



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)
tumor necrosis factor receptor
-associated factor 2 클로닝 및
NF- κ B 활성화에 미치는 영향



수 산 생 명 의 학 과

김 우 리

이 학 석 사 학 위 논 문

돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)
tumor necrosis factor receptor
-associated factor 2 클로닝 및
NF- κ B 활성화에 미치는 영향

지도교수 김 기 홍
공동 지도교수 허 민 도

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2010년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

김 우 리

김우리의 이학석사 학위 논문을 인준함.

2010년 2월 25일



주심 이학박사 정현도 印

위원 약학박사 정준기 印

위원 이학박사 김기홍 印

목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험어	5
2. 면역유전자의 Complete ORF 결정	5
2-1. 돌돔 TRAF2의 isolation of partial cDNA	5
2-2. RACE-PCR	6
3. 조직 별 발현 분석	7
3-1. Total RNA 분리 및 RT-PCR	7
4. 돌돔 TNF- α 단백질 정제	10
4-1. Vector construction	10
4-2. Protein expression	10
5. 돌돔 TRAF2 관련한 NF- κ B 활성 측정	12
5-1. Cells	12
5-2. Vector construction	12
5-3. Transfection and selection	13
5-4. 돌돔TRAF2 transcription 확인	14
5-5. Cell treatment 준비 및 stimulation	15
5-6. Reporter gene assay	16
III. 결 과	19
1. TRAF2의 complementary DNA 와 염기서열 분석	19
2. Nucleotide sequence 비교 분석	23
3. 돌돔 조직 별 TRAF2 발현 분석	26
4. 돌돔 TNF- α 단백질 정제 결과	28
5. 돌돔 TNF- α 자극에 따른 면역유전자 활성화 분석	30

5-1. 돌돔 TRAF2를 발현 하는 vector construction 및 transcription 확인	30
5-2. 돌돔 $TNF-\alpha$ 자극에 의한 TRAF2 관련 NF- κ B의 활성 분석.....	33
IV. 고 찰.....	36
V. 요 약.....	41
VI. 감사의 글.....	43
VII. 참고문헌.....	45



Molecular cloning of rock bream's (*Oplegnathus fasciatus*) tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and its function on NF- κ B activation.

Woo Li Kim

Department of fish pathology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) acts as a transducer of tumor necrosis factor- α (TNF- α) triggered cell signals which results in inflammation, cell proliferation and anti-apoptotic response. In this study, we have cloned cDNA of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) TRAF2, and analyzed its function in activation of NF- κ B. The open reading frame (ORF) of rock bream TRAF2 consisted of 1563 bp encoding 520 amino acids that contained N-terminal RING-type and TRAF-type zinc finger domains and C-terminal TRAF domain. The rock bream TRAF2 protein showed more than 75% identity with other fish TRAF2s, and even as high as 56% identity with mouse and human TRAF2 proteins. Semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that rock bream TRAF2 was expressed in all tested tissues of unstimulated fish, and, interestingly, tissues of spleen, gill, leukocytes, intestine, and skin showed higher expression than other tissues. TRAF2 is essential for TNF- α -induced NF- κ B activation. To know whether the rock bream TRAF2 involves in NF- κ B activation, *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cells harboring an NF- κ B reporting vector were transfected with a vector expressing rock bream TRAF2 or a control empty vector. EPC cells transfected with the vector expressing rock bream TRAF2 showed

significantly higher NF- κ B activity than cells transfected with a control empty vector, suggesting rock bream TRAF2 acts as a transducer of TNF- α -mediated cell signals that enhance NF- κ B activation.



I. 서론

대식세포 또는 단세포 혈구세포에서 주로 생성되는 tumor necrosis factor (TNF)는 여러 사이토카인의 생성, 세포의 성장, 분화 그리고 자연고사 (apoptosis) 및 괴사 (necrosis)등의 다양한 기능에 관여하는 염증성 사이토카인으로 알려져 있다. TNF는 NF- κ B를 활성화시킴으로써 염증반응에서 중요한 역할을 하며 (Tartaglia LA, Goeddel DV, 1992; Rothe J *et al.*, 1992), trimer로 작용하여 TNF receptor를 trimer로 이루게 하며 이는 일련의 신호 전달 과정을 매개한다. TNFR1은 세포사멸과 더불어 NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 신호전달을 매개한다 (Baudv & Karin M, 2001). TNF 수용체들은 효소 기능을 가지고 있지 않아 신호 전달을 위해서는 다른 단백질의 결합을 필요로 하는데, death domain을 가진 TNF-R1에는 유도단백 (adapter protein)인 TNF receptor-associated death-domain-containing-protein (TRADD)이 자신의 death-domain (DD)을 이용하여 결합함으로써 다른 단백질이 계속 결합되기 위한 기반을 구축한다. 우선 TNF가 그 수용체 (TNF receptor, TNFR)와 결합하면, TNFR는 몇몇 단백질을 끌어들여 TNFR 신호전달 복합체를 형성한다 (Rothe J *et al.*, 1992; Sudhir G, 2002). TRADD에 Fas-associated death domain protein (FADD)가 결합하면 caspase-8이 결합 및 활성을 유도하고, 이후 하위 단계의 caspase를 활성화시킴으로써 다양한 단백질의 분해를 일으켜 세포사멸을 유발한다 (Boldin MP *et al.*, 1996; Li H & Yuan J, 1999). 한편 TRADD에 TRAF2 (TNF receptor associated factor2)와 RIP (receptor-interacting protein)이 결합하게 되면 NF- κ B와 JNK를 활성화

시킨다(Hsu H *et al.*, 1996; Ting AT *et al.*, 1996; Devin A *et al.*, 2000). NF- κ B는 TNF에 의한 세포 반응의 가장 중요한 전사 조절인자 중의 하나로서, 대부분의 세포에서 TNF에 의하여 그 활성이 증가된다(Israel *et al.*, 1989). 휴식상태의 세포에서 NF- κ B는 억제 단백질인 I κ B와 결합된 상태로 세포질 내에 존재하며, TNF를 비롯한 여러 자극에 의하여 I κ B가 I κ B kinase(IKK)에 의하여 인산화된 후 ubiquitination 과정을 거쳐 프로테아좀(proteasome)으로 분해된다. 분해된 I κ B는 NF- κ B가 핵 안쪽으로의 이동을 허용함으로써 표적 유전자의 전사를 활성화시킨다 (Karin M & Ben-Neriah Y, 2000). 따라서 IKK의 조절은 NF- κ B 활성화의 가장 중요한 요소이며, 최근 수년간 TNF에 의한 IKK의 기능에 관하여 광범위한 연구가 진행되어왔다. IKK 활성화와 관련되어 처음으로 동정된 TNFR1의 결합 단백질은 TRAF2이다 (Rothe M *et al.*, 1994; Rothe M *et al.*, 1995). TRAF2는 TRAF1부터 TRAF6까지 밝혀진 TRAF family의 하나로 TRADD와 결합하여 NF- κ B를 활성화시키는데 중요한 역할을 한다. TRAF2의 카르복실기는 TRADD의 아미노기와 결합하여 TNFR1 신호전달 복합체를 이루고, TRAF2의 아미노기에 존재하는 RING-과 Zinc-finger 부위는 IKK의 leucine zipper 부위에 결합된다 (Anne D *et al.*, 1995; A. Grech *et al.*, 2000). TRAF2는 처음 TNFR2와 결합하는 단백질로 동정되었으나, TNFR1의 중요 결합단백질인 TRADD가 동정된 후 TRAF2의 TRAF 도메인이 TRADD와 직접 결합을 이루고, 이의 Ring finger 도메인 및 Zinc finger 도메인이 TNF의 신호를 아래단계로 전달함으로써, 오히려 TNFR1에 의한 NF- κ B의 활성화 경로에 더욱 중요한 역할을 한다고 생각하였다. 이와 더불어 Fas 결합 단백질중의 일부로 알려진 death domain-kinase RIP 단백질도 TRADD의 death 도메인과 결합을 함으로서 TRAF2와

더불어 RIP단백질이 TNFR1에 의한 NF- κ B 활성화 경로에 중요한 부분을 담당함을 보고하였다 (Hsu H *et al.*, 1996). 최근 TRAF2에 존재하는 ring finger 도메인에 의하여 RIP 단백질의 인산화 및 ubiquitination됨 (Lee TH *et al.*, 2004)이 알려짐으로써 두 단백질간의 서로 상호작용에 의하여 NF- κ B의 활성을 조절될 수 있음이 추측된다. 또한 TRAF2를 제거할 경우 TNF에 의한 JNK 활성화 현상이 사라지며 TRAF2와 TRAF5를 동시에 제거할 경우에만 TNF에 의한 NF- κ B 활성화 현상이 사라지는 것이 관찰되었다 (Tada K *et al.*, 2001).

TNF- α 및 그 signaling에 관여하는 TRAF2와 같은 단백질들이 감염성 질병에 대한 숙주의 초기 대응에 매우 중요한 역할을 함에도 불구하고 어류에서의 관련 연구는 국내외적으로 모두 매우 부족한 실정이며, 어류 TRAF2에 관한 연구는 grass carp에서 유전자가 cloning된 (Xu Z *et al.*, 2007) 것을 제외하고는 전혀 연구가 이루어져 있지 않은 실정이다. GenBank에 등록되어 있는 어류 TRAF2 유전자로는 green puffer *Tetraodon nigroviridis*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, zebrafish *Danio rerio*, goldfish *Carassius auratus*가 올려져 있다. 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)은 국내에서 양식하는 주요 해수어 중의 하나이다. 최근 본 연구실에서는 돌돔의 TNF- α 유전자를 cloning하여 GenBank에 등록한 바 있으며 (Accession No. FJ623187), 그 기능과 관련된 선행연구를 진행하고 있는 중이다. 그러나 TNF- α 의 면역학적 기능을 밝히기 위해서는 TNF- α signaling에 관여하는 factor들에 대한 연구가 필수적이며, 그 중심에 TRAF2가 있기 때문에 TRAF2에 관한 연구는 반드시 필요하다. 또한 signaling의 후반부에 속하는 NF- κ B와 같은 전사인자들의 활성 변화에 대한 분석 역시 주요한 부분을 차지한다. 따라서 본 실험에서는 경골어류인 돌돔에서 TNF- α 관련 인자인

TRAF2 에 대한 분석을 통해 NF- κ B 의 활성 변화를 살펴보면,
TRAF2 의 유전학적 특징과 어류의 면역체계에서 담당하고 있는 주요
기능들을 밝히고자 한다.



II. 재료 및 방법

1. 실험어

실험어로 외관상 질병 증상이 없는 건강한 양식산 돌돔 (어체중 120 ± 10 g) 개체들을 구입하였으며, 25℃ 수온에서 1 주일 간 순치한 후 실험하였다.

2. 면역유전자의 Complete ORF 결정

2.1. 돌돔 TRAF2의 isolation of partial cDNA

돌돔 spleen 부터 RNAiso plus reagent (Takara)를 사용하여 total RNA 를 분리하였다. 분리된 total RNA 를 protocol 에 따라 DNase I (Promega) 처리 후 stop solution 을 첨가하였다. 위의 RNA 를 다음과 같은 조건으로 cDNA 를 합성하기 위해 사용하였다. 1 μ g의 DNaseI 을 처리한 RNA 에 1 μ l의 random primer (0.5 μ g/ml) (Promega)를 첨가한 후, 80℃에서 10 분간 incubation 하였다. 그리고 5 $\times$ reaction buffer 4 μ l, 10 mM dNTP mix (Takara) 4 μ l, M-MLV reverse transcriptase (Promega) 1 μ l, RNase inhibitor (Promega) 0.5 μ l, RNase free water 를 첨가하여 최종 반응 용액 20 μ l를 42℃에서 60 분간 incubation 하였다.

GenBank 에 등록되어있는 *Homo Sapiens* (CAI12703), *Mus musculus* (CAM25165), *Oncorhynchus mykiss* (CAD69021), *Carassius auratus* (CAC82653) TRAF2 의 cDNA sequence 를 서로 비교하여 4 개의 유전자에서 conserved 한 region 을 찾아 degenerated primer (TRAF2-F1, TRAF2-R1)를 제작하여(Table.1), RT-PCR 을 실시하였다. 위의 cDNA 를 10 배 희석한 후 template 로 사용하여 다음과 같은 조건으로 PCR 하였다. 먼저 pre-denaturation 과정을 95℃에서 3min 간 1cycle 수행 후, 95℃에서 30s denaturation, 60℃에서 30s annealing, 72℃에서 30s extension 의 반응을 1cycle 로 하여, 35cycle 을 반응시켰다. 그리고 final extension 과정을 72℃에서 7min 간 1cycle 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 을 이용하여 전기영동 한 후, gel purification kit(Cosmo Genentech, Korea)를 이용해 DNA 를 분리한 후, pGEM-T easy vector 에 cloning 하여 ABI 3700(PE Applied Biosystems)을 이용해 sequence 를 분석하였다. sequence 분석 결과 TRAF2 의 specific 한 부분에서 primer(TRAF2-R2)를 제작하여, 새로운 degenerate primer (TRAF2-F2)와 RT-PCR 을 실행하였다.

2.2. RACE-PCR

RACE-PCR은 cDNA의 알고 있는 일부 염기 서열을 이용하여 cDNA의 full-length 5' -과 3' - ends를 밝혀서 돌돔의 TRAF2의 완전한 cDNA 염기서열을 결정하기 위해 사용하였다. Degenerated PCR로 얻은 특정한 돌돔 TRAF2 cDNA sequence 에서 5' 과 3' RACE primer를 제작하였다. 돌돔 비장에서 분리한 Total RNA 1 μ g 을

SMART RACE cDNA Amplification Kit(Clontech) 사용방법에 따라 5' 과 3' RACE 용 cDNA를 만들어 RACE-PCR을 수행하였다. RACE-PCR를 하여 얻은 products는 gel purification kit(Cosmo Genentech, Korea)를 이용해 DNA를 분리한 후, pGEM-T easy vector에 cloning하여 얻은 white colony를 ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 배양한 후 이 배양액에서 plasmid를 분리하여 sequencing 하였다. 사용한 primer는 Table1에 나타나있다.

3. 조직별 발현 분석

돌돔의 장기별 TRAF2 발현을 확인하기 위해 semi-quantitative RT-PCR 를 실시 하였다. 먼저 liver, spleen, head kidney, body kidney, gill, brain, muscle, leukocyte, eye, stomach, intestine, skin, heart 로부터 RNAiso plus reagent (Takara)를 사용하여 total RNA 를 분리하였다. 분리된 total RNA 를 protocol 에 따라 DNaseI (Promega) 처리 후 stop solution 을 첨가하였다. 위의 RNA 를 다음과 같은 조건으로 cDNA 를 합성하기 위해 사용하였다. 1 μ g의 DNaseI 를 처리한 RNA 에 1 μ l의 random primer (0.5 μ g/ml) (Promega)를 첨가한 후, 80 $^{\circ}$ C에서 10 분간 incubation 하였다. 그리고 5 $\times$ reaction buffer 4 μ l, 10 mM dNTP mix (Takara) 4 μ l, M-MLV reverse transcriptase (Promega) 1 μ l, RNase inhibitor (Promega) 0.5 μ l, RNase free water 를 첨가하여 최종 반응 용액 20 μ l를 42 $^{\circ}$ C에서 60 분간 incubation 하였다. 위의 cDNA 를 10 배 희석한 후 template 로 사용하였고, control 로써 housekeeping gene 인 18s 로 발현량을

보았다. TRAF2 detection primer(Table 1)로 다음과 같은 조건으로 PCR 하였다. 95℃에서 30s denaturation, 58℃에서 30s annealing, 72℃에서 30s extension 의 반응을 1cycle 로 하여, 32cycle 을 반응시켰다. 그리고 final extension 과정을 72℃에서 7min 간 1cycle 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 을 이용하여 전기영동 한 후, ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 확인하였다(Fig.5).



Table 1. Oligonucleotides used for cloning and detection of rock bream TRAF2 and 18S ribosomal RNA gene

Name	Sequence (5' to 3')	Purpose
TRAF2-F1	GCGGARAAYATHGTNTGYGT	degenerated primer
TRAF2-R1	GNCCNGTNCCRTCNCCTT	
TRAF2-F2	GCARGCNCARTGYGGNCA	
TRAF2-R2	GCTCTCGCAACAGCTGTTCGG	specific primer
TRAF2,5'-RACE	CTTGGCGGCATGCTTCACATGGC	5' RACE of TRAF2
TRAF2,3'-RACE	GTCAGCTGGAGCGGACGCTCACG	3' RACE of TRAF2
TRAF2-F3	CTCAGTGTGCTGTCAGTGCC	detection of TRAF2
TRAF2-R3	GACAGATCTCATCATGGGCC	
RB 18s-F	TAACGGGGAATCAGGGTTCGAT	detection of 18s
RB 18s-R	CAAGAATTTACCTCTAGCGGC	

4. 돌돔 TNF- α 단백질 정제

4.1. Vector construction

돌돔의 TNF- α 항체를 제작하기 위해 본 실험실에서 pGEM T-easy vector 에 full ORF 가 cloning 된 clone 을 보관하고 있어 이를 받아서 사용하였다. 이 clone 으로부터 plasmid 를 분리하여 restriction enzyme 을 붙이기 위한 PCR template 로 사용하였으며 사용된 primer 는 Table 2 에 나타나있다. T-vector 에 cloning 된 것을 macrogen 사에 sequencing 의뢰 후 결과를 확인하였으며, BamHI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 발현 vector 인 pET28a 에 ligation 하였다.

4.2. Protein expression

Construction 된 vector 를 BL21(DE3) pLysS Competent Cells 에 transformation 하였다. 확인된 clone 을 이용하여 ampicillin 이 첨가된 LB broth 3 ml에 배양하였다. 배양은 37°C overnight incubation 하였으며, 전 배양액 1 ml을 ampicillin 이 첨가된 LB broth 15 ml에 subculture 한 후 37°C, 230rpm, OD1.0 이 될 때까지 배양한 후 IPTG 를 최종 농도 1mM 이 되도록 첨가하여 37°C에서 induction 하는 group 은 4 시간 배양하였으며 18°C에서 induction 하는 group 은 overnight 으로 배양하였다. 배양된 균은 원심분리(5000rpm, 4°C, 10min)한 후, 상층액을 제거하여 사용 전까지 -80°C에서 보관하였다.

유전자 발현 확인을 위한 SDS-PAGE sample 제조는 다음과 같이 수행하였다. -80°C 에서 보관중인 균 pellet 을 on ice 하여 녹인 후 HBSS buffer 에 현탁 하였다. 현탁액을 Sonication 하여 파쇄한 후 원심분리 (12000rpm, 4°C , 30min)함으로써 상층액과 pellet 부분을 나눈 후 각각 SDS sample buffer 를 이용하여 (95°C , 10min) denaturation 하였다. 위에서 만들어진 sample 을 이용하여 SDS-PAGE(gel 장당 0.02A)를 수행 후 Coomassie Brilliant Blue 로 염색하여 확인 하였다(Fig.7.a). Ni-NTA column 을 이용하여 제조사의 protocol 을 참조하여 단백질을 정제하였다(Fig.7.b). 정제 후 BCA protein assay 를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다.

Table 2. Oligonucleotides used for PCR amplification of the mature form of rbTNF- α (restriction site is underlined)

Name	Sequence (5' to 3')	Purpose
RB TNF BamHI F	<u>GAATTCA</u> AGCGTATCAGCAGCAAAGC	rbTNF- α using the forward
RB TNF HindIII R	<u>AAGCTT</u> TCAAAGTGCAAAGCGACC	rbTNF- α using the reverse

5. 돌돔 TRAF2 관련한 NF- κ B 활성 측정

5.1. Cells

Endothelial papulosum cyprinid(EPC) cells는 L-15 medium(Sigma)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 antibiotics(100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin)이 포함된 배지를 사용하며, 28℃에 배양하였다.

5.2. Vector construction

NF- κ B 활성 측정을 위해, luciferase reporter system (Ready-To-Glow™ NF κ B Secreted Luciferase Reporter System, Clontech)을 구입하였다. 위의 kit 내의 pNF κ B-MetLuc2-Reporter that contains a metridia luciferase gene as the reporter gene plasmid DNA를 EPC에 transfection 하기 위해 준비하였다. 본 실험에서 pNF κ B-MetLuc2-Reporter vector를 transfection하여 selection 한 cells에 다시 돌돔 TRAF2 발현 vector를 transfection하여 selection을 해야 하는데 사용한 pNF κ B-MetLuc2-Reporter vector와 돌돔 TRAF2 유전자가 발현되는 pcDNA3.1(+) vector의 selectable marker가 neomycin으로 동일 하므로 다른 selectable marker 인 promycin을 사용하기 위해 본 실험에서는 pGEM T-easy vector를 이용하였다.

돌돔(RB) TRAF2를 발현하는 pNF κ B-MetLuc2-Reporter/EPC cells을 만들기 위해 아래와 같이 vector를 제작하였다. 먼저 pcDNA3.1(+) vector (Invitrogen)를 template로 하여 pCMV-MCS-

BGHpA 아래의 primers를 사용하여 PCR 증폭 산물을 얻었다. 이를 pGEM T-easy vector (Promega)에 cloning하여 pCMV-MCS-BGHpA/T plasmid DNA를 backbone으로 하였고, 여기에 HindIII와 BamHI 제한효소를 처리하고 RB-TRAF삽입함으로써 TRAF2 expression cassette vector를 제작하였다. 그리고 RB-TRAF2 expressing stable NFkB/EPC cell line을 만들기 위해, ApaI site를 사용하여 Puromycin cassette를 삽입하였다. Puromycin cassette는 pSilencer 4.1-CMV puro (Ambion) vector를 template로 하여 아래의 primers를 사용하여 PCR 증폭 산물을 얻어 pGEM T-easy vector에 cloning하고 pCMV-target gene (RB-TRAF2)-BGHpA/T vector에 subcloning 하였다. 그리고 puromycin cassette를 cloning 해둔 puromycin cassette/T plasmid DNA는 control vector로 사용하였다. 여기서 완성된 pSV40-Puromycin-SV40pA/T/pCMV-RB-TRAF2-BGHpA 및 pSV40-Puromycin-SV40pA/T plasmid DNA를 Puromycin cassette/T/RB-TRAF2 cassette 및 Puromycin cassette/T로 명명하였다.

5.3. Transfection and selection

어류 cells에서의 transfection 효율은 10% 이하로 매우 낮으므로 본 실험 과정에서 실험의 효율과 정확성을 높이기 위해 실험에 사용한 모든 cells들은 transfection 후 selection 과정을 실행 해 주었다.

먼저 transfection 24 시간 전에, EPC cell 을 3×10^5 cells/well 의 density 로 35mm dish 에 준비하였다. 배지는 L-15 medium containing 20 mM HEPES and 10% FBS 를 사용하였고 28℃에서 배양하였다. Cell 이 약 80% confluence 를 보일 때, PBS 로 washing

해주고 transfection mixture 를 다음과 같이 준비하였다. 1 μ g 의 plasmid DNA (pNFkB-MetLuc2-Reporter)를 FuGENE6 transfection reagent (Roche)와 함께 DNA/FuGENE6 = 1:3 의 비율로 혼합하고 실온에서 5 분 preincubation 하였다. 그 후, total 100 μ l가 되도록 위의 배지 (L-15 medium containing 20 mM HEPES and 10% FBS)를 첨가하여 실온에서 1 시간 반응하였다. (Manufacturer' s instructions 에 따라 transfection 수행)위와 같이 준비된 transfection mixture 를 EPC cell 에 첨가하고 12 시간 후 항생제가 첨가된 배지로 교환, 72 시간 후 G-418 (400 μ g/ml)이 첨가된 배지로 교환하였다. 3 일마다 위의 배지로 교환해주면서 pNFkB-MetLuc2-Reporter plasmid DNA 가 transfection 된 EPC cells 만을 selection 하였다. Selection 이 끝난 pNFkB-MetLuc2-Reporter/EPC 는 NFkB/EPC 로 명명하였다. 또한, Puromycin cassette/T 및 Puromycin cassette /T/RB-TRAF2 cassette plasmid DNA 를 위와 같은 방법으로 28 $^{\circ}$ C에 배양해둔 NFkB/EPC [35mm dish (3×10^5 cells)]에 Transfection 하였다. 12 시간 후 항생제가 첨가된 배지로 교환 . 72 시간 후 puromycin(400ng/ml) 이 첨가된 배지로 교환하였다. 그 후, 3 일마다 puromycin 이 첨가된 배지로 교환해주면서 Control vector/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2 expressing stable NFkB/EPC 를 만들었으며 이를 Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC 라고 명명하였다.

5.4. 돌돔 TRAF2 transcription 확인.

앞에서 만든 돌돔 TRAF2 발현 vector 가 돌돔 TRAF2 transcription 되는지 확인하기 위해 RT-PCR 을 실시 하였다. 먼저 배양 중인 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 를 1500rpm 으로 5 분 원심분리 후 PBS washing 하여 cells 를 모아 RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN)를 사용하여 total RNA 를 분리하였다. 분리된 total RNA 를 protocol 에 따라 DNaseI (Promega) 처리 후 stop solution 을 첨가하였다. 위의 RNA 를 다음과 같은 조건으로 cDNA 를 합성하기 위해 사용하였다. 1 μ g의 DNaseI 을 처리한 RNA 에 1 μ l의 random primer (0.5 μ g/ml) (Promega)를 첨가한 후, 80℃에서 10 분간 incubation 하였다. 그리고 5 $\times$ reaction buffer 4 μ l, 10 mM dNTP mix (Takara) 4 μ l, M-MLV reverse transcriptase (Promega) 1 μ l, RNase inhibitor (Promega) 0.5 μ l, RNase free water 를 첨가하여 최종 반응 용액 20 μ l를 42℃에서 60 분간 incubation 하였다. 위의 cDNA 를 10 배 희석한 후 template 로 사용하였다. pCMV-F, RB-TRAF2-F, RB-TRAF2 Partial R primer (Table 3)로 다음과 같은 조건으로 PCR 하였다. 95℃에서 30s denaturation, 58℃에서 30s annealing, 72℃에서 1min extension 의 반응을 1cycle 로 하여, 32cycle 을 반응시켰다. 그리고 final extension 과정을 72℃에서 7min 간 1cycle 수행하였다. PCR 산물은 1% agarose gel 을 이용하여 전기영동 한 후, ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 확인하였다.

5.5. Cell treatment 준비 및 stimulation

돌돔 TNF- α 자극에 의한 RB-TRAF2 signaling NF-kB activation 양상을 확인하기 위해 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-

TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 를 각각 3×10^5 cells/well 의 density 로 6-well plates 에 준비하였다. 배지는 L-15 medium containing 10% FBS and antibiotics 를 사용하였고, 28℃에서 100% confluence 가 될 때까지 배양하였다. 대조구로서 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 에 아무런 처리를 하지 않았고, 실험구로서 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 에 이전에 정제해둔 TNF- α 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하여 28℃에서 12 시간 및 24 시간 동안 반응시켰다.

5.6. Reporter gene assay

Ready-To-Glow Secreted Luciferase System 은 gene expression 을 쉽고, 간단하게 직접적으로 관찰할 수 있는 시스템으로, 하나의 reporter gene 을 detection 하는 system 으로 gene expression 을 모니터링 할 때 cell lysis 과정이 필요 없으며, transfection 한 cell supernatant 에서 reporter 의 양을 바로 측정할 수 있기 때문에 매우 간단하면서 시간도 절약할 수 있다.

TNF- α 자극 후 각각의 반응시간이 되었을 때, 상층액을 수집하여 분비된 luciferase 를 Manufacturer's instructions 에 따라 luminometer (victor3)를 사용하여 측정하였다. 간단히 그 측정 방법을 기술하면 아래와 같다. 각각의 상층액 50 μl 씩을 one well of a 96-well plate 에 옮기고 각 sample 당 1 $\times$ Substrate/Reaction Buffer 5 μl 씩 첨가하여 즉시 luminometer 로 발광 정도를 측정하였다.

Tabel 3. Oligonucleotides used for cloning and construction of a vector for rock bream TRAF2 expression or a control vector containing puromycin cassette alone

Name of fragment		Sequence (5' to 3')	Restriction enzyme
pCMV-MCS-	pCMV-F	<u>AGATCT</u> CCCGATCCCCTATGGTGCAC	BglII
BGHPA	BGHPA-R	<u>GTCGAC</u> CCATAGAGCCCACCGCAT	SalI
RB-TRAF2	F	<u>AAGCTT</u> ATGGCTCGAATCTCGTTGG	HindIII
	R	<u>GGATCC</u> CTACAAGCCTGTGAGGTC	BamHI
Puromycin cassette	F	<u>GGGCCC</u> CCAGCAGGCAGAAGTATGC	ApaI
	R	<u>GGGCC</u> CTTATTTGTGAAATTTGTGATGC	ApaI
RB-TRAF2	Partial R	TCGCACGGACAAGGACAGACATAA	—

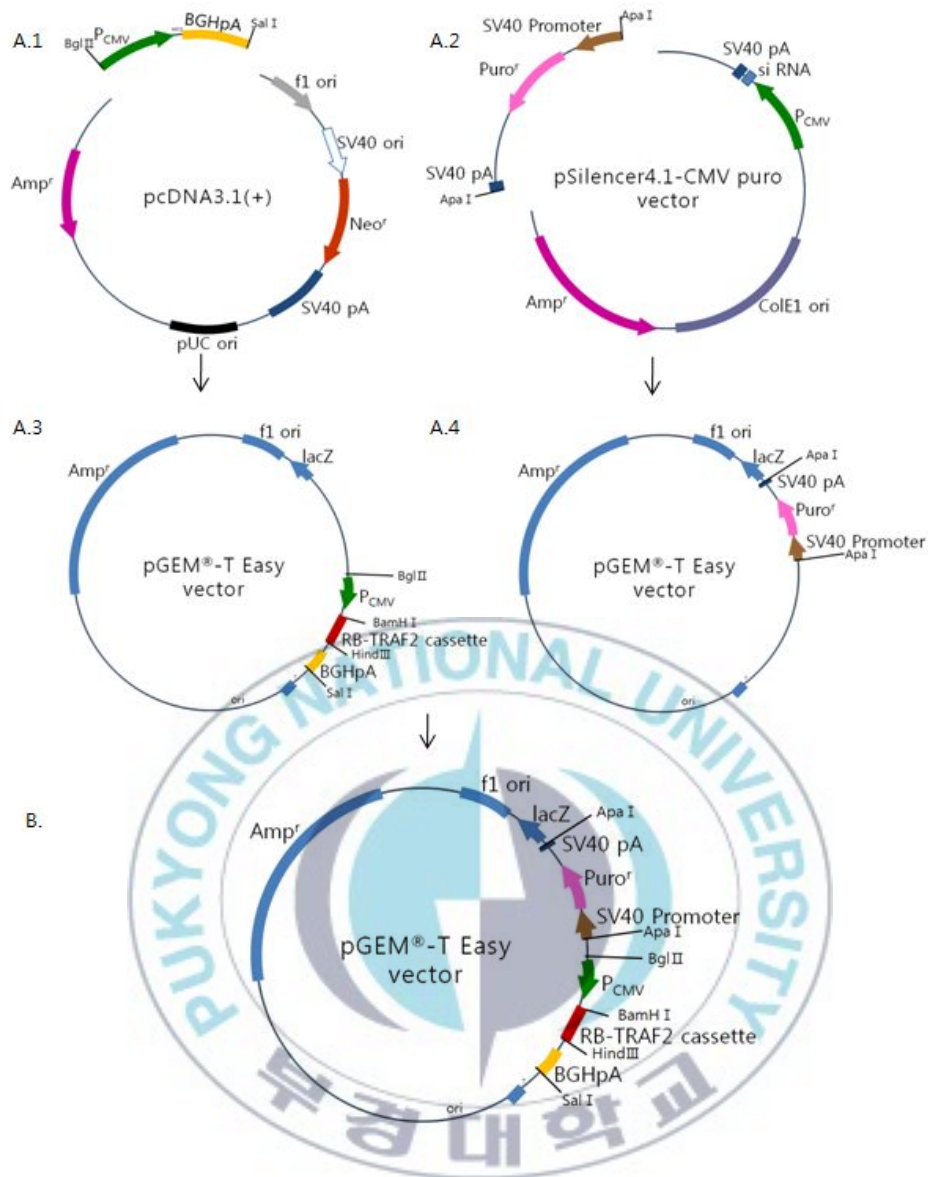


Fig. 1. Map of vector construction. Detailed procedure of vector construction was provided in Materials and Methods section. Backbone of all vector presented is pGEM T easy vector. A.4. Puromycin cassette vector, B. TRAF2 expression vector.

III. 결과

1. TRAF2의 complementary DNA 와 염기서열 분석.

돌돔 비장에서 total RNA를 분리하여 reverse transcription을 한 뒤 GenBank에 등록되어있는 *Homo Spiens* (CAI12703), *Mus musculus* (CAM25165), *Oncorhynchus mykiss* (CAD69021), *Carassius auratus* (CAC82653) TRAF2의 sequence 를 서로 비교하여 degenerated primers를 제작하여 RT-PCR한 결과 367bp의 product 를 얻을 수 있었다. 이 product를 gel상에서 elution한 다음 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 plasmid를 분리하여 그 염기서열을 결정하였다.

degenerated primers를 사용하여 RT-PCR을 한 결과로 획득된 product의 sequence 를 바탕으로 primer(TRAFF2-R2)를 제작하였고 (Table 1), 새로운 degenerated primer(TRAFF2-F2)를 제작하여 RT-PCT 한 결과 968bp의 product를 얻을 수 있었다. 이 product의 sequence 를 바탕으로 primer를 제작하였고 (Table 1), cDNA 5' 과 3' end를 밝혀 돌돔의 TRAF2 gene의 완전한 cDNA 염기 서열을 결정하기 위해 RECE-PCR를 수행하였다. RECE-PCR을 실행하여 얻은 product를 gel 상에서 elution을 한 다음 pGEM-T easy vector에 cloning한 후 염기서열을 결정하였다. degenerated primers와 그 RT-PCR로 생성된 product, RACE-PCR에 사용된 primers와 RACE-PCR 에 의해 얻은 products를 Fig.2에 도식화하였다. 그 결과 돌돔의 TRAF2 cDNA의 전체 sequence의 길이는 1993bp이고,

95bp의 5' UTR (untranslated region), 520의 아미노산으로 translation이 일어나는 1563bp의 ORF(open reading frame), 335bp의 3' UTR로 구성되어있었다. (Conserved domain을 분석하기 위해 InterProScan tool(included in ExPASy)를 사용하였다. 돌돔 TRAF2는 N-terminal region 에 RING-type zinc finger(30 to 68a.a.)가 있으며, 두 개의 TRAF-type zinc fingers(121 to 163a.a.와 173 to 220a.a.)가 middle region에 포함되어 있고, coiled-coil 구조를 하고 있는 C-terminal TRAF-N domain (330 to 349a.a.), TRAF-C domain(377 to 516a.a.)로 이루어져 있었다(Fig.3,4).



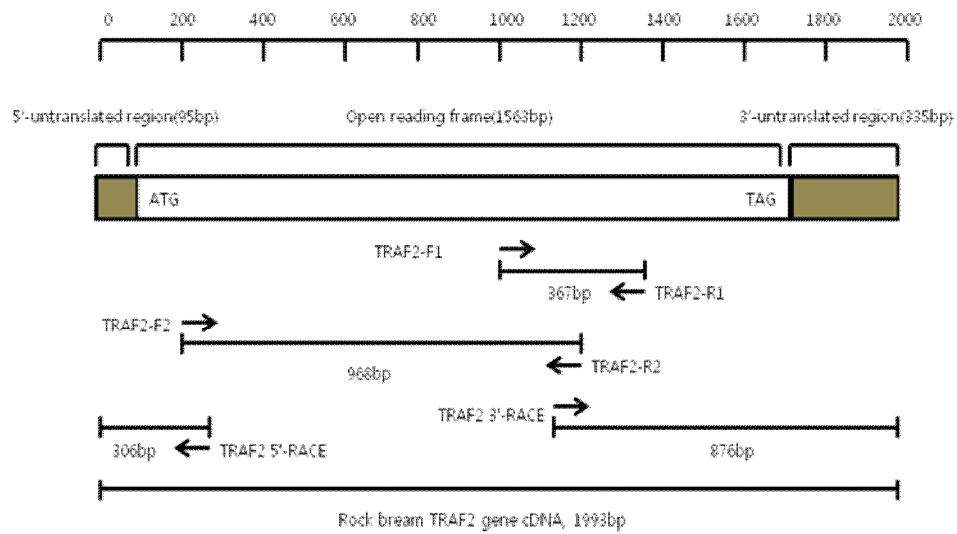


Fig.2. A schematic illustration of rock bream TRAF2 cDNA cloning with position of the primers used in PCR and RACE- PCR (gray regions: UTR).

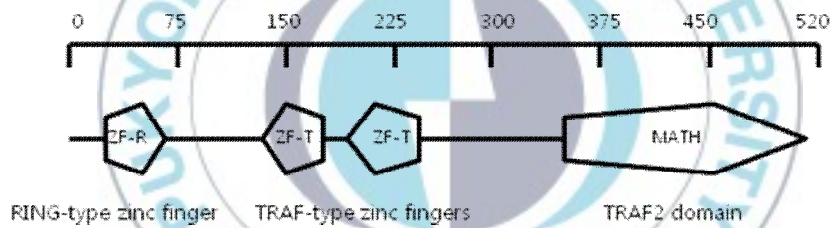


Fig.3. A schematic illustration of the rock bream TRAF2 conserved domain features.

AAGCA 5

GTGGTATCAACGAGAGTACGCGGACTATAAGGTGCACACAGGCAGCATTTTCAAGCTCGGTTATTGGACCAGATTGATGGAGAAGA 95

ATGGCTCGAATCTGTTGGACTGTTCCAACTCTTTACCGGGATCCCCCTCAGTGTGCTGCTCAGTGCCTATGGAGAATAATACAAATGT 185

M A R I S L D C S N S L P G I P L S V L S V P M E N K Y K C

CAGCAGTGTCTCCAGGTCTGAGGAAGCTGTCCAGGCTCAGTGCGGCCACGGCTTCTGTGTACTGTCTTCAAGCAGCTCACCAGTTCT 275

Q Q C A L Q V L R K P V Q A Q C G H R F C V H C F K Q L T S S

GGGCCAAAGCCATGTGAAGCATGCCGCCAGAGAGATCTATGAGGAACCTATTTCATTCTCANTAGTAATGAGGCATTTCAGACAAT 365

G P K P C E A C R Q E E I Y E E P I S I L N S N E A F P D N

GCTGCAGGTGAGAAATAGCAAGTCTTCCTGCCAGGTGTTTGAACCGGGCTGCGATTGGACAGGCTCAATAAAGAAATATGAGGCTCAG 455

A A G R E I A S L P A R C L N Q G C D W T G S I K E Y E A Q

CATGAAGGTGCGTGTGAATTGTAGCGGATCAGTGCAGGGCTGCCAAACCTCAATCCTTCGCACGGACAAGGACAGACATACAGAGAGA 545

H E G R C E F E R I Q C E A C Q T S I L R T D K D R H N E R

GAATGTGAAGCAAGACCTCAACTGTAAATAGTCAAGATAACCTTCAACTTCAAGACATTAAGGCCCATGATGAGATCTGTCTGAAG 635

E C E A T L N C K Y C K I T F N F K D I K A H D E I G L K

TTTCCCTTACAAAGCAAGAAATGTGGCAAGAAGAAGATCCCAAGAGAAAAGTTCAATGACACAGCAGGTCTGCGCCAGTCAAAAGAGT 725

F P L Q C K E C G K K K I P R E K F N D H S R S C A K S K S

GCGTGTCCATTCAACGAGTGGGCTGTAAATCTGTGATCATAACGGGAAGCTCAGCGACCATGAGCACAGCAGCACCATTGGACACTTG 815

A C P F N E V G C K S V I D N G K L S D H E H S S T M E S

CGTCTGCTGCTGCCATGTGCTGTCCATGGCTCGGCCGCTGCTGACGCTCTGCTCCGGGGAGTGGCAGGAGACTTGTGCTGGGC 905

R L L L P M V L S M A R P R A D A P G P G E W Q E D S G L G

CTGTACAGGCTCTCTGAGGAGGAGTCAATATGGGCGCGGAGCTGACGCTCTGGGCAGTCTGTAGACATAGAAAAAAGGTGAACGCT 995

L Y R A P E E G V N M G A G A A S G Q S V D I E K K V N A

TTAGAAAACATCGTGTGCTCTGTAACCGGAGGTGGAGCGCAGTTCTGTTACAAATGGAGGCTTTCTCACATCAACACCGTTTAGACAG 1085

L E N I V C V L N R E V E R S S V T M E A F S H Q H R L D Q

GAAAAATTTGAAACCTCTCCAAATAAGTGCCTCAGCTGGAGCGGACGCTCAGATGAAAGACCTGCAGCTGCTGAAACCGAACAGCTG 1175

E K I E N L S N K V R Q L E R T L T M K D L Q L S E T E Q L

TTGCGAGAGCTCCAGTTCTGCACCTATGACGGGATATTCGTTCTGAAAATCTCTGACTTCTCGCGCCGACAGCAGGACGCGTGGCCGGT 1265

L R E L Q F C T Y D G I F V W K I S D F S R R R Q D A V A G

CGAACACCGGCAATGTTCTCTCCAGCGTTTACTCCAGCAATATGGATACAAAATGTCTGAGGCTGTATTGAAATGGCGACGGGACG 1355

L Y R A P E S P A F Y S S K Y G Y K M C L R L Y L N G D G T

GGTCGAGGAACCCACCTTTCACTGTTCTTTGTGTCATGAGGGGAAAGTGCATGCGCTGCTCAATGGCCGTTCTAGTCAGAAGGTGACT 1445

G R G T H L S L F F V V M R G K C D A L L K W P F S Q K V T

CTGATGCTCTGGATCAGAACACAGGGAGCAGATTATGATGCTTTCCGGCCGACGTCACCTCCACCTCCTTTTCAGCGCCCAATCAGT 1535

L M L L D Q N N R E H I I D A F R P D V T S T S F Q R P I S

GAGATGAACATCGCCAGTGGCTGCCCGCTCTCTGTGCGCTGCTAACTGCGCGCAAGAGCCGATCTGAGAGATGATCAATTTTC 1625

E M N I A S G C P L F C P L A K L A G K S P Y L R D D T I F

ATCAAGCCATTGTAGACCTCACAGGCTTGTAGGGTGTGACTGTGGAAGCCCAACCAAGCATGTTAAAAACAAAACATATAAAGAG 1715

I K A I V D L T G L *

AGCGAGAGATGTGATCTGGCGCACTGAAACAGTTTGAACAACTCTGCAAGCTGCTGAAGAAAAACAACACACATGGTGACACCCA 1805

AAAAAACCCAAACCCGGTTAACCCTAGTTACTGCTTCACTGCTTACTGCTGTTGTCACGGATGTGGAATGACTGTTCCTTTCCCTTCA 1895

TGTTGTTACAAAAGTTGTTGGCTGGAGTCCCAAAACATTATATTAATAAAGGGGAAAAAACAACAAAAAATAAAGAG 1985

AAAAAAA 1993

Fig.4. Nucleotide sequence of rock bream tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and deduced amino acid sequence (GenBank accession number ACV04846). The 5' and 3' untranslated regions (UTR) are indicated in italics. The RING-type and TRAF-type zinc fingers are underlined with single line, and the coiled-coil structure is underlined with double line. The stop (TAG) codon is indicated with an asterisk.

2. Nucleotide sequence 비교 분석.

돌돔 TRAF2 cDNA sequence 와 GenBank에 등록되어 있는 다른 종의 TRAF2 cDNA sequence를 BioEdit program을 사용하여 비교해 보았을 때, green puffer와의 nucleotide identity가 86%로 가장 높게 나타났고 그 다음으로 rainbow trout(82%), grass carp(77%), zebrafish(76%), goldfish(75%)의 순으로 유사하게 나타났다. *Mus musculus*, human *Homo sapiens*는 56% 유사성을 보였으며, 포유류보다는 어류 TRAF2 간에서 높은 identity가 나타남을 알 수 있었다 (Table 4). 또한 어류와 포유류 간의 TRAF2가 계통발생학적으로 차이가 나타나는 것을 Phylogenetic tree에서 확인 할 수 있었다(Fig.5). 하지만 어류와 포유류에서 C-terminal TRAF domain 부분을 보면 높은 상동성을 나타내는 것을 알 수 있다(Fig.6).



Table.4. Amino acid sequence homology of rock bream TRAF2 with other TRAF2s

Specie	Common name	Genbank accession	Identity (%)	Similarity (%)
Tetraodon nigroviridis	Green Puffer	CAF99177	86	91
Oncorhynchus mykiss	rainbow trout	CAD69021	82	91
Ctenopharyngodon idella	grass carp	ABE99696	77	92
Danio rerio	Zebrafish	CAM15136	76	92
Carassius auratus	Goldfish	CAC82653	75	85
Mus musculus	house mouse	BAC29937	56	91
Homo sapiens	Human	NP_066961	56	86

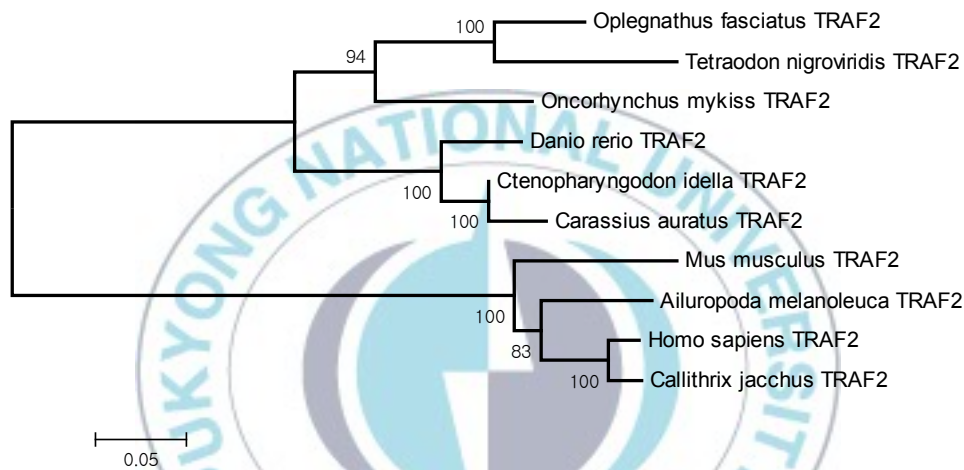


Fig.5. Phylogenetic tree showing the relationship between different TRAF2 amino acid sequences. The GenBank accession numbers of the TRAF2 genes are as follows : Oplegnathus fasciatus TRAF2, ACV04846; Tetraodon nigroviridis TRAF2, CAF99177; Oncorhynchus mykiss TRAF2, CAD69021; Ctenopharyngodon idella TRAF2, ABE99696; Danio rerio TRAF2, CAM15136; Carassius auratus TRAF2, CAC82653; Ailuropoda melanoleuca TRAF2, EFB23709; Mus musculus TRAF2, BAC29937; Homo sapiens TRAF2, NP_066961; Callithrix jacchus TRAF2, XP_002743517.

```

Rock bream -----MARISLD-CSN-SLDGIPLSVLSVPMERYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 85
Green puffer -----MARISLD-CSP-SLDGIPLSVLSVPMERYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFRELTSSTGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 85
Rainbow trout -----MARISLP-SLDSSLIPQSVLAVSVBARYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFKLLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 86
Grass carp MISTAGTAGMKAMARPSLPSSLDSTLPGISREVLVSVMERYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 100
Zebrafish MISAAGTLCKMKMERPSLPSSLDSTLPGISREVLVSVMERYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 100
Goldfish MISTAGTAGMKAMARPSLPSSLDSTLPGISREVLVSVMERYCQCCLQVLRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 100
Mouse -----MAASVTSPGSLLELLQPFSTLTGTRLPARYLSACENILRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 89
Human -----MAASVTTPGSLLELLQPFSTLTGTRLPARYLSACENILRIRVCAQCGHRQVCFKQLTSSGPTGCAACQCEIYIEPTSHNSNE 89

Rock bream AFEDNAAAREIASLIAACLNQCQWIGSIRFPAQHEGECFERIGCEACQTSILRTDIPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 185
Green puffer VEEDNAAAREIASLIAACLNQCQWIGSIRFPAQHEGECFERIGCEACQTSILRTDIPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 185
Rainbow trout AFEDNAAAREIASLIAACLNQCQWIGSIRFPAQHEGECFERIGCEACQTSILRTDIPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 186
Grass carp AFEDNAAAREIDSLIAACGNDCCSNQSTLKNQHEGECQFERVCEACQAVILLSETPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 200
Zebrafish AFEDNAAAREIDSLIAACGNDCCSNQSTLKNQHEGECQFERVCEACQAVILLSETPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 200
Goldfish AFEDNAAAREIDSLIAACGNDCCSNQSTLKNQHEGECQFERVCEACQAVILLSETPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 200
Mouse AFEDNAAAREVESLIAACGNDCCSNQSTLKNQHEGECQFERVCEACQAVILLSETPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 189
Human AFEDNAAAREVESLIAACGNDCCSNQSTLKNQHEGECQFERVCEACQAVILLSETPHHFECEARHNGKICITPNFMDIKAHFHCGRFFLQC 189

Rock bream KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 280
Green puffer KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VH 280
Rainbow trout KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 286
Grass carp KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 296
Zebrafish KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 294
Goldfish KDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 296
Mouse DDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 271
Human DDCGRRRIREFAPDHSRSCAKSKACPFSEVGGCVVDNGKLSDEHSSTLDEHRLILFMVLSMARPRADAPGHGEWQEDSGLGIRAPFEG-----VN 271

Rock bream MGAGAAASGQSVDIRKYNALDINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 380
Green puffer VGAGAAAS-VHVNLERKTALEINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 379
Rainbow trout DGGAGAAASGQTFGLDERTALEINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 386
Grass carp AAAHNAGRGGGGPGVQQRTALEINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 396
Zebrafish --AHNVNAGRGGGGPGVQQRTTULEINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 392
Goldfish AAAHNAGRGGGGPGVQQRTALEINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 396
Mouse -----CQILEKATATPAINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 361
Human -----CESLERKATATPAINVCVLNFEVERSSVTMEAFSPHSHLOPRIELSNRTOLERTLTMDQLQSETOQLRLQFCQMDGHPFWRISDF 361

Rock bream SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 480
Green puffer SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 479
Rainbow trout SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 486
Grass carp SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 496
Zebrafish SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 492
Goldfish SRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 489
Mouse TRPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 461
Human ARPQAVVGRFAFSEAFYSYGYMCLRLVINGDGTGRGHLLEFVVMGKFDALLWFFSQFVTIMLLDNNREHIDAEREDVTSSSFQRPIS 461

Rock bream EMNIASGCLFPCPLARLAGKSSYLDDTIFIKAVLLTGL 520
Green puffer EMNIASGCLFPCPLARLAGKSSYLDDTIFIKAVLLTGL 519
Rainbow trout EMNIASGCLFPCPLARLAGKSSYLDDTIFIKAVLLTGL 526
Grass carp EMNIASGCLFPCPLARLAGKSSYLDDTIFIKAVLLTGL 536
Zebrafish EMNIASGCLFPCPLARLAGKSSYLDDTIFIKAVLLTGL 532
Goldfish -----RLVLLRPLSLCL----- 501
Mouse DMNIASGCLFPCFVSRMEAKNSYVRDDAIFIKAVLLTGL 501

```

Fig. 6. Multiple alignment of deduced amino acids sequence of rock bream tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) with other teleostean and mammalian TRAF2s. Amino acids identical from fish to mammals are shaded in black. The N-terminus of the TRAF domain is boxed. The GenBank accession numbers of the sequences are equal to Tabel.4.

3. 돌돔 조직 별 TRAF2 발현 분석.

돌돔 TRAF2 발현 알아보기 위해 양식 돌돔 (어체중 $120 \pm 10\text{g}$)을 구입 후 순치한 다음 자극하지 않은 실험어 3 마리 각 각의 여러 조직들을 분리하여 semi-quantitative RT-PCR 로 면역 유전자 발현을 비교하였다. 그 결과 돌돔 3 마리의 조사한 조직에서 돌돔 TRAF2 유전자가 모두 발현 되는 것을 알 수 있었고, 돌돔 3 마리 모두 TRAF2 발현을 분석한 조직 중 동일하게 spleen, gill, leukocytes, intestine, skin 에서 가장 높게 발현되었다(Fig.6).



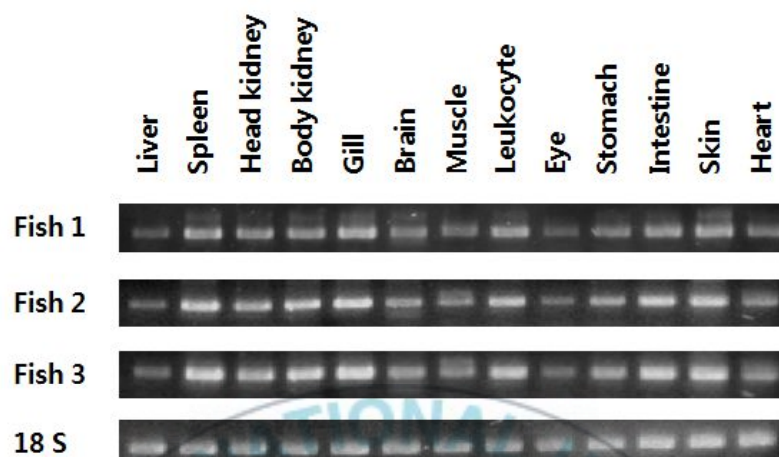


Fig.7. Tumor necrosis factor receptor-associated factor2 (TRAF2) mRNA expression in tissues of unstimulated rock bream (*Oplegnathus fasciatus*). Total RNAs from the 13 tissues were subjected to RT-PCR amplification of TRAF2 transcripts. Amplification of rock bream 18s in each tissue was also shown as an internal control.

4. TNF- α 단백질 정제 결과.

돌돔 재조합 His-tagged TNF- α mature form의 molecular weight (MW)는 약 22.2kDa 이고, host bacteria의 inclusion body와 cytoplasm 에서 다 발현이 되었다(Fig.7.a). 돌돔 TNF- α 를 Ni-nitrilotriacetic acid resin을 사용하여 돌돔 Soluble 재조합 TNF-a 로 정제하는데 성공하였다(Fig.7.b).



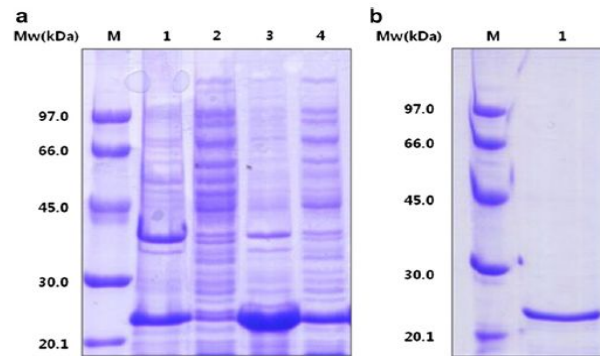


Fig.8. (a) Coomassie blue stained SDS-PAGE gel of His-tagged tumor necrosis factor- α (TNF- α) of rock bream (*O. fasciatus*). M: prestained protein marker (Amersham), Lane 1: Pellet of bacterial lysate (non-induced), Lane 2: Supernatant of bacterial lysate (non-induced), Lane 3: Pellet of bacterial lysate induced with IPTG, Lane 4: Supernatant of bacterial lysate induced with IPTG. (b) Recombinant rock bream TNF- α protein purified by a Ni-NTA His-Bind Resin (Novagen) open column. Lane 1: Band of purified His-tagged TNF- α (approximately 22.2 kDa).

5. 돌돔 TNF- α 자극에 따른 면역유전자 활성화 분석.

5.1. 돌돔 TRAF2를 발현하는 vector construction 및 transcription 확인.

RB-TRAF2를 발현시키기 위한 cassette vector를 만들기 위해 pCDNA3.1(+)의 pCMV-MCS-BGHpA 부분을 pGEM T-easy vector에 cloning 하여 만들어진 pCMV-MCS-BGHpA/T plasmid DNA에 돌돔 TRAF2 (RB-TRAF2)를 삽입함으로써 TRAF2 expression cassette vector를 제작하였으며, 이를 pCMV-F와 RB-TRAF2 Partial R primer(Table 3)로 PCR을 실시한 결과 vector가 만들어졌음을 확인하였다(Fig.9). 그리고 RB-TRAF2 expressing stable NFkB/EPC cell line을 만들기 위해, Puromycin cassette F와 R Primer(Table 3)를 사용하여 PCR로 Puromycin cassette를 증폭 한 후, pGEM T-easy vector에 cloning 하였으며, colony PCR 결과 Puromycin cassette vector가 완성된 것을 확인 할 수 있었다(Fig 10). 또한 transfection 및 selection 과정을 거쳐 만들어진 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells에서 CMV promoter가 활성화 되어 돌돔 TRAF2가 transcription되는지 RB-TRAF2-F와 RB-TRAF2 Partial R primer(Table 3)로 RT-PCR 한 결과 돌돔 TRAF2가 transcription 되고 있는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 vector contamination 확인을 위해 pCMV-F와 RB-TRAF2 Partial R primer(Table 3)로 RT-PCR 한 결과 vector contamination 되지 않은 것을 알 수 있었다(Fig.11).

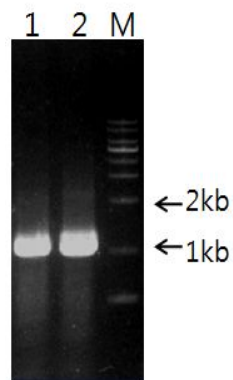


Fig.9. Agarose gel electrophores of the amplicons produced by PCR using vector construction primers (pCMV-F, RB-TRAF2 Partial R primer) Lane1,2. RB-TRAF2 expression vector PCR product. M, 1kb DNA ladder.

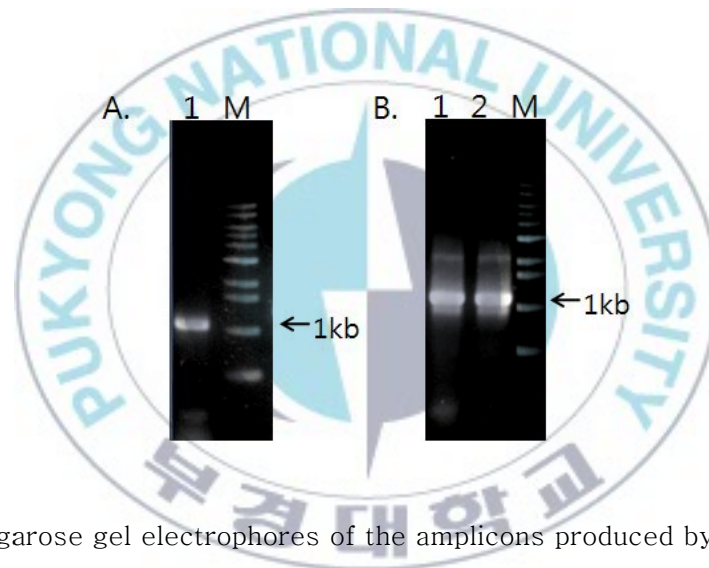


Fig.10. Agarose gel electrophores of the amplicons produced by PCR using vector puromycin cassette primers (Puromycin cassette F, R primer) A. Lane1. Puromycin cassette vector PCR product. B. Lane1,2. Puromycin cassette vector colony PCR product. M, 1kb DNA ladder.

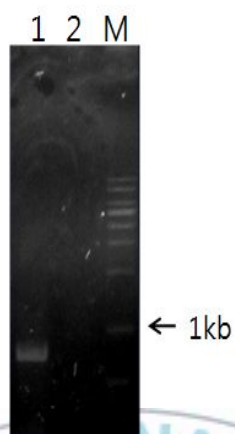


Fig.11. RT-PCR detection of rock bream TRAF2 transcript. Agarose gel electrophores of the amplicons produced by PCR using vector construction primers (pCMV-F, RB-TRAF2 Partial R primer) and RB-TRAF2 primer (RB-TRAF2-F, RB-TRAF2 Partial R primer). Lane1. rock bream TRAF2 mRNA PCR product. Lane2. Checking for vector contamination PCR product. M, 1kb DNA ladder.

5.2. 돌돔 TNF- α 자극에 의한 TRAF2 관련 NF-kB의 활성화 분석.

우선적으로 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 에서 TNF- α 자극에 의한 RB-TRAF2 signaling NF-kB activation 양상을 보기 위해 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC 및 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells 에 정제해둔 돌돔 TNF- α 1 μ g/ml 농도로 처리하였고, 대조구로 아무런 처리를 하지 않은 위의 cells를 28℃에서 12시간 및 24시간 동안 반응시켜 NF-kB 활성화 양상을 측정하였다. 그 결과 정제한 돌돔 TNF- α 단백질에 의해서 자극이 된 실험구가 아무런 자극을 하지 않은 대조구보다 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC cells는 2배 정도, RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells는 12시간에는 3.5배, 24간에는 5.5배정도로 NF-kB 활성화 양상이 높게 나타났으며, 실험구에서는 NFkB/EPC, Puromycin/NFkB/EPC cells에 비해 돌돔 TRAF2를 발현하는 vector가 들어있는 RB-TRAF2/Puromycin/NFkB/EPC cells에서 12시간, 24시간 모두 높은 NF-kB 활성을 볼 수 있었다 (Fig .12, 13).

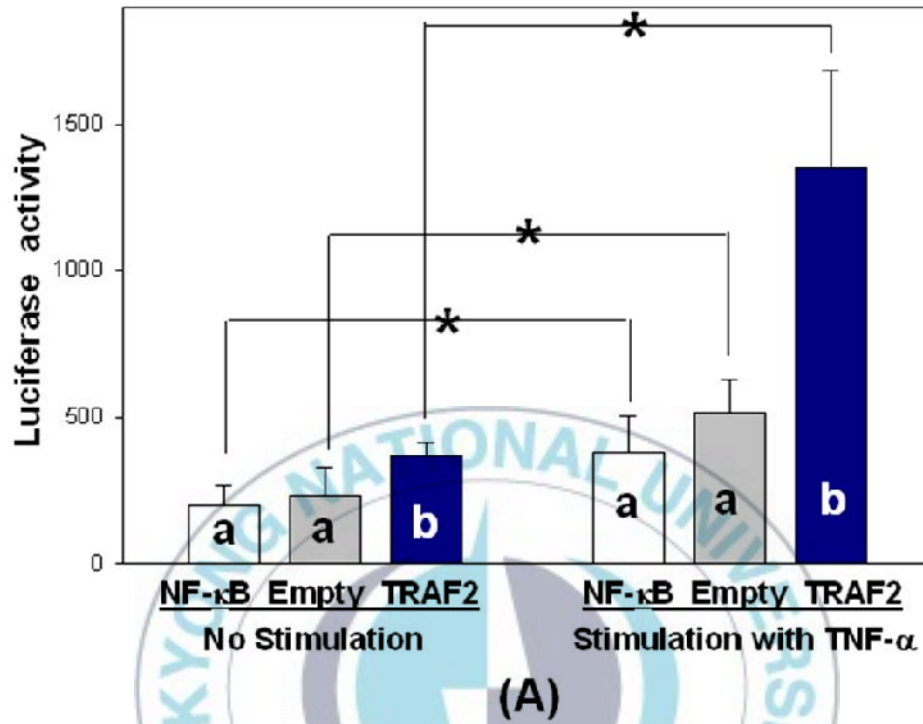


Fig.12. To determine whether rock bream TRAF2 can modulate TNF- α induced NF- κ B activation, EPC cells harboring NF- κ B activation reporting plasmids were transfected with either the TRAF2 expressing plasmids or empty control plasmids, and selected by G-418 and puromycin. In all experimental cells, NF- κ B activity was significantly increased by stimulation with the recombinant rock bream TNF- α .

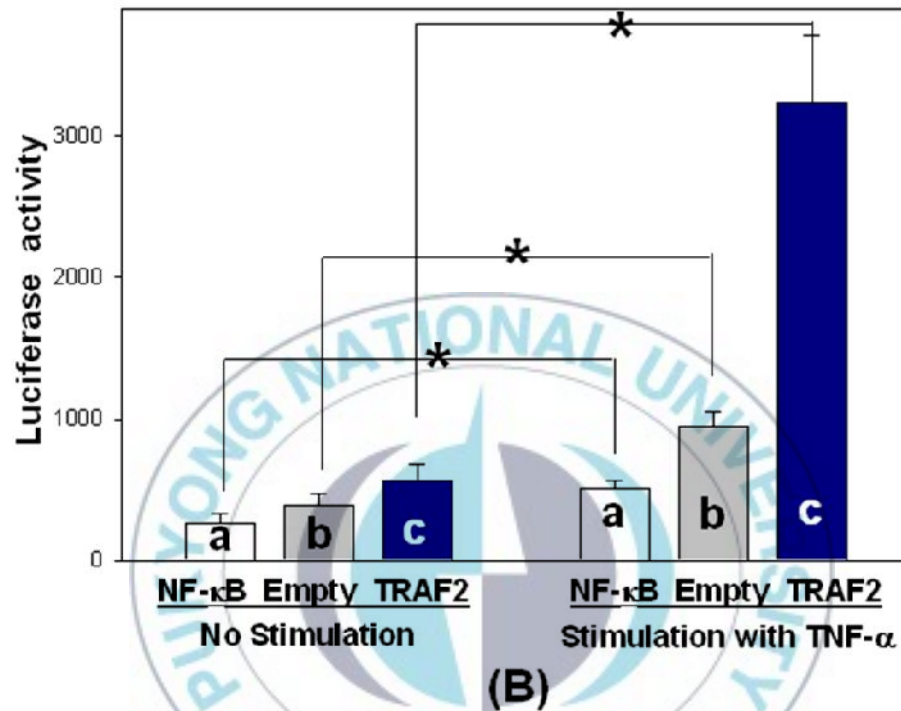


Fig .13. Cells harboring empty control plasmids plus NF-κB vector with or without stimulation by the TNF- α showed significantly higher NF-κB activity than cells containing NF-κB vector alone at 24 h.

IV. 고찰

어류에서의 $\text{TNF-}\alpha$ 및 관련 요소들의 면역학적 기능을 밝히는 것은 비교 면역학적 측면뿐만 아니라 어류 질병에 대한 과학적 제어방법을 개발하는데 있어서 필수적인 기반이 되는 연구라 할 수 있다. 그 중 $\text{TNF-}\alpha$ signaling 에 관여하는 주요한 요소인 TRAF2 에 관한 연구는 국내외적으로 매우 부족한 실정이며, 이는 반드시 필요하다. 본 연구실에서는 돌돔의 $\text{TNF-}\alpha$ 유전자를 cloning 하여 GenBank 에 등록한 바 있다 (Accession No. FJ623187) (Kim MS *et al.*, 2009). 따라서 본 연구에서 $\text{TNF-}\alpha$ 의 관련 요소인 돌돔 면역 유전자 TRAF2 를 cloning 하고, 이 면역 관련 유전자가 어떻게 연관되어 있는지 NF- κ B 의 활성 변화를 통해 분석하여, $\text{TNF-}\alpha$ signaling 중 TRAF2 와 관련하여 어류의 면역체계에서 담당하고 있는 주요 기능을 알아보고자 하였다. 먼저 TRAF2 의 염기서열을 밝히기 위해 Genbank 에 등록되어 있는 다른 어류 또는 포유류들의 TRAF2 를 비교하여 conserve 되어 있는 부위를 증폭하는 degenerated primer 를 제작하였다. 돌돔의 spleen 에서 분리한 total RNA 를 template 로 RT-PCR 을 한 결과, 364bp 와 968bp 의 product 를 얻을 수 있었고, 이것을 sequencing 하여 이미 밝혀져 알려진 다른 종의 TRAF2 와 비교하였을 때, 높은 homology 를 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 그 결과, 이 product 는 TRAF2 라는 것을 증명 할 수 있었으며, TRAF2 full sequence 를 밝히기 위해 RACE-PCR 을 실행하여 TRAF2 의 전체 cDNA 염기서열을 확인 하였고, 이를 돌돔 TRAF2 (RB-TRAF2)라고 명명 하였다. 돌돔의 전체 TRAF2 cDNA 는 1993bp 로 95bp 의

5' UTR, 1563bp 의 ORF, 335bp 의 3' UTR 로 이루어져 있으며, translation 이 일어나는 ORF 는 520 개의 amino acids 를 가지고 있었다. 3' UTR 에는 polyadenylation signal(AATAAA)과 함께 poly (A)tail 이 포함되어 있었다.

TRAF1 을 제외한 TRAFs 구조적 특징으로는 N-terminal RING-type, TRAF-type zinc finger domain 과 C-terminal TRAF domain 으로 이루어져 있는데(Arch RH *et al.*, 1998; Leon Grayfer *et al.*, 1993), 돌돔 TRAF2 도 이와 같은 구조를 이루고 있었고, 또한 C-terminal TRAF domain 부분은 C-terminal TRAF-N domain 과 TRAF-C domain 으로 이루어져 있었다. TRAF domain 은 TRAF protein receptor interaction 을 매개하는 기능뿐만 아니라 protein oligomerization 을 담당한다. 또한 하부 신호 전달 경로를 시발하는데 요구되는 단백질 결집(aggregation)을 매개하는 기능을 가진 독특한 단백질 multimerization motif 를 구성한다(cheng *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1995; Rothe *et al.*, 1995; Mosialos *et al.*, 1995). 본 실험에서 밝힌 돌돔 TRAF2 의 경우 GenBank 에 등록되어있는 어류 TRAF2 들과 비교하였을 때 Tetraodon nigroviridis 가 86%로 가장 높은 amino acid identity 를 보였으며, Oncorhynchus mykiss, Ctenopharyngodon idella, Danio rerio, Carassius auratus 순으로 유사하였다. 돌돔 TRAF2 amino acid sequence 를 다른 어류의 TRAF2 들과 비교하였을 때 75%로 이상의 identity 로 어류의 TRAF2 간의 높은 상동성을 보였다. 포유류 TRAF2 중 mouse 와 human 에서 56%의 identity 를 나타냈다. 어류와 포유류 C-terminal TRAF domain 구조에서 종에 상관 없이 높은 유사성을 보인다(Xu Z *et al.*, 2007).

TNF- α 는 염증성 사이토카인으로 알려져 있으며, immune cells과

non-immune cells를 포함하고 있는 많은 cell type에서 생성된다. 그러나 급성 염증 일 경우, 주로 대식 세포와 같은 immune cells 에서 생성 된다(Rothe J *et al.*, 1992; Bazzoni F *et al.*, 1996). Rothe *et al.* 에서 TRAF2의 발현이 tissue-specific이 아니라고 보고되어 있으며 본 연구에서 아무런 자극을 하지 않은 돌돔을 사용하여, TRAF2 전사가 일어나는 대부분의 조직에서 발현을 확인해 보았다. 조사한 모든 조직에서 TRAF2가 발현 되었고 다른 조직에 비해 Spleen, Gill, Leukocyte, Intestine, skin의 조직에서 높은 발현이 나타나는 것을 알 수 있었다. 어류에서 TRAF2 조직별 발현에 관한 자료가 매우 부족한 실정이며, 현재 보고된 연구로는 Xu *et al.*(Xu *et al.*,2007)가 있으며 이 연구에서 아무런 자극을 하지 않은 grass carp의 조직별(Brain, Gill, Heart, Head kidney, body kidney, Liver, Spleen, Thymus) TRAF2의 발현을 연구하였고, 돌돔 TRAF2와 같이 모든 장기에서 TRAF2가 발현되었으나, Heart에서 가장 높은 발현을 나타냈다. 본 실험에서 돌돔 TRAF2 gene의 발현은 생물학적, 화학적, 물리적으로 범위가 넓고 다양한 자극에 대해 반응이 일어나며(Bazzoni F& Beutler B, 1996) 조직들을 주위 위협적인 요소로부터 보호하기 위해 TNF-TNFR1-TRADD-RIP-TRAF2 signaling과 같은 면역 반응 활성화가 일어날 것이라고 추측 할 수 있었다. TNF- α 에 의해 TRAF2는 AP1과 NF-kB 전사인자들을 활성화 시키며, 발현 유전자들은 염증반응, 내재면역반응, 세포증식, anti-apoptosis를 유도한다(Baud V & Karin M, 2001). 또한 TRAF2 mediated NF-kB 활성화는 세포 활성화 요구 뿐만 아니라 programmed cell death를 방지하는 데에도 요구되며 (Lee *et al.*, 1997), TRAF2를 overexpression 시 NF-kB를 활성화를 유도한다(Tsitsikov *et al.*, 1997). Israel *et al.*(Israel *et al.*,1989) 연구에서는 NF-kB는 TNF에 의한 세포 반응의 가장 중요한 전사

조절인자 중의 하나로서, 대부분의 세포에서 TNF에 의하여 그 활성이 증가됨을 확인하였다. 본 연구에서는 이러한 보고들에 근거하여, TNF 반응 경로 중 하위 signaling 에 관련되는 주요 전사인자인 TRAF2가 NF- κ B의 활성화에 관여하는지 알아보고자 하였다. 본 실험에서는 pNF κ B-MetLuc2-Reporter that contains a metridia luciferase gene as the reporter gene plasmid DNA(Clontech)를 EPC cells에 transfection 시킨 NF κ B/EPC cells, Puromycin cassette를 NF κ B/EPC cells에 transfection 시킨 Puromycin/NF κ B/EPC cells, TRAF2 expression cassette vector에 Puromycin cassette를 삽입한 후 NF κ B/EPC cells에 transfection 시킨 RB-TRAF2/Puromycin/NF κ B/EPC cells를 만들어 돌돔 TNF- α 재조합 단백질 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)로 위의 cells를 자극한 후 NF- κ B 활성을 측정하였다. 실험 결과 자극하지 않은 cells에 비해 TNF- α 로 자극이 된 cells에서 NF- κ B 활성이 높게 나타났고, 돌돔 TRAF2 발현 vector가 들어가 있는 RB-TRAF2/Puromycin/NF κ B/EPC cells에서 NF- κ B가 다른 cells에 비해 더 많이 활성화 되는 것을 알 수 있었다. TRAF2는 TNFR1의 중요 결합 단백질인 TRADD가 TRAF2의 TRAF domain과 직접 결합을 이루고, 이의 Ring finger domain 및 zinc finger domain 이 TNF의 신호를 아래단계로 전달함으로써, TNFR1에 의한 NF- κ B의 활성화 경로에 중요한 역할을 한다(Yeh WC *et al.*,1997; Véronique Baud & Michael Karin, 2001). 이 결과 TNF- α 에 의해 TRAF2가 활성화되고 이는 NF- κ B 활성화에 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 이 실험에서는 TRAF2의 어떤 요소에 의해서 NF- κ B가 활성이 일어나는지는 알 수 없지만 어류에서 거의 보고된 바가 없는 TNF- α pathway 중 염증반응 관련 요소인 TRAF2와 NF- κ B 연관관계를 밝혔다는 것이 이 실험에서 주목 할 만한 결과이다.

물론 $\text{TNF-}\alpha$ 가 TRAF2에 의해서만 NF- κB 를 활성화 시킨다 라고는 말 할 수 없지만, $\text{TNF-}\alpha$ signal에 의해 TRAF2와 결합하여 NF- κB 활성화에 영향을 받았다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 본 연구에서 장기별 발현을 통하여 TRAF2가 대부분의 조직에서 발현 되는 것을 보아 대부분의 조직에 분포하고 있는 것을 알 수 있었고, $\text{TNF-}\alpha$ 에 대한 TRAF2의 연관 관계와 TRAF2가 NF- κB 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, $\text{TNF-}\alpha$ 는 염증반응을 유도하는데 TRAF2가 관련하고 있었으며, TRAF2에 의해 NF- κB 활성이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 반응은 $\text{TNF-}\alpha$ 가 NF- κB 활성을 유도하는데 TRAF2가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 이 연구 결과는 앞으로 TRAF2와 관련한 어류 면역 반응에 관한 연구를 하는데 있어서 도움이 될 것이라 생각된다.



V. 요약

TRAF2 활성은 $\text{TNF-}\alpha$ cell 신호가 세포의 성장과 분화, 항 세포사멸, 염증 반응을 유발하며, 본 실험에서는 돌돔 면역유전자 $\text{TNF-}\alpha$ 관련 인자인 돌돔 TRAF2 유전자를 cloning 하고 NF- κB 의 활성 변화를 통해 TRAF2 기능적면을 알아 보고자 하였다.

돌돔의 TRAF2 cDNA의 전체 sequence의 길이는 1993bp이고, 95bp의 5' UTR, 520의 아미노산으로 translation이 일어나는 1563bp의 ORF(open reading frame), 335bp의 3' UTR로 이루어져 있었고, RING-type zinc finger(30 to 68a.a.), 두 개의 TRAF-type zinc fingers(121 to 163a.a.와 173 to 220a.a.)와 C-terminal TRAF domain (330 to 516a.a.) 구조를 이루고 있었다. 돌돔 TRAF2와 다른 어류의 TRAF2들과 protein sequence를 비교 분석한 결과 75% 이상의 높은 상동성을 나타내었고, human과 mouse에서는 56%의 상동성을 보였다. 아무런 자극을 하지 않은 건강한 돌돔 3마리에서 liver, spleen, head kidney, body kidney, gill, brain, muscle, leukocyte, eye, stomach, intestine, skin, heart를 분리하여 semi-quantitative RT-PCR로 면역 유전자 발현을 비교한 결과 조사한 모든 조직들에서 돌돔 TRAF2 유전자가 모두 발현되는 것을 알 수 있었고, TRAF2발현을 분석한 돌돔 3마리에서 동일하게 spleen, gill, leukocytes, intestine, skin에서 가장 높게 발현되었다. TRAF2는 $\text{TNF-}\alpha$ 가 NF- κB 활성을 유도하는데 필수적이며, 돌돔 TRAF2에 의한 NF- κB 활성을 알아 보고자 하였다. NF- κB reporting vector가 Transfection 된 EPC cells에 돌돔 TRAF2 발현 vector와 control

vector를 Transfection 하였으며, 돌돔 TNF- α 재조합 단백질 1 μ g/ml로 자극하여 12시간, 24간 NF-kB 활성을 측정하였다. 아무런 자극을 하지 않은 cells에 비해 TNF- α 로 자극을 한 cells에서 NF-kB 활성이 높게 나타났으며, 돌돔 TRAF2 발현 vector가 들어가 있는 EPC cells 에서 control vector가 들어있는 EPC cells보다 더 높은 NF-kB 활성 양상이 나타났다. 이 결과 돌돔 TRAF2는 TNF- α cell 신호에 관련 하고 있는 NF-kB 활성을 유도하데 관여 할 것이라 생각 된다.



VI. 감사의 글

처음 실험을 하면서 꾸중도 많이 듣고 실수도 많이 하여 ‘내가 과연 잘 할 수 있을까’ 하며 고민하던 때가 엇그제 같은데 벌써 달려가야 할 길을 모두 달려 그 끝을 눈앞에 두게 되었습니다. 부족한 저에게 공부할 수 있게 해 주시고, 실험실 생활이며 여러모로 많은 도움을 주신 김기홍 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 부족한 제 논문을 검토해 주신 정현도 교수님, 정준기 교수님께도 깊은 감사를 드리며, 항상 따뜻한 눈길을 보내 주시는 박수일 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사를 드립니다. 자주 연락 못 드려 죄송하지만 언제나 변함 없으신 박성우 교수님께도 감사를 드립니다. 실험실 생활을 하며 정신적으로 많은 위안이 되어 주신 매니저 예재 선배님과, 실험하는 동안 많이 의지하고, 많은 도움 주신 민선 선배, 애증관계인 승혁 선배 모두에게 정말 깊이 감사 드립니다. 1년 동안 옆 자리에 앉아 많이 정들고 기쁨과 슬픔을 함께 공유한 쌍둥이 선영이, 여전히 약간 어색한 사이인 특별한 병철이, 아직 어설픈 것도 많지만 열심히 하는 모습이 이쁜 간죽쟁이 대한이, 지금 밖에서 돈 버느라 고생하는 친구 같은 동생 지윤이를 비롯하여 어패류 기생충학 실험실 모든 선, 후배님들께도 감사를 드립니다. 가끔 실험실 생활에 답답해 할 때 마다 격려해주고 웃게 해준 효진, 민정, 문정, 지영 너무 고맙고, 바쁘다는 핑계로 모임에 잘 참석하지 못해도 날 이해해주라 믿는 우리 썬보스비시 멤버 현정, 경마니, 재룡, 대장, 변소, 종갈이 너무 보고 싶고, 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 또한 멀리서 항상 격려와 관심을 보내주시는 우리 S.M 선배님들에게 감사 드리고, 실험하느라 힘들다고 칭얼대고 짜증 부려도

묵묵히 다 받아주고 이해해주고 든든한 버팀목이 되어준 우리 포와 멀리 타국에서 일하느라 힘들 텐데도 동생 잘하고 있나 걱정해주는 사랑하는 우리 언니에게도 고맙고, 사랑한다는 말 전하고 싶습니다. 마지막으로 내가 무엇을 하든 잘 할 수 있을 꺼라 격려와 믿음으로 저를 항상 지지해주시는 든든한 후원자이신 우리 부모님께도 말로 다 표현 할 수 없는 감사하고 고마운 마음을 이 논문으로나마 전하고 싶습니다.



VII. 참 고 문 헌

A. Grech, R. Quinn, D. Srinivasan, X. Badoux, R. Brink. Complete structural characterisation of the mammalian and drosophila TRAF genes: implications for TRAF evolution and the role of RING finger splice variants. *Molecular Immunology* 2000;37:721

Anne D, Amy C, Yong L, Yolanda R, Michelle K, Zheng-gang Liu. The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation. *Immunity* 2000;12:419-429

Anne D, Yong L Shoji Y, Zhiwei L, Michael K, Zheng-Gang L. The α and β subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor in response to TNF. *Mol Cell Bio* 2001;21:3986-3994

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) - a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998;12:2821-30.

Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-7.

baudv, Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11:372

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families, *N Engl J Med* 1996;334:1717–25.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996;85:803–815.

Cheng, G., Cleary, A.M., Ye, Z., Hong, D.I., Lederman, S., and Baltimore, D. Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in the CD 40 signaling. *Science.* 267, 1494–1498.

Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M, Liu Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 12:419

Freemont PS. The RING finger: a novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann NY Acad Sci* 1993;684:174–92.

García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor α from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics* 2002;54:200–7.

Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV. TNF dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNFreceptor-1 signaling complex. *Immunity*. 4:387–396, 1996

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV.(1996) TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interaction define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84:299

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.(1995) The TNF receptor 1–associated protein TRADD signals cell death and NF–kappa B activation. *Cell* 81:495

Israel A, Le Bail O, Hatat D, Piette J, Kieran M, Logeat F, Wallach D, Fellous M, Kourilsky P. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B–like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J*. 8:3793–3800, 1989

Israel A, Le Bail O, Hatat D, Piette J, Kieran M, Logeat F, Wallach D, Fellous M, Kourilsky P. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B–like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *EMBO J*. 8:3793–3800, 1989

Karin M, Ben–Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the

control of NF- κ B activity. Annu Rev Immunol. 18:621–663, 2000

Kim MS, Hwang YJ, Yoon KJ, Zenke K, Nam YK, Kim SK, Kim KH. Molecular cloning of rock bream (*Oplegnatus fasciatus*) tumor necrosis factor- α and its effect on the respiratory burst activity of phagocytes. Fish Shellfish Immunol 2009;DOI:10.1016/j.fsi.2009.07.007.

Lee SY, LeeSY an Choi (1997). TRAF-interacting protein(TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor(TNFR)-and CD 30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF- κ B activation. J. Exp Med 185,1275–1285.

Lee TH, Shank J, Cusson N, Kelliher MA. The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- α -induced IkappaB kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. J Biol Chem. 279:33185–33191, 2004

Leon Grayfer , Miodrag Belosevic. Molecular characterization of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 of the goldfish (*Carassius auratus* L.). Molecular Immunology 46 (2009) 2190–2199

Leon Grayfera, John G. Walshc, Miodrag Belosevic. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor

necrosis factor- α . Developmental and Comparative Immunology (2008) 32, 532–543

Li H, Yuan J. Deciphering the pathways of life and death. Curr Opin Cell Biol. 11:261–266, 1999.

Praveen K, Evans DL, Jaso-Friedmann L. Constitutive expression of tumor necrosis factor- α in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. Mol Immunol 2006;43:279–91

Rothe J, Gehr G, Loetcher H, Lesslauer W. Tumor necrosis factor receptor – structure and function. Immunol 1992;11:81–90

Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor 2 and CD40. Science. 269:1424–1427, 1995

Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. Cell. 78:681–692, 1994

Sudhir G. Tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in T cell from aged humans: a role of TNF-R1 and downstream signaling molecules. Experimental Gerontology 2002;37:293–299

Tada k, Okazzki T, Sakon S, Kvbarai T, Kurosawa K, Yamanko S, Hashimoto H, Mak TW, Yagita H, Okumura K, Yeh WC, Nakano H.(2001) Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. J Biol Chem. 276:36530

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. Immunol Today. 13:151-153, 1992

Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B .(1996) RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. EMBO J. 15: 6189

Tsitsikov EN, Wright DA and GEha RS(1997) CD 30 induction of human immunodeficiency virus gene transcription is mediated by TRAF2. Proc. Natl. Acad. Sci USA 94, 1390-1395.

Veronique B, Michael K. Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor and Its Relatives. TRENDS in Cell Biology 2001;11:119-223

Véronique Baud and Michael Karin. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. TRENDS in Cell Biology Vol.11 No.9 September 2001

Xu Z, Nie P, Sun B, Chang M. Molecular identification and

expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 in grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007;39:857–68.

Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., et al. 1997. Early lethality, functional NF- κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* **7**: 715–725.

Zou J, Secombes CJ, Long S, Miller N, Clem LW, ChincharVG. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev Comp Immunol* 2003; 27:845–58.

