

FIV-Tet-On Vector System을 이용한 *hG-CSF* 유전자의 효율적인 발현 조절

권모선 · 구본철 · 김태완<sup>†</sup>  
 대구가톨릭대학교 의과대학 생리학교실

Efficient Control of Human *G-CSF* Gene Expression in the Primary Culture Cell using a FIV-Tet-On Vector System

Mo Sun Kwon, Bon Chul Koo and Teoan Kim<sup>†</sup>

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

## ABSTRACT

In this study, using FIV-based lentivirus vector system, we tried to express *hG-CSF* in tetracycline-controllable manner. *hG-CSF* influences the proliferation, differentiation, and survival of cells in the neutrophil lineage. To enhance stability and translation of *hG-CSF* transcript, WPRE sequence was also introduced into FIV-Tet-On vector at downstream region of either the *hG-CSF* gene or the sequence encoding *rtTA*. Primary culture cells (CEF, chicken embryonic fibroblast; PFF, porcine fetal fibroblast) infected with the recombinant FIV were cultured in the medium supplemented with or without doxycycline for 48 hours, and induction efficiency was measured by comparing the *hG-CSF* gene expression level using quantitative real-time PCR, Western blot and ELISA. Higher *hG-CSF* expression and tighter expression control were observed from the vector in which the WPRE sequence was placed at downstream of the *hG-CSF* (in CEF) or *rtTA* (in PFF) gene. This FIV-Tet-On vector system may be helpful in solving serious physiological disturbance problems which has continuously hampered successful production of transgenic animals and gene therapy.

(Key words : FIV vector, Tet-On, WPRE, *hG-CSF*, Induction efficiency)

## 요 약

본 연구에서는 *hG-CSF*의 발현을 유도적으로 조절하기 위한 FIV-Tet-On lentivirus vector system을 구축하고자 하였다. *hG-CSF*는 호중성구 계열 세포의 증식과 분화, 생존에 영향을 미치는 물질로서, 이 유전자의 발현을 증가시키기 위하여 FIV-Tet-On vector 상의 *hG-CSF*나 *rtTA2<sup>S</sup>M2* 서열의 3' 위치에 WPRE 서열을 도입하였다. 구축된 각각의 vector는 293FT 세포에 일시적으로 transfection하여 virus를 생산하였으며, 이 virus를 일차 배양 세포인 CEF와 PFF에 감염시켰다. 각 세포에 전이된 *hG-CSF*의 발현 양상을 관찰하기 위하여 doxycycline을 첨가하거나 첨가하지 않은 배지에서 배양한 후 quantitative real-time PCR, Western blot과 ELISA를 이용하여 *hG-CSF* 유전자의 발현 정도를 비교 측정된 결과, CEF에서는 WPRE가 *hG-CSF*의 3' 위치에 도입된 경우에 발현량과 유도율이 가장 높은 것으로 나타났고, PFF에서는 *rtTA* 서열의 3' 위치에 도입된 경우에 발현량과 유도율이 가장 큰 것으로 확인되었다. 이 FIV-Tet-On vector system은 형질 전환 동물의 생산이나 유전자 치료에서 문제시되는 외래 유전자의 지속적인 과다 발현에 의한 개체의 생리적인 부작용을 최소화하기 위한 해결 방법으로 제시될 수 있을 것이다.

## 서 론

Lentivirus vector는 포유류 세포에서 외래 유전자의 전이와 발현에 이용되며, 분열 세포뿐만 아니라 비분열

세포에서도 효율적인 유전자 전달의 수단이 된다(Reiser 등, 1996; Amado와 Chen, 1999). 가장 오랫동안 연구된 lentivirus vector는 HIV-1-based vector (human immunodeficiency virus type 1-based vector)인데(Naldini 등, 1996a,b), 이 vector는 잠재적인 생물학적 위험성 때문

\* 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업(R11-2002-100-010050-0), 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2005-0501-034-844), 농촌진흥청 공동연구사업(현장협력기술개발사업)(과제번호: 20070401-080-120) 지원에 의해 이루어진 것임.

<sup>†</sup> Corresponding author : Phone: +82-53-650-4470, E-mail: takim@cu.ac.kr

에 실험에 있어서 많은 제약이 따른다(Emerman, 1996; Romano, 2005). 이러한 HIV vector에 대한 대안으로 비영장류 유래의 lentivirus vector인 FIV (feline immunodeficiency virus) vector (Poeschla 등, 1998; Johnston 등, 1999), BIV (bovine immunodeficiency virus) vector (Berkowitz 등, 2001), 그리고 EIAV (equine infectious anemia virus) vector (Mitrophanous 등, 1999) 등이 개발되었다. 이 중 FIV는 고양이의 면역 부전에 원인이 되는 virus인데, 감염에 있어서 높은 종 특이성 때문에 사람에게 노출되어도 발병되지 않는 특성이 있다(Sauter와 Gasmir, 2001; Saenz와 Poeschla, 2004). 하지만 VSV-G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein)에 의해 포장된 재조합 FIV는 인간 세포를 감염시킬 수 있으며(Price 등, 2002; Song 등, 2003), 다양한 형태로 개발된 FIV vector는 뇌, 눈, 기도, 조혈계, 근육, 그리고 척장 등의 표적세포에 대한 유전자 전이 수단으로 사용되고 있다(Johnston 등, 1999; Wang 등, 1999; Curran 등, 2002; Loewen 등, 2002; Price 등, 2002; Stein과 Davidson, 2002). 이러한 특징에 근거하여 본 연구에서는 FIV를 이용한 외래 유전자 전이 및 발현 실험을 수행하기 위해 다음과 같은 vector를 고안하였다. 먼저, FIV vector의 생물학적 안정성을 높이기 위해 insertional mutagenesis에 의한 부작용을 최소화시킬 수 있는 self-inactivating (SIN) vector를 사용하였으며(Kafri 등, 2000), 둘째, 외래 유전자의 발현 효율을 증가시키기 위하여 WPRE (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) 서열을 도입하였고(Zufferey 등, 1999), 마지막으로 tetracycline-inducible expression system을 사용하여(Gossen과 Bujard, 1992) 외래 유전자의 발현을 조절함으로써 개

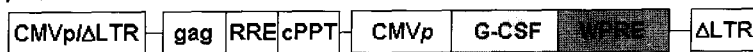
체내의 생리적인 부작용을 최소화하고자 하였다. 본 연구에서 발현시키고자 한 *hG-CSF* (human granulocyte colony stimulating factor)는 조혈 전구세포들의 증식과 분화를 조절하고, 중성구의 식세포 작용이나 살균 작용을 강화시키는 당단백질로(Fabian 등, 1991; Lieschke와 Burgess, 1992; Bober 등 1995), 고형 암 및 혈액 종양 환자의 항암 요법 치료시, 재생 불량성 빈혈이나 골수 이형성 증후군 발생시, HIV 감염시, 그리고 조혈모 세포 이식시에 나타나는 호중구 감소증을 치료하기 위하여 사용된다. 본 연구에서는 고가의 바이오 의약품인 *hG-CSF*를 대량 생산하는 생체 반응기의 개발을 위한 기초 연구로 *hG-CSF*의 발현을 유도적으로 조절할 수 있는 tetracycline-inducible vector system을 구축하고 *in vitro*에서의 유전자 발현 조절 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

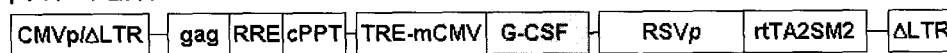
### FIV Vector의 구축

*hG-CSF* 유전자를 발현시키기 위한 FIV vector의 구축은 pCDF1-MCS2-EF1-copGFP vector (System Biosciences, USA)의 CMV promoter 대신에 CMV enhancer가 포함된 보다 긴 CMV promoter를 대체시켰으며, *copGFP*를 제거하고 *hG-CSF* 유전자를 삽입하여 pFIV-CGW를 구축하였다(Fig. 1). 또한, *hG-CSF*의 발현을 유도적으로 조절하기 위해서 tetracycline-inducible vector도 동시에 구축하였다. 각 vector의 구조는 Fig. 1과 같다.

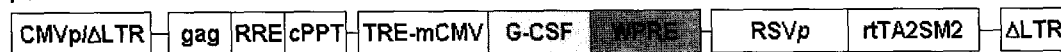
#### pFIV-CGW



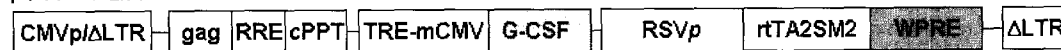
#### pFIV-TGRT



#### pFIV-TGWRT



#### pFIV-TGRTW



#### pFIV-TGWRTW



**Fig. 1.** Structures of pFIV-CGW and tetracycline inducible expression FIV vectors. CMVp/ΔLTR, hybrid FIV LTR whose U3 region was replaced with cytomegalovirus (CMV) promoter; gag, Packaging signal; RRE, Rev-responsive element; cPPT, Central polypurine tract; CMVp, human cytomegalovirus promoter; G-CSF, human granulocyte colony stimulating factor gene; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; TRE-mCMV, Tet-response element containing seven direct repeats of the 42-bp tetO operator sequence and a DNA fragment consisting of minimal CMV promoter; RSVp, Rous sarcoma virus promoter; rtTA2<sup>SM2</sup>, reverse tetracycline repressor (rtTetR) fused to a VP16 transactivation domain; ΔLTR, long terminal repeat without U3 region. The vectors of FIV-based vector carrying this 3'ΔLTR are self-inactivating.

### Lentivirus의 생산 및 표적세포에의 감염

구축된 각각의 vector를 이용하여 virus를 생산하기 위하여 lentivirus를 생산하는데 필요한 구조단백질을 coding하는 pFIV-34N (System Biosciences, USA)과 pVSV-G (System Biosciences, USA)을 동시에 293FT (Clontech, USA) 세포에 calcium phosphate 방법으로 co-transfection하여 다음날 새 배지로 교환한 다음 48시간 후 virus가 포함된 배지를 수확하였다. 수확한 virus는 CEF와 PFF를 감염시키는 데 사용하였으며, 감염된 세포는 vector 상에 항생제 내성 유전자가 없는 관계로 선별 과정을 거치지 않고 바로 doxycycline 유도 실험을 진행하였다.

### hG-CSF의 발현 검증 및 Tet System을 이용한 외래 유전자의 발현 확인

CEF와 PFF 세포에서 hG-CSF 유전자의 발현 검증은 RT-PCR, Western blot, 그리고 ELISA 방법을 이용하여 확인하였다. Tet system을 이용한 hG-CSF의 유도적 발현은 Tet system이 도입된 각 세포들을 doxycycline이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 48시간 배양한 후 RNA와 단백질 수준에서 RT-PCR과 Western blotting, ELISA, 그리고 real-time quantitative RT-PCR 방법을 이용하여 확인하였다.

### RT-PCR

RT-PCR은 virus에 감염되지 않은 세포와 virus에 감염된 세포에서 trizol을 이용하여 분리한 각각 1 µg의 total RNA로부터 ImProm-II reverse transcription system (Promega, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. 각각의 실험군에서 2 µl의 cDNA를 주형으로 이용하여 hG-CSF에 해당하는 primer를 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 실험에 사용한 hG-CSF에 해당하는 primer는 + strand primer인 5'-AAGCTGTGTGCCACCT-ACAAGC-3'와 - strand primer인 5'-GCCATTCCCAGTTCCTCCATCT-3'이며, 대조구로 각 세포주의 GAPDH 유전자에 대하여 PCR을 수행하였다.

### Western Blotting

각 세포를 발현 유도 조건과 비유도 조건에서 48시간 배양한 후 세포 배양액을 수거한 후 초음파 파쇄와 원심 분리 방법을 이용하여 세포 단백질을 분리하였다. 세포 배양액은 10 µl를, 분리한 세포 단백질은 Bradford 방법으로 정량한 후 4 µg을 각각 SDS-PAGE한 후 nitrocellulose membrane에 transfer시켰다. 5% skim milk가 포함된 0.03% tween-20 blocking buffer에 1시간 방치한 후 1:5,000으로 희석한 anti-human G-CSF antibody (R&D systems, USA)와 1:8,000으로 희석한 anti-Actin (beta) antibody (Abcam, UK)를 16시간 반응시켰다. TBS buffer로 수세한 다음 이차 항체인 HRP conjugated Goat anti-mouse IgG (Pierce, USA) 1:5,000으로 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

ELISA 분석은 standard에 해당하는 재조합 hG-CSF (Komabiotech, Korea), 대조구와 실험구의 세포 배양액을 전날 anti-human G-CSF monoclonal antibody (BD Biosciences, USA)로 coating시켜 둔 96 well plate에 100 µl씩 첨가하여 4°C에서 16시간 반응시킨 후 수세하였으며, biotinylate rat anti-human G-CSF monoclonal antibody (BD Biosciences, USA)를 처리하였다. 다시 수세한 후 각 well에 streptavidin-HRP conjugate (BD Biosciences, USA) 용액을 첨가하여 반응시킨 후, 수세 과정을 재실시하고 기질인 TMB (tetramethylbenzidine, Komabiotech, Korea)를 첨가하여 암조건에서 반응시켰다. 일정 시간 경과 후 stop solution을 첨가하여 반응을 종결하였고, microplate reader를 사용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### Quantitative Real-Time PCR

Bio-Rad 회사(USA)의 MiniOpticon real-time PCR detection system을 이용하여 동일한 sample을 4개씩 동시에 real-time PCR을 수행하였으며, 같은 과정을 3회 반복 실험하였다. PCR 반응은 DyNAmo SYBR Green qPCR Master mix (Finnzymes, Finland) 10 µl에 각각 5 pmol의 +와 - strand primer, 그리고 cDNA 0.5 µg을 넣어 전체 20 µl로 수행하였다. 세포의 RNA에서 hG-CSF 유전자의 발현량을 측정하기 위하여 internal control인 GAPDH와 함께 quantitative real-time PCR을 수행하였다. Quantitative real-time PCR 결과를 Opticon Monitor analysis software로 분석하여 Ct값을 결정하였으며, Ct값에서 GAPDH 유전자의 Ct값은 reference로 정하고, hG-CSF 유전자의 Ct값은 target으로 정한 뒤 2- $\Delta\Delta$ CT 방법 (Livak과 Schmittgen, 2001)을 사용하여 최종적으로 hG-CSF 유전자의 발현 정도를 비교하였다.

## 결 과

### FIV-CGW Virus Vector System의 발현 여부 확인

RT-PCR을 이용한 분석 결과에서는 virus에 감염되지 않은 세포의 경우, hG-CSF 유전자에 대한 단편이 증폭되지 않은데 반해 FIV-CGW virus에 감염된 세포에서는 PCR 단편의 증폭이 뚜렷하게 확인되었다(Fig. 2-I). Western blotting 결과에서도 virus에 감염된 세포에서 hG-CSF의 발현이 확인되었으며, 특히 세포에서 분리한 단백질에서의 발현에 비해 세포 배양액에서의 발현이 매우 강하게 나타났는데(Fig. 2-II), 이는 hG-CSF가 세포 내에서 생산된 후 세포 외로 분비되었음을 의미한다. ELISA 방법을 이용하여 각 세포에서 hG-CSF의 농도를 측정된 결과, 정상세포에서는 hG-CSF의 값이 나타나지 않았으며, CEF-FCGW에서는 626 ng/ml, PFF-FCGW에서는 720 ng/ml의 값을 가지는 것으로 나타났다(미제시).

### Tet System을 이용한 hG-CSF 유전자의 유도적 발현 여부 확인

Tetracycline에 의해 발현이 조절되는 FIV-TGRT 계열

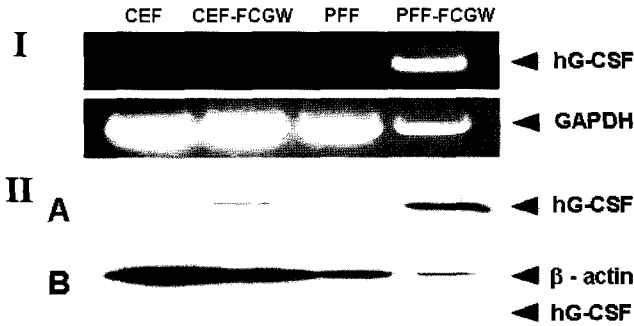


Fig. 2. RT-PCR (I) and Western blot (II) analyses of *hG-CSF* gene expression in target cells. CEF and PFF cells uninfected with FCGW recombinant vector virus were denoted by "-FCGW". *GAPDH* and  $\beta$ -actin was used as an internal controls. II-A, medium harvested from each cell line; II-B, cell lysate from the each cell line.

의 실험군에서 RT-PCR을 실행한 결과, 모든 세포에서 281 bp의 *hG-CSF* 유전자에 해당하는 PCR 단편이 확인되었으며, 특히 doxycycline을 첨가한 조건에서 더 진한 것으로 나타났다(Fig. 3). 이에 비해 *GAPDH* 유전자에 대한 PCR 단편은 모든 실험군에서 거의 동일한 양으로 나타났다. WPRE 서열의 위치에 따른 *hG-CSF*에 대한 발현은, CEF의 경우 WPRE 서열을 *hG-CSF* 유전자의 3' 위치에 도입한 FIV-TGWRT에서 가장 높게 나타났으며, PFF의 경우는 WPRE 서열을 *rtTA2<sup>S</sup>-M2*의 3' 위치에 도입한 FIV-TGRTW에서 가장 높은 발현율을 나타내었다. Western blot 결과도 RT-PCR과 마찬가지로 doxycycline을 첨가하지 않은 조건에 비해 첨가한 조건에서 *hG-CSF*의 발현이 상대적으로 높았으며, CEF에서는 FIV-TGWRT에서, PFF에서는 FIV-TGRTW에서 *hG-CSF*의 발현이 가장 높게 나타났다(Fig. 3). 이에 비해 WPRE가 삽입되지 않은 FIV-TGRT나, WPRE가 *hG-CSF*의 3' 위치와 *rtTA2<sup>S</sup>-M2*의 3' 위치에 동시에 도입된 FIV-TGWRTW의 경우에는 CEF와 PFF 모두에서 *hG-CSF* 유전자의 발현율과 유도율이 현저히 낮은 것으로 확인되었다(Fig. 3).

*hG-CSF* 발현 여부를 재확인하기 위하여 *hG-CSF* 유전자에 대한 특이적인 PCR primer를 사용하여 quantitative real-time PCR을 수행한 결과는 다음과 같다. 먼저 세포의 total RNA에서 *GAPDH* 유전자에 대한 *hG-CSF* 유전자의 발현 정도를  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법을 사용하여 상대적으로 분석한 결과, doxycycline이 첨가되지 않은 조건에 비해 첨가된 조건에서 *hG-CSF*의 발현이 높은 것으로 확인되었다(Fig. 4). RT-PCR과 Western blotting의 결과와 마찬가지로 발현 유도의 조건에서 절대적인 발현량은 CEF에서는 FIV-TGWRT virus가 감염된 경우가 가장 높았으며, PFF에서는 FIV-TGRTW virus가 감염된 경우가 가장 높았다(Fig. 4). 또한, 이 세포들의 발현 유도율은 각각 CEF-FIV-TGWRT 세포에서 163배, PFF-FIV-TGRTW 세포에서 1,000배의 매우 높은 유도율을 나타내었다.

각 세포의 배양액을 수확하여 ELISA를 실시한 결과, doxycycline이 없는 조건에서 배양한 세포의 배양액에서는 매우 낮은 농도의 *hG-CSF*가 측정되었으며, doxycycline이 있는 조건에서 배양한 세포의 배양액은 상대적으로 높은 값을 나타내었다. 특히, Western blot이나 RT-

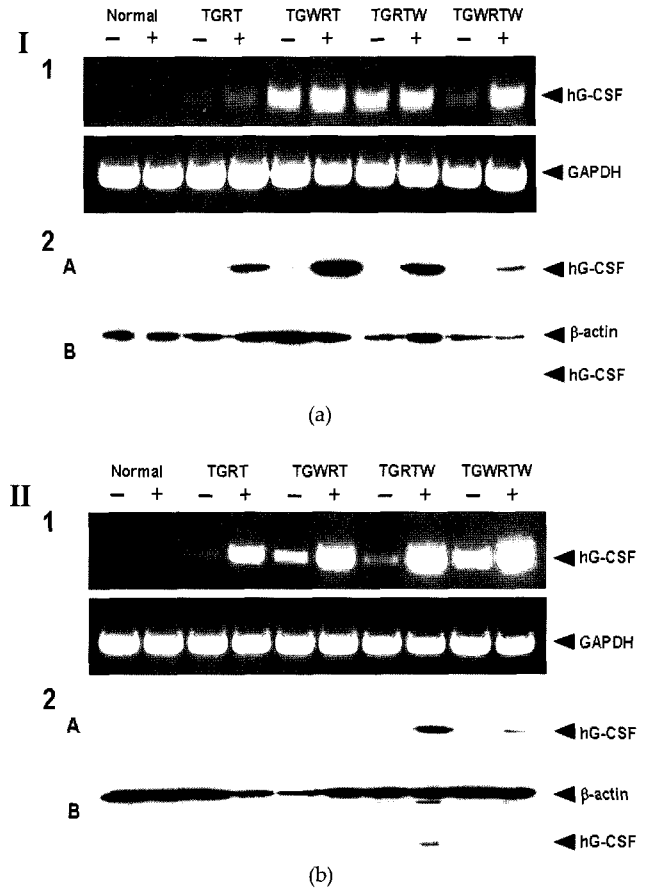


Fig. 3. Determination of doxycycline induction-mediated *hG-CSF* gene expression in CEF (I) and PFF cells (II) by RT-PCR (1) and Western blot (2) analyses. Normal, uninfected cells; TGRT, cells infected with FIV-TGRT; TGWRT, cells infected with FIV-TGWRT; TGRTW, cells infected with FIV-TGRTW; TGWRTW, cells infected with FIV-TGWRTW. - and + indicate absence and presence of doxycycline, respectively. *GAPDH* and  $\beta$ -actin was used as an internal control. A: 10  $\mu$ l cell media per well, B: 4  $\mu$ g of total lysate cellular protein per well.

PCR 결과 비교적 높은 발현을 보인 CEF-FIV-TGWRT 세포에서는 826 ng/ml, CEF-FIV-TGRTW에서는 624 ng/ml의 양을 나타내었으며, PFF-FIV-TGWRT 세포에서는 218 ng/ml, PFF-FIV-TGRTW 세포에서는 712 ng/ml의 농도를 나타내었다(Fig. 5). 이상의 결과에서 Tet system을 이용한 *hG-CSF*의 발현 조절이 효율적으로 이루어지며, 세포에 따라 가장 적절한 vector system이 다르게 나타난다는 사실을 확인할 수 있었다.

## 고찰

외래 유전자의 효율적인 발현 조절은 많은 질환에 대한 유전자 치료에서 뿐만 아니라 바이오 의약품의 대량 생산을 위한 생체 반응기로서의 형질 전환 동물의 생산에 있어서도 필수적으로 요구되는 연구 분야이다. 본 연

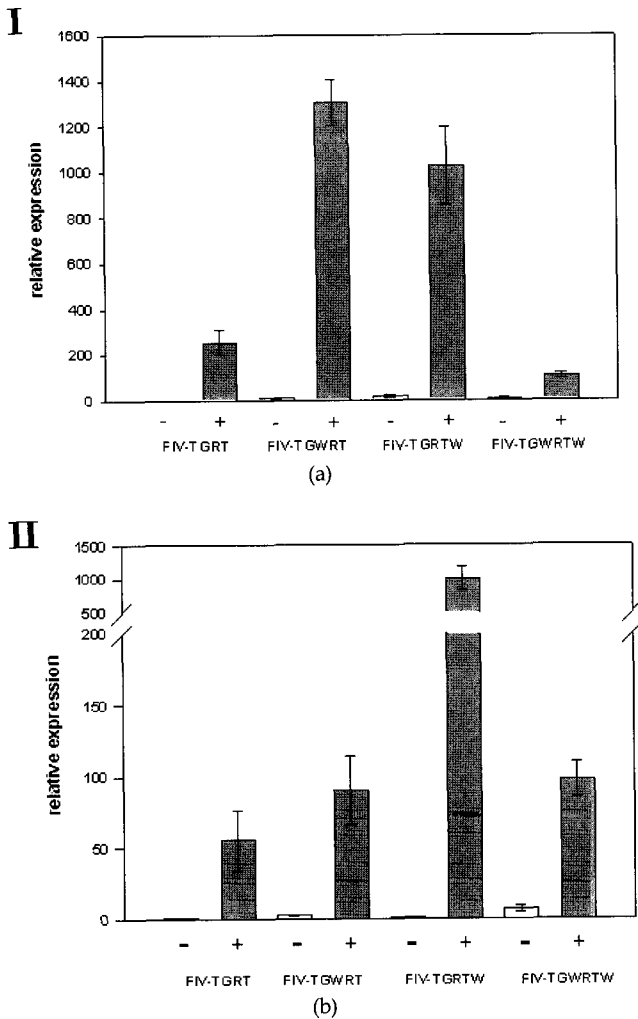


Fig. 4. Quantitative real-time PCR analyses of hG-CSF in CEF (I) and PFF (II) cells. The cell infected with four different viruses are denoted by virus name on the X-axis. - and + indicate absence and presence of doxycycline (1 µg/ml), respectively.

구에서는 비영장류의 lentivirus vector system인 FIV vector system을 기본으로 하여 효율적인 유전자 조절 system을 구축하고자 하였다. FIV vector를 비롯한 lentivirus vector들은 생물학적 안정성을 확보하기 위하여 주로 SIN vector 형태로 구축되는데, 본 연구에서 사용한 vector도 3' LTR의 enhancer/promoter 부위의 일부를 제거하여 표적세포 감염 후 재조합으로 인한 replication competent lentivirus의 생산 가능성과 LTR에 의해 발생할 수 있는 동일 vector 내의 internal promoter의 transcriptional activity에 대한 부정적인 영향을 최소화하고자 하였다(Soriano 등, 1991; Miyoshi 등 1998). 본 연구에서는 또한 SIN vector 형태의 FIV vector를 근간으로 하여 외래 유전자 발현의 유도적인 조절이 가능한 system을 구축하고자 하였다. 여러 가지 발현 조절 system 중에서 가장 많이 사용되고 있는 tetracycline inducible expression system은 Tet-On과 Tet-Off system으로 구분되는데, 전자는 tetracycline 계열의 물질이 존재하는 조건에

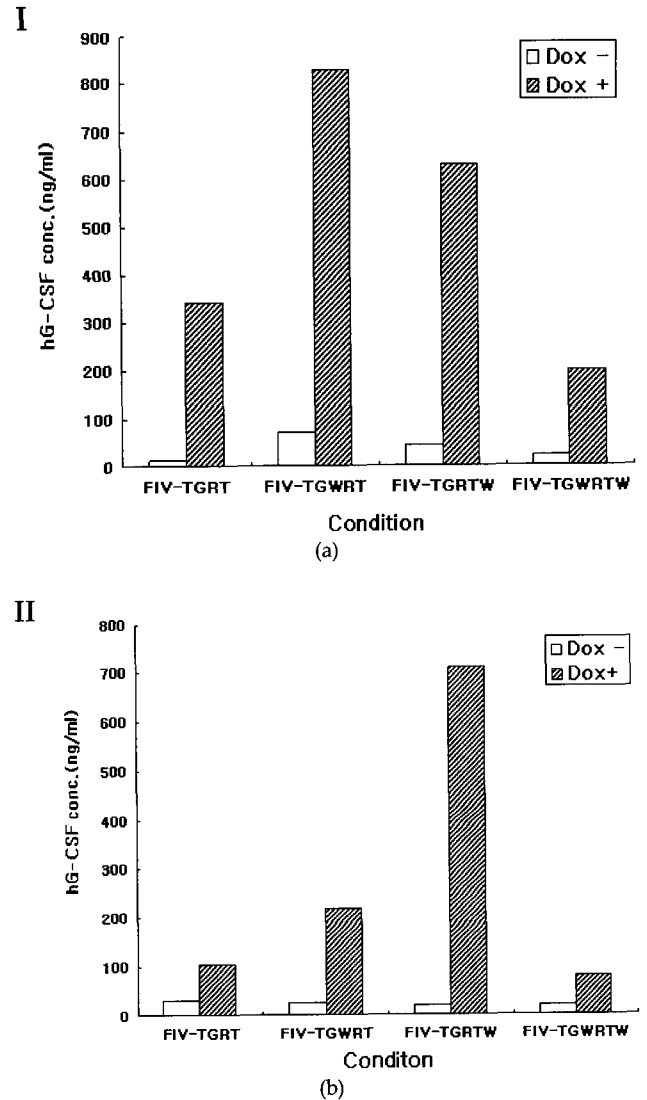


Fig. 5. ELISA analyses of hG-CSF in CEF (I) and PFF (II) cells infected with FIV-TGRT, FIV-TGWRT, FIV-TGRTW, or FIV-TGWRTW. □: cell was grown in the doxycycline free media. ▨: cell was grown in the media supplemented with doxycycline (1 µg/ml).

서, 후자는 물질이 존재하지 않는 경우에만 외래 유전자의 발현이 turn-on 되는 구조이다. 표적세포에 Tet system을 도입하기 위해서는 두 개의 vector가 동시에 transfection되어야 한다. 그러나 두 가지 유전자를 동시에 transfection하는 경우, 두 유전자 모두를 동시에 효율적으로 발현시키기가 매우 어렵다. 이 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 TRE와 rtTA 서열을 동일 vector 상에 구축하였으며, 또한 기존의 rtTA 유전자 대신 현재 낮은 background activity와 높은 발현 유도율, 그리고 tetracycline에 대한 높은 감수성을 가지는 rtTA<sup>2S</sup>-M2 유전자를 사용하였다(Urlinger 등, 2000; Koponen 등, 2003). Vector 내 rtTA<sup>2S</sup>-M2 유전자는 RSV (Rous sarcoma virus) promoter의 3' 위치에 두었으며, TRE 서열의 3' 위치에 hG-CSF 유전자를 위치시킴으로써 hG-CSF

유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 효율적인 유전자 전이 system을 구축하고자 하였다. 본 연구에서 구축한 FIV-Tet system은 일차 배양 세포주에서 WPRE 위치에 따라 다양한 형태의 유전자 발현 조절 양상을 나타내었다. WPRE 서열은 mRNA의 nuclear export를 촉진하고 splicing과 polyadenylation 과정을 강화함으로써 최종적으로 외래 유전자의 발현을 증강시킨다(Minvielle-Sebastia과 Keller, 1999; Zufferey 등, 1999; Loeb 등, 1999). 본 연구에서도 WPRE 서열이 도입된 vector의 경우 외래 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며 WPRE가 외래 유전자의 3'이나 *rtTA2<sup>S</sup>-M2*의 3'에 위치한 경우에서 가장 높은 발현율을 나타내었다. WPRE의 도입에 의한 외래 유전자의 발현 증가율은 표적세포의 종류나 외래 유전자의 발현을 조절하기 위해 사용되는 promoter의 종류에 따라서 다양하게 나타난다고 보고되어 있다(Ramezani 등, 2000; Burn 등, 2003). 그러나 WPRE의 도입 위치나 copy number에는 큰 영향을 받지 않는다고 보고되어 있는데(Hlavaty 등, 2005), 본 연구에서는 WPRE의 도입 위치와 수에 따라서 발현 유도율이 다양하게 나타남으로써 기존의 연구 보고와는 차이가 있었다. 두 세포 모두에서 WPRE가 두 위치에 동시에 도입된 경우에는 한 위치에 도입된 경우에 비해서 발현 유도율이 저조하였는데, 이러한 현상은 *rtTA2<sup>S</sup>-M2*의 과다 발현으로 인한 외래 유전자의 발현 조절이 효율적으로 이루어지지 않은 데서 기인하는 것으로 보인다. 또한, 표적세포의 종류에 따라서 발현율과 유도율이 높은 vector system이 다르게 나타났는데, 이러한 연구 결과는 발현시키고자 하는 유전자와 표적세포의 종류에 따라서 적절한 vector system을 선택해야 함을 의미한다.

## 인용문헌

- Amado RG, Chen IS (1999): Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach? *Science* 285: 674-676.
- Berkowitz R, Ilves H, Lin WY, Eckert K, Coward A, Tamaki S, Veres G, Plavec I (2001): Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol* 75: 3371-3382.
- Bober LA, Grace MJ, Puliese-Sivo C, Rojas-Triana A, Waters T, Sullivan LM, Narula SK (1995): The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function. *Immunopharmacology* 29:111-119.
- Burn S, Faucon-Bigué N, Mallet J (2003): Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implication for gene therapy. *Mol Ther* 7:782-789.
- Curran MA, Ochoa MS, Molano RD, Pileggi A, Invernardi L, Kenyon NS, Nolan GP, Ricordi C, Fenjves ES (2002): Efficient transduction of pancreatic islets by feline immunodeficiency virus vectors. *Transplantation* 74:299-306.
- Emerman M (1996): From curse to cure: HIV for gene therapy? *Nat Biotechnol* 14:943.
- Fabian I, Kletter Y, Bleiberg I, Gadish M, Naparsteck E, Slavin S (1991): Effect of exogenous recombinant human granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on neutrophil function following allogeneic bone marrow transplantation. *Exp Hematol* 19:868-873.
- 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.
- Hlavaty J, Schittmayer M, Stracke A, Jandl G, Knapp E, Felber BK, Salmons B, Günzburg WH, Renner M (2005): Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors. *Virology* 341:1-11.
- Johnston JC, Gasmí M, Lim LE, Elder JH, Yee J-K, Jolly DJ, Campbell KP, Davidson BL, Sauter SL (1999): Minimum requirements for efficient transduction of dividing and nondividing cells by feline immunodeficiency virus vectors. *J Virol* 73:4991-5000.
- Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM (2000): Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1:516-521.
- Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, Bujard H, Ylä-Herttuala S (2003): Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator *rtTA2<sup>S</sup>-M2* shows a tight control of gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther* 10:459-466.
- Lieschke GJ, Burgess AW (1992): Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *N Eng J Med* 327:28-35.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C (T)</sup> Method. *Methods* 25:402-408.
- Loeb JE, Cordier WS, Harris ME, Weitzman MD, Hope TJ (1999): Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 10:2295-2305.
- Loewen N, Bahler C, Teo WL, Whitwam T, Peretz M, Xu R, Fautsch MP, Johnson DH, Poeschla EM (2002): Preservation of aqueous outflow facility after second-generation FIV vector-mediated expression of marker genes in anterior segments of human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3686-3690.
- Minvielle-Sebastia L, Keller W (1999): mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 11:352-357.
- Mitrophanous K, Yoon S, Rohll J, Patil D, Wilkes F,

- Kim V, Kingsman S, Kingsman A, Mazarakis N (1999): Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther* 6: 1808-1818.
19. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1998): Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72:8150-5157.
  20. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1999a): Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11382-11388.
  21. Naldini L, Blomer U, Gsllay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996b): *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
  22. Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ (1998): Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med* 4:354-357.
  23. Price MA, Case SS, Carbonaro DA, Yu XJ, Petersen D, Sabo KM, Curran MA, Engel BC, Margarian H, Abkowitz JL, Nolan GP, Kohn DB, Crooks GM (2002): Expression from second-generation feline immunodeficiency virus vectors is impaired in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 6:645-652.
  24. Ramenzani A, Hawley TS, Hawley RG (2000): Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther* 2:458-467.
  25. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M (1996): Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15266-15271.
  26. Romano G (2005): Current development of lentiviral-mediated Gene Transfer. *Drug News & Perspectives*. 18:128-134.
  27. Saenz DT, Poeschla EM (2004): FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* 6:S95-S104.
  28. Sauter SL, Gasmir M (2001): FIV vector systems. *Somat Cell Mol Genet* 26:99-129.
  29. Song JJ, Lee B, Chang JW, Kim J-H, Kim Kwon Y, Lee H (2003): Optimization of vesicular stomatitis-G pseudotyped feline immunodeficiency virus vector for minimized cytotoxicity with efficient gene transfer. *Virus Res* 93:25-30.
  30. Soriano P, Friedrich G, Lawinger P (1991): Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells. *J Virol* 65:2314-2319.
  31. Stein CS, Davidson BL (2002): Gene transfer to the brain using feline-immunodeficiency virus-based lentivirus vectors. *Methods Enzymol* 346:433-454.
  32. 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.
  33. Wang G, Slepshkin V, Zabner J, Keshavjee S, Johnston JC, Sauter SL, Jolly DJ, Dubensky TW, Davidson BL, McCray PB (1999): Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect. *J Clin Invest* 104:R55-R62.
  34. 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: 2007. 8. 9 / 채택일자: 2007. 9. 7)