*Journal of Life Science* 2007 Vol. 17. No. 8. 1129~1134 ©JLS / ISSN 1225-9918

# 소포체 스트레스에 대한 Protein Disulfide Isomerase의 세포보호효과

구태원 · 윤은영 · 김성완 · 최광호 · 강석우 · 권기상[1] · 권오유[1]*

농업과학기술원 농업생물부, [1]충남대학교 의과대학 해부학교실

Received June 5, 2007 / Accepted June 25, 2007

***Bombyx mori* Protein Disulfide Isomerase (bPDI) Protects Sf9 Cells from Endoplasmic Reticulum (ER) Stress.** Tae Won Goo, Eun Young Yun, Sung Wan Kim, Kwang Ho Choi, Seok Woo Kang, Kisang Kwon[1] and O Yu Kwon[1]*. *Department of Agricultural biology, the National Institute of Agriculture Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea, [1]Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea* – In the previous our study, a cDNA that encodes protein disulfide isomerase from *Bombyx mori* (bPDI) was isolated and characterized. bPDI has an open reading frame of 494 amino acids contained two PDI-typical thioredoxin active site of WCGHCK and ER (endoplasmic reticulum) retention signal of the KDEL motif at its C-terminal. Recent studies have demonstrated that misfolded proteins are accumulated in many diseases including Alzheimer's, goiter, emphysema, and prion infections. bPDI was over-expressed or knock-downed in Sf9 cells to study the relationship between bPDI expression and protections against protein misfolding. bPDI gene was cloned in insect expression vector pIZT/V5-His for over-expression and bPDI double-stranded RNA (dsRNA) was generated for knock-down. Over-expression of bPDI significantly improved survival rate, but bPDI dsRNA transfection significantly reduced survival rate after 48 hours exposure. In mock-transfected or wild-type cells had no significant effect. The results support the view that bPDI is one of the important intracellular components for cell protect mechanism, especially, against ER stress such as protein misfolding.

**Key words** – *Bombyx mori*, protein disulfide isomerase, endoplamic reticulum, misfolding

## 서 론

세포가 다양한 물리 · 화학적 스트레스를 받게 되면 소포체 (endoplasmic reticulum; 이하 ER) 내강 (lumen)에는 정확하게 폴딩 (folding)되지 못한 단백질 (unfolded 또는 misfolded protein)이 과다 축적되는데, 이들 misfolding 단백질들은 ERSD (endoplasmic reticulum storage diseases)을 유발할 수 있다[2,3,7,11]. 단백질의 misfolding은 단백질의 기능을 명백하게 손실시키며, 대량으로 축적된 misfold된 단백질의 불용성 집합체 (insoluble aggregate)는 세포의 기능을 저해한다[3,9]. 따라서 세포는 단백질의 misfolding을 방지하기 위하여 다수의 기작을 사용하는데, 이들 기작은 폴딩에 실패한 단백질을 분해하는 시스템을 포함하여 집합체 형성 억제와 폴딩 촉진을 위한 샤페론 (chaperone)과 folding catalyst를 포함하고 있다[1]. 이처럼, 최근 포유동물에서는 PDI (protein disulfide isomerase)가 퇴행성 질환인 Alzheimer's disease[5,8,12]와 밀접한 관련이 있다는 많은 연구가 보고되고 있으나 곤충에서는 PDI와 ER 내 misfold된 단백질의 생성에 의해 유발되는 ERSE (ER stress response element)와의 관계해석이 전무한 실정이다. 이전 연구에서, 누에에 *E. coli*를 주사한 후 시간별 bPDI (*Bombyx mori* protein disulfide isomerase)의 전사체발현 분석에서 bPDI의 시간별 전사체 발현이 항세균 펩타이드 (antibacterial peptide)의 시간별 발현 양상과 매우 유사하여 bPDI과 곤충 면역과 관련할 것으로 추정하였다[4].

따라서 본 연구에서는 bPDI가 곤충의 ERSE와 관계하는지를 해석하기 위한 기초 실험으로, bPDI가 과발현 (overexpression)되는 곤충세포주와 이와 반대로 bPDI가 억제 발현 (knock-down)되는 곤충세포주를 제작하여 bPDI가 misfolding 단백질의 생성을 제한함으로써 곤충의 ERSE에 관련하는지를 해석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 배양세포주

본 연구에 사용된 곤충 배양세포주는 *Spodoptera frugiperda*의 난소 (ovary) 조직에서 수립된 Sf9 세포주를 사용하였으며, 세포주는 10% (v/v) FBS (heat-inactivated fetal bovine serum)이 포함된 TC-100 배양액 (Sigma)에서 계대배양 및 유지되었다[10].

### 곤충 형질전환용 전이벡터 제작

bPDI의 발현이 과발현 및 억제 발현되는 형질전환 곤충

*Corresponding author
Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800
E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

배양세포주는 pIZT/V5-His 형질전환용 전이벡터 (Invitrogen)를 이용하여 제작하였다. bPDI 과발현용 형질전환 전이벡터를 제작하기 위하여 bPDI 유전자의 sense primer는 Kozak 법칙을 고려하여 번역 개시코돈인 ATG를 포함한 5′-GGGG TACCCCAAA**ATG**AAGCCTATATTTTTG-3′ (31 mer)으로 합성하였으며, antisense primer는 pIZT/V5-His 벡터 (Invitrogen)의 6×His-tag 발현을 고려하여 번역 종결코돈인 TAA를 GAA로 전환하여 5′-GCTCTAGAGCGTAGACGT**GAA**C CTGGCTGGCTGC-3′ (34 mer)으로 합성하였다. 또 한편으로 bPDI 억제 발현용 형질전환 전이벡터를 제작을 위한 sense primer (5′-GGGGTACCCCTAACTCGTCTTTGGCAGG-3′; 28 mer)로, antisense primer (5′-GCTCTAGAGCGAAATGCGT GTTTTAATT-3′; 28 mer)로 합성하였다. 각각의 프라이머를 이용하여 PCR 반응에 의해 open reading frame (ORF)을 포함하는 cDNA 절편을 증폭시킨 후, pGEM-T 벡터 (Promega)에 과발현을 위한 bPDI와 억제발현을 위한 antisense-bPDI를 각각 클로닝하여 pGEMT-bPDI 및 pGEMT-antisense-bPDI를 제작하였다. pGEMT-bPDI 및 pGEMT-antisense-bPDI의 *Kpn* I /*Xba* I DNA 절편을 pIZT/V5-His 벡터의 *Kpn* I /*Xba* I 위치에 삽입하여 bPDI가 과발현 및 억제 발현되는 형질전환 곤충 배양세포주 제작을 위한 전이벡터인 pIZT-bPDI 및 pIZT-antisense-bPDI를 제작하였다.

### 형질전환 곤충 배양세포주 제작

Sf-9 세포주에 제작한 형질전환용 전이벡터 (pIZT-bPDI 및 pIZT-antisense-bPDI) 0.5 μg과 transfection reagent인 Tfx (Promega Co., USA)을 첨가하여 상온에서 15분 반응시킨 후, 이 혼합액을 세포주에 접종하여 27℃에서 1시간 처리하고, FBS가 첨가된 배양액을 부가하였다. 48시간 후에 새 배양액으로 교체한 후, 세포주를 1 : 5로 희석하여 배양액을 제거하고 zeocin (400 μg/ml)이 포함된 배양액을 부가하였으며, 약 14일 후에 GFP가 발현되면서 동시에 zeocin에 저항성을 나타내는 콜로니를 선발할 수 있었다.

bPDI 유전자가 Sf-9 세포주의 게놈내에 정확하게 도입되었는지 확인하기 위하여 형질전환 곤충배양세포주로부터 genomic DNA를 분리하고, 이것을 주형으로 하여 pIZT-bPDI 및 pIZT-antisense-bPDI 전이벡터 작성에 사용된 sense 및 antisense primer를 사용하여 PCR를 수행한 후 그 증폭산물의 크기를 확인하였다. 형질전환 곤충 세포주의 전사체 검정은 정상 및 형질전환 곤충 세포주로부터 각각 total RNA를 분리하고, 65℃에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 나이론막에 각각 동일한 2 μg의 RNA를 blotting한 후, Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene Co., USA)를 이용하여 [α-$^{32}$P] dATP로 표지한 cDNA를 탐침으로 Northern dot blot 분석을 수행하였다.

### bPDI dsRNA 제작

RNAi (RNA interference) 기법을 이용 bPDI의 전사체 발현이 억제된 곤충 배양세포주와 누에를 제작하기 위하여 먼저 bPDI cDNA[4] 의 231번 염기 위치와 979 염기 위치 사이를 PCR로 증폭하기 위하여 sense primer는 5′-TAATACGA CTCACTATAGGGAGACACGGAGTACATTTTAGTTTG-3′ (44 mer)으로 제작하였으며, antisense primer는 5′-TAATAC GACTCACTATAGGGAGATCGATGGCGACGGTCATGAT C-3′ (44 mer)으로 제작하였다. PCR 반응에 의해서 증폭된 증폭산물은 MEGAscript™ RNAi Kit (Ambion Co., USA)를 이용하여 bPDI의 dsRNA (double-stranded RNA)를 제작하였다.

### 곤충 배양세포 내 dsRNA 도입

곤충 배양세포 및 누에 생체 내 제작한 bPDI dsRNA를 도입하기 위하여 먼저 제작한 bPDI dsRNA를 *Silencer*™ siRNA Labelling Kit (Ambion)를 이용하여 Cy3로 표지한 후 20 μM로 희석하였다. 곤충 배양세포내 dsRNA의 도입은 Sf-9 세포주에 Cy3로 표지된 20 μM bPDI dsRNA 2.5 μl와 transfection reagent인 siPORT Amine (Ambion) 7 μl를 혼합하여 15분간 실온에서 반응 시킨 후 이 혼합액을 세포주에 접종하여 27℃에서 20분간 처리하고 FBS가 첨가된 배양액을 부가하고 4시간 후에는 FBS가 첨가된 새 배양액으로 완전히 교체하였다. 제작한 bPDI의 dsRNA가 곤충 배양세포의 세포질 (cytosol)에 정확하게 도입 되었는지에 대한 확인은 먼저 4′,6-Diamidino-2-phenyindole (DAPI) (Sigma)로 세포의 핵을 염색한 후 형광현미경을 이용하여 Cy3로 표지된 bPDI의 dsRNA를 관찰하였다.

### 전사체 발현 분석

bPDI의 전사체 발현분석을 위하여 정상 세포주, pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주 (Sf9-pIZT), pIZT-bPDI 도입에 의해서 bPDI가 과발현되는 세포주 및 bPDI의 dsRNA 도입에 의해 bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주로부터 각각 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 65℃에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 나이론 막에 각각 동일한 5 μg의 RNA를 blotting한 후, Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene Co., USA)를 이용하여 [α-$^{32}$P] dATP로 표지한 bPDI 및 18S rRNA 유전자를 탐침으로 Northern dot blot 분석을 수행하였다.

### SDS-PAGE 및 Western blot

정상 세포주, pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주, pIZT-bPDI 도입에 의해서 bPDI가 과발현되는 세포주 및 bPDI의 dsRNA 도입에 의해 bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주로부터 도입유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 접종 4일 후

세포를 회수하여 단백질 전기영동을 수행하였다. 세포 배양액을 회수하여 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수거한 세포를 PBS로 2회 세척하고, 2배 농도의 단백질 시료 용액 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue)을 혼합하고 100℃에서 5분간 가열하여 시료를 준비하고 전기영동은 12.5% SDS-polyacrylamide 겔에서 수행하고 Coomassie brilliant blue로 염색한 후 탈색하여 관찰하였다.

Western blot 분석을 위하여 12.5% SDS-PAGE에 전기영동을 수행한 후 이를 Semiphore transfer unit (Hoefer, TE-70)를 이용하여 PVDF membrane (Amersham Co., USA)에 transfer 하였다. 비특이적인 반응을 막기 위해 2.5% skim milk로 1시간 동안 blocking한 후, TBS-T 완충액 (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 5분간 2회 세척하였다. 세척 후 blocking 용액에 1차 항체 (primary antibody)를 적정량 희석해서 넣어주고 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T 완충액으로 상온에서 10분간 5회 세척하고 HRP (horseradish peroxide)로 표지된 2차 항체 (secondary antibody)를 희석해서 넣어 주고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 상온에서 10분간 5회 세척한 후, 발색 반응은 ECL System (Amersham)을 이용하였다. 제조사의 지시에 따라 solution A와 B를 1:1로 섞은 용액에 PVDF membrane를 넣어 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광하여 결과를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 형질전환 곤충세포주 제작

bPDI가 항시 과발현되는 형질전환 Sf9 세포주의 제작은 bPDI 유전자에 *Kpn* I 및 *Xba* I 코딩 서열을 flanking시킨 후 형질전환용 전이벡터인 pIZT/V5-His (Invitrogen)의 *Kpn* I 과 *Xba* I 위치에 bPDI를 도입하여 형질전환 전이벡터 (pIZT-bPDI)를 제작한 다음, Sf-9 세포주에 도입하여 제작하였다 (Sf9-bPDI) (Fig. 1). 곤충 형질전환용 전이벡터 pIZT/V5-His는 baculovirus 초기발현 유전자인 IE1 프로모터 하에 zeocin 저항성 유전자와 GFP 유전자가 융합 발현되는 특성이 있으므로, pIZT-bPDI가 도입된 형질전환 곤충세포주의 선발은 Sf-9 세포주에 zeocin (400 μg/ml)이 포함된 배양액을 부가한 후 zeocin에 저항성을 나타내는 colony를 계대배양하여 형광현미경으로 GFP 발현을 관찰함으로써 선발하였다 (Fig. 2). 선발한 pIZT-bPDI가 도입된 형질전환 곤충세포주는 정상 곤충세포주가 zeocin (400 μg/ml) 부가 배양액에서 전부 파열되는 것에 비하여 정상 세포 형태를 유지하면서 GFP를 정확하게 발현한다는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 선발한 형질전환 세포주의 게놈내에 bPDI 유전자가 정확하게 도입되었는지를 확인하기 위하여 genomic DNA를 분리하고,

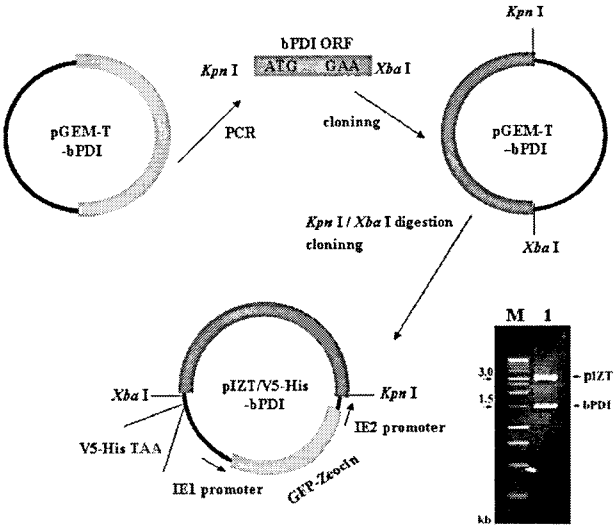


Fig. 1. Construction of transfer vector, pIZT-bPDI. The ORF of bPDI was flanked with *Kpn* I and *Xba* I site, and then inserted into the pGEM-T vector. The pGEMT-bPDI was digested with *Kpn* I and *Xba* I, and then DNA fragment was subcloned into the *Kpn* I and *Xba* I site into the immediate-early expression vector, pIZT/V5-His to construct pIZT-bPDI. The pIZT-bPDI was digested with *Kpn* I and *Xba* I (lane 1). M, 1kb ladder DNA marker.

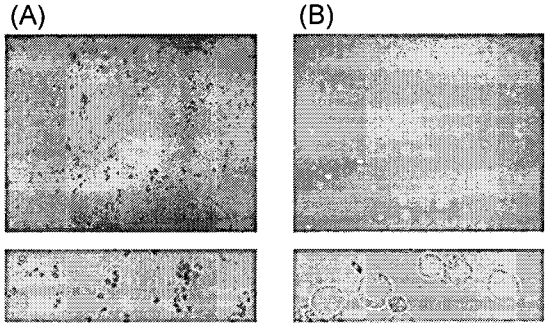


Fig. 2. Construction of bPDI-overexpressed Sf9 cell lines, Sf9-bPDI. The pIZT-bPDI transfer vector was transfected into Sf9 cells, and then GFP expression and zeocin resistance colony was selected. Panel A; Normal cells were treated with zeocin (400 μg/ml). Panel B; The Sf9-bPDI cells were selected by treatment with zeocin (400 μg/ml) and GFP expression. Sf9 cells were photographed under fluorescence microscope (x200).

이를 주형으로 PCR를 수행하여 그 증폭산물의 크기를 확인하였다. PCR은 형질전환 전이벡터 제작시 사용된 bPDI primer를 사용하여 수행하였다. PCR 증폭산물의 확인한 결과, 정상 세포주 및 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주 (Sf9- IZT)에서는 어떠한 PCR 산물도 확인할 수 없었으나, pIZT- bPDI가 도입된 형질전환 곤충 세포주 (Sf9-bPDI)에서는 bPDI에 대한 뚜렷한 PCR 증폭산물을 확인할 수 있어 bPDI 유전자

가 Sf-9 세포주의 게놈내에 정확하게 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 곤충 세포주 게놈내로 도입된 bPDI 유전자가 정확하게 전사체 및 단백질을 발현하는지를 확인하기 위하여 정상 세포주, pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주 및 pIZT-bPDI가 도입된 형질전환 곤충세포주에 대하여 Northern dot blot 및 Western blot 분석을 수행한 결과, 정상세포주와 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주에서는 매우 약한 bPDI 전사체 및 bPDI 단백질을 확인할 수 있었지만 pIZT-bPDI가 도입된 형질전환 곤충세포주에서는 뚜렷한 bPDI 전사체 및 bPDI 단백질을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B and 3C). 따라서 이상의 결과로부터 제작된 형질전환 세포주는 bPDI 유전자가 게놈내로 정확하게 삽입되어 전사체 및 단백질로 발현된다는 것을 확인할 수 있어, 곤충세포내 비정상단백질 생성시 bPDI의 역할 해석에 사용하였다.

또 한편으로, bPDI가 항시 억제 발현되는 형질전환 Sf9 세포주의 제작은 bPDI 유전자에 *Kpn* I 및 *Xba* I 코딩 서열을 flanking시킨 후 형질전환용 전이벡터인 pIZT/V5-His (Invitrogen)의 *Kpn* I 과 *Xba* I 위치에 bPDI와 역방향성인 antisense bPDI를 도입하여 형질전환 전이벡터 (pIZT-antisense-bPDI)를 제작한 다음, Sf-9 세포주에 도입하여 제작하였다 (Sf9-antisense-bPDI). 전이벡터 (pIZT-antisense-bPDI)가 도입된 곤충세포주의 선발은 bPDI가 항시 과발현되는 곤충세포주 선발과 동일한 방법으로 수행하여 선발하였다. 즉, 선발한 pIZT-antisense-bPDI는 도입된 곤충세포주는 zeocin (400 μg/ml) 부가 배양액에 대하여 저항성을 나타내었으며 GFP 발현도 확인할 수 있어 제작 Sf9-antisense-bPDI 세포주에 대한 특성분석을 위하여 PCR 반응 및 Northern dot blot을 수행하였다. PCR 수행결과, antisense bPDI가 곤충세포의 게놈내에 정확하게 도입되어 있음을 확인할 수 있었다. 이렇게 곤충 세포의 게놈내에 도입된 antisense-bPDI가 bPDI의 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 Northern dot blot을 수행한 결과, pIZT-antisense-bPDI가 도입된 형질전환 세포주는 정상 세포주나 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주와 비교하여 뚜렷한 bPDI 억제 효과를 나타내지는 못하였다 (Fig. 4).

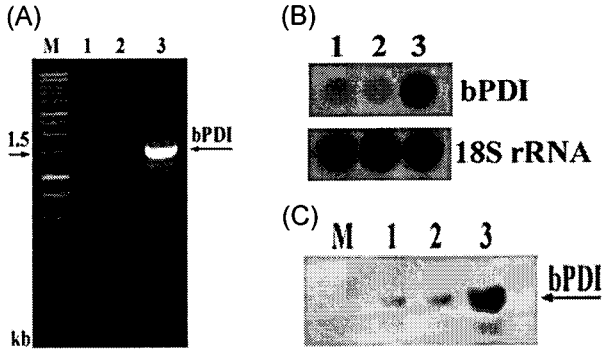


Fig. 3. PCR screening (A), Northern dot blot (B) and Western blot analyses (C) for bPDI. Panel A; PCR screening of the normal Sf9 cells (lane 1), Sf9 cells transfected with pIZT/V5-His (Sf9-pIZT) (lane 2) and pIZT-bPDI (Sf9-bPDI) (lane 3), respectively. PCR was performed with sense and antisense primer used in construction of the pIZT-bPDI transfer vector. M, 1 kb ladder DNA maker. Panel B; Northern dot blot analysis of the Sf9 (lane 1), Sf-pIZT (lane 2) and Sf9-bPDI (lane 3) cells. Total RNA (5 μg) from each sample was transferred onto a nylon membrane. Hybridization was carried out using α-$^{32}$P labeled bPDI as a probe. Panel C; Western dot blot analysis of the Sf9 (lane 1), Sf9-pIZT (lane 2) and Sf9-bPDI (lane 3) cellular proteins were performed using anti-serum against the His-tag. The protein samples were subjected to 12.5% SDS-PAGE, electroblotted, and incubated with anti-His-tag antibody.

### PDI의 dsRNA가 도입된 곤충세포주 제작

상기 결과에서 antisense bPDI의 도입에 의해서는 bPDI의 전사체 발현을 억제시킬 수 없어, 최근에 개발된 발현유전자의 억제를 위한 강력한 기법으로 이용되고 있는 RNAi 기법을 이용하여 bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주를 제작하고자 하였다. 이를 위해서 먼저 bPDI cDNA의 231염기 위치와 979 염기위치 사이를 PCR로 증폭한 후에 이 증폭산물을 *in vitro* transcription을 수행하여 bPDI의 double-stranded RNA (dsRNA)를 제작하였다 (Fig. 5A). 제작한 bPDI의 dsRNA는 열처리, nuclease 처리 및 column을 이용하여 순수분리하여, Cy3로 형광표지한 후에 세포내로 도입하였다. 도입된 bPDI의 dsRNA가 세포에 정확하게 도입되었는지를 확인하기 위하여, 세포의 핵을 DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole)로 염색한 후 형광현미경을 이용하여 Cy3로 형광표

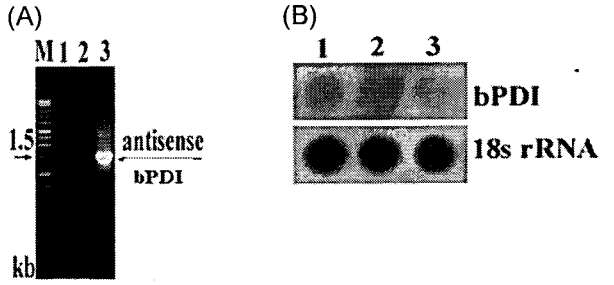


Fig. 4. PCR screening (a) and Northern dot blot (b) analysis for bPDI. Panel A; PCR screening of the normal Sf9 cells (lane 1), Sf9 cells transfected with pIZT/V5-His (Sf9-IZT) (lane 2) and pIZT-antisense-bPDI (Sf9-bPDI) (lane 3). PCR was performed with sense and antisense primer used in construction of the pIZT-antisense-bPDI transfer vector. M, 1 kb ladder DNA maker. Panel B; Northern dot blot analysis of the Sf9 (lane 1), Sf-IZT (lane 2) and Sf9-antisense-bPDI (lane 3) cells. Total RNA (5 μg) from each sample was transferred onto a nylon membrane. Hybridization was carried out using α-$^{32}$P labeled bPDI as a probe.

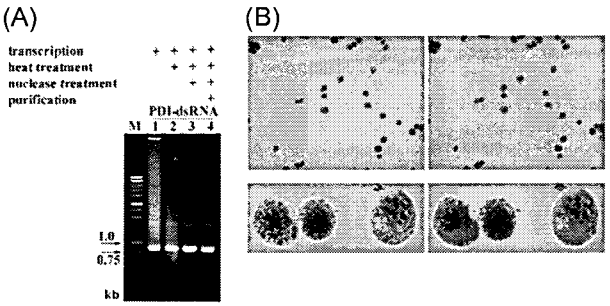


Fig. 5. Generation of double-stranded RNA (dsRNA) for bPDI expression regulation (A) and Construction of bPDI knock-downed Sf9 cell lines using dsRNA (B). Panel A; the region selected for bPDI gene silencing was from 231th to 979th nucleotide. The region was added the T7 RNA polymerase promoter sequence at both ends using PCR. It was used as a template for *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase. Lanes : M, 1 kb ladder DNA marker; 1, dsRNA 2, heat-treated (75℃, 5 min) dsRNA 3, nuclease-treated (DNase and RNase) dsRNA 4, purified dsRNA. Samples (1/400th of eluted dsRNA) were analyzed on a 1.2% agarose gel, stained with ethidium bromide. Panel B; purified dsRNA to bPDI was fluorescently labeled with Cy3, transfected into Sf9 cells, and analyzed by fluorescence microscopy (x400). DAPI stained nuclei (blue) (left panel). Cy3 labeled bPDI dsRNA (red) (right panel).

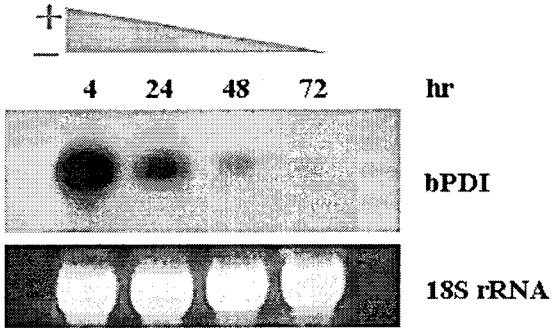


Fig. 6. Temporal regulation of bPDI mRNA by bPDI dsRNA. Sf9 cells grown in a 6-well culture dish were transfected with dsRNA to bPDI. After 4, 24, 48 and 72 hr following transfection, the cells were harvested and analyzed by Northern blot analysis for both bPDI mRNA and 18S rRNA. Total RNA (5 μg) from each sample was transferred onto a nylon membrane. Hybridization was carried out using $\alpha$-$^{32}$P labeled bPDI as a probe.

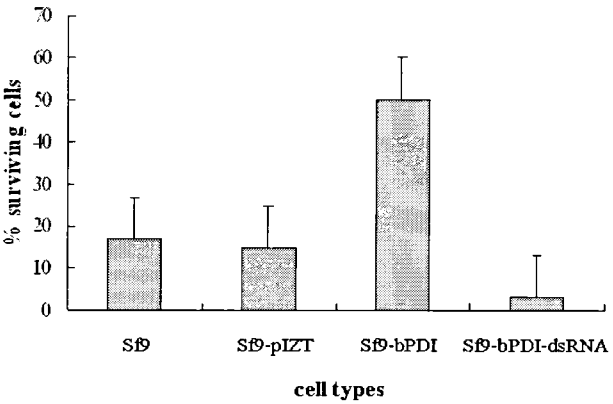


Fig. 7. Cell survival test against dithiothreitol (DTT). Cell survival of normal cells (Sf9), Sf9 cells transfected with pIZT/V5-His (Sf9-pIZT), Sf9 cells transfected with pIZT-bPDI (Sf9-bPDI) and Sf9 cells transfected with dsRNA for bPDI (Sg9-bPDI-dsRNA) were treated for 5 hr with 5 mM DTT.

지된 PDI의 dsRNA를 관찰하였다. Cy3로 형광표지된 bPDI의 dsRNA는 DAPI로 염색된 세포 핵 주변의 세포질에 정확하게 도입되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5B). 도입된 bPDI의 dsRNA가 bPDI 전사체 발현을 강력하게 억제시키는지 확인하기 위하여, Northern blot 분석에 의해 bPDI dsRNA 도입 시간별로 bPDI의 전사체 발현을 확인하였다. bPDI 전사체 발현은 bPDI의 dsRNA가 도입된 48시간 후에 강력하게 억제되어 72시간 이후에는 bPDI가 거의 발현되지 않음을 확인할 수 있어 (Fig. 6), 곤충세포내 비정상단백질 생성시 bPDI의 역할 해석에 사용하였다.

### 곤충세포내 비정상단백질 생성시 bPDI의 역할

곤충세포내 비정상단백질 생성시 bPDI의 역할 해석을 위하여 정상 세포주 (Sf9), pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주 (Sf9-pIZT), pIZT-bPDI 도입에 의해서 bPDI가 과발현되는 세포주 (Sf9-bPDI) 및 bPDI의 dsRNA 도입에 의해 bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주 (Sf9-bPDI-dsRNA)에 disulfide 형성 저해제인 5 mM의 DTT를 처리하여 48시간 이후에 각각의 세포에 대하여 생존율을 조사하였다. bPDI가 과발현되는 세포주는 정상세포주나 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주에 비하여 생존율이 월등히 높았지만 (> 30%), bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주는 오히려 정상세포주나 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주에 비하여 생존율이 약 15% 낮았다 (Fig. 7). 이와 같은 결과로써, bPDI는 ER내 misfolding 단백질의 생성을 제한함으로써 곤충의 ERSE과 밀접하게 관련할 것이라 추정할 수 있었다.

## 요 약

bPDI가 ER내 misfolding 단백질의 생성을 제한함으로써 곤충면역과 관계하는지를 해석하기 위하여 bPDI가 과발현 (overexpression)되는 곤충세포주와 이와 반대로 bPDI가 억제 발현 (knock-down)되는 곤충세포주를 제작하여 bPDI가 곤충면역에 관련하는지를 해석하였다. bPDI가 과발현되는 세포주 (Sf9-bPDI)는 정상세포주 (Sf9)나 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주 (Sf9-pIZT)에 비하여 생존율이 30% 이상

높았지만, bPDI의 전사체 발현이 억제된 세포주 (Sf9-bPDI-dsRNA)는 오히려 정상세포주나 pIZT/V5-His 벡터만 도입된 세포주에 비하여 생존율이 약 15% 낮았다. 이와 같은 결과로써, bPDI는 ER내 misfolding 단백질의 생성을 제한함으로써 곤충의 ERSE과 밀접하게 관련할 것이라 추정할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 2007 0401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임

## 참 고 문 헌

1. Brodsky, J. L., E. D. Werner, E. D. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse and A. A. McCracken. 1999. The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* **274**, 3453-3460.
2. Chiti, F. and C. M. Dobson. 2006. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366.
3. Dobson, C. M. 2001. Protein folding and its links with human disease. *Biochem. Soc. Symp.* **68**, 1-26.
4. Goo, T. W., E. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W. Kang, S, Park, K. H. You and O. Y. Kwon. 2002. Molecular characterization of a *Bombyx mori* protein disulfide isomerase (bPDI). *Cell Stress Chaperones* **7**, 118-125.
5. Kim, H. T., R. L. Russell, A. K. Raina, P. L. Harris, S. L. Siedlak, X. Zhu, R. B. Petersen, S. Shimohama, M. A. Smith and G. Perry. 2000. Protein disulfide isomerase in Alzheimer disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2**, 485-489.
6. Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-1026.
7. Ko, H. S., T. Uehara and Y. Nomura. 2002. Role of ubiquilin associated with protein disulfide isomerase in the endoplasmic reticulum in stress-induced apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **277**, 35386-35392.
8. Lan, H., M. E. Rabaglia, K. L. Schueler, C. Mata, B. S. Yandell and A. D. Attie. Distinguishing covariation from causation in diabetes: a lesson from the protein disulfide isomerase mRNA abundance trait. *Diabetes* **53**, 240-244.
9. Rutishauser, J. and M. Spiess. 2002. Endoplasmic reticulum storage diseases. *Swiss Med. Wkly.* **32**, 211-222.
10. Summers, M. D. and G. E. Smith. 1987. A methods for baculovirus vector and insect cell culture procedures, *Texas Agricultural Experiment Station, Bulletin* No. 1555.
11. Thomas, P. J., B. H. Qu and P. L. Pedersen. 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459.
12. Yoo, B. C., K. Krapfenbauer, N. Cairns, G. Belay, M. Bajo and G. Lubec. 2002. Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* **4**, 196-200.