

Mouse 유선세포에서 Homologous recombinae와 MMR 관련 유전자의 조절

김가연*, 유형주*, 강만중*

*전남대학교 동물공학과

e-mail:mjkang@jnu.ac.kr

Regulation of Homologous recombinae and MMR-related gene in mouse mammary gland cell

Ga-Yeon Kim*, Hyeong-Ju You*, Man-Jong Kang*

*Dept. of Animal science and Biotechnology, Chonnam National University

요약

유전자적중은 gene therapy, 유전자 기능연구, 재조합단백질 생산 등에 이용된다. 상동재조합(HR)을 이용한 유전자적중법은 특정 유전자위치에 왜래유전자를 정확하게 도입할 수 있다. 따라서 유전자 적중 효율을 높이기 위해 상동재조합의 발생빈도를 높이는 것은 중요하다. Rad51은 상동재조합의 가닥침입에 관여하고 HR과 관련된 Mismatch repair mechanism은 HR의 정확성에 관여한다. 본 연구에서는 Mouse mammary gland cell인 Hc11 세포에서 효율적인 유전자적중을 위해 UV조사 및 카드뮴 처리가 HR 관련 recombinae인 Rad51에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 MMR inhibitor인 카드뮴 처리를 통해 MMR 관련 유전자(Msh2, Msh3, Msh6)의 발현을 검증하였다. 이와 같은 Rad51과 MMR 관련 유전자의 조절은 상동재조합을 통한 유전자적중 효율을 향상시키기 위한 기초연구자료로 사용될 것으로 생각된다. (Key words :Homologous recombination, Rad51, Mismatch repair)

1. 서론

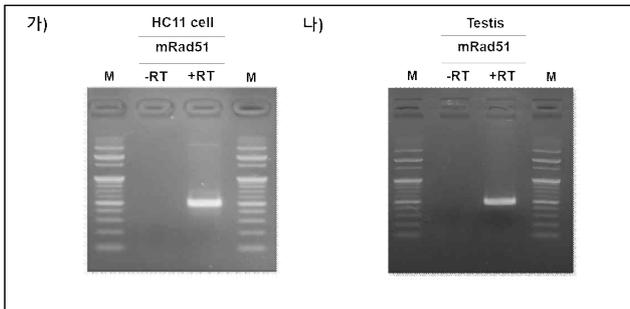
상동재조합(Homologous Recombination, HR)은 DNA의 복제, 재조합과정에서 일어나며 박테리아부터 인간까지 모든 종에서 상당히 보존되어있다(1). HR을 통한 유전자 적중은 상동서열을 이용하기 때문에 관심 있는 유전자를 원하는 위치에 정확하게 Knock-in할 수 있다(2). 그러나 HR은 세포주기의 S/G2에서만 특징적으로 일어나며(3), 특히 고등동물세포에서 HR의 빈도는 NHEJ에 비해 매우 낮다고 보고된 바 있다(4). 따라서 왜래 유전자의 효율적인 Knock-in을 위해 HR을 향상시키는 것은 상당히 중요하다. HR에 관여한다고 알려진 Rad51과 Dmc1은 상동염기쌍 형성과 가닥 침입단계의 주된 recombinae이다(5). Dmc1은 감수분열과정에서만 발현하지만 Rad51은 유사분열과 감수분열단계 모두에 발현한다고 보고된 바 있다(6). Rad51과 HR의 연관성은 세포 내에 인위적인 DSB를 유도하는 UV조사, Inoizing-radiation 등을 통해 확인된 바 있다(7,8). 또한 Human cell에 UV를 조사했을 때 S기 동안 Rad51의 발현이 증가되었다고 보고된 바 있다(9). 이와 같은 연구들은 Rad51이 HR에 관여하는 단백질

임을 증명한다. HR은 Mismatch repair(MMR)을 통해 fidelity를 유지한다(10). MMR은 복제나 재조합동안 base indel, replacement와 같은 문제를 인식하고 수리한다(11). 박테리아에서 MMR은 광범위한 heteroduplex가 형성되면 MSH complex를 통해 비상동서열 간의 재조합을 방지한다고 보고된 바 있다(10). 또한 포유동물세포에서 MSH2를 mutation시 비상동서열 간의 재조합이 증가했다고 보고된 바 있다(12). 따라서 복제와 재조합동안에 발생하는 HR과 MMR은 연관관계에 있다. 현재까지 HR을 이용한 Knock-in을 향상시키기 위해 세포주기(13), HR 관련 유전자 조절(14) 등 다양한 연구가 진행되었음에도 불구하고, 포유동물에서 Knock-in 효율은 낮다. 또한 mouse mammary gland cell에서 HR 관련 유전자를 조절하거나 HR과 관련된 MMR gene의 조절에 대한 연구는 부족하다. 본 연구는 HC11 세포에서 상동재조합을 이용한 효율적인 유전자편집기술을 개발하기 위한 기초 연구이며 mouse mammary gland cell인 Hc11 세포에서 UV조사와 카드뮴 처리를 통해 HR의 recombinae(Rad51)의 발현을 확인하기 위하여 실시하였다. 또한 MMR inhibitor인 카드뮴 처리를 통해 mouse에서 MMR 관련 유전자의 발현을 검증하기 위해 실시하였다.

2. 결과 및 고찰

2.1 HC11 세포와 Testis에서 Rad51의 mRNA 발현 확인

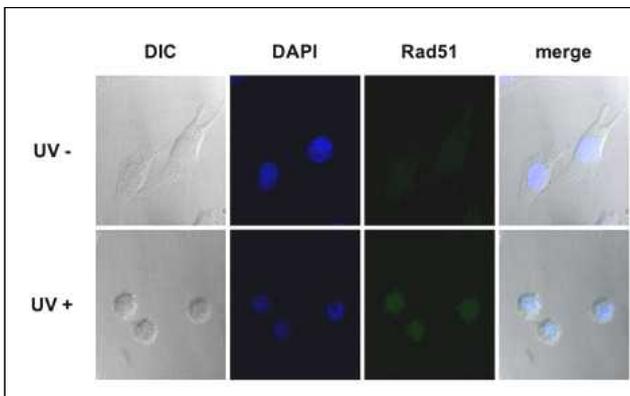
유사분열과 감수분열 단계에의 Rad51의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. Template는 Normal HC11 세포와 mouse의 Testis 조직에서 확보한 cDNA를 사용하였다. 그 결과 Hc11과 Testis에서 Rad51의 mRNA 발현을 확인 할 수 있었다.



[그림 1] HC11과 Testis에서 Rad51의 mRNA 발현. 가) HC11 세포에서 Rad51의 mRNA 발현. 나) Testis에서 Rad51의 mRNA 발현. M, DNA size marker (100bp ladder); RT-, Reverse transcriptase-, RT+, Reverse transcriptase +

2.2 HC11에 UV조사를 통한 Rad51의 단백질 발현 확인

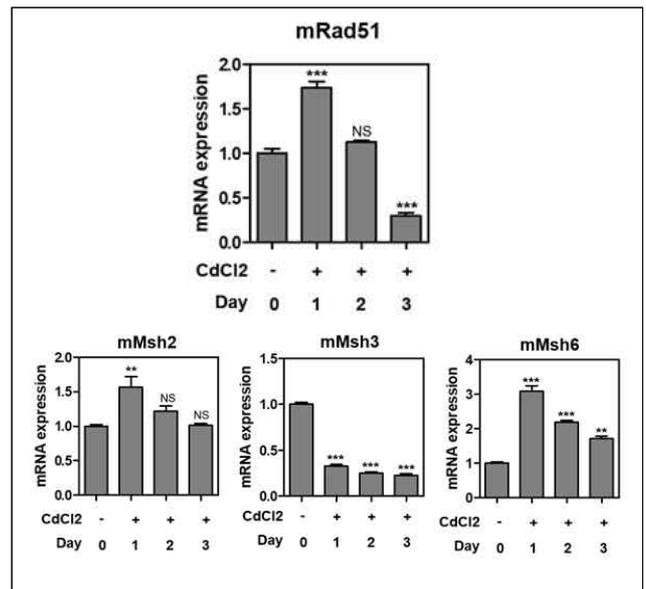
HC11 세포에 UV조사에 따른 Rad51과 Dmc1 단백질의 발현을 확인하기 위해 immunocytochemistry를 실시하였다. 그 결과 UV를 조사하였을 때 Rad51의 단백질 발현이 증가했다. 따라서 HC11에 UV조사는 Rad51의 발현을 증가시키는 것으로 사료된다.



[그림 2] Hc11 세포에서 UV 조사 유무에 따른 Rad51 단백질 발현 확인

2.3 HC11에 카드뮴 처리를 통한 Rad51과 MMR related gene의 mRNA 발현 확인

HC11 세포에 1 uM의 카드뮴 처리에 따라 Rad51과 MMR related gene(MutS)의 mRNA 발현을 확인하기 위해 RT-qPCR을 수행하였다. 그 결과 생쥐 Rad51의 mRNA 발현은 카드뮴을 처리하지 않은 군에 비해 1일째 증가했다가 3일째 1.4배 감소하였다 ($P < 0.0001$). mouse Msh2와 Msh6는 카드뮴을 처리하지 않은 군에 비해 1일째 증가했다가 감소하는 경향을 보였다. 그러나 Msh2는 유의차는 없었다($P = 0.0062$). Msh6의 경우 3일째 카드뮴을 처리하지 않은 군에 비해 1.7배 증가하였다 ($P < 0.0001$). 생쥐 Msh3의 mRNA 발현은 카드뮴을 처리하지 않은 군에 비해 카드뮴 처리 1일째 급격하게 감소하였으며, 3일째에는 4.4배 감소하였다 ($P < 0.0001$). MMR경로의 억제제는 비상동서열 간의 재조합을 증가시킨다. 따라서 MMR gene의 억제는 HR의 발생비율을 높일 것으로 생각된다. HC11에 MMR inhibitor인 카드뮴 처리로 Msh3의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었으나, HR의 주된 recombinase인 Rad51의 발현량 또한 감소시켰다. 따라서 카드뮴은 HR을 이용한 Knock-in 효율을 향상시키기 위한 compound로 부적합한 것으로 판단된다.



[그림 3] 카드뮴이 처리된 HC11에서 Rad51과 MutS(Msh2, Msh3, Msh6)의 mRNA 발현. 오차막대는 각 처리구의 표준편차를 나타낸다. NS, no statistical difference; ***: $P < 0.0001$.

논문사사 및 기여도

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2019R1F1A1061424).

참고문헌

- [1] Stéphane Vispé, Christophe Cazaux, Claire Lesca. “Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation”, *Nucleic acids*, Volume 26, Issue 12 pp.2859-2864, Jun, 1998.
- [2] Raphael Ceccaldi, Beatrice Rondinelli. “Repair pathway choices and consequences at the double-strand break”, *Trends Cell Biol*, Volume 26, Issue 1, pp.52-64, Jan, 2016.
- [3] Zhiyong Mao, Michael Bozzella. “DNA repair by non-homologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells”, *Cell Cycle*, Volume 7, Issue 18, pp.2902-2906, sep, 2008.
- [4] 송규영, “Gene structure, Function and Regulation :Homologous Recombination in Mammalian Cells”, *생화학총설집*, 4권, pp.1-7, 1992.
- [5] Anjali Gupta Hinch, Philipp W. Becker, Tao Li, “The configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates”, *Molecular Cell*, Volume 79, Issue 4, pp.689-701, Aug, 2020.
- [6] M.Scott Brown and Douglas K.Bishop, “DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis” *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Volume 7, Issue 1, a016659, Dec, 2015.
- [7] Ingegerd Elvers, Fredrik Johansson, Petra Groth, “UV stalled replication forks restart by re-priming in human fibroblasts”, *Nucleic acid Research*, Volume 39, Issue 16, pp.7049-7057, Jun, 2011
- [8] Julien Vignard, Gladys Mirey, “Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up”, *Radiotherapy and Oncology*, Volume 108, pp.362-369. sep, 2013.
- [9] Satoshi Tashiro, Joachim Walter, Akira Shinohara, “Rad51 Accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin”, *J Cell Biol*, Volume 150, Issue 2, pp.283-292, Jul, 2000.
- [10] Khék-Chian Tham, Nicolaas Hermans, Herrie H K Winterwerp, Michael M Cox, Claire Wyman, Roland Kanaar, Joyce H G Lebbink, “Mismatch repair inhibits homeologous recombination via coordinated directional unwinding of trapped DNA structures”, *Mol Cell*, Volume 51, Issue 3, pp.326-37, Aug, 2013.
- [11] Guo-Min Li, “Mechanisms and functions of DNA mismatch repair”, *Cell Res*, Volume 18, Issue 1, pp.85-98, Jan, 2008.
- [12] Beth Elliott, Maria Jasin, “Repair of double-strand breaks by homologous recombination in mismatch repair-defective mammalian cells”, *Mol Cell Biol*, Volume 21, Issue, 8, pp.2671-82, Apr, 2001.
- [13] Takeshi Maruyama, Stephanie K Dougan, Matthias C Truttmann, “Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining”, *Nat Biotechnol*, Volume 33, Issue 5, P.538-842, May, 2016.
- [14] Jun Song, Dongshan Yang, Jie Xu, “RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency”, *Nat Commun*, Volume 7, pp.10548, Jan, 2016.