

폐특이 전사조절 유전자의 DNase I Hypersensitive Sites

전북대학교 의과대학 내과학교실, 임상의학연구소

이 용 철

= Abstract =

DNase 1 Hypersensitive Sites of Lung Specific Transcription Factor Gene

Yong Chul Lee, M.D

*Department of Internal Medicine, Research Institute of Clinical Medicine,
Chonbuk National University, Medical School, Chonju, Korea*

Background : Thyroid Transcription Factor-1(TTF-1) acts as a tissue specific transcription factor in the regulation of lung specific gene expression and as morphogenic protein during lung organogenesis. Currently, there is very little information on the cis-acting sequences and transcription factors that direct the TTF-1 gene expression. DNase 1 hypersensitive (DH) sites represent a marker for active or potentially active chromatin and are likely to be especially important in gene regulation, being associated with many DNA sequences that regulate gene expression. It is clear that DH regions correlate with genetic regulatory loci and binding for sequence-specific DNA-binding proteins.

Methods : We have used DH site assays to identify putative distal regulatory elements in H441 lung adenocarcinoma cells, which express the TTF-1 gene and HeLa cells.

Results : There are four DH sites 5' of the TTF-1 gene. These sites are located at base pair approximately +150, -450, -800, and -1500 from the start of transcription.

Conclusion : These data suggest that there may be at least one intragenic site and regulatory region 5' prime to the promotor region. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 879-886)

Key words : Transcription, Lung, Gene.

[†]이 논문은 전북대학교병원 임상연구소의 학술연구비의 일부 지원에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :

Yong Chul Lee, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, Chonbuk National University, Medical School
Chonju, Chonbuk, 560-182, Korea

Phone : 0652-250-1664 Fax : 0652-254-1609 E-mail : leeyc@moak.chonbuk.ac.kr

서 론

기관으로부터 폐포에 이르는 폐상피세포는 전장의 내배엽에서 태아 흉곽의 중간엽 안으로의 outpocketing에 의해서 유래된다^{1,2}. 이 상피세포의 발생과 분화는 성숙된 폐에서 여러 가지 중요한 기능을 제공하는 많은 수의 분화된 세포 형태의 형성을 가져온다. 표면활성물질 단백질(surfactant protein) A,B,C와 clara 세포 분비 단백질(Clara cell secretory protein, CCSP)은 이들 세포의 명확한 표식자인데, 이들 유전자의 표현을 조절하는 가장 중요한 2가지 전사 인자는 Hepatocyte Nuclear Factor-3 (HNF-3)와 Thyroid Transcription Factor-1(TTF-1)이며³⁻⁷, 이 중 TTF-1은 표면활성물질 단백질과 clara 세포 분비 단백질 유전자에 중요한 전사 활성 인자이며 폐의 발생에 꼭 필요한 물질이라는 것이 알려졌다². 또한 TTF-1 유전자가 결핍된 쥐는 폐실질의 형성이 전혀 되지 않으며, 감상선과 일부 뇌에도 심한 병변을 일으킨다⁸.

현재까지 폐의 특이한 유전자의 표현을 조절하는 전사인자들과 DNA의 조절인자의 cis-acting sequences에 관해서는 아직 거의 밝혀지지 않았다³. TTF-1 유전자는 폐상피의 비섬모 세기관지세포와 제2형 폐포세포에서 표현되는데 이 유전자의 전사 조절에 대한 연구가 폐에 특이적인 유전자 표현을 밝혀낼 수 있다⁹. 이에 저자는 폐특이 전사인자 특히 TTF-1 유전자의 proximal promoter바깥쪽의 전사인자를 밝혀 DNase 1 Hypersensitive(DH) 검사를 이용하여 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 게놈 클론의 확인

Novel bacterial artificial vector인 pCYPAC-2의 인간 genomic library를 polymerase chain reaction(PCR)방법을 통해서 확인하였다. PCR의 시발체는 5'-GGC ATG AAC ATG AGC GGC AT-3'와 5'-CTG TTG CTT GAA GCG TCC CT-3'이며

30초동안 95℃에서 denaturation, 56℃에서 annealing, 72℃에서 extension의 조건하에서 30 cycles을 반복하고 1.6% agarose gel에서 electrophoresis 시켜 확인하였다. cloning DNA를 확인하기 위해 Southern blot analysis시행하였다. 인간 TTF-1 유전자를 포함하고 있는 pCYPAC-2 plasmid DNA를 Not-1, Sal-1, Mlu-1, Xho-1, BamH 1, Kpn 1, Nco 1, Eco1471, Pvu 1, Not 1과 Sal 1, 그리고 Mlu 1과 Not 1등의 효소로 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기영동 시킨 후 Hybond 에 전이 시킨 후 PCR 산물로 probe를 만들어 65℃에서 밤새 내내 작동시킨 후 2x SSC와 1% SDS로 65℃에서 washing후 -80℃에서 Kodak XAR에 노출시켰다.

2. 세포 배양

인간의 악성 폐종양 세포주인 ATCC에서 분양받은 NCI H441 세포주와 L88 세포주는 RPMI 1640 medium (Life Technologies)에 10% fetal calf serum과 페니실린(100 U/ml), 스트렙토마이신(100 µg/ml)과 L-glutamine을 같이 넣은 후 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다. 인간의 자궁경부 epitheloid 암주인 HeLa 세포는 Dulbecco's modified Eagle Medium에서 유지하였다.

3. 총 세포 RNA의 추출

2M sodium acetate와 isopropanol을 이용하는 Promega사의 Total RNA Isolation system방법에 의하여 총 세포 RNA를 추출하였다.

4. Reverse Transcription과 PCR

5 µg의 RNA sample을 25 µl의 RNase-free microcentrifuge tube에 넣은 후 65℃에서 10분 동안 열을 가한 후 2분 동안 얼음위에서 식힌 후 Pharmacia사의 First-Strand Reaction Mix Beads에 넣은 후 primer를 투여 후 약 1분 동안 위치 시

킨 후 60분 동안 37℃에서 배양하였다. primer의 sequence는 5'-CGG CGA CTG CTG CTG AGC-3'이다. 33 μ l의 reverse-transcription product를 가지고 PCR을 시행하였다. 20pmol의 primers를 넣고 95℃에서 denaturation, 60℃에서 annealing 그리고 72℃에서 extension을 30초동안 30회 시행하였다. 이때 사용하는 sequence는 5'-CGC TTC CCC GCC ATC TCC-3'과 5'-TGC TGC TGC GGG CAC CCG GT-3'이다. PCR product는 1.6 % agarose gel에서 전기영동 시켰다.

5. DNase 1 hypersensitive site assay

약 1×10^8 의 NCI H441와 HeLa 세포를 1400 g, 4℃, 12분의 조건하에서 원심분리 시킨 후 4ml ice cold RSB로 resuspension시키고 이들을 glass Dounce homogenizer fitted with Pestle B에 넣은 후 1 ml 0.5% IGEPAL CA-630(Sigma)을 넣은 후 10-20번 동안 천천히 stroke하고, 1% crystal violet으로 핵을 염색시킨후 10배의 RSB로 핵을 희석시키고 1800 rpm, 5분, 4℃의 조건하에서 원심분리

시키고 상층액을 버린 후 1ml RSB로 resuspension 시켰다. DNase 1 digestion은 DNase 1을 0.2mg/ml로 희석시킨 후 튜브에 DNase 1을 0부터 10 μ l 까지 투여하고 100 μ l 핵을 DNase 1 이 미리 들어 있는 tube에 넣은 후 37℃에서 4분간 water bath에서 위치시킨 후 100 μ l 2x stop 용액을 투여하고, 10 mg/ml proteinase K를 10 μ l 투여 후 밤새 내내 위치시킨 후 다음날 phenol/chloroform으로 extraction시키고 에탄올로 침전시킨 후 0.6% agarose gel에서 digestion 정도를 확인 후 제한 효소인 Xho 1로 37℃에서 밤새 내내 배양시킨 후 Southern blotting을 시행한다.

6. Southern Blot Analysis

Xho 1 효소로 절단한 후 0.8% agarose gel을 통해 전기 영동시킨 후 Hybond(Amersham)에 transfer시킨 후 5'-TCT TGT TGC TTT AGC GCT TA-3'와 5'-CTA CCA AGT GCC TGT TCT TG-3'를 primer로 사용해 만든 PCR product를 정제한 후 이 DNA를 probe로 사용해 65℃에서 밤새내내

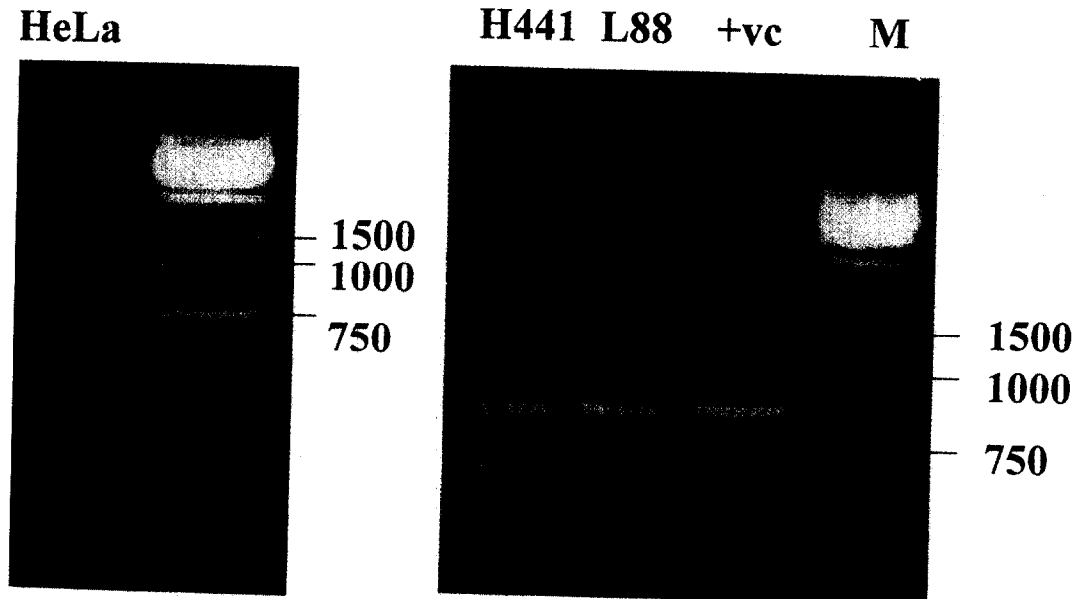


Fig. 1. Reverse transcription and PCR ; HeLa, NCI H441, L88 cell, positive control(+ve).

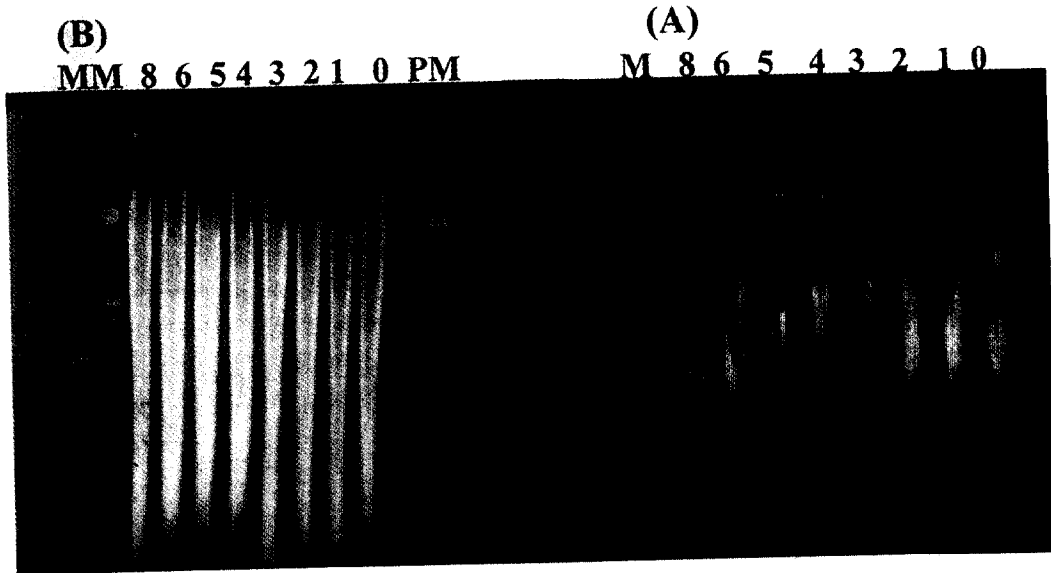


Fig. 2. DNase I hypersensitivity sites assay of the TTF-1 Gene.

Nuclei from H441 cells were treated with increasing amounts of DNase I(0-4000U/ml)(A). Chromosomal DNA was digested with Xho I and subjected to Southern-blot analysis(B). The DNA was hybridized with probe 0.8kb. M ; marker, P ; positive control

hybridization시킨후 2x SSC와 1% SDS로 65℃에서 washing후 -80℃에서 Kodak XAR에 노출시킨다.

결 과

1. 게놈 클론의 확인

Novel bacterial artificial vector인 pCYPAC-2의 인간 genomic library를 PCR 방법을 통해서 확인하였다. Cloning DNA를 재확인하기 위해 Southern blot analysis시행하였다. 인간 TTF-1 유전자를 포함하고 있는 pCYPAC-2 plasmid DNA를 Not-1, Sal-1, Mlu-1, Xho-1, BamH 1, Kpn 1, Nco 1, Eco1471, Pvu 1, Not 1과 Sal 1, 그리고 Mlu 1과 Not 1등의 효소로 절단위치 부위를 확인하였다.

2. NCI H441, L88 세포주와 HeLa 세포주에서 인간 TTF-1 유전자의 표현

Reverse transcription과 PCR을 통해서 NCI H441와 L88 세포주에서 인간 TTF-1 유전자에 해당하는 930 bases에서 band를 보이나 HeLa 세포주에서는 관찰 할 수 없었다(Fig. 1).

3. DNase 1 hypersensitive sites의 확인

1×10^6 의 NCI H441와 HeLa 세포에서 핵을 추출한 후 DNase 1으로 자른 후 0.6% agarose gel에서 digestion정도를 확인 후(Fig. 2A), 제한 효소인 Xho 1로 37℃에서 밤새 내내 배양시킨 후(Fig. 2B) Southern blotting을 시행해서 NCI H441세포주에서 인간 TTF-I 유전자의 전사시작부위부터 +150 Kb, -460 Kb, -800 Kb, 그리고 -1500 Kb의 4부위

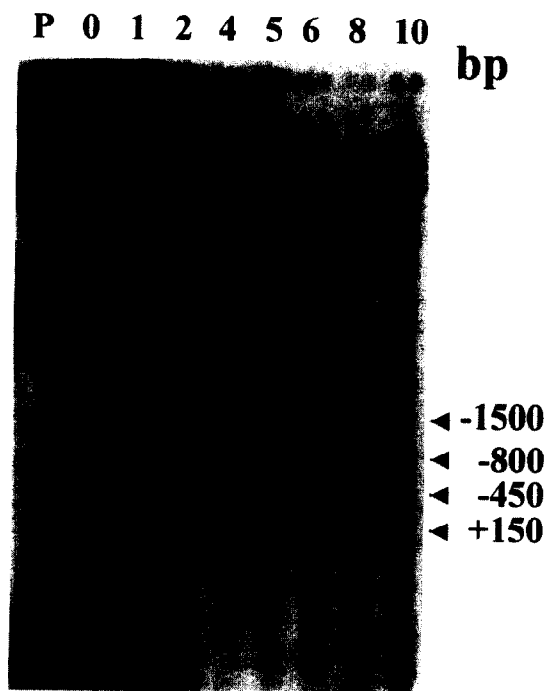


Fig. 3. Southern blot analysis of TTF-1 gene.

The DNA was hybridized with probe o. 8kb. DNase I concentrations : 1; 200U/ml, 2; 400U/ml, 4; 1200U/ml, 5; 1600U/ml, 6; 2000U/ml, 8; 3200U/ml, 10; 400U/ml. P; positive control.

에 DH sites가 있음을 알 수 있었다(Fig. 3, 4).

고 찰

본 연구에서 폐특이 전사조절 유전자인 TTF-1 유전자의 proximal promoter에서 떨어져 위치한 전사인자 DH sites 분석을 통해서 일부 밝혀질 수 있었다. TTF-1은 Nkx 2 유전자계의 homeodomain-containing 핵전사 단백질인데 처음에는 갑상선에 특이한 유전자의 전사에 중요한 중계자로서 밝혀진 38KDa 핵단백질이다^{10,11}. 폐의 상피세포의 유전자 표현에 TTF-1의 역할은 TTF-1이 인간의 surfactant protein B(SPB) 유전자를 활성화 시킨다는 Yan등¹²의

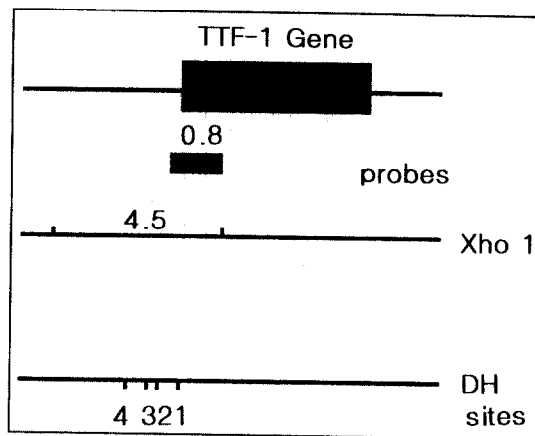


Fig. 4. Mapping DNase I hypersensitive sites (DH) of the TTF-1 Gene.

There are four sites(+150, -450, -800 and -1500 from the start of transcription).

보고에 의해서 최근에 밝혀졌다. TTF-1은 SPB 유전자 전사의 시작 부위로부터 -80에서 -100 base pairs에 위치한 2개의 TTF-1 DNA 결합부위에 결합하며 이는 배아전뇌에도 표현된다. 폐는 전장 내배엽으로부터 상피세포의 outpouching에 의해서 발생되는데 태아의 폐는 branching morphogenesis와 세포분화의 과정을 통해 성숙된 폐의 복잡한 폐상피의 특징을 형성한다². 다양한 종류의 단백질, 특히 SP A, B와 C 그리고 CCSP이 폐의 상피 세포에 의해서 선택적으로 표현이 되는 중요한 단백질이다. 표면활성물질 단백질은 표면활성물질의 항상성의 유지에 중요한 역할을 하며 alveolar phospholipid의 spreading을 강화시키고 Type II 상피세포에 의한 표면활성물질의 흡수와 재순환을 조절한다. Ikeda등⁹은 SP B와 C 뿐만 아니라 CCSP유전자의 promoter element가 TTF-1에 의해서 활성화되고 TTF-1이 폐의 상피세포 유전자의 표현에 중요한 역할하고, TTF-1 유전자가 결핍된 쥐는 폐실질의 형성이 전혀 되지 않으며 뿐만 아니라 갑상선과 일부 뇌부위에 심한 병변을 일으킨다. Devriendt등⁸의 gene targeting연구는 TTF-1은 폐와 갑상선의 발생에 필수 불가결한 역

합을 하고 TTF-1 유전자가 결핍된 쥐는 폐실질이 완전히 없기 때문에 죽어서 태어난다. 따라서 TTF-1 유전자는 폐에 선택적인 유전자의 표현의 조절에 폐조직 특이전사인자로 작용하고 폐의 형성에 형태발생 단백질로서 작용한다. 그러나 현재까지 이 TTF-1 유전자의 전사인자에 대한 연구는 거의 미미하다. 폐 상피의 nonciliated bronchiolar와 alveolar type II cells에서 TTF-1 유전자의 명백한 표현은 이 유전자의 전사인자에 대한 연구가 폐특이 유전자의 표현에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이라는 것을 강력히 암시한다.

현재까지 폐에만 특이하게 작용하는 유전자의 표현을 조절하는 전사인자 또는 DNA 조절 인자에 대한 보고는 거의 없다. 특히 폐에만 특수한 세포의 유형의 유전자 표현이 공통적이고 특수한 cis-active elements와 transacting factor에 의해서 조절되는지 아직 명확하지 않다. 폐 상피 세포의 alveolar type II 세포와 nonciliated bronchiolar 세포에 SP B의 뚜렷하게 조절되어지는 표현은 이 유전자에 대한 전사 조절에 대한 연구는 폐에 만 특이하게 작용하는 유전자의 표현을 알 수 있는 중요한 단서를 제공할 수 있다는 것을 암시한다. 이들 부위는 폐세포에 특이한 DH의 predominant domain과 밀접한 관계가 있고 널리 존재하고 있거나 폐 세포에만 특이하게 작용하는 nuclear DNA 결합 단백질과 상호 작용을 한다.

저자는 추정적인 distal regulatory elements를 밝혀 내기 위해서 TTF-1을 표현하는 세포주를 사용해 DH site assay를 시행하였다. 우선 인간 TTF-1 유전자의 발현을 밝히기 위해 Reverse transcription과 PCR을 통해 인간의 폐선암 세포주인 NCI-H441와 L88, 그리고 HeLa 세포주를 이용했다. NCI-H441와 L88 세포주는 인간 TTF-1 유전자에 해당하는 930 bases에서 band를 보이나 HeLa 세포주에서는 관찰할 수 없었다. 이들을 이용해 시행한 DH site assay는 enhancers, silencers 또는 locus control regions(LCRs)과 같은 전사인자들과 DH sites와는 일치하며 DH regions은 유전자의 조절 부위와

sequence-specific DNA 결합단백질의 결합과 밀접한 관계가 있다는 보고에 근거를 둔다¹³. 과민 부위는 활발한 염색체에 대한 중요한 표식자이며 유전자를 조절하는 많은 DNA sequences와 관계가 있다는 것은 명백한 사실이다. 이 과민 부위는 뉴클레오솜이 없고 특이한 양상을 갖는 DNA의 부분을 나타내며 비뉴클레오솜 구조는 조절 단백질의 통과를 쉽게 촉진시킬 수 있고 따라서 전사의 시작을 일으킬 수 있다. 따라서 이 방법을 이용해 아직 uncharacterised cis-acting elements를 밝혀 낼 수 있고 전사인자 분석의 다른 방법에 의해서 무시되었던 거리와 위치에 있는 요소를 알 수 있으며 유전자의 coordinate expression에 관여하는 LCRs과 같은 공동의 조절 요소를 알아 낼 수 있다. DH site assay는 DNA의 어떠한 특별한 부위에 대한 DNase 1의 민감도를 측정하는데 기본을 두는데 염색체를 DNase 1과 제한 효소로 자른 후 알고져 하는 유전자로부터 만들어진 탐식자를 이용해 Southern blotting 방법을 이용해 결과를 얻는 것이다. 유전자의 전체적인 민감도는 유전자로부터 만들어진 제한효소 분절이 효소의 증가 정도에 따라 얼마나 빨리 사라지는가 하는 정도를 관찰함에 의해서 측정되어진다. 그러한 제한효소에 의해서 특수한 절단 부위가 한쪽 끝 부위에서 뚜렷하게 나타나고 다른 방향에서는 DNase 1에 의해서 절단된 부위가 뚜렷한 분절로서 나타난다. 유전자 내에서 제한효소에 의해서 절단된 부위를 알 수 있기 때문에 과민 부위의 위치는 parent band로부터의 거리를 측정함으로써 알 수 있다. DNase 1에 대한 민감도가 과민 부위를 보이는 부위는 다른 활발한 유전자의 부위에 비해 10배 그리고 비활성인 DNA에 비해서는 100배 이상 높게 나타난다. 따라서 과민 부위는 유전자가 아주 활발한 조직에서만 나타난다. 과민 부위는 유전자의 조절과 밀접한 관계가 있는데 이들 중 대부분이 유전자의 5' end에 위치해 있으며 전사를 조절하는데 중요하다고 알려진 DNA sequence에 상응하는 위치에 존재한다.

저자는 추정적인 distal regulatory elements를 밝혀 내기 위해서 TTF-1을 표현하는 인간의 폐선암 세

포주인 NCI-H441을 사용해 DH site assay를 이용하여 TTF-1 유전자에는 전사의 시작부위에서 +150, -450, -800, 그리고 -1500 base pair 부위에 4곳의 DH sites가 있음을 할 수 있어 전사 조절부위가 TTF-1 유전자 내에 그리고 5' prime 부위에 위치함을 추정할 수 있었다. 이들의 기능적인 역할을 확인하기 위해 유전자 형질 변형체와 cell culture system에서 시행이 필요하다.

요 약

연구배경 :

폐특이 전사조절 유전자인 Thyroid Transcription Factor-1(TTF-1) 유전자는 폐에 선택적인 유전자의 표현의 조절에 중요한 전사인자로 작용하고 폐의 발생에서 morphogenic protein으로서 작용한다. 그러나 현재까지 이 TTF-1 유전자의 전사인자에 대한 연구는 거의 미미하다. DNase 1 hypersensitive(DH) regions은 활동적인 염색체에 대한 중요한 표식자이며 유전자를 조절하는 많은 DNA sequences와 밀접한 관계가 있다.

방 법 :

추정적인 distal regulatory elements를 밝혀 내기 위해서 TTF-1을 표현하는 인간의 폐선암 세포주인 NCI-H441을 사용해 DNase 1 hypersensitive site assay를 이용하였다.

결 과 :

TTF-1 유전자에는 전사의 시작부위에서 +150, -450, -800, 그리고 -1500 base pair 부위에 4곳의 DH sites가 있음을 할 수 있었다.

결 론 :

이상의 결과로 전사 조절부위가 TTF-1 유전자 내에 그리고 5' prime 부위에 위치함을 추정할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Minoo P, Hamdan H, Bu D, Warburton D, Stepanik P, deLemos R. TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis. *Dev Biol* 1995;172:694-8
2. Whitsett JA. A lungful of transcription factors. *Nature Genet* 1998;20:7-8
3. Bohinski RJ, Huffman JA, Whitsett JA, Lattier DL. Cis-active elements controlling lung cell-specific expression of human pulmonary surfactant protein B gene. *J Biol Chem* 1993;268:11160-6
4. Whitsett JA, Korfhausen TR. Regulation of gene transcription in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:118-20
5. Cardoso WV. Transcription factors and pattern formation in the developing lung. *Am J Physiol* 1995;269:L429-42
6. Bohinski RJ, DiLauro R, Whitsett JA. The lung-specific surfactant protein B gene promoter is a target for thyroid transcription factor 1 and hepatocyte nuclear factor 3, indicating common factors for organ-specific gene expression along the foregut axis. *Mol Cell Biol* 1994;14:5671-81
7. Glasser SW, Korfhausen TR, Wert SE, Whitsett J. Transgenic models for study of pulmonary development and disease. *Am J Physiol* 1994;267:L489-97
8. Devriendt K, Vanhole C, Matthijs G, deZegher F. Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med* 1998;338:1317-8
9. Ikeda K, Clark JC, Shaw-White JR, Stahlman MT, Boutell CJ, Whitsett JA. Gene structure and expression of human thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* 1995;270:8108-14
10. Nakazato M, Endo T, Saito T, Harii N, Onaya T. Transcription of the thyroid transcription factor-

- 1(TTF-1) Gene from a newly defined start site : positive regulation by TTF-1 in the thyroid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:748-52
11. Zannini M, Acebron A, de Felice M, Arnone MI, Martin-Perez J, Santisteban P, Di Lauro R, Mapping and functional role of phosphorylation sites in the thyroid transcription factor-1 (TTF-1). *J Biol Chem* 1996;271:2249-54
12. Yan C, Sever Z, Whitsett JA, Upstream enhancer activity in the human surfactant protein B gene is mediated by thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 1995;270:24852-7
13. Dillon N, Grosveld F. Transcriptional analysis using transgenic animals. In : Hames BD, Higgins SJ. *Gene transcription ; a practical approach*. 1st ed. Oxford : Oxford University Press, Inc.;1993. p. 172
-