

RNA aptamer 발현을 통한 CD4+ peripheral blood lymphocytes에서의 인간 면역결핍 바이러스의 증식 억제

이성욱*

단국대학교 자연과학부 분자생물학전공 나노센서 바이오텍 연구소

제1형 인간 면역결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)의 Rev 단백질에 대하여 야생형보다 10배 더 잘 결합하도록 시험관에서 선택된 RRE40라 명명된 RNA aptamer가 과연 임상적으로 유용한지 알기 위하여 인체의 CD4+ peripheral blood lymphocytes 세포에서 레트로바이러스 벡터를 이용하여 RRE40 RNA를 발현한 후에 그 세포에서의 HIV-1 증식 현상을 관찰하였다. 그 결과 대조군인 tRNA를 발현하는 유전자가 전달된 세포에 비해 RRE40 RNA를 발현하는 세포에서 보다 더 효과적으로 HIV-1의 증식이 억제되었다. 그러나 바이러스의 증식이 완전히 억제되지는 못하였고 일시적 또는 감소된 형태로 바이러스 증식이 억제되었다. 이러한 결과는 RRE40 RNA가 decoy로서 세포에서의 HIV-1 증식 억제에 유용함을 시사하지만 RNA decoy를 HIV-1 감염 환자의 치료에 이용하기 위해선 보다 효과적인 유전자 전달방법 및 보다 개선된 RNA decoy의 개발 등이 필요할 것이다.

Key words □ CD4+ peripheral blood lymphocytes, gene therapy, HIV-1, RNA aptamer, RNA decoy, RRE

제1형 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)에 대하여 현재 유용되고 있는 항바이러스제들은 여러 부작용과 복잡한 투여 일정 및 돌연변이 출몰 등의 여러 문제점들로 인해 그 사용에 많은 제약이 있다(12). 그러나 HIV-1이 감염하는 세포의 전구세포인 조혈모세포에 *ex vivo* 상으로 약영향 없이 유전자를 전달할 수 있으므로(16) HIV-1 감염 환자의 치료를 위하여 HIV-1의 증식을 억제할 수 있는 유전자 또는 HIV-1에 대한 면역작용을 유발할 수 있는 유전자를 이용한 유전자 치료요법이 유용한 방법이 될 수 있다. 이와 같이 세포 내에서의 HIV-1의 증식을 억제할 수 있는 유전자 치료로서 HIV-1에 대한 antisense RNA, 리보자임, RNA decoy 또는 siRNA 등과 같이 바이러스 증식을 억제할 수 있는 짧은 길이의 RNA를 발현할 수 있는 유전자를 세포 내에서 발현시키는 방법이 유용할 것이다(18). 왜냐하면 인체에서 이러한 RNA에 대한 면역작용이 유발되지 않는 것으로 알려져 있으며 RNA의 세포 내 과발현이 용이하고 또한 RNA가 바이러스 산물과 매우 특이적으로 반응할 수 있으므로 RNA를 기반으로 한 억제제들은 숙주세포의 정상적인 기능에 영향을 덜 끼칠 수 있기 때문이다. 그러나 antisense RNA, 리보자임, 또는 siRNA 등을 이용한 방법들은 그러한 억제제에 대해 저항성을 가질 수 있는 돌연변이가 바이러스의 출몰 가능성이 있을 수 있다는 단점이 내재해 있다.

RNA decoy란 짧은 길이의 oligonucleotide로서 HIV-1 RNA에 존재하는 trans activation response (TAR) RNA 또는 Rev response

element (RRE) RNA에 해당되는 부위를 말한다. HIV-1의 TAR와 RRE는 HIV-1의 증식 조절 단백질인 Tat와 Rev에 각각 결합함으로써 HIV-1의 유전자 발현 나아가 HIV-1의 증식을 위해 매우 중요한 부위이다(14). 이러한 TAR 또는 RRE decoy RNA들을 세포 내에서 과발현 시 HIV-1의 TAR 또는 RRE RNA와 Tat 또는 Rev 단백질과의 상호 결합이 방해됨으로서 인체의 CD4+ T 임파구 세포주에서의 HIV-1 증식이 매우 효과적으로 억제될 수 있다고 보고되었다(7, 8, 15, 17). 특히 RNA decoy가 다른 억제 RNA보다 유리한 점은 RNA decoy에 해당되는 HIV-1 RNA 부위가 HIV-1 strain마다 잘 보존되어 있으며 이러한 RNA decoy에 대하여 저항성을 가지도록 HIV-1의 Tat 또는 Rev 부위가 변이된 돌연변이들은 또한 자기 자신의 RNA와 결합을 하기 힘들 것이므로 출몰되기가 힘들 것이다.

보다 더 효과적인 RNA decoy의 개발을 위해서 SELEX라는 시험관내 선택 방법(1, 20)에 의해 HIV-1의 조절 단백질에 대하여 보다 더 잘 결합할 수 있는 RNA 분자들이 선택되었다. 이러한 시험관내 선택 방법을 통해 어떠한 종류의 단백질에 대해서도 높은 결합력으로 결합할 수 있는 RNA가 선택될 수 있으며 이러한 RNA는 RNA aptamer라 불린다. SELEX를 이용하여 HIV-1의 Rev 단백질에 대하여 야생형 RRE RNA보다 10배 더 잘 결합할 수 있는 RRE40라 명명된 RNA aptamer가 선택되었으며 이러한 RNA aptamer의 세포 내에서의 기능도 야생형 RRE보다 더 향상되었음이 보고되었다(2,19). 이러한 RRE40 RNA aptamer를 인체의 CD4+ T세포주에 과발현 시에 야생형 RRE RNA를 이용한 decoy RNA의 발현보다 훨씬 더 효과적으로 HIV-1의 증식을 억제할 수 있었다(9). 따라서 본 연구에서는

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-709-2905, Fax: 02-798-4733
E-mail: SWL0208@dankook.ac.kr

RRE40 RNA decoy가 과연 임상적으로 HIV-1 감염 환자의 치료에 응용될 수 있는지 검증하기 위해 인체에서 CD4+ peripheral blood lymphocytes (PBLs) 세포를 추출 후 레트로바이러스 벡터를 이용하여 RRE40 RNA를 발현한 후에 그러한 세포에서의 HIV-1 증식 현상을 한 달 동안 관찰하였다. 효과적으로 세포에 유전자 전달을 하기 위해 바이러스 포장 세포주와 CD4+ PBLs 세포를 공동 배양한 결과 약 20%의 CD4+ PBLs 세포에 레트로바이러스 벡터에 의해 RRE40 유전자가 전달되었으며 이러한 세포에서의 HIV-1 증식이 대조군인 tRNA가 발현되는 세포군에 비해 매우 효과적으로 억제되었다. 그러나 바이러스 증식이 완전히 억제되는 못하였으며 일시적 또는 감소된 형태의 바이러스 억제 패턴을 보여 주었다.

재료 및 방법

CD4+ PBLs 세포 추출 및 배양과 바이러스

정상인 혈액 100 ml을 lithium heparin collection tube에 모아 phosphate buffered saline 용액 (PBS)에 1:1로 희석시킨 후 Lymphoprep (Axis-Shield PoC, Oslo, Norway) cushion을 이용하여 4°C에서 1500×g로 15분 간 원심 분리하였다. Mononuclear band를 모은 후 PBS로 두 번 씻어 내고 1 mM EDTA와 0.5% Gamimune (Bayer, Pittsburgh, USA)이 포함된 PBS 용액에 ml 당 5×10^6 개의 세포가 되도록 상온에서 20분간 처리하였다. 2×10^7 개의 세포를 1 mM EDTA가 함유된 PBS로 3번 미리 처리 한 T-25 anti-CD4 Microcollector flask (Applied Immune Sciences, Santa Clara, USA)에 풀어 넣었다. 각 flask에 10%의 열처리한 인체의 AB serum (Pel-Freez, Rogers, USA)과 ml 당 50 U의 rh-IL2 (Novartis, Basel, Switzerland) 및 ml 당 5 mg의 PHA-M (Sigma, St. Louis, USA)이 함유된 RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, USA) 배지 5 µl을 첨가후 세포들을 37°C에서 3일간 배양하였다. 증식하는 CD4+ PBLs 세포들을 flask로부터 가볍게 tapping을 통해 제거한 후 여러 flask의 세포들을 T-25 flask에 모은 후 1 ml 당 2×10^6 개의 세포 농도가 되도록 새로운 배지를 첨가하였다. 레트로바이러스 벡터로 유전자를 전달하기 전에 CD4+ PBLs 세포들을 이틀간 더 배양하였다.

CD4+ PBLs 세포를 이용한 HIV-1 증식 실험을 위해 primary CD4+ 임파구 세포에서 증식할 수 있는 HIV strain SF13을 이용하였다(3). 바이러스를 HUT-78 세포에 감염시킨 후 열혈 후에 바이러스가 분리된 세포 상층액을 모은 후 원심분리로 남아있는 세포 잔해를 제거하고 그 상층액을 -80°C에 보관하였다.

레트로바이러스 제조 및 CD4+ PBLs 세포로의 유전자 전달

RRE40에 해당되는 oligonucleotide를 변형 DCT 벡터(9)의 *SacII*와 *BamHI* 부위에 삽입하였다. 이와 같이 변형된 벡터에는 tRNA^{met} 유전자(Δ3-2)가 존재하며 tRNA 유전자와 transcription termination signal 사이에 두 개의 stem loop 구조(hpI, hpII)가 들어 있다. 또한 두 stem loop은 짧은 길이의 염기서열(L)로 분

리되어 있어 이러한 L 염기서열 중간에 RRE40에 해당되는 oligonucleotide를 삽입하였다. 이러한 벡터를 DCT-RRE40으로 명명하였다. 따라서 결과적으로 벡터의 L은 LI과 LII로 분리된다. 벡터 DNA에 해당되는 바이러스를 다음과 같이 제조하였다(7, 9). 1 µg의 벡터 DNA를 AM12 바이러스 포장 세포주로 gene pulsor (BioRad, Hercules, USA)를 이용하여 electroporate한 후 DNA가 전달된 세포들을 1 ml 당 0.7 mg의 G418을 이용하여 분리하였다. G418에 저항성이 있는 세포들을 모은 후 배지로 분비된 유전자 전달용 재조합 레트로바이러스를 얻기 위해 세포배양 상층액을 수집하였다.

CD4+ PBLs 세포를 배양 플라스크에서 배양하고 있는 80% confluent 상태의 DCT 또는 DCT-RRE40 벡터 바이러스 포장 세포주 위에 놓았다. 이 때 한 개의 T-25 플라스크에 1 ml 당 2×10^6 개의 CD4+ PBLs 세포 20 ml을 1 ml 당 4 µg의 polybrene (Sigma, St. Louis, USA)과 함께 바이러스 포장 세포와 같이 24 시간 동안 공동 배양하였다. 배양 후 PBLs 세포들을 제거하여 새로운 flask에 모은 후 1 ml 당 2×10^6 개의 세포가 되도록 새 배지를 첨가한 후 남아 있는 바이러스 포장 세포들을 제거하기 위해 매번 2시간 동안 새로운 플라스크로 세포들을 3번 통과, 배양하였다. 이후 매 3일간 세포수를 세어서 1 ml 당 2×10^6 개의 세포가 유지되도록 새로운 배지를 첨가하였다.

DNA blot 분석

염색체 DNA를 guanidium isothiocyanate 방법과 CsCl cushion을 이용한 원심분리 방법을 이용하여 분리하였다(10). 분리된 DNA를 제한효소로 처리한 후 agarose gel을 이용한 전기영동을 통하여 크기별로 분류하였고 alkaline 용액 (0.2 N NaOH-0.6 M NaCl)으로 40분간 denaturation한 후 BIO-RAD electroblotter를 이용하여 nylon membrane (Biotrans, ICN, Costa Mesa, USA)으로 전달하였다. 자외선을 이용하여 membrane으로 전달된 DNA를 cross-link후 membrane을 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.5 M Na₂PO₄ (pH 7.2) 및 7% SDS가 함유된 용액에서 65°C에서 1 시간 동안 prehybridization하였다. 방사선 동위원소 ³²P로 표식된 probe를 prehybridization 용액에 첨가 후 65°C에서 16시간 동안 hybridization을 수행하였다. 그 후 반응시킨 membrane을 2×SSC와 1% SDS가 함유된 용액으로 상온에서 20분간 한번 씻어낸 후 0.2×SSC와 0.1% SDS가 함유된 용액으로 65°C에서 20분간 한번 더 씻어 내었다. 처리된 membrane은 X선 필름 (HyperfilmTM-MP, Amersham, Piscataway, USA)을 이용하여 autoradiography하였다.

RNA 분리 및 발현 분석

Total cellular RNA는 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 방법(4)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA를 8 M urea가 함유된 polyacrylamide gel을 이용한 전기영동을 수행한 후 electroblotter를 이용하여 nylon membrane (Biotrans, ICN, Costa Mesa, USA)으로 전달하였다. Oligonucleotide 특이 probe

또는 tRNA_i^{met} DNA probe를 이용하여 hybridization 실험을 수행하였다. Oligonucleotide 특이 probe를 이용하는 경우 membrane을 5× SSC, 10× Denhardt 용액, 20 mM Na₂PO₄ (pH 7.2), 7% SDS 및 ml 당 100 mg의 sonicate된 salmon sperm DNA 등이 함유된 용액을 이용, 65°C에서 4시간 동안 prehybridization을 수행하였다. Terminal transferase를 이용하여 방사선 동위원소를 표식 시킨 probe를 10% dextran sulfate와 함께 prehybridization 용액에 첨가한 후 16시간 동안 hybridization 실험을 수행하였다. 반응시킨 membrane을 3X SSC, 5% SDS, 10× Denhardt 용액 및 20 mM Na₂PO₄ (pH 7.2)가 함유된 용액으로 65°C에서 20분간 한 번 씻어낸 후 1× SSC와 1% SDS가 함유된 용액으로 65°C에서 20분간 한 번 더 씻어 내었다. tRNA_i^{met} DNA probe를 이용한 경우 membrane을 DNA blot 분석 실험에서 이용한 prehybridization 용액을 이용하여 60°C에서 1시간 미리 반응 후 oligolabeling kit로 표식 시킨 probe를 첨가하여 60°C에서 16시간 동안 hybridization 실험을 수행하였다. 반응시킨 membrane은 DNA blot 분석 실험에서 이용한 washing 용액을 이용하여 씻어낸 후 autoradiography를 수행하였다.

CD4+ PBLs 세포로의 SF13 HIV-1 감염

1 × 10⁷ 개의 CD4+ PBLs 세포들을 1 ml 당 4 μg의 polybrene과 함께 10⁵로 희석된 바이러스 1 ml이 첨가된 10 ml 배지로 37 °C에서 2시간 감염시켰다.

P24 항원 ELISA test

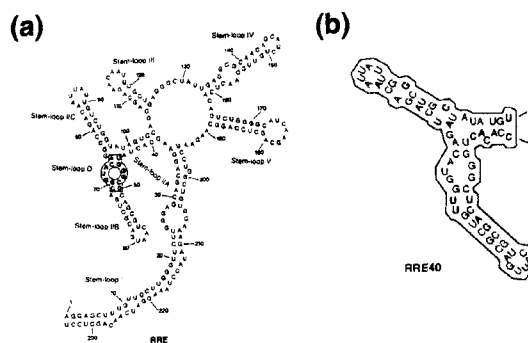
HIV-1에 감염된 세포의 상층액으로 분리되는 바이러스 단백질의 농도를 결정하기 위해 p24 항원 특이적 ELISA kit (DuPont, Wilmington, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

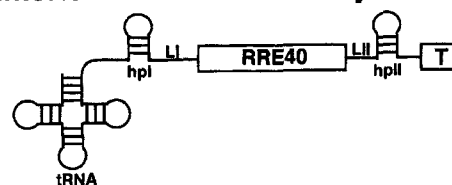
RRE40 decoy RNA를 encode하는 레트로바이러스 벡터 제조

CD4+ PBLs 세포에서의 RRE40 decoy RNA에 의한 HIV-1 증식 억제도를 관찰하기 위해 RRE40을 발현할 수 있는 tRNA expression cassette와 그 cassette를 함유한 레트로바이러스 벡터를 제조하였다(Fig. 1). Fig. 1A(a)는 234개 nucleotide로 구성된 RRE 염기서열 및 2차 구조를 보여주고 있다. 이러한 구조 중 purine-rich bubble 또는 stem-loop D라 불리는 13개 nucleotide로 구성된 stem loop 구조 (SL, boxed sequence)는 Rev와의 결합을 위해 최소로 필요한 결합부위이다(5). Fig. 1A(b)는 SELEX 기법을 이용하여 HIV-1의 Rev에 대해 야생형 RRE보다 10배 더 잘 결합하도록 시험관에서 선택된 RRE40라 불리는 RNA aptamer의 염기서열 및 구조로서 RRE의 SL domain II에 해당되는 부위를 보여주고 있다(2). 이러한 RRE40 decoy는 CD4+ T 세포주인 CEM의 clone 세포주에서 야생형 RRE decoy보다 더 효과적으로 HIV-1의 증식을 억제할 수 있다(9). RRE40 decoy RNA를 세포 내에서 과발현하기 위해 tRNA 발현 시스템을 이용하였다(Fig. 1B). RRE40 염기서열을 야생형 tRNA_i^{met} 유전자 (Δ3-2)의

A. Structure and sequence of RRE



B. Chimeric tRNA-RRE40 decoy transcripts



C. Retroviral vector

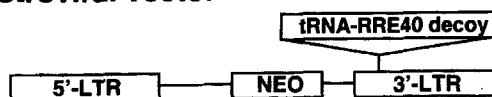


Fig. 1. Structure of chimeric tRNA, RRE40 decoy template, and retroviral vector. A. Sequence and predicted secondary structure of RRE and RRE40. (a) The proposed secondary structure of the HIV Rev response element (RRE) shows a central stem and five stem-loop structures. The primary Rev binding site was mapped to a short region within stem loop (SL) II (boxed sequences) which forms a purine-rich “bubble”, also known as stem-loop D. (b) The sequence of RNA aptamer against HIV Rev, known as RRE40 (open box), corresponds to the sequence within the SLII domain with the variant nucleotides (bold letters) that were selected *in vitro* to bind Rev 10-fold more tightly than the wild type. B. The chimeric-RRE40 decoy construct consists of a wild type human tRNA_i^{met} gene and a RRE40 sequence inserted between the tRNA and the transcription termination signal (T). Two stem-loop structure (hpl and hpII) and additional short sequences (LI and LII) are present on both sides of the RRE40 sequence in the chimeric transcript. C. The chimeric tRNA-RRE40 constructs were inserted into the polylinker sequence present in the 3' LTR of the N2A vector to generate retroviral vectors. In the target cells, the tRNA-RRE40 DNA template is duplicated and transferred to the 5' LTR.

3' 말단에 부착하였는데 RNA의 세포내 안정성을 증가하기 위하여 두 개의 stem loop (hpl, hpII)을 RRE40의 양쪽에 삽입하였고 Rev 단백질과 RRE40과의 결합시 형성될 수 있는 구조적 방해물을 제거하기 위하여 두 개의 stem loop은 다시 L1, LII라는 짧은 길이의 염기서열을 이용하여 RRE40으로부터 분리하였다. 이러한 tRNA cassette의 변형을 통하여 삽입된 RNA decoy의 발현양은 변형되지 않은 tRNA 발현 cassette를 이용한 것 보다 20배 이상 증가되어 보고 되었다(7, 8). tRNA-RRE40 DNA

construct를 N2A 레트로바이러스 벡터의 3' LTR에 삽입함으로써 바이러스에 의해 유전자가 전달된 표적 세포에선 proviral DNA의 양쪽 LTR에 tRNA-RRE40 cassette가 위치하게 하였다(Fig. 1C). 이러한 레트로바이러스 벡터를 DCT-RRE40라 명명하였다.

벡터 DNA에 해당되는 재조합 레트로바이러스를 제조하기 위해 우선 벡터를 AM12 바이러스 포장 세포주로 전달한 후 G418을 이용하여 벡터가 주입된 AM12 세포를 선택 분리후 분비되는 세포 상층액을 획득하였다.

RRE40 decoy RNA를 발현하는 레트로바이러스 벡터를 이용한 CD4+ PBLs 세포로의 유전자 전달

HIV-1 Rev에 대한 RNA aptamer인 RRE40 decoy RNA의 임상적인 효능을 관찰하기 위해 HIV-1 seronegative인 인체로부터 CD4+ PBLs 세포를 추출하여 레트로바이러스 벡터를 이용, RRE40 decoy RNA 유전자를 전달한 후 HIV-1의 증식 패턴을 관찰하였다. CEM 세포주를 갖고 HIV-1 증식 연구를 하는 경우에는 레트로바이러스로 유전자를 전달 후 G418이 포함된 배지에서 2-3주 동안 배양함으로써 유전자가 전달된 세포들을 분리해 낼 수 있다. 그러나 인체로부터 추출된 PBLs 세포의 경우 세포주에서와 같이 G418이 함유된 배지에서 오랫동안 배양시 그 세포가 갖고 있는 *in vivo* 기능의 변화가 일어날 수 있으므로 되도록이면 drug을 이용한 분리 과정 없이 최소한도의 시간동안만 배양한 후 HIV-1 증식 실험을 하여야 할 것이다. 따라서 이와 같은 PBLs 세포에서의 RNA decoy의 효능은 RNA decoy가 갖고 있는 항바이러스 성질뿐만 아니라 RNA decoy 유전자가 얼마나 효과적으로 세포 내로 전달되는가에 비례할 것이다. 효과적으로 RRE40 유전자를 CD4+ PBLs 세포로 전달하기 위해 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 인체로부터 추출한 CD4+ PBLs 세포를 바이러스 포장 세포주와 함께 16시간 동안 공동으로 배양 하였다. 유전자가 전달된 세포를 IL-2가 함유된 배지에서 2-3일간 더 배양한 후 HIV-1을 감염시켰다.

RRE40 발현 유전자가 얼마나 효과적으로 CD4+ PBLs 세포에 전달되었는지 그리고 얼마나 효과적으로 RRE40 RNA가 발현되었는지 관찰하기 위해 DNA 및 RNA blot 분석 실험을 각각 수행하였다(Fig. 2). DNA blot 분석은 PBLs 세포의 염색체에 삽입되지 않은 DNA에 의한 결과 오차를 최소화하기 위해 레트로바이러스로 유전자를 전달후 4일후에 수행하였다. Chimeric tRNA-RRE40 decoy를 발현할 수 있는 레트로바이러스 vector인 DCT-RRE40이 전달된 CD4+ PBLs 세포에서의 DNA blot을 분석한 결과 세포의 염색체 내로 provirus DNA가 삽입되었을 시에 예상될 수 있는 3.2 kb 크기의 DNA 단편에 해당되는 single band 형태가 관찰되었다(Fig. 2A, lane 4). RRE40을 발현하는 provirus DNA가 삽입된 세포가 과연 얼마나 되는지 알기 위해 CD4+ PBLs 세포에서 관찰되는 DNA band의 강도를 세포 당 하나의 DCT-RRE40 provirus DNA가 함유된 CEM clone 세포주(9)에서 관찰될 수 있는 DNA band 강도와 상호 비교하였다. 분석 결과 약 20%의 CD4+ PBLs 세포가 RRE40 decoy 벡터 DNA를 함유함을 확인하였다. RNA blot 분석을 통해 유전자가

전달된 CD4+ PBLs 세포에서의 chimeric tRNA-RRE40 decoy RNA의 발현을 관찰한 결과 DCT-RRE40이 전달된 CD4+ PBL 세포에서 281 nucleotide 크기의 새로운 RNA가 발현됨을 확인하였다(Fig. 2B, lane 1). CD4+ PBLs 세포에서의 tRNA-RRE40 decoy RNA는 세포 당 하나의 DCT-RRE40 provirus DNA가 함유된 CEM 세포 clone line에서의 RNA 발현양에 비해 역시 약 20% 정도 발현됨을 관찰하였다. 이러한 결과는 CD4+ PBLs 세포에서의 RNA decoy RNA의 steady state level은 CEM 세포주에서의 발현 수준과 상응함을 시사하며 본 연구에 의해 수행된

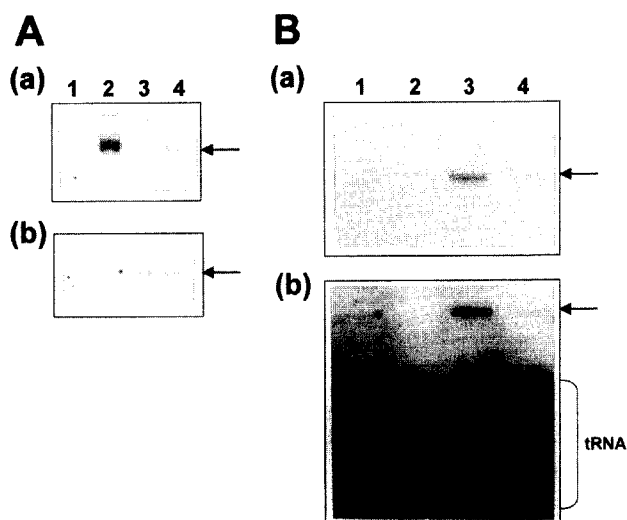


Fig. 2. Nucleic acid analysis of CD4+ PBLs transduced with the DCT-RRE40 vector. A. Structure of proviral DNA. Ten μ g of genomic DNA was digested with *Bgl*III (which has recognition sites in the viral LTRs and yields a characteristic 3.2 kb vector-specific DNA fragment), was subjected to electrophoresis in 1% agarose gels, transferred to a nylon membrane, and hybridized with a 32 P-labeled neomycin phosphotransferase (neo) probe or a human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe (panels a and b, respectively, with arrows indicating the migration of the DNA fragments). Lane 1: 5:1 mixtures of DNA from nontransduced CEM cells and the RRE40 decoy vector transduced CEM cells. Lane 2: DNA from a CEM clone harboring one copy of DCT-RRE40 vector. Lane 3: DNA from nontransduced control CD4+ PBLs. Lane 4: DNA from CD4+ PBLs obtained 96 hrs following transduction with the DCT-RRE40 vector. B. Expression of chimeric tRNA-RRE40 transcripts. Total cellular RNA was obtained 96 hrs following transduction of CD4+ PBLs with the DCT-RRE40 vector. Twenty μ g of total RNA were subjected to electrophoresis in 8% polyacrylamide/urea gels, blotted to nylon membrane and hybridized with a 32 P-labeled RRE40 specific probe (panel a), or with a tRNA_i^{met} probe (panel b). The migration of the 281 nt chimeric tRNA-RRE40 transcript detected with either probe is indicated by an arrow. Lane 1: RNA obtained 96 hrs following transduction of CD4+ PBLs obtained 96 hrs following transduction with the DCT-RRE40 vector. Lane 2: RNA from parental nontransduced CD4+ PBLs. Lane 3: RNA from a CEM clone harboring one copy of DCT-RRE40 vector. Lane 4: RNA from 5:1 mixtures of parental CEM cells and CEM cells harboring the DCT-RRE40 vector.

표적세포와 레트로바이러스 포장 세포주와의 공동 배양을 통해 약 20% 정도의 표적세포에 유전자가 전달될 수 있음을 시사한다.

RRE40 decoy RNA 유전자가 전달된 CD4+ PBLs 세포에서의 HIV-1 증식 억제

DCT-RRE40 벡터 및 대조군인 DCT 벡터가 전달된 CD4+ PBLs 세포에서의 HIV-1 증식 패턴을 관찰하기 위하여 바이러스를 각 세포에 감염후 한 달 동안 일정 기간별로 배양액을 추출하여 배지로 방출되는 바이러스 양을 측정하였다(Fig. 3). 배지로 방출되는 HIV-1의 양을 측정하기 위해 p24 항원 ELISA test를 수행하였다. 그 결과 대조군인 DCT 벡터가 전달된 세포의 경우는 바이러스 증식이 매우 활발하여 감염후 25일 후 바이러스 방출량이 최대가 된 후 감소함이 관찰되었다. 이러한 바이러스 양이 감소되는 이유는 바이러스 증식에 따른 syncytia 형성 후의 세포사 때문이다. 반면에 DCT-RRE40 벡터가 전달된 세포는 p24 방출 정도가 대조군에 비해 현격히 감소됨을 관찰할 수 있었다. 그러나, CEM 세포주를 이용한 실험에서는 RRE40 decoy RNA의 발현에 의해 HIV-1 증식이 감염후 한 달이 지나도 거의 시작되지 않는 것에 비해(9) CD4+ PBLs 세포의 실험에서는 HIV-1 감염 후 21일 후부터 그 증식이 점차 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, CD4+ PBLs 세포에서는 RRE40 decoy RNA에 의해 HIV-1의 증식이 완전히 억제 되는 것 보다는 일시적 또는 감소된 형태의 바이러스 억제 패턴을 보여 주었다.

본 연구에서는 HIV-1의 Rev에 대한 RNA aptamer인 RRE40 decoy RNA가 과연 임상적으로 유용한지 관찰하기 위해, 레트로바이러스를 이용하여 인체로부터 추출된 CD4+ PBLs 세포로 RRE40을 발현하는 유전자를 전달후 HIV-1 증식 패턴을 관찰하였다. 그 결과 약 20%의 CD4+ PBLs 세포로 RRE40 유전자가 전달되었으며 이러한 유전자가 전달된 PBLs 세포에서 HIV-1의 증식이 효과적으로 억제되었다. 그러나 완벽하게 HIV-1 증식이 억제되는 못하였으며 시간이 지나면서 점차 HIV-1의 증식이 시작되었다. 이와 같이 CEM 세포주에 비해 CD4+ PBLs 세포에서 RRE40 decoy의 기능이 떨어지는 이유로 크게 세 가지를 예상할 수 있다. 하나는 유전자 전달의 비효율화라 하겠다. 본 실험에서는 단지 20%의 CD4+ PBLs 세포에만 RRE40 유전자가 전달되었으므로 유전자가 전달되지 않은 나머지 80% 세포에선 HIV-1이 감염 후 왕성하게 증식될 수 있다. 이와 같이 RRE40 유전자가 없는 세포에 감염되어 세포 밖으로 방출되는 바이러스 증식을 RRE40 유전자가 함유된 세포에서 충분히 억제하지 못한다면 시간이 흐를수록 바이러스 증식이 왕성해질 수밖에 없을 것이다. 또 다른 이유로는 RRE40 decoy RNA가 HIV-1 증식을 억제할 수 있는 능력이 부족한 경우이다. 비록 이전의 실험 결과 CEM 세포주에선 매우 효과적으로 RRE40이 decoy로서 HIV-1 증식을 억제하였으나 세포 line이 아닌 primary 세포에서의 기능에 대해선 더욱 검증할 필요가 있을 것이며 더욱 강력한 기능을 가진 RNA decoy가 필요할 수 있을 것이다. 마지막 이유로는 RNA decoy의 발현양이 부족한 경우이다. 비록 본 결과로부터

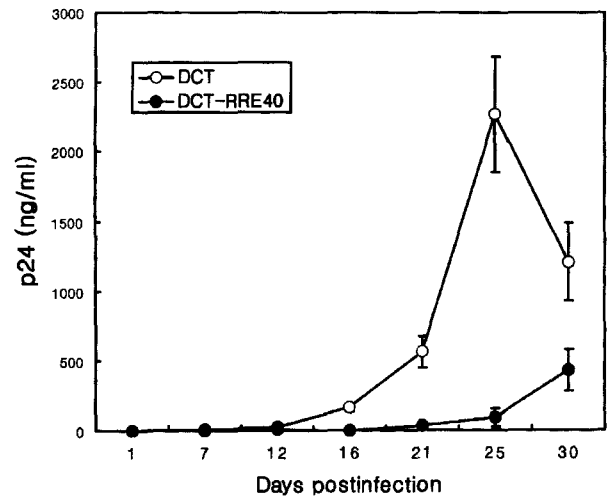


Fig. 3. Replication of HIV-1 in CD4+ PBLs. Cells transduced with DCT vector (open circle) or DCT-RRE40 (closed circle) were infected with HIV-1 (SF13 isolates) and the appearance of progeny virus in the cell supernatant was assayed using a p24 antigen ELISA test. Values shown represent the averages \pm standard deviation of three independent experiments.

tRNA expression cassette를 이용시에 CD4+ PBLs 세포에서의 RNA decoy가 CEM 세포주에서의 발현양에 상응하도록 과 발현됨을 관찰하였으나 primary 세포에서의 HIV-1 증식과 경쟁을 하기 위해선 더 많은 양의 RNA decoy 발현이 필요할 수도 있을 것이다. 따라서 RNA decoy를 HIV-1 감염 환자를 치료하기 위한 임상적인 치료제로 사용하기 위해선 다음과 같은 개선안이 필요할 것이다. 그 하나는 보다 더 효과적으로 유전자를 전달할 수 있는 벡터 및 유전자 전달 방법의 개발이다. 또한 조혈모세포와 같이 HIV-1 감염 세포의 전구세포로 유전자를 전달하는 경우엔, 유전자를 전달하기 위해선 세포의 분열을 요구하는 레트로바이러스를 이용하기 보다는 렌티바이러스 등과 같이 분열되지 않는 세포로도 유전자를 전달할 수 있는 벡터 시스템을 개발할 필요가 있을 것이다(11). 또한 보다 더 강력한 RNA decoy 시스템의 개발도 필요할 것이며, 그 한 예로서 RRE decoy와 TAR decoy를 하나의 transcript로 발현시킨 종류의 RNA decoy를 발현한 경우보다 훨씬 더 효과적으로 HIV-1의 증식을 억제할 수 있음을 관찰하였다 (Lee, 결과 미제출). 또한 tRNA 벡터로부터 발현되는 RNA decoy 양을 U6, 7SL promoter 또는 pol II expression cassette 등과 같은 다른 벡터(13)를 이용하여 발현되는 RNA decoy 양과 상호 비교하고 또한 HIV-1 증식을 억제할 수 있는 기능을 상호 비교함으로써 더욱 임상적으로 응용될 수 있는 발현 벡터 시스템을 개발할 수 있을 것이다. 이러한 RNA decoy가 HIV-1 증식을 억제할 수 있는 정도를 antisense, 리보자임 및 siRNA 등과 같은 다른 RNA 억제제(18,21)와 상호 비교 연구를 통하여, 또는 하나의 유전자 전달 벡터 안에 여러 억제제를 동시에 발현시킬 수 있는 유전자 벡터 시스템의 개발을 통하여 HIV-1 환자를 치료할 수 있는 효과적인 유전자치료법의 개발

을 피할 수 있을 것이다. 그러나, 최근 레트로바이러스 벡터를 이용하여 X 염색체 관련 중증면역결핍증 환자들에 대한 유전자 치료 결과, 그 치료효과는 뛰어나 몇 명의 환자에서 바이러스 벡터가 인체 염색체의 LMO2 oncogene 근방에 삽입, 그 유전자 발현을 증가시킴으로써 백혈병이 유발되는 부가 효과 (side effect)가 발표되었다(6). 따라서 RNA decoy를 이용한 보다 효과적이며 안전한 유전자 치료법의 개발을 위해선 안전한 유전자 전달벡터 시스템에 관한 연구가 함께 진행되어야 할 것이다.

감사의 말

본 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Bae, S.-J., J.-H. Oum, S. Sharma, J. Park, and S.-W. Lee. 2002. *In vitro* selection of specific RNA inhibitors of NFATc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 486-492.
- Bartel, D.P., M.L. Zapp, M.R. Green, and J.W. Szostak. 1991. HIV-1 Rev regulation involves recognition of non-Watson-Crick base-pairs in viral RNA. *Cell* 67, 529-536.
- Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. Levy. 1988. Biological features of HIV-1 that correlate with virulence in host. *Science* 240, 80-82.
- Chomczynski, P and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Heaphy, S., J. Finch, M. Gait, J. Karn, and M. Singh. 1991. Human immunodeficiency virus type I regulator of virion expression, rev, forms, nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich "bubble" located within the rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7366-7370.
- Kaiser, J. 2003. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* 299, 495.
- Lee, S.-W., H.F. Gallardo, E. Gilboa, and C. Smith. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus type I in human T cells by a potent Rev response element decoy consisting of the 13-nucleotide minimal Rev-binding domain. *J. Virol.* 68, 8254-8264.
- Lee, S.-W., H.F. Gallardo, O. Gasper, C. Smith, and E. Gilboa. 1995. Inhibition of HIV-1 in CEM cells by a potent TAR decoy. *Gene Ther.* 2, 377-384.
- Lee, S.-W. 1998. Studies on the inhibition of HIV replication with a number of RRE decoy derivatives. *J. Microbiol.* 36, 308-315.
- Lee, S.-W. and E. Gilboa. 1998. High level accumulation of an aberrantly spliced human DHFR RNA species. *Mol. Cells* 8, 189-200.
- Li, M.-J., G. Bauer, A. Michienzi, J.-K. Yee, N.-S. Lee, J. Kim, S. Li, D. Castanotto, J. Saia, and J.J. Rossi. 2003. Inhibition of HIV-1 infection by lentiviral vectors expressing pol III-promoted anti-HIV RNAs. *Mol. Ther.* 8, 196-206.
- Martinez-Picado, J., M.P. DePasquale, N. Kartsonis, G.J. Hanna, J. Wong, D. Finzi, E. Rosenberg, H.F. Gunthard, L. Sutton, A. Savara, C.J. Petropoulos, N. Hellmann, B.D. Walker, D.D. Richman, R. Siliciano, and R.T. D'Aquila. 2000. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10948-10953.
- Paul, C.P., P.D. Good, S.X. Li, A. Kleihauer, J.J. Rossi, and D.R. Engelke. 2003. Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol. Ther.* 7, 237-247.
- Rosen, C. and G. Pavlakis. 1990. Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression. *AIDS* 4, 499-509.
- Smith, C., S.-W. Lee, E. Wong, H. Gallardo, K. Page, O. Gasper, J. Lebkowski, and E. Gilboa. 1996. Transient protection of human T-cells from human immunodeficiency virus type 1 infection by transduction with adeno-associated viral vectors which express RNA decoys. *Antiviral Res.* 32, 99-115.
- Statham, S. and R.A. Morgan. 1999. Gene therapy clinical trials for HIV. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1, 430-436.
- Sullenger, B., H. Gallardo, G. Ungers, and E. Gilboa. 1990. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* 63, 601-608.
- Sullenger, B.A. and E. Gilboa. 2002. Emerging clinical applications of RNA. *Nature* 418, 252-258.
- Symensma, T.L., L. Giver, M. Zapp, G.B. Takle, and A.D. Ellington. 1996. RNA aptamers selected to bind human immunodeficiency virus type I Rev *in vitro* are Rev responsive *in vivo*. *J. Virol.* 70, 179-187.
- Tuerk, C. and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Yu, M., E. Poeschla, and F. Wong-Staal. 1994. Progress towards gene therapy for HIV infection. *Gene Ther.* 1, 13-26.

(Received September 8, 2003/Accepted November 12, 2003)

ABSTRACT: Inhibition of HIV-1 Replication in CD4+ Peripheral Blood Lymphocytes by Intracellular Expression of RNA Aptamer

Seong-Wook Lee* (Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Seoul 140-714, Korea)

We have previously demonstrated that intracellular expression of an RNA aptamer termed RRE40, which was selected *in vitro* to bind HIV Rev 10-fold much tighter than wild-type RRE, efficiently protected human CD4+ T cell line, CEM, from HIV-1. In this study, to evaluate the efficacy of the RRE40 RNA in clinical settings, polyclonal CD4+ peripheral blood lymphocytes (PBLs) were transduced with retroviral vectors expressing RRE40 decoy RNA and then challenged with clinical isolates of HIV-1. In contrast to the control cells transduced with vectors expressing control tRNA, intracellular expression of RRE40 RNA more effectively inhibited HIV-1 replication in CD4+ PBLs. However, transient and diminished inhibition, rather than complete inhibition, of HIV-1 replication in PBLs expressing RRE40 decoys have been observed. These results suggest that RRE40 decoy RNA would be useful to inhibit HIV-1 replication in cells. However, development of more efficient gene transfer protocols and/or more effective decoy RNAs would be needed to apply RNA decoy to modulate HIV-1 patient.