

Histone Methylation Regulates Retinoic Acid-induced *Hoxc* Gene Expression in F9 EC Cells

Hyehyun Min and Myoung Hee Kim*

Department of Anatomy, Embryology Laboratory, Brain Korea 21 Plus project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Received December 1, 2014 / Revised March 11, 2015 / Accepted March 12, 2015

Hox genes encode a highly conserved family of homeodomain-containing transcription factors controlling vertebrate pattern formation along the anteroposterior body axis during embryogenesis. Retinoic acid (RA) is a key morphogen in embryogenesis and a critical regulator of both adult and embryonic cellular activity. Specifically, RA regulates *Hox* gene expression in mouse- or human-derived embryonic carcinoma (EC) cells. Histone modification has been reported to play a pivotal role in the process of RA-induced gene expression and cell differentiation. As histone modification is thought to play an essential role in RA-induced *Hox* gene expression, we examined RA-induced initiation of collinear expression of *Hox* genes and the corresponding histone modifications in F9 murine embryonic teratocarcinoma (EC) cells. *Hox* expression patterns and histone modifications were analyzed by semi-quantitative RT-PCR, RNA-sequencing, and chromatin immuno-precipitation (ChIP)-PCR analyses. The *Hoxc4* gene (D0) was initiated earlier than the *Hoxc5* to *-c10* genes (D3) upon RA treatment (day 0 [D0], day 1 [D1], and day 3 [D3]). The *Hox* nonexpressing D0 sample had a strong repressive marker, H3K27me3, than the D1 and D3 samples. In the D1 and D3 samples, reduced enrichment of the H3K27me3 marker was observed in the whole cluster. The active H3K4me3 marker was closely associated with the collinear expression of *Hoxc* genes. Thus, the *Hoxc4* gene (D1) and all *Hoxc* genes (D3) expressed H3K4me3 upon transcription activation. In conclusion, these data indicated that removing H3K27me3 and acquiring H3K4me3 regulated RA-induced *Hoxc* gene collinearity in F9 cells.

Key words : F9 EC cells, histone modification, *Hoxc* cluster, RA, retinoic acid

서론

Hox 유전자는 동물의 초기 배 발생 과정 중 시공간적으로 특이적인 발현을 하여 전후축 형태 형성에 중요한 영향을 끼치는 전사 조절 인자로 알려져 있다[2]. 사람이나 생쥐 같은 고등동물의 경우 39개의 *Hox* 유전자가 서로 다른 4개의 염색체에 각각의 cluster를 이루어 위치하고 있으며[9], 각 cluster에서 배아의 전후축을 따라 3'에서 5' 방향으로 *Hox* 유전자가 순서대로 위치하고 있다[17]. 발생 과정 중 *Hox* 유전자들이 순차적으로 발현된다는 것이 보고 되어 있으며[14], 이는 3'쪽에 위치한 유전자들이 5'쪽에 위치한 유전자보다 더 머리쪽(anterior)에서 발현하며, 시기적으로도 먼저 발현한다는 것을 뜻한다. 이러한 *Hox* 유전자의 위치특이적이고 순차적인 발현은 배아의 형태 형성에 있어 매우 중요한 역할을 하지만, 이에

대한 정확한 기작은 아직 많은 것이 밝혀져 있지 않다.

Hox 유전자의 순차적인 발현은 다양한 조절인자들에 의해 일어나고, 그 발현이 유지된다. Retinoic acid (RA) [18], FGF 신호[16], Cdx 단백질[25], polycomb group (PcG)과 trithorax group (TrxG) [19]이 중요한 조절인자로 알려져 있다. 이 중 RA는 비타민 A의 유도체로 배아와 중추 신경계의 발달에 관여하며 상피 조직의 성장과 분화를 조절하는 중요한 형태형성 인자(morphogen)이다[4, 22]. 또한 배아의 발생 과정 중 세포 수명 등 다양한 생물학적 기능을 조절하는 중요한 역할을 한다[13]. 특히, RA에 의해 *Hox* 유전자들의 발현이 유도되고, 배아의 전후축 형성에 중요한 역할 한다는 것이 보고 되어있지만[1, 5, 23] 그에 대한 자세한 기작은 잘 알려져 있지 않다.

Hox 유전자의 특이적인 발현은 크로마틴 구조 변형[12]과 히스톤 변이[19, 20]와 같은 정교한 후성유전학적 기작을 통해 조절된다고도 알려져 있다. 특히 히스톤 변이는 세포의 분화 과정 중 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 히스톤의 특정 아미노산 잔기의 메틸화, 아세틸화 등을 통해 *Hox* 유전자의 발현 양상이 변화된다고 보고된 바 있다[11]. 최근의 보고에 따르면 형태조절인자인 RA를 처리하여 유전자 전사를 유도한 F9 생쥐배아 기형암종(embryonic teratocarcinoma, EC)세포에서 발현에 따라 유전자 좌위에 다양한 히스톤 변이가 표지

*Corresponding author

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

E-mail : mhkim1@yuhs.ac

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

되어 있으며, 크로마틴 구조의 변형이 일어나기도 한다[6, 10, 12].

본 연구에서는 retinoic acid (RA)에 의해 유도된 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현이 유전자 좌위의 특정 히스톤 변이에 의해 일어나는 것인지를 밝히기 위해, F9 EC 세포에 날짜 별로 레티노산(RA)을 처리 한 후 RT-PCR, RNA-sequencing, ChIP assay 등의 분자생물·후성유전학적 기법을 이용하여 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 실험에 사용된 F9 배아암종(EC)세포는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, WelGENE Inc., Daegu, Korea)과 100 ug/ml penicillin-streptomycin (WelGENE Inc.)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, WelGENE Inc.) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 5×10⁷ M 레티노산(Retinoic acid (RA), Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)을 배지에 첨가하여 분화를 유도하였고, 시약 처리 후 1일째부터 3일째까지의 세포를 수집하였다. 시약을 처리하지 않은 세포는 대조군으로 이용하였다.

RNA의 분리

적정 조건에서 배양된 세포들의 RNA를 분리하기 위해 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하였다. 세포가 담긴 plate의 배지를 제거한 후 PBS로 세척해준 뒤, 5×10⁶ 세포 당 1 ul의 Trizol을 첨가하여 세포를 분쇄시켰다. 얼음에서 약 5분간 보관한 뒤 회사에서 제공한 방법에 따라 RNA를 분리하고 농도를 측정하였다. 1 ug의 RNA로 Im-Prom-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA를 제작하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 및 RNA sequencing

합성한 cDNA를 주형으로 한 PCR은 Taq DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였고, 모든 PCR primer는 이전의 논문과 동일하게 사용하였다[15]. PCR 반응 산물을 1% agarose를 이용하여 분리한 뒤, 발현의 차이를 비교하였다. 유전자 발현 정도를 정량적으로 분석하기 위해 Multi Gauge V3.0 software (Fuji, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 각각의 시료에서 추출한 RNA의 sequencing (RNA-seq (exon analysis))은 포항공대 생명과학과 노태영 교수님 실험실에서 진행하였다.

In silico data 분석

RNA-seq의 결과는 UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>)에서 Genome browser의 custom track에 law data를 upload한 뒤 대조군과 실험군의 *Hoxc* 유전자 발현 양상을 분석하고 그래프화 하였다.

ome.ucsc.edu/)에서 Genome browser의 custom track에 law data를 upload한 뒤 대조군과 실험군의 *Hoxc* 유전자 발현 양상을 분석하고 그래프화 하였다.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

각각의 시료에서 *Hoxc* 좌위의 히스톤 변이를 관찰하기 위해 ChIP assay를 수행하였다. F9 세포는 Formaldehyde (final 1%)를 첨가한 serum-free DMEM (WelGENE Inc.)배지로 교체하고 실온에서 15분간 반응시켰다. 2.5 M glycine을 첨가하여 반응을 종료한 후 12,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리시킨 다음 PBS로 세척하였다. 세척 후 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0)가 함유된 SDS lysis buffer 750 ul를 첨가하여 얼음에서 10분간 세포를 파괴하였다. 용해시킨 세포는 VibracellTM sonicator (VCX130, Sonics & Materials Inc., Newton, CT, USA)를 이용하여 (30 times, pulse on 10 sec, pulse off 30 sec, Amplitude 30%) chromatin DNA 단편이 500-1,000 bp가 되도록 절단하였다. 절단된 DNA sample에 salmon sperm DNA/protein A/G agarose beads (Santa Cruz, CA, USA)와 1 ug의 H3K4me3, H3K27me3 항체 (Abcam, Cambridge, UK)를 첨가하여 4°C에서 16시간 이상 반응시켰다. 다음 날, wash buffer로 세척한 뒤 elution buffer를 첨가하여 15분 동안 실온에서 반응시켰다. 4,000 rpm에서 5분간 원심분리하고 얻어진 상등액에 RNase A를 첨가하고 65°C에서 5시간 이상 반응시킨 뒤 PCR purification kit (COSMO Genetech, Seoul, Korea)로 DNA를 정제하였다.

ChIP-PCR

ChIP assay를 통해 얻은 chromatin DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며, PCR primer와 조건은 이전의 논문[15]과 동일하게 사용하였다. 반응 산물은 1.5% agarose를 이용하여 분리한 뒤, 각 시료 간의 히스톤 변이의 차이를 비교하였다.

결과 및 고찰

F9 배아암종 (embryonic carcinoma, EC) 세포에서 RA에 의한 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현 변화

레티노산(RA)에 의한 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현 변화를 관찰하기 위해 생쥐 F9 EC 세포에 5×10⁷ M의 RA를 3일간 처리했다. RA를 처리 하지 않은 day0 (D0), RA를 1일 처리한 day1 (D1)과 RA를 3일간 처리한 day3 (D3), 각각 세 가지의 RNA 시료를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 1A). RT-PCR 결과, D0는 *Hoxc* 유전자들의 발현이 일어나지 않았고 D1의 경우 *Hoxc4*만 발현이 유도되었으며, D3에서는 *Hoxc4*부터 *-c10*의 발현이 관찰되었다. *Hoxc13*은 D0에서부터 이미 발현하고 있으며 D3에서는 그 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었다. Fig. 1B는 agarose gel에 loading한 PCR 결과물을 β-actin

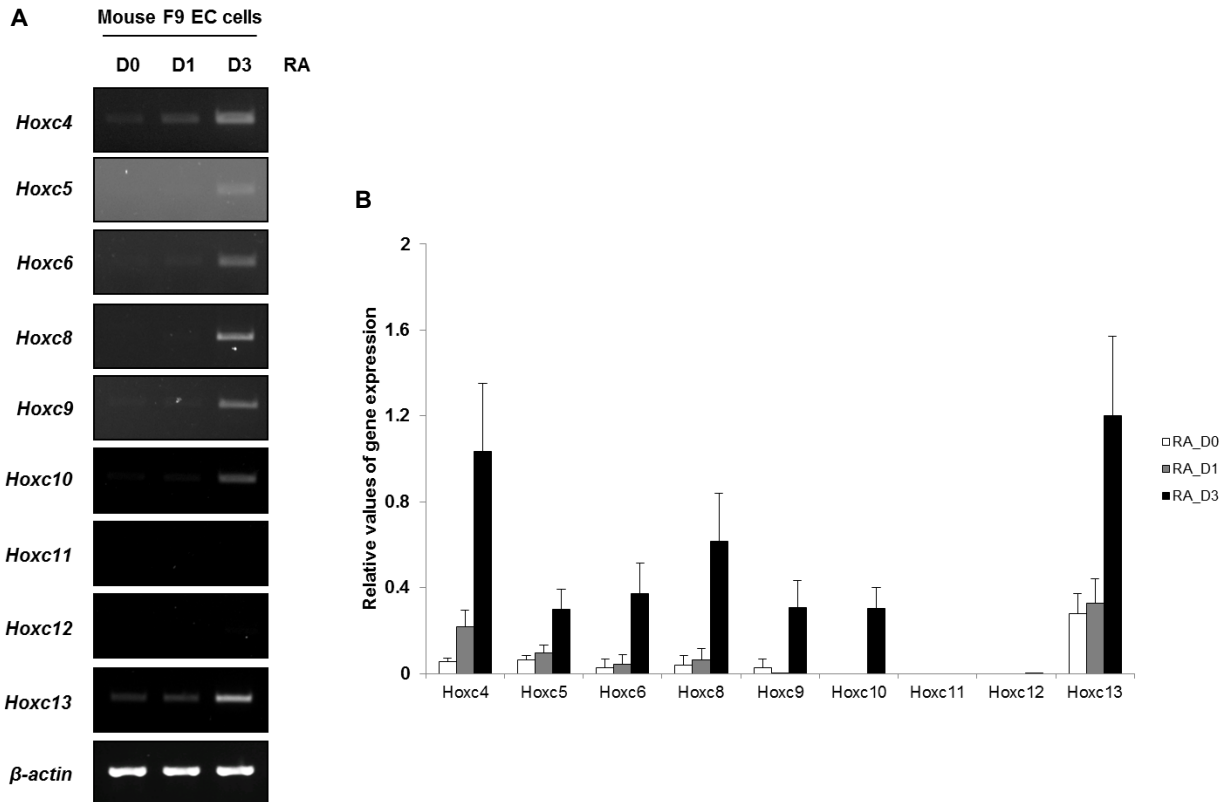


Fig. 1. Expression pattern of *Hoxc* cluster genes following Retinoic acid (RA) treatment in F9 EC cells by RT-PCR. Mouse F9 EC cells were cultured with RA for 3 days. Total RNAs were isolated each day from Day 0 (D0), Day 1 (D1) and Day 3 (D3), and then (A) RT-PCR was performed with each *Hoxc* primers. β -actin was used as a positive control for amplifiable cDNA. (B) The RT-PCR results were normalized using the β -actin signal. The data are representative of the three replicate experiments.

값으로 나누어 정량적으로 분석하여 그래프화한 결과로, D0와 비교하여 D1과 D3에서 *Hoxc* 유전자의 발현이 앞에서부터 차례대로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과들을 종합해 보면 F9 EC 세포에 RA를 처리하여 유도된 *Hoxc* 유전자의 발현은 시간에 따라 순차적으로 일어난다는 것을 알 수 있으며, 이는 이전의 결과와 동일하다[12, 13].

RNA-seq을 이용한 *Hoxc* 유전자의 발현 변화 관찰

레티노산(RA)에 의한 *Hoxc* 유전자 발현의 변화를 semi-quantitative RT-PCR로 관찰한 뒤, 이를 genome-wide하게 분석하기 위해 RNA-sequencing을 수행하였다. 이전 단계의 실험과 동일하게 생쥐 F9 EC 세포에 5×10^{-7} M의 RA를 3일간 처리하였다. RA를 처리 하지 않은 D0 (대조군)와 RA를 3일간 처리한 D3 (실험군), 각각의 RNA 시료를 이용하여 RNA-sequencing을 수행하였다. RNA-sequencing 데이터를 UCSC genome browser에 upload하여 분석한 결과, RT-PCR 결과와 동일하게 D0에서는 *Hoxc* 유전자의 발현이 거의 일어나지 않았고, D3에서는 *Hoxc4* 부터 *-c10*까지 발현되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 또한 *Hoxa*, *-b*, *-d* cluster 유전자의 발현도 D0와 비교하여 D3에서 증가하는 것을 관찰하였다(data not

shown). 이와 같이 F9 EC 세포에 RA를 처리하여 유전자의 전사 정도를 genome-wide하게 분석을 한 결과, *Hox* 유전자는 RA에 의해 발현이 유도되며 이는 4개의 *Hox* 유전자 집합체 (*Hoxa*, *-b*, *-c*, *-d* cluster) 모두에게 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다.

***Hoxc* 유전자의 순차적인 발현과 히스톤 변이와의 관계**

Hoxc 유전자의 순차적인 발현 변화가 크로마틴 구조의 리모델링과 관련되어 있다는 이전의 보고[12]와 더불어 *Hoxc* 유전자의 발현과 히스톤 변이와는 어떤 상관관계가 있는 지 알아보기 위해 히스톤 표지 항체로 ChIP assay를 수행하였다. RA를 날짜 별로 처리한 D0, D1, D3 세포에서 크로마틴을 분리하고, 전사 발현 시 히스톤에 표지 되는 마커인 H34me3 (histone H3 lysine 4 tri-methylation)과 전사 억제 시 히스톤에 표지 되는 마커인 H3K27me3 (histone H3 lysine 27 trimethylation) 항체를 첨가하여 반응시켰다. 반응 후 얻어낸 각각의 크로마틴 시료로 ChIP-PCR을 수행하였다(Fig. 3). D0의 경우 전사 억제 마커인 H3K27me3이 모든 *Hoxc* 좌위에서 관찰되었고, 전사 발현 마커인 H3K4me3은 관찰되지 않았다. D1에서는 모든 H3K27me3 변이가 사라지고 발현 중인 *Hoxc4*에

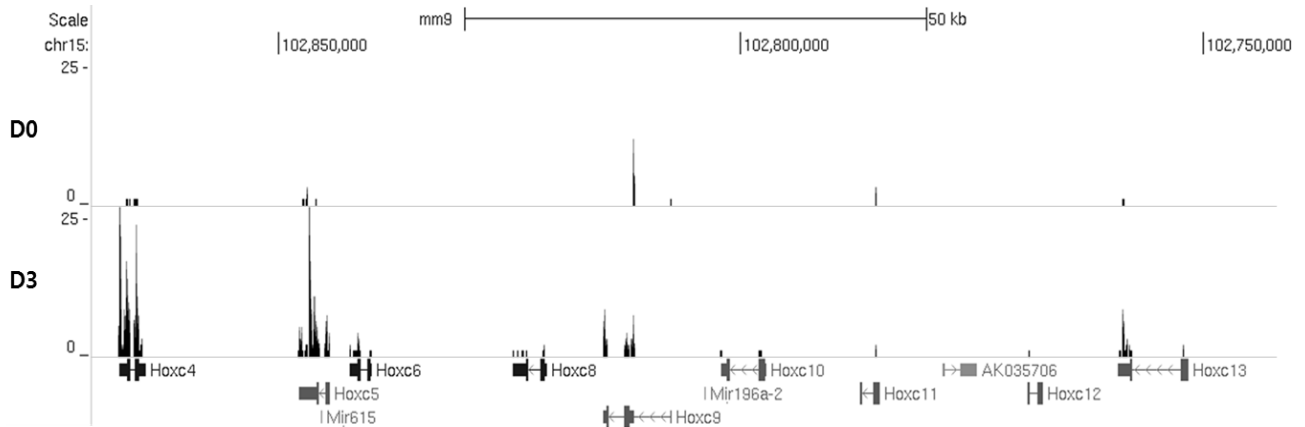


Fig. 2. Expression profiles of *Hoxc* genes following RA treatment in F9 EC cells by RNA-sequencing (RNA-seq). Total RNAs were isolated each day from D0 and D3 (D0: control cells with no RA treatment). These RNA-seq data were illustrated using UCSC genome browser. Reference genes are depicted at the lower in blue (*Hoxc* genes). Sequential expression pattern of *Hoxc* cluster genes in RA-untreated (D0) and treated (D3) samples.

대한 H3K4me3 변이의 표지만 관찰되었다. D3에는 D1과 마찬가지로 H3K27me3 변이가 관찰되지 않았고 모든 *Hoxc* 좌위에서 H3K4me3 변이가 표지된 것을 확인할 수 있었다. *Hoxc11*과 *Hoxc12*의 경우 D3에서 발현하지 않음에도 불구하고 H3K4me3 변이가 관찰되고 있는데, 이는 *Hoxc11*과 *Hoxc12* 유전자는 히스톤 변이만으로는 발현이 시작될 수 없어 다른 전사인자단백질이 필요한 것으로 유추할 수 있다. 최근 발표된 논문에서 *Hoxc11*, *-c12* 유전자가 posterior *Hoxc* 유전자의 upstream regulator의 영향을 받아 조절된다는 보고[7]가 되어 있어 단순히 히스톤 표지의 변이만으로는 설명할 수 없는 발

현 기작이 따로 존재할 것으로 보인다. *Hoxc13* 유전자는 D0에서부터 이미 발현되고 있으며, 이는 RA 처리에 의해 증가된다 (Fig. 1). 이 데이터는 1997년에 발표된 실험 결과와 유사한 것으로[3], 이 논문의 human EC 세포 또한 RA를 처리하기 전부터 *HOXC13*이 이미 발현하고 있으며 RA처리 후 약간의 발현 증가를 보이는 것이 관찰되었다. 이처럼 다른 *Hoxc* 유전자들의 순차적인 발현과 관계없이 *Hoxc13* 유전자가 따로 발현하는 것은 EC 세포의 특징으로 보인다. *Hoxc13*의 경우 히스톤 변이가 유전자의 발현 양상과 동일하게 움직이지 않는 것도 관찰되었는데 (Fig. 3), *Hoxc11*, *-c12*와 마찬가지로 히스톤 표지

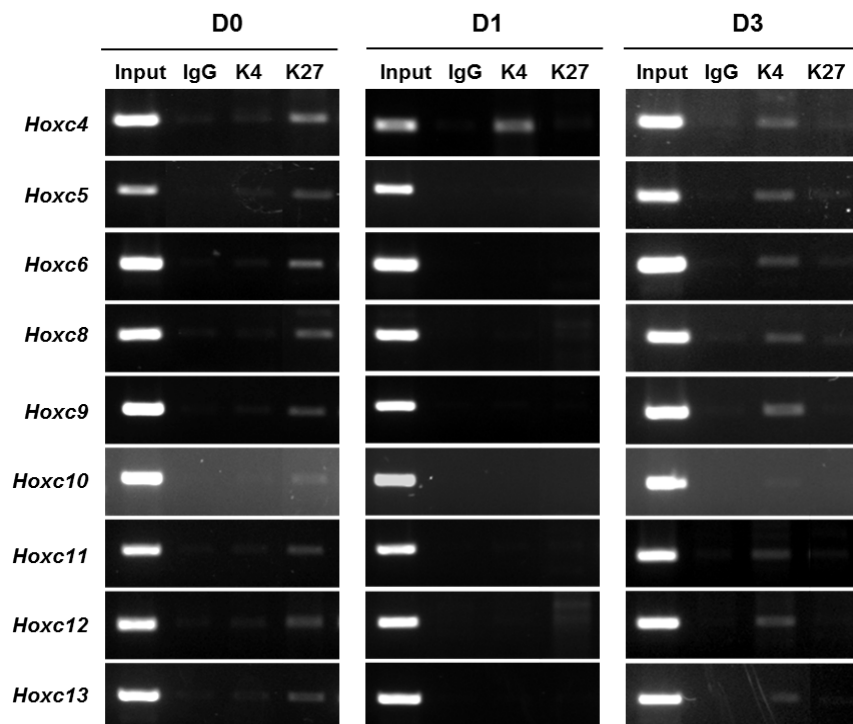


Fig. 3. Histone H3 modifications at *Hoxc* loci in mouse F9 EC cells. ChIP assays were performed with the indicated histone antibodies on cross-linked chromatin samples from the Day 0, Day 1 and Day 3 samples. Immunoprecipitated and input DNAs were amplified by PCR using region specific primers. The data show the results of one experiment of at least three independent experiments giving comparable results.

의 변이만으로는 설명할 수 없는 후성유전학적 발현 기작[8, 24]이 있을 것으로 예상된다. 또한, *Hoxc11-c13* 유전자 발현과 관계없이 전체가 동일한 히스톤 마커(D0:H3K27me3, D1:no enrichment (*Hoxc4* 제외), D3:H3K4me3)로 표지 되어있는 것을 볼 수 있는데, 이는 *Hoxc* 좌위 전체에서 히스톤 변이가 일어나지만 posterior *Hoxc* 유전자(*Hoxc11-c13*)의 경우 anterior *Hoxc* 유전자(*Hoxc4-c10*)와 다른 기작으로 발현이 시작되며, 특히 EC 세포에서 순차적인 발현과 관계없이 따로 독특하게 움직이는 *Hoxc13*의 발현은 특이적인 경로가 있을 것으로 추측된다. 이 과정을 밝히기 위해서는 추가적으로 심도 있는 연구가 필요할 것으로 보인다.

이상의 결과와 이전에 보고된 결과[12]를 통해 F9 EC 세포에서 *Hoxc* 유전자들이 발현하지 않을 때(D0)는 크로마틴 뭉침 현상과 함께 전사 억제 마커인 H3K27me3이 표지 되어 있으며, RA를 처리하여 *Hoxc* 유전자들이 발현할 때(D1, D3)는 크로마틴 풀림 현상과 함께 H3K27me3 변이가 사라지고, H3K4me3 변이는 유전자 발현에 따라 표지 되어있는 것을 알 수 있다. 결론적으로 F9 EC 세포에서 RA에 의해 유도된 *Hoxc* 유전자가 시간에 따라 순차적으로 발현하게 되는 것은 *Hoxc* 좌위의 히스톤 메틸화가 중요한 후성유전학적 기작의 하나로 작용하여 일어나는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(2013R1A1A2008399) 및 연세대학교 의과대학(6-2014-0147)의 연구비 지원을 받았습니니다.

References

- Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D. and Mavilio, F. 1991. HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.* **7**, 329-334.
- Favier, B. and Dolle, P. 1997. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 115-131.
- Flagiello, D., Gibaud A, Dutrillaux, B, Poupon, M. F. and Malfoy, B. 1997. Distinct patterns of all-trans retinoic acid dependent expression of HOXB and HOXC homeogenes in human embryonal and small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* **415**, 263-267.
- Gillespie, R. F. and Gudas, L. J. 2007. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of *Hoxa1*, *RARbeta* (2), and *Cyp26A1* in F9 embryonal carcinoma cells. *J. Mol. Biol.* **372**, 298-316.
- Kashyap, V., Gudas, L. J., Brenet, F., Funk, P., Viale, A. and Scandura, J. M. 2011. Epigenomic reorganization of the clustered Hox genes in embryonic stem cells induced by retinoic acid. *J. Biol. Chem.* **286**, 3250-3260.
- Kashyap, V., Laursen, K. B., Brenet, F., Viale, A. J., Scandura, J. M. and Gudas, L. J. 2013. RARgamma is essential for retinoic acid induced chromatin remodeling and transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* **126**, 999-1008.
- Kong, K. A., Lee, J. Y., Oh, J. H., Lee, Y. and Kim, M. H. 2014. Akt1 mediates the posterior Hoxc gene expression through epigenetic modifications in mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 793-799.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krumlauf, R. 1992. Evolution of the vertebrate Hox homeobox genes. *Bioessays* **14**, 245-252.
- Laursen, K. B., Wong, P. M. and Gudas, L. J. 2012. Epigenetic regulation by RARalpha maintains ligand-independent transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 102-115.
- Lee, E. R., Murdoch, F. E. and Fritsch, M. K. 2007. High histone acetylation and decreased polycomb repressive complex 2 member levels regulate gene specific transcriptional changes during early embryonic stem cell differentiation induced by retinoic acid. *Stem Cells* **25**, 2191-2199.
- Lee, J. Y., Min, H., Wang, X., Khan, A. A. and Kim, M. H. 2010. Chromatin organization and transcriptional activation of Hox genes. *Anat. Cell. Biol.* **43**, 78-85.
- Lee, Y., Lee, J. Y. and Kim, M. H. 2014. PI3K/Akt pathway regulates retinoic acid-induced Hox gene expression in F9 cells. *Dev. Growth. Differ.* **56**, 518-525.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302.
- Min, H., Lee, J. Y. and Kim, M. H. 2012. Structural dynamics and epigenetic modifications of Hoxc loci along the anteroposterior body axis in developing mouse embryos. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 802-810.
- Partanen, J., Schwartz, L. and Rossant, J. 1998. Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for *Fgfr1* in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev.* **12**, 2332-2344.
- Pearson, J. C., Lemons, D. and McGinnis, W. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 893-904.
- Simeone, A., Acampora, D., Arcioni, L., Andrews, P. W., Boncinelli, E. and Mavilio, F. 1990. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* **346**, 763-766.
- Soshnikova, N. and Duboule, D. 2008. Epigenetic regulation of Hox gene activation: the waltz of methyls. *Bioessays* **30**, 199-202.
- Soshnikova, N. and Duboule, D. 2009. Epigenetic temporal control of mouse Hox genes *in vivo*. *Science* **324**, 1320-1323.
- Soshnikova, N. and Duboule, D. 2009. Epigenetic regulation of vertebrate Hox genes: a dynamic equilibrium. *Epigenetics* **4**, 537-540.
- Soprano, D. R., Teets, B. W. and Soprano, K. J. 2007. Role of retinoic acid in the differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Vitam. Horm.* **75**, 69-95.
- Stornaiuolo, A., Acampora, D., Pannese, M., D'Esposito, M., Morelli, F., Migliaccio, E., Rambaldi, M., Faiella, A., Nigro, V., Simeone, A. and et al. 1990. Human HOX genes are dif-

- ferentially activated by retinoic acid in embryonal carcinoma cells according to their position within the four loci. *Cell Differ. Dev.* **31**, 119-127.
24. Strahl, B. D. and Allis, C. D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
25. Young, T. and Deschamps, J. 2009. Hox, Cdx, and anteroposterior patterning in the mouse embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.* **88**, 235-255.

초록 : F9 EC 세포에서 레티노산에 의해 유도되는 *Hoxc* 유전자의 발현에 히스톤 메틸화가 미치는 영향

민혜현 · 김명희*

(연세대학교 의과대학 해부학교실 발생학 실험실)

Hox 유전자는 호메오도메인을 포함한 전사인자로서, 발생 과정 중 전후축을 따라 몸의 형태 형성을 조절하는 역할을 한다. 레티노산(RA)은 발생 과정에서 필수적인 형태형성인자이며 세포의 특성을 결정하는데 중요한 조절자이다. 특히, RA는 생쥐나 인간으로부터 만들어진 배아암종(EC)세포에서 *Hox* 유전자의 발현을 조절한다고 밝혀져 있다. 또한 RA에 의한 세포 분화와 유전자 조절 과정에 히스톤 변이가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 히스톤 변이가 RA에 의해 유도되는 *Hox* 유전자의 발현에 특이적인 역할을 할 것으로 유추되기 때문에, 이 연구의 목적은 F9 생쥐배아 기형암종세포에서 RA에 의해 유도되는 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현이 히스톤 변이에 의해 일어나는 것인지를 조사하는 것이다. *Hox* 유전자의 발현 양상과 히스톤 변이는 semi-quantitative RT-PCR, RNA-sequencing 과 chromatin immuno-precipitation (ChIP)-PCR 기법을 이용하여 관찰하였다. RA 처리 후(0일(D0), 1일(D1), 3일(D3)), *Hoxc4* 유전자의 발현(D1)은 *Hoxc5*부터 *-c10* 유전자(D3)보다 먼저 시작되었다. *Hoxc*가 발현하지 않는 D0 샘플은 전사 억제 마커인 H3K27me3이 모든 *Hoxc* 좌위에 강하게 표지 되어 있었으나 D1과 D3 샘플에서는 모든 좌위의 H3K27me3 표지가 확연히 줄어들어 있었다. 전사 발현 마커인 H3K4me3가 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현과 더 연관성이 있는 것으로 보이는데 D1에서 *Hoxc4* 발현과 함께 H3K4me3이 표지 되어 있었고, D3에서는 *Hoxc* 유전자 발현과 함께 모든 좌위에서 H3K4me3 마커가 존재했기 때문이다. 모든 결과를 종합해 보았을 때 F9 세포에서 RA에 의해 유도된 *Hoxc* 유전자의 순차적인 발현은 *Hoxc* 좌위에서 H3K27me3가 사라지고, H3K4me3가 표지 되는 히스톤 메틸화의 변이에 의해 결정되는 것으로 사료된다.