

*Escherichia coli*의 purine
repressor를 이용한 유핵세포에서
작용하는 새로운 DNA-binding
domain의 개발 및 특성 규명

연세대학교 대학원

의과학사업단

연 은 희

*Escherichia coli*의 purine
repressor를 이용한 유핵세포에서
작용하는 새로운 DNA-binding
domain의 개발 및 특성 규명

지도교수 김 경 섭

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함


2001년 6월 일


연세대학교 대학원


의과학사업단

연 은 희

연은희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 가 경서 

심사위원 이 진성 

심사위원 최 강열 

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

하나님께 이 모든 감사를 드립니다.

이 논문을 완성함에 있어 세심한 배려와 아낌없는 지도를 베풀어주신 은사 김경섭 선생님께 진심으로 감사드리며, 부족한 논문을 심사하여 주신 최강열 선생님과 이진성 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 언제나 따뜻한 관심과 도움을 주신 오상환 선생님, 안용호 선생님, 허만욱 선생님께도 감사드립니다.

아울러 연구기간 중 큰 힘이 된 생화학-분자생물학교실의 모든 동료 선생님들의 관심과 충고에 고마운 마음을 드립니다.

언제나 기도와 사랑으로 보살펴 주신 부모님과 가족들, 그리고 여우훈 목사님과 살롬에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	5
1. Recombinant DNA-binding domain construct 제조	5
가. pGEX-PurR, PurG, PurHG 제조	5
나. Recombinant protein 분리	6
2. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	6
가. Oligonucleotide	6
나. Electrophoretic mobility shift assay	7
(1) Oligonucleotide의 방사성 동위원소 표지	7
(2) Electrophoretic mobility shift assay	8
3. 인공 핵 수용체 및 reporter gene construct 제조	8
가. 인공 핵 수용체 construct의 제조	8
나. Reporter gene construct 제조	10
4. 유핵세포 내에서의 활성 측정 (Transient transfection assay)	11
가. 세포 배양	11
나. Transient transfection assay 및 활성 측정	11
(1) Transient transfection assay	11
(2) Luciferase 활성 측정	12
(가) 세포 추출 용액의 준비	12
(나) β -galactosidase 활성 측정	12
(다) Luciferase 활성 측정	12
III. 결 과	14
1. <i>E. coli</i> 의 purine repressor를 이용한 recombinant	

DNA-binding domain 제조	14
2. 유핵세포 내에서의 recombinant DNA-binding domain 활성측정	17
3. Gal4 dimerization domain 변형에 따른 인공 핵 수용체 의 활성측정	18
4. Mutant consensus sequence에 따른 PurHG의 DNA 결합능 측정	25
IV. 고 찰	28
V. 결 론	32
참고문헌	33
Abstract	37

그림 차례

그림 1. Purine repressor의 DNA-protein 결합 모식도	15
그림 2. 재조합 DNA-binding 단백질의 DNA 결합능 측정	16
그림 3. 유핵세포 내에서의 recombinant DNA-binding domain 활성측정	20
그림 4. NIH 3T3 세포에서의 인공 핵 수용체의 transcription 활성측정	21
그림 5. 인공 핵 수용체 PurANR기능에 대한 Gal4 dimerization domain의 역할 규명	22
그림 6. DNA-binding domain내 Gal4 dimerization domain 크기에 따른 인공 핵 수용체의 transcription 활성 측정	23
그림 7. Purine repressor의 DNA-binding domain와 Gal4 dimerization domain 사이에 glycine첨가에 따른 인공 핵 수용체의 transcription 활성 측정	24
그림 8. 여러 변형된 purine repressor binding site에 따른 PurHG 단백질의 결합능 측정	26
그림 9. 변형된 인공 핵 수용체에 대한 여러 변형된 response element들의 반응성 측정	27

국문요약

*Escherichia coli*의 purine repressor를 이용한 유핵세포에서 작용하는 새로운 DNA-binding domain의 개발 및 특성 규명

새로운 DNA-binding domain (DBD)을 개발하고자 *E. coli*의 purine repressor DBD를 이용하였다. Purine repressor는 purine 생합성에 관여하는 유전자들의 promoter에 존재하는 16bp palindrome인 purine repressor response element (PurRE)에 결합하여, 이들 유전자들의 발현을 조절한다. Guanine, hypoxanthine등의 corepressor가 카복시 말단의 corepressor-binding domain (CBD)에 결합하면, purine repressor의 dimer 구조가 변화되어 두 개의 DBD가 서로 근접하여 palindrome의 major groove와 minor groove에 결합하게 된다. Purine repressor와 DBD만으로 corepressor와 무관하게 DNA에 결합할 수 있도록 Gal4의 dimerization domain (DD)을 결합시켜 PurHG를 제조한 결과, 새로이 개발된 DBD는 시험관내에서나 세포내에서 모두 PurRE에 강한 친화력을 나타내었다. Progesterone receptor ligand-binding domain (LBD)과 SREBP1a activation domain (AD)을 PurHG와 연결하여 인공 전사인자 (PurAD) 및 인공 핵 수용체(PurANR)를 제조하였고, 이들은 유핵세포 내에서 target 유전자의 발현을 효과적으로 조절하였다.

이상의 실험을 통하여 무핵세포 LacI 계열의 전사인자의 하나인 purine repressor의 DBD를 유핵세포에서 기능을 나타내도록 고안할 수 있었으며, 이러한 실험 결과는 무핵세포에서 발견되는 많은 종류의 전사인자들의 DBD를 인공 전사인자 개발에 이용할 수 있음을 시사한다.

핵심되는 말 : DNA-binding domain (DBD), dimerization domain (DD), 전사인자, 핵 수용체, 인공 핵 수용체

*Escherichia coli*의 purine repressor를 이용한 유핵세포에서 작용하는 새로운 DNA-binding domain의 개발 및 특성 규명

<지도교수 김경섭>

연세대학교 대학원 의과학사업단

연 은 희

I. 서 론

세포내 유전자 전사(transcription)는 특정 유전자의 promoter와 조절 부위에 general transcription factor와 transcription activator가 결합하여 서로 간의 상호작용을 통하여 조절된다. 대부분 transcription activator들은 homodimer나 혹은 heterodimer를 이루며, 특정 염기 서열을 인식하여 결합하는 DNA-binding domain (DBD)과, 전사를 활성화시키는 activator domain (AD)으로 이루어져있다.^{1,2} 최근에 서로 다른 transcription factor에서 유래된 AD와 DBD를 결합하여 새로운 형태의 인공 전사인자들이 개발되어 여러 가지 연구에 응용되고 있다. 현재 개발된 인공 전사인자들에서는 LexA와 Gal4의 DBD가 가장 널리 사용되고있으며, 최근 GCN4와 Zif268에서 유래된 DBD를 변형시켜 새로운 DBD를 개발하여 사용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.³⁻⁵ GCN4의 경우, DBD가 DNA-binding consensus 중의 half-site만으로도 매우 잘 결합하는 성질이 있어서, 이를 이용한 새로운 DBD가 개발되어 사용되었다.^{5,6} 또한 zinc finger DBD를 이용한 많은 연구가 이루어지고 있는데, 그 예로 zinc finger transcription factor DBD내의 DNA결합에 관여하는 아미노산을 변화시킬 경우, DBD가 인식하여 결합하는 염기 배열이 변화된다는 사실을 근거로 하여, 다양한 종류의 새로운 DBD를 제조하고 이들을 적당한 배열로 결합시킴으로서 새로운 염기서열을 인식하는 DBD를 개발하려는 시도가 있었다.^{1,7-10}

특정 유전자를 세포 내에서 발현시키고자 할 때 사용되는 일반적인 expression vector는 CMV promoter나 SV40 promoter를 이용하여 특정 유전자를 과발현 하는데 목적을 두고 있다. 그러나 원하는 세포에서, 원하는 시기에, 원하는 만큼만 발현이 이루어지도록 하기 위해서는 일반적으로 사용되는 expression vector로는 불가능하다. 이러한 목적으로 사용되어지는 promoter들은 외부에서의 신호에 의해 유전자발현을 임의대로 turn-on 또는 turn-off할 수 있어야 한다. Nuclear hormone receptor family에 속하는 steroid hormone receptor들의 경우 hormone이 없을 시에는 비활성화 되어 있다가 hormone이 결합되면 receptor가 활성화되어 핵으로 이동하여 특정 유전자의 transcription을 유도한다.^{8,11} 대부분의 inducible expression system에서는 steroid hormone receptor들의 ligand-binding domain (LBD)이 많이 이용되어지고 있다. 이 중 human progesterone receptor (PR) LBD이나 murine estrogen receptor (ER) LBD들이 현재 주로 이용되고 있는데, PR LBD의 경우 카르복시 말단의 915-933 아미노산을 제거한 부분의 domain은 특징적으로 생체 hormone인 progesterone과는 결합하지 않고 progesterone antagonist인 RU486 (mifepristone)에만 특이적으로 반응을 나타낸다. ER의 경우에는 525번째 glycine을 arginine으로 치환시킬 경우 estrogen antagonist인 4-OHT (hydroxytamoxifen)와만 반응을 보인다.^{12,13} 변형된 LBD와 DBD를 결합시킨 다양한 expression system이 많이 소개되어지고 있는데, 그 중 Beerli (2000)⁸ 등은 새로운 형태의 zinc finger DBD를 만들어 변형된 LBD를 결합시킨 regulator를 개발하여 이들이 4-OHT나 RU486에 의해 유전자 발현이 조절되도록 inducible expression system을 개발하여 보고하였다.

본 연구에서는 유핵세포 내에서 특정 염기서열을 인식하여 결합하는 새로운 DBD를 개발하고, 이를 이용한 inducible expression system을 만들었다. 즉, *E. coli* purine repressor의 DNA-binding domain을 변형시켜 특이 염기서열에 친화력이 높은 DBD를 개발하고, 그 특성을 규명하였다. *E. coli*의 purine repressor는 341개의 아미노산으로 구성되어 있으며 purine과 pyrimidine의 *de novo* pathway를 조절하는 억제 인자이다.^{14,18}

아미노 말단에 52개의 아미노산으로 구성되어 있는 DBD와 카르복시 말단에 289개의 아미노산으로 이루어진 corepressor 결합과 dimerization에 관여하는 CBD로 구성되어 있으며, 이 두 domain 사이에 hinge region이 있어 이들을 연결시켜주고 있다. DBD는 helix-turn-helix motif를 지니고 있어 target DNA의 major groove에 특이하게 결합하며, α helix구조인 "hinge" helix는 minor groove에 결합되어, 전체적으로 purine repressor의 DNA 결합을 안정화한다.^{14,15,16,17,21} Purine repressor는 *pyrC*, *pyrD*, *purF*, *purHD*, *purL* 등의 유전자 promoter에 존재하는 16 base pair(bp)로 구성되어 있는 purine regulatory sequence에 결합한다.^{17,18} 이 중 *purF*의 regulatory sequence를 변형시킨¹⁷ 완벽한 16bp palindrome sequence에 가장 친화력이 높다고 알려져 있다. Purine repressor는 카르복시 말단에 존재하는 CBD에 hypoxanthine이나 guanine corepressor가 결합하여야 비로서 활성화되어, DNA에 결합한다.¹⁵ 그러므로 purine repressor의 DBD만으로는 DNA 결합능력이 없기 때문에, 본 연구에서는 yeast의 galactose나 melibiose의 catabolic enzyme 유전자들의 발현을 조절하는 transcriptional activator인 Gal4 dimerization domain (DD)을¹⁹ 결합시켜, corepressor가 결합된 활성형 purine repressor의 DBD 형태를 인위적으로 만들어 corepressor의 존재유무에 관계없이 DNA에 결합능을 가질 수 있도록 고안하였다. 또한 고안된 새로운 DBD의 특성을 규명하였고, 이를 이용한 새로운 인공 핵 수용체를 제작하여 유핵세포에서 inducible gene expression system을 고안하였다.

II. 재료 및 방법

1. Recombinant DNA-binding domain construct 제조

가. pGEX-PurR, PurG, PurHG 제조

Recombinant DBD인 pGEX-PurR을 만들기 위해 pPR1010 plasmid를¹⁴ 주형으로 polymerase chain reaction (PCR)을 실시하여 DBD를 합성하였다. Primer는 ①5'-CTG AGA TCT AAT ACC ATG GCA ACA ATA-3'과 ②5'-ATC GGT GGA TCC AGC TTT TGC TTC ACC-3'을 사용하였고, 밑줄 친 부분은 인위적으로 만든 BglII와 BamHI 인식 부위이다. PCR반응에 사용된 효소는 Taq polymerase (BioBasic Inc., Canada)이다. 합성된 PCR산물을 BglII와 BamHI 제한 효소로 절단하여 1% agarose gel에 전기영동 한 후 Qiaquick gel extraction kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA fragment를 분리하였다. T4 DNA ligase (Bio Basic Inc., Canada)를 이용하여 pGEX-4T1 vector (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)의 BamHI 부위에 결합시켜 pGEX-PurR을 제조하였다. pGEX-PurG를 만들기 위해 먼저 pPR1010 plasmid를 주형으로 PCR을 실시하였다. 사용된 primer는 위에서 사용된 ①과 ③ 5'-CCT TTT GGT TTT GGG GCT AGG GGA GTA GTG TAA TT-3'이다. 그 다음 pCMV-Gal4ANR을 주형으로 PCR을 실시하였고, 사용된 primer는 ④5'-CAC TAC TCC CCT AGC CCC AAA ACC AAA AGG TCT CC-3'과 ⑤5'-TGA AAA AGT GGA TCC GGG CGA TAC AGT-3'이며 밑줄 친 부위는 BamHI 인식 부위이다. 여기서 생긴 2개의 PCR 산물을 주형으로 다시 PCR을 실시하였고, primer는 ①과 ⑤를 사용하였다. 새로 합성한 PCR산물을 BglII와 BamHI 제한 효소로 절단한 후, pGEX-4T1 vector의 BamHI 부위에 결합시켰다. 마지막으로 pGEX-PurHG를 제조하기 위해 우선 pPR1010 plasmid를 주형으로 PCR을 실시하였다. 여기에 사용된 primer는 ①과 ⑥5'-CCT TTT GGT TTT GGG GTT AAC CTT CAG GCT ACG CG-3'을 사용하였다. 그 다음 pCMV-Gal4ANR을 주형으로 PCR을 실시하였다.

사용된 primer는 ⑦5'-AGC CTG AAG GTT AAC CCC AAA ACC AAA AGG TCT CC-3'와 ⑤를 사용하였다. 두 개의 PCR산물을 얻은 후, 이들을 주형으로 다시 PCR을 실시하였다. Primer로는 ①과 ⑤를 사용하였으며, 얻어진 PCR산물은 BglIII와 BamHI 제한효소로 절단하여 pGEX-4T1 vector의 BamHI부위에 결합시켜 최종적으로 pGEX-PurHG를 얻었다.

나. Recombinant protein 분리

Recombinant PurR, PurG, PurHG 단백질을 얻기 위하여 제조된 pGEX-PurR, pGEX-PurG, pGEX-PurHG를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환시킨 뒤, colony 하나를 100 µg/ml 의 ampicillin이 포함된 5 ml Terrific Broth배양액에 접종하고, 37°C 배양기에서 12시간 배양시켰다. 이 세포배양액을 다시 100 µg/ml ampicillin이 포함된 새 배양액에 1:100으로 희석하여 접종한 후 600 nm에서 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양시켰다. 여기에 isopropyl-1-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.5 mM이 되도록 넣어준 후 3시간 동안 33°C 배양기에서 배양시켰다. 배양액을 원심 분리하여 bacteria 세포를 수거한 뒤, PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4)용액에 부유시킨 후 얼음 위에서 20초간 5회 sonication을 한 후, 4°C에서 12000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하였다. 아미노 말단에 glutathione S-transferase를 지니고 있어 glutathione-agarose (SIGMA Chemical Co., USA)를 이용하여 분리하였고, 농도는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)후 Coomassie Brilliant Blue staining을 통하여 확인하였다.

2. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

가. Oligonucleotide

Recombinant 단백질이 결합하는 부위의 염기서열을 다음과 같다

(Bioneer, Chungwon, Korea). PurE는 5'-CCC TAC GCA AAC GTT TGC GTT TTC TGA GCT-3', 5'-CAG AAA ACG CAA ACG TTT GCG TAG GGA GCT-3', mPurE1은 5'-CCC TAC GCA AAC AGT TTG CGT TTT CTG AGC T-3', 5'-CAG AAA ACG CAA ACT GTT TGC GTA GGG AGC T-3', mPurE2는 5'-CCC TAC GCA AAC AAG TTT GCG TTT TCT GAG CT-3', 5'-CAG AAA ACG CAA ACT TGT TTG CGT AGG GAG CT-3', mPurE3는 5'-CCC TAC GCA AAC GCG TTT GCG TTT TCT GAG CT-3', 5'-CAG AAA ACG CAA ACG CGT TTG CGT AGG GAG CT-3', mPurE4는 5'-CCC TAC GCA AAC GTT TAA ACG TTT GCG TTT TCT GAG CT-3', 5'-CAG AAA ACG CAA ACG TTT AAA CGT TTG CGT AGG GAG CT-3', 마지막으로 mPurE5는 5'-CCC TAC GCA AAC GTT TAA ACT TTC TGA GCT-3', 5'-CAG AAA GTT TAA ACG TTT GCG TAG GGA GCT-3'이다.

나. Electrophoretic mobility shift assay

(1) Oligonucleotide의 방사성 동위원소 표지

실험 2.가.에서 만든 oligonucleotide (10 pmoles/ μ l)를 1 μ l 사용하여 다음과 같이 probe를 제조하였다. 1 μ l의 oligonucleotide에 [γ -³²P] ATP (6,000 Ci/mmol, Amersham International)를 2 μ l 첨가하고 1 μ l의 10x T4 polynucleotide kinase 반응 완충용액 (1M Tris-Cl, pH 7.6, 200 mM MgCl₂, 200 mM β -mercaptoethanol), T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ l, Promega) 1 μ l 첨가하고 최종 부피를 10 μ l로 맞춘 후 37°C에서 90분간 반응시켰다. 이 반응액에 상보적인 염기배열을 갖는 oligonucleotide (10 pmoles/ μ l) 3 μ l, 10x H 완충용액 (500 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol, 1000 mM NaCl)을 첨가하여 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하여 90°C 이상에서 3분간 반응 후, 서서히 온도를 낮추어 annealing되도록 하였다. 여기에 TE 80 μ l를 넣어 Sephadex G-50 (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden) resin을 이용하여 분리하여 총

100 μl (0.1 pmoles/ μl)를 만들어 이 용액 1 μl 를 실험 2.나.(2)에 사용하였다.

(2) Electrophoretic mobility shift assay

결합 반응은 실험 2.나.(1)에서 제조한 probe 1 μl 와 정제된 각각의 GST-PurR, GST-PurG, GST-PurHG 단백질 0-120 ng 또는 500 ng에 10 mM HEPES, pH 7.9, 75 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ poly(dI-dC), 0.5% fetal bovine serum을 넣고 총 용액이 20 μl 되게 하였다. 이것을 상온에서 30분간 반응시킨 후에 1x TBE (45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA)가 들어있는 4% polyacrylamide gel을 1x TBE로 200 volt에서 전기영동을 약 1시간 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Whatman 3MM paper에 부착시켜 gel 건조기에서 말린 후 -70°C에서 over night동안 X-ray film에 노출시켰다.

3. 인공 핵 수용체 및 reporter gene construct제조

가. 인공 핵 수용체 construct 제조

인공 핵 수용체인 pCMV-PurANR을 만들기 위하여 먼저 실험 1.가의 pGEX-PurHG를 주형으로 PCR을 실시하여 약 520bp의 PurHG domain 전체를 합성하였다. 사용된 primer는 실험 1.가의 ①과 ⑤이다. PCR 산물을 BglIII와 BamHI 제한효소로 절단하여 분리한 후, T4 DNA ligase를 이용하여 pcDNA3 (Invitrogen)의 BamHI 위치에 결합시켜 pCMV-PurHG construct를 얻었다. 여기에 PR891LBD부분과 SREBP AD부분을 넣기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. 먼저 pGal4ANR construct의 SREBP AD부분과 vector 연결부위에 BamHI 제한효소 인식 부위를 만들기 위하여 site-directed mutagenesis를 실시하였다. 여기서 사용된 mutagenic primer는 5'-TAC TGC TTG AAT GGA TCC AGA TCC ATG GAC-3'와 5'-GTC CAT GGA

TCT GGA TCC ATT CAA GCA GTA-3'이며 밑줄 친 부위는 BamHI 제한효소 인식 부위이다. 주형인 pGal4ANR (10 ng/ μ l)를 1 μ l, 각각의 primer (10 pmoles/ μ l)는 1.25 μ l씩, dNTP (10 mM)는 1 μ l, 10x *Pfu* polymerase 반응 완충용액을 5 μ l 넣은 후 *Pfu* polymerase 1 μ l를 넣고, 총 용액부피가 50 μ l 되도록 하여 PCR을 실시하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C 30초, 1회, 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 68 $^{\circ}$ C 10분간 15회, 4 $^{\circ}$ C 조건으로 실시하였고, 반응 후에 DpnI (10 U/ μ l) 효소를 1 μ l를 직접 PCR 반응액에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 이 용액 1 μ l를 취하여 DH5 α 에 형질전환 시켰다. 이 colony 한 개를 실험 1.나에서와 같은 세포배양액에 넣어 배양시킨 후 QuickGene miniprep. Kit (GENEPIA, Seoul, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였다. 이 plasmid를 BamHI 제한효소로 절단한 후 1% agarose gel에서 분리하였다. 이 DNA fragment를 T4 DNA ligase를 이용하여 pCMV-PurHG construct의 BamHI 제한효소 인식 부위에 ligation시킨 후 DH5 α 에 형질 전환시켰다. 이 colony 한 개를 취하여 실험 1.나에서 사용한 세포배양액인 Terrific Broth에 키워 Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen Inc.)로 pCMV-PurANR를 분리하였다.

다음으로 pCMV-PurANR Δ Gal4 construct를 만들기 위해 pCMV-PurANR을 주형으로 PCR을 실시하였다. PurH DBD와 Gal4 DD사이에 BamHI 제한효소 인식 부위를 만들기 위해 site-directed mutagenesis를 실험 3.가와 같은 방법으로 실시하였고, 사용된 primer는 5'-AGC CTG AAG GTT AAC GGA TCC ACC AAA AGG TCT CCG CTG-3'과 5'-CAG CGG AGA CCT TTT GGT GGA TCC GTT AAC CTT CAG GCT-3'이며 밑줄 친 부위는 BamHI 제한효소 인식 부위이다. Mutation된 plasmid를 분리하여 BamHI으로 절단하여 Gal4 DD부위를 제거하고, vector만 다시 self-ligation 시켰다. DH5 α 에 형질전환 시킨 후 실험 1.나에서 사용한 Terrific Broth 세포배양액에 밤새 키워 Qiagen Plasmid Midi Kit로 pCMV-PurANR Δ Gal4 plasmid를 분리하였다.

또 다른 constructs인 pCMV-PurANR(G1)과 pCMV-PurANR(G2) 2개의 plasmid를 분리하기 위해서 먼저 pCMV-PurANR을 주형으로

site-directed mutagenesis를 실험 3.가와 같은 방법으로 실시하였다. 사용된 primer는 5'-AGC CTG AAG GTT AAC GGA CCC AAA ACC AAA AGG-3'과 5'-CCT TTT GGT TTT GGG TCC GTT AAC CTT CAG GCT-3'이며 밑줄 친 부위는 한 개의 glycine첨가부위이다. 또 다른 primer는 5'-AGC CTG AAG GTT AAC GGA GGC CCC AAA ACC AAA AGG-3'과 5'-CCT TTT GGT TTT GGG GCC TCC GTT AAC CTT CAG GCT-3'이며 밑줄 친 부위는 두 개의 glycine이 첨가됨을 나타낸 것이다.

마지막으로 pCMV-PurANRGal34, pCMV -PurANRGal57을 만들기 위하여 pCMV-PurANR을 주형으로, site-directed mutagenesis를 실시하였다. 사용된 primer는 5'-ATT TTT CCT GGA TCC GAC CTT GAC ATG-3' , 5'-CAT GTC AAG GTC GGA TCC AGG AAA AAT-3' , 5'-GCA TTG TTA ACA GGA TCC TTT GTA CAA GAT-3' , 5'-ATC TTG TAC AAA GGA TCC TGT TAA CAA TGC-3' 이며 밑줄 친 부위는 BamHI 제한효소 인식 부위를 나타낸 것이다. 분리해낸 각각의 plasmid를 BamHI으로 절단하여 Gal4 카복시 말단부위를 제거한 후 1% agarose gel에서 vector만 분리하여 self-ligation시켰다. 다시 DH5 α 에 형질전환 시킨 후 plasmid를 분리하였다.

나. Reporter gene construct 제조

Recombinant 단백질이 결합하는 부위의 염기서열¹⁸을 실험 2.가와 같이 제조하였다 (Bioneer, Chungwon, Korea). 실험 2.가와 같은 방법으로 각각의 oligonucleotide를 정제한 후 10 μ l TE에 녹인 후 1 μ l의 10x T4 polynucleotide kinase반응 완충용액, 10 mM ATP 2 μ l, T4 polynucleotide kinase 1 μ l를 넣고 총 부피가 20 μ l가 되도록 하여 37 $^{\circ}$ C에서 45분간 phosphorylation시켰다. 두 개의 sample을 섞은 후, 90 $^{\circ}$ C이상에서 2분간 가열하고 서서히 온도를 내려가며 annealing시켰다. 여기에 oligonucleotide가 여러 개 반복되어 결합하도록 T4 DNA ligase를 1 μ l넣은 후 16 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. pACL60 plasmid¹⁹를 SacI 제한효소로 자른 후 실험 1.가와 같은 방법으로

DNA fragment를 1% agarose gel에서 분리하여 TE 30 μ l에 녹였다. 이러한 vector를 위의 annealing시킨 sample에 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l 넣은 후 1시간 동안 ligation시키고, DH5 α 에 형질 전환시켰다. Colony 여러 개를 취하여 각각을 실험 1.나와 같은 방법으로 배양시킨 후 plasmid를 분리하여 T7 sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)로 sequence를 확인하여 5개 또는 3개가 반복하여 들어있는 plasmid를 선택하였다. 또한 ACL -60/+67 promoter를 TATA box로 바꾸기 위하여 실험 3.가와 같은 방법으로 pACL60을 주형으로 site-directed mutagenesis를 실시하였다. 최종적으로 실험 1.나와 같은 방법으로 각각의 reporter plasmid를 분리하였다.

4. 유핵세포 내에서의 활성 측정 (Transient transfection assay)

가. 세포 배양

ATCC에서 구입한 NIH 3T3 세포를 10% fetal bovine serum, 100 unit/ml penicillin G-sodium, 100 μ g/ml streptomycin sulfate와 0.25 μ g/ml amphotericin B가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies, Inc., USA)에서 배양시켰다.

나. Transient transfection assay 및 활성 측정

(1) Transient transfection assay

NIH 3T3 세포를 2×10^5 cells/35-mm dish의 density로 plating하고, 그 다음날 transfection을 실시하였다. 먼저 pCMV-PurANR plasmid를 pPuRE-luc, pCMV- β -gal plasmid와 섞었다. 35-mm dish 1 well당 100 μ l의 DMEM (free FBS, antibiotics)과 Plus reagent (Life Technologies, Inc.) 4 μ l를 섞어 놓은 plasmid와 섞었다. 이 혼합물을 상온에서 15분간 방치시킨 후 다시 100 μ l의 DMEM (free FBS, antibiotics)에 Liphofectamine reagent (Life

Technologies, Inc.) 2 μ l 넣어 희석시킨 후 위의 혼합물에 섞고 상온에서 15분간 방치하였다. 이 때 전날 미리 plating해 놓은 세포는 DMEM 배지틀 제거한 후 PBS 완충용액으로 1 ml로 2회 세척하고 800 μ l의 DMEM (free FBS, antibiotics) 배지틀 넣어 놓았다. 이 세포에 위에 섞어 놓은 혼합물 200 μ l를 분주하고 37°C, CO₂ incubator에서 3시간 배양시켰다. Transfection한 배지틀 모두 제거한 다음, 다시 새 DMEM 배지로 갈아주고, 24시간 배양시켰다. 24시간 후에 2 μ l의 RU486 (1 mM/ μ l)을 처리하였으며, 다시 24시간 배양시켰다.

(2) Luciferase 활성 측정

(가) 세포 추출 용액의 준비

실험 4. 나. (1)의 세포가 들어있는 plate에서 배양액을 제거하고 2 ml의 PBS로 2회 세척하였다. 각 plate에 20 μ l의 reporter lysis beffer (Promega)를 가한 후, 세포를 긁어 세포를 회수하였다. 1분간 vortex 하여 완전히 세포를 lysis시킨 후에 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리 한 후 상층액을 회수하여 세포 추출용액을 얻었다. 세포추출용액 20 μ l는 β -galactosidase활성을 측정하였고, 5 μ l는 luciferase 활성을 측정하였다.

(나) β -galactosidase 활성 측정

β -galactosidase 활성의 측정은 Hall 등(1983)의 방법으로 시행하였다. 세포 추출 용액 20 μ l에 3.2 mg의 O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), 0.1 M sodium phosphate beffer, pH 7.8, 4 ml, 40 μ l의 100x Mg용액 (0.1 M MgCl₂, 4.5 M β -mercaptoethanol)용액을 180 μ l 넣고 37°C, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) Luciferase 활성 측정

Luciferase 활성은 Luciferase Assay System (Promega)을 이용하여 측정하였다. 세포 추출 용액 5 μ l에 50 μ l의 Luciferase

Assay Substrate를 넣고 Luminometer에서 luciferase에 의한 substrate분해 정도를 측정하였다.

III. 결 과

1. *E. coli*의 purine repressor를 이용한 recombinant DBD 제조

새로운 형태의 DBD를 만들기 위하여 구조가 잘 알려져 있는 *E. coli* purine repressor의 DBD를 이용하였다. Purine repressor는 아미노 말단에 6kDa의 DBD와 카복시 말단에 32 kDa의 regulatory domain으로 되어있다.¹⁵ DBD가 포함된 1-155 아미노산부분만을 떼어내어 glutathione S-transferase (GST)에 연결시켜 GST-PurR 단백질을 만들었고(그림 2A), 이들이 DBD으로써의 활성을 나타내는가를 알아보기 위하여 purine repressor의 binding site(그림 2B)를 probe로 하여 EMSA를 실시한 결과, 전혀 DNA와의 결합능을 관찰할 수 없었다(그림 2C, lane 2-6). 이와 같은 결과는 purine repressor의 아미노 말단의 DBD만으로는 corepressor가 결합된 활성형 상태의 purine repressor DBD구조를 형성할 수 없음을 시사한다. 활성형 상태의 purine repressor는 DBD의 카복시 말단 부위 hinge helix가 서로 근접하도록 dimer가 형성됨으로서, helix-turn-helix motif가 major groove에, hinge helix는 minor groove에 결합할 수 있는 구조를 이룬다²¹(그림 1). 그러므로 purine repressor DBD의 카복시 말단부위에서 인위적으로 dimer를 형성시켜줄 경우, 두 개의 hinge helix가 근접하게 위치함으로써 DNA에 결합할 수 있을 것이라는 가설을 세우고 (그림 1), 그림 2A에 서와 같이 hinge helix (AVARSLKVN, 9개 아미노산)부위가¹⁶ 포함되지 않거나 혹은 포함된 purine repressor DBD를 Gal4 DD와 연결하여, 두 가지의 재조합 단백질, 즉 GST-PurG와 GST-PurHG를 만들었다. 이들의 DNA 결합능을 EMSA를 통하여 관찰한 결과(그림 2C, lane 12-14), hinge helix가 포함된 GST-PurHG의 경우 예상하였던 바와 같이 강한 DNA 결합능을 나타내는 데 반하여 GST-PurG의 경우 DNA 결합능이 전혀 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 purine repressor의 DNA 결합에 hinge helix가 중요한 역할을 한다는 보고들과 일치된 결과이며, DNA에 결합하기 위해서는 hinge helix부위가 서로 근접할 수 있도록 dimer가 형성되어야 한다는 사실을 시사한다.

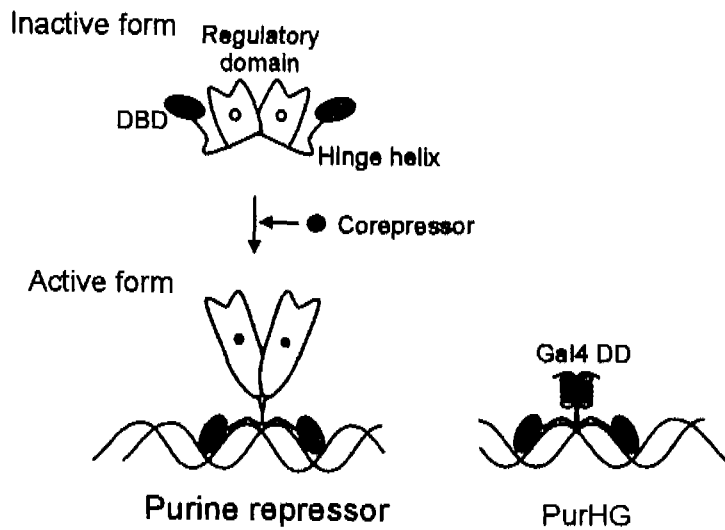


그림 1. Purine repressor의 DNA-protein 결합 모식도. 비활성형 purine repressor의 regulatory domain에 corepressor가 결합하면 활성 형태가 되어 DBD는 DNA의 major groove에, hinge helix는 minor groove에 각각 결합한다. 오른쪽 그림은 purine repressor DBD, hinge helix와 Gal4 DD를 연결시킨 PurHG 단백질의 모식도로 Gal4 DD에 의해 활성형의 purine repressor와 같은 형태로 DNA에 결합할 수 있음을 나타낸 모식도이다.

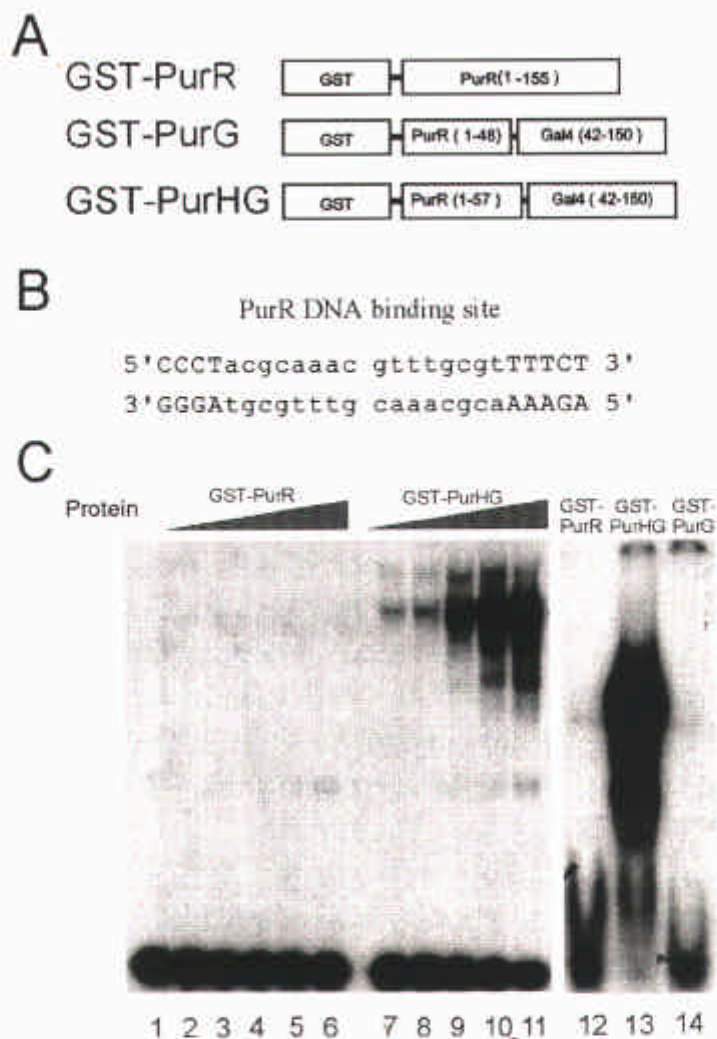


그림 2. 재조합 DNA-binding 단백질의 DNA 결합능 측정. A, 재조합 DNA-binding 단백질들의 구조를 나타낸 모식도 B, purine repressor의 DNA-binding site인 16bp palindrome이 포함된 probe 의 염기서열. C, GST-PurR, GST-PurG와 GST-PurHG 재조합 단백질들을 이용한 EMSA결과이며, 단백질의 양은 다음과 같다: lane 1, 0 ng; lane 2-6, GST-PurR 10-500 ng; lane 7-11, GST-PurHG 10-500 ng; lane 12, GST-PurR 500 ng; lane 13, GST-PurHG 500 ng; lane 14, GST-PurG 500 ng.

2. 유핵 세포 내에서의 recombinant DNA-binding domain 활성 측정

새롭게 만들어진 recombinant DBD가 실제로 유핵 세포 내에서 활성을 나타내는지를 관찰하기 위하여, 그림 3A와 같이 새로이 개발된 DBD인 PurHG와 SREBP1a의 activation domain (AD, 1-79 아미노산)을 연결하여 transcription activator인 PurAD를 만들고, 이들의 발현이 CMV promoter에 의해 이루어지도록 pCMV-PurAD를 만들었다. Reporter plasmid인 pPuRE-luc는 purine repressor response element (PurRE) 염기서열이 5회 반복되도록 하고, 그 3' 쪽으로 TATA box가 포함된 minimal promoter, luciferase 유전자, SV40 poly(A) signal 서열 순으로 배열하여 제작하였다(그림 3A). PurRE 염기서열은 *E. coli*의 *purC*, *purD* 및 *purF*, *purHD*, *purL* 등의 유전자에서 발견되는 purine repressor 결합 부위의 consensus로서 완전한 16bp palindrome 서열을 사용하였다.^{17,18} PurAD transcription activator가 유핵세포 내에서 활성을 나타내는가를 알아보기 위하여 NIH 3T3 세포에 pCMV-PurAD와 reporter plasmid인 pPuRE-luc를 cotransfection하였다. 그 결과 pCMV-PurAD가 증가함에 따라 luciferase 유전자 발현이 증가되었다(그림 3B). 10 ng의 적은 농도의 pCMV-PurAD를 넣어준 상태에서도 luciferase 발현이 크게 증가되었으며, 50 ng에서는 약 100배까지 luciferase 유전자 발현이 증가되었고, 50 ng 이상에서는 더 이상 크게 증가되지 않았다. 이러한 결과는 purine repressor DBD와 Gal4 DD로 이루어진 새로운 PurHG DBD가 시험관 실험(그림 2)에서와 마찬가지로 유핵세포 내에서도 reporter plasmid내의 PurRE에 선택적으로 결합하여 luciferase 유전자 발현을 증가시킬 수 있음을 시사한다.

마찬가지로 PurHG를 사용하여 유핵세포 내에서 유전자 발현이 외부의 signal에 의해서 조절되도록 인공 핵 수용체를 만들었다. 동물의 생체내 호르몬인 progesterone과는 결합하지 않고 antiprogesterin인 RU486/mifepristone과만 특이적으로 결합하여 활성화되는 PR의 LBD(645-891 아미노산)과 SREBP1a의 AD를 그림 4A와 같은 배열로 하여 인공 핵 수용체, PurANR을 고안하였으며, CMV promoter에 의하여 이를 과발현하는 pCMV-PurANR을 제작하였다. 고안된 PurANR 인공

핵 수용체가 유핵세포 내에서 효과적으로 RU486에 반응하여 특정 유전자 발현을 조절할 수 있는지를 알아보기 위해서, pCMV-PurANR을 reporter gene인 pPuRE-luc과 같이 NIH 3T3 세포에 cotransfection을 실시하였다. RU486을 처리하지 않은 상태에서는 luciferase 발현이 PurANR에 의하여 오히려 억제되었으며, RU486을 처리한 경우, pCMV-PurANR의 양을 증가함에 따라 dose dependent하게 luciferase 발현이 증가되었다(그림 4B). 또한 RU486의 농도에 따른 luciferase 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 pCMV-PurANR과 pPuRE-luc를 NIH 3T3 세포에 cotransfection하고, RU486의 양을 증가시킨 결과 luciferase 발현이 30nM에서 이미 최대치에 도달되었다(그림 4B). 이상의 결과로 새롭게 만들어진 PurANR은 유핵세포 내에서 RU486에 의해 특정 유전자 발현을 조절할 수 있음을 보여주었다.

3. Gal4 dimerization domain 변형에 따른 인공 핵 수용체의 활성측정

Gal4의 DD가 PurHG의 DNA 결합에 필수적임을 transient transfection을 통하여 관찰하고자, pCMV-PurANR에서 Gal4 DD 부위를 제거하여 pCMV-PurANR Δ Gal4를 제작하여 관찰하였다(그림 5B). 그림 5B에서 보이는 바와 같이 PurANR은 RU486에 반응하여 효과적으로 luciferase 유전자 발현을 증가시키는데 반하여 Gal4의 DD를 제거한 PurANR Δ Gal4의 경우 RU486에 전혀 반응을 보이지 않았다. 이러한 결과는 EMSA의 결과와 일치하는 결과로서 PurHG DBD 단백질이 DNA에 결합할 수 있도록 구조적 형태를 유지하는데 Gal4의 DD가 필수적임을 시사한다. 그러나, 이상의 결과들이 Gal4의 DD가 실제로 dimer를 형성하여 PurHG의 DNA결합을 가능케 하는지를 증명하지는 못한다. 따라서 Gal4의 DD가 실제로 PurHG를 dimerization시킨다는 사실을 증명하기 위하여, Gal4 DBD를 사용하는 인공 핵 수용체를 발현하는 pCMV-Gal4ANR을 사용하여 실험하였다. Gal4의 DBD 역시 Gal4의 DD를 함유하기 때문에 Gal4ANR은 PurANR과 heterodimer를 형성할 수 있고, 따라서 이와 같은 heterodimer 형성은 PurANR을 비활성화 시킬 것이다. 예상대로 PurANR의 RU486에 대한 반응성은 Gal4ANR의 양을 증가시킴에 따라

억제됨을 관찰할 수 있었다(그림 5C). 이상의 결과를 종합하면, PurANR의 Gal4 DD부위가 실제로 세포 내에서 dimer형성에 관여하며, 이러한 dimer형성이 DNA 결합에 필수적임을 시사한다.

PurHG의 DBD가 DNA 결합능을 가지기 위한 최소한의 Gal4 DD부위를 결정하기 위하여 102개의 아미노산으로 이루어진 Gal4 DD를 카복시 말단 부위를 제거하여, 그 크기가 34개 아미노산 혹은 57개의 아미노산으로 이루어진 Gal4 DD를 함유하는 인공 핵 수용체를 고안하였으며, 이들을 발현하는 construct, 즉 pCMV-PurANRGal34와 pCMV-PurANRGal57을 제조하였다(그림 6A). pCMV-PurANRGal34와 pCMV-PurANRGal57을 reporter gene과 함께 세포내에 transfection시킨 결과, RU486을 처리한 상태에서 pCMV-PurANRGal34의 인공 핵 수용체는 pCMV-PurANR과 같은 정도의 발현이 이루어졌으나, pCMV-PurANRGal57의 경우, RU486에 전혀 반응을 보이지 않았다(그림 6B).

PurH DBD에 연결되어지는 Gal4 DD 시작부위의 아미노산 서열 PKTK가 cloning 과정에서 뜻하지 않게 변형되어 PNK로 lysine과 threonine 두 개의 아미노산이 asparagine으로 변형된 clone이 얻어졌다. 이 변형된 PurHG 단백질은 DNA 결합 활성이 원래 PurHG보다 매우 약화되었다. 이러한 사실은 Gal4 linker 부위의 변형이 DNA 결합활성에 크게 영향을 미침을 시사한다. 따라서 PurH DBD과 Gal4 DD사이에 한 개 또는 두 개의 glycine을 첨가할 경우 DNA 결합 활성이 어떻게 변화되는지를 transient transfection 실험으로 관찰하고자 pCMV-PurANR(G1)과 pCMV-PurANR(G2) construct를 만들었다(그림 7A). Glycine이 첨가된 인공 핵 수용체의 경우 RU486을 처리하지 않은 상태의 활성도가 훨씬 낮아졌으며, 반면 RU486에 의한 유전자 발현은 크게 증가됨을 관찰할 수 있었다(그림 7B). 특히 한 개의 glycine 첨가 시 이러한 현상이 가장 두드러졌다. 또한 기존에 사용되어지고 있는 Gal4 DBD를 이용한 인공 핵 수용체 pCMV-Gal4ANR, PurHG의 DBD를 사용한 인공 핵 수용체 모두에서 RU486에 의한 유전자 발현증가가 매우 높게 나타나는데, 특히 glycine 1개가 첨가된 pCMV-PurANR(G1)이 가장 효능성이 좋게 나타났다.

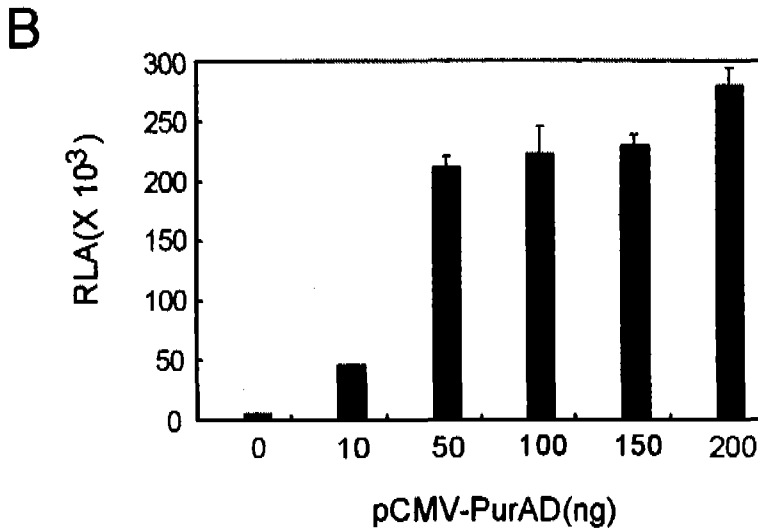
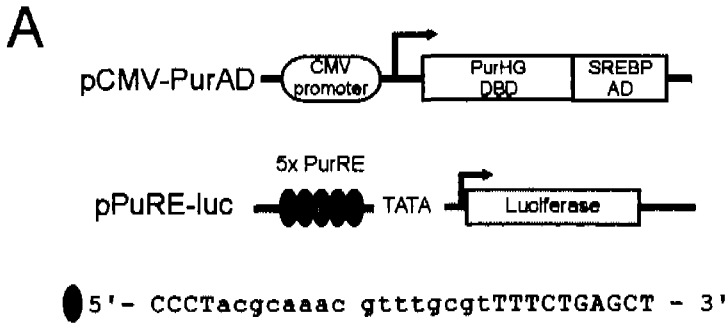


그림 3. 유핵세포 내에서의 recombinant DNA-binding domain 활성측정. A, pCMV-PurAD와 reporter construct의 구조를 나타낸 것으로, purine repressor의 DBD(1-57 아미노산)과 SREBP1a의 AD(1-70 아미노산)을 연결시켰다. pPuRE-luc plasmid는 PurRE를 5번 반복시키고, 3'쪽으로 TATA-box, luciferase gene, SV40 poly(A) 신호 서열을 연결시켰다. B, NIH 3T3 세포에 각각 pPuRE-luc를 150 ng, pCMV- β -gal을 20 ng 넣고 pCMV-PurAD를 0에서 200 ng까지 증가시키며 transfection시켰다. 48시간 이후에 luciferase 활성과 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 그래프의 bar는 표준편차를 나타낸다.

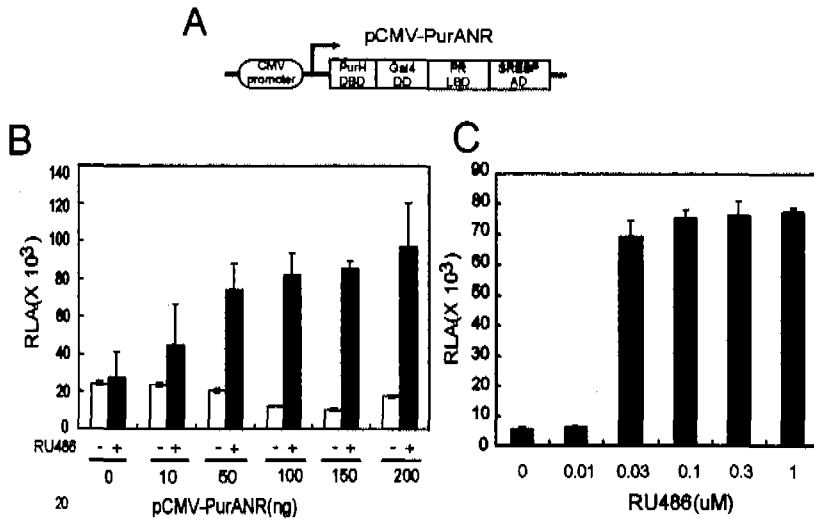


그림 4. NIH 3T3 세포에서의 인공 핵 수용체의 transcription 활성 측정. A, 인공 핵 수용체 PurANR을 과발현 하는 construct인 pCMV-PurANR 구조로, purine repressor의 DBD(1-57아미노산), PR의 LBD(645-914아미노산)와 SREBP1a의 AD(1-70아미노산)를 연결시켰다. B, NIH 3T3 세포에 각각 pPuRE-luc을 150 ng, pCMV- β -gal을 20 ng 넣고 pCMV-PurANR의 양을 0에서 200 ng까지 증가시키며 transfection시켰다. 24시간 후에 1 μ M의 RU486을 처리, 또는 처리하지 않고, 다시 24시간 배양한 후에 luciferase 활성과 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. C, NIH 3T3 세포에 pPuRE-luc 150 ng, pCMV- β -gal 20 ng과 pCMV-PurANR 200 ng을 transfection시켰다. 24시간 후에 RU486의 양을 0-1 μ M까지 증가시키며 처리하고, 다시 24시간 배양 후에 luciferase 활성과 β -galactosidase의 활성을 측정하였다. 모든 그래프의 bar는 표준편차를 나타낸다.

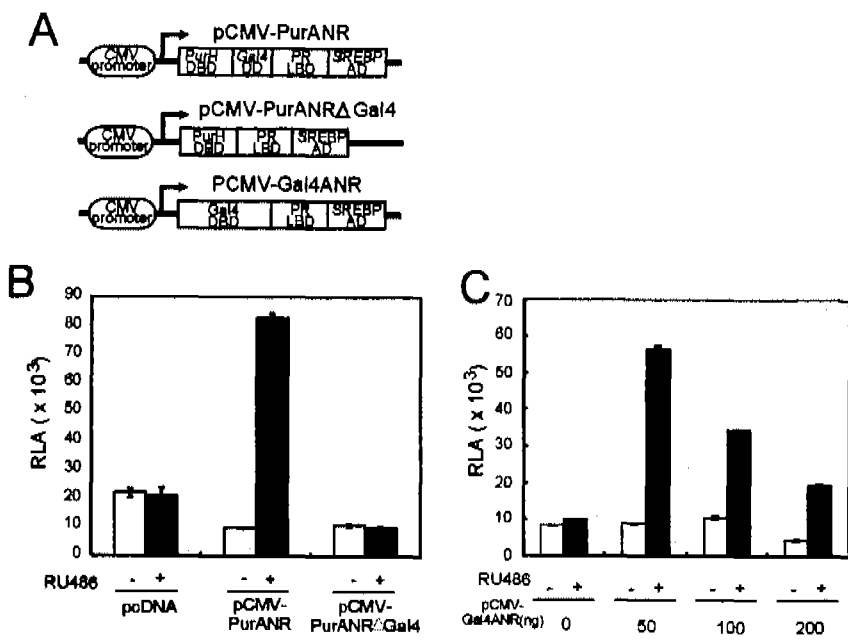


그림 5. 인공 핵 수용체 PurANR 기능에 대한 Gal4 dimerization domain의 역할 규명. A, pCMV-PurANR과 Gal4 DD을 제거한 pCMV-PurANRΔGal4의 구조 및 pCMV-Gal4ANR구조를 나타낸다. B, 각각의 pCMV-PurANR과 pCMV-PurANRΔGal4를 NIH 3T3 세포에 그림 2와 같은 방법으로 transfection시키고, assay를 실시하였다. C, NIH 3T3 세포에 pCMV-PurANR 200 ng, pPuRE-luc 500 ng, pCMV-β-gal 20 ng과 함께 pCMV-Gal4ANR을 0에서 200 ng까지 증가시키며 transfection을 실시하였다.

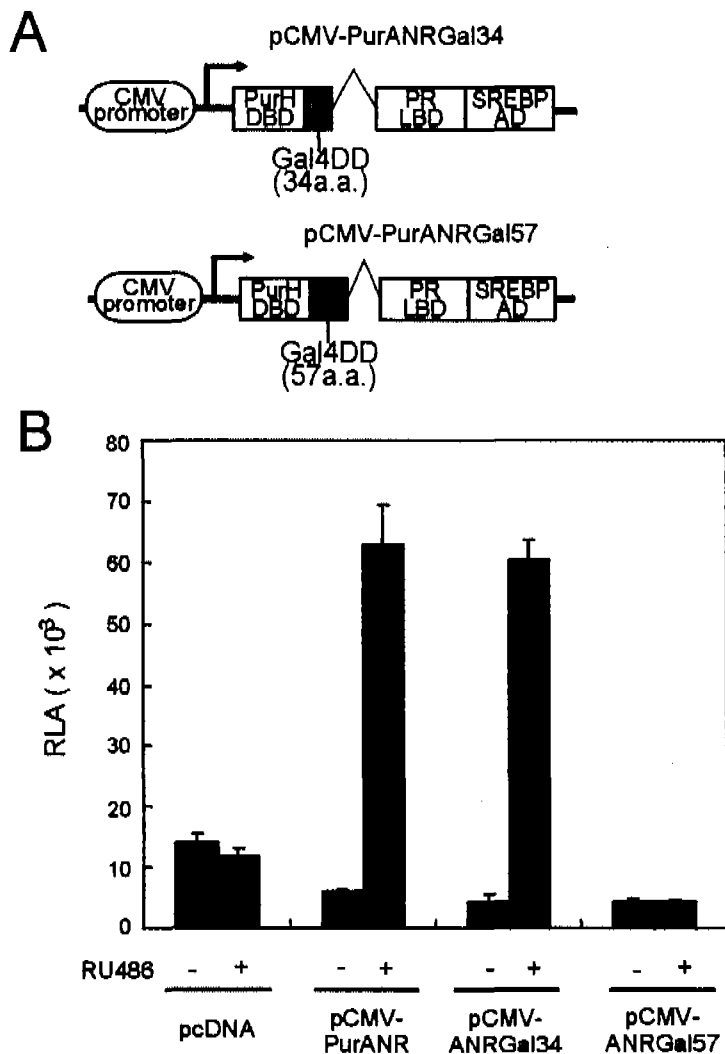


그림 6. DNA-binding domain내 Gal4 dimerization domain 크기에 따른 인공 핵 수용체의 transcription 활성 측정. A, pCMV-PurANR Gal34는 42-76까지의 34개 아미노산으로 이루어진 Gal4 DD가 결합된 인공 핵 수용체이며, pCMV-PurANRGal57은 Gal4 DD부위가 Gal4의 42-99까지의 57개의 아미노산으로 이루어진 인공 핵 수용체를 나타낸다. B, 각각의 pCMV-PurANR Gal34, pCMV-PurANRGal57과 reporter construct를 NIH 3T3 세포에 그림 2와 같이 transfection후 assay를 실시하였다.

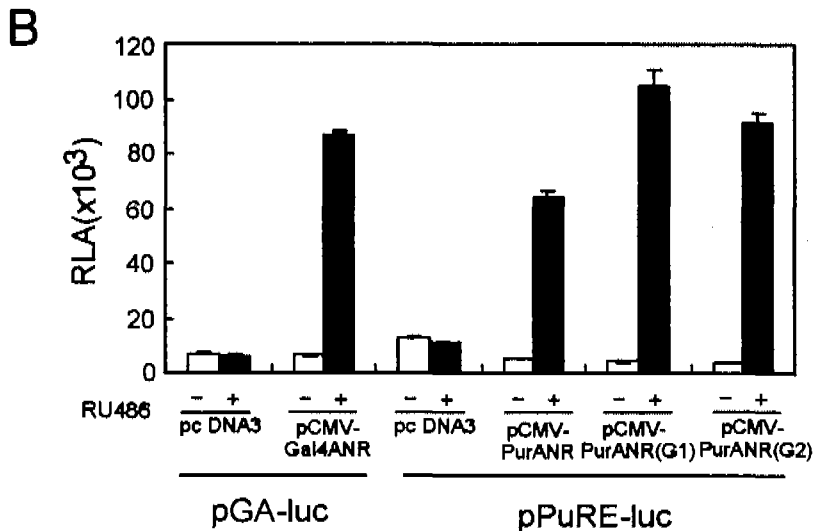
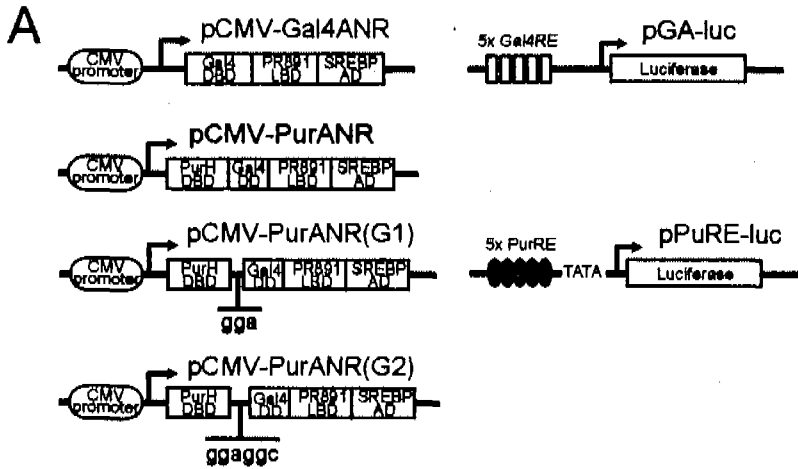


그림 7. Purine repressor의 DNA-binding domain과 Gal4 dimerization domain 사이에 glycine 첨가에 따른 인공 핵 수용체의 transcription 활성 측정. A, 인공 핵 수용체의 구조로 pCMV-Gal4 ANR, pCMV-PurANR 및 purine repressor의 DBD와 Gal4 DD 사이에 glycine 한 개를 첨가한 pCMV-PurANR(G1)과 두 개를 첨가한 pCMV-Pur ANR(G2)의 구조를 나타낸다. B, Reporter construct와 인공 핵 수용체를 과발현하는 construct를 NIH 3T3 세포에 그림 2와 같이 transfection을 실시하고 분석하였다.

4. Mutant consensus sequences에 따른 PurHG의 DNA 결합능 측정

Purine repressor의 DBD를 Gal4와 DD와 연결하여 corepressor와 무관하게 특정 DNA에 선택적으로 결합할 수 있도록 인위적으로 PurHG DBD를 개발하였는데, 개발된 PurHG DBD가 인식하는 DNA 염기서열이 원래의 purine repressor가 인식하는 염기서열과 차이가 있는지를 관찰하고자, 16bp의 palindrome을 여러 형태로 변형하여 그 결합정도를 실험하였다. 먼저 그림 8A와 같이 16bp palindrome sequence 중간에 한 개 또는 두 개의 'A'를 첨가하여 mPuRE1과 mPuRE2를 만들었고, 'CG'를 첨가하여 9개의 완벽한 palindrome형태인 mPuRE3를 제조하여 EMSA를 실시한 결과, 이들 3가지 probe모두 PurHG 단백질과 전혀 결합하지 않았다(그림 8B). 이러한 결과로 PurHG 단백질이 인식하여 결합하는 총 16bp palindrome 염기서열에서 정 중앙의 염기서열이 DNA결합에 있어서 매우 중요하다는 것을 알 수 있었다. 그러면 중앙의 염기서열 중에서도 어디까지의 서열이 중요한지를 알아보기 위하여 16bp palindrome의 반쪽인 8bp와 다음 반쪽의 4bp를 포함하는 24bp palindrome sequence를 지닌 mPuRE4와 16bp palindrome에서 3'쪽의 4bp를 변형시킨 mPuRE5를 만들어(그림 8A) EMSA를 실시하였다. 16bp palindrome인 PuRE만큼의 친화력은 아니지만 mPuRE4의 경우 PurHG 단백질이 강하게 결합할 수 있었으며, mPuRE5 또한 약하지만 PurHG 결합을 관찰할 수 있었다(그림 8B). 그러므로 총 16개의 palindromic sequence중 가운데 부분의 염기서열, 특히 5-12번째까지의 염기서열이 DNA-protein interaction에 매우 중요함을 알 수 있었다.

여러 copy수의 mPuRE4와 mPuRE5염기서열이 삽입된 reporter construct (pPuRE4-luc, pPuRE5-luc)를 만들고, 여러 인공 핵 수용체들에 대한 이들의 반응성을 transfection을 통하여 관찰하였다 (그림 9). mPuRE4는 시험관 내 PurHG에 대한 친화력이 높았음에도 불구하고, 예상과는 반대로 mPuRE4 염기서열을 3회 반복시킨 reporter construct에서는 세포 내에서 PurANR에 대한 반응성이 크게 감소되었다. 이에 반하여 pPuRE5-luc는 기초 전사율이 pPuRE-luc에 비하여 약 2배 증가되었으며, RU486에 의한 luciferase 발현증가도 현저하였으나, 기초 전사율의 증가로 발현 증가 비율은 pPuRE-luc보다 적었다. 인공 핵 수용체중에서는 purine repressor DBD와 Gal4 DD사이에 glycine 1개가 첨가된 pPurANR(G1)이 pPuRE-luc, pPuRE5-luc 모두에서 가장 효과적으로 luciferase 발현을 증가시켰다.

A

PuRE = ccctACGCAAAC GTTTGCGTtttctgaget
 mPuRE1 = ccctACGCAAACAGTTTGCGTtttctgaget
 mPuRE2 = ccctACGCAAACAAGTTTGCGTtttctgaget
 mPuRE3 = ccctACGCAAACG CGTTTGCGTtttctgaget
 mPuRE4 = ccctACGCAAACGTTT AAACGTTTGCGTtttctgaget
 mPuRE5 = ccctACGCAAACGTTTAAA Ctttctgaget

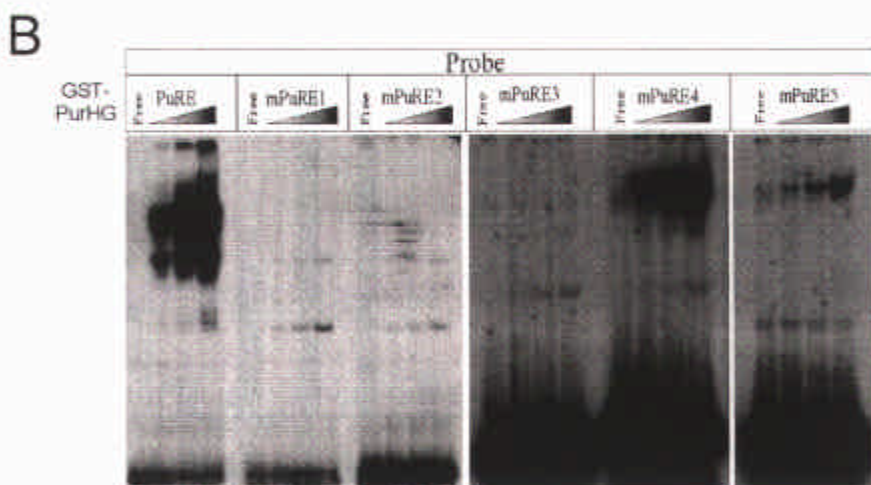


그림 8. 여러 변형된 purine repressor-binding site에 따른 PurHG 단백질의 결합능 측정. A, EMSA에 사용된 probe들의 염기서열. B, 각각의 probe에 따른 GST-PurHG단백질의 결합능을 측정한 EMSA결과로서 단백질의 양은 0, 30, 60, 120 ng을 각각 사용하였다.

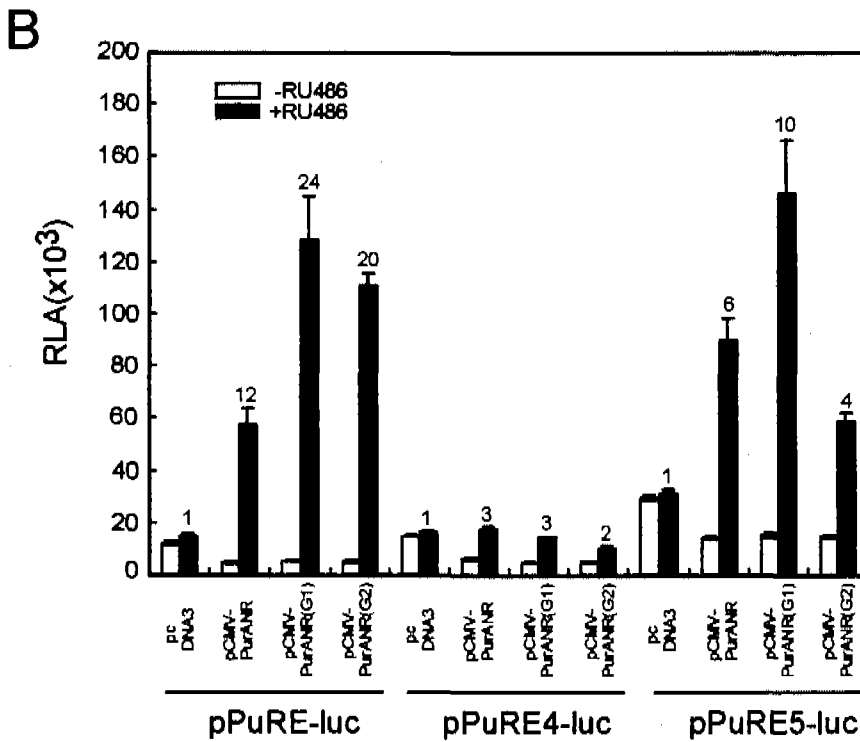
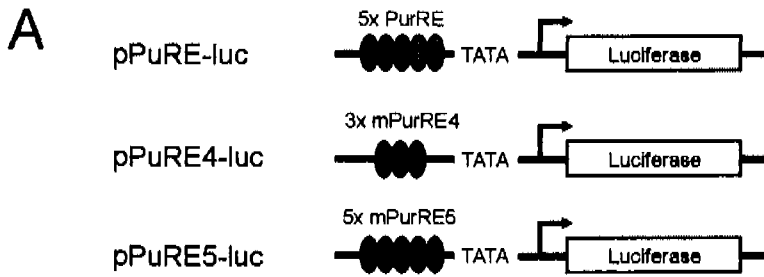


그림 9. 변형된 인공 핵 수용체에 대한 여러 변형된 response element들의 반응성 측정. A, Reporter construct들의 구조. B, NIH 3T3 세포에 재조합 단백질을 발현시키는 plasmid와 pPuRE-luc, pPuRE4-luc, pPuRE5-luc를 그림 3과 같은 방법으로 co-transfection시킨 후, 48시간이후에 assay를 실시하였다.

IV. 고찰

질병 치료목적으로 외부에서 치료 유전자를 도입하는 유전자 치료나, 세포 내에서 어떤 단백질의 기능을 밝히기 위한 연구에서 inducible expression system이 점차 중요한 도구로 이용되고 있기 때문에, inducible expression system 개발에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있다. 도입된 유전자가 지속적으로 과발현 된다면 세포내 독성등 여러 부작용이 발생할 가능성이 많기 때문에, 유전자 발현을 시기 적절하게 조절 가능케 하는 일은 유전자 치료의 적용 범위를 크게 넓힐 뿐 아니라 생명 현상에 관한 많은 연구를 가능케 할 것이다. 유전자의 발현 조절은 유전자 전사단계나 단백질의 합성단계, 또는 단백질의 secretion단계 등에서 이루어질 수 있지만, 유전자 전사단계에서의 조절을 통한 inducible expression system의 개발에 대한 연구가 가장 활발히 이루어지고 있다. 그 예로 isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 inducer로 사용한 lac repressor/operator system,^{22,23} tetracycline에 의한 조절 system인 Tet repressor system,^{24,25} rapamycin을 inducer를 사용하는 rapamycin-inducible system,^{26,27} steroid hormone을 ligand로 사용하는 여러 인공 핵 수용체를 이용한 inducible system들이 개발되고 있다.^{8,12,13,28,29}

이러한 inducible expression system 개발에서 가장 중요한 과제는 인공 전사인자의 개발이다. 대부분의 전사를 조절하는 전사인자는 DNA에 결합하는 DBD와 전사를 활성화시키는 AD로 이루어져 있는데, 이들은 서로 독립적으로 작용을 나타내기 때문에 각기 다른 전사인자에서 유래한 DBD와 AD를 재조합하여, 새로운 전사인자를 인위적으로 제작할 수 있다. 이러한 인공전사인자 개발에 가장 널리 사용되는 DBD로는 yeast Gal4 transcription factor와³⁰ LexA, GCN4,^{5,6} zinc finger^{2-4,7-10,31} 등이 이용되고 있다. 동물세포에서 이용하기 위한 인공전사인자 개발에, 동물세포에서 유래되는 전사인자의 DBD를 사용할 경우, 동물세포내 여러 유전자 발현에 영향을 줄 가능성이 높기 때문에 주로 yeast나 무핵세포의 전사인자에서 유래되는 DBD를 주로 사용하고 있으며, 현재까지 널리 사용되는 DBD의 종류는 매우 제한적이다. 따라서 본 연구에서는 그 구조가

잘 알려져 있는 *E. coli*의 purine repressor DBD를 이용하여 유핵세포에서 사용할 수 있는 새로운 DBD를 만들고, 그 특성을 규명하고자 하였다. Purine repressor는 LacI family에 속하는 전사인자로서, LacI family에 속하는 전사인자들 간에는 특히 아미노 말단 부위 아미노산 서열의 상동성이 매우 높다.²¹ 그러나 purine repressor는 lac repressor등과는 상이한 차이점이 있는데, 즉 lac repressor의 경우 tetramer로 존재하며, corepressor가 결합하면 operator에 결합능력이 소실되는데 반하여, purine repressor는 dimer로 존재하고, hypoxanthine이나 guanine등의 corepressor가 결합하여야 operator에 친화력을 가지게 된다.^{15,18}

Purine repressor는 아미노 말단에 helix-turn-helix motif와 hinge helix motif로 이루어진 DBD와 카복시 말단의 CBD로 이루어져 있다. CBD에 corepressor가 결합하면 purine repressor dimer의 4차 구조에 커다란 변화가 유발되어 DBD부위가 operator를 인식하여 결합하게 된다. Corepressor가 결합된 상태에서의 DBD구조를 살펴 보면, 48-56번째까지의 9개의 아미노산으로 이루어진 hinge helix가 minor groove와 결합하고, 1-43번째까지의 helix-turn-helix 부위가 major groove와 접하고 있게 된다.²¹ 이와 같이 purine repressor dimer의 DBD가 operator에 결합할 수 있기 위해서는 hinge helix간에 근접된 구조가 형성되어 minor groove에 놓여져야 하며, 이러한 역할을 corepressor가 결합된 CBD가 담당한다.²¹ 따라서 purine repressor의 DBD부위만으로는 hinge helix간에 근접된 형태로 dimer형성이 불가능하기 때문에 DNA 결합능력을 가질 수 없을 것이다. 본 실험에서 합성한 DBD를 포함하는 purine repressor의 아미노 말단 부위의 재조합 단백질은 앞서 예상했던 바와 같이 전혀 DNA 결합능력이 없었다. Corepressor가 결합된 활성형의 purine repressor에서의 DBD의 구조를 인위적으로 만들기 위하여 본 실험에서는 yeast의 전사인자인 Gal4에 존재하는 DD를 hinge helix의 카복시 말단에 결합시켰다. Yeast Gal4는 galactose나 melibiose의 catabolism에 관여하는 유전자들의 전사를 활성화시키는 activator로서, DBD, linker region, DD, activation domain(AD)등으로 구성되어 있다. Gal4의 DBD는 1-65 아미노산으로 아미노 말단에 존재하며, 두 개의 Zn^{2+} 와 여섯 개의 cysteine residue로 구성된 bimetal-thiolate cluster형태로 존재한다. 또한

50-64번째의 14개 아미노산은 DD부위로 α -helix형태로 dimer를 이뤄 평행의 coiled-coil상태로 존재한다. DBD와 DD를 연결하는 부위인 41-49 아미노산의 linker가 존재한다. 65-100사이의 아미노산부위 역시 dimer결합에 기여한다고 알려져 있다.³⁰

이러한 Purine repressor DBD와 hinge helix의 카복시 말단에 Gal4의 linker부위와 DD를 포함하는 42-150 아미노산 부위를 연결시켜 PurHG를 만든 결과, DNA에 강한 결합능을 보였다. 그러나 Gal4 DD부위가 존재하더라도 purine repressor의 hinge helix부위가 존재하지 않으면 DNA에 전혀 결합을 하지 않았다. 이러한 결과는 hinge helix의 9개 아미노산 중 DNA결합에 특히 중요한 부분으로 알려져 있는 3가지 아미노산을 mutation시켰을 때, 즉 arginine을 glutamine으로, leucine을 threonine으로, lysine을 glutamine으로 변환하였을 때 DNA와 결합하지 않는다는 보고와 일치하는 결과이다. Purine repressor의 hinge helix부위와 Gal4 DD부위가 DNA결합에 필수적임을 시사한다.

Purine repressor DBD, hinge helix와 Gal4 DD로 형성된 PurHG DBD가 유핵세포 내에서도 활성을 나타내는가를 알아보고자, AD를 이용하여 전사 활성인자인 PurAD를 만들었다. AD는 전사인자들의 유전자 전사를 활성화시키는 domain으로써, VP16, NF-kappaB의 p65 subunit에서 유래된 AD들이 인공전사인자 개발에 주로 이용된다. 본 실험에서는 SREBP1a AD를 사용하였는데, SREBP1a의 아미노 말단의 acidic domain은 CBP (CREB-binding protein), p300 (CBP-related protein)과 같은 coactivator와 특이하게 결합하며, 또한 16개 이상의 cofactor들의 complex로 이루어진 activator-recruited coactivator complex (ARC)와도 직접적으로 결합하여 매우 강하게 전사를 활성화시킨다고 알려져 있다.³²⁻³⁴ 본 연구에서는 PurHG DBD에 AD를 연결시켜 PurAD를 만들고 세포 내에서 활성을 측정한 결과, PurRE에 선택적으로 결합하여 luciferase 유전자 발현을 크게 증가시켰다. 이러한 결과를 토대로 antiprogesterin인 RU486/mifepristone과만 특이적으로 결합하여, 활성화되는 PR의 LBD를 PurAD에 삽입하여 연결한 인공 핵 수용체인 PurANR을 만들어 세포 내에서의 활성을 측정한 결과, RU486에 의해 luciferase 유전자 발현이 현저히 증가하였다. 이러한 RU486에 의한 세포내의 유전

자 발현 정도는 기존에 개발된 Gal4, Zif268이나 GCN4 등의 DBD를 이용한 인공 전사인자들의 실험 결과들과 비교시, 비슷한 정도의 유전자 발현이 이루어짐을 알 수 있었다. Gal4 DD에 의한 dimerization이 PurHG와 DNA 결합에 필수적이라는 사실은 Gal4 DD를 제거한 pCMV-PurANR/Gal4에서 전사 활성이 완전히 소실되며, 또한 PurANR에 의한 유전자의 발현이 Gal4 DD를 함유하는 또 다른 인공 핵 수용체인 Gal4ANR에 의하여 억제된다는 실험을 통하여 재차 확인할 수 있었다. PurHG DBD와 Gal4 DD의 dimerization element 사이를 연결하는 linker부위 역시 DNA 결합에 많은 영향을 미치는데, PurHG DBD와 Gal4 DD사이에 glycine을 삽입시킬 경우, 원래 형태에 비해 모두 그 활성이 증가하였으며, 한 개의 glycine을 첨가시켰을 때, RU486에 대한 반응성이 가장 크게 나타났다. 이러한 사실은 Gal4 DD의 linker 부위의 길이 및 그 flexibility가 DNA 결합에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

Purine repressor의 16bp palindrome sequence의 8-9번째 사이에 nucleotide 삽입은 모두 PurHG 단백질이 결합을 하지 못하였으나, 3'쪽의 염기만을 변화시킨 mPuRE4와 mPuRE5는 모두 PurHG 단백질과 잘 결합하였다. 이러한 결과는 16bp중 5-12번째의 염기서열이 PurHG 단백질이 인식, 결합하는데 가장 중요한 부위인 것으로 판단되어지며, *pyrC*, *pyrD*, *purF*, *purHD*, *purL*등의 purine repressor가 결합하는 purine regulatory sequence들의 16bp중 5-12번째 염기서열의 homology가 매우 높게 나타나는 사실과 일치한다.^{35,36} 이상의 실험들을 통하여 무핵세포의 전사인자들의 DBD를 유핵세포에서 작용할 수 있도록 변형할 수 있었으며, 이러한 가능성은 무핵세포에서 발견된 많은 종류의 LacI family의 전사인자들의 DBD 역시 인공 전사인자 개발에 사용할 수 있음을 시사한다 하겠다.

V. 결 론

Escherichia coli purine repressor의 DBD와 yeast Gal4의 DD를 이용하여 새로운 DBD(PurHG)을 만들었다. Purine repressor DBD의 카르복시 말단의 hinge helix (9개의 아미노산)와 Gal4 DD는 DNA-binding activity에 반드시 필요하며, hinge helix부위와 Gal4 DD사이에 한 개나 두 개의 glycine의 첨가로 인해 유핵 세포 내에서의 activity가 증가하였다. 또한 유핵 세포 내에서 RU486에 의해서 조절되어지는 expression system (pCMV-PurANR)을 PurHG, progesterone receptor LBD, SREBP1a AD를 연결하여 만들었으며, cell내에서 발현되어지는 PurANR은 RU486에 잘 반응하여 reporter gene (luciferase)의 발현을 증가시킬 수 있었다.

참고문헌

1. Wendt H, Thomas RM, Ellenberger T. DNA-mediated folding and assembly of MyoD-E47 heterodimers. *J Biol Chem* 1998;273:5735-43.
2. Kang JS, Kim JS. Zinc finger protein as designer transcription factors. *J Biol Chem* 2000;275:8742-8.
3. Lin Q, Segal DJ, Ghiara JB, Barbas III CF. Design of polydactyl zinc finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5525-30.
4. Kim JS, Pabo CO. Getting a handhold on : Design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2812-17.
5. Hollenbeck JJ, Oakley MG. GCN4 binds with high affinity to DNA sequence containing a single consensus half-site. *Biochem* 2000;39:6380-9.
6. Dterding CJ, Kast J, Przybylski M, Tomer KB. Molecular characterization of a tetramolecular complex between dsDNA and a DNA-binding leucine zipper peptide dimer by mass. *Bioconjug Chem* 2000;11:335-44.
7. Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition : crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1. *Science* 1991;252:809-17.
8. Beerli RR, Schopfer U, Dreier B, Barbas III CF. Chemically regulated zinc finger transcription factors. *J Biol Chem* 2000;275:32617-27.
9. Kim JS, Pabo CO. Transcription repression by zinc finger peptides. *J Biol. Chem* 1997;272:29795-800.
10. Choo Y, Castellanos A, Garcia-Hernandez B, Sanchez-garcia I, Klug A. Promoter-specific activation of gene expression directed by bacteriophage-selected zinc finger. *J Mol Biol* 1997;273:525-32.
11. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endoct Rev* 1997;18:306-60.

12. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1686-90.
13. Wang Y, Xu K, Pierson T, O'Malley BW, Tsai SY. Positive and negative regulation of gene expression in eukaryotic cells with an inducible transcriptional regulator. *Gene Ther* 1997;4:432-41.
14. Rolfes RJ, Zalkin H. *Escherichia coli* gene PurR encoding a repressor protein for purine nucleotide synthesis. *J Biol Chem* 1988;263:19653-661.
15. Choi KY, Zalkin H. Structural characterization and corepressor binding of the *Escherichia coli* purine repressor. *J Bacteriol* 1992;174:6207-14.
16. Choi KY, Zalkin H. Role of the purine repressor hinge sequence in repressor function. *J Bacteriol* 1994;176:1767-72.
17. Choi KY, Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli* *pyrC* by purine regulin repressor protein. *J Bacteriol* 1990;172:3201-7.
18. Choi KY, Lu F, Zalkin H. Mutagenesis of amino acid residues required for binding of corepressors to the purine repressor. *J Biol Chem* 1994;269:24066-72.
19. Moon YA, Lee JJ, Park SW, Ahn YH, Kim KS. The roles of sterol regulation element-binding proteins in the transactivation of the rat ATP citrate-lyase promoter. *J Biol Chem* 2000;275:30280-6.
20. Hall CV, Jacob PE, Ringold GM, Lee F. Expression and regulation of *Escherichia coli* lacZ gene fusion in mammalian cells. *J Mol Appl Genet* 1983;2:101-9.
21. Schumacher MA, Choi KY, Zalkin H, Brennan RG. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by α helices. *Science* 1994;266:763-770.
22. Baim SB, Labow MA, Levin AJ, Shenk T.A Chimeric mammalian transactivator based on the lac repressor that is regulated by

- temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5072-6.
23. Figge J, Wright C, Collins CJ, Roberts TM, Livingston DM. Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli* lac repressor in monkey cell. *Cell* 1998;52:713-22.
24. Bohl D, Heard JM. Transcriptional modulation of foreign gene expression in engineered somatic tissues. *Cell Biol Toxicol* 1998;14:83-94.
25. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5547-51.
26. Freiberg RA, Spencer DM, Chiate KA. Specific triggering of the fas signal transduction pathway in normal human keratinocytes. *J Biol Chem* 1996;27:31666-9.
27. Spencer DM, Belshaw PJ, Chen L. Functional analysis of fas signalling *in vivo* using synthetic inducers of dimerization. *Curr Biol* 1996;6:839-47.
28. Thurmond DC, Baillie RA, Goodridge AG. Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptor by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem* 1998;273:15373-81.
29. Kim JS, Kim J, Cepek KL, Sharp PA, Pabo CO. Design of TATA box-binding protein/zinc finger fusions for targeted regulation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3616-20.
30. Marmostein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC. DNA recognition by Gal4 : structure of protein-DNA complex. *Nature* 1992;356:408-14.
31. Elrood-Erickson M, Pabo CO. Binding studies with mutants of Zif268. *J Biol Chem* 1999;274:19281-5.
32. Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, et al. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein

coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a *in vitro*. *Genes Dev* 1998;1:3020-31.

33. Oliner JD, Andresen JM, Hansen SK, Zhou S, Tjian R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev* 1996;15:2903-11.

34. Naar Am, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W. Composite co-activator ARC mediates chromatin-different transcriptional activation. *Nature* 1999;29:828-32.

35. He B, Choi KY, Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli* *glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor. *J Bacteriol* 1993;175:3598-606.

36. He B, Shiau A, Choi KY, Zalkin H, Smith JM. Genes of the *Escherichia coli* *pur* are negatively controlled by a repressor-operator interaction. *J Bacteriol* 1990;172:4555-62.

Abstract

Development and characterization of new DNA-binding domain
which acts in eukaryotic cells by using *Escherichia coli*
purine repressor

Eun Hee Yeon

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Kyung-Sup Kim)

We intended to generate the noble DBD, DBD of using *E. coli* purine repressor, which could bind 16 palindrome and repress the expression of purine synthesis-related genes in purine nucleotide-enriched environment, and to apply this new DBD to construction of artificial transcription activation and nuclear receptors. When the guanine or hypoxanthine bind carboxy-terminal regulatory domain of purine repressor, the quarternary structure of this dimeric transcription factor is severely changed, and thus two DBDs are positioned into close proximity to fit into major and minor groove of palindromic DNA sequences. The replacement of regulatory domain with dimerization domain of Gal4 could mimic the activated DBD structure. The dimerization between Gal4 DDs might dispose two hinge helix of purine repressor DBD in to the minor groove. The addition of one or two glycine residues in amino-terminus of Gal4 DD markedly increased the binding affinity *in vitro* and *in vivo*. Minimal peptide

region corresponding to amino terminal 34 amino acids of Gal4 DD was sufficient to recover DNA binding ability of purine repressor DBD. This artificial DBD recognize and bind the same consensus palindrome as wild type of purine repressor, and any mutations in palindrome decrease the affinities. We tested their binding activity in eukaryotic cell, in the form of the artificial nuclear receptor. The artificial nuclear receptor, PurANR, regulates expression of the luciferase gene in animal cells through microbial purine repressor response elements according to the presence of RU486. The usage of microbial DBD in artificial transcription factor can restrict the target gene.

key words : DNA-binding domain (DBD), dimerization domain (DD), transcription factor, nuclear receptor, artificial nuclear receptor