

## 2-D 전기영동 분석을 통한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 연계된 효모 시스템 NDPK에 관한 연구

문혜정 · <sup>1</sup>윤대진 · †<sup>2</sup>박창호

경희대학교 산학협력기술연구원, <sup>1</sup>경상대학교 대학원 응용생명과학부, <sup>2</sup>경희대학교 환경·응용화학대학  
(접수 : 2004. 12. 8., 게재승인 : 2005. 9. 29.)

## Two-dimensional Electrophoretic Analysis of Nucleotide Phosphate Kinase Mediated Hydrogen Peroxide Cross-linking in *Saccharomyces cerevisiae*

Haejeong Moon, Dae-Jin Yun<sup>1</sup>, and Chang-Ho Park<sup>2†</sup>

Industrial Liaison Research Institute,

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

<sup>2</sup>Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received : 2004. 12. 8., Accepted : 2005. 9. 29.)

Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase (NDPK) is identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer. The quaternary structure of NDPK appears to be regulated by cross-linking with an oxidant, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We compared roles of NDPK in each of wild type and ynk mutant against oxidative stress. Six specific proteins changed by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were identified using two-dimensional electrophoretic analysis. YNK regulated several proteins, related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling functions. These results suggest that one of the important functions of NDPK is the regulation of cellular redox state.

**Key Words** : NDPK, two-dimensional electrophoretic analysis, ynk mutant, MALDI-TOF MS

### 서론

유해한 휘발성 유기 화합물, VOC (volatile organic compounds)는 인체 내에 쌓이게 되면, 활성 산화종 (reactive oxygen species, ROS)의 수준이 올라가는 현상을 야기한다. 예를 들면, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)에 노출되었을 때 TNT의 환원 시, 산화 음이온이 다량 생성되어지며, 톨루엔, 벤젠 등에 의해서도 ROS에 의한 메카니즘에서 일어나는 것과 동일한 현상이 보고 되어져 있다(1). 게다가 이러한 VOC에 의한 독성 효과는 산화방지 단백질과, 특이적으로 TNT에 작용하는 TNT 환원 효소(2)에 의해서 제거될 수 있다. glutathione peroxidase 등의 항산화 효소는 톨루엔에 의해서 매개되어지는 ROS를 효율적으로 잘 제거할 수 있다(3). 유해 유기화합물에 노출되었을 때 방지 시스템과,

항산화 효소에 관한 메카니즘, 휘발성 유기 화합물에 의해서 야기되는 현상을 분석 파악하여 제거하고, 유해 유기화합물의 산화를 여러 산화 방지 효소들에 의해서 제거하는 기작들을 적용해서, 이와 관련된 폭넓은 연구의 기초를 수립하고자 하는 실험을 수행하고자 한다. 산화 환원 메카니즘에 관련된 유전자들 선별하기 위해서 유용한 2-D 전기영동방법을 사용했고, VOC를 세포내에 직접 처리하기보다, 이러한 유해 유기 화합물에 의해서, 1차적으로 발생해서, 신호 전달 매체가 되며, 유전자 조절 작용의 개시가 되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발현되어지는 단백질을 분석하였다.

Redox signaling은 활성 산화종인 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (HO·) lipid hydroperoxides에 의해 매개되어지는 기작이며, ROS는 물리적 기작에 의해 산화적 세포 손상에 대해서 apoptosis, 신경 퇴행성 질환과 암을 유발하는 물질이다. glutathione, ascorbic acid, thioredoxin과 glutaredoxin 등에 의해서 제거되거나 catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase 등의 항산화 효소에 의한 방어를 의해서 제거되는 현상들이 현재 보고 되어지고 있는데, 이러한 산화적 스트레스 하에서, 종종

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

Tel : +82-31-201-2531, Fax : +82-31-202-1946

E-mail : chpark@khu.ac.kr

chaperon-like molecules나 heat shock proteins들이 구조나 형태학적 변화가 일어나고 있다고 보고 되어져 있다(4, 5). 이와 마찬가지로, NDPK 역시 항산화 단백질로서의 직접적인 효과는 아니지만, 이러한 산화 매체를 통한 신호 전달 메커니즘에 관여하는 것으로 알려졌으며 산화 스트레스에 대해서, 구조의 변화를 야기하는 것으로 알려져 있다(6).

NDPK는 pyruvate kinase, Pra, Ras EF-Tu와 같은 GTP 결합 단백질 등과 연관되어져서 세포의 조절 기작을 조절하며, 세포 내에서 house keeping 단백질로서, 에너지 전환에 있어 중요한 역할을 하는 효소이다(7, 8). 효모를 제외한 다른 종인 동물과, 식물에서 밝혀진 NDPK의 성질과 구조의 특징과 여러 스트레스에 대한 변화를 살펴보면, 동물 NDPK는 세포 분화 조절, transcription 조절, 단백질의 phosphotransferase 활성을 가지는 것으로 오랜 연구에 의해서 밝혀져 있으며(9, 10) 식물에서는, phytochrome B 반응, UV-B signaling, heat stress와 호르몬 관련 반응에 관여하고 있다(11, 12). 구조적으로는 hexameric 구조이며 약 17 kDa 정도의 단량체로 존재하지만, non-covalent weak interactions으로 non-reducing 상태에서는 oligomeric structure로서 생체 내에서의 기능을 수행할 것으로 보고 되어져 있다. 최근 보고에 따르면, NDPK는 다양한 신호 전달 경로에 관련된 단백질들과 연관되어지며 미토콘드리아 단백질인, GAPDH, DnaK, heat stress proteins들이 산화적 스트레스 조건하에서 이 단백질의 활성을 조절하는 것에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 효모 NDPK에 관한 연구는 현재까지는 보고된 바 없다는 점에 착안하여, 이러한 사실들을 토대로, NDPK의 산화적 기작에 관한 연구를 수행하고자 하였다(13, 14).

산화 환원 신호 체제에 관여될 것으로 보는 NDPK의 역할을 좀 더 구체적으로 연구 접근하는 과정을 기초로, 보다 단순한 시스템을 통해서, 복잡한 신호 전달 매체 단백질을 탐색하고자, *S. cerevisiae*를 사용하였고, 효모 계층 상에서 한 개의 NDPK 유전자를 동정하였고 YNK라 명명하였다. 우리는 정상적인 효모 균주와 NDPK가 파괴되어진  $\Delta ynk$ 를 구축한 후에  $H_2O_2$ 를 처리한 후 조절되어지는 단백질 profile을 비교해보았다. 이 연구를 통해서, 우리는 산화적 스트레스에 처한 세포내에서 NDPK에 의해서 조절되어진다고 예상되어지는 redox 조절 단백질 몇 개를 찾을 수 있었다.

## 재료 및 방법

### Yeast Strains과 Media

*Saccharomyces cerevisiae*, W303-1a를 사용하며 (*MATa ura3-1 leu2-3,112 his3-11, 15 ade2-1 trp1-1 can1100*) (15), 배양 배지와 조건은 Sherman(16)의 연구를 따랐으며, 효모의 형질전환 방법은 Elble의 lithium acetate 방법(17)을 사용하였다.

### $\Delta ynk$ Strain의 구축

*S. cerevisiae* genome database (SGD, Stanford University)로부터 YNK의 유전자 염기서열을 획득한 후, 왼쪽과 오른쪽 arm은 YNK-URA, 프라이머를 사용하고, pVT-U 벡터의 URA3 프라이머를 (YNK forward primer 5'atcagggcgccattcgcc-(URA overhang arm)-cgtctgtcacggcagtg-3'와 reverse primer 5'-gcacgtgcacccccg-

(URA arm)-taagccctctggacac-3') 각각 사용하여 PCR 방법에 의하여 증폭시켜, YNK 유전자를 치환하여 W303a에 도입하였다. YNK의 앞쪽과 뒤쪽 사이트의 프라이머를 (YNK5' upstream (+569bp)-5'tggaagctgaaacgcaaggattg3'과 YNK3' down stream (-515bp)-5'atagccaaggcgcatgaactac3') 사용하였다.

### 배양 조건과 단백질의 분리

정상 균주와  $\Delta ynk$ 는 YPD 배지에서 24시간 동안 계대 배양했으며, 지수 생장기 중간 (흡광도 600 nm에서 OD값이 0.4-0.5 될 때)까지 키운 후, 5 mM  $H_2O_2$ 를 처리한 후, 30°C에서 2시간 더 배양하였다. 4,000 rpm에서 효모균주를 각각 원심분리시킨 후, 멸균된 증류수로 씻어준 다음 상등액은 버리고, 효모 균주만 모아서 protein extraction buffer (200 mM Tris pH 8.0, 150 mM ammonium sulfate, 10% glycerol, 1 mM EDTA)에 녹인 후, glass beads (0.25-0.5 mm)를 넣고 섞어준 후 초음파 분쇄 과정을 수행한다. 15분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하여 단백질을 분리한다.

### 2-D 전기영동 분석법

2-D 전기영동은 Kim(18)에 의해서 사용되어진 방법을 기초로 분석한다. IEF glass tube (5 mm inner diameter, 20 cm lengths) 내에서 분석하며, IEF gel mixture는 4.5% w/v acrylamide solution, 9.5 M urea, 2% v/v NP-40, and 2.5% v/v carrier ampholytes (pH 3-10 : pH 5-8 : pH 4-6.5 = 1 : 2.5 : 3.5)로 구성되어진다. SDS-PAGE를 12.5% w/v acrylamide로 수행하였다. 2-D 전기영동 겔은 고정 후, 은 염색법을 수행하였다. 1시간동안 50% v/v MeOH에 담근 후 건조하고, 두장의 셀로판지사이에서 건조시킨다.

### MALDI-TOF Mass Spectrometry

2-D gels로부터 단백질 조각을 얻은 후, 37°C에서 하루 밤 동안, 25 mM ammonium bicarbonate 용액에 final concentration이 0.015  $\mu\text{g/ml}$  이 되도록 trypsin (Promega)으로 peptide를 자른다. 다른 조각으로 MALDI-TOF MS를 수행하며 펩티드 염기서열 분석 후에 데이터를 분석한 결과로 도출된 스펙트라는 NCBI non-redundant database using Mascot (Matrix Science)에 의해서 어떤 단백질인지 검색한다.

## 결과 및 고찰

### $\Delta ynk$ 구축

YNK에 의해서 조절되어지는 산화적 스트레스에 대한 발현 패턴이 변화될 수 있는 단백질의 유무를 알아보기 위하여, YNK 유전자가 제거된 효모 시스템을 구축하였다. knock out (KO) mutant는 정상적인 효모 균주의 YNK 위치에 URA3를 대치해 넣은 후, 검정을 위해서 Northern과 Southern blotting에 의해서, YNK가 deletion 되어졌는지 확인하였다. YNK가 deletion 되어진 균주는  $\Delta ynk$ 라 명명한다. 데이터로 보여주진 않았지만 YNK를 KO시킨 효모는 kinase 활성이 현저히 떨어지는 것을 TLC판에서, NDPK 활성 측정 방법에 의해서 검증할 수 있었다. 재조합된 유전자적 유사성을 바탕으로 치환된  $\Delta ynk$

구축 전략을 나타낸 모식도에서(Fig. 1), URA3를 YNK가 들어가 있는 자리를 대신 인식하도록 primer를 재구성시켜, URA3가 들어가 있는 균주만 자랄 수 있는 SC-URA 배지에서 선택적 선별을 수행하였다.

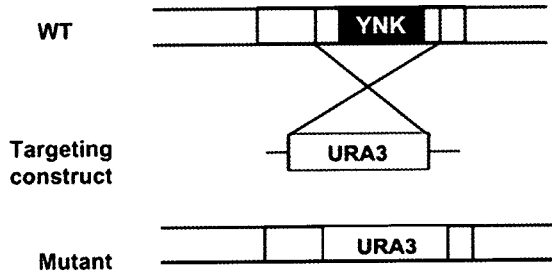


Figure 1. The strategy for construction of YNK gene disrupted by an URA3 gene.

2-D 전기영동 분석

두 종류의 정상적인 효모세포와,  $\Delta ynk$ 를 가지고, 5 mM  $H_2O_2$ 을 각각 처리한 후, 2-D 전기영동을 수행하였다(Fig. 2). 최근 발표한 논문(6) 의하면, 5 mM의 농도의 과산화수소를 처리했을 때 구조적 변화를 가져오기 때문에 이 농도를 처리하였고, 정상 균주에 과산화수소를 처리했을 때의 단백질 발현 변화된 것과,  $\Delta ynk$ 의 결과와 비교분석하기 위해 2-D 전기영동을 수행한 결과, 10개 이상의 변화된 spot을 관찰할 수 있었다. 발현의 변화를 보이는 단백질을 mass로 elution한 후, MALDI-TOF MS 분석으로 분석해 본 결과 양이 부족한 단백질 조각은 분석이 불가능하였으며, 그 외 6개의 효소에 대한 결과와 고찰을 수행하였다. Fig. 2와 Table 1에서 보는 바와 같이 Cpr1p와, Hsp의 크기는 동일하며, 이 사이즈를 1로 표시했을 때의 상대적인 크기를 비교하였다.

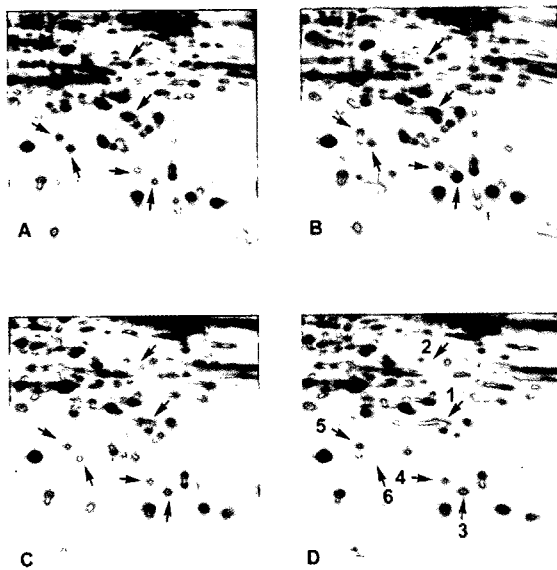


Figure 2. Protein pattern by two-dimensional electrophoretic analysis (A: Wild-type (W303a) was cultured for 24 hr at 30°C (up to OD; 0.4-0.6 at 600 nm), B: After cultured, W303a was treated with 5 mM  $H_2O_2$ . C:  $\Delta ynk$  was cultured at the same condition with A, D:  $\Delta ynk$  was treated with 5 mM  $H_2O_2$ . 1; Guk1, 2:unknown, 3;Cpr1p, 4;Hsp, 5;FKBP 6;Tdh).

Table 1. A list of oxidation related proteins in wild-type and  $\Delta ynk$

No	Gene name	W303(-)	W303(+)	$\Delta ynk$ (-)	$\Delta ynk$ (+)
1	<sup>1</sup> Guk	1.41	1.64	1.19	1
2	unknown	2.6	1.7	1	1.3
3	<sup>2</sup> Cpr1p	1	3.3	1.5	1.4
4	<sup>3</sup> Hsp	1	1.96	1.12	1
5	<sup>4</sup> FKBP	1.92	1.66	1.34	1
6	<sup>5</sup> Tdh	1.9	1.4	1.09	1

(-); no treatment, and (+); treatment with 5 mM  $H_2O_2$  (<sup>1</sup>Guk1; Guanylate kinase, <sup>2</sup>Cpr1p; Pro-isomerase (Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase), <sup>3</sup>Hsp; Heat shock protein, <sup>4</sup>FKBP; FK506-binding protein, <sup>5</sup>Tdh; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase).

MALDI-TOF MS 분석

MALDI-TOF MS 분석법에 의해 밝혀진 발현의 차이를 보이는 효소인 Guk1은 GMP를 GDP로 변환 시켜주는 역할을 하며, cell wall N-linked glycoproteins의 만노스 (mannose) 연장 사슬과 성장에 관여되는 중요한 역할을 하는 단백질이며, 효모 내에 이 유전자가 없을 경우는 세포 사멸을 초래하게 된다. purine nucleotides의 생합성을 매개하는 신호 전달에 있어 중요한 역할을 하는 이 단백질은,  $H_2O_2$ 의 처리에 의해서 미묘한 발현의 증가를 보이지만, YNK가 KO된 mutant에서는 이 유전자의 발현은 반대로 저하되는 패턴을 보인다. 그 외에도, 예상한 바와는 다르게 FKBP나 Tdh의 경우는 정상균주와  $\Delta ynk$ 에서 비교해 본 결과,  $H_2O_2$ 에 의해서 영향은 받지만, 다른 단백질에 비해서 2배 정도의 정상균주에서의 높은 발현 뿐만 아니라,  $H_2O_2$ 의 처리에 의해서도 감소의 경향을 보이며,  $\Delta ynk$ 에서는 그 발현 정도가 아주 낮아지는 패턴을 볼 수 있다.

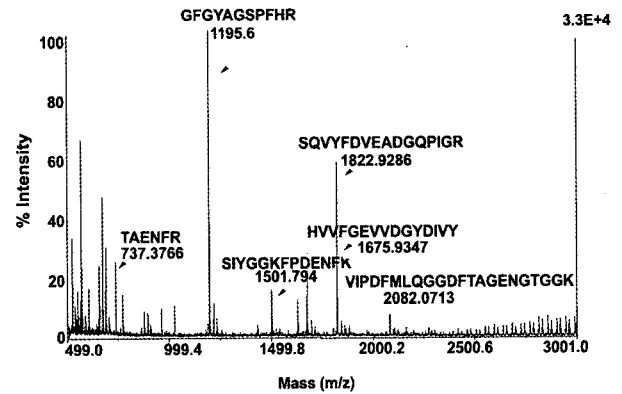


Figure 3. Analysis of MALDI-TOF MS (Cpr1p).

최근 Proteomics 저널에서 Vorum(19)가 발표한 바에 의하면 동일한 실험 방법에 의한 MALDI-TOF MS 분석에 의하여 cytoskeletal structure, glycolysis, redox status, signal transduction, transcription과 protein folding에 관여한다고 보고 되어진, Villin 2, tublin beta, profilin I, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase, peroxiredoxin 1, neuropolypeptide h3, poly(rC)-binding protein 1과 cyclophilin A.가 hyperoxia (과산소증) 상태일 때 down stream에서 조절되어지는 단백질들이라고 밝혔다.

우리의 실험 결과에 의하면, 중복되어지는 단백질이 Cpr1p (cyclophilin)과, tdh가 있다. 이 데이터들을 종합해 보면, 세포의 조절과 산화적 스트레스에 대한 세포내의 반응을 매개하는 단백질들의 역할을 구축할 수 있는 기초적인 실험을 제공할 것으로 보인다. Hsp과 Cpr1p(Fig. 3)는 정상 균주에 대해서  $H_2O_2$ 를 처리하여 ROS를 발생시킨 결과, 2배에서 3배 이상의 단백질 발현 현상을 보였으나,  $\Delta ynk$ 의 경우는 그 변화가 미비하였다. 이러한 결과를 살펴볼 때, 이 두 효소는 YNK에 대해서 직접적, 간접적으로 down stream 쪽에서 조절 받는 단백질일 것으로 예상되어진다.

## 요약

최근의 연구에 의하면 열이나, 산화적 스트레스에 대해서 NDPK는 구조적인 변화를 유발하며, 효소 활성과 구조가 oxidant에 의해 변화된다는 보고를 근거로 하여 정상적인 효모 균주와 효모의 NDPK 유전자가 파괴된 mutant에서, 산화적 스트레스에 관련된 역할을 규명하고자 2-D 전기영동 방법을 통해서,  $H_2O_2$ 의 처리전과 처리 후에 전사패턴이 변화된 유전자들, 즉, 산화적 조절 신호체계에 연관되어졌을 것이라고 생각되어지는 몇 개의 단백질 리스트를 얻었다. 이 결과는 NDPK의 redox state의 조절에 관련된 효소의 성질을 규명함에 있어 유용한 유전자 신호 체계 정보를 제공할 것으로 생각되어진다.

## 감사

본 연구는 한국학술진흥재단의 중점연구소지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다(KRF-2003-D00014).

## REFERENCES

1. Kumagai, Y., T. Wakayama, S. Lib, A. Shinohara, A. Iwamatsu, G. Sun, and N. Shimojo (2000), Zeta-crystallin catalyzes the reductive activation of 2,4,6-trinitrotoluene to generate reactive oxygen species: a proposed mechanism for the induction of cataracts, *FEBS Lett.* **478**, 295-298.
2. Tabatabaie, T. and T. A. Floyd (1996), Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **141**, 389-393.
3. Shen, Y., H. M. Shen, C. Y. Shi, and C. N. Ong (1996), Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells, *Hum. Exp. Toxicol.* **15**, 422-427.
4. Mesnildrey, S., F. Agou, and M. Vero (1997), The in vitro DNA binding properties of NDP kinases are related to its oligomeric state, *FEBS Lett.* **418**, 53-57.
5. Leung, S. M. and L. F. Hightower (1997), A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the nm23/nucleoside diphosphate kinase family, *J. Biol. Chem.* **272**, 2607-2614.
6. Song, E. J., Y. S. Kim, J. Y. Chung, E. Kim, S. K. Chae, and K. J. Lee (2000), Oxidative modification of nucleoside diphosphate kinase and its identification by Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization time of flight mass spectrophotometry, *Biochemistry* **39**, 10090-10097.
7. Chakrabarthy, A. M. (1998), Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signaling and polysaccharide synthesis, *Mol. Microbiol.* **28**, 875-882.
8. Cippollini, G., A. Berti, L. Fiore, G. Rainaldi, F. Basolo, G. Merlo, G. Beveilaqua, and M. Galigo (1997), Down regulation of the nm23.h1 gene inhibits cell proliferation, *Int. J. Cancer* **73**, 297-302.
9. Engel, M., M. Seifert, B. Theisinger, U. Seyfert, and C. Welter (1998), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and NM23-H1/nucleoside diphosphate kinase A: two old enzymes for the novel Nm23 protein phosphotransferase function, *J. Biol. Chem.* **273**, 20058-20065.
10. Postel, E. H., S. J. Berberich, J. Flint, and C. A. Ferone (1993), Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumour metastasis, *Science* **261**, 478-480.
11. Choi, G., H. Yi, J. Lee, Y. K. Kwon, M. S. Soh, B. Shin, Z. Luka, T. R. Hahn, and P. S. Song (1999), Phytochrome signaling is mediated through nucleoside diphosphate kinase2, *Nature* **401**, 610-613.
12. Zimmermann, S., A. Baumann, K. Jaekel, I. Marbach, D. Engelberg, and H. Frohnmeyer (1999), UV responsive genes of arabidopsis revealed by similarity to the Gcn4-mediated UV response in yeast, *J. Biol. Chem.* **274**, 17017-17024.
13. Escobar-Galvis, M. L., S. Martilla, G. Hakansson, J. Forseberg, and C. Knorpp (2001), Heat stress response in pea involves interaction of mitochondrial nucleoside diphosphate kinase with a novel 86 kD protein, *Plant Physiol.* **126**, 69-77.
14. Barthel, T. K. and G. C. Walker (1999), Inferences concerning the ATPase properties of DnaK and other HSP70s are affected by the ADP kinase activity of the co-purifying nucleoside diphosphate kinase, *J. Biol. Chem.* **274**, 36670-36678.
15. Davidson, J. F., B. Whyte, P. H. Bissinger, and R. H. Schiestl (1996), Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *S. cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5116-5121.
16. Sherman, F. (1991), Getting started with yeast, *Met. Enzymol.* **194**, 12-17.
17. Elble, R. (1992), A simple and an efficient procedure for transformation of yeast, *BioTechniques* **13**, 18-22.
18. Kim, S. T., K. S. Cho, Y. S. Jang, and K. Y. Kang (2001), Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays, *Electrophoresis* **22**, 2103-2109.
19. Vorum, H., M. Ostergaard, P. Hensechke, J. J. Enghild, M. Riazati, and G. E. Rice (2004), Proteomic analysis of hyperoxia-induced responses in the human choriocarcinoma cell line JEG-3, *Proteomics* **4**, 861-867.