

Bacterial Expression of Cytochrome b₅ Type III Pseudogene

Sun Ah Baek, Su Won Kim, Jong won Kim and Min Yoo[†]

Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Cytochrome b₅ is involved in the reduction of methemoglobin back to hemoglobin, thereby maintaining normal function of the blood to carry oxygen around. Congenital abnormal condition of this enzyme causes a rare disease called methemoglobinemia. At least 4 different retropseudogenes are reported so far for cytochrome b₅. However, type III pseudogene has attracted most attention because it contains open reading frame in its structure. Although there is no evidence yet if this pseudogene is actually expressed in the cell or the blood the possibility of its expression needs to be elucidated. We have isolated type III pseudogene by polymerase chain reaction and cloned into pGEX-4T-1 expression vector followed by SDS-PAGE. Protein was expressed and the size of the expressed protein was 28 kDa as expected in its genetic code. This result also shows that the protein is not harmful for the viability of the microorganism. This study may contribute to the genetic diagnosis of cardiac diseases, possibly caused by cytochrome b₅.

Key Words: Cytochrome b₅, Congenital cardiac disease, Retropseudogene

Cytochrome b₅ (b₅)는 막단백질로서, 모양이 작고 원통형이다. 헤모단백질 (hemoprotein)로서 생체조직에서 산화환원반응에 관여하여 전자를 전달하는 기능을 한다 (Mathews, 1985). 이 효소는 신체 여러 조직에서 발견되는데 특히 간과 적혈구에서 정상적인 생리 현상을 유지하는데 역할이 크다고 보고되어 있다 (Perrin 1994; Lee et al., 2003; Lin et al., 2006). 특이하게도 적혈구에서는 막결합부위가 없어 세포질에 그냥 떠있는 형태이다. 이 효소는 적혈구에서 b₅ reductase와 함께 methemoglobin을 hemoglobin으로 환원시켜서 혈액의 주요기능인 산소 운반 작용을 정상적으로 유지시켜준다 (Vergères et al., 1995; Porter 2002; Schenkman and Jansson, 2003). Methemoglobin은 헤모글로빈의 제이철이온 (ferrous ion, Fe²⁺)이 제이철이온 (ferric ion, Fe³⁺)으로 산화되어 형성되는 산물로서 산소 운반 능력이 없다 (Park, 2007). Methemoglobinemia는 전 세계적으로 발견되는 질환이며 1948년 독일에서 met-

hemoglobinemia 증세를 나타내는 가족력이 발견되면서 유전될 수 있다는 것이 알려졌다. Methemoglobinemia는 청색증, 두통, 피로감, 정신박약 등의 증상을 나타내며 심하면 사망을 초래하기도 한다.

사람에게서 그 동안 b₅ pseudogene이 여러 개 발견되었다 (Yoo et al., 1993). Type I과 type II가 1989년에 보고되었으며 (Yoo and Steggle, 1989), type III가 1993년에 계속해서 보고되었다 (Yoo and Kim, 1993). 특징적으로 type II는 개시코돈과 종료코돈 및 완벽한 해석틀 (reading frame)을 포함하고 있어 pseudogene임에도 불구하고 발현될 가능성이 높지만 아직 그 여부는 확인된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 조직 차원에서 심혈관계 질환을 일으키는 iNOS 유전자와, 세포 차원에서 영향을 미치는 b₅ 유전자 중 type III pseudogene에 대해 유전자 분석을 시도하였다.

먼저 λ vector에 클로닝된 pseudogene clone을 분리하기 위해 숙주세포로 Y1090균을 사용하였으며, bacteriophage library 원액을 만들기 위해 phage 원액을 SM 용액에 100 배로 희석하였다. Phage DNA를 분리한 후, PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 pre-denaturation 반응은 94°C에서 5분, denaturation 반응을 94°C에서 30초, annealing 반응을 58.2°C에서 30초, extension 반응을 72°C에서 30초씩 모두 35회 실시하였다. Post-extension 반응은 72°C에

*Received: January 26, 2012 / Revised: June 27, 2012
Accepted: June 27, 2012

[†]Corresponding author: Min Yoo. Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
Tel: +82-53-580-5537, Fax: +82-53-580-5953
e-mail: ymin@kmu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

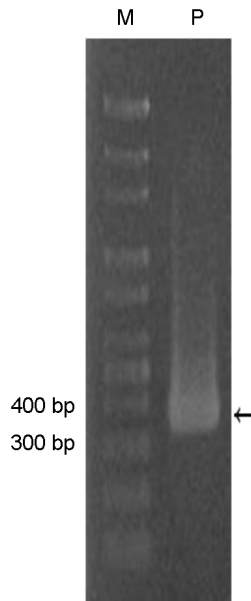


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product (M: 100 bp DNA ladder, P: Insert of PB5-F PCR product).

서 7분간 유지하였다. PCR 반응이 끝난 후 그 산물을 pGemT-easy vector에 *EcoRI*과 *XhoI*을 사용하여 cloning하였다.

제조합 단백질을 만들기 위해 발현 vector pGEX-4T-1의 multicloning 부위를 고려하여 미리 sense primer에는 *EcoRI* 제한효소 염기서열을, antisense primer에는 *XhoI* 제한효소 염기서열을 삽입하여 제작하였다. 염기의 수에 따라 해석틀이 달라지므로 3F1, 3F2, 3F3의 3종류의 primer를 제작하여 각각 PCR하였다. 발현 vector에 PCR 산물들을 클로닝 하였고 밴드를 확인한 후 염기서열을 다시 결정하였다. 이때 사용한 sequencing primer는 pGEX-4T-1의 지도에 보고된 것과 같은 염기서열로 제작하였다. 발현된 Type III b₅ pseudogene 단백질을 확인하기 위하여 계산상 3F1 primer로 증폭시킨 염기서열들이 해석틀에 맞기에 IPTG로 발현을 유도하여 SDS-PAGE로 관찰하였다. 대조군으로는 IPTG를 처리하지 않은 3F1 primer가 삽입된 expression vector를 사용하였다.

실험의 결과, 원액의 phage 수는 2×10^9 pfu/ml로 계산되었다. Phage DNA를 분리하여 전기영동한 결과 DNA가 관찰가능한 양으로 분리된 것을 확인하였다. PCR product를 전기영동하여 band가 약 350 bp에 나타나는 것을 확인하였으며 (Fig. 1), pseudogene이 제대로 클로닝된 것을 PCR 반응으로 확인하고 DNA sequencing을 실시하였다. 그 결과 우리가 원하는 type III b₅ pseudogene이 제

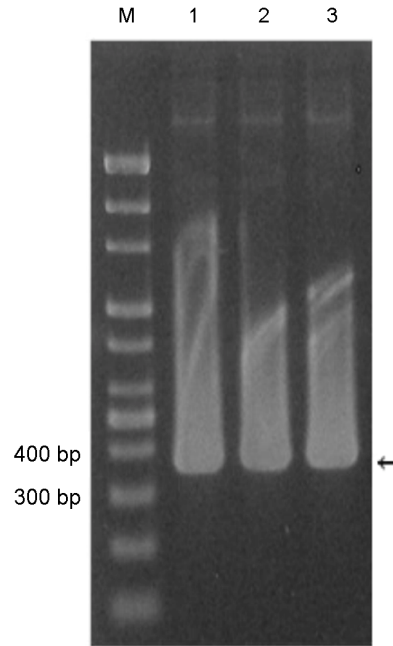


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products (M: 100 bp DNA ladder. 1: Insert of PB5-3F1 PCR product, 2: Insert of PB5-3F2 PCR product, 3: Insert of PB5-3F3 PCR product).

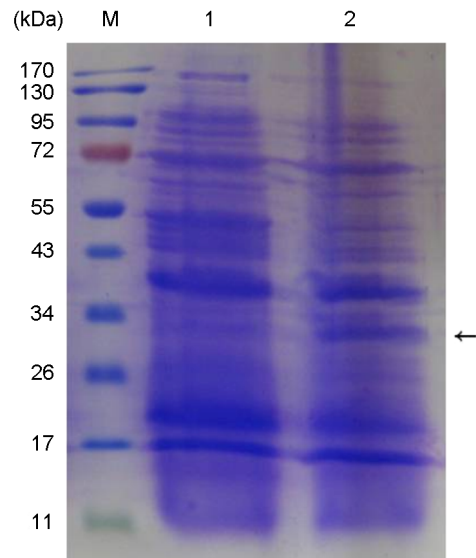


Fig. 3. SDS-PAGE of expressed type III b₅ pseudogene protein fused to GST (M: Protein size Markers. 1: 3F1 primer-protein without IPTG treatment, 2: 3F1 primer-protein with IPTG treatment). Arrow indicates the expressed type III b₅ pseudogene protein (ca 28 kDa).

대로 클로닝된 것이 확인되었다.

제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*을 사용하여 vector를 자르고 PCR product를 cloning한 후 LB amp 배지에 도말한 결과

콜로니가 10여 개 자라난 것이 확인되었다. 이 중 1개의 콜로니를 임의로 선택하여 plasmid DNA를 분리하였고 제작한 primer로 증폭시킨 결과 예상과 맞게 약 350 bp에서 밴드가 나타났다. 염기가 1~2개 추가된 primer인 3F2와 3F3의 PCR 결과도 전기영동상으로는 3F1의 밴드와 크기에서 별다른 차이가 없었다 (Fig. 2). 그러나 DNA sequencing 결과에서는 이들 3개 primer의 PCR product들이 확연하게 달랐다. 예상대로 3F1, 3F2, 3F3의 product들은 모두 한 개 염기만큼씩 차이가 있었다. 당연히 이들 모두 5'-end에는 *EcoRI* 부분을 포함하고 있었으며 3'-end에는 *XhoI* 부분을 포함하고 있었다. 이 중 3F1 primer로 형질전환된 콜로니를 IPTG로 발현을 유도시킨 결과 대조군과 실험군 모두에서 약 37 kDa 위치에서 단백질 밴드가 관찰되었다. 그리고 실험군에서만 약 28 kDa 위치에 뚜렷한 band가 확인되었다 (Fig. 3). 발현시키고자 하는 단백질의 크기는 61개 아미노산이기에 약 28 kDa의 단백질을 만들어 낼 것으로 예상되었고 이는 실험 결과와 정확히 일치하는 것이었다.

본 연구를 통해 type III b_5 pseudogene의 단백질을 *E. coli*에서 발현시키는데 성공하였다. 본 연구는 b_5 의 선천성이상으로 인해 심혈관계 질환으로 고통 받는 환자들을 유전자차원에서 진단하고 치료하기 위한 발판을 마련하는 데에 기여할 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Lee YS, Han OK, Shin SW, Park JH, Kwon YK. Effect of Water-Extracted *Cyperus Rotundus* on the Nitric Oxide Production and Cytokine gene Expression. *Kor J Oriental Pathol.* 2003. 17: 771-776.
- Lin YW, Zhao DX, Wang ZH, Yu WH, Huang ZX. Expression of lipase-solubilized bovine liver microsomal cytochrome b_5 in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase fusion protein (GST-*cytb_5*). *Protein Expr Purif.* 2006. 45: 352-258.
- Mathews FS. The structure function and evolution of cytochromes, *Prog. Biophys Mol Biol.* 1985. 45: 1-56.
- Park SS, Nam EM, Kim IH, Kim JS, Lim YJ, Ahn SJ. A case of methemoglobinemia caused by hair dyeing henna. *Kor Int Med.* 2007. 72: S314-S317.
- Perrin CW. Genetic Diseases of Steroid Metabolism. *Vitam Horm.* 1994. 49: 131-195.
- Porter TD. The roles of cytochrome b_5 in cytochrome P450 reactions. *J Biochem Mol Toxicol.* 2002. 16: 311-316.
- Schenkman JB, Jansson I. The many roles of cytochrome b_5 . *Pharmacol Ther* 2003. 97: 139-152.
- Vergèresb G, Waskell L. Cytochrome b_5 , its functions, structure and membrane topology. *Biochimie.* 1995. 77: 604-620.
- Yoo M, Steggles AW. The characterization of three types of partially processed mRNA and two pseudogenes for human liver cytochrome b_5 . *Biochem. Biophys Res Commun.* 1989. 163: 18-24.
- Yoo M, Kim DJ, Steggles AW. Complete nucleotide sequence of type III pseudogene for human cytochrome b_5 . *Kor Biochem J.* 1993. 26: 168-171.
- Yoo M, Kim DJ. Isolation and characterization of retropseudogene for human cytochrome b_5 . *Molecular and Cells.* 1993. 88: 8870-8874.