

2 중으로 Protein 발현을 직접 조절할 수 있는 획기적인 기술

ProteoTuner 기술과 Tet-inducible 기술이 조합된 pTRE-Cycle1

pTRE-Cycle Vector는 Transcription (Tet-inducible system)과 Post-translation (ProteoTuner™ system)의 2 단계에서 각각 독립적으로 단백질의 발현을 조절할 수 있는 획기적인 Protein regulatory system 이다. Tet-inducible system의 경우 전사 (transcription) 단계에서 유전자의 발현을 조절할 수 있으며, ProteoTuner™ system은 post-translation 과정에서 단백질의 proteosomal degradation을 조절하여 발현 단백질의 양을 조절할 수 있다. 그리고 각 system은 **doxycycline** (Dox ; tetracycline 유도체)과 **Shield1** stabilizing ligand 라고 하는 막 투과성 (membrane permeable) 물질의 농도를 배지 상에서 조절하므로써 간단하고 효과적으로 단백질 발현을 조절할 수 있다.

- Tight Transcriptional Regulation - Tetracycline (Tet)-inducible Expression
- Rapid, reversible Post-translational Regulation-ProteoTuner-controlled Protein degradation
- Control the Level of TWO protein - Independently

■ 간단한 벡터

Tet-On® 또는 Tet-Off® Advanced transactivator를 안정적으로 발현하는 포유류 세포에서 원하는 유전자를 발현시키고자 한다면 Clontech의 pTRE-Cycle Vector의 사용을 고려해 볼 수 있다.^{1,3)} 본 vector를 이용하면 배양 배지 내의 doxycycline (Dox ; tetracycline 유도체) 농도를 변화시키므로써 목적으로 하는 2 개의 단백질 또는 1 개의 목적 단백질과 이미 cloning된 1 개의 형광 단백질이 함께 발현되도록 정확하게 조절 할 수 있다. 개별적인 단백질 발현 조절은 배지에 Shield1 안정화 리간드 (Shield1 stabilizing ligand ; Shield1)의 양을 조절하여 번역 후 (post- translation) 과정에서 가능하다.

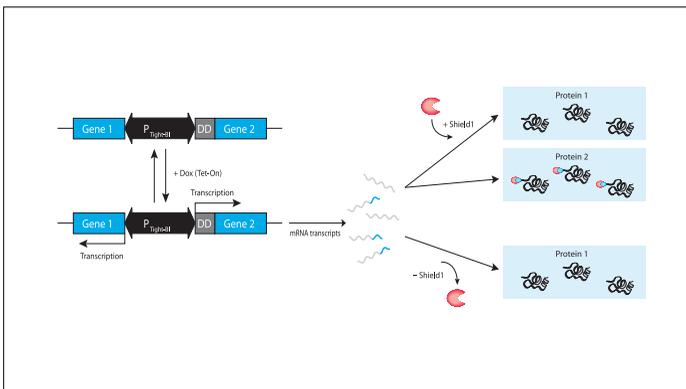


그림 1, pTRE-Cycle Vector에서는 2 개의 단백질 발현을 독립적으로 조절 가능하다.

■ 작용 기작

두 유전자의 전사는 tetracycline-controlled transactivator (stable Tet-On® Advanced/Tet-Off® Advanced cell line에서 제공^{4,6)} 존재 하에서 Tet-inducible promoter (pTight-BI)에 의해 양방향 (bidirectional)으로 진행되며, 가역적 동시 발현은 배지의 Dox 농도 변화를 통하여 조절할 수 있다. 그 다

음 단계에서의 조절은 2 개의 목적 유전자 중 하나를 vector 내에 존재하는 ProteoTuner destabilization domain (DD7) 서열과 reading frame 맞추어 목적 단백질의 N-말단 부위에 DD (destabilization domain7)가 tag으로 함께 발현되도록 cloning 하여, 세포 내에서 발현시키면 DD-tag이 붙어있는 단백질은 proteosomal degradation 과정을 통하여 급격하게 분해된다. 하지만, 이 DD-tagged protein은 Shield1 (Shield1 stabilizing ligand)이 DD와 결합하여 DD를 안정화시키면 더 이상 proteosomal degradation 과정을 거치지 않게 되어 세포 내에 축적이 되게 된다. 그리고 다시 Shield1이 DD에서 떨어지게 되면 DD-tagged protein은 다시 proteosomal degradation 과정을 거치게 된다. 이와 같이 Shield 1의 농도 조절을 통하여 반복적으로 단백질의 분해와 축적을 되풀이 하여 조절할 수 있으며, Shield1은 막 투과성이 있어 배지 상에서 그 농도를 조절하여 쉽게 단백질 발현량을 조절할 수 있다. 본 Vector는 전사과정에서 두 개의 목적 유전자의 발현을 pTight-BI를 통하여 조절하지만, 전사 후 과정에서는 한 개의 단백질만이 DD-tag를 갖기 때문에 하나의 단백질만이 Tet-based regulation과 proteosomal degradation 모두의 영향을 받게 된다. 그러나 untagged protein은 Tet-based regulation만 받기 때문에 단백질 발현은 배지의 Shield1 농도 조절과는 무관하다.

Clontech은 실험자의 편리함을 위해 3가지 pTRE-Cycle Vector를 제공한다 (그림 2). pTRE-Cycle1은 2 개의 다른 multiple cloning sites (MCSs)를 가지고 있어 DD-tag를 가진 단백질 1 개와 DD-tag가 없는 단백질 1개를 발현시킬 수 있다. pTRE-Cycle2와 pTRE-Cycle3는 하나의 MCS와 각각의 형광 단백질 (각각 mCherry와 ZsGreen18,9))을 발현하기 때문에 관심 있는 DD-tagged protein이 적색 또는, 녹색의 형광 단백질과 co-expression 하도록 한다.

형광 단백질과 함께 발현되기 때문에 형광 현미경이나 flow cytometry를 사용하여 목적 단백질을 발현하는 세포를 쉽게 관찰하거나 선별할 수 있다.

■ 3 종류의 pTRE-Cycle Vectors

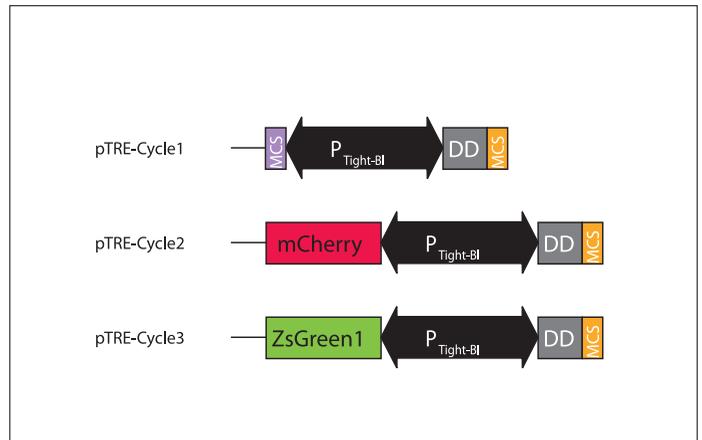


그림 2, pTRE-Cycle Vectors available from Clontech.

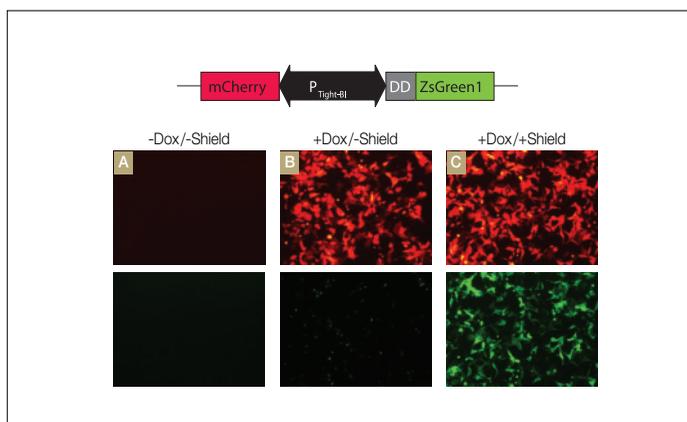


그림 3. Regulating protein levels is easy with pTRE-Cycle Vectors. HEK 293 cells were cotransfected with pTet-On Advanced and pTRE-Cycle2-ZsGreen1 (encoding mCherry and DD-tagged ZsGreen1). Transfected cells were subsequently grown in medium: -Dox/-Shield1 (Panel A); +Dox/-Shield1 (Panel B); and +Dox/+Shield (Panel C). Cells incubated in medium containing only Dox accumulated only mCherry, whereas cells incubated in medium containing both Dox and Shield1 accumulated both mCherry and DD-tagged ZsGreen1.

■ 독립적인 단백질 발현 조절

pTRE-Cycle Vector는 포유류 세포에서 단백질 발현을 독립적으로 조절하기 쉽도록 만들어준다. 이를 확인하기 위하여 mCherry를 encoding하는 pTRE-Cycle2의 DD-tag 서열의 frame에 ZsGreen1을 cloning 하였고, 이것을 Tet-On Advanced expression vector와 함께 HEK 293 cell로 transfection 하였다 (그림 2). Dox와 Shield1이 모두 없는 경우, 어떠한 단백질도 발현되지 않았다 (그림 2-A). 배지에 Dox를 첨가하면 두 가지 단백질 모두 발현이 유도되지만, 배지에는 Shield1이 없으므로 DD-tagged ZsGreen1은 급속도로 분해되고 mCherry만 세포 내에 축적된다 (그림 2-B). Dox와 Shield1이 모두 배지에 첨가되면, Dox는 두 가지 단백질 모두의 발현을 유도하고 Shield1은 DD-tagged ZsGreen1을 안정화시켜 두 단백질이 모두 축적되게 된다 (그림 2-C).

■ 엄격하고 독립적인 조절 - 1개의 Vector로 2 개의 단백질 조절

이 vector들의 독립적인 조절을 좀 더 확인하기 위하여, Sox2와 Oct4 유전자를 pTRE-Cycle1에 cloning 하여 pTet-On Advanced와 함께 HEK 293 cell에 transfection 하였다. Transfection된 세포들은 다양한 Dox와 Shield1의 농도에서 배양하고, anti-Sox2 monoclonal antibody (mAb)와 anti-DD mAb를 사용하여 Western blot으로 분석하였다 (그림 3). Shield1이 없을 때, DD-tagged Oct4는 전혀 감지되지 않았음에도 Dox 농도에 따라 다양하게 Sox2가 발현됨을 확인하였다 (그림 3-2, 3). DD-tagged Oct4는 Shield1과 Dox를 모두 배지에 첨가하였을 때만 검출되었다 (그림 3-4, 5).

■ 관련제품

제품명	용량	Takara Code
pTRE-Cycle 1	20 µg	631115
pTRE-Cycle 2	20 µg	631116
pTRE-Cycle 3	20 µg	631117

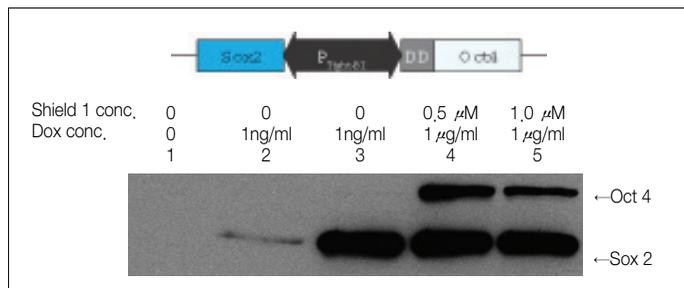


그림 4. Get tight, independent control over levels of coexpressed proteins. HEK 293 cells were cotransfected with pTet-On Advanced and pTRE-Cycle1-Sox2-Oct4 (encoding both Sox2 and DD-tagged Oct4), and grown on medium containing various concentrations of Dox and Shield1. 48 hrs post-transfection, cell lysates were subjected to western analysis with an anti-Sox2 monoclonal antibody (mAb) and an anti-DD mAb. Cells incubated in medium containing only Dox, accumulated only Sox2 in a concentration-dependent manner (Lanes 2&3); cells incubated in medium containing both Dox and Shield1 accumulated both Sox2 and DD-tagged Oct4, also in a concentration-dependent manner (Lanes 4&5).

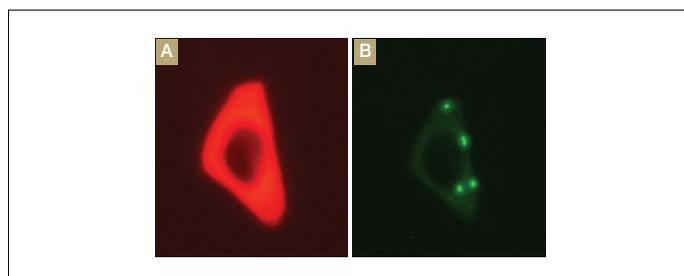


그림 5. Protein levels can be adjusted in less than 4hrs. HEK 293 cells were cotransfected with pTet-On Advanced and pTRE-Cycle2-ZsGreen1 (encoding both mCherry and DD-tagged ZsGreen1), and incubated overnight in medium containing Dox and Shield1. Transfectants were subsequently incubated in medium containing only Dox (no Shield1). After 4hrs, mCherry levels were unaffected (Panel A); however, DD-tagged ZsGreen1 was largely degraded (Panel B).

■ 단, 4 시간 만에 단백질 발현 레벨 조절

단백질 발현 레벨 조절은 쉬우면서도 빠르다. pTet-On Advanced와 pTRE-Cycle2-ZsGreen1으로 co-transfection한 HEK 293 cell을 Dox와 Shield1을 첨가한 배지에서 하룻밤 배양하였다. 이후 Dox만 첨가한 배지에서 4 시간 동안 배양하였다. 단일 세포의 형광 현미경 사진을 통해 Shield1이 없는 경우 mCherry 발현은 영향을 받지 않는 반면 (그림 4-A), DD-tagged ZsGreen1은 거의 완벽하게 분해되었다 (그림 4-B). DD-tagged ZsGreen1이 소량 남아있는 부분은 ubiquitinated protein에 관하여 보고된 연구들과 일치한다¹⁰⁻¹².

pTRE-Cycle Vector는 목적으로 하는 2 개의 단백질 또는 1 개의 목적 단백질과 1 개의 형광 단백질을 이용한 단백질 발현을 가역적이고 쉽게 조절할 수 있도록 한다.

■ 참고문헌

- 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.
- pTRE-Tight Vectors (April 2003) *Clontechiques XVIII*(2):10-11.
- Bidirectional Tight Expression Vectors (April 2006) *Clontechiques XXI*(1):12-13.
- Inducible Gene Expression Systems (January 2007) *Clontechiques XXI*(1):1-2.
- Banaszynski, L. *et al.* (2006) *Cell* **126**(5):995-1004.
- Shaner, N. C. *et al.* (2004) *Nature Biotech.* **22**(12):1567-1572.
- Matz, M. V. *et al.* (1999) *Nature Biotech.* **17**(10):969-973.
- Donaldson, K. M. *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **100**(15):8892-8897.
- Seibenhener, M. L. *et al.* (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**(18):8055-8068.
- Wooten, M. W. *et al.* (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* **2006**(3):1-12.