

Prohibitin 유전자 발현양 검출 역전사 중합효소연쇄반응 키트 개발 및 검사성능 평가

Development and Performance Evaluation of a Quantitative Reverse Transcription PCR Kit for the Determination of *prohibitin* Gene Expression

나보람¹ · 이영은¹ · 강민구² · 원용관³ · 김혜란⁴ · 신명근^{1,5}

Bo-Ram Na, M.S.¹, Young-Eun Lee, M.S.¹, Min-Gu Kang, M.D.², Yonggwon Won, Ph.D.³, Hye-Ran Kim, Ph.D.⁴, Myung-Geun Shin, M.D.^{1,5}

전남대학교 의과대학 두뇌한국21 플러스사업¹, 광양사랑병원 진단검사의학과², 전남대학교 공과대학 전자컴퓨터공학부³, 동신대학교 한의과대학⁴, 화순전남대학교병원 진단검사의학과 · 전남대학교 의과대학 진단검사의학교실⁵

Brain Korea 21 Plus Project¹, Chonnam National University Medical School, Gwangju; Department of Laboratory Medicine², GwangYang Sarang General Hospital, GwangYang; School of Electronics and Computer Engineering³, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju; College of Korean Medicine⁴, Dongshin University, Naju; Department of Laboratory Medicine⁵, Chonnam National University Medical School and Chonnam National University Hwasun Hospital, Hwasun, Korea

Background: *Prohibitin (PHB)* regulates intracellular signal pathways, transcription, and cell cycles. Aberrant expression of the *PHB* gene is known to be related to tumorigenesis, tumor progression, and chronic metabolic and inflammatory diseases. The present study aimed to develop a one-step quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) kit for quantifying *PHB* mRNA levels and evaluate its performance in the laboratory.

Methods: TaqMan chemistry was used to develop the one-step *PHB1* and *PHB2* RT-qPCR kit. Normal peripheral blood cells from healthy individuals (N=20) and leukemia cells from patients initially diagnosed with acute myeloid leukemia (AML, N=20), chronic myeloid leukemia (CML, N=13), and acute lymphoid leukemia (ALL, N=7) were enrolled to evaluate the laboratory performance of the kit using commercially available total human RNA controls.

Results: The intra-assay and inter-assay precision of the kit developed in this study was less than 2%. The distribution of *PHB1* mRNA expression of AML, CML, and ALL was 0.898-0.993 (median: 0.936), 0.817-0.976 (0.918), and 0.844-1.074 (0.973), respectively. The distribution of *PHB2* mRNA expression of AML, CML, and ALL was 0.957-1.024 (median: 0.985), 0.988-1.047 (1.002), and 0.937-1.059 (1.004), respectively. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and test effectiveness of the developed *PHB1* and *PHB2* kit were greater than 50% for each parameter.

Conclusions: Our developed kit would be useful for diagnosing leukemia as well as detecting residual disease. Additionally, this kit could be used for monitoring and conducting molecular pathophysiological studies of obesity, metabolic, and inflammatory diseases.

Key Words: Prohibitin, Gene expression, Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), Laboratory performance

서론

Corresponding author: Myung-Geun Shin, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0002-0372-9185>

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Hwasun Hospital, 322 Seoyang-ro, Hwasun-eup, Hwasun-gun, Jeollanam-do 58128, Korea

Tel: +82-61-379-7950, Fax: +82-61-379-7984, E-mail: mgshin@chonnam.ac.kr

Received: July 31, 2019

Revision received: October 29, 2019

Accepted: October 29, 2019

This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2020, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Prohibitin (PHB) 단백질은 세포 내 미토콘드리아와 핵, 세포질, 세포막 등에 존재하며, 기본적으로 미토콘드리아의 기능 및 형태 유지에 매우 중요한 역할을한다고 알려져 있다[1]. PHB는 이러한 기본적인 기능 외에 핵수용체를 포함한 다양한 전사인자와 직간접적으로 상호작용함으로써 전사활성을 조절한다고 알려져 있다[2]. PHB 단백질은 두가지 형태(type I과 II)로 존재하는데 이들을 코딩하는 유전자는 각각 *PHB1*과 *PHB2*이다. *PHB1*과 *PHB2* 단백질은 미토콘드리아 내막에 고리모양의 구조로 존재한다[1]. *PHB1*과 *PHB2* 유전자는 각각 17번 염색체 장완(17q21.33)과 12번 염색체 단완(12p13.31)에 존재하며, 이들 단백질의 분자량은 각각 32 kDa와 34 kDa이다[3].

PHB 기능 이상은 노화[4], 증식성 질환[5], 퇴행성 질환[6] 그리고 대사질환[7] 등과 연관이 있다고 알려져 있다.

종양발생과 병태생리에 *PHB*의 역할에 대한 연구 보고가 주로 고형장기 종양에서 보고되고 있다. 위암, 식도암, 대장암, 전립선암, 고위험 유방암, 방광암 및 갑상선암 등에서 *PHB* 단백질 및 mRNA가 높게 발현됨이 보고되었다. 이들 종양세포에서 과발현된 *PHB*는 세포고사 회피의 주된 인자로 작용할 뿐만 아니라 항암제에 내성을 야기하는 주요인자임이 밝혀졌다[3]. 혈액질환에서 *PHB*의 역할에 대한 연구보고는 많지 않았으나, 최근 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 다른 고형장기 종양에서와 마찬가지로 혈액질환에서의 *PHB*의 역할에 대한 관심이 증가하고 있다. 백혈병에서 *PHB1* 및 *PHB2* 단백질은 과발현됨이 보고되었고, 과발현된 *PHB* 단백질은 백혈병세포 증식과 세포고사 회피에 역할을 함이 보고되었다[8]. 이상과 같이 *PHB*가 다양한 종양에서 그 병태생리적 의의가 속속 밝혀지고 있음에도 불구하고, *PHB*유전자 발현량을 정량적으로 검출할 수 있는 분자진단키트가 시장에 소개되고 있지 않는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 실험실 수준에서만뿐만 아니라 실제 검사현장에서도 손쉽게 *PHB1*과 *PHB2* 유전자를 정량검출할 수 있는 역전사 중합효소연쇄반응 키트를 개발하여 백혈병환자 검체와 관리물질을 이용한 간략한 성능평가와 함께 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 정량검출 역전사 중합효소연쇄반응 키트 제작

PHB 유전자 발현량 정량검출을 위한 역전사 중합효소연쇄반응 키트는 TaqMan 화학 기술을 기본으로 하여 개발하였다. *PHB1*, *PHB2* 및 *ABL* 유전자 각각에 대한 프로브 및 시발체 염기서열은 Table 1과 같다. *PHB1* 프로브에는 FAM 형광물질과 이를 제어하는 EBQ quencher를 사용하였고, *PHB2* 프로브에는 TET 형광물

질과 *PHB1* 프로브에서 사용한 동일한 EBQ quencher를 부착하여 제작하였다. 전혈 또는 골수 검체에서 추출한 total RNA 또는 mRNA로부터 *PHB1* (또는 *PHB2*) 유전자와 *ABL* 유전자 발현량을 동일한 한 개의 튜브에서 한번에 역전사(reverse transcription, RT) 과정과 정량중합효소연쇄반응(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)이 진행되는 one-step RT-qPCR 키트로 개발하였다(GeneMedikit®*PHB1* RT-qPCR kit 및 GeneMedikit®*PHB2* RT-qPCR kit; GeneMedica, Gwangju, Korea).

2. 검체와 인간유래 RNA 관리물질

신체검사와 다양한 검사를 통해 정상으로 판명된 20명의 말초혈액을 채혈하여 정상인에서 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 발현량의 분포를 Bayesian법으로 구하였다.백혈병 환자의 경우 진단시 골수 검체를 이용하였는데, 급성골수성백혈병 20예, 만성골수성백혈병 13예, 그리고 급성림프구성백혈병 7예를 이용하였다. 이들 검체에서 total RNA의 추출은 상품화 키트(Invitrogen™ RNAqueous Total RNA Isolation Kit; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였다. Total RNA의 농도는 분광광도법(Micro UV-VIS spectrophotometer; Malcom, Tokyo, Japan)으로 측정하여 PCR반응에 이용하였다.

개발된 키트의 검사능 평가를 위해, 추가적으로 상품화된 인간유래 RNA 관리물질(Thermo Fisher Scientific)을 이용하였다. 환자 유래 검체는 검사 후 잔여검체로부터 획득하여 사용하였고, 이와 관련하여 기관윤리위원회 승인(CNUHH-2019-001)을 얻어 본 연구를 수행하였다. 한편 본 연구는 임상검사 후 폐기예정인 잔여검체를 이용하는 연구로서 체외진단용 의로기기 임상시험 피험자 동의면제 요건에 해당됨을 기관윤리위원회로부터 승인받았다.

3. 검사성능 평가

검출 한계를 결정하기 위하여 위의 표준물질(2×10^5 copies/ μ L)을 이용하여 DEPC 처리 증류수로 희석하여 2×10^4 copies/ μ L, 2×10^3 copies/ μ L와 2×10^2 copies/ μ L 농도의 희석액을 만들어 사용하였다. 각 농도당 4번 반복검사를 실시하여 검출한계를 검증하였다. 특이도 평가를 위해 정량증폭 음성 대조검체로서 DEPC처리 증류수를 사용하였다. 양성 대조검체로는 상품화된 인간유래 total RNA control (ThermoFisher Scientific)을 이용하였다. 정밀도 평가는 상품화된 인간유래 total RNA control (ThermoFisher Scientific)을 이용하여, 측정 내 정밀도(intra-assay precision)와 측정 간 정밀도(inter-assay precision) 평가를 위해 4일간 하루 10번씩 반복검사를 수행하여 평가하였다.

검사능 분석은 병원종사자와 검진센터에서 혈액검사를 포함하여 다양한 검사에서 비정상적인 소견이 관찰되지 않은 정상인 20

Table 1. Nucleotide sequences for primers and probes

Primers/Probes	Sequence*
<i>PHB1</i> Probe	[FAM]TGTGGXXXXXXXXXXCAGAGCTG[EBQ]
<i>PHB1</i> Reverse	GGAGXXXXXXXXAACTCTG
<i>PHB1</i> Forward	CTGGXXXXXXXXGTGGTCGA
<i>PHB2</i> Probe	[TET]TGACATXXXXXXXXXXCCTCGA[EBQ]
<i>PHB2</i> Reverse	CTTGGTXXXXXXXXCCCAT
<i>PHB2</i> Forward	CGAGXXXXXXXXCAGGG
<i>ABL</i> Probe	[FAM]TCTAAXXXXXXXXXAAAGGT[EBQ-dT] GAAAAAXXXXXXTCTT[Phosphate]
<i>ABL</i> Reverse	AAAATGXXXXXXXXCTTTTCG
<i>ABL</i> Forward	CCATTCXXXXXXXXATTATAGC

*X represents nucleotides hidden for security reasons.

명의 혈액검체를 이용하여 *PHB1* 및 *PHB2* mRNA 정량 발현량의 cutoff 수치를 결정하였다. 골수 조직검사와 염색체검사를 포함한 다양한 분자생물학적 검사로 급성골수성백혈병(acute myeloid leukemia, AML)으로 확진된 환자의 진단 시 골수검체를 이용하여 민감도, 특이도, 양성예측률, 음성예측률 및 검사효능(일치율)을 구하였다.

4. 백혈병환자 검체 적용

개발한 GeneMediKit®*PHB1* 및 *PHB2* RT-qPCR (GeneMedica) 키트의 임상검체 적용과 백혈병 진단 효율성을 평가하기 위해 정상인 20명의 말초혈액 검체와 백혈병환자 40명(급성골수성백혈병 20예, 만성골수성백혈병 13예 및 급성림프구성백혈병 7예)의 진단 시 골수검체에 적용하여 보았다.

5. 통계분석

통계분석에 이용한 통계 소프트웨어는 SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하였다. 직선성을 평가하기 위해 다항회귀분석을 시행하였고, *t*-test로 검정하였다.

결 과

1. 키트 개발 결과

본 연구에서 개발된 키트는 검사현장에서 이용되는 실시간 중합효소연쇄반응기인 CFX96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 ABI 7500 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에 바로 적용할 수 있게 하였다. 설명서에 명시된 반응액의 조성은 시발체와 프로브 혼합물(5 µL), 2x RT-qPCR 반응액(12.5 µL), 증류수(2.5 µL), ROX 형광물질(0.5 µL, ABI 7500 사용할 경우에 추가), 그리고 검체에서 추출한 RNA (5 µL)이다. PCR 반응 조건은 역전사반응 과정을 위해 50°C에서 30분간 반응시키고, 95°C에서 5분간 변성(denaturation) 과정을 거친 후, 95°C에서 20초, 55°C에서 30초 반응을 40회 수행하는 과정으로 구성되었다.

개발된 키트에는 내부대조 *ABL* 유전자와 *PHB1* 또는 *PHB2* 유전자 각각에 해당되는 표준 유전자물질이 2×10^2 copies/µL부터 2×10^6 copies/µL까지 10배 농도 구배로 5개가 포함되어 있어 quantification cycle (Cq) 값에 기초한 상대정량 보고뿐만 아니라 표준 유전자 물질을 이용한 상대정량도 가능하게 하였다.

2. PCR 증폭효율평가

PHB1 및 *PHB2* 유전자 표준물질 2.0×10^6 copies/µL 농도부터 2.0×10^2 copies/µL 농도까지 5개의 표준물질에 대한 증폭결과는 Fig. 1과 같다. *PHB1* 및 *PHB2* 표준물질을 7번 반복 측정한 기대치

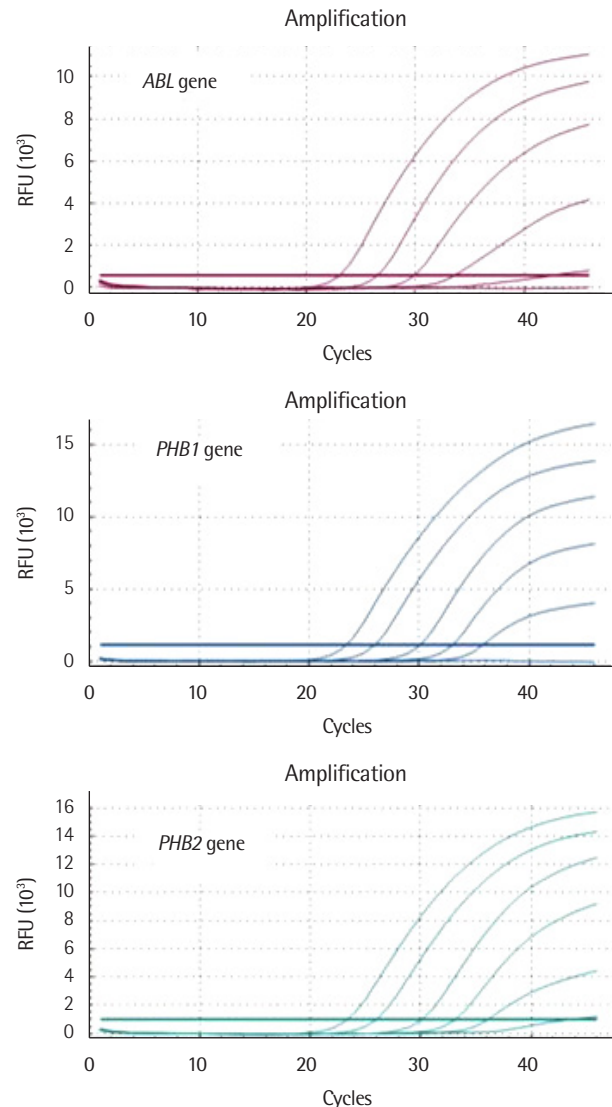


Fig. 1. Amplification plots of standards for *ABL* (upper panel), *PHB1* (middle panel), and *PHB2* (lower panel) genes. Five standards of *ABL*, *PHB1*, and *PHB2* genes were used in each experiment with the same number of copies (Standard 1: 2×10^2 copies/µL, Standard 2: 2×10^3 copies/µL, Standard 3: 2×10^4 copies/µL, Standard 4: 2×10^5 copies/µL, Standard 5: 2×10^6 copies/µL).

에 대한 관측치의 회수율은 각각 $101.55 \pm 10.50\%$ (평균 \pm 표준편차) 및 $102.09 \pm 10.88\%$ 였고, 기울기는 -3.31 및 -3.30이었다. 한편 *PHB1* 및 *PHB2* 표준물질의 기대치에 대한 R^2 값은 각각 0.996 및 0.995이었다(Fig. 2).

3. 검출한계 평가

검출한계를 검증하기 위해 시행한 검사에서 GeneMediKit *PHB1* RT-qPCR은 회수율 93% 수준에서 검출 한계는 200 copies/µL이었다. GeneMediKit *PHB2* RT-qPCR 키트는 회수율 92% 수준에서 검

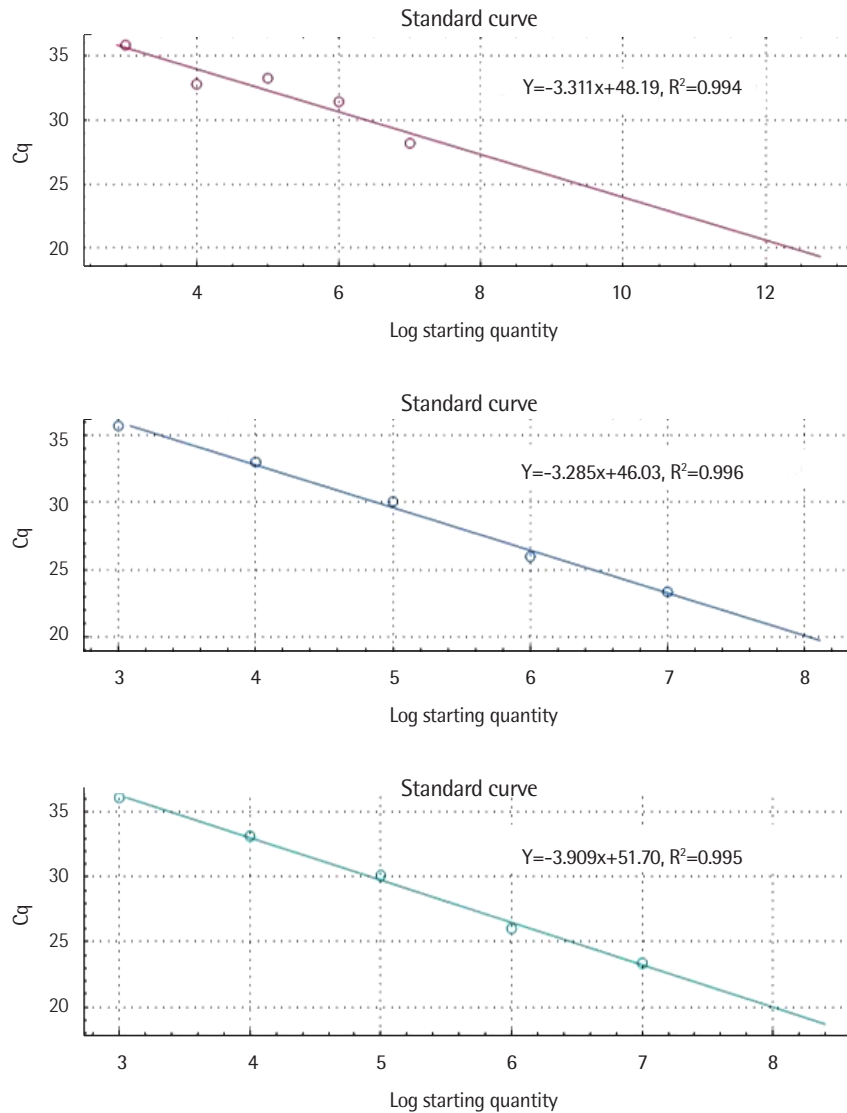


Fig. 2. The slope of the standard curve used to estimate PCR amplification efficiency of *ABL* (upper), *PHB1* (middle), and *PHB2* (lower) genes. A standard curve is graphically represented as a semi-log regression line plot of the Cq value versus log of standard nucleic acid copies.

출 한계는 2,000 copies/ μ L이었다.

4. 특이도 평가

개발한 키트를 사용하여, 양성 대조검체로 사용한 상품화된 인간유래 total RNA control로써 *PHB1* 및 *PHB2* mRNA 정량 증폭을 20번 실시해 보았는데, 모든 반응에서 검출되었으나, 20번 독립적으로 음성 대조검체를 이용한 실험에서는 해당 유전자 증폭반응이 검출되지 않아 100% 특이도를 보였다.

5. 정밀도 평가

상품화된 인간유래 total RNA control (ThermoFisher Scientific)을 이용하여 검증한 측정내 정밀도는 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자에서

Table 2. Precision evaluation of the GeneMediKit® *PHB1* and *PHB2* RT-qPCR using human total RNA as a control

Gene	Test No.	Intra-assay precision			Inter-assay precision		
		Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
<i>PHB1</i>	40	0.983	0.010	1.095	0.983	0.011	1.150
<i>PHB2</i>	40	0.890	0.014	1.613	0.891	0.015	1.689

각각 2% 이내의 매우 양호한 정밀도를 보였다. *PHB1*과 *PHB2* 유전자 정량발현 검출의 측정 간 정밀도는 2% 이내의 우수한 정밀도를 보였다(Table 2).

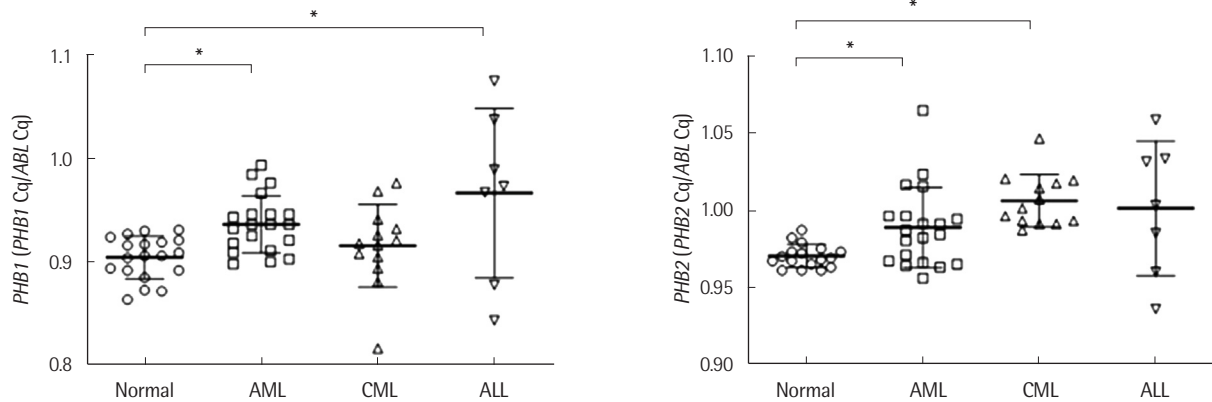


Fig. 3. Distribution of *PHB1* and *PHB2* mRNA expression in healthy individuals and individuals with acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), and acute lymphoid leukemia (ALL). *, $P < 0.05$.

Table 3. Diagnostic efficacy of the GeneMediKit® *PHB1* and *PHB2* RT-qPCR kit

	<i>PHB1</i>			<i>PHB2</i>		
	Leuke-mia (N)	Healthy (N)	Total (N)	Leuke-mia (N)	Healthy (N)	Total (N)
<i>PHB</i> quantification						
Out of RI (+)	25	4	29	32	5	37
Within RI (-)	15	15	30	8	12	20
Total (No)	40	19	59	40	17	57
Laboratory performance for leukemia						
Sensitivity	62.5			80.0		
Specificity	78.9			70.6		
PPV	86.2			86.5		
NPV	50.0			60.0		
TE	50.4			53.1		

Abbreviations: RI, reference interval; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; TE, test effectiveness.

6. 정상인 및 백혈병환자에서 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 발현량

정상인과 각종 백혈병환자에서 *PHB1*과 *PHB2* 유전자 발현량에 대한 실험 결과를 Fig. 3에 제시하였다. 매우 제한된 수이지만 정상인 20명을 대상으로 한 말초혈액 단핵구세포에서 *PHB1* 유전자 발현량의 분포는 0.864-0.931 (중앙값 0.906)이었고, *PHB2* 유전자 발현량의 분포는 0.962-0.988 (중앙값 0.970)이었다. 표본수가 적어 Bayesian법(2.5 percentile-97.5 percentile)을 적용하여 참고치를 설정하였을 때, *PHB1*과 *PHB2* 유전자 발현량의 참고범위는 각각 0.892-0.930 및 0.966-0.986이었다. 한편 백혈병환자에서 *PHB1* 유전자 발현량의 분포는 급성골수성백혈병(N=20), 만성골수성백혈병(N=13) 및 급성림프구성백혈병(N=7) 환자에서 0.898-0.993 (중앙값 0.936), 0.817-0.976 (중앙값 0.918), 0.844-1.074 (중앙값 0.973)이었다. *PHB2* 유전자 발현량의 분포는 급성골수성백혈병(N=20), 만성골수성백혈병(N=13) 및 급성림프구성백혈병(N=7) 환자에서

각각 0.957-1.024 (중앙값 0.985), 0.988-1.047 (중앙값 1.002), 0.937-1.059 (중앙값 1.004)이었다. *PHB1* 유전자 발현량은 정상인의 백혈구세포보다 급성골수성백혈병이나 급성림프구성백혈병 세포에서 유의하게 더 높게 나타나는 점을 관찰할 수 있었다($P < 0.05$; Fig. 3). 한편, *PHB2* 유전자 발현량은 정상인의 백혈구세포보다 급성골수성백혈병 또는 만성골수성백혈병 세포에서 유의하게 더 높게 나타나는 것을 알 수 있었다($P < 0.05$; Fig. 3).

7. 검사능(진단효율)검증

GeneMediKit® *PHB1* RT-qPCR (GeneMedica) 키트에 의한 *PHB1* 유전자 정량 발현량 검사의 백혈병에 대한 민감도, 특이도, 양성예측률, 음성예측률 및 검사 효능은 각각 62.5%, 78.9%, 86.2%, 50.0% 및 50.4%였다. 한편 GeneMediKit® *PHB2* RT-qPCR (GeneMedica) 키트에 의한 *PHB2* 유전자 정량검사는 백혈병에 대해 민감도, 특이도, 양성예측률, 음성예측률 및 검사 효능은 각각 80.0%, 70.6%, 86.5%, 60.0% 및 53.1%였다(Table 3).

고찰

PHB 단백질의 기능은 세포내 존재 위치에 따라 그 기능이 결정된다. PHB가 세포막에 존재할 경우 세포막 전달에 관여하는 세포 신호를 조절하고, 핵내에서 PHB는 전사활성화와 세포주기를 조절한다. 미토콘드리아 PHB는 미토콘드리아 유전체를 안정화시킬 뿐만 아니라 미토콘드리아 형태유지, 미토콘드리아 생성과 내인성 세포고사 경로를 조절한다[9]. PHB는 세포 내 세포고사 신호에 따라 핵이나 미토콘드리아에 그 위치를 변경하게 된다. 따라서 PHB는 세포생존과 세포고사에서 매우 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 있다.

종양발생을 포함한 종양병태생리에서 PHB의 분자기능에 대해

서는 확실히 규명되어있지 않지만 최근 연구결과들을 살펴보면, PHB가 전립선암, 난소암, 방광암 및 위암의 발생에서 그 역할이 규명되고 있다[5]. 혈액암, 특히 백혈병의 분자병태 생리에서 PHB의 역할에 대한 연구보고는 이제 시작단계라고 할수 있는데, 최근 미토콘드리아 PHB가 혈액암세포에서 과발현됨이 보고되었고, 이들 세포에서 PHB가 세포고사를 회피하는데 중요한 역할을 함이 보고되었다. 한편 PHB1 및 PHB2 단백질은 정상인으로부터 분리된 말초혈액 단핵구세포보다는 백혈병과림프종 세포에서 매우 높게 발현되어 PHB가 백혈병 등 혈액암에서 새로운 표적치료제 개발을 위한 중요한 분자적 표적이 제시되었다[8]. 본 연구에서도 제한된 수의 백혈병환자의 진단시 검체를 이용하여 *PHB1*과 *PHB2* 유전자 발현량의 분포와 진단적 가치를 평가하여 보았는데, *PHB1* 유전자와 *PHB2* 유전자는 각각 급성골수성백혈병/급성림프구성백혈병, 급성골수성백혈병/만성골수성백혈병 세포에서 발현량이 더 높게 나타남을 확인하였다. 그러나 *PHB1*은 만성골수성백혈병에서, *PHB2*는 급성골수성백혈병에서 정상인과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 분석한 검체수가 적었기 때문에 이에 대한 추가적인 연구분석이 필요할 것으로 판단되었다. 한편, *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 정량 발현량 검사의 각각의 검사 효능은 50.4% 및 53.1%였다.

한편, Mishra와 Nyomba의 연구에서는, 생쥐의 지방조직과 대식세포에서 야생형(wild-type) *PHB* 유전자의 과발현을 유도한 생쥐 실험을 해보았을 때, 암컷과 수컷 생쥐 모두에서 공통적으로 비만이 발생하였으나, 수컷 생쥐에서만 당뇨병과 간암이 추가로 발생하였다. 또, 유전변이 PHB 단백질(tyrosine-114)을 지방세포와 대식세포에 과발현시킨 암컷과 수컷 모두에서 비만이 발생하였는데, 흥미롭게도 간암은 발생하지 않았으나 수컷 생쥐에서는 림프절종양이 발생했다. 따라서 PHB는 비만, 당뇨병, 종양발생과의 연관성을 시사하는 중요한 인자임이 판명된 바 있다[10]. 따라서 본 연구에서 개발한 *PHB* 유전자 정량발현검사 키트는 이러한 비만, 당뇨병, 종양 발생과의 연관성 및 분자병태 생리를 규명하는 데에도 매우 유용하게 이용될수 있을 것으로 판단된다.

PHB는 진화론적으로 잘 보존된 세포내 단백질로서 핵, 세포질 및 세포내소기관등 다양한 세포내 부위에서 다양한 기능을 갖는다. PHB1은 미토콘드리아 기능유지와 생성과정에 필요한 단백질의 입체구조 형성을 도와주는 단백질인자(chaperone)이다[11]. PHB1과 종양발생과의 연관성에 대해서는 최근 중요한 연구들이 보고되었는데, 특히 간세포암과 간담관암에서 PHB1단백 발현이 현저하게 감소되어 있음이 알려졌고, 이들 종양에서 추가적인 연구를 통해 PHB1이 MAT1A 양성 조절인자로 작용하고, 반면에 *c-MYC*, *MYFG*와 *c-MAF* 발현은 억제함이 밝혀져서 간 및 담도계에서 PHB1 단백질 발현의 감소는 간세포암 및 간담관암의 발병에 중요함

이 보고된바 있다[12]. 본 연구에서 개발한 키트는 *PHB1*과 *PHB2* 유전자 발현량을 각각 검사할 수 있어, 아직 간암으로 이행하지 않은 간경구암 병변조직이나 만성 염증성 간조직에 적용한다면 간암의 발생을 예측할수 있는 중요한 검사키트로도 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

PHB2 단백질은 미토콘드리아 내막에 위치하며 이의 기능은 개체 발달과정, 수명조절 등을 포함한 미토콘드리아 동력학(dynamics)을 포함한 다양한 세포 내 조절대사 과정에 중요하다[13]. 손상되었거나 필요하지 않은 미토콘드리아 제거과정(mitophagy)은 종양발생 억제, 신경퇴행성질환/노화예방, 세포기능 항상성 유지를 위해 필수적이다. 최근 PHB2는 mitophagy 수용체로서 그 역할이 명확히 규명되었고, 정상적인 세포기능 유지에도 매우 중요한 단백질이고, PHB2 관련 병태생리는 종양 및 노화 병태생리를 비롯한 다양한 질환에서 그 중요성이 강조되고 있다[14, 15]. 본 연구에서 개발한 GeneMediKit®*PHB2* RT-qPCR (GeneMedica)는 이러한 *PHB2* 유전자 발현량 뿐만 아니라, *PHB1* 유전자 발현량 또한 모든 인체 세포나 조직에 적용하여 검출할 수 있고 병원의 검사현장에서도 쉽게 이용할 수 있도록 개발되었다.

요 약

배경: PHB는 세포 내 신호전달을 조절하고, 핵내에서 전사 활성화와 세포주기를 조절한다. 따라서 PHB 이상발현은 종양발생, 진행 및 만성 대사성질환이나 염증성질환과 관련이 있음이 알려지고 있다. 본 연구에서는 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 정량발현 one-step RT-qPCR키트를 개발하여 이의 검사능을 평가하여 보았다.

방법: TaqMan법을 적용하여 one-step RT-qPCR키트를 개발하였다. 정상인 20명의 말초혈액검체, 급성골수성백혈병 20예, 만성골수성백혈병 13예, 급성림프구성백혈병 7예의 진단시 골수검체와 상화화된 인간유래 RNA 관리물질을 이용하여 개발된 키트의 검사능 평가에 이용하였다.

결과: 개발한 *PHB1* 및 *PHB2* RT-qPCR 키트의 측정내 정밀도와 측정 간 정밀도는 모두 2% 이내의 매우 양호한 정밀도를 보였다. 급성골수성백혈병, 만성골수성백혈병 및 급성림프구성백혈병환자에서 *PHB1* 유전자 발현량은 각각 0.898-0.993, 0.817-0.976, 0.844-1.074이었고, *PHB2* 유전자 발현량의 분포는 각각 0.957-1.024, 0.988-1.047, 0.937-1.059이었다. 개발한 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 정량 발현량 검사키트의 백혈병에 대한 민감도, 특이도, 양성예측률, 음성예측률 및 검사효능은 각각에서 50% 이상이었다.

결론: 본 연구에서 개발한 *PHB1* 및 *PHB2* 유전자 정량발현 one-step RT-qPCR 검사키트는 백혈병 등 혈액암의 진단 및 잔류병소 측정뿐만 아니라, 비만 등 만성대사/염증성질환이나 당뇨병 등의

추적검사 및 새로운 병태생리 규명을 위한 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

이해관계

신명근, 원용관은 GeneMedica의 공동 창업자입니다. 본 연구과제는 GeneMedica에서 어떠한 직접적인 재정지원을 받지 않았음을 밝힙니다.

감사의 글

본 연구는 2018년 과학기술정보통신부 기술이전 사업화 사업과 한국연구재단 이공학 개인 기초학술연구비(NRF-2018R1D1A1B07040984 및 NRF-2019R1F1A1059859) 일부 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Tatsuta T, Model K, Langer T. Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Mol Biol Cell* 2005;16:248-59.
2. Kurtev V, Margueron R, Kroboth K, Ogris E, Cavailles V, Seiser C. Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem* 2004;279:24834-43.
3. Signorile A, Sgaramella G, Bellomo F, De Rasmio D. Prohibitins: a critical role in mitochondrial functions and implication in diseases. *Cells* 2019;8:71.
4. Artal-Sanz M and Tavernarakis N. Prohibitin couples diapause signaling to mitochondrial metabolism during ageing in *C. elegans*. *Nature* 2009;461:793-7.
5. Koushyar S, Jiang WG, Dart DA. Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer Lett* 2015;369:316-22.
6. Dutta D, Ali N, Banerjee E, Singh R, Naskar A, Paidi RK, et al. Low levels of prohibitin in substantia nigra makes dopaminergic neurons vulnerable in Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 2018;55:804-21.
7. Supale S, Thorel F, Merkwirth C, Gjinovci A, Herrera PL, Scorrano L, et al. Loss of prohibitin induces mitochondrial damages altering beta-cell function and survival and is responsible for gradual diabetes development. *Diabetes* 2013;62:3488-99.
8. Ross JA, Robles-Escajeda E, Oaxaca DM, Padilla DL, Kirken RA. The prohibitin protein complex promotes mitochondrial stabilization and cell survival in hematologic malignancies. *Oncotarget* 2017;8:65445-56.
9. Peng YT, Chen P, Ouyang RY, Song L. Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis* 2015;20:1135-49.
10. Mishra S and Nyomba BG. Prohibitin - At the crossroads of obesity-linked diabetes and cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017;242:1170-7.
11. Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:143-55.
12. Fan W, Yang H, Liu T, Wang J, Li TW, Mavila N, et al. Prohibitin 1 suppresses liver cancer tumorigenesis in mice and human hepatocellular and cholangiocarcinoma cells. *Hepatology* 2017;65:1249-66.
13. Merkwirth C and Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:27-32.
14. Lahiri V and Klionsky DJ. PHB2/prohibitin 2: An inner membrane mitophagy receptor. *Cell Res* 2017;27:311-2.
15. Wei Y, Chiang WC, Sumpter R Jr, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell* 2017;168:224-38.e10.