생명과학캡스톤 PBL 연구제안서

생명과학과 2017044120 남희정

과제명 : macrophage의 형질전환 유도

1. 연구의 목표 및 내용

macrophage의 분극화와 전환 기작에 대해 안다. macrophage는 M1 혹은 M2로 분극화되고 전화된다. M1은 전염증성 마크로파지로 IFN-χ와 LPS에 의해 분극화되고, M2는 항염증성 마크로파지로 IL-4, IL-13, IL-10 등에 의해 분극화된다. 이렇게 차이가 있는 두 마크로파지를 구별하기 위해 M1과 M2을 정확히 구분할 수 있도록 세포 마커를 더 찾는다. mouse와 human에 차이가 있으므로 그 차이에 대한 연구도 필요하다. 염증성 질환에서 macrophage의 형질전환을 위한 적절한 target을 찾는다. 또한 각각의 염증성 질환에 대해 macrophage의 분극화와 분극화 된 macrophage의 면역조절에 대해 살펴본다.

2. 연구의 필요성

macrophage를 적절한 시기에 형질전환을 유도할 수 있다. macrophage는 분극화하고 전환하므로 분극화를 조절하는 전사인자를 통해 형질전환을 유도할 수 있을 것이다. macrophage의 형질전환을 원하는 시기에 유도할 수 있다면 다양한 질환의 치료에 도움이 된다.

3. 연구의 추진전략 및 방법

분극화를 조절하는 전사인자들에 알고 적절한 타겟을 설정해 형질전환이 일어나는지 screening 실험을 진행한다. 또한 human macrophage 마커를 찾는다. mouse 실험뿐아니라 인간을 대상으로 임상실험을 진행하여 의미있는 결과를 도출한다.

4. 연구결과의 중요성

면역 환경에 대한 심도깊은 이해를 바탕으로 다양한 염증성 질환의 치료에 도움이 된다.

5. 참고문헌

이욱빈(2017). 급성, 만성 염증에서의 마크로파지 분극화(Macrophage polarization in acute and chronic inflammation). BRIC View 2017-T19. Available from https://www.ibric.org/myboard/read.php?Board=report&id=2740 (May 18, 2017)

생명과학캡스톤PBL
연구제안서

생명과학과 2019037510 장성우

과제명	국문	Erythropoietin과 neuropeptide가 multiple sclerosis에 시너지 효과가 있는지, 그리고 재조합 C. reinhardtii 를 이용한 두 펩타이드의 대량생산에 관한 연구
	영문	A study on the synergistic effect of Erythropoietin and Neuropeptide on multiple sclerosis and the mass production of the peptides using recombinant C. reinhardtii.

1. 연구의 목표 및 내용

Erythropoietin과 특정 neuropeptide를 같이 처리하여 Multiple sclerosis 등 neuronal disease에 효과가 있는지 확인한다. 이후 형질 전환된 C. reinhardtii UVM4 세포주를 사용하여 Erythropoietin과 특정 neuropeptide를 생산하는 것이 최종 연구 목표이다.

Erythropoietin은 neuroprotection 기능을 하는 물질로 알려져 있다 [참고문헌 1]. 또한, neuropeptide는 neuronal disease인 multiple sclerosis (MS)에 효과가 있을 것이라는 연구가 많이 진행되어 있는데, 이를 바탕으로 erythropoietin과 여러 neuropeptide가 MS 등 neuronal disease에서 시너지 효과를 가지는지 확인한다.

Erythropoietin과 neuropeptide를 저비용으로 생산하기 위해 Chlamydomonas reinhardtii UVM4 세포주에 EPO gene (erythropoietin gene for human)과 neuropeptide의 gene을 삽입하여 erythropoietin과 neuropeptide 생성이 가능한 돌연변이를 만든다.

2. 연구의 필요성

Multiple sclerosis (MS)는 immune cells에 의해 brain에 damage가 생기는 질병이다. 다양한 neuropeptide가 MS의 model disease인 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)에 효과가 있다는 것이 확인되었다 [참고문헌 2]. Erythropoietin은 neuroprotection 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 [참고문헌 1]. 따라서 이 두 약물을 동시에 처리하였을 때 MS의 완화에 시너지 효과가 날 수 있을 것이며, MS에 대한 더 좋은 치료제로 활약할 수 있을 것이다.

현재 세포 치료제, 디지털 치료제 등의 새로운 치료제가 개발되고 있지만 상대적으로 저렴한 peptide therapeutics 시장은 계속 증가하고 있으며, [참고문헌 3] 2020년 약 370조 원이던 시장은 2030년까지 약 740조 원까지 오를 것으로 전망된다 [참고문헌 4].

재조합 미세조류를 이용한 peptide 치료제 생산의 장점은 저렴하다는 것이다. 아직 효율이 높지 않지만, 미세조류의 배양환경 등을 조절하는 다양한 연구가 현재 진행되고 있어 큰 기대가 있으며, Haematococcus pluvialis를 이용한 astaxanthin 생성이 현재 대표적으로 이루어지고 있다 [참고문헌 5]. 이러한 재조합 미세조류의 특성을 이용하여 erythropoietin과 neuropeptide를 저렴한 가격에 대량으로 생산할 수 있다.

3. 연구의 추진전략 및 방법

우선 Erythropoietin과 neuropeptide가 synergy 효과가 있다는 것을 확인해야 한다. EAE mice에 다양한 neuropeptide를 처리한 실험이 이미 많은 논문으로 출판되어 있으므로, EAE mice에 erythropoietin과 neuropeptide를 동시에 처리하여 disease score 감소에 시너지 효과가 있는지 확인해 보는 과정이 필요하다.

미세조류인 C. reinhardtii에 EPO gene과 neuropeptide의 gene을 삽입하여 배양한 후 실제로 미세조류가 erythropoietin과 특정 neuropeptide를 생산하는지 확인 후 효율을 계산해 보는 과정이 필요하다.

4. 연구결과의 중요성

Erythropoietin이나 neuropeptide를 단독으로 EAE mice에 처리하였을 때보다 동시에 처리하였을 때 disease를 훨씬 많이 저해하였다면 두 peptide는 시너지 효과가 있는 것이다. 이 경우 두 약물을 높은 농도로 처리하여 시너지 효과를 노려 MS 환자를 더 빠르게 치료할 수도 있고, 두 약물을 낮은 농도로 처리하여 치료 효과는 비슷하면서도 더 저렴하게 치료를 받을 수도 있을 것이다.

재조합 C. reinhardtii에서 erythropoietin과 neuropeptide가 생성되는 것을 확인한다면 그 미세조류의 배양환경 등을 조절하여 최상의 효율을 내게 만들 수 있을 것이다. 이 경우 erythropoietin과 neuropeptide를 비교적 저렴하게 공급이 가능하기 때문에 MS 치료제를 더 저렴한 가격에 제공할 수 있어 저소득층에서도 MS 치료를 받을 수 있다.

5. 참고 문헌

1. Rey F, Balsari A, Giallongo T, Ottolenghi S, Di Giulio AM, Samaja M, Carelli S. Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. ASN Neuro. 2019 Jan-Dec;11:1759091419871420.
2. Moransard M, Bednar M, Frei K, Gassmann M, Ogunshola OO. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms. J Neuroinflammation. 2017 Oct 13;14(1):202.
3. “Global Peptide Therapeutics Market Size”, GRNAD VIEW RESEARCH, last modified N.D., accessed Dec 15, 2022, https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/peptide-therapeutics-market
4. Banerjee A, Ward V. Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae. Curr Opin Biotechnol. 2022 Dec;78:102784.
5. Potvin G, Zhang Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. Biotechnol Adv. 2010 Nov-Dec;28(6):910-8.

생명과학캡스톤PBL
연구제안서

과제명	국문	한국 한강계 참조하천의 규조류 군집의 생태적 특성 연구
	영문	Ecological characteristics of diatom communities in reference streams, Hangang river system, South Korea

1. 연구의 목표 및 내용

(1) determine driving environmental factors and diatom communities in reference streams,
(2) familiar with diatom collection, isolation and cultivation methods,
(3) assess the health of the aquatic ecosystem using the diatom index.

2. 연구의 필요성

A reference stream should reflect totally or nearly undisturbed conditions for general physical and chemical elements, biological quality elements and hydromorphology elements. Reference stream selection for a country is important as it helps to establish the upper grade of the water environment assessment system and can guide the restoration of streams.

3. 연구의 추진전략 및 방법

1.Diatom medium 제작, sample 채집
2. 단일 규조류 분리
3.배양
4.보조 배양
5.세포밀도 검사
6.DNA 추출
7.PCR
8.전기영동(PCR 결과 확인)
9.Sequencing
10.전자현미경 SEM 사진촬영
11.형태 특정 비교 분석

4. 연구결과의 중요성

In the assessment of water systems, diatoms are an excellent indicator of environmental changes as diatoms assemblages can be significantly affected by physicochemical factors. Therefore, the biological index of diatoms is used to evaluate the health of aquatic systems.
As an important river in Korea, the Hangang River studied basins in different seasons to observe the variation factors of water quality and the influence of the variation factors on the distribution of diatoms.

생명과학 캡스톤 PBL

연구제안서

과제명	국문	*Chlamydomonas reinhadifii* 에서의 유전자 과발현을 통한 β-carotene 생합성
	영문	Engineering β-carotene biosynthesis gene in *Chlamydomonas reinhardtii*

1. 연구의 목표 및 내용

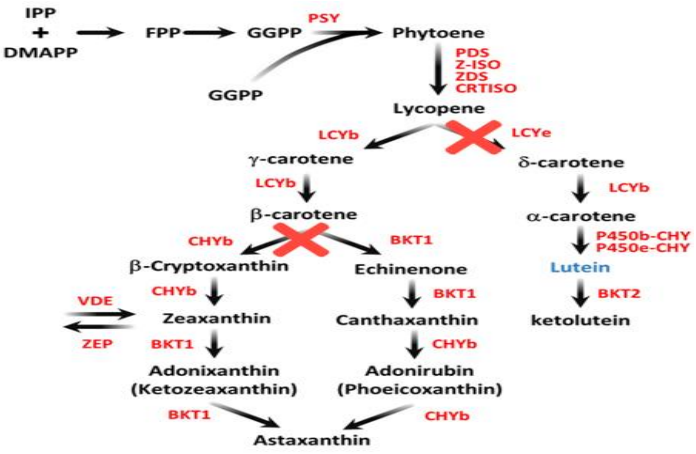
Chlamydomonas reinhaditii 를 이용하여, β-carotene 생성 경로를 제외한 다른 합성경로를 차단하여 다른 pigment의 발현을 막고 β-carotene 합성을 극대화 시킴.

2. 연구의 필요성

β-carotene 은 비타민 A의 전구체이며 녹황색 채소나 과일에 다량 함유되어 있는 카로티노이드계 색소의 일종이다(Mangels등, 1998). β-carotene 은 항산화제로서 망막을 비롯한 여러 조직의 상피세포 분화 및 증식을 정상적으로 유지, 재생시키고(Desobry 등, 1998), 항암작용, 심장병과 시력감퇴, 백내장에 예방 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Omenn 등, 1996).

β-carotene 생성 경로를 제외한 나머지 생합성 경로를 막고 β-carotene 합성에 관여하는 LCYb 유전자를 과발현시켜준다면, β-carotene 색소의 함유량이 높은 Chlamydomonas를 생성할 수 있을 것으로 추정한다.

3. 연구의 추진전략 및 방법



1) Clamydomonas를 LCYe, CHYb와 BKT1을 knock-out시키고 LCYb 유전자를 삽입한 mutant로 형질전환시킨 뒤 plating한다.

2) 10일 뒤 colony를 선별하여 pcr을 진행하여 형질전환이 되었는지 확인한다. 형질전환에 성공한 colony만을 선별하여 20ml Tap에 접종한다.

3) 7일 뒤 Clamydomonas mutant의 , β-carotene 의 함량을 HPLC를 통해 확인한다.

4) mutant의 성장속도를 확인하기 위해, 새로이 접종한 cell을 3일 동안 24시간에 한 번씩 흡광도를 측정하여 성장속도를 확인한다.

4. 연구결과의 중요성

β-carotene은 항산화제로서 유용하며 여러 조직의 상피세포 정상적 분화 및 증식에 기여한다. 또한 항암작용과 심장병, 시력감퇴, 백내장 예방 효과와 더불어 면역작용에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. β-carotene 생합성이 가능한 Chlamydomonas로 형질 전환시키는 것이 성공하게 되고 성장속도 또한 WT과 비슷하다면, 상업적으로 유용한 사용을 기대해 볼 수 있을 것 같다. 또한 심장질환과 면역관련 효과를 통해 의학적으로도 유용한 사용을 기대해 볼 수 있을 것 같다.

5. 참고문헌

[1] Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. Carot-enoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analyticdata. J. Am. Diet. Assoc. 93: 284-296 (1993)

[2] Desobry SA, Netto FM, Labuza TP. Preservation of β-carotene fromcarrots. Crit. Rev. Food Sci. 38: 381-396 (1998)

[3] Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR,Glass A, Keogh JP, Meyskens Jr FL, Valanis B, Williams Jr JH.Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lungcancer and cardiovascular disease. New Engl. J. Med. 334: 1150-1155 (1996)

생명과학캡스톤 PBL 연구제안서

T 세포 분화 조절인자로서 IL-7의 기능과 동맥경화병변의 상관관계에 대한 연구

Relation between Atherosclerosis disease and Function of IL-7 as a regulator of T cell's differentiation

한양대학교 생명과학과 4학년 이준기 (2015021530)

1. 연구의 목표 및 내용

지난 20년간 동맥경화 질병의 병변 생성 유도와 조절에 있어 T cell의 잠재적인 역할이 계속 밝혀져 왔다. 동맥경화에서도 CD4+ T cell의 기능은 다양하다. CD4+ T cell은 동맥경화를 가속하거나 경감하는 cytokine의 분비한다. 쥐를 이용한 실험에서 CD4+ T cell을 제거했을 때, 동맥경화 병변의 성장을 억제했다. CD4+ T reg cell을 제거했을 때는 동맥경화를 가속시켰다. IL-7의 기능이 T cell의 생존, 분화와 관련이 있기에, IL-7 유무가 동맥경화 플라그의 생성과 제거에 어떤 영향을 미치는 지 알아보고자 한다.

2. 연구의 필요성

전 세계 사망원인 중 1위는 심혈관계 질환이다. 그 중에서도 동맥경화는 핵심질병이다. 동맥경화는 염증성 질환으로서 면역세포와 큰 관련이 있다. 기존의 동맥경화의 발병 및 치료 기전 연구는 대식세포를 중심으로 이루어졌다. 지난 20년간 동맥경화 질병에 있어 T cell의 역할이 중요하다는 연구결과가 꾸준히 보고되었다. T cell이 동맥경화 병변에 미치는 영향과 함께 T cell 분화와 관련된 cytokine, Interleukin에 대한 연구가 필요하다. IL-7이 T-cell의 분화에 영향을 미친다. 동맥경화가 진행되는 쥐에서는 CD+4 T cell의 수가 많을 것으로 추측한다. 반대로 CD4+ T reg cell은 수가 적을 것으로 추측한다. IL-7을 제거해 T cell의 분화에 영향을 준다면 어떤 결과가 나올 지 확인하고 싶다.

3. 연구의 추진전략 및 방법

1. IL-7 발현 유전자를 Knock Out한 mouse를 준비한다.
2. Control mouse와 IL-7 KO mouse에 동맥경화 병변을 유도한다.
3. FACS, IHC, 조직염색 방법을 통해 2, 4, 6, 8주 순으로 Control mouse에서 naïve T Cell, CD4+ T cell, CD4+ T reg cell의 수를 확인한다.
4. 3번과 동일한 방식으로 2, 4, 6, 8주 순으로 IL-7 Knock Out에서 naïve T cell, CD4+ T cell, CD4+ T reg cell의 수를 확인한다. 또한 동맥경화 병변의 크기, 콜레스테롤 수치를 확인한다.

4. 연구결과의 중요성

동맥경화 질환과 면역세포의 관계를 이해하는데 도움이 될 것이다. 특히 대식세포에 비해 덜 주목받았던 T 세포와 동맥경화 질환의 관계 및 기전을 더 잘 이해할 수 있다. 이 연구를 통해 IL-7이라는 면역신호전달물질과 동맥경화 병변과의 구체적인 작용 기전에 대해 이해하는 좋은 기회가 될 것이다.

5. 참고문헌

1. Saigusa, R., Winkels, H. & Ley, K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* **17**, 387–401 (2020). https://doi-org-ssl.access.hanyang.ac.kr:8443/10.1038/s41569-020-0352-5

2. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295. PMID: 25190079; PMCID: PMC4176007.

P.S. 가약빙 학생의 생태와 관련된 주제는 이번 과제에 포함시키지 못했습니다... 어떻게 주제를 혼합해야 할지 도저히 감이 안잡혔습니다...

생명과학캡스톤PBL

연구제안서

생명과학과 2017044357 이창준

과제명	**국문**	**EPO를 형질전환 시켰을 때, EPO-Receptor의 자극 없이도 활성화될 가능성이 있는지 검증하는 연구**
	영문	**A study to verify whether transformed EPO can be activated without stimulation of EPO-Receptors**

1. 연구의 목표 및 내용

에리스로포이에틴(Erythropoietin, EPO)은 Cytokine의 일종으로, 신장과 간에서 생성되는 조혈 호르몬이다. 신장에서 분비되는 EPO는 조혈 모세포의 표면에서 발현되는 수용체(EPO-Receptor, EpoR)와 결합하여 적혈구(Red Blood Cell, RBC)의 분화를 촉진하는 신호를 활성화시킨다. 때문에 신장 질환자에게 EPO을 투여하여 RBC의 분화를 유도한다.

반대로 수용체가 없으면 EPO가 제 역할을 수행하지 못한다고 할 수 있는데, 이 때 EPO의 형질전환을 일으켜 적절한 형태로 구조를 변화시키면 EpoR 없이도 조혈 모세포가 RBC로 성장 및 분화할 수 있게 신호를 활성화할 수 있는지 가능성을 검증할 필요성이 있다. 연구를 통해 EPO를 적절하게 형질전환 시켰을 때 EpoR 없이도 활성을 유도할 수 있다면, 신장 뿐만 아니라 채내 다양한 기관에 RBC의 분화를 촉진할 수 있을 것이다. 이 연구의 목표는 이를 검증하고, 기존의 치료법 외에 새로운 활용법을 찾아 혈액 관련 치료법의 발전에 기여하는 것이다.

연구는 기존의 EPO의 구조와 기능에 대한 연구 논문을 분석하고, 새로운 형질전환 실험을 설계하여 시행한다. 이를 통해 형질전환이 이루어진 transformed EPO를 여러 기관에 투약했을 때 반응이 일어나는지, 그 반응이 EpoR과 결합했을 때와 동일한지 알아본다.

2. 연구의 필요성

연구는 EPO의 구조를 분석하고, 기능을 담당하는 핵심 구조를 제외한 부분에서 형질전환을 일으키는 방향으로 진행될 것이다. Transformed EPO를 간, 신장을 제외한 여러 기관에 투약하여 반응을 일으킨다.

연구의 핵심 가설은 EPO의 형질전환을 일으켰을 때, 기존에는 활성에 필수적이었던 EpoR이 없어도 EPO가 기관에 투약되어 제 기능을 수행할 수 있다는 것이다. 이 가설의 근거로, memory CD4+ T cell이 TCR의 자극 없이도 cytokine에 의해 활성화 되듯이, neuropeptide에 의해서도 활성 또는 억제될 수 있을 가능성에 대해 검증한 연구가 있다.

현재 EPO는 신장 질환 환자와 간 질환 환자에게 널리 쓰이고, 관심도가 높은 동시에 활용도도 높다. 이미 활용도가 높은 EPO의 활용 범위를 더 넓힐 수 있다면 현행 치료법의 발전에 크게 기여할 수 있을 것이다.

3. 연구의 추진전략 및 방법

EPO의 실험군과 대조군을 설정한다. 대조군은 기존에 약물로서 이용되고 있던 EPO이다. 실험군은 EpoR과 결합하는 부위에 다양한 형질전환을 일으킨 transformed EPO이다. 실험군과 대조군을 같은 외부 조건에서 같은 기관에 투약했을 때 활성 차이를 비교한다. 활성 차이는 실험군과 대조군을 투약하고 일정한 시간이 지난 후, 기관의 조혈 모세포의 활성도 차이를 통해 비교한다. 이는 RBC의 분자량을 측정하여 비교할 수 있을 것이다. 예를 들어, 대조군을 투약한 기관에서 RBC의 양에 비해 실험군을 투약한 경우 RBC의 양이 유의미하게 많다면, transformed EPO가 정상적으로 작용했다는 것을 유추할 수 있다.

만약 실험군과 대조군에서 유의미한 차이를 나타내지 않는다면, 대조군의 형질전환이 EPO와 EpoR의 상호작용에 영향을 미치지 못했다는 뜻이다. 그 경우 EPO의 형질전환 단계로 돌아가서 결합하는 부위 또는 그 외 구조적인 형질전환을 통해 대조군을 다시 설정한다.

4. 연구결과의 중요성

전세계 100만 명 이상의 암환자 등에게 투약하고 있으며, 연간 판매액이 120억 달러를 초과할 만큼 관심도가 높고, 지금도 다양한 연구가 이루어지고 있다. 이러한 상황에 EPO의 새로운 활용을 개척한다면 인류의 질병 치료 수준을 한 단계 높이는 데 많은 영향을 줄 것이다.

EPO에 대한 연구가 유의미한 결론을 이끌어냈을 때, 다른 약물에도 이 연구를 적용할 수 있다는 점에서 중요성을 가진다. 간이나 신장에 쓰이는 EPO와 같이, 심장에 쓰이는 약물, 운동기관에 쓰이는 약물, 소화기관에 쓰이는 약물 등에 연구의 활용이 확장될 수 있는 가능성은 매우 높다.

5. 참고문헌

Kosin University, 2015 Sep; “Functional mechanisms of erythropoietin and the erythropoietin receptor in cancer cells”, https://doi.org/10.23000/TRKO201600009774.

Chauveau A, Luque Paz D, Lecucq L, Le Gac G, Le Maréchal C, Gueguen P, Berthou C, Ugo V. A new point mutation in EPOR inducing a short deletion in congenital erythrocytosis. Br J Haematol. 2016 Feb;172(3):475-7. doi: 10.1111/bjh.13511. Epub 2015 May 26. PMID: 26010769.

Daniela Ostrowski, Ralf Heinrich, 2018 Feb; “Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System”, DOI: 10.3390/jcm7020024