

# “Advanced” 타입으로 upgrade된 Tetracycline에 의한 유도발현 system Tet-On<sup>®</sup> Advanced / Tet-Off<sup>®</sup> Advanced Inducible Gene Expression System



Clontech의 Tet-On<sup>®</sup> /Tet-Off<sup>®</sup> system은 포유류 세포에서 목적유전자의 발현을 정확하고 정량적으로 조절 가능한 유도발현 system이다. 기존의 tetracycline 유도발현 system을 보다 upgrade한 Tet-On<sup>®</sup> Advanced /Tet-Off<sup>®</sup> Advanced Inducible Gene Expression System은 아래와 같은 장점을 갖고 있다.

- 발현이 유도되지 않았을 경우 background를 한층 더 감소
- Doxycycline에 의한 고감도의 유도발현 가능
- 보다 효율적으로 stable cell line 구축 가능

따라서, 기존의 system에서는 발현 조절이 어려웠던 목적 유전자나 포유류 host cell을 이용한 유전자 발현 해석도 “Advanced” System에서는 가능하다.

본 내용에서는 Tet system의 기본 원리와 신제품인 “Advanced” system의 장점 및 관련 제품에 대해 소개하고자 한다.

### ■ Tet system의 기본 원리

Tet system은 대장균의 tetracycline-resistance operon에서 유래한 2종류의 조절 인자인 Tet repressor protein (TetR)과 Tet operator DNA sequence (tetO)를 기본으로 한 system이다. Regulatory plasmid 와 response plasmid 는 이 인자들을 목적세포에 전달하고, host genome에 이 인자들이 integration된 double-stable cell line을 구축한다. Stable cell line은 tetracycline 또는 doxycycline의 용량에 따라 반응하므로 목적 유전자의 발현을 정확하게 조절할 수 있다.

### (1) Tet-Off<sup>®</sup> system

Tet-Off<sup>®</sup> system은 doxycycline (Dox)이 없을 때 목적 유전자를 유도 발현하는 system이다. 이 system에서는 tetracycline-controlled transactivator (tTA)를 발현하는 Tet-Off<sup>®</sup> regulator plasmid와 tetO 반복 서열을 가지는 tetracycline response element (TRE)를 코딩하는 response plasmid를 사용한다. tTA는 Tet repressor protein (TetR)과 VP16 activation domain (AD)으로 구성된 융합 단백질이다. tTA는 Dox가 없을 경우 tetracycline response element (TRE)와 결합하여 downstream의 유전자 발현을 유도한다.

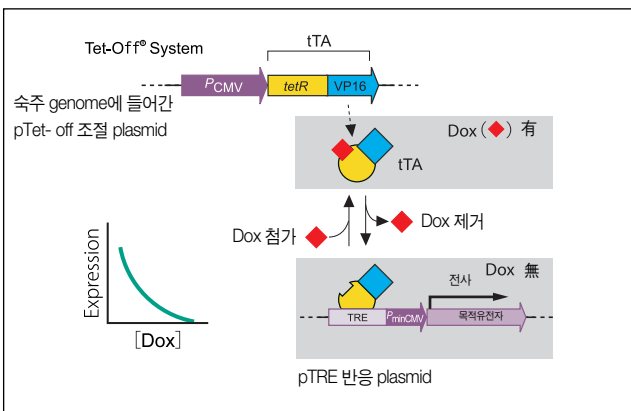


그림 1A, Tet-Off<sup>®</sup> system의 원리

### (2) Tet-On<sup>®</sup> system

Tet-On<sup>®</sup> system은 doxycycline (Dox)이 존재할 때 목적 유전자가 유도 발현되는 system이다. 이 system에서는 reverse tet controlled transactivator (rtTA)를 발현하는 pTet-On regulator plasmid와 tetO 반복 서열을 가지는 tetracycline response element (TRE)를 코딩하는 response plasmid를 사용한다. Response plasmid는 Tet-Off system과 공통으로 사용할 수 있다. rtTA는 변이형 Tet repressor protein (rtTetR)과 VP16 activation domain (AD)으로 구성되는 융합 단백질이다. rtTA는 Dox 존재하에서 tetracycline response element (TRE)와 결합해 downstream의 유전자 발현을 유도하는 기능이 있다.

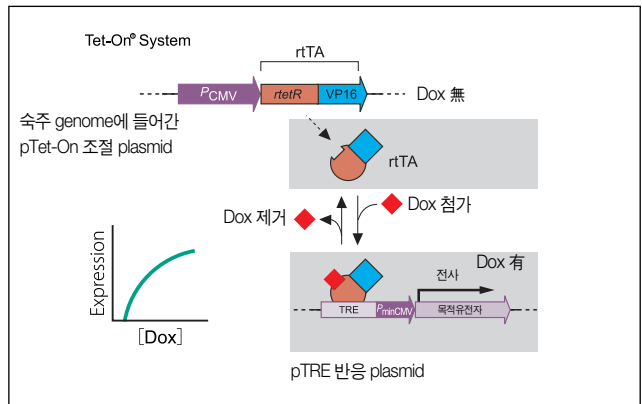


그림 1B, Tet-On<sup>®</sup> system의 원리

### ■ Tet system계 구축 방법

우선 Tet-Off<sup>®</sup> 또는 Tet-On<sup>®</sup> regulator plasmid를 대상으로 하는 세포주에 transfection하여 transactivator element (tTA or rtTA)를 발현하는 stable cell line (Tet-Off<sup>®</sup> 또는 Tet-On<sup>®</sup> 세포주)을 구축한다. 다음에 목적 유전자를 도입한 pTRE-Tight 등의 response plasmid와 selection marker를 먼저 구축한 stable cell line (Tet-Off<sup>®</sup> 또는 Tet-On<sup>®</sup> 세포주)에 co-transfection한다. Transactivator element와 목적 유전자를 발현하는 response plasmid, 두 인자를 갖는 double-stable cell line을 제작하면 Tet inducible gene expression system계의 구축이 완료된다.

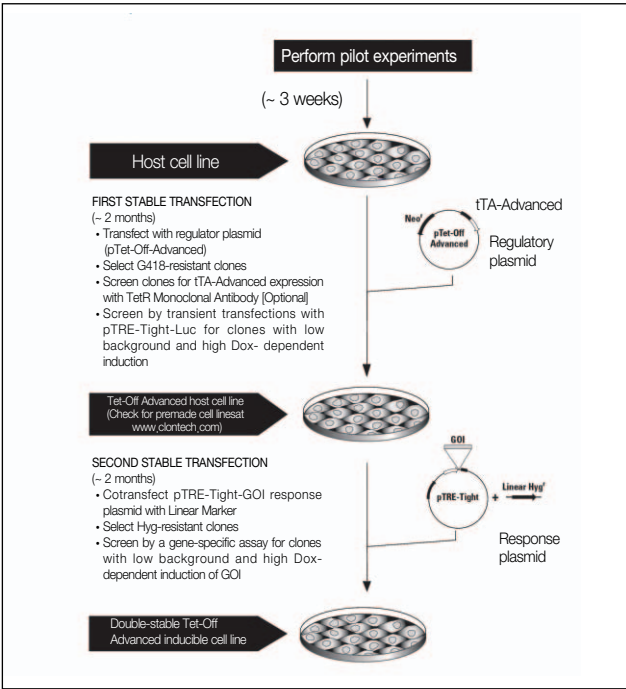


그림 2. Overview of developing the stable cell lines of the Tet-Off Advanced System.

**Tet Advanced Inducible Gene Expression System의 장점**

Tet-Off® Advanced 또는 Tet-On® Advanced system (그림 3)을 이용한 advanced transactivator element (tTA-Advanced/rtTA-Advanced)의 서열은 codon을 포유류 세포 발현에 최적화한 것으로 잠재적인 splicing site를 제거하였다. 또한, HSV VP16 transcription activation domain을 최소 영역(min VP16)을 3회 반복한 서열로 대체하였다. 발현이 유도되지 않을 경우, 이 요소들에 의해 잔존하는 TRE 서열에 결합 활성이 억제되어 host cell에의 독성이 감소되는 결과를 얻었다. 또한 발현 조절 promoter에는 transactivator element와 결합 친화성과 특이성이 강화된 advanced TRE 서열(TREmod)을 가지는 TRE-Tight promoter를 사용하고 있다. 이와 같은 upgrade에 의해, 종래의 Tet system과 비교해 효율적으로 transactivator element 발현 세포주의 구축이 가능하게 되어(실험예 1), 보다 폭넓은 host cell 이용이 가능하고, background가 매우 감소된 정확한 유전자 발현 유도가 가능해졌다(실험예 2).

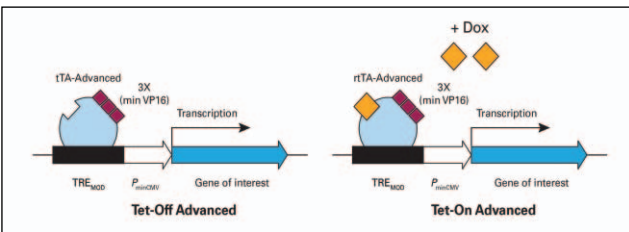


그림 3. Gene induction in the Tet-Off Advanced and Tet-On Advanced Systems. The Tet-controlled transactivators for these systems (tTA-Advanced and rTA-Advanced) are fusion proteins derived from a wild-type or mutant Tet repressor (TetR), respectively. Each DNA-binding TetR domain is joined to three minimal transcription activation domains of the herpes simplex virus VP16 protein, and each has been optimized for expression in mammalian cells. For Tet-Off Advanced, the uninduced basal state is maintained in the presence of doxycycline, which prevents the tTA-Advanced protein from binding to TREmod sequences in pTRE-Tight. Removal of doxycycline permits tight binding and induces high-level transcription. In exact contrast, the Tet-On Advanced System is activated by doxycycline.

**■ 실험예 1 :**

Tet-On® Advanced system을 이용한 transactivator element 발현 stable cell line 구축

**【방법】**

HEK293 세포에 pTet-On regulatory plasmid 또는 pTet-On Advanced regulatory plasmid를 도입한 후, G418에 의해 각 36개의 클론을 선별하였다. 선별된 각 클론에 목적 유전자로 luciferase를 도입한 response element plasmid를 transient하게 도입해 Dox 첨가에 의한 luciferase 유전자의 발현 유도를 평가하였다.

**【결과】**

Advanced transactivator element (rtTA-Advanced)를 coding하는 pTet-On Advanced regulatory plasmid를 도입한 경우에, 보다 효과적으로 높은 유도능을 가지는 안정 세포주를 얻을 수 있었다(그림 4).

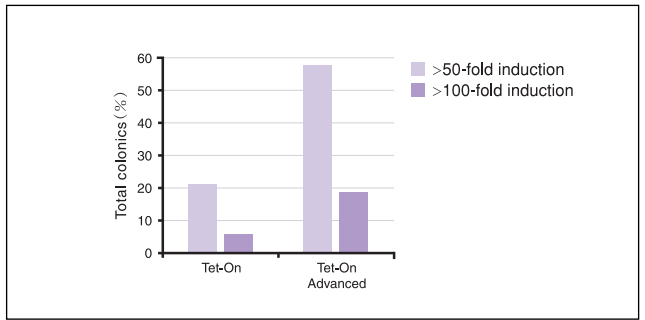


그림 4. Tet-On® 또는 Tet-On® Advanced를 도입해 구축한 stable cell line의 발현 유도능

**■ 실험예 2 :**

Tet-On® Advanced/Tet - Off® Advanced system에 의한 유전자 발현 조절능의 검증

**【방법】**

Tet-On® Advanced 또는 Tet-Off® Advanced transactivator element를 안정하게 발현하는 HEK293 세포에 목적 유전자로 luciferase를 삽입한 pTRE-Tight response plasmid를 도입했다. 48시간 후, β-actin의 발현정도를 internal control로 Western blot하여 Dox 유무에 따른 luciferase 발현 레벨을 확인했다.

**【결과】**

발현 유도 조건하에서는 luciferase 단백질이 대량으로 발현한 것에 비해, 비유도 조건하에서는 발현이 관찰되지 않고 정확하게 조절되는 것을 알 수 있었다.

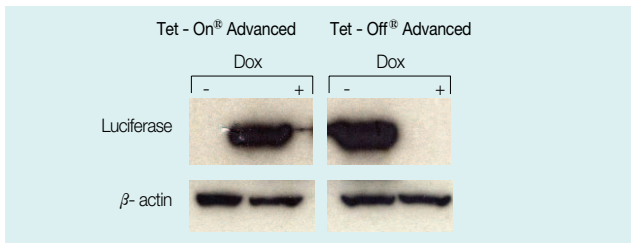


그림 5. Tet-On® Advanced 또는 Tet-Off® Advanced system의 발현 조절 검증

### ■ 관련 제품 소개

#### • Tet-On® Advanced Cell Lines

Transactivator element인 rTA-Advanced 발현하는 stable cell line. 현재 HEK293, HepG2, MCF7 및 HeLa에 유래하는 4종류의 세포주를 판매하고 있다. 본 제품을 이용하면, 안정적인 세포주를 수립하는 시간을 약 2개월 가량 단축할 수 있다.

#### • Tet System Approved Fetal Bovine Serum

Tet 세포주를 이용한 고감도의 기능 시험에 의해 Tet system의 유전자 발현 조절 기능을 100% 발휘할 수 있는 것을 확인한 FBS이므로, 일반적으로 사용하는 antibiotic-free FBS를 사용했을 경우에 발생할 수 있는 background 없이 정확한 실험이 가능하다.

#### • TetR Monoclonal Antibody

Tet System으로 사용되는 transactivator element를 검출하는 monoclonal antibody이다.

### ■ 관련제품

#### 【Tet Advanced start-up system】

- Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System 1 Kit 630934
- Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System 1 Kit 630930

#### 【premade Tet-On® Advanced cell line】

- HEK293 Tet-On® Advanced Cell Line 1 ml 630931
- HepG2 Tet-On® Advanced Cell Line 1 ml 630932
- MCF7 Tet-On® Advanced Cell Line 1 ml 632108
- HeLa Tet-On® Advanced Cell Line 1 ml 632110
- HeLa Tet-Off® Advanced Cell Line 1 ml 632111
- MCF7 Tet-Off® Advanced Cell Line 1 ml 632109
- HEK293 Tet-Off® Advanced Cell Line 1 ml 632107
- Hep G2 Tet-Off® Advanced Cell Line 1 ml 632106

#### 【Tet System Approved Fetal Bovine Serum】

- Tet System Approved FBS, USDA-Approved 50 ml 631107
- Tet System Approved FBS, US-Sourced 50 ml 631105

#### 【TetR 검출용 monoclonal antibody】

- TetR Monoclonal Antibody 40 µg 631108

## Inducible MicroRNA and Living Colors® Fluorescent Protein Reporters Using the Tet-On® Advanced System

RNA interference (RNAi)는 새로 발견된 포유류 유전자의 역할과 기능을 규명하는데 사용할 수 있는 매우 유용한 방법이다. Micro RNAs (miRNA)를 사용한 RNAi 실험시 miRNA와 reporter 유전자를 연결하여 실험하면, miRNAs 발현을 추적할 수 있는 장점이 생긴다. Clontech miRNA-Living Colors® Fluorescent Protein expression constructs를 Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System에 삽입하여 살아있는 세포에서 miRNA의 발현 조절을 모니터링하면서 목적 유전자의 발현 억제를 관찰할 수 있다. 다양한 용도로 사용될 수 있는 본 시스템은 최적의 miRNA 발현을 관찰할 수 있고, 목적 유전자의 발현을 정확하게 조절할 수 있는 stable cell line을 찾기 쉽도록 하였다. Tet-On Advanced System은 Pol II-based miRNA 전사 활성을 사용하기 때문에 transgenic animal에서 조직 특이적인 유전자 발현 억제에 이용할 수 있다.

### 서론

최근 RNAi 기술의 발전에 따라 'loss-of-function method'가 개발됨에 따라 보다 빨리 유전자의 기능을 규명할 수 있게 되었다. RNAi는 서열 특이적이고 효과적인 세포내의 유전자 발현 억제 기작이며, 이는 수많은 Small noncoding RNA들에 의해 수행된다.

Short hairpin RNAs (shRNA)는 target mRNA를 서열 특이적으로 분해하는 작은 Pol III 전사물이다<sup>1-2</sup>. miRNA 또한 작은 hairpin 형태의 RNA로 mRNA를 분해할 수도 있지만, translation 과정을 저해할 수도 있다<sup>3</sup>. miRNA 전구체는 다양한 Pol II 전사물들과 함께 존재하며, 인간, 동물, 그리고 바이러스에 이르기까지 두루 존재한다. 이러한 모든 inhibitory RNA들은 siRNA duplex를 만들어내는 과정을 거치고, 여기서 생산된 siRNA는 target 단백질과 결합하여 RNAi 경로를 따라 그 효과를 발휘하게 된다.

Pol III shRNA expression constructs를 target 세포로 삽입하면 RNAi 현상이 효과적으로 시작될 수 있다. 그러나, Pol III transcripts는 단백질로 쉽게 번역되지 않기 때문에 함께 발현시킨 reporter 단백질을 이용하여 shRNA 발현을 독립적으로 추적하기는 불가능하다. 따라서 shRNA에 의한 유전자 억제가 실패하고 reporter 단백질이 발현되지 않았을 경우 shRNA가 기능을 못해서인지 아니면 단백질 발현 정도가 낮아서인지 결정하기가 어렵다.

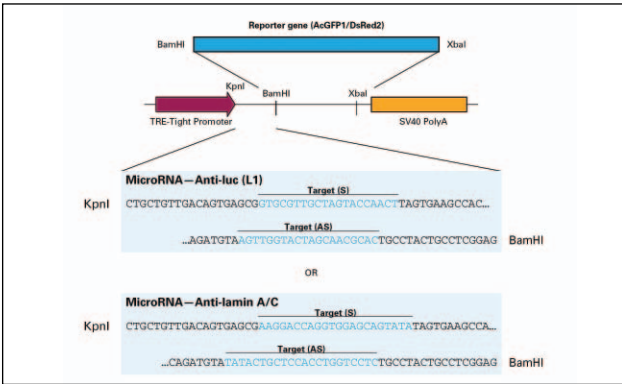


그림 6. Organization of the anti-lamin A/C and anti-Luc (L1) miRNA expression cassettes. Anti-luciferase and anti-lamin A/C miRNA-like sequences, based on the miR-30 miRNA<sup>®</sup>, were joined to the coding regions of AcGFP1 or DsRed2 cDNAs in the pTRE-Tight expression plasmid. Sense (S) and anti-sense (AS) target sequences are connected by a 19 nt loop sequence. Transcripts are processed to yield either an active miRNA or a mature mRNA for the fluorescent protein.

### A Tet-On Advanced System for miRNA Delivery

RNAi 관련 연구에 miRNA를 사용하는 것은 유리한 몇 가지 이유가 있다. 이 강력한 inhibitory RNA는 세포 내에서 shRNA 보다 훨씬 쉽게 만들어진다. 실제로, miRNA는 Pol II에 의해 만들어지는 단백질을 coding하고 있는 mRNA의 intron에서 자주 발견된다. Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System (Cat. No. 630930)은 miRNA의 이러한 특징을 이용하여 miRNA 전사를 높은 수준으로 조절할 수 있도록 한다. 또한, reporter 단백질을 coding하는 유전자 서열은 single transcript 내의 miRNA와 편리하게 결합할 수 있다. Coexpress된 reporter 단백질은 miRNA의 발현을 확인하고 추적하는데 매우 유용하다. Tet-On® Advanced System은 강력하게 조절되어 정확하게 발현되는 tetracycline에 의해 제어되는 유전자 발현시스템이기 때문에 이러한 적용이 가능하다<sup>(4-7)</sup>. 유전자의 발현 억제가 독성을 가지고 있거나 치명적일 때는 이러한 inducible RNAi에 의한 제어가 특별히 유용하다. 기저상태의 Tet-On® Advanced System에서는 target 유전자의 발현이 극도로 억제되어 있는 반면, 발현을 유도 했을때는 강력한 유전자 억제 효과를 발휘한다. Promoter 활성보다는 전사 억제를 이용하는 타사의 시스템과는 다르게 Tet-On® Advanced delivery 방법은 RNAi에 의해 조절되는 유전자 억제를 조직 특이적으로 조절할 수 있게 한다.

### Linking miRNAs to Fluorescent Reporters

Clontech에서는 두 개의 다른 target 유전자(endogenous lamin A/C 유전자와 luciferase transgene)의 RNAi 유도 억제 실험을 통하여 본 시스템의 유용성을 입증하였다. 각각 anti-lamin A/C와 anti-luciferase (L1)에 해당하는 miR-30-like 서열을 포함하는 miRNA-based expression constructs를 만들고, 형광 단백질을 cDNA 서열의 5' 말단을 연결시켰다(그림 6). 각 miRNA 서열은 G. J. Hannon (Cold Spring Harbor Laboratory, NY) 연구실에서 개발한 온라인 miRNA/shRNA design tools를 이용하여 제작되었고, 22개 염기의 sense, anti-sense 서열이 19개의 염기로 구성되어 있는 loop에 의해 연결된 형태이다<sup>(8)</sup>. miRNA의 발현을 추적하기 위해 Living Colors® 형광 단백질인 DsRed2와 AcGFP1을 reporter 단백질로 사용하였다. 이렇게 만들어진 construct는 세포 안에서 RNA 전구체를 거쳐 활성 miRNA로 만들어졌고, 형광단백질을 coding하는 일부 mRNA는 processing 되지 않고 남아 있었다<sup>(9)</sup>.

Tet-On® Advanced System의 TRE-Tight promoter는 Tet-On® Advanced reverse transactivator에 의해 조절되는 miRNA fusion transcripts의 발현을 위해 사용되었다. pTRE-Tight plasmid는 HEK 293 Tet-On® Advanced Cell Line (TaKaRa Code 630931)에 도입시키거나, pTet-On-Advanced expression plasmid와 함께 HeLa cells에 도입시켜 stable cell line을 제작하여 동시에 doxycycline (Dox; a tetracycline derivative)에 의해 RNAi 유도 target 유전자의 억제와 형광 단백질의 발현을 유도할 수 있었다.

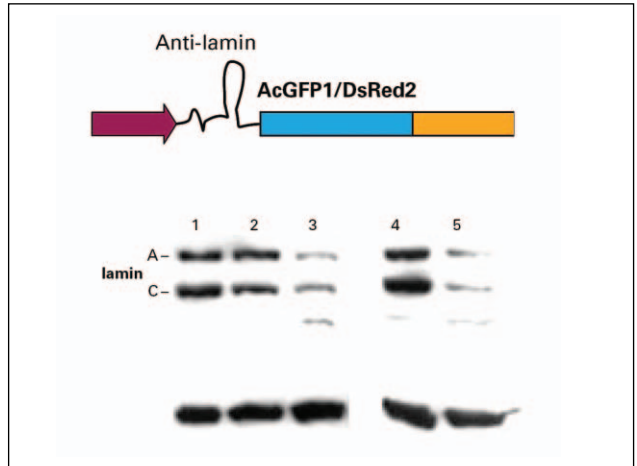


그림 7. Doxycycline-induced suppression of lamin A/C in HeLa cell lines. Stable, inducible HeLa cell lines were produced that expressed the Tet-On Advanced transactivator and either the pTRE-Tight-lamin A/C-AcGFP1 or -DsRed2 construct. Cells were grown in the presence or absence of Dox and assayed after 72 hr by Western Blot analysis. Lane 1 : Parental cells. Lane 2 : Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells without Dox. Lane 3 : Anti-lamin A/C-AcGFP1 with Dox (1 µg/ml). Lane 4 : Anti-lamin A/C-DsRed2 without Dox. Lane 5 : Anti-lamin A/C-DsRed2 with Dox (1 µg/ml).

### Inhibition of Endogenous HeLa Cell Lamin Expression

Anti-lamin-DsRed2와 anti-lamin-AcGFP1은 HeLa 세포내의 lamin 발현을 억제하는데 사용하였다. Tet-On® Advanced System에 의해 조절되는 anti-lamin miRNA constructs를 발현하는 stable HeLa cell line을 제작하였다. Dox의 존재 하에 자란 transfected HeLa 세포의 lamin 단백질 발현 양이 크게 감소되었고, 이를 Western blot으로 확인하였다(그림 7). 반면, Dox가 존재하지 않았을 때 자란 모세포와 transfected cell은 정상 수준의 lamin 단백질을 발현하였다. Dox를 투여하였을 경우 살아있는 세포에서 형광 단백질을 높은 수준으로 발현되는 것이 관찰되었다(그림 8). 이와 같은 결과는 형광 단백질과 함께 발현된 miRNA가 세포 내 target 유전자의 발현을 효과적이고 특이적으로 억제하였고, 남아있는 intact mRNA 양이 reporter 단백질을 확인하는데 충분했다는 것을 보여준다.



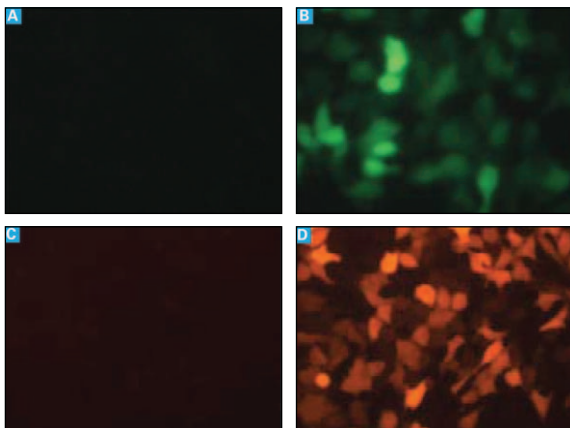


그림 8. Doxycycline-induced fluorescence in anti-lamin A/C HeLa cell lines. The HeLa cell lines described and treated as in 그림 7 were visualized by fluorescence microscopy.  
 Panel A, Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells without Dox.  
 Panel B, Anti-lamin A/C-AcGFP1 cells with Dox (1 µg/ml).  
 Panel C, Anti-lamin A/C-DsRed2 cells without Dox.  
 Panel D, Anti-lamin A/C-DsRed2 cells with Dox (1 µg/ml).  
 Dox treatment-induced strong fluorescence in cells that also exhibited lamin A/C knockdown.

### Suppression of a Luciferase Transgene

Luciferase transgene의 억제를 관찰하기 위한 cell line으로 HEK 293 Tet-On® Advanced Cell Line을 사용하였다. pTRE-Tight-L1-DsRed2 construct와 luciferase expression plasmid인 pCMVLuc을 일시적으로 도입한 세포를 72시간 동안 Dox를 처리하거나 혹은 처리하지 않은 조건에서 배양했다. Luciferase 발현을 분석한 결과, Dox가 처리된 세포에서 발현된 L1 miRNA가 Dox 처리되지 않은 세포에 비해 luciferase 효소 활성을 85%까지 감소시켰다(그림 9). 또한 Dox 처리한 세포에서만 강력한 DsRed2 형광 발색이 나타났는데, 이는 luciferase gene이 효과적으로 발현 억제되었음을 나타낸다(그림 10).

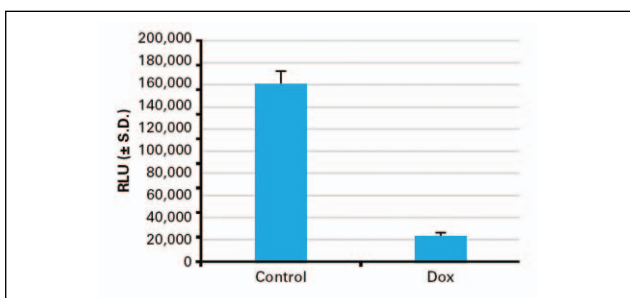


그림 9. Doxycycline treatment reduces luciferase activity in HEK-293 cells transfected with the Anti-Luc-DsRed2 reporter.  
 HEK-293 cell lines stably transformed with Tet-On Advanced were transiently cotransfected with pCMV-Luc and pTRE-Tight-L1-DsRed2 in triplicate at a ratio of 1:2, and then grown in the presence of Dox (1 µg/ml) for 72 hr. The L1 miRNA induced by Dox treatment caused a 85% reduction in luciferase activity. S.D. = standard deviation.

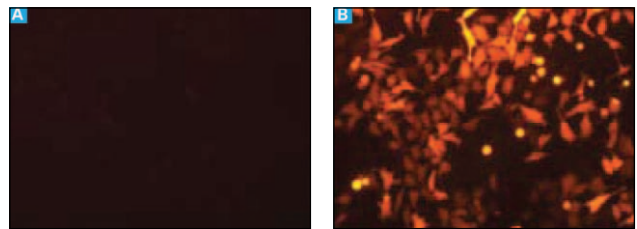


그림 10. Visualization of HEK-293 cells expressing the Anti-Luc-DsRed2 reporter in the absence and presence of doxycycline.  
 Panel A, In the absence of Dox, the Anti-Luc-DsRed2 reporter is undetectable by fluorescence microscopy.  
 Panel B, In the presence of Dox (1 µg/ml), Anti-Luc-DsRed2 expression reaches high levels.

### 결론

이와 같은 일련의 실험들은 miRNA에 의해 유도된 목적유전자의 발현 억제를 조절하는데 Tet-On® Advanced System의 적용과 reporter gene으로써 형광 단백질을 같이 발현시키는 것이 유용하다는 것을 증명했다. miRNA 활성 보다 whole cell fluorescence가 목적 단백질의 발현량 감소나 기능적인 분석을 통해서 stable cell line을 선별하는데 유용할 수 있다. 이러한 다기능 constructs는 쉽게 Tet-On® Advanced System과 통합되어 정확하고 강력한 유전자 억제를 가능하게 한다. 장기간 동안 RNAi 실험을 필요로 하는 세포 내의 유전자 연구에서, 현재 많은 Tet system cell line들이 이러한 construct의 host로서 사용 가능하다.

Product	Size	TaKaRa Code
Tet-On® Advanced Inducible Gene Expression System	each	630930
HEK 293 Tet-On® Advanced Cell Line	each	630931
HepG2 Tet-On® Advanced Cell Line	each	630932
pTRE-Tight-DsRed2 Vector	20 µg	631061
pTRE-Tight-BI-AcGFP1 Vector	20 µg	631066
pTRE-Tight-BI-DsRed2 Vector	20 µg	631064

### References

- Paddison, P., et al. (2002) *Genes & Devel.* 16(8): 948-958.
- Du, T. & Zamore, P. (2005) *Development* 132(21):4645-4652.
- Bartel, D. (2004) *Cell* 116(2):281-297.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(12):5547-5551.
- Gossen, M., et al. (1995) *Science* 268(5218):1766-1769.
- Urlinger, S., et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(14):7963-7968.
- Tet-On Advanced Inducible Gene Expression System (July 2006) *Clontechiques* XXI(2):1-3.
- HannonLabWebsite; <http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=shRNA>.
- Cai, X. et al. (2004) *RNA* 10(12):1957-1966.

※ 본문 중 제품에 해당하는 라이선스 확인사항은 [License Notice] 참조  
 17), 22), 27)