

# Stem cell 연구를 위한 제품군 소개

## Clontech의 혁신적인 제품들로 stem cell 연구가 진화한다!

Clontech의 다양하고 포괄적인 제품 라인을 통해 많은 연구자들이 지난 20년 동안 유전자의 발견, 조절, 기능규명을 포함한 연구분야에서 주목할만한 발전 성과를 이뤘다. 그중에서도 특히 stem cell 연구에 지대한 공헌을 세웠으며 stem cell을 포함한 수많은 연구에 유용하게 사용되고 있다. 이들 중 일부는 수년간 지속적으로 사용되었고, 일부는 Clontech의 부단한 기술개발 의지의 산물로 발매된 최근 제품이다. 많은 제품이 stem cell을 이해하는데 중요한 역할을 했지만, 그 중에서도 최근 과학적 업적을 이룬 제품을 심층있게 다뤄 stem cell 연구에 도움이 되고자 한다.

- DsRed : Clontech의 Living color® 형광단백질 중 하나 (그림 1)로 apoptosis가 일어나는 동안 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell) 단백질의 세포 내 위치추적을 위한 tag로 사용되었다(1).
- Matchmaker™ Yeast Two-Hybrid System (그림 2) : chromatin 구조를 조절하는 단백질을 포함하는 원시조혈모세포(primitive hematopoietic stem cell)의 cDNA library 제작, 스크리닝에 사용되었다(2).
- SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (그림 3) : 비백혈성 조혈모세포로부터 백혈성 조혈모세포를 구분하기 위한 막 표지 단백질 규명에 PCR-based 방법을 사용하였다(3).
- Adeno-X™ Tet-Off® Expression System 2 : doxycycline에 의해 조절되는 adenovirus expression system으로 인간 중간엽 줄기세포에 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)를 일시적으로 유도하거나 치료상 목적으로 과발현시키는데 사용되었다(4).

### ■ Living Colors Fluorescent Protein을 이용한 줄기세포 내 단백질 위치 모니터링

Raz, V, et al. (2006) Changes in lamina structure are followed by spatial reorganization of heterochromatic regions in caspase-8-activated human mesenchymal stem cells. *J. Cell Sci.* **119**(Pt 20):4247-4256.

Apoptosis는 세포내 항상성 유지에 중요한 현상이다. 하지만 줄기세포 항상성을 둘러싼 현상은 잘 알려져 있지 않다. 이 같은 연구에서 인간 중간엽 줄기세포에 유도적이고 caspase-8-의존적인 모델 시스템을 이용하여 줄기세포 apoptosis 초기에 일어나는 현상을 연구하였다. 이들은 caspase-8 활성을 분석하기 위하여 nuclear lamina와 telomeres 구조에 관여하는 단백질의 세포내 위치 변화를 모니터링 하였다. 특히 nuclear lamina의 구조 단백질인 lamin A와 telomere 결합 단백질인 TRF1에 초점을 맞춰 연구하였다. 본 논문에서는 목적단백질에 Living color® (그림1)의 일종인 빨간색을 나타내는 형광단백질 DsRed를 tagging하여 발현시켰다. 융합 단백질이 발현된 인간 중간엽 줄기세포의 형광 이미지를 통하여 caspase-8-의존적인 apoptosis에서 lamina 구조의 재배치가 활발히 이루어지며 곧 lamins A, B의 분해, chromatin 분해로 이어짐을 확인하였다. 인간 중간엽 줄기세포에서 발현된 TRF1- DsRed를 모니터링 결과 역시 caspase-8 경로를 거치는 apoptosis 유도 현상에서 telomere 구성에 변화를 일으키는 것으로 나타났다. 형광 현미경을 이용해 apoptosis가 일어나는 세포의 telomere에서 서로 가까이 이동하는 것을 관찰하였다. 다른 방법으로 표지된 단백질, TRF2- citrine을 이용한 실험에도 유사한 결과를 나타냈고, 이는 telomere의 공간적 구조 변화가 DsRed의 응집에 의한 것이 아

님을 확인하였다.

**편집자 노트** : 비록 이번 실험에서 사용된 이전 버전의 DsRed에서 응집현상이 나타났지만 DsRed2, DsRed-Monomer, DsRed-Express와 같이 업그레이드된 버전의 단백질을 사용하여 문제를 해결하였다.

이번 실험에서 DsRed를 사용하여 apoptosis가 일어난 인간 중간엽 줄기세포에서 핵 구조의 재배치 초기 현상을 규명할 수 있었다.

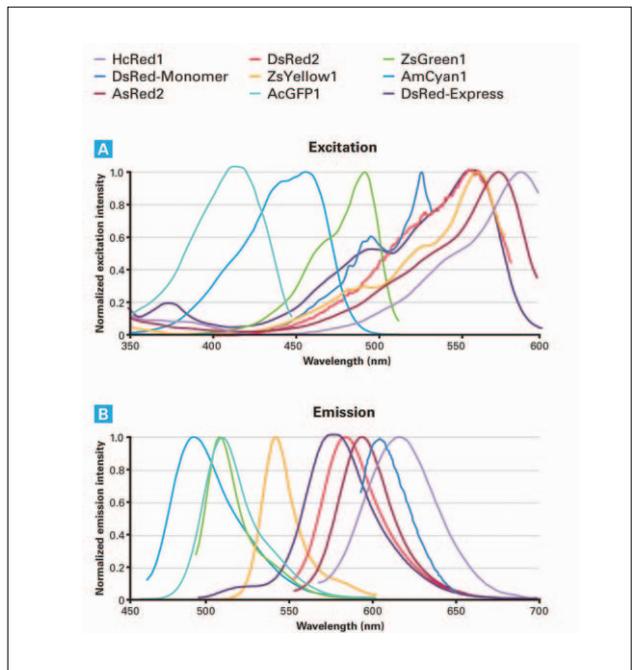


그림 1. Excitation and emission spectra of Living Colors Fluorescent Proteins. Clontech offers the broadest spectrum of colors available in fluorescent protein tags, Panel A, Excitation spectra, Panel B, Emission spectra.

### ■ Matchmaker Yeast Two-Hybrid System을 이용한 줄기세포 조절 단백질의 규명

Chagraoui, J, et al. (2006) E4F1: a novel candidate factor for mediating BMI1 function in primitive hematopoietic cells. *Genes Dev.* **20** (15):2110-2120.

Polycomb group (PcG) 단백질인 BMI1 단백질을 연구하였다. 초파리에서 처음 발견된 이 단백질 그룹은 transcription factor가 DNA의 프로모터에 결합하는 것을 막아 chromatin을 재구성할 수 있다. PcG 유전자가 변이된 개체는 암 진행이 극심하게 증가한다. PcG 유전자는 원시조혈모세포 (hematopoietic stem cells; HSC)의 생존에 필수적이고 T-세포, B-세포로 분화한다. 주로 인간 원시골수 세포에서 발견되는 BMI1의 이러한 역할 때문에 HSC 증식, 재생, HSC내의 BMI1 기능을 증대하는 요소를 밝히는 것은 매우 중요하다.

이번 연구에서 원시조혈모세포유래 fetal cDNA library를 스크리닝하기 위하여 BMI1을 bait로 Clontech의 Matchmaker Yeast Two-Hybrid System (그림 2)을 이용하였고, 결합 파트너로 transcription factor E4F1이 확인되었다.

추가로 BMI1과 E4F1간의 결합부위를 알아보기 위해 Yeast two-hybrid assay 를 사용하였다. 이러한 연구를 통해 원시 조혈모세포에서 E4F1이 BMI1 활성화에 있어 중요한 조절인자임이 증명되었다.

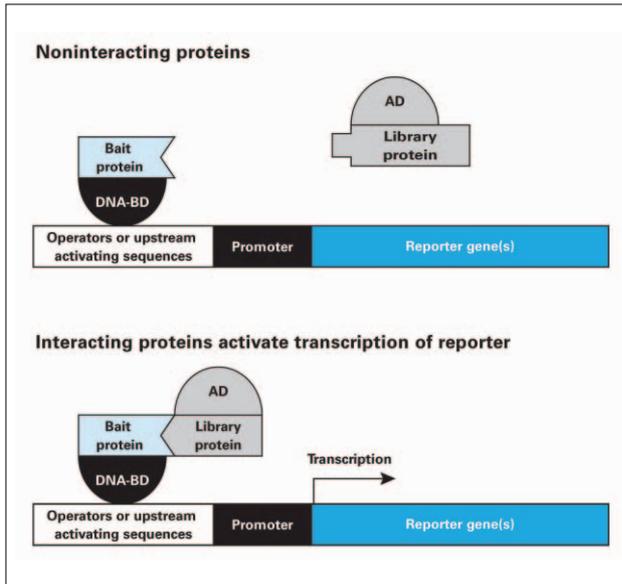


그림 2. Matchmaker Yeast Two-Hybrid System의 원리

■ SMART PCR cDNA Synthesis Kit를 이용한 줄기세포 막단백질의 규명

Hosen, N, et al. (2007) CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** (26):11008-11013.

급성 골수백혈병은 병을 재발시킬 수 있는 백혈병조혈모세포(leukemic stem cells; LSC)를 제거하지 못하므로 일반적으로 사용되는 화학적 요법으로 치료할 수 없다. 특별히 이러한 LSCs를 목표로 하는 치료제를 만들기 위하여 비백혈성조혈모세포와 LSC를 구별할 수 있는 LSC의 세포 표면에 존재하는 marker를 밝히는 것이 첫번째로 필요하다. Clontech의 SMART PCR cDNA Synthesis Kit (그림3)와 함께 signal sequence trap PCR 방법을 사용하여 LSC 막 표지 단백질인 CD96을 동정할 수 있었다. CD96의 존재여부에 따라 정상적인 조혈모세포와 LSCs를 구별할 수 있다. 이러한 발견으로 정상적인 조혈모세포에 해가 되지 않고 LSC에 특이적인 CD96을 이용하여 좀 더 획기적인 치료법 연구가 시작될 것이다.

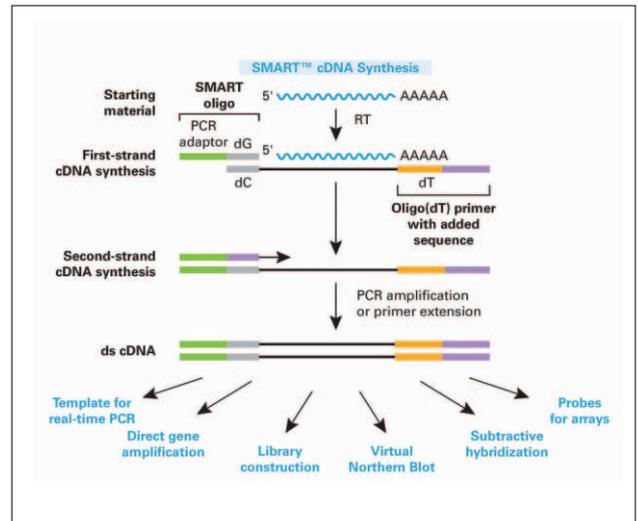


그림 3. SMART cDNA synthesis 방법

■ Adeno-X Tet-Off Adenoviral Expression System 2를 이용한 줄기세포의 gene transduction 및 therapeutic overexpression

Kanki-Horimoto, S, et al. (2006) Synthetic vascular prosthesis impregnated with mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase, *Circulation* **114** (1 Suppl) : I327- I330.

관상동맥질환은 내피기능 장애에 의해 악화되는 심각한 질병으로 돌이킬 수 없는 심장근육의 손상을 야기할 수 있다. 많은 환자들은 반드시 다방면의 외과적 수술을 받아야 하고, 이는 이식조직의 부족으로 이어질 것이다. 작은 직경의 vascular prostheses는 혈전과 혈관폐색으로 인해 실패할 가능성이 무척 높다. 이식조직으로부터 방출된 산화질소가 이러한 문제를 완화시키는 것으로 나타났다. 중간엽줄기세포(MSC)는 혈관내피로 분화하여 paracrine 현상에 작용하는 동맥의 cytokine을 생산할 수 있다. MSCs는 또한 viral vector를 이용하여 세포내로 도입하기 용이하다. 이번 연구에서 내피조직의 nitric oxide synthase (eNOS)를 발현하는 adenovirus를 이용하여 MSC를 형질전환한 후, polytetrafluoroethylene 재질의 이식조직에 도입시켜 새로운 이식조직을 만들었다. eNOS 유전자는 rat cDNA library로부터 증폭하여 Clontech의 doxycycline-regulated adenoviral vector system 인 Adeno-X Tet-Off Expression System 2의 pDNR-CMV plasmid에 클로닝하였다. eNOS-pDNR-CMV와 pLP-Adeno-TRE의 site-specific Cre-loxP 재조합 반응에 의해 eNOS를 발현하는 adenovirus를 제작하였다(그림 4). 같은 기술을 이용하여 lacZ유전자를 클로닝, 발현시켜 대조군으로 사용하였다. Adenovirus는 감염을 통해 MSCs에 도입되었고 eNOS를 높은 수준으로 발현하였다. 생물학적 활성을 띠는 eNOS를 발현하는 작은 직경의 prostheses를 성공적으로 만들었으며 이러한 발견은 혈관을 보호하는 hybrid vascular prostheses로 이끌 것이다.

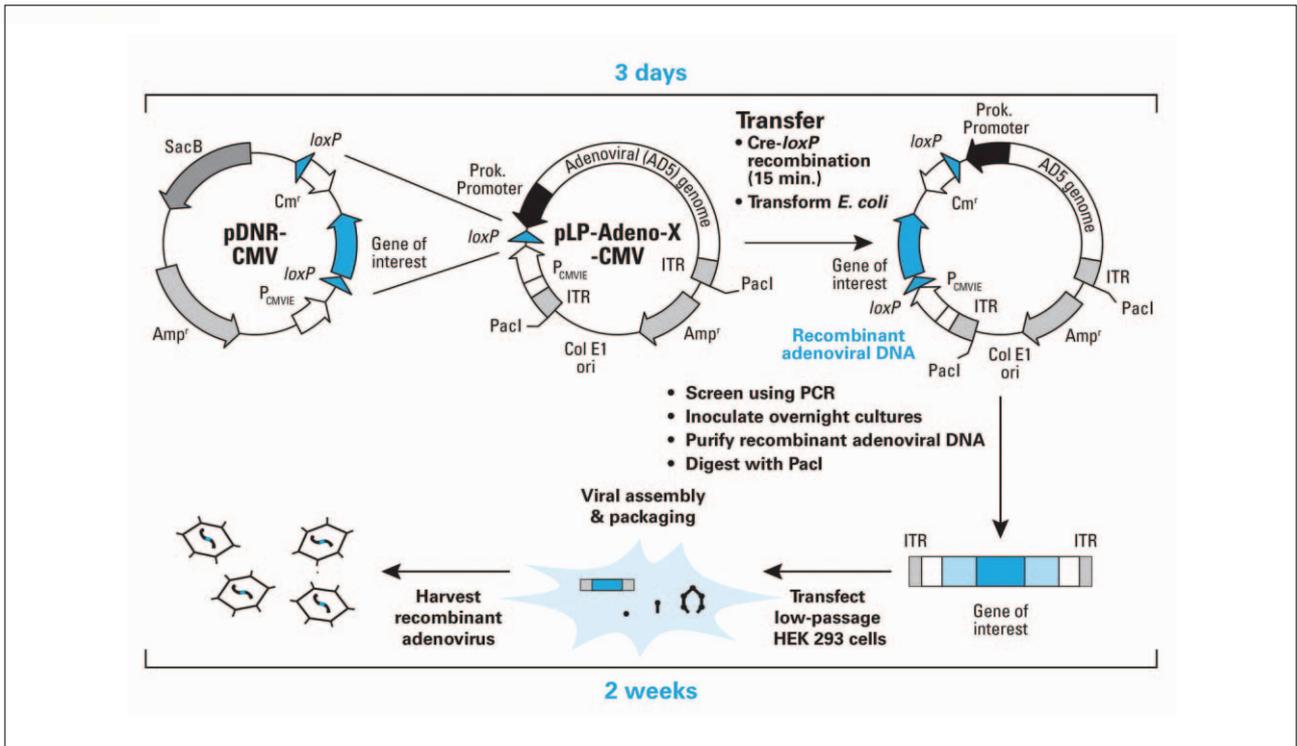


그림 4. Adeno-X Expression System 2. The Adeno-X Expression System 2 reduces the overall timeline for constructing recombinant adenovirus vectors. Using Cre-loxP recombination, the standard system generates a recombinant adenoviral construct in which gene expression is regulated by the CMV major immediate-early promoter/enhancer. Other Adeno-X expression systems feature a promoterless adenoviral Acceptor Vector (for use in shRNA or tissue-specific applications) or an adenoviral Acceptor Vector that includes a Tet-response element (TRE) for doxycycline-inducible expression applications.

■ 관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
DsRed Fluorescent Protein Vectors	20 µg	many
Matchmaker Two-Hybrid System	3 each	630303
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	7rxns	634902
Adeno-X Tet-Off Expression System 2	5 rxns	631058

※ License Notice : [17, 21, 26, 28, 29, 30, 31]