



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학석사 학위논문

ReCLIP 방법을 이용한
DNA 복제 인자와 결합하는
단백질 분리에 관한 연구

Study on the DNA replication factor binding
protein purification using ReCLIP method

2016년 02월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물교육전공
김 연 수

국 문 초 록

진핵 세포에서 일어나는 DNA 복제는 생명의 연속성을 유지하는데 필수적인 과정이다. 이 과정 속에서 CMG 복합체는 (Cdc45/GINS 복합체/MCM2-7 복합체) DNA 복제 개시뿐만 아니라 복제 신장 단계에서 두 가닥의 DNA를 단일 가닥으로 풀어주는 DNA Helicase로서 중요한 역할을 담당하는 것으로 잘 알려져 있다. S기 동안 CMG 복합체는 복제 기구(replisome)의 중요한 구성요소로서 복제 과정에서 역동적으로 움직이면서 수많은 단백질들과 함께 결합을 한다. 따라서 본 연구는 CMG 복합체를 구성하고 있는 단백질들을 연구 대상으로 선정하여 TAP (Tandem Affinity Purification) method와 ReCLIP (Reversible Cross-Link Immuno-Precipitation) method를 함께 사용하였고, 세포의 핵 속에서 일어나는 단백질들 간의 결합을 확인하고자 하였다. 그리고 이를 위해서 CMG 복합체를 구성하는 단백질인 Cdc45, Mcm2, Sld5와 TAP tag(N-terminal 또는 C-terminal)을 pIRESpuro3 Vector 내에 함께 삽입하였고, 제작한 재조합 DNA에 의해서 발현되는 단백질의 발현량을 일정하게 유지하기 위하여 stable cell line을 제작하여 실험에 사용하였다. 다음으로는 이 세포를 이용하여 인간 세포 내에서 TAP tag를 이용한 연속적인 2번의 Affinity Purification 실험 가능여부를 확인하였으며, 그 결과 성공적으로 TAP-Sld5가 정제되었을 뿐만 아니라 low salt buffer (50mM Potassium Acetate) 환경에서는 세포 내에서 Sld5와 함께 CMG 복합체를 형성하는 Cdc45, Mcm2를 함께 확인되었다. 하지만 시료의 순도를 높이기 위하여 high salt buffer (300mM Potassium Acetate)를 사용하는 경우 low salt buffer를 사용한 실험 결과에 비해 단백질 간의 결합이 줄어드는 것을 확인하였다. 이를 보완하기 위하여 두 단백질 간의 결합을 가역적으로 조절할 수 있는 Cross-linker (SDAD)를 사용하였다. Cross-linker를 처리한 후에는 high salt buffer (300mM

Potassium Acetate)로 bead를 세척하여도, TAP-Sld5와 Mcm2 사이의 결합이 강하게 유지되는 것이 확인되었다. 이를 통하여 TAP method와 ReCLIP method를 함께 이용하여 인간 세포의 핵 속에서 일어나는 단백질 간의 결합을 확인 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이 실험 결과는 아직까지 밝혀지지 않은 새로운 단백질 간의 결합을 연구하는데 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

주요어 : ReCLIP, TAP method, Protein interaction, SDAD

학 번 : 2013-21439

목 차

제 1 장 서론	1
제 1 절 연구배경	1
제 2 절 연구의 필요성 및 목적	6
제 2 장 연구방법	7
제 3 장 연구결과	13
제 4 장 논의	28
참고문헌	30
Abstract	33

그림 목 차

그림 1. Affinity purification 실험 과정 3단계	03
그림 2. Tandem Affinity Purification method의 개요	04
그림 3. TAP tag을 포함하는 CMG 복합체 단백질을 발현시키기 위한 재조합 플라스미드 클로닝	14
그림 4. DNA를 형질도입 시킨 후 인간 세포 내에서 단백질 발현을 확인	15
그림 5. 재조합 단백질 발현량을 일정한 수준으로 유지하기 위한 stable cell line 제작	17
그림 6. TAP tag를 이용하여 TAP-Sld5를 정제하기 위한 1차 affinity purification과 CMG 복합체 형성 확인	19
그림 7. TAP tag를 이용한 TAP-Sld5를 정제하기 위한 2차 affinity purification과 CMG 복합체 형성 확인 ..	21
그림 8. 세포 내에서 SDAD가 Cross-Linker로 작용하는 경우 CMG 복합체 형성에 영향을 미치지 않으며, High salt washing resistance를 갖는다.	24

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 배경

DNA 복제는 세포의 유지에 필수적인 과정이며, 진핵세포의 DNA 복제 기작은 진화적으로 잘 보존되어 있다. DNA 복제는 크게 개시, 신장, 종결의 세 과정으로 나뉘며, 각 과정은 다양한 단백질들의 순차적인 조합과 재배열에 의해 진행 된다 (1). DNA 복제의 첫 번째 과정은 origin licensing 이라고 불리며, G1 초기에 ORC (origin recognition complex), Cdc6, Cdt1, MCM (Mini chromosome maintenance)2-7 복합체가 복제 원점에 결합하여 pre-RC (pre-replicative complex)가 형성된다 (2,3). DNA 복제 개시는 CDK와 Cdc7가 활성화 되면서 이 두 Kinase에 의해 인산화 된 단백질들에 의해서 DNA 중합 효소, RPA 그리고 GINS 복합체와 같은 DNA 복제 인자의 염색질 결합이 유도된다 (4). 이 때 Cdc45 와 GINS 복합체가 MCM2-7 복합체에 결합하여 CMG 복합체 (Cdc45/Mcm2-7/GINS 복합체)가 만들어지면, MCM2-7이 갖고 있던 Helicase activity가 활성화 되고, CMG 복합체는 DNA Helicase로 작용한다. CMG 복합체에 의해 복제 원점 DNA가 풀리면 그 곳에 DNA 중합효소 등의 복제 인자들이 결합하여 복제기구 (replisome)가 형성되며 복제가 시작된다 (5).

이처럼 DNA 복제가 일어나는 과정 속에서는 굉장히 수많은 단백질 간의 결합이 이루어지고 있다. 그 중에서도 복제 개시 단계뿐만 아니라 복제 신장 단계에서 이중 가닥의 DNA를 푸는 역할을 담당하면서 DNA를 역동적으로 움직이면서 수많은 단백질과 결합하는 CMG 복합체의 경우 이미 밝혀진 단백질 간의 결합 이외에도 현재까지 검증된 실험 방법으로는 찾을 수 없는 더 많은 단백질들 간의 결합하고 있을 것이다.

생물학적으로 복합체를 이루고 있는 단백질들을 그들 사이에 기능적으로 동질성을 가지고 있는 것이 확인되었다 (6). 단백질 복합체를 정제하는 궁극적인 이유는 새로운 단백질을 밝혀내거나 아니면 단백질 복합체의 기능과 같은 특성들을 규명하기 위하여 사용되어 왔다. 단백질을 생화학적으로 정제하고 그 시료를 질량분석기로 분석하는 전략이 함께 사용되고 있는데, 최근에는 질량분석기를 통하여 단백질을 규명하는 단계보다도 단백질을 정제하는 과정에서 더욱 많은 어려움을 겪고 있다. 그 이유는 각각의 단백질은 독특한 특성을 가지고 있으며, 그 특성들이 단백질을 정제하는 과정에서 매우 큰 영향을 미치기 때문이다 (7).

Co-Immunoprecipitation이나 Pull down assay와 같이 단백질 복합체를 정제하는 다양한 방법들이 존재하고 있지만 그 중에서도 tandem affinity purification (TAP) method는 세포 내에서와 동일한 조건에서 신속하게 단백질을 정제할 수 있는 방법으로서 개발되었다. TAP method는 가장 먼저 효모에서 개발이 되었으며 지금 현재는 효모뿐만 아니라 고등 진핵 생물에서도 단백질 복합체를 정제하고 규명하는데 사용되고 있다 (8). 이 방법이 가지는 가장 큰 장점은 실험에서 정제하고자 하는 복합체의 구성요소나 그 기능에 대해서 전혀 알지 못하고 있는 경우에도 실험이 가능하다는 점이다. TAP method를 진행하기 위해서는 가장 먼저 목표로 단백질의 N-terminal 또는 C-terminal 부분에 TAP tag를 달아야만 한다 (9). 실험에 사용되는 TAP tag는 두 개의 IgG binding domain을 가지고 있는 Staphylococcus aureus protein A (ProtA)와 calmodulin binding peptide 그리고 두 부분을 나눌 수 있는 TEV cleavage site로 구성되어 있다.

TAP method는 두 번의 연속적인 affinity purification과정을 거쳐 단백질을 정제할 수 있는 방법이다. affinity purification은 기본적으로 3단계를 거친다. 첫 번째로 세포 추출액을 Bead와 결합 시키는 단계, 두 번째로 결합이 끝난 추출액을 제거하고 비특이적인 결합을 세척하는 단계, 마지막으로 단백질을 bead에서 떨어뜨려서 용출시키는 단계로 이루어져 있다 (그림1).

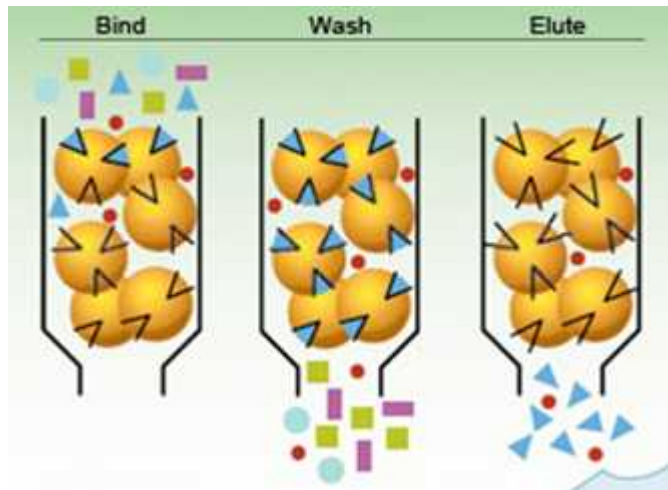


그림1. Affinity purification 실험 과정 3단계 Affinity purification은 기본적으로 3단계를 거친다. 첫 번째로 세포 추출액을 bead와 결합 시키는 단계, 두 번째로 결합이 끝난 추출액을 제거하고 비 특이적인 결합을 줄이기 위한 세척 단계, 마지막으로 단백질을 bead로부터 떨어뜨려서 용출시키는 단계로 이루어져 있다.

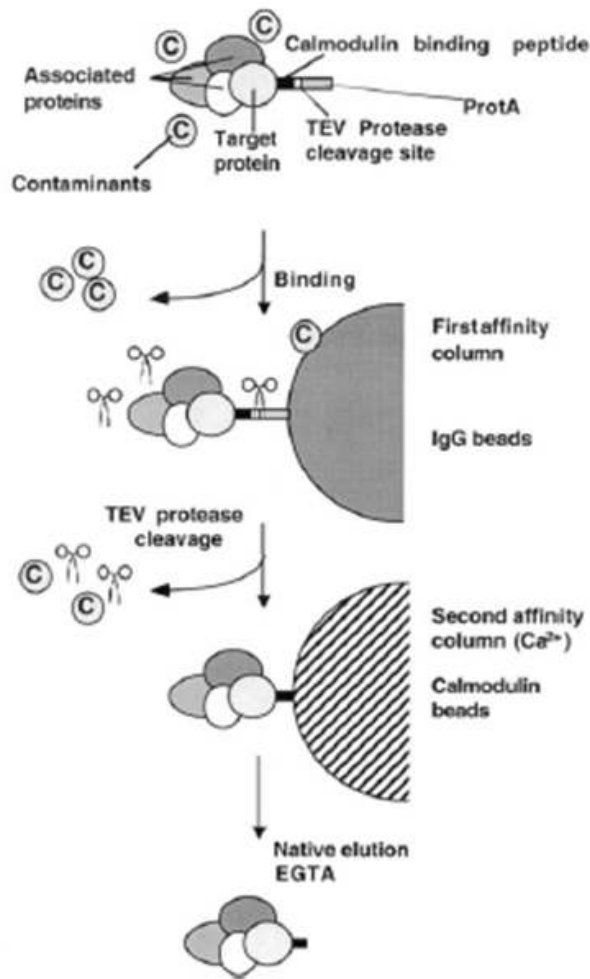


그림2. Tandem Affinity Purification method 개요 첫 번째 affinity purification 단계에서 IgG bead에 결합한 단백질들이 TEV(tobacco etch virus) protease에 의해서 bead로부터 용출된다. 용출 단계를 거친 단백질 시료를 Ca^{2+} 이온을 포함하는 환경에서 calmodulin bead와 결합시키고, 2가 이온 chelator로 작용하는 EDTA 또는 EGTA를 사용하여 bead로부터 단백질을 용출시킨다. 위의 두 단계로 구성된 단백질 정제 방법은 생화학적으로 시료를 분석하기에 충분한 순도를 제공하고 다양한 단백질 복합체를 분석하기에 적합한 방법이다.

이 모든 과정의 실험이 끝이 나면 용출된 단백질들을 포함하고 있는 최종 시료를 질량분석기를 사용하여 분석하는 과정을 거치게 된다 (10). 그러나 약하거나 일시적인 결합의 경우에는 두 단계의 단백질 정제 과정을 거치면서 단백질 복합체 간의 결합이 확인되지 않는 경우가 발생하는 것으로 확인되었다 (8).

이와 같이 세포 내에서 일어나는 모든 결합이 안정적으로 이루어지고 있는 것은 아니다. 결합 강도가 약하거나 일시적이기 때문에 단백질 복합체 간의 결합이 불안정한 단백질 간의 결합들도 존재한다. 이러한 불안정한 단백질 간의 결합을 연구하기 위한 새로운 실험 방법으로 ReCLIP (Reversible Crosslink Immuno Precipitation) method을 제안되었다 (10). 이 실험 방법은 기존의 TAP method에 의해서 확인 할 수 없었던 단백질들 간의 결합을 crosslinker를 사용하여 보완한 실험 방법이다. 이 때 사용되는 crosslinker는 세포 내로 투과가 가능해야하며 단백질 간의 결합을 가역적으로 조절 할 수 있어야한다는 특징을 가지고 있어야만 한다. TAP method에 비하여 단 한 번의 affinity purification 과정을 진행하기 때문에 시료의 손실이 더욱 줄어들 수 있다 (11). 하지만 과정이 간소화 되면서 비특이적인 단백질 간의 결합이 증가할 수 있다는 단점을 가진다. 이를 방지하기 위하여 보다 높은 농도의 염을 포함하는 용액을 사용하여 bead를 세척하는 과정을 거쳐야만 한다. 이 때 crosslinker와 단백질 간의 결합이 공유결합으로 유지되기 때문에 세포를 파쇄하는 과정이나 bead를 세척하는 과정에서 단백질 간의 결합이 유지될 뿐만 아니라 비특이적인 단백질 간의 결합을 더욱 확실하게 제거할 수 있게 된다.

제 2 절 연구의 필요성 및 목적

생물학적으로 복합체를 이루고 있는 단백질들을 확인해본 결과 그들 사이에는 기능적으로 동질성이 존재한다. 즉, 단백질 간의 결합을 연구하는 것은 세포 내에서 단백질의 기능을 이해하기 위한 필수적인 단계라고 할 수 있다 (6). 사람의 유전체에 존재하는 약 3만개의 유전자는 일련의 post-translational modification과 gene splicing 기작을 통하여 약 100만 개 이상의 단백질을 만들어내는 것으로 알려져 있다. 세포 내에 존재하는 수많은 단백질들 가운데서 특정 단백질들이 결합을 한다는 것을 우연이라고 생각하기에는 어려움이 따른다.

이미 그 기능이 잘 알려진 단백질과 결합하는 새로운 단백질 사이의 결합을 밝힐 수 있다면, 아직 잘 알려지지 않은 새로운 단백질의 기능을 유추할 수 있게 될 것이다. 본 연구에서는 가장 먼저 효모에서 개발되어 지금은 고등 진핵생물을 사용한 실험에서도 널리 사용되고 있는 단백질 정제 방법인 TAP method와 함께 불안정한 단백질 간의 결합을 연구할 수 있는 가능성을 보여준 ReCLIP Method를 함께 사용하였고, 실제로 인간 세포의 핵 속에서 일어나는 DNA 복제 과정에 참여하는 단백질 간의 결합을 확인하는 것이 가능한지를 확인해보고자 하였다.

단백질들이 세포 내에서 안정적인 결합을 하는 경우 multi subunit complex로서 정제될 수 있으며 이러한 결합을 연구하는 방법으로는 co-immunoprecipitation, pull-down 방법 등이 있다. 하지만 단백질 간의 결합이 약하거나 일시적인 단백질간의 결합의 경우 비특이적인 결합을 제거하기 위한 세척 단계에서 그 결합이 끊어져 결합 하지 않는 것처럼 보이는 경우가 발생하게 된다 (7). 본 연구에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 Amine-Reactive Diazirine Cross-linker의 한 종류인 NHS-SS-Diazirine (SDAD)을 사용하여 단백질 간의 결합을 안정화 시키는 단계를 포함하였다. 이러한 연구는 기존에 CMG 복합체와 결합하는 단백질이 아닌 새로운 단백질과 단백질들의 기능을 규명하는 데에도 상당히 의미 있는 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 장 연구 방법

TAP tag과 CMG 복합체를 구성하는 단백질들을 포함하는 재조합 플라스미드 cloning

CMG 복합체를 구성하는 단백질(Cdc45, Mcm2, Sld5)에 TAP tag를 달기 위해서 효모에서 사용되고 있는 TAP tag Vector pBS1761를 사용하였다. pBS1761로부터 TAP tag를 encoding하는 부분의 앞과 끝에 적절한 제한효소 서열을 추가한 insert를 PCR 방법으로 얻었다. 그리고 CMG 복합체를 구성하는 3개의 subunit에 해당하는 서열과 함께 N-terminal 또는 C-terminal TAP tag에 해당하는 서열을 Mammalian expression vector인 pIRESpuro3 vector의 MCS 부위에 삽입하였다.

plasmid DNA 형질도입

지름이 35mm인 culture dish인 6-well plate에 Hela 세포를 약 4.0×10^5 개가 되도록 seeding하고, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 세포가 dish 바닥의 절반 정도를 채우면 polyfect를 이용하여 형질도입을 시행한다. 100 μ l의 SFM(serum free medium)을 넣은 e-tube에 recombinant DNA를 희석시킨 다음 10 μ l의 polyfect reagent를 넣고 잘 섞어 상온에서 10분간 반응시킨다. 그동안 1X DMEM 1ml로 세포를 씻어준다. 10분이 경과하면 1X DMEM 600 μ l를 DNA와 polyfect가 담긴 e-tube에 넣고 잘 섞는다. 세포에 골고루 떨어뜨리고 dish를 흔들어 준 다음 배양기에 넣고 24시간 동안 배양한다. 24시간이 경과한 후에는 재조합 DNA에 의해서 만들어지는 단백질을 발현시키는지 확인 한다.

세포 배양

이번 연구에서 사용된 세포는 인간의 자궁경부암 세포 (Human cervical adenocarcinoma, Hela)이며, 이 세포를 10% FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO)와 항생제를 첨가한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, WelGENE)에서 배양하였다. 세포는 37°C의 온도와 5% 이산화탄소 농도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

Stable Cell Line 제작

지름이 100mm인 culture dish에 25% 정도가 되도록 Hela 세포를 seeding 하고 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 세포가 dish 바닥의 절반 정도를 채우면 polyfect로 형질도입을 시행한다. e-tube에 300ml의 SFM (serum free medium)를 넣고, 약 5 μ g의 재조합 DNA와 40 μ l의 polyfect reagent를 넣고 잘 섞어 준 다음 상온에서 10분간 반응시킨다. 그동안 1X DMEM 7ml로 세포를 씻어 준다. 10분이 경과하면 1X DMEM 1ml를 DNA와 polyfect를 섞어 세포에 골고루 떨어뜨린 후 dish 를 흔들어 준 다음 배양기에 넣고 24시간 동안 배양한다. 24시간이 경과한 후에는 1X DMEM에 1 μ g/ml의 puromycin을 넣어준다. 2~3일 간격으로 puromycin이 포함되어 있는 배지를 바꿔주면서 살아남은 세포가 colony 상태로 자란 것을 확인한다. 각각의 colony를 96well dish로 옮겨 키우고 세포의 양이 충분하게 늘어나면 재조합 DNA에 의해서 발현되는 단백질을 확인한다.

Cross-Linker (SDAD) 처리하기

최종적으로 사용하고자 하는 농도보다 10배 높은 농도로 cross-linker 를 DMSO에 녹인다. 세포를 덮고 있는 DMEM을 제거한 후 DPBS를 이용하여 2회 정도 세척한다. 세포의 표면을 충분히 덮을 정도의 DPBS에 미리 준비한 cross linker를 잘 섞어 주고 상온에서 10분 간 반응시킨다. 1M Tris-Cl(pH8.0) 용액을 DPBS 용액의 1/10 정도를 첨가하여 최종 농도가 50~100mM가 되도록 Tris-Cl(pH8.0)를 dish에 넣어 준 후 상온에서 5분간 반응 시킨다. 시간이 경과 한 후 반응하지 않은 cross-linker를 제거하기 위해서 DPBS를 이용하여 2~3회 정도 세포를 씻어준다. 365nm 파장의 UV 전구를 이용하여 15분간 UV를 쬐어준 후 세포를 수거한다.

세포추출액 및 염색질 분획 제조

세포를 수거하여 4℃, 3000rpm, 3분간 원심분리한다. pellet을 PBS로 씻어 주고 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor(10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.5% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM EDTA(pH 8.0))를 이용하여 resuspension 시킨다. 얼음 위에서 5분간 반응 시킨 후에 4℃, 13000rpm, 10분간 원심분리하여 세포질 부분(S1)과 핵 부분(P1)으로 분리한다. 세포질 부분(S1) 부분을 분리 한 후 0.5% NP-40 lysis buffer를 처음에 사용한 절반 정도의 양으로 핵 부분(P1)을 resuspension 시킨 후 초음파로 10초간 연속 2회 분해하여 균질하게 파쇄한다. 이 세포 추출액에 final 250unit/ml의 bezonase를 첨가하여 4℃ shaker에서 약 16시간 정도 반응시킨다. 시간이 지나면 4℃, 13000rpm, 30분간 원심분리 하여 S2와 P2로 분리한다. P2는 0.5% NP-40 lysis buffer를 처음 사용한 양의 1/4 정도로 균질하게 resuspension 시킨다. 각 단계의 모든 시료 (S1, P1, S2, P2)들은 western blotting을 하기 위해 bradford assay로 단백질의 총량을 monitoring 하였고 일부는 5X sample buffer를 넣고 끓는 물에 중탕하여 sampling 하였다.

1차 Affinity Purification

IgG bead binding 보존액 (20% EtOH)에 담긴 IgG Beads를 증류수로 1회 그리고 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 0.05% NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.05% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM EDTA(pH 8.0))로 3~4회 정도 씻어준다. 그리고 bead와 위에서 분리한 S2를 7시간 동안 4°C shaker에서 결합시킨다. 시간이 경과한 후에는 결합하지 않은 시료를 bead에서 분리하고 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 0.1% NP-40 lysis buffer (10mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM EDTA(pH 8.0))를 이용하여 비특이적인 결합을 제거하기 위한 bead 세척 과정을 거쳤다. 세척이 끝난 bead는 남아있는 용액을 모두 제거한 후 western blotting을 하기 위해 2X sample buffer를 넣고 끓는 물에 증탕하여 sampling 하였다.

TEV Elution S2와 IgG bead를 결합시키고 세척 과정이 끝나면 남아있는 용액을 모두 제거한다. protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 TEV buffer (50mM Tris-Cl(pH7.5), 0.5mM EDTA, 1mM DTT)와 TEV protease를 120units/ml이 되도록 넣은 후 약 16시간 동안 4°C shaker에서 결합시킨다. 시간이 경과한 후 bead에 남아있는 용액을 모두 제거하고 western blotting을 하기 위해 2X sample buffer를 넣어 끓는 물에 증탕하여 sampling 하였다.

2차 Affinity Purification

Calmodulin Beads binding 보존액 (20% EtOH)에 담긴 calmodulin bead를 증류수로 1회 그리고 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 calmodulin binding buffer (50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM Magnesium acetate, 1mM Imidazole, 2mM calcium acetate, 10mM β -mercaptoetanol, 10% glycerol)를 이용하여 3~4회 bead를 씻어준다. TEV elution sample은 Calmodulin binding buffer를 이용하여 volume을 10배가 되도록 희석한 후 calmodulin bead와 4°C shaker에서 3시간 동안 결합시킨다.

EGTA Elution 3시간이 경과한 후에는 결합하지 않은 시료 (FT)를 bead에서 분리한다. beads에서 남아있는 용액을 모두 제거한 후 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 calmodulin elution buffer(50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM Magnesium acetate, 1mM Imidazole, 20mM EGTA, 10mM β -mercaptoetanol, 10% glycerol)를 100 μ l씩 넣고 1분 간격으로 tapping하면서 얼음 위에서 10분간 반응시킨다. 10분이 경과하면 2000rpm, 4°C, 2min으로 원심분리를 시켜 bead에 남아있는 용액을 모두 제거하는 위의 과정을 3회 정도 반복한다. 3회가 끝나고 나면 bead에 남아있는 용액을 모두 제거한 후 western blotting을 하기 위해 2X sample buffer를 넣고 끓는 물에 증탕하여 sampling 하였다.

DTT Elution

Cross-linker를 처리한 시료의 S2를 IgG bead와 4°C shaker에서 7시간 동안 결합시킨다. 시간이 경과한 후에 결합하지 않은 시료 (FT)를 bead에서 분리하고 protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 0.1% NP-40 lysis buffer (10mM Tris-Cl(pH7.5), 0.1% NP-40, 50mM potassium acetate, 1mM EDTA(pH 8.0))를 이용하여 비특이적인 결합을 제거하기 위해 3~4회 정도 bead를 세척하는 과정을 거친다. 마지막 세척 과정이 끝나면 남아있는 용액을 모두 제거하고, protease inhibitor (5mg/ml leupeptin, 1mM benzamidine, 5mg/ml pepstatin, 1mM PMSF)와 phosphatase inhibitor (10mM sodium fluoride, 1mM sodium vanadate)가 첨가된 DTT elution buffer (20mM Tris-Cl(pH7.5), 50mM Potassium acetate, 1mM EDTA, 50mM DTT, 5% glycerol)를 100 μ l 넣은 후 약 16시간 동안 4°C shaker에서 결합시킨다. 시간이 경과한 후 bead에 남아있는 용액을 모두 제거하고 western blotting을 하기 위해 2X sample buffer를 넣고 끓는 물에 증탕하여 sampling 하였다.

Western Blot 및 항체(Antibody) 처리

제조한 sample을 SDS/PAGE gel에서 전기영동 한 후 nitrocellulose (NC) membrane에 200mA에서 보고자하는 단백질의 크기에 따라 1~2시간 transfer하였다. NC membrane을 5% non-fat milk (in TBS) 용액으로 30분 동안 blocking한다. 3% BSA (in TBS) 용액에 1차 항체를 적절 한 희석 비율로 희석하여 이를 상온에서 1시간 처리하거나 4°C에서 하루 동안 처리하였다. TBS-T(0.05% tween 20)로 10분간 4번씩 씻어 주었다. 5% non-fat milk (in TBS)에 2차 항체를 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하였다. TBS-T(0.05% tween 20)로 10분간 4번씩 씻어 주었다. 세척 과정이 끝난 후 NC membrane에 ECL 용액 I 과 II를 1:1 동일한 비율로 처리하여 필름에 감광시키고 현상하여 확인하였다.

제 3 장 연 구 결 과

제 1 절 TAP tag를 포함하는 CMG 복합체 구성 단백질 발현하는 세포주 제작

효모에서 사용되고 있는 TAP tag Vector pBS1761에서 TAP tag를 encoding하는 부분의 앞과 끝에 적절한 제한효소 서열을 추가한 insert를 PCR 방법으로 얻었다. 그리고 N-terminal 또는 C-terminal TAP tag에 해당하는 서열을 CMG 복합체를 구성하는 단백질에 해당하는 서열과 함께 mammalian expression vector인 pIRESpuro3 vector의 MCS (Multi Cloning Site) 부위에 삽입하였다.

각각의 construct들을 제작할 때에 CMG 복합체를 구성하는 단백질들의 N-terminal 부분에 tag를 추가하는 경우에는 TAP tag 서열 뒤에 있는 종결 코돈을 제거한 후 CMG 복합체를 구성하는 단백질들과 연결하였다. 그리고 C-terminal의 경우 CMG 복합체를 구성하는 단백질들의 서열 뒤에 있는 stop codon을 제거한 후 pIRESpuro3 벡터 내에 삽입하였다. 이 플라스미드를 가지는 세포는 ampicilin과 puromycin이라는 두 종류의 항생제에 대한 저항성을 가진다 (그림 3. A).

일반적으로 vector 내부에 있는 프로모터에 의하여 단백질의 발현이 조절 되도록 하기 위해 C-term TAP tag를 사용하는 것을 선호한다. 하지만 진핵세포인 효모에서 실험을 진행하는 경우 단백질의 C-terminal 부분에 TAP tag를 다는 경우 약 5% 정도에서 단백질의 기능에 이상이 생기는 문제가 발생하였다. 이번 실험에서는 vector의 endogenous 프로모터로 발현이 조절될 수 있는 N-term TAP tag를 제작하였다.

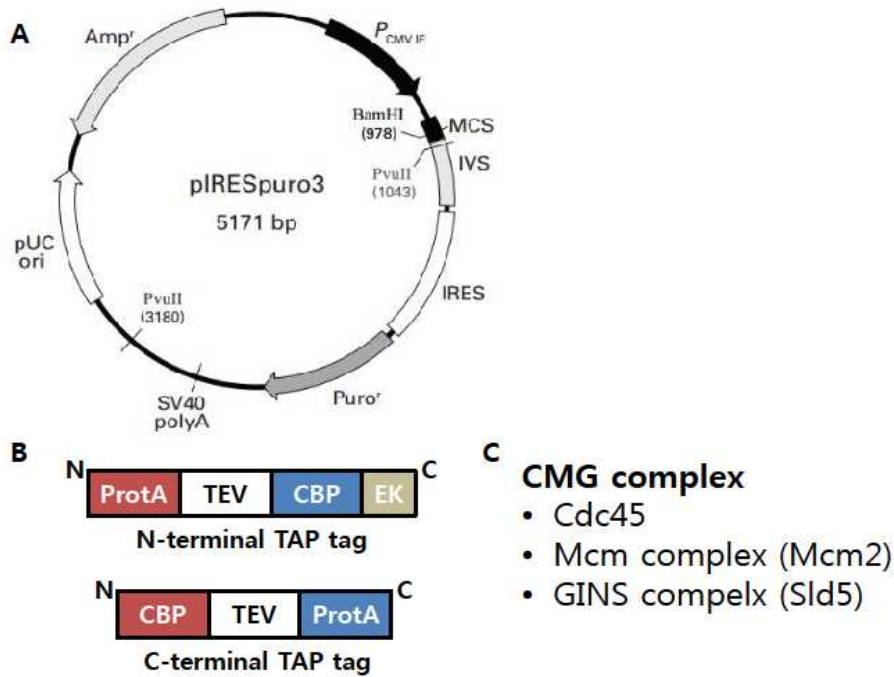


그림 3. TAP tag을 포함하는 CMG 복합체 단백질을 발현시키기 위한 재조합 플라스미드 클로닝 (A) 실험에서 사용한 vector는 pIRESpuro3이다. 이 vector는 포유류 세포에서 단백질 발현이 가능하고 세포가 puromycin에 대한 저항성을 가질 수 있도록 한다. (B) N-terminal, C-terminal TAP tag의 모식도이며 두 tag은 목표로 하는 단백질에서 CBP 부분이 가깝게 위치하고 ProtA 부분이 멀리 위치하도록 제작되었다. (C) 실험에 사용된 단백질들은 CMG 복합체를 구성하는 Cdc45, MCM 2-7 복합체(Mcm2), GINS 복합체(Sld5) 중에서 선정하였다.

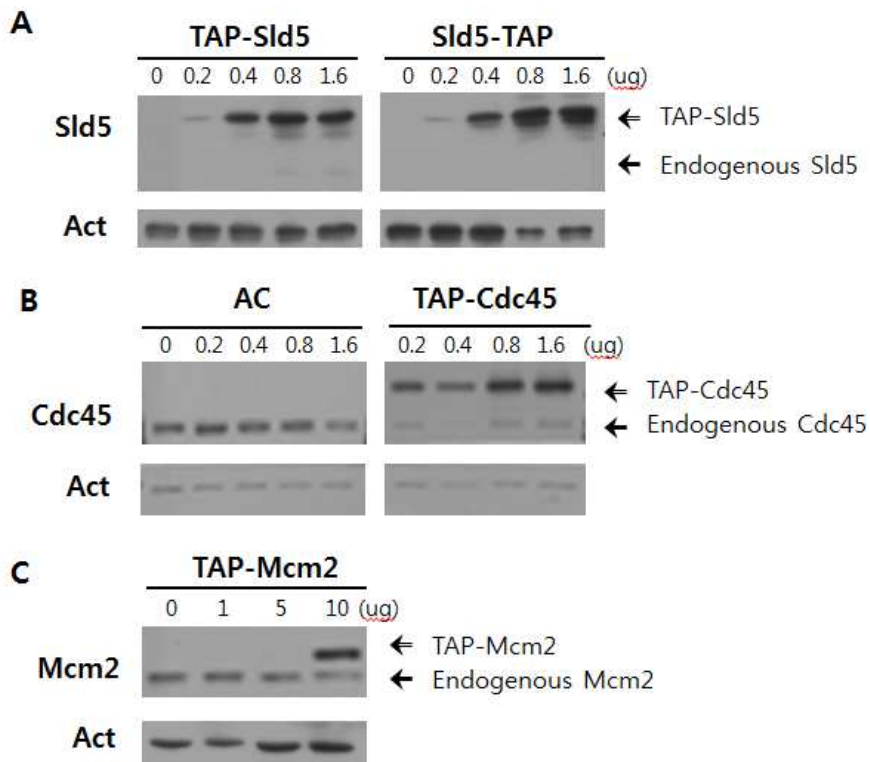


그림 4. DNA를 형질도입 시킨 후 인간 세포 내에서 재조합 단백질의 발현을 확인. 재조합 DNA 농도를 달리하여 HeLa 세포에 형질도입 시키고 24시간 동안 배양한 후 단백질 발현 정도를 확인하였다. N-term TAP의 경우 단백질의 이름 앞 쪽에 AC를 넣었고, C-term TAP의 경우에는 단백질 이름의 뒤쪽에 CA를 넣어서 표기 하였다. AC는 pIRESpuro3 Vector에 TAP tag만을 넣은 plasmid이다. Actin은 loading control으로 함께 확인하였다.

다음으로는 (그림 3)에서 만든 재조합 DNA에 의해서 발현되는 단백질들이 세포 내에서 정상적으로 발현이 되는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이 때 특정 단백질이 세포 내에서 정상 범위 이상으로 과발현이 되는 경우 비특이적인 단백질 간의 결합이 증가할 수 있다. 때문에 일반적으로 세포 내에서 발현되는 단백질의 양과 비슷한 수준의 발현량을 찾기 위하여 세포 내에 도입하는 재조합 DNA의 농도를 다양한 범위로 설정하여 실험을 진행하였다 (그림 4).

pIRESpuro3 벡터에 TAP tag만 포함하는 pIRESpuro3 Vector만을 형질 도입한 실험 (그림 4. B 왼쪽)은 TAP tag를 포함하는 재조합 DNA가 세포 내에 도입될 경우 세포 내의 단백질 발현에 다른 영향을 미치지 않는지를 확인하기 위한 대조군 실험으로서 진행하였다. TAP tag를 포함하는 경우 기존의 세포 내에서 발현되는 단백질보다 약 20kDa 정도 크기가 증가한다. (그림 2)에서 보이는 것과 같이 세포 내에서 발현되는 기존의 단백질 보다 위쪽에 위치하는 밴드가 DNA의 농도에 따라 점점 진해지는 것을 확인할 수 있다. 이로써 TAP tag를 포함하는 재조합 단백질들이 세포 내에서 정상적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

TAP tag이 달린 재조합 DNA를 세포 내에서 추가적으로 발현시키는 과정을 거치게 되면 실험을 진행할 때마다 세포 내에서 발현되는 단백질의 양을 일정하게 유지하기 힘들다. 발현되는 단백질의 양이 변화하게 되면 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 일정한 단백질 발현량을 유지하기 위하여 stable cell line을 제작하여 실험에 사용하였다. 이 때 stable cell line이 뜻하는 의미는 목적으로 하는 특정 유전자가 genome에 통합 되어 세포가 분열 또는 증식하여도 그 유전자가 소실되지 않고 계속 전달되어 발현되는 세포주를 뜻한다.

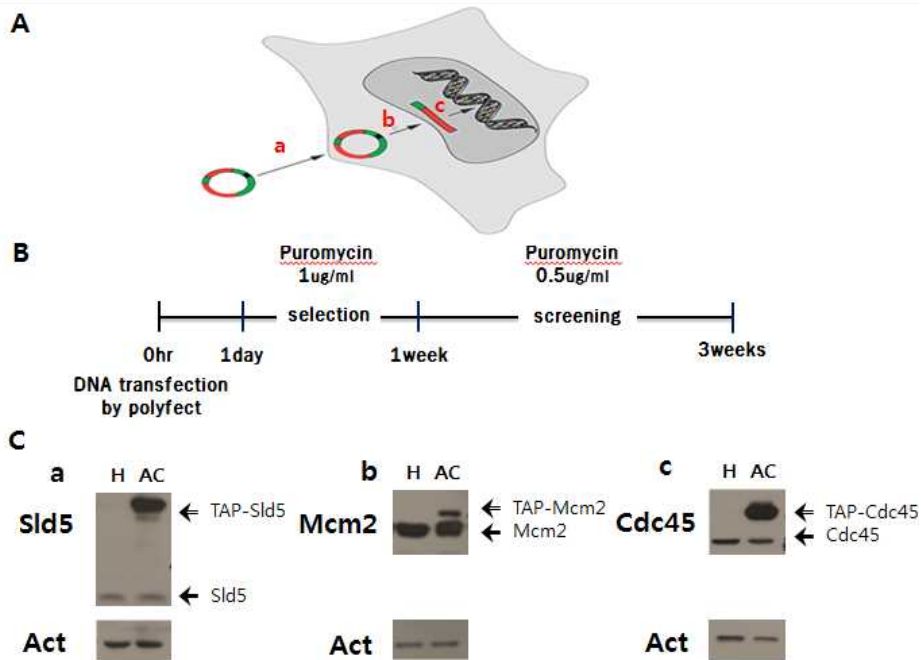


그림5. 재조합 단백질 발현량을 일정한 수준으로 유지하기 위한 stable cell line 제작 (A) 재조합 DNA가 [a] 세포 안으로 형질도입이 되면, [b] 세포의 핵 속으로 들어가서, [c] 최종적으로는 유전체 DNA 속으로 통합된다. (B) stable cell line 제작 과정은 DNA를 세포 내로 도입시키는 Transfection, 플라스미드가 성공적으로 들어간 세포만을 선별하는 Selection, 선별된 세포들이 정상적으로 단백질을 발현하는지를 확인하는 Screening 3단계로 진행된다. (C) 선별 과정이 끝난 세포 내에서 재조합 단백질이 정상적으로 발현 되고 있는가는 확인한 실험결과이다. H는 Hela 세포이며, TAP-Sld5는 N-terminal TAP tag를 포함하는 단백질을 발현하는 stable cell line을 나타낸다.

형질 도입시킨 유전자가 오랜 기간 지속적으로 발현되기 위해서는 세포의 유전체로 형질 도입 시킨 플라스미드가 직접적으로 통합되는 과정을 필요로 한다. 결과적으로는 인간 세포 내로 항생제 저항성을 가지고 있는 재조합 플라스미드가 들어가게 되면, 배지에 항생제를 처리하였을 때 플라스미드를 가지고 있지 못한 세포들은 죽어나가고 플라스미드를 가지고 있는 일부 세포만이 살아남게 되는 것이다. puromycine이 포함된 배지에서 살아남은 약 20개의 균집을 puromycine이 0.5ug/ml의 농도 포함되어있는 배지에서 배양한 후 TAP-Sld5 발현량이 가장 적당한 균집을 골라 실험에 사용하였다. 항생제를 이용한 선별 과정을 거친 세포들은 (그림 4)의 실험 결과와 동일하게 TAP tag가 달려 있어 그 크기가 약 20kDa 정도 증가한 band가 추가로 형성된 것을 확인되었다. 이 결과를 통해서 재조합 DNA에 의해 발현되는 단백질이 제작한 stable cell line 내에서 정상적으로 발현 되고 있는 것을 확인할 수 있다 (그림 5).

제 2 절 TAP tag를 이용하여 인간 세포 내에서 TAP-Sld5 정제하기

인간 세포 내에서 발현되고 있는 TAP tag를 포함하는 CMG 복합체 단백질 (TAP-Sld5, Cdc45, Mcm2)들을 TAP tag를 이용하여 affinity purification 방법으로 정제할 수 있는지 확인하는 과정을 진행하였다.

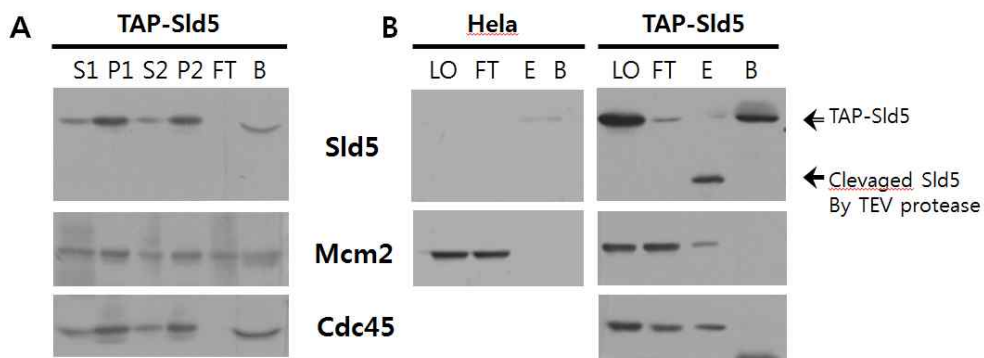


그림6. TAP tag를 이용한 TAP-Sld5의 1차 affinity purification 과 CMG 복합체 형성 확인 (A) 세포 추출액 중에서 세포질 부분 (S1)과 핵 부분 (P1)을 분리하고 (P1)에 benzonase 처리를 하였다. 이 후 4°C에서 30분간 13000rpm으로 돌려서 상층액 (S2)만을 IgG bead와 결합시켰다. bead와 결합하지 못한 남은 상층액 (FT)을 수거한 후 low salt buffer (50mM potassium acetate)를 사용하여 bead를 세척한 후 2X sample buffer를 첨가하여 western blot하였다. (B) 세척 단계가 끝난 bead에 TEV buffer와 TEV protease를 첨가한다. 반응이 끝나면 상층액 (E)을 수거하고 bead에 2X sample buffer를 첨가하여 western blot한 결과이다.

(그림 6. A) 6번째 lane에서 TAP-Sld5 (약 50kDa) 밴드가 확인되는 것으로 보아 세포 내에서 발현되고 있는 TAP tag의 일부인 ProtA 부분과 IgG bead가 정상적으로 결합하고 있는 것이 확인되었다. 이후 IgG bead에 결합되어 있는 TAP-Sld5의 TEV cleavage site 부분이 TEV protease에 의해서 끊어지면서 ProtA 부분이 잘려 나가게 된다. 다른 lane에 보이는 TAP-Sld5 (약 50kDa) band 비해 크기가 약 13kDa가량이 줄어들어 밴드가 아래쪽에 생긴 것을 확인할 수 있다 (그림 4. B lane7). 이 실험 결과를 통해 TAP tag를 이용하여 TAP-Sld5의 첫 번째 affinity purification이 가능한 것이 확인되었다. 또한 세포 내에서 GINS (Sld5)와 함께 CMG 복합체를 형성하는 것으로 잘 알려져 있는 CMG 복합체를 구성하는 다른 단백질들을 함께 western blotting한 결과, TAP-Sld5가 Cdc45, Mcm2와 함께 세포 내에서 정상적으로 CMG 복합체를 형성하고 있는 것이 동시에 확인되었다 (그림 6. B) 따라서 TAP tag를 포함하는 Sld5가 세포 내에서 정상적으로 기능을 수행하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

이 실험은 TAP-Sld5, TAP-Cdc45, TAP-MCM2를 발현하는 세포주를 모두 사용하여 실험하였으나 (그림 6)의 실험 결과와는 다르게 TAP-Cdc45, TAP-MCM2를 발현하는 세포주에서는 CMG 복합체를 구성하는 단백질 간의 결합이 확인되지 않아 이후 실험은 TAP-Sld5를 발현하는 세포주만을 사용하여 시행하였다.

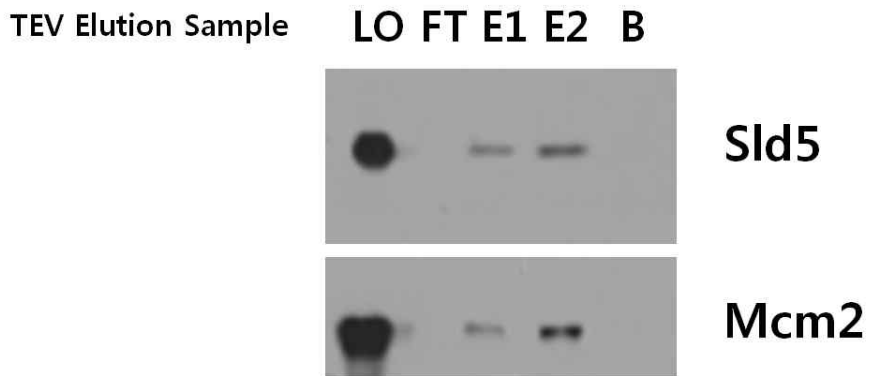


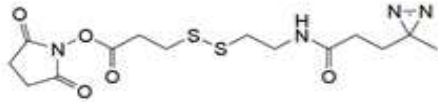
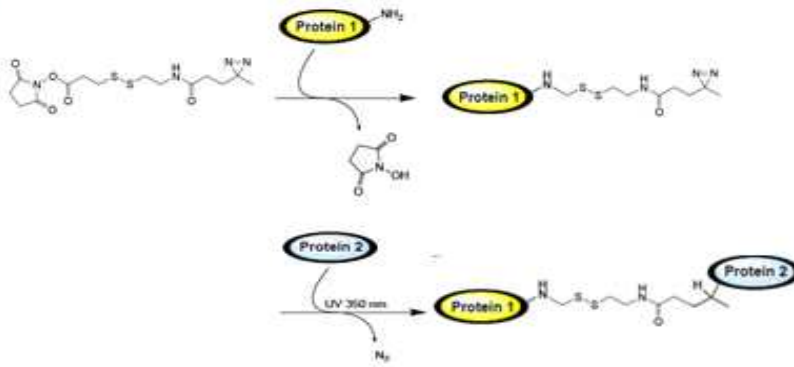
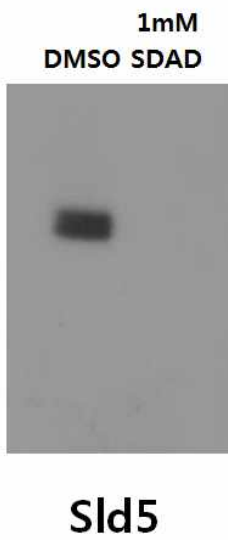
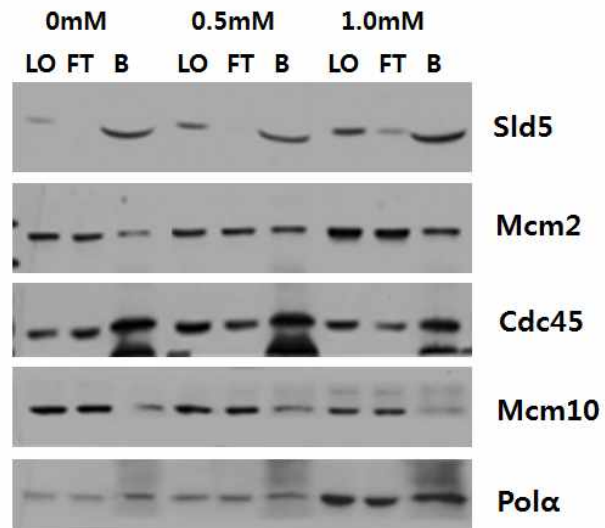
그림7. TAP tag를 이용한 TAP-Sld5의 2차 affinity purification과 CMG 복합체 형성 확인 그림6의 1차 affinity purification 실험 결과로 얻은 TEV elution sample을 calmodulin bead와 결합시킨다. 결합하지 못한 남은 상층액 (FT)들을 수거한 후 EGTA를 포함하는 buffer를 사용하여 용출 과정을 진행 한 후에 남은 bead에 2X sample buffer를 첨가하여 western blot을 한 결과이다.

2차 affinity purification을 진행하기 위해 TEV elution sample 속에 포함되어 있는 EDTA 농도를 희석시켰다. 그 이유는 EDTA 또는 EGTA의 경우 2가 이온 킬레이터로 작용하여 calmodulin bead와 CBP(calmodulin binding protein) 사이의 결합을 방해할 수 있기 때문이다. EGTA로 용출 시킨 시료 (그림 7 lane3, 4)에서 Sld5와 Mcm2 band가 함께 확인되는 것으로 보아 인간 세포 내에서 2차 affinity purification이 가능하고, CMG 복합체 형성이 유지되는 것 또한 확인되었다. (그림 6)과 (그림 7)의 실험 결과를 통해서 인간 세포 내에서 TAP tag를 이용하여 TAP-Sld5를 정제할 수 있는 것이 확인되었다.

위에서 진행된 두 단계의 affinity purification 방법의 순서를 바꾸는 것이 가능한 것으로 알려져 있다. 하지만 두 단계의 순서가 바뀌는 경우에는 최종적으로 얻은 시료가 TEV protease를 포함한다. 최종 시료를 질량분석기를 통하여 분석하기에 적당하지 않기 때문에 IgG bead와 결합시킨 후에 calmodulin bead와 결합시키는 순서로 실험을 진행하였다.

제 3 절 인간 세포의 핵 내에서 Amine-Reactive Diazirine Cross-linker의 사용 가능 여부 확인

세포 내에서 단백질 간의 결합이 일시적으로 일어나는 경우 그 결합은 매우 불안정하다. 이를 보완하기 위하여 이번 실험에는 양쪽 말단이 기능적으로 다르게 각각의 단백질과 결합하는 cross-linker를 사용하였다. 한 쪽은 amine-reactive N-hydroxysuccinimide (NHS) ester를 포함하며 다른 한 쪽에는 광활성화가 일어날 수 있는 diazirine 고리를 포함하고 있어 양 말단은 각각 다른 방법으로 단백질과 결합할 수 있다. 그리고 crosslinker의 중앙 부분에는 이황화결합이 존재한다. 이황화결합은 DTT 또는 β -mercaptoethanol과 같은 환원제에 의해 끊어지면서 단백질 간의 결합을 분리시킬 수 있게 된다 (그림 8. A). 이번 실험에서 사용되는 cross-linker의 경우 특이사항으로는 물에는 녹지 않기 때문에 사용하기 전에 DMSO와 같은 유기 용매에 녹여서 사용해야 하며 극성을 띠고 있지 않기 때문에 세포막을 통과할 수 있다.

A**a****b****B****C**

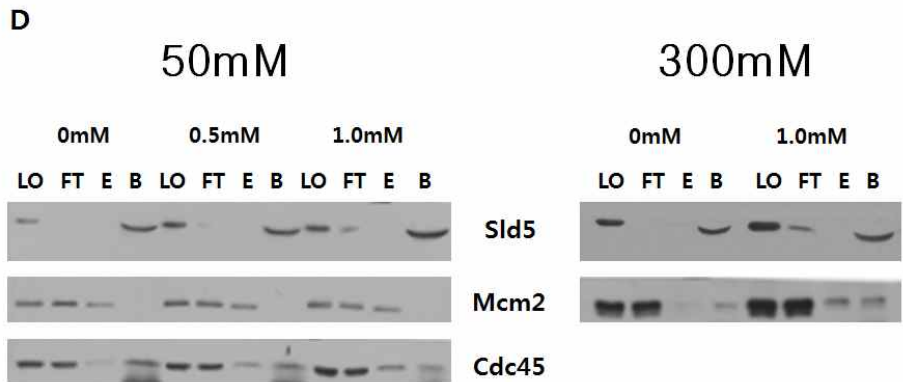


그림8. 세포 내에서의 SDAD가 cross-linker로 작용하는 경우 CMG 복합체 형성에 영향을 미치지 않고 High salt washing resistance를 가진다. (A) [a] SDAD의 구조식, [b] SDAD의 양 말단이 단백질과 결합하는 과정 (B) Cross-linker (SDAD) 처리 후 세포 추출액을 denature 과정을 거치지 않은 채로 western blot 실험 결과. M은 Maker, DMSO는 cross-linker 처리를 하지 않은 세포 그리고 SDAD는 1mM 농도로 cross-linker를 처리한 세포를 의미한다 (C) 상온에서 0/0.5/1.0mM 3단계의 농도로 cross-linker를 처리하고 세포 추출액을 IgG bead와 결합시킨 후 western blot 결과 (D) IgG bead와 결합이 끝난 뒤 저농도 (왼)와 고농도 (오) salt가 포함된 washing buffer로 bead를 세척한 후 환원제인 DTT가 포함된 buffer를 사용하여 단백질을 용출시킨 실험 결과이다.

일반적으로 western blot 실험 결과를 확인하기 위한 SDS-PAGE gel 을 내릴 때, 시료를 sampling하는 과정에서 환원제 (DTT 또는 β -mercaptoethanol)가 첨가된 상태의 sample buffer를 사용한다. 단백질들은 이러한 환원제들에 의해서 이황화 결합을 끊어지고 95°C로 끓여서 수소결합을 끊어지면서 denature 과정을 거친다. 하지만 (그림 8. B)에서는 환원제를 포함하지 않는 sample buffer를 사용하여 denature 과정을 거치지 않았다.

Cross-linker를 처리하지 않은 TAP-Sld5 stable cell line과 1mM의 농도로 처리한 TAP-Sld5 stable cell line으로 Sld5를 western blotting을 진행한 결과 cross-linker를 처리하지 않은 세포에서는 Sld5 band가 원래 크기에서 확인되었다. 하지만 1mM SDAD를 처리한 경우에는 Sld5 band를 확인할 수 없었다. 그 이유는 Sld5가 SDAD에 의하여 다른 단백질과 복합체를 이루고 있는 상태라서 그 크기가 커진 상태이기 때문에 원래 자신의 크기에서 band가 확인되지 않은 것으로 볼 수 있다 (그림 8. B).

cross-linker를 처리하였을 때, 복제기구를 형성하는 다른 단백질들을 함께 western blotting하였다. 이 때 Sld5와 함께 복제기구를 형성하는 Cdc45, Mcm2, Pola와 Mcm10 band에 변화가 없는 것으로 보아 cross-linker (SDAD)가 세포 내에서 단백질 간의 결합을 방해하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. (그림 8. C).

이번 실험에 사용한 cross-linker (SDAD)는 DDT와 같은 환원제를 사용한 단백질 용출 과정에서 (그림 8. D)의 결과와 같이 TAP-Sld5는 TAP tag에 포함되어 있는 ProtA 부분과 IgG bead에 결합된 상태로 존재하며, 이황화결합이 끊어지면서 용출된 Elution sample에는 세포 내에서 Sld5와 CMG 복합체를 구성하는 Cdc45와 MCM2와 같은 다른 단백질들이 떨어져 나온 것을 확인할 수 있다. 이 결과를 통해서 세포 내에서 cross-linker가 가역적으로 단백질 간의 결합을 조절할 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

Cross-linker 처리를 하지 않은 경우에는 100mM Potassium Acetate를 포함하는 용액으로 bead를 세척 하는 경우 CMG 복합체를 구성하는 단백질 간의 결합이 확인되지 않는 것에 비해 보다 이보다 농도가 높은 300mM Potassium Acetate로 bead를 세척한 후에도 CMG 복합체를 구성하는 다른 단백질 간의 결합이 정상적으로 유지되고 있는 것을 확인할 수 있다 (그림 8. D). 위의 두 결과를 통하여 cross-linker (SDAD)가 세포 내에서 일어나는 단백질 간의 결합을 단단하게 고정시키는 역할을 정상적으로 수행할 수 있는 것을 확인하였다.

제 4 장 논 의

인간 세포 내에서 TAP tag를 이용하여 단백질 정제가 가능한지 확인하기 위해서 가장 먼저 목표로 하는 단백질에 TAP tag를 달고 (그림 3) 세포 내에서 정상적으로 발현하는 것을 확인하였다 (그림 4). 다음으로 재조합 DNA가 세포가 증식을 거듭하는 과정에서 일정한 발현량을 유지할 수 있도록 stable cell line을 제작하여 실험에 사용하였다 (그림 5). 앞에서 제작한 TAP tag를 포함하는 Sld5를 발현하는 stable cell line을 이용하여 인간 세포 내에서 TAP tag를 이용한 단백질 정제가 가능한지를 확인하였고, 이 실험에서 low salt buffer (50mM Potassium Acetate) 환경에서 TAP-Sld5가 세포 내에서 Cdc45 또는 MCM2와 함께 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 6, 7). 위의 실험 결과를 토대로 인간 세포 내에서 TAP method를 이용하여 시료의 손실을 최소화하고 신속하게 단백질을 정제할 수 있다는 사실이 확인되었다.

하지만 low salt buffer (50mM Potassium Acetate) 환경에서는 CMG 복합체를 구성하는 단백질 간의 결합이 확인되었으나 100mM Potassium Acetate로 염의 농도가 높아질 경우 그 결합이 줄어드는 현상이 관찰되었다. CMG 복합체가 DNA 가닥 위를 매우 역동적으로 움직이는 만큼 안정적인 단백질 간의 결합뿐만 아니라 일시적으로 일어나는 단백질 간의 결합이 존재할 것으로 추측해볼 수 있다. 따라서 불안정한 단백질 간의 결합을 고정시킬 수 있고 그 결합을 가역적으로 조절 할 수 있는 cross-linker를 사용하여 실험을 진행하였다. 이 때 극성을 띄지 않는 cross-linker (SDAD)가 세포 내로 들어가 CMG 복합체와 복제기구를 구성하는 다른 단백질 간의 결합을 방해하지 않는 것이 확인되었고, high salt buffer (300mM Potassium Acetate)로 세척 단계를 거치는 경우에도 Sld5와 Mcm2 간의 결합이 유지되는 것이 확인되었다 (그림 8). 이 결과를 토대로 cross-linker (SDAD)가 인간 세포의 핵 내에서 정상적인 기능을 수행하며, 핵 속에서 일어나는 불안정한 단백질 간의 결합을 유지하는데 도움을 줄 수 있다는 것을 알 수 있었다.

따라서 본 연구를 통해서 인간 세포 내에서 TAP method와 ReCLIP method를 함께 사용하여 세포의 핵 내에서 DNA 복제 기능을 수행하는 단백질 간의 결합을 확인할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

단백질을 생화학적으로 정제하는 실험이 진행된 후 생성되는 최종 시료를 만드는 것에서 끝나는 것이 아니다. 이 시료들은 질량분석기를 통한 분석 과정을 필요로 한다. 하지만 질량분석기를 사용한 시료 분석에 있어서 시료의 순도가 가지는 영향력이 매우 크기 때문에 시료의 순도를 높이기 위한 추가적인 실험 과정들이 개선되어야 할 것이다.

앞으로는 본 연구의 실험 결과를 바탕으로 기존의 실험 방법으로는 알 수 없었던 불안정한 단백질 간의 결합이 연구가 가능해짐에 따라 핵 속에 존재하고 있는 새로운 단백질과 단백질 복합체가 가지는 새로운 기능에 대한 연구가 더욱 폭넓게 가능해질 것으로 기대해 본다.

참 고 문 헌

1. Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication; where, when and how? *Annu Rev Biochem* 79:89-130.
2. Bell SP & Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 71:333.-374
3. Forsburg SL (2004) Eukaryotic MCM protein: beyond replication initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(1)109-131
4. Bousset K & Diffly JF (1998) The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes Devel* 12(4):480-490
5. Masai H & Arai K (2002) Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication *J Cell Physiol* 190(3) 287-296
6. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24:218-229.
7. Deutscher MP. (2009) Maintaining protein stability. *Methods Enzymol.* 463:121-127
8. T. Bürckstümmer, K.L. Bennett, A. Preradovic, et al. (2006) An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells, *Nature Methods*, 3(12):1013 - 1019
9. Swaffield JC, Melcher K, Johnston SA (1995) A highly conserved ATPase protein as a mediator between acidic activation domains and the TATA-binding protein, *Nature*, 374(6517):88-91

10. Blackstock WP, Weir MP. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* 17(3):121-7.
11. Smith AL, Friedman DB, Yu H, Carnahan RH, Reynolds AB (2011) ReCLIP (Reversible Cross-Link Immuno-Precipitation): An Efficient Method for Interrogation of Labile Protein Complexes. *PLoS ONE* 6(1): e16206.
12. Andrew L. Smith, Michael R. Dohn, Meredith V. Brown, Albert B. Reynolds (2012) Association of Rho-associated protein kinase 1 with E-cadherin complexes is mediated by p120-catenin, *Mol Biol Cell.* 23(1): 99 - 110.
13. Gerace E, Moazed D. (2015) Affinity Purification of Protein Complexes Using TAP Tags, *Methods Enzymol.* 559:37 - 52.
14. Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., Se'raphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 17:1030 - 1032.
15. C.J. Gloeckner, K. Boldt, A. Schumacher, R. Roepman, M. Ueffing, (2007), A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes, *Proteomics*, 7(23):4228 - 4234
16. Catherine A. Gouge, Tim W. Christensen (2010) Drosophila Sld5 is essential for normal cell cycle progression and maintenance of genomic integrity, *Biochem Biophys Res Commun.* 400(1):145-150
17. Aparicio T, Guillou E, Coloma J, Montoya G, Méndez J. (2009) The human GINS complex associates with Cdc45 and MCM and is essential for DNA replication, *Nucleic Acids Research*, 37(7) 2087-2095

18. Stephen E. Moyer, Peter W. Lewis, and Michael R. Botchan (2006) Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(27)10236-10241
19. Kira S Makarova, Eugene V Koonin, Zvi Kelman (2012) The CMG (CDC45/RecJ, MCM, GINS) complex is a conserved component of the DNA replication system in all archaea and eukaryotes, *Biology Direct*
20. Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K. (2006) GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* 8(4):358-66

Abstract

Study on
the DNA replication factor
binding protein purification
using ReCLIP method

Yeon-Soo Kim

Science Education (Biology Education)

The Graduate School

Seoul National University

DNA replication in eukaryotic cells is the essential process to maintain the continuity of life. Not only DNA replication initiation but also DNA replication elongation, especially the combination between Cdc45, GINS and MCM2-7 complex is well known to play an important role in unwinding double strand DNA as DNA helicase. During S phase, CMG complex is essential as an important component of the replisome, and combines with numerous proteins by moving dynamically during the replication process. Thus, this study targets the proteins that form CMG complex and intends to confirm the linkage between the proteins in the nucleus using TAP and

ReCLIP method.

First, TAP tag was added to the target protein and human cells expressing constant level of proteins with TAP tag were made. TAP tag is composed of three domains: protein A domain that can bind to IgG matrix, another that can combine with Calmodulin, and finally between the two, there is another that can be separated by TEV protease. TAP method was developed as a way to minimize the loss of reagent generated in the protein purification. However, in case of TAP method, the linkage is relatively weak, and thus could be easily broken in the process of breaking cells or washing the beads. ReCLIP method was used to complement this. A cross-linker is used to stabilize the weak or temporary linkage between two proteins within the cell reversibly.

This study intends to minimize the loss of sample that could happen in the purification process by minimizing the number of steps in the current protocol, utilizing TAP method. Also, unstable linkages between proteins that were hard to confirm with existing methods were stabilized by using a cross-linker and breaking it with a reducing agent afterwards. The final sample gained from the experiment combining the two methods mentioned above would be used for analysis through mass spectrometer.

keywords : ReCLIP, TAP method, Protein interaction, SDAD

Student Number : 2013-21439