



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

# 신경능선세포 발달에서 UTX 역할

The role of UTX in neural crest cell  
development

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

이윤영

# 신경능선세포 발달에서 UTX의 역할

The role of UTX in neural crest cell  
development

지도교수 이승희

이 논문을 약물학 석사학위논문으로 제출함

2018 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

이윤영

이윤영의 석사학위논문을 인준함

2018 년 2 월

위 원 장 \_\_\_\_\_ 김 상 건 (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ 강 건 욱 (인)

위 원 \_\_\_\_\_ 이 승 희 (인)

국문초록

# 신경능선 세포 (neural crest cell) 발달 과정에서의 UTX의 역할

이윤영

서울대학교 대학원

약학과 약물학전공

UTX는 가부키 증후군의 주요한 돌연변이 유전자 중 하나로 알려져 있으며, 가부키 증후군은 신경능선 세포(Neural crest cell: NCC) 발달 과정에서의 결함에 의해 나타나는 심장 결함, 청력 상실, 지적 장애, 특이한 얼굴 표현형 등의 여러 가지 표현형을 가지고 있다. 이러한 가부키 증상은 배아 발생 단계 중 신경능선 세포의 분화에 문제가 생겨 기인한다고 예상해 볼 수 있다. 신경능선 세포는 척추동물 배아의 발달과정에서 여러 세포조직 형성에 관여하는 다능성 이동 세포 집단이다. 신경관 유도 (crest induction), 계통 결정 (lineage decisions), 특정 세포 유형으로의 분화에 이르기까지 신경능선 (Neural crest) 발달의 여러 단계를 제어하는 전사 인자와 신호 분자에 대한 연구는 비교적 잘 알려져 있다. 그러나 신경능선 세포의 여러 발달 단계에서 작용하는 표적 유전자 발현을 조절하는데 있어서 후성 유전적 조절 인자의 중요성에도 불구하고 이에 대한 연구는 아직 많이 진행되지 않았다.

본 연구에서는 신경능선 세포 발달 과정에서 H3K27 demethylase 인 UTX가 어떤 역할을 하는지 밝히고자 하였다. Chick 배아에 전기

천공법(In ovo Electroporation)으로 유전자를 도입하는 실험과 단백질 복합체 면역침강 실험(CO-IP)을 통해 UTX가 신경능선 세포 분화의 주요 전사인자인 FoxD3와 상호 작용한다는 것을 발견했다. 또한 UTX가 Neuro2a 세포에서 슈반세포 전구체의 초기 결정 인자인 지방산 결합 단백질 7 (Fabp7) 와 myelin protein zero (P0) 프로모터의 활성을 활성화시키는 Sox10 및 FoxD3의 보조 인자로서 기능한다는 것을 밝혀내었다. 생쥐 모델의 신경능선 세포 발달과정에서 UTX의 기능을 규명하기 위해 Wnt1-Cre를 사용하여 신경능선 세포에서 UTX를 특이적으로 제거하고, 배아 발달에 어떤 형태학적 표현형이 있는지를 조사한 결과, 뼈 골격의 이상, 얼굴 형태의 결함 등의 표현형을 관찰하였다. UTX에 의해 조절 받는 유전자 발현 양상을 연구함으로써 신경능선 세포 분화에 영향을 미치는 분자 메커니즘을 밝혀내고, 생쥐 배아의 발달과정에서 나타나는 형태적 표현형에 대해 추가적으로 연구를 진행할 예정이다. 이 연구를 통해 신경능선 세포 발달에 UTX가 어떻게 기능하는지에 대한 분자 메커니즘을 규명하고 이를 바탕으로 비정상적인 신경능선 세포 발달로 인한 질병을 치료하거나 개선하는 새로운 치료법 개발의 가능성을 제공하고자 한다.

**주요어:** 신경능선 세포(NCC), 배아 발달과정, 표현형, UTX, FoxD3, Sox10

학번: 2015-23188

# 목차

List of Abbreviations.....	1
List of Figures.....	2
I. 서론.....	3
II. 실험재료 및 방법.....	6
III. 실험결과.....	10
IV. 결론 및 고찰.....	32
V. 참고문헌.....	35
Abstract 영문요약.....	40

## List of Abbreviations

NCC	Neural Crest Cell
TF	Transcription Factor
HH	Hamburger-Hamilton stage
WT	Wild Type
MT	Mutant
KO	Knock Out
KD	Knock down
IHC	Immunohistochemistry
ISH	<i>In situ</i> hybridization
SC	Spinal Cord
WB	Western Blot
H&E	Hematoxylin and Eosin
IP	Immunoprecipitation

## List of Figures

- Figure 1.** Expression of UTX in chick dorsal (NCC) spinal cord by UTX co staining with NCC TFs
- Figure 2.** Expression of UTX in mouse dorsal (NCC) spinal cord by UTX co staining with NCC TFs
- Figure 3.** Pax3, Pax7 level does not affected by UTX deletion
- Figure 4.** UTX KO mouse embryo show smaller body size and abnormal brain structure
- Figure 5.** UTX KO mouse embryo shows craniofacial deformity and osteodysplasty
- Figure 6.** UTX KO mouse embryo has craniofacial abnormality in later stage
- Figure 7.** UTX interacts with NCC transcription factor FoxD3
- Figure 8.** UTX seems to facilitate FoxD3 function in neural crest cell
- Figure 9.** UTX seems to facilitate FoxD3 function in neural crest cell
- Figure 10.** UTX facilitate activity of FoxD3 function



## I. 서론

가부끼 증후군(Kabuki syndrome)이란 드문 유전성 질환으로 가부끼 증후군 환자 대부분이 일본의 가부끼 배우 얼굴 모습을 닮았다고 하여 그 이름이 지어졌다. 가부끼 증후군 환자들의 대부분은 독특한 얼굴의 이상을 가지고 있으며, 발달 지체, 비정상적으로 짧은 키 및 행동 이상, 정신 지체를 동반하는 경우도 있다. 또한 심장 결함, 청력 장애, 골격계 이상 등의 증상을 보이는 경우도 있다. 가부끼 증후군의 주요 원인 유전자는 KMT2D (MLL4) 와 KDM6A (UTX)로 알려져 있는데 환자의 40-80% 정도에서 MLL4 유전자의 변이가 관찰되었다고 보고 되어있다. MLL4 유전자는 배아형성과 발달을 조절하는 히스톤 메틸 전이효소 (histone methyltransferase) 역할을 하며 12번 염색체에 위치해 있는 유전자이다. 또한 환자 중 10% 정도 에서는 X염색체 상에 위치하는 KDM6A 유전자의 소실이 관찰되었다. KMT2D (MLL4)와 KDM6A (UTX)는 함께 유전자 발현을 조절하는 것으로 보이나 이 두 유전자의 돌연변이가 어떻게 장애와 그와 관련된 증상을 일으키는지를 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. KDM6A는 UTX (Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X 염색체) 로 알려진, 라이신 특이적인 탈 메틸 효소이며, 히스톤, 특히 H3K27의 라이신 잔기의 탈 메틸화와 관련되어 있으며 UTX 유전자의 JmjC 부분이 탈메틸화 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이로 인해 유전자 억제가 가능하며 세포 대사의 잠재적인 조절 수단으로 이용된다. UTX는 H3K27me3의 탈메틸화에서 특이적인 촉매 활성을 나타내지만, UTY는 동일한 분석 조건 하에서 불활성을 나타낸다. UTX는 Hox 유전자 활성화에 중요한 역할을 하며 특히 제브라 피쉬 배아에서의 발달에 영향을 미친다는 연구 결과는 많이 보고되어 왔다. 그러나, 신경능선세포 (neural crest cell, NCC)의 발달과정에서 UTX의 기능과 역할은 아직 많이 알려지지 않

아 연구가 필요한 실정이다.

신경능선 세포는 신경 외배엽으로부터 기인하며 배아 발생 과정 중에서 신경관의 형성과 함께 생성되어 배 쪽으로 이동하는 세포군을 지칭하며 이동성은 이 세포의 특성을 구분 짓는 매우 중요한 요소 중 하나이다. 신경능선 세포는 생성된 위치에서부터 체내의 다양한 조직과 기관이 생성되는 곳으로 이동하며 전신에 걸쳐 분화가 이루어지게 된다. 이들은 BMP, Wnt 등의 국소 분비인자에 의한 신경능선 세포 분화 결정 이후에 획득되는 이동능력의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있어 생물학적 기능에 대해 주목하고 있다. 신경능선 세포의 이동능력과 관련하여 다양한 연구가 시도되고 있는데 Pax3, Pax7, FoxD3, Snail 및 Sox family와 같은 이동 전후의 신경능선세포를 구분하기 위한 유전인자 및 단백질들이 밝혀지고 있으나 아직 정확한 기전이나 그 역할에 대해서는 연구가 부족하다. 전사인자 중 하나인 Pax3는 주로 신경관 가장자리에서 작용하며 신경능선 세포 발달 과정 중 초기단계에서 발생하는데 신경관이나 표피가 되는 현상을 방지하는 작용을 하기도 한다. 신경능선 예정자라고 불리는 전사인자로는 FoxD3와 Sox9,10 등이 있는데 FoxD3는 Snail과 같이 신경상피세포가 신경능선세포로 분화 하도록 유도하는 기능을 한다. Sox9는 분층 후 몸통을 이루는 신경능선 세포의 생존에 필요하다고 알려져 있으며 Sox10은 신경능선 세포의 분층뿐만 아니라 수많은 신경능선계보의 분화에 필수적인 인자이다.

본 연구에서는 가부키 증후군의 주요 유전자인 UTX가 가부키 증후군에 의해 나타나는 표현형이 발생하는 과정 중에 관여를 할 것이라고 생각하고, UTX가 신경능선 세포 분화 과정에 작용하는 여러 단백질과 상호작용 하여 비정상적인 발달을 야기한다고 가정하고 실험을 진행하였다. mouse 와 chick과 같은 동물 모델을 이용한 in vivo 실험과 cell을 통한 in vitro 실험을 병행하였다. In vitro 실험으로는 세포에 UTX와 신경능선 세포에 관여하는 전사인자 유전자를 처리하여 단백질간의 결합과 활성화 정도를 확인하였고, in vivo 실험을 통해서도 UTX

가 신경능선 특이적으로 결여된 mouse에서 나타나는 여러 형태적 표현형을 관찰하였다. 또한 chick 배아를 통해 UTX를 주입하여 신경능선 세포 발달과 관련된 인자들의 발현 양상의 변화를 확인하였다.

전체적으로 본 연구 결과는 신경능선 세포 분화 발달 과정에서 UTX와 같은 후성 유전 인자 연구의 중요성을 시사하고 나아가 희귀 질병 치료제 개발 가능성을 제기한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. DNA construct

HA가 표지되어 있는 pCS2 벡터에 Chick FoxD3를 클로닝 하여 ckFoxD3-HA/pCS2를 만들었다. 3flag와 6myc이 표지되어 있는 pCS2 벡터에 human UTXwt 과 UTXmt (탈메틸화 기능을 상실한 UTX construct)를 클로닝 하여 hUTXwt/mt-3flag-6myc/pCS2를 만들었다. UTX가 Knockdown(K.D)된 construct 인 shRNA-human UTX는 OSHU로부터 받았다.

### 2. 전기 천공법(In ovo Electroporation)과 면역조직 화학 염색(Immunohistochemisrty)

2일간 37℃에서 배양한 Chick 배아의 spinal cord에 전기 천공법(In ovo electroporation)으로 DNA를 주입하고 37℃에서 48시간 더 배양시킨 후 자란 chick embryo들을 4℃ 방에서 2 시간 동안 4 % PFA (paraformaldehyde)로 고정시킨 다음 1X PBS에서 하루 동안 놔두었다. 그 다음 4℃ 방의 rotator에서 2 시간 동안 30 % sucrose로 옮겨 넣어 두었다가 OCT (frozen section compound, Leica)에 넣어 동결보존하고 면역조직 화학 염색 (immunohistochemistry) 또는 in situ hybridization을 위해 -20℃에서 Leica cryostat를 이용하여 조직을 절단하였다. 면역 조직 화학적 분석을 위해 조직을 12  $\mu\text{m}$ ~14  $\mu\text{m}$  두께로 절단하여 염색을 진행하였다. Mouse의 경우 특정 단계의 배아를 수집하고 이전에 설명한대로 chick 배아와 유사하게 가공하였다. 면역 조직 화학 염색을 위해 다음 항체를 사용 하였다.

ms anti-HA(Covance), ms anti-myc(sigma),  
ms anti-Pax3 (sigma), ms anti-Pax7(sigma),  
rb anti-UTX(Cell Signaling), rb anti-Slug(Abcam),  
rb anti-Sox10(Abcam), rb anti-laminin(Abcam),  
rb anti-Isl1&2(sigma), ms anti-HNK1(sigma)

### 3. 실험동물 (Mouse genetics)

본 연구를 위해 Wnt1-cre, UTX flox/flox 계통의 mouse를 사용 하였다. 이 mouse는 Jackson Lab 으로 부터 받았다. 유전자 확인을 위한 프라이머 서열을 이용해 PCR을 통해 유전자형을 확인하였다.

UTX flox 프라이머

forward: 5'-TCTGGTATAGATTTTGGCTAA-3'

and reverse: 5'-CTGTAATCTCTGCTGATACAA-3'

Wnt1-cre 프라이머

forward: 5'-TAAGAGGCCTATAAGAAGCGG-3'

and reverse: 5'-TTTTGGTGTACGGTCAGTAAATTG-3'

### 4. 골격계 염색법 (skeletal staining)

E14.5 단계 mouse embryo의 피부를 벗기고, 장기와 지방을 떼어낸 후 embryo 전체를 95% 에탄올에 2일간 두고 고정시켰다. 그 다음 100% 아세톤에 하루 동안 두고, 0.015% Alcian Blue 시약으로 1-2 일 동안 뼈를 염색한 후 0.005% Alizarin Red 에 하루 동안 두고 연골 등을 염색하였다. Embryo가 투명해질 때까지 1% potassium

chloride에 넣어두었다가 완전히 투명해지면 100% glycerol에 옮겨 보관하고, Nikon dissection 현미경으로 관찰하였다.

## 5. H&E 염색법

Mouse embryo의 머리 부분을 E17.5 단계에서 수확하여 4% PFA (paraformaldehyde)에 5시간 고정 시킨 후 OCT (frozen section compound, Leica)에 넣어, 16  $\mu$ m로 저온 section 하였다. 이때 관찰면 (coronal plane)으로 절단하였고, 이 조직을 hematoxylin과 eosin 으로 염색한 후, Zeiss 현미경으로 관찰하였다.

## 6. 면역 침강법 (Co-immunoprecipitation :CO-IP)

Myc 이 표지된 UTX와 HA가 표지된 FoxD3의 결합을 관찰하기 위하여 HEK293T 세포를 10cm dish에 깔고, 하루 동안 배양한 후 DNA를 형질도입 하였다. 형질 도입된 HEK293T 세포를 수확하여 전체 세포 용해물에 anti-HA 항체를 넣고 4℃에서 2시간 배양, 면역 침강 후 항원-항체 결합체를 단백질 G-agarose와 4℃에서 하룻밤 배양하였다. 2X SDB(sample dilution buffer)에 용해시켜 끓는 물에 5분간 반응시키고 추출된 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였는데 10% SDS page gel을 사용하여 전기 완충액 내에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 전기영동 전달 장치를 이용하여 전이 완충액 내에서 nitrocellulose 지에 단백질을 전이시키고 관찰하려는 단백질에 대한 1차 항체(anti-myc)와 반응 시킨 후 이어서 2차 항체 (anti-HA)와 반응시키고 odyssey 시스템을 이용하여 발색하였다.

## 7. *In situ* hybridization

*In situ* hybridization은 형태학적으로 보존된 세포 내 DNA 또는 RNA의 특정 target strand에 상보적인 DNA 또는 RNA의 단일가닥 조각 (oligonucleotide probe)을 붙여 목적 미생물을 검출하는 방법이다. Chick 배아를 HH12-13단계에서 수확하여 4% PFA (paraformaldehyde)에 2시간 고정 시킨 후 OCT (frozen section compound, Leica)에 넣어 굳히고, 18  $\mu$ m로 저온 section 하였다. 배아는 digoxigenin으로 표지된 ckFabp7 probes를 사용하여 염색하였는데 ckFabp7 probe는 E4 단계의 chick cDNA 에서 400-500bp 사이즈로 얻어낸 Fabp7을 pBluescript 벡터에 클로닝하여 만들었다.

## 8. Luciferase 분석법

Luciferase 분석법은 유전자 발현 수준, 프로모터 활성 특성 등을 확인하는 Gene regulation과 Gene modulator를 스크리닝 하는 약물 검색에 주로 이용되는 분석법으로 UTX와 FoxD3가 형질 도입된 세포에서 Fabp7 활성도의 변화를 알아보고자 진행하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)과 Penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM (GIBCO) 배지에서 N2a (mouse neuroblastoma)세포를 48well에 24시간 동안 배양하고, Superfect(QIAGEN)를 이용해 DNA를 형질 도입하였다. actin - $\beta$ - galactosidase를 형질도입 효율의 표준화를 위해 함께 넣어주었고 공 벡터를 사용하여 DNA 총량을 동일하게 하였다. 형질도입 48 시간 후에 세포를 수확했다. 세포 추출물을 Luciferase 활성에 대해 분석하고 값을  $\beta$ - galactosidase 활성으로 정규화 시켰다. 모든 형질도입은 3번 이상 독립적으로 반복되었다. 데이터는 대표 실험으로부터 얻어진 3 개의 값의 평균으로 나타내었다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

### III. 실험 결과

#### 1. UTX는 발달과정 중 척수의 신경능선 세포 발현 부분에서 신경능선 세포 전사인자와 함께 존재한다

가부키 증후군에 의해 나타나는 여러 가지 증상은 신경능선 세포가 분화하는 과정에서 장애가 생겨 야기되는데 이 과정 중에 UTX가 관여할 것이라는 가정 하에 본 연구를 진행하게 되었다. 신경능선 세포는 신경외배엽에서 기인하며 신경관이 발생하는 과정에서 생성되는 이동성 세포이며, 신경관은 후에 척수가 된다. 신경능선 세포는 척수 내에 존재하고 발달과정에 따라 분포하는 위치가 달라지게 되는데 배아 발생 초기 단계에서는 척수의 dorsal 부분에 대부분 분포하고 있다. 후기로 갈수록 신경능선 세포는 척수 바깥으로 이동한 후 여러 갈래로 나뉘어 다양한 세포나 조직을 이루게 된다.

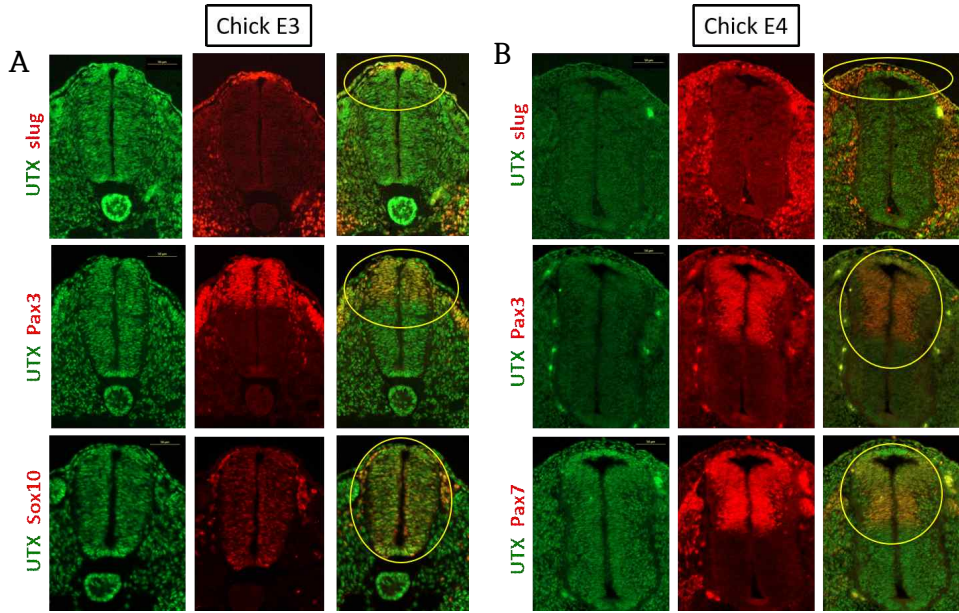
본 실험에서는 배아 발달 및 가부키 증후군에서의 UTX의 역할을 이해하기 위해, Wnt1 cre를 이용, cre-lox recombination에 의해 신경능선 부위에서 특이적으로 UTX의 결실을 유도하는 형질 전환 mouse를 사용하여 실험을 진행하였다.

배아에서 UTX의 발현 패턴을 확인하기 위해 WT mouse 배아 척수에서 면역 조직 화학 염색 (immunohistochemisrty)을 시행하였다. 그 결과, mouse E8.5 와 E9.5 초기 배아 단계에서 UTX는 척수의 dorsal 영역에서 높게 발현되었으며 신경능선 세포의 전사인자인 Pax3 및 Pax7와 같이 존재하고 있는 것을 확인하였다.(Fig. 2A,B) 좀 더 후기인 E10.5 및 E11.5 단계에서는 dorsal 쪽 뿐 만 아니라 더 광범위하게 발현하였다.(Fig. 2c). mouse 배아에서 뿐만 아니라 chick 배



아에서도 같은 실험을 진행하여 UTX의 분포를 확인해 보았는데 특히 chick E3 및 E4 단계에서 높게 발현되는 것을 관찰하였다.(Fig. 1A, B). E3에서는 전사인자인 Pax3와 Slug, Sox10과 같이 염색을 진행하였는데 특히 척수의 dorsal 부분에 많이 분포하였고,(Fig. 1A) E4에서도 비슷한 양상을 보였다.(Fig. 1B)

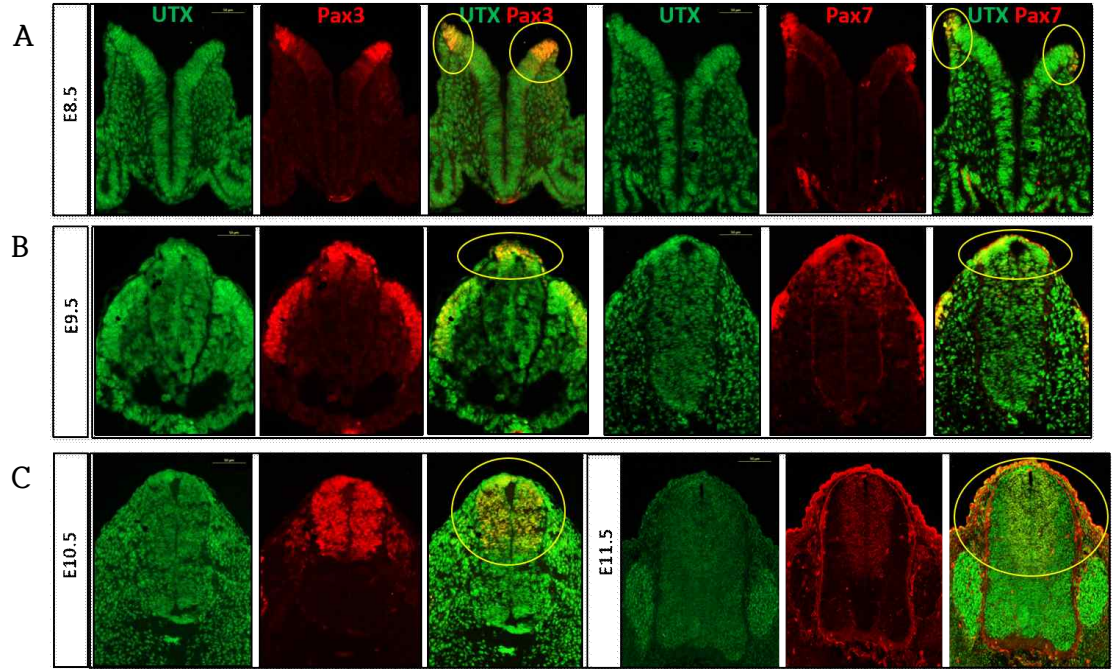
이로써 배아에서 UTX가 신경능선 세포에 존재한다는 것을 확인하였으므로 다음으로 면역 조직 화학 염색법을 이용하여 신경능선 세포 전사인자로 알려진 많은 단백질 중 UTX에 의해 조절되는 전사인자를 찾고, 전사인자 발현 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아보기 위한 추가적인 연구가 필요하다.



**Figure 1. Expression of UTX in chick dorsal (NCC) spinal cord by UTX co staining with NCC TFs.**

(A) Co-staining of UTX with neural crest cell transcription factor Slug, Pax3, Sox10 shows colocalized population at chick spinal cord especially upper neural tube region.at E3

(B) Co-staining of UTX with neural crest cell transcription factor Slug, Pax3, Sox10 shows colocalized population at chick spinal cord especially upper neural tube region at E4



**Figure 2. Expression of UTX in mouse dorsal (NCC) spinal cord by UTX co staining with NCC TFs.**

(A) Co-staining of UTX with neural crest cell transcription factor Pax3, Pax7 shows colocalized population at mouse spinal cord especially dorsal neural region.at E8.5

(B) Co-staining of UTX with neural crest cell transcription factor Pax3, Pax7 shows colocalized population at mouse spinal cord especially dorsal neural region.at E9.5

(C) Co-staining of UTX with neural crest cell transcription factor Pax3 shows colocalized population at mouse spinal cord especially dorsal neural region.at E10.5 and E11.5

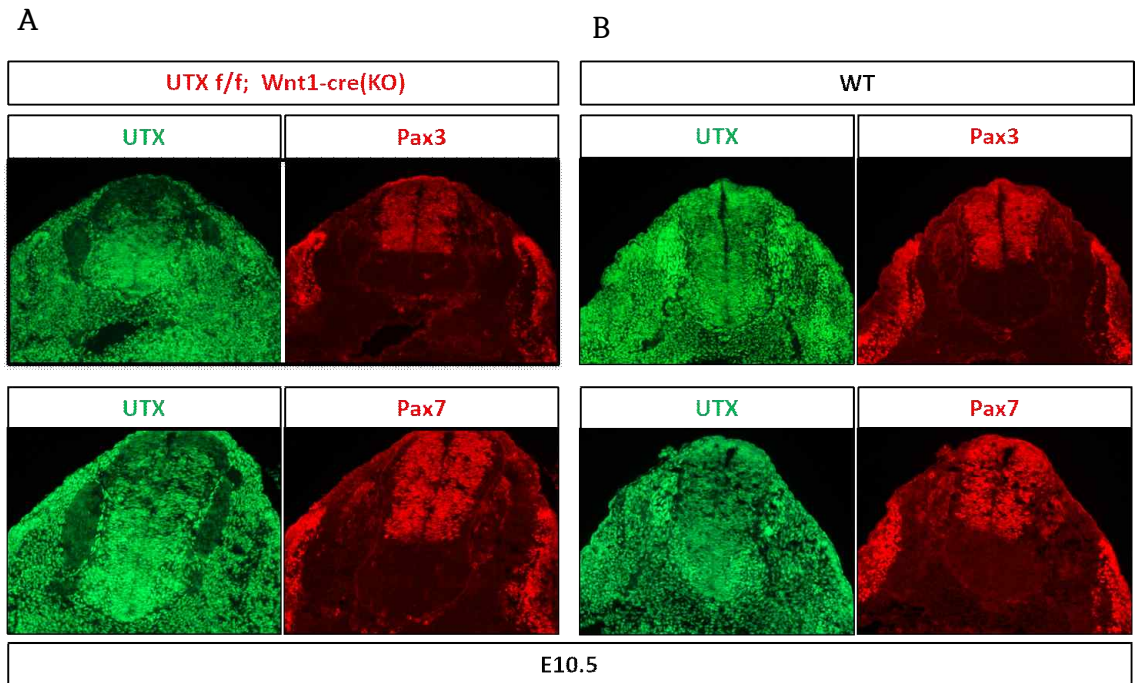
## 2. UTX 결여에 의해 나타나는 형태학적 표현형과 신경능선 세포 전사 인자 발현 양상

배아 발생 단계에서 UTX가 신경능선 세포에 존재한다는 것을 확인하고 mouse에서 가부키 증후군을 모델링하기 위해 Wnt1-Cre 도입 유전자를 가진 조건부 UTX 대립 유전자의 신경능선 특이적 결손을 야기했다. UTX는 X chromosome에만 존재하기 때문에 수컷 UTX 돌연변이가 표현형은 UTY이며 수컷 KO mouse에서는 demethylase 의존성을 나타내는 UTX 손실을 완전히 보장할 수 없다. 대조적으로, UTX 동형 접합 암컷 mouse는 Wnt1 cre와 결합하여 완전한 UTX의 결여가 가능하다. UTX<sup>f/y</sup> Wnt1-Cre 수컷 (이후 수컷 KO mouse는 MKO로 약칭)은 대부분 태어나고 정상적으로 자라지만, UTX<sup>f/f</sup> Wnt1-Cre 암컷 (암컷 KO mouse는 FKO로 약칭)은 출생 후 치명적인 사망률을 나타내며 대부분이 배아단계에서 죽는 것으로 보인다. 평균적으로 FKO mouse에서 성장지연, craniofacial 및 심장 이상 등과 같은 더 심각한 장애가 나타난다고 알려져 있다.

면역 조직 화학 염색 (immunohistochemistry)을 통해 Wnt1-Cre에 의해 신경능선 세포에서 UTX가 결여된 E10.5 단계의 KO mouse 척수를 WT과 비교하여 보았을 때 척수의 dorsal 쪽과 DRG 쪽에서 확실히 UTX 발현이 사라진 것으로 보아 KO이 되었다는 것을 확인하였다.(Fig. 3A,B) UTX의 결손이 전사인자 발현 양상에 영향을 주는 지 알아보기 위해 Pax3, Pax7과 함께 염색을 진행하였지만 WT과 비교해 본 결과 큰 차이를 보이지 않아서 UTX 단독으로는 전사인자 발현에 영향을 주지 못한다고 판단하였다.(Fig. 3A,B)

다음으로 E13.5(Fig. 3A), E14.5(Fig. 3B) 단계에서 Wnt1-Cre에 의해 신경능선 세포에서 UTX가 제거 되었을 때 관찰되는 특이적 표현형을 확인할 수 있었다. E13.5와 E14.5에서 모두 KO mouse가 WT

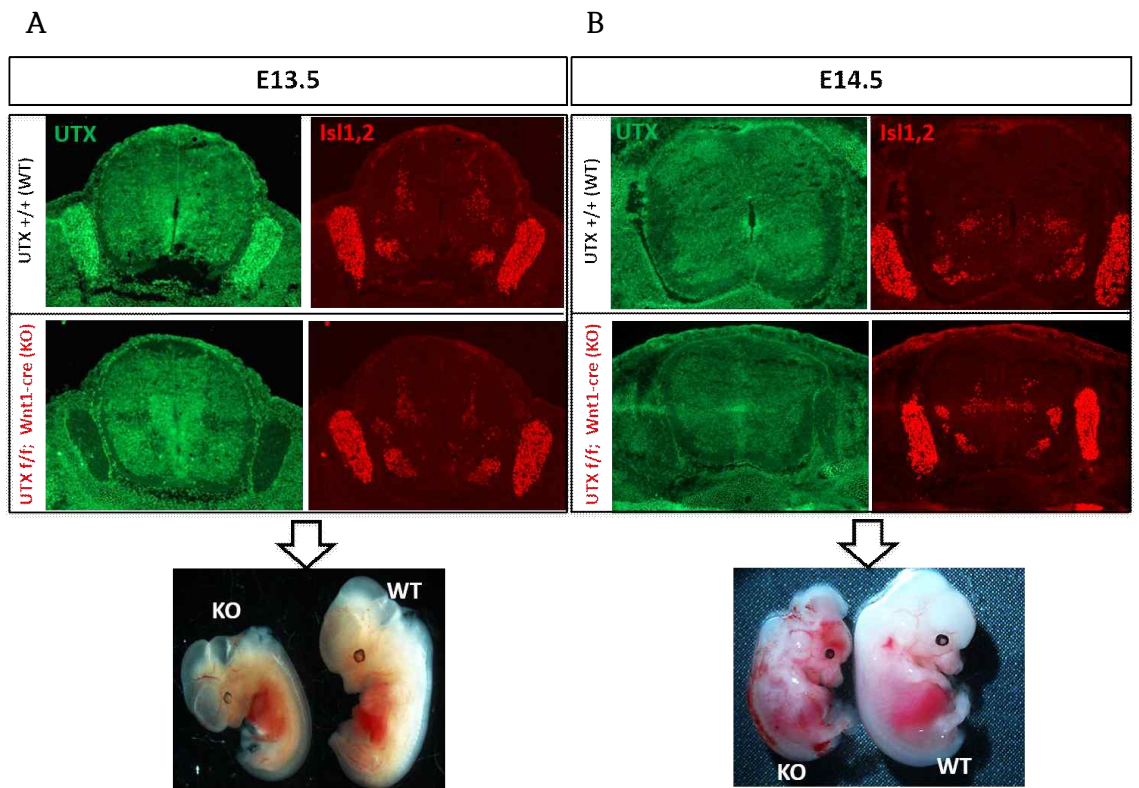
에 비해 전체적인 크기가 작고, 특히 머리 부분의 심각한 형태 변화를 나타내었다. 이는 가부키 증후군 환자들이 가지고 있는 특징적인 장애와 비슷한 양상을 띄고 있다. (Fig. 4A,B) KO mouse가 더 작은 이유가 운동신경 분화와 관련이 있지 않을까 가정하여 WT과 KO mouse의 척수에서 운동신경 특이적 marker인 Isl1,2를 UTX와 같이 염색하였는데, UTX가 결여 되었음에도 불구하고 Isl1,2의 발현 양상이나 그 수의 차이를 확인할 수 없었다. 하지만 KO mouse에서 전체적인 몸 크기뿐만 아니라 척수의 크기자체도 WT보다 작은 것을 알 수 있었다. (Fig. 3A,B)



**Figure 3. Pax3, Pax7 level does not affected by UTX deletion**

(A) staining of UTX with neural crest cell transcription factor Pax3, shows specific deletion of UTX in neural crest cell region at UTX KO mouse spinal cord at E10.5 but Pax3 level does not changed.

(B) staining of UTX with neural crest cell transcription factor Pax3, shows existence of UTX in neural crest cell region at UTX WT mouse spinal cord at E10.5 but Pax3 level does not changed.



**Figure 4. UTX KO mouse embryo show smaller body size and abnormal brain structure**

(A) KO mouse has smaller body size and unnatural brain shape. Staining of UTX with motor neuron marker Isl1&2, shows specific deletion of UTX in neural crest cell region at UTX KO mouse spinal cord at E13.5 and has smaller spinal cord compare to WT mouse but Isl1&2 level does not changed

(B) KO mouse has smaller body size and unnatural brain shape. Staining of UTX with motor neuron marker Isl1&2, shows specific deletion of UTX in neural crest cell region at UTX KO mouse spinal cord at E14.5 and has smaller spinal cord compare to WT mouse but Isl1&2 level does not changed

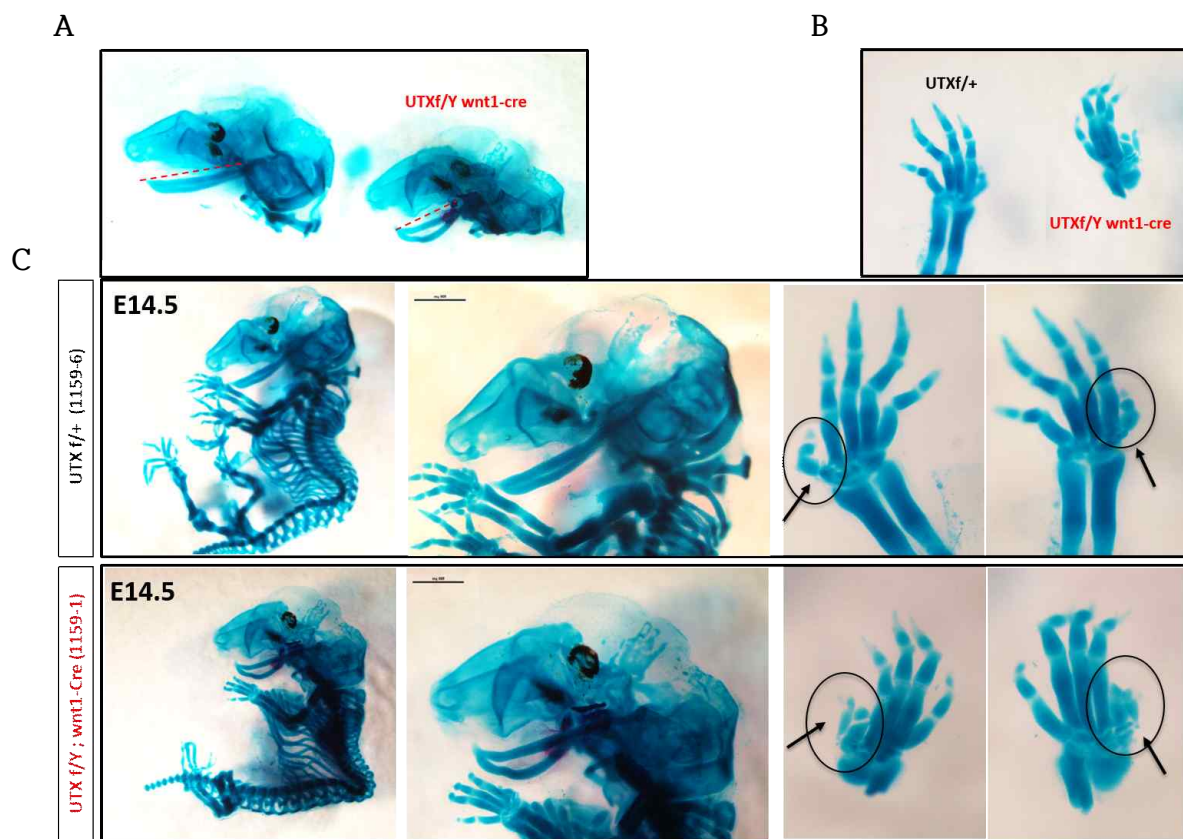


### 3. 골격계 발달 과정에서 UTX의 관여

신경능선 세포의 분화에 의해 형성되는 두개골 구조와 골격계 구조에서의 UTX의 기능을 규명하기 위해 배아 상태의 UTX KO mouse 관찰하였다. E14.5 mouse 배아를 골격 염색법 (skeletal staining)을 이용하여 WT와 KO 간의 골격계 차이를 비교하여 보았다. 먼저 배아의 피부를 제거한 후 100% 알콜에 고정시켰다가 alizarin red (연골 염색)와 alcian blue (뼈만 염색)로 염색을 진행하였다. 그 결과 몸통 부분의 총 뼈의 구성은 WT과 비교하여 차이를 보이지 않았지만 KO mouse의 전체적인 크기가 작았고, 특히 측면 머리 부분 뼈의 길이가 짧고, 아래 턱 뼈의 단축이 나타났다 (Fig. 5A).

또한, KO mouse는 정상적인 손가락 발달에 결함을 보였다. (Fig. 5B). WT mouse는 정상적인 5 개의 손가락을 가지고 있지만 KO mouse에서는 새끼손가락 부분의 손가락 뼈 발달 이상으로 뼈가 갈라진 듯한 형상을 보이며 6개의 손가락을 가지고 있는 것으로 나타났다. (Fig. 5B) 이는 후기의 배아 단계에서 배아 발달과정 중 나타난 골격 이상을 의미하며, UTX가 신경능선 세포가 골격계로 분화하는 과정 중 작용하여 정상적인 분화가 되지 못한 것으로 보여 진다. 정확히 어떠한 기작에 의해서 UTX가 관여하는 지는 추후 연구가 더 필요하다.





**Figure 5. UTX KO mouse embryo shows craniofacial deformity and osteodysplasty**

- (A) Comparison between WT and MKO mouse embryos head size by skeletal staining in E14.5
- (B) Comparison between WT and MKO mouse embryos finger formation by skeletal staining in E14.5
- (C) Comparison between WT and MKO mouse embryos whole body, head and finger's bone by skeletal staining in E14.5

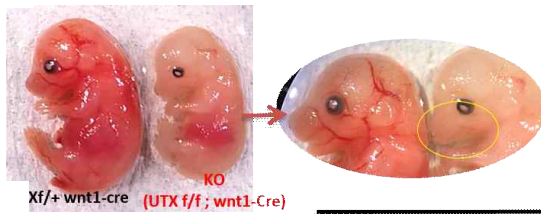
#### 4. 구개열(cleft palate) 발생과정에서 UTX의 작용

구개 발달에 있어서 UTX의 역할을 이해하기 위해서 본 연구에서는 UTX KO mouse의 구개 표현형을 관찰하였다. E17.5 단계의 WT mouse와 KO mouse를 비교한 결과 UTX가 결여된 mouse 배아에서는 상대적으로 전체 몸의 크기도 작고, 특히 아래턱 형성이 WT에 비해 거의 되어있지 않은 것으로 나타났다. 또한 WT mouse에서는 혀가 존재하지만 UTX가 결여된 KO mouse에서는 혀의 생성이 아예 되지 않은 것을 관찰하였다. (Fig 6A)

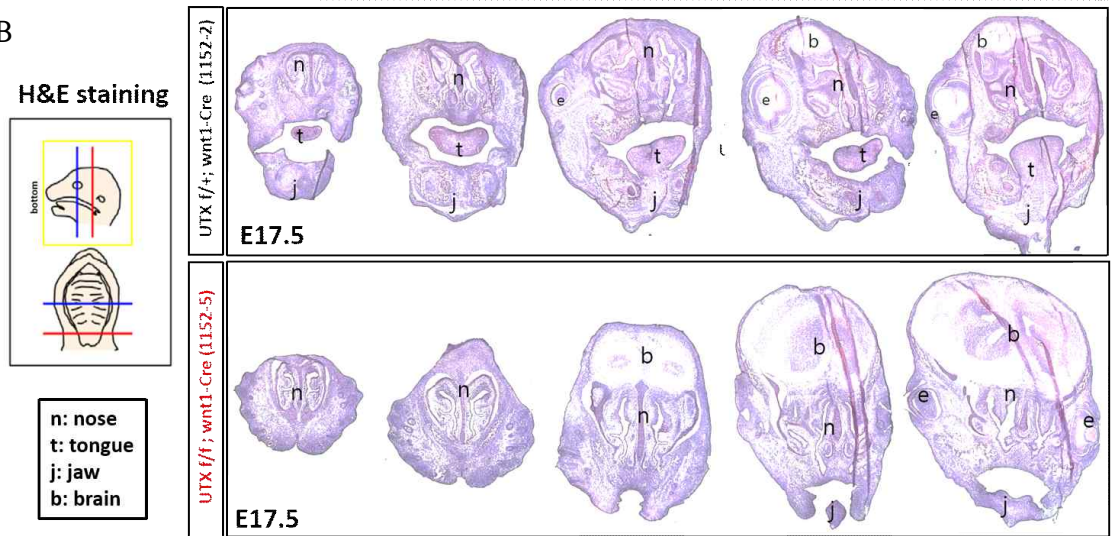
E17.5 mouse 배아의 머리 부분을 4% PFA 로 고정 한 후 OCT에 넣어 굳힌 후 이마와 평행하게 절단하고, hematoxylin 과 eosin으로 염색하는 H&E 염색법 사용하여 WT mouse와 KO mouse 의 구개 부분을 단계별로 비교하였다.

배아 상태에서 관찰한 결과와 마찬가지로 KO mouse 에서는 혀가 형성되지 않았고, 아래턱의 길이가 WT에 비해 매우 짧아 mouse 배아의 코 부분에서부터 절단하였을 때 WT에 비해 현저히 뒷부분에서 턱이 나타나는 것을 염색한 사진을 통해 알 수 있었다. (Fig. 6B) 즉 UTX가 결여된 mouse 배아에서는 구개열 (cleft palate) 발생과정에서의 결함을 보였으며 이는 가부끼 증후군의 증상과 연결지어 생각해 볼 수 있다.

A



B



**Figure 6. UTX KO mouse embryo has craniofacial abnormality in later stage**

(A) Comparison between WT and FKO mouse embryos in E17.5 . FKO mouse has smaller body and unusual facial features.

(B) section image by H&E staining in progress, between hetero and FKO mouse's cleft palate.

## 5. UTX와 FoxD3간의 단백질 상의 결합

본 연구에서는 HEK293T 세포에서 면역 침강법 (Co-IP : co immunoprecipitation) 분석을 사용하여 신경능선 세포의 전사인자인 FoxD3와 UTX간의 단백질 상 결합을 확인하였다(Fig.7A). HEK293T 세포에 HA가 표지된 FoxD3와 Myc이 표지된 UTXwt을 함께 transfection 한 후 anti-HA (hemagglutinin)로 면역침강(IP)을 진행, anti-HA and anti-myc을 이용하여 western blot을 실시한 결과, 모두 band가 발현되었다(Fig. 7A). 이를 바탕으로 UTX와 FoxD3가 단백질 상에서 결합한다는 결론은 내렸다.

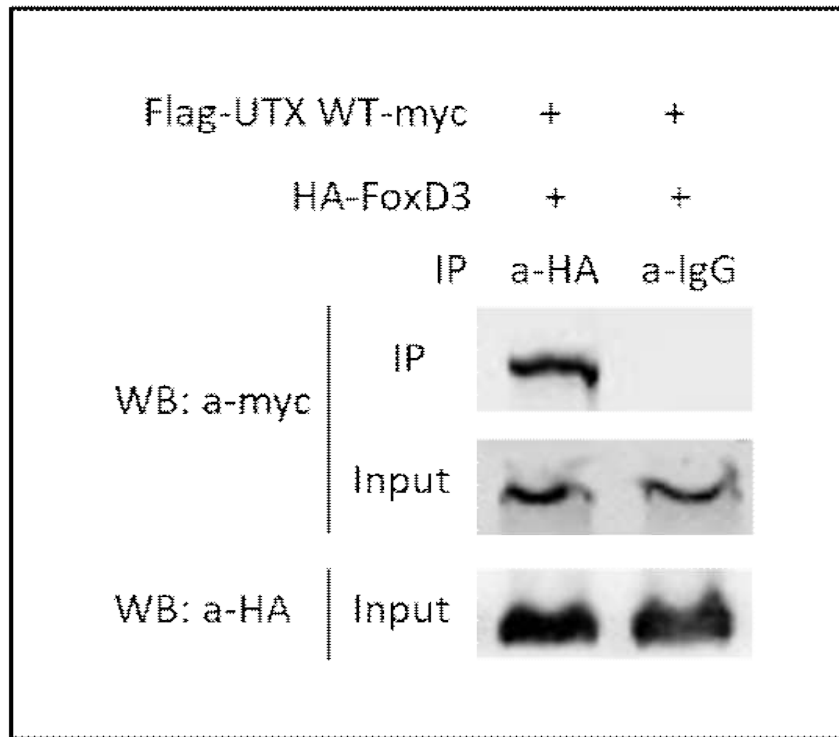


Figure 7. UTX interacts with NCC transcription factor FoxD3

## 6. 척수 내에서 FoxD3에 의해 조절되는 신경능선 세포 분화과정에 작용하는 UTX의 역할 (UTX의 GOF & LOF)

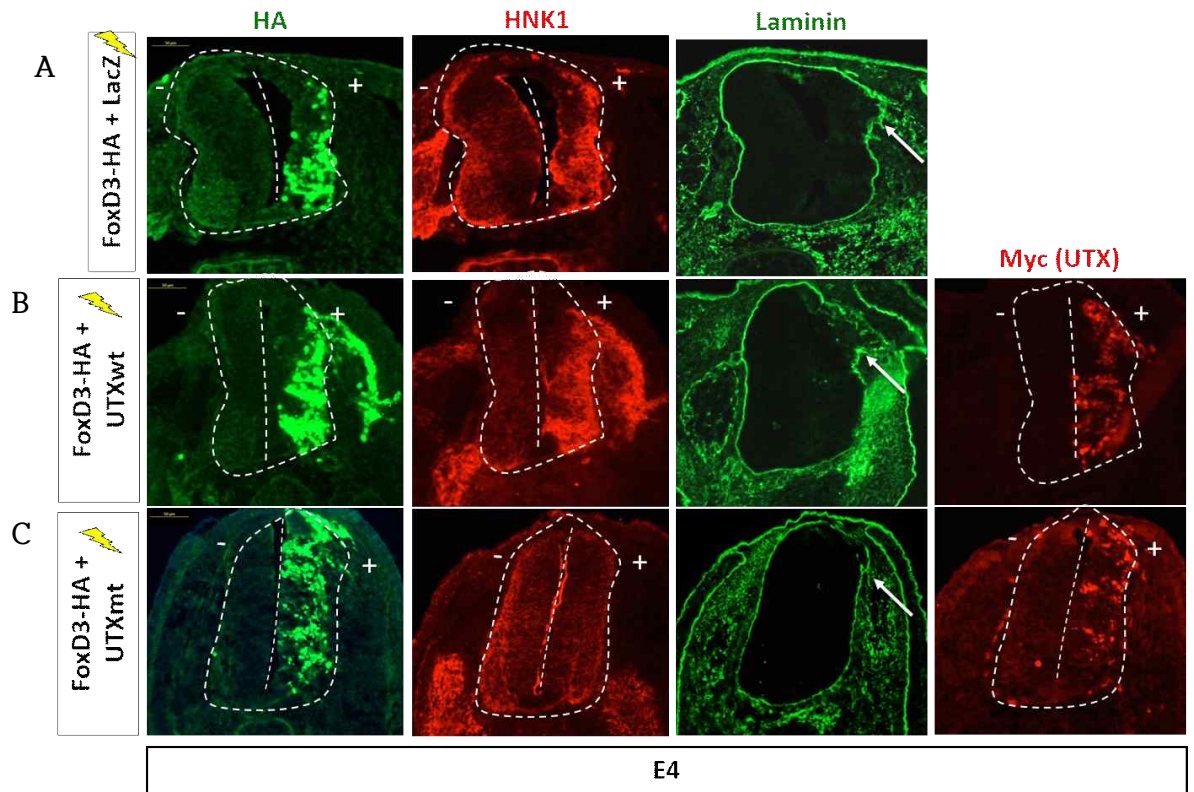
chick 배아는 유용성과 실험 조작의 용이함 때문에 발생학에서 많이 이용되는 이상적인 실험 모델이다. 본 연구에서는 HH12-13 단계인 chick의 배아를 이용하여 실험을 진행하였는데, 척수에 전기침공법 (in ovo electroporation)을 사용하여 DNA를 주입한 후 일시적으로 전기 자극을 주어 음으로 하전된 DNA가 양전하를 띤 전극에 인접한 척수 측으로 이동하게 하였다. 배아는 DNA를 주입한 후 2일 후에 harvest 하였다. (Fig. 8, 9) 이러한 실험 기법은 목표 DNA가 척수의 한쪽 면에서만 표현 되도록 하며, 이는 DNA의 분포 또는 형태에 대한 DNA의 효과를 반대쪽 (또는 대조군) 과 비교하여 관찰할 수 있다는 장점이 있다.

FoxD3가 신경능선 세포의 발달 및 분화에서 중요하다는 사실을 확인하기 위해 FoxD3를 과 발현 시켰을 때, FoxD3가 주입된 부분에서 신경능선 세포 마커인 HNK1의 발현이 증가하고, 신경능선 세포의 이동성을 표시해주는 laminin의 발현 양상으로 보아 신경능선 세포가 FoxD3에 의해 척수 dorsal쪽에서 바깥쪽으로 이동하고 있다는 것을 확인하였다. (Fig. 8A, 9A)

FoxD3와 UTX간의 상호 작용 확인하기 위해 HA가 표지 FoxD3와 myc이 표지되어 있는 UTXwt을 함께 배아에 주입하였다. 그 결과 FoxD3만 주입하였을 때 보다 HNK1의 발현이 더 유도된 것을 관찰하였고, laminin의 발현 양상으로 보아 신경능선 세포의 이동이 더 활발한 것으로 보였다. (Fig. 8B) 이 결과는 UTX의 과 발현이 신경능선 세포의 이동 및 분화과정에서 FoxD3의 활성을 자극시킨 것으로 보인다. 그러나 반대로 myc이 표지된 UTXmt와 FoxD3를 같이 주입하면

FoxD3에 의해 유도된 HNK1 발현이 유의하게 감소하였으며, 유사하게 laminin 발현 양상도 dorsal 쪽에서 변화를 보였다. 이 결과는 UTXmt가 FoxD3의 기능을 방해한다는 것을 의미 한다 (Fig. 8C). 다음으로 sh-hUTX (탈메틸 기능이 상실된 dominant negative form 으로 작용) 를 사용하여 UTX의 loss of function 연구를 수행하였다. sh-UTX와 FoxD3을 함께 chick 척수에 주사했을 때, HNK1은 UTXmt와 마찬가지로 현저한 감소를 보였고, 반대로 Pax3의 발현은 FoxD3만 주입한 척수와 비교하였을 때 증가하였다.(Fig. 9B)

Chick 척수에서 UTX의 작용 분석은 FoxD3이 신경능선 세포를 활성화시키고 Pax3 발현을 억제하면서 신경 말단 세포의 이동성을 증가시키는 작용을 돕는 기능을 한다는 것을 일관되게 나타내었다.



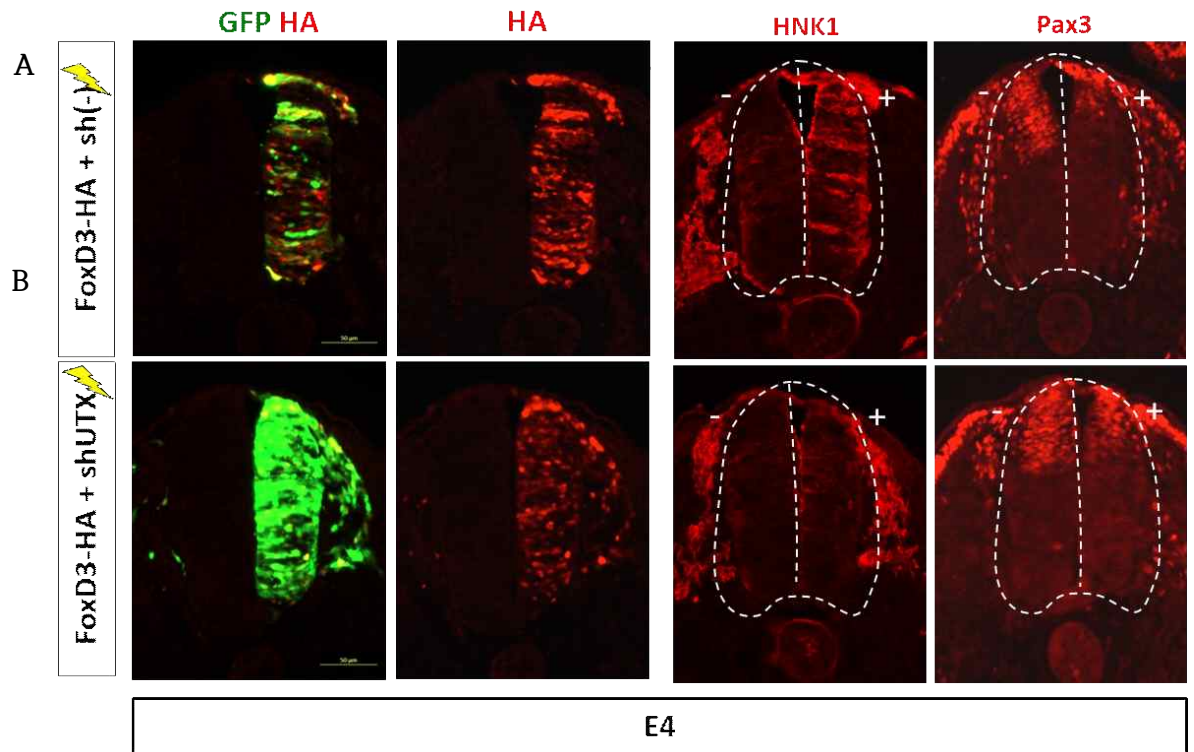
**Figure 8. UTX seems to facilitate FoxD3 function in neural crest cell**

(A) chick spinal cord electroporated with HA tagged FoxD3 leads to increased HNK1 level and promote cell migration.

(B) chick spinal cord electroporated with HA tagged FoxD3 and UTXwt leads to ectopic increased HNK1 level and promote cell migration.

(C) chick spinal cord electroporated with HA tagged FoxD3 and UTXmt leads to decreased HNK1 level and suppress cell migration.





**Figure 9. UTX seems to facilitate FoxD3 function in neural crest cell**

(A) chick spinal cord electroporated with HA tagged FoxD3 leads to increased HNK1 level but decreased Pax3 level in NCC.

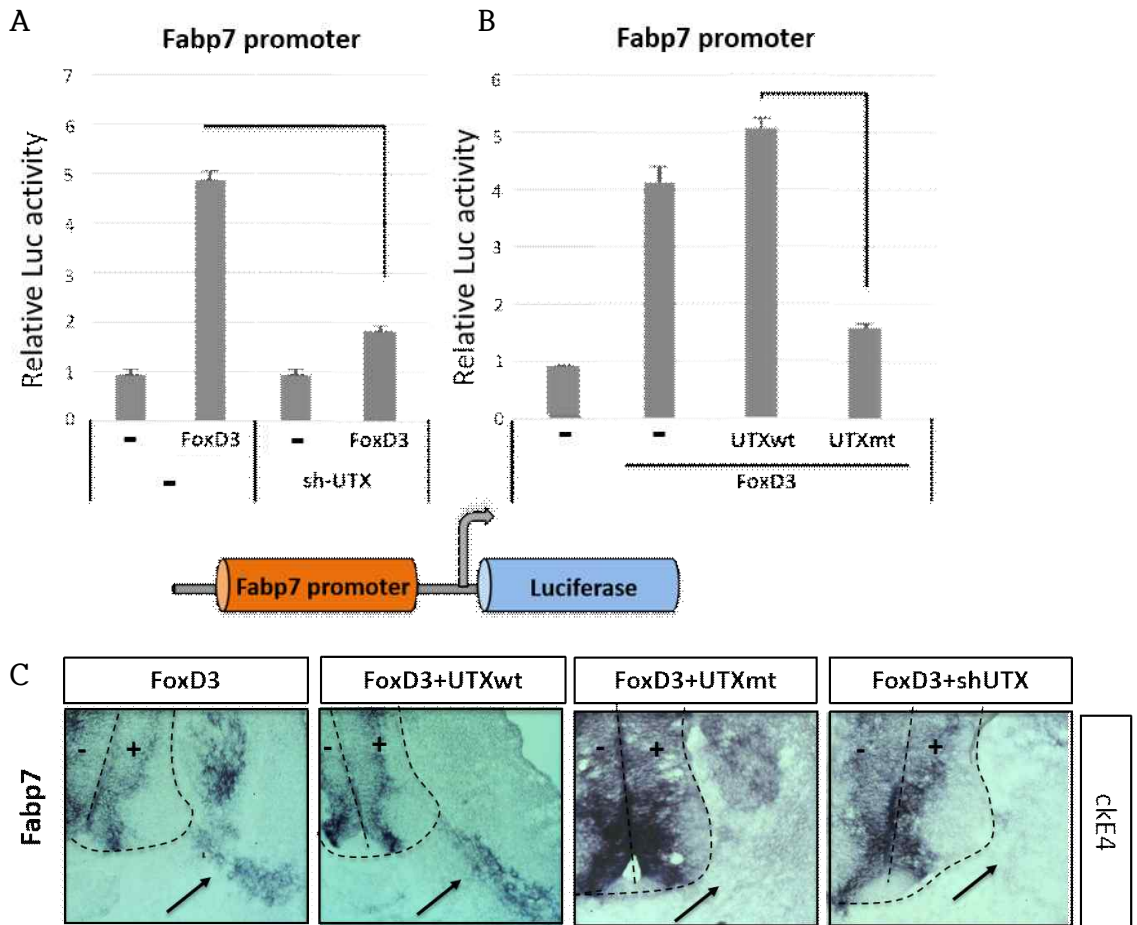
(B) chick spinal cord electroporated with HA tagged FoxD3 and UTX Knock down construct leads to suppressed HNK1 level but increased Pax3 level in NCC.

## 7. UTX가 Foxd3에 의해 활성화된 Fabp7의 유전자 발현 양상에 미치는 영향

슈반세포의 초기 결정 인자인 Fabp7은 신경능선 세포 전사인자인 FoxD3, Sox10 , 그리고 Pax3에 의해 활성화 된다고 알려져 있기 때문에 UTX가 전사인자와 상호작용하여 Fabp7에 미치는 영향을 알아보기 위해 Luciferase 분석과 in situ hybridization 실험을 수행하였다. 실험 결과, FoxD3가 과발현된 N2a (mouse neuroblastoma) 세포에서 Fabp7 프로모터의 활성화가 증가한 것을 확인하였고(Fig. 10A), 이러한 검증된 설정에서 UTX를 억제하거나 과발현 시키면 어떤 효과를 나타내는지 확인하였다. UTX K.D(sh-UTX)를 사용하여 UTX 활성을 억제시켰더니 Foxd3에 의해 유도된 Fabp7 프로모터의 활성이 감소하였고(Fig. 10A), UTXmt 또한 Fabp7 활성을 감소시켰다. (Fig. 10B). 그러나 UTXwt의 과발현은 FoxD3에 의해 유도된 Fabp7 프로모터의 활성화 수준을 증가시켰다. (Fig. 10B) 따라서 UTX는 FoxD3에 의존하는 Fabp7과 같은 조절 요소의 활성화에 영향을 미친다고 판단하였다.

In vivo 상에서도 실험을 진행하였는데, chick의 척수 내에서 전기침 공법 (In ovo electroporation) 을 이용해 FoxD3를 과발현 시키면 척수 아래 바깥쪽으로 Fabp7이 뿜어나가는 양상을 보이는데 (Fig. 10C), 이는 신경능선 세포가 신경교 (glia)로 분화되어 나가는 과정을 나타낸다. 여기에 UTX를 같이 주입하였을 때 변화를 알아보기 위해 in situ hybridization 실험으로 Fabp7 발현을 관찰하였다. 먼저 UTX를 과발현 하였을 때는 FoxD3에 의해 유도되는 Fabp7 정도가 유지되는 것으로 보였고, 반대로 UTXmt, UTX K.D (sh-UTX)을 같이 주입하여 주었을 때는, 척수 바깥쪽으로 뿜어나가는 현상이 현저히 줄어들었다. (Fig. 10C)

이러한 결과는 신경능선 세포의 이동이 UTX의 소실에 영향을 받는다는 것을 나타낸다. 이것은 N2a 세포를 이용한 *in vitro* 실험 결과와 일치하여, UTX가 신경능선 세포 전사인자들에 작용하여 DRG 및 말초 신경에서 발현되는 Fabp7의 활성을 조절하는 역할을 한다는 것을 시사한다.



**Figure 10. UTX facilitate activity of FoxD3 function**

(A) Relative luciferase activity of Fabp7 promoter-driven luciferase reporter constructs (-luc) induced by FoxD3 overexpression, with or without UTX K.D, 24 h after transfection and induction of differentiation in N2a cells . *p*-values from two-tailed or paired

(B) Relative luciferase activity of Fabp7 promoter-driven luciferase reporter constructs (-luc) induced by FoxD3 overexpression, with UTXwt and UTXmt, 24 h after

transfection and induction of differentiation in N2a cells .  
 $p$ -values from two-tailed or paired

(C) In situ hybridization of Fabp7 in chick spinal cord  
electroporated with HA tagged FoxD3 and UTX construct  
(UTXwt, UTXmt, shUTX)

## IV. 결론 및 고찰

UTX는 골격계 기형과 특이한 얼굴형 등의 증상을 동반하는 가부끼 증후군의 주요 원인 유전자이다. 이러한 증상은 신경능선 세포가 분화하는 과정에서 문제가 생겨 정상적인 세포와 조직으로 발달하지 못하여 발생하게 되는데, UTX가 신경능선 세포의 분화에 관여한다는 연구결과는 아직 알려진 바가 거의 없다. 신경능선 세포는 이동성을 가진 세포이며 이를 이용하여 생성된 위치로부터 체내의 다양한 조직 및 각종 기관이 형성되는 위치로 이동함으로써 인체 내 광범위한 분포가 가능한 것으로 알려져 있다. 신경능선 세포로부터 분화 및 생성되는 세포로는 대표적으로 말초신경, 슈만세포, 멜라닌 세포가 있으며 이 외에도 각종 뼈, 근육, 연골 등이 있다. 이러한 신경능선 세포의 이동능력에 대해 많은 연구가 진행되고 있고 그 과정에서 여러 전사인자들과 관여 단백질들이 밝혀졌으나 자세한 기전과 기능에 대해서는 아직 연구가 더 필요하다.

따라서 본 연구에서는 UTX가 신경능선 세포의 분화와 발달 과정에 영향을 미칠 것이라고 가정하고 연구를 진행하였다. 본 연구에서는 UTX가 mouse 와 chick 의 척수 내에서 신경능선 세포가 존재하는 부분에서 Pax3, Pax7, Slug, Sox10 같은 신경 능선 세포 전사 인자와 공존해 있는 것을 확인하였고 후속 연구를 진행하기 위해 Wnt1 cre를 이용해 신경능선 부분에서 특이적으로 UTX 발현을 억제시킨 조건부 KO mouse를 이용하여 실험을 진행하였다. 신경 능선 세포에서 UTX가 삭제되면 어떤 일이 발생하는지 알아내기 위해 배아 발생 단계에서 관찰하였는데 결과적으로, mouse 배아의 신경 능선 세포내에서 UTX의 부재는 Pax3, Pax7 및 다른 신경능선 세포 전사 인자의 발현 양상을 변화시키지 않았다. 즉 UTX는 신경능선 세포 전사 인자의 조절 인자로서 직접적으로 기능하지는 않는 것으로 확인되었다. 그러나 UTX가 KO된 mouse의 배아에서 몇 가지 특이한 표현형을 보이는 것이 관찰되었는데, 이는 가부끼 증후군 환자들의 증상과 유사하였다. 먼저 전체적인 몸

크기가 WT(정상)에 비해 작고, 특히 머리 부분 모양이 WT과는 다르게 함몰되어 있는 등의 장애를 보이는 경우가 많았고, 손가락 뼈 형성 장애, 특히 FKO의 경우에는 혀와 아래 턱 형성에 문제가 발생하는 현상을 관찰하였다. 전체적으로 신경능선 특이적으로 UTX가 결여된 mouse에서 두개 및 안면 장애나 골격계 이상과 같은 증상이 나타났다. UTX가 어떤 신경능선 세포 전사인자와 결합하고 있는지 알아보기 위해 면역 침강법을 이용해 확인해 본 결과 단백질 상에서 FoxD3와 결합한다는 것을 알아내었고, 이를 바탕으로 chick 배아의 척수에 전기 천공법(in ovo electroporation)으로 UTX와 FoxD3를 같이 주입하여 UTX가 FoxD3의 작용에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하였다. 그 결과 FoxD3 단일만으로도 신경능선 세포 표지자인 HNK1 과 Laminin의 발현이 증가되긴 하지만 UTXwt을 같이 주입하여 주었을 때 HNK1 과 Laminin의 발현이 더욱 증가하는 양상을 확인하였고, 탈메틸화 기능이 상실된 UTXmt를 같이 주입하여 주었을 때는 FoxD3에 의한 발현 정도가 훨씬 감소하는 양상을 보였다. 그리고 UTX K.D을 같이 주입하여 주었을 때도 UTXmt 와 마찬가지로의 현상을 보인 것으로 보아 UTX는 FoxD3와 결합하고, 신경 능선 세포 발달과정에서 FoxD3의 co-activator 로서 작용한다는 결과를 도출하였다. 또한 luciferase 분석을 통해 UTX가 FoxD3에 의해 활성화되는 슈반세포 전구체인 Fabp7의 활성을 조절하고 신경 능선 세포가 척수 아래 바깥쪽으로 분화되어 뻗어나가는 현상에 관여하는 것으로 판단된다.

종합적으로 본 연구는 UTX가 척수 내의 신경능선 세포 발현 부위에 그 전사인자들과 함께 존재하고, 전사인자들 중 FoxD3와 결합하여 FoxD3의 기능을 활성화 시키는 작용을 하여 하위 유전자 발현 조절에 관여한다는 점, 그리고 mouse 모델에서는 UTX가 결여되면 가부끼 증후군의 증상과 유사한 형태의 형태학적 결함이 나타난다는 점을 증명하였다. 따라서 이 연구는 UTX가 신경능선 세포 분화에 결정적인 역할을 할 수 있다는 가능성을 제시하고, 나아가 가부끼 증후군과 그와 유사한

회귀 질병을 예방할 수 있는 치료 전략에 주요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.



## V. 참고문헌

Bolande RP (1974) Neurocristopathies - Unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. Hum Pathol 5:409 - 429.

Dupin E, Creuzet S, Le Douarin NM (2006) The contribution of the neural crest to the vertebrate body. Adv Exp Med Biol 589:96 - 119.

Trainor PA (2005) Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. Semin Cell Dev Biol 16:683 - 693.

Santagati F, Rijli FM (2003) Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. Nat Rev Neurosci 4:806 - 818.

Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T (1981) Kabuki make-up syndrome: A syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. J Pediatr 99:565 - 569.

Adam MP, Hudgins L, Hannibal M (1993) Kabuki syndrome. GeneReviews(R), eds Pagon RA, et al. (University of Washington, Seattle).

Miyake N, et al. (2013) MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. Am J Med Genet A 161A:2234 - 2243.

Bögershausen N, et al. (2016) Mutation update for Kabuki syndrome

genes KMT2D and KDM6A and further delineation of X-linked Kabuki syndrome subtype 2. *HumMutat* 37:847 - 864.

Lederer D, et al. (2012) Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. *Am J Hum Genet* 90:119 - 124.

Banka S, et al. (2015) Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome (KS2). *Clin Genet* 87:252 - 258.

Shpargel KB, Sengoku T, Yokoyama S, Magnuson T (2012) UTX and UTY demonstrate histone demethylase-independent function in mouse embryonic development. *PLoS Genet* 8:e1002964.

Lan F, et al. (2007) A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449:689 - 694.

Hong S, et al. (2007) Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18439 - 18444.

Lang D, et al. (2005) Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature* 433:884 - 887.

Jarad G, Miner JH (2009) The Pax3-Cre transgene exhibits a rostrocaudal gradient of expression in the skeletal muscle lineage. *Genesis* 47:1 - 6.

Lederer D, Shears D, Benoit V, Verellen-Dumoulin C, Maystadt I (2014) A three generation X-linked family with Kabuki syndrome phenotype and a frameshift mutation in KDM6A. *Am J Med Genet A* 164A:1289 - 1292.

Shpargel KB, Starmer J, Yee D, Pohlers M, Magnuson T (2014) KDM6 demethylase independent loss of histone H3 lysine 27 trimethylation during early embryonic development. *PLoS Genet* 10:e1004507.

Byrd NA, Meyers EN (2005) Loss of Gbx2 results in neural crest cell patterning and pharyngeal arch artery defects in the mouse embryo. *Dev Biol* 284:233 - 245.

Ellis P, et al. (2004) SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci* 26:148 - 165.

Vissers LE, et al. (2004) Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 36:955 - 957.

Wang C, et al. (2012) UTX regulates mesoderm differentiation of embryonic stem cells independent of H3K27 demethylase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 15324 - 15329.

Faralli H, et al. (2016) UTX demethylase activity is required for satellite cell-mediated muscle regeneration. *J Clin Invest*

126:1555 - 1565.

Cheon CK, et al. (2014) Identification of KMT2D and KDM6A mutations by exome sequencing in Korean patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 59:321 - 325.

Miyake N, et al. (2013) KDM6A point mutations cause Kabuki syndrome. *Hum Mutat* 34:108 - 110.

Van Laarhoven PM, et al. (2015) Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: Functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. *Hum Mol Genet* 24:4443 - 4453.

Agger K, et al. (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449:731 - 734

Sengoku T, Yokoyama S (2011) Structural basis for histone H3 Lys 27 demethylation by UTX/KDM6A. *Genes Dev* 25:2266 - 2277.

Miller SA, Mohn SE, Weinmann AS (2010) Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell* 40:594 - 605.

Yoo KH, et al. (2016) Histone demethylase KDM6A controls the mammary luminal lineage through enzyme-independent mechanisms.

Mol Cell Biol 36:2108 - 2120.

Welstead GG, et al. (2012) X-linked H3K27me3 demethylase UTX is required for embryonic development in a sex-specific manner. Proc Natl Acad Sci USA 109: 13004 - 13009.

Verhagen JM, Oostdijk W, Terwisscha van Scheltinga CE, Schalij-Delfos NE, van Bever Y (2014) An unusual presentation of Kabuki syndrome: Clinical overlap with CHARGE syndrome. Eur J Med Genet 57:510 - 512.

Braut V, et al. (2001) Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. Development 128:1253 - 1264.

Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S (1997) Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. Nature 389:966 - 970.

## Abstract

# The role of UTX in neural crest cell development.

Lee yun young

Pharmacology Major / College of Pharmacy

Seoul national University

The neural crest cell (NCC) is a multipotent, migratory cell population that arises from the developing dorsal neural fold of vertebrate embryos. Abnormal development of NCCs causes a number of human diseases, including ear abnormalities (including deafness), heart anomalies, neuroblastomas, and mandibulofacial dysostosis. Transcription factors and signaling molecules that control multiple steps of neural crest development, ranging from neural crest induction, lineage decisions, to specific cell type differentiation, are relatively well defined. However, despite the critical role of epigenetic regulators in controlling target gene expression at different developmental stages of neural crest, it has not been fully elucidated. Here, we investigated the role of UTX, a H3K27 demethylase, in NCC development. UTX was identified as

one of the mutated genes in Kabuki syndrome with multiple problems such as heart defects, hearing loss, intellectual disabilities and distinct facial phenotypes supposedly derived from defects in NCC development. We found that UTX interacts with FoxD3, a major transcription factor in NCC differentiation. We also found that UTX functions as a co-activator of Sox10 and FoxD3 in activating the promoter activity of fatty acid binding protein 7 (Fabp7) in Neuro2a cells. To define the function of UTX in NCC development, we specifically deleted UTX in NCCs using Wnt1-Cre. We will examine whether there's any morphological phenotype in developing embryos and further define the molecular mechanism of which NCC population is affected by studying the gene expression profiles regulated by UTX. Furthermore, we will examine the histone modification states in the genomic region of UTX target genes during NCC development. From this study, we'd like to define the molecular mechanism of how UTX functions in NCC development and provide a new therapeutic approaches treating or improving the condition derived from abnormal NCC development.

*key words:* UTX, Neural crest cell (NCC), Development  
.,FoxD3, Sox10

Student number: 2015-23188