

Hox Genes are Differentially Expressed during Mouse Placentation

Sung Joo Park^{1,2}, Ji-Yeon Lee¹, Jihyun Ma¹, Helena Hyesoo Kim¹ and Myoung Hee Kim^{1,2,†}

¹Department of Anatomy, Embryology Laboratory, ²Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

The placenta is an extraembryonic tissue that is formed between mother and fetus and mediates delivery of nutrients and oxygen from the mother to the fetus. Because of its essential role in sustaining the growth of the fetus during gestation, defects in its development and function frequently result in fetal growth retardation or intrauterine death, depending on its severity. Vertebrate *Hox* genes are well known transcription factors that are essential for the proper organization of the body plan during embryogenesis. However, certain *Hox* genes have been known to be expressed in placenta, implying that *Hox* genes not only play a crucial role during embryonic patterning but also play an important role in placental development. So far, there has been no report that shows the expression pattern of the whole *Hox* genes during placentation. In this study, therefore, we investigated the *Hox* gene expression pattern in mouse placenta, from day 10.5 to 18.5 of gestation using real-time RT-PCR method. In general, the 5' posterior *Hox* genes were expressed more in the developing placenta compared to the 3' *Hox* genes. Statistical analysis revealed that the expression of 15 *Hox* genes (*Hoxa9*, *-a11*, *-a13/ -b8*, *-b9/ -c6*, *-c9*, *-c13/ -d1*, *-d3*, *-d8*, *-d9*, *-d10*, *-d11*, *-d12*) were significantly changed in the course of gestation. The majority of these genes showed highest expression at gestational day 10.5, suggesting their possible role in the early stage during placental development.

Key Words: Placenta, *Hox* genes, Expression pattern

배외 조직 (extraembryonic tissue)으로 분류되는 태반은 임신 중에만 나타나는 기관으로, 어미와 태아 사이에 위치하여, 이 둘 사이의 물질 교환 및 임신 중 보호막 역할 등 중요한 기능을 수행한다 (Watson and Cross, 2005). 따라서, 태아의 생존과 성장은 전적으로 이 태반의 기능에 달려 있으며, 태반의 부적절한 발달과 이에 따른 생리적 변화는 태아의 정상적인 성장 저해를 일으키거나, 심할 경우 임신 중 태아 사망으로 이르게 되는 결과를 초래할 수 있다 (Rossant and Cross, 2001).

Hox 유전자는 배아 발달 과정 중 특정 시기에 배아의 전후축 (anteroposterior axis)을 따라 특정 위치에서 발현

하여 배아의 형태를 만드는데 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있으며 (Gehring and Hiromi, 1986; Duboule, 1994; Kim et al., 2011), 이 *Hox* 유전자의 발현에 이상이 생기면 원래의 위치에서 만들어져야 할 형태가 다른 부위의 형태로 바뀌는 호메오틱 변이가 나타나게 된다 (Gehring and Hiromi, 1986; Duboule, 1994). 흥미 있는 점은, 배아의 전후축을 따라 서로 다른 조합으로 발현하여 형태를 만드는데 관여한다고 보고된 *Hox* 유전자들이 발생 중인 배아에서 뿐만 아니라 태반에서도 발현된다는 점이다.

사람 태반의 경우, 세포 영양막 (cytotrophoblast), intermediate trophoblast, 합포 영양막 세포 (syncytiotrophoblast cell)에서 HOXA11, HOXB6 단백질이 발현된다는 보고가 있으며 (Amesse et al., 2003), 생쥐 태반의 경우 *Hoxc9* 유전자가 임신 12일부터 19일까지 trophoblast giant cell (TGC)에서 (Murasawa et al., 2000) *Hoxa13*은 미로충 (labyrinth) 부분의 혈관에서 발현된다는 보고 (Shaut et al., 2008)가 있다.

*Received: 23 May, 2012 / Revised: 1 June, 2012

Accepted: 1 June, 2012

†Corresponding author: Myoung Hee Kim, Department of Anatomy, Embryology Laboratory, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, C.P.O. Box 8044, Seoul 120-752, Korea.

Tel: +82-2-2228-1647, Fax: +82-2-365-0700

e-mail: mhkim1@yuhs.ac

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

생쥐나 사람을 포함하는 고등 포유류의 경우 총 39개의 *Hox* 유전자가 밝혀져 있다. 이들은 4개의 염색체에 cluster를 이루며 존재하고, 이들을 각각 *Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc*, *Hoxd* cluster라고 한다. 각각의 cluster에는 9~11개의 *Hox* 유전자들이 head-to-tail 방향으로 직렬로 위치하고 있으며 cluster 안에서의 유전자 위치와 이들이 발현하는 시기 및 배아 전후축에서의 위치가 상응하다는 특징이 있다: cluster에서 더 3' 쪽에 위치한 유전자가 더 먼저 그리고 더 앞쪽 (anterior)에서 발현하고 순차적으로 더 5' 쪽에 위치한 유전자가 발현한다 (Gehring and Hiromi, 1986; Duboule, 1994; Kim et al., 2011). 배아에서 이런 시공간 특이적인 co-linear 발현 양상이 잘 알려진 것과는 달리 태반에서는 앞서 언급한 몇몇 *Hox* 유전자에 대한 단편적인 발현 보고 외에는 발현 양상이 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 실험에서는 태반에서도 *Hox* 유전자의 시공간 특이적인 발현 양상이 관찰되는지 알아 보고자 *Hox* cluster 안에 존재하고 있는 모든 *Hox* 유전자의 총체적인 발현을 태반 발달시기별로 분석하였다.

먼저, 임신 10.5, 12.5, 14.5, 16.5, 18.5일의 생쥐로부터 태반을 분리한 후, 이전 논문에 보고한 바와 같은 방법으로 RNA를 얻은 후 cDNA를 합성하였다 (Ruthala et al., 2011). 유전자의 발현 양을 비교하기 위한 Real-time PCR은 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)를 사용하여 시행하였다. 각각의 *Hox* 유전자에 대한 primer sequence는 이전 논문에 보고된 바와 같으며 (Yu et al., 2009), 그 외 몇몇 보고되지 않은 새로운 primer는 다음과 같다: *Hoxa2*, 5'-AAC AAA ACG CCT TTG ACC AG (forward), 5'-CAG GCC TCC TGT TTT GTT TT (reverse); *Hoxa4*, 5'-ACT TCC CAA CAC CAA GAT GC (forward), 5'-ATG AGG ACA GGA GCA GGA GA (reverse); *Hoxa6*, 5'-TAC GGG GCC TCA TGT TTC TA (forward), 5'-CTG CAT CCA GGG GTA AAC AG (reverse); *Hoxb2*, 5'-TTT CTT CGC TGC AGA CTC (forward), 5'-CAG ACG GAA AGG ACC AAA GA (reverse); *Hoxb8*, 5'-GCG CTG TGA GCA TTG TTA AA (forward), 5'-TAA CTC TTC CGC CCT TTT CA (reverse); *Hoxb9*, 5'-CAT GAA GTG GCC AGA CTC CT (forward), 5'-CAG GTG CAG ATG AGG GAT TT (reverse); *Hoxc4*, 5'-GGT TCC AAA ACC GTC GTA TG (forward), 5'-GGG GCA GGG GTG TAA GTT AT (reverse); *Hoxc6*, 5'-CTC ACG TCC ACA CTC TCA GG (forward), 5'-CCA CGT CTG ACT CCC TGT TT (reverse). Real-time PCR을 진행한 다음 태반 발달 단계별 *Hox* 유전자의

발현 차이는 ANOVA를 통해 통계적 유의성을 확인하였으며, ANOVA에서 유의함을 보여주는 유전자에 한하여 Bonferroni correction을 통한 pair-wise 비교를 시행하여 분석하였다.

흥미롭게도, *Hoxa*와 *Hoxd* cluster 유전자들이 발생 중인 태반에서 강한 발현을 보였으며 (Fig. 1A), *Hoxb*와 *-c* cluster 유전자들은 상대적으로 매우 약하게 발현하였다 (Fig. 1A-C). Cluster 내에서는 더 5' 쪽에 위치한 *Hox* 유전자 (7-13번 paralogous group)가 3' 쪽에 위치한 유전자 (1-6번 paralogous group)보다 더 강하게 발현하는 경향을 보여주었다 (Fig. 1A). *Hoxa* cluster 중에서는 *-a9*, *-a10*, *-a11*이 임신 10.5일 태반에서 강한 발현을 보였으며, 그 외의 유전자들은 상대적으로 발현 양이 낮았으나 임신 후반기로 갈수록 발현 양이 미미하나마 소폭 증가하는 경향을 나타내었다. *-d* cluster의 경우도 역시 주로 임신 10.5일에서 강하게 발현하는 양상을 보여주었다 (Fig. 1A).

Hoxb (Fig. 1A, B)와 *-c* cluster 유전자들의 경우 *-a*와 *-d* cluster 유전자에 비해 상대적 발현 양은 매우 적었으나 (Fig. 1A) *-b* cluster의 경우 대체로 태반 발생 초기인 10.5일에 강하게 발현하였고 (Fig. 1B), *-c* cluster (*-c4*, *-c6*, *-c8*, *-c9*)의 경우는 대체로 태반 발생과 함께 점점 그 발현이 증가하여 18.5일째 태반에서 가장 강한 발현 양상을 보였다 (Fig. 1C). 그러나 전반적인 발현 양이 *-a*, *-d* cluster 유전자들과 비교하여 100~1,000배 낮은 수준이므로 이런 발현 양상이 background level인지 아니면 태반 발달에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 현재의 상황에서 그 판단이 어렵다. 아마도 추후 태반 특이적인 conditional gene knock-out 실험을 통해 그 기능이 밝혀질 수 있을 것으로 생각된다.

태반의 발달 단계에 따라 발현되는 *Hox* 유전자의 발현 양 차이를 서로 비교해 보고자 ANOVA 분석을 시도하였다. 먼저 통계적으로 유의성을 보이는 *Hox* 유전자들만을 이용하여 태반 발달 단계별로 발현에 유의적인 차이가 있는지를 Bonferroni correction을 통한 pair-wise 비교를 시행하여 분석하여 본 결과 *-a9*, *-a11*, *-a13*, *-b8*, *-b9*, *-c6*, *-c9*, *-c13*, *-d1*, *-d3*, *-d8*, *-d9*, *-d10*, *-d11*, *-d12* 유전자의 경우 단계별 유의성이 확인되었다 (Table 1).

Hox 유전자 총 39개 중 가장 강하게 발현한 *Hoxa10*과 *Hoxa11*의 경우 (Fig. 1A), 배아의 착상이 이루어지는 자궁과 자궁경부에서 발현된다는 보고가 있다 (Taylor et al., 1997; Zanatta et al., 2010). 태반은 배아유래 조직과 모체, 즉 자궁내막 유래 조직으로 구성되어 있다. 본 연구에서

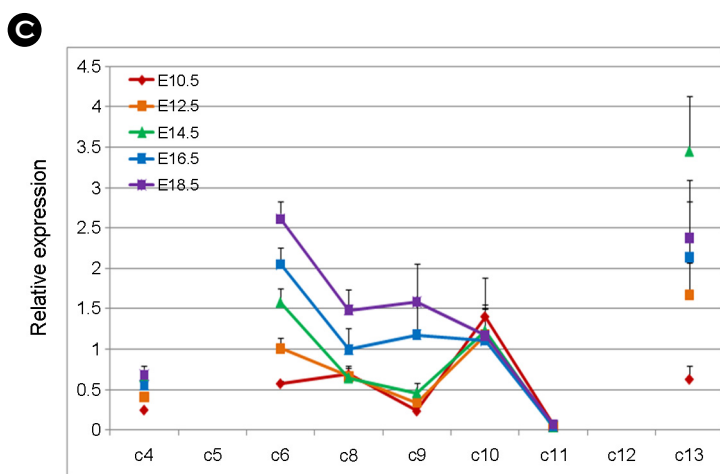
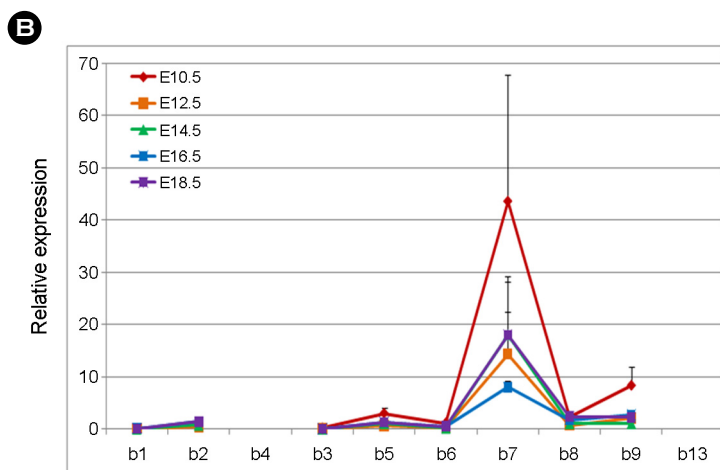
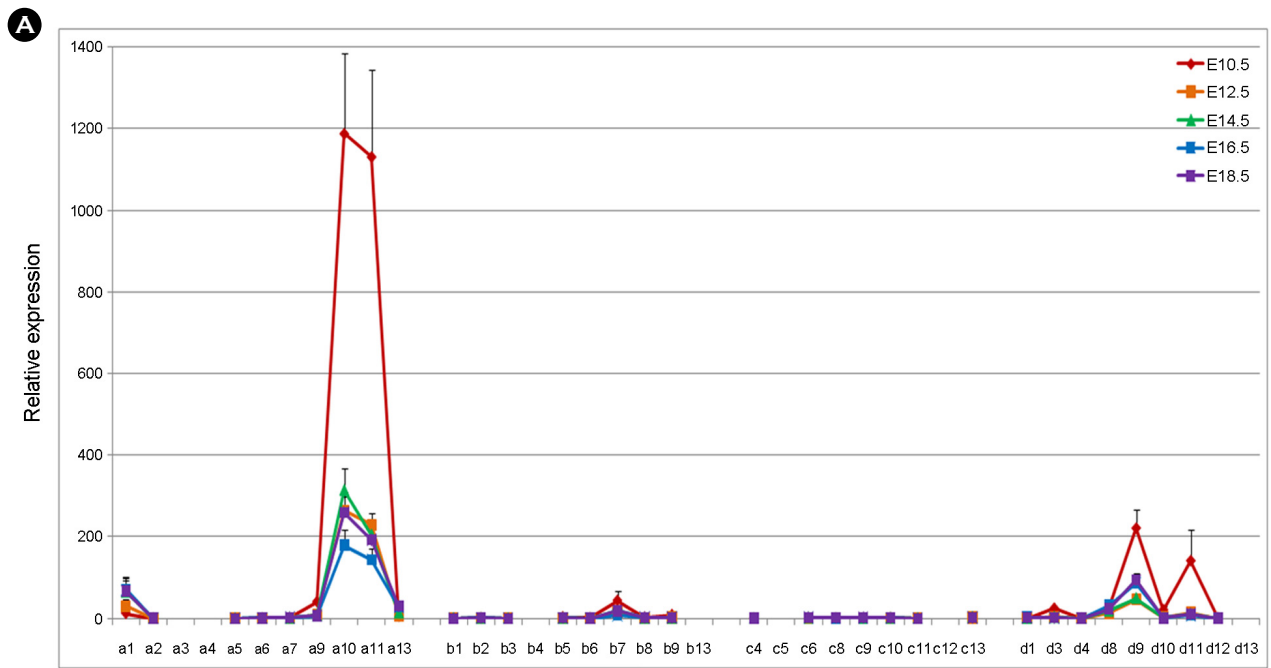


Fig. 1. Relative expression level of *Hox* genes in the developing mouse placenta. (A) A relative expression level of each *Hox* genes located in 4 clusters (*Hoxa*, *-b*, *-c*, and *-d* clusters) is presented following the placental development from the embryonic day 10.5 (E10.5) through 18.5 (E18.5). Name of each *Hox* gene is written in the X-axis (a1, *Hoxa1*; a2, *Hoxa2*; etc.) as their relative position along the cluster. The 3' side in the cluster is on the left (paralog 1) and the 5' side is on the right near the 13 paralog. The relative expression level of *Hoxb* (B) and *Hoxc* cluster genes (C) are represented again with different scale in Y-axis. Values are expressed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Each bar indicates the mean \pm SEM of three independent experiments of each *Hox* gene.

Table 1. Statistical analysis of *Hox* gene expression data

Gene name	ANOVA <i>P</i> -value*	Statistically significant in bonferroni correction**			
<i>Hoxa9</i>	3.16464E-06	10.5 vs 12.5	12.5 vs 16.5		
		14.5	18.5		
		16.5			
		18.5			
<i>Hoxa11</i>	2.07302E-05	10.5 vs 12.5	12.5 vs 14.5	14.5 vs 16.5	16.5 vs 18.5
		14.5	16.5	18.5	
		16.5	18.5		
		18.5			
<i>Hoxa13</i>	0.000205003	10.5 vs 12.5	12.5 vs 14.5	14.5 vs 16.5	
		14.5	16.5	18.5	
		16.5	18.5		
		18.5			
<i>Hoxb8</i>	0.011736367				
<i>Hoxb9</i>	0.01276612	10.5 vs 14.5			
		18.5			
<i>Hoxc6</i>	5.55349E-06	10.5 vs 18.5			
<i>Hoxc9</i>	0.042441514				
<i>Hoxc13</i>	0.01095886	10.5 vs 12.5			
		14.5			
		16.5			
		18.5			
<i>Hoxd1</i>	6.17598E-07	10.5 vs 16.5	12.5 vs 16.5	14.5 vs 16.5	
		18.5	18.5	18.5	
<i>Hoxd3</i>	1.80686E-05	10.5 vs 12.5	12.5 vs 14.5	14.5 vs 18.5	
		14.5	18.5		
		16.5			
		18.5			
<i>Hoxd8</i>	0.044233349				
<i>Hoxd9</i>	0.005376585	10.5 vs 12.5	14.5 vs 18.5		
		14.5			
		18.5			
<i>Hoxd10</i>	0.004705989	10.5 vs 16.5			
<i>Hoxd11</i>	0.004661833				
<i>Hoxd12</i>	8.67873E-05	10.5 vs 12.5			
		14.5			
		16.5			
		18.5			

*; ANOVA *P*-value < 0.05, **; Bonferroni correction < 0.005

는 분리한 태반 조직 전체를 사용하였으므로, *in situ* 등을 통해 발현 위치를 정확히 분석하지 않은 상황에서 단정하기는 어렵지만, 아마도 *Hoxa10*과 *-all*의 경우 모체

자궁의 endometrium에서 유래한 부위에서 발현되어 있을 가능성이 높을 것으로 생각된다. *Hoxa13*의 경우는 질 (vagina)과 (Taylor et al., 1997; Zanatta et al., 2010) 태반의 미

로층 형성에 관여하는 태아 혈관 내피 세포에서 발현한다는 보고가 있다 (Shaut et al., 2008). 본 연구에서 사용한 태반의 경우 자궁 내에서의 위치까지 추적하지는 않았으므로 여기서 발현한 *Hoxa13*이 자궁에서 유래한 태반 조직에서 발현한 것인지 아니면 배아유래 미로층에서 발현한 것인지 현재의 data만으로는 불명확하다. 태반 유래일 경우 생쥐의 경우 자궁이 매우 긴 구조로 되어 있으므로 난소에 가까이 위치한 조직보다 질에 가까이 위치하는 태반 조직에서 발현하였을 가능성을 완전히 배제하기는 어렵다고 본다.

Hoxc cluster 유전자의 경우 전반적인 발현은 매우 미미하였다. 그러나 ANOVA 분석 후 bonferroni correlation 을 보면 *-c6, -c9, -c13*의 경우 발달 시기별 발현 양의 차이가 유의적으로 다르다고 분석되었다 (Table 1). *Hoxc9*의 경우는 특히 생쥐의 태반 발달 중 주요 계통 세포인 거대 영양막 세포에서 발현이 된다는 이전 보고 (Murasawa et al., 2000)에 비추어 볼 때, 적은 양이긴 하나 발생 후기로 갈수록 발현 양이 소폭 증가하는 양상이 무엇을 의미하는지는 추후 더 분석해 볼 여지가 있다고 생각된다.

본 연구에서 살펴본 태반 내에서의 *Hox* 유전자 발현 양상을 보면 많은 유전자들이 임신 10.5일에 가장 발현 양이 높으며, 임신 12.5일에 발현 양의 급감을 보인다. 생쥐 태반의 발달 과정 중 임신 10.5일은 생쥐 태반의 미로층을 이루게 되는 태아 쪽 혈관 형성이 형성되어 가고 있는 시기이며, 이러한 과정은 생쥐 태반 형성과 임신 중 태반의 기능에 있어서 매우 중요한 시기인 점을 감안할 때 (Cross, 2005; Watson and Cross, 2005), 이러한 발현 패턴은 태반의 발달 과정 중 초기 단계에 *Hox* 유전자가 관여를 할 것이라는 가능성을 제시해준다. 본 연구에서 real-time PCR 반응 시 MTP (Multiple Tm Peaks) 문제를 보이거나, 태반 내 발현이 현저히 낮은 일부 *Hox* 유전자 (*Hoxa3, -a4, -b4, -b13, -c5, -c12, -d13*)들을 발현 분석 단계에서 제외하였으나, 전체 *Hox* 유전자를 대상으로 임신 기간에 따른 태반 내에서의 발현 양상을 살펴보았다는 점에서 의미가 크다. 결론적으로, 태반에서는 배아 발달 과정 중 보여준 *Hox* 유전자의 collinear 발현 패턴이 관찰되지는 않았으나 본 연구를 통해서 생쥐 태반 내 *Hox* 유전자의 발현 변화를 시기별로 분석한 결과는 각각의 *Hox* 유전자가 태반 발달 단계에서 어떠한 기능을 수행할 것인가를 알아보는 데 중요한 정보를 제공할 것이며, 비슷한 시기에 동시에 발현하는 *Hox* 유전자들의 경우 서로 상호 협력 또는 보완적인 기능을 수행할 가능성이

있음을 제시해 준다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단 (2010-0000155, 2011-0027603, 2011-0027088) 및 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업 (PJ007124082011)의 일부로 수행되었음.

REFERENCES

- Amesse LS, Moulton R, Zhang YM, Pfaff-Amesse T. Expression of HOX gene products in normal and abnormal trophoblastic tissue. *Gynecol Oncol.* 2003. 90: 512-518.
- Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice. *Placenta.* 2005. 26; A: S3-S9.
- Duboule D. Temporal colinearity and the phylotypic progression: a basis for the stability of a vertebrate Bauplan and the evolution of morphologies through heterochrony. *Dev Suppl.* 1994. 135-142.
- Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 1986. 20: 147-173.
- Kim SH, Lee JY, Park SJ, Kim MH. Effect of dexamethasone on embryo development and Hox gene expression patterns in mice. *J Exp Biomed Sci.* 2011. 17: 231-238.
- Murasawa H, Takashima R, Yamanouchi K, Tojo H, Tachi C. Comparative analysis of HOXC-9 gene expression in murine hemochorial and caprine synepitheliochorial placentae by in situ hybridization. *Anat Rec.* 2000. 259: 383-394.
- Rossant J, Cross JC. Placental development: lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet.* 2001. 2: 538-548.
- Ruthala K, Gadi J, Lee JY, Yoon H, Chung HJ, Kim MH. Hoxc8 downregulates Mgl1 tumor suppressor gene expression and reduces its concomitant function on cell adhesion. *Mol Cells.* 2011. 32: 273-279.
- Shaut CA, Keene DR, Sorensen LK, Li DY, Stadler HS. HOXA13 is essential for placental vascular patterning and labyrinth endothelial specification. *PLoS Genet.* 2008. 16; 4: e1000073.
- Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod.* 1997. 57: 1338-1345.
- Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology.* 2005. 20: 180-193.
- Yu SJ, Lee JY, Kim SH, Deocariz CC, Kim MH. Synthetic maternal

stress hormone can modulate the expression of Hox Genes. J. Exp. Biomed. Sci. 2009. 15: 249-255.

Zanatta A, Rocha AM, Carvalho FM, Pereira RM, Taylor HS, Motta EL, Baracat EC, Serafini PC. The role of the Hoxa10/

HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. J Assist Reprod Genet. 2010. 27: 701-710.