ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
*Journal of Life Science* **2014** Vol. 24. No. 1. 1~7 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2014.24.1.1

# Promoter Cloning of Human SETDB1 Gene Utilizing Bioinformatic Programs

Hee-Jung Noh and Keun-Cheol Kim*

*Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea*

Received September 23, 2013 / Revised December 30, 2013 / Accepted January 21, 2014

Eukaryotic gene expression is an important process, which is initiated by several transcription factors and RNA polymerases that occupy the promoter region of genomic DNA. Although there are many experiments to identify the promoter region in a gene, it is time and labor consuming to finalize it. In this study, we utilized bioinformatic programs, including Ensembl, NCBI, and CpG plots, to identify the cloning promoter region in SETDB1 genomic DNA. We performed PCR amplification to obtain the SETDB1 promoter on an approximately 2 kb region upstream from the TSS named SETDB1-P1. The PCR product was ligated with TA cloning vectors, and we confirmed the insert size using restriction enzyme digestion. Sequentially, the insert was subcloned into a pGL3-luc vector to produce pGL3-SETDB1- P1-luc and then confirmed by DNA sequencing. We also obtained a fragmented PCR product called P2 and P3 and performed a luciferase assay using pGL3-SETDB1-P1-luc transfection. We found that several anticancer drugs, including taxol, 4-FU, and doxorubicin, decreased the promoter activity of SETDB1. We obtained consistent data on the regulation of SETDB1 gene expression after anticancer drug treatment using Western blot analysis and RT-PCR. Our results suggest that promoter cloning of the human SETDB1 gene utilizing bioinformatics is a very useful and timesaving approach to study gene expression.

**Key words** : Activity, bioinformatics, cloning, promoter, SETDB1

## 서 론

진핵세포의 유전자 발현은 세포 내에서 특정 단백질들이 생산될수 있도록 조절되며, 발생 및 분화과정, 개체 유지, 발병 진행 등을 위해 중요한 기작이다[9, 16]. 진핵세포 유전자 전사(transcription) 과정은 genomic DNA 내 프로모터 부위에 RNA polymerase, 전사 인자들(transcription factors), activator, enhancer, repressor 등과 같은 transcription machinery들이 결합함으로써 진행된다[4]. 전사인자들은 DNA에 직접 작용하거나 RNA 중합효소의 결합력을 변화시켜 전사단계를 조절하는 등 RNA 합성을 증진 시키거나, 감소 시키는 역할을 수행한다[1]. 따라서 유전자 발현을 연구하기 위해 프로모터 부위를 클로닝하여 luciferase 등과 같은 reporter 유전자 활성 등을 분석하는 실험들이 수행되고 있다[10].

그러나 단순히 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 등의 4개 염기 배열로 이루어진 genomic DNA 내의 특정부위를 프로모터라고 단정짓기는 쉽지 않다. 일반적으로 진핵세포의 프로모터는 전사개시점(transcription start site; TSS)으로부터 위쪽에 존재하는 -20 부위 또는 -100 부위에 consensus 서열이 존재하는 것으로 알려져 있으며, GC 염기 서열이 많이 존재하는 특징을 가지고 있기 때문에 프로모터를 예측 할수 있다[12]. Human genome project가 완성됨에 따라 생물정보학(bioinformatics)이 발전하게 되었으며, 유전자 서열에 대한 정확한 정보들이 제공된다[7]. NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 등에서 제시되는 cDNA에 대한 정보는 매우 정확하며, 발현단백질에 대한 정보를 담고 있기 때문에 클로닝 등을 통하여 유전자 발현연구에 이용할 수 있다[14]. 또한 Ensembl (http://www.ensembl.org) 프로그램은 개별 염색체내에 존재하는 유전자의 genomic DNA의 엑손-인트론 경계부위를 제시하고 있기 때문에 프로모터 부위에 대한 정보들을 예측할 수 있다[2].

SETDB1 단백질은 H3K9me3 활성을 나타내며, 여러 전사인자들과 결합을 통하여 heterochromatin 구조 안정화에 기여한다고 알려졌다[11]. SETDB1은 발생과정에서 ES cells의 분화에 필요한 Oct4의 발현을 억제함으로써 발생과정을 조절하는 유전자 발현 조절 단백질이라고 보고되었다[19].

본 연구에서는 다양한 생물정보학 프로그램들을 활용하여 SETDB1 의 프로모터 부위를 동정한후 이를 클로닝하였으며, 활성도를 측정하여 향후 유전자 발현연구에 적용 가능성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 생물정보학 프로그램

NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 또는 Ensembl (www.

*Corresponding author
Tel : +82-33-250-8532, Fax : +82-33-251-3990
E-mail : kckim@kangwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ensembl.org) 프로그램을 이용하여 SETDB1 유전자의 genomic DNA내의 cDNA, 엑손-인트론 서열을 분석하였다. 또한 프로모터에 존재하는 CpG 서열분석은 EMBL-EBI CpG plot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/)을 이용하였다. 전사인자 결합가능성분석은 TFSEARCH (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)를 활용하였다.

### Genomic DNA 추출 및 PCR

genomic DNA 추출은 세포 시료에 500 µl의 DNA 용출완충액(20 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris HCl pH 8.0, 1% sodium dodecyl sulfate, 0.1 M NaCl, 0.5 mg/ml proteinase K)을 가하고 55℃에서 30분간 반응시켰다. 동량의 페놀 클로로포름 이소아밀 알코올(25:24:1, v/v/v)을 첨가한 후 원심분리하여 상층액을 모았고, 이 상층액에 두배의 100% 알코올을 넣고 -20℃에서 8~12시간 침전시켰다. 원심분리하여 침전물을 모은 후 RNA 분해효소가 포함된 멸균된 50 µl의 증류수를 넣어 녹인후 보관하였다. PCR증폭을 위해 OligoTM V6.5 소프트웨어를 이용하여 SETDB1 프로모터 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하였다. SETDB1-P1 (S) 5′-AGGCAGGAGAACTGCTTGAA-3′, SETDB1-P1 (AS) 5′-GAGTTGTGAGTCTGGGGTCT-3′. genomic DNA template는 1~10 ng을 사용하였으며, 10 pM의 primer 쌍들을 넣은 후, 차례대로 1 mM dNTPs, 1 µg BSA와 함께 1 U Pfu Taq DNA polymerase (Hoffman-LaRoche, USA)등을 넣어 25 µl 반응 조건에서 수행되었다. 증폭주기조건은 95℃에서 DNA 변성을 거친 후 62℃에서 annealing한 후 72℃에서 DNA 합성을 수행하였다. PCR은 GeneAmp® 9700을 사용하여 수행하였고, PCR 산물은 브롬산 에티디움(Ethidium Bromide, EtBr)이 포함된 1% 아가로즈젤에 전기영동하여 증폭여부를 확인한 후 깨끗한 염기서열 결과를 위해 젤을 잘라내어 Rapid Gel Extraction Kit (TAKARA, Japan)를 이용하여 정제하였다.

### DNA ligation 및 *E. coli* transformation

PCR 산물과 TA cloning vector를 혼합하여 16℃에서 16시간 동안 반응을 통해 DNA 재조합을 수행하였다. 재조합된 DNA 용액을 42℃에서 반응시킴으로써 *E. coli* XL-1 Blue에 형질 전환을 시켰고, 50 µg/ml의 암피실린 항생제가 포함된 LB 고체배지에 도말하여 형질전환체를 선별하였다. 또한 pGL3-luc vector로의 재조합은 클로닝된 TA vector를 주형으로 하여 제한 효소 자리가 포함된 PCR 프라이머를 합성 제작하여 얻은 PCR 밴드와 16℃에서 16시간 동안 DNA 재조합 반응후 형질전환을 수행하였으며 암피실린 항생제에서 선별과정을 거쳐 형질전환체를 얻었다.

### 플라스미드 추출 및 DNA 염기서열 분석

LB 배지에서 배양된 대장균 형질전환체를 모아 알카리 추출방법을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. *Sol* I 100 µl, *Sol* II 200 µl, *Sol* III 150 µl 차례로 넣은 후 원심분리를 거쳐 페놀 정제를 수행하여 에탄올침전을 수행하였다. 물에 녹인 후 1% agarose gel을 사용하여 전기영동을 수행하였으며, 플라스미드 크기 및 제한 효소 절단 등을 이용하여 클로닝된 플라스미드 DNA를 선별하였다. 클로닝된 플라스미드는 마크로젠사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

### Western blot

항암제를 24시간 처리한 후 얻은 시료에 RIPA 완충액을 넣어 세포를 파쇄한 후 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 단백질 상층액을 얻어 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 BCA Protein Assay kit (PIERCE)를 이용하였다. 단백질이 포함된 상층액 2 µl를 BCA로 발색시켜 bovine serum albumin을 기준으로 해서 분광광도계로 농도를 측정하였다. 단백질 분리를 위해 7%의 Acrylamide이 포함된 gel을 준비하여 SDS-PAGE를 수행 하였다. 각 레인당 100 µg의 단백질 시료를 로딩한후 을 20 mA로 1시간 전기영동 한 다음 PVDF Membrane으로 이동시켰다. 이후 Membrane은 5% Skim milk가 포함된 1X TBST buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 0.5% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking 하였고, 1X TBST 로 10분간 3번 washing한 후, 1% BSA가 포함된 1X TBST에 담겨져 있는 적당한 1차 antibody를 이용하여 3시간 이상 반응시켰다. 다시 TBST buffer로 washing 한 후 2차 antibody가 포함된 1X TBST에서 반응시켰다. ECL 용액(Animal Genetics, Inc., Cat. No. LR01-01)으로 감광시킨 후 암실에서 X-선 필름에 노출시킨 후 인화하였다.

### RT-PCR

항암제를 처리한 세포를 모아 Trizol (Ambion) 시약으로 RNA를 추출하였다. M-MLV Reverse Transcriptase (Enzynomics)와 ramdom hexamer (Enzynomics)를 사용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성하였고, 이를 주형으로 한쌍의 SETDB1 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭조건은 95℃, 45초, 58℃, 45초, 72℃, 45초 총 30 cycle 수행하였다. 실험에 사용된 프라이머들은 다음과 같다. SETDB1 (S) 5′-GCC TGC CAT CAA CTA ACT ATC C-3′, (AS) 5′-CCT GGT CCT TCA AGT CTA CAC C-3′, Actin (S) 5′-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAG GGT-3′, (AS) 5′-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3′

### Transient transfection 및 luciferase assay

RPMI 배지에 10 µl의 lipofectamine2000 (Invitrogen)과 5 µg의 SETDB1 프로모터 부위를 포함하는 pGL3-luc 플라스미드를 혼합한 후 FBS와 항생제가 들어있지 않은 RPMI 배지에서 5시간 굶긴 세포에 넣어주었다. 이후 약 6시간 뒤에 FBS와 항생제가 들어있는 DMEM 배양액으로 갈아주었고, 24시간 더 배양한 후 세포를 모아 luciferase assay를 수행하였다. 세포

를 PBS로 두 번 세척하고 0.4 ml의 reporter lysis buffer (Promega)를 이용하여 용해시켜 cell lysate을 10분 동안 상온에서 둔 후, 4℃, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮겨 실험에 사용하였다. 20 μl의 cell lysate에 20 μl의 luciferase assay 시약(Promega)를 기질(substrate)로 사용하여 luminometer로 측정하였다. 평균 활성도는 3번의 실험결과로부터 평균과 표준편차 값으로부터 분석하였으며, β-galactosidase를 이용하여 luciferase 활성 수치를 보정하는데 사용하였다.

## 결 과

### SETDB1 genomic DNA의 생물정보학 분석

SETDB1 유전자의 프로모터를 동정하고자 Ensembl과 NCBI 등의 생물정보학 프로그램들을 이용하여 SETDB1 cDNA와 genomic DNA 서열을 확인하였다. SETDB1 유전자는 사람의 1번 염색체에 위치하고 있으며, 22개의 exon으로 구성되며, intron 등을 포함하여 약 38,400 bp가 SETDB1 genomic DNA에 해당된다(Fig. 1A). 전사 개시점의 염기서열(TSS; transcription start site, +1)은 구아닌(G)이며, exon2에 단백질 개시코돈인 ATG 서열이 존재한다. exon 22에 단백질 종결코돈을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. SETDB1 단백질은 1291개의 아미노산으로 구성되어 있으며, C-말단 부위에 히스톤 메틸화에 관여하는 SET domain을 포함하며, 단백질 결합에 관여하는 Tudor domain, Methyl CpG DNA binding domain 등을 포함한다(Fig. 1B). 또한 조직에 따라 alternative splicing을 거쳐 10종의 단백질이 만들어질 수 있다고 추정된다. CpG plot 을 이용하여 +1 upstream 방향의 약 2 kb 부위에 대한 CpG 부위를 조사한 결과, 프로모터 부위에 존재하는 것으로 보여지는 CpG 서열이 높은 것으로 보아 SETDB1유전자 발현 과정에서 DNA 메틸화가 중요한 조절 기작일 것으로 추정할 수 있다(Fig. 1C). 따라서 우리는 +1 의 상위 방향 염기서열 약 2 Kb 부위를 SETDB1 프로모터로 동정하였으며, PCR 증폭을 통해 이 부위에 대한 클로닝을 수행 하였다(Fig. 1D).

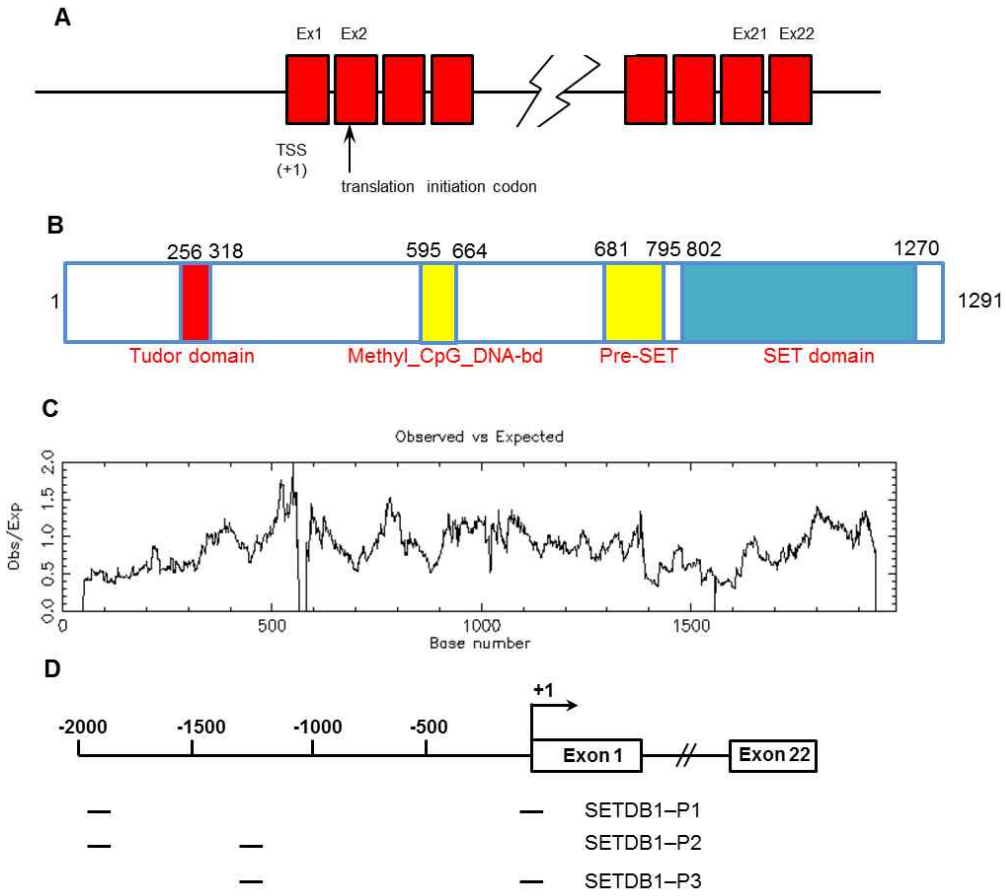


Fig. 1. Bioinformatic analyses on SETDB1 genes. (A) Ensembl program showed that SETDB1 genomic DNA is 38,000 bp in 22 exons and introns. The first DNA sequence is G in exon 1. Coding regions start from exon 2. (B) NCBI program says that SETDB1 protein is consisted of 1291 amino acids. SET domain is implicated in histone methylation activity, whereas Tudor domain or methyl CpG domain is for protein interactions. (C) SETDB1 promoter regions were analyzed with CpG plot. High level of CpG sequence was shown in this region. (D) Priming site was selected for SETDB1 promoter cloning.

### Genomic DNA로부터 SETDB1 프로모터 부위 증폭 및 클로닝

SETDB1 프로모터 클로닝은 두단계로 진행되었다(Fig. 2A). PCR 반응물은 TA cloning vector에 삽입한 후, 이후 제한효소 절단을 통하여 pGL3-luc vector로 subcloning 하고자 하였다. 293세포, IMR90 세포들로부터 genomic DNA를 추출하여 이를 template로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. SETDB1 genomic DNA의 -1980 ~ + 1 region에 해당하는 서열에 대한 PCR 증폭을 위해 프라이머를 제작하였으며, 최적의 annealing 온도를 찾고자 다양한 온도에서 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과 62℃에서는 비특이적 밴드들이 많이 관찰되었으나, 온도를 올렸더니 65℃ 온도에서 약 2 kb의 PCR 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 밴드를 추출하여 TA 클로닝 벡터와 ligation 반응을 수행한 후 *E .coli* transformation을 수행하여 여러 개의 형질전환체들을 얻었다(Fig. 2C). 이를 다시 제한효소자리가 삽입된 프라이머들을 이용하여 PCR 반응을 수행하였으며, pGL3-luc vector와 ligation 반응을 수행한 후 형질전환체들을 얻었다(Fig. 2D). 이후 -1980 ~ -1263 부위와 -1263 ~ + 1의 다양한 부위를 증폭하여 클로닝 하고자 프라이머를 제작하여 PCR 증폭을 수행하였다(Fig. 2E).

### pGL3-SETDB1-luciferase 플라스미드 염기 서열 분석

제작된 PGL3-SETDB1-luc plasmid의 SETDB1 프로모터 염기서열은 마크로젠사에 의뢰하여 분석을 수행하였다. pGL3-luc의 염기서열을 분석하기 위한 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석한 결과 총 1,862 bp의 SETDB1 genomic DNA 염기서열을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 염기서열의 시작과 끝의 밑줄 친 대문자부분이 클로닝에 사용된 프라이머 서열이고, 또한 Fig. 4의 소문자 부분은 SETDB1 +1의 upstream 염기서열을 의미하며, 아래의 대문자부분으로 표시된 염기서열은 엑손 1번 부위에 해당한다. 우리가 클로닝한 SETDB1프로모터 염기서열은 NCBI에서 제공하는 RefSeq와 99% 이상 일치하며, 1059(A→G), 1496(T→C)와 같이 일부 염기서열에서 전이가 있음을 확인하였다. 이러한 염기서열의 전이는 단백질 정보를 담고 있는 coding 부분 이외에서 일어나는 일반적인 현상으로 여겨진다. 한편 TFSEARCH (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)에 해당 염기서열을 분석한 결과 TSS 의 upstream 1 kb 내의 SETDB1 프로모터 부위에는 E2F, SRY, p300/CBP, GATA, Sp1, p53 등과 같은 전사조절인자들이 결합할 가능성이 있다고 추정되었다.

### 항암제에 의한 SETDB1 발현 분석

SETDB1은 항암과정에서 발현 감소가 나타나는 메틸화 효소중 하나이다[11]. 따라서 제작된SETDB1 프로모터가 항암제를 처리하였을 때 luciferase 활성도의 변화가 있는지를 조사하고자, H1299 사람 폐암세포주에 pGL3-SETDB1-P1-luc vec-

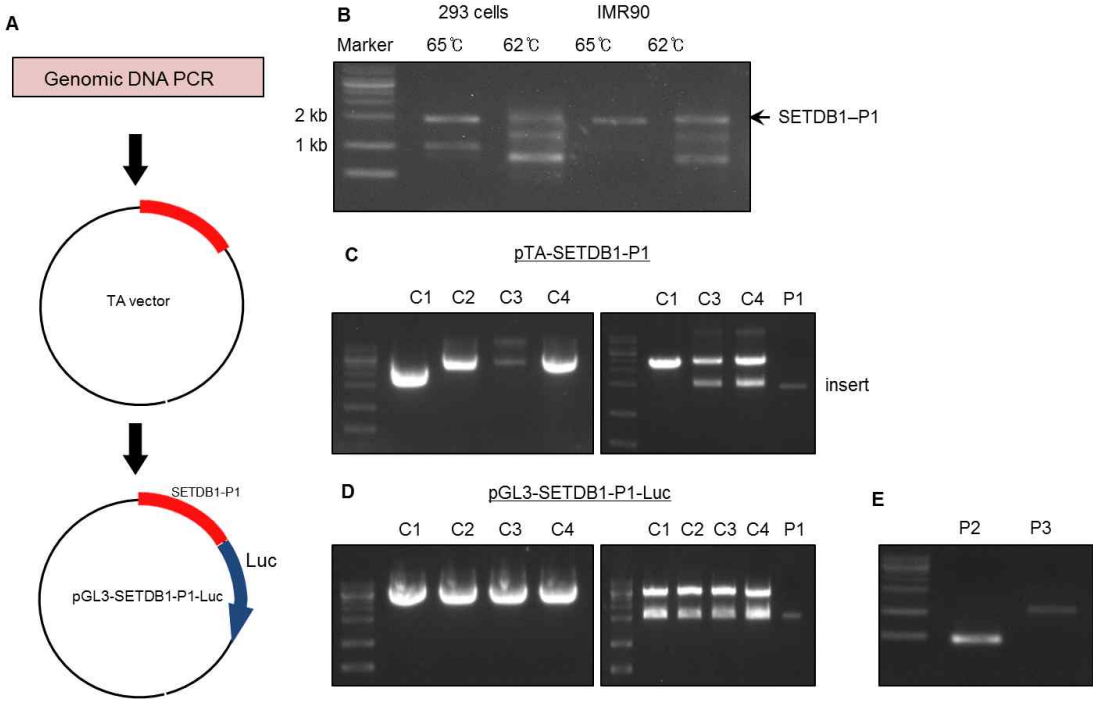


Fig. 2. Genomic DNA PCR and cloning. (A) Two step subcloning is performed to make SETDB1 promoter construct. (B) PCR amplification is performed at several annealing temperature. using genomic DNA extracted from IMR or 293 cells. (C) PCR product was ligated with TA vector and selected for positive clones. (D) SETDB1-P1 insert was subcloned into pGL3-luc vector. (E) Two deletion mutants were amplified with specific primer sets.

**AGGCAGGAGAACTGCTTGAA**cccgggaggtggaggttgcagtgagccgagatcgcaccat
tgcactccagcttgggtgacaagagcgaaactcagtctcaaaaacaaacaaacaaacaaa
aaaaggaaggctcggcgcagtggctcacacctgtatgtaatcccagcactttgggaggcc
gaggtgtgacgaggccagcctggctaacacggtgaaaccccgtctctactaaaaatacaa
aaaattaggcgggcgtggtggcacgcgcctgtagtcccagctactcggaaggacgagcca
ggagaatcgcttgaacccgggaggtggaggttgcagtgagccaagatcgcgccattgcac
tccagcctgggcgatagaacgaaacgccttctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaag
gaaaaaagcacatattatttttactcaaattccattttgggaaatcttttcttttttgtttt
ttgttttgttttgtttttgagacggagtctcgctcggtcacttaggctggagtgcagtgg
cgcgatctcctctcactgaagcctctgccaccggggctcaagcgatcctccccccgcctc
agctgcggagttgctgggaccacagacgcgaactaccacgcctggctttttttttttttt
ttttaccttgtatttttagtcgagatggcgtttcgccgtgttgcccaggctggtctggaa
ctcctgggctctagcaatcctcccgcctcggacacaaagcgcccggcctggggaatcttt
tctacagaaataaaagtactacttcaaaaggatgtttatttttattgttgcgctatttgt
cggggctgagaacggaaaacaatctaaacaatctaaactattcaggtgtcaaaaatacaa
gttattggtttttttgttttttttgttttttttggttttttttgagacggagtctcgctctgt
cgcccaggctggagtgcagtggcgcgatctccgctcaccgcaagcaccgcctcccgggtt
cacgccattctcctgcctcagcctcccgagtagctgggGctacaggcgcccgccaccacg
cccggctaacatttttagtacagacggggtttcaccgtgttagccaggatgatctccatc
tcctgacctcgtgatccgcccgcctctgactcccaaagtgctgggattacaggcgtgagc
taccgcgcccggccaaaaatacaagttttacctttttttattggcttcaggtaatgtccac
atgttaaatgaaaacaacaaaaatccaaatacagaaactcgtacatacaagactggaaaa
tgaagctgtattacctgaaaggagcggagtggtgatggggcaagagagaatattatcacg
tttttcttattacatcttgatagcctttacaatttgtatcacttatgtaacaaaacaaac
tcaagtaaaactgagagaataaagctctgaacctatgagcgtttcccCaagtctttacac
aatgaatatagtaatggggccactagtcgagggtggtaggagcggcggagactcggtaat
atactggccacgcctactctgccctgccagtctcttctcacgtgtgcccctggaaggctc
tgccttaacgcatgcgtagttaccttagttttcgtcgcctctgaggggcgccccgcggct
Ttggatttgaccccgtcaggctaccgtcgcggtgaccggaac
GGCACTAAAGGTTTGCTTCCGGGCGTTTCTTTTGCTTCCCCTTCCCTCTTTCACGCTTCC
TCCCCTCCCCCTCCTCCCTTATCCCTTCGCTTTCGCTCTTTTCCGTCGAGGCCGACCC**CT**
**GAGTTGTGAGTCTGGGGTCT**

Fig. 3. DNA sequencing of Cloned SETDB1 promoter region. We performed sequencing analysis after cloning of pGL3-SETDB1-luc vector. SETDB1 promoter region (1,862 bp) was sequenced using specific primers in pGL3-luc vector for sequencing analysis.

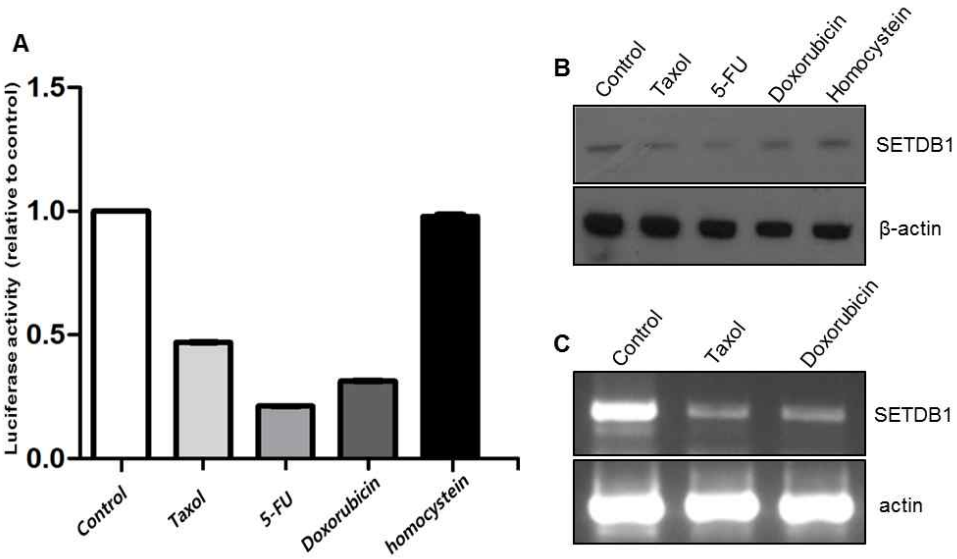


Fig. 4. Regulation of SETDB1 promoter activity by various anticancer drugs. (A) pGL3-SETDB1-P1-luc vector was transfected into H1299 human lung cancer cells, and then treated with various anticancer drugs. Luciferase activity was decreased in treatment of taxol, 5-FU, or doxorubicin, whereas was no changed in treatment of homocystein. (B) Western blot analysis was shown consistent data with luciferase activity. (C) RT-PCR analysis showed that SETDB1 gene expression was repressed by taxol and doxorubicin treatment.

tor를 transfection 한 후 luciferase 분석을 수행하였다. 그 결과 taxol, 5-FU, doxorubicin 등의 처리한 실험군에서 luciferase 활성도가 현저히 감소된 것을 확인할 수 있었으며, homocystein 처리군에서는 큰 영향은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 4A). 이러한 SETDB1 발현 감소 경향은 항암제들을 처리한 후 SETDB1 단백질의 발현 양상을 비교하였을 때도 일치되는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4B). 한편 taxol, doxorubicin 등의 항암제를 처리하여 RT-PCR를 수행한 결과 SETDB1의 발현이 RNA 수준에서도 감소한다는 사실을 확인하였다(Fig. 4C). 그러므로 생물정보학 프로그램을 이용하여 제작된 SETDB1 프로모터는 유전자발현 연구 등에 적절하게 이용될 수 있다고 사료된다.

## 고 찰

SETDB1 단백질은 DNA 메틸화 효소(DNMTs), 히스톤 탈아세틸효소(HDACs), TRIM28/KAP-1 등의 단백질결합을 통하여 유전자 발현 조절기능을 수행한다[6, 18]. 또한 SETDB1 은DNA 복제 과정에서 염색체 조립을 조절하며, SETDB1 KO 쥐는 발생과정에서 정상적인 발생이 진행되지 않기 때문에 발생단계를 조절하는 중요한 유전자로 밝혀지고 있다[5, 13]. 최근에는 흑색종과 관련된 BRAF 유전자와의 상호작용을 통하여 흑색종양 발병에 중요한 인자라고 보고된다[3].

유전자의 프로모터를 동정하기 위한 실험방법으로는 primer extension, S1 nuclease mapping 등이 사용 되어져 왔지만, 연구자들의 집중된 노동력과 많은 실험 시간들이 요구된다[15]. 그러나 본 연구는 유전자의 염기서열 정보 정확도가 높은 생물정보학 프로그램을 이용하여 히스톤 메틸화를 담당하는 SETDB1 유전자의 genomic DNA를 분석하고, 프로모터로 추정되는 염기서열 정보를 동정한후 이를 클로닝하여 활성도를 측정하고자 하였다. 그러므로 관련 프로그램을 잘 활용한다면, 유전자 발현 연구를 수행하는데 활용도가 높아질 것이다. 본 연구에서 사용된 Ensembl과 NCBI의 염기서열 정보들은 꾸준히 업그레이드되고 있으며, 분자 생물학 관련 연구자들 사이에서 활용도가 점점 증대되고 있는 실정이다. 따라서 이들 프로그램을 이용하여 SETDB1의 cDNA, 단백질 정보를 분석은 이제는 보편화되었다. 최근에는 유전자의 genomic DNA 서열에 대한 정확한 자료가 제시되며, promoter 동정 등에 필요한 유전자의 엑손-인트론 서열정보를 쉽게 동정할 수 있다. 또한 CpG plot을 이용하여 CpG 부위를 조사하는 것은 프로모터 부위를 예측하는데 유용한 프로그램이며, 프로모터의 메틸화와 관련이 있기 때문에 많이 활용되고 있는 실정이다. 암발병 과정에서 암억제 유전자인 p16의 발현이 DNA 메틸화로 발현이 억제된다고 알려져 있으며, CpG plot에서 이러한 염기서열의 특징을 쉽게 확인할 수 있다[8]. 또한 히스톤 메틸화 효소 중 RIZ1의 프로모터에서 메틸화가 유전자 발현 조절을 위해 중요하다는 보고도 있다[17]. 그러므로 프로모터 부위의 CpG 동정은 프로모터를 동정하는데 중요할 뿐 아니라, 발현조절기작을 예측하는데도 매우 중요한 분석법으로 사료된다.

최근 epigenetic drug인 DZNep이 SETDB1 유전자의 발현을 조절하는 것으로 보고되었다[10]. 몇 종의 항암제는 SETDB1의 발현에 영향을 미치는 것으로 추정된다. taxol, doxorubicin, 5-FU 주로 DNA damaging agents이며 이들은 아마도 항암과정에서 DNA fragmentation 등을 유도하기 위해 핵 내 물리적 구조인 chromatin의 해체 등을 위해 SETDB1의 발현을 조절하는 것으로 여겨진다. 항암제들에 의한 단백질 발현조절은 클로닝된 SETDB1 프로모터 활성도와 일치하는 현상을 확인할 수 있었다.

결과적으로 본 연구에서 사용된 Eensembl, NCBI, CpG plot 프로그램 등을 사용하여 SETDB1 등의 유전자 프로모터 동정은 luciferase 분석을 통한 확인 작업에서도 매우 효과적인 것으로 나타났으며, 이러한 생물정보학 프로그램을 통한 프로모터 동정 및 클로닝을 다른 유전자들에도 적용시킨다면, 유전자 발현 연구에 매우 유용할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년 강원대학교 기본연구비 지원사업에 의해 진행되었음.

## References

1. Barrero, M. J. and Malik, S. 2012. The RNA polymerase II transcriptional machinery and its epigenetic context. *Subcell Biochem* **61,** 237-259.
2. Bonizzoni, P., Rizzi, R. and Pesole, G. 2005. ASPIC: a novel method to predict the exon-intron structure of a gene that is optimally compatible to a set of transcript sequences. *BMC Bioinformatics* **6,** 244.
3. Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J., Ferre, F., Bourque, C., Burke, C. J., Turner, L., Uong, A., Johnson, L. A., Beroukhim, R., Mermel, C. H., Loda, M., Ait-Si-Ali, S., Garraway, L. A., Young R. A. and Zon, L. I. 2011. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* **471,** 513-517.
4. Chatterjee, R. and Vinson, C. 2012. CpG methylation recruits sequence specific transcription factors essential for tissue specific gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1819,** 763-770.
5. Cho, S., Park, J. S., Kwon, S. and Kang, Y. K. 2012. Dynamics of Setdb1 expression in early mouse development. *Gene Expr Patterns* **12,** 213-218.
6. Hashimoto, H., Vertino, P. M. and Cheng, X. 2010. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation.

*Epigenomics* **2,** 657-669.
7. Hwang, Y. C., Zheng, Q., Gregory, B. D. and Wang, L. S. 2013. High-throughput identification of long-range regulatory elements and their target promoters in the human genome. *Nucleic Acids Res* **41,** 4835-4846.
8. Kang, S., Kim, J., Kim, H. B., Shim, J. W., Nam, E., Kim, S. H., Ahn, H. J., Choi, Y. P., Ding, B., Song, K. and Cho, N. H. 2006. Methylation of p16INK4a is a non-rare event in cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Mol Pathol* **15,** 74-82.
9. Kim, W., Kim, M. and Jho, E. H. 2013. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J* **450,** 9-21.
10. Lee, J. K. and Kim, K. C. 2013. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **438,** 647-652.
11. Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y. and Almouzni, G. 2009. The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* **10,** 769-775.
12. Martinho, A., Santos, C. R. and Goncalves, I. 2013. A distal estrogen responsive element upstream the cap site of human transthyretin gene is an enhancer-like element upon ERalpha and/or ERbeta transactivation. *Gene* **527,** 469-476.
13. Mund, A., Schubert, T., Staege, H., Kinkley, S., Reumann, K., Kriegs, M., Fritsch, L., Battisti, V., Ait-Si-Ali, S., Hoffbeck, A. S., Soutoglou, E. and Will, H. 2012. SPOC1 modulates DNA repair by regulating key determinants of chromatin compaction and DNA damage response. *Nucleic Acids Res* **40,** 11363-11379.
14. NCBI Resource Coordinators. 2013. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **41,** D8-D20.
15. Paramasivam, M., Cogoi, S. and Xodo, L. E. 2011. Primer extension reactions as a tool to uncover folding motifs within complex G-rich sequences: analysis of the human KRAS NHE. *Chem Commun (Camb)* **47,** 4965-4967.
16. Park, J. A. and Kim, K. C. 2010. Expression patterns of PRDM10 during mouse embryonic development. *BMB Rep* **43,** 29-33.
17. Piao, G. H., Piao, W. H., He, Y., Zhang, H. H., Wang, G. Q. and Piao, Z. 2008. Hyper-methylation of RIZ1 tumor suppressor gene is involved in the early tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol* **23,** 1171-1175.
18. Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G. and Rauscher 3rd, F. J. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* **16,** 919-932.
19. Yuan, P., Han, J., Guo, G., Orlov, Y. L., Huss, M., Loh, Y. H., Yaw, L. P., Robson, P., Lim, B. and Ng, H. H. 2009. Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes Dev* **23,** 2507-2520.

---

## 초록 : 생물정보 프로그램을 활용한 SETDB1 유전자 프로모터 클로닝

노희정 · 김근철*
(강원대학교 자연과학대학 생명과학과)

진핵세포의 유전자 발현은 genomic DNA 부위의 프로모터라고 불리우는 지역에 전사인자와 RNA 중합효소가 자리하면서 시작되는 기작이다. 유전자 내의 프로모터를 동정하는 여러종류의 실험 방법들이 있지만, 많은 시간과 노동력이 요구되어진다. 본 연구에서는 Ensembl, NCBI, CpG plot 등과 같은 생물정보학 관련 프로그램들을 활용하여 SETDB1 유전자의 프로모터를 동정하여 클로닝하고자 하였다. PCR 증폭을 수행한 후 얻은 약 2 kb DNA 조각을 SETDB1-P1이라 명명하였으며, PCR 산물은 TA 벡터로 클로닝 후 확인하였으며, 이를 다시 제한 효소 절단을 통하여 pGL3-luc 벡터로 클로닝하였다. 클로닝된 pGL3-SETDB1-P1-luc 플라스미드를 H1299 폐암세포주에 transfection 시킨 후 여러 가지 항암제를 처리하였을 때, taxol, 5-FU, doxorubicin 처리군에서 SETDB1 프로모터 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 실험을 통해 항암제 처리 후 SETDB1 유전자 발현이 조절됨을 확인하였다. 그러므로 bioinformatics 프로그램을 통한 프로모터 동정 및 클로닝 방법을 다른 유전자들에도 적용시킨다면, 유전자 발현 연구에 매우 유용할 것으로 사료된다.