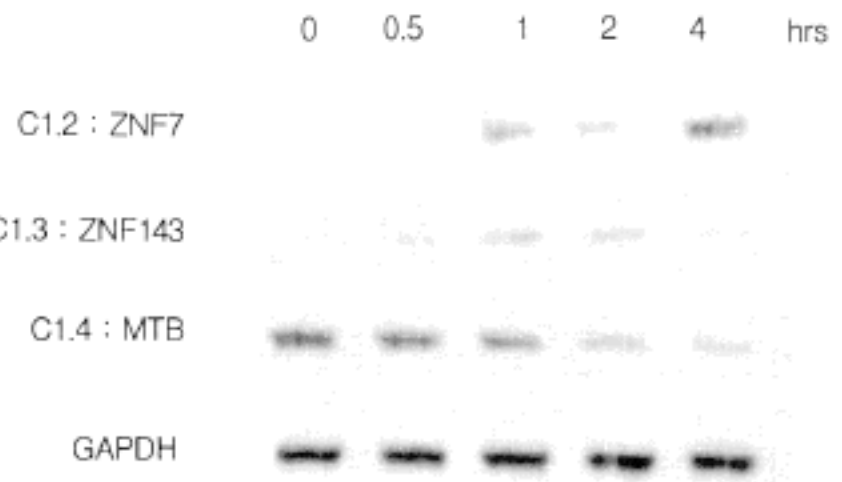


Fig. 3. Ribonuclease protection assay of three zinc finger genes. Time of ionophore treatment (in hours) is indicated at the top of each lane. Even loading of the gel was determined by GAPDH.

ZNF143은 A23187 처리 직후부터 발현이 점차 증가하면서 2시간대에 최고조로 발현되다가 다시 감소하였다. MTB의 경우에는 아포토시스 유도 후 점차 감소하는 양상을 보였다.

고 찰

본 연구에서 사용한 방법은 결과의 특이도를 높이기 위하여 기존 보고된 방법을 일부 수정하여 사용한 것이다.⁴ 본 연구자들의 예비 실험결과에 의하면, 기존 보고된 방식대로 zinc finger gene family의 conserved sequence에 해당되는 4종류의 specific primer와 6종류의 arbitrary primer를 여러가지로 조합하여 사용하여 PCR을 실시한 결과, specific primer는 다르고 arbitrary primer는 동일한 조합에 의한 PCR의 경우에 전기영동 상에서 증폭산물들을 비교하였을 때 동일한 크기의 band가 다수 출현하였다. 이러한 현상은 PCR 과정에서 specific primer가 작용하지 못하고 arbitrary primer만이 annealing되어 abundant RNA인 ribosomal RNA 등이 증폭되고 또한 이 현상으로 인해 목표하고 있는 zinc finger gene family에 속하는 유전자들의 증폭은 오히려 저해된 결과로 생각되었다. 따라서 연구자들은 상기한 현상을 극복하기 위하여, 역전사 실시후 실시하는 PCR을 두 단계로 나누어 실시하면서 첫 단계에서는 arbitrary primer 없이 specific primer만을 사용하는 일종의 'asymmetric PCR'을 실시하여 해당 gene family에 속하는 gene product의 양을 어느 정도 증가 시킨후 두 번째 PCR에서 specific primer와 arbitrary primer를 이용하여 증폭시켰다. 이 결과 기존 방식으로 실시한 경우에 출현하던 비특이적 증폭 산물로 생각되던 band들이 사라지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 이러한 방법을 이용하여 clone된 13개의 유전자들 중에서 10개의 clone이, 염기서열을 조사한 결과 zinc finger gene으로 판명됨으로서, 본 연구자들이 기존 방식을 일부 수정한 이 방법이 매우 특

이도가 높은 방법으로 판명되었다.

본 실험에서 클론된 유전자들 중에서 100% 상동성을 보인 3가지 유전자, 즉, ZNF7, ZNF143 및 MTB-Zf는 기존 보고에 의하면 이들은 모두 최근에 밝혀진 유전자들로서 이들의 기능은 아직 밝혀지지 않았지만, 각종 종양 발생과 관련이 있을 것으로 추측되는 유전자들이다. ZNF7은 8번 염색체에 존재하며 B세포를 비롯하여 여러 가지 세포에서 발현되는 것으로 알려져 있다.⁶ 이 유전자와 관련하여 특히 흥미로운 사실은 본 실험에서 사용한 Burkitt lymphoma 세포주인 Ramos cell을 비롯한 대부분의 Burkitt lymphoma 세포주들에서 이 유전자 부위가 methylation 되어 있어서 이 유전자의 발현이 되지 않는다는 점이다. 따라서 이러한 소견 때문에 ZNF7이 종양억제유전자로서의 기능을 할 것으로 추측하고 있다.⁷ 한편 본 실험 결과에 의하면 ZNF7이 아포토시스를 유도함에 따라 발현되기 시작했는데, 이는 ZNF7이 아포토시스를 유발하는 종양억제 유전자로서의 가능성을 시사한다고 하겠고, 아마도 아포토시스 유도과정에서 이 유전자 부위가 demethylation 되면서 발현되었으리라 생각된다.

ZNF143은 11번 염색체의 단완에 존재하며 이 부위는 월름종양, 간모세포종, 황문근모세포종 등 소아성 종양에서 흔히 소실되는 것으로 알려져 있다.⁸ 따라서 이 유전자도 ZNF7의 경우 처럼 본 실험 결과에 의하면 아포토시스 유도시 발현의 증가를 보임으로 아포토시스 유발과 관련된 종양억제 유전자로서의 기능을 하리라 추측된다.

MTB-Zf는 일명 RIZ로도 보고되어 있는 유전자로서, 동일한 유전자를 서로 다른 실험실에서 heme-oxygenase-1에 대한 전사인자와 Rb-binding protein으로 각각 보고하면서 붙인 이름들이다.^{9,10} 이 유전자는 1번 염색체 단완에 위치하는데, 이 부위가 신경모세포종, 간암, 대장암에서 흔히 소실되는 곳으로 보고된 위치이다. 따라서 이 유전자도 확실한 기능은 모르지만 상기한 2가지 유전자와 마찬가지로 종양억제 유전자로서의 기능을 하리라 생각된다. 본 실험 결과에 의하면 이 유전자는 아포토시스를 유도함에 따라 발현이 감소하였다. 상기한 2가지 유전자와는 반대의 경우인데, 이 유전자는 기존 보고에 의하면 여러 개의 alterantive splicing product가 존재하며 경우에 따라 발현 양상이 서로 다르게 나타난다고 한다. 따라서 본 실험에서는 RPA로 발현 양상을 조사하였기 때문에 어떤 크기의 전사체가 아포토시스 유도과정에서 감소한 것인지 알 수가 없었다. 본 유전자의 전사체의 종류에 따른 아포토시스에 대한 조절 기능에 대한 조사가 추가로 이루어져야 되리라 생각된다.

상기한 3가지 zinc finger 유전자들의 공통점은 첫째, 3가지 모두 기존 보고에 의하면, 여러 가지 종양에서 발현의 감소 내지는 유전자의 소실이 관찰됨으로서, 아직 확실한 기능은 모르지만, 새로운 종양억제 유전자로

추측되고 있다. 둘째, 본 실험 결과에 의하면 3가지 모두 아포토시스 유도 과정에서 발현의 변화를 보임으로서 아포토시스의 조절에 관여할 가능성이 있다. 일반적으로 지금까지 보고된 종양억제유전자의 기능은 세포 증식의 억제 내지는 아포토시스의 유도, 이 두가지로 집약된다. 따라서 기존 보고와 본 실험 결과를 종합하면, 이 3가지 zinc finger 유전자들은 아포토시스 조절과 관련된 종양억제유전자일 가능성이 높다고 하겠다. 그러나 antisense기법 등을 이용하여 해당 유전자의 기능을 억제한 상태에서 아포토시스를 유도하여 세포의 변화를 조사함으로써, 이 유전자들의 아포토시스 조절에 대한 관련 여부와 더불어 조절 기전 등에 대한 확실한 규명이 이루어지리라 생각된다.

결론적으로, 본 실험의 결과에 의하면, 많은 zinc finger 유전자들이 B세포의 아포토시스 조절 기능을 하리라 생각되며, 특히 새로운 종양억제유전자로 예상되는 3가지 zinc finger 유전자 즉, ZNF7, ZNF143 및 MTB-Zf가 아포토시스 유도과정에서 발현의 변화를 보인다는 것을 본 실험을 통하여 처음으로 발견함으로써 앞으로 이 유전자들의 기능 연구에 중요한 단서를 제공하리라 생각된다. 또한 본 실험을 통하여 기존 targeted RNA fingerprinting 방법을 일부 수정하여 아포토시스 실험 모델에 성공적으로 적용함으로써 이 방법이 아포토시스 관련 유전자들을 동정하는데 유용한 방법이라고 생각된다.

결 론

전형적인 programmed cell death는 이 과정에 필요한 유전자들의 발현이 수반되며, 아포토시스라는 형태학적 변화를 공통적으로 보인다. 본 연구자들은 B 세포에서 아포토시스 발생 기전을 밝히기 위하여, 칼슘운반체 투여시 발생하는 Ramos B 세포의 아포토시스 유도과정에서 발현의 변화를 보이는 zinc finger 유전자들을 targeted RNA fingerprinting 방법을 이용하여 동정하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) targeted RNA fingerprinting 시행 결과, 13개의 RNA가 아포토시스의 유도과정에서 발현의 변화를 보였다. 이 중에서 11개는 발현이 점차 증가하였고, 나머지 2개는 감소하였다.

2) 염기서열분석을 하여 상동성 검색을 시행한 결과 13개 중에서 3개는 기존 보고된 zinc finger 유전자인 ZNF7, ZNF143 및 MTB-Zf와 동일한 염기서열을 보였고, 나머지 10개중에서 8개는 기존 보고된 zinc finger 유전자와 부분적인 상동성을 보임으로서, 이것들은 기존 보고되지 않은 새로운 zinc finger 유전자로 판단되었다.

3) RPA를 이용하여 ZNF7, ZNF143 및 MTB-Zf의 발현을 재확인한 결과에 의하면 ZNF7은 1시간대에서 부터 발현되어 점차 증가하였고, ZNF143은 발현이 점차 증가하면서 2시간대에 최고조로 발현되다가 다시 감소

하였다. MTB의 경우에는 아포토시스 유도후 점차 감소하는 양상을 보였다.

이상의 결과로 많은 zinc finger 유전자들이 B세포의 아포토시스 조절 기능을 하리라 생각되며, 특히 3가지 zinc finger 유전자 즉, ZNF7, ZNF143 및 MTB-Zf가 아포토시스 유도과정에서 발현의 변화를 보인다는 것을 본 실험을 통하여 처음으로 발견함으로써 앞으로 이 유전자들의 기능 연구에 중요한 단서를 제공하리라 생각된다. 또한, 본 실험을 통하여 targeted RNA fingerprinting 방법을 아포토시스 실험 모델에 성공적으로 적용함으로써, 이 방법이 아포토시스 관련 유전자들을 동정하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Green DR, Scott DW. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 476-87.
2. Ning Z, Murphy JJ. Calcium ionophore-induced apoptosis of human B cells is preceded by the induced expression of early reponse genes. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3369-72.
3. Ning Z, Norton JD, Johnson D, Murphy JJ. Early gene signalling-dependent and-independent induction of apoptosis in Ramos human B cells can be inhibitory by over-expression of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 23-9.
4. Stone B, Wharton W. Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 2612-8.
5. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis. In: Schwartz LM, Osborne BA, ed. *Cell death*. San Diego: Academic Press, 1995; 153-87.
6. Lania L, Donti E, Pannuti A, et al. cDNA isolation, expression analysis, and chromosomal localization of two human zinc finger genes. *Genomics* 1990; 6: 333-40.
7. Feduchii E, Gallego MI, Lazo PA. The human zinc-finger protein-7 gene is located 90 kb 3' of MYC and is not expressed in Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 1994; 58: 855-9.
8. Tommerup N, Vissing H. Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* 1995; 27: 259-64.
9. Muraosa Y, Takajashi K, Yoshizawa M, Shibahara S. cDNA cloning of novel protein containing two zinc-finger domains that may function as a transcription factor for the human hemo-oxygenase-1 gene. *Eur J Biochem* 1996; 235: 471-9.
10. Buyse IM, Shao G, Huang S. The retinoblastoma protein binds to RIZ, a zinc-finger protein that shares an epitope with the adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4467-71.