

Retrovirus Vector System을 이용한 hPTH가 발현되는 돼지 세포의 구축

정지연¹ · 구본철¹ · 김남형¹ · 권모선 · 박성환² · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

초 록

골다공증 치료제로 이용되고 있는 hPTH는 체내의 혈중 칼슘 농도를 조절하는 인간의 부갑상선 호르몬이다. 본 연구에서는 hPTH를 효율적으로 생산하는 돼지세포를 구축하고자 다양한 retrovirus vector를 이용하였는데 다음과 같은 결과를 관찰하였다.

1) hPTH 유전자의 전이를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, 형질전환된 모든 돼지세포에서 420 bp의 hPTH에 해당하는 단편을 확인할 수 있었으며, WPRE가 도입되지 않은 실험군보다 WPRE 서열이 도입된 실험군에서 더 강한 밴드를 확인하였다.

2) ECLIA 측정 결과 hPTH 유전자가 도입된 모든 세포에서 hPTH가 생성되었으며, 특히 Tet-On system에서는 doxycycline을 처리한 실험군에서 hPTH의 발현이 유도되었음을 확인하였다. 또한 RT-PCR과 ECLIA를 수행하여 hPTH의 도입 여부와 단백질 생산을 비교한 결과, WPRE 서열이 hPTH 유전자의 downstream 위치에 도입된 실험군에서 가장 많은 단백질이 생산됨을 확인할 수 있었다.

(주제어 : hPTH, Tet-On system, Retrovirus vector, WPRE)

서 론

인간의 부갑상선 호르몬인 hPTH는 골다공증 치료제로 이용되고 있는 호르몬 중의 하나(Goltzman, 2002) 혈중 내 칼슘 농도를 증가시키는 역할을 한다. 골다공증은 호르몬 질환 등 여러 질환의 증세로도 생기지만 보통은 뼈의 노화현상으로 생기는 것이며(Christodoulou와 Cooper, 2003), 현재까지 알려져 있는 치료 방법은 골 질량이 감소되는 것을 막는 것이다. 현재까지 골질의 감소를 막는 결정적인 방법은 아직까지 보고되고 있지 않지만 운동이나 호르몬 대체, 칼슘 공급, 부갑상선 호르몬 및 비타민 D 공급 같은 대증요법들이 이용되고 있다(Lin과 Lane, 2002; Rubin과 Bilezikian, 2002; Watson 등, 1995). 특히 부갑상선 호르몬 요법은 조골 세포의 활성을 높이는 것으로 보고되고 있어 새로운 골 형성 치료제로써 관심의 대상이 되고 있다(Rubin과 Bilezikian, 2002). 본 연구에서는 human PTH를 생산하는 돼지 세포를 구축하고자 하였다. hPTH는 부갑상선에서 분비되는 호르몬으로 84개의 아미노산으로 구성된 단백질이다(Keutmann 등, 1978; Marx 등, 1995). hPTH는 체내에서 (i) 골의 칼슘 유출, (ii) 신장에서의 칼슘 재흡수 그리

고 비타민 D의 활성화를 통한 장에서의 칼슘 흡수 또는 촉진과 같은 작용을 통해서 혈중 내 칼슘 농도를 증가시키는 역할을 하는데 골다공증 환자에게 단기적으로 사용을 하면 골다공증 치료에 상당한 효과가 있는 것으로 알려져 있는 호르몬이다(Lanna 등, 2002).

본 연구에서는 이와 같이 이용성이 높은 hPTH를 생산하는 형질전환 돼지를 생산하기 위하여 hPTH 유전자를 효율적으로 발현하는 돼지세포를 구축하고자 한다. hPTH를 효율적으로 생산하는 돼지세포를 구축하기 위한 유전자 전이 방법으로는 retrovirus vector system을 이용하였다. 이 방법은 다른 유전자 도입방식에 비해 전이되는 유전자가 숙주세포의 genome 내로 삽입되기 때문에 유전적으로 안정성을 나타내며(Temin, 1989), 여러 종류의 세포에 다양한 외래 유전자를 높은 효율로 감염시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 이 방법은 감염성이 우수한 retrovirus의 부재, 고농도로 농축시 감염성의 저하, 숙주의 제한성 등과 같은 단점이 있다(Kim, 1995). 이러한 단점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 Burns 등(1993)이 개발한 VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)를 이용하여 종래의 retrovirus envelope을 대신하는 pseudotyped retrovirus vector system을 사용하였다. 또한 hPTH 유전자의 발현율을 증가시키기 위하여 기존의 retrovirus vector에 WPRE

* 본 연구는 "2002년~2005년 농림부 농림기술개발사업", "한국과학재단 우수 연구센터(R11-2002-100-01000-0)", "농촌진흥청 바이오그린 21 연구비"와 축산연구소의 지원으로 수행되었음.

¹ 충북대학교 축산학과(Department of Animal Science, Chungbuk National University)

² 대구가톨릭대학교 의과대학 일반외과(Department of General Surgery, Catholic University of Daegu School of Medicine)

[†] Corresponding author : Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, 712-702, Korea. TEL: 82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

서열을 도입하였으며, hPTH 유전자의 발현을 효율적으로 조절하기 위하여 Tet-On system (Zhu 등, 2002)을 도입하였다. WPRE 서열은 promoter의 종류, 세포의 종류, 위치에 상관없이 전사된다고 알려져 있으며(Zufferey 등, 1999), mRNA splicing에 관여하여 mRNA를 안정화시켜 결과적으로는 단백질 생산량을 증가시킨다(Popa 등, 2002). Tet-On system은 돼지 세포에서 hPTH 유전자의 발현을 조절하기 위해서 도입하였는데, tetracycline계의 물질에 의하여 발현이 조절되는 system이다(Kistner 등, 1996; Rennel와 Gerwins, 2002; Gossen 등, 1995; Yao 등, 1998). 따라서 이와 같은, controllable expression system 하에서는 외래 유전자의 발현을 통제할 수 있기 때문에 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 생리적 부작용들을 최소화할 수 있다(Zhu 등, 2002; Gossen과 Bujard, 1992). Tet-On system 상에서 inducible promoter의 역할을 하는 TRE (tetracycline-responsive element)는 rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator)와 tetracycline계의 물질이 함께 존재할 때 turn-on 되는데(Zhu 등, 2002), 유도물질로 더해지는 tetracycline계의 물질인 doxycycline은 의학용으로 널리 쓰이고 있으며, 독성 유발 가능성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Urlinger 등, 2000; Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996).

기존의 Tet system은 TRE 하의 외래 유전자를 발현시키는 vector와 rtTA 유전자를 발현시키는 vector로 구성되어 있다. 따라서 세포에 Tet-On-system을 도입하기 위해서는 2개의 vector가 동시에 transfection되어야 하는 문제점이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 Tet-On system의 발현에 필요한 rtTA 단백질을 coding하는 유전자 서열과 TRE 부분에 해당하는 서열이 하나의 vector에 위치한 Tet-On system을 구축하였다. 이 vector system에서는 RSV (*Rous sarcoma virus*) promoter (Zarrin 등, 1999)에 의해 발현된 rtTA와 세포배양액에 첨가한 doxycycline이 TRE promoter를 활성화시켜 결과적으로 hPTH 유전자가 발현된다. 세포내에서의 hPTH 유전자의 발현은 RT-PCR을 통해 확인하였으며, 세포배양액 속으로 분비된 hPTH 단백질은 ECLIA (Electrochemiluminescent Immunoassay) 방법을 통해 정량하였다.

재료 및 방법

Retrovirus Vector의 구축

RT-PCR을 통한 hPTH cDNA의 cloning : hPTH 유전자는 갑상선 암 환자로부터 적출한 부갑상선 조직의 RNA를 주형으로 50 pmole hPTH primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 5U AMV reverse transcriptase, 5U Tfl DNA polymerase, AMV/Tfl 5X Reaction Buffer로 만든 reaction mixture와 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48°C에서 45분간 반응한 다음 AMV reverse transcriptase의 불활성화와 RNA/cDNA/ primer의 denaturation을 위해 94°C에서 2분간 반응시켰다. 그 후, 생성된 cDNA의 PCR 증폭을 위해 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분간 반응하는 cycle을 35회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험

에 사용한 primer는 "+" strand primer인 5'-TCA GCATCAGCTACTAACATACCTG-3'와 "-" strand primer인 5'-CTGTTTTCATTTTCACTGGGATT-3'를 사용하였으며, 1.5% agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 hPTH 유전자에 해당하는 420 bp의 DNA 단편을 분리하였다. 분리한 hPTH DNA는 sequencing을 의뢰하였으며, 이를 GenBank에 수록되어 있는 hPTH 유전자 sequence와 비교하였다. 확인된 hPTH 유전자는 pGEM-T Easy vector (미국의 promega사로부터 구매)에 cloning하여 pGEM-T Easy-PTH를 구축하였으며, 구축된 vector는 Qiagen maxiprep kit (독일의 Qiagen 회사로부터 구매)를 사용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

pLNR-PTH와 pLNR-PTH-WPRE의 구축 : WPRE 서열은 본 연구실에서 이미 구축한 pGEM-T Easy-WPRE에서 분리하여 이용하였는데, 이는 WHV (woodchuck hepatitis virus) (Galibert 등, 1982) clone으로부터 WPRE 서열을 PCR한 후 pGEM-T Easy vector에 cloning하여 구축하였다. 앞에서 cloning한 pGEM-T Easy-PTH에서 분리한 PTH와 pGEM-T Easy-WPRE로부터 분리한 WPRE 서열을 pLNCX (미국의 Clontech사로부터 구매)에 도입한 후 pLXRN (미국의 Clontech사로부터 구매)에서 분리한 RSV promoter를 CMV promoter와 치환하여 pLNR-PTH와 pLNR-PTH-WPRE를 구축하였다(Fig. 1). 구축된 재조합 vector들은 Qiagen maxiprep kit를 사용하여 대량 분리한 후 다음 실험에 사용하였다.

Tetracycline Inducible Expression Vector의 구축 : 본 실험실에서 이미 구축한 pGEM-T Easy-PTH, pGEM-T Easy-WPRE, 그리고 pRevTRE-EGFP-RSV-rtTA^{2S}-M2와 Clontech에서 구입한 pRevTRE vector를 이용하여 pRevTRE-PTH-RSV-rtTA^{2S}-M2, pRevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA^{2S}-M2와 pRevTRE-PTH-RSV-rtTA^{2S}-M2-WPRE vector를 Fig. 1의 strategy에 의해 구축하였다. pRevTRE-EGFP-RSV-rtTA^{2S}-M2의 rtTA^{2S}-M2는 독일의 Hillen 박사로부터 증정받은 pUHRt62-1 (Urlinger 등, 2000)에서 분리한 것으로 현재까지 보고된 여러 reverse tetracycline-controlled transactivator 중에서 가장 우수한 것으로 알려지고 있다.

PFF (porcine fetal fibroblast)에 Recombinant hPTH DNA의 도입

재조합된 retrovirus vector DNA 10µg을 PT67 (Clontech, USA) virus packaging 세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection한 후 0.45 µm pore-size의 filter로 여과하여 준비한 virus를 packaging 세포인 GP293 (Clontech, USA)에 infection하였다. Infection된 packaging 세포주는 G418 (600 µg/ml; USB, USA) 혹은 hygromycin (150 µg/ml; Sigma, USA)이 첨가된 선별 용액에 3일에 한번씩 배양액을 바꿔주면서 2주간 선별하였다. 선별된 GP293 세포는 calcium phosphate 방법을 이용하여 20 µg의 pHCMVG (Yee 등, 1994)를 tranfection하여 8시간 배양 후 새로운 배양액으로 갈아주었다. 48시간 배양 후 0.45 µm pore-size의 filter로 여과한 retrovirus가 포함된 배양액 1 ml을 미리 60 mm dish당 1×10⁶으로 준비한 PFF 세포에 감염시켰다.

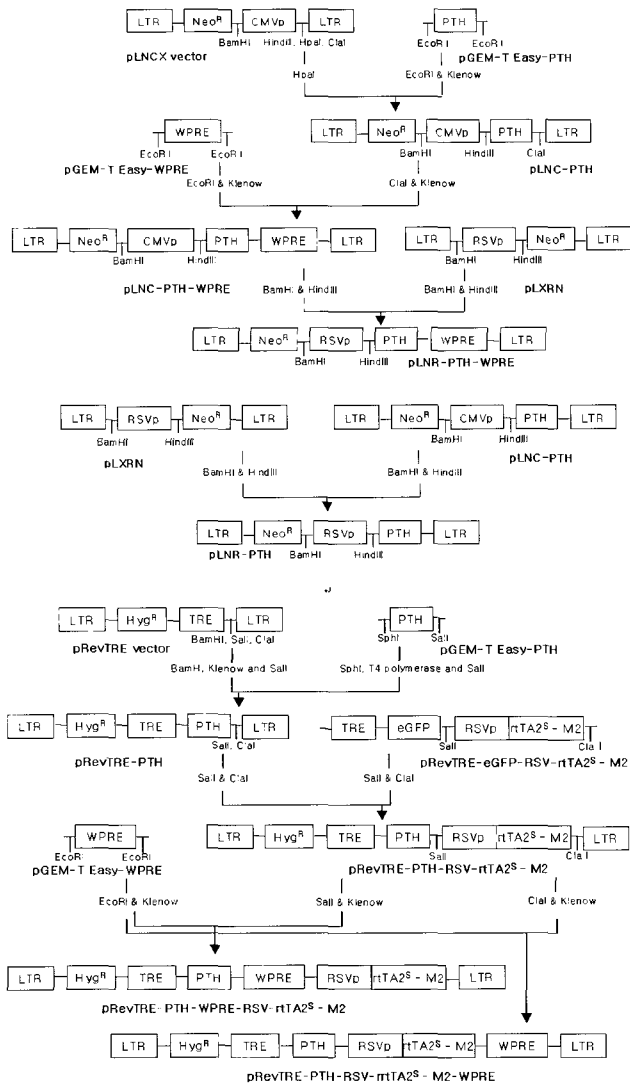


Fig. 1. Strategy of retroviral vectors. LTR, long terminal repeat; Neo^R, Neomycin resistance gene; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; CMVp, cytomegalovirus promoter; PTH, human parathyroid hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Hyg^R, Hygromycin resistance gene; TRE, tetracycline-responsive element; rtTA2^S-M2, reverse tetracycline-controlled transactivator.

감염된 PFF 세포는 G418(600 μg/ml; USB, USA) 혹은 hygromycin(150 μg/ml; Sigma, USA)이 포함된 선별 배양액에서 3일에 한번씩 배양액을 갈아주면서 2주간 선별하였다. 본 실험에서 사용한 PT67, GP293, PFF 세포는 10% FBS (fetal bovine serum; Hyclone)와 penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 μg/ml) (GibcoBRL)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, 4.5 g/l glucose; GibcoBRL)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다. 모든 transfection 실험에는 실험 전날 100 mm dish당 1 × 10⁶의 세포를 준비하여 사용하였으며, infection 실험에는 60 mm dish당 1 × 10⁶의 세포를 준비하여 사용하였다. 또한, infection시 감염 촉매제로 polybrene (5 μg/ml; Aldrich)을 첨가하였다.

hPTH 유전자의 발현 확인

RT-PCR을 이용한 hPTH 유전자의 확인 : 감염후 G418 혹은 hygromycin으로 선별된 PFF 세포로부터 Trizol 방법으로 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 50 pmole의 hPTH primer, 0.2 mM dNTP, 1 mM MgSO₄, 5U AMV reverse transcriptase, 5U Tfl DNA polymerase, AMV/Tfl 5X Reaction Buffer로 만든 reaction mixture와 혼합하여 RT-PCR을 수행하였다. 일차적 cDNA를 합성하기 위하여 48°C에서 45분간 반응한 다음 AMV reverse transcriptase의 불활성화와 RNA/cDNA/primer의 denaturation을 위해 94°C에서 2분간 반응시켰다. 그 후, 생성된 cDNA의 PCR 증폭을 위해 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 다음 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. "+" strand primer로 5'-TCAGCATCAGCTACTAACATAC CTG-3' sequence를 "-" strand primer로 5'-CTGTTT CA-TTTTCACTGGGATT-3' sequence를 사용하였으며, 1.5 % agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여 RT-PCR의 결과를 확인하였다.

ECLIA를 이용한 hPTH의 정량 : 감염 후 선별이 끝난 PFF-LNR-PTH와 PFF-LNR-PTH-WPRE 세포는 100 mm dish당 1 × 10⁶ 세포로 준비한 다음 24시간 배양 후 새로운 배양액으로 바꿔주었다. 또한 Tet-On system의 ECLIA 측정을 위해 PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2, PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA2^S-M2, PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2-WPRE 세포는 2 × 10⁶ cells/ 100 mm dish으로 준비하여 24시간 동안 배양 후 세포의 배양액을 doxycycline (2 μg/ml)이 첨가되거나 첨가되지 않은 배양액으로 교체하였다. 모든 형질전환 세포는 48시간 배양 후 배양액을 수확하여 ECLIA (Sanchez-Carbayo 등, 1999; Sakazono 등, 1998) 방법으로 단백질을 정량하였다. 또한, Tet-On system의 실험에 사용한 모든 FBS는 혈청 자체에 함유되어 있을 수도 있는 미량의 tetracycline으로 인한 실험 결과의 오차를 줄이기 위하여 tetracycline-free FBS를 사용하였다.

결과

hPTH의 염기서열

RT-PCR을 이용하여 cloning한 420 bp로 구성된 hPTH 유전자의 염기서열은 Fig. 3과 같다. GenBank에 수록된 hPTH의 DNA sequence와 비교하여 모든 염기가 일치함을 확인하였다.

RT-PCR을 통한 hPTH 유전자의 전이와 발현 확인

Retrovirus vector system에 의한 유전자 전이와 발현에 대한 확인은 hPTH가 전이된 PFF 세포의 RNA를 이용한 RT-PCR을 실시하여 확인하였다. hPTH primer로 RT-PCR을 수행한 결과 모든 세포주에서 420 bp의 hPTH에 해당하는 밴드를 확인할 수 있었으며, 이러한 결과로 hPTH 유전

자의 도입과 발현이 성공적으로 이루어진 것을 확인하였다. 단백질의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있는 WPRE의 효과 역시 RT-PCR을 수행하여 확인한 결과, WPRE 서열이 도입되지 않은 대조군에 비해 도입된 실험군에서 더 강한 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

또한, Tet-On system에서는 배양액에 doxycycline의 첨가여부에 관계없이 모든 세포에서 약간의 hPTH의 발현이 확인되었다. 그러나 virus vector에 WPRE 서열이 포함될 경우에는 doxycycline에 의한 induction 효과를 뚜렷이 볼 수 있었다(Fig. 4).

In vitro에서 생산된 hPTH 정량

본 연구에서는 돼지세포인 PFF 세포를 GP293 세포로부터 생산한 virus로 감염시켜 hPTH를 발현하는 돼지세포를 구축하였다. 구축된 돼지세포에서 수확한 배양액은 ECLIA 방법을 통해 hPTH를 정량하였는데 WPRE 서열이 도입된 PFF-LNR-PTH-WPRE (17,830 pg/ml) 세포에서는 PFF-LNR-PTH (22.9 pg/ml)에 비해 778배 많은 hPTH가 발현되는 것

```
TCAGCATCAGCTACTAACATACCTGAACGAAGATCTTGTCTAAGACATTGTATGTGAAG
M I P A K D M A K V M I V M L A I C F L
ATGATACCTGCAAAAGACATGGCTAAAGTTATGATTGTCATGTTGGCAATTTGTTTTCTT
T K S D G K S V K K R S V S E I Q L M H
ACAAAATCGGATGGGAAATCTGTTAAGAAGAGATCTGTGAGTGAATACAGCTTATGCAT
N L G K H L N S M E R V E W L R K K L Q
AACCTGGGAAAACATCTGAACTCGATGGAGAGATAGAATGGCTGCGTAAGAAGCTGCAG
D V H N F V A L G A P L A P R D A G S Q
GATGTGCACAATTTTGTGCOCTTGGAGCTCCTCTAGCTCCCAGAGATGCTGGTCCCAG
R P R K K E D N V L V E S H E K S L G E
AGGCCCGAAAAAGGAAGCAATGTCTTGGTTGAGAGCCATGAAAAAGTCTTGGAGAG
A D K A D V N V L T K A K S Q
GCAGACAAAGCTGATGTGAATGTATTAACCTAAAGCTAAATCCAGTGAAAATGAAAACAG
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of human PTH mRNA. The sequence of cDNA primers used in RT-PCR are shaded of underline.

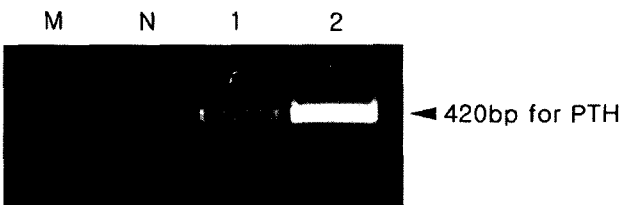


Fig. 3. RT-PCR analysis of hPTH gene expression in PFF cells. M, 100bp ladder; N, PFF cell; 1, PFF-LNR-PTH; 2, PFF-LNR-PTH-WPRE.

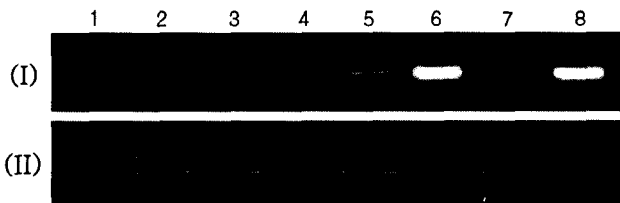


Fig. 4. RT-PCR analysis of the tetracycline-mediated hPTH gene expression. In (I), PFF cells were infected with no virus (1 and 2), PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2 (3 and 4), PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA2^S-M2 (5 and 6), PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2-WPRE (7 and 8), respectively. 1, 3, 5 and 7 lanes; no doxycycline treatment. 2, 4, 6 and 8 lanes; treated with doxycycline. For control, total RNA of each sample was electrophoresed to compare relative amount RNA sample used for RT-PCR (II).

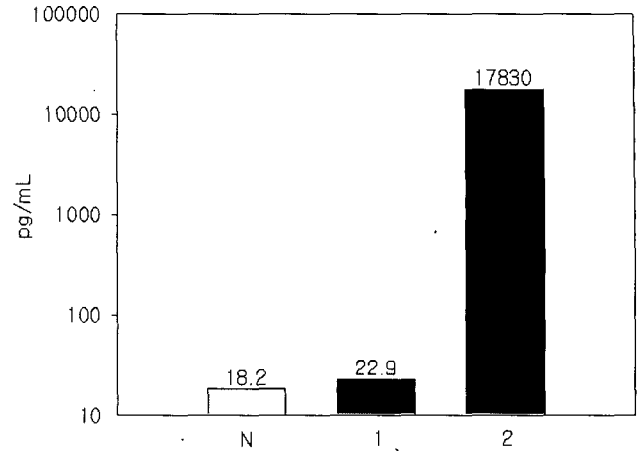


Fig. 5. ECLIA analysis of hPTH. N, PFF cells; 1 and 2, PFF cells infected with PFF-LNR-PTH and PFF-LNR-PTH-WPRE viruses, respectively. All cell culture media were harvested after 48 hours of incubation.

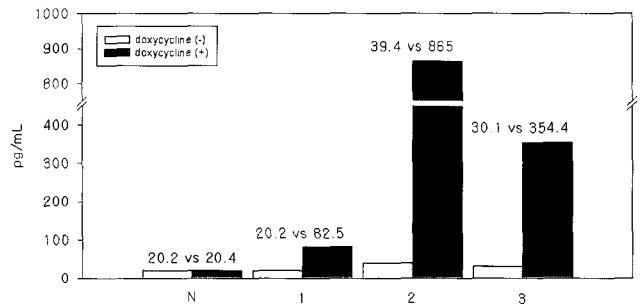


Fig. 6. Measurement of human PTH in culture media of PFF cells using ECLIA. PFF cells were infected with no virus (N), PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2(1), PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA2^S-M2(2), PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2-WPRE(3), respectively. All cell culture media were harvested after 48 hours of incubation.

을 확인하였다(Fig. 5).

Tet-On system에서의 hPTH 호르몬의 정량 결과, doxycycline이 첨가되지 않은 세포에서는 PFF 세포와 거의 유사한 것으로 보아 hPTH 유전자가 거의 발현되지 않았으나, doxycycline을 첨가하였을 때 PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2, PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA2^S-M2, PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2-WPRE에서 각각 4배, 22배, 12배의 hPTH 유전자의 발현 증가를 확인하였다(Fig. 6). 또한, 이 실험에서도 WPRE 서열이 hPTH 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였는데, rtTA2^S-M2 서열의 downstream에 위치할 때(PFF-RevTRE-PTH-RSV-rtTA2^S-M2-WPRE)보다 hPTH 유전자의 downstream에 위치하는 것이(PFF-RevTRE-PTH-WPRE-RSV-rtTA2^S-M2) hPTH의 발현을 더욱 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

고 찰

본 연구에서는 retrovirus vector system을 이용하여 hPTH 유전자를 효율적으로 생산하는 돼지세포를 구축하

고자 하였다. hPTH 유전자의 발현율을 증가시키기 위하여 WPRE 서열을 도입하였으며, 형질전환 가속 생산 시 외래 유전자의 지속적인 발현으로 일어날 수 있는 생리적 부작용(Vize 등, 1988)을 최소화하기 위하여 tetracycline계의 유도 물질에 의해 발현이 유도되는 Tet-On system을 이용하여 외래 유전자의 발현을 효율적으로 조절하는 돼지세포를 구축하고자 하였다. 구축한 다양한 vector를 PFF 세포에 도입하여 형질전환 돼지세포를 구축하였으며, hPTH 유전자의 발현과 도입 여부는 RT-PCR과 ECLIA 방법을 이용하여 확인하였다. RT-PCR을 수행한 결과 구축된 모든 돼지 세포에서 420 bp에 해당하는 hPTH를 확인하였으며, 특히 WPRE 서열이 도입된 실험군에서 훨씬 더 진한 밴드를 확인하였다(Fig. 3, 4). 이는 WPRE 서열이 mRNA의 post-transcriptoinal processing에 관여하여 결과적으로 WPRE가 포함된 mRNA의 양을 증가시키기 때문인 것으로 생각된다.

효율적인 외래유전자의 발현을 유도하기 위한 유전자 조절 system의 필수 조건은 유도물질이 공급되었을 경우에만 조절인자가 활성을 나타내어야 하며, 유도물질이 공급되지 않으면 활성이 사라져야 하는데(Watsuji 등, 1997), 이러한 조건에 부합하는 system이 바로 본 연구에서 도입한 Tet-On system이다. Tet-system에는 tetracycline계의 유도 물질이 계속 공급되어야만 발현이 억제되는 Tet-Off system과 tetracycline계의 유도 물질이 존재할 경우에만 유전자가 발현이 되는 Tet-On system이 있는데(Zhu 등, 2002) 본 연구에서는 Tet-On system을 이용하여 형질전환 돼지세포를 구축하였다. hPTH 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, doxycycline의 첨가 여부를 막론하고 형질전환된 모든 PFF 세포에서 hPTH에 해당하는 밴드를 확인하였는데(Fig. 4), doxycycline에 의한 유도 효과는 WPRE 서열이 존재할 때 훨씬 더 명확하였다. 비록 RT-PCR에서 doxycycline을 처리하지 않은 대조군에서도 약한 밴드가 확인되었지만, Tet-On system의 ECLIA 결과, doxycycline을 처리하지 않은 세포에서의 hPTH 발현은 대조군인 PFF 세포의 수치와 거의 일치하는 것으로 보아 실제 hPTH의 생산은 거의 되지 않음을 알 수 있었으며, doxycycline을 첨가한 실험군에서는 예상한 대로 hPTH 유전자가 유도 발현되어 호르몬이 생성됨을 확인하였다. 특히, WPRE 서열이 hPTH 유전자의 downstream에 위치한 세포에서의 발현율이 가장 높았다(Fig. 6).

이상의 결과를 종합하면 WPRE 서열은 형질전환 돼지세포에서 hPTH의 생성을 현저히 증가시킴을 확인할 수 있었다. Tet-On system에서는 WPRE 서열이 hPTH 유전자의 downstream에 위치했을 때 가장 단백질 생산이 많았다. 또한 RT-PCR로 측정된 바로는 본 연구의 Tet-On system은 hPTH의 발현에 있어서 약간의 leakiness를 보였으나(Fig. 4), 단백질 합성의 단계에서는 외래 유전자의 발현에 있어서 거의 완벽한 turn-On system임을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 hPTH의 발현이 효율적으로 조절되는 형질전환된 PFF 세포는 장차 외래유전자의 지속적인 발현으로 인한 생리적 부작용이 거의 없는 형질전환 돼지의 생산에 직접 사용될 수 있으며, 나아가 형질전환 동물을 통한 hPTH 이외의 다른 유용물질의 생산이나 유전자 치료에도 상당한 도움이 될 것으로 기대된다.

Retrovirus Vector-Mediated Construction of Porcine Cell Lines Expressing Human PTH

Jeong, J. Y., B. C. Koo, N. H. Kim, M. S. Kwon, S. H. Park and T. O. Kim

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

ABSTRACT

Human PTH (parathyroid hormone) is known to be efficacious for curing osteoporosis. In this study, we attempted to construct genetically modified porcine cell lines that can ultimately be used for donor cells in nuclear transfer-mediated transgenesis. By using retrovirus vectors carrying tetracycline-regulatory expression system and WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) sequence, we could control PTH expression with tetracycline and boost the promoter activity. Considering that low or constitutive expression of the transgene has been one of major problems that needs to be solved in transgenic animal studies, our results could be helpful in successful production of transgenic pigs as bioreactors.

(Key words : hPTH, Tet-On system, retrovirus vector, WPRE)

인용문헌

1. Bohl D, Naffakh N, Heard JM (1997): Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat Med* 3:299-305.
2. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
3. Christodoulou C, Cooper C (2003): What is osteoporosis?. *Postgrad Med J* 79:133-138.
4. Galibert F, Chen TN, Mandart E (1982): Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: comparison with the hepatitis B virus sequence. *J Virol* 41:51-65.
5. Goltzman D (2002): Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat Rev Drug Discov* 1:784-796.
6. 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.
7. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-

- 1769.
8. Keutmann HT, Sauer MM, Hendy GN, O'Riordan LH, Potts JT Jr (1978): Complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry* 17: 5723-5729.
 9. Kim, T (1995): Retrovirus vector-mediated Gene Transfer into the Fertilized Embryos of the Farm Animals. *Animal Reprod.* 19: 293-305.
 10. 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.
 11. Lanna CM, Paula FJ, Montenegro RM Jr, Moreira AC, Foss MC (2002): Parathyroid hormone secretion in chronic human endogenous hypercortisolism. *Braz J Med Biol Res* 35:229-236.
 12. Lin JT, Lane JM (2002): Nonmedical management of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 14:441-446.
 13. Marx UC, Austermann S, Bayer P, Adermann K, Ejchart A, Sticht H, Walter S, Schmid FX, Jaenicke R, Forssmann WG (1995): Structure of human parathyroid hormone 1-37 in solution. *J Biol Chem* 270: 15194-15202.
 14. Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996): Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678-1683.
 15. Popa I, Harris ME, Donello JE, Hope TJ (2002): CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* 22:2057-2067.
 16. Rennel E, Gerwins P (2002): How to make tetracycline-regulated transgene expression go on and off. *Anal Biochem* 309:79-84.
 17. Rubin MR, Bilezikian JP (2002): New anabolic therapies in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 14: 433-440.
 18. Sakizono K, Oita T, Shibata Y, Tamura A, Kasakura S (1998): Clinical usefulness of serum PIVKA-II levels determined by ECLIA system as a tumor maker for hepatocellular carcinoma. *Rinsho Byori* 46:936-941.
 19. Sanchez-Carbayo M, Mauri M, Alfayate R, Miralles C, Soria F (1999): Analytical and clinical evaluation of TSH and thyroid hormones by electrochemiluminescent immunoassays. *Clin Biochem* 32:395-403.
 20. Temin HM (1989): Retrovirus variation and evolution. *Genome* 31:17-22.
 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7963-7968.
 22. Vize PD, Michalska AE, Ashman R, Lloyd B, Stone BA, Quinn P, Wells JR, Seamark RF (1988): Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci* 90: 295-300.
 23. Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsman A (1995): PTH restores bone mass and enhances osteoblast IGF-1 gene expression ovariectomized rats. *Bone* 16:357-365.
 24. Watsuji T, Okamoto Y, Emi N, Katsuoka Y, Hagiwara M (1997): Controlled gene expression with a reverse tetracycline-regulated retroviral vector (RTRV) system. *Biochem Biophys Res Commun* 234:769-773.
 25. Yao F, Svensjo T, Winkler T, Lu M, Eriksson C, Eriksson E (1998): Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* 9:1939-1950.
 26. Yee JK, Friedmann T, Burns JC (1994): Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol* 43:99-112.
 27. Zarrin AA, Malkin L, Fong I, Luk KD, Ghose A, Berinstein NL (1999): Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1446:135-139.
 28. Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA (2002): Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol* 13:121-128.
 29. 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: 2004. 9. 6. / 채택일자: 2004. 9. 20.)