

# 신장특이성 전사인자 Kid-1의 유전자 구조

경희대학교 의과대학 내과학교실

이 태 원

## Renal Transcription Factor Kid-1 Gene

Tae-Won Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Kyung Hee University, College of Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

신장은 심장의 심근세포나 뇌의 신경세포와는 달리 허혈성 또는 독성 손상을 받더라도 상피세포가 재생되고 기능을 회복하는 복원력을 가지고 있다. 신손상 및 복구 과정은 상피세포의 탈분화(dedifferentiation), 재생(regeneration), 분화(differentiation)의 과정을 밟아 이루어지는데 이는 신장의 발생(development) 과정과 흡사하다<sup>1-6)</sup>. 신장의 발생과 세포분화는 전사단계에서 조절되는 것으로 보이며 신장에 특이성을 가진 유전자의 발현에 의한<sup>7-9)</sup>. 최근 신손상후 복구 및 신장의 생성과 분화과정에 관여할 것으로 추정되는 신장특이성 유전자인 Kidney Ischemia and Developmentally Regulated Gene 1 (이하 Kid-1)이 새로 발견되고 이 유전자의 구조가 밝혀졌는데 이 유전자는 염기배열분석 및 일부 기능분석상 전사인자의 특징을 소유하고 있다.

모든 유전자가 기능을 하기 위해서는 발현(expression)되어야 한다. 유전정보의 발현은 DNA의 전령 RNA(messenger RNA; mRNA)로의 전사(transcription) 과정과 mRNA의 단백질로의 번역(translation) 과정에 의해 이루어진다. 전사는 RNA 중합효소(polymerase)에 의해 시작되는데 이 효소가 전사를 시작하기 위해서는 전사인자가 DNA의 특수한 염기서열에 먼저 결합되어야 한다. 즉 전사인자는 한마디로 DNA의 특수한 염기서열(cis 요소)에 결합함으로써 전사를 일으키는 DNA 결합단백이라 할 수 있다<sup>11)</sup>.

신장의 전사인자로 추정되는 Kid-1의 염기서열 및 특징을 밝히기까지의 실험과정과 결과를 이해를 돕기위한

간단한 설명을 덧붙여서 기술하고자 한다. 실험과정은 크게 대별하여 실험동물의 신장조직에서 mRNA를 분리하고 complementary DNA (cDNA) library를 만든 다음, 선별(screening) 과정을 거쳐서 원하는 유전자를 찾아내어 DNA 염기서열을 결정하고 이 유전자의 기능적 특성을 밝히는 것이다.

### Kid-1 유전자의 염기서열을 알기까지

#### 1. 쥐 신장의 cDNA Library 작성

쥐(Male Sprague-Dawley rats, 250-300 g)의 양쪽 신경(renal pedicles)에 미세동맥류 겸자로 30분간 혈류

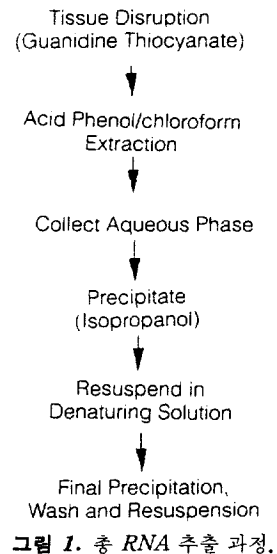


그림 1. 총 RNA 추출 과정.

를 차단한 후 1시간동안 혈류를 재개한다. 이들 신장과 정상 신장에서 다음과 같은 과정을 거쳐 cDNA library를 만든다<sup>10)</sup>.

**1) 총 RNA 추출과 mRNA 분리**

총 RNA 추출은 acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform 추출법을 이용하였다<sup>10)</sup>(그림 1), mRNA는 Oligo (dT)-cellulose column을 이용하여 분리하는데 이는 mRNA가 3'말단부에 poly (A) 미부를 가지고 있음을 이용한 것이다.

**2) cDNA의 합성과 Phage λ에의 결합**

mRNA는 직접 phage λ에 결합시킬 수 없으므로 일단 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 double stranded cDNA로 전환시킨다. cDNA가 합성되면 여기에 EcoR1 접합기(adaptor)를 붙이고, λgt11

과 같은 phage λ의 arm을 EcoR1 제한효소로 처리한 다음 양자를 결합시킨다(그림 2).

**3) Phage λ DNA의 in Vitro Packaging**

재결합된(recombinant) phage λ DNA는 그 자체로는 E. coli에 잘 transfection 되지 않으므로 그림 3과 같은 과정을 통해 λ head-tail 구조로 포장한다.

**4) Phage λ 역가의 산정**

Maltose-LB 배양액에 적절히 선택된 E. coli 균주 (LE392)의 단세균 집락을 점종시켜 배양한다. Maltose는 phage λ 수용체를 생산하는 lamb 유전자를 유도하여 λgt11이 E. coli에 잘 흡착하게한다. 재결합 λgt11을 E. coli에 흡착시킨 다음 상층한천배지(top agar)에 넣어 LB 한천배지판에 부은후 배양한다. 형질전환된 E. coli는 용해되어 plaque라 불리는 투명한 반점으로 보

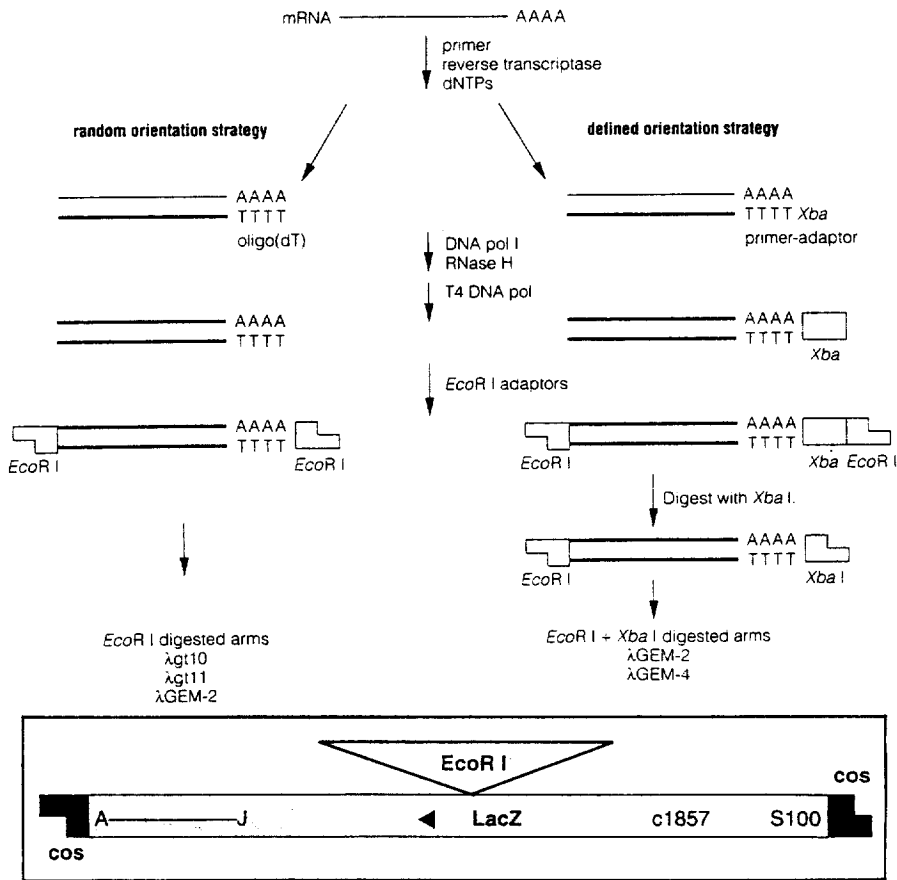


그림 2. 1) Random orientation cloning과 orientation-specific cloning.  
2) λgt11 vector의 map.

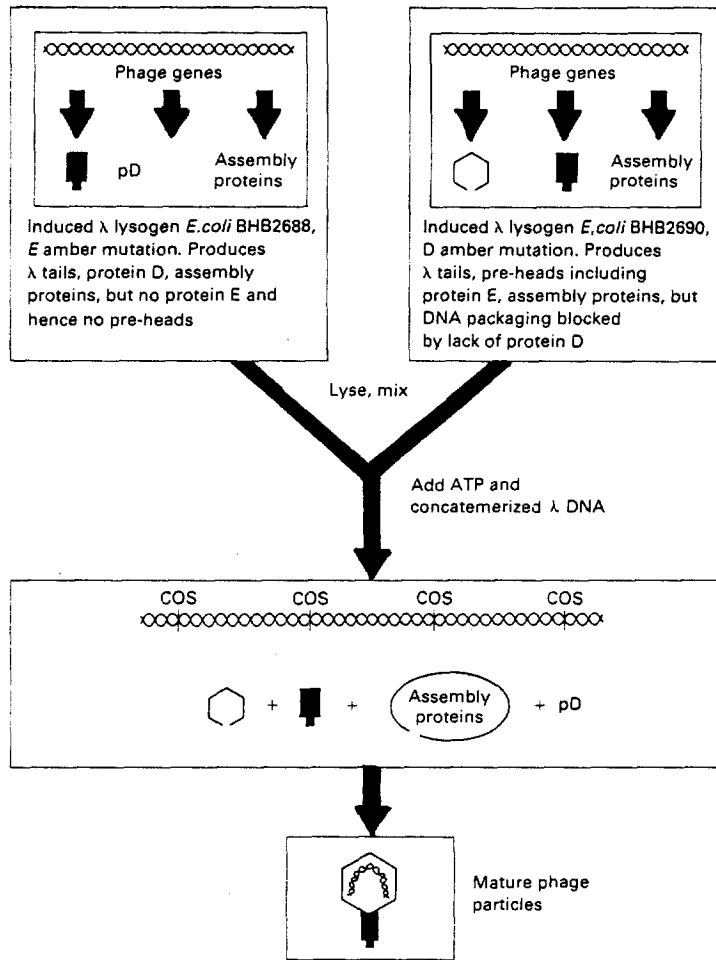


그림 3. *In vitro* packaging of concatemeric phage  $\lambda$  DNA in a mixed lysate.

이는데 수를 세어서 phage액의 역가(titer)를 계산하여 plaque forming unit (PFU/ml)로 표시한다<sup>10)</sup>.

그후 cDNA insert 분석과정을 거쳐 완전한 cDNA library를 작성하고 증폭시킨다.

## 2. cDNA library의 선별(Screening)

cDNA library의 재결합  $\lambda$ gt11들에는 각기 다른 cDNA가 들어있는데 이중 원하는 재결합  $\lambda$ gt11을 찾기 위한 선별검사를 시행한다<sup>10)</sup>.

위에 기술한 phage titer 검사와 유사한 과정을 거쳐 plaque가 형성되면 그림 4의 과정을 통해 *in situ* hybridization 방법으로 양성 plaque를 선정한다. 본 실

험에서 사용한 소식자는  $^{32}\text{P}$  표지한 DNA 소식자로써  $\text{C}_2\text{H}_2$  전사인자의 zinc finger 고리사이에 잘 유지되어 존재하는 아미노산 배열인 'HTGEKPY'를 인지하도록 만든 oligonucleotide 소식자로써 A/GTA/NGGC/TTTC/TTCNCCNGTA/GTG 이었다<sup>11)</sup>.

양성 plaque가 선정되면 자가방사기록(autoradiography)된 X-선 필름 위에 LB 한천배지판을 올려 놓고 잘 분리되어 있는 양성 plaque를 선정하여 그 밑의 한천 배지와 함께 pasteur 파이펫으로 찍어올려 SM완충액에 넣고 phage가 확산되어 나오도록 한 다음 회석해 plating 하여 배양한다. 그후 위 과정을 반복하여 양성 plaque를 최종 선정한다.

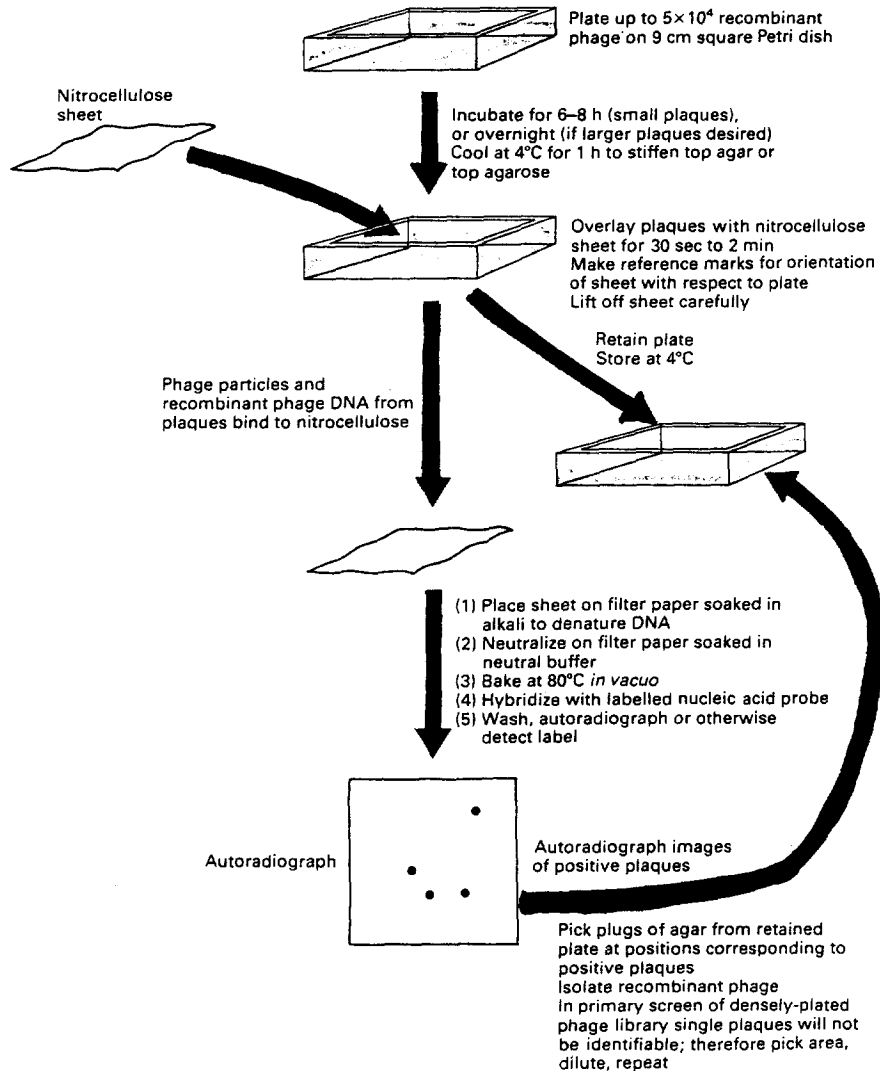


그림 4. cDNA library의 screening.

### 3. 재결합 박테리오페이지의 분석

최종 선정된 재결합  $\lambda$ gt11에서 DNA를 추출하여 제한효소로 처리한 후 전기영동하여 southern 분석을 통해 재결합  $\lambda$ gt11의 선정이 올바르게 되었는지 확인하고 DNA를 추출한다. 이 과정을 간단히 기술하면 다음과 같다<sup>10)</sup>.

양성 plaque를 SM 완충액에 넣고 phage가 확산되어 나온 후 plating하여 배양한다. Plaque가 생성되면 희석액을 상층한천배지 표면에 부어서 phage를 용출시

킨다. Phage 용출액에 PEG 8000/2M NaCl 용액을 가해 phage 입자를 침전시킨 후 DNA를 추출한다. DNA 추출후 EcoRI 제한효소로 처리하고 그림 5와 같은 southern 분석을 통해 양성띠가 있는지 확인한다. 이때 사용한 소식자는 cDNA library 선별시 사용한 소식자이다.

### 4. DNA의 pBluescript Vector로의 결합

Autoradiography상 소식자에 양성을 보인 DNA 띠를 저온도 용해성 한천젤에서 잘라내어서 DNA를 뽑아

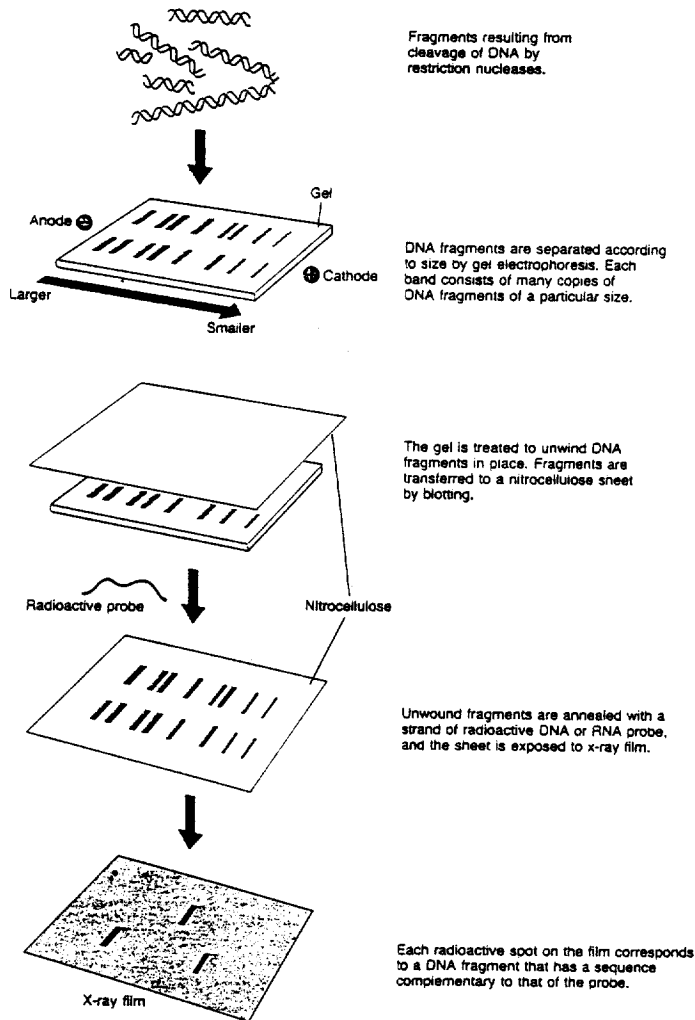


그림 5. Southern analysis.

낸 다음 pBluescript에 결찰시킨다. 결찰은 DNA에 인산화한 linker를 붙인후 EcoR<sub>1</sub> 처리하는 한편, pBluescript를 EcoR<sub>1</sub> 처리후 alkaline phosphatase로 탈인산화시켜서 자가결찰을 방지한 다음, T<sub>4</sub> DNA ligase 효소를 이용하여 양자를 붙여서 이루어진다.

pBluescript는 pUC19에서 유래된 2961 염기쌍의 phagemid이다. LacZ 유전자 옆에 존재하는 multiple cloning site (MCS)의 양쪽 끝 부위에 T<sub>3</sub> primer와 T<sub>7</sub> primer가 붙을 수 있으므로 pBluescript에 결찰된 DNA의 염기서열 분석을 간편하게 할 수 있다. 또한 MCS에 DNA가 결찰되면 lacZ 유전자가 불활성화 되어

$\beta$ -galactosidase를 생성할 수 없게 되므로 재결합 pBluescript에 의해 형질전환된 E. coli는 하얀 군락을 형성하고 그렇지 않은 E. coli는 청색을 띄게되어 이들의 구분을 가능케한다<sup>10)</sup>. 이를 알기 위해서는 효소유도체인 isopropyl-thiogalactoside (ITPG)와 효소에 의해 분해되는 lactose 유사물질인 X-gal을 함유하는 한천배지판을 사용하여야 한다. 또한 pBluescript는 ampicillin 저항성 유전자를 함유하고 있다(그림 6).

### 5. E. coli 형질전환과 Phagemid DNA의 정제

재결합 pBluescript에 결찰된 DNA 염기서열 분석에

필요한 DNA을 얻기 위해서는 E. coli를 재결합 pBluescript로 형질전환(transformation) 시켜서 증식시킨 후 다시 pBluescript를 추출(mini-or maxi-preparation) 한다<sup>10)</sup>.

1) E. coli의 형질전환

E. coli를 CaCl<sub>2</sub> 등으로 처리하면 pBluescript가 세

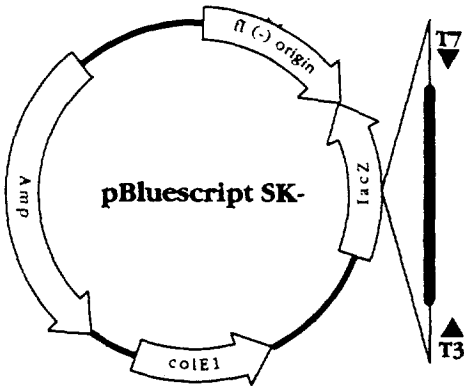


그림 6. pBluescript의 map.

포벽에 잘 붙게되는데 이를 competent cell이라 한다. pBluescript가 competent cell의 세포표면에 붙은 후 42°C로 90초간 처리하면(heat shock), pBluescript가 세포내로 들어간다. 재결합 pBluescript가 유입된 E. coli 선택은 lacZ 유전자 불활성화에 따른 청색/백색 색깔 구분에 의한다.

2) pBluescript DNA의 정제

백색세포균락 하나를 백금니로 떼서 ampicillin을 가한 LB 배양액에 배양한다. 알카리용해후 재결합 pBluescript DNA를 정제한후(miniprep), ECoRI 제한효소로 처리하고 전기영동해서 pBluescript에 결합된 DNA를 확인한다. 이 방법에 의해 얻은 DNA는 염기서열 분석에 바로 이용할 수도 있으나 maxiprep을 하기도 하는데 이 방법은 다량의 LB 배양액이 이용되고 cesium chloride 밀도구배법을 이용하여 고순도의 covalently closed circular DNA를 다량 얻을 수 있다<sup>10)</sup>.

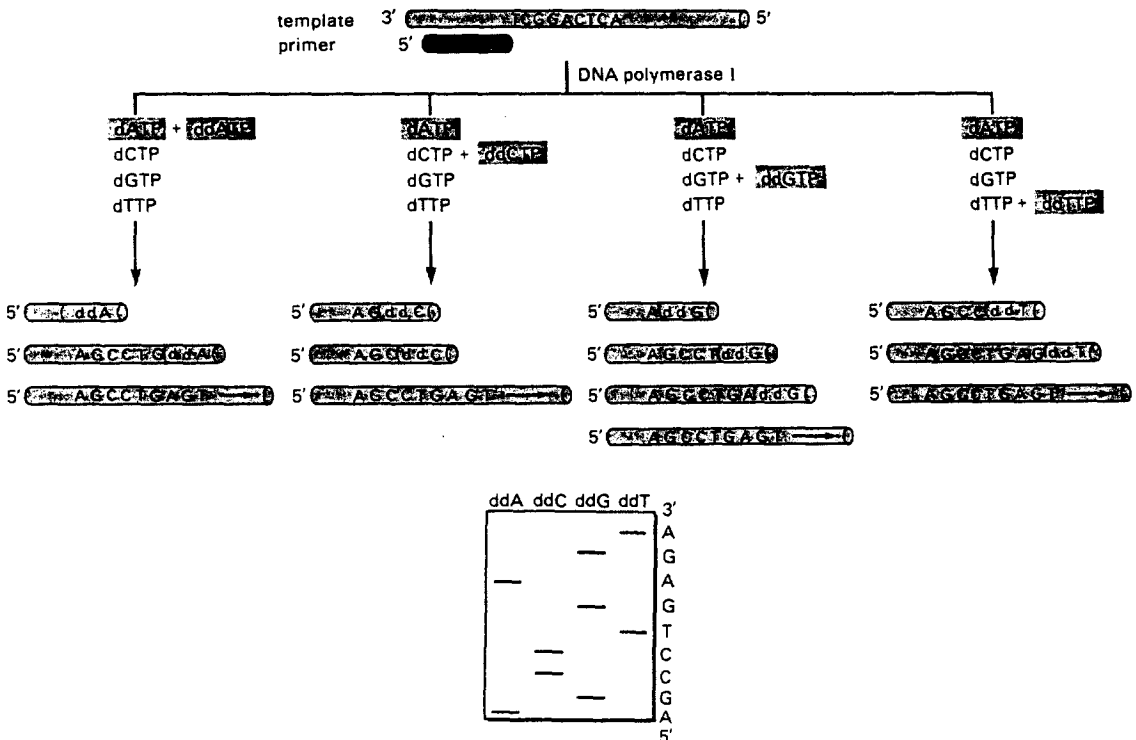


그림 7. DNA 염기서열 분석의 dideoxy 법.



cing을 계속한다.

그 결과 Kid-1 cDNA의 1380개 뉴클레오타이드 염기서열을 알게되었고 이를 분석하여  $C_2H_2$  zinc finger motifs가 존재함을 밝혀내고 Z5.9로 명명하였다. 완전한 cDNA의 염기서열을 알기위하여  $\lambda$ gt11 rat kidney cDNA library를 구입하여 Z5.9를 소식자로 하여 cDNA library 선별로부터 phage DNA 정제과정을 통해 DNA를 얻은 다음 외부의 lambda specific primer와 내부의 Z5.9 specific primer를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 시행하였다. PCR 산물을 전기영동하여 5' 및 3'로 연장되는 clone에서 DNA를 정제한 후 pBluescript에 결찰시켜서 염기서열을 분석하였다. 그 결과 Z5.9/16, Z 5.9/9C의 염기서열을 알게 되었으며(그림 8) 이들을 종합하여 완전한 Kid-1 cDNA의 염기서열이 결정되었다(그림 9).

### Kid-1 유전자의 염기서열 분석

Kid-1 cDNA는 2563 염기로 구성되어 있으며 이중 번역되는 영역은 312번째 부터 2040번째 염기까지이고 예견되는 단백질의 분자량의 66KDa이다. Kid-1의 cDNA와 예상되는 Kid-1 단백질의 구조의 전체적 윤곽은 그림 10과 같으며 몇가지 중요한 구조물은 다음과 같다.

#### 1. Zinc Finger 영역

Zinc finger는 3가지 종류가 있는데, 이중 하나가 kid-1 유전자 산물과 같이 cystein쌍과 histidine쌍이 zinc를 사이에 두고 배열되면서( $C_2H_2$ ) 고리모양을 하고 있다(그림 11). Cystein쌍과 histidine쌍 사이에는 12개 아미노산이 존재한다<sup>13)</sup>. Zinc finger 전사인자는 DNA

의 전사조절영역에 붙어서 전사개시에 영향을 미치는 대표적인 전사인자로서 어떤 유전자의 염기서열상 zinc finger 구조가 발견되면 이 유전자 산물이 전사조절능을 소유함을 의미한다. Zinc finger외에 helix-trun-helix, homeodomain, POU domain, leucine zipper 등도 전사인자의 DNA 결합부로서 작용한다<sup>13)</sup>.

Kid-1 cDNA에는 879번째 염기와 1193번째 염기 사이에 4개의 zinc finger가, 1290번째 염기와 2040번째 염기 사이에는 9개의 zinc finger가 존재하며 이들 사이에는 32개의 아미노산 spacer가 존재한다. Kid-1의 Zinc finger 고리사이에는 HTGEKPY의 consensus 아미노산 배열이 잘 유지되어 있다<sup>11)</sup>(H: Histidine, T: Threonine, G: Glycine, E: Glutamic acid, K: Lysine, P: Proline, Y: Tyrosine)(그림 12).

#### 2. Krüppel-Associated Box(KRAB) 영역

Zinc finger 영역의 아미노 말단부에서 얼마간 떨어져서 발견되는 영역으로 A와 B 두영역으로 나뉘며 기능은 나선형 구조를 형성하여 단백질과의 상호 반응을 촉진시키고 전사의 활성화에 관여할 것으로 추정된다<sup>14)</sup>.

Kid-1 cDNA에서는 417번째 염기부터 KRAB-A 및 -B 영역이 관찰된다(그림 9, 10).

#### 3. 전사 개시코돈과 종료코돈

전사 개시코돈인 ATG는 Kid-1 cDNA의 312번째 및 460번째 염기위치에 있다. ATG는 대부분 포유동물에서 유일한 개시코돈으로 작용하여 methionine으로 번역된다. 460번째 염기에 존재하는 ATG는 부차적인 개시코돈으로 생각되는데 A를 기준으로 그 주위의 염기서열을 보면 -3번 위치에 T, 즉 pyrimidine이 존재한다는 점을 제외하고는 Kozak box에 합당한 염기서열이다.

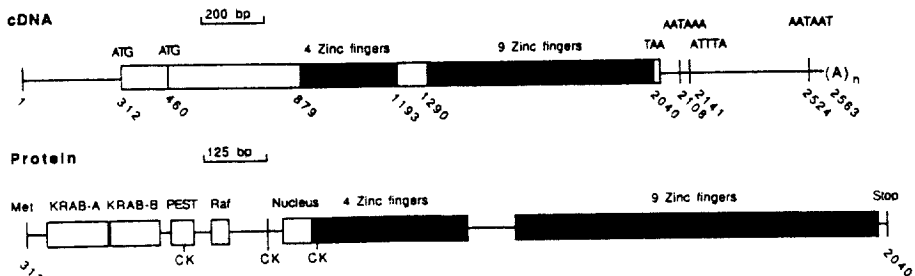


그림 10. Kid-1 cDNA와 Kid-1 단백질의 구조적 영역.

Kozak box는 번역시작과 관련된 consensus context 로써 GCCA(or G) CCATGG로 이루어져 있는데 기능 상 중요하고 잘 유지되는 염기는 -3번 위치의 purine (대부분 A) 이고 4번위치의 G이다<sup>15)</sup>(그림 9, 10).

· 종료코돈은 TAA, TAG, TGA가 있으며 개시코돈과는 달리 아미노산으로 번역되지 않고 단백 번역이 끝남 을 의미할 뿐이다(그림 9, 10).

4. 기 타

1) PEST 염기서열

불안정하고 짧은 반감기를 가지는 전사인자에서 발견 되는 염기서열로 proline, glutamic acid, serine, threonine을 많이 함유하여 붙여진 이름으로<sup>10)</sup> Kid-1 cDNA에서는 597번째 염기부터 존재한다.

2) AUUUA 염기서열

3' 비번역 부위인 2141번째 염기부터는 AUUUA라는 염기서열이 존재하고 있다. 이는 PEST 염기서열과 마찬가지로 불안정하고 짧은 반감기를 가지는 mRNA에

서 관찰되는데 이 염기서열은 cytokine, lymphokine, oncogene 등에서도 흔히 발견된다<sup>17)</sup>.

3) Raf과의 Serine/Threonine Kinase 영역

모든 raf 과에 속하는 serine/threonine kinase 의 catalytic domain IV에 존재하며 12개의 아미노산으로 이루어진 염기서열이다. Kid-1과 다른 raf 과 효소와의 유사성은 그림 13과 같다. Kid-1의 678번째 염기부터 관찰되고 있는데 이는 Kid-1 산물이 단백질과의 상호작용 또는 단백질과 DNA 간의 상호작용에 중요역할을 하는 kinase 작용을 가짐을 시사한다<sup>18~20)</sup>.

4) CK II Consensus 부위

Casein kinase II consensus 부위가 3군데에서 발견 되는데 2개는 비 zinc finger 영역에서, 1개는 첫번째 zinc finger 영역에서 관찰된다. 이는 Kid-1 유전자 산 물이 인산화에 의한 단백질의 조절에 관여할 가능성을 시사한다<sup>21)</sup>.

5) Polyadenylation 염기서열

Polyadenylation 염기서열로<sup>22)</sup> 생각되는 AATAAA 와 AATAAT가 3' 비번역부의 2108번째와 2524번째 염 기부터 존재한다.

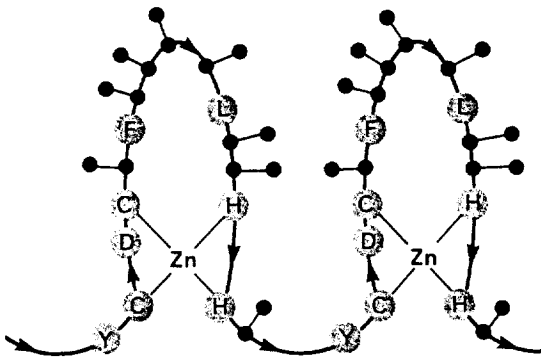


그림 11. Zinc fingers.

Kid-1의 특징

1. 허혈성 신손상과 재관류가 Kid-1 유전자 발현에 미치는 영향

1) 동물 실험

쥐 (male Sprague-Dawley rats, 150-250 g) 의 편 측 신장 신경에 미세동맥류 겹자를 이용하여 30분간 혈류를 차단한 후 재관류시키면서 1, 5, 48, 96시간 간격으로 신

190						C	S	M	C	E	K	T	F	I	N	T	S	S	L	R	K	H	E	K	N	H		
211	S	G	E	K	L	F	K	C	K	E	C	S	K	A	F	S	O	S	S	A	L	I	Q	H	Q	I	T	H
239	T	G	E	K	P	Y	V	C	K	E	C	G	K	A	F	T	I	S	T	S	L	Y	K	H	I	R	T	H
267	T	V	E	K	S	Y	R	C	K	E	C	G	K	S	F	G	O	R	S	G	L	F	L	H	Q	K	I	H
327	.	.	.	.	.	.	.	C	N	E	C	G	N	T	F	K	S	S	S	S	L	R	Y	H	Q	R	I	H
355	T	G	E	K	P	F	R	C	S	E	C	G	R	A	F	S	Q	S	A	S	L	I	Q	H	F	R	I	H
383	T	G	E	K	F	Y	R	C	G	E	C	G	K	G	F	T	S	I	S	R	L	N	R	H	R	J	I	H
411	T	G	E	K	L	Y	N	C	N	E	C	G	K	A	L	S	S	H	S	T	L	I	I	H	E	R	I	H
439	T	G	E	K	P	C	K	C	K	V	C	G	K	A	F	R	Q	S	S	A	L	I	Q	H	Q	R	N	H
467	T	G	E	R	P	Y	K	C	N	E	C	G	K	T	F	R	C	N	S	S	L	S	N	H	Q	R	I	H
495	T	G	E	K	P	Y	Q	C	I	E	C	G	M	S	F	G	Q	S	S	A	L	I	Q	H	R	R	I	H
523	T	G	E	K	P	F	K	C	N	T	C	G	K	T	F	R	Q	S	S	S	R	I	A	H	Q	R	I	H
551	T	G	E	K	P	Y	E	C	N	T	C	G	K	L	F	N	Y	R	S	S	L	T	N	H	Y	K	I	H

consensus T G E K P F/Y - C - - C G K - F - - S/T - L - - H - - - H

그림 12. Kid-1의 zinc finger 영역.

그림 14. 허혈성 신손상 및 재관류후 신장 RNA의 Northern 분석.

장을 떼어내고 반대쪽 신장은 대조군으로 한다.

## 2) Northern 분석

신장에서 총 RNA를 추출하고 이중 25  $\mu$ g을 취해 formaldehyde 겔 전기영동을 시행하여 나일론막에 전이시킨다. Z5.9를 ECoR1-Xnm1 제한효소로 절단한 zinc-finger 분절(Z5.9zf<sup>-</sup>)을 소식자로 하여 동위원소 표지 후 hybridization 시행하고 세척하여 autoradiography를 시행하였다<sup>23)</sup>.

## 3) 결과 및 해석

Kid-1 mRNA 양은 재관류후 1시간에서 96시간까지 저하되었다(7일후에는 정상 mRNA 양 회복함). SGP-2 (sulfated glycoprotein 2) mRNA 양은 재관류후 48

시간과 96시간까지 현저히 증가되었다(그림 14). SGP-2 유전자의 발현은 고도로 분화된 상피세포에서 하향조절되는 것으로 알려져 있는데<sup>24)</sup> 허혈성 손상후 탈분화된 상태에서 SGP-2 mRNA가 증가됨은 이와 일치하는 결과이다. 이러한 결과는 허혈성 손상후 Kid-1 유전자 산물이 신장 상피세포의 분화에 관여할 가능성을 시사한다.

## 2. 엽산(Folic Acid) 투여가 Kid-1 유전자 발현에 미치는 영향

쥐의 복강내로 엽산을 250-350 mg/kg 투여한 후 350 mg/kg 투여쥐에서는 3시간 및 8시간 만에, 250 mg/kg

투여쥐에서는 24시간 만에 신장을 떼어 총 RNA 추출 후 northern 분석을 시행한 결과 SPG-2 mRNA는 8시간, 24시간에 증가되어 있으나 Kid-1 mRNA는 3시간 만에 저하되어있고 이러한 현상은 최소한 24시간 지속되었다(그림 15). 이는 허혈성 신손상 실험과 비슷한 결과인데 고농도의 염산은 급성세뇨관 괴사를 일으키고 그후 재생이 일어난다는 점에서 허혈성 신손상모델과 유사하다<sup>25~26</sup>.

그림 15. 엽산(folic acid) 투여후 신장 RNA의 Northern 분석.

### 3. 발생(Development) 과정에서의 Kid-1 유전자 발현

쥐의 신장을 생후 0.5일, 10일, 15일, 20일, 40~50일에 떼어서 총 RNA 추출후 northern 분석을 시행한 결과, 출생시에는 Kid-1 mRNA가 극소량 발견되었고 시일이 경과할수록 점차 증가하였다. 이러한 결과는 발생과정에서 분화가 진행됨에 따라 Kid-1 mRNA 양이 증가됨을 의미한다. 즉 Kid-1 산물이 분화에 관여할 가능성을 시사한다.

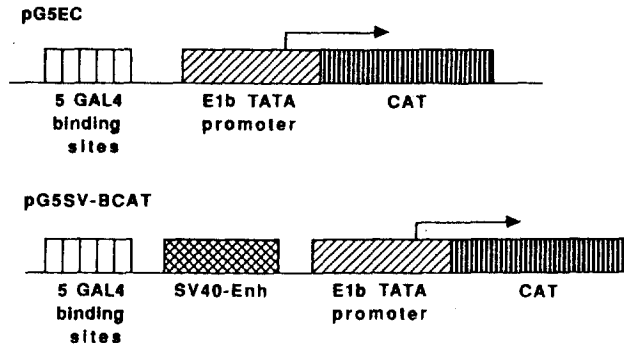
사람은 신장의 발생이 출생시 이미 완료되어 있지만 쥐는 출생후에도 발생이 진행된다<sup>27~29</sup>.

### 4. 각종 조직에서의 Kid-1 mRNA 발현도

뇌, 폐, 심장, 간, 고환, 신장, 비장, 대장, 골격근 등에서 총 RNA 추출후 시행한 northern 분석상 오직 신장에서만 2.8Kb의 띠가 발견되었다(그림 16). 또한 Kid-1 mRNA의 예민도를 증가시키기 위해 이들 조직에서의 총 RNA를 분리하여 RT-PCR 방법으로 Kid-1 cDNA의 441-955번째 까지의 515 염기쌍을 증폭시킨 후 southern 분석을 시행하였다. 이때 소식자는 Z5.9/16 cDNA clone으로 부터 PCR에 의해 증폭된 515 염기쌍 분절을 random primer법으로 방사동위원소 표지한 것을 사용하였다. Autoradiograph X-선 필름의 양성띠에 해당되는 나일론막의 부분을 잘라 방사활성도를

그림 16. 여러조직에서의 신장 RNA의 Northern 분석.

### Reporter Plasmids



### Expression Vectors

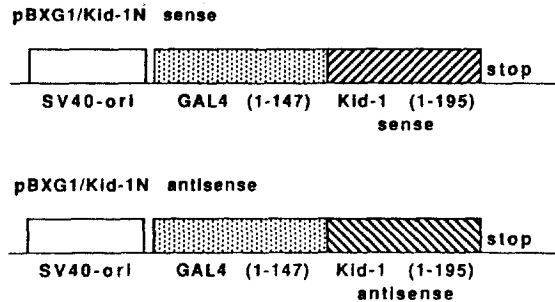


그림 17. *Kid-1*의 비 *zinc-finger* 영역이 전사에 미치는 영향을 알기 위한 reporter plasmid와 expression vector.

측정하였다. 그 결과 신장에서만 13,750 cpm의 방사활성도가 관찰되었다.

전사인자 *Kid-1*은 신장에서 일차적으로 발현되는 첫 번째 *zinc finger* 전사인자로 생각된다. 장기 특이성을 보이는 전사인자는 *Kid-1* 외에도 근육의 *helix-loop-helix* 단백질(*MyoD*), myeloid 세포에서 주로 발견되는 *MZF-1*, 신장과 비장에서 일차적으로 발견되는 *Wilms' tumor gene* 등이 있다<sup>30-34</sup>).

### 5. *Kid-1* 비 *Zinc-Finger* 영역 산물의 전사조절능

#### 1) Expression Vector와 Reporter Plasmid

Expression vector는 *Kid-1*의 비 *zinc-finger* 영역과 *GAL4*의 DNA 결합부를 결합시킨후 *PBXG1* vector에 sense 또는 antisense 방향으로 유입시킨 *PBXG1/Kid-1N sense*와 *PBXG1/Kid-1N antisense*를 이용하였다(그림 17). 이 expression vector는 large-T 항원으로 형질변환된 green monkey cell line인 COS 세포

에 transfection 되면 COS 세포의 T 항원이 vector의 SV40-origin of replication (SV40-ori)을 활성화시키고 vector의 복사에 필요한 인자를 내어서 *GAL4-Kid-1N* chimeric 단백질이 고농도로 발현된다.

Reporter plasmid는 *PG5EC*, *PG5SV-BCAT*를 이용하였다. *PG5EC*는 *CAT* reporter plasmid로 *GAL4* binding site, E1b TATA promoter, *CAT*으로 구성되어 있고 *PG5SV-BCAT*는 *PG5EC*에 SV40 enhancer가 더 존재하여 *CAT* 유전자를 강력하게 조종한다.

Expression vector와 reporter plasmid가 동시에 세포에 transfection되면 expression vector에서 발현된 *GAL4-Kid-1N* chimeric protein이 reporter plasmid의 *GAL4* binding site에 결합함으로써 *Kid-1N*이 전사 조절능을 발휘하게 되는데 *Kid-1N*의 전사조절능은 *CAT* 활동도 측정에 의해 알게된다. *CAT* (chloramphenicol acetyl transferase)은 세포내의 다른 효소에 의해 방해받거나 경쟁하지 않으며 그 활성도를 비교적

쉽게 빨리 측정할 수 있기 때문에 가장 많이 쓰이는 reporter 유전자이다.

## 2) 형질전환 (Transfection)

형질전환은 COS세포와 LLC-PK1세포에 위의 expression vector 와 reporter plasmid 를 DEAE-dextran 중개법에 의해 삽입하여 시행하였다<sup>10)</sup>. 즉 세포들을 2일간 배양한 후 DNA, DEAE-dextran, chloroquine으로 4시간, dimethyl sulfoxide(DMSO)로 2분간 처리한 다음 배양액을 교환하여 48시간 배양하였다.

DEAE-dextran 중개법에서 DEAE-dextran은 DNA와 결합하여 DNA가 세포막에 잘 붙게 하고 endocytosis에 의해 세포내로 쉽게 삽입되도록 돕는다. 그러나 세포독성이 있으므로 농도 및 노출시간 조절이 필요하며, 세포선택에도 제한이 있고 오직 일시적인 형질전환세포 생산시에만 이용된다. Chloroquine은 DNA의 세포내 섭취를 증가시키는데 아마도 DNA가 lysosomal hydrolase에 의해 DNA가 변성되는 것을 억제하는 것으로 생각되며, DMSO는 transfection의 효율을 증가시키고 삽입된 DNA의 일시적 발현을 돕는것으로 알려져 있다.

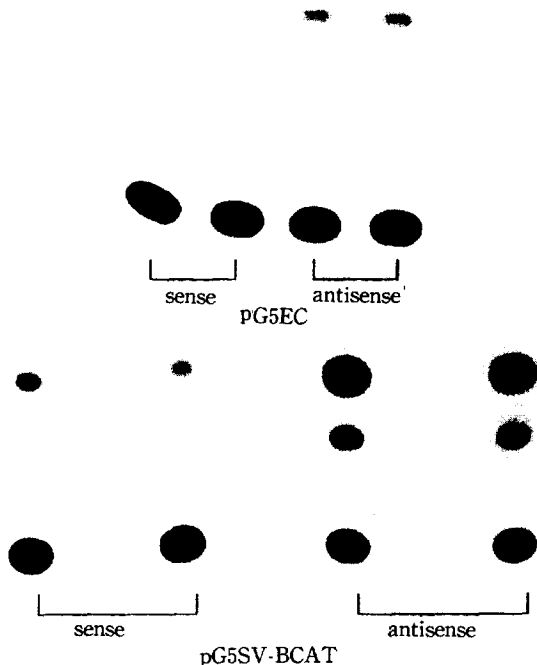


그림 18. COS 세포내에서 발현된 *Kid-1N-GAL4* 단백질이 CAT 활성도에 미치는 영향.

## 3) CAT 분석

CAT 분석은 형질전환된 세포의 추출물(extract)에 포함된 CAT 활성도를 측정하는 것으로 개략적 측정원리는 다음과 같다<sup>11)</sup>. 형질전환세포 추출물과 <sup>14</sup>C 표지-chloramphenicol(CM), acetyl CoA를 작용시키면 추출물내의 CAT 활성도에 따라 <sup>14</sup>C 표지-CM이 아세틸화되는데 이를 thin layer chromatography 판에서 분리한 다음 autoradiography 시행한다. Autoradiograph상 각 반점에 해당되는 silica gel 부위를 긁어서 방사활동도를 측정하고 acetyl화 CM의 방사활동도를 CM의 총방사활동도로 나누어 CAT 활성도를 계산한 후 동시에 측정된 luciferase 활성도로 교정한다<sup>39)</sup>. Luciferase 활성도는 PoLucSV/T1 이라는 luciferase 발현 plasmid를 동시에 transfection시켜서 측정하는데 이를 동시에 시행하는 이유는 전사외에 transfection 정도가 CAT 활성도 결과에 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

## 4) 결 과

Chimeric Kid-1N-GAL4 단백질이 CAT활성도에 미치는 영향에 있어서 reporter plasmid로 PG5EC와 PG5SV-BCAT 사용시 공히 PBXG1/Kid-1N antisense expression vector에 비해 sense 구조물을 cotransfection 시켰을때 CAT 활성도가 현저히 저하되었다(그림 18). 이러한 현상은 고도로 분화된 상피세포인 LLC-PK1 세포나, 섬유아세포양 세포인 COS 세포에서 공히 관찰되었다(그림 19).

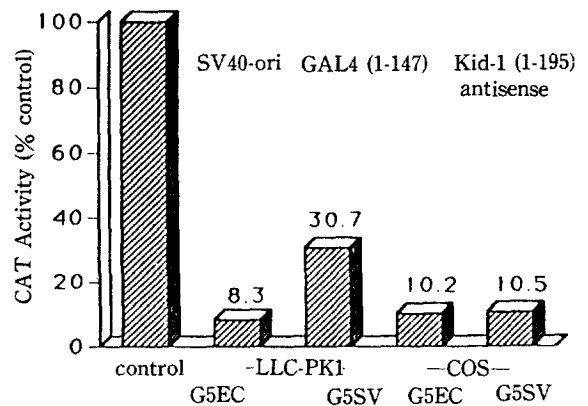


그림 19. COS 세포와 LLC-PK1 세포내에서 발현된 *Kid-1N-GAL4* 단백질이 CAT 활성도에 미치는 영향.

Kid-1에 의한 전사억제 기전은 잘 모르지만 Kid-1이 promotor 주위 DNA 구조에 국소적 변화를 일으켜서 다른 전사인자가 PG5SV-BCAT의 SV40 enhancer에 붙는 것을 억제하기 때문일 것으로 추정된다. 그러나 최소한의 promotor를 가진 PG5EC에서도 Kid-1이 전사를 억제한 것을 Kid-1이 다른 전사인자의 단백질과 상호 반응하거나 전사인자의 조립을 억제할 가능성도 있을 것이라 생각된다.

이상의 결과로 미루어 쥐의 신장에서 발견된 Kid-1 전사인자는 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>류의 zinc finger 유전자에 해당되었으며 Kid-1 유전자 산물은 신장의 발생과 분화에 관여하고 신손상후 복구기전에 중요한 역할을 할 것으로 보인다.

## PEFERENCES

- 1) Derman E, Krauter K, Walling L, Weinberger C, Ray M, Darnell JE Jr: *Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. Cell* **23**:731-739, 1981
- 2) Lai E, Darnell JEJ: *Transcriptional control in hepatocytes: a window on development. Trends Biochem Sci* **15**:427-430, 1991
- 3) Maniatis T, Goodburn S, Fischer JA: *Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science* **236**:1287-1244, 1987
- 4) Bonventre JV, Leaf A, Malis CD: *Nature of the cellular insult in ischemic acute renal failure. In Brenner BM, Lazarus JM (ed.), Acute renal failure. Churchill Livingstone, New York p 3-43, 1988*
- 5) Moll R, Hage C, Thoenes W: *Expression of intermediate filament proteins in fetal and adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. Lab Invest* **65**:74-86, 1991
- 6) Ouellette AJ, Malt RA, Sukhatme VP, Bonventre JV: *Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. J Clin Invest* **85**:766-771, 1990
- 7) Bacallao R, Fine LG: *Molecular events in the organization of renal tubular epithelium: From nephrogenesis to regeneration. Am J Physiol* **F913**:f924, 1989
- 8) Molitoris BA, Hoilien CA, Dahl R, Ahnen DJ, Wilson Pd, Kim J: *Characterzation of ischemia-induced loss of epithelial polarity. J Membr Biol* **106**:233-242, 1988
- 9) Wallin A, Zhang G, Jone TW, Jaken S, Stenens JL: *Mechanism of Nephrogenic repair response. Studies on proliferation and Vimentin expression after <sup>32</sup>S-1, 2-dichlorovinyl-L-cysteine nephrotoxicity in vivo and in cultured proximal tubule epithelial cells. Lab Invest* **66**:474-484, 1992
- 10) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY, 1989*
- 11) Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R, Jack H: *A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. Cell* **47**:1025-1032, 1986
- 12) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467, 1977
- 13) Singer M, Berg P: *Genes and genome, 1st ed. University Science Book, Blackwell, CA*
- 14) Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA: *The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. Proc Natl Acad Sci USA* **88**:3608-3612, 1991
- 15) Kozak M: *An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. J Cell Biol* **115**:887-903, 1991
- 16) Rogers S, Wells R, Reichsteiner M: *Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science* **234**:364-368, 1986
- 17) Brawerman G: *Mechanisms of mRNA decay. Trends Biotechnol* **8**:171-174 1990
- 18) Hanks SK, Quinn AM, Hunter T: *The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science* **241**:42-52, 1988
- 19) Knighton DR, Zheng J, Eyck LFT, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM: *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate dependent protein dinase. Science* **253**:407-414, 1991
- 20) Knighton DR, Zheng J, Eyck LFT, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM: *Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science* **253**:414-420, 1991

- 21) Pinna LA: *Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular recognition?* *Biochim Biophys Acta* **1054**: 267-284, 1990
- 22) Wickens M: *How the messenger got its tail: addition of poly (A) in the nucleus.* *Trends Biochem. Sci* **15**: 277-281, 1990
- 23) Kroczek RA, Siebert E: *Optimization of Northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation.* *Anal Biochem* **184**: 90-95, 1990
- 24) Harding MA, Chadwick LJ, Gattone II VH, Calvet JP: *The SGP-2 gene is developmentally regulated in the mouse kidney disease.* *Dev Biol* **146**:483-490, 1991
- 25) Asslin C, Marcu KB: *Mode of c-myc gene regulation in folic acid-induced kidney regeneration.* *Oncogene Res* **5**:67-72, 1989
- 26) Fink M, Henry M, Tange D: *Experimental folic acid nephropathy.* *Pathology* **19**:143-149, 1987
- 27) Chailier P, Briere N: *Integration of proliferation and differentiation phenomena during rodent kidney ontogeny.* *Growth Dev Aging* **55**:11-18, 1991
- 28) Saxen L: *Organogenesis of the kidney.* Cambridge University Press, Cambridge p 173, 1987
- 29) Stocker E, Butter D: *Die DNS-Synthese in Leber und Niere Junger Ratten. Autoradiographische Untersuchungen mit H3-Thymidin.* *Experientia* **24**: 704-705, 1968
- 30) Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lesis WH, Jones C, Housman DE: *Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus.* *Cell* **60**:509-520, 1990
- 31) Cunliffe V, Koopman P, McLaren A, Trowsdale J: *A mouse zinc finger gene which is transiently expressed during spermatogenesis.* *EMBO J* **9**:197-205, 1990
- 32) Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.* *Cell* **51**:987-1000, 1987
- 33) Hromas R, Collins SJ, Hickstein D, Raskind W, Deaven LL, O'Hara P, Hagen FS, Kaushansky K: *A retinoic acid responsive human zinc finger gene, MZF-1, preferentially expressed in myeloid cells.* *J Biol Chem* **266**:14183-14187, 1991
- 34) Schneider-Gadicke A, Beer-Romero P, Brown L, Nussbaum R, Page DC: *ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation.* *Cell* **57**:1247-1258, 1989
- 35) Kakidani H, Ptashne M: *Gal4 activates gene expression in mammalian cells.* *Cell* **52**:161-167, 1988
- 36) Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M: *GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator.* *Nature (London)* **335**:563-564, 1988
- 37) Lillie JW, Green MR: *Transcription activation by the adenovirus Ela protein.* *Nature (London)* **338**:39-44, 1989
- 38) Shelley CS, Arnaout MA: *The promoter of the CD11b gene directs myeloid-specific and developmentally regulated expression.* *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:10525-10529, 1991