

생쥐 배자 발생 동안
Glucose-regulated protein 78(Grp78)
의 발현양상 분석

연세대학교 대학원

의과학과

강진주

생쥐 배자 발생 동안
Glucose-regulated protein 78(Grp78)
의 발현양상 분석

지도 김 명 희 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

강 진 주

강진주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 6 월 일

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. <i>Grp78</i> 의 시·공간적 발현양상 분석	6
가. 배자 준비	6
나. RNA 분리	6
다. Reverse transcription(RT)	7
라. <i>Hoxc8</i> downstream target genes primer 제작 및 PCR	7
2. <i>Grp78</i> 의 삼차원적 발현양상 분석	9
가. 배자 준비	9
(1) Whole mount <i>in situ</i> hybridization	9
(2) Frozen section	9
나. <i>In vitro</i> transcription	10
(1) <i>Grp78</i> 유전자의 subcloning	10
(2) Plasmid DNA 정제	11
(3) RNA probes	11
다. <i>In situ</i> hybridization을 통한 입체적 발현양상 분석	12
(1) Whole mount <i>in situ</i> hybridization	12
(2) Cold <i>in situ</i> hybridization	13
3. <i>Hoxc8</i> 에 의한 <i>Grp78</i> 의 발현 조절	14

가. <i>Hoxc8</i> 과발현 시 <i>Hoxc8</i> downstream target gene의 발현분석	14
(1) Cell culture	14
(2) Transfection	15
(3) RNA 분리 및 RT-PCR	15
나. Report analysis of <i>Grp78</i>	16
(1) Mouse genomic DNA 정제	16
(2) <i>Grp78</i> upstream specific primer 제작 및 PCR	16
(3) Cloning	17
(가) Ligation	17
(나) 형질전환	17
(다) Plasmid DNA 정제	17
(4) Cell culture	19
(가) Transfection	19
(나) Dual luciferase reporter assay	19
다. <i>Hoxc8</i> siRNA에 의한 <i>Grp78</i> 의 발현 분석	20
(1) <i>Hoxc8</i> siRNA design 및 제작	20
(2) Transfection 및 dual luciferase reporter assay	20
Ⅲ. 결과	22
1. <i>Grp78</i> 의 시·공간적 발현양상 분석	22
2. <i>Grp78</i> 의 삼차원적 발현양상 분석	25
3. <i>Hoxc8</i> 에 의한 <i>Grp78</i> 의 발현 조절	28
가. <i>Hoxc8</i> 과발현 시 <i>Hoxc8</i> downstream target genes의 발현 분석	28
나. <i>Grp78</i> reporter analysis	30
다. <i>Hoxc8</i> 의 siRNA에 의한 <i>Grp78</i> 의 발현 분석	33

IV. 고찰	34
V. 결론	39
참고문헌	40
<i>Abstract</i>	46

그림 차례

Figure 1. Spatial expression pattern of <i>Grp78</i> in mouse embryo at day 11.5 p.c.	23
Figure 2. Temporal expression pattern of <i>Grp78</i> in mouse embryos of day 7.5-17.5 p.c.	24
Figure 3. Expression pattern of <i>Grp78</i> during murine embryonic development	26
Figure 4. Expression pattern of plausible <i>Hoxc8</i> target genes in F9 and differentiated F9 cells	29
Figure 5. Sequence analysis of the upstream regulatory region of murine <i>Grp78</i> gene	31
Figure 6. Transactivation of <i>Grp78</i> by <i>Hoxc8</i>	32
Figure 7. Effect of <i>Hoxc8</i> siRNA the expression of <i>Grp78</i> in F9 cells	33

표 차례

Table 1. Primers used for the analysis of putative <i>Hoxc8</i> downstream target genes	8
Table 2. PCR conditions for the putative <i>Hoxc8</i> downstream target genes	9
Table 3. Proposed siRNA sequence of murine <i>Hoxc8</i> gene	21

국문요약

생쥐 배자 발생 동안 *Glucose-regulated protein 78(Grp78)*의 발현양상 분석

Hox 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중의 하나로 척추동물과 무척추 동물에 있어서 초기 배 발생 시 특정시기 및 특정 위치에서 발현하며, 몸통 전·후 축의 형태를 형성하는데 있어 *master regulator* 유전자로서 알려져 있다. 그러나 이 *Hox* 유전자가 어떤 유전자를 조절하여 발생에 관여하는 지에 대해서는 자세하게 밝혀져 있는 바가 없다.

본 연구에서는 프로테옴 분석을 통해 *Hoxc8*의 *downstream target gene*으로 잠정 발견된 *Grp78*이 배자 발달 과정 중 어느 시기에 또 배자의 어느 부위에서 발현하는 지를 RT-PCR, *in situ hybridization* 등을 통해 분석하고, *in vitro cell culture system*에서 *Grp78*이 실제로 *Hoxc8*에 의해 직접 조절을 받는 지를 *reporter-effector assay*를 통해 분석하였다.

*Grp78*의 시·공간적 발현 패턴을 *transcriptional level*에서 보면, 11.5일 배자를 전·후 축을 따라서 7부분으로 나눈 것과 7.5일에서부터 17.5일 배자를 가지고 RT-PCR를 이용하여 관찰한 결과, 시기에 따라서는 *Grp78*의 발현이 차이가 많이 나지만 모든 시기에 발현된다는 것을 알 수 있었고, 배자의 몸통부분에서 강하게 발현하는 패턴이 *Hoxc8*의 발현과 유사한 것으로 나타났다.

In situ hybridization 방법을 이용하여 *Grp78*이 삼차원적으로 발현되는 패턴을 관찰해 보면, 초기 배자에서 *Grp78*은 후에 기관으로 형성되는 내배엽, 체절(*somite*) 그리고 신경관(*neural tube*)을 이루는 신경상피세포(*neuroepithelium cell*)에서 발현하는 것을 볼 수 있었고, 후기 배자에서는

간, 늑골(*rib*)과 척추(*vertebra*)가 되는 연골 부분, 폐의 *cranial lobe* 안에 가지가 형성되는 부분, 턱밑샘(*submandibular gland*)과 후신(*metanephros*)에서 발현되는 것으로 보아 기관형성 중에 *tissue-specific*하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었다.

신경관의 신경상피세포, 늑골과 척추가 되는 연골 부분, 후신은 *Hoxc8*의 발현과 일맥상통하는 부분으로서 *Hoxc8*이 형태 형성 시에 세포의 *apoptosis*의 진행을 조절한다고 보고된 바를 토대로 유추해 보면, *Grp78*이 *Hoxc8*에 의해서 세포의 *apoptosis*를 조절한다고 생각된다.

*Grp78*이 *Hoxc8*에 의해 조절 받는 지를 *in vitro* 상에서 알아보기 위해 잠정적인 *Hox*와 *cofactor binding site*를 가진 *Grp78 upstream* 부분을 *pGL2 promoter*에 클로닝하고, *Hoxc8*의 존재 하에 발현을 분석한 결과 *Hoxc8*에 의해 *Grp78*의 발현이 *control*보다 3배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이 증가를 다시 *siRNA*를 이용하여 *Hoxc8*의 발현을 저하시켰을 때는 *Grp78*의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 *Grp78*은 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절을 받는 *Hoxc8 downstream target gene*이라고 생각된다.

핵심 되는 말 : *Grp78*, 발현 패턴, *Hoxc8*, *Grp78 upstream* 부분, *Hoxc8 downstream target gene*

생쥐 배자 발생 동안 *Glucose-regulated protein 78*
(*Grp78*)의 발현양상 분석

<지도교수 김 명 희>

연세대학교 대학원 의과학과

강 진 주

I. 서론

배자가 형성되어 하나의 개체가 되기 위해서 사용되는 수많은 분자들은 진화를 통해서 복잡한 관계를 이루고 있다.¹ 그 중에서도 초파리에서 처음 발견된 *Hox* 유전자는 *helix-turn-helix* 형태의 DNA결합 부위 (*homeodomain*)를 공유하고 있는 전사조절인자(*transcription factor*)로 보고 되어 있다.²⁻⁴ 발생 과정 중 몸체 형성 과정은 초파리와 생쥐가 동일한 종류의 유전자를 사용한다고 알려져 있다.^{5,6}

Hox 유전자는 발생을 조절하는 유전자 중의 하나로 척추동물과 무척추 동물에 있어서 초기 배 발생 시 특정시기 및 특정 위치에서 발현하며,^{2,3,7} 몸통 전·후 축의 형태를 형성하는데 있어 *master regulator* 유전자로서 알려져 있지만⁸, 이 *Hox* 유전자가 어떤 유전자를 조절하여 발생에 관여하는 지에 대해서는 자세하게 밝혀져 있는 바가 없다.

*Grp78*은 본 실험실에서 *Hox* 유전자의 *paralogous group VIII*의 하나인 *Hoxc8*의 *putative downstream target genes* 중의 하나로 분석되었다.⁹

GRPs는 처음 닭의 배자 *fibroblast*를 *glucose*가 없는 배지에서 배양했을 때 강하게 발현되어지는 단백질로서 보고되었으며,¹⁰ 그 후 *glycosylation*에 영향을 미치는 물질이나 세포 내의 Ca^{2+} level 저해 등의 조건 아래에서 GRPs가 유도된다고 알려졌다. 또한 GRPs는 극심하게 *glucose*가 없는 상태, 저산소증, *endoplasmic reticulum*(ER)에서 칼슘이 고갈되었을 때와 같은 *stress*상태에서 전사 조절이 야기되어진다는 것이 *in vitro cell culture* 실험에서 밝혀졌다.^{11,12} 이렇듯 GRPs의 발현 유도 기작에서는 GRP promoter에 다수의 *endoplasmic reticulum stress elements*(ERSEs)를 가지고 있기 때문인 것으로 보고되고 있다.¹⁰

현재 약 10여종의 GRPs(*Grp78*, *Grp94*, *Grp170*, *Erp72*, *PDI*, *Grp58/alias Erp57*, *calreticulin* 등)가 보고되었으며, 그 중 하나인 *Grp78*은 ER 내부에 존재하는 *chaperone*으로 알려졌다. 또한, 이것은 *lymphoid* 세포에서 *immunoglobulin heavy* 또는 *light chain*과 결합하기 때문에 *immunoglobulin heavy-chain-binding protein*(BiP)이라고도 불리 운다. 뿐만 아니라, *Grp78*은 *heat-shock-protein 70*(*Hsp70*) family에 속하는 일종의 *Hsp70*이라고도 불리우며 61%의 *homology*를 가지고 있지만, *stress protein family*의 구성원일 뿐 그 기능은 다르다고 알려져 있다. 또한 대장균에서 *Grp78*과 유사한 기능을 하는 *Escherichia coli*(*E. coli*) *Dnak*나 ER luminal Ca^{2+} storage protein이라고 보고되었다.^{11,13,14}

그 기능에는 *molecular chaperone*으로서 ER 내에서 단백질의 알맞은 *fold*ing과 *assembly*에 도움을 주고, 서로 *aggregation*하는 것을 방지해주는 역할을 한다고 보고되었다. ER로부터 운송되어지는 *misfold*ing 및 *under-glycosylated* 단백질과 좀 더 안정된 복합체를 만드는 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 ER내에서 Ca^{2+} 항상성을 조절하는 것으로도 발표되었으며, 산화적인 스트레스에 대항하여 세포의 *apoptotic pathway*에 관여한다고

도 보고되었다.¹⁵⁻¹⁷

발생 동안 배자 조직에서의 *Grp78* 발현은 생쥐 발생에서 초기 *2-cells* 시기에서부터 *blastocyst stage*로 진행되는 동안 증가한다는 보고가 있으며, *whole embryo culture* 실험을 통해 발생 9.5일째의 생쥐 배자에서 저혈당 스트레스를 유발 시키면 심장(*heart*), 신경관(*neural tube*), 장 내배엽(*gut endoderm*), 체절(*somite*), 외배엽(*surface ectoderm*)에서 발현한다고 보고된 바 있다. 그러나 정상 배자 발생 과정 중 체계적인 발현 패턴은 잘 알려져 있지 않은 실정이다.^{10,11}

그러므로 본 연구에서는 생쥐 배자 발생과정 중 *Grp78*의 시·공간적인 발현 패턴을 RT-PCR 그리고 *whole mount/cold in situ hybridization*를 통해 관찰하고, *Hoxc8* 발현과의 연관성을 비교하고자 한다. 또, *Hoxc8*의 *downstream target genes* 중 하나로 발견된 *Grp78*이 실제로 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절을 받는 지를 *reporter-effector plasmid*를 제작한 후 분석하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. *Grp78*의 시·공간적 발현양상 분석

가. 배자 준비

교배를 위해 ICR 생쥐(Samtako, Osan, Korea)를 이용하였다. 생쥐는 저녁에 암컷 3-4마리와 수컷 1마리를 한 우리에 합사시켰고, 다음 날 오전 10시 전에 암컷에서 질전(*vaginal plug*)이 관찰되면, 이때를 발생 0.5일로 정의하였다. 발생 7.5일부터 17.5일까지의 배자의 경우 날짜에 맞게 임신한 암컷을 경추 탈골 시켜 희생시킨 후 배자를 차가운 1× PBS 안에서 적출하였다.

나. RNA 분리

바로 적출한 배자 혹은 배자 절편을 액체질소에 넣어 얼린 다음 *guanidium isothiocyanate technique(GIT)* 방법을 이용하여 RNA를 추출하였다. 조직을 *tube*에 넣고 *denaturing* 용액(4 M *guanidium isothiocyanate*, 25 mM *sodium citrate/2H₂O*, 0.5%(w/v) *sodium lauryl sarcosinate*, 0.1 M β -*mercaptoethanol*)을 배자 무게 100 mg당 3 ml씩을 첨가시킨 후, *pestle*로 잘게 파쇄시켰다. 배자를 15 ml 튜브로 옮긴 후, 2 M NaOAc를 140 μ l 넣고 잠깐 동안 섞어 주었다. *Chloroform-isoamyl alcohol*(49:1)을 처리하였고, 15초간 강하게 혼합한 후 얼음에 15분간 방치하였다. 4°C 3,500 rpm 으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 새로

은 1.5 ml 용량의 *microtube*로 옮긴 후, 상층액과 동량의 *chloroform-isoamyl alcohol*(49:1)을 처리하고 혼합하였다. 다시 12,000 rpm 으로 4°C에서 20분간 원심분리한 후 상층액을 취해 새로운 1.5 ml 용량의 *microtube*로 옮긴 다음, 상층액과 동량의 *isopropanol*을 첨가하여 -70°C *freezer*에서 1시간 이상 반응시켰고, 12,000 rpm 으로 20분간 원심분리하여 침전시킨 다음 70% *ethanol*로 세척한 후 건조시켰다. 침전된 RNA는 DEPC 처리한 증류수에 녹이고, UV-*spectrophotometer*를 이용하여 정량하였다.

다. Reverse transcription(RT)

RT는 2 μ g의 RNA를 200 ng의 *oligo dT*, H_2O 를 14 μ l까지 넣고 70°C에서 5분간 열을 준 후, 바로 열음에 넣어두고 *dNTP*(2.5 mM each) 5 μ l, *RNase inhibitor*(0.5 unit/ μ l) 0.5 μ l, *moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*(MMLV-RT 200 unit/ μ l, Promega) 0.5 μ l, MMLV-RT 10 \times Buffer 5 μ l 혼합액을 11 μ l씩 첨가시켜 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 *cDNA*를 만들었다.

라. *Hoxc8* downstream target genes primer 제작 및 PCR

준비한 *cDNA*를 가지고, *Hoxc8* downstream target genes에 대한 *primer*는 바이오니아(대전, 한국)회사를 통해 *primer design* 프로그램에 적용하여 제작, 구입하였다. 대조군으로 β -*actin*과 *Hoxc8* specific *primer*를 사용하였다.: β -*actin* *primer*(sense; 5'-CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3', antisense; 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG-3'; 350 bp)

와 *Hoxc8* specific primer(sense; 5'-CACGTCCAAGACTTCTTCCACCA CGGC-3'; antisense; 5'-CACTTCATCCTTCGATTCTGGAACC-3'; 450 bp). 이외에 PCR 반응에 사용한 primer와 PCR 조건은 Table 1과 2에 나타 내었다.

Table 1. Primers used for the analysis of putative *Hoxc8* downstream target genes

primer	sequences	size (bp)
<i>Glucose-regulated protein 78(Grp78)</i>	(F) 5'-CTCGAATTCCAAAGTTCAG -3' (R) 5'-TACCAAGTGTAAGGGGACAC -3'	187 bp
<i>Carbonic anhydrase II(CAII)</i>	(F) 5'-AAAATATGCTGCAGAGCTTC -3' (R) 5'-CCTTTGTTTTAATGGAATGC -3'	173 bp
<i>Tubulin beta 5 chain</i>	(F) 5'-TACACAGAGGGAGCTGAGTT -3' (R) 5'-CAGTAGGTCTCATCCGTGTT -3'	287 bp
<i>ATP synthase</i>	(F) 5'-ATTTTCCAGGCATCATTG -3' (R) 5'-GATGGTCATATTCACCTGCT -3'	209 bp
<i>Proliferating cell nuclear antigen(Pcna)</i>	(F) 5'-TGCTCTGAGGTACCTGAACT -3' (R) 5'-TGCTTCCTCATCTTCAATCT -3'	160 bp
<i>Retinoblastoma binding protein 7(Rbbp7)</i>	(F) 5'-AAGTGAATCGTGCTCGTTAT -3' (R) 5'-AGGCATACAGTATGGTCATC -3'	125 bp
<i>Elongation factor I-beta</i>	(F) 5'-AGTATGGCCCTAGCAGTGTA -3' (R) 5'-TAGCTTCTCTGCTTCCTCAC -3'	122 bp
<i>proteasome subunit alpha type 5</i>	(F) 5'-TTGGAGAAGAAGATGCAGAT -3' (R) 5'-ACACTGTACAAAGGTCCCAG -3'	128 bp

Table 2. PCR conditions for the putative *Hoxc8* downstream target genes

primer	denaturation	annealing	polymerization	cycle
<i>Grp78</i>	94 °C 30sec	55 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>CAII</i>	94 °C 30sec	45 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>Tubulin beta 5 chain</i>	94 °C 30sec	45 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>ATP synthase</i>	94 °C 30sec	45 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>Pcna</i>	94 °C 30sec	50 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>Rbbp 7</i>	94 °C 30sec	55 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>Elongation factor I-beta</i>	94 °C 30sec	55 °C 30sec	72 °C 1min	25
<i>proteasome subunit alpha type 5</i>	94 °C 30sec	55 °C 30sec	72 °C 1min	25

2. *Grp78*의 삼차원적 발현양상 분석

가. 배자 준비

(1) Whole mount *in situ* hybridization

임신한 암컷을 날짜에 맞게 경추를 탈골시켜 희생시킨 후 배자를 PBS 안에서 적출한 다음, PBS로 한 번 씻어 준 후 4% *paraformaldehyde* (PFA)/PBS에 넣어 4°C에서 배자의 크기에 따라 1-12시간 동안 고정시켰다. 그리고 PBT, 25%, 50%, 70% *MetOH*/PBT로 5분씩 4°C에서 씻어준 다음, 마지막으로 100% *methanol*에 담가서 필요할 때까지 -20°C에서 저장하였다.

(2) Frozen section

임신한 암컷을 날짜에 맞게 경추 탈골 시켜 희생시킨 다음 배자를 PBS

안에서 적출한 후, PBS로 한 번 씻어주었고 4% *paraformaldehyde*(PFA)/PBS에 넣어 4°C에서 하루 넣어두었다. 그리고 30% *sucrose*/PBS로 바꾸어 준 후 4°C에서 하루 더 넣어두었다. 그 다음 *tissue tek*(Miles, Elkhart, IN)에 배자를 넣었고, *tissue freezing medium*(TRIANGLE Biomedical Science, Durhm, NC)으로 덮은 다음 -70°C에 보관하였다.

나. *In vitro* transcription

(1) *Grp78* 유전자의 *subcloning*

*pGEM T-vector*에 있는 *Grp78*을 제한 효소 *sph I*과 *sal I*으로 잘라 *jetsorb gel extraction kit*(GENOMED, U.S.)를 사용하여 *elution*하였다.

Multicloning 자리의 끝에 각각 T7과 SP6 *promoters*를 가지고 있는 *pGEM-7zf* 와 *pGEM-3zf*를 *sph I*과 *Xho I*, 그리고 *sph I*과 *sal I*으로 각각 잘라 *elution* 한 다음, 분리해 놓은 *Grp78* 절편과 실온에서 1시간 동안 *ligation*하였다. 그리고 형질 전환을 하기 위해서 먼저, *competent cell* 현탁액이 들어 있는 *microtube*를 -70°C *freezer*로부터 꺼내 얼음에 두면서 녹였다. *Ligation* 혼합물이 포함된 *microtube*에 *competent cell* 현탁액 30 μ l를 넣고, 20분간 얼음에 방치하였다. 그 다음 42°C에서 90초간 열을 가하였고, LB 배지를 950 μ l 넣고 다시 37°C에서 1시간 배양한 후 *X-gal* 40 μ l(50 mg/ml)/IPTG 4 μ l(0.8 M)가 포함된 LB *agar plate* 표면에 도말한 다음, 37°C 배양기에서 밤새 배양한 다음, *blue/white colony selection*을 하였다. 멸균된 이쭉시개를 이용하여 *white colony*를 선택하여 LB배지에 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다.

(2) Plasmid DNA 정제

Plasmid DNA를 분리하기 위해 *alkaline lysis* 방법을 사용하였다. 원하는 *plasmid*를 포함하는 대장균 균주를 LB 배지에서 밤새 배양한 후 3,500 rpm에서 20분 동안 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다. 침전물에 *solution I* (50 mM *glucose*, 25 mM *Tris-HCl*, pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0)을 100 μ l 첨가하고 혼합한 후 여기에 *solution II*(0.2 N NaOH, 1% SDS)를 200 μ l 첨가하여 실온에서 5분간 방치한 다음, 여기에 다시 150 μ l 의 *solution III* (60 ml 5 M *potassium acetate*, 11.5 ml *acetic acid*, 28.5 ml *dH₂O*)를 첨가하고 혼합한 후, 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 *plasmid* DNA를 포함하고 있는 상층액을 새 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 *chloroform-isoamyl alcohol*(24:1) 혼합액을 넣고, 섞어서 원심분리하고 상층액을 새 튜브에 옮긴 후 100% *ethanol*을 1 ml 첨가하고 잘 혼합하여 실온에서 2분간 방치하고 5분간 4°C에서 12,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 제거하였다. DNA 침전물을 70% *ethanol*로 세척한 후 다시 한 번 원심분리하여 DNA를 침전시키고 건조시켰다. 최종적으로 RNaseA(10 mg/ml)가 첨가된 적당량의 TE buffer(10 mM *Tris-HCl*, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 -20°C에 보관하면서 제한효소 반응에 이용하였다.

(3) RNA probes

Probe으로서 *antisense*와 *sense* RNA를 합성하기 위해 *pGEM 7-grp78* 과 *pGEM 3-grp78*를 제한 효소 *BamH I*로 잘라서 *linear*로 만든 다음, T7 RNA polymerase를 이용하여 *digoxigenine labeled* UTP가 포함되어 있는 *nucleotide* 혼합액을 섞어 준 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

그 다음 4 M LiCl과 100% ethanol로 정제해 준 다음, whole mount와 tissue sections의 *in situ* hybridization에 사용하였다.

다. *In situ* hybridization을 통한 입체적 발현양상 분석

(1) Whole mount *in situ* hybridization

먼저 배자를 75%, 50%, 25% MetOH/PBT와 PBT로 *rehydration* 시킨 다음, 6% H₂O₂/PBT로 1시간 동안 *bleach*하고 다시 10 µg/ml *proteinase* K/PBT를 배자의 크기에 따라 2-15분간 처리하였다. 그 다음, 2 mg/ml *glycine*을 넣어 *proteinase* K를 불활성하게 만들었다. 그리고 0.2% *glutaraldehyde*/4% *paraformaldehyde*/PBT를 첨가하여 재고정을 시킨 후, PBT로 씻어주었고 배자를 *prehybridization solution*(50% *formamide*, 5× SSC, pH 4.5, 50 µg/ml *yeast tRNA*, 1% SDS, 50 µg/ml *heparin*)에 넣어 1시간 동안 70°C에서 반응시킨 다음, 1 µg/ml *digoxigenine-labeled RNA probe*를 포함하는 *hybridization solution*을 첨가하여 70°C에서 밤새 반응시켰다.

그 다음 날 *posthybridization wash* 과정으로 *solution I*(50% *formamide*, 5× SSC, pH 4.5, 1% SDS)으로 30분간 70°C에서 2번 씻어주었다. 그 다음, *solution I*과 *solution II*(0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% *tween* 20)를 동량으로 혼합하여 10분간 70°C에서 씻어주었고 다시 *solution II*만으로 3번 실온에서 5분씩 씻어주었다. 그 다음 배자를 100 µg/ml RNaseA를 포함하고 있는 *solution II*에 넣어 37°C에서 30분간 2번 반복해준 후 TBST로 다시 씻어주었고, *blocking solution*(FBS 1 ml, 10% *blocking powder* 1 ml, *Malate Buffer* 3 ml)을 처리하여서 *preblocking*을 실

온에서 90분 동안 반응시켰고, *anti-digoxigenine antibody*(1:1,000)를 첨가하여서 실온에서 밤새 반응시켰다.

다음 날, TBST로 1시간 썩 5번, NTMT로 30분씩 2번 씻어주었고, 다시 NTMT로 밤새 씻어주었다. 그 다음 날, 4.5 $\mu\text{l/ml}$ NBT와 3.5 $\mu\text{l/ml}$ BCIP를 첨가한 NTMT에 배자를 옮겨 어두운 곳에서 발색 반응을 시켰다. 3시간 이후부터 원하는 발색이 관찰되면 PBT로 2-3번 씻어주어 발색 반응을 정지시켰다.

(2) *Cold in situ* hybridization

얼어 있는 배자를 10-12 μm 두께로 잘라서 코팅이 되어 있는 슬라이드에 붙인 다음 4% *paraformaldehyde*/PBS에서 20분 동안 고정을 시켰고, PBS에서 3분씩 3번을 씻어 주었다.

그리고 10 $\mu\text{g/ml}$ *proteinase K*/PBS를 4분간 처리하고, 다시 4% *paraformaldehyde*/PBS에 5분간 고정시켜 준 다음 PBS로 다시 씻어주었다. *Acetylation*(295 ml H_2O , 4 ml *triethanolamine*, 0.525 ml *HCl*, 0.75 ml *acetic anhydride*) 반응을 한 다음, 다시 PBS로 씻어주었고 500 μl *prehybridization solution*을 각각의 배자 절편 위에 떨어뜨렸다.

슬라이드를 *humidified chamber*(5 \times SSC , 50% *formamide*용액을 적신 종이를 깔아서 준비)에 올려놓고, 2시간 동안 실온에 방치한 후 RNA probe 200-400 ng/ml 를 포함하고 있는 *hybridization solution*을 첨가한 다음 위에 *coverslip*을 덮고, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 밤새 반응시켰다.

다음 날 *coverslip*을 제거하고, 0.2 \times SSC에서 3시간 동안 72 $^{\circ}\text{C}$ 에 넣은 다음, 0.2 \times SSC에서 5분간 실온에 두었다. 그리고 *levamisole*(240 mg/l)를 포함하고 있는 *buffer B1*(0.1 M *Tris*, *pH* 7.5, 0.15 M *NaCl*)을 첨가

하여 실온에서 5분간 반응한 다음, *blocking solution*을 떨어뜨리고 1시간 동안 실온에 다시 *anti-digoxigenine antibody*(1:5,000)를 첨가한 다음, 4°C에서 하룻밤 반응시켰다.

다음 날 *buffer B1*으로 3번 씻어 준 다음 *levamisole*(240 mg/ℓ)를 포함하고 있는 *buffer B3*(0.1 M *Tris*, pH 9.5, 0.1 M *NaCl*, 50 mM *MgCl₂*)를 첨가하고, 10분 후 *buffer B4*(240 mg/ℓ *levamisole*을 포함하고 있는 *buffer B3*, 4.5 μℓ/ml *NBT*, 3.5 μℓ/ml *BCIP*)을 다시 배자에 첨가한 다음, *parafilm*으로 덮은 후 어두운 곳에서 반응시켰다. 발색된 것이 관찰되면 *PBS*로 씻어주었고, 말린 다음에 *universal mount*(Huntsville, AL, USA)를 첨가하여 보관하였다.

3. *Hoxc8*에 의한 *Grp78*의 발현 조절

가. *Hoxc8* 과발현 시 *hoxc8* downstream target genes의 발현분석

(1) Cell culture

Mouse F9 *teratocarcinoma cell*(F9 cell)은 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 구입하였다. 세포 배양은 0.1% 젤라틴 코팅이 된 *plate*에 10% fetal bovine serum(FBS), 60 μg/ml *penicillin*(Gibco BRL)과 100 μg/ml *streptomycin* 첨가된 *dulbecco's modified eagle medium*(DMEM, Gibco BRL, USA)에 5% CO₂, 37°C 배양기에서 수행하였다.

분화시키기 위해 0.1% 젤라틴 코팅이 된 60 mm *dish*에 1×10⁵개의 세포를 단층이 되게 깔아 주었다. 다음 날 10⁻⁷ M *retinoic acid*(RA)와 10

mM *dibutyryl-cAMP*를 첨가하고 4일 동안 매 24시간 될 때마다 배지를 갈아주면서 호일에 싸서 빛을 차단한 다음 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다.

(2) Transfection

F9과 분화된 F9 *cell*을 6 *well plate*에 1×10^5 개 정도 단층이 되게 갈아주었다. 다음 날, 혈청이 없는 배지에 DNA 1 μ g를 넣고, *plus reagent*를 첨가시키고 실온에서 15분간 반응시킨 다음 혈청이 없는 배지에 *lipofectamine reagent*를 준비하여 혼합하여 다시 15분 동안 방치하였다. 그 동안 *cell*이 있는 *plate*에서 배지를 제거하고 혈청이 없는 배지로 바꿔주었다. 그리고 DNA-*plus-lipofectamine reagent* 혼합물을 골고루 넣어 준 다음 3시간 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한 후에 혈청이 있는 배지로 갈아주었다.

(3) RNA 분리 및 RT-PCR

배양한 세포(1×10^6 *cells*)에 RNazolTM B를 0.2 ml 넣고 *pipetting*으로 *cell*을 분쇄시켜주었다. 그 다음 *chloroform/isoamyl alcohol*(49:1)을 넣고 혼합해준 후 얼음에 5분간 방치해두었고, 12,000 *rpm*에서 15분간 4°C에서 원심분리하였다.

상층액을 옮겨 동량의 *isopropanol*를 넣은 다음 4°C에서 1시간 정도 두거나 -20°C에서 밤새 반응시켰다. 다음 날 원심분리하여 75% *ethanol*로 씻어주었고 말려서 DEPC H₂O에 녹였다. RT-PCR은 1-다와 같은 방법으로 수행하였다.

나. Reporter analysis of *Grp78*

(1) Mouse genomic DNA 정제

쥐의 꼬리를 1 cm 정도 잘라서 *proteinase K buffer*(10 mM *Tris-HCl*, pH 7.8, 5 mM EDTA, 0.5% SDS, H_2O) 350 μ l를 넣고, 해부용 가위를 이용하여 잘게 자른 다음, *proteinase K buffer* 350 μ l와 *proteinase K*(20 mg/ml) 36 μ l를 다시 첨가한 다음 55°C에서 밤새 반응시켰다. 다음 날 *RNaseA*(10 mg/ml)를 첨가하고, 37°C에서 1-2시간 동안 반응시킨 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하였다. 여기에 동량의 *phenol:chloroform-isoamyl alcohol*(25:24:1)을 넣고 원심분리하여 상층액을 분리하였고, 이 과정을 한 번 더 반복하였다. 그리고 *chloroform-isoamyl alcohol*(24:1)을 혼합한 후 원심분리하여 상층액을 분리하고 동량의 *isopropanol*을 섞어 주었다. 튜브 안에 DNA가 실 모양으로 보이면, 끝이 약간 구부러진 유리막대를 이용하여 DNA를 건져낸 다음 막대에 붙은 상태로 70%, 99.9%, 99.9% *ethanol*로 세척 및 탈수하고 TE buffer에 유리막대를 잘라 넣어 DNA를 녹인 후 사용하였다.

(2) *Grp78* upstream specific primer 제작 및 PCR

*Genebank*로 부터 *Grp78*의 *upstream sequence*를 분석(NCBI, *blast program*)하여 *primer*를 제작 하였다. *Grp78* upstream primer(*sense*; 5'-GCACCAGTAGATTGGGTTA-3', *antisense*; 5'-GCACCTCACTTTC TCACGCTG-3'; 2361 bp)는 바이오니아(대전, 한국)에서 구입하였다. Mouse genomic DNA를 주형으로 94°C에서 5분, 50.5°C에서 30초, 72°C에서

3분 동안 30회를 반복하였다.

(3) Cloning

(가) Ligation

*Jetsorb gel extraction kit*을 이용하여 원하는 크기의 *band*를 *elution* 하여 *pGEM-T vector*에 클로닝 한 후, 제한 효소 *EcoR I*으로 자른 *insert*를 *pBluescript vector*(*pBS vector*)의 동일한 자리에 *subcloning*을 하였다. *pBS vector*에 클로닝된 것을 제한 효소 *Kpn I*과 *BamH I*으로 잘라 *insert*를 꺼냈다. 그리고 *T4 DNA ligase*를 이용하여 *pGL2 promoter vector*의 *Kpn I*과 *Bgl II* 자리에 *insert*와 *vector*를 3:1 비율로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 *ligation*하였다.

(나) 형질전환

먼저 *competent cell* 현탁액이 들어 있는 *microtube*를 -70°C freezer에서 꺼내 얼음에 두면서 녹였다. *Ligation* 혼합물이 포함된 *microtube*에 *competent cell* 현탁액 $30\ \mu\text{l}$ 를 넣고, 20분간 얼음에 방치하였다. 그 다음 42°C 에서 90초간 열을 가하였고, LB 배지를 $950\ \mu\text{l}$ 넣고 다시 37°C 에서 1시간 배양한 후 LB *agar plate* 표면에 도말한 다음, 37°C 배양기에서 밤새 배양한 다음, 멸균된 이쑤시개를 이용하여 *colony*를 선택하여 LB배지에 접종하여 37°C 에서 밤새 배양하였다.

(다) Plasmid DNA 정제

*Plasmid DNA*를 분리하기 위해 *alkaline lysis* 방법을 사용하였다. 원하

는 *plasmid*를 포함하는 대장균 균주를 LB 배지에서 밤새 배양한 후 3,500 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거한 다음 STE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 25 ml를 혼합하여 원심분리하여 상층액을 제거하였다. Solution I(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0)을 4 ml 첨가하고 혼합한 후 여기에 solution II(0.2 N NaOH, 1% SDS)를 8 ml 첨가하여 실온에서 5분간 방치한 다음, 다시 여기에 6 ml의 solution III(60 ml 5 M potassium acetate, 11.5 ml acetic acid, 28.5 ml dH₂O)를 첨가하였고, 혼합한 후 얼음에서 10분간 방치하였다. 4°C 3,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리한 다음 0.6배의 isopropanol를 섞어서 실온에 10분간 방치하고, 3,500 rpm으로 30분간 실온으로 원심분리한 후, 70% ethanol으로 씻어주고 말렸다. 그리고 TE 300 µl에 녹인 다음 5 M LiCl를 첨가하고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 동량의 isopropanol을 넣고 실온으로 원심분리한 후 pellet을 70% ethanol로 씻어주고 말린 다음 RNaseA(10 mg/ml)를 첨가한 TE에 녹여 실온에서 30분간 방치하였다.

여기에 동량의 phenol:chloroform-isoamyl alcohol(25:24:1)을 혼합하여 원심분리한 상층액에 동량의 chloroform-isoamyl alcohol(24:1)를 첨가하였고 다시 원심분리한 상층액에 2배 부피의 100% ethanol, 1/10배의 3 M sodium acetate를 넣어서 -20°C에서 밤새 방치하였다. 다음 날 원심분리한 후 70% ethanol으로 씻어주었고 말린 다음 H₂O 1 ml와 PEG-MgCl₂(40% polyethylene glycol 8000, 3 mM MgCl₂) 0.5 ml를 넣고 침전물을 완전히 녹여 실온에 10분 이상 방치해 둔 후 실온에서 20분간 12,000 rpm에서 원심분리하였다. 그리고 이후부터는 clean bench에서 처리하였다. 70% ethanol을 넣고 원심분리하는 것을 2번 반복하여 수행한 다음 10-20분간 말린 후 ultra-pure H₂O에 녹이고, spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

(4) Cell culture

(가) Transfection

전 날 F9 cell을 12 well plate에 1×10^5 개 단층이 되게 깔아 주었다. 다음 날, 혈청이 없는 배지에 DNA 1 μ g를 넣고, 여기에 control인 pRL-SV40 vector(*renilla luciferase*) 10 ng와 plus reagent를 첨가하고 실온에서 15분간 반응시킨 다음 혈청이 없는 배지에 lipofectamine reagent를 준비하여 혼합하여 다시 15분 동안 방치하였다. 그 동안 cell이 있는 plate에서 배지를 제거하고 혈청이 없는 배지를 넣어주었다. 그리고 DNA-plus-lipofectamine reagent 혼합물을 골고루 넣어 준 다음 3시간 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양한 다음 혈청이 있는 배지로 갈아주었다.

(나) Dual luciferase reporter assay

Transfection 후 24시간 동안 방치한 다음, luciferase reporter assay는 dual luciferase assay kit(Promega)에서 제시한 방법을 따랐다. PBS로 씻어 주고 $1 \times$ PLB($5 \times$ passive lysis buffer를 증류수로 희석하여 사용)를 첨가하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 그런 다음 튜브를 얼음 안에 박은 후 4°C에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다.

다른 튜브에는 LARII(10 ml luciferase assay buffer II에 luciferase assay substrate를 녹인 용액)를 담아 여기에 cell 분해물을 20 μ l 넣어 혼합하여 reporter activity를 10초 동안 읽어준 다음 여기에 stop & glo reagent (stop & glo buffer 1 ml에 $50 \times$ stop & glo substrate 20 μ l가 혼합된 용액)를 혼합하여 준 후 10초 동안 *renilla activity*를 읽었다. 이 때

luminometer(TD20/20)는 2초간 지연 후 10초간 *activity*를 읽는 것으로 설정하였고 모드를 DLR(*dual luciferase report*)로 해서 *luciferase*와 *renilla*를 측정하였다.

다. *Hoxc8* siRNA에 의한 *Grp78*의 발현 분석

(1) *Hoxc8* siRNA design 및 제작

Hoxc8(NM_01046) *sequence*를 이용하여 제작 가능한 siRNA 서열을 분석한 다음(Table 3), 그 중에서 가장 유력할 것으로 분석된 siRNA(1)와 homeobox 안에 위치하고 있는 siRNA(2)를 선택하여 삼천리 제약(시흥, 경기도)에 제작·의뢰하여 합성하였다.

*Sense RNA oligo*와 *antisense RNA oligo*에 각각 1 ml의 RNase가 없는 물을 넣고 섞는 다음, *sense RNA oligo* 60 μ l와 *antisense RNA oligo* 60 μ l에 5 \times *universal buffer*를 혼합하여 90 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시킨 후, 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하여 *double strand* 구조를 만들었다.

(2) *Transfection* 및 *dual luciferase reporter assay*

12 well plate에 F9 cell을 1×10^5 개로 단층이 되게 깔아 주었고, 다음 날 혈청이 없는 배지에 DNA 1 μ g와 *Hoxc8* siRNA 10 nM을 넣고, *plus reagent*를 첨가시킨 다음 실온에서 15분간 반응시켰다. 다음, 혈청이 없는 배지에 *lipofectamine reagent*를 준비하여 혼합하고 다시 15분 동안 방치하였다. 그 동안 cell이 있는 plate에서 배지를 제거하고 혈청이 없는 배지로 바꿔준 다음 DNA-*plus-lipofectamine reagent* 혼합물을 골고루 넣어주고

3시간 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양 한 후에 혈청이 있는 배지로 갈아주었다. *Luciferase assay*는 나-4(나)와 같이 수행하였다.

Table 3. Proposed siRNA sequence of murine *Hoxc8* gene

<i>Hoxc8</i> (NM_010466) : mouse siRNA design	
(1)	Sense 5'- AGA CGC CUC CA AUU CUA U -3' Antisense 5'- AUA GAA UUU GG GGC GUC U -3'
(2)	Sense 5'- GUA UCA GAC CUU GGA ACU A -3' Antisense 5'- UAG UUC CCA GGU CUG AUA C -3'
(3)	Sense 5'- CAA GGC CAC UUA AAU CAG A -3' Antisense 5'- UCU GAU UUA AGU GGC CUU G -3'
(4)	Sense 5'- UAA AUC CUC CGC CAA CAC U -3' Antisense 5'- AGU GUU GGC GGA GGA UUU A -3'
(5)	Sense 5'- AUG ACA CUC ACA ACU CUA A -3' Antisense 5'- UUA GAG UUG UGA GUG UCA U-3'
(6)	Sense 5'- AAA GAC AAG UGA AGA UUU G -3' Antisense 5'- CAA AUC UUC ACU UGU CUU U -3'

III. 결 과

1. *Grp78*의 시·공간적 발현양상 분석

*Hoxc8*의 *downstream target genes*으로 잠정 보고된 유전자들과 위치 특이적으로 발현되는 *Hoxc8*과의 관계를 알아보기 위하여 형태 형성 중 *Hoxc8*이 강하게 발현하는 11.5일된 배자를 이용하여 전·후 축에 따른 발현양상을 비교하였다. 배자를 전·후 축을 따라 7부분(H1, H2, M1, M2, M3, M4, T)으로 절단한 다음 각 부위로부터 총 RNA를 분리한 후, RT-PCR을 수행하였다.

그 결과 *Hoxc8*에서는 forelimb과 흉부 부분을 포함하는 M2와 아래 흉부 부분을 포함하는 M3에서 강하게 발현되는 것과 유사하게 *Grp78*이 M2 부분에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 다른 *Hoxc8* *downstream target genes*는 모든 부분에서 발현 되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

또한, 시기적으로도 관계가 있는 지 알아보기 위해 7.5일 배자에서부터 17.5일 배자에서 RNA를 분리하여 RT-PCR로 확인 하였다. *Hoxc8*은 8.5일 배자에서부터 17.5일까지 거의 모든 배자에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 비하여 *Grp78*은 7.5 배자에서부터 16.5일 배자까지 발현되었으나 발현 양은 시기에 따라 많은 차이가 있었고, 특이하게도 *periodic*한 발현 양상을 보였다(Fig. 2).

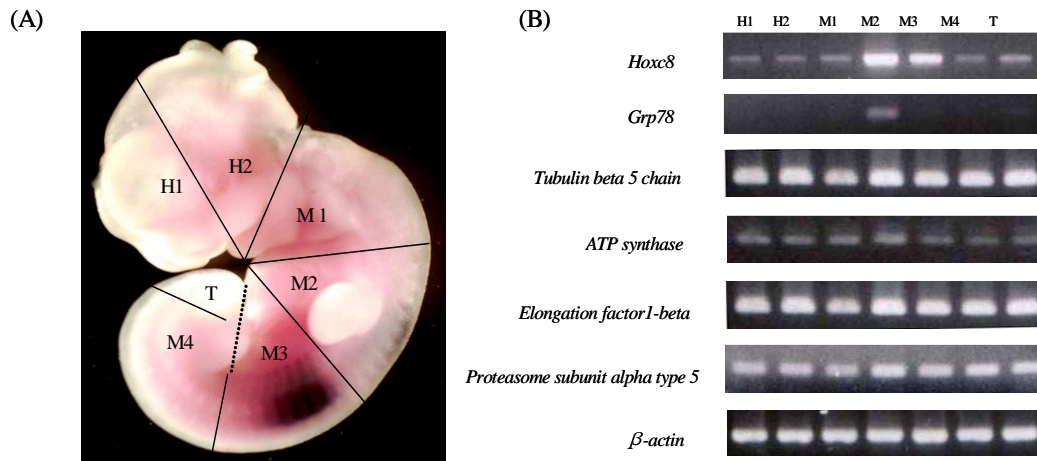


Figure 1. Spatial expression pattern of *Grp78* in mouse embryo at day 11.5 p.c. (A) lines indicate the dissected regions at embryo of day 11.5 p.c. (B) RT-PCR pattern of *Hoxc8* and putative *Hoxc8* downstream target genes including *Grp78* along the A-P axis; H1(head 1), H2, M1 (middle 1), M2, M3, M4, and T (tail). *β-actin* was used for the internal control.

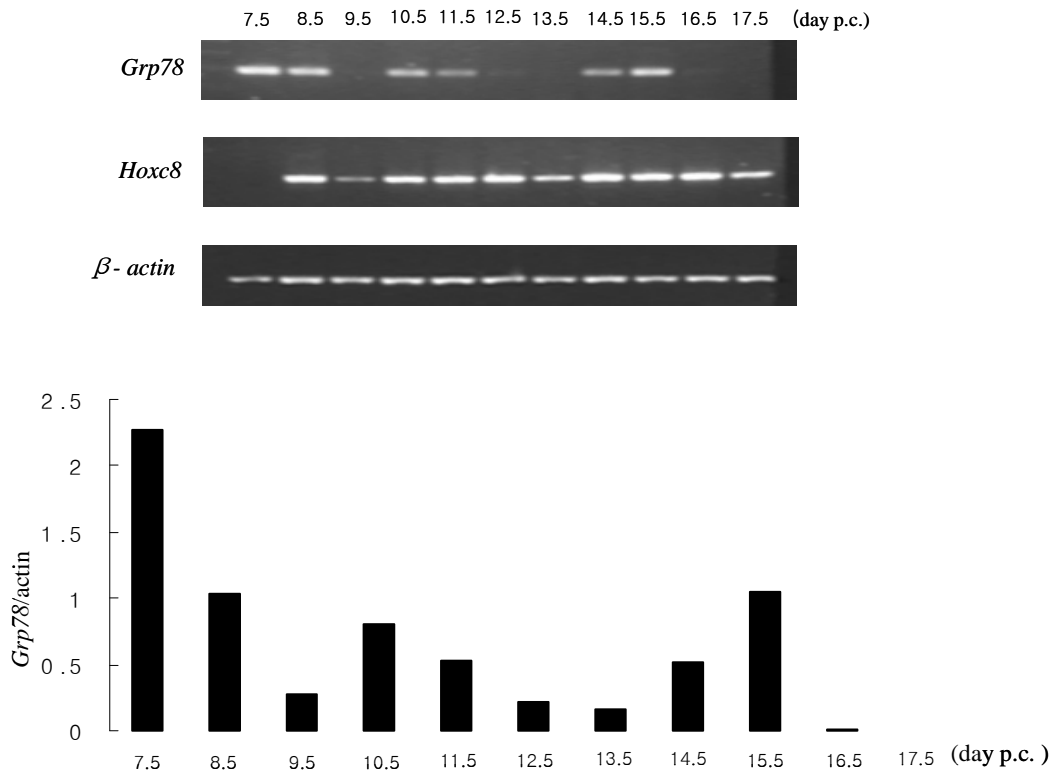


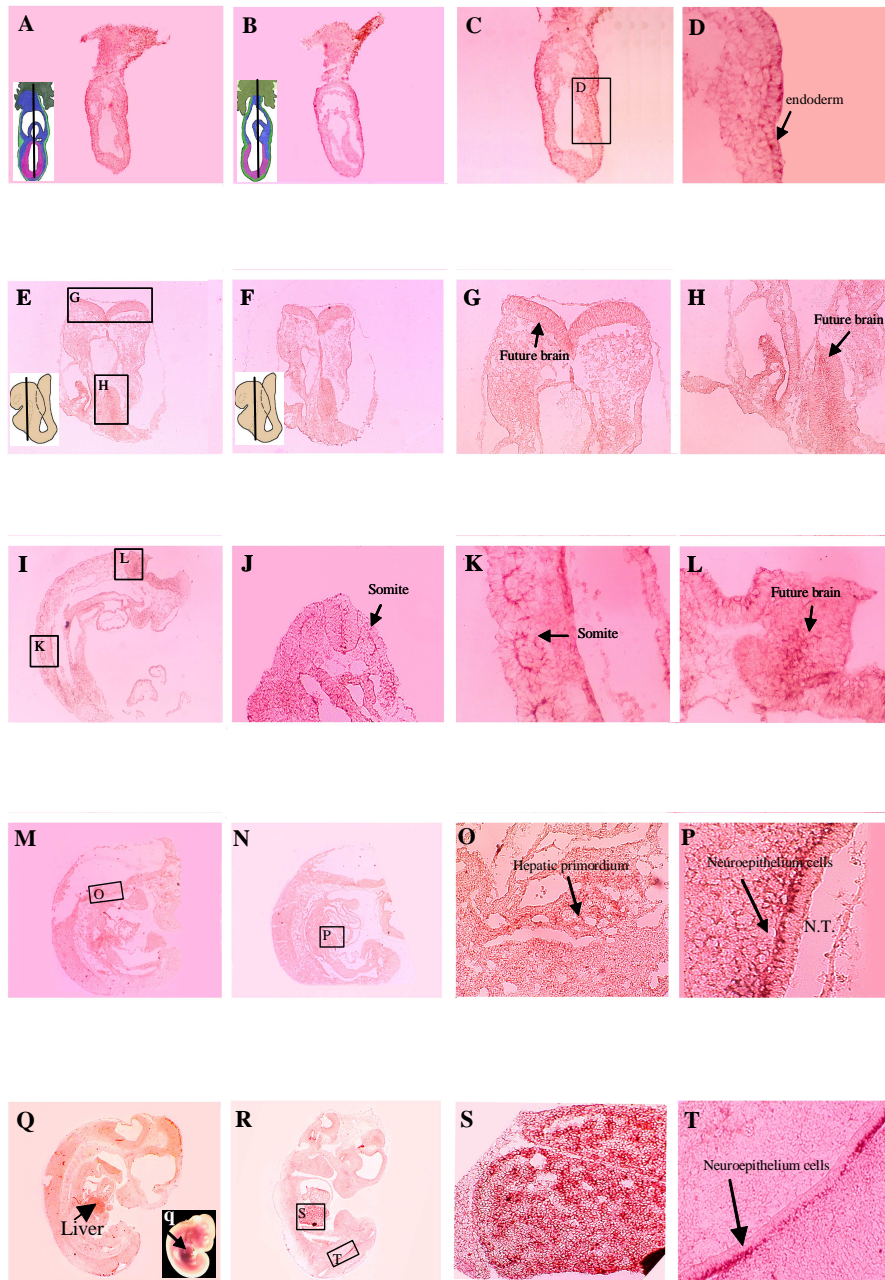
Figure 2. Temporal expression pattern of *Grp78* in mouse embryos of day 7.5–17.5 p.c. RT-PCR pattern of *Hoxc8* and *Grp78* in mouse embryos. β -actin was used for the internal control. The amount of mRNA expression was normalized with that of β -actin.

2. *Grp78*의 삼차원적 발현양상 분석

낭배형성(*gastrulation*)이 시작되는 초기 7.5일째 배자에서는 내배엽에서 관찰되었으며(Fig. 3A-D), 8.5일과 9.5일째 배자의 경우 신경관(*neural tube*)의 신경상피세포(*neuroepithelium cell*)에서 발현되었다(Fig. 3E-I, L). 9.5일째 배자에서는 체절(*somite*)에서도 *Grp78*이 강하게 발현되었다(Fig. 3I-K).

배자의 기관들이 형성되기 시작하는 중기 배자인 10.5일과 11.5일 배자에서는 공통적으로 간으로 될 *hepatic primordium*과 신경관의 신경상피세포에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3Q-U). 특히, 11.5일 배자의 *whole mount in situ hybridization* 방법으로 분석한 경우에도 간에서 매우 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3q).

후기 14.5일 및 15.5일 배자는 공통적으로 늑골(*rib*)이 되는 연골 부위(*cartilage primordium*)와 폐의 *cranial lobe* 부분의 통로 주위에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3U-Z, 3a, b). 15.5일 배자에서는 턱밑샘(*submandibular gland*)과 신장이 되는 후신(*metanephros*)에서 *Grp78*의 발현이 관찰되었다(Fig. 3c, d).



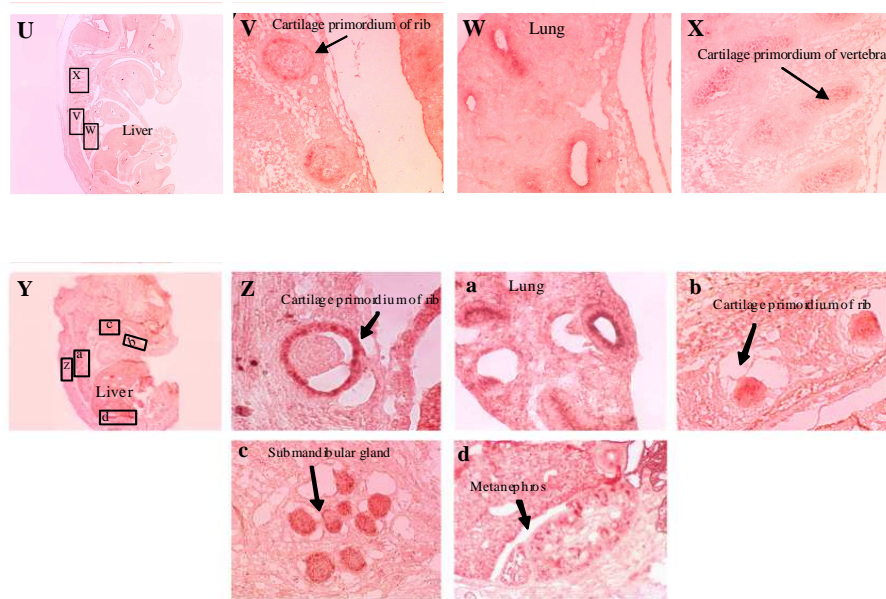


Figure 3. Expression pattern of *Grp78* during murine embryonic development. Cold *in situ* hybridization was performed. (A, C, D) sagittal (B) frontal section of day 7.0 p.c. embryo; (E, F) frontal section of day 8.0 p.c. embryo; (G, H) neuroepithelium cells; (I, K, L) sagittal and (J) cross section of day 9.0 p.c. embryo; (M, N) sagittal section of day 10.5 p.c. (Q, R) sagittal section of day 11.5 p.c., inset in (Q) whole mount *in situ* hybridization; (O, S) hepatic primodium, (P, T) neuroepithelium cells of neural tube; (U) sagittal section of day 14.5 p.c. (paraffin section), (Y) sagittal section of day 15.5 p.c.. (V, Z) cartilage primordium of rib, (W, a) lung- segmental bronchus within cranial lobe, (X) cartilage primordium of vertebra, (b) cartilage primordium of ventral part of shaft, (c) submandibular gland and (d) metanephros.

3. *Hoxc8*에 의한 *Grp78*의 발현 조절

가. *Hoxc8* 과발현 시 *Hoxc8* downstream target genes의 발현분석

Putative *Hoxc8* downstream target genes으로 분석된 유전자들 (*Glucose-regulated protein 78(Grp78)*, *Carbonic anhydrase II(CAII)*, *Tubulin beta 5 chain*, *ATP synthase*, *Proliferating cell nuclear antigen(Pcna)*, *Retinoblastoma binding protein 7(Rbbp7)*, *Elongation factor 1-beta*, *proteasome subunit alpha type 5*)이 transcriptional level에서 *Hoxc8*에 의해 직접 조절을 받는지를 알아보기 위하여 F9 cell과 분화시킨 F9 cell에 *Hoxc8*를 각각 과발현 시킨 다음 RT-PCR을 수행하였다. 대조군으로는 F9 cell과 *Hoxc8*이 들어있지 않은 벡터만 transfection시킨 F9 cell을 사용하였으며, 실험군인 *Hoxc8*을 과발현 시킨 F9 cell과 그 발현 양을 비교하였을 때 *Grp78*은 *Hoxc8*이 과발현 되었을 때 그 양이 더 증가 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

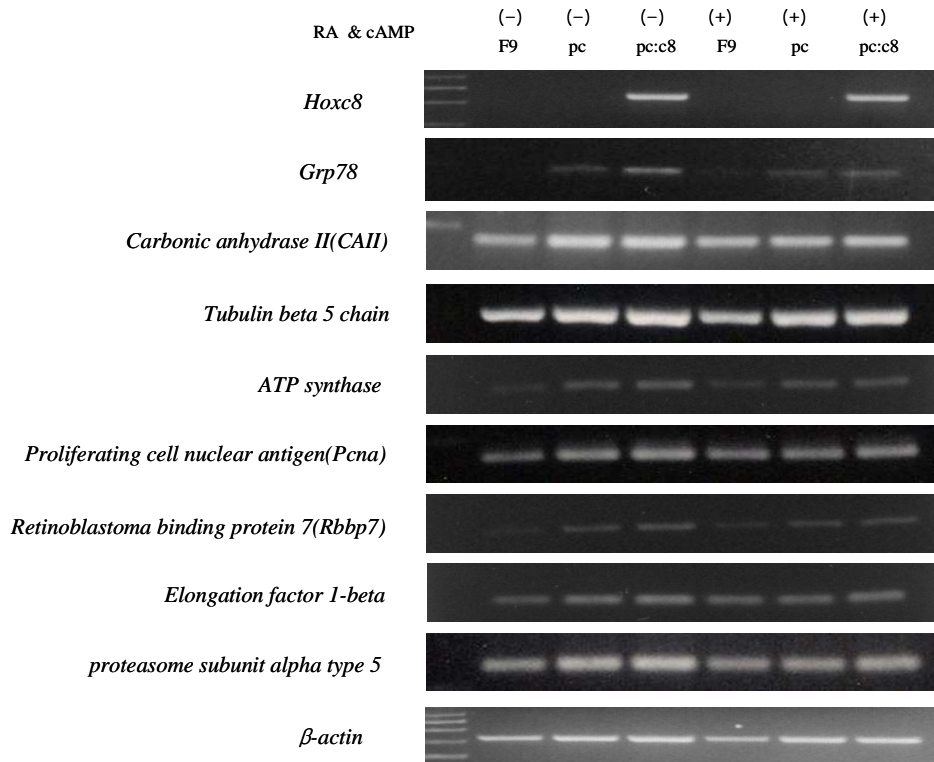


Figure 4. Expression pattern of plausible *Hoxc8* target genes in F9 and differentiated F9 cells. Differentiation of F9 cells were grown for 4 days in the presence of 10^{-7} M retinoic acid (RA) combined with 10 mM cAMP. Total RNA was isolated from F9 cell (control) or pcDNA3 (control) or pcDNA: c8 (*Hoxc8* transfectant) transfected F9 and differentiated F9 cells were analyzed by quantitative RT-PCR.

나. *Grp78* reporter analysis

*Hoxc8*에 의해 *Grp78*의 발현이 증가되는 것을 관찰하였으므로 *Grp78*의 *upstream region*에 현재까지 보고된 *Hox binding motif*¹⁸⁻²⁴가 존재하는 지를 분석하였다. NCBI의 Blast program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하여 분석한 결과 여러 군데에 *Hox*와 결합하는 부분 (TAAT, ATTA, TGAT[t/g]NA[t/c])이 존재하고 있음을 발견하였다(Fig. 5, 6A).

*Hoxc8*에 의해 *Grp78*의 발현이 실제로 조절되는지 알아보기 위해서 *upstream Grp78(ugrp78)*을 pGL2 promoter vector에 클로닝하여(pGL2-ugrp78) *Hoxc8*과 함께 F9 cell에 cotransfection한 다음 luciferase activity를 측정하였다. 그림 6B에서와 같이 *Hoxc8*에 의해 reporter의 발현이 증가됨을 알 수 있었고, *upstream sequence*가 reverse로 들어간 경우(pGL2-rugrp78)는 *Hoxc8*이 transactivation시키지 않았다.

GCACCAGTAGATTGGGCTTAGTGATTCTATCTTAATACTAGTCTGATGCAACCCAA-56
 AGGAAGATCAATGTTATGACAGTATTACAAGCCTGACTGAAAGAGCTGTGTGATGC-112
 AACTTCTATAGCAAGGATGGAGTTGACTGAGTCACTAATCTTTGAGGAATGAGAAA-168
 GGAAAAAATTCTGAAACACTGATTCATAGGCTCAACATTTTAGTGACTGTGCGTG-224
 TGATGTTTTAGTAGTATTTGCACAGTGTACTTATGAAGCTCAGAATACATTTAATA-280
 GGAATACTGGAGTCATTTCCCTGCCTGTAATTAAATGGCCCAAGTAGCCTTCATAAGC-336
 ATGTCTATAAAGGACTTGGGGTGCAGAGATGGTGGACCTGAGAGTTCAAGGCCAGCC-392
 TGGTGGACATGTTGAGCTCCAGGCCTGGAGACAGATGTCAGTTGTGTAGCATGCAT-448
 AGATGCAAGTCCCATGGTAGTACATGCCTATGCCTGAAGTTCTCAGCACTGGGAG-504
 GTATAGATAGAAGAAACAGAAAGTTCAAAGTCATTTGCTACACAGTTTGAAGACTGG-560
 GGGTGCATGAAATTTGTCTTTAAACAACAAAAAGGGTGGTGGTGGTGGGAATCAA-616
 TAGTATAAATTATGGAGTAAAATCAACCGGGTATTAACTATATTCTCAGCACTTA-672
 TCAATCGACCATTCTAGCTATTTTAATCGCTCTTGGTCTCAATGGTCTCTTCTGGAA-728
 AATGGGAAAAATGTACCAAGACTTGAATATGAATAAATGACACATGGAAAAACATA-783
 AGGAGGATCAGTAGTTATAGACCAGCTTGGCCTGTGTACAATGCCTCTCAAATA-839
 CATAAAACAAAACAATGAAGTACATAATAAGCTCAAGTAGTAACCTGTTTTGTTTG-895
 TCCCCAACATACTATTATAAAAGAGTAAAGCATCAGCAAGACTTTTTTGTCTGCT-951
 AAACGTCTTTAGCATTATCAGCCCTATTCCAAGAGTCGAATAGGGTGGTGTCAAGA-1007
 AGGAAGAGGGAAAGAGGAAGGACTTATAAATAATAACCAGTGTCAATAATGGAAAT-1063
 GCTATGCTAGAACAGGTTAGCGAACAATAAGGCCTACGAGAGAGAGAGAGAGAGA-1119
 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAGAAAAGATACATCTCATGGTGGAAAGTGCTCGTTT-1175
 GACCATGACTGAATCTCCGCGCGGAGAAAGGGAATAGGTTACAATTGGCCAGG-1231
 CCAATCTGGGACTTAACCCCGGCAAGGGAAGATTGAAAAGGCCTGAAAAGACAC-1287
 ATACGGCTAGCCTTGGGGTGAAGGAGAAACACGGTTAGCTGAGAAGCACCAGGATT-1343
 CTCAGCGAGGCAGAATCCAGATCAGGCCCCAGCTCGAGACGTGCAGGCCGGGCGAG-1399
 TAACAGGGCCTGGACTCTGGGACATCCGAGAACGTGTGGAGGCTGGGGAGGGCGAT-1455
 CACAGCTGAGGCCGGGCAGCTCAGGACCGGGGAATCGAGGAGGAGAAAAGGCCGCG-1511
 TACTTCTCAGAGTGAGAGACAGAAAAGGAGACCCCCGAGGGAACCTGACACGCAGAC-1567
 CCCACTCCAGTCCCCGGGGGCTGGCGTGAGGGGAGGACCTGAACGGTTACCGGGC-1623
 GAAACGCTCTCGGGTGAGAGGTCACCCGAAAGGACAGGCAGCTGCTGAACCAATAG-1679
 GACCAGCGCTCAGGGCGGATGCTGCCTCTCATTGGTGGCCGTTAAGAATGACCAGT-1735
 AGCCAATGAGTCAGCCCGGGGGCGTAGCAATGACGTGAGTTGCGGAGGAGGCCGCG-1791
 TTCGAATCGGCAGCAGCCAGCTTGGTGGCATGGACCAATCAGCGGCCTCCAACGAG-1847
 TAGCGACTTCACCAATCGGAGGCCCTCCACGACGGGGCTGTGGGGAGGGTA**TATA**AG-1903
 GCGAGTCGGCGACGGCGCGCTCGATACTGGCCGAGACAACACTGACCTGGACACTT-1959
 GGGCTTCTGCGTGTGTGTGAGGTAAGCGCCGCGGCCCTGCTGCTAGGCCCTGCTCCGA-2015
 GTCTGCTTCGTGTCTCCTCCTGACCCCGAGGCCCTGTCGCCCTCAGACCAGAACC-2071
 GTCGTCGCGTTTCGGGGCCACAGCCTGTTGCTGGACTCCTAAGACTCCTGCCTGAC-2127
 TGCTGAGCGACTGGTCCCTCAGCGCCGGCATGATGAAAGTTCACTGTGGTGGCGGCGG-2183
 CGTTGCTGCTGCTGGGCGCGGTGCGGGCCGAGGAGGAGGACAAGAAGGAGGATGTG-2239
 GGCACGGTGGTCCGCATCGACTTGGGGACCACCTATTCTTGGTAAAGTGGTATCCGT-2295
 CGAAGGAGGAGGGGGTGGGGAGGAGTGGGGCGTGGCCCTCCGGGGCCAGCGTGAGAA-2351
 AGTGAGGTGC-2361

Figure 5. Sequence analysis of the upstream regulatory region of murine *Grp78* gene. Putative Hox binding core motifs are boxed. Start codon (ATG) is underlined. TATA box is marked by bold characters.

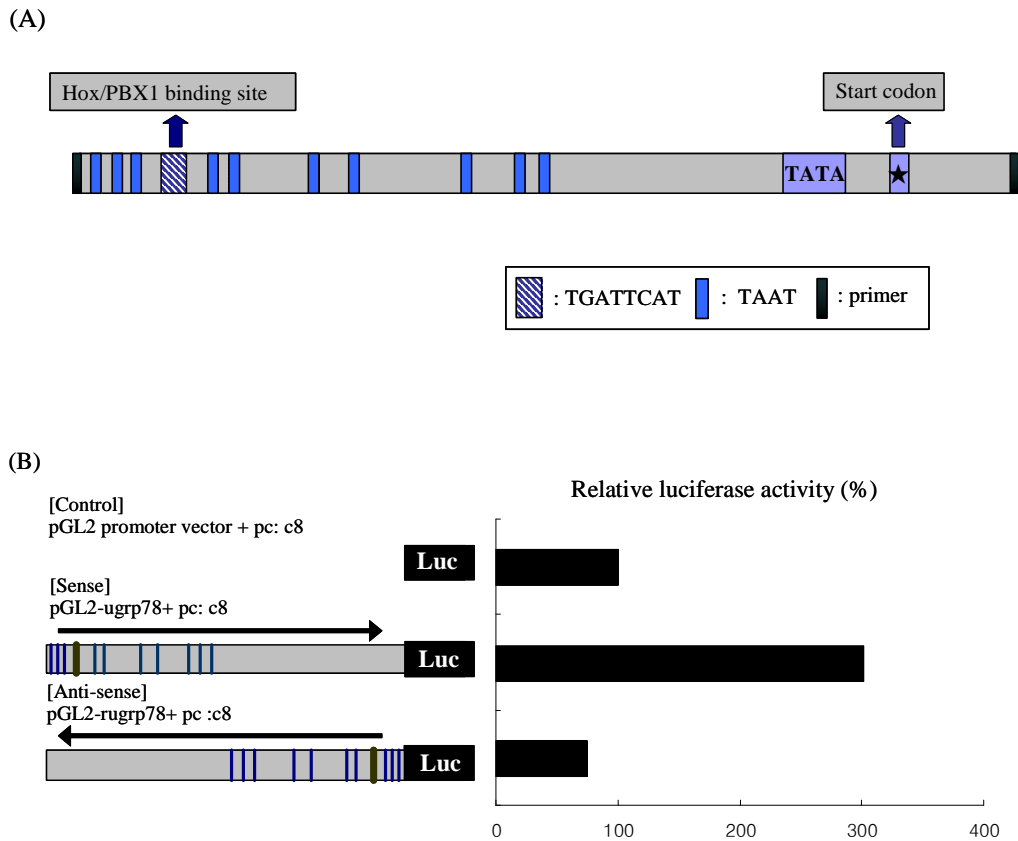


Figure 6. Transactivation of *Grp78* by *Hoxc8*. (A) Schematic representation of *Grp78* upstream sequence, showing the location of the *Hox* binding site. (B) Luciferase (*Luc*) activities were assayed 24hr after transfection using the Dual luciferase assay kit (Promega). The results are the mean value of three independent experiments. *pGL2-ugrp78* and *pGL2-rugrp78* plasmid ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) were transiently cotransfected with $0.5 \mu\text{g}$ of the *Hoxc8* expression vector. Transfection efficiency for each assay was assessed by cotransfection of 10 ng of renilla luciferase expression plasmid.

다. *Hoxc8*의 siRNA에 의한 *Grp78*의 발현 분석

*Grp78*의 발현이 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절을 받는다는 것을 재검증하기 위하여 *Hoxc8*에 대한 siRNA를 제작하였다(재료 및 방법 참조). Control pGL2-promoter에 비해 pGL2-ugrp78이 *Hoxc8* 발현시 약 4.5배 정도 증가하였으며 이 발현의 증가는 *Hoxc8* siRNA(1)과 (2) 그리고 siRNA(1), (2)가 동시에 존재할 때 모두 down-regulation 되었다(Fig. 7).

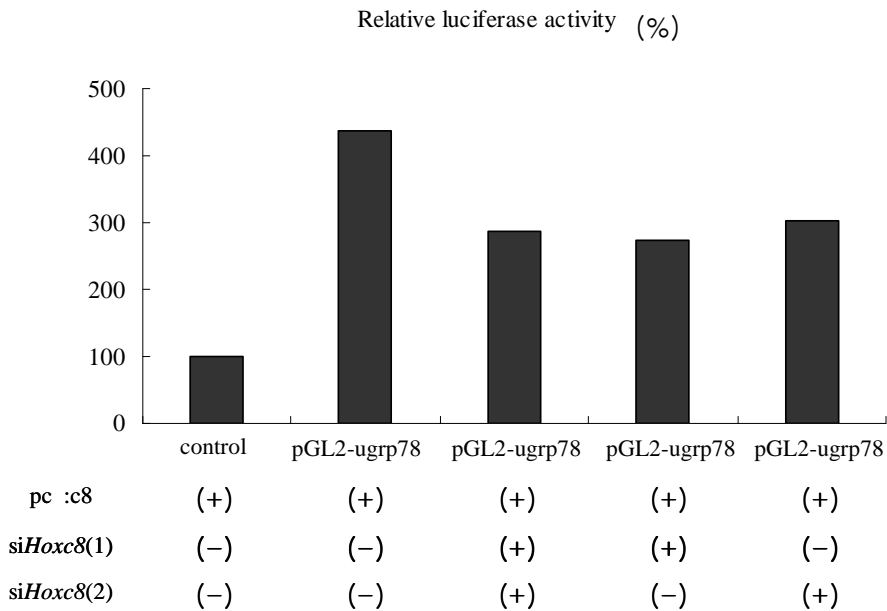


Figure 7. Effect of *Hoxc8* siRNA on the expression of *Grp78* in F9 cells. Luciferase activities were assayed 24 hr after transfection using the dual luciferase assay kit (Promega). Transfection efficiency for each assay was assessed by cotransfection of 10 ng of renilla luciferase expression plasmid. The results are the mean value of three independent experiments.

IV. 고찰

Hox 유전자는 발생 과정 중 시·공간 특이적으로 발현하여 개체의 형태를 만드는데 관여하는 전사 조절 인자로서 다수의 *downstream target genes*의 활성을 조절하는 *master switch*로서 알려져 있다.²⁵⁻²⁷

현재까지 직접적으로 *Hox* 유전자로부터 조절을 받는 *downstream target genes*에 대해서는 알려진 것이 거의 없다. 그러나 최근 보고에 따르면, *molecular level*에서 *Hoxa7*이 *keratinocyte transglutaminase type 1*을 조절하여 *keratinocyte* 분화에 관여하고²⁸, *Hoxa5*는 *progesterone receptor gene*의 활성을 조절하며, *Hoxc8*이 *osteopontin gene*을 억제하는 데 관여한다는 연구가 보고되었다.²⁹

본 연구에서는 *Hoxc8*의 직접적인 *target genes*을 규명하기 위하여 프로테옴 분석을 통해 *Hoxc8*의 *downstream target genes*⁹로 추정되는 유전자들의 발현 양상을 조사하여 *transcriptional level*에서 *Hoxc8*과 비교하였다. 대부분의 경우, *Hoxc8* mRNA의 발현 양상과 일치하지 않는 것으로 보아 이들이 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절되기 보다는 *Hoxc8*의 과발현으로 인해 변화된 다른 유전자들의 발현에 의해 조절되는 것으로 보이며, 조절되었다 하더라도 *transcriptional level*이라기 보다는 *post-transcriptional* 또는 *translational level*에서 조절된 것으로 생각된다. 그러나 *Grp78*의 경우, *Hoxc8* 과발현에 의해 발현이 증가하였으며 배자 발생과정 중 시·공간적 발현 양상이 *Hoxc8*과 상당히 유사한 것을 확인할 수 있었다.

신경관(*neural tube*)의 경우, 9.5일 부터 *Grp78*의 발현이 관찰되었으며, *Hoxc8*도 8.5일에서는 신경외배엽(*neuroectoderm*)에서 발현되고, 9.5일 이후 부터는 신경관에서 발현됨을 관찰할 수 있었다.²⁶ *Hoxc8*이 강하게 발현되는

C(*cervical*)₅-T(*thoracic*)₁의 *neuronal segment*는 *forelimb*으로 뻗어나가는 운동 신경(*motor neuron*)이 존재하는 것으로 알려져 있는데³⁰ 흥미롭게도 *Grp78* 또한 이 부위에서 강하게 발현되었다. *Hoxc8-deficient mouse* 경우, 운동 신경에서 *apoptosis*가 증가하였으며 이를 통해 *Hoxc8*이 운동 신경의 *survival*에 관여할 것이라고 보고된 바 있다.³⁰ *Grp78* 또한 C₅-T₁에서의 강한 발현을 고려해 볼 때, *Hoxc8*이 *Grp78*를 조절하여 운동 신경 *apoptosis*를 억제하고, *cell survival*에 도움을 주어 척수(*spinal cord*) 형성에 중요한 역할을 수행할 것이라고 생각된다.

체절(*somite*)의 경우, *paraxial mesoderm*으로 *cell cluster*들은 척추(*vertebra*)의 신경관과 척색(*notochord*)에 접하여 형성되고, 발생 후기에는 *cell*이 이동하여 늑골(*rib*), 척추, *vertebral discs*로 분화된다고 보고된 바 있다.³¹ *Grp78*도 9.5일부터는 체절에서 보여 지고, 14.5일 이후부터는 척추와 늑골이 될 연골 부분(*cartilage primordium*)에서 발현되는 것을 관찰할 수 있다. 특히, 늑골이 되는 연골 부분은 *Hoxc8*의 과발현에 의해 *proliferating chondrocytes*가 축적되고, *maturation*이 억제된다는 보고가 있다.³² *Grp78* 역시 늑골이 되는 연골 부분에서 발현이 되었고, *Grp78*이 *cell survival*에 관여하고, *cancer cell*에서 *cell proliferation*에 관여한다는 사실로 유추해 볼 때¹⁰, *Hoxc8*의 과발현에 의한 *proliferating chondrocytes*의 축적은 *Grp78*이 그 기능을 수행하는 것일 수도 있다고 사료된다.

후신(*metanephros*)의 경우, 14.5일과 15.5일 쯤 배자에서 *Grp78*이 후신의 *branch*가 형성되는 부분에서 발현하는 것을 관찰하였다. 보고된 바에 따르면, *rat* 13일 쯤 배자에서 *Grp78*이 *mesenchymal-epithelial conversion*에 관여한다고 한다.³³ 이 때, TGF- β 2는 *mesenchymal cell*의 *proliferation*을 촉진하는데 신장의 발생과정에서 TGF- β family인 BMP4, BMP7, TGF- β 2 등이 발현되어 신장의 발생을 조절하는 것으로 알려져 있다.³³ *Hoxc8*은 11.5

일로부터 *mesonephric*과 *metanephric kidney*에서 발현이 되고, *Hoxc8*이 BMP4에 의해 세포의 분화와 증식을 조절한다는 연구 결과를 볼 때⁴⁰, *Hoxc8*과 *Grp78*이 BMP4 *signal*를 통해 신장의 발생을 조절할 수도 있음을 시사한다.

신장의 형태 형성을 위해서는 *extracellular matrix molecule* 즉 *matrix metalloproteinase*, *matrix molecules*, *growth factor*, *growth factor receptor* 들이 요구되는데 이들은 모두 *secretory* 혹은 *transmembrane protein*으로서 ER 내에서 합성되며, 이를 위해서는 왕성한 ER *protein bioassembly activity*를 갖고 있는 GRP78같은 단백질이 많이 요구될 것으로 생각된다. 그리고 흥미롭게도 *rat* 13.5일 배자의 *ureteric bud (UB) branch*에서 *metalloprotease*와 *growth factor receptor*의 발현이 증가되었으며, 이와 함께 *Grp78*도 발현이 증가되었다고 보고된 바 있다.³⁴ 그리고 *Hoxc8*의 경우도 *mouse* 배자에서 UB branch 근처의 *mesenchymal cell*에서 발현된다는 보고로 미루어³⁵ 신장 형성에 있어서 *Hoxc8*에 의해 *Grp78*이 조절될 수도 있음을 시사한다.

폐의 경우, *Grp78*은 *cranial lobe*의 가지에서 발현되는 것이 관찰되었다. 폐 또한 신장과 같이 많은 가지를 가진 기관으로서 형태 형성에 있어 FGF나 BMP4와 같은 *secretory protein*이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.³⁶ 따라서 폐에서도 *Grp78*이 ER 내에서 단백질의 합성, *folding*, *assembly*들이 용이하게 이루어질 수 있도록 도와줄 것으로 생각된다. 또한, 폐가 발생하는 과정 중 여러 단계에서 *apoptosis*가 일어난다고 알려져 있는데³⁶ 태아일 때는 *epithelium*이나 *mesenchyme*에서 *apoptosis*가 상대적으로 일어난다고 알려져 있다. 그러나 *apoptosis* 조절 기작에 대해서는 알려진 바가 없다.³⁶ 따라서 본 연구의 결과들로 *Grp78*이 *apoptosis*를 조절하여 폐의 형태를 구축하는데 관여할 것으로 사료된다.

사람의 경우, *Hoxc8*이 성인의 폐에서는 발현이 되지 않으나 태아의 폐에서는 발현이 된다고 보고되어 있다.³⁷ 이와 같이, 태아의 폐에서 *apoptosis*가 적게 일어나는 것은 *Hoxc8*이 태아의 폐에서 발현된 양상과 유사한데, 이상의 보고로 미루어 보아 아마도 *Grp78*이 *Hoxc8*의 조절을 받아 *anti-apoptotic pathway*에 관여한 것으로도 생각된다.

간에서는 다양한 종류의 분비 단백질과 막 단백질들이 만들어지므로¹⁶ 많은 *chaperone* 단백질들이 필요할 것으로 생각되며, 따라서 *Grp78*의 발현이 증가되었다고 생각되어진다. 그러나 *Hoxc8*이 간에서 발현된다는 보고는 없었던 것으로 보아 간에서 *Grp78*의 발현을 위한 또 다른 기작이 있을 것이라고 생각된다.

턱밑샘(*submandibular gland*)에서는 중심에 있던 세포들이 하나의 층이 될 때까지 *apoptosis*가 일어난다. 이 때 *p53/caspase3-mediated apoptosis*는 *terminal bud formation*에서 중요하고, *caspase8/caspase3-mediated apoptosis*는 *ductal lumen formation*에 관여한다고 보도되어있지만 *apoptotic stop signal*에 대해서는 알려진 것이 없다.³⁸ *Grp78*의 경우 *caspase activity*를 억제하여 *apoptotic signal*를 저해한다는 보고로 미루어¹³ 턱밑샘 형성 시 *apoptotic stop signal*에 *Grp78*이 관여할 수도 있을 것으로 생각된다.

*Grp78*이 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절을 받는다는 것을 증명하기 위해 *in vitro* 상에서 mouse genomic DNA의 *Grp78 upstream* 부분에서 *Hox binding core motif* (TAAT, TTAT) 9개와 *Hox cofactor* 라고 알려진 PBX1와 *Hox*가 *binding*하는 서열(TGAT[t/g]NA[t/c]) 한 부위를 발견하여 이 부위를 클로닝 한 다음 *reporter analysis*를 시행한 결과³⁹, *Hoxc8*에 의해 *Grp78*이 *up-regulation*되고, 이 *up-regulation*이 다시 *siHoxc8*에 의해 *down-regulation*되는 것으로 보아 *Hoxc8*이 *Grp78*를 직접적으로 조절하는

것으로 보인다. 앞으로 *Grp78* upstream 부분을 *deletion*시켜 정확히 어느 부위가 *Hoxc8*에 의해 조절을 받는 곳인지 알아보고, *Hoxc8*이 *Grp78*의 upstream 부분에 *binding*하는지 확인하여야 할 것이다.

이상의 *in vivo* 및 *vitro* 결과로 미루어 보아 *Grp78*이 초기 발생동안 신경관과 체절에서 발현되고, *organogenesis* 과정에서 후신, 폐, 척추와 늑골이 될 연골 부분에서 관찰되는 것이 *Hoxc8*의 발현 패턴과 유사하며, *reporter-effector analysis* 분석을 통해 *Grp78*이 *Hoxc8*에 의해 직접적으로 조절 되는 것으로 보아 *Grp78*이 *Hoxc8* direct target genes 중의 하나일 것으로 생각된다.

V. 결 론

*Hoxc8*의 *downstream target genes* 중의 하나로 유추된 *Grp78*의 발현 패턴을 분석하고, *reporter-effector assay*를 통해 *Hoxc8*(effector)이 *Grp78*(*reporter*)의 발현을 조절하는 지 알아보았다.

1. 생쥐 배자 발생 과정 중 *Grp78*은 일정한 시기에 발현되었으며, 11.5일째 배자의 경우는 흉부 부분에서 강하게 발현이 관찰되었다.

2. *Grp78*이 발현되는 기관은 초기 배자에서는 내배엽, 신경관의 신경상피세포에서 발현되었고, 후기 배자에서는 간, 폐의 *cranial lobe*에서 가지가 되는 부분, 척추와 늑골이 되는 연골 부분, 턱밑샘과 후신에서 발현 되는 것으로 보아 *tissue-specific*하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

3. *Grp78*의 *upstream* 부위를 *pGL2-promoter(reporter)*에 클로닝하여 분석하였을 때, *Hoxc8*(effector)에 의해 *reporter*의 발현이 증가하는 것을 알 수 있었고, 다시 *Hoxc8* siRNA를 이용하여 *Hoxc8*의 기능을 저해하면 *reporter*의 발현이 감소하였다.

이상의 결과들로 미루어 보아 *Grp78*은 배자 발생 과정 중 시·공간적으로 *tissue specific*하게 발현하며 또, *Hoxc8*에 의해 직접적으로 발현이 조절되는 *downstream* 유전자임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Morsi El-Kadi AS, *in der Reiden* P, Durston A, Morgan R. The small GTPase Rap1 is an immediate downstream target for Hoxb4 transcriptional regulation. *Mech Dev* 2002;113:131-139.
2. Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Info* 1993;5:301-308.
3. Sharkey M, Graba Y, Scott MP. Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends Genet* 1997;13:145-151.
4. Thattaliyath BD, Firulli BA, Firulli AB. The basic-helix-loop-helix transcription factor HAND2 directly regulates transcription of the atrial natriuretic peptide gene. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1335-1344.
5. Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organism to humans. *Mol Genet Metab* 2000;69:85-100.
6. Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Repord* 1997;3:115-131.
7. Dubouls D. *Guidebook to the Homeobox genes* New York: Oxford University Press Inc; 1994.
8. Hombria JC, Lovegrove B. Beyond Homeosis-Hox function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 2003;71:461-476.

9. Kwon Y, Ko JH, Kim B, Kim MH. *Analysis plausible downstream target genes of Hoxc8 in F9 teratocarcinoma cells.* Mol Biol Rep 2003;30:141-148.
10. Lee AS. *The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications.* Trends Biochem Sci 2001;26:504-510.
11. Barnes JA, Smoak IW. *Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress.* Anat Embryol 2000;202:67-74.
12. Mote PL, Tillman JB, Spindler SR. *Glucose regulation of GRP78 gene expression.* Mech Ageing Dev 1998;104:149-158.
13. Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T *et al.* *Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone Grp78.* FEBS Lett 2002;514:122-128.
14. Chang SC, Erwin AE, Lee AS. *Glucose-regulated protein (GRP94 and GRP78) genes share common regulatory domains and are coordinately regulated by common trans-acting factors.* Mol Cell Biol. 1989;9:2153-2162.
15. Watson LM, Chan AK, Berry LR, Li J, Sood SK, Dickhout JG *et al.* *Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/ immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity.* J Biol Chem 2003;278:17438-17447.

16. Little E, Tocco G, Baudry M, Lee AS, Schreiber SS. *Induction of glucose-regulated protein (glucose-regulated protein 78/BiP and glucose-regulated protein 94) and heat shock protein 70 transcripts in the immature rat brain following status epilepticus.* *Neuroscience* 1996 ;75:209-219.
17. Tillman JB, Mote PL, Walford RL, Spindler SR. *Structure and regulation of the mouse GRP78 (BiP) promoter by glucose and calcium ionophore.* *Gene* 1995;158:225-229.
18. Ekker SC, Jackson DG, von Kessler DP, Sun BI, Young KE, Beachy PA. *The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins.* *EMBO J* 1994;13:3551-3560.
19. Hayashi S, Scott MP. *What determines the specificity of action of Drosophila homeodomain proteins?* *Cell* 1990;63:883-894.
20. Knoepfler PS, Lu Q, Kamps MP. *Pbx-1 Hox heterodimers bind DNA on inseparable half-sites that permit intrinsic DNA binding specificity of the Hox partner at nucleotides 3' to a TAAT motif.* *Nucleic Acids Res* 1996 ;15:2288-2294.
21. Mann RS, Affolter M. *Hox proteins meet more partners.* *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:423-429.
22. Neuteboom ST, Murre C. *Pbx raises the DNA binding specificity but not the selectivity of antennapedia Hox proteins.* *Mol Cell Biol* 1997 ;17:4696-4706.

23. Shanmugam K, Green NC, Rambaldi I, Saragovi HU, Featherstone MS. PBX and MEIS as non-DNA-binding partners in trimeric complexes with HOX proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:7577-7588.
24. Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C. The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J Biol Chem* 1997;272:8198-8206.
25. Jave-Suarez LF, Winter H, Langbein L, Rogers MA, Schweizer J. HOXC13 is involved in the regulation of human hair keratin gene expression. *J Biol Chem* 2002;277:3718-3726.
26. Kwon Y, Shin J, Park HW, Kim MH. Dynamic expression pattern of Hoxc8 during mouse early embryogenesis. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;283:187-192.
27. Villaescusa JC, Verrotti AC, Ferretti E, Farookhi R, Blasi F. Expression of Hox cofactor genes during mouse ovarian follicular development and oocyte maturation. *Gene* 2004;330:1-7.
28. La Celle PT, Polakowska RR. Human Homeobox HOXA7 Regulates Keratinocyte Transglutaminase Type 1 and inhibits Differentiation. *J Biol Chem* 2001;276:32844-32853.
29. Raman V, Tamori A, Vali M, Zeller K, Korz D, Sukumar S. HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. *J Biol Chem* 2000;275:26551-26555.

30. Turet L, Le Mouellic H, Maury M, Brulet P. *Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice.* *Development* 1998;125:279-291.
31. Dubrulle J, Pourquie O. *Coupling segmentation to axis formation.* *Development* 2004;131:5783-5793.
32. Yueh YG, Gardner DP, Kappen C. *Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:9956-9961.
33. Plisov SY, Ivanov SV, Yoshino K, Dove LF, Plisova TM, Higinbotham KG *et al.* *Mesenchymal-epithelial transition in the developing metanephric kidney: Gene expression study by differential display.* *genesis* 2000;27:22-31.
34. Meyer TN, Schwesinger C, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM *et al.* *Spatiotemporal regulation of morphogenetic molecules during in vitro branching of the isolated ureteric bud: toward a model of branching through budding in the developing kidney.* *Dev Biol* 2004;275:44-67.
35. Patterson LT, Potter SS. *Atlas of Hox gene expression in the developing kidney.* *Dev Dyn* 2004;229:771-779.
36. Wang J, Ito T, Udaka N, Okudela K, Yazawa T, Kitamura H. *P13K-AKT pathway mediates growth and survival signals during development of fetal mouse lung.* *Tissue cell* 2005;37:25-35.

37. Golpon HA, Geraci MW, Moore MD, Miller HL, Miller GJ, Tuder RM *et al.* *HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema.* Am J Pathol 2001;158:955-966.
38. Jaskoll T, Chen H, Min Zhou Y, Wu D, Melnick M. *Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development.* BMC Dev Biol. 2001;3:1-5.
39. Hedlund E, Karsten SL, Kudo L, Geschwind DH, Carpenter EM. *Identification of a Hoxd10-regulated transcriptional network and combinatorial interactions with Hoxa10 during spinal cord development.* J Neurosci Res. 2004;75:307-19.
40. Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X. *Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling.* J Biol Chem 1999;274:13711-13717.

Abstract

*A study on the expression of Glucose-regulated protein 78
(Grp78) during murine embryogenesis*

Jin Joo Kang

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Myoung Hee Kim)

The *Hox* genes are key regulators for animal body pattern formation and are expressed position-specifically along the antero-posterior (A-P) body axis during early embryogenesis. Although the molecular analysis for the position-specific expression has well been studied, what *Hox* regulates -i.e., *Hox* downstream target genes are not clear yet.

Previously, *Grp78* has been discovered as one of the putative target genes of *Hoxc8*. *Grp78*, a member of a hsp70 family, is a highly conserved stress protein and functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum (ER) or in the cytosol.

In order to see the stage-specific expression pattern of *Grp78*, mouse embryos from day 7.5 to 17.5 p.c. were isolated and total RNAs were purified. When RT-PCR was performed using *Grp78* specific primers, periodic expression pattern was detected.

Since the position-specific expression was clearly detected on day 11.5 p.c. in the case of *Hoxc8*, the region specific expression of *Grp78*

was also analyzed at this stage: total RNAs were isolated from the segments of the embryos along the A-P axis and RT-PCR was performed. Interestingly, the region-specific expression pattern was detected with a strong expression in the trunk part of the embryo.

Using *in situ* hybridization, dynamic expression of *Grp78* revealed that endoderm, somite and neuroepithelium cells of the neural tube in early embryos expressed *Grp78*. In the case of late embryos, *Grp78* expression was detected in the liver, segmental bronchus within cranial lobe of lung, ossification center within the cartilage primordium of rib and vertebra, submandibular gland, as well as metanephros. These expression patterns are alike to those of *Hoxc8* very much. Since *Hoxc8* has been reported to be a regulator of apoptosis during organogenesis, it could be possible that the apoptotic function could have been conveyed through the expression of *Grp78*.

In order to investigate the effect of *Hoxc8* on *Grp78* expression, reporter-effector assay was performed. When the effector *Hoxc8* was present, the luciferase activity of the reporter (pGL2-ugrp78) containing the upstream sequence of *Grp78* harboring putative Hox and Hox-cofactor binding sites was up-regulated. Whereas, pGL2-rugrp78 containing the upstream sequence of *Grp78* in reverse orientation, and pGL2 promoter vector were not transactivated by *Hoxc8*. Furthermore the up-regulation of reporter (pGL2-ugrp78) expression in the presence of *Hoxc8* was down-regulated when small interfering, si*Hoxc8* was treated. These results altogether indicate that *Grp78* is one of the *Hoxc8* downstream target genes.

Key words : *Grp78*, expression pattern, *Hoxc8*, reporter-effector assay, *Hoxc8* downstream target genes