

## Tetracycline으로 발현이 유도되는 Retrovirus Vector System을 이용한 Human *Lactadherin* 유전자의 전이와 발현

이용석 · 오훈규<sup>1</sup> · 권모선<sup>2</sup> · 박창식<sup>3,4</sup> · 김태원<sup>2,4</sup> · 박재복<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 병리학교실

## Inducible Expression of the *Lactadherin* Gene with a Reverse Tetracycline-Regulated Retroviral Vector System

Lee, Y. S., H. K. Oh<sup>1</sup>, M. S. Kwon<sup>2</sup>, C. S. Park<sup>3,4</sup>, T. Kim<sup>2,4</sup> and J. B. Park<sup>†</sup>

Department of Pathology, Catholic University of Daegu School of Medicine

### ABSTRACT

Lactadherin (formerly known as BA46), a major glycoprotein of the human milk fat globule membrane, is abundant in human breast milk and breast carcinoma cells and is known to prevent symptomatic rotavirus infections. In this study, we tried to transfer the human *lactadherin* gene to the Chinese Hamster Ovary (CHO) cells using retrovirus vector system and tested inducible expression of the gene under the tetracycline-controllable promoter. At first, tetracycline-mediated inducibility was tested using *E.coli LacZ* marker gene. NIH3T3 cells co-infected with RevTet-On and RevTRE-LacZ retrovirus vectors showed that the cells responded to doxycycline (a derivative of tetracycline) in a dose-dependent manner, and prominent induction of the *lacZ* gene expression was observed from 1  $\mu$ g/ml of doxycycline concentration. Based on the results of the pilot experiment, inductional expression of the human *lactadherin* gene was conducted using RevTet-On and RevTRE-Ltd retrovirus vectors. Analysis with the RT-PCR demonstrated successful inductional expression of the *lactadherin* gene in the Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Considering that constitutive overexpression of the exogenous genes in the target cells causes serious physiological imbalance, the results obtained in this study will be very useful especially in the studies of gene therapy and transgenic animal production.

(Key words : *Ltd* gene, Inducible expression, Doxycycline, CHO cell, RT-PCR)

\* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-01000-0)지원으로 수행되었음.

<sup>†</sup> Corresponding Author: Tel: 053-650-4155, E-mail : jbpark@cu.ac.kr

<sup>1</sup> 계명대학교 의과대학 병리학교실(Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine).

<sup>2</sup> 대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실(Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine).

<sup>3</sup> 충남대학교 동물자원과학부(Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University).

<sup>4</sup> 충남대학교 형질전환복제돼지 연구센터(Research Center for Transgenic Cloned Pig, Chungnam National University).

## I. 서 론

Rotavirus는 유아기의 어린이들에게 주로 감염되어 급성설사를 일으키는 virus로 이로 인하여 때때로 심한 탈수증과 함께 발육과 성장의 저해, 그리고 심하면 생명에 커다란 영향을 미쳐 세계적으로 매년 44만 정도의 사망자를 내고 있는 것으로 보고되고 있다(Parashar 등, 2003). 또한 가축에도 큰 피해를 주는데 특히 자돈과 송아지 등의 설사로 인한 가축의 폐사는 천문학적인 경제적 손실을 가져오기도 한다. 이 rotavirus의 감염을 억제하는 것으로 알려진 물질인 lactadherin은 rotavirus가 다른 분자와 결합하는 능력과 감염성을 약화시켜서 그 바이러스의 번식을 억제하는 것으로 밝혀졌다(Newburg 등, 1998). 분자량이 46 Kd인 lactadherin은 인간의 유선세포와 유방암 세포에서 주로 발현되며(Taylor 등, 1997), pH 4 이하의 위산에서 변성되지 않는 생화학적 특성으로 인해 그 정제가 기술적으로 매우 간편하고(Peterson 등, 1998), 다른 약품들과는 달리 대량 생산 후 이유식이나 분유에 혼합하여 간편하게 복용시킬 수 있다는 장점을 지니고 있다. 이러한 측면에서, 생명공학기술을 이용한 lactadherin의 대량 생산은 국민의 보건뿐만 아니라 소모성질환의 예방을 통한 가축의 생산성 향상에 기여하여 경제적으로도 큰 가치를 창출할 수 있다.

본 연구에서는 *in vivo*에서 lactadherin을 생산하기 위한 기초실험으로 retrovirus vector를 이용한 효과적인 유전자의 전이 및 발현 system을 *in vitro*에서 확립하고자 한다. 유전자의 전이와 발현을 위해 사용하는 retrovirus vector system의 장점은 다른 유전자 전이 system과 비교하여 월등히 높은 유전자 전이율과 표적세포의 염색체내로의 삽입으로 인한 전이되는 유전자의 안정성이다. 그러나 형질 전환 동물의 생산에 retrovirus vector system을 비롯한 대부분의 유전자전이 system을 이용할 때 해결하여야 할 가장 큰 문제점은 외래 단백질의 지속적인 발현으로 유발되는 생리적인 유해성을 어떻게 극복하느냐에 있다. 이를 해결하기 위한 수단으로 현재 가장 광범위하게 사용되고 있는 유전자

발현의 유도 system은 10여 년 전에 Gossen 등에 의해 개발된 tetracycline-controlled transactivator (tTA) system (Gossen과 Bujard, 1992)과 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) system (Gossen 등, 1995) 등을 들 수 있다.

현재 사용중인 이들 두 가지 system 중에서 Tet-On system이 Tet-Off system에 비해 유전자의 발현의 시작과 종료(on/off)가 훨씬 더 신속하게 일어나는 것으로 보고되어 있다(Zhu 등, 2002). 따라서 외래 유전자의 발현을 개체나 세포의 단시간 내의 반응이나 영향을 연구하기 위해서는 Tet-On system이 Tet-Off system보다 우수한 것으로 판단된다.

기존에 사용한 중금속이나 steroid hormone, heat shock 등에 의해 유전자의 발현이 유도되는 system은 발현의 조절이 불완전한 경우가 많았으며 유도체 자체의 세포 독성과 부정적인 영향이 많은 것으로 보고되었다. 이에 비해 Tet-On system은 매우 특이적이며 tetracycline이 매우 낮은 농도에서 발현 효과를 볼 수 있기 때문에 세포 자체의 독성을 유발할 가능성이 매우 적은 것으로 보고되고 있다(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996). 이러한 장점에 근거하여 본 연구에서는 기존의 retrovirus vector system에 tetracycline으로 원하는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 system을 도입하여 목표 유전자인 lactadherin 유전자의 유도적 발현을 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포에서 확인하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 명 명

Plasmid DNA를 지정하는 경우에는 접두어로 "p"를 사용하였으며(예를 들어 pLNβZ), virus producing cell에서 생산된 virus를 명명하는 경우에는 "p"를 사용하지 않았다(예를 들면 LNβZ). Helper cell에 plasmid DNA를 transfection하여 구축된 virus producing cell의 명명은 helper cell의 명칭 뒤에 plasmid 명칭을 연결하였고(예를 들면 PT67-pRevTRE-LacZ), virus producing cell에서 생산된 virus를 표적세포에 감염시켜 구축된 세포주인 경

우에는 cell의 명칭 뒤에 virus 명칭을 결합시켰다 (예를 들면 CHO- RevTRE-LacZ).

## 2. 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA)과 NIH3T3, 293mGPHy (Kim 등, 2001) packaging cell line은 10%의 Fetal Bovine Serum (FBS; HyClone)과 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL 12800-017)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. CHO 세포는 10%의 FBS와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 Ham's F-12 Medium (GibcoBRL 21700-075)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다.

## 3. Tetracycline-inducible retrovirus vector system의 구축

본 실험에 선행하여 *E. coli LacZ* 유전자를 표지 유전자로 사용하기 위하여 pLNβZ의 *LacZ* 유전자 조각을 Hind III와 Sal I 으로 절단한 후 이를 pTRE에 LTR (Long Terminal Repeat)을 비롯한 몇 개의 retrovirus vector에 필요한 DNA 조각이 첨가된 plasmid인 pRevTRE vector (Clontech, USA)의 multi-cloning site의 Hind III와 Cla I 위치에 cloning 하여 pRevTRE-LacZ를 재조합하였다(Fig. 1). Tetracycline에 의해 사람의 *lactadherin* 유전자가 발현이 유도되게끔 고안된 pRevTRE-Ltd는 pGEM-Ltd의 *Ltd* 유전자를 Hind III와 Sal I 으로 절단한 후 이를 pRevTRE vector의 Hind III와 Sal I 위치에 cloning하여 재조합하였다(Fig. 2). 새로 재조합된 vector들은 Qiagen maxiprep kit을 이용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

## 4. Retrovirus vector의 생산

Tetracycline에 의해 *LacZ* 혹은 *Ltd* 유전자 발현이 유도되는 retrovirus vector system을 구축하기 위해서는 한 쌍의 plasmid, 즉 앞에서 구축한 pRevTRE-LacZ (혹은 pRevTRE-Ltd)와 pRevTet-On (Cl-

ontech, USA) plasmid가 필요하다.

Tetracycline의 유도에 의해 *E. coli LacZ* 유전자가 발현되는 system을 완성하기 위해서는 먼저, pRevTRE-LacZ와 pRevTet-On의 두 가지 plasmid DNA를 calcium phosphate의 침전을 이용하는 방법으로 PT67 packaging cell에 transfection한 후, 각각 hygromycin (200 µg/ml, pRevTRE-LacZ가 transfection된 세포의 경우) 혹은 G418 (500 µg/ml, pRevTet-On이 transfection된 세포의 경우)이 첨가된 선별 배양액으로 2주간 선별하여 PT67-pRevTRE-LacZ와 PT67-pRevTet-On virus producing cell line을 확립하였다. 각각의 세포를 DMEM/FBS에서 48시간 배양한 후 수확한 배양액을 표적세포의 감염(co-infection)에 사용하였다.

*Ltd* 유전자의 경우는 *LacZ* 유전자의 경우와 동일한 과정을 통해 PT67-pRevTRE-Ltd와 PT67-pRevTet-On virus producing cell line을 확립하였다. 확립한 각각의 세포를 DMEM/FBS에서 48시간 배양한 후 배양액을 수확하여 표적세포의 감염(co-infection)에 사용하였다.

## 5. Tetracycline-inducible retrovirus vector system을 이용한 *E. coli LacZ* 유전자의 발현 유도 및 확인

전 단계에서 수확한 PT67-pRevTRE-LacZ와 PT67-pRevTet-On virus producing cell의 virus가 함께 포함된 배양액을 표적세포인 NIH3T3에 순서대로 감염시켜서 각각 hygromycin (200 µg/ml)과 G418 (800 µg/ml)으로 선별하여 NIH3T3-RevTet-On/RevTRE-LacZ 세포를 확립하였다. 확립한 세포의 *LacZ* 유전자의 발현에 있어서 가장 적절한 항생제의 종류와 농도를 찾기 위하여 tetracycline과 doxycycline을 1 ng에서 10 µg의 농도의 범위로 처리한 후 48시간 동안 37°C에서 배양하여 *LacZ* 유전자의 발현 정도를 비교하였다. 세포의 배양액 제조에 사용한 FBS는 혈청 자체에 함유되어 있을 수도 있는 미량의 tetracycline으로 인한 실험 결과의 부정확성을 최소화하기 위하여 tetracycline-free FBS를 사용하였다. *LacZ* 유전자의 발현은 발색시약인 ONPG (ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)를 첨가하

여 *LacZ* 유전자에 의해서 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 가수분해로 인한 색의 변화를 통해 그 발현 정도를 비교하였는데 ONPG assay 방법은 다음과 같다. 100 mm 접시에 과밀하게 자란 세포를 trypsinization하여 PBS 1 ml에 재부유한 후 10초간의 원심분리로 생긴 세포 덩어리를 1 ml의 Tris-HCl (0.25 M)에 다시 재부유한다. 재부유된 세포를 액체질소에 30초간 넣었다가 37°C로 옮기기를 3번 정도 반복하여 세포를 깼 후 4°C, 12,000×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수한 30  $\mu$ l의 상층액을 0.7 ml의  $\beta$ -mercaptoethanol (0.27%)이 첨가된 Z buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16.1 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5.5 g/l, KCl 10.75 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.246 g/l)와 160  $\mu$ l의 ONPG (4 ng/ml)와 혼합한 다음 30°C에서 30분간 반응시킨 후 반응물의 색이 노란색으로 변하면 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 을 0.4 ml 넣어 반응을 중지시킨 후 상층액의 OD<sub>420</sub>값을 측정하여  $\beta$ -galactosidase의 활성도를 결정하였다.

RNA는 48시간 동안 배양한 세포에 trizol을 가하여 분리하였으며 이 RNA를 template로 하여 RT-PCR을 실시하였다. 분리한 RNA는 50 pmole의 primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 5 U AMV 역전사효소(Reverse Transcriptase) (Promega), 5 U *T7*/DNA Polymerase (Promega), 그리고 AMV/Tfl 5×Reaction Buffer (Promega)로 구성된 reaction mixture와 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48°C에서 45분간 반응한 다음, AMV 역전사효소의 활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94°C에서 2분간 반응시켰다. 2차 cDNA 합성과 PCR을 위하여 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72°C에서 5분간 방치하였다. 반응에 사용한 primer의 서열은 + strand primer로 5'AAATGGCTTTCGCTACCTGGA3'과 - strand primer로 5'GGTAGTTCAGGCAGT TCAATC3'을 사용하였다.

#### 6. 감염세포에서의 $\beta$ -Galactosidase assay

감염된 세포에서 *E. coli LacZ* 유전자의 유도적

발현을 확인하기 위하여 doxycycline를 48시간동안 처리한 세포와 doxycycline를 처리하지 않고 배양한 세포를 Sanes 등(1986)의 방법으로 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) staining하였다. Staining한 세포는 광학현미경 상에서 관찰한 후 사진 촬영하였다.

#### 7. Tetracycline-inducible retrovirus vector system을 이용한 *Ltd* 유전자의 발현 유도과 확인

Virus producing cell line인 PT67-pRevTet-On과 PT67-pRevTRE -Ltd에서 생산된 virus를 CHO 세포에 감염시킨 후 hygromycin (200  $\mu$ g/ml)과 G418 (500  $\mu$ g/ml)으로 선별하여 CHO-RevTet-On/RevTRE-Ltd cell line을 확립하였다. *Ltd* 유전자의 유도적 발현 여부의 확인은 확립한 CHO-RevTet-On/RevTRE-Ltd 세포를 DMEM/tetracycline free FBS에 doxycycline (1  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배양액에서 48시간 배양한 후, 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시함으로써 이루어졌다. 각 반응에서 사용한 primer의 sequence는 *Ltd* 유전자에 해당하는 것으로, + strand primer로 5'AGTAAGATCTCCCTGGCAAC3'과 - strand primer로 5'GAAAACAGGACAGTGAGGACT3'을 사용하였다. RT-PCR은 48°C에서 45분간 반응한 다음 94°C에서 2분간 반응시켰다. 2차적 cDNA의 합성과 PCR 증폭을 위하여 94°C에서 30초, 48°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 72°C에서 5분간 방치하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Tetracycline-controlled retrovirus vector system의 확립과 *E. coli LacZ* 유전자의 발현 유도

효율적인 유도 system이 갖추어야 할 조건으로는 외부에서 매개체(mediator)가 공급되었을 경우에만 조절인자(regulator)가 활성을 나타내며, 외부의 자극이 제거되었을 경우에는 즉시 활성이 사라져야 한다(Watsuji 등, 1997). 이 때 사용되는 매개체는 세포나 개체에 있어서 쉽게 흡수되고 독성을 나타내지 않아야 하며 경구 투여에도 활성을 가져

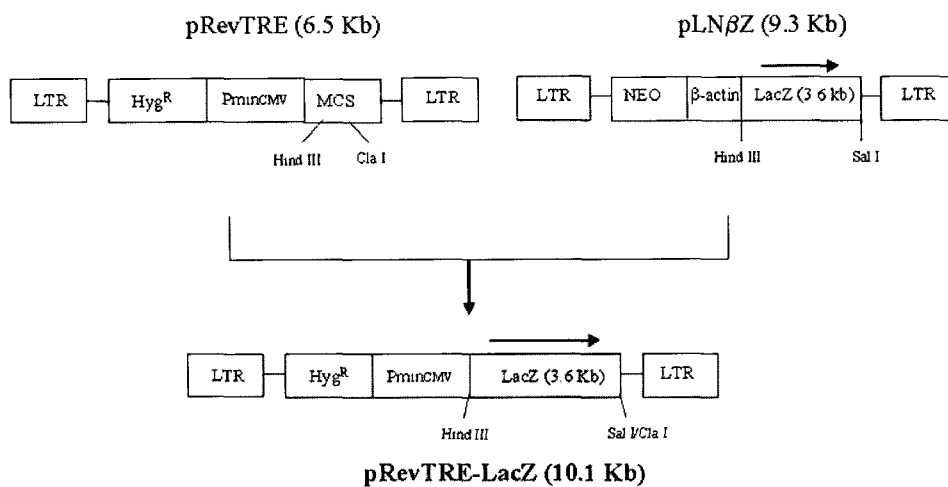


Fig. 1. Construction of pRevTRE-LacZ retrovirus vector. TRE, Tet-response element; LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; β-actin, rat β-actin promoter; LacZ, *E. coli* LacZ gene; P<sub>minCMV</sub>, human cytomegalovirus immediate early minimal promoter; MCS, multi cloning sites. The pRevTRE-LacZ was constructed by filling the multi cloning sites of the pRevTRE with LacZ fragment derived from pLNβZ. Length of each sequence is not drawn to scale.

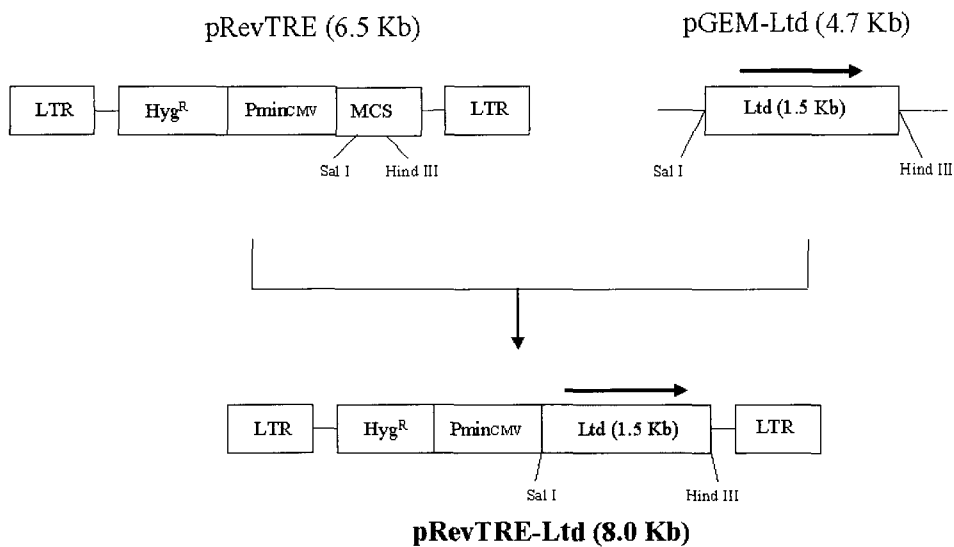


Fig. 2. Construction of pRevTRE-Ltd retrovirus vector. TRE, Tet-response element; LTR, long terminal repeat; Neo, G418 resistant gene; Ltd, human *Lactadherin* gene; P<sub>minCMV</sub>, human cytomegalovirus immediate early minimal promoter; MCS, multi cloning sites. The pRevTRE-Ltd was constructed by filling the multi cloning sites of the pRevTRE with Ltd fragment derived from pGEM-Ltd. Length of each sequence is not drawn to scale.

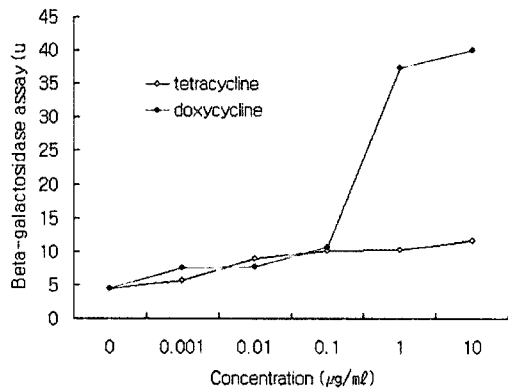
야 하고 적당한 시간이 경과되면 체내에서 분해되거나 배출될 수 있어야 한다. 세포나 개체르 전이된 외래 유전자는 비유도(non-inductional) 조건에서 가능한 한 최소한의 발현 정도를 보여야 하고 유도 조건에서는 신속하게 발현 정도가 최대한 높아져야 한다(Rossi 등, 1998). 또한 이 system의 구성 요소가 세포 본래의 유전자나 요소에 대해서는 활성을 나타내지 않아야 하며 세포의 조절 기전을 방해하지 않아야 한다. 이외에도 외래 유전자가 도입된 세포나 개체는 transactivator protein에 대해서 낮은 면역생성력(immunogenicity)을 나타내는 것이 이상적이다(Rossi 등, 1998).

원핵세포, 진핵세포, 그리고 virus성 단백질 등으로 구성되어 있는 tetracycline-inducible system의 chimeric transactivator는 표적세포 본래의 유전자와 상호 작용을 거의 유발시키지 않는다. 뿐만 아니라, 유도제로 사용되는 doxycycline의 양은 매우 소량이어서 세포에 미치는 독성이 거의 나타나지 않으며 유전자의 발현 조절 정도가 다른 system에 비하여 탁월한 것으로 인정되고 있다 (Bohl et al., 1997; Mayford et al., 1996). 그러나 본래의 tTA system은 tTA가 고 발현되도록 조절할 경우 세포에 독성을 유발시키는데 이는 아마도 tTA의 transcription activation domain인 VP16이 전사 기전의 필수 요소를 희석시킴으로써 세포내의 다른 유전자의 발현을 억제하는 squelching effect때문인 것으로 보인다(Sadowski 등, 1988; Strathdee 등, 1999). 또한 이 tTA system은 유도되지 않은 상태에서 발현되는 정도(background)가 비교적 높을 뿐만 아니라(Ackland-Berglund와 Leib, 1995), 발현이 억제된 상태를 유지하기 위해서는 tetracycline의 지속적인 처리가 필요하다. 이 외에도 외래 유전자의 발현이 시작 혹은 종료(turn on/off)되는 데 소요되는 시간이 긴 것으로 나타났다. 이에 비하여 rtTA system은 원하는 유전자의 발현이 시작 혹은 종료에 소요되는 시간이 짧으며 doxycycline의 체내에 축적되는 속도에 비해 배출되는 속도가 더 빠른 것으로 나타났다(Urlinger 등, 2000). 실제로 생쥐의 뇌에서 외래 유전자의 활성은 기존의 tTA system을 이용할 경우는 doxycycline를 제거한 후

15일에서 20일 경과한 후 관찰되었으나 rtTA system에서는 doxycycline 첨가 후 3일에서 5일 경과 후 활성이 나타났다(Mansuy 등, 2000).

이상과 같은 rtTA system의 장점으로 말미암아 이 system을 동물의 유전자 치료 모델에 적용하여 외래 유전자의 발현을 관찰한 연구가 많이 보고되었다(Bohl 등, 1998). 또한 이 system은 형질전환 동물 모델의 다양한 조직과 기관에서 여러 외래 유전자의 유도적 발현을 목표로 사용되고 있다. Kistner 등(1996)은 doxycycline를 응용시킨 형질전환 생쥐의 척장 조직에서 reporter 유전자의 발현 활성이 대조군보다  $10^4$  배 이상 유도되는 것을 보고하였고, Lamartina 등 (2003)은 Internal Ribosome Entry Site (IRES) 서열이 첨가된 rtTA system을 이용하여 생쥐에서 erythropoietin (EPO)와 serum alkaline phosphatase (SEAP) 유전자의 유도적 활성을 확인하였으며, SEAP의 경우는 원숭이에서도 유도적 활성을 측정하였다.

본 연구에서는 retrovirus vector system을 이용하여 CHO 세포에 tetracycline에 의해 발현이 제어되는 promoter 하의 *lactadherin* 유전자를 전이시킨 후 *lactadherin*이 tetracycline에 의해 발현이 유도되는지의 여부를 실험하였다. 본 실험에 앞선 기초실험으로 2가지의 RevTRE-LacZ와 RevTet-On virus를 NIH3T3에 감염시킨 후 이 세포(NIH3T3-RevTRE-LacZ/RevTet-On)를 이용하여 *LacZ* 유전자의 발현에 가장 적절한 항생제의 종류와 농도를 선별하였다. ONPG 분석방법을 이용하여 비교한 결과 항생제는 doxycycline이 tetracycline에 비해 발현의 유도 정도가 현저히 우월하였고 투여량에 비례하여 반응정도가 증가하는 양상을 나타내었으며 최대의 반응은 doxycycline 농도가  $1 \mu\text{g/ml}$  이상부터 관찰되었다(Fig. 3).  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 doxycycline를 이용한 다음의 실험에서는 *LacZ* 유전자 발현의 유도성을 mRNA 전사 정도로 확인하였다. 앞의 실험과 동일한 NIH3T3-RevTet-On/RevTRE-LacZ 세포로부터 RNA를 분리한 다음 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행한 결과 525 bp의 *LacZ* 유전자에 해당하는 band를 확인하였으며 48시간 동안 doxycycline를 처리한 군이 대조군에 비해 *LacZ* 유

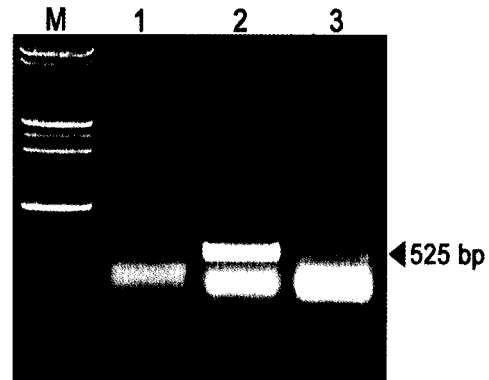


**Fig. 3.** Dose-response curve for the NIH3T3-Rev Tet-On/RevTRE-LacZ cell line. Cells were cultured for 48 hours at various concentration of tetracycline or doxycycline, then subjected to ONPG assay to determine  $\beta$ -galactosidase activity. Quantification of  $\beta$ -galactosidase was done using the following equation:  $\beta$ -gal unit =  $1,000 \times (OD_{420}/t \cdot v \cdot OD_{600})$ , where  $t$  = time of incubation in minutes,  $v$  = volume of cell culture added to z-buffer in ml.

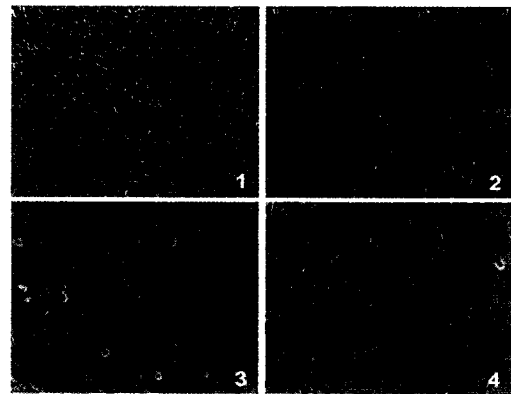
전자의 mRNA 양이 약 7배 이상임을 densitometer로 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 동일 세포에서 *LacZ* 유전자의 발현에 의해 생산된  $\beta$ -galactosidase의 생산을 시각적으로 확인하기 위하여 실시한 X-gal 염색에서도 doxycycline를 처리한 세포는 대조군에 비해  $LacZ^+$  세포의 수가 현저히 많을 뿐만 아니라, 개개의  $LacZ^+$  세포를 현미경으로 관찰하였을 때 *LacZ* 유전자의 발현의 척도인 푸른색의 농도가 doxycycline 처리 군이 대조군에 훨씬 높음을 확인하였다(Fig. 5).

## 2. Tetracycline-controlled retrovirus vector system을 이용한 *Ltd* 유전자의 발현 유도

앞에서의 예비실험의 결과들을 바탕으로 Rev Tet-On과 RevTRE-Ltd retrovirus vector를 이용하여 사람의 lactadherin 유전자의 유도적 발현을 검정하였다. CHO 세포에서 *lactadherin* 유전자의 유도적 발현을 RT-PCR 기법을 이용하여 확인한 결



**Fig. 4.** Determination of doxycycline induction of the *E. coli LacZ* gene in NIH3T3 cell using RT-PCR. M: 100 bp ladder, 1: H<sub>2</sub>O, 2: NIH3T3-RevTet-On/RevTRE-LacZ cells grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml), 3: Same cells grown in the doxycycline-free media.



**Fig. 5.** Induction of the *E. coli LacZ* gene expression in NIH3T3-RevTet-On/RevTRE-LacZ cells as detected under the light microscope after X-gal staining. 1 and 3; Non-induced condition by culturing cells in the doxycycline-free media. 2 and 4; Induced condition by culturing the cells in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml). Magnifications: 40 × (1 and 2), 100 × (3 and 4).

과 doxycycline의 유도효과는 대조군에 비하여 약 3배 이상임을 densitometer로 확인하였다(Fig. 6).

본 연구에서는 이상의 연구결과로써 retrovirus vector system과 Tet-On system을 결합하여 *in vitro*에서 *LacZ* 유전자와 *lactadherin* 유전자를 효율적으로 발현할 수 있음 증명하였다. 따라서 이러한 복합 system을 형질전환동물의 생산에 이용할 경우, retrovirus vector system의 높은 유전자 전이 및 발현율과 Tet-On system의 효율적인 유전자 발현의 유도성으로 형질전환동물 생산의 성공률을 보다 제고할 수 있을 뿐만 아니라 또한 생산된 형질전환 동물의 생리적 부작용을 최소화 할 수 있으리라 예상된다. 뿐만 아니라, 이러한 유전자 전이 및 발현 system은 사람의 유전자 치료에도 직접 응용이 가능하리라 생각된다. 그러나 *in vivo*에 적용할 경우에는 PLAP (liver enriched activator protein promoter) (Kistner 등, 1996), hSP-C promoter (human surfactant protein-C promoter) (Tichelaar 등, 2000), rCCSP promoter (rat Clara cell secretory protein promoter) (Tichelaar 등, 2000; Zhu 등, 2001) 등과 같은 조직 특이성(tissue specific) promoter의 조절을 받을 수 있도록 *tTA*나 *rtTA* 유전자

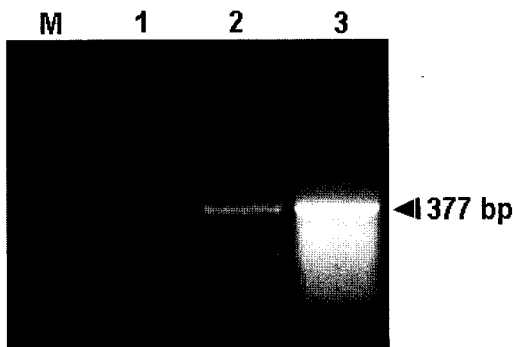
를 위치시킴으로써, 외래 유전자의 발현이 tetracycline과 조직 특이성 promoter에 의해 이중적으로 조절이 되도록 하는 것이 필요하다고 생각한다.

#### IV. 요약

모유에 존재하는 유지방구의 막을 구성하는 주된 당단백질인 하나인 lactadherin(과거에는 BA46로 일컬어짐)은 rotavirus에 의한 감염증상을 예방하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 retrovirus vector system을 이용하여 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포에 tetracycline에 의해 발현이 제어되는 promoter 하의 *lactadherin* 유전자를 전이시킨 후 lactadherin이 tetracycline에 의해 발현이 유도되는지의 여부를 실험하였다. 먼저 기초 실험으로 대장균의 *LacZ* 유전자를 이용하여 tetracycline에 의한 유도 여부를 시험하였다. RevTet-On과 RevTRE-LacZ retrovirus를 동시감염시킨 NIH3T3는 doxycycline (tetracycline 유도체)에 의해 투여량에 비례하여 반응정도가 증가하는 양상을 나타내었으며 최대의 반응은 doxycycline 농도가 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상에서부터 관찰되었다. 이 예비실험의 결과를 바탕으로 RevTet-On과 RevTRE-Ltd retrovirus vector를 이용하여 사람의 *lactadherin* 유전자의 유도적 발현을 검정하였는데 CHO 세포에서 *lactadherin* 유전자의 유도적 발현을 RT-PCR 기법을 이용하여 확인하였다. 표적세포 내에서 외부에서 도입된 유전자가 지속적으로 발현될 경우 심각한 생리적 부작용을 야기시킨다는 사실을 감안할 때 본 실험의 결과는 유전자 치료와 형질전환동물의 생산에 크게 도움이 될 것으로 예상된다.

#### V. 인용문헌

1. Ackland-Berglund, C. E. and Leib, D. A. 1995. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type. *Biotechniques* 18:196-200.
2. Bohl, D., Naffakh, N. and Heard, J. M. 1997. Long-term control of erythropoietin secretion



**Fig. 6.** Determination of doxycycline induction of the human *Lactadherin* gene in CHO cells using RT-PCR. M: 100 bp ladder, 1: CHO-RevTet-On/RevTRE-Ltd was grown in the doxycycline-free media with tetracycline-free FBS. 2; CHO-RevTet-On/RevTRE-Ltd grown in the media supplemented with doxycycline (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).



- by doxycycline in mice with engineered primary myoblast. *Nature Med.* 3:299-305.
3. Bohl, D., Salvetti, A., Moullier, P. and Heard, J. M. 1998. Control of Erythropoietin Delivery by Doxycycline in Mice After Intramuscular Injection of Adeno-Associated Vector. *Blood* 92: 1512-1517.
  4. Gossen, M. and Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551.
  5. Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. and Bujard, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769.
  6. Kim, T., Lee, Y. M., Lee, H. T., Heo, Y. T., Yom, H.-C., Kwon, M. S., Koo, B. C., Whang, K. and Roh, K. S. 2001. Expression of the *E. coli LacZ* gene in chicken embryos using replication defective retroviral vectors packaged with vesicular stomatitis virus G glycoprotein envelopes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14:163-169.
  7. Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lübbert, H. and Bujard, H. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10933-10938.
  8. Lamartina, S., Silvi, L., Roscilli, G., Casimiro, D., Simon, A. J., Davis, M-E, Shiver, J. W., Rinaudo, C. D., Zampaglione, I., Fattori, E., Colloca, S., Paz, O. G., Laufer, R., Bujard H., Cortese, R., Ciliberto, G. and Toniatti, C. 2003. Construction of an rtTA2<sup>S</sup>-M2/tTS<sup>kid</sup>-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility and high responsiveness to Doxycycline in mice and non-human primates. *Mol. Ther.* 7:271-280.
  9. Mansuy, I. M. and Bujard, H. 2000. Tetracycline-regulated gene expression in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10:593-596.
  10. Mayford, M., Bach, M. E., Huang, Y.-Y., Wang, L., Hawkins, R. D. and Kandel, E. R. 1996. Control of mammary formation through regulated-expression of a CaMK transgene. *Science* 274:1678-1683.
  11. Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., Guerrero, M. L., Chaturvedi, P., Newburg, S. O., Scallan, C. D., Taylor, M. R., Ceriani, R. L. and Pickering, L. K. 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351:1160-1164.
  12. Parashar, U. D., Hummelman, E. G., Bresee, J. S., Miller, M. A. and Glass, R. I. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 9:565-572.
  13. Peterson, J. A., Hamosh, M., Scallan, C. D., Ceriani, R. L., Henderson, T. R., Mehta, N. R., Armond, M. and Hamosh, P. 1998. Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatr. Res.* 44:499-506.
  14. Rossi, F. M. V. and Blau, H. M. 1998. Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456.
  15. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. and Ptashne, M. 1988. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335:563-564.
  16. Strathdee, C. A., McLeod, M. R. and Hall, J. R. 1999. Efficient control of tetracycline-responsive gene expression from an autoregulated bi-directional expression vector. *Gene* 229:21-29.
  17. Taylor, M. R., Couto, J. R., Scallan, C. D., Ceriani, R. L. and Peterson, J. A. 1997. Lactadherin (formerly BA46), a membrane-associated glycoprotein expressed in human milk and breast carcinomas, promotes Arg-Gly-

- Asp(RGD)-dependent cell adhesion. *DNA Cell Biol.* 16:861-869.
18. Tichelaar, J. W., Lu, W. and Whitsett, J. A. 2000. Conditional expression of fibroblast growth factor-7 in the developing and mature lung. *J. Biol. Chem.* 275:11858-11864.
  19. Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H. and Hillen, W. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:7963-7968.
  20. Zhu, Z., Ma, B., Homer, R. J., Zheng, T. and Elias, J. A. 2001. Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 276:25222-25229.
  21. Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J. and Elias, J. A. 2002. Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Cell Develop. Biol.* 13:121-128.
- (접수일자: 2003. 6. 19. / 채택일자: 2003. 8. 8.)