

ProteoTuner™ System의 응용에

분비형단백질 발현과 Knockout Phenotype 회복의 정확한 조절

Cell Biology Group
Clontech Laboratories, Inc.

ProteoTuner System은 DNA 혹은 mRNA의 레벨에서 단백질의 발현을 조절하는 것보다 더 정확하고, 직접적으로 목적단백질의 발현 레벨을 조절할 수 있는 새로운 기술이다. 이 기술의 특징을 보다 잘 설명하기 위하여, Shield1이 세포독성이 없음을 증명하였고, 또한 본 시스템이 cytosolic protein 뿐만 아니라 분비형단백질에도 적용 가능함을 확인하였다. 마지막으로 정확한 조절능력을 보여주기 위해 Knockout Phenotype의 회복에 본 시스템을 사용하였다.

ProteoTuner System은 세포내에서 ligand의 존재적이고, 조절가능하며, 가역적인 방법으로 목적단백질의 안정적인 발현과 분해를 가능하게 한다. 본 시스템은 MCS의 upstream에 ProteoTuner destabilization domain(DD)을 포함한 vector와 DD의 stabilizing ligand인 Shield1으로 구성되어 있다. DD는 변형된 FKBP 단백질을 기본으로 한 12 kDa (107 aa) tag이다. 목적단백질이 DD tag와 융합단백질로 발현되면, proteasome에 의해 빠르게 분해된다. 하지만 작고(750 Da), 세포막을 자유롭게 통과할 수 있는 ligand인 shield1을 세포배양액에 첨가하면, 이 Shield1은 가역적으로 DD tag와 결합하여 DD-tag가 붙어있는 목적단백질의 분해를 막아 빠르게 세포내에 축적되게 한다¹⁾.

■ No Detectable Side Effects

ProteoTuner 기술은 다양한 세포주와 생물체에 성공적으로 사용되고 있다¹⁻⁶⁾. 최근 Wandless와 연구자들은 Shield1의 영향으로 인한 유전자발현상의 교란을 찾기 위해 microarray를 이용하였다. 1 μM~10 μM의 Shield1을 처리하였을 때 단지 몇 개의 유전자만이 RNA 레벨에서 미세한 변화를 나타냈다. 100 nM Shield1을 처리했을 때는 어떤 유전자도 변화를 나타내지 않았다²⁾. 이번 연구뿐 아니라 여러 다른 논문의 저자들은 Shield1이 tumor-bearing mice에서 치료성과에 어떤 영향도 주지 않으며, Shield1을 처리한 mouse가 정상적인 몸무게와 활동성 및 섭식행동을 유지하고 있음을 보고했다³⁾.

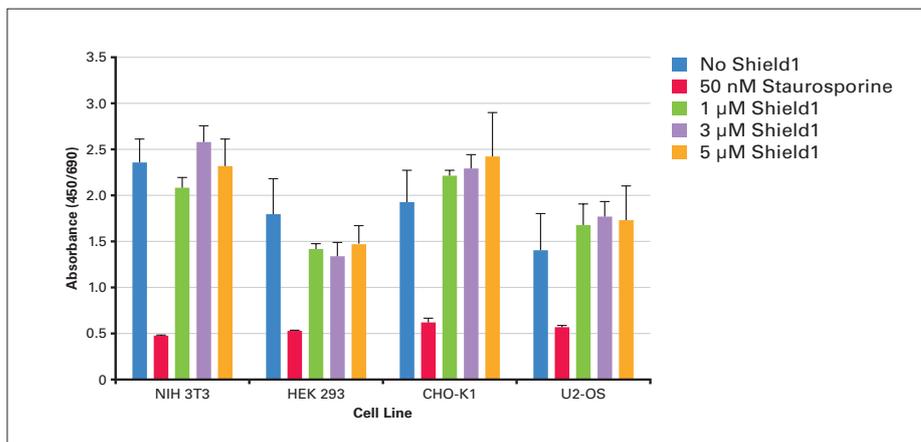


그림 1. Shield1 does not affect viability, even at 5–10 times the recommended concentration. Each indicated cell type (1×10^4 cells/well of a 96-well plate) was treated with 0, 1, 3, or 5 μM Shield1. Staurosporine (50 nM), a known apoptosis inducer, was used as a negative control. 48 hr later, cell proliferation was measured using the Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent.

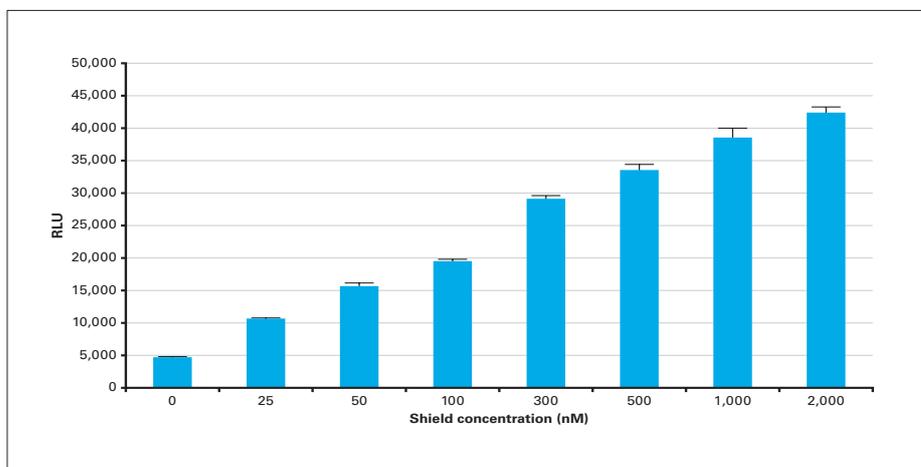


그림 2. Shield1 has a stabilizing effect on secreted *Metridia* luciferase protein, implying a similar mechanism for Shield1-based stabilization of secreted and cytosolic proteins. Shield1 stabilizes secreted proteins in a tunable manner. Cells were transiently transfected with the DD-*Metridia* luciferase construct, and treated with increasing concentrations of Shield1. Six hr later, media samples were collected and the amount of secreted DD-*Metridia* luciferase in the media was determined using the Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter Assay. RLU = relative light units.

이러한 최근의 연구보고를 확인하기 위해, 실험에 많이 사용하는 NIH-3T3, HEK 293, CHO-K1, U2OS 세포주에 Shield1의 농도를 증가시켜 처리한 후, 그 영향을 관찰하였다. 세포독성은 Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent (TaKaRa Code 630118)를 사용해 확인하였다. 조

직배양시 사용권장량의 5–10배의 Shield1을 처리했을 때도 세포의 증식에는 문제가 없었다(그림 1). 기존의 연구결과와 같이 이번 실험에서도 Shield1은 세포독성이 없고, 부작용도 없는 것으로 나타났다.

continued...

■ 분비형 단백질에 적합한 시스템

ProteoTuner 시스템이 cytosolic protein의 발현 레벨을 조절할 수 있다는 것은 이미 널리 보고되고 있고, 최근에는 분비형 단백질의 연구에도 적용되고 있다³⁾. 본 실험에서는 secreted reporter 단백질인 *Metridia* luciferase를 ProteoTuner 시스템에 적용하여, Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System (TaKaRa Code 631730)으로 확인하였다. 먼저 N-terminal signal peptide와 *Metridia* luciferase 사이에 DD를 삽입한 vector를 제작하여, secreted pathway에 사용될 수 있도록 하였다.

이 vector를 도입한 세포에 다양한 농도로 Shield1을 처리하고, 세포배양액으로 분비된 DD-*Metridia* luciferase의 양을 Ready-To-Glow assay 방법으로 측정하였다. 이 결과는 Shield1이 DD-*Metridia* luciferase 단백질의 안정에 미치는 영향을 반영하는 것이다. 세포배양액의 Shield1 농도는 bioluminescence와 직접적으로 연관이 있었으며(그림 2), 이 결과는 농도 의존적으로 Shield1이 DD-tagged secreted protein의 안정에 관여함을 나타낸다. 그러나 분비형단백질의 안정성은 cytosolic protein의 안정성보다는 약간 낮을 수도 있다. 소포체(ER)를 통해 수송되는 동안 분비형단백질이 가장 높은 안정성을 갖기 위해서는 높은 농도의 Shield1 (2 μM)이 필요한 반면, cytosolic protein의 완전한 안정성에 필요한 Shield1 농도는 500-1,000 nM이다. 그러나 그림 1에서 나타난 것과 같이, Shield1은 5 μM까지 세포생존력에 영향을 주지 않는다 (그림 1).

■ Knockout Phenotype의 회복

Knockout 모델은 단백질 기능연구에 강력한 연구방법이다. 그러나 'Knocked-out' 단백질이 조절가능한 방법으로 재도입되어 표현형이 회복된다면, 단백질기능에 대해 보다 자세하게 연구할 수 있다. 본 실험에서는 ZAP70 knockout 세포주(116 Jurkat)에 DD-tagged ZAP70 protein을 재도입시키는데 ProteoTuner System을 사용하였다. ZAP70 (Zeta chain-associated protein kinase 70)은 T세포와 NK (natural killer) 세포에서 기본적으로 발현되는 tyrosine kinase로, IL-2

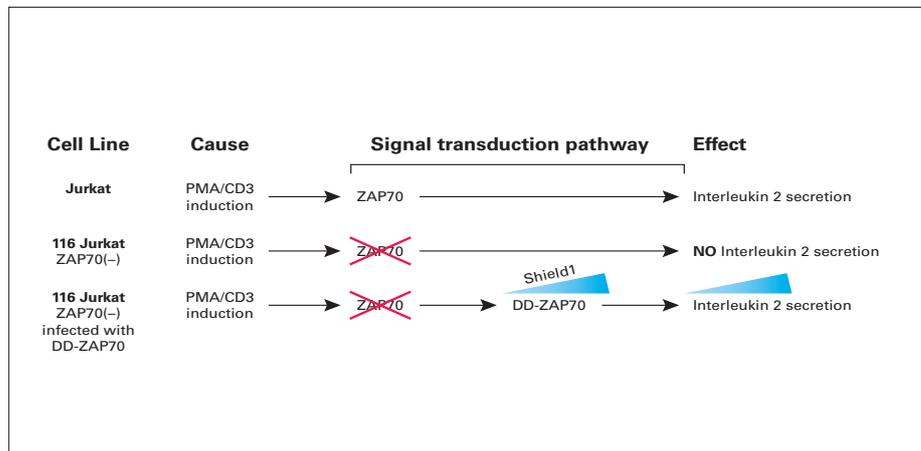


그림 3. Tunable rescue of the ZAP70 signal transduction pathway in the ZAP70 deficient 116 Jurkat cell line.

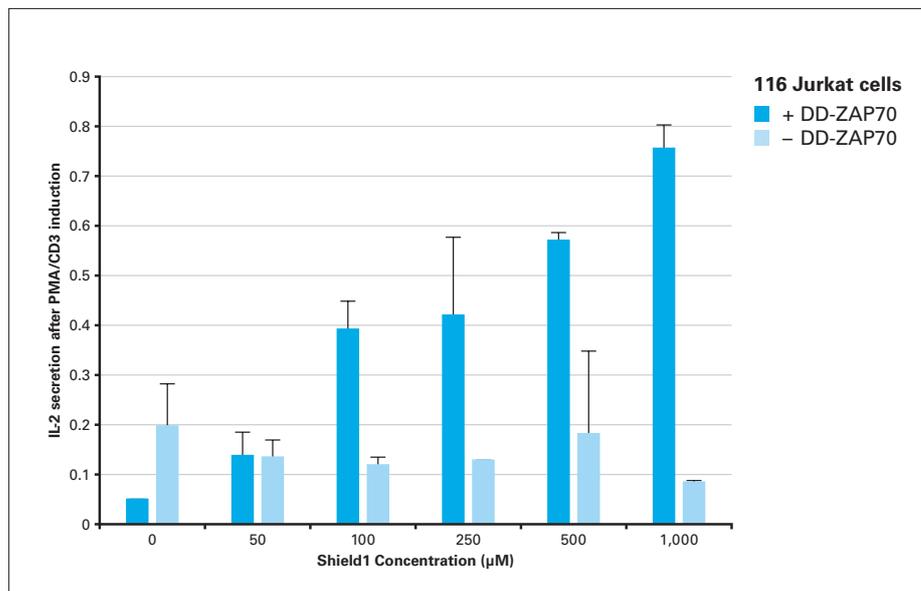


그림 4. Rescue of the ZAP70-dependent signaling pathway with the ProteoTuner system. The level of rescue is proportional to the amount of ZAP70 that is rescued, 116 Jurkat cells (ZAP70-negative) were infected or mock-infected with a construct for DD-ZAP70, cultured in varying concentrations of Shield1, and induced with PMA and CD3. The extent of recovery was measured by IL-2 secretion into the culture media, via an ELISA assay.

분비에 관여하는 T-cell signaling의 시작에 중요한 역할을 한다 (그림 3). 본 실험에서는 116 Jurkat에서 DD-ZAP70을 발현시키기 위해 Lenti-X ProteoTuner System과 RetroNectin Reagent를 사용하여, 형질도입이

어려운 이러한 세포에서 형질도입효율을 90%까지 높였다. Shield1의 양이 증가함에 따라 DD-ZAP70이 안정화되었고, PMA/CD3 유도에 의해 ZAP70 의존적인 신호전달이 회복되는 것을 확인하였다(그림 4).

ProteoTuner™ System의 응용에 분비형단백질 발현과 Knockout Phenotype 회복의 정확한 조절

continued...

세포배양액에서 IL-2의 양을 반영하여 산출한 회복율은 Shield1의 농도와 정비례하였으며, 이는 곧 세포내의 안정된 DD-ZAP70의 양과 정비례함을 나타낸다. 위의 실험으로 ZAP70 signaling pathway는 on/off switch가 아니라 ZAP70 발현을 통해 조절될 수 있음을 밝혀낸 것이다. Shield1이 없을 때 형질도입된 세포내의 DD-ZAP70 레벨은 매우 낮아, signal pathway를 회복시킬 수 없었다. 형질도입되지 않은 116 Jurkat 세포와 비교하여 IL-2 레벨이 낮았다.

■ 다재다능한 시스템

ProteoTuner 시스템은 광범위한 단백질과 다양한 실험에 적용할 수 있고, Shield1이 세포독성이 없기 때문에 실험에 의해 관찰된 결과가 목적 단백질의 변화에 의한 것이라고 확신할 수 있다. 또한 ProteoTuner 시스템은 cytosolic protein의 양 뿐만 아니라 분비형단백질의 양을 조절하는 데도 사용할 수 있다. 본 실험에서는 Knockout 시스템에서 단백질 회복율을 빠르고 정확하게 조절하여, 목적단백질의 회복을 미세하게 조절할 수 있었다.

■ 참고문헌

1. Banaszynski, L. A. *et al.* (2006) *Cell* 126 (5):995-1004.
2. Maynard-Smith, L. A. *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* 282 (34):24866-24872.
3. Banaszynski, L. A. *et al.* (2008) *Nature Med.* 14 (10):1123-1127.
4. Armstrong, C. M. and Goldberg, D. E. (2007) *Nature Meth.* 4 (12):1007-1009.
5. Berdeaux, N. *et al.* (2007) *Nature Med.* 13(5): 597-603.
6. Herm-Gotz, A. *et al.* (2007) *Nature Meth.* 4(12):1003-1005.

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
ProteoTuner System	each	632172
ProteoTuner IRES2 System	each	632168
Retro-X ProteoTuner System	each	632171
Retro-X ProteoTuner IRES System	each	632167
Lenti-X ProteoTuner System	each	632173
Lenti-X ProteoTuner Green System	each	632175
Shield1*	60 µl	631037
	200 µl	631038
	500 µl	632189
Lenti-X HT Packaging System	20 rxns	632160
	40 rxns	632161
Premixed WST-1 Cell Proliferation Reagent	2,500 rxns	630118
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System	100 rxns	631730
	500 rxns	631731
	1,000 rxns	631732
RetroNectin	0,5 mg	T100A
	5×0,5 mg	T100B

* The number of reactions depends on the concentration of Shield1 used. At the maximum

* License Notice: [1], [2], [3], [5], [6], [7], [8], [9], [13], [14], [16]

Berthold Detection Systems

Your Partner for Luminescence Measurement



FB12 Tube Luminometer

The Gold Standard for Glow Luminescence

- Ultrasensitive Photon Counting Detector
- Total Flexibility in Sample Format
- Standalone Operation or PC Operation



Sirius Tube Luminometer

Highest Performance and Flexibility
same features as FB12, PLUS:

- Built-in Printer
- Up to Two Automated Reagent Injectors
- Safe Operation through Sample Presence Detection



Orion L Microplate Luminometer

All You Need for Luminescence
Measurement

- Ultrasensitive Photon Counting Detector
- Up to Two Automated Reagent Injectors
- Sophisticated PC Software



Orion II Microplate Luminometer

The Top Instrument in the Field
same features as Orion L, PLUS:

- Up to Four Automatic Reagent Injectors
- Two Temperature Control Options
- And Many More Powerful Functions

