



## 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

의학석사학위논문

# 헌팅턴병에서 긴 비암호화 리보핵산 발현 분석

2014 년 8 월

서울대학교 대학원

자연과학대학 협동과정 뇌과학전공

선우준상

# 헌팅턴병에서 긴 비암호화 리보핵산

## 발현 분석

지도교수 김만호

이 논문을 의학석사학위논문으로 제출함

2014 년 8 월

서울대학교 대학원

자연과학대학 협동과정 뇌과학전공

선우준상

선우준상의 석사학위논문을 인준함

2014 년 8 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 목인희 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ 김만호 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 이상건 \_\_\_\_\_ (인)

## 학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

### 1. 동의사항

- ① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.
- ② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제·배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

### 2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

### 3. 서울대학교의 의무

- ① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.
- ② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문제목 : 헌팅턴병에서 긴 비암호화 리보핵산 발현 분석

제 출 일 : 2014 년 8 월 1 일

서울대학교총장 귀하

## 논문 초록

헌팅턴병은 비정상적인 CAG (cytosine adenine guanine) 삼뉴클레오타이드 확장에 의해서 발생하는 유전성 신경퇴행성 질환이다. 긴 비암호화 리보핵산(long non-coding RNA, lncRNA)은 생체 내에서 풍부하게 발현되는 것에 비해서 그 기능이 잘 알려져 있지 않았으나 최근에 활발한 연구가 진행되고 있다. LncRNA 는 후생유전학적 기전과 전사 과정의 조절 등을 통해 유전자 발현에 관여한다고 알려져 있다. 일부 연구에서 신경계 퇴행성질환에서 lncRNA 가 질병발생에 기여한다는 결과가 밝혀졌으나 헌팅턴병을 대상으로 lncRNA 발현에 대한 유전체 수준의 연구는 아직까지 보고되지 않았다. 이에 헌팅턴병에서 lncRNA 의 발현 변화를 분석하기 위해서 사후 인체 뇌조직을 사용하여 마이크로어레이 분석을 시행하였다. 총 282 개 lncRNA 전사물에서 대조군과 비교하여 헌팅턴병 환자에서 유의한 발현 차이를 보였다. 발현이 증가된 lncRNA 전사물 67 개가 확인되었고, 발현이 감소된 lncRNA 전사물은 215 개였다. 그 중 NEAT1(nuclear paraspeckle assembly transcript 1)의 발현 증가는 정량적 중합효소연쇄반응을 이용하여 확인하였다. 본 연구에서 헌팅턴병 환자의 꼬리핵 조직의 lncRNA 발현 변화를 확인하였다. 이는 헌팅턴병의 질병발생에 lncRNA 가 기여할 가능성을 제시하며 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

**주요어:** 헌팅턴병, 긴 비암호화 리보핵산, 마이크로어레이, NEAT1

**학번:** 2009-22969

## 목 차

제 1 장 서 론 .....	6
제 2 장 재료 및 방법.....	7
제 1 절 조직 수집 및 RNA 추출 .....	7
제 2 절 마이크로어레이 .....	8
제 3 절 정량적 역전사 중합효소연쇄반응.....	9
제 4 절 분석.....	10
제 3 장 결 과 .....	10
제 4 장 고 찰 .....	12
참고문헌 .....	17

## 표 목차

[표 1] .....	21
[표 2] .....	22

## 그림 목차

[그림 1] .....	24
[그림 2] .....	25
Abstract .....	27

## 제 1 장 서론

헌팅턴병(Huntington's disease)은 대표적인 유전성 신경퇴행성 질환으로, 상염색체 우성 유전을 보이며, 인지기능 저하, 무도병 그리고 정신 증상을 특징으로 한다. 원인 유전자인 헌팅틴(huntingtin)의 엑손 1 에 위치한 CAG(cytosine adenine guanine) 삼뉴클레오타이드의 비정상적인 확장이 단백질 말단에 다양한 크기의 글루타민 가닥을 형성하게 된다(1, 2). 돌연변이 헌팅틴은 신경세포 내에 응집을 형성하여 세포의 사멸을 유발하는데, 병리적인 변화는 꼬리핵과 조가비핵에서 비교적 선택적으로 나타나며 중간크기 가시형태의 신경세포가 현저하게 소실되는 특징을 갖는다(3). 헌팅턴병의 원인 유전자가 밝혀진 이후로 신경퇴행의 발병기전에 대한 많은 연구 결과가 보고되었으나 아직도 치료는 대중적인 치료에 머물고 있으며, 병의 경과를 바꿀 수 있는 치료제 중 무작위 대조군 연구를 통해서 효과가 입증된 치료제는 없는 실정이다(2).

비암호화 리보핵산(non-coding RNA, ncRNA)는 일반적으로 단백질을 합성하지 않는 RNA 를 뜻한다. 마이크로어레이와 RNA 시퀀싱 등 유전체 분석 기술의 발전에 의해서 단백질을 합성하는 암호화 유전자는 전체 전사물의 약 3%에 불과하다고 알려지면서, ncRNA 에대한 연구가 과학자들의 이목을 끌고 있다(4). ncRNA 는 200bp 를 기준으로 전사물의 크기에 따라서 small 또는 long ncRNA 두 가지로 분류된다. Small ncRNA 의 가장 대표적인 시스템으로 마이크로알엔에이(microRNA)가 있으며 전사 후 과정에서 유전자 발현 조절에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다(5). Long ncRNA(lncRNA)는

200bp 크기 이상의 open reading frame(ORF)를 포함하지 않는 전사물로 정의되며, ncRNA 중에서 가장 풍부하게 발현되는 그룹으로 알려졌고 최근 가장 활발한 연구가 진행되고 있는 대상이다 (6). lncRNA 는 단백질 합성에 필요한 ORF 가 없기 때문에 RNA 자체로서 생물학적 기능을 할 것으로 추정되었고, 최근까지 연구 결과를 통해 다양한 방식으로 유전자 발현 조절에 관여하는 것으로 알려졌다. 히스톤 단백질의 변형을 통해서 전사과정의 조절 기능이 대표적이며, 이외에도 스플라이싱 변경, 번역 과정 억제, 전사물의 분해 등의 전사 후 과정의 조절도 알려져 있다. 또한 생물학적 상호작용에 의한 조절로 lncRNA 와 단백질간의 결합을 통해서 단백질의 세포 내 국소화를 유발하고 단백질의 활성을 변경함으로써 유전자 발현을 조절한다는 보고도 있다.

헌팅턴병에서 lncRNA 발현 패턴에 대한 유전체 수준의 연구는 아직까지 보고되지 않았다. 이에 저자는 헌팅턴병에서 lncRNA 의 발현이 어떻게 변하는지 확인하기 위해서 헌팅턴병 환자의 뇌조직을 이용하여 마이크로어레이를 시행하였고 대조군과의 발현 차이를 분석하였다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 제 1 절 조직 수집 및 RNA 추출

본 연구는 서울대학교의과대학 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회의 심의면제를 승인 받았다. 인체 사후 뇌조직은 미국 University of Maryland 의 NICHD Brain and Tissue Bank for



Developmental Disorders 를 통해서 얻었다. 환자군은 생전에 헌팅턴병을 진단받은 환자 중 PMI (postmortem interval)가 10 시간 이하에 해당하는 5 명을 선정하였다. 정상 대조군으로 조직은행에 등록된 환자들 중에서 환자군과 성별, 나이, PMI 가 유사한 5 명을 대조군으로 선정하였다. 환자군과 대조군의 인구학적, 임상적 특징을 표로 정리하였다(표 1). 모든 뇌조직은  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관되었으며, 꼬리핵에서 500mg 에 해당하는 크기를 분리하여 본 실험에 사용하였다.

전체 RNA 는 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조자의 지시에 따라서 추출하였다. 추출한 RNA 의 농도와 품질은 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Tech., Rockland, DE, USA)와 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 평가하였다.

## 제 2 절 마이크로어레이

추출한 RNA 샘플 중에서 헌팅턴 환자군과 대조군 각각 RNA 품질이 가장 불량한 샘플 1 개씩을 제외하고 총 8 개 샘플에 대해서 마이크로어레이를 시행하였다. 전체 RNA 는 Low RNA Input Linear Amplification kit PLUS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 증폭 및 Cyanine 3 라벨링 과정을 수행하였고, Agilent Gene Expression Hybridization kit 를 이용하여 Agilent SurePrint G3 Human GE  $8 \times 60\text{K}$  v2 Microarray kit 에 hybridization 을 수행하였다. 이 마이크로어레이는 lncRNA 를 포함한

인간 유전자 전사물에 대한 50,599 개의 탐침으로 구성되어 있으며, 이는 RefSeq, Ensemble, GenBank, 그리고 Broad Institute 등의 공인된 데이터베이스를 기반으로 만들어졌다. Agilent Gene Expression Wash Buffer kit 를 이용하여 세척 과정을 수행한 뒤, Agilent DNA microarray scanner 및 Feature Extraction Software 를 이용하여 스캔 및 영상 분석을 수행하였다. 이후에 Agilent Genespring software 를 이용하여 데이터 표준화를 수행하였다.

### 제 3 절 정량적 역전사 중합효소연쇄반응

헌팅턴 환자군과 대조군 각 5 개 샘플에서 정량적 역전사 중합효소연쇄반응(quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 이용하여 NEAT1 의 발현량을 측정하였다. 모든 qPCR 은 ABI PRISM 7000(Applied Biosystem) 서열 분석 시스템을 사용하여 triplicate 로 수행하였다. 얻어진 Ct(threshold cycle) 값을 이용하여 상대적 발현량을  $2^{-\Delta Ct}$  로 계산하였고, 내부 대조군 유전자로 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)을 선정하여 발현량을 표준화 하였다. NEAT1 primer 서열은 다음과 같다. 정방향 5'-CTTCCTCCCTTTAACTTATCCATTCAC-3'; 역방향 5'-CTCTTCCTCCACCATTACCAACAATAC-3'.

## 제 4 절 분석

마이크로어레이 데이터 표준화 과정은 다음과 같다. 데이터 변환을 통해서 신호강도가 5.0 보다 낮은 값은 noise 의 가능성을 고려하여 5.0 값으로 보정하였다. 전체 탐침에 대한 신호강도의 50 번째 백분위수 값으로 각 탐침의 신호강도를 나누어 표준화 하였다. 표준화된 마이크로어레이 데이터에서 환자군 시료의 신호강도의 평균값을 대조군 시료의 신호강도의 평균값으로 나눈 비율을 산출하여 각 탐침별 발현 변화를 측정하였다. Flag 지표에서 Absent 로 지정된 결과는 분석에 제외하였다. 발현 변화 비율이 2 이상 혹은 0.5 이하이면서 동시에 Student's t-test 결과 p 값이 0.05 미만인 경우를 차별화된 발현 유전자의 기준으로 설정하였다. 계층별 군집분석은 MultiExperiment Viewer(MeV) version 4.9 (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA)를 사용하였다.

정량적 중합효소연쇄반응에서 얻어진 NEAT1 의 상대적 발현량은 Mann-Whitney U test 를 사용하여 그룹별 차이를 비교하였다. 유의한 차이는 p 값 0.05 미만을 기준으로 하였고, 통계 분석 프로그램은 SPSS 21 (IBM, Armonk, NY, USA)을 사용하였다.

## 제 3 장 결과

17,001 개의 lncRNA 전사물에 대한 마이크로어레이 결과 헌팅턴병 환자와 정상 대조군 사이에 차별화된 발현을 보이는 282 개 전사물을 확인하였다. 발현이 증가된 lncRNA 는 67 개였고, 발현이 감소된

lncRNA 는 215 개로 증가된 lncRNA 보다 많이 확인되었다. 발현이 증가된 lncRNA 전사물 중에서 XLOC\_12\_010636 (탐침 번호 A\_21\_P0012722)가 발현 비율 8.45 로 가장 큰 발현 증가를 보였다. 발현이 감소된 lncRNA 전사물 중에서는 LOC100507043 (A\_21\_P0000821)가 발현 비율 0.069 로 발현이 가장 감소되었다. 마이크로어레이 결과에서 발현이 증가된 lncRNA 와 감소된 lncRNA 상위 20 개씩을 표로 정리하였다 (표 2).

유의하게 발현 변화를 보인 282 개 lncRNA 결과를 대상으로 계층별 군집 분석을 시행하고 heatmap 을 작성하였다. LncRNA 발현 패턴을 기반으로 헌팅턴병 환자군과 대조군에서 차별화된 군집을 형성하는 결과를 보였다 (그림 1).

발현이 증가된 lncRNA 전사물 중에서 NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1)과 LINC00341 는 다른 헌팅턴병에 대한 마이크로어레이 연구에서도 발현 증가가 확인되었다(7). NEAT1 의 경우 서로 다른 유전자 서열을 타겟으로 하는 3 개의 독립적인 탐침 (A\_21\_P0011024, A\_19\_P00321333, A\_19\_P00321332)에서 증가가 확인되어 발현 변화에 대한 강한 증거를 시사한다. LINC00341 은 2.02 배로 비율 증가는 크지 않지만 유의한 발현 증가를 보였다. MAGI2-AS3 는 헌팅턴병과 관련되어 보고된 바는 없으나, NEAT1 과 같이 3 개의 독립적인 탐침에 대해서 발현 증가가 확인되었다. 발현이 감소된 lncRNA 중에서 MEG3 (maternally expressed 3), DGCR5 (DiGeorge syndrome critical region 5)의 발현 감소 역시 이전 연구 결과와 일치하였다.

마이크로어레이 결과를 입증하기 위해서 정량적 중합효소연쇄반응을 이용하여 NEAT1 의 발현양을 측정하였고, 헌팅턴병 환자군에서 대조군이 비해 유의하게 발현양이 증가되었다 ( $2.24 \pm 0.92$  vs  $1.00 \pm 0.76$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 5$  per group, 그림 2)

## 제 4 장 고찰

이 연구에서 저자는 마이크로어레이를 이용하여 헌팅턴병에서 lncRNA 의 발현 패턴을 분석하였고, 그 결과 총 215 개의 lncRNA 전사물의 발현이 대조군과 비교하여 유의하게 변화되는 것을 확인하였다.

lncRNA 는 단백질을 합성하지 않는 200bp 이상 크기의 전사물로 정의되며, 단백질을 합성하는 암호화 유전자(coding gene)에 비해서 전사물이 세포 내에 더욱 풍부하게 존재한다는 사실이 밝혀지면서 lncRNA 의 생물학적 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재 상당수의 lncRNA 가 암호화 유전자의 발현을 조절하는 역할을 한다고 알려졌으며, X 염색체 불활성화에 관여하는 lncRNA XIST 의 연구가 대표적이다. 불활성화되는 X 염색체에서 발현되는 XIST 는 PRC2(polycomb repressive complex 2)를 동원하여 히스톤단백의 메틸레이션에 의한 이질염색질(heterochromatin) 형성을 유발하고 후생유전학적 조절을 통해서 전사 과정의 유전자의 기능을 억제함이 알려졌다 (8). 신경계질환과 관련된 lncRNA 로는 알츠하이머병에서 BACE1-AS(beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 antisense transcript)가 대표적이다. 이는 암호화 유전자인 BACE1 의

반대편 가닥에서 전사되는데 BACE1 mRNA 와 결합하여 안정성을 증가시키고 마이크로어레이 결합부위를 차단하여 mRNA 의 분해를 억제시킴으로써 BACE1 발현을 증가시키고 결과적으로 아밀로이드 베타 단백질의 축적을 유발한다(9). BACE1-AS 의 발현은 알츠하이머병 동물모델뿐 아니라 환자 뇌조직에서도 발현 증가가 확인되었고, 결론적으로 lncRNA 가 알츠하이머병의 질병발생에 직접적으로 관여할 가능성을 시사한다. 알츠하이머병과 헌팅턴병 등 다양한 신경퇴행성 질환의 질병 기전에 중요한 인자로 알려진 BDNF(brain derived neurotrophic factor)에서도 발현을 조절하는 lncRNA 인 BDNF-AS 가 알려졌다(10). 이는 BDNF 유전자의 반대 가닥에서 전사되며 히스톤 메틸레이션을 통해 후생유전학적으로 BDNF 의 발현을 억제한다. BDNF-AS 를 제거함으로써 BDNF 의 발현이 증가되고 신경세포의 성장과 증식이 증가되는 결과가 확인되었다.

헌팅턴병과 직접적으로 관련된 lncRNA 에 대한 연구는 거의 보고된 바가 없으며, HAR1(human accelerated region 1)이 헌팅턴병에서 발현이 감소된다는 결과가 유일하다(11). 헌팅턴병에서 REST(RE1 silencing transcription factor)에 의한 광범위한 유전자의 발현 억제가 발생하기 때문에, REST 의 타겟이 되는 lncRNA 역시 헌팅턴병에서 발현이 감소된다는 것을 확인하였으나 헌팅턴병의 기전과 관련된 HAR1 의 기능적 연관성은 밝혀내지 못했다.

헌팅턴병에서 유전체 수준(genome-wide)의 lncRNA 프로파일링 역시 거의 연구되지 않았으나, 유일하게 마이크로어레이 데이터 마이닝을 통한 결과가 보고되었다(7). 하지만 이는 lncRNA 분석을 위해 마이크로어레이를 수행한 연구가 아니라, mRNA 분석에 사용된

마이크로어레이에서 lncRNA 에 해당하는 데이터를 추출하여 재분석한 연구이다. 저자의 연구에서 lncRNA 에 대한 탐침이 17,001 개가 포함되고 215 개 lncRNA 의 발현 변화를 확인한 것과 비교하면, 탐침의 수가 1,127 개로 제한적이며 발현차이가 확인된 lncRNA 가 7 개에 불과하기 때문에 전체 유전체에 대한 분석이라고 보기 어렵다. 이런 방법적인 차이에도 불구하고 lncRNA 의 발현변화는 본 연구와 어느 정도 일치하는 결과를 보였다. 앞선 연구에서 확인된 7 개의 lncRNA 중에서 NEAT1, LINC00341, MEG3, DGCR5 의 발현 변화는 본 연구에서도 동일한 양상으로 관찰되었다. TUG1 은 이전 연구에서 발현이 증가되었으나, 본 연구에서는 증가의 정도가 유의하지 않았다. 나머지 2 개 lncRNA(RPS20P22, LINC00342)는 본 연구에 사용된 마이크로어레이에 포함되지 않아 발현 차이가 확인되지 않았다.

발현이 증가된 lncRNA 중 NEAT1(nuclear paraspeckle assembly transcript 1)에 주목할 필요가 있다. NEAT1 은 핵 내부에 존재하는 소체 중 하나인 파라스페클(Paraspeckle) 형성에 필수적인 구조물로 알려져 있다(12). 인간 염색체 11 번에 위치한 MEN1 (multiple endocrine neoplasia 1) 유전자에서 전사되며, 전사물은 3.7kb 크기의 NEAT1\_1 과 23kb 크기의 NEAT1\_2 두 가지 형태로 구성된다(13). 인간에서 뇌를 포함한 다양한 장기에서 발현이 되고 포유류의 여러 종에서도 발현이 확인되었으며, 일반적인 lncRNA 와는 다르게 진화학적으로 유전자 서열이 보존되는 사실은 NEAT1 이 생체 내에서 중요한 기능을 할 가능성을 시사한다(14). NEAT1 의 발현 증가는 일본뇌염바이러스, 광견병 바이러스, 그리고 인체면역결핍바이러스 감염에서 보고되었으며(15, 16), 인간 배아줄기세포 분화과정에서도

발현이 증가가 보고된 바 있다(17). 인체 뇌조직을 이용한 연구에서 헤로인 남용과 관련하여 중격핵(nucleus accumbens)에서 NEAT1 이 증가되었다는 보고가 있으나, 현재까지 뇌질환과 관련된 NEAT1 의 역할은 명확히 밝혀지지 않았다(18). 최근 파라스페클과 함께 NEAT1 이 세포 내 분자 스펀지(molecular sponge)로 작용하여, mRNA 혹은 전사인자와 같은 단백질을 파라스페클 내로 격리시키고 이를 통해서 타겟 유전자의 발현 조절에 관여한다는 사실이 알려졌다(19). 특히 프로테아좀(proteasome) 억제에 의한 NEAT1 발현 증가 연구 결과에 주목할 필요가 있는데, 파라스페클 형성에 필수적인 단백질인 동시에 유전자의 전사인자로 작용하는 SFPQ(splicing factor proline/glutamine-rich)를 파라스페클 내로 격리시킴으로써 NEAT1 이 전사과정에서 유전자 발현을 조절하는 역할이 밝혀졌다(20). 이를 통해서 NEAT1 과 파라스페클은 스트레스에 반응하는 일종의 센서로 작용하며 전사 수준의 유전자 발현 조절 과정을 통해서 스트레스에 대응하는 반응을 유발한다고 볼 수 있다.

이 연구 결과들은 NEAT1 이 헌팅턴병의 질병기전에 중요한 역할을 할 가능성을 제시한다. 첫째로 NEAT1 의 발현을 증가시키는 프로테아좀 억제는 비정상 단백질의 세포 내 축적과 관련된 헌팅턴병 병리의 중요한 인자이다. NEAT1 의 증가가 헌팅턴병에서 어떻게 작용하는지는 아직 알려지지 않았으나, NEAT1 을 녹아웃(knock out)시켰을 때 프로테아좀 억제에 의한 세포사멸이 증가된다는 결과는 NEAT1 이 헌팅턴병에서 세포사멸을 억제하는 방향으로 작용할 가능성을 시사한다. 향후 헌팅턴병 모델을 이용하여 NEAT1 억제 혹은 과발현이 세포사멸에 어떻게 작용하는지 확인할 필요가 있다. 두번째로 NEAT1 과



파라스페클이 분자 스펀지로서 전사 인자의 조절에 작용한다는 점이다. 헌팅턴병에서 전사 조절 이상으로 인한 광범위한 유전자의 발현 변화가 발생한다는 것은 잘 알려져 있다(21). 하지만 일부 전사 인자의 경우 돌연변이 헌팅틴 단백질이 전사 인자의 장애에 어떻게 작용하는지 명확히 알려지지 않았다. NEAT1 및 파라스페클이 전사 인자 변화에 작용할 가능성이 있으며 이에 대한 연구가 필요하다.

본 연구는 인체 사후 뇌조직을 이용한 연구로 샘플 퀄리티의 제한점이 있다. 사후 뇌조직은 시간 경과에 따라서 RNA 의 분해가 일어나며, 쥐의 뇌조직을 이용한 연구에서 사후 2 시간 이후부터 RNA 퀄리티의 저하가 발생한다고 알려져 있다(22). 조직은행에서 얻을 수 있는 헌팅턴병 뇌조직의 가장 짧은 PMI 시간은 2-10 시간이었고, RNA 퀄리티 저하는 감수할 수 밖에 없었다. 그러나 마이크로어레이에서 밝혀진 NEAT1 의 발현 증가가 정량적 중합효소연쇄반응에서도 확인되었고, 헌팅턴병의 인체 뇌조직을 이용한 다른 연구 결과와 대부분 일치하는 결과를 보인 점은 본 연구 결과를 신뢰할 수 있는 증거가 된다.

이 연구를 통해 헌팅턴병의 신경퇴행이 명확하게 발생하는 꼬리핵 조직에서 lncRNA 의 발현이 변화되는 결과를 확인하였다. 앞으로 lncRNA 가 헌팅턴병의 질병발생에 어떻게 작용하는지에 대한 추가 연구가 필요하다.

## 참고 문헌

1. MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, Myers RH, Lin C, Srinidhi L, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993;72(6):971–83.
2. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet neurology*. 2011;10(1):83–98.
3. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet*. 2007;369(9557):218–28.
4. Schaukowitch K, Kim TK. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs. *Neuroscience*. 2014;264:25–38.
5. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215–33.
6. Wu P, Zuo X, Deng H, Liu X, Liu L, Ji A. Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin*. 2013;97:69–80.
7. Johnson R. Long non-coding RNAs in Huntington's disease neurodegeneration. *Neurobiology of disease*. 2012;46(2):245–54.
8. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 2008;322(5902):750–6.

9. Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nature medicine*. 2008;14(7):723–30.
10. Modarresi F, Faghihi MA, Lopez-Toledano MA, Fatemi RP, Magistri M, Brothers SP, et al. Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nature biotechnology*. 2012;30(5):453–9.
11. Johnson R, Richter N, Jauch R, Gaughwin PM, Zuccato C, Cattaneo E, et al. Human accelerated region 1 noncoding RNA is repressed by REST in Huntington's disease. *Physiological genomics*. 2010;41(3):269–74.
12. Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T. MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(8):2525–30.
13. Naganuma T, Hirose T. Paraspeckle formation during the biogenesis of long non-coding RNAs. *RNA biology*. 2013;10(3):456–61.
14. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC genomics*. 2007;8:39.

15. Saha S, Murthy S, Rangarajan PN. Identification and characterization of a virus-inducible non-coding RNA in mouse brain. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 7):1991–5.
16. Zhang Q, Chen CY, Yedavalli VS, Jeang KT. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *mBio*. 2013;4(1):e00596–12.
17. Chen LL, Carmichael GG. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Molecular cell*. 2009;35(4):467–78.
18. Michelhaugh SK, Lipovich L, Blythe J, Jia H, Kapatos G, Bannon MJ. Mining Affymetrix microarray data for long non-coding RNAs: altered expression in the nucleus accumbens of heroin abusers. *Journal of neurochemistry*. 2011;116(3):459–66.
19. Fox AH, Lamond AI. Paraspeckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(7):a000687.
20. Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(1):169–83.
21. Sugars KL, Rubinsztein DC. Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(5):233–8.
22. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim JH, Huh JY, Yoon H, et al. miR-206 regulates brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer disease model. *Annals of neurology*. 2012;72(2):269–77.



**Table 1. Demographic characteristics.**

Subject	Age (year)	Sex	Ethnicity	PMI (hour)	Cause of Death
HD					
1	43	Male	Caucasian	10	Complication of HD
2	55	Male	Caucasian	10	Complication of HD
3	78	Female	Caucasian	2	Complication of HD
4	82	Female	Caucasian	6	Complication of HD
5	69	Female	Caucasian	10	Chronic obstructive pulmonary disease
Control					
1	43	Male	Caucasian	9	Drug intoxication
2	56	Male	Caucasian	10	Atherosclerotic cardiovascular disease
3	77	Female	Caucasian	8	Drowning
4	80	Female	Caucasian	10	Pneumonia
5	71	Female	Caucasian	9	Multiple medical disorders

HD=Huntington's Disease, PMI=postmortem interval

**Table 2. Top 20 up-regulated and down-regulated lncRNAs in Huntington' s disease.**

Up-regulated lncRNA				Down-regulated lncRNA			
Probe ID	Gene symbol	Fold change	p-value	Probe ID	Gene symbol	Fold change	p-value
A_21_P0012722	XLOC_l2_010636	8.45395	0.001268396	A_21_P0000821	LOC100507043	0.06908785	6.25E-04
A_21_P0012583	XLOC_l2_010636	7.653006	0.002893021	A_21_P0000620	LOC386597	0.09113867	0.008617504
A_21_P0001639	XLOC_001246	6.7311053	0.002965137	A_21_P0006580	XLOC_008152	0.10241947	0.006542555
A_19_P00322310	LOC100505702	5.42353	0.026987325	A_32_P68942	ANKRD20A5P	0.11718879	8.43E-04
A_33_P3409518	TUBBP5	4.3138814	0.017883409	A_33_P3254380	SLC9A7P1	0.12419593	0.00907131
A_21_P0000797	LOC100506795	4.263572	0.047895305	A_21_P0009612	LOC100505797	0.12894118	0.022462659
A_21_P0004047	XLOC_004512	4.1573763	0.003163185	A_21_P0010315	XLOC_013980	0.12958041	8.25E-04
A_24_P391991	FAM183B	3.6566143	0.005140839	A_21_P0010427	XLOC_014280	0.14684318	0.025349729
A_21_P0011024	NEAT1	3.6418896	0.007995949	A_21_P0011169	XLOC_l2_003881	0.14756957	0.001755869
A_23_P359214	LOC643650	3.3564487	0.007077519	A_21_P0008848	XLOC_011480	0.15306382	0.010970537
A_24_P303420	LOC221442	3.3485637	0.002010482	A_21_P0012221	C21orf81	0.15384118	4.31E-04
A_24_P300302	ZNF300P1	3.245677	0.048480712	A_33_P3216098	DGCR9	0.15388373	8.57E-08
A_21_P0002667	XLOC_002192	3.134458	6.42E-04	A_21_P0012310	XLOC_l2_009292	0.16474827	0.003020729
A_21_P0005047	XLOC_005793	3.071281	0.006350786	A_33_P3251492	LOC100133669	0.17532669	0.015644684
A_21_P0004244	XLOC_004361	3.0669324	2.80E-04	A_21_P0014217	LOC100507278	0.18101996	0.003135898
A_21_P0010773	FLJ43315	3.066572	0.006953586	A_19_P00315647	LOC100507165	0.18337914	0.02470184

A_21_P0009073	XLOC_012025	2.9862394	8.27E-04	A_19_P00812924	LOC100507165	0.19136904	0.027266584
A_21_P0002865	XLOC_003176	2.9539936	0.016393311	A_21_P0000960	XLOC_000107	0.19180088	0.002333565
A_21_P0011017	XLOC_12_002767	2.938818	0.00198233	A_21_P0010798	LOC646627	0.1919172	0.001340138
A_23_P256965	C8orf12	2.8825705	0.02935191	A_23_P63736	LOC84856	0.19212113	0.009129975

---



Figure 1.

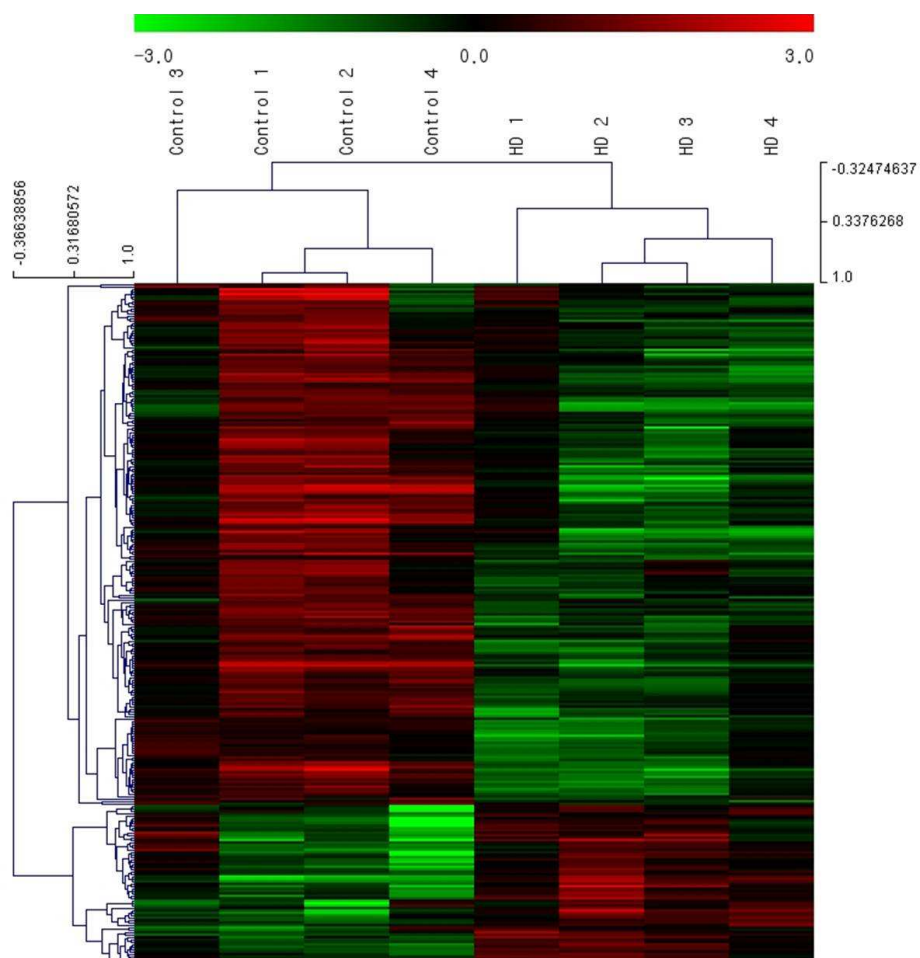
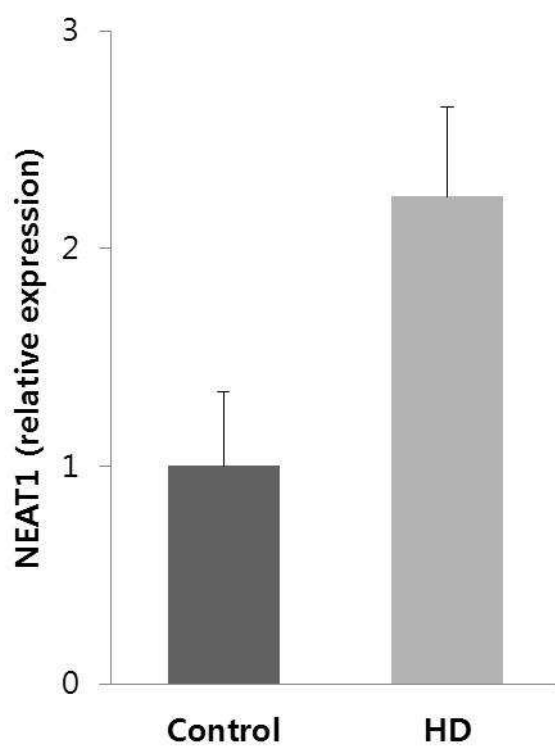


Figure 2.



## Figure legends

Figure 1. Heatmap showing differentially expressed lncRNAs from caudate nucleus of Huntington's disease patients compared with those of normal controls. Each row represents one lncRNA, and each column represents one brain sample. The relative lncRNA expression is represented according to the color scale. Red indicates up-regulation, and green indicates down-regulation. The differentially expressed lncRNAs segregate brain samples into Huntington's disease and control clusters.

Figure 2. Validation of the up-regulated NEAT1 in Huntington's disease (HD) by qRT-PCR. The caudate nucleus samples from Huntington's disease patients showed higher expression of NEAT1 compared to those of normal controls ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test). The expression level of NEAT1 was normalized to Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Error bars represent the standard error of the mean.

## Abstract

# Analysis of Long non-coding RNA expression in Huntington's Disease.

Jun-Sang Sunwoo

Interdisciplinary Program in Neuroscience

College of Natural Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disease caused by the abnormal expansion of CAG (cytosine adenine guanine) trinucleotide repeats. Recently attention has focused on long non-coding RNA (lncRNA) which is the most abundant but poorly understood group. An increasing amount of evidence suggests that lncRNAs are involved in a variety of regulatory process, including epigenetic regulation and transcriptional regulation. A small number of studies have revealed clues that lncRNAs are associated with neurodegenerative diseases, but there are few reports regarding genome-wide lncRNA expression change in HD. To discover lncRNAs involved in HD, microarray analysis was performed using caudate nucleus of human brain. A total of 282 lncRNA transcripts were differentially expressed in HD compared with normal control. There were 67 up-

regulated lncRNAs and 215 down-regulated lncRNAs, which was consistent in part with previously reported data. Among them up-regulation of NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) was validated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction. Our data demonstrated differential expression of lncRNAs in caudate nucleus of HD, suggesting possibility that dysregulation of lncRNAs accompany neurodegeneration in HD. Further research is needed to assess the functional implication of lncRNAs in HD.

**Keywords:** Huntington's disease, long non-coding RNA, microarray, NEAT1

**Student Number:** 2009-22969