

Zebrafish 동물모델에서 human HtrA2의 expression system 정립에 관한 연구

조성원^{1,2} · 박효진^{2,3} · 김구영^{1,2} · 남민경^{1,2} · 김호영^{1,2} · 고인호² · 김철희⁴ · 임향숙^{1,2*}¹가톨릭대학교 생명과학과, ²분자유전학연구소, ³고려대학교 생명과학대학 생명과학부, ⁴충남대학교 생명과학부 생물학과

Received March 7, 2006 / Accepted April 11, 2006

Establishment of the expression system of human HtrA2 in the zebrafish. Sung-Won Cho^{1,2}, Hyo-Jin Park^{2,3}, Goo-Young Kim^{1,2}, Min-Kyung Nam^{1,2}, Ho-Young Kim^{1,2}, Inho Ko², Cheol-Hee Kim⁴ and Hyangshuk Rhim^{1,2*}. ¹Department of Biomedical Sciences, ²Research Institute of Molecular Genetics, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ³School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ⁴Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, South Korea – HtrA2/Omi, a mitochondrial trypsin-like serine protease, is pivotal in regulating apoptotic cell death. Several lines of recent evidence suggest that HtrA2 is associated with the pathogenesis of neurodegenerative disorders; however, the physiological function of HtrA2 still remains elusive. For studying physiological function of HtrA2 in depth, it is necessary to develop a suitable expression system in the model animal. We therefore utilized the zebrafish as a model animal to establish expression of human HtrA2 (hHtrA2) *in vivo*. For expression of mature HtrA2 as GFP fusion in zebrafish embryos, the HtrA2 (WT) or (S306A) cDNAs with the C-terminal GFP tag were inserted into the pCS2+ plasmid. Expression patterns of HtrA2 in HEK293 cells were first monitored by immunofluorescence staining and immunoblot assays, showing approximately 64 kDa of the HtrA2-GFP fusion proteins. Subsequently, the hHtrA2 plasmid DNA or *in vitro* transcribed mRNA was microinjected into zebrafish embryos. The expression patterns of HtrA2 in Zebrafish embryos were monitored by GFP fluorescence in 24 hours-post-fertilization (hpf). Although expression patterns of HtrA2-GFP in developing embryos were different between the injected DNA and mRNA, both nucleic acids revealed good expression levels to further study the physiological role of HtrA2 *in vivo*. This study provides a suitable condition for expressing hHtrA2 in the zebrafish embryos as well as a method for generating useful system to investigate physiological properties of the specific human genes.

Key words – Human HtrA2, zebrafish, embryos, expression system, serine protease

서 론

High temperature requirement protein A2 (HtrA2)는 mitochondrial serine protease로 Mxi2와 상호작용하는 단백질로 처음 동정되었다[1,2,17]. HtrA2는 mitochondrial targeting sequence (MTS), transmembrane domain (TM), protease domain, PDZ domain으로 구성되어 있으며, mitochondria의 intermembrane space에 존재한다[10,21]. Bacterial HtrA는 생리적 온도(37°C)에서는 chaperon으로 작용하고, 고온에서는 unfolded protein이나 denatured protein을 제거하는 protease로서의 기능을 하는 단백질이다[14,19]. 따라서 *Escherichia coli* (*E. coli*) protein HtrA (또는 Deg P)의 human homologue인 HtrA2도 생리적인 환경 변화에 대응하여 chaperon이나 protease로 작용할 가능성이 높다.

최근 UV, staurosporine 등과 같은 세포사멸 자극이 주어졌을 때, mitochondria로부터 Smac/DIABLO, cytochrome c 등과 함께 HtrA2가 세포질로 방출되어 inhibitor of apopto-

sis protein (IAP)의 작용을 억제시켜 caspase 3-dependent cell death의 유발을 조절한다는 결과들이 발표되고 있다 [5,11,17,20,21]. 여러 연구를 통해 HtrA2는 apoptosis 경로에서 중추적인 역할을 담당하는 조절인자 중의 하나로 알려지고 있다[11,17]. 또한 linkage analysis와 mutation screening을 통해 motor neuron degeneration 2 (*mnd2*) mice의 HtrA2 유전자에서 serine 276이 cysteine으로 mutation되어 있는 것을 확인하였고, HtrA2의 serine protease의 기능 상실로 인해 *mnd2* mouse는 정상 mouse보다 비장과 흉선의 크기가 작고 몸의 크기가 작으며, 운동성이 저하되고, 평균 수명이 약 40일 정도가 되는 등의 phenotype을 나타낸다는 결과가 보고되었다[7,8,16]. 이 연구결과는 HtrA2가 퇴행성 뇌질환의 발병경로에서 중요한 역할을 할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 그러나 여전히 HtrA2의 생리적 기능에 대해서는 잘 알려져 있지 않고, 적당한 동물 모델 시스템도 정립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 HtrA2의 생리적 기능을 더욱 심도 있게 연구하기 위해서는 적절한 동물 모델 시스템이 필요하며, 이를 이용하여 HtrA2의 serine protease 활성을 분석하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 human HtrA2 (hHtrA2)의 생리적 기능을

*Corresponding author

Tel : +82-2-590-2390, Fax : +82-2-590-2390

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

보다 명확히 규명하기 위한 일환으로 zebrafish라는 새로운 척추동물모델을 도입하였다. Zebrafish는 단 기간에 발생이 이루어지며 사육과 유지가 매우 손쉽다는 장점이 있다. 또한 embryo와 치어 상태가 매우 투명하여 내부의 장기 관찰이 용이하다는 장점이 있으며 인간의 장기와 기능적으로나 형태적으로 매우 유사하다[3,4,18]. 최근 이러한 zebrafish의 장점으로 인해 zebrafish는 인간 유전자의 생리적 기능 연구를 위한 실험동물로 매우 각광을 받고 있다. Zebrafish에서 인간 유전자의 생리적 기능을 연구하기 위해서는 먼저 인간 유전자를 발현하는 기초 실험이 진행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 hHtrA2의 생리적 기능을 보다 명확히 밝히기 위한 기초 실험으로 zebrafish에서 hHtrA2를 발현하기 위한 시스템을 정립하였다.

재료 및 방법

Zebrafish의 사육

Zebrafish는 적정 생육온도인 28.5°C로 수온을 유지하여 사육하였다. Zebrafish의 산란과 수정은 빛에 의하여 유도되므로 zebrafish 생육과정은 낮 14 시간과 밤 10 시간으로 명암 주기를 조절하여 관리하였다. Brine shrimp (INVE)를 28.5°C로 유지한 2% 소금물에서 18 시간 배양하여 부화시킨 후 깨끗한 물로 소금기를 제거하고 zebrafish 먹이로 사용하였다.

Zebrafish 발현 용 hHtrA2 plasmid 제조

Zebrafish에서 hHtrA2를 발현시키기 위하여 hHtrA2 cDNA를 pCS2+ expression vector에 클로닝 하였다. Zebrafish에서 발현된 단백질을 용이 하게 관찰하기 위하여 HtrA2의 C-terminus에 green fluorescence protein (GFP)를 fusion 시킨 plasmid를 제작하였다. 아미노산 134-458을 포함하는 hHtrA2 mature form의 cDNA는 pFlag-hHtrA2 (aa 134-458) plasmid를 *Bgl* II와 *Kpn* I으로 절단하여 얻었다 [17]. *Bgl* II와 *Kpn* I으로 절단한 pEGFP-N3 plasmid (Clontech)에 hHtrA2 fragment를 삽입하여 제작한 plasmid를 pEGFP-hHtrA2-GFP라 명명하였다. pEGFP-N3 plasmid의 *Xba* I enzyme site 주위의 sequence가 TCTAGATC(볼드체는 Dam methylase가 인지하는 nucleotide sequence임)이므로 *E. coli* 내에서 GATC sequence 중 A의 N⁶ position이 Dam methylase에 의해 methylation되므로 *Xba* I (TCTAGA 인지) 효소로는 이 부분을 절단할 수 없다. 이 문제를 해결하기 위해 pEGFP-hHtrA2-GFP plasmid를 Dam methylase가 결여된 *E. coli*인 DAM strain에 transformation 시킨 후 *Bgl* II와 *Xba* I으로 절단하였다. 이렇게 얻어진 hHtrA2 (aa 134-458)-GFP를 *Bam*HI과 *Xba* I으로 절단한 pCS2+ plasmid에 cloning하여 제작한 plasmid를 pWT-GFP라 명명하였다(Fig. 1B). Serine 306 residue를 alanine으로 변경하여 serine protease 효소 활

성을 제거한 HtrA2 mutant form을 포함하는 pFlag-hHtrA2 (aa 134-458, S306A)로부터 hHtrA2 (S306A) fragment를 얻어 상기에서 설명한 방법으로 plasmid를 제작하여 그 이름을 pS306A-GFP라고 명명하였다(Fig. 1B).

pRFP-NLS plasmid 제조

Nucleus targeting vector를 제작하기 위해 red fluorescence protein (RFP)의 C-terminus에 nucleus localization signal (NLS)를 결합시켜 pRFP-NLS plasmid를 클로닝하였다. 이를 위해 RFP cDNA fragment는 pDsRed1-N1 plasmid (Clontech)를 template로 하여 PCR을 통해 얻었다. PCR을 위해 사용한 primer는 RFP-F (5'-GCGCGAATTCATGGTGCCTCCTCCAAGAAC-3')와 RFP-R (5'-GCGCGCGCCGCTAGTCGACCAGGAACAGGTGGTGGCGGC-3')이다. 증폭한 RFP fragment는 *Eco*R I과 *Not* I restriction enzyme으로 절단하여 pEGFP-N1 plasmid (Clontech)에 삽입하여 pRFP를 제작하였다. NLS 부분의 nucleotide를 얻기 위해 N1~N4의 4종류의 primer를 이용하였다: N1 (5'-GCGC GTCGACGATCCAAAAAGAAAAGAAAGGTAGATCCAAAA-3'), N2 (5'-TAC CTTTCTCTCTTTTTGGATCTACCTTTCTCTCTTTTTGGATC-3'), N3 (5'-A AGAAGAGAAAGGTAGATCA-3'), N4 (5'-GCGCGCGCCGCTTATACCTTTCTC TTCTTT TTTGGATC-3'). 먼저 N1과 N2를 혼합(A)하고 N3과 N4를 혼합(B)한 후 95°C에서 3분간 열을 가한 후 서서히 냉각시켜 각 complementary strand들을 annealing시켰다. A와 B 반응물을 혼합하여 T4 DNA ligase (Takara)를 이용하여 두 fragment를 ligation하여 PCR template로 이용하였다. 이 NLS template를 N1과 N4 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 후 *Sal* I과 *Not* I restriction enzyme으로 절단하여 pRFP (*Sal* I과 *Not* I으로 절단) plasmid에 cloning하여 pRFP-NLS라고 명명하였다.

Cell culture 및 transfection

HEK293 cell은 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin과 50 µg/ml streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium (DMEM) (Invitrogen)에서 5% CO₂ 상태로 37°C에서 배양하였다.

LipofectAMINE reagent (Invitrogen)를 이용하여 pWT-GFP, pS306A-GFP, pCS2+EGFP (pGFP라 명명) plasmid 각각을 HEK293 cell에 transfection하였다. HEK293 cell에 pRFP-NLS와 pWT-GFP나 pS306A-GFP를 co-transfection한 후 발현 양상을 immunofluorescent staining assay와 immunoblot assay 방법으로 관찰하였다.

Immunoblot assay

HEK293 cell에 DNA를 transfection하여 24 시간 경과한

후 cell을 harvest하여 배지를 제거하고 RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate)로 30 분간 얼음에서 반응 시켜 cell을 용해시키고 14,400xg에서 30 분간 원심분리 하여 cell 찌꺼기를 제거하였다. Protein Assay Solution (Bio-Rad)을 이용하여 각 각의 단백질 농도를 측정 한 후, 20 μ g의 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 옮겨 immunoblotting을 실시하였다. hHtrA2 antibody를 반응시킨 다음 secondary antibody로 antigen-antibody complex와 반응시킨 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech.) 방법으로 밴드를 확인하였다[13,15].

In vitro transcription에 의한 mRNA 제조

pWT-GFP plasmid를 *Nsi* I으로 linearization한 후 mMESSAGE mMACHINE high yield capped RNA transcription kit (Ambion)를 이용하여 *in vitro*에서 mRNA를 합성하였다. 이 plasmid에 SP6 promotor가 존재하므로 SP6 polymerase 200 unit, capping과 RNA 합성에 이용되는 NTP mixture를 혼합하여 37°C에서 2시간 동안 반응 시켜 cap 구조를 가지고 있는 mRNA를 합성하였다. 합성한 mRNA (100 ng/ μ l 농도)를 각 embryo 당 400~600 pl를 microinjection하여 각 embryo에 약 40~60 pg의 mRNA를 injection하였다.

Microinjection

Microinjection용 plasmid는 HiYield Plasmid Mini kit (Real Biotech Corp. RBC)을 이용하여 정제하였고, 이 정제된 DNA를 zebrafish embryo에 microinjection하였다. Needle (World Precision Instrument Inc.)을 8~10 μ m로 제작하고 제작한 needle에 DNA 또는 RNA 용액을 넣은 후 injector (World Precision Instrument Inc.)를 이용하여 embryo에 DNA 또는 RNA를 microinjection 하였다. DNA 또는 RNA를 주입할 때는 1 세포기의 embryo를 이용하여 microinjection을 수행하였으며, sample이 embryo에 잘 injection되었는지를 확인하기 위해 DNA나 RNA를 포함하는 용액과 붉은 색을 띠는 phenol red (Sigma) 용액을 1:1 비율로 섞어서 사용하였다. Embryo 당 250 ng/ μ l의 농도로 녹인 DNA 용액을 140~240 pl씩 microinjection 하였으며, 이때 embryo에 주입하는 DNA의 양은 embryo당 약 35~60 pg이다.

한 개의 embryo에 microinjection하는 DNA 또는 RNA의 정확한 양을 알기 위해서는 먼저 embryo에 microinjection하는 DNA나 RNA 용액의 부피를 알아야한다. Embryo에 microinjection하는 sample의 부피는 hemacytometer와 heavy oil (Sigma)을 이용하여 측정하였다. Embryo에 microinjection하게 되는 DNA나 RNA 용액과 동일한 부피의 sample을 injector를 이용하여 heavy oil에 loading을 하게

되는 데, 이 때 loading된 용액은 구의 형태를 띠게 되므로 hemacytometer로 이 구의 반지름을 측정하여 구의 부피를 계산한다(구의 부피 = $4/3\pi r^3$). 이 구의 부피와 한 embryo에 한번 microinjection한 sample의 부피는 동일하므로, 이 부피를 이용하여 알고 있는 농도의 stock DNA나 RNA로부터 한 embryo당 microinjection한 DNA나 RNA의 양을 산출해 낼 수 있다.

Microscope 관찰

Embryo의 관찰은 Stereo-Microscope (Leica)과 inverted fluorescence-microscope (Olympus)로 관찰하고, 사진은 DP 70 디지털 카메라 (Olympus)로 촬영하였다.

결 과

Zebrafish에서 hHtrA2를 발현시키기 위한 plasmid 제작과 이용

hHtrA2의 생리적 기능을 연구하기 위해서는 적절한 동물 모델에서 hHtrA2를 발현할 수 있는 시스템의 정립이 필요하다. 이를 위하여 척추동물인 zebrafish를 동물모델로 선택하였고, 이 zebrafish에서 특정 유전자를 발현하기 위해 가장 널리 사용되고 있는 pCS2+ plasmid에 134에서 458 amino acid residue로 이루어진 mature HtrA2를 encoding하는 hHtrA2 cDNA를 cloning하였다(Fig. 1). Zebrafish에서 hHtrA2의 발현양상을 용이하게 분석하기 위하여 hHtrA2의 C-terminus에 GFP를 fusion시켰다(Fig. 1B). Zebrafish에서 hHtrA2의 생리적 기능을 비교 분석하기 위한 일환으로 serine protease activity를 갖고 있는 wild type hHtrA2 뿐만 아니라, 306 amino acid residue의 serine을 alanine으로 바꾸어 serine protease activity를 상실한 mutant hHtrA2를 발현하는 construct들을 제작하였다. 이 plasmid들은 zebrafish embryo에 microinjection하여 embryo의 발생단계에서 hHtrA2의 발현양상을 연구하는 데 사용하였다. 또한, *in vitro*에서 합성한 mRNA를 zebrafish embryo에 microinjection하여 특정 유전자의 발현양상을 연구할 수 있다. 이를 위해 pWT-GFP plasmid를 *Nsi* I site restriction enzyme으로 절단, linearize하여 zebrafish embryo에 microinjection할 hHtrA2 mRNA를 합성하기 위한 template로 이용하였다.

Mammalian cell에서 hHtrA2의 발현양상 비교 분석

Zebrafish embryo에 microinjection하여 발현 시스템을 정립하기 전에 HEK293 cell에 pWT-GFP나 pS306A-GFP plasmid를 transfection하여 hHtrA2의 발현양상을 immunoblotting 방법으로 확인하였다(Fig. 2). ExPASy Molecular Biology Server Program (http://us.expasy.org/tools/pi_html)을 이용하여 단백질의 분자량을 이론적으로 계산하면 mature

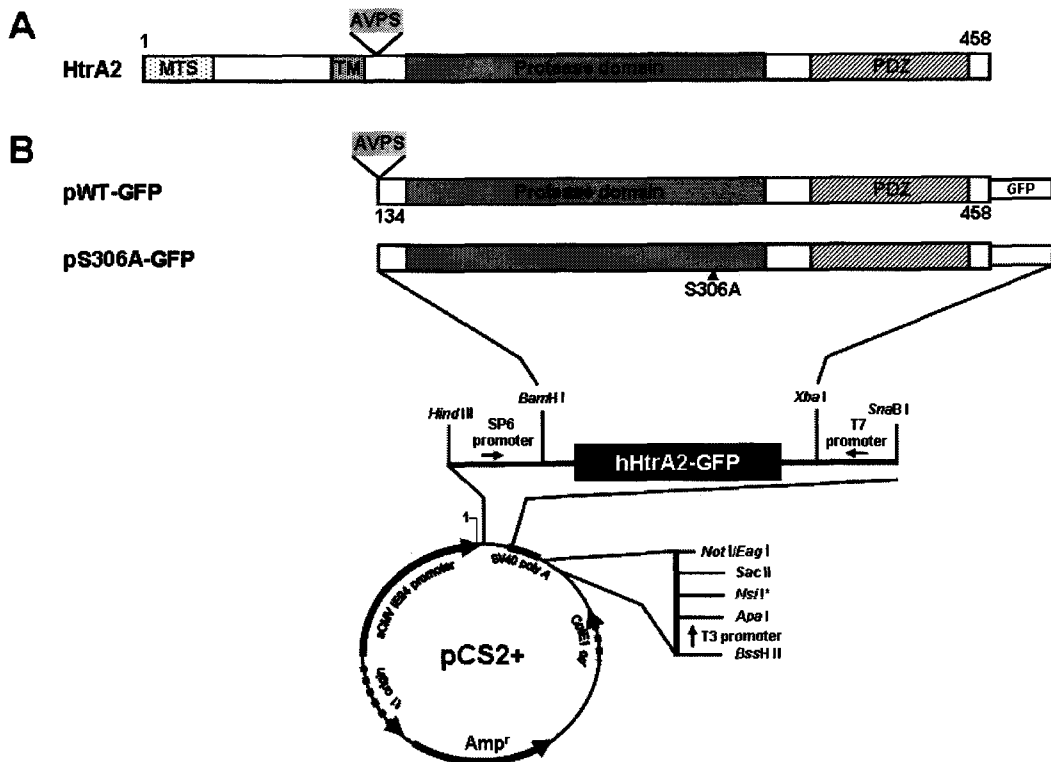


Fig. 1. Schematic representation of the HtrA2-GFP expression constructs in zebrafish embryos. A. Schematic diagram of human HtrA2. Human HtrA2 consists of functional domains: MTS, mitochondrial target sequence (aa 1-40), TM, transmembrane domain (aa 105-123), trimerization motif (aa 146-155), serine protease domain (aa 150-343), and PDZ domain (aa 364-445). B. Schematic diagram of zebrafish expression constructs for HtrA2. pWT-GFP and pS306A-GFP are mature HtrA2 (aa 134-458) with C-terminal Green Fluorescence Protein (GFP) epitope tag. WT indicates wild-type HtrA2 with serine protease activity, and S306A indicates the proteolytically inactive HtrA2 mutant by replacing the serine 306 residue with alanine. The plasmid backbone for expressing HtrA2-GFP in zebrafish embryos is the pCS2+ plasmid. The plasmid was linearized with *Nsi* I (asterisk) and transcribed with SP6 RNA polymerase to synthesize run-off HtrA2-GFP mRNA.

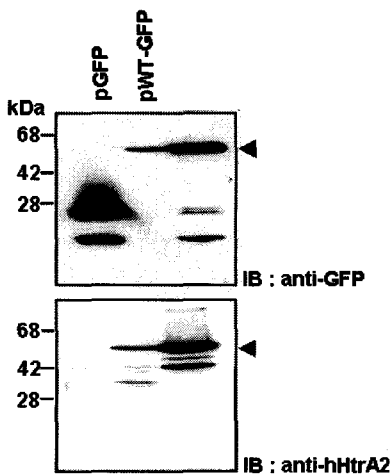


Fig. 2. Expression patterns of hHtrA2 in mammalian cells. A plasmid encoding pWT-GFP, pS306A-GFP or pGFP (pCS2+ EGFP) was transiently transfected into HEK293 cells, proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by immunoblot (IB) assay with anti-hHtrA2 (lower panel) or anti-GFP (upper panel) antibodies. HtrA2-GFP proteins are indicated by arrowhead.

hHtrA2은 34.98 kDa이고 GFP는 26.94 kDa 이므로 hHtrA2-GFP fusion 단백질의 분자량은 61.92 kDa이다. SDS-polyacrylamide gel 상에서 약 64 kDa의 hHtrA2-GFP fusion 단백질을 관찰할 수 있는데, 이는 이론적인 분자량의 수치와 거의 유사하다.

Immunofluorescent staining assay를 이용하여 cell 내에서 WT-GFP나 S306A-GFP fusion 단백질이 발현되는 양상과 cellular localization을 확인하였다(Fig. 3). NLS sequence를 포함하는 pRFP-NLS plasmid를 hHtrA2 발현 vector와 co-transfection한 후 cell의 nucleus는 RFP의 발현으로 관찰하고, GFP fusion 단백질과 RFP의 merge 유무로 WT-GFP나 S306A-GFP가 nucleus에 존재하는 지 여부를 확인하였다. WT-GFP와 S306A-GFP 각각이 RFP와 merge가 되지 않는다는 것은 GFP-fusion 단백질이 nucleus에 존재하지 않는다는 것을 말해준다. Mitochondria에 주로 존재하는 full-length HtrA2와는 달리 N-terminus에 존재하는 MTS를 제거한 WT-GFP와 S306A-GFP의 경우는 주로 cytosol에서 발현되는 것을 관찰할 수 있는데, 이는 기존의 연구 결과와 일치한다[20].

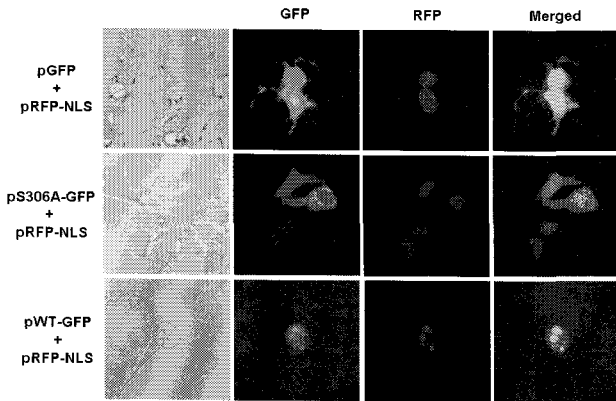


Fig. 3. Expression and localization of HtrA2 in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently cotransfected with plasmids encoding RFP-nucleus marker (pRFP-NLS) and HtrA2-GFP fusion proteins (WT-GFP or S306A-GFP). Expression of RFP-NLS and GFP-fusion was monitored with RFP (red) and GFP (green) expression, respectively.

Zebrafish에서 hHtrA2의 DNA나 RNA의 발현양상의 비교 분석

Zebrafish에서 hHtrA2의 발현양상을 알아보기 위하여 pWT-GFP DNA나 이 plasmid를 linearize하여 *in vitro*에서 합성한 WT-GFP mRNA를 각각 embryo에 microinjection하여 단백질 발현의 효율을 조사하였다(Fig. 4). WT-GFP DNA (Fig. 4, middle panel)나 mRNA(Fig. 4, right panel) 각각을 one cell stage의 embryo에 약 35 pg을 microinjection하였으며, 수정 후 24 시간째인 prim-5 stage [somite(체절) 발생이 끝나는 단계(총 30개의 somite 발생)]에서 관찰하였다. DNA의 microinjection 후 WT-GFP의 발현양상은 embryo 전체에 dot 형태로 나타나는 것을 확인할 수 있다. York에서 관찰되는 녹색의 형광은 plasmid로부터 발현되는 WT-GFP 단백질

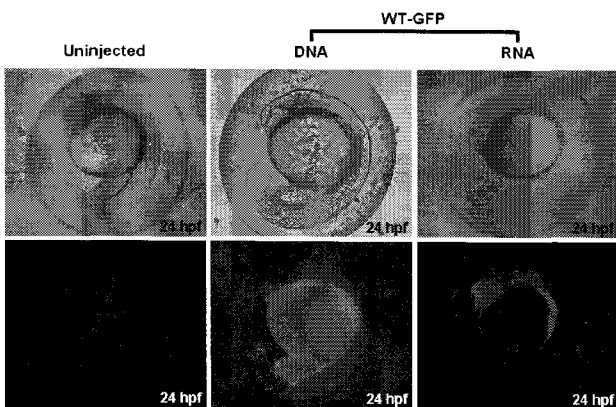


Fig. 4. Expression patterns of hHtrA2 derived from DNA or mRNA microinjection into zebrafish embryos. Embryos were microinjected with WT-GFP DNA (middle panel) or mRNA (right panel). GFP expression was examined in lateral view of embryos under a fluorescent microscope at 24 hpf.

이 아니라 york 자체가 형광을 흡수함으로써 나타나는 background이다. WT-HtrA2 mRNA를 embryo에 microinjection 후 WT-HtrA2의 발현양상을 관찰한 결과, DNA를 embryo에 microinjection하였을 때 관찰할 수 있었던 dot 형태의 양상과는 달리 몸 전체에 퍼져 있는 것과 같은 발현양상을 보였다. 특히, 발생과정 중인 zebrafish의 머리 쪽에서 WT-HtrA2가 강하게 발현되며 몸통과 꼬리 쪽으로 갈수록 약하게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 transient로 zebrafish embryo에서 DNA 또는 RNA로부터 WT-HtrA2 단백질을 발현시켰을 때 모든 세포에서 골고루 발현되지는 않지만 zebrafish의 body 전체에 퍼져 발현되는 양상을 보였다. 또한 DNA와 mRNA 모두 발생과정 중인 zebrafish에서 발현시키게 될 경우 발현에 별 문제점이 없으므로 실험 목적에 따라 DNA나 mRNA를 선택하여 zebrafish embryo에 microinjection하는 실험을 수행할 수 있다.

Zebrafish에서의 WT-HtrA2 단백질 발현 시스템 구축

앞 실험에서 DNA나 mRNA를 embryo에 microinjection 하였을 때 GFP fusion 단백질의 발현을 잘 관찰할 수 있으므로, *in vitro*에서 mRNA를 만드는 과정을 거치지 않고 plasmid DNA를 embryo에 직접 microinjection하여 발생과정 중인 zebrafish에서 WT-GFP의 발현양상을 관찰하는 방법을 선택하였다. DNA의 microinjection은 zebrafish embryo의 one cell stage에서만 실시하였다. 두 개의 다른 발생시기인 12 hours post fertilization (hpf) (5~6 somite stage, 5~6개의 somite가 발생하는 단계이며 최초로 눈이 구별되는 단계)와 24 hpf 에서 관찰하였으며, 발생하는 embryo의 측면을 관찰하였다(Fig. 5).

pWT-GFP, pS306A-GFP, pGFP plasmid 모두 동일한 양의 DNA를 embryo에 microinjection하여 각 단백질들의 발현양상을 관찰하였다(Fig. 5B, C, D). GFP가 zebrafish embryo에서 발현될 경우 zebrafish의 발생에 전혀 영향을 미치지 않는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 5B). Zebrafish에서 WT-GFP (Fig. 5C)가 S306A-GFP (Fig. 5D)보다 다소 적은 양이 발현되기는 하나, 각각의 HtrA2 단백질의 발현을 쉽게 확인할 수 있고 GFP 자체도 zebrafish에 영향을 끼치지 않으므로 생체 내에서 HtrA2의 생리적 기능을 연구하는 데 이 발현 시스템을 이용할 수 있다. 또한 사용한 GFP나 HtrA2 발현 vector 모두에서 embryo에 DNA를 microinjection한 후 24시간 일 때 보다는 early time인 12 시간대에 WT-GFP fusion 단백질이 더 잘 발현되는 것을 관찰할 수 있다. Zebrafish가 점점 성장해감에 따라 단백질의 발현이 감소하며 72 시간 경에는 WT-GFP의 발현을 거의 관찰할 수 없었다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 zebrafish에서 인간 유전자인 hHtrA2를 정상적으로 발현할 수 있는 시스템을 정립함으로써, 앞으로 zebrafish에서 hHtrA2의 생리적 기능을 연구하는 데 있어 기본적인 자료로 활용 할 수 있을 것이다.

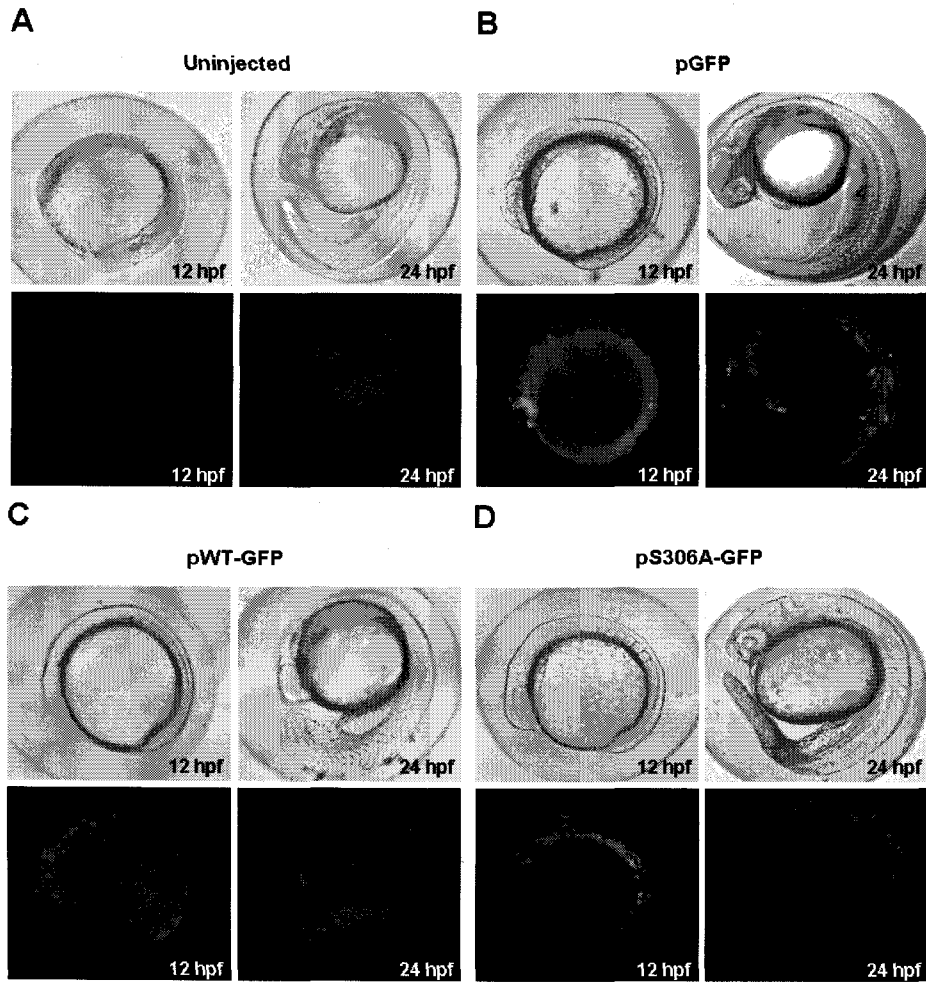


Fig. 5. Expression patterns of hHtrA2 in zebrafish embryos. The plasmid encoding GFP (B), WT-GFP (C), or S306A-GFP (D) was microinjected into zebrafish embryos. GFP expression in the microinjected embryos was visualized by fluorescent microscopy at two different embryonic developmental stages, 12 hpf (5~6 somite stage) and 24 hpf (prim 5 stage).

고 찰

많은 연구자들이 지금까지 수행해 오고 있는 HtrA2에 관한 연구들은 enzyme activity나 이 단백질의 세포사멸 경로에서의 기능, 또는 세포사멸에 관여하는 다른 단백질들과의 상호작용 등에 관한 내용들이 주를 이룬다[1,2,9,11,12,15,17,20,21]. 이러한 연구들은 cell 내에서 HtrA2가 관여하는 생체 반응의 mechanism을 규명하는 데 이용되지만, 실제로 whole-organism 내에서 HtrA2의 생리적 기능을 연구하기 위한 시스템이나 적절한 동물모델에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 hHtrA2의 생리적 기능을 보다 명확히 연구하기 위한 기반 기술을 구축하기 위해, 인간과 유사한 새로운 척추동물 모델인 zebrafish를 선택하여 이 물고기의 발생과정 중 hHtrA2 발현을 관찰할 수 있는 적절한 vector 시스템과 발현 조건을 확립하였다. Expression vector인 pcDNA는 human CMV promoter를 가지고 있어 zebrafish나 mammalian

cell에서 특정 유전자를 발현하는 데 이용할 수 있으나, *in vitro*에서 mRNA를 합성하는 데 사용하기는 적절하지 않아 pCS2+ vector를 사용하였다. 이 vector는 simian CMV promoter를 가지고 있고 SV40 polyA tail 뒤에 multiple restriction enzyme site가 존재하므로 plasmid DNA로 embryo에 microinjection할 수 있을 뿐만 아니라, 이 plasmid를 linearize하여 polyA tail을 가지고 있는 mRNA를 *in vitro*에서 쉽게 제작할 수 있다는 장점도 있다(Fig. 1).

pCS2+ vector 시스템을 이용하여 zebrafish에서 microinjection한 후 WT-GFP의 DNA와 mRNA로부터 단백질의 발현을 비교한 결과 커다란 차이점은 보이지 않았다. DNA는 mRNA와는 달리 embryo에 microinjection하면 nucleus로 가서 transcription이 일어나고, 합성된 mRNA가 cytoplasm으로 export된 후 protein synthesis machinery를 통해 단백질이 만들어져야 하므로 단백질 발현의 효율이 다소 낮을 수 있고 단백질이 발현하는 데 시간이 걸릴 수 있으나 다루기가 쉽다는 큰 장점이 있다.

WT-GFP DNA를 발현시켜 다음 실험을 진행하기 위한 일환으로 여러 가지 농도(10, 50, 100 pg)의 DNA를 embryo에 microinjection하였다. DNA 100 pg을 embryo에 microinjection하였을 때는 발현을 확인하기도 전에 대부분의 microinjection 된 embryo가 사망하여 유전자의 발현을 거의 확인하지 못하였으며, 50~100 pg을 microinjection 하였을 때는 발생과정 중 embryo가 사망하는 비율이 매우 높았다. 전체 microinjection한 embryo 중 약 70% 이상이 사망하여 다음 실험을 진행하기에는 무리가 있었다. Embryo에 10 pg의 DNA를 microinjection 하였을 경우 WT-GFP의 발현율이 너무 약하여 WT-GFP 단백질의 발현을 확인하기가 어려웠다. WT-GFP 단백질의 적절한 발현 조건을 잡기위해, 10 pg과 50 pg 사이의 농도인 25~35 pg을 embryo에 injection 하였을 때, WT-GFP 단백질의 발현율도 높으면서 embryo의 사망률도 낮아 이 농도를 선택하였다(data not shown). 가시적으로 WT-GFP의 발현이 GFP vector alone이나 S306A-GFP보다 발현율이 다소 떨어짐을 볼 수 있다. 이러한 현상은 WT-GFP의 특성 때문이라고 사료되며 WT-GFP가 embryonic development상에서 어떠한 역할을 하는 지는 앞으로 좀더 연구가 진행되어야 할 부분이다.

이러한 연구결과를 바탕으로 mammalian cell에 transfection하는 expression plasmid를 zebrafish embryo에 microinjection하는 데 이용할 수 있으므로 인간 유전자의 발현과 기능을 mammalian cell과 zebrafish에서 동시에 연구할 수 있는 장점이 있다. 또한 본 연구에서 정립한 발현 시스템을 이용하면 생체 내에서 hHtrA2의 생리적 기능을 용이하게 연구 할 수 있다.

요 약

Mitochondrial serine protease로 알려진 human HtrA2 (hHtrA2)는 apoptosis 유도 과정에서 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라 hHtrA2가 motor neuron degeneration과 관련이 있다는 최근 연구 결과가 있으나, hHtrA2의 생리적 기능은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 이와 같이 생체 내에서 필수적인 업무를 담당하는 hHtrA2의 기능을 심도 있게 연구하기 위해서는 적절한 동물모델 시스템이 필요하나 이에 대한 연구도 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 hHtrA2의 기능 분석을 위한 기본적인 실험으로 zebrafish라는 동물모델을 선택하여 hHtrA2의 발현 시스템을 정립하였다. 먼저 zebrafish에 hHtrA2를 발현시키기 위하여 zebrafish에서 일반적으로 사용되는 발현 시스템인 pCS2+ vector에 hHtrA2와 GFP를 cloning하고 plasmid를 HEK293 cell에 transfection한 후, hHtrA2-GFP fusion 단백질의 발현을 immunoblot과 immunofluorescence staining assay로 확인한 바 약 64 kDa의 hHtrA2 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

Zebrafish에서 hHtrA2-GFP fusion 단백질의 발현양상은 immunofluorescence microscope으로 확인하였다. hHtrA2-GFP DNA와 mRNA를 zebrafish embryo에 microinjection하여 두 가지 component의 발현을 비교 분석한 결과, DNA는 dot 형태로 mRNA는 몸 전체에 퍼져보이는 형태로 발현 양상의 차이는 있었으나 둘 다 zebrafish embryo에서 잘 발현되는 것을 알 수 있다. 다음 DNA를 주 component로 microinjection하여 zebrafish embryo에서 발현을 확인한 결과 hHtrA2는 72 hpf 까지 발현이 지속되는 것을 확인하였다. 본 연구에서 정립한 hHtrA2의 zebrafish 발현 조건은 앞으로 zebrafish에서 hHtrA2의 생리적 기능을 심도있고 정확하게 연구하는 데 있어 기본적인 자료로 활용 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050401-034-658-135-03-0)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1. Faccio L., C. Fusco, A. Chen, S. Martinotti, V. Bonventre J., and A. S. Zervos. 2000. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J. Biol. Chem.* **275**, 2581-2588.
2. Gray C. W., R. V. Ward, E. Karran, S. Turconi, A. Rowles, D. Viglianghi, C. Southan, A. Barton, K. G. Fantom, A. West, J. Savopoulos, N. J. Hassan, H. Clinkenbeard, C. Hanning, B. Amegadzie, J. B. Davis, C. Dingwall, G. P. Livi, and C. L. Creasy. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5699-5710.
3. Grunwald, D. J. and J. S. Eisen. 2002. Headwaters of the zebrafish -emergence of a new model vertebrate. *Nature Genetics* **3**, 717-724.
4. Guo, S. 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?. *Genes, Brain and Behavior* **3**, 63-74.
5. Gurp, M. Van, N. Festjens, G. Loo, X. Saelens, and P. Vandenaabeele. 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**, 487-497.
6. Hu, S. I., M. Carozza, M. Klein, P. Nantermet, D. Luk, and R. M. Crowl. 1998. Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage. *J. Biol. Chem.* **273**, 34406-34412.
7. Jones, J. M., P. Datta, S. M. Srinivasula, W. Ji, S. Gupta, Z. Zhang, E. Davies, G. Hajnóczy, T. L. Saunders, M. L. Van Keuren, T. Fernandes-Alnemri, M. H. Meisler, and E. S. Alnemri. 2003. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant

- mice. *Nature* **425**, 721-727.
8. Jones, J. M., R. L. Albin, E. L. Feldman, K. Simin, T. G. Schuster, W. A. Dunnick, J. T. Collins, C. E. Chrisp, B. A. Taylor, and M. H. Meisler. 1993. mnd2: A new mouse model of inherited motor neuron disease. *Genomics* **16**, 669-677.
 9. Kuninaka, S., M. Nomura, T. Hirota, S. I. Iida, T. Hara, S. Honda, N. Kunitoku, T. Sasayama, Y. Arima, T. Marumoto, K. Koja, S. Yonehara, and H. Saya. 2005. The tumor suppressor WARTS activates the Omi/HtrA2-dependent pathway of cell death. *Oncogene* **24**, 5287-5298.
 10. Li, W., S. M. Srinivasula, J. Chai, P. Li, J. W. Wu, Z. Zhang, E. S. Alnemri, and Y. Shi. 2002. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 436-441.
 11. Liu, H. R., E. Gao, A. Hu, L. Tao, Y. Qu, P. Most, W. J. Koch, T. A. Christopher, B. L. Lopez, E. S. Alnemri, A. S. Zervos and X. L. Ma. 2005. Role of Omi/HtrA2 in Apoptotic Cell Death After Myocardial ischemia and Reperfusion. *Circulation* **111**, 90-96.
 12. Liu, Z., H. Li, M. Derouet, A. Berezkin, T. Sasazuki, S. Shirasawa, and K. Rosen. 2006. Oncogenic Ras inhibits anoikis of intestinal epithelial cells by preventing the release of a mitochondrial pro-apoptotic protein Omi/HtrA2 into the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* in press.
 13. Nam, M. K., H. M. Park, J. Y. Choi, H. J. Park, K. C. Chung, S. K. Kang, and H. S. Rhim. 2005. The expression patterns of human Parkin in *E. coli* and mammalian cells. *J. Life Science* **15**, 916-922.
 14. Pallen, M. J., and B. W. Wren. 1997. The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbio.* **26**, 209-221.
 15. Park, H. J., J. Y. Choi, Y. M. Seong, C. Han, S. J. Yoon, S. M. Kang, and H. S. Rhim. 2003. Antigenicity of the region encoded by exon8 of the human serine protease, HtrA2/Omi, is associated with its protein solubility. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1597-1603.
 16. Rathke-Hartlieb, S., U. Schlomann, P. Heimann, M. H. Meisler, H. Jockusch, and J. W. Bartsch. 2002. Progressive Loss of Striatal Neurons Causes Motor Dysfunction in MND2 Mutant Mice and Is Not Prevented by Bcl-2. *Experimental Neurology* **175**, 87-97.
 17. Seong, Y. M., J. Y. Choi, H. J. Park, K. J. Kim, S. G. Ahn, G. H. Seong, I. K. Kim, S. M. Kang, and H. S. Rhim. 2004. Autocatalytic Processing of HtrA2/Omi Is Essential for Induction of Caspase-dependent Cell Death through Antagonizing XIAP. *J. Biol. Chem.* **297**, 37588-37596.
 18. Shin, J. T. and M. C. Fishman. 2002. FROM ZEBRAFISH TO HUMAN: Modular Medical Models. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **3**, 311-40.
 19. Spiess C., A. Beil, and M. Ehrmann. 1999. A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein. *Cell* **97**, 339-347.
 20. Suzuki, Y., K. Takahashi-Niki, T. Akag, T. Hashikawa, and R. Takahashi. 2004. Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. *Cell Death and Differentiation* **11**, 208-216.
 21. Uren, R. T., G. Dewson, C. Bonzon, T. Lithgow, D. D. Newmeyer, and R. M. Kluck. 2005. Mitochondrial Release of Pro-apoptotic Proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 2266-2274.