

Isolation of Differentially Expressed Genes in Chondrocytes Treated with Methylprednisolone by Subtractive Hybridization

Ji-Hee Kim*, Soon-Min Kang**, Jin-Soo Suh*** and Chong-Rak Kim***†

*Department of Biology, **Department of Medical Laboratory Science,

***Department of Medicine, Inje University

Osteoarthritis (OA), the most common form of arthritis, involves the destabilization of the normal balance between the degradation and the synthesis of articular cartilage and subchondral bone within a joint. As articular cartilage degrades over time, its smooth surface roughens and bone-against-bone contact ensues, producing the inflammation response symptomatic of this 'wear and tear' disease. Although a variety of genetic, developmental, metabolic, and traumatic factors may initiate the development of osteoarthritis, its symptoms (joint pain, stiffness, and curtailed function) typically evolve slowly, and patients experience periods of relative calm alternation with episodes of inflammation and pain. Rheumatoid arthritis (RA), an autoimmune disease of unknown etiology characterized by chronic synovitis and cartilage destruction, affect 1% of the total population. Cartilage is a specialized connective tissue in which the chondrocytes occupy only 5% of the volume. Cartilage is particularly rich in extracellular matrix, with matrix making up 90% of the dry weight of the tissue chondrocytes have cell processes that extend a short distance into the matrix, but do not touch other cells thus in cartilage, cell-matrix interactions are essential for the maintenance of the extracellular matrix. In this study, subtractive hybridization method was utilized to detect genes differentially expressed in chondrocytes treated with methylprednisolone. We have isolated 57 genes that expressed differentially in the chondrocytes by methylprednisolone. 13 clones of them were analyzed with sequencing and their homologies were searched. 8 cDNAs included KIAA 0368, upregulated during skeletal muscle growth 5 (usmg 5), ribosomal protein S 18 (RPS 18), skeletal muscle ryanodine receptor, radial spoke protein 3 (RSP 3), ribosomal protein QM, ribosomal protein L37a (RPL37A), cytochrome c oxidase subunit VIII (COX8).

Key Words: Osteoarthritis, Rheumatoid arthritis, Chondrocyte, Methylprednisolone, Subtractive hybridization

서 론

관절염 (arthritis)은 일반적으로 관절의 염증, 고통, 종창의 특징을 가진 질병군으로 이것은 영구적인 관절의 손상, 유연성과 운동성의 상실을 이끈다. 미국에서는 4천만 이상의 사람들이 관절염으로 고통받고 있으며, 이 병이 능력상실의 원인일 뿐 아니라 특히 노인병의 의학적 면에서 건강관리부의 무거운 짐으로 남아 있다^{16,17,20,28}. 관절염의 특징을 가진 많은 질환 양상으로는 골관절염, 류머티스 관절염, 낭창, 통풍, 활

액낭염, 류머티스열, Lyn arthritis 등이 있으며, 골관절염, 류머티스 관절염이 대부분의 진단명으로 일컬어진다. 만성적인 심질환 이후 2차의 가장 보편적 진단으로서 관절염은 미국에서 무능력 보상을 위한 장기간의 사회보장 문제를 가져왔다. 나이의 증가에 따라 위험인자가 증가하겠지만 관절염은 모든 연령, 인종, 성별에 관계없이 개개인적으로 피로움에 시달리고 있다. 관절염으로 고생하는 사람의 1/2 이하가 65세 이하이고 남자보다는 여자에게서 훨씬 더 발병률이 높다^{16,17,20}.

골관절염 (osteoarthritis, OA)는 관절염 중의 가장 일반적인 형태이며, 관절 내의 퇴화와 관절연골, 아연골 합성에서의 불균형과 관련되어 있다²⁹. 관절연골이 시간이 지남에 따라 퇴화되고 부드러운 표면이 bone과 bone 접촉에 의해 거칠어지며 염증 생성으로 인해 'wear and tear' (소모)질병의 징후를 나타낸다. 유전적 발생학적 대사작용과 외상인자의 변종이 골관절염의 발생의 시작일지라도⁹ 그것의 증상 (관절통증, 경직, 기능박탈)이 전형적으로 천천히 진행되고 염증과 통증이 번갈아 일어나서 환자의 상대적 침착기를 경험한다. 골관절염의

*논문 접수: 2002년 6월 28일
수정재접수: 2002년 9월 27일

†별책 요청 저자: 김정락, (우) 621-749 경상남도 김해시 어방동 607 인제대학교 의생명공학대 임상병리학과
Tel: 055-320-3215, Fax: 055-334-3426
e-mail: bioxeny@hanmail.net

"본 연구는 과학기술부, 한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재연구센터 연구비와 2000학년도 인제대학교 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었음"

병인학적 증명을 위한 주요 연구의 초점은 aggrecanase의 동정이다. Aggrecan, biglycan, decorin, fibromodulin의 다른 변화가 골관절염과 류머티스 관절염 환자의 검체에서 분리되는데⁷⁾ 골관절염 환자의 대부분에서 normal articular cartilage의 특징적인 proteoglycan species가 있다. 연골세포의 대사변화가 골관절염에서 나타나는데 이러한 arthropathy의 한가지 병인학적 특징은 cartilage로부터 matrix macromolecules의 상실 특히 aggrecan의 상실을 가져온다¹⁵⁾. 이러한 상실이 degeneration 증가의 원인이다. 또한 chondrocyte receptor인 CD44의 기능분열이 cartilage homeostasis 방해로 병리학적인 변화를 가져오며 degenerative disease에서 관찰되었던 것과 같은 extracellular matrix의 상실을 가져온다.

류머티스 관절염 (Rheumatoid arthritis RA)은 전체 인구의 1% 정도가 발병하는 질환으로 만성 활액막염과 연골과괴가 특징이나 병인학적으로는 잘 알려져 있지 않은 자가면역 질환이다.

연골 (cartilage)은 chondrocyte (5%)와 extracellular matrix (90%)로 구성된 특이한 조직으로^{13,15)} 연골세포는 matrix쪽으로 뻗어서 짧은 거리를 유지하면서 다른 세포와 직접적인 접촉은 없다. 이러한 연골은 cell과 matrix의 interaction은 연골 조직 유지를 위해서 필수적이다. 연골은 다양한 proteoglycan이 나타난다. 원형의 연골 proteoglycan인 aggrecan은 연골형성의 하나의 증거로 직접적으로 참가하며, 조직의 삼투저항에 기능 역할을 공급한다. Core protein aggrecan은 분자량이 230 KDa이며 G1, G2, G3의 globular domain과 keratan sulfate, chondroitin sulfate, glycosaminoglycan attachment의 three interglobular domain을 구성하고 G2와 G3사이에 위치하며 G1과 G2사이에는 짧은 interglobular domain을 가진다. 이러한 aggrecan은 연골조직에서 proteoglycan으로서 중요한 역할을 담당하고 단일한 특성을 나타내며, 다른 glycosaminoglycan, hyaluronan과 함께 작용할 수 있는 능력을 가진 core protein이다. 30개 이상의 aggrecan 효소합성은 post translational modification을 수행하고 aggrecan core protein은 N-linked mannose-rich oligosaccharide에 의해 cotranslation을 modify한다.

Steroid는 gene network의 발현을 조절하고 다양한 생리학적 반응에 영향을 준다²⁾. 30년 전 핵전사와 단백질 합성에서 steroid의 영향이 인식되었다 그 이후 연구의 방향은 specific target tissue에서 steroid의 작용과 연관된 세포나 분자 메커니즘의 분석에 초점을 두었다^{2,3,10)}. Steroid 호르몬은 intracellular receptor를 통하여 유전자의 전사를 조절한다. 이 조절 단백질들은 ligand binding domain, DNA binding domain, 여러 transcription 기능을 가진 molecule로 구성되어 있다. 전사나 번역이 억제에 민감한 것 (예를 들어 Actinomycin D, cycloheximide), 오랜 지속의 생리학적 반응들은 steroid의 genomic 작용에 의해 분류된 것이다. 핵 DNA에 steroid의 직접적인

상호작용은 알려져 있으나¹⁴⁾, 이 관찰에서 생리학적인 관련성의 결정은 남아 있는 상태이다. Steroid receptor, thyroid hormone, 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3의 구조적인 homology로 인하여 이러한 receptor들은 steroid receptor superfamily member에 속한다^{9,10)}. 각각의 steroid는 specific target organ에 특이한 효과를 나타낸다. 예를 들어 혈압에 영향을 주는 mineralocorticoid는 신장의 전해질과 양의 조절에 genomic 작용이 반영되는 것으로 해석한다. Type I mineralocorticoid receptor에 의한 aldosterone의 반응은 신장의 원위세뇨관에 Na⁺을 전송하는데 영향을 준다. 이 영향은 상피세포의 Na⁺ channel과 Na⁺-K⁺ ATPase 발현 조절에 관계하는 것으로 aldosterone-induced protein이라 한다^{11,21)}. 비록 mineralocorticoid와 glucocorticoid가 이러한 반응에 있어 뚜렷한 차이를 나타내고 있다고는 하지만 genomic steroid 하나의 작용으로 현재의 이론을 설명하기에는 충분하지 않다. 지연성 genomic steroid 작용에 부가하여 steroid에 특이한 membrane receptor에 의해 전송되는 효과와 같은 빠른 nongenomic steroid의 영향에 관한 증거가 증가하고 있다^{5,23,27)}. 이러한 모든 steroid group에서 나타나지만 steroid 작용의 genomic 메커니즘 논리와는 상반된 것이다. 약리학적으로 빠른 steroid 효과는 광범위하게 인식되었고 genomic 효과와 비교하여 심오한 차이를 알게 되었다. Genomic steroid 작용으로 특이한 steroid 반응차이를 완전하게 설명할 수 없음에 따라 아마도 가설일지 모를 steroid의 선택성이 적어도 일부에서 interacellular 신호에 의해 빠른 steroid의 작용으로 전송되는 것이 결과적으로 핵전사와 단백질 합성으로 변갈아 조절할 것으로 여겨진다. 빠른 steroid 작용의 메커니즘에서 생물학적 관련성의 충분한 확립연구가 요구되어진다^{8,22)}.

Methylprednisolone은 관절염에 항염증, 면역억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이는 세포 내에서 mRNA transcription을 일으켜 단백질 합성을 유도한다. 이러한 단백질 중 lipocortin (lipomodulin)은 세포막 인지질에서 arachidonic acid를 생성하게 하는 phospholipase A2를 억제하여 염증반응 매개체인 prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes 등의 합성을 억제함으로써 혈관투과성 항진, 부종, fibrin 침착, 백혈구의 염증부위 이동 등 염증반응을 억제한다. 이러한 관절염에 항염증, 면역억제 작용을 가진 methylprednisolone의 분자적 효과를 알아내기 위하여 subtractive hybridization을 이용하여 up-regulated gene을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연골세포 배양

적당히 잘라온 돼지 무릎 관절을 수술용 소독약을 멸균한 거즈에 묻혀 닦아 1차 소독 후, clean bench로 가져온 다음

70% 에탄올이 묻은 거즈로 관절을 2차 소독했다. 70% 에탄올이 마르면 관절강을 조심스럽게 분리하여 연골을 되도록 얇게 그리고 충분한 양을 잘라내어 10× antibiotics/Ham's F-12 용액에 모았다. 10× antibiotics/Ham's F-12 용액이 담긴 새 dish로 조직을 옮겨 1시간 동안 상온에 두었다. 연골조직 조각을 100 mm dish로 옮긴 후, Ham's F-12 media로 씻어낸 다음 새 dish로 옮겼다. 연골을 1~2 mm³가 되도록 잘게 조각낸 후 다시 Ham's F-12 media로 씻어 냈다. 배양액을 제거하고 0.5% hyaluronidase 용액 8 ml에 상온에서 10분간 놓아둔 다음 0.5% hyaluronidase 용액을 제거하고 새 0.5% hyaluronidase 용액 16 ml에 상온에서 20분간 처리하였다. 0.5% hyaluronidase 용액을 제거하고 Ham's F-12 media 10 ml로 두 번 씻어 냈다. 배양액을 제거한 후 4 ml의 0.2% trypsin 용액을 처리한 후 씻어 내고 다시 0.2% trypsin 8 ml을 37°C에서 30분간 처리하였다. Trypsin을 제거하고 10 ml의 배양액으로 두 번 씻어낸 후 0.2% collagenase (in Ham's F-12 media) 용액 4 ml에 5분간 놓아 두었다. 원심분리로 collagenase 용액을 제거한 후 다시 0.2% collagenase 용액 8 ml에 30분간 37°C에서 반응시킨 다음 원심분리 (600×g, 8 min)하여 상층액을 제거했다. Pellet에 8 ml의 collagenase를 처리한 후 37°C에서 1시간마다 pipetting하면서 3시간 동안 반응시켰다. 원심분리하여 상층액 세포를 새 tube로 1차 회수하였다. 나머지 pellet을 8 ml의 collagenase 용액을 처리하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰고 (2차 회수용), 1차 회수된 상층액은 원심분리 후 cell pellet을 Ham's F-12/20% FCS 용액으로 풀었고 다시 원심분리 후 cell을 Ham's F-12/10% FCS 배양액을 첨가 후 37°C에서 2차 세포 회수 때까지 저장한다. 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 세포를 가져와 1차 회수된 세포와 같은 방식으로 세포를 모았다. 1차, 2차로 회수된 세포를 cell strainer (70 μm Nylon, Falcon 2350)에 통과시킨 다음 counting하였다. 5×10⁶ cells/100 mm dish의 농도가 되도록 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

1) Methylprednisolone 처리

Methylprednisolone는 현재 상품으로 판매되고 있는 약품을 사용하였다. 약품을 세포가 배양되고 있는 dish에 최종 농도 4,000 ng/ml (10⁻⁶ M)를 첨가하였다. 약품을 첨가한 후 24시간 더 culture한 후 total RNA를 분리하였다.

2. RNA Isolation

약품 처리 후 24시간이 지난 연골세포를 Chomczynski의 방법⁴⁾에 따라 TRI REAGENT (NRC, TR-118)로 분리한 total RNA를 20 μl의 TE buffer (pH 7.5)에 녹인 후 DNase 0.5 μg을 처리한 후 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)과 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)를 이용하여 단백질과 지방을 제거한 뒤 100% 에탄올로 침전시킨 후 20 μl의 멸균수에

녹였다.

3. cDNA 합성

1) Driver cDNA 합성

정상 연골세포의 total RNA 2 μg, 0.5 μg/μl oligo(dT)₁₂₋₁₈ 1 μl, 10 mM dNTP mix를 첨가하여 65°C에서 5분간 변성시킨 후 5× First-strand buffer 4 μl, 0.1 M DTT, RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/μl) 첨가 후 42°C에서 2분간 반응시킨다. 반응이 끝나면 SuperScript II (200 units) 1 μl를 첨가하고 42°C에서 2시간 반응시킨다. 반응이 끝난 후 70°C에서 5분간 가열한 후 PCR의 주형으로 이용한다. 합성된 cDNA 4 μl를 주형으로 10× PCR buffer 5 μl, 25 mM MgCl₂ 3 μl, 10 mM dATP 1 μl, 10 mM dCTP 1 μl, 10 mM dGTP 1 μl, 9 mM dTTP 1 μl, 0.5 mM Biotin-21-dUTP 2 μl, random primer (0.5 μg/μl) 2 μg, Taq DNA polymerase (5 units/μl) 1 μl를 첨가하고 최종 부피 50 μl로 PCR하였다. PCR 조건으로 94°C 2분간 변성시킨 후, 94°C 30초, 37°C 1분 72°C 3분간 40 cycle 실시한 후, 72°C 7분간 신장반응을 실시하고 Sephacryl S-400 spin column을 통과시켜 dNTP, 남은 primer, salt, 짧은 DNA 조각 등을 제거하였다.

2) Tester cDNA 합성

약품을 처리한 연골세포의 total RNA 1 μg, 3' Oligo RT primer (10 μM) 1 μl, 5' Cap RT primer (10 μM) 1 μl를 첨가하여 70°C 2분간 변성시킨 후 5× First-strand buffer 2 μl, DTT (20 mM) 1 μl, 10 mM dNTP 1 μl, SuperScript II (200 units) 1 μl를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시킨 후 72°C에서 7분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다. 합성된 cDNA 4 μl를 주형으로 10× Advantage 2 PCR buffer 5 μl, 10 mM dNTP 1 μl, 5' Cap PCR primer 1 μl, 3' Oligo PCR primer 1 μl, 50× Advantage 2 Polymerase Mix 1 μl를 첨가하고 최종 부피 50 μl로 PCR하였다. PCR 조건으로 95°C에서 3분간 변성시킨 후, 95°C 15초, 64°C 1분, 68°C 6분간 25 cycle 실시한 후 68°C 7분간 신장반응을 실시하고 Sephacryl S-400 spin column을 통과시켜 dNTP, 남은 primer, salt, 짧은 DNA 조각 등을 제거하였다.

4. Subtractive Hybridization

Tester PCR 산물 8 μl (90 ng/μl)와 증류수 2.5 μl, driver PCR 산물 42 μl를 섞고 98°C에서 5분간 변성시키고 미리 데워둔 12×SSC/1% SDS 50 μl (최종 농도: 6× SSC/0.5% SDS)를 첨가하였다. 그리고 65°C water bath에서 12시간 반응시켰다. Sephacryl S-400 spin column을 이용하여 salt와 짧은 DNA 조각 등을 제거하고 100 μl의 멸균수와 최종 농도 0.6 mg의 Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (SA-PMPs; Promega, Z5481)/0.1× SSC 100 μl를 첨가하고 상온에서 2분, 65°C에서 5분간 SA-PMPs 입자와 biotinylated DNA와 결합한

응 후 SA-PMPs 입자를 자석으로 가라 앉히고 상층액을 새 tube에 옮겼다. 여기에 1/10배 양의 3 M sodium acetate와 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 침전시키고 침전물을 10 µl의 멸균수로 녹여 1차 subtraction 산물을 얻었다. 10 µl의 첫 번째 subtracted sample을 tester PCR 증폭과정과 동일한 방법으로 50 µl 반응액에서 15 cycle 증폭하였다.

5. 형질전환

1) 클로닝

pGEM-T 벡터에 subtracted sample을 클로닝 하였다. pGEM-T 벡터 1 µl, 2× rapid ligation buffer 5 µl, 3차 subtracted sample 3 µl, T4 DNA ligase (3 units/µl; Promega, M1801) 1 µl를 첨가하고 최종 부피 10 µl로 4°C에서 16시간 반응시켰다.

2) 형질전환

각각의 연결반응한 시료 5 µl를 숙주 대장균 DH5α에 CaCl₂ 방법으로 형질전환하여 선별 배지인 Ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하였다. 모든 colony를 QIAprep Spin Mini-prep kit (27106)를 이용하여 플라스미드를 분리하였다.

6. Dot blotting

1) Probe 제작

Subtraction하기 전의 tester PCR 산물과 driver PCR 산물을 dot blotting하기 위하여 probe의 주형으로 사용하였다. 각각의 tester와 driver PCR 산물 (25 ng/µl) 10 µl와 멸균수 20 µl를 섞고 100°C에서 3분간 가열하여 변성시킨 후 곧바로 얼음에 두고 얼음 위에서 500 µM dNTPs 2 µl, 10 mg/ml BSA 2 µl, 5× labelling buffer (Promega) 10 µl, [α -³²P]dCTP (50 µCi, 3,000 Ci/mmol) 5 µl, Klenow enzyme (100 u/ml, Promega) 1 µl를 섞고 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 100°C에서 2분간 가열하여 반응을 종결하고 20 mM EDTA를 첨가하였다. 그리고 trichloroacetic acid (TCA) 침전 방법으로 합성된 probe의 활성도를 측정하였고, 나머지는 dot blotting 할 때까지 -20°C에 보관하였다.

2) Dot blotting

순수 분리한 plasmid DNA를 membrane에 점적하기 전 0.4 M NaOH, 10 mM EDTA를 첨가한 후 100°C에서 10분간 변성을 시켰다. 그런 후 cold 2 M ammonium (pH 7.0)을 첨가하여 중화하였다. Nitrocellulose membrane (Amersham)은 6× SSC에 적신 후 Bio-Dot Microfiltration Apparatus (BIO-RAD)에 장치하고 멸균수로 membrane을 수화시켰다. 변성된 plasmid DNA를 진공상태에서 점적하였다. 점적 후 2× SSC로 행군 후 vacuum oven에서 80°C로 2시간 동안 baking하여 membrane에 hybridization하였다.

3) Pre-Hybridization

20× SSC 45 ml, 20% SDS 3.75 ml, 50× Denhardt's solution

15 ml, 10 mg/ml herring sperm DNA 1.5 ml, 50 mM EDTA 3 ml, 멸균수 81.75 ml를 첨가하여 membrane을 hybridization bottle에 넣고 hybridization oven에서 회전시키면서 68°C에서 4시간 pre-hybridization 시켰다.

4) Hybridization

각각의 tester probe와 driver probe를 미리 100°C에서 5분간 가열하여 변성시키고 얼음에서 식힌 후 pre-hybridization이 끝난 용액에 첨가하고 hybridization oven에서 회전시키면서 68°C에서 24시간 hybridization 시켰다.

5) Washing

Membrane을 2× SSC, 0.5% SDS로 상온에서 행군 다음 다시 상온에서 5분간 두 번 행군다. 다시 membrane을 1× SSC, 0.5% SDS로 15분간 65°C에서 두 번 행군다. 그리고 0.5× SSC, 0.5% SDS로 30분간 65°C에서 행군다. 다시 membrane을 0.1× SSC, 0.5% SDS에 30분간 68°C에서 두 번 행군다. 마지막으로 상온에서 0.1× SSC로 행군다.

6) Film exposure

Washing이 끝난 membrane을 3 M 여과지 위에서 건조시키고 비닐 랩으로 봉한 후 X-ray film을 덮어 -70°C에서 24시간 감광시킨 후 현상하였다.

7. 염기서열 분석

DNA의 염기서열은 형광으로 표지된 universal한 primer인 T7과 SP6를 이용하여 Thermo Sequenase cycle Sequencing Kit (USB)와 DNA 증폭기 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer)를 이용하여 DNA 증폭을 한 후 염기서열 자동 분석기 (LI-COR 4200)로 염기서열을 알아보았다. 이렇게 해서 밝혀진 염기서열을 BLAST와 FASTA search를 이용하여 기존의 염기서열과의 상동성을 비교하였다.

결 과

1. Subtraction Hybridization

연골세포 (driver)와 methylprednisolone를 처리한 연골세포 (tester)로부터 total RNA를 분리하여 driver는 oligo dT primer를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤 biotin labeled dUTP와 random primer를 이용하여 PCR을 한 후 double strand cDNA를 준비하였다. Tester는 5' Cap-finder와 3' Oligo dT primer를 이용하여 full length cDNA를 합성하였고 동일한 염기서열을 가진 5' Cap primer와 3' Oligo primer를 이용하여 PCR을 한 후 double strand cDNA를 준비하였다. 이렇게 각기 준비된 driver와 tester를 섞은 후 6× SSC, 0.5% SDS로 65°C에서 12시간을 hybridization하였다. Hybridization 후 subtracted cDNA를 5' Cap primer와 3' Oligo primer를 이용하여 PCR을 실시하였다. 이 PCR 산물을 repeated hybridization시 tester로 사용하였다.

본 연구에서는 3차의 hybridization을 실시하였다. Subtraction의 효율을 알아보기 위하여 1.2% agarose gel에 전기영동 하였다 (Fig. 1). 전기영동 결과, 3회의 hybridization을 하는 동안 특정 유전자만 증폭됨을 알 수 있었고, smear한 band 분포로 보아 multiple gene임을 알 수 있었다.

2. Dot blotting

3회의 subtraction 후 PCR 증폭한 산물을 pGEM-T 벡터에 클로닝 하였다. 이렇게 재조합된 DNA를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였다. 이 클론들의 위양성을 diver cDNA로 합성된 probe를 가지고 dot blotting을 실시하여 제거하였다. Driver와 tester의 RT-PCR 산물을 주형으로 random probe을 합성된 뒤 각각 probe의 합성 효율을 liquid scintillation counting으로 측정하였다. 재조합시킨 subtracted cDNA로부터 plasmid DNA만을 순수 분리한 후 nitrocellulose membrane에 진공상태에서 점적시켰다. Pre-hybridization 후 hybridization시 driver probe와 tester probe를 이용하여 dot blotting을 실시하였다 (Fig. 2).

8번째 line의 2번째는 D.W, 3번째는 pGEM-5Z, 4번째는 tester cDNA 그리고 5번째는 driver cDNA를 점적하여 control로 사용하였다. 각각 negative control에서는 signal이 보이지 않으며, positive control은 확실하게 signal를 보였다. Tester probe에 반응을 보인 clone중 우선 13개를 선별하여 염기서열을 분석하였다.

3. 염기서열 분석

형질전환 후 나타난 클론들 중 전기영동을 통한 선별과정을 거친 클론을 형광이 부착된 universal primer T7과 SP6을 이용하여 DNA 증폭 후 LI-COR 염기서열 분석기로 DNA 염

기서열을 분석하였다. 클론들의 분석된 염기서열을 BLAST와 FASTA를 이용하여 기존의 유전자들과의 상동성을 비교하였다. 13개의 clone 중 각기 독특한 유전자로 생각되어지는 것으로 8종류의 유전자를 찾았다. 이 중 7종류는 기존에 알려진 기능이 있으나 1종류의 유전자는 genbank상에 유전자만 등록된 것이었다. 8개의 유전자들의 특징은 Table 1에 요약 정리하였다.

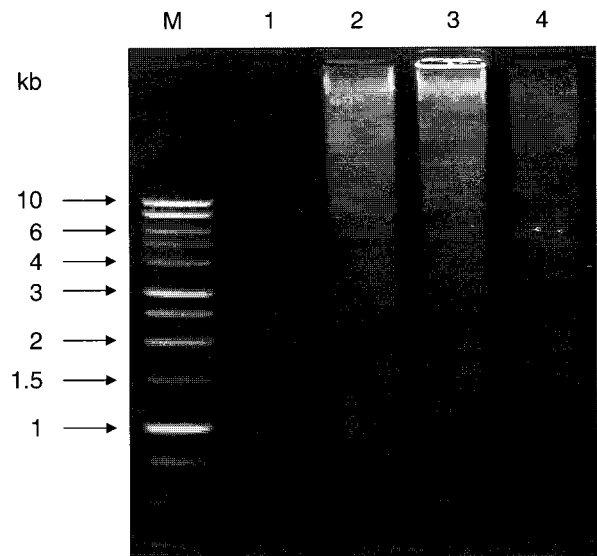
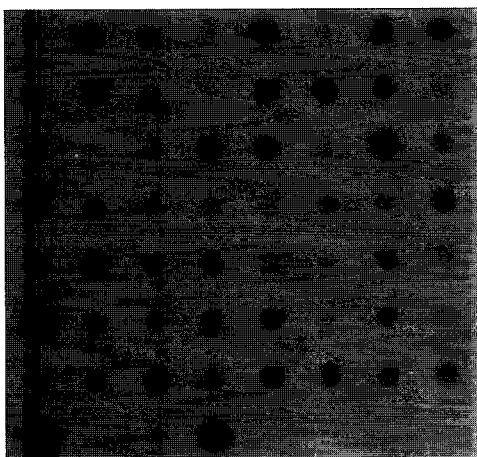


Fig. 1. The subtracted cDNA amplification of methylprednisolone-induced genes in chondrocyte. 1.2% agarose gel shows the decreased PCR products after three rounds of subtractive hybridization. Lane M, 1 kb DNA ladder (Promega); lane 1, un-subtractive tester cDNA PCR products; lane 2, the first subtractive PCR products; lane 3, the second subtractive PCR products; lane 4, the final subtractive PCR products.

(A)



(B)

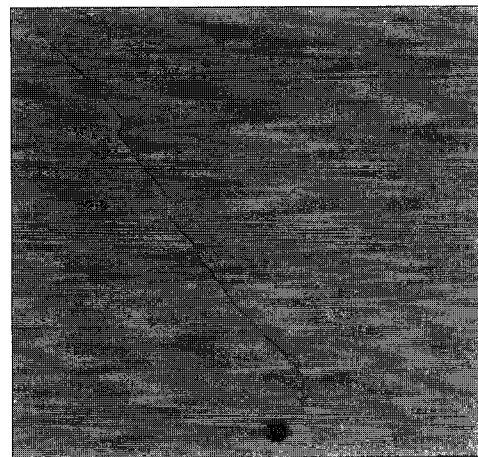


Fig. 2. The result of dot-blotting for clones 57 clones by using radio-labeled probe prepared from the tester cDNA. The third dot of the eighth row is the plasmid control (negative). Fourth dot of the eighth row is the tester cDNA control (positive) (A) and fifth dot of the eighth row is the driver cDNA control (positive) (B).

Table 1. Identification of differentially expressed genes in chondrocyte treated with methylprednisolone

Clone No.	Reading Size (bp)	Homology analysis (Species)	ID (%)	Accession No.
M-PRED 1	198	KIAA0368 (Human)	92	XM_036708
M-PRED 9	260	Upregulated during skeletal muscle growth 5 (Mouse)	86	NM_023211
M-PRED 10, 13	62	Ribosomal protein S18 (RPS18) (Human)	85	NM_022551
M-PRED 18	155	Skeletal muscle ryanodine receptor (Pig)	93	X69465
M-PRED 19	40	Radial spoke protein 3 (RSP3) (Human)	87	XM_027659
M-PRED 34, 35, 65	61	Ribosomal protein QM (Pig)	93	AF143815
M-PRED 37, 50	274	Ribosomal protein L37a (RPL37A) (Mouse)	92	NM_009084
M-PRED 44, 45	135	Cytochrome c oxidase subunit VIII (COX8) (Cow)	88	J05201

M-PRED: Methylprednisolone, ID: Identity

고 찰

독특하게 발현되는 유전자의 identification에는 differential display polymerase chain reaction (DD-PCR)과 serial analysis of gene expression (SARPA), representational difference analysis, enzymatic degrading subtraction, cDNA library based subtraction 등이 있다. 위와 같은 방법들은 많은 시간과 인력을 요구하며 적은 양의 species를 이용하기 어렵다. 또한 짧은 단편들의 transcript들이 클로닝 되는 경우가 많다. 이런 단점들을 보완하기 위해 다양한 방법을 수정한 것이 PCR-based subtractive hybridization이다. 이 방법은 시간 절약과 불필요한 과정을 줄이고 PCR에 의한 적은 양의 sample의 수를 충분히 늘려서 driver와 tester로 이용할 수 있으며 각 subtraction 시 subtraction의 반복 실시가 가능하다. 극소수의 transcript들이 subtraction 후 1,000배 이상으로 enrich됨을 알 수 있다. Subtracted cDNA는 cDNA library를 만들 수가 있으며 다른 species의 screening에 probe로 이용할 수 있다¹⁾.

이런 subtractive hybridization의 장점 이외에도 본 연구에서는 여러 가지를 응용하여 사용하였다. "cap-finder" cDNA 합성 방법을 이용하여 전체 길이의 cDNA를 합성하였으며, "long-distance PCR" 방법으로 전체 길이의 cDNA를 증폭하였다. 또한 hybrid된 cDNA의 효율적인 분리를 위하여 biotin system을 사용하였다²⁸⁾. Long distance PCR을 수행할 때 각각의 염기서열이 다른 5-Cap PCR primer와 3'-Oligo PCR primer를 이용하여 PCR 증폭함으로써 PCR product의 Panhandle 구조에 의한 suppression PCR effect를 피하였다. 그리고 PCR-based subtraction 방법의 주요 문제점인 PCR product의 변이를 줄이기 위하여 3'-5' exonuclease 활성을 가진 DNA 중합효소를 사용하였으며, PCR cycle 또한 60 cycle을 초과하지 않았다.

M-PRED 1은 human mRNA for KIAA0368과 높은 상동성을 보이는 잘 알려지지 않은 human gene으로 염기서열만 알려

져 있으며²⁹⁾ methylprednisolone에 의해 chondrocyte에서 발현되는 유전자로 관절염치료 시 중요한 기능을 할 것으로 보인다. M-PRED 9는 upregulated during skeletal muscle growth 5와 86% 상동성을 보였다. M-PRED 18-1 Ryanodine Receptor (RYR)은 calcium release channel로서 skeletal muscle (RYR1), Heart (RYR2), Brain (RYR3)에서 많이 나타나는데 이러한 조직에 제한적이지는 않다. Skeletal muscle ryanodine receptor와 93% 상동성을 보이는 골격근 흥분수축연 (excitation contraction coupling) 작용을 하는 T관 (transverse tubule)과 근소포체망 (sarcoplasmic reticulum)의 calcium release channel이다. 근육 수축이 일어나면 RYR를 통하여 근소포체망의 종말수조 (terminal cisternae)로부터 calcium release된다. RYR결핍에 의하여 근소포체망의 calcium이 비정상적으로 증가하면 악성고열을 나타낸다. 이러한 결과로 근육의 농도가 만성적 질병과 연관이 있는 것 같다^{18,19)}. M-PRED 34, 35, 65는 ribosomal protein QM으로 bone 발생에 있어서 독특한 특징을 가지며 bone 형성에 있어서 분화 역할을 한다. 또한 protein synthesis에 있어서 추상적으로 housekeeping 역할을 한다¹²⁾. M-PRED 44, 45는 cytochrome c oxidase (COX) subunit VIII으로 respiratory chain의 terminal enzyme이고 cytochrome c에서 전자를 molecular oxygen으로 넘겨주는 역할을 한다. Subunit VIa, VIa, VIIa, VIII은 소, 돼지, 쥐에서 간과 심장에 조직특이성을 나타낸다. 포유동물의 심장에서 분리된 COX VIII은 간에서 분리된 것과는 전기영동 분석이나 면역학적 조성에 있어서 상당한 차이를 나타낸다.

관절염치료제로 사용되고 있는 steroid hormone의 일종인 methylprednisolone를 chondrocyte에 처리한 결과 발현한 이들 유전자들은 지금까지 알려진 기능 외에 연골세포의 분화와 성장에 또 다른 기능을 할 것으로 생각되어진다. 이들 유전자들이 연골세포의 분화와 성장에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다. 연골세포의 분화 시 발현되는 이들 유전자들의 연구로 관절염의 유전적 치료에 도

움이 될 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- 1) Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L, Hill JE, Siebert PD, Lukyanov SA, Sverdlov ED and Berg DE (1998): PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95(22)**: 13108-13113.
- 2) Beato M (1989): Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, **56(3)**: 335-344.
- 3) Beato M and Sanchez-Pacheco A (1996): Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev*, **17(6)**: 587-609.
- 4) Chomczynski P (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15(3)**: 532-534, 536-537.
- 5) Christ M and Wehling M (1998): Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails? *Cardiovasc Res*, **40(1)**: 34-44.
- 6) Creamer P and Hochberg MC (1997): Osteoarthritis. *Lancet*, **350(9076)**: 503-508.
- 7) Cs-Szabo G, Roughley PJ, Plaas AH and Glant TT (1995): Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum*, **38(5)**: 660-668.
- 8) Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER and Monder C (1988): Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, **2(8618)**: 986-989.
- 9) Evans RM (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240(4854)**: 889-895.
- 10) Fuller PJ (1991): The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J*, **5(15)**: 3092-3099.
- 11) Garty H and Palmer LG (1997): Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev*, **77(2)**: 359-396.
- 12) Green H, Canfield AE, Hillarby MC, Grant ME, Boot-Handford RP, Freemont AJ and Wallis GA (2000): The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. *J Bone Miner Res*, **15(6)**: 1066-1075.
- 13) Hardingham TE and Fosang AJ (1992): Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*, **6(3)**: 861-870.
- 14) Jolly WT, Whittem T, Jolly AC and Firth EC (1995): The dose-related effects of phenylbutazone and a methylprednisolone acetate formulation (Depo-Medrol) on cultured explants of equine carpal articular cartilage. *J Vet Pharmacol Ther*, **18(6)**: 429-437.
- 15) Knudson CB and Knudson W (2001): Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*, **12(2)**: 69-78
- 16) Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD and Wolfe F (1998): Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*, **41(5)**: 778-799.
- 17) Lawrence RC, Hochberg MC, Kelsey JL, McDuffie FC, Medsger TA Jr, Felts WR and Shulman LE (1989): Estimates of the prevalence of selected arthritic and musculoskeletal diseases in the United States. *J Rheumatol*, **16(4)**: 427-441.
- 18) Leeb T and Brenig B (1996): Structural analysis of the porcine skeletal muscle ryanodine receptor gene coding region 3385 to 4623. *Mamm Genome*, **7(2)**: 152-154.
- 19) Leeb T, Schmolzl S, Brem G and Brenig B (1993): Genomic organization of the porcine skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene coding region 4624 to 7929. *Genomics*, **18(2)**: 349-354.
- 20) No authors listed (1994): Arthritis prevalence and activity limitations--United States, 1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, **43(24)**: 433-438.
- 21) Oguchi A, Ikeda U, Kanbe T, Tsuruya Y, Yamamoto K, Kawakami K, Medford RM and Shimada K (1993): Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **265(4 Pt 2)**: H1167-1172.
- 22) Petrelli MD, Lim-Tio SS, Condon J, Hewison M and Stewart PM (1997): Differential expression of nuclear 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in mineralocorticoid receptor positive and negative tissues. *Endocrinology*, **138(7)**: 3077-3080.
- 23) Picard D (1998): Molecular endocrinology. Steroids tickle cells inside and out. *Nature*, **392(6675)**: 437-438.
- 24) Saari H, Tulamo RM, Kontinen YT and Sorsa T (1992): Methylprednisolone acetate induced release of cartilage proteoglycans: determination by high performance liquid chromatography. *Ann Rheum Dis*, **51(2)**: 214-219.
- 25) Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H and Fukuda K (1998): Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, **27(6)**: 392-399.

- 26) Wehling M (1997): Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, **59**: 365-393.
- 27) Yelin E and Callahan LF (1995): The economic cost and social and psychological impact of musculoskeletal conditions. *Arthritis Rheum*, **38(10)**: 1351-1362.
- 28) Zhao Z, Huang X, Li N, Zhu X, Chen S and Cao X (1999): Direct cloning of cell differential expression genes with full-length by a new strategy based on the multiple rounds of 'long distance' polymerase chain reaction and magnetic beads mediated subtraction. *J Biotechnol*, **73(1)**: 35-41.
-