

Isolation of Putative *in vivo* Hoxc8 Downstream Target Genes Using ChIP-Cloning Method

Hyun Joo Chung, Myengmo Kang and Myoung Hee Kim[†]

Department of Anatomy, Embryology Lab., Brain Korea 21 Project for Medical Science,
Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Hox genes are known to be transcription factors controlling vertebrate pattern formation along the anteroposterior body axis by regulating many target gene expressions during vertebrate embryogenesis. In order to isolate *in vivo* Hox responsive target genes, ChIP-cloning technique has been applied using Hoxc8 antibody. Here murine embryo of day 11.5 post coitum (E11.5) highly expressing Hoxc8 gene was used after removing head and tail portions where Hoxc8 is rarely expressing. After fixation with formaldehyde, the chromatin DNAs harboring bound proteins were isolated. After sonication, about 0.5- to 1 Kb chromatin DNAs were immunoprecipitated with anti Hoxc8 antibody. After removing the bound proteins with proteinase K, DNAs were isolated, cloned into the pBluescript II SK vector, and then sequenced. Total 33 random clones sequenced were analyzed to be located at 12 different genomic regions. Among these, 8 turned out to be introns and 4 were intergenic regions localized in random chromosomes. The base composition of total cloned genomic sequences (6608 bp) were AT-rich, i.e., 40% GC. When the Hoxc8 core binding sites, such as TAAT, ATTA, TTAT, and ATAA were analyzed total number of 55, 45, 54, and 55 were found, respectively, which are than twice as many as expected number of 26. Although this *in silico* analysis does not mean that the ChIP-cloned sequence is real Hoxc8 regulatory element *in vivo*, these results strongly imply that the DNA fragments cloned through chromatin immunoprecipitation could be very much likely the putative Hoxc8 downstream target genes.

Key Words: Hoxc8, ChIP-Cloning, Hoxc8 downstream target gene, Mouse embryo

혹스 유전자 (Hox gene)는 척추동물의 발생과정 중 시공간 특이적으로 발현하여 몸의 형태를 만드는데 관여한다고 알려져 있다. 현재 사람이나 생쥐 같은 포유류의 경우 39개의 혹스 유전자가 분리되었으며 (Zelster et al., 1996), 이들은 4개의 염색체 위에 cluster -Hoxa, Hoxb, Hoxc, Hoxd cluster-를 이루며 위치하고 있다 (Akam, 1989; McGinnis et al., 1984; Krumlauf, 1992; Acampora et al., 1989). 모든 혹스 유전자는 180개의 뉴클레오티드로 이루어진 호메오박스 (homeobox) 서열을 포함하고 있으며 (McGinnis et al., 1984; Krumlauf, 1994) 이것은 60개의 아미노산으로 구성된 helix-turn-helix motif로 이루어진 호메오도메인 (homeodomain)을 암호화한다. 발생과정 중 Hox 유전자의 발현은 cluster 내에서의 상대적인 위치와 발현

하는 시기 및 발현 부위가 colinear하다는 것이 보고되어 있다 (McGinnis and Krumlauf, 1992). 즉, 더 3' 쪽에 위치한 Hox 유전자가 발생과정 중 더 먼저 발현하며 그보다 더 5' 쪽에 위치한 유전자가 더 나중에 발현하는 등 순차적으로 발현하며, 발현위치 또한 더 3' 쪽에 있는 유전자가 더 머리쪽 (anterior)에서 발현하며, 5' 쪽에 위치할 수록 점점 더 꼬리 쪽에서 발현하는 것으로 알려져 있다 (Akam, 1989; McGinnis and Krumlauf, 1992).

발생 중인 배자에서 모든 Hox 유전자들은 각각 자기만의 독특한 전방경계 (anterior boundary of expression)를 가지며 특정 시기에 발현한다고 알려져 있다 (Kim and Kessel, 1993; Püschel et al., 1990; Knittel et al., 1995; Min et al., 1996; Min et al., 1998; Kim et al., 2002). 따라서 배자의 전후축 (anteroposterior axis) 상의 일정 부위 (체절)에서 발현하는 특정 Hox 유전자의 조합이 달라지며 이들 조합을 혹스 코드 (Hox code)라고 한다 (Gaunt, 1994). 형질전환 생쥐 (transgenic mice)를 이용한 Hox 유전자의 ectopic 발현이나 (Balling et al., 1989; Kessel et al., 1990) loss-of-

*논문 접수: 2008년 1월 30일

수정재접수: 2008년 2월 16일

[†]교신저자: 김명희, (우) 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 해부학교실

Tel: +82-2-2228-1647, Fax: +82-2-365-0700

e-mail: mhkim1@yuhs.ac

function (knock-out) mutation의 도입 (Gendron-Maguire et al., 1993; Horan et al., 1994), 임신 중 레티노산을 투여하여 Hox 유전자의 발현을 정상위치가 아닌 다른 곳으로 변경, 즉 Hox code를 변경 시키면 변경된 곳에서 호메오틱 변이가 유발되어 형태가 바뀐다는 것이 보고되어 있다 (Kessel and Gruss, 1991). 또, transplantation 실험을 통해, 발생과정 중 가슴 부위의 체절을 목 부위로 이식하였을 경우 이식된 곳에서 만들어진 경추 (cervical vertebrae)에 갈비뼈가 만들어진다. 이것은 anteroposterior axis를 따라 각 체절에서 발현하고 있는 Hox 유전자들이 다르며 (Hox code가 다름), 또 체절 단계에 발현한 Hox 유전자의 발현 패턴에 의해 장래 흉추 (thoracic vertebrae)로 될 운명이 이미 결정되어 있었다는 것을 보여준다 (Tam and Trainor, 1994).

이상과 같이 Hox 유전자의 발현 이상에 의해 호메오틱 변이, 즉 형태 변이 (경추가 흉추로 변이)가 유발된다는 것은 알고 있으나 어떻게 이런 변이가 유발되게 되는지에 대한 연구는 매우 미미하다. 모든 Hox 단백질에 내재되어 있는 호메오도메인은 helix-turn-helix 구조를 갖는 DNA binding domain으로서 (Gehring et al., 1994^a; Gehring et al., 1994^b) 한 부위의 형태를 만드는데 관여하는 수많은 유전자들을 인식하고 이들의 발현을 총체적으로 그리고 또 체계적으로 조절해야 한다. 현재까지 Hox가 조절하는 유전자들을 분석하기 위하여 여러 가지 방법이 이용되었으나 아직까지 natural Hox response gene들에 관한 연구는 미미하다. 초기에는 enhancer trap (Capovilla et al., 1994), subtractive hybridization (Feinstein et al., 1995), reporter-effector 분석 (Mastick et al., 1995; Min et al., 2007), immunoprecipitation (Graba et al., 1992; Gould et al., 1995) 등을 이용한 분석이 시도되었고 근래에는 microarray (Lei et al., 2005)와 proteomics 기법을 이용한 시도 (Kwon et al., 2003)가 있었으나 모두 다 내재된 단점으로 인하여 아직도 Hox에 의해 조절 받는 유전자들의 총체적인 분석은 보고되어 있지 않은 상황이다. 특히 proteomics 기법을 이용한 방법의 경우 찾아진 단백질이 Hox에 의해 direct하게 조절 받는 것인지 아니면 indirect하게 2차적으로 조절 받는 것인지에 대한 논란의 여지가 있으며 reporter-effector 분석에 의한 방법은 Hox에 의해 activation되는 유전자만을 동정한다는 단점이 있었다. 그리고 Hox antibody를 이용한 immunoprecipitation 방법의 경우 얻은 DNA 서열이 실제로 세포 내에서 functional한 Hox binding site인가에 대한 논란의 여지가 있었다. 그리고 enhancer trap법

의 경우 random transgenic mice를 제작하여 유전자의 발현 패턴을 분석하여 유추하는 것이므로 이것 역시 진정한 Hox responsive gene인지에 대한 의문이 있었고 subtractive hybridization 역시 Hox에 의한 primary target인지 secondary target인지 구분하기가 명확하지 않았다. 또 가장 최근 보고된 microarray를 이용한 경우도 특정 MEF (mouse embryo fibroblast) cell에서 Hox를 과발현시킨 다음 서로 다르게 발현한 mRNA를 분석한 것으로 Lei 등 (2005)은 34개 (up- 16개, down- 18개) 유전자를 분석 보고하였는데, 이것 역시 한 종류의 특정 세포에서 Hox에 의해 달리 발현되는 유전자를 분석한 것으로 발생과정 중의 일반적인 유전자 조절과는 거리가 있었다.

따라서 본 실험에서는 ChIP (Chromatin Immunoprecipitation)-cloning (Weinmann et al., 2001; Lei et al., 2005; Birkaya et al., 2007)을 통해 *in vivo*에서 Hoxc8이 직접 결합하는 DNA를 분리하고 분석함으로써 Hox가 조절하는 downstream target 유전자들의 총체적인 분석을 시도하였다.

Hoxc8이 많이 발현하는 시기로 보고된 (Kwon et al., 2005) 임신 11.5일째의 생쥐 배자 (E11.5)를 분리하여 Hoxc8이 발현하지 않는 머리와 꼬리 그리고 발달 중인 내부장기를 제거한 다음 신경관 (neural tube)과 중배엽 유래 조직을 포함하고 있는 나머지 조직을 사용하여 blue pipette tip으로 조직을 기계적으로 분쇄한 다음 Tomotsune 등 (1993)의 방법에 따라 1% formaldehyde로 실온에서 5

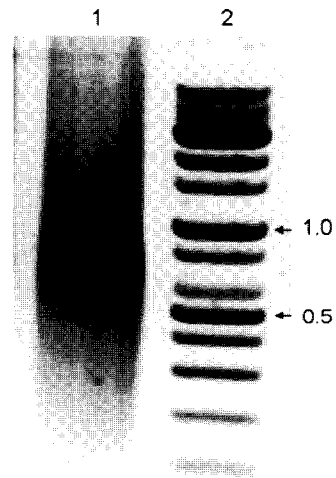


Fig. 1. DNA fragmentation through sonication. Chromatin DNAs were isolated from the murine embryo of day 11.5 post coitum and then sonicated as written in the text. The sonicated DNA samples (lane 1) were loaded on 1% agarose gel along with 1 Kb DNA molecular weight marker (lane 2). The size of DNA was indicated in Kb on the right.

분간 고정하였다. 2.5 M Glycine을 첨가하여 반응을 종료한 후 5,000 rpm으로 3분간 원심분리한 다음 cold PBS로 세척하고 SDS lysis buffer (1% sds, 10 mM EDTA, 50 mM Tris, PH 8.0)를 첨가하여 얼음에서 10분간 세포를 파괴하였다. 그 다음 Sonicator (Vibra cell, Sonics & Materials Inc., Newton, CT. USA)를 이용하여 (30 times, pulse on 10 sec, pulse off 30 sec, Amplitude 30%) chromatin DNA 길이가 약 500 bp-1 kb 되도록 절단하였다. 이 중 일부는 proteinase K를 처리하여 chromatin에 존재하는 단백질을 제거한 다음 agarose gel에서 전기영동하여 DNA 길이를 확인하였다 (Fig. 1).

나머지 sonicated genomic DNA sample에 ChIP-dilution buffer (0.01% sds, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris, pH 8.0, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF)와 Protein A agarose (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)를 첨가하고 4°C에서 30분간 반응시켰다. 다시 4,000 rpm으로 5분간 4°C에서 원심분리하여 agarose bead를 제거한 다음 상등액을 새 튜브로 옮기고, mouse-Hoxc8 monoclonal 항체 (MMS-266R, Covance Research Product Inc., Emeryville, CA, USA)를 첨가하여 4°C에서 3시간 반응시켰다. 여기에 다시 Protein A agarose bead를 첨가한 다음 4°C에서 1시간 반응시킨 후 10,000 rpm에서 30초간 원심분리하

여 agarose bead를 침전시켰다. 이것을 low salt immune complex wash buffer, high salt immune complex wash buffer, LiCl immune complex wash buffer, TE buffer로 각각 세척 (4,000 rpm에서 5분간 4°C 조건으로 원심분리)한 다음, elution buffer 500 µl를 첨가하여서 15분 이상 실온에서 반응시킨 다음 원심분리 (5분간 4,000 rpm)하여 상등액을 얻었다. 상등액 (500 µl)에 5 M NaCl 20 µl를 첨가하고 65°C에서 4시간 이상 반응시킨 다음 proteinase K를 첨가하고 55°C에서 한 시간 이상 반응시켜 DNA와 결합되어 있는 Hoxc8 단백질을 분해하였다.

DNA를 정제하기 위해 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)을 동량 첨가해서 잘 혼합한 후, 12,000 rpm에서

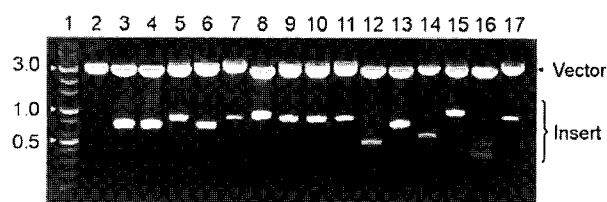


Fig. 2. Size analysis of ChIP clones. Plasmids were isolated from each white (lanes 3~17) and blue (lane 2) colonies, and then the *EcoRI/HindIII* restriction endonucleases were treated before loading onto the 1% agarose gel. 1 Kb molecular weight DNA marker was loaded (lane 1) and then the size of DNA was indicated in Kb on the left.

Table 1. Putative *in vivo* Hoxc8 binding regions (genes) in E11.5 murine embryo

No.	Gene	Chr. No. (position ^a)	Size ^b (bp)	% AT	No. ^c TAAT/ATTA/TTAT/ATAA
1	mutS homolog 5	17 (Int 11)	647	54	3 / 1 / 1 / 3
2	tau tubulin kinase 2 isoform 1,2	2 (Int 10)	385	64	4 / 4 / 4 / 4
3	118.3 kb at 5' side: hypothetical protein 22 kb at 3' side: Similar to lanin A-related sequence	6 (IG)	754	58	3 / 5 / 9 / 3
4	zinc finger protein 804A	2 (Int 1)	845	73	22 / 14 / 15 / 24
5	phosphatase and tensin homolog	19 (Int 5)	95	64	1 / 2 / 0 / 1
6	calpain 10	1 (Int 5-Ex 6)	274	40	0 / 0 / 0 / 0
7	usher syndrome 3A homolog isoform 1,2	3 (Int 1)	626	58	4 / 2 / 2 / 5
8	G protein-coupled receptor 128	16 (Int 4)	500	56	2 / 3 / 3 / 2
9	47 kb at 5' side: LOC73410 50 kb at 3' side: 5'-3' exoribonuclease 1	9 (IG)	717	66	7 / 4 / 4 / 5
10	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2	2 (Int 1)	939	60	5 / 5 / 9 / 3
11	134 kb at 5' side: Rho GTPase activating protein 28 221 kb at 3' side: LOC320858	17 (IG)	407	59	3 / 3 / 4 / 1
12	139 kb at 5' side: Cardiomyopathy associated 3 isoform 2 459 kb at 3' side: UDP-Gal:β-GlcNAc β1,3-galatosyl transferase	2 (IG)	419	65	1 / 2 / 3 / 4
Total			6608	60	55 / 45 / 54 / 55

^a Genomic regions of intron (Int), exon (Ex), or intergenic region (IG) were indicated.

^b The size of genomic DNA cloned in the *EcoRV* site of the vector.

^c The number of each sequences (TAAT/ATTA/TTAT/ATAA) found in the cloned DNA.

Table 2. Nucleotide sequences of genomic DNA cloned as putative *in vivo* Hoxc8 binding regions

1. mutS homolog 5

CGGTATCGATAAGCTTGATCTTGTGAGTCAGAGCCCTGTGGGGTGGGCACTACCTCCACCTTCAGCTCACAGATGAGCAGTCTGAAGCACAAAGGCCAAT
GGCAGCCTCAACTCTCACAGCAAATTAATGAACTGGGGCTTGAATCAAGGGTGTAGCTCCCTTGTCTCATTGTCCACATGCACCCTGCTAAGCTGCAA
CCCAACGTTTACTCTGAGATAATATCACACTAAGTTACCCACACAGCTTCTAACTCACTCTGTAGCCAGGATAGCCTTGTGCTTCTTTTGTCTTGGGG
GCACAAGGCTCAATTGGGTGTGATGTCGAAAGTCTGTAATCCAGCAGCTCTGGAACTGAGGCAGATGGATCACAAATTCAGATCAACTGAGATGTCA
TAGTCATTTAAGGCTAGCCTGTGCTATATTTTGTAGATCCTGTGTCTAAGCAACCAACAAGCAAATGTCAGTGTCTATAAGGCAGAGACAAAAGGGCTG
CTACAAGTTTGTAGGCTAGCCTACTCTACACAGCAAGTTACAGGAAGTACATGTCTACACAGTGAAGCCCTGTCTCAAGCTAGACAAATAAAAATTTTGT
GTTGTTGTGGTTTTTGTGTTGTCGAGACTGGGTTTTCTGTAGCCCTGGCTGTCTGGAAGTCACTATCGAATTCCTGCAGCCCC

2. tau tubulin kinase 2 isoform 1,2

CGGTATCGATAAGCTTGATAACAGGTTCTCTCTGTAACAAAGACAATTTAAGGCAAACCTTAGCTGAACTTTGGAAAGGCTCATTAACTGCTACCCTACAG
AATTACTTCAGTGGTACAGATGAACAAAGCCAGTAACATTGACTGACTGCCAGCACACAGCACAGGCAGCTTTCACAGATATATAATCTAGTTACACA
GTTTCTTCTGGTCAAGAAATTTGTAACAACTTATTATCATGTTCTATATCAGTGGTTCTCAACTTTTCTAAGGCTTCAACCTTTAATACAGTTCTCTCA
TGTTGTGGTGACTCTCAACATAAAATATTTTTCATGCTATTTTCATAACTGTAATTTTTCTGTATGAAACATAATGTAATATCTGTGTTTTCCAATG
GTCTATCGAATTCCTGCAGCCCC

3. 118.3 kb at 5' side: hypothetical protein-22 kb at 3' side: Similar to lanin A-related sequence

CGGTATCGATAAGCTTGATTTTATTAATAGAGCTTCTTTCTCTGGGAAGTCTGCCGGGAGTCCCTGGAGGGCCAGCTGAGAGGCTCAGAGCTGCTAATG
CTTTCTAAACCAGAGAGAAAAGAAAGGGAAAGAGCTCACACAGACAACCTCACACTCAGCAAAGTGGAAAATGGCTGCACCACCTTCTTTTATGGCTTGT
TTTTTTATAGCTTTAAGCCAAAAGTTCTCTATGTAAGAAAGAAATACCTCATAGAGAAGATGTTACAAAAAGGGGAGTTACAGGAAGGTATCGATAACA
AGTTCAAAGCAGTGTTCACACTGTAAGCTCGTTACAAGTTCAGAGCCACAGTTTTTACATGGCCTTGCCTTAACATAGTGCACACCTGTAGCTTTCATCT
TTGACCCGTAATATTTCCCTTGAACGCAGATTTGTCCCAAGCCTATTTATTTATCTTTTTATATAATATGAAAGCTCATTGTACTTCTATTTATGAA
GCCTTTACTTACCATCATGAGGCGTGGGCACATTCTATTATGATATAACTTTTCTAGCAAACAACCTAAAACCACCTCTTAAAACCTTTCTCCCTCCTC
ACTCCTTTCCGGCTGGAAGCATGGAGGATGTTCCAGAGAAGAAAAGAAAGGTTGCCGCTGTGCCAGAAACCCTTAAGAAAAGCAAGGAATTTCCGAG
AGTTGAAGGTGAATCACCCGAGGAAGAAGTTGCCCTGAAGACACTGCAAGAGGGAAGGAGGAAGCTCAGTGTATCGAATTCCTGCAGCCCC

4. zinc finger protein 804A

CGGTATCGATAAGCTTGATATTAATAATCAAGATGACATATTATTGACAACATTTGTCTCTACTTCCAAAAGTCCAGATAAATATGCATATTTCTATGTTA
AAACAACCTATGGTCAAAGAATCATTTGAGATGATGAAAAAATAAAAGCCTTAACTTCAAGCAATATAGTGAGAAAACATGAATGCAAGAGGTCTCT
TGGTATTTAAATGTTGGAGTCAACAACAAATCTGCTGTGATAAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA
AGTTTTTAATCAAATTTTTTATTAAGTGTGTGAAACAAAATAATTTATTTGATAAATTTTCCACATAAACATAGTACTAAATGATAGTAGTCTATAT
AATGCCAAAATTCCTGCAATAGTATCTTTTACATTATATTGCTATTTATATAAATACCAATGAATCTAAGAAAGTGAATAGATTAAAAAATTAATG
GCACTGACCTGAATTCATAGCTCAGACTATAACCTGTTTAACTGAAATAGTTTATACCTATGATTTTGTCTACTAAGTGTGAGTTTCAAGAAAGATTT
TTGAAGCATTAGAATATTTTGAATGTAATTTATTTCTTTTAAATTTCTTATATGTTAATGTTCTGTGAGCATGTTTCTTTAAGAAAATAAATATT
ATTTGCTCAAGACTCAGATTTAGTATCTCTGTGAGGATCAGGAACAAAAGCCTAAAAGTCTTATTTATGTAATAGTCTTCAACCACATGTACAA
ACAAAATAAACTCATGCATATTTAATCTTCTCTTAGCGGTAGCAAACATCCACTTTTATGATCGAATTCCTGCAGCCCC

5. Phosphatase and tensin homolog

CGGTATCGATAAGCTTGATTTCTAGGTATATTAACATGCAACAGGTACAGTAGATCCTACTGATGTGGCTGTAAGATGCTAAATTAAGGAGTCTTA
GTATAATGCAATGGATCGAATTCCTGCAGCCCC

6. calpain 10

CGGTATCGATAAGCTTGATTCCTGCAGAGGTGAAGGGTGAACAGGTAGAGCCAGCTAAGGAGTCTGAGTGTGCTGGCCAACTCCAGGAAGGAGAGTTC
TGGGTGAGGAAAGAGGAGTTCCTCAGGGAGTTGATGAGGTCACCATCGGCTACCCAGTCCACAGAGGCCGGCCACCTACAGAGTCTCCACACAGGTAGGG
CTGCCGCCAGGAGCCTGCATGGGCTGCCACACCATGGACAGATACCGTCTTTCTGCTGATGACTGACTGGGGTTTGGAGGTGGGAGCGGATCGAAT
TCCTGCAGCCCC

7. Usher syndrome 3A homolog isoform 1,2

CGGTATCGATAAGCTTGATCTTCTGAGAATGGCTTGGCCACAGTTATAACATGCTGAGATGGAGCAAAGCACCAGGCTGCATAAATATTCGACCCGAT
ATCAAGTTTGTCTAGCTAGTTCTATCATACCTGTATTGAGAGTATCCAACCTACCACATCTAGCCTGAGCATTAGTGTGCTATCTATGAGAAGCAAAGT
TTTTAATTTGGTGGCCATCTTCTTACTATGGGGTACACACCTGAATGTTGAGGGTCTAAAAGGTCAGGCAACCATAAAAATGTTTCTGAATGAGTAAAAAT
TAATTCAAAATCGAATGTGTAGTGAATGTGAGGTGTTGCAGGTGGCAGTGTATGTTGATGCAAGATTTTCATGTCAGGTTTGGTGTGAGCTGCAGAGC
ACTGTACATCTGTAACACCACAAATCGGTGATGCACACCACCTATCCACTCACACCTCACAATGGCGATGCACACCACACATCCACTCACACCACACA
ATGGAGGCACACACTACTTAAAACACTAGGCTCAGTTCAGACTGTCTTGCATATAAGGTTTTCTGCCCTAATAAACATCATGAAAACAAAGGCTTTTT
AGTAGTTTCTACATCATATCTAGCATGTAAGTATCAAGTTAATTCGAATTCCTGCAGCCCC

8. G protein-coupled receptor 128

CGGTATCGATAAGCTTGATATGTTTAAAGCTTTATATTTAATATTTAAGCCACAGATAAATATATAGGTTGAGAAAAGTTAGAATCTTGTAGTGAGAATG
CTTTTGGCCAGGGACCATCGCAAGCTGACACAGAGCTACTGCTGAGTTTAAAAATCCACAACGGGAGGAGAGGCCCTTGGTCTAGCGAAGATCATATGCC
CCAGTACAGGGGAATGCCAGGCCAAGAAGGGGAGTAGGTTGGGAGCAAGGCCAGGAGAGGAATAGGGGGCTTTGGGGATAGCATTTGAAATG
TAAATGAAGAAAATATCTAATTTAAAAAATCCACAAGGAACCAAGCAATTTCTTATCACAGATGGCCAGGGTGTGGGTGGGTTGAAAATGAGAGAG
CGGTTGTGAGGATGATCAGTTACATATTTGAAAGGAAGACTACAGATTTCTGGAATCTGACAAGCCAGTATTAGCCTCTCCACGCTGCGATTTCCAAGC
TGTGTAACCTTTAGGATAATTCGAATTCCTGCAGCCCC

Table 2. Continued

9. 47 Kb at 5' side: LOC73410- 50 Kb at 3' side 5'-3' exoribonuclease 1

CGGTATCGATAAGCTTGATAGCAAGTACCTTTACTGCTGAGCCATTACACTAGTCCATGGTGTGACACATTTGTAACAGAGATTGAAGGAACTTCTCAG
ATGGGGTACCCTGAGCTTTAATATACAGTCTCTAAATTTAGAGTGAGCTGTAATGGTACCTGTATTTGGAAGATTTAAGTTTGTAGAACCGATTGAA
TCTAATGAAGTTCAGGTTGCCACAGAAATAAATTTGTTTCAGAAAACCTTGAGAATGTGACTAGGCAGAACCTGACTTGTAGTTTCATACTCATAATTTTTT
AAGTTAAATTCACCTTAAGCATTTTAGTTCACATAAAAAATGTCTTCACACAAAAGTTTACTCCTGTTTTACTGTTATATTTGAGATTTGTGGATTCTTGT
TTTCTAAAACATGGGCTATAGTAAAGTATTATTTTTTCTGGAAGATCTCGAGCATAGAGCAACTATAATAAATATCAATTAGAATCTATGCCTTTTCAGA
AAATTTACAGCTATGTAGTTGTGAGATGAGAGCTGTTTGAACATGTTTAAACAAAAGTACAGCTGAGGACACAAAGGAAAAGTCACTACTGCCTAATGGG
AGACTTTCTCTTATTTTAAAGGAAAAGCTAAAGACACCAGCTGTGTTTACAGTTAGATTTTAAAGAAAAGCACTACTTTTATTTCTATGTGAAGTCGGA
AGTACAGGAGATGATATCACTGGGCAAAAAGTGGCAGATCGAATTCCTGCAGCCCG

10. ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2

CGGTATCGATAAGCTTGATCAAAAAGGAAAAATAAAAAGACTTAAAGTAAATGGGGAAAAATTTGTCTACAGTTAAACGGAATCAACCTAAAGGATCCTT
TTGTGTGAGTGGTGGGGTGTGTGTGTGTGTGTTGTGAAGAGAGAGAGAGAGAGAATCCATTTAATAATTTAATATGAACAAAGCA
TATGAAGGGGCCAAAAGTGTTCCTTGTAAATTTAGCTGTCAATGTTTCAGCCATCATGAAAGTATAAAAACAAACATGTATCTATTTGTCATCGGAAATC
GGCTGTGGTTCATGTCATATAGCATCTATGCCTAGCTGTGTTTCTGAATCCAGGCAGTGCCTCCTGTGAGCTTTAGTTCGGACCTTACTATTAT
TATCTCCTCCATTAAGGCCTAAGAGTTGGAAACAGTGGTGCCTCTGCTGAAGAGACTGTTTTCTGAAGTTGAATCTAAGTTACATTTTTTTATAGA
TGTTTTGTTTTAATTTTTATTTTTTAAAGATTTATTTATTTATATATGTAAGTACACTGTAGCTGTCTTCAGACACACCAGAAGAGGGCGTC
AGATCTCGTTACGGATGTTTGTGAGCCACCATGTGGTGTCTGGGATTTGAATCCAGACCATTTGGAAGAGCAGTTAGTACTCTTACCCTAGGCCATC
TCACCAGCCCCTAAGTTACATTTGAAACCTTCTGGTCAAAAAGATTTTTTTTTCTGCAGTATTTACTCTGTCTGTTGTGTTGGAAGTGGTTCAG
GTGAGCATCACTGAGCTAGGTTTTCTGATTCCTGTTATCTGCCACAGTAGCCTGAGCTCTGTGCTCCATATTCGGGATGATGACTGTCTGGGTTACT
CTTACAGCAGGAAAACAAAGGAGAGTCAATTTGCCACAGCTACATAGTGGGCGGCAAGATCGAATTCCTGCAGCCCG

11. 134 Kb at 5' side: Rho GTPase activating protein 28-221 Kb at 3' side: hypothetical protein LOC320858

CGGTATCGATAAGCTTGATCAGACACACAGAGTCCCTTTCTTAAGAGTGACTTAAATTTCTGAAATTTGAGTTACCATAGTCATATACCTGGGGACGA
GAGGCCACAGAAAGGGCTTAGGTCACAGGGTCACTGAAAGTCAGAAAGCTGTGTTCTCCAAGGACCAGCTGTTGGGCTTTCCCATGGTCATTTCTGA
AGCAATTCCTTAGAGAGAAAGAGTTCCTGGGACTCCTCATAAAAGCCAGCTGCCAACCAATGTCCTTGGGATGCAATGTCATTAATAGTAAGAA
AACAAAAGAAGCTTGTATGGTGTATTTATGCAACTATACATTTTTATTATTATTAGTTTTTTTCATAATGTATATTGGCACTCACCTGTATGTA
ATCTGGGTATCAATGCATCCCTGGTATCGAATTCCTGCAGCCCG

12. 139 Kb at 5' side: cardiomyopathy associated3 isoform 2-459 Kb at 3' side: UDP-Gal: beta GlcNAc beta 1,3-galatosyl transferase

CGGTATCGATAAGCTTGATGCAAACTGACTTCAACCCATTTTACTGAAGGGTATGGAGTTCCTTGACCCTGGGGGAAAAATGCATCAATTCCTTTTGTGC
ACAAAATGATTTCTAGAGTATAAGTATCATTTTTATCTTTTTTAAAATTTGGAAGACATATTTCCAAGAATATGTCAGTTTTTTGGCTGGCAGGAGA
AGTCACAATCTGGTTAGAGAAAGAGTGGCCAGTGTATTATATAAGAAGAACATCTCTTAGACTGAGTTCTGTGATTCGAAATGTCATTAATAGTAAGAA
TCAAGATAAATCCAACAGTAAATATTTCTGCCAGAGCTCAAGTGGCTGTAAAATTTTGTGTGTTTCAGTATCATAATCTTCTCTTCCACAAGACA
AAAAAAGAAAGAAAGCAAGTATGTAATTCATAGATCGAATTCCTGCAGCCCG

The 5' and 3' vector sequences were written in a normal letter whereas each genomic sequences cloned in *EcoRV* (GATATC) site in pBluscript II SK(+) were written in a bold letter

15분간 4°C에서 원심분리하고 상등액을 얻었다. 여기에 동량의 100% ethanol을 첨가하여 -70°C에 16시간 반응시킨 후 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여서 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척 (12,000 rpm, 4°C, 5분간 원심분리)하고 완전히 말린 다음 30 μl의 멸균수에 녹였다.

이 DNA들은 pBluscript II SK(+)벡터의 *EcoRV* site에 삽입하고 *E. coli* 균주 *DH5α*에 형질전환한 다음 X-gal과 IPTG를 포함하고 있는 agarose plate에 도포하였다. 37°C에서 16시간 배양한 다음 흰색 콜로니들을 선택하여 T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')과 T3 (5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3') primer로 PCR을 수행하여 insert를 포함하고 있는 클론들을 얻었다. 이 클론들로부터 플라스미드를 추출한 후 제한효소 *HindIII*와 *EcoRI*으로 절단하여 sonicated DNA fragment (0.5~1 kb)가 제대로 삽입된 것을 확인하였다 (Fig. 2).

무작위로 33개의 클론을 선택하여 염기서열을 결정하고, 미국 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 운영하는 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 프로그램을 이용하여 생쥐 Reference genomic DNA 서열과 대조하여 putative *in vivo* Hoxc8 binding fragment를 분석하였다. 그 결과 6개의 클론은 염색체 17번에 위치하고 있는 MutS homolog 5 (MSH5) 유전자의 intron 11의 일부와 일치하였으며, 클론 7개는 tau-tubulin kinase 2 isoform 1, 2 (염색체 2번)의 intron 10 서열과 일치하였다. 또, 클론들 중 8개는 6번 염색체 위에 존재하는 hypothetical protein과 lanin A-related sequence 사이의 intergenic region 서열과, 2개는 2번 염색체에 존재하는 zinc finger protein 804A의 intron 1 서열과, 2개는 3번 염색체에 위치하는 Usher syndrome 3A homolog isoform 1, 2의 intron 1서열과, 또 2개는 16번 염색체에 위치하는 G protein-coupled receptor 128의 intron

4 서열과 일부 일치하는 것으로 분석되었다. 그 외에도 19번 염색체에 위치하는 Phosphatase and tensin homolog (intron 5), 1번 염색체에 존재하는 Calpain 10의 intron 5와 exon 6부위, 2번 염색체에 존재하는 ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2의 intron 1의 일부 서열이 각각 하나씩 클론되었으며, 또 9번 염색체의 LOC-73410과 5'-3' exoribonuclease 1 사이의 intergenic region, 17번 염색체에서 Rho GTPase activating protein 28과 LOC320858 사이의 intergenic region, 그리고 2번 염색체에서 cardiomyopathy associated 3 isoform 2와 UDP-Gal:beta GlcNAc beta 1,3-galactosyl transferase 사이의 intergenic region에 위치하는 서열이 각각 하나씩 클론된 것으로 분석되었다 (Table 1). 흥미 있게도 분석된 서열의 67%는 특정 유전자의 intron 서열이었으며 나머지는 intergenic region이었다. 이것은 Hoxc8 단백질이 5' 조절 서열뿐만 아니라 intron과 결합하여 유전자의 발현을 조절할 가능성이 있음을 제시하여준다. 이상의 결과가 *in silico* data이긴 하지만 최근 들어 intron의 유전자 조절 기능 (Eddy and Maizels, 2008)이 점점 부각되고 있는 점에 비추어 매우 흥미 있는 결과로 생각된다.

클론된 genomic DNA의 뉴클레오티드 염기 비율을 분석한 결과 클론 한 개를 제외하고는 AT 염기가 평균 60% 이상 존재하였다. 생쥐 유전체에서 5' UTR과 coding 부위는 각각 59%, 그리고 51% GC로 구성되어 있다는 보고 (Zhang, 2004)와 비교하여, 본 연구에서 클론된 서열은 매우 AT-rich 하다는 것을 알 수 있다. 또 AT rich 서열 중에서도 Hoxc8 단백질이 결합하는 것으로 보고된 core binding 서열 (Kwon et al., 2003; McCabe and Innis, 2005) 즉, TAAT/ATTA, TTAT/ATAA은 평균 256 bp 마다 한번 ($1/4^4$)의 확률로 존재하여야 하나 각각의 서열들이 매우 많이 존재하고 있음을 알 수 있었다. 총 클론된 6608 bp 서열 중 TAAT/ATTA/ TTAT/ATAA가 평균 25~26 개씩의 확률로 존재하여야 하나 각각 55/45/54/55개로 분석되었다 (Table 1, 2). 그러나 이렇게 core 서열이 많이 존재한다는 것이 생체 내에서 실제로 Hoxc8 단백질의 결합을 의미하지는 않으므로 추후 여기서 분리된 putative Hoxc8 binding 서열을 pGL2같은 reporter 벡터에 클론하여 Hoxc8 존재할 때 reporter 유전자의 발현 증감을 관찰 (min et al., 2007)함으로써 *in vivo* regulatory 서열인지를 분석할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 이상의 결과는 ChIP-cloning이라는 방법을 통해서 전체 genome 중 Hoxc8 단백질이 직접 결합하고 있는 DNA 서열, 즉 Hoxc8의

direct target 서열의 총체적인 분석이 가능함을 제시해 준다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (20070401-034-030)과 학술진흥재단의 우수여성과학자 연구지원사업 (KRF-2005-204-C00074)의 지원에 의해 이루어진 것이며 본 논문의 염기서열분석을 도와준 김상훈학생에게 감사드립니다.

REFERENCES

- Acampora D, D'Esposito M, Faiella A, Pannese M, Migliaccio E, Morelli F, Stornaiuolo A, Nigro V, Simeone A, Boncinelli E. The human HOX gene family. *Nucleic Acids Res.* 1989. 17: 10385-10402.
- Akam M. Hox and HOM: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 1989. 57: 347-349.
- Balling R, Mutter G, Gruss P, Kessel M. Craniofacial abnormalities induced by ectopic expression of the homeobox gene Hox-1.1 in transgenic mice. *Cell* 1989. 58: 337-347.
- Birkaya B, Ortt K, Sinha S. Novel *in vivo* targets of Δ Np63 in keratinocytes identified by a nidified chromatin immunoprecipitation approach. *BMC Mol Biol.* 2007. 43: 1-15.
- Capovilla M, Brandt M, Botas J. Direct regulation of decapentaplegic by Ultrabithorax and its role in Drosophila midgut morphogenesis. *Cell* 1994. 76: 461-475.
- Eddy J, Maizels N. Conserved elements with potential to form polymorphic G-quadruplex structures in the first intron of human genes. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan 10 [Epub ahead of print]
- Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS, Mann RS. Identification of homeotic target genes in Drosophila melanogaster including nervy, a proto-oncogene homologue. *Genetics* 1995. 140: 573-586.
- Gaunt SJ. Conservation in the Hox code during morphological evolution. *Int J Dev Biol.* 1994. 38: 549-552.
- Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem.* 1994^a. 3: 487-526.
- Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wüthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 1994^b. 78: 211-223.
- Gendron-Maguire M, Mallo M, Zhang M, Gridley T. Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal

- elements derived from cranial neural crest. *Cell* 1993. 75: 1317-1331.
- Gould AP, Brookman JJ, Strutt DI, White RA. Targets of homeotic gene control in *Drosophila*. *Nature* 1990. 348: 308-312.
- Graba Y, Aragnol D, Laurenti P, Garzino V, Charnot D, Berenger H, Pradel J. Homeotic control in *Drosophila*; the scabrous gene is an *in vivo* target of Ultrabithorax proteins. *EMBO J*. 1992. 11: 3375-3384.
- Horan GS, Wu K, Wolgemuth DJ, Behringer RR. Homeotic transformation of cervical vertebrae in *Hoxa-4* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994. 91: 12644-12648.
- Kessel M, Balling R, Gruss P. Variation of cervical vertebrae after expression of a *hox-1.1* transgenic in mice. *Cell* 1990. 61: 301-308.
- Kessel M, Gruss P. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 1991. 67: 89-104.
- Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Inf*. 1993. 5: 301-308.
- Kim MH, Shin JS, Park S, Hur MW, Lee MO, Park H, Lee CS. Retinoic acid response element in *HOXA-7* regulatory region affects the rate, not the formation of anterior boundary expression. *Int J Dev Biol*. 2002. 46: 325-328.
- Knittel T, Kessel M, Kim MH, Gruss P. A conserved enhancer of the human and murine *Hoxa-7* gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development* 1995. 121: 1077-1088.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994. 78: 191-201.
- Krumlauf R. Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* 1992. 14: 245-252.
- Kwon Y, Ko JH, Kin B-G, Kim MH. Analysis of plausible downstream target genes of *Hoxc8* in F9 teratocarcinoma cells-Putative downstream target genes of *Hoxc8*. *Mol Biol Rep*. 2003. 30: 141-148.
- Kwon Y, Shin J, Park HW, Kim MH. Dynamic expression pattern of *Hoxc8* during mouse early embryogenesis. *Ana Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005. 283: 187-192.
- Lei H, Wang H, Juan AS, Ruddle FH. The identification of *Hoxc8* target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005. 102: 2420-2424.
- Mastick GS, McKay R, Oligino T, Donovan K, López AJ. Identification of target genes regulated by homeotic proteins in *Drosophila melanogaster* through genetic selection of Ultrabithorax protein-binding sites in yeast. *Genetics* 1995. 139: 349-363.
- McCabe CD, Innis JW. A genomic approach to the identification and characterization of *HOXA13* functional binding elements. *Nucleic Acids Res*. 2005. 33: 6782-6794.
- McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 1984. 37: 403-408.
- McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992. 68: 283-302.
- Min H, Kang M, Kim MH. A homeotic gene, *Hoxc8* regulates the expression of proliferating cell nuclear antigen in NIH3T3 cell. *J Exp Biomed Sci*. 2007. 13: 239-244.
- Min W, Cho M, Jang SI, Chang HH, Lee CS, Jun MH, Kim MH. Sequence and functional analysis of an upstream regulatory region of human *HOXA7* gene. *Gene* 1996. 182: 1-6.
- Min W, Woo HJ, Lee CS, Lee KK, Yoon WK, Park HW, Kim MH. 307-bp fragment in *HOXA-7* upstream sequence is sufficient for anterior boundary formation. *DNA Cell Biol*. 1998. 17: 293-299.
- Püschel AW, Balling R, Gruss P. Position-specific activity of the *Hox1.1* promoter in transgenic mice. *Development* 1990. 108: 435-442.
- Tam PP, Trainor PA. Specification and segmentation of the paraxial mesoderm. *Anat Embryol*. 1994. 189: 275-305.
- Tomotsune D, Shoji H, Wakamatsu Y, Kondoh H, Takahashi N. A mouse homologue of the *Drosophila* tumour-suppressor gene *l(2)gl* controlled by *Hox-C8 in vivo*. *Nature* 1993. 365: 69-72.
- Weinmann AS, Bartley SM, Zhang T, Zhang MQ, Farnham PJ. Use of chromatin immunoprecipitation to clone novel E2F target promoters. *Mol Cell Biol*. 2001. 21: 6820-6832.
- Zhang L, Kasif S, Cantor CR, Broude NE. GC/AT-content spikes as genomic punctuation marks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004. 101: 16855-16860.
- Zeltser L, Desplan C, Heintz N. *Hoxb-13*: a new Hox gene in a distant region of the *HOXB* cluster maintains colinearity. *Development* 1996. 122: 2475-2484.