

A Homeotic Gene, Hoxc8, Regulates the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen in NIH3T3 Cell

Hye Hyun Min, Myengmo Kang and Myoung Hee Kim[†]

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

Hoxc8 is one of the homeotic developmental control genes regulating the expression of many downstream target genes, through which animal body pattern is established during embryonic development. In previous proteomics analysis, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which is also known as cyclin, has been implied to be regulated by Hoxc8 in F9 murine embryonic teratocarcinoma cell. When the 5' upstream region of PCNA was analyzed, it turned out to contain 20 Hox core binding sites (ATTA) in about 1.17 kbp (kilo base pairs) region (-520 ~ -1690). In order to test whether this region is responsible for Hoxc8 regulation, the upstream 2.3 kbp fragment of PCNA was amplified through PCR and then cloned into the pGL3 basic vector containing a luciferase gene as a reporter. When the luciferase activity was measured in the presence of effector plasmid (pcDNA : c8) expressing murine Hoxc8, the PCNA promoter driven reporter activity was reduced. To confirm whether this reduction is due to the Hoxc8 protein, the siRNA against Hoxc8 (5'-GUA UCA GAC CUU GGA ACU A-3' and 5'-UAG UUC CAA GGU CUG AUA C-3') was prepared. Interestingly enough, siRNA treatment up regulated the luciferase activity which was down regulated by Hoxc8, indicating that Hoxc8 indeed regulates the expression of PCNA, in particular, down regulation in NIH3T3 cells. These results altogether indicate that Hoxc8 might orchestrate the pattern formation by regulating PCNA which is one of the important proteins involved in several processes such as DNA replication and methylation, chromatin remodeling, cell cycle regulation, differentiation, as well as programmed cell death.

Key Words: Hoxc8, Proliferating cell nuclear antigen, PCNA upstream region, Hoxc8 downstream target gene

Hox 유전자는 발생과정 중 특정 개체의 형태를 형성 하는데 관여하는 유전자로 알려져 있으며 (Gehring and Hiromi, 1986) 성장과 분화 모든 과정에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다 (Abate-Shen, 2002). 사람과 생쥐 같은 포유류에서는 39개의 Hox 유전자가 보고되어 있으며, 이들은 서로 다른 염색체 위에 존재하는 4개의 cluster 즉, HoxA, HoxB, HoxC, HoxD cluster 위에 존재한다 (Kim and Kessel, 1993). 초파리 (*Drosophila melanogaster*) 같은 하등 동물부터 사람에 이르기까지 Hox 유전자들은 매우 잘 보존되어 있으며 이 중에서도 61개의 아미노산 (호메오도메인)을 암호화하고 있는 183 bp의 Homeobox 서열은 특히 더 잘 보존되어 있다 (Gehring

and Hiromi, 1986; McGinnis and Krumlauf, 1992; Kim and Kessel, 1993). 이 호메오도메인은 helix-turn-helix motif를 갖는 DNA 결합 부위로서, 이를 통해 전사인자로서의 기능을 갖게 된다 (Gehring and Hiromi, 1986; McGinnis and Krumlauf, 1992; Gehring et al., 1994^a; Gehring et al., 1994^b). Hox 단백질은 다른 유전자들의 발현 조절 서열과 결합하여 이들 하부 유전자들의 발현에 영향을 주며 (Levine and Hoey, 1988), 이들은 궁극적으로 세포 분열이나 세포 죽음, 세포들간의 부착 및 세포 분화 등을 유도하여 발생과정 중 세포의 형태를 만들어가는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

발생과정 중 Hox 유전자는 특정 발생 단계에 그리고 배자의 전후축 (anterior-posterior axis) 상의 특정 부위에서 발현하여 그 부위의 형태를 결정한다고 알려져 있다 (Gehring and Hiromi, 1986; Kim and Kessel, 1993). Hox 유전자에 돌연변이가 일어나 잘못된 발현이 유도되면 호메오틱 돌연변이 (몸의 한 부분의 형태가 다른 부위의 형

*논문 접수: 2007년 8월 9일

수정재접수: 2007년 8월 15일

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

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

e-mail: mhkim1@yuhs.ac

태로 바뀐 돌연변이)가 유발되므로 일종의 호메오틱 유전자라고 할 수 있다. 잘 알려진 호메오틱 유전자로, 초파리에서 안테나가 생길 위치에 다리가 생기게 하는 안테나피디아 (*Antennapedia; Antp*) 유전자와 가슴부위에 1쌍이 아닌 2쌍의 날개를 유도하는 *Ultrabithorax (Ubx)* 유전자 등이 있으며 이런 호메오틱 유전자들은 하등 동물부터 사람을 포함한 고등 포유동물까지 매우 잘 보존되어 있다 (Akam, 1989; McGinnis et al., 1984).

이상과 같이 Hox 유전자의 변이, 즉 발현 이상에 의해 호메오틱 변이가 유발된다는 것은 알고 있으나 어떻게 이런 형태 변화가 유발되는지에 대한 분자수준에서의 연구는 아직까지 미미하다. 이를 이해하기 위해선 우선 어떤 유전자들이 Hox에 의해 조절을 받는지 분석해야 할 것이며 이들 유전자들이 분석되면 Hox 유전자로부터 형태까지의 큰 gap이 이해 될 것이다. 따라서 본 실험실에서는 proteomics 기법을 이용하여 Hoxc8 단백질이 조절하는 유전자 산물로 Vimentin, γ -actin, tropomyosin, tubulin β -5 chain, GRP78, proteasome subunit α type 5, 26S proteasome regulatory subunit p27 protein, PDIR, ATP synthase beta subunit, Pgaml, and CAII, RbAp46, PCNA, eEF-1-beta, 그리고 nucleophosmin 등을 보고한 바 있다 (Kwon et al., 2003).

이 중 특히 cyclin이라고도 알려져 있는 PCNA는 (Mathews et al., 1984) 세포 주기 중 DNA가 복제하는 시기인 S기에 DNA polymerase 보조인자로서의 기능을 하며 높은 발현을 보이는 핵 단백질이다 (Kelman, 1997; Bravo et al., 1987). PCNA는 homotrimeric 단백질로 중간에 둥근 고리 구조를 가지며 DNA 복제 과정 중 이 고리를 통해 딸 이중나선 DNA가 지나가게 함과 동시에 DNA 중합효소 δ (Pol δ) 및 Rfc (Replication factor C)와 복합체를 형성함으로써 이들이 DNA template로부터 떨어지는 것을 막는다 (Madsen and Celis, 1985). 생쥐 세포주인 Balb/c3T3 cell을 이용한 실험에서 antisense oligonucleotide를 처리하여 PCNA의 발현을 억제하였을 때 DNA 합성과 세포 분열이 완전히 억제되는 것을 알 수 있는데 (Jaskulski et al., 1988), 이는 PCNA가 DNA 합성 및 세포 주기에 관여한다는 것을 의미한다. 그러나 PCNA가 과잉 발현하여도 p53이 없거나 적을 때 혹은 p21이 많이 존재할 때 세포 성장이 억제된다는 보고가 있으며 (Tournier et al., 1996; Paunesku et al., 2001) 또 과잉 발현이 DNA 수선을 저해한다고도 보고되고 있다 (Lemmoine et al., 2000). 한편 사람의 각질세포에서는 PCNA가 각질세포 증식에

는 관여하나 분화와는 관련이 없는 것으로 보고되었다 (Miyagawa et al., 1989). 이상과 같이 PCNA는 DNA 복제와 수선에 필수적이며 (Maga and Hubscher, 2003), DNA 대사와 세포 주기, 세포 생존능력의 조절에도 개입하며, 또 DNA methylation, chromatin remodeling과 세포주기 조절에도 관여한다고 보고되어 있는데 (Warbrick, 2000; Paunesku et al., 2001) 이런 다양한 기능은 서로 다른 multiple partner와 결합함으로써 가능할 것으로 추측되고 있다 (Maga and Hubscher, 2003; Shan and Morris, 2005).

초파리의 경우 발생 초기에 그리고 미수정관에서는 PCNA가 많이 발현하나 발생 후기에는 적게 발현하는데, PCNA의 5' upstream에 여러 개의 호메오도메인을 포함하고 있는 단백질 binding site가 존재하는 것으로 보아 호메오도메인 단백질에 의해 PCNA의 발현이 조절받을 것임을 강력히 시사하였다 (Yamaguchi et al., 1990). 이는 본 실험실에서 보고한 이전 결과 즉, 생쥐의 호메오단백질 중 하나인 Hoxc8이 PCNA의 발현을 조절할 것이라고 추측한 결과 (Kwon et al., 2003)와 비교해 볼 때 매우 흥미롭다.

따라서 본 실험에서는 proteomics 기법을 통해 Hoxc8에 의해 조절되는 것으로 분석된 PCNA가 *in vitro* cell culture system에서 실제로 Hoxc8에 의해 직접 영향을 받는지 알아보기 위해 먼저 PCNA의 upstream region에 Hox binding site (TAAT, ATTA)가 존재하는지를 분석하였다. NCBI의 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) program을 이용하여 PCNA의 upstream 서열을 분석한 이 부위에 putative Hox binding site가 여러 곳에 존재하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1).

생쥐의 경우에도 초파리에서 (Yamaguchi et al., 1990)와 마찬가지로 PCNA 유전자의 5' upstream쪽에 putative Hox binding site가 많이 존재하는 것을 알았으므로, 이 부위가 실제로 Hoxc8에 의해 조절받는지 분석하기 위하여 upstream 약 2.3 kbp를 증폭하기 위한 primer를 design하였으며 이때 클로닝이 수월하도록 양끝에 각각 제한효소 *Sma*I (5'-CCCGGG)과 *Xho*I (5'-CTCGAG) 자리가 존재하도록 5' primer (5'-TCCCC CGGGT AATAT ATGAT TAAGG GGTGG G-3')와 3' primer (5'-CCGCT CGAGT TGTGG CGACT AGATG AGA-3')를 제작하였다.

Hox binding site를 가지고 있는 PCNA의 upstream region이 실제로 세포 내에서도 Hoxc8에 의해 조절되는지 알아보기 위해 생쥐 DNA를 template로 PCR을 수행하여 약 2.3 kbp uPCNA (upstream sequence of PCNA) DNA

```

-2340 GGTAAATATAT GATTAAGGGG TGGGGGCTGA AAGTATAGTA GTGGGGTTTT CTGGGTTTTG
-2280 TTTTTAAATTT TAAAAAAATTT GTATTTCAATA TTTTAAAGAT TTATTTATTT ATGCATTTAT
-2220 ACAAATACAG GTCCTTTTCT GCATGTACAC CAGAGGATGG CATCACACAG CTGTGAGCTG
-2160 CCATGCAGGT TCTGGGAATT GAACTCGGGA CCTTTGGAAG AACAGCAAGT ACTCTTAACC
-2100 ACTGAGCCAT GTCTCCAGCC CATAACTGTT TTTATTTGTA ACTATTATAG TATCAAAAT
-2040 GTATGTGATA TAGCACTGTG TGGTAGTTTG ACAGTTTTCC TCGTTTTGTG TGCATAAAAT
-1980 AATGATGCAC CTTATAAGCT GACATAAATG CTGGGCTGGA TGCATACACA CCAATTTTAA
-1920 AAAGTCAAAT TTGCCAGCCT GGTCTACCAA GCAAACCTCA GTACAGCCAG GGAACATGAG
-1860 AGACCCTTAT CTCAAAACAAA ACAAACAAA ACAAACAAC TGAATAGATC TAAAGTTCTG
-1800 TAAATCCAC ACGCCGGGCA GTGAACAGTG TAGGGAAACC GAACACTTGC CATCAGAGTG
-1740 GTCGAGAGTA TTCTAGACCT GATGGAATCA ATGAATCTTC AATACTGTGA GAGTGATTAA
-1680 TACATTTGTG TCTCAGCATA CCTAGATATA TGGTGAAAAG AATAAAGAA AAAAAAAGCT
-1620 GAGAAATCCT ACAAACCAAG ATATTAATG AACTAAAGA GTTAAGCTTG ATGCCAGACT
-1560 GTGGCATCAA ATTGTGAGTT CAAGGCCAGC ATGGATAACA GAGTGAGTTT GATGCAAGCC
-1500 TCAAAAAAATT ATGGAGACTC TTAACAGGCT GAGGCTATAG CTCAATAAGT TATACAGTTT
-1440 TCTGGCTAAA TCCCAAGCC AGGAAAAGAA AAATCAAACA AGACAAACTA AAGGGAAATG
-1380 CAGTGAATAA GGAAAGAATA AATGAACATG AAATGGAATT AATATGCTCC TATGTAAACT
-1320 TTTTCCCCTT TGGTCAGTCT TGGTAGATAG TCCAAGGTGA GTTTAAATCT AGGCCCTCCG
-1260 ACCTCAGCCT TCCCATGTGC TGGAATTATA ATCACTAATC ACTCTCACA GCTAAAACGG
-1200 TCCTTTTAACT TTTCTGAAAT TGTATATACC TTATTAGTGA AAAGCAAACA AACAAAAAAC
-1140 CCTTACACAC ATAAATAAAA CATCACACAC CAAAAGCTTT CTTCACAAC CAACCAACTT
-1080 CTATACAGTT AGAAGAGGCA TTCCAATGG AACTATCAA GTTTCACATT AAAGTATTAC
-1020 ACTTTTATTA TCAAATATAT TTTACCTACC ACCAAAACCA AAAGAAAAAA ACATGAGAAA
-960 TTGAAAAACT CTATATCCTT TTGTAATGA TGTTAATCTA CCTGCAGTCA GTTCTTCCCC
-900 ATCCTCATAA TCAATAGGAA AAACAAAAAA AAAAAAAAC TTTAGTAGAA CAAAATGCTG
-840 CAGCCCAGGG ACATATGAAA GACGCTCCAC CTGCAACAGC TAACATTTTC AGGATGGGC
-780 TCAGGCTCGG GTTCATCTTC AGCCTAAAAT TAAGATGAAA ATACTAGTAA TATCTACCTT
-720 TAGAAAAATG TAGAGAACCA GACATAAAAG GAAAATAATT ACGTGATACA TATGGACTTG
-660 GTATCTTCTT TGGAGAAGCG TTCACGTTAA GAGGTATTTT TTTAGTCTTT AGAGAGAAAA
-600 GTTCAGAGCG ACGCACACAG AAAAGTGATA TGAATGGGG GGGGGGGTAG GGGTGTAAAA
-540 ATATGGTGGC CTCTTTATTA CTCGATATTT TGCAGCGTAT TTCTTACGTT AGGGAAAACG
-480 CTCCTAGTGT TTTAAAATAC TCTCCAGCTT CAAGGCAGGC CGCCGCGCAC AGCTCGATTT
-420 GCCTGTGACT TCCACTTCCG TGGCGGGAA ACTTCTAAG GATGGAAACT GCAGCCTAAA
-360 CTCCACAAA CTTGGGCGGT GACGACAGCC TACGGAACC CCGTGATGCC CCTCGCTCC
-300 CAGGCTCCTA CCCCAGCC CCGCTTTGC ATACGCGGTG GGGCGGGCCT TGCTCAAACC
-240 ACGGTTACGA TTGGTCCTTG AGGAGAGGTG GGTGGATCAG CGCTGTGGCG TCATGACCTC
-180 GCGCAGGAA AAGGCGCGC CTTAGGAAG CCGGCATTA GACGGTTGCG GCGCGAGAGG
-120 GTTGGTAGTT GTCGCTGTAG GCCTTCGCTG CCGCTTCTGC ATCGTGAATC GGGGGACCTT
-60 GGCAGCCAGA CCTCGTTCCT CTTAGAGTAG CTCTCATCTA GTCGCCACAA CTCCGCCACC
  1 ATGTTTGAGG CACGCCTGAT CCAGGGCTCC ATCCTGAAGA AGGTGCTGGA GGCTCTCAA
  61 GACCTCATCA ATGAGGCCTG CTGGGACGTC AGCTCGGGCG GCGTGAACCT GCAGAGCATG
  121 GACTCGTCTC ACGTCTCCTT GGTACAGCTT ACTCTGCGCT CCGAAGGCTT CGACACATAC
  181 CGCTGCGACC GCAACCTAGC CATGGGCGTG AACCTCACCA G

```

Fig. 1. Sequence analysis of the upstream regulatory region of murine PCNA gene. Putative Hox binding sites and primer regions are written in bold and in rectangles, respectively. The start codon (ATG) is underlined. The 1st nucleotide at initiation codon (ATG) is denoted as the nucleotide number 1, and the 5' upstream of this sequence is indicated as the negative (-) number.

fragment를 증폭하였으며 이를 pGEM T-Easy vector (Promega)에 cloning하여 pGEM T-uPCNA를 만들었다. pGEM T-uPCNA를 다시 *Sma*I과 *Xho*I으로 자른 후 약 2.3 kbp uPCNA fragment를 분리한 다음 이를 luciferase reporter 벡터인 pGL3 Basic vector (Promega)의 *Sma*I과 *Xho*I 자리에 subcloning하여 pGL3 : uPCNA를 제작하였다. 한편 pcDNA 3.0 vector에 *Hoxc8*이 삽입된 플라스미드 pcDNA : c8 (Kown et al., 2003)는 *Hoxc8*을 발현하는 effector 플라스미드로 사용하여 NIH3T3 cell에 pGL3 : uPCNA 플라스미드와 함께 co-transfection 시킨 후 luciferase 활성을 측정하

였다. 우선 NIH3T3 cell은 24 well cell culture plate에 fetal bovine serum (FBS) 10%와 60 µg/ml Penicillin (Gibco BRL, USA), 100 µg/ml Streptomycin을 포함하고 있는 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco BRL, USA) 배지 500 µl와 함께 4×10⁴개 정도 단층이 되게 깔아준 다음 37°C, 5% CO₂ 환경의 인큐베이터에서 배양하였다. 다음날 transfection 3시간 전에 plate로부터 배지를 제거하고 1× PBS로 한 번 세척한 뒤 혈청이 없는 배지로 갈아주었다. 혈청과 항생제가 없는 배지에 reporter (pGL3 : uPCNA)와 effector (pcDNA : c8) DNA 200 ng을 넣고, internal control로

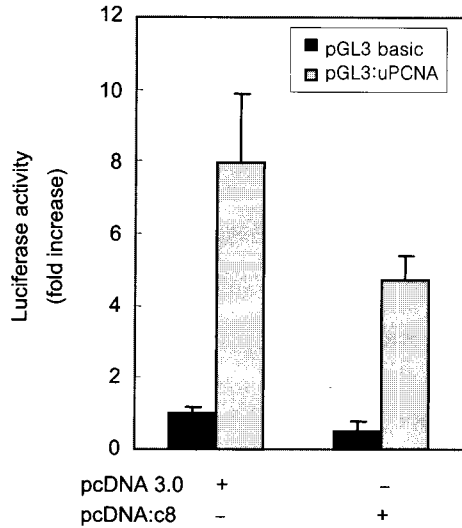


Fig. 2. Luciferase analysis of pGL3 : uPCNA in the presence of Hoxc8. pGL3 : uPCNA and blank pGL3 basic vector were co-transfected with pRL-TK along with pcDNA 3.0 blank vector or pcDNA : c8. Forty eight hour after transfection, cells were collected and then the luciferase activity was measured as described in the text. This experiment was performed three times independently and the mean values were drawn.

pRL-TK vector (renilla luciferase) 20 ng 및 serum free DMEM과 5분간 반응시킨 lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)를 준비하여 혼합하고 다시 20분 동안 방치하였다. 그 다음 NIH3T3 cell이 있는 plate에 DNA-lipofectamine 2000 reagent 혼합물을 각각의 well에 넣어준 후 5% CO₂, 37°C 배양기에서 3시간 배양한 다음 혈청이 있는 배지로 갈아주었다. 다시 48시간 배양한 다음, dual luciferase assay kit (Promega, USA)를 이용하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. 세포를 꺼내 각 well은 PBS로 한번 세척하고 passive lysis Buffer를 100 µl씩 각 well에 첨가하였다. 실온에서 shaking하면서 약 15분~1시간 반응시킨 다음 1.5 ml 튜브에 Luciferase assay buffer II 100 µl와 세포 분해물 20 µl를 넣어 혼합한 후 TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 Luciferase reporter 활성을 측정하였다. Stop & Glo buffer 1 ml에 50× Stop & Glo substrate 20 µl가 혼합된 용액 100 µl를 넣어 renilla 활성을 측정하고, 결과 값은 Luciferase reporter 활성 값과 renilla 활성 값의 비율 (ratio)로 나타내어 분석하였으며, 그 결과 Fig. 2에서처럼 Hoxc8에 의해 Luciferase reporter의 발현이 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 2).

이는 Hoxc8이 PCNA의 upstream 서열에 작용하여 PCNA의 발현을 down regulation한다는 것을 의미하므로

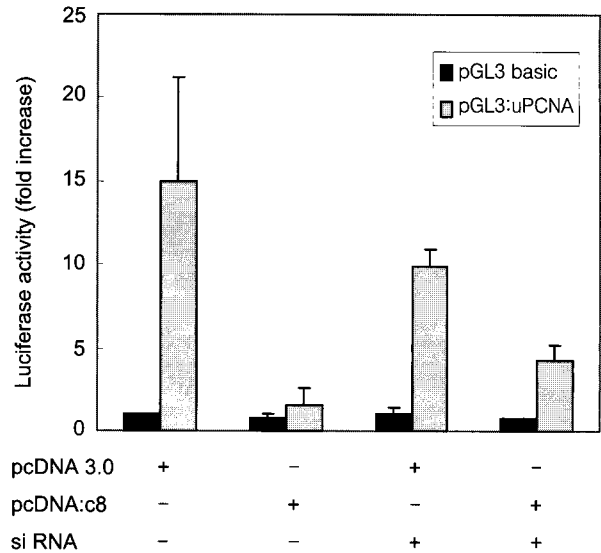


Fig. 3. Effect of Hoxc8 on expression of reporter luciferase gene in the presence or absence of siRNA against Hoxc8. pGL3 : uPCNA and blank pGL3 basic vector were co-transfected with pRL-TK along with pcDNA 3.0 blank vector or pcDNA : c8 in the presence or absence of siRNA against Hoxc8. Forty eight hour after transfection, cells were collected and then the luciferase activity was measured as described in the text. This experiment was performed three times independently and the mean values were drawn.

다시 본 실험에서는 이 down regulation이 실제로 Hoxc8에 의한 것인지를 증명하기 위하여 Hoxc8 siRNA를 이용하였다. 두 종류의 Hoxc8 RNA oligonucleotides (5'-GUAUCA GAC CUU GGA ACU A-3'와 5'-UAG UUC CAA GGU CUG AUA C-3')를 제작하였고 (삼천리제약) 이를 각각 1:1 비율로 혼합하여 90°C에서 2분 동안 반응시키고 30°C에서 1시간 방치하여 double strand siRNA 구조로 만든 다음 실험을 진행했다. Hoxc8에 의해 감소하였던 reporter의 발현이 Hoxc8 siRNA를 처리하여 Hoxc8을 제거할 경우 uPCNA로 인한 reporter의 발현이 다시 증가되는 것으로 보아 (Fig. 3.) Hoxc8이 PCNA의 upstream 서열에 작용하여 PCNA의 발현을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

이상으로 Hoxc8이 PCNA 유전자의 upstream 서열과 작용하여 PCNA의 발현을 조절함을 알 수 있었다. 흥미로운 점은 Kwon 등이 프로테오믹스 기법을 통해 분석한 이전 보고에 의하면 Hoxc8을 F9 (murine embryonic teratocarcinoma cell line) cell에 transfection 시켜 Hoxc8이 과발현 하였을 때 PCNA 단백질의 양 역시 증가하였다는 점이다 (Kwon et al., 2003). 이 결과는 본 실험의 결과와 상반되는 것으로 본 실험에서는 Hoxc8의 과발현에 의해 PCNA가 down regulation되는 결과를 얻었다. 본 실험에서는 PCNA의 약 2.3 kbp upstream 서열만 사용하였으므로

로 실제로 *in vivo*에서는 다를 수도 있을 것이다. 2.3 kbp upstream보다 더 멀리 떨어진 곳에 혹은 PCNA의 intron이나 3' downstream 서열에 PCNA 발현을 조절하는 서열이 있을 수도 있고, 또 사용한 세포가 달라 embryonic teratocarcinoma cell인 F9에서는 Hoxc8에 의해 PCNA의 발현이 증가하나 여기서 사용한 생쥐 fibroblast cell인 NIH3T3 cell에서는 감소했을 수도 있다. 어떤 경우이건 Hoxc8에 의해 PCNA의 발현이 조절되며 이상은 putative Hox binding site (ATTA)가 PCNA의 upstream 약 1170 bp (-520 ~ -1690 in Fig. 1)에 4.6개 (1/4⁴) 정도의 확률로 존재하여야 하나 Fig. 1에서 보듯이 20개가 존재하는 것으로 보아 발생과정 중 Hoxc8이 이 서열과 결합하여 PCNA의 발현을 조절할 가능성은 매우 높다고 본다. 세포의 종류와 발생 단계에 따라 서로 다른 Hox cofactor가 존재할 수 있으며, 따라서 Hoxc8에 의한 PCNA의 발현이 up-혹은 down으로 달리 조절될 수 있을 것으로 생각된다. 발생이란 세포의 수를 증식해야 하기도 하지만 어느 특정 위치 또는 특정 시기에는 증식을 멈추고 분화를 시켜야 한다. 증식기에는 PCNA의 발현이 필수적이거나 분화를 위해서는 증식이 멈추어야 하므로 Hox 단백질이 PCNA 양을 시기와 장소에 따라 달리 발현시킴으로써 증식과 분화가 한 단백질에 의해 조절될 수도 있을 것임을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (20070401-034-030)과 학술진흥재단의 우수여성과학자 연구지원사업 (KRF-2005-204-C00074)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

Abate-Shen, C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause consequence? 2002. *Nat Rev Cancer*. 2: 777-785.

Akam M. Hox and HOM: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 1989. 57: 347-349.

Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987. 326: 515-517.

Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T. Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem*. 1994^a. 63: 487-526.

Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Ann Rev Genet*. 1986. 20: 147-173.

Gehring WJ, Qian YQ, Billeter M, Furukubo-Tokunaga K, Schier

AF, Resendez-Perez D, Affolter M, Otting G, Wuthrich K. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*. 1994^b. 78: 211-223.

Jaskulski D, deRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*. 1988. 240: 1544-1546.

Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 1997. 14: 629-640.

Kim MH, Kessel M. Homeobox genes as regulators of vertebrate development. *AgBiotech News Information*. 1993. 5: 301-308.

Kwon Y, Ko JH, Kim B-G, Kim MH. Analysis of plausible downstream target genes of Hoxc8 in F9 teratocarcinoma cells -Putative downstream target genes of Hoxc8. *Mol Biol Rep*. 2003. 30: 141-148.

Lemoine FJ, Kao SY, Marriott SJ. Suppression of DNA Repair by HTLV Type 1 Tax Correlates with Tax trans-Activation of Proliferating Cell Nuclear Antigen Gene Expression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000. 16: 1623-1627.

Levine M, Hoey T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell* 1988. 55: 537-540.

Madsen P, Celis JE. S-phase patterns of cyclin (PCNA) antigen staining resemble topographical patterns of DNA synthesis. A role for cyclin in DNA replication? *FEBS Lett*. 1985. 193: 5-11.

Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci*. 2003. 116: 3051-3060.

Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JI. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984. 309: 374-376.

McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 1992. 68: 283-302.

McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ. A homologous protein-coding sequence in Drosophila homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 1984. 37: 403-408.

Miyagawa S, Okada N, Takasaki Y, Iida T, Kitano Y, Yoshikawa K, Sakamoto K, Steinberg ML. Expression of proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 1989. 93: 678-681.

Paunesku T, Mittal S, Protić M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*. 2001. 77: 1007-1021.

Shan B, Morris GF. Binding sequence-dependent regulation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by p53.

Exp Cell Res. 2005. 305: 10-22.

Tournier S, Leroy D, Goubin F, Ducommun B, Hyams JS. Heterologous expression of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21Cip1 in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe* reveals a role for PCNA in the chk1+ cell cycle checkpoint pathway. *Mol Biol Cell*. 1996. 7: 651-662.

Warbrick E. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays*

2000. 22: 997-1006.

Yamaguchi M, Nishida Y, Moriuchi T, Hirose F, Hui CC, Suzuki Y, Matsukage A. *Drosophila* proliferating cell nuclear antigen (cyclin) gene: structure, expression during development, and specific binding of homeodomain proteins to its 5'-flanking region. *Mol Cell Biol*. 1990. 10: 872-879.