

다양한 종에서 하우스키핑 유전자 선택의 중요성

채한화¹, 노윤정², 노희종³, 임다정^{2*}

¹국립축산과학원 동물유전체과, 전남대학교 약학대학, ²국립축산과학원 동물유전체과, ³국립축산과학원 가축유전자원센터

Importance of Selecting The characterized Housekeeping Genes as Reference Genes in Various Species

Han-Ha Chai¹, Yun Jeong Noh², Hee-Jong Roh³, Dajeong Lim^{2*}

¹Animal of Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science and Collage of Pharmacy, Chonnam National University

²Animal of Genomics and Bioinformatics Division, National Institute of Animal Science

³Animal of Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science

요약 하우스키핑 유전자는 에너지생성, 물질합성, 세포사멸 및 세포방어 등과 같은 세포의 기본적인 기능을 수행하기 때문에 모든 유기체의 세포에서 발현된다. 세포의 기본적인 기능을 유지하기 때문에 발현 수준이 상대적으로 일정하여 단백질 발현 및 목적 유전자의 mRNA 발현 분석 등과 같은 유전자 발현 연구에서 기준 유전자로 사용되고 있다. 그러나 이들 유전자의 발현 수준은 조직과 세포마다 다를 수 있으며, 특정 환경 하에서 변할 수 있다. 그러므로 하우스키핑 유전자의 발현 안정성을 탐색하여 유전자 발현 연구에서 최적의 기준 유전자를 선택하는 것이 중요하다. 이 리뷰는 문헌을 통해 인간, 닭, 돼지 그리고 쥐에서 발견된 하우스키핑 유전자를 요약하고, geNorm, NormFinder 그리고 BestKeeper 소프트웨어를 통해 발현 안정성을 추정하였다. 하우스키핑 유전자의 발현 안정성에 대한 탐색은 유전자 발현 연구에서 실험 조건에 따라 가장 적합한 기준 유전자를 선별할 수 있고, 데이터의 정규화를 위해 적용될 수 있다.

Abstract Housekeeping genes are expressed in cells of all organisms and perform basic cellular functions such as energy generation, substance synthesis, cell death, and cell defense. Accordingly, the expression levels of housekeeping genes are relatively constant, and thus they are used as reference genes in gene expression studies, such as protein expression and mRNA expression analysis of target genes. However, the levels of expression of these genes may be different among various tissues or cells and may change under certain circumstances. Therefore, it is important to select the best reference gene for specific gene expression research by exploring the stability of housekeeping gene expression. This review summarizes housekeeping genes found in humans, chickens, pigs, and rats in the literature and estimates expression stability using geNorm, NormFinder, and BestKeeper software. The most suitable reference housekeeping gene can be selected based on expression stability according to the experimental conditions of the gene expression study and can thus be applied to data normalization.

Keywords : Housekeeping Genes, mRNA Expression, Protein Expression, Expression Stability, Reference Gene

본 논문은 농촌진흥청 포스트게놈 다부처유전체사업 연구과제로 수행되었음

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01334101, 김포리닭 유전체 해독 및 유전자 발현변이정보 지도 구축)의 지원에 의해 이루어진 것입니다. 또한 본 연구는 2020년 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 이루어진 것입니다.

*Corresponding Author : Dajeong Lim(National Institute of Animal Science)

email: lim.dj@korea.kr

Received June 1, 2020

Revised July 14, 2020

Accepted August 7, 2020

Published August 31, 2020

1. 서론

유전자의 발현은 측정시점에 따라 조직이나 세포에서 달라질 수 있다. 이와 반대로 생명체의 생존에 필수적인 유전자인 경우에는 어느 조직이나 세포에서 일정하게 (consistent/stable) 발현이 되는데, 이 유전자를 하우스키퍼 유전자(Housekeeping gene)라고 한다. 즉, 하우스키퍼 유전자는 어떤 특정 조건에 상관없이 세포의 생명 활동 및 기능 유지에 필수적인 구성 유전자로, 여러 조건과 발달단계에서도 발현의 변화가 매우 적은 특징을 가지고 있다[1,2]. 하우스키퍼 유전자는 세포내 DNA복제, 세포분열·증식·사멸과 같은 세포 수명 주기(life cycle) 유지, 에너지대사, 물질대사 등 다양한 기능을 하고 있다. 예를 들어, 세포의 자극 등 충격에 대비하는 열 충격단백질, 세포내 단백질 발현에 관여하는 리보솜 단백질도 하우스키퍼 유전자에 속한다. 오늘날, 하우스키퍼 유전자만을 가지고 컴퓨터에서 생명체를 설계해서 인공 생명체 합성도 가능해졌다. 실제로 2016년 미국 크레이그 벤터 연구소에서 미코플라스마 마이코이데스(*mycoplasma mycoides*, 유전체 크기 1,079kb)라는 세균이 갖고 있는 총 917개 유전자 중에서 437개 하우스키퍼 유전자만을 가지고 인공적으로 세균(JCVI-syn3.0, 유전체 크기 531kb)을 합성해서, 세균 활동이 유지됨을 확인했다[3]. 이 연구를 통해 생명체의 세포 속에 담고 있는 유전정보를 하우스키퍼 유전자로 재현함으로써, 정상세포의 생명 활동이 이상이 생겼을 때 교정할 target으로 하우스키퍼 유전자가 대두되었다. 비정상세포(암세포 등)에서 하우스키퍼 역할을 하는 passenger gene을 제거하여 암 치료에 적용하는 것이 대표적인 사례일 것이다[4].

유전자 구조적인 측면에서 살펴보았을 때, 하우스키퍼 유전자는 다른 유전자(non-housekeeping gene, non-HK gene)보다 인트론(intron)이 더 짧게 존재해서 높은 발현 수준을 보인다. 이는 짧은 인트론이 전사과정을 최소화하여 높은 발현을 나타내기 때문이다. 예를 들어, 인간에서 하우스키퍼 유전자의 인트론 평균길이가 2,573bp 이지만, 다른 유전자는 5,025bp로 약 2배 길었고, 하우스키퍼 유전자의 엑손 평균 길이 212bp보다 다른 유전자에서 240bp로 더 길게 존재한다. 결과적으로 번역되지 않은 영역(untranslated region, UTR)과 단백질 번역 영역(protein coding region)이 다른 유전자에 비해 하우스키퍼 유전자에서 더 짧게 존재한다[5,6]. 더 나아가서, 특정 조직에서만 발현되는 조직 특이 유전자(tissue-specific genes)는 하우스키퍼 유전자보다 더

길게 존재하는 데, 더 많은 기능을 하는 도메인을 1.5배 이상 갖고 있어서 복잡한 단백질 구조를 갖기 때문이다 [7].

많은 연구에서 일정하게 발현되는 하우스키퍼 유전자를 기준(reference gene, control gene)으로 서로 다른 조직이나 동일한 조직에서 다른 세포내 관심대상 유전자(target gene)의 발현을 상대적으로 비교하게 된다. 게다가, 어떤 측정 시점에서 정상 상태와 비정상상태 간의 유전자의 발현비교는 다양한 유전자의 기능, 상호작용하는 유전자들의 조절네트워크에 대한 정보로부터 대량의 목적유전자를 발굴하게 된다.

만일 마이크로어레이(microarray), RNA-시퀀싱(RNA-Seq) 방법으로 유전자의 발현양상을 조사하거나 실험적으로 검증할 때, 어떤 하우스키퍼 유전자를 기준으로 선택하는 것에 따라, 상대적 발현차이가 달라질 수 있다. 특히, 서로 다른 조건에서 목적유전자의 상대적 발현정도를 비교하고자 할 때, 각각의 조건에서 목적유전자의 발현량을 하우스키퍼 유전자의 발현량으로 나눠서 표준화(normalization)한 후에 직접비교를 해야만 한다.

하우스키퍼 유전자는 특정 조직에서만 발현되는 조직 특이 유전자와 달리 1) 모든 조직 또는 세포에서 유전자 발현이 되어야 한다. 그때, 2) 발현되는 조직이나 세포간의 발현의 차이가 2배 이상이면 안 된다. 3) 발현되지 않은 조직이나 세포가 없어야만, 기준(control)이 될 수 있다[8, 9]. 여러 조직에서 유전자 발현의 비교분석 할 때와 특정한 1개 조직에서 유전자 발현을 비교할 때, 하우스키퍼 유전자에서 어떤 유전자를 기준으로 표준화할 것인지 선택이 중요하다.

유전자 정량화를 위한 실험방법인 RT-qPCR은 유전자 발현의 변화를 실시간으로 모니터링하여 유전자 발현량을 측정할 수 있어 다양한 분자생물학적 연구에 사용된다. RT-qPCR 방법에서 많이 쓰이는 하우스키퍼 유전자의 종류는 ACTB, GAPDH, HPRT1 및 B2M 등이 있으며, 대부분의 실험적 조건에 영향을 받지 않는다는 가정 하에 적절한 검증 없이 보편적으로 세포와 조직에서 유전자 변화를 정량화하기 위한 기준유전자로 사용되고 있다. 놀랍게도, 기준유전자로 가장 많이 적용되고 있는 GAPDH의 mRNA는 골격근에서 가장 많이 발현이 되지만, 유방에서는 가장 낮게 발현되는 데, 두 조직에서 15배 이상 발현의 차이가 존재한다[2]. 게다가, 엑손 4개와 6개 가진 GAPDH 유전자 isoform들은 서로 2배 이상 차등발현이 된다. GAPDH 이외에도 하우스키퍼 유전자는 여러 개 isoform들이 존재하며, 기준이 되는 하우스

키퍼 유전자의 구조변이를 고려하여 일정하게 발현이 되는 지는 살펴보아야 한다.

연구 대상 조직이나 세포의 특성을 고려하지 않고 가장 많이 사용하는 하우스키퍼 유전자를 기준으로 한다면 연구결과에 오류를 줄 수 있다. 한 예로, 적용이 많이 되는 3개 하우스키퍼 유전자 GAPDH, ACTB, B2M 발현은 동종 지방유래 중간엽 줄기세포에서 골수 유래 중간엽 줄기세포보다 각각 2배, 6배, 7배 이상 과발현 된다. 즉, 중간엽 줄기세포에서 3개 GAPDH, ACTB, B2M 하우스키퍼 유전자 세트를 기준으로 연구를 하는 것은 부적절 하다[10]. GAPDH나 ACTB도 시료의 처리, 발생학적 상태 및 병리학적 상태에 따라 발현이 조절될 수 있기 때문에 2개 이상의 하우스키퍼 유전자 발현을 확인 후 기준유전자 세트로 선택하는 것이 적절하다[11-14].

직접적 실험검증 이외에도 하우스키퍼 유전자의 안정적인 발현양상을 알아보기 위해 geNorm[15], NormFinder[16] 및 BestKeeper [17] 등의 소프트웨어를 사용할 수 있다 [18]. Bestkeeper 툴(www.gene-quantification.org/bestkeeper.html)은 각 하우스키퍼 유전자의 특이적으로 유도된 증폭곡선으로부터 한계사이클(threshold cycle) Ct값의 표준편차(SD) 및 유전자의 변동계수(coefficient of variation)로서 발현의 변이를 표현한다. 따라서 다양한 조건에서 발현의 변이가 낮은 표준편차로 존재하는 하우스키퍼 유전자를 기준유전자로 선택할 수 있다. geNorm 분석은 다른 모든 기준이 될 수 있는 하우스키퍼 유전자와 pairwise로 비교하여 발현의 변이(V)를 결정함으로써 후보기준유전자의 안정도(M)값을 정의한다. 결과적으로 가장 낮은 M값을 갖는 하우스키퍼 유전자가 가장 안정적으로 발현된다. NormFinder 툴은 geNorm 알고리즘과 달리 그룹들 간의 유전자 발현 안정성에 기초하여 후보 하우스키퍼 유전자 세트간의 최적의 기준유전자를 밝히는 것으로 geNorm처럼 낮은 변이 값 (Stability value, Sv)을 가지는 최적의 후보 기준유전자 세트를 동정할 수 있다.

본문에서는 일반적으로 사용되는 GAPDH, ACTB 보다 연구의 목적에 따라 특정 실험 시스템이나 제한된 조직들에서 가장 안정적으로 발현을 보이는 하우스키퍼 유전자를 기준유전자로 적용한 연구를 살펴보고자 한다.

2. 본론

2.1 Human housekeeping genes

인간 유전체(genome)는 매우 복잡한 조직발현 네트워크를 가진다. 인간이 가지고 있는 유전체의 모든 염기 서열을 해석한 인간 게놈 프로젝트(human genome project, HGP)를 통해, 22쌍 상염색체와 2개 성염색체에 분포하는 약 32,000개 단백질 암호화 유전자가 있음이 밝혀졌다[19]. 인간의 단백질 암호화 유전자 중에서 조직 특이 유전자는 특정 조직에서만 발현된다. 반면, 하우스키퍼 유전자는 가장 기본적으로 세포생리학적 과정에 필요하며, 측정시점과 상관없이 일정하게 발현된다 [20]. 하우스키퍼 유전자는 전체 유전자의 40%에 해당하지만, 특정한 세포에 국한되어 발현되는 조직 특이 유전자는 5%에 불과하다. 하우스키퍼 유전자와 조직 특이적 유전자를 비교하면 하우스키퍼 유전자가 더 느리게 진화하는 특징을 가진다[21, 57].

인간에게 존재하는 하우스키퍼 유전자는 Human Body Map(HBM) 2.0 프로젝트의 RNA-Seq 데이터(GEO accession GSE30611, HBM)를 통해 지방, 뇌, 유방, 결장, 신장, 심장, 간 및 폐 등 16개 정상적인 조직유형에서 총 3,804개 하우스키퍼 유전자를 발굴하였다. 탐색된 인간 하우스키퍼 유전자 목록과 각 하우스키퍼 유전자 isoform별 발현정도를 <http://www.tau.ac.il/~elieis/HKG/>에서 다운로드 받아 활용할 수 있다[8]. 또 다른 연구에서 104개 마이크로어레이 데이터로부터 43개 정상적인 조직에서 2,064개를 발견하였다. 발굴된 하우스키퍼 유전자는 RNA 대사과정, 산화적 인산화, 단백질 번역, 분해 및 조절 등과 같은 기본적인 생물학적 과정의 기능을 한다[22].

항상 일정하게 발현되는 하우스키퍼 유전자의 발현 증가/감소는 바로 질병 진단에 적용되기 때문에 하우스키퍼 유전자 자체의 발현변화는 중요한 지표이다. 다른 측면에서 노화는 세포표현형과 대사 효율이 변함에 따라 노화연구에 기준이 되는 하우스키퍼 유전자는 절대적으로 발현 변화가 없어야 한다. 노화연구를 위한 내피 집단 형성 세포(Endothelial colony-forming cells, ECFCs)에서 단백질 합성에 관여하는 리보솜 단백질 RPL13(ribosomal protein L13), RPL31(ribosomal protein L31), RPL37(ribosomal protein L37) 및 RPL30(ribosomal protein L30) 유전자가 GAPDH, ACTB보다 더 안정적으로 발현된다[23]. 일정하게 발현이 되는 RPL19(ribosomal protein L19)는 정상 전립선 세포주(PNT) 보다 4개 전립선 암세포주(LNCaP, DU145, PC3, PCM3)에서 4.9-6.7배 발현이 증가한다[24]. 전립선 암세포주와 더불어 악성 전립선 조직이 양성 전립선 조직보다 RPL19

을 더 발현시킨다. 전립선암을 갖는 환자를 확인 하거나 고위험 전립선암의 예측을 하는 데 RPL19 mRNA가 바이오마커로 적용될 수 있다. 이와 반대로, BI-1 결합단백질인 RPL19 과발현은 소포체 스트레스를 야기하여 유방암세포주의 세포사멸을 촉진시킨다[25]. 그 이외에도 RPL15(ribosomal protein L15)는 위암[26], RPS15A(ribosomal protein S15A)는 폐암[27] 등에서 정상세포보다 발현이 증가된다. 12개 하우스키핑 유전자를 이용해 아토피가 없는 비천식, 아토피성 및 아토피 천식 어린이의 기도 상피 세포를 통해 유전자 발현 안정성을 조사하였을 때, PPIA(peptidylprolyl isomerase A) 유전자는 알러지 유발 항원에도 영향을 받지 않은 하우스키핑 유전자로 천식 기도상피에서도 일정하게 발현되어 가장 적합한 기준 유전자이다[28]. 또한 폐의 편평세포암종에서 ACTB, EEF1A1(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), FAU(FAU ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion), RPS9(ribosomal protein S9), RPS11(ribosomal protein S11) 및 RPS14(ribosomal protein S14) 유전자가 가장 최적의 하우스키핑 유전자 세트로 확인되었다[29]. 폐의 편평세포암종에서 글루코스 대사과정에 포함이 되는 호르몬(PGK1, LDH등)과 GAPDH는 급격히 발현이 증가하는 경우도 있어 기준유전자 세트에서 제외되었다. 특히, GAPDH는 염증, 당뇨병, 저산소증과 호흡기 질병에서 발현이 상향조절 된다. 산화환원효소(oxidoreductase)인 GAPDH는 산화 스트레스를 유발하여 산화 변형을 일으키는 아밀로이드- β (amyloid β , A β)과 아밀로이드- β 전구체 단백질(amyloid- β precursor protein, A β PP)을 포함하는 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 관련 단백질과 상호작용을 한다. 이로 인해 나타나는 GAPDH의 산화적 기능 장애는 기억상실, 인지감소 및 치매 등의 증상이 나타나는 알츠하이머병의 뇌에서 신경 기능 손실에 영향을 끼친다[30,31]. 또한, GAPDH는 심장과 근육을 제외하고 다른 조직에서도 기준 유전자로 적용을 하지 않는다.

상기의 질병 관련 연구 이외에도, 인간에서 다양한 조직을 동시에 고려하여 기준이 될 수 있는 하우스키핑 유전자는 ACTG1(actin gamma 1), RPS18(ribosomal protein S18), POM121C(POM121 transmembrane nucleoporin C), MRPL18(mitochondrial ribosomal protein L18), TOMM5(translocase of outer mitochondrial membrane 5), YTHDF1(YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 1), TPT1(tumor protein,

translationally-controlled 1) RPS27(ribosomal protein S27)이지만, 골격근만 고려한다면 RPL41(ribosomal protein L41), PRDX1(peroxiredoxin 1), RPL8(ribosomal protein L8), RTRAF(RNA transcription, translation and transport factor), JTB(jumping translocation breakpoint), RPS29(ribosomal protein S29), SNRPD2(small nuclear ribonucleoprotein D2 polypeptide), NOP10(NOP10 ribonucleoprotein)로 우선순위가 바뀐다[32]. 이는 여러 조직에서 유전자 발현 프로파일링을 고려할 때와 특정 조직에서 발현되는 유전자 발현의 변이 패턴 차이가 나기 때문이다. 기존의 GAPDH와 ACTB는 유전자 발현 값이 커서 실험적으로 측정하기 쉽지만, 조직 간의 넓은 차등발현 분포를 갖는다. 일반적으로 인간 유전자 발현연구에서 세포질의 액틴 형태인 ACTG1 하우스키핑 유전자가 모든 세포에서 높은 발현 값을 갖기 때문에 기준유전자로 제일 적합한 것으로 알려져 있다.

연구의 목적에 적합한 기준 유전자로 사용할 하우스키핑 유전자 세트를 결정하기 위해서는 일정하게 발현되는지를 우선적으로 확인하여야 한다. 이때, 하우스키핑 유전자의 기능을 고려하지 않는다. 기준 유전자로 적용할 하우스키핑 유전자는 1) 실험대상 조직이나 세포에서 가능한 발현량이 높아 쉽게 측정할 수 있어야 한다. 2) 다른 조직이나 세포에서 일정하게 발현이 되어야 하며, 같은 조직이나 세포에서는 다르게 처리를 해도 일관성 있게 발현되어야 한다. 3) 하우스키핑 유전자의 특성은 가능한 많은 조직에서 유지되어야 한다. 이와 같은 조건을 만족할 때, 인간 하우스키핑 유전자 목록에서 해당 유전자의 기능 정보와 발현 프로파일을 GEO(Gene expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)와 AltAnalyze 프로그램(<http://www.altanalyze.org>)로 확인 후, 하우스키핑 유전자세트를 구성하는 것이 우선순위 높은 기준 유전자를 선택하는 데 도움이 된다.

2.2 Chicken housekeeping genes

닭은 동물 성장 특성 인자 개발에 이상적이며 기본 생물학, 행동 및 질병 등을 연구하기 위한 생물학모델로 잘 알려져 있다. 조류에서 유전체 서열이 가장 잘 연구되어 있고, 독특하고 진화적인 특징으로 인해 다른 종과의 비교되는 표현형 연관된 전사체 분석에 적용된다. 이는 척추동물 종의 유전자 조절과 기능적 요소의 진화를 이해하는데 사용되어지기 때문이다. 닭을 적용하여 비교한 연구는 행동, 생태학, 질병 및 신경생물학등 광범위한 연

구에 응용되고 있다[33]. 여러 연구에서 돼지, 소 및 양 등의 하우스키핑 유전자의 안정성 평가가 보고되어 있지만, 닭 유전자 발현 실험에서 18S(18S ribosomal RNA), ACTB 및 GAPDH 등이 빈번하게 검증 없이 사용되고 있다[34]. 닭에서도 표현형이나 경제형질 또는 질병 저항성 연관 유전자 발현 연구를 진행하기 전에 최적의 기준유전자를 찾기 위해 다양한 유형과 조건에서 발현양상을 평가해야 한다[35].

닭의 성장에 따른 지방 침착 연관 조직에서 기준유전자 규명한 연구는 RefFinder 소프트웨어 (www.leonxine.com/referencegene.php)를 통해 대흉근, 넓다리두갈래근과 간 조직에서 가장 안정적인 하우스키핑 유전자로 YWHAZ(tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta) 탐색되었다. TBP(TATA-box binding protein)는 넓다리두갈래근과 간에서 두 번째로 안정적인 발현을 보였으며, RPL32(ribosomal protein L32)는 대흉근에서 안정적

인 발현을 보였다[36]. 대흉근에는 지방이 적지만, 넓다리두갈래근은 지방침착과 관련 근육 조직에서 세포골격 구조(B2M), 리보솜 복합체(RPL32), 기본전사인자(TBP), 신호전달(YWHAZ), 시트르산 회로 (SDHA)가 후보 기준 유전자로 탐색되었다. 이 중에서 B2M은 세포구조에 따른 세포골격 변이가 존재 하였고, SDHA는 시트르산 회로에서 기질인 석신산(succinate)을 산화시키는 기능 때문에 조직 간의 발현차이가 존재하여, 최종적으로 RefFinder 방법에서 제거되었다. 또한 닭 림프조직에서 분리된 세포를 이용하여 7개 하우스키핑 유전자 후보 중 geNorm과 NormFinder 소프트웨어의 결과로 TBP, GAPDH 및 r28S(28S ribosomal RNA) 조합이 가장 안정적으로 발현하여 림프세포에서 가장 적절한 기준유전자 세트로 확인되었다[37]. 특히, 적은 양이 존재하는 r28S는 다른 하우스키핑 유전자 발현변이보다 적은 것처럼 계산될 수 있지만, 전염성 살상염 바이러스(Infectious bursal disease virus, IBDV)에 감염되어도 일정하게 발현된다.

Table 1. Housekeeping genes of various species

Gene symbol	Description	Human (RefSeq)	Pig (RefSeq)	Chicken (RefSeq)	Mouse (RefSeq)
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	NM_000194	NM_001032376	NM_204848	NM_013556
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	NM_000190	NM_001097412	XM_417846	NM_013551
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_002046	NM_001206359	NM_204305	NM_001289726
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	NM_001099932	NM_204985	NM_008828
B2M	beta-2-microglobulin	NM_004048	NM_213978	NM_001001750	NM_009735
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase /tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	NM_003406	NM_001315726	NM_001031343	NM_011740
SDHA	Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	NM_004168	XM_021076930	NM_001277398	NM_023281
TBP	TATA box binding protein	NM_003194	XM_021085483	NM_205103	NM_013684
GUSB	Glucuronidase-beta	NM_000181	NM_001123121	NM_001039316	NM_010368
RPL13	Ribosomal protein L13	NM_000977	NM_001243345	NM_204999	NM_016738
RPL19	Ribosomal protein L19	NM_000981	XM_003131509	NM_001030929	NM_009078
TFRC	Transferrin receptor	NM_003234	NM_214001	NM_205256	NM_011638
VIM	Vimentin	NM_003380	XM_005668106	NM_001048076	NM_011701
ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	NM_005157	XM_005660525	XM_015279734	NM_001112703
ALB	Albumin	NM_000477	NM_001005208	NM_205261	NM_009654
EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	NM_001402	NM_001097418	NM_001321516	NM_010106
ACTB	Actin, beta	NM_001101	XM_003124280	NM_205518	NM_007393

Reference: 미국국립생물공학정보센터 (National center for biotechnology information, NCBI)

반면에 B2M과 TBP 하우스키퍼 유전자는 안정성이 유지 되지 않는다.

닭의 품종인 노란 깃털 육계 Brolier집단의 간과 공장 조직에서 Normfinder, geNorm 및 BestKeeper 소프트웨어의 세 가지 분석법을 이용하여 하우스키퍼 유전자의 발현 안정성을 평가하였을 때, 간과 공장에서 RPL13과 GAPDH 각각 안정성이 높았다. ACTB와 HMBS (hydroxy-methylbilane synthase)는 두 조직에서 공통적으로 안정성이 높기 때문에 가장 적절한 하우스키퍼 유전자로 선별되었다[38]. 이러한 결과는 닭도 닭 태아섬유아세포(chicken embryo fibroblast)에서 다른 가축처럼 조직마다 안정적으로 발현하는 하우스키퍼 유전자가 다르게 나타난다는 것을 의미한다.

2.3 Pig housekeeping genes

돼지는 생리학적으로 사람과 유사해서 가장 많이 연구된 가축이며, 돼지 유전 연관 지도는 수백 개의 유전자를 포함하는 약 3000개 좌위(loci)를 가지고 있다. 돼지는 인간의 질병 치료를 위한 중요한 모델로 사용되었으며, 돼지를 이용한 다양한 연구는 유전자의 정량화를 필요로 한다[39]. 유전자 정량화를 위한 RT-qPCR 방법에서 적절한 기준유전자 선택을 위해 돼지의 성장별 하우스키퍼 유전자 안정성을 조사하였을 때 RPL4(ribosomal protein L4), PPIA 및 YWHAZ의 유전자 발현은 이유자돈 및 성돈의 다양한 조직유형에서 높은 안정성을 보

였으나 B2M, YWHAZ 및 SDHA(succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A) 유전자는 자돈에서 높은 안정성을 보였다. 이와 반대로 GAPDH는 모든 연령대 돼지에서 낮은 안정성을 보였다 [40]. 돼지에서도 실험적 검증을 하지 않고 GAPDH를 기준유전자로 사용하지만, GAPDH는 지방조직에서 돼지 집단별 발현차이가 존재한다. 닭 태아섬유아세포에서 일정하게 발현되지 않은 TBP는 다른 세포나 조직(돼지 등지방과 근육 등)에서 적은 발현 변이로 존재하지만, 돼지 난자세포와 배아착상에서 많이 발현이 되는 특성이 있다. 흥미롭게도 RRL4, HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyl-transferease 1), B2M 기준유전자 세트는 돼지 소장과 장내미생물 상호작용에서도 일정하게 발현된다. 이와 달리, RPL27 (ribosomal protein L27)은 위 조직에 적합한 기준유전자이다. HPRT1 하우스키퍼 유전자의 결핍은 인간에서 특이적인 정신지체, 운동장애 및 요산의 과생산 등을 나타내는 레쉬-니한병 (Lesch-Nyhan disease)을 발생한다[41].

돼지 품종별로 탐색된 하우스키퍼 유전자의 평가는 통청(Tongcheng)돼지의 배측 최장근 근육조직에서 H3F3A(H3.3 histone A)와 RPS18가 가장 적합하였고, 랜드레이스(Landrace) 돼지의 배측 최장근 근육조직에서 RPL32와 RPS18 유전자 조합이 기준유전자로 발현 안정성을 갖는다. 그렇지만, 요크셔(Yorkshire) 돼지의 골격근에서 SDHA, PPIA 및 HPRT1이 적합하였고, 메

Table 2. Function of housekeeping genes

Gene symbol	Function
HPRT1	Enzymes in the purine salvage pathway[58]
HMBS	Provides instructions for making Hydroxymethylbilane synthase enzyme[18]
GAPDH	Enzymes involved in glycolysis[59]
PGK1	Enzymes involved in glycolysis[59]
B2M	Component of MHC(major histocompatibility complex) class I molecules[59]
YWHAZ	Major regulator of apoptotic pathways[18]
SDHA	Helps transfer electrons to the Oxidative phosphorylation pathway[58]
TBP	Transcription factor by RNA polymerase[59]
GUSB	Provides instructions for producing an β -glucuronidase enzyme[18]
RPL13	As a component of the 60S subunit, it encodes a ribosomal protein[60]
RPL19	Component of the 60S subunit[61]
TFRC	Encodes cell surface receptor required for cellular iron uptake[18]
VIM	Stabilizing cytoskeletal interaction[62]
ABL1	Activated to stimulate cell proliferation or differentiation, survival or death, migration[63]
ALB	Regulation of colloid osmotic pressure, capillary membrane permeability and free radical scavenging[64]
EEF1A1	Translation elongation factor 1- α -1[18]
ACTB	Cell cytoskeleton protein[59]

이시안(Meishan) 돼지는 PPIA, HPRT1 및 eEF-1 γ (eukaryotic translation elongation factor 1 gamma) 하우스키핑 유전자가 기준유전자 세트에 적합하였다[42, 43]. 일반적으로, 돼지 품종별 성장에 따른 배측 최장근 발달에서는 기준유전자 세트 RPL32, RPS18, H3F3A가 일정하게 발현하였다. 다만, 돼지 근력이 다른 집단에서 골격근의 기준유전자로 PPIA와 eEF-1 γ 를 적용할 수 있지만, PPIA는 인간 골격근의 근원세포(myoblast)가 성장하여 근관조직(myotube)을 형성하는 데 발현이 일정하지 않다.

또 다른 연구에서 17개 돼지조직을 이용해 하우스키핑 유전자 9개를 평가하였을 때, 이 중 ACTB, RPL4, TBP 및 HPRT1 유전자가 돼지조직에서 가장 높은 안정성을 나타냈다. 이 연구를 통해 ACTB와 RPL4가 발현이 잘되는 전사체에서 사용하기 적합한 하우스키핑 유전자이고, TBP와 HPRT1은 적은양이 존재하는 전사체에서 사용하기 적합한 하우스키핑 유전자라고 밝혔다[44]. 추가적으로 조직별 HMBS 하우스키핑 유전자 발현도 고려하였지만 닭의 간과 공장에서 기준유전자로 적합한 HMBS는 돼지의 골수에서 높은 발현 특성을 나타냈다. 돼지에서는 성장단계별과 품종별 특성이 고려된 하우스키핑 유전자로부터 기준유전자를 선택하는데 적용의 범위가 확대되었다.

2.4 Mouse housekeeping genes

쥐는 인간의 유전학, 생물학 및 질병 연구를 위해 널리 사용되는 동물모델이다. 쥐 모델을 이용한 질병에 대한 연구에서 하우스키핑 유전자의 발현 안정성을 보기 위해 카에롤레인(caerulein)과 LPS(lipopolysaccharide)로 자극된 급성 췌장염의 쥐 모델에서 10개 하우스키핑 유전자의 발현 안정성을 평가하였다. geNorm과 BestKeeper 소프트웨어 분석에서 RPL13A 및 YWHAZ를 가장 안정적인 유전자로 확인하였고, NormFinder 소프트웨어 분석에서 GAPDH, UBC(ubiquitin C), RPL13A 및 YWHAZ가 가장 높은 발현 안정성을 가진 적절한 참조 유전자 세트에 확인되었다. geNorm 알고리즘은 하우스키핑 유전자 쌍을 가지고 발현의 안정성을 비교하기 때문에, 서로 발현조절 하는 하우스키핑 유전자에 영향을 받지만, NormFinder는 그룹간의 비교이기 때문에 영향을 받지 않는다. 알고리즘적 접근 방법이 달라서 geNorm과 NormFinder에서 찾은 기준유전자의 우선순위는 차이가 있다. 이러한 결과를 통해 급성 췌장염 쥐 모델에서 RPL13A와 YWHAZ의 조합이 가장 안정

적인 하우스키핑 유전자로 나타났다[45]. 특히, ACTB mRNA는 카에롤레인과 LPS 자극된 급성 췌장염에서 발현이 급격하게 증가하였지만, 글루코스 대사과정과 관련된 GAPDH mRNA는 카에롤레인 처리군에서만 증가하였다.

쥐의 탈신경화에 의해 유도된 근육위축에 영향을 미치는 연구를 통해 14개 하우스키핑 유전자의 발현 평가는 TBP가 가장 적합하였다[46]. TBP mRNA는 탈신경손상에 의한 근육위축에서는 발현변이가 존재하지 않았지만, 대측근육(contralateral muscle)에서는 발현이 약간 증가하는 경향이 관찰되었다. 더 나아가서, 근육위축에서 글루코스 분해로 에너지 생산하는 GAPDH와 미토콘드리아 ATP 합성과정에 관여하는 PGK1 하우스키핑 유전자는 안정성이 감소하였다. PGK1의 결핍은 용혈성 빈혈(hemolytic anemia)을 나타낸다고 보고되어 있다[47].

쥐의 태반 조직의 조성은 매우 이질적이고, 조직의 복잡성 때문에 다른 조직에서 기준유전자로 선택된 하우스키핑 유전자가 태반 조직에서는 안정적으로 발현이 되지 않을 수 있다. 쥐의 태반 조직에서 15개 후보 하우스키핑 유전자를 NormFinder와 BestKeeper 소프트웨어를 통해 발현 안정성을 분석하였을 때, Polr2a(RNA polymerase II subunit A) 및 UBC 유전자가 태반 조직에서 가장 높은 발현 안정성을 보였다[48]. 다만, Polr2a 하우스키핑 유전자는 태아의 성에 따라 발현 안정성의 차이가 존재한다. 선행연구 결과를 기반으로 조직 유형과 질병유형에 따라 적합한 하우스키핑 유전자를 선별해야 한다. 쥐 유전체 정보 데이터베이스인 MGI (Mouse genome informatics, www.informatics.jax.org/)에서 특정 하우스키핑 유전자 발현정보, 기능, 척추동물 유사성 정보이외에 인간과 쥐에서 질병 연관 유전자 정보도 얻을 수 있어 매우 유용하다.

2.5 Housekeeping genes comparison in various species

인간과 쥐는 유전체 영역내 약 90% 비슷한 신테니(syteny)를 가지고 있어 기능이 유사하게 진화된 orthologous 유전자는 78.5%의 아미노산 동일성을 가진다. 이러한 특징 때문에 쥐는 알츠하이머병, 다운증후군, 전염병 및 예방요법 등 인간생물학을 연구하는데 질병 모델로 가장 많이 활용되었다[49,50]. 인간과 쥐의 하우스키핑 유전자를 비교하기 위해 GTEx(genotype-tissue expression)와 ARCHS4(all RNA and ChIP-seq sample and signature search)의 데이터베이스를 이용하여 웹 기반

사이트인 HT Atlas v1.0(housekeeping gene transcript Atlas)에서 인간과 쥐의 하우스키퍼 유전자들의 리스트를 정리하였다. 이 데이터베이스를 통해 인간 52개 조직과 세포유형에서 하우스키퍼 유전자 2,176개가 존재한다. 또한, 쥐 14개 조직과 세포유형에서 하우스키퍼 유전자 3,277개를 발견하였다. 두 종의 하우스키퍼 유전자를 비교하여 인간과 쥐에서 1,121개의 공통된 하우스키퍼 유전자가 있다. 공통된 하우스키퍼 유전자 목록 중 세포주기, 전사조절에 관여하는 MBD1(methyl-CpG binding domain protein 1), 여러 세포유형들의 세포이동을 조절하는 AAMP(angio associated migratory cell protein), 세포 분열 주기에 관여하는 CDC34(cell division cycle 34), 성장 억제 활성을 가지는 BAP1(BRCA1 associated protein 1) 등이 포함된다. 이러한 유전자들은 공통적으로 인간과 쥐에서 생명활동에 필수적인 기능을 지닌다[51-55]. 인간에게 중요한 육류 자원 중 하나인 돼지는 잘 연구된 생명체로서, 인간과의 해부학적인 유사성을 고려하여, 생명의학 연구에 모델로 사용된다.

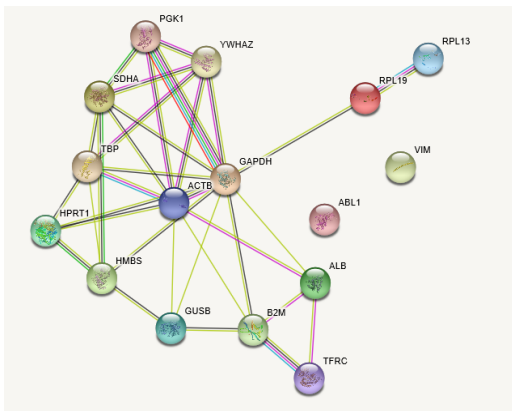


Fig. 1. Network of the functions of housekeeping genes. Housekeeping genes are involved in various metabolic processes in biological processes, and have essential functions in cells through molecular functions such as double-stranded RNA binding and identical protein binding. Each gene symbol is explained in the description on the Table 1.

인간과 돼지의 하우스키퍼 유전자 비교에서 돼지 하우스키퍼 유전자의 총 인트론 길이는 28,108bp이지만 인간은 21,062bp이며, CDS(coding sequence, CDS)의 길이는 돼지가 2,181bp, 인간은 1,460bp의 길이로 인간 하우스키퍼 유전자의 길이가 돼지에 비해 짧게 나타

났다. 인트론 이외에도 돼지 하우스키퍼 유전자의 구조는 인간보다 훨씬 길게 나타났다. 또한 인간과 돼지에서 공통적으로 존재하는 1,102개 하우스키퍼 유전자를 제외하고 인간 특이적인 하우스키퍼 유전자 1,690개와 돼지 특이적인 하우스키퍼 유전자 1,022개가 각각 존재한다. 인간과 돼지에서 존재하는 종 특이적 하우스키퍼 유전자의 기능은 GO(gene ontology) term enrichment analysis를 통해서 분석하였을 때, 생물학적 과정에 대한 기능에서 약간의 차이를 보였고, 기초대사 유전자 발현과 관련된 활성 분자에서 유사한 경향을 보였다. 이것은 인간과 돼지가 유사한 세포기능을 가지고 있다는 것을 의미한다. 이러한 결과로 보아 인간과 돼지의 하우스키퍼 유전자는 목록과 구조가 다양하면서도, 종의 특이성과 별도로 세포에게 필수적인 세포기능을 유지하기 위해 발현하고 있다[56]. 다양한 척추동물(인간, 닭, 돼지, 쥐)에서 공통적으로 발현되는 하우스키퍼 유전자와 기능 정보, 기능 네트워크 정보(주로 대사과정과 외부자극에 대한 세포반응에 관여)를 Table 1,2와 Figure 1로 요약하였다. 이런 하우스키퍼 유전자는 종의 특이성에 영향을 받지 않고 종별로 발현량 확인 후 바로 기준 유전자로 적용가능하다.

3. 결론

조직 특이적 유전자(tissue-specific gene)는 여러 조직들과 세포유형에서 기능과 표현형이 더 반영된 유전자의 그룹이다. 조직 특이적 유전자와 다르게 하우스키퍼 유전자는 모든 조직에서 발현되어 세포기능을 유지하지만, 발현 수준은 조직이나 세포에 따라 차이가 존재할 수 있으며, 특정 환경에서 바뀔 수 있다. 다만, 발현되는 모든 조직에서 발현의 차이가 2배 이상 나지 않아야 한다. 또한 하우스키퍼 유전자는 조직유형, 발달상태, 세포주기 또는 외부환경과 상관없이 발현되기 때문에 유전자 발현 연구의 대조군이 되는 기준유전자로 사용되며, 하우스키퍼 유전자 과발현 또는 억제는 여러 질병과 암에서도 연관이 있다. 하우스키퍼 유전자가 질병과 직접적으로 연관성이 있을 때, 비정상세포 및 조직 유형에 따라 발현 안정성이 변화되어 질 수 있다. 따라서 유전자 발현 연구를 위해 여러 조건에서 하우스키퍼 유전자의 안정성을 평가하여 각 조건에 맞는 적절한 기준유전자를 선택해야한다.

References

- [1] C. M. Chen, Y. L. Lu, C. P. Sio, G. C. Wu, W. S. Tzou, T. W. Pai, "Gene ontology based housekeeping gene selection for RNA-seq normalization" *Methods*. Vol.67, No.3, pp.354-363, June 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.019>
- [2] R. D. Barber, D. W. Harmer, R. A. Coleman, B. J. Clark, "GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues" *Physiol. Genomics*. Vol.21, No.3, pp.389-395, May 2005.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1152/physiolgenomics.00025.2005>
- [3] C. A. Hutchison, R. Y. Chuang, V. N. Noskov, N. Assad-Garcia, T. J. Deerinck, M. H. Elisman, J. Gill, K. Kannan, B. J. Karas, L. Ma, J. F. Pelletier, Z. Q. Qi, R. A. Richer, E. A. Strychalski, L. Sun, Y. Suzuki, B. Tsvetanova, K. S. Wise, H. Q. Smith, J. I. Glass, C. Merryman, D. G. Gibson, J. C. Venter, "Design and synthesis of a minimal bacterial genome" *Science* Vol.351, No. 6280, Mar. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aad6253>
- [4] F. Muller, S. Colla, E. Aquilant, V. E. Manzo, G. Genovese, J. Lee, D. Eisenson, R. Narurkar, P. Deng, L. Nezi, M. Lee, B. Hu, J. Hu, E. Sahin, D. Ong, E. Flectcher-Sananikone, D. Ho, L. Kwong, C. Brennan, Y. A. Wang, L. Chin, R. A. DePinho, "Corrgendum: Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer" *Nature*. Vol.525, No.7568, pp.278-278, Jul. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14609>
- [5] E. Eisenberg, E. Y. Lavanon, "Human housekeeping genes are compact" *TRENDS*. Vol.19, No.7, pp.362-365, July 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00140-9)
- [6] C. I. Castillo-Davis, S. L. Mekhedov, D. L. Hartl, E. V. Koonin, F. A. Kondrashov, "Selection for short introns in highly expressed genes" *Nature genetics*. Vol.31, No.4, pp.415-418, July 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1038/ng940>
- [7] A. E. Vinogradov, "Compactness of human housekeeping genes selection for economy or genomic design?" *Trands in Genetics*. Vol.20, No.5, pp.248-253, May 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.03.006>
- [8] E. Eisenberg, E. Y. Levanon, "Human housekeeping genes, revisited" *Trends in Genetics*. Vol.29, No.10, pp.569-574, Oct. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- [9] Y. Zhang, D. Li, B. Sun, "Do housekeeping genes exist?" *PLoSOne*. Vol.10, No.5, May 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123691>
- [10] F. Nazari, A. Parham, A. F. Maleki, "GAPDH, β -actin and $\beta 2$ -microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose- and marrow-derived mesenchymal stem cells" *J. Anim. Sci. Technol*. Vol.57, No.18, May 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s40781-015-0050-8>
- [11] Y. Panina, A. Germond, S. Masui, T. M. Watanabe, "Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process" *Scientific reports*. Vol.8, No.1. June. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26707-8>
- [12] C. Guo, S. Liu, J. Wang, M. Z. Sun, F. T. Greenaway, "ACTB in cancer" *Clinica chimica acta*. Vol.417, pp.39-44, Feb. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.012>
- [13] Y. Wang, Y. Zhao, J. Li, H. Liu, C. W. Ernst, X. Liu, G. Liu, Yu. Xi, M. Lei, "Evaluation of housekeeping genes for normalizing real-time quantitative PCR assays in pig skeletal muscle at multiple developmental stages" *Gene*. Vol.565, No.2, pp.235-241, July 2015
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.016>
- [14] B. Kozera, M. Rapacz, "Reference genes in real-time PCR" *J. Appl. Genetics*. Vol.54, No.4, pp.391-406, Sep. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>
- [15] J. Vandesompele, K. D. Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. V. Roy, A. D. Paepe, F. Speleman, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes" *Genome Biology*. Vol.3, No.7, June 2002.
DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- [16] W. De Spiegelaere, J. D. Wieloch, R. Weigel, V. Schumacher, H. Schorle, D. Nettersheim, M. Bergamann, R. Brehm, S. Kliesch, L. Vandekerckhove, C. Fink, "Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages" *PLoSOne*. Vol.10, No.3, Mar. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
- [17] M. W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet, T. P. Neuvians, "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: bestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations" *Biotechnology Letters*. Vol.26, No.6, pp.509-515, Mar. 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000019559.84305.47>
- [18] W. Ju, A. O. Smith, T. Sun, P. Zhao, Y. Jiang, L. Liu, T. Zhang, K. Qi, J. Qiao, K. Xu, L. Zeng, "Validation of housekeeping genes as reference for reverse-transcription-qPCR analysis in busulfan-injured microvascular endothelial cells" *Biomed. research international*. Vol.2018, Oct. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4953806>
- [19] G. L. Zhou, L. Xin, W. Song, L. J. Di, G. Liu, X. S. Wu, D. P. Liu, C. C. Liang, "Active chromatin Hub of the mouse α -globin locus forms in a transcription factory of clustered housekeeping genes" *MCB*. Vol.26, No.13, pp.5096-5105, April 2006.

- DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.02454-05>
- [20] Z. Tu, L. Wang, M. Xu, X. Zhou, T. Chen, F. Sun, "Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes" *BMC*. Vol.7, No.31, Feb. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-31>
- [21] K. E. Kouadjo, Y. Nishida, J. F. Cadrin-Girard, M. Yoshioka, J. St-Amand, "Housekeeping and tissue-specific genes in mouse tissues" *BMC Genomics*. Vol.8, No.127, May 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-127>
- [22] C. W. Chang, W. C. Cheng, C. R. Chen, W. Y. Shu, M. L. Tsai, C. L. Huang, I. C. Hsu, "Identification of human housekeeping genes and tissue-selective genes by microarray meta-analysis" *PLoSOne*. Vol.6, No.7, July 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022859>
- [23] K. J. McLoughlin, E. Pedrini, M. MacMahon, J. Guduric-Fuchs, R. J. Medina, "Selection of a real-time PCR housekeeping gene panel in human endothelial colony forming cells for cellular senescence studies" *Front. Med.* Vol.6, No.33, Mar. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00033>
- [24] A. Bee, Y. Ke, S. Forootan, K. Lin, C. Beesley, S. E. Forrest, C. S. Foster, "Ribosomal protein L19 is a prognostic marker of human prostate cancer" *Clin. Cancer. Res.* Vol.12, No.7, pp.2061-2065, April 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2445>
- [25] M. N. Hong, H. R. Kim, I. K. Kim, "Ribosomal protein L19 overexpression activates the unfold protein response and sensitizes MCF7 breast cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced cell death" *BBRC*. Vol.450, No.1, pp.673-678, July. 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.036>
- [26] H. Wang, L. N. Zhao, K. Z. Li, R. Ling, X. J. Li, L. Wang, "Overexpression of ribosomal protein L15 in associated with cell proliferation in gastric cancer" *BMC. Cancer*. Vol.6, No.91, April 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-91>
- [27] X. Zhao, L. Shen, Y. Feng, H. Yu, X. Wu, J. Chang, X. Shen, J. Qiao, J. Wang, "Decreased expression of RPS15A suppress proliferation of lung cancer cells" *Tumor Biol.* Vol.36, No.9, pp.6733-6740, April 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3371-9>
- [28] J. Q. He, A. J. Sandford, I. M. Wang, S. Stepaniants, D. A. Knight, A. Kicic, S. M. Stick, P. D. Pare, "Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells" *Eur. Respir. J.* Vol.32, No.3, pp.755-762, April 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1183/09031936.00129107>
- [29] C. Zhen, Y. Zhang, J. Ma, L. Wang, W. Jiang, Y. Shi, Q. Wang, "Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq" *ABBS*. Vol.46, No.4, pp.330-337, April 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt153>
- [30] D. A. Butterfield, S. S. Hardas, M. L. B. Lange, "Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration" *Jad*. Vol.20, No.2, pp. 369-393, April 2010.
DOI: <https://doi.org/10.3233/jad-2010-1375>
- [31] N. E. Kadmiri, I. Slassi, B. E. Moutawakil, S. Nadifi, A. Tadevosyan, A. Hachem, A. Soukri, "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and alzheimer's disease" *Pat. Bio.* Vol.62, No.6, pp. 333-336, Dec. 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.08.002>
- [32] M. Caracausi, A. Piovesan, F. Antonaros, P. Strippoli, L. Vitale, M. C. Pelleri, "Systematic identification of human housekeeping genes possibly useful as references in gene expression studies" *Mol. Med. Rep.* Vol.16, No.3, pp.2397-2410, Sep. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6944>
- [33] D. W. Burt, W. Carre, M. Fell, A. S. Law, P. B. Antin, D. R. Maglott, J. A. Weber, C. J. Schmidt, S. C. Burgess, F. M. McCarthy, "The chicken gene nomenclature committee report" *BMC. Genomics*. Vol.10, No.S5, July 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-S2-S5>
- [34] C. S. Nascimento, L. T. Barbosa, C. Brito, R. P. M. Fernandes, R. S. Mann, A. P. G. Pinto, H. C. Oliveira, M. V. Dodson, S. E. F. Guimaraes, M. S. Duarte, "Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction assays on *pectoralis major* muscle in chicken (*Gallus gallus*)" *PLoSOne*. Vol.10, No.5, May 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127935>
- [35] J. Lenart, K. Kogut, E. Salinska, "Lateralization of housekeeping genes in the brain of one-day old chicks" *Gene expression patterns*. Vol.25-26, pp.85-91, Nov. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.06.006>
- [36] S. Bages, J. Estany, M. Tor, R. N. Pena, "Investigating reference genes for quantitative real-time PCR analysis across four chicken tissues" *Gene*. Vol.561, No.1, pp.82-87, April 2015
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.016>
- [37] D. Borowska, L. Rothwell, R. A. Bailey, K. Waston, P. Kaiser, "Identification of stable reference genes for quantitative PCR in cells derived from chicken lymphoid organs" *VII*. Vol.170, pp.20-24, Feb. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jvetimm.2016.01.001>
- [38] J. Zhang, Y. Y. Gao, Y. Q. Huang, Q. Fan, X. T. Lu, C. K. Wang, "Selection of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in yellow-feathered broilers" *IJAC*. Vol.17, No.2, pp.540-546, Aug. 2017.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2017.1365633>
- [39] M. F. Rothschild, "Advances in pig genomics and functional gene discovery" *Comp. Funct. Genom.* Vol.4, No.2, pp.266-270, April 2003.

- DOI: <https://doi.org/10.1002/cfg.261>
- [40] M. J. Uddin, M. U. Cinar, D. Tesfaye, C. Looft, E. Tholen, K. Schellander, "Age-related changes in relative expression stability of commonly used housekeeping genes in selected porcine tissues" *BMC*. Vol.4, No.441, Oct. 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-441>
- [41] H. A. Jinnah, J. E. Visser, J. C. Harris, A. Verdu, L. Larovere, I. Ceballos-Picot, P. Gonzale-Alegre, V. Neychev, R. J. Torres, O. Dulac, I. Desguerre, D. J. Schretlen, K. L. Robey, G. Barabas, B. R. Bloem, W. Nyhan, R. D. Kremer, G. E. Edey, J. G. Puig, S. G. Reich, "Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease" *Brain*. Vol.129, No.5, pp.1201-1217, May. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1093/brain/awl056>
- [42] J. Zhang, Z. Tang, N. Wang, L. Long, K. Li, "Evaluating a set of reference genes for expression normalization in multiple tissues and skeletal muscle at different development stages in pigs using quantitative real-time polymerase chain reaction" *DNA and cell biology*. Vol.31, No.1, pp.106-113, Jan. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1249>
- [43] X. Feng, Y. Xiong, H. Qian, M. Lei, D. Xu, Z. Ren, "Selection of reference genes for gene expression studies in porcine skeletal muscle using SYBR green qPCR" *J. Biotech*. Vol.150, No.3, pp.288-293, Nov. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.949>
- [44] A. B. Nygard, C. B. Jorgensen, S. Cirera, M. Fredholm, "Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR" *BMC*. Vol.8, No.67, Aug. 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-67>
- [45] Z. Yan, J. Gao, X. Lv, W. Yang, S. Wen, H. Tong, C. Tang, "Quantitative evaluation and selection of reference genes for quantitative RT-PCR in mouse acute pancreatitis" *BioMed*. Vol.2016, Mar. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/8367063>
- [46] R. Nakao, S. Yamamoto, Y. Yasumoto, K. Kadota, K. Oishi, "Impact of denervation-induced muscle atrophy on housekeeping gene expression in mice" *MUS*. Vol.51, No.2, pp.276-281, Feb. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1002/mus.24310>
- [47] N. Noel, J. Flanagan, S. G. Kalko, M. J. R. Bajo, M. D. M. Manu, J. L. G. Fuster, E. Beutler, J. L. V. Corrons, "Two new phosphoglycerate kinase mutations associated with chronic haemolytic anaemia and neurological dysfunction in two patients from Spain" *Bjh*. Vol.132, No.4, pp.523-529, Jan. 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05882.x>
- [48] M. E. Solano, K. Thiele, M. K. Kowal, P. C. Arck, "Identification of suitable reference genes in the mouse placenta" *Placenta*. Vol.39, pp.7-15, Mar. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.12.017>
- [49] G. Monaco, S. V. Dam, J. L. C. N. Ribeiro, A. Larbi, J. P. de Magalhaes, "A comparison of human and mouse gene co-expression networks reveals conservation and divergence at the tissue, pathway and disease levels" *BMC*. Vol.15, No.259, Nov. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0534-7>
- [50] A. Breschi, T. R. Gingeras, R. Guigo, "Comparative transcriptomics in human and mouse" *NRG*. Vol.18, pp.425-440, May. 2017.
DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.19>
- [51] B. W. Hounkpe, F. Chenou, F. Lima, E. V. de Paula, "HT Atlas v1.0 database: redefining human and mouse housekeeping genes and candidate reference transcripts by mining massive RNA-seq datasets" *BioRxiv*. Oct. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1101/787150>
- [52] J. Xu, W. Zhu, W. Xu, W. Yao, B. Zhang, Y. Xu, S. Ji, C. Liu, J. Long, Q. Ni, X. Yu, "Up-regulation of MBD1 promotes pancreatic cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin" *CMM*. Vol.13, No.3, pp.387-400, Mar. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.2174/156652413805076740>
- [53] J. Hu, J. Qiu, Y. Zheng, T. Zhang, T. Yin, X. Xie, G. Wang, "AAMP regulates endothelial cell migration and angiogenesis through RhoA/Rho kinase signaling" *BMES*. Vol.44, No.3, pp.830-832, Mar. 2016.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/s10439-015-1537-7>
- [54] D. E. Spratt, G. S. Shaw, "Association of the disordered C-terminus of CDC34 with a catalytically bound ubiquitin" *JMB*. Vol.407, No.3, pp.425-438, April 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.047>
- [55] Y. J. Machida, Y. Machida, A. A. Vashisht, J. A. Wohlschlegel, A. Dutta, "The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1" *JBC*. Vol.284, No.49, pp.34179-34188, Dec. 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.046755>
- [56] K. Wei, T. Zhang, L. Ma, "Divergent and convergent evolution of housekeeping genes in human-pig lineage" *PeerJ*. Vol.6, May 2018.
DOI: <https://doi.org/10.7717/peeri.4840>
- [57] S. J. Xiao, C. Zhang, Q. Zou, Z. L. Ji, "TiSGeD: a database for tissue-specific genes" *Bioinformatics*. Vol.26, No.9, pp.1273-1275, Mar. 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq109>
- [58] E. D. L. Reboucas, J. J. D. N. Costa, M. J. Passos, J. R. D. S. Passos, R. V. D. Hurk, J. R. V. Silva, "Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues" *BABT*. Vol.56, No.1, pp.143-154, Feb. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>
- [59] J. Caradec, N. Sirab, C. Keumeugni, S. Moutereau, M. Chimingqi, C. Matar, D. Revaud, M. Bah, P. Manivet, M. Conti, S. Loric, "Desperate housekeeping genes: the dramatic example of hypoxia" *BJC*. Vol.102, Feb. 2010.

DOI: <https://doi.org/10.1038/si.bic.6605573>

- [60] S. N. Zhang, W. R. Hou, J. Yang, X. ding, Y. L. Hou, Z. S. Peng, "Cloning and sequence analysis of ribosomal protein L13 gene(RPL13) from ailuropoda melanoleuca" *CSIP*. Aug. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1109/csip.2012.6308911>
- [61] A. Bee, D. Brewer, C. Bessley, A. Dodson, S. Forootan, T. Dickinson, P. Gerard, B. Lane, S. Yao, C. S. Cooper, M. B. A. Djamgoz, C. M. Gosden, Y. Ke, C. S. Foster, "siRNA knockdown of ribosomal protein gene RPL19 abrogates the aggressive phenotype of human prostate cancer" *PLoSOne*. Vol.6, No. 7, Jul. 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022672>
- [62] M. Ogrodnik, H. Salmonowicz, R. Brown, J. Turkowska, W. Sredniawa, S. Pattabiraman, T. Amen, A. C. Abraham, N. Eichler, R. Lyakhovetsky, D. Kaganovich, "Dynamic JUNQ inclusion bodies are asymmetrically inherited in mammalian cell lines through the asymmetric partitioning of vimentin" *PNAS*. Vol.111, No.22, pp.8049-8054, June 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1324035111>
- [63] J. Y. J. Wang, "The capable ABL: What is its biological function?" *MCB*. Vol.34, No.7, pp.1188-1197, April 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.01454-13>
- [64] G. Fanali, A. D. Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, "Human serum albumin: from bench to bedside" *MAM*. Vol.33, No.3, pp.209-290, June 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>

채 한 화(Han-Ha Chai)

[정회원]



• 2010년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물 기능유전체, 화학·생명정보 응용연구(분자모델링)

노 윤 정(Yun Jeong Noh)

[정회원]



• 2019년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 전문연구원(석사)

<관심분야>

동물유전체 정보 활용 기능성 물질 탐색

노 희 종(Yun Jeong Noh)

[준회원]



• 2015년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축유전자원 특성정보 및 다양성

임 다 정(Dajeong Lim)

[정회원]



• 2007년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청
국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>

가축 집단 유전체, 생명정보 적용 유전체 선발