

Lentivirus System을 이용한 Glucocorticoid 유도 Reporter 유전자 발현의 분석

이미숙 · 김지연 · 허승욱*

한국 기초과학 지원 연구원 춘천센터

***In vitro* Analysis of Glucocorticoid-induced Reporter Gene Expression Using Lentivirus System.** Mi-Sook Lee, Ji-Yeon Kim, Song Her*. *Korea Basic Science Institute Chuncheon Center, Hyoja2-dong, Chuncheon, Gangwon-do, Korea*

Abstract Glucocorticoid hormone regulates numerous physiological processes, such as regulation of metabolism, and anti-inflammatory and immunosuppressive actions *via* the activation and repression of gene expression. Here we described a lentivirus-based reporter vector system expressing red fluorescent protein (mRFP) or firefly luciferase (Luc) under the control of a glucocorticoid-responsive element that allows observation of the temporospatial pattern of glucocorticoid induced GR-mediated signaling on a cellular level. Moreover, usage of the chromatin insulator of the chicken β -globin locus induced a marked increase of sensitivity of glucocorticoid inducible promoter of a reporter gene. Use of this method will be applicable of screening for agonist and antagonist of GR *in vitro*, and also a reporter gene assay for the *in vivo* determination of the GR-mediated gene activation.

Key words : Glucocorticoid-responsive element (GRE), lentivirus, glucocorticoid receptor, insulator

서 론

글루코코르티코이드 (Glucocorticoid) 호르몬은 글루코스, 단백질과 지방 대사의 조절, 항염증, 면역억제 작용과 같은 다양한 생리적 과정을 표적 유전자의 발현 촉진(transactivation)과 억제 (transrepression)를 통해 조절한다 [1,11,12,15]. 이 호르몬의 작용은 기본적으로 글루코코르티코이드에 결합한 글루코코르티코이드 수용체(GR)가 이중체를 형성하고 핵속으로 이동하여 GREs (glucocorticoid response elements, [7])에 결합함으로써 표적 유전자의 발현을 유도하는데 있다 [2,8,9]. 이 호르몬과 결합한 수용체의 활성화는 GRE를 포함한 리포터 유전자의 발현을 측정함으로써 분석할 수 있다. 기존의 리포터 유전자 분석법은 세포 내에서 다양한 리포터 유전자들 - GFP (Green Fluorescent Protein), CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase), luciferase, LacZ - 을 전사인자가 결합하는 특정반응부

위 (specific response element)의 downstream에 삽입된 벡터를 이용한 방법이다 [13,14]. 이들 리포터 유전자들 중에서 세포내에서 뿐만 아니라, 최근에는 생체내 (*in vivo*)에서 반복적이며 비침습적인 리포터 유전자로 GFP와 luciferase가 널리 사용되어지고 있다. 특히, GFP는 *Aequorea victoria* 라는 해파리에서 유래한 것으로 현미경으로 가시화 할 수 있을 뿐만 아니라 유세포분석기 (FACS)를 사용하여 확인할 수 있다는 장점이 있는 반면, 낮은 신호 감도와 정량적 분석이 어렵다는 단점이 있다. 반딧불이 luciferase 유전자는 높은 감도와 넓은 스펙트럼의 방출파장을 갖으며, 분석시간이 짧고 비방사성 측정법이 가능하여 많이 활용되고 있다 [6].

생체 내에서의 유전자 전달 방법은 gene gun DNA 전달법이나 바이러스를 이용한 유전자 전달 방법 등이 이용되어져 왔으며 [13], 최근에 피부에서 gene gun 전달법을 이용하여 글루코코르티코이드에 의해

* Corresponding author

Phone: +82-33-250-7394, Fax: +82-33-255-7273

E-mail: seher@kbsi.re.kr

유도된 리포터 유전자 발현을 보고 한 바가 있다 [14]. 그러나 이러한 방법은 다양한 조직에서 장기간 유전자 발현을 안정적으로 유도하기 어렵다는 단점을 갖고 있다. 따라서 생체내에서도 유전자의 효율적이고 안정적인 발현을 유도할 수 있는 유전자 전달방법으로써 렌티바이러스 시스템을 도입하여 위에서 언급한 단점을 보완하고자 하였다.

렌티바이러스 벡터는 대개 단일 open reading frame (ORF)에서 발현되도록 제작되어져 왔으나, 많은 유전자 전달을 위해 다양한 transgene의 발현이 효과적이며 높은 수준으로 발현되도록 하는 방법을 개발하고자 하였다. 그러나 단일 벡터에서 transgene의 발현은 프로모터간의 간섭에 의해 유전자간의 발현에 영향을 받을 수 있다고 알려져 왔다 [3,5,10]. 본 연구에서는 인접한 유전자간의 간섭에 의해 프로모터 활성이 저해 받는 것을 최소화하기 위해 insulator를 삽입한 렌티바이러스 벡터를 제작하여 GRE 프로모터 전사 효율을 높여 리포터 유전자 발현을 향상시켰다.

렌티바이러스 리포터 시스템을 이용하여 글루코코르티코이드에 의해 유도된 글루코코르티코이드 수용체 활성을 luciferase 와 RFP (Red Fluorescent Protein) 리포터 유전자의 발현을 통해 정량, 정성 분석을 하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 시약

HeLa 세포와 293T (human embryonic kidney) 세포는 1% penicillin (10,000 U/ml)/streptomycin (10 mg/ml) (Gibco BRL, USA), 10% FBS가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO, USA) 배지에서 유지되었으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양되었다. 코티졸 (Sigma, USA)은 메탄올에 녹인 후 PBS로 실험조건에 맞게 희석하여 사용하였다.

렌티바이러스 벡터 제조 및 생산

루시페라아제 또는 mRFP를 암호화하는 유전자를 트랜스퍼 렌티바이러스에 삽입하여 루시페라아제 또는 RFP가 GRE에 의해 발현이 조절된 벡터를 제조하였다. 이때 사용된 모체벡터로 pWPXL GFP (Dr. Didier Trono, Geneva) 을 사용하였으며, 루시페라아

제와 RFP를 클로닝하기 위한 벡터로 pGL3-Basic (Promega, USA)과 pCS2-mRFP (강동민 박사, 이화여대, 대한민국)를 사용하였다. 또한 insulator와 5개의 GRE는 각각 chicken β -globin locus(1)와 pGRE-Luc [4]에서 서브클로닝 하였다.

렌티바이러스 soup를 제조하기 위하여, 상기와 같이 제조된 렌티트랜스퍼 리포터 벡터 5 μ g와 포장 벡터 (psPAX2) 3.75 μ g 및 외피 벡터 (pMD2G) 1.25 μ g을 SuperFect 시약(Qiagen)을 사용하여293T 세포에 삽입 (transfection)시켰다. 37°C 에서72시간 동안 배양 후 분리된 렌티바이러스를 0.45 μ m 필터(Millipore)에 통과시켜 렌티바이러스를 얻어 세포에 실험을 진행하였다.

리포터 유전자 분석

제조된 렌티바이러스의 형광 단백질과 발광 단백질 발현을 측정하기 위하여 HeLa세포에 렌티바이러스를 감염시켜 영상장비인 IVIS-200 (Xenogen Ins, USA)과 공초점현미경 (MP-confocal microscope, Zeiss, Germany)으로 발광 (BLI, Bioluminescence imaging) 과 형광을 측정하였다.

루시페라아제 활성 분석

24well plate에서 배양된 HeLa 세포에 GRE-inducible 루시페라아제가 발현되는 바이러스를 감염시킨 후 12시간 경과 후 코티졸 호르몬을 농도별로 36시간동안 처리하였다. well 당 100ul의 luciferase lysis buffer를 처리하고 20분간 교반한 다음 용해된 세포를 수확하였다. Lysate를 원심분리하여 상등액 50 μ l에 luciferase활성 분석용 시약 50 μ l를 첨가하고 루시페라아제 활성을 Microluminometer (공동실험실습관, 강원대학교, 대한민국)로 측정하였다.

결과 및 고찰

렌티바이러스 제조

렌티바이러스를 이용한 GR 활성을 탐색하기 위해 GRE inducible한 렌티 리포터 벡터를 제조하였다 (Fig. 1. A). 리포터 벡터는 렌티 트랜스퍼 벡터에 insulator와 5XGRE를 포함한 mRFP와 루시페라아제 리포터 유전자를 클로닝하여 제작하였다. 293T 세포에 제조된 렌티 벡터와 함께 포장, 외피 벡터를

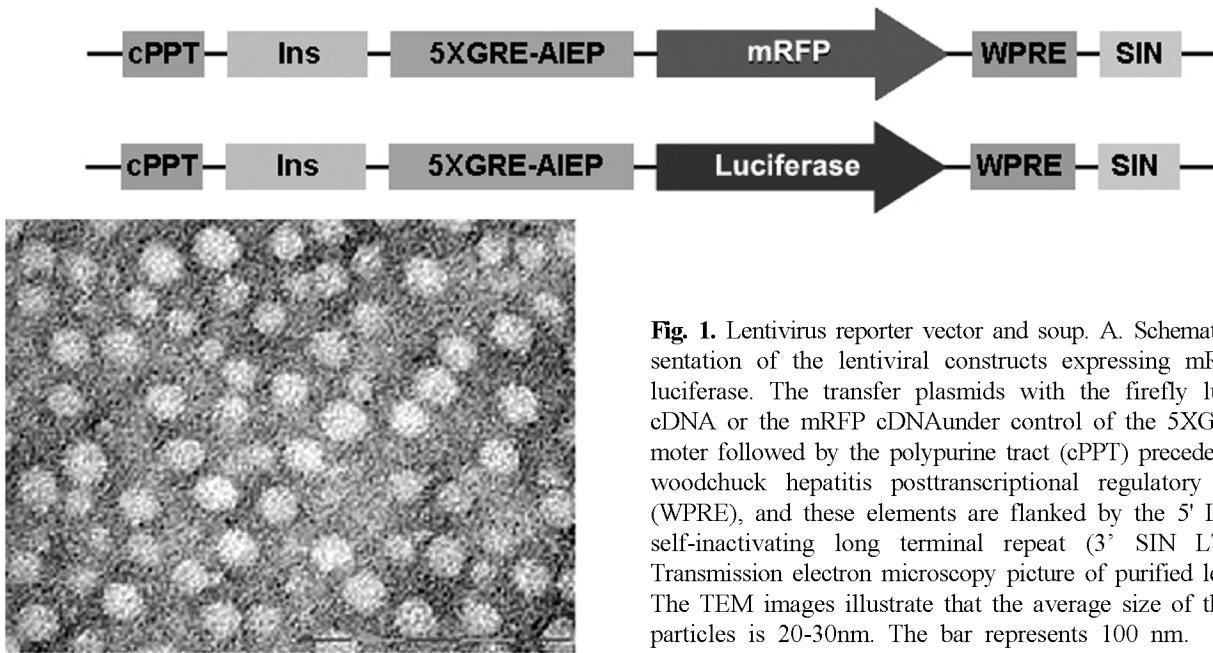


Fig. 1. Lentivirus reporter vector and soup. A. Schematic representation of the lentiviral constructs expressing mRFP and luciferase. The transfer plasmids with the firefly luciferase cDNA or the mRFP cDNA under control of the 5XGRE promoter followed by the polypurine tract (cPPT) preceded by the woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (WPRE), and these elements are flanked by the 5' LTR and self-inactivating long terminal repeat (3' SIN LTR). B. Transmission electron microscopy picture of purified lentivirus. The TEM images illustrate that the average size of the nanoparticles is 20-30nm. The bar represents 100 nm.

삽입하고 2일, 3일 경과 후 각각의 배양액으로부터 바이러스를 회수하였을 때 고르게 바이러스가 제조되었음을 투과전자현미경 (TEM) 이미지를 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 1. B). 이러한 렌티 바이러스를 이용한 GRE inducible 한 리포터 유전자의 발현은 다양한 GR 길항제의 탐색을 *in vitro*에서 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 가능하도록 하는 유용한 수단으로 쓰여질 수 있다.

코티졸 농도 차이에 따른 GRE-inducible 형광 단백질의 발현 탐색

코티졸 호르몬에 의해 활성화된 GR이 GRE inducible 한 mRFP 리포터 유전자의 발현을 유도하는 지 확인하기 위해 코티졸을 농도별로 처리한 후 mRFP 발현을 핵에서 GFP가 발현되도록 만들어진 stable HeLa 세포에서 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 확인하였다. 그 결과 코티졸 농도가 증가함에 따라 H2B-GFP가 발현되는 HeLa 세포에서 mRFP 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 코티졸 호르몬에 의해 활성을 띠는 GR이 핵내로 이동하여 GRE에 결합하여 mRFP 리포터 유전자의 발현을 촉진시켰음을 알 수 있었다.

코티졸 농도 차이에 따른 GRE-inducible 발광 단백질의 발현 탐색

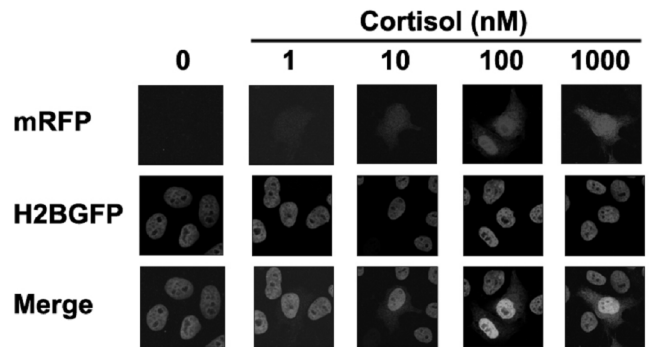


Fig. 2. GRE-inducible mRFP expression is dependent on cortisol dose. Stable HeLa cell lines expressing histones H2B tagged with green fluorescent protein (GFP) were infected with lentivirus (1.6 ng p24) with the 5xGRE-mRFP reporter. Cells were incubated overnight as indicated with cortisol. GRE-inducible mRFP expression was then determined using confocal microscopy.

코티졸 호르몬에 의한 GR 활성이 GRE inducible 한 루시페라아제 리포터 유전자의 발현을 유도하는 지 확인하기 위해 제작된 렌티바이러스로 HeLa 세포를 감염시킨 후, 코티졸을 농도별로 처리하여 루시페라아제 활성을 IVIS-200을 통해 BLI를 확인하였다. 그 결과 코티졸 호르몬이 증가함에 따라 루시페라아제의 활성이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 3), 이는 코티졸 호르몬에 의해 활성을 띠는 GR이 핵내로 이동하여 GRE에 결합하여 루

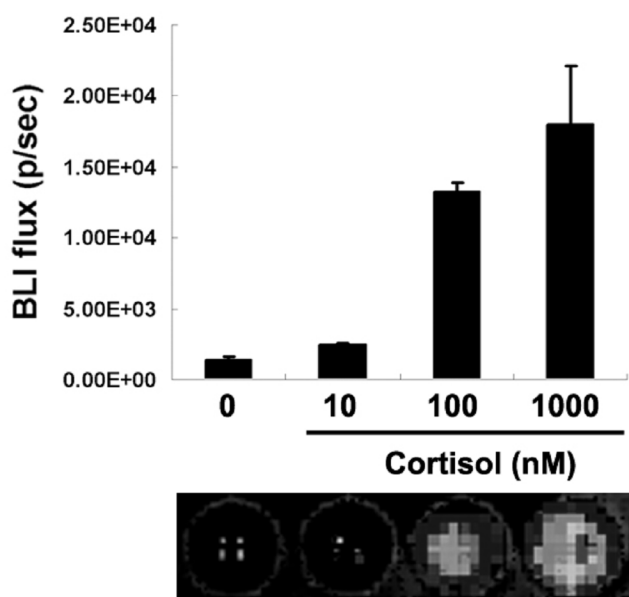


Fig. 3. GRE-inducible luciferase expression is dependent on cortisol dose. HeLa cells were infected with lentivirus (1.6 ng p24) with the 5xGRE-Luc reporter. Cells were incubated overnight as indicated with cortisol. GRE-inducible luciferase enzyme activities were confirmed using the IVIS-200 system. Data are mean \pm SEM of three independent experiments from different preparations.

시퍼라아제 리포터 유전자의 발현을 촉진시켰음을 알 수가 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, 렌티바이러스를 이용한 GR 활성 측정이 GRE inducible한 리포터 측정법을 통해 세포 수준에서 가능하다는 것을 확인할 수 있었으며, 현재, 이러한 렌티 리포터 시스템을 이용하여 동물 쥐 모델에서 GRE inducible response를 확인하고 있으며, 이러한 기술은 GR 길항제의 탐색 뿐만 아니라 스트레스와 우울증에 밀접하게 관련된 GR signaling기작 연구에 많은 단서를 제공할 수 있다.

요약

글루코코르티코이드의 다양한 생리학적 과정은 이 호르몬에 의해 활성화된 수용체가 표적 유전자의 전사를 촉진 혹은 억제시킴으로써 일어나게 된다. 본 논문은 렌티바이러스 리포터 시스템을 이용하여 글루코코르티코이드 호르몬에 의한 GR 활성을 핵 내에서 GRE에 의해 유도된 리포터 단백질인 mRFP 또는 루시퍼라아제의 발현을 통해 정성, 정량화 하였다. 그 결과 GR이 endogenous 하게 발현되는 HeLa

세포에서 코티졸을 처리하였을 때 활성화된 GR에 의해 GRE-inducible한 RFP와 루시퍼라아제의 발현이 각각 공초점 형광 현미경과 IVIS-200을 이용하여 형광 또는 BLI 을 통해 증가함을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 렌티바이러스 리포터 시스템을 이용한 연구는 세포 내에서 뿐 만 아니라 향후 생체내에서의 GR signaling을 모니터링하는데 유용하게 사용되어질 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 Korean Health 21 R&D project (A060075)의 지원으로 이루어졌음.

참고 문헌

1. Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851-857.
2. Dames, P., A. Laner, C. Maucksch, M. K. Aneja, and C. Rudolph. 2007. Targeting of the glucocorticoid hormone receptor with plasmid DNA comprising glucocorticoid response elements improves nonviral gene transfer efficiency in the lungs of mice. *J. Gene. Med.* **9**, 820-829.
3. Hasegawa, K., and N. Nakatsuji. 2002. Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett.* **520**, 47-52.
4. Her, S., P. D. Patel, A. F. Schatzberg, and D. M. Lyons. 2005. Mutations in squirrel monkey glucocorticoid receptor impair nuclear translocation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **94**, 319-326.
5. Kadesch, T., and P. Berg. 1986. Effects of the position of the simian virus 40 enhancer on expression of multiple transcription units in a single plasmid. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2593-2601.
6. Lai, C., X. Jiang, and X. Li. 2006. Development of luciferase reporter-based cell assays. *Assay Drug Dev. Technol.* **4**, 307-315.
7. McIver, S. R., C. S. Lee, J. M. Lee, S. H. Green, M. S. Sands, B. J. Snider, and M. P. Goldberg. 2005. Lentiviral transduction of murine oligodendrocytes in vivo. *J. Neurosci. Res.* **82**, 397-401.
8. McKenna, N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Malley. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* **20**, 321-344.
9. Nelson, C. C., S. C. Hendy, R. J. Shukin, H. Cheng, N. Bruchovsky, B. F. Koop, and P. S. Rennie. 1999. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* **13**, 2090-2107.

10. Osti, D., E. Marras, I. Ceriani, G. Grassini, T. Rubino, D. Vigano, D. Parolaro, and G. Perletti. 2006. Comparative analysis of molecular strategies attenuating positional effects in lentiviral vectors carrying multiple genes. *J. Virol. Methods* **136**, 93-101.
11. Resche-Rigon, M., and H. Gronemeyer. 1998. Therapeutic potential of selective modulators of nuclear receptor action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 501-507.
12. Schoneveld, O. J., I. C. Gaemers, and W. H. Lamers. 2004. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1680**, 114-128.
13. Stuelten, C. H., A. K. Kamaraju, L. M. Wakefield, and A. B. Roberts. 2007. Lentiviral reporter constructs for fluorescence tracking of the temporospatial pattern of Smad3 signaling. *Biotechniques* **43**, 289-290.
14. Tanigawa, K., K. Tanaka, H. Nagase, H. Miyake, M. Kijniwa, and K. Ikizawa. 2002. In vivo analysis of glucocorticoid-induced reporter gene expression using gene gun DNA delivery. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 1115-1118.
15. Wikstrom, A. C. 2003. Glucocorticoid action and novel mechanisms of steroid resistance: role of glucocorticoid receptor-interacting proteins for glucocorticoid responsiveness. *J. Endocrinol.* **178**, 331-337.