

Mouse Embryo에서 In Vivo Gene Silencing을 위한 Clontech Knockout RNAi System

Madis Jakobson¹, Merlin Ploom², Jonna Hakulinen¹, Hannu Sariolal, and Kirsi Sainiol

- 1 Developmental Biology, Institute of Biomedicine, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, P.O. Box 63, FIN-00014 Helsinki, Finland
- 2 Department of Integrative Zoology, Institute of Zoology and Hydrobiology, University of Tartu, 46 Vanemuise St, Tartu 51014, Estonia

Clontech의 Knockout Clone& Confirm PCR Kit와 RNAi-Ready pSIREN-DNR-DsRed-Express Vector는 *in vivo*에서 mouse 유전자인 Pax8의 silence expression에 사용되었다. siRNA는 임신한 mouse의 꼬리 정맥에 15~20 ug의 vector DNA를 주입하는 방법으로 도입하였다. 가장 중요한 것은 embryo에서 short hairpin RNA(shRNA)를 암호화하는 plasmid를 주입하여 RNA interference를 유도시키고, 그 결과 target mRNA인 Pax8의 발현을 특이적으로 knockdown 시키는 것이다.

Mouse 배아 줄기세포에서 homologous recombination을 통한 유전자 targeting은 *in vivo*에서 포유동물의 유전자 기능을 알 수 있는 방법으로 주목받고 있다.

비록 도입된 target 유전자는 활성억제가 일어나야 한다고 할지라도, target 유전자가 도입되어 있는 mouse의 발생과정은 어렵고, 문제점도 많은 과정이며, 특히 초기 배발생 단계에서 가장 중요하다. RNA interference(RNAi) 기술은 많은 개체에서 유전자 기능을 알기 위한 loss-of-function법으로 빠르게 공급되어 왔다. RNAi는 유전자 발현의 서열 특이적인 posttranscriptional inhibition과 관련하여 강력하게 나타난 생물학적인 전략이다. 이것은 small interfering RNA(siRNA)를 통해 전달되며, 특이한 mRNA의 분해를 유도한다. 그러나 포유동물 시스템에서 siRNA의 적용은 siRNA가 불안정하기 때문에 엄격하게 저해되고, modify 하지 않은 siRNA 분자는 *in vivo* 세포로 이동이 어렵다. 그래서 RNAi 기술로 *in vivo*에서 gene silencing을 유도하는 것은 어려운 일이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 shRNA 분자를 발현시키는 RNA polymerase III(RNAPol III) promoter를 사용한 plasmid-based 시스템이 siRNA를 안정하게 제작하기 위하여 만들어져 왔다. 본 고에서는 정맥주사로 plasmid-encoded shRNA를 mouse 배아로 도입하고, *in vivo* RNAi와 유전자 기능을 빠르고 편리하게 알아보기 위하여 Clontech Knockout RNAi Systems 제품을 이용하였으며, 더불어 이 제품의 장점과 유용성도 증명하였다.

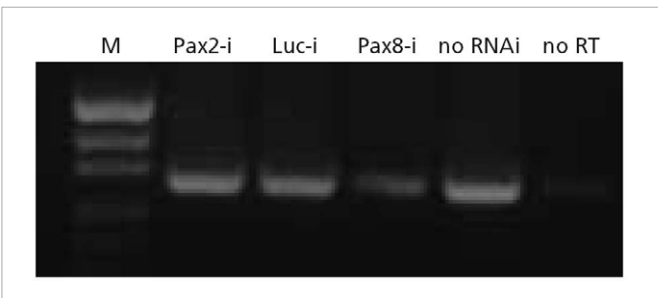


그림 1 HeLa cell에서 double-transfection한 Pax8의 발현(RT-PCR) Mouse Pax8 mRNA의 발현을 억제하기 위한 Pax8-RNAi는 HeLa cell과 함께 Pax8-pSIREN-DNR-DsRed-Express(Pax8-RNAi)와 pcDNA3-Pax8 발현 벡터를 cotransfection한 후 증명하였다. 2일 후, 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR 하였다. RT-PCR 결과, Pax8은 약 80%의 발현량(lane 4)이 knockdown 됨을 보여주었다. 반면에 control로 Pax2-RNAi(lane 2) 또는 Luciferase-RNAi(lane 3)를 transfection한 것은 Pax8 RNA와 단백질이 높은 발현양상을 보였다.

*in vivo*에서 전사인자 Pax8의 발현의 silencing

Silence를 선택한 증거로서 임신 중기에 mouse 배아의 전사 인자인 Pax8 발현과의 관련성을 볼 수 있다.

Pax8은 배설기관과 갑상선 발달을 포함해 여러 가지의 조직에서 발현된다. Pax8은 갑상선의 여포성 세포의 형성에 필수적이며, family 구성인, Pax2와 함께 상호의존적으로 신장 발달을 조절한다.

shRNA oligonucleotide의 디자인과 검증

이미 보고된 참고문헌^{2,3}과 Clontech knockout clone and confirm PCR kit과 knockout RNAi system의 매뉴얼을 참고하여 shRNA를 암호화 하는 oligonucleotide를 디자인하고 선택한다.

Mouse의 Pax8 mRNA와 단백질의 발현을 억제하는 Pax8-RNAi clones은 Pax8-pSIREN-DNR-DsRed-Express(Pax8-RNAi)와 pcDNA3-Pax8 발현 벡터의 cotransfection에 의해 첫번째로 검증되었다. 2일 후, 세포에서 RNA와 단백질을 추출하여 RT-PCR과 immunoblotting을 하였다. RT-PCR 분석으로 약 80% 정도 Pax8 mRNA 발현이 knockdown 된 것을 확인할 수 있었다. 또한, Pax8-shRNA-발현 세포에서 관찰된 Pax8의 단백질 발현은 Luciferase-RNAi plasmid DNA(그림 1)로 transfection한 control과 비교한 결과 발현량이 적었다.

In vivo에서 Pax8 유전자 발현의 knockdown

가장 효과적으로 mRNA 발현을 억제하는 것으로서 mouse Pax8 mRNA의 5' region을 target으로 한 clone이 선별되었다. *in vivo*에서 RNA interference를 확인하기 위해, Ringer buffer 200 ul에 녹인 Pax8-RNAi이나 control Luciferase-RNAi plasmid DNA를 임신한 mouse(7 d.p.c)의 꼬리 정맥에 주입하였다.

3일 후(10 d.p.c), 배아를 모아 plasmid delivery(delivery 효율)를 형광현미경으로 확인하였다. 배아는 DsRed 형광의 강도에 따라 분류한 후 고정화시켰다(그림 2).

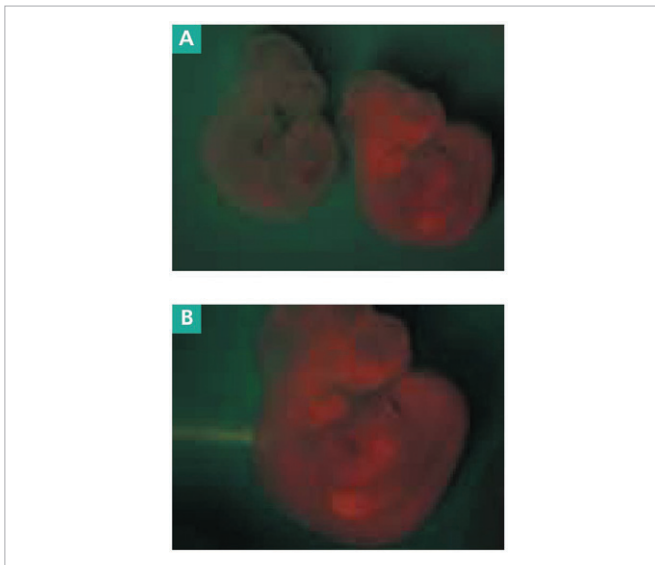


그림 2. *in vivo*에서 Pax8 유전자 발현의 knockdown

*in vivo*에서 Pax8 유전자 발현의 knockdown을 확인하기 위해, Ringer buffer 200 ul에 20 ug의 Pax8-RNAi와 control Luciferase-RNAi plasmid DNA를 임신한 mouse(7 d.p.c)의 꼬리 정맥에 주입했다. 3일후, mouse(10 d.p.c)의 배아를 모으고 형광현미경으로 plasmid delivery 효율을 측정하였다. 배아는 DsRed 형광 강도에 따라 분류한 후 고정화시켰다. Panel A, pSIREN-DNR-DsRed Express vector가 주입된 mouse의 2개의 배아에서 발현량이 차이가 있음을 보여준다. Panel B, 오른쪽의 배아로 더 높은 배율이다.

Pax8 mRNA 발현이 shRNA가 도입된 배아에서 영향을 받는지 확인하기 위하여, 전체 mount mRNA를 이용하여 *in situ* hybridization을 하였다. Luciferase-shRNA 처리한 control 배아는 mid-hindbrain isthmus organizer, embryonic kidney, 그리고 ventral spinal cord에서 Pax8이 고발현되었고, Pax8 mRNA는 Pax8-RNAi가 도입된 배아에서는 거의 관찰할 수 없었다. 이 결과들은 DsRed signal 강도와 Pax8-RNAi로 처리한 배아에서의 Pax8 mRNA knockdown의 정도와 매우 밀접하게 연관성이 있음을 강력하게 시사한다.

mRNA knockdown은 여러가지 배아조직과 기관에서 다양하게 나타난다. 적어도 knockdown은 배아의 branchial arch 영역에서 관찰되었다. 이런 현상의 원인은 알려져 있지 않지만 단백질에 결합하는 조직 특이적인 mRNA와 밀접하게 관련되어 있을 것이라고 추정하고 있다. 다른 한편으로, 전사 기작의 특이적 조절은 RNAi knockdown 과정에 영향을 줄 수도 있다고 생각하고 있다.

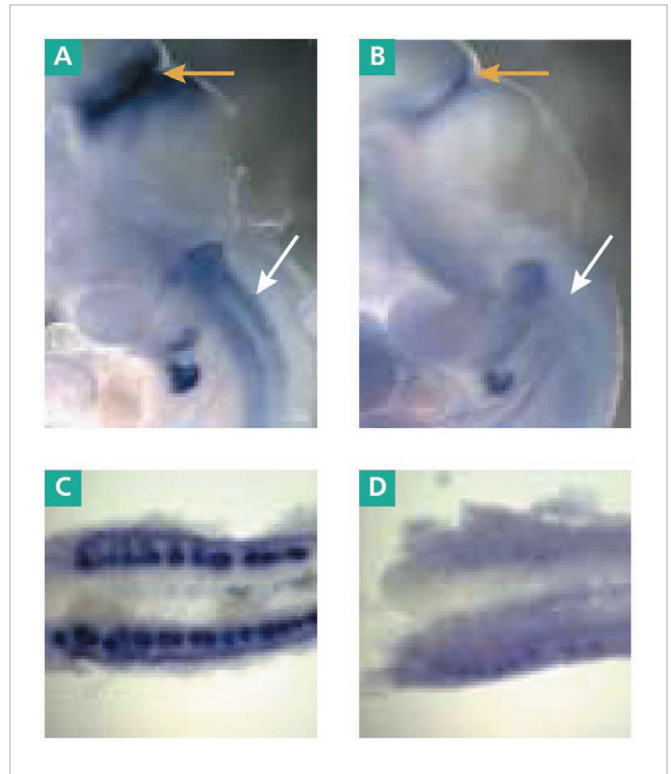


그림 3. Pax8 mRNA 발현의 knockdown

shRNA에 의한 배아의 Pax8 mRNA 발현량을 확인하기 위해 전체 mount mRNA(전체 mount ISH)를 이용하여 *in situ* hybridization을 하였다. Panel A와 B에서는 머리 영역에서 Pax8 mRNA 발현이 knockdown 된 것을 볼 수 있었다. 노란색 화살표는 중간-후 뇌 협부의 형성체를, 하얀색 화살표는 복부의 척추 인대를 가리킨다. Panel C와 D는 mesonephros 단계에서 배아 신장의 Pax8 mRNA 발현이 knockdown 된 것을 보여 준다.

shRNA의 정맥 주입의 장점

꼬리 정맥 주입의 가장 큰 장점 중 하나는 정밀함과 타이밍이다. shRNA plasmid를 관심있는 특정 위치에 주입할 수 있다. 초기 배아에 치명적일 수 있는 유전자의 기능 상실을 연구할 수 있는 강력한 방법이다. 더욱이, 여러가지 전사 영역을 구성하는 shRNA를 동시 주입함으로써 다양한 발현이 나타나는 RNA silencing을 만들 수 있다. Heterozygous animals의 splice된 exons이나 또는 wild-type alleles 중에 선택적으로 targeting 한다면 더 효과적으로 hypomorphic alleles를 생산할 수 있고 유전자 구조와 기능을 더 쉽게 이해할 수 있을 것이다.

Clontech의 pSIREN-DNR-DsRed-Express vector는 CMV enhancer element와 human U6 promoter가 있기 때문에 또 하나의 장점을 제공한다. CMV enhancer는 U6 promoter의 활성을 증진시키고 그것으로 RNA interference의 효과와 shRNA의 생산을 증가시킨다.

결론

shRNA를 암호화하는 plasmid를 꼬리 정맥에 주입하여 RNAi를 *in vivo*로 적용하는 빠르고 간편한 시스템을 사용한다. 이 방법은 mouse의 배아를 통해 *in vivo*에서 유전자 기능을 신속하게 평가할 수 있는 강력한 수단이다. 이 결과는 Clontech의 Knockout Clone and Confirm RNAi System과 pSIREN-DNR-DsRed-Express Vector로 만든 mouse 배아를 이용하여 *in vivo* endogenous genes의 발현을 효과적으로 저해하는데 이용할 수 있다. 더욱이, DsRed-Express 형광 마커를 이용하면 원하는 mRNA

Technical1

다카라제품 130% 활용법

knockdown의 수준과 상관성을 이용하여 배아로의 plasmid delivery를 빠르고 편리하게 평가할 수 있다.

제품명	Size	Cat. No.
Knockout Clone & Confirm Retro Core RNAi System	20 회	632476
Knockout Clone & Confirm Adeno Core RNAi System 2	20 회	632477
Knockout Clone & Confirm Adeno Core RNAi System 1	20 회	631536
Knockout Clone & Confirm Adeno RNAi System 2	20 회	632458
Knockout Clone & Confirm Retro Q RNAi System	20 회	632456
RNAi-Ready pSIREN-DNR-DsRed-Express Vector	20 ug	632457
RNAi-Ready pSIREN-RetroQ-ZsGreen Vector	20 ug	632455

【참고문헌】

- 1) Gratsch, T. E., *et al.* (2003) *Genesis* **37**(1):12-17.
- 2) Chalk, A. M., *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**:319(1):264-74.
- 3) Miyagishi M., *et al.* (2004) *J. Gene Med.* **6**(7):715-23.
- 4) Xia, X. G., *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**(17):e100.

관련제품

제품명	Size	Cat. No.
Knockout Tet RNAi System H	each	630925
Knockout Tet RNAi System P	each	630926
pSIREN Control Vector Set	6× 20 ug	631627
Adeno-X [®] Virus Purification Kits		
Adeno-X [®] Rapid Titer Kit	1 set	631028
Retro-X [®] Universal Packaging System	8 회	631530