

## 형질전환 CHO-K1 세포주를 이용한 EPO의 생산에서 zinc ion이 미치는 영향

이경선, 김동일\*

인하대학교 공과대학 화공생명공학부

전화 (032) 863-5946, FAX (032) 865-2771

### Abstract

Exogenous glutamine synthetase (GS) was used efficiently as a selectable marker to identify successful transfectants for the production of erythropoietin (EPO) in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells in the absence of glutamine. Inclusion of methionine sulphoximine (MSX), an inhibitor of glutamine synthetase, enabled further selection of clones with relatively high levels of transfected glutamine synthetase and EPO genes which were coupled together. In this study, a new cell line was established by using GS system and enhancement of EPO production by zinc ion was evaluated using the transfected CHO-K1 cell line under normal condition. It was found that EPO production from CHO-K1 cells was enhanced 40% when the optimal amount of zinc ion was added.

### 서론

동물세포배양은 인간 질병의 치료나 진단의 목적으로 사용되는 생물공학 의약품의 생산에 사용되는 주요한 기술 중 하나이다<sup>1)</sup>. 의약품 제조합 단백질을 생산하기 위해 사용되는 동물 세포배양용 세포주는 여러 종류가 있으나 배양조건이 까다롭지 않고, 안정성이 입증된 Chinese hamster ovary(CHO) 세포주가 가장 많이 사용되고 있다. CHO 세포주에서 제조합 단백질을 생산하기 위해서는 보통 dhfr<sup>-</sup> system을 사용하거나 glutamine synthetase(GS) system을 사용한다. GS system은 glutamine synthetase 유전자와 목표 단백질을 발현하는 유전자를 함께 포함하는 vector를 세포 내에 삽입한 후, glutamine이 함유되지 않은 배지에서 세포를 배양하면 GS 유전자를 발현하면서 동시에 목표 단백질 유전자를 함께 생산하게 하는 발현계이다<sup>2,3)</sup>. Erythropoietin(EPO)은 골수에서 적혈구로의 분화를 촉진하는 cytokine의 일종으로 현재 생물공학 의약품 중에서 가장 큰 시장을 확보하고 있으며, 그 시장 규모 또한 증가하는 추세에 있다.

본 연구에서는 GS system을 사용하여 EPO를 생산하는 제조합 CHO 세포주를 얻고, EPO의 생산에 미치는 zinc 이온의 영향에 대해 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양

형질전환 되지 않은 CHO-K1 세포의 배양을 위해서는 10%의 fetal bovine serum(FBS)이 포함된 IMDM 배지를 사용하였고, 배양은 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C, humidified CO<sub>2</sub>

incubator에서 수행하였다. 계대배양은 3일 간격으로 수행하였고 1:10의 split ratio를 유지하였다. 재조합 단백질을 생산하도록 형질전환된 세포주는 glutamine이 포함되지 않은 IMDM 배지에 10% dialysed FBS와 50× GSEM supplement, 100 μM의 MSX를 첨가하여 배양하였다. 계대배양은 4일 간격으로 수행하였으며, split ration는 1:10을 유지하였다. Cell counting과 trypan blue dye exclusion method를 이용한 viability 측정에는 hemacytometer를 이용하였다.

#### Plasmid DNA의 제조

목적 단백질을 유전자를 포함하는 pEE 14.1 벡터의 증폭을 위해서 pEE 14.1 벡터가 삽입된 *E. coli*를 200 μg/mL의 ampicillin이 포함된 LB 배지에 접종한 후, 37°C, 250 rpm의 조건에서 12시간 동안 진탕배양하였다. 배양이 끝난 *E. coli*는 원심 분리하여 수거하고, 삽입된 plasmid 벡터 DNA를 분리하였다. 분리된 plasmid 벡터 DNA의 농도는 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### Transfection

형질전환은 Lipofectamine Plus reagent를 사용하여 6-well plate에서 수행하였다. 형질전환을 위한 세포는 하루 전날  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 계대 배양하여 준비하였고, 형질전환에 사용된 DNA의 양은 1 μg과 3 μg이었으며, 형질전환은 22시간 동안 수행하였다. 형질전환된 세포군을 선별하기 위하여 100 μM과 200 μM의 MSX를 첨가하였다. 이렇게 선별된 6종류의 세포군을 분리하여, 이후 실험에 사용하였다.

#### EPO 생산량의 측정

EPO의 생산량은 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 이용하여 측정하였다.

#### Zinc ion의 효과 실험

실험에 사용한 ZnCl<sub>2</sub> 용액은 멸균된 3차 증류수에 녹여 50 mM의 농도로 제조한 후, 0.22 μm membrane filter를 이용하여 여과한 뒤 실험에 사용하였다. EPO의 생산에 있어서 zinc 이온의 영향을 보기 위한 실험은  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 6-well plate에 세포를 접종하여 수행하였으며, 실험에 사용된 zinc 이온의 농도는 각각 50, 100, 150 μM이었다.

### **결과 및 고찰**

세포주의 형질전환에서 3 μg의 DNA를 첨가한 경우에서만 100 μM 농도의 MSX에 의해 선별된 세포군을 관찰할 수 있었다(Figure 1).



Figure 1. Generated colony on 100 μM MSX condition

세포군의 선별을 위해 200  $\mu\text{M}$ 의 MSX를 처리한 경우에는 생성되는 세포군을 관찰 할 수 없었는데, 이는 고농도의 MSX에 의해 세포의 생장이 저해되었기 때문으로 판단된다. 100  $\mu\text{M}$  농도의 MSX 조건에서 선별된 6 종류의 세포군 중 세포 생장이 빠른 3 종류의 세포군을 선별하였고, 세포 증식의 경향은 Figure 2에 정리한 것과 같다. 또한 선별된 3종류의 세포군의 EPO 생산량을 측정하였으며 이는 Figure 3에 결과를 나타내었다.

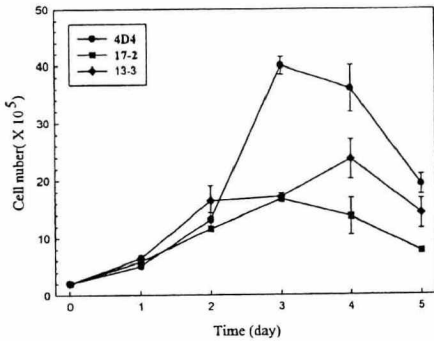


Figure 2. Time course of growth on each clone

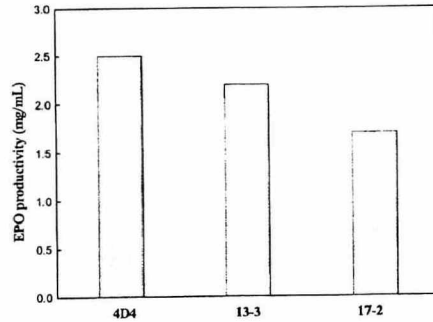


Figure 3. EPO production of each clone

형질 전환된 CHO-K1 세포 배양을 통하여 생산되는 EPO의 양을 증가시키기 위하여 zinc(Zn) 이온을 각각 50, 100, 150  $\mu\text{M}$ 의 농도로 첨가한 결과 세포의 생장은 크게 저해되지 않은 반면에 EPO의 생산은 대조구에 비해 40% 이상 증가하였다(Figure 4). 이는 zinc ion이 RNA polymerase의 cofactor로 작용하여, mRNA의 생성량이 증가하고, 이에 따라 단백질의 발현도 증가한 것으로 사료된다. 다른 이가 이온들 중에서 Mn 이온을 처리한 경우 Zn 이온과 비슷한 효과를 나타내었는데, 이러한 결과는 Mn 이온 역시 세포 내 많은 효소들의 cofactor로 작용하기 때문일 것으로 판단된다(Figure 5).

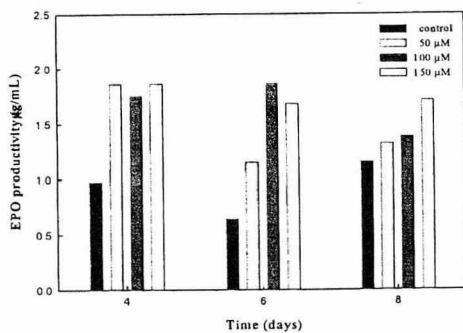


Figure 4. Effect of Zn ion on EPO production

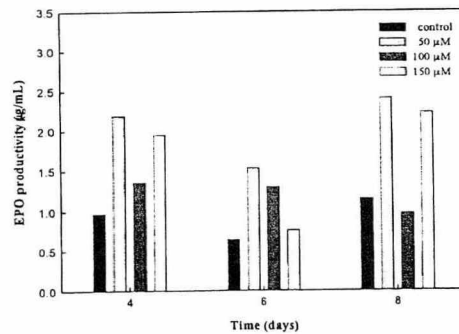


Figure 5. Effect of Mn ion on EPO production

## 요약

GS system을 이용하여 재조합 EPO를 생산하는 새로운 CHO-K1 세포주를 확립하였으며, 이 세포주를 이용하여 Zn 이온과 Mn 이온이 EPO의 생산에 미치는 영향에 관해서 연구하였다. 형질 전환에 있어서 DNA 3  $\mu$ g을 사용하고, 세포군 선별을 위한 MSX의 농도는 100  $\mu$ M을 사용한 경우에만 세포군이 발견되었다. 200  $\mu$ M의 MSX를 처리한 경우에는 세포군이 생성되지 않았고, 이는 고농도의 MSX에 의해 세포 생장이 저해되었기 때문이다. 형질 전환된 CHO-K1 세포 배양에 Zn 이온을 첨가한 결과 세포의 생장은 크게 저해되지 않은 반면에, EPO의 생산은 대조구에 비해 40% 이상 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Mn 이온을 처리한 실험에서도 관찰할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Butler, M. Mammalian Cell Biotechnology, Oxford University Press, New York, 1991.
2. Barnes, L. M., C. M. Bentley, and A. J. Dickson, Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology*, 2000. 32, 109-123.
3. Barnes, L. M., C. M. Bentley, and A. J. Dickson, Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system. *Biotechnol. Bioeng.*, 2001. 73, 261-270.
4. Yang, M. and M. Butler, Enhanced erythropoietin heterogeneity in a CHO culture is caused by proteolytic degradation and can be eliminated by a high glutamine level. *Cytotechnology*, 2000. 34, 83-99.
5. Hartmann, R., G. Walko, and J. Justesen, Inhibition of 2'-5' oligoadenylate synthetase by divalent metal ions. *FEBS Lett.*, 2001. 507, 54-58.