

BAEC 細胞에서의 Laminin 異型體 Subunit의 會合에 관한 연구

전 훈* · 임강현

우석대학교 약학대학 한약학과

Subunit Assembly of Laminin Variants in Cultured BAEC

Hoon Jeon*, Kang hyun Leem

Department of Oriental Pharmacy, Woosuk University

Bovine aortic endothelial cells(BAEC) produce two variant forms of laminin with a subunit composition of AB1B2 and A'B1B2. Analyses of the intracellular assembly of these subunits revealed that the B1B2 dimer formed first, and that A or A' joined to form the AB1B2 or A'B1B2 trimer. Angiostatic steroids shifted the relative size of the A and A' monomer pool in BAEC, and competition between the A and A' subunits in joining the B1B2 dimer produced AB1B2 and A'B1B2 in different ratios. This result suggests that subunit replacement is the general mechanism for producing laminin variants by various cells for tissue morphogenesis. When laminin subunits in BAEC were cross-linked with dithio-bis-succinimidylpropionate(DSP) and immunoprecipitated with anti-laminin antiserum, monomeric A,A',B1 and B2 monomers and the B1B2 dimer migrated as extremely large molecules in sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis under nonreducing conditions. When the crosslinking disulfide bonds were cleaved under reducing conditions, they migrated as the usual subunits. This result suggests that molecular chaperones were involved in the process of the assembly and replacement of laminin subunits.

Key words : BAEC, laminin, molecular chaperones

서 론

조직은 세포만으로 형성되어 있지 않고 상당부분은 세포외 공간으로, 대부분 세포외 matrix라고 하는 거대분자의 복잡한 網狀구조에 의해 형성되어 있다. 基底膜(basement membrane)은 이와 같은 세포외 matrix의 일종으로 세포의 형태, 분화 등에 작용하여 형태형성과 발생과정에 있어서 극성의 上皮(內皮)구조를 형성하는 역할을 하고 있다^{1,2}. 基底膜은 암의 전이에도 관여하며 종양세포는 혈관벽에 있는 基底膜을 관통하지 않으면 타 조직으로 전이 할 수 없다. 基底膜의 구성성분 중 양적으로 많은 단백질은 laminin, type IV collagen 및 proteoglycan 등으로 특히 laminin은 세포활성에 큰 영향을 미치는 당단백질로 알려져 있다. Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)종양에서 처음 정제된 典型的 laminin은 A(400kD), B1(230kD) 및 B2(210kD)로 명명되어진 3개의 subunit가 회합하여 disulfide 결합으로 안정화한 十字구조의 형태를 하고 있다³. 3종류의 subunit의 cDNA 배열이 human⁴

및 mouse⁵로부터 밝혀져 있으며, B1 subunit의 異性體인 s-laminin⁶과 A subunit의 異性體인 merosin⁷의 cDNA가 단리되어 염기배열이 밝혀졌다. 또한 上皮의 특이적인 laminin 異性體인 kalinin⁸이 발견되었으며, cDNA 염기배열에 의해 subunit의 일부가 결손된 laminin family라는 것이 밝혀졌다. Kalinin A subunit는 典型的 laminin의 B1 subunit 및 B2 subunit와 회합하여 k-laminin(분자량 600,000)으로 명명되었다⁹. 각 subunit의 아미노산배열과 전자현미경 등에 의해 laminin의 정확한 구조모델이 알려졌다¹⁰. 3개의 subunit 중 A subunit가 회합부위로 7잔기 단위의 반복배열(heptad repeat)이며 1번째와 4번째 위치에 소수성아미노산이, 5번째와 7번째 위치에 하전아미노산이 존재한다. 異種의 laminin subunit의 회합은 이 중복코일부분의 특이적인 상호작용으로 유도되는 것으로, heterodimer 또는 heterotrimer 형성의 회합 subunit의 선택성은 7잔기 단위의 반복배열의 5번째와 7번째 위치의 하전아미노산의 배열형태에 따라 결정된다고 생각되어진다. 소대동맥내피세포(bovine aortic endothelial cells, BAEC)는 A,B1 및 B2 subunit의 전형적 laminin과 A',B1 및 B2 subunit의 異性體를 합성, trimer 형성과정에서 A subunit와 A' subunit의 互換에 의해 형성된다는 보고¹¹가 있어, 본 연구는

* 교신저자 : 전 훈, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 약학대학
E-mail : jeonh@core.woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1577
· 접수: 2002/05/09 · 수정: 2002/05/31 · 채택 : 2002/07/24

kalinin과 k-laminin 사이에도 동일한 A subunit가 공유한다고 생각되어 7잔기 단위의 반복배열로 유도되어 互換되는 중복코일의 형성은 다양한 구조와 기능을 가진 laminin 異型體를 형성하기 위해 여러 가지 기전이 작용될 것으로 생각되어진다. 따라서 본 연구에서는 이와 같은 laminin 구성 subunit의 회합과정에 molecular chaperones이 관여하고 있을 것으로 생각되며 그 가능성을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DME), penicillin-streptomycin, anti-rabbit laminin, dithio-bis-(succinimidyl)propionate(DSP)은 Sigma Co.에서 fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co.에서 Protein A Sepharose CL-4B는 Pharmacia Co.에서 L-[35S]methionine(1200 Ci/mmol)은 ICN에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask(Nunc), CO₂ incubator(Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope(Zeiss Co.), electrophoresis system(Bio-Lad), XAR-5 X-ray film(Kodak) 등을 사용하였다.

2. 세포배양

BAEC는 Gospodarowics¹²⁾ 등의 방법에 의해 소동맥으로부터 단리하였으며, 세포 배양액은 FBS 10%와 antibiotics 1% (penicillin-streptomycin 100 units/ml)를 첨가한 DME 배지를 사용하였다.

3. 방사성 아미노산에 의한 세포의 labeling

24 well plate에서 배양한 세포는 MEM으로 세척하고, 0.5mCi/ml [35S] methionin을 첨가한 200 μ l의 methionin-free MEM 배지상에서 37 $^{\circ}$ C 조건에서 4시간 배양하였다.

4. 架橋反應

Labeling한 BAEC를 PBS로 세척 후, 100 μ l의 2mM DSP용액을 첨가해 30분간 氷上에서 반응시킨 다음 2mM glycine으로 세척한 후, 가교반응을 정지시키기 위해 PBS로 세척하였다¹³⁾.

5. Immunoprecipitation 및 전기영동

Immunoprecipitation은 Aratani¹⁴⁾ 등의 방법에 準하였다. Labeling한 세포를 200 μ l의 immunoprecipitation buffer(10mM Tris-HCl(pH8.0), 2mM EDTA, 1%(v/v) Triton X-100, 0.4%(w/v) SDS, 1mM PMSE, 0.4M NaCl)로 용해한 후, 적당량을 immunoprecipitation buffer로 희석하여 1ml로 하여 1 μ l의 anti-laminin 혈청을 첨가해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation한 후, 25 μ l의 10%(w/v) protein A sepharose 현탁액을 가하여 1시간 동안 진탕하였다. 진탕한 세포를 2,000 rpm에서 3초간 원심분리하여 침강된 sepharose수지를 immunoprecipitation buffer로 3회

세척한 후, 3배 농도의 SDS 전기영동 buffer(9%(w/v) SDS, 0.2% Tris-HCl(pH6.8), 15%(v/v) glycerol, 6%(v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% BPB) 중에 5분간 자비한 후 SDS 전기영동을 하였다. SDS 전기영동은 Laemmli¹⁵⁾의 불연속완충액계를 사용, 3%의 농축용과 4% 또는 8%의 분리용 acrylamide gel을 이용하였다. 비환원 조건의 전기영동을 위해 上記의 immunoprecipitation 추출에 2-mercaptoethanol을 첨가하지 않은 SDS 전기영동 buffer를 사용하였다. 이차원 전기영동은 일차원재의 비환원조건의 전기영동을 직경 2mm의 유리관내에서 4%의 분리용 acrylamide gel을 사용하였으며, 이 gel을 2-mercaptoethanol을 첨가한 SDS 전기영동 buffer중에 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 incubation하여 disulfide 결합을 환원하였다. 이차원재의 환원조건의 SDS 전기영동에는 4%의 분리용 acrylamide gel을 사용하였다.

결 과

1. 內皮細胞가 합성하는 2종류의 laminin 異型體 상대량의 혈관신생에 의한 변동

배양한 내피세포가 AB1B2의 조성을 가진 典型的 laminin 외에 A'B1B2의 조성을 가진 laminin 이형체를 합성, 이들의 상대치가 혈관신생억제 steroid에 의해 변동함으로써 혈관신생에 관여하고 있다는 보고가 있다¹¹⁾. BAEC 세포가 4개의 laminin subunit(A,A',B1,B2)를 합성함으로써 각 subunit의 세포내 회합기구를 알아보기 위해 환원조건과 비환원조건에서 SDS 전기영동으로 분리하였다(Fig.1).



Fig. 1. Non-reducing and reducing two-dimensional SDS gel electrophoresis of laminin-related polypeptides in BAEC. Radiolabelled cell lysate from BAEC was immunoprecipitated and electrophoresed from left to right under non-reducing conditions, and under reducing condition from top to bottom. The subscripts to A,A',B1 and B2 indicate the intracellular precursors for each subunit at different stages of N-glycan processing. It is important to notice that the glycan processing of each subunit in a same complex was synchronized.

일차원재(왼쪽에서 오른쪽 방향)는 비환원조건에서 분리한 complex를, 이차원재는(위에서 아래 방향) 환원조건으로 구성 subunit를 분리하였다. Monomer는 gel의 대각선상에 위치하며, disulfide 결합으로 complex를 형성하고 있던 구성 subunit는 縱방향으로 정렬한다. 이 결과로부터 B1B2 complex가 먼저 형성

된 후 A subunit가 회합하여 AB1B2 complex가 형성되며, 또는 A' subunit가 회합하여 A'B1B2 complex가 형성되는 과정을 알 수 있었다(Fig.2). 이와 같이 laminin complex의 구조와 기능의 다양성이 어느 쪽이든 subunit의 相同體에 의한 置換으로 생긴다는 것을 알 수 있었다. 혈관신생 상황으로 활성화된 배양상태에서는 BAEC 세포가 합성한 laminin의 분자종은 A'B1B2이지만, 혈관신생억제 steroid를 첨가하면 A' subunit의 합성이 억제되는 대신에 A subunit의 합성이 촉진되어 주요 laminin 분자종이 AB1B2로 전환되었다. 이러한 결과는 혈관신생의 과정에서 내피세포가 다양한 laminin 이형체를 합성하고 있다는 것을 시사한다.

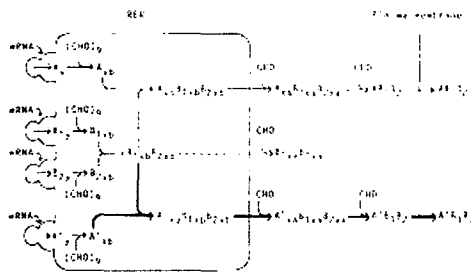


Fig. 2. Intracellular assembly of four laminin-related polypeptides into two laminin variants in endothelial cells. AA',B1 and B2 are the four laminin-related polypeptides found in endothelial cells. Subscripts xa and xb indicate stable intermediates at different stages of glycan processing. y indicates an unglycosylated form observed in the presence of tunicamycin. (CHO)_y shows the high mannose oligosaccharide chain. CHO shows terminally transferred monosaccharide, and RER shows rough endoplasmic reticulum.

2. laminin의 세포내 회합시 molecular chaperones의 관여

Laminin subunit의 회합과 치환에 molecular chaperones이 어떠한 관여를 하는지 관찰하기 위해 방사선으로 labeling한 BAEC 세포를 단백질 架橋劑로 용해하고 anti-laminin 혈청으로 immunoprecipitation하여 SDS 전기영동으로 분리하였다. 이러한 방법을 이용하면 세포내 laminin subunit의 주위에 존재하고 있는 단백질이 가교되어 coprecipitation할 것으로 기대할 수 있다. 가교제로서는 세포막투과성으로 환원조건하에서 가역적으로 脫架橋하는 DSP⁶⁾를 사용하였다. 이 결과 비환원조건에서의 SDS 전기영동으로 검출되는 A,A',B1 및 B2 subunit의 monomer와 B1B2 complex의 양은 DSP에 의한 세포내 가교반응으로 현저하게 감소하였다(Fig.3A). 동일한 시료를 환원조건에서 분리하면 비환원조건에서는 소실된 것으로 보였던 laminin subunit가 가교반응 후에는 대부분 검출되었다(Fig.3B). 이것은 laminin subunit의 monomer와 dimer가 AB1B2 또는 A'B1B2 complex에 회합하기 전에 molecular chaperones과 같은 단백질과 상호작용하고 있다는 것을 시사하고 있다. Fig.3에서는 laminin subunit의 작용을 관찰하기 위해 4%의 acrylamide gel을 사용하였다. 이와 같은 온화한 gel을 사용한 전기영동에서는 laminin subunit와 가교하고 있는 molecular chaperones과 같은 단백질이 저분자량일 경우 충분한 분리가 되지 않을 것으로 생각되어, 동일 시료를 8%의 acrylamide gel로 다시 분리하였다(Fig.4). 이 전기영동의 결과, laminin 각 subunit와 더불어 80, 60 및 50kD에 상당하는 band가 검출되었다.

이들 단백질의 분자량을 측정해본 결과, GRP94, GRP78 및 HSP47 등의 잘 알려진 molecular chaperones과는 다른 단백질을 알 수 있었다. 따라서 이 band의 검출이 DSP에 의한 가교반응으로 의존하고 있기 때문에, 이 단백질들이 세포내에서 laminin subunit의 주위에 존재하여 상호작용하고 있다고 생각되어진다.

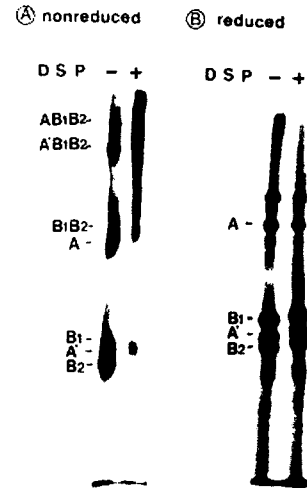


Fig. 3. Non-reducing and reducing SDS gel electrophoresis of the radiolabelled laminin subunits in BAEC after crosslinking with DSP. Metabolically radiolabelled BAEC cultures were crosslinked by incubating with or without 2mM DSP for 30 min. at 4°C before the cells were lysed. The laminin subunits were immunoprecipitated together with crosslinked proteins and separated by SDS gel electrophoresis under non-reducing(A) and reducing(B) conditions. A separating gel of 4% acrylamide was used.

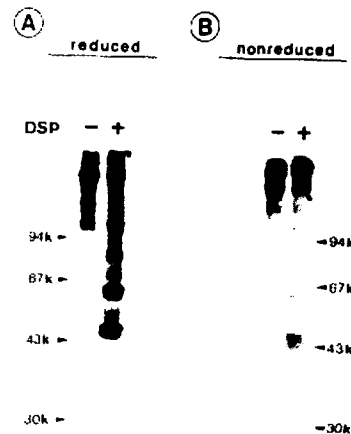


Fig. 4. Polypeptides in BAEC crosslinked to laminin subunits by DSP. The radiolabelled lysate from BAEC with or without DSP treatment was separated in 8% acrylamide gel. The other details are the same as in Fig. 3. Arrow heads beside the lanes indicate the migration position of standard proteins with the corresponding sizes.

고찰

Laminin 각 subunit의 선택적인 상호인식에는 7잔기단위의 반복배열에 의해 생성되는 subunit 들의 이온성결합과 소수성결합이 중요하다. Laminin 각 subunit는 A subunit의 아미노산 배열을 토대로 구조를 형성하고 있다. 따라서 laminin subunit의

회합기전에 molecular chaperones과 같은 보조인자가 필요하지 않을 것으로 생각할 수도 있지만, 회합을 완료하기전의 monomer 또는 dimer가 가용상태로 존재하기 위해서는 monomer 또는 dimer가 노출하고 있는 소수면을 중화하는 어떤 인자가 필요할 것으로 생각되어진다. 소수면은 trimer로 회합이 완료된 시점에서 서로 중화되지만, 이 과정에서 molecular chaperones에 의해 보호되고 있다고 추측할 수 있다. 본 실험에서 가교반응에 의해 monomer 또는 dimer가 상당히 큰 complex로 변환된다는 사실에 주목해야 할 것으로 생각된다. 더욱이 F9 세포¹⁷⁾와 3T3-L1 세포¹⁴⁾의 경우 laminin subunit의 세포내 회합의 해석 결과, laminin 각 subunit는 trimer를 형성하지 않으면 조면소포체를 경유해 골지체에 이동하지 않는다는 것이 보고되었다. 이러한 결과로부터 molecular chaperones은 laminin subunit의 monomer와 dimer의 상태에서 응집을 방지하기 위한 작용뿐만 아니라, monomer와 dimer 상태의 laminin subunit를 조면소포체내에 잔류시켜 놓는 작용도 하고 있을 것으로 생각되어진다. 따라서 laminin subunit의 회합과 치환 기전에 molecular chaperones과 같은 인자가 관여하고 있을 것으로 생각되며, 이에 대한 자세한 기전은 추후 연구되어야 할 것이다.

결 론

BAEC 세포의 laminin subunit를 DSP로 가교하여 immunoprecipitation한 후 비환원조건에서 SDS 전기영동을 한 결과 A,A',B1 및 B2 subunit의 monomer와 B1B2 subunit의 dimer가 대단히 큰 분자로 영동하였다. 그러나 환원조건에서 가교반응을 절단하면 통상의 크기로 영동하였다. 이 결과로부터 laminin subunit의 회합과 치환에는 molecular chaperones과 같은 인자가 관여하고 있음을 의미하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 우석대학교 교내학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Madri, J.A. and Williams, S.K.: Capillary endothelial cell cultures; phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* 97, 153, 1983.
- Form, D.M., Pratt, B.M. and Madri, J.A.: Endothelial cell proliferation during angiogenesis. *Lab. Invest.* 55, 521, 1986.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, L.A., Furthmayr, H., Rohde, H., and Timpl, R.: Shapes, domain organization and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J. Mol. Biochem.* 150, 97, 1981.
- Pikkarainen, T., Kallunki, T., and Tryggvason, K.: Human laminin B2 chain. *J. Biol. Chem.* 263, 6751, 1988.
- Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R., and Yamada, Y.: Laminin, a multidomain protein. *J. Biol. Chem.* 263, 16536, 1988.
- Ehrig, K., Leivo, I., Argraves, W.S., Rouslahti, E., and Engvall, E.: Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 3264, 1990.
- Hunter, D.D., Shah, Y., Merlie, J.P., and Sanes, J.R.: A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*, 338, 229, 1989.
- Rousselle, P., Lunstrum, G.P., Keene, D.R., and Burgeson, R.E.: Kalinin; An epithelium specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J. Cell Biol.*, 114, 567, 1991.
- Marinkovich, M.P., Lunstrum, G.P., Keene, D.R., and Burgeson, R.E.: The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J. Cell Biol.*, 119, 695, 1992.
- Beck, K., Hunter, I and Engel, J.: Structure and function of laminin; anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.*, 4, 148, 1990.
- Tokida, Y., Aratani, Y., Morita, A. and Kitagawa, Y.: Production of two variant laminin forms by endothelial cells and shift of their relative levels by angiostatic steroids. *J. Biol. Chem.* 265, 18123, 1990.
- Gospodrowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C.: Clonal growth of bovine aortic endothelial cells; Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4120, 1976.
- Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., and Nagata, K.: Involvement of the stress protein HSP 47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, 117, 903, 1992.
- Aratani, Y. and Kitagawa, Y.: Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J. Biol. Chem.* 263, 16163, 1988.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680, 1970.
- Roth, R.A., and Pierce, S.R.: In vivo cross-linking of protein disulfide isomerase to immunoglobulins. *Biochemistry*, 26, 4179, 1987.
- Morita, A., Sugimoto, E., and Kitagawa, Y.: Post-translational assembly and glycosylation of laminin subunits in parietal endoderm-like F9 cells. *Biochem. J.*, 229, 259, 1985.