啓明醫大學術誌 第22券 1號
Keimyung Med J
Vol. 22, No. 1, June, 2003

HIV-1 성장억제제 발굴을 위한 영구 세포주 개발

계명대학교 의과대학 의학유전공학교실

박종구

Development of Permanent Cell Lines for HIV-1 Tat Inhibitor Screening

Jong-Gu Park, Ph.D.

Department of Medical Genetic Engineering,
Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Abstract : Among potential genetic targets for intervention of HIV-1 replication, the *tat* gene product is a key target. In this study, two permanent cell lines, HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1, have been developed for screening of Tat inhibitors. pcDNA3-LT1 and pcDNA3-LT2 plasmids that contain the firefly luciferase and HIV-1 *tat* genes were constructed to this end. The luciferase reporter gene is under the control of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) and the HIV-1 *tat* gene is expressed constitutively from the cytomegalovirus (CMV) promoter. These plasmids were stably transfected into HeLa and CCRF-CEM cell lines and maintained under stable selection. G418-selected cell lines were assayed for luciferase activity, identified by polymerase chain reaction (PCR), and further analyzed for expression of the HIV-1 *tat* gene by RT-PCR. The inhibitory activity of Tat inhibitors is assessed by measuring suppressed expression of the luciferase gene. This *in vitro* assay system can be a useful tool for screening of new Tat inhibitors such as *tat* antisense and TAR decoy.

Key words : HIV-1, Permanent cell line, Tat inhibitor

서 론

Human immunodeficiency virus type-1(HIV-1)은 lentivirus의 대표 종으로 약 9.2 kb인 두개의 동일한 단가닥 RNA 유전자로 구성되어 있는 AIDS의 원인 병원체이다[1]. 다양한 길이의 mRNA로부터 바이러스 증식에 필수적인 단백질(Gag, Pol, Env)과 적어도 6개의 조절 단백질(Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu, Nef)이 발현된다[2]. HIV-1의 복제는 주로 바이러스에서 발현되는 Tat와 세포 내 전사요소인 nuclear factor-κB(NF-κB)에 의해 조절된다. AIDS 바이러스에 감염된 세포가 다양한 외부 신호에 의해 자극되면 NF-κB가 활성화되면서 바이러스 유전자의 발현을 유도하게 된다[3-5]. 이때 Tat가 발현되면서 급격한 바이러스 생산이 시작되어 $CD4^+$ T- 세포를 죽이게 된다.

Tat는 모든 알려진 lentivirus에 존재하고, 전사 초기에 RNA에 결합하는 단백질로서 바이러스 증식에 절대적으로 필요하다[6]. HIV-1 Tat는 86개의 아미노산으로 이루어져 있으며 두 개의 엑손으로부터 만들어진다. 이 중에 첫 번째 엑손으로부터 코딩되는 72개의 아미노산이 전체 trans-activation 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[7]. Tat의 작용은 바이러스 RNA의 5' 말단에 있는 trans-activation response element(TAR)를 필요로 한다[8]. TAR은 59개의 nucleotide RNA로 되어있으며 stem-loop 구조를 하고 있다. TAR은 HIV-1 core promoter element에 속하는 Sp1 결합 부위, TATA box 부위들과 함께 바이러스 mRNA의 기본적인 전사 조절 기능을 가진다[9]. TAR의 2차 구조 부위는 Tat과 결합할 수 있음이 *in vivo* [10-12]와 *in vitro*[9] 연구에서 확인되었다. 따라서 Tat나 TAR가 없는 HIV-1은 효과적으로 복제를 할 수 없어서 $CD4^+$ T-세포를 파괴하지 못하게 된다. 이를 고려해 볼 때 Tat 단백질의 효과적인 저해는 AIDS 치료제 개발에 중요한 목표가 된다.

현재까지 HIV-1 바이러스 생성을 억제하기 위해 Tat-TAR 상호작용의 저해가 다양하게 시도되었다. 한 예는 Tat 단백질이 TAR 자리에 효과적으로 잘 결합하지 못하도록 TAR decoy[13-15] 또는 Tat 단백질의 유사체를 사용하여 Tat의 결합력을 경쟁적으로 저해하는 방법이다[16,17]. 또 다른 방법으로는 antisense를 이용하여 *tat*나 *tar* 유전자가 발현되지 못하도록 하는 것이다[18]. 이러한 저해제를 찾기 위해서는 *in vitro* 분석시스템이 필요하다. 지금까지 사용되고 있는 세포주는 *tat* 유전자를 따로 세포 내로 도입해야하는 불편함이 있거나 분석이 민감하지 못하다는 단점을 가지고 있다[19]. 또한 현재까지 여러 가지 Tat 저해제를 찾았지만 좁은 치료범위와 세포독성 등의 이유로 임상에 적용되고 있는 약물은 없는 실정이다.

이 실험에서는 여러 가지 단점들을 보완하여 *in vitro*에서 Tat 단백질의 저해제를 효과적으로 탐색할 수 있는 새로운 세포주의 개발을 목적으로 하였다. 이들 세포주는 *tat*과 *tar* 유전자를 모두 가지고 있고, TAR 부분을 포함하고 있는 long terminal repeat(LTR) 말단에 luciferase 유전자를 연결하여 빠르고 정확하게 tat-tar 상호작용의 저해를 조사하는데 사용할 수 있다.

재료 및 방법

1. 세포주 배양

자궁경부암 세포주인 HeLa와 $CD4^+$ T-세포주인 CCRF-CEM은 각각 가온 처리한 fetal bovine serum(FBS, JBI사, 한국)을 10% 포함한 DMEM과 RPMI1640(JBI사, 한국) 배양액으로 37℃에서 5% 농도의 CO_2 배양기(Forma Scientific사, 미국)에서 배양하였다. Geneticin G418(Life Technologies사, 미국)으로 선별한 세포주는 G418을 500 g/mL 농도로 배양액에 첨가해서 배양하였다.

2. 플라스미드 제작

먼저 LTR-1과 LTR-2 primers(Table 1)를 이용하여 pHXBc2-pBR322로부터 HIV-1의 LTR 부분을 증폭하여 pBS-SK(+)에 클로닝(pBS-SK(+)-LTR)하고, pBS-SK(+)-LTR의 LTR 부분을 pGEM-*luc*벡터에 다시 클로닝(pGEM-*luc*-LTR)하였다. 또한 pBS-SK(+)에 먼저 클로닝 되어 있는 TKpA 부위를 pGEM-*luc*-LTR 벡터에 클로닝(pGEM-*luc*-LTR-TKpA)하였다. 한편 pGEX-2T-TAT72의 TAT72 부분을 pcDNA3 벡터에 클로닝(pcDNA3-TAT72)하였다. 끝으로 pGEM-*luc*-LTR-TKpA 벡터를 *Pst*Ⅰ과 *Sal*Ⅰ으로 절단한 후 LTR-*luc*-TKpA 부분을 pcDNA3-TAT72 벡터를 *Bgl*Ⅱ로 절단한 벡터에 클로닝(pcDNA3-LT1 또는 pcDNA3-LT2)하였다.

3. Transfection

앞에서 제작한 플라스미드가 세포 내에서 바르게 발현하여 luciferase를 만들어 내는지 확인하기 위하여 transfection을 실시하였다. HeLa세포를 transfection 하기 하루 전에 24-well plate의 well 당 7×10^4개씩의 세포를 분주하였다. Transfection은 양이온 liposomes(Lipofectamine Plus Reagent, Life Technologies사, 미국)을 이용하였고, 제작자가 제시한 방법에 따라 수행하였다. luciferase 활성을 분석하기 까지 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

4. 영구적인 세포주 개발

HeLa세포를 transfection 하기 하루 전에 12-well plate의 한 well 당 1×10^5개씩 분주하였다. CCRF-CEM세포는 24-well plate의 한 well 당 2.5×10^5 개씩 분주하였다. Transfection은 cationic liposomes을 이용하여 수행하였다. 다음 날 transfection 한 HeLa 세포를 10 cm dish로 옮기고, 2일 후부터 G418이 500 g/mL 농도로 들어있는 DMEM배양액으로 배양하였다. 일주일에 두 번씩 배양액을 교체해 주면서 2주 동안 배양하였다. 이 때 영구적으로 플라스미드 DNA가 세포 내로 도입된 세포는 G418에 대한 저항성을 나타내며 세포 군집을 형성하였다. 세포 군집을 각각 떼어내어 24-well plate로 옮기고, 세포가 well에 90% 정도 자라면 24-well plate에 2개로 나누어 키운 후, 그 중 하나만 luciferase 활성을 조사하였다. CCRF-CEM세포는 10 cm dish로 옮긴 후 일주일에 두 번씩 subculture를 하였고, 3주 후에 luciferase 활성을 조사하였다. Luciferase 활성 분석은 relative light units(RLU)를 luciferase assay system kit(Promega사, 미국)을 사용하여 제작자가 제시한 방법에 따라 수행하였다. 상대적으로 높은 luciferase 활성을 나타내는 세포를 HeLa세포와 CCRF-CEM세포에

Table 1. Nucleotide sequences of primers for polymerase chain reactions

Primer1	Sequence
LTR*-1 (sense)	5' TGGAAGGGCTAATTCACTCC 3'
LTR-2 (antisense)	5' CCCTGTTCGGGCGCCACTGCT 3'
Tat-1 (sense)	5' ATGGAGCCAGTAGATCCTAG 3'
Tat-2 (antisense)	5' ACTTGATGAGTCTGACTGCC 3'

*LTR: long terminal repeat.

서 각각 하나씩 선별하였다.

5. 중합효소 연쇄반응(PCR)

Transfection 후에 선별된 세포의 지놈에 플라스미드 DNA가 도입되어 있는지 확인하기 위하여 선별한 HeLa세포와 CCRF-CEM세포(이하 HeLa-LT2, CCRF-CEM-LT1이라 함)의 genomic DNA를 분리하였다. 세포를 차가운 PBS로 두 번 씻어낸 후에 digestion buffer{100 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% (w/v) SDS, 0.1 mg/mL proteinase K} 1 mL을 첨가한 후 16시간 동안 반응시켰다. 그 후 페놀과 클로로포름으로 각각 한번씩 정제 추출하였다. 중합효소 연쇄반응은 PCR kit(Neurotics사,한국)과 thermal cycler(PTC-100™, MJ Research사,미국)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 30초, 57℃에서 40초, 72℃, 1분간의 DNA 합성과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 genomic DNA 내의 *tat* 유전자 존재여부를 확인하였다.

6.역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

전체 RNA는 Tri-Reagent(Molecular Research Center, USA)를 이용하여 분리하였고, 분리된 RNA는 RNase-free DNase I(5 units/μL, Takara Shuzo사., 일본) 1 μL로 37℃에서 10분간 반응시킨 후 페놀과 클로로포름으로 추출하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응은 RT-PCR kit(Promega사, 미국)과 thermal cycler를 이용하여 수행하였다. cDNA 합성은 48℃에서 45분간 수행하였고, PCR 반응은 94℃에서 30초, 57℃에서 1분, 68℃ 2분간의 DNA 합성과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 *tat* mRNA의 존재여부를 확인하였다.

성 적

1. 플라스미드 제작 및 세포 내 발현 확인

LTR의 TAR RNA와 Tat 단백질의 상호작용을 저해하는 저해제를 탐색하기 위한 세포주를 개발하기 위해 LTR과 *tat* 유전자를 둘 다 포함하는 플라스미드를 제작하였다. pGEM-*luc*-LTR-TKpA벡터의 LTR-*luc*-TKpA 부분을 pcDNA3-TAT72벡터에 클로닝한 결과 pcDNA3-LT1과 pcDNA3-LT2의 두 가지 형태의 플라스미드를 제작하였다(Fig. 1).

제작한 플라스미드를 제한 효소와 DNA sequencing으로 확인한 후, 세포 내에서 정상적으로 *tat* 유전자를 발현하는지 조사하기 위해 HeLa 세포에서 일시적 transfection을 수행하였다. *tat* 유전자를 포함하고 있지 않는 플라스미드(pGEM-*luc*-LTR-TKpA)에 비해 *tat* 유전자를 포함하는 pcDNA3-LT1과 pcDNA3-LT2의 경우 각각 7배와 12배 높은 luciferase 활성을 나타내었다. 즉, *tat* 유전자가 발현되어 LTR의 TAR 부위에 결합함으로 luciferase 유전자의 발현이 증가한 것을 관찰하였다. 이러한 결과로서, 제작된 플라스미드에서 Tat 단백질이 세포 내에서 정상적으로 발현되며 TAR sequence에 결합함을 알 수 있었다(Fig. 2).

2. HeLa-LT2와 CCRF-CEM-LT1 세포주 개발

다음 단계로 세포 내에서 정상적으로 발현이 확인된 두 종류의 플라스미드를 세포 내에서 영구적으로 발현하도록 하기 위한 transfection을 수행하였다. HeLa 세포의 경우는 transfection 이후 일주일 정도 지나서 G418 저항 세포 군집이 나타나기 시작했다. 2주 후에 세포 클론을 24-well plate에 옮기고, 일주일 동안 더 키운 후에 luciferase 활성을 조사하였다. CCRF-CEM 세포의 경우는 3주 동안 계속 subculture 해 줌으

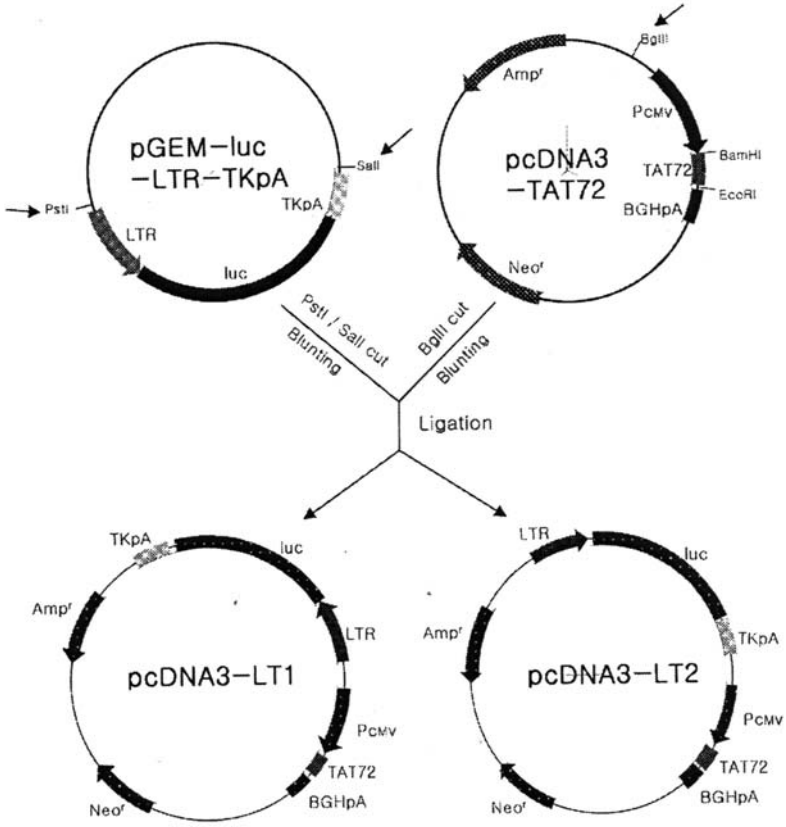

Fig. 1. Schematic diagram for the construction of pcDNA3-LT1 and pcDNA3-LT2. The LTR region amplified by polymerase chain reaction (PCR) was subcloned at the 5' end of the luciferase reporter gene in the pGEM-*luc* vector. The TKpA region was inserted at the 3' end of the luciferase gene. The HIV-1 *tat* gene from pGEX-2T-TAT72 plasmid was subcloned into the pcDNA3 plasmid. The pGEM-*luc*-LTR-TKpA was digested with *Pst* Ⅰ and *Sal* Ⅰ and blunted. The LTR-*luc*-TKpA expression cassette was subcloned into the pcDNA3-TAT72.

로 G418에 대해 저항성이 있는 세포만 남도록 하였다. 여러 개의 세포 클론 중에서 luciferase 활성을 높게 나타내는 세포를 선별하였다. HeLa 세포의 경우 pcDNA3-LT2로 transfection한 세포주(HeLa-LT2)에서 지속적으로 높은 luciferase 활성을 나타내었고, CCRF-CEM세포는 pcDNA3-LT1으로 transfection한 세포주(CCRF-CEM-LT1)에서 높은 luciferase 활성을 나타내었다. 그리고, CCRF-CEM-LT1세포주가 HeLa-LT2세포주보다 일반적으로 약 2배 정도 더 높은 luciferase 활성을 나타내었다 (Fig. 3).

3. HeLa-LT2와 CCRF-CEM-LT1 세포주 확인

Luciferase 활성을 조사하여 선별한 각각의 세포주가 정상적으로 만들어 졌는지 확인하기 위해 DNA와 RNA를 분리하여 조사하였다. 각 세포에서 genomic DNA를 분리하여 PCR로 확인한 결과 HeLa와 CCRF-CEM 세포의 DNA에서는 나타나지 않는 200 bp 크기의 *tat* DNA 띠가

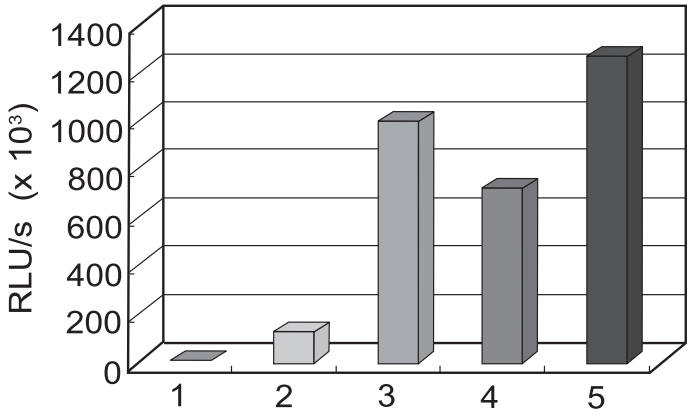

Fig. 2. Luciferase activity from HeLa cells transfected with different plasmids. Lane 1: HeLa cells without transfection were used as a negative control, lane 2: cells were transiently transfected with pGEM-*luc*-LTR-TKpA, lane 3: pGEM-*luc*-LTR-TKpA + pcDNA3-TAT72, lane 4: pcDNA3-LT1, and lane 5: pcDNA3-LT2. The transfectants were assayed for luciferase activity 24 hr post transfection, and values are represented as relative light units (RLU).

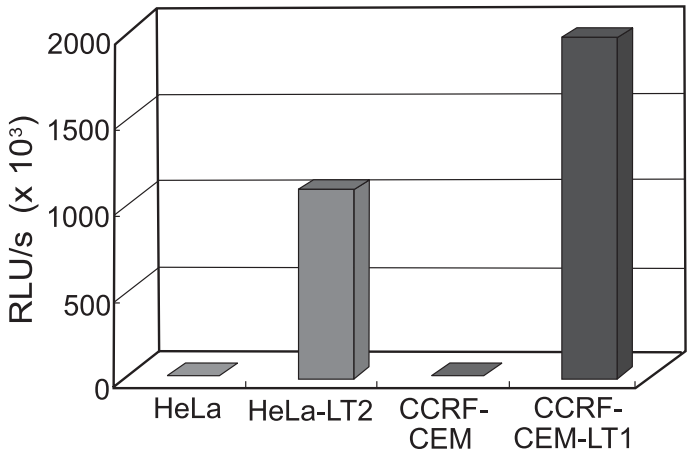

Fig. 3. Luciferase activity in HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1 cells. HeLa or CCRF-CEM cells without transfection (denoted as HeLa or CCRF-CEM) were assayed for luciferase activity as negative controls. Cells with transfection and G418 selection (denoted as HeLa-LT2 or CCRF-CEM-LT1) were assayed for luciferase activity, and values are represented as relative light units (RLU).

HeLa-LT2와 CCRF-CEM-LT1 세포의 DNA에서 확인되었다. 한편 두 종류의 플라스미드 DNA에서도 동일한 크기의 *tat* 띠를 볼 수 있었다(Fig. 4). 따라서 외부에서 세포 내로 도입한 pcDNA3-LT2 또는 pcDNA3-LT1 플라스미드가 HeLa와 CCRF-CEM 세포의 게놈에 안정적

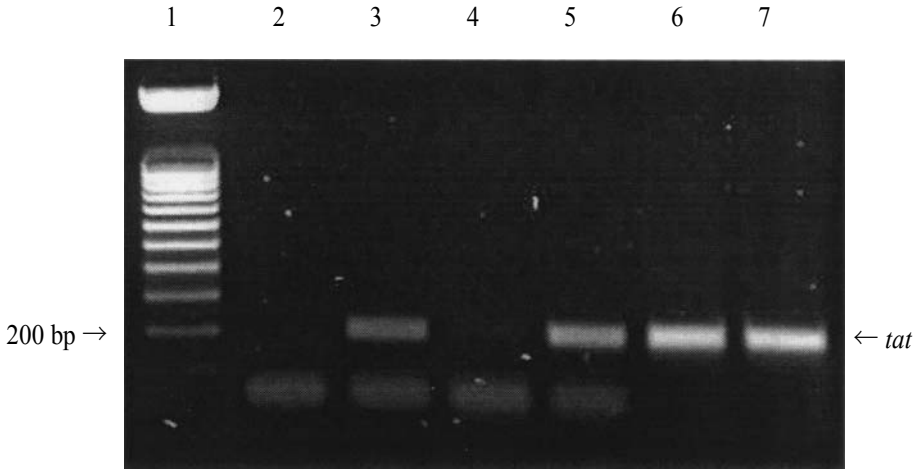

Fig. 4. PCR analysis of the HIV-1 *tat* gene in HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1 cells. The HIV-1 *tat* gene in genomic DNA extracted from HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1 cells was detected by PCR amplification of 200 bp fragments. Genomic DNA from HeLa and CCRF-CEM cells were processed as negative controls. Two different Plasmid DNA containing the *tat* gene were processed as positive controls. Lane 1: size marker (100 bp ladder), lane 2: HeLa, lane 3: HeLa-LT2, lane 4: CCRF-CEM, lane 5: CCRF-CEM-LT1, lane 6: pcDNA3-LT1, lane 7: pcDNA3-LT2.

으로 위치하고 있음을 확인하였다.

또한 이렇게 들어간 유전자가 mRNA로 전사가 일어나는지 확인하기 위해 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과 HeLa세포와 CCRF-CEM세포의 RNA에서는 나타나지 않는 200 bp 크기의 *tat* 띠가 HeLa-LT2와 CCRF-CEM-LT1의 RNA에서 확인되었다 (Fig. 5). 즉 genome 상의 *tat* 유전자에서 정상적으로 전사가 일어남을 확인하였다.

고 찰

현재 AIDS 치료에 사용되고 있는 AZT, ddI, D4T와 같은 약물은 모두 HIV-1 역전사 효소의 저해제이다. 이러한 역전사 효소 저해제는 HIV 감염의 초기에는 효과적이지만 후기에는 별 효과가 없는 것으로 알려져 있다. 하지만 역전사 효소 저해제와는 다르게 Tat 저해제는 급성과 만성 감염상태에서 모두 HIV-1 복제를 저해하는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 Tat 저해를 이용한 효율적 치료제 개발이 이루어지지 않았다. 따라서 이 실험에서는 Tat 저해제 개발을 위해 효율적 분석을 가능하게 할 세포주를 개발하고자 하였다.

Promoter의 방향이 다른 두 가지 종류의 플라스미드를 세포 내로 도입하여 luciferase 유전자의 발현 정도를 살펴 본 결과 pcDNA3-LT2가 더 높은 수준의 유전자 발현을(luciferase 활성) 나타내었다. 이는 하나의 벡터에 두개의 유전자 발현 cassettes가 있고 두개의 promoters 방향이 같을 경우에는 서로 영향을 주어서 보강효과를 나타내는 것으로 보인다. 이 실험에서는 강력한 CMV promoter가 LTR에 영향을 주어 pcDNA3-LT2의 luciferase 활성이 향상된 것으로 추측된다. 또한 pcDNA3-LT1 또는

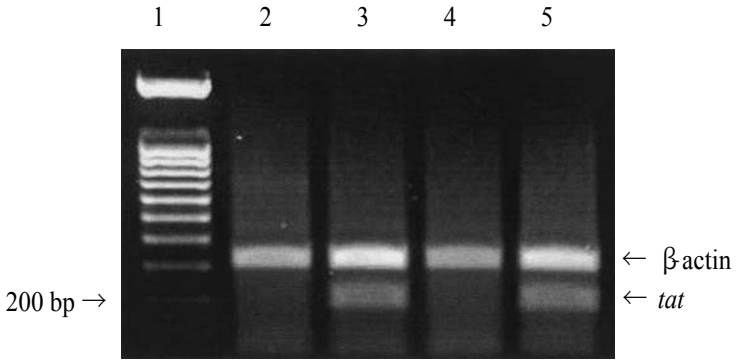

Fig. 5. RT-PCR analysis of HIV-1 *tat* gene expression in HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1 cells. HIV-1 *tat* mRNA extracted from HeLa-LT2 and CCRF-CEM-LT1 cells was detected by RT-PCR amplification of 200 bp cDNA fragments. mRNA from HeLa and CCRF-CEM cells were processed as negative controls. -Actin gene expression was used as an internal control. Lane 1: size marker (100 bp ladder); lane 2: HeLa; lane 3: HeLa-LT2; lane 4: CCRF-CEM; lane 5: CCRF-CEM-LT1.

pcDNA3-LT2를 HeLa 세포 내로 도입했을 때 pGEM-luc-LTR-TKpA에 비해 각각 7배와 12배 높은 luciferase 활성을 나타내었다. 실제로 *in vivo*에서 HIV-1 전사는 Tat가 없을 때보다 존재할 때에 100배 이상 더 높게 나타나는 것으로 보고 되었다[6]. 이 실험에서 개발된 세포주에서 Tat가 상대적으로 낮은 비율로 유전자의 발현을 증가시킨 것은 사용한 세포가 HIV-1이 감염되지 않는 세포이고, HIV-1과는 상관이 없는 luciferase의 활성을 측정 한 것으로 설명할 수가 있다. 더불어 세포내에서 발현된 tat와 TAR sequence의 비율이 최적화 되지 않았을 수도 있을 것이다. 그럼에도 불구하고 10배 정도의 transactivation이 발생하였으므로 본연의 목적으로 Tat 저해제를 발굴하는 데는 유용하게 사용될 수 있다.

이 실험에서 개발된 두 세포주 중에서 CCRF-CEM-LT1이 pcDNA3-LT1 플라스미드를 가지고 있는데 pcDNA3-LT2 플라스미드를 갖고 있는 HeLa-LT2보다 더 높은 luciferase 활성을 나타내었다. 이것은 세포의 종류가 다르기 때문에 나타나는 현상으로 판단된다. 왜냐하면 LTR의 전사조절에 관여하는 단백질이 Tat 이외에도 NF-κB와 cyclin dependent kinase 9(Cdk9) 등을 포함한 여러 인자가 세포마다 다르게 존재하기 때문이다[20]. 따라서 HIV-1이 잘 들어가서 증식하기에 좋은 조건을 가지고 있는 CCRF-CEM 세포에서 LTR이 HeLa 세포에서보다 더 높은 전사 활성을 나타내는 것으로 추측된다. 이러한 사실을 종합할 때 Tat 단백질만을 저해해서는 AIDS 바이러스의 증식을 완전하게 억제하기에 부족할 수 있다는 것이다. 하지만 이 세포주를 이용하여 일차적으로 저해제를 탐색하기에는 문제가 없을 것으로 보인다.

HeLa와 CCRF-CEM의 두 종류 세포를 사용한 것은 서로의 부족한 점을 보충해 주기 위한 목적이 있다. CCRF-CEM세포의 경우에는 liposomes을 이용하여 분자량이 큰 안티센스 계통의 핵산을 세포 내로 도입하는데 어려움이 따른다. 따라서 이때는 HeLa세포를 사용함으로 transfection을 효과적으로 수행할 수 있을 것이라 생각된다. HeLa세포가 transfection 할 때 상당한 장점을 가지고 있는 반면에 생체 내에서는 HIV-1에 의해 감염이 되지 않으므로 Tat 저해제

를 탐색할 때에 세포 내 다른 조절인자의 영향이 배제될 수 있는 약점을 지니고 있다. 따라서 두 세포주를 사용하여 서로의 단점을 보완해 줄 때 효과적으로 Tat 저해제를 탐색할 수 있을 것으로 판단된다. 리포터 유전자로 luciferase를 선택한 것은 민감성에 근거를 두고 있다. 일반적으로 luciferase를 이용한 분석에서는 picomolar 농도까지 감지가 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 이렇게 민감할 뿐만 아니라 분석하는데 시간이 적게 걸리고 정량적으로 결과를 볼 수 있다는 장점도 가지고 있다.

이 실험에서는 AIDS 바이러스의 복제에 가장 중요한 조절인자로 알려진 Tat 단백질의 저해제를 민감하게 정량적으로 탐색할 수 있는 *in vitro* 분석시스템이 HeLa세포와 CCRF-CEM세포에서 개발되었다. Tat 저해제의 활성은 luciferase의 발현이 감소됨을 살펴봄으로서 쉽게 알 수 있다. 이들 세포주는 *tat* 유전자뿐만 아니라 LTR도 함께 포함하고 있으므로 TAR decoy의 작용을 조사하는데도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

HIV-1의 전사조절에 가장 중요한 역할을 하는 단백질은 Tat이다. 이 실험에서는 이러한 Tat과 TAR의 상호작용을 억제하는 억제제를 효율적으로 찾기 위한 세포주인, Hela-LT2 와 CCRF-CEM-LT1을 개발하였다. 세포주 제작 목적으로 반딧불의 luciferase(*luc*)와 HIV-1의 *tat* 유전자를 함께 가지고 있는 pcDNA3-LT1 와 pcDNA3-LT2 플라스미드가 구축되었다. HIV-1 LTR의 3 쪽에는 리포터 유전자로 *luc*를 결합하여 분석을 용이하게 하였고, *tat* 유전자는 CMV promoter에 의해 계속적으로 발현되게 하였다. 이렇게 제작된 플라스미드는 HeLa세포와 CCRF-CEM 세포에 도입된 후 영구세포(permanebt cell line) 구축을 위해 제한 배지에서 유지되었다. G418 처리에서 선별된 세포주는 luciferase 활성으로 분석되었고 추가적으로 genomic DNA와 RNA를 분리하여 각각 PCR과 RT-PCR을 수행하여 genomic DNA 상에 편입된 *tat* 유전자와 전사된 *tat* mRNA를 확인하였다. Tat 억제제의 활성은 억제제 처리 후 발현된 luciferase의 감소를 측정하는 방식으로 수행되었다. 개발된 세포주는 아주 민감하고 빠르게 Tat 저해제를 정량적으로 탐색할 수 있는 *in vitro* 분석 시스템이므로 Tat antisense와 TAR decoy를 이용한 실험 등에 사용될 수 있을 것이다

참 고 문 헌

1. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;**224**:497-500.
2. Kingsman SM, Kingsman AJ. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* 1996;**240**:491-507.
3. Cullen BR. Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell* 1993;**73**:417-20.
4. West MJ, Lowe AD, Karn J. Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J Virol* 2001;**75**:8524-37.
5. Pieper GM, Olds CL, Bub JD, Lindholm PF. Transfection of human endothelial cells with HIV-1 tat gene activates NF-kappa B and enhances monocyte adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**283**:H2315-21.
6. Fisher AG, Feinberg MB, Josephs SF, Harper ME, Mulselle LM, Reyes CT, *et al.* The trans-activator gene of HTLV-Ⅲ is essential for virus replication. *Nature* 1986;**320**:367-71.
7. Jeang KT, Xiao H, Rich EA. Multifaceted activities

of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat [Minireview]. *J Biol Chem* 1999;**274**:28837-40.

8. Okamoto T, Wong-Staal F. Demonstration of virus-specific transcriptional activator(s) in cells infected with HTLV-III by an *in vitro* cell-free system. *Cell* 1986;**47**:29-35.
9. Berkhout B, Jeang KT. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 1992 ;**66**:139-49.
10. Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type Ⅲ (HTLV-Ⅲ). *Science* 1985;**229**:69-73.
11. Cullen BR. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. *Cell* 1986;**46**:973-82.
12. Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J* 1989;**8**:765-78.
13. Michienzi A, Li S, Zaia JA, Rossi JJ. A nucleolar TAR decoy inhibitor of HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;**29**:14047-52.
14. Chang HK, Gendelman R, Lisziewicz J, Gallo RC, Ensoli B. Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. *Gene Ther* 1994;**1**:208-16.
15. Bohjanen PR, Colvin RA, Puttaraju M, Been MD, Garcia-Blanco MA. A small circular TAR RNA decoy specifically inhibits Tat-activated HIV-1 transcription. *Nucleic Acids Res* 1996;**24**:3733-8.
16. Cupelli LA, Hsu MC. The human immunodeficiency virus type 1 Tat antagonist, Ro 5-3335, predominantly inhibits transcription initiation from the viral promoter. *J Virol* 1995;**69**:2640-3.
17. Kashanchi F, Sadaie MR, Brady JN. Inhibition of HIV-1 transcription and virus replication using soluble Tat peptide analogs. *Virology* 1997;**227**:431-8.
18. Li Y, Starr SE, Lisziewicz J, Ho WZ. Inhibition of HIV-1 replication in chronically infected cell lines and peripheral blood mononuclear cells by retrovirus-mediated antitat gene transfer. *Gene Ther* 2000;**7**:321-8.
19. Spenlehauer C, Gordon CA, Trkola A, Moore JP. A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 2001;**280**:292-300.
20. Romano G, Kasten M, De Falco G, Micheli P, Khalili K, Giordano A. Regulatory functions of Cdk9 and of cyclin T1 in HIV tat transactivation pathway gene expression [Review]. *J Cell Biochem* 1999;**75**(3):357-68.