단백질-단백질 결합 분석 :
AcGFP1과 DsRed-Monomer를 이용한 FRET 분석

Bing-Fen Liu[1], Kumarasamy Anbarasu[1], & Jack J-N. Liang[1,2]
[1] Ophthalmic Research/Surgery, Brigham and Women's Hospital
[2] Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston, MA

■ 서론

단백질-단백질 결합은 세포와 단백질 기능에 있어 중요한 역할을 한다. 눈의 수정체에서 중요한 단백질 구성물인 Crystallin은 α-crystallin과 βγ-crystallin의 2개의 그룹로 나눌 수 있다[1]. α-crystallin은 hetero-oligomer인 αA-crystallin과 αB-crystallin 2개의 polypeptide subunit으로 구성되어 있다. 또한 in vitro상에서는 αA-crystallin과 αB-crystallin은 homo-oligomer를 형성할 수 있다. βγ-crystallin은 α-crystallin보다 heterogenous하다. hetero-oligomeric β-crystallin은 7개의 subunit을 가지고 있다 (4개의 acidic : βA1-4-crystallin, 3개의 basic : βB1-3-crystallin). 반면 monomeric γ-crystallin은 6개의 subunit (γA-γF-crystallin)으로 구성되어 있다.

Crystallin 사이의 단백질-단백질 결합을 연구하기 위한 많은 방법들은 단백질 정제를 필요로 한다. 반면에 세포내에서의 two-hybrid system을 이용한 단백질-단백질 결합연구는 단백질 정제과정이 필요없다[2, 3]. 하지만 two-hybrid system에서 reporter 유전자를 활성화시키기 위해서는 두 단백질이 핵으로 이동해야 하고, α-crystallin과 같은 큰 단백질은 핵안으로 들어가기가 어렵다.

위와 같은 이유로 단백질-단백질 결합연구를 위한 매우 강력한 방법 중의 하나가 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer; 이하 FRET)이다. 이 방법은 살아있는 세포에서 단백질-단백질 결합을 직접적으로 관찰할 수 있다. *in vitro* 실험과 다르게 FRET은 단백질 정제가 필요없고, two-hybrid system처럼 reporter assay나 세포 용해에 의존하지 않는다.

■ 수정체 투명도와 관련된 단백질-단백질 결합의 역할

최근 연구에서 αA-crystallin과 다른 crystalline 사이의 단백질-단백질 결합을 확인하기 위해 confocal FRET microscopy를 이용하였다. Crystallin간의 결합은 단백질 구조를 안정화시키고, 이 단백질 구조의 안정도는 수정체의 투명도와 밀접한 관련이 있다[4]. 만약 posttranslational modification이나 변이에 의해 이 결합이 깨진다면 백내장이 나타난다[5]. 수정체 단백질에 대한 초기 연구는 노화와 관련된 백내장의 posttranslational modification에 초점을 맞추어 진행되었지만, 최근 연구는 선천적인 백내장을 보이는 site-specific mutation에 대한 연구가 진행되고 있다.

최근 desmin 관련 근질환과 백내장의 원인인 R120G αB-crystallin 변이에 관한 연구를 진행하였다[6]. 재조합 R120G αB-crystallin은 비정상적인 구조로 인해 샤페론 유사활성이 감소하고, αB-crystallin과의 결합력이 감소한다고 보고되었다. FRET imaging을 위해 αA-crystallin을 AcGFP1에 융합사여 제공자(doner)로 사용하고, R120G αB-mutant를 포함한 다른 crystallin을 DsRed-Monomer와 융합시켜 수여자(acceptor)로 사용하였다. FRET 이미지를 통해 단백질-단백질 결합을 직접 눈으로 관찰할 수 있었고, 결합의 정도를 정량화할 수 있었다.

■ 실험방법

형광단백질로는 Living Colors® pAcGFP1-C1 (TaKaRa Code 632470)과 pDsRed-Monomer-C1 (TaKaRa Code 632466) vector를 사용하였다. pAcGFP1-C1 vector는 Aequorea coerulescens ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 475/505 nm) 유래의 초록색 형광단백질을 인코딩한다. pDsRed-Monomer-C1 vector는 Discosoma sp. ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 557/585 nm)유래의 단량체로 적색 형광단백질을 인코딩한다. R120G αB-crystallin을 포함한 αA-, αB-, βB2-, γC-crystallin constructs는 이전 연구에서 기술한 대로 만들었다(2,8). αA-crystallin 유전자는 pAcGFP1-C1에 서브클로닝하였고, 나머지 crystallin유전자는 pDsRed-Monomer-C1에 서브클로닝하였다. 이 construct들을 AcGFP1-αA-, DsRed-Monomer-αA-, DsRed-Monomer-αB-, DsRed-Monomer R120G αB-, DsRed-Monomer-βB2-, DsRed-Monomer-γC-crystallin라고 각각 표기하였다.
AcGFP1과 DsRed-Monomer사이의 17개의 아미노산 linker를 이용하여 만든 pAcGFP1-pDsRed-Monomer 융합단백질, G-17-R을 positive control로 준비하였다.

HeLa cell은 일반적으로 사용되는 방법으로 배양하였다. Transfection 하루 전에 HeLa cell ($1x10^5$/ml)을 35 mm dish에 깔았고, lipid-based transfection 방법을 이용하여 vector들을 cotransfection 시켰다. 6시간 배양 후에 배양액을 바꿔주고, 다시 48시간 이상 배양한 후에 이미지를 분석하였다. 이미지 분석전에 배양액을 FBS를 포함하지 않은 L-15 배양액으로 교체하였다.

이미지 분석은 Zeiss® Laser Scanning Microscope (LSM) 510 META Axioplan® 2 confocal microscope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)를 이용하였다. Multitrack channels의 이미지 (12-bit)는 다음과 같은 형식으로 기록되었다 :

* Green channel (donor excitation/donor emission: $Green_{ex/em}$) : an argon/2 laser (25 mW, T1 and T3=10% of laser exposure)
* FRET channel (donor excitation/ acceptor emission : $FRET_{ex/em}$) : excitation at 488 nm
* Red channel (acceptor excitation/acceptor emission : $Red_{ex/em}$) : excitation at 543 nm, HeNe 1 Laser (T2=100%)

LSM 이미지는 Metamorph® 7.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 분석하였다. FRET 분석에 대한 자세한 정보는 Molecular Vision에 보다 자세하게 나와있다[9].

Crystallin의 FRET 분석을 위한 AcGFP1과 DsRed-Monomer pair의 효율성

FRET 파트너의 Spectral bleed-through (SBT)는 FRET microscopy의 가장 큰 문제점이다. FRET channel에 대한 SBT는 AcGFP1 channel이 약 35%, DsRed-Monomer channel은 약 5% 정도였다. 종전에 많이 사용되던 cyan fluorescent protein (CFP) channel이 약 70%, yellow fluorescent protein (YFP) channel이 약 20%였던 것에 비하면 매우 낮은 수치이다[10].

처음으로 수행한 control 실험에서는 G-17-R fusion 단백질을 positive control로 사용하였고, AcGFP1과 DsRed-Monomer 융합 단백질 각각을 negative control로 사용하였다. G-17-R을 HeLa cell에 transfection하였을 때, 매우 강한 FRET signal이 관찰되었다. 그러나 AcGFP1과 DsRed-Monomer를 HeLa cell에 cotransfection시켰을 때는 매우 약한 siganl만이 나타났다(data not shown,9). 이 결과로 AcGFP1과 DsRed-Monomer 융합 단백질을 이용한 FRET 실험이 단백질-단백질 결합 연구에 유용하게 사용될 수 있다는 가능성을 보여주었다.

■ Crystallin- Crystallin 결합 강도의 측정

본 FRET microscopy 실험에서는 제공자(doner)로 AcGFP1-αA-crystallin, 수용자(acceptor)로 DsRed-Monomer-crystallin을 사용하였다. αA-crystallin과 각 crystallin의 결합한 결과를 그림 1에 나타내었다. Nomalized FRET (nFRET) signal은 제공자(donor)인 αA-crystallin과 수용자(acceptor)인 αA-, αB-, βB2-, γC-crystallin의 결합력을 보여주었다(그림 2). nFRET 분석 결과, wild-type αB-crystallin에 비해 R120G αB- mutant의 결합력이 크게 감소함을 알 수 있었다.

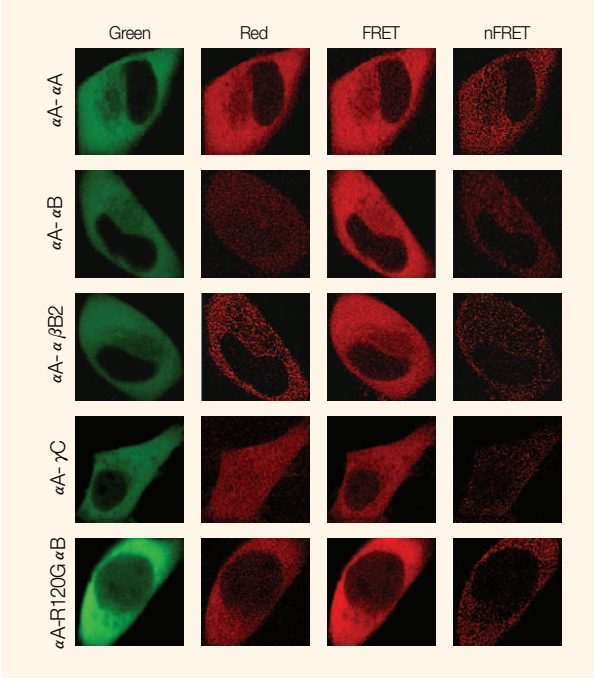


그림 1. Interactions between αA- and αB-crystallin are greater than interactions between αA- and bB2- or gC-crystallin. LSM-FRET images of cells expressing the following AcGFP1 and DsRed-Monomer con-structs are shown: AcGFP1-αA-crystallin as a donor and DsRed-Monomer-crystallin (αA-, αB-, βB2-, γC-, or R120G αB-crystallin) as an acceptor. HeLa cells were cotransfected with the respective constructs shown on the left. Cells from each culture were imaged using laser scanning microscopy. Green and red filter sets were used to detect either green or red fluorescence. The normal-ized FRET signal (nFRET) is shown in the rightmost column.

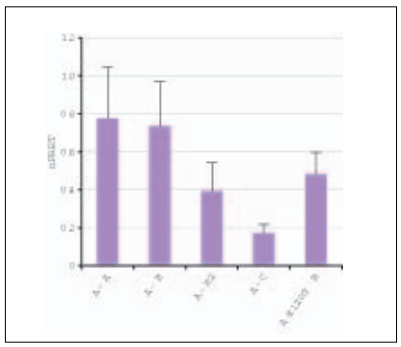


그림 2. αA-crystallin interacts with other crystallins to different extents. Quantified nFRET values of crystallins were calculated from LSM-FRET images. The nFRET values are the average of regions of interest (ROIs; n=60-90) in three transfection exper-iments. ROIs were chosen in areas that did not contain protein aggregates. Significant differences were observed for the follow-ing pairs: (αA- or αB- and βB2-crystallin), (αA- or αB-and γC-crystallin), (βB2-and γC-crystallin), and (αB- and R120G αB-crystallin). The difference between the αA-αA- and αA-αB-crystallin pairs is statistically insignificant.

■ 단백질 aggregation에서 αB-Crystallin의 역할

세포내에서 발현되는 각각 crystallin의 상대적인 용해도(solubility)는 같이 발현되는 다른crystallin에 따라 크게 달라질 수 있다. Laser microscopy에서 관찰한 결과 αA-crystallin 하나만 transfection되었을 때 aggregate가 거의 없었지만, αB-crystallin 단독으로 transfection시켰을 때는 보다 많은 aggregate가 생기는 것을 관찰할 수 있었다(그림 3, A). αA-crystallin과 αB-crystallin을 cotransfection시켰을 경우 단백질 aggregate가 나타나는 세포의 비율이 1/4로 감소하였다(그림 3, C & 그림 4). 그러므로 그림 1과 2에서 확인할 수 있었던 αA-crystallin과 αB-crystallin의 결합이 αB-crystallin의 용해도를 크게 증가시킨 것이다.

그러나, wild type αB-crystallin 대신에 αB-crystallin의 선천적 백내장변이인 R120G를 transfection 시켰을 경우, 단백질이 aggregate되는 세포의 수가 급격이 증가하고 단백질 aggregate의 크기가 커지는 것을 관찰할 수 있었다. 더군다나 αA-crystallin과 wild type αB-crystallin을 coexpression 시킨 세포(4배)보다 αA-crystallin과 R120G을 coexpression을 한 세포내의 aggregate의 양이 적게 감소(1.5배)하는 것을 알 수 있었다(그림 3, 그림 4).

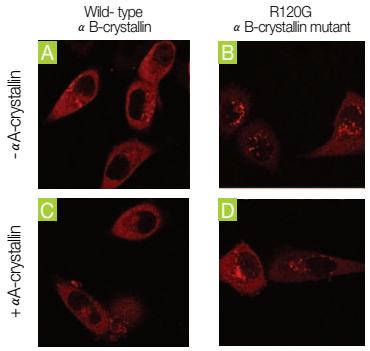


그림 3. Cells transfected with the R120G αB-crystallin mutant are more susceptible to protein aggregation than cells transfected with wild-type αB-crystallin. Furthermore, cotransfection with αA-crystallin does not reduce aggregation of mutant αB-crystallin as much as it reduces aggregation of wild-type αB-crystallin. Representative laser scanning microscopy images of HeLa cells transfected or cotransfected with the following αA- and αB-crystallin genes include : Panel A. DsRed-Monomer-αB-, Panel B. DsRed-Monomer-R120G αB-, Panel C. AcGFP1-αA- and DsRed-Monomer-αB-, and Panel D. AcGFP1-αA- and DsRed Monomer-R120G αB-crystallin. Only images obtained with the red channel are shown.

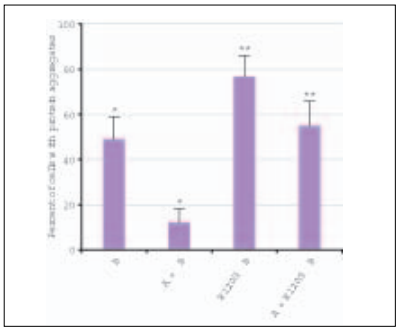


그림 4. Role of αB-crystallin in protein aggregates. A fourfold decrease in the number of cells containing protein aggregates was observed for cotransfection of αA-and αB-crystallin (the asterisk indicates a p=0,006), but only about a 1,5 fold de-crease for cotransfection of αA- and R120G αB-crystallin (the double asterisk indicates a p=0,02). The mean and standard deviation are shown as percentage ± SD and repre-sent an average of three independent ex-periments. For each experiment, cells were counted in 30?50 confocal LSM images.

■ 토의

in vitro 단백질-단백질 결합연구는 단백질 정제과정이 어렵고, 정제한 단백질이 in vivo 환경에서의 형태와 in vitro 상에서의 형태가 달라 어려움을 겪고 있다. 반면에, two-hybrid system은 살아있는 세포에서 단백질-단백질 결합을 연구할 수 있고 단백질 정제과정을 생략할 수 있지만[2], FRET microscopy는 살아있는 세포의 생리학적인 측면이나 자연적인 환경을 고려한 단백질-단백질 결합연구에 보다 많은 이득을 줄 수 있다.

AcGFP1과 DsRed-Monomer를 FRET pair로 이용하여 crystalline 결합을 FERT microscopy로 분석한 결과는 종전의 two-hybrid system을 이용한 결과와 동일하며, 수정체 단백질에 대한 단백질-단백질 결합연구, 예를 들어 crystalline과 막단백질 혹은 세포골격단백질 결합을 연구하기 위한 더 진보된 기술임을 나타낸다. FRET에서 에너지는 제공(donor) 단백질과 수용(acceptor) 단백질사이의 거리가 매우 가까울 때(약 50 A)와 제공(donor) 단백질의 emission spectrum과 수용(acceptor) 단백질의 excitation spectrum이 일치할 때 옮겨가게 된다[11]. AcGFP1와 DsRed-monomer는 아주 적합한 FRET partner임을 확인하였고, 이 단백질들의 SBT 수치 또한 기존의 CFP-YFP FRET pair보다 매우 뛰어나다.

FRET microscopy를 이용한 crystalline의 단백질간 결합(αA-αA-, αA-αB-, αA-βB2-, αA-γCcrystallin)연구는 기존의 HeLa cells에서의 two-hybrid system 연구와(2) 용액상태에서의 단백질 FRET연구와 일치한다[12]. 소수성 결합은 αA- αB-crystallin이 βB2-, γC-crystallin보다 소수성을 더 많이 띄므로, 소수성 결합은 α-crystallin사이의 FERT을 증가시킬 것이다[13].

단백질-단백질 결합은 단백질 구조를 안정화시키고, 세포기능을 가지는 단백질 complex를 형성하고, 단백질의 안정성과 용해도를 증가시키는 많은 역할을 한다. 수정체에서 crystallin은 굴절률 변화를 일으키는데 상호작용하여, 빛이 최소한으로 분산되어 망막에 초점이 맞을 수 있도록 한다[5]. 정상적인 단백질과 수정체 구조를 유지하기 위하여, 여러가지 crystallin은 서로 결합하여 구조적인 안정성을 강화하게 된다. 예를 들어, 최근 이 βA2-crystallin 단독으로 있을 때는 용해되지 않지만, βB2- 와 βA2-crystallin을 coexpression시키면 βA2-crystallin의 용해도가 매우 높아지는 것을 밝혀냈다. 앞선 연구에서도 βA4-βB2- 와 αA-αB-crystallins도 동일한 효과가 있음을 밝혔다[14,15].

Posttranslational modification이나 site specific mutation은 이런 결합을 방해하거나, 감소시킨다. Solution상에서 이러한 단백질-단백질 결합 변화에 대한 FRET 연구는 많이 보고되고 있다[16, 20]. 최근 AcGFP1과 DsRed-Monomer를 이용한 cell-based FRET 연구를 통해 단백질 구조나 결합특성을 변화시키는 deamidation, COOH-terminal truncation과 같은 posttranslational modification을 모니터할 수 있게 되었다.

노화된 수정체에서 주로 나타나는 posttranslational modification인 deamidation은[21] 단백질을 불안정하게 만들고[22, 23], COOH-terminal truncation은 노화와 당뇨병이 있는 환자의 수정체에서 많이 나타난다고 보고되었다[24, 25].

노화와 관련된 결함뿐만 아니라, 본 연구에서 사용된 R120G αB-crystallin 변이를 포함하여 많은 선천적 백내장 관련 변이 또한 보고되고 있다[8]. 최근 연구에서 mutant αB-crystallin의 nFRET측정치가 감소하는 것은 단백질 solution[12]과 세포내에서 관찰된 결과와 일치한다[8]. 이번 confocal microscopy 이미지에서 R120G αB-crystallin이 wild-type αB-crystallin보다 용해도가 낮으며, αA-crystallin과 cotransfection 시켰을 때도 wild-type αB-crystallin에 비해서 aggregate가 덜 줄어든 것을 확인하였다. 이 결과는 단백질 aggregate 형성이 R120G αB-crystallin mutation에서 수정체의 불투명도를 결정하는 주 기작임을 의미한다.

이 연구에서는 우수한 FRET pair인 AcGFP1과 DsRed-Monomer를 이용한 FRET 분석이 수정체 불투명도에 미치는 영향과 crystalline 간의 단백질-단백질 결합의 중요성을 보여줄 수 있는 매우 효과적인 방법임을 보여주었다.

[참고문헌]

1) Harding, J. (1991) *Cataract: Biochemistry, Epidemiology, and Pharmacology*. (Chapman & Hill, London).
2) Fu, L. and Liang, J. J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277(6):4255-4260.
3) Boelens, W. C. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273(43):28085?28090.
4) Delaye, M. and Tardieu, A. (1983) *Nature* 302(5907):415-417.
5) Ponce, A. *et al.* (2006) *Mol. Vis.* 12:879-884.
6) Vicart, P. *et al.* (1998) *Nat. Genet.* 20(1):92-95.
7) Bova, M. P. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(11):6137-6142.
8) Fu, L. and Liang, J. J. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(3):1155-1159.
9) Liu, B. F. *et al.* (2007) *Mol. Vis.* 13:845-861.
10) Trinkle-Mulcahy, L. *et al.* (2001) *J. Cell. Sci.* 114(Pt 23):4219-4228.
11) Wu, P. and Brand, L. (1994) *Anal. Biochem.* 218(1):1-13.
12) Liang, J. J. and Liu, B. F. (2006) *Protein Sci.* 15(7):1619-1627.
13) Fu, L. and Liang, J. J. (2001) *Mol. Vis.* 7:178-183.
14) Sun, T. X. and Liang, J. J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273(1):286-290.
15) Marin-Vinader, L. *et al.* (2006) *FEBS J.* 273(14):3172-82.
16) Cobb, B. A. and Petrash, J. M. (2000) *Biochemistry* 39(51):15791-15798.
17) Pasta, S. Y. *et al.* (2004) *Mol. Vis.* 10:655-662.
18) Liang, J. J. (2004) *Protein Sci.* 13(9):2476?2482.
19) Liang, J. J. and Fu, L. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293(1):7-12.
20) Bova, M. P. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275(2):1035-1042.
21) Wilmarth, P. A. *et al.* (2006) *J. Proteome Res.* 5(10):2554-2566.
22) Lampi, K. J. *et al.* (2006) *Biochemistry* 45(10):3146-3153.
23) Flaugh, S. L. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281(41):30782-30793.
24) Srivastava, O. P. and Srivastava, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301(1):44-49.
25) Thampi, P. *et al.* (2002) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43(10):3265?3272. 26. Aquilina, J. A. *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280(15):14485-14491.

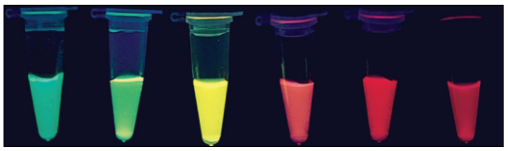
■ 관련제품

제품명	Size	TaKaRa Code
pDsRed-Monomer-N1 Vector	20 ㎍	632465
pDsRed-Monomer-C1 Vector	20 ㎍	632466
pAcGFP1-N1 Vector	20 ㎍	632469
pAcGFP1-N2 Vector	20 ㎍	632483
pAcGFP1-N3 Vector	20 ㎍	632484
pAcGFP1-N Vector Set	3 vectors	632485
pAcGFP1-C1 Vector	20 ㎍	632470
pAcGFP1-C2 Vector	20 ㎍	632481
pAcGFP1-C3 Vector	20㎍	632482
pAcGFP1-C Vector Set	3 vectors	632486

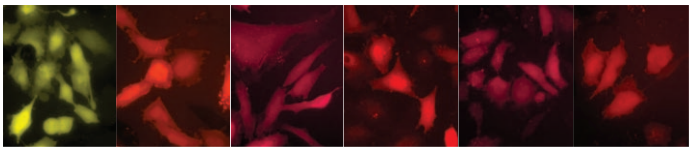
※ License Notice [5] [6] [7]

Clontech Fluorescent Protein의 명성 그대로!!

Living Colors® Fluorescent Proteins
Fruit Fluorescent Proteins



AmCyan1 ZsGreen1 ZsYellow1 DsRed2 AsRed2 HcRed1



mBanana mOrange mRaspberry mStrawberry mPlum mCherry

■ Clontech 형광단백질 선택가이드

Application	추천 단백질	Comments	적용가능한 vector 형태
Fusion Tags	AcGFP1 DsRed-Monomer mCherry	단량체 형광 단백질로 목적단백질에 구조적으로 영향을 적게 주므로 Fusion Tag으로 적당하다.	A
Reporters of Promoter Activity	DsRed2 ZsGreen1 ZsYellow1	밝기가 밝은 다량체 형광단백질로 Reporter로 적합하다. Promoter 활성 측정을 위한 promoterless 형광 vector도 판매되고 있다.	B
Cell Labeling and Imaging	DsRed-Express ZsGreen1 mCherry mOrange AmCyan1	각기 다른 파장대의 형광단백질로 multiplex image 실험이 가능하다. 매우 다양한 파장대의 단백질 중 색깔, filter등에 따라 원하는 것을 선택할 수 있다.	C
Detection of Protein-Protein Interactions (FRET)	AcGFP1 and DsRed-Monomer AcGFP1 and mCherry mOrange and mStrawberry mOrange and mCherry	높은 효율의 FRET 실험을 위해 형광단백질pairs를 추천한다.	A, D
Measuring Proteasome Activity	ZsProSensor	Proteasom 저해/활성 특징을 가지는 물질을 탐색하기 위한 image-based asssy에 적합하다.	E
Subcellular Labeling	AcGFP1 DsRed-Monomer mCherry HcRed1	Subcelluar Localization Vector를 이용하여 아래와 같은 구조에 형광단백질을 발현시킬 수 있다. golgi complexes endoplasmic reticuli actin filaments mitochondria plasma membranes peroxisomes nuclei endosomes microtubules	C
In vivo (Plant/Animal) Imaging	mPlum HcRed1 mCherry	Far red 파장의 단백질은 식물 또는 동물 세포 자체적으로 발광되는 녹색 형광을 배제한 채 *in vivo* 관찰이 가능하다.	A, B, D
Visualization of Gene Expression	DsRed-Express ZsGreen1	IRES (bicistronic) vector는 원하는 단백질과 형광단백질을 하나의 RNA 전사물로부터 번역할 수 있다. Transfection 효율, 유전자 발현 정도를 모니터링하는데 적합하다.	F
Bacterial Expression	GFPuv	GFPuv (variant of Aequorea victoria green fluorescent protein)는 lac promoter에 의해 발현조절되며, UV상(360~400nm)에서 최대형광값을 관찰 할 수 있다.	D
Kinetic Studies	HcRed1-DR DsRed-Express-DR ZsGreen1-DR	Mammalian system에서 rapid turnover를 위해 특별히 불안정화된 형광단백질 변이체를 포함하는 vector이다.	B
Timed Gene Expression and DownRegulation	pTimer Vectors	형광단백질이 녹색에서 적색으로 시간에 따라 변하여 promoter 활성을 시간단위로 확인할 수 있다.	B, D

The available vector formats for the recommended fluorescent proteins (FP) are indicated below:
A : N- and C-Terminal Fusion Vectors (pFP-N1 and pFP-C1; e.g., pAcGFP1-N1 and pAcGFP1-C1)
B : Promoterless Vectors (pFP-1; e.g., pDsRed2-1)
C : Subcellular Localization Vectors (pFP-Structure; e.g., pAcGFP1-Actin)
D : Source Vectors (pFP; e.g., pAcGFP1)
E : Proteasome Sensor Vector (pZsProSensor-1) F: IRES Vectors (pIRES2-FP; e.g., pIRES2-AcGFP1)