



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](#)

이학석사 학위논문

MERS-CoV 단백질 코딩
DNA 라이브러리 제작 및
MERS 환자의 면역반응 분석

2017년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

박한별

국문초록

메르스 코로나바이러스는 2012년 사우디아라비아에서 처음 보고된 이후 전 세계로 확산되었으며 인간을 감염시켜 심각한 호흡기 질환인 메르스(중동 호흡기 증후군)를 일으키고 심지어는 사망에까지 이르게 하는 고 병원성 바이러스이다. 지금까지 명확히 밝혀지진 않았으나 메르스 코로나바이러스는 박쥐에서 기원하여 낙타를 통해 인간으로 전파되었을 것이라 추정되며 인간들 사이에서 밀접한 접촉으로 인해 전파됨이 보고되었다.

현재 메르스를 치료할 수 있는 백신이 개발되어 있지 않아 치료법 개발을 위한 연구가 계속적으로 진행되고 있다. 메르스 코로나바이러스가 발현하는 단백질의 활성을 억제하여 병을 치료하는 방법이 대표적인 예로, 바이러스가 발현하는 단백질의 기능을 밝히는 일이 점점 더 중요해 지고 있다. 하지만 지금까지 바이러스가 발현하는 몇몇 단백질의 기능 중 일부만 밝혀져 있고 코로나바이러스의 보존된 염기서열 분석을 통해 메르스 코로나바이러스가 발현하는 단백질의 기능을 예상하는 정도의 수준에 연구가 머물러 있다. 또 바이러스 단백질의 발현을 위한 DNA 라이브러리 또한 구축되어 있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 보다 심화된 연구를 위해 필수라고 할 수 있는 메르스 코로나바이러스가 발현하는 25개의 단백질 대부분을 발현 할 수 있는 유전자를 가진 DNA 라이브러리를 최초로 제작하였다. 또 제작한 DNA 라이브러리를 활용하여 바이러스의 E, M, N 단백질이 동물 세포에서 발현할 수 있는 발현 벡터를 만들었고 실제 동물 세포에 형질주입하여 바이러스 단백질이 발현하는 것을 확인하였다.

다음으로 메르스 환자에서 바이러스 감염으로 인한 사이토카인의 분비가 어떠한 양상으로 일어나는지, 또 환자에서 보이는 증상의 심각성에 따라 서로 다른 사이토카인 발현 양상을 보이는지를 본

연구에서 확인하였다. 메르스 환자의 혈청을 분석한 결과 급성 호흡곤란 증후군(ARDS) 환자에서 확인 할 수 있었던 CXCL10, CCL2와 같은 다양한 면역반응 및 염증반응과 관련된 사이토카인이 메르스 환자에서도 분비됨을 확인 할 수 있었다. 또 메르스와 비슷한 증상을 보이는 것으로 알려진 2003년에 유행한 사스(중증 급성 호흡기 증후군)의 경우, 같은 바이러스에 감염되었더라도 질병으로부터 건강을 회복한 경증 환자와 회복하지 못하고 사망에 이른 중증 환자로 나뉘는 것을 확인할 수 있었는데 메르스 환자들 사이에서도 같은 현상을 확인 할 수 있었다. 또 각 증상의 심각성에 따라 환자들이 분비하는 사이토카인의 경향성 역시 서로 다름을 확인 할 수 있었다. 이 외에도 본 연구에서는 한국에서만 특별히 나타난 사례인 메르스 코로나바이러스의 만성 감염을 보인 지속감염환자에서 확인할 수 있는 사이토카인의 발현 양상을 다른 환자들과 비교 분석하였다.

본 연구에서 제작된 DNA 라이브러리는 추후에 진행될 메르스 연구에 있어 그 활용도가 높을 것으로 보인다. 또 메르스 환자의 증상에 따른 사이토카인의 발현 양 및 그 양상을 분석함으로써 얻어진 정보는 향후 바이러스 감염에 의한 면역반응을 연구하는데 필요한 기초자료로 그 이용가치가 있을 것으로 보인다.

**주요어 : 메르스, 메르스 코로나바이러스, 면역반응, DNA 라이브러리,
사이토카인**

학 번 : 2015-20435

목 차

1. 서론	1
2. 재료 및 실험 방법	7
2.1 RT-PCR을 이용한 DNA 라이브러리 제작	7
2.2 서브 클로닝을 이용한 DNA 라이브러리 제작	7
2.3 바이러스 단백질 발현 벡터 제작	8
2.4 세포주와 세포 배양	8
2.5 바이러스 단백질 발현 및 검출	11
2.6 메르스 환자 혈청 사이토카인 분석	12
3. 결과	13
3.1 바이러스 단백질 코딩 DNA 라이브러리 제작	13
3.2 바이러스 단백질 발현 확인	16
3.3 증상별 메르스 환자 혈청 내 사이토카인 분석	18
4. 고찰	30
5. 참고문헌	34
Abstract	41

표 목 차

[표 1]	9
[표 2]	10
[표 3]	15
[표 4]	21

그림 목 차

[그림 1]	4
[그림 2]	17
[그림 3]	22
[그림 3]	25

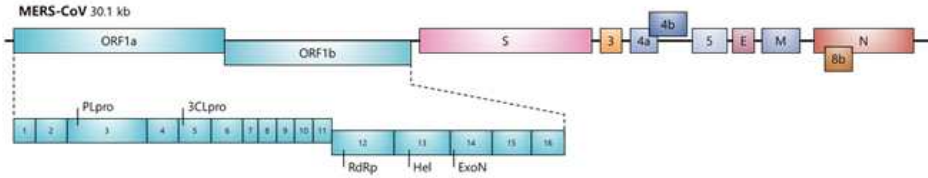
1. 서론

메르스(중동호흡기 증후군, MERS)는 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)의 감염에 의해 기침, 호흡곤란과 같은 호흡기 질환 외에도 발열, 두통, 오한, 인후통, 콧물, 근육통, 구토, 복통, 설사 등의 증상을 보이며 심하게는 사망에 이르게 하는 바이러스성 감염병이다(1-3). 2012년 사우디아라비아의 60대 노인에게서 메르스 코로나바이러스를 처음으로 분리한 것을 시작으로 2017년 6월까지 27개국에서 2,015명의 사람들이 메르스 코로나바이러스에 감염되었고 그 중에서 703명이 사망했다고 WHO에서 밝히고 있다(1). 메르스 코로나바이러스는 약 30kbp의 단일가닥 RNA를 가지는 바이러스로 16개의 비구조 단백질(non-structural protein)로 나누어지는 pp1a 및 pp1ab 2가지의 다단백질(polyprotein)과 4가지의 구조 단백질(structural protein) 및 5가지의 액세서리 단백질(accessory protein)을 유전자에 코딩하고 있다(그림 1A)(4). 다단단백질인 pp1a와 pp1ab는 PLpro(papainlike protease)와 3CLpro(3C-like protease)의 두 단백질가수분해효소(protease)에 의해 분해되어 16가지의 비구조 단백질로 나뉘어진다. 나뉜 단백질들은 서로 상호작용하여 바이러스의 replicase-transcriptase complex를 형성하고 바이러스의 유전자를 복제 및 전사한다(4-6). 비구조 단백질의 기능은 각각 다음과 같이 알려져 있거나 예측되고 있다. nsp1(non-structural protein 1)은 숙주의 mRNA를 인지하여 번역을 막고 분해를 유도하는 방법으로 숙주의 유전자 발현을 저해한다고 보고 되었으며 nsp2는 prohibitin 1 또는 prohibitin 2와 상호작용하여 세포 내 신호전달을 방해할 것으로 추정하고 있다(7, 8). nsp3는 PLpro로 다단단백질을 분해하는 역할 외에도 ubiquitin 및 ubiquitin-like protein

인 ISG15(interferon-stimulated gene 15)가 단백질과 결합하는 것을 막는 DUB(deubiquitinating) 및 deISGylating 활성을 가지고 있다고 연구 되었으며 이 외에도 다양한 기능이 있을 것으로 예상하고 있다(9). nsp4는 바이러스의 replication complex를 형성하는데 이용될 것으로 추측하고 있으며 nsp5는 3CLpro로 다단백질을 분해하여 replicase와 helicase를 만드는 데에 중요한 역할을 한다고 연구되었다(10-12). nsp6는 DMV(double membrane vesicles)를 형성하는데 기여하고 있다고 알려져 있다(10, 13). nsp7은 nsp8의 특정 상태를 안정화 하는데 필요한 요소이며 nsp8은 primase domain을 가지고 있다고 보고되었다(14). nsp9, 10, 11은 현재까지 그 기능이 연구된 바 없으며 nsp12는 RNA-dependent RNA polymerase(RdRp)로 RNA를 복제하고 전사하는 replicase로써 주요한 역할을 한다고 알려져 있다(15). nsp13은 helicase domain을 가지며 dNTPase 및 RNA 5' triphosphatase 활성을 가질 것으로 추정하고 있다(16). nsp14는 3' to 5' exoribonuclease로 역할을 nsp15은 RNA endoribonuclease로 기능할 것으로 예측하고 있다(17, 18). 메르스 코로나바이러스에서의 nsp16의 기능은 아직까지 알려진바 없다. 구조단백질에는 spike(S), envelope(E), membrane(M) 그리고 nucleocapsid(N) 단백질이 있으며 각각 바이러스 입자를 구성하는 주요 단백질이다(그림 1B). S 단백질은 숙주세포의 DPP4(dipeptidyl peptidase 4)와 결합하여 세포 내로 진입하는데 필수적이며 E 단백질은 바이러스에서 이온채널 역할을 하는 것으로 추정된다(19, 20). M 단백질은 바이러스의 표면을 구성하고 있다(21). N 단백질은 바이러스 입자가 형성될 때 바이러스의 RNA를 M 단백질에 고정시키는 역할을 한다(22). 나머지 subgenomic RNA로부터 생성되는 단백질은 액세서리 단백질로, 액세서리 단백질을 발현하지 못하는 돌연변이 바이러스를 생성하였을 때 재생산되는 바이러스의 수는

줄어드는 경향을 보였지만 바이러스의 재생산 자체에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보아 숙주의 면역반응을 회피하는 기작에 연관되어 있을 것으로 보고 있으며 실제로 ORF4a와 ORF4b, ORF5가 인터페론(interferon)의 길항물질로 작용한다는 연구가 보고되고 있다(23, 24). 이 외에도 비구조 단백질 및 구조 단백질 중 일부 또한 면역 회피 기작에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다(21, 23, 25). 다만 지금까지 연구된 각각의 단백질의 기능이 실제 단백질 발현을 통해 연구된 것은 극히 일부분이며 대부분의 기능이 코로나바이러스 사이에 보존된 염기서열 분석을 통한 잠재적 역할을 추정한 것이다. 각 단백질들의 기능을 밝히는 연구는 바이러스 자체를 연구, 분석하는 과정일 뿐만 아니라 백신개발 등의 다양한 분야의 연구에 필수적인 단계이다. 따라서 본 연구에서는 메르스에 대한 연구를 진행하는데 있어 가장 기초라고 할 수 있는 메르스 코로나바이러스의 단백질 발현을 위해, 각 단백질을 암호화 하고 있는 DNA 라이브러리를 구축하였다.

A



B

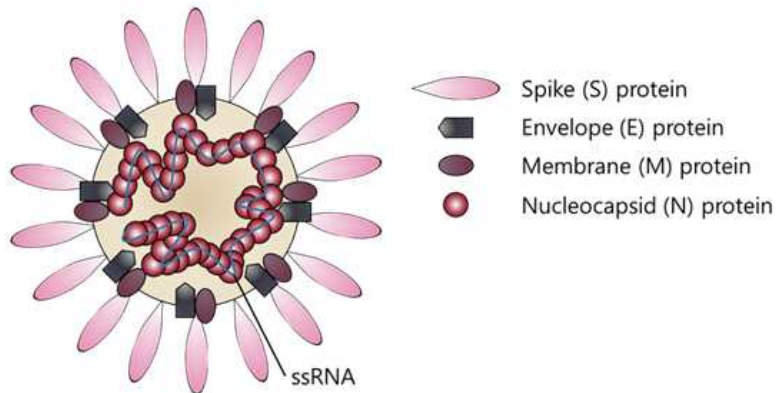


그림 1. 메르스 코로나바이러스 게놈 및 입자.

메르스 코로나바이러스의 단백질을 코딩하고 있는 단일가닥 RNA 게놈 (A)과 4가지 구조 단백질로 구성된 구 형태의 바이러스 입자(B)의 모습이다.

인간은 바이러스와 같은 병원체에 감염되었을 때, 이 외부 요인을 체 내에서 제거하기 위한 다양한 면역반응을 보인다. 이때 특정 병원체나 그 산물에 대한 세포의 반응으로 항체의 생산과 같은 특이면역반응을 적응면역반응(adaptive immune response)이라 한다. 반면 병원체에 대하여 비 특이적으로 반응하는 신체 내외의 물리적 화학적 장벽을 내재면역반응(innate immune response)이라 한다. 내재면역반응의 화학적 장벽으로 세포가 분비하는 사이토카인(cytokine)을 들 수 있는데 이는 직접적으로 병원체를 제거할 뿐만 아니라 염증반응을 일으키고 나아가 적응면역반응을 유도하는 매개체로 그 역할을 하고 있다(26, 27). 따라서 병원체의 감염으로 인해 일어나는 숙주에서의 초기 사이토카인 분비는 병원체로부터 자신을 지키는데 필수적인 반응이라고 할 수 있으며 메르스 코로나바이러스에 감염된 환자에서도 인터페론을 포함한 다양한 사이토카인을 분비한다고 보고되고 있다(28, 29). 한편 같은 병원체에 감염되어도 감염된 개체에 따라 질병의 경과가 상이한 경우를 많이 확인할 수 있는데 메르스 환자들에서도 마찬가지로 바이러스 감염 후 회복한 환자와 생명 보조 장치로 연명하다 사망에 이른 환자가 존재함을 확인할 수 있었다(30, 31). 같은 병원체에 감염되었음에도 불구하고 보이는 경과 차이에는 나이, 성별, 기저 질환의 다름과 같은 다양한 원인이 있겠으나 바이러스에 감염된 개체에 따라 분비되는 사이토카인이 상이하서 서로 다른 면역반응을 유도했기 때문이라는 연구가 보고되고 있다(32). 메르스 코로나바이러스에 감염된 환자에서도 마찬가지로 감염되었다 회복한 환자와 사망한 환자에서 보이는 인터페론의 발현 강도 및 발현하는 사이토카인의 종류가 달랐음을 확인할 수 있다(31). 다만 지금까지의 연구는 감염된 환자로부터 특정된 일부 사이토카인만을 측정된 연구이거나 메르스 코로나바이러스가 감염된 세포주에서 보인 면역반응에 대한 연구였다는 한계가 있다. 본 연구에서는 각기 다른 양상을 보인 환자에

서 추출한 혈청에 있는 102가지의 사이토카인을 분석하여 다양한 사이토카인들이 병증의 심각함에 따라 어떤 차이점을 보이는지와 시간 경과에 따른 사이토카인 발현의 변화를 분석하여 유형을 알아보고자 하였다. 또 본 연구에서는 한국에서만 특이적으로 발생한 바이러스의 만성 감염을 보인 지속감염환자의 혈청 속 사이토카인의 양을 확인하고 이를 다른 환자와 비교 분석함으로써 지속감염현상을 이해하고자 하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1 RT-PCR을 이용한 DNA 라이브러리 제작

메르스 코로나바이러스의 전체 RNA를 SuperScript™III Reverse Transcriptase 키트(invitrogen)를 이용하여 DNA로 전환하였다. 역전사에 사용한 프라이머의 서열은 각 nsp를 PCR 하기 위한 역방향 프라이머의 서열과 같다(표 1). RNA로부터 전환된 DNA를 주형으로 각 16개의 비구조 단백질 유전자를 PCR을 통해 증폭하였다. PCR은 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(NEB)를 사용하였으며, PCR을 위한 프라이머의 서열은 다음과 같다(표 1). 각각의 PCR 산물을 pENTR™/D-TOPO™ 클로닝 키트(invitrogen)를 이용하여 pENTR/D-TOPO 벡터(vector)에 삽입하고 Cosmogenetech을 통해 삽입된 DNA 염기서열을 분석하였다.

2.2 서브 클로닝을 이용한 DNA 라이브러리 제작

서울대학교 의과대학에서 제공받은 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 벡터에 삽입되어 있는 메르스 코로나바이러스의 구조, 액세서리 단백질 유전자 및 RT-PCR을 통해 만들어지지 않은 일부 비구조 단백질을 코딩하는 유전자를 인공적으로 합성한 벡터(Cosmogenetech)를 주형으로 각 4개의 구조 단백질, 5개의 액세서리 단백질 및 일부 비구조 단백질의 유전자를 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(NEB)를 사용

하여 PCR을 진행하였다. PCR에 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다 (표 1, 표 2). 각각의 증폭된 PCR 산물을 pENTR™/D-TOPO™ 클로닝 키트(invitrogen)를 이용하여 pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입하고 Cosmogenetech을 통해 삽입된 DNA 염기서열을 분석하였다.

2.3 바이러스 단백질 발현 벡터 제작

메르스 코로나바이러스의 E, M, N 단백질을 발현할 수 있는 유전자가 삽입되어 있는 pENTR/D-TOPO 벡터와 본 연구실에서 제작한 pDEST-SG5-HA5' 벡터를 Gateway™LR Clonase™II Enzyme Mix(invitrogen)를 이용하여 LR반응을 시켰다. 반응을 통해 pDEST-SG5-HA5' 에 삽입된 바이러스 단백질 유전자서열은 Cosmogenetech을 통해 분석하였다.

2.4 세포주와 세포 배양

HEK 293T 세포는 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2mM GlutaMAX-I(invitrogen)를 포함한 DMEM에서 배양하였다.

표 1. 비구조 단백질용 PCR 프라이머 서열

올리고 이름	방향	서열(5' - 3')
nsp1	정방향	CACCATGTCTTTCGTGGCTGGTG
	역방향	TTATCAACTTCTTAAGCAGATTCTGG
nsp2	정방향	CACCATGGATGTCACTCCAGTTGACC
	역방향	TCAACCTCCCTTAAGTCTAAAGAG
nsp3	정방향	CACCATGGCACCTGTAAAAAAGTAGCC
	역방향	TCAACCACCAACAATTTTGTAGCAG
nsp4	정방향	CACCATGGCTCCTACATGGTTAATGTG
	역방향	TCATTGCAACACGCCAGAG
nsp5	정방향	CACCATGAGCGGTTTGGTGAAAATG
	역방향	TCACTGCATAACCACACCC
nsp6	정방향	CACCATGAGTGGTGTGAGAAAAGTTACATATG
	역방향	TCACTGCATAGCAGCAACCTTTATAC
nsp7	정방향	CACCATGTCTAAACTTACAGATCTTAAATGC
	역방향	TTATTGAAGTACGCTAGGAGTGTG
nsp8	정방향	CACCATGGCTACTCTTTCTGAGTTTTCACAC
	역방향	TCATTGCAACTTAACGGCAGAAG
nsp9	정방향	CACCATGAATAATGAGATCAAACCTTCAGG
	역방향	TTATTGCAATCTAACAGTCGC
nsp10	정방향	CACCATGGCTGGTTCTAACACCGAG
	역방향	TTATTGGGGCAGTGCTACTTG
nsp11	정방향	CACCATGTCTAAAGATTCCAATTTTTTAAACGAGTC CGGGTTTCTATTGTGA
	역방향	TCACAATAGAACCCCGGACTCGTTTTAAAAAATTGG AATCTTTAGACATGGTG
nsp12	정방향	CACCATGTCTAAAGATTCCAATTTTTTAAACC
	역방향	TCACTGCAAAGTGGTAGGC
nsp13	정방향	CACCATGGCTGTCGGTTCATGCG
	역방향	TCACTGGAGCTTGAATTAGTAAAAG
nsp14	정방향	CACCATGTCTCAGATTGTAAGTGGCC
	역방향	TCATTGAACTTTTGTAAAAGTAGACCAG
nsp15	정방향	CACCATGGGTTTGGAAAACATTGC
	역방향	TTACTGGAGTCGAGGGTAGAAG
nsp16	정방향	CACCATGGCTTCTGCAGATTGGAAAC
	역방향	TCAACGTAACCTTTCTGTAGGTGTTAAACAAG

표 2. 구조 및 엑세서리 단백질용 PCR 프라이머 서열

올리고 이름	방향	서열(5' - 3')
S	정방향	CACCATGATGATACACTCAGTGTTCCTAC TGATGTTCTTG
	역방향	TTAGTGAACATGAACCTTATGCGG
ORF3	정방향	CACCATGAGAGTTCAAAGACCACCC
	역방향	TTAATTAAGTGAAGTAACCAACGTC
ORF4a	정방향	CACCATGGATTACGTGTCTCTGCTGC
	역방향	TTAGTTGGAGAATGGCTCCTC
ORF4b	정방향	CACCATGGAGGAATCCCTGACGG
	역방향	TTAAAATCCTGGATGATGTAATAATG
ORF5	정방향	CACCATGGCTTTCTCGGCGTC
	역방향	TTAAACGATAAGCGAGCTCG
E	정방향	CACCATGTTACCCTTTGTCCAAGAAC
	역방향	TTAAACCCACTCGTCAGG
M	정방향	CACCATGTCTAATATGACGCAACTCAC
	역방향	CTAAGCTCGAAGCAATGC
N	정방향	CACCATGGCATCCCCTGCTGCAC
	역방향	CTAATCAGTGTTAACATCAATCATTG
ORF8b	정방향	CACCATGCCAATTCTACCCCTG
	역방향	TTAAGCTAGAGGCTCTTGAAGATG

2.5 바이러스 단백질 발현 및 검출

HEK 293T 세포를 12-홈판(12-well plates)에 각각 0.8×10^5 개의 세포를 깔아주고 10% FBS, 100U/ml penicillin, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, 2mM GlutaMAX-I(invitrogen)를 포함한 DMEM에서 하룻밤 동안 배양한 뒤 PBS로 1회 씻어내고 바이러스의 E, M, N 단백질 유전자가 삽입된 pDEST-SG5-HA5' 벡터 $1 \mu\text{g}$ 을 PEI로 형질주입하고 2일간 배양하였다.

50 mM Tris(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% CHAPS로 구성된 완충액에 cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail(Roche)를 첨가하여 세포 분해 완충액을 제조하였다. 이것을 2일간 배양한 세포가 있는 홈판에 처리하고 4°C에서 15분 반응시키고 세포가 용해된 완충액을 1.5ml 튜브에 모아 다시 15분간 반응시킨 뒤 13000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻는다. 얻어진 상층액과 SDS 표본 완충액을 섞은 뒤 100°C에서 10분간 끓인다. 끓인 시료를 식힌 뒤 SDS-PAGE를 통해 단백질들을 분자량에 따라 분리하였고 다시 100V에서 90분 동안 니트로셀룰로오스 막으로 단백질을 이동시켰다. 단백질이 부착된 니트로셀룰로오스 막은 5% 탈지분유 혼합액으로 30분간 블로킹한 뒤 HA항체로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. HA항체와 반응한 니트로셀룰로오스 막을 0.1% TBST로 3번 씻어주고 상온에서 HA항체를 인지하는 2차 항체를 30분간 반응시킨 뒤 다시 0.1% TBST로 3번 씻어준다. 씻어진 막을 ECL 검출 시약과 반응시킨 뒤 검출기(chemidoc)를 통해 단백질 발현을 확인하였다.

2.6 메르스 환자 혈청 사이토카인 분석

불활성 처리된 메르스 환자의 혈청 200 μ L를 Human XL Cytokine Array 키트(RnD systems)에 있는 막에 뿌려준 뒤 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 막에 있는 각 사이토카인 항체에 잡힌 사이토카인 외의 물질을 제거하기 위해 키트에서 제공하는 완충액으로 3회 이상 씻어 준다. 이후 biotin이 부착되어 있는 102가지 사이토카인 항체 각테일을 막과 1시간 반응시키고 완충액으로 씻은 뒤 biotin에 붙을 수 있는 streptavidin-HRP와 30분간 반응시킨다. 다시 완충액으로 헹군 후 chemiluminescent reagent를 뿌려준 뒤 발생하는 신호를 검출기를 통해 검출한다. 이렇게 검출된 신호의 강도를 ImageJ 프로그램을 이용하여 수치화 하여 분석한다.

3. 결과

3.1 바이러스 단백질 코딩 DNA 라이브러리 제작

RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction)기법을 사용하여 비구조 단백질 16개의 유전자가 삽입된 벡터를 제작하였다. 메르스 코로나바이러스는 양성-극성 단일가닥 RNA를 유전체로 가지는 바이러스이다. 바이러스의 S 단백질이 숙주세포의 DPP4와 상호작용하여 세포 내로 바이러스가 들어가면 바이러스의 RNA가 세포질로 노출된다. 노출된 RNA는 번역되어 RNA replicase-transcriptase complex를 형성하고 소포체로부터 유래된 특정부위에서 바이러스의 구조 단백질 및 genomic RNA를 합성하여 바이러스를 재생산하고 세포로부터 방출된다(4). 따라서 바이러스에 감염된 숙주로부터 바이러스의 RNA를 추출할 수 있다. 본 연구실에서는 메르스 코로나바이러스에 감염된 환자로부터 추출한 병원성이 없음이 확인된 메르스 코로나바이러스의 genomic RNA를 서울대학교 의과대학으로부터 제공받아 실험을 진행하였다. 메르스 코로나바이러스의 RNA를 DNA화하기 위해 역전사효소를 이용하여 역전사하였다. 이때 무작위 핵사머가 아닌 각 nsp를 PCR할 때 사용하는 역방향 프라이머와 같은 서열의 유전자 특정 프라이머를 역전사에 사용하였다. 역전사된 DNA를 주형으로 각 비구조 단백질을 코딩하는 염기서열에 맞는 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 증폭시켰다. PCR을 통해 만들어진 16개의 PCR 산물은 topoisomerase를 이용한 TOPO 클로닝 기법을 이용하여 pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입하였다(33). 이 중 RT-PCR을 이용한 방법으로 완성하지 못한 nsp2, 3, 5, 11, 12와

nsp13의 경우, nsp3를 제외한 nsp2, 5, 11, 12, 13의 유전자를 인공적으로 합성하였고 이를 주형으로 사용한 서브 클로닝을 진행하였다. 이를 통해 nsp2, 5, 11, 12, 13의 유전자를 pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입하였다.

구조 단백질 및 액세서리 단백질 유전자는 서울대 의과대학에서 염기서열 분석을 위해 제작한 벡터에 있는 유전자를 제공받았다. 제공받은 벡터 중 S 단백질의 경우 단백질 발현을 향상시키기 위해 코돈 최적화된 서열을 가지고 있었고, 이는 Sino biological에서 판매하는 VG40069-CH에서 유래되었기에 서로 같은 서열을 가진다. S 단백질 외 나머지 단백질 유전자는 환자로 부터 추출된 RNA로 제작한 벡터이다. 벡터에 있는 바이러스 단백질 유전자를 주형으로 PCR을 통해 각각의 유전자를 증폭시켰다. 만들어진 PCR 산물을 TOPO 클로닝을 통해 pENTR/D-TOPO 벡터에 삽입하였다. 삽입된 바이러스의 단백질을 코딩하는 DNA 염기서열 정보는 다음과 같다(표 3). 최종적으로 메르스 코로나바이러스가 발현하는 25개의 단백질 중에서 nsp3을 제외한 나머지 모든 메르스 코로나바이러스의 단백질을 코딩하는 DNA 라이브러리를 제작하였다. 이 중 ORF4a의 경우 KX034100.1의 26167번째 T(thymine)이 C(cytosine)으로 점 돌연변이가 발생했다.

표 3. 메르스 코로나바이러스의 단백질 코딩 DNA 서열

단백질 이름	GenBank ID (range)	비고
nsp1	KX034100.1 (279 to 857)	
nsp2	JX869059.2 (858 to 2837)	
nsp4	KX034100.1 (8499 to 10019)	
nsp5	JX869059.2 (10020 to 10937)	
nsp6	KX034100.1 (10938 to 11813)	
nsp7	KX034100.1 (11814 to 12062)	
nsp8	KX034100.1 (12063 to 12659)	
nsp9	KX034100.1 (12660 to 12989)	
nsp10	KX034100.1 (12990 to 13409)	
nsp11	KX108946.1 (13391 to 13432)	
nsp12	JX869059.2 (13410 to 16207)	13433에서 ribosomal frameshifting
nsp13	JX869059.2 (16208 to 18001)	
nsp14	KX034100.1 (18002 to 19573)	
nsp15	KX034100.1 (19574 to 20602)	
nsp16	KX034100.1 (20603 to 21511)	
S	VG40069-CH	catalog number
ORF3	KX034100.1 (25532 to 25843)	
ORF4a	KX034100.1 (25852 to 26181)	T26167C
ORF4b	KX034100.1 (26093 to 26833)	
ORF5	KX034100.1 (26840 to 27514)	
E	KX034100.1 (27590 to 27838)	
M	KX034100.1 (27853 to 28512)	
N	KX034100.1 (28566 to 29807)	
ORF8b	JX869059.2 (28762 to 29100)	

3.2 바이러스 단백질 발현 확인

3.1에서 제작한 DNA 라이브러리 제작에 사용된 벡터는 pENTR/D-TOPO로 삽입된 유전자 양 끝에 attL 염기서열을 가지고 있으며 이를 entry clone이라 한다. attL 염기서열과 반응할 수 있는 attR 염기서열을 가지는 벡터를 destination 벡터라 하며 LR clonase를 이용한 LR 반응을 통해 entry clone에 있는 특정 유전자를 destination 벡터에 삽입할 수 있다. 이때 destination 벡터에 원하는 유전자가 들어간 것을 발현 벡터라 한다(33). 본 실험에서는 pSG5에 attR 서열을 추가하고 발현하는 단백질의 아미노기에 HA(haemagglutinin)를 표지 할 수 있도록 변형시킨 pDEST-SG5-HA5' 를 destination 벡터로 사용하여 DNA 라이브러리 중 E, M, N 유전자를 가지는 벡터와 LR 반응시켜 E, M, N 유전자를 pDEST-SG5-HA5' 벡터에 삽입시켰다. 각 유전자가 삽입된 pDEST-SG5-HA5' 벡터를 HEK293T 세포에 형질주입시켜 2일간 배양한 뒤 단백질의 발현을 면역 블롯법을 이용하여 확인하였다(그림 2). E, M, N 단백질은 각각 약 9.4kDa, 24.5kDa, 45.1kDa의 분자량을 가지며HA 표지로 인해 3.2kDa의 분자량이 증가할 것이므로 각 단백질은 자신의 분자량에 맞는 위치에서 나타났음을 알 수 있다.

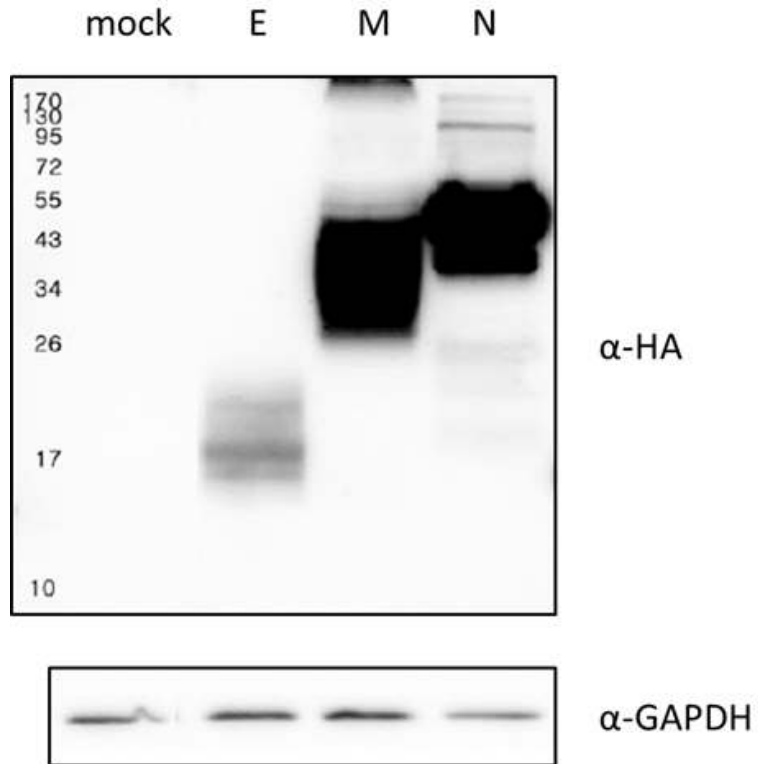


그림 2. 메르스 코로나바이러스의 E, M, N 단백질 발현

HEK293T 세포에 HA와 함께 메르스 코로나바이러스의 envelope(E), membrane(M) 그리고 nucleocapsid(N) 단백질을 발현 할 수 있는 pDEST-SG5-HA5' 벡터를 형질주입하였고, 2일 후에 각 단백질의 발현을 면역 블롯법으로 확인 하였다.

3.3 증상별 메르스 환자 혈청 내 사이토카인 분석

사이토카인은 세포와 세포사이에서 소통을 매개하는 세포 외 신호전달 물질로 개체에서 다양한 대사를 조절하는 물질이다. 개체가 바이러스에 감염되면 전신성 염증반응이 일어나면서 다양한 종류의 사이토카인이 분비된다(34). 따라서 감염부위에서 일어나는 염증반응에서 사이토카인이 큰 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다. 사이토카인은 단백질이므로 특정 사이토카인을 검출하기 위해서 항원-항체 반응을 이용할 수 있다. 본 연구에서는 항원-항체 반응을 응용한 기법인 sandwich ELISA의 원리를 이용한 Human XL Cytokine Array 키트를 사용하여 증상의 심각성에 따라 환자의 혈청 속에 있는 102가지 사이토카인의 발현 양이 어떻게 달라지는 지를 알아보았다. 서울대 의과대학으로부터 병원성이 없음이 확인된 환자의 혈청을 제공받았으며 제공받은 혈청 정보는 다음과 같다(표 4). 막과 각 혈청에 있는 사이토카인을 반응시킨 뒤 그 양을 검출기로 확인하고 사이토카인이 반응한 양에 따른 신호 강도를 수치화시켜주는 프로그램인 ImageJ를 이용하여 각 신호를 수치화한 뒤 대조군과 비교하여 분석한다(그림 3). 102가지의 사이토카인 중 유의미한 정도로 증가하였거나 감소한 다음의 15가지의 사이토카인에 한하여 혈청의 채취 일에 따른 사이토카인의 변화를 분석하였다. 그 결과 지속감염 환자 및 가벼운 증상의 환자와 심각한 증상의 환자가 비슷한 정도의 사이토카인을 발현하는 경우, 지속감염환자가 중증 환자와 비슷한 정도의 사이토카인을 발현하는 경우, 발병 초기에는 각 환자들이 비슷한 발현 양을 보이다 시간 경과에 따라 지속감염환자에서 사이토카인의 양이 증가 또는 감소하는 경우, 가벼운 증상의 환자와 심각한 증상의 환자에 비하여 지속감염환자에서만 특이적으로 사이토카인이 많이 발현하였거나

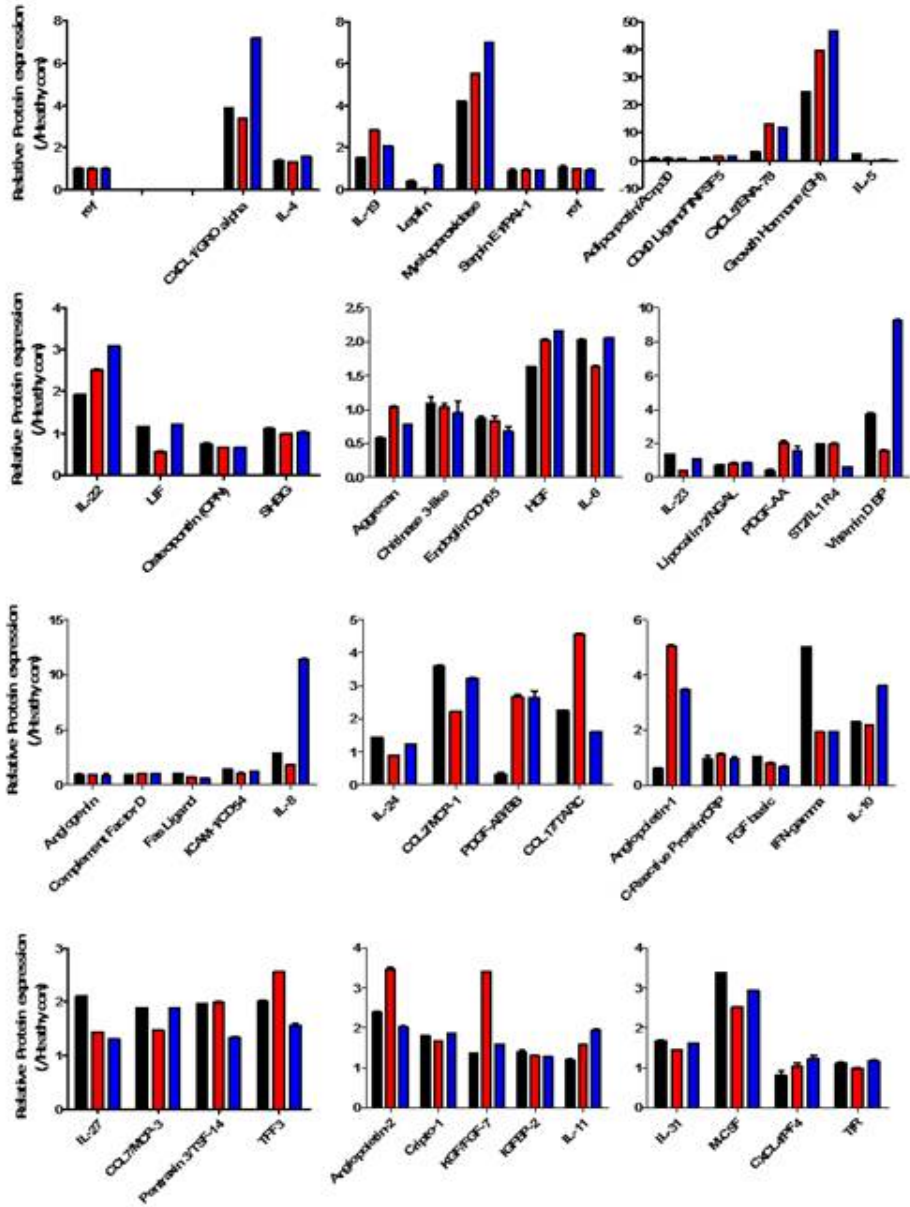
적게 발현하는 경우, 지속감염환자의 발병기간동안 발현하는 사이토카인이 일정하지 않은 경우와 같은 5가지의 유형을 확인 할 수 있었다(그림 4). 첫 번째 유형인 경증, 중증 및 지속감염환자 모두에서 비슷한 정도로 발현하는 사이토카인으로 보체를 활성화시키고 면역세포를 유도하는 C5a(Complement component 5a), 대표적인 면역반응에 관여하는 사이토카인인 CD14, 손상된 조직에서 염증 및 세포자살 경로를 조절하는데 관여하는 GDF-15(Growth differentiation factor 15)가 있었고 이들은 대조군이 발현하고 있는 양보다 항상 더 높은 정도로 발현하고 있음을 확인 할 수 있었다(그림 4A)(35-37). 다음으로 가벼운 증상을 보인 환자와는 달리 심각한 증상을 보인 환자와 지속감염환자에서 비슷한 수준으로 발현하는 사이토카인으로 근래에 염증반응과 관련성이 밝혀지고 있는 Leptin, 내재면역반응 경로의 중간물질과 상호작용하는 ST2 그리고 대식세포의 활성화와 관련성이 알려지고 있는 Vitamin D BP(binding protein)이 있음을 알 수 있었다(38-41). Leptin은 중증 및 지속감염환자에서 대조군 및 가벼운 증상의 환자가 발현하는 양보다 현격히 적은 양을 발현하였고 ST2는 반대로 대조군 및 경증 환자의 경우보다 높은 수준으로 발현하는 경향을 보였다. Vitamin D BP는 가벼운 증상을 보인 환자에서만 증가된 양상을 보였다(그림 4B). 백혈구를 염증부위로 유도하는 사이토카인인 CCL5은 지속감염환자에서 초기에는 다른 환자 및 대조군의 혈청에서 발현하는 양과 비슷한 수준이었다가 시간경과에 따라 점점 감소하는 경향을 보였고 면역체계를 활성화 하는 물질인 uPAR는 초기에 비해 증가하는 경향을 보여주었다(그림 4C)(42, 43). 염증반응과 연관되어 있다고 알려진 Resistin은 가벼운 증상 또는 심각한 증상을 보인 환자에서만 대조군 및 지속감염환자에 비해 많이 발현되었고 B 림프구를 활성화 시키는 BAFF는 지속감염환자에서만 특이적으로 많이 발현하고 있었다(그림 4D)(44, 45). 마지막으로 면역반응,

세포자살 등과 관련된 사이토카인인 Fit-3 Ligand, CXCL9, CXCL10, CD30과 면역계로 수지상세포 등을 유도한다고 밝혀진 CCL19은 지속 감염환자에서만 발현의 증감이 반복되는 현상을 보였음을 확인 할 수 있었다(그림4E)(46-50). 따라서 본 실험을 통해 메르스 환자들에서 분비되는 다양한 사이토카인이 면역반응과 연관성이 있다는 것을 확인 할 수 있었으며 병중의 경중에 따라서 분비되는 사이토카인의 발현 경향성이 달라진다는 것을 확인 할 수 있었다.

표 4. 메르스 환자 혈청 정보

환자	발병일	혈청 채취일	경과일
지속감염환자	2015-06-02	2015-07-06	35
		2015-07-15	44
		2015-08-10	70
		2015-09-01	92
		2015-09-10	101
		2015-09-28	119
		2015-10-30	151
		2015-11-09	161
중증 환자	2015-06-02	2015-06-09	8
		2015-06-18	17
		2015-06-24	23
		2015-07-02	31
경증 환자	2015-06-03	2015-06-11	9
		2015-06-15	13
		2015-06-22	20

지속감염환자
 중증환자
 경증환자



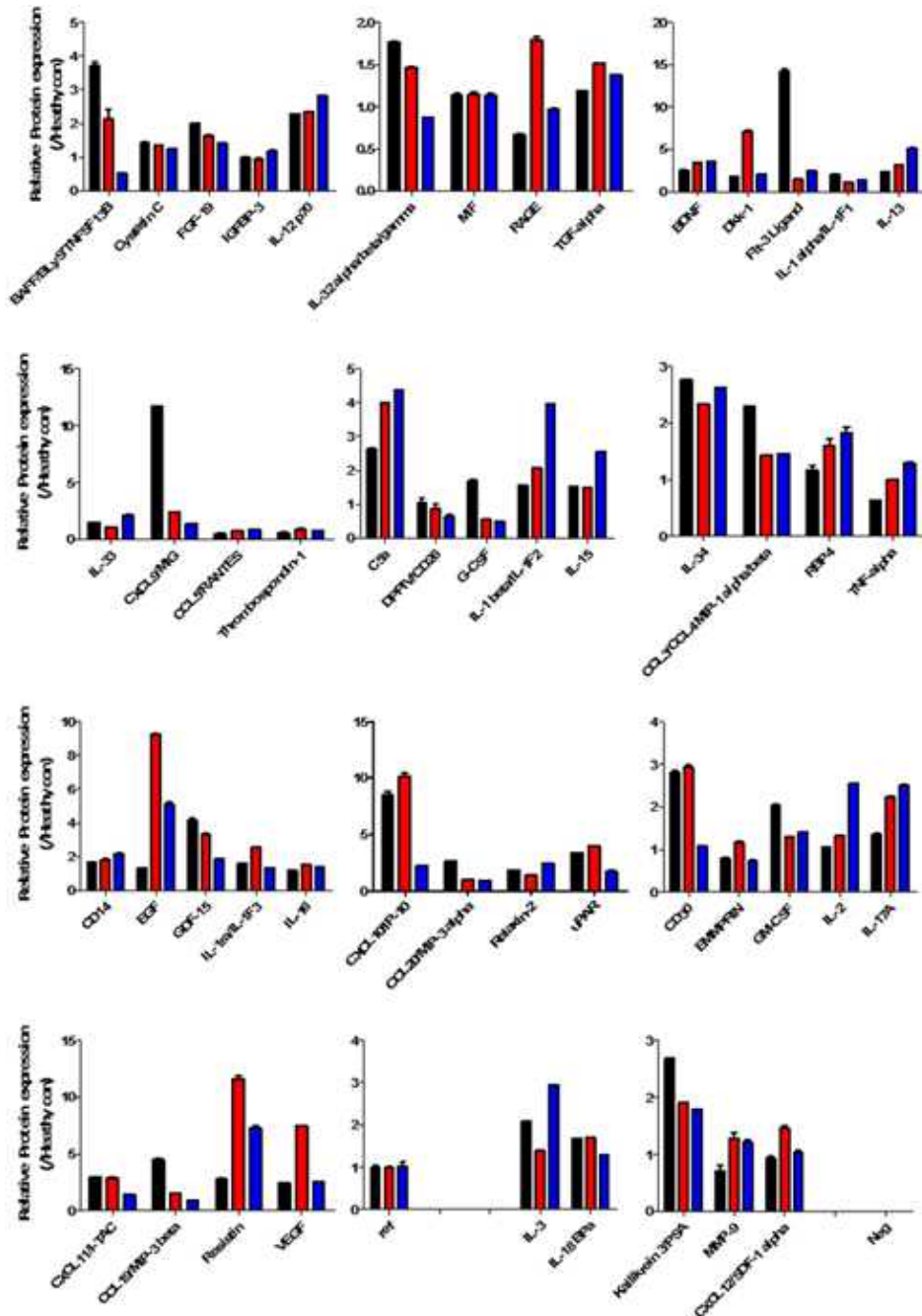
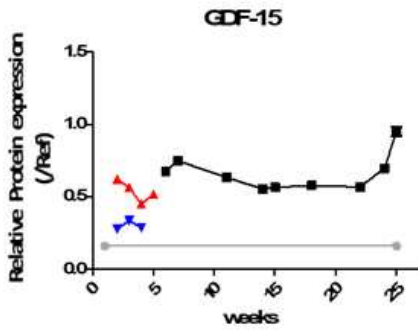
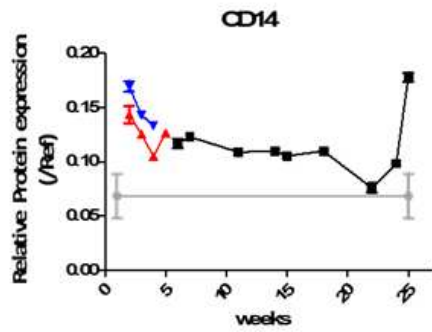
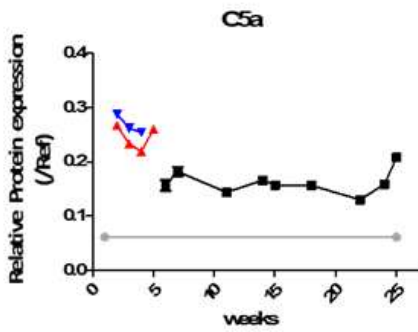


그림 3. 증상에 따른 메르스 환자의 사이토카인 발현

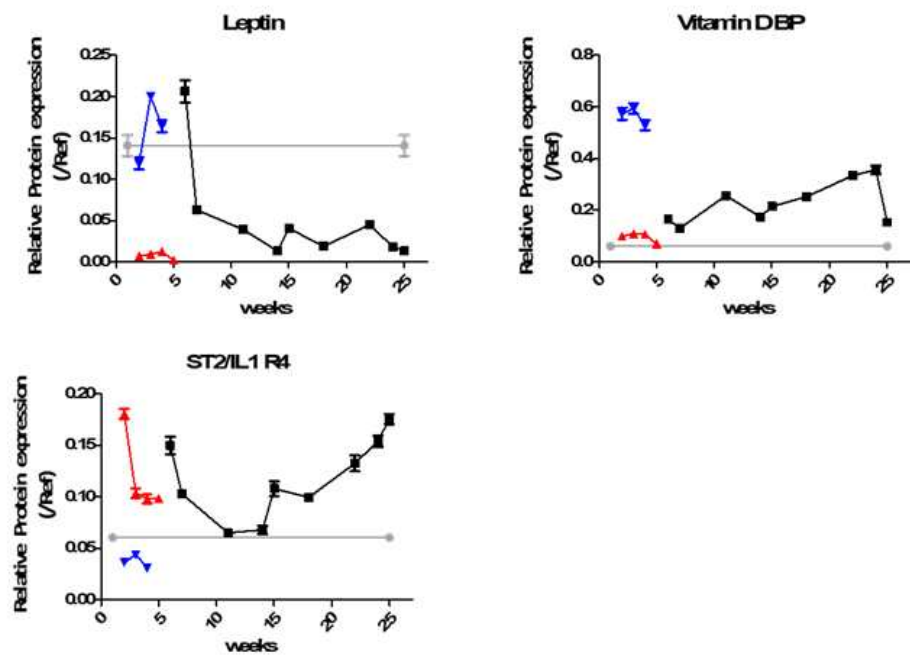
경증, 중증, 지속감염환자의 혈청 내 사이토카인의 발현 양을 Human XL Cytokine Array 키트로 측정하여 ImageJ로 수치화 한 뒤, 대조군에서 발현한 사이토카인의 양을 1이라고 할 때 각 환자에서 발현하는 사이토카인의 상대값을 계산하여 그래프로 나타내었다.

- 대조군
- 지속감염환자
- ▲— 중증환자
- ▼— 경증환자

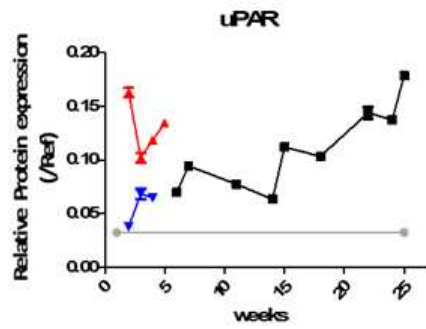
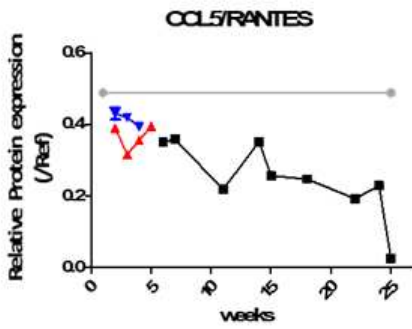
A



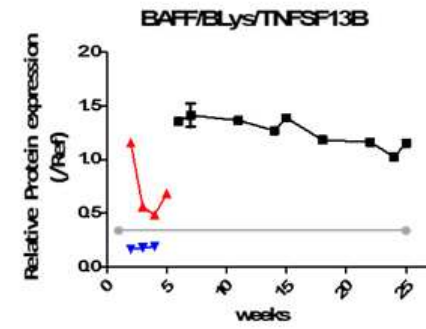
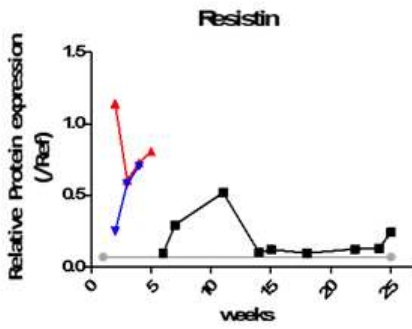
B



C



D



F

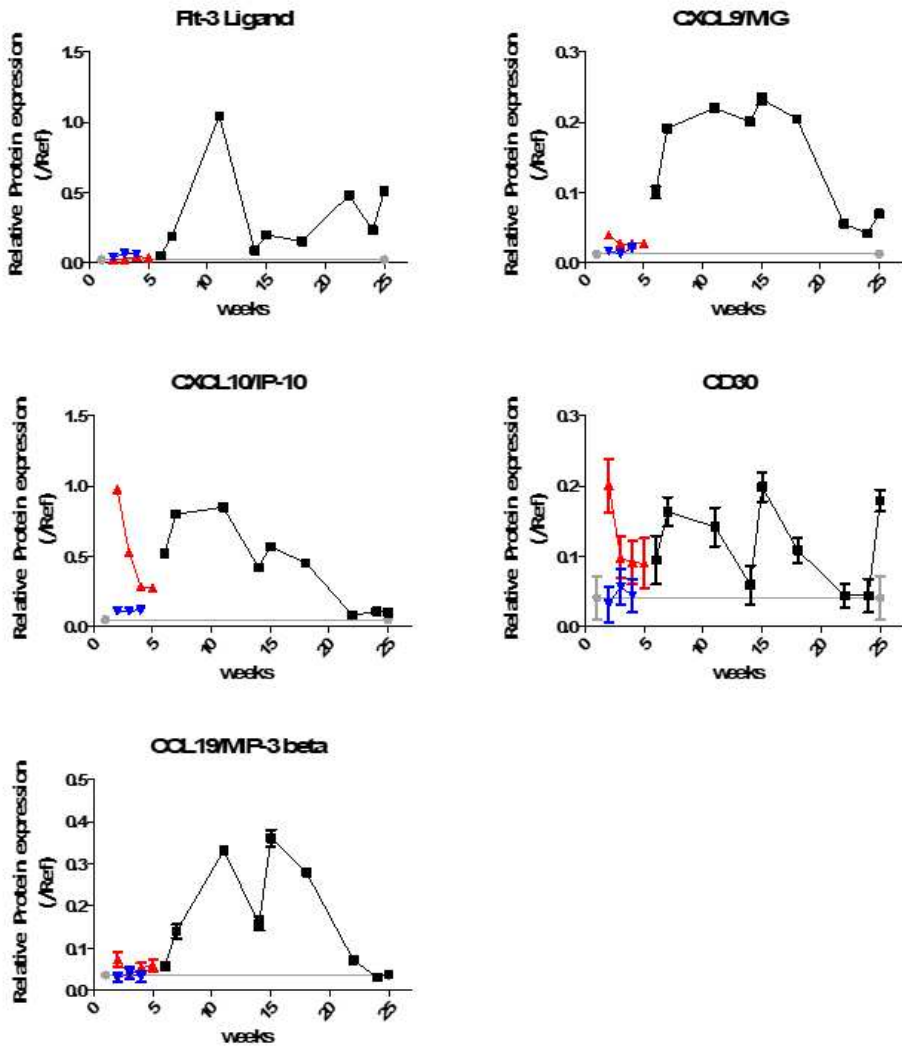


그림 4. 시간 경과에 따른 증상별 메르스 환자의 사이토카인 발현

대조군과 비교한 메르스 환자의 혈청 내 사이토카인의 발현 양이 유의미하게 증가 또는 감소한 15가지 사이토카인을 유형별로 분석하였다. 모든 환자가 비슷한 정도의 사이토카인을 발현하는 경우(A), 지속감염환자와 중증 환자가 비슷한 정도의 사이토카인을 발현하는 경우(B), 발병 초기에는 각 환자들이 비슷한 발현 양을 보이다 시간 경과에 따라 지속감염환자에서 사이토카인의 양이 증가 또는 감소하는 경우(C), 지속감염환자에서만 특이적으로 사이토카인이 증가 또는 감소한 경우(D), 지속감염환자의 발병기간동안 사이토카인의 발현이 불규칙한 경우(E)와 같은 5가지의 유형을 확인 할 수 있다.

4. 고찰

박테리아 및 바이러스로 인한 전염병은 과거에서부터 현재까지 인간의 생존에 문제가 되어 왔으며 점점 그 심각성이 대두되고 있다. 코로나바이러스는 개, 돼지, 조류뿐만 아니라 사람도 감염시켜 병을 일으키는 바이러스이다. 기존에 발견되었던 코로나바이러스의 경우 사람에게 감염되었을 시 콧물, 기침, 열 등 가벼운 코감기 증상을 보이며 대부분 시간의 경과에 의해 자연스럽게 치유되는 사례가 많았으나 2003년 사스 코로나바이러스의 중간 전염 및 전 세계적인 확산과 10%에 달하는 치사율은 코로나바이러스의 위험성을 보여주는 계기가 되었다(51). 근래에는 메르스 코로나바이러스까지 새롭게 발견되어 중동지역을 포함한 다양한 지역에서 감염환자가 나타났으며 30%가 넘는 치사율을 보였고 현재까지도 메르스 의심환자가 나타나고 있어 날로 코로나바이러스의 위험성이 커지고 있음을 확인할 수 있다(52). 이러한 위험성을 해결하기 위해 현재까지 많은 연구가 진행되고 있다. 메르스 또한 치료를 위한 백신 개발 연구와 바이러스에 대한 연구가 수행되었으나 아직까지도 바이러스에 대한 직접적인 치료법이 개발되어 있지 않고 인터페론을 투여하는 대증요법을 이용한 치료법이 유일한 치료법으로 알려져 있으며 바이러스 자체에 대한 연구도 바이러스의 분류학적인 측면에서의 연구와 PLpro나 3CLpro와 같은 바이러스의 특정 단백질에 대해서만 연구가 이루어져 있다(9-12, 53, 54). 현재까지 메르스 코로나바이러스가 발현하는 단백질의 기능에 대해서 많은 부분이 밝혀지지 않았거나 유전자 서열 분석 비교를 통한 기능을 예상하는 정도의 상태로 남겨져 있기에 메르스 코로나바이러스에 대하여 보다 심도 있는 연구가 계속되어야 한다. 이를 실행하기 위해서는 메르스 코로나바이러스 단백질의 발현이 필수적이라고 할 수 있으나

메르스 코로나바이러스의 단백질을 발현하기 위한 DNA 라이브러리가 지금까지 제작되어 있지 않았다. 따라서 본 연구에서 메르스 코로나바이러스의 단백질 코딩 DNA 라이브러리를 최초로 구축하였다. 특히 본 연구에서 제작한 라이브러리에 사용된 벡터인 pENTR/D-TOPO 벡터는 attL 염기서열을 가지는 entry clone으로 attR 염기서열을 가지는 destination 벡터와 LR 반응하여 발현 벡터를 제작할 수 있다. Gateway 클로닝이라 불리는 이 방법은 기존의 복제 방법에 비해 쉽고 간편하게 자신이 원하는 특성을 가진 destination 벡터에 목표하는 메르스 코로나바이러스의 단백질 유전자를 삽입할 수 있다(33). 본 연구에서도 구축한 DNA 라이브러리를 활용하여 아미노기에 HA가 추가된 메르스 코로나바이러스의 단백질 발현을 확인할 수 있었다. 이 뿐만 아니라 본 연구에서 제작한 라이브러리를 이용하여 다양한 벡터에 바이러스 단백질 유전자를 삽입함으로써 다양한 특성을 바이러스 단백질에 부여할 수 있다. 이를 통해 동물 세포나 박테리아 등에서 발현한 바이러스 단백질을 연구할 수 있을 것이며 각 단백질의 기능을 추정하는 수준에서 벗어나 직접적으로 단백질의 기능을 확인할 수 있는 등 더욱 심화된 메르스 연구를 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 발현한 단백질을 이용하여 바이러스 단백질과 상호작용하는 다양한 단백질에 대한 정보를 구축하는데 이용할 수 있고 박테리아에서의 단백질 발현을 통해 항체 제작 및 크리스탈 구조를 파악하는 연구에도 활용할 수 있을 것이다. 다만 본 연구에서 RNA의 한정된 양과 5kbp가 넘는 큰 크기로 인해 제작의 어려움이 많았던 nsp3를 최종적으로 제작하지 못하였지만 다행히 다른 단백질들에 비해 단백질 발현을 통한 연구가 상당 수준 진행되어 있었기에 nsp3를 연구하는데 무리가 없을 것으로 보인다. 다만 향후 바이러스 RNA의 확보나 다른 연구자들로부터 공여받은 벡터를 통해 nsp3 유전자가 삽입된 pENTR/D-TOPO 벡터의 제작이 필수적으로 진행되어야

할 것이다. 또 인공적으로 합성한 유전자의 경우 메르스 코로나바이러스의 기원종인 Human β -coronavirus 2c EMC/2012의 염기서열 (JX869059.2)을 토대로 제작하였는데 환자에서 추출한 RNA로 만든 유전자의 경우 그 비율이 극히 적으나 기원종과 비교해보면 돌연변이가 발생한 것을 확인 할 수 있다. 프라이머 역시 기원종의 염기서열을 참고하였기에 ORF4a에서 돌연변이가 발생한 것을 관찰할 수 있다. 추후 통일성 있는 연구를 위해 점돌연변이를 유도하여 한 가지 종으로 DNA 염기서열을 정리해야 할 것이다. 또 본 연구에서 일부 수행하였으나, 구축된 라이브러리를 활용한 발현 벡터의 제작과 이 발현 벡터를 이용한 세포에서 바이러스 단백질 발현을 추후 연구를 통해 반드시 확인해야 할 것이다.

사이토카인 분석 키트를 이용하여 대조군과 비교해 가벼운 증상 및 심각한 증상의 환자 그리고 지속감염환자의 혈청을 분석한 결과 다양한 사이토카인에서 주로 발현하는 사이토카인의 종류와 그 발현하는 양이 차이가 있음을 확인 할 수 있었다. 이 중 대조군과 비교하여 차이가 나는 사이토카인 대부분이 염증 및 면역반응과 연관되어 있다는 것을 알 수 있고 이는 메르스 코로나바이러스의 감염이 주된 원인이라고 볼 수 있다. 지금까지 메르스 코로나바이러스에 감염됐을 때와 비슷한 증상을 보인다고 알려진 사스 환자에서 보여지는 면역반응이 메르스 환자에서도 비슷한 경향성을 보이는지 정확히 연구된 바가 없다. 하지만 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS) 환자에서 증가하는 경향을 보이는 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)인 IL-1b, IL-8, IL-6, CXCL10, CCL2이 사스 코로나바이러스에 감염된 환자에서도 증가하는 경향을 보인다고 연구 되었고 본 연구에서 분석한 메르스 환자의 결과에서도 모든 환자군에서 대조군에 비해 CCL2와 CXCL10 등이 약 2배 이상 증가해 있음을 확인함으로써 사스와 메르스 상호간의 비슷한 반응을 관찰할 수

있었다(55). 또 지속감염환자의 경우 CXCL10이 대조군이 분비하는 양에 비해 크게 증가해 있음을 확인 할 수 있었다. 사스 환자의 경우에서도 가벼운 증상을 보여 빠르게 회복한 환자와 사망에 이른 심각한 증상의 환자가 모두 나타나는 것을 확인 할 수 있는데 두 그룹의 환자 모두에서 초기에 IFN- α , IFN- γ , CXCL10, CCL2 및 ISG들의 증가가 보였으나 회복한 환자의 경우 이후 적응면역반응과 관련된 유전자의 발현이 증가한 것에 반해 사망한 환자에서는 계속적으로 CXCL10, CCL2 및 ISG(interferon-stimulated genes)의 발현이 높은 수준으로 유지되었다고 보고되고 있다(56-58). 이는 중증환자의 경우 선천성 면역반응에서 적응면역으로의 전환이 원활하지 않았다는 것을 암시한다. 본 연구에서 지속감염환자에서 CXCL10이 시간경과에도 불구하고 계속적으로 대조군이 분비하는 양에 비해 그 발현 양이 증가해 있음을 보였고 또 다른 선천성면역반응으로 인한 사이토카인인 CXCL9 역시 마찬가지로 시간이 경과하였음에도 불구하고 증가된 양상을 확인 할 수 있었다. 이는 사스 코로나바이러스에 감염되어 심각한 증상을 보인 환자와 마찬가지로 선천성면역반응에서 적응면역으로의 전환이 잘 일어나지 않았음을 유추할 수 있다. 본 연구에서 밝힌 환자와 대조군에서 유의미한 차이가 있어 보이는 사이토카인에 대해 추후 ELISA를 이용하여 각 혈청에 대한 심층적인 분석 또한 필요 할 것이다. 또 본 연구가 좀 더 통계적으로 유의미한 값을 가지기 위해서는 더 많은 환자들의 검체를 확보할 필요가 있다. 그럼에도 각 환자들에서 기존의 연구보다 다양한 사이토카인의 분비를 확인하였고 그 중 면역 및 염증반응과 관련된 사이토카인의 변화를 확인 할 수 있었으며 경증 및 중증 사스 환자에서 보이던 경향성을 메르스 환자에서도 확인할 수 있었다는데 본 연구의 의의가 있다.

5. 참고문헌

1. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *The New England journal of medicine*. 2012;367(19):1814–20.
2. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol*. 2013;87(14):7790–2.
3. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet (London, England)*. 2015;386(9997):995–1007.
4. de Wit E, van Doremalen N, Falzarano D, Munster VJ. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature reviews Microbiology*. 2016;14(8):523–34.
5. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*. 2012;3(6):e00473–12.
6. Lin MH, Chuang SJ, Chen CC, Cheng SC, Cheng KW, Lin CH, et al. Structural and functional characterization of MERS coronavirus papain-like protease. *Journal of biomedical science*. 2014;21:54.
7. Lokugamage KG, Narayanan K, Nakagawa K, Terasaki K, Ramirez SI, Tseng CT, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus nsp1 Inhibits Host Gene Expression by Selectively Targeting mRNAs Transcribed in the Nucleus while Sparing mRNAs of Cytoplasmic Origin. *J Virol*. 2015;89(21):10970–81.
8. Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR, 3rd, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol*.

2009;83(19):10314–8.

9. Mielech AM, Kilianski A, Baez–Santos YM, Mesecar AD, Baker SC. MERS–CoV papain–like protease has deISGylating and deubiquitinating activities. *Virology*. 2014;450–451:64–70.

10. Lundin A, Dijkman R, Bergstrom T, Kann N, Adamiak B, Hannoun C, et al. Targeting membrane–bound viral RNA synthesis reveals potent inhibition of diverse coronaviruses including the middle East respiratory syndrome virus. *PLoS pathogens*. 2014;10(5):e1004166.

11. Stobart CC, Sexton NR, Munjal H, Lu X, Molland KL, Tomar S, et al. Chimeric exchange of coronavirus nsp5 proteases (3CLpro) identifies common and divergent regulatory determinants of protease activity. *J Virol*. 2013;87(23):12611–8.

12. Tomar S, Johnston ML, St John SE, Osswald HL, Nyalapatla PR, Paul LN, et al. Ligand–induced Dimerization of Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus nsp5 Protease (3CLpro): IMPLICATIONS FOR nsp5 REGULATION AND THE DEVELOPMENT OF ANTIVIRALS. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(32):19403–22.

13. Al–Mulla HM, Turrell L, Smith NM, Payne L, Baliji S, Zust R, et al. Competitive fitness in coronaviruses is not correlated with size or number of double–membrane vesicles under reduced–temperature growth conditions. *MBio*. 2014;5(2):e01107–13.

14. Xiao Y, Ma Q, Restle T, Shang W, Svergun DI, Ponnusamy R, et al. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer–independent RNA polymerase activity. *J Virol*. 2012;86(8):4444–54.

15. Subissi L, Posthuma CC, Collet A, Zevenhoven–Dobbe JC, Gorbalenya AE, Decroly E, et al. One severe acute respiratory syndrome coronavirus protein complex integrates processive RNA polymerase and exonuclease activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

2014;111(37):E3900–9.

16. Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol.* 2004;78(11):5619–32.

17. Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, et al. Infidelity of SARS–CoV Nsp14–exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS pathogens.* 2010;6(5):e1000896.

18. Cao J, Zhang X. Comparative in vivo analysis of the nsp15 endoribonuclease of murine, porcine and severe acute respiratory syndrome coronaviruses. *Virus research.* 2012;167(2):247–58.

19. Raj VS, Mou H, Smits SL, Dekkers DH, Muller MA, Dijkman R, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus–EMC. *Nature.* 2013;495(7440):251–4.

20. Surya W, Li Y, Verdia–Baguena C, Aguilera VM, Torres J. MERS coronavirus envelope protein has a single transmembrane domain that forms pentameric ion channels. *Virus research.* 2015;201:61–6.

21. Lui PY, Wong LY, Fung CL, Siu KL, Yeung ML, Yuen KS, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus M protein suppresses type I interferon expression through the inhibition of TBK1–dependent phosphorylation of IRF3. *Emerging microbes & infections.* 2016;5:e39.

22. Chan JF, Lau SK, To KK, Cheng VC, Woo PC, Yuen KY. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS–like disease. *Clinical microbiology reviews.* 2015;28(2):465–522.

23. Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS–CoV and other coronaviruses. *Antiviral research.* 2014;109:97–109.

24. Yang Y, Zhang L, Geng H, Deng Y, Huang B, Guo Y, et al. The structural and accessory proteins M, ORF 4a, ORF 4b, and ORF 5 of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS–CoV) are potent

interferon antagonists. *Protein & cell*. 2013;4(12):951.

25. Yang X, Chen X, Bian G, Tu J, Xing Y, Wang Y, et al. Proteolytic processing, deubiquitinase and interferon antagonist activities of Middle East respiratory syndrome coronavirus papain-like protease. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 3):614–26.

26. Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood*. 1997;89(3):910–8.

27. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;162(8):4511–20.

28. Josset L, Menachery VD, Gralinski LE, Agnihothram S, Sova P, Carter VS, et al. Cell host response to infection with novel human coronavirus EMC predicts potential antivirals and important differences with SARS coronavirus. *MBio*. 2013;4(3):e00165–13.

29. Selinger C, Tisoncik-Go J, Menachery VD, Agnihothram S, Law GL, Chang J, et al. Cytokine systems approach demonstrates differences in innate and pro-inflammatory host responses between genetically distinct MERS-CoV isolates. *BMC genomics*. 2014;15(1):1161.

30. Assiri A, Al-Tawfiq JA, Al-Rabeeh AA, Al-Rabiah FA, Al-Hajjar S, Al-Barrak A, et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(9):752–61.

31. Faure E, Poissy J, Goffard A, Fournier C, Kipnis E, Titecat M, et al. Distinct immune response in two MERS-CoV-infected patients: can we go from bench to bedside? *PloS one*. 2014;9(2):e88716.

32. Bermejo-Martin JF, de Lejarazu RO, Pumarola T, Rello J,

- Almansa R, Ramirez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Critical Care*. 2009;13(6):R201.
33. Xu R, Qingshun LQ. Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway-TOPO vector system. *Plant Methods*. 2008;4(1):4.
34. Grunfeld C, Pang M, Doerrler W, Shigenaga J, Jensen P, Feingold K. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1992;74(5):1045-52.
35. Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. Complement component 5a (C5a). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(11):2114-7.
36. Zimmers TA, Jin X, Hsiao EC, McGrath SA, Esquela AF, Koniaris LG. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock*. 2005;23(6):543-8.
37. Kirkland TN, Viriyakosol S. Structure-function analysis of soluble and membrane-bound CD14. *Progress in clinical and biological research*. 1998;397:79-87.
38. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394(6696):897-901.
39. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(4):437-46.
40. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature immunology*. 2004;5(4):373-9.

41. Malik S, Fu L, Juras DJ, Karmali M, Wong BY, Gozdzik A, et al. Common variants of the vitamin D binding protein gene and adverse health outcomes. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2013;50(1):1–22.
42. Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *European journal of immunology*. 1996;26(2):315–9.
43. Thun ϕ M, Macho B, Eugen–Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. *Disease markers*. 2009;27(3–4):157–72.
44. Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer J–L, Holler N, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(11):1747–56.
45. Kusminski CM, da Silva NF, Creely SJ, Fisher FM, Harte AL, Baker AR, et al. The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(1):270–6.
46. Tensen CP, Flier J, van der Raaij–Helmer EM, Sampat–Sardjoepersad S, van der Schors RC, Leurs R, et al. Human IP–9: a keratinocyte–derived high affinity CXC–chemokine ligand for the IP–10/Mig receptor (CXCR3). *Journal of investigative dermatology*. 1999;112(5):716–22.
47. Fathi AT, Chen Y–B. Treatment of FLT3–ITD acute myeloid leukemia. *Am J Blood Res*. 2011;1(2):175–89.
48. Kocob AJ, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins as intracellular signaling intermediates. *FEBS journal*. 2016;283(2):221–31.
49. Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, F \ddot{u} rster R, et al. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B–cell position. *Nature*. 2002;416(6876):94–9.
50. Robbiani DF, Finch RA, J \ddot{u} nger D, Muller WA, Sartorelli AC, Randolph GJ. The Leukotriene C 4 Transporter MRP1 Regulates CCL19

(MIP-3 β , ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Cell*. 2000;103(5):757-68.

51. Peiris J, Lai S, Poon L, Guan Y, Yam L, Lim W, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*. 2003;361(9366):1319-25.

52. Group WM-CR. State of knowledge and data gaps of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in humans. 2013.

53. Zhang N, Jiang S, Du L. Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines. *Expert review of vaccines*. 2014;13(6):761-74.

54. Du L, Kou Z, Ma C, Tao X, Wang L, Zhao G, et al. A truncated receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein potently inhibits MERS-CoV infection and induces strong neutralizing antibody responses: implication for developing therapeutics and vaccines. *PloS one*. 2013;8(12):e81587.

55. Binnie A, Tsang JL, dos Santos CC. Biomarkers in acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care*. 2014;20(1):47-55.

56. Baas T, Taubenberger JK, Chong PY, Chui P, Katze MG. SARS-CoV virus-host interactions and comparative etiologies of acute respiratory distress syndrome as determined by transcriptional and cytokine profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of interferon & cytokine research*. 2006;26(5):309-17.

57. Kong SL, Chui P, Lim B, Salto-Tellez M. Elucidating the molecular physiopathology of acute respiratory distress syndrome in severe acute respiratory syndrome patients. *Virus research*. 2009;145(2):260-9.

58. Tang NL-S, Chan PK-S, Wong C-K, To K-F, Wu AK-L, Sung Y-M, et al. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clinical chemistry*. 2005;51(12):2333-40.

Abstract

Construction of MERS–CoV protein–coding DNA library and analysis of the immune response in MERS patients

Han Byul Park

Biological Science

The Graduate School

Seoul National University

MERS–CoV (middle east respiration syndrome coronavirus) was first reported in Saudi Arabia in 2012 and it has spread to several other countries. It is a high pathogenic virus and develops severe viral respiration illness, including fever, cough, and even death to humans. It is believed that MERS–CoV was derived from bats, and camels are the mediators of the virus to humans. It is known that close contact with an infected person spreads the virus to other humans. There is no specific treatment or vaccine presently, but many researchers are trying to develop treatments and vaccines. One of the ways to treat

MERS is inhibiting the activity of the viral protein. Therefore, identifying the role of each viral protein becomes important, however, function of the viral proteins is partially uncovered and most of the known viral protein characters are assumed by analyzing conserved DNA sequence among Coronaviridae Family. This study firstly constructs the DNA library, encodes 16 non-structural proteins, 4 structural proteins and 5 accessory proteins of MERS-CoV and confirms the expression of E, M and N protein in mammalian cells.

In this study, I wanted to find out how cytokine expression profile changes in serum of MERS patients and how differently cytokines are secreted depending on the severity of the illness. Various cytokines, related with immune response and inflammation such as CXCL10, CCL2, are detected in the serum of MERS patients, as well as in the serum of ARDS (Acute respiratory distress syndrome) patients. Like SARS (severe acute respiratory syndrome) patients, MERS patients show symptoms from mild to severe. This research found that cytokine expression profile changes depending on the severity of the illness and analyze cytokine expression of a patient who shows persistent viral infection, only in an isolated example in South Korea. This patient showed increased levels of CXCL9 and CXCL10 in the serum, which means conversion from innate immune response to adaptive immune response hardly succeeded.

This study constructs the MERS-CoV DNA library, essential for the virus research, so it would serve as the basis for future

studies. Data, cytokine expression profile depending on the severity of the illness, will also provide basic information, therefore our understanding of MERS-CoV will much more developed and in-depth.

**Keywords : MERS, MERS-CoV, immune response, DNA library,
cytokine**

Student Number : 2015-20435