

RNAi 유도발현을 위한

# Knockout™ Single Vector System

## Single vector를 이용한 안정적인 유전자 유도 억제 시스템

- Strong and tightly regulated suppression of any target gene
- Save weeks of time by creating a stable, inducible cell line in only one step
- Ideal for cases where gene suppression may be lethal

### ■ 강력한 유전자 억제

Clontech의 Knockout Single Vector Inducible RNAi System은 mammalian cells에서 기능성 shRNA(short hairpin RNAs)의 발현을 완벽하게 조절하고, RNAi(RNA interference)를 통해 목적유전자의 유도발현을 억제할 수 있다. 종래에는 RNAi 유도발현을 위해 2가지의 vectors가 필요했으나, Clontech에서는 tetracycline-controlled regulatory protein(tTS) 및 tetracycline-inducible shRNA expression cassette가 하나의 vector에 결합되어 발현되는 새로운 시스템을 개발하였다.

shRNA 서열을 expression cassette에 cloning하여 한번의 transfection 만으로 inducible RNAi system이 완성되어, 기존처럼 예비 tTS-expression stable host cell line을 제작하는 단계가 필요하지 않기 때문에 몇 주의 시간을 절약할 수 있는 장점이 있다.

Clontech의 Knockout Single Vector Inducible RNAi System은 목적유전자의 구조적 발현시에 치사상태가 되어 그 유전자의 기능분석이 어려울 경우에 적합한 시스템이다(1). 또한 유도가 없는 상태에서 shRNA의 background 발현이 매우 낮아, 목적유전자 이외의 발현 억제를 방지한다. 그러나, 본 시스템이 유도되면, shRNA는 즉시 강력한 단백질 knockdown을 수행할 수 있다.

### ■ Inducible RNAi Mechanism

Knockout Inducible RNAi System은 기존의 Gossen & Bujard (2) 및 Freundlieb, et al (3)에 기재된 tetracycline-controlled gene expression system을 변형하여 최근 개발한 것으로, 완전하게 발현을 조절할 수 있는 시스템이다. 본 시스템을 갖는 stable cell line은 배양 배지에 doxycycline (Dox; a tetracycline derivative)을 첨가했을 때에만 shRNA를 발현한다(그림 1). shRNA의 유도는 세포내 RNAi pathways를 활성화하여 목적유전자의 발현이 억제된다. 따라서 본 시스템은 Dox inducer의 농도에 비례하여 정확하게 목적유전자의 발현을 억제한다. 이러한 이유로 Knockout Inducible RNAi System은 세포 생존에 필요한 유전자의 기능연구에 최적화된 시스템이라 할 수 있다.

본 시스템의 inducibility는 다음 2가지 구성요소에 의해 결정된다. pSingle-tTS-shRNA vector(tTS regulatory protein의 P<sub>CMV</sub>-driven expression) 및 Tet-responsive promoter cassette (3). 강력한 전사억제제로 작용하는 tTS 단백질은 Tet repressor protein(TetR)과 KRAB silencing domain이 융합된 것이다(3-5).

Gene-specific shRNA의 발현을 작동시키는 TRE/U6(Tet-responsive cassette)는 Tet response element(P<sub>TREmod</sub>)를 대체하여 제작한 hybrid Pol III promoter이다. 이 promoter는 tetO 19-mer의 7개 반복서열과 minimal U6 promoter로 구성되어 있다. 여기에 사용된 TRE의 특징은 pTRE-Tight (hybrid Pol II promoter)에서 발견된 (P<sub>tight</sub>) response element와 유사하다(6).

Dox가 없을 때, tTS는 TRE에 있는 tetO 서열에 결합하여 minimal U6 promoter downstream의 shRNA 전사를 억제한다(그림 1). 하지만, Dox를 배양배지에 첨가할 때에는, tTS는 TRE와 분리되어 전사 억제가 해제되고, TRE/U6 promoter로부터 shRNA가 전사된다.

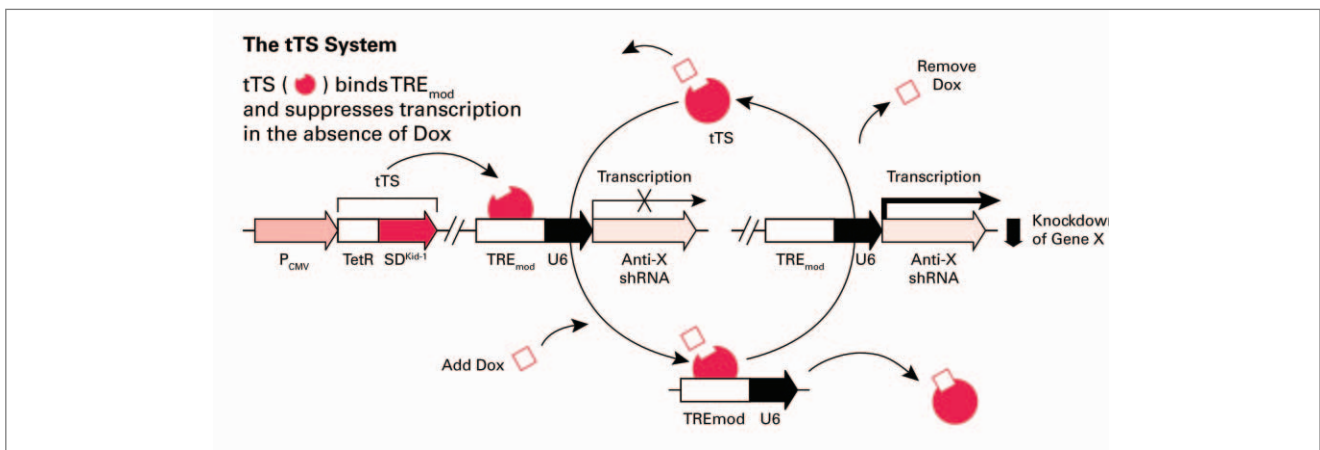


그림 1. The Knockout Single Vector Inducible RNAi System uses a modified form of the tightly regulated, tetracycline-controlled gene expression system. In the absence of Dox, tTS binds the tetO sequences within the TRE/U6 promoter and actively silences transcription of the shRNA. When Dox is added to the culture medium, tTS dissociates from the TRE, relieving transcriptional suppression and allowing high level transcription of the shRNA from the hybrid TRE/U6 promoter.

■ 단일 transfection에 의한 inducible RNAi cell line 제작

Tet inducible RNAi 시스템의 최종목표는 tTS regulatory protein을 발현하고 shRNA 발현을 위한 TRE/U6 response cassette를 포함하는 안정적인 cell line을 제작하는 것이다. 주요한 구성요소가 neomycin 선택 마커가 있는 하나의 vector에 모두 있기 때문에, 시간과 노력을 상당히 줄일 수 있다. 본 시스템을 준비하기 위해서는 연구자가 선택한 목적유전자에의 shRNA 서열을 포함하는 dsDNA oligonucleotide를 pSingle-tTS-shRNS vector에 cloning하고, 이를 원하는 cell line에 transfection한다. 항생제를 이용한 선별 및 안정적인 clones을 스크리닝한 후에 원하는 연구에 사용하면 된다.

■ 빠른 반응시간 및 높은 induction level

Clontech의 Knockout Inducible RNAi System에서 Tet/U6 promoter의 억제제는 전사 시작을 단순하게 억제(steric hindrance) 하기 보다는 tTS 단백질질을 이용하여 강하게 조절한다. 그렇기 때문에 shRNA의 background 전사를 낮추기 위한 tTS suppressor 단백질질의 높은 발현은 필요하지 않다. Background를 낮추었기 때문에 본 시스템의 장점은 입체적 억제(steric hindrance)에만 의존하는 다른 inducible RNAi 시스템에 비하여 확실하게 조절 가능한 높은 반응성을 갖고 있다는 것이다(7).

■ Effective & Sensitive Gene Suppression

목적유전자의 유의성 있는 knockdown은 Dox를 처리하여 shRNA를 유도한지 24시간 후에 나타나며 (data not shown), 최대 knockdown은 72시간 후에 나타날 수도 있다. Single Vector 시스템에서 anti-lamin A/C shRNA를 사용하였을 때, HeLa cell line에서 Dox 처리 6시간 만에 endogenous lamin 발현이 감소되고, 72시간 후에는 대부분 없어졌다 (그림 2).

Knockdown의 정도는 목적유전자 또는 사용한 shRNA에 따라 달라질 수 있으나, 본 시스템은 Dox에 매우 반응성이 높다. HEK 293 cells에 일시적 (transient) co-transfection하였을 때, 1 ng/ml Dox를 사용하여 유도한 anti-luciferase shRNA는 luciferase 활성을 70% 정도 억제하였다 (그림 3).

RNAi는 유전자 기능연구에 강력한 방법 중의 하나이다. Clontech의 Knockout Inducible RNAi System은 RNAi set-up을 보다 효율적으로 가능하도록 만들었을 뿐만 아니라 목적유전자의 발현 억제를 통해 유전자의 실질적인 기능을 연구하기 위한 확실한 발현 조절과 다양한 기능을 갖고 있다.

Transfection이 어려운 세포의 경우, retrovirus를 기본으로 한 Knockout Tet RNAi Systems (H or P)을 사용할 것을 권장한다.

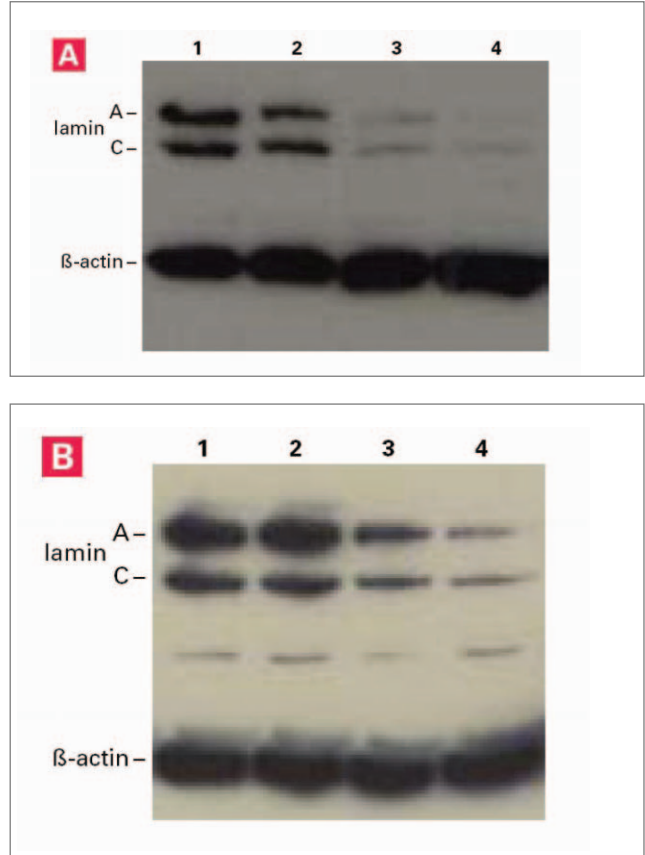


그림 2. Doxycycline-induced knockdown of lamin A/C in HeLa cells. Panel A, A stable HeLa cell line that expresses an anti-lamin A/C shRNA was produced using the Knockout Single Vector System. Cells were grown in the absence or presence of Dox (1 µg/ml) for the times indicated. They were then harvested and analyzed by Western blot using β-actin expression as a control. Suppression of lamin A/C expression is evident after 6 hr of treatment, and is virtually abolished after 72 hr. Lane 1: control, Lanes 2-4: 6 hr, 48 hr, and 72 hr, respectively. Panel B, The anti-lamin A/C HeLa cell line was grown in the absence or presence of increasing concentrations of Dox for 72 hr, then harvested and analyzed by Western blot. Lane 1: parental cells. Lane 2-4: 0, 0.1, and 1 µg/ml Dox, respectively.

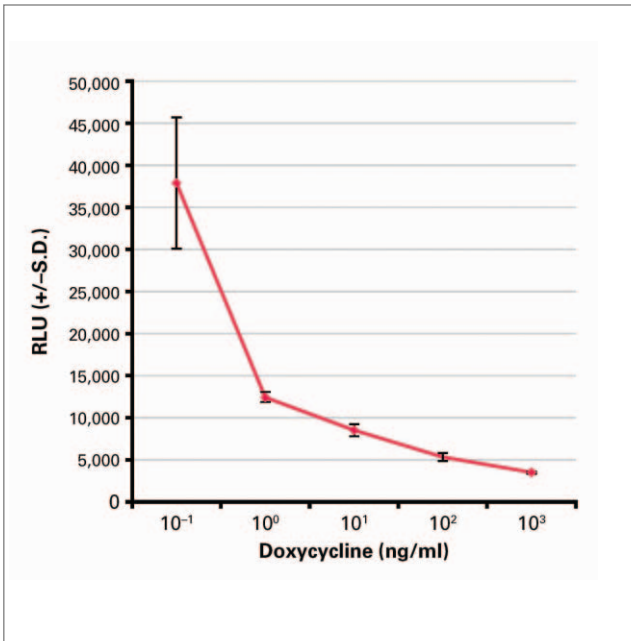


그림 3. Sensitive doxycycline-induced knockdown of luciferase activity.  
HEK 293 cells were transiently co-transfected with the pSingle-tTS-shRNA vector expressing an anti-luciferase shRNA and a pCMV-luciferase expression vector at a ratio of 1:1. Cells were grown in the absence or presence of 0–1 ug/ml Dox for 72 hr, then harvested and lysed to measure luciferase activity. Luciferase activity was reduced by 67% at 1 ng/ml Dox and by 88% at 1 ug/ml.

#### Reference

1. Liu, C.Y., et al. (1996) *Genes Devel.* 10(14):1835–1843.
2. Gossen, M., & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(12):5547–5551.
3. Freundlieb, S., et al. (1999) *J. Gene Med.* 1(1):4–12.
4. Witzgall, R., et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(10):4514–4518.
5. Wiznerowicz, M., & Trono, D. (1999) *J. Virol.* 77(16):8957–8961.
6. pTRE-Tight Vectors (April 2003) *Clontechiques XVIII*(3):13–14.
7. Yao, F., et al. (1998) *Hum. Gene Ther.* 9(13):1939–1950.

**Tet-On® & Tet-Off®  
Advanced**

- ▶ Inducible RNAi and cDNA expression
- ▶ Up to 10,000-fold inducibility
- ▶ Highly sensitive and controllable