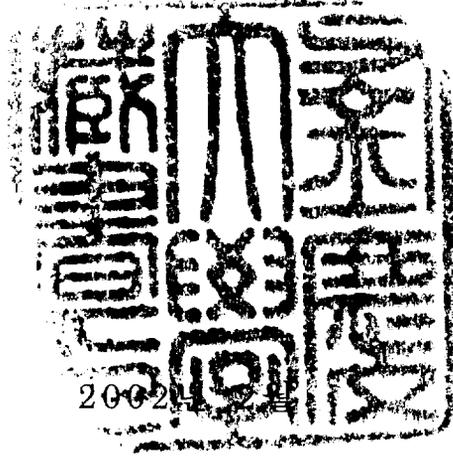


공학석사 학위논문

넙치, *Paralichthys olivaceus* 유래
핵 기질 결합 DNA의 특성 분석

지도교수 이 형 호

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함



부경대학교 대학원

생물공학과

김옥순

김옥순의 공학석사 학위논문을 인준함

2002년 2월

주	심	공학박사	홍	용	기
위	원	이학박사	이	형	호
위	원	공학박사	김	성	구



목 차

그림목차

도표목차

요약

I. 서 론	1
1. Nuclear matrix	1
2. Matrix attachment regions (MARs)	1
3. MARs의 분자적 특징과 연구목적	2
II. 실험 재료 및 방법	4
1. Strains, plasmids	4
2. Cell culture	4
3. MAR library 구축	5
4. <i>E. coli</i> transformation	5
5. <i>E. coli</i> 로부터 plasmid DNA의 분리	6
6. Polymerase Chain Reaction (PCR)	6
7. 어류의 혈구세포로부터의 Matrix/Halo Structure 분리	7
8. MAR의 분리	9
9. Matrix / Halo와 MAR의 binding	9
10. Matrix / Halo와 core MAR의 binding	10
11. Southern blot and hybridization	11
12. MARs DNA 염기서열 분석	12
13. MAR data computational analysis	12
III. 결론	14
1. MAR clones	14

2. <i>In vitro</i> MAR binding assay	14
3. Binding strength에 따른 분류	14
4. MAR DNA의 염기 서열 분석	15
5. MAR의 특성 분석	15
1) Matrix association potential과 motifs의 상대적인 분포	16
2) Binding strength와 motifs의 상관성	16
3) MAR fragment와 %AT	17
6. <i>In vitro</i> core MAR binding assay	17
IV. 고찰	18
1. Matix / Halo binding assay	18
2. MAR clones의 선택	18
3. 핵 내에서 MAR의 역할과 관련된 motif들	19
4. MAR motif model	20
5. 목표 유전자의 도입을 위한 발현 벡터의 개발	21
V. 영문 초록	22
VI. 감사의 글	23
VII. 참고 문헌	24

그림 목차

- Fig 1. Electron microscope of nuclei (A) , halo structure (B) and nuclear matrix (C) isolated which from *P.olivaceus* blood cell.
- Fig 2. Schematic representation of roles of Matrix attachment regions(MARs) in the compacted and open chromatin domains of a eukaryotic chromosome.
- Fig 3. Experimental outline.
- Fig 4. Construction of pURY19 - MAR.
- Fig 5. Identification of MAR DNA PCR products.
- Fig 6. *In vitro* Matrix / Halo binding assay.
- Fig 7. *In vitro* Matrix / Halo binding assay.
- control experiment
- Fig 8. MAR association potential and distribution of motifs.
- Fig 9. Correlation of MAR-related motifs and binding strength.
- Fig 10. Sliding window of % AT across the MARs.
- Fig 11. Fractions of bound DNA (P) and released DNA (S) in each structure.
- Fig 12. *In vitro* core MAR binding Assay.
- Fig 13. Core MAR binding and MAR binding motifs model in the flounder Matrix.
- Fig 14. Schematic representation of roles of MARs in the MAR binding motifs model.

도 표 목 차

- Table 1. Functional properties associated with isolated nuclear matrix.
- Table 2. Strains and plasmids DNAs.
- Table 3. Classification of MAR by binding strength.
- Table 4. MAR related motifs sequences.
- Table 5. Properties of 21 *P.olivaceus* MARs.
- Table 6. Primer sequences.

넙치, *Paralichthys olivaceus* 유래 핵 기질 결합 DNA의 특성 분석

부경대학교 생물공학과

김 옥 순

요약

진핵 세포에서 염색질은 응축되어 각 각의 loop구조나 domain으로 구성되며, 섬유상의 염색질(Chromatin fiber)들은 “Nuclear matrix”라는 핵 구조물에 부착되어 핵 내의 중요한 대사 과정들을 수반한다. 핵 기질 (N. matrix)은 저 염 처리(LIS; 3.5-diiodosalicylate)와 제한 효소 처리에 의해 얻게 되는데, 이 핵 기질에 특이적으로 결합한 부위를 MAR(Matrix attachment region)라고 한다. 이러한 MAR는 핵 내에서 DNA 복제, 전사, 회복, RNA 스플라이싱, 그리고 인헨서 등의 기능을 수행하며, 구조를 결정하는 등 구조적·기능적으로 중요한 역할을 담당하고 있다.

이러한 MAR의 특성을 분석하기 위해 넙치 (*P. olivaceus*)의 혈구세포로부터 핵 기질과 MAR를 분리하였다. 이러한 MAR 중 25개의 MAR 단편들을 선택하여 37°C에서 12시간 동안 핵 기질과의 결합 반응을 실시한 후, 원심분리기를 이용하여 부착된 DNA와 핵 기질에서 떨어져 나온 DNA를 분리하였다. 이 후 Southern-hybridization을 이용하여 핵 기질과의 결합력에 따라 MAR DNA들을 분류하였다. 분석한 결과, MAR 단편이 700 bp 이하로 짧을 때에는 낮은 결합력으로 나왔다. 물론 MAR의 크기가 클 경우에 핵 기질과의 접촉 부분이 넓기 때문에 결합력이 클 가능성이 크나 MAR의 단편이 크다고 해서 결합력에 영향을 주는 것은 아니다. 그리고 MAR의 염기 서열은 분석한 결과 AT-rich, ORI, ATC Rule 그리고 Topo II motif등과 연관되어 있으며 이 motif들이 함께 복합체를 이루어 기능을 수반함을 알 수 있었다. 그리고 이러한 MAR의 특성을 이용하여 유용한 유전자의 도입을 위한 발현 벡터로의 개발을 이룰 수 있을 것으로 생각된다.

주요어 : 넙치(*P. olivaceus*), 핵 기질 (N. matrix), MAR(Matrix Attachment Region)

I. 서론

1. Nuclear Matrix

진핵 생물의 세포에 있어서 핵은 생명 활동의 중심이 되는 장소이다. 유전자 복제가 일어나 핵 분열이 이루어지는 중요한 과정들이 핵 내에서 이루어진다. 최근의 연구에 따르면, 이러한 대사 과정들이 핵을 지탱해주는 핵 구조물(nucleoskeleton) 또는 핵 기질(nuclear matrix)에서 일련의 과정들이 이루어진다고 보고되고 있다(Table. 1). 우선 핵의 구조를 살펴보면, 염색질(chromatin), 핵인 부위(nucleolar compartments), 핵 공 복합체(nuclear pore complex)로 되어있다. 그리고 이 염색질 중 단백질과 섬유질로 구성된 nonchromatin이 핵 기질(nuclear matrix)에 속하며 (Bernhard and Granboulan, 1963), 핵 기질은 크게 1) nuclear lamina 2) internal protein network 3) residual nucleolar structure 등 3가지로 분류된다(Fig. 1).

섬유상의 염색질(chromatin fiber)은 유사분열의 간기 나 중기의 시기에 핵 기질에 의해 응축되는데, 이들은 domain 형태나 loop 구조를 이루고 있다. 이 중 간기 염색질은 'nuclear matrix' 라는 단백질 지지체내에 구조를 이루고 있으며, 이 구조물은 고 염 처리와 DNase 처리를 통해서 얻을 수 있다. 이 구조물 내에서 DNA는 일차적으로 nuclear lamina에 부착하게 되고 그 다음 단계에는 internal network 형태를 이루며 안정화되어 섬유상의 염색질과 접힘(folding)을 이룬다. 그리고 중기 염색체의 구조체는 'scaffold' 라고 불리는데 비히스톤 단백질로 이루어져 있으며 이 시기의 핵의 형태적 모습을 결정하며 더 나아가 세포의 형태를 결정하기도 한다 (Jovan Mirkovitch, 1984).

2. Matrix attachment regions (MARs)

핵 기질(N. matrix)의 loop구조 중에서 구조물에 특이적으로 부착되어 있는 DNA가 있는데 이 부위를 MARs 또는 SARs (matrix/scaffold attachment regions)라고 한다. MAR는 구조적, 기능적으로 중요한 특징을 지니고 있는데, 구조적으로는 핵 기질에 강하게 부착되어 핵 내의 수반되는 조절 기작들이 일

어나며 형성된 부수물 들은 핵 기질을 통해 외부로 전달된다. 진핵 세포의 염색체 상에서 MAR의 역할의 모식도를 Fig. 2에 나타내었다(Rachel Holmes-Davis and Luca Comai, 1998). 그리고, 진핵 생물의 DNA 복제에서 그 단위체를 replicon이라 하며, 이들이 핵 기질에 부착되어 있는 DNA loop 구조에서 다발형태로 모인 것을 replisomes이라 한다. 이 replisomes에서 origin이 발견되며 복제가 일어나 이중으로 된 고리모양의 새로운 DNA가 생겨 loop 구조를 이루게 된다. 그리고 MAR를 살펴보면 비 암호화 지역(noncoding area), 전사 조절 요소들이 많이 발견되는데, 이처럼 MAR에서 DNA 복제, 전사, 그리고 RNA splicing을 조절하게 되고 이에, 핵 기질을 통하여 전사체가 외부로 수송된다. 또한 enhancer의 역할과 함께 전이된 조절 유전자 부위에 MAR가 있을 경우, 핵 내의 염색질 경계 부위에 존재하여 외부 도입 유전자의 발현에 도움을 주는 것으로 나왔다. 이러한 과정들이 MAR 내에서 일어나게 된다 (M. E. Eva Luderus, 1992 ; C. Bruce A. White law, 2000).

3. MARs의 분자적 특징과 연구 목적

MAR의 특징을 알아보기 위하여 우선 넙치(*P.Olivaceus*)의 혈구세포로부터 핵을 추출한 다음, LIS(low salt)와 제한효소를 처리하여 핵 기질(N. matrix)을 분리한 후, 핵 기질 부착 DNA(MAR)를 얻었다. 그리고 구축된 MAR libraries는 다시 넙치의 혈구세포에서 분리한 핵 기질과 결합을 시킴으로써 MAR의 종류에 따라서 핵 기질에 붙는 강도를 알 수 있었다. 이러한 실험의 모식도를 Fig. 3에 나타내었다. 본 연구에서 핵 기질과 결합된 MAR libraries를 결합력에 따라 분류하기 위해 *in vitro* matrix binding assay를 실행하였다. 그리고 MAR DNA의 염기 서열을 분석한 결과, 핵 기질과 결합력이 높은 부위에 AT-rich motif가 많이 분포하는 것으로 나왔다.

핵 내에서의 중요한 기능을 담당하고 있는 핵 기질에 부착된 DNA 즉, MAR가 염색질에 분포되어 있다. 이러한 MAR DNA를 핵 기질과의 재 결합성을 검토한 후, 염기서열 분석을 통하여 MAR에 관계된 motif들을 알아보고 그에 대한 MAR DNA의 특성을 밝혀내고자 한다. 그리고 유용한 유전자의 도입을 위한 안전성과 효율성이 높은 발현 벡터의 중요성이 대두되고 있는 실정

에서 MAR의 특성을 이용함으로써 한층 더 높은 발현 벡터의 개발을 이룰 수 있을 것으로 생각된다.

II. 실험 재료 및 연구 방법

1. Strains, plasmids

본 실험에서 사용된 strain과 plasmid는 Table. 2에 나타내었다. 사용된 *E. coli*는 DH5 α MCR, JM 109를 선택했으며 이는 National Institutes of Health(NIH; Bethesda, MD, USA)에서 받았다. 그리고 plasmid는 pUC19, YIp5, pBluescript SK +, YEp24를 사용했는데, pUC19과 YIp5는 서울대학교 세포 생물학 실험실에서 분양 받았으며, pBluescript SK +는 부경대학교 미생물학과 유전학 실험실에서 분양 받아 사용하였다.

E. coli DH5 α MCR은 MAR fragment가 삽입되어 있는 plasmid vector의 증폭을 위한 host cell로 사용되었고, JM 109 strain은 pUC19 vector를 증폭시키기 위한 목적으로 사용되었다. 그리고 pUC19, YIp5 등의 plasmid는 MAR fragment의 삽입 시 필요한 MAR cloning vector(pURY19)를 구축하기 위한 것으로 사용되었다. 그리고 MAR binding을 통해 선택된 MAR DNA의 염기서열 분석을 실시했는데 이 때 pURY19M vector가 사용되었다. 이 vector는 pURY19에 *Pvu*II digestion 처리를 한 후 Polylinker Cloning Site를 잘라낸 후, 대신 pBluescript SK + vector의 *Pvu*II digestion 처리로 얻은 MCS (Multi Cloning Site) 부위를 삽입하여 만든 것으로 cloning 작업을 하는데 있어서 주로 사용되었다. 그리고 YEp24의 2 μ circle DNA 부분을 *Eco*R I으로 자른 후, pURY19M의 *Eco*R I 자리에 삽입하여 pURY19A vector를 구축하였다.

2. Cell culture

*E. coli*는 Luria-Bertani [LB:1% bacto-tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract] medium으로 37°C에서 진탕 배양되었다. 그리고 필요시에는 LB medium에 최종 농도가 100 μ g/ml이 되도록 ampicillin을 첨가하여 ALB 배지를 사용 하였다.

3. MAR library 구축

우선 MAR fragment를 삽입하기 위한 pURY19 vector를 구축하였다. pURY19는 pUC19에 *Ssp* I digestion 처리를 한 후, 그 자리에 YIp5에 *Eco*47 III digestion 하여 잘려진 *URA* 3 gene 부위를 pUC19의 *Ssp*I 자리에 삽입한 vector이다. 이 vector 내의 Polylinker Cloning Site의 *Eco*RI 부위를 자른 후, *넙치*(*P.Olivaceus*)로부터 얻은 *Eco*RI MAR fragment를 삽입하여 pURY19-MAR library를 구축하였다. (Fig. 4)

4. *E. coli* transformation

E. coli transformation은 Calcium Chloride 방법을 이용하였다. (Inoue, H.Nojima, 1990) LB에 *E. coli* DH5 α MCR 배양액 0.1ml을 10ml의 LB배지에 넣어 37°C에서 overnight growth 시킨다. 이 후 SOB [2%(w/v) bacto tryptone, 0.5%(w/v) yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, pH 6.7-7.0] 배지 250ml에 LB 배지의 배양액 2.5ml을 넣어서 1/100로 접종한 후 18°C에서 O.D.가 0.4-0.5가 될 때까지 배양을 한다. 이 후 ice에서 10분간 방치시킨 후, 원심분리기를 이용하여 4°C, 2500×g에서 10분 동안 돌린 후 cell을 얻는다. 얻은 cell을 ice-cold 상태인, TB buffer [10mM Pipes, 55mM MnCl₂, 15mM CaCl₂, 250mM KCl, pH6.7] 80ml을 넣어 잘 혼합시킨다. 이 후 ice에서 한번 더 10분간 둔 후, 다시 4°C, 2500×g에서 10분간 원심분리기를 돌린 후 supernant를 버리고 pellet에 있는 cell을 20ml의 TB buffer [7% DMSO가 첨가된 상태]와 잘 혼합시킨다. 이 후 만들어진 competent cell 200 μ l와 형질 전환 하고자 하는 DNA를 0.1-50ng의 양으로 넣어 잘 섞어 준 후 ice에서 30분 동안 반응시킨다. 30분 후 42°C에서 30초 동안 heat shock을 시킨 후, ice에서 2분 동안 두었다. 그리고 30분 후 0.8ml의 SOC [SOB 배지 + 20mM Glucose]배지를 넣어 준 후 37°C 배양기에서 1시간 동안 배양시킨다. 이 후 배양액 200 μ l를 ALB plate [LB + X-gal(50 μ g/ml), IPTG(150 μ g/ml), Amp(100 μ g/ml)]에 넣어 도말 한 후 37°C 배양기에서 overnight하여 형질 전환시킨 colony를 얻었다.

5. *E. coli*로부터 plasmid DNA의 분리

QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol(Qiagen^R)에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. ampicillin 항생제가 들어있는 LB배지 5ml에 각 colony를 접종한 후, 37°C에서 overnight하여 진탕 배양했다. 그리고 각 배양된 bacteria를 1.5ml polypropylene tube에 붓고, 60초 동안 원심분리하여 cell을 얻었다. 이 후 250 μ l의 resuspension buffer [50mM Tris pH8.0, 10mM EDTA]를 넣고 vortex시켜 cell과 잘 혼합하였다. 이 후 250 μ l lysis buffer [200mM NaOH, 1% SDS]를 넣어서 조심스럽게 혼합시킨 후 5분간 실온에 두었다. 이 후 350 μ l의 neutralization buffer [3.0M potassium acetate pH 5.5 with acetic acid]를 넣어 혼합시킨 후 15,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 supernant를 silica가 있는 QIAprep spin column에 넣어서 30-60초 동안 원심분리를 하였다. 그런 다음 아래로 내려온 buffer 용액을 버린 다음 750 μ l의 washing buffer [50mM NaCl, 10mM Tris pH7.5, 2.5mM EDTA, 50% ethanol]를 넣고 30-60초 동안 원심분리기에서 돌린 후, 다시 buffer 용액을 버린다. 그리고 남은 washing buffer를 없애기 위해 1분 동안 원심분리기에서 한 번 더 돌린 후 ethanol이 남아 있지 않도록 dry시킨 후, 50 μ l의 TE buffer [10mM Tris, 1mM EDTA pH8.5]나 증류수를 넣어 DNA가 녹을 수 있도록 1분간 방치시킨 후, 1분간 원심분리 시킨 후 plasmid DNA를 회수하여 0.7% agarose gel에서 전기영동법에 의해 확인했다.

6. Polymerase chain reaction (PCR)

분리한 pURY19-MAR DNA를 *EcoRI* digestion 처리를 함으로써 *EcoRI* MAR fragment의 존재 유무와 크기를 알 수 있었다. 이 후 Matrix와의 결합을 위한 MAR fragment를 얻기 위하여 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 시행했다. PCR 증폭은 Perkin Elmer PCR System 9700을 사용하였다. 반응 부피는 총 50 μ l로 하였으며, 10ng의 template DNA, 0.25mM의 dNTP, 0.5-1.0U의 Tag polymerase(Promega^R), 1 \times buffer, 3mM MgCl₂, 10pmole의 universal primer (M13F/R)를 혼합하여 반응시켰다. 사용한 primer 중 M13 Forward(24mer)는 5'-d(CGC-CAG-GGT-TTT-CCC-AGT-CAC-GAC)-3',

M13 Reverse (22mer)는 5'-d(TCA-CAC-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C)-3'을 사용하였다. 그리고 Matrix와의 결합 실험을 확인하기 위한 것으로 MAR fragment의 labeling을 하는 경우에는 0.2mM의 digoxigenin-1-dUTP (DIG)를 반응물에 첨가하였다. PCR 반응 조건으로 Hot Start는 94℃, 5분간 반응시켰고, 94℃, 40초 동안 Denaturation 반응, 60℃, 40초 동안 Annealing 반응, 72℃, 80초 동안 Extension 반응을 총 30cycle을 시행했다. 그리고 이후 72℃, 7분 동안 둔 후 4℃에서 Storage 반응을 시킨 후, 전기영동에 의해 PCR product들을 확인 할 수 있었다.

7. 어류의 혈구세포로부터의 Matrix / Halo Structure 분리

본 연구는 넙치(*P. olivaceus*)로부터 lithium 3,5-diiodosalicylate (LIS) 추출 방법을 이용하여 핵 구조물인 Matrix/Halo를 얻었다 (Mirkomitch *et al.* 1984). 넙치로부터 혈액을 채취하여 혈액응고를 방지하기 위해 혈액 10ml당 3.2mM EDTA가 들어 있는 tube에 넣어서 ice에서 보관했다. 이 후 원심분리기를 이용하여 4℃, 3000rpm에서 10분간 돌린 후, 혈청을 제거하여 혈구 세포를 얻었다. 얻어진 혈구 세포에 bufferA를 사용된 혈액 부피의 2배로 넣어 천천히 흔탁 시킨다. 이 때, bufferA는 3.75mM Tris-HCl pH7.4, 20mM KCl, 3.2mM EDTA, 0.25M Sucrose, 0.05mM Spermine, 0.125mM Spermidine, 1% thiodiglycol, 1mM DTT, 20µg/ml Aprotinin으로 구성되어 있다. EDTA는 수용액 중의 미량 금속 제거에 사용이 되어 혈액의 응집 현상을 방지하기 위해 사용되었고, spermine과 spermidine은 DNA의 구조를 안정화시키기 위한 것이며, DTT(dithiothreitol)는 고정화의 역할뿐 아니라 Aprotinin과 같은 Protease inhibitor로 사용되었다. 이러한 DTT는 SH(thiol)의 산화를 방지하여 disulfide 결합이 일어나지 못하도록 함으로써 protease inhibitor로의 기능을 수행한다. (R. CURTIS BIRD *et al.*, 1997)

이 후 4℃, 3,000rpm에서 10분간 원심분리를 한 뒤 bufferA에 있는 혈청을 분리하여 버리고, 다시 한번 washing을 위해서 bufferA와 섞어 원심분리를 했다. 이 후 같은 방법으로 supernant를 버리고, 0.5mM EDTA가 든 bufferA와 혼합하여 같은 방법으로 washing을 2번 더 시행하였다. 2번의 washing이 끝난 후 15ml의 bufferB [bufferA(without Sucrose), 0.1% digitonin(Sigma),

1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 4mM Vanadyl Riboside Complex (VRC)]를 넣어 현탁 후 teflon-glass homogenizer을 이용하여 15분 왕복하여 cell을 깨뜨려 핵을 얻었다. 이 때 bufferB의 digitonin은 세포막의 지질층을 녹이는데 쓰이며, PMSF는 Protease inhibitor의 역할, VRC는 RNase inhibitor로의 역할을 수행한다. 이 후 핵을 포함한 현탁액에 15ml의 buffer C [buffer B+0.5M Sucrose]를 첨가하여 잘 혼합한 후 4°C, 3,000rpm에서 15분 동안 원심분리기에서 돌렸다. 원심분리 시킨 후 supernant를 버리고 분리한 핵에 20-25ml의 bufferB를 첨가하여 4°C, 2500rpm에서 10분간 2번 washing을 하였다.

모든 washing이 끝난 후 핵을 10 O.D.200/100 μ l 농도가 되도록 Stabilization buffer [buffer A(without 1mM PMSF, 4mM VRC, 0.5mM CuSO₄)]와 현탁시켜 37°C에서 20분간 반응을 시켰다. 이 후 8ml의 3,5-diiodosalicylate (LIS) buffer [25mM LIS, 2mM KCl, 2mM EDTA/KOH pH7.4, 0.25mM spermidine, 5mM Hepes/NaOH pH7.4, 0.1% digitonin, 1mM PMSF, 4mM VRC]를 조금씩 천천히 첨가한 후 실온에서 5분간 반응시킴으로써 Matrix 구조에 loop모양의 DNA가 붙어있는 상태인 Halo structure를 얻을 수 있었다. 이 후 실온에서 2,000 \times g 로 10분간 원심분리 시킨 후, pellet을 10ml의 MWB [Matrix Washing Buffer; 20mM KCl, 10mM MgCl₂, 70mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.4, 0.05mM spermine, 0.125 spermidine, 0.1% digitonin, 1mM PMSF, 4mM VRC]와 혼합한 후, 실온의 2,000 \times g에서 10분간 4번 washing을 실시하였다. 이 후 Storage buffer [7.5mM Tris-HCl pH7.4, 40mM KCl, 1mM EDTA, 0.2M Sucrose, 50% glycerol, 0.1mM spermine, 0.25mM spermidine, 1% thiodiglycol]에 Halo를 -70°C에서 보관하였다. (Pierre Rollini, 1999)

그리고 Matrix를 얻기 위해서 5 \times 10⁷ Halos 당 0.5ml의 *EcoRI* 처리(*EcoRI* 400Units/ml) 하여 37°C에서 3시간 반응 시킨 후, 4°C, 2,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 그 pellet을 0.5ml의 MWB [without MgCl₂, with 1mM EDTA]로 두 번 washing을 한 후 -70°C에서 보관하였다. (S.M.Gasser and U.K. Laemmli, 1986)

8. MAR의 분리

분리한 Matrix에 lysis buffer [10mM Tris-HCl pH7.4, 10mM EDTA, 0.5% SDS]를 넣고 현탁시킨 후, proteinase K를 100 μ g/ml로 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 overnight시킨다. 이 후 Phenol-Chloroform 처리를 하여 MAR DNA를 정제하고 이를 isopropanol 침전 반응을 한 후, TE buffer [10mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH7.4]를 넣어 MAR DNA를 얻었다. 이 후 pURY19의 *EcoRI* 자리에 *EcoRI*으로 잘려진 MAR fragment를 삽입하여 MAR library를 완성하였다.

9. Matrix / Halo와 MAR의 binding

핵 구조물과 MAR의 binding 실험을 하기 위해 2가지 방법을 사용하였다. 우선 MAR fragment는 M13F/R primer를 이용한 PCR방법에 의해 준비되었다. matrix와 MAR binding 실험은 nuclear matrix(3×10^6 nuclear)와 MAR DNA(30-100ng)를 matrix binding buffer [2% triton X-100, 250mM KCl, 70mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7.4]에서 혼합시켰다. 그리고 이 혼합액에 *E.coli* DH5 α MCR에서 분리한 genomic DNA를 sonication 시켜 얻은 그 fragment들을 binding 실험에서 competitor DNA로서 첨가하여 반응물이 총 100 μ l의 양이 되게 하였다. 그리고 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 binding 실험을 실시했다. 그리고 Halo와 MAR binding 실험은 이전의 같은 조건으로 Halo Structure와 MAR DNA를 1 \times *EcoRI* digestion buffer와 혼합한 후 *EcoRI* (36units) 처리를 하여 전체 100 μ l의 양을 맞춘 후 37 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 binding을 실시했다. (Cornelis M. van Drunen, 1999)

Matrix/Halo와 MAR와 binding 반응이 끝난 후, 4 $^{\circ}$ C의 10,000 \times g에서 10분간 원심분리시킨 후 supernant와 pellet을 각각 조심스럽게 분리했다. 그리고 50 μ l의 1 \times *EcoRI* digestion buffer으로 pellet을 washing 해 준 후 lysis buffer와 함께 100 μ g/ml proteinase K를 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응을 시켰다. 이 후 각각의 Matrix에서 떨어져 나온 DNA 단편들인 supernant와 Matrix에 붙어있는 DNA 단편들인 pellet을 알콜 침전법을 이용하여 10 μ l TE buffer를 넣어 DNA를 회수하였다. 이 후에 0.8% agarose gel에서 binding에

사용된 MAR fragment와 supernant, pellet의 DNA를 각 각 loading하여 전기영동을 시킨 후 VILBER LOURMAT(BIO-PRINT^R)을 이용하여 사진을 찍어 확인하였다.

10. Matrix / Halo와 core MAR의 binding

in vitro MAR assay를 통해서 strong binder로 밝혀진 MAR DNA를 선택하여 core MAR binding을 실시했다. 이에 선택된 5개의 MAR DNA 중 pURY19-MAR 362는 3개의 단편으로 각 각 나누었다. 362-core1은 *EcoR* I-*BamH* I 단편, 362-core2는 *BamH* I-*Xho* I 단편, 362-core3는 *Xho* I-*EcoR* I 단편으로 잘라 core fragment들을 준비하였다. 그리고 pURY19-MAR 366은 6개의 단편을 준비했는데, 366-core1은 *EcoR* I-*Sca* I 단편으로 잘랐으며, 366-core2~4 단편들은 염기 서열 분석을 위해서 Exonuclease III를 통해서 얻은 각 각의 pURY19M-MAR 366B16, C12, C2의 DNA를 M13F/R primer를 사용하여 PCR을 통하여 각 각의 산물을 얻을 수 있었다. 그리고 366 core5는 M13F, 366AR primer를, 366-core6은 366BF, 366BR primer를 사용함으로써 PCR을 통하여 각 각의 산물들을 얻을 수 있었다. 그리고 PCR의 반응 조건은 이전의 MAR DNA를 얻기 위한 방법과 같았다. 그리고 pURY19- MAR 374는 *EcoR* I-*Sal* I 단편의 374-core1, *Sal* I-*Xmn* I 단편의 374-core2, *Xmn* I-*EcoR* I 단편의 core3을 준비하였다. 또한 pURY19-MAR 380은 *Sac* I 단편이 제거된 core1, *Sac* I-*Pvu*II 단편인 core2, *Pvu*II-*Sac* I 단편인 core3, core2와 core3을 합친 core4 단편으로 구성되며, pURY19-MAR 390은 *EcoR* I-*Sac* I 단편인 core1, *Sac* I-*Sac* I 단편인 core2, *Sac* I-*EcoR* I 단편의 core3, Exonuclease III를 통해서 얻은 pURY19-MAR 390 C16의 M13F/R primer를 이용한 core4, 390AF, M13R primer를 이용하여 얻은 core5 단편들을 각 각 준비하였다(Fig. 13-1~5). 각 각의 primer sequences는 Table 6. 에 나타내었다.

준비되어진 각 각의 MAR 단편들을 Halo 구조물과 binding을 실시했다. 실험 조건 중 core MAR DNA를 100ng으로 첨가하였으며, 그 외의 조건은 이전의 binding 실험과 동일하게 실시하였다.

11. Southern blot and hybridization

회수한 pellet과 supernant DNA를 TAE buffer[0.04M Tris-acetate pH8.3, 1mM EDTA]에서 ethidium bromide가 들어간 0.8% agarose gel에 loading 시킨 후 적당량의 0.25N HCl을 넣어 5분간 천천히 흔들어 주면서 depurination을 시켰다. 이를 한 번 더 시행한 후, 증류수로 gel을 씻은 후 버렸다. 이 후 0.4N NaOH를 gel에 적당하게 넣어준 후 천천히 흔들면서 20분간 반응시키는데 이를 2번 실시했다. denaturation 과정이 끝나고 나면, gel의 뒷면에 positive charged nylon membrane을 붙였다. 이 때 membrane은 GeneScreen Plus(Dupont-NEN Research Products^R)을 사용하였다. 그리고 gel의 앞뒤로 Whatman 3MM paper를 각각 3장씩 붙인 뒤 towel위에 놓아 최종적으로 transfer buffer[0.4N NaOH]와 연결할 수 있는 긴 Whatman 3MM paper를 연결하여 모세관 현상에 의해 DNA가 membrane으로 옮겨 갈 수 있도록 장치했다. 12-16시간 이후 gel에서 membrane을 꺼내어 NaOH를 중화시키고 남은 agarose를 없애기 위해서 neutralization buffer [0.1× SSC, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl pH7.5]에서 5분간 반응시켰다. (Samrook *et al.* 1989)

neutralization이 끝난 membrane을 hybridization tube에 넣어 15ml의 hybridization solution[5× SSC buffer, 0.1% N-lauroylcosine(Sigma), 0.02% SDS, 1% blocking reagent]을 첨가했다. 그리고 hybridization incubator에 넣어 68℃에서 1시간 반응시켜 prehybridization 과정을 거쳤다. 그리고 digoxigenin(DIG) Mix (Roche^R)를 이용하여 PCR labeling 된 probe를 100℃에서 10분간 denaturation 시킨 후 바로 ice에 넣어 3-5분간 두었다. 이 후 hybridization solution을 제거한 뒤, hybridization solution과 probe를 넣고 68℃에서 16-17시간 동안 반응시켰다. 반응 뒤 tube에서 probe를 제거하고 wash solution 1[2×SSC, 0.1% SDS]을 넣고 실온에서 5분간 돌렸다. 이를 2번 washing 한 뒤, wash solution 2 [0.1× SSC, 0.1% SDS]를 넣고 68℃에서 15분간 washing을 2번 하였다. 이 때 첨가하는 buffer의 양은 membrane 100cm²당 50ml이다.

그 다음 과정은 모두 실온에서 행해지며 detection을 위해 washing buffer [Maleic acid buffer(0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5 with NaOH), 0.3% Tween 20]로 1-3분간 rinse 시킨다. 그리고 25ml의 blocking solution

[1% blocking reagent, Maleic acid buffer]를 첨가하여 30분간 돌린 후, blocking solution의 5ml당 1 μ l의 anti dig AP conjugate solution(Roche^R)의 비율로 25ml을 첨가한 후 30분간 반응을 실시했다. 일련의 과정들이 끝난 후 washing buffer로 15분간 2번 반응시켰으며 tube에서 membrane을 꺼내어 detection buffer [0.1M Tris-HCl pH9.5, 50mM MgCl₂ , 0.1M NaCl]이 담긴 150mm dish에 5분간 넣어 두었다. 그리고 새로운 150mm dish에 membrane을 넣고 color-substrate solution [20 μ l/detection buffer ml]을 천천히 부은 후 어두운 곳에 넣어 DNA fragment가 보일 때까지 반응시켰다. 이후 반응을 멈추기 위해서 TE buffer를 넣어 5분간 반응시킨 후 Image Analysis System(BIO-PRINT^R)를 사용하여 사진을 찍은 후, DNA 단편들을 비교했다.

12. MARs DNA 염기서열 분석

MAR fragment는 pURY19 vector 내에 있어 M13F/R primer를 사용하여 BigDye Terminator Cyclic Sequencing 반응으로 PCR 한 후 ABI 377 DNA Sequencer를 이용하여 염기 서열을 분석했다. 그리고 1Kb 이상의 크기를 가진 MAR DNA 중 MAR 366, MAR390, MAR20, MAR63들은 Exonuclease III를 이용하여 자른 후, 각 각의 단편들을 ligation 시켜서 pURY19 vector를 이용하여 분석했다. MAR374(*Sal* I), MAR380(*Sac* I), MAR74(*Eco*R I)들은 각 각의 제한효소로 처리하여 pURY19M vector의 MCS(Multi Cloning Sites)에 넣어 cloning 하여 염기 서열 분석을 실시하였다.

13. MAR data computational analysis

우선 MAR 염기 서열을 분석하기 위해 DNAsis Sequence Analysis Software(Hitachi Software^R)을 사용하였으며, genome data를 분석하기 위해 GenBank인 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하였다. 그리고 밝혀진 MAR DNA의 염기 서열을 이용하여 MAR에 관계된 motif들과 matrix와의 결합력을 알아보기 위해 MAR Finder (<http://futuresoft.org/MAR-Wiz>)를 이용하여 MAR의 특징들을 분석하였다. 이 밖에 MAR 내에서

interspersed repeats sequence를 찾기 위해 RepeatMasker2 (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RM2-resp.pl>)을 사용하였으며, transcription binding site를 알아보기 위해 Motif (<http://www.motif.genome.ad.jp>), promoter 부위를 찾기 위해서 (<http://www-hgc.lbl.gov/projects/promoter.html>), 그리고 예상되는 Exon 부위를 찾기 위해서 BCM (<http://dot.imager.bcm.tmc.edu;9331/search/gene-search.html>)등의 internet program을 이용하여 data를 분석하였다.

III. 결론

1. MAR clones

Matrix로부터 분리된 각 각의 MAR fragment를 pURY19 vector에 넣어 *E.coli* DH5 α MCR strain으로부터 MAR clone들을 얻었다. 이들 각 clone 중 25개를 선택하여 MAR binding에 사용하였다. 각 각의 MAR 삽입 부분은 PCR을 이용하여 증폭시켰으며 clone 들의 크기와 종류는 Fig. 5와 Table. 3에 나타내었다.

2. *In vitro* MAR binding assay

Halo(3×10^6 nuclear)와 MAR binding을 한 후, Matrix에 붙어 있는 DNA는 원심분리를 했을 때 단백질 성질을 가지는 Matrix에 의해 pellet 부분으로 가라앉는다. 이에 반해 떨어져 나온 DNA는 supernant로 나와 분리가 가능하다. 이와 같은 원리를 이용하여 binding 시킨 MAR fragment는 Southern hybridization 결과를 통해서 pellet, supernant에서의 band 진하기를 비교함으로써 matrix와의 결합력을 알 수 있었다. 그리고 binding 실험에 있어서 negative control로서 pUC19을, positive control로서 pURY19A를 사용하였다. 이러한 binding assay는 Fig. 6(1~8) - Fig. 7에 나타내었다.

3. Binding strength에 따른 분류

Pellet과 supernant의 band 진하기를 비교하기 위하여 quantification density(BIO-PRINT^R)를 이용하여 binding strength(%)를 구했다. 그리고 binding strength에 따라 5가지로 분류했는데, strong binder는 70-100%, medium binder는 40-70%, medium-weak binder는 30-40%, weak binder는 30%이하, unbound는 0%로 각 각 구분 지었다. 이로써 25 MAR fragment 중 strong binder는 5개, medium binder는 5개, medium-weak 2개, weak 6개, unbound 7개로 결과가 나왔다. (Table. 3)

4. MAR DNA의 염기 서열 분석

각 MAR DNA의 염기 서열을 확인 한 뒤, MAR와 관련되는 motif들을 찾기 위해 DNAsis sequence analysis software와 MAR Finder를 이용했다. 이 중 MAR390의 염기 서열 중 937-972 부위에서 (CA)_n simple repeat가 발견되었다. 이 simple repeat는 핵 내의 단백질 수송에 관련된 signal의 암호화와 관련된다. 그리고 231-241 부위에서 ACS(ARS Consensus Sequence) motif가 존재했다. 그리고 MAR20은 (CGGGG)_n simple repeat (422-446), MAR32는 (GA)_n simple repeat(196-218)가 발견되었다. 이외에, MAR64는 997-1005 부위에서 BUR(base unpairing region) motif가 발견되는데 이것은 DNA의 unwinding에 관여하는 것으로 MAR와 관련되는 motif로 잘 알려져 있다. 그리고 MAR76의 염기 서열을 분석한 결과 62-72 부위에서 ACS motif가 발견되었고 MAR366(1460-1485)과 MAR76(47-72)는 plant MAR consensus motif가 나타났다. 이 consensus motif는 TCTTTAATTTCTAATATATTTAGAA의 염기서열을 가진다 (Kohul-shigematsu's lab. JBC). 각 각의 motif의 관한 내용은 Table. 4에 나타내었다.

5. MAR의 특성 분석

MAR DNA의 염기 서열 분석을 통해서 MAR에 관련된 motif들을 조사한 결과 (Table. 5), AT-rich, ORI, ATC Rule등의 motif가 matrix binding에 상관성이 있는 것으로 보인다. 하지만 이 motif들만 많이 존재한다고 영향력이 있다고 할 수 없고, 부가적으로 kinked DNA, Topo II motif가 함께 존재할 때 binding strength에 영향력을 주는 것으로 보인다. 그리고 TG-rich, curved DNA, CAAT·TATA box motif등은 상관성이 적은 것으로 나왔다. 이러한 MAR의 특성을 정확히 분석하기 위해서 MAR Finder(Gautam B. Singh, 1997)를 통해 각 각의 fragment에서 이 motif들의 상대적인 위치와 nuclear matrix와의 binding 정도를 다음과 같이 알아보았다.

1) Matrix association potential과 motifs의 상대적인 분포

각 각의 MAR fragment들의 matrix association potential과 motif 위치를 비교하기 위해서 Fig. 8(1~7)에 나타내었다. 우선 binding strength에 따라 구분했을 때 그 강도에 따른 차이점을 확실히 결정지을 수 있다. 우선적으로 binding association potential이 높게 나온 부분에는 AT-rich, ATC Rule motif가 집중되어 있음을 알 수 있다. 그리고 이 motif들과 더불어 Topo II motif가 항상 존재했다. 그리고 motif의 상대적인 위치로 살펴보았을 때, curved DNA motif는 전체 수로 살펴 볼 때와 달리 각 fragment 상의 위치에서 어느 정도 matrix binding에 영향력을 지님을 알 수 있었다. 그리고 또한 binding strength가 낮은 MAR fragment 경우에는 전체 motif 수도 적지만 AT-rich motif가 거의 보이지 않음을 알 수 있었다.

2) Binding strength와 motifs의 상관성

MAR fragment의 binding strength를 기준으로 하여 각 각의 motif들과의 연관성을 나타내기 위해 plot graph와 1차 함수를 이용하여 나타냈다. (Fig. 9) 우선 binding strength와 length를 살펴보았을 때 기울기 값이 높게 나와 MAR에 있어서 약간 상관성이 있는 것으로 나왔다. 그리고 binding assay를 한 결과 700bp 이하의 짧은 단편들은 결합력이 약한 경향으로 나왔다. 그러나 MAR fragment가 큰 길이를 지니고 있다고 해서 matrix와 연관성이 있는 것은 아니며 그 만큼 확장된 부분이 많이 존재하는 만큼 matrix와의 결합성의 가능성이 커진다고 할 수 있다.

MAR와 관련된 motif들 중에서 TopoII motif가 $r=0.63$ 으로 가장 높게 나왔으며, ORI($r=0.40$), ATC Rule($r=0.39$) motif 순으로 높게 나왔다. 각 fragment의 위치 상으로 살펴 보았을 때 AT-rich motif가 높게 나왔으나 전체적인 수로 살펴보았을 때는 $r=0.32$ 로 약간 낮은 값이 나왔다. 이로써 MAR DNA의 특징은 ATC Rule, ORI, TopoII, AT-rich 의 motif들이 관여하는데 이들이 단독으로 역할을 하는 것이 아니라, 함께 복합체를 이루어 N. matrix와의 결합력에 영향을 줌을 알 수 있었다.

3) MAR fragment와 %AT

각각의 MAR fragment와 %AT 그래프는 Fig. 10에 나타내었다. 이를 통해서 각 binding strength의 분류에 따라 살펴보면 결합력이 높은 MAR fragment들은 %AT값이 높은 부위가 고르게 많이 분포함을 알 수 있었다. 이에 반해 결합력이 낮을수록 %AT 값이 낮아지는 부위가 많이 발견되며, Matrix와의 결합력이 없는 MAR fragment의 경우에는 확실히 %AT가 낮아짐을 확인 할 수 있었다.

6. *In vitro* core MAR binding assay

Strong binder로 선택된 5개 MAR DNA로부터 core MAR DNA 각 단편들을 Halo 구조물과 binding을 한 후, Southern-Hybridization을 통하여 각각 단편들의 결합력을 알 수 있었다. 이를 Fig. 12 (1-5)에 나타내었다. 그리고 각각의 MAR DNA를 positive control, pURY19-MAR 49를 negative control로서 사용하였다.

IV. 고찰

1. Matix / Halo binding assay

MAR fragment와 matrix와의 binding 실험을 하는 경우에 제한 효소를 처리하지 않고, *E. coli* DH5 α MCR로부터 분리한 genomic DNA를 competitor DNA로서 첨가했다. 그리고 Halo Structure와의 binding을 위해서는 제한 효소를 처리하여 같은 조건에서 실험을 실시하였다. 두 가지 실험의 경우에 Matrix와의 실험에서 genomic competitor DNA를 넣어주는 것과 Halo와의 binding에서 제한 효소에 의해 잘려 나온 단편들의 competitor DNA가 실험에 있어서 비슷하게 보인다. 그러나 MAR fragment를 넣지 않은 상태에서 matrix만을 같은 조건으로 실험했을 때 supernant에 밀려 나오는 DNA가 많이 발견되었다. (Fig. 11) 이것은 그만큼 Matrix에 DNA가 안정적으로 붙어 있지 않아 MAR DNA를 넣었을 때 또 하나의 competitor DNA로 작용하여 MAR fragment의 Matrix와의 특이성이 떨어지게 되는 것이다. 따라서 Halo structure 상태에서 MAR binding을 하게 되면, 제한 효소에 의해서 나오는 DNA fragment가 Matrix와의 binding 실험에서의 양보다 적으므로 binding 실험에 있어서 특이성이 높아지게 된다. 이에 본 연구자는 Matrix binding 실험에서 Halo structure binding 실험으로 조정하게 되었다.

2. MAR clones의 선택

구축되어진 MAR libraries에는 pURY19 vector가 공통적으로 존재한다. 이를 이용하여 pURY19 vector를 probe로 하여 MAR fragment들을 vector와 함께 binding 실험을 하였다. 따라서 Southern-Hybridization을 통해 그 중에서 matrix와의 결합력이 높은 MAR fragment들을 결정지을 수 있었고, 이들을 선택하여 PCR을 이용하여 증폭된 25개의 MAR 삽입체 들을 얻을 수 있었다. 그리고 pURY19 vector를 이용하여 binding 실험을 할 경우에는 pUC19(-), pURY19A(+)가 control로서 사용되었고, 각 각의 증폭된 MAR 삽입체를 실험했을 경우 strong binder로 확인된 MAR390을 positive control, unbound로 확

인된 MAR49를 negative control로서 선택하였다.

3. 핵 내에서 MAR의 역할과 관련된 motif들

MAR(Matrix attachment region)는 핵 구조물에 특이적으로 붙어 있으면서 진핵 생물의 유전자내의 구조적·기능적인 역할을 담당하고 있다. MAR 내에서는 DNA 복제, 전사, 회복 그리고 RNA splicing 등 핵 내 중요한 기능들이 수반되어지고, 유전자 발현에 있어서 enhancer의 기능으로 cis-acting element 나 trans-acting factor등이 발견되며, 진화적으로 잘 보존되어 있다. 그리고 MAR 핵 구조물 상에서 비틀어져 늘려진 상태인 loop 구조를 형성하도록 anchorage point를 가지고 있어 구조적인 역할에 관여한다 (Susan M. Michalowski, 1999). 이러한 MAR DNA를 조사한 결과로 관련된 motif들이 많이 존재했다. 그 중에서 AT-rich motif가 matrix binding에 관여하는데, genome 내에서 Topo II, kinked DNA, curved DNA motif들과 복합체를 이루으로써 DNA의 구조를 고차원적으로 만들어준다. 그리고 이 중 topoisomerase II는 DNA 분자에 knotting, unknotting 그리고 supercoiling, relaxation 반응을 활성화시켜서 replication, transcription, recombination, daughter chromosome segregation 등의 염색체내의 대부분의 중요한 기능을 수행할 수 있도록 한다 (Miriam Sander, 1985). 그리고 ORI motif도 또한 origin 역할로써 복제와 연관되며, curved DNA motif는 재조합, 복제, 전사 등의 DNA와 단백질간의 상호작용이 이루어지는 반응에서 중요한 기능을 담당한다. 또한 조사된 TG-rich motif는 적은 수치로 나왔는데 이 motif는 gene의 3' UTR에 주로 존재하며 재조합 부위에서 신호자로서의 역할을 담당한다. 그리고 마지막으로 kinked DNA는 비틀어주는 역할로 구조적인 특징에 반영된다.

MAR library 중 interspersed repeats가 발견되었다. 그 중 MAR 390에서 나온 (CA)_n simple repeat는 NLS(nuclear location signals)-binding protein을 암호화하는 영역이다. NLS는 핵 내로 단백질의 수송에 관여하는 것으로 알려져 있으며, NLS에 결합하는 protein을 찾기 위해서 simple sequence length polymorphism(SSLP)인 p(CA)_n repeat를 이용한 것으로 알려져 있다 (Elkind NB, 1995). 그리고 MAR fragment상에서 조사된 전사 조절 인자를 통해서

eukaryotic cis-acting regulatory DNA element 역할이나 enhancer와 관련이 있음을 알 수 있었다. 이러한 MAR의 특성을 이용하여 유전자 발현을 촉진하며 (C. Burce A. Whitelaw, 2000), 목표 유전자와 MAR 부위를 넣은 vector를 세포 내로 도입시켰을 때, 세포 내에서 copy 수는 낮으나 여러 세대를 거쳐 안전성이 높은 상태로 계속 발현을 유지한다고 보고되고 있다 (C. Piechaczek, 1999).

4. MAR motif model

Core MAR binding assay를 통해서 각 각의 단편에서 motif와의 관계성을 조사해 보았을 때, MAR와 matrix와의 구조 관계를 모델로서 제시할 수 있었다. 이 중 MAR 362의 경우에는 core1에서 높은 결합력이 나왔고, gene은 발견되지 않은 것으로 보아 core1이 matrix에 결합하며 이와 더불어 AT-rich, Topo II, Kinked DNA, ORI 등의 motif와 관계를 이루며, 이 외의 부분은 Matrix주위에 있는 것으로 모델을 제시할 수 있었다. (Fig. 13-1)

MAR 366의 염기 서열 분석 결과 444-556, 707-827, 983-1075 부위에서 exon들이 발견되어 이는 Anti-HIV protein을 발현할 수 있도록 하는 ChainA, Met-Rantes gene이 존재했다. 그리고 core MAR binding을 통해서 exon1 부위의 앞부분과 core6부위에서 Matrix와 결합을 하며, 이 부위의 444bp의 앞부분에서 promoter가 작동하여 이 두 부분의 사이에서 Met-Rantes gene 이 발현될 것으로 생각된다. 그리고 앞부분에 결합된 부위에는 kinked DNA motif가 관여하며, 뒷부분에는 AT-rich, kinked DNA, Topo II, ORI motif등이 복합체를 이루며 결합력에 영향을 미칠 것으로 생각된다. (Fig. 13-2)

MAR 374에서는 16-587, 651-911 부위에서 exon1, 2가 발견되었는데 이것은 myc-binding protein의 발현과 관계된 KIAA0916 gene이었다. core binding 실험을 통해서, 635-647 부위에서 kinked DNA motif가 관여하면서 matrix와의 결합력을 보이며, exon1 부위 뒷부분에서 다시 matrix와의 결합력을 보이며 이 때 AT-rich, TopoII, ORI, curved DNA motif등이 나타났다. 그리고 이 두 부분 사이의 결합되지 않은 부위에서 promoter(983-1033)가 작동하여 KIAA0916 gene이 발현되는 모델을 제시할 수 있었다. (Fig. 13-3)

그리고 MAR 380의 경우에는 954-1268 부위에서 alternative splicing에 관

여하는 polycystin-1 gene이 있으며, core1과 3에서 결합하는 것으로 나타났다. 그리고 core1부위의 가까운 곳에서 promoter(832-877)가 작동하여 polycystin-1 gene을 발현시킬 것으로 생각된다. 그리고 관계된 motif들을 Fig. 13-4에 나타내었다.

마지막으로 MAR 390은 300-409 부위에서 hypothetical protein FLJ12547 gene이 발견되었는데 이것은 transcription과 관계된 것이다. 그리고 core5부위에서 결합력을 지니고 있는 것으로부터 이 주위의 부위에서 promoter(455-505)가 작동하여 발현시키는 모델을 제시할 수 있었다. (Fig. 13-5)

이러한 core MAR binding assay와 발현되는 유전자 부위를 살펴보면 matrix와 결합되도록 관여하는 motif등을 알 수 있었다. 따라서 전체 MAR DNA 중 특정 부위는 matrix에 결합을 하고 있으며, 그와 함께 AT-rich, TopoII, curved DNA, kinked DNA, ORI motif등이 수반되어진다. 그리고 결합된 부위의 주위에서 promoter가 존재하며, matrix와 결합되어 있지 않은 부위에서는 유전자가 발현되는 모습의 구조 모델을 제시할 수 있었다. (Fig. 14)

5. 목표 유전자의 도입을 위한 발현 벡터의 개발

현재 형질 전환 어류의 생산에 많은 연구가 행해지고 있다. 이를 위해 목표 유전자가 어류 내에 삽입되는데 개체 내에서의 유도율이 높아야 하며, 목표로 하는 유전자의 발현이 제대로 이루어져야 한다. 그리고 삽입된 유전자가 chromosomal integration되어 다른 유전자의 비 활성화가 유발되지 않도록 해야 하며, 다음 세대에서도 발현이 잘 이루어져야 한다. 이러한 목표 유전자의 삽입을 위해서 발현 벡터에 대한 연구가 이루어지고 있으며, 이에 발현 벡터의 효율을 증가시키기 위하여 여러 조절인자를 첨가하는 등의 연구가 수행되고 있다. 현재 벡터의 안전성에 관여하는 MAR에 대한 인식이 부족한 상태이다. 따라서 핵 내에서의 여러 가지 조절 기작과 관련있는 MAR의 특성을 이용하여 효율성과 안전성이 함께 검증된 발현 벡터를 개발 할 수 있을 것이다.

V. 영문 초록

Characterization of Matrix Attachment Regions from the Flounder, *Paralichthys olivaceus*

Matrix attachment regions (MARs) are specific DNAs attached to nuclear matrix which is the nuclear skeleton that remains after salt extraction and nuclease treatment of nuclei. In this study, MARs were obtained from the fish blood(*P. Olivaceus*) by a modified LIS method. *In vitro* nuclear matrix binding assay, twenty-five DNA fragments were selected from library of the nuclear matrix-attached DNA. The selected MARs were incubated with halo structure at 37°C for overnight and the mixtures separated into bound and released fractions by centrifugation. After electrophorization and southern hybridization, the MARs were classified as strong, medium, and weak binding activity to the nuclear matrix. The results showed that sequences (< 700-bp) have not strong binding activity to the nuclear matrix. Longer MARs, of course, have the potential for extended regions that bind to the nuclear matrix and thus increase the strength of binding through cooperativity. However, binding strength does not appear to be strongly dependent upon only length. *In vitro* nuclear matrix binding assay and their sequence analysis suggested that the binding activity was related to AT-rich, ORI, ATC rule and Topo II motifs.

VI. 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 많은 가르침과 사랑으로 이끌어주신 이형호 교수님께 진심으로 머리 숙여 감사드립니다. 또한 학부과정에서부터 지금까지 항상 관심과 애정을 보내주신 공재열 교수님, 홍용기 교수님, 공인수 교수님, 김종균 교수님, 박남규 교수님, 김성구 교수님께 감사를 드립니다. 그리고 실험을 하는데 있어서 많은 도움을 주셨던 수산생명의학과의 서정수 선배님과 sequencing을 맡아서 도와주신 공동실험실습관의 정용실 선생님께서도 고마움의 마음을 전합니다.

학부과정에 들어오면서부터 실험뿐 아니라 그 외의 일에도 많은 도움을 주셨던 임학섭 박사님, 김무상 박사님과 박진영 선배님, 황지연 선배님, 그리고 최강은 선배님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 석사 과정동안 함께 많은 고민을 했던 최영미, 김지연에게도 고마움의 말을 전합니다. 또한 지금까지 실험실에서 생활을 같이한 안상중 선배님과 동기 임상욱, 박성준에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 같이 생활했던 생물공학과와 동기와 선배님, 후배님께도 감사를 드립니다.

마지막으로 언제나 변함없는 사랑으로 저를 믿고 지켜봐 주신 아버지, 어머니께 이 논문을 바칩니다. 그리고 사랑하는 저의 동생 정미와 은정에게도 고마움을 전하며, 모든 이에게 감사의 마음을 표하며 이 글을 맺으려 합니다.

VII. 참고 문헌

1. Cornelis M. van Drunen, Richard G. A. B. Sewalt, Rob W. Oosterling, Peter J. Weisbeek, Sjef C. M. Smeekens and Roel van Driel. 2924-2936. *Nucleic Acids Research*, 1999. Vol. 27, No.14
2. Cornelis M. van Drunen, Rob W. Oosterling, Gerbienne M. Keultjes, Peter J. Weisbeek 3904-3911, *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 19
3. C. Bruce A. Whitelaw, Stefano Grolli, Paolo Accornero, Gaetano Donofrio, *Gene* , 244, 2000, 73-80
4. C. Piechaczek, C. Fetzer, A. Baiker, J. Bode and H. J. Lipps, *Nucleic Acids Research*, 1999, Vol. 27, No. 2, 426-428
5. Dacheng He, Jeffrey A. Nickerson, and Sheldon Penman, *The Journal of Cell Biology*, Volume 110. 569-580. 1990
6. E. Izaurralde, J. Mirkovitch and U. K. Laemmli, *J. Mol. Biol.* 1988, 200, 111-125
7. E. Wingender, X. Chen, E. Fricke, R. Geffers, R. Hehl, I. Liebich, *Nucleic Acids Research*, 2001, Vol. 29, No. 1, 281-283
8. Elkind NB, Goldfinger N, Rotter V. *Oncogene*, 1995, 7;11(5):841-51
9. GERALD HALL, JR, GEORGE C. ALLEN, DEBORAH S. LOER, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 88, pp9320-9324, 1991.

Biochemistry

10. Gautam B. Singh, Jeffrey A. Kramer and Stephen A. Krawetz, Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 7, 1419-1425
11. Inoue, H. , H. Nojima, and H. Okayama. 1990. Gene 96:23-28
12. Jovan Mirkovitch, Marc-Edouard Mirault, and Ulrich K. Laemmli, Cell. Vol. 39, 223-232, 1984
13. Kohwi-Shigematsu's lab, JBC, 270:23239-23242
14. Miriam Sander and Tao-shin Hsieh, Nucleic Acids Research. Volume 13, Number 4, 1985
15. M. E. Eva Ludeurs, Arjan de Graaf, Elena Mattia, Jan L. den Blaauwen, Marjolein A. Grande, Luitzen de Jong, and Role van Driel. Cell. Vol. 70, 949-959, 1992
16. Pierre Rollini, Stephanie J. Namciu, Mark D. Marsden and R. E. K. Fournier, Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 19, 3779-3791
17. Rachel Holmes-Davis and Luca comai. trends in plant science. reviews. 91-116. 1998. Vol. 3, No. 3
18. R. CURTIS BIRD, GARY S. STEIN, JANE B. LIAN, JANET L. STEIN, Nnclear Structure and Gend Expression, 1997
19. R. CURTIS BIRD et al.,Nuclar Structure and Gene Expression,

1995

20. SHYH-HAN TAN, DUSAN BARTSCH, ELESABETH SCHWARZ AND HANS-ULRICH BERNARD, *Journal of VIROLOGY*, 1998, p. 3610-3622
21. Susan M. Michalowski, George C. Allen, Gerald E. Hall, Jr., William F. Thompson, and Steven Spiker, *Biochemistry* 1999, 38, 12795-12804
22. S. A. Miller, D. D. Dykes and H. F. Polesky, *Nucleic Acids Reserch*, Volume 16, Number 3, 1988
23. Sambrook et al. 1989
24. S. M. Gasser and U. K. Laemmli, *The EMBO Journal*. vol. 5 no. 3 pp511-518, 1986
25. Tatsuya Sawasaki, Misa Takahashi, Naoki Goshima, Hiromichi Morikawa, *Gene*. 218, 27-35, 1998
26. Yegor S. Vassetzky, Anna N. Bogdanova, and Sergey V. Razin, *Journal of Cellular Biochemistry*, 79:1-14, 2000

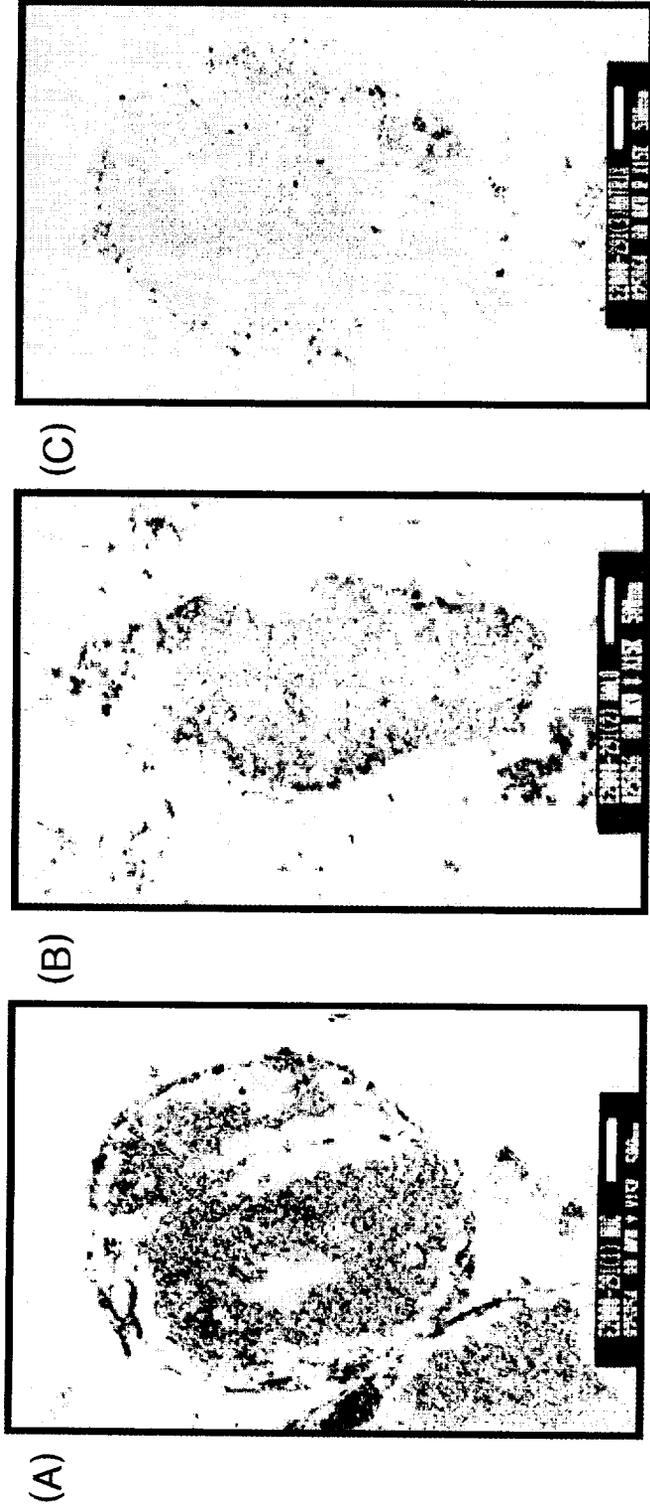


Fig 1. Electron microscope of nuclei (A) , halo structure (B) and nuclear matrix (C) isolated which from *P. olivaceus* blood cell.

A, B and C ; 15,000 × ; Bar = 200nm

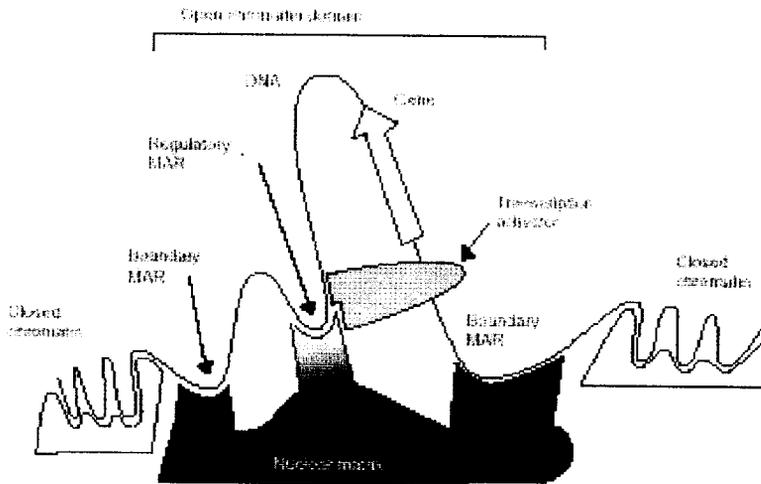


Fig 2. Schematic representation of roles of matrix attachment regions(MARs) in the compacted and open chromatin domains of a eukaryotic chromosome.

Three MARs are present in the DNA segment shown, corresponding to the domain boundary and regulatory sites. Domain boundaries prevent the spreading of alternative chromatin states along the chromosome, thus insulating the domain. The regulatory MAR is shown facilitating the access of a transcription activator to the gene promoter via the formation of a ternary complex consisting of a MAR, matrix and activator.

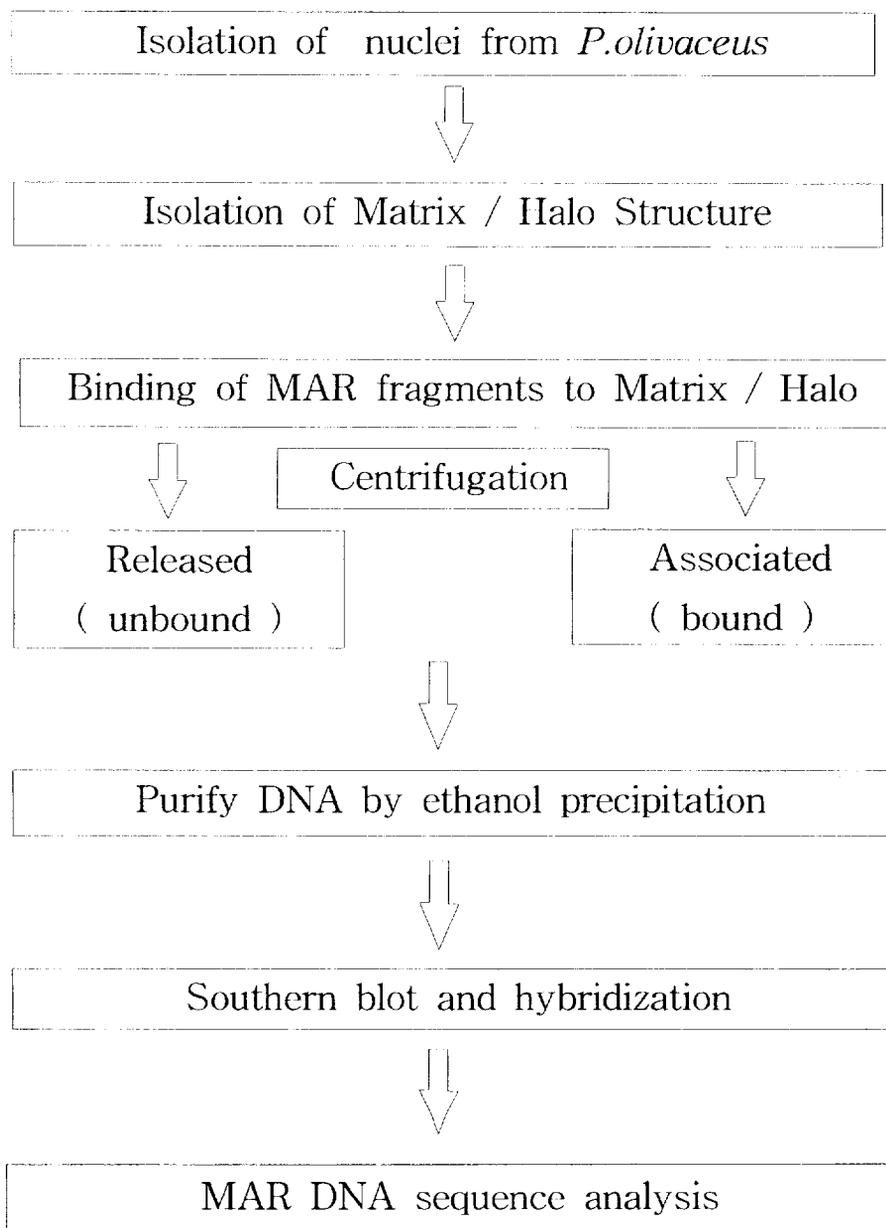


Fig 3. Experimental outline

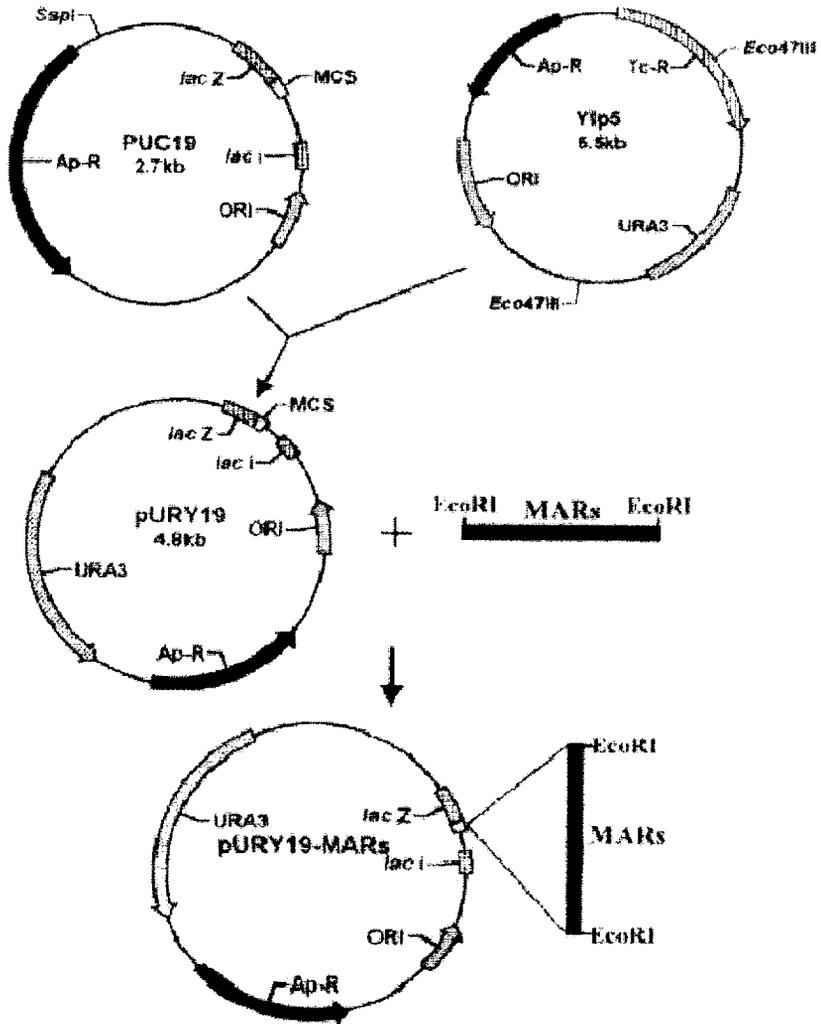
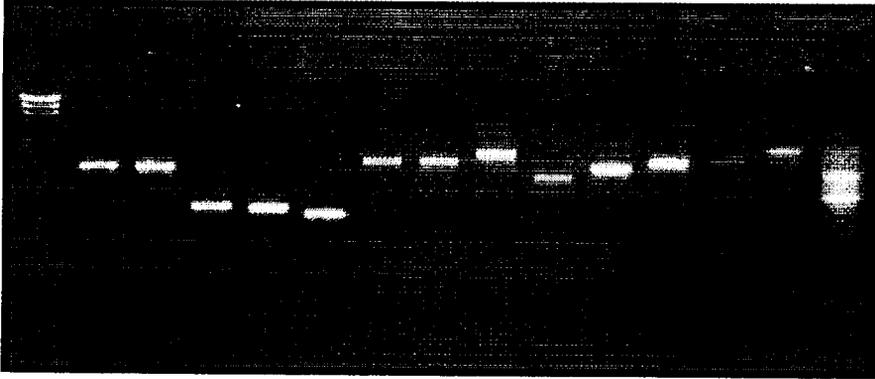


Fig 4. Construction of pURY19 - MARs

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M2



M1 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 M2

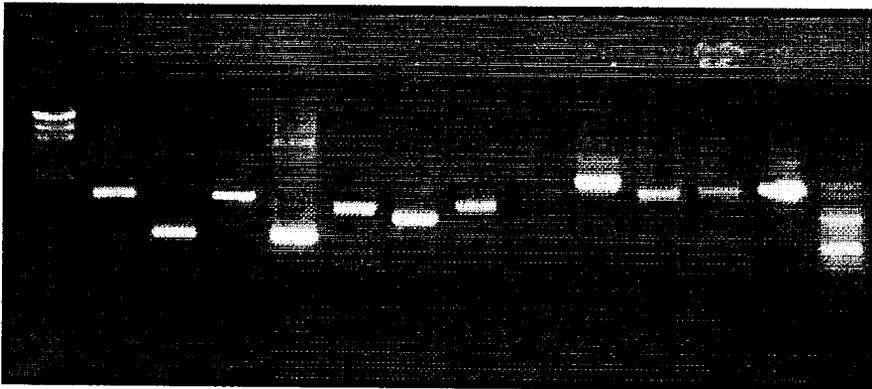


Fig 5. Identification of MAR DNAs by PCR.

PCR products from MAR were inserted in pURY19 vector.

M13F/R was used as a primer for amplifying MAR fragments.

M1 ; λ DNA/Hind III size marker

M2 ; 100bp size marker

Lane 1 ~ 25 ; MAR DNAs

(64, 76, 96, 66, 99, 92, 73, 74, 69, 18, 32, 20, 33,

63, 40, 48, 49, 95, 22, 362, 363, 366, 380, 390, 374)

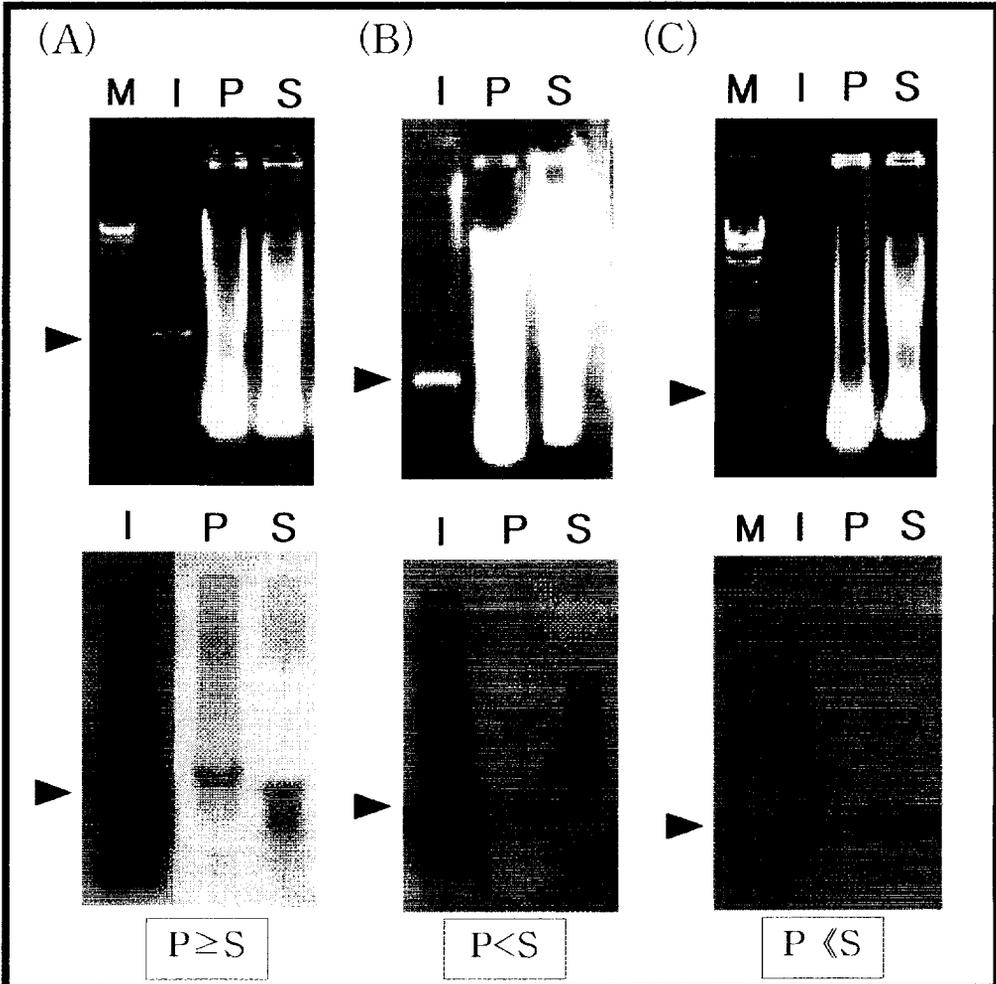


Fig 6-1. *In vitro* Matrix / Halo binding assay

M : λ DNA/Hind III marker , I indicates aliquots of the total MAR DNA used in the assay. P indicates bound DNA in the matrix. S indicates the fraction of released to the matrix. It is identified by the density of band in each fraction. Upper panels show the ethidium bromide/UV staining patterns of these DNAs and down panels show the hybridization patterns of a probe to a southern transfer of the gel shown in upper panel A,B, and C respectively.
 (A) pURY19-MAR64 ,(B) pURY19-MAR76, (C) pURY19-MAR96

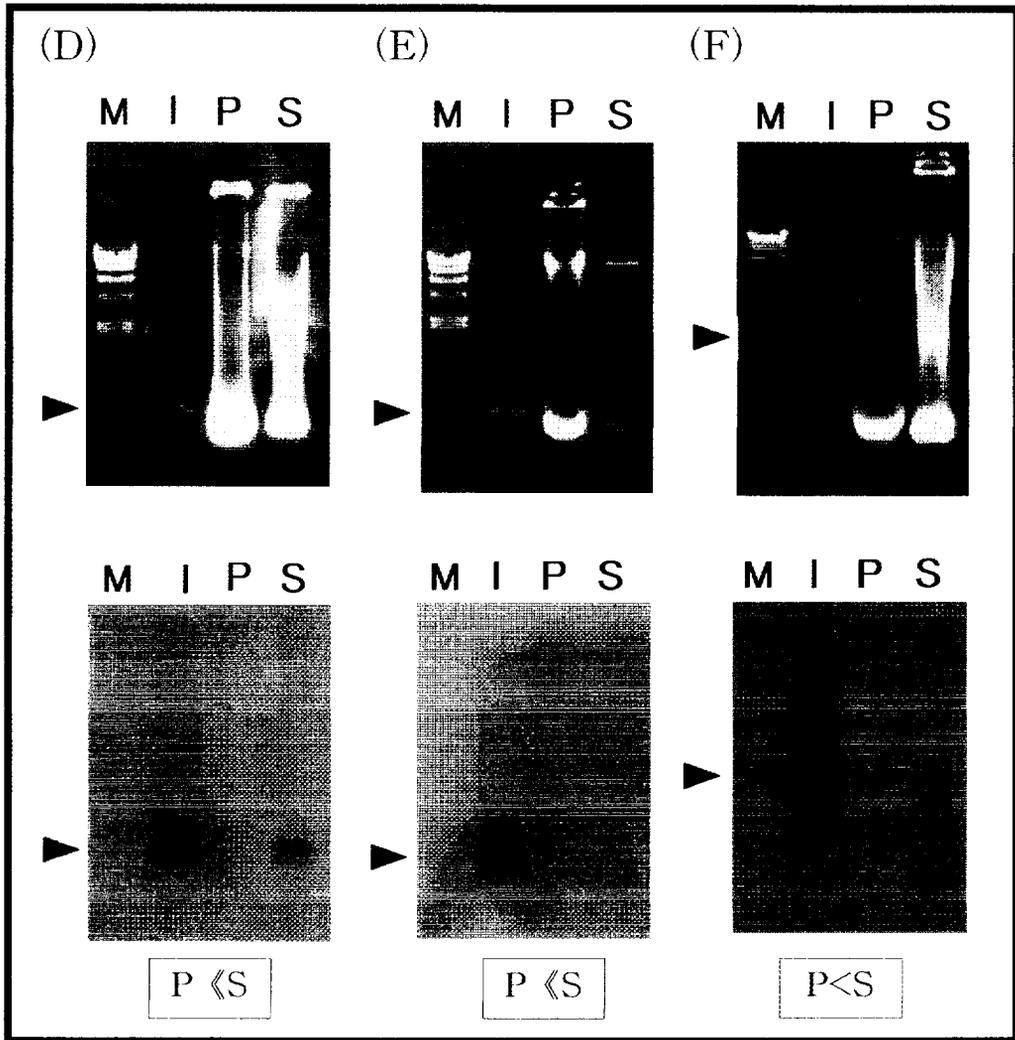


Fig 6-2. *In vitro* Matrix / Halo binding assay

- (D) pURY19-MAR66 ; unbound
- (E) pURY19-MAR99 ; unbound
- (F) pURY19-MAR92 ; weak binder

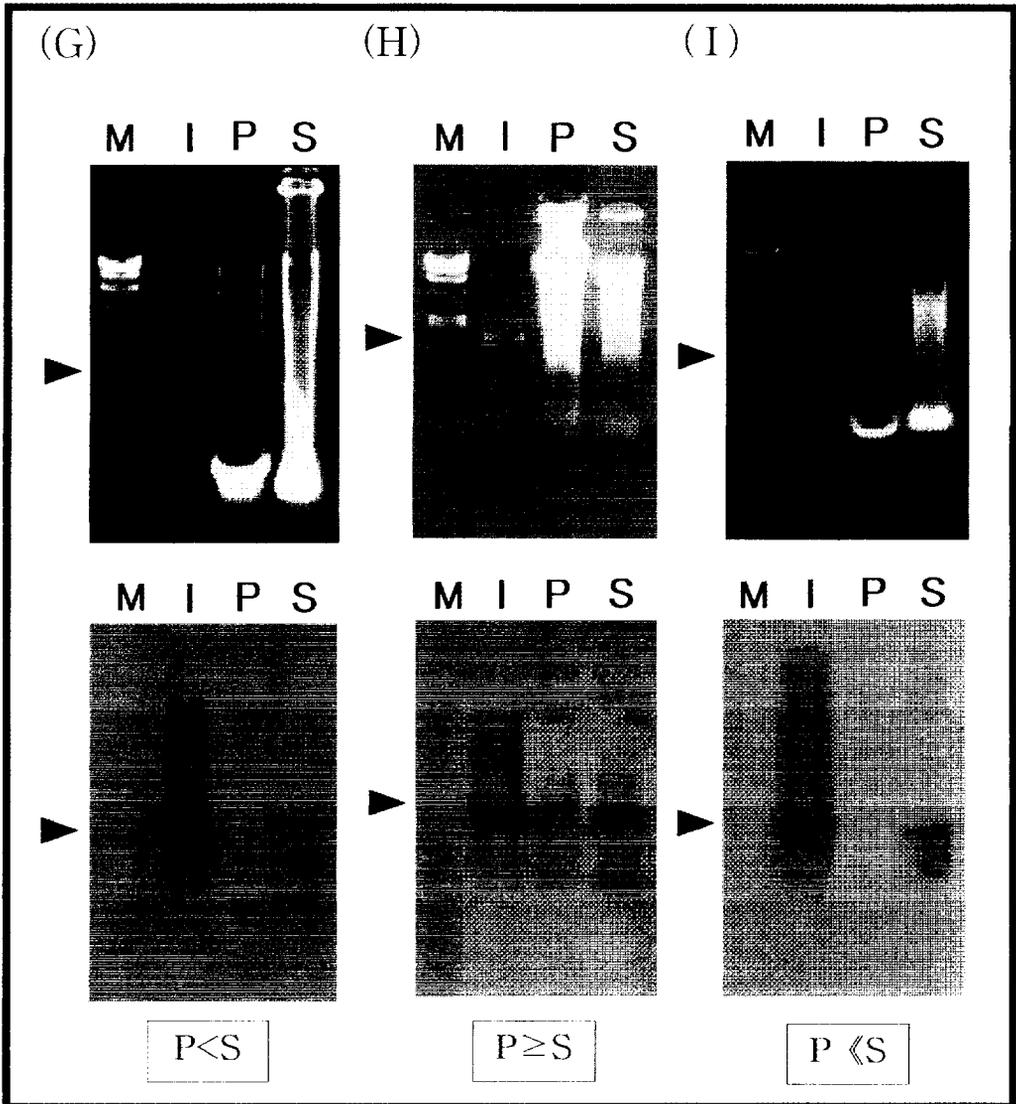


Fig 6-3. *In vitro* Matrix / Halo binding assay

(G) pURY19-MAR73 ; weak binder

(H) pURY19-MAR74 ; medium binder

(I) pURY19-MAR69 ; unbound

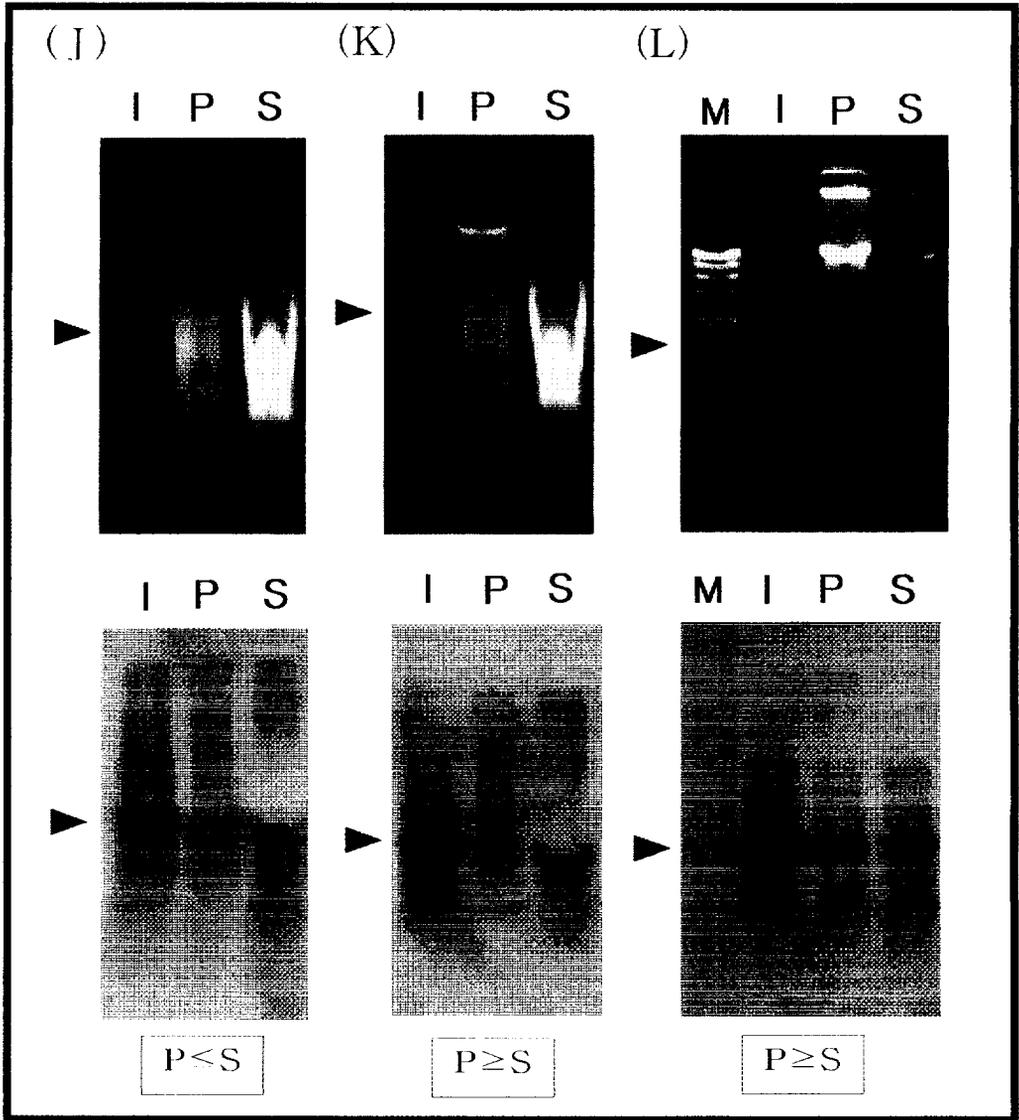


Fig 6-4. *In vitro* Matrix / Halo binding assay

- (J) pURY19-MAR18 ; medium - weak binder
- (K) pURY19-MAR32 ; medium binder
- (L) pURY19-MAR20 ; medium binder

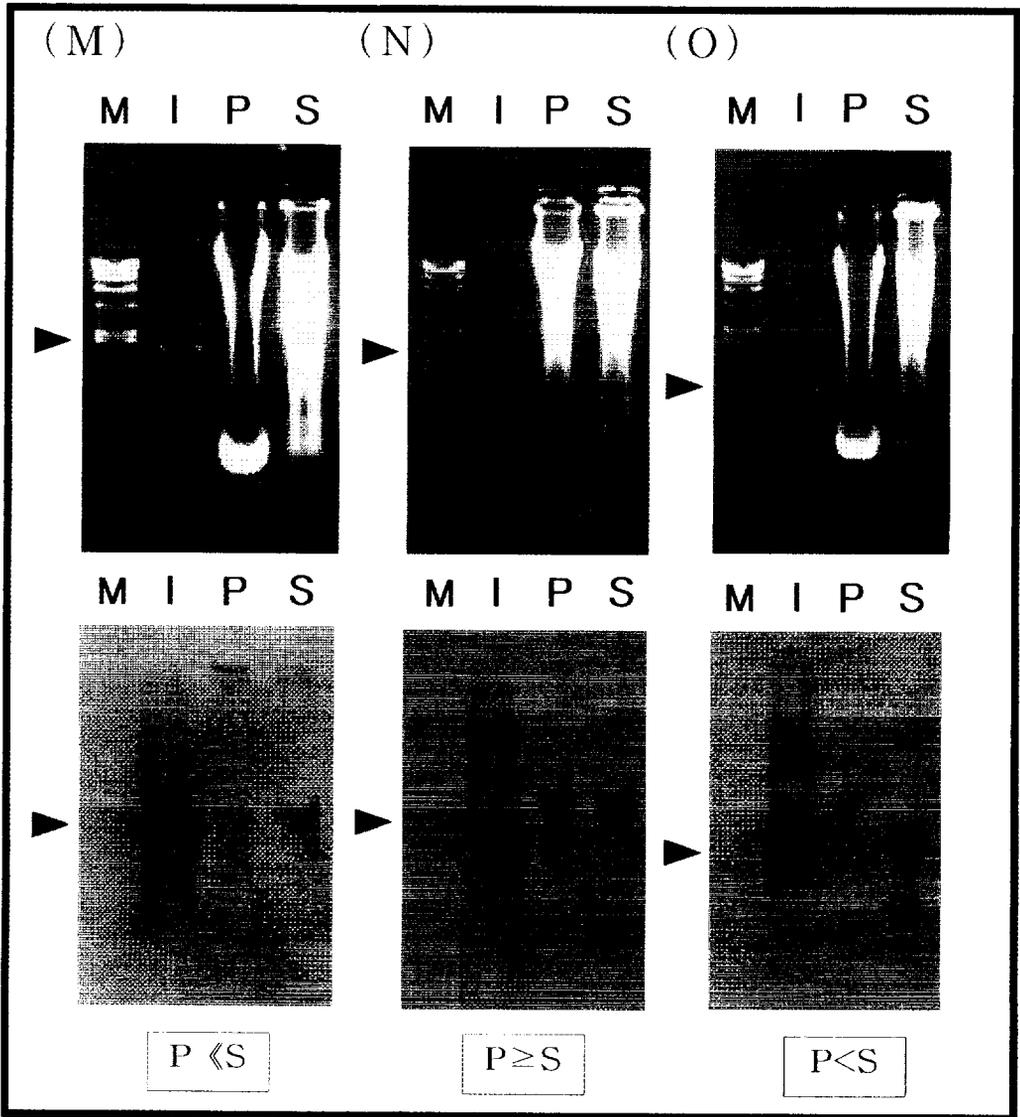


Fig 6-5. *In vitro* Matrix / Halo binding Assay

(M) pURY19-MAR33 ; unbound

(N) pURY19-MAR63 ; medium binder

(O) pURY19-MAR40 ; weak binder

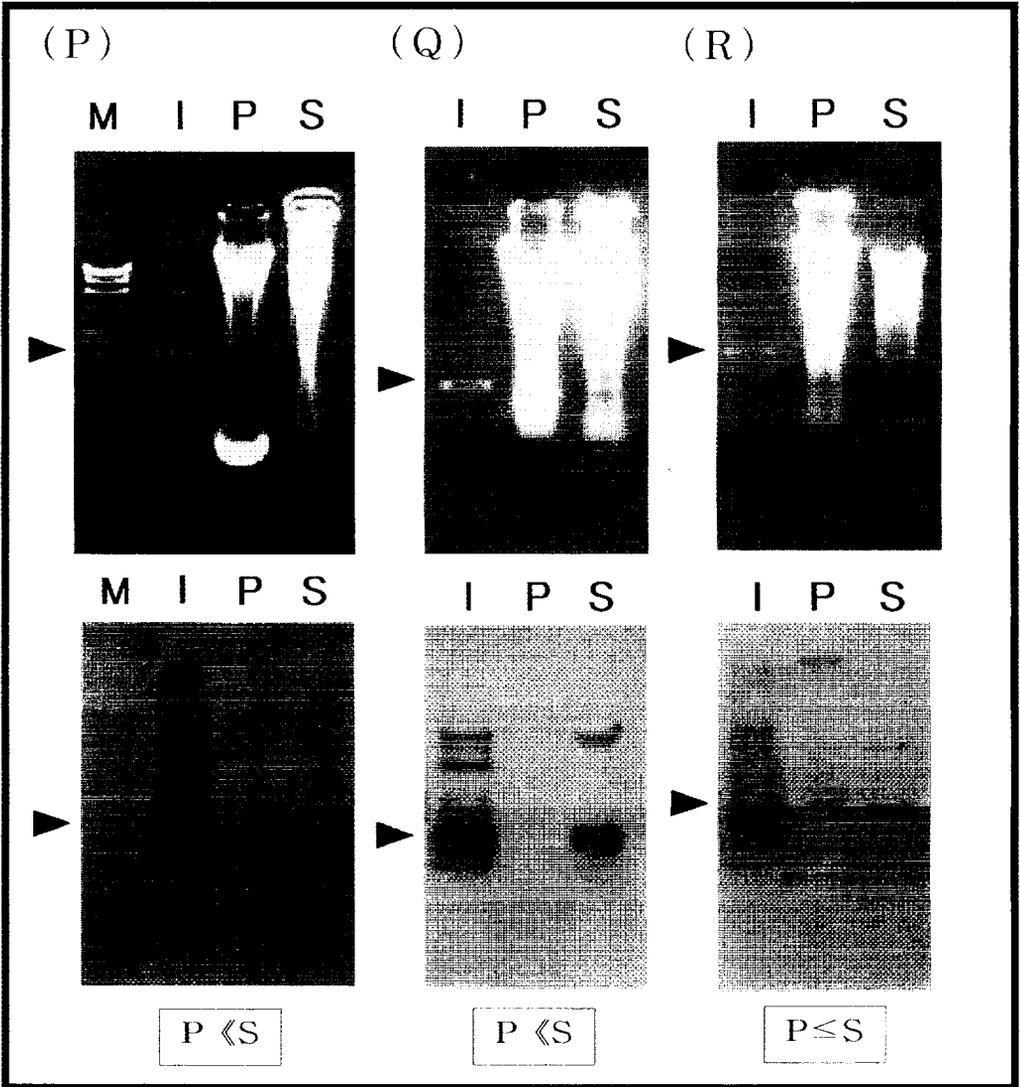


Fig 6-6. *In vitro* Matrix / Halo binding Assay

(P) pURY19-MAR48 ; unbound

(Q) pURY19-MAR49 ; unbound

(R) pURY19-MAR95 ; medium - weak binder

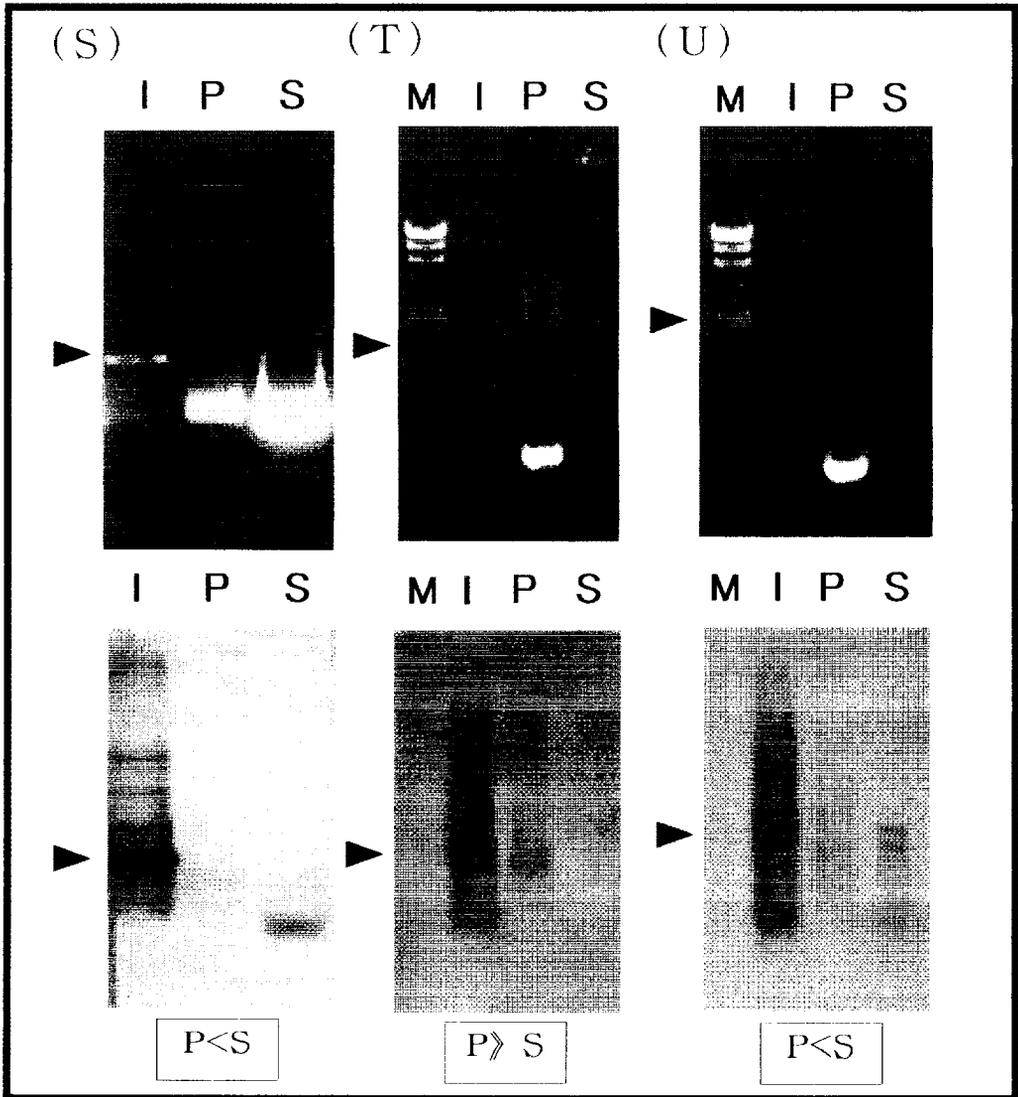


Fig 6-7. *In vitro* Matrix/Halo binding Assay

(S) pURY19-MAR 22 ; weak binder

(T) pURY19-MAR 362 ; strong binder

(U) pURY19-MAR 363 ; weak binder

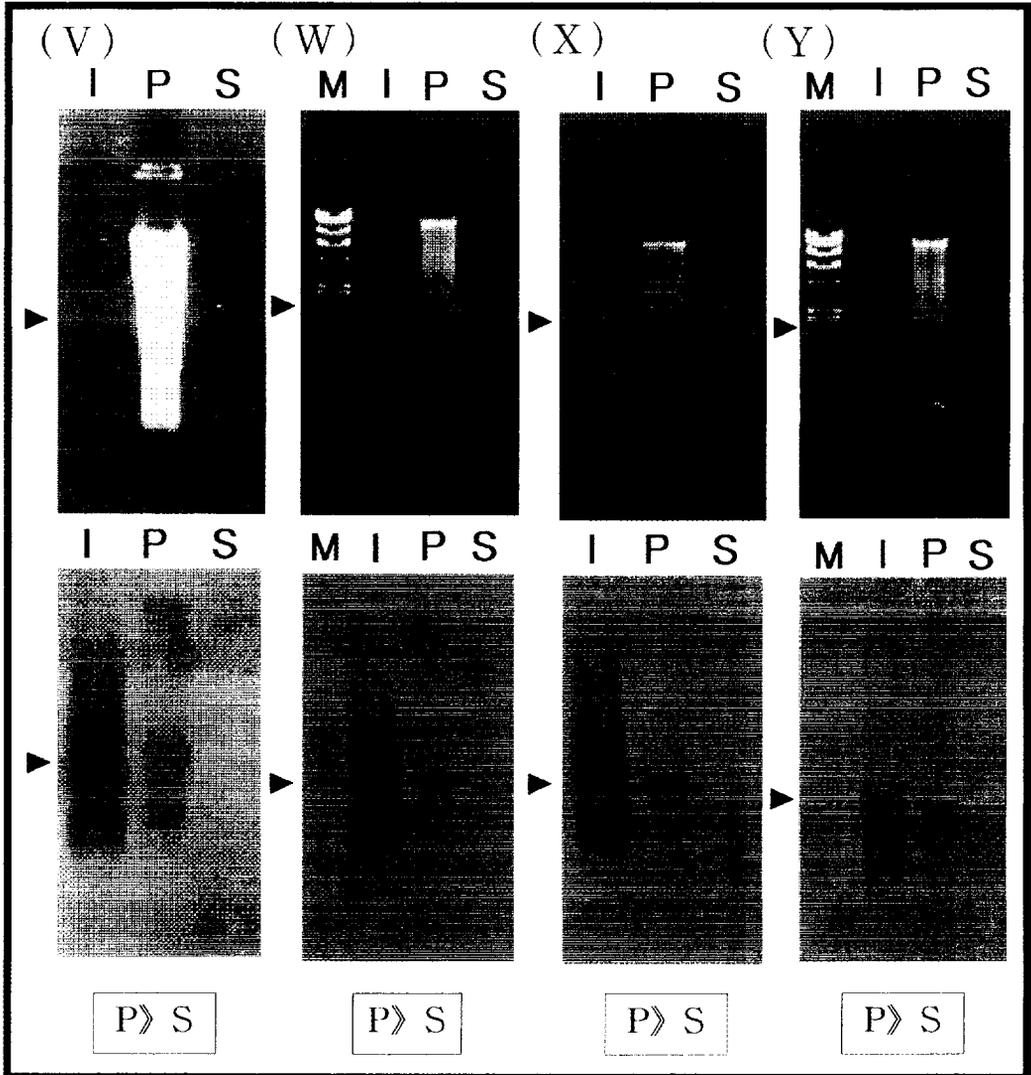


Fig 6-8. *In vitro* Matrix / Halo binding Assay

- (V) pURY19-MAR 366 ; strong binder
- (W) pURY19-MAR 380 ; strong binder
- (X) pURY19-MAR 390 ; strong binder
- (Y) pURY19-MAR 374 ; strong binder

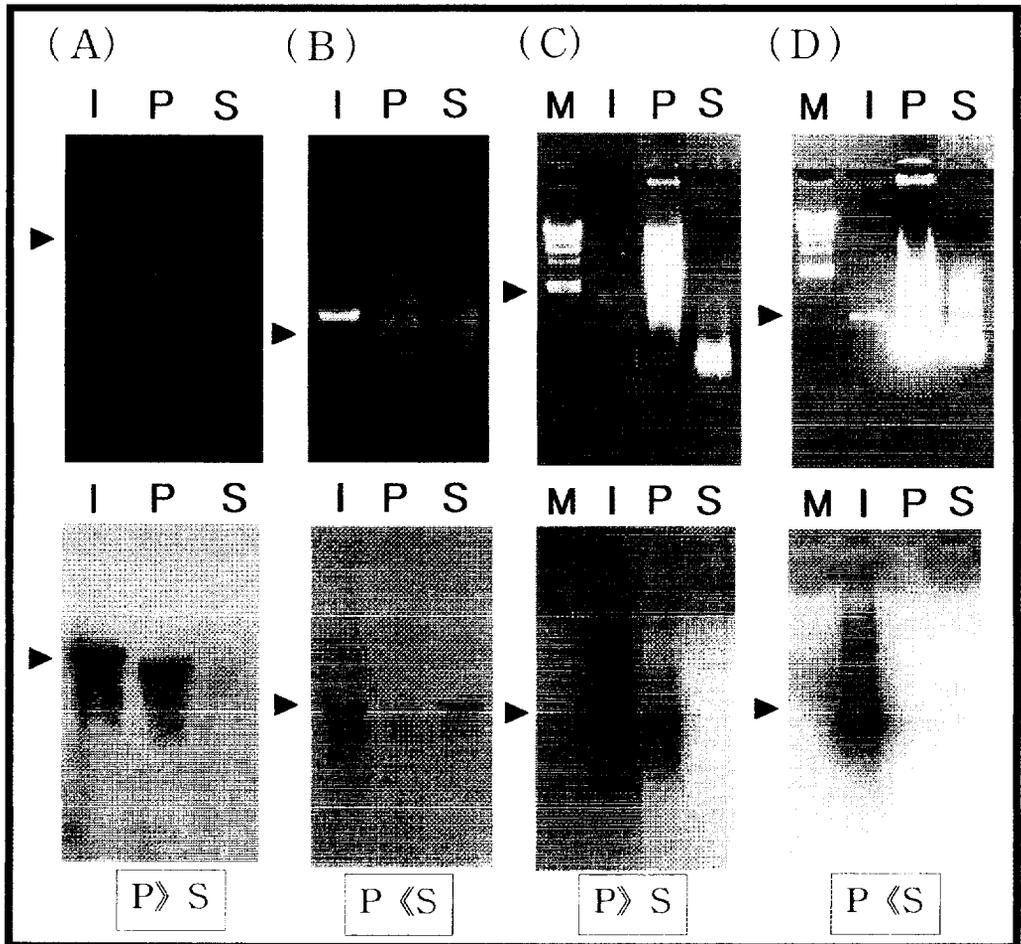


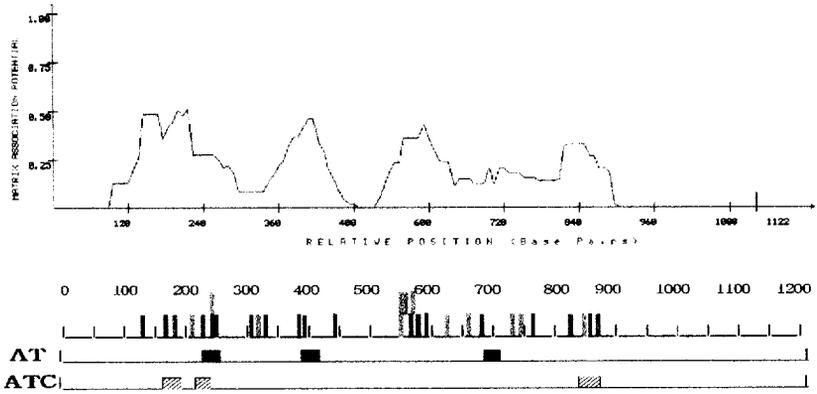
Fig 7. *In vitro* Matrix/Halo binding Assay
 - control experiment

- (A) pURY19A ; Positive control
- (B) pUC19 ; Negative control
- (C) MAR 390 ; Positive control
- (D) MAR 49 ; Negative control

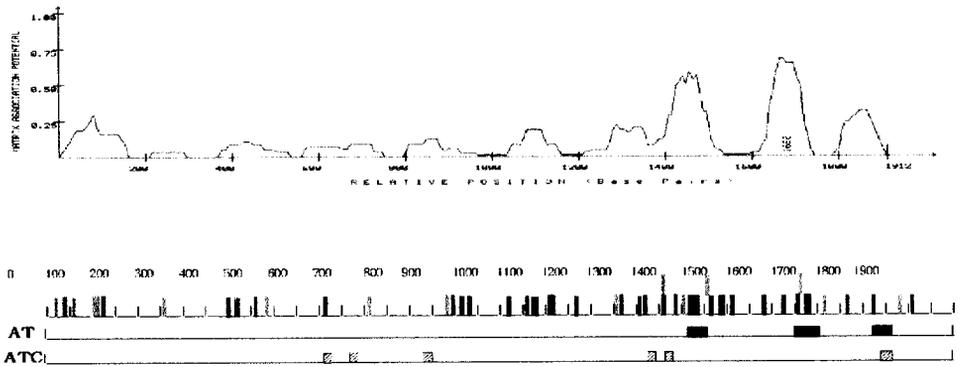
pURY19A and pUC19 are used as positive and negative control fragments in the matrix binding assay respectively.

MAR 390, MAR 49 are used as strong and unbound MARs in the halo structure binding assay respectively.

(A) MAR 362 (1122bp)



(B) MAR 366 (1912bp)



(C) MAR 374 (1627bp)

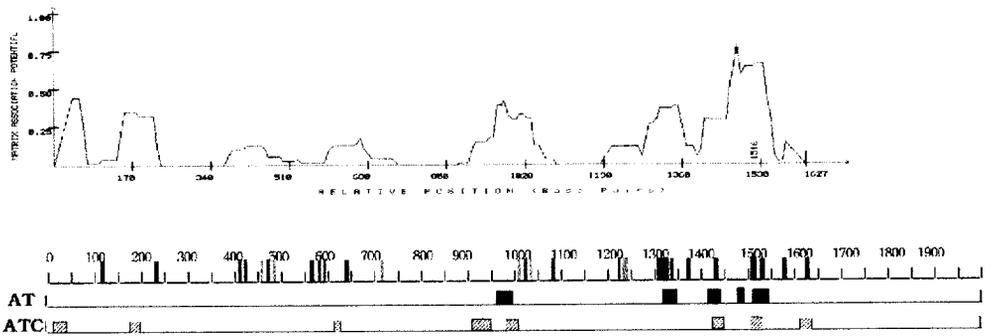
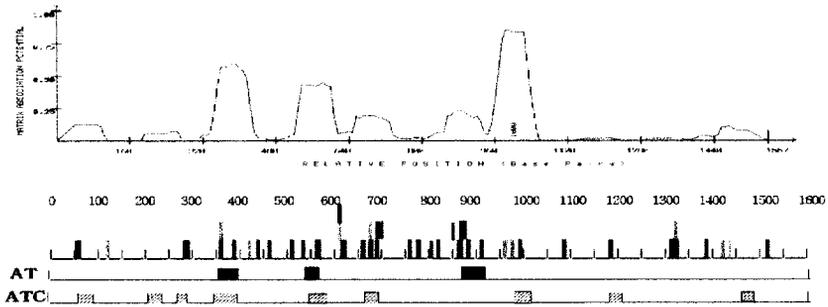
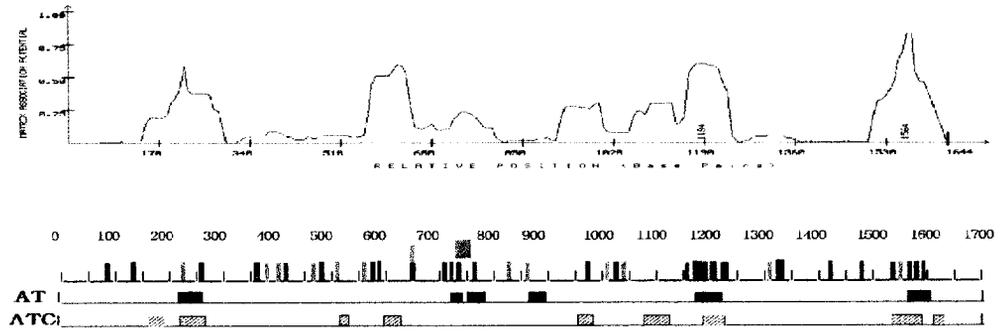


Fig 8-1. MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

(D) MAR 380 (1557bp)



(E) MAR 390 (1644bp)



(F) MAR 20 (1328bp)

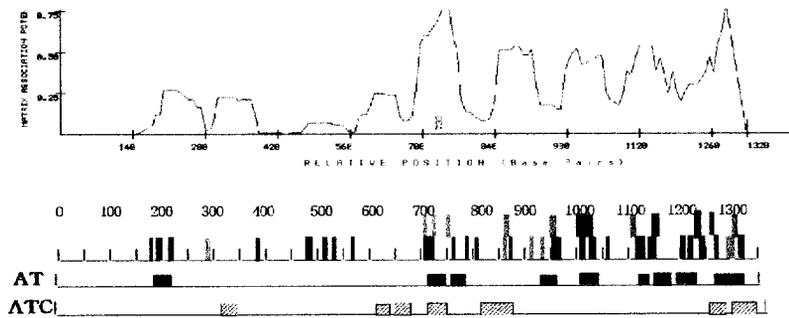
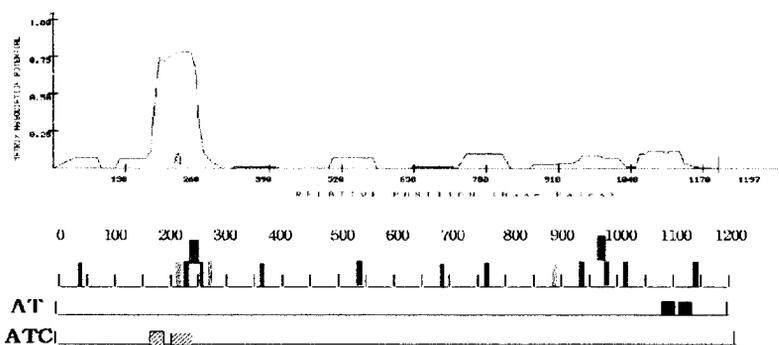
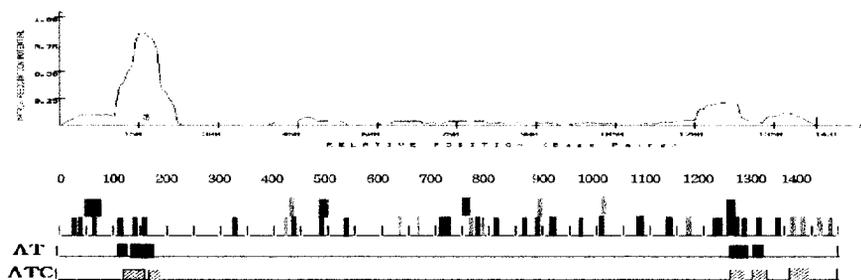


Fig 8-2. MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

(G) MAR 32 (1197bp)



(H) MAR 63 (1431bp)



(I) MAR 64 (1071bp)

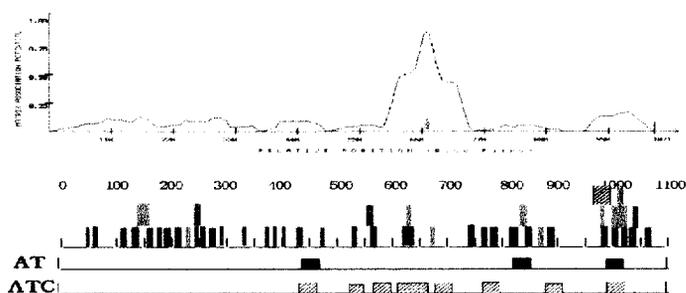
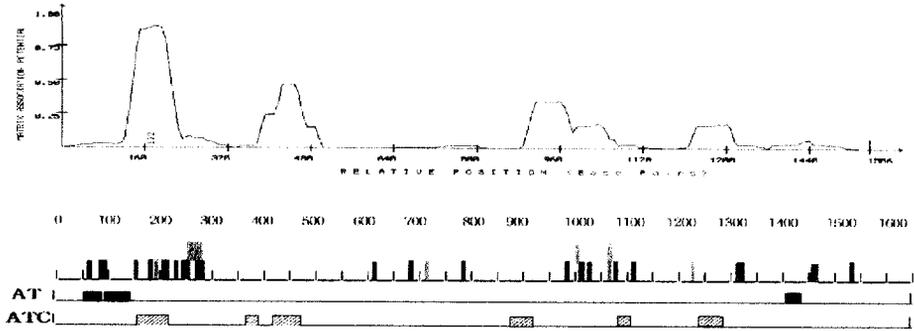
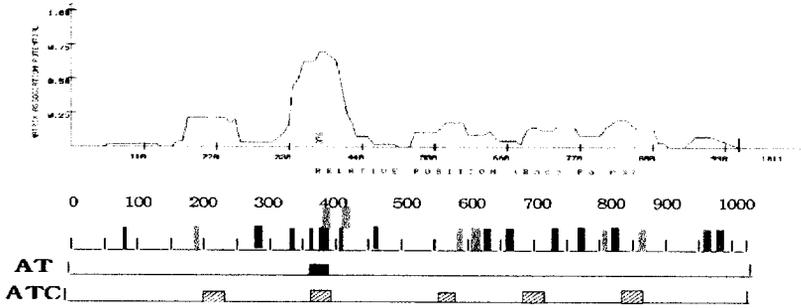


Fig 8-3 . MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

(J) MAR 74 (1556bp)



(K) MAR 18 (1011bp)



(L) MAR 95 (1068bp)

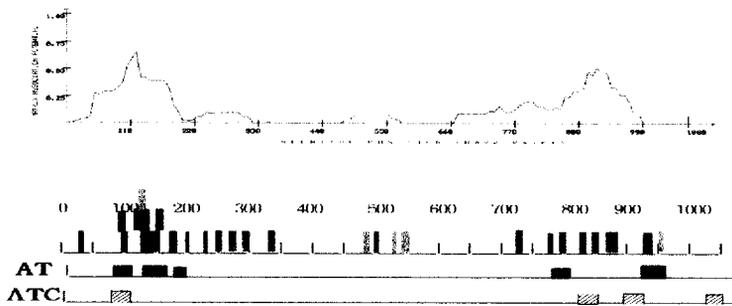
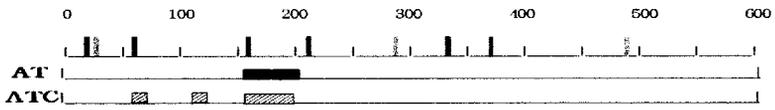
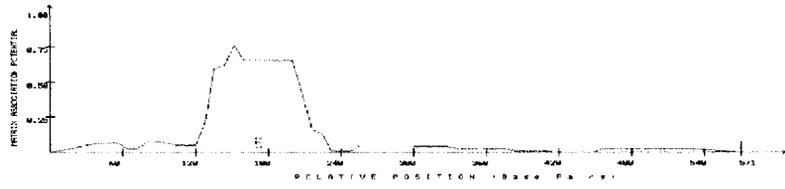
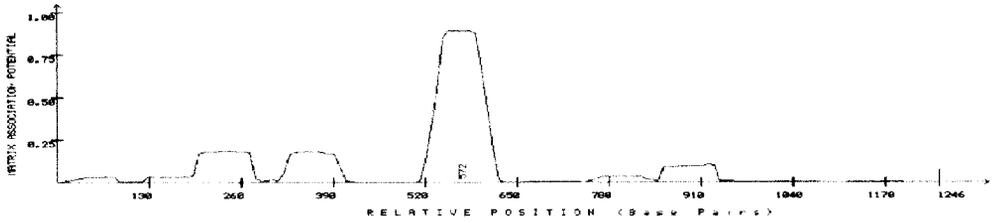


Fig 8-4. MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

(O) MAR 40 (570bp)



(P) MAR 73 (1224bp)



(Q) MAR 76 (1027bp)

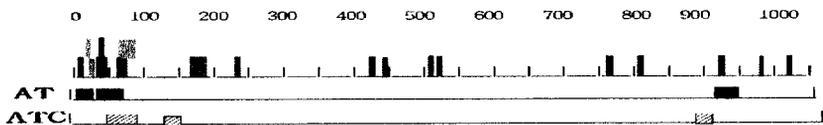
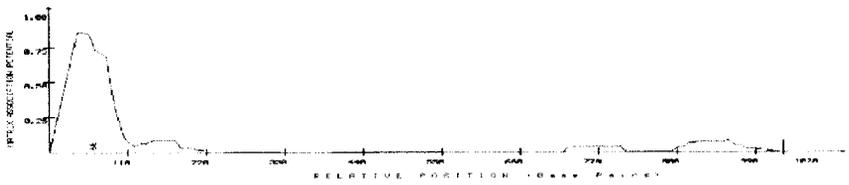
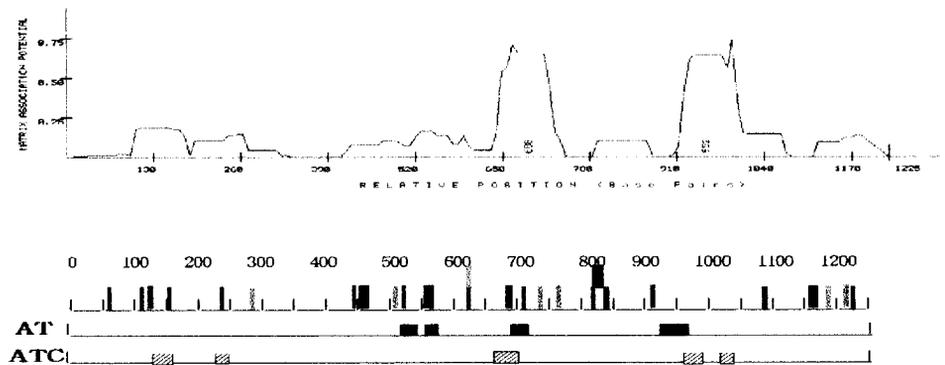
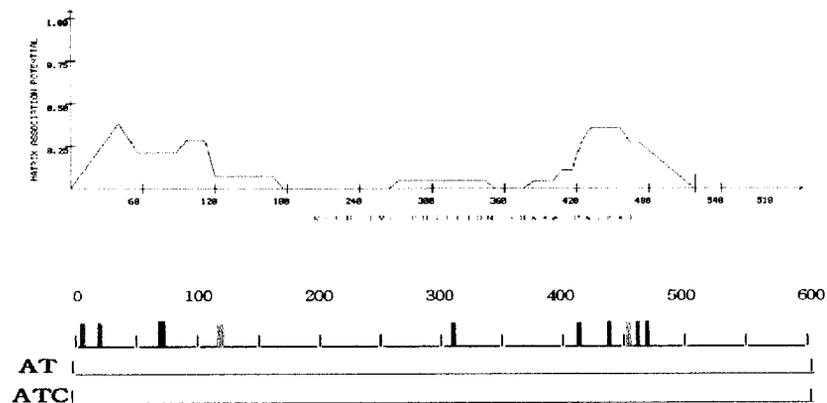


Fig 8-5. MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

(R) MAR 92 (1225bp)



(S) MAR 49 (518bp)



(T) MAR 66 (196bp)

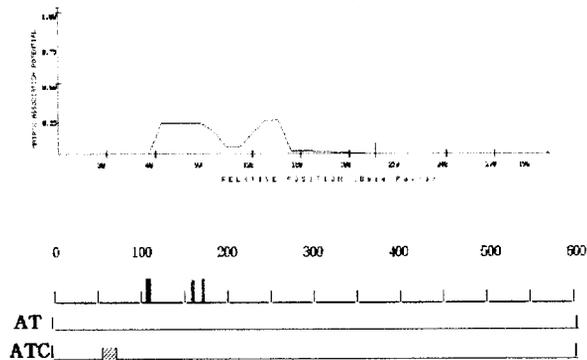
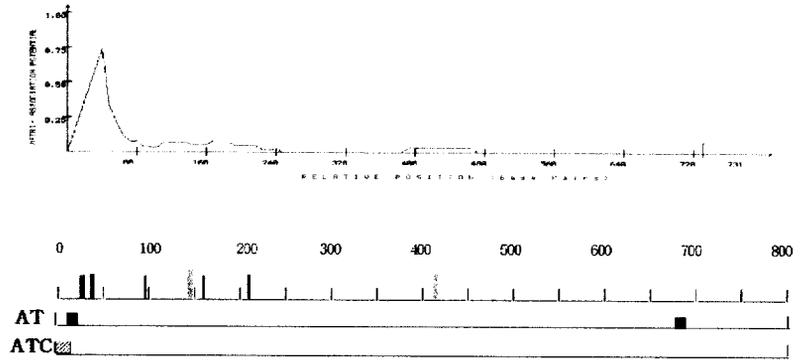
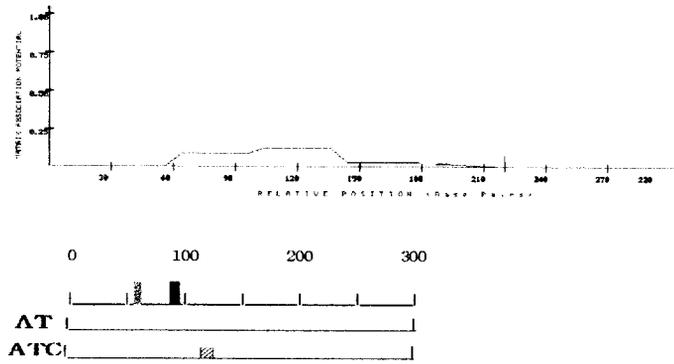


Fig 8-6. MAR association potential and distribution of motifs in the *P. olivaceus* MARs.

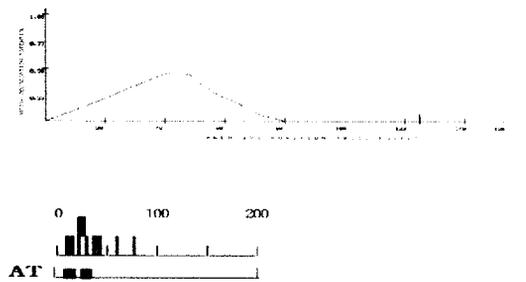
(U) MAR 69 (731bp)



(V) MAR 96 (220bp)



(W) MAR 99 (125bp)



| - ORI | - TG-Richness | - Curved DNA | - Kinked DNA
 | - CAAT box | - TATA box | - Topo II | - BUR

Fig 8-7. MAR association potential and distribution of motifs in the *P.olivaceus* MARs.

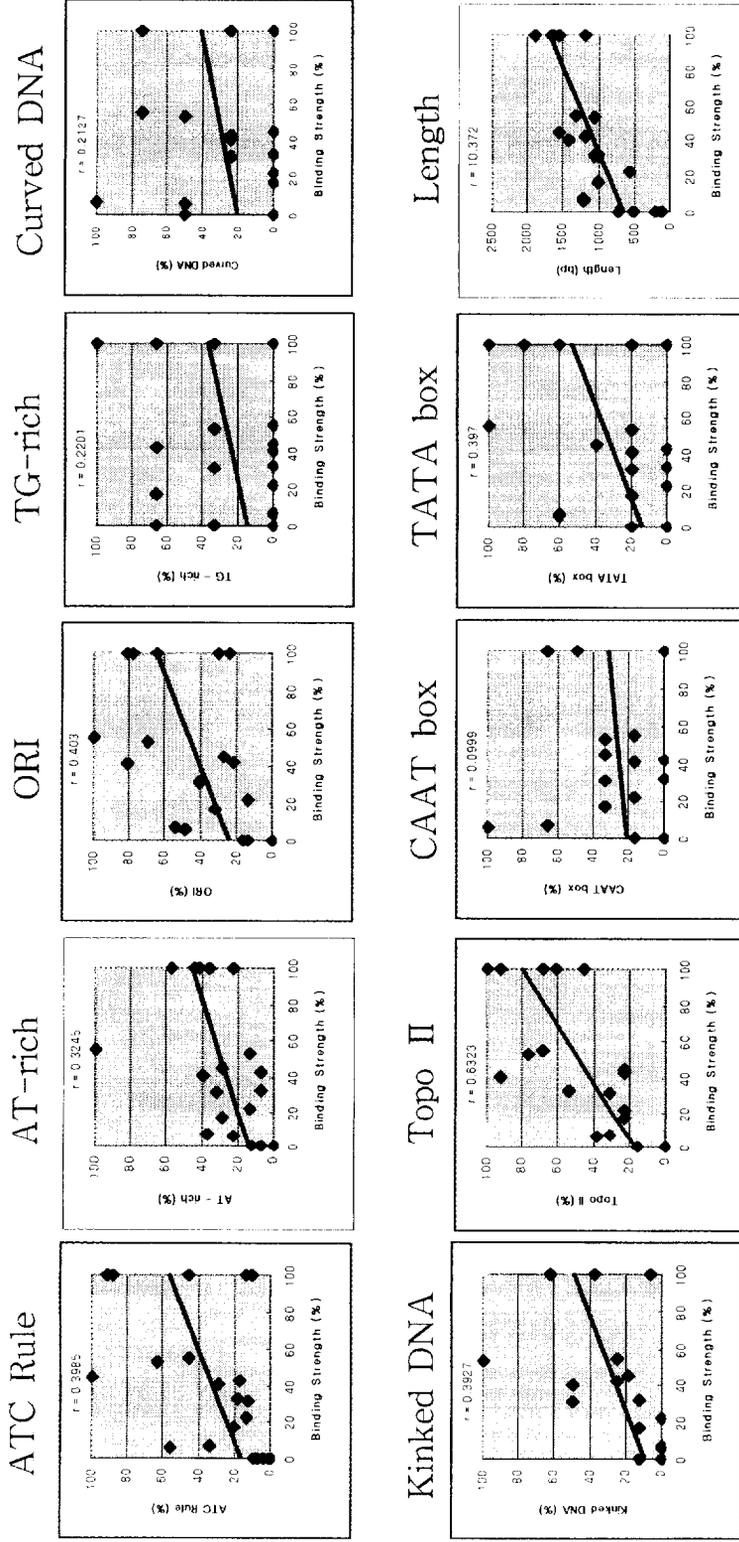


Fig 9. Correlation of MAR-related motifs and binding strength.

The several of MAR-related motifs is plotted versus binding strength for the 21 *P. olivaceus* MARs and "r" indicates a slope related with binding strength. Y_{number} divided by Y_{max} indicates Y coordinate axis (%).

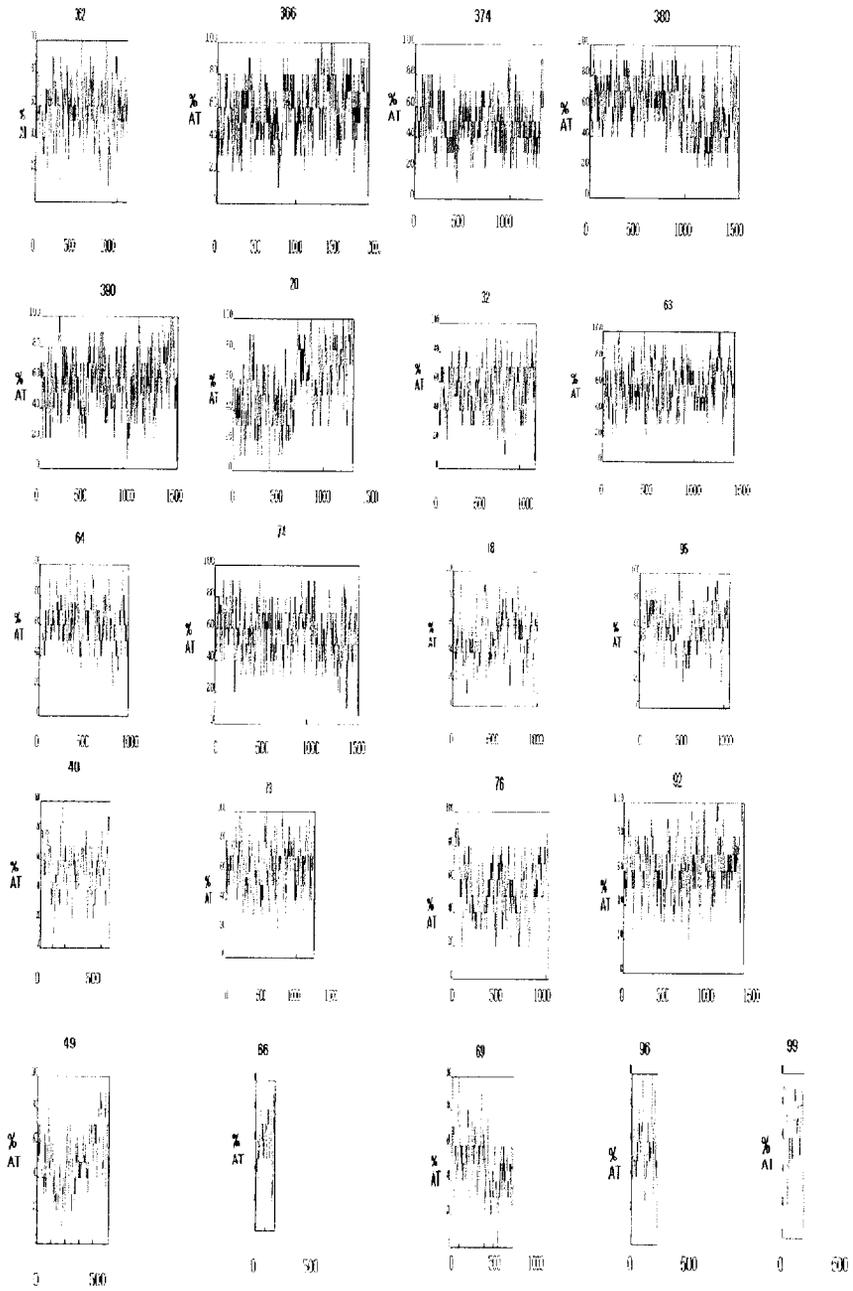


Fig 10. Sliding window of %AT across the MARs.

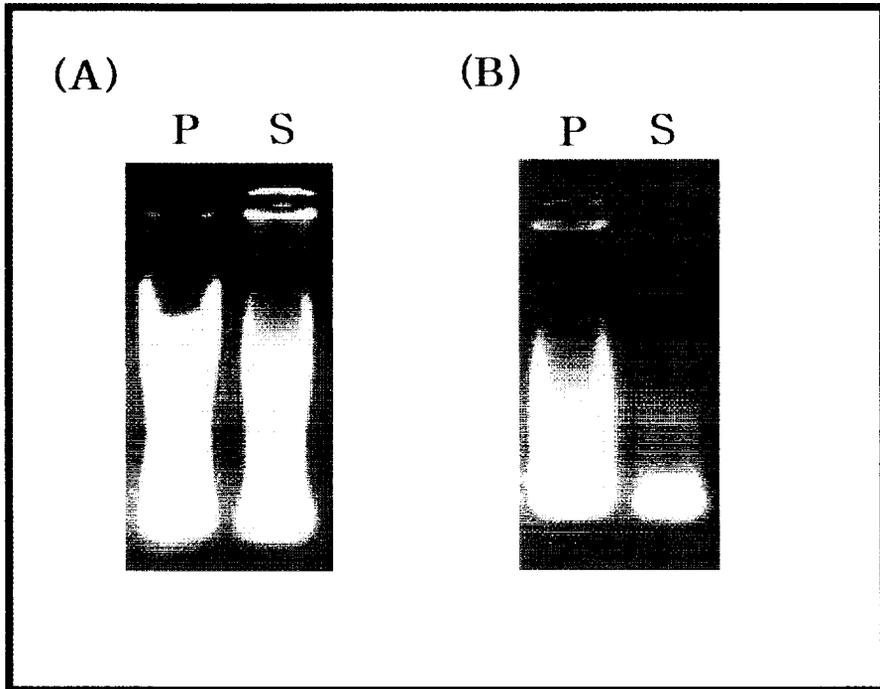


Fig 11. Fractions of bound DNA (P) and released DNA (S) in each structure.

(A) ; N. matrix

(B) ; Halo structure

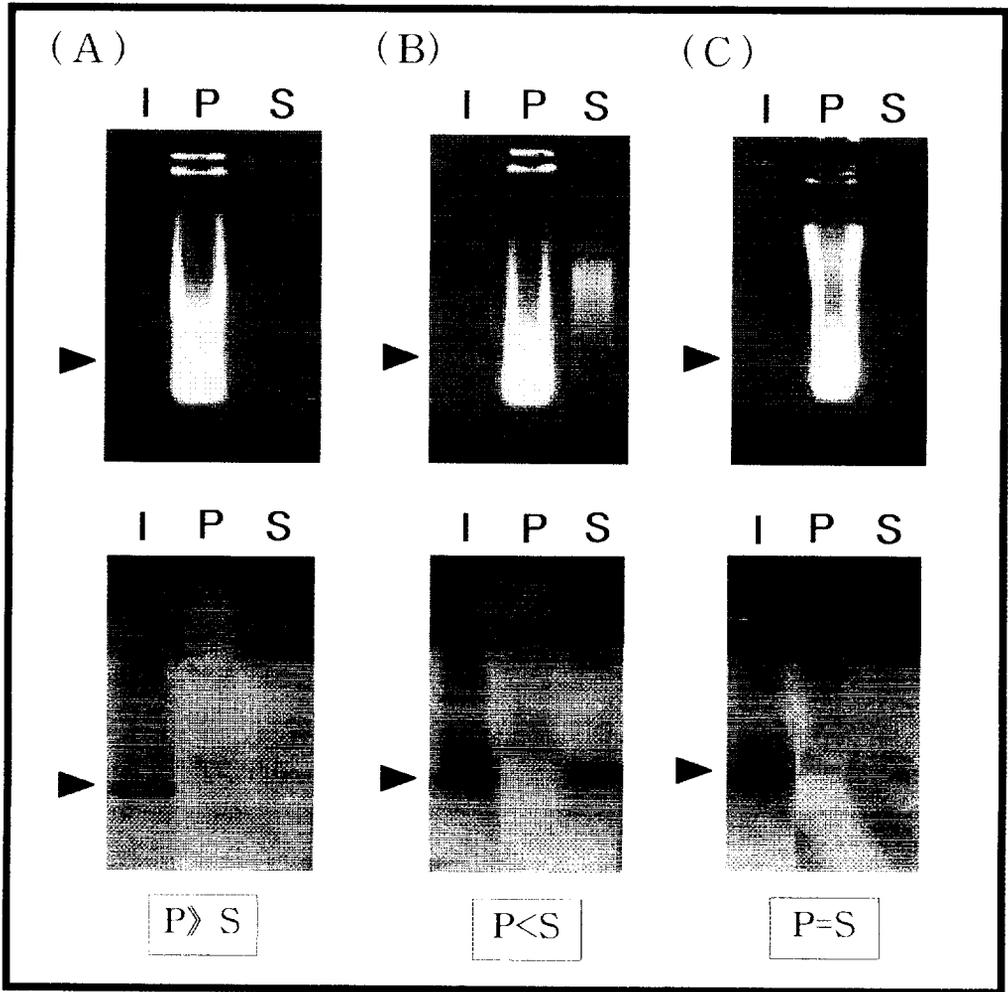


Fig 12-1. *In vitro* core 362 MAR binding assay

(A) 362- core1

(B) 362- core2

(C) 362- core3

The core 1 shows that "P" is darker signal than "S" fraction. The core 2 and 3 fragments show that "P" is similar to "S". Thus the core1 is the strong region in the 362 MAR DNA.

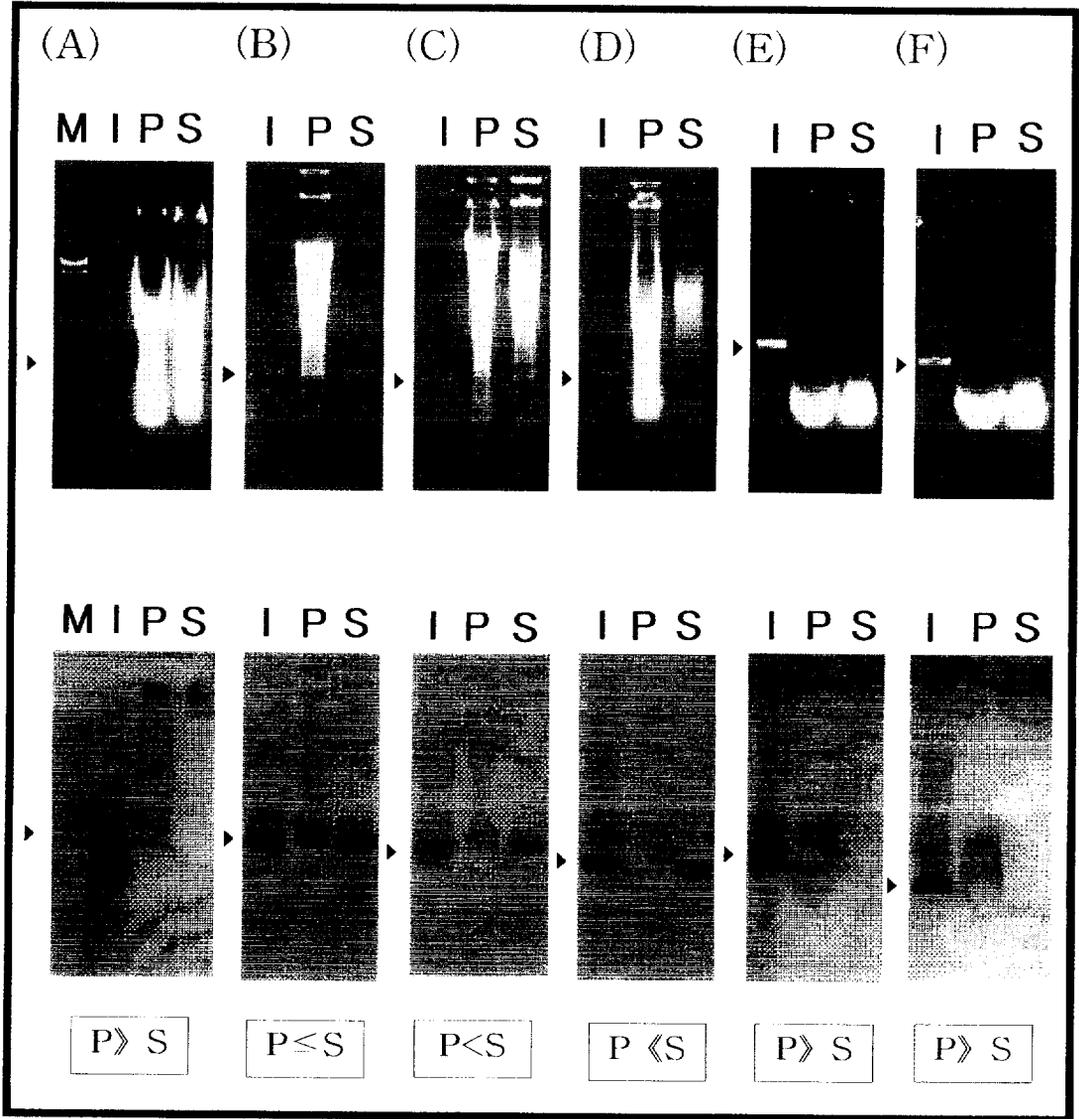


Fig 12-2. *In vitro* core 366 MAR binding assay

- (A) 366- core1 (B) 366- core2
 (C) 366- core3 (D) 366- core4
 (E) 366- core5 (F) 366- core6

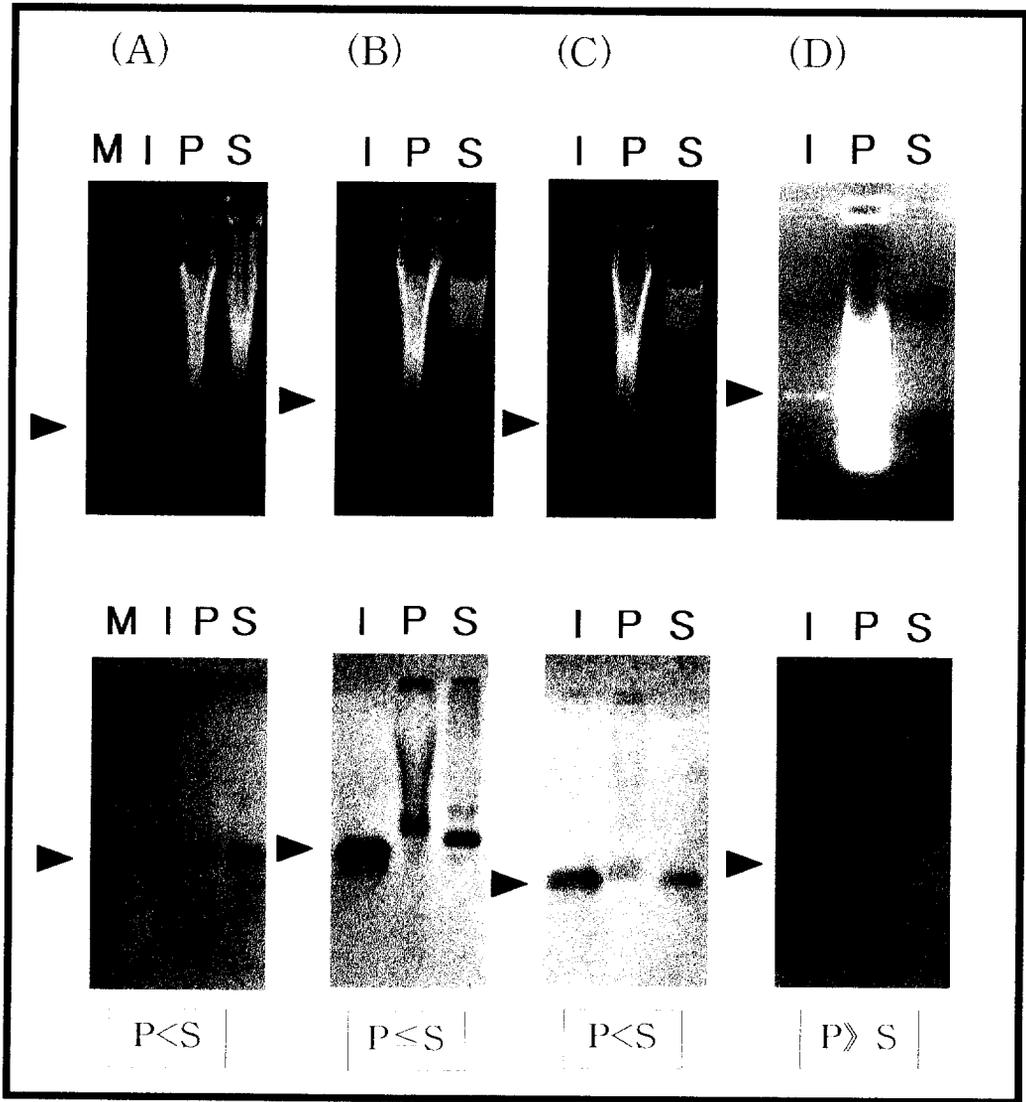


Fig 12-3. *In vitro* core 374 MAR binding assay

(A) 374- core1

(B) 374- core2

(C) 374- core3

(D) 374- core4

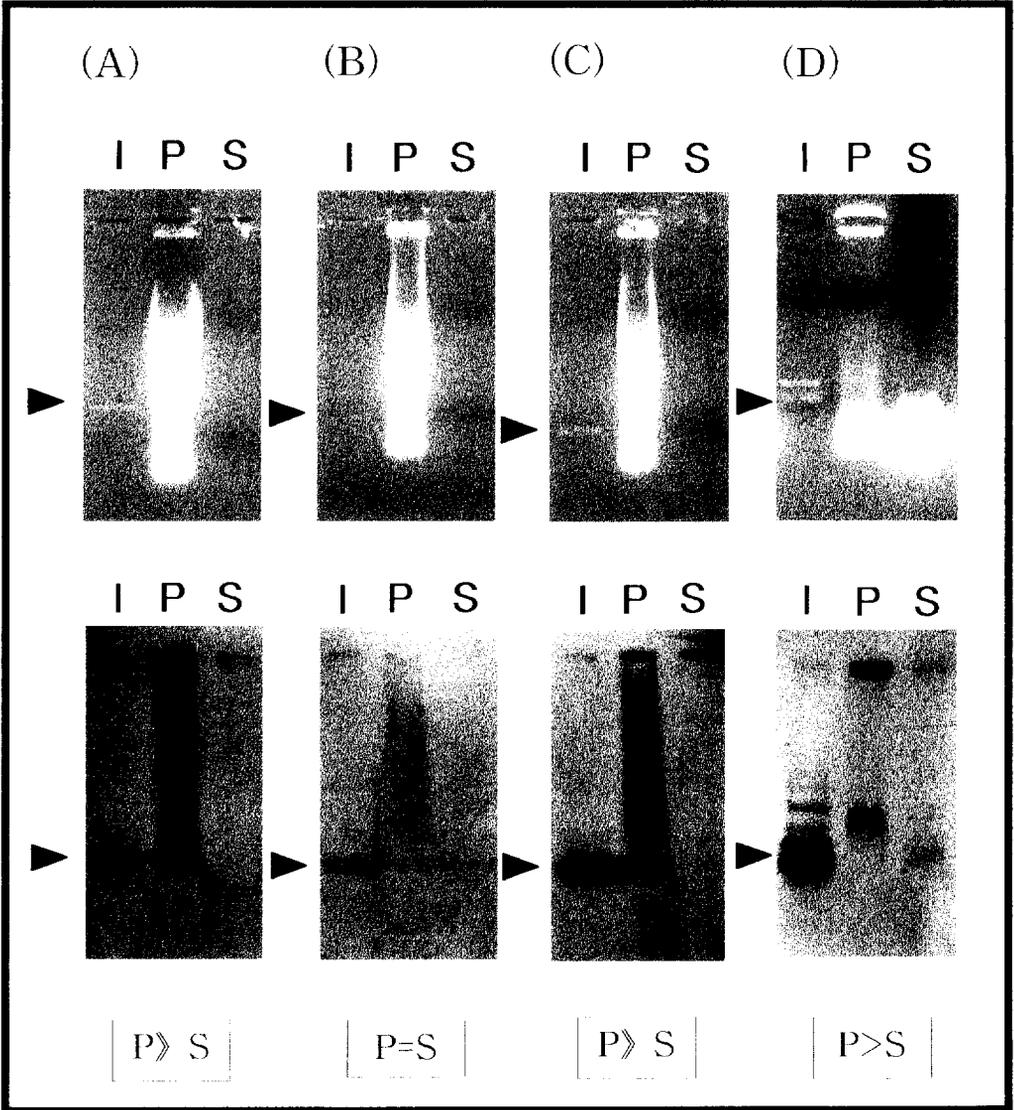


Fig 12-4. *In vitro* core 380 MAR binding assay

(A) 380- core1

(B) 380- core2

(C) 380- core3

(D) 380- core4

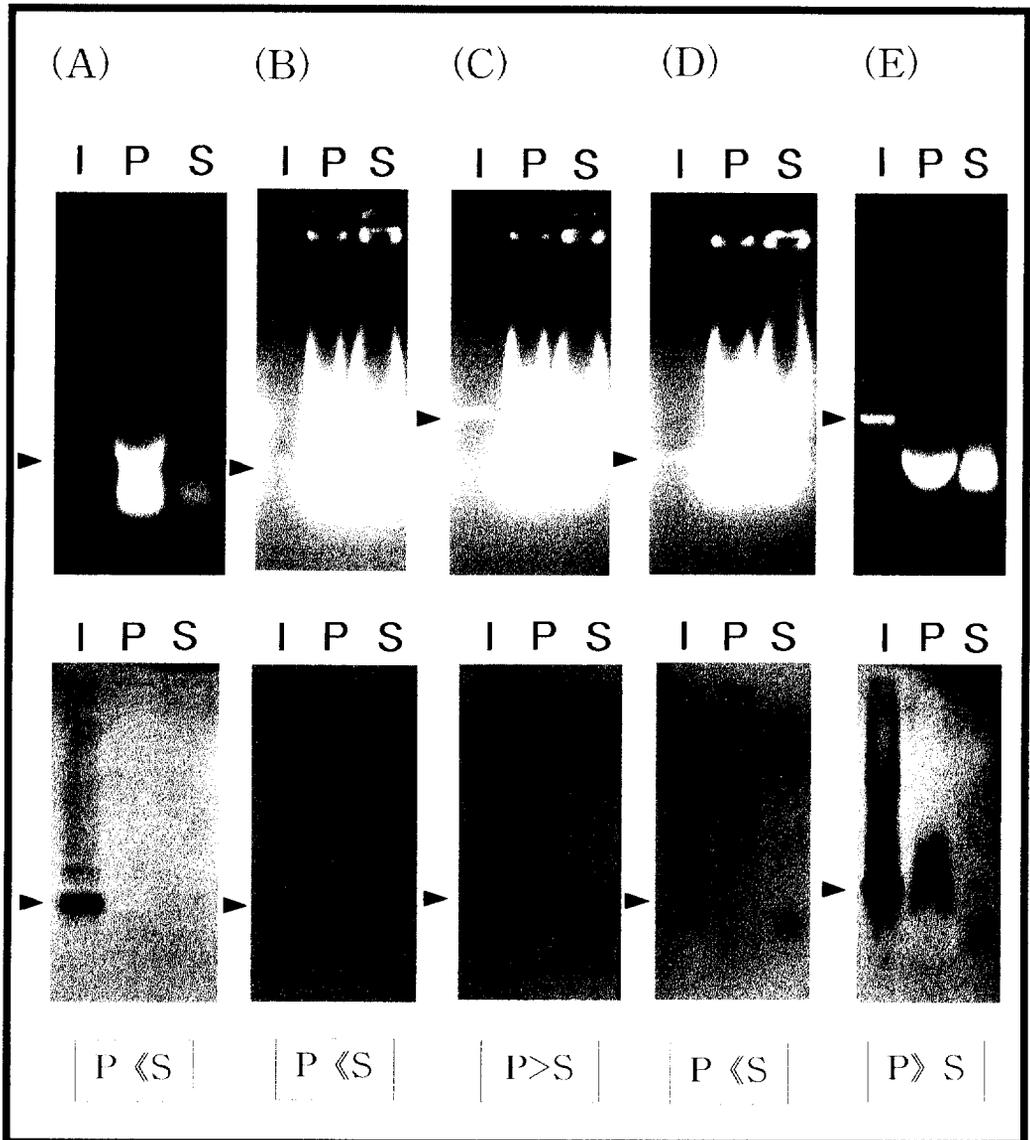
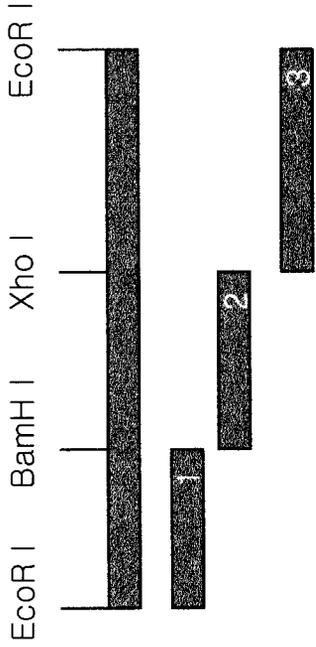
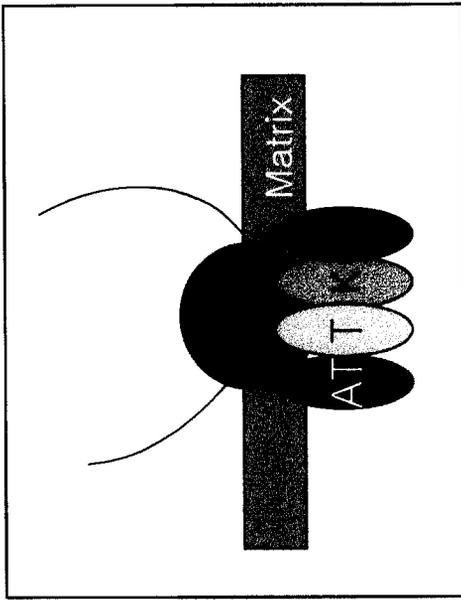
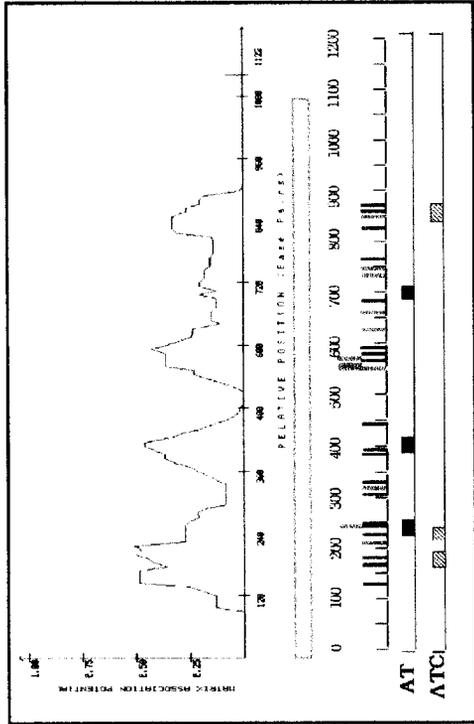


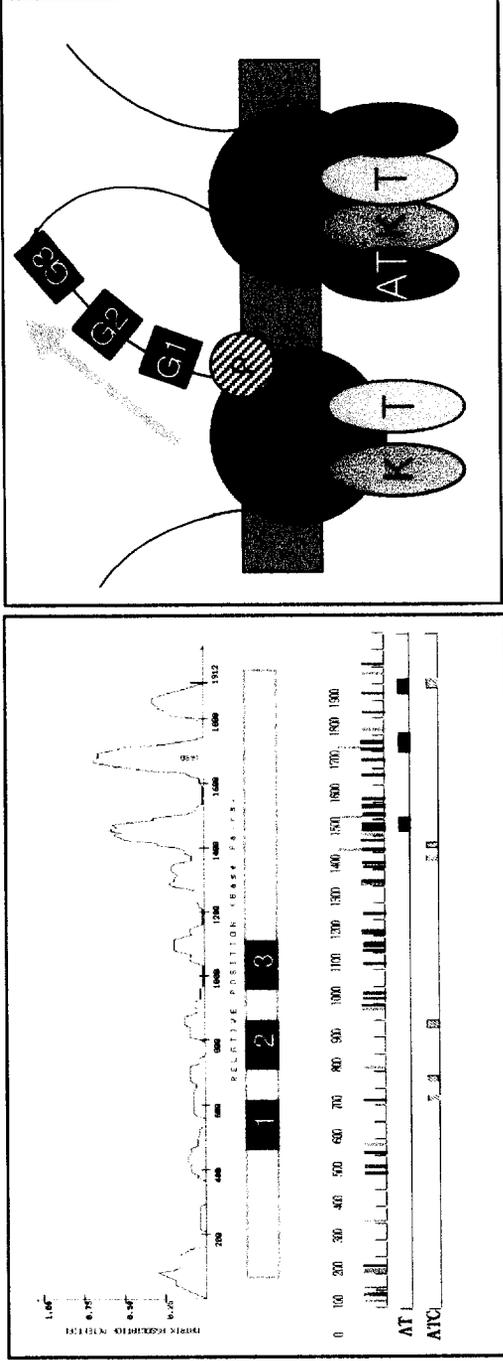
Fig 12-5. *In vitro* core 390 MAR binding assay

(A) 390- core1 (B) 390- core2 (C) 390- core3
 (D) 390- core4 (E) 390- core5



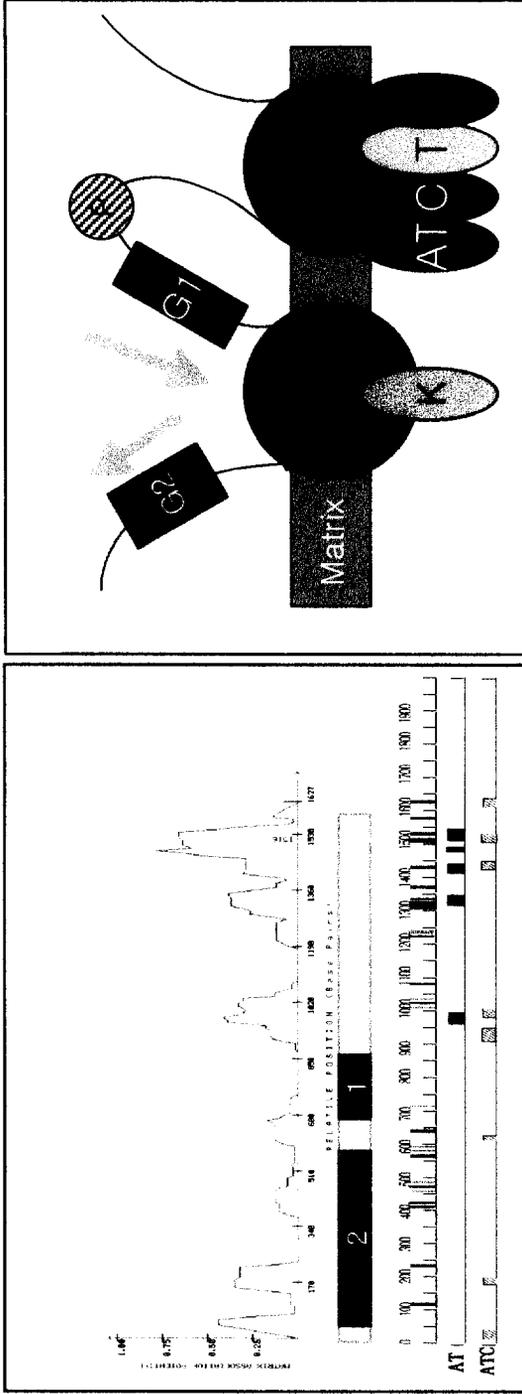
MAR	Specificity
362 (1122bp)	++++
✓ Core 1 (335bp)	+++
Core 2 (356bp)	+
Core 3 (431bp)	+

Fig 13-1. Core MAR 362 and its core fragments binding motifs model in the flounder matrix. AT ; AT-rich , T ; Topo II , K ; Kinked DNA , O ; ORI , C ; Curved DNA, P ; promoter



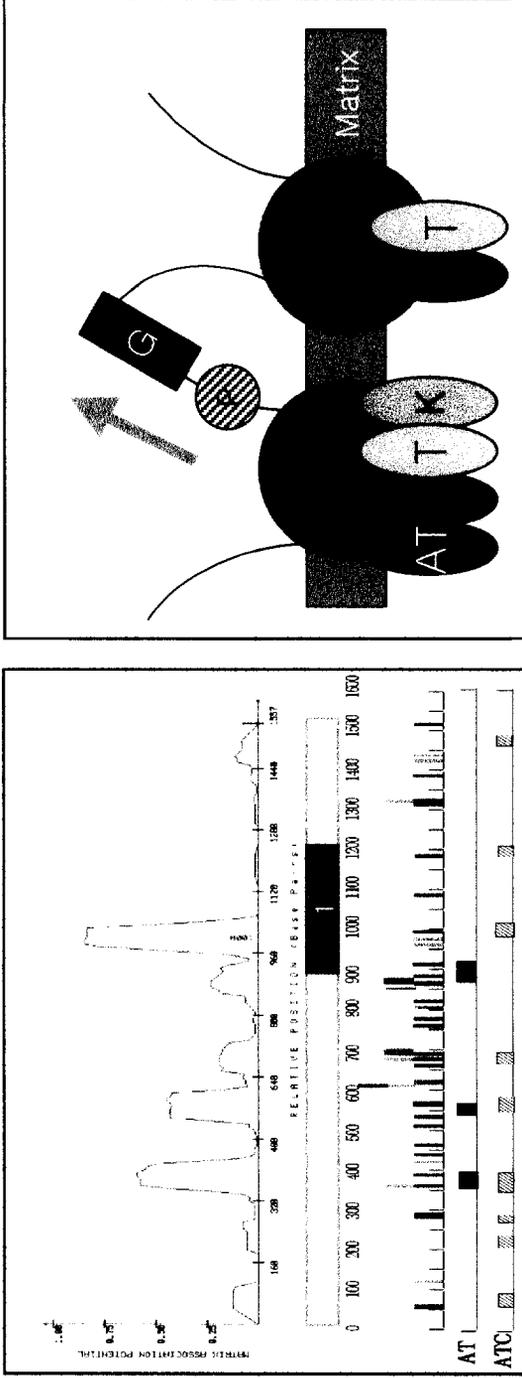
MAR	Specificity
366 (1912bp)	++++
✓ Core 1 (1383bp)	+++
✓ Core 5 (1000bp)	+++
✓ Core 6 (750bp)	+++
Core 2 (757bp)	++
Core 3 (595bp)	+
Core 4 (437bp)	-

Fig 13-2. Core MAR 366 and its core fragments binding motifs model in the flounder matrix.



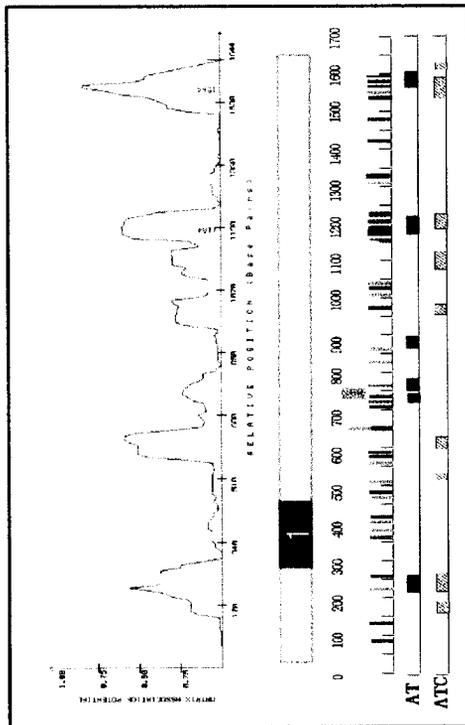
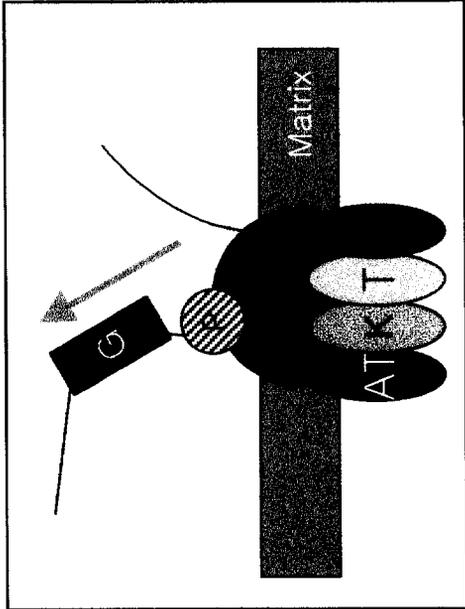
MAR	Specificity
374 (1627bp)	++++
Core 1 (455bp)	+
Core 2 (754bp)	++
Core 3 (418bp)	+
✓ Core 4(1172bp)	+++

Fig 13-3. Core MAR 374 and its core fragments binding motifs model in the flounder matrix.



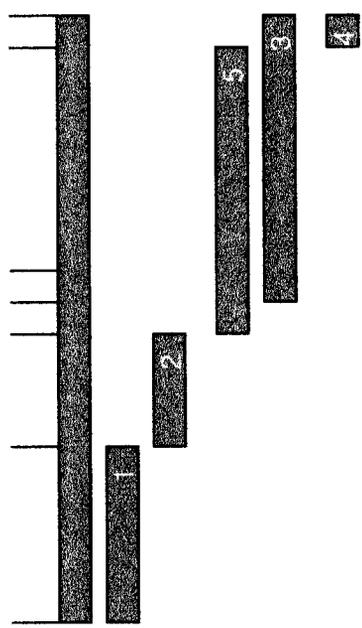
MAR	Specificity
380 (1557bp)	++++
✓ Core 1 (823bp)	+++
Core 4 (734bp)	++
Core 2 (406bp)	+
✓ Core 3 (328bp)	+++

Fig 13-4. Core MAR 380 and its core fragments binding motifs model in the flounder matrix.



AF C16

EcoR I Sac I C17 EcoR I



MAR	Specificity
390 (1644bp)	++++
Core 1 (495bp)	-
Core 2 (322bp)	-
✓ Core 5 (726bp)	+++
Core 3 (672bp)	++
Core 4 (101bp)	-

Fig 13-5. Core MAR 390 and its core fragments binding motifs model in the flounder matrix.

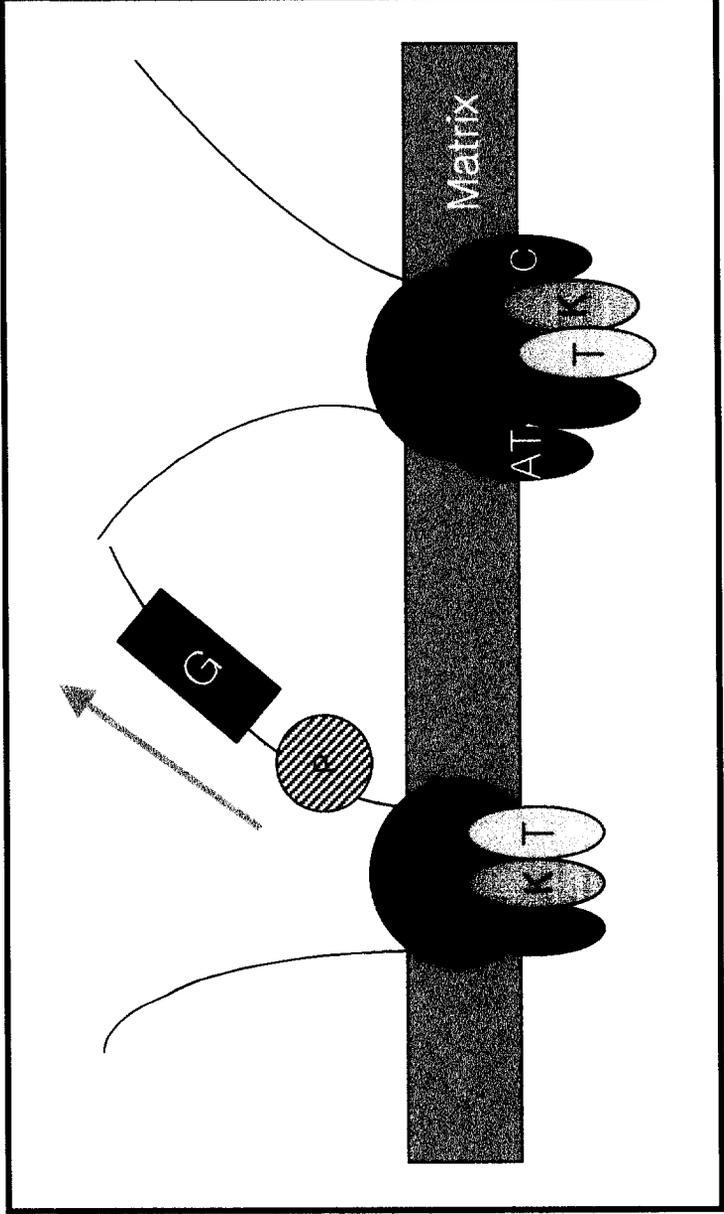


Fig 14. Schematic representation of roles of MARs in the MAR binding motifs model.

Table 1. Fuctional properties associated with isolated nuclear matrix.

(From Nuclar Structure and Gene Expression, R. CURTIS BIRD et al.,)

Property	Reference
DNA loop attachment site sequences	(Gasser and Laemmli, 1987)
DNA binding proteins	(Hakes and Berezney, 1991)
DNA topoisomerase II	(Fernandes and Catapano, 1991)
Replication DNA	(van der Velden and Wanka, 1987)
Replication origins	(Dijkwel et al., 1986)
DNA polymerase α and primase	(Tubo and Berezney, 1987b)
Other replicative factors	(Tubo and Berezney, 1987a)
Active gene sequences	(Zehnbauer and Vogelstein, 1985)
RNA polymerase II	(Lewis et al.,1984)
Transcriptional regulatory proteins	(Feldman and Nevins, 1983)
hn-RNA and RNP	(Verheijen et al., 1988)
Preribosomal regulatory proteins	(Ciejek et al., 1982)
sn-RNA and RNP	(Harris and Smith, 1988)
RNA splicing	(Zeitlin et al., 1987)
Spliceosome - associated proteins	(Blenkove et al., 1988)
Steroid hormone receptor binding	(Rennie et al., 1983)
Viral DNA and Replication	(Smith et al., 1985)
Viral premessenger RNA	(Mariman et al., 1982)
Viral proteins	(Covey et al., 1984)
Carciongen binding	(Gupta et al., 1985)
Oncogene proteins	(Eisenman et al., 1985)
Tumor suppressors	(Mancini et al., 1994)
Heat shock proteins	(Reiter and Penman, 1983)
Calmodulin binding proteins	(Bachs and Carafoli, 1987)
HMG-14 AND HMG-17 Binding	(Reeves and Chang, 1983)
ADP-ribosylation	(Cardenas-Comna et al., 1987)
Protein phosphorylation	(Allen et al., 1977)
Protein kinase A	(Sikorska et al., 1988)
Protein kinase B	(Sahyoun et al., 1984)
Protein kinase C	(Captiani et al., 1987)
Protein kinase CK2	(Tawfic and Ahmed, 1994)
Histone acetylation and deacetylation	(Hendzel et al., 1991, 1994)
Protein disulfide oxidoreductase	(Altieri et al., 1993)
Reversible size chagnes	(Wunderlich and Herlan, 1977)

Table 2. Strains and plasmid DNAs

	Strains, plasimds	Descriptions
Strains	<i>E. coli</i> DH5 α MCR	F', <i>mcr</i> A Δ (<i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC), Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 (Δ L <i>lacZYA</i> - <i>arg</i> F), U169, <i>deo</i> R, <i>rec</i> A1, <i>end</i> A1, <i>sup</i> E 44 , <i>thi</i> -1, <i>gyr</i> A1
	<i>E. coli</i> JM109	<i>end</i> A1, <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> , <i>hsd</i> R17 (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺), <i>rel</i> A1, <i>sup</i> E44, Δ (<i>lac</i> - <i>pro</i> AB), [F', <i>tra</i> D36, <i>pro</i> AB, <i>lac</i> / <i>qZ</i> Δ M15]
Plasmids	pUC19	2.686 Kb, Amp, <i>lac</i> I, <i>lac</i> Z, <i>col</i> E1 <i>ori</i>
	YIp5	4.431Kb, ampr, terr, Ura ⁺ , <i>col</i> E1 <i>ori</i>
	pBluescript II SK +	2.961Kb, Amp, F1(+) <i>ori</i> , <i>col</i> E1 <i>ori</i> , <i>lac</i> I, <i>lac</i> Z, T7 and T3 promoter
	YEp24	7.769Kb, ampr, terr, Ura ⁺ , 2 μ circle DNA
	pURY19	4.8Kb, ampr, Ura ⁺ , <i>lac</i> I, <i>lac</i> Z, <i>col</i> E1 <i>ori</i>
	pURY19M	4.942Kb, ampr, Ura ⁺ , <i>lac</i> I, <i>lac</i> Z, <i>col</i> E1 <i>ori</i>

Table 3. Classification of MAR by binding strength.

Classification	MAR	Length (bp)	K _a	K _d	Binding Strength (%)
Strong	pURY19-MAR 362	1122	100	0	100
	pURY19-MAR 366	1912	100	0	100
	pURY19-MAR 374	1627	100	0	100
	pURY19-MAR 380	1557	100	0	100
	pURY19-MAR 390	1644	100	0	100
Medium	pURY19-MAR 20	1328	48,644	40,255	54.7
	pURY19-MAR 32	1197	35,452	48,232	42.4
	pURY19-MAR 63	1431	22,197	32,581	40.5
	pURY19-MAR 64	1071	43,154	37,810	53.3
	pURY19-MAR 74	1556	26,277	31,940	45.1
Medium-weak	pURY19-MAR 18	1011	20,399	43,049	32.2
	pURY19-MAR 95	1068	12,513	27,342	31.4
	pURY19-MAR 22	≈1000	9,687	25,197	27.8
Weak	pURY19-MAR 40	571	16,533	58,569	22.0
	pURY19-MAR 73	1224	5,896	94,211	5.9
	pURY19-MAR 76	1027	10,865	49,473	17.4
	pURY19-MAR 92	1225	6,729	85,137	7.3
	pURY19-MAR 363	≈1200	3,369	13,139	20.4
Not-bound	pURY19-MAR 33	≈1600	0	100	0
	pURY19-MAR 48	≈1500	0	100	0
	pURY19-MAR 49	518	0	100	0
	pURY19-MAR 66	196	0	100	0
	pURY19-MAR 69	731	0	100	0
	pURY19-MAR 96	220	0	100	0
	pURY19-MAR 99	125	0	100	0

$$\text{Binding Strength (\%)} = K_a / (K_a + K_d) \times 100$$

(K_a = association constant, K_d = dissociation constant)

Motifs sequence	
ORI pattern	ATTA ATTTA ATTTTA TGTTTTG
TG-riches pattern	TGTTTTTTG TTTTGGGG
Curved DNA pattern	AAAAN ₇ AAAN ₇ AAAA TTTAAA
Kinked DNA pattern	TAN ₃ TGN ₃ CAN ₃
TOPO II	WNYNNCNGYNGKTNYN GTNWAYATTNATNNR
CAAT box	CCAAT
TATA box	TATAAA
ACS	WTTTAYRTTTW
BUR	AATATATTT

Table 4. MAR related Motifs Sequences.

W = A/T(U), R = A/G, Y = T/C, K = G/T

ORI motif is related to replication. It is known that DNA replication is associated with the N.matrix. It has also been demonstrated that N.matrix attachment sites, homeotic protein recognition and binding sites and the origins of replication. This implies that differential activation of origins of replication are regulated while part of the n.matrix. And TopoII binding and cleavage sites are concentrated at the sites of nuclear attachment. Selecting this rule will use both vertebrate and *Drosophila* TopoII consensus sequences. In addition to, many MARs contain significant stretches of AT-rich sequences. It has been suggested that the simple occurrence of isolated AT-rich regions is not sufficient to cause matrix association. Several such regularly spaced motifs are required for matrix association. Such a periodicity was considered while formulating this rule.

Table 5-1. Properties of 21 *P. olivaceus* MARs.

MAR	binding strength	binding %	length (bp)	% AT	AT-Rich	ORI	ATC Rule	Curved DNA	Kinked DNA	Topo II	TG-Rich	CAAT box		TATA box	
												box	box	box	box
362	strong	100	1122	58.2	13	11	11	0	6	9	2	0	0	3	3
366	strong	100	1912	58.2	26	29	14	1	10	12	1	4	4	1	1
374	strong	100	1627	51.8	21	9	48	3	1	8	3	3	3	0	0
380	strong	100	1557	60.4	24	30	95	1	6	6	0	3	3	4	4
390	strong	100	1644	56.6	33	24	92	3	10	13	0	0	0	5	5
20	medium	54.7	1328	54.2	58	37	48	3	4	9	0	1	1	5	5
32	medium	42.4	1197	54.1	4	8	18	1	4	3	2	0	0	0	0
63	medium	40.5	1431	59.2	23	30	30	1	8	12	0	1	1	1	1
64	medium	53.3	1071	62.3	8	26	66	2	16	10	1	2	2	1	1
74	medium	45.1	1556	57.8	17	10	104	0	3	9	0	2	2	2	2

Table 5-2. Properties of 21 *P. olivaceus* MARs.

MAR	binding strength	binding %	length (bp)	% AT	AT- Rich	ORI	ATC Rule	Curved DNA	Kinked DNA	Topo II	TG- Rich	CAAT box	TATA box
18	medium-weak	32.2	1011	51.8	4	15	19	0	2	9	0	0	0
95	medium-weak	31.4	1068	60.9	19	15	19	1	8	4	1	2	1
40	weak	22.0	570	54.4	8	5	14	0	0	3	0	1	0
73	weak	5.9	1224	61.3	13	18	58	2	0	5	0	6	3
76	weak	17.4	1027	54.6	17	12	22	0	2	3	2	2	1
92	weak	7.3	1225	61.7	22	20	36	4	0	4	0	4	3
49	unbound	0	518	49.5	0	5	0	0	2	2	1	0	0
66	unbound	0	196	56.6	0	0	4	0	2	0	0	0	0
69	unbound	0	731	49.6	4	6	10	0	0	2	0	1	1
96	unbound	0	220	57.9	0	0	1	0	0	0	2	0	0
99	unbound	0	125	65.4	7	6	8	2	2	0	0	0	0

Table 6. Primer sequences.

These primers were used for amplifying MAR fragments by PCR from *P. olivaceus*.

Primer	Sequences
M13F (24mer)	5'-CGC-CAG-GGT-TTT-CCC-AGT-CAC-GAC-3'
M13R (22mer)	5'-TCA-CAC-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C-3'
366AR	5'-CCT-GCT-TGC-TGA-ACC-AGA-AAA-G-3'
366BF	5'-CTT-TTC-TGG-TTC-AGC-AAG-CAG-G-3'
366BR	5'-CAA-GGT-TAC-AGC-ATT-TTC-TCC-C-3'
390AF	5'-CAG-AGC-TTT-GTG-CTC-GGA-GCT-C-3'