



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](#)

李名淑教授指導

碩士學位 請求論文

3T3-L1 지방전구세포에서
DNAJC6 과잉 및 억제 현상이
지질대사와 인슐린 신호에
미치는 영향

2022

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

孫多情

3T3-L1 지방전구세포에서
DNAJC6 과잉 및 억제 현상이
지질대사와 인슐린 신호에
미치는 영향

이 명 숙 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2022년 5월

성신여자대학교 일반대학원

식품영양학과

손 다 정

인 준 서

손다정의 석사학위 논문으로 인준함

2022년 05월

심사위원장 이 승 민 (서명 또는 인)
심 사 위 원 김 창 수 (서명 또는 인)
심 사 위 원 이 병 숙 (서명 또는 인)

성신여자대학교 대학원

논문 개요

국내 비만 유병률은 해마다 증가하고 있으며, 특히 소아청소년기의 비만은 조기 성인병 발병의 위험성이 높으므로 소아청소년 비만의 예방 및 관리는 매우 중요하다. 비만의 원인은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 알려져 있으나 에너지 불균형과 관련된 유전자 추적 및 기전 규명 연구는 거의 없다. 본 연구실에서는 소아비만 코호트를 기반으로 유전체 연구(GWAS)에서 휴지기 대사량(RMR)과 비만(BMI)과의 연관성에 유의적인 상관성을 보이는 유전자 *DNAJC6*를 도출하였다. *DNAJC6* 유전자 변이가 신경 퇴행성 질환(파킨슨병)과 관련이 있고, 전사자리를 공유하는 *LEPR* promotor와의 유전자 결손이 소아 비만을 유발시키며, *DNAJC6*가 암호화한 auxilin이 transferrin, GLUT4 등 endocytosis 기능을 억제한다는 연구가 발표된 바 있다. 그러나 아직까지 *DNAJC6*의 유전자 발현 차이가 adipogenesis 혹은 thermogenesis에 미치는 영향에 관한 기전 연구가 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 3T3-L1 지방전구세포에 *DNAJC6* 유전자를 과발현(over-expression, Tg+ 군) 혹은 억제(siRNA, Tg- 군)했을 때 지방세포의 생리학적 기전의 변화를 확인하는 것이다.

DNAJC6 유전자를 과발현 혹은 억제한 3T3-L1 preadipocyte의 adipocyte 분화 과정에서의 생리적 기전을 확인하기 위한 실험 분석을 수행하였다. 3T3-L1 세포에 *DNAJC6* 유전자를 과발현하거나 억제할 때 사용되는 항생제 농도와 transfection reagent 농도를 결정하기 위해 세포생존을 실험을 하였으며, RT-PCR과 western blotting analysis로 *DNAJC6* 유전자 발현을 확인하였다. 지질 축적 및 세포 핵 손상 정도(DAPI/BODIPY staining, Oil Red O staining), 지질 분해(TG/free glycerol excretion), 지질 합성 및 분해 관련 인자, adipocytokines 인자, insulin-GLUT4 cascade

signals 인자(Western blotting analysis), 미토콘드리아 기능(mitochondria stress test) 등 생리적 기전을 대조군과 비교 분석하였다.

3T3-L1 세포에서 *DNAJC6* 유전자를 과발현 할 때 분화 8일차에서 DAPI/BODIPY staining과 Oil Red O staining에서 지방구 염색이 되지 않았고, adipogenesis 인자인 PPAR γ , C/EBP α , aP2 발현이 대조군 분화 8일차 대비 Tg+ 분화 8일차에서 78.18%, 89.76%, 99.52% 유의적으로 감소하였으며, preadipocyte 인자인 Pref-1 발현이 2.45배 유의적으로 증가하였다. 또한 lipolysis 인자인 pHSL(Ser563), HSL 발현이 대조군 분화 8일차 대비 Tg+ 분화 8일차에서 73.53%, 88.10% 유의적으로 감소하였으며, 세포 배양액에서 TG와 free glycerol 농도가 72.19%, 90.84% 감소하였다. 지방 세포에서 분비하는 아디포사이토카인인 LEPR, leptin, adiponectin 발현이 대조군 분화 8일차 대비 Tg+ 분화 8일차에 98.55%, 79.83%, 99.94% 유의적으로 감소하였다. 인슐린-Glut4 신호체계인 insulin receptor β , pIRS(Ser307), pAkt(Thr308), AS160, GLUT4의 발현이 순차적으로 억제되었다. 세포 내 에너지 결핍 상태에서 Akt의 다른 downstream인 mTOR 활성이 Tg+ 세포에서 대조군 대비 억제되며 autophagy 인자인 LC3II 발현이 유의적으로 증가하는 조절작용이 있음을 확인하였다. 미토콘드리아 기능 바이오마커인 PGC1 α 와 UCP1 발현이 대조군 8일차 대비 78.31%, 31.99% 감소하였으며, 미토콘드리아의 산소 소비량과 ATP 생산량이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다.

3T3-L1 세포에서 *DNAJC6* 유전자를 억제 할 때 분화 4일차에서 DAPI/BODIPY staining에서 지방구가 대조군에 비해 강하게 염색되었으며, Oil Red O staining에서 흡광도 값이 대조군에 비해 1.18배 높았다. 그리고 분화 8일차에서 leptin, insulin receptor β , GLUT4 발현이 대조군과 유의적인 차이가 나지 않았다. 미토콘드리아 기능 인자인 UCP1 활성화도 지

지방세포의 분화 시에 대조군과 비슷한 발현 양상을 보였다. 그러나 미토콘드리아의 최대호흡량과 예비호흡용량이 대조군 대비 48.97%, 243.28% 유의적으로 감소하였다.

결론적으로 *DNAJC6* 유전자가 과발현된 3T3-L1 세포는 지방 합성과 분해, 아디포사이토카인 발현, 인슐린-GLUT4 신호체계가 억제되며 미토콘드리아 증식 및 기능 등이 억제되었다. *DNAJC6* 유전자가 억제된 3T3-L1 세포는 대조군에 비하여 분화 중반부에 높은 지방 합성을 보이고, adipocyte 상태에서 정상적인 인슐린-GLUT4 체계를 보이며 UCP1 활성화도 대조군과 비슷한 증가 양상을 보였다.

본 연구는 *DNAJC6* 유전자를 과발현하거나 억제한 3T3-L1 세포로 실험을 진행하였다. *DNAJC6* 유전자 억제 효과는 분화 중반부(분화 4일차)부터 증가함에 따라 지방세포의 대사가 빠르게 나타날 것이므로 향후 이를 기준으로 추가실험이 필요하다. 또한 *DNAJC6* 유전자 과발현 혹은 억제 transgenic mice를 대상으로 기관 간 상호기전을 규명할 필요가 있다. 그러나 본 연구는 에너지불균형과 관련된 유전자인 *DNAJC6* 발현의 차이가 지방세포의 대사를 조절하는 기전을 확인하였으므로, 향후 에너지 불균형에 따른 비만연구와 관련된 전임상(in vivo) 및 임상(clinics)연구를 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

목 차

논문 개요

I. 서론	1
1. 비만 발생 후보 유전자	1
2. DnaJ family group and <i>DNAJC6</i> gene	3
3. 3T3-L1 지방전구세포의 adipogenesis 과정	6
3-1. Adipogenesis	6
3-2. Insulin-GLUT4 cascade system	7
3-3. Adipocytokines	8
4. 미토콘드리아 기능	10
5. 연구목적	11
II. 재료 및 방법	12
1. 3T3-L1 세포배양 및 분화	12
2. 세포독성평가 (Cell viability assay)	13
3. 형질주입 (Transfection)	13
3-1. 과발현 (Overexpression)	13
3-2. 억제 (Inhibition)	14
4. DAPI/BODIPY staining	14
5. Oil Red O staining	15
6. Free glycerol 및 triglyceride 측정	16

6-1. Free glycerol 측정	16
6-2. Triglyceride 측정	17
7. RT-PCR	17
8. Western Blotting analysis	18
9. Mitochondrial function test	21
9-1. 산소소비량을 활용한 미토콘드리아 스트레스 측정 원리	21
9-2. 실험 방법	21
10. Statistical analysis	24
III. 결과 및 고찰	25
1. <i>DNAJC6</i> transfection의 안전성 확인 (세포 생존율)	25
2. <i>DNAJC6</i> gene overexpression 및 inhibition 확인	27
3. DAPI/BODIPY staining	29
4. 지방구 형성 (Oil Red O 염색)	31
5. 지방합성 (Adipogenesis) 및 지방분해 (Lipolysis) 관련 단백질 발현	33
6. Tg- & Tg+ 세포에서의 TG 및 free glycerol 분비	35
7. 비만세포 관련 사이토카인 (Adipocytokines) 발현	37
8. Insulin-GLUT4 신호체계	39
8-1. <i>DNAJC6</i> 과발현의 영향	39
8-2. <i>DNAJC6</i> 억제시 Leptin-인슐린-GLUT4 체계	41
8-3. <i>DNAJC6</i> 과발현 혹은 억제시 Autophagy	41
9. Mitochondrial function	44
9-1. PGC-1 α 와 UCP1 발현	44

9-2. 산소소비량 및 ATP 생성 46

IV. 요약 및 결론 50

References

Abstract(영문초록)

List of Table

Table 1. Obesity related DnaJ protein.	4
Table 2. Types and functions of adipocytokines secreted by adipocytes.	9
Table 3. Calculation formula of free glycerol.	16
Table 4. Primer sequencing and cycle by RT-PCR.	18
Table 5. 1 st antibodies and 2 nd antibodies used in western blotting assay.	20
Table 6. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Parameter Equations.	23
Table 7. Stock solutions and Compound preparation for loading to XFe24 sensor cartridges.	24

List of Figure

Figure 1. Domain structures of Hsp70 and Hsp40 family protein.	3
Figure 2. Overview of 3T3-L1 preadipocyte maturation and expression of adipogenesis protein.	6
Figure 3. Schematic of the Insulin signaling pathway for GLUT4 expression to uptake of glucose.	8
Figure 4. 3T3-L1 cell culture procedure.	12
Figure 5. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test assay parameters and kinetic profile and Electron Transport Chain	22
Figure 6. Cell viability of 3T3-L1 preadipocyte after various levels of antibiotics and reagents used in the transfection process were treated to decide the concentration for safety.	26
Figure 7. Expression of <i>DNAJC6</i> overexpression and inhibition compared to the control.	28
Figure 8. Differentiation of DAPI/BODIPY staining on 0-day, 4-days, and 8-days.	30
Figure 9. Oil Red O staining of Control, Tg ⁻ , and Tg ⁺ cells at 0, 4, and 8 days.	32
Figure 10. Protein expression related to adipogenesis and lipolysis in the control and Tg ⁺ groups.	34
Figure 11. TG & free glycerol concentration in medium cultured with control, Tg ⁻ , and Tg ⁺ cells at 0, 2, 4, 6, and 8 days.	36
Figure 12. Adipocytokine factors protein expression of control and Tg ⁺ cells.	38

Figure 13. Protein expression related to the insulin cascade signals for GLUT4 synthesis.	40
Figure 14. Protein expression related to leptin-insulin-GLUT4 system in Tg ⁻ and Tg ⁺ cells compared to the control.	42
Figure 15. Protein expression related to autophagy in Tg ⁻ and Tg ⁺ cells compared to the control.	43
Figure 16. Protein expression related to mitochondrial function factors in the control, Tg ⁻ , and Tg ⁺ cells.	45
Figure 17. OCR graphs normalized by cell numbers of preadipocyte and adipocytes according to time-differences in the control, Tg ⁻ , and Tg ⁺ cells.	48
Figure 18. Oxygen consumption, ATP production and supplementary data came from Seahorse XF cell Mito Stress test in the control, Tg ⁻ , and Tg ⁺ cells.	49

ABBREVIATIONS

GWAS	Genome-Wide Association Study
RMR	Resting Metabolic Rate
BMR	Basal metabolic Rate
BMI	Body Mass Index
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
WAT	White Adipose Tissue
BAT	Brown Adipose Tissue
FCCP	Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone
Pref-1	Preadipocyte Factor 1
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein alpha
aP2	adipocyte protein 2
HSL	Hormone-sensative lipase
LEPR	Leptin Receptor
IRS	Insulin Receptor Substrate
Akt	Protein Kinase B
AS160	Akt substrate 160kDa
GLUT4	Glucose Transporter type 4
mTOR	mammalian target of rapamycin
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
PGC1 α	PPAR γ coativator 1 alpha
UCP1	Uncoupling Protein-1
OCR	O ₂ Consumption ratio
Tg ⁻ cell	<i>DNAJC6</i> inhibition in 3T3-L1
Tg ⁺ cell	<i>DNAJC6</i> overexpression in 3T3-L1

I. 서론

1. 비만 발생 후보 유전자

국내 비만 유병률은 2009년 31.3%에서 2019년 33.8%로 약 2.5% 증가하였으며, 국내 소아청소년의 비만 유병률은 2009년 5.1%에서 2019년 11.1%로 약 6.0% 증가하였다.[1] 비만 유병률은 해마다 증가하고 있으며, 이는 고혈압이나 고콜레스테롤혈증 등 만성질환 유병률이 전년도와 비슷하거나 증가하는 양상과 흐름이 유사하다.[2] 국내에서는 비만 예방을 위해 관계부처 합동 대책 등 다양한 노력을 하고 있지만 지속적으로 증가하는 국내 비만율은 여전히 해결해야 할 문제이다.[3]

소아청소년 비만에 관한 추적 연구 결과 소아청소년 비만의 54.7% 이상이 성인 비만이나 과체중으로 이어졌다.[4] 특히 소아청소년 비만은 정신적 문제를 일으킬 수 있고 대사 증후군이나 성인병, 인슐린 저항성이 조기에 심하게 발생한다.[5, 6] 이러한 연구를 토대로 소아청소년 비만은 신체적, 정신적, 사회적 건강에 악영향을 미치므로 예방과 관리가 요구되며, 소아청소년 비만일지라도 개인의 특성, 환경, 유전 등을 고려한 개인적인 중재가 이루어져야 비만 예방 및 관리에 효과적일 수 있다.[7]

비만이 되는 요인은 원인을 알 수 없는 특발성 (spontaneous naturally occurring), 유전적 요인 (β -3 adrenergic receptor, UCP 1,2,3, PPAR γ , Leptin receptor, IRS-1 등), 식이성 요인 (섭취 음식의 에너지 밀도 증가, 음식의 시각적 영향, 달고 짠 음식 섭취, 외식 빈도수 증가), 환경적 요인 (신체활동 부족, 스트레스로 인한 과식), 호르몬 불균형 등 신경내분비적 원인 (갑상선기능저하증, 쿠싱증후군, 고인슐린혈증, 시상하부 손상-과식욕, 낮은 기

초대사율, 자율신경 불균형, 성장호르몬 결핍), 사회 경제적 상태 (식품 회사의 성장, 나라의 경제력), 약제 섭취 (항정신병제, 항우울제, 경구피임제, 경구 혈당강하제, 항경련제, 항히스타민제 등) 등이 있으며 관련 기전연구가 다양하게 진행되고 있으며, 일반적으로 대부분 비만환자들은 에너지 섭취와 에너지 소비의 불균형으로 알려져 있다.[8, 9] 최근 인간유전체프로젝트 이후 향상된 유전체기술의 발달과 함께 글로벌 연구를 통하여 비만후보 유전자가 인종에 따라 감수성이 다르며 이와 관련된 다양한 유전체 관련 상관성 및 민감성 연구 등 유전적 원인을 이해하는 연구가 이루어지고 있다.[10] 특히 에너지 소비의 경우 Basal metabolic rate (BMR)을 포함한 Resting Metabolic Rate (RMR)가 70%를 차지하며 유전성이 강한 인자로 비만의 에너지 불균형에 관한 유전자 연구로 적절하다.[11] 따라서 본 연구실에서는 기존에 구축한 소아비만코호트를 활용하여 Genome-wide association studies (GWAS)기술을 이용해 RMR과 Body Mass Index(BMI) 간 유의적인 상관성을 보이는 유의적인 유전자로 *MAP2K6*과 *DNAJC6*을 도출하였다.[12] *MAP2K6* gene은 in vitro, in vivo, 인체에서 비만과의 관련성을 증명하였으며 본 연구는 *DNAJC6*의 in vitro 실험을 디자인한 것이다.[13, 14, 15] 비록 본 실험실의 연구결과인 RMR 관련 유전자 (*MAP2K6*) 와 에너지 불균형성 비만과의 관계가 밝혔지만, *MAP2K6*와 *DNAJC6* 유전자 기능 및 역할이 매우 다르고 아울러 에너지 불균형에 영향을 주는 유전자와 비만 발생 간 상관성에 영향을 주는 환경인자 (식생활, 운동 등) 연구는 지속되어야 한다. 따라서 소아에서 도출된 *MAP2K6*와 *DNAJC6* 유전자 이외에도 생애주기별 에너지 불균형에 관련하는 유전자의 탐색 뿐 만 아니라 개인 맞춤형 비만 예방이나 치료를 할 수 있는 연구가 필요하다.

2. DnaJ family group and *DNAJC6* gene

Heat shock protein은 추위, UV광선, 상처치유, 조직재형성 등 스트레스 동안 발현되는 것으로 알려져 있으며[16], 단백질을 안정화하거나 세포 스트레스에 의해 손상된 단백질을 다시 접힘으로써 샤페론 기능을 수행한다.[17]

그 중 DnaJ/Hsp40 protein은 기질과의 상호작용을 안정화하여 Hsp70의 ATPase 활성을 자극해 단백질 번역, 접힘, 풀림, 전이, 분해 등의 기능을 갖는다.[18] DnaJ protein의 C-말단 영역은 이량체화에 관여하며, 이량체 구조가 샤페론 활성화에 필요하기 때문에 세포 생존에 필수적인 다양한 세포 과정에 참여한다.[19] DnaJ는 Hsp70 N-terminal에 결합하는 J-domain을 갖고 있으며, Gly/Phe-rich region이나 cysteine 반복 존재에 따라 I, II, III 유형으로 분류할 수 있다(Figure 1).[18, 20, 21] 유형 I은 E. coli DnaJ와 유사하고, 유형 II는 포유류 유형이며, 유형 I, II는 non-native substrates

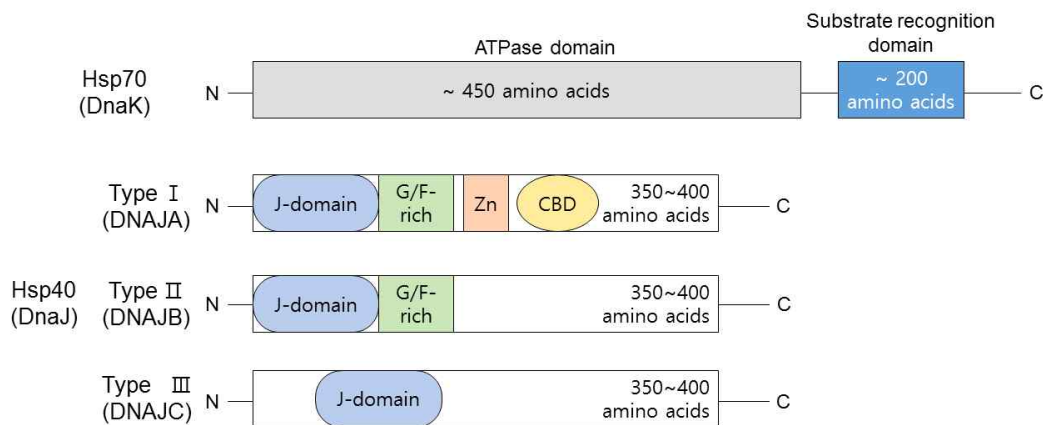


Figure 1. Domain structures of Hsp70 and Hsp40 family protein.

The type of Hsp40 is divided into the presence or absence of glycine/phenylalanine (G/F)-rich region, a zinc-finger motif and C-terminal client-binding domain (CBD).[21]

와 결합해 분자 샤페론 기능을 한다. 유형 III은 non-native substrates와 결합하지 않을 수 있어 그 자체로는 분자 샤페론 기능을 하지 않을 수 있다. [18] DnaJ protein은 종류에 따라 조직에서 특이적으로 발현되며, 돌연변이가 발생하면 신경 장애나 일부 비신경장애를 유발한다.[20] DnaJ protein중 비만 발생과 관련 있는 것으로 *DNAJB3*, *DNAJB9*, *DNAJC27*이 있다(Table 1).[22, 23, 24]

Table 1. Obesity related DnaJ protein.

Gene	Subject to Study	Result and Conclusions	Reference
<i>DNAJB3</i>	Human	<ul style="list-style-type: none"> • Decrease expression in obese cases • Regulating gene uplift with regular exercise 	[22]
<i>DNAJB9</i>	In vitro	<ul style="list-style-type: none"> • Gene inhibition : Inhibition of glycolysis and mitochondria oxidative phosphorylation in 3T3-L1 cells 	[23]
	In vivo	<ul style="list-style-type: none"> • Gene inhibition : leads to obesity • Gene overexpression : leads to improves insulin sensitivity and lowers plasma glucose levels • Gene recrudescence : significant reduced weight, liver size, and obesity 	
<i>DNAJC27</i>	Human	<ul style="list-style-type: none"> • Non-diabetic group : Increased expression in obese cases • Type 2 diabetes group : No significant difference in expression 	[24]

DnaJ family에 속하는 *DNAJC6* gene은 Hsp40/C6, auxilin, PARK19 등의 이명이 있다. *DNAJC6*는 clathrin 매개 endocytosis에서 특이적으로 기능하는 auxilin을 암호화하고, clathrin uncoating에서 중요한 역할을 하며, clathrin으로 둘러싸인 소낭을 분해하기 위한 Hsc70 기능을 지원한다.[25, 27] *DNAJC6*는 신경 특이적이며 신경 말단에 풍부하고, 시냅스 소포 재활용 역할을 할 수 있다.[28, 29] *DNAJC6* 돌연변이는 소아 파킨슨병이나 간세포 암종의 진행을 촉진한다.[29, 30] 또한 J-Domain에 돌연변이를 가진 Auxilin은 Hsc70과 정상적 상호작용이 불가능하여 transferrin, GLUT4 등 endocytosis 기능을 억제한다는 연구가 발표된 바 있다.[25] *DNAJC6* gene 영역 결손과 *DNAJC6*과 전사자리를 공유하는 LEPR 1p31.3 영역 결손이 7세 아동에게서 조기 비만이 발생한다는 연구도 있다.[26] 그러나 *DNAJC6* gene의 결핍이나 돌연변이가 비만으로 이어진다는 기전 연구는 없으므로 관련 기전을 연구할 필요가 있다.

3. 3T3-L1 지방전구세포의 adipogenesis 과정

3-1. Adipogenesis

3T3-L1 지방전구세포는 mouse의 배아에서 파생되었으며, 지방 합성, 지방 분해, 지방산 산화, browning 과정 연구에 폭넓게 사용되고 있는 세포 모델이다.[31]

3T3-L1 preadipocyte의 100% confluence 이후 cell arrest가 일어나야 지방세포로 분화를 할 수 있다(Figure 2.). Confluence 과정에서 Pref-1에 의해 지방 형성으로 가는 과정을 억제한다.[32] 지방 전구세포가 분화하기 전 Cell arrest 상태에서 분화 초기 3-Isobutyl-1-methylxanthine, Dexamethasone, insulin (MDI) treat 시 Pref-1의 발현은 감소하고 C/EBP β , C/EBP δ 의 발현이 증가하며, 앞서 말한 단백질의 발현이 증가함에 따라 PPAR γ 와 C/EBP α 의 전사를 유도한다.[32, 33] 분화 후기에는 adipokines, aP2, FAS 등 유전자가 특이적으로 발현하며 세포에 지방구가 생성된다.[34]

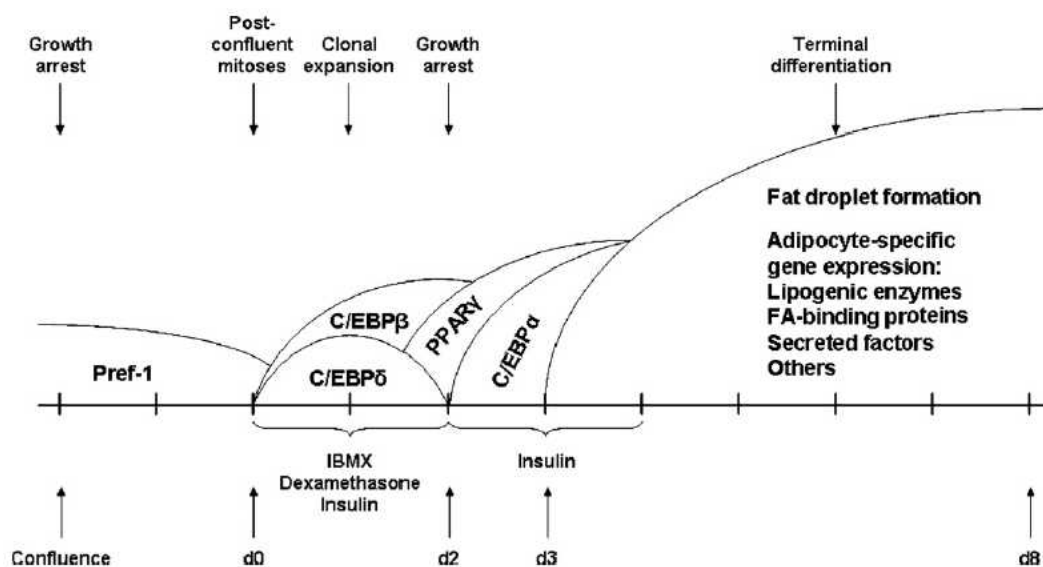


Figure 2. Overview of 3T3-L1 preadipocyte maturation and expression of adipogenesis protein. [32]

3T3-L1 cells에서 TG가 축적되며, 과도하게 축적될 경우 세포질에서 저장된 지방구를 표면으로 이동시켜 지방 분해 (lipolysis)를 일으킨다.[35] 지방 분해는 HSL에 의해 조절되며, HSL은 Protein kinase A (PKA)에 의해 활성화된다.[35] 지방은 인체 내 필수적인 에너지원이므로 에너지 항상성을 위한 적절한 지방 분해 정도를 유지할 필요가 있다.[36, 37]

3-2. Insulin-GLUT cascade system

3T3-L1 cells에 인슐린을 처치하면 지방조직세포막의 포도당 투과성을 증진시키고, 유입된 포도당은 지방을 합성하는데 사용되어진다(Figure 3). 인슐린은 세포막에 있는 insulin receptor α -subunit과 결합해 β -subunit의 tyrosine kinase domain을 자가인산화하며 활성화시킨다.[38] 인슐린 자극으로 활성화된 자가인산화는 도킹 단백질인 Serine 307 Insulin receptor substrate (IRS)의 활성화를 일으켜 Phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K)에 부착된다.[39] PI-3K는 PIP2, PIP3을 인산화하여 PI3K/PDK1 의존성 인산화를 통해 Threonine 308 Akt를 활성화시킨다.[40, 41] Akt 활성화로 Akt substrate 160 (AS160)의 인산화를 촉진하여 Glucose transporter type 4 (GLUT 4)가 endocytosis 작용을 할 수 있도록 세포막과 결합해 포도당을 세포 내로 운반할 수 있게 된다.[38] 지방세포에서의 인슐린 신호전달이 GLUT4를 원형질막과 융합하는 속도를 증가시키고, 원형질막의 클라트린 기반 세포내이입 구조에서 GLUT4 축적을 촉진한다.[42] 지방 조직에서 GLUT4가 부족하면 근육과 간에서 인슐린 저항성을 나타내며, 인슐린 저항성 상태가 되면 지방 조직에 저장된 TG가 유리지방산으로 분해된다.[43]

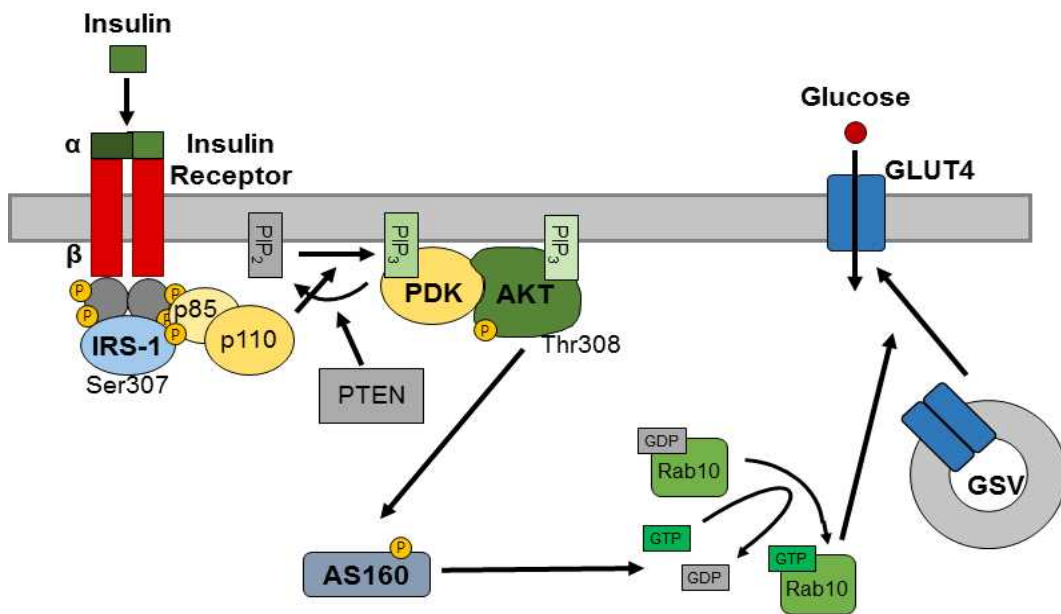


Figure 3. Schematic of the Insulin signaling pathway for GLUT4 expression to uptake of glucose. The phosphorylated receptor recruits and phosphorylates the insulin receptor substrate-1(IRS-1) on tyrosine residues and activate Akt. AS160 and Rab10 activation plays critical role in tracking of GLUT4 storage vesicles (GSVs) to the plasma membrane for influx of glucose.[39, 40, 41, 44]

3-3. Adipocytokines

3T3-L1 cells에서 TG가 축적되거나 분해되면 지방 세포에서 유래한 세포 신호 단백질 사이토카인이 분비되는데, 이는 아디포카인 (adipokine)이라고 불린다.[45] 아디포카인의 분비는 비만, 대사증후군, 당뇨병, 면역 반응과 관련성이 있기 때문에 에너지 저장에 관련한 질병 발병에 기여한다.[46] 지방 세포에서 지방이 과잉으로 축적되면 전염증성 사이토카인인 렙틴이 분비되는데, 렙틴은 뇌 시상하부 수용체에 작용하여 식욕을 조절하고, PI3K 경로

및 전염증성 사이토카인의 생성을 향상시킨다.[46, 47] 아디포넥틴은 지방조직에서 발현 분비되는 식욕억제 호르몬으로 항염증성 아디포카인으로 AMPK 신호 전달 및 PPAR γ 의 활성화를 통해 지방산 산화와 포도당 흡수를 촉진하는 등 체지방조절에 중요한 역할을 한다. 비만이 되면 혈중 아디포넥틴이 감소하여 체지방감소는 아디포넥틴량을 증가시킨다.[48] 또한 지방이 축적되면서 TNF- α , IL-6 등 염증성 사이토카인을 분비하여 지질 대사 기능장애에 기여한다.[46] 지방세포에서 지방이 과잉으로 축적되면 항염증성 아디포카인은 감소하고 전염증성 아디포카인은 증가한다.[46, 49] (Table 2.)

Table 2. Types and functions of adipocytokines secreted by adipocytes. [49]

Adipocytokine	Inflammatory effect	Functions
Leptin	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> - Partially mimics the action of insulin in the liver, adipose tissue, and muscle. - Overcoming insulin resistance, diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver when leptin is administered in a mouse model that lacks adipose tissue.
TNF- α	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> - Fat TNF-α and plasma TNF-α increase in obesity and insulin resistance. - However, high production of TNF-α in accumulated adipose tissue is the cause of obesity-related insulin resistance. - Insulin signaling is weakened by TNF-α treatment in adipocytes.
Resistin	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> - High plasma concentrations in insulin resistant obese mice.
PAI-1	Pro-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> - Increased in abdominal visceral fat when obese. - Associated with type 2 diabetes and hypertriglyceridemia-expressed in adipocytes.
Adiponectin	Anti-inflammatory	<ul style="list-style-type: none"> - Decreased expression level when obese. - Inhibition of adipocyte differentiation through COX-2 pathway. - Up-regulation of PPARγ expression in 3T3-L1 cells.[47]

4. 미토콘드리아 기능

미토콘드리아는 유기물 에너지 자원을 전자전달계의 산화적 인산화과정을 통해 생명활동에 필요한 ATP를 생성하는 역할을 수행하는 중요한 기관이며 세포의 종류와 기능에 따라 크기와 수는 다양하다. 또한 자체 DNA 및 RNA를 가지고 있어서 세포질유전에도 관여한다. 비만세포는 두 종류가 있으며 brown adipose tissue (BAT)와 white adipose tissue (WAT)이다. BAT의 미토콘드리아 역할은 non-shivering thermogenesis로 잘 알려져 있으나 WAT은 에너지 저장의 역할 외 미토콘드리아의 역할은 매우 제한적이다. WAT는 저온 및 베타-아드레너직 향상제 공급상황에서 BAT로 전환되며 미토콘드리아활성이 동반된다. WAT 미토콘드리아는 타 조직에 존재하는 미토콘드리아와 유사하게 ATP의 주요 공급원 역할을 하며, 세포 분화, 지방생성, 지방분해, 지방산 산화 등 지방세포의 생물학적 과정에 관여한다. WAT 미토콘드리아 생합성은 adipogenesis에 결정적인 유전자인 PPAR γ 및 관련 agonists 들로 유도할 수 있으므로 지방산 합성, 지방산의 에스터화(중성지방 합성), 관련 사이토카인분비 기능, 인슐린 민감성, 인슐린 신호 연계 GLUT4 합성 등 모든 과정이 WAT 미토콘드리아의 기능 활성화에 영향을 준다고 할 수 있다.[50]

제2형 당뇨병환자, 비만 등 대사성질환에서의 비만세포의 미토콘드리아 기능손상 밀접한 관계가 있는데 비만세포의 미토콘드리아 기능손상이 비만세포증식억제, 인슐린저항성, 지질대사 및 산화반응 이상, thermogenesis 이상 등을 야기하기 때문이다.[51] 따라서 본 연구에서는 협의적 의미인 WAT 미토콘드리아 기능을 분석하기보다 전체적인 인체 생리적 조절 및 에너지 항상성에 기여하는 영향력 및 관련된 기전을 보고자한다.

5. 연구목적

DNAJC6 gene은 파킨슨병 등 신경 퇴행성 질환 연관성 연구가 이루어지고 있으나[51], 소아비만의 RMR, BMI나 포도당 수송, deletion 시 소아의 조기 비만 유발 등에 관여함에도 비만이나 thermogenesis에 대한 기전연구가 이루어지지 않고 있다. 그리고 3T3-L1 지방전구세포에서 *DNAJC6* gene을 과발현 시 지방 생성을 억제했다는 연구 결과가 있으나 knock out 또는 knock down case에서 지방 생성을 유도하는지 여부를 확인하지 않았다.[27] 따라서 *DNAJC6* gene을 억제했을 때 지질합성 및 억제, 인슐린 신호전달, 염증 등 기전을 연구할 필요성이 있다.

본 연구의 목적은 3T3-L1 지방전구세포에서 *DNAJC6* gene을 과발현 혹은 억제하였을 때 지방 합성 및 분해, 염증반응 (아디포사이토카인 발현), 인슐린-GLUT4 신호전달 체계, 미토콘드리아의 에너지대사 기능 (thermogenesis 포함)등 지방세포의 생리학적 메커니즘에 미치는 영향을 확인하는 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 3T3-L1 세포배양 및 분화

세포는 마우스 배아 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 분양받아 사용하였다. preadipocytes를 10% bovine calf serum (BCS) (Thermo Fisher Scientific, 26170043, USA), 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Welgene, LS202-02, Korea)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Welgene, LM001-05, Korea)으로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. Post-confluent 이후 (Day 0), cells를 10% fetal bovine serum (FBS) (Capricorn Scientific GmbH, Ebscorfergrund, Germany), 1% P/S이 함유된 DMEM에 0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 μ g/mL insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 첨가하여 differentiation을 유도하며 48시간 배양하고, 10% FBS, 1% P/S이 함유된 DMEM에 10 μ g/mL insulin을 첨가하여 differentiation을 유지하며 48시간동안 배양하였다 (Day 2). 성숙 시에는 48시간마다 10% FBS, 1% P/S이 함유된 DMEM으로 교체하였다 (Days 4-8); 위 과정을 통해 preadipocytes가 WAT cells와 유사한 세포인 지방이 축적된 adipocytes로 분화된다(Figure 4.).

Preadipocyte		Post-Confluency		Adipocyte differentiation			Adipocyte maturation					
Day -4	Day -3	Day -2	Day -1	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
10% BCS, 1% P/S DMEM				10% FBS, 1% P/S DMEM								
				MDI		Insulin						
New media		New media		New media		New media		New media		New media		harvest

Figure 4. 3T3-L1 cell culture procedure.

2. 세포독성평가 (Cell viability assay)

세포독성평가는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Duchefa, Haarlem, Netherlands) 용액을 사용하여 측정하였다. 3T3-L1 cells를 96 well plate에 5.0×10^4 cells/100 μ L plating해 72시간 동안 배양시킨 다음, 형질 주입을 하고 24시간 이후 실험하였다. 배지를 제거하고 MTT를 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)에 용해시켜 제조한 0.5mg/mL MTT solution을 well당 100 μ L씩 넣어 2시간동안 incubator에서 반응시켰다. MTT solution을 제거하고 DMSO를 well당 100 μ L씩 넣어 30분동안 shaker한 후 spectrometer (Thermofisher, Waltham, MA, USA) 기기로 570nm, 630nm 흡광도를 측정하였다. 계산은 570nm-630nm한 값을 사용하였고, Control 군을 100%로 계산했을 때의 %를 확인하였다.

3. 형질주입 (Transfection)

3-1. 과발현 (Overexpression)

LipofectamineTM3000 Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 3T3-L1 cell의 *DNAJC6* gene (Dnajc6 Mouse Tagged ORF Clone; ORIGENE, Rockville, MD, USA)을 과발현하였다. 3T3-L1 cell 배양 후 형질주입 효율을 높이기 위해 serum free DMEM으로 1hour fasting 하였다. 1시간 후, Opti-MEM (Thermofisher, Waltham, MA, USA), *DNAJC6* gene DNA 2,500ng, P3000 reagent, lipofectamine 3000 reagent를 혼합하여

DNA master mix를 제조하고 15분간 상온에서 반응시켰다. DNA master mix를 6 well plate에 250 μ L, 96 well plate에 10 μ L 분주한 후 4시간동안 incubator에서 반응시켰다. 이후 항생제 G418 (Thermofisher, Waltham, MA, USA)을 500 μ g/mL 농도로 희석한 10% BCS, 1% P/S DMEM을 지급하고 24시간 배양한 후 실험을 진행하였다.

3-2. 억제 (Inhibition)

siRNA Reagent System (santacruz, Dallas, TX, USA)을 사용하여 3T3-L1 cell의 *DNAJC6* gene (siDNAJC6; santacruz, Dallas, TX, USA)의 발현을 억제하였다. Transfection 45분 전 solution A (siDNAJC6 duplex + siRNA Transfection Medium (santacruz, Dallas, TX, USA))와 solution B (siRNA Transfection Reagent (santacruz, Dallas, TX, USA) + siRNA Transfection Medium)을 각각 제조하고 하나로 합친 후 실온에서 45분간 반응시킨다. 3T3-L1 cell 배양 후 배지를 제거하고 serum free DMEM으로 cell을 세척한 후 solution AB 200 μ L (10 μ L)와 siRNA Transfection Medium 800 μ L (40 μ L)을 6 well plate (96 well plate)에 지급하고 5시간동안 incubator에서 반응시켰다. 이후 10% BCS, 1% P/S DMEM을 지급하고 24시간 배양한 후 실험을 진행하였다.

4. DAPI/BODIPY staining

DAPI/BODIPY staining을 통해 세포 내 핵과 지방을 염색하여 핵 손상 정도와 지방 형성을 확인하였다. 세포의 배지를 제거하고 1X PBS

(Welgene, Gyeongsan, Korea)로 2번 세척한 후 4% paraformaldehyde로 1시간동안 세포를 고정시켰다. 고정이 끝나면 고정액을 제거하고 1X PBS로 shaker 위에서 5분간 3번 세척한 후 1X PBS에 1:2000으로 희석한 BODIPY를 세포에 지급하여 15분간 shaker 위에서 세포 내 지방을 염색시켰다. BODIPY 염색이 끝나면 BODIPY 용액을 제거하고 1X PBS로 shaker 위에서 5분간 3번 세척한 후 1X PBS에 1:5000으로 희석한 DAPI를 세포에 지급하여 30분간 shaker 위에서 세포 핵을 염색시켰다. DAPI 염색이 끝나면 DAPI 용액을 제거하고 1X PBS로 shaker 위에서 5분간 3번 세척한 후 fluorescent mounting medium (Vector Laboratories, Newark, CA, USA)로 wet mount를 만들고 4°C에서 overnight한다. 위의 모든 과정은 암실에서 진행한다. Mounting 용액에 굳으면 Confocal Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, Overkohen, Germany)를 통해 염색을 확인하였다.

5. Oil Red O staining

세포 내 지방 합성 정도를 측정하기 위해 Oil Red O (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 로 염색하였다. 실험 전 isopropanol에 Oil Red O를 희석하여 0.5% stock solution을 제조한다. 세포의 배지를 제거하고 1X PBS로 2번 세척한 후 4% paraformaldehyde로 1시간동안 세포를 고정시켰다. 고정하면서 Oil red O stock solution과 1X PBS를 4:6으로 섞어 Oil red O working solution을 만들고 0.22 μ m filter unit (Millipore, Burlington, VT, USA)으로 filtering한다. 고정이 끝나면 고정액을 제거하고 1X PBS로 2번 세척한 후 Oil red O working solution을 세포에 1mL씩 분주하여 1시간동안 세포 내 지방을 염색시켰다. 이후 Oil Red O working solution을 제거하

고 1X PBS로 shaker 위에서 5분간 3번 세척한 후 20배율에서 현미경으로 염색 정도를 관찰하고 사진 촬영하였다. 염색된 Oil Red O를 추출하기 위해 1X PBS를 제거하고 100% isopropanol을 1mL 분주한 후 shaker 위에서 10분간 추출하였다. 추출이 끝나면 e-tube에 옮겨 담아 spindown으로 불순물을 제거하고 상층액만 96 well plate에 100 μ L씩 분주하여 spectrometer 기기로 492nm 흡광도를 측정하였다.

6. Free glycerol 및 triglyceride 측정

세포의 지방 분해 정도를 측정하기 위해 세포 medium에서 free glycerol 및 triglyceride를 측정하였다.

6-1. Free glycerol 측정

Free glycerol은 Free Glycerol Reagent (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 사용해 측정하였다. Free glycerol reagent를 e-tube에 320 μ L 넣고 3차 증류수, standard, sample을 각각 40 μ L씩 넣고 vortex한다. 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 spectrometer 기기로 540nm 흡광도를 측정하였다. 계산식은 Table 3.와 같다.

Table 3. Calculation formula of free glycerol.

$$\text{Free glycerol} = \frac{\text{sample 흡광도} - \text{blank 흡광도}}{\text{standard 흡광도} - \text{blank 흡광도}} \times 0.26\text{mg} \times 100 / \text{dL}$$

6-2. Triglyceride 측정

Triglyceride는 중성지방 측정용시액 (ASAN PHARM.CO.,LTD., Seoul, Korea)을 사용해 측정하였다. 표준시약용해액을 e-tube에 750 μ L 넣고, sample을 5 μ L씩 넣은 후 vortex한다. 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고 96 well plate에 100 μ L씩 분주한 후 spectrometer 기기로 550nm 흡광도를 측정하였다. Triglyceride 농도는 triglyceride standard curve 추세선을 작성하여 계산하였다.

7. RT-PCR

DNAJC6 gene의 발현 정도를 확인하기 위해 역전사효소 PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 진행하였다. Cell 배지를 제거하고 1X PBS로 세척한 후 TRIzol reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 cell을 긁어모은 후 chloroform 200 μ L를 추가하여 vortex하였다. 13,000rpm에서 10분간 원심분리하였고, 투명한 상층액만 새로운 e-tube에 옮겨 담은 후 동량의 isopropanol을 넣어 가볍게 섞어주었다. 실온에서 10분간 방치하고 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 용액을 제거해 RNA pellet만 tube에 남게 한다. RNA pellet을 75% ethanol로 2번 세척하고 13,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 용액을 제거해 ethaol을 깔끔히 제거한다. Rnase free water로 pellet을 완전히 녹이고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후 Nanodrop spectrophotometer (Thermofisher, Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량하였다.

ReverTra Ace™ qPCR RT Kit (toyobo, Osaka, Japan)를 사용해 cDNA를 합성하였다. 5X RT, enzyme, primer, RNase free water로 1X RNA master mix를 제조하고, sample RNA 500ng과 RNase free water를 혼합하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 시 37℃ 15분, 98℃ 5분으로 가열하고 4℃에서 유지하였다. AccuPower PCR PreMix (Bioneer, K-2016, Korea)를 사용해 primer set를 제조하였다. AccuPower PCR PreMix PCR tube에 제조한 Primer set 19μL와 합성한 cDNA 1μL를 up and down mixing한다. 사용한 primer (GenoTech Corp., Daejeon, Korea)의 sequencing과 cycle은 Table 4.과 같다. Agarose gel 2%로 45분간 100V에서 전기영동 (Mupid-2plus; Takara, Shiga, Japan)하였고, Chemidoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 통해 발현 정도를 측정하였다.

Table 4. Primer sequencing and cycle by RT-PCR.

Gene	Primer
<i>DNAJC6</i>	Forward: GTG TAC GGT GGG AGG TCT AT
	Reverse: CCG CCT TTC ACC ATG TCA AA
	Cycle: 94℃ 15mins → (94℃ 15sec → 59.8℃ 20sec → 72℃ 20sec)×40cycles →72℃ 10mins → 4℃ ∞
GAPDH	Forward: CGT GCC GCC TGG AGA AAC C
	Reverse: TGG AAG AGT GGG AGT TGC TGT TG
	Cycle: 94℃ 15mins → (94℃ 15sec → 62.7℃ 20sec → 72℃ 20sec)×40cycles →72℃ 10mins → 4℃ ∞

8. Western blotting analysis

1X Trypsin-EDTA Solution (Welgene, LS015-01, Korea)를 사용하여 cell을 떼어내고, 13,000rpm에서 10분간 centrifuge하여 cell pellet을 모았다.

Cell pellet에 protease inhibitor (GenDEPOT, Katy, TX, USA), phosphatase inhibitor (GenDEPOT, Katy, TX, USA), lysis buffer (CST, Danvers, MA, USA)를 mixing하여 ice에서 10분씩 3번 vortex하였고, 13,000rpm에서 10분간 centrifuge하고 상층액만 e-tube에 옮겨 protein을 추출하였다.

Western blot sample은 bradford assay로 정량하였고, Lasemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 mixing하여 제조하였다.

SDS-PAGE gel을 제조하여 120V에서 90분간 전기영동 하였고, 280mA에서 90분간 nitrocellulose membrane (GE healthcare, 10600003, USA)과 polyvinylidene fluoride membrane (GE healthcare, 10600023, USA)으로 protein을 transfer하였다. Membrane은 1X Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 (TBST)에 녹인 3% BSA에서 1시간동안 blocking하였다. 1차 항체를 3% BSA에 1:500~1:2000으로 희석하였고, membrane에 4°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 1차 항체를 제거하고 TBST로 10분씩 3번 세척하였으며, 2차 항체를 3% BSA에 1:5000으로 희석해 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 사용한 항체는 Table 5.에 제시되어있다. ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 3분간 반응시킨 후 Chemidoc Imaging System을 통해 감광하였으며, Image lab software (Bio-Rad, Laboratories, USA)를 이용하여 분석하였다.

Table 5. 1st antibodies and 2nd antibodies used in western blotting assay.

1 st antibody	Company	Cat. #
<i>DNAJC6</i>	Invitrogen	PA5-26981
Pref-1	santa cruz	sc-376755
PPAR γ	CST*	2435
C/EBP α	CST	8178
aP2	santa cruz	sc-271529
pHSL (Ser563)	CST	4139
HSL	CST	4107
LEPR	abcam	ab5593
Leptin	biologend	675002
Adiponectin	CST	2789
Insulin receptor β	CST	3025
pIRS1 (Ser307)	CST	2381
IRS1	CST	2382
pAkt (Thr308)	CST	9275
Akt	CST	9272
AS160	CST	2670
GLUT4	CST	2213
mTOR	CST	2972
LC3 A/B	CST	12741
UCP1	CST	14670
PGC1 α	Boster	M00236
GAPDH	EnoGene	E11-12057
Vinculin	CST	4650
2 nd antibody	Company	Cat. #
anti-mouse	CellNest	CNG004-0005
anti-rabbit	CellNest	CNG005-0005

* CST; Cell Signaling Technology

9. Mitochondrial function test

9-1. 산소소비량을 활용한 미토콘드리아 스트레스 측정 원리

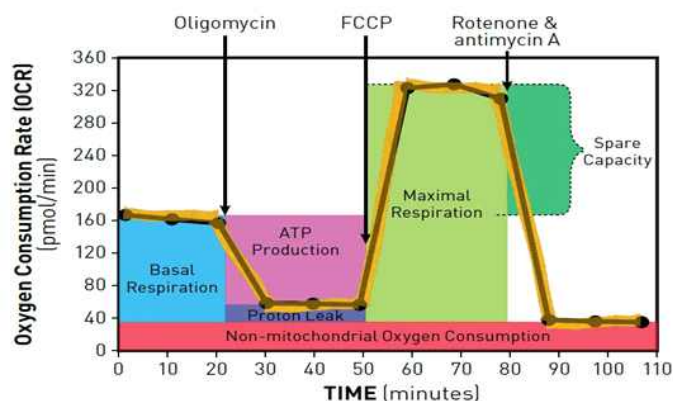
세포의 미토콘드리아 활성과 산소소비량 분석을 위해 Seahorse XF Cell mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 live cell의 바이오에너지의 개별 변화를 실시간으로 측정하였고, 기초호흡, 최대호흡 등 미토콘드리아 호흡을 포함한 산소소모율 (Oxygen Consumption Rate; OCR) 및 ATP 생성률 등 관련 test 항목을 측정하였다 (Figure 5. & Table 6.).

9-2. 실험 방법

실험을 위해 cell을 XF Cell Culture Microplate에 5.0×10^4 cells/100 μ L seeding하였다. Mito stress 측정 24시간 전에 카트리지의 utility plate에 3차 증류수를 1mL씩 넣고, XF calibrant 용액을 50mL tube에 넣어 37 $^{\circ}$ C non-CO₂ incubator에 예열 및 hydration 하였다. XF analyzer는 실험 시작 최소 4시간 전에 켜두어 예열시켰다.

실험 당일 utility plate에 담겨 있던 3차 증류수를 제거하고 XF calibrant 용액을 well당 1mL씩 넣어 37 $^{\circ}$ C non-CO₂ incubation하였다. 카트리지에 넣을 drug compound를 용해하였다(Table 7.). Drug가 채워진 sensor cartridge와 utility plate를 37 $^{\circ}$ C non-CO₂에서 incubation 하였다. CO₂ incubation에 있는 XF Cell Culture Plate를 꺼내서 XF Running Media로 2회 세척 후 well당 XF Running Media를 525 μ L 넣고 30~60분간 37 $^{\circ}$ C non-CO₂에서 incubation 하였다. XF analyzer software에서 실험 디자인을

(A) **Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile**
Mitochondrial Respiration



(B)

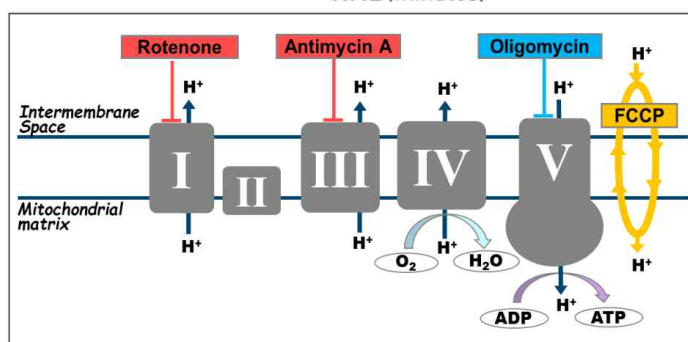


Figure 5. Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test assay parameters and kinetic profile(A), and Electron Transport Chain (B). [53] Oligomycin inhibits ATP synthase (complex V), and impacts or decrease electron flow through the Electron Transport Chain (ETC), resulting a reduction in mitochondrial respiration or OCR. FCCP is an uncoupling agent that collapses the proton gradient and disrupts the mitochondrial membrane potential, and electron flow through the ETC is uninhibited, and consumption by complexIV reaches the maximum. Rotenone inhibits complex I, and antimycin A inhibits complexIII. This combination shuts down mitochondrial respiration and enables the calculation of nonmitochondrial respiration.

Table 6. Seahorse XF Cell Mito Stress Test Parameter Equations.
[53]

Parameter Value	Equation
Non-mitochondrial Oxygen Consumption	Minimum rate measurement after Rotenone / antimycin A injection
Basal Respiration	(Last rate measurement before first injection) - (Non-Mitochondrial Respiration)
Maximal Respiration	(Maximum rate measurement after FCCP injection) - (Non-Mitochondrial Respiration)
H ⁺ (Proton) Leak	(Maximum rate measurement after Oligomycin injection) - (Non-Mitochondrial Respiration)
ATP Production	(Last rate measurement before Oligomycin injection) - (Minimum rate measurement after Oligomycin injection)
Spare Respiratory Capacity	(Maximal Respiration) - (Basal Respiration)
Coupling Efficiency	(ATP Production Rate) / Basal Respiration Rate) × 100

하고, drug가 채워진 sensor cartridge와 utility plate를 XF analyzer 트레이 위에 놓고 15분간 calibration 하였다. Calibration이 종료되면 utility plate를 cell culture plate로 교체하고 equilibration 과정 후 각 구간별로 3분 mix, 2분 wait, 3분 measure을 3번 반복하여 OCR을 측정하였다. 미토콘드리아 기능을 측정하고 각 구간별 계산은 Table 7., Figure 5.에 따라 계산하였다. 측정이 끝난 후 trypsin-EDTA로 세포를 모으고 세포 수를 측정하여 normalization을 진행하였다.

Table 7. Stock solutions and Compound preparation for loading to XFe24 sensor cartridges.

Stock solutions					
	Volume of assay medium		Stock concentration		
Oligomycin	630 μ L		100 μ M		
FCCP	720 μ L		100 μ M		
Rot/AA	540 μ L		50 μ M		
Compound preparation for loading to XFe24 sensor cartridges					
	Final well (μ M)	Stock solution volume (μ L)	Media Volume (μ L)	Port (μ M)	Volume added to prot (μ L)
Port A Oligomycin	1.5	360	2,640	8X, 15	75
Port B FCCP	0.5	135	2,865	9X, 5	75
Port C Rot/AA	0.5	300	2,700	10X, 5	75

10. Statistical analysis

본 연구의 모든 실험은 최소 3반복 수행하였고, Statistical Package for the Social Science software ver 25.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 통해 분석하였다. 모든 결과는 mean \pm SD로 나타내었다. Sample 간 차이는 독립표본 T검정 (independent two sample t-test)과 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 통해 유의성을 확인하였고, 일원배치 분산분석에서 사후 평가 도구로 Duncan's multiple range test를 사용하였다. 모든 통계 분석은 $p < .05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *DNAJC6* transfection의 안전성 확인 (세포 생존율)

3T3-L1 preadipocyte 세포를 이용한 *DNAJC6* transfection과정에서 사용하는 항생제와 형질감염시약의 독성효과 및 처치농도를 결정하기 위하여 세포생존율을 기반으로 독성 및 안전성 테스트를 시행하였다(Figure 6.).

실험에 사용한 *DNAJC6* DNA vector에는 항생제가 있어 실험 중 항생제를 투여하여 vector가 삽입된 세포를 선택적으로 배양할 수 있다. 3T3-L1 대조군 세포와 *DNAJC6* transfection (Tg+) 세포에서 항생제 시약인 G418 항생제를 처치한 결과 500 μ g/mL의 농도 에서 각 86.22 \pm 7.77%, 74.50 \pm 8.35%의 세포 생존율을 보이는 것으로 확인되었다. 반면 Tg- 세포 (siRNA 처치한 *DNAJC6* knock down 효과)에서 siRNA Transfection reagent의 농도가 세포생존율에 미치는 영향에는 큰 차이가 없었다.

세포 생존율 검사 결과를 바탕으로 *DNAJC6* transfection 시 과발현 실험에 사용할 항생제 농도는 75% 생존 정도를 보이는 500 μ g/mL, siRNA 실험에 사용할 siRNA Transfection reagent 농도는 8 μ L/mL로 결정하였다.

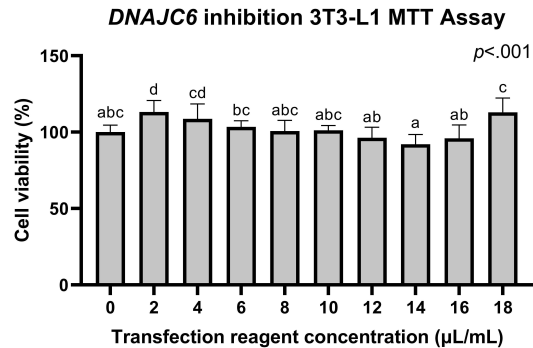
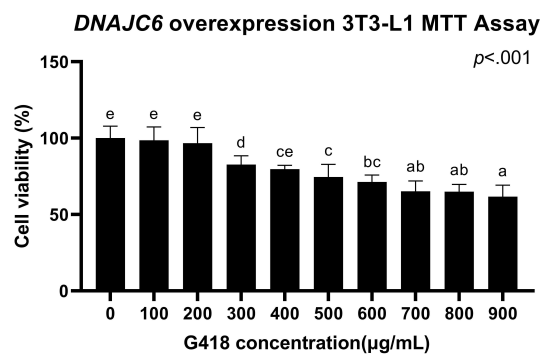
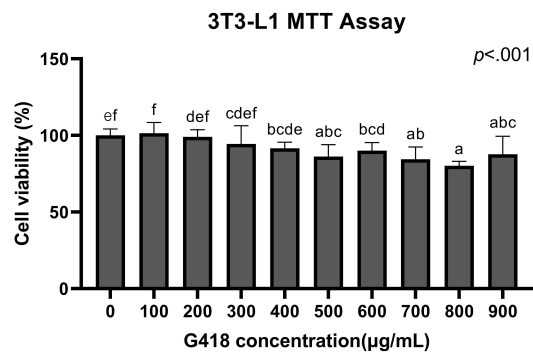


Figure 6. Cell viability of 3T3-L1 preadipocyte after various levels of antibiotics and reagents used in the transfection process were treated to decide the concentration for safety. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, c, d, e, and f) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

2. *DNAJC6* gene overexpression 및 inhibition 확인

DNAJC6 transfection을 확인하기 위하여 분화 0일째, 8일째에 RT-PCR 과 분화 0일째, 4일째, 8일째에 western blotting을 수행하였다(Figure 7.). Tg⁺ 세포에서 *DNAJC6*의 mRNA 및 단백질 발현 preadipocyte (분화 0일째)와 adipocyte (분화 8일째) 모두 대조군에 비해 1.38배, 1.78배 증가하였다(Figure 7-A & -B.). 단, preadipocyte 대비 adipocyte에서 Tg⁺ 세포의 *DNAJC6* 단백질 발현이 유의적으로 낮고, Tg⁻ 세포의 *DNAJC6* 단백질 발현이 대조군 대비 유의적인 차이가 없어 siRNA시 inhibition 효율을 확인하기 위해 분화 4일째를 추가 실험하였다. 그 결과 분화 4일째에 *DNAJC6* 발현이 Tg⁻ 세포에서 대조군에 비해 약 65.47% 감소하였으며, Tg⁺ 세포에서 대조군에 비해 약 1.37배 증가하였다(Figure 7-C.).

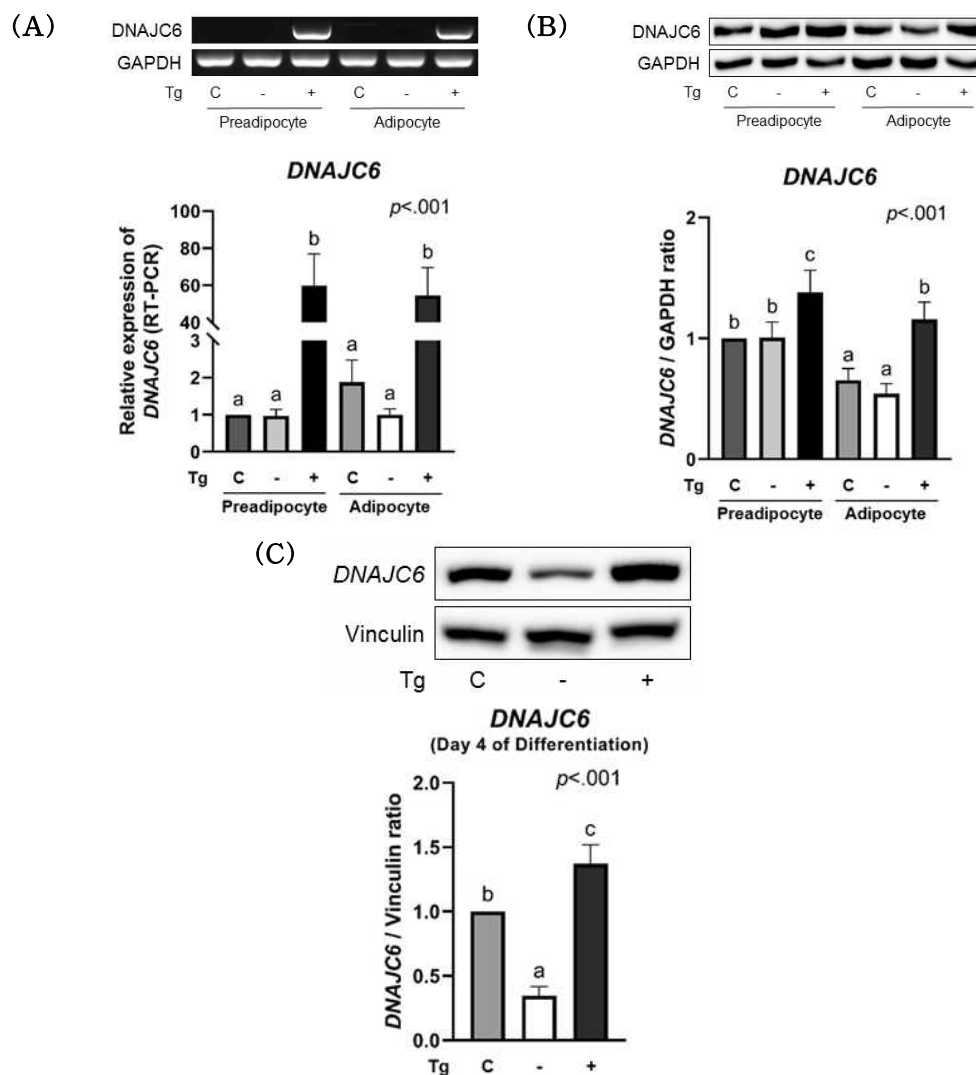


Figure 7. Expression of *DNAJC6* overexpression and inhibition compared to the control. (A) mRNA expression of *DNAJC6*. (B) Protein expression of *DNAJC6*. (C) Protein expression of *DNAJC6* at day 4. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

3. DAPI/BODIPY staining

Transfection 후 지방세포에서의 지질 축적과정에서의 세포 핵 손상과 지질 축적 정도를 확인하기 위해 DAPI/BODIPY staining을 수행하였다 (Figure 8). DAPI 염색 시 세포 핵의 손상은 핵의 모양이 원형을 유지하지 않거나, 여러 개로 쪼개져 있거나, 핵 주변이 파랗게 번져있는 모습일 때 핵 손상이 보인다고 판단하였다.[54] 대조군은 분화 0일, 4일, 8일 모두 핵 손상을 보이지 않고, 분화 8일째에 세포핵 주위에 지질이 형성되었다. Tg⁻ 세포는 분화 0, 4일, 8일 모두 핵 손상을 보이지 않았으며 4일째에 대조군에 비해 BODIPY 염색이 강하게 된 것을 확인하였다. 8일째에 세포핵 주위에 지질이 형성되었으나 대조군과 큰 차이가 보이지 않았다. 반면 Tg⁺ 세포는 분화 0일, 4일째에 핵 손상이 보이며, 분화 8일째에 세포핵 주위에 지질 방울이 형성되지 않았다.

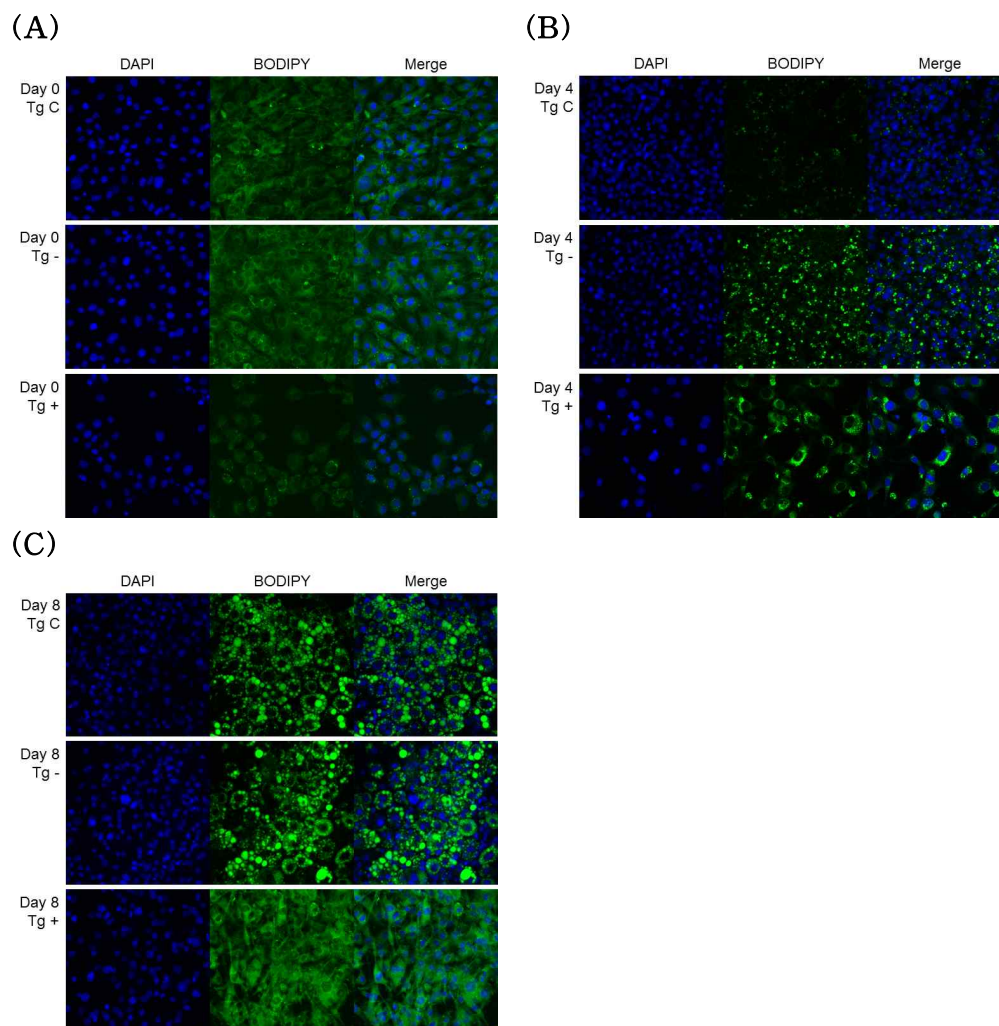


Figure 8. Differentiation of DAPI/BODIPY staining on 0-day (A), 4-days (B), and 8-days (C). The scale of the picture is 20X.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

4. 지방구 형성 (Oil Red O 염색)

지방세포에서 *DNAJC6* transfection이 지방구 형성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 Oil Red O 염색으로 지방구를 염색하였다. 염색 후 현미경으로 관찰하였을 때 대조군, Tg⁻ 세포는 분화 8일에 지방구가 형성되며 붉게 염색된 지방구를 확인하였으나 Tg⁺ 세포는 분화 8일에 염색된 지방구를 확인할 수 없었다(Figure 9-A.). 염색된 지방구를 isopropanol로 추출하여 492nm에서 흡광도를 측정한 결과 대조군과 Tg⁻ 세포는 분화 0일차에 비해 흡광도 값이 분화 4일차에서 약 2.41배, 2.29배, 분화 8일차에서 약 3.59배, 3.82배로 증가하였다. Tg⁺ 세포 또한 0일차 대비 분화 4, 8일차에서 약 1.10배, 1.34배 증가하였으나 대조군 세포의 분화 4, 8일차 흡광도 값보다 약 42.09, 52.88% 정도 낮았다(Figure 9-B.). 결론적으로 *DNAJC6*의 과발현은 지방구 형성을 억제하는 반면, *DNAJC6*의 억제는 지방구 형성 과정이 정상적으로 진행되는 것을 확인하였다.

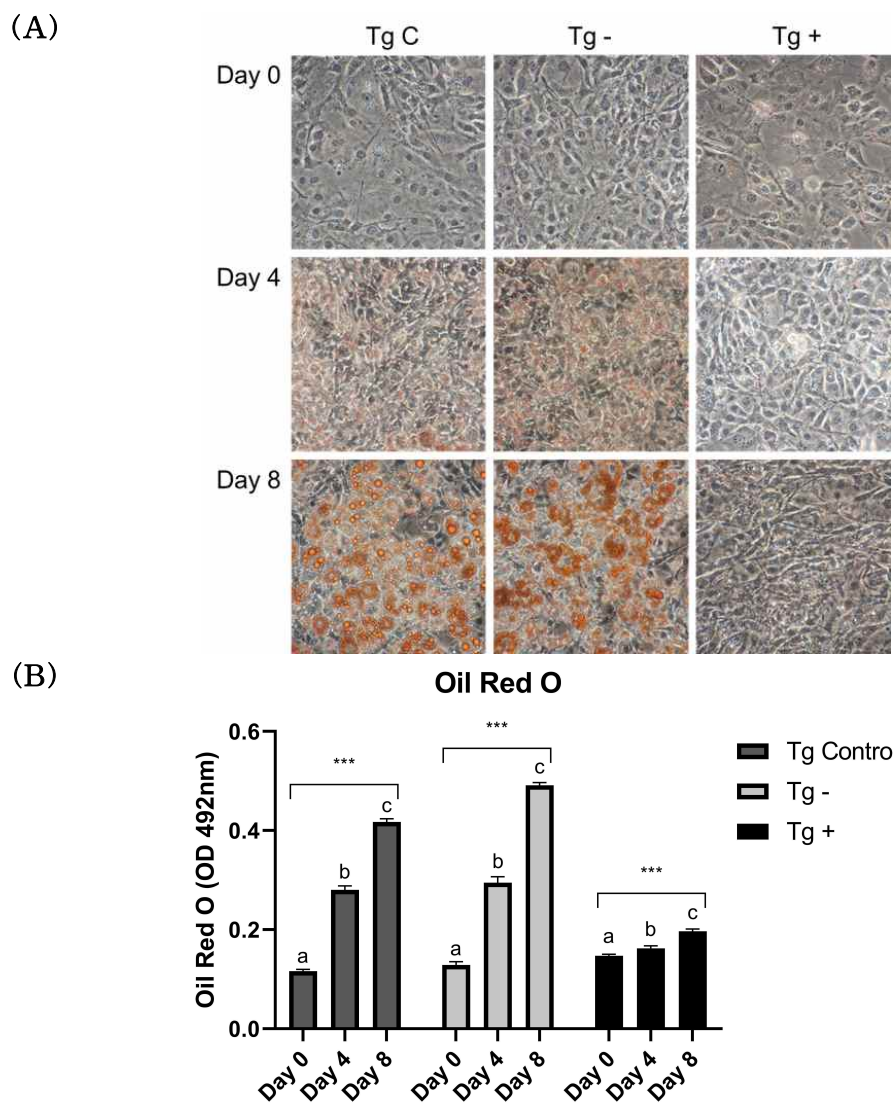


Figure 9. Oil Red O staining of Control, Tg⁻, and Tg⁺ cells at 0, 4, and 8 days. (A) Pictures of Oil Red O staining. (B) OD value of Oil Red O staining. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript alphabet letters indicate significant differences between groups at $p < .05$.

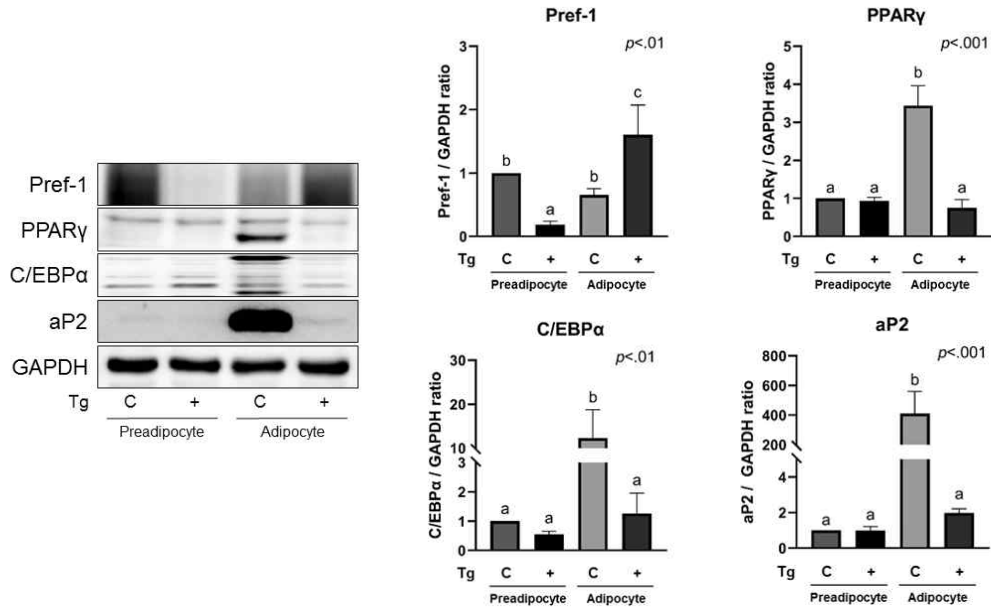
TgC; Control group, Tg⁻; *DNAJC6* inhibition group, Tg⁺; *DNAJC6* overexpression group

5. 지방합성 (Adipogenesis) 및 지방분해 (Lipolysis) 관련 단백질 발현

지방세포의 지방합성에 어떠한 영향을 미쳤는지 확인하기 위하여 지방합성 관련 단백질 발현 정도를 확인하였다(Figure 10.). 지방전구세포 마커(Preadipocyte marker)로 알려져 있는[32] Pref-1은 대조군 분화 8일째에 0일째보다 약 34.37% 감소하였으나 Tg⁺ 세포는 분화 8일째에 0일째보다 8.9배 증가하여 *DNAJC6* 과발현은 adipogenesis 과정을 억제하며 preadipocyte 상태를 유지하는 것을 확인하였다. 이는 대조군 세포에서 분화 8일째에 지방 합성 (adipogenesis) 관련 마커인 PPAR γ , C/EBP α , aP2가 각각 3.4배, 12.3배, 411배 증가하였으나 Tg⁺ 세포에서는 변화가 없었음을 확인하였다.(Figure 10-A.)

지방 분해 마커인 HSL, pHSL(Ser563)은 대조군에서 분화 0일째보다 분화 8일째에 4.0배, 26배 증가하였으나 Tg⁺ 세포에서는 유의적인 변화가 없었다(Figure 10-B.). 위의 결과 Tg⁺ 세포에서 지방 합성과 지방 분해가 일어나지 않았음과 동시에 분화 8일째에 지방 전구 세포를 유지하고 있음을 나타낸다.

(A)



(B)

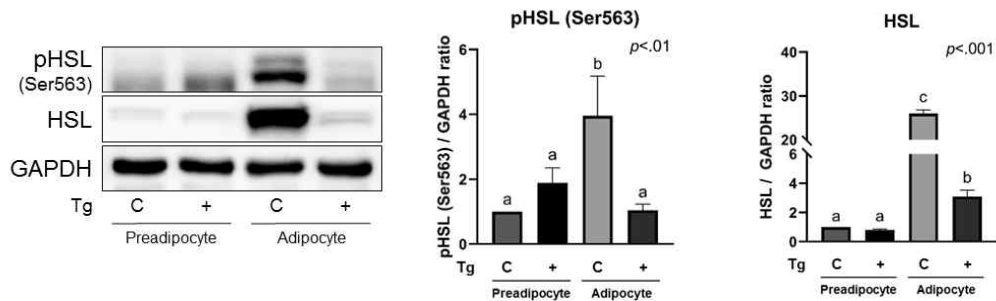


Figure 10. Protein expression related to adipogenesis (A) and lipolysis (B) in the control and Tg+ groups. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

6. Tg- & Tg+ 세포에서의 TG 및 free glycerol 분비

대조군 대비 Tg- 및 Tg+ 지방세포에서의 지방구의 분해를 확인하기 위해 cell medium 내 triglycerides (TG), free glycerol 농도를 측정하였다 (Figure 11.). 대조군은 분화가 진행될수록 분화 0일차에 비해 분화 8일차가 TG 4.72배, free glycerol 24.91배 증가하고, Tg-군도 분화가 진행될수록 분화 0일차에 비해 분화 8일차가 TG 5.58배, free glycerol 52.73배 증가하였다. 그러나 Tg+ 세포의 medium은 TG 1.48배, triglyceride 2.66배 증가해 증가 폭이 대조군이나 Tg- 세포보다 작다. 또한 Tg+ 세포 분화 8일차에 분비된 TG와 free glycerol은 대조군 대비 약 72.19%, 90.84% 낮은 농도를 가졌다. 위의 결과 Tg+ 세포에서는 분화 시에도 지방 합성과 분해가 이루어지지 않는 것으로 보인다.

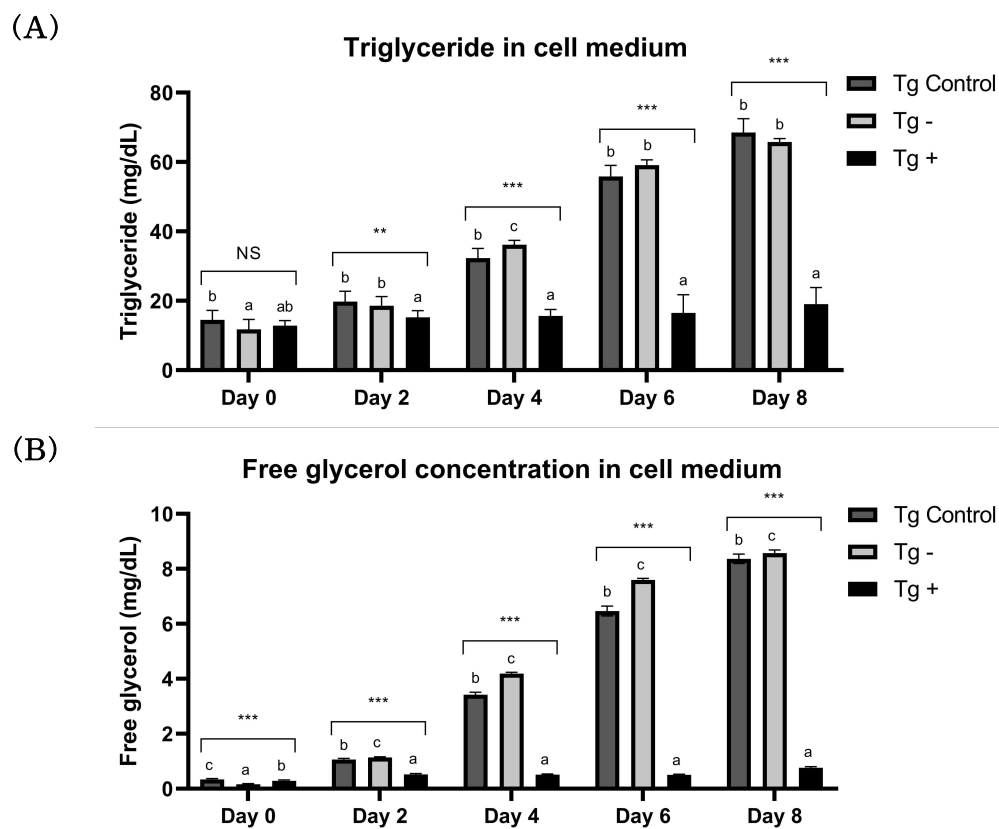


Figure 11. TG (A) & free glycerol (B) concentration in medium cultured with control, Tg-, and Tg+ cells at 0, 2, 4, 6, and 8 days. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

7. 비만세포 관련 사이토카인 (Adipocytokines) 발현

DNAJC6 과발현이 지방세포에서 지방구 형성에 비례하여 분비하면서 지방세포와 기타 세포 간 신호전달의 활성화에 기여하는 adipocytokines인 leptin 및 adiponectin 등의 발현에 미치는 영향을 확인하였다(Figure 12.). LEPR 및 leptin 발현은 대조군 분화 8일차에 비하여 Tg+ 세포 분화 8일차에 각각 98.56%, 79.83% 감소하였고, 이는 *DNAJC6* 과발현이 지방 세포의 지방구형성 저하로 leptin 분비를 감소시켰다고 볼 수 있다. 아울러 leptin receptor 발현에도 영향을 미치지 못하는 preadipocytes와 유사한 상태이었다. Tg+ 세포에서는 항염증인자 역할을 하는 adiponectin 혹은 leptin/adiponectin ratio의 유의적인 변화도 없었다.

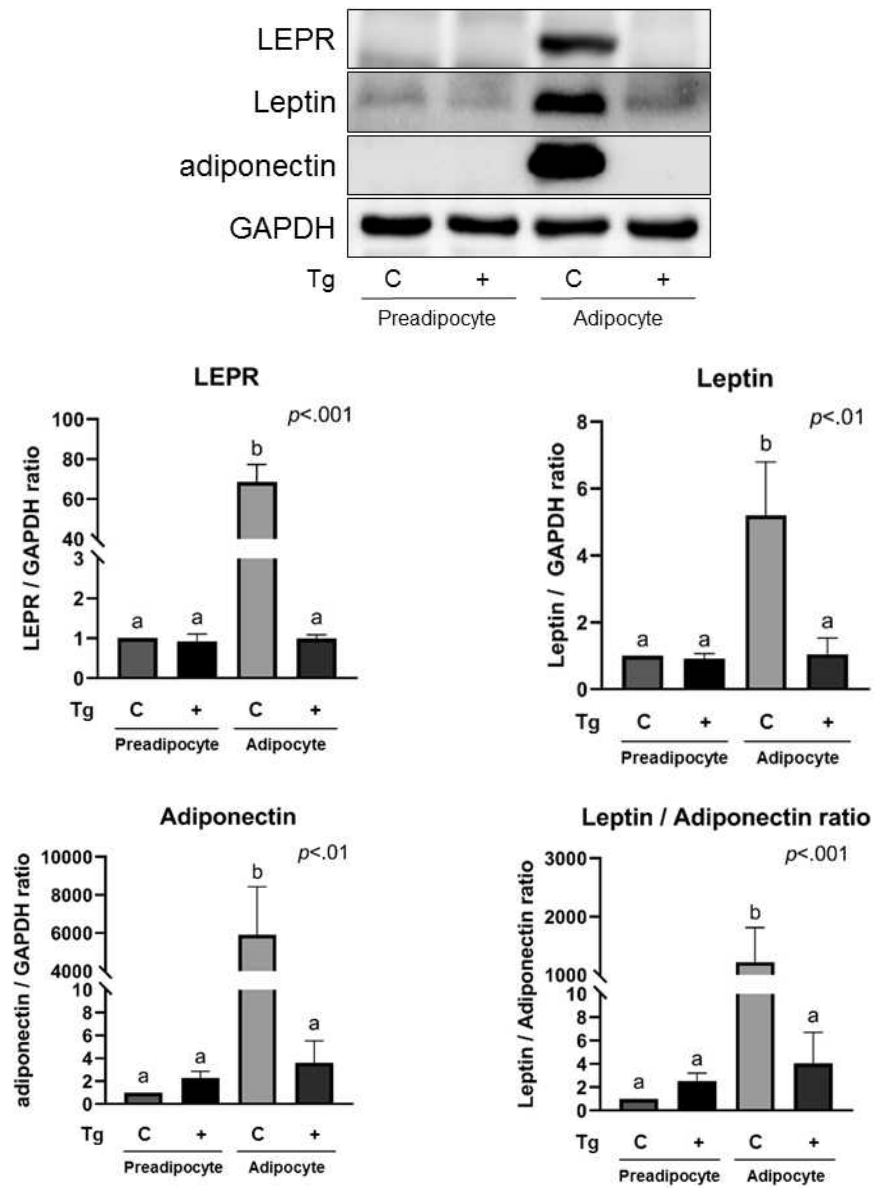


Figure 12. Adipocytokine factors protein expression of control and Tg+ cells. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a and b) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC: Control group, Tg-: *DNAJC6* inhibition group, Tg+: *DNAJC6* overexpression group

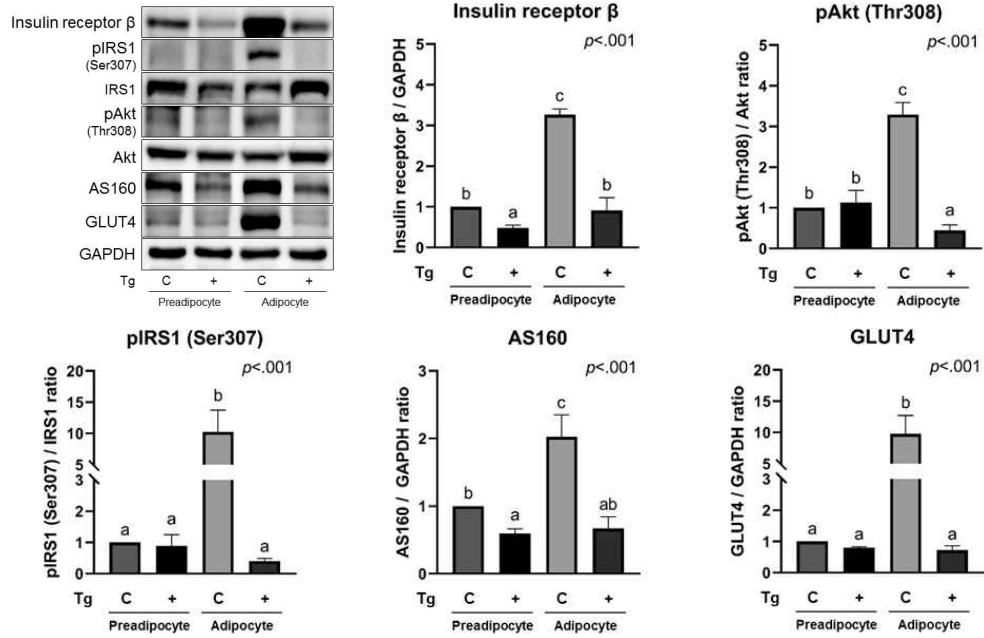
8. Insulin - GLUT4 신호체계

8-1. *DNAJC6* 과발현의 영향

지방세포에서 *DNAJC6* 과발현이 insulin signals에 따른 포도당 전달체 (GLUT4) 합성 등 insulin-GLUT4 cascade 체계에 미치는 영향을 확인하기 위하여 관련 단백질 발현 정도를 확인하였다.(Figure 13.) Insulin receptor β 발현은 대조군 분화 0일차보다 분화 8일차에서 3.3배 높았으나 Tg+ 세포는 유의한 차이가 없었다. IRS1은 대조군 분화 8일차에서 분화 0일차보다 감소된 경향을 보이거나 pIRS1(Ser307)이 증가하면서 활성이 증가함을 확인하였다. 그러나 Tg+ 세포는 분화 후 IRS1 활성에 유의적인 차이가 있지 않았다. IRS의 downstream인 Akt와 pAkt (Thr308)의 ratio는 대조군 분화 0일차보다 분화 8일차에서 3.3배 높았으나 Tg+ 세포는 분화 0, 8일차끼리 유의한 차이가 없었다. Akt의 downstream인 AS160 과 GLUT4 발현량도 대조군 분화 8일차에서 각각 2.0배, 9.8배 높았으며 Tg+ 세포는 분화 0, 8일차에서는 유의한 차이가 없었다(Figure 13-A).

배지 내 glucose 양에 따라 GLUT4 발현에 차이가 있는지 확인하기 위해 분화과정에서 배지에 포도당 공급을 2배 (9,000mg/L)로 증가하였다. 배지에 포도당을 2배 증가했을 때 기존 (4,500mg/L)과 비교 시 GLUT4 발현량이 대조군은 유의적으로 증가하였으나 Tg+ 세포는 유의적인 차이가 없었다(Figure 13-B). 이는 Tg+ 세포에서 배지의 포도당량이 증가하여도 지방세포의 유입단백질인 GLUT4 합성을 위한 인슐린 신호 체계가 정상적으로 작동하지 않은 것을 알 수 있다.

(A)



(B)

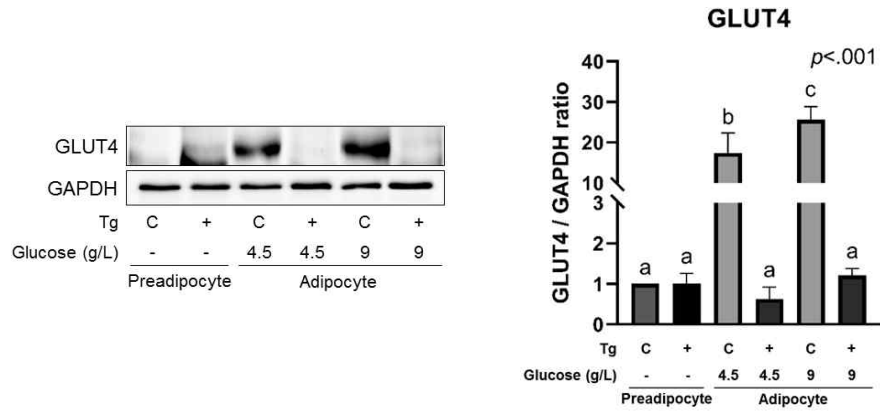


Figure 13. Protein expression related to the insulin cascade signals for GLUT4 synthesis. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

8-2. *DNAJC6* 억제시 Leptin-인슐린-GLUT4 체계

지방세포에서 *DNAJC6* gene을 siRNA transfection (Tg⁻ cells)시 adipokine과 insulin signals에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Figure 12., 13.에서 유의한 인자인 Leptin, insulin receptor β , GLUT4의 발현량을 재확인하였다(Figure 14.). Adipocyte에서 Tg⁻ 세포의 각 protein level은 대조군과 유의한 차이가 없었으며, Tg⁺ 세포에 비해 leptin, insulin receptor β , GLUT4의 발현량이 3.5배, 4.2배, 8.0배 증가하여 *DNAJC6* 과발현보다 정상적인 인슐린-GLUT4 체계를 유지하였다.

8-3. *DNAJC6* 과발현 혹은 억제시 Autophagy

Akt의 다른 downstream인 mTOR 체계는 preadipocyte와 adipocyte 모두 대조군보다 Tg⁺ 세포에서 약 51.42%, 21.39% 낮았다(Figure 15.). mTOR의 발현이 억제되면 autophagy가 일어난다는 보고가 있으므로 *DNAJC6* 과발현 시 (Tg⁺) autophagy factor인 LC3(I의 II 전환)의 발현을 확인하였다.[55] Preadipocyte가 adipocyte가 될 때 대조군과 Tg⁻ 세포에서 LC3 II/I 발현량이 약 52.99%, 76.73% 감소하였으나 Tg⁺ 세포에서는 약 1.51배 증가하였다. 결론적으로 Tg⁺ 세포에서 insulin signals 억제로 포도당 유입이 이루어지지 않으며, 세포 내 에너지 결핍 상태에서 mTOR 활성이 억제되며 autophagy가 증가하는 조절작용이 있음을 알 수 있다.

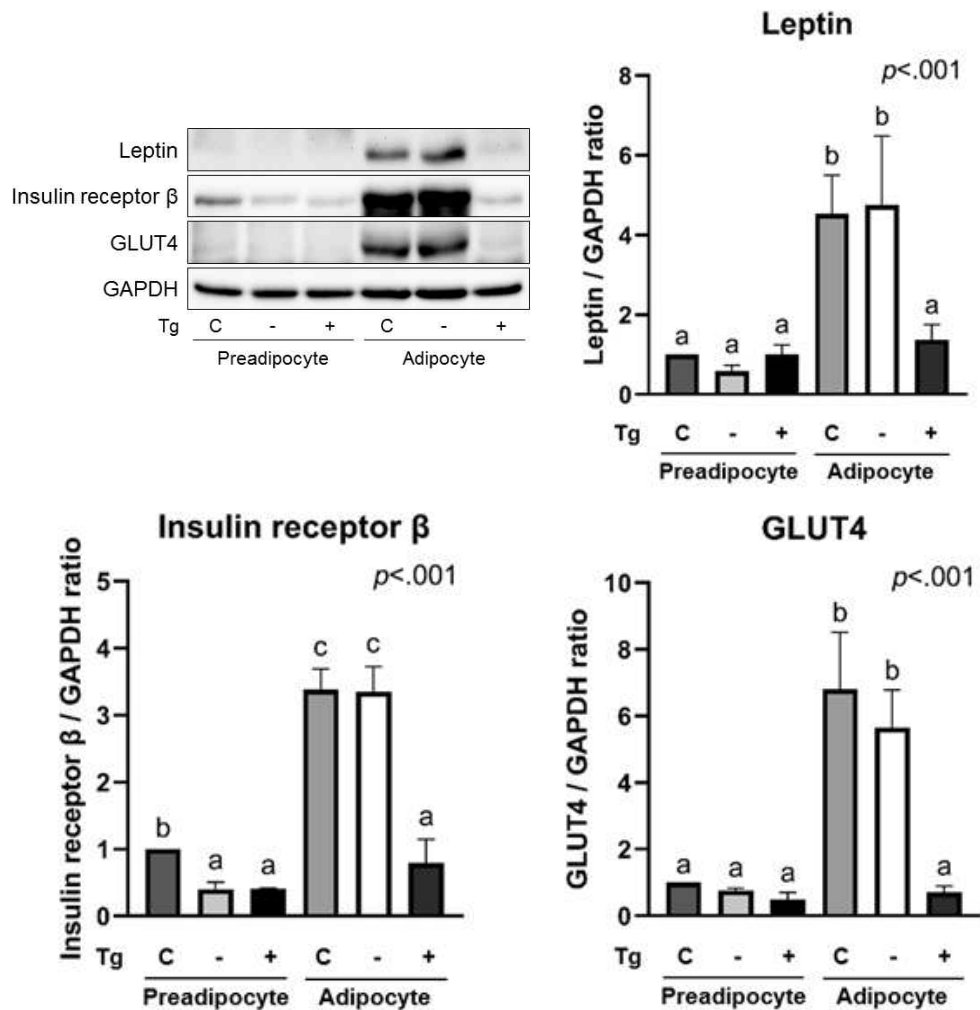


Figure 14. Protein expression related to insulin-GLUT4 system in Tg⁻ and Tg⁺ cells compared to the control. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, c and d) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg⁻; *DNAJC6* inhibition group, Tg⁺; *DNAJC6* overexpression group

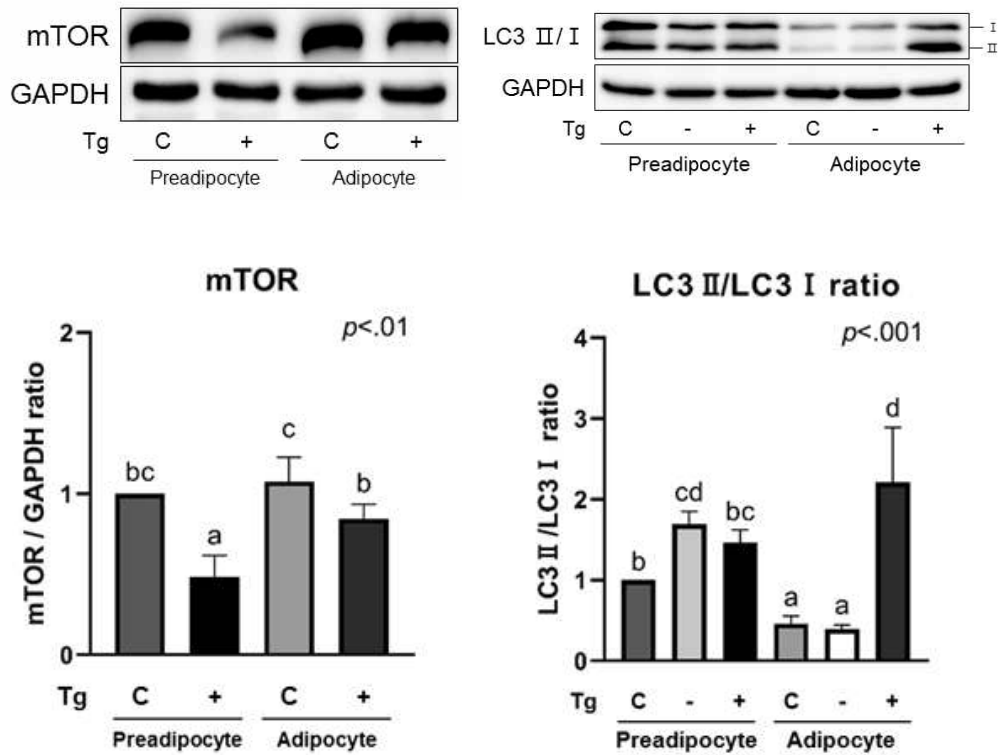


Figure 15. Protein expression related to autophagy in Tg⁻ and Tg⁺ cells compared to the control. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, c and d) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg⁻; *DNAJC6* inhibition group, Tg⁺; *DNAJC6* overexpression group

9. Mitochondrial function

9-1. PGC-1 α 와 UCP1 발현

DNAJC6 gene은 인체의 휴지기대사량(RMR)의 저하가 소아비만을 야기한다는 사전 코호트 연구 결과로 도출된 유전자인 만큼 생체에너지를 생성하는 미토콘드리아의 기능을 확인하고자 하였다. PGC1 α 는 미토콘드리아 수를 증가시키는 master regulator이며 PGC1 α 발현으로 유도되는 UCP1은 thermogenesis 마커로 미토콘드리아의 정상적인 기능을 대표하는 단백질이다.[56, 57]

대조군의 PGC1 α 발현은 분화 0일차보다 분화 8일차에서 약 4배정도 유의하게 높았으나, Tg⁺ 세포는 유의한 차이가 없었다(Figure 16.). PGC1 α 의 발현패턴과 유사하게 대조군과 Tg⁻ 세포는 분화 0일차보다 분화 8일차에서 UCP1 발현이 각각 1.3배, 1.5배 증가하였으나, Tg⁺ 세포는 유의한 차이가 없었다. 위의 결과 *DNAJC6* gene을 3T3-L1 세포에 overexpression transfection 시 미토콘드리아 수가 증가가 억제되며, 이는 미토콘드리아 thermogenesis marker인 UCP1 발현에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

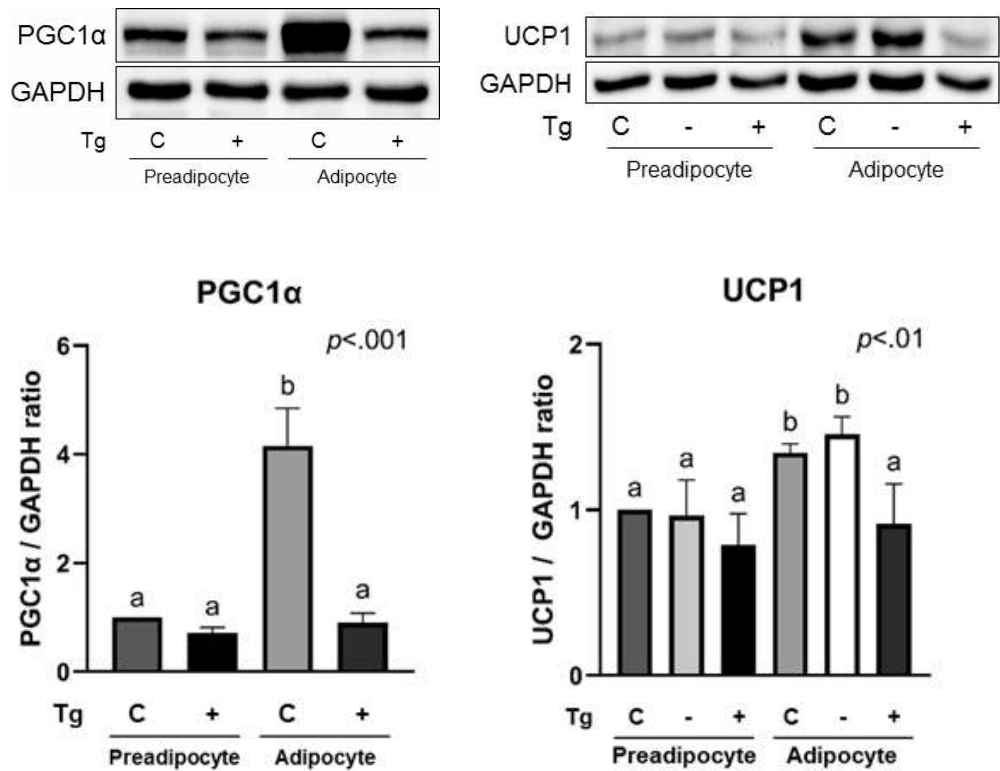


Figure 16. Protein expression related to mitochondrial function factors in the control, Tg⁻, and Tg⁺ cells. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a and b) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg⁻; *DNAJC6* inhibition group, Tg⁺; *DNAJC6* overexpression group

9-2. 산소소비량 및 ATP 생성

3T3-L1은 adipocyte로 분화됨에 따라 PPAR γ , PGC1 α 의 발현으로 미토콘드리아 생합성이 유도 되어진다.[58] 미토콘드리아는 세포 내로 유입된 에너지 자원을 전자전달계의 산화적인산화 과정을 통해 생명활동에 필요한 ATP를 생성하는데[59], 위 실험결과 Tg+ 세포에서 insulin-GLUT4 신호체계가 억제되어 세포 내 포도당 유입이 잘 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 3T3-L1 세포에서 *DNAJC6*을 과발현하거나 억제했을 때의 산소소비량을 측정하여 미토콘드리아의 대사경로 변화를 확인하고 *DNAJC6*의 발현이 미토콘드리아 기능에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다(Figure 17.).

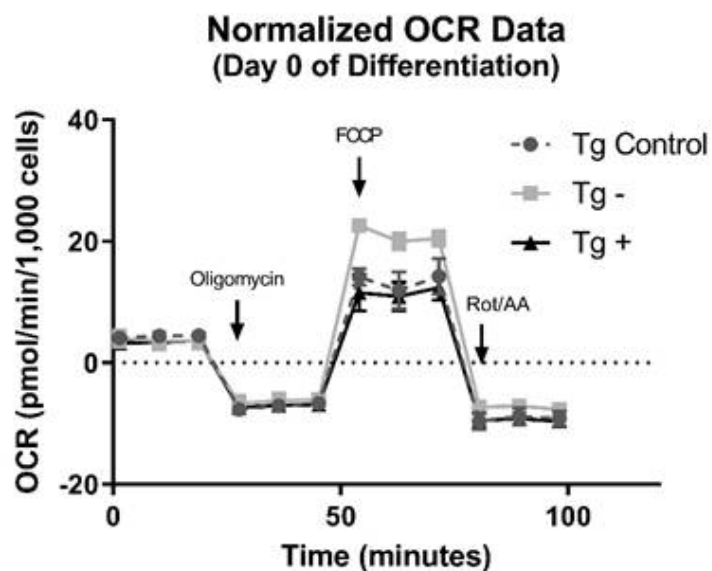
분화 0일차에서 OCR graph는 Tg+ 세포의 최대 호흡량이 높으나 그래프 모양에는 큰 차이가 없었다. 분화 8일차에서 OCR graph는 각 그룹별 그래프 모양에 차이가 있어 미토콘드리아의 기능을 Table 6.을 참고하여 매개변수 값을 구하였다(Figure 18.).

분화가 끝난 adipocyte에서 대조군의 최대 호흡량은 198pmol/min으로 기저호흡량인 143pmol/min보다 약 1.8배 증가하였다. Tg- 세포의 최대 호흡량은 101pmol/min으로 기저호흡량인 179pmol/min보다 약 43.53% 감소하였으며, Tg+ 세포의 최대 호흡량은 50pmol/min으로 기저호흡량인 23pmol/min보다 약 2.19배 증가하였다. 그리고 Tg+ 세포는 최대호흡량이나 기저호흡량이 대조군과 Tg- 세포보다 유의적으로 낮았다. Cho. E et al, 2017에서 미토콘드리아에 결함이 있을 때 미토콘드리아의 호흡을 보완하기 위해 최대 용량으로 산소 호흡을 한다는 연구 결과를 발표하였다.[60] 위 결과 Tg+ 세포는 이미 최대 용량으로 산소 호흡을 하고 있다는 것을 보여주며, 미토콘드리아의 호흡을 보완하고 있는 것을 알 수 있다. 최대호흡량과

기저호흡량 수준으로 확인할 수 있는 예비호흡용량은 Tg⁻ 세포가 78pmol/min으로 대조군 (58pmol/min)이나 Tg⁺ 세포 (27pmol/min)보다 유의적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다. 미토콘드리아 대사는 세포 기능과 관련된 생체 에너지 수준을 유지하기 위해 스트레스 조건에 지속적으로 적응해야 하는데, 스트레스 수준이 증가하면 미토콘드리아의 예비호흡용량이 낮은 수준을 보인다는 연구 결과가 있다.[61] 위 결과 Tg⁻ 세포에서 세포 내 지방 합성 및 축적으로 인해 스트레스 수준이 증가해 미토콘드리아의 예비호흡용량 기능에 영향을 미친 것으로 확인된다.

ATP 생성은 대조군이 85pmol/min, Tg⁻ 세포가 110pmol/min, Tg⁺ 세포가 18pmol/min으로 Tg⁻ 세포에서 대조군, Tg⁺ 세포에 비해 각 1.29배, 6.01배 유의적으로 높았다. 양성자 누출은 대조군이 58pmol/min, Tg⁻ 세포가 68pmol/min, Tg⁺ 세포가 4pmol/min으로 Tg⁺ 세포에서 대조군, Tg⁻ 세포에 비해 약 92.74%, 93.82% 낮았다. Coupling efficiency는 ATP 합성을 유도되는데 사용되는 산소 비율로, 대조군 60%, Tg⁻ 세포 62%, Tg⁺ 세포 82%로 Tg⁺ 세포가 대조군과 Tg⁻ 세포에 비해 1.36배, 1.32배 유의적으로 증가하였다. 이는 Tg⁺ 세포에서 ATP 생산이 제대로 이루어지고 있지 않으며, figure 16.에서 UCP1 발현량도 감소하였으므로 기초대사율의 저하로 산소 소비의 감소가 나타난 것으로 보인다. 또한 세포 증식과 분화는 산화적 인산화와 미토콘드리아 커플링 효율을 증가시키는데[62], Tg⁺ 세포는 커플링 효율이 높으나 산소 호흡량이 낮으므로 세포 증식이나 분화가 제대로 되지 않았음을 나타낸다.

(A)



(B)

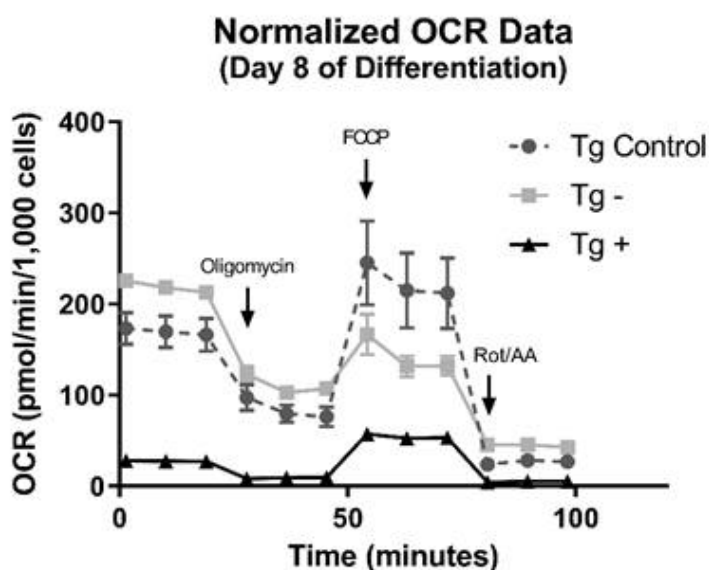


Figure 17. OCR graphs normalized by cell numbers of preadipocyte (A) and adipocyte (B) according to time-differences in the control, Tg-, and Tg+ cells.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

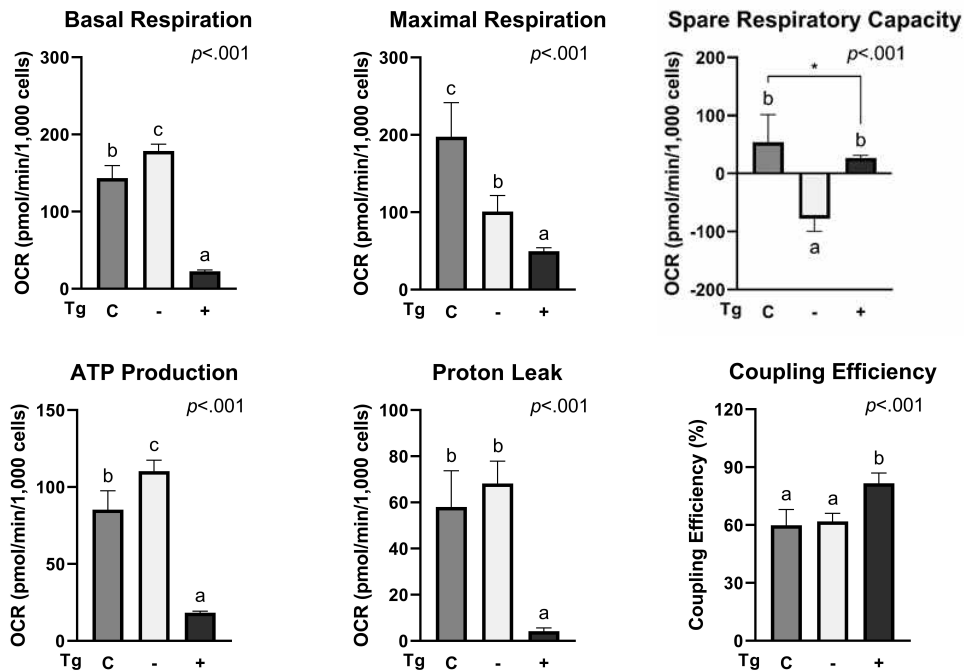


Figure 18. Oxygen consumption, ATP production and supplementary data came from Seahorse XF cell Mito Stress test in the control, Tg-, and Tg+ cells. Basal respiration is the oxygen consumption that meets the cellular ATP demand. Maximum respiration is the oxygen used to oxidize the substrate to solve metabolic problems rapidly. Spare respiratory capacity indicates the ability of cells to respond to energy demand and how close they are to their theoretical maximum. ATP production is produced in mitochondria, which contributes to cells' energy needs. Proton leak is the amount of oxygen respiration induced while inhibiting ATP synthesis. Coupling efficiency is the respiratory rate used in ATP synthesis. Data were assessed by one-way ANOVA with Duncan's test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$) or t-test (* $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$). Superscript letters (a, b, and c) indicate significant differences between groups at $p < .05$.

TgC; Control group, Tg-; *DNAJC6* inhibition group, Tg+; *DNAJC6* overexpression group

IV. 요약 및 결론

국내 비만 유병률은 해마다 증가하고 있으며, 특히 소아청소년기의 비만은 성인비만, 당뇨, 고혈압, 대사증후군 등 조기 성인병 발병(early-onset)의 위험성이 높으므로 소아청소년비만의 예방 및 관리는 매우 중요하다. 비만의 원인은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 알려져 있으나 국내외 관련 연구는 매우 부족하고 에너지 불균형과 관련된 유전자 추적 및 기전 규명 연구는 거의 없다.

본 연구실에서는 소아비만코호트를 활용한 GWAS 기술을 이용하여 RMR과 BMI간 유의적인 상관성을 보이는 유전자 *MAP2K6*과 *DNAJC6*를 도출하였다. 비만 발생과 관련 있는 DnaJ protein가 있으며, *DNAJC6*가 암호화한 auxilin이 transferrin, GLUT4 등 endocytosis 기능을 억제한다는 연구가 발표된 바 있으나 비만이나 thermogenesis에 대한 기전 연구가 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 3T3-L1 지방전구세포에서 *DNAJC6* 유전자를 과발현(over-expression, Tg+군) 혹은 억제(siRNA, Tg-군)하였을 때 지방합성 및 분해 관련 단백질 발현, 아디포사이토카인 발현, 인슐린-GLUT4 신호전달 체계, 미토콘드리아 기능(thermogenesis 포함) 등을 확인함으로써 *DNAJC6* 유전자가 지방세포의 생리적 기전에 미치는 영향을 확인하는 것이다. 연구 목적에 따른 세부항목 별 실험결과는 다음과 같다.

1) *DNAJC6* 유전자를 transfection하는 과정에서 사용하는 G418 항생제와 transfection reagent 농도가 3T3-L1 세포독성에 미치는 영향을 실험한 결과 생존율 75% 수준을 보이며 독성이 없는 농도인 G418 500 μ g/mL, transfection reagent 8 μ L/mL로 결정하였다. 또한 *DNAJC6*의 과발현 및 억

제 transfection 실험은 mRNA(PCR) 및 단백질(western blotting) 수준에서 각각 검증하였다. 대조군과 비교한 *DNAJC6* 발현 수준은 Tg⁻ 세포에서 감소하였고, Tg⁺ 세포에서 증가하였으나 Tg⁺ 세포는 분화 8일째까지 발현상태가 유지된 반면, Tg⁻ 세포에서는 분화 4일차까지 억제 효과가 나타났다.

2) 대조군 대비 Tg⁺ 혹은 Tg⁻ 지방세포에서의 지질 축적과정에서 핵 손상 및 세포 손상 여부를 확인하기 위하여 DAPI/BODIPY 염색실험을 진행하였다. Tg⁻ 세포는 분화 4일차에서 대조군보다 축적된 지방구를 확인할 수 있었고, Tg⁺ 세포는 분화 0-4일 차에 세포 핵 손상이 보이며 분화 8일차에서 지방구를 확인할 수 없었다. Oil Red O 염색으로 지방구형성 정도를 확인한 결과 Tg⁺ 세포는 대조군이나 Tg⁻ 세포보다 지방구 형성이 억제되는 것을 확인하였다.

3) 지방합성(PPAR γ , C/EBP α , aP2) 관련 단백질발현(western blotting)의 차이를 확인한 결과, 대조군에 비하여 adipocyte Tg⁺ 세포에서 지방합성 관련 단백질발현이 유의적으로 감소하였다. 아울러 지방전구세포 마커인 Pref-1은 adipocyte Tg⁺ 세포에서도 유의적으로 유지되어 preadipocyte 상태인 것을 알 수 있었다. 반면 지방분해(HSL) 관련 단백질발현도 감소한 것은 HSL이 작용할 지방구의 형성이 없기 때문이다. 배지의 TG 농도는 Tg⁻ 세포가 분화 4일차에서 control 군보다 증가하였으나 Tg⁺ 세포에서는 분화가 진행되는 동안 감소하였다. 배지의 free glycerol 농도 또한 Tg⁻ 세포가 분화가 진행되는 동안 대조군보다 높은 수준을, Tg⁺ 세포는 대조군보다 낮은 수준을 보였다.

4) 대조군 대비 Tg⁺ 세포에서의 아디포사이토카인(leptin, LEPR,

adiponectin)발현을 비교하였고, 그 결과 Tg⁺ 세포 분화 8일차에서 아디포 사이토카인 발현이 유의적으로 감소하였다. 이는 3) 결과에서 도출한 Tg⁺ 세포의 지방구 형성 억제로 아디포사이토카인 분비를 감소시켰다고 볼 수 있다.

5) *DNAJC6* 과발현(Tg⁺ 세포) 시 Insulin- GLUT4 신호체계와 관련된 단백질 발현(insulin receptor β , IRS1, Akt, AS160, GLUT4)은 연쇄적으로 모두 억제되었다. Tg⁺ 세포의 배양액에 glucose를 2배로 증가시켰을 경우에도 GLUT4 단백질 발현은 증가하지 않아서 insulin influx에 문제를 야기하는 것으로 보인다. 반면 *DNAJC6* 억제(Tg⁻ 세포)시 대조군과 유의한 차이가 없으며, Tg⁺ 세포보다 유의적으로 높은 발현량을 보이며 정상적인 인슐린-GLUT4 체계를 유지하였다.

6) Insulin-GLUT4 신호체계 중 중요한 대사물인 Akt의 다른 경로인 mTOR 체계와 autophagy 발현을 확인한 결과 Tg⁺ 세포 내 포도당 유입이 억제된 상태에서 mTOR 활성 억제와 동시에 LC3II 발현 증가로 Tg⁺ 세포의 autophagy 조절작용을 확인하였다.

7) 지방세포의 미토콘드리아 기능을 확인하기 위하여 mitochondria-stress test를 실험한 결과, Tg⁺ 세포에서 PGC1 α 와 UCP1의 발현이 분화 8일차에서 대조군에 비해 억제되었으며, UCP1은 대조군과 Tg⁻ 세포에서 분화 0일차보다 8일 차일 때 유의하게 증가하였다. 산소소비량 측정 결과, 대조군 대비 Tg⁺ 세포에서 기저호흡량, 최대호흡량, ATP 생성, 양성자 누출이 감소하였으며, Tg⁻ 세포에서 기저호흡량, ATP 생성이 증가하고 최대호흡량, 예비호흡량이 감소한 것을 확인하였다. 대조군과 Tg⁻세포에 비하여 *DNAJC6*

과발현 세포는 지방구를 형성하지 못함으로써 미토콘드리아에서 ATP생성을 위한 산소소비량, 에너지 형성(ATP) 및 thermogenesis 과정 등이 매우 미비하였다.

결론적으로 *DNAJC6* 유전자가 과발현된 3T3-L1 세포는 지방 합성과 분해, 아디포사이토카인 발현, 인슐린-GLUT4 신호체계가 억제되며 미토콘드리아 증식 및 기능 등이 억제되었다. *DNAJC6* 유전자를 억제하였을 때는 대조군에 비하여 분화 중반부에 높은 지방 합성을 보이고, adipocyte 상태에서 정상적인 인슐린-GLUT4 체계를 보이며 UCP1 활성화도 대조군과 비슷한 증가 양상을 보였다. 단, *DNAJC6* 유전자 억제 효과는 분화 중반부(분화 4 일차)부터 증가함에 따라 지방세포의 대사가 빠르게 나타날 것이므로 향후 이를 기준으로 추가실험이 필요하다. 또한 *DNAJC6* 유전자 과발현 혹은 억제 transgenic mice를 대상으로 기관 간 상호기전을 규명할 필요가 있다.

그러나 본 연구는 에너지불균형과 관련된 유전자인 *DNAJC6* 발현의 차이가 지방세포의 대사를 조절하는 기전을 확인하였으므로, 향후 에너지 불균형에 따른 비만연구와 관련된 전임상(in vivo) 및 임상(clinics)연구를 위한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

Reference

- [1] 통계청, 질병관리청, 건강영양조사분석과, 검색일자 2021년 11월 19일, 웹사이트: <https://kostat.go.kr/>
- [2] Ramos-Lopez, O., Milagro, F. I., Allayee, H., Chmurzynska, A., Choi, M. S., Curi, R., De Caterina, R., Ferguson, L. R., Goni, L., Kang, J. X., Kohlmeier, M., Marti, A., Moreno, L. A., Pérusse, L., Prasad, C., Qi, L., Reifen, R., Riezu-Boj, J. I., San-Cristobal, R., Santos, J. L., ... Martínez, J. A. (2017). Guide for Current Nutrigenetic, Nutrigenomic, and Nutriepigenetic Approaches for Precision Nutrition Involving the Prevention and Management of Chronic Diseases Associated with Obesity. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 10(1-2), 43 - 62. <https://doi.org/10.1159/000477729>
- [3] 보건복지부, 건강증진과, 검색일자 2021년 9월 6일, 웹사이트: <http://www.mohw.go.kr/>
- [4] Togashi, K., Masuda, H., Rankinen, T., Tanaka, S., Bouchard, C., & Kamiya, H. (2002). A 12-year follow-up study of treated obese children in Japan. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(6), 770 - 777. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801992>
- [5] 노한내, 박화영, 윤혜선, 진선미, 서지영, 한혜원, et al. 한국 소아 청소년에서 비만 및 대사 이상의 유병률. *대한소아소화기영양학회지*. 2009;12(2):20

7-14.

[6] 서정완, 정지아, 박혜숙, 고재성, 김용주, 류일, et al. 소아청소년 비만상담에서 설문지를 이용한 중재 가능한 행동요인 탐색. *Korean Journal of Pediatrics*. 2008;51(6):576-83.

[7] 정성민, 박철형, 제갈윤석. 소아, 청소년 비만의 위험성과 비만클리닉의 문제점 및 개선방안. *체육과학연구*. 2014;20:31-7.

[8] 서영성. 고려해야 할 비만의 원인. *생물치료정신의학*. 2002;8(2):218-24.

[9] Haslam, D. W., & James, W. P. (2005). Obesity. *Lancet* (London, England), 366(9492), 1197 - 1209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67483-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67483-1)

[10] 양승. 비만의 유전학적 연구. *대한소아내분비학회지: 제*. 2008;13(2).

[11] Fukagawa, N. K., Bandini, L. G., & Young, J. B. (1990). Effect of age on body composition and resting metabolic rate. *The American journal of physiology*, 259(2 Pt 1), E233 - E238. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.259.2.E233>

[12] Myoungsook Lee. (2015). Genome-wide of Association Studies (GWAS) of Children Obesity according to the Basal Metabolic Rate (BMR) or Resting Metabolic Rate (RMR). *한국식품영양과학회 학술대회발표집*, S-11:157.

[13] Lee, M., Lee, Y., Kang, I., Shin, J., & Sorn, S. R. (2021). RMR-Related MAP2K6 Gene Variation on the Risk of Overweight/Obesity in Children: A 3-Year Panel Study. *Journal of personalized medicine*, 11(2), 91. <https://doi.org/10.3390/jpm11020091>

[14] Kang, S., & Lee, M. (2021). Beiging Modulates Inflammatory Adipogenesis in Salt-Treated and MEK6-Transfected Adipocytes. *Cells*, 10(5), 1106. <https://doi.org/10.3390/cells10051106>

[15] Lee, S., & Lee, M. (2021). MEK6 Overexpression Exacerbates Fat Accumulation and Inflammatory Cytokines in High-Fat Diet-Induced Obesity. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13559. <https://doi.org/10.3390/ijms222413559>

[16] Laplante, A. F., Moulin, V., Auger, F. A., Landry, J., Li, H., Morrow, G., Tanguay, R. M., & Germain, L. (1998). Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 46(11), 1291 - 1301. <https://doi.org/10.1177/002215549804601109>

[17] De Maio A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock (Augusta, Ga.)*, 11(1), 1 - 12. <https://doi.org/10.1097/00024382-199901000-00001>.

[18] Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., & Wang, L. (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 63(22), 2560 - 2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6192-6>

[19] Shi, Y. Y., Hong, X. G., & Wang, C. C. (2005). The C-terminal (331-376) sequence of Escherichia coli DnaJ is essential for dimerization and chaperone activity: a small angle X-ray scattering study in solution. The Journal of biological chemistry, 280(24), 22761 - 22768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503643200>

[20] Ohtsuka, K., & Hata, M. (2000). Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40--a review. International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group, 16(3), 231 - 245. <https://doi.org/10.1080/026567300285259>

[21] Zarouchlioti, C., Parfitt, D. A., Li, W., Gittings, L. M., & Cheetham, M. E. (2018). DNAJ Proteins in neurodegeneration: essential and protective factors. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 373(1738), 20160534. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0534>

[22] Abubaker, J., Tiss, A., Abu-Farha, M., Al-Ghimlas, F., Al-Khairi, I., Baturcam, E., Cherian, P., Elkum, N., Hammad, M., John, J., Kavalakatt,

S., Khadir, A., Warsame, S., Dermime, S., Behbehani, K., & Dehbi, M. (2013). DNAJB3/HSP-40 cochaperone is downregulated in obese humans and is restored by physical exercise. *PloS one*, 8(7), e69217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069217>

[23] Sun, F., Liao, Y., Qu, X., Xiao, X., Hou, S., Chen, Z., Huang, H., Li, P., & Fu, S. (2020). Hepatic DNAJB9 Drives Anabolic Biasing to Reduce Steatosis and Obesity. *Cell reports*, 30(6), 1835 - 1847.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.043>

[24] Cherian, P. T., Al-Khairi, I., Sriraman, D., Al-Enezi, A., Al-Sultan, D., AlOtaibi, M., Al-Enezi, S., Tuomilehto, J., Al-Mulla, F., Abubaker, J. A., & Abu-Farha, M. (2018). Increased Circulation and Adipose Tissue Levels of DNAJC27/RBJ in Obesity and Type 2-Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, 9, 423. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00423>

[25] Zhao, X., Greener, T., Al-Hasani, H., Cushman, S. W., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2001). Expression of auxilin or AP180 inhibits endocytosis by mislocalizing clathrin: evidence for formation of nascent pits containing AP1 or AP2 but not clathrin. *Journal of cell science*, 114(Pt 2), 353 - 365. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.2.353>

[26] Vauthier, V., Jaillard, S., Journel, H., Dubourg, C., Jockers, R., & Damm, J. (2012). Homozygous deletion of an 80 kb region comprising part of DNAJC6 and LEPR genes on chromosome 1P31.3 is associated with earl

y onset obesity, mental retardation and epilepsy. *Molecular genetics and metabolism*, 106(3), 345 - 350. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.026>

[27] Kim, J., & Lee, M. (2022). RMR-Related DNAJC6 Expression Suppresses Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Cells*, 11(8), 1331. <https://doi.org/10.3390/cells11081331>

[28] Yang, T., Li, X. N., Li, X. G., Li, M., & Gao, P. Z. (2014). DNAJC6 promotes hepatocellular carcinoma progression through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Biochemical and biophysical research communications*, 455(3-4), 298 - 304. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.11.011>

[29] Ahle, S., & Ungewickell, E. (1990). Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *The Journal of cell biology*, 111(1), 19 - 29. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.1.19>

[30] Köroğlu, Ç., Baysal, L., Cetinkaya, M., Karasoy, H., & Tolun, A. (2013). DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism & related disorders*, 19(3), 320 - 324. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.11.006>

[31] Ntambi, J. M., & Young-Cheul, K. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *The Journal of nutrition*, 130(12), 3122S - 3126S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.12.3122S>

[32] Phrakonkham, P., Viengchareun, S., Belloir, C., Lombès, M., Artur, Y., & Canivenc-Lavier, M. C. (2008). Dietary xenoestrogens differentially impair 3T3-L1 preadipocyte differentiation and persistently affect leptin synthesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 110(1-2), 95 - 103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.02.006>

[33] Reichert, M., & Eick, D. (1999). Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene*, 18(2), 459 - 466. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202308>

[34] Byadgi, O., Chen, C. W., Wang, P. C., Tsai, M. A., & Chen, S. C. (2016). De Novo Transcriptome Analysis of Differential Functional Gene Expression in Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) after Challenge with *Nocardia seriolae*. *International journal of molecular sciences*, 17(8), 1315. <https://doi.org/10.3390/ijms17081315>

[35] Martin, S., Okano, S., Kistler, C., Fernandez-Rojo, M. A., Hill, M. M., & Parton, R. G. (2009). Spatiotemporal regulation of early lipolytic signaling in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 284(46), 32097 - 32107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002675>

[36] Greenberg, A. S., Shen, W. J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S. C., Roth, R. A., & Kraemer, F. B. (2001). Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276(48), 45456 - 45461. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101.010101>

1074/jbc.M104436200

[37] Serr, J., Li, X., & Lee, K. (2013, August 31). The Regulation of Lipolysis in Adipose Tissue. *Journal of Animal Science and Technology*. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.5187/jast.2013.55.4.303>

[38] Saini V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes*, 1(3), 68 - 75. <https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i3.68>

[39] Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of biological chemistry*, 277(2), 1531 - 1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>

[40] Draznin B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes*, 55(8), 2392 - 2397. <https://doi.org/10.2337/db06-0391>

[41] Copps, K. D., & White, M. F. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*, 55(10), 2565 - 2582. <https://doi.org/10.1007/>

s00125-012-2644-8

[42] Huang, S., Lifshitz, L. M., Jones, C., Bellve, K. D., Standley, C., Fonseca, S., Corvera, S., Fogarty, K. E., & Czech, M. P. (2007). Insulin stimulates membrane fusion and GLUT4 accumulation in clathrin coats on adipocyte plasma membranes. *Molecular and cellular biology*, 27(9), 3456 - 3469. <https://doi.org/10.1128/MCB.01719-06>

[43] 인슐린저항성의 발생기전, 대한내과학회지, 제 77권, 제 2호, 2009, 최철수

[44] Carmichael, R. E., Wilkinson, K. A., & Craig, T. J. (2019). Insulin-dependent GLUT4 trafficking is not regulated by protein SUMOylation in L6 myocytes. *Scientific reports*, 9(1), 6477. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42574-3>

[45] Pittas, A. G., Joseph, N. A., & Greenberg, A. S. (2004). Adipocytokines and insulin resistance. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(2), 447 - 452. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031005>

[46] Mancuso P. (2016). The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets and therapy*, 5, 47 - 56. <https://doi.org/10.2147/ITT.S73223>

[47] DiSilvestro, D. J., Melgar-Bermudez, E., Yasmeeen, R., Fadda, P., Lee, L. J., Kalyanasundaram, A., Gilor, C. L., & Ziouzenkova, O. (2016). Leptin Production by Encapsulated Adipocytes Increases Brown Fat, Decreases Re

sistin, and Improves Glucose Intolerance in Obese Mice. *PloS one*, 11(4), e0153198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153198>

[48] 식품의약품안전평가원 (2019.). 건강기능식품 기능성 평가 가이드-‘체지방 감소에 도움을 줄 수 있음’ 편-. (이동희 외) 식품의약품안전처.

[49] Tohru Funahashi, Ichiro Shimomura, Yuji Matsuzawa. (2004). Adipocytokines. *Encyclopedia of Endocrine Disease: Elsevier*, 41-44, <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/01460-8>.

[50] Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 435 - 443. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.004>

[51] Lee, J. H., Park, A., Oh, K. J., Lee, S. C., Kim, W. K., & Bae, K. H. (2019). The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4924. <https://doi.org/10.3390/ijms20194924>

[52] Olgiati, S., Quadri, M., Fang, M., Rood, J. P., Saute, J. A., Chien, H. F., Bouwkamp, C. G., Graafland, J., Minneboo, M., Breedveld, G. J., Zhang, J., International Parkinsonism Genetics Network, Verheijen, F. W., Boon, A. J., Kievit, A. J., Jardim, L. B., Mandemakers, W., Barbosa, E. R., Rieder, C. R., Leenders, K. L., ... Bonifati, V. (2016). DNAJC6 Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Annals of neurology*, 79(2), 244 - 25

6. <https://doi.org/10.1002/ana.24553>

[53] Multi-File XF Report Generator User Guide - Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test, publish part No. 103312-400, 2020.10.02., site : <https://www.agilent.com/en-us/library/usermanuals?N=135+900016200&Ntt=parameter%20calculation&redirect=0>

[54] Tsiapla, A. R., Uzunova, V., Oreshkova, T., Angelakeris, M., Samaras, T., Kalogirou, O., & Tzoneva, R. (2022). Cell Behavioral Changes after the Application of Magneto-Mechanical Activation to Normal and Cancer Cells. *Magnetochemistry*, 8(2), 21.

[55] Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters*, 584(7), 1287 - 1295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>

[56] Valero, T. (2014). Editorial (thematic issue: Mitochondrial biogenesis: Pharmacological approaches). *Current pharmaceutical design*, 20(35), 5507-5509.

[57] Kajimura, S., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional control of brown fat development. *Cell metabolism*, 11(4), 257 - 262. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.005>

[58] Choi, J. H., Kim, S. W., Yu, R., & Yun, J. W. (2017). Monoterpene ph

enolic compound thymol promotes browning of 3T3-L1 adipocytes. *European journal of nutrition*, 56(7), 2329 - 2341. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1273-2>

[59] Schultz, B. E., & Chan, S. I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 30, 23 - 65. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.23>

[60] Cho, E., Jung, W., Joo, H. Y., Park, E. R., Kim, M. Y., Kim, S. B., Kim, K. S., Lim, Y. B., Lee, K. H., & Shin, H. J. (2019). CluH plays a pivotal role during adipogenesis by regulating the activity of mitochondria. *Scientific reports*, 9(1), 6820. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43410-4>

[61] Marchetti, P., Fovez, Q., Germain, N., Khamari, R., & Kluza, J. (2020). Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(10), 13106 - 13124. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R>

[62] Yao, C. H., Wang, R., Wang, Y., Kung, C. P., Weber, J. D., & Patti, G. J. (2019). Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *eLife*, 8, e41351. <https://doi.org/10.7554/eLife.41351>

ABSTRACT

Effects of DNAJC6 overexpression and inhibition on lipid metabolism and insulin signaling in 3T3-L1 cells.

Dajeong Son

Department of Food & Nutrition

Graduate School of

Sungshin Women's University

The prevalence of obesity in Korea is increasing every year. In particular, obesity in children and adolescents is at high risk of developing early-onset adult diseases, so prevention and management of obesity are essential. The cause of obesity is known as an imbalance in energy intake and consumption, but few studies have been conducted on gene tracking and mechanism identification related to energy imbalance. In this lab, we derive gene *DNAJC6* that shows a significant correlation between resting metabolic rate(RMR) and obesity(BMI) in genomic studies(GWAS) based on childhood obesity cohort. Studies have been published that *DNAJC6* gene mutation is related to neurodegenerative diseases(Parkinson's disease), gene deficits with LEPR promoters that share transcription sites cause childhood obesity, and auxilin encoded by

DNAJC6 inhibits endocytosis functions such as transferrin and GLUT4. However, no mechanical studies have been conducted on the effect of gene expression differences in *DNAJC6* on adipogenesis or thermogenesis. Therefore, this study aims to confirm the change in the physiological mechanism of adipocytes when the *DNAJC6* gene is overexpressed(Tg⁺) or inhibited(Tg⁻) in 3T3-L1 preadipocyte cells.

The experiment conducted an experimental analysis to confirm the physiological mechanism in the adipocyte differentiation process of 3T3-L1 preadipocyte in which *DNAJC6* was overexpressed or inhibited. Cell survival rates were confirmed to determine the antibiotic and transfection reagent concentration in 3T3-L1 cells was confirmed when *DNAJC6* was overexpressed and inhibited, and *DNAJC6* gene expression was confirmed at the level of mRNA and protein. Physiological mechanisms such as lipid accumulation and cell nuclear damage(DAPI/BODIPY staining, Oil Red O staining), lipid degradation(TG/free glycerol extraction), adipogenesis and lipolysis, adipocytokines, insulin-GLUT4 signals related protein expression(western blotting analysis), mitochondrial function(mitochondria stress test) were compared and analyzed with the control group.

When the *DNAJC6* gene was overexpressed in 3T3-L1 cells, lipid staining was not stained in DAPI/BODIPY staining and Oil Red O staining at day 8 of differentiation, and the expression of PPAR γ , C/EBP α , and aP2 of the adipogenesis factors was significantly reduced by 78.18%, 89.76%, and 99.52% on the day 8 of Tg⁺ compared to day 8 of control. Futhermore, Pref-1 expression of the preadipocyte factor was

significantly increased by 2.45times. in addition, the expression of pHSL(Ser563) and HSL of lipolysis factors was significantly reduced by 73.53% and 88.10% on day 8 of Tg⁺ compared to day 8 of control, and TG and free glycerol concentrations in cell culture medium were decreased by 72.19% and 90.84%. The expression of LEPR, leptin, and adiponectin of adipocytokines was significantly reduced by 98.55%, 79.83%, and 99.94% on day 8 of Tg⁺ compared to day 8 of control. The expression of insulin-GLUT4 signaling systems(insulin receptor β , pIRS1(Ser307), pAkt(Thr308), AS160, and GLUT4) was sequentially suppressed. In the state of intracellular energy deficiency, it was confirmed that the mTOR activity, another downstream of Akt, was suppressed on the Tg⁺ cells compared to the control, and there was a regulatory action that significantly increased the expression of LC3II, an autophagy factor. The expression of PGC1 α and UCP1, which are mitochondrial functional biomarkers, decreased 78.31% and 31.99% on day 8 of Tg⁺ compared to day 8 of control, and the oxygen consumption and ATP production of mitochondria were significantly lower than of the control group.

When inhibiting the *DNAJC6* gene in 3T3-L1 cells, adipocytes were stained strongly in DAPI/BODIPY staining at day 4 of differentiation, and absorbance values in Oil Red O staining were 1.18 times higher than the control. And on day 8 of differentiation, there was no significant difference in leptin, insulin receptor β , and GLUT4 expression compared to the control. The UCP1 activity also showed a similar expression to the control group when differentiated into adipocytes.

However, mitochondria's maximal respiratory and spare respiratory capacity was significantly reduced by 48.97% and 243.28% compared to the control group.

In conclusion, overexpression of the *DNAJC6* gene in 3T3-L1 cells inhibited glucose inflow into 3T3-L1 cells, inhibiting adipogenesis and degradation, adipocytokines expression, insulin-GLUT4 signaling system, and mitochondrial proliferation and function at day 8 of differentiation. Inhibition of the *DNAJC6* gene showed higher adipogenesis than the control group in the middle of differentiation. In addition, Tg- on day 8 of differentiation, the normal insulin-GLUT4 system was shown, and the UCP1 activity was similar to the control group.

This study experimented with 3T3-L1 cells that overexpressed or inhibited the *DNAJC6* gene. As the *DNAJC6* gene inhibition effect increases from the middle of differentiation(day 4 of differentiation), the metabolism of fat cells will appear quickly, so additional experiments are needed based on this in the future. In addition, it is necessary to identify inter-organizational mechanisms targeting *DNAJC6* gene overexpression or inhibition transgenics. However, since this study identified the mechanism by which differences in *DNAJC6* gene expression, a gene related to energy imbalance, control the metabolism of fat cells, it can be used as basic data for in vivo and clinical studies related to obesity studies.