

## RNA 간섭을 통한 Porcine Endogenous Retrovirus의 발현 억제

이현아 · 구본철 · 권모선 · 김태완<sup>†</sup>

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

## Inhibition of Porcine Endogenous Retrovirus Expression by RNA Interference

Hyuna Lee, 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

In recent years the number of patients waiting for organ transplantation has greatly outpaced the supply of human organs available, which leads to a renewed interest in pig-to-human xenotransplantation as an alternative. However, one of the biggest barriers in the xenotransplantation is presence of porcine endogenous retroviruses (PERV) that can infect human cells. In this study, to present a possible solution for this problem, we tried to inhibit expression of PERVs using shRNAs (short hairpin RNA) at the level of RNA synthesis and virus release. The shRNA targeting the sequence of PERV A, B type was cloned into pSIREN-RetroQ vector under the control of polymerase-III U6-RNA gene promoter. Quantitative real-time PCR was performed to detect any alterations in mRNA production of PERV A, B targeted by the shRNA in each clone. Depending on the target sequence of the shRNA, the transcription of PERV was decreased to as much as 4% and the number of progeny viruses was reduced to less than 1/200,000. Transgenic pigs producing such shRNAs may result in a highly reduced PERV expression in cells and organs, which is a prerequisite for safe xenotransplantations.

(Key words : Porcine endogenous retrovirus, RNA interference, Short hairpin RNA, Xenotransplantation)

### 요 약

최근 돼지의 장기를 사람에게 이식하는 이종간 장기 이식에 관한 연구가 급속히 발전되고 있다. 그러나 돼지의 장기를 이식할 경우 가장 큰 문제점 중의 하나는 돼지 genome 내에 존재하는 내인성 레트로바이러스(porcine endogenous retrovirus; PERV)가 인간에게 그대로 전이될 수 있다는 것이다. 이에 대한 대안으로 최근 활발히 연구되고 있는 RNA 간섭을 통한 PERV RNA의 발현을 최대한 억제하는 방법이 제안되고 있는데, RNA 간섭(RNA interference)은 double-stranded RNA (dsRNA)가 상보적인 표적 mRNA를 분해하여 결과적으로 표적 단백질의 발현을 특이적으로 억제하는 현상을 의미한다. 본 연구에서는 PERV에 대한 RNA 간섭 현상을 일으키는 shRNA 유전자를 레트로바이러스 벡터를 이용하여 돼지세포에 RNA가 상보적인 표적 mRNA를 분해하여 결과적으로 표적 단백질의 발현을 특이적으로 억제하는 현상을 의미한다. 도입한 후 PERV의 발현을 감소 여부를 조사하였다. 그 결과, gag-pol 유전자와 env 유전자 발현은 각각 대조군 세포의 4%와 10% 정도로 억제되었다. 한편, virus 입자의 생산에서 gag-pol 유전자는 대조군 세포에 비해 300배 이상 억제되었으며, env 유전자에서는 20만 배 이상 억제되었다. 이상의 결과를 미루어 볼 때 형질 전환 돼지를 이용한 이종 장기 이식에 있어서 RNA 간섭 현상을 이용한 PERV의 발현을 억제하는 시도는 생물학적 안전성을 크게 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

### 서 론

장기 이식에 있어서 가장 큰 문제점은 이식용 장기 수요에 비해 공여 장기가 절대적으로 부족한 데에 있다. 현 재의 생물학 수준에서 가장 직접적인 해결책은 동물의

장기를 이용한 이종간 이식인데(White와 Nicholson, 1999; Dorling, 2002), 장기 공여 동물로써 돼지는 장기의 해부학적 크기나 다산성으로 인한 경제적인 면 등 다른 동물에 비하여 여러 가지 장점을 가지고 있다. 그러나 돼지의 장기를 인간에 이식할 경우 돼지의 질병이 인간에게 그대로 전이될 수 있다는 문제점이 제기되고 있는데(Blusch

\* 본 연구는 농림부 바이오장기 생산 연구사업, 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업(센터과제번호 R11-2002-100-01005-0)의 지원으로 이루어진 것임.

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

등, 2002), 문제의 핵심은 대부분의 외인성 병원균은 무균 돼지의 사육을 통하여 제거가 가능하지만 돼지 genome에 삽입되어 있는 내인성 레트로바이러스(porcine endogenous retrovirus; PERV)는 이러한 사육 환경 조건만으로는 제거할 수 없다는데 있다.

돼지 genome의 일부로 존재하는 PERV 중에서 subgroup A, B, 그리고 C type만이 virus 입자를 만들고 감염력을 가지고 있다. 그 중 PERV C type은 돼지세포만 감염시킬 수 있는 반면, gag과 pol 유전자의 homology가 매우 높은 PERV A와 B type은 돼지뿐만 아니라 사람 세포에도 감염 및 증식이 가능하다고 알려져 있다(Blusch 등, 2000). 이러한 특징으로 인하여 돼지 장기를 이식한다고 가정했을 때 이식받는 사람의 면역력이 저하된다면 적어도 PERV A와 B type의 virus는 사람을 감염시킬 가능성이 있다. 이에 대한 해결책으로 최근 활발히 연구되고 있는 RNA 간섭을 통한 PERV RNA의 발현을 최대한 억제하는 방법이 제안되고 있다.

RNA 간섭의 작용 메커니즘은 다음과 같다. 즉, ds-RNA가 세포내로 도입되면 dicer라는 세포내 효소가 이를 인지한 다음 21~23 nucleotide 크기의 작은 조각으로 절단한다. Small interfering RNA (siRNA)라 불리는 잘려진 조각들은 세포내 단백질 복합체인 RNA induced gene silencing complexes (RISC)와 특이적으로 결합한 후 상보적 염기서열을 갖는 virus의 mRNA를 선택적으로 찾아내어 분해한다(Tuschl 등, 1999; Hutvagner와 Zamore, 2002).

포유류 세포에서 siRNA를 이용한 RNA 간섭 유도(Caplen 등, 2001; Elbashir 등, 2001)는 이미 많은 분야에서 적용되고 있는데 특히 HIV, Hepatitis C virus 등과 같은 질병의 유전자 치료 분야에도 응용되고 있다(Morris와 Rossi, 2006; Wilson과 Richardson, 2005). 동물세포에서 사용할 siRNA를 이용하는 방법은 (i) 합성한 siRNA를 transfection 과정을 거쳐 직접 세포 안으로 도입시키거나 (ii) 세포 안에서 siRNA가 발현되도록 만들어진 siRNA 발현 벡터를 세포 안으로 transduction시켜서 세포 내에

서 siRNA가 발현되게 하는 등의 두 가지가 있다(Paddison 등, 2002). 전자의 경우 세포 밖에서 쉽게 제조할 수 있고 한시적으로 특정 유전자의 발현을 억제시키기 때문에 influenza 또는 SARS와 같은 급성 질병의 치료에 응용될 수 있으며(Tompkins 등, 2004), 후자의 경우는 세포 내에서 오랜 기간 동안 특정 유전자의 발현을 억제하여야 하는 hepatitis 또는 HIV-1과 같은 만성적인 질병의 치료에 응용될 수 있다(Giladi 등, 2003; Banerjee 등, 2003). 본 연구에서는 장기간 발현이 가능하게끔 레트로바이러스 벡터를 사용하여 shRNA 유전자를 표적세포에 도입하였는데, 이 벡터에서는 RNA polymerase III promoter에 의해 PERV mRNA의 특정 서열에 대한 sense와 antisense sequence, 그리고 loop sequence로 구성된 short hairpin 구조의 RNA (shRNA)가 합성되게 된다. 세포내에서 생산된 shRNA는 dicer에 의해 21 nucleotide 크기로 잘린 후 RISC와 결합하여 PERV의 target mRNA를 분해하여(Paddison 등, 2002), 결과적으로 돼지 세포내 PERV의 발현을 억제하게 된다.

### 재료 및 방법

#### shRNA의 Target Sequence의 결정

사람세포에 감염이 가능한 PERV A와 B type의 viral RNA의 생산을 억제하기 위하여 먼저 PERV A type (Genbank accession No. AY099323)의 cDNA 염기서열을 Clontech사(USA)의 siRNA sequence selector (<http://ioinfo.ontech.com/maidesigner/>)에 입력한 후 Reynolds 등(2004)이 선택한 기준을 최대한 반영하여 6개의 target site를 도출하였다. 이들 중 4개는 gag-pol 유전자 내에 존재하고 2개는 env 유전자 내에 존재하는데, 이들 모두 target site의 DNA 사본이 B type PERV (Genbank accession No. AY099324)에서도 보존된 서열임을 확인하였다. Fig. 1에서 표시한 7 군데의 target site 중 4204는 Karlas 등(2004)에 의해 이미 PERV 발현의 억제 효율이 확인된 것으로

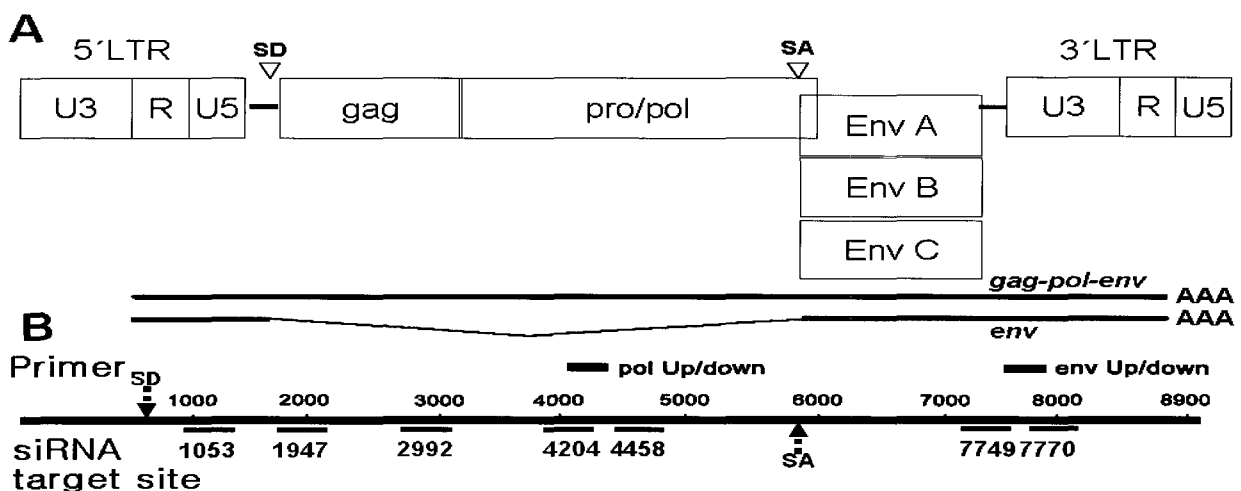


Fig. 1. Schematic presentation of the porcine endogenous retroviruses (PERV) genome and two mRNA species being expressed from proviral PERV. (A) Localization of siRNA target sequences and primers used for detection of viral RNA. (B) SD and SA indicate splice donor and acceptor sites.

본 실험에서 합성한 shRNA 벡터와 함께 효율성을 비교하기 위해 positive control로 사용하였다. 이상과 같이 결정된 target site를 기준으로 모두 7개의 oligonucleotide (약 70 nucleotide)를 합성하였다. 각 shRNA를 coding하는 oligonucleotide는 sense, loop, antisense 그리고 6 base의 poly(T)로 구성되어 있다.

#### 바이러스의 생산 및 표적세포로의 감염

shRNA 유전자가 내재된 레트로바이러스를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP293에 재조합한 각각의 pSIREN-RetroQ 벡터와 피막 유전자인 VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)가 포함된 pHCMV-G 벡터(Yee 등, 1994)를 calcium phosphate 방법으로 cotransfection하였다. 48시간이 경과된 후 생성된 virus를 24시간 전에 준비한 ( $1 \times 10^6$ /60 mm) PK-15 (porcine kidney; CCL-33 from ATCC, USA) 세포에 감염시켰다. 감염시 감염 촉매제인 polybrene (5  $\mu$ g/ml; Sigma, USA)도 함께 첨가하였다. 다음날부터 puromycin (3  $\mu$ g/ml; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. 본 실험에서 사용한 GP293 (Clontech, Palo Alto, Ca) 세포는 10%의 FBS (fetal bovine serum; HyClone, USA)와 penicillin (100 U/ml) - streptomycin (100  $\mu$ g/ml) (Pen/Strep; GibcoBRL, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, GibcoBRL, USA)에서 배양하였으며, PK-15 세포는 전자와 동일한 FBS와 Pen/Strep, 그리고 1 mM의 sodium pyruvate (GibcoBRL, Grand Island, NY)와 0.1 mM의 non-essential amino acid (GibcoBRL, Grand Island, NY)가 첨가된 MEM/EBSS medium (Hyclone, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 incubator에서 배양하였다.

#### RNA 분리 및 RT (Reverse Transcription) PCR

pSIREN-RetroQ 벡터가 도입된  $1 \times 10^6$ 개의 PK-15 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포내 total RNA와 배양액 내로 방출된 자손 virus의 genomic RNA를 분리하였다. 세포내 total RNA는 세포를 TRI reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH)로 처리하여 분리하였다. 자손 virus의 genomic RNA는 배양액을 초원심 분리 (BECKMAN Ultracentrifuge의 rotor 90Ti를 사용하여 17,000 rpm으로 2시간) 수확한 virus로부터 QIAamp Viral RNA mini Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 분리하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여

ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다.

#### Quantitative Real-Time PCR

PERV 발현 억제 여부를 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR을 수행하였는데 PERV *gag-pol* 및 *env* 유전자에 대한 specific한 PCR primer로 Mang 등(2001)에 의해 이미 확인된 것을 사용하였다(Table 1). Bio-Rad 회사(USA)의 MiniOpticon real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample을 4개씩 동시에 real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 3회 반복 실험하였다. PCR 반응은 DyNAmo SYBR Green qPCR Master mix (Finnzymes, Finland) 10  $\mu$ l에 각각 5 pmol의 +와 - strand primer, 그리고 cDNA template 0.5  $\mu$ g을 넣어 전체 20  $\mu$ l로 수행하였다. 세포의 total RNA에서 *gag-pol* 및 *env* 유전자의 발현량을 측정하기 위하여 internal control인 *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)와 함께 quantitative real-time PCR을 수행하였다. Quantitative real-time PCR 결과를 Opticon Monitor analysis software로 분석하여 Ct값을 결정하였으며, Ct값에서 *GAPDH* 유전자의 Ct값은 reference로 정하고 *gag-pol* 및 *env* 유전자의 Ct값은 target으로 정한 뒤  $2^{-\Delta Ct}$  방법(Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 최종적으로 *gag-pol* 및 *env* 유전자의 발현 정도를 비교하였다(Fig. 3A, 4A). shRNA에 의한 knock-down 작용이 실제 virus의 생산에 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 knock-down 효과를 확인했던 세포의 배양 배지로부터 virus를 수확하여 절대정량 분석을 하였다. 절대정량 분석을 위해 이미 copy 수를 알고 있는 standard virus DNA를 10배씩 희석하여 virus cDNA sample과 함께 quantitative real-time PCR을 수행한 후, standard curve를 기준으로 각 sample의 virus cDNA copy 수를 계산하였다(Fig. 3B, 4B).

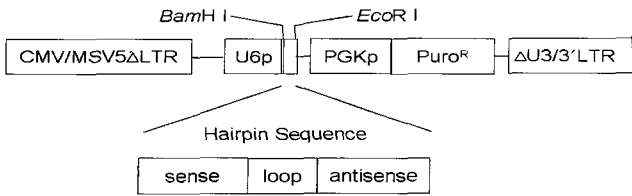
## 결 과

각 shRNA를 coding하는 약 70 nucleotide 길이의 DNA를 *Bam*HI 과 *Eco*R I으로 처리된 pSIREN-RetroQ 벡터 내의 U6 promoter 다음에 도입하여 최종적으로 7종류의 pSIREN-RetroQ-shRNA 벡터를 구축하였다(Fig. 2).

여러 종류의 shRNA 벡터로 전이된 세포에서, 세포의

Table 1. Primers used in Real-time PCR Analysis

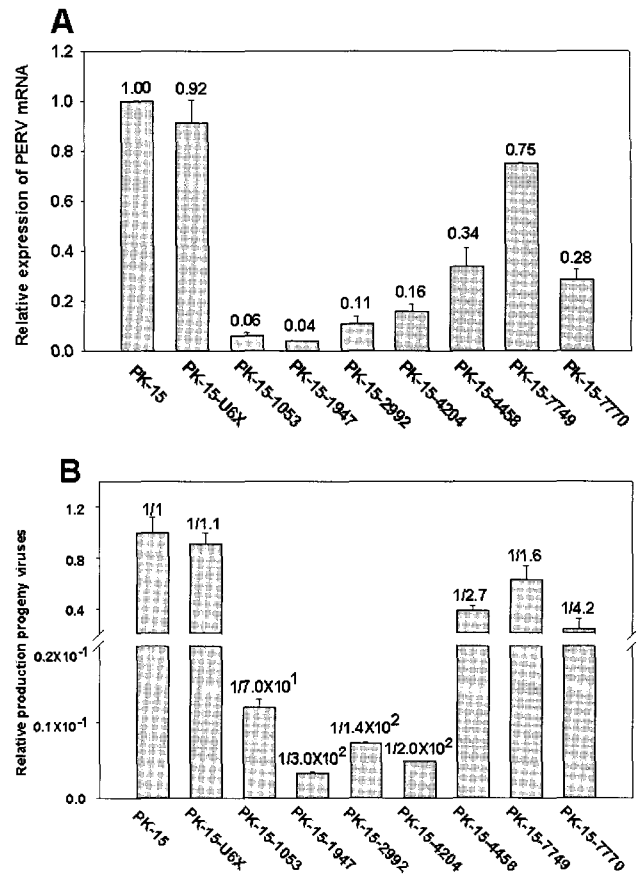
Target virus	Target gene	Primer sequence (5' → 3')		Fragment length (bp)
PERV-A/B/C	<i>pol</i>	Upstream primer	CCATACTGGTCAAGGACG	217
		Downstream primer	TGCTTCGGTCAGTGAACC	
PERV-A/B	<i>env</i>	Upstream primer	AGGTCCTCCTGGATGACC	138
		Downstream primer	GATCTGGACTGCACTCAC	
Porcine GAPDH	<i>GAPDH</i>	Upstream primer	TTACCTGACCTGGATTAG	219
		Downstream primer	TGTTAGAGGATGGTCTCG	



**Fig. 2. Construction of shRNA retrovirus vector.** pSIREN-RetroQ is a self-inactivating retroviral expression vector designed to express a small hairpin RNA (shRNA) under the control of the human U6 promoter (U6p). The hybrid 5' LTR consists of the cytomegalovirus (CMV) type I enhancer and the mouse sarcoma virus (MSV) promoter. Puro<sup>R</sup>, puromycin resistance gene, PGKp; Phosphoglycerate kinase promoter.

total RNA와 배양액 내로 방출된 자손 virus의 genomic RNA에 대한 각각의 cDNA를 주형으로 하여 quantitative real-time RT-PCR로 분석한 결과는 다음과 같다. 먼저 세포의 total RNA에서 *GAPDH* 유전자에 대한 *gag-pol* 유전자의 억제 정도를  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법(Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 상대적으로 분석한 결과(Fig. 3A), target site가 *gag-pol* 유전자인 shRNA 벡터로 전이된 PK-15-1053, 1947 세포에서 PERV 발현 효율이 PK-15 세포에 대비하여 각각 6%, 4%로 가장 낮게 나타났다. 그 외 PK-15-2992, 4204, 4458 세포에서는 각각 11%, 16%, 34% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었고, target site가 *env* 유전자인 shRNA 벡터로 전이된 PK-15-7749, 7770 세포에서는 각각 75%, 28%로 비교적 낮은 발현 억제를 보였다. 다음으로 PERV의 발현 억제가 일어난 세포주를 대상으로 세포 외로 방출되는 virus의 생산 억제에 대하여 standard curve를 작성하여 분석하였다(Fig. 3B). 그 결과 세포에서 PERV의 억제 효율이 가장 높았던 PK-15-1947 세포에서 virus의 입자 생산에서도 PK-15 세포에 대비하여 300배 이상 억제되었으며, PK-15-4204 세포에서는 200배 이상 억제되었음을 확인하였다. 그 외 PK-15-2992 세포에서는 130배 이상, PK-15-1053 세포에서는 79배 이상의 억제를 보였다. 그러나 PK-15-4458, 7749, 7770 세포의 경우, virus의 입자 생산이 5배 이하 밖에 억제되지 않았음을 확인하였다(Fig. 3B). 이들 3개의 target site(4458, 7749, 7770)에 대한 shRNA 벡터들은 세포내 total RNA에 대한 *gag-pol* 유전자의 억제 정도에서도 낮은 발현 억제율(Fig. 3A)을 나타낸 것으로, 결과적으로 PERV의 유전자 발현을 knock-down 시키기엔 적절하지 않은 벡터임을 알 수 있었다.

한편 PERV의 발현 억제를 *env* primer를 사용한 quantitative real-time PCR로 측정된 결과, shRNA 벡터가 전이된 7개의 세포에서 PERV의 발현율은 control의 10~20% 정도로 억제되었다(Fig. 4A). 그 중에서 target site가 *env* 유전자인 shRNA 벡터가 전이된 PK-15-7770와 PK-15-7749 세포에서 PERV의 발현이(대조군에 비해 각각 10%, 15%) 가장 높게 억제되었다. 그러나 세포 밖으로 방출된 자손 virus를 기준으로 검정하였을 때 이들 세포들의 shRNA에 의한 억제율은 control에 비해 1/10 혹은 1/2 정도로 가장 낮은 양상을 보였다(Fig. 4B). 비록 세포내 PERV의 발현 억제와 같은 양상은 아니었지만 Karlas 등(2004)의 연구에서 사용된 target site가 도입된 PK-15-4204 세포의 경우 최고 20만 배가 넘는 차이를 보였으며

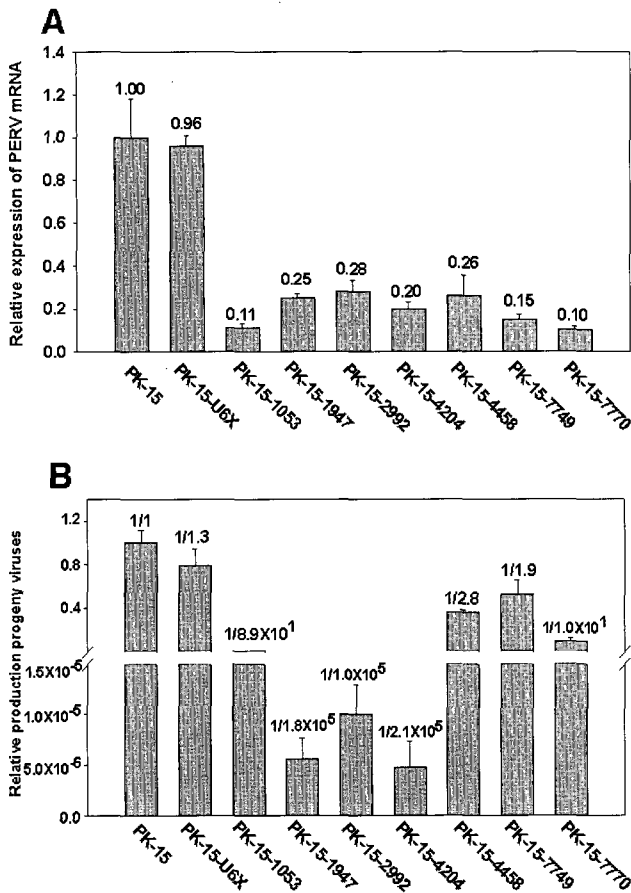


**Fig. 3. Inhibition of PERV *gag-pol* gene expression in the PK-15 cells transduced with various shRNA vectors.** (A) total RNA extracted from each cell line was reverse transcribed and the resulting cDNA was subjected to quantitative real-time PCR using a *pol* primer set shown in Table 1. Relative expression level was determined by comparison with the level of each cell line's *GAPDH* cDNA. (B) to evaluate inhibitory effect on the progeny virus production from each cell line, viral genomic RNA extracted from the released viruses in the media was reverse transcribed, then the resulting cDNA was subjected to same quantitative real-time PCR. Inhibitory effect was determined by comparison with the cDNA copy number obtained from PK-15 cells expressing no shRNA. PK-U6X; PK-15 cells transformed with SIREN-RetroQ carrying no shRNA coding sequence. The data were obtained from experiments performed in triplicate, and are presented as mean $\pm$ SD.

본 실험에서 만든 벡터 중에서는 PK-15-1947 세포에서 17만 배 이상으로 많은 차이를 나타내었다(Fig. 4B).

## 고찰

최근 돼지의 장기를 사람에게 이식하는 이종간 장기 이식에 있어서 가장 큰 문제점은 돼지 genome의 일부로 존재 하는 PERV가 인간에게 그대로 전이될 수 있다는 것이다(Blusch 등, 2002). 이러한 PERV 감염의 가능성을 최소화하기 위한 방책으로 현재의 생물학적 기술 수준으로 가능한 것은 (i) virus 생산이 낮은 동물들을 장기 이



**Fig. 4.** Inhibition of PERV *env* gene expression in the PK-15 cells transduced with various shRNA vectors. (A) total RNA extracted from each cell line was reverse transcribed and the resulting cDNA was subjected to quantitative real-time PCR using a *env* primer set shown in Table 1. Relative expression level was determined by comparison with the level of each cell line's GAPDH cDNA. (B) to evaluate inhibitory effect on the progeny virus production from each cell line, viral genomic RNA extracted from the released viruses in the media was reverse transcribed, then the resulting cDNA was subjected to same quantitative real-time PCR. Inhibitory effect was determined by comparison with the cDNA copy number obtained from PK-15 cells expressing no shRNA. PK-U6X; PK-15 cells transfected with SIREN-RetroQ carrying no shRNA coding sequence. The data were obtained from experiments performed in triplicate, and are presented as mean±SD.

식용으로 선택하거나(Oldmixon 등, 2002), (ii) 항바이러스 백신을 개발하거나(Fiebig 등, 2003), (iii) 특정 mRNA sequence를 분해하는 RNA 간섭 기술을 이용하는 것이다. 이들 방법 중 특히 RNA 간섭을 적용한 항바이러스 치료의 개발 분야는 5년 전 포유류 세포에서 RNA 간섭 유도의 가능성이 처음 증명(Elbashir 등, 2001)된 이래로 매우 빠른 속도로 발전하고 있는데, 대표적인 연구로 Karlas 등(2004)에 의한 PERV에 감염된 사람 세포에서의 siRNA의 PERV 발현 억제에 관한 연구와 Miyagawa 등(2005)에 의한 siRNA 벡터를 전이시킨 돼지 세포 내에서의 PERV의 발현 억제에 관한 보고를 들 수 있다. 연구 방향을 후자의 경우와 동일하게 설정한 본 연구에서는

기존의 다른 발현 벡터에 비해 세포 내에서 오랜 기간 동안 안정적인 유전자 발현이 가능한 레트로바이러스 벡터를 이용하여 형질 전환된 돼지에서 장기간 RNA 간섭 유도를 일으키는 벡터 시스템을 개발하고자 하였다. 먼저 사람세포에 감염성이 있는 PERV genome의 염기서열을 기준으로 모두 7개의 다른 shRNA를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 구축한 다음, 구축한 레트로바이러스 벡터를 돼지세포인 PK-15 세포에 전이시킨 후 세포 내에 존재하는 PERV의 발현 억제 효과를 quantitative real-time PCR 방법을 이용하여 확인하였다. Internal control인 GAPDH 유전자에 대한 gag-pol 유전자의 억제 정도는 벡터가 전이되지 않은 세포에 비해 4~75%의 발현율을 나타냈으며 shRNA 벡터 중 PK-15-1947 세포가 전이된 세포 주에서 가장 낮은 발현율(4%)을 보였다(Fig. 3A). Karlas 등(2004)이 사용한 siRNA target site인 pol2 sequence와 본 실험의 6개의 target site와 비교하였을 때, Karlas 등(2004)의 연구에서 PERV에 감염된 사람 세포 내에서 10%의 PERV 발현효율을 보였던 4204 siRNA는 본 연구의 돼지세포(PK-15-4204)에서도 거의 비슷한 발현 억제 효과를 보였다(16%, Fig. 3A). 반면에 본 연구에서 합성한 shRNA 벡터로 전이된 PK-15-1053, 1947 세포에서는 이보다 더 높은 발현 억제율을 보였다(Fig. 3A). *Env* primer를 이용한 발현 억제율 비교에서는 PK-15-7770 세포가 가장 억제된 발현율(10%)을 보였다(Fig. 4A). 이처럼 PERV의 발현 억제 효율이 사람세포에서 이미 확인된 기존의 shRNA보다 본 실험에서 합성한 shRNA가 더 높은 억제 효율을 나타냈으며, 이 벡터들을 PERV에 감염된 사람세포에 도입하였을 경우에도 역시 높은 억제 효율을 보일 것이라 예상된다. PERV의 발현 억제가 일어난 세포 주를 대상으로 세포 외로 방출된 자손 virus의 발현 억제 정도를 standard curve를 이용하여 분석한 결과, 최고 17~20만 배에 달하는 감소율을 보였다(Fig. 4B). 이와 같은 결과에서 표적 서열에 knock-down을 유도하는 RNA 간섭은 세포 내에서의 PERV의 발현을 억제시킬 뿐 아니라 세포 외로 방출된 PERV virus의 입자 수도 현저히 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

바이러스 유전자를 표적으로 한 RNA 간섭 유도에 있어서 하나의 결점이라면 virus의 돌연변이가 RNA 간섭에서 sensitivity의 감소를 이끌 수 있다는 것이다. 이러한 문제는 특히 DNA virus보다 환경에 따라 돌연변이가 쉽게 일어나는 RNA virus의 경우에서 더욱 현저하다(Drake 등, 1998). Das 등(2004)은 RNA 간섭을 이용한 virus 억제 실험에서 RNA virus 돌연변이의 계속적인 축적으로 인해 시간이 지날수록 siRNA에 의한 knock-down 효과가 점점 감소하는 것을 확인하였다. 이에 대한 대안으로 여러 개의 virus 유전자를 동시에 표적으로 할 경우 돌연변이에 의한 siRNA 저항력의 감소 효과를 증대시킬 수 있다(Kahana 등, 2004; Chen 등, 2005). 즉, siRNA에 의한 특정 유전자의 발현 억제가 저하되기 위해서는 여러 개의 siRNA의 돌연변이가 축적되어야 하기 때문에 여러 곳을 target으로 한 shRNA 벡터를 동시에 세포에 전이시킨다면, siRNA에 대한 완전한 저항력을 가진 virus 돌연변이가 나타날 가능성은 상당히 감소될 것이다(Wilson 등, 2005; Leonard 등, 2005). 따라서 본 실험에서 PERV의 발현 억제가 확인된 shRNA 벡터들 중 1개가 아닌 그 이상의 shRNA 벡터를 동시에 돼지 세포에 전이

시킨다면 PERV의 발현 억제 효율이 더욱 높아질 것으로 사료된다.

### 인용문헌

- Banerjee A, Li MJ, Bauer G, Remling L, Lee NS, Rossi J, Akkina R (2003): Inhibition of HIV-1 by lentiviral vector-transduced siRNAs in T lymphocytes differentiated in SCID-hu mice and CD43+ progenitor cell-derived macrophages. *Mol Ther* 8: 62-71.
- Blusch JH, Patience C, Takeuchi Y, Templin C, Roos C, Von Der Helm K, Steinhoff G, Martin U (2000): Infection of nonhuman primate cells by pig endogenous retrovirus. *J Virol* 74:7687-7690.
- Blusch JH, Patience C, Martin U (2002): Pig endogenous retroviruses and xenotransplantation. *Xenotransplantation* 9:242-251.
- Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA (2001): Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9742-9747.
- Chen Z, Xu ZF, Ye JJ, Yao HP, Zheng S, Ding JY (2005): Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *J Zhejiang Univ Sci B* 6:236-241.
- Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, Berkhout B (2004): Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 78: 2601-2605.
- Dorling A (2002): Clinical xenotransplantation: pigs might fly? *Am J Transplant* 2:695-700.
- Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998): Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148: 1667- 1686.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Fire A (1999): RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15:358-363.
- Giladi H, Ketzinel-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E (2003): Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 8:769- 776.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002): RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 12: 225-232.
- Kahana R, Kuznetzova L, Rogel A, Shemesh M, Hai D, Yadin H, Stram Y (2004): Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* 85:3213-3217.
- Karlas A, Kurth R, Denner J (2004): Inhibition of porcine endogenous retroviruses by RNA interference: increasing the safety of xenotransplantation. *Virology* 325:18-23.
- Leonard JN, Schaffer DV (2005): Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape. *J Virol* 79:1645-1654.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002): Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30:1292-1305.
- Martin U, Kiessig V, Blusch JH, Haverich A, von der Helm K, Herden T, Steinhoff G (1998): Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells. *The Lancet* 352:692-694.
- Miyagawa S, Nakatsu S, Nakagawa T, Kondo A, Matsunami K, Hazama K, Yamada J, Tomonaga K, Miyazawa T, Shirakura R (2005): Prevention of PERV infections in pig to human xenotransplantation by the RNA interference silences gene. *J Biochem (Tokyo)* 137:503-508.
- Morris KV, Rossi JJ (2006): Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* 13:553-558.
- Paddison PJ, Caudy AA, Hannon GJ (2002): Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1443-1448.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS (2002): Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16:948-958.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22:326-330.
- Specke V, Rubant S, Denner J (2001): Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses. *Virology* 285: 177-180.
- Takeuchi Y, Patience C, Magre S, Weiss RA, Banerjee PT, Le Tissier P, Stove JP (1998): Host range and interference studies of three classes of pig endogenous retrovirus. *J Virol* 72:9986-9991.
- Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8682-8686.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA (1999): Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. *Genes Dev* 13:3191-3197.

29. White SA, Nicholson ML (1999): Xenotransplantation. *Br J of Surg* 86:1499-1514.
30. Wilson JA, Richardson CD (2005): Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 79:7050- 7058.
31. Wong ML, Medrano JF (2005): Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:75-85.
32. 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.  
(접수일자: 2006. 8. 2 / 채택일자: 2006. 8. 28)