

PU.1 유전자(cDNA)의 인위적 변이체 클로닝

*류 종 석 · 유 시 현 · 장 시 혁 · 김 무 섭 · **김 재 범 · †권 무 식
성균관대학교 생명자원과학대학 유전공학과

Molecular Cloning of Mutant cDNA of PU.1 Gene

Chong-Suk Ryou*, Shi-Hyun Yu, Si-Hyug Jang, Moo-Sup Kim,
Jae-Beom Kim and Moo-Sik Kwon†

Department of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea

*Department of Genetics and Molecular Biology, Wayne State University, Detroit MI.48201

**Department of Biology, The University of Toledo, Toledo OH.43606

ABSTRACT

PU.1, a tissue-specific transcription activator, binds to a purine-rich sequence(5' -GAGGAA-3') called PU box. The PU.1 cDNA consists of an open reading frame of 816 nucleotides coding for 272 amino acids. The amino terminal end is highly acidic, while the carboxyl terminal end is highly basic. Transcriptional activation domain is located at the amino terminal end, while DNA binding domain is located at the carboxyl terminal end. Activation of PU.1 transcription factor is supposed to be accomplished by the phosphorylation of serine residue(s). There exist 22 serines in the PU.1. Five(the 41, 45, 132·133, and 148th) of the serines(plausible phosphorylation site by casein kinase II), are the primary targets of interest in elucidating the molecular mechanism(s) of the action of the PU.1 gene. In this study, PU.1 cDNA coding for the five serine residues(41th AGC, 45th AGC, 132·133th AGC·TCA, and 148th TCT), was mutated to alanine codon(41th GCC, 45th GCC, 132·133th GCC·GCA, and 148th GCT), respectively, by Splicing-Overlapping-Extension(SOE) using Polymerase Chain Reaction (PCR). And each mutated cDNA fragments was ligated into pBluescript KS+ digested with HindIII and Xba I, to generate mutant clones named pKKS41A, pRKS45A, pMKS132·133A, and pMKS148A. The clones will be informative to study the "Structure and Function" of the immunologically important gene, PU.1.

서 론

진핵세포의 유전자는 아미노산 합성을 지령하는 부위(coding region)와 이에 관련하지 않는 부위(non-coding region)로 구성되어 있다. Non-coding 부위에는 DNA 전사조절에 작용하는 여러 종류

의 요소들(예, *cis*-acting elements)이 자리잡고 있다(1-7). 이 요소들은 수개의 DNA 염기로 이루어져 있으며, 이를 특수하게 인식하는 인자들(예, 단백질)이 결합하게 된다. 이러한 특수한 DNA 염기 몇 개를 DNA motif라고 하고, 여기에 결합하여 유전자 발현을 조절하는 단백질을 전사인자(transcription factor)라고 한다. 유전자 전사과정은 DNA motif와 전사인자와의 상호작용에 의해서 조절되는

† Corresponding Author

것으로 추측되고 있다(1-5). 수년 전까지만 하여도 진핵세포 유전자의 발현조절 기작은 거의 알려지지 않았으나, 최근 들어 새로운 유전자 클로닝기법을 도입하여 몇몇 전사인자 합성을 지령하는 유전자들을 분리하게 됨으로써 이들에 관한 분자유전학적 연구가 시작되었다. 일반적으로 전사인자들은 유전자 발현의 중요한 조절자들이며, 발생과정, 호르몬 및 성장인자들(growth factors)에 대한 반응과 암화를 유발하는 과정에 관여한다(8). 이 전사인자들은 어느 세포에서든지 발현되어 유전자 발현을 조절하지만, 일부 전사인자는 특수한 세포에서만 제한적으로 발현되는 것도 있다(3, 9-12). 특히, 제한된 세포에서만 발현되는 전사인자들의 분자생물학적 특성을 이해하는 것은 진핵세포의 유전자 조절기작 뿐만 아니라 세포의 발생, 분화과정을 규명하는 데 많은 기여를 한다.

전사인자 PU.1은 포유류의 B-cell 또는 macrophage에서 특이하게 발현되며, 푸린계 염기가 많이 존재하는 DNA motif인 PU Box(5'-GAGGAA-3')에 결합하여 포유동물 면역계 세포의 분화에 관여한다고 보고되었다. Klemsz 등(12)은 생쥐의 유전자 은행(cDNA library)에서 이 polypeptide를 합성하는 PU.1 full length cDNA 클론(λ 25.1)을 분리하는 데 성공하였다. PU.1 cDNA의 coding 부위(816 nucleotides)는 216개의 아미노산 합성을 지령한다. PU.1은 두 개의 domains(아미노 말단, 카르복시 말단)으로 형성되어 있으며, 전자는 PU.1의 전사 활성화에 관여하는 domain이고, 후자는 PU box에 결합하는 domain이다(12). PU.1 단백질의 활성은 이 polypeptide의 구성원 중 세린 잔기의 인산화에 의해 유도된다고 추측되고 있다. PU.1의 전사 활성화 domain(아미노 말단쪽)에는 17개의 세린 잔기들이 중요한 인산화 부위로 사료된다. 이는 이들 세린 잔기들이 casein kinase II(CK II)에 의하여 인산화된다고 추측되기 때문이다(13). CK II는 serine/threonine kinase로서 DNA 전사와 세포분열을 조절하는 데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 예를 들어 oncoprotein E1A의 경우, CK II에 의해서 인산화되는 제136번 세린을 인위적으로 알라닌으로 치환한 경우에 형질전환 효율이 매우 떨어진다고 보고되었다(4, 13). 이와 같은 사실에 근거하여 PU.1 단백질의 제41, 45, 132-133, 148번 세린 잔기 codon이 비극성 아미노산인 알라닌 codon으로 치환된 mutant PU.1 cDNA 클론들을 얻는 것이 본 연구의 목적이다. 이 mutant 클론들은 사람의 면역

계에 중요한 역할을 담당하는 B-cell 혹은 macrophage를 활성화시키는 transcription activator, PU.1의 역할을 분자생물학적 수준에서 연구하는 데 이바지할 것이다.

재료 및 방법

재료

시약 및 효소

본 연구에 사용된 시약은 다음과 같다. 기타 시약은 국내에서 시판되는 특등품을 사용하였다. Sodium chloride, calcium chloride, cesium chloride, sodium acetate, ethidium bromide, light mineral oil, sodium dodecyl sulfate(SDS), ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), hydroxymethylaminomethane(Tris) base, sodium hydroxide, butanol, isoamylalcohol, lysozyme, acetic acid, boric acid, Triton X-100, chloroform, NuSieve GTG agarose, antibiotics인 tetracycline과 ampicillin은 Stratagene(미국) 또는 Sigma Chemical Co.(미국) 제품을, N',N',N',N'-teteramethylethylenediamine(TEMED)와 ammonium persulfate(APS)는 Bio-Rad(미국) 제품을, absolute ethanol은 Merck(독일) 제품을, acrylamide, bisacrylamide, urea(ultra-PURE), agarose, phenol은 BRL(미국) 제품을, 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactoside(X-gal), isopropyl- β -thio-galactopyranoside(IPTG), ATP는 Stratagene(미국) 제품을, diethyl-aminoethyl(DEAE)-cellulose membrane(NA-45)은 Schleicher & Schuell(독일) 제품을 사용하였다. 배지에 사용된 Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, Bacto-agar, peptone은 Difco(미국) 제품이었으며, DNA size marker인 λ /HindIII와 ϕ X174/HaeIII는 BRL(미국) 제품이었으며, 방사성 동위원소(α - 32 P-dATP)는 Amersham(영국) 제품을, X-ray film은 Kodak(미국) 또는 Agfa(독일) 제품을 사용하였다. 사진 현상액과 고정액은 국산품을 사용하였다.

제한효소(EcoR I, Xba I, HindIII, Sal I, Not I), alkaline phosphatase, polynucleotide kinase, T₄ DNA ligase, Vent DNA polymerase는 Stratagene(미국) 또는 NEB(미국) 제품을, DNA 염기결정에 사용된 nonisotopic sequencing kits(No. 7006 & 7409)는 Bio-Rad(미국) 제품을, Sequenase version 2.0 DNA sequencing kits는 USB(미

Table 1. Nucleotide Sequences of Primers. 25-5' -Hind III(5' -primer) and 25' -3' -Xba I (3' -primer) contain the restriction sites of Hind III and Xba I respectively. These sites were used for the cloning of the PCR products into the Hind III-Xba I cut vector(pBluescript). Other primers are synthetic primers which alanine codons were substituted for serine codon at positions 41, 45, 132-133, and 148 amino acids of the PU.1, respectively. The underlined sequences indicate the substituted alanine codons. A(5' -primer) is complementary to the corresponding B(3' -primer). The annealing position and orientation of primers to the template are presented in Fig. 1.

Name	Nucleotide Sequences
25-5' -HindIII	5' -TTGTTCAAGCTTCTGGATGTTACAGGCG-3'
25-3' -Xba I	5' -AGAATGTCTAGATCTCTGCGGGCGATCAGT-3'
S41A(A)	5' -TCCTTCGTGGGCGCCGATGGAGAAAGC-3'
S41A(B)	5' -GCTTTCTCCATCGGCGCCACGAAGGA-3'
S45A(A)	5' -AGCGATGGAGAAGCCCATAGCGATCAC-3'
S45A(B)	5' -GTGATCGCTATGGGCTTCTCCATCGCT-3'
S132-133A(A)	5' -GCCACCAGCAGGCCGAGATGAGGAGGAG-3'
S132-133A(B)	5' -CTCCTCTCATCTGCGGCTGCTGGTGGGC-3'
S148A(A)	5' -CCCCTGGAGGTGGCTGATGGAGAAGCT-3'
S148A(B)	5' -AGCTTCTCCATCAGCCACCTCCAGGGG-3'

국) 제품을 사용하였다.

기기

본 연구에 사용된 기기는 다음과 같다. 원심분리기인 high speed centrifuge(rotor : JA-20, JA-14, JS-13.1), ultracentrifuge L8-80M(rotor : VTi65), spectrophotometer(DU-65)는 Beckman(미국) 제품을 사용하였고, microcentrifuge는 한일(한국) 제품을 사용하였다. Sequencing gel 전기영동장치(SE1500)는 Hoefer Scientific Instruments(미국) 제품을, sequencing gel 전기영동시 사용한 power supply는 Vision Scientific(한국) 제품을 사용하였다. Agarose gel 전기영동시 이용된 power supply는 Hoefer Scientific Instruments(미국) 제품을, 전기영동장치, 연동펌프, water bath는 Korea Manhattan Co.(한국) 제품을 사용하였다. UV transilluminator는 Spectronics Co.(미국) 제품을 사용하였고, PCR은 Ericomp(미국)사 제품인 Single block™ System을 사용하였다.

균주와 벡터

균주 *Escherichia coli*(*E. Coli*) XL1-Blue, JM 109, plasmid pBluescript KS+ 및 helper phage M13K07은 Stratagene(미국)에서 구입하였으며, 균주의 유전자형은 다음과 같다.

E. coli XL1-Blue : sup E44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac[F' proAB+, lac^zΔM15, Tn10(tet^r)]

E. coli JM 109 : e14⁻(mcrA), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, (τ₁⁻, m₁⁺), supE44, relA1, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, lac^zΔM15]

방법

PU.1 cDNA의 제41, 45, 132-133, 148번째 아미노산인 세린 잔기들을 coding하고 있는 nucleotides가 알려진 coding nucleotides로 치환된 점돌연변이체들(site-directed mutants)은 Splicing-Overlapping-Extension(SOE)법으로 얻었다(1). 이 방법이 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)과 병합하여 수행될 때, 어떤 유전자의 특정부위가 실험자의 의도대로 정확히 치환된 DNA 유전자 절편을 인공적으로 대량 합성할 수 있다. 이와 같이 합성된 mutant DNA 절편을 적합한 운반체(pBluescript KS+)에 접합시키어 재조합 plasmid DNA를 얻은 후, 이를 숙주세포(*E. coli* XL1-Blue)에 형질전환하여 PU.1 cDNA 변이체 클론 4종류를 형성하였다. 이 과정은 PU.1 cDNA의 특수부위 변이 절편 합성, PU.1 cDNA 변이체 클로닝, DNA sequencing을 통한 PU.1 cDNA 점돌연변이 확인의 세 단계로 요약할 수 있으며 이를 기술하면 다음과

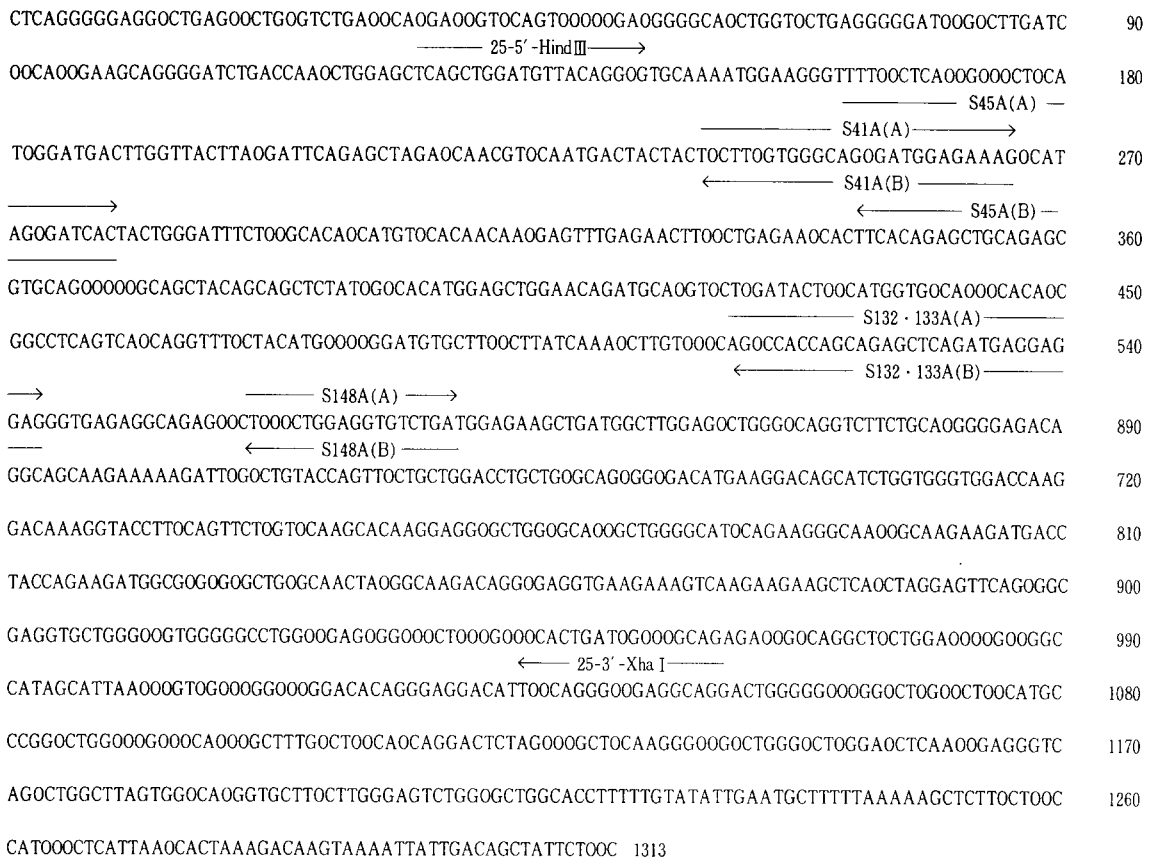


Fig. 1. Nucleotide Sequences of PU.1 cDNA and Annealing Site of Oligonucleotide Primers Used in PCR. The long arrows(→) indicate the annealing position and orientation of the primers. The curved parts of arrows(25-5' -Hind III and 25-3' -Xba I) are non-annealing regions. Of the primers, PCR-synthesized mutant DNAs are expected to 860 nt long.

같다.

Site-Directed Mutagenesis of PU.1 cDNA

Mouse PU.1 full length cDNA가 삽입된 plasmid인 p25.1을 calcium chloride 법으로 숙주세포에 형질전환하였다. Plasmid p25.1은 EcoR I 으로 절단하여 1,313 nucleotides(nt)의 PU.1 full length cDNA 절편을 분리 정제하였다. 이를 PU.1 mutant cDNA를 얻기 위한 PCR template로 사용하였다.

특수부위 돌연변이를 위한 mutagenic primers의 이름과 그 염기 서열순서(5' → 3')는 Table 1과 같이 설계하여, phosphoamidites 기법으로 합성하였다(1, 2). Primers가 PU.1 cDNA에 annealing하는 위치는 Fig. 1과 같다.

PCR 조건은 95°C에서 5분간 변성, 53°C에서 1분간 annealing시킨 후 72°C에서 2분씩 30회 동안 합성하였다. Full length mutant cDNA(세린→알라닌)는 다음과 같이 3단계를 거쳐 합성하였다.

Step 1 : PU.1 cDNA(wild type)를 template로 하고, 25-5' -Hind III와 mutagenic oligo (B)를 primers로 사용하여 PU.1 cDNA의 5' 쪽 단편(5' - half fragment)을 PCR을 이용해 증폭하였다.

Step 2 : PU.1 cDNA(wild type)를 template로 하고, 25-3' -Xba I과 mutagenic oligo (A)를 primers로 사용하여 PU.1 cDNA의 3' 쪽 단편(3' - half fragment)을 PCR을 이용해 증폭하였다.

Step 3 : Step 1과 Step 2에서 합성된 mutant cDNA half fragments를 templates로 하고, 25-5'

-HindIII와 25-3'-Xba I 을 primers로 사용하여 원하는 세린 codon이 알라닌 codon으로 치환된 full length의 mutant PU.1 cDNA를 얻었다.

이와 같이 하여 합성된 PCR 산물은 모두 세린 codon이 알라닌 codon으로 바뀐 full length의 cDNA이고, 길이는 860 nucleotides(nt)이었다. PCR products는 agarose gel electrophoresis(0.8%)를 수행하여 확인하였다(1, 2). 그러나 5'-S41A와 5'-S45A PCR products는 각각 합성된 DNA 절편의 크기가 작으므로(151nt와 163nt), NuSieve GTG agarose(4%)를 사용하였다(14). Gel상의 DNA fragments는 DEAE-cellulose membrane을 이용하여 분리·정제하였다(3).

Mutant cDNA Clones(Ser→Ala)의 형성 및 이들의 DNA 염기분석

세린 codon이 알라닌 codon으로 치환된 mutant full length cDNA 절편들과 vector로 사용된 plasmid pBluescript KS+를 제한효소(HindIII와 Xba I)로 처리하여(15), 이들 insert DNA와 vector DNA를 T₄ DNA ligase와 반응시켜 접합시킨 후, *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켰다(16). 이 형질전환체에서 재조합 plasmid를 boiling 방법(7)으로 분리·정제하여서 형질전환 여부 및 insert의 크기를 확인하였다. 이들 mutant cDNA 및 wild type PU.1 cDNA의 염기서열 순서는 Sanger법(19)으로 결정하였다. 사용된 sequencing primers는 아래와 같다.

S76A(B)

5' - CGGGGGCTGCACGGCCTGCAGCTCTGT
-3' (27mer)

S168A(B)

5-AATCTTTTTCTTGGCGCCTGTCTCCCC-3'
(27mer).

이들 primers는 PU.1 유전자의 sense strand의 일부에 상보적인 염기서열로 이루어져 있다. pKKS41A 및 pRKS45A는 S76A(B)를, pMKS132·133A 및 pMKS148A는 S168A(B)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Wild type인 p25.1은 이들 두 가지 primers를 모두 사용하였다.

결과 및 고찰

Mutagenic cDNA Sequencing Primers의 합성
PU.1 cDNA의 점돌연변이를 유도하기 위한 mu-

tagenic primers와 DNA 염기서열 결정을 위한 sequencing primers는 phosphoamidite 법으로 합성하였다(1, 2) 이들의 명칭, nucleotide 조성(See Table 1)을 설명하면 다음과 같다. 유전자의 점돌연변이를 유도하기 위한 template가 되는 PU.1 cDNA를 증폭하기 위하여 5'-HindIII와 3'-Xba I primers를 제작하였다. 5'-HindIII primer는 PU.1의 첫번째 아미노산 메티오닌 codon(ATG)을 포함하는 28-mer이며, 3'-Xba I primer는 마지막 아미노산 히스티딘 codon(CAC)의 상보염기중 2개의 염기(GT)를 포함하는 28-mer로 제작되었다. 그리고 원하는 세린 잔기를 알라닌 잔기로 치환하기 위하여, 세린 codon(41번, AGC, 45번 AGC, 132번 AGC, 133번 TCA, 148번 TCT)을 알라닌 codon(41번 GCC, 45번 GCC, 132번 GCC, 133번 GCA, 148번 GCT)으로 바꾸고, 치환된 각각의 codon을 중심으로 하여 양쪽(5'과 3'쪽)으로 12 nucleotides씩 포함된 25-mer를 합성하였다. 이 primers의 방향이 PU.1 cDNA의 5'→3' 방향으로 합성된 것을 oligo (A) primers (S41A(A), S48A(A), S132·133A(A), S148A(A))로 명명하고, 이들과 상보적인 것을 oligo (B) primers (S41A(B), S48A(B), S132·133A(B), S148A(B))로 명명하였다. 각 primers에서 mutagenic sites로 치환된 부분이 template와 mismatch되지만 점돌연변이를 중심으로 좌우양쪽의 상보적인 염기들에 의해서 template와 안정적으로 annealing될 수 있다. PU.1 polypeptide의 132번, 133번 세린은 연속되는 세린 잔기들로 이루어져 있기 때문에, 동시에 알라닌으로 치환할 수 있도록 설계하여 primers를 합성하였다. 이들 primer들이 PU.1 cDNA(template)상에서 annealing되는 위치는 언급한 바와 같다(Fig. 1).

Serine→Alanine Mutant PU.1 cDNA(PU.S41A, PU.S45A, PU.S132·133A, PU.S148A) 절편의 합성

Mutant PU.1 cDNA를 합성하기 위한 PCR template DNA는 p25.1을 제한효소 EcoRI으로 절단하여 얻었다. Plasmid DNA p25.1을 제한효소 EcoRI으로 절단하면 두 개의 절편으로 나뉜다(Fig. 2). 이 가운데 한 절편(2,950nt)은 선형화된 pBluescript KS+이며, 다른 한 절편(1,313nt)은 Klemsz 등이 보고한 PU.1 cDNA에 해당된다(12). 그러므로 이 1,313nt 크기의 절편을 분리·정제하여 mutant PU.1 cDNA를 형성하기 위한 PCR에서 template DNA로 사용하였다.

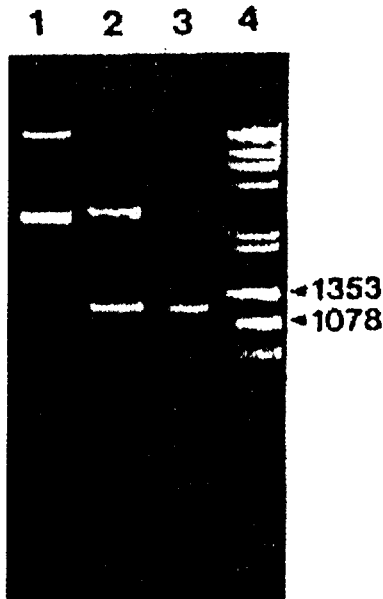


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of full length PU.1 cDNA and p25.1. Lane 1: ccc p25.1, Lane 2: EcoR I digestion, Lane 3: Full length PU.1 cDNA, Lane 4: DNA size marker(λ /Hind III- ϕ X174/Hae III).

PU.1 cDNA를 template로 하고 25-5'-HindIII와 S41A(A)의 두 mutagenic primers를 이용하여 PCR을 수행하면 5' 쪽의 mutant PU.1 cDNA 단편(151nt, Fig. 3, lane 9)을 주요한 PCR의 산물로 얻었다. 또한 25-3'-Xba I과 S41A(B)의 두 mutagenic primers를 이용하여 3' 쪽의 mutant PU.1 cDNA 단편(736nt, Fig. 3, lane 8)을 주요한 PCR의 산물로 얻었다. 수행시 처음에 넣어준 template는 cycle이 지나면서 산술적으로 늘어나고, PCR product는 기하급수적으로 늘어나므로, 원하는 size의 증폭된 DNA는 모두 염기가 치환된 컷들이다. 마찬가지로 25-5'-HindIII와 S45A(A), S132-133A(A), S148A(A)의 두 mutagenic primers를 각각 이용하여 PCR을 수행하여 5' 쪽의 mutant PU.1 cDNA 단편들(163, 427, 472nt; Fig. 3; lane 7, 5, 3)을 주요한 PCR의 산물로 얻었다. 또한 25-3'-Xba I과 S45A(B), S132-133A(B), S148A(B)의 두 mutagenic primers를 이용하여 3' 쪽의 mutant PU.1 cDNA 단편들(724, 463, 415nt; Fig. 3; lane 6, 4, 2)을 주요한 PCR의 산물로 얻었다.

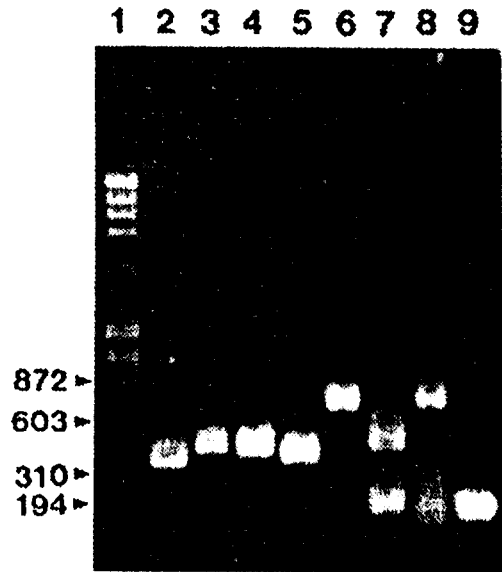


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products(Half-fragments) Lane 1: DNA size marker(Ladder 123), Lane 2: 3'-S148A DNA fragment(415nt long), Lane 3: 5'-S148A DNA fragment(472nt long), Lane 4: 3'-S132-133A DNA fragment(463nt long), Lane 5: 5'-S132-133A DNA fragment(427nt long), Lane 6: 3'-S45A DNA fragment(724nt long), Lane 7: 5'-S45A DNA fragment(163nt long), Lane 8: 3'-S41A DNA fragment(736nt long), Lane 9: 5'-S41A DNA fragment(151nt long).

이렇게 하여 얻어진 mutant PU.1 cDNA 단편들(5'- 및 3'-쪽 단편들)은 양쪽 끝에 mutagenic primers의 sequence를 가지므로 서로 상보적 염기 서열을 갖게 된다. 그리고 이 상보성에 의해서 두 개의 mutant 단편이 denature되어 annealing될 때 서로 반대의 가닥에 결합하게 된다. 실험방법의 Step 3에서는 이와 같은 성질을 이용하여 full length의 mutant PU.1 cDNA를 얻었다. 상보적으로 결합된 두 가닥 중에 하나는 스스로 primer로 작용할 수 있는 부위가 없기 때문에 양쪽 끝의 primer, 즉 25-5'-HindIII와 25-3'-Xba I을 넣어 주어 DNA 사슬을 합성하도록 하였다. 이 세번째의 PCR 산물은 모두 세련이 알라닌으로 바뀐 full length의 cDNA 이고, 길이는 860nt이었다. PU.1 cDNA

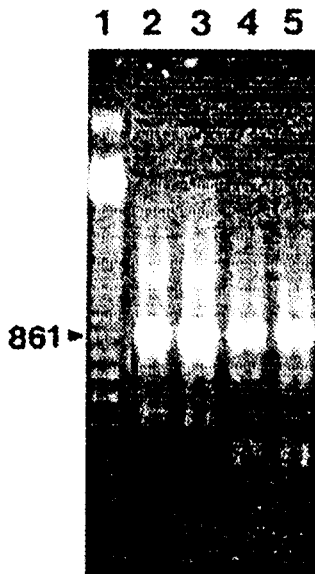


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of PCR products(Full length mutnat PU.1). Lane 1: 123 bp ladder, Lane 2: Mutant PU.1 cDNA, PUS41A(861nt long), Lane 3: Mutant PU.1 cDNA, PUS45A(861nt long), Lane 4: Mutant PU.1 cDNA, PUS132-133A(861nt long), Lane 5: Mutant PU.1 cDNA, PUS148A(861nt long).

wild type의 제41, 45, 132-133, 148번 세린 codon이 알라닌 codon으로 치환된 mutant PU.1 cDNA의 절편들을 각각 PUS41A(Fig. 4, lane 2), PUS45A(Fig. 4, lane 3), PUS132-133A(Fig. 4, lane 4), PUS148A(Fig. 4, lane 5)로 명명하였다.

재조합 Plasmid DNA(pKKS41A, pRKS45A, pMKS132-133A, pMKS148A)의 형성 및 이의 클로닝

Mutant PU.1 cDNA인 PUS41A, PUS45A, PUS132-133A, PUS148A를 제한효소 HindIII와 Xba I으로 처리하고 동일한 효소로 자른 pBluescript KS+에 접합시킨 후, *E. coli* XL1-Blue에 형질전환 시켰다. 형질전환체들을 선별배지(tetracycline, ampicillin, X-gal, IPTG 함유)에서 배양하여 다수의 백색과 청색의 균군락을 얻었다. 이들 중 백색 군락은 α -complementation이 일어나지 못하여 β -galactoside를 분해할 수 없기 때문에 청색을 띠지 못하는 것으로 사료된다. 그러므로 백색 군락들

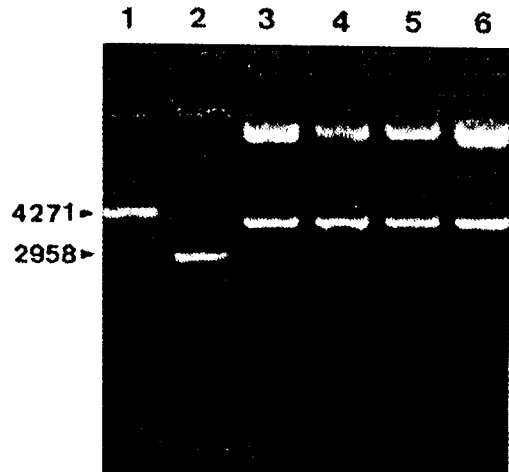


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis pattern of recombinant plasmids. Lane 1: ccc p25.1, Lane 2: ccc pBluescript KS+, Lane 3: pKKS41A, Lane 4: pRKS45A, Lane 5: pMKS132-133, Lane 6: pMKS148A.

은 mutant PU.1 cDNA가 각각 pBluescript KS+에 접합된 재조합 plasmid를 extrachromosomal DNA로 갖고 있다고 볼 수 있다. 이를 확인하기 위하여 백색 군락들로부터 boiling방법으로 DNA를 분리-정제하였다(18). 이를 agarose gel상에서 전기영동한 결과(Fig. 5), pBluescript KS+(2,958nt)보다는 천천히 이동하나, p25.1(4,271nt)보다는 빨리 이동하였다. 이 이동도로 미루어 보아 이 재조합 DNA의 크기들은 각각 3,766nt임을 알 수 있었으며, 이는 재조합 plasmid가 성공적으로 제작된 것을 의미하는 것이다. 이 재조합 plasmids를 각각 pKKS41A, pRKS45A, pMKS132-133A, pMKS148A로 명명하였다.

PU.1 cDNA Mutant의 DNA 염기서열 치환 확인

PU.1 cDNA의 제41, 45, 132-133, 148번 세린 codon이 알라닌 codon으로 치환된 것을 Sanger 법(19)을 이용하여 이들 클론의 DNA 염기 서열순서를 조사하였다. 그 결과 pKKS41A는 41번째 세린 codon(AGC)이 알라닌 codon(GCC)으로, pRKS45A는 45번째 세린 codon(AGC)이 알라닌 codon(GCC)으로, pMKS132-133A는 132-133번째 세린 codon(AGC-TCA)이 알라닌 codon(GCC-GCA)으로, pMKS148A는 148번째 세린 codon

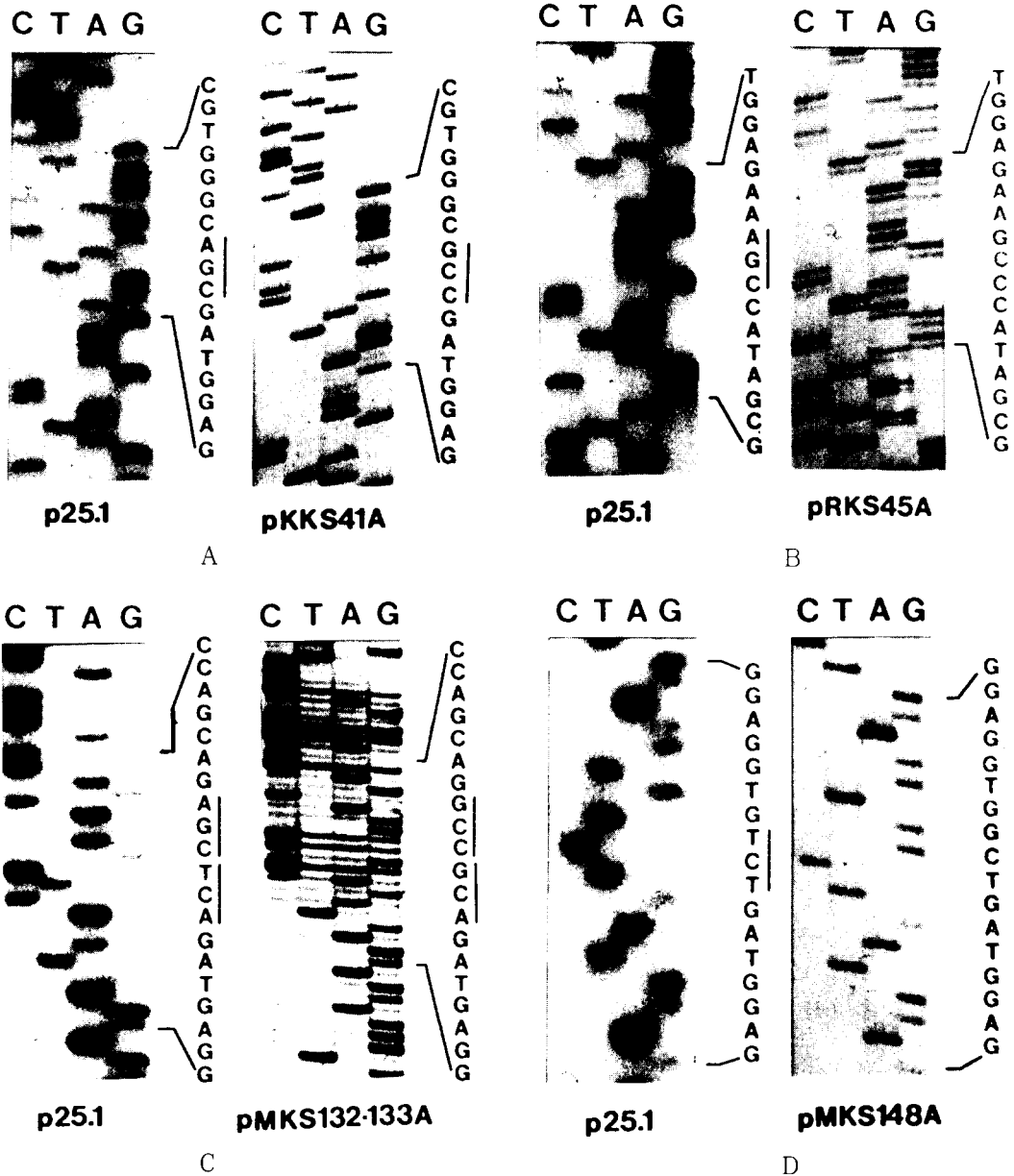


Fig. 6. DNA sequences of the wild p25.1 and recombinant plasmid(pKKS41A, pRKS45A, pMKS132·133A, pMKS148A) in the mutated region by site directed mutagenesis. (A) p25.1 and pKKS41A, (B) p25.1 and pRKS45A, (C) p25.1 and pMKS132·133A, (D) p25.1 and pMKS148A.

(TCT)이 알라닌 codon(GCT)으로 각각 치환된 mutant PU.1 cDNA를 갖는 재조합 plasmids임을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 또한 wild PU.1 cDNA

의 full sequencing을 통하여 이의 염기서열에는 이상이 없음을 확인하였다. PCR을 통하여 얻은 mutant PU.1 DNA 산물이 PCR 과정중에 사용된

DNA polymerase 또는 cycle 횟수에 따라 잘못된 염기를 가지고 있을 가능성을 배제할 수 없다. 따라서, 이러한 무작위 돌연변이의 유·무를 확인하기 위하여 site-directed mutation 부위를 중심으로 전후 100~200 bases의 염기서열을 결정하여 분석한 결과, 원하는 부위 이외에는 wild PU.1 cDNA와 동일한 염기서열을 가지고 있었다. 이것은 *Taq* DNA polymerase와 달리 *Vent* DNA polymerase는 3'→5' proofreading exonuclease activity를 가지고 있어서 error률이 지극히 낮기 때문일 것이다. 따라서 PU.1 cDNA 특정부위의 인위적 변이체 형성은 성공적으로 수행되었다고 사료된다.

전사인자 PU.1은 포유류의 면역 기작 연구에 중요한 위치를 차지하고 있으며, 특히 PU.1은 B세포의 분화과정에서 immunoglobulin 유전자의 재배열 및 이의 발현을 조절하는 데 관여한다는 보고가 있었다(27). 그러나 PU.1의 입체 구조나 정확한 활성화 기작이 밝혀지지 않은 상태이다. PU.1도 다른 전사인자와 같이 post-translational modification 과정을 거쳐 활성화됨에는 의심할 여지가 없다. Meisner 등은 PU.1의 세린 잔기가 CK II에 의해 인산화되며, 이 과정은 PU.1이 활성을 가지는데 있어서 선행되어야 할 것이라고 추측하였다(13). 인접한 아미노산 서열을 고려해 볼 때 (β -turn S-*-*-E/D), CK II에 의하여 인산화될 수 있는 세린 잔기들은 PU.1 transactivation domain내에 다섯 군데가 있다(13, 21-26). 이를 규명하고자 본 연구에서는 제41, 45, 132·133 및 148번째 세린 잔기가 알라닌으로 치환된 mutant PU.1 cDNA(pKKS41A, pRKS45A, pMKS132·133A 및 pMKS148A)를 제조하여 PU.1 세린 잔기의 인산화 부위를 밝히는데 기여하고자 하였다. 본 연구에서는 원하는 세린 잔기가 알라닌으로 치환된 점돌연변이체를 합성하기 위하여, SOE 기법을 이용한 site-directed mutagenesis를 수행하였다(1, 2). Site-directed mutagenesis에 있어서, PCR을 이용한 SOE 기법은 기존에 개발된 생물학적 방법보다도 훨씬 간편하고 정확하게 원하는 nucleotide가 치환된 변이체를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 SOE 기법을 이용한 site-directed mutagenesis를 확립할 수 있었으며, 이를 통하여 mutant PU.1 cDNA를 얻을 수 있었다. Mutant PU.1 cDNA를 클로닝하여 얻은 클론들이 원하는 부위가 치환된 재조합 mutant PU.1 cDNA 클론인지 확인하기 위하여, DNA sequencing, restriction mapping, ligation

orientation 등의 과정을 거쳤다. 그러므로 이 클론들은 CK II에 의하여 인산화된다고 사료되는 transactivation domain내의 17개의 세린 잔기중, 제41, 45, 132·133 및 148번 세린 잔기를 인산화될 수 없는 알라닌 잔기로 각각 변형시킨 mutant PU.1 polypeptide를 생산하도록 조작되었다. 이러한 mutant 클론들은 인산화될 가능성이 있는 모든 세린 잔기들을 치환시킨 multimutated 클론 제작을 위한 초기 단계 역할을 한다. Multimutated 클론은 본 실험에서 수행한 방법을 활용하여 각 mutant 클론들을 combination함으로써 제작될 수 있다. 이 클론들은 PU.1의 인산화 부위 및 수량을, 그리고 이들이 활성화에 미치는 영향을 규명하는 데 유용하게 쓰일 것이다. 현재 multimutated PU.1 DNA 합성이 진행 중에 있으며, 이를 클론화할 계획이다. 따라서 이러한 모든 mutant 클론들은 PU.1 단백질의 “구조 및 기능”을 규명하는 데 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

인산화된 PU.1은 B세포에 제한되어 있는 핵인자 NF-EM5와 상호작용하여 NF-EM5를 조절하며, 이들 두 인자들간의 상호작용시 PU.1의 아미노산 116~160 잔기들 부분이 관여한다고 보고되었다(28). 이 부분에는 CK II에 의해 인산화될 수 있는 consensus sequence(β -turn S-*-*-E/D)가 두군데 존재하며, 이 부위 중 하나는 제148번 세린 잔기를 포함하고 있다. 따라서 제41, 45 및 132·133번 세린 잔기들은 CK II에 의해 인산화될 가능성이 희박하다고 추측된다. 그러나, 세포 내에는 여러 종류의 protein kinases가 존재하므로, 제148번 세린 잔기를 제외한 세린 잔기들이 CK II 이외의 protein kinases(특히 B세포에 존재하는 protein kinases)에 의해 인산화될 가능성은 배제할 수 없을 것이다. 이를 규명하기 위하여, PU.1 클론 및 모든 mutant 클론들을 생체 내에서 발현시켜야 한다. COS 세포 또는 S107 plasmacytoma 세포는 CK II를 가지고 있으며, 따라서 이에 적합한 세포 계라고 할 수 있다. 이러한 세포에서 합성된 PU.1 단백질, NF-EM5 및 이들 복합체가 결합되는 DNA를 반응시키고 이들 반응물을 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법에 적용함으로써 세린 잔기(들)의 인산화가 PU.1의 활성화도에 미치는 영향을 규명할 수 있을 것이다. PU.1 활성화 기작의 규명은 B세포의 분화 및 항체 형성 기작에 대한 분자생물학적 연구의 기초를 제공할 것이다. 뿐만 아니라 B세포 또는 단일항체를 생산하는 Hybridoma 세포의 배양에 이

를 활용함으로써 이들 세포를 통한 immunoglobulin의 대량 생산에 응용할 수 있을 것이다.

요 약

PU.1은 6개의 특이적인 purine-rich 염기서열(5'-GAGGAA-3')로 구성된 PU box에 결합하는 transcription activator이다. 이 PU.1은 macrophage와 B-cell에서만 발현되어 이들 세포를 활성화시키므로, 포유동물의 면역계를 연구하는 데 중요한 위치를 차지하고 있다. Full length PU.1 cDNA는 open reading frame 816개의 DNA 염기로 구성되어 있으므로, 아미노산 272개의 합성을 지령한다. PU.1의 활성화는 이를 구성하고 있는 polypeptide 중 세린 잔기가 인산화되어 전사인자로서 작용한다고 추측된다. PU.1은 22개의 세린을 함유하고 있으며, 정확한 인산화 위치 및 수량은 알 수 없으나, casein kinase II에 의하여 인산화된다고 추측되는 제41, 45, 132·133, 148번째 아미노산 세린들이 제1차 target sites이다.

본 연구에서는 이상의 제41, 45, 132·133, 148번 아미노산 세린 codon(AGC, AGC, AGC·TCA, TCT)이 알라닌 codon(GCC, GCC, GCC·GCA, GCT)으로 치환된 4가지의 점돌연변이체 클론(pKKS41A, pRKS45A, pMKS132·133A, pMKS148A)을 다음과 같이 제조하였다. Wild type PU.1 cDNA(template)를 해당되는 mutant DNA primers로 증폭(PCR/SOE)하여 mutant cDNA 단편을 얻었다. 이를 HindIII와 Xba I으로 절단된 pBluescript KS+에 접합시킨 후, 대장균(E. coli XL1-Blue)에 형질전환시켰다. 이 점돌연변이체들은 인산화 부위 및 수량은 물론 PU.1의 구조 및 기능(Structure and Function) 연구에 기여할 것이다.

감 사

이 연구는 1993년도 한국과학재단 연구비 지원(과제번호: 931-0500-017-2('93~'95))으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- C. Ryou(1992), *Master Thesis*, Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon.
- S. Yu(1992), *Master Thesis*, Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon.
- S. Jang(1994), *Master Thesis*, Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon.
- M. Kim(1994), *Master Thesis*, Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon.
- M. Ptashne(1988), *Nature*, **363**, 683.
- W. McGinnis and R. Krumlauf(1992), *Cell*, **68**, 283.
- M. Kwon and R. G. Oshima(1992), *Developmental Dynamics*, **193**, 193.
- J. Caubin, T. Iglesias, J. Bernal, A. Munoz, G. Márquez, J. L. Barbero and A. Zaballos (1994), *Nucleic Acid Res.*, **22**(20), 4132.
- L. M. Staudt, H. Singh, R. Sen, T. Wirth, P. A. Sharp and D. Baltimore(1986), *Nature*, **323**, 640.
- M. Muller, S. Ruppert, W. Schaffner and P. Matthias(1988), *Nature*, **336**, 544.
- C. Scheidereit, J. A. Cromlish, T. Gerster, K. Kawakami, C. Balmaceda, R. A. Currie and R. G. Roeder(1988), *Nature*, **336**, 551.
- M. J. Klemsz, S. R. Mckercher, A. Celada, C. V. Beveren and R. A. Maki(1990), *Cell*, **61**, 113.
- H. Meisner and M. P. Czech(1991), *Current Opinions in Cell Biology*, **3**, 474.
- A. Belyavsky(1989), *Resolutions*, **5**, 1.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* 2nd ed., p. 5.31, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U. S. A.
- J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), Protocol II : Fresh competent E. coli prepared using calcium chloride. In : *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* 2nd ed., p. 1. 82, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U. S. A.
- G. P. Dotto, K. Horiuchi and N. D. Zinder (1984a), *J. Mol. Biol.*, **712**, 507.
- J. Viera and J. Messing(1987), *Methods in Enzymology*, **153**, p. 3, Academic Press Inc.,

- NY, U. S. A.
19. F. Sanger(1981), *Science*, **214**, 1205.
 20. M. Frain, G. Swart, P. Monaci, A. Nicosia, S. Stampfli, R. Frank and R. Cortese(1989), *Cell*, **59**, 145.
 21. D. Carrol, N. Santoro and D. R. Marshak (1988), *Quant. Biol.*, **53**, 91.
 22. L. A. Pianna, F. Meggio and F. Marchiori (1990), *Peptides and Protein Phosphorylation*, Kemp PE, ed., p. 145, CRC press, BocaRaon, Floria.
 23. R. Marias, J. J. Hsuan, C. McGuigan, J. Wymme and R. Treisman(1992), *EMBO*, **11**, 97.
 24. R. Peperkok, P. Lorenz, R. Jakobi, W. Ansorge and W. Pterrin(1991), *Experimental Cell Research*, **197**, 245.
 25. W. E. Taylor and E. T. Young(1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 4098.
 26. M. Tanaka and W. Herr(1990), *Cell*, **60**, 375.
 27. B. Nelsen, G. Tian, B. Erman, J. Gregoire, R. Maki, B. Graves and R. Sen(1993), *Science*, **261**, 82.
 28. E. A. Kuenzel, J. A. Mulligan, J. Sommercorn, E. G. Krebs(1987), *J. Bio. Chem.*, **262**, 9136.