

Tetracycline Inducible Retrovirus Vector System에 의한 GFP 유전자의 발현 조절

구본철 · 권모선 · 김태원[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

초 록

본 연구에서는 retrovirus를 이용한 유전자 전이에 있어서 대두되는 큰 문제점의 하나인 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 개체의 생리적인 손상을 최소화하기 위하여 tetracycline계 물질의 공급 여부에 따라서 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 one vector 형태의 Tet-On system을 구축하고자 하였다. 또한 WPRE 서열을 이 vector 상에 도입하여 유도적 조건에서 외래 유전자의 발현이 보다 강하게 일어날 수 있는 효율적인 retrovirus vector system을 확립하고자 하였다. 구축한 각각의 vector system에서 fluorometry와 western blotting을 이용하여 GFP 유전자의 발현 정도를 비교 측정된 결과, RevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2SM2 virus를 이용하여 유전자를 전이시킨 표적세포에서 GFP의 절대적인 발현량이 가장 큰 것으로 나타났고, 유전자 발현의 turn on/off에 의한 유도율은 RevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2-WPRE virus의 경우에서 8~21배로 가장 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 외래 유전자의 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 vector system은 WPRE가 rtTA2SM2 서열의 3'에 위치한 형태로, 이 system을 이용하여 생산한 고감염가의 virus는 유전자 치료나 형질전환 동물의 생산에 있어서 요구되는 외래 유전자의 발현을 효율적으로 조절할 수 있는 수단이 될 것이다.

(주제어 : rtTA system, WPRE, GFP, Doxycycline, Induction efficiency)

서 론

유전자 치료법의 개발이나 형질전환 동물의 생산에 있어서 가장 효율적인 유전자 전이 방법으로 외래 유전자의 전이율이 높고 그 발현이 장시간 지속되는 바이러스를 이용한 방법이 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법에 사용되는 virus로는 retrovirus(Miller 등, 1993), lentivirus(Naldini 등, 1996), Adeno-associated virus(Rabinowitz 등, 1998), Adenovirus(Davidson 등, 1993), Herpes simplex virus(Samaniego 등, 1998) 등이 있으며 이 가운데 retrovirus가 많은 부분의 유전자 전이 연구에 적용되고 있다. Retrovirus에 의해 도입된 viral RNA는 DNA로 역전사된 후, 안정적이며 장기적인 유전자 전이가 가능하고, insertional mutation의 유발의 가능성이 있으나 이러한 현상도 매우 낮은 빈도로 나타나는 것으로 보고되어 있다(Jaenisch, 1988). 또한 *in vitro*에서 조작이 간편하며 virus의 대량생산도 우수한 것으로 알려져 있어서 유전자 전이에 있어서 retrovirus vector system은 매우 효율적인 방법으로 평가되고 있다. 그러나 이 방법의 가장 큰 문제점은 첫째, 감염성의 증가를 위한 고농도의 virus 농축시 발생하는 감염성의 손실과 둘째, 외부에서 도입되는 외래 유전자의 표적세포 genome에 대한 상대적인 copy의 수적 열세로 인한 발

현율의 저하이다. 그리고 마지막으로 대부분의 유전자 전이 system을 이용할 때 나타나는 공통적인 문제점인 외래 단백질의 지속적인 발현에 의해서 유발되는 개체의 생리적인 유해성을 어떻게 극복하느냐는 것이다.

첫번째 문제의 해결을 위하여 본 연구에서는 VSV-G 당 단백질을 피막으로 가지는 pseudotyped retrovirus vector system을 이용하였는데 이 retrovirus는 물리적인 충격에 대하여 매우 안정하여 초원심분리 방법을 이용한 virus의 농축시에도 감염성의 손실이 거의 없는 것으로 알려져 있다(Burns 등, 1993; Chen 등, 1996). 두 번째 문제는 WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 서열을 retrovirus vector 상에 도입함으로써 극복이 될 것으로 예상하는데 이 서열은 mRNA processing의 효율성을 증가시키고 이에 따라 단백질의 합성도 향상시키는 것으로 알려져 있다(Zufferey 등, 1999). 마지막 문제점은 현재 가장 광범위하게 사용되고 있는 유전자 발현의 유도 system인 Tet system을 도입하여 해결하고자 한다. Tet system은 TRE(tetracycline response element)와 transactivator의 두 구성 요소로 이루어져 있으며 이 system의 가장 큰 특징은 tetracycline 계열의 물질로 외래 유전자의 발현을 turn on/off할 수 있기 때문에 기존의 promoter 사용시 나타나는 외래 유전자의 지속적인 발현(constitutive expression)으로 인한 형질전환 개체의 부정적인 생리적

* 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-01005-0), 1999년~2002년 농림부 농림기술개발사업, 농촌진흥청 바이오그린21 (바이오장기-무균폐지) 연구비 지원으로 수행되었음.

[†] Corresponding author : T. A. Kim, Dept. of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine. TEL : 053-650-4470, E-mail : takim@cu.ac.kr

변화를 효과적으로 방지할 수 있다는 점이다. Tet system은 tetracycline-controlled transactivator(tTA) system (Tet-Off system, Gossen과 Bujard, 1992)과 reverse tetracycline-controlled transactivator(rtTA) system(Tet-On system, Gossen 등, 1995)으로 크게 나눌 수 있는데 후자가 전자에 비해 유전자의 발현의 시작과 종료(on/off)가 훨씬 더 신속하게 일어난다(Zhu 등, 2002). 따라서 본 연구와 같이 개체나 세포에서 외래 유전자의 발현에 대한 단시간 내의 변화를 연구하기 위해서는 rtTA system이 tTA system보다 적절한 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서는 기존의 two vector system에 있어서 나타나는 virus 생산세포주의 구축시 co-transfection에 의한 감염가의 저하 현상과 두 가지의 선별 유전자에 해당하는 항생제 사용 등에 의한 세포의 부정적 영향 등의 문제를 해결하기 위하여 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 TRE 부분에 해당하는 서열을 한 vector 상에 재조합하고자 하였다. 이 vector의 효율성을 확인하기 위하여 GFP 유전자를 표지 유전자로 사용하였으며 rtTA에 대한 promoter로 RSV promoter를 도입하였다.

본 연구에서 구축한 retrovirus vector system은 유전자 치료나 형질전환 동물의 생산에 있어서 가장 큰 문제가 되는 과다한 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 매우 효과적인 유전자 전이 체계를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

실험 방법

세포배양

본 실험에서 사용한 PT67(Clontech, USA)과 GP293 (Clontech, USA), BFF(소의 배아 섬유아세포, bovine fetal fibroblast), HeLa(사람의 자궁경부암 세포, ATCC CCL 2), NIH3T3(생쥐의 배아 섬유아세포, ATCC CRL 1658), 그리고 PFF(돼지의 태아섬유아세포, porcine fetal fibroblast)는 10%의 FBS(HyClone, USA)와 penicillin(100 U/ml)- streptomycin(100 µg/ml)(Pen/Strep; GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

WPRE의 Cloning

WPRE는 woodchuck hepatitis virus 2의 genomic DNA(GenBank accession number M11082) 서열을 참고로 하여 WHV(woodchuck hepatitis virus) clone으로부터 cloning하였다(Zufferey 등, 1999). WHV clone의 cDNA를 주형으로 + strand primer 5'TCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGG3'와 - strand primer 5'GAGCCCGAGCG-AAACAG3'를 이용하여 PCR을 수행하였다.

PCR은 10 ng의 cDNA에 1 µM의 각 primer, 50 µM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polymerase(Promega, USA), 10× Taq polymerase buffer(Promega, USA)를 혼합하여 94°C에서 5분간 방치 후, 94°C에서 30초, 53.5°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응을 30회 반복 실시하였다. 증폭된 619 bp의 WPRE 단편은 pGEM-T Easy(Promega, USA)

내로 도입한 후 T7 promoter primer를 이용하여 sequencing하였다.

Tet System의 구축과 Retrovirus의 생산

기존의 two vector system을 보완한 형태인 one vector Tet system을 구축하기 위하여 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 GFP를 표지 유전자로 포함하는 TRE 부분에 해당하는 서열을 한 vector 상에 재조합하고자 하였다.

먼저 pLXRN(Clontech, USA)으로부터 유래한 RSV promoter와 pEGFP-N1(Clontech, USA)으로부터 분리한 GFP 유전자를 pRevTRE vector(Clontech, USA)의 minCMV promoter 하에 도입하여 pRevTRE-EGFP-RSVp를 구축하였다. 다음 단계로 rtTA 단백질에 해당하는 부분인 rtTA2SM2 유전자를 독일의 Hillen 박사로부터 증정받은 pUHRt62-1 plasmid로부터 분리하여 이를 pRevTRE-EGFP-RSVp vector의 RSV promoter 하에 도입함으로써 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2 vector를 재조합하였다. 이 vector를 근간으로 하여 유전자의 발현을 촉진시키는 인자인 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다. 첫째로, pGEM-Teasy-WPRE에서 분리한 WPRE 서열을 EGFP 유전자의 3' 위치에 도입하여 pRevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2SM2를 구축하였으며, 두 번째로 WPRE 서열을 rtTA2SM2 유전자의 3' 위치에 도입하여 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2-WPRE를 구축하였다. 마지막으로 WPRE 서열을 앞의 두 위치에 동시에 도입하여 pRevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2SM2-WPRE를 구축하였다.

재조합된 각각의 retroviral vector는 PT67에 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 virus stock을 수확한 후 이 virus를 GP293에 감염시켜 hygromycin(150 µg/ml)이 첨가된 선별용액으로 2주간 선별하였다. 선별된 각각의 세포에 calcium phosphate 방법으로 20 µg의 p-HCMV-G를 일시적으로 transfection하여 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 수확하였다.

여러 표적 세포주에 있어서의 GFP 유전자 발현 측정

수확한 virus 용액은 하루 전날 60 mm dish에 1×10⁶개로 준비해 둔 표적세포인 HeLa, NIH3T3, PFF, BFF에 각각 감염시켰다. 4 ml의 배양액과 virus stock 10 µl을 표적세포에 더해주고 polybrene를 5 µg/ml 농도로 첨가하였다. 24시간 경과 후 세포를 3일 간격으로 G418(600 µg/ml)이 첨가된 선별배양액으로 갈아주어 Neo^R CFU/ml(colony forming unit per milliliter)를 측정하였다.

선별된 각각의 세포에서 GFP의 발현 정도를 측정하였는데 구축한 vector system이 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우에 유전자 발현이 turn on되는 system임을 감안하여 배양배지에 tetracycline 유도체인 doxycycline을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 GFP 유전자의 발현을 비교하였다. 전날 각 세포를 60 mm dish에 5×10⁵으로 준비한 후 그 다음날 doxycycline을 1 µg/ml 농도로 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지로 교환해 주었다. 48시간 배양한 후 각 세포를 split하여 세포만 수확한 후 초음파 분쇄하였으며 원심분리를 이용하여 전단백질을 분리하였다. 분리한 전단백질을 Bradford 방법으로 정량한 후 100 µg을 취하여 fluorometer로 GFP 발현 정도를 측정하였다.

분리한 전단백질 중 10 μ g을 취하여 SDS-PAGE를 실시한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% skim milk가 포함된 0.03% tween-20 blocking buffer에 1시간 방치한 후 1:5,000으로 희석한 anti-GFP 항체와 1:8,000으로 희석한 anti- β -actin 항체를 16시간 반응시켰다. TBS buffer로 수세한 다음 이차항체인 HRP conjugated Goat anti-mouse IgG 1:1,000으로 희석하여 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 수세한 후 기질 용액인 West Dura Extended Duration substrate(Pierce, USA)용액을 첨가하여 X-ray film에 60초간 노출시켜서 현상하였다.

결과 및 고찰

WPRE의 Cloning

WPRE는 mRNA의 processing의 효율성을 증가시키고 이로 인하여 외래 유전자의 발현을 촉진하는 인자로서 α , β , γ 의 세 개의 subunit으로 구성되어져 있으며, 이는 기능적으로 유사한 인자로서 두 개의 subunit으로 이루어진 사람의 HBVPRE(Hepatitis B virus Posttranscriptional Regulatory Element)보다 효율적으로 유전자의 발현율을 증가시키는 것으로 보고되어 있다(Donello 등, 1998). WPRE는 세포의 종류나 promoter, 그리고 vector의 종류에 대해서 비의존적인 활성을 나타내며 WPRE가 존재하지 않는 대조구에 비해서 유전자의 발현을 3~5배로 증가시키는 것으로 알려져 있다(Zufferey 등, 1999). WPRE에 의한 외부 유전자의 발현 촉진은 adenovirus(Glatzel 등, 2000), adeno-associated virus(Glatzel 등, 2000), lentivirus (Lotti 등, 2002), retrovirus(Zufferey 등, 1999)에서 이미 그 효과가 증명되었다. 본 연구에서도 GFP 외래 유전자의 발현을 증가시키기 위해서 WPRE를 WHV clone으로부터 cloning 하였으며 sequencing 결과는 Fig. 1과 같다.

One Vector 형태의 Tetracycline Inducible Expression System의 구축

일반 promoter에 의한 외래 유전자의 지속적인 발현으로 인한 형질전환 개체의 부정적인 생리적 변화를 효과적

으로 방지할 수 있는 가장 대표적인 system인 Tet system은 transactivator가 tetracycline계의 물질의 존재 여부에 따라서 rtTA 복합체를 형성하고, 이 복합체가 TRE를 구성하는 인자 중 tet operator 부분에 결합함으로써 tet operator의 downstream에 위치한 promoter의 활성을 유도해서 도입한 외래 유전자가 발현하도록 한다. 기존에 사용되었던 rtTA는 원핵세포성의 codon과 내재된 splice site의 존재로 인한 불안정성 때문에 형질전환 동물의 일부 신체 기관에서 비효율적인 유도 형태를 나타내며, 높은 Dox의 농도를 요구함으로써 세포 자체의 독성을 유발하고, Dox 부재시에도 tet operator에 대한 rtTA의 잔류된 친화성에 의한 promoter의 background 활성을 유발하게 된다(Urlinger 등, 2000; Qu 등, 2004). 이러한 한계를 극복하기 위해서 rtTA의 일부 아미노산 서열을 변형시켜서 Dox에 대한 감수성을 증가시키고, splice site와 원핵세포성 codon을 최소화함으로써 진핵세포 내에서 매우 안정하며 Dox가 없을 경우에 background 활성이 유발되지 않게끔 보완된 rtTA2SM2를 도입하였다(Urlinger 등, 2000). 또한 본 연구에서는 보다 효율적인 유전자 전이 system을 구축하기 위하여 기존의 rtTA와 TRE 부분이 두 개의 vector 상에 각각 위치하는 two vector system을 보완하여 one vector system을 구축하고자 하였다. 이 vector의 효율성을 확인하기 위하여 GFP 유전자를 표지 유전자로 사용하였으며 rtTA 단백질에 대한 promoter로 RSV promoter를 도입하였다. 그 결과 제조된 vector는 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2로서 이 vector는 tetracycline 계열의 물질이 존재하면 rtTA 단백질이 그 물질과 결합하여 그 복합체가 TRE 부분에 결합함으로써 minCMV promoter 하의 GFP 유전자의 발현을 나타내게 된다.

제조한 pRevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2에 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 알려진 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다. WPRE 단편은 EGFP 유전자의 3'과 rtTA 단백질을 암호화하는 유전자의 3' 위치에 도입하였으며 구축한 각 vector의 구조는 Fig. 2와 같다.

Retrovirus의 생산과 표적세포에서의 GFP 발현의 측정

전 단계에서 생산한 retrovirus를 여러 종류의 표적세포

```

1 GGGCGAATTG GGCCCGACGT CGCATGCTCC CGGCCCCAT GGCGGCCGCG GGAATTCGAT
61 TCTGTTCCT GTTAATCAAC CTCGGGATTA CAAAATTTGT GAAAGATTGA CTGGTATTCT
121 TAACATATGTT GCTCCTTTTA CGCTATGTGG ATACGCTGCT ITAATGCCTT TGTATCATGC
181 TATTGCTTCC CGTATGGCTT TCATTTTCTC CTCCTGTAT AAATCCTGGT TGCTGTCTCT
241 TTATGAGGAG TTGTGGCCCG TTGTACAGCA ACGTGGCGTG GTGTGCACTG TGTTTGCTGA
301 CGCAACCCCC ACTGGTTGGG GCATTGCCAC CACCTGTACG CTCCTTTCCG GGACTTTCCG
361 TTTCCCTTC CATTATGCCA CGCGGAACT CATCGCCGCC TGCCTTGCCC GCTGCTGGAC
421 AGGGGCTCGG CTGTTGGGCA CTGACAATTC CGTGGTGTG TCGGGGAAGC TGACGTCTTT
481 TCCATGGCTG CTCGCCTGTG TTGCCACCTG GATTCTGCGC GGGACGTCCT TCTGCTACGT
541 CCCTTCGGCC CTCAATCCAG CGGACCTTCC TCCCCTGGC CTGCTGCCGG CTCTGCGGCC
601 TCTTCCGCGT CTTCGCCTTC GCCCTCAGAC GAGTCGGATC TCCCTTTGGG CCGCCTCCCC
661 GCCTGTTTCG CCTCGGGCTC AATCACTAGT GAATTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the WPRE. The sequences of cDNA primers used in RT-PCR are shaded.

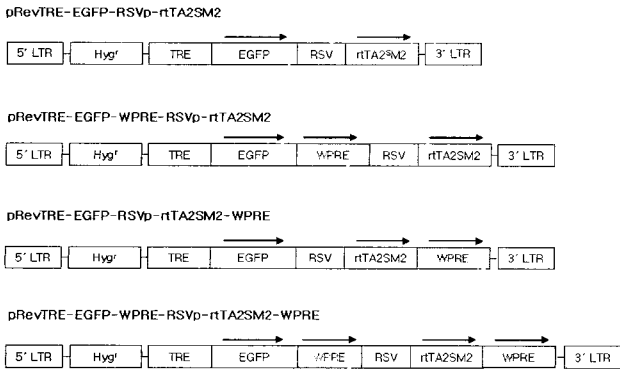


Fig. 2. Construction of tetracycline inducible expression retrovirus vectors. TRE, Tet-response element; LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin resistant gene; P_{minCMV}, human cytomegalovirus immediate early minimal promoter; EGFP, enhanced Green Fluorescence Protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; RSV, Rous sarcoma virus promoter; rtTA2SM2, rtTA consist of the reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain. Length of each sequence is not drawn to scale.

에 감염시켜서 GFP 유전자의 발현 정도를 측정하였다. 구축한 vector system이 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우에 유전자 발현이 turn on되는 system임을 감안하여 배양매지에 tetracycline 유도체인 doxycycline을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 있어서 GFP 유전자의 발현을 fluorometry와 western blotting을 이용하여 비교 측정하고자 하였다. 먼저 RevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2 virus vector를 이용하여 구축한 각각의 표적세포에서 fluorometer를 이용하여 형광을 측정한 결과, 모든 세포주에서 doxycycline이 존재하지 않는 배지에서 배양한 것보다 doxycycline이 함유된 배지에서 배양한 세포들이 4~5배 정도의 높은 형광 발현을 나타내었다(Fig. 3). 이는 본 연구에서 구축한 one vector tet system이 표적세포의 범위나 유전자의 유도적인 발현 조절의 측면에 있어서 기존의 two vector system에 비해 부족함이 없음을 증명하는 것이다. 외래 단백질의 발현을 증가시키기 위하여 도입한 WPRE 서열은 도입 위치에 따라 그 발현 양상이 각각 다르게 나타났다. 먼저 EGFP 유전자의 3' 위치에 WPRE가 위치한 RevTRE-EGFP-WPRE-RSVp-rtTA2SM2의 경우 doxycycline이 함유된 조건에서 가장 높은 발현 정도를 나타내었

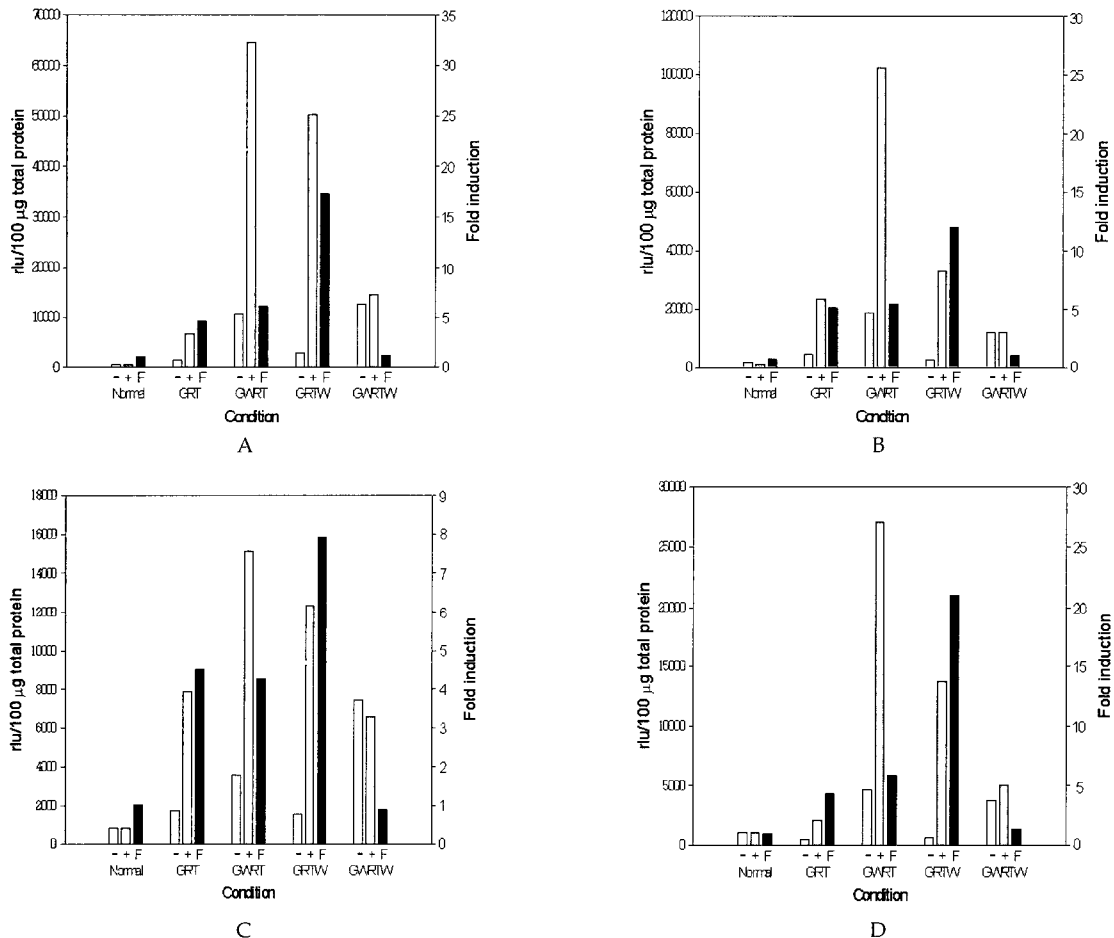


Fig. 3. Expression and fold induction of GFP after doxycycline induction for 48 hours in various target cells. A: BFF cell, B: HeLa cell, C: NIH3T3 cell, D: PFF cell, - : cell was grown in the doxycycline free media with tetracycline free FBS. + : cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μg/ml). WPRE enhances gene expression in cells transduced with RevTRE-RSV-rtTA2SM2 vectors. rlu=relative light units.

으며 doxycycline이 없는 조건, 즉 비유도 조건에서도 비교적 강한 발현을 나타내었다. 이는 절대적인 발현량은 크나 background가 심해서 완전한 유전자의 turn on/off가 완벽하게 이루어지지 않음을 의미한다. 이에 비해서 WPRE가 rtTA2SM2의 3'에 위치한 RevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2-WPRE의 경우에는 절대적인 형광 발현율은 전자보다 약하나 doxycycline의 존재에 따른 GFP 발현의 turn on/off의 상대적인 유도율은 가장 우월한 것으로 나타났다(Fig. 3). 특히 PFF 세포에서는 약 21배의 유도율을 나타내어 다른 표적세포에 비해서 탁월한 유도율을 보였다. 마지막으로 WPRE가 GFP와 rtTA2SM2 유전자 다음의 위치에 모두 존재하는 경우는 모든 표적세포에서 GFP의 발현율과 유도율 모두 미미한 것으로 나타났다(Fig. 3). 따라서 재조합한 vector 중에서 WPRE를 한 개만 포함한 두 종류의 vector가 GFP의 발현과 그 발현의 조절에 있어서 적절한 system인 것으로 생각된다.

Fluorometry 결과를 재확인하기 위하여 western blotting 방법으로 GFP의 유도적인 발현을 확인하고자 하였다. Virus를 감염시키지 않은 정상세포도 실험군과 동일한 조건에서 doxycycline으로 발현을 유도하였으며 각 대조군과 실험군에서 단백질의 발현이 정상적으로 이루어지는 것을 확인하기 위하여 β -actin에 대한 일차 항체를 GFP 일차 항체와 동시에 사용하였다. 그 결과 모든 세포에서 β -actin 단백질이 확인되었으며 GFP 단백질은 virus가 감염되지 않은 정상세포를 제외한 세포들에서만 검출되었다(Fig. 4). Vector의 종류에 따른 단백질의 발현 양상은 모든 세포주에서 거의 동일하게 나타났으며, WPRE가 도입되지 않은 RevTRE-GFP-RSV-rtTA2SM2가 전이된 세포들에서는 doxycycline이 첨가된 경우에만 약한 GFP 단백질이 확인되었다. WPRE가 GFP 유전자의 3'에 위치한 조건에서는 doxycycline이 첨가되었을 때 가장 진하게 나타났으며 첨가되지 않은 경우에도 약간의 단백질이 확인되었다(Fig. 4). 이에 비해 WPRE가 rtTA2SM2 유전자의 downstream에 위치한 경우에는 doxycycline이 첨가된 조건에서는 단백질의

존재가 선명하게 확인되었으나 첨가되지 않은 조건에서는 거의 나타나지 않았으므로 유전자의 발현 유도율이 전자의 경우에 비해서 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4). WPRE가 GFP와 rtTA2SM2 유전자의 3' 위치에 동시에 도입된 경우에는 doxycycline의 유도에 의한 발현량과 유도율이 모두 미약한 것으로 확인되었다(Fig. 4). 이상의 western blotting의 결과는 fluorometry의 결과와 일치하였으며 유도 조건에서 GFP의 발현량이 가장 큰 것은 WPRE가 GFP의 3'에 위치한 경우이며, 유도율이 가장 높은 vector system은 rtTA2SM2의 3' 위치에 WPRE가 도입된 경우이다.

이상의 결과를 바탕으로 하여 *in vivo*에서 외래 유전자의 지속적인 발현에 의한 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 가장 적절한 Tet system은 WPRE가 rtTA2SM2 유전자의 3'에 도입된 RevTRE-EGFP-RSVp-rtTA2SM2-WPRE이며 WPRE가 GFP 유전자의 3'에 위치한 경우는 절대적인 발현량은 높으나 비유도 조건에서 나타나는 "leaky"한 발현에 대한 생리적인 영향의 재고가 선행되어야 할 것이다.

Regulation of GFP Expression Using the Tetracycline Inducible Retroviral Vector System

Koo, Bon Chul, Mo Sun Kwon, and Teoan Kim

Department of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

ABSTRACT

One of the critical problems to be solved in transgenic animal production is uncontrollable constitutive expression of foreign genes, which usually results in serious physiological disturbances in the transgenic animal. To circumvent this problem, we constructed and tested two retrovirus vectors designed to express the GFP(green fluorescent protein) gene under the control of the tetracycline-inducible promoters. To maximize the GFP gene expression at turn-on state, WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) sequence was introduced into the retrovirus vectors at downstream region of either the GFP gene or the sequence encoding rtTA(reverse tetracycline-controlled transactivator). Transformed cells were cultured in the medium supplemented with or without doxycycline(tetracycline derivative) for 48 hours, and induction efficiency was measured by comparing the GFP gene expression level using fluorometry and western blotting. Higher GFP expression was observed from the vector carrying the WPRE sequence at 3' side of the GFP gene, while tighter expression control(up to 20 fold) was obtained from the vector in which the WPRE sequence was placed at 3' side of rtTA sequence. The resulting tetracycline inducible vector system may be used in transgenic animal production and gene therapy.

(Key words : rtTA system, WPRE, GFP, Doxycycline, Induction efficiency)

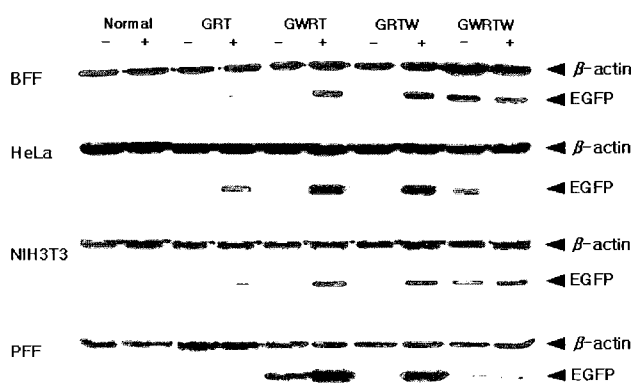


Fig. 4. Determination of doxycycline induction of the EGFP gene in various target cells using western blot analysis. Normal: uninfected target cell, GRT: target cell infected with RevTRE-EGFP-RSV-rtTA2SM2. GWRT: target cell infected with RevTRE-EGFP-WPRE-RSV-rtTA2SM2. GRTW: target cell infected with RevTRE-EGFP-RSV-rtTA2SM2-WPRE. GWRTW: target cell infected with RevTRE-EGFP-WPRE-RSV-rtTA2SM2-WPRE. -: cell was grown in the doxycycline free media with tetracycline free FBS. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml).

인용문헌

- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee J (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.
- Chen S-T, Iida A, Guo L, Friedmann T, Yee J-K (1996): Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10057-10062.
- Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, Wilson JM, Roessler BJ (1993): A model system for *in vivo* gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat Genet* 3:219-223.
- Donello JE, Jonathan EL, Hope TJ (1998): Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-5092.
- Glatzel M, Flechsig E, Navarro B, Klein MA, Paterna JC, Büeler H, Aguzzi A (2000): Adenoviral and adeno-associated viral transfer of genes to the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:442-447.
- 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.
- Jaenisch R (1988): Transgenic animals. *Science* 240: 1468-1474.
- Lotti F, Menguzzato E, Rossi C, Naldini L, Ailles L, Mavilio F, Ferrari G (2002): Transcriptional targeting of lentiviral vectors by long terminal repeat enhancer replacement. *J Virol* 76:3996-4007.
- Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM (1993): Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217:581-599.
- Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996): Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11382-11388.
- Qu Z, Thottassery JV, Van Ginkel S, Manuvakhova M, Westbrook L, Roland-Lazenby C, Hays S, Kern FG (2004): Homogeneity and long-term stability of tetracycline-regulated gene expression with low basal activity by using the rtTA2S-M2 transactivator and insulator-flanked reporter vectors. *Gene* 327:61-73.
- Rabinowitz JE, Samulski J (1998): Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 9:470-475.
- Samaniego LA, Neiderhiser L, DeLuca NA (1998): Persistence and expression of the herpes simplex virus genome in the absence of immediate-early proteins. *J Virol* 72:3307-3320.
- 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.
- Zhu Z, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, Elias JA (2002): Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Cell Develop Biol* 13:121-128.
- 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: 2005. 3. 10. / 채택일자: 2005. 3. 25.)

논문(국·영문 혼용) 투고규정

(2004년 6월 개정)

1. 본 학회에 대한 투고는 본 학회 회원에 한함을 원칙으로 한다. 단, 초청논문 및 편집위원회에서 인정한 논문은 예외로 한다.
 2. 투고원고는 다른 학술잡지에 제출, 채택 혹은 발표되지 않은 것에 한한다.
 3. 원고의 내용은 학술논문, 총설, 속보 및 초록으로 한다.
 4. 원고의 채택 여부는 한국동물번식학회 논문심사 세부규칙에 따라 심사위원 2인 이상의 심사를 거쳐 편집위원회에서 결정하며, 채택되지 않은 원고는 그 이유를 명기하여 투고자에게 반송한다.
 5. 투고원고는 원본 1부와 사본 2부를 제출하여야 한다. 또한, 원고채택이 결정된 후 수정본을 제출할 때 file을 diskette 또는 e-mail을 통하여 함께 제출하여야 한다.
 6. 원고는 그림, 표 및 사진을 포함하여 인쇄 후 5쪽 이내를 원칙으로 한다. 이 배수를 초과하는 분량에 대해서는 투고자가 실비를 부담한다. 원고 내용 중 color 사진을 게재하고자 하는 투고자는 이에 대한 인쇄비를 별도로 부담하여야 한다.
 7. 원고는 국문 또는 영문으로 아래아한글 97판 이상의 문서작성기를 사용하여 A4 용지에 좌우 25mm의 여백을 두고 줄 간격은 160으로 하여 작성한다. 원고의 배 면에는 쪽수를 기입하고, 왼쪽 끝에 5줄마다 줄 수를 기입하여야 한다.
 8. 원고의 논문체제는 ABSTRACT(목적, 주요방법, 결과, 결론 등을 포함하는 200자 이내 한 문단으로 국문으로 작성한 논문의 경우 별도의 영문초록을 함께 제출), 서론(INTRODUCTION), 재료 및 방법(MATERIALS AND METHODS), 결과(RERESULTS), 고찰(DISCUSSION) 혹은 「결과 및 고찰」(RESULTS AND DISCUSSION), 인용문헌(REFERENCES) 순으로 한다. ABSTRACT의 하단에 영문 5단어 이내의 Key words를 작성하고 각 단어의 첫 자는 대문자로 한다.
 9. 논문의 제목, 저자명, 소속기관 및 주소는 국문과 영문을 병기하고, 공동저자의 소속기관이 다를 때는 해당 저자의 이름 오른쪽에 위 첨자 숫자를 표기하고 각주에 그 기관을 명기한다. 또한 연락저자(corresponding author)의 이름 오른쪽 상단에 *표하고 각주에 명기(e-mail 포함) 한다. 저자나 소속기관에 관한 소개 및 사사 등을 제외한 각주는 원칙적으로 인정하지 않는다.
 10. 표(Table)의 제목은 해당표의 상단에 그림(Figure)의 제목은 해당그림의 하단에 영문으로 기재한다. 영문제목의 첫 글자만 대문자로 하고 제목의 끝에 마침표를 붙이지 않는다. 표와 그림의 순서는 아라비아 숫자로 표기하며, 특별한 사유가 없는 한 동일한 실험결과를 표와 그림으로 이중기재하지 말아야 한다.
 11. 그림은 흑색 먹으로 정밀하게 도안하거나 그래픽 소프트웨어를 이용하여 해상도가 높은 프린터로 인쇄한다.
 12. 도량형은 CGS단위를 사용하고, 약자는 본문에서 처음 사용하는 위치에서 기재하며, 일반적으로 보편화된 약자는 별도의 정의 없이 사용한다.(예 : BSA, DNA, FSH, IVF, PBS 등)
 13. 본문과 문헌 중에서 이탤릭체로 표시해야 할 학명 및 서명은 이탤릭체로 직접 표기한다.
 14. 원고 중 소재목의 번호는 따로 표기하지 않는다. 단, 원고의 특성상 필요한 경우 1., 1., 1), (1), 가. 와 같이 한다.
 15. 인용문헌의 인용은 다음의 원칙에 따른다.
 - 1) 인용문헌을 본문에 인용시에는 저자와 연도를 괄호 안에 표기하되, 2인의 경우는 와 또는 과를, 3인 이상의 경우에는 주 저자의 성에 등을 붙인다. 문장의 일부인 경우에는 저자의 성 뒤에 연도를 괄호 안에 표기하고 [예: 김과 이(1991), Wilmut 등(1997)], 문장의 마지막에서는 괄호 속에 저자의 성과 연도를 함께 표기한다[예: (김 등, 1993; Smith와 John, 1995)].
 - 2) 인용문헌은 발표된 문자로 기재하고, 영문문헌은 저자명의 알파벳 순으로 성을 먼저 기재하며, 국문문헌은 저자명의 가나다 순에 의거하여 영문문헌의 후반부에 삽입한다.
 - 3) 인용문헌의 기재요령은 정기 간행물의 경우 저자명, 발행년도, 논문제목, 잡지명, 권(호)수, 쪽수의 순서로 단행본의 경우 저자명, 발행년도, 서명, 판수, 출판사명, 발행지, 쪽수의 순서로 기술함을 원칙으로 하고, 논문의 약에 번호를 기재한다. 정기간행물의 약자는 국제 줄여 쓰기 관례에 따른다.
- (보기) 1. Davis DL (1985): Culture and storage of pig eggs. J Reprod Fertil 33:115-124.
 2. Linder GM, Wright RW (1983): Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20:407-416.
 3. Prather RS, Sims MM, First NL (1989): Nuclear transplantaion in early pig embryos. Biol Reprod 41:414-418.
 4. Shioya Y, Hosoe M (1998): Blastocyst development of bovine oocytes classified as low quality. Proc. 8th World Conference on Animal Production. Vol. II. Seoul Korea. pp:298-299.
 5. Swatland HJ (1984): Structure and Development of Meat Animals. Prentice-Hall. Inc., S.A. pp 10-20.
 6. Wilson AP (1992): Cytotoxicity and viability assays. In; Animal Cell Culture, R.I. Freshney(Ed.), 2nd ed., IRL Press, Oxford, UK, pp 263-304.
 7. 이장희, 김창근, 정영채 (1997): 돼지 난포란의 동결과 체외수정에 관한 연구. 한국가축번식학회지 21:355-362.
16. 논문의 별책은 50부를 증정한다. 단 50부 이상이 필요한 때에는 투고시에 원고 표지의 상단 좌측에 추가로 필요한 부수를 기록하여야 하며, 이 초과분에 대해서는 저자가 실비를 부담하여야 한다.
 17. 학술논문의 원고 및 편집에 관한 모든 문서는 본 회 편집위원장에게 등기로 우송해야 한다.
 18. 기타 본 규정에서 명시하지 않은 사항은 관례에 따른다.