



구순구개열 발생의 분자유전학 연구를 위한 유전자 표적/적중 생쥐모델의 이용

백진아

전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

ABSTRACT

Gene Targeting Mouse Genetic Models for Cleft Lip and Palate

Jin-A Baek

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
Chonbuk National University, Korea*

*Center for Oral Biology, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester,
NY, USA*

Cleft lip and/or palate are common birth defects in humans and the causes including multiple genetic and environmental factors are complex. Combinations of genetic, biochemical, and embryological approaches in the laboratory mice are used to investigate the molecular mechanisms underlying normal craniofacial development and the congenital craniofacial malformations including cleft lip and/or palate. Both forward and reverse genetic approaches are used. The forward genetic approach involves identification of causative genes and molecular pathways disrupted by uncharacterized mutations that cause craniofacial malformations including cleft lip and/or cleft palate. The reverse genetic approach involves generation and analyses of mice carrying null or conditional mutations using the Cre-loxP mediated gene targeting techniques.

Key words : Gene targeting mouse model, Cre-loxP, Cleft lip and palate

I. 서론

해외연수 프로그램의 일환으로 미국 북동부, 캐나다와 Lake Ontario에 인접한 Rochester city (New York State)의 University of Rochester에서 연구하게 되었다. University of Rochester에 관해 간단히 소개하자면, 이 대학은 1850년 설립된 사립 명문 대학이다. 이후 코닥(Kodak) 설립

자 George Eastman의 기부로, 학교는 더욱 확장되고 발전하게 된다. 음대, 의대, 치대가 설립되고, 1925년에는 박사 학위까지 수여되어, 명실 상부한 최고 수준의 교육 체제를 완성하게 된다. 이후 1929년에는 광학(Optics) 연구소가 미국 최초로 개설되어, 광학 연구가 가장 유명한 학교로 현재까지 위상을 떨치고 있다. 그 외에도 경영대, 공대, 그리고 교육 대학들이 설립되면서 최고의 아카데믹 프로그램을 가진, 한국에서의 인지도는

높지 않지만 미국 내에서는 New Ivy League에 속하는 학교이다. 8명의 노벨상 수상자들과 12명의 풀리처상 수상자들을 배출하였고, 특히 Eastman 음대는 줄리어드, 커티스, NEC 등과 더불어 최고 수준의 음악 프로그램을 가지고 있다.

또한 School of Medicine and Dentistry는 연방 정부로부터의 많은 연구 기금과 투자기금을 확보하고 있어, 이 분야에서 Top rank되어 있는 Research 중심의 학교라고 말할 수 있다. 수많은 basic science departments와 clinical research departments & centers에서 활발한 연구와 이에 기초한 임상과의 연계가 이루어지고 있다¹⁾.

치과환자와 치과 전공의를 위한 임상 및 이와 연관된 임상 연구는 Eastman Dental Center에서 행해진다. Eastman Dental Center에는 Advanced Education in General Dentistry, General Practice Residency, Oral and Maxillofacial Surgery, Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Pediatric Dentistry, Periodontology, Prosthodontics, TMJ Fellowship 등의 Certificate Programs이 운영되고 있다. 치의학에 관한 기초 연구는 Center for Oral Biology에서 이루어진다¹⁾.

이 글에서는 필자가 소속되어 있는 기관과 그 곳에서 행해지는 연구에 대해 간단히 소개하고자 한다. 필자가 소속되어 있는 곳은 Center for Oral Biology in School of Medicine and Dentistry이며 Department of Biochemistry, Developmental biology, Genetics, Immunology, Microbiology, Physiology, Pharmacology and Structural Biology으로 구성되어 있다.

2007년 노벨 생리의학상 수상의 영광은 유전자 표적/적중(gene targeting) 및 DNA 재조합(re-combination) 기술의 발견, 배아줄기세포(embryonic stem cells)와 상동재조합(homologous recombination)으로 500여 이상의 인간의 질병을 가진

쥐가 탄생, 이러한 질병을 가진 생쥐를 바탕으로 인간의 건강과 질병을 연구하는데 기여한 공로를 인정받아 Mario R. Capecchi 교수(University of Utah, USA), Oliver Smithies 교수(University of North Carolina, USA), Martin J. Evans 교수(Cardiff University, UK)에게 돌아갔다²⁾. 오늘날까지 포유류, 특히 인간의 유전자 33,300개 중 30%인 10,000여개 이상의 쥐의 유전자가 targeting되었다. 따라서 앞으로 수년 안에 국제적인 연구에 힘입어 쥐의 전체 유전자가 완전 적중될 것(knockout mice)으로 보인다. 또한 유전자 표적/적중을 통해 쥐의 genomes 중 어떤 유전자도 원하는 대로 조작(DNA modification) 할 수 있다. 이 DNA modification을 통해 과학자들은 인간의 건강과 질병을 일으키는 개별 유전자들의 역할을 밝힐 수 있다. Gene targeting을 통해 인간이 갖고 있는 3,199가지의 질병 중 500개 이상의 질병을 가진 500종 이상의 모델 쥐가 이미 탄생되어 각 장기의 발생 및 성장, 생리, 노화 및 질병을 일으키는 여러 가지 유전자들의 역할 규명 및 치료방법 연구가 상당히 진전되어 있는 상황이다.

Cleft lip and palate를 포함하는 craniofacial malformations은 여러 유전적인 요인과 환경적 요인이 복합되어 나타난다고 알려져 있다. 다른 장기의 발생과정과 비교할 때 palatal development는 다소 간단한 것처럼 보일 수 있다. 그러나 palatal development의 각 과정은 epithelial-mesenchymal interactions에 의해 지배되는 tight molecular control이라고 말할 수 있다. 하나의 단백질의 기능만 소실되어도 이로 인해 복합적인 원인의 malformations이나 cleft palate가 발생한다는 사실이 이를 반증하고 있다. 실험용 생쥐의 targeted mutations과 인간의 genetic studies를 통해 palatogenesis에 관한 여러 가지

사실들을 밝혀내는 노력들을 하고 있다. 정상적인 craniofacial development와 pathogenic processes로 인한 congenital craniofacial malformations에 관계된 molecular mechanism을 밝혀내기 위해 실험용 생쥐를 이용하여 genetic, biochemical, embryological approaches를 복합 시도하고 있다. Cleft lip and palate를 포함한 craniofacial malformations를 야기하는 uncharacterized mutation에 의해 disruption된 molecular pathways와 그 원인이 되는 genes을 밝혀내거나, Cre/loxP-mediated gene targeting techniques를 이용하여 null mutations 또는 conditional mutations carrying mice를 만들어서 분석하는 방법이 사용된다. Cre/loxP-mediated gene targeting techniques에 대해 잠깐 설명하자면

recombination-out 하고자 하는 target gene 혹은 gene segment를 두 개의 loxP라는 34 bp nucleotide sequences 사이에 위치시켜 P1 bacteriophage에서 유래된 cre라는 recombinase에 의해 loxP site가 인식되어 두 loxP sites간에 recombination이 일어난다(Figure 1). Cre를 conditional knockout mouse에 도입하는 방법은 adenovirus를 통해 infection시키거나 혹은 homologous recombination에 의해 targeting 시키기도 하나 현재 가장 널리 쓰이는 방식은 조직 특이적 혹은 발생 특이적으로 조절되는 유전자의 promoter를 이용한 cre-transgenic mouse이다. 이 cre-recombination을 이용한 conditional knockout mouse를 통해 null mutation mouse에서 많이 나타나는 embryonic lethality를 극복

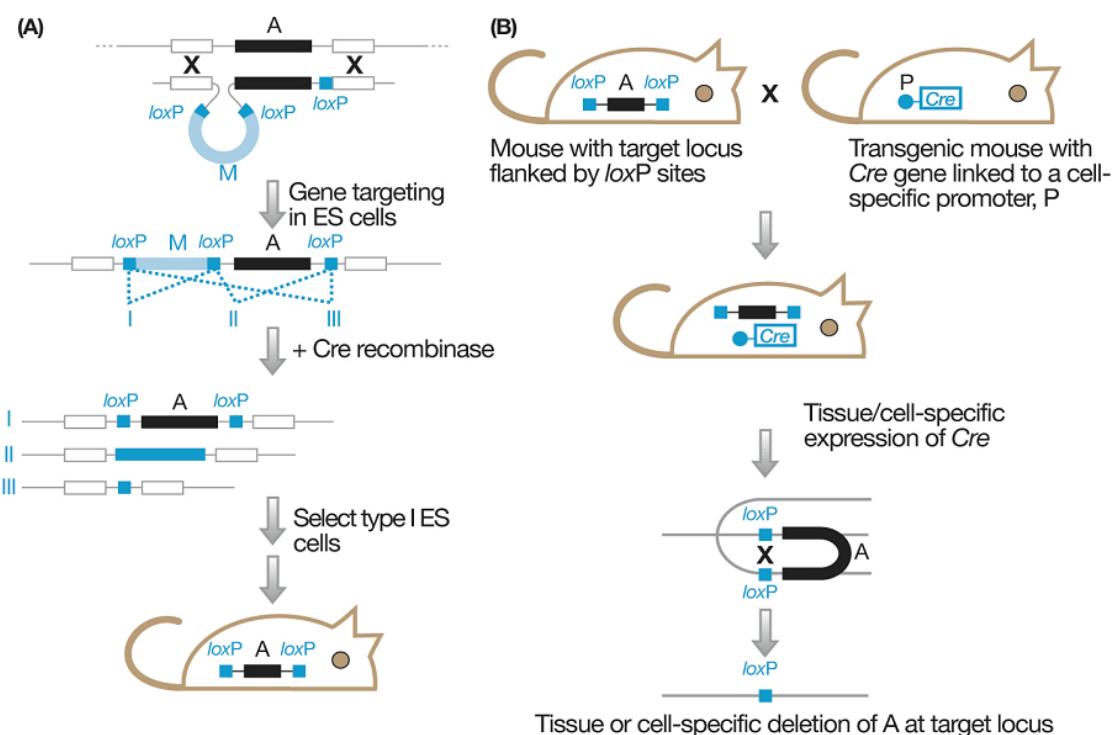


Figure 1. *Mus musculus*. Cre-loxP targeting for making conditional knockouts.

할 수 있으며 knockout의 공간적 혹은 시간적 조절이 가능해졌다. 주 모델에서 expression 혹은

knockout을 임의적으로 조절할 수 있다는 것은 매우 매력적인 수단이다. 현재 tetracycline과

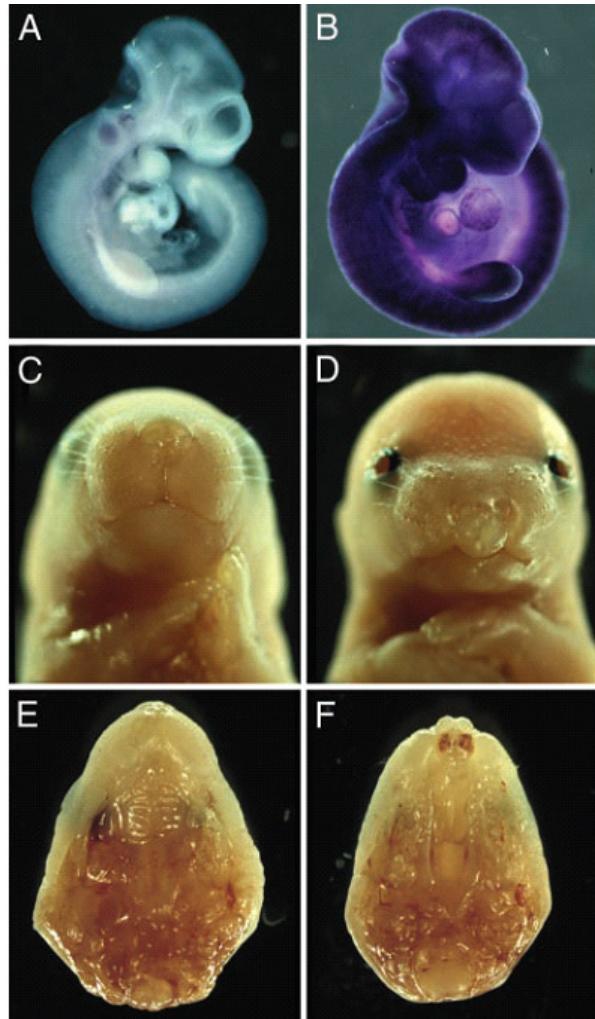


Figure 2. Transgenic *Tbx10* overexpression causes CL_P. (A and B) Wholemount *in situ* hybridization analysis showed ubiquitous overexpression of *Tbx10* transcripts in *CMV-Tbx10* transgenic embryos at E10.5 (B) compared with the highly restricted hindbrain expression in wild-type littermates (A). (C and D) Frontal views of a wild-type E18.5 embryo (C) and of a littermate transheterozygous for *Dc* and the *CMV-Tbx10* transgene (D). The transheterozygous embryo exhibited bilateral cleft lip and open eyelids. (E and F) Palatal views of wild-type (E) and transheterozygous mutant (F) upper jaws showed cleft primary and secondary palates in the mutant.

tamoxifen, 이 두 ligand에 의해 transactivation이 조절되는 방식이 널리 사용된다³⁾. 최근의 gene targeting projects는 craniofacial development 동안 조직특이적 expression patterns을 나타내는 transcription factors and signaling molecules의 역할을 밝혀내는데 초점이 맞춰지고 있다. 필자가 근무하는 실험실에서는 최근 몇 년간, cleft lip or/and cleft palate를 포함하여 craniofacial developmental defects를 가진 다섯 종 이상의 mutant mouse strains을 분석해왔다. *Dancer* mutant mice에서 cleft lip을 발생시키는 mutant gene cloning을 시행하였으며(Figure 2)⁴⁾ Cleft palate development와 관련하여 palatal outgrowth의 key regulator로서 *Osr2*(Odd-skipped related-2) zinc finger transcription factor를 identification

하였다(Figure 3)⁵⁾. *Twirler* mutant mice에서의 cleft lip pathogenesis를 밝혀내는 연구를 진행하고 있으며⁶⁾, 또한 midfacial development에서 Wnt signaling pathway를 밝혀내는 연구를 진행하고 있다⁷⁾. *Osr2* gene을 이용하여 developing palatal mesenchyme에서 특별히 cre DNA recombination expression되는 mouse model을 만들어냈고⁸⁾, Cre/loxP-mediated tissue-specific gene inactivation strategies를 사용하여 Bmp, Shh, and Wnt signaling 등과 연계된 molecular network을 밝혀내는 연구들을 진행하고 있다.

이러한 연구들이 cleft lip and palate 환자들에게 실질적인 큰 도움이 될 수 있는 그 날들을 기대하면서 오늘도 열심히 mouse room을 향하고 있다.

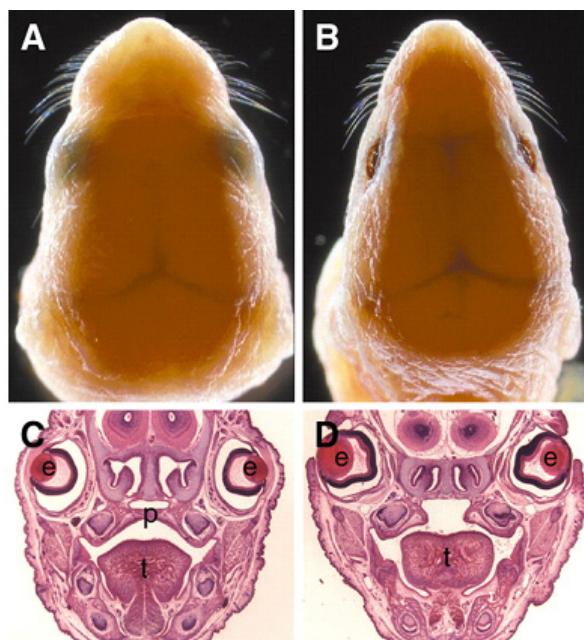


Figure 3. *Osr2*^{tm1Jian/tm1Jian} mutant mice are born with open eyelids and cleft palate. (A, B) Dorsal view of heterozygous (A) and homozygous (B) mutant newborn heads. (C, D) Frontal sections of heterozygous (C) and homozygous (D) newborn mutant heads

참고문헌

1. www.urmc.rochester.edu
2. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/
3. Hickman-Davis JM, and Davis IC. Transgenic mice. *Paediatr Respir Rev.* 2006;7:49–53.
4. Bush, JO., Lan, Y., and Jiang, R. The cleft lip and palate defects in the Dancer mutant mice result from gain of function of the Tbx10 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 2004;101:7022–7027.
5. Lan, Y., Ovitt, CE., Cho, ES., Maltby, KM., Wang, Q., and Jiang, R. Odd-skipped related 2(Osr2) encodes a key intrinsic regulator of secondary palate growth and morphogenesis. *Development.* 2004;131:3207–3216.
6. Liu, H., Liu, W., Maltby, KM., Lan, Y. and Jiang, R. Identification and developmental expression analysis of a novel homeobox gene closely linked to the mouse Twirler mutation. *Gene Expression Patterns(Mechanisms of Development).* 2006;6:632–636.
7. Lan, Y., Ryan, RC., Zhang, Z., Bush, JO., Maltby, KM., Bullard, SA., Lidral, AC. and Jiang, R. Expression of Wnt9b and activation of canonical Wnt signaling during midfacial morphogenesis in mice. *Developmental Dynamics.* 2006; 235:1448–1454.
8. Lan, Y., Wang, Q., Ovitt, CE., and Jiang, R. A unique mouse strain expressing Cre recombinase for tissue-specific analysis of gene function in palate and kidney development. *Genesis.* 2007; 45:618–624.

교신 저자

백진아, 전북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실
전북 전주시 덕진구 덕진동 664-14 우편번호: 561-756/
Tel: 063-250-2213/ Fax: 063-250-2089/ e-mail: omfsbj@chonbuk.ac.kr