

Expression of Cytochrome b₅ Retropseudogenes in Hunam Blood

Mi-Sun Hwang¹, Alan W. Stegges and Min Yoo^{1†}

¹Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

²Department of Biochemistry, NEOUCOM, Rootstown, OH 44272, USA

Cytochrome b₅ (b₅) can be found in a variety of tissues and plays a role in the electron transfer pathways. Several retropseudogenes (numbered as I, II, III, IV, V) have been identified and well investigated for their structures. However, retropseudogene I is not clear in terms of its location on the chromosome. In addition the structure and the expression of retropseudogene V have not been confirmed. To examine the structure of b₅ retropseudogenes V and to see whether it is expressed in human blood we applied recombinant DNA technologies including polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. Retropseudogene V turned out to contain open reading frame (ORF) within its structure, however, no evidence of its expression was detected. Retropseudogene I was also found on the chromosome V. This study should contribute to the understanding of the structure of b₅ gene family.

Key Words: Cytochrome b₅ retropseudogene, PCR, DNA sequencing

서 론

Cytochrome b₅ (b₅)는 간, 뇌, 혈액 등 신체 여러 조직에서 발견되는 효소인데 그 동안 주로 간에서 연구가 되어 왔다. 그것은 간이 물질대사의 주된 장소이기 때문이다. 분자유전학의 발달과 함께 최근에는 혈액과 뇌에서의 b₅ 발현에 대한 관심도 점차 높아지고 있는 추세이다.

b₅는 간과 혈액에서 여러 가지 산화환원반응에 관여하여 전자를 전달해 주는 역할을 한다. 특히 간에서는 NADH를 매체로 하여 지방산의 불포화반응에 관여하며, cytochrome P-450이 촉진하는 hydroxylation 반응에도 관여한다^{6,11,14}.

혈액에서 b₅는 methemoglobin (metHb)의 환원에 직접 관여한다^{4,9}. Hemoglobin (Hb)의 heme group은 평상시 환원된 상태에서 산소와의 결합이 가능하다. 그러나 산화 Hb인 metHb에서는 heme group이 산화되어 산소와의 결합이 불가능하다. 정상인의 혈액에서도 metHb은 전체 Hb 중 약 1% 정도로 관찰이 되지만¹⁰ 특히 강한 산화제 (마취제, 질산염 등)와 접촉하였을 때 갑작스럽게 증가하게 된다⁷. 혈액 중 metHb이 10% 이상의 농도로 증가하면 혈액이 마치 간장처럼 검게 변

하게 되는데 이런 증상을 병리학적으로 methemoglobinemia라 부른다. Methemoglobinemia의 대표적인 증세는 청색증 (cyanosis)이다⁹. 만일 b₅가 유전적으로 결핍되면 체내에 metHb이 심하게 축적되어 쉽게 피로해지거나 심하면 사망하게 되고 만다.

b₅는 조직에 따라 조금씩 다른 구조를 하고 있다. 특히 간과 적혈구의 b₅를 비교하면, 간에서 발견되는 b₅가 134개의 아미노산으로 되어 있는데 비해 적혈구의 b₅는 98개의 아미노산으로 되어 있어 그 차이가 현저함을 알 수 있다¹¹. 이러한 차이에도 불구하고 이들이 유사한 기능을 수행하고 있는 것으로 미루어 보면 이들의 생합성 관계가 매우 밀접할 것임을 추측할 수 있다.

간의 b₅는 전체가 소포체 막에 결합되어 있는데 기능기로서의 역할을 하는 N-말단 쪽의 큰 부위와 막 결합부인 C-말단 쪽의 작은 두 개의 부위로 나뉘어진다¹². 반면에 적혈구의 b₅는 세포질에 떠 있는 형태인데, 이것은 막 결합부위가 없이 N-말단 쪽의 98개의 아미노산만으로 되어 있기 때문이다². 간과 적혈구에서 b₅의 이러한 구조적 차이는 alternative mRNA splicing에 의하여 만들어지는 것으로 알려져 있다¹³.

이 b₅의 retropseudogene들이 또한 여러개 발견되었다^{3,15,16}. Retropseudogene의 생성과정은 대략 다음과 같이 추정되고 있다. Genomic DNA로부터 transcription에 의해 pre-mRNA가 만들어지고, 이것이 splicing에 의해 mature mRNA로 되었을 때 세포가 retrovirus의 공격을 받게 되면 mRNA는 reverse transcriptase에 의해 cDNA로 전환이 되고 만다. 이 cDNA는

*논문 접수: 2003년 8월 14일

수정재접수: 2003년 9월 16일

†별책 요청 저자: 유민, (우) 704-701 대구광역시 달서구 신당동 1000 계명대학교 생물학과

Tel: 053-580-5537, Fax: 053-580-5537

e-mail: ymin@kma.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 및 계명대학교 TMR 센터의 간접적인 지원과 (주)비락의 협조에 의하여 이루어졌음.

계속해서 retrovirus에 의해 genomic DNA 속으로 끼어 들어 가게 되고 여러 가지 돌연변이가 일어나 기능은 없어지게 된다¹⁵⁾. 이렇게 형성된 retropseudogene는 exon에 해당하는 염기 서열만 있는 것이 특징이다^{8,16)}. Retropseudogene은 발현은 되지 않지만 유전병을 DNA 차원에서 진단할 때 extra band를 형성하여 오진의 가능성을 야기시키는 것이 문제이다. 따라서 retropseudogene의 구조를 명확히 밝히는 것은 분자병리학적인 차원에서 볼 때 대단히 중요한 일이 아닐 수 없다.

본 연구에서는 retropseudogene의 구조를 밝히고, 원래 기능이 없지만 다른 유전자 프로모터의 도움을 받아 발현될 가능성도 완전히 배제할 수 없기에 이를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 이용된 Taq DNA polymerase와 dNTP 등 PCR 관련 제품은 Takara (Japan)에서 구입하였다. MMLV reverse transcriptase, RNasin Ribonuclease Inhibitor, Wizard Plus Minipreps DNA Purification System, pGemT-easy vector는 Promega (USA)의 제품을 사용하였으며 RNeasy Blood mini kit은 QIAGEN (Germany)의 제품을 사용하였다. Primer는 (주)바이오니아 (korea)에 의뢰하여 제작하였다. X-ray film은 Agfa (Belgium)의 것을, [³⁵S]-dATP와 Sequenase V2.0 kit은 Amersham (UK)의 제품을 사용하였다.

2. 방법

염색체 14번에서 분리한 DNA 절편이 들어 있는 여러 개 clone 중 하나인 clone 14.3에서 template DNA를 분리하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응물은 pGemT-easy vector로 클로닝하였고 color selection으로 결과를 확인한 후 plasmid를 분리해 DNA sequencing을 실시하였다. PCR 반응에 사용된 primer들은 Table 1에 나타낸 바와 같으며 이들은 100 pmol/μl의

농도로 제작하였다. PCR 반응은 template 1 μl, sense primer와 antisense primer를 각각 10 pmole, dNTP 0.125 mM, 10×buffer 2 μl, Taq DNA polymerase 2 U를 섞어 전체 반응 부피가 20 μl가 되게 하여, 반응 cycle은 denaturation을 94°C에서 30초, annealing을 60°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초로 모두 35회 반복하였으며, pre-denaturation을 94°C에서, post-extension을 72°C에서 3분씩 각각 추가 처리하였다. DNA sequencing의 세부적인 과정은 Sequenase V2.0 kit에서 제시한 안내서에 따라 수행하였다. Gel은 6% polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide = 19:1), 8 M urea gel을 사용하였으며 2,000 V, 50 W로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 3 MM paper로 옮겨 표면을 wrap으로 차단하여 80°C에서 1시간 동안 진공건조 후 cassette에 넣어 X-ray 필름에 24시간 노출시킨 뒤 현상하였다. 임상적으로 건강하다고 판명된 성인의 혈액에서 RNeasy Blood mini kit을 이용하여 RNA를 분리하여 reverse transcription (RT)하였고, 반응물 2~4 μl를 PCR에 사용하였다.

결 과

염색체 14번의 일부 염기서열이 들어 있는 clone 14.3은 NEOUCOM (미국)의 Alan W. Steggles 박사로부터 분양받았

Table 1. List of PCR Primers

Primer	Sequence
β-globin1	TGAGGCCCTGGGCAGGCTGCTGG
β-globin2	TTGCCAGGAGCCTGAAGTTCTCAGG
14.3-1	TTTCTGGAGGAGCACCCCTGGAGGGGAG
14.3-2	GGCCATGTAGAGGCGATACATCAGTGCC
b ₅ -5	GAGCATCCTGGTGGGGAAGAAGTCCT
b ₅ -7	GGGATCACCCAGTTGGTCCACC

5' ACGGCCGAGC AGCTGGACGA GGCCGTGAAG TACTACACCC TAGAGGAGAT TCAGAAGCAC
AACGACAGCA AGAGCACCTG ACTGATTCTG CACCACAAGG TGTACTATTT GACCAAATTT
CTGGAAGAGC ATTCTGGTGG GGAAGAAGTC TTAAGGGAAC AAGCTGGAGG TGACGCTACT
GAGAATTTTG AGGATGTCGG GCATCTTTGA GATGCCATGG AATTGTCCAA AACATATATC
ATTCAGGAGC CCCATCCAGA CGACAGACCA AAGTTAAACA AGCTTCCGGA AACTCTTATC
ACTGCTGTTG ATTCTAGCTC CAGTTGGTGG ACCAACTGAG TGACCCCTGCC ATGTCAGCAG
TGGCCGTCGC CTATCAAGGC ACCCTATACA TGGCAGAAGG CTGA 3'

Fig. 1. Sequence of b₅ retropseudogene I. DNA sequence of clone 14.3 is indicated as underlined letters.

```

5' GAATTCTAAA GGAGAACTGC AGAGATGGCT GCGCAGTCAG ACAAAGACGT GAAGTACTAC
ACCCTAGAAG AGATTAAGAA GCACAACCAC AGCAAAAGCA CCTGGCTGAT CCTGCACCAC
AAGGTGTACA ATCTGACCAA ATTTCTGGAG GAGCACCTG GAGGGGAGG AGTCCTGAGG
GAACAAGCTG GGGGCGATGC CACTGAAAAC TTTGAGGACG TCGGGCACTC GACAGATGCC
AGAGAGCTGT CCAAGACCTT CATCATCGGG GAGCTGCACC CGGATGACAG ATCAAAATTG
AGCAAGCCTA TGGAAACTCT TATCACCACC GTCGATTCCA ATTCCAGCTT GTGGACCAAC
TTGGTGATCC CCGCCATCTC CGCCCTGATC GTGGCACTGA TGTATCGCCT CTACATGGCC
GACGACTGAG CCCCTGCCCA GCAGCCCGTG CAAGAAAAGA CGGCCTGGGA CAAGGGGCAG
AAGCAGCTC TGGTAATCAC TCAGCTGACA GAAACCTTCA CCTGAGAAAT AATTGTAATA
TGTCTGTTTC CCTTTCTTCC TATGTTAGAA GCAAACAAGA ACTGTT 3'

```

Fig. 2. Sequence of b₅ retropseudogene V. ATG and TGA (bold letters) represent the initiation codon and the stop codon, respectively.



Fig. 3. Results of RT-PCR. Lanes M, 1, 2 represent 100 bp ladder as a size marker, β -globin, and b₅ retropseudogene V, respectively.

다. Clone 14.3에서 template DNA를 분리하여 PCR한 후 pGemT-easy vector로 클로닝하여 DNA sequencing을 실시한 결과 b₅의 retropseudogene I이 포함되어 있다는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 이로서 retropseudogene I이 염색체 14번에 위치함을 염기서열 차원에서 확인할 수 있었다.

가장 최근에 밝혀진 b₅의 retropseudogene V clone을 분리 분석한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 이것은 지금까지 밝혀진 것처럼 기능이 사라진 보통의 retropseudogene과는 다르게 ATG의 개시코돈과 TGA의 종말코돈을 가지는 open reading frame (ORF)의 구조를 포함하는 것으로 확인되었다. 따라서

이 경우에는 발현이 되는지 여부를 직접 확인할 필요가 있었다. 성인 혈액에서 RNA를 뽑아 RT-PCR로 발현의 가능성을 확인한 결과는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. Lane M은 size marker로 100 bp ladder이며, lane 1은 대조군으로 β -globin의 증폭을 참고한 것이다. β -globin이 확실히 증폭된 것으로 미루어 실험상의 오류는 없는 것으로 판명되었다. 그러나 lane 2에서 retropseudogene V의 발현여부를 확인한 결과 증폭되지 않은 것으로 보아 retropseudogene V는 혈액에서 발현되지 않는다고 최종 결론지었다.

고 찰

신체 여러 조직에서 발견되는 효소인 b₅는 특히 간과 혈액에서 여러 가지 산화환원반응에 관여하여 전자를 전달해 주는 역할을 한다¹⁾. 간에서는 지방산의 불포화반응과 cytochrome P-450이 촉진하는 hydroxylation 반응에 관여하며^{6,11)}, 혈액에서는 metHb의 환원에 관여하여 Hb이 정상적으로 산소를 운반할 수 있게 한다⁴⁾. 최근에 b₅의 retropseudogene이 여러개 발견되었는데 그 중에서도 I번과 V번에 대한 분석이 아직도 미비한 실정이다. Retropseudogene은 특히 유전성 질환의 진단 과정에서 종종 오진을 야기시킬 가능성이 있기 때문에 더욱 그 분석 작업이 시급한 실정이다. 염색체 14번을 분획하여 재조합한 14.3 clone을 sequencing한 결과 retropseudogene I의 염기서열이 포함되어 있음이 확인되었다 (Fig. 1). 이는 b₅ retropseudogene I이 염색체 14번에 위치함을 염기서열 차원에서 확인해 주는 결과라 하겠다. 물론 이전에 hybridization 방법으로 retropseudogene I이 염색체 14번에 위치함을 확인한 적이 있기는 하나³⁾ 염기서열 차원에서 정확

하게 확인된 것은 이것이 처음이라 할 수 있다.

Retropseudogene V의 전체 염기서열을 결정한 결과에 의하면 (Fig. 2) 지금까지의 pseudogene과는 달리 ATG의 개시코돈과 TGA의 종말코돈을 온전히 가지는 ORF 구조가 들어 있음을 알 수 있었다. Pseudogene은 원칙적으로 발현이 되지 않는 유전자를 의미하지만 b_5 retropseudogene V 같은 경우 genomic DNA 상으로 integration되는 과정 중에 만일 어떤 유전자의 promoter 뒤에 끼어 들어간다면 발현의 가능성이 있음을 강력하게 시사하는 것이다. 따라서 혈액에서 발현의 가능성을 확인하고자 RT-PCR을 수행하였지만 여기에서 나타난 결과에 의하면 실제로는 발현되지 않는 것으로 결론지어졌다 (Fig. 3).

본 연구에서는 retropseudogene I이 14번 염색체에 위치함을 염기서열 차원에서 재확인하였으며, retropseudogene V의 구조와 염기서열을 결정하였고 비록 ORF가 있기는 하나 이것이 혈액에서 발현되지는 않음을 확실하게 증명하였다. 본 연구는 b_5 retropseudogene의 분리, 분석을 유전자 차원에서 시도하였기에 관련 분야에 대한 학문적 발판을 마련하는데 기여할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- 1) Abe KS, Kimura R, Kizawa FK, Anan and Sugita Y (1985): Amino acid sequences of cytochrome b_5 from human, porcine and bovine erythrocytes and comparison with liver microsomal cytochrome b_5 . *J Biochem*, **97**: 1659-1668.
- 2) Douglas RH and Hultquist DE (1978): Evidence that two forms of bovine erythrocyte cytochrome b_5 are identical to segments of microsomal cytochrome b_5 . *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**: 3118-3122.
- 3) Giordano SJ, Yoo M, Ward DC, Bhatt M, Overhauser J and Steggle AW (1993): The human cytochrome b_5 gene and two of its pseudogenes are located on chromosomes 18q23, 14q31-32.1 and 20p11.2, respectively. *Human Genetics*, **92**: 615-618.
- 4) Hegesh E, Hegesh J and Kaftory A (1986): Congenital methemoglobinemia with a deficiency of cytochrome b_5 . *N Engl J Med*, **314**: 757-761.
- 5) Jaff ER (1981): Methemoglobinemia. *Clinics in Hematology*, **10**: 99-122.
- 6) Jagow G and Sebal W (1980): b-Type cytochromes. *Ann Rev Biochem*, **49**: 611-624.
- 7) Kellett PB and Copeland CS (1983): Methemoglobinemia associated with benzocaine containing lubricant. *Anesthesiology*, **59**: 463-464.
- 8) Kim DJ and Yoo M (1993): Isolation and characterization of retropseudogene for human cytochrome b_5 . *Mol Cells*, **3**: 55-57.
- 9) Leroux A, Junien C, Kaplan JC and Bamberg J (1975): Generalized deficiency of cytochrome b_5 reductase in congenital methemoglobinemia with mental retardation. *Nature (London)*, **258**: 619-620.
- 10) Mansouri A (1985): Methemoglobinemia. *Am J Med Sci*, **289**: 200-209.
- 11) Mathews FS (1985): The structure, function and evolution of cytochromes. *Prog Biophys Molec*, **45**: 1-56.
- 12) Ozols J and Gerard C (1977): Covalent structure of the membranous segment of horse cytochrome b_5 . *J Biol Chem*, **252**: 8549-8553.
- 13) Ozols J (1989) Structure of cytochrome b_5 and its topology in the microsomal membrane. *Biochim Biophys Acta*, **997**: 121-130.
- 14) Schenkman JB, Jansson I and Robie-Suh KM (1976): The many roles of cytochrome b_5 in hepatic microsomes. *Life Science*, **19**: 611-624.
- 15) Yoo M and Steggle AW (1989): The characterization of three types of partially processed mRNA and two pseudogenes for human liver cytochrome b_5 . *Biochem Biophys Res Commun*, **163**: 18-24.
- 16) Yoo M, Kim DJ and Steggle AW (1993): Complete nucleotide sequence of type III pseudogene for human cytochrome b_5 . *Korean Biochem J*, **26**: 168-171.