

Spatio-Temporal Expression Pattern of *Grp78*, a Putative *Hoxc8* Downstream Target Gene, During Murine Embryogenesis

Jin Joo Kang, Yunjeong Kwon, Eun Young Lee, Hyoung Woo Park,
Hye-Won Yang 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

Grp78, discovered as one of the putative target genes of *Hoxc8*, is a highly conserved stress protein and functions as a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum (ER). In order to see the stage-specific expression pattern of *Grp78* during development, mouse embryos from day 7.5 to 17.5 p.c. were isolated, and RT-PCR as well as in situ hybridization was performed. When RT-PCR was performed using *Grp78* specific primers, periodic expression pattern was detected. And also a region-specific expression pattern was detected with a strong expression in the trunk part of day 11.5 p.c. embryo, like that of *Hoxc8*. When *in situ* hybridization was performed, *Grp78* was revealed to be expressed in the endoderm, somite, neuroepithelium cells of neural tube in early embryos. 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 very much similar to those of *Hoxc8*. Since *Hoxc8* has been reported to regulate apoptosis during organogenesis, it might be possible that the apoptotic function could have been conveyed through the expression of *Grp78*, implying that the *Grp78* is one of the *Hoxc8* downstream target genes.

Key Words: Expression pattern, Embryogenesis, Grp78

서 론

초기 배자에서 형태가 만들어지기 위해서는 수많은 유전자들이 관여하며, 이들 유전자들은 진화를 거치면서도 매우 잘 보존되어 있다. 이 중에서도 초파리에서 처음 발견된 Hox 유전자는 척추동물과 무척추동물의 초기 배 발생 과정에서 특정한 시기에 그리고 배자의 특정한 위치에서 발현하여 (Kim and Kessel, 1993; Duboule, 1994; Sharkey et al., 1997) 몸의 전·후 축을 따라 형태를 형성하는데 관여하는 master regulator 유전자로 보고 되고 있다 (Hombria et al., 2003). Hox 유전자가 어떤 유전자들을 조절하여 형태 형성에 관여하게 되는지에 대해서는 자세하게 밝혀져 있는 바가 없으나 최근 proteomics 기법을 이용하여 Hox 유전자 중 하나인 *Hoxc8*이 *Grp78*의 발현을 조절한다는 것이 보고 되었다 (Kwon et al., 2003).

GRP (glucose-regulated protein) 단백질은 처음 닭의 배자 fibroblast를 포도당이 없는 배지에서 키웠을 때 강하게 발현되어지는 단백질로서 보고 되었으며 (Lee, 2001), 그 후 glycosylation에 영향을 미치는 물질이나 세포 내의 Ca^{2+} level 저해 등의 조건 아래에서 GRP가 유도된다고 알려졌다. 또한 GRPs는 극심하게 glucose가 없는 상태, 저산소증, 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)에서 칼슘이 고갈되었을 때와 같은 여러 종류의 스트레스 상태에서 전사 조절이 야기되어 진다는 사실이 *in vitro* cell culture 실험에서 밝혀졌으며 (Mote et al., 1998; Barnes et al., 2000), 이 후 Grp 유전자의 promoter에 다수의 endoplasmic reticulum stress elements (ERSEs)가 존재하고 있다는 것이 보고 되었다 (Lee, 2001).

현재 약 10여종의 GRPs (*Grp78*, *Grp94*, *Grp170*, *Erp72*, *PDI*, *Grp58/alias Erp57*, *calreticulin* 등)가 보고 되었으며, 그 중 하나인 *Grp78*은 ER 내부에 존재하는 chaperone으로 알려져 있다. 이것은 또 lymphoid 세포에서 immunoglobulin heavy chain과 결합하기 때문에 immunoglobulin heavy-chain-binding protein(BiP)이라고도 불리우며, heat-shock-protein 70 (Hsp70) family에 속하는 단백질로서 Hsp70과는 약 61%의 homology를 가지고 있으나 stress protein family의 구성원일 뿐 그 기능은 다르다고도 보고 되고 있다. 또 *Grp78*은 대장균의 Dnak

* 논문 접수: 2005년 8월 29일

수정재접수: 2005년 9월 13일

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

Tel: 02-2228-1647, Fax: 02-365-0700

e-mail: mhkim1@yumc.yonsei.ac.kr

와 유사한 서열 및 기능을 갖고 있으므로 DnaK-type molecular chaperone protein이라고도 하며 ER 내에서 Ca^{2+} 의 항상성을 조절하므로 ER luminal Ca^{2+} storage protein이라고도 한다 (Chang et al., 1989; Barnes and Smoak, 2000; Rao et al., 2002).

현재까지 보고된 Grp78의 기능은 molecular chaperone으로서 ER 내에서 새로이 합성되는 단백질의 folding과 assembly를 도와주며, 서로 aggregation하는 것을 방지해주는 역할을 한다고 알려져 있다. ER로부터 운송되어지는 misfolding 및 under-glycosylated 단백질과 좀 더 안정된 복합체를 만들고, ER 내에서 Ca^{2+} 항상성을 조절하며 또 산화적인 스트레스에 대항하여 세포의 apoptotic pathway에 관여한다고도 보고되고 있다 (Tillman et al., 1995; Little et al., 1996; Watson et al., 2003).

Hoxc8에 의해 조절을 받는 유전자로 분석된 Grp78의 발생 과정 동안의 발현 양상에 대해서는 생쥐 발생 과정 중 초기 2-cell 시기에서부터 blastocyst stage로 진행되는 동안 Grp78의 발현이 증가한다는 보고 외에는 잘 알려져 있지 않다. 이 외에 whole embryo culture 실험을 통해 발생 9.5일째의 생쥐 배자에 저혈당 스트레스를 유발시키면 심장 (heart), 신경관 (neural tube), 장 내배엽 (gut endoderm), somites, 외배엽 (surface ectoderm)에서 발현한다는 보고가 있으나 정상 배자 발생 과정 중 체계적인 발현 패턴에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다 (Barnes and Smoak, 2000; Lee, 2001). 따라서 본 연구에서는 생쥐 배자 발생 과정 중 Grp78의 시공간적인 발현 패턴을 RT-PCR 그리고 whole mount/cold *in situ* hybridization를 통해 관찰하고, Hoxc8 발현과의 연관성을 고찰해 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 배자 준비

교배를 위해 ICR 생쥐 (Samtako, Osan, Korea)를 이용하였다. 생쥐는 저녁에 암컷 3~4마리와 수컷 1마리를 한 우리에 합사시키고, 다음 날 오전 10시 전에 암컷에서 질전 (vaginal plug)이 관찰되면, 이때를 발생 0.5일로 정의하였다. 발생 8.5일부터 17.5일까지의 배자 준비를 위해 날짜에 맞게 임신한 암컷을 경추 탈골 시켜 sacrifice 한 다음 1× PBS를 이용하여 배자를 적출하였다.

2. RNA 분리

적출한 배자는 액체질소에 넣어 얼리거나 바로 Gunitidum Isothiocyanate Technique (GIT) 방법을 이용하여 RNA를 추출하였다. 조직을 tube에 넣고 denaturing 용액 (4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate/2H₂O 0.5% (w/v) sodium

lauryl sarcosinate, 0.1 M β-mercaptoethanol)을 배자 무게 100 mg에 3 ml씩을 첨가시킨 후, pestle로 잘게 파쇄시켰다. 배자를 15 ml 튜브로 옮긴 후, 2 M NaOAc를 140 μl 넣고 잠깐 동안 섞어 준 다음 chloroform-isoamylalcohol (49:1) 588 μl를 첨가하고 15초간 강하게 혼합한 후 얼음에 15분간 방치하였다. 4°C 3,500 rpm으로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취해 새로운 1.5 ml 용량의 microtube로 옮긴 후, 상층액에 동량의 chloroform-isoamylalcohol (49:1)을 다시 혼합하고 같은 방법으로 원심분리한 다음 상층액을 취하였다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -70°C freezer에서 1시간 이상 반응시킨 다음, 4°C 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 70% ethanol로 세척한 후 건조시킨 다음 DEPC 처리한 증류수에 RNA를 녹이고, UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 정량하였다.

3. RT-PCR (Revers Transcription-PCR)

RT 반응은 2 μg의 RNA를 200 ng의 oligo dT, H₂O를 14 μl까지 넣고 70°C에서 5분간 열을 준 후, 바로 얼음에 넣어 두고 dNTP (2.5 mM each) 5 μl, RNase inhibitor (0.5 unit/μl) 0.5 μl, MMLV-RT (moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 200 unit/μl, Promega) 0.5 μl, MMLV-RT 10× Buffer 5 μl 혼합액을 11 μl씩 첨가시켜 37°C에서 1시간 동안 수행하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 이 중 일부를 취하여 PCR 반응 (94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min을 25회 반복)을 수행하였으며, 이때 사용한 primer는 다음과 같다. Grp78 (forward, 5'-CTCGAATTCCAAAGATTCAG; reverse, 5'-TACCAAGTGT-AAGGGGACAC) β-actin (forward, 5'-CAATGTTTGGACCTT-CAACACCCC; reverse, 5'-GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG), Hoxc8 (forward, 5'-CACGTCCAAGACTTCTTCCACCACGGC; reverse, 5'-CACTTCATCCTTCGATCTGGAACC).

4. Grp78 subcloning 및 RNA probe 제작

Sense와 antisense RNA probe를 제작하기 위해 Grp78 PCR product를 pGEM T-vector에 클론 하였다. 그 다음 제한 효소 *sphI*과 *sall*을 처리하여 Grp78를 분리한 다음 Jetsorb gel extraction kit (GENOMED, U.S.)를 사용하여 elution하였다. 이것을 다시 multicloning site의 양 끝에 각각 T7과 SP6 promoters 가지고 있는 pGEM-7zf와 pGEM-3zf의 *sphI*과 *XhoI* 그리고 *sphI*과 *sall*자리에 각각 삽입하여 pGEM7-grp78과 pGEM3-grp78을 얻었다.

Antisense와 sense RNA probe를 합성하게 위해 pGEM7-grp78과 pGEM3-grp78를 제한 효소 *BamHI*로 잘라서 linear로 만든 다음, T7 RNA polymerase를 이용하여 digoxigenine labeled UTP가 포함되어 있는 nucleotide 혼합액을 첨가하고 37°C에서 2시간 동안 *in vitro* transcription 반응을 수행하였다.

합성된 sense 및 antisense RNA probe은 4 M LiCl과 100% EtOH로 침전하여 정제한 다음 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 정량한 다음 whole mount 및 tissue sections의 *in situ* hybridization에 사용하였다.

5. Whole mount *in situ* hybridization

배자는 크기에 따라 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS, 4°C에서 1~12시간 고정시키고 PBT, 25%, 50%, 70% MetOH/PBT로 5분씩 4°C에서 씻어준 다음, 100% methanol에 담가서 사용할 때까지 -20°C에 보관하거나 바로 *in situ* hybridization에 사용하였다. 먼저 배자를 75%, 50%, 25% MetOH/PBT와 PBT로 rehydration 시킨 다음, 6% H₂O₂/PBT로 1시간 동안 bleach하고 다시 10 µg/ml proteinase K/PBT를 배자의 크기에 따라 2~15분간 처리하였다. 그 다음, 2 mg/ml glycine을 넣어 proteinase K를 불활성화 시키고 0.2% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde/PBT를 첨가하여 재고정 한 다음 PBT로 씻어주고 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 반응시켰다. 여기에 1 µg/ml digoxigenine-labeled RNA probe를 포함하는 hybridization solution을 첨가하여 70°C에서 밤새 반응시키고 다음 날 posthybridization wash 과정으로 solution I (50% formamide, 5× SSC, pH 4.5, 1% SDS)으로 30분간 70°C에서 2번 세척하였다. 다시 solution I과 solution II (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% tween 20)를 동량씩 혼합하여 10분간 70°C에서 씻어준 다음 solution II만으로 5분씩 3번 실온에서 세척하였다. 그 다음 배자를 100 µg/ml RNaseA를 포함하고 있는 solution II에 넣어 37°C에서 30분간 2번 반복해준 후 TBST로 다시 세척하고, blocking solution (FBS 1 ml, 10% blocking powder 1 ml, Malate Buffer 3 ml)을 첨가하고 90분간 preblocking을 진행한 다음 anti-digoxigenine antibody (1:1,000)를 첨가하여서 실온에서 밤새 반응시켰다. 다음 날, TBST로 1시간 씩 5번, NTMT로 30분씩 2번 세척하고, 다시 NTMT로 밤새 세척하였다. 다음 날 4.5 µl/ml NBT와 3.5 µl/ml BCIP를 첨가한 NTMT에 배자를 옮기고 어두운 곳에서 발색 반응을 시켰다. 3시간 이후부터 원하는 발색이 관찰되면 PBT로 2~3번 씻어 주어 발색 반응을 정지시켰다.

6. Cold *in situ* hybridization

배자는 PBS로 한 번 세척한 후 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS로 4°C에서 하룻밤 고정시키고 다음날 30% sucrose/PBS, 4°C에 하루 더 놓아두었다. 그 다음 tissue tek (Miles, Elkhart, IN)에 배자를 넣고, tissue freezing medium (TRIANGLE Biomedical Science, Durham, NC)으로 덮은 다음 -70°C에 저장하였다. 얼어 있는 배자를 10~12 µm 두께로 잘라 코팅이 되어

있는 슬라이드에 붙인 다음 4% paraformaldehyde/PBS에서 20분간 고정 시키고, PBS에서 3분씩 3번을 씻어주었다. 그리고 10 µg/ml proteinase K/PBS를 4분간 처리하고, 4% paraformaldehyde/PBS에서 다시 5분간 고정시킨 다음 PBS로 세척하였다. Acetylation (295 ml H₂O, 4 ml triethanolamine, 0.525 ml HCl, 0.75 ml acetic anhydride) 반응을 한 다음 PBS로 세척하고 500 µl prehybridization solution을 각각의 배자 절편 위에 떨어뜨린 다음 슬라이드를 humidified chamber (5× SSC, 50% formamide 용액을 적신 종이를 깔아서 준비)에 올려놓고 2시간 동안 실온에 방치하였다. 다시 여기에 RNA probe 200~400 ng/ml를 포함하고 있는 hybridization solution을 첨가한 다음 coverslip을 덮고 72°C에서 밤새 반응시켰다. 다음 날 coverslip을 제거하고, 0.2× SSC (72°C)에서 3시간 그리고 다시 0.2× 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)에서 5분간 (실온), blocking solution (실온)에서 1시간, 다시 anti-digoxigenine antibody (1:5,000)를 첨가한 다음 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음 날 buffer B1으로 3번 세척한 다음 levamisole (240 mg/l)이 포함된 buffer B3 (0.1 M Tris, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂)에서 10분간 방치한 후 buffer B4 (240 mg/l levamisole을 포함하고 있는 buffer B3, 4.5 µl/ml NBT, 3.5 µl/ml BCIP)를 첨가하고 parafilm으로 덮은 후 어두운 곳에서 반응시켰다. 발색이 관찰되면 PBS로 세척하고 말린 다음 universal mount (Huntsville, AL, USA)를 첨가하고 현미경을 이용하여 관찰하였다.

결 과

*Grp78*이 *Hoxc8*의 downstream target genes으로 추정되었으므로 본 연구에서는 *Hoxc8*의 위치 특이적 발현이 가장 잘 보고된 11.5일째 되는 생쥐 배자를 이용하여 배자를 전후축을 따라 7부분 (H1, H2, M1, M2, M3, M4, T)으로 절단한 다음 각 부분으로부터 총 RNA를 분리하고 RT-PCR 기법을 이용하여 *Grp78*과 *Hoxc8*의 발현 패턴을 분석하였다. 그 결과, *Grp78*은 forelimb을 포함하는 흉부 M2 부위에서 강하게 발현하는 것이 관찰되었다. *Hoxc8*의 경우 M2뿐만 아니라 M3에서도 강하게 발현하였으며, 이 외의 다른 부위에서도 약하긴 하나 발현이 관찰되었다 (Fig. 1).

그 다음 발생 시기에 따른 *Grp78*의 발현 양상을 분석하기 위하여 낭배 형성 초기 배자인 7.5일 배자부터 기관 형성이 거의 다 끝나는 17.5일까지의 배자를 각각 분리하고 이 배자로부터 총 RNA를 분리한 다음 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 2에서와 같이 *Grp78*은 7.5, 8.5, 10.5, 11.5, 14.5, 그리고 15.5일째 배자에서 강한 발현이 관찰되었으며 특이하게도 발생 시기에 따라 periodic한 발현 양상을 관찰되었다. 이에 반하

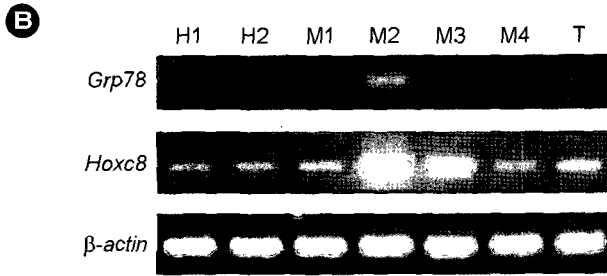
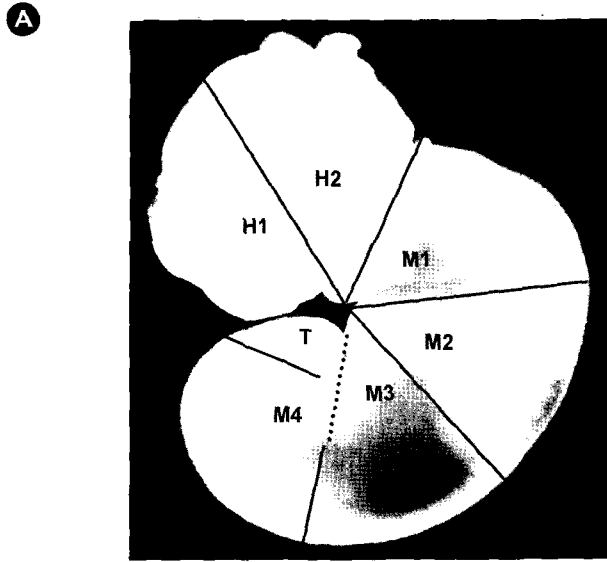


Fig. 1. Spatial expression pattern of *Grp78* in mouse embryo at day 11.5 p.c. (A) lines indicate the dissected regions at embryo at day 11.5 p.c. (B) RT-PCR pattern of *Hoxc8* and *Grp78* along the A-P axis; H1 (head 1), H2, M1 (middle1), M2, M3, M4, and T (tail). β -actin was used for the internal control.

여 *Hoxc8*은 8.5일 배자에서부터 17.5일까지 거의 모든 배자에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

배자 발달 시기에 따라 기관의 분화 정도와 배자의 발달 상태 즉 형태가 달라지므로 *Grp78*이 특정 발달 시기에 있는 배자의 어느 위치 그리고 어느 기관에서 발현하는지를 형태학적으로 분석하기 위해 유전자의 발현 패턴을 *in situ* hybridization 방법을 통해 분석하였다. 낭배 형성 초기 7.0일째 배자에서는 내배엽에서 관찰되었으며 (Fig. 3A-D), 8.0일과 9.0일째 배자의 경우 신경관 (neural tube)의 신경상피세포 (neuroepithelium cell)에서 발현하였다 (Fig. 3E-I, L). 9.0일째 배자에서는 체절 (somite)에서도 *Grp78*이 강하게 발현되었다 (Fig. 3I-K). 기관 형성이 활발한 중기 배자인 10.5일과 11.5일 배자에서는 공통적으로 간으로 될 hepatic primordium과 신경관의 신경상피세포에서 발현되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3M-T). 특히, 11.5일 배자의 whole mount *in situ* hybridization 방법으로 분석한 경우에도 간에서 매우 강하게 발현

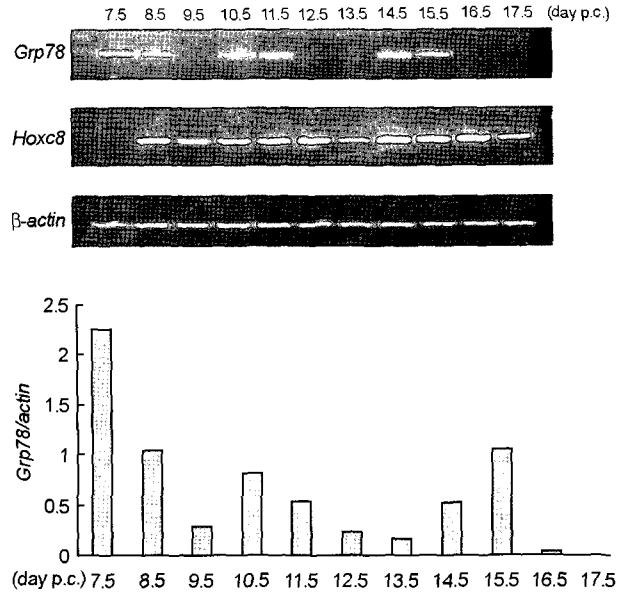


Fig. 2. Temporal expression pattern of *Grp78* in mouse embryo 7.5~17.5 day p.c. RT-PCR pattern of *Hoxc8* and *Grp78* in mouse embryo. β -actin was used for the internal control. The amount of mRNA expression was normalized with that of β -actin.

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

고 찰

Hox 유전자는 발생 과정 중 시·공간 특이적으로 발현하여 개체의 형태를 만드는데 관여하는 전사 조절 인자로서 다수의 downstream target genes의 발현을 조절하는 master control gene으로 알려져 있다 (Jave-Suarez et al., 2002; Villacscusa et al., 2004; Kwon et al., 2005). 그러나 현재까지 직접적으로 Hox 단백질의 조절을 받는 downstream target gene에 대해서는 Hoxa7이 keratinocyte transglutaminase type 1을 조절하여 keratinocyte의 분화에 관여한다는 것 (La Celle et al., 2001)과 Hoxa5가 progesterone receptor gene의 활성을 조절한다는 것, 또 Hoxc8이 osteopontin gene을 억제하는 데 관여한다는 연구 (Raman et al., 2000) 등 외에는 보고된 것이 그리 많지 않은 실정이다.

본 연구에서는 프로테옴 분석을 통해 *Hoxc8*의 downstream target genes (Kwon et al., 2003) 중의 하나로 분석된 *Grp78*이 생쥐의 배자 발생 과정 중 어느 시기에 그리고 어느 위치에

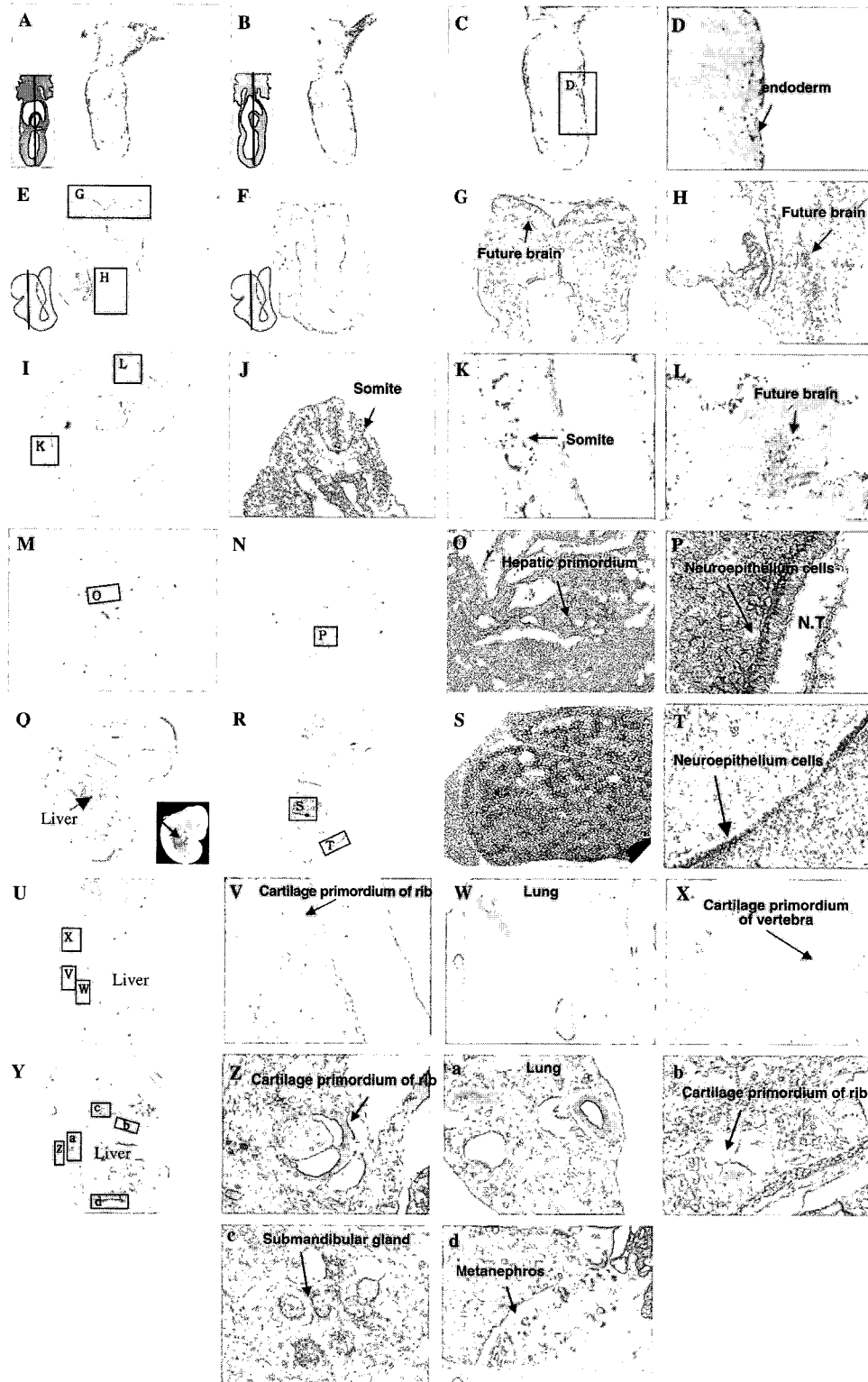


Fig. 3. Expression pattern of *Gfp78* during murine embryonic development. Cold in situ hybridization was performed. (A, C, D) sagittal (B) frontal section of day 7.0 p.c. embryo; (E, F) frontal section of day 8.0 p.c. embryo; (G, H) neuroepithelium cells; (I, K, L) sagittal and (J) cross section of 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 primordium, (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.

서 발현하는지를 분석하고 *Hoxc8* 발현 패턴과의 연관성을 고찰하고자 하였다. *Hoxc8*의 위치특이적 발현이 가장 잘 분석된 11.5일째 되는 생쥐 배자를 이용하여 전후축을 따라 *Grp78*과 *Hoxc8*의 발현을 비교하였을 때 *Grp78*은 forelimb을 포함하는 흉부 M2 부위에서 강하게 발현되었으며 *Hoxc8*의 경우는 M2뿐만 아니라 M3에서도 강하게 발현하였다 (Fig. 1). 또, 발생 시기에 따라서는 특이하게도 periodic하게 *Grp78*의 발현 즉, 8.5, 10.5, 11.5, 14.5, 그리고 15.5일째 배자에서 발현이 관찰되었다 (Fig. 2). 이에 반해 *Hoxc8*의 경우 8.5일 배자부터 모든 단계의 배자에서 발현하였다. 흥미있는 점은 7.5일째 배자만 제외하고 *Hoxc8*이 과발현되는 시기와 *Grp78*의 발현이 관찰되는 배자의 stage가 일치하는데 이것은 아마도 *Grp78*의 발현을 위해서는 *Hoxc8*이 적정량 발현하여야만 하는 것으로 유추된다. 이런 현상은 Fig. 1에서도 관찰되는데, M2보다 적게 *Hoxc8*이 발현한 M3에서는 *Grp78*의 발현이 관찰되지 않았으며 이는 *Grp78*의 발현을 위해 *Hoxc8*의 양이 매우 critical 할 수도 있을 것으로 생각된다. 그러나 7.5일째 배자의 경우 *Hoxc8*의 발현 없이도 높은 발현이 관찰되는데, 이는 아마도 *Grp78*의 발현을 위한 또 다른 기작이 있을 것으로 생각된다. 배자의 implantation과 early development는 ER stress를 유발하는 것으로 알려져 있는데, *Grp78*의 upstream regulatory region에 여러개의 ER stress regulatory element를 포함하고 있으므로 *Hoxc8*의 발현과는 무관한 mechanism에 의해 유도되었을 것으로 생각된다.

발생 과정 중 신경관 (neural tube)에서는 *Grp78*의 발현이 8.5일과 9.5일부터 neuroepithelium에서 관찰되었으며 이는 8.5일에서는 신경외배엽 (neuroectoderm)에서 그리고 9.5일 이후부터는 신경관에서 발현하는 *Hoxc8*의 경우 (Kwon et al., 2005)와 일치하였다. 특히 *Hoxc8*은 강하게 발현되는 C(cervical)₃-T(thoracic)₁의 neuronal segment는 forelimb로 뻗어나가는 운동 신경 (motor neuron)이 존재하는 것으로 알려져 있는데 (Tiret et al., 1998) 흥미롭게도 *Grp78* 또한 이 부위에서 강하게 발현되었다. *Hoxc8* 유전자 과발현된 생쥐의 경우, 운동 신경에서 apoptosis가 증가하였으며 이는 *Hoxc8*이 운동 신경의 survival에 관여할 것이라고 생각되며 (Tiret et al., 1998), *Grp78* 또한 C₅-T₁에서의 강한 발현을 고려해 볼 때, *Hoxc8*이 *Grp78*를 조절하여 운동 신경의 apoptosis를 억제하고, cell survival에 도움을 주어 척수 (spinal cord) 형성에 중요한 역할을 수행할 것으로 유추된다.

척추와 늑골은 발생 초기 체절 즉 somite라고 불리는 paraxial mesoderm으로 부터 분화하는데 신경관과 척색 (notochord)에 접하여 위치하는 세포들이 척추 (vertebra) 그리고 intervertebral disc로 분화하고 발생 후기 세포들이 더 이동하여 늑골 (rib)로 분화한다 (Dubrulle and Pourquie, 2004). *Grp78*의 경우 발생 9.5일에는 체절 (somite)에서 그리고 14.5일 이

후부터는 척추와 늑골이 될 연골 부분 (cartilage primordium)에서 발현이 관찰되었는데 (Fig. 3), 후에 늑골이 될 연골 부위에 *Hoxc8*을 과발현시키면 proliferating chondrocytes가 축적되고 maturation이 억제된다는 보고 (Yueh et al., 1998)로 미루어 볼 때, 아마도 *Hoxc8*이 cell survival과 cancer cell에서 proliferation에 관여한다고 알려진 (Lee, 2001) *Grp78*의 발현을 유도하여 proliferating chondrocytes의 축적에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

신장은 caudal intermediate mesoderm으로부터 분화하는데 *Grp78*이 15.5일째 배자에서 후신 (metanephros)의 branch가 형성되는 부분에서 발현하였다 (Fig. 3d). 흰쥐의 metanephric kidney 발생시 mesenchymal-epithelial conversion에 *Grp78*이 관여한다 (Plisov et al., 2000)고 알려져 있으며 또 TGF- β family인 BMP4, BMP7, TGF- β 2 등이 발현되어 신장의 발생을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Plisov et al., 2000). *Hoxc8* 역시 발생 과정 중 mesonephric과 metanephric kidney에서 발현되며 BMP4 signalling에 작용하여 세포의 분화와 증식을 조절한다는 연구 결과로 (Shi et al., 1999) 미루어 볼 때 *Hoxc8*과 *Grp78*이 BMP4 신호를 받아 신장의 발생을 조절할 수도 있음을 시사한다. 한편 신장의 형태 형성을 위해서는 extracellular matrix molecule 즉 matrix metalloproteinase, matrix molecules, growth factor, growth factor receptor들이 요구되는데 이들은 모두 secretory 혹은 막 단백질로서 ER 내에서 합성되며 이와 함께 ER protein bioassembly activity를 갖고 있는 *Grp78*같은 chaperone 단백질이 많이 요구될 것으로 생각된다. 흥미롭게도 13.5일째 흰쥐 배자의 ureteric bud (UB) branch에서 metalloprotease와 growth factor receptor의 발현이 증가되었으며, 이와 함께 *Grp78*도 발현이 증가되었다고 보고 (Meyer et al., 2004) 뿐만 아니라 *Hoxc8*의 경우도 mouse 배자에서 UB branch 근처의 mesenchymal cell에서 발현된다는 보고로 미루어 (Patterson and Potter., 2004) 신장 형성에 있어서 *Hoxc8*에 의한 *Grp78*의 발현이 신장 형태 형성에 기여하였을 것으로 유추된다.

폐의 경우, *Grp78*은 cranial lobe의 가지에서 발현되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3U, Y, a). 폐 또한 신장과 같이 많은 가지를 가진 기관으로서 형태 형성에 있어 FGF나 BMP4와 같은 secretory protein이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Wang et al., 2005). 따라서 폐에서도 *Grp78*이 ER 내에서 단백질의 합성, folding, assembly 등이 용이하도록 도와줄 것으로 생각된다. 또한, 폐가 발생하는 과정 중 여러 단계에서 apoptosis가 일어난다고 알려져 있는데 태아에서는 epithelium이나 mesenchyma에서 상대적으로 적게 일어난다고 알려져 있다 (Wang et al., 2005). 사람의 경우 성인의 폐와는 달리 태아의 폐에서 *Hoxc8*이 발현하는데 (Golpon et al., 2001), 태아의 폐에서 apoptosis가 적게 일어나는 것은 아마도 *Grp78*이 *Hoxc8*

의 조절을 받아 anti-apoptotic pathway에 관여하여 궁극적으로 폐의 형태를 구축하는데 관여 하였을 것으로 생각된다.

간은 다양한 종류의 분비 단백질과 막 단백질들이 만들어지는 장기로 (Little et al., 1996) chaperone 단백질들이 많이 필요할 것으로 생각되며, 따라서 *Grp78*의 발현이 증가되었다고 생각되어진다. 그러나 현재까지 *Hoxc8*이 간에서 발현된다는 보고는 없는 것으로 보아 간에서 *Grp78*의 발현을 위한 또 다른 기작이 있을 것으로 유추된다. 한편 턱밑샘(submandibular gland)에서는 중심에 있던 세포들이 하나의 층이 될 때까지 apoptosis가 일어난다고 알려져 있다. 그리고 이 때 p53/caspase3-mediated apoptosis는 terminal bud formation에 그리고 caspase8/caspase3-mediated apoptosis는 ductal lumen formation에 관여한다고 보고 되어 있지만 apoptotic stop signal에 대해서는 알려진 것이 없다 (Jaskoll et al., 2001). *Grp78*은 caspase activity를 억제하여 apoptotic signal를 저해한다고 알려져 있으므로 (Rao et al., 2002) 턱밑샘 형성 시 apoptotic stop signal에 *Grp78*이 관여할 수도 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보아 *Grp78*이 초기 발생 동안 신경관과 체절에서 발현되고, organogenesis 과정 중 후신, 폐, 척추와 늑골이 될 연골 부분 등에서 발현하였다. 이런 발현 패턴은 *Hoxc8*의 발현 양상과 유사한 것으로 *Grp78*이 *Hoxc8* target genes 중의 하나일 가능성이 높은 것으로 유추되며 발생 과정 중 Hox 유전자의 조절을 받아 세포의 증식과 apoptosis 등의 기작을 유도하여 배자의 형태를 형성하는데 관여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 학술진흥재단의 기초과학 연구지원사업 연구비 (KRF-2004-015-E00012)의 지원에 의해 이루어졌으며 강진주, 이은영학생은 BK21 장학금 수혜자로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- 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.
- 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.
- Duboule D. Guidebook to the Homeobox genes. Oxford University Press Inc., New York, 1994.
- Dubrulle J, Pourquie O. Coupling segmentation to axis formation. *Development* 2004. 131: 5783-5793.
- 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.
- Hombria JC, Lovegrove B. Beyond Homeosis-Hox function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation* 2003. 71: 461-476.
- 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.
- 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.
- Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Info.* 1993. 5: 301-308.
- 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.
- 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.
- La Celle PT, Polakowska RR. Human Homeobox HOXA7 Regulates Keratinocyte Transglutaminase Type 1 and inhibits Differentiation. *J Biol Chem.* 2001. 276: 32844-32853.
- Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci.* 2001. 26: 504-510.
- 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.
- Meyer TN, Schwesinger C, Bush KT, Stuart RO, Rose DW, Shah MM, Vaughn DA, Steer DL, Nigam SK. 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.
- Mote PL, Tillman JB, Spindler SR. Glucose regulation of GRP78 gene expression. *Mech Ageing Dev.* 1998. 104: 149-158.
- Patterson LT, Potter SS. Atlas of Hox gene expression in the developing kidney. *Dev Dyn.* 2004. 229: 771-779.
- Plisov SY, Ivanov SV, Yoshino K, Dove LF, Plisova TM, Higinbotham KG, Karavanova I, Lerman M, Perantoni AO.

- Mesenchymal-epithelial transition in the developing metanephric kidney: Gene expression study by differential display. *Genesis* 2000. 27: 22-31.
- 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.
- Rao RV, Peel A, Logvinova A, del Rio G, Hermel E, Yokota T, Goldsmith PC, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone Grp78. *FEBS Lett*. 2002. 514: 122-128.
- Sharkey M, Graba Y, Scott MP. Hox genes in evolution: protein surfaces and paralog groups. *Trends Genet*. 1997. 13: 145-151.
- 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.
- 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.
- Tiret 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.
- 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.
- 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.
- Watson LM, Chan AK, Berry LR, Li J, Sood SK, Dickhout JG, Xu L, Werstuck GH, Bajzar L, Klamut HJ, Austin RC. 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.
- Yueh YG, Gardner DP, Kappen C. Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95: 9956-9961.
-