

p388D₁ 세포주에서 혈청결핍시 발현되는 유전자의 분리

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

김수영 · 김상호 · 이석형 · 유남진 · 이정용 · 김주성

Identification of Differentially Expressed Genes from Serum Deprived p388D₁ Cells

Su Young Kim, Sang Ho Kim, Sug Hyung Lee, Nam Jin Yoo
Jung Young Lee, and Choo Soung Kim

Department of Pathology, Catholic University College of Medicine, Seoul 137-701, Korea

This experiment is designed to find differentially expressed genes in p388D₁ cells that are specific for the serum deprived state. Serum starvation induces cells to enter the quiescent state in the cell cycle and is used to arrest cell growth or synchronize the cell cycle. Differential display and ribonuclease protection assay were used to identify quantitative change in gene expression. Nineteen genes that showed a differential expression in the differential display were cloned and 7 clones were verified by a ribonuclease protection assay. Among the 7 clones clone-16 showed same expression pattern in comparison with the differential display. Deduced amino acid sequences of clone-16 had N-glycosylation motif and seems to be a secretory protein. Getting a full sequence of clone-16 is critical for the characterization of it. (Korean J Pathol 1998; 32: 488~493)

Key Words: Growth arrest, Differential display, Gene expression

서 론

정상세포는 세포주기¹가 엄격히 통제되어 있는데, 정상적인 통제로 조절되지 않는 세포의 증식을 통해 종양이 생기게 된다. 이러한 세포주기와 종양의 관계가 알려지면서 세포의 증식은 여러 측면에서 연구의 주제가 되어왔다. 세포의 증식을 유도하는 성장인자와 종양유전자의 상호작용에 대한 연구가 발표되었고,^{2,3} 종양의 치료 및 예방의 차원에서 세포증식을 이해하고 세포주기의 조절인자의 규명에 많은 노력이 쏟아졌다. 이러한 맥락에서 성장인자의 영향과,⁴ 종양유전자의 작용들이 알려지기 시작했다.

이렇듯 대부분의 연구가 주로 세포증식을 유도하는 인자에 관하여 이루어져 왔으나 특정 유전자에 의해 세

포증식이나 형질전환이 억제된다는 제안⁵이 나오면서부터 세포증식을 억제하는 인자들에 관심을 두기 시작하였다. 이후 세포증식 억제에 관여하는 유전자들이 밝혀지고⁶ 이들 유전자의 특성⁷⁻⁹ 및 다른 유전자와의 상호작용^{10,11}들이 보고되었다. 혈청제거나 제한배지 등의 성장억제 상태에서도 증식을 계속하는 것이 종양세포의 특징인 것을 감안하면 성장억제에 대한 연구가 종양연구에서 중요한 위치를 차지하고 있다는 것을 알 수 있다.

이러한 세포성장 억제에 관여하는 유전자들의 규명은 우태아혈청 결핍상태에서 세포를 배양하여 세포증식을 억제시키는 실험모델을 사용하여 왔다. 우태아혈청이 없는 배지에서 배양하는 것은 세포주기에 들어있는 세포를 휴지기로 유도하여 세포주기의 동일화 (synchronization)를 유도하는데 쓰이는 방법으로,^{12,13} 이것이 세포배양에서 세포의 증식을 억제하는 것은 널리 알려진 사실이나 아직 그 기전은 잘 알려져있지 않다.¹⁴ 이러한 모델에서 유전자 발현의 차이를 발견하기 위해 사용해온 것이 cDNA subtraction method이다. 이 방법은 비교적 풍부한 mRNA species에 대하여 그 차이를 발견

접 수: 1998년 3월 10일, 게재승인: 1998년 5월 25일

주 소: 서울시 서초구 반포동 505, 우편번호 137-701

가톨릭의대 병리학교실, 김수영

ISSN : 0379-1149

할 수 있으나 시간이 많이 들고 기술적으로 여러단계를 거치는 어려운 방법에 속한다.¹⁵ 따라서 기존의 방법을 통해서 검출될 수 있는 유전자의 범위가 제한적이라 할 수 있다.

이러한 단점을 보완하기 위하여, 세포에서 발현되는 유전자를 정량적으로 검출할 수 있는 민감한 방법으로 근래에 사용되는 것이 differential display이다.^{16,17} 이 방법의 원리면에서 중요한 점은 첫째, 역전사 과정에서 anchored oligo-dT primer를 사용한다는 점, 둘째, PCR을 이용하여 cDNA를 증폭시에 5' primer로서 arbitrary primer를 사용함으로써 해당 mRNA의 전체 길이의 일부만이 증폭되게 한 점, 셋째, 증폭된 cDNA를 크기별로 효율적으로 분리하기 위하여 sequencing gel을 이용한다는 점이다. 이 방법을 사용하면 증폭시 사용한 arbitrary primer의 종류에 따라 적게는 50종류, 많게는 150종류의 mRNA가 무작위로 증폭되는데, 이 때 arbitrary primer를 사용함으로써 해당 mRNA의 전체길이의 일부만이, 즉 100~500 base 크기로 증폭된다. 따라서 증폭된 cDNA의 숫자와 크기가 sequencing gel 상에서 각 band의 비교 분석이 용이한 정도로 결과가 나오게 된다. 지금까지 소개 및 사용되고 있는 primer의 종류는 anchored primer는 4~12종, arbitrary primer는 20~26종 정도로서 이 두 부류의 primer를 다양하게 조합하여 사용함으로써 발현되는 거의 모든 유전자들 (약 15,000 종)을 검색할 수 있으리라 생각되고 있다

본 연구는 마우스 단구 세포주인 p388D₁ 세포를 24시간 및 48시간동안 우태아혈청을 결핍시켜 성장을 억제시켰을 때 발현이 증가하는 새로운 유전자를 differential display, TA cloning 방법, 상동성 검색 및 ribonuclease protection assay 방법을 동원하여 찾아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포배양

마우스 단구 세포주인 p388D₁ (ATCC, Rockville, MD, USA)을 10% 우태아혈청 (Atlanta Biologicals, Norcross, GA, USA)을 함유한 RPMI-1640배지 (Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA)에서 3군으로 나누어 배양하였다. 아무 처치를 가하지 않은 군을 대조군 (A군)으로 하고 혈청결핍 24시간군 (B군)과 혈청결핍 48시간군 (C군)은 RPMI-1640배지로 3번 수세한 후 2×10^6 cells/ml의 농도로 우태아혈청없이 배양하였다. B군과 C군은 우태아혈청을 첨가한 군에 비해 각각 30%와 50%의 세포수 감소를 보였다.

2. RNA 추출

앞에서 정한 시간에 각 군의 세포를 수거하여 이들 세포에서 total RNA를 추출하기 위하여 Trizol (Life Technologies)을 제작자의 방법대로 사용하였다. RNA

추출 과정에서 제거되지 않은 DNA를 제거하기 위하여 RNase-free DNase I (10 units/ μ l) 2 μ l과 RNasin (40 U/ μ l) 0.5 μ l을 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다.

3. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

cDNA를 만들기 위해 oligo (dT) primer 0.5 μ g, total RNA 2.5 μ g을 70°C에서 변성시킨 다음, 10 mM dNTP 1 μ l와 Superscript (200 U/ μ l, Life Technologies) 1 μ l를 이용하여 42°C에서 50분간 역전사하였다. 이어서 10배 희석한 이 cDNA 1 μ l를 template로 하고 primer들 (20 μ M) 각각 1 μ l, dNTP (5 mM) 0.2 μ l, ³²P-dATP (1,000~3,000 Ci/mmmole; 3.3 μ M) 0.1 μ l, Taq polymerase (5 U/ μ l) 0.4 μ l를 혼합한 후 PCR 기계 (PTC-100, MJ Research, Watertown, MA, USA)로 증폭하였다. 이 때 사용한 primer들과 조건은 Delta RNA Fingerprinting Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA)의 방법을 사용하였다.

Table 1에 보인 19개의 primer들을 이용하여 90가지의 조합을 만들어 실험하였다. PCR 첫 3 cycle은 low stringency condition으로 하기 위하여 annealing 온도를 40°C로 하였다. 첫 cycle의 조건은 94°C에서 5분, 40°C에서 5분, 72°C에서 5분이었고 그 다음 두 cycle은 94°C에서 2분, 40°C에서 5분, 72°C에서 5분이었다. 이후 시행한 35 cycle은 94°C에서 1분, 40°C에서 1분, 72°C에서 2분이었으며, 끝으로 72°C에서 7분동안 반응시켰다.

Table 1. Primers used in the differential display

Arbitrary primers

- P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
- P2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'
- P3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
- P4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
- P5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
- P6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
- P7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
- P8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
- P9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
- P10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'

Oligo (dT) primers

- T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAA-3'
- T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAC-3'
- T3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTAG-3'
- T4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCA-3'
- T5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCC-3'
- T6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTCG-3'
- T7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGA-3'
- T8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGC-3'
- T9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTGG-3'

4. Polyacrylamide gel 전기영동 및 자가방사기록법

PCR 산물은 5% polyacrylamide gel을 이용하여 50°C, 90W 상태에서 7시간동안 전기영동하여 분리하였다. Whatman 용지에 gel을 건조시킨 후 -20°C에서 하룻밤 동안 X-ray 필름에 노출시켰다.

5. 클로닝

A군에서는 발현되지 않으나 B군과 C군에서 발현되는 band들을 gel에서 잘라 50 µl의 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA에 넣고 100°C에서 5분간 끓여 cDNA를 분리하였다. 얻어진 cDNA를 RT-PCR에 사용했던 primer들로 같은 조건에서 PCR로 증폭시켰다. TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbed, CA, USA)를 이용하여 insert를 pCRII plasmid에 삽입하였는데, 이때 사용한 insert로는 50배 희석한 PCR 산물 1 µl를 사용하였으며 vector (25 ng/µl) 1.5 µl, T4 DNA ligase (4.0 U/µl) 1 µl를 혼합하여 4°C에서 하룻밤동안 반응시켰다. *E. coli*에 transfection시키기 위해 One Shot Cell (Invitrogen)을 얼음위에서 녹이고 0.5 M mercaptoethanol 2 µl를 혼합한 다음, insert가 든 plasmid 1.5 µl를 섞어 30분간 얼음위에 둔 후, 42°C에서 30초간 열을 가했다. 다시 2분동안 얼음위에 둔 후 SOC 배지 450 µl를 가해 1시간동안 37°C, rotary shaker로 배양하였다. Transfection된 *E. coli*만을 구분하기 위해 X-gal과 ampicillin(50 µg/ml)이 든 LB agar plate에 도말한 후 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 각 plate에서 흰색 집락을 2개씩 따서 ampicillin(50 µg/ml)이 든 배지에서 14시간 동안 37°C, rotary shaker에서 배양하였다.

6. plasmid 추출

배양한 *E. Coli*를 8,000 RPM으로, 1분동안 원심분리하여 얻은 다음 lysis buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 4 mg/ml lysozyme) 100 µl에 재부유하였다. 실온에서 5분 동안 반응시키고 다시 알칼리용액 (0.2 N NaOH, 1% SDS)을 가하여 5분 동안 얼음위에 방치하였다. 차가운 potassium acetate 용액 (3 M potassium acetate, 11.5% glacial acetic acid)을 넣고 흔든 다음 얼음위에서 10분간 방치 후 원심분리 (14,000 RPM, 15분)하였다. 상청액을 수거하여 0.6 volume의 isopropanol을 가해 plasmid를 침전시켰다. 70% ethanol로 세척하고 TE buffer 100 µl에 녹여 다음 실험때까지 -20°C에 보관하였다.

7. 염기서열 분석

1/20로 희석한 plasmid를 template로 하여 RT-PCR 때와 같은 조건으로 PCR하여 증폭하고 5 µl를 취하여 Sequenase (United States Biochemical, Cleveland, OH, USA)를 이용한 염기서열 분석에 사용하였다. 먼저 exonuclease I (10.0 U/µl)과 shrimp alkaline phosphatase (2.0 U/µl)를, 각각 1 µl을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰

다. 80°C에서 15분간 가열하여 효소의 작용을 정지시킨 다음 5 µl를 M13 primer (20 pmol/µl) 1 µl를, 증류수 4 µl와 섞어 100°C에서 3분동안 변성시켜 얼음위에 보관하였다. 여기에 reaction buffer 2 µl, DTT (0.1 M) 1 µl, diluted labeling mix 2 µl, ³⁵S dATP 0.5 µl, Sequenase DNA polymerase 2 µl를 섞어 실온에서 5분간 반응시켰다. 다시 3.5 µl씩 취하여 4개의 G, A, T, C termination tube에 넣고 37°C에서 7분간 반응시킨 후 4 µl의 반응정지 용액을 넣어 반응을 정지시켰다. 이것을 5% polyacrylamide gel을 이용 90 W에서 2시간 30분간격으로 3회 loading하였다. Whatman 용지에 gel을 건조시킨 후 실온에서 사흘동안 X-ray 필름에 노출시켰다.

8. 상동성 검색

클론된 염기서열을 인터넷을 통하여 National Center for Biotechnology Information(URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 GenBank에 등록된 유전자들의 서열과 BLAST 프로그램^{18,19}을 이용하여 비교하였다.

9. Ribonuclease protection assay (RPA)

클론된 염기서열이 실제로 발현에 차이를 보이는지 검증하기 위하여 RPA II kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용, ribonuclease protection assay를 시행하였다. 이때 사용한 탐식자는 MAXIsript kit (Ambion)를 이용하여 제작하였다. 앞에서 클론하여 얻은 cDNA 1 µg에 10x transcription buffer 2 µl, 10 mM ATP, CTP, GTP, 각각 1 µl, ³²P-UTP 12.5 µM, T7 RNA polymerase (5 U/µl) 2 µl를 혼합하고 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 다시 RNase-free DNase I (2 U/µl) 1 µl을 첨가하여 15분동안 37°C에서 반응시켜 탐식자를 만들었다. 대조군으로 쓸 beta-actin 탐식자는 cDNA 대신 클론된 mouse beta-actin을 사용하여 앞의 방법과 동일하게 제작하였다. 이렇게 만든 탐식자 500 pg을 20 µg RNA와 섞은 후 1/10배 용량 NH₄OAc (5 M)과 2.5배 용량 ethanol을 넣어 침전시켰다. 15분동안 -20°C에 방치한 후 원심분리로 모으고 ethanol을 조심스럽게 제거한 후 실온에서 5분동안 건조시켰다. 침전물을 보합(保合)완충액에 녹이고 90°C에서 4분간 가열하였다. 다시 45°C 배양기에서 하룻밤동안 방치하여 보합시키고 희석한 RNase 용액 200 µl을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켜 보합이 일어나지 않은 RNA를 제거하였다. 여기에 RNase inactivation/precipitation 혼합액 300 µl을 가해 반응을 정지시키고 남아있는 RNA를 침전시켰다. -20°C에서 15분간 방치한 후 5% polyacrylamide gel에서 500 V 전압으로 5시간동안 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel을 Whatman 용지에 건조시켜 X-ray film에 1시간동안 노출시켰다.

결 과

B군과 C군에서 새로이 발현되는 띠들은 매우 많았으

Table 2. Nucleotide sequence of clone-16

CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTC^aAGATCTCAAAGACATTTATTATTTT
 TGAAAGGCTGAGGGGGACTTTACAAGAGTTTGAAGCCAGTAACTACAATGGATGA
 TAAATAAAATACAAAGCCAGTATGTTGTGTTTCATACAGCATTAGTGAGGGTTAA
 TA^b

^aShadow area is T4 primer sequence, ^bShadow area is P7 primer sequence

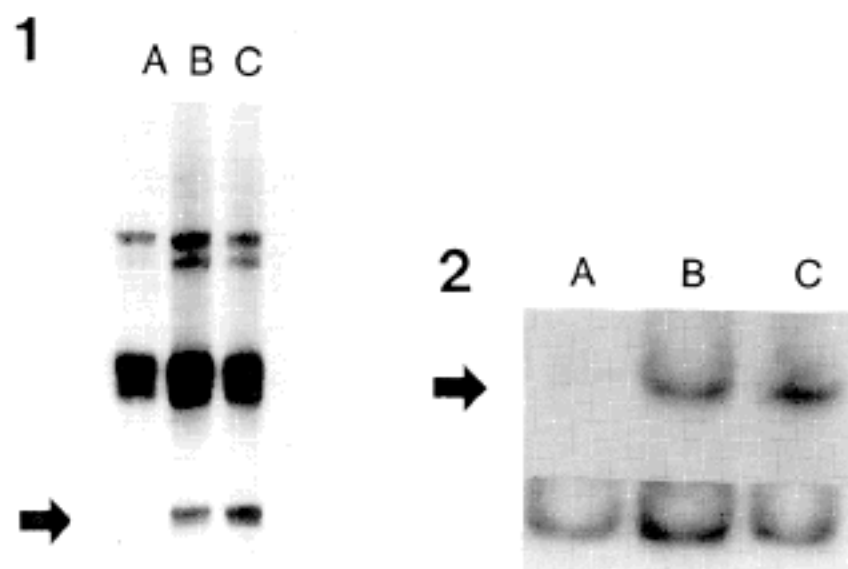


Fig. 1. Electrophoretic patterns of the differential display of clone-16. It showed differentially expressed DNA bands in group A, B and C. In group B and C, a few new bands were appeared and some bands of amplified expression were noted in comparison with group A.

Fig. 2. Electrophoretic patterns after ribonuclease protection assay. The bands indicated showed same pattern of expression as in Figure 1. Bottom bands are beta-actins of mouse.

나 (Fig. 1) 그 중 그 차이가 현저하다고 생각되는 19개를 분리하였다. 이들 sequence tag를 TA cloning 방법으로 클론하였고 모두 염기서열을 밝혔다. 밝혀진 염기서열을 Gene Bank에 등록된 서열과 비교하여 rRNA나 중복되어 검출된 클론들을 제외한 7개에 대해 ribonuclease protection assay를 시행하였다. 그 결과 6개는 발현의 양상이 앞서의 differential display와 달랐고 clone -16만이 동일한 양상을 보였다 (Fig. 2). 이 때 대조군으로 RPA II Kit (Ambion)에 포함된 beta-actin을 이용하였다. clone -16의 양끝의 primer 서열을 제외한 나머지 서열 (Table 2)을 이용하여 상동성 검색을 한 결과, BLAST 프로그램에서 clone-16와 상동성을 보이는 알려진 유전자들 (Table 3)은 probability number가 높아서 상동관계를 보인다고 보다 서열의 일부가 우연히 일치한 것으로 보여진다. 이와는 대조적으로 expressed Sequence Tags database에서는 clone-16과 염기 한두개 차이를 보이는 cDNA들이 발견되었다. 그러나 이 cDNA들은 아직 발현조건이나 기능 및 전체 유전자가 밝혀져 있지 않은 상태이다.

clone-16의 특성을 알아보기 위하여 가능한 6가지 frame으로 번역을 하여 보았는데 이 중 한 개의 frame에

Table 3. Known genes homologous to clone-16

Genes	High score	Probability number
<i>Mus musculus</i> platelet-activating factor, acetylhydrolase 45 kD subunit (Pafaha/Lis1) gene, exon 1	100	0.66
Human gene for L-histidine decarboxylase	122	0.71
<i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid K04B12	121	0.78

Table 4. The deduced amino acid sequence of clone-16

-Asn-Thr-Thr^a-Tyr-Trp-Leu-Cys-Ile-Leu-Phe-Ile-Ile-His-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gln-Thr-Leu-Val-Lys-Ser-Pro-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Ile-Ile-Asn-Val-Phe-Glu-Ile-

^aShadow area is N-glycosylation motif (20)

서 stop codon이 없는 open reading frame이 발견되었고 그 아미노산 서열을 Table 4에 보였다. 이 아미노산 서열에서 N-glycosylation motif 부위가 발견되었다.

고 찰

이상의 실험을 통해 우태아혈청이 없는 배지에서 특이적으로 발현되는 유전자의 cDNA 부분을 클론하고 그 염기서열을 밝혔다.

Schneider⁶은 NIH3T3 세포주를 이용한 실험을 통해 우태아혈청 결핍상태에서 특이적으로 발현하는 growth arrest specific (*gas*) gene 6개를 보고하였는데 본 실험에서 *gas* 유전자는 하나도 발견되지 않았다. 이러한 발현의 차이를 다음의 몇가지 원인들로 생각해 볼 수 있다. 먼저 본 실험에 사용한 primer 조합에 *gas* 유전자들이 검출되지 않았을 가능성이 있다. PCR 조건을 low stringency상태로 하였지만 모든 mRNA가 이 primer 조합에 검출되리라 기대할 수는 없다. 둘째로 그들의 실험에서 사용한 세포주 및 일차 배양세포와 본 실험의 세포주가

다르다는 점을 들 수 있다. 따라서 *gas* 유전자는 그 발현에 있어서 조직 특이성을 보인다고 생각할 수 있겠다. 또다른 이유로 배양 과정에서의 형질변환을 생각할 수 있다.²¹ 이로 인하여 우태아혈청 결핍이 성장억제에 충분한 자극으로 작용하지 못했을 가능성이 있다.

RPA 결과로 볼 때 clone-16는 혈청제거후 24시간 이내에 발현하고 이로부터 24시간 이상 지속적으로 발현되는 양상을 보였다 (Fig. 2). clone-16이 혈청제거 상태에서 발현하는 것은 확실하지만 아직 그 발현이 세포에서 성장억제를 유도한다고 말할 수는 없다. 그 관계의 규명을 위해서는 본 실험에서 알아낸 cDNA 조각을 탐식자로 하여 cDNA library를 이용, 전체 유전자 서열을 알아내어 단백질 합성을 하고 그 산물을 투여하여 세포의 반응을 보거나, antisense sequence를 transfection하여 해당 유전자의 발현을 막은 상태에서 혈청제거에 대한 반응을 보는 연구를 수행하면 보다 많은 정보를 얻으리라 생각된다.

Clone-16이 기존의 연구에서 발견되지 않았던 것은 앞서 언급한 이유외에도 유전자 발견에 사용된 방법의 민감도 차이로 보인다. Liang과 Pardee¹⁶가 differential display를 처음 보고하면서 이미 기존의 cDNA subtraction에 비해 민감도가 매우 높다고 밝힌바 있다. 이후 Liang과 Pardee²²는 Northern blot에서 유전자 발현의 차이를 증명하지 못하는 이유로 위양성과 적은 수의 mRNA를 들고 있다. 따라서 정상 상태에서 clone-16은 세포내의 mRNA 수가 적은 유전자일 수도 있다.

Differential display는 앞에 언급한 것처럼 민감도가 높은 반면에 위양성의 빈도가 높은 단점이 있다.²³ 본 실험에서도 RPA를 시도한 7개 클론 중에서 1개만이 differential display와 동일한 패턴이 나왔다는 것에서 알 수 있다.

앞에서 밝혀진 clone-16의 염기서열에서 추측한 폴리펩타이드가 N-glycosylation motif를 가지는 것으로 보여 지는데, N-glycosylation은 asparagine의 NH₂기에 올리고당이 붙어 당단백질이 만들어지는 반응으로 O-glycosylation과 함께 secretory apparatus를 통과하는 거의 모든 단백질에서 일어난다.²⁰ 따라서 clone-16이 분비단백을 생산할 가능성이 있다. 그러나 밝혀진 염기서열이 짧기 때문에 지금의 결과로 clone-16의 염기서열의 의미를 결론지을 수는 없을 것으로 보인다.

본 연구에서 differential display 방법을 이용하여 성장 인자가 결핍된 상태에서 발현이 증가하는 유전자의 일부 염기서열을 밝혀내었다. 세포의 성장이 정지된 상태에서 발현되는 유전자는 여러 가지 면에서 중요한 의미를 갖는다. 첫째는 세포 분열과정의 진행을 억제하는 지금까지 알려지지 않은 새로운 성장 억제 유전자로서의 가능성과, 둘째로는 지금까지, 세포 분열과정의 진행을 억제하는 여러 가지의 성장억제 유전자가 밝혀졌고, 이중의 일부는 많은 종류의 암에서 돌연변이를 일으켜 기능이 소실됨으로서 암발생과정에서 관여하는 것으로

알려짐으로써, 새로운 종양억제 유전자의 가능성이다. 따라서, 본 실험에서 발견한 새로운 유전자에 대한 확실한 기능 연구를 위해서는 전체 유전자의 염기서열을 밝히고 이를 이용한 기능적 연구가 추가로 이루어져야 한다고 생각한다.

결 론

본 연구에서 마우스 단구 세포주인 p388D₁ 세포를 24시간 및 48시간동안 우태아혈청을 결핍시켜 성장을 억제시켰을 때 발현이 증가하는 새로운 유전자를 differential display, TA cloning 방법, homology search 및 ribonuclease protection assay 방법을 동원하여 찾아보았다.

그 결과, differential display에서 각 군간에 차이를 보인 여러 띠들 중, 그 차이가 현저하다고 생각되는 19개의 클론을 분리하여 그 염기서열을 알아보았다. 이 중에서 rRNA와 중복되는 클론을 제외한 7개의 클론에 대해 ribonuclease protection assay를 시도하였고, 이 중 한 유전자 (clone-16)가 differential display와 같은 유형의 발현을 보였다. clone-16은 기존의 알려진 유전자들과 상동성이 적어 새로운 유전자의 일부로 여겨진다. clone-16의 염기서열에서 추론한 폴리펩타이드는 N-glycosylation motif를 가지고 있으며 분비성의 단백질로 여겨지나 정확한 규명을 위하여는 cDNA library를 이용해 해당 유전자의 전체 염기서열을 밝히는 것이 필요하다.

참 고 문 헌

1. Howard A, Pelc SR. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 1953; 6(Suppl): 261-73.
2. Kluftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1992; 1: 97-105.
3. Gashler AL, Bonthron DT, Madden SL, Rauscher FJ 3d, Collins T, Sukhatme VP. Human platelet-derived growth factor A chain is transcriptionally repressed by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10984-8.
4. Cochran BH, Reffel AC, Stils CD. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 33: 939-47.
5. Stanbridge EJ, Der CJ, Doersen CJ, et al. Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenesis. *Science* 1982; 215: 252-9.
6. Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988; 54: 787-93.
7. Sal GD, Collavin L, Ruaro ME, et al. Structure, function,

- and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine *gas1* gene. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 1848-52.
8. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Scheider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (*gas6*) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. Mol Cell Biol 1993; 13: 4976-85.
 9. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. Oncogene 1996; 12: 471-80.
 10. Stitt TN, Conn G, Gore M, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, *gas6*, are ligands for the tyro 3/*axl* family of receptor tyrosine kinase. Cell 1995; 80: 661-70.
 11. Varnum BC, Young C, Elliott G, et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. Nature 1995; 373: 623-6.
 12. Liu YC, Chen GS, Liu WL, Wen SF. Estimation of PCNA mRNA stability in cell cycle by a serum-deprivation method. J Cell Biochem 1995; 57: 641-6.
 13. Liu YC, Liu WL, Ding ST, Chen HM, Chen JT. Serum responsiveness of the rat PCNA promoter. Exp Cell Res 1995; 218: 87-95.
 14. Straus DS. Nutritional regulation of hormones and growth factors that control mammalian growth. FASEB J 1994; 8: 6-12.
 15. Davis L, Kuehl M, Battey J. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1994: 509-48.
 16. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 1992; 257: 967-71.
 17. Lee JJ, Costlow NA. A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels. Meth Enzymol 1987; 152: 633-48.
 18. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215: 403-10.
 19. Altschul SF, Boguski MS, Gish W, Wootton JC. Issues in searching molecular sequences databases. Nat Genet 1994; 6: 119-29.
 20. Lewin B. Genes VI. New York: Oxford University Press Inc, 1997; 1027-51.
 21. Freshney RI. Culture of animal cells - a manual of basic technique. 2nd ed. New York: Alan R Liss Inc., 1987.
 22. Liang P, Pardee AB. Recent advances in differential display. Curr Opin Immunol 1995; 7: 274-80.
 23. Debouck C. Differential display or differential dismay? Curr Opin Biotechnol 1995; 6: 597-9.
-