

# Tetracycline Inducible Retrovirus Vector System을 이용한 *In Vitro*에서의 인간 부갑상선 호르몬의 발현 조절

구본철 · 권모선 · 김태완<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

## Regulation of *hPTH* Expression *In Vitro* Using the Tetracycline Inducible Retrovirus Vector System

Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon and Teoan Kim<sup>†</sup>

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

### ABSTRACT

Endogenous 84 amino acid parathyroid hormone (PTH) is synthesized as a pre-pro hormone by the chief cells of the parathyroid glands. Physiological actions of PTH include regulation of bone metabolism, renal tubular reabsorption of calcium and phosphate, and intestinal calcium absorption. In addition, PTH stimulates new bone formation by extraordinary stimulation of osteoblastic activity and decreasing calcium excretion by the kidney. In this study, we constructed and tested retrovirus vectors designed to express the human parathyroid hormone (*hPTH*) gene under the control of the tetracycline-inducible promoters. To increase the *hPTH* gene expression at turn-on state, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) sequence was also introduced into retrovirus vector at downstream region of either the *hPTH* gene or the sequence encoding reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA). Transformed primary culture cells (porcine fetal fibroblast, PFF, chicken embryonic fibroblast, CEF) were cultured in the medium supplemented with or without doxycycline (tetracycline derivative) for 48 hours, and induction efficiency was measured by comparing the *hPTH* gene expression level using two step RT-PCR and ELISA. Higher *hPTH* expression ( $3 \times 10^4$  pg/ml,  $5.3 \times 10^4$  pg/ml) and tighter expression control (up to 8 fold) were observed from the vector in which the WPRE sequence was placed at downstream of the *hPTH* gene. The 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 : rtTA, WPRE, *hPTH*, Doxycycline, Induction efficiency)

### 요 약

본 연구에서는 인간 부갑상선 호르몬의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 retrovirus vector system을 확립하고자 하였다. 이에 tetracycline계 물질로 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 one vector 형태의 Tet-On system을 이용하였으며 WPRE 서열을 도입하여 유도적 조건에서 외래 유전자의 발현을 증가시켰다. 구축한 각각의 표적세포에서 RT-PCR과 ELISA를 이용하여 *hPTH* 유전자의 발현 정도를 비교 측정된 결과, WPRE가 *hPTH*의 3' 위치에 도입된 RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2 virus를 이용하여 유전자를 전이시킨 경우에 *hPTH*의 발현량이 가장 높은 것으로 나타났고, 또한 유도율도 가장 큰 것으로 확인되었다. 이 system을 이용하여 생산한 고감염가의 virus는 인간의 부갑상선 호르몬을 생산하기 위한 동물세포주의 구축이나 형질전환 동물의 생산에 있어서 매우 효율적인 유전자 전이 수단이 될 것으로 사료된다.

### 서 론

인간의 부갑상선 호르몬은 84개의 아미노산으로 구성

\* 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업(센터과제번호 R11-2002-100-01005-0), 농림부 농림기술개발사업(2005년 ~2008년), 농촌진흥청 바이오그린21사업, 농림부 바이오장기 생산 연구사업, 2004년도 대구가톨릭대학교 의과대학연구소 연구비의 지원으로 이루어진 것임.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

된 단백질로서(Milhaud 등, 1983) 골대사의 조절, 칼슘과 인의 세뇨관의 재흡수, 그리고 장의 칼슘 흡수에 관여한다(Jüppner 등, 2001). 최근에 들어 부갑상선호르몬은 새로운 골다공증 치료제로 각광을 받고 있는데, 골흡수 억제 작용을 하는 기존의 치료제와는 달리 골재 형성 공간을 채울 뿐만 아니라 직접적으로 조골세포의 수명을 길게 함으로써 뼈의 강도를 복구하는 골형성 촉진 작용을 하는 것으로 알려지고 있다(Canalis 등, 2000; Heaney 등, 2003).

본 연구에서는 재조합 부갑상선호르몬 유전자가 도입된 retrovirus vector를 매개체로 하여 일차배양한 동물세포주에 유전자를 전이시킨 후 유전자의 발현 여부를 *in vitro* 상에서 확인하고자 하였다. Retrovirus vector system은 유전자 치료법의 개발이나 형질전환 동물의 생산에 있어서 가장 효율적인 유전자 전이 방법으로 외래 유전자의 전이율이 높고 그 발현이 장시간 지속되는 것으로 알려져 있다(Miller 등, 1993). 보다 효율적인 유전자의 전이를 위하여 woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) 서열을 retrovirus vector 상에 도입함으로써 외래 유전자에 대한 mRNA processing의 효율성을 증가시키고 단백질의 합성도 향상시키도록 하였다(Donello 등, 1998; Zufferey 등, 1999; Popa 등, 2002). 또한 외래 단백질의 지속적인 발현에 의해서 유발되는 개체의 생리적인 유해성을 감소시키기 위하여 현재 가장 광범위하게 사용되고 있는 유전자 발현의 조절 system인 tetracycline-controllable vector system (Gossen과 Bujard, 1992)을 도입하였으며, 이 system 중에서도 특히 tetracycline 계열의 물질이 존재할 경우, 외래 유전자의 발현을 turn on 할 수 있는 형태인 reverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA) system (Tet-On system, Gossen 등, 1995; Zhu 등, 2002)을 사용하였다. 또한 rtTA 단백질을 발현하는 유전자 서열과 외래 유전자를 포함하는 Tet-response element (TRE) 부분의 서열을 동일 vector 상에 재조합한 one vector system을 구축함으로써 기존의 Tet-On system이 two vector 형태의 system으로 인해 초래되는 co-transfection에 의한 감염가의 저하 현상과 두 가지의 항생제 사용 등에 의한 세포의 부정적 영향 등의 문제를 해결하고자 하였다. 이상과 같이 본 연구에서 구축한 retrovirus vector system은 유전자 치료나 형질전환 동물의 생산에 있어서 매우 효율적인 유전자 전이 체계를 제공할 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

본 실험에서 사용한 PT67 (Clontech, USA)과 GP293 (Clontech, USA), 돼지의 태아 섬유아세포(porcine fetal fibroblast, PFF), 그리고 닭의 배아 섬유아세포(chicken embryonic fibroblast, CEF)는 10%의 FBS (HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100 µg/ml) (Pen/Strep; HyClone, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, HyClone, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하

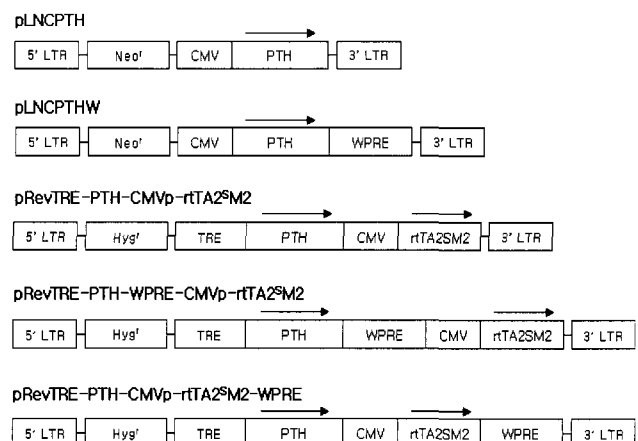
였다. PTH의 발현을 위한 retrovirus vector system의 구축 및 재조합 virus의 생산 pLNCPTH와 pLNCPTHW는 본 연구실에서 이미 구축된 retrovirus vector인 pLNRPTH와 pLNRPTHW의 RSV promoter 위치에 CMV promoter를 대체하여 구축하였으며(Fig. 1), *hPTH* 유전자의 발현을 증폭시키기 위해 WPRE 서열(Zufferey 등, 1999)을 각 vector에 도입하였다.

*hPTH* 유전자의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 tetracycline-inducible retrovirus vector system은 pLNCX (Clontech, USA)로부터 유래한 CMV promoter와 pGEM T easy-*hPTH*로부터 분리한 *hPTH* 유전자를 pRevTIRE vector (Clontech, USA)의 minimal CMV promoter 하에 도입한 다음, 독일의 Hillen 박사로부터 증정받은 rtTA 단백질에 해당하는 부분인 *rtTA2<sup>S</sup>M2* 유전자를 CMV promoter 하에 도입함으로써 pRevTIRE-*hPTH*-CMVp-*rtTA2<sup>S</sup>M2* vector를 재조합하였다(Fig. 1). 이 vector를 근간으로 하여 *hPTH* 유전자의 발현을 촉진시키는 인자인 WPRE 서열을 *hPTH* 유전자의 3' 위치와 *rtTA2<sup>S</sup>M2* 유전자의 3' 위치에 각각 도입하여 pRevTIRE-PTH-WPRE-CMVp-*rtTA2<sup>S</sup>M2*와 pRevTIRE-PTH-CMVp-*rtTA2<sup>S</sup>M2*-WPRES를 구축하였다(Fig. 1).

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

### In Vitro에서 *hPTH* 유전자의 발현 측정

수확한 virus 용액은 다양한 농도로 희석하여 1×10<sup>6</sup>개로 준비해 둔 CEF와 PFF에 각각 감염시켜서 hygromycin



**Fig. 1. Construction of retrovirus vectors.** LTR, long terminal repeat; Neo<sup>I</sup>, *G418* resistant gene; CMV, human cytomegalovirus promoter; PTH, human parathyroid hormone gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Hyg<sup>I</sup>, Hygromycin B resistant gene; TRE, Tet-response element; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; rtTA2<sup>S</sup>M2, consist of the reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain. Length of each sequence is not drawn to scale.

B (150  $\mu$ g/ml)가 첨가된 배양액으로 colony를 선별하여 crystal violet으로 염색함으로써 감염가(titer)를 측정하였으며 측정값을 근거로 하여 multiplicity of infection (MOI)를 1로 맞추어 동일한 수의 virus particle을 표적세포로 감염시켰다. 세포는 hygromycin B (150  $\mu$ g/ml)가 첨가된 배지에서 배양하여 유전자가 전이된 세포주를 선별 및 확립하였다.

선별된 각각의 세포에서 *hPTH*의 발현은 two-step RT-PCR과 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. LNCPTH와 LNCPTHW를 이용하여 구축한 세포주는 60 mm dish에  $5 \times 10^5$ 개의 세포를 준비한 다음 그 다음날 새 배지에서 48시간 배양한 후 세포에서 분리한 RNA와 100배로 희석한 세포 배양액을 이용하여 RT-PCR과 ELISA를 실시하였다. Tet system이 도입된 실험군에서는 tetracycline 유도체인 doxycycline을 배양매지에 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우로 나누어 *hPTH* 유전자의 발현을 비교하였다. 전날 각 세포를 60 mm dish에  $5 \times 10^5$ 개로 준비한 후 그 다음날부터 48시간 동안 doxycycline (1  $\mu$ g/ml)이 첨가된 혹은 첨가되지 않은 배지에 배양한 후 RT-PCR과 ELISA를 실시하였다.

#### Two-step RT-PCR을 이용한 *hPTH*의 발현 여부 확인

감염과 선별과정이 끝난 각 세포는 trizol을 이용하는 방법으로 RNA를 분리한 후 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 제조한 cDNA를 주형으로 PCR을 실시하였는데 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험에 사용한 primer는 *hPTH* 유전자에 대한 서열로서 + strand primer인 5'-TCAGCATCAGCTACTAACATACCTG-3'와 - strand primer인 5'-CTGTTTTTCATTTTCACTGGGATT-3'를 사용하였다. 정상적인 전사과정이 일어나고 있음을 확인하기 위하여 각 세포의 cDNA를 *GAPDH* 유전자에 대한 primer로 PCR을 수행하였는데 CEF 세포의 경우는 + strand primer로 5'-ACGCCATCACTATCTTCCAGGAG-3', -strand

primer로 5'-CAGCAGCCTTCACTACCCCTCTTG-3'를 사용하였으며, PFF 세포의 경우에는 + strand primer로 5'-TCCACTACATGGTCTACATGTTCCAG-3', - strand primer로 5'-ATGTCATCATATTTGGCAGGTTTCTC-3'를 사용하였다. PCR 반응 과정은 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시하였다.

#### PTH의 ELISA 분석

Virus에 감염되지 않은 대조군 세포와 *hPTH* 유전자가 전이된 세포들을 각각 DMEM/FBS 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 수확하여 1:100으로 희석한 후 DSL-10-8000 ACTIVE I-PTH ELISA Kit (DSL-10-73100, USA)을 사용하여 ELISA를 수행하였다.

Tet system에 있어서 *hPTH* 유전자의 유도적 발현 여부의 확인은 확립한 각각의 세포주를 doxycycline (1  $\mu$ g/ml)이 첨가되거나 되지 않은 배지에서 각각 48시간 배양한 후, 그 배양액을 10배 희석하여 ELISA 분석을 실시하였다. 실험의 정확성을 기하기 위하여 FBS는 tetracycline이 첨가되어 있지 않는 TET Screened FBS (Hyclone, USA)를 구입하여 사용하였다.

## 결 과

#### Retrovirus Vector System에서의 WPRE 서열에 의한 *hPTH*의 발현 촉진

본 연구에서는 일차배양한 돼지와 닭의 세포에서 *hPTH*의 발현 양상과 그 발현의 조절 system을 구축하고자 하였다. *hPTH* 유전자를 CMV promoter 하에 도입하여 pLNC-PTH retrovirus vector를 구축하였으며 일차배양한 CEF와 PFF 표적세포에 전이시켜서 발현을 분석한 결과, 각 세포 배양액 1 ml당 500~700 pg의 생산량을 나타내었다(Fig. 2). *hPTH*의 발현을 증대시키기 위하여 pLNCPTH에 WPRE 서열을 도입하였는데 CEF 세포에서

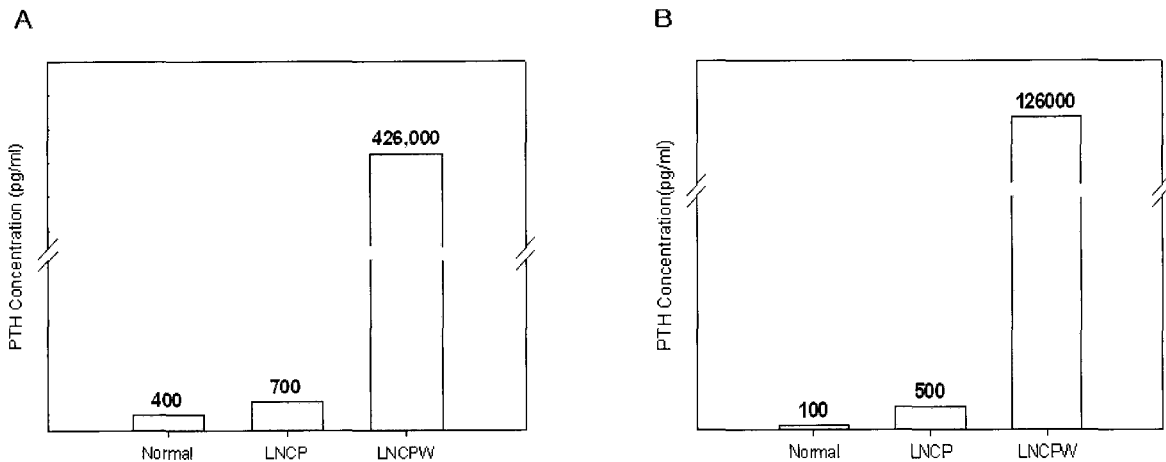
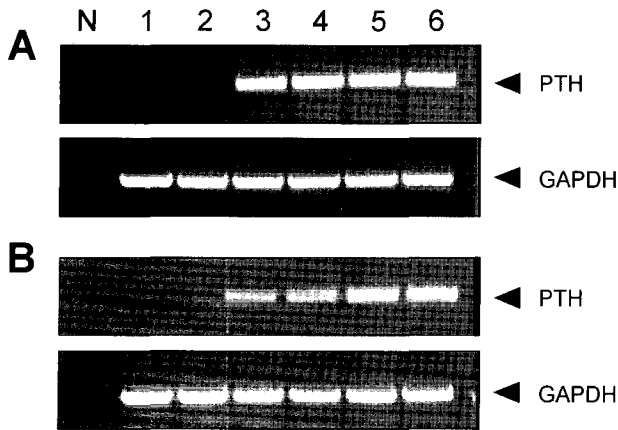


Fig. 2. ELISA analysis of *hPTH* in CEF (A) and PFF (B) cells. Normal, uninfected cells; LNCPTH, cells infected with LNCPTH viruses; LNCPTHW, infected with LNCPTHW viruses, respectively. All cell culture media were harvested after 48 hours of incubation.



**Fig. 3.** RT-PCR analyses of *hPTH* gene expression in CEF (A) and PFF (B) cells. N, negative control; 1, 2, uninfected cell; 3, 4, cells infected with LNCPTH viruses; 5, 6, cells infected with LNCPTHW viruses, respectively.

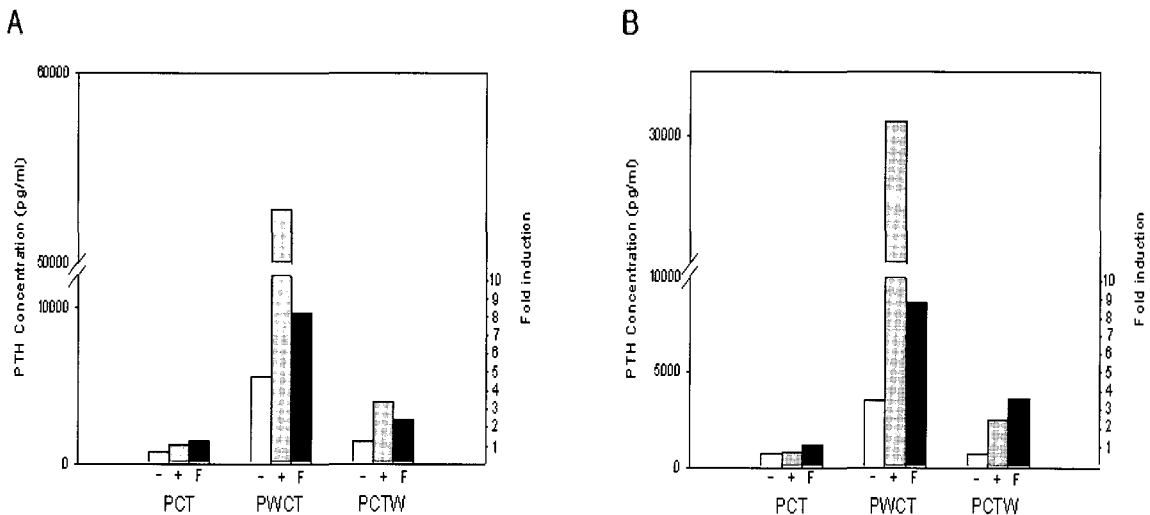
는 426,000 pg/ml, PFF 세포에서는 126,000 pg/ml의 생산량을 나타내었다(Fig. 2). 이는 WPRE 서열을 도입하지 않은 경우에 비해서 각각 600배, 250배 이상의 발현 증가를 의미하는데, 기존의 연구에서는 WPRE가 3~5배의 유전자 발현 증가 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Zufferey 등, 1999; Ramezani 등, 2000). 각각의 세포에서 분리한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시한 결과, WPRE가 도입된 실험군에서 PCR 단편이 더 진하게 나타났다(Fig. 3).

**Tetracycline Inducible Expression System으로부터의 *h-PTH*의 발현**

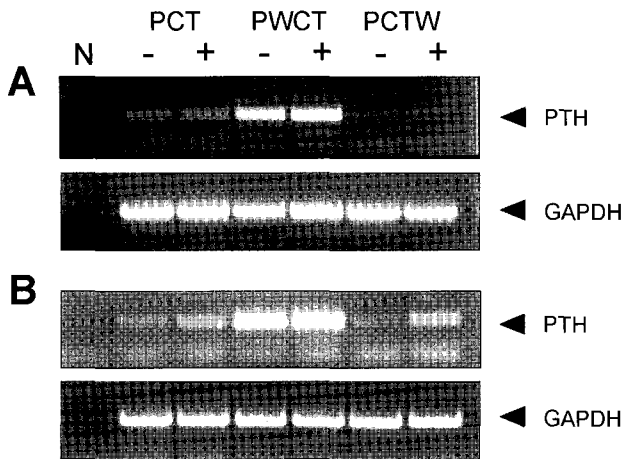
본 연구에서는 기존에 사용한 rtTA에 비해 여러 가지 면에서 보완된 형태의 rtTA2<sup>S</sup>M2를 사용한 one vector Tet

system을 구축하였다. 재조합한 기본 vector는 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2로서 이 vector에 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적으로 *hPTH* 유전자의 발현이 조절되는 vector system을 선별하고자 하였다. 그 결과 Tet system이 전이된 모든 표적 세포주들에서 doxycycline의 첨가에 의해 *hPTH*의 발현이 증가됨이 관찰되었으나 발현 양상은 WPRE의 vector 내의 위치에 따라서 다르게 나타났다(Fig. 4). 즉, *hPTH* 유전자의 3' 위치에 WPRE가 위치한 RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2의 경우, doxycycline이 함유된 조건에서 PFF에서는 30,000 pg/ml, CEF에서는 53,000 pg/ml로 가장 높은 발현 정도를 나타내었으며 doxycycline이 없는 조건에 대한 발현 유도율도 각각 8.6배, 9.6배로 가장 높게 나타났다(Fig. 4). WPRE가 rtTA2<sup>S</sup>-M2의 3'에 위치한 RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2-WPRE의 경우에는 두 세포주 모두에서 절대적인 발현율과 유도율이 WPRE가 없는 경우에 비해서는 높고 WPRE가 외래 유전자 다음에 위치한 경우에 비해서는 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4).

Two-step RT-PCR을 이용한 *hPTH* 유전자의 발현 여부의 확인을 위한 실험에서도 앞의 ELISA를 이용한 실험 결과와 거의 동일한 양상을 나타내었다. 각 실험군에서 정상적인 전사가 진행되는 것을 확인하기 위하여 *GAPDH* 유전자에 대한 RT-PCR을 동시에 수행하였다. 그 결과 모든 실험군에서 거의 동일한 양의 *GAPDH* 유전자에 대한 PCR 단편이 나타났는데 비해 *hPTH*에 대한 PCR 단편은 실험군마다 다양한 양상을 나타내었다. 모든 Tet vector에서 doxycycline이 첨가되지 않은 경우보다 첨가된 경우, 즉 유전자의 발현 유도가 일어난 경우에 PCR의 산물이 많은 것으로 보였으며 특히 WPRE가 *hPTH* 유전자 다음에 위치한 pRevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2 vector가 전이된 세포주에서 가장 높은 발현율과 유도율을 나타내었다(Fig. 5). 이에 비해 WPRE가 삽입되지 않았거나 rtTA2<sup>S</sup>M2 유전자의 downstream에 위치한 경우에는



**Fig. 4.** Expression and fold induction of *hPTH* after doxycycline treatment for 48 hours in target cells. A, CEF cell; B, PFF cell; -, cell was grown in the doxycycline free media; +, cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml); F, fold induction. Both CEF and PFF cells were infected one of RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2 (PCT), RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2(PWCT), and RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2- WPRE (PCTW).



**Fig. 5. Determination of doxycycline induction of the *hPTH* gene in CEF (A) and PFF (B) cells using RT-PCR analysis.** N, Negative control; PCT, target cell infected with RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2; PWCT, target cell infected with RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2; PCTW, target cell infected with RevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2-WPRE; -, cell was grown in the doxycycline free media; +, cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml). In RT-PCR analysis, two primer sets were used: One for the *hPTH* gene and the other for the control GAPDH gene.

doxycycline이 첨가된 조건에서의 전사 정도와 유도율이 비교적 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 5).

## 고찰

본 연구에서는 일차배양한 돼지와 닭의 세포에서 *hPTH*의 발현을 조절할 수 있는 system을 구축하고자 하였다. 먼저 *hPTH* 유전자의 발현을 증대하기 위해서 WPRE 서열을 여러 vector에 도입하였는데, WPRE는 전사후 조절인자로 mRNA의 생산을 촉진시키고 외래 유전자의 발현을 증가시키는 인자로 알려져 있다(Donello 등, 1998; Zufferey 등, 1999). 기존의 연구에서 외래 유전자의 발현을 3~5배로 증가시키는 것으로 나타난 것에 비해(Zufferey 등, 1999; Ramezani 등, 2000) 본 연구에서는 최대 600배의 매우 높은 발현 촉진 정도를 나타내었다(Fig. 2). 또한 RT-PCR의 결과에서 보는 바와 같이 WPRE 서열에 의한 RNA 생산량의 증가도 확인할 수 있었다(Fig. 3, 5).

Tetracycline-inducible system은 retrovirus 뿐만 아니라(Hofmann 등, 1996; Iida 등, 1996) adenovirus (Hu 등, 1997; Yoshida 등, 1997), AAV (Rendahl 등, 1998; Chenuaud 등, 2004), lentivirus (Verhoef 등, 2001; Marzio 등, 2001) 등에도 도입되어 외래유전자의 조절에 사용되어 왔다. 다른 유전자 조절 system과 비교하여 볼 때, Tet system의 장점은 유전적인 안정성, 기술적으로 간단한 적용성, 그리고 조절제로 사용되는 doxycycline의 조직, 또는 세포에 대한 뛰어난 침투성과 낮은 세포독성이다. 뿐만 아니라 Tet-on의 여러 요소들은 박테리아로부터 유래

되었기 때문에 진핵세포 내에서 일어나는 생리학적 대사 과정에 대한 간섭을 최소화할 수 있다. 그러나 이 system의 주된 문제점은 doxycycline이 없는 상황에서 rtTA와 operator의 잔여 친화성으로 인해서 외래 유전자의 발현에 대한 background activity(바탕활성)를 보이는 점이다. 이를 해결하기 위한 방안으로 본 연구에서는 새로운 돌연변이성 reverse transactivator인 rtTA2<sup>S</sup>M2를 도입하였다. 이 서열은 rtTA의 일부 아미노산 서열을 변형시켜서 doxycycline에 대한 감수성을 증가시키고, splice site와 원핵세포성 codon을 최소화함으로써 진핵세포 내에서 매우 안정하며 doxycycline이 없을 경우에 background 활성이 최소화되는 특성을 가졌다(Urlinger 등, 2000; Qu 등, 2004). 선행된 연구에서 원래의 rtTA 대신에 rtTA2<sup>S</sup>M2의 도입으로 외래 유전자의 leaky한 background expression(바탕 발현)을 최소화하는 연구 결과가 발표되었는데, Pluta 등(2005)은 HOS (human osteosarcoma) 세포에서 외래 유전자인 *LacZ*의 발현 유도율이 rtTA보다 rtTA2<sup>S</sup>M2를 사용하였을 때 약 25배 증가하는 것을 확인하였으며 Lamartina 등(2002)도 *in vivo*에서 rtTA보다 rtTA2<sup>S</sup>M2가 doxycycline 부재시에 낮은 바탕 활성을 보이며 높은 발현 유도율을 나타낸다고 보고하였다. 이에 본 연구에서도 기존에 사용한 rtTA에 비해 여러 가지 면에서 보완된 형태의 rtTA2<sup>S</sup>M2를 사용하였다. 또한 본 연구에서는 보다 효율적인 유전자 전이 system을 구축하기 위하여 rtTA2<sup>S</sup>M2와 TRE 서열을 한 vector 내에 위치시킴으로써 one vector system인 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2를 구축하였다. 이러한 구조의 vector에서는 rtTA 단백질과 tetracycline이 결합한 복합체가 TRE 부분에 결합함으로써 minimal CMV promoter 하의 *hPTH* 유전자의 발현을 유발하게 된다.

WPRE 서열은 vector나 promoter의 종류, 그리고 외래 유전자의 종류에 관계없이 유전자의 전사후 조절인자로서 발현을 증대시키는 것으로 보고되고 있다(Zufferey 등, 1999). 본 실험에서는 재조합한 pRevTRE-PTH-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2에 WPRE 서열을 여러 위치에 도입하여 가장 효율적인 vector system을 선별하고자 하였다. 그 결과, *hPTH* 유전자의 3'에 WPRE가 도입된 RevTRE-PTH-WPRE-CMVp-rtTA2<sup>S</sup>M2가 doxycycline이 함유된 조건에서 가장 높은 발현 정도와 발현 유도율을 나타내었고(Fig. 4), two-step RT-PCR을 이용한 실험에서도 ELISA를 이용한 실험 결과와 거의 동일한 양상을 나타내었다(Fig. 5). 이상의 연구에서 구축한 tetracycline inducible retrovirus vector system은 동물세포주나 형질전환 동물을 이용하여 *hPTH* 등의 여러 생리활성물질을 생산하는데 있어서 매우 유용한 유전자 전이 체계로 사용될 수 있을 것이다.

## 인용문헌

1. Canalis E (2000): Novel treatments for osteoporosis. *J Clin Invest* 106:177-179.
2. Chenuaud P, Larcher T, Rabinowitz JE, Provost N, Joussemet B, Bujard H, Samulski RJS, Favre D, Moullier P (2004): Optimal design of a single recombinant adeno-associated virus derived from serotypes

- 1 and 2 to achieve more tightly regulated transgene expression from nonhuman primate muscle. *Mol Ther* 9:410-418.
3. Donello JE, Jonathan EL, Hope TJ (1998): Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Viol* 72:5085-5092.
  4. 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.
  5. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Müller G, Hillen W, Bujard H (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769.
  6. Heaney R (2003): Advances in therapy for osteoporosis. *Clin Med Res* 2:93-99.
  7. Hofmann A, Nolan GP, Blau HM (1996): Rapid retroviral delivery of tetracycline-inducible genes in a single autoregulatory cassette. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5185-5190.
  8. Hu SX, Ji W, Zhou Y, Logothetis C, Xu HJ (1997): Development of an adenovirus vector with tetracycline-regulatable human tumor necrosis factor alpha gene expression. *Cancer Res* 57:3339-3343.
  9. Iida A, Chen S-T, Friedmann T, Yee J-K (1996): Inducible gene expression by retrovirus-mediated transfer of a modified tetracycline-regulated system. *J Virol* 70:6054-6059.
  10. Jüppner H, Gardella TJ, Brown EM, Kronenberg HM, Potts JT Jr (2001): Parathyroid hormone, and parathyroid hormone-related peptide in the regulation of calcium homeostasis and bone development; in DeGroot LJ, Jameson JL (eds): *Endocrinology*, ed 4. Philadelphia, Saunders, 969-998.
  11. Lamartina S, Roscilli G, Rinaudo CD, Sporeno E, Silvi L, Hillen W, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G, Toniatti C (2002): Stringent control of gene expression *in vivo* by using Novel Doxycycline-Dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* 13:199-210.
  12. Marzio G, Verhoef K, Vink M, Berkhout B (2001): *In vitro* evolution of a highly replicating, doxycycline-dependent HIV for applications in vaccine studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6342-6347.
  13. Milhaud G, Labat ML, Moricard Y (1983): (Dichloromethylene) diphosphonate-induced impairment of T-lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4469-4473.
  14. Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM (1993): Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 217:581-599.
  15. Pluta K, Luce MJ, Bao L, Agha-Mohammadi S, Reiser J (2005): Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med* 7:803-817.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG (2000): Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-469.
  19. Rendahl KG, Leff SE, Otten GR, Spratt SK, Bohl D, Van Roey M, Donahue BA, Cohen LK, Mandel RJ, Danos O, Snyder RO (1998): Regulation of gene expression *in vivo* following transduction by two separate rAAV vectors. *Nat Biotechnol* 16:757-761.
  20. 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.
  21. Verhoef K, Marzio G, Hillen W, Bujard H, Berkhout B (2001): Strict control of human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat. *J Virol* 75:979-987.
  22. Yoshida Y, Hamada H (1997): Adenovirus-mediated inducible gene expression through tetracycline-controllable transactivator with nuclear localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 230:426-430.
  23. 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.
  24. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Viol* 73:2886-2892.

(접수일자: 2006. 6. 25 / 채택일자: 2006. 8. 13)