

형질전환생쥐에서 Lck Promoter에 의한 Diphtheria Toxin-A Gene의 발현 분석

나루세겐지 · 이승현¹ · 최희식² · 이성호³ · 박창식 · 진동일[†]
충남대학교 동물자원학부, 형질전환복제돼지연구센터

Expression Analysis of Diphtheria Toxin-A Gene Regulated by Lck Promoter in Transgenic Mice

Kenji, N., S. H. Lee¹, H. S. Choi², S. H. Lee³, C. S. Park and D. I. Jin*
Division of Animal Science & Resources,
Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University

ABSTRACT

Transgenic mice containing Diphtheria Toxin-A (DT-A) gene fused to proximal lck promoter sequences was used for analysis of DT-A gene expression and thymocyte development. The diphtheria toxin gene was expressed in thymus, spleen and liver of transgenic mice confirmed by RT-PCR and Northern blotting. A FACS analysis with thymocyte cell surface antigens antibodies (CD4 and CD8) showed that the number of peripheral mature single positive thymocytes (CD4⁺ and CD8⁺ cells) T-cells was severely reduced in transgenic mice compared to that in the non-transgenic littermates. A relative portion of CD8⁺ single positive thymocytes was about 33.2% in transgenic peripheral T-cells while 50.6% in wild type. Reduction of CD4⁺ cell numbers in transgenic mice was observed (5.9% in transgenic versus 10.3% in non-transgenic). The data from analysis of these transgenic mice indicate that the proximal lck promoter regulated the expression of DT-A gene at high level in developing thymocytes and the DT-A disrupted developing thymocytes in transgenic mice.

(Key words : Diphtheria Toxin-A, Lck promoter, Transgenic mice, Gene expression)

I. 서 론

면역결핍을 유도할 수 있는 이식유전자(trans-gene)를 구축하고 돼지나 원숭이와 같은 중형동물의 이종장기 배양용(*in vivo* culture system) 형질전

환동물을 생산하는 것은 또 하나의 이종장기이식을 위해 형질전환기술이 응용될 수 있는 중요한 분야로 대두되고 있다(Tary-Lehmann 등, 1995; Nazirudin 등, 1996; Lee 등, 2002; Naruse 등, 2003). 본 실험실에서는 이와 관련된 기초실험으로 면

* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-03001-0) 지원으로 수행되었음.

[†] Corresponding author: Dr. D. I. Jin, Division of Animal Science & Resources, Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon City, Chungnam, 305-764, E mail: dijin@cnu.ac.kr

¹ 서울대학교 유전자 이식연구소

² 김천대학교 임상병리학과

³ 공주대학교 영상보건대학

역결핍동물을 생산하기 위해 lck promoter sequence를 이용하여 Diphtheria Toxin-A(DT-A) 유전자와 함께 이식유전자를 구축하고 이미 형질전환생쥐를 생산을 보고하였다(Naruse 등, 2003). 이 형질전환생쥐의 연구에서 이용된 3.2 kb lck promoter는 thymus에서 이식유전자를 특이적으로 발현시키고 또한 spleen이나 혈액 내 T-cell에서도 발현을 주도하는 것으로 알려져 있다(Wildin 등, 1995). lck 유전자는 lymphocyte-specific tyrosine kinase인 p56^{lck}로 발현되는데 초기 T-cell 발달에 중요한 역할을 하고 T-cell의 신호전달체계에 관여하는 물질로 알려져 있고(Perlmutter 등, 1993), T-cell의 분화 중에 lck gene의 transcription level이 잘 조절되고 있어 proximal lck promoter는 T-cell과 관련하여 형질전환생쥐를 이용한 연구에 이미 널리 사용되고 있다(Garvin 등, 1990; Allen 등, 1992). Diphtheria toxin subunit A 유전자는 형질전환생쥐에서 단백질합성을 저해함으로써 특이적으로 조직이나 세포를 파괴하는 것으로 알려져 있고 생체 내 특정세포를 제거함으로써 그 세포군의 기능을 연구하는데 이용되고 있다(Van Ness 등, 1980; Palmiter 등, 1987; Lowell 등, 1993; Arase 등, 1999; Bartell 등, 2000).

본 연구는 Naruse 등(2003)이 생산한 proximal lck promoter에 DT-A gene을 가진 형질전환생쥐에서 DT-A 유전자의 발현 상황과 DT-A 유전자가 발현되면서 면역세포의 발달에 이상 유무를 분석하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. Transgene cloning 및 형질전환생쥐의 생산

DT-A gene은 PKODT vector(Lexicon Co. USA) 안의 DT gene을 이용하였고 3.2 kb lck promoter와 pgk polyA 사이에 BamHI site에 cloning하여 lck promoter-DT gene-pgk polyA transgene을 완성하였다(Fig. 1). 형질전환생쥐의 생산은 Naruse 등(2003)에 의해 보고된 대로 구축한 lck promoter-DT-A DNA를 생쥐 FVB 종의 1-cell 수정란 전핵에 microinjection을 실시하였고 DNA가 주입된 수

정란은 곧바로 대리모 생쥐의 난관으로 이식하였다. 태어난 새끼는 꼬리 조직 일부를 잘라 proteinase K로 처리하여 genomic DNA를 추출한 후 specific primer를 이용하여 PCR 방법으로 DT-A gene의 sequence를 가지고 있는가를 검사하였다. PCR 조건으로는 30 cycles을 사용하였는데 95°C에서 1 분, 60°C에서 1 분, 72°C에서 1 분의 cycle이 되도록 하였다.

2. RT-PCR과 Northern blotting

형질전환생쥐에서 DT-A gene이 조직 특이적으로 발현되는지를 확인하기 위해서 먼저 RT-PCR를 수행하였다. 형질전환생쥐와 정상생쥐를 희생시켜 thymus, spleen, liver에서 각각 RNA를 추출하였다. RNA는 Trizol(Life Technologies Inc.)을 사용하여 분리하였고 분리된 total RNA는 reverse transcriptase superscript II(Life Technologies Inc.)와 poly-dT oligo primer를 사용하여 42°C에서 약 40분간 배양하여 cDNA를 증폭하였다. 얻어진 cDNA를 증폭하기 위해서 아래와 같은 DTF와 DTR primers를 사용하였다.

DTF F 5'-CTAGCGGATCCTTCAGGATCTGCGA
CCTGCAG-3' (forward)
DTR R 5'-TAGCAGGATCCTCTCTGTAGGTAG
TTTGTCCA-3' (reverse)

RT-PCR은 0.5 umol의 primers, 2 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 1.25 U Taq polymerase II (Takara Inc.)를 이용하여 95°C에서 5분간의 denaturation step과 곧이어 94°C에서 30초, 60°C에서 30 초 및 72°C에서 1 분의 조건으로 총 30 cycle을 실시하였다. 증폭된 산물은 2 % agarose gel에서 전기영동을 실시하여 확인하였다.

형질전환생쥐의 각 line 별 F₁ 및 F₂ 새끼의 조직에서 RNA를 추출하여 Northern blotting을 시도하였다. 형질전환생쥐와 정상 생쥐의 thymus, spleen 및 liver에서 Trizol을 사용하여 total RNA를 추출하였다. Northern blot을 위해 15 ug의 total RNA를 formaldehyde agarose gel로 전기영동시킨 후 Hy-

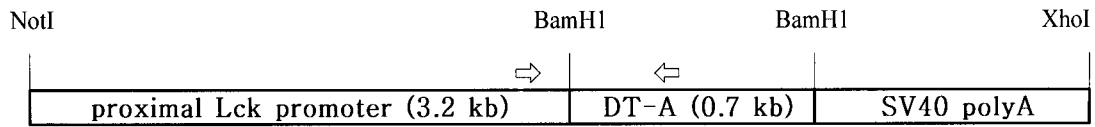


Fig. 1. A schematic diagram of the 4.4 kb Lck-DT-A transgene construct used for microinjection. This construct consists of lck proximal promoter, diphtheria toxin-A subunit gene (DT-A) and SV40 polyadenylation signal. ⇨: 5' primer, ⇩ : 3' primer for genomic DNA screening.

Bond-N nylon membrane으로 transfer시켰다. random priming kit(Amesharm Inc)을 이용하여 DT-A DNA sequence를 ³²P-dCTP로 labeling하여 probe을 만들고 이 probe을 이용하여 Hybridization을 시키고 washing한 후 X-ray film에 노출시켜 발현양상을 관찰하였다.

3. Flow Cytometric 분석

형질전환생쥐의 혈액에서 mature T-cell의 감소 여부 확인을 cell surface antigen의 발현을 flow cytometry를 이용하여 분석하였다. T-cell을 농축시키기 위해 다른 cell surface receptor를 발현하는 세포를 제거하는 magnetic bead를 이용하였다. anti-CD4 fluorescein phycoerythrin(PE)와 anti-CD8 FITC antibody를 이용하여 염색을 한 후 FACS 분석을 실시하였다. FACS medium(PBS, 2% fetal calf serum and 0.01% NaN₃)을 사용하여 혈액의 cell suspension을 준비하였고 Flow cytometry는 FAC Scan과 CellQuest software를 이용하여 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환생쥐의 생산 및 이식 유전자의 발현

본 연구진 Naruse 등(2003)에 의해 생산된 proximal lck promoter-DT-A 형질전환생쥐는 outbreeding시켜 후 F₁ 및 F₂ 새끼의 생산을 시도한 결과 약 50%의 이식유전자를 후대에 전달되어 안정적으로 이식유전자가 염색체 상에 정착된 것으로 나타났다(Fig. 2). 형질전환생쥐에서 DT-A gene이 조직 특이적으로 발현되는지를 확인하기 위해서 먼저 RT-PCR를 수행하였다(Fig. 3). 형질전환생쥐와 정상생쥐로부터 thymus, spleen 및 liver를 분리

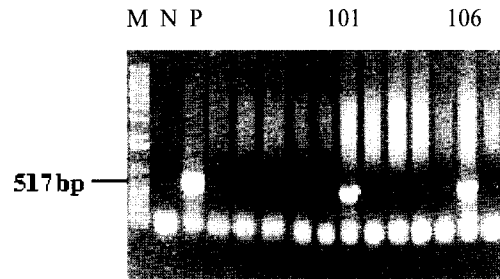


Fig. 2. PCR analysis of transgenic lines. Negative control (N) with wild-type mouse DNA and positive control (P) with vector were used to ensure that the PCR reaction was correctly operated.

한 후 Trizol을 사용하여 각각 RNA를 추출하였고 RT-PCR kit과 oligo dT-adaptor primer를 사용하여 cDNA를 증폭을 시도하였다. RT-PCR로 얻어진 cDNA를 DTF와 DTR primer로 PCR하여 DT-A gene의 발현을 확인하였다. RT-PCR 결과 형질전환생쥐의 thymus, spleen, liver에서 DT gene의 발현을 확인할 수 있었고 정상생쥐의 조직에서는 DT-A gene의 발현을 검출할 수 없었다. 또한 형질전환생쥐에서 DT-A gene의 발현양을 확인하기 위해서 형질전환생쥐의 thymus, spleen 및 liver의 total RNA를 이용하여 DT-A probe으로 Northern blotting를 실시하였다. Northern analysis에서 형질전환생쥐의 thymus, spleen 및 liver에서 DT-A gene이 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그러나 정상생쥐의 조직에서는 어떠한 DT-A signal도 얻을 수 없었다.

2. 형질전환생쥐의 T-cell 분석

형질전환생쥐 F₁ 및 F₂ 산자의 혈액에서 T-cell

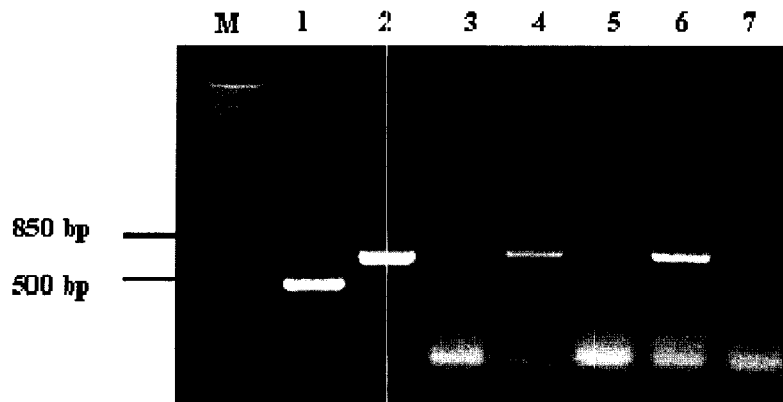


Fig. 3. Analysis of DT-A gene expression in transgenic mice by RT-PCR. Representative results obtained from transgenic mouse (2, 4, 6) and non transgenic littermate (3, 5, 7) are shown. RNA was extracted from thymus (2, 3), spleen (4, 5) and liver (6, 7). Lane 1 was internal control from kit supplier for RT-PCR.

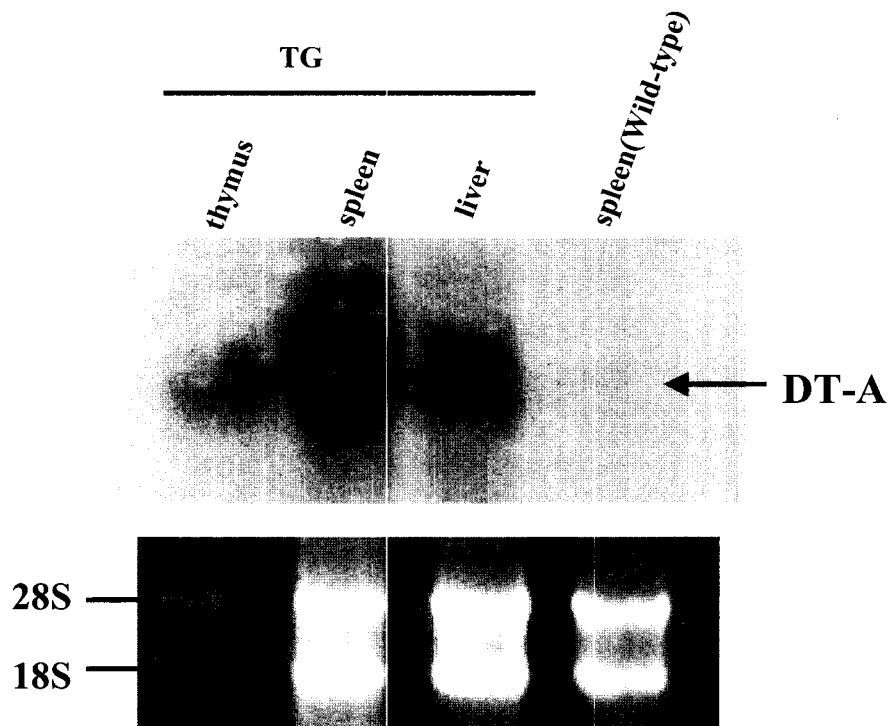


Fig. 4. Northern blot assay of DT-A transgenic mouse tissues (TG) and wild-type mouse spleen.

발달의 분포도를 확인하기 위해 혈액을 채취한 후 magnetic bead를 이용하여 T-cell만을 분리한 다음 CD4 및 CD8 antibody를 이용하여 FACS analysis를 실시하였다(Fig. 5). 형질전환생쥐의 혈액 내 mature T-cell인 single positive thymocyte의 수가 정상생쥐에 비해 감소하는 경향을 나타냈다. CD8⁺ T-cell의 경우 정상생쥐의 경우 약 50.6%를 나타내고 있으나 형질전환생쥐의 경우 33.2%로 감소하였고, CD4⁺ T-cell은 정상생쥐에서 10.3%에서 형질전환생쥐에서는 5.9%로 감소되는 경향을 나타냈다. 이는 정상생쥐의 single positive T-cell에 비해 약 30~40% 감소된 것으로 확인되었다.

IV. 고 찰

본 연구에서는 Naruse 등(2003)에 의해 생산된 DT-A 형질전환생쥐에서 lck promoter에 의해 DT-A gene의 발현되는 양상을 분석하였고 DT-A gene이 발현되면서 혈액 내 mature T-cell의 감소 여부를 확인하였다. lck gene은 발육하고 있는 초기 T-cell에 많이 발현되고 점차 mature T-cell에서는 발현량이 감소되는 것으로 밝혀져 있다(Garvin 등,

1990). 그러므로 본 연구에서 생산된 형질전환생쥐의 경우 DT-A gene이 발육초기 T-cell에서 발현되어 DT-A의 toxicity에 의해 T-cell이 파괴될 것으로 추정하였다. 형질전환생쥐에서 T-cell이 주로 발달하고 있는 기관인 thymus나 spleen에서 DT-A gene이 강하게 발현되는 것으로 나타나(Fig. 3와 Fig. 4) lck promoter에 의해 DT-A gene의 발현이 잘 조절되고 있는 것으로 확인되었다. 또한 liver에서 발현되는 것으로 나타났는데 이는 발육중인 T-cell이 혈액을 통한 liver로의 이동에 의한 것으로 추정된다. 이는 Wildin 등(1995)이 lck promoter는 thymus와 spleen이나 혈액내 T-cell에서도 이식유전자의 발현을 주도한다는 결과와 일치되는 것이다.

Naruse 등(2003)에 의해 형질전환생쥐의 혈액에서 적혈구, 백혈구, 혈소판, 헤모글로빈 등이 정상생쥐보다 감소된 것을 확인할 수 있었는데 특히 백혈구수와 혈소판의 수가 크게 감소해 있음을 확인되었고 또한 형질전환생쥐의 혈액에서 CD3 antibody를 이용하여 FACS 분석 결과 형질전환생쥐의 혈액 중 T-cell이 수가 비정상적으로 줄어든 것을 보고하였다. 본 연구에서는 T-cell surface receptor인 CD4와 CD8 antibody를 이용하여 T-cell

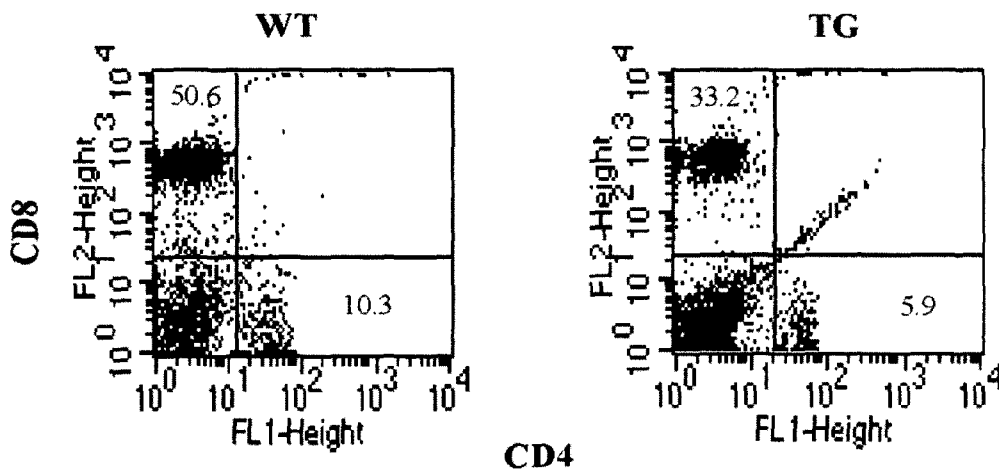


Fig. 5. FACS analysis of peripheral lymphocytes from wild-type and DT-A mice. Blood lymphoid cells were stained with phycoerythrin-conjugated CD4 antibody (x-axis) and fluorescein-conjugated CD8 antibody (y-axis).

의 분포를 확인하여 보았다. 대부분의 mature T-cell은 CD4나 CD8의 coreceptor와 함께 $\alpha\beta$ -TRC를 갖는데 T-cell은 thymus에서 CD4⁺CD8⁻ cell (double-negative)로부터 시작하여 immature 상태인 CD4⁺CD8⁺ cell(double-positive) stage를 거쳐 mature한 상태인 CD4⁺CD8⁻나 CD4⁺CD8⁺ cells(single-positive)로 발달하게 된다(Zuniga-Pfucker와 Lenardo, 1996). lck genes은 초기 T-cell 발육에 발현되는 것으로 알려져 있어(Perlmutter 등, 1993) 본 연구의 형질전환생쥐에서도 초기 immature한 상태의 T-cell에서 lck promoter에 의해 DT-A gene이 발현되어 초기 T-cell이 파괴되어 mature 상태인 CD4⁺CD8⁻나 CD4⁺CD8⁺ cells(single-positive)들이 감소된 것으로 추정된다(Fig. 5). 그러나 lck promoter의 strength에 의해 DT-A 유전자의 발현량이 조절되기 때문에 DT-A gene의 발현량이 많으면 T-cell이 초기에 기능이 상실되어 파괴될 것이고, 발현이 미약하다면 계속 발육하여 mature T-cell로 발달할 것으로 추정된다. 이러한 결과는 proximal lck promoter를 이용한 형질전환생쥐에서의 다른 연구의 발현조절 결과와도 일치하는 것으로 나타났다(Garvin 등, 1990; Allen 등, 1992; Wildin 등, 1995).

본 연구에서는 lck promoter를 이용하여 DT-A gene을 형질전환생쥐에서 발현시켜 mature T-cell이 감소된 것을 보여주고 있다. 앞으로 이 형질전환생쥐의 다른 조직에서 면역세포들의 상태를 분석하고 면역결핍 실험을 수행하여 궁극적으로는 본 연구의 결과를 토대로 하여 사람의 세포나 조직을 배양할 수 있는 면역결핍 돼지의 개발에 응용하고자 한다.

V. 요약

본 연구는 생체 내 세포 및 조직배양기로서의 면역결핍동물을 개발할 목적으로 proximal lck promoter와 DT-A gene를 이용하여 형질전환생쥐를 생산하고 이 형질전환생쥐의 면역세포에서 DT-A gene이 발현되는지를 분석하였다. 형질전환생쥐와 정상생쥐로부터 thymus, spleen 및 liver에서

RNA를 추출하여 RT-PCR 수행하였는데 정상생쥐의 조직에서는 어떠한 DT-A gene의 발현양상을 얻을 수 없었으나 형질전환생쥐의 thymus, spleen, liver에서 DT gene의 발현을 확인할 수 있었고, Northern blotting을 이용하여 형질전환생쥐의 thymus, spleen 및 liver에서 DT-A gene이 강하게 발현되는 것으로 나타났다.

형질전환생쥐 F₁ 및 F₂ 산자의 혈액에서 T-cell 발달의 분포도를 확인하기 위해 CD4 및 CD8 antibody를 이용하여 FACS analysis를 실시하였는데 형질전환생쥐의 혈액 내 mature T-cell인 single positive thymocyte의 수가 정상생쥐에 비해 감소하는 경향을 나타냈다. 정상생쥐의 혈액 내 T-cell 중 CD8⁺ T-cell의 경우 약 50%를 나타냈으나 형질전환생쥐의 경우 33%로 감소하였고, CD4⁺ T-cell은 정상생쥐에서 10%를 차지하고 있으나 형질전환생쥐에서는 5.9%로 감소되는 것으로 분석되었다. 그러므로 본 연구의 형질전환생쥐에서 lck promoter에 의해 초기 immature한 상태의 T-cell에서 DT-A gene이 발현되어 발육중인 T-cell이 파괴되어 mature 상태인 CD4⁺CD8⁻나 CD4⁺CD8⁺ cells (single-positive)들이 감소된 것으로 확인되었다.

VI. 인용문헌

1. Allen, J. M., Forbush, K. A. and Perlmutter, R. M. 1992. Functional dissection of the lck proximal promoter. *Mol. Cell. Biol.* 12:2758-2768.
2. Arase, K., Saijo, K., Watanabe, H., Konno, A., Arase, H. and Saito, T. 1999. Ablation of a specific cell population by the replacement of a uniquely expressed gene with a toxin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9264-9268.
3. Bartell, J. G., Fantz, D. A., Davis, T., Dewey, M. J., Kisler, M. K. and Kisler, W. S. 2000. Elimination of male germ cells in transgenic mice by the diphtheria toxin A chain gene directed by the histone H1 promoter. *Biol. Reprod.* 62:409-416.
4. Garvin, A. M., Abraham, K. M., Forbush, K. A.,

- Farr, A. G., Davison, B. L. and Perlmutter, R. R. 1990. Disruption of thymocyte development and lymphomagenesis induced by SV40 T antigen. *Int. Immunol.* 2:173-180.
5. Lee, S. H., An, J. H., Ko, Y. G., Kim, H. J., Lee, S. H., Park, C. S. and Jin, D. I. 2002. Study for the production of immunodeficiency animals for xenotransplantation. *Korean J. Anim. Reprod.* 26: 347-351.
 6. Lowell, B. B., S-Susulic, V., Hamman, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagan, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P. and Flier, J. S. 1993. Development of obesity in transgenic mice after genitic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366: 740-742.
 7. Naruse, K., Yang, J. H., Lee, S. H., Choi, H. S., Lee, S. H., Park, C. S. and Jin, D. I. 2003. Analysis of transgenic mouse for the production of immunodeficiency animals. *Korean J. Anim. Reprod.* 27: 179-185.
 8. Nazirudin, B., Shiroki, R., Shishido, S., Howard, T. and Mohanakumar, T. 1996. Biochemical and functional characterization of xenoreactive natural antibodies in hu-PBL-SCID mice. *J. Clin. Invest.* 97:1267-1275.
 9. Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, I. H. and Brinster, R. L. 1987. Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50: 435-443.
 10. Perlmutter, R. M., Levin, S. D., Appleby, M. W., Anderson, S. J. and Alberola-Ila, J. 1993. Regulation of lymphocyte function by protein phosphorylation. *Ann. Rev. Immunol.* 11:451-499.
 11. Tary-Lehmann, M., Sexon, A. and Lehmann, P. 1995. The human immune system in hu-PBL-SCID mice. *Imm. Today* 16:529-533.
 12. Wildin, R. S., Wang, H. U., Forbush, K. A. and Perlmutter, R. M. 1995. Functional dissection of the murine lck distal promoter. *J. Immunol.* 155:1286-1295.
 13. Van Ness, B. G., Howard, J. B. and Bodley, J. W. 1980. ADP-ribosylation of elongation factor2 by diphtheria toxin: NMR spectra and proposed structures of ribosyl-diphthamide and its hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* 55:10717-10720.
 14. Zuniga-Pflucker, J. C. and Lenardo, M. J. 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 215-224.
- (접수일자: 2003. 5. 15. / 채택일자: 2003. 7. 2.)