

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠 C 型血小板生長因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-384-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學畜產學系暨研究所

計畫主持人：鄭登貴

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 5 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告 期中

中進度
報告

應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠 C 型
血小板生長因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制
(1/3)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 91-2313-B-002-384-
執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭登貴
共同主持人：李國光
計畫參與人員：陳侑亨、蔡元彰

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究

計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開
查詢

執行單位：國立台灣大學 畜產學系

中華民國 92 年 5 月 30 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫期中報告

應用條件化基因剔除及轉基因策略探討小鼠 C 型 血小板生長因子(PDGF-C)生理作用之分子調控機制(1/3)

計畫編號：NSC91-2313-B-002-384

91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：鄭登貴 國立台灣大學 畜產學系

一、中文摘要

近年來，已有多種可於生物體外具備可誘導性質之基因表現系統陸續發展而出，以進一步突破傳統產製轉基因動物之諸多限制，尤有更甚者，係成功應用於生物體內之四環黴素調控系統表現系統。我們嚐試使用四環黴素來控制 rtTA 或 tTA 的表現；而 PDGF-C 則結合在 rtTA 或 tTA 相對應的啟動子之後，故可用四環黴素去控制 PDGF-C 基因之表現 (tet operator sequence; tet O)，以條件化控制目標蛋白質 (PDGF-C)；另為能夠進一步讓四環黴素辨識及調節轉 C 型血小板生長因子基因轉殖鼠之表現與否和量上之表現情形，我們使內源性基因(PDGF-C)受特定活化啟動子(promoter)控制，此活化啟動子可接受四環黴素控制支配的轉錄活化子(transactivator) tTA 及 rtTA 所調控，故理論上同時具備此二種共同構築的轉基因鼠，可使用四環黴素來調控目標基因的生理作用；且亦有研究指出四環黴素衍生物-Doxycycline，此化合物對於上述雙基因轉基因鼠具更高敏感性之控制能力。針對於此，吾等已成功構築四種表現載體(Expression vector)及二種反應載體(Response vector)，前者攜帶有特定組織專一性表現之啟動子諸如：四環黴素反應啟動子(Tet-responsive promoter)或者是 *4311* 基因上之特定胎盤組織調控區域(trophoblast-specific promoter)，後者則攜帶有報導基因(綠螢光蛋白質)及有興趣之轉殖基因(PDGF-C)，我們樂觀地預期上述數種構築之轉殖基因所產製的轉

基因小鼠，更能提供吾等針對 PDGF-C 基因於活體動物內更具真實性的 biological function 之資料收集及探索，提供日後進行有關該基因之生理學功能及各項應用之可能性等探討時的依據。

關鍵詞: C 型血小板生長因子、四環黴素調控系統、綠螢光蛋白質、轉基因小鼠。

二、英文摘要

Several inducible gene expression systems have been developed *in vitro* in recent years to overcome limitations with traditional transgenic mice. One of these, the tetracycline-regulated system, has been used successfully *in vivo*. The expression of the targeted protein are controlled by a promoter containing seven DNA operator sequences from the *Escherichia coli* transposon 10 (Tn10). To control the expression of PDGF-C in transgenic (Tg) mice, we used a tetracycline-controlled transactivator (tTA or rtTA) and a tTA/rtTA-dependent promoter linked to a PDGF-C gene. Doxycycline (Dox)-sensitive co-regulation of two transcriptionally coupled transgenes will be investigated in the mouse. For this, we generated four independent mouse line clone carrying coding regions for mouse PDGF-C gene and green fluorescent protein (GFP) in a bicistronic, bidirectional module under the control of the Tet-responsive promoter and/or *43II* regulatory regions of trophoblast- specific promoter. It is anticipated that the rtTA and/or tTA-sensitive bi-directional expression module is well suited to express genes of interest in a regulated manner and that GFP can be used to track transcriptional activity of the module in the living mouse.

Key words: PDGF-C, Tetracycline-regulated system, green fluorescent protein, transgenic mice.

三、緣由與目的

近年來由於分子生物學及新興生物技術之快速精進，使吾人對生命之奧秘得有機會深入詳加探討，其貢獻除由助於提昇禽畜之生產力與生殖效率外，且可提供針對禽畜及人類眾多繁殖相關遺傳疾病，作為診治之依據。特別隨著新近人類基因體計畫 (Lander *et al.*, 2001；Venter *et al.*, 2001) 之完成，許多生物的基因及其轉譯的蛋白質也已陸續完成其定序工作；然而對於這些蛋白質在生物體中的生理功能、表現部位及表現時間的資料大多仍未了解，尤其對牽涉到黃體血管新生成、胎盤之形成及分化、與子宮內膜血管系統之週期性變化等，涉及生殖生理系統之分子調控機制，目前仍鮮有詳實深入之探討。本研究室鑑於前曾與台北瑪偕醫研科李國光主任及蔡元彰博士合作，並成功選殖獲得得一個有關人類生長因子，稱為fallotein (命名為PDGF-C) 基因(Tsai *et al.*, 2000)；因此本計畫擬針對涉及動物生殖系統有關之fallotein / PDGF-C分子進行探討，冀能究明此一特異性基因對於正常生殖功能調控之分子作用機制。鑑於四環黴素調控系統(tetracycline-dependent regulatory systems；tet systems)由Hermann Bujard 研究團隊首先推出

後，該項策略旋即被廣泛應用於體外培養細胞，俾為控制基因表現程度之依據，且也能藉此系統達成有效調控轉殖基因在轉基因動物中表現程度之目的(Beck *et al.*, 1982; Furth *et al.*, 1994; Gossen and Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1995; Kistner *et al.*, 1996; Udo and Hermann, 2000)。職是之故，本三年期研究計畫之第一年計畫工作，乃著重於帶有 tetracycline-controlled transactivator (tTA or rtTA) and/or tTA/rtTA-dependent promoter 轉殖基因之構築(Fig. 1)，俾確保往後可以藉由 Tet-On™ Gene Expression Systems 建立一良好動物模式，針對 fallotein / PDGF-C 深入探討其在動物生殖生理學所可能扮演分子調控機制。

四、結果與討論

本研究第一期計畫之策略目標在於針對小鼠 C 型血小板生長因子(PDGF-C) 基因，選擇採行 Tet-On 和 Tet-Off Regulatory Expression System 之條件化調控系統(Fig. 1)，俾供往後試驗可以據以藉由產製轉基因小鼠之活體測試策略，探討 PDGF-C 基因之詳實生理功能。試驗進行迄今，已分別成功構築含有四環黴素控制轉錄活化子 (reverse tetracycline-controlled transcription activator, 簡稱 rtTA) 之表現載體(expression vector)，及含有 TRE(tetracycline response element)、PDGF-C 和 GFP 報導基因等回映載體 (response vector)(Table 1 and Fig. 2~4))。此外，鑑於本研究先前已證實 PDGF-C 基因特別於小鼠生殖系統包括卵巢、子宮及睪丸等處，最具活躍表現，此一事實暗示 PDGF-C 基因之表現與性腺及生殖道功能之正常運作關係密切；職是之故，本年度之試驗工作乃進一步根據經發表之文獻(Blackburn *et al.*, 1995、Kamat *et al.*, 1999 and Calzonetti *et al.*, 1995)，成功選殖獲得具胎盤組織專一性表現基因(如 Tpbp-4311 基因，Table 2)之啟動子序列，並完成 PDGF-C 基因之分別構築於具有 Trophoblast-specific promoter (Tpbp-4311), CMV promoter 及載體中 (Fig.5~7)之轉殖基因構築工作，此等轉殖基因構築且結合四環黴素調控系統之設計，並加入一段 Kozak consensus ribosome binding site (序列如 Fig.8.)，令其更具備 improve interest gene expression level 之效，俾確保未來可以藉由此等調控序列，方便針對 PDGF-C 探討其在懷孕小鼠生殖生理功能調控機制之應用。本計畫目前正應用顯微注射技術，針對前述構築完成之轉殖基因，積極進行 Tet-On and PDGF-C 轉雙基因小鼠之產製，冀能從而獲得較佳的條件化剔除效果。

五、參考文獻

1. Barbara, RJ, and K Donald. 2001. The Human Genome. Science 291(5507): 1153.
2. Beck, CF, R Mutzel, J Barbe, and W Muller. 1982. A multifunctional gene (tetR) controls Tn10-encoded tetracycline resistance. J. Bacteriol. 150: 633-642.
3. Blackburn, MR, M Wakamiya, CT Caskey, and RE Kellems. 1995. Tissue-specific rescue suggests that placental adenosine deaminase is important for fetal development in mice. J. Biol. Chem. 270: 23891-4.
4. Calzonetti, T, L Stevenson, and J Rossant. 1995. A Novel Regulatory Region Is Required for Trophoblast Specific Transcription in Transgenic Mice. Dev. Biol.

- 171: 615-626.
5. Furth, PA, L St Onge, H Boger, P Gruss, M Gossen, A Kistner, H Bujard, and L Hennighausen. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 9302–9306.
 6. Gossen, M, and H Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline- responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 5547–5551.
 7. Gossen, M, S Freundlieb, G Bender, G Muller, W Hillen, and H Bujard. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science (Washington DC)* 268: 1766–1769.
 8. Kamat, A, KH Graves, ME Smith, JA Richardson, and CR Mendelson. 1999. A 500-bp region, approximately 40 kb upstream of the human CYP19 (aromatase) gene, mediates placenta-specific expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 96: 4575-80.
 9. Kistner, A, M Gossen, F Zimmermann, J Jerecic, C Ullmer, H Lubbert, and H Bujard. 1996. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93: 10933–10938.
 10. Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.*15:8125-8148.
 11. Udo, B, and B Hermann. 2000. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol.* 327: 401-421.

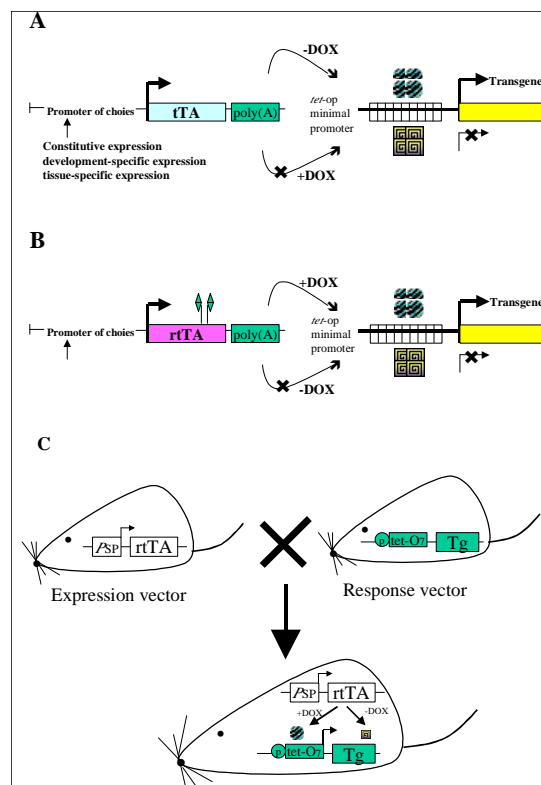


Fig. 1. Diagram of the tetracycline-inducible expression system.

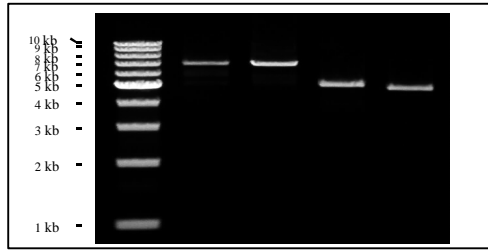


Fig. 2. The quality of linearized plasmid DNA (for microinjection) check by agarose gel electrophoresis. lane 1. 1Kb DNA molecular marker (promega) ; lane 2. Tg CMV rtTA plasmid linearized by Sca I digest (7391bp) ; lane 3. Tg CMV tTA plasmid linearized by Bsa I digest (7391bp) ; lane 4. TgCMV (tet O7) plasmid linearized by Bgl II digest (5325bp) ; Lane 5. TgGFP (Bi-tet O7) plasmid linearized by Bgl II digest (5121bp).

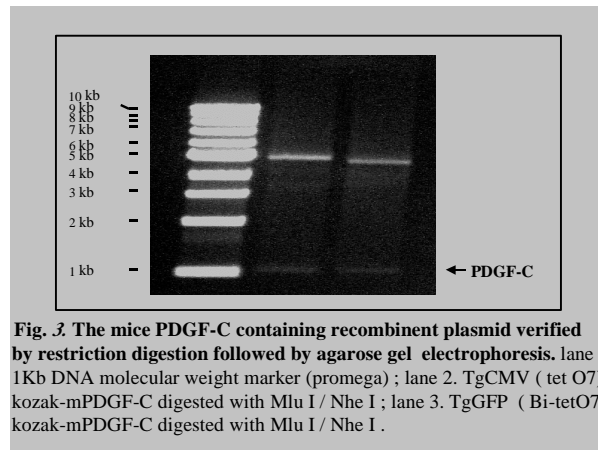


Fig. 3. The mice PDGF-C containing recombinent plasmid verified by restriction digestion followed by agarose gel electrophoresis. lane 1. 1Kb DNA molecular weight marker (promega) ; lane 2. TgCMV (tet O7) kozak-mPDGF-C digested with Mlu I / Nhe I ; lane 3. TgGFP (Bi-tetO7) kozak-mPDGF-C digested with Mlu I / Nhe I .

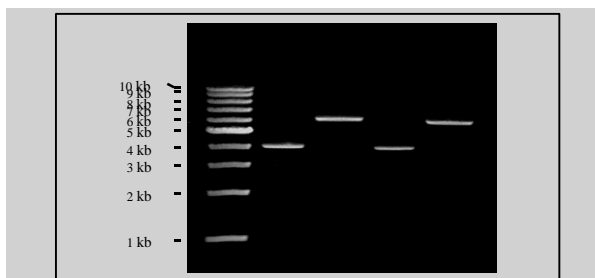


Fig. 4. The mice PDGF-C cDNA containing recombinent plasmid, checked by agarose gel electrophoresis. Lane 1, 1Kb DNA molecular weight marker (promega) ; lane 2, TgCMV (tet O7) kozak-mPDGF-C digested (supercoil form) ; lane 3, TgCMV (tet O7) kozak-mPDGF-C linearized with Fap I. ; lane 4, TgGFP (Bi-tetO7) kozak-mPDGF-C (supercoil form) ; lane 5, TgGFP (Bi-tetO7) kozak-mPDGF-C linearized with Ahd I.

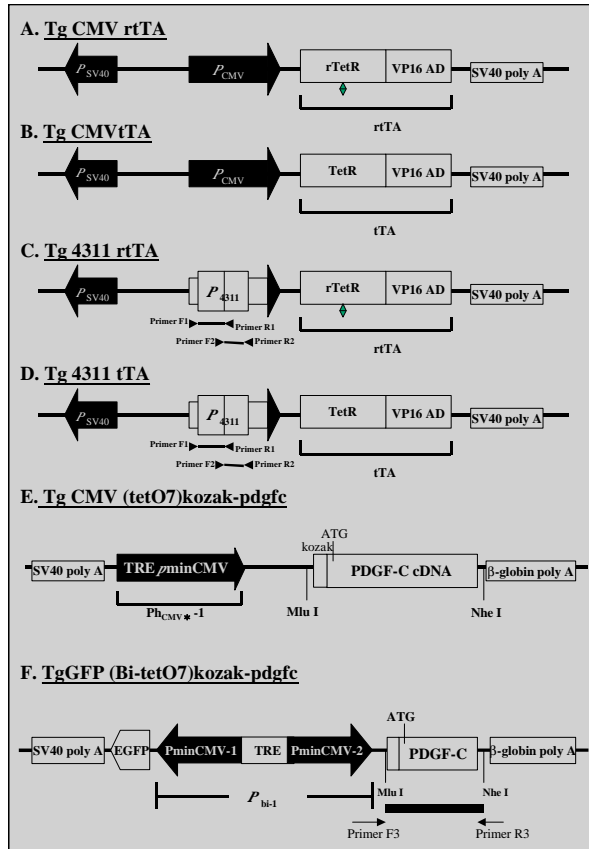


Fig. 5. The schematic representation of the linearized recombinant plasmid construction for double transgenic animal production.

placenta basal promoter

TTTCTAAACAACCTTTTATTTAACTCTGTTTACGTTTATGTGCGCTTTACTCTGTTCACTTGAGAGTCTAGTGCTCAAAGAGGCAAAACAATAGGACA
 GTGTATTCCCTAAAATTTAGTTAAAGACAGTTGGGAGCTCCAAGTGGGCTCGGGAACATAATTCAGGTCTTCTACAAGTCAAGTAAAGTCTTTAA
 CTGCAAGCCATTTATCTAGCACCTTCCCTAAGTATTTTGTGAGATCTACCTGGATCCAACCAGATATCAGAGAAGGATCCTGGGGTCTGTATTTT
 CAAGAGACATTAGACTTGAATATGCTGACTCATACTGCTCCAGGGTGTGGTATGCTCCAGTCAAACCATAGTTGAACATAAAAGCCACTCAAAGTT
 ACCTAGAACCATTCTTTTTCAGCAGCCCAAAAGCACAGCATTGGGGTACTAATAGCCAAGGACCTCAATGTTCAATTTCCAACCTTCTCTAAAAC
 TGACTCATGCAAACTCTCCCATAGTCCAATGCAGCAATCCACACTTCATCTTCAATTTCTGTAATGCTGGAGTCCCTATAGCCCAGGGCCAATGGT
 GTCATCAACACAACCAATCATAAAAACATTAGTACTTATGGGTGGTCTTAGTAGCCAGAAATAGGGATTAAAGACTGAATGGTGTGCGGCTCA⁴⁹
 CTGCTAGATTCTGGATCTCCAAGGACTCTGAAGAGCTGAACCACTGGAGTGCACAGCCTTTGGACATCACAGGTAAGGCCAAAGCAGATTGAG
 GACTTGAGGAGTCCCTGGAGGAACCTCCCTGGAGAATGAGGCACAAGAGAAAATCTGACCATCAGGA

Fig. 6. Illustration of the structure of the 4311 gene (placenta basal promoter). BamH I: **GGATCC** ; Xho I:**CTCGAG** ; boldface is the-409 ~ +75 region; **A⁴⁹GCT** is the +1 site.

placenta specific promoter

CACCCGGAACATGACCTTTTTTATTAAGTGTCTGATTCTCTAGTGAATTACAGGCAAAAGAAAGGGTAGTGAACATTTCTTTAAG
 AGGAATTAGGTCATAATTTCTTAATAAAAATAAATATAGGAATTGAATAATTACTTATTTAAAATATCTAGGTAAGCTATACTCAA
 GAGTAGGCTATAGCTACAGAAGTCATTTGTATGGAGTCTACAGAAAGAGAAGAAATGTTTAAATGTCATGTGTAGATGGATATGT
 AAATTTTATTGCAGGGA**GTAGAC**tgttcctcagtagattgaaaaatggttaagaaggagattatgagaaaacagacatacaggaatc
 ttgctgttgccatgtgaggagacataacctagggtcagtaggagaaagagactcttgatcacgtaggaggactagcagatggg
 aaggacagaagtttatgctaaactgacataatagaattgttggctgaaataggatgatatacaagacttgcataagacaggctccaa
 ctatatttagagaccttaattaagattatataagataacttaaaaatgtgttaaacaggatcccaataacttacaacaagtg
 tctttctct**CTCGAG**CTTAAACATCCATCACTGTTTTTTCTTGCAATACAAATCTTTGGATCAAATTTAGACTTTATGCATATTT
 GGTAGTGAAGGGGAGAAGGCAT

Fig. 7. Illustration of the structure of the 4311 gene (placenta specific promoter). ACC I:**GTAGAC** Xho I:**CTCGAG** (boldface is the-3442 ~ -3742region).

kozak-PDGF-C

tcgcacggtcgccaccatgctcctcctcggectcctcctgctgacatctgccctggccggccaaagaacggggactcgggctgagtccaacctgagcagcaagttgcagctctccagc
 gacaaggaaacagaacggagtgaagatccccggcatgagagattgtcactatctggtaatggagcatccacagcccgaagttcctcatactacccaagaaatggtgctggtgtg
 gagattagttgcagtagatgaaatgtgcggatccagctgacattgatgagagattgggctggaagatccagaagacgatataatgcaagtattttgtagaagttgaggagcccagtgat
 ggaagcgttttaggacgcgggtgtggtctgggactgtccaggaaagcagacttctaaaggaatcatatcaggataagattgtatctgatgagtatttccatcgaacccggattctgcatc
 cactacagtattatcatgccacaagtcacagaaaccacgagtcctcgggtgtgcccccttcatcttgcattggacctgctcaacaatgctgactgcctcagttacctggaagagctgattc
 ggtacctagagccagatcgatggcaggtggactggacagcctctacaagccaacatggcagcttttggcaaggcttctctgtatgggaaaaaaagcaaaaggtggaatctgaatcctc
 aaggaagaggtaaaactctacagctgcacacccggaaacttctcagtgccatagggaaagactaaagaggacagataccatattctggccaggtgtctcctggtcaagcgtgtggag
 gaaattgctcctgtgtctcataattgcaatgaatgtcagtggtcccacgtaaaagtacaaaaaagtaccatgaggtcctcagttgagacccaaaactggagcaagggattgcataagtca
 ctactgatgtggctctggaacaccacgaggaatgtgactgtgtgtgtagagaaacgcaggagggaactgctagcttcgtagcagc

Fig. 8. Illustration of the structure of the MluI-kozak- PDGF-C-NheI (total length:1074bp);MluI acgctg; NheI: gctagc.

Table 1. The restriction enzymes used for linearization of various recombinant plasmids.

Recombinant plasmids	Restriction enzymes
Tg CMVrtTA	Sca I
TgCMVtTA	Bsa I
TgCMV(tetO7kozak-pdfe	Fsp I
TgGFP(Bi-tetO7)kozak-pdgfe	Ahd I

Table 2. Various placenta-specific promoters and placenta-originated cell types identified to be feasible for further construction of the transgene in the future transgenic studies.

promoter	Placenta cell types	Reference for promoter	Status
ADA placental - specific promoter/enhancer	pan-trophoblast	<u>Blackburn <i>et al.</i>, (1995)</u>	testing
Cyp19 (aromatase) Placental-specific Promoter/enhancer	labyrinth / syncytiotrophoblast	<u>Kamat <i>et al.</i>, (1999)</u>	testing
P11 (knock-in)	giant cells	—	testing
Tpbp (4311)	ectoplacental cone & spongiotrophoblast	<u>Calzonetti <i>et al.</i>, (1995)</u>	Confirmed available