



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](#)

수의학석사학위논문

봄-여름 계절에 따른 개 혈액 중  
유전자 발현 차이

Differences of gene expression between  
spring and summer seasons in canine  
blood

2016년 8월

서울대학교 대학원

수의학과 수의병인생물학 및 예방수의학 전공

최 유 정

# 봄-여름 계절에 따른 개 혈액 중 유전자 발현 차이

Differences of gene expression between  
spring and summer seasons in canine  
blood

지도교수 류 덕 영

이 논문을 수의학석사학위논문으로 제출함  
2016년 4월

서울대학교 대학원  
수의병인생물학 및 예방수의학 (환경위생학)전공  
최 유 정

최유정의 석사학위논문을 인준함  
2016년 6월

위 원 장      이 소 영

부위원장      류 덕 영

위      원      조 성 범

## 초록

현재 기후와 환경 변화에 따른 동물의 적응기전 연구는 극히 드물다. 본 연구에서는 봄/여름 개의 혈액 내 mRNA 발현을 분석하여 계절에 따른 환경 변화 적응 특성을 파악하였다. 그 결과 몇 가지 유전자가 의미 있는 수준으로 발현이 증가하거나 감소하는 양상을 보였다. 봄보다 여름에 증가한 유전자는 cfa-mir-223, TIMM13, SPTSSA, NEAT1\_1, C19orf24, RSAD2, AADACL3, ISG15 등이 있었다. 또한, 봄보다 여름에 감소한 유전자는 RPS15A, ACADL, RPL14 등이 있었다. 이들은 계절별 생체반응 분석을 위한 지표로서의 가치가 있을 것으로 판단된다. 이 때문에 후속 연구를 통하여 해당 유전자들의 계절변화 적응과의 연관성을 파악하기 위한 추가적 연구가 요구될 것으로 판단된다.

주요어 : 계절, 개, 혈액, 유전자 발현

학 번 : 2014-22952

# 목 차

초록 .....	i
목차 .....	ii
표 목차 .....	iii
그림 목차 .....	iv
서론 .....	1
재료 및 방법 .....	4
결과 .....	9
고찰 .....	11
표 .....	16
그림 .....	19
참고문헌 .....	21
영문초록 .....	27

## 표 목차

[표 1]	.....	16
[표 2]	.....	17
[표 3]	.....	18

## 그림 목차

[그림 1]	.....	19
[그림 2]	.....	20

## 서론

대부분 동물은 허용 가능한 범위의 온도 변화에 대해서 항상성을 유지할 수 있다. 하지만 조절 범위를 넘어선 온도변화 또는 급격한 온도변화는 동물에게 산화적 스트레스를 유발하거나 생리학적 기능 이상을 야기할 수 있다 (Pörtner, 2001; Lushchak et al., 2006). 또한, 온도 변화로 인해 세포 내 유전자 발현 양상이 달라질 수 있으며 이는 동물의 생리학적 형질 발현에 영향을 미칠 수 있다 (Gerlach et al., 1990; Larsson et al., 2002; Buhr et al., 2010). 이 때문에 계절별 동물 생체 내 유전자 발현 양상에 대한 정보 수집은 계절 변화, 특히 기온에 따른 동물 조직 내 스트레스 반응이나 생리학적 형질 발현을 이해하는 데 중요한 바탕이 될 수 있다. 특히, 온도에 반응하는 관련 유전자군의 이해는 종의 분자 기전에 대한 심화 이해에 도움이 될 뿐만 아니라 특정 유전자를 동정할 경우 외부 온도 변화를 통해 반응하는 특정 유전자 모니터링을 가능케 할 수 있다.

현재 외부 환경변화에 대응한 동물의 적응 기전 파악과 스트레스 지표 확인을 위한 연구, 계절에 따른 생체 내 유전자 변화 양상과 생리학적 변화 대한 몇 연구가 보고된 바 있다 (Pujolar et al., 2012; Dopico et al., 2015; Mukai et al., 2009). Pujolar et al.은 유럽산 뱀장어 (*Anguilla anguilla*)의 유전자 발현 프로파일링을 통해 환경오염 물질에 노출된 뱀



장어의 해독 작용 유전자 발현이 증가하고 체내 호흡량, 에너지 생산량과 관련된 인자들이 감소했다는 연구 결과를 제시하였고, Dopico et al.은 인간 생체 내 유전자의 20% 이상이 계절 변화에 반응하며 그 중 특히적으로 겨울보다 여름에 B-cell 수용체 신호 연관 유전자가 발현이 감소 (식포, 리소좀, 박테리아 감염 관련; CR2, FCGR2B, CD72, BLNK2, CD79B, BTK, BLNK, CIITA, BTK 등)하고 겨울보다 여름에 RNA 수송 연관 유전자가 발현이 증가하는 등 계절에 따라 특정 임무를 수행하는 유전자가 민감하게 반응한다고 언급하였다. 또 Mukai et al.에서는 번식기인 봄과 비번식기인 가을에 멧종다리 (*Melospiza melodia*) 시상하부에서 타 개체의 영역 침범에 대해 반응하여 발현되는 유전자가 다르고, 차별 발현된 유전자 중 황체형성호르몬과 소낭자극호르몬과 같은 성호르몬의 분비와 연관된 트랜스티레틴 (TTR)이 가을보다 봄에 영역 침범에 의해 유의적으로 증가하였다.

그러나 계절환경 변화에 따른 동물의 유전자 조절기작 연구와 신규 유전자 발굴을 위한 대량 탐색 등의 노력은 아직 미미한 단계로서 추가적 연구가 필요한 실정이다.

개(*Canis lupus familiaris*)는 인간과 가장 가까이 지내며 인간과의 해부 생리학적, 생리학적 유사성이 높아 약리 동역학적 연구 등에 널리 이용되는 동물이다 (Shou et al., 2003; Sutter et al., 2004; Scherr et al., 2011). 또한 *in vitro* 실험으로부터 도출된 대량의 약리동역학적 추적 데

이터는 인간과 개 두 종 모두의 *in vivo* 실험을 해석하는 데 유용하게 사용될 수 있다 (Mise et al., 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://ensembl.org>). 개에 대해서는 기본 형질적 특성 파악, 예를 들어 single nucleotide polymorphism (이하 SNP)과 유전자형, 계통 발생 분석 연구나 개의 혈액단백질, DNA 다형 관련 연구 등 단백질과 DNA 중심의 연구와 미토콘드리아 DNA의 restriction fragment length polymorphism (이하 RFLP) 분석에 의한 혈연 연구, 적혈구 아데닐산 키나아제와 알칼리성 인산가수분해 효소의 유전적 다형에 대한 유전학적 연구, 집단 구조와 유전적 변화를 이해하기 위한 미토콘드리아 기반 가계도 분석 등 주로 혈연과 유전적 다형성을 파악하기 위한 연구가 유전자 대량 탐색을 통해 진행되었다 (Kim et al., 2012; Kim et al., 1998; Kim et al., 1989; Kim et al., 2011; Kim et al., 1997; Lee et al., 1993; Kim et al., 1997; Park, 2012). 하지만 현재 외부 환경적 요인에 의한 개의 유전적 변화 양상, 환경 적응에 관여하는 대사 메커니즘 등의 생물학적 연구에 관한 보고는 극히 드물며, 연구를 통한 정보 확보가 필요하다.

이에 본 연구는 동일한 환경조건 하에서 사육된 유사 연령대의 개들을 계절에 따른 동물의 적응 기전을 파악하기 위한 모델로 사용하고, 연구의 일환으로 next generation sequencing (이하 NGS) 기법을 사용해 계절변화 (봄/여름)에 노출된 개에서 관찰되는 혈액 내 mRNA들의 발현 양상과 유의적으로 변화된 유전자들의 역할을 탐색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 환경

실험에 이용된 동물은 암컷 삽살개 (2012년 3월생), 수컷 삽살개 (2012년 3월생), 암컷 진돗개 (2012년 6월생), 수컷 진돗개 (2012년 6월생) 총 4개체이며 실험은 제주대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 실행되었다 (승인번호 2015-0030).

암컷 삽살개는 경북 경산, 수컷 삽살개는 독도, 진돗개들은 전남 진도에 서 출생 후 문화재청 문화재연구소 관리하에 사육되었으며 2014년 1월 제주대학교로 이관된 이후 동일한 사육조건과 식이 (Potato & Duck Allergy Dog Formula, Natural balance, Burbank, CA, USA)하에 사육되었다.

채혈은 비 발정기일 때 시행되었다. 봄 채혈은 2014년 4월 14일 실시하였으며 채혈 전 14일간 일일평균 기온은  $13.22 \pm 1.90$  °C 일일평균습도는  $64.64 \pm 11.95$  %로 측정되었다 (해당일 일일 평균 기온 14.5°C, 최고 기온 18.2°C, 최저 기온 10.7°C, 일일 평균 습도 53%). 여름 채혈은 2014년 7월 21일 실시하였으며 채혈 전 14일간 일일평균 기온은  $24.41 \pm 1.16$  °C 일일평균습도는  $85.79 \pm 6.38$  %로 측정되었다 (해당일 일일 평균 기온 25.5°C, 최고 기온 27.7°C, 최저 기온 23.8°C, 일일 평균 습도 84%). 자료

는 기상청 기상현상증명서 제주 184번 지점 측정값을 인용하였다  
(<http://www.kma.go.kr>).

## 시약

재료 및 방법에서 출처가 기술된 재료를 제외한 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다.

## 채혈

혈액은 개체별 경정맥으로부터 채혈하여 혈액 4 ml 당 Trizol LS (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 16 ml을 넣고 균질화를 실시하였다. 균질화된 시료는 50 ml conical tube (SPL Life sciences, Pocheon, Gyunggi-do, Korea)에 냉장 보관, 나머지 시료는 EDTA tube (K2 EDTA 1.8 mg/mL, BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 분주해 냉장 보관하였다.

## RNA 추출

Trizol LS와 개 혈액(whole blood)이 혼합된 샘플을 0.75 ml 당 클로로폼 0.2 ml 을 넣은 후 10~20초 동안 흔들어 혼합하였다. 혼합물을 상온에서 2~15분간 반응시킨 후, 4°C에서 14,000 rpm, 15분간 원심 분리하

여 상층액을 확보해 이소프로필알코올과 1:1로 혼합하였다. 그 후, 상온에서 약 10분간 반응 시켜 4°C에서 14,000 rpm, 10분간 원심 분리해 침전물을 확보하였다. 침전물 외 상층액이 모두 제거한 뒤, 70% 에탄올 1 ml을 첨가해 4°C에서 14,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 세척한 다음 상층액을 모두 제거하고 상온에서 tube 뚜껑을 열어놓은 채 RNA 침전물을 완전히 건조하였다. RNA 침전물이 완전히 건조된 후 20~100 ul의 HPLC 물을 첨가하여 용출과정을 진행하였고, 최종적으로 ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA) 으로 RNA 농도와 순도를 측정하였다.

## Next Generation Sequencing (NGS)

(주)마크로젠에서 TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 메신저 RNA 라이브러리 (mRNA library)를 제작하였다. 이후 폴리-T 시퀀스가 붙어있는 magnetic bead를 사용하여 폴리-A 올리고만 포함된 mRNA 정제를 하였다. 2번의 정제 과정 후 RNA는 cDNA 합성을 위해 단편화하였다. 이후 역전사효소(reverse transcriptase)와 random primer를 사용하여 RNA 가닥으로부터 첫 번째 가닥의 상보적 DNA (cDNA)를 합성하고, 첫 번째 가닥의 상보적 DNA를 이용하여 두 가닥 (double-stranded)의 상보적 DNA를 합성하였다.

그 후, Ampure XP (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) 자석으로 상보적 DNA를 분리하고, end repair (이하 ERP) 혼합물을 첨가하여 양 끝 말단을 blunt end로 만든 뒤, 3' 말단에 A 염기를 첨가하였다. 그리고 A 염기가 첨가된 상보적 DNA 양 끝 말단에 어댑터를 부착하고, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)을 이용하여 선택적으로 양 끝 말단에 2개의 어댑터 분자를 가지는 DNA 단편만을 증폭시켰다. 제작된 mRNA 라이브러리는 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative polymerase chain reaction, 이하 qPCR)을 이용하여 품질과 농도를 확인하였으며, HiSeq 2000 장비를 사용하여 클러스터링 및 시퀀싱을 실시하였다. 그리고 최종적으로 Solexa QA (Perl-based software package)를 사용하여 데이터 품질을 확인하였다.

## NGS 데이터 분석

시퀀싱 품질 확인 후, 생산된 RNA-Seq read들은 웹 기반 분석 프레임워크인 Galaxy를 통해 분석되었다 (<https://usegalaxy.org/>). 우선 생산된 FASTQ 파일은 염기서열(short reads)의 품질 체크와 분석을 위한 변환 및 낮은 품질의 reads 제거 (grooming & trimming, Fastqc) 작업을 거쳤다. 이후, 샘플별 전사체 리드 (short read)를 공개된 개의 참조 유전체 (reference chromosome) 에 TopHat 2 (version 0.6)을 사용하여

정렬 (alignment)시켰다 ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Canis\\_lupus\\_familiaris/GFF/ref\\_CanFam3.1\\_top\\_level.gff3.gz](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Canis_lupus_familiaris/GFF/ref_CanFam3.1_top_level.gff3.gz)).

그리고 Cufflink (version 0.0.6)를 사용하여 transcript set으로 조립 한 후, Cuffdiff (version 0.0.7)를 사용하여 mRNA의 상대적인 양을 비교, 분석한 뒤 (시퀀스를 참조 유전체에 매핑 할 때, 유전자 별로 그 코딩된 영역의 크기가 다르므로 read가 얼마나 많이 매핑 되었는지 확인하기 위해서 결과물의 FPKM (fragments per kilobase of exon er million fragments mapped) 을 비교하였다.) 샘플별 발현이 유의한 유전자 추출 및 발현 패턴이 유사한 유전자를 군집화하여 분석 (biological process, molecular function 파악)하였다 [그림 1].

## 결과

### NGS 데이터

생산된 데이터를 Solexa QA (Perl-based software package)를 사용해 품질을 확인하였다 [표 1].

HiSeq 2000 데이터의 phred score값 Q30이 80% 이상이 되어야 해당 데이터의 품질이 보장되므로 (Illumina 기준), 모든 데이터의 Q30이 80% 이상임을 확인한 후, 분석을 시작하였다.

### 봄, 여름 발현 차이 분석

Cuffdiff를 통해 분석된 24,344종의 gene scripts 중 1,526종 유전자가 큰 발현 변화 ( $\text{Log}_2(\text{fold change})$  1.5 이상, -1.5 이하)를 보였으며, 나머지 22,818종 유전자는 계절변화에 따른 발현 차이가 크게 발생하지 않았다.

### 계절별 유전자 차별 발현 heat map

개 혈액 내 유전자 발현은 R studio package를 통한 FPKM meta 분석으로 구현되었다. 각 개체 유전자 발현의 상호 유사성에 따라 계층적 군집화 (hierarchical clustering)가 이루어져 계절, 건중, 성별 유사성을 확



인할 수 있었다. 계절에 따른 구분은 확인되었으나 견종과 성별로 인한 차이는 확인되지 않았다 [그림 2].

## 봄보다 여름에 발현이 증가한 유전자

발현 차이가 크게 나타난 1,526개 유전자 중  $\text{Log}_2(\text{fold change})$ 값이 1.5 이상이고,  $P < 0.05$ 인 명명된 유전자만을 선별하였다 [표 2].

봄에 비하여 여름에 발현이 유의적으로 증가한 유전자는 cfa-mir-223, TIMM13, SPTSSA, NEAT1\_1, C19orf24, RSAD2, AADAACL3, ISG15 총 8종이었다.

## 봄보다 여름에 발현이 감소한 유전자

발현 차이가 크게 나타난 1,526개 유전자 중  $\text{Log}_2(\text{fold change})$ 값이 -1.5 이하이고,  $P < 0.05$ 인 명명된 유전자만을 선별하였다 [표 3].

봄에 비하여 여름에 유의적으로 감소한 유전자는 RPS15A, ACADL, RPL14 총 3종이었다.

## 고찰

최근 인간의 혈액과 지방세포 내 유전자들이 계절에 영향을 받아 민감하게 변화한다는 사실이 밝혀지면서 환경에 따라 변화하는 동물의 유전자 발현과 발현 유전자의 역할 규명 연구에 대한 중요성이 재조명 되었다 (Dopico et al., 2015). 이에 본 연구에서는 개의 혈액에서 발현된 유전자에 대한 계층적 군집화 (hierarchical clustering)를 바탕으로 봄/여름 유전자 발현 차이를 확인한 뒤 유전자 역할조사를 시행하였다.

개의 혈액 내에서 여름에 유의적으로 증가한 면역 관련 유전자는 RSAD2와 ISG15가 있었으며 이 둘 모두 인터페론의 항바이러스 작용 (interferon effector)에 관여하는 유전자이다 (UniProt, E2R7B5, E2R7R1; Chung et al., 2011; Skaug et al., 2010; Hori et al., 2012). 이 중 전염 증반응 (proinflammatory) 주요 조절인자 RSAD2는 alpha-beta T cell 분화와 T-helper 2 cell 사이토킨 분비 증진 등의 면역반응과 연관되어 있으며 바이러스나 미생물 산물 (LPS, double stranded RNA)에 대한 높은 감수성을 지닌 단백질을 코딩하는 유전자로 알려져 있다 (Chung et al., 2011). 특이점으로, RSAD2는 대서양 대구 (*Gadus morhua Linnaeus*)의 비장에서 (Vehicle control, PBS 주사 6시간 후) 봄보다 여름 환경에 유전자 발현 증가 양상을 보임이 확인된 바 있다 (Hori et al, 2012). 이러한 결과는 RSAD2가 종과 관계없이 계절에 따라 발현이 변

화될 수 있음을 시사한다. ISG15는 항바이러스 면역반응 이외에도 단백질 유비퀴틴화 억제와 적혈구 분화 촉진 등의 역할과 관계되어 있다 (Skaug et al., 2010; Maragno et al., 2011; Malakhova and Zhang, 2008).

개의 혈액 내에서 여름에 유의적으로 증가한 세포 구성성분과 단백질 수송연관 유전자는 C19orf24와 TIMM13이 있었다. C19orf24는 세포질 내 분비 단백질을 코딩하는 유전자이며, TIMM13은 금속 이온 결합과 미토콘드리아 내막 수송 연관 단백질을 코딩하는 유전자이다 (UniProt, J9NXU4, J9P150; Wang et al., 2006). 동물의 세포 구성성분과 단백질 수송은 온도에 영향을 받는다. 남극 대구 (*Pagothenia borchgrevinki*)가 4°C 환경에 17일간 노출될 경우 포스파티딜콜린과 포스파티딜에탄올아민 같은 세포막 구성 성분의 조성과 구조 변화가 유발됨이 알려졌고, 동면하는 포유류의 (다람쥐, *Otospermophilus beecheyi*) 세포 구조 또한 체온이 결빙온도까지 떨어지면서 변화한다고 보도된 바 있다 (Logue et al., 2000; Dey et al., 1993; Azzam et al., 2000). 하지만 계절 변화에 따라 동물의 세포 구조와 성분 변화가 왜 일어나는지, 어떻게 변화하는지에 관한 생물학적 메커니즘 연구는 극히 드물다. 따라서 봄보다 여름에 유의적으로 증가하고 세포 내 물리적 구성과 수송에 영향을 줄 수 있는 유전자인 C19orf24와 TIMM13에 대한 발현정보를 제공한 점에서 본 연구의 의의가 있다.

이 외에, SPTSSA의 경우 serine c-palmitoyltransferase activity와 연관 있는 것으로 알려진 유전자이며 AADACL3는 carboxylic ester hydrolase activity에 관여한다고 알려졌다 (UniProt, J9NZS9, F1PW90; NCBI). 두 유전자 모두 자체 연구내용이 적고, 계절 변화에 관련된 연구가 존재하지 않지만 봄보다 여름에 발현이 유의적으로 증가하였다. cfa-mir-223, NEAT1\_1도 개에서는 각각 정확한 역할이 규명되지 않았지만 봄보다 여름에 발현이 유의적으로 증가하였다.

개의 혈액 내에서 봄보다 여름에 발현이 유의적으로 감소한 RPS15A와 RPL14은 모두 리보솜 구성 요소를 코딩하는 유전자들이다 (UniProt, J9NSL1, F1PF85; NCBI). RPS15A 의 경우 40S 리보솜을 코딩하는 유전자이며 동면에 들어간 곰 (*Ursus americanus*)과 다람쥐 (*Uroditellus parryii*)의 근육세포에서 발현이 증가하는 것으로 알려졌다 (Fedorov et al., 2014). 추후 연구결과를 기반으로 RPS15A가 종과 동면 여부와 관계 없이 계절에 따라 발현 양상이 변화하는지를 확인할 필요가 있을 것으로 보인다.

개의 혈액 내에서 봄보다 여름에 발현이 유의적으로 감소한 ACADL은 전자전달계 활성, long-chain-acyl-CoA dehydrogenase 활성과 flavin adenine dinucleotide 결합과 관계있다. 또한 ACADL은 미토콘드리아 베타산화 초기 과정을 촉진하는 효소 중 하나이다 (UniProt, F1PQ86; NCBI). ACADL은 26°C에서 4°C로 환경이 변화했을 때, 올챙이

(*Lithobates catesbeianus*)의 간에서 발현이 유의적으로 증가하는 것으로 알려진 유전자이지만 (Suzuki et al., 2016), 흥미롭게도 동면하는 곰 (*Ursus americanus*)의 간에서는 하향 조절 된다는 연구결과가 제시된 바 있다 (Fedorov et al., 2009). 따라서 해당 유전자 발현을 이해하기 위해서는 단순 계절 변화가 아닌 개체 생리학적 활성과 활동성 여부까지 염두 한 분석이 필요할 것으로 판단된다.

이러한 유전자 차별 발현 자료는 계절에 따라 변화하는 세포 내 구성성분, 면역반응, 물질수송과 대사 변화를 시사하므로 개별적인 역할로나 통합적 발현 양상으로나 여러 면에서 그 의미가 크다. 또한, 본 연구를 통해 확보된 유전자 자료는 계절에 따른 개의 특정 유전자 발현에 대한 첫 참고 자료가 될 뿐만 아니라, 특정 환경에서의 계절별 온도 변화가 동물에 미치는 영향 평가 등에 유용한 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대된다.

그러나 아직 연구를 통해 확보된 각 유전자를 정밀한 지표로 이용하기 위해서는 다량의 생물정보 수집 및 유전자 간의 네트워크 정보 분석 연구가 뒤따라야만 한다. 또한, 선구 연구가 대부분 여름과 겨울과 같이 큰 기온 대비를 보이는 환경 노출이나 사계에 대한 분석을 진행한 것과 달리 본 연구는 봄과 여름에 국한된 자료를 분석해 데이터의 연속성을 파악하기가 어렵다. 따라서 추후 다양한 사계 온도별 전사 수준에서의 전사체 분석이 필요하며 아울러 이와 함께 프로테옴 및 개의 생리학적 표

현형 (나이 및 성별 등) 분석이 병행되어야 할 것이라 사료된다.

Table 1. Sanger quality check (ASCII character code = phred quality value + 33).

Read Counts annotates total bases divided by the base length (101 bp; Illumina pipeline (CASAVA, Ver 1.8.2)). GC stands for the percentage of guanine and cytosine bases on a total reads. Q20, Q30 each means phred score equivalent to the probability of an incorrect base call 1 in 100, 1000 times. JM, Male Jindo dog; JF, Female Jindo dog; SM, Male Sapsali; SF, Female Sapsali.

Sample	Total Bases	Read Counts	GC(%)	Q20(%)	Q30(%)	
Spring	JM	8,226,195,884	81,447,484	50.95	94.74	88.69
	JF	8,081,541,664	80,015,264	50.52	94.75	88.68
	SM	8,127,867,132	80,473,932	50.08	94.84	88.91
	SF	8,222,274,458	81,408,658	53.08	94.65	88.35
Summer	JM	5,648,296,730	55,923,730	50.78	95.81	89.86
	JF	5,695,177,698	56,387,898	50.40	95.77	89.73
	SM	5,254,408,446	52,023,846	49.64	95.77	89.91
	SF	5,107,990,160	50,574,160	51.22	95.82	89.84

Table 2. mRNA expression increased in summer compared with spring in canine blood

The chart shows sorted  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  value over 1.5 ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.

Gene	Full Name	Locus	Spring (FPKM)	Summer (FPKM)	$\text{Log}_2(\text{fold change})$	$P_{\text{value}}$
cfa-mir-223	microRNA mir-223	Chromosome X: 50838130-50838233	135.51	1040.46	2.94	0.0463
TIMM13	Translocase of inner mitochondrial membrane 13	Chromosome 20: 56666068-56666167	8185.71	48302.70	2.56	0.00005
SPTSSA	Serine palmitoyl transferase small subunit A	Chromosome8: 13317294-13317396	2222.42	9925.93	2.16	0.00005
NEAT1_1	Nuclear enriched abundant transcript 1 conserved region 1	Chromosome 18: 51768479-51768596	2746.06	12193.70	2.15	0.00005
C19orf24	Chromosome 19 open reading frame 24	Chromosome 20: 57519903-57520026	743.55	3267.17	2.14	0.00005
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing2	Chromosome 17: 4488287-4508752	27.27	114.97	2.08	0.00005
AADACL3	Arylacetamide deacetylase-like 3	Chromosome 2: 83737051-83743769	0.83	2.81	1.76	0.00135
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	Chromosome 5: 56230817-56237586	39.05	110.57	1.50	0.00005



Table 3. mRNA expression decreased in summer compared with spring in canine blood

The chart shows sorted  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  value under  $-1.5$  ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.

Gene	Full Name	Locus	Spring (FPKM)	Summer (FPKM)	$\text{Log}_2(\text{fold change})$	$P_{\text{value}}$
RPS15A	Ribosomal protein S15a	Chromosome 6: 26309072-26329529	135.11	47.57	-1.51	0.00005
ACADL	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain	Chromosome 37: 18032113-18073621	0.88	0.27	-1.71	0.0336
RPL14	Ribosomal protein L14	Chromosome 23: 9907478-9911114	6.31	0.34	-4.23	0.0002

Fig. 1

Analysis schematic of differential mRNA expression between spring and summer seasons in canine blood

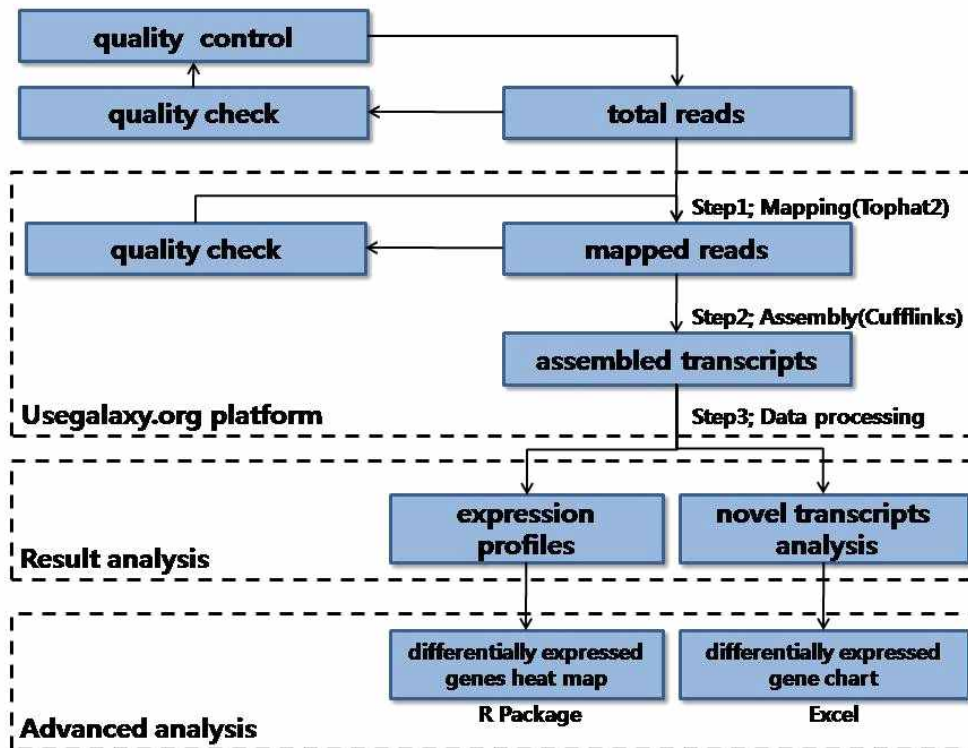
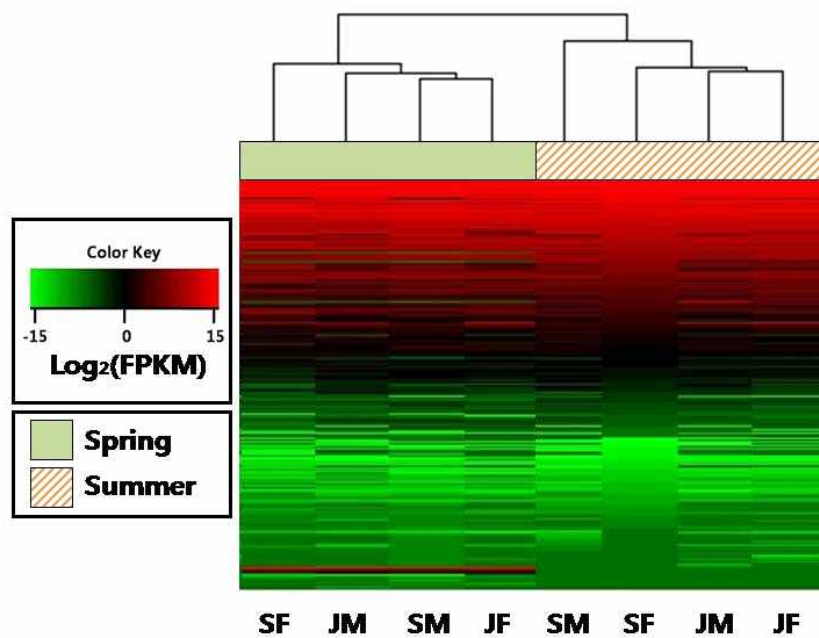


Fig. 2

Heat map (constructed using R software with gplots package) of differential mRNA expression between spring and summer seasons in canine blood

JM, Male Jindo dog; JF, Female Jindo dog; SM, Male Sapsali; SF, Female Sapsali. FPKM: fragments per kilobase of exon per million fragments mapped.



## 참 고 문 헌

- Azzam, N.A., Hallenbeck, J.M., Kachar, B., 2000. Membrane changes during hibernation. *Nature* 407, 317-318.
- Buhr, E.D., Yoo, S.H., Takahashi, J.S., 2010. Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science* 330, 379-385.
- Cho, Y.S., Lee, S.Y., Noh, C.H., Nam, Y.K., Kim, D.S. 2006. Survey of Genes Responsive to Long-Term Heat Stress Using a cDNA Microarray Analysis in Mud Loach (*Misgurnus mizolepis*) Liver. *Korean J. Ichthyol.* 18(2), 65-77.
- Chung, E.S., Chung, H.C., Bae, H.S., 2011. RSAD2 is a key requirement for Golgi trafficking of TNF- $\alpha$  in activated microglia. *The Journal of Immunology* 186, 117-126.
- Coppe, A., Pujolar, J.M., Maes, G.E., Larsen, P.F., Hansen, M.M., Bernatchez, L., Zane, L., Bortoluzzi, S., 2010. Sequencing, de novo annotation and analysis of the first *Anguilla anguilla* transcriptome: EelBase opens new perspectives for the study of the critically endangered european eel. *BMC Genomics* 11(635), doi: 10.1186/1471-2164-11-635.
- Dedeoğlu, B.G., 2013. High-Throughput Approaches for MicroRNA Expression Analysis. *Methods Mol. Biol.* 1107, 91-103.
- Dey, I., Buda, C., Wiik, T., Halver, J.E., Farkas, T., 1993. Molecular and structural composition of phospholipid membranes in livers of marine and freshwater fish in relation to temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 7498-7502.
- Dopico, X.C., Evangelou, M., Ferreira, R.C., Guo, H., Pekalski, M.L., Smyth, D.J., Cooper, N., Burren, O.S., Fulford, A.J., Hennig,

- B.J., Prentice, A.M., Ziegler, A.G., Bonifacio, E., Wallace, C., Todd, J.A., 2015. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* 6(7000), doi: 10.1038/ncomms8000.
- Fedorov, V.B., Goropashnaya, A.V., Stewart, N.C., Tøien, Ø., Chang, C., Wang, H., Yan, J., Showe, L.C., Showe, M.K., Barnes, B.M., 2014. Comparative functional genomics of adaptation to muscular disuse in hibernating mammals. *Mol Ecol.* 23, 5524 - 5537.
- Fedorov, V.B., Goropashnaya, A.V., Tøien, O., Stewart, N.C., Gracey, A.Y., Chang, C., Qin, S., Pertea, G., Quackenbush, J., Showe, L.C., Showe, M.K., Boyer, B.B., Barnes, B.M., 2009. Elevated expression of protein biosynthesis genes in liver and muscle of hibernating black bears (*Ursus americanus*). *Physiol Genomics.* 37(2), 108-118.
- Gerlach, G.F., Turay, L., Malik, K.T., Lida, J., Scutt, A., Goldspink, G., 1990. Mechanisms of temperature acclimation in the carp: a molecular biology approach. *Am. J. Physiol* 259, 237-244.
- Hale, D.E., Batshaw, M.L., Coates, P.M., Frerman, F.E., Goodman, S.I., Singh, I., Stanley, C.A., 1985. Long-Chain Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency: An Inherited Cause of Nonketotic Hypoglycemia. *Pediatric Research* 19, 666 - 671.
- Hanada, K., 2003. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1632(1-3), 16 - 30.
- Hori, T.S., Gamperl, A.K., Booman, M., Nash, G.W., Rise, M.L., 2012. A moderate increase in ambient temperature modulates the Atlantic cod (*Gadus morhua*) spleen transcriptome response to intraperitoneal viral mimic injection. *BMC Genomics* 13(431),

doi: 10.1186/1471-2164-13-431.

- Jeon, Y.J., Yoo, H.M., Chung, C.H., 2010. ISG15 and immune diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802(5), 485 - 496.
- Kim, R.N., Kim, D.S., Choi, S.H., Yoon, B.H., Kang, A.R., Nam, S.H., Kim, D.W., Kim, J.J., Ha, J.H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kim, A.R., Kim, M.Y., Park, K.H., Lee, K.S., Park, H.S., 2012. Genome Analysis of the Domestic Dog (Korean Jindo) by Massively Parallel Sequencing. *DNA Res* 19(3), 275 - 287.
- Kim, K.S., Lee, S.E., Jeong, H.W., Ha, J.H., 1998. The complete nucleotide sequence of the domestic dog (*Canis familiaris*) mitochondrial genome. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10, 210-220.
- Kim, M.G., Kim, N.Y., Lee, S.S., Kim, K.I., Yang, Y.H., 2011. Phylogenetic Relationships of Jeju Dogs to Other Domestic and Foreign Dog Breeds Determined by Using mtDNA D-loop Sequences. *J. Anim Sci. Technol* 53(4), 303-310.
- Kim, J.B., Studies on the genetic polymorphism of hemoglobin in korean jindo dog. *J.Basic Sci. Res. Inst* 11(1),59-63.
- Larsson, D.G., Mayer, I., Hyllner, S.J., Forlin, L. 2002. Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female eel pout (*Zoarces viviparus*). *Gen. Comp. Endocrinol* 125,184-196.
- Logue, J.A., de Vries, A.L., Fodor, E., Cossins, A.R., 2000. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 203(14), 2105-2115.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 36-41.
- Malakhova, O.A., Zhang, D.E., ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3

- activity and enhances the innate antiviral response. 2008. *J Biol Chem.* 283(14), 8783–8787.
- Maragno, A.L., Pironin, M., Alcalde, H., Cong, X., Knobloch, K.P., Tangy, F., Zhang, D.E., Ghysdael, J., Quang, C.T., 2011. ISG15 modulates development of the erythroid lineage. *PLoS One.* 6(10), e26068.
- Mise, M., Hashizume, T., Komuro, S., 2008. Characterization of substrate specificity of dog CYP1A2 using CYP1A2-deficient and wild-type dog liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1903–1908.
- Mukai, M., Replogle, K., Drnevich, J., Wang, G., Wacker, D., Band, M., Clayton, D.F., Wingfield, J.C., 2009. Seasonal Differences of Gene Expression Profiles in Song Sparrow (*Melospiza melodia*) Hypothalamus in Relation to Territorial Aggression. *PLoS One* 4(12), e8182.
- Oh, S.I., Lee, C.Y., Lee, C.G., Kang, M.I., Wee, S.K., 1998. Histopathological observation on jindo-dogs orally administered with Ivermectin. *Korean J Vet Public Health* 22(4), 329–333.
- Pujolar, J.M., Marino, I.A.M., Milan, M., Coppe, A., Maes, G.E., Capoccioni, F., Ciccotti, E., Bervoets, L., Covaci, A., Belpaire, C., Cramb, G., Patarnello, T., Bargelloni, L., Bortoluzzi, S., Zane, L., 2012. Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel. *BMC Genomics* 13(507), doi: 10.1186/1471-2164-13-507.
- Park, C.E., 2012. Analysis of Pedigree Based on Mitochondrial Genomes in Dogs. *Journal of the Korea Entertainment Industry Association* 6(3), 175–180.

- Pörtner, H.O., 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88, 137 - 146.
- Scherr, M.C., Lourenco, G.J., Albuquerque, D.M., Lima, C.S., 2011. Polymorphism of cytochrome P450 A2 (CYP1A2) in pure and mixed breed dogs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 34, 184-186.
- Shou, M., Norcross, R., Sandig, G., Lu, P., Li, Y., Lin, Y., MCI, Q., Rodrigues, A.D., Rushmore, T.H., 2003. Substrate specificity and kinetic properties of seven heterologously expressed dog cytochrome p450. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1161-1169.
- Skaug, B., Chen, Z.J., 2010. Emerging role of ISG15 in antiviral immunity. *Cell* 143(2), 187-190.
- Sutter, N.B., Ostrander, E.A., 2004. Dog Star Rising: The Canine Genetic System. *Nat Rev* 4, 900-910.
- Suzuki, S., Awai, K., Ishihara, A., Yamauchi, K., 2016. Cold temperature blocks thyroid hormone-induced changes in lipid and energy metabolism in the liver of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Cell Biosci* 6(19), doi: 10.1186/s13578-016-0087-5.
- Wang, X.R., Zhou, Y.B., Liu, F., Wang, K.S., Shen, Y., Liu, J.H., Han, Z.G., 2006. A novel recently evolved gene C19orf24 encodes a non-classical secreted protein. *Cell Mol Biol Lett.* 11(2), 161-170.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genetics* 10, 57-63.
- Yang, C., Pan, H., Liu, Y., Zhou, X., 2015. Temperature and Development Impacts on Housekeeping Gene Expression in Cowpea Aphid, *Aphis craccivora* (Hemiptera: Aphidiae). *PLoS One.* 10(6), e0130593.
- 국립문화재연구소, 천연기념물 삼살개의 우수성 입증을 위한 생물학적



기반 연구.

- 김우권, 이재홍, 김자숙 1989. 진도견의 혈액화학치 및 성장에 따른 체형에 관한 연구 II. 진도견의 성장에 따른 체형. 대한수의학회 29(3), 275-281.
- 김종봉, 윤인숙, 1995. 한국고유견 삼사리의 유전학적 연구 I: 적혈구 phosphoglucose isomerase 와 phosphoglucomutase 의 유전적 다형. 기초과학연구논집 9, 77-80.
- 김종봉, 윤인숙, 1992. 한국 진도개와 삼사리 혈액 단백질의 비교연구 II; 혈청 Lactate Dehydrogenase와 혈청 Alkaline Phosphatase의 동위효소와 활성도. 한국동물학회 116, 102-106.
- 이상욱, 홍성용, 하지홍, 1993. 미토콘드리아 DNA 의 RFLP 분석에 의한 삼사리 혈연 연구. 유전공학연구소보 8, 71-75.
- 질병관리본부, 2014. 한국인후성유전체사업 최종보고서.

# Differences of gene expression between spring and summer seasons in canine blood

Yu Jung Choi

Laboratory of Environmental Health and Biomarkers  
Veterinary Pathobiology and Preventive Medicine  
The Graduate School of Seoul National University

Genomic and transcriptomic analysis have the potential for revealing the genome-wide response to environmental alterations. Pioneering genome sequencing projects using the Sanger method to sequence the dog genomes shed the first light on the dog genome sequence, gene structure, linkage disequilibrium patterns, single nucleotide polymorphism (SNP) and evolutionary hierarchy. But genomic approaches into dog's ecological (seasonal) challenges have rarely been studied.

To this end, we first extract individual mRNA samples from dog blood on spring and summer to identify mRNA expression patterns and genetic characteristic.

Several cellular immunity, metabolism, structure related genes, including cfa-mir-223, TIMM13, SPTSSA, NEAT1\_1, C19orf24, RSAD2, AADA3L3, ISG15 were up-regulated in summer. In addition, ribosomal subunit coding genes and electron transportation related

gene RPS15A, RPL14, ACADL were down-regulated.

They were expected to be worth as bio-indicators for the seasonal response analysis, believing that further research is required to understand the relationship between climate change and biological adaptation (gene expression changes).

---

**Keywords : Season, Dog, Blood, Gene expression.**

***Student Number : 2014-22952***