

필요에 따라 신속하게 단백질 발현을 조절하는 Lenti-X™ ProteoTuner™ Systems

Cell Biology Group
Clontech Laboratories, Inc.

액틴(actin)을 신속하게 재구성하기 위해서는 세포골격(cytoskeleton)의 역할이 필수적이지만, 액틴의 재구성 과정이 매우 빨라 연구를 진행하는데 어려움이 있다. 그러나 ProteoTuner 시스템을 이용하여 단백질의 안정성을 조절함으로써 액틴의 재구성을 연구하는 것뿐만 아니라 다른 빠른 세포 현상도 연구할 수 있게 되었다.

진핵세포는 세포내로 고분자를 전달하거나 감염부위로 이동하는 동안 그들의 형태를 빠르게 변화할 수 있는 능력을 가지고 있다.

이런 현상은 세포골격(cytoskeleton)이라고 불리는 세포이하의 시스템을 통해 이뤄지는데, 세포골격(cytoskeleton)은 미소관(microtubule), 중간 필라멘트(intermediate filaments) 그리고 액틴 필라멘트 네트워크(actin filament network)로 이뤄진 3종류의 단백질 필라멘트(protein filament)로 구성되어 있다.

■ 액틴의 재구성(Actin Reorganization)

액틴은 세포와 관련된 필라멘트(filament) 시스템을 형성하는 42 kDa 단백질로, 끊임없이 자가결합과 자가분해를 한다^{1,2} (리뷰). 각 필라멘트의 “플러스” 쪽은 필라멘트 “마이너스” 쪽 또는, 반대쪽보다 단량체 액틴에 친화성이 더 높다 (그림 1).

지금까지도 세포내 액틴 필라멘트 네트워크가 얼마나 빨리 재구성하는지 측정하는 것은 매우 어려웠다. 기존의 시각화 방법으로는 형광으로 라벨링한 액틴과 액틴 항체를 마커로 이용하거나 형광 라벨된 phalloidin(액틴 필라멘트에 결합하는 특수한 단백질)을 이용하는 방법이 있다. 그러나 이런 기술들은 염색하거나 라벨링하는 동안의 액틴 필라멘트 상태를 기록할 수 없을 뿐만 아니라 액틴 필라멘트의 역동적인 재구성과정을 모니터링할 수 없다.

다른 방법으로는 라벨링된 액틴을 미량주입하여 주입 후에 만들어지거나 재배열되는 액틴 필라멘트를 모니터링하는 방법을 사용하기도 한다. 라벨링된 액틴을 이용한 실험에 따르면 PtK2 상피세포(epithelial cell)에서 액틴 필라멘트 네트

워크가 완벽하게 재구성되기 위해서는 1시간 정도 소요된다고 보고되었다³⁾. 그러나 미량주입법은 매우 노동집약적이며 한번에 제한된 수의 세포에만 적용할 수 있다. 그래서 Clontech은 Lenti-X lentiviral delivery(렌티바이러스 도입법)기술과 ProteoTuner 기술의 장점을 결합하여 매우 간단한 대안을 개발하였다.

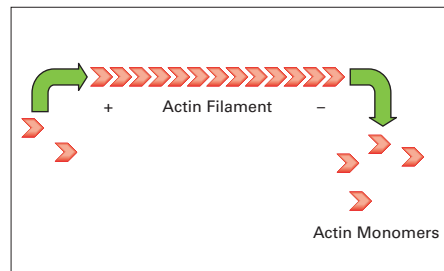


그림 1. Dynamic polymerization and depolymerization of actin. Self-assembly of actin filaments occurs at the plus end of an existing actin filament, as monomeric actin is incorporated. Conversely, disassembly occurs at the minus end where actin monomers depolymerize from the filament, causing a continuous rearrangement of the actin filament network.

■ ProteoTuner 시스템을 이용한 액틴의 안정화 조절

Clontech의 ProteoTuner 시스템을 이용하여 좀더 간단하고 신뢰성 있게 액틴 필라멘트 네트워크의 세포골격의 재구성(cytoskeletal rearrangement)과 같은 빠른 세포내 과정을 관찰할 수 있게 되었다. ProteoTuner 시스템은 관찰하려는 단백질에 반응이 매우 빠른 불안정화 도메인(DD)을 융합시킨 융합단백질로 발현하도록 한다. DD와 융합된 단백질(DD-tagged fusion protein)은 프로테오솜(proteasome)에 의해 빠르게 분해되지만, 세포가 Shield1이라는 안정화 리간드를 넣은 배지에서 배양된다면, 단백질은 분해되지 않고 세포내에 축적될 수 있다⁴⁾.

배양배지에 Shield1을 첨가 후 15~20분이면 융합단백질이 관찰할 수 있을 정도로 축적된다⁵⁾.

클론텍은 세포내에서 액틴 필라멘트의 역동적인 변화를 연구하기 위해 ProteoTuner 시스템의 장점을 적용하였다(그림 2). 특히 Lenti-X ProteoTuner System을 이용하여 신경줄기세포(neural progenitor cell)에서 DD와 융합된 액틴

(DD-tagged actin molecule)을 도입하고 발현시켰다.

Clontech에서는 인간 α -actin의 N 말단에 mCherry 형광단백질을 융합시켜 세포내의 모든 액틴이 mCherry-Actin로 발현되거나, 인간 α -actin의 N말단에 DD로 태그된 AcGFP1 (DD-tagged AcGFP1)를 융합시켜 DD-AcGFP1-Actin이 발현되도록 하는 2가지 렌티바이러스를 설계하였다. 이때 DD-AcGFP1-Actin 단백질은 Shield1이 있을 때만 안정화되며 Shield1이 없을 때는 즉시 프로테오솜에 의해 분해된다.

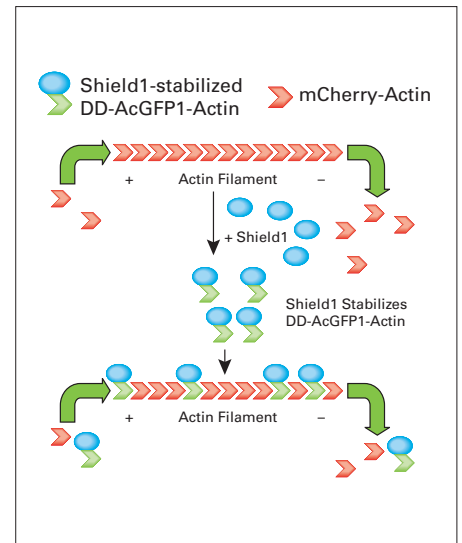


그림 2. Experimental design. In the absence of Shield1 only mCherry-Actin is present to be incorporated into newly forming actin filaments. When Shield1 is added, DD-AcGFP1-Actin is stabilized, and is therefore incorporated together with mCherry-Actin into newly formed actin filaments.

■ 실험결과와 고찰

mCherry-Actin 렌티바이러스와 DD-AcGFP1-Actin 렌티바이러스로 동시에 감염된 HeLa 세포와 신경줄기세포(neural progenitor cell)는 Shield1이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 배양되었다. Shield1이 첨가된 배지에서는 DD-AcGFP2-Actin이 매우 빨리 안정화되어 액틴 필라멘트로 결합되는 것을 확인할 수 있었다. 예상했던 것과 같이, Shield1이 없는 배지의 녹

continued...

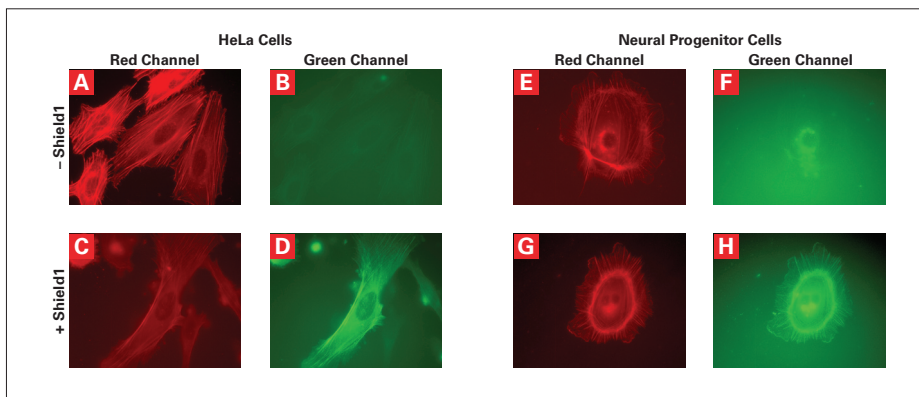


그림 3. Controlling actin stability with the ProteoTuner system. In the absence of Shield1, DD-AcGFP1-Actin is not present (Panels B & F) despite a normal, mCherry-labeled actin filament network (Panels A & E). In the presence of Shield1, DD-AcGFP1-Actin is stabilized, and present in the actin network (Panels D & H) in addition to mCherry-labeled actin (Panels C & G). Cells were fixed using 4% paraformaldehyde and imaged with a 40X objective on a Zeiss Axioskop microscope using the green Chroma filter set HQ460/40, Q490LP, HQ515/30 and the red Chroma filter set HQ 540/40X, 570DCPL, D600/50M.

색 채널에서는 어떤 시그널도 없는 반면 적색 채널에서는 mCherry-Actin으로 라벨된 세포골격 (cytoskeleton)의 매우 강한 적색 시그널을 관찰할 수 있었다(그림 3). 이 결과는 DD-AcGFP1-Actin이 역동적으로 변화하는 액틴 필라멘트 네트워크로 구성되기전에 빠르게 분해되는 것을 보여준다(그림 3-A, B, E, F). HeLa 세포에 Shield1을 첨가한지 1시간 후, DD-AcGFP1은

안정화되고 mCherry-Actin과 함께 액틴 필라멘트 네트워크로 구성되었다(그림 3-C, D). 실제 Shield1을 처리한지 15분만에 DD-AcGFP1-Actin은 액틴 필라멘트에서 mCherry-Actin과 함께 관찰되었다(data not shown). 이와 같이 신경 세포에서 액틴 필라멘트의 전환이 매우 빠르게(3시간 이내) 진행되는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다(그림 3-E, H).

■ 관련제품

제품명	Vector	용량	TaKaRa Code
ProteoTuner System	pPTuner	each	632172
ProteoTuner-IRES2 System	pPTuner IRES2	each	632168
Retro-X ProteoTuner System	pRetroX-PTuner	each	632171
Retro-X ProteoTuner IRES System	pRetroX-PTuner IRES	each	632167
Lenti-X ProteoTuner System	pLVX-PTuner	each	632173
Lenti-X ProteoTuner Green System	pLVX-PTuner Green	each	632175
Shield1*		60 µl	631037
		200 µl	631038
		500 µl	632189

* The number of reactions depends on the concentration of Shield1 used. At the maximum suggested concentration (1,000 nM) 60 µl = 30-plus reactions and 200 µl = 1,000-plus reactions in a six-well plate.

* Shield1 (60 µl) is included with all ProteoTuner Systems.

본 실험을 통해 mCherry-Actin과 Shield1으로 안정화된 DD-AcGFP1-Actin이 모두 HeLa 세포에서 1시간 이내에 액틴 필라멘트 네트워크를 완벽하게 재구성하는 것을 확인하였다. 이 결과는 앞서 언급한 미세주입실험 결과³⁾와 완벽하게 일치하며, ProteoTuner 기술을 이용하였을 때 훨씬 더 간편하게 데이터를 얻을 수 있었다. 또한 본 실험에서는 액틴 네트워크의 신속한 재구성의 관찰 뿐만아니라 mCherry-Actin과 DD-AcGFP1-Actin이 동일한 필라멘트 패턴을 나타냄을 확인하여(그림 3-C, D, G, H) DD가 융합 단백질 단량체의 액틴 필라멘트 구성을 간섭하지 않는다는 것을 보여주었다. 또한 Shield1에 의한 어떤 독성도 관찰되지 않았다.

■ 결론

ProteoTuner시스템은 목적 단백질의 양을 신속하게 변화시킬 수 있을 뿐만 아니라 DD융합단백질의 발현과 Shield1을 이용한 발현 단백질의 안정화를 조절하여 세포골격 재구성과 같은 역동적인 과정을 관찰할 수 있게 한다.

■ 참고문헌

1. Holmes, K. C., et al. (1990) *Nature* 347(6288):44-49.
2. Ono, S. (2007) Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its Significance in Cytoskeletal Dynamics. In, *International Review of Cytology*, Ed. Jeon, K. W. (Academic Press, NY) Vol. 253, pp. 1-82.
3. Theriot, J. A. and Mitchison, T. J. (1991) *Nature* 352(6331):126-131.
4. Quick & Reversible Control of Your Protein of Interest. (April 2008) *Clontechiques* XXIII(2):1-2.
5. Banaszynski, L. A. et al. (2006) *Cell* 126(5):995-1004.

* License Notice : [17], [18], [19], [20], [21], [22], [23]