

# Development of Inducible siRNA Expression System

조한길, 조익훈 /서울시립대 생명과학과

## RNA interference (RNAi)의 기전과 적용

siRNA는 *C. elegans* 에서 long double-stranded RNA가 homologous한 gene들을 silencing하는 현상인 'RNA interference (RNAi)'의 intermediate로 처음 발견되었다. 몇몇의 식물 중에서 나타나는 post-transcriptional gene silencing (PTGS)은 RNAi와 유사한 현상이다. 이후 RNAi pathway는 *Drosophila*, mouse embryo등의 다양한 organism과 human cell type들에도 conserved된 gene-silencing mechanism으로 보고되었다. 특히 animal cell에서는 long double stranded RNA (dsRNA)가 cellular RNAi pathway상에서 'Dicer'라 불리는 RNase III-like enzyme에 의해 processing되어 20-25 nt 길이의 siRNA를 생성하게 된다. 이렇게 생성된 siRNA는 RNA-induced silencing complexes (RISC)로 알려진 endoribonuclease-containing complex에 결합되며, siRNA가 guider으로써 작용하여 RISC가 상보적인 RNA를 인식, 파괴하게 된다 (Fig.1). 일반적으로 mammalian cell에서 30 nt 이상의 long-dsRNA의 introduction이 interferon (IFN) pathway를 활성화 시킴으로써, 강력한 antiviral response, 즉 비 특이적인 protein 합성 저해와 RNA degradation을 유도하게 된다는 것이 보고되고 있었다. 그러나, 독일의 Tuschl 박사 그룹은 *in vitro* 에서 30 nt 이하, 특히 21~23 nt 사이의 siRNA는 RNAi pathway의 intermediate 역할을 함으로써, non-specific IFN pathway의 활성화를 야기하지 않으며, complementary한 서열을 가지는 specific-gene의 mRNA degradation을 유도할 수 있다는 것을 증명함으로써 siRNA의 실험적 이용을 가능하게 하였다.

Human Genome Project (HGP)가 완성된 post-genomic era에서 'small interfering RNA (siRNA)'는 두 가지 큰 중요성을 갖고 있다고 할 수 있다. 먼저 생물학적 측면에서, micro RNA (miRNA)나 siRNA와 같은 small RNA molecule 들이 개체 발생과 proliferation 등의 다양한 생물학적 과정에서 유전자 발현 조절에 관여한다는 사실이 최근 밝혀짐으로써 그동안 'central dogma'에서 DNA와 protein을 연결하는 'intermediate'로만 간주되어 왔던 RNA의 기능이 small non-coding RNA molecule이라는 형태로 유전자 발현 조절까지 확장되었다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 고등 동물인 인간의 복잡한 생명 현상이 초파리나 선충의 2~3배인 3~5만 개만으로 조절된다는 놀라운 사실을 풀 수 있는 실마리를 제공하고 있다. 일부 학자들이 '유전자 발현 조절'이라는 측면에서 위와 같은 문제에 접근하고 있고, siRNA를 포함하는 non-coding RNA가 intron이 관여하는 alternative splicing 조절과 더불어 인간의 제한된 유전자 수를 설명할 수

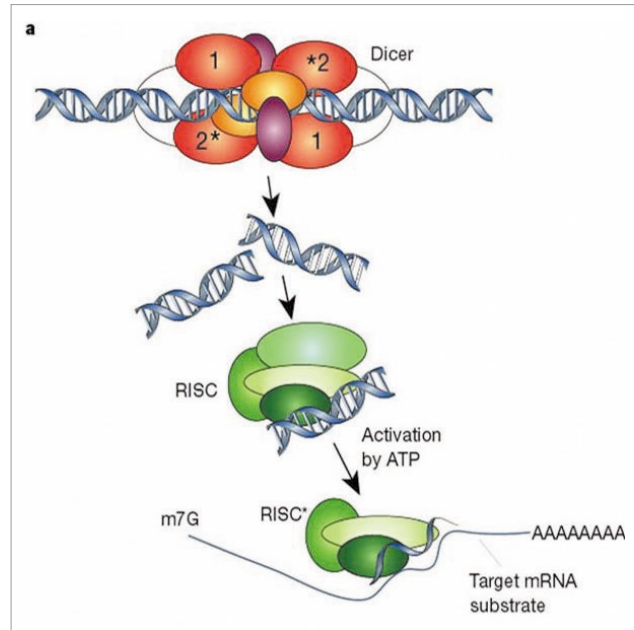


Fig.1 Small interfering RNA (siRNA) in RNA interference pathway (Hannon GJ, 2002)

있는 중요한 열쇠 중의 하나로 주목 받고 있다. 기술적인 측면에서, siRNA가 특정 유전자 발현을 억제 할 수 있다는 사실은 새로운 reverse genetics tool의 출현이라는 중요성을 갖고 있다. 지금까지 *in vivo*에서 reverse genetics를 위한 일반적인 실험 방법은 homologous recombination에 의한 gene knock-out 방법이 있었지만, 고비용, 장기간의 실험을 필요로 하는 단점을 가지고 있었다. 또한 *in vitro*에서 기존에 사용되었던 antisense oligonucleotide, ribozyme등을 통한 gene-suppression이 nonspecific effect를 동반한다는 점에서 그 결과들의 해석에 문제가 있었다. 이러한 측면에서 특이적으로 target gene을 knock-down할 수 있는 siRNA technology는 data-base에 축적된 수 많은 유전자들의 기능을 *in vivo*와 *in vitro*에서 연구하는데 있어서 새로운 전환점을 만들고 있다.

초기 siRNA를 이용한 실험들에서는 주로 chemically 합성한 synthetic RNA를 사용했다. 각각의 sense와 anti-sense sense RNA를 각각 합성하여, *in vitro*상에서 annealing함으로써 만들어진 duplex RNA를

mammalian이나 *Drosophila* cell line에 transfection하는 방법을 이용하였다. 그러나, 위와 같은 방식의 RNA합성은 고비용이 소모되고, siRNA effect가 단 기간 동안에만 지속된다는 단점을 가지고 있었다. 이를 극복하기 위해, siRNA를 vector system에서 stable하게 발현 시킬 수 있는 DNA vector-based siRNA expression system이 출현하게 되었다. H1, U6 promoter와 같은 RNA polymerase III (RNA pol III) type promoter를 이용하는 siRNA expression vector system은 RNA 합성이 아닌 DNA oligomer를 합성함으로써 비용적으로 저렴하며, 각각의 sense, anti-sense oligomer가 hairpin stem loop로 연결된 형태의 small hairpin RNA (shRNA)를 발현하게 된다. DNA-vector system의 궁극적인 목적이었던 long-term effect와 더불어, adeno-, retro-, lenti-viral vector system 등과의 fusion을 통한 transfection-limitation을 극복할 수 있게 되어 siRNA technology의 이용 범위가 확장되었다.

siRNA expression vector system이 출현한 이래로, 원하는 시간과 장소에 따라 siRNA의 발현을 조절할 수 있는 더 진보된 system, 즉 inducible siRNA expression system에 대한 요구가 증대 되어 최근에 여러 방법이 고안되었다. siRNA technology의 전체적인 review에 관해서는 수많은 논문이 이미 발표되었으므로, 본 논문에서는 최근에 개발된 siRNA inducible system을 중점적으로 소개하고자 한다.

## Inducible siRNA expression system

Development나 differentiation, survival 또는 cell cycle regulation 등에 관여하는 유전자들의 연구에 있어서, siRNA에 의한 지속적인 target gene suppression은 정확한 gene-function을 연구하는데 한계점을 가지고 있다. 따라서 기존에 존재하던 Tetracycline inducible system이나 Ecdysone inducible system과 같이 원하는 시간대와 특정 조직에서 임의적으로 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있는 inducible system에 siRNA expression 개념을 도입하고자 하는 연구가 진행 되었다. 개발에 주로 이용된 RNA pol III type U6, H1,7SK promoter는 과거에 antisense, ribozyme RNA와 같은 짧은 RNA transcript 합성에 주로 이용되던 promoter이다. 구조적으로 유사한 consensus site들을 공유하고 있으며, H1 promoter가 보다 compact한 구조를 가지고 있다. RNA pol III type promoter는 mRNA transcription에 관여하는 RNA polymerase II type promoter와 달리 거의 모든 human cell type에서 highly active하며 transcript의 initiation과 termination site가 정해져 있다. 또한 생성된 transcript의 3' -terminus가 UU가 된다는 것은 기존에 보고된 siRNA stability에 관여하는 3' -UU overhang과 일치한다.

### 1) Tetracycline (tet) · inducible system

지금까지 보고된 inducible siRNA expression system의 대부분은 tet-inducible system에 기반하고 있다. 주로 Taira 박사팀이 U6 promoter를 이용해 보고했던 inducible antisense RNA expression system을 응용한 형태들이다.

기존의 tet inducible system은 doxycycline (tetracycline derivative, Dox)에 대한 반응에 따라 tet-off system과 tet-on system으로 분류된다. 기본적으로 VP 16 transactivation domain이 fusion 된 tet-repressor를 발현하는 tTA (tet-off) 또는 rTA (tet-on)를 생성하는 vector와 생성된 tTA 또는 rTA가 binding 하는 TRE (tetracycline responsive element) sequence와 target 유전자가 연결된 vector로 구성된다. Tet-off system은 Dox가 없을

때에는 tet-repressor (tTA)가 TRE에 결합하여 C-terminal에 fusion된 VP16 domain을 통해 target gene의 expression을 유도한다. 그러나, Dox를 처리하면, tTA가 TRE에서 분리되어 VP16 domain에 의한 transcription의 activation이 생기지 않게 됨으로써 target gene의 expression이 유도되지 않는다. 반대로 tet-on system의 경우에는 Dox가 rTA에 binding 된 후 TRE sequence에 rTA가 binding하여 target gene의 발현을 유도하게 된다.

Tet · inducible system을 이용한 inducible siRNA expression system은 우선 tTA 대신에 modification이 없는 naive tet-repressor(TR)를 발현하는 vector와 U6 promoter와 H1 promoter의 TATA box와 initiation site 사이에 tet-operator sequence를 삽입한 siRNA expression vector로 구성된다. U6 promoter와 H1 promoter의 TATA box와 initiation site 사이에 sequence는 RNA pol III에 의한 transcription에 큰 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있다. Dox 가 없을 때에는 CMV 또는 tissue-specific promoter에 의해 발현된 naive TR이 tet-operator에 결합하여 transcription에 대한 'road block'의 역할을 하게 된다 (Fig.2). 여기에 Dox를 처리하게 되면 tet-repressor가 tet-operator site에서 분리되어, downstream에 위치한 siRNA hairpin oligomer가 transcription 된다. 생성된 hairpin 형태의 siRNA는 Dicer와 같은 RNAes III type의 enzyme에 의해 hairpin 부분이 절단되어, competent dsRNA가 만들어 지게 되고, 이것이 siRNA로 역할을 하게 된다. 보고된 바에 의하면, 앞에 언급한 hairpin 형식의 siRNA (shRNA)와 chemically 합성된 synthetic siRNA 의 gene-silencing 효율은 동일하다고 한다. Dox를 처리 한지 4시간 후에 siRNA expression을 확인할 수 있으며, target gene에 따라 24~48 시간 사이에서 최고의 siRNA effect를 northern이나 western analysis로 관찰할 수 있다고 알려졌다. 또한 Dox를 제거했을 시, 다시 siRNA expression이 억제되는 reversible한 특징을 가진다. 그러나, tet-inducible system을 이용한 siRNA의 expression은 naive tet-repressor가 충분히 발현되지 않으면, Dox를 처리하지 않은 상태에서도 siRNA expression이 일어난다는 'leakiness'의 문제점과 high-dose Dox를 처리할 경우 growth arrest 등의 toxicity를 유발할 수 있다는 것이 보고된바 있다. 현재 'Oligoengine'이라는 회사에서 pSuperior라는 이름으로 판매하고 있지만, 실제로 이 vector를 이용하여 발표된 논문은 아직까지 없는 실정이다.

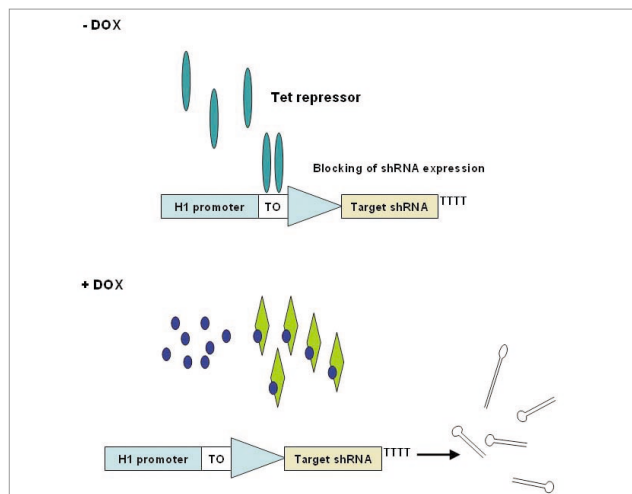


Fig.2 Tet-inducible siRNA expression system  
(Van de Wetering *et al.*, 2003)

위에서 기술한 naive tet-repressor를 road blocker로 이용하는 inducible siRNA expression system과 달리 Trono 그룹은 tTA의 VP16 domain 대신에, transcriptional repressor로 작용한다고 알려진 KRAB domain을 fusion 시킨 새로운 hybrid protein을 사용하였다 (Fig.3). KRAB domain은 human Kox1의 domain으로 Kox1의 binding site로부터 약 3 kb 안에서 orientation에 상관없이 RNA polymerase II, III에 의한 transcription을 억제할 수 있다고 알려져 왔다. 이러한 KRAB domain과 tet-repressor (TR)가 fusion 된 protein은 H1 promoter (about 100 bp) upstream에 insertion 시킨 tet-operator에 결합하여 H1 promoter에 의한 siRNA expression을 억제 시킬 수 있다. 그러나, Dox를 처리하면 tet-repressor: KRAB domain이 H1 promoter upstream에서 분리되어 siRNA expression이 가능하게 된다. Trono 박사 팀은 위의 system을 lentiviral system에 도입하여, host range를 stem cell과 non-dividing neuronal cell 및 *in vivo* model까지 확장시켰다. 이 system은 앞에서 설명한 tet-inducible siRNA expression system과 유사하지만, lentiviral system을 이용함으로써 reverse transcription 과정에서 H1-siRNA expression cassette가 2개로 duplication되므로 보다 강력한 siRNA effect를 관찰할 수 있다. 그러나, tet-repressor에 fusion된 KRAB domain이 hetero-chromatin을 형성함에 의해서 transcription을 suppression 시키는 것이기 때문에, lentiviral system에 의한 siRNA expression cassette가 genome에 integration 되어서 주위에 있는 endogenous gene의 발현에도 영향을 줄 수 있다는 문제점이 있다.

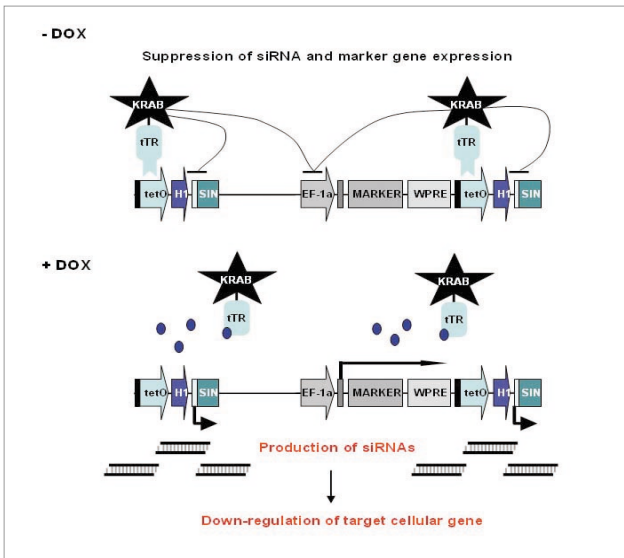


Fig.3 KRAB mediated regulation of siRNA expression (Wiznerowicz et al., 2003)

## 2) Ecdysone · inducible synthesis of shRNA

Ecdysone inducible system을 이용한 inducible siRNA expression system은 최근 Cold Spring Harbor Laboratory의 Mittal 박사 그룹에 의해서 보고되었다. Ecdysone inducible system은 3개의 vector로 구성된다. 2개의 vector는 insect steroid hormone인 ecdysone과 결합하는 nuclear receptor인 ecdysone receptor (EcR)와 EcR과 heterodimer를 이루는 transcription factor Ultraspiracle의 vertebrate homologue인 retinoid X receptor (RXR)로 구성된다. 현재 EcR에 Vp16 domain이 fusion된 VgEcR

이 주로 이용되고 있다. inducer인 ecdysone이나 derivative인 muristerone A (mura)를 처리해주면, EcR과 RXR과의 heterodimer가 형성되고, 이 complex가 나머지 1개의 vector에 존재하는 ecdysone-responsive promoter에 결합하여 target gene을 발현하게 된다.

Mittal 박사 팀은 retroviral ecdysone inducible system과 modified U6 promoter를 이용하여 inducible siRNA expression system을 개발하였다 (Fig.4). 이 system에서는 chimeric transactivator protein인 GAL4-Oct-

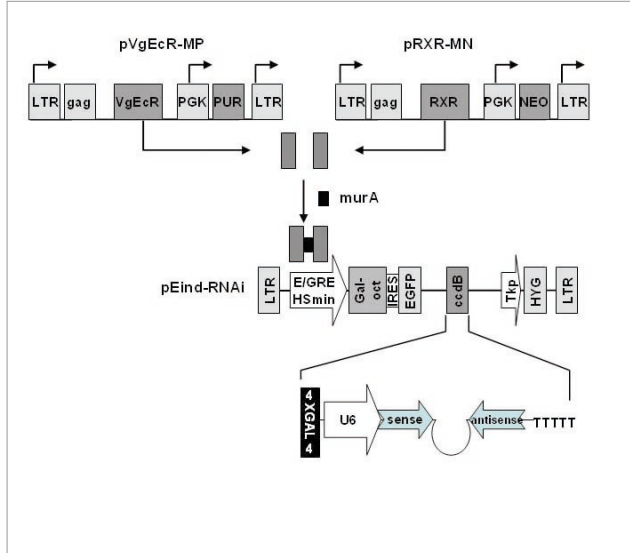


Fig.4 Ecdysone-inducible synthesis of shRNA (Gupta et al., 2004)

2(Q-A)를 발현하기 위한 pEind-RNAi vector가 필요하다. Oct2는 U6 promoter의 octamer sequence (Oct)에 결합하여 RNA pol III transcription을 activation 하는 enhancer protein이고, GAL4-Oct-2(Q-A)는 Oct와 GAL4 DNA binding domain과 fusion 된 단백질이다. siRNA의 발현을 위한 또 다른 vector로는 U6 promoter상에서 Oct-binding site를 포함하는 enhancer protein binding element가 GAL4-Oct-2(Q-A)이 결합할 수 있는 4개의 tandem GAL4-binding sites로 치환된 modified U6 promoter가 제작되었다. mura를 처리하게 되면 EcR과 RXR의 heterodimer가 생성되고, 이것이 ecdysone · responsive promoter에 결합하여 GAL4-Oct-2(Q-A)을 발현하게 된다. 발현된 GAL4-Oct-2(Q-A)는 modified U6 promoter의 GAL4 DNA-binding sites에 결합함으로써, U6 promoter를 activation시켜 downstream의 target shRNA를 발현하게 되는 것이다. 사용되는 vector 수를 줄이기 위해, GAL4-Oct-2(Q-A)를 발현하는 pEind-RNAi vector에 gateway site-specific acceptor (ccdB)를 넣어, modified U6 siRNA expression cassette를 insertion 할 수 있게 만들었다. 이렇게 개발된 ecdysone inducible siRNA expression system은 기존의 ecdysone inducible system이 가지고 있던 장점을 보유하고 있다고 주장되었다. 즉 tet-inducible system에 비해 basal activity가 낮고, inducer가 lipophilic steroid이기 때문에 toxicity가 낮고, brain을 포함한 모든 tissue에 적용이 가능 할 것으로 예상된다. 그러나, retroviral ecdysone inducible siRNA system은 modified U6 promoter를 포함하는 siRNA expression cassette를 donor vector로 하여 pEind-RNAi vector에 sub-cloning이 이루어져야 하는 번거로움이 존재한다. 그리고, siRNA effect

(p53의 경우)가 일반적인 tet-inducible siRNA expression system에 비해 약 24 시간 뒤에 최고치에 도달한다고 보고되었다. 이는 U6 promoter modification으로 인한 transcription activity 저하로 예상된다. 그리고, Inducer로 사용되는 ecdysone 이나 murA가 상당히 비싸다는 단점이 있다고 할 수 있다.

### 3) Cre-loxP recombination system

Cre-loxP system을 이용한 siRNA expression의 조절은 최근 일본의 Taira 박사 팀에 의해 보고되었다. Cre-loxP system은 현재 reverse genetic tool로서 tissue-specific gene knock-out 실험에 많이 적용되고 있다. Cre recombinase는 bacteriophage P1에서 발견된 것으로 loxP site (13 bp)을 인식하여 두 loxP site 사이의 recombination을 유도하는 특성을 가진다. 지금까지 Cre-mediated recombination은 yeast, plant, mammalian cell과 transgenic mouse에서도 성공적으로 이루어지고 있다. 그러나, 기존의 Cre-loxP system은 Cre-upstream의 promoter에 따라 tissue-specificity를 조절할 수 있지만, reversible, time-dependent한 조절은 사실상 불가능했다. 최근 보고에 의하면, Cre recombinase에 TAT와 nuclear localization signal (NLS) peptide를 fusion 시킨 hybrid protein (TAT-NLS-Cre)이 medium에서 cell membrane을 통과하여 cell nuclear로 이동하는 것이 가능하다고 알려졌다. TAT는 HIV에서 유래한 11개의 amino acid로 구성된 arginine-rich peptide로 다양한 cell type의 membrane을 통과하는데 필수적인 역할을 한다. 이러한 recombinant TAT-NLS-Cre recombinase는 siRNA expression의 inducer로 작용하며, medium에 처리 한지 1시간 후면, nuclear fraction에서 발견된다. 또한, cell 내에서 loxP site를 인식, recombination을 유도할 수 있는 catalytic activity를 그대로 보유한다고 보고되었다.

Taira 박사팀은 siRNA expression을 위해, 앞에 언급한 그룹들과는 달리, U6 promoter에 직접적인 modification을 가하지는 않았다. 대신 U6 promoter downstream에 위치한 sense, anti-sense shRNA oligomer 사이에 두 개의 loxP site를 포함하는 linker fragment를 삽입하였다 (pGL3BCre-on). 두 개의 loxP site 사이에는 TTTT transcription stop signal이 존재하며, 809 bp의 linker region이 shRNA coding sequence의 transcription을 억제하게 된다. 그러므로 Cre recombinase가 없는 상태에서는 single sense strand만 transcription 되어 RNAi를 유도하지 못하게 된다. 그러나, bacteria에서 purification된 TAT-NLS-Cre recombinase를 처리하게 되면, Cre recombinase가 작용하여 transcription을 방해하는 linker region이 제거되고, loxP site를 hairpin loop로 하는 shRNA가 발현하게 되게 된다. 그러나, 발현된 shRNA의 hairpin loop가 보통의 9 nt가 아닌 34 bp이기 때문에, plasmid concentration이 낮으면 좋은 siRNA effect를 볼 수가 없으며 TAT-NLS-Cre가 충분하지 않으면 100% loxP site의 recombination이 안 일어날 수 있다는 단점이 있다. 또한, Cre-loxP recombination을 이용한 siRNA expression system은 *in vitro*에서는 TAT-NLS-Cre recombinase가 cell membrane을 통과할 수 있는지가 중요하기 때문에 cell type에 따른 변수가 존재할 수 있다. *in vivo* model system에서는 여전히 tissue-specificity만을 가지기 때문에, Cre recombinase를 inducible 하게 발현하기 위해 다른 inducible system을 이용해야 한다.

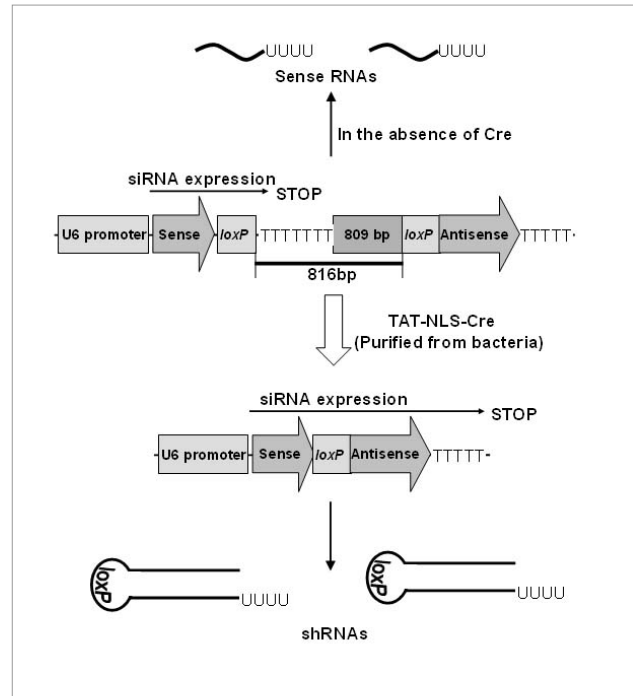


Fig.5 siRNA expression using Cre-loxP recombination system (Kasim *et al.*, 2003)

### 지금까지의 문제점과 활용 전망

지금까지 연구, 개발되어 보고된 tetracycline inducible system, ecdysone inducible system과 Cre-loxP recombination system들 외에도 tet-on inducible system이나 lac-operon을 이용한 inducible siRNA expression system등 다양한 형태의 inducible system이 본 연구자의 실험실을 비롯한 여러 그룹에서 시도되고 있다. Inducible siRNA expression system은 기존에 존재하던 tet-inducible system이나 ecdysone inducible system과 같이 원하는 시간대와 특정 조직에서 임의적으로 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있는 inducible system을 이용함으로써, differentiation, survival 또는 cell cycle regulation 등에 관여하는 연구에 있어서 보다 정확한 gene-function 연구를 가능하게 한다. 또한 inducer의 treatment-dosage를 조절함으로써 target gene에 대한 partial suppression을 유도 가능하다는 장점도 갖고 있다. 따라서, partial suppression으로 인한 phenotype을 통해 보다 정밀한 gene-function의 연구도 가능해진 것이다. 최근 viral vector를 이용한 siRNA의 발현에 의한 target gene의 down-regulation이 mouse를 이용한 *in vivo*에서도 적용될 수 있다는 보고들로 보아 inducible siRNA expression system도 *in vivo*에서도 적용이 가능할 것이라고 생각한다.

실제로 inducible siRNA expression system을 적용한 실험은 주로 stable cell line을 이용한다. 이것은 inducible siRNA expression을 위해서는 적어도 2개 이상의 vector를 이용하고, siRNA induction에 필요한 hybrid protein들이 충분히 발현되어야 하는 inducible system의 특성상, transient transfection만으로는 좋은 결과를 얻는 것이 어렵기 때문이다. 실제로 최근에 발표된 inducible vector system의 plasmid들을 얻어서 본 연구 책임자의 실험실에서 transient transfection에 의한 target gene의

표1) web sites for siRNA design

Site	URL
Ambion's siRNA Target Finder	<a href="http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html">http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html</a>
Cold Spring Harbor's RNAi Oligo Retriever	<a href="http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/">http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi/</a>
Dharmacon's siDesign Center	<a href="http://www.dharmacon.com/">http://www.dharmacon.com/</a>
Qiagen's siRNA Target Sequence Design	<a href="http://www.qiagen.com/jp/siRNA/sirna_design.asp">http://www.qiagen.com/jp/siRNA/sirna_design.asp</a>
Sirna's Emboss	<a href="http://www.biobase.dk/embosdocs/sirna.html">http://www.biobase.dk/embosdocs/sirna.html</a>
Tuschl Laboratory siRNA User Guide	<a href="http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html">http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html</a>
The Whitehead RNAi Selection Program	<a href="http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAext/">http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAext/</a>
Oligoengine's RNAi software	<a href="http://www.oligoengine.com/index.html">http://www.oligoengine.com/index.html</a>

inducible down-regulation의 실험 결과는 만족스럽지 못하였다. 또한, siRNA에 의한 gene-silencing은 mRNA level의 inhibition이기 때문에 mRNA 또는 protein의 양이 abundant하거나 stable한 protein을 발현하는 gene을 target으로 할 때에는 그 effect를 보기가 어려울 수도 있다는 점등을 고려할 때, 아직 siRNA의 inducible expression은 보편화 되기에는 상당히 많은 개선이 필요하다고 생각된다.

siRNA를 이용한 실험에서 있어서, 당면하는 어려움 중의 하나는 siRNA sequence의 선정이다. *in vitro* transcription에 의해 합성된 long dsRNA를 Dicer와 같은 RNase III-like enzyme을 통해 절단하여 사용하는 방법을 제외하고는 target mRNA에 대한 siRNA sequence를 결정하여 oligonucleotides를 design 해야 한다. siRNA를 이용한 target gene-silencing은 knock-out이 아닌 knock-down으로써 target mRNA의 어느 부분을 선정 하느냐에 따라 effect가 달라질 수 있기 때문에 siRNA sequence의 선정은 실험의 성공을 좌우하는 중요한 과정이다. 현재, RNA secondary structure나 GC contents 등을 고려한 알고리즘이 개발되어 web site를 통해 서비스 되고 있다 (표1). 따라서, 연구하고자 하는 유전자의 sequence를 여러 곳의 알고리즘을 사용하여 분석하고 공통적으로 선정된 sequence를 기준으로 oligonucleotides를 제작하여 expression vector에 cloning하는 것이 적중 효율을 높일 수 있는 한가지 방법이라고 여겨진다.

micro RNA (miRNA)나 siRNA와 같은 small RNA molecule 들이 다양한 생물학적 과정에서 유전자 발현 조절에 관여한다는 사실이 최근 밝혀짐으로써, 생체 내에서 이들 small RNA molecule의 형성 및 조절 기전에 관한 연구는 엄청난 경쟁 속에서 진행되리라고 생각된다. 이러한 연구와 병행하여 효율적인 inducible siRNA expression vector system 및 *in vivo*에서의 적용을 위한 delivery system의 개발은 더욱더 진전 되어서 생물학적인 연구의 tool로서 뿐만 아니라, gene therapy의 효율적인 방법으로 사용될 것이라고 예상된다.

참고 문헌

(1) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**: 550-3.  
 (2) Cullen BR. (2002) RNA interference: antiviral defense and genetic

tool. *Nat Immunol.*, **3**:597-9.

(3) Czauderna F, Santel A, Hinz M, Fechtner M, Durieux B, Fisch G, Leenders F, Arnold W, Giese K, Klippel A, Kaufmann J. (2003) Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res.*, **31**: e127.  
 (4) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**: 494-8.  
 (5) Gossen M, Bujard H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci.*, **89**:5547-51  
 (6) Hannon GJ. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**:244-51.  
 (7) Howard K. (2003) Unlocking the money-making potential of RNAi. *Nat Biotechnol.*, **21**:1441-6.  
 (8) Kasim V, Miyagishi M, Taira K. (2003) Control of siRNA expression utilizing Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res.*, **3**:255-6.  
 (9) Kunkel GR, Hixson JD. (1998) The distal elements, OCT and SPH, stimulate the formation of preinitiation complexes on a human U6 snRNA gene promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **26**:1536-43.  
 (10) Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V. (2004) Inducible, reversible, and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **101**:1927-32.  
 (11) McManus MT, Sharp PA. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.*, **3**:737-47.  
 (12) Matsukura S, Jones PA, Takai D. (2003) Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res.*, **31**:e77.  
 (13) Myslinski E, Ame JC, Krol A, Carbon P. (2001) An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.*, **29**:2502-9  
 (14) No D, Yao TP, Evans RM. (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.*, **93**:3346-51.  
 (15) Ohkawa J, Taira K. (2000) Control of the functional activity of an

- antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum Gene Ther.*, **11**:577-85.
- (16) Van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H. (2003) Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* **4**:609-15.
- (17) Wiznerowicz M, Trono D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol.*, **77**:8957-61
- (18) Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **99**:6047-52.


**조 한길 (johangil@hanmail.net)**

서울 시립 대학교 생명과학과 석사 후 연구원

 1994. 3 ~ 2002. 2  
 2002. 3 ~ 2004. 2

 서울시립대학교 생명과학과 학사  
 서울시립대학교 생명과학과 석사

**조 익훈 (ej70@uos.ac.kr)**

서울 시립 대학교 생명과학과 조교수

 1990 ~ 1995  
 1995.11 ~ 1997.02  
 1997.03 ~ 2000.12  
 2001.09 ~ 현재

 Michigan State University (E. Lansing) Ph.D.  
 동물학과  
 SUNY at Stony Brook Post-doctoral  
 Research Scientist  
 Columbia University (New York)  
 Associate Research Scientist  
 서울시립대학교 생명과학과 조교수