



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](#)

석 사 학 위 논 문

MicroRNA-124 controls proliferation
and migration of human RPE cells by
targeting RHOG

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

손 명 진

지도교수 전 중 화

2021년 2월

MicroRNA-124 controls proliferation and migration of human RPE cells by targeting RHOG

지도교수 전 중 화

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2 0 2 1 년 2 월

계 명 대 학 교 대 학 원

의학과 안과학 전공

손 명 진

손명진의 석사학위 논문을 인준함

주 심 이 동 철

부 심 전 종 화

부 심 강 경 태

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 1 년 2 월

감사문

본 논문을 제출하기까지에 많은 지지와 아낌없는 조언을 해주신 전종화 지도교수님께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 오랜시간 많은 것을 배우고 동시에 많은 일들이 있어 힘이 들어 포기하고 싶을 때도 있었지만 교수님의 많은 배려로 버텨올 수 있었던 거 같습니다. 잊지 않겠습니다. 바쁘신 와중에 심사위원이라는 무거운 자리를 맡아주신 이동철 교수님, 강경태 교수님께 감사드립니다. 아무것도 모르던 저에게 기초부터 천천히 모든 것을 알려주시고 더 나은 논문이 될 수 있도록 조언을 아끼지 않으신 이현교 박사님께 깊은 감사드립니다. 연구할 때 마다 도움을 주고 함께 해준 김하림 선생님 감사합니다.

21살 아무것도 모르는 학사로 들어와 많은 것을 배우고 경험하고 석사학위를 거둬들이기까지 많은 시간이 흘렀습니다. 많은 분들의 도움으로 여기까지 오게 되었습니다. 잊지 않겠습니다. 지금까지 제가 해온 일들을 자랑스럽게 바라봐주고 묵묵히 지켜봐준 우리가족 감사하고 사랑합니다.

2021년 2월

손 명 진

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	8
4. 고 찰	22
5. 요 약	25
참고문헌	26
Abstract	29
국문초록	31

그림목차

그림 1. 망막색소상피세포의 증식 및 합류에 의한 miR-124 및 RhoG의 발현 변화	11
그림 2. 망막색소상피세포 증식 및 생존에 대한 miR-124 형질 주입의 효과	13
그림 3. 망막색소상피세포세포 운동성에 대한 miR-124 형질 주입의 효과	16
그림 4. 망막색소상피세포 운동성에 대한 miR-124 억제제 형질 주입의 효과	18
그림 5. RHOG mRNA 3' UTR에 결합하는 miR-124 분석	20

1. 서 론

망막색소상피세포(retinal pigment epithelial cell)는 광수용(light absorption), 물질 수송(epithelial transport), 시각 회로 조절(visual cycle), 탐식 작용(phagocytosis), 호르몬 분비 및 면역조절 작용 등의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 망막색소상피세포의 이상 증식과 이동은 임상적으로 특발성망막전막(1), 당뇨병망막병증의 견인막형성(2), 증식유리체망막병증(3,4)과 같은 시력을 위협하는 망막 질환의 병리학적 기전에 있어 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

최근 약 22개의 뉴클레오타이드로 구성된 small non-coding RNA인 마이크로RNA(micro RNA, miRNA)는 다양한 유전자들의 전사 후 조절 과정에 관여하는 것으로 보고되어 주목 받고 있다. 특히 마이크로RNA는 messenger RNA(mRNA)와는 다르게 특정 유전자의 발현 억제를 주요 기전으로 하여 전체 포유류 유전자의 약 30% 정도의 발현을 조절하는데 중추적인 역할을 하는 것으로 알려졌다(5,6). 또한 최근 종양의 생리학적 조절에 관여하며 신경분화에 있어서도 핵심적인 역할을 하는 것으로 보고되면서 더욱더 관심이 집중되고 있다. 하지만 안질환의 병리학적 기전에 관련된 마이크로RNA의 조절 기작에 대한 연구는 매우 미비하여 최근까지도 마이크로RNA에 의한 망막색소상피세포의 생리학적, 병리학적 조절에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다.

일반적으로 miRNA-124는 뇌조직에 상당히 풍부하게 발현되어 있으며 중추신경계가 발현하는 전체 마이크로RNA중 약 25-48%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 특히 발생학적 측면에서 망막색소상피세포는 중추신경계 특이 세포들과 동일하게 신경외배엽에서 기원하게 되는데 최근 설치류의 발달 과정 중에 있는 안구 내에서 발현되는 마이크로RNA의 프로파일 분석을 통해 망막 색소 상피에서 miRNA-124가 발현됨을 확인함으로써 이를 통해 miR-124가 인간의 신경망막(neural retina)에서도 중요한 역할을 할 것이라는 가설을 세울 수 있었다(7,8).

한편 small GTPase Ras Homolog(RHO) family는 세포내 actin cytoskeleton의 조절인자로서 잘 알려져 있는데 명칭에서 유추할 수 있듯이 세포의 이동과 분화, 세포분열 또한 조절하는 것으로 알려져 있다. RHO GTPases는 액틴 세포 골격을 조절 및 액틴 재구성에 있어서 중요한 역할을 하며 세포 증식 및 이동 등 다양한 세포기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(9). 현재까지 miR-124의 주요 타겟 신호전달물질로서 RHOG가 보고되고 있는데 이 RHO 또한 망막색소상피세포의 증식과 이동을 조절하는 것으로 알려져 있으므로 miRNA-124는 망막색소상피세포의 증식과 이동을 조절할 가능성이 있다.

MiR-124가 RHOG를 표적화함으로써 뉴런 세포의 분화를 조절 한다는 연구 결과는 이미 알려져 있는데(10) 망막색소상피세포의 증식과 이동을 통제하는 기본적인 기능과 메커니즘은 알려져 있지 않다(11). 따라서 본 연구에서는 망막색소상피세포에서 miR-124 도입과 그에 따라 RHOG의 발현을 저해함으로써 세포생존능력과 증식 및 상처치유의 조절을 통해 망막색소상피세포 증식성 질환의 치료제 개발의 단서를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 세포주 및 세포 배양:

본 연구에서는 상업적으로 이용 가능한 불멸화 인간 망막색소상피세포주인 ARPE-19 세포를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 세포는 1% penicillin/streptomycin과 10%의 Fetal bovine serum(FBS)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium과 Nutrient Mixture F12가 1 : 1로 혼합된 DMEM/F12 = 1 : 1 배지에서 37 °C, 5% CO₂의 조건으로 배양하였다

2.2. 망막색소상피세포의 내인성 miRNA-124발현의 상대 정량 분석:

망막색소상피세포의 배양 밀도에 따른 내인성 miR-124의 상대적 발현 수준을 조사하기 위해 ARPE-19 세포를 6-well plate에 배양하였다. 세포를 계대 배양한 후 각각 24, 48, 72, 96시간에 마이크로RNA를 추출하고 마이크로RNA 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(real-time quantitative PCR, qPCR)분석을 수행하였다. 각 시점에서 상대적인 RhoG 단백질 발현량의 분석을 위해 단백질도 동시에 추출하여 분석하였다. 배양 배지를 제거한 뒤, 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척하고 QIAzol(Qiagen, Hilden, Germany) 용해 시약을 사용하여 total RNA를 추출하였다. MiScript II Reverse Transcriptase(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA의 1 µg aliquot을 역전사 시켰다. QPCR은 QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master Mix(Qiagen, Hilden, Germany) 및 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR 검출 시스템(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행되었다. MiR-124의 발현은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용하여 대조

군 RNU6 RNA 또는 miR-16의 발현으로 정규화 하였다.

2.3. 단백질 발현 분석:

APRE-19 세포에서 단백질을 추출하기 위해 조건별로 시료 처리가 완료된 세포를 PBS로 3회 세척하고 lysis buffer를 첨가하여 30분 동안 용해시킨 후 13,000 x g로 4 °C에서 15분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 Bradford법을 이용한 protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량 하였다. 10 µg의 단백질을 8-15% SDS-polyacrylamide(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 겔을 이용하여 100볼트에서 60분간 전기 영동을 실시하였다. 전기 영동으로 분리한 단백질은 항원항체 반응을 용이하게 하기 위해 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 단백질이 이동된 membrane은 5% skim milk로 blocking 하였다. 일차 항체는 1 : 1000으로 희석하여 16시간 동안 4 °C에서 반응시킨 후 Tris-buffered saline Tween-20(TBST)(Amresco, Solon, OH, USA)로 3회, 각 5분간 세척하였다. 이차 항체를 1 : 3000으로 희석하여 2시간 동안 상온에서 반응 시킨 후 TBST로 3회, 각 5분간 세척하였다. 세척이 끝난 membrane은 Enhanced chemiluminescent detection kit를 이용하여 ChemiDoc™ MP System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 단백질 발현량을 확인하였다. 관심 단백질 발현량에 대한 정량적 분석은 ImageJ 프로그램(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 각 단백질 밴드의 강도를 GAPDH의 발현량으로 보정하였다.

2.4. 세포 생존력 및 증식 분석:

ARPE-19세포를 96-well plate에 파종하고 24시간 후 Lipofectamine™ RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)시약을 이용하여

마이크로RNA mimic negative control(miR-NC)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 mirVana™ miR-124 mimic(miR-124)(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 37 °C의 온도와 5% CO₂ 농도가 유지되는 인큐베이터에서 6시간동안 형질 주입시켰다. 형질 주입 24시간 후에 세포의 생존 분석과 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) 혼입 분석을 시행 하였다. 세포 생존은 CCK-8 분석으로 평가되었고 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)를 이용하였다. 배양 배지를 제거하고 PBS로 3번 세척한 후에 90 µL의 무혈청 배지와 10 µL의 CCK-8 시약을 혼합하여 96-well plate에 첨가하였다. 4시간 배양 후 microplate reader(VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 450 nm 파장의 흡광도로 비색 검출을 수행하였다. BrdU 혼입 분석은 배양 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 BrdU 라벨링 시약을 배양 배지에 첨가하고 2시간 동안 배양하였다. 2시간 후 배양 배지를 제거하고 고정, 변성을 시행하고 anti-BrdU 페록시다아제를 결합하여 발색 반응을 검출하였다. 판독은 마찬가지로 microplate reader에서 비색 검출을 시행 하였다.

2.5. 망막색소상피세포의 Transwell migration 분석:

ARPE-19세포를 파종한 후 miR-NC또는 miR-124로 각각 6시간동안 형질 주입시킨 후, 세포를 plate에서 분리하여 무혈청 배지에서 고르게 재현탁시켰다. 상부 챔버에 마이크로RNA가 형질 주입된 세포를 파종하고 10% FBS를 함유하는 배지를 각 well의 하부 챔버에 첨가하였다. 37 °C의 온도와 5% CO₂농도가 유지되는 인큐베이터에서 12시간동안 배양한 후, 8 µm pore의 polycarbonate membrane insert를 통과하지 않은 세포들이 있는 상부 챔버의 상측면을 멸균된 면봉으로 닦아주었고, polycarbonate membrane 바닥으로 이동한 세포를 4% paraformaldehyde에 5분간 고정하고 haematoxylin으로 염색하였다. 위상차 현미경(CKX53, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용

하여 무작위로 선정한 3개의 부위의 세포수를 계수하였다.

2.6. 망막색소상피세포의 상처 치유 분석:

ARPE-19 세포를 12-well plate에 최대 100% 밀도로 파종하였다. 각각 miR-NC와 miR-124로 형질 주입시킨 뒤, 십자형 선형 상처에 증식에 의한 상처 치유를 배제하기 위해 50 $\mu\text{g/mL}$ mitomycin-C를 1시간동안 처리 하였다. 이후 PBS로 3회 세척한 후 200 μL 피펫 팁을 이용하여 각 well의 중심부에 십자형 상처를 만들었다. PBS로 3번 세척하여 분리된 세포를 제거한 뒤 1% FBS가 포함된 배지에서 48시간동안 배양하였다. 상처를 만든 직후와 각각 16시간, 24시간, 48시간째에 위상차 현미경을 이용하여 십자형 상처의 회복 정도를 기록하였다. 각 시점별로 촬영된 사진에서 ImageJ 프로그램을 이용하여 남아있는 상처의 면적을 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

2.7. Phalloidin 염색 및 면역세포화학염색:

ARPE-19 세포를 4-well 세포 배양 슬라이드(SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 파종하였다. 세포 배양 24시간 후, 배양 슬라이드 내 부착 세포 면적이 50%-60%에 도달했을 때, miR-NC 또는 miR-124를 형질 주입 시켰다. PBS로 3회 세척한 후 4% paraformaldehyde로 30분간 고정시켰다. 망막색소상피세포의 Filamentous 액틴을 관찰하기 위해 세포를 Alexa Fluor™ 488 Phalloidin(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 Hoechst 33342(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 시약으로 염색하였다. 이 후 세포를 0.4%(v/v) Triton™ X-100(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)으로 15분간 배양한 후 1%(w/v) bovine serum albumin으로 15분간 blocking하였고 0.1%(v/v) Tween-20이 함유된 PBS-T로 30분동안 세척하였다. Ki-67(1 : 200)(Abcam, Cambridge, UK)

일차 항체를 4 °C에서 12시간동안 배양한 뒤 Alexa Fluor® 594(Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 이차 항체를 실온에서 2시간 배양하였다. 이를 PBS-T로 5분간 3회 세척한 후에 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)가 함유된 Vectashield® mounting solution(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 고정하였다. 각 슬라이드는 직립 형광 현미경(Zeiss, Cologne, Germany)으로 관찰하고 이미지는 AxioVision SE64 버전 4.9.1.0 소프트웨어(Zeiss, Cologne, Germany)를 사용하여 얻었다. Ki-67양성 세포의 수는 무작위로 선정한 5개의 다른 위치에서 계수하고 Ki-67/DAPI 양성 세포는 백분율로 계산하였다.

2.8. 플라스미드 형질 감염 및 Luciferase Reporter 분석:

무작위 대조 luciferase 플라스미드 및 RHOG mRNA 3' 비 번역 영역(untranslated region, UTR) 플라스미드는 LightSwitch™(SwitchGear Genomics, Menlo Park, CA, USA)에서 구입하였다. 세포를 96-well plate에 파종한 뒤, 24시간에 걸쳐 배양 plate 내부의 부착된 세포 면적이 약 70% 도달했을 때, Lipofectamine™ 3000(Thermo fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 시약을 사용하여 무작위 대조군 또는 RHOG mRNA 3' UTR luciferase 플라스미드 및 miR-124 또는 miR-NC로 6시간 동안 공동 형질 주입시킨 다음 24시간 동안 배양하였다. 형질 주입된 세포를 완충 기질 용액으로 용해시켰다. 30분 동안 배양한 후에, 각 well의 luciferase 활성을 luminometer(Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)를 사용하여 검출하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 시행하였다.

3. 성 적

3.1. 망막색소상피세포에서 miR-124와 RhoG의 내인성 발현 수준:

망막색소상피세포를 계대 배양한 후 24, 48, 72 및 96시간이 경과함에 따라 각각 약 25%, 50%, 90% 및 100%의 합류(confluence)에 도달하였다(그림 1A&B). 마이크로RNA qPCR을 통해 확인된 망막색소상피세포의 miR-124 내인성 발현 수준은 24시간에 비해 48시간 경과 후 3배로 급격히 증가하였으며 계대 배양 후 72시간까지 유지되었다. 그러나 망막색소상피세포가 완전히 합류하였을 때 그 발현 수준은 24시간째 발현 수준의 절반 미만으로 감소하였다(그림 1C). RhoG 단백질 발현은 계대 배양 후 최대 72시간까지 감소했으며 망막색소상피세포가 100% 합류에 도달했을 때의 발현량은 24, 48 및 72시간째에 비해 크게 감소하였다(그림 1D).

3.2. MiR-124의 과발현에 의한 망막색소상피세포의 증식 및 생존능:

망막색소상피세포를 miR-124로 형질 주입시킨 후 위상차 현미경을 통해 관찰하여 세포의 밀도를 평가하였다. MiR-124의 도입은 miR-NC를 형질 주입 시켰을 때와 비교하여 24시간에 망막색소상피세포의 세포밀도를 유의하게 감소시켰다(그림 2A). 또한 miR-124의 과발현은 망막색소상피세포의 증식력과 생존력을 통계학적으로 유의하게 감소 시켰다(그림 2B). 모의 통제 대조군, miR-NC 또는 miR-124의 형질 주입 후 24시간마다 세포수를 계수하였을 때 망막색소상피세포에서 miR-124로 형질 주입은 세포증식을 유의하게 감소시켰다(그림 2C). 모의통제 대조군, miR-NC 또는 miR-124의

형질 주입 후 24시간째에 Ki-67의 면역세포화학염색을 시행하였을 때 miR-124의 형질 주입은 Ki-67의 세포핵 내 발현을 유의하게 감소시켰다(그림 2C&D).

3.3. MiR-124의 과발현에 의한 망막색소상피세포의 운동성 감소:

망막색소상피세포의 운동성에 대한 miR-124의 역할을 조사하기 위해 세포수준에서 상처치유반응 및 transwell migration 분석을 시행하였다. MiR-NC와 비교하여 miR-124의 과발현은 24시간 및 48시간에 망막색소상피세포의 상처 치유를 유의하게 감소시켰다(그림 3A&B). 또한 transwell migration 실험에서 miR-124의 과발현은 막의 8 μ m pore를 통과하는 세포의 수를 유의하게 감소시켰다(그림 3C&D). MiR-124의 과발현에 의한 세포의 운동성 구조에 미치는 영향을 확인하기 위해 phalloidin 염색을 통해 filamentous 액틴의 변화를 평가하였다. MiR-124의 형질 주입 시, 세포 경계 부분 lamellipodia의 발현이 유의하게 감소하였다. 또한 세포 경계부분에서 액틴 응축을 특징으로 하는 구조적 변화가 유도되었다(그림 3E). 반면 망막색소상피세포의 내인성 miR-124발현을 길항 하도록 설계된 miR-124 억제제를 형질 주입하였을 때 16, 24 및 48시간 배양 이후 망막색소상피세포의 상처 치유능력은 크게 향상되었다(그림 4A&B). 또한, miR-124 억제제는 transwell migration 분석에서 망막상피세포의 이동을 크게 증가시켰다(그림 4C&D).

3.4. 시뮬레이션 프로그램 분석에 의한 RHOG 3' UTR에서 추정 miR-124 표적 서열의 식별:

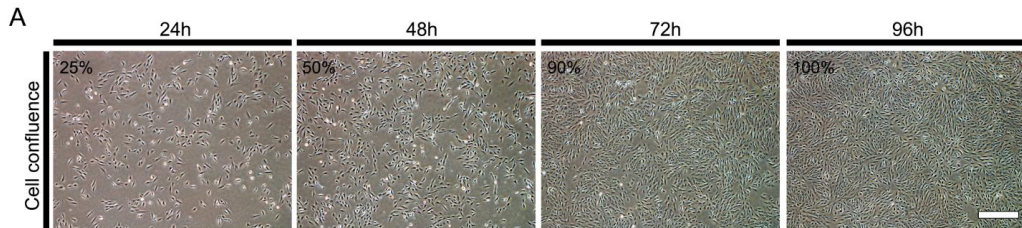
망막색소상피세포에서 miR-124의 세포내 조절을 교차 검증하기 위해

TargetScan 프로그램(버전 6.2)(http://www.targetscan.org/vert_61/)을 사용한 시뮬레이션 분석을 시행하여 miR-124의 추정표적서열을 산출하였다. RHOG는 세포에서 lamellipodium형성 및 조절과 관련된 유전자로써 이미 잘 알려져 있으며 인간 RHOG의 3'UTR을 검색했을 때 miR-124에 의해 표적화 될 수 있는 종자 서열을 확인하였다(그림 5A).

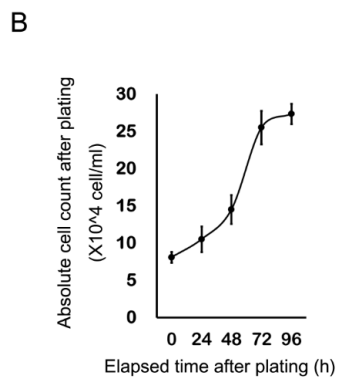
3.5. MiR-124는 RPE세포에서 RHOG 3' UTR을 직접 표적:

RHOG 3' UTR이 망막색소상피세포에서 miR-124의 표적이 될 것으로 예측한 시뮬레이션 분석결과를 기반으로 RHOG 3' UTR reporter 플라스미드 실험을 시행하였다. 무작위 대조 reporter 플라스미드 형질 주입에서는 miR-NC 또는 miR-124의 형질 주입이 luciferase의 활성에 영향을 미치지 않았다(그림 5B). 그러나 RHOG 3' UTR reporter 플라스미드와 miR-124를 동시 형질 주입하였을 때 miR-NC와 RHOG 3' UTR reporter 플라스미드가 동시 형질 주입된 대조군보다 15% 미만으로 luciferase의 활성이 감소하였다(그림 5C).

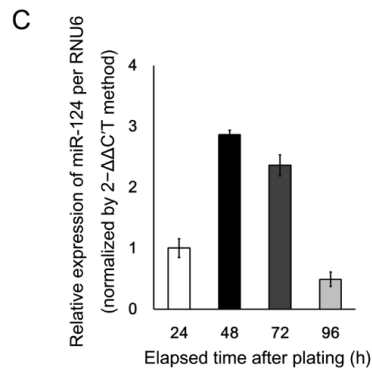
그림 1. 망막색소상피세포의 증식 및 합류에 의한 miR-124 및 RhoG의 발현 변화.



(A) 6-well plate에 mL당 7.5×10^4 개의 망막색소상피세포를 파종한 후 24 시간 간격으로 세포의 합류 정도를 나타낸 이미지.

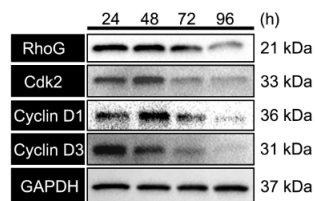


(B) 24시간 간격으로 서로 다른 3개 well의 세포 계수를 시행한 평균값 그래프(continued).



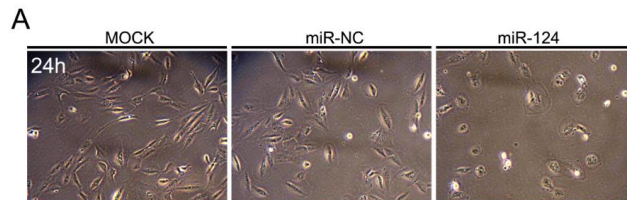
(C) 24시간마다 망막색소상피세포에서 RNU6의 발현 수준에 따른 내인성 miR-124의 발현량을 나타낸 그래프. 세포를 파종 후 48시간째에 최댓값에 이르렀다가 이후 차츰 감소하여 96시간째에 24시간째의 50%로 감소됨.

D

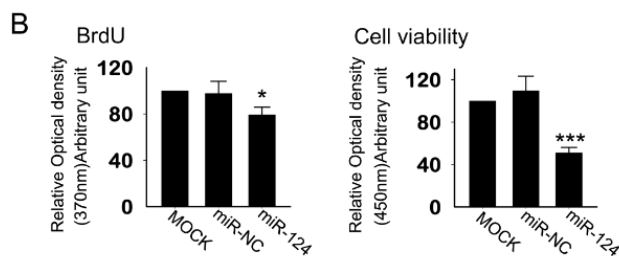


(D) Western blot 분석을 이용한 세포주기 인자 및 RhoG의 발현 수준 확인. 24-48시간째에 최댓값에 이르렀다가 이후 차츰 감소됨.

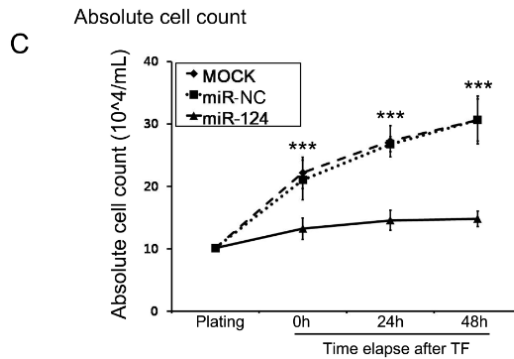
그림 2. 망막색소상피세포 증식 및 생존에 대한 miR-124 형질 주입의 효과.



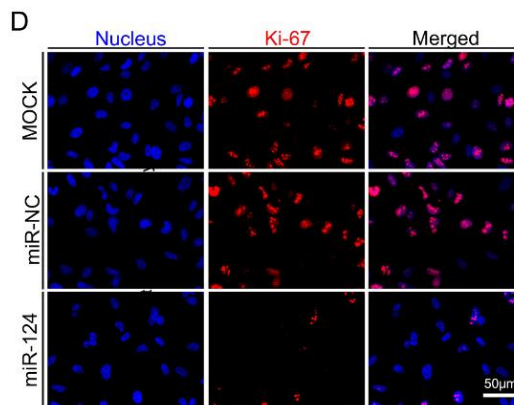
(A) MiR-124를 형질 주입 후 망막색소상피세포의 합류 정도에 따른 대표 이미지. miR-124 형질 주입은 24시간째 세포의 합류를 감소시킴.



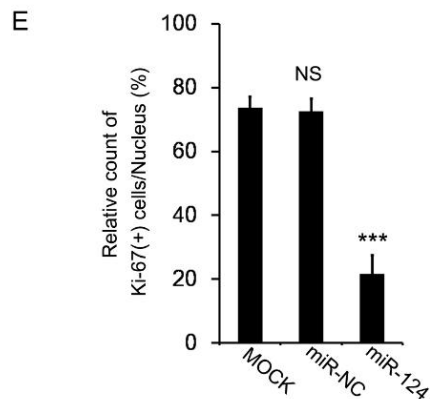
(B) 세포의 증식능과 생존능을 BrdU 분석과 CCK-8 분석을 통해 정량적으로 측정. MiR-124의 형질 주입은 세포의 증식과 생존을 유의하게 감소시킴 (continued). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.



(C) MiR-124로 형질 주입 후 시간에 따른 망막색소상피세포의 절대 세포 수 그래프. miR-124의 형질 주입은 대조군에 비해 유의하게 24시간째부터 절대 세포수의 증가를 억제함. *** $p < 0.001$.

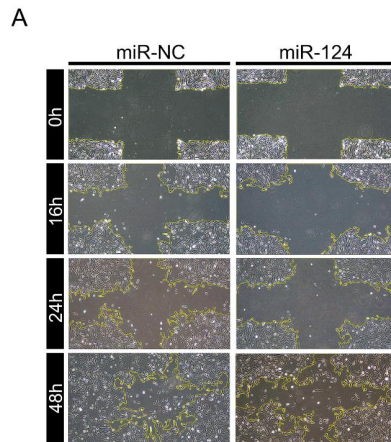


(D) MiR-124로 형질 주입 후 Ki-67 면역세포화학염색. miR-124의 형질 주입은 세포핵 내 Ki-67 염색을 감소시킴(continued). Bar, 50 μ m.

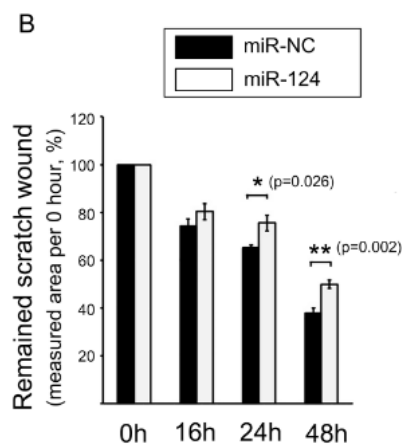


(E) DAPI 양성 핵 염색을 가진 모든 세포에서 나타난 Ki-67 양성 세포의 백분율. 통계학적으로 유의하게 miR-124 주입군에서 양성률이 감소됨. 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)를 나타낸다. 단방향 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)에 이어 터키의 honestly significant difference(HSD) 테스트를 통해 분석된 데이터임. not significant(NS) $p > 0.05$, *** $p < 0.001$.

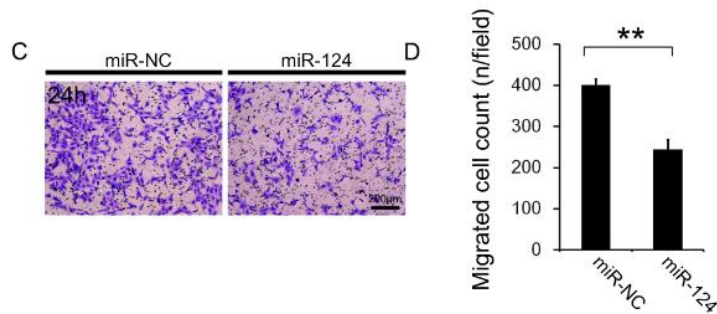
그림 3. 망막색소상피세포 운동성에 대한 miR-124 형질 주입의 효과.



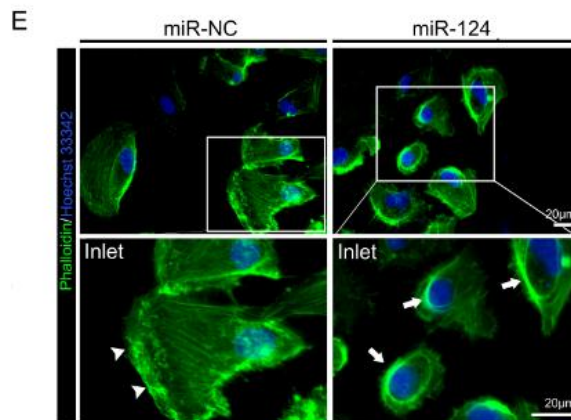
(A) 망막색소상피세포를 6-well plate에 배양하여 완전 합류를 이룬 후 십자형 상처를 내고 배양한 실험의 대표 이미지. miR-124의 형질 주입은 상처 치유 반응을 저해하였음.



(B) MiR-NC와 miR-124의 형질 주입 후 잔여 십자형 상처 영역의 정량적 측정. 24시간 이후부터 통계학적으로 유의하게 miR-124의 형질 주입된 그룹의 잔여 상처 영역이 넓었음(continued). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

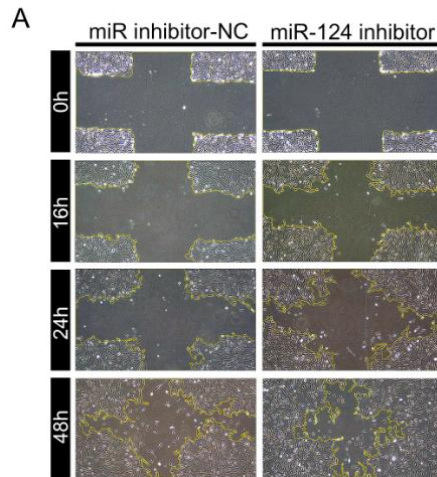


(C)&(D) MiR-124 형질 주입 24시간 후 망막색소상피세포의 transwell migration을 확인하였을 때 miR-124의 형질 주입이 miR-NC에 비해 유의하게 transwell migration된 세포수가 적었음. Bar, 200 μ m. ** p < 0.01.

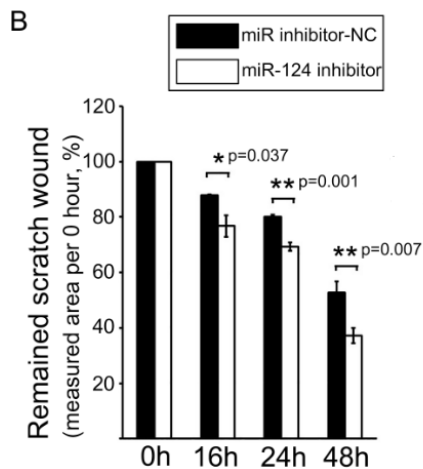


(E) Lamellipodium 형성 및 filamentous 액틴 응축을 확인하기 위해 phalloidin 염색을 시행함. miR-124의 형질 주입에 의해 세포의 lamellipodium 형성이 억제되고 액틴의 세포 경계 응축이 일어남. 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타냄. 데이터는 독립표본 t-검정으로 분석. Bar, 20 μ m.

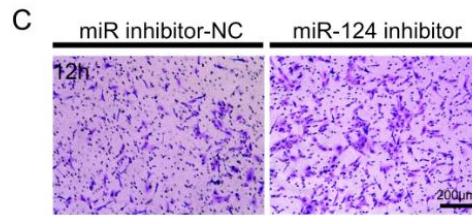
그림 4. 망막색소상피세포 운동성에 대한 miR-124 억제제 형질 주입의 효과.



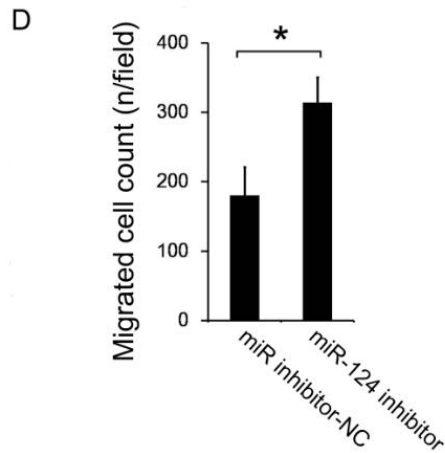
(A) MiR inhibitor-NC 또는 miR-124 inhibitor를 형질 주입시킨 망막색소상피세포의 상처 치유 실험 결과를 보여주는 대표적 이미지.



(B) (그림 4A)의 통계 분석(continued). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

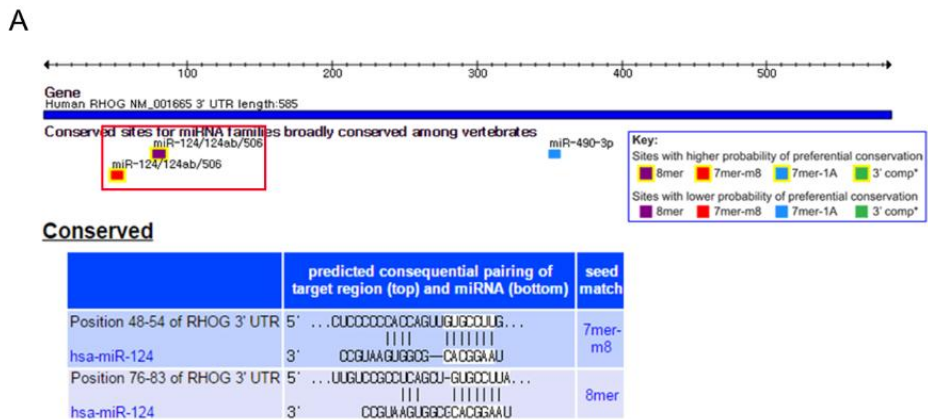


(C) MiR inhibitor-NC와 miR-124 inhibitor로 형질 주입된 망막색소상피세포를 사용한 transwell migration의 대표적인 이미지. Bar, 200 μ m.

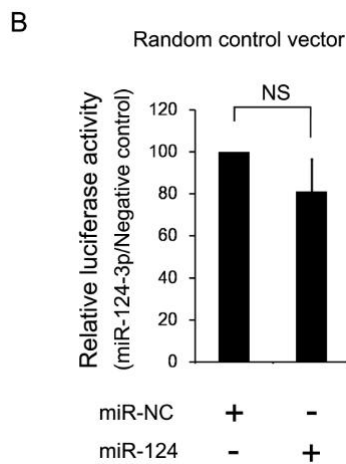


(D) (그림 4C)의 통계분석. 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. 데이터는 독립표본 t-검정으로 분석되었다. * $p < 0.05$.

그림 5. RHOG mRNA 3' UTR에 결합하는 miR-124 분석.



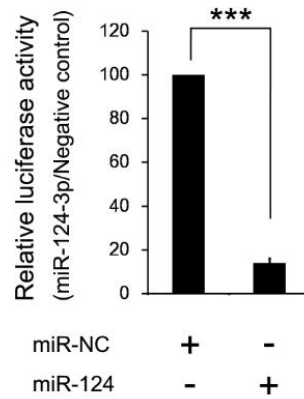
(A) RHOG mRNA의 3' UTR에서 보존된 miR-124 결합 서열의 In sillico 평가.



(B) MiR-NC 또는 miR-124로 형질 감염된 세포에서 무작위 대조군 vector에 결합하기 위한 luciferase 분석(continued). NS $p > 0.05$.

C

RHOG mRNA 3' UTR vector



(C) MiR-NC 또는 miR-124로 형질 감염된 세포에서 *RHOG* mRNA 3' UTR vector에 결합하기 위한 luciferase 분석. 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타낸다. 데이터는 독립표본 t-검정으로 분석되었다. *** $p < 0.001$.

4. 고 찰

인간을 제외한 다른 종의 망막색소상피세포는 상처 발생 시 인접한 다른 망막색소상피세포의 증식 및 이동에 의해 빠르게 치유 된다(12-14). 그러나 인간의 경우 망막색소상피세포 증식 및 이동은 제한적이며 이 경우 병리학 적 epithelial - mesenchymal transition(EMT)를 동반한다. 이렇듯 인간에서 망막색소상피세포의 재생능력이 부족하기 때문에 dry age-related macular degeneration와 같은 질환에 대한 세포 기반 치료 방법에 관한 연구는 중요한 의의를 가진다(15-17). 반면 중추 신경 계통(central nervous system, CNS)이나 망막의 일반적인 증식 제한과 달리, 증식성 유리체 망막 병증의 망막하막의 형성(3,4), 당뇨병성 망막 병증에서 견인막 형성(2), 특발성 망막 전막의 형성(1)은 망막색소 상피세포의 비정상적인 증식 및 이동에 의해 유도된다. 따라서 망막색소상피세포의 증식 및 이동을 제어하는 기본 메커니즘을 이해하는 것은 증식성 망막질환 치료제 개발에 있어서도 필수적일 것으로 생각된다.

현재까지 보고된 연구에서 보면 RhoG는 miR-124의 표적 신호전달물질로 잘 알려져 있으며 그 이름에서 유추할 수 있는 것처럼 RhoG는 세포의 성장에 중요한 영향을 끼친다. 따라서 본 연구에서는 miR-124에 의한 RhoG 조절을 통해 망막색소상피세포의 세포주기 진행 또는 증식이 제어될 것이라는 가정 하에 이를 검증하고자 하였다(10,18,19). MiR-124의 발현은 망막색소상피세포의 합류정도에 따라 역동적으로 변화하는 양상을 보였고 완전 합류후 급격히 감소되었다. 이는 murine 망막색소상피세포에서 마이크로RNA In Situ hybridization(ISH)를 시행한 기존 연구결과와 일치하는 양상이었다(8). 그러나 망막색소상피세포에서 내인성 miR-124의 발현은 세포의 50-90% 합류지점에서 오히려 유의하게 증가하는 양상이었고 miR-124의 내인성 발현 증가에 의해 억제될 수 있는 RhoG 발현은 miR-124 발현과 유사하지만 지연된 패턴을 보였다. 이는 마이크로RNA는 주로 RNA의 전사 후 조절을 제어하기 때문에 miR-124와 비교하여 RhoG의 발현이 지연되어

감소된 것은 논리적으로 타당하다 할 수 있다. 하지만 완전합류후 miR-124의 발현이 급격히 감소된 이후에도 RhoG의 발현은 더 이상 증가되지 않았는데 이러한 패턴이 나타난 이유는 세포수준에서 실험적으로는 지속적으로 낮은 합류 수준을 유지하는 것이 불가능하며 망막색소상피세포의 장기 배양에 따른 완전합류의 세포-세포간 접촉은 세포 증식에 있어서 무엇보다도 강력한 억제 효과를 나타내기 때문으로 생각된다(20,21). 따라서 향후 실험에서는 miR-124에 의한 역동적 RhoG 발현 조절을 입증하기 위해 miR-124억제제를 형질 주입하여 내인성 miR-124의 발현을 억제한 이후 RhoG의 발현이 증가하는지 여부에 대한 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

세포의 운동성 증가는 세포주기의 진행과 함께 배아 발달 및 상처 치유에 있어 중요한 역할을 한다. 안구 내의 세포, 특히 수정체와 망막색소상피세포에서의 이러한 운동성증가는 백내장 수술 후 환자에서 수정체 후낭을 혼탁시키거나 또는 망막박리 환자에서 발생하는 증식성 유리체 망막 병증과 같은 안구 조직의 병리학적 변화에 중요한 역할을 한다. 따라서 임상적인 측면에서 보았을 때 이러한 안구내 세포들에서 운동성의 조절은 후낭 혼탁 또는 증식성 유리체 망막 병증으로 인한 시력소실을 예방 및 치료할 수 있는 이론적 배경을 제시한다. 이론적으로 세포의 운동성은 세포의 분극, 세포 변연부의 돌출, 세포의 안정적인 국소 부착, 부착의 분리 및 수축을 포함하는 통합적인 다단계 사이클이라 할 수 있다. RHO GTPases 신호전달계는 이러한 세포 운동성의 요소를 제어하는 것으로 잘 알려져 있는데 본 연구의 결과를 통해 miR-124의 과발현에 의한 망막색소상피세포의 운동성 조절기작은 이러한 miR-124/RhoG/Rac1 신호전달체계를 통해 작용한다는 결론에 도달할 수 있다. RHOG mRNA의 3' UTR에 miR-124이 상보적으로 결합함으로써 RhoG발현의 전사 후 발현억제를 유도하여 망막색소상피세포의 lamellipodium 형성, 상처 치유 억제 및 이동의 억제 등의 양상을 나타내는 것으로 사료된다.

결론적으로, miR-124에 의한 RhoG 신호전달 체계의 조절은 증식성 유리체 망막 병증과 같은 망막색소상피세포에 의한 증식성 질환에서 잠재적인

치료 표적이 될 수 있음을 시사한다.

5. 요약

망막색소상피세포(retinal pigment epithelial cell)는 다양한 망막질환의 병리에 핵심적인 역할을 한다. 망막색소상피세포의 운동성 조절은 비정상적인 증식 및 이동에 의해 유도되는 망막전막과 증식성 유리체 망막 병증과 같은 망막질환으로 인한 시각 장애를 억제하는 치료의 이론적 배경을 제시한다.

마이크로RNA가 RhoG단백질을 표적으로 하여 특정 세포의 분화를 조절한다는 연구 결과가 보고되어 있기도 하지만, 망막색소상피세포의 증식과 이동을 조절하는 메커니즘에 관하여는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 망막색소상피세포에서 증식 및 이동을 조절하는 miR-124와 RhoG의 역할을 조사하고자 하였다.

본 연구에서는 망막색소상피세포에 miR-124를 형질 주입하여 RhoG의 발현을 저해함으로써 세포생존능력과 증식 및 상처치유가 억제되는 것을 확인하였다. 또한 miR-124의 세포내 과발현시 표적단백질로 알려진 RhoG의 발현량은 낮아지며 세포생존능과 증식, Ki-67발현/DAPI염색 비율 또한 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 miR-124에 의한 RhoG의 조절은 망막색소상피세포의 세포주기진행과 증식 및 이동을 제어하는 것으로 확인하였고 이러한 결과는 향후 dry age-related macular degeneration, 당뇨망막병증의 건인막 형성, 증식성 유리체 망막병증과 같은 망막질환에 대한 새로운 개념의 치료제 개발의 이론적 배경을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Smiddy WE, Maguire AM, Richard Green M, Michels RG, De La Cruz Z, Enger C, et al.: Idiopathic epiretinal membranes: Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* 1989; 96: 811 - 820 discussion 821.
2. Hiscott P, Gray R, Grierson I, Gregor Z: Cytokeratin-containing cells in proliferative diabetic retinopathy membranes. *Br J Ophthalmol* 1994; 78: 219 - 22.
3. Pastor JC, de la Rua E, Martin F: Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res* 2020; 21: 127 - 44.
4. Tosi GM, Marigliani D, Romeo N, Toti P: Disease pathways in proliferative vitreoretinopathy: an ongoing challenge. *Journal of Cellular Physiology* 2014; 229: 1577 - 83.
5. Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215 - 33.
6. Macfarlane LA, Murphy PR: MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 2010; 11: 537 - 61.
7. Karali M, Peluso I, Gennarino VA, Bilio M, Verde R, Lago G, et al.: miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye. *BMC Genomics* 2010; 11: 715.

8. Karali M, Peluso I, Marigo V, Banfi S: Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 509 - 15.
9. Etienne-Manneville S, Hall A: Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420: 629 - 35.
10. Franke K, Otto W, Johannes S, Baumgart J, Nitsch R, Schumacher S: miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signalling. *EMBO J* 2012; 31: 2908 - 21.
11. Vincent S, Jeanteur P, Fort P: Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family. *Molecular and cellular Biology* 1992; 12: 3138 - 48.
12. V Del Priore L, Hornbeck R, J Kaplan H, Jones Z, L Valentino T, Mosinger-Ogilvie J, et al.: Debridement of the pig retinal pigment epithelium in vivo. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 939 - 44.
13. V Del Priore L, J Kaplan H, Hornbeck R, Jones Z, Swinn M: Retinal pigment epithelial debridement as a model for the pathogenesis and treatment of macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 629 - 643.
14. F Lopez P, Yan Q, Kohen L, A Rao N, Spee C, Black J, et al.: Retinal pigment epithelial wound healing in vivo. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1437 - 46.

15. E Buchholz D, O Pennington B, H Croze R, R Hinman C, J Coffey P, O Clegg D: Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 384 - 93.

16. D Schwartz S, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, K Pan C, M Ostrick R, et al.: Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713 - 20.

17. D Schwartz S, D Regillo C, L Lam B, Elliott D, J Rosenfeld P, Z Gregori N, et al.: Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; 385: 509 - 16.

18. Jun JH, Joo CK: MicroRNA-124 controls transforming growth factor beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium by targeting RHOG. *Investigative Ophthalmology Vis Sci* 2016; 57: 12-22.

19. Schumacher S, Franke K: miR-124-regulated RhoG: a conductor of neuronal process complexity. *Small GTPases* 2013; 4: 42 - 6.

20. Ribatti D: A revisited concept: contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp Cell Res* 2017; 359: 17 - 9.

21. Kim NG, Koh E, Chen X, M Gumbiner B: E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11930 - 5.

MicroRNA-124 controls proliferation and migration of human RPE cells by targeting RHOG

Son, Myeong Jin

Department of Ophthalmology
Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Jun, Jong Hwa)

(Abstract)

The proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells plays a major role in the pathology of various retinal diseases such as epiretinal membrane, age-related macular degeneration, diabetic retinopathy, and proliferative vitreoretinopathy. Small GTPase RHO is known to regulate the proliferation and migration of retinal epithelial cells, and among them, RHOG has been reported as a major target gene of microRNA-124 (miR-124). Therefore, miR-124 has the potential to regulate the proliferation and migration of retinal epithelial cells. After transfection of miR-124 into cells, an enzyme immunoassay for WST-8 and BrdU was performed to quantitatively measure cell viability and 5-bromo-2' deoxyuridine (BrdU) binding. After miR-124 was overexpressed in cells, the expression ratio of Ki-67 to the number of

nuclear staining was calculated. Wound healing ability and cell migration were analyzed under the action of miR-124 and miR-124 inhibitors, and changes in cytoskeleton were confirmed by observation of filamentous actin through phalloidin staining. After overexpression of miR-124, the cell viability and proliferation of retinal pigment epithelial cells and the ratio of Ki-67 expression/DAPI staining were significantly decreased. Wound healing and cell mobility also exhibited effects on the intracellular inhibitors of miR-124, which also significantly decreased. It could be observed that lamellipodia significantly inhibited the motility that can observe filamentous actin. In the target gene identification assay, miR-124 and luciferase 3' UTR luciferase activity are drastically reduced. Inhibition of RHOG by miR-124 reduces cell viability and proliferation, wound healing, and cell migration. Through the results of this study, it was confirmed that miR-124 is involved in various physiological regulation of retinal pigment epithelial cells.

망막색소상피의 증식과 이동에 miR-124와 RHOG가 미치는 영향

손 명 진

계명대학교 대학원
의학과 안과학 전공

(지도교수 전 중 화)

(초록)

망막색소상피세포의 증식과 이동은 망막전막, 연령관련황반변성, 당뇨병성망막병증의 건인막형성 그리고 증식유리체망막병증과 같은 다양한 망막 질환의 병리에 주요한 역할을 한다. Small GTPase RHO는 망막상피세포의 증식과 이동을 조절하는 것으로 알려져 있고 이중 RHOG는 microRNA-124 (miR-124)의 주요한 타겟 유전자로서 보고되고 있어 miR-124는 망막상피세포의 증식과 이동을 조절할 가능성이 있다. MiR-124를 세포 내에 도입한 후 세포 생존능과 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 결합 정도를 정량적으로 측정하기 위해 WST-8과 BrdU에 대한 효소면역분석법을 시행하였고 miR-124를 세포 내에 과발현한 후 핵 염색수에 대한 Ki-67의 발현 비율을 계산하였다. 상처치유능과 세포 이동을 miR-124와 miR-124 저해제의 작용 하에 분석하였고 세포 골격의 변화를 phalloidin 염색을 통한 filamentous 액틴의 관찰을 통해 확인하였다. MiR-124을 과발현한 후 망막색소상피세포

의 세포 생존능과 증식, Ki-67발현/DAPI염색 비율은 유의하게 감소하였다. 상처 치유와 세포 이동성 또한 유의하게 감소하였고 miR-124의 세포 내 저해제에 의해서는 촉진되는 양상을 보였다. Filamentous 액틴을 관찰하였을 때는 운동성을 나타내는 lamellipodia가 유의하게 형성 저해되는 것을 또한 관찰할 수 있었다. 표적유전자확인분석에서 miR-124와 luciferase 플라스미드의 동시 도입은 RhoG 3' UTR luciferase 활성도를 급격하게 감소시켰다. MiR-124에 의한 RHOG의 억제능은 세포생존능과 증식, 상처치유, 세포 이동을 감소시킨다. 본 연구의 결과를 통해 miR-124가 망막색소상피세포의 다양한 생리학적 조절에 관여함을 확인할 수 있었다.