



살아있는 세포에서 Fluorescent & Chemiluminescent reporter를 이용한 NF-κB 신호전달 다중분석 Ready-To-Glow™ Secreted Reporter Systems

Cell Biology Group, Clontech Laboratories, Inc., in collaboration with Molecular Devices, now a part of MDS Analytical Technologies

TNF-α에 의한 NF-κB response element를 모니터링하기 위해 Ready-To-Glow™ Secreted *Metridia* Luciferase reporter system과 fluorescence-based ZsGreen Proteasome Sensor를 이용하였다. 이 assay를 통해 TNF-α에 의해 유도되는 NF-κB 시그널링에 proteasome 활성이 필요하다는 것을 직접적으로 증명하였다. Fluorescence와 Chemiluminescence를 같이 측정할 수 있는 microplate reader를 이용하여 세포 용해(cell lysis) 없이 96웰 플레이트에서 측정할 수 있었다.

NF-κB Translocation은 Proteasome-의존적

Proteasome은 ubiquitin에 의존하여 protein을 짧은 peptide로 분해하는 large protein complex이다. Proteasome은 유전자의 전사, cell-cycle 진행, DNA repair, 세포 분화, 바이러스 감염, oncogenesis 등의 과정에서 매우 중요한 역할을 한다(1). Proteasome 활성은 NF-κB-기본 전사 조절에 중요한 역할을 한다(TNF-α 자극에 의해 I-κB가 인산화되어 proteasome에 의해 분해되면 NF-κB가 활성화된다).

Proteasome 분해가 저해되면, NF-κB는 제대로 활성화되지 못한다(2-3). 그러나 지금까지 같은 샘플에서 proteasome 활성과 NF-κB 시그널링을 동시에 관찰할 수 있는 방법이 없었다.

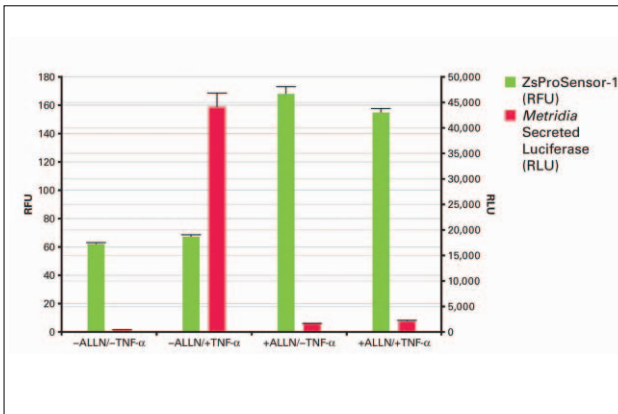


그림 1, NF-κB activation by TNF-α requires proteasomal activity. High levels of *Metridia* luciferase signal were only observed in the absence of ALLN and the presence of TNF-α. When the proteasome is inactivated by ALLN (monitored by increasing levels of ZsProSensor-1 fluorescence), the NF-κB signaling pathway cannot respond effectively to TNF-α stimulation. ALLN = N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal.

ZsGreen Proteasome Sensor

Living Colors® HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line (TaKaRa Code 631535)를 이용하면 간단한 방법으로 proteasome 활성을 모니터링할 수 있다(4). 이 안정한 transfected cell line은 proteasome 타겟 서열을 가지고 있는 wild-type ZsGreen 형광 단백질을 기반으로 만들어진 Proteasome

Sensor Vector (TaKaRa Code 632425)를 토대로 만들어졌다. 일반적으로 ZsProSensor-1 융합 단백질은 빠르게 분해된다. 그러나, proteasome 기능이 제대로 발휘되지 못하면, ZsProSensor-1은 빠르게 축적되며, 이것은 fluorescence plate reader 혹은 flow cytometry에서 쉽게 검출할 수 있다(4,7-8). ZsGreen Proteasome Sensor는 이미 SpectraMax® M5 plate reader(Molecular Devices)로 proteasome 활성 측정에 활용된 적이 있다(8).

Secreted *Metridia* Luciferase

Ready-To-Glow Secreted Luciferase는 인간 코돈에 최적화된 *Metridia longa* luciferase를 이용한 효소-기반 chemiluminescent 리포터이다(9). Secreted *Metridia* luciferase는 살아있는 세포에서 균일하게 신호전달 경로를 분석하는데 이상적이다. 이 luciferase는 시그널 안정성과 강도를 강화시켜 높은 배율을 나타내며, 효소-기반 시스템을 이용하여 높은 감도를 나타낸다(9-10). 이 어세이는 높은 감도와 넓은 dynamic range에서 검출이 가능하므로, 별도의 샘플 희석이 필요없다(11).

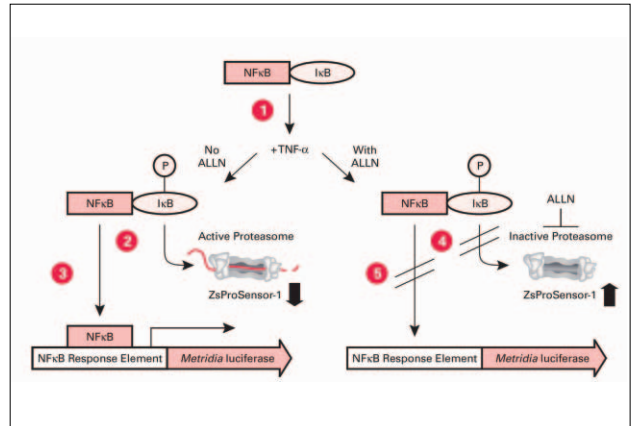


그림 2, Requirement for active proteasomes in TNF-α-induced, NF-κB-dependent signaling. Inactive NF-κB is sequestered in the cytoplasm by I-κB. I-κB must be phosphorylated upon TNF-α induction (1) and degraded by the proteasome (2) in order for NF-κB to translocate to the nucleus and initiate signaling (3). Alternatively, when the proteasome is inhibited by the peptide ALLN (4), I-κB is not degraded and NF-κB cannot translocate (5). The status of the proteasome (active or inactive) can be monitored based on ZsProSensor-1 levels.

Proteasome 상태 & NF-κB 신호전달 관찰

Proteasome 활성과 NF-κB 의존 신호전달의 상관관계를 만들기 위해 NF-κB response element를 포함한 Ready-To-Glow secreted *Metridia* luciferase를 인코딩하는 리포터 벡터를 Proteasome Sensor Cell Line에 일시적으로 transfection시켰다. ZsGreen fluorescence는 proteasome 활성을 측정하기 위해 사용되었으며, *Metridia* luciferase chemiluminescence는 TNF-α 첨가에 의해 유도된 NF-κB를 통한 NF-κB response element의 전사 활성 측정에 사용되었다. Proteasome Sensor와 Ready-To-Glow assay 모두 살아있는 세포에서의 어세이이기 때문에, SpectraMax® M5 microplate reader를 이용하여

같은 세포, 같은 well에서 fluorescence와 chemiluminescence를 동시에 측정할 수 있었다.

Transfected cell을 proteasome 저해제인 ALLN(50 μ M)이 존재하거나 혹은 없는 상태에서 TNF- α (25 ng/ml)에 의해 유도시켰다. ZsGreen 형광 시그널을 이용하여 proteasome 활성을 측정하였고, 그 후 같은 well에 secreted *Metridia* luciferase 기질을 첨가하여 chemiluminescent 시그널을 측정하였다.

ALLN이 없는 경우 proteasome이 활성화되고, ZsProSensor-1 단백질이 분해되었음을 나타내는 낮은 레벨의 ZsGreen이 관찰되었다. Proteasome 저해제 ALLN이 없는 상태에서, TNF- α 에 의해 유도된 세포의 상층액에서는 NF- κ B response element가 활성화되어 secreted *Metridia* luciferase가 발현되었음을 나타내는 *Metridia* luciferase reporter가 높게 발현되었다(그림 1).

하지만 ALLN 존재하에 TNF- α 로 유도 시켰을때 ZsGreen 형광이 높게 발현되면, proteasome의 불활성을 의미하는 것이다. TNF- α 유도에 불구하고 낮은 레벨의 *Metridia* luciferase transcription reporter가 검출되었다면, NF- κ B가 효과적으로 활성화 되지 못했다는 것을 의미한다(그림 1). 이러한 결과를 조합하면, TNF- α 로 유도 되었을때의 proteasome 활성은 NF- κ B 의존 시그널링에 필수적인 요소임을 나타낸다(그림 2).

결론

Proteasome Sensor와 Ready-To-Glow system을 이용하여 살아있는 세포에서 TNF- α 의 유도에 의한 NF- κ B의 발현에 proteasome 활성이 필요함을 관찰할 수 있었다(그림 2). 그러므로 NF- κ B의 phosphorylation/dissociation이 NF- κ B 시그널링을 좌우한다는 기존의 연구는 불완전한 것으로 판명되었다.

Spectra Max® M5 microplate reader와 SoftMax® Pro software를 이용하여 ZsGreen 형광을 측정한 후에 즉시 *Metridia* luciferase substrate를 처리하여 같은 well에서 chemiluminescence를 측정하는 것이 가능했다. 이 측정은 같은 세포, 같은 측정 기기, 같은 software를 이용하여 실험하였으며, 그 결과 proteasome 활성과 TNF- α 에 의한 NF- κ B 의존 시그널링을 동시에 측정할 수 있었다(그림 1).

과거에는 다중분석(multiplex assay)을 위해서 다른 종류의 형광 단백질을 사용하거나 세포를 용해하여 서로 다른 luciferase를 사용했었다. 하지만, *Metridia* luciferase는 세포 용해가 필요없는 분비형 리포터이기 때문에 이 리포터를 이용하여 fluorescence와 chemiluminescence를 이용하는 다중분석이 가능하게 되었다. fluorescent와 chemiluminescent를 이용한 multiplex live cell assay는 뛰어난 분석 시스템 발전에 새로운 길을 열었다.

참고문헌

1. Adams, J. (2002) *Trends Mol. Med.* **8** (4 Suppl):S49-S54.
2. Haas, M, et al. (1998) *J. Leukocyte Biol.* **63** (3):395-404.
3. Sun, L, and Carpenter, G. (1998) *Oncogene*, **16** (16):2095-2102.
4. Proteasome Sensor Vector. (April 2003) *Clontechiques XVII* (2):14.
5. Matz, M, V, et al. (1999) *Nature Biotech* **17** (10):969-973. *Erratum in Nature Biotech*, **17** (12):1227.
6. Li, X, et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** (52):34970-34975.
7. Living Colors® Cell Lines, (April 2004) *Clontechiques XVII* (2):14.
8. Measurement of proteasome inhibition in live cells in Molecular Devices microplate fluorometers, (2006) *SpectraMax Application Note*. Molecular Devices.
9. Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System, (July 2006) *Clontechiques XXI* (2):12-13.
10. Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System, (October 2006) *Clontechiques XXI* (3):1.
11. Detection Limit and Linear Range of Ready-To-Glow Secreted *Metridia* Luciferase Determined on the Molecular Devices SpectraMax® L, (July 2007) *Clontechiques XXII* (3):20-21.
12. SpectraMax® M5/M5e multi-detection reader: A five-mode microplate reader with three-mode cuvette port, *Molecular Devices Data Sheet* (2006).
13. SoftMax® Pro software : The industry standard in microplate data analysis, *Molecular Devices Data Sheet* (2006).

Ready-To-Glow™ Secreted Reporter Systems - FAQs

- 살아있는 세포에서 동시에 어세이
- 다중분석 리포터 (multiplex reporter)
- 동일한 세포를 사용하여 다중분석 실험 수행

Clontech의 Ready-To-Glow Secreted Luciferase System은 특정한 프로모터나 신호전달에 중요한 역할을 하는 response element와 transcription factor 사이에 결합을 연구하는데 최적인 시스템이다. 매우 민감한 효소 리포터는 세포 용해 과정 없이 transfection한 세포의 상층액에서 바로 측정할 수 있다 (그림 1).

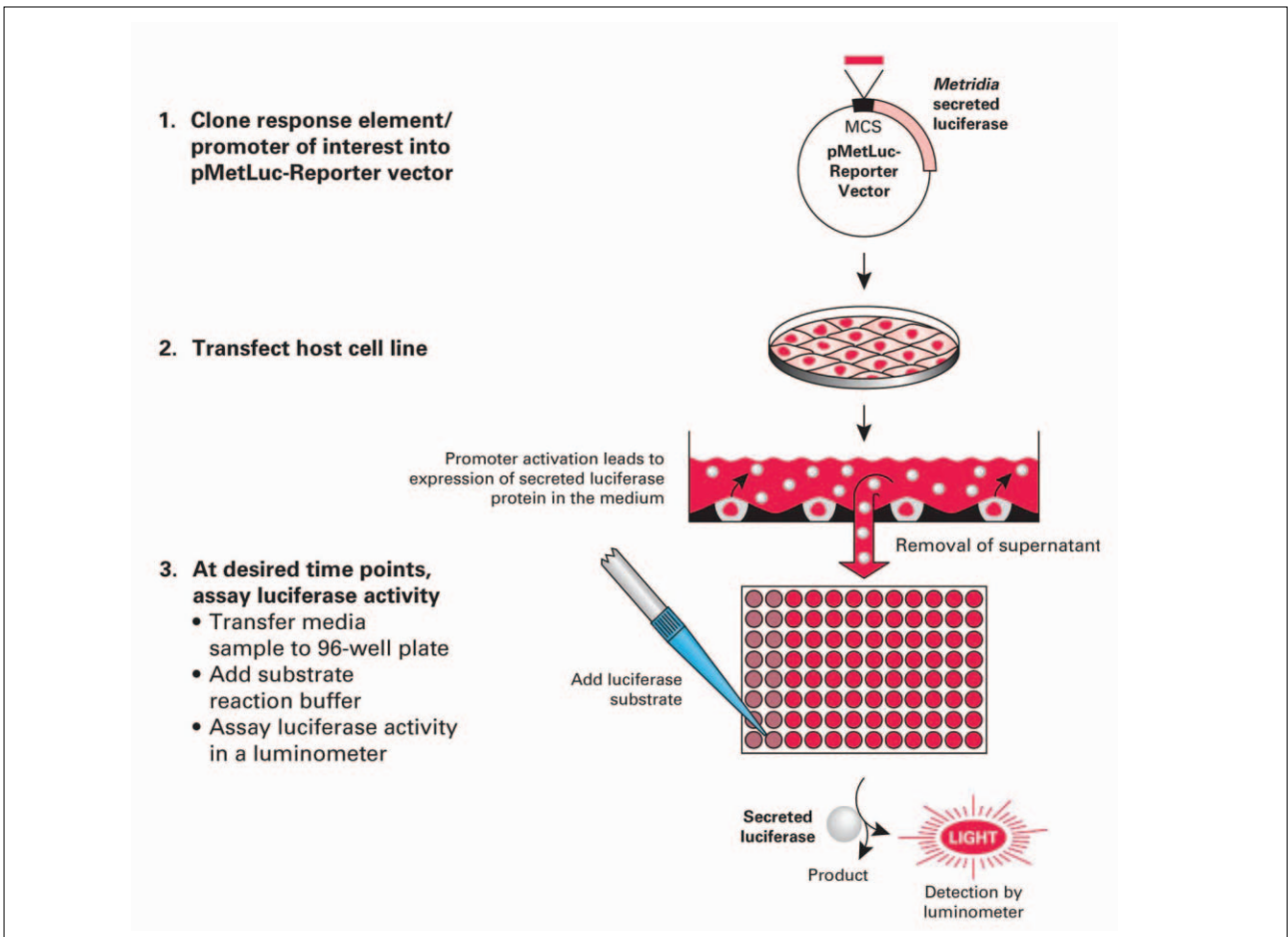


그림 3. Ready-To-Glow Secreted Luciferase Assay

Frequently Asked Questions

1. Secreted reporter assay를 이용하는 이유는?

일반적인 reporter assay는 세포 용해가 필요하지만, secreted reporter system은 세포를 용해하는 과정이 필요 없으므로 실험자의 시간과 노력을 상당히 줄일 수 있다. 더 중요한 것은, 샘플의 용해 과정이 없으므로 reporter assay 이후에도 세포가 살아있다는 것을 의미한다는 것이다. 그러므로 샘플

간의 변화나 유도제, 저해제의 영향없이 시간에 따른 변화를 관찰하는 완벽한 time-course 실험이 가능하며, reporter assay 후에 같은 샘플로 추가 실험을 할 수 있다.

2. Secreted reporter assay가 백그라운드 시그널이 낮은 이유는?

몇몇 실험의 경우 사용하고자 하는 프로모터가 “leaky” 해서 transfection한 후 실질적인 reporter assay를 하는 시간까지 reporter가 발현되어 축적될 수 있다. Nonsecreted reporter를 사용할 경우, 세포내에 축적되어 제거되기 어렵다. 하지만, secreted reporter system를 사용하면, reporter assay전에 간단하게 배지 교환을 통해 transfection후에 축적된 reporter를 제거할 수 있다.

3. Secreted *Metridia* luciferase를 위한 검출 한계는 얼마이며, *Metridia* Luciferase detection에 필요한 세포의 최소량은 얼마인가?

Metridia Luciferase 활성은 최소 6 logs 이상의 농도만 되면 매우 폭넓고 직선형으로 관찰할 수 있다. 검출 한계는 2 fg/well 또는 40 fg/ml 정도이다(1, 그림 2). *Metridia* luciferase는 최소 200-300개의 세포만 있으면 detection할 수 있다(96 well plate 사용시).

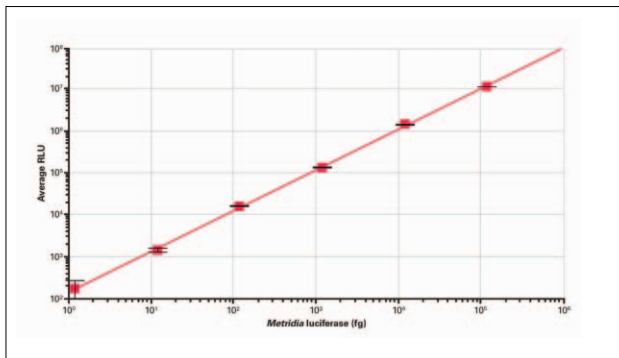


그림 4. Limit of detection for recombinant *Metridia* luciferase protein. The indicated amounts of recombinant *Metridia* luciferase (fg/well) were spiked into DMEM containing 10% FBS. *Metridia* luciferase activity was measured in a 96-well format on the SpectraMax® L. The limit of detection was determined to be 2 fg/well (40 fg/ml).

4. *Metridia* luciferase는 DMSO 존재 하에서 안정한가?

Metridia luciferase는 2 % DMSO까지 안정하다.

Metridia luciferase는 37 °C에서 매우 안정하다. 37 °C에서 72시간 동안 유도한 후 활성을 측정할 결과 *Metridia* luciferase의 최초 활성이 85%정도까지 유지되고 있음을 확인하였다.

5. *Metridia* luciferase로 assay 가능한 plate종류는?

Ready-To-Glow assay에는 96-, 384-, 1536- well plates 모두를 이용할 수 있다(1,2). 모든 chemiluminescent assays를 할 때 clear plates는 적절한 well 사이에 cross talk 현상 때문에 사용하지 않는 것이 좋으며, white-walled plates를 사용하는 것이 최적이다. Clear plates와 white-walled plates를 각각 이용하여 측정할 결과 white-walled plates를 이용하여 측정할 RLU값이 3.5배 더 높게 나왔다. Black-walled plates도 사용가능하나, total RLU값이 white-walled plates 보다 낮게 나온다.

6. Ready-To-Glow assay 사용 방법은?

Ready-To-Glow assay는 매우 간단하고 쉽다(그림 3). 세포가 있는 plate에서 바로 assay할 수도 있고, 배양 배지를 새로운 plate로 옮겨 측정할 수도 있다. 세포가 있는 plate에서 직접 측정할 수 있으므로 매우 능률적이며, HTS(high throughput) 실험에 적용하기 쉽다(2).

7. Ready-To-Glow와 다른 reporter로 multiplex assay가 가능한가?

Clontech에서는 human placental alkaline phosphatase(SEAP)와 *Metridia* luciferase를 이용한 Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter System을 개발하였다(3). 원하는 세포에 이 두 가지 reporter를 cotransfection시키고, 각각이 발현되어 분비될 수 있는 자극을 주어 관찰할 수 있다. 이 두가지 reporter는 분비되기 때문에, 세포 배양 배지에서 바로 프로모터-특이 활성을 측정할 수 있다. 이 시스템을 이용하면 두개의 promoter/response element를 동시에 테스트할 수 있으며, 혹은 둘 중 하나의 reporter는 transfection 효율을 체크하는데 이용할 수 있다.

또한 Ready-To-Glow system은 fluorescent reporter 와도 같이 사용할 수 있다. 실험에 필요한 reporter에 따라 multimode plate reader는 fluorescence, chemiluminescence, 흡광도 측정도 가능하다. 실험에 적합한 vector를 이용하여 transfection하여 간단하게 사용할 수 있다.

8. Ready-To-Glow assay 후 downstream에서 어떤 실험을 할 수 있는가?

실험에 이용했던 세포가 살아 있기 때문에, 같은 세포에서 추가로 데이터를 얻을 수 있다. Kinetic 연구 및 가능성 있는 유도제/저해제 등을 연구할 수 있고, 독성/생존력 테스트, 현미경, immunocytochemistry, protein/RNA 분석 등 여러가지 연구에 적용할 수 있다.

참고문헌

1. Detection Limit and Linear Range of Ready-To-Glow™ Secreted *Metridia* Luciferase Determined on the Molecular Devices SpectraMax L. (July 2007) *Clontechiques* **XXI** (3):20-21.
2. Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase System.(July 2006) *Clontechiques* **XXI** (2):12-13.
3. Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter System.(October 2006) *Clontechiques* **XXI** (3):1.

■ 관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
Proteasome Sensor Vector	20 µg	632425
Living Colors HEK 293 ZsGreen Proteasome Sensor Cell Line	1 vial	631535
Ready-To-Glow Secreted Luciferase pMetLuc Vector Kit	each	631729
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay	100 rxns	631726
	500 rxns	631727
	1,000 rxns	631728
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System ¹	100 rxns	631730
	500 rxns	631731
	1,000 rxns	631732
Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Vector Kit	4 x 20 µg	631735
Ready-To-Glow Dual Secreted Reporter Assay	500 rxns	631734

¹The Reporter System combines the Reporter Assay and the pMetLuc Vector Kit components.

※ License Notice : [21, 26, 27]