



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](#)

인플루엔자 바이러스(H1N1) 감염
마우스 모델을 통한 Beclin-1
유전자의 생리학적 역할 규명

연세대학교 대학원

의과학과

오 지 환

인플루엔자 바이러스(H1N1) 감염
마우스 모델을 통한 Beclin-1
유전자의 생리학적 역할 규명

지도교수 유 지 환

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

오 지 환

오지환의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 유 지 환 인

심사위원 윤 상 선 인

심사위원 최 준 용 인

연세대학교 대학원

2016년 6월

감사의 글

내용

쉽지 않았다. ‘석사’ 라는 학위를 수여 받기까지. 수많은 내적 갈등과 수많은 외적 갈등들로 둘러싸여 학위를 마치기까지 그 과정이 쉽지 않았다. 이런 시간들을 잘 견딜 수 있었던 것은 많은 교수님들과 주변 동료들의 지도와 관심. 그리고 도움들 덕분인 것 같다.

처음부터 끝까지 지도해주신 유지환 교수님과 윤상선 교수님, 그리고 최준용 교수님 감사합니다. 논문을 쓰기까지 훌륭한 연구 환경을 만들어주신 윤주현 교수님, 학문적으로나 인격적으로 많은 조언을 해주신 김창훈 교수님, 그리고 매번 여쭙볼 때마다 도와주신 이상남 교수님까지 진심으로 감사 드립니다.

그리고 가족보다도 더 오래 함께하며 실험도 도와주고 어려움도 나누며 많은 도움을 주었던 동료 선생님들도 감사 드립니다.

힘든 과정 중 나의 모든 부족한 모습을 품어준 사랑하는 우리 가족들도 너무나 고맙고 사랑합니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 재료	6
가. 세포와 바이러스	6
나. 실험 동물 및 방법	6
(1) Mouse	6
(2) Virus 감염	7
다. 항체와 시약	7
2. 방법	7
가. Lung sampling	7
나. Quantitative PCR	8
다. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)	10
라. Flow cytometry (FACS assay)	10

마. Histopathology	11
바. Virus titer 측정	11
사. 통계분석	11
III. 결과	12
1. IAV 감염으로 인한 Mouse의 생리학적 변화	12
2. $Becn1^{+/+}$ 에 비해 IAV에 대해 향상된 저항성을 보이는 $Becn1^{+/-}$	15
3. $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 차이가 없는 바이러스 농도	17
4. $Becn1^{+/-}$ 에서 높게 발현되는 항 바이러스성의 Cytokine과 Chemokine 유전자	19
5. $Becn1^{+/-}$ 에서 유일하게 단백질의 발현도 증가하는 CXCL-10	23
6. IAV 감염 시 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 감소되는 호흡기 상피세포사멸	25
7. IAV에 저항성을 띄는 $Becn1^{+/-}$ 의 Lung에서 관찰한 호흡기 상피세포 상의 병리학적 차이	28

IV. 고찰	30
V. 결론	34
참고문헌	36
Abstract	40

그림 차례

- 그림 1. IAV에 감염된 mouse의 생리학적인 변화관찰
..... 13
- 그림 2. Influenza A virus에 감염 시킨 후 4일 동안의
체중 측정 결과..... 16
- 그림 3. Mouse lung에서의 viral gene과 바이러스 농도
측정 18
- 그림 4. IAV에 감염된 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 의 lung
에서의 감염관련 유전자들의 발현 비교 .. 21
- 그림 5. IAV 감염 시 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 에서 분비된
cytokine들을 ELISA로 측정 24
- 그림 6. $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 의 Lung에서 Myeloid cell과
Airway epithelial cell의 death를 비교 .. 26

그림 7. 감염 후 4일이 지난 mouse의 lung 조직을 H&E
staining한 뒤 관찰 29

표 차례

표 1. Quantitative PCR에 사용한 primers	9
--	---

국문요약

인플루엔자 바이러스(H1N1) 감염 마우스 모델을 통한

Beclin-1 유전자의 생리학적 역할 규명

인플루엔자 A 바이러스 감염으로 인해 심각한 폐 손상을 앓는 환자들이 매년 꾸준히 발생하고 있다. 지금까지 인플루엔자 A 바이러스 관련 연구들은 면역반응을 유도하고 감염에 의해 활성화되는 물질의 기능을 Macrophage와 Memory B cell과 같은 세포에서 규명한 결과들이 대부분이다. 최근 들어 바이러스들이 Autophagy를 이용하여 자가 복제에 이용한다는 연구결과들이 발표됨에 따라 인플루엔자 A 바이러스와 Autophagy의 관계에 대한 연구도 많이 이뤄지고 있다. 특히, M2 단백질은 Beclin-1과 결합하여 Autophagosome과 Lysosome간의 fusion을 막아 Autophagosome을 축적시키게 되고 이것을 바이러스는 복제 과정을 위한 보호소로 이용한다.

본 연구에서는 인플루엔자 A 바이러스를 감염시킨 mouse model을 통해 Beclin-1 유전자의 역할을 확인하고자 했다. 가장 먼저 Beclin-1 유전자가 knock out된 Mouse에 인플루엔자 A 바이러스를 감염시켜 체중 변화를 관찰한 결과 체중이 덜 감소하는 점을 확인하였다. 먼저, 이러한 경향이 바이러스

농도가 감소함으로 인한 결과인지를 확인해보았고 차이가 없음을 확인했다. 이러한 근거로 Beclin-1이 바이러스 복제에는 영향을 주지 않을 것이라고 예상할 수 있었다. 다음으로 숙주세포의 향상된 바이러스 저항성에서 비롯된 결과인지 확인하기 위해 항 바이러스 관련 Cytokine들의 유전적, 단백질적 발현 수준을 확인해보았다. 그 결과, $Becn1^{+/-}$ 에서 인터페론 $\lambda 3$ 와 CXCL-10 유전자가 높게 발현되었고 동시에 호흡기 상피세포의 사멸이 감소하는 점을 확인하였다. 본 실험 결과로 인플루엔자 감염으로 인한 인터페론 $\lambda 3$ 와 CXCL-10의 분비와 세포사멸 기전에서 beclin-1이 중요한 역할을 할 것이라는 점을 예상할 수 있었다. 이런 향상된 저항성이 상피세포 사멸의 감소가 원인인지 아니면 Beclin-1에 의해 향상된 항 바이러스성 Cytokine과 Chemokine이 원인인지를 규명하기 위해 *in vitro* 상의 세포 기전 연구가 필요하지만 바이러스에 의해 야기된 심각한 폐 손상이 나타나기 까지 beclin-1이 중요한 매개 인자로 작용할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

더 나아가 본 연구 결과가 바이러스 감염 후기 Beclin-1의 발현을 억제시켜 호흡기 상피세포의 손상을 줄여줌으로써 바이러스 감염 치료에 새로운 방법을 제시할 것으로 기대한다.

핵심되는 말 : 인플루엔자 A 바이러스, 호흡기 상피세포, Beclin-1, 세포 사멸

인플루엔자 바이러스 (H1N1) 감염 마우스 모델을 통한
Beclin-1 유전자의 생리학적 역할 규명

<지도교수 유지환>

연세대학교 대학원 의과학과

오 지 환

I. 서론

인플루엔자 A 바이러스 (Influenza A virus, IAV)는 이중 음성 가닥 바이러스로 8개의 조각으로 이루어진 오소믹소 바이러스 (Orthomyxovirus) 과의 대표적인 예이다. World Health Organization (WHO)에 의하면 IAV에 의해 매년 3~5백만명의 중증 환자들이 발생하고 있고 대략 25만에서 50만명이 사망에까지 이르게 된다.¹ 이로 인한 감염으로부터 회복되기까지 필요한 사회적 비용은 연 10억 달러로 추정된다.²

이런 인플루엔자 A 바이러스는 가장 먼저 숙주의 호흡기 상피세포를 감염시키는데, 대부분의 호흡기 상피세포에서 발현되어 있는 시알산 수용체가 매개하는 내포작용을 거쳐 세포 내로 들어간다. 세포 내로 들어간 바이러스는 세포 내의 방어기전을 방해함과 동시에

바이러스 복제를 촉진시킨다.³ 최근들어 인플루엔자 바이러스가 호흡기상피세포에서 Autophagy를 이용해 이런 바이러스 복제과정을 촉진시킨다는 연구결과⁴가 있기도 하고, 바이러스에 감염된 Memory B cell에서는 바이러스가 자가 복제를 위해 Autophagy기전을 이용하기 보다는 B 세포를 안정된 상태로 유지시킨다는 결과도 있다.⁵ 이렇듯 세포 종류에 따라 바이러스는 Autophagy 기전을 다양하게 이용한다. 이러한 Autophagy mechanism은 처음 효모에서 발견된 기전으로 오래된 단백질과 Organelle들을 제거하거나 재활용할 때 주요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 효모의 Autophagy 기전 관련 유전자는 지금까지 약 20개가 밝혀졌는데, 사람에서 이와 상응하는 유전자들도 다수 밝혀졌으며⁶ 대표적으로 효모의 ATG6와 상응하는 Beclin-1 유전자의 경우 소포체에서의 Autophagosome 형성과 Autophagosome과 Lysosome간의 결합을 매개하는데 중요한 역할을 한다.

IAV는 이런 숙주세포의 Autophagy 기전을 시기에 따라 다르게 이용한다. 즉, 감염 초기 Autophagy 기전은 세포사멸을 억제하다가 감염 후기에는 반대로 세포사멸을 유도한다는 것이다. IAV는 감염 초기에는 호흡기 상피세포에서 숙주세포의 Autophagosome 성숙을 억제시켜 Lysosome과의 결합이 막히게 되고 바이러스는 이를 보호소로 이용한다.⁷ 이 과정을 매개하는 바이러스 단백질은 M2 단백질이며, 이 단백질은 이온 채널 단백질로 LC3와 Beclin-1이 결합하는 부분²이 존재하는데 M2 단백질의 N-terminal쪽 60개의 아미노산 부분과 beclin-1이 결합한다는 점은 이미 규명되었다.^{8,9} 이런 결합으로 인해 바이러스는 숙주에서 성공적으로 Lysosome과의 결합을 막게 되고 축적된 Autophagosome은 바이러스 증식에 적합한 환경을 만들어 주어 복제를 촉진시킨다.¹⁰

반대로 감염 후기에는 바이러스가 Autophagy를 이용해 세포 사멸을

유도할 가능성이 있다.¹¹ 이와 관련된 많은 가설들은 공통적으로 모두 감염 초기부터 지속적으로 생성된 M2 단백질로 인해 세포 내 스트레스가 증가한다는 것이지만, 구체적인 기전을 거쳐 세포 수축을 일으키게 되고 그 결과 세포사멸까지 이르게 하는 지에 대해서는 차이점이 있다.^{12,13} 결론적으로 IAV는 시기, 규모, 그리고 세포소멸기전에서 다양하게 Autophagy를 이용하고 세포 사멸 단계까지도 이 기전을 이용할 것으로 예상된다.¹¹ 이런 연구경향에 따라 최근 IAV 감염 시 ATG5와 ATG7의 기능에 관한 연구결과도 발표되었다.¹⁰

최근 Autophagy와 IAV 감염을 키워드로 하는 많은 연구 결과들이 발표되고 있는데,^{14,15} 마우스를 이용한 체내에서의 Beclin-1 (ATG6)의 역할에 대한 결과가 아직 보고된 바가 없고 무엇보다 대부분의 바이러스 감염 관련 논문들은 감염 초기에 일어나는 일들을 중심으로 하는 구체적인 기전에 관한 연구결과들이었다. 그래서 본 연구는 감염 후기라는 시기에 마우스를 이용한 체내에서의 Beclin-1의 역할을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 세포와 바이러스

본 실험에 사용한 Influenza A Virus / WSN / 1933 (H1N1)는 Mouse에 적응과정을 거친 바이러스로 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)을 이용하여 농도를 측정하였다. MDCK는 10% Bovine Serum Albumin (BSA)과 1% Penicillin / Streptomycin (P/S)가 포함된 Minimum Essential Medium (MEM) Media에서 배양한다. BSA, P/S, MEM media는 Gibco (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA)에서 구입하였고 cell은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양되었다.

나. 실험 동물 및 방법

(1) Mouse

감염 실험 시 7-9주령 된 수컷 Mouse를 사용했다. C57BL/6를 바탕으로 하는 Wild-Type Mouse (Oriental bio, Seoul, Korea)를 대조 군으로 하고 실험 군으로는 *Becn1*^{+/-}을 사용한다. *Beclin-1* gene이 완전히 Knock out되면 미발달 치사 표현형을 보여 실험에는 Hetero type의 mouse를 사용하였고 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였다. 모든 동물들은 SPF (specific, pathogen -free conditions) 구역에서 사육되며 연세대학교 의과대학의 Institutional Review Board로부터 승인 하에 진행 되었다. (IRB: 2015-019)

(2) Virus 감염

Influenza A virus (H1N1) 는 Virus Growth Media에 희석한다. Virus Growth Media의 조성은 10% Bovine Serum Albumin (BSA), 1M HEPES (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA), 0.25% Trypsin을 EMEM (Lonza, Basel, Switzerland)으로 구성된다. 200pfu/20 μ l의 IAV를 Mouse의 Intranasal로 감염시킨다.¹⁶ 감염 후 생리학적인 변화를 확인하기 위해 매일 체중을 측정한다.

다. 항체와 시약

본 실험에 사용하는 모든 항체는 Anti-Mouse 이며 종류는 다음과 같다. CD326, CD31, CD45, TER-119에 대한 FACS용 항체는 BD bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였으며 LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit는 Thermo Fisher scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. FACS assay를 하기 위해 Mouse Lung을 Single Cell로 만들 때 사용하는 buffer는 HBSS buffer에 1% Type 2 collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)를 섞은 Buffer를 사용하였다.

2. 방법

가. Lung sampling

Zoletil 50 (Virbac, Bogotá D.C., Colombia) 30mg/kg과 Rompun (Bayer, Leverkusen, Germany) 10mg/kg로 섞어 마취시킨다. 이후 왼쪽 엽은 조직병리분석용으로 사용하고 오른쪽 엽은 RNA 추출과 virus 농도 측정, FACS assay용으로

사용한다. 각각의 용도에 맞게 RNA용은 QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Hilden, Germany)에 넣고, virus 농도 측정용은 Hank' s Balanced Salt Solution (Welgene, deagu, Korea)에, FACS assay용은 1% Type 2 collagenase buffer (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)에 넣고 조직을 균질 하게 파쇄시킨다.

나. Quantitative PCR

Lung sampling으로 얻은 한 엽의 lung을 trizol reagent에 넣어 total RNA를 추출한다. 추출한 1 μ g의 RNA를 template로 하여 reverse transcription과정을 거쳐 cDNA를 합성한다. 이때 최종 volume은 20 μ l로 한다. Virus RNA는 uni12 primer를, host의 RNA는 random hexamer를 primer로 이용하였으며 나머지는 M-MLV RT Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) 를 이용하였다. 합성한 cDNA에 80 μ l의 ddH₂O를 넣어 희석시키고, 5 μ l의 KAPA SYBR® fast qpcr kits (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA)와 2 μ l의 ddH₂O, 그리고 0.5 μ l의 확인하고자 하는 유전자의 primer 한 쌍을 섞어준 뒤 2 μ l의 합성한 cDNA를 첨가함으로써 최종 부피를 10 μ l로 하였다. Realtime-PCR은 Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기기를 사용하였고 Stage 1(50 $^{\circ}$ C에서 2분), Stage 2(95 $^{\circ}$ C에서 10분), Stage 3 (95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분, 40 cycle), Stage 4(95 $^{\circ}$ C에서 15초, 60 $^{\circ}$ C에서 30초, 95 $^{\circ}$ C에서 15초)로 실험하였다. 실험에 사용한 primer들은 cosmo genetech(Seoul, Korea)에서 합성 의뢰하였다. (표 1)

표 1. Quantitative PCR에 사용한 primers

종류		sequence	
NS	F	5'	- AGCAAAAGCAGGGTGACAAAGACA -3'
	R	5'	- TCGGTGAAAGCCCTTA -3'
M1	F	5'	- AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA -3'
	R	5'	- CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC -3'
M2	F	5'	- AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA -3'
	R	3'	- CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC -3'
IFN- β	F	5'	- ATGAACAACAGGTGGATCCTCC -3'
	R	3'	- AGGAGCTCCTGACATTTCCGAA -3'
IFN- γ	F	5'	- GCCATCAGCAACAACATAAGCGTC -3'
	R	3'	- CCACTCGGATGAGCTCATTGAATG -3'
IFN- λ 2	F	5'	- TCCCAGTGGAAGCAAAGGATTG -3'
	R	3'	- TCAAGCAGCCTCTTCTCGATGG -3'
IFN- λ 3	F	5'	- AGCTGCAGGTCCAGGAGCC -3'
	R	3'	- GGTGGTCAGGGCTGAGTCATT -3'
IL-6	F	5'	- TGGAGTCACAGAAGGAGTGGCTAAG -3'
	R	3'	- TCTGACCACAGTGAGGAATGTCCAC -3'
CXCL10	F	5'	- CCTTAAACCAGAGGGGAGC -3'
	R	3'	- CCTCTGTGTGGTCCATCCTT -3'
FasL	F	5'	- GGCTCCTCCAGGGTCAGTTT -3'
	R	3'	- GGGGTGGCTATTTGCTTTTC -3'
Tnf- α	F	5'	- CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA -3'
	R	3'	- TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC -3'

* 실험에 사용한 primer의 최종 농도는 10pmol이다.

다. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

HBSS buffer에 담긴 lung을 homogenizer로 균질하게 갈아준 다음 13,200rpm에서 20분 간 원심분리한다. 투명한 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 sample로 사용한다. 본 연구에서는 mouse TNF- α 와 CXCL10 (IP-10) ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하였고, manual에 따라 실험을 진행하였다.

라. Flow Cytometry (FACS assay)

HBSS에 0.1% Type 2 collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA)를 녹인 buffer에 mouse lung을 넣고 잘게 잘라준 뒤 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30분 간 incubation시킨다. 이후 40 μ m의 strainer (BD Falcon, NY, USA)을 이용해 걸러 준 다음 1,200rpm에서 5분 간 원심분리한다. Supernatant를 제거한 뒤 1X RBC lysis buffer (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용해 적혈구를 제거한다. 5분 후 PBS (Lonza, Basel, Switzerland)를 더 넣어주어 세포용해 반응을 멈춰주고 다시 1,200rpm에서 5분 간 원심분리한다. 이후 1ml의 PBS로 pellet을 풀어 EP tube로 옮겨준다. 여기에 확인하고자 하는 세포 수용체와 결합할 수 있는 항체를 붙여준다. CD31⁻CD45⁻TER-119⁻CD326⁺일 경우를 호흡기 상피세포로, CD31⁻TER-119⁻CD45⁺일 경우를 Myeloid cell이라고 정의했다. 세포 사멸은 LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA)로 염색하였다. Flow cytometry는 BD FACSVerser (BD bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA)로 측정하였고 결과는 Flow Jo (Flow Jo, Ashland, OR, USA) 프로그램으로 분석하였다.

마. Histopathology

Mouse의 왼쪽 엽은 4% paraformaldehyde(biosesang, seoul, Korea)에 넣고 상온에서 24시간 동안 incubation시킨다. 이후 3개의 도막으로 잘라준 뒤 cassette에 넣어 연세대학교 의과대학 연세의생명연구원 조직병리실에 paraffin block과 H&E staining slide를 제작 및 의뢰하였다.

바. Virus 농도 측정

Virus의 양을 측정하기 위해서 먼저 하루 전에 Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cell을 96 well plate에 2.5×10^4 /ml로 깔아준다. Lung sampling으로 얻은 한 엽은 homogenizer로 갈아주고 13,200rpm에서 20분 간 원심분리한다. Supernatant를 1/10씩 10^{-1} 부터 10^{-8} 까지 희석시킨다. Sample이 준비되면 96 well plate에 100 μ l씩 8칸에 분주한 뒤 2시간동안 shaker위에서 incubation한다. 2시간 후 media를 fresh한 Virus growth media로 바꿔 준 다음 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 incubation한다. 48시간 뒤 Media를 제거하여 죽은 well 수 측정해 측정 값을 REED-MÜENCH 계산식에 대입하여 virus 농도를 계산하였다.

사. 통계분석

통계학적 분석은 GraphPad Prism software v5.0을 이용하였다. 그래프로 나타낸 모든 결과들은 평균값 \pm SEM으로 표시하였으며 body weight을 제외한 그룹간의 비교는 one-way ANOVA test로 분석하였다. Body weight의 경우는 각각의 Day를 기준으로 t-test함으로써 통계학적 분석을 수행하였다.

Ⅲ. 결과

1. IAV 감염으로 인한 Mouse의 생리학적 변화

가장 먼저 대조군 mouse를 이용해 바이러스 감염 후기라고 정의함과 동시에 실험하기 적합한 시기를 결정하기 위해 Wild type mouse에 IAV를 감염시킨 후 시간에 따른 생리학적 변화를 관찰했다. 바이러스 감염에 의해 체중이 감소하는 점으로 보아 체중의 변화를 통해 생리학적 변화를 잘 볼 수 있다는 점을 알 수 있었다(그림 1A). 특히, 2일에서 3일로 넘어가는 시점에서 체중이 가장 급격하게 감소하는 점을 근거로 하여 2일과 4일로 실험 시기를 정하였다. 실험 결과 IL-6와 IFN- γ 는 2일 차에 최고점을 보였다가 감소하는 경향을 보였다(그림 1B). 특히 IL-6의 경우 ELISA로 확인한 결과 gene과 비슷하게 증가 후 감소하는 동일한 경향을 보였다(그림 1C). IFN- β , λ 2/3는 시간에 따라 점점 발현이 증가하였지만(그림 1B) 동시에 IFN- λ 2/3의 단백질 농도 측정을 위해 ELISA로 확인한 결과 시간에 비례하여 증가하는 경향은 볼 수 없었다(그림 1C). 정리하면, gene과 protein의 경우 시기에 따라 최고점을 보이는 지점이 달랐으나 대부분의 gene들이 4일 차 때 최고점을 보였으며 무엇보다 감염 후 4일 후 체중이 최저로 낮아져 있는 점을 참고로 하여 이 시기를 감염 후기라고 정의한 뒤 다음 실험을 진행하였다.

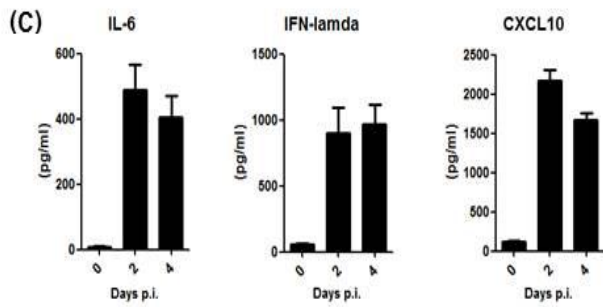
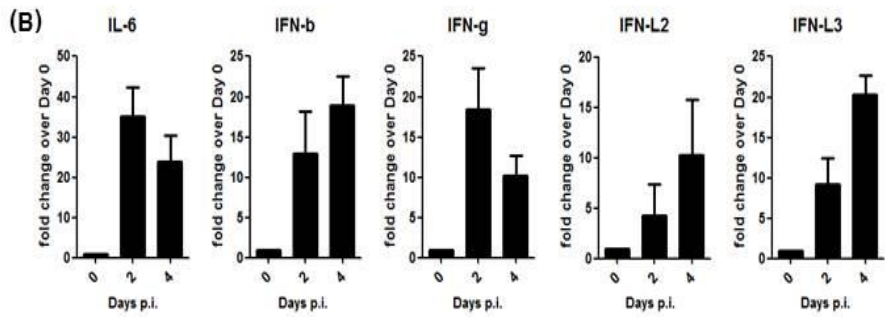
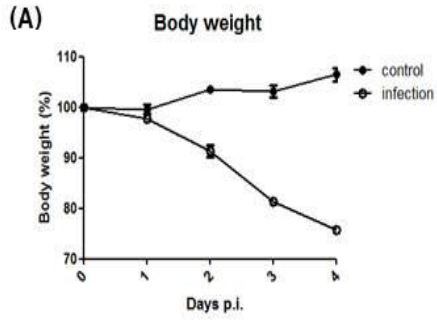


그림 1. IAV에 감염된 mouse의 생리학적인 변화관찰. (A) Influenza A virus에 감염된 mouse의 체중 변화 (B) 감염 2일, 4일 후 lung에서 추출한 Gene의 양을 Real time-PCR로 확인한 결과. 대표적인 Gene을 선별하여 실험하였는데, 염증성 Cytokine 중 IL-6를, antiviral factor들 중 IFN- β , γ , λ 2/3를 확인했다. (C) ELISA로 protein level을 확인한 결과. Inflammatory cytokine인 IL-6, antiviral factor인 IFN- λ 2/3, 마지막으로 interferon에 의해 촉진되는 CXCL-10의 단백질 농도를 측정.

2. $Becn1^{+/+}$ 에 비해 IAV에 향상된 저항성을 보이는 $Becn1^{+/-}$

IAV에 감염된 mouse의 생리학적인 변화를 가장 잘 볼 수 있는 방법으로는 체중변화를 관찰하는 것이다.¹⁷ 본 연구의 목적에 따라 가장 먼저 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 에 IAV를 감염 시킨 후 체중 변화를 측정 및 비교 분석하였다. 체중의 차이를 토대로 IAV 감염 후기 $Becn1^{-1}$ 유전자의 역할을 대략적으로 추측해보고자 하였다. 실험 결과 $Becn1^{-1}$ 이 없을 경우 대조 군에 비해 체중이 덜 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 감염 후 2일 차부터 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 체중이 5% 포인트 덜 감소하였고, 이런 차이가 4일 차까지 지속되었다(그림 2A). $Becn1^{-1}$ 유전자가 없을 때 체중이 덜 감소한 결과를 통해 인플루엔자 A 바이러스에 감염 될 경우 $Becn1^{-1}$ 유전자가 부정적인 역할을 할 것이라고 예상할 수 있었다. 하지만 $Becn1^{-1}$ 유전자가 어떤 세포 타입에서 작용하는지, 또 구체적으로 어떤 기전을 통해서 질병의 progression을 촉진시키는지 는 위 결과로 추측하기에는 한계가 있었다.

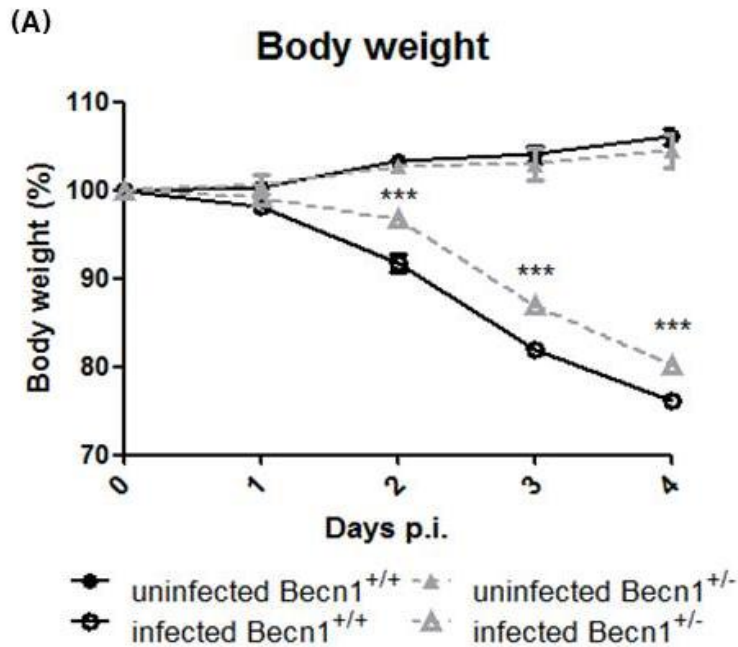


그림 2. Influenza A virus에 감염 시킨 후 4일 동안의 체중 측정 결과.
 (A) 체중은 감염 전을 기준으로 하여 변화한 체중을 백분율로 계산하여 그래프를 그렸다. *Becn1*^{+/+}와 *Becn1*^{+/-} 모두 2일에서 3일로 넘어갈 때 체중이 급격하게 감소하는 경향을 보이다가 4일 차 때는 *Becn1*^{+/+}의 경우는 처음 체중에 비해 약 24% 포인트 정도 감소한 반면 *Becn1*^{+/-}은 20% 포인트 정도 감소하였다. 특히, *Becn1*^{+/-}의 경우 2일 차 때부터 *Becn1*^{+/+}에 비해 체중이 5% 높게 나타난 경향이 4일 차까지 지속되었다. ($p < 0.0005$)

3. $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 차이가 없는 바이러스 농도

IAV 감염에 의한 질병은 2가지 원인으로 야기되는데, host의 면역력이 약해졌을 경우이거나 virus의 양이 과도하게 많아졌을 경우다.¹⁸ 이러한 점을 참고로 하여 먼저 체중의 차이가 virus의 양이 감소한 결과로 나타난 표현형 인지를 확인하기 위해 virus 농도를 측정했다. Virus 농도를 측정하는 방법은 viral gene의 양을 Real time-PCR로 확인하거나 TCID₅₀방법이 있다. 본 연구에서는 두 가지 방법을 모두 사용하여 바이러스 농도를 측정하였다.

먼저, Real time-PCR 방법으로 viral gene인 NS, M1, M2의 양을 정량 분석하였다(그림 3A). Interferon 기능을 억제하여 IAV의 병원성을 결정하는 NS와 Matrix protein인 M1은 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 사이에 차이가 없었지만 Beclin-1의 negative regulator로 알려진 M2 gene은 $Becn1^{+/-}$ 에서 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. M2 protein은 beclin-1에 대해 negative regulator 역할을 할 뿐만 아니라 virus가 host에 endocytosis를 통해 cell 내로 들어갔을 때 vesicle 내의 pH를 낮추는 Ion channel 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ $Becn1^{+/-}$ 에서 M2 gene의 발현이 증가하는 것으로 보아 virus에 감염 시 M2 protein이 beclin-1을 직접적으로 조절할 가능성이 있을 것으로 예상된다. 이러한 유전적인 발현 증가가 실질적인 감염성을 갖는 바이러스의 농도까지 상관관계를 갖는지를 확인하기 위해 TCID₅₀으로 감염성을 띄는 바이러스 농도를 측정하였다(그림 3B). 측정결과, $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 유의한 차이는 없었으며 두 strain 모두 상당한 양의 바이러스가 분비되는 점을 확인했다. 결과로 보아 향상된 바이러스 내성을 보이는 $Becn1^{+/-}$ 의 원인이 바이러스의 농도 감소로 인한 결과가 아닌 것을 추측할 수 있었다.

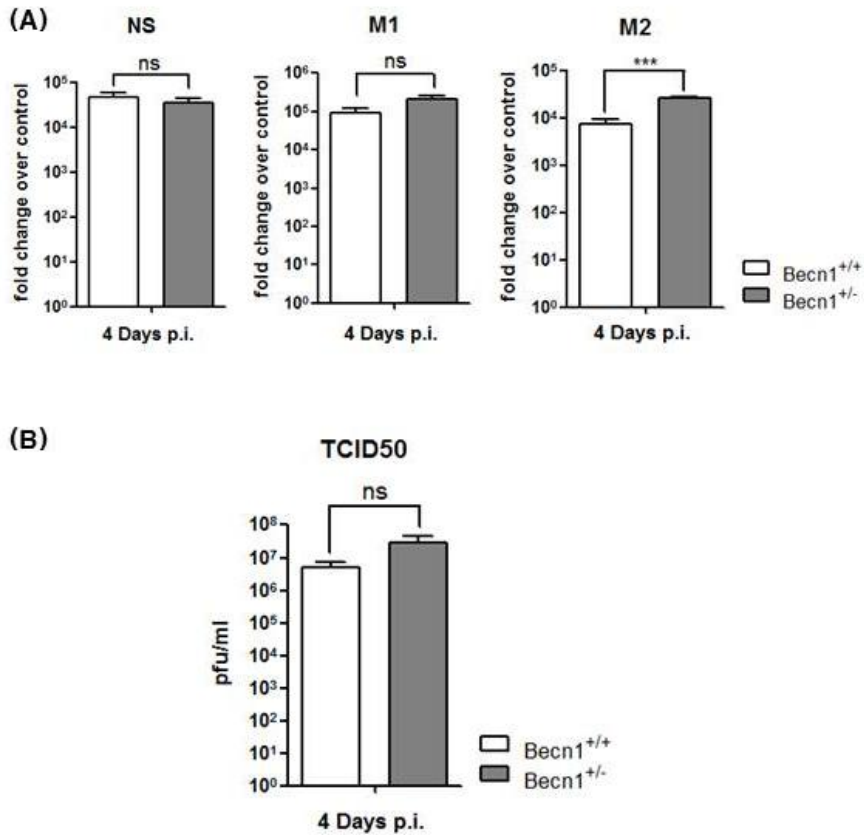


그림 3. Mouse lung에서의 viral gene과 바이러스 농도 측정. (A) Virus에 감염시킨 후 4일이 지났을 때 mouse의 lung으로부터 RNA를 추출해 Real time-PCR 방법으로 viral gene의 양을 측정한 결과이다. NS와 M1은 Becn1^{+/+}과 Becn1^{+/-} 간의 차이는 없었지만 M2 gene은 Becn1^{+/-}에서 발현이 증가되는 것을 확인하였다. (B) 감염 후 4일 된 mouse의 lung에 있는 감염성을 띄는 바이러스의 농도를 TCID₅₀으로 측정한 결과. Becn1^{+/+}과 Becn1^{+/-}사이에 차이는 없었다. (p<0.0005)

4. $Becn1^{+/-}$ 에서 높게 발현되는 항 바이러스성의 Cytokine과 Chemokine 유전자

앞서 바이러스 감염으로 질병을 일으킬 수 있는 원인 중 하나인 바이러스 농도에서는 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 간의 차이가 없음을 확인했다. 그래서 두 번째로 숙주세포의 바이러스에 대한 저항성에 차이가 있을 것으로 예상할 수 있었다. IAV에 감염되면 여러 방어 기전들이 활성화되는데 먼저 염증성 Cytokine들 중 IL-6의 gene expression 정도를 비교하였다. IL-6는 폐에서 바이러스에 의해 유도된 neutrophil의 세포사멸을 막아 neutrophil에 의한 viral clearance를 위해 필수적인 요소²⁰이지만 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 사이에 차이는 없었다. 즉, 바이러스 감염으로 인한 neutrophil의 viral clearance 기능에는 차이가 없을 것으로 예상하였다.

다음으로 virus에 감염 시 중요한 역할을 하는 interferon(IFN) gene들을 확인해보았다. $CD4^+$ T cell에서 분비되는 $IFN-\gamma$ 의 경우 감염된 세포에 autophagy를 induce하는 역할을 하는데, 이 gene은 두 strain사이에 차이가 없었다. 뿐만 아니라 $IFN-\lambda 2$ 에서도 차이가 없었다. $IFN-\beta$ 는 Type I interferon의 subtypes으로 influenza A virus에 대항하는 host defense 기전에서 중요한 역할을 한다²¹고 잘 알려져 있는데 본 실험에서는 $Becn1^{+/-}$ 에서 expression level이 현저히 낮아지는 결과를 확인하였다. $IFN-\beta$ 만 보면 $Becn^{+/-}$ 에서 host defense system이 나빠져 있다고 생각할 수 있지만 $IFN-\lambda 3$ 의 발현이 $Becn^{+/-}$ 에서 더 향상되어 있었다. $IFN-\lambda$ 는 가장 최근에 발견된 IFNs family로 최근 들어 virus를 포함하는 병원체들과 $IFN-\lambda$ 와의 관계에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.²²

$IFN-\lambda 3$ 의 경우, type 1과 2 IFN에 의해 촉진되는 gene들을 동시에 유도하는데 많은 ISG들 중 대표적으로 Cxcl-10의 발현 양을 측정해본

결과 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 상당히 높아져 있는 점을 확인할 수 있었다. $Cxcl-10$ 은 host에서 virus의 복제와 pathogenesis를 억제함으로써 protective한 역할을 하는 것²³으로 알려져 있지만 구체적인 역할에 관한 연구는 더 필요한 실정이다.

마지막으로 cell death ligand들 중 FasL와 $Tnf-\alpha$ 의 양을 Real time-PCR로 확인해보았을 때 $Becn1^{+/-}$ 에서 더 높은 발현 양을 보였다. 또한, FasL에 비해 $Tnf-\alpha$ 의 발현 수준이 더 높았는데, $Tnf-\alpha$ 의 경우 IFN- γ 와 마찬가지로 $CD4^+$ T cell이 분비하는 물질로 감염된 세포에 autophagy를 induce하는 factor로 잘 알려져 있다.²⁴

종합하여 보면, 바이러스 감염 시 중요한 역할을 하는 IFN- β 의 gene level이 감소한 반면 IFN- $\lambda 3$ 는 증가하였다. 이는 Beclin-1이 IFN- β 와 $\lambda 3$ 의 분비 기전과 관련이 있을 것으로 추측해볼 수 있는데 IFN- $\lambda 3$ 의 유전자의 발현 증가로 $Cxcl-10$ 의 발현이 같이 증가한 것으로 보아 Beclin-1이 IFN- β 보다 IFN- $\lambda 3$ 분비 기전에 더 밀접하게 관련이 있을 것으로 보여진다. 결론적으로 IFN- $\lambda 3$ 와 $Cxcl-10$ 의 발현 증가를 토대로 Influenza A virus에 대항하는 host의 defense system이 $Becn1^{+/-}$ 에서 더 향상되어 있음을 확인하였다.

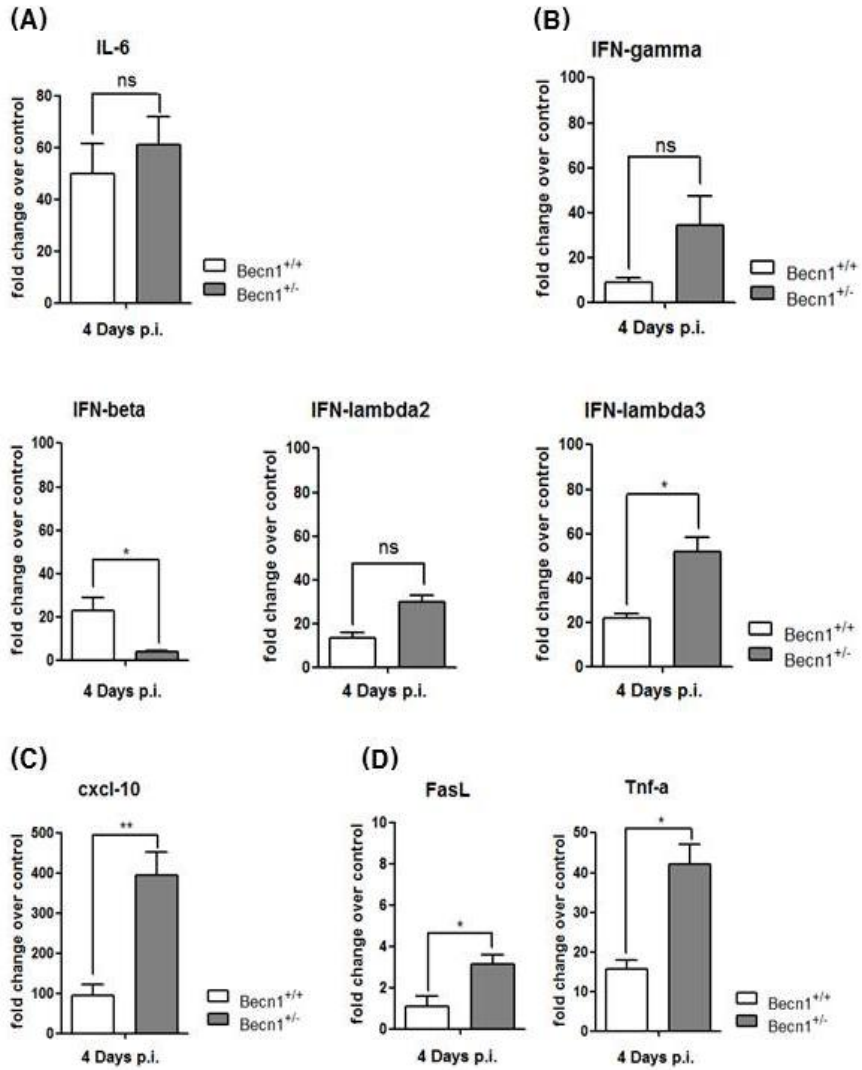


그림 4. IAV에 감염된 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 의 lung에서의 감염관련 유전자들의 변화 비교. (A) pro-inflammatory cytokine인 IL-6. (B) anti-viral factor인 각 종 interferon gene들. IFN- γ 와 $\lambda 2$ 의 경우 두 strain간의 유의한 차이가 없었던 반면 IFN- β 는 $Becn1^{+/-}$ 에서 유의하게 감소하였던 반면 IFN- $\lambda 3$ 는 유의하게 증가했다. (C) interferon stimulating gene(ISG)로 잘 알려진 Cxcl-10(IP-10)은 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 높은 gene expression level을 보였다. (D) cell death ligand인 FasL와 Tnf- α 의 경우 모두 $Becn1^{+/-}$ 에서 유의하게 높았다. ($p < 0.05$, $p < 0.005$)

5. $Becn1^{+/-}$ 에서 유일하게 단백질의 발현도 증가하는 CXCL-10

Gene expression에서 유의한 차이를 보였던 TNF- α 와 CXCL-10 (IP-10)의 protein level을 ELISA를 이용해 확인하였다. $Becn1^{+/-}$ 에서 높은 발현 level을 보였던 TNF- α 의 경우 protein level에서는 $Becn1^{+/+}$ 와 차이가 없었다. 이런 점으로 볼 때 IAV 감염 시 분비되는 TNF- α 와 beclin-1 간에는 관련이 없을 것으로 예상할 수 있었다(그림 5A). 다음으로 IFN에 의해 inducible한 factor인 CXCL-10의 경우 $Becn1^{+/-}$ 에서 높은 발현을 보였던 결과가 protein에서도 연관성 있게 발현 양이 높아져 있는 것을 확인하였다(그림 5B). 즉, influenza A virus에 감염 되었을 때 항 바이러스성의 CXCL-10이 분비되는 과정과 Beclin-1이 더 밀접한 관계가 있을 것으로 예상할 수 있었다.

(그림 4)와 (그림 5)에서 유전자와 단백질 수준을 Real time-PCR과 ELISA 방법으로 측정하였다. 종합하여 보면 결과적으로 Beclin-1의 양이 감소하면 오히려 바이러스 저항성이 향상되는 것을 알 수 있었다. 이는 Beclin-1이 IAV 감염에 의한 pathogenesis의 과정을 매개하는 중요한 인자로 작용할 것으로 예상할 수 있었다.

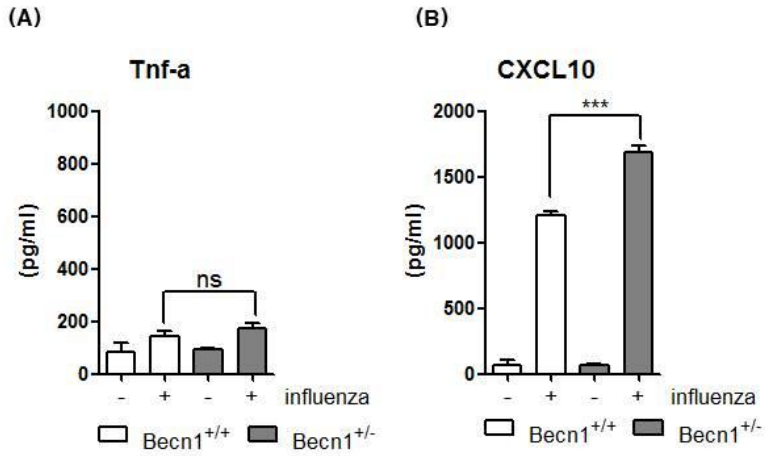


그림 5. IAV 감염 시 $Becn1^{+/+}$ 과 $Becn1^{+/-}$ 에서 분비된 cytokine들을 ELISA로 측정. (A) Mouse TNF- α 의 양을 ELISA로 확인한 결과. (B) Mouse CXCL-10(IP-10)의 양을 측정한 결과. $Becn1^{+/-}$ 에서 CXCL-10만 protein level이 높아져 있는 점을 확인할 수 있었다. ($p < 0.0005$)

6. IAV 감염 시 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 감소되는 호흡기 상피세포사멸

그렇다면 Real time-PCR과 ELISA 실험을 통해 확인하였던 Cytokine들을 분비하는 세포들의 사멸에는 차이가 있는지를 FACS analysis로 측정하였다. 먼저, 감염 후 4일이 지난 mouse의 lung 조직을 Type 2 collagenase를 이용하여 single cell로 만든 뒤 Airway epithelial cell(AEC)과 myeloid cell에 특이적인 surface marker에 형광이 달린 항체를 붙여 주었다. Dot blot 그래프를 이용해 상피세포와 면역세포를 정의하는 과정을 나타냈으며 구체적인 과정은 관련 논문을 참고하였다(그림 6A).²⁵ Myeloid cell과 AECs를 정의한 후 ViD 발현 정도에 따라 cell death가 일어난 비율을 diagram으로 그려 분석하였다(그림 6B).

$Becn1^{+/+}$ 의 Myeloid cell의 경우 IAV에 감염이 되면 약 3%에서 약 7%로 cell death가 4% 포인트 증가하였고 $Becn1^{+/-}$ 는 약 6.7%로 증가하였다(그림 6C). 두 strain간의 차이가 없는 것으로 보아 IAV 감염으로 인한 면역세포들의 cell death에는 Beclin-1과 관련이 없을 것으로 추측할 수 있었다. 반면 AECs의 경우는 Myeloid cell과는 다른 경향을 보였다. IAV를 감염시킨 $Becn1^{+/+}$ 의 AECs death가 12%에서 약 35%로 23% 포인트가량 증가한 반면, ($p < 0.0005$) 동일하게 감염시킨 $Becn1^{+/-}$ 의 AECs death는 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 16% 포인트 낮은 19%정도 증가하는데 그쳤다(그림 6C).

Airway epithelial cell에서만 cell death가 감소한 점과 AECs에서 주로 분비되는 IFN- λ 3가 증가한 결과를 볼 때 IAV의 감염으로 인한 호흡기 상피세포의 사멸과정에서 Beclin-1이 이를 매개 혹은 유도할 것이고 그 결과 선천 면역 세포의 붕괴로 인한 2차 감염으로까지 이르게 할 것으로 예상된다.

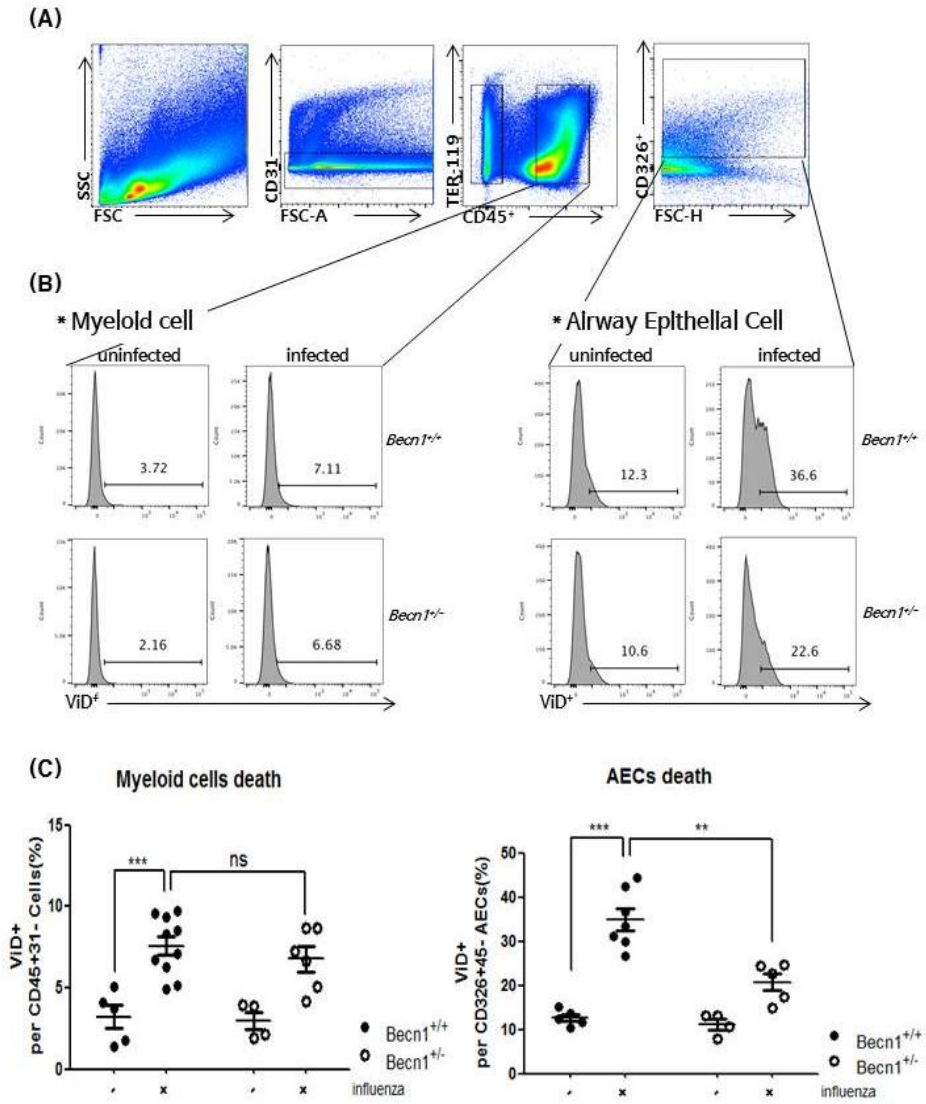


그림 6. $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 의 Lung에서 Myeloid cell과 Airway epithelial cell의 death를 비교. (A) AECs과 Myeloid cell을 정의하는 과정을 나타낸 dot plot. Single cell에서 $CD31^{-}CD45^{-}Ter119^{-}CD326^{+}$ cell을 정의한 뒤 $CD326^{+}$ cell과 $CD45^{+}$ cell을 다시 ViD⁺를 Diagram으로 나타냈다. (B) $CD45^{+}$ cell들 중에서 ViD⁺한 cell과, $CD45^{-}$ 이면서 $CD326^{+}$ cell 중 ViD⁺한 cell. 이 두 가지 경우를 Diagram으로 정리한 결과. ViD는 LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit를 이용한 것으로 cell이 죽었을 경우 높은 형광 값을 나타내게 된다. (C) Myeloid ($CD45^{+}$) Cells과 Airway Epithelial Cell이 Influenza A virus에 감염 되었을 때 세포사멸이 얼마나 일어났는지를 그래프로 나타낸 결과. 바이러스 감염 시 Myeloid cell과 Airway Epithelial cell에서 모두 세포사멸이 유의하게 증가 ($p < 0.0005$) 하였지만 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 Myeloid cell death에서는 차이는 볼 수 없었다. 반면, Airway epithelial ($CD326^{+}45^{-}$) Cells은 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 세포 사멸에서 유의한 차이가 있었다. $Becn1^{+/+}$ 가 Influenza A virus에 감염 되면 약 12% 수준이었던 cell death가 약 35%로 23% 포인트 증가하였다. ($p < 0.0005$) 하지만 $Becn1^{+/-}$ 에서는 약 12%에서 약 20%로 8% 포인트 증가하는데 그쳤다. 이 둘 간의 차이는 약 15% 포인트 였다. ($p < 0.005$)

7. IAV에 저항성을 띄는 $Becn1^{+/-}$ 의 Lung에서 관찰한 호흡기 상피세포 상의 병리학적 차이

바이러스를 감염 시킨, 혹은 시키지 않은 mouse의 lung을 H&E staining을 한 결과를 보면 앞서 FACS를 통해 확인했던 Airway epithelial cell death의 차이가 병리학적으로도 동일하게 나타나는 점을 확인하였다. IAV에 감염된 $Becn1^{+/+}$ 의 경우 상피세포 구조가 완전히 무너진 반면 $Becn1^{+/-}$ 의 경우는 상대적으로 덜 무너진 부분을 관찰할 수 있었다. 즉, $becn1^{+/-}$ 에서 바이러스에 의한 호흡기상피세포의 사멸이 조직학적으로도 감소해 있는 점을 관찰하였다.

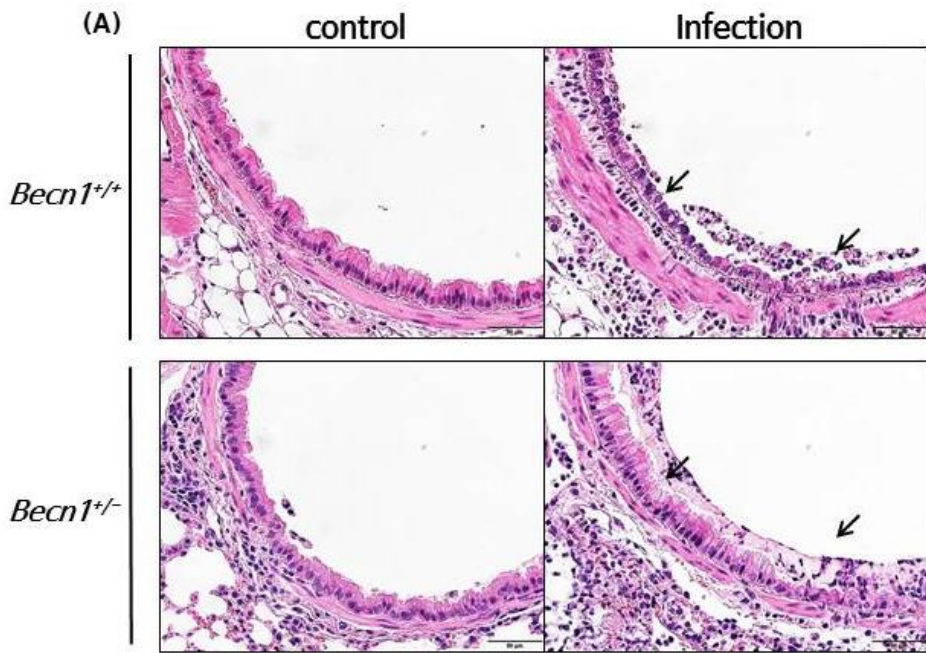


그림 7. 감염 후 4일이 지난 mouse의 lung 조직을 H&E staining한 뒤 관찰. (A) 400배로 관찰한 결과. 감염시키지 않은 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$. 두 가지 경우 모두 Airway epithelium은 잘 형성되어 있는 것을 확인할 수 있다. 반면 감염시킨 $Becn1^{+/+}$ 의 경우 상피세포들이 대부분 무너져 있는 상태를 관찰했다. 뿐만 아니라 정상적인 상피세포와는 달리 세포질이 거의 없는 세포들이 단층으로 이루고 있는 점도 볼 수 있었다. 반대로, $Becn1^{+/-}$ 의 상피세포를 보면 mucus가 많이 분비되었지만 mucus에 여러 면역 세포들이 aggregation되어 있는 것처럼 보였다. 동시에 상피세포의 구조는 감염 전의 상피세포 구조와 비슷한 상태를 유지하고 있었다.

IV. 고찰

Autophagy 관련 유전자인 Beclin-1은 수많은 바이러스들의 면역반응 피하기 위한 Target protein으로 바이러스들이 이를 이용한다는 점은 이미 잘 알려져 있다.²⁶ 대표적으로 Herpes virus, HIV, 그리고 Influenza A virus들이 Beclin-1과 결합하여 Autophagy 기전을 억제한다. 하지만 Autophagosome이 생성되기 전/후를 기점으로 바이러스마다 각각 다른 시기와 방법으로 Autophagy 기전을 억제하고 나아가 이를 바이러스 복제에 유용하게 이용한다. 예를 들어 MHC class II cell에서는 바이러스가 Autophagy 기전을 억제함으로써 CD4⁺ T cell로 항원을 주는 과정을 막기도 하고,²⁷ CV-1 cell에서는 바이러스가 Autophagy machinery 중 하나인 Beclin-1의 발현을 증가시켜 autophagy 기전을 촉진 시키기도 한다.²⁸

이렇듯 바이러스가 Autophagy기전을 이용한다면, 실제 생체 내에서 Beclin-1이 없을 경우 Wild type mouse에 비해 어떤 생리학적 차이가 나타나는지를 본 연구를 통해 확인하고자 하였다. 우선, 체중 변화 그래프를 통해 감염 후 생리학적 변화를 관찰하였다. 그 결과 *Becn1*^{+/-}에서 체중이 덜 감소하여 더 나은 표현형을 보였다.

바이러스 감염 시 더 나은 표현형을 보였다는 것은 *beclin-1* 유전자가 없는 mouse가 ‘바이러스에 강한 숙주’ 이거나 ‘바이러스에 내성을 띄는 숙주’ 인 경우로 정의할 수 있다.¹⁸ ‘바이러스에 강한 숙주’란, 병원체를 완전히 제거한 경우를 말하고 ‘내성이 있는 숙주’란 숙주의 조직 손상을 감소시킨 경우를 말한다. 바이러스가 감염된 MDCK cell에서 LC3-II와 Beclin-1의 양이 증가하고 이를 siBeclin-1, siLC3로 knock down시키거나 3-Methyladenine과 같은 화합물로 Autophagosome과 lysosome의 결합을 억제 시킬 경우, 바이러스 복제가 감소되는 결과를 통해 바이러스 복제와

autophagy간의 밀접한 관계가 있다는 점은 이미 보고되었다.⁴ 이를 토대로 바이러스의 농도에서 차이가 있을 가능성이 있어 우선 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 바이러스 농도를 비교하였다. 바이러스의 농도를 2가지 수준에서 측정하였는데 하나는 NS, M1과 같은 viral RNA의 양을 Real time-PCR로 확인하는 것이고 다른 하나는 바이러스 활성을 띄는 입자의 농도를 TCID₅₀으로 확인하는 것이다. 측정결과 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 차이는 없었다. 반면 M2의 경우만 $Becn1^{+/-}$ 에서 높은 발현 수준을 보였는데, 이는 M2 단백질이 Beclin-1의 음성 조절인자로 작용하기 때문이라고 예상할 수 있지만²⁶ 구체적인 관계는 아직 밝혀진 바가 없다.

바이러스 농도에서 차이가 없었기 때문에 ‘내성이 있는 숙주’의 경우를 예상하고 실험을 진행하였다. 즉, Beclin-1이 없음으로써 숙주 세포의 방어 기전 향상으로 인해 더 나은 표현형을 보였을 것으로 예상되어 항 바이러스 인자인 Cytokine들의 유전자와 단백질 발현 양을 측정했다. 바이러스 감염에 의한 염증성 폐 손상 Marker로 볼 수 있는 IL-6의 경우,²⁹ 두 mouse들 간의 차이가 없어 염증 발생은 비슷하다는 것을 확인했다. 이런 결과는 Autophagy 기전이 IAV 감염 시 폐의 염증을 유도한다는 연구결과³⁰와는 다른 경향을 보였다. 이외에 Macrophage에서 주로 분비되는 IFN- α/β , TNF- α 도 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 사이에서 차이를 볼 수 없었다. 하지만 인터페론 촉진 유전자(ISG)로 잘 알려진 CXCL-10 (IP-10)은 $Becn1^{+/-}$ 에서만 유전자와 단백질의 발현이 높게 나타났다. 한 연구에 따르면 IAV에 감염된 Human Blood Macrophage에서 CXCL-10의 분비가 증가하는데, 이 때 siAtg5로 Autophagy 기전을 knock down시키게 되면 CXCL-10의 분비가 감소한다고 보고되었다. 즉, CXCL-10의 분비와 Autophagy 기전 간에 밀접한 관계가 있을 것으로 예상된다.^{31,32} 하지만 본 연구에서는

ATG6인 Beclin-1이 없을 경우 오히려 CXCL-10의 분비가 증가했기 때문에 CXCL-10이 Macrophage가 아닌 다른 세포에서 분비되었거나 다른 신호전달체계에 의해 유도되었을 것이라고 추측할 수 있었다. CXCL-10이 상피세포의 사멸을 감소시키는 대표적인 anti-viral factor라고 정의할 순 없지만 CXCL-10은 바이러스 감염으로 인해 활성화되는 protective T cell 반응과 development에 중요하게 작용할 뿐 아니라 감염 부위로 NK cell을 migration시키는 Chemo-attractant 로써도 중요한 역할을 하기 때문에³³ 바이러스 감염으로 인한 CXCL-10 역할의 중요성은 점점 강조되고 있다. CXCL-10과 유사한 경향을 보이는 Interferon이 있는지를 확인해본 결과, 유일하게 IFN- λ 3만 증가하였다. 즉, CXCL-10의 분비가 IFN- λ 3에 의해 유도되었을 가능성이 높지만 Beclin-1 없을 때, 어떤 기전을 통해 촉진되는지에 대한 부분은 추가적인 연구가 필요하다. IFN- λ family의 경우 가장 최근에 확인된 인터페론으로 IFN- λ 1부터 λ 4까지 총 4종류가 있다.^{34,35} 4종류의 IFN- λ 들이 결합하는 수용체들은 주로 호흡기 상피세포에 분포하고 있고 최근 들어 HCV 감염에서도 IFN- λ 3가 핵심적인 기능을 하는 Cytokine³⁶으로 밝혀져 그 중요성은 점차 강조되고 있다. 본 연구 결과에서도 IFN- λ 3의 발현과 항 바이러스성 인자인 CXCL-10의 발현이 증가되었으므로 Influenza A virus 감염 시 Beclin-1 유전자가 IFN- λ 3, CXCL-10의 분비 과정에 깊이 관여할 것으로 예상할 수 있었다.

그렇다면 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 항 바이러스성 cytokine의 차이가 호흡기 상피세포의 사멸에서도 동일하게 나타나는지를 확인하기 위해 FACS 분석법을 사용하였다. 실험 결과 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 의 Myeloid cell의 사멸에서는 둘 간의 차이가 없었던 반면, 호흡기 상피세포의 사멸에서는 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 $Becn1^{+/-}$ 에서 감소하는 점을 확인하였다.

이런 경향은 폐 조직을 병리학적으로 관찰했을 때도 동일한 경향을 확인하였다.

종합적으로 Beclin-1이 없을 때 IFN- λ 3와 CXCL-10의 발현 증가됨과 동시에 상피세포의 사멸은 감소하는 점으로 보아 2가지 경우를 예측할 수 있었다. 한 가지는 IAV 감염 후기 Beclin-1이 호흡기 상피세포의 사멸을 유도하는 중요한 인자로 작용할 수 있다는 점이고 다른 하나는 호흡기 상피세포에서 Autophagy 기전이 IFN- λ 3 및 CXCL-10 분비 과정에서 중요한 역할을 할 수 있다는 점이다. 하지만 본 실험에서는 CXCL-10만을 확인하였기 때문에 Mx1, ISG15등과 같은 ISG들의 발현 양을 추가적으로 확인해야 하며, 구체적으로 어떤 기전이 먼저 일어나는지에 대한 연구도 필요하다. 즉, IFN- λ 3와 CXCL-10의 발현 증가로 호흡기 상피세포의 사멸이 감소한 것인지 아니면 Beclin-1이 없음으로 인해 호흡기 상피세포의 사멸의 감소로 cytokine의 발현이 증가한 것인지에 대해 추가적인 연구가 수행되어야 한다.

본 연구 결과는 바이러스 감염에 의한 급성 혹은 심각한 폐 손상 시 Beclin-1 작용을 억제하는 약물을 이용한다면 중증 호흡기 상피세포 손상을 지연시킬 수 있을 가능성을 제시하였고, 현재 판매되는 인플루엔자 치료제와는 전혀 다른 단계에서 작용하는 새로운 치료 방법을 제시할 수 있을 것으로 기대한다.

V. 결론

매년 WHO에서는 올 해 유행할 인플루엔자 바이러스의 종을 공표한다. 즉, 매해 각기 다른 바이러스들이 창궐하고 그 결과 매해 변형된 바이러스에 감염된 많은 사람들이 호흡기 중증 질환을 앓게 되고 더 나아가 사망에 이르는 사례도 빈번하게 나타난다. 바이러스는 숙주세포를 감염시켜 많은 면역 반응을 유도하지만 세포 항상성 조절로 잘 알려진 Autophagy 기전도 촉진시킨다. 감염 시기에 따라 Autophagy 기전은 다르게 기능을 하는데, 감염 전기에는 Autophagy가 세포사멸을 감소시켜 바이러스 복제에 유익하게 작용하는 반면 감염 후기에는 Autophagy가 오히려 세포 사멸을 유도시킨다. 이런 근거로 본 연구는 Beclin-1이 없는 knock-out mouse가 H1N1 바이러스에 감염 되면 Wild type mouse에 비해 호흡기 상피세포의 사멸이 감소하는 점을 확인하였다. 즉, Beclin-1 유전자가 감염 후기 호흡기 상피세포사멸을 유도하는 중요한 조절인자일 가능성을 밝혔다.

이런 결론은 다양한 인자들을 측정 및 분석한 결과로 정의하였다. 먼저, 인플루엔자 바이러스를 감염시켰을 때 $Becn1^{+/-}$ 의 체중이 $Becn1^{+/+}$ 에 비해 5% 포인트 덜 감소하는 점과 $Becn1^{+/+}$ 와 $Becn1^{+/-}$ 간의 바이러스의 농도에서 차이가 없는 점으로 볼 때, Beclin-1이 바이러스 복제에는 영향을 주지 않는다는 것을 증명하였다. 다시 말하면, 체중에서 5% 포인트의 차이는 바이러스 농도의 감소로 인한 결과는 아니라는 것이므로 Beclin-1 유전자는 바이러스 복제기전과는 관련이 없을 가능성이 크다는 점을 확인하였다. 이를 토대로 Beclin-1이 IAV의 내성성과 더 관련이 있을 것이라고 예상할 수 있었다. 이러한 예측을 증명하기 위해 항 바이러스 성의 cytokine들과 인터페론의 양을 두 strain들을 비교 및 분석하였다. 실험 결과 $Becn1^{+/-}$ 에서 IFN- λ 3와 CXCL-10이 높게 발현되는 것을

확인했지만 ‘IAV에 내성을 갖는 숙주’ 라면 항 바이러스 성의 cytokine의 발현이 증가함과 동시에 바이러스 감염으로 나타나는 폐 조직의 손상도 감소해야 한다. 그래서 면역세포와 호흡기 상피세포의 사멸 정도를 비교하였더니 면역세포의 사멸은 차이가 없었던 반면 호흡기 상피세포의 사멸은 $Becn1^{+/-}$ 에서 현저하게 낮아져 있는 점을 확인하였다. 또한 H&E 염색한 mouse의 lung의 상피세포의 상태도 FACS 분석결과와 상응하는 경향을 관찰하였다. 즉, Beclin-1이 없을 경우 호흡기 상피세포의 사멸과 폐 조직 손상 정도가 동시에 감소하는 경향을 보였다. 세포 사멸과 조직 손상이 모두 감소한 점은 인플루엔자 A 바이러스 감염으로 인한 폐 손상 과정에서 Beclin-1이 중요한 폐 손상을 유도하는 중요한 인자로 작용할 가능성을 제시하였다.

하지만 본 연구에서는 ‘조직 손상’ 과 ‘증가된 항 바이러스성 인자’ 들 중 어느 것이 먼저 일어나는 지에 대한 연구가 필요할 뿐만 아니라 Beclin-1이 없을 경우 이러한 결과가 나타나기까지 어떠한 신호전달 과정이 매개하는지에 대한 연구도 *in vitro* 실험을 통해 규명되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Coates BM, Staricha KL, Wiese KM, Ridge KM. Influenza A Virus Infection, Innate Immunity, and Childhood. *JAMA Pediatr* 2015;169:956-63.
2. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe* 2009;6:367-80.
3. Ludwig S, Pleschka S, Planz O, Wolff T. Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol* 2006;8:375-86.
4. Zhou Z, Jiang X, Liu D, Fan Z, Hu X, Yan J, et al. Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* 2009;5:321-8.
5. Chen M, Hong MJ, Sun H, Wang L, Shi X, Gilbert BE, et al. Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection. *Nat Med* 2014;20:503-10.
6. Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:1421-34.
7. Lennemann NJ, Coyne CB. Catch me if you can: the link between autophagy and viruses. *PLoS Pathog* 2015;11:e1004685.
8. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 2009;11:385-96.
9. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 2009;11:468-76.

10. Hahn DR, Na CL, Weaver TE. Reserve autophagic capacity in alveolar epithelia provides a replicative niche for influenza A virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;51:400-12.
11. Yatim N, Albert ML. Dying to replicate: the orchestration of the viral life cycle, cell death pathways, and immunity. *Immunity* 2011;35:478-90.
12. de la Calle C, Joubert PE, Law HK, Hasan M, Albert ML. Simultaneous assessment of autophagy and apoptosis using multispectral imaging cytometry. *Autophagy* 2011;7:1045-51.
13. Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ* 2009;16:991-1005.
14. Tripathi S, Garcia-Sastre A. Antiviral innate immunity through the lens of systems biology. *Virus Res* 2015.
15. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011;469:323-35.
16. Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods* 2014;410:60-79.
17. Pan W, Dong Z, Li F, Meng W, Feng L, Niu X, et al. Visualizing influenza virus infection in living mice. *Nat Commun* 2013;4:2369.
18. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014;14:315-28.
19. Lin TI, Schroeder C. Definitive assignment of proton selectivity and attoampere unitary current to the M2 ion channel protein of influenza A virus. *J Virol* 2001;75:3647-56.
20. Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier PA, Burg E, Drew A, et al.

- Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol* 2012;5:258-66.
21. Koerner I, Kochs G, Kalinke U, Weiss S, Staeheli P. Protective role of beta interferon in host defense against influenza A virus. *J Virol* 2007;81:2025-30.
 22. Egli A, Santer DM, O'Shea D, Tyrrell DL, Houghton M. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. *Emerg Microbes Infect* 2014;3:e51.
 23. Yuan J, Liu Z, Lim T, Zhang H, He J, Walker E, et al. CXCL10 inhibits viral replication through recruitment of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Circ Res* 2009;104:628-38.
 24. Harris J. Autophagy and cytokines. *Cytokine* 2011;56:140-4.
 25. Rodrigue-Gervais IG, Labbe K, Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Champagne C, Morizot A, et al. Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival. *Cell Host Microbe* 2014;15:23-35.
 26. Munz C. Beclin-1 targeting for viral immune escape. *Viruses* 2011;3:1166-78.
 27. Comber JD, Robinson TM, Siciliano NA, Snook AE, Eisenlohr LC. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to major histocompatibility complex class II-restricted presentation. *J Virol* 2011;85:6453-63.
 28. Zhirnov OP, Klenk HD. Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells. *J Virol* 2013;87:13107-14.

29. Svitek N, Rudd PA, Obojes K, Pillet S, von Messling V. Severe seasonal influenza in ferrets correlates with reduced interferon and increased IL-6 induction. *Virology* 2008;376:53-9.
30. Pan H, Zhang Y, Luo Z, Li P, Liu L, Wang C, et al. Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014;306:L183-95.
31. Law AH, Lee DC, Yuen KY, Peiris M, Lau AS. Cellular response to influenza virus infection: a potential role for autophagy in CXCL10 and interferon-alpha induction. *Cell Mol Immunol* 2010;7:263-70.
32. Law AH, Lee DC, Leon TY, Lau AS. Role for autophagy in cellular response to influenza virus infection. *Hong Kong Med J* 2014;20 Suppl 6:20-4.
33. Arai K, Liu ZX, Lane T, Dennert G. IP-10 and Mig facilitate accumulation of T cells in the virus-infected liver. *Cell Immunol* 2002;219:48-56.
34. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003;4:69-77.
35. Kempuraj D, Donelan J, Frydas S, Iezzi T, Conti F, Boucher W, et al. Interleukin-28 and 29 (IL-28 and IL-29): new cytokines with anti-viral activities. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004;17:103-6.
36. Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut* 2011;60:1284-93.

Abstract

The role of Beclin-1 in Influenza A virus-infected mouse model

Ji Hwan Oh

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor **Ji-Hwan Ryu**)

The number of patients with severe lung injury is consistently increased by Influenza A virus infection every year. So far, Influenza A virus-related studies are mostly about viral proteins inducing immune responses and cytokines activated by virus infection in macrophage or memory B cells. Recent studies showed that viruses use autophagy for their replication. Also, there are many studies about the relationship between influenza A viruses and autophagy. In particular, NS and M2 proteins can block the fusion between autophagosome and lysosome through binding to beclin-1, so autophagosome can be used as a niche for viral replication.

This study sought to determine the role of Beclin-1 in influenza A virus infection in vivo. $Becn1^{+/+}$ and $Becn1^{+/-}$ were infected by influenza A virus and then I observed the body weight change. As a result of observing the change, I found that the weight of $Becn1^{+/-}$ was higher than that of control group. To check if the difference was resulted from

difference of the amount of virus, I compared the amount of virus from $Becn1^{+/+}$ and $Becn1^{+/-}$. However, there was no difference. Based on this, it seems that Beclin-1 has no effect on influenza A virus replication. Next, to verify that the enhanced viral resistance of $Becn1^{+/-}$, I monitored the gene and protein expression levels of anti-virus related Cytokines. IFN- λ 3 and CXCL-10 genes were specifically expressed higher and Cell death in epithelial cells of the respiratory tract was decreased in lung of $Becn1^{+/-}$ than that of $Becn1^{+/+}$. My recent results reveal a critical role of Beclin-1 in which IFN- λ 3 and CXCL-10 are secreted by Influenza A virus infection. Although the cell signaling mechanism still has to be investigated in vitro to identify if cell death happens first and then produce cytokines or opposite, I identified a possibility that beclin-1 can mediated a lung injury caused by influenza A virus.

In conclusion, this study may provide a new way of improving treatment against lung injury induced by virus infection.

Key Words : Influenza A virus, Airway Epithelia cell, Beclin-1, Cell death