

## 종양 억제 인자, Merlin의 FERM 도메인과 C-말단 도메인간의 결합

강범식\* · 오정일<sup>1</sup>

경북대학교 자연과학대학 생명공학부, <sup>1</sup>부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Received September 10, 2007 / Accepted September 17, 2007

**Interaction of FERM Domain of Tumor Suppressor, Merlin to its C-terminal Domain.** Beom Sik Kang\* and Jeong Il Oh<sup>1</sup>. *School of Life Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-736, Korea* - A tumor suppressor, merlin is a member of ERM family proteins. It consists of N-terminal FERM domain,  $\alpha$ -helical region, and C-terminal domain. Alternative splicing of merlin's mRNA generates two isotypes of merlin. Isotype I, which has exon17 at the C-terminus instead of exon16 in isotype II, is known to have tumor suppressor activity. Like other ERM proteins, the C-terminal domain of merlin isotype I interacts to its FERM domain. That of isotype II, however, was reported not to bind FERM domain despite the large common part of C-terminal domain, which possibly binds FERM domain. Here, we show the binding of FERM domain to both C-terminal domains of merlin's two isotypes by isothermal titration calorimetry. These results support that merlin isotype II also can form a closed conformation or a multimer by intramolecular or intermolecular interactions using their FERM domain and C-terminal domain.

**Key words** – Merlin, ERM, tumor suppressor, isothermal titration calorimetry

### 서 론

Neurofibromatosis (NF)는 신경계를 따라 다수의 종양을 형성시키는 원인이 되는 유전질환이다. 이 질환은 이명, 청각 장애, 균형기능장애와 관련된 양측성 전정슈반세포종(bilateral vestibular schwannoma)으로 특징지어지며 다른 증상으로는 두개신경과 말초신경의 슈반세포종, 수막종과 연소성후낭하백내장이 있다[4]. 또한 뼈나 피부 등 다른 조직에도 영향을 미쳐 다양한 비정상적 발생을 유도하기도 한다. 이 질환은 1882년 F. von Recklinghausen에 의해 처음 알려졌으며 두 가지 구별되는 종류, NF1과 NF2가 있다[1,26]. NF1은 피부에 나타나는 다수의 반점과 neurofibromas로 특징지어지며 간혹 신경계의 종양을 형성하기도 한다. NF2의 경우, 두개골과 척추신경에서 종양이 발생함으로 인해 뇌와 척수에 손상을 준다. NF2는 전형적으로 청신경계에 영향을 미쳐 bilateral acoustic NF라 불리기도 한다[11]. 이 질환은 한 개의 유전자의 이상이 원인인 가장 흔한 신경계의 질환으로 우성유전을 하며 환자의 반은 새로운 유전자의 mutation에 의한 결과이고 변형된 유전자가 유전될 확률은 50%이다. NF2 유전자에는 25개가 넘는 종양과 연관된 mutation이 발견되었는데[16], 이 중 유전자산물의 일부가 잘린 mutation은 심한 표현형을 보여주며 missense mutation은 완화된 표현형을 보여 준다[12,24].

NF2 유전자의 위치는 chromosome 22q에 위치하며 그 산물은 아미노산 595개 크기인 단백질로 actin-cytoskeleton associated protein으로 알려진 4.1 band protein에 속한다[6]. 특히, ERM 단백질이라 불리는 erzin, radixin, moesin과 상당한 아미노산서열의 유사성을 갖고 있어 ERM family에 포함시키며 merlin (moesin, erzin, radixin like protein)이라고 부른다[19,20,22]. ERM 단백질과 merlin은 3개의 도메인으로 이루어져 있다. FERM 도메인이라 불리는 구형의 N-말단 도메인은 약 300 아미노산으로 이루어져 있으며 이들 family 안에서 상당히 잘 보존되었다(Fig. 1). 이밖에 150 개 정도의 아미노산으로 구성된 중간의  $\alpha$ -helical 부분과 약 100개의 C-말단 도메인으로 구성되었으며 merlin의 경우는 C-말단 부위가 다른 ERM 단백질과 약간의 차이를 가지고 있다(Fig. 1). ERM 단백질은 C-말단 도메인의 끝부분에 actin이 결합하는 것으로 알려져 있는데 이 C-말단은 FERM 도메인보다 결합할 수 있어 한 분자 내에서 N-와 C-말단이 결합된 단량 구조를 형성할 수 있을 뿐만 아니라 다른 분자와 결합하여 dimer를 형성하거나 여러 분자가 연결된 multimer를 형성할 수도 있는 것으로 알려져 있다[2,5,23]. 따라서 이들 단백질은 세포 내에서 FERM 도메인 결합물질과 actin을 연결하는 linker 단백질로서의 역할을 할 것으로 기대된다. ERM 단백질의 C-말단 도메인은 actin과 결합하는데 비해 merlin은 actin과의 결합에 FERM 도메인과  $\alpha$ -helical 부위가 관여하는 것으로 보고 되어 있으나 C-말단 도메인이 FERM 도메인에 결합하는 것은 동일하다고 알려져 있다. 또한 FERM 도메인의 유사성으로 인해 ERM 단백질과 merlin의 FERM 도메인은 서로 다른

\*Corresponding author

Tel : +82-53-950-6357, Fax : +82-53-943-2762

E-mail : bskang2@knu.ac.kr

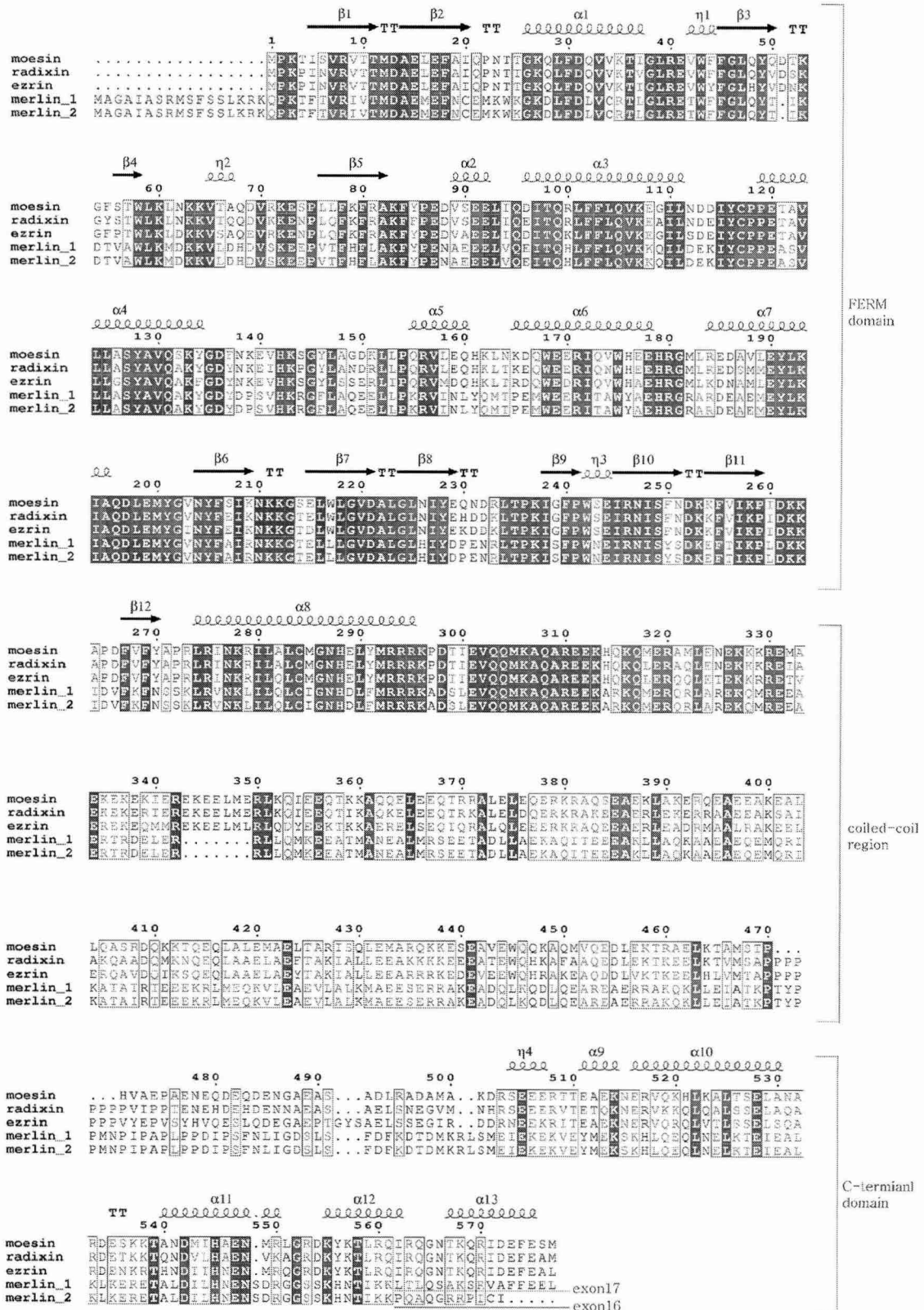


Fig. 1. Sequence alignment of merlin with ERM proteins. Amino acid sequences of moesin, ezrin, radixin and merlin isotype I and II were aligned. Earlier shown alignments are elements of secondary structure of moesin. FERM domain and C-terminal domain are indicated. Sequences of exon 16 and 17 of merlin are underlined. Conserved residues are in red background. Multiple alignment was done using ClustalW software and visualized using ESPrpt software.

단백질의 C-말단도메인과 결합하여 heterodimer나 heteromultimer를 형성할 수도 있는 것으로 알려져 있다. 특히 moesin의 FERM 도메인과 C-말단 도메인의 결합구조가 밝혀져짐으로서 moesin 분자 내 상호작용이나 분자 간 상호작용의 형태에 대한 이해가 가능해졌을 뿐만 아니라 다른 ERM 단백질과 merlin의 결합형태도 추측할 수 있게 되었다.

Merlin 유전자는 모두 17개의 exon으로 구성되어 있으며 두 종류의 유전자산물, merlin isotype I과 isotype II가 생성된다[3,7,18]. 이것은 alternative splicing의 결과로 exon 16이 결핍된 형태인 isotype I은 tumor suppressor의 기능이 있는 것으로 알려져 있으며, isotype II는 exon16을 갖는 대신 종결코돈으로 인해 exon 17을 포함하지 않는 형태이다(Fig. 1). 따라서 이 두 종류간의 차이는 C-말단 도메인 마지막 끝 쪽이며 이 작은 부위의 차이에 의해 merlin의 암 억제 기능의 유무의 차이를 보여준다. 또한 C-말단 잔기의 차이로 인해 FERM 도메인과의 결합에 있어 isotype I의 C-말단 도메인은 결합이 되고 isotype II는 결합되지 않는 것으로 알려져 있다. 그러나 moesin의 FERM도메인과 C-도메인의 결합구조에서 보여진 것과 같이 C-말단뿐 만 아니라 C-말단 도메인의 전체가 FERM 도메인을 둘러싸는 구조이기에 merlin의 경우도 FERM 도메인과 C-말단 도메인이 같은 형태로의 결합될 것으로 추정된다. 이럴 경우 merlin isotype II는 isotype I에 비해 C-말단의 6개의 아미노산잔기가 적지만 FERM 도메인과의 결합에 이용되는 대부분의 C-말단 도메인부분을 공통적으로 가지고 있기 때문에 merlin isotype II에 있어서도 moesin에서 보여진 것과 같이 C-말단 도메인의 대부분을 이용하여 FERM 도메인과 결합할 수 있을 것으로 여겨진다. ERM 단백질에 있어 열린 구조와 닫힌 구조 사이의 형태변환이 이들의 기능조절에 중요하기에 merlin에 있어서도 FERM 도메인과 C-말단 도메인간의 결합여부를 정확히 알아내는 것은 이들의 세포내 역할, 즉 암 억제자로서의 작용기전을 알아내는 데 매우 중요하다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 C-말단의 아미노산 서열이 서로 다른 merlin의 두 가지 isotype을 대상으로 각각의 C-말단 도메인과 FERM 도메인의 결합력을 측정하였다.

Merlin의 isotype I의 유전자는 ATCC로부터 구입하였으며 isotype II의 유전자는 exon16 해당하는 부분을 primer로 합성한 후 isotype I의 유전자에서 exon 17부분과 치환하여 얻었다. Merlin의 FERM 도메인 유전자를 PCR을 통하여 증폭하여 GST-parallel vector [17]에 클로닝한 후, 재조합된 플라스미드를 대장균 BL21-RIL strain (Stratagene)에 도입하였다. 형질 전환된 대장균을 LB 배지에서 3시간 진탕배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 재조합단백질의 발현을 유도한 후 18°C에서 계속 배양하여 수용성인 GST-fusion 단백질형태로 다량 발현시켰다. Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare)를 이용하여 융합단백질을 정제하였으며 rTEV (Invitrogen)

로 자른 후 GST-tag를 제거하여 FERM 도메인을 순수 정제하였다. 두 isotype의 C-말단 도메인은 PCR을 통하여 각각 증폭한 후 pHis-parallel vector [17]에 클로닝 하였으며, 재조합된 단백질을 Ni-NTA agarose (Qiagen)를 이용하여 정제하고 rTEV를 이용하여 hexa-His tag를 잘라내었다. Tag가 제거된 단백질은 Sephadex G-75 (GE Healthcare)를 통하여 순수정제 하였다. 정제된 단백질은 Centriprep (Amicon)을 이용하여 농축시켰다. 정제된 FERM 도메인과 C-말단 도메인을 isothermal titration calorimetry를 이용한 열량측정에 적합하도록 150 mM의 NaCl을 포함한 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) 완충용액을 이용하여 투석시켰다. 모든 적정실험은 13°C에서 수행하였다.

먼저 단백질간의 결합이 없을 때에 측정되는 열량변화를 알아보기 위해 Merlin의 FERM 도메인을 완충용액으로 적정하였을 때 발생하는 열을 측정하였다. 열량측정기의 셀에 1.7 mg/ml로 농축된 FERM 도메인을 넣고 완충용액을 주사기를 통해 10  $\mu$ l씩 16회에 걸쳐 주입하면서 발생하는 열량을 측정하였다. 이때 측정된 반응열은 0.05  $\mu$ cal/sec이하이며 전회에 걸쳐 발생하는 열량의 변화는 거의 없었다(Fig. 2A). Merlin의 FERM 도메인과 isotype I의 C-말단 도메인의 결합 특성을 조사하기 위해 0.7 mg/ml로 농축된 FERM 도메인을 셀에 넣고 6.9 mg/ml로 농축된 isotype I의 C-말단 도메인을 주사기 넣고 8  $\mu$ l씩 15회에 걸쳐 주입하면서 발생하는 열량을 측정하였다(Fig. 2B). 이 결과 초기에는 0.2  $\mu$ cal/sec 정도의 열량이 측정되었으며 적정이 끝나는 부분에서는 발생하는 열량이 감소하였다. 이러한 발생하는 열량의 변화는 단백질-단백질간의 결합이 있음을 의미한다. 적정 결과 두 도메인간의 결합이 1:1 stoichiometry임을 알 수 있으며 이 때의  $K_d$  값은 96 nM로 측정되었다. 따라서 isotype I은 FERM 도메인이 C-말단 도메인과 결합하여 한 분자 내에서 닫힌 형태의 구조형성이 가능하며 다른 분자와의 상호작용으로 head-to-tail의 multimer로도 존재할 수도 있다. 또한  $\mu$ M 수준 이하의  $K_d$  값으로 이들 간의 결합은 실제 세포내에서도 의미가 있는 수준이다. 그 다음 merlin의 FERM 도메인과 isotype II의 C-말단 도메인간의 결합을 측정하였다. 1.4 mg/ml 농도의 FERM 도메인을 셀에 넣고 14 mg/ml로 농축된 C-말단 도메인을 주사기에 넣고 8  $\mu$ l 씩 14회에 걸쳐 주입하였다. 적정 시 발생하는 열량의 변화를 측정된 결과, 적정이 완료되었을 때에 비해 적정 초기에는 0.2  $\mu$ cal/sec 정도의 열량의 변화가 측정되었다(Fig. 2C). 열량의 변화를 통하여 측정된 두 도메인간의 결합은 1:1 stoichiometry이고  $K_d$  값은 0.25  $\mu$ M 이다. 따라서 isotype II의 C-말단 도메인의 경우도 하나의 FERM 도메인과 결합하는 것을 알 수 있었으며 isotype I의 경우와 마찬가지로 분자 내 상호작용으로 닫힌 구조의 형태로 존재할 수 있으며 분자 간 상호작용으로 multimer를 형성할 수도 있다. 또한  $\mu$ M 이하수준의 결합력으로

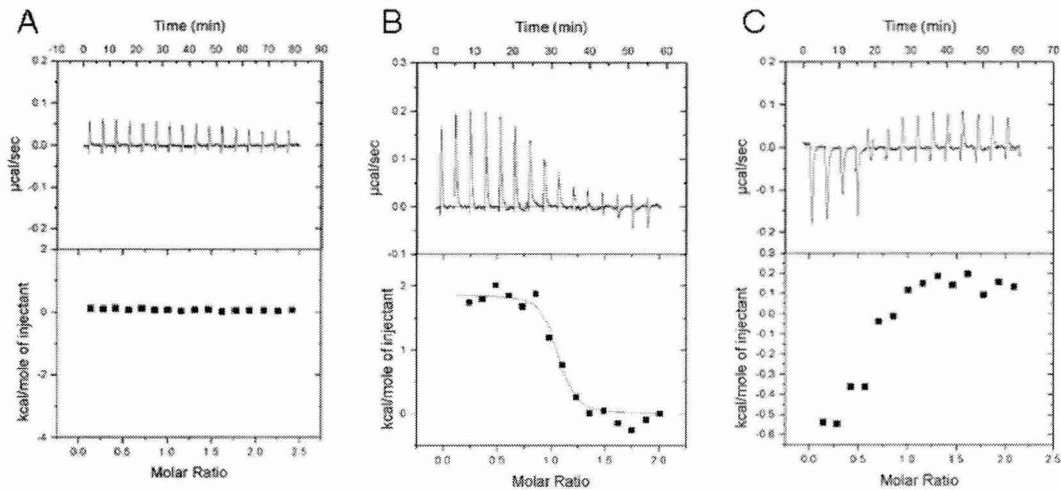


Fig. 2. Calorimetric titration of FERM domain of merlin with buffer (A), merlin C-terminal domain of isotype I (B) or isotype II (C). The upper panels contain the raw data and the lower panels indicate the peak-integrated, concentration-normalized heats of reaction versus the molar ratio of titrant to FERM domain.

isotype II의 C-말단 도메인을 통한 결합도 세포내에서 유의할 수준임을 알 수 있다.

Yeast two-hybridization 방법이나 immunoprecipitation과 pulling down같은 실험을 통해 단백질간의 결합을 측정할 때에는 그 결합력이 약한 경우 세척조건의 세기에 따라 그 결합이 무시될 가능성이 있다. 특히 일반적인 리간드와 수용체간의 보여 지는 강한 결합력에 비해 낮은 결합력을 보이는 세포내 신호전달체간의 결합을 정확하게 측정하는 것은 쉽지 않다. 따라서 merlin isotype II의 C-말단 도메인과 FERM 도메인간의 결합은 isotype I에 대해 상대적으로 약한 결합력으로 인해 간과되었을 가능성을 배제할 수 없다. 세포내에서 on-off의 전환이 신속해야하는 신호전달계의 단백질간의 결합에서 대부분 낮은 수준의 결합력을 보이는 것을 고려할 때 merlin의 C-말단 도메인과 FERM 도메인 사이에서 측정된 결합력은 의미 있는 크기로 merlin은 isotype I 뿐만 아니라 isotype II도 다양한 형태의 oligomerization이 가능함을 의미한다. 두개의 merlin isotype간의 heterodimer의 형성도 가능하며 다른 ERM family 단백질과의 이형복합체를 형성이 가능하다. 따라서 merlin의 isotype I에서만 보이는 tumor repressor로서의 역할에서 두 isotype에서 모두 가능한 FERM 도메인과 C-말단 도메인과의 결합보다는 isotype I의 C-말단 끝의 아미노산 서열에 의한 가능성이 높아 보인다.

현재 세포내에서 merlin과 ERM 단백질과 연결되는 upstream과 downstream의 단백질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있으며 여러 단백질들이 이들의 상대단백질로 알려져 있다. ERM 단백질의 FERM 도메인은 CD44, CD43, ICAM1, ICAM2, NHE-RF 같은 막 단백질 리간드와 결합하며 merlin은 N-말단 FERM 도메인의 유사성으로 이들과의 상호작용이 예상된다[8,14,15,21,27]. 또한 merlin과 ERM 단백질의 N-말단 도메인은 RhoGDI (Rho type small GTPase

의 GDP nucleotide dissociation 억제단백질)와도 연결되는데[13,24] 이는 merlin과 ERM 단백질의 신호전달체계에서 small cytosolic Rho GTPase인 Rac과 Rho, Cdc42가 연관되어 있다는 것을 암시한다. 그러나 다른 ERM family 단백질과는 달리 merlin만이 tumor suppressor의 기능이 있기 때문에 merlin에 특이적인 결합상대가 있을 것이 추정된다. 특히, C-말단에 차이를 보이는 isotype I에만 나타나는 종양 억제작용을 고려할 때 C-말단과의 결합의 기능을 갖는 PDZ 도메인을 갖는 단백질과의 결합이 중요할 수 있다. 따라서 PDZ 도메인을 갖는 syntenin이 merlin과 결합한다는 사실은 매우 주목할 만한 것이다. Syntenin은 유방암 및 위암세포에서 다량 발견되며 암의 전이를 촉진하는 것으로 알려져 있다[9,10]. 종양 억제기능이 없는 것으로 알려진 merlin isotype II의 경우도 C-말단 도메인이 FERM 도메인과 결합할 수 있다는 본 연구의 결과는 merlin의 종양 억제인자의 기능이 FERM 도메인과 C-말단 도메인의 결합에 의한 열린 구조-닫힌 구조간의 형태적인 변화보다는 C-말단의 아미노산잔기에 결합하는 단백질과의 상호작용에 의해 조절될 것임을 암시해 준다. 따라서 syntenin과 같은 단백질과의 결합에 대한 연구는 향후 merlin의 종양 억제기능을 밝히는데 중요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음. (KRF-2004-041-E00035)

## 참고 문헌

1. Baser, M. E., D. G. Evans and D. H. Gutmann. 2003.



- Neurofibromatosis 2. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 27-33.
2. Berryman, M., R. Gary and A. Bretscher. 1995. Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J. Cell Biol.* **131**, 1231-1242.
  3. Bianchi, A. B., T. Gara, V. Ramesh, J. Gao, A. J. Klein-Szanto, F. Morin, A. G. Menon, J. A. Trofatter, J. F. Gusella and B. R. Seizinger. 1994. Mutations in transcript isoforms of the neurofibromatosis 2 gene in multiple human tumour types. *Nat. Genet.* **6**, 185-192.
  4. Evans, D. G., M. Sainio and M. E. Baser. 2000. Neurofibromatosis type 2. *J. Med. Genet.* **37**, 897-904.
  5. Gary, R. and A. Bretscher. 1993. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10846-10850.
  6. Gutman, D. H. 1997. Molecular insights into neurofibromatosis 2. *Neurobiol. Dis.* **3**, 247-261.
  7. Hara, T., A. B. Bianchi, B. R. Seizinger and N. Kley. 1994. Molecular cloning and characterization of alternatively spliced transcripts of the mouse neurofibromatosis 2 gene. *Cancer Res.* **54**, 330-335.
  8. Heiska, L., K. Alftan, M. Gronholm, P. Vilja, A. Vaheri and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 21893-900.
  9. Jannatipour, M., P. Dion, S. Khan, H. Jindal, X. Fan, J. Laqaniere, A. H. Chishti and G. A. Rouleau. 2001. Schwannomin isoform-1 interacts with syntenin via PDZ domains. *J. Biol. Chem.* **276**, 33093-33100.
  10. Koo, T. H., J. J. Lee, E. M. Kim, K. W. Kim, H. D. Kim and J. H. Lee. 2002. Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cell lines. *Oncogene* **21**, 4080-4088.
  11. Li, Y., G. Bollag, R. Clark, J. Stevens, L. Conroy, D. Fults, K. Ward, E. Friedman, W. Samowitz and M. Robertson. 1992. Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in human tumors. *Cell* **69**, 275-281.
  12. Lutchman, M. and G. A. Rouleau. 1996. Neurofibromatosis type 2: a new mechanism of tumor suppression. *Trends Neurosci.* **19**, 373-377.
  13. Maeda, M., T. Matsui, M. Imamura, S. Tsukita and S. Tsukita. 1999. Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene* **18**, 4788-4797.
  14. Murthy, A., C. Gonzalez-Agosti, E. Cordero, D. Pinney, C. Candia, F. Solomon, J. Gusella and V. Ramesh. 1998. NHE-RF, a regulatory cofactor for Na(+)-H+ exchange, is a common interactor for merlin and ERM (MERM) proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 1273-1276.
  15. Pestonjamas, K., M. R. Amieva, C. P. Strassel, W. M. Nauseef, H. Furthmayr and E. J. Luna. 1995. Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol. Biol. Cell* **6**, 247-259.
  16. Rouleau, G. A., P. Merel, M. Lutchman, M. Sanson, J. Zucman, C. Marineau, K. Hoang-Xuan, S. Demczuk, C. Desmaze and B. Plouqastel. 1993. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* **363**, 515-521.
  17. Sheffield, P., S. Garrard and Z. Derewenda. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "Parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* **15**, 34-39.
  18. Sherman, L., H. M. Xu, R. T. Geist, S. Saporito-Irwin, N. Howells, H. Ponta, P. Herrlich and D. H. Gutmann. 1997. Interdomain binding mediates tumor growth suppression by the NF2 gene product. *Oncogene* **15**, 2505-2509.
  19. Trofatter, J. A., M. M. MacCollin, J. L. Rutter, J. R. Murrell, M. P. Duyao, D. M. Parry, R. Eldridge, N. Kley, A. G. Menon and K. Pulaski. 1993. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* **72**, 791-800.
  20. Tsukita, S. and S. Yonemura. 1997. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 70-75.
  21. Tsukita, S., K. Oishi, N. Sato, J. Sagara, A. Kawai and S. Tsukita. 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* **126**, 391-401.
  22. Tsukita, S., S. Yonemura and S. Tsukita. 1997. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 53-58.
  23. Turunen, O., M. Sainio, J. Jaaskelainen, O. Carpen and A. Vaheri. 1998. Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **1387**, 1-16.
  24. Turunen, O., T. Wahlstrom and A. Vaheri. 1994. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J. Cell Biol.* **126**, 1445-1453.
  25. Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takahashi, T. Kameyama, S. Tsukita and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 23371-23375.
  26. Xu, G. F., P. O'Connell, D. Viskochi, R. Cawthon, M. Robertson, M. Culver, D. Dunn, J. Stevens, R. Gesteland and R. White. 1990. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**, 599-608.
  27. Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Hondo, S. Tsukita and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* **140**, 885-895.