Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 32, No. 1, 11-15 (2004)

Mouse Embryonic Stem Cell에서 Tetracycline-Inducible System(Tet-on System)을 이용한 *Corynebacterium diphtheria* Toxin-A 유전자의 발현 조절

박재균 · 임수빈 · 송지환*
포천중문의과대학교 세포유전자치료연구소

Controlling the Gene Expression of *Corynebacterium diphtheria* Toxin-A Using the Tet-On System in Mouse Embryonic Stem Cells. Park, Jae-Kyun, Su-Bin Yim, and Jihwan Song*. *Cell & Gene Therapy Research Institute, Pochon CHA University College of Medicine, 605 Yeoksam 1-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-081, Korea* – Embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass of the blastocyst-stage embryos that can be propagated indefinitely and, at the same time, can be differentiated into all the cell types that constitute the body. Current research using ES cells is mainly focused on the efficient generation of specific cell types by employing optimal differentiation conditions, which often requires the genetic manipulation of ES cells. As a way of developing an efficient system to regulate foreign gene expression in ES cells, we have inserted the gene encoding *Corynebacterium diphtheria* toxin-A (DTA) into an autonomously induced plasmid under positive doxycycline control ('Tet-on' system). In this study, we demonstrate that this system can lead to the cell death of mouse ES cells by the induction of DTA expression when exposed to the tetracycline derivative, doxycycline. MTT assay showed that this induction resulted in the apoptosis of ES cells.

Key words: Embryonic stem (ES) cells, differentiation, Tet-on system, DTA, doxycycline, *Corynebacterium diphtheria* toxin-A, teratoma formation

Embryonic stem(ES) cell은 blastocyst 시기의 inner cell mass로부터 유래한 세포로 미분화상태에서 정상적인 염색체를 유지하면서 무한히 증식할 수 있으며, 또한 적절한 환경하에 놓이면 신체를 구성하는 모든 세포 및 조직으로 분화할 수 있는 두 가지 큰 특징을 갖는다[10-12]. 이와 같이 ES cell은 기타 다른 종류의 stem cell에 비해 분화 및 증식 능력이 우수하기 때문에 특정세포로의 분화 및 이를 이용한 세포치료법의 개발과 같은 여러 연구 분야에서 활발히 이용되고 있다. 한편, 배양된 ES cell을 생체 내에 이식할 경우 종양(teratoma)이 형성되거나 원치 않는 다른 세포로 분화가 이뤄질 수 있기 때문에 이식한 ES cell을 효과적으로 조절할 수 있는 방법의 개발이 절실히 필요한 상황이다.

따라서 본 연구에서는 ES cell에서의 유전자 발현을 조절시키는 효과적인 방법 개발의 일환으로 Tet-on system을 이용하여 tetracycline derivative인 doxycycline을 통해 *Corynebacterium diphtheria* toxin-A의 발현 조절이 가능한 ES cell을 제작하였고, 이를 바탕으로 diphtheria toxin-A (DTA)의 발현을 유도하여 ES cell을 선택적으로 사멸 시키는 방법을 개발하였다. 따라서 본 연구는 ES cell에서의 유전자의 발현 조절을 위한 기초 연구로서, 이를 이용하여 ES cell에 다양한 유전자를 도입하여 이 유전자의 발현 조절을 통해 ES cell로부터 특정 세포로의 분화 조절 및 부작용 발생시 세포 사멸의 유도 등과 같은 다양한 연구 분야에서 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

*Corresponding author
Tel: 82-2-3468-3393, Fax: 82-2-3468-3264
E-mail: jsong@cha.ac.kr

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 이용된 mouse ES cell(B5)은 캐나다 토론토 대학의 Andras Nagy 교수로부터 제공받았으며, Tet-on system은 Clontech(Franklin Lakes, U.S.A.)으로부터 구입하여 사용하였다[5-7, 13]. Mouse ES cell의 배양을 위한 DMEM, antibiotics(penicillin-streptomycin), non-essential amino acid 등은 Gibco-BRL(Gaithersburg, U.S.A.)으로부터, FBS는 Hyclone(Utah, U.S.A.)으로부터, 또한 MTT assay 용 시약 및 β-mercaptoethanol 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Missouri, U.S.A.)으로부터 각각 구입하여 사용하였다. Tetracycline derivative인 doxycycline은 Clontech으로부터 구입하였으며, 유전자가 도입된 ES cell line의 선별을 위해 각각 G418(Stratagene, Inc. La Jolla, U.S.A.)과 hygromycin (Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.)을 사용하였다. *C. diphtheria* toxin-A 유전자[1-3]를 함유한 plasmid DNA (pDT-A)는 포천중문의대 전기선 교수로부터 제공 받아 사용하였다.

실험방법

Tet-on 발현 vector의 구축

Clontech으로부터 구입한 pTRE2hyg vector를 제한 효소 *Eco*R V로 절단하고 *C. diphtheriae* toxin-A 유전자를 함유한 plasmid DNA(pDT-A)를 *Pst* I과 *Kpn* I으로 절단한 후 T4 DNA polymerase(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)로 blunt end를 만든 후 16°C에서 16시간 동안 ligation 시킨 후 *Escherichia coli* DH5α에 형질 전환 후 LB-ampicillin 고체 배지에서 16시간 동안 배양하여 선별된 군주로부터 TRE2hyg-DTA plasmid를 분리하였다(Fig. 1). 제조된 재조합 pTRE2hyg-DTA DNA는 Qiagen사의 plasmid DNA isolation kit로 대량 분리하여 사용하였다. pTet-On vector도 *E. coli* DH5α에 형질 전환 후 상기의 방법으로 대량 분리하여 사용하였다.

Mouse ES cell의 배양 및 유전자 도입

Mouse ES cell은 0.2% gelatin으로 coating된 tissue culture plate상에 mitomycin C(Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.)가 처리된 mouse embryonic fibroblast(MEF) feeder layer 위에서 배양시켰으며, 이 배양액은 기본 배지인 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)-high glucose에 15% fetal bovine serum(FBS), 1% non-essential amino acid, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin 및 500 units/ml mouse recombinant Leukemia inhibitory factor(LIF)(Chemicon, Temecula, U.S.A.)이 포함되어 있다. Mouse ES cell 내로 pTet-on vector를 도입시키기 위해 6 well plate에 3 μg의 DNA를 Exgen 500(Fermentas, Hanover, U.S.A.)을 이용하여 transfection시켰으며, pTet-on vector가 삽입된 mouse ES cell을 선별하기 위해 G418(100 μg/ml)를 3~4 일간 처리하였다. 이후 stable cell line의 확립 및 이의 유지를 위해 G418농도를 10 μg/ml으로 지속적으로 배양액에 첨가시켰다. 지속적으로 계대 배양된 pTet-on vector가 포함된 mouse ES cell line에 에 다시 한번 재조합 pTRE2hyg-DTA를 transfection시켰으며, 2 μg/ml의 hygromycin이 들어간 배지로 이를 선별하였다. 선별된 mouse ES cell은 G418과 hygromycin이 들어간 이중 선별 배지에서 유지하였다.

Table 1. Primer sequences for neomycin and hygromycin genes.

Name	Sequence	Size
Neo-F	5' CAA CCC GTA AAC TCG CCC AGA AG 3'	360 bp
Neo-R	5' GCT GTA CGC GGA CCC ACT TTC AC 3'	
Hyg-F	5' GCC TGA ACT CAC CGC GAC GTC 3'	554 bp
Hyg-R	5' GCG ATC GCA TCC ATG GCC TC 3'	

MTT assay

pTet-on system plasmid를 포함한 mouse ES cell에서 tetracycline derivative인 doxycycline에 의해 발현이 유도되는 DTA에 의해 mouse ES cell의 세포 사멸이 이뤄지는지 여부를 관찰하기 위해 microculture tetrazolium법(MTT assay)을 수행하였다[9]. 먼저 형질 전환된 mouse ES cell과 형질 전환되지 않은 1×10^6 cell개의 mouse ES cell을 각각 6 well plate에 접종하고 doxycycline을 ES cell 배지로 희석하여 5가지 농도를 만든 후 각 well에 첨가하고 대조군은 doxycycline 대신 PBS를 첨가하였다. Mouse ES cell과 doxycycline이 첨가된 plate를 37°C에서 5% CO_2 하에서 1일간 배양했다. 배양된 plate에 0.1 mg(50 μl of 2 mg/ml)의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 모든 well에 처리한 후 37°C에서 4시간 더 배양했다. Plate를 500 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 배지를 30 μl 정도만 남기고 모두 제거하였다. 그리고 각 well에 dimethyl sulfoxide(DMSO) 150 μl씩을 가한 후 formazan 결정이 녹을 때까지 10분간 가볍게 진탕해 주고 microplate reader(ELISA 540 nm)를 이용하여 흡광도를 측정했다. 이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타내며 따라서 각 well에 존재하는 살아 있는 세포의 개수와 비례한다.

PCR을 이용한 ES cell에 도입된 vector의 발현 여부 확인

형질 전환된 mouse ES cell에 존재하는 pTet-on vector와 재조합 pTRE2hyg-DTA의 존재 및 발현 유무를 확인하기 위해 neomycin과 hygromycin이 첨가된 배지에서 선별된 mouse ES cell의 chromosomal DNA와 total RNA를 추출한 후 이로부터 각각 genomic PCR과 RT-PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 neomycin과 hygromycin를 검출하기 위해 Table 1과 같이 사용하였다. Chromosomal DNA는 lysis buffer(Tris-HCl, pH 8.0, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA)와 10 μl의 proteinase K(10 mg/ml)를 처리하고 phenol/chloroform extraction을 통해 분리하였다. Total RNA는 Trizol reagent[8]를 이용하여 제공된 사용방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA를 RNase-free DNase I(Roche) 처리하여 genomic DNA로부터의 contamination 가능성을 배제한 후 RT-PCR을 수행하였다.

결과 및 고찰

Tet-on system이 발현된 mouse ES cell line의 구축

Tet-on system은 *E. coli*의 tetracycline resistance operator (tetO) 및 CMV minimal promoter가 target 유전자 앞에 위치하여, tetracycline을 처리할 시 이에 의해 transactivator (tTA)이 TRE에 결합하여 그 결과 target 유전자의 발현을 가능케 해주는 system이다. Tet-off system에서 tTA는 tetracy-

cline이 존재할 때는 tetracycline과 결합하여 transcription repressor로 작용하나 tetracycline을 제거하면 target gene의 발현을 유도하는 activator로 기능한다. 그러나 이 방법을 사용할 경우에는 culture medium에 항상 tetracycline을 첨가하여 배양해야 하기 때문에 cell 성장에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다. 따라서 본 연구에서는 반대로 tetracycline를 첨가할 때만 activator로서 작용하는 reverse tTA(rtTA)를 사용하는 Tet-on system을 사용하였다. 따라서 원하는 시기에만 target gene을 발현 시킬 수 있는 장점 외에도 tetracycline의 첨가량에 따라 유전자 발현량도 정밀하게 조절해 줄 수 있는 특징이 있다. 결국 생체내로 이식한 ES cell의 분화 조절, 부작용 발생시 이의 제거 혹은 특정 유전자의 발현을 tetracycline의 첨가를 통해 쉽게 조절시킬수 있는 장점을 갖는다(Fig. 1B). 본 실험에서는 tetracycline의 derivative인 doxycycline을 사용하였으며, doxycycline에 의해 조절 받는 재조합 pTRE2hyg-DTA는 Fig. 1A과 같이 제작하였다.

Doxycycline의 농도에 따른 DTA 유전자의 발현 영향

*C. diphtheriae*의 toxin 유전자는 63 KD의 단백질로 A, B 두가지 fragment로 구성되어져 있다[1-3]. Prototype A-B exotoxin은 각각 다른 작용을 한다. 먼저 B fragment는 target 세포의 receptor site에 결합하여 수용체에 의한 endocytosis로 세포내로 들어간다. 일단 세포내에 들어간 후 A fragment는 elongation factor-2(EF-2)의 ADP-ribosylation에

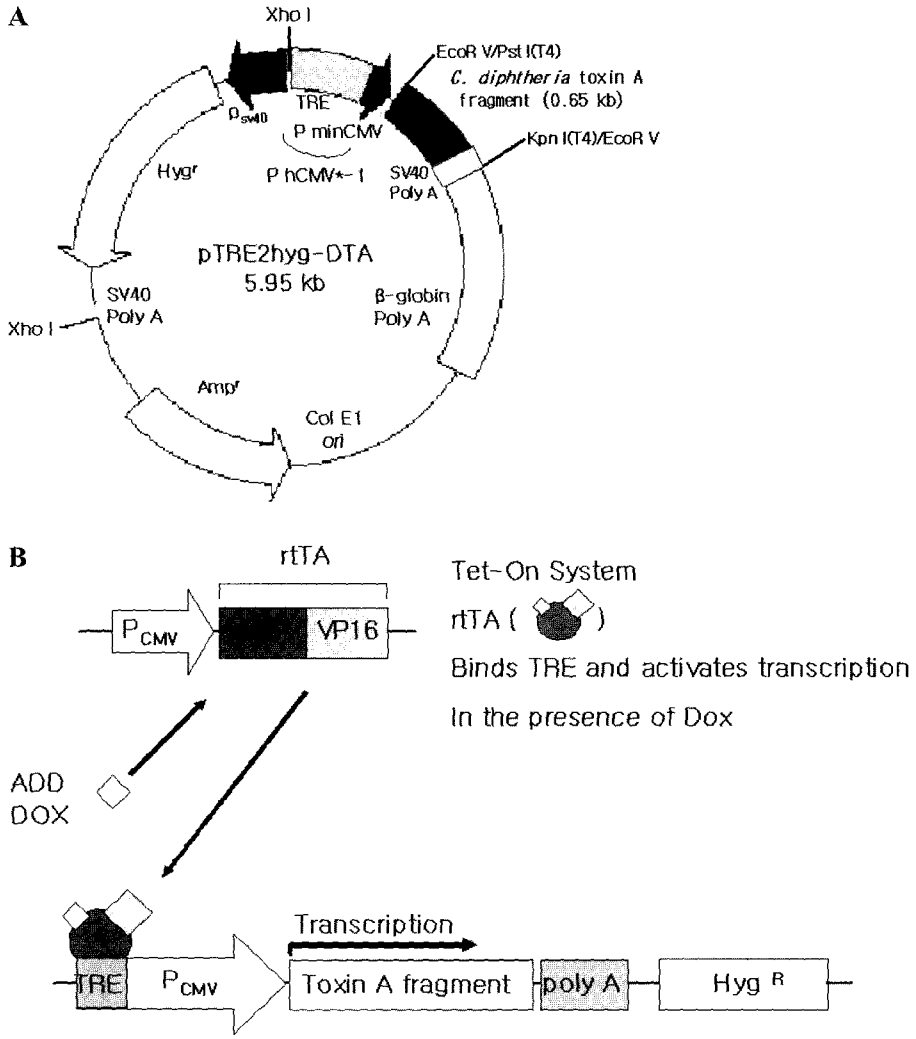

Fig. 1. Construction of *C. diphtheria* toxin-A expression plasmid, pTRE2hyg-DTA (A). Regulation of pTet-on system by doxycycline (3). pTRE2hyg-DTA contains an DTA gene immediately downstream of the Tet-responsive P hCMV*-1 promoter. DTA will be responsive to the tTA and rtTA regulatory proteins in the Tet-off and Tet-on systems, respectively. P hCMV*-1 contains the Tet response element (TRE), which consists of seven copies of the 19-bp tet operator sequence (tetO). The TRE element is just upstream of the minimal CMV promoter (Pmin CMV), which lacks the enhancer that is part of the complete CMV promoter. Consequently, P hCMV*-1 is silent in the absence of binding of TetR or rTetR to the tetO sequences. pTRE2hyg-DTA also contains the hygromycin resistance gene for direct selection of stable transformants.

의한 단백질 합성을 방해하며, 이 결과 세포 사멸을 일으키게 된다. 따라서 mouse ES cell 내에 포함된 재조합 pTRE2hyg-DTA로부터 A fragment가 만들어 지고 이는 세포 사멸을 일으키게 되는 것이다. 실험 결과 doxycycline의 농도 증가에 따라 세포 사멸의 정도가 늘어나는 것을 MTT assay를 통하여 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 pTet-on vector가 doxycycline 농도 증가에 따라 rtTA와 doxycyline의 결합을 증가시키고, target vector인 pTRE2hyg-DTA의 발현을 증가시켜 이 결과 세포내 DTA의 증가로 세포 사멸이 늘어나는 것이다. 그러나 형질 전환되지 않은 mouse ES cell은 doxycycline농도에 영향을 받지 않았다(Fig. 2). 한편, 형질 전환된 ES cell 중 저농도(1 ng/ml)의 doxycycline을 처리한 후 생존한 세포 및 doxycycline을 처리하지 않은 세포를 계속 배양시킨 결과 정상 ES cell과 마찬가지로 증식하였으며, 분화 조건 하에서도 차이를 나타내지 않았다(data not shown). 따라서 DNA transfection 과정을 통해 ES cell의 증식 및 분화에 영향을 미치는 현상이 일어나지 않았음을 관찰할 수 있었다. Doxycycline은 비교적 세포독성이 낮은 것으로 알려져 있으며[4], 또한 형질 전환되지 않은 ES cell은 이에 의한 영향을 받지 않은 것으로 나타나 doxycycline에 의한 non-specific한 효과는 없는 것을 확인할 수 있었다.

Mouse ES cell내의 pTet-on system의 존재 및 발현 여부의 확인

형질 전환된 mouse ES cell내 존재하는 pTet-on vector와 재조합 pTRE2hyg-DTA의 존재 및 발현 유무를 확인하기 위해 형질 전환된 mouse ES cell로부터 추출된 chromosomal DNA와 total RNA으로부터 neomycin과 hygromycin 유전자의 존재와 발현 유무를 확인하였다. 각각의 template DNA는 chromosomal DNA와 RT-PCR을 통한 cDNA를 사용하였다. 결과에서처럼 예상되는 크기의 band를 확인하였다

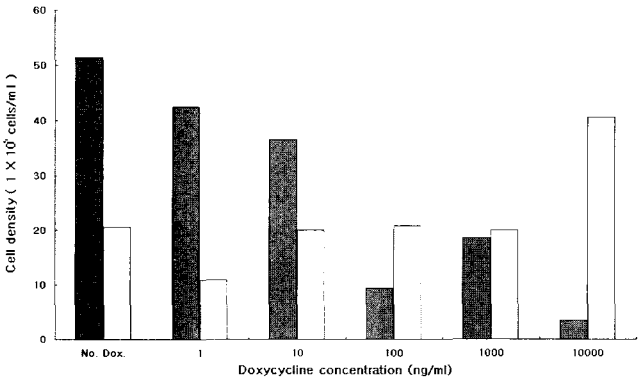

Fig. 2. Effect of doxycycline treatment in mouse ES cell (B5). Closed bar indicates the transfected ES cell containing "Tet-on system" and Open bar indicates the untransfected ES cell. Statistical analysis was performed using student's T test from three independent experiments.

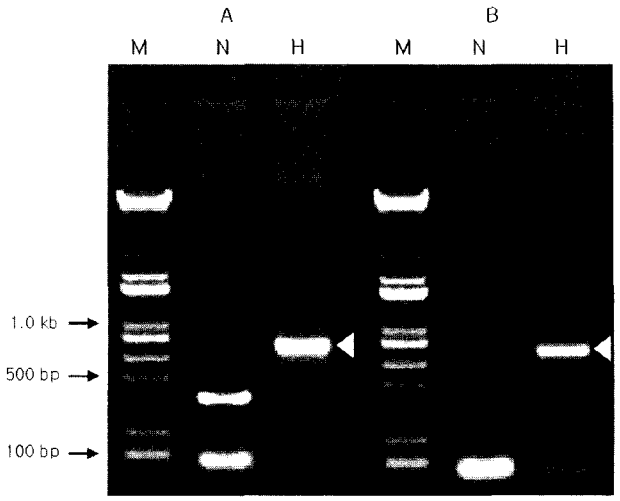

Fig. 3. Detection of neomycin and hygromycin genes using PCR in transfected ES cells. (A) genomic PCR from chromosomal DNA. (B) RT-PCR from total RNA. Abbreviations: M, 1kb plus DNA ladder; N, neomycin; H, hygromycin. Closed and open arrowheads indicate the expected sizes of neomycin (◀; 360 bp) and hygromycin (◁; 554 bp) genes, respectively.

(Fig. 3). Doxycycline에 의해 DTA 유전자의 발현이 유도되는지, 또는 DTA 유전자의 전사량과 단백질 합성이 비례하는지의 여부는 doxycycline에 의해 유전자 발현이 조절될 수 있음을 증명하는 직접적인 척도이므로, 이와 관련된 연구가 향후 진행되어져야 할 것으로 사료된다.

본 연구결과의 의의 및 향후 연구 방향

유전자의 시간적 혹은 공간적 발현 조절은 특정 유전자의 작용 기작 및 기능을 파악하는데 필수적이며, 이를 위해 현재까지 heat shock, heavy metal ion, interferon, FK506 dimer, glucocorticoid 및 tetracycline 등에 의해 유전자의 발현을 유도시키는 방법이 개발되어져 있다[4]. 하지만, 이와 같은 방법은 각각 장단점을 갖고 있으며, 아직까지 완벽하게 유전자의 발현을 조절시키는 방법이 정립되지는 못한 상태이다. 본 연구에서는 세포독성이 비교적 낮고, 또 많은 연구자들에 의해서 보편적으로 사용되고 있는 tetracycline-inducible system을 연구방법으로 택하여 *C. diphtheriae* toxin-A(DTA) 유전자를 선택적으로 발현시켰으며, 이 결과 세포 사멸이 유도됨을 확인하였다.

ES cell은 무한히 증식할 수 있고, 또한 적절한 환경 하에서 신체를 구성하는 모든 세포 및 조직으로 분화할 수 있어 세포치료의 가장 이상적인 재료로 간주되고 있지만, 생체 내에 이식할 경우 종양을 형성할 수 있기 때문에 안전성 측면에서 많은 우려가 제기되고 있다. 이런 측면에서 본 연구 결과는 만일 이식된 ES cell로부터 종양이 형성될 시 이를 선택적으로 제거시킬 수 있는 기반을 구축시켰으며, 향후 이식 실험을 통해 *in vivo*에서 이를 입증할 계획이다. 체내에서 종

양이 형성될 경우는 대다수 이식된 세포가 미분화상태로 존재하는 경우인 만큼, 본 연구에 사용된 human cytomegalovirus(CMV) promoter 대신 미분화상태에서만 발현되는 Rex-promoter를 사용할 경우 doxycycline 처리시 분화된 세포는 남겨 놓고 미분화된 세포만 선택적으로 제거할 수 있는 보다 정교한 방법이 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 *C. diphtheriae* toxin-A(DTA)를 합성하는 유전자를 tetracycline derivative인 doxycycline에 의해 발현이 유도되는 plasmid('Tet-on' system)에 삽입시켜, 이를 mouse ES cell에 도입시켰으며, 이렇게 제작된 mouse ES cell이 doxycycline의 처리 농도에 따라 mouse ES cell내의 DTA의 발현이 유도되어 이 결과 세포 사멸(apoptosis)을 유발시키는 것을 MTT assay를 통해 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 식품의약안전청 위탁과제(03142바이오032-1) 지원에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Barbieri, J. T. and R. J. Collier. 1987. Expression of a mutant, full-length form of diphtheria toxin in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**: 1647-1651.
2. Bruce, C., R. L. Baldwin, S. L. Lessnick, and B. J. Wisnieski. 1990. Diphtheria toxin and its ADP-ribosyltransferase-defective homologue CRM197 possess deoxyribonuclease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2995-2998.
3. Falnes, P. O., A. Wiedlocha, A. Rapak, and S. Olsnes. 1995. Farnesylation of CaaX-tagged diphtheria toxin A-fragment as a measure of transfer to the cytosol. *Biochemistry* **5**: 11152-11159.
4. Gingrich, J. and J. Roder. 1998. Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu. Rev. Neurosci.* **21**: 377-405.
5. Gossen, M. and H. Bujard. 1995. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *BioTech.* **89**: 213-215.
6. Gossen, M. and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 5547-5551.
7. Hillen, W. and C. Berens. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10-encoded tetracycline resistance. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**: 345-369.
8. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
9. Rubinstein, L. V., R. H. Shoemaker, and M. R. Boyd. 1990. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1113-1118.
10. Smith, A. 2001. Embryonic stem cells. p. 205-230. In stem cell biology, D. R. Marshak, R. L. Gardner, and D. Gottlieb (eds.), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Habor Laboratory Press.
11. Smith, A. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 435-462.
12. Song, J. 2002. Current trends of stem cell research using pluripotent stem cells. *Exp. Mol. Med.* **34**: 7-21.
13. Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, and S. L. McKnight. 1988. Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2**: 718-729.

(Received Nov. 1, 2003/Accepted Feb. 9, 2004)