

DNase I Hypersensitive Site 8 as an Enhancer is Mapped in the Upstream Vicinity of the Crlz1 Promoter

Seong-Young Choi and Chang-Joong Kang*

Department of Genetic Engineering, Graduate School of Biotechnology, College of Life Sciences, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

Received June 15, 2012 / Revised August 31, 2012 / Accepted September 13, 2012

The Crlz1 gene is known to be expressed specifically in the pre-B cell stage during B-cell development. With regards to the specific expression of the pre-B cell stage of the Crlz1 gene, we have previously identified three pre-B cell-specific DNase I hypersensitive sites (HSS), which are named HSS8, 9, and 10, in the upstream vicinity of this gene. In this paper, we report that HSS8 increases further the strong Crlz1 promoter activity driven by HSS9/10 and, therefore, acts as its enhancer. Furthermore, HSS8 has been finely mapped between -1055 and -1159 from the transcription start site of the Crlz1 gene.

Key words : Charged amino acid rich leucine zipper 1 (Crlz1), pre-B cell, promoter, enhancer, DNase I hypersensitive site

서 론

B 세포는 외부로부터 유입된 항원에 의하여 자극되어 항체를 생산하는 한편 T 세포에 항원을 제시하여 T 세포의 활성을 유도하는 등의 면역반응을 일으키게 된다. B 세포는 골수에서 여러 분화 단계를 거쳐서 발생되어지며, 이러한 발생 과정에서 면역 글로불린 유전자의 재배열을 통하여 수많은 외부 항원에 대응할 수 있는 다양한 항체를 생성하게 된다. 항체는 B 세포가 말기 분화한 plasma 세포에서 분비되는데, 1차 면역 반응에서 처음으로 분비되는 IgM은 pentamer를 이루고 있으며 class-switch 후에 점막 조직에서 분비되는 IgA는 dimer를 이루고 있다. Immunoglobulin J (IgJ) chain은 이러한 IgM 및 IgA 항체들의 중합과 분비를 도와 주는 역할을 하게 된다[11]. IgJ chain 유전자는 B 세포 분화 과정 중 마지막 단계인 plasma 세포에서 발현되는 것으로 잘 알려져 있다[6,7,9].

Crlz1 (charged amino acid rich leucine zipper 1) 유전자는 IgJ chain 유전자로부터 약 30 kb 정도 위쪽에 위치하고 있으며 B 세포의 분화 과정 중 pre-B 세포 분화 단계에서 특이적으로 발현됨이 northern blot 및 RT-PCR 실험 등을 통하여 밝혀져 있다[9]. Crlz1 유전자는 전사인자인 CBF β (Core Binding Factor β)를 미기로 사용한 yeast-2-hybrid 실험을 통해 CBF β 와 결합하는 단백질을 찾는 과정에서 최초로 알려지게 되었다[14]. 한편 CBF β 는 Runx (runt-related transcription factor)와 heterodimer의 형태로 여러 세포의 분화 및 증식에 관여한다고 알려져 있으며, Runx/CBF β 의 조절 이상은 암, 뼈 형성

장애, 면역 질환 등의 원인으로 보고되고 있다[1,5,16]. 흥미롭게도 Runx/CBF β heterodimer가 형성되려면 Runx가 존재하는 핵 쪽으로 세포질에 머물고 있는 CBF β 가 이동하여야 하는데, Crlz1이 이러한 CBF β 의 세포 내 이동을 유도한다는 사실을 최근의 연구 논문에서 보고하였었다[12].

B 세포 분화 과정 중에 일어나는 이러한 두 인접 유전자의 역동적인 발현 조절을 규명하기 위하여 IgJ 유전자와 Crlz1 유전자가 위치하는 chromatin 주위에서 수행한 DNase I hypersensitivity assay에서 총 10 개의 DNase I hypersensitive site (HSS)가 발견되었었다[6,7,9]. IgJ 유전자로부터 순서대로 나열하였을 때 HSS1은 IgJ promoter 지역이고 HSS3/4는 IgJ enhancer 지역에 해당하였었다[6,7]. 또한 HSS8, 9, 10은 Crlz1 유전자의 바로 위쪽으로 위치하고 있는데[9], HSS9/10은 Crlz1 promoter 지역으로서 Fli-1 및 GABP 등의 Ets 전사인자 군과 Wnt 신호를 전달하는 LEF-1 전사인자가 결합하여 그 활성을 조절한다는 것도 밝혀져서 이미 보고 되었다[13]. 그러나 HSS8이 Crlz1 유전자의 전사 활성에 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않고 있다.

본 연구에서는 HSS8이 Crlz1 promoter의 전사활성을 더욱 높여주는 enhancer의 역할을 함을 밝혔으며, 또한 HSS8의 정확한 위치는 Crlz1의 전사시작점으로부터 -1055와 -1159 사이에 존재함을 밝히게 되었다.

재료 및 방법

세포 배양

실험에 사용된 PD36 세포는 Abelson virus에 의하여 세포주로 확립된 mouse pre-B 세포이다[4]. PD36 세포는 RPMI1640에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS),

*Corresponding author

Tel : +82-31-201-2682, Fax : +82-31-203-4969
E-mail : cj kang@khu.ac.kr

2 mM L-glutamine, 0.1 mM MEM nonessential amino acids, 1 mM MEM sodium pyruvate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin G, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 배양액을 사용하여서 CO₂ 5% 및 가습이 된 37°C의 환경에서 배양하였다.

Criz1 promoter upstream deletion constructs 제작

Criz1 promoter 주위의 genomic DNA를 간직한 phage λ clone을 배양하여 추출한 DNA를 *Sma*I 으로 자른 후 7411 bp DNA fragment를 분리하였다. 한편 pGL2-Basic luciferase reporter plasmid vector (Promega)는 *Hind*III로 자른 후 T4 DNA polymerase (EC 2.7.7.7)로 fill-in하고 CIP (EC 3.1.3.1, calf intestinal alkaline phosphatase)을 처리하여 탈인산화 시켰다. 위에서와 같이 준비된 7411 bp *Sma*I DNA fragment와 pGL2-Basic plasmid fragment를 ligation 하고 DH5 α (Stratagene)에 transformation 시킨 후, 원하는 colony를 선별하였고, 최종적으로 plasmid DNA를 추출하였다.

위에서와 같이 pGL2 plasmid의 *Hind*III site에 7411 bp *Sma*I DNA fragment가 삽입된 sub-clone으로 부터 출발하여 아래에서 열거한 여러 가지 deletion constructs를 제작하였다. Crp-4476, Crp-1845, Crp-1159, Crp-1055, Crp-880 deletion constructs를 각각의 경우에 *Kpn*I, *Nco*I, *Hind*III, *Eco*31I, *Bse*R I 제한효소를 사용하여 제작하였다.

Transient transfection 및 luciferase assay

Transient transfection은 DEAE-dextran 방법에 의하여 CsCl로 정제된 plasmid DNA를 0.5 pmole 그리고 PD36 세포를 1×10^7 개 사용하여 전에 보고된 바와 같이 수행하였다[7]. 간략히 요약하여 정리하면, 먼저 세포를 TS solution (138 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.37 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.9 mM CaCl₂ · 2H₂O, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 한 번 씻어준 후 plasmid DNA mix (luciferase reporter plasmid construct 0.5 pmole, plasmid size로 인한 DNA 양의 차이는 pBluescript plasmid로 맞추어 주고, 10 mg/ml DEAE-dextran 50 μ l, TS 500 μ l)를 넣은 후 정확히 15분간 섞어 준 후 100 μ M chloroquine이 첨가된 RPMI1640 media 10 ml를 가하고 37°C에서 30분간 처리하였다. Plasmid DNA mix와 chloroquine RPMI1640 media 처리 시 세포가 가라앉지 않도록 일정 간격으로 세포를 계속해서 부유시켜 주었다. 마지막으로 FBS 등이 첨가된 RPMI1640 media를 사용하여 씻어주고 같은 배양액 10 ml를 다시 가한 후 5% CO₂ 및 30°C 환경에서 2일간 배양하였다.

Luciferase assay를 수행하기 위하여 2일간 배양한 세포를 PBS로 2번 씻어 주고 lysis buffer (Promega) 300 μ l를 가하여 저온실에서 30분간 회전시켜서 얻은 세포 용해액 중 50 μ l를 취하고 luciferase assay reagent (Promega) 100 μ l를 첨가한

후 luciferase activity를 측정하였다.

DNase I hypersensitivity assay

PD36 세포 5×10^7 개를 침전시킨 후, 10 ml hypotonic solution [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM KCl, 3 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.75 mM spermidine, 0.15 mM spermine]을 가하여 부유시킨 후 Dounce homogenizer로 옮기고 얼음 상에서 20분간 놓아 두었다. 1 M DTT 30 μ l를 넣어 준 후, tight A pestle을 사용하여 20번 왕복하여 세포막을 깨뜨려 준 뒤 세포핵을 침전시켰다. 침전된 세포핵에 DNase I digestion buffer [0.25 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 5% glycerol] 1.2 ml와 1 M DTT 60 μ l를 넣고 섞어 주었다[2]. 이어서 DNase I (Promega, EC 3.1.21.1) 10 unit을 넣어 주고 0, 1, 3 분간 반응시킨 후 400 μ l 씩 quenching solution (200 mM EDTA, 10% SDS) 50 μ l가 담긴 micro-tube로 옮겨 줌으로써 반응을 멈추게 하였다. 계속하여 RNase A (USB, 10 mg/ml, EC 3.1.27.5) 20 μ l를 첨가하여서 37°C에서 1시간 반응시킨 후 proteinase K (USB, 20 mg/ml, EC 3.4.21.64) 18 μ l를 첨가하여서 55°C에서 밤새 처리하였다. 다음 날 phenol 및 chloroform에 의하여 sample에서 DNA를 추출하고, *Nde*I 을 사용하여 두 번에 걸쳐서 충분히 반응시켜 주었다.

Southern Blot

DNase I hypersensitivity assay에서 준비된 sample을 0.8% agarose gel에서 전기영동 한 후 0.2 N HCl 용액에 10 분간 담가 두었다가 증류수로 행구고 이어서 변성용액(1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)으로 옮겨서 20분간 천천히 흔들어 주고 다시 증류수로 씻어 준 후 마지막으로 Tris-HCl 완충용액(1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl)을 사용하여 중화시켰다. 위와 같이 처리된 agarose gel 상의 DNA를 nitrocellulose membrane으로 $10 \times$ SSC (saline sodium citrate) 완충용액을 사용하여 약 18시간 동안 이동시킨 후 nitrocellulose membrane을 진공 상태로 80°C에서 30분간 처리하여 DNA를 고정시켰다. Pre-hybridization buffer [5 \times Denhardt's, 50% formamide, 5 \times SSC, 50 mM Na-PO₄ (pH 6.8), 0.1% SDS, 100 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA]와 hybridization buffer [1 \times Denhardt's, 50% formamide, 5 \times SSC, 50 mM Na-PO₄ (pH 6.8), 0.1% SDS, 10% dextran sulfate sodium salt, 100 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA, probe DNA]를 차례로 사용하여 hybridization반응을 42°C에서 수행한 뒤 membrane blot을 충분히 씻어 주었다. Membrane blot에 물기가 보이지 않을 정도가 되었을 때 비닐랩으로 싸고 -70°C에서 autoradiography하였다.

결과 및 고찰

DNase I hypersensitive site 8 (HSS8)의 전사 기능을 분석하기 위하여 λ phage mouse genomic DNA library에서 Crlz1 유전자의 염기서열을 probe로 사용하여 선별된 λ phage clone으로부터 얻은 DNA 조각을 pGL2-Basic vector로 sub-cloning을 수행하였다(Fig. 1).

먼저 pGL2-Basic luciferase reporter plasmid vector를 HindIII로 자른 후 T4 DNA polymerase (EC 2.7.7.7)로 fill-in 한 다음 CIP (EC 3.1.3.1, calf intestinal alkaline phosphatase) 처리를 하였다. 한편, 선별된 λ phage clone으로부터 HSS8, 9, 10이 모두 포함된 DNA fragment를 얻기 위하여 phage에서 추출한 DNA를 SmaI 으로 잘라서 0.8% agarose gel에 loading 하고 전기영동을 한 다음 해당하는 DNA를 추출해 내었다. 위에서 준비한 SmaI DNA fragment와 plasmid DNA fragment를 ligation하여 sub-cloning에 성공하였다. Sub-cloning의 성공 여부는 XbaI, EcoRV, Acc65I, BamHI, SacI, ScaI, ClaI 등으로 잘라 봄으로써 확인하였다.

HSS8이 전사 활성을 가지는 지를 분석하기 위하여 sub-cloning된 SmaI DNA fragment로부터 KpnI, NcoI, HindIII 제한효소를 각각의 경우에 사용하여 여러 deletion

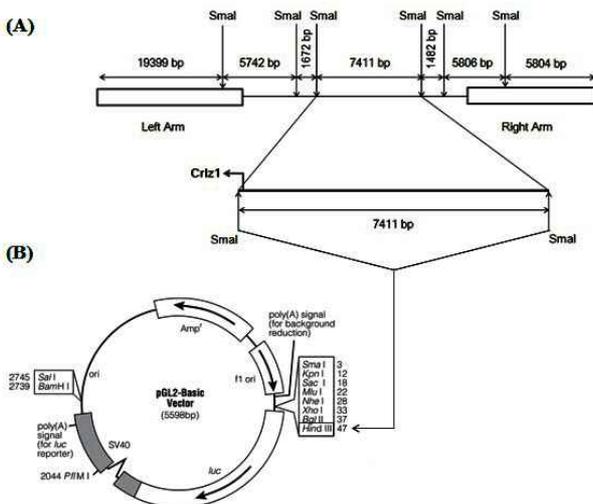


Fig. 1. (A) The 7411 bp SmaI DNA fragment of Crlz1 promoter with its upstream vicinity, which contains HSS8, 9, 10, is originated from the λ phage mouse genomic DNA clone. (B) Map of pGL2-Basic luciferase reporter plasmid vector, which is used to sub-clone the 7411 bp SmaI DNA fragment as depicted in panel A. The plasmid vector for sub-cloning this SmaI DNA fragment was prepared for the sub-cloning as followed: the HindIII site within multiple cloning site of plasmid was cut by its restriction enzyme and filled in by T4 DNA polymerase, and then dephosphorylated by CIP (calf intestinal alkaline phosphatase).

construct들을 만들어 내었다. 각각의 deletion construct들은 Crlz1 유전자의 전사 시작점으로부터 거리를 표시하기 위하여 Crp-7277 (SmaI construct), Crp-4476 (KpnI construct), Crp-1845 (NcoI construct), Crp-1159 (HindIII construct)로 명명하였다. 그리고 HSS9/10만을 포함하는 Crlz1 promoter construct [13]는 Crp-664 (XbaI construct)로 명명하였다 (Fig. 2).

이렇게 얻어진 deletion construct들을 pre-B 세포주인 PD36에 transient transfection한 후에 luciferase reporter의 효소 활성을 측정함으로써 각각의 deletion construct가 가지는 전사 활성을 비교 분석하였다(Fig. 3). 이러한 비교 분석에서 HSS9/10에 HSS8을 더 포함한 deletion construct (Crp-4476, Crp-1845, Crp-1159)들이 HSS9/10은 포함하나 HSS8은 포함하지 않은 deletion construct (Crp-664)와 비교하였을 때 약 2배의 전사 활성을 가지게 됨을 확인할 수 있었다. Crlz1 promoter에 해당하는 Crp-664 deletion construct가 가지는 전사 활성은 진핵 세포에서 단백질을 대량 발현시킬 때 자주 사용되고 있는 EF1a (elongation factor 1a) promoter의 전사 활성에 버금가며, CMV (cytomegalovirus) promoter의 약 1/4, 그리고 SV40 (simian virus 40) promoter의 약 20 배에 해당 될 정도로 매우 높다는 것을 지난 논문에서 이미 보고하였었다 [13]. 따라서 이번 실험의 결과는 HSS8의 기능이 HSS9/10이 가지는 Crlz1 promoter의 강한 전사 활성을 더욱 증가시켜 주는 enhancer의 역할을 하고 있음을 보여 주고 있다. 그러나 Crp-7277 construct의 전사 활성은 Crp-4476 deletion construct의 경우와 비교하여 볼 때 HSS8에 의한 enhancer 효과가

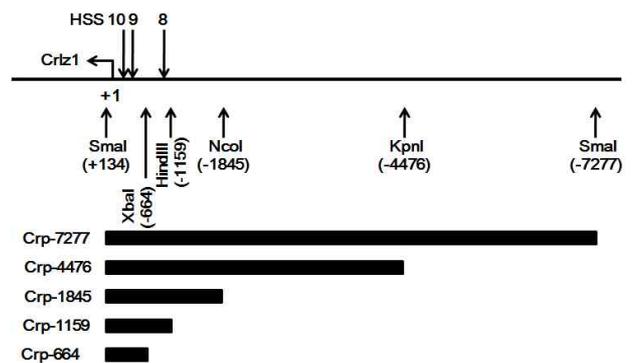


Fig. 2. A schematic diagram of various deletion constructs that were used to test the transcriptional activity of HSS8 in the upstream vicinity of Crlz1 gene. Various restriction enzyme sites utilized to delete the 7411 bp SmaI DNA fragment from its 5'-end are indicated together with HSS8, 9, 10, and Crlz1 transcription start site. Black bars below for the various deletion constructs are aligned to the indicated restriction enzyme sites, and also labeled on the left with their corresponding names, in which the number indicates the distance in bp from the Crlz1 transcription start site.

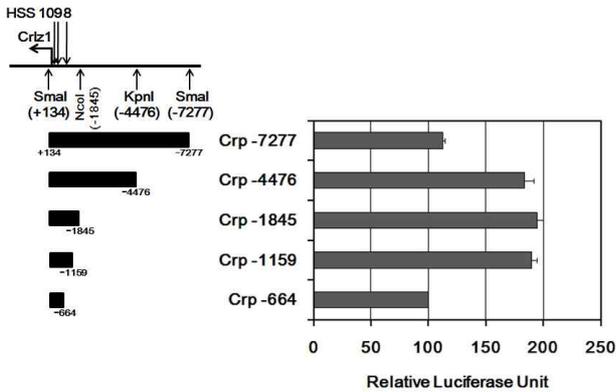


Fig. 3. Transcriptional activities of various deletion constructs as mentioned in Fig. 2 were compared to the one of Crlz1 promoter (Crp-664), which contains HSS9/10 only [13]. The transcriptional activity of this Crp-664 deletion construct was set 100% as a control. The bar graph represents the relative luciferase activity of each deletion construct with an SEM (standard error of the mean) error bar calculated from at least 3 independent duplicate experiments.

사라지면서 Crlz1 promoter로서의 Crp-664 deletion construct가 가지는 전사 활성과 같아 지는 결과를 보여 주었으며, 현재로서는 이러한 결과에 대한 이유를 명확하게 설명하기는 어렵다고 여겨진다.

HSS8의 위치를 더욱 정확히 규명하고자 HSS8 주위에서 두 개의 deletion construct를 더 제작하였고, Crp-1055 (*Eco3I* I construct), Crp-880 (*BseR1* construct)이라고 명명하였다. Fig. 3에서와 마찬가지로 luciferase reporter assay를 수행하기 위하여 Crp-1159, Crp-1055, Crp-880, Crp-664 deletion construct들을 PD36 pre-B 세포주에 transient transfection 시키고 luciferase reporter assay를 수행함으로써 전사 활성을 측정하였다(Fig. 4). 이러한 실험의 결과에서 Crp-1159 construct를 104 bp 더 잘라 낸 Crp-1055 deletion construct로부터는 전사 활성이 감소하여 Crp-664 deletion construct가 가지는 전사 활성과 다시 같아 지는 것을 볼 수 있었다. 이러한 실험 결과를 토대로 분석하여 볼 때 HSS8의 위치가 Crp-1159와 Crp-1055의 사이, 즉 104 bp chromatin DNA 상에 존재할 것임을 예상시켜 주고 있다.

이러한 deletion construct들의 전사 활성을 측정하여 얻은 실험 결과들을 분석하여 예상하게 된 HSS8의 위치를 DNase I hypersensitivity assay를 수행하여서도 증명하고자 PD36 pre-B 세포주를 사용하여 HSS8 주위의 *NdeI* site를 기준으로 하여 DNase I hypersensitivity assay를 다시 수행하였다(Fig. 5). *NdeI* site는 Crp-1159 deletion construct의 5'-end 인 *HindIII* site로부터 아래 쪽, 즉 3' 쪽으로 32 bp 떨어진 곳에 존재하고 있다. *NdeI* 을 사용하여 다시 수행한 DNase I hypersensitivity assay의 Southern blot 결과에서 보듯이 HSS9/10

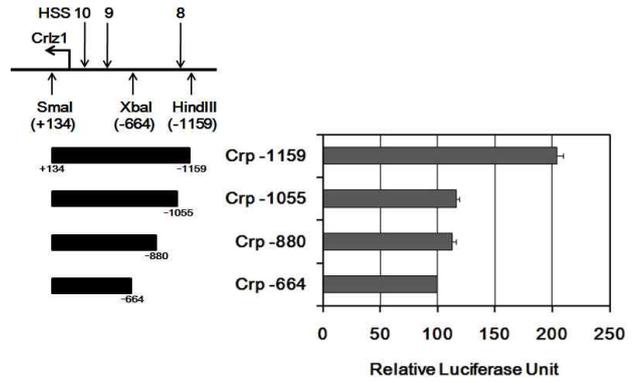


Fig. 4. Transcriptional activities of two additional deletion constructs around HSS8, which are named as Crp-1055 and Crp-880, were compared to the ones of Crp-1159 as well as Crp-664. The transcriptional activity of Crp-664 deletion construct as the Crlz1 promoter was again set 100% as a control. The bar graph represents the relative luciferase activity of each deletion construct with an SEM error bar calculated from at least 3 independent duplicate experiments.

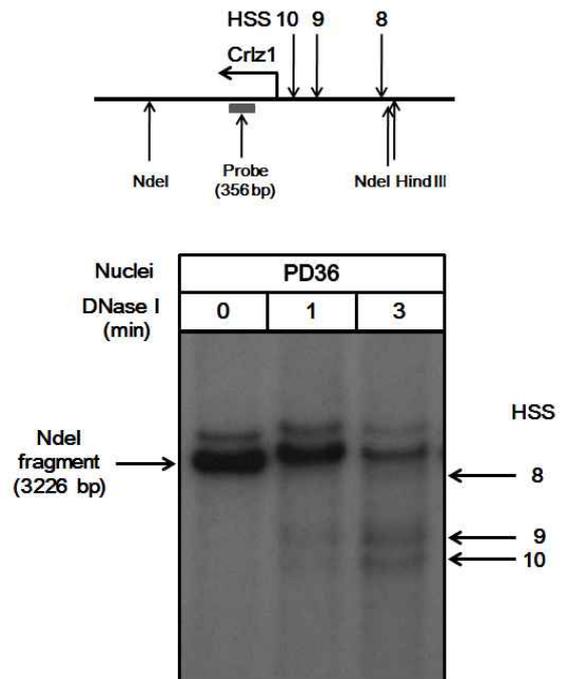


Fig. 5. HSS8, 9, 10 are located to the 3'-side of the first *NdeI* site in the upstream vicinity of Crlz1 promoter as demonstrated by *NdeI* Southern blot analysis of DNase I hypersensitivity assay in PD36 pre-B cells. This first upstream *NdeI* site is located at the 32 bp position of 3'-side of the *HindIII* site, which was utilized to make the Crp-1159 deletion construct.

은 Crlz1 promoter 상에 위치하고 있으며, HSS8은 *NdeI* fragment의 5'-end 바로 안쪽, 따라서 *HindIII* site로부터도 아래

쪽에 위치하고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 위의 Fig. 3과 4에서 보여준 luciferase reporter assay를 통하여 측정된 여러 deletion construct들의 전사 활성 결과와도 잘 부합되고 있었으며, 따라서 HSS8이 HSS9/10 상에 존재하는 Crlz1 promoter의 전사 활성을 더욱 높여 주는 enhancer 역할을 하고 있음을 알 수가 있었다.

HSS8 enhancer는 pre-B 세포에서 Crlz1 유전자의 발현을 더욱 높여 줌으로써 CBF β 의 핵 이동을 촉진시키고[12], 따라서 형성된 Runx/CBF β heterodimer는 VpreB 및 λ 5 등의 표적 유전자를[8,10] 발현시켜서 pre-B 세포의 증식 및 분화를 유도할 것으로 추측하고 있다[3,15].

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부의 제2차 BK21 program의 지원에 의하여 수행되었다.

References

- Alarcón-Riquelme, M. E. 2004. Role of runx in autoimmune diseases linking rheumatoid arthritis, psoriasis and lupus. *Arthritis Res. Ther.* **6**, 169-173.
- Chung, S. Y., Folsom, V. and Wooley, J. 1983. DNase I-hypersensitive sites in the chromatin of immunoglobulin κ light chain genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 2427-2431.
- Herzog, S., Reth, M. and Jumaa, H. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 195-205.
- Hesse, J. E., Lieber, M. R., Gellert, M. and Mizuuchi, K. 1987. Extrachromosomal DNA substrates in pre-B cells undergo inversion or deletion at immunoglobulin V-(D)-J joining signals. *Cell* **49**, 775-783.
- Ito, Y. 2004. Oncogenic potential of the RUNX gene family: Overview. *Oncogene* **23**, 4198-4208.
- Kang, C.-J., Oh, U. and Koshland, M. E. 2000. Dynamic chromatin remodeling in the vicinity of J chain gene for the regulation of two stage-specific genes during B cell differentiation. *Mol. Cells* **10**, 32-37.
- Kang, C.-J., Sheridan, C. and Koshland, M. E. 1998. A stage-specific enhancer of immunoglobulin J chain gene is induced by interleukin-2 in a presecretor B cell stage. *Immunity* **8**, 285-295.
- Kuo, Y.-H., Gerstein, R. M. and Castilla, L. H. 2008. Cbf β -SMMHC impairs differentiation of common lymphoid progenitors and reveals an essential role for RUNX in early B-cell development. *Blood* **111**, 1543-1551.
- Lim, J.-H., Cho, S.-J., Park, S.-K., Kim, J., Cho, D., Lee, W. J. and Kang, C.-J. 2006. Stage-specific expression of two neighboring Crlz1 and Igl genes during B cell development is regulated by their chromatin accessibility and histone acetylation. *J. Immunol.* **177**, 5420-5429.
- Martensson, A., Xie, X.-Q., Persson, C., Holm, M., Grundstrom, T. and Martensson, I.-L. 2001. PEBP2 and c-myb sites crucial for λ 5 core enhancer activity in pre-B cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3165-3174.
- Niles, M. J., Matsuuchi, L. and Koshland, M. E. 1995. Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and non-lymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2884-2888.
- Park, S.-K., Lim, J.-H. and Kang, C.-J. 2009. Crlz1 activates transcription by mobilizing cytoplasmic CBF β into the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta-Gene Regul. Mech.* **1789**, 702-708.
- Park, S.-K., Son, Y. and Kang, C.-J. 2011. A strong promoter activity of pre-B cell stage-specific Crlz1 gene is caused by one distal LEF-1 and multiple proximal Ets sites. *Mol. Cells* **32**, 67-76.
- Sakuma, T., Li, Q.-L., Jin, Y., Choi, L.-W., Kim, E.-G., Ito, K., Ito, Y., Nomura, S. and Bae, S.-C. 2001. Cloning and expression pattern of a novel PEBP2 β -binding protein (charged amino acid rich leucine zipper-1 [Crl-1]) in the mouse. *Mech. Develop.* **104**, 151-154.
- Schlissel, M. 2003. How pre-B cells know when they have it right. *Nat. Immunol.* **4**, 817-819.
- Stein, G. S., Lian, J. B., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Javed, A., Zaidi, S. K., Young, D. W., Choi, J.-Y. and Pockwinse, S. M. 2004. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* **23**, 4315-4329.

초록 : Crlz1 promoter의 상위에 인접한 DNase I hypersensitive site 8의 enhancer 기능

최승영 · 강창중*

(경희대학교 생명과학대학 유전공학과 생명공학원)

Crlz1 유전자는 B 세포 분화 과정 중 pre-B 세포 분화 단계에서 특이적으로 발현됨이 밝혀져 있다. Crlz1 유전자의 발현과 연관되는 3개의 DNase I hypersensitive site (HSS8, 9, 10)가 Crlz1 유전자의 전사 시작점으로부터 바로 위쪽의 chromatin 상에서 발견되었고, 그 중에서 HSS9/10은 Crlz1 promoter 지역에 해당하며 매우 높은 전사 활성을 가지는 것으로 이미 보고 되었다. 본 연구에서는 앞의 연구에서 더 나아가 HSS8이 Crlz1 promoter의 전사 활성을 약 2 배 증가시키는 enhancer의 역할을 하고 있는 현상을 밝혔으며, 또한 HSS8의 위치가 Crlz1 유전자의 전사 시작점을 기준으로 하였을 때 -1055와 -1159 사이, 즉 104 bp 길이의 chromatin DNA 상에 존재하며, 이러한 HSS8의 위치는 luciferase reporter의 활성 측정으로 비교 분석되어진 deletion construct들의 전사 활성에 대한 결과와도 잘 부합되었다.