

## 中英文摘要：

此計畫的最終目的是想了解在哺乳動物中，胚胎發育成個體的整個遺傳機制。我們在先前的研究中，發現一個全新的同源箱基因 ENK，此基因只在胚胎幹細胞及囊胚期的內源細胞表現。我們以不同技術了解此基因在小鼠胚胎發育過程中所扮演的角色。首先在 ENK 基因結構分析中發現人類的 ENK 基因其同源箱區與老鼠同源箱區具有 86% 的相似性，同樣由四個 exons 所組成，位於 12 號染色體上。在 ENK 基因表現之研究中發現 ENK 只表現在多功能性的 inner cell mass, ES, epiblast 及 P19 細胞，但同屬於多功能性的 mesenchymal stem cell 並不會表現 ENK 基因，顯示只有屬於胚胎的多功能細胞才會表現 ENK。ES cell 或 P19 cell 經 retinoic acid (RA) 誘導分化成為神經細胞後，ENK 基因的表現明顯的下降了。除了小鼠的 P19 cell 外，人類的 teratocarcinoma cell :NCCIT 及 NT2era2 之 ENK 基因的表現也因 RA 誘導分化而下降。ENK 基因功能的研究方面，製造基因剔除小鼠是了解 ENK 功能最直接的方法，目前已得到兩個帶有 ENK 基因異合子的胚胎幹原細胞，並已得到 ENK 基因異合子之嵌合小鼠，但目前尚無法得到 germ-line transmission 小鼠。ENK 基因表現之調控方面，ENK 基因表現所需之 minimal promoter 序列為 transcription start site 前約 380 bp，同時 transcription start site 前 420 至 480 之序列與 RA 抑制 ENK 基因之表現有關，將進一步分析參與 RA 抑制 ENK 基因表現之因子為何。

關鍵字：胚胎幹細胞、同源箱基因、胚胎發育、胚胎幹細胞分化

**Abstract:**

The long-range object is to understand the genetic program residing in the zygote that enables zygote to become a complete mammalian. The special goal of this proposed research is to determine the developmental functions of a novel *ENK* (murine early embryo specific expression *NK* family) gene. We propose to determine the developmental functions of the *ENK* gene using a combination of different techniques. First of all, the homeodomain of human *ENK* and mouse *ENK* exhibited about 86% identity, and both of them contain four exons. The *ENK* gene of mouse and human are positioned at chromosome 6 and 12, respectively. Analysis of *ENK* developmental expression patterns showed that *ENK* preferentially expressed in pluripotent cell including ES, ICM, epiblast and P19 teratocarcinoma cells. However, the expression of *ENK* was not found in the adult pluripotent cell mesenchymal stem cell, indicating that *ENK* is only expressed in embryonic pluripotent cells. The expression of *ENK* is dramatically decreased by retinoic acid (RA) treatment. The expression of *ENK* gene is also inhibited by RA-treated human teratocarcinoma cell—NT2era2 and NCCIT. To analyze the *in vivo* function of *ENK*, the *ENK* knockout mouse will try to be obtained. Two heterozygous *ENK* knockout ES cell lines are obtained. The heterozygous *ENK* knockout chimera mice are now obtained, but mouse with germ-line transmission of knockout *ENK* gene is not obtained now. Furthermore, a detailed characterization of the cis-acting regulatory elements in the 5' region of *ENK* gene controlling the spatial and temporal transcription patterns of *ENK* is also performed. DNA fragments contain different length of 5' *ENK* promoter regions were ligated to 5' region of luciferase gene and then were transfected into ES or P19 cells treated with/without RA. By analysis of luciferase activities, the minimal promoter of *ENK* gene is 380bp upstream of *ENK* transcription start site. The sequences between 420 to 480 bp upstream of *ENK* transcription start site are responsible for the inhibition of *ENK* gene expression by RA treatment. The factor involved in the RA repression of *ENK* expression will need to be further characterized.

**Key word: embryonic stem cell, homeobox gene, embryo development, differentiation**

## (一) 研究計畫之背景及目的

### 胚胎幹原細胞 (embryonic stem cell: ES)

胚胎幹原細胞 (embryonic stem cell, ES) 是將囊胚期(blastocyst)中的內源細胞 (ICM) 取出所建立的細胞株(Evans and Kaufman, 1981)，在體外培養時保有與 ICM 一樣的多能的特質，具有自我更新複製的能力，同時具有發展出胚胎內不同細胞型態的潛能(Bradley et al., 1984)，當 ES 細胞再放回囊胚期內源細胞中，可發育成為包括生殖細胞在內的不同的組織(Beddington and Robertson, 1989)，利用此特質，可將基因改造的 ES 細胞放入實驗動物的囊胚期內源細胞中(基因剔除或基因轉殖)，建立不同基因改造動物(Wurst and Joyner, 1993)，進而了解特定基因的功能，因此，**ES 細胞對於研究早期或晚期胚胎細胞發育而言，將是一個很有用的工具。**

### ES 細胞的分化

體外培養的 ES 細胞除了具有複製更新的能力外，也具有分化成為特定的細胞的能力，包括造血細胞(Wiles and Keller, 1991)、神經細胞(Li et al., 1998)、肝臟(Jones et al., 2002)、及胰臟細胞(Lumelsky et al., 2001)等等，藉此將 ES 細胞分化成特定的細胞如神經細胞，可治療腦部疾病如 Parkinson's disease 等，作為治療疾病之轉殖細胞之來源，對於未來疾病之治療將具有極大的潛力。目前體外細胞分化的研究雖已能將 ES 細胞分化成不同的細胞，但仍無法完全的將 ES 細胞藉由體外培養分化成為純的單一細胞，主要是因為使用的體外分化的方法還是遵循起始的自發性的分化，再以不同的培養條件或分化系統，增加特定細胞的比例，若以此包含不同細胞之混合細胞作為疾病治療之用，將有造成腫瘤的風險。**因此對於 ES 細胞內部自我控制複製更新及分化機制的進一步了解，將可建立有效的體外細胞分化機制，將有助於未來細胞治療之應用。**

根據過去的研究結果顯示，LIF (Leukemia inhibitory factor) 是使 ES 細胞在體外培養時維持在多能(pluripotent)的狀態不可缺少的因子之一。若將 ES 細胞漂浮培養，ES 細胞會聚成細胞團稱為 EB (Embryoid bodies) 則會促進 ES 細胞的分化，若再配合不同誘導藥物，如 retinoic acid 或生長因子，以及不同的篩選培養條件，則可以誘導 ES 細胞分化成不同的細胞型態(Rathjen et al., 1998)；**除了形成 EB 之外，轉錄因子的表現也會誘導 ES 細胞分化(Levinson-Dushnik and Benvenisty, 1997)，尤其在早期發育成為特定細胞型態時，轉錄因子的表現更是扮演主要的角色，尤其是那些調節組織或發育上專一性表現基因的轉錄因子。**

### 轉錄因子

大部份的轉錄因子根據其與 DNA 結合之特殊結構而分類，這些轉錄因子結合到特定的 DNA 序列後可以活化或抑制下游基因的表現，或經由與其它蛋白質的結合而調節基因的表現。同源箱基因即是調節生物發育上很重要的一種轉錄因子家族(De Robertis, 1994)，可藉由調節下游基因的表現而調控生物之發育過程 (De Robertis, 1994)。

## Novel Homeobox gene : ENK

我們最近發現一個新的同源箱基因，與目前已知 NK 家族之同源箱基因最相似，但只有 50% 的相似性，屬於新的同源箱基因，更重要的是 ENK 專一性的表現在 ES 細胞，因此我們命名為 ENK (early embryo specific expression NK family)(Wang et al., 2003) 或稱為 nanog (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003)。ENK 是目前所知專一性的表現在多能之 ES 細胞及 ICM 的分子，其他已知表現在囊胚期中之 ICM 的轉錄因子還包括 Rex1、Genesis(Sutton et al., 1996)、GBX2、Oct 4、UTF2 (Okuda et al., 1998)、Pem (Fan et al., 1999) 及 L17(Rodda et al., 2001)，雖然也都能表現在 ES 細胞，但並不是專一性的只在多能的細胞表現，在其他的體細胞也可發現。因此，ENK 是目前發現唯一專一性的表現在 ES 細胞的基因，可作為 ES 細胞之 marker 基因，**研究專一性的表現在 ES 細胞的 ENK 基因的功能**，將有助於我們了解早期胚胎發育之機制及 ES 細胞如何維持多功能性，進而精確的調控 ES 細胞體外分化成單一細胞，減少將來作細胞治療時，可能因少量未分化之 ES 細胞而造成的腫瘤現象。

### (二) 研究方法、結果與討論

#### 1. ENK 基因結構分析

我們最近在老鼠發現一個新的同源箱基因 ENK，更重要的是 ENK 專一性的表現在 ES 細胞，是目前所知專一性的表現在多能之 ES 細胞及 ICM 的分子，同時我們也找到人類的 ENK 基因---H-ENK，比較 ENK 與 H-ENK 的同源箱區其相似度為 86% (圖一)，ENK 基因分別位於老鼠的六號染色體與人類的十二號染色體上，同樣都由四個 exon 所組成，四個 exon 在染色體上的分佈極為相似(圖二)。

#### 2. ENK 基因表現之研究

由去年計劃之研究結果已知 ENK 基因專一性的表現在 ES 細胞及囊胚期中之 ICM，在成熟組織並不會表現，ES 細胞體外分化成同樣是多功能性的 epiblast 後，ENK 基因表現還是存在，但以 RA 誘導分化成神經細胞後，ENK 基因的表現明顯下降了，表示只有多功能性的細胞如 ES, ICM, epiblast 才有 ENK 基因的表現，但其他成熟組織的多功能性的細胞如 Mesenchymal stem cell 並沒有 ENK 基因的表現(data not shown)。

由於 ES 細胞具有複製更新的能力，因此我們也分析同樣具有分裂複製能力的腫瘤細胞，是否也會表現 ENK 基因，由圖三的結果可看出只有一種腫瘤細胞-P19 (teratocarcinoma cells) 具有 ENK 基因的表現，P19 cell 與 ES 細胞一樣具有再分化成其他不同細胞的能力，相當於胚胎細胞中的 epiblast，也是具有多功能性的，同時 P19 經由 RA 誘導分化成為神經細胞後，ENK 基因的表現也同時消失了，ENK 基因在 ES 及 P19 細胞的表現趨勢是一樣的(圖四)。同時人類的 NCCIT 及 NT2ERA2 細胞受 RA 抑制後其表現也明顯的消失(圖五)，由以上結果推測，ENK 基因的表現可能與細胞分裂複製的能力無關，但與早期胚胎中具有多功能性的未分化細胞的維持與調控細胞分化的能力有關。

### 3. 改造 ENK 基因

為了進一步了解 ENK 基因的功能，製造基因剔除小鼠是了解 ENK 功能最直接的方法。目前的技術已可以用胚胎幹原細胞改變老鼠內源性的基因，構築適當基因並將其送入 ES 細胞內進行同源性重組現象，可以藥物或 PCR 及南方吸漬法篩選內部基因產生重組之少數 ES 細胞，再將此細胞打入 blastocyst，使其成為 inner cell mass 的一部分，並形成為 embryo，將此 blastocyst 植入代理孕母的子宮內，生下之子代嵌合小鼠，其有些細胞為原本之 blastocyst 發育而來，有些則由改造之 ES 細胞發育而來。

ES 細胞本身為多能的，若將其打入適當品種之 blastocyst，其將有機會發育成為子代小鼠之生殖細胞，將此嵌合鼠進行交配，有機會可得到改造 ES 細胞發育而來之子代，這些子代為異型合子，帶有一正常之基因及一個改變之基因，將此異形合子之小鼠再彼此交配，有機會得到帶有二個改造基因之同型合子小鼠，觀察此小鼠的表現型態，將可知將基因改造對小鼠發育所造成的影響。

我們建構了如圖六 所示的 knockout construct，將大約~1Kb 的 ENK 基因 promoter 區接在 HSV-Tk gene 及 nuclear lac Z 之間及大約 4.5kb 的 3'flanking region，接在 pol Neo 及另一個 HSV-TK gene 之間，將此 construct 以 NotI 切成線性 DNA 後，以電擊的方式送入 ES 細胞，在 ES 細胞進行 homologous recombination 後 ENK 基因將被剔除，並被 nLacZ 及 polNeo 所取代，可以 G418 篩選進行 homologous recombination 之 ES 細胞，再以 5' promoter 及 nLacZ 之間設計一組 primer，及 neo 及 UTR 間設計另一組 primer，以此兩組 primer 篩選 ENK 基因被 nLacZ 取代之 ES 細胞，若 ES 細胞之 ENK 基因被剔除，PCR 篩選的結果將得到約 1kb 與 4.5kb 之片段，同時 southern blot 的結果也證實此 ES clone 之 ENK 基因為 heterozygous (圖七)，我們將篩選到的 ES clone，送入 blastocyst 得到了嵌合鼠，目前將此嵌合鼠與 wild type 小鼠交配，希望藉此得到基因型為異型合子的小鼠，再進一步得到二個改造基因之同型合子小鼠，觀察此小鼠的表現型態，將可知將基因改造對小鼠發育所造成的影響。進而了解此基因之功能。

### 4. ENK 基因表現之調控

已知 ENK 基因專一性的表現在 ES 細胞，且 ENK 基因的表現會受 retinoic acid 抑制(Wang et al., 2003; 圖六(B))，同樣的 P19 以 RA 處理大約 48 小時後 ENK 的表現明顯消失(圖八)，但分析 promoter 區並沒有所謂的 retinoic acid response element，因此推測 ENK 基因的表現並不是直接受 retinoic acid 調控。將 ENK 基因上游可能的調控序列分別接 luciferase 基因，將其送入以 RA 分化之 ES 細胞或未分化之 ES 細胞，再追蹤 ES 細胞分化後 luciferase 基因的表現，了解決定 ENK 基因細胞或組織專一性表現相關之調控序列。由圖九 的結果可看出 ENK 基因的 minimal promoter 約 380bp，但不同片段的 promoter 序列接上 luciferase 基因後送入經 RA 分化後的細胞，在 420 至 480 之間的序列使 luciferase 活性明顯下降，推測此段序列與 RA 抑制 ENK 基因的表現有關。

**(三)結論**

1. ENK 基因專一性的表現在 ES 細胞，ENK 基因可以做為 ES 細胞之 marker 基因
2. 未來將找出決定 ES 基因只在 ES 細胞表現之 pluripotent 序列
3. 將以 420 至 480 之間的序列與 ES cell extract 進行 gel mobility shift assay 找出與此序結合之 factor，進而了解 RA 抑制 ENK 基因表現之分子機制

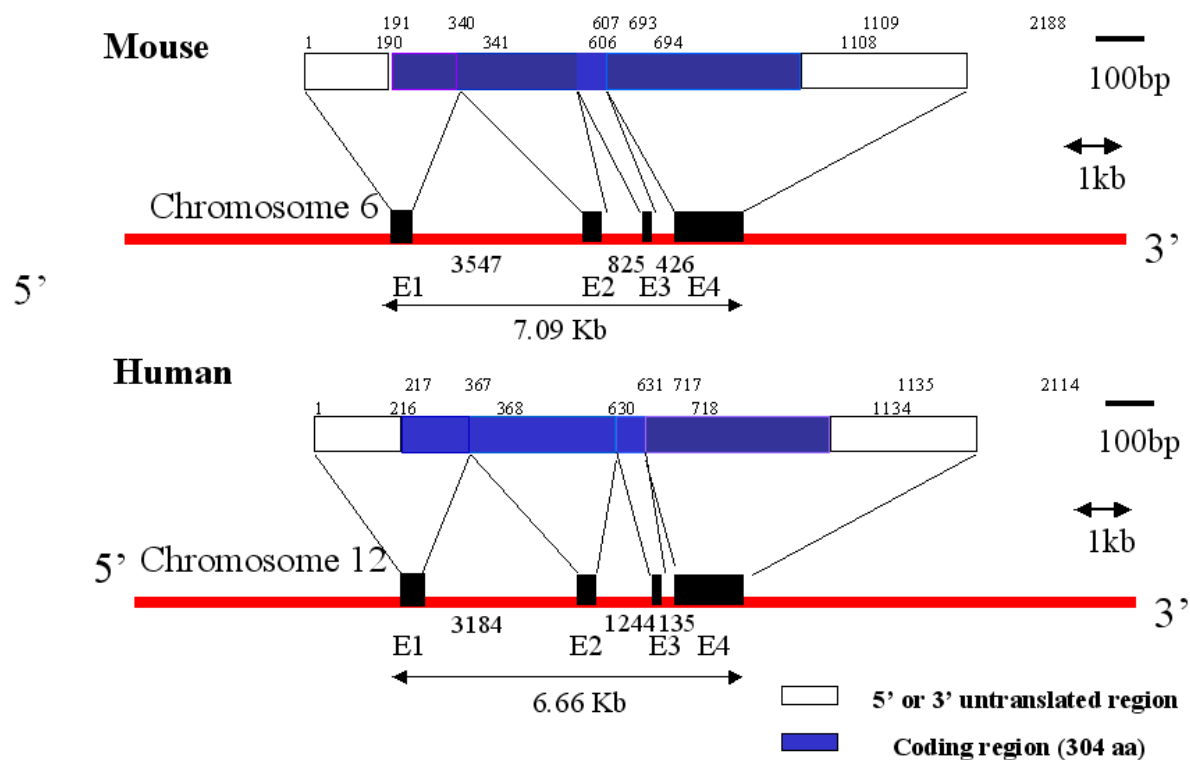
**參考文獻**

- Beddington, R.S. and Robertson, E.J. (1989) Development 105, 733-737.**
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. and Robertson, E. (1984) Nature 309, 255-256.**
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 113(5), 643-655.**
- De Rebertis, E.M. (1994) The homeobox in cell differentiation and evolution. In : Guidebook to the Homeobox genes, Duboule, D. (Ed), Oxford University Press, New York, p11-23.**
- Evans, M. and Kaufman, M. (1981) Nature 292, 154-156.**
- Fan, Y., Melhem, M.F. and Chaillet, J.R. (1999) Dev. Biol. 210, 481-496.**
- Jones, E.A., Tosh, D., Wilson, D., Lindsey, S. and Forrester, S.M. (2002) Exp. Cell. Res. 272, 15-22.**
- Levinson-Dushnik, M. and Benvenisty, N. (1997) Mol. Cell. Biol. 17, 3817-3822.**
- Li, M., Pevny, L., Lovell-Badge, R. and Smith, A.G. (1998) Curr. Biol. 8, 971-974.**
- Lumelsky, N., Bondel, O., Laeng, P., Valasco, I., Ravin, R. and McKay, R. (2001) Science 292, 1389-1394.**
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S.(2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 113(5), 631-642.**
- Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi, T., Nabeshima, Y., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Boon, K., Keeney, M., Stunnenberg, H.G. and Muramatsu, M. (1998) EMBO J. 17, 2019-2032.**
- Rathjen, P.D., Lake, J., Whyatt, M., Bettess, M.D. and Rathjen, J. (1998) Reprod. Fertil. Dev. 10, 31-47.**

- Rodda, S., Sharma, S., Scherer, M., Chapman, G. and Rathjen, P. (2001) J. Biol. Chem. 276, 3324-3332.**
- Sutton, J., Costa, R., Klug, M., Field, L., Xu, D., Largaespada, D.A., Fletcher, C.F., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Klemsz, M. and Hromas, R. (1996) J. Biol. Chem. 271, 23126-23133.**
- Wang, S.H., Tsai, M.S., Chiang, M.F. and Li, H. (2003) A novel NK-type homeobox gene, ENK(early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. Gene Express. Pattern 3, 99-103.**
- Wurst, W. and Joyner, A.L. (1993) in Gene Targeting: A Practical Approach (Joyner, A.L., ed) pp. 33-61, IRL Press, Oxford.**
- Wiles, M.V. and Keller, G. (1991) Development 111, 259-267.**

	Helix 1	Helix 2	Helix 3
human-ENK-H	1 KQKTRTVFSSTQLCVLNDRFQRQKYL	LQMQELSN	ILNLSYKQVKTWFQNRMKSKRWQ 60
mouse-ENK-H	1 KQKMRTVFSQAQLCALKDRFQKQKYL	LQMQELESSI	LNLSYKQVKTWFQNRMKCKRWQ 60
	*** *****	.*** * *****	.***** ***** .***

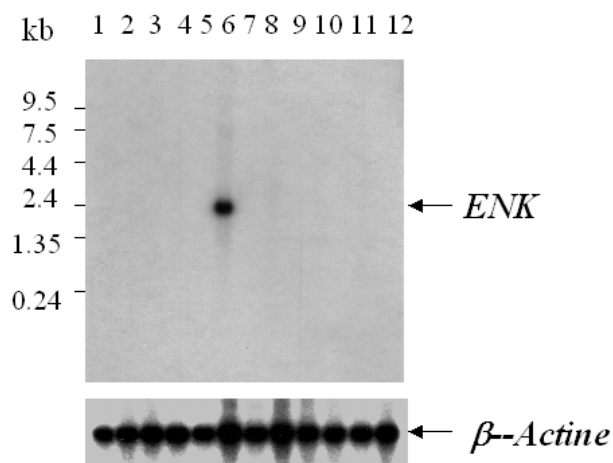
圖一: comparison of homeodomain of human and mouse ENK



圖二 genomic structure of ENK gene

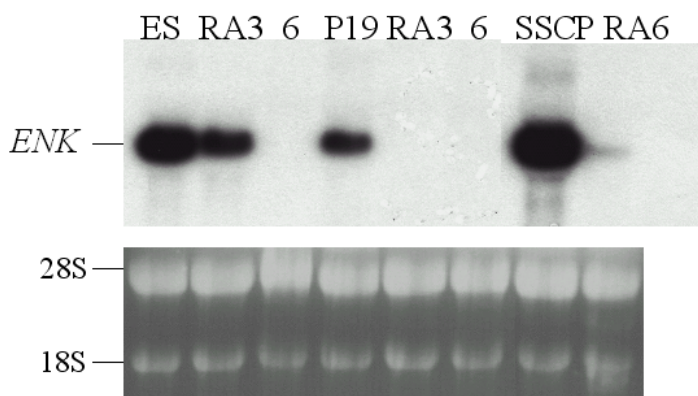


## Mouse multiple tumor cell line P19 cell line: teratocarcinoma cell



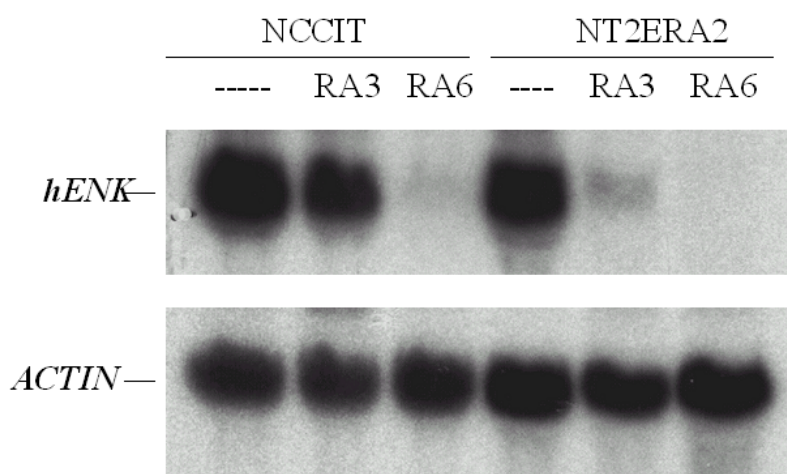
**Fig. 3** Northern blot analysis of ENK expression in multiple cell lines. Poly(A)+ RNA from multiple cell-lines were blotted onto a nylon membrane (clontech). Cell line used for this blot are (1) Lymphoid tumor PU5-1.8;(2) Abelson murine leukemia virus-induced tumor RAW264.7; (3) fibroblast k-BALA; (4) fibroblast M-MSVBALB/3T3; (5) subcutaneous connective tissue-type L-M; (6) **embryonic carcinoma P19**; (7) hepatoma Hepa1-6; (8) lymphoma R1.1; (9) lymphocytic leukemia L1210; (10) lymphoma P388D1; (11) mastocytoma P815; (12) neuroblastoma NB41A3.  $\beta$ -actine was used for control.

### Mouse ES cell line and P19



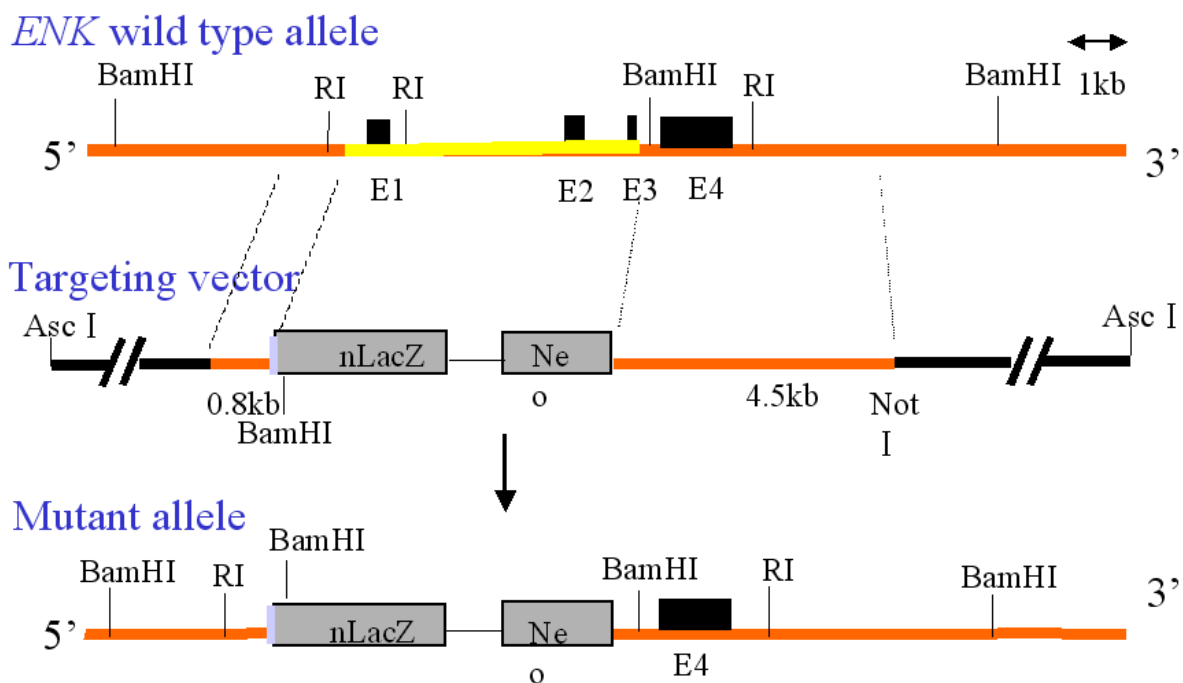
圖四 The expression of ENK was decreased in ES and P19 cells following RA treatment

## Human teratocarcinoma cell

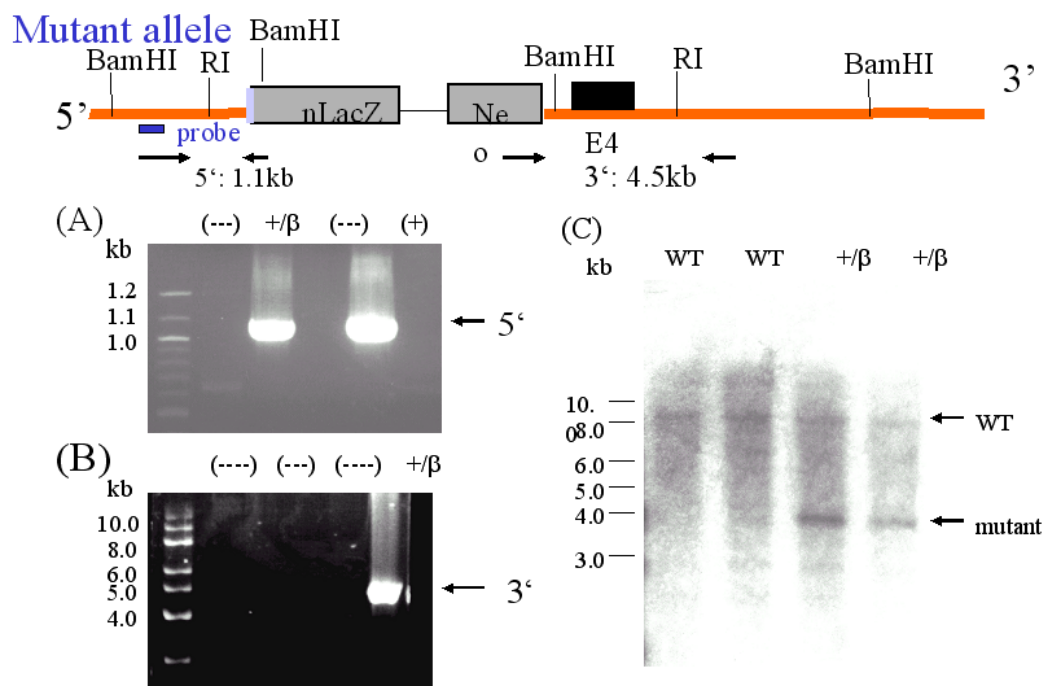


圖五 The expression of ENK in NCCIT and NT2ERA2 cells was decreased by RA treatment

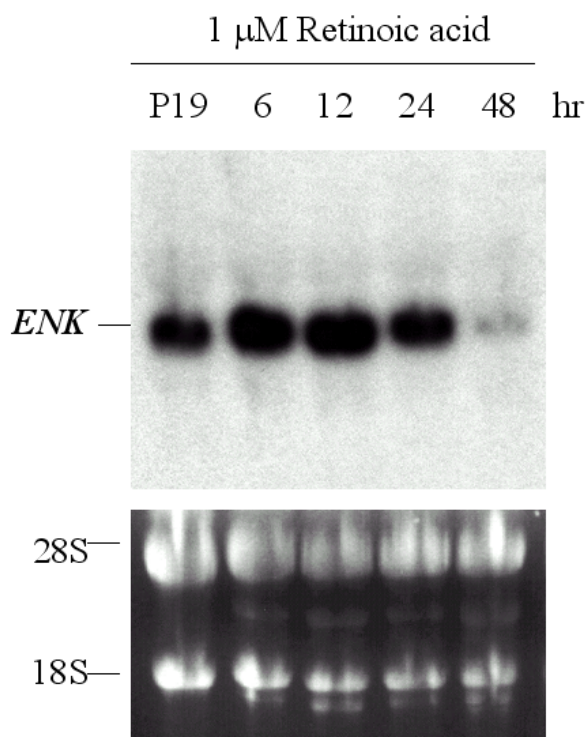
## Targeted disruption of the *ENK* gene



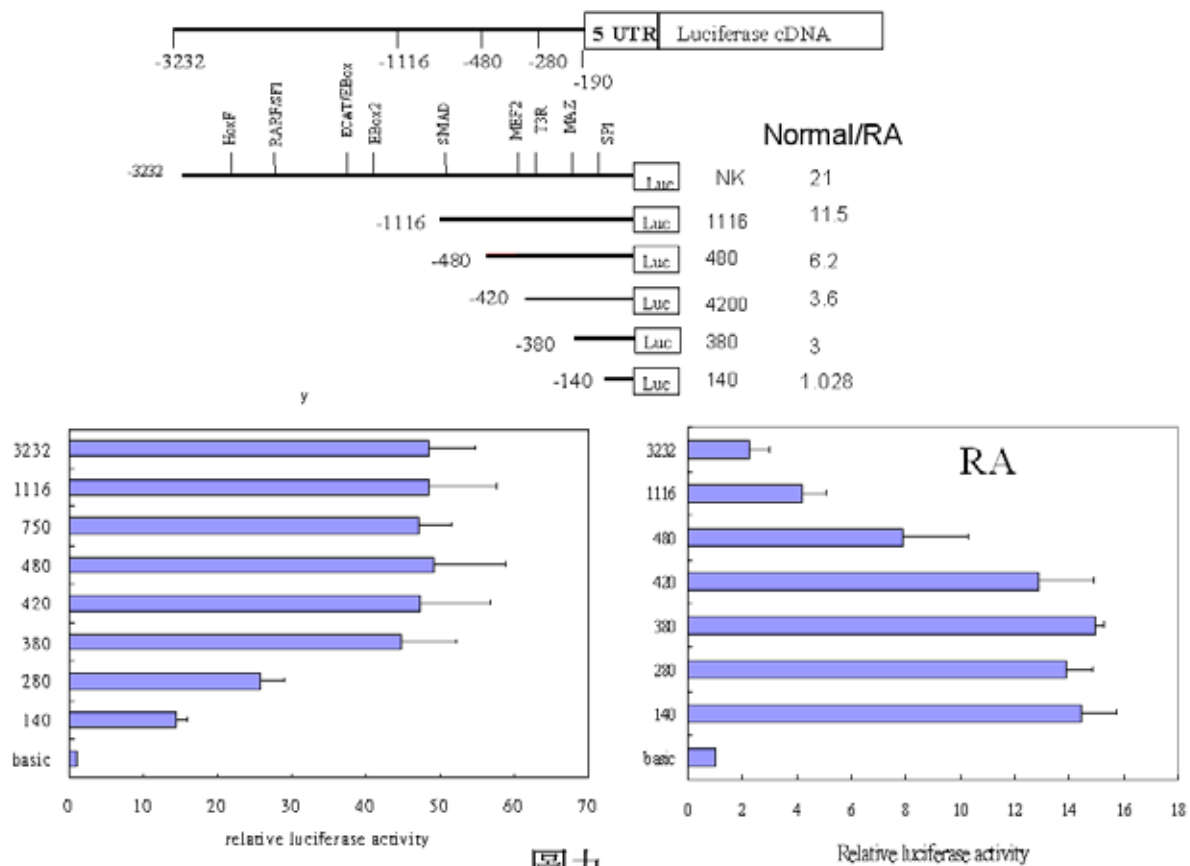
圖六 ENK gene knockout construct



圖七 scream ENK heterozygous of ES clone by PCR and southern blot



圖八 The expression of ENK was decreased by RA following different time course



圖九