

Cloning and Activity Analysis of the FosB Promoter Region from Human Genomic DNA

Han-Heom Na¹, Yoonsung Kang² and Keun-Cheol Kim^{1*}

¹Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

²Institute for Diagnostic Markers, Eudipia Inc, Osong 28160, Korea

Received November 17, 2016 / Revised February 6, 2017 / Accepted March 13, 2017

The FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FosB) gene is located at chromosome 19, and encodes 43 Kda protein. Functionally, the FosB gene is important for differentiation, development, and pathogenesis. Furthermore, the FosB gene is suggested as possible biomarker for tracing disease prognosis. In this study, we constructed plasmid containing a FosB promoter region and evaluate its promoter activity. We analyzed the putative promoter region in FosB genomic DNA using bioinformatics program, and we found important regulatory elements in 1 Kb upstream from transcription start site (TSS). Therefore, we performed polymerase chain reaction (PCR) amplification on region from -1,555 upstream to +73 of the FosB genomic DNA, and PCR product was inserted into TA vector to create the TA-1stFosBp plasmid. We then prepared the primer sets, which contain a restriction enzyme site for Kpn1 and Nhe1, in order to reinsert into the TA vector to prepare TA-2ndFosBp plasmid. It was finally subcloned into pGL3-luc vector after enzyme cutting. To evaluate whether the cloned plasmid is useful in cell based experiment, we performed luciferase assay with pGL3-FosBp-luc transfection. FosB promoter activity was increased compared to empty vector, and this activity was significantly increased by treatment of doxorubicin and taxol. We obtained consistent data on regulation of FosB gene expression after anticancer drug treatment using Western blot analysis. The results suggest that promoter cloning of the human FosB gene is very useful for studying gene expression and analyzing biomarkers.

Key words : Activity, biomarkers, cloning, FosB, promoter

서 론

유전자 클로닝은 필요한 단백질을 발현시켜 특성을 조사하는데 널리 이용되고 있다. 목적에 따라 다양한 클로닝 전략이 있겠지만, 유전자의 프로모터 지역을 LacZ 또는 luciferase 등의 reporter 유전자에 결합시켜 효소 활성도를 측정하는 실험 방법은 유전자 발현 조절 기작을 조사하는데 정확도가 높기 때문에 매우 유용하다[4]. Reporter 분석을 위하여, 바이오인포매틱스 관련 사이트에서 해당 유전자에 대한 DNA 정보를 분석한 후, 유전자의 프로모터 지역에 대한 genomic DNA를 선별하여 클로닝하는 과정이 선행되어야 한다.

FosB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B) 유전자는 Fos family에 속하는 유전자로 약 43 KDa의 단백질을 코딩한다[7]. Fos family에 속하는 모든 유전자들은 Jun family와 결합하여 AP-1 전사인자를 형성할 수 있다[9]. AP-1

전사인자의 활성 증가는 세포내에서 특정 단백질들이 생산될 수 있도록 표적유전자에 대한 전사를 조절할 수 있으며, 발생 및 분화과정, 개체 유지, 발병 진행 등을 위해 중요한 기작이다 [16, 23]. FosB 단백질에 대한 연구는 신경계통 질환 등에서 그 기능에 대한 많은 보고들이 있으며, 외부자극, 또는 환경적 변화, 특히 신경중심계(CNS; Central Nerve System)에서 고통 등을 조절하는 다양한 신호전달 기작에 의해 발현이 급격하게 증가된다고 알려져 있다[8]. 특히 FosB의 C 말단 부위 101개 아미노산이 제거된 ΔFosB는 약제남용, 우울증 치료, 스트레스 적응 등을 매개하는 중요한 전사인자라고 알려져 왔다[25]. ΔFosB는 truncated splicing variants 이지만, AP-1 전사인자를 형성할 수 있는 dimerization 영역과 DNA binding 영역을 가지고 있기 때문에, 고유한 유전자 발현조절 능력을 가지고 있다[6, 22]. 어떤 기작에 의해 ΔFosB가 형성되는지에 대한 보고는 아직 없지만, ΔfosB단백질이 합성되고 일어날 수 있는 단백질 번역 후 변형(posttranslational modifications)으로 인하여, ΔFosB의 반감기는 엄청나게 증가될 수 있다는 보고도 있다[5, 19]. 그러므로 FosB, 또는 ΔFosB는 여러 신호전달 자극에 의해 발현이 조절되는 유전자 산물이며, AP-1 전사인자로서 표적 유전자들의 발현 조절능력을 통해, 기능을 수행하는 중요한 단백질일 것이다.

한편, 자극전달과정에서 FosB 발현을 조절하는 신호전달체

*Corresponding author

Tel : +82-33-250-8532, Fax : +82-33-259-5665

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.

계에 대해서도 어느 정도 알려져 있다. 항암제 처리에 의해 SETDB1 HMTase는 전사수준에서 감소하게 되는데, SETDB1 단백질의 감소로 FosB의 발현이 증가한다고 보고된 바 있다 [14]. 이렇게 발현이 증가한 FosB는 암전이 등에서 중요한 역할을 한다고 알려진 MMP9 유전자의 발현을 조절한다[13]. 최근에는, antimicrobial peptide 처리로 인해 발현이 증가하는 FosB는 TNBC (triple negative breast cancer)의 세포 사멸을 유도한다고 보고 되기도 하였는데, 이러한 사실은 FosB가 drug 반응에 대한 중요한 바이오 마커로 제안 될 수도 있을 것이다[17].

본 연구에서는 생물정보학 프로그램들을 활용하여 FosB의 프로모터 부위를 동정한 후, 이를 클로닝하고자 하였으며, 항암제 처리에 따른 활성도를 측정하여 향후 바이오 마커 분석 등에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

FosB 유전자 프로모터 분석

FosB 유전자에 대한 cDNA, genomic DNA내의 엑손-인트론 서열 분석을 위해, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 또는 Ensembl (www.ensembl.org) 프로그램을 이용 하였다. 또한 프로모터 지역의 CpG 서열분석은 EMBL-EBI CpG plot (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/>)을 이용하였다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출을 위해 배양중인 IMR90 세포들을 모아 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°C에서 30분간 반응시켰다. 동량의 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올(25:24:1, v/v/v)을 첨가한 후, 원심분리를 통하여 상층액을 얻어, 두배의 100% 알코올을 넣고 -20°C에서 침전시켰다. 다음날, 원심분리를 수행한 후 얻은 침전물에 대해 증류수에 녹여 보관하였다.

TA벡터 클로닝을 위한 1st PCR 및 2nd PCR

OligoTM V6.5 소프트웨어를 이용하여, FosB 프로모터를 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 제작하였다. Genomic DNA로부터 FosB 프로모터를 증폭하기 위해 1st PCR의 경우 1stFosBp-S1: 5'-GAGCAGTAAGAAGGAGATTGTA-3', 1stFosBp-AS1 5'-CTTGAAACTTGATTGTTGTGG-3'를 합성하여 사용하였다. Genomic DNA template 는 1~10 ng을 사용하였으며, primer 쌍들을 넣은 후, 1 mM dNTPs, 1 µg BSA와 함께 1 U Taq DNA polymerase (Biosolution, Korea)등을 넣어 25 µl 반응 조건에서 수행되었다. 제작된 TA-1stFosBp 플라스미드로부터 2nd PCR을 위해 제한 효소 자리가 첨가된 2ndFosBp-Kpn1 S1 5'-AGGTACCGAGCAGTAAGAAGGAGATTGTA-

3', 2ndFosBp-Nhe1 AS1 5'-AGCTAGCCACAACAATCAAGTTTCCAAG-3'을 사용하여 증폭하였다. PCR 산물은 브롬산 에티디움(Ethidium Bromide, EtBr)이 포함된 아가로즈젤에 전기영동하여 증폭여부를 확인 하였고, 젤을 잘라내어 rapid gel extraction kit (TAKARA, Japan)를 이용하여 정제하였다. TA-2ndFosBp 플라스미드로부터 제한효소를 이용하여 FosBp를 절단하여 pGL3-luc vector와 재조합을 통해 최종 클로닝을 수행하였다.

E. coli transformation

각 단계에서 증폭된 PCR 산물과 클로닝 플라스미드를 혼합하여 16°C에서 16시간 반응시켜 DNA 재조합을 수행하였다. 재조합된 DNA 용액을 42°C에서 반응시킴으로써 E. coli XL-1 Blue에 형질 전환 시켰고, 50 µg/ml의 앵피실린 항생제가 포함된 LB 고체배지에 도말 하여 형질 전환체를 선별하였다.

플라스미드 추출

LB 배지에서 배양된 대장균 형질전환체를 모아 알칼리 추출방법을 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. Sol I 100 µl, Sol II 200 µl, Sol III 150 µl를 차례로 넣은 후 원심분리를 거쳐 페놀 정제를 수행하여 에탄올 침전을 수행하였다. 물에 녹인 후 1% agarose gel을 사용하여 전기 영동을 수행하였으며, 플라스미드 크기 및 제한 효소 절단 등을 이용하여 클로닝된 플라스미드 DNA를 선별하였다.

Transient transfection 및 luciferase 분석

배양중인 A549 세포를 일정시간 굶긴 후, 10 µl의 lipofectamine2000 (Invitrogen, USA) 과 5 µg의 pGL3-FosBp-luc 플라스미드를 혼합하여 넣어주었다. 이후 약 6시간 뒤에 FBS와 항생제가 들어있는 DMEM 배양액으로 갈아주었고, 12시간 더 배양하고, doxorubicin 또는 taxol등의 항암제를 12시간 처리한 후, luciferase assay를 수행하였다. Luciferase assay 는 0.4 ml의 reporter lysis buffer (Promega, USA)를 이용하여 용해시킨 후, 이중 20 µl의 cell lysate와 20 µl의 luciferase assay 시약을 기질(substrate)로 사용하여 luminometer로 측정하였다. 평균 활성도는 3번의 실험결과로부터 평균과 표준편차 값으로부터 분석하였으며, β-galactosidase를 이용하여 luciferase 활성 수치를 보정하여 사용하였다.

Western blot

A549 세포에 doxorubicin 또는 taxol 항암제를 24시간 처리한 후, 얻은 시료에 RIPA 완충액을 넣어 세포를 파쇄하였고, 12,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 단백질 상층액을 얻어 사용하였다. 단백질의 농도 측정은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하였다. 단백질이 포함된 상층액 2 µl를 BCA로 발색시켜 bovine serum albumin을 기준으로

로 해서 분광광도계로 농도를 측정하였다. 단백질 분리를 위해 12%의 acrylamide이 포함된 젤을 준비하여 전기영동을 수행 하였다. 단백질 시료를 로딩한 후, 20 mA로 1시간 전기영동한 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 blocking하였고, 1X TBST로 10분간 3번 washing 한 후, 1% BSA가 포함된 1X TBST 에 담겨져 있는 1차 FosB antibody (Santa Cruz, USA)를 이용하여 3시간 이상 반응시켰다. 다시 TBST buffer로 washing 한 후 2차 antibody가 포함된 1X TBST에서 반응시켰다. ECL 용액(Animal Genetics, Inc. Korea)으로 감광시킨 후 암실에서 X-선 필름에 노출시킨 후 인화하였다.

결 과

FosB genomic DNA 분석

FosB 유전자의 프로모터를 동정하고자 Ensembl 프로그램들을 이용하여 FosB genomic DNA 서열을 확인하였다. FosB 유전자는 사람의 19번 염색체에 위치하고 있으며, 세포에 따라 다양한 variants 들이 발현된다고 보고되어 있다[12]. 이중 FosB transcription variant 1은 4 exons으로부터 338개의 아미노산으로 구성된 단백질을 생산할수 있다. 그러나 alternative splicing으로 약 100 여개의 아미노산이 제거된 ΔFosB단백질도 존재한다고 알려져 있다[15]. 전사 개시점의 염기서열(TSS; transcription start site, +1)은 시토신(C)이며, exon 1의 593번째 염기부터는 단백질 개시코돈인 ATG 서열이 존재한다

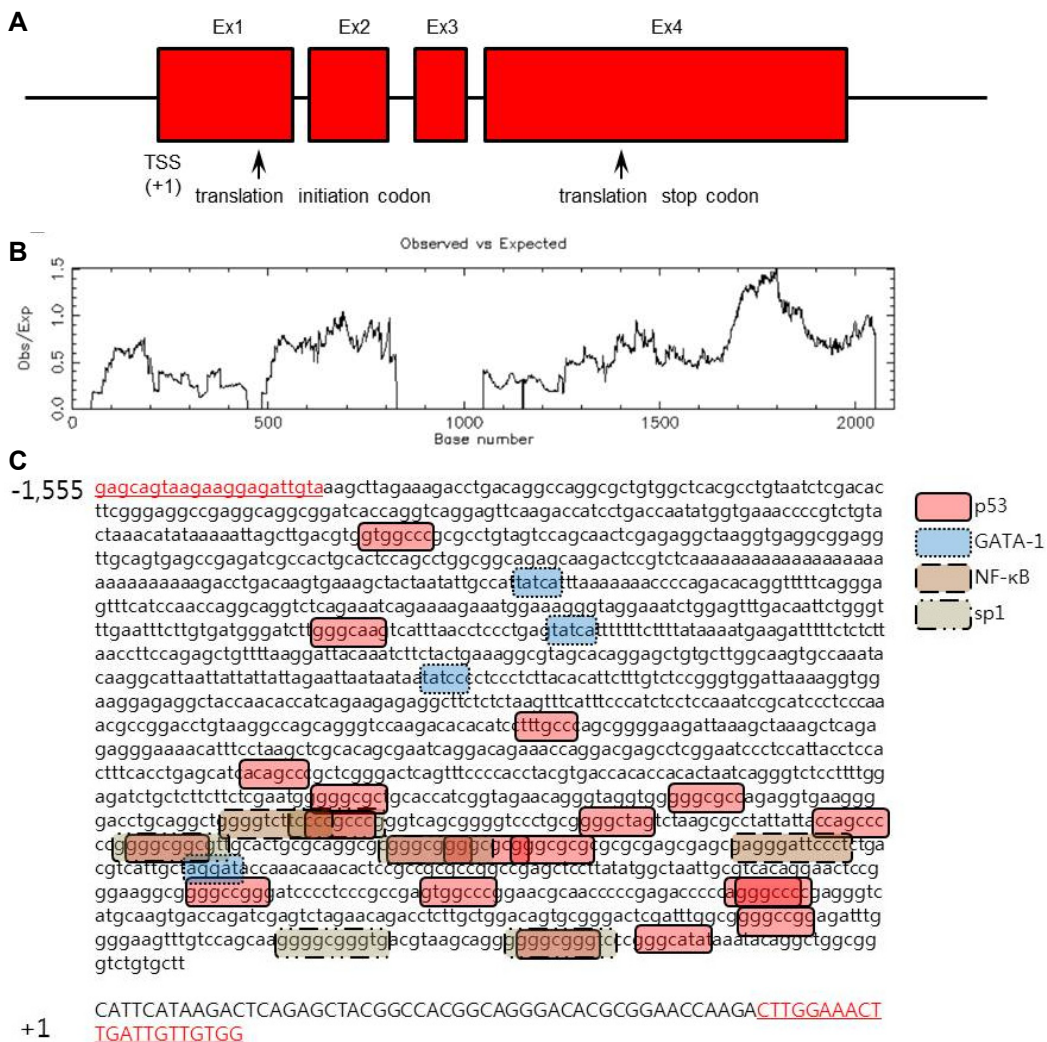


Fig. 1. Analyses on promoter region in FosB genomic DNA. (A) FosB gene is consisted of 4 exons and translation initiation codon is in the exon 1. (B) 2 Kb of FosB promoter regions were analyzed with CpG plot. High level of CpG sequence was shown in the proximal region near TSS site. (C) FosB genomic DNA was analyzed from Refseq. Upstream region of FosB exon 1 was predicted as FosB promoter region. It was shown that many cis-elements bind to these regions of FosB genomic DNA. Primer set was prepared for PCR amplification.

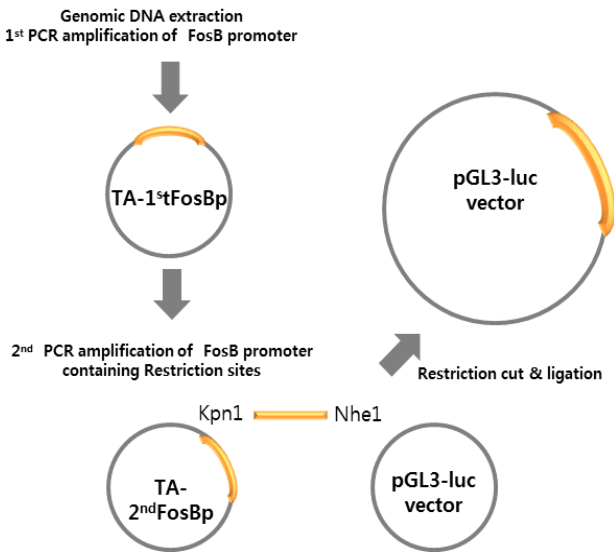


Fig. 2. Strategy for FosB promoter cloning. Genomic DNA is extracted from normal IMR90 cells. The first PCR amplification was performed with the extracted genomic DNA, and then the PCR product was cloned into TA cloning vector to produce TA-1stFosBp plasmid. The second PCR amplification was performed using TA-1stFosBp plasmid as a template, and then it was cloned into TA vector again to prepare TA-2ndFosBp plasmid. After TA-2ndFosBp plasmid was cutted with Kpn1 and Nhe1 restriction enzymes, and finally ligated in to pGL3-luc vector.

(Fig. 1A). 또한 Exon 4의 459 번째 염기부터는 단백질 종결코돈(TGA)를 포함하고 있는 것으로 확인되었다. TSS upstream 방향으로 약 2 Kb 부위에는 다양한 전사인자들이 결합하는 것으로 추정되며, 이중 약 -300 bp 근처에 높은 CpG 빈도가 있음을 알 수 있었다. 이러한 genomic DNA의 구조적인 특징은 FosB 유전자는 DNA 메틸화 등에 의해 발현이 조절 되어질 수 있다는 것으로 예상할 수 있다(Fig. 1B). 특히, 1 Kb upstream 부위에는 약 20여개의 p53 결합 부위가 존재할 수 있을 것으로 분석되어지며, GATA-1, NF-kB, sp1 등과 같은 주요 전사 인자들이 결합할 수 있는 부위도 다수 존재하는 것으로 확인 되었다. 그러므로 우리는 이 부위를 포함하여 FosB genomic DNA의 upstream -1,555 부위부터 exon 1의 +73 까지 약 1.6 kb의 FosB 프로모터 부위를 동정하고자 하였다(Fig. 1C).

FosB 프로모터 클로닝

FosB 프로모터부위를 pGL3-luc vector로 클로닝하기 위해 우선적으로 TA 벡터로 삽입하고자 하였다(Fig. 2). 정상세포인 IMR90 세포로부터 genomic DNA를 추출한 후, 이를 template로 이용하여 FosB 프로모터 부위에 대한 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응물은 TA 벡터에 삽입한 후 TA-1stFosBp 플라

스미드라 명명하였다. 다시TA-1stFosBp 플라스미드를 template로 2차 PCR을 수행하였다. 이때 2차 PCR 를 수행하기 위한 프라이머들은 pGL3-luc vector로 원활하게 클로닝을 할 수 있도록 Kpn1과 Nhe1 제한 효소 절단부위를 프라이머에 삽입한 후 제작하였다. 따라서 2차 PCR를 수행하여 얻어진 PCR 산물은 다시 TA벡터로 클로닝 되어졌으며, 이를 TA-2ndFosBp 라고 명명하였다. 이후 Kpn1과 Nhe1 제한효소 절단을 통하여 FosB를 획득하였으며, 같은 제한 효소로 절단된 pGL3-luc vector로 삽입하였다.

pGL3-FosBp-luciferase 플라스미드 확인

IMR90 genomic DNA을 이용하여 수행된 FosB 프로모터 PCR 증폭은 58℃ annealing 온도에서 예상했던 크기의 FosB 프로모터PCR 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 두 단계의 TA 벡터로 클로닝을 거쳐 pGL3-luc vector와 ligation 반응을 수행한 후, 대장균 변형을 수행하였다. 플라스미드를 추출하여 확인한 후 제한 효소로 절단하여 FosB프로모터가 삽입된 형질 전환체를 확인할 수 있었다.

항암제 처리에 따른 FosB 활성도 분석

제작된 pGL3-FosBp-luc를 이용하여 항암제에 대한 활성도를 분석하고자 A549 사람 폐암세포주에 pGL3-FosBp-luc vector를 transfection 한후 luciferase 활성도 분석을 수행하였다. 대조군으로는 pGL3-basic-luc 플라스미드를 transfection 하였다. 각각 플라스미드를 transfection한 후 doxorubicin 또는 taxol을 처리하였을 때 대조군의 luciferase 활성도 변화는 거의 없었다. 그러나 pGL3-FosBp-luc 플라스미드를 transfection

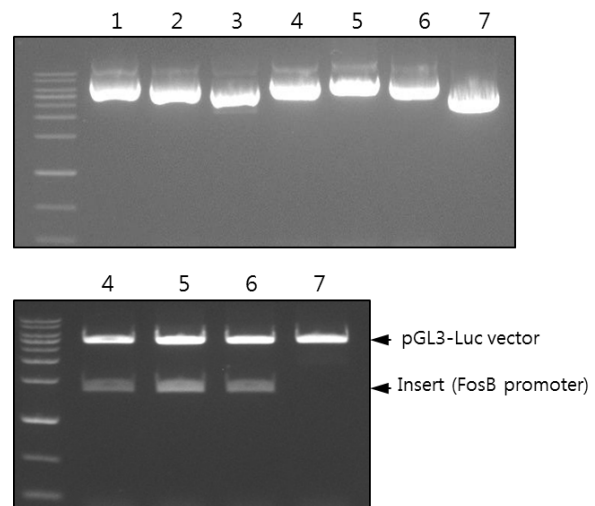


Fig. 3. Cloning of FosB promoter into pGL3-luc vector. It was selected to find true clones containing FosB promoter PCR product. Several colonies were selected and cutted with Kpn1 and Nhe1 restriction enzymes to find true colonies.

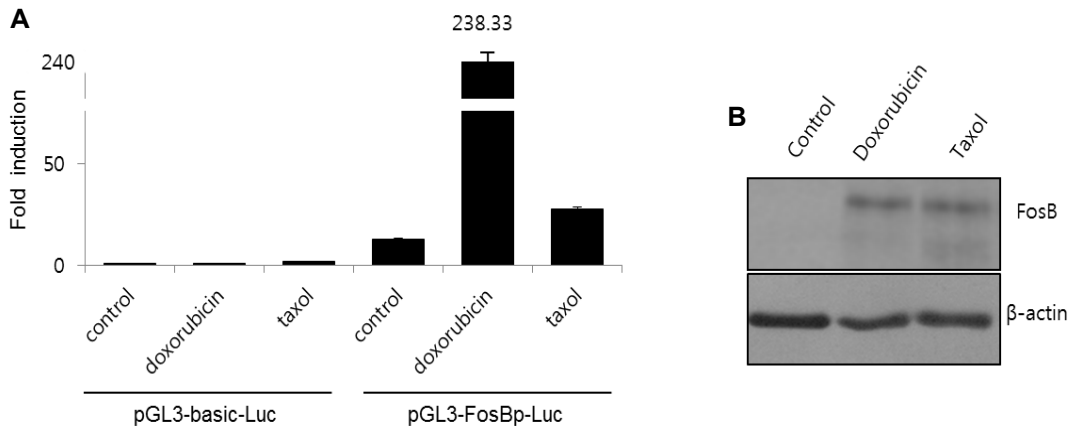


Fig. 4. Evaluation on FosB promoter activity. A) Luciferase assay using the cloned pGL3-FosBp-luc plasmids. A549 cells were transfected with pGL3-basic-luc or pGL3-FosB-luc plasmids and then anticancer drugs were treated for 12 hr. Proteins were extracted from the cells, and adjusted for luciferase assay. B) Cells were treated with doxorubicin or taxol treatment for 12 hr. after cells were extracted with RIPA buffer, Western blot was performed using FosB antibody.

하였을 경우에는 대조군에 비해 약 15배 활성도 증가가 있음을 알 수 있었고, doxorubicin을 처리한 실험군의 활성도는 약 240배 증가 하였음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 또한 taxol을 처리한 경우, 약 25배 정도 이상으로 활성도가 증가함을 확인 하였다. 이러한 luciferase 활성도 증가는 doxorubicin, taxol 등을 처리한 후 단백질 발현 양상과 비교 하였을 때도 일치되는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4B).

고 찰

FosB 유전자는 정신 질환(psychiatric diseases) 모델에서 특히 많은 연구가 진행 되어왔다[3, 20]. 여러 정신 질환의 치료를 위해 약제들을 장기적으로 사용함으로써 발생하는 만성적인 약제남용, 약제 중독과정에서 FosB 유전자의 발현이 변화한다 [1]. 이러한 결과들은 동물모델에서도 많은 연구들이 진행되어 왔으며, 설치류 모델동물에 지속적인 코카인 자극을 주었을 때 대뇌피질 해마조직 등에서 prefrontal cortex (PFC)와 hippocampus (HPC)에서 FosB 전사인자와 ΔFosB의 발현이 증가한다고 알려져 왔다[10]. HPC의 경우에는 원래는 FosB는 발현되지 않지만, 신경전달물질에 대한 반응으로 ΔFosB 또는 변화한다고 보고된바 있다[3]. 이러한 FosB전사인자들의 발현의 기능적 의미는 자극에 대한 보상기작(reward circuitry) 이 가동되기 위한 하향식 조절 방식에 의한 것으로 추측하고 있다 [21].

Methamphetamine (METH)을 처리한 쥐에서는 FosB를 포함하는 Fra2, Egr1, Egr3 mRNAs 등과 같은 초기반응 유전자 (IEG; Immediately Early response Genes)들의 발현이 급격하게 증가한다[18]. 이러한 발현에는 히스톤 탈아세틸화 효소 (HDAC2)와 인산화된 CREB (pCREB) 단백질이 매개하는 것이라고 보고도 있다[11]. FosB는 혈액시료의 EDTA에 대한 반

응도를 나타내는 다양한 조건 실험에서 발현이 증가하는 유전자이며, 이를 활용한다면 진단 마커로 이용될 수 있다고 보고된 바 있다[24].

본 연구에서는 여러가지 약제 조절 기작과 관련된 FosB 유전자의 프로모터를 클로닝하여 항암제 조절기작을 분석하는데 사용하고자 하였다. 우리는 정상세포를 이용하여 PCR 증폭을 이용하여 FosB genomic DNA의 upstream -1555 부위부터 exon 1의 +73 까지 약 1.6 kb의 FosB 프로모터 부위를 동정하였다. Ensembl 프로그램을 이용하여 조사한 바에 의하면, FosB genomic DNA 서열 중 프로모터 지역에는 다양한 전사인자들의 결합사이트가 존재하는 것으로 보아, FosB 유전자 발현을 조절하는 다양한 신호전달 체계가 있음을 예측할 수 있다. 또한 +1 상위 방향에 밀집 되어져 있는 CpG island의 존재는 FosB 유전자 발현 조절에는 DNA 메틸화에 의한 기작도 있을 것임을 예측 할수 있다.

Genomic DNA를 template로 이용하여 PCR 증폭을 수행할 때, 클로닝 등을 고려하여 제한 효소부위를 포함하는 프라이머를 제작 사용한다면, PCR 성공 가능성은 매우 낮다. 따라서, 본 연구는 제한효소부위를 포함하지 않는 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 수행하여 TA 벡터로 1차 클로닝 하였으며, 이를 TA-1stFosBp라고 명명하였다. 안정적으로 TA 벡터에 클로닝된 FosB 프로모터 DNA를 template로 이용되어질 수 있으며, 제한 효소 좌위가 포함된 프라이머 세트를 이용하여 손쉽게 PCR 증폭을 수행할 수 있다. 그러므로 TA-1stFosBp 플라스미드를 template로 이용하였으며, TA-2ndFosBp와 같은 2차 클로닝을 손쉽게 성공할 수 있었다. 한편, 제한효소 좌위가 포함된 프라이머를 이용한 후, PCR 증폭을 수행하여 바로 PCR 산물을 제한효소로 절단하였을 경우에는 효소에 의한 절단 효율이 현저하게 낮아지는 경향이 발생하기도 한다. 따라서 우리는 TA-2ndFosBp플라스미드로부터 PCR 산물을 절단

해 내어 pGL3-luc 플라스미드로 삽입하는 과정을 통해 클로닝 성공율을 더 높일수 있었다.

항암제들에 의한 FosB 유전자 발현조절은 아직 정확한 기작에 대해서는 밝혀진 것은 없다. 최근 보고에 의하면, FosB 유전자의 발현은 항암제들에 의해 발현이 감소되는 SETDB1 HMTase에 의해 조절된다. FosB 발현이 세포증식 증가를 유도하는 것으로 보아 SETDB1-FosB 발현 체계는 항암제 저항성 등과 관련 있을 것으로 추측되고 있다[14]. 우리가 제작한 pGL3-luc 벡터로 클로닝된 FosB 프로모터를 이용하여 transfection 후 항암제를 하게 되면, FosB 프로모터 활성이 매우 급격하게 증가함을 알수 있었다. FosB 프로모터 활성의 정도는 항암제에 따라 다르며, 이것은 항암제 작용기전이 다른 이유에 기인한 것으로 여겨진다. 그러므로 FosB 프로모터 동정은 luciferase 분석을 통한 확인작업에서도 매우 효과적인 것으로 나타났다. 또한 FosB의 발현은 다양한 자극원에 의해 아주 초기에 증가하는 유전자이며, 마이크로어레이를 이용한 실험 등에서 증명되고 있다[2]. 흥미로운 것은 여러 자극원에 의해 증가하는 FosB 유전자는 ATF3, JunD, JunB 등의 발현증가 양상과 중요한 상관관계가 있으며, 유방암에서 p53 유전자의 기능을 못하게 하는 표적 유전자들의 발현을 조절할 것이라고 추정하고 있다[2].

따라서, FosB 프로모터를 이용한 분석은 다양한 생리적인 시스템에서 발현이 조절 되어진다고 알려진 FosB의 기능을 분석하는데 매우 유용할 것이며, 유전자 발현 연구에 매우 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2015년 강원대학교 교내기본연구, 2016년 강원대학교 Linc R&BD, 연구재단 지역대학우수과학자 지원사업(C1012885-01-01) 등에 의해 수행되었음.

References

- Chandra, R., Francis, T. C., Konkalmatt, P., Amgalan, A., Gancarz, A. M., Dietz, D. M. and Lobo, M. K. 2015. Opposing role for Egr3 in nucleus accumbens cell subtypes in cocaine action. *J. Neurosci.* **35**, 7927-7937.
- Chen, D. and Yang, H. 2015. Integrated analysis of differentially expressed genes in breast cancer pathogenesis. *Oncol. Lett.* **9**, 2560-2566.
- Gajewski, P. A., Turecki, G. and Robison, A. J. 2016. Differential expression of FosB proteins and potential target genes in select brain regions of addiction and depression patients. *PLoS One* **11**, e0160355.
- Halder, K., Benzler, M. and Hartig, J. S. 2012. Reporter assays for studying quadruplex nucleic acids. *Methods* **57**, 115-121.
- Imbe, H. and Kimura, A. 2016. Repeated forced swim stress affects the expression of pCREB and DeltaFosB and the acetylation of histone H3 in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Brain Res. Bull.* **127**, 11-22.
- Jurado, J., Fuentes-Almagro, C. A., Prieto-Alamo, M. J. and Pueyo, C. 2007. Alternative splicing of c-fos pre-mRNA: contribution of the rates of synthesis and degradation to the copy number of each transcript isoform and detection of a truncated c-Fos immunoreactive species. *BMC Mol. Biol.* **8**, 83.
- Jurzak, M. and Adamczyk, K. 2013. Influence of genistein on c-Jun, c-Fos and Fos-B of AP-1 subunits expression in skin keratinocytes, fibroblasts and keloid fibroblasts cultured *in vitro*. *Acta. Pol. Pharm.* **70**, 205-213.
- Knight, W. D., Little, J. T., Carreno, F. R., Toney, G. M., Mifflin, S. W. and Cunningham, J. T. 2011. Chronic intermittent hypoxia increases blood pressure and expression of FosB/DeltaFosB in central autonomic regions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **301**, R131-139.
- Lazenka, M. F., David, B. G., Lichtman, A. H., Nestler, E. J., Selley, D. E. and Sim-Selley, L. J. 2014. Delta FosB and AP-1-mediated transcription modulate cannabinoid CB(1) receptor signaling and desensitization in striatal and limbic brain regions. *Biochem. Pharmacol.* **91**, 380-389.
- Lobo, M. K., Zaman, S., Damez-Werno, D. M., Koo, J. W., Bagot, R. C., DiNieri, J. A., Nugent, A., Finkel, E., Chaudhury, D., Chandra, R., Riberio, E., Rabkin, J., Mouzon, E., Cachope, R., Cheer, J. F., Han, M. H., Dietz, D. M., Self, D. W., Hurd, Y. L., Vialou, V. and Nestler, E. J. 2013. DeltaFosB induction in striatal medium spiny neuron subtypes in response to chronic pharmacological, emotional, and optogenetic stimuli. *J. Neurosci.* **33**, 18381-18395.
- Martin, T. A., Jayanthi, S., McCoy, M. T., Brannock, C., Ladenheim, B., Garrett, T., Lehrmann, E., Becker, K. G. and Cadet, J. L. 2012. Methamphetamine causes differential alterations in gene expression and patterns of histone acetylation/hypoacetylation in the rat nucleus accumbens. *PLoS One* **7**, e34236.
- Martin-Gallardo, A., McCombie, W. R., Gocayne, J. D., FitzGerald, M. G., Wallace, S., Lee, B. M., Lamerdin, J., Trapp, S., Kelley, J. M. and Liu, L. I. 1992. Automated DNA sequencing and analysis of 106 kilobases from human chromosome 19q13.3. *Nat. Genet.* **1**, 34-39.
- Milde-Langosch, K., Roder, H., Andritzky, B., Aslan, B., Hemminger, G., Brinkmann, A., Bamberger, C. M., Loning, T. and Bamberger, A. M. 2004. The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* **86**, 139-152.
- Na, H. H., Noh, H. J., Cheong, H. M., Kang, Y. and Kim, K. C. 2016. SETDB1 mediated FosB expression increases the cell proliferation rate during anticancer drug therapy. *BMB Rep.* **49**, 238-243.
- Nestler, E. J. 2015. FosB: a transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur. J. Pharmacol.* **753**, 66-72.
- Park, S. J., Bae, H. S. and Park, J. C. 2015. Osteogenic differentiation and gene expression profile of human dental fol-

- licle cells induced by human dental pulp cells. *J. Mol. Histol.* **46**, 93-106.
17. Ting, C. H., Chen, Y. C., Wu, C. J. and Chen, J. Y. 2016. Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **7**, 40329-40347.
 18. Torres, O. V., McCoy, M. T., Ladenheim, B., Jayanthi, S., Brannock, C., Tulloch, I., Krasnova, I. N. and Cadet, J. L. 2015. CAMKII-conditional deletion of histone deacetylase 2 potentiates acute methamphetamine-induced expression of immediate early genes in the mouse nucleus accumbens. *Sci. Rep.* **5**, 13396.
 19. Ulery, P. G., Rudenko, G. and Nestler, E. J. 2006. Regulation of DeltaFosB stability by phosphorylation. *J. Neurosci.* **26**, 5131-5142.
 20. Vialou, V., Bagot, R. C., Cahill, M. E., Ferguson, D., Robison, A. J., Dietz, D. M., Fallon, B., Mazei-Robison, M., Ku, S. M., Harrigan, E., Winstanley, C. A., Joshi, T., Feng, J., Berton, O. and Nestler, E. J. 2014. Prefrontal cortical circuit for depression- and anxiety-related behaviors mediated by cholecystokinin: role of DeltaFosB. *J. Neurosci.* **34**, 3878-3887.
 21. Vialou, V., Thibault, M., Kaska, S., Cooper, S., Gajewski, P., Eagle, A., Mazei-Robison, M., Nestler, E. J. and Robison, A. J. 2015. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. *Neuropharmacology* **99**, 28-37.
 22. Wang, H., Tao, X., Huang, S. T., Wu, L., Tang, H. L., Song, Y., Zhang, G. and Zhang, Y. M. 2016. Chronic Stress Is Associated with Pain Precipitation and Elevation in Delta Fosb Expression. *Front. Pharmacol.* **7**, 138.
 23. Yoon, J., Kim, J. H., Lee, O. J., Lee, S. Y., Lee, S. H., Park, J. B., Lee, J. Y., Kim, S. C. and Kim, J. 2013. AP-1(c-Jun/FosB) mediates xFoxD5b expression in *Xenopus* early developmental neurogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 865-872.
 24. Zhang, H., Korenkova, V., Sjoback, R., Svec, D., Bjorkman, J., Kruhoffer, M., Verderio, P., Pizzamiglio, S., Ciniselli, C. M., Wyrich, R., Oelmueller, U., Kubista, M., Lindahl, T., Lonneborg, A. and Rian, E. 2014. Biomarkers for monitoring pre-analytical quality variation of mRNA in blood samples. *PLoS One* **9**, e111644.
 25. Zhang, Q., Liu, Q., Li, T., Liu, Y., Wang, L., Zhang, Z., Liu, H., Hu, M., Qiao, Y. and Niu, H. 2016. Expression and colocalization of NMDA receptor and FosB/DeltaFosB in sensitive brain regions in rats after chronic morphine exposure. *Neurosci. Lett.* **614**, 70-76.

초록 : 사람 핵DNA로부터 FosB 유전자 프로모터 클로닝 및 활성도 분석

나한흠¹ · 강운성² · 김근철^{1*}

(¹강원대학교 자연과학대학 생명과학과, ²유디피아 분자진단 연구소)

FosB (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B) 유전자는 사람의 19번 염색체에 위치하고 있으며 약 43 KD의 단백질을 코딩하며, 발생 및 분화과정, 개체 유지, 발병 진행 등을 조절한다고 알려져 왔다. 본 연구에서는 바이오 마커 등의 가능성이 있다고 보고된 FosB 유전자의 프로모터를 클로닝하여 활성도를 분석하고자 하였다. FosB genomic DNA 서열을 확인한 결과, TSS upstream 방향의 약 1 Kb 안쪽 부위에 FosB 유전자 발현을 위한 중요한 요소들이 있을 것으로 추정하였고, 따라서 FosB genomic DNA의 upstream -1,555 부위부터 exon 1의 +73까지 부위에 대한 PCR 증폭을 수행하였다. 또한 클로닝 성공을 높이기 위하여 일차로 TA-1stFosBp plasmid를 얻은 후, 다시 TA-1stFosBp plasmid를 template로 Kpn1과 Nhe1 제한 효소 절단부위를 프라이머에 삽입한 후 제작하여 2차 PCR을 수행하였으며, TA-2ndFosBp 플라스미드를 제작한 후 제한 효소로 절단하여 pGL3-luc vector로 subcloning하였다. 제작된 pGL3-FosBp-luc를 이용하여 항암제에 대한 활성도를 분석하고자 A549 사람 폐암세포주에 pGL3-FosBp-luc 플라스미드를 transfection 한 후 luciferase 활성도 분석을 수행하였다. Luciferase 활성도 증가는 doxorubicin, taxol 등을 처리한 후 단백질 발현 양상과 비교 하였을 때도 일치되는 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 FosB프로모터 클로닝은 향후 유전자 발현 연구, 마커분석 등에 유용할 것으로 사료된다.