

재조합 *hTPO* 유전자의 발현 조절을 위한 Retrovirus Vector System의 구축

권모선[†] · 구분철 · 김도향 · 김태완

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Construction of Retrovirus Vector System for the Regulation of Recombinant *hTPO* Gene Expression

Mo Sun Kwon[†], Bon Chul Koo, Do Hyang Kim and Teoan Kim

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 705-718, Korea

ABSTRACT

In this study, we constructed and tested retrovirus vectors designed to express the human thrombopoietin gene under the control of the tetracycline-inducible promoters. To increase the *hTPO* gene expression at turn-on state, WPRE sequence was also introduced into retrovirus vector at downstream region of either the *hTPO* gene or the sequence encoding reverse tetracycline-controlled transactivator (*rtTA*). Primary culture cells (PFF, porcine fetal fibroblast; CEF, chicken embryonic fibroblast) infected with the recombinant retrovirus were cultured in the medium supplemented with or without doxycycline for 48 hr, and induction efficiency was measured by comparing the *hTPO* gene expression level using RT-PCR, western blot and ELISA. Higher *hTPO* expression and tighter expression control were observed from the vector in which the WPRE sequence was placed at downstream of the *hTPO* (in CEF) or *rtTA* (in PFF) gene. This resulting tetracycline inducible vector system may be helpful in solving serious physiological disturbance problems which have been a major obstacle in successful production of transgenic animals.

(Key words : Tetracycline-inducible promoter, WPRE, *hTPO*, Induction efficiency)

요 약

본 연구에서는 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 형질 전환 개체나 세포의 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 *hTPO* 유전자의 발현을 조절할 수 있는 tetracycline-inducible retrovirus vector system을 구축하고자 하였다. *hTPO* 유전자는 사람의 간암세포인 HepG2에서 분리한 RNA를 주형으로 하여 RT-PCR 방법을 이용하여 확보하였으며, 이 유전자를 MLV 유래의 vector에 도입하여 pLNChTPOW를 재조합하였다. 재조합한 vector는 GP2 293 포장세포에 도입하여 바이러스를 생산하였으며, 이 바이러스를 이용하여 감염시킨 여러 표적세포에서 *hTPO*의 발현을 확인하였다. 또한, *hTPO*의 발현을 유도적으로 조절할 수 있도록 하기 위하여 *hTPO*를 one vector 형태의 Tet-On vector system에 도입하였으며, 발현의 유도 조건에서 보다 강한 발현을 위하여 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하였다. 구축한 Tet system의 발현 조절 정도는 각 바이러스를 감염시켜서 구축한 CEF와 PFF 세포에서 RT-PCR과 Western blot, 그리고 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. 그 결과, CEF에서는 WPRE 서열이 *hTPO* 유전자의 3'에 위치한 경우에서, PFF에서는 WPRE가 *rtTA*의 3'에 위치한 경우의 vector system에서 가장 높은 발현율과 유도율을 나타내었다. 이는 Tet system에서의 *hTPO* 유전자 발현 조절이 매우 효율적으로 이루어지며, 세포주에 따른 의존적인 조절 양상을 보이는 것을 의미한다. 따라서 *hTPO*의 대량 생산을 위한 생체 반응기로서의 형질 전환 동물의 개발을 보다 효율적으로 수행하려면 적절한 Tet system이 선별적으로 적용되어야 할 것이다.

서 론

거대 핵 세포의 생존, 증식, 분화를 촉진하여 혈소판을 생산하도록 하는 조절자이며(Kaushansky, 1998), 조혈모 세포의 생존과 증식에도 관여하는 것으로 알려져 있는

* 이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-050-C00004).

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4469, E-mail: mskwon@cu.ac.kr

(Sitnicka 등, 1996) thrombopoietin (TPO)은 353개의 아미노산으로 이루어진 당단백질이다. TPO는 백혈병과 여러 고형 암에 대한 화학적인 항암 치료시 나타나는 혈소판 감소증, 재생 불량성 빈혈이나 골수 부전증, HIV에 의한 혈소판 감소증, 그리고 빈혈 신부전증 등의 여러 증상의 치료제로 사용되고 있다(Vadhan-Raj 등, 2000). 이 고가의 생리 활성 물질인 TPO 생산은 주로 동물 세포를 이용하여 이루어지고 있으나 경제적, 기술적인 여러 문제점을 나타내어 이를 해결하기 위한 대안으로 형질 전환 동물을 생체 반응기로 이용한 연구가 주목받고 있다. 그러나 이 연구의 가장 큰 문제점은 지속적인 활성을 나타내는 β -actin이나 CMV promoter 등을 사용하여 유전자를 발현시킬 경우 유전자의 발현 시기나 정도가 조절되지 않기 때문에 개체 전체에 걸쳐서 광범위하며, 지속적인 발현이 이루어짐으로써 생리적인 부작용을 유발하는 경우가 많다는 것이다(Ebert 등, 1988; Vize 등, 1988). 이를 해결하기 위하여 외래 유전자의 발현 조절이 원하는 시기에 단시간 내에 효율적으로 일어나며, 표적이 되는 세포나 조직에 대해 특이적인 유전자 전이 system을 개발하려는 연구가 시도되었다. 초기의 유전자 발현 조절 system으로는 heat shock protein (Schweinfest 등, 1998), metallothionine (Hu와 Davidson, 1990), steroid regulatory promoter (Ko 등, 1989) 등을 이용한 시도가 있었는데, 이 system들은 다면적 영향, 비유도 조건에서의 발현, 유도물질의 세포 독성, 낮은 발현 정도 등이 문제가 되었다(Yarranton, 1992). 이러한 단점을 해결하기 위하여 ecdysone-regulated gene switch (Saez 등, 1997; Saez, 2000), lac operator-repressor system (Cronin 등, 2001), GAL4/UAS system (Wang 등, 1999), 그리고 tetracycline-controlled inducible expression system (Gossen과 Bujard, 1992) 등이 유전자 전이 system으로 개발되었다. 이 가운데 가장 광범위하게 사용되고 있는 system은 Gossen과 그의 동료들에 의해서 개발된 tetracycline-controlled transcriptional regulatory system으로, 높은 발현 유도율과 다른 system에 비해 비교적 강한 비유도 조건에서의 발현 제어를 나타낸다. 이 system은 크게 tTA system (Gossen과 Bujard, 1992)과 rtTA system (Gossen 등, 1995)으로 분류되는데, 전자는 외래 유전자의 발현이 유도물질이 가해지는 조건에서 일어나며, 후자는 유도물질이 존재하지 않는 조건에서 발현이 유도되는 구조이다. 형질 전환 동물을 이용한 생리 활성 단백질의 생산에 있어서 후자의 rtTA system을 많이 이용하는데, 이는 유도물질이 첨가되는 조건에 한정되어 외래 유전자의 발현이 일어나므로 개체의 생리적인 부작용의 발생을 최소화하면서 특정 조직과 기관에서 필요한 시기에 국한하여 외래 단백질을 생산하는 것이 가능하기 때문이다(Kistner 등, 1996; Ray 등, 1997; Tichelaar 등, 2000). 이에 본 연구에서도 고가의 생리 활성 물질인 hTPO를 대량 생산하는 생체 반응기 개발을 위한 기초 연구로 hTPO의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 Tet system을 구축하고, 유도 조건에서 외래 유전자의 발현을 극대화하기 위하여 WP-RE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 도입하였으며(Zufferey 등, 1999), *in vitro*에서의 유전자 발현 조절 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사람의 TPO 유전자의 확보

hTPO 유전자를 확보하기 위하여 사람의 간암 세포인 HepG2에서 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리하였으며, 분리한 RNA는 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA로 제조한 후, 2 μ l의 cDNA를 주형으로 이용하여 hTPO에 대하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 과정은 역전사를 위하여 48°C에서 45분, 94°C에서 2분간 반응시키고, 2차 cDNA 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 1분, 56°C에서 1분, 68°C에서 1분간 반응하는 cycle을 30회 반복 실시하였다. 이 반응에서 사용한 forward primer는 5' CCAGAATGG-AGCTGACTGAATTGC 3'이며, reverse primer는 5' ACC-TTACCCTTCCTGAGACAGATTCTG 3'이다. 생산된 증폭 절편은 pGEM-Teasy vector (Promega, USA)에 도입하여 T7 promoter primer를 이용한 sequencing을 의뢰하였다.

Retrovirus Vector의 구축

pGEM-Teasy vector에 삽입된 hTPO 유전자는 EcoRI 과 Klenow fragment를 순서대로 처리하여 양 말단이 blunt한 형태의 단편으로 분리하였으며, 이를 SmaI 과 CIP (calf intestinal phosphatase)를 처리하여 양 말단이 blunt 형태인 pGEM-7zf vector에 삽입하여 pGEM-TPO를 재조합하였다. 이 plasmid를 다시 EcoRI 과 Klenow fragment, 그리고 HindIII로 처리하여 hTPO 단편을 분리한 후 이를 HpaI 과 HindIII를 처리한 pLNChTPO와 재조합하여 pLNChTPO를 구축하였다.

hTPO 유전자의 발현을 유도적으로 조절하기 위한 Tet system의 구축은 다음과 같이 진행되었다. 본 연구실에서 보유하고 있는 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2^SM2, pRevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2^SM2, 그리고 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2^SM2-WPRE plasmid의 EGFP 유전자를 제거하고 hTPO 유전자를 대체하여 재조합하였다. 구축한 각 vector의 구조는 Fig. 1과 같다.

Virus의 생산 및 표적세포의 감염

재조합한 pLNChTPO는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 virus를 생산한 후 이 virus를 virus packaging cell인 GP2 293 (Clontech, USA)에 infection시켜서 GP2 293-LNChTPO 세포주를 각각 확립하였다. 확립된 세포주에 virus 피막 유전자인 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 유전자를 가진 plasmid를 일시적으로 transfection시켜서 virus를 생산하였으며, 생산한 virus는 재조합된 hTPO의 생물학적 활성을 확인하기 위하여 chicken embryonic fibroblast (CEF)와 porcine fetal fibroblast (PFF) 세포에 감염시켰다. 감염된 세포를 600 μ g/ml의 G418이 첨가된 배양액에서 10일간 선별하여 virus vector가 전이된 세포주를 확립하였다. Tet vector system의 각각의 vector도 pLNChTPO와 동일한 과정으로 virus를 생산하였으며, 수확한 virus로 CEF와 PFF 세포를 감염시킨 후 150 μ g/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액으로 선별하였다.

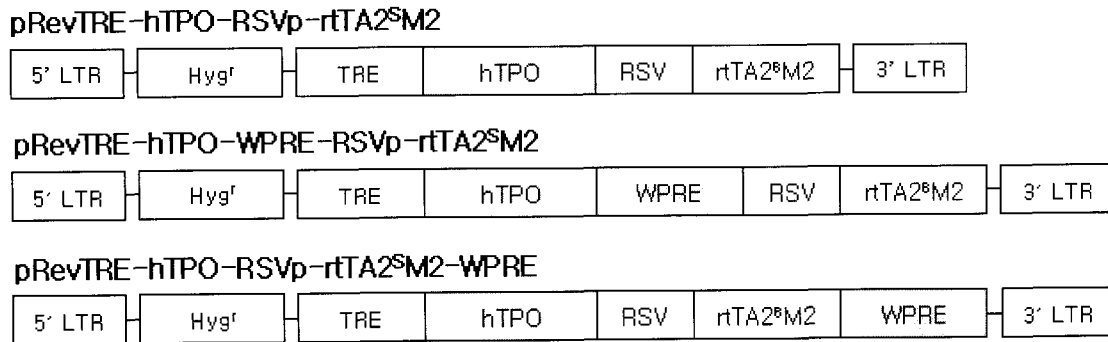


Fig. 1. Structures of tetracycline inducible expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin B resistant gene; TRE, Tet-response element contains seven direct repeats of the 42-bp tetO operator sequence and minimal CMV promoter; hTPO, human thrombopoietin gene; RSV, Rous sarcoma virus promoter; rtTA^{2SM2}, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rTetR) fused to a VP16 transactivation domain; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

재조합 hTPO의 발현 검증

확립한 각각의 세포주에서 hTPO의 발현을 확인하기 위하여 각 세포를 doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배양액에서 48시간 배양한 후, RT-PCR과 Western blotting, 그리고 ELISA를 실시하였다.

RT-PCR

RT-PCR은 virus에 감염되지 않은 세포와 virus에 감염된 각각의 세포에서 분리한 RNA로 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조한 후 각각의 실험군에서 2 µl의 cDNA를 주형으로 이용하여 hTPO와 대조구인 각 세포주의 GAPDH에 대하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험에 사용한 hTPO에 해당하는 primer로 forward primer는 5'CCAGAATGGAGCTGACTGAATTGC 3'이고, reverse primer는 5'ACCTTACCCTTCCTGAGACAGATTCTG 3'이며, GAPDH 유전자에 대한 primer는 Table 1과 같다.

Western Blotting

Western blotting을 실시하기 위하여 배양액 10 µl와 세포에서 분리한 단백질 중 10 µg을 각각 취하여 SDS-PAGE를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% skim milk가 포함된 0.03% tween-20 blocking buffer에 1시간 방치한 후 배양액 실험군에는 1:5,000으로 희석한 anti-TPO 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)를, 세포 단백질 실험군에는 1:8,000으로 희석한 anti-β-actin 항체(Abcam, UK)를 첨가하여 16시간 동안

반응시켰다. 이차 항체인 HRP conjugated Donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA)를 반응시킨 후 기질 용액인 West Dura Extended Duration substrate (Pierce, USA)용액을 첨가하여 X-ray film에 60초간 노출시켜서 현상하였다.

ELISA 분석

ELISA 방법을 이용한 실험에서는 virus에 감염되지 않은 대조군 세포와 hTPO 유전자가 전이된 세포들을 각각 DMEM/FBS 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 1:10,000으로 희석한 후 Quantikine Human Tpo Immunoassay kit (R&D systems, USA)을 사용하여 ELISA 반응을 실시하였다. 먼저 여러 단계로 희석한 standard와 각 sample을 plate의 각 well에 200 µl씩 넣어서 실온에서 3시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였다. 각 well에 200 µl의 anti-hTPO-HRP conjugate를 더한 후 실온에서 1시간 방치한 후 wash buffer로 4회 수세하였으며, 200 µl의 TMB (tetramethylbenzidine) substrate solution을 각 well에 더하여 빛을 차단시킨 상태로 실온에서 30분간 방치하였다. Stop solution을 더하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

hTPO 유전자의 확보와 발현 확인

사람 세포주인 HepG2의 RNA를 주형으로 하여 RT-PCR 방법을 이용해서 구축한 hTPO 서열을 sequencing 한 결과, genbank (assession No. NM000460)의 사람의

Table 1. Primers used for GAPDH analysis

Cell line	Species	Sequence	Product size (bp)
CEF	Chicken	ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG (+) CAGCAGCCTTCACTACCCTCTTG (-)	582
PFF	Pig	TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG (+) ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC (-)	655

TPO 유전자 서열과 동일한 것으로 확인되었다(Fig. 2). 확보한 *hTPO* 유전자는 LNChTPOW virus로 생산하여 CEF와 PFF 세포에 감염시켜 유전자가 전이된 세포주를 확립하였으며, 이 세포와 대조구 세포를 RT-PCR을 이용한 분석 결과에서는 virus에 감염되지 않은 세포의 경우, *hTPO* 유전자에 대한 단편이 증폭되지 않은데 비해 virus에 감염된 세포에서는 PCR 단편의 증폭이 뚜렷하게 확인되었다(Fig. 3). 각 세포의 정상적인 전사가 이루어지는 것을 확인하기 위하여 GAPDH를 대조구로 사용하였다. Western blotting 결과에서도 virus에 감염된 세포에서만 *hTPO*의 발현이 확인되었으며, 대조구로 사용한 β -actin은 모든 세포주에서 확인되었다(Fig. 3). 각 세포의 배양액을 이용하여 ELISA를 실시한 결과, virus에 감염되지 않은 세포에서는 발현이 전혀 확인되지 않았으며, CEF-LNChTPOW에서는 8.0 μ g/ml, PFF-LNChTPOW에서는 1.0 μ g/ml의 양을 나타내었다(Fig. 3).

Tet System을 이용한 *hTPO* 유전자의 유도적 발현 여부 확인

CEF와 PFF 세포에서 Tet system의 발현 양상을 관찰한 결과, Tet vector가 도입된 세포주들은 doxycycline이 없는 경우보다 첨가한 경우에 더 강한 발현을 나타내었다(Fig. 4). RT-PCR에서는 doxycycline의 존재 여부에 따른 발현의 차이는 보였으나, vector의 종류에 따른 차이는 미미하였다. 이에 비해 western blotting 결과에서는 확연한 차이를 나타내었는데, CEF 세포에서는 WPRE 서열이 *hTPO* 유전자의 3'위치에 도입된 경우에, PFF 세포에서는 WPRE가 *rtTA2^SM2*의 3' 위치에 도입한 경우에 가장 강한 발현을 나타내었다(Fig. 4). 그러나 WPRE가 도입되지 않은 virus에 감염된 세포주에서는 발현이 미미하여 *hTPO* 유전자의 발현이 확인되지 않았다(Fig. 4).

hTPO 발현 여부를 보다 확실하게 확인하기 위하여 *hTPO* 유전자가 전이된 각 세포의 배양액을 수확하여 ELISA를 실시한 결과 western blotting에서 비교적 높은 발현을 보인 CEF-RevTRE-*hTPO*-WPRE-RSVp-*rtTA2^SM2*

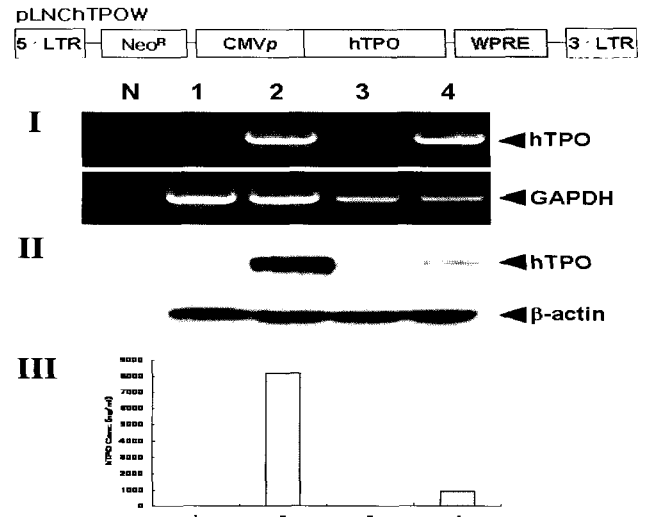


Fig. 3. RT-PCR (I) Western blot (II), and ELISA (III) analyses of *hTPO* gene expression in CEF and PFF cells. N, negative control; 1, 2, CEF cell; 3, 4, PFF cell; 1, 3 cells uninfected cell; 2, 4 cells infected with LNChTPOW viruses, respectively. In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the *hTPO* gene and the other for the control GAPDH gene. In Western blot analysis, upper, medium contained by the cell line; Lower, cell lysate from the each cell line. β -actin was used as an internal control.

세포에서는 2.6 μ g/ml, CEF-RevTRE-*hTPO*-RSVp-*rtTA2^SM2*-WPRE에서는 0.5 μ g/ml의 양을 나타내었으며, PFF-RevTRE-*hTPO*-WPRE-RSVp-*rtTA2^SM2* 세포에서는 0.2 μ g/ml, PFF-RevTRE-*hTPO*-RSVp-*rtTA2^SM2*-WPRE 세포에서는 1.5 μ g/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 5). 발현 유도율은 CEF 세포에서는 RevTRE-*hTPO*-WPRE-RSVp-*rtTA2^SM2* 세포주에서 약 30배의 유도율을 나타내었으며, PFF에서는 RevTRE-*hTPO*-RSVp-*rtTA2^SM2*-WPRE에서 300배 이상의 발현 유도율을 나타내었다(Fig. 5).

1 CCAGAATGGA GCTGACTGAA TTGCTCCTCG TGGTCATGCT TCTCCTAACT GCAAGGCTAA
 61 CGCTGTCCAG CCCGGCTCCT CTTGCTGTG ACCTCCGAGT CCTCAGTAAA CTGCTTCGTG
 121 ACTCCCATGT CCTTCACAGC AGACTGAGCC AGTGCCAGG GGTTCACCCT TTGCCTACAC
 181 CTGTCCTGCT GCCTGCTGTG GACTTTAGCT TGGGAGAATG GAAAACCCAG ATGGAGGAGA
 241 CCAAGGCACA GGACATTCTG GGAGCAGTGA CCCTTCTGCT GGAGGGAGTG ATGGCAGCAC
 301 GGGGACAACCT GGGACCCACT TGCCCTCAT CCCTCCTGGG GCAGCTTCTT GGACAGGTCC
 361 GTCTCCTCCT TGGGGCCCTG CAGAGCCTCC TTGGAACCCA GCTTCCTCCA CAGGGCAGGA
 421 CCACAGCTCA CAAGGATCCC AATGCCATCT TCCTGAGCTT CCAACACCTG CTCCGAGGAA
 481 AGGTGCGTTT CCTGATGCTT GTAGGAGGGT CCACCCTCTG CGTCAGGCGG GCCCCACCCA
 541 CCACAGCTGT CCCAGCAGA ACCTCTCTAG TCCTCACACT GAACGAGCTC CCAAACAGGA
 601 CTTCTGGATT GTTGGAGACA AACTTCACTG CCTCAGCCAG AACTACTGGC TCTGGGCTTC
 661 TGAAGTGGCA GCAGGGATTG AGACCCAAGA TTCCTGGTCT GCTGAACCAA ACCTCCAGGT
 721 CCCTGGACCA AATCCCAGG TACCTGAACA GGATACACGA ACTCTTGAAT GGAAGCTCGT
 781 GACTCTTTC TGGACCCTCA CGCAGGACCC TAGGAGCCCC GGACATTTCC TCAGACTACAT
 841 CAGACACAGG TCCCTGCCA CCAACCTCC AGCCTGGATA TTCTCCTTCC CCAACCCATC
 901 CTCCTACTGG ACAGTATACG CTCTTCCCTC TTCCACCCAC CTTGCCACC CCTGTGGTCC
 961 AGCTCCACCC CCTGCTTCCT GACCCTTCTG CTCCAACGCC CACCCTACC AGCCCTCTTC
 1021 TAAACACATC CTACACCCAC TCCAGAAATC TGTCTCAGGA AGGTAAGGT

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *hTPO*. The sequences of cDNA primers used in RT-PCR are shaded.

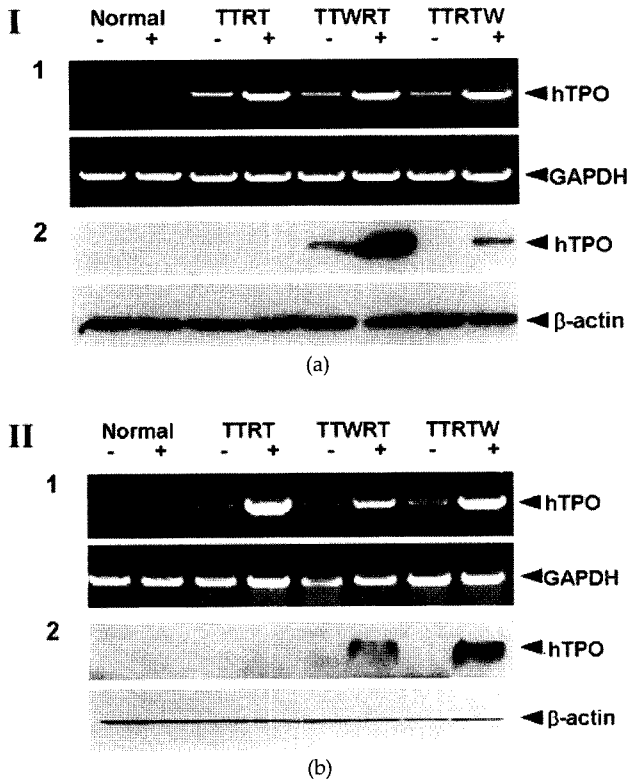


Fig. 4. Determination of doxycycline induction-mediated *hTPO* gene expression in CEF (I) and PFF cells (II) by RT-PCR (1) and Western blot (2) analyses. Normal, uninfected cells; TTRT, cells infected with RevTRE-*hTPO*-RSVP-*rtTA2^SM2*; TTWRT, cells infected with RevTRE-*hTPO*-WPRESVP-*rtTA2^SM2*; TTRTW, cells infected with RevTRE-*hTPO*-RSVP-*rtTA2^SM2*-WPRES. - and + indicate absence and presence of doxycycline, respectively. GAPDH and β -actin was used as an internal control. A: 10 μ l cell media per well, B: 4 μ g of total lysate protein per well.

고찰

형질 전환 동물이나 유전자 치료 등의 연구에서 가장 중요한 요소는 인위적인 외래 유전자의 도입과 발현이다. 그러나 세포나 개체 내에서의 외래 유전자의 지속적인 발현은 개체에 있어서 치명적인 생리적 부작용을 초래할 수 있다. 이에 외래 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 유전자 전이 system이 요구되며, 현재 세포나 개체에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 유전자 조절 system은 Tet system이다. 이 system은 tTA나 rtTA를 선택하여 tetracycline 계열의 물질을 투여함으로써 외래 유전자의 발현 조절을 억제하거나 유도할 수 있다. Tet system은 두 개의 vector 구조를 가지는데, 그 중 하나는 tetracycline-response element의 조절 하에 외래 유전자가 도입된 vector 구조이고, 하나는 지속적이거나 조직 특이적인 promoter의 조절 하에 transactivator가 위치해 있는 vector 구조이다. Tet system의 주요점은 비유도 조건에서의 완전한 발현 제어와 doxycycline에 대한 감수성

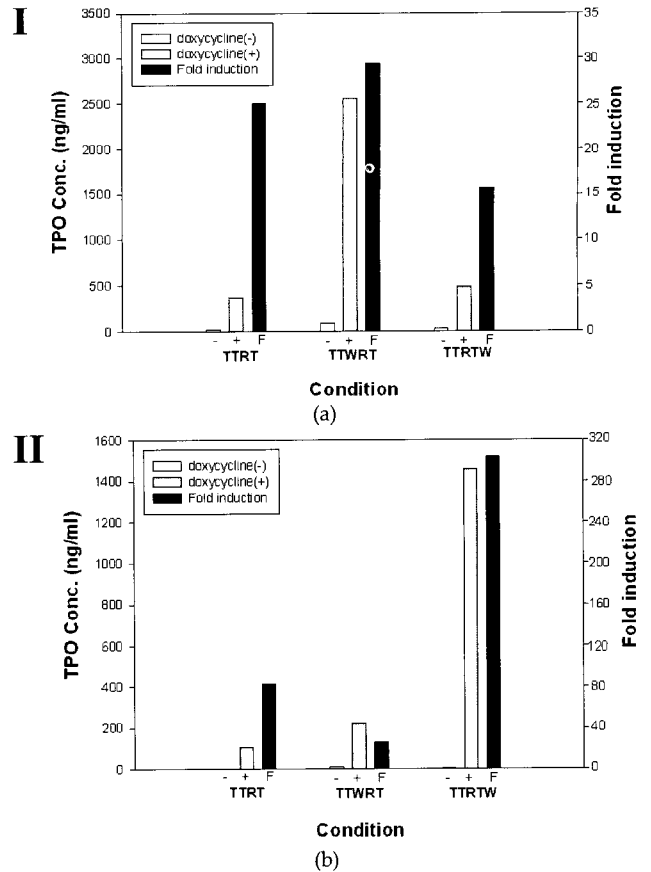


Fig. 5. ELISA analyses of *hTPO* in CEF (I) and PFF (II) cells. TTRT, target cell infected with RevTRE-*hTPO*-RSVP-*rtTA2^SM2*; TTWRT, infected with RevTRE-*hTPO*-WPRESVP-*rtTA2^SM2*; TTRTW, infected with RevTRE-*hTPO*-RSVP-*rtTA2^SM2*-WPRES. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml).

의 증가, 그리고 발현 유도율의 탁월한 증대이다(Zhu 등, 2002). 이러한 요소들을 해결하기 위하여 여러 연구가 진행되고 있으며, 본 연구에서도 보다 최적화된 vector system을 구축하고자 하였다.

본 연구에서는 *rtTA* 서열을 *rtTA2^SM2* 서열로 교체하였는데, 이 서열은 *rtTA*에 비해서 낮은 농도의 Doxycycline에서 발현이 유도되며, 비유도 조건에서의 발현이 낮은 것으로 알려져 있다(Urlinger 등, 2000; Koponen 등, 2003). 따라서 외래 유전자의 발현 유도율도 향상되어 효율적인 유전자 발현 조절이 가능하게 된다. 실험상의 효율성을 위하여 이 두 구조를 단일 vector로 재조합하여 형질 전환 동물의 생산에 사용한 경우, TRE 부분과 transactivator의 발현을 위해 사용하는 promoter 부분의 밀접한 연관성에 기인하는 상호 간섭 현상 때문에 완벽한 발현 조절이 매우 어렵게 된다(Smith-Arica 등, 2000; Fitzsimons 등, 2001). 이러한 현상을 최소화하기 위하여 transactivator에 대한 promoter를 기존의 CMV promoter에서 다른 종류의 promoter로 대체하거나 양 방향 vector 형태를 취하기도 하는데, 본 연구에서는 CMV promoter 대신에 RSV promoter를 도입하였다.

이 외에 유도 조건에서 외래 유전자의 발현을 강화시킬 목적으로 WPRE 서열을 도입하였는데, 이 서열은 세포나 promoter의 종류에 따라서 의존적인 활성을 나타낸다. Zhu 등(2004)의 연구에서는 WPRE가 도입된 vector를 이용하여 유전자를 전이시킨 세포의 종류에 따라서 강한 발현을 나타내는 경우가 있는가 하면 이와 대조적으로 전혀 발현의 증가가 관찰되지 않은 경우도 있었다. 뿐만 아니라 사람의 수지상 세포에서는 WPRE가 도입된 vector에 의해 유전자가 전이된 경우, 오히려 발현이 저해되는 현상이 관찰되기도 하였다(Mangeot 등, 2002). 이 외에도 WPRE의 활성은 promoter의 종류에 의존적으로 나타나는 것으로 보고되어 있다(Ramenzani 등, 2000; Klein 등, 2006). 본 연구에서도 WPRE의 도입 위치에 따른 활성이 세포의 종류에 따라서 다른 양상을 보였는데, CEF에서는 WPRE가 Tet vector 내의 hTPO 유전자의 3'에 위치한 경우에 발현이 가장 강하고, PFF에서는 WPRE 서열이 rtTA2^SM2 서열 다음에 위치한 경우에 가장 높은 발현을 나타내었다. 따라서 WPRE를 도입한 vector system을 유전자 전이의 수단으로 사용하기 위해서는 적절한 vector system을 선별하는 과정이 선행되어야 할 것이다.

이상과 같이 본 연구에서 hTPO의 발현 조절이 가능한 효율적인 유전자 전이 system을 구축하였으므로 동물을 생체 반응기로 이용하는 hTPO 생산에 있어서의 외래 유전자 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화할 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

- Cronin CA, Gluba W, Scrabble H (2001): The lac operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes Dev* 15:1506-1517.
- Ebert KM, Low MJ, Overstrom EW, Buonomo FC, Baile CA, Roberts TM, Lee A, Mandel G, Goodman RH (1988): A moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Mol Endocrinol* 2:277-283.
- Fitzsimons HL, McKenzie JM, During MJ (2001): Insulators coupled to minimal bidirectional tet cassette for tight regulation of rAAV-mediated gene transfer in the mammalian brain. *Gene Ther* 8:1675-1681.
- Gossen M, Bujard H (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5547-5551.
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
- Hu MC, Davidson N (1990): A combination of depression of the lac operator-repressor system with positive induction by glucocorticoid and metal ions provides a high-level-inducible gene expression system based on the human metallothionein-IIA promoter. *Mol Cell Biol* 10:6141-6151.
- Kaushansky K (1998): Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339:746-754.
- Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, Bujard H (1996): Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10933-10938.
- Klein R, Ruttkowski B, Knapp E, Salmons B, Günzburg WH, Hohenadl C (2006): WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. *Gene* 372:153-161.
- Ko MS, Takahashi N, Sugiyama N, Takano T (1989): An auto-inducible vector conferring high glucocorticoid inducibility upon stable transformant cells. *Gene* 84:383-389.
- Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, Bujard H, Ylä-Herttuala S (2003): Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2^S-M2 shows a tight control of gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 10:459-466.
- Mangeot P-E, Duperrier K, Nègre D, Boson B, Rigal D, Cosset F-L, Darlix J-L (2002): High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol Ther* 5:283-290.
- Ramenzani A, Hawley TS, Hawley RG (2000): Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-467.
- Ray P, Tang W, Wang P, Homer R, Kuhn C, Flavell RA, Elias JA (1997): Regulated overexpression of interleukin 11 in the lung. Use to dissociate development-dependent and -independent phenotypes. *J Clin Invest* 100:2501-2511.
- Saez E (2000): Identification of ligands and co-ligands for the ecdysone-regulated gene switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:14512-14517.
- Saez E, No D, West A, Evans RM (1997): Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotech* 8:608-616.
- Schweinfest CW, Graber MW, Henderson KW, Pappas TS, Baron PL, Watson DK (1998): Cloning and sequence analysis of Hsp89alpha DeltaN, a new member of the Hsp90 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1398:18-24.
- Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K (1996): The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87:4998-5005.
- Smith-Arica JR, Morelli AE, Larregina AT, Smith J, Lowenstein PR, Castro MG (2000): Cell-type-specific and regulatable transgenesis in the adult brain: adenovirus-encode combined transcriptional targeting and inducible transgene expression. *Mol Ther* 2:579-587.
- Tichelaar JW, Lu W, Whitsett JA (2000): Conditional

- expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J Biol Chem* 275:11858-11864.
21. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *The National Academy of Sciences* 97: 7963-7968.
 22. Vadhan-Raj S, Verschraegen CF, Bueso-Ramos C, Broxmeyer HE, Kudelka AP, Freedman RS, Edwards CL, Gershenson D, Jones D, Ashby M, Kavanagh JJ (2000): Recombinant human thrombopoietin attenuates carboplatin-induced severe thrombocytopenia and the need for platelet transfusions in patients with gynecologic cancer. *Ann Intern Med* 132:364-368.
 23. Vize PD, Michalska AE, Ashman R, Lloyd B, Stone BA, Quinn P, Wells JRE, Seamark RF (1988): Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci* 90:295-300.
 24. Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, O'Malley BW, Roop DR (1999): Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor β 1 the epidermis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8483-488.
 25. Yarranton GT (1992): Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 3:506-511.
 26. Zhu Q, Ricardo RR, Zhang L, Ogueta SB, Agrawal RS, Dzau VJ, Marasco WA (2004): Development of constitutive and inducible self-inactivating lentiviral vectors and their application in cardiovascular gene transfer. *Gene Ther Mol Biol* 8:91-102.
 27. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
(접수일자: 2007. 8. 9 / 채택일자: 2007. 9. 7)