

Bak-like 단백질을 code 하는 cDNA 의 동정

김진경*

포천중문의과대학교, 여성의학연구소
(Received June 5, 2001; Revised June 27, 2001)

Identification of Bak-like Protein cDNA

Jin-Kyeong Kim

College of Medicine, Pochon CHA University, Infertility of Medical Center, CHA General Hospital,
606-5, Yeoksam 1-Dong, Kangnam-Gu, Seoul, Korea 135-081.

Abstract — Cells are eliminated in a variety of physiological settings by apoptosis, a genetically encoded process of cellular suicide. Bak, a member of the Bcl-2 protein family, accelerates apoptosis by an unknown mechanism. We have found a novel cDNA encoding a 101 amino acid protein possessing a Bak-like in our full-length cDNA bank. Bak-like shares the conserved domains BH1 and 2 with other proapoptotic proteins but lacks the BH3 domain. Bak-like is expressed in a wide variety of tissues. Like Bak, Bak-like gene product primarily enhances apoptotic cell death following an appropriate stimulus.

Keywords □ Human cDNA bank, apoptosis, Bak-like, alternative splicing variants

Apoptosis(이하 세포사라함)에 관여하는 Bcl-2 family는 기능에 따라, 세포사를 촉진시키는 그룹과 세포사를 억제시키는 그룹으로 나누어진다. 전자에는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w 등이, 후자에는 Bax, Bak, Bad 등이 알려져 있다.¹⁾ Bcl-2 family의 단백질을 코드하는 아미노산배열에는 4개의 BH영역(BH1, BH2, BH3, BH4, BH : bcl-2 homology)이 존재한다.²⁾ 세포사를 억제시키는 그룹에는 반드시 BH1~BH4의 모든 영역이 존재하지만, 세포사를 촉진시키는 그룹에는 BH4영역이 존재하지 않는다. 세포사를 촉진시키는 그룹 중에서 Bad와 Bid에는 BH3영역만이 존재하지만 세포사를 촉진시키는 활성을 가진다.³⁾ 그러므로 BH3영역은 세포사의 촉진에 관여할 것으로 추정된다. 변이도입실험의 결과, BH1, 2영역은 Bcl-2 family단백질의 이량체 형성에 필수적인 것으로 추정된다.^{4,5)}

Bak은 세 그룹에 의해 각각 다른 방법으로 동정되

었다. Farrow는 adenovirus의 유전자산물로서 세포사를 억제시키는 E1B 19K단백질과 결합하는 유전자로 분리하여, Bcl-2 homologous antagonist/killer의 약자로 bak이라 명명하였다.⁶⁾ 다른 두 그룹은 bcl-2 family유전자에 존재하는 BH1과 BH2에 대응하는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켜 bcl-2와 상동성을 보이는 클론을 선택하여 bak을 동정하였다.^{7,8)} Bak은 Bcl-2, Bcl-xL과 E1B 19K와 결합한다. Bak의 BH3영역은 단독으로 Bcl-2, Bcl-xL과 결합하는 활성을 가지며, 세포사를 촉진시킨다.⁹⁾ Bak은 많은 세포의 세포사를 촉진시키며, 대부분의 조직에서 발현한다.⁶⁾

이에 저자는 human full-length cDNA bank¹⁰⁾에서 bak과 상동성을 보이는 bak-like를 동정하여 다소의 지견을 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

실험방법

염기배열결정 - bak과 상동성을 보이는 bak-like의

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3468-3463 (팩스) 02-501-8704

plasmid DNA를 primer cycle sequence kit(Perkin-Elmer, USA)로 반응시켰다. 반응물은 DNA sequencer (Perkin-Elmer ABI, model 377)를 이용하여 염기배열을 결정하였다.

Northern blot analysis - Multiple Tissue Northern Blot filters(Clontech, USA)에 random primer labeling kit(Takara, Japan)으로 bak-like를 ³²P로 표지하여 QuickHyb원충액(Clontech, USA)으로 50°C에서 하이브리드화하였다. 0.1×SC, 0.05% SDS로 50°C에서 세척하여 X-ray필름으로 -80°C에서 12시간 처리하여 현상하였다.

PCR - PCR의 주형은 colon, ovary, peripheral blood

leukocytes, prostate, small intestine, spleen, testis, thymus, breast carcinoma(GI-101), lung carcinoma (LX-1), colon adenocarcinoma(CX-1), lung carcinoma (GI-117), prostatic adenocarcinoma(PC3), colon adenocarcinoma(GI-112), ovarian carcinoma(GI-102), pancreatic adenocarcinoma(GI-103)의 mRNA로 합성한 cDNAs(Clontech, USA)를 사용하였다. bak-like의 프라이머는 5'-TTCGAGGACTTTTCT-3', 5'-GAGGGAT-TGCACAG-3'(A)와 bak과 상동성을 보이지 않는 부위 5'-GAGTATCCAAGGACT-3', 5'-GGAGAAACAAG-GTGG-3'(B)를 사용하였다. 또한, bak의 프라이머는 ORF(open reading frame)부위를 사용하였다(C). PCR

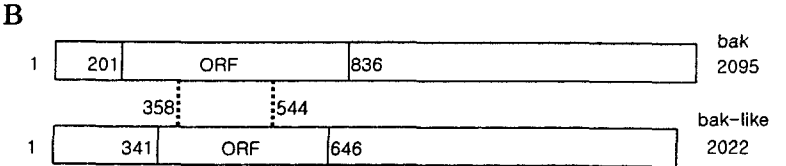
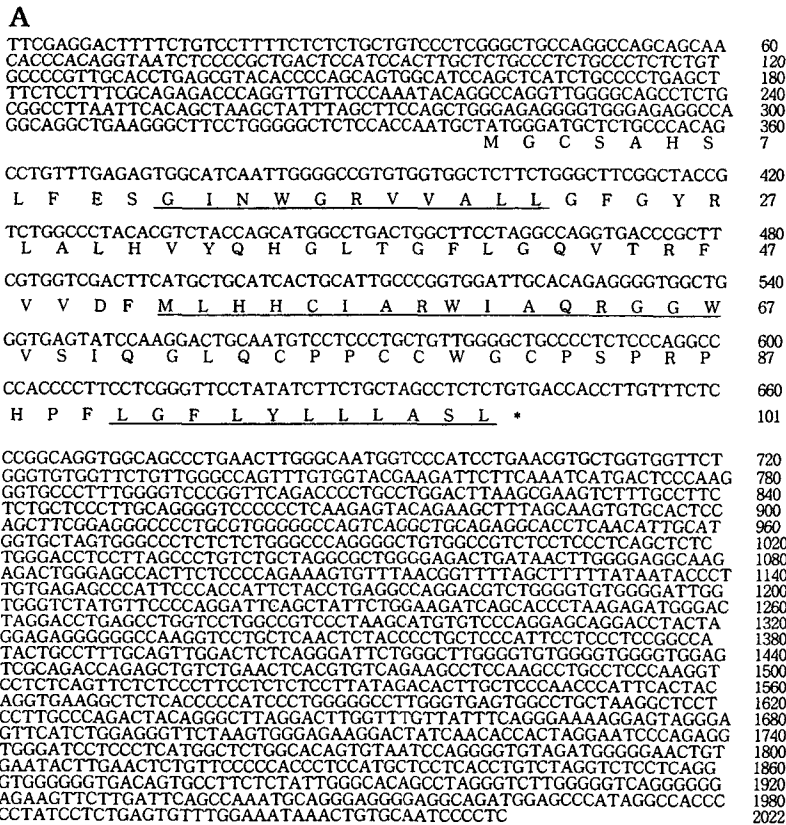


Fig. 1 - Primary structure of bak-like, and sequence comparisons with bak. A, Nucleotide sequence of human bak-like cDNA and deduced amino-acid sequence. B, alignment of sequence from bak and bak-like.

은 PCR Reagent System(GIBCO BRL, USA)을 사용하여 94°C에서 3분간 처리 후, 94°C에서 45초, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초간 30 cycles로 반응시켰다.

Southern blot analysis - 전혈의 게놈 DNA (Promega, USA)유래의 게놈 DNA 10 µg을 *SacI*, *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI*으로 분해하고, 0.8% 아가로스겔 전기영동으로 분리한 다음, 나일론 막(Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Japan)상으로 전이시켰다. ³²P로 표지된 210 bp 단편(bak의 뉴클레오티드 위치 335에서 544에 대응)과 267 bp 단편(bak-like의 뉴클레오티드 위치 91에서 375에 대응)을 사용하여 QuickHyb완충액(Clontech, USA)으로 60°C에서 하이브리드화하였다. 0.1×SSC, 0.05% SDS로 50°C에서 세척하여 X-ray필름으로 -80°C에서 24시간 처리하여 현상하였다.

세포의 생존율 - 10% 태내 송아지 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지에 HeLa 세포(2×10⁵ cells/well)를 준비하였다. GenePORTERIM(Gene Therapy Systems, USA)를 사용하여 각각의 유전자와 EGFP(enhanced green fluorescent protein)를 융합한, EGFP-융합유전자와 pCMV-β-gal 플라스미드를 형질 감염시켜 24시간 배양 후, β-galactosidase expression kit(Promega, USA)으로 측정하였다.¹¹⁾

실험결과 및 고찰

Bak-like의 염기배열

전장의 인간 cDNA의 포괄적 세트를 포함시킬 목적으로 제조한 호모·프로테인 cDNA बैं크의 작제에 대해서는 Kato에 의해서 이미 보고되었다.¹⁰⁾ 이러한 cDNA बैं크에서 저지는 세포사를 촉진시키는 Bak과 상동성을 보이는 클론을 발견하여 Bak-like라 명명하였다. bak-like의 염기배열을 결정된 결과, 2022개의 mRNA로 구성되며, 101개의 아미노산을 코드하였다. 또한 아미노산배열에는 BH1(아미노산 12번에서 21번까지), BH2(아미노산 52번에서 67번까지), TM(아미노산 91번에서 101번까지)영역이 존재하였다(Fig. 1A, 밑줄 친 부위). Bak-like에는 Bcl-2 family단백질의 이량체 형성에 필수적인 것으로 추정되는 BH1, 2영역은 존재하였지만, 세포사의 촉진에 관여할 것으로 추정되는 BH3영역은 존재하지 않았다. bak유전자와의 상동성을 비교한 결과, bak-like유전자를 기준으로 358번에서 544번까지의 염기배열에 상동성을 보였다(Fig. 1B). N말단의 10개의 아미노산과 C말단의 33개의 아미노산은 Bak과 상동성을 보이지 않았다.

세포 내에서의 mRNA의 발현

Bak-like의 발현 프로필을 보다 상세하게 규명하기 위하여, 정상과 암의 세포와 조직에서 추출한 mRNA

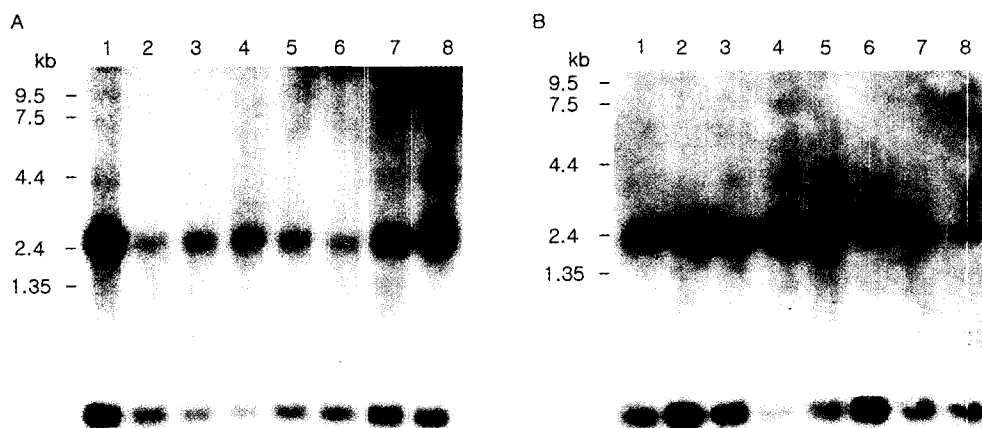


Fig. 2 - Northern blot analysis of bak-like expression. A, Multiple tissue northern blot (human cell line). Lanes: 1, promyelocytic leukaemia HL-60; 2, HeLa cell S3; 3, chronic myelogenous leukaemia K562; 4, lymphoblastic leukaemia MOLT-4; 5, Burkitt's lymphoma Raji; 6, colorectal adenocarcinoma SW480; 7, lung carcinoma A549; 8, melanoma G361. B, Multiple tissue northern blot (human II). lanes: 1, spleen; 2, thymus; 3, prostate; 4, testis; 5, ovary; 6, small intestine; 7, colon; 8, peripheral blood leukocytes.

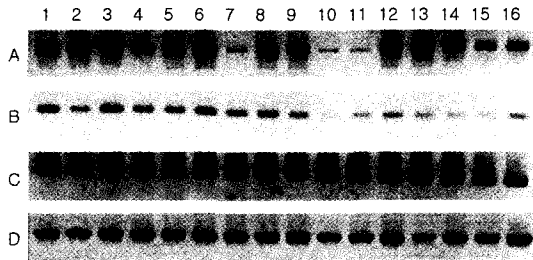


Fig. 3 – Expression of bak-like and bak on a transcriptional level. Template cDNA libraries for PCR derived from: 1, colon; 2, ovary; 3, peripheral blood leukocytes; 4, prostate; 5, small intestine; 6, spleen; 7, testis; 8, thymus; 9, breast carcinoma (GI-101); 10, lung carcinoma (LX-1); 11, colon adenocarcinoma (CX-1); 12, lung carcinoma (GI-117); 13, prostatic adenocarcinoma (PC3); 14, colon adenocarcinoma (GI-112); 15, ovarian carcinoma (GI-102); 16, pancreatic adenocarcinoma (GI-103). A, bak-like (nucleotide 1 to 2022). B, bak-like (nucleotide 544 to 646). C, bak (nucleotide 201 to 836). D, G3PDH.

를 전이시킨 나일론 막을 사용하여 노던 분석을 실시하였다. 그 결과, bak과 거의 동일한 mRNA의 길이(약 2.4 kb)를 가지며, 거의 모든 정상과 암의 세포와 조직에서 발현하고 있었다(Fig. 2). bak-like가 cDNA 라이브러리를 작제할 때 생긴 인공물이라는 추정을 배제하기 위하여, 정상과 암의 세포와 조직에서 추출한 mRNA로 작제한 cDNA 라이브러리를 주형으로 사용하여 PCR을 실시하였다. bak-like의 전장(Fig. 3A), bak과 상동성을 보이지 않는 뉴클레오티드 544번에서 646번까지(Fig. 3B)와 bak의 뉴클레오티드 201번에서 836번까지(Fig. 3C)의 5'와 3'의 프라이머를 사용하여 실시하였다. 그 결과, bak-like는 모든 정상과 암의 세포와 조직에서 발현하고 있었으며, bak과는 조금 다른 발현의 차이를 보였다. 이러한 사실로부터, bak-like는 cDNA 라이브러리를 작제할 때 생긴 인공물이 아니라 세포 내에 발현하고 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

선택적 접목 변형체 (alternative splicing variants)

Bak-like가 cDNA 라이브러리를 작제할 때 생긴 인공물이 아니라는 사실로부터, bak의 선택적 접목 변형체일 가능성이 대두되었다. 따라서 전혈의 게놈 DNA를 각각의 제한효소로 처리하여, bak과 상동성을 보이는 뉴클레오티드 335번에서 544번까지(Fig. 4A)와 bak과 상동성을 보이지 않는 뉴클레오티드 91번에서 357

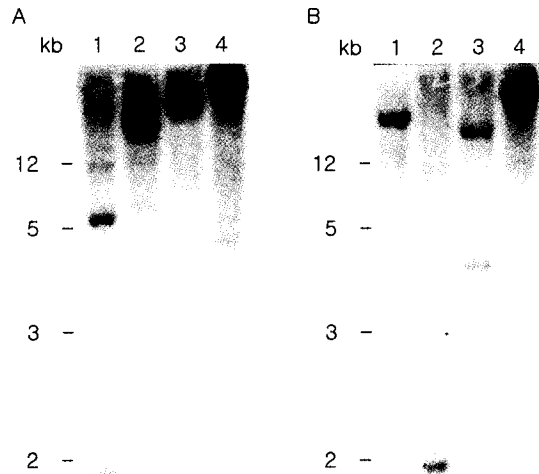


Fig. 4 – In Southern blot analysis. Human genomic DNA (10 µg) was digested with the indicated restriction enzymes (lane 1 : *SacI*, lane 2 : *HindIII*, lane 3 : *XbaI*, lane 4 : *EcoRI*) and probed with the 210 bp cDNA fragment (bak nucleotide 335 to 544) (A) or a 267 bp cDNA fragment (bak-like nucleotide 91 to 357) (B).

번까지(Fig. 4B)의 cDNA를 탐침으로 서던 블롯 분석을 실시하였다. 그 결과, 서로 다른 발현을 보이므로 bak-like는 bak의 선택적 접목 변형체일 것으로 추정되었다.

세포의 생존율

Bak-like는 Bak과 상동성을 보이며, 선택적 접목 변형체이므로 세포사를 촉진시킬 것으로 예상되었다. 반면, 세포사의 촉진에 필수적인 것으로 알려진 BH3영역이 존재하지 않기 때문에 쉽게 단정할 수 없었다. 여기서, 저자는 Bak-like가 세포사를 촉진하는지를 HeLa세포를 사용하여 세포의 생존율을 실시하였다. 그

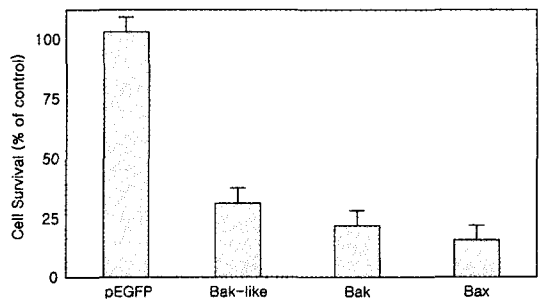


Fig. 5 – Comparison between “Bak and Bak-like, pEGFP, Bax” in apoptosis induction.

결과, Bak-like는 BH3영역이 존재하지 않음에도 불구하고, Bak보다는 못하지만 세포사를 촉진한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5). 또한, Yeast-two hybrid법을 이용하여 Bak과 Bak-like의 이량체 형성을 확인하였다. 그 결과, Bak-like에 BH1, 2영역이 존재하지만, Bak과 이량체를 형성하지 않았다(data not shown).

결론

호모·프로테인 cDNA 뱅크에서 획득된 bak-like를 이용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Bak-like는 101개의 아미노산으로 구성되는 단백질을 코딩하였다. 또한, 구조적으로 Bak에서 보여지는 BH1, 2영역은 존재하지만, BH3영역은 존재하지 않았다.

2. 노던 블롯 분석의 결과, 검출되는 mRNA의 길이는 bak과 거의 동일한 약 2.4 kb였다.

3. PCR과 서던 블롯 분석의 결과, Bak-like는 Bak의 선택적 접목 변형체일 것으로 예상되었다.

4. Bak-like cDNA의 발현 벡터를 세포 내에 도입하면 세포사가 촉진되었다.

이상의 결과, Bak-like는 세포사의 촉진에 관여할 것으로 예상된다. Bak-like에는 이량체 형성에 필요한 것으로 추정되는 BH1, 2영역이 존재하지만, 이량체를 형성하지 않으며, 세포사를 촉진시키는데 필수적인 것으로 추정되는 BH3영역이 존재하지 않지만 세포사를 촉진시킨다는 사실로부터, Bak-like는 세포사에 관여하는 기존의 유전자와 다른 기작으로 세포사를 촉진할 것으로 추정할 수 있다. 그러므로, 이러한 기작을 밝혀서 정상세포에는 작용하지 않고 암세포에서만 작용하는 항암제의 개발을 위한 기초로 이용하고자 한다.

감사의 말씀

본 논문의 완성에 여러 가지 조언을 주신 중앙대학교 약학대학의 황 완균 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J.: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285 (1995).
- 2) Adams, J. M. and Cory, S.: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322 (1998).
- 3) Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., Strasser, A.: The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**, 287 (1999).
- 4) Hunter, J. J., Parslow, T. G.: A peptide sequence from Bax that converts Bcl-2 into an activator of apoptosis. *J Biol Chem.* **271**, 8521 (1996).
- 5) Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., Hardwick, J. M.: Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**, 554 (1996).
- 6) Farrow, S. N., White, J. H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K. T., Grinham, C. J., Martinou, J. C., Brown, R.: Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* **374**, 731 (1995).
- 7) Chittenden, T., Harrington, E. A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, R. J., Evan, G. I., Guild, B. C.: Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 733 (1995).
- 8) Kiefer, M. C., Brauer, M. J., Powers, V. C., Wu, J. J., Umansky, S. R., Tomei, L. D., Barr, P. J.: Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* **374**, 736 (1995).
- 9) Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A. B., Ebb, R. G., Gallo, G. J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R. J.: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO J.* **14**, 5589 (1995).
- 10) Kato, S., Sekine, S., Oh, S.-W., Kim, N.-S., Umezawa, Y., Abe, N., Yokoyama-Kobayashi, M., Aoki, T.: Construction of a human full-length cDNA bank. *Gene* **150**, 243 (1994).
- 11) Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A. J.: Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 12401 (1997).

- 1) Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J.: Bad, a heterodimeric