

*Tetrahymena thermophila*의 group I intron에 의한 trans-splicing 반응에 미치는 표적 RNA 구조의 영향분석

이 성 욱*

단국대학교 자연과학부 분자생물학과

표적 RNA의 구조가 *Tetrahymena thermophila*의 group I intron에 의한 trans-splicing 반응에 미치는 영향을 분석하기 위해 강력한 stem-loop 형태의 안정된 구조를 갖고 있는 표적 RNA를 제조한 후 이러한 RNA에서 group I intron ribozyme에 대한 최적 인지 부위를 검색하였다. RNA mapping 분석 방법을 이용한 결과 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 stem 부위의 염기들에 반해 loop 부위의 염기들이 ribozyme에 의해 잘 인지되었으며 이러한 결과는 그러한 부위들을 인지할 수 있는 ribozyme들에 의한 trans-cleavage 그리고 trans-splicing 반응을 수행함으로써 검증하였다. 또한 이러한 trans-splicing 반응은 정확하게 일어남을 반응 산물의 염기서열 결정을 통해 확인하였다. 따라서 표적 RNA의 구조가 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 ribozyme 활성화에 매우 중요한 요인임을 확인하였다.

Key words □ gene therapy, group I intron, ribozyme, trans-splicing

*Tetrahymena thermophila*의 precursor ribosomal RNA(rRNA)에는 group I에 속하는 intron이 존재하는데 이러한 group I intron은 단백질의 도움 없이 자기 자신을 self-splicing 할 수 있는 ribozyme의 활성을 갖고 있다(7). 이러한 활성은 두 번의 연속적인 trans-esterification 반응을 통해 이루어지는데 우선 intron에 결합된 guanosine이 5' splice site에 존재하는 phosphodiester 결합을 공격하여 절단한 후 절단된 5' exon에 3' exon이 결합됨으로써 수행된다(2). 또한 이러한 group I intron ribozyme은 self-splicing 반응 이외에도 실험관 내에서 자기 자신의 3' 끝에 부착되어 있는 exon RNA를 trans하게 존재하는 5' exon을 표적으로 한 후 부착시킴으로써 두 별도로 존재하는 전사체를 서로 연결시킬 수 있는 trans-splicing 반응을 유발할 수 있다(1). 더욱이 최근에 group I intron ribozyme에 의한 trans-splicing 반응이 *Escherichia coli*에서도 유발될 수 있어서 truncate된 lacZ 전사체가 보정될 수 있음이 보고되었다(14). 또한 포유류 세포 내에서도 group I intron ribozyme이 매우 높은 정확성을 갖고 trans-splicing 반응을 통해 두 유전자 전사체를 연결시킬 수 있다고 보고되었다(5). 이러한 결과는 곧 group I intron을 기조로 한 ribozyme이 인체의 세포 내에서 여러 질병에 관여하는 RNA message를 변형, 보정시킬 수 있고 따라서 이러한 ribozyme을 이용하여 RNA 변형 또는 보정을 기조로 한 유전자 치료방법을 개발할 수 있음을 시사한다. 실제로 최근에 group I intron을 기조로 한 ribozyme이 포유류 세포 내에 있는 myotonic dystrophy protein kinase 유전자 전사체를 변형할 수 있다고 보고되었고(11) 또한 겸상 적혈구 빈혈증이라는 유전질환 환자의 erythrocyte precursor 세포 내에서 그 질

병의 유발에 관여하는 β -globin 유전자 전사체를 그 전사체의 특정 부위를 인지 후 trans-splicing 반응을 통하여 anti-sickling 단백질인 γ -globin 전사체로 전환할 수 있다고 보고되었다(8).

그러나 이와 같이 trans-splicing 반응을 유발할 수 있는 group I intron ribozyme과 또는 human immunodeficiency virus(HIV)의 복제를 억제하기 위하여 고안된 HIV RNA들을 trans-cleavage 반응을 통해 절단할 수 있는 hammerhead ribozyme 등(16)이 실제 임상적으로 효과를 보기 위해선 환자 세포 내에서 그 표적 RNA들이 효과적으로 ribozyme에 의해 인지되어야 할 것이다. 이러한 표적 RNA에서의 ribozyme에 대한 인지부위는 주로 표적 RNA의 2차, 3차 구조에 의해 결정될 것이다. 이러한 RNA의 2차 구조의 예측은 computer를 이용하여 분석할 수 있겠으나(9) 실제 *in vivo* 내에서의 구조를 예측하기에는 한계가 있다. 따라서 *in vivo*에서 표적 RNA의 ribozyme에 대한 최적 인지 부위를 탐색할 수 있는 방법이 필요할 것이다. 위에서 설명한 group I intron에 의한 trans-splicing 방법을 통하면 *in vivo* 내에서도 안정된 ribozyme 반응 산물들을 추적 가능(5, 6)하기에 이러한 방법 개발을 도모할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 표적 RNA의 2차 구조가 *in vitro* 및 *in vivo*에서 ribozyme의 활성화에 과연 어떠한 영향을 끼치는지 알기 위해 그 구조가 강력한 stem-loop을 이루어 매우 안정된 형태를 띠고 있는 표적 RNA를 인위적으로 제작한 뒤 그러한 표적 RNA에 대한 ribozyme의 인지도 즉 활성을 위에서 설명한 trans-splicing 반응을 통하여 검색하였다.

재료 및 방법

표적 RNA 제조

표적 RNA를 제조하기 위해 우선 그 RNA를 발현할 수 있는

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 02-709-2905, Fax : 02-793-0176
E-mail : SWL0208@unitel.co.kr

plasmid (pSub)를 다음과 같이 제조하였다. 5' 끝 부위에 T7 RNA 중합효소의 인지부위를 갖고 있고 *EcoRI*과 *XbaI* 인지부위로 cloning될 수 있는 염기서열을 5'와 3' 끝 부위에 각각 갖고 있는 oligonucleotide들을 구입하였다. 그 염기서열은 다음과 같다. (Sense oligonucleotides; 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGACATTTGCTTCTGACACAAGTGTGTGAGTGTGAG-AAGCAATGTCCCT-3', Antisense oligonucleotides; 5'-CTAGAGGGACATTTGCTTCTGACACTCACACAGTGTGTGTCAGAGCAATGTCCCTATAGTGAGTCGTATTAG-3') 이와 같은 두 oligonucleotide들을 염기 결합시킨 후 *EcoRI* 및 *XbaI*으로 절단한 pUC18 벡터에 cloning 하였다. 표적 RNA는 pSub를 *XbaI*으로 절단 후 T7 RNA 중합효소를 이용한 *in vitro* transcription 반응을 통하여 제조하였다.

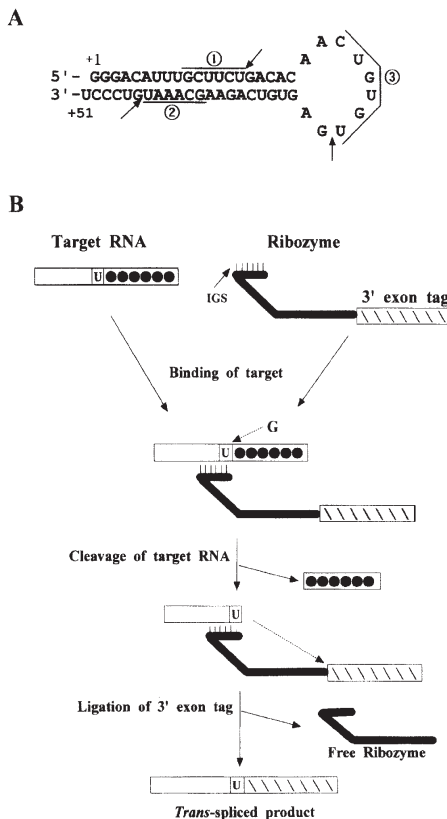


Fig. 1. A. Sequence and predicted secondary structure of target RNA. The structure of the target RNA ($\Delta G = -38.4$ Kcal/mole) was determined by using the MULFOLD program(9). Sequences of ① ② and ③ are the target sites of group I intron ribozymes constructed for Fig. 2-4 in this study. Arrows are the sites cleaved by each ribozyme. B. Trans-splicing reaction. A group I ribozyme recognizes a target RNA by base pairing through the internal guide sequence (IGS) on the ribozyme(10). The ribozyme splices its 3' exon tag onto a target RNA by cleaving the target just 3' of the targeted uridine residue using an exogenous guanosine (G) as a nucleophile and then ligating the 3' exon tag onto the same residue.

Ribozyme RNA 제조

*Tetrahymena*의 group I intron 염기배열을 함유하고 있고 3' 부위에 lacZ의 3' 부위를 발현하는 200 nucleotide(nt)들이 tagging되어 있는 pT7L-21 plasmid(14)를 활용하여 ribozyme library RNA 및 특정 ribozyme을 발현할 수 있는 DNA construct를 제조하였다. 우선 ribozyme library RNA의 경우 pT7L-21 plasmid의 특정부위를 PCR로 증폭시킴으로써 ribozyme library RNA를 발현할 수 있는 DNA를 제조하였다. PCR에 이용된 5' primer 5'-GGGGGGATCCTAATACGACTCACTATAGNNNNNAAAAGTTATCAGGCATGCACC, 여기에서 N은 G, A, T, C가 같은 양 존재는 T7 RNA 중합효소의 인지부위 및 group I intron의 5' 끝 부위와 염기결합을 이룰 수 있는 염기서열로 이루어져 있다. 그러나 이때 IGS는 5' 끝의 G 염기를 제외하고는 random화 한 5개의 nt들로 대체시킴으로써 PCR로 증폭된 DNA는 4⁵개(즉 1024개)의 다른 IGS를 발현할 수 있는 library 형태로 존재할 것이다. 3' primer(5'-GGGGTATCCAGGGTTTTCAGTCAC)는 ribozyme의 3' 부위에 tagging된 lacZ의 특정 부위와 염기결합을 이룰 수 있는 염기서열로 이루어져 있다. Ribozyme RNA는 이렇게 만들어진 DNA로부터 T7 RNA 중합효소를 이용한 *in vitro* transcription 반응을 통하여 제조하였다. Control 실험으로 사용하기 위한 inactive ribozyme RNA의 제조를 위해선 ribozyme의 catalytic core sequence가 제거된 pT7L(d)-21 plasmid(14)를 위에서 이용한 primer들을 이용하여 PCR로 증폭시켰다.

특정 ribozyme RNA는 우선 ribozyme을 발현할 수 있는 DNA를 역시 pT7L-21을 이용한 PCR 방법을 통해 제조한 후 T7 RNA 중합효소를 이용한 *in vitro* transcription 반응을 통해 제조하였다. 특정 ribozyme들을 제조하기 위한 5' primer들은 pT7L-21이 갖고 있던 IGS (5'-GGAGGG)가 표적 RNA의 특정 부위를 인지할 수 있는 IGS로 대체되어 있는 oligonucleotide들 (5'-GGGGGGATCCTAATACGACTCACTATA-IGS-AAAAGTTATCAGGCATGCACC)이고 3' primer들은 위에서 이용한 것과 동일한 oligonucleotide들이다. 표적 RNA의 ①과 ② 및 ③ 부위 (Fig. 1A)를 인지할 수 있는 ribozyme(Rib-①, Rib-②, Rib-③)의 IGS 부위는 각각 5'-GGAAGC와 5'-GTTTGC 및 5'-GCTCTG이다. Trans-cleavage 반응을 위한 ribozyme들은 위에서 제조한 PCR 산물들을 ribozyme의 intron 부위와 3' exon tagging된 부위의 경계 부위를 자르는 *ScaI*으로 절단 후 *in vitro* transcription을 통하여 제조하였다.

In vitro에서의 trans-splicing 반응 분석

정제된 ribozyme RNA와 기질로 이용된 표적 RNA를 splicing 조건(50 mM HEPES(pH 7.0), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 μM GTP) 하에 37°C에서 일정시간 반응시켰다. 반응을 시작하기 전 우선 ribozyme RNA를 50°C에서 5분간 반응시킨 후 37°C에서 2분간 더 반응시킴으로써 ribozyme이 올바른 3차구조를 갖도록 도모하였다. 표적 RNA와 GTP는 ribozyme과 섞기 전 37°C에서 5분간 미리 반응시켜주었다. 두 RNA의 반응 결과로 얻어진 RNA 산물을 RT-PCR 방법을 통해 분석하였

다. RT-PCR을 위한 3' primer (D primer)로는 위에서 설명한 ribozyme RNA 제조 때에 이용한 3' primer를 이용하였고 5' primer(U primer; 5'-GGGGAATTCGGGACATTTGCTTCTGAC)로는 기질로 이용된 표적 RNA의 5' 끝 부위와 염기결합을 이루는 염기서열과 *EcoRI* 인지부위로 이루어진 primer를 이용하였다. 따라서 trans-splicing 반응에 의해 두 별개로 존재하는 RNA가 연결된 결과 산물만이 이러한 RT-PCR 반응에 의해 감지될 것이다.

OST7-1 세포로의 transfection

2×10^5 의 OST7-1 세포를 60 mm 평판 배지 판에서 배양시킨 후 semi-confluent한 상황에서 calcium phosphate 침전 방법을 이용하여 DNA들을 transfection 시켰다. Transfection 후 세포 배양 배지 (DMEM+10% fetal bovine serum)를 갈아주고 세포를 이틀 더 배양하였다. Total RNA는 guanidine isothiocyanate 방법(4)을 이용하여 추출하였다. 이 때 RNA를 추출하는 동안에 일어날 수 있는 trans-splicing 반응을 억제하기 위해 20 mM EDTA를 그 추출액에 첨가하였고 추출된 RNA는 다음 실험을 위해 농축 후 20 mM EDTA 용액에 녹여 -20°C 에 보관하였다.

In vivo에서의 trans-splicing 반응 분석

세포 내에서의 trans-splicing에 의한 결과 산물의 분석은 추출된 total RNA의 RT-PCR 방법을 통해 수행하였다. 이 때 total RNA의 RT 반응 중에 trans-splicing 반응이 일어날 수 있으므로 ribozyme 활성을 방해하는 10 mM L-Argininamide (5,14)를 RT 반응시 첨가하였다. RT-PCR을 위한 3' primer 및 5' primer로써 in vitro에서의 trans-splicing 반응 분석에 이용되었던 primer들을 이용하였다.

Trans-splicing된 반응물의 염기서열 분석

Trans-splicing된 RNA의 RT-PCR 산물을 U primer에 주입시킨 *EcoRI* 인지부위 및 splicing된 lacZ에 존재하는 *HindIII* 인지부위를 이용하여 절단한 후 절단된 DNA를 pUC18 plasmid에 cloning하였다. 여러 clone들을 얻은 후 이러한 clone들의 염기서열을 dideoxy-termination 방법을 이용하여 결정하였다.

RNA mapping strategy

In vitro에서 표적 RNA의 ribozyme에 대한 인지부위를 탐색하기 위해 정제된 ribozyme library RNA(20 nM)와 표적 RNA(500 nM)를 앞에서 설명한 splicing 조건하에서 3시간 반응시켰다. Trans-splicing된 여러 산물들의 splicing-junction 부위를 탐색하기 위해 trans-splicing된 RNA를 위에서 설명한 U primer와 D primer를 이용한 RT-PCR 방법을 통해 증폭시킨 후 그 DNA를 pUC18에 cloning하고 그 clone들의 염기서열을 결정하였다. In vivo에서 표적 RNA의 ribozyme에 대한 인지부위를 탐색하기 위해 ribozyme library RNA 및 표적 RNA를 발현할 수 있는 DNA plasmid를 각각 1 µg 및 10 µg씩 OST7-1 세포에 앞에서 설명한 방법을 통하여 co-transfection시켰다. Total

RNA를 추출 후 U와 D primer를 이용한 RT-PCR과 cloning 및 염기서열 결정 등을 통해 trans-splicing 된 여러 산물들의 splicing-junction 부위를 탐색하였다.

결과 및 고찰

표적 RNA 제조 및 ribozyme에 대한 인지부위 mapping

RNA의 2차구조가 group I ribozyme에 의한 trans-splicing 반응에 어떠한 영향을 끼치는지 분석하기 위해 매우 안정된 stem-loop 형태를 갖고 있는 RNA를 제조하였고 그 RNA를 다음 일련의 ribozyme 실험을 위한 기질로 이용하였다(Fig. 1A). 이러한 표적 RNA의 stem에는 +7, +8, +9, +12, +13, +15, +32, +34, +45, +47 그리고 +51 부위에, loop에는 +24, +26, 그리고 +28 부위에 각각 ribozyme에 표적이 될 수 있는 U 염기를 함유하고 있다.

*Tetrahymena thermophila*의 rRNA에 존재하는 group I intron의 5' exon 결합 부위 (또는 internal guide sequence, IGS)의 염기서열은 5'-GGAGGG이지만 5' 끝의 G를 제외한 다른 IGS 부위의 염기서열을 바꿈으로써 기질 RNA의 어떠한 U 염기도 group I intron ribozyme에 의해 인지될 수 있는 잠재력을 갖고 있다(10). 그러나 RNA의 2차구조 형성에 의하여 모든 U가 다 ribozyme에 의해 인지되지는 못 할 것이다. 따라서 과연 본 연구에서 이용한 표적 RNA의 어느 부위의 U가 ribozyme에 의한 인지부위인지 알기 위해 다음과 같이 RNA mapping 방법을 고안하였다. IGS의 5' 끝을 제외한 5 염기들이 random화된 염기서열을 갖는 ribozyme library RNA를 제조하였다. 이러한 library RNA는 3' 부위에 tagging된 염기들을 갖고 있어서 표적 RNA의 ribozyme에 대해 노출된 U 염기부위와 결합할 수 있는 ribozyme의 경우는 표적 RNA와 trans-splicing 반응을 하여 노출된 U 염기의 바로 3' 부위를 절단한 후 그 위치에 tagging된 염기들을 전달할 수 있을 것이다(Fig. 1B). 이러한 trans-splicing된 RNA에 상응되는 DNA는 target RNA 부위와 결합할 수 있는 염기서열을 5' primer로 그리고 ribozyme에 tagging된 부위와 결합할 수 있는 염기서열을 3' primer로 이용하여 RT-PCR 반응을 통해 얻을 수 있었다. 이러한 산물들을 cloning한 후 그 염기서열을 결정함으로써 과연 어느 부위가 splicing-junction 부위인지 즉 ribozyme에 대한 인지부위인지 알 수 있었다(Table 1). 이러한 RNA mapping 실험을 실험관 내 (in vitro)에서 정제된 표적 RNA와 ribozyme library RNA를 3시간 반응시켜 수행한 후 위와 같이 그 결과 산물들을 분석하였다. 또한 T7 RNA 중합효소를 세포질에서 계속 발현하고 있는 mouse fibroblast cell line인 OST7-1 세포(3) 내에서 표적 RNA와 ribozyme library RNA를 발현할 수 있는 DNA를 세포 내로 transfection 시켜 transient하게 발현 후 RNA를 추출하여 위와 같은 방법으로 그 결과 산물들을 분석하였다. 표적 RNA에 존재하는 U 염기들 중 어느 부위가 ribozyme에 잘 인지되었는지는 그러한 U 염기를 junction 부위로 하여 trans-splicing된 clone들의 숫자로 표시되었다. 그 결과 Table 1에서와 같이 in vitro나 in vivo 모두 매우 비슷한 양상을 보여 주

고 있는데 특히 대부분의 clone들이 +24, +26 그리고 +28에 집중되어 있는 것으로 보아 stem-loop의 loop 부위가 가장 실험관 내에서뿐만 아니라 세포 내에서도 ribozyme에 잘 인지될 수 있음을 보여 준다. 이는 곧 표적 RNA의 2차 구조 형성에 의해 ribozyme의 기질 RNA에 대한 인지도가 강력히 영향을 받음을 시사한다.

특정 ribozyme들에 의한 trans-cleavage 반응

RNA mapping을 통해 강력하게 염기결합을 이루고 있는 RNA의 stem 부위는 ribozyme이 거의 인식을 못하는데 반해 loop 부위는 ribozyme이 매우 잘 인지할 수 있음을 알았다. 그러나 mapping 실험은 trans-splicing된 산물들의 cloning을 통하여 이루어졌으므로 매우 극소수로 존재하는 trans-splicing된 산물들의 존재가 무시될 수 있는 가능성이 있다. 따라서 이러한 mapping 결과를 확인하기 위해 표적 RNA의 stem 부위 즉 +15 및 +45 부위를 인지할 수 있는 IGS를 함유한 ribozyme (Rib-①, Rib-②)과 loop 부위 즉 +28 부위를 인지할 수 있는 IGS를 함유한 ribozyme들을 제조(Fig. 1A)한 후 그 활성을 검증하였다. 우선 3'에 tagging된 염기배열을 갖고 있지 않는 ribozyme을 재료 및 방법에서 언급한 방법을 통하여 제조하였다. 그 크기가 51 nt인 방사선 동위원소로 표지된 표적 RNA (1 nM)와 다량의 ribozyme RNA (100 nM)를 splicing 조건하에서 3시간 동안 반응하여 일정 시간별로 반응 산물들을 채취한 후 gel 상에서 분석하여 얼마나 잘 표적 RNA가 ribozyme에 의하여 잘렸는지 검사하였다(Fig. 2). 그 결과 표적 RNA의 stem에 존재하는 U 염기를 인지하는 Rib-①과 ②의 경우는 3시간이 지나도 표적 RNA를 자를 수 없었다(Fig. 2A). 그러나

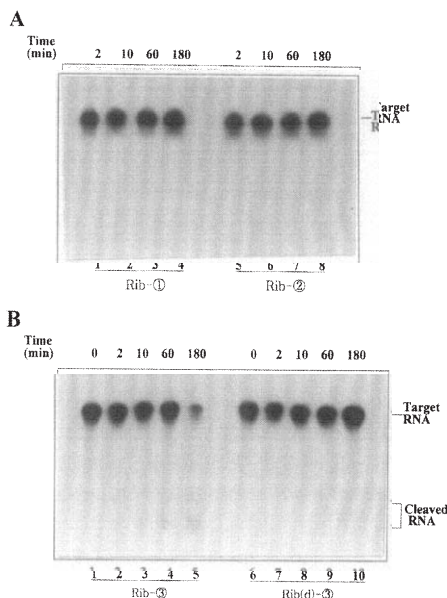


Fig. 2. *In vitro* trans-cleavage reaction. Body-labeled target RNA (1 nM) was incubated under splicing condition with an excess of group I ribozyme without 3' exon tag (100 nM). Reaction products were analyzed on a 8% polyacrylamide-urea gel. A. Rib-① and -② indicate ribozymes which can recognize the sequences of ① and ② of the target RNA shown in Fig. 1A, respectively. B. Rib-③ and Rib(d)-③ indicate active and inactive ribozyme which can recognize ③ sequence of the target RNA, respectively.

Table 1. Mapping results of the target RNA

Reaction sites(nt)	number of clones	
	<i>in vitro</i>	<i>in cells</i>
+7	0	0
+8	0	0
+9	0	0
+12	0	0
+13	0	0
+15	0	0
+24	3	2
+26	3	4
+28	6	5
+32	0	1
+34	0	0
+45	0	0
+47	0	0
+51	0	1

Nucleotide positions are presented for the uridines which can be accessible to group I ribozyme. The number of individual clones which contain a given uridine at the splice sites identified from *in vitro* (left) and *in vivo* (right) mapping analysis is indicated.

loop 부위에 존재하는 U 염기를 인지하는 Rib-③의 경우는 시간이 지날수록 그 크기가 28과 23 nt인 표적 RNA의 잘린 산물들을 볼 수 있었고 3시간이 흐른 후 표적 RNA의 50% 정도가 잘린 것을 볼 수 있었다(Fig. 2B). Control로써 ribozyme의 catalytic core 부위가 제거되어 있어서 활성을 나타낼 수 없는 Rib(d)-③과 표적 RNA를 반응하면 어떠한 잘린 산물들도 볼 수 없는 것으로 보아 Rib-③에 의한 잘린 산물들은 ribozyme의 활성에 의한 것임을 알 수 있었다. Rib-③이 표적 RNA의 +28 부위를 정확히 인지하여 절단함을 Fig. 3과 4에서 수행된 3' exon이 부착된 Rib-③과 표적 RNA 간의 trans-splicing 반응산물의 염기분석을 통하여 확인하였다.

In vitro 에서 특정 ribozyme들에 의한 trans-splicing 반응

실험관 내에서 표적 RNA의 loop 부위 즉 +28 부위가 ribozyme에 의해 잘 인지될 수 있는지 확인하기 위해 3' exon이 tagging된 ribozyme들(500 nM)과 실험관에서 제조된 표적 RNA(100 nM)간의 trans-splicing 반응을 시켜 보았다(Fig. 3B). Trans-splicing된 RNA 산물의 분석은 target RNA 부위의 5' 끝 부위와 결합할 수 있는 염기서열을 5' primer로 그리고 ribozyme에 tagging된 부위와 결합할 수 있는 염기서열을 3' primer로 이용한 RT-PCR 반응을 통해 수행하였다(Fig. 3A).

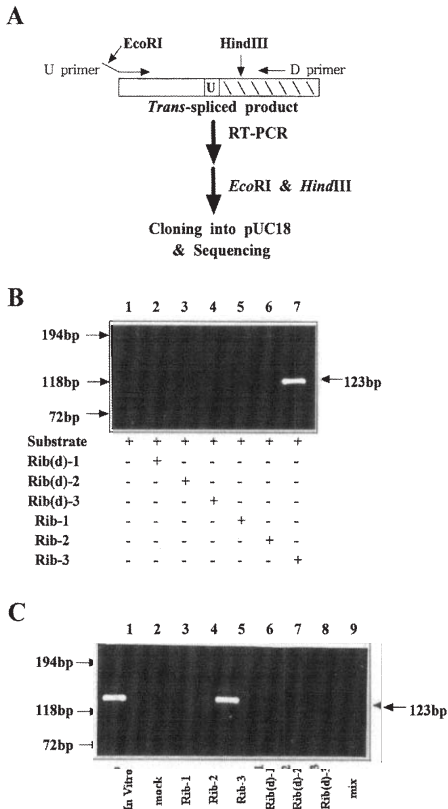


Fig. 3. *In vitro* and *in vivo* trans-splicing reaction. A. Scheme for the analysis of trans-splicing reaction. Trans-spliced transcripts were amplified by RT-PCR using a U primer and a D primer hybridized with 5' end of target RNA and 3' exon tagged at ribozyme, respectively. B. RT-PCR analysis of trans-spliced RNA products generated *in vitro*. 500 nM of active (Rib-) or inactive (Rib(d)-) ribozymes were incubated with 100 nM of target RNA as substrate. Reaction products were subjected to electrophoresis in a 2.5% agarose gel. Amplification of trans-splicing reaction products is expected to yield a 123 bp product. The migration of Φ X174 DNA digested with *Hae*III is indicated as a molecular mass marker. C. RT-PCR analysis of trans-spliced RNA products in cells. OST-7 cells were mock-transfected (mock) or cotransfected with 5 μ g of plasmids encoding active (pRib-) or inactive (pRib(d)-) ribozymes along with 1 μ g of plasmid expressing substrate RNA (pSub). Total RNA was extracted from these cells and trans-spliced products were analyzed as described above. In the "mix" sample, two cells were separately transfected with Rib-③ encoding plasmid and substrate RNA-expressing plasmid. These cultures were mixed, and RNA was isolated and analyzed. The migration of Φ X 174 DNA digested with *Hae*III is also indicated as a molecular mass marker.

그 결과 Rib-①, Rib-② 및 Rib(d)-①, Rib(d)-②, Rib(d)-③ 등과 반응 시에는 어떠한 trans-splicing 산물들도 생성되지 못하였으나 Rib-③과 반응 시에는 우리가 예상한 123 base pair (bp) 크기의 trans-splicing 산물이 생성되었다(Fig. 3B, lane 7). 따라서

RNA mapping 결과(Table 1), 실험관 내에서의 trans-cleavage 반응 결과(Fig 2) 그리고 실험관 내에서의 trans-splicing 반응 결과(Fig 3)로부터 RNA의 2차 구조의 형성이 ribozyme의 활성을 결정해 주는 매우 중요한 요인임을 알 수 있었다.

*In vivo*에서 특정 ribozyme들에 의한 trans-splicing 반응

포유류 세포 내에서도 표적 RNA의 loop 부위 즉 +28 부위가 ribozyme에 의해 잘 인지될 수 있는지 확인하기 위해 실험관 내에서의 실험에 이용됐던 활성이 있는 또는 활성부위가 제거된 ribozyme들을 발현할 수 있는 plasmid(pRib-또는 pRib(d))를 제조한 후 표적 RNA를 발현할 수 있는 plasmid(pSub)와 함께 OST7-1 세포에 co-transfection 시킨 후 추출된 RNA의 RT-PCR 반응을 수행하였다(Fig. 3C). 이러한 plasmid들은 모두 T7 RNA 중합효소의 인지부위를 함유하고 있으므로 T7 RNA 중합효소를 세포질에서 계속 발현하는 OST7-1 세포 내에서 발현될 수 있다(3). Plasmid로부터 RNA들이 제대로 발현되는지는 transfection 후 추출된 RNA의 RT-PCR 반응을 통해 확인하였다(결과 미제출). 그 결과 pRib-③을 pSub와 transfection 한 경우(lane 5) *in vitro* 상에서 Rib-③과 표적 RNA의 반응에 의해 형성된 trans-splicing 산물(lane 1)과 같은 크기인 123 bp의 산물이 형성되었다. 그러나 나머지의 경우는 반응산물들이 거의 형성되지 못하였다(lane 2-4, 6-8). 다만 pRib-②의 경우 약간의 trans-splicing 산물이 검출되었는데 이것은 아마도 실험관 내에서와 포유류 세포 내에서 표적 RNA가 약간 다른 2차 구조를 형성함으로써 일어난 것이 아닌가 추측된다. 왜냐하면 실험관 내에서의 표적 RNA는 pSub를 *Xba*I로 자른 후 *in vitro* transcription을 수행하였으므로 Fig. 1A와 같이 정확히 +51 부위 근처까지 RNA가 형성되나 세포 내에서의 실험은 pSub 자체를 transfection 시켰으므로 기질로 사용될 RNA에는 표적 RNA의 +51 부위에 벡터의 RNA 염기들이 더 첨가될 수 있기 때문이다. Fig. 3C의 lane 5에서 나타난 산물이 진정으로 세포 내에서 일어난 trans-splicing 반응의 결과산물인지 검증할 필요가 있다. 왜냐하면 비록 세포에서 RNA를 추출할 때 유발될 수 있는 trans-splicing 반응을 억제하기 위해 재료 및 방법에서와 같이 RNA 추출액에 EDTA를 첨가하였으나 lane 5에서 본 결과가 *in vitro*에서 유발된 trans-splicing 산물일 가능성이 있기 때문이다. 이러한 가능성을 배제하기 위해 lane 9에서 보는 바와 같은 "mix" 실험을 수행하였다. 즉 pSub와 pRib-③을 각각 따로 OST7-1 세포에 transfection 시킨 후에 두 세포들을 섞은 후 RNA를 추출하였다. 이렇게 섞인 세포로부터 추출된 RNA의 RT-PCR 반응을 수행한 결과 어떠한 산물도 형성되지 않았다(Fig. 3C, lane 9). 따라서 lane 5에서 나온 결과는 세포 내에서 발현된 Rib-③과 표적 RNA간의 trans-splicing 반응 결과에 의한 것임을 알 수 있었다. 따라서 RNA mapping 결과(Table 1) 그리고 세포 내에서의 trans-splicing 반응 결과(Fig. 3C)로부터 RNA의 2차 구조의 형성이 ribozyme의 활성을 결정해 주는 매우 중요한 요인임을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

Trans-splicing의 정확성

Fig. 3에서 수행한 Rib-③과 표적 RNA 간의 *trans*-splicing 반응에서 얻은 결과들이 진정으로 정확한 부위에서 splicing 반응이 일어나서 형성된 산물들을 나타내는지 확인하기 위해 *trans*-splicing 산물들을 gel에서 추출 후 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 벡터에 cloning한 후 그 clone들의 염기서열을 결정해보았다(Fig. 4). 그 결과 *In vitro*에서 얻은 반응 산물뿐만 아니라 (결과 미제출) *in vivo*에서 형성된 반응 산물들은 ribozyme이 예상된 표적 RNA의 반응부위(5'-CUGUGU)를 정확히 인지 후 그 ribozyme에 tagging되어 있는 염기배열들을 표적 RNA에 부착시킨 결과임을 알 수 있었다. 따라서 이러한 결과들은 group I intron ribozyme이 표적 RNA가 ribozyme에 노출된 구조를 형성할 경우 그 부위를 정확히 인지하여 *trans*-splicing 반응을 유발할 수 있음을 나타낸다.

본 연구의 결과들로부터 표적 RNA의 2차 구조가 ribozyme 활성화에 영향을 끼치는 매우 중요한 요인임을 알 수 있다. 즉 강력한 염기결합을 통하여 RNA의 stem 부위에 위치하는 염기들의 경우는 ribozyme이 인식하기 매우 어려웠지만 RNA의 loop 부위에 위치하는 염기들의 경우는 ribozyme에 잘 인식되도록 노출되어 있었다. 본 연구에서는 인위적으로 매우 안정된 stem-loop 구조를 통한 2차 구조를 형성할 수 있는 표적 RNA를 합성하여 실험하였으므로 여기에서 수행된 결과들을 예상할 수 있었다. 그러나 실제로 이용될 수 있는 표적 RNA의 경우는 그 크기도 훨씬 클 뿐만 아니라 computer 분석만으로는 그 2차 구조를 정확히 예측하는데에는 한계가 있다. 따라서 ribozyme에 표적이 될만한 염기부위를 찾는다는 것이 그 만큼 힘들

것이다. 그러나 본 연구에서 수행한 *trans*-splicing 반응을 유발할 수 있는 ribozyme을 이용한 RNA mapping 연구(Table 1)로부터 이러한 한계점을 극복할 수 있을 것이다. 특히 Fig. 2, 3 및 4에서 얻은 결과로부터 RNA mapping 연구방법을 통한 표적 RNA에서의 ribozyme에 잘 인식되는 부위의 탐색이 의미가 있음을 확인하였다. 즉 RNA mapping 연구 결과로부터 표적 RNA의 어느 부위가 ribozyme에 잘 인식될 수 있는지 탐색함으로써 그 부위가 구조적으로 ribozyme에 잘 노출되어 있는 부위임을 추론할 수 있을 것이다. 또한 *in vivo*에서의 ribozyme의 반응물들을 얻을 수 있다는 결과(Table 1, Fig. 3, 4)는 보다 개선된 ribozyme의 제조를 위한 실험적 바탕을 제공할 수 있겠다. 보통 hammerhead ribozyme 등과 같은 *trans*-cleavage ribozyme의 경우는 세포 내에서의 반응 결과물들을 추적하기가 매우 힘들다. 왜냐하면 ribozyme에 의해 잘린 표적 RNA들은 세포 내에서 매우 불안정하여 nuclease에 의해 쉽게 분해되기 때문이다(13). 그러나 *trans*-splicing의 경우는 RT-PCR을 통해 ribozyme에 의한 반응 산물들을 세포 내에서도 쉽게 추적할 수가 있었다 (Fig 3C, 4). 따라서 여기에서 수행된 일련의 실험을 통하여 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo*에서도 group I intron을 비롯한 여러 다른 ribozyme들이 잘 반응할 수 있는 표적 RNA의 부위를 추정할 수 있을 것이다. 실제 *in vivo*에서 ribozyme의 활성화에 끼치는 요인들은 *in vitro*보다는 훨씬 복잡, 다양할 것이다. 예를 들면 표적 RNA와 ribozyme의 세포 내에서의 colocalization의 여부(13), 표적 RNA의 구조가 매우 다양한 경우, RNA trafficking, 우리가 원하지 않는 RNA들이 표적이 되는 경우(5), 그리고 단백질이 표적 RNA에 붙어 있는 경우 등이 이에 해당될 것이다. 그러나 이러한 모든 요인들을 극복할 수 있는 ribozyme의 제조를 위해선 ribozyme의 세포 내 활성을 추적할 수 있어야 하기에 본 연구가 수행한 *trans*-splicing 반응을 통한 ribozyme 반응물의 추적방법이 의미가 있을 것이다. 이러한 group I intron ribozyme들의 *trans*-splicing 반응 능력 검증을 통한 표적 RNA의 최적 부위를 인지하는 ribozyme의 탐색, *in vitro* selection(15)을 통한 ribozyme의 개발 또는 표적 RNA와 ribozyme이 세포 내에서 colocalization하게 하는 방법 등을 통하여 효과적인 ribozyme의 개발을 꾀할 수 있을 것이다.

본 연구에서 수행된 방법들은 *trans*-splicing 반응을 유발하는 ribozyme을 이용한 유전자 보정 또는 유전자치환 등과 같은 유전자치료법의 개발을 위해 이용될 수 있을 것이다(12). 표적이 될 수 있는 유전자들은 특정 유전자의 결함에 의해 유발되는 유전질환에 관계하는 돌연변이 유전자 또는 virus의 유전자 등과 같은 감염성 질병에 관련된 유전자 등 매우 많은 경우를 들 수 있다. 본 연구에서 수행한 RNA mapping 연구 및 RT-PCR 반응을 통한 분석을 통해 이러한 유전자들로부터의 RNA에서 ribozyme의 표적이 될 수 있는 최적 부위의 탐색을 수행할 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 한국학술진흥재단에서 지원하는 과학기

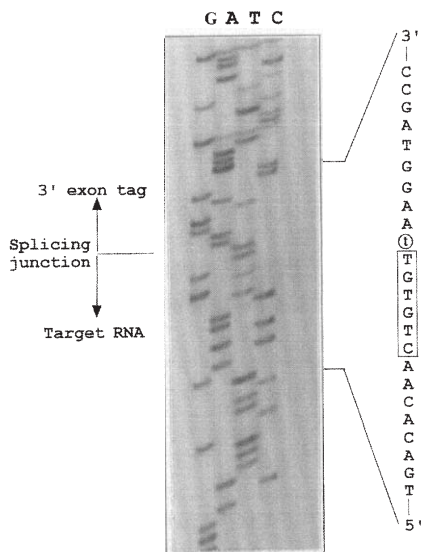


Fig. 4. Sequence analysis of *trans*-spliced transcripts *in vivo*. The RT-PCR amplified products shown in Fig. 3C, lane 5 were isolated on a gel and cloned into pUC18 after digestion with *Eco*RI and *Hind*III as shown in Fig. 3A. The expected sequence around the splicing junction is shown with the ribozyme recognition sequence boxed and the first nucleotide of the 3' exon tag circled

술기초 중점연구과제의 학술연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Been, M. and T. Cech. 1986. One binding site determines sequence specificity of Tetrahymena pre-rRNA self-splicing, trans-splicing, and RNA enzyme activity. *Cell* **47**, 207-216.
2. Cech, T. 1990. Self-splicing of group I introns. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 543-568.
3. Elroy-Stein, O. and B. Moss. 1990. Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6743-6747.
4. Feramisco, J.R., J.E. Smart, K. Burridge, D.M. Helfman, and G.P. Thomas. 1982. Co-existence of vinculin and vinculin-like protein of higher molecular weight in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **257**, 11024-11031.
5. Jones, J., S.-W. Lee, and B.A. Sullenger. 1996. Tagging ribozyme reaction sites to follow trans-splicing in mammalian cells. *Nature Medicine* **2**, 643-648.
6. Jones, J.T. and B.A. Sullenger. 1997. Evaluating and enhancing ribozyme reaction efficiency in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **15**, 902-905.
7. Kruger, K., R.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling, and T.R. Cech. 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157.
8. Lan, N., R.P. Howrey, S.-W. Lee, C.A. Smith, and B.A. Sullenger. 1998. Ribozyme-mediated repair of sickle β -globin mRNAs in erythrocyte precursors. *Science* **280**, 1593-1596.
9. Mathews, D.H., J. Sabina, M. Zuker, and D.H. Turner. 1999. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Provides Robust Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911-940.
10. Murphy, F. and T.R. Cech. 1989. Alteration of substrate specificity for the endoribonucleotic cleavage of RNA by the Tetrahymena ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9218-9222.
11. Phylactou, L.A., C. Darrah, and M.A.J. Wood. 1998. Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat. Genet.* **18**, 378-381.
12. Sullenger, B.A. 1995. Revising messages traveling along the cellular information highway. *Chem. Biol.* **2**, 249-253.
13. Sullenger, B.A. and T.R. Cech. 1993. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* **262**, 1566-1569.
14. Sullenger, B.A. and T.R. Cech. 1994. Ribozyme-mediated repair of defective mRNA by targeted trans-splicing. *Nature* **317**, 619-622.
15. Szostak, J.W. and A.D. Ellington. 1993. *In vitro* selection of functional RNA sequences. p. 511-533. In R.F. Gesteland and J.F. Atkins (eds) *The RNA World*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
16. Yu, M., E. Poeschla, and F. Wong-Staal. 1994. Progress towards gene therapy for HIV infection. *Gene Ther.* **1**, 13-26.

(Received August 9, 1999 / Accepted August 26, 1999)

ABSTRACT : Effects of Substrate RNA Structure on the Trans-splicing Reaction by Group I Intron of *Tetrahymena thermophila*

Seong-Wook Lee* (Department of Molecular Biology, Dankook University, Seoul 140-714, Korea)

Effects of substrate RNA configuration on the trans-splicing reaction by group I intron ribozyme of *Tetrahymena thermophila* were analyzed with substrate RNAs which have been generated to have very stable structures with stem-loop. RNA mapping strategy was performed *in vivo* as well as *in vitro* to search the most accessible sites to the trans-splicing ribozymes in the substrate RNAs. Sequences present in the loop of the target RNAs have shown to be well recognized by and reacted with group I intron ribozymes while sequences present in the stem do not. These results were confirmed with the experiments of trans-cleavage and trans-splicing reaction with the specific ribozymes recognizing those sequences. Moreover, sequence analysis of the trans-splicing products have shown that trans-splicing reaction can proceed with high fidelity. In conclusion, the secondary structure of substrate RNAs is one of the most important factors to determine the ribozyme activity.