

Tet-On 3G Inducible Expression System

# Low background, High Sensitivity의 3세대 Tet-On System

Tet-On 3G Tetracycline Inducible Gene Expression Systems은 가장 강 력하고 적용성이 뛰어난 3세대 포유류 유도 발현 시스템으로 정밀하 게 유전자 발현을 조절할 수 있도록 기존 제품의 성능을 개선하였다. 본 시스템을 이용하면 좀 더 가역적이고 정량적이며 재현성 있게 목 적 유전자의 발현을 조절할 수 있다. Hermann Bujard와 Manfred Gossen, Wolfgang Hillen 연구 그룹<sup>(1,2)</sup>에 의해 개발된 3G 시스템은 promoter 변형으로 백그라운드를 현저하게 줄이고 transactivator protein 개선을 통해 Dox에 대한 민감도를 한층 높인 혁신적인 Tet 시 스템이다.

# Tet-On 3G Inducible System의 개요

Tet-On 3G transactivator protein을 발현하면서 TRE3G promoter (P<sub>TRESG</sub>)로 목적 유전자를 조절하는 Tet-On 3G 세포는 독시사이클린 doxycycline (Dox; tetracycline analog)이 첨가되었을 때 목적 유전자를 고발현 시킨다. Tet-On 3G protein은 Dox가 결합하면 형태적인 변화가 생겨 P<sub>TRESG</sub> 내의 tet operator (*tet O*)에 결합하게 된다 (그림 1). 새로운 시스템은 기존의 낮은 수준의 TetR-based system (Clontech 에서는 판매하지 않는 제품)과는 달리, Tet-On 기술을 적용하여 transcription을 저해하기 보다는 촉진시키는 것으로 극도로 낮은 기 저발현basal expression과 높은 목적 유전자 발현이 가능하다. 뿐만 아니 라 한층 더 빨라진 반응시간 등의 장점을 갖고 있으며 특히 *in vivo* 실 험에 최적이다.



그림 1. The Tet-On 3G systems allow inducible gene expression only in the presence of doxycycline. When Dox binds, the transactivator undergoes a conformational change allowing it to bind tet operator (*tet* O) repeats within the TREG Promoter ( $P_{\text{TREG}}$ ). The transactivator activates expression through transcription activation domain repeats.

# 극도로 낮은 백그라운드와 높은 감도

Tet-On 3G 시스템은 최적화된 두 가지 요소의 결합으로 기존의 Tet-On 시스템보다 한층 더 성능이 향상되었다.

- PTRESS promoter 기존의 inducible promoter의 변이형으로 최대
  20 배 가량 백그라운드 발현을 줄였다 (그림 2).
- Tet-On 3G transactivator protein 유도 물질인 Dox에 대한 감도를 획기적으로 높여 아주 낮은 농도의 Dox (5~10 ng/ml)에서 도 기존 Tet-On Advanced 보다 100~150 배 이상 발현 배율을 증가시켰다(그림 3).

두 가지 요소를 조합하면 10 ng/ml의 Dox에서도 목적 유전자를 높은 수준으로 발현시킬 수 있을 뿐만 아니라(그림 3), 백그라운드 발현이 매우 낮아 transient cotransfection을 통해서도 발현 유도 시점과 발 현을 유도하지 않은 시점에서의 발현량이 27,000 배 이상 차이가 나는 것을 확인하였다(MCF cells, data not show).



그림 2. The P<sub>TRESG</sub> promoter results in significantly reduced basal expression. HEK 293 cells were transiently cotransfected with both the response vectors (containing luciferase) and regulator vectors from each of the Tet-On 3G and Tet-On Advanced Inducible Expression Systems. The cells were cultured in the

presence and absence of Dox, and after 24 hr, luciferase expression was measured. Although both systems provided strong expression in the presence of Dox, the Tet-On 3G System produces far lower background expression in the absence of Dox (inset).



그림 3. Tet-On 3G is highly sensitive to as little as 10 ng/ml of doxycycline. Following cotransient transfection of pCMV-Tet3G and  $P_{\text{TRESG}}$ -Luc in HeLa cells, increasing levels of Dox were added and expression of luciferase was measured using an antiluciferase antibody (Panel A) and a luciferase assay (Panel B). Induced expression was very high even with Dox concentrations as low as 10 ng/ml, and was detectable even at 0.1 ng/ml Dox.

# Tet-On 3G System - 두 개의 최적화된 요소의 강력한 조합

## (1) Tet-On 3G Transactivator Protein

Tet-On 3G는 Tet-On Advanced transactivator protein의 성능을 개선하여 독시사이클린doxycycline에 대한 감도를 높였다<sup>(4)</sup>. Tet-On 3G Transactivator Protein은 변형된 박테리아 Tet repressor (TetR)를 3 개의 minimal VP16 activation domain에 융합하여 새로운 전사 활성 단백질transactivator을 만들었다. 이 단백질은 기존의 Tet-On Advanced transactivator 에서 5 개의 아미노산을 변형시킨 것이다 (Tet-On transactivator 서열 비교는 www.clontech.com 사이트 참조). Tet-On 3G는 기존 버전에 비해 아주 높은 발현율을 나타내며, 낮은 Dox 농 도에도 민감하게 반응한다. 이와 같이 Dox에 대한 민감도가 증가함으 로써 낮은 농도로 투여할 수 있기 때문에 세포 배양이나 형질전환연구 transgenic study시 세포 독성을 줄일 수 있다. 특히, 높은 Dox 농도를 유지 하기 어려운 조직(뇌 등)의 *in vivo* 실험에 유용하다.



그림 4. Comparison of the three generations of Tet-On. Panel A shows the transactivator and inducible promoter combinations for each generation of the Tet-On system. Tet-On was launched by Clontech in 1996—at the time this was the premier inducible expression system, and its performance has only been surpassed by subsequent generations of the Tet-On system. Panel B shows co-transient transfection experiments with both vectors in HEK 293 and HeLa cells. Although Tet-On Advanced shows great improvement over the original Tet-On System when comparing the difference between the induced and the uninduced states (fold induction), Tet-On 3G shows even higher fold induction due to the significantly reduced basal expression provided by the  $P_{\text{TREMS}}$  promoter.

## (2) P<sub>TRE3G</sub> Inducible Promoter

P<sub>THESS</sub> promoter는 기저 발현basal expression을 극도로 억제해서 발현 유도 시 발현율을 최대로 끌어올린다<sup>(3)</sup>. CMV promoter의 상류에 19 bp의 *tet* operator 서열이 7 개 반복되어 있는데, 이를 tetracycline response element (TRE)라 부른다. tet operator 반복 서열은 모든 Tet-On 시 스템에서 공통적으로 사용되었지만 P<sub>THESS</sub>의 연결 부위 서열의 간격과 중 앙 부분의 배열이 변경되었고 minimal CMV promoter 의 요소도 일부 변형되어 있다. P<sub>THESS</sub>는 내인성 포유류 전사 요소가 결합 할 수 있는 부 위가 적어졌고 transactivator가 없을 때는 비활성화되기 때문에 어느 TRE 계열의 promoter보다도 낮은 기저발현basal expression을 나타낸다.

결과적으로 Press promoter와 Tet-On 3G transactivator의 결합으로 기존의 포유류 유도 발현 시스템보다 더 높은 유도 발현율을 보일 수 있게 되었다.

## 다양한 Tet-On 3G Vector

Clontech에서는 다양한 형태의 Tet-On 3G vector가 포함된 시스템을 판매하고 있으며, 각 시스템에는 아래 구성품도 포함되어 있다.

- Tet-On transactivator vector (pCMV-Tet3G 生는 pEF1a-Tet3G)
- PTRESS promoter와 multiple cloning site가 포함된 TRE response vector
- Hygromycin & puromycin linear selection markers
- Tet Approved FBS
- Xfect transfection reagent

#### (1) Transactivator Vectors

pCMV-Tet3G는 CMV promoter로부터 Tet-On 3G protein을 발현 시키는 vector로 EF1α 버전을 제외한 모든 Tet-On 3G System에 포 함되어 있다. Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1α version) (Code 631167)에는 EF-1 α promoter로부터 transactivator를 발현하 는 vector가 포함되어 있다.



그림 5. Tet-On 3G Transactivator Vectors

## (2) Response Vectors

모든 response vector는 *P*<sub>TRESG</sub> promoter를 포함하고 있으며 *P*<sub>TRESG</sub>는 Tet-On 3G Inducible Expression System (Code 631168)과 Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1α Version) (Code 631167)의 구성품이다. 두 종류의 유전자를 함께 발현시킬 수 있는 *P*<sub>TRESG</sub>-IRES는 bicistronic Tet-On 3G system에 포함되어 있다. 목적에 따라 적색 또 는 녹색 형광단백질이 포함된 mCherry 또는 ZsGreen1 시스템을 선택 할 수도 있다.



그림 6. Tet-On 3G Response Vectors

## (3) Linear Selection Markers

Linear selection marker인 hygromycin 또는 puromycin을 사용하여 clone을 선별할 수 있으며 두 marker 모두 Tet-On 3G system에 포함 되어 있다.



그림7. Linear Selection Markers

# 조혈모세포와 줄기세포에서의 유도 발현 예

Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1α Version)은 EF-1 alpha promoter가 포함된 Tet-On 3G System 버전으로 이를 이용 하면 시간이 지남에 따라 CMV promoter에서 유전자 silencing 현 상이 나타난다고 알려진 줄기세포나 조혈모세포 등에서도 Tet-On 3G transactivator를 장기간 안정적으로 발현시킬 수 있다 (그림 8). Clontech에서는 CMV 유래 vector를 사용하였을 때 클론간의 발현 차이를 나타내거나 발현 정도가 낮다고 알려진 Jurkat cell을 이용해 EF-1 alpha 버전을 테스트하였다. EF-1 alpha promoter로 Tet-On 3G transactivator를 발현시켰을 때 83%의 Jurkat Tet-On 3G 클론 이 높은 유도 발현을 보였고, 2,000 배 이상의 높은 유도 발현율을 나 타낸 클론도 33%나 되었다 (그림 8).

EF-1 alpha promoter는 줄기세포의 유전자 발현에 적합하며, Tet-On 3G Inducible Expression System (EF1 α version)이 mouse embryonic stem cell에서 효과적으로 작용하는 것을 확인하였다 (그 림 9).



**그림** 8. Tet-On 3G (EF1 $\alpha$  Version) provides inducible expression in hematopoietic cells. Jurkat cells were transfected with pEF1 $\alpha$ -Tet3G using Xfect transfection reagent, and stable clones were selected by limiting dilution. 18 stable clones were then tested for inducibility by transient transfection using  $P_{\text{TREAG}}$ -expressing luciferase. Six out of eighteen clones showed more than 2,000 fold induction via transient transfection.



**그림** 9. Tet-On 3G (EF1 $\alpha$  Version) provides inducible expression in stem cells, Mouse embryonic stem cells (ES-E14TG2a mES cells) were cotransfected with  $P_{TRE3G}$ -ZsGreen1 and pEF1 $\alpha$ -Tet3G using Xfect Stem transfection reagent. The stem cells show ZsGreen1 expression only in the presence of Dox (Panel C).

## 최적화된 Tetracycline Approved Serum

Tet-On 3G system은 감도가 크게 증가되었기 때문에 tetracyclinefree가 보장된 fetal bovine serum을 선택하는 것이 매우 중요하다. Clontech에서 판매되는 serum은 실제 Tet inducible cell line에서 테 스트를 진행하여 기저 발현에 영향을 미치지 않음이 확인된 제품이다. Tet-On 3G system에는 50 ml의 프리미엄 Tet-Approved FBS가 포 함되어 있다.



그림 10. To ensure low background with Tet-On 3G, it is essential to use fetal bovine serum that is functionally tested. Clontech offers four such serum options, including serum that is sourced from the US, Mexico, and Australia, as well as US-sourced serum that is additionally tested for use in mouse embryonic stem cells.

### References

- 1. Gossen, M. & Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(12):5547-5551.
- 2. Urlinger, S. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(14):7963-7968.
- 3. Löw, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H. & Gossen, M. (2010) BMC Biotechnology 10:81.
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B. & Das, A. T. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. (2006) *Gene Ther.* 13(19):1382–1390.

| 제품명   | Size   | Code   |
|---|--------|--------|
| Tet-On 3G Inducible Expression System                       | each   | 631168 |
| <br>Tet—On 3G Inducible Expression System (EF1α Version)    | each   | 631167 |
| Tet-On 3G Inducible Expression System (Bicistronic Version) | each   | 631166 |
| Tet-On 3G Inducible Expression System (with mCherry)        | each   | 631165 |
| Tet-On 3G Inducible Expression System (with ZsGreen1)       | each   | 631164 |
| <br>Tet System Approved FBS                                 | 500 ml | 631106 |
| <br>Doxycycline   | 5 g    | 631311 |
| TetR Monoclonal Antibody (Clone 9G9)                        | 200 µg | 631132 |
|   |        |        |

License Notice [K45]