

새로운 Tetracycline 유도적 유전자 발현 System의 *In Vitro* 검증

권모선 · 김태완 · 구본철[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Examination of Improved Tetracycline Inducible Gene Expression System *In Vitro*

Mo Sun Kwon, Teoan Kim and Bon Chul Koo[†]

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

ABSTRACT

Until recently the most popular tetracycline-inducible gene expression system has been the one developed by Gossen and Bujard. In this study, we tested the latest version of same system and the results are summarized as follows: Compared with previous one, the difference of new system are minor changes of nucleotide sequences in transactivator and tetracycline response element (TRE) regions. Sensitivity to the doxycycline (a tetracycline derivative) was improved. Leakiness of GFP marker gene expression in non-inducible condition was significantly decreased. Higher expression of the marker gene was observed when the cells were fed with doxycycline-containing medium. Optimal insertion site of woodchuck posttranscriptional regulatory element (WPRE) sequence which was known to increase gene expression was different depending on the origin of cells. In chicken embryonic fibroblast, location of WPRE sequence at 3' end of TRE resulted in the highest GFP expression. In bovine embryonic fibroblasts, 3' end of transactivator was the best site for the GFP expression.

(Key words : Tet system, Transactivator, TRE, WPRE, Primary culture cell)

서 론

현재 가장 널리 사용되고 있는 목적 유전자 발현 조절 system은 Gossen과 Bujard에 의해 개발된 tetracycline-inducible gene expression system (Tet system)으로서, 유도체인 tetracycline 계열의 물질의 공급 여부에 따라 외래 유전자의 발현을 가역적이며, 유도적으로 조절할 수 있다(Gossen과 Bujard, 1992). 최근 들어 Tet system이 적용되고 있는 여러 연구 분야로는 질환모델 동물의 개발, 질병 치료 기작에 관한 연구, 줄기세포 관련 연구, SiRNA에 관한 연구 등이 있다. 다양한 질환 연구에 이용할 수 있는 모델 동물로서 형질전환 zebrafish와 형질전환 개, 그리고 신장 질환 모델 mouse가 생산되었으며(Li 등, 2012; Kim 등, 2011; Traykova-Brauch 등, 2008), 유방암이나 당뇨병 치료에 관한 연구에도 이용되었다(Sun 등, 2011; Thorel 등, 2010). 또한 비바이러스성 방법을 이용

한 유도만능줄기세포의 구축 및 줄기세포의 지방세포로의 분화에 관한 연구에도 사용되었으며(Woltjen 등, 2009; Ahfeldt 등, 2012), *in vitro*와 *in vivo*에서 유도적 RNA 간섭 현상에 관한 연구 및 배아줄기세포에서 특정 부위 염기 서열에 대한 비바이러스성의 유도적 RNAi 도입에 관한 연구에도 사용되었다(Meerbrey 등, 2011; Wang 등, 2007). 이러한 여러 방면의 연구에서 사용되고 있는 Tet system은 중금속이나 steroid hormone 등을 이용한 유전자 발현 조절 system에 비해 발현 유도율이 높고, 비특이적인 발현이 상대적으로 낮으며, 유도물질에 의한 세포 독성이나 다면적 영향이 거의 나타나지 않는 장점을 가진다(Bohl 등, 1997; Mayford 등, 1996). 그러나 비유도 조건에서 완벽한 발현 억제가 일어나지 않은 관계로 background 활성이 미미하게 존재하고 있어서, 이를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 유도물질에 대한 transactivator의 감수성을 향상시켜서 유도물질의 낮은 농도에서도 유전자의 발현을 극대화하기 위한 시도도 이루어

* 본 연구는 농림축산식품부 생명산업기술개발사업과 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ009587042013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-650-4469, E-mail: bckoo@cu.ac.kr

지고 있다(Urlinger 등, 2000; Löw 등, 2010).

이의 일환으로 본 연구에서는 가장 개선된 형태의 Tet system의 각 요소들을 이용하여 one vector 형태의 유전자 발현 조절 system을 구축한 후, 일차배양한 세포주에서 이 system의 효율성을 증명하고자 하였다. 재조합한 요소는 Tet system의 구성에 있어서 가장 중요한 2가지 요소인 transactivator와 minimal promoter를 포함하는 tetracycline response element (TRE)로 각각의 일부 서열이 변형된 형태이다. 본 연구에 도입한 transactivator는 기존의 Tet system에 있는 transactivator에 비해 5개의 아미노산 서열이 변형되어 있으며, 유도 조건에서의 외래 유전자의 발현을 극대화시키고, 발현 유도물질인 doxycycline에 대한 감수성을 높여서 저농도의 doxycycline 존재 하에서도 외래 유전자의 발현 유도가 가능하다(Zhou 등, 2006). 새로운 TRE 서열은 기존의 서열에서 일부 서열의 배치 간격과 도입 요소가 변경되어 endogenous mammalian transcription factor가 결합할 수 있는 부위가 부족하기 때문에, transactivator가 없는 경우 promoter가 비활성화 되어서 유전자의 발현이 turn on되지 않으므로 background 활성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다(Löw 등, 2010). 이상의 두 요소를 단일 vector에 재조합하여 기존의 Tet system과 비교하여 유전자 발현 조절의 효율성을 *in vitro*에서 검증하고자 하였다.

본 연구에서 구축한 개선된 형태의 Tet system은 외래 유전자의 유도적 발현 조절이 요구되는 동물생명공학, 의약학, 분자생물학 등의 여러 분야 연구에 활용될 수 있을 것이다.

실험 방법

새로운 Tet System의 구축

새로운 Tet system에 사용하기 위한 Tet3G 계열의 vector는 WPRE 위치에 따라서 두 가지 종류로 구축하였다. 먼저 WPRE가 EGFP 유전자의 3' 위치에 도입된 pT3-GWPT vector의 구축은 본 연구실에서 보유하고 있는 pTt-GWPT (Koo 등, 2009)를 HindIII와 Cla I 제한효소 순으로 처리하여 transactivator인 rtTA2^SM2 부분을 제거하고, 그 위치에 pCMV-Tet3G-IRES (Clontech, USA)에 동일한 제한효소를 처리하여 분리한 rtTA3G 부분을 도입하였다. 재조합한 이 vector를 Bgl II와 BamH I으로 처리하여 minimal promoter 부분인 TRE-tight 서열을 제거하고 p-TRE3G vector (Clontech, USA)에서 분리한 TRE3G promoter 부분을 재조합하여 pT3GWPT vector를 구축하였다. WPRE 서열이 transactivator 서열의 3'에 위치한 pT3-GPTW vector는 pTtGWPT 대신 pTtGPTW vector (Koo 등, 2009)를 사용하여 전자와 동일한 과정으로 재조합하였다. 구축한 각 vector와 대조구로 사용할 vector의 최종 구조는 Fig. 1과 같다.

Virus의 생산 및 표적세포로의 감염

구축한 각각의 vector는 Gibbon ape leukemia virus의

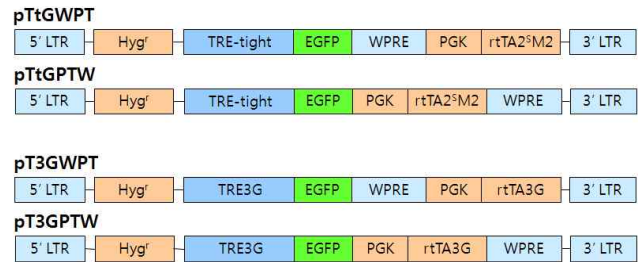


Fig. 1. Structure of tetracycline-inducible expression retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Hyg^r, Hygromycin B resistant gene; TRE-tight, is a modified Tet response element, which consists of seven direct repeats of a 36-bp sequence and 19-bp tet operator sequence; EGFP, enhanced Green Fluorescent Protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; PGK, phosphoglycerate kinase promoter; rtTA2^SM2, modified rtTA consisting of the reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain; TRE3G, Tet-response element consist of 7 repeats of a 19 bp tet operator sequence located upstream of a minimal CMV promoter, the junction sequences of TRE3G has been altered to an even spacing and the central portions are randomized; rtTA3G, five amino acid changes convert rtTA2^SM2 to rtTA3G. Length of each sequence is not drawn to scale.

피막 유전자가 발현되는 PT67 (Clontech, USA) 포장세포에 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. PT67에서 생산된 virus는 Moloney murine leukemia virus의 gag과 pol 유전자가 발현되는 GP2 293 (Clontech, USA) 세포에 감염시켜서 hygromycin B (150 μg/ml)가 첨가된 배양액에서 2주간 배양하였다. 구축된 각 세포주에 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G) 피막 유전자를 가진 pVSV-G (Clontech, USA) plasmid를 일시적으로 transfection하여 48시간 후에 virus 배양액을 수확하였다. 생산된 virus는 일차배양한 소의 태아섬유아세포(bovine fetal fibroblast, BFF)와 닭의 배아섬유아세포(chicken embryonic fibroblast, CEF)에 MOI 1.0으로 감염시켜서 150 μg/ml의 hygromycin B가 첨가된 배양액으로 2주간 선별하여 외래 유전자가 전이된 각각의 세포주를 확립하였다. 실험에 사용한 모든 세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA), 100 U/ml의 penicillin과 100 μg/ml의 streptomycin (Hyclone, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone, USA) 배지에서 배양하였다.

형광현미경 하에서 Tet System에 의한 EGFP 유전자 발현 관찰

각 세포에서 EGFP 유전자의 발현은 60 mm dish에 5×10⁵개로 준비한 각 세포를 1 μg/ml의 doxycycline을 첨가하였거나 첨가하지 않은 배지에서 48시간 배양한 후, 형광현미경 하에서 FITC filter를 통해 관찰하였다.

Doxycycline의 농도에 따른 EGFP 유전자의 발현 관찰 실험도 동일한 조건에서 실시하였는데, 단 배지에 첨가된 doxycycline의 농도는 1 μg/ml의 농도에서부터 10배수로 희석하여 0.1 ng/ml의 농도까지 처리하였으며, doxy-

cycline을 공급하지 않은 조건에서 배양한 세포를 대조구로 사용하였다.

RT-PCR 분석

각 세포에서 *EGFP* 유전자의 도입 여부 확인은 RT-PCR 방법을 이용하였으며, 다음과 같은 과정으로 실시하였다. 먼저 형광현미경 하에서 관찰한 각 세포로부터 *trizol* (Invitrogen, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 1 µg의 RNA로 *ImProm-II reverse transcription system* (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 각각의 실험군에서 2 µl의 cDNA를 주형으로 이용하여 PCR을 실시하였으며, 94°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초간 반응하는 cycle을 25회 반복 실시한 후, 최종 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. 본 실험에서는 세포 내로의 virus vector의 도입 여부를 확인하기 위하여 *EGFP* 유전자와 WPRE 서열에 대한 primer로 PCR을 실시하였으며, 정상적인 전사과정이 일어나고 있음을 확인하기 위한 대조구로 각 세포주에 해당하는 *GAPDH* 유전자에 대한 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다.

Western Blotting 분석

전날 각 세포를 60 mm dish에 5×10⁵개로 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, Western blotting을 실시하였다. 먼저 분리한 전단백질 중 10 µg을 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.

ELISA 분석

발현된 *EGFP*의 정량적 분석을 위하여 ELISA를 실시하였으며, Western blotting과 동일한 조건에서 세포를 배양하였다. 48시간 배양한 후, 각 세포에 400 µl의 PRO-REP 용액(Intron Biotechnology, Korea)을 첨가하여 scrapper로 세포를 떨어뜨려서 epp tube로 옮긴 후, -20°C에 20분간 방치하였다. 이를 4°C에서 13,200 rpm, 5분간 원심분리하여 전단백질이 함유된 상층액을 분리하였다. 분리한 단백질에 포함된 GFP 단백질의 정량은 GFP ELISA kit (Cell Biolabs, USA)을 이용하여 실시하였는데, 먼저 standard GFP와 세포 단백질을 적절한 배수로 희석하여 Anti-GFP antibody가 coating된 plate에 100 µl씩 첨가하여 2시간동안 방치하였다. 1×washing buffer로 3회 수세한 후 biotinylated anti-GFP antibody를 100 µl씩

더하여 2시간 동안 반응시킨 다음, streptavidin-enzyme conjugate와 substrate 용액을 순서대로 첨가하여 반응을 실시하였다. Stop 용액을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

형광현미경 하에서의 각 Vector에 따른 EGFP 유전자의 발현 조절 양상 관찰

각각의 Tet system이 도입된 세포들에서 *EGFP* 유전자의 발현은 발현 유도물질인 doxycycline이 첨가된 조건에서 강한 발현이 유도되는 것으로 확인되었다(Fig. 2, Fig. 3). BEF에서 기존의 Tet system과 개선된 형태의 Tet3G system을 이용하여 *EGFP* 유전자의 발현을 각각 유도한 결과, 기존의 Tet system에 비해 새롭게 구축한 Tet3G system이 도입된 세포인 BFF-T3GPTW에서 가장 강한 발현을 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 또한 두 종류의 vector system 모두 WPRE 서열이 *EGFP* 유전자의 3' 위치에 도입된 경우보다 transactivator 서열의 3'에 위치한 조건에서 강한 발현율과 유도율을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 2). Doxycycline이 첨가되지 않은 조건, 즉 비유도 조건에서는 TtGWPT와 TtGPTW보다 T3GWPT와 T3GPTW에서 형광이 전혀 관찰되지 않았으므로, 발현 억제제가 더 강하게 이루어지는 것으로 판단되었다(Fig. 2). 따라서 기존의 Tet system보다 새로운 Tet system이 외래 유전자의 발현 조절에 있어서 발현 유도율과 유도

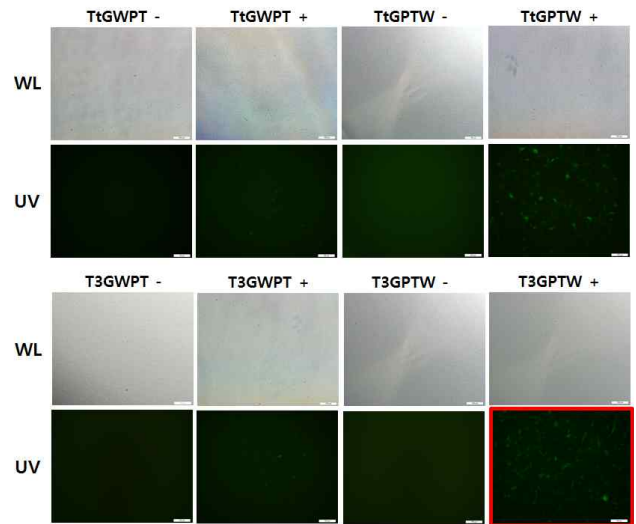


Fig. 2. Expression of the *EGFP* gene in BFF cells. The cells were divided into four groups of cells according to the virus (TtGWPT, TtGPTW, T3GWPT or T3GPTW) used for infection. Each group of the cells were further divided by modification of the virus and presence of doxycycline in the media: The symbols of '-' or '+' at the top of each column indicate culture of cells 'in the absence' or 'in the presence' of doxycycline (1 µg/ml). Other symbols at the left side indicate the white light (WL) or fluorescence (UV).

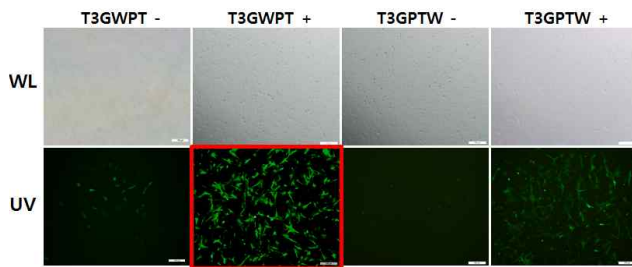


Fig. 3. Expression of the EGFP gene in CEF cells. The cells were divided into two groups of cells according to the virus (T3GWPT or T3GPTW) used for infection. Each group of the cells were further divided by modification of the virus and presence of doxycycline in the media. The symbols of '-' or '+' at the top of each column indicate culture of cells 'in the absence' or 'in the presence' of doxycycline (1 μ g/ml). Other symbols at the left side indicate the white light (WL) or fluorescence (UV).

조건 하에서의 발현량이 강하게 나타나므로 매우 효율적인 유전자 전이 system임을 확인하였다.

Tet3G system의 유전자 발현 유도 양상이 세포주에 관계없이 동일하게 나타나는지의 여부를 확인하기 위하여 CEF에서도 EGFP 유전자 발현을 형광현미경 하에서 관찰하였다. 그 결과, BEF와는 달리 CEF에서는 WPRE 서열이 transactivator 서열의 3'에 위치한 경우보다 EGFP 유전자의 3' 위치에 도입된 경우에 더욱 강한 발현율과 유도율을 나타내는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이는 세포주에 따른 가장 효율적인 Tet system의 선별적인 적용의 필요성을 증명하는 것이다.

각 세포주에서 EGFP 유전자의 전이에 대한 RT-PCR 분석

Doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 배양한 각 세포주의 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, virus에 감염되지 않은 정상 세포주에서는 EGFP에 대한 증폭 단편이 나타나지 않았으며, virus에 감염된 세포주에서는 증폭 단편이 확인되었다(Fig. 4, Fig. 5). 증폭 단편은 vector system의 종류나 발현 유도 조건에 관계없이 동일하게 나타났으며(Fig. 4, Fig. 5), 이러한 결과를 통해 virus vector system에 의한 외래 유전자의 전이가 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

각 세포주에서 EGFP 발현에 대한 단백질 수준의 정량 분석

RT-PCR 실험과 동일한 조건에서 배양한 BFF 세포로부터 전단백질을 분리하여 Western blotting을 실시하였다. 동일한 세포의 전단백질을 SDS-PAGE한 후 EGFP에 특이적으로 결합하는 항체를 반응시킨 결과, doxycycline이 존재하는 발현 유도 조건에서는 TtGWPT나 TtGPTW 실험군에 비해서 T3GWPT나 T3GPTW 실험군이 더 강한 발현을 나타내었다(Fig. 6). 그러나 doxycycline이 없는 비유도 조건에서는 TtGWPT가 감염된 세포주에서 약한 발현이 확인되었다(Fig. 6). 이러한 현상은 기존의 Tet system에서는 EGFP 유전자의 발현 억제제가 완벽하게 이루어지지 않아서 background 활성이 존재하며, 새로운

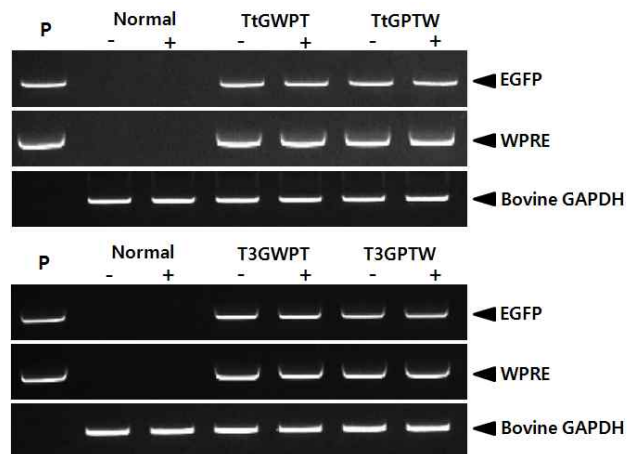


Fig. 4. RT-PCR analyses of the EGFP gene in BEF cells. The symbols at the top row, such as 'P', 'Normal', 'TtGWPT', 'TtGPTW', 'T3GWPT' and 'T3GPTW' indicate plasmid vector, uninfected cell, TtGWPT, TtGPTW, T3GWPT or T3GPTW infected cells. The symbols at the second row from the top, such as '-' or '+' indicate culture media supplemented with or without doxycycline, respectively.

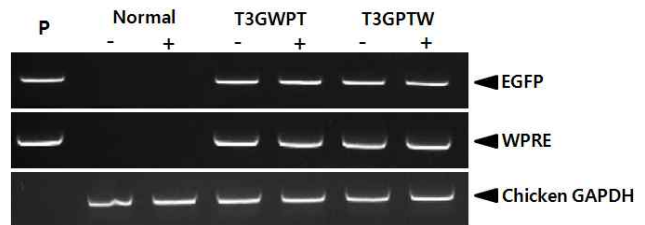


Fig. 5. RT-PCR analyses of the EGFP gene in CEF cells. The symbols at the top row, such as 'P', 'Normal', 'T3GWPT' and 'T3GPTW' indicate plasmid vector, uninfected cell, T3GWPT or T3GPTW infected cells. The symbols at the second row from the top, such as '-' or '+' indicate culture media supplemented with or without doxycycline, respectively.

Tet3G system에서는 보다 강력한 발현 억제가 이루어짐을 의미하는 것이다. 세포주에서의 전반적인 발현이 정상적으로 진행되고 있음을 확인하기 위해 대조구로 사용한 α -tubulin 항체에 대한 반응은 모든 세포들에서 거의 동일한 양상을 보였다(Fig. 6).

Tet3G vector virus를 CEF 세포에 감염시켜서 발현 양상을 관찰한 결과, BFF에서는 WPRE 서열이 transactivator 서열의 3' 위치에 도입한 조건에서 가장 강한 발현량과 발현 유도율을 나타내었는데 비해, CEF에서는 WPRE 서열이 EGFP 유전자의 3' 위치에 도입된 T3GWPT vector가 도입된 세포에서 가장 강한 발현과 높은 발현 유도율을 보이는 것으로 확인되었다(Fig. 7). 따라서 세포주의 종류에 따라 보다 효율적인 vector system의 선별 과정이 필수적으로 선행되어야 할 것으로 생각된다.

각 Tet System의 Doxycycline에 대한 민감도 확인

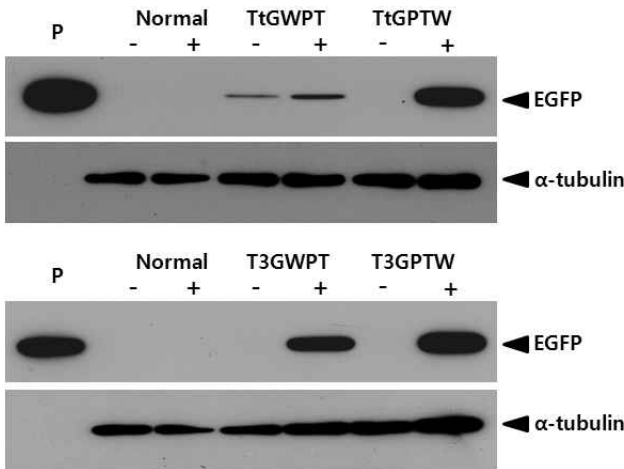


Fig. 6. Determination of doxycycline induction of the *EGFP* gene in BFF cells using Western blot analyses. P, recombinant EGFP protein; Normal, uninfected cell; Each other cells are designated with the virus name used to infect. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml).

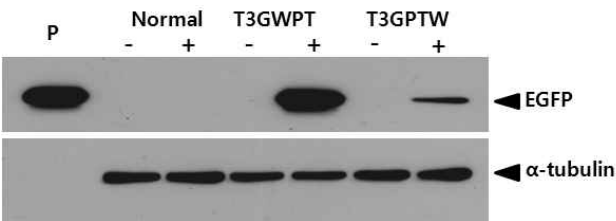


Fig. 7. Determination of doxycycline induction of the *EGFP* gene in CEF cells using Western blot analyses. P, recombinant EGFP protein; Normal, uninfected cell; Each other cells are designated with the virus name used to infect. -: cell was grown in the doxycycline free media. +: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 μ g/ml).

발현 유도 조건에서 강한 GFP 발현을 나타낸 BFF-TtGPTW와 BFF-T3GPTW 세포주에서 유도물질인 doxycycline에 대한 민감도를 확인하고자 각 세포주에 다양한 농도의 doxycycline을 첨가하여 발현을 유도한 후, Western blotting과 ELISA 방법을 이용하여 발현을 측정하였다. Western blotting 실험에서는 TtGPTW에서 EGFP의 발현이 doxycycline 농도가 100 ng/ml 이상에서 확인된 데 비해, T3GPTW에서는 10 ng/ml 조건에서 약한 발현이 나타났다(Fig. 8).

ELISA 결과에서도 TtGPTW에 비해 T3GPTW에서 높은 GFP 발현량을 나타내었는데, 10 ng/ml의 doxycycline 농도에서는 약 11배, 100 ng/ml에서는 1.8배, 그리고 1,000 ng/ml에서는 약 1.6배 이상 높게 나타났다(Fig. 9). 이는 전자에 비해 후자 system이 발현 유도물질에 대한 민감성이 향상되어서 저농도의 유도물질이 존재하는 조건에

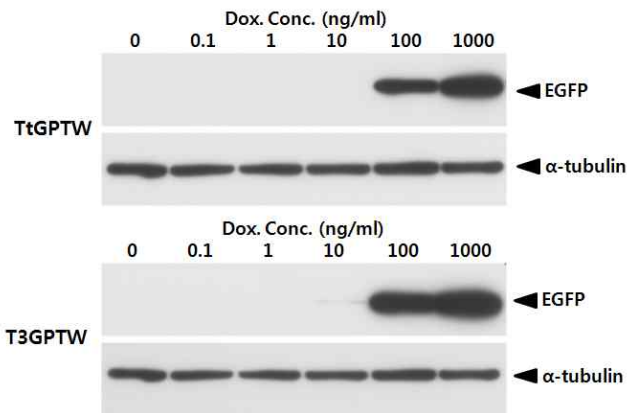


Fig. 8. Western blot analyses of BFF-TtGPTW and BFF-T3GPTW cells in different doxycycline concentration. Cell was grown in the media supplemented with doxycycline (concentrations used are indicated) for 2 days.

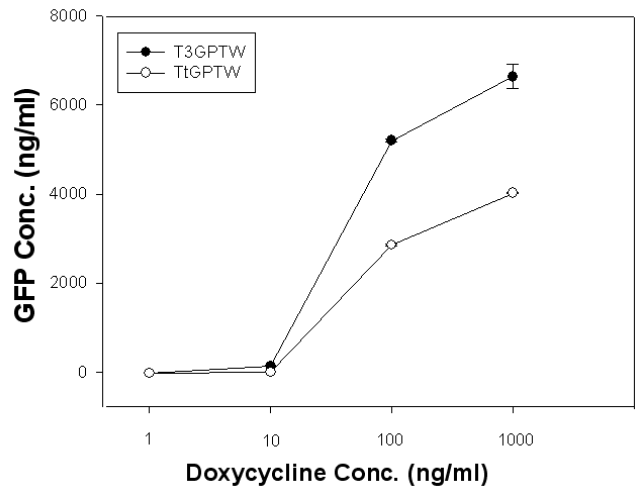


Fig. 9. ELISA analyses of BFF-TtGPTW and BFF-T3GPTW cells in different doxycycline concentration. Cell was grown in the media supplemented with doxycycline (concentrations used are indicated) for 2 days.

서도 발현이 유도될 수 있음을 의미한다.

고찰

Tet system은 *in vitro*나 *in vivo*에서 외래 유전자의 발현을 유도적으로 조절하기 위한 가장 널리 알려진 유전자 조절 system이다. 1992년 Gossen과 Bujard에 의해서 소개된 이 system은 생산된 transactivator 단백질이 발현 유도체인 tetracycline 계열의 물질과 결합하여 TRE 부분에 작용함으로써 tetracycline inducible promoter의 조절 하에 외래 유전자의 발현이 일어나는 system으로, 이 system이 도입된 세포나 형질전환 개체에서는 발현 유도

체인 tetracycline 계열의 물질이 존재하는 조건 하에서 외래 유전자의 발현이 유도된다(Gossen과 Bujard, 1992; Gossen 등, 1995). Tet system의 초기 구성은 두 요소, 즉 TRE가 포함된 promoter 부분과 transactivator 부분이 서로 다른 vector 상에 존재하는 two vector system으로서, 형질전환 동물 생산 등의 실험에 적용시 각각의 vector가 도입된 개체를 선별한 후 교미를 통한 후세대 생산 및 개체 분석 등을 실시해야 하므로 시간적, 경제적 손실이 크다(Ryding 등, 2001). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 두 요소를 단일 cassette에 도입하여 구축한 one vector system을 형질전환 동물 생산 및 knock out/in 동물 생산 등의 여러 연구에 사용하고 있으며(Bäckman 등, 2004), 본 연구실에서 구축한 기존의 one vector system도 기존의 two vector Tet system에 비해서 실험 과정의 단축으로 인한 기술적, 시간적 측면에서의 장점을 가지며, 발현율과 유도율이 높은 것으로 보고되었다(Koo 등, 2005; Koo 등, 2009). 이 외에도 Tet system의 개선은 TRE가 포함된 promoter 부분과 transactivator 부분의 구성을 변형시켜서 비유도 조건에서의 background 활성을 감소시키고, tetracycline 계열의 물질에 대한 감도를 향상시켜서 발현 유도율을 증가시키는 방향으로 진행되고 있다.

본 연구에서 구축한 Tet3G system은 PGK promoter 하에 rtTA2^{M2} 서열이 존재하고, TRE-tight (Clontech, USA)가 도입되어 있는 기존의 Tet system에 비해서(Koo 등, 2009) 개선된 형태의 transactivator와 inducible promoter를 도입한 형태로서, transactivator는 변형된 bacterial Tet repressor와 3개의 minimal VP16 activation domain을 결합하였으며, 기존의 Tet-On Advanced transactivator의 5개의 아미노산을 변형시킨 구조이다. Promoter 부위는 기존의 pTRE-tight promoter 서열의 연결 부위 서열 간격이 변형되고, 중앙 부분이 무작위로 정렬된 형태로 endogenous mammalian transcription factor 결합 부위가 존재하지 않는 구조이다. 이 Tet3G system은 기존의 여러 Tet system에 비해 발현 유도 조건에서는 매우 높은 발현율을 나타내며, 낮은 doxycycline 농도에도 민감하게 반응한다. 또한 TRE3G promoter에는 endogenous mammalian transcription factor 결합 부위가 존재하지 않으므로 transactivator protein이 없는 조건에서는 활성화가 되지 않아서 기저 발현이 거의 나타나지 않는다. 따라서 본 연구에서 구축한 이 두 조합의 Tet3G system은 매우 효율적인 외래 유전자 발현 조절 system으로, 외래 유전자를 도입하는 실험 방법을 이용하는 모든 연구, 즉 형질전환 동물의 생산이나 유전자 치료, 유전자 적중 등에서 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

인용문헌

- Ahfeldt T, Schinzel RT, Lee YK, Hendrickson D, Kaplan A, Lum DH, Camahort R, Xia F, Shay J, Rhee EP, Clish CB, Deo RC, Shen T, Lau FH, Cowley A, Mowrer G, Al-Siddiqi H, Nahrendorf M, Musunuru K, Gerszten RE, Rinn JL, Cowan CA (2012): Programming human pluripotent stem cells into white and brown adipocytes. *Nat Cell Biol* 14:209-219.
- Bäckman CM, Zhang Y, Hoffer BJ, Tomac AC (2004): Tetracycline-inducible expression systems for the generation of transgenic animals: a comparison of various inducible systems carried in a single vector. *J Neurosci Methods* 139:257-262.
- Bohl D, Naffakh N, Heard JM (1997): Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice with engineered primary myoblasts. *Nature Med* 3:299-305.
- 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.
- Kim MJ, Oh HJ, Park JE, Kim GA, Hong SG, Jang G, Kwon MS, Koo BC, Kim T, Kang SK, Ra JC, Ko C, Lee BC (2011): Generation of transgenic dogs that conditionally express green fluorescent protein. *Genesis* 49:472-478.
- Koo BC, Kwon MS, Kim T (2005): Regulation of GFP expression using the tetracycline inducible retroviral vector system. *Reprod Dev Biol* 29:57-62.
- Koo BC, Kwon MS, Kim T (2009): Construction of improved tetracycline-inducible expression system for the effective regulation of transgene expression. *Reprod Dev Biol* 33:63-69.
- 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.
- Li Z, Huang X, Zhan H, Zeng Z, Li C, Spitsbergen JM, Meierjohann S, Scharl M, Gong Z (2012): Inducible and repressible oncogene-addicted hepatocellular carcinoma in Tet-on xmrk transgenic zebrafish. *J Hepatol* 56:419-425.
- Löw R, Heinz N, Hampf M, Bujard H, Gossen M (2010): Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnology* 2010, 10:81.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996): Control of mammary formation through regulated-expression of a CaMK transgene. *Science* 274:1678-1683.
- Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccia A, Sun T, Schmitt EM, Bernardi RJ, Fu X, Bland CS,

- Cooper TA, Schiff R, Rosen JM, Westbrook TF, Elledge SJ (2011): The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:3665-3670.
14. Ryding ADS, Sharp MGF, Mullins JJ (2001): Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol* 171:1-14.
 15. Sun T, Aceto N, Meerbrey KL, Kessler JD, Zhou C, Migliaccio I, Nguyen DX, Pavlova NN, Botero M, Huang J, Bernardi RJ, Schmitt E, Hu G, Li MZ, Dephore N, Gygi SP, Rao M, Creighton CJ, Hillenbeck SG, Shaw CA, Muzny D, Gibbs RA, Wheeler DA, Osborne CK, Schiff R, Bentires-Alj M, Elledge SJ, Westbrook TF (2011): Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase. *Cell* 144:703-718.
 16. Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL (2010): Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464:1149-1154.
 17. Traykova-Brauch M, Schönig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M, Felsher DW, Glick AB, Kwiatkowski DJ, Bujard H, Horst J, von Knebel Doeberitz M, Niggli FK, Kriz W, Gröne HJ, Koesters R (2008): An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med* 14:979-984.
 18. 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.
 19. Wang J, Theunissen TW, Orkin SH (2007): Site-directed, virus-free, and inducible RNAi in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20850-20855.
 20. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A (2009): piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-770.
- (Received: 6 September 2013/ Accepted: 10 September 2013)