

Tetracycline 유도적인 RNAi System을 이용한 생쥐 성장 관련 유전자의 발현 억제

손혜진 · 구본철 · 권모선 · 이영만 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Inhibition of *mIGF-1* and *mGHR* Gene Expression using Tetracycline-Inducible RNAi System in Mouse Liver Cell

Hye Jin Son, Bon Chul Koo, Mo Sun Kwon, Young Man Lee and Teoan Kim[†]

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

ABSTRACT

In this study, to further understand the mechanism of animal growth and to develop a miniature transgenic animal model, we constructed and tested tetracycline-inducible RNAi system using shRNA targeting the mRNA of mouse insulin-like growth factor (*mIGF-1*) or mouse growth hormone receptor (*mGHR*) gene. Quantitative real-time PCR analysis of mouse liver cell (Hepa1c1c7) cells transfected with these vectors showed 85% or 90% of expression inhibition effect of IGF-1 or GHR, respectively. In ELISA analysis, the protein level of IGF-1 in the cells expressing the shRNA targeting IGF-1 mRNA was reduced to 26% of non-transformed control cells. Unexpectedly, in case of using shRNA targeting GHR, the IGF-1 protein level was decreased to 75% of control cells. Further experiments are needed to explain the lower interference effect of GHR shRNA in IGF-1 protein. Accumulated knowledge of this approach could be applicable to a variety of related biological area including gene function study, gene therapy, development of miniature animals, etc.

(Key words : RNAi system, IGF-1, GHR, Albumin promoter, Tetracycline inducible gene expression)

서 론

생쥐의 성장은 직간접적으로 성장에 관련하는 호르몬과 조절 인자, 그리고 호르몬 수용체들이 관여하는 복잡한 기작에 의해 이루어진다(Lupu 등, 2001). 성장을 조절하거나 성장과 관련된 질환 연구를 위하여 표적이 되는 유전자는 호르몬뿐만 아니라 수용체 유전자도 그 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 insulin-like growth factor (IGF-1)과 성장호르몬(growth hormone, GH) 수용체인 growth hormone receptor (GHR) 유전자를 표적으로 하여 각 유전자의 발현을 유도적으로 억제할 수 있는 system을 확립하고자 하였다. 표적 인자 중 IGF-1은 70개의 아미노산으로 이루어진 peptide hormone으로서 GH의 조절 하에 주로 간에서 합성 및 분비된다. IGF-1은 세포성장과 분화를 조절하여 성장을 촉진할 뿐만 아니라 뼈, 근육, 신경조

직을 형성하며, 손상된 세포를 재생시키는 역할을 한다(Isaksson 등, 1987). 또한, 뇌하수체에 작용하여 GH의 분비를 억제하는 피떡임 작용을 나타낸다. 성장호르몬의 수용체 역할을 담당하고 있는 GHR은 세포막을 관통하는 구조를 가지며, 세포의 영역을 단백질 분해효소로 분해한 후 혈액 내에 유리되어 성장호르몬의 결합단백질로 작용한다. *IGF-1* 유전자의 돌연변이는 생쥐의 체성장을 억제하여 정상 대조군에 비해 45%의 체중을 나타내도록 하였으며(Liu 등, 1993), GHR 유전자의 돌연변이는 성장 장애로 인한 왜소증인 Laron syndrome의 주요 원인으로 확인되었다(Eshet 등, 1984). 또한, *GHR* 유전자를 knockout 시켜서 Laron syndrome 동물 모델을 개발한 연구도 보고되었다(Zhou 등, 1997). 이에 본 연구에서는 생쥐의 *IGF-1*과 *GHR* 유전자의 발현을 보다 효율적으로 억제하여 성장 저해를 유도하고자 하였으며, 각 유전자의 발현 억제 수단으로 RNAi system을 이용하였다. RNAi sys-

* 본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호:PJ009601)의 지원에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

tem은 초파리나 생쥐의 배아, 사람의 세포 등 여러 개체에서 나타나는 gene-silencing 기작으로 1998년에 Fire 등에 의해 dsRNA에 의해 서열 특이적으로 유전자 발현을 억제할 수 있음을 처음으로 발견하였다. 이후 2001년에 Elbashir 등이 포유류 세포에서 21~25 mer의 siRNA (short interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적인 발현 억제가 가능하다는 사실을 보고하였다. 이러한 작은 크기의 siRNA는 외부에서 단시간에 합성이 가능하고, 신속하고 효율적으로 표적 유전자를 knock-down시킬 수 있는 장점을 가지나, 높은 합성 비용과 siRNA 효율이 단시간 동안만 지속된다는 단점을 가진다(Devroe와 Silver, 2002). 또한, 세포 내로 유전자를 transfection하는 과정에서 세포에 따른 유전자 도입 효율이 매우 저조하거나, 도입된 유전자가 시간의 경과에 따라 세포 내에서 소실되어 버리는 현상도 나타난다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 50~70 bp의 shRNA를 합성하여 virus vector system에 도입하고자 하였다. shRNA는 sense, antisense oligomer가 5~10 bp nucleotide의 loop 부위 양쪽으로 위치하여 서로 상보적으로 연결된 hairpin stem loop의 형태를 이루고 있다(Chen 등, 2003; Kwak 등, 2003). 이 shRNA를 합성하여 retrovirus vector에 도입함으로써 세포나 개체 내에서 장시간에 걸쳐 RNAi 효과가 유지되도록 하였다(Wilson과 Richardson, 2003). 또한, 개체 발생과 증식 등의 과정에서 관여하는 유전자 기능 해석 및 특정 유전자의 발현을 억제함으로써 유전자 치료에 적용하는 등의

보다 정확한 연구를 위하여 원하는 시간이나 국한된 조직에서 RNAi 발현을 조절할 수 있도록 shRNA inducible expression system을 구축하고자 하였다(Van de Wetering 등, 2003). 본 연구에서도 생쥐의 체성장 관련 유전자에 대한 shRNA를 합성하여 간 조직 특이적인 promoter의 조절 하에 위치하도록 하였으며, 이를 tetracycline inducible retrovirus vector에 도입함으로써 간세포 내에서 체성장 관련 유전자의 지속적인 발현 억제가 일어나도록 하였다. 각 shRNA에 위한 체성장 관련 유전자의 발현 억제는 ELISA와 quantitative real-time PCR 방법으로 확인하였으며, 가장 효율적인 shRNA 서열을 선별하고자 하였다.

실험 방법

shRNA 합성

생쥐 IGF-1 (GenBank accession No. NM_010512.4) 유전자와 GHR (GenBank accession No. NM_010284.3)에 대한 RNA 간섭 서열은 Clontech사의 온라인 프로그램인 RNAi Target Sequence Selector (http://www.clontech.com/KR/Support/Online_Tools)를 이용하여 도출하였다. RNA 간섭 서열은 각 유전자의 cDNA 서열 중 open reading frame 부분만의 염기서열을 프로그램에 도입하여 결정하였다. 각 유전자에 대하여 결정된 RNA 간섭 서열은 다시

Table 1. Designed shRNAs targeting the mRNA of *mIGF-1* and *mGHR* genes

Target gene	siRNA target sequence	shRNA sequence
Mouse IGF-I	mIGF-1 siRNAi-342 CIGTGACTTCITGAAGATA	Top Strand (66 bp) 5'-gatccGCTGTGACTTCTTGAAGATATTCAAGAGATATCTTCAAGAAGTCACAGTTT TTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66 bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACTGTGACTTCTTGAAGATATCTTGAATATCTTCAAGA AGTCACAGCg-3'
Mouse IGF-I	mIGF-1 siRNAi-674 CTGACATGCCCAAGACTCA	Top Strand (66 bp) 5'-gatccGCTGACATGCCCAAGACTCATTCAAGAGATGAGTCTTGGGCATGTCAGTTT TTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66 bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACTGACATGCCCAAGACTCATCTTGAATGAGTCTTGGG CATGTCAGCg-3'
Mouse GHR	mGHR siRNA-1197 TCCAGATCTTCTCAAGGAA	Top Strand (66 bp) 5'-gatccGTCCAGATCTTCTCAAGGAATTCAAGAGATTCCTTGAGAAGATCTGGATTT TTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66 bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAATCCAGATCTTCTCAAGGAATCTTGAATTCCTTGAGAA GATCTGGACg-3'
Mouse GHR	mGHR siRNA-1358 CAGACAGACTTCTAAGCAA	Top Strand (66 bp) 5'-gatccGCAGACAGACTTCTAAGCAATTCAAGAGATTGCTTAGAAGTCTGTCTGTTT TTTACGCGTg-3'
		Bottom Strand (66 bp) 5'-aattcACGCGTAAAAAACAGACAGACTTCTAAGCAATCTTGAATTGCTTAGAA GTCTGTCTGCg-3'

shRNA Sequence Designer (http://www.clontech.com/KR/Support/Online_Tools) 프로그램을 이용하여 shRNA 간섭 서열로 디자인하였으며, 각각의 shRNA 간섭 서열은 주식회사 바이오니아에 의뢰하여 합성하였다. 합성된 oligonucleotide들은 BamHI 점착 말단부, sense, loop, anti-sense, 전사 중지 서열인 6 base의 poly T 및 EcoRI 점착 말단부로 구성되어 있는 top strand oligonucleotide와 이와 상보적 서열인 bottom strand oligonucleotide로 각각의 single-strand 구조이다(Table 1).

Oligonucleotide (20 μM)들은 T4 polynucleotide kinase와 PCR 기기를 이용하여 37°C에서 30분간 반응시켜서 5' 말단의 염기를 인산화 하였고, 이 후 95°C에서 2분간 가열 후 PCR 기기의 작동을 멈추고, 1시간 동안 서서히 반응 온도를 낮추어 double-strand 구조의 oligonucleotide를 형성하였다. 이상의 생쥐 shRNA double-strand oligonucleotide들은 간 조직 특이적인 albumin promoter의 조절 하에 tetracycline-controlled transcriptional suppressor (tTs) sequence가 도입되어 있고, TREmod/U6p promoter 조절 하에 shRNA 서열을 도입할 수 있는 tetracycline inducible retrovirus vector인 pTetRNAi-X-ATINW와 재조합하였다. 각각의 구축한 vector의 구조는 Fig. 1과 같다.

생쥐 shRNA를 도입한 Tet Vector System의 유전자 발현의 Knock-Down 효과 검증

생쥐 shRNA 유전자가 내재된 retrovirus를 생산하기 위하여 packaging 세포인 GP2 293 (Clontech, USA)에 재조합한 각각의 pTetRNAi-mIGF1i-ATINW, pTetRNAi-mGHRi-ATINW vector와 피막 유전자인 VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)가 포함된 pVSV-G (Clontech, USA)를 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하였다. 48시간이 경과된 후 virus를 수확하여 감염 촉매제인 polybrene (5 μg/mL; Sigma, USA)을 첨가한 후 24시간 전에 준비해 둔 1×10⁶개의 Hepa1c1c7 세포에 감염시켰다. 다음날부터 G418 (600 μg/mL; Sigma, USA)이 첨가된 배양액으로 2주간 선별 과정을 거친 후 유전자가 전이된 세포주를 확립하였다. 본 실험에서 사용한 GP2 293 (Clontech, USA) 세포는 10%의 FBS (fetal bovine serum; 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)에서 배양하였으며, Hepa1c1c7 세포는 10% FBS가 첨가된 Alpha minimum essential medium (α-MEM, GibcoBRL, USA)에서 배양하였다. 확립한 각 세포를 1 μg/mL의 doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배양액에서 48시간 배양하였다. 실험에 사용한 doxycycline은 tetracycline의 유도물질로서 induction의 효율을 높여주는 물질로 알려져 있으며 (Cunningham 등, 1997), 실험에 사용한 doxycycline의 최적 농도(1 μg/mL)는 Urlinger 등 (2000)의 보고와 본 연

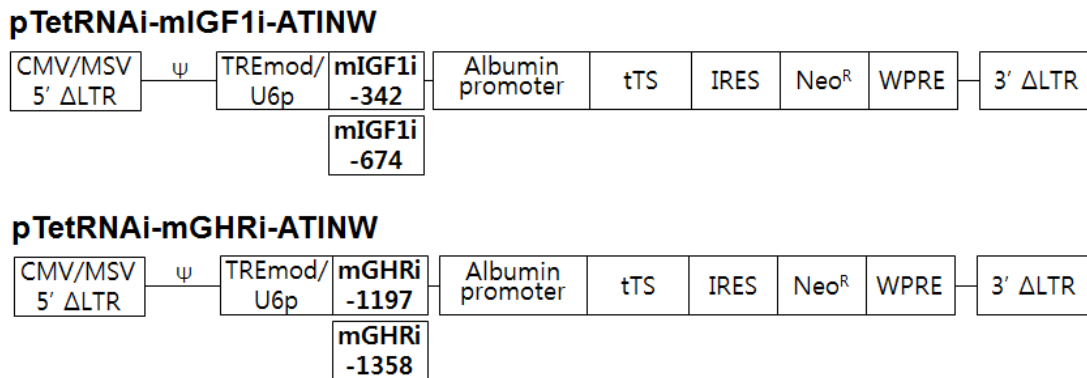


Fig. 1. Construction of pTetRNAi-mIGF1i-ATINW and pTetRNAi-mGHRi-ATINW retrovirus vectors. CMV/MSV LTR, cytomegalovirus/mouse sarcoma virus hybrid promoter long terminal repeat; TREmod/U6p, derived from modified Tet response element and human U6 small nuclear promoter; mIGF1i, mouse IGF-1 shRNA; Alb, albumin promoter; tTS, tetracycline-controlled transcriptional suppressor; IRES, internal ribosome entry site; Neo^R, neomycin resistant gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; mGHRi, mouse GHR shRNA. Length of each sequence is not drawn to scale.

Table 2. Mouse shRNA primers used in real-time PCR analysis

Gene	Sequence	Product size (bp)
mIGF-1	5'-CTTCTACCTGGCGCTCTGCTTG-3' (+)	208
	5'-ATCACAGCTCCGGAAGCAACAC-3' (-)	
mGHR	5'-TGAGGCACTTCAAAGTCTTGCC-3' (+)	223
	5'-GTGCTCTTCCACCTTGATTT-3' (-)	
mGAPDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACT-3' (+)	230
	5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTTGC-3' (-)	

구자의 예비 실험을 통해 결정하였다. 배양한 세포로부터 total RNA를 분리하여 quantitative real-time PCR을 실시하였으며, 배양액을 취하여 mIGF-1에 대한 ELISA를 실시하였다.

먼저 세포내 total RNA는 세포를 TRI reagent (TaKaRa, Japan)로 처리하여 분리하였다. 분리한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여 ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega, USA)을 사용하였다. *mIGF-1* 및 *mGHR* 유전자의 knock-down 여부를 확인하기 위하여 quantitative real-time PCR을 수행하였는데 반응에 사용한 각 유전자에 대한 특이적인 PCR primer 서열은 Table 2와 같다.

Bio-Rad 회사(USA)의 CFX96™ real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample을 4개씩 동시에 real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 2회 반복 실험하였다. PCR 반응은 IQ™ SYBR Green qPCR Master mix (Bio-Rad, USA) 10 μ L에 각각 5 pmol의 +와 - strand primer, 그리고 cDNA template 30 ng을 넣어 전체 20 μ L로 수행하였다. 세포의 total RNA에서 *mIGF-1* 및 *mGHR* 유전자의 상대적 발현량을 측정하기 위하여 internal control인 *mGAPDH*와 함께 quantitative real-time PCR을 수행하였다. Quantitative real-time PCR 결과를 CFX manager software로 분석하여 Ct값을 결정하였으며, Ct값에서 *mGAPDH* 유전자의 Ct값은 reference로 정하고 *mIGF-1* 및 *mGHR* 유전자의 Ct값은 target으로 정한 뒤 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법(Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 최종적으로 *mIGF-1* 및 *mGHR* 유전자의 발현 정도를 비교하였다.

ELISA 실험은 R&D systems (USA)의 Mouse/Rat IGF-I ELISA kit을 이용하여 실시하였다. 96 well plate에 Calibrator Diluent RD5-38 buffer를 50 μ L씩 넣은 후 준비된 sample과 standard를 50 μ L씩 첨가하여 실온의 microplate shaker 상에서 2시간 반응시켰다. 반응 2시간 후 wash buffer로 4회 수세한 다음 100 μ L의 conjugate를 각 well에 첨가하여 2시간 동안 실온의 microplate shaker 상에서 반응시켰다. 4회 수세한 각 well에 substrate 100 μ L를 첨가하여 실온에 30분간 방치한 후, stop solution 100 μ L를 넣고 반응을 종료하였다. 발색반응을 확인한 뒤 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

Tetracycline 유도적인 Retrovirus Vector System을 이용한 mIGF-1의 Knock-Down 효과 검증

본 실험에 사용된 vector의 경우, Tet-system이 적용된 shRNA vector이므로 각 세포에서 mIGF-1 및 mGHR의 발현 조절을 알아보기 위해 doxycycline을 1 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 처리하였다. TetRNAi-mIGF1i-342, 674-ATINW 세포에서 *mGAPDH* 유전자에 대한 *mIGF-1* 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과, 발현 억제 효율이 83.7%, 85.3% 정도의 발현 억제 효과를 나타내

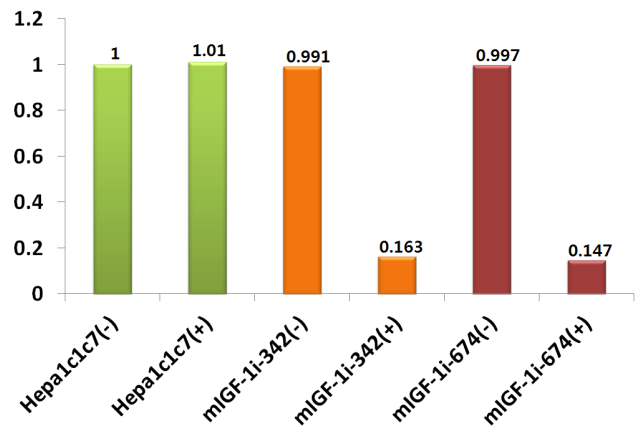


Fig. 2. Efficiency of mIGF-1 knock-down using mIGF1i shRNA in Hepa1c1c7 and Hepa1c1c7-TetRNAi-mIGF1i-ATINW cells using quantitative real-time PCR analysis. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/mL) for 48 hrs.

었고(Fig. 2), doxycycline에 의한 유도적 shRNA 발현이 이루어져 knock-down 되고 있음을 알 수가 있었다.

Tetracycline 유도적인 Retrovirus Vector System을 이용한 mGHR의 Knock-Down 효과 검증

TetRNAi-mGHR1i-641, 1197, 1358-ATINW 세포에서 *mGAPDH* 유전자에 대한 *mGHR* 유전자의 억제 정도를 상대적으로 분석한 결과, 발현효율이 90.4%, 90.3%, 93.4% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 또한, *mGHR* 유전자의 억제로 인하여 *mGHR*의 결핍이 생기면서 세포에 mIGF-1의 합성에 영향을 미치므로 *mIGF-1* 유전자의 억제효율 정도를 같이 상대적으로 분석한 결과, 발현효율이 86.7%, 88.9%, 91.9% 정도의 발현 억제 효과를 나타내었다(Fig. 3). 결과적으로 doxycycline을 48시간 처리시 TetRNAi-mIGF1i-674-ATINW에서 가장 높은 85.3%의 억제 효율이 나타났으며, TetRNAi-mGHR1i-1358-ATINW에서 가장 높은 93.4%의 억제 효율을 나타내었다(Fig. 3). 이상의 결과로, *mIGF-1* 유전자 및 *mGHR* 유전자의 target site에 대한 각각의 shRNA vector들은 세포내 total RNA 수준에서 전반적으로 높은 발현 억제 효율을 나타내므로, 각 유전자의 발현을 doxycycline 조절 하에 knock-down시키기 위한 적합한 vector system임을 확인할 수 있었다.

단백질 수준에서의 mIGF-1i와 mGHR의 Knock-Down 효율 양상 확인

각 shRNA에 의한 RNA 수준에서의 knock-down 효율을 quantitative real-time PCR 방법으로 확인한 후, 단백질 수준에서의 억제 효율을 검증하고자 mIGF-1에 대한 ELISA를 실시하였다.

Hepa1c1c7-TetRNAi-mIGF1i-342-ATINW와 Hepa1c1c7-TetRNAi-mIGF1i-674-ATINW 세포에 doxycycline을 1 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 처리한 후, 배양

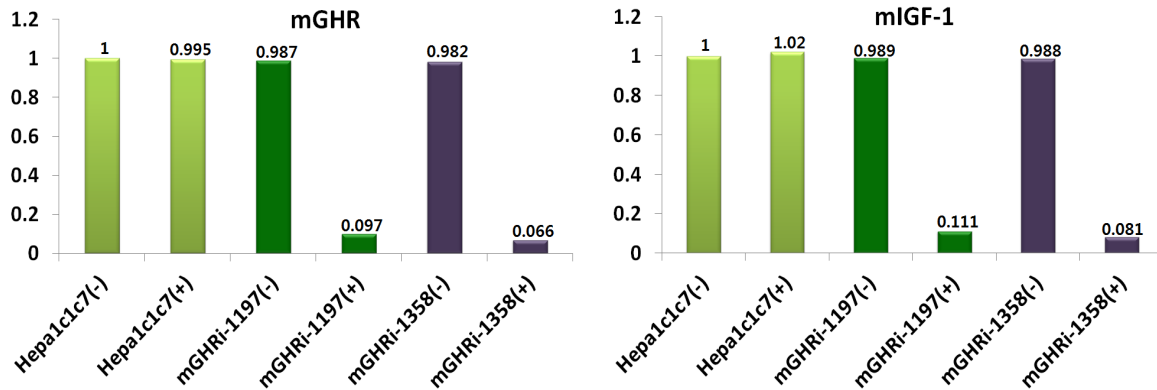


Fig. 3. Efficiency of mGHR and mIGF-1 knock-down using mGHRI shRNA in Hepa1c1c7 and Hepa1c1c7-TetRNAi-mGHRI-ATINW cells using quantitative real-time PCR analysis. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/mL) for 48 hrs.

액에 포함된 mIGF-1 단백질 양을 ELISA 방법으로 측정 한 결과, 전자의 세포에서는 doxycycline 처리를 하지 않은 경우와 처리한 경우가 각각 370.8 pg/mL, 96.7 pg/mL로 나타났고, 후자의 세포는 각각 378.6 pg/mL, 97 pg/mL의 값을 나타내었다(Fig. 4). 즉, 각각의 shRNA에 대한 표적 유전자의 발현 억제 효율은 73.9%, 74.4%로 측정되었는데, 이는 doxycycline에 의한 유도적인 shRNA 발현으로 인해 표적 유전자의 발현 억제가 단백질 수준에서 일어나고 있음을 증명하는 결과이다.

이에 반해 mGHR에 대한 shRNA가 도입된 Hepa1c1c7-TetRNAi-mGHRI-1197-ATINW와 Hepa1c1c7-TetRNAi-mGHRI-1358-ATINW 세포에서는 mIGF-1 단백질 양이 전자의 세포에서는 doxycycline 처리를 하지 않은 경우와 처리한 경우가 각각 347.2 pg/mL, 266 pg/mL로 나타났고, 후자의 세포는 각각 287.9 pg/mL, 209.3 pg/mL로 측정되었다(Fig. 5). 각각 shRNA의 단백질 수준에서의 발현 억제 효율은 23.4%와 27.3%로서, mIGF-1에 대한 shRNA가

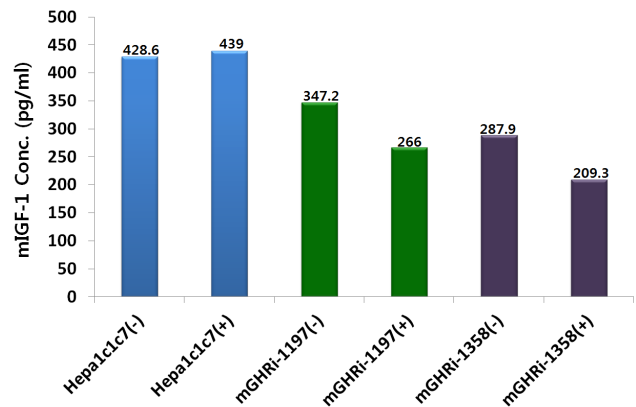


Fig. 5. ELISA analysis of mIGF-1 in Hepa1c1c7 and Hepa1c1c7-TetRNAi-mGHRI-ATINW cells. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/mL) for 48 hrs.

도입된 경우에 비해 표적 유전자의 발현 억제 효율이 상대적으로 저조한 것으로 확인되었다.

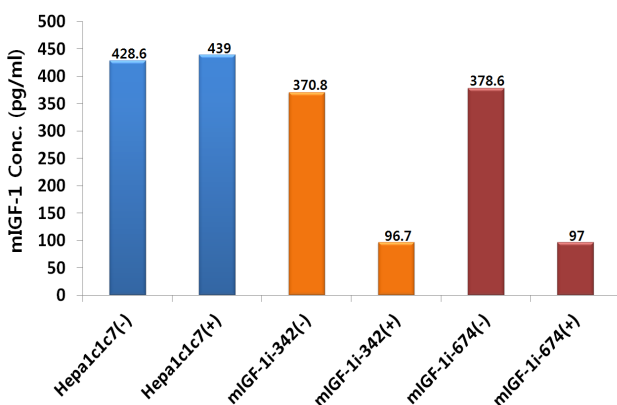


Fig. 4. ELISA analysis of mIGF-1 in Hepa1c1c7 and Hepa1c1c7-TetRNAi-mIGF-1i-ATINW cells. (-), cell was grown in the doxycycline-free media for 48 hrs; (+), cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/mL) for 48 hrs.

고찰

체성장에 관여하는 유전자인 IGF-1과 GH receptor의 발현의 억제에 관한 연구는 성장 관련 질환에 대한 유전자 치료뿐만 아니라, 형질전환 소형 동물의 개발에도 적용될 수 있다. 이에 본 연구에서는 생쥐의 체성장에 관련된 유전자인 mIGF-1과 mGHR 유전자에 대한 shRNA 서열을 design하였으며, 동물에 적용시 shRNA에 의한 특정 유전자의 knock-down이 유발됨으로 인하여 나타날 수 있는 생리적인 부작용을 최소화하기 위하여 tetracycline 유도적인 retrovirus vector system을 도입하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 virus vector는 복제 불능 retrovirus vector로서, 종양 유발성 인자들이 제거된 형태

로 세포독성을 나타내지 않으며, 감염된 숙주세포의 genome 상으로 안정하게 도입되어 지속적인 유전자의 전달이 가능한 매개체로 알려져 있다(Tai와 Kasahara, 2008). 발생 및 분화, 세포주기 조절 등에 관여하는 유전자의 기능 연구나 특정 유전자의 조직 또는 시기 특이적인 발현 억제에 관한 연구에 있어서 shRNA에 의한 지속적인 유전자 발현 억제는 큰 문제점으로 대두될 수 있다. 이에 기존의 유전자 발현 조절 system인 tetracycline inducible system이나 ecdysone inducible system을 RNAi system에 도입하고자 하는 연구가 시도되었다(Van de Wetering 등, 2003; Gupta 등, 2004). 본 연구에서는 전자의 system을 도입하였는데, 이 system의 조절단백질로는 보편적으로 사용되는 reverse tetracycline controlled transactivator (rtTA) 대신 tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS)를 사용하였다. tTS는 Tet repressor protein (TetR)과 Kid-1 protein (SDKid-1)의 KRAB-AB silencing domain이 융합된 형태로서 강력한 transcriptional suppressor로 작용한다(Freundlieb 등, 1999; Witzgall 등, 1994). 작용 기작을 간단히 살펴보면, Dox가 없을 때 tTS는 Tet operator sequences (TetO)와 결합하고 KRAB-AB domain은 TetO sequence의 promoter downstream에서 강력한 transcription suppressor로 작용한다(Zhu 등, 2001, 2002). 또한, promoter가 내재된 TRE 부위는 U6 promoter와 H1 promoter의 TATA box와 initiation site 사이에서 tet-operator 서열이 삽입된 형태이다. 본 연구에서 구축한 tetracycline 유도적인 RNAi retrovirus vector system을 이용한 각각의 shRNA에 의한 체성장 관련 유전자의 발현 억제를 *in vitro* 상에서 확인한 결과, 매우 효율적인 유전자 발현의 knock-down 효과를 나타내는 것으로 확인되었는데, mIGF-1 shRNA가 mGHR shRNA를 사용한 경우보다 RNA와 단백질 수준 모두에서 효율적인 발현 억제 현상을 나타내는 것으로 판단되었다. Quantitative real-time PCR 분석에서는 mIGF-1에 대해서 약 85%의 유전자 발현 억제 효율을 나타냈고, mGHR에 대해서는 약 90% 이상의 유전자 발현 억제 효율을 나타내었다. 또한, mIGF-1과 mGHR 유전자에 대한 shRNA의 단백질 수준에서의 발현 억제 양상을 확인하기 위하여 ELISA를 실시한 결과, mIGF-1에서는 약 74% 단백질 발현 억제 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 이는 성장에 관련하는 인자 중 GHR보다 IGF-1을 이용한 발현의 knock-down이 더 효율적임을 증명하는 결과이다. GHR보다 IGF-1이 성장에 있어서 보다 큰 영향을 나타낸다는 연구는 Lupu 등 (2001)이 실시한 GHR과 IGF-1 유전자를 제거한 생쥐를 이용한 실험에서도 보고되었는데, GHR과 IGF-1이 모두 결손된 생쥐의 경우에 가장 심한 성장장애가 관찰되며, IGF-1이 결손된 생쥐와 GHR만 결손된 생쥐 순으로 성장장애가 나타나서, GHR에 비해 IGF-1이 성장에 큰 영향을 나타내는 것으로 확인되었다.

이상의 연구에서 도출한 Tet-RNAi system 및 *in vitro* 결과들은 개체 발생과 증식 등의 과정에서 관여하는 유전자 기능 연구 및 특정 유전자의 발현 억제에 적용하여 유전자 치료 연구에 이용하거나, 성장 관련 질환 모델의 생산 및 애완용 형질전환 소형 동물의 개발 등의 여러 분

야에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

- Chen YC, Song C, Luo CQ (2003): Short hairpin RNAs induced RNA interference in human cells. *Ai Zhong* 22:566-570.
- Cunningham SM, Cunningham MD, Zhu L, Kain S (1997): Determination and correlation of expression levels of luciferase and EGFP using the tetracycline-controlled gene expression system and fluorescence imaging. *Neuroscience Abs* 23:647.
- Devroe E, Silver PA (2002): Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol* 2:15.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
- Eshet R, Laron Z, Pertzlan A, Arnon R, Dintzman M (1984): Defect of human growth hormone receptors in the liver of two patients with Laron-type dwarfism. *Isr J Med Sci* 20:8-11.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Freundlieb S, Schirra-Müller C, Bujard H (1999): A tetracycline controlled activation/repression system for mammalian cells. *J Gene Med* 1:4-12.
- Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V (2004): Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 101:1927-32.
- Isaksson OG, Lindahl A, Nilsson A, Isgaard J (1987): Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocr Rev* 8: 426-438.
- Kwak YD, Koike H, Sugaya K (2003): RNA Interference with small hairpin RNAs transcribed from a human U6 promoter-driven DNA vector. *J Pharmacol Sci* 93:214-217.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993): Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
- 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.
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A (2001): Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth.

- Dev Biol 229:141-162.
14. Tai CK, Kasahara N (2008): Replication-competent retrovirus vectors for cancer therapy. *Front Biosci* 13:3083-3095.
 15. 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.
 16. Van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H (2003): Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep* 4:609-615.
 17. Wilson JA, Richardson CD (2003): Induction of RNA interference using short interfering RNA expression vectors in cell culture and animal systems. *Curr Opin Mol Ther* 5:389-396.
 18. Witzgall R, O'Leary E, Leaf A, Onaldi D, Bonventre JV (1994): The Krüppel-associated box-A (KR-AB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci* 91:4514-4518.
 19. Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ (1997): A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13215-20.
 20. Zhu Z, Ma B, Homer RJ, Zheng T, Elias JA (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 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.
- (Received: 25 August 2014/ Accepted: September 16 2014)