

여러 표적세포에서 Retrovirus Vector의 내부 Promoter의 종류와 WPRE의 유무에 따른 GFP 유전자의 발현 효율성 비교

김영혜 · 구분철¹ · 권모선 · 김태완[†]

대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

초 록

본 실험에서는 외래 유전자의 효율적인 발현을 위하여 GFP 표지유전자를 이용하여 여러 종류의 promoter를 검정하였다. 또한, retrovirus vector에 WPRE 서열을 도입함으로써 GFP 유전자의 발현 증가 여부를 확인하였다. 모든 표적 세포에 있어서 UbC와 β -actin promoter에 비해 RSV와 CMV promoter 통제하의 GFP의 발현이 더 강하게 나타났으며, 특히 CEF 세포에서는 RSV promoter가 가장 우수한 것으로 확인되었다. WPRE의 도입으로 인한 발현율의 증가는 CEF를 제외한 세포주에서 promoter의 종류에 관계없이 확인되었다. 이상의 결과로 각 세포주는 promoter에 따라 발현 양상이 약간의 차이를 보이고 있으나 RSV와 CMV promoter에서 유전자의 발현이 보다 효율적이며, WPRE 서열이 도입된 경우에 HeLa와 PFF 세포에서 발현이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 효율적인 유전자의 발현 체계를 확립하는데 기여함으로써 더 나아가 유전자 치료나 형질전환 동물생산에 적극적으로 활용되어질 수 있을 것이다.

(주제어 : Retrovirus vector, Promoter, GFP, WPRE)

서 론

세계적으로 형질전환동물을 이용하는 기술은 축산 분야 뿐만 아니라 유전적 질환이나 암 등과 같은 의학 연구 분야에서도 활발히 연구가 진행되고 있는 생명공학 분야이다. 이러한 분야에서 기술화를 높이기 위해서는 promoter 등과 같은 조절 유전자와 외래 유전자를 효율적이고 안정적으로 발현시킬 수 있는 유전자 전이 system에 관한 연구가 체계적으로 수행되어야 한다.

이에 본 연구에서는 외래 유전자의 효율적인 발현을 위하여 RSV (Luciw 등, 1983; Norton 등, 1987), UbC (Jentsch 등, 1991; Marinovic 등, 2000), β -actin (Mähönen 등, 2004), CMV (Boshart 등, 1985; Nelson 등, 1987)의 네 가지 promoter 하에 GFP 표지유전자를 사용하여 여러 종류의 표적 세포에서 그 발현 정도를 비교하고자 하였다. 또한 RSV와 CMV promoter 상에 외래 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려진 WPRE 서열을 도입하여 발현의 증감을 검정하고자 하였다. 본 실험에서의 유전자 전이 수단으로는 기술적인 용이성과 유전자 전이의 효율성, 전이된 유전자의 안전성 등의 장점을 가지고 있는 retrovirus vector system (Temin, 1989)을 사용하였다. 그러나 retrovirus vector sys-

tem은 숙주세포의 제한성과 virus 농축에 따른 감염성의 저하 현상이 문제점으로 지적되고 있는데, 본 연구에서는 이를 해결하기 위해 vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)을 피막으로 하는 pseudotyped retroviral vector system을 사용하였다(Burns 등, 1993). 다른 retrovirus의 피막단백질이 숙주세포막의 특이적인 수용체와의 상호작용에 의해 virus가 도입되는 반면에 VSV-G는 지질성 세포막의 합입에 의한 형태로 도입된다(Liu 등, 1996). 따라서 이 system에 의해 생산되는 virus는 거의 모든 척추 동물에서 유래된 세포에 높은 감염성을 나타내며 초원심 분리를 이용한 농축 후에도 바이러스의 감염성의 손실이 거의 나타나지 않는다(Burns 등, 1993; Lin 등, 1994). Retroviral vector를 이용한 유전자 전이에 있어서의 또 다른 문제점은 외래 유전자의 발현이 매우 약한 경우가 많다는 것이다. 이러한 발현을 저하의 해결 방안으로 본 연구에서는 RNA processing을 촉진하고 이로 인해 단백질의 발현을 증가시키는 것으로 알려진 WPRE 서열을 도입하고자 하였다. WPRE는 WPRE α , WPRE β , WPRE γ 세 개의 요소로 구성되어 있으며 이것은 두 부분으로 이루어진 사람의 HBVPRE (hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element)보다 발현율을 증가시키는 측면에서 더 높은 효율을 나타낸다(Donello 등, 1998). 본 연구에서는 이 WPRE 서열과 여러 종류의 promoter를 조합한 retrovirus vector

* 본 연구는 "2001년~2004년 농림부 농림기술개발사업", "한국과학재단 우수 연구센터(R11-2002-100-01000-0)", "농촌진흥청 바이오그린 21 연구비"와 축산연구소의 지원으로 수행되었음.

¹ 충북대학교 축산학과(Dept. of Animal Science, Chungbuk National University)

[†] Corresponding author : Dept. of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu, 712-702, Korea. TEL: 82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

를 구축하여 가장 효율적인 유전자 전이 system을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

Retrovirus Vector의 구축

pLNRG와 pLNRGW : RSV promoter는 pLXRN (Clontech, USA)을 HindIII와 Klenow로 순서대로 처리하여 평활 말단으로 만든 후 이를 다시 Xho I으로 절단함으로써 준비하고, 이를 BamH I, Klenow, Xho I의 순으로 처리한 pEGFP-N1 (Clontech, USA)과 결합시켜 pRSVpro-EGFP-N1을 구축하였다. 구축한 pRSVpro-EGFP-N1을 Xho I, Not I, Klenow 순으로 처리하여 RSV promoter와 GFP 유전자를 분리한 후 이를 BamH I, HindIII, Klenow 순으로 처리하여 CMV promoter를 제거한 pLNCX (Clontech, USA)에 도입하여 pLNRG를 구축하였다.

WHV(woodchuck hepatitis virus) (Donello 등, 1998) clone으로부터 cloning한 WPRE는 pGEM-T Easy vector (Promega, USA) 내로 도입하였다. 재조합된 pGEM-T Easy-WPRE를 EcoR I과 Klenow를 처리하여 WPRE 서열을 분리하였으며 이를 Hpa I과 CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)를 처리한 pLNRG와 재조합하여 pLNRGW를 구축하였다.

pLNUG : UbC promoter는 FUGW (Lois 등, 2002)를 Pac I과 T4 DNA polymerase, 그리고 Age I을 처리하여 분리하였다. 이를 Xho I, Klenow, Age I 순으로 처리하여 RSV promoter를 제거한 pLNRG에 도입하여 pLNUG를 구축하였다.

pLNβG : pEGFP-N1에 Not I, Klenow, HindIII를 처리하여 GFP 유전자를 분리한 후 이를 Sal I, Klenow, Hind III 순으로 처리하여 LacZ를 제거한 pLNβZ (Kim 등, 1993)에 도입하여 pLNβG를 구축하였다.

pLNCG와 pLNCGW : pEGFP-N1에 Age I, Not I, Klenow를 처리하여 GFP 유전자를 분리한 후 이를 Hind III, Klenow를 처리한 pLNCX에 도입하여 pLNCG를 구축하였으며, pGEM-T Easy-WPRE로부터 WPRE 서열을 분리하여 이를 Hpa I과 CIP를 처리한 pLNCG와 재조합하여 pLNCGW를 구축하였다.

이상에서 구축한 retrovirus vector의 구조는 Fig. 1과 같다.

세포 배양

본 실험에서 사용하는 PT67 (Clontech, USA), GP293 (Clontech, USA), HeLa(사람의 자궁경부암 세포), CEF (chicken embryonic fibroblast, 닭의 배아 섬유아세포), PFF (porcine fetal fibroblast, 돼지의 태아 섬유아세포) 세포들은 10% FBS (fetal bovine serum; GibcoBRL, USA)와 penicillin (100 U/ml)- streptomycin (100 μg/ml) (GibcoBRL,

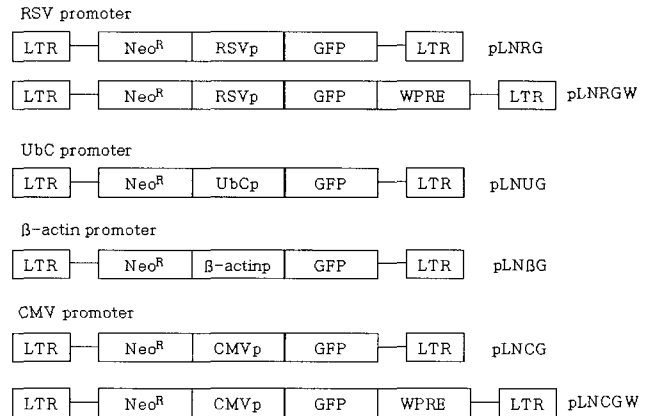


Fig. 1. Construction of retrovirus vectors. LTR, long terminal repeat; Neo^R, Neomycin resistant gene; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; UbCp, ubiquitin C promoter; β-actinp, chicken β-actin promoter; CMVp, human cytomegalovirus promoter; GFP, green fluorescent protein gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

USA)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium; GibcoBRL, USA) 배지에서 37°C, 5%의 CO₂ 조건으로 배양하였다.

Retrovirus Vector System의 생산

PT67 세포에 각각 20μg의 vector plasmid를 calcium phosphate 방법으로 transfection하여 다음날 새 배양액으로 갈아준 다음 48시간 후 virus stock을 수확하였다. 이 virus를 gag와 pol 유전자를 가지고 있는 GP293에 각각 감염시켜서 G418 (600 μg/ml)이 첨가된 배양액으로 1주간 선별하였다. 선별된 Neo^R (G418 resistant)한 GP293-LNRG, GP293-LNRGW, GP293-LNUG, GP293-LNβG, GP293-LNCG, GP293-LNCGW 세포에 VSV-G 유전자를 도입하기 위하여 20μg의 pHCMV-G (Yee 등, 1994)를 calcium phosphate 방법으로 transfection하였다. 37°C, 5%의 CO₂ 조건에서 8시간 배양 후 PBS로 수세한 후에 새 배양액으로 갈아주었다. 48시간이 경과한 후 retrovirus가 포함된 배양액을 각각 0.45 μm pore-size의 cellulose acetate filter를 이용해 수확하였다.

GFP 유전자의 발현 유도과 확인

하루 전날 60 mm dish에 1 × 10⁶개로 준비해 둔 표적 세포(HeLa, CEF, PFF)에 virus가 포함된 배양액 10 μl를 더하고 5 μg/ml의 polybrene을 첨가하였다. 다음날 G418 (600 μg/ml)이 첨가된 배양액으로 1/10로 5 dish를 split하여 3, 4일 간격으로 선별 배양액으로 갈아주면서 약 2주간 배양 후, 3 dish에서 형성된 colony는 crystal violet staining (Ching-suwanrote 등, 2003)을 이용해 Neo^R CFU/ml (colony forming unit per ml)을 측정하였다. 나머지 2 dish에서 형성된 세포는 GFP 전용 filter (460-490 nm excitation, 510-550 nm emission)가 장착된 형광현미경을 통하여 GFP의 발현을 확인하였다. 이 세포를 48시간 배양한 후 sonication buffer (50mM Na₂HPO₄, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 200mM NaCl)에 현탁하여 초음파 분쇄(Vibracell; Sonics &

Material Inc, USA)를 하고 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 추출하였다. 추출된 단백질을 Bradford 방법으로 정량하여 100 µg에 해당하는 양으로 fluorescence (Twinkle™ LB 970T Fluorometer; Berthold Technologies, Germany)를 측정하였다.

Western Blotting

GFP 단백질의 발현 정도를 확인하기 위하여 4 µg의 단백질을 전기영동한 후 semi-dry transfer cell (Bio-Rad)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Transfer가 끝난 membrane을 5% skim milk가 포함된 blocking buffer에서 incubation한 후, GFP monoclonal antibody (Clontech, USA)와 대조구로서 β-actin monoclonal antibody (Abcam Ltd, USA)를 각각 1:8000으로 희석한 용액으로 반응시킨 다음 horseradish peroxidase-conjugated된 secondary antibody (Pierce, USA)를 처리하였다. 항체를 반응시킨 membrane은 SuperSignal West Dura Substrate kits (Pierce, USA)를 이용하여 X-ray film에 감광시킨 후 현상하였다.

결과 및 고찰

표적세포에 대한 감염성 조사

제조한 retrovirus vector는 최종적으로 GP293 세포에 도입되어 virus 생산 세포주를 확립하였다. 수확한 virus stock (LNRG, LNRGW, LNUG, LNβG, LNCG, LNCGW)은 표적세포(HeLa, CEF, PFF)에 감염시켰으며 각 세포에서 Neo^R titer를 측정하고 결과 세포주에 따라 약간의 차이를 보이나 4 × 10⁵ ~ 8 × 10⁵ Neo^R CFU/ml의 감염가를 나타내었다.

GFP 유전자의 발현 확인

감염과 선별과정이 끝난 GFP 유전자가 전이된 각각의 표적세포에서 단백질을 추출하여 Fluorometry를 실시하였다. 그 결과 감염되지 않은 HeLa, CEF, PFF 세포에서는 330~390 rlu/100 µg(단백질 100 µg당 relative light unit) 값을 나타낸데 비해서 GFP 유전자가 전이된 표적세포들에서는 세포주에 따라서 1,000 rlu/100 µg에서 최고 2,000배인 600,000 rlu/100 µg의 증가된 값을 나타내었는데, promoter 순으로 GFP 유전자의 발현 효율을 살펴보면, RSV와 CMV promoter가 UbC와 β-actin promoter보다 더 높은 것으로 나타났다(Fig. 2). 그 중에서도 HeLa와 CEF에서는 RSV promoter가 가장 높은 효율을 보였고, PFF에서는 RSV보다 CMV promoter가 더 높게 나타났다. 이상의 결과는 형광현미경을 통한 세포의 관찰에서도 UbC와 β-actin promoter보다 RSV와 CMV promoter에서 좀 더 강한 형광이 보이는 것을 확인하였다(Fig. 5).

본 연구에서 사용하는 네 가지 promoter 중에서 RSV와 CMV promoter는 많은 세포주에서 발현율을 높이는데 성공되고 있는데(Baldwin 등, 1997), 특히 RSV promoter보다 CMV promoter가 더 높은 외래 유전자의 발현율을 나타내는 것으로 보고되고 있으나(Smith 등, 2000; Schaack 등,

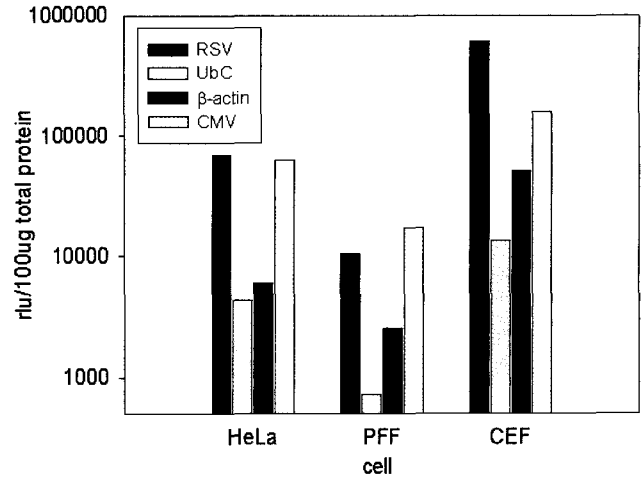


Fig. 2. Fluorescence analyses of GFP gene expression in various target cells. RSV, UbC, β-actin and CMV represent internal promoter of LNRG, LNUG, LNβG and LNCG retrovirus, respectively. rlu: relative light unit.

2001), Zarrin 등(1999)의 T lymphoid cell에서는 RSV promoter가 CMV promoter에 비해서 더 높은 발현을 보인다고 발표되었다. 본 실험에서도 세포와 promoter의 종류에 따라 GFP 유전자의 발현 효율이 다른 양상을 보이는 것으로 보아서 외래 유전자의 발현율의 크기는 표적세포와 promoter에 따라 결정됨을 알 수 있다.

WPRE에 의한 외래유전자의 발현 증대는 adenovirus (Glover 등., 2002; Xu 등, 2003), adeno-associated virus (Loeb 등, 1999; Paterna 등, 2000), lentivirus (Ramezani 등, 2000; Moreau-Gaudry 등, 2001), retrovirus (Schambach 등, 2000)에서 이미 그 효과가 증명되었다. WPRE는 세포의 종류나 promoter, vector에 관계없이 mRNA processing을 증가시키고 이에 따라 WPRE를 도입한 경우에 도입하지 않은 것보다 유전자 발현의 효율을 5배에서 최대 8배까지 증가시킨다고 보고되고 있다(Zufferey 등, 1999). 앞의 실험에서 네 가지 promoter 중 RSV와 CMV promoter가 UbC와 β-actin promoter에 비해 GFP 유전자의 발현에 있어서 우수하였기 때문에 RSV와 CMV promoter에서 WPRE의 도입 유무에 따른 형광 발현 정도를 비교하기로 하였다. 이 실험에서 RSV와 CMV promoter는 CEF 세포를 제외한 나머지 세포주에서 WPRE를 도입한 vector가 도입하지 않은 것보다 2배 이상의 발현 효과를 보였다(Fig. 3). 그러나 CEF 세포의 경우에는 WPRE의 효과가 거의 없다고 할 수 있는데, Fig. 3에서 promoter의 활성이 약간 감소하거나(RSV promoter의 경우) 약간 증가하는 것은(CMV promoter의 경우) 실험상의 미미한 오차에 기인한다고 생각된다. 이 결과를 Western blotting 실험에서 재확인하였는데, CEF를 제외한 다른 세포주에서는 WPRE를 도입한 vector가 WPRE를 도입하지 않은 vector보다 더 많은 GFP 단백질이 검출되었다(Fig. 4). 또한 형광현미경으로 RSV와 CMV promoter에 WPRE의 도입 유무에 따른 형광 발현 정도를 HeLa 세포에서 비교한 결과, 일반 vector보다 WPRE를 도입한 vector에서 더 강한 형광 발현을 나타내었다(Fig. 6).

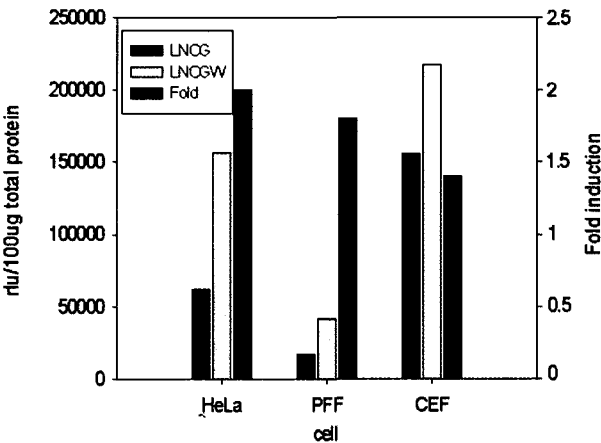
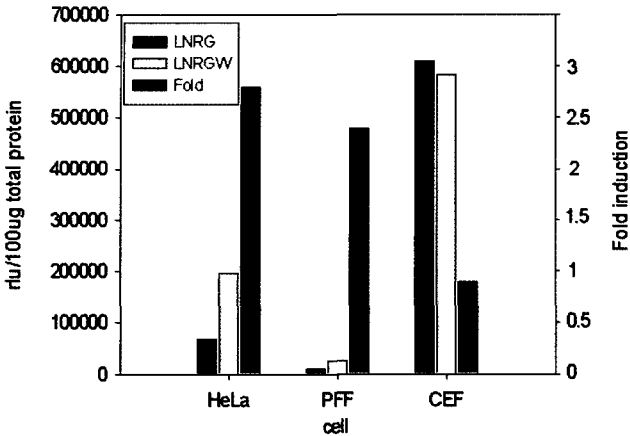


Fig. 3. Effect of WPRE on the GFP gene expression and fold induction in various target cells.

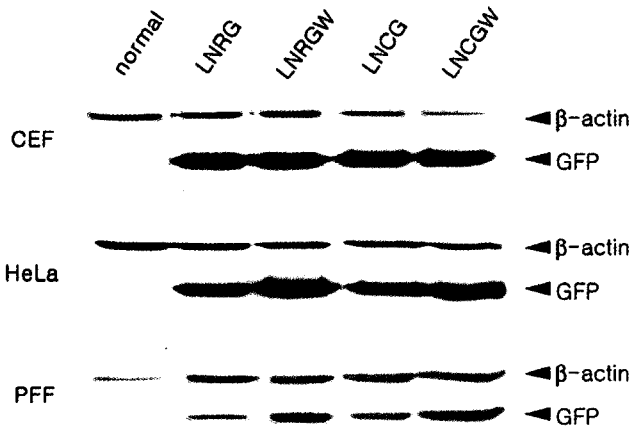


Fig. 4. Western blotting analyses of the GFP gene expression in various target cells.

이상의 결과와 같이 CEF를 제외한 두 가지 세포주에서는 promoter의 종류에 관계없이 WPRE의 효과를 볼 수 있었다. 이러한 WPRE를 도입한 retrovirus vector system을 형질전환동물 생산에 이용할 경우, 효율적인 유전자의 발현으로 형질전환동물 생산의 성공률을 높일 뿐만 아니라 사람의 유전자 치료에도 직접적인 응용이 가능한 것으로

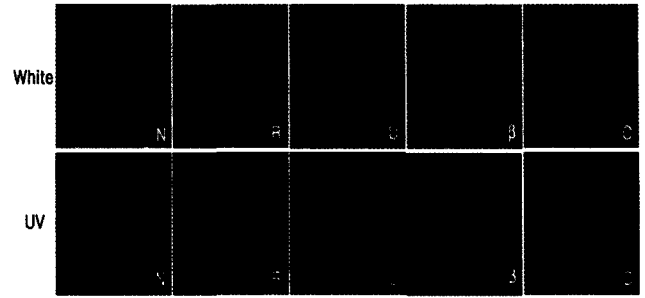


Fig. 5. Expression of the GFP gene in HeLa cell. N, uninfected; R, infected with LNRG; U, infected with LNUG; β , infected with LN β G; C, infected with LNCG.

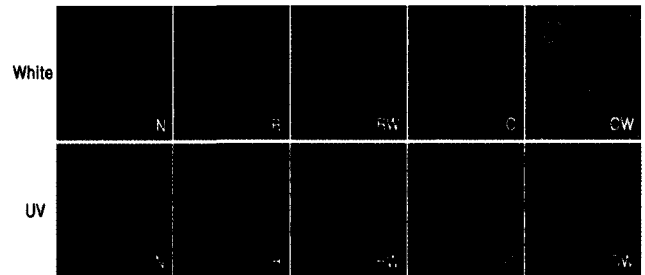


Fig. 6. Expression of the GFP gene in HeLa cell. N, uninfected; R, infected with LNRG; RW, infected with LNRGW; C, infected with LNCG; CW, infected with LNCGW.

사료된다.

Expression Comparison of the GFP Gene under the Controls of Several Internal Promoters in the Retrovirus Vectors with or without WPRE Sequence

Kim, Y. H., B. C. Koo, M. S. Kwon and T. O. Kim
Dept. of Physiology, Catholic University of Daegu School of Medicine

ABSTRACT

In this study, to construct more effective retrovirus system, we compared four internal promoters (RSV: Rous sarcoma virus, UbC: Ubiquitin C, β -actin, CMV: human cytomegalovirus) in the retrovirus vector by measuring GFP (green fluorescent protein) expression. The effect of WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) sequence on transgene expression was also investigated. Experiments were conducted with cells derived from three different species (human, pig and chicken) and evaluated the activity of each promoter and the effect of WPRE sequence by fluorometry and Western blotting. In all cells tested, RSV and CMV promoters were superior to UbC and β -actin promoters, and RSV promoter was the best one in chicken cells. The boosting effect of WPRE sequence on GFP expression was evident in human and porcine cells but not in chicken cells.

(Key words : Retrovirus vector, Promoter, GFP, WPRE)

인용문헌

- Baldwin HS, Mickanin C, Buck C (1997): Adenovirus-mediated gene transfer during initial organogenesis in the mammalian embryo is promoter-dependent and tissue-specific. *Gene Ther* 4:1142-1149.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-531.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vector: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8033-8037.
- Chingsuwanrote P, Susksanpaisan L, Smith DR (2003): Adaptation of the plaque assay methodology for dengue virus infected HepG2 cells. *Virol Methods* 116:119-121.
- Donello JE, Loeb JE, Hope TJ (1998): Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72:5085-5092.
- Glover CPJ, Bienemann AS, Heywood DJ, Cosgrave AS, Uney JB (2002): adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity. *Mol Ther* 5:509-516.
- Jentsch S, Seufert W, Hauser H (1991): Genetic analysis of the ubiquitin system. *Biochem Biophys Acta* 1089:127-139.
- Kim T, Leibfried-Rutledge ML, First NL (1993): Gene transfer in bovine blastocysts using replication-defective retroviral vectors packaged with Gibbon ape leukemia virus envelopes. *Mol Reprod Dev* 35:105-113.
- Lin S, Galiano N, Culp, Burns JC, Friedmann T, Yee JK, Hopkins N (1994): Integration and germ-line transmission of a pseudotyped retroviral vector in zebrafish. *Science* 265:666-668.
- Liu ML, Winter BL, Kay MA (1996): Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Molony leukemia virus-derived retrovirus vectors: Comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* 70:2497-2502.
- Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ (1999): Enhanced expression of transgene from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 10:2295-2305.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgene delivered by lentiviral vectors. *Science* 295:868-872.
- Luciw PA, Bishop JM, Varmus HE, Capecchi MR (1983): Location and function of retroviral and SV40 sequence that enhance biochemical transformation after microinjection of DNA. *Cell* 33:705-716.
- Mähönen AJ, Airenne KJ, Lind MM, Lesch HP, Ylä-Herttuala S (2004): Optimized self-excising Cre-expression cassette for mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 320:366-371.
- Marinovic AC, Mitch WE, Price SR (2000): Tools for evaluating Ubiquitin (UBC) gene expression: characterization of the rat UBC promoter and use of a unique 3' mRNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 274:537-541.
- Moreau-Gaudry F, Xia P, Jiang G, Perelman NP, Bauer G, Ellis J, Surinya KH, Mavilio F, Shen CK, Malik P (2001): High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors. *Gene Ther* 98:2664-2672.
- Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA (1987): Negative and positive regulation by a short segment in the 5'-flanking region of the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 7:4125-4129.
- Norton PA, Coffin JM (1987): Characterization of *Rous sarcoma* virus sequence essential for viral gene expression. *J Virol* 61:1171-1179.
- Paterna JC, Moccetti T, Mura A, Feldon J, Büeler H (2000): Influence of promoter and WHV post-transcriptional regulatory element on AAV-mediated transgene expression in the rat brain. *Gene Ther* 7:1304-1311.
- Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG (2000): Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-469.
- Schaack J, Allen B, Orlicky DJ, Bennett ML, Maxwell IH, Smith RL (2001): Promoter strength in adenovirus transducing vectors: Down-Regulation of the adenovirus E1A promoter in 293 cells facilitates vector construction. *Virology* 291:101-109.
- Schambach A, Wodrich H, Hildinger M, Bohne J, Krüsslich HG, Baum C (2000): Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Therapy* 2:435-445.
- Smith RL, Traul DL, Schaack J, Clayton GH, Staley KJ, Wilcox CL (2000): Characterization of promoter function and cell-type-specific expression from viral vectors in the nervous system. *J Virol* 74:11254-11261.

24. Temin HM (1989): Retrovirus variation and evolution. *Genome* 31:17-22.
25. Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T (2003): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances transgene expression from adenovirus vectors. *Biochem Biophys Acta* 1621:266-271.
26. Yee JK, Friedmann T, Burns JC (1994): Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods in Cell Biol* 43:99-112.
27. Zarrin AA, Malkin L, Fong I, Luk KD, Ghose A, Berinstein NL (1999): Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and V λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochem Biophys Acta* 1446:135-139.
28. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999): Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
(접수일자: 2004. 9. 6. / 채택일자: 2004. 9. 20.)