

자가면역 당뇨병모델인 NOD mouse의 ontogeny에 따른 GAD 유전자의 특이한 발현양상

유한양행 연구소 생물제품연구실, 아주대학교 의과학연구소 내분비연구실*

고 인 영 · 감 열*

서 론

인슐린의존형 당뇨병(제1형 당뇨병)은 유전적 및 환경적 요인이 복합적으로 작용하여 궁극적으로 인슐린을 생산하는 췌장 베타세포에 대한 면역반응이 항진되고, 항진된 면역체계가 베타세포를 파괴함으로써 발병하는 자가면역질환으로 알려져있다¹⁾. 베타세포의 파괴와 관련하여 나타나는 자가면역현상은 크게 T 세포에 의한 세포성 면역반응과 여러가지 자가항체의 생성과 연관된 체액성 면역반응을 들 수가 있다. 이러한 자가항체는 크게 항소도세포질 항체(ICA; islet cell cytoplasmic antibody)와 항소도표면 항체(ICSA; islet cell surface antibody)로 나눌 수 있는데 지금까지 자가항원의 특성이 알려진 것 들에는 인슐린²⁾, carboxypeptidase H³⁾, ganglioside⁴⁾, heat shock protein⁵⁾, BSA (bovine serum albumin)⁶⁾, insulin secretory granule⁷⁾, tyrosine phosphatase⁸⁾ 등이 알려져 있다. 특히, 1990년 Baekkeskov 등⁹⁾에 의해 알려진 자가항원으로서 glutamate에서 gamma aminobutyric acid(GABA)를 생성하는 효소인 glutamate decarboxylase(GAD: EC 4.1.1.15)는 인체에서 뿐만 아니라 인슐린의존형 당뇨병연구의 동물모델인 non-obese diabetic(NOD) mouse와 biobreeding(BB) rat에서도 공통적으로 발견되는 것

으로 보고가 되어 인슐린의존형 당뇨병의 발병과 관련하여 많은 연구가 이루어 졌다^{10~12)}.

GAD는 각각 67KDa(GAD67)과 65KDa(GAD65)의 두가지 isoform이 존재하는데 각각 서로 다른 chromosome에 있는 gene에서 만들어 진다¹³⁾. 각각의 isoform 사이에는 약 65~67%의 nucleotide homology가 존재하며, brain 형태와 islet 형태는 99% 이상 유사하고, 서로 다른 종간에도 약 90% 이상의 homology가 존재하여 진화과정에서도 매우 conserved 되어 있는 것으로 알려져 있다^{14,15)}. 또한, GAD65는 세포질에서와 세포막 결합 상태에서 모두 발견이 되며, 대부분이 co-factor인 PLP(pyridoxal phosphate)가 없는 apoenzyme 상태로 존재하는 반해 GAD67은 주로 세포질에만 존재하며, PLP와 결합되어 있는 holoenzyme 상태로 존재하는 서로 다른 특성을 가지고 있다¹⁶⁾. 이러한 GAD 단백질의 췌장 소도세포에서의 역할에 대하여는 아직 자세히 밝혀지지 않았으나, 최근의 보고에 의하면 인슐린 분비작용이나 췌장 소도세포의 분화 및 발달과 관련이 있을 것으로 추정하고 있다¹⁷⁾.

또한, 제1형 당뇨병 환자의 경우 GAD에 대한 자가항체가 당뇨병의 임상중세가 나타나기 수개월 또는 수년 전부터 혈액내에 존재하는 것이 밝혀짐으로서¹⁰⁾, GAD 단백질이 제1형 당뇨병 발병의 초기 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 추정하였다. 이와 관련하여 제1형 당뇨병 연구의 대표적인 동물모델인 NOD mouse를 사용한 실험에서도 GAD 단백질의 면역에 의한 면역관용의 유발이나 GAD 항원에 대한 T세포 면역반응의 유실 등의 결과를 관찰함으로써^{18,19)} GAD 단

접수일자: 1997년 5월 19일

통과일자: 1997년 7월 15일

책임저자: 고인영, 유한양행 중앙연구소

백질이 NOD mouse의 당뇨병 발병과 밀접한 관련이 있다는 것을 제시하였다.

최근들어 GAD 유전자 발현에 대한 연구와 관련하여 여러 보고가 이루어 졌는데, Kim 등²⁰⁾은 immunoblotting 방법을 사용한 실험에서 인체의 췌장세포에는 단지 GAD65 isoform만이 존재하나 mouse에서는 GAD65 및 GAD67 두가지 형태가 모두 존재한다는 것을 보고하였다. 그러나, Faulkner-Jones 등²¹⁾은 in-situ hybridization 방법을 사용하여 mouse 췌장세포에서의 GAD isoform 발현을 측정한 결과 GAD67 isoform만이 존재하는 것을 관찰 보고하였으며, 인체와 mouse에서 GAD 유전자 발현 양상도 다르다는 것을 제시하였다. 또한 Velloso 등²²⁾은 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법을 사용하여 NOD 췌장에서의 GAD RNA 발현을 측정한 결과, GAD67 및 GAD65 두가지 형태가 모두 발현되나 GAD67 isoform이 GAD65 isoform보다 훨씬 많이 발현되는 것을 관찰하여 NOD mouse에서의 GAD isoform의 발현 형태가 특이하다는 것을 제시하였다. Martignat 등²³⁾은 semi-quantitative RT-PCR 방법으로 NOD mouse에서의 GAD67 유전자의 발현을 측정하였으며 NOD mouse에서 GAD67 유전자의 발현이 생후부터 30일 까지는 증가하다 그 후에는 점차 감소하는 경향을 보이는 것으로 보고하였다. 최근에는 Pleau 등²⁴⁾이 quantitative RT-PCR 방법을 사용한 실험결과 5주령 이후의 NOD mouse에서 GAD67 유전자의 발현이 대조군인 Balb/C나 C57BL과 비교하여 5배 이상 높게 나타나며, GAD65 유전자의 발현에서도 NOD mouse가 대조군과 비교하여 현저하게 낮은 것으로 보고하였으나, 아직까지 NOD mouse의 ontogeny와 관련한 GAD65 및 GAD67 유전자의 발현에 대하여는 자세히 알려져 있지 않은 상태이다.

따라서, 본 실험에서는 NOD mouse의 pancreas에서 ontogeny와 관련한 GAD65 및 GAD67 유전자의 발현 차이를 RT-PCR과 Southern blot 방법을 사용하여 측정하였으며, 대조군으로서 ICR mouse를 사용하여 비교하였다.

대상 및 방법

1. 실험대상

본 실험에서는 NOD/Ed(Edmonton strain; Dr. Rabinovitch, Univ. of Edmonton, Canada)로부터 분양 받아 유한양행 중앙연구소 동물사육실에서 breeding하여 얻은 NOD/Yh strain을 사용하였으며, 이 strain의 당뇨병 발병률은 female의 경우 31.8%(168/529), male은 0%(0/592)로서 암수 간의 당뇨병 발병률에 현저한 차이가 있었다. NOD/Yh의 사육조건으로는 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 상대습도(30~70%), 환기회수(12~15회/시간), 조도(300 Lux이상, 12시간주기)를 유지하였고, 사료는 (주)삼양유지의 실험동물용 고형사료와 filter(5 μm ~10 μm)에서 여과한 수도물을 자동공급장치로 공급하였다.

Total RNA분리를 위하여 neonate(생후 2~3일)는 10마리, 4주, 8주, 12주, 16주, 20주된 NOD female은 각각 3마리를 사용하였으며, 대조군으로는 동일한 연령의 ICR female mouse를 사용하였다.

2. RNA 분리

Total RNA는 Chomczynsky와 Sacchi의 방법²⁵⁾을 변형하여 분리하였다. 먼저 각 연령의 NOD mouse에서 10~20mg의 췌장을 떼어낸 후 즉시 5mL의 lysis 용액(4M guanidine thiocyanate, 25mM sodium citrate [pH 7.0], 0.5% sarkosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)에 넣고 homogenizer로 30초간 분쇄시켰다. 1/10부피의 2M sodium acetate(pH 4.5)를 넣고 물로 포화시킨 phenol을 동량 넣은 다음 1/5부피의 chloroform을 넣고 vortex 혼합하였다. 얼음위에서 15분간 방치한 후 4 $^\circ\text{C}$ 에서 12,000g로 15분간 원심분리하고 상등액만 조심스럽게 얻은 후 같은 양의 isopropanol을 넣어 -20 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 방치하고 12,000g로 원심분리하여 RNA만 침전시켰다. 70% 에탄올로 세척 후 진공 건조하고 0.5mL의 DEPC(diethyl pyrophosphate) 처리된 증류수에 RNA를 녹여 260nm에서 흡광도를 측정, 정량하였다.

Table 1. Nucleotide Sequence of Amplification Primers and Hybridization Probes

Mouse β -actin*	
forward primer	: 5'-CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3'
backward primer	: 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG-3'
hybridization probe	: 5'-GCCCATCTACGAGGCTATGCTCTCCCTCACG-3'
Mouse GAD65	
forward primer	: 5'-CCAAAAACCCTGCAACTGCCCCAAAGG-3'
backward primer	: 5'-GCATATTTTAGAGTTGTTTGCAATGC-3'
hybridization probe	: 5'-CCCAATGAGCTTCTTCAAGAGTATAATTGG-3'
Mouse GAD67	
forward primer	: 5'-ACAGTGACCAGGGTGCCCGCTTCCGG-3'
backward primer	: 5'-GCGAACCCCGTACTTCAGGGTGTCTC-3'
hybridization probe	: 5'-ACACCAGTTGCTGGAAGGCATGGAAGGCTTT-3'

* Sequence information of mouse β -actin was obtained from Genbank data search using Entrez(www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)

3. cDNA 합성

RNA로 부터 cDNA를 합성하기전 먼저 RNase가 없는 DNase I(Boehringer Mannheim)을 37°C에서 30분간 처리(1.5U/1ug RNA)하여 DNA를 제거하고 75°C에서 5분간 처리하여 DNase를 불활성화 시켰다. cDNA는 Pharmacia사의 first strand synthesis kit(cat. No 27-9261-01)를 이용하여 합성하였다. 4 μ L의 증류수, 5ul의 완충액, 1 μ L의 dithiothreitol, 1 μ L의 random primer(0.2ug/ μ L), 4 μ L(0.5ug/ μ L)의 RNA용액을 섞고 37°C에서 한시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 PCR 증폭 때까지 -20°C에서 보관하였다.

4. PCR 증폭

NOD 및 ICR mouse의 췌장 RNA에서 GAD65 및 GAD67의 발현양을 비교하기위한 PCR 증폭 방법은 Velloso 등²³⁾의 방법을 사용하였다. 2 μ L의 cDNA합성 용액, 5 μ L의 primer(10pmole/ μ L), 4 μ L의 4 dNTP (2.5mM), 5 μ L의 완충액, 34 μ L의 증류수와 0.5 μ L의 ExTaq polymerase(Takara, 5 U/ μ L)을 섞고 94°C에서 5분간 변성시켰다. 증폭은 94°C에서 45초 변성, 60°C에서 1분 annealing하였으며, 72°C에서 45초간 합성의 과

정을 β -actin은 30회, GAD65 및 GAD67은 40회 증폭하여 비교하였다. 증폭에 사용한 primer는 이미 보고된 rat의 GAD65와 GAD67의 염기서열^{13,15)}에서 서로 상동성이 없는 위치로부터 인용하였으며, 각각의 primer가 서로 교차반응성이 없는 것을 확인한 후 PCR 증폭에 사용하였다. Hybridization probe는 GAD65 및 GAD67 primer로 증폭된 부위의 중간의 염기서열로부터 인용하였으며 본 실험에 사용된 primer들의 염기서열은 Table 1에 표시하였다.

5. Southern transfer

증폭된 PCR용액 10 μ L를 1% agarose 겔 상에서 전기영동하여 증폭된 DNA를 분리한 다음 EtBr 용액으로 DNA를 염색하여 UV상에서 증폭된 DNA를 관찰하였다. 3M NaCl, 0.4M NaOH 용액에 겔을 30분간 담궈 전기영동한 DNA를 변성시키고 다시 겔을 transfer 용액(3M NaCl, 0.8M NaOH)에 10분간 담근 후 nylon membrane(Schleicher & Schuell, cat. No 01020)을 겔에 접착시켰다. 각각 위와 아래에 2장의 3MM (Whatman, cat. No 3030-6185) paper를 접촉시켜 downward transfer 방법으로 1~2시간동안 DNA를 nylon membrane으로 옮긴 다음 중화용액(0.2M

sodium phosphate, pH 6.8)에 membrane을 담궈 중화시킨 후 건조시켰다. DNA는 80°C에서 30분간 baking하여 nylon membrane에 고정시켰다.

6. Probe labelling

Hybridization에 사용할 probe를 5'-말단 kination 방법을 사용하여 방사선 동위원소 ^{32}P -ATP로 labelling시켰다. $1\mu\text{L}$ 의 probe oligonucleotide($10\text{pmole}/\mu\text{L}$), $2\mu\text{L}$ 완충액(10x), gamma ^{32}P -ATP(Amersham, $3,000\text{Ci}/\text{mmole}$, $10\text{mCi}/\text{mL}$), $13\mu\text{L}$ 증류수, $1\mu\text{L}$ 의 T4 polynucleotide kinase($10\text{U}/\mu\text{L}$)를 섞은 후 37°C 에서 4분간 반응시킨 후 68°C 에서 10분간 처리하여 효소를 불활성화시켰다. 여기에 $40\mu\text{L}$ 의 증류수, $69\mu\text{L}$ 의 7.5M ammonium acetate를 넣고 $325\mu\text{L}$ 의 -20°C 의 에탄올을 첨가하여 oligonucleotide를 침전시킨 다음 원심분리($12,000\text{g}$, 10분)하여 상등액에 존재하는 반응하지 않은 ^{32}P -ATP를 제거하였다.

7. Hybridization

Nylon membrane을 비닐백에 넣고 $0.1\text{mL}/\text{cm}^2$ 양의 prehybridization 용액($6 \times \text{SSC}$, $5 \times \text{Denhardt's solution}$, 0.5% SDS, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ salmon sperm DNA)을 넣고 65°C 에서 흔들면서(50rpm) 4시간 반응시켜 membrane을 blocking시켰다. 그 다음 prehybridization 용액을 제거하고 동량의 hybridization 용액($6 \times \text{SSC}$, 0.01M sodium phosphate [pH 6.8], 1mM EDTA, 0.5% SDS, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ salmon sperm DNA)과 $1\text{pmole}/\text{mL}$ 의 labelled probe를 넣은 후 65°C 에서 16시간 hybridization 시켰다. Membrane을 세척용액($2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS)에 옮겨 65°C 에서 10분간 3회 세척한 후 상온에서 건조시키고 X-ray 필름에다 8시간 감광시켜 현상하였다.

결 과

1. NOD mouse에서 GAD65 및 GAD67의 발현

Table 1은 GAD65 및 GAD67을 증폭시키기 위하여 사용한 primer set와 internal control로 사용한 β -actin

primer, 또한 hybridization probe로서 GAD65 및 GAD67의 internal sequence로부터 합성한 primer의 염기서열을 보여주고 있다. NOD mouse의 췌장 total RNA로부터 RT-PCR 방법을 사용하여 GAD65 및 GAD67의 상대적인 발현양 차이를 비교하기 위하여는 일차적으로 Velloso 등²²⁾의 방법에 따라 PCR 증폭회수에 따른 조건을 비교하였다. $2\mu\text{g}$ 의 total RNA로부터 동일한 PCR 조건에서 증폭회수만을 25회, 30회, 35회, 40회로 변화하여 PCR 수행한 결과 GAD65 및 GAD67은 35회 부터 미약한 PCR band가 관찰되기 시작하여 40회에서 명확한 차이가 나타났으며, β -actin의 경우에는 30회 증폭시에도 PCR band의 확인이 가능하였다. 따라서 $2\mu\text{g}$ ($4\mu\text{L}$)의 total RNA와 각각의 primer set를 사용하여 GAD65 및 GAD67은 40회씩 증폭시켰으며, β -actin의 경우에는 30회를 증폭하여 비교하였다. 이러한 결과는 GAD65나 GAD67 RNA가 β -actin보다 극히 적은 양 존재하기 때문인 것으로 추정되었으며, GAD65와 GAD67사이의 상대적 증폭결과의 비교에 문제점은 없었다. 증폭된 PCR 용액($10\mu\text{L}$)은 agarose 겔상에서 전기영동 한 다음 EtBr 용액으로 염색하여 일차적으로 band 강도를 비교하였다. 동일한 겔을 다시 NaOH 용액에 넣어 DNA를 변성시킨 후 nylon membrane에 이동시킨 다음 ^{32}P -ATP로 labelling된 각각의 hybridization probe(Table 1)를 사용하여 hybridization 시키고 X-ray 필름에서 8시간 감광시켜 autoradiography를 수행하였다.

Fig. 1은 Southern blot(1A) 및 densitometric scanning(1B) 결과를 나타내는 것으로서 NOD mouse에서는 neonate의 경우 GAD67 RNA가 GAD65에 비하여 6배 이상 많이 발현되었으며, insulinitis가 시작되는 4주 이후부터 그 발현량이 급격히 감소하여 12주 이후부터는 그 발현량이 극히 미세하였다. 4주 이후부터의 GAD65 및 GAD67 발현량의 감소 현상은 NOD mouse의 경우 insulinitis의 시작과 함께 췌장 베타세포의 파괴현상이 일어나기 때문인 결과로 추정되나, NOD neonate에서의 GAD67의 높은 발현양은 NOD mouse에서만 특이적인 양상인 것으로 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Pleau 등²⁴⁾이 5주령의 NOD mouse에서 GAD67의 발현량이 대조군인 Balb/C나 C57BL 보다 5

Fig. 1A. Southern hybridization and autoradiography of PCR amplified GAD65 and GAD67 pancreatic mRNA from NOD and ICR mouse at different ages. The pancreas was isolated from female NOD and age-matched female ICR mouse, and subjected to total RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate method as described in materials and methods. After RT-PCR amplification using GAD65 - and GAD67 - pefic primer, the PCR product was blotted onto the nylon membrane and southern hybridized using radio-labelled hybridization probe(see table 1). Actin expression was measured in parallel as an internal control.

배 이상 높다고 보고한 결과와도 일치하는 것이었다. 그러나 Martignat 등²³⁾은 NOD mouse에서 GAD67의 발현량이 생후부터 증가하여 30일 까지 증가하다가 그 후에는 점차적으로 감소하는 것으로 관찰 보고하여 본 연구결과와는 다소 상이하였다. NOD mouse에서 GAD isoform간의 특이적인 발현을 차이를 GAD65의 낮은 발현특성으로 추정 할 수도 있었으나, ICR mouse와 비교하여 볼 때 ICR neonate나 NOD neonate 사이에 GAD65의 발현량에 있어서는 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 NOD neonate에서의 높은 GAD67 발현은 NOD mouse에 특이한 현상인 것을 알 수 있었다. 이외는 달리 ICR mouse에서는 neonate에서도 GAD65와 GAD67의 발현량의 차이가 없었으며 4주이후부터 20주 까지에도 두 GAD isoform간에 발현량 차이는 관찰되지 않았다. 본 실험에서 internal control로 사용한

β -actin 의 경우 ICR이나 NOD에서 모두 일정한 수준으로 발현이 되었으며, 두 strain간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

지금까지 NOD neonate에서 GAD67의 특이하게 높은 발현량이 NOD mouse에서의 당뇨병 발병과 어떠한 관련이 있는지에 대하여는 아직까지 밝혀진 바가 없으며, 이에 대하여는 추후 지속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

고 찰

NOD mouse는 human IDDM 연구의 가장 근접한 동물모델로서 BB rat과 함께 널리 이용되고 있다. 비록 NOD mouse의 경우 female에서의 당뇨발생률이 male과 비교하여 현저하게 높은 차이점을 가지고 있으나,

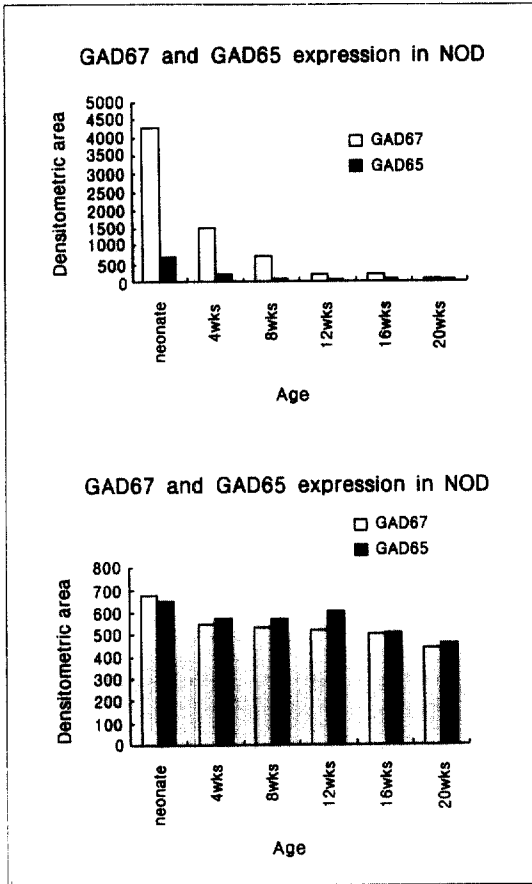


Fig. 1B. Densitometric scanning of autoradiogram for GAD65 and GAD67 expression in NOD(upper) and ICR(lower) mouse

insulinitis의 발생, 췌장 베타세포를 공격하는 T 세포의 존재, 자가항체의 존재 등에서 인체에서의 당뇨병 병인과 유사한 발병기작을 가지고 있을 것으로 추정되고 있다. 일반적으로 NOD mouse의 경우 생후 4~5주부터 췌장소도세포에 면역세포들이 침투하기 시작하여 insulinitis 현상을 나타내며, 췌장소도세포의 파괴가 80~90% 이상 진행된 15~20주부터 전반적인 당뇨증상을 나타내는 것으로 알려져있다²⁶⁾.

본 실험에서는 NOD mouse에서의 GAD 유전자 발현과 관련하여 NOD mouse의 ontogeny에 따른 GAD65 및 GAD67 isoform의 발현차이에 대하여 실험하였으며, 그 결과 NOD mouse에서는 GAD isoform

유전자의 발현이 대조군인 ICR mouse와 비교하여 매우 특이한 발현 양상을 보이는 것을 관찰하였다.

NOD mouse의 경우 GAD67 유전자의 발현량이 GAD65에 비하여 6~8배이상 높게 나타났는데 이러한 차이는 neonate에서부터 시작하여 12주 이후까지 계속되었다. 이와는 달리 대조군으로 사용한 ICR의 경우 GAD67이나 GAD65 유전자의 발현양에 차이가 없었으며, 모든 연령에 걸쳐 일정하게 발현되는 것으로 나타나 NOD mouse에서의 GAD67 유전자의 높은 발현 양상은 매우 특이한 현상으로 추정되었다. 또한, NOD mouse에서는 GAD67 및 GAD65 유전자의 발현이 neonate에서 가장 높았으며, 그후 점차적으로 감소하여 12주 이후부터는 미약한 양만이 측정되었는데, 이러한 결과는 NOD mouse에서의 insulinitis와 관련하여 췌장 베타세포의 점진적인 파괴과정과 관련이 있는 것으로 추정된다.

Martignat 등²³⁾은 NOD mouse에서 GAD67의 발현이 GAD65보다 상대적으로 높고 GAD67의 발현이 neonate에서부터 30일까지는 증가하다가 그후 점차 감소하는 것으로 보고하였으나 본 연구자들은 neonate에서 가장 높으며, 그후 급격히 감소하는 것으로 나타나 다소 상이한 결과였다. Pleau 등²⁴⁾도 5주, 10주, 15주의 NOD mouse 췌장에서 GAD67 유전자의 발현이 대조군인 Balb/C나 C57BL/6 보다 5배 정도로 높게 나타나는 것으로 보고하였는데 이러한 결과는 본 연구자들의 결과와 유사한 것이었다. 그러나, GAD65 유전자의 경우 Pleau 등²⁴⁾은 NOD female에서의 발현량이 대조군과 비교하여 5주에서만 4~5배 낮게 발현되고 그 이후에는 대조군과 비슷한 비율로 감소하는 경향을 관찰하였으나, 본 연구자들의 결과에서는 NOD neonate에서는 GAD65의 발현량이 대조군인 ICR mouse와 비슷한 수준을 보이다가 4주이후 부터 급격히 감소하여 대조군보다 매우 낮은 발현 양상을 보여주었다.

본 실험에서는 NOD mouse의 췌장만 사용하여 GAD 유전자의 발현을 비교하였기 때문에 NOD mouse strain의 모든 조직세포에서 나타나는 일반적인 현상일 가능성을 배제할 수 없었으나, Pleau 등²⁴⁾의 결과에서 NOD brain에서의 GAD65 및 GAD67 유전자의 발현량은 대조군과 차이점이 없는 것으로 보아,

NOD mouse에서의 GAD isoform의 발현차이는 췌장 세포에서 특이하게 나타나는 것으로 고찰되었다. 그러나, GAD65 isoform이 췌장의 베타세포 뿐만 아니라 알파세포나 델타세포에의 세포질에도 존재하는 것이 밝혀져 있으므로²⁷⁾ 위와 같은 일련의 결과가 이러한 비 베타세포로부터 야기될 수 있다는 가정을 전혀 배제할 수는 없었다.

또한, 본 실험결과 NOD neonate에서 GAD67 및 GAD65 유전자의 발현량에 현저한 차이가 있었는데 이러한 현상은 GAD67 유전자의 특이적인 과다발현 측면과 GAD65 유전자의 발현억제의 두가지 측면에서의 가정이 가능하였다. 그러나, ICR mouse와 비교하여 볼 때 ICR neonate나 NOD neonate 사이에 GAD65의 발현량에 있어서는 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 NOD neonate에서의 높은 GAD67 발현은 NOD mouse에서의 GAD67 유전자의 특이적인 과다발현 현상인 것으로 추정된다. 이와 관련하여 췌장 베타세포에서 GAD67 및 GAD65의 균형이 베타세포에서의 GAD 유전자 기능 유지에 중요하다는 보고가 있어²⁸⁾, GAD isoform의 발현이 췌장베타세포의 functional development에 매우 중요한 역할을 하며, NOD mouse에서 GAD isoform의 dysfunction에 의하여 베타세포의 파괴가 나타날 수 있다는 추정도 가능하였다. 췌장세포에서의 GAD65가 insulin 분비작용과 관련이 있을 것이라는 보고도²⁹⁾ 췌장세포에서의 GAD의 발현이 베타세포의 기능에 중요한 역할을 하며, 이의 불균형이 당뇨병의 발병과 관련이 있을 수 있다는 것을 제시하였다. 또한, NOD mouse에서의 GAD 유전자의 특이한 발현 양상에 대하여 당뇨병 발병비율이 높은 NOD female에서만 hormonal effect일 가능성도 제시되었으나³⁰⁾ 이에 대하여는 아직까지 확실한 결과가 보고되어 있지는 않은 상태이다.

흥미로운 것은 mouse에서 GAD isoform 발현의 특이적인 양상은 human을 대상으로 유사한 실험을 진행하여 보고된 결과와는 달라 mouse에서의 GAD 유전자의 역할이 human과는 다를 수 있다는 것이었다. Peterson 등²⁷⁾은 GAD 유전자의 발현에 대하여 일찍이 보고한 바 있는데, rat에서는 GAD65와 GAD67 mRNA가 모두 췌장소도세포에서 발견되나 human의

경우에는 GAD65 mRNA만을 관찰하여, human에서의 GAD 유전자 발현이 rat와는 달리 특이한 양상을 가지고 있다는 것을 발표하였다. 그후 Mally 등²⁸⁾도 human에서 developmental stage에 따른 췌장세포에서의 GAD isoform 발현에 대한 연구 결과로써 GAD65 유전자의 발현이 GAD67보다 현저하게 높은 것을 관찰 보고하였으며, human에서 GAD65 유전자의 발현이 췌장소도세포의 development에 중요한 역할을 하는 것으로 제시하였다. 또한 이들은 Petersen 등²⁷⁾의 보고와는 달리 human islet에도 미량의 GAD67 isoform이 존재한다는 것을 관찰하였으나, 이러한 차이는 각각의 실험에서 사용한 방법의 민감도 차이에서 나타나는 것으로 고찰하였다.

그러나, 이들의 결과가 직접 IDDM patient를 대상으로 하여 얻은 결과가 아니기 때문에 NOD mouse에서 관찰된 GAD isoform 유전자의 특이적인 발현특성과 직접적인 고찰이 불가능하였으며, 이에 대하여는 앞으로 비교연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 그러나, human에 있어서는 GAD65가 소아기에서의 endocrine development 뿐만 아니라 성년기에서의 췌장소도세포 기능유지에 중요한 역할을 한다는 것을 제시함으로써 위에서 언급한 GAD isoform의 췌장 베타세포에서의 functional role을 재확인하여 주었다.

결론적으로 NOD mouse에서는 GAD 유전자의 발현 양상이 췌장의 ontogeny에 따라 매우 특이하게 나타나며, 또한 이러한 발현양상은 인체의 경우와도 상당히 다르다는 것을 제시하였고, 이러한 점에 있어서는 앞으로 좀더 연구결과가 뒷받침되어야 하겠지만, 적어도 NOD mouse에서와 인체에서 당뇨병 병인과 관련된 GAD 항원/항체의 역할이 다를 수도 있다는 것을 제시하였다.

요 약

연구배경: 제1형 당뇨병 연구에서 대표적인 자가항원으로 알려진 glutamate decarboxylase(GAD; EC 4.1.1.15)는 두개의 isoform(GAD65 및 GAD67)으로 존재하는 것이 밝혀져 있으며, 당뇨병의 발병 병인과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 본 연구에

서는 제 1 형 당뇨병 연구의 동물모델로 널리 사용되고 있는 non-obese diabetic(NOD) mouse를 사용하여 NOD mouse에서 ontogeny와 관련하여 각각의 GAD isoform의 발현특성을 polymerase chain reaction (PCR) 및 Southern blot 방법을 사용하여 대조군과 비교하였다.

방법: 암능 NOD mouse와 대조군인 ICR mouse의 췌장을 연령별(생후 2~3일, 4주, 8주, 12주, 16주, 20주)로 취한 후 RNA를 분리하고, 합성한 GAD65-specific primer와 GAD67-specific primer를 사용하여 효소중합 연쇄반응으로 증폭하였다. 증폭후 nylon membrane에 transfer하고 ³²P-ATP로 labelling된 hybridization probe를 사용하여 Southern blotting 함으로써 NOD mouse의 ontogeny와 관련한 GAD65 및 GAD67 유전자의 발현양상을 비교하였다.

결과: GAD65 RNA가 NOD mouse의 neonate에서는 미량 발현되나 insulinitis가 나타나기 시작하는 4주 이후(8주, 12주, 16주, 20주까지)에는 거의 감지되지 않았다. 이외는 달리 GAD67 RNA는 neonate에서 GAD65 RNA보다 6배 이상 발현되었으며, 그후 조금씩 줄어드는 양상을 보였으나 16주 까지에도 GAD65 RNA에 비하여는 상당량이 발현되는 것으로 나타났다. 그러나 대조군으로 사용한 ICR mouse에서는 GAD65 RNA나 GAD67 RNA 모두 neonate부터 일정량 발현되어 adult 시기까지 일정하게 유지가 되었다.

결론: NOD neonate에서 GAD67 유전자의 발현이 GAD65와 비교하여 특이하게 높게 발현 되었으나, 대조군인 ICR mouse에서는 GAD isoform간의 발현양 차이가 없었다. 또한 NOD 마우스에서는 GAD67 및 GAD65의 발현이 4주이후 부터 급격히 감소하였는데 이러한 결과는 췌장 베타세포에서의 insulinitis와 관련이 있는 것으로 추정하였다. 결론적으로 NOD mouse에서는 GAD isoform의 발현이 매우 특이하게 나타났으며, 이러한 특이한 GAD isoform 발현 양상이 당뇨병의 발병과 관련이 있을 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한, GAD 항원 및 GAD 자가항체와 관련한 NOD mouse에서의 당뇨병 발병 병인이 인간의 경우와는 다를 수도 있다는 것을 제시하는 결과였다.

= Abstract =

Distinct Pattern of GAD65 and GAD67 Gene Expression in the Pancreas of NOD Mouse

In Young Ko, Ph.D. and Yup Kang, Ph.D.*

Lab of Biotechnology, Yuhan Research Center, Yuhan Pharmaceutical Co., Kunpo, Korea

*Lab of Endocrinology, Institute for Medicinal Science, Ajou University, Suwon, Korea**

Background: Glutamic acid decarboxylase(GAD; EC 4.1.1.15), one of the major β -cell autoantigens in IDDM, is an enzyme which catalyzes the synthesis of major inhibitory neurotransmitter, γ -aminobutyric acid (GABA), in the mammalian brain, pancreas and other organs. Two isoforms of GAD, GAD65 and GAD67, have been identified which differ in their intracellular localization. Autoantibodies to GAD have been detected several years before the clinical onset of IDDM, implicating GAD as a leading autoantigen which somehow correlated with the pathogenesis of IDDM. We have determined the characteristics of GAD isoform expression in the pancreas of NOD mouse, an animal model extensively employed in IDDM study, using RT-PCR and Southern blot methods.

Methods: Pancreas was obtained from female NOD mouse(neonate, 4, 8, 12, 16, 20 week-old) and age-matched female ICR mouse. Total cellular RNA was isolated by acid guanidinium thiocyanate method and employed in the RT-PCR amplification using GAD65- and GAD67-specific primer designed in our laboratory. The PCR product was blotted onto the nylon membrane and subjected to Southern analysis using ³²P-ATP labelled hybridization probe.

Results: In NOD pancreas, GAD67 was expressed six times higher than GAD65 at neonatal stage. Then,

the expression was dramatically decreased from 4 weeks when the pancreatic insulinitis begins to occur. After 12 weeks of age, both GAD67 and GAD65 expression was almost undetectable. However, in control ICR mouse, there were no significant differences between GAD65 and GAD67 expression throughout the ages. And, the expression of both GAD65 and GAD67 was not decreased with ages in contrast to NOD mouse.

Conclusion: In this experiment, we found that the expression of GAD isoforms in NOD mouse shows distinct pattern in comparison to that of control ICR mouse. The expression of GAD67 was significantly higher than GAD65 in neonatal NOD mouse while, in control ICR mouse, same level of GAD isoforms expression was observed. This finding clearly suggested the possibility that the expression of GAD isoforms in diabetic NOD mouse is quite distinct and may somehow play a role in the pathogenesis of diabetes although the precise mechanism remains to be unveiled. In addition, our data also supported the hypothesis that expressional pattern, and, if possible, the etiophysiological function of GAD isoforms in NOD mouse pancreas may be quite different from that in human pancreas.

Key Words: Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), non-obese diabetic(NOD) mouse, GAD65, GAD67, RNA, RT-PCR, Southern blot, ontogeny, Expression

참 고 문 헌

- Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP: *Immunopathogenesis of diabetes mellitus. Diabetes Rev 1:43-75, 1993*
- Atkinson MA, Maclaren HK: *Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 92:1608-1616, 1993*
- Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL: *Detection of 64,000 Mr autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. J Clin Invest 92: 240-248, 1993*
- Nayak RC, Omar MAK, Rabizadeh A, Srikanta S, Eisenbarth GS: *Cytoplasmic islet cell antibodies; evidence that the target antigen is a sialoglycoconjugates. Diabetes 34:617-619, 1985*
- Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR: *Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic(NOD/Lt) mouse by a 65 KDa heat shock protein. Proc Natl Acad Sci 87:1576-1580, 1990*
- Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch HM: *A bovine serum albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. N Eng J Med 327:302-307, 1992*
- Roep BO, Arden SD, de Vries RRP, Hutton JC: *T-cell clones from a type 1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. Nature 345:632-634, 1990*
- Rabin DU, Pleasic SM, Shapiro JA, Yoo-Warren H, Oles J, Hicks JM, Goldstein DE, Rae PMM: *Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific autoantigen related to tyrosine phosphatases. J Immunology 152:3138-3188, 1994*
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgaud S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olsen H, DeCamilli P: *Identification of the 64KDa autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature 347:151-156, 1990*
- Baekkeskov S, Nielson JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark A: *Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitates specific human islet cell proteins. Nature*

- 298:167-169, 1982
11. Atkinson MA, Maclaren NK, Scharp D, Lacy PE, Riley WJ: 64000 Mr autoantibodies as predictors of insulin-dependent diabetes. *Lancet* 335:1357-1360, 1990
 12. Atkinson MA, Maclaren NK: Autoantibodies in nonobese diabetic mice immunoprecipitate 64,000 Mr islet antigen. *Diabetes* 37:1578-1590, 1988
 13. Erlander MG, Tillakaratne NJK, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ: Two genes encode distinct glutamate decarboxylase. *Neuron* 7:91-100, 1991
 14. Edelhoff S, Grubin CE, Karlsen AE, Alder DA, Foster D, Distechi CM, Lernmark A: Mapping of glutamic acid decarboxylase(GAD) genes. *Genomics* 17:93-97, 1993
 15. Bu DF, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ: Two human glutamate decarboxylase, 65KDa GAD and 67KDa GAD are each coded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci* 89:2115-2119, 1992
 16. DeAizpurua HJ, Harrison LC: Glutamic acid decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 8:133-147, 1992
 17. Gilon P, Remacle C, Janssens de Vareveke P, Pauwels G, Hoet JJ: GABA content and localisation of high affinity GABA uptake during the development of the rat pancreas. *Cell Mol Biol* 33:573-585, 1987
 18. Kaufman D, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting G, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:69-72, 1993
 19. Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau R, Fugger L, McDevitt H: Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366:72-75, 1993
 20. Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi Y, Fu Q, Rajotte R, Warnock G, Baekkeskov S: Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat, and mouse pancreatic islets. *Diabetes* 42:1799-1808, 1993
 21. Faulkner-Jones BE, Cram DS, Kun J, Harisson LC: Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat. *Endocrinology* 133:2962-2972, 1993
 22. Velloso LA, Eizirik DL, Karlsson FA, Kampe O: Absence of autoantibodies against glutamate decarboxylase(GAD) in the non-obese diabetic (NOD) mouse and low expression of the enzyme in mouse islets. *Clin Exp Immunol* 96:129-137, 1994
 23. Martignat L, Elmansour A, Audrain M, Julien JF, Charbonnel B, Sai P: Pancreatic expression of antigens for islet cell antibodies in non-obese diabetic mice. *J Autoimmunity* 8:465-482, 1995
 24. Pleau JM, Esling A, Bach JF, Dardenne M: Gene expression of pancreatic glutamic acid decarboxylase in the nonobese diabetic mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 220:399-404, 1996
 25. Chomczynsky T, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
 26. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y: Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Exp Animal* 29:1-3, 1980
 27. Petersen JS, Russel S, Marshall MO, Kofod F, Buchard K, Cambon N, Karlsen AE, Boel E, Hagopian WA, Hejnaes KR, Moody A, Dyberg T, Lernmark A, Madsen OD, Michelsen BK: Differential expression of glutamic acid decarboxylase in rat and human islets. *Diabetes*

- 42:484-495, 1993
28. Mally MI, Cirulli V, Otonkoski T, Soto G, Hayek A: *Ontogeny and tissue distribution of human GAD expression. Diabetes* 45:496-501, 1996
29. Gilon P, Remacle C, Janssens de Varebeke P, Pauwels G, Hoet JJ: *GABA content and localization of high affinity GABA uptake during the development of the rat pancreas. Cell Mol Biol* 33:573-585, 1987
30. Pleau JM, Esling A, van Acker C, Dardenne M: *Glutamic acid decarboxylase(GAD67) gene expression in the pancreas and brain of the nonobese diabetes mouse. Biochem Biophys Res Commun* 224:747-753, 1996