

인간 배아줄기세포와 Oct-4 기능조절 메커니즘

김 정 호

서강대학교 생명과학과

I. 세미나 개요

Oct-4 (Oct-3라고도 부름)는 인간 배아줄기세포의 totipotency를 유지하는데 결정적인 역할을 한다. Oct-4는 downstream target 유전자에 인식부위가 있으면 전사를 활성화시킬 수 있다. 배아줄기세포의 경우, Oct-4 인식부위와 전사개시부위와의 거리에 상관없이 대상 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있다. 하지만 분화된 세포의 경우, Oct-4는 전사개시인자로부터 가까이에 위치한 Oct-4 결합부위를 가지고 있는 유전자만을 활성화시킨다. 전사개시부위로부터 멀리 떨어진 Oct-4 결합부위를 갖는 유전자의 발현을 촉진시키기 위해서는 줄기세포에만 존재하는 특이 보조인자를 필요로 하는데, 이것이 Oct-4 단백질과 전사인자들과의 연결고리 역할을 할 것으로 추정하고 있다. 유감스럽게도 이와 같은 보조인자들은 아직 배아줄기세포로부터 분리되지는 못했고, 아데노바이러스의 발암유전자산물인 E1A가 줄기세포 특이 보조인자와 유사한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 분화된 세포에서 Oct-4는 전사개시인자로부터 멀리 떨어진 위치에 Oct-4 결합부위가 있을 때 E1A가 존재하면 Oct-4가 분화된 세포에서도 유전자의 발현을 촉진할 수 있다. 본 실험실은 인간 배아줄기세포의 자가재생산에 관여하는 Oct-4 유전자에 대한 기능조절 메커니즘을 분자적인 수준에서 밝히기 위해 BacterioMatch 시스템을 이용해 Oct-4의 기능을 조절할 수 있는 단백질을 자가재생산 능력이 있는 배아줄기세포 유래 cDNA로부터 분리하였다. 본 연구실이 추구하는 연구목표는 인간 배아줄기세포의 자가재생산에 관여하는 Oct-4 유전자에 대한 기능조절 메커니즘을 분자적인 수준에서 밝히는 것이다.

II. 연구 방법

본 연구는 1) BacterioMatch 시스템을 이용한 인간 배아줄기세포 특이적인 Oct-4에 대한 보조인자 분리, 2) Oct-4 기능적 도메인에 결합하는 보조인자 분석 연구, 3) 보조인자가 Oct-4 작용에 미치는 영향 및 작용기전 규명 등의 세가지 주제에 관한 실험을 수행하였다. 첫째로 배아줄기세포 특이적인 cDNA 라이브러리를 제작하였고, Oct-4를 bait로 하여 최근에 개발된 BacterioMatch 시스템을 이용해 라이브러리 스크리닝을 수행하여 Oct-4와 결합할 수 있는 target cDNA를 분리하였다. 그런 후 GST pull-down assay와 immunoprecipitation 등의 방법을 이용해 *in vitro*와 *in vivo*에서의 Oct-4와 보조인자 사이의 상호작용과 이 상호작용에 관여한 Oct-4와 보조인자 내의 결합부위를 mapping하는 연구를 수행했다. 또한

보조인자의 세포 특이성을 결정하기 위해 인간 배아줄기세포뿐만 아니라 마우스 배아줄기세포, P19 embryonic carcinoma cell, NIH3T3 cell, 293 cell 등에서의 Oct-4와 보조인자의 발현 양상과 subcellular localization, 세포 내에서의 colocalization 등을 연구하였고, 보조인자가 Oct-4 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 Oct-4 유전자에 대한 reporter assay 등을 수행하였다.

III. 연구내용

Oct-4를 bait로 하여 BacterioMatch 시스템을 이용해 배아줄기세포 특이적인 cDNA 라이브러리를 스크리닝한 결과 RNA 결합 단백질인 Ewing's sarcoma (EWS) 단백질을 분리하였다. 인간과 마우스 배아줄기세포, P19 EC 세포, COS-7 세포, 인간 배아 콩팥세포 (293 세포), NIH3T3 세포의 RNA를 분리해 northern blot analysis를 수행한 결과 Oct-4는 줄기세포와 EC 세포에서만 특이적으로 발현되는 반면에 EWS mRNA는 배아줄기세포와 EC 세포뿐만 아니라 조사한 모든 세포에서 발현됨을 발견하였다. Oct-4와 EWS의 상호작용을 조사하기 위해 GST pull-down assay를 수행한 결과 *in vitro* 시스템에서 두 단백질이 서로 결합할 수 있음을 확인하였고, immunoprecipitation을 이용해 *in vivo* 시스템에서도 두 단백질의 상호작용을 증명하였다. 두 단백질 사이에 존재하는 결합부위를 결정하기 위해 다양한 종류의 deletion 돌연변이체를 만들어 결합능력 여부를 연구한 결과 Oct-4 단백질은 POU 도메인이 EWS 단백질과의 상호작용에 관여하고 있었고, EWS는 N-말단부위, 첫 번째 GRP-rich 부위, 그리고 두 번째와 세 번째 GRP-rich 부위의 세 곳이 각각 Oct-4와 결합할 수 있음을 발견했다. 두 단백질들의 subcellular localization을 조사한 결과 Oct-4와 EWS는 transfected cell과 P19 EC cell에서 모두 핵에 colocalization하고 있음을 발견했다. 마지막으로 EWS가 Oct-4 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 cotransfection후 Oct-4에 대한 reporter assay를 수행한 결과 EWS가 Oct-4의 기능을 positive하게 조절함을 발견했고, EWS N-말단부위에 강력한 전사활성화 도메인이 존재함도 새롭게 발견하였다. 이상의 연구결과 인간배아줄기세포의 stemness 유지에 중요한 역할을 하는 Oct-4의 기능조절 과정에 EWS가 어떻게 관여하고 있는지를 새롭게 밝혀 낼 수 있었다. Oct-4 결합단백질의 네트워크 구성 연구는 Oct-4에 의한 배아줄기세포의 자가재생산 메커니즘을 밝히는 중요한 역할을 할 것이다.

IV. BacterioMatch 시스템을 이용한 Oct-4 특이적인 보조인자 분리 방법

(1) Oct-4 기능적 도메인에 대한 Bait construct 제조

인간과 마우스 Oct-4는 모두 360개와 352개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이들은 POU 도메인을 중심으로 N-말단 부위와 C-말단 부위로 나뉘어져 있다.

- Bait insert 준비 ; Oct-4의 (1) N-말단, (2) POU 도메인, (3) C-말단을 PCR을 이용해 증폭한다.
- 람다 C1을 가지고 있는 pBT에 in frame으로 DNA insert를 ligation한다.
- Competent cell에 transformation한다.
- Insert를 확인하고 단백질의 발현을 체크한다.

(2) 배아줄기세포에 대한 cDNA 라이브러리 제조

- 배아줄기세포 배양을 위한 Feeder cell 배양한다.
- 배아줄기세포 expansion한다.
- 트립신을 처리하여 배아줄기세포와 feeder cell harvest한다.
- 시럼을 이용해 트립신 비활성화한다.
- 새 세포배양 용기에 세포를 깔고, 10분 후에 미디어를 제거하여 feeder cell만을 제거한다.
- 트리졸(Trizol) 용액을 이용하여 전체 RNA(total RNA) 분리한다.
- Oligo(dT) linker-primer를 이용해 배아줄기세포에 대한 mRNA 원본 분리한다.
- 역전사효소, 5-methyl dCTP, dATP, dGTP, dTTP를 가지고 합성한다.
- RNase H, DNA polymerase I, dNTPs를 가지고 second-strand 합성한다.
- EcoRI adapter를 첨가하고, T4 DNA ligase로 linker adapter 첨가한다.
- XhoI 제한효소를 처리하여 unidirectional한 배아줄기세포 cDNA 제조한다.
- pBT 플라스미드를 절단한 후 합성한 배아줄기세포 cDNA와 연결한다.
- 배아줄기세포 특이적인 cDNA 제조한다.

(3) Bait용 박테리아 제조와 백그라운드 레벨 적정

- 람다 조절유전자에 Ampr과 lacZ가 연결된 DNA가 염색체 DNA에 통합된 리포터 박테리아 세포(XL1-Blue MRF' Kan strain)에 Oct-4/N-말단, Oct-4/POU, Oct-4/C-말단 bait 플라스미드를 각각 transformation 한다.
- 박테리아에서 bait 플라스미드의 발현을 람다 억제유전자에 대한 항체를 가지고 웨스턴 블롯으로 체크한다.
- 빈 cDNA용 pTRG 플라스미드를 transformation한다.
- pBT-Oct-4 bait와 pTRG가 모두 들어간 세포 분리한다.
- 카베니실린 농도를 달리하여 백그라운드 레벨의 정량한다.

(4) 배아줄기세포 특이적인 cDNA 라이브러리 스크리닝

- LB-CTK와 LB-CTCK 아가 플레이트 준비한다.
- Oct-4/N-말단, Oct-4/POU 도메인, Oct-4/C-말단에 대한 각각의 수용성 세포에 pTRG 벡터에 있는 배아줄기세포에 대한 cDNA 라이브러리 transformation 한다.
- 1차, 2차, 3차 스크리닝 수행한다.

(5) 검출된 Oct-4-unknown protein interaction의 validation

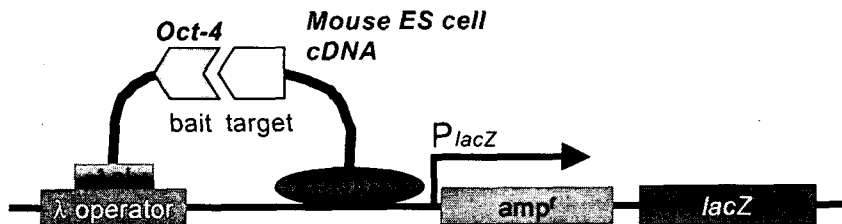
- 대상 플라스미드의 재 transformation을 통한 단백질-단백질 상호작용을 확인한다. - 분리한 pTRG-cDNA 대상 플라스미드를 pBT-Oct-4 수용성 세포에 재 transformation하여 콜로니 형성빈도를 계산한다.
- 베타-갈락토시다제 리포터 에세이를 통한 단백질-단백질 상호작용을 확인한다. - (i) 박테리아 세포를 수거한 후 sonication을 통해 파쇄하고, ONPG를 이용해 베타-갈락토시다제 양을 정량한 후, 단백질 농도를 측정해 정상화. (ii) X-gal 플레이트를 이용한 확인한다.

(6) 대상 cDNA의 분리, 데이터베이스 조사 및 완전한 cDNA 분리

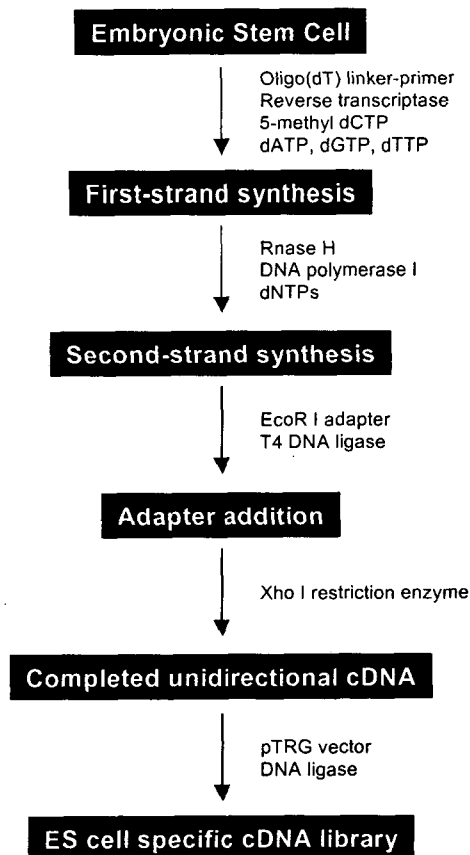
- pTRG-cDNA 플라스미드만을 선별적으로 분리하기 위해 테트라사이클린만 넣은 배지에서 배양한다.
- 플라스미드 DNA 분리 및 회석, 그리고 재 transformation 한다.
- 생성된 콜로니를 테트라사이클린 플레이트와 테트라사이클린+클로람페니콜 플레이트에 스트리킹하여 pBT-Oct-4가 없이 pTRG-cDNA만 가지고 있는 박테리아를 선별한다.
- 미니-프랩을 통한 플라스미드 분리 및 서열분석한다.
- 블라스트 조사를 통해 cDNA 종류 확인한다.
- PCR 증폭이나 cDNA 스크리닝을 이용해 완전한 cDNA를 분리한다.

V. 반응 모식도

(1) BacterioMatch 시스템



(2) 배아줄기세포 특이적인 cDNA 합성과정



VI. 참고문헌

1. Brehm, A., Ohbo, K., and Scholer, H. R. (1997) The carboxy-terminal transactivation domain of Oct-4 acquires cell specificity through the POU domain. *Mol. Cell. Biol.* 17, 154-162
2. Brehm, A., Ohbo, K., Zwerschke, W., Botquin, V., Jansen-Durr, P., and Scholer, H. R. (1999) Synergism with germ line transcription factor Oct-4: Viral oncoproteins share the ability to mimic a stem cell-specific activity. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2635-2643
3. Fuchs, E., and Segre, J. A. (2000) Stem cells: A new lease on life. *Cell* 100, 143-155
4. Herr, W., and Cleary, M. A. (1995) The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 1679-1693
5. Lee, H. J., Kim, S., Pelletier, J., and Kim, J. (2004) Stimulation of hTAFII68(NTD)-mediated transactivation by v-Src. *FEBS Letters* 564, 188-198
6. Lee, J., Rhee, B. K., Bae, G.-Y., Han, Y.-M., and Kim, J. (2005) Stimulation of Oct-4 activity by Ewing's Sarcoma Protein. *Stem Cells* 23, 738-751
7. Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, Chambers, I., Scholer, H. R., and Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 95, 379-391
8. Scholer, H. R., Ciesiolka, T., and Gruss, P. (1991) A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell* 66, 291-304
9. Weissman, I. L. (2000) Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168
10. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635-2645