KISEP Experimental Researchs J Korean Neurosurg Soc 29 : 1283-1288, 2000

GFP를 이용하여 in-vivo에서 추적한 Bad와 Bcl-XL의 Mitochondria 이동

아주대학교 의과대학 신경외과학교실
윤수한 · 김진영 · 박승우 · 안영환 · 안영민 · 조기홍 · 조경기

= Abstract =

Bad Translocation to Mitochondria with Bcl-XL Traced in-vivo by Using GFP

Soo Han Yoon, M.D., Jin Young Kim, M.D., Seung Woo Park, M.D., Young Hwan Ahn, M.D., Young Min Ahn, M.D., Ki Hong Cho, M.D., Kyung Gi Cho, M.D.

Department of Neurosurgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Objectives : The subcellular locations of Bad, Bid, Bax and Bcl-XL change during apoptosis and this change is important for the regulation of cell death. The purpose this study was to elucidate binding of Bad with Bcl-XL in vivo

Methods : We mads Bad with Green Fluorescent Protein(GFP) using PCR method. We transfected and overexpressed GFP-Bad with or without Bcl-XL cotransfection in living COS-7 cell.

Results : Bad and Bcl-XL bind one another in healthy living cells and this association controled mitochondrial docking. In the absence of Bad-XL, Bad was mainly cytosolic and partially bound to mitochondria. Upon coexpression of Bad and Bcl-XL, most of Bad translocated to mitochondria.

These should suggest that Bad binds to the mitochondrial and cytoplasmic forms of Bcl-XL and Bad bound to cytoplasmic Bcl-XL translocates to mitochondria. These in vivo findings confirm that Bad make a complexes with Bcl-XL and cause mitochondrial translocation of Bad-Bcl-XL complex.

KEY WORDS : Apoptosis · Bad · Bcl-XL · Green fluorescent protein.

서 론

Bcl-2 family 단백질들은 세포사망 촉진, 또는 억제를 나타내는 programmed cell death의 조절인자로서 잘 알려져 있다[1]. 이러한 결과는 적어도 부분적으로 BH1에서 BH4에 걸친 Bcl-2 homology domain의 여부에 따라 결정된다고 믿어진다[2]. 여러 연구에서 Bcl-2 family는 단백질 상호간의 동종결합 및 이종 결합을 형성해서 세포사망 기능을 촉진하거나 차단할 것으로 시사되고 있다[5][11][15]. 어떤 Bcl-2 단백질은 mitochondria의 외막에 이온통과성 통로를 형성하고 이어서 apoptosis 촉진 단백질들을 방출하여 세포를 사망을 초래한다[6]고 알려진 반면에 특정 Bcl-2 단백질사이에 일어나는 이종결합이 얼마나 일어나는지, 어떤 기작에 의해서 형성되는지, 그리고 어떤 결과를 초래하는지 등에 대해서는 아직도 알려져 있지 않다.

Bcl-XL은 세포의 생존촉진 단백질로서 mitochondria 기능부전과 caspase 활성이 있기 전에 작용한다고 알려져 있으며, 건강한 세포에서 세포질과 세포내 기관막에 분포하고 있지만 apoptosis가 시작되면 mitochondria로 이동하여[7] 세포기관의 결집을 유지하고 caspase 활성화를 조절하는데 관여할 것으로 추측되고 있다[4]. 과거에 발표된 모델에 의하면 mitochondria에 붙어있는 Bcl-XL이 Apaf-1과 결합하면 procaspase 9의 활성화를 억제하게 되고 결국 전체 caspase계

의 활성화가 억제된다[10)12)]. 여기에 Bcl-XL과 Bad의 상호작용이 Bcl-XL의 활동을 조절하는데 필수적이며[17)18)], 이러한 상호작용은 Bad의 phosphorylation 정도와 일치한다고 보고[3)19)]하여 Bcl-XL의 작용영역은 더욱 복잡하게 되었다.

그러나, 최근에 세포외에서의 단백질간의 상호작용 및 결합이 실험방법적 차이 또는 오류에서 기인할 수 있다는 보고[8)9)]로 지금까지의 모든 세포외 실험결과에 대한 재고가 불가피해졌다. Bad와 Bcl-XL에 대한 모든 결과도 세포외에서 이루어진 결과로 이에 저자는 Green fluorescence protein (GFP)를 이용하여 세포내에서 Bad와 Bcl-XL의 결합이 실제로 일어나는지를 확인하여 Bad의 기전에 대한 이해에 보탬이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

원숭이 신장 상피세포에서 배양된 Cos-7 cell은 ATCC에서 구입하여 사용하였으며, 모든 primer는 GIBCO BRL에서 주문하여 제작하였다. pcDNA3 mammalian expression vectors는 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 구입하였으며, C3-EGFP plasmid는 Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA)에서 구입하였다. Lipofectamine은 Life Technologies(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)에서 구입하였고, polyclonal anti-N-terminal Bad antibody sc-941은 Santa Cruz Inc.(Santa Cruz, CA)에서, 그리고 anti-phospho Bad polyclonal antibody는 Et-Te Hsu 박사(NIH, MD, USA)로부터 공여받았다. Donkey anti-rabbit immunoglobulin peroxidase conjugates와 ECL Western blotting detection kit는 Amersham Corp.(Arlington Heights, IL)에서 구입하였고, 기타재료는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2. 방 법

1) Bad plasmid cloning과 mutagenesis

Bad는 HA-tagged Mouse Bad cDNA(Michael Greenberg 박사(UCLA, CA)가 공여한 것임)에서 PCR로 C3-EGFP plasmid(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)의 EcoRI과 BamHI 제한효소 부위, 그리고 pcDNA3 mammalian expression vector(Invitrogen, Carlsbad, CA)의 EcoRI 효소 부위에 cloning해 넣었다. 사람의 Bcl-XL은 PCR로 C3-EGFP plasmid와 pcDNA3의 EcoRI 부위에 넣었다.

2) Cos-7 세포에 Bad를 일시적으로 transfection

Cos-7 monkey kidney epithelial cell 세포를 confocal microscopy를 위해서 4.3cm^2 chamber slides(Lab-Tek chambered coverglass system ; Nalge Nunc Inc., Naperville, IL)에 배양한 후 단일 DNA transfection을 위해서는 0.5ug의 DNA를, 그리고 2개의 DNA를 동시에 cotransfection할 경우에는 1 : 4 비율로(C3-EGFP-Bad construct : pcDNA3-Bcl-XL 또는 Bax construct) 3ul의 LipofectAMINE(제조회사에서 작성한 설명서에 의함)을 사용하였다.

3. Western blotting에 의한 Bad의 세포내 위치확인

Western blotting에 의한 Bad의 세포내 위치확인은 과거에 기술된 바와 같이 시행되었다[8)]. 간단히 기술하면, 각각의 cotransfection에 대하여 3개의 판배양기(100mm 지름)에 Cos-7 세포를 약 80 90% confluency를 이루도록 배양후 4ug의 C3-EGFP-Bad 그리고 16ug의 pcDNA3-Bcl-XL, 또는 pcDNA3 vector만을 LipofectAMINE(24ul/plate)을 이용하여 transfection시켰다. Cotransfection하고 36시간후에 세포를 모아서 원심분리하고 PBS로 씻어낸 다음, Dounce homogenizer를 이용하여 homogenize하였다. 다시 Beckman TLA 120.2 rotor에서 130,000×g로 원심분리를 시행하여 Bad의 세포질 부분과 막 부분을 분리한 다음, 같은 량의 SDS lysis buffer를 추가하고 polyclonal anti-N-terminal Bad antibody sc-941을 이용하여western blotting을 시행하였다.

4. Confocal microscopy

4.3cm^2 chamber slide에 키운 Cos-7 세포를 각 DNA로 transfection후 16 24시간에 confocal microscope으로 관찰하였다. 만약 mitochondria 염색이 필요한 경우에는 mitochondria-specific dye(Mitotracker Red CMXRos ; Molecular Probes Inc., Eugene, OR)를 20ng/m가 되도록 투여하고 약 20분 후에 confocal microscope(a model LSM 410 confocal, Carl Zeiss, Thornwood, NY)를 이용하여 600배에서 관찰하였다. Chamber slide의 온도유지는 35 37℃를 air stream incubator를 이용하여 유지하였다. GFP 추적을 위해서는 580nm 파장을 사용하였으며, mitotracker를 추적하기 위해서는 420nm 파장을 사용하였다. staurospo-rine을 추가한 경우에는 0.5uM 농도를 사용하였으며, confocal microscpe에서 매 5 10분 간격으로 4 6시간 정도 사진을 계속 촬영하였다

5. 세포생존율

Bad에 의한 세포생존율 실험은 mouse fibroblast L929 세포주에서 이루어졌다. 세포를 6 well plates에서 키운 다음 C3 - EGFP vector와 the pcDNA3 vector, 또는 C3 - EGFP - Bad와 pcDNA3 vector, 그리고 C3 - EGFP vector와 pcDNA3 - Bad를 LipofectAMINE을 이용하여 cotransfection하였다. 36시간후 형광현미경하에서 GFP에 의해서 형광을 보이는 세포수를 시간별로 세고 나서 staurosporine을 0.1uM의 농도가 되도록 배양액에 추가하고 24시간후에 다시 형광현미경하에서 GFP를 보이는 세포수를 세었다. 이러한 측정은 세 번에 걸쳐서 반복되었으며 생존율은 처음 세포수에 대한 분율에서 %로 계산하였다.

결 과

1. Cos-7 세포주에서 과발현된 GFP-Bad의 세포내 위치

살아있는 건강한 Cos - 7 세포에서 GFP - Bad는 주로 세포질에 미만성으로 분포하였으며, mitochondria의 특정 염색을 위한 Mitotracker의 위치와 일치하지 않았다. 그러나 건강하지 않은 Cos - 7 세포에서는 일부 GFP - Bad가 mitochondria에 이동하여 Mitotracker와 일치하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1A, B, C). 실제로 Bad가 staurosporine을 배양액에 첨가해서 apoptosis를 유도한 경우에 많은 부분의 Bad가 mitochondria로 이동하여 Mitotracker 위치와 일치하였다(발표준비자료임).

2. GFP-Bcl-XL의 세포 내 위치

면역화학 염색에서 Bcl - XL은 세포질과 mitochondria에 주로 분포한다고 보고되고 있지만, 살아있는 세포 내에서 GFP를 이용하여 관찰하면 세포질에서도 일부 분포하지만 많은 부분이 mitochondria에 위치하고 있다고 보고되어 있다[34]. 본 실험에서도 GFP를 이용하여 Bcl - XL의 세포내 위치를 확인해 보았더니 세포질에도 있었지만 주로 mitochondria에 분포되어 있었다(Fig. 1D, E, F). 이러한 작은 원이 모인 형태의 mitochondria의 표현은 시간에 따라서 변화되는 것을 볼 수 있었는데 transfection 후 초기에는 여러가닥의 실이 꼬여져 있는 형상에서 점차로 근처의 실이 뭉쳐지면서 작은 원의 형태로 바뀌는 것을 볼 수 있었다.

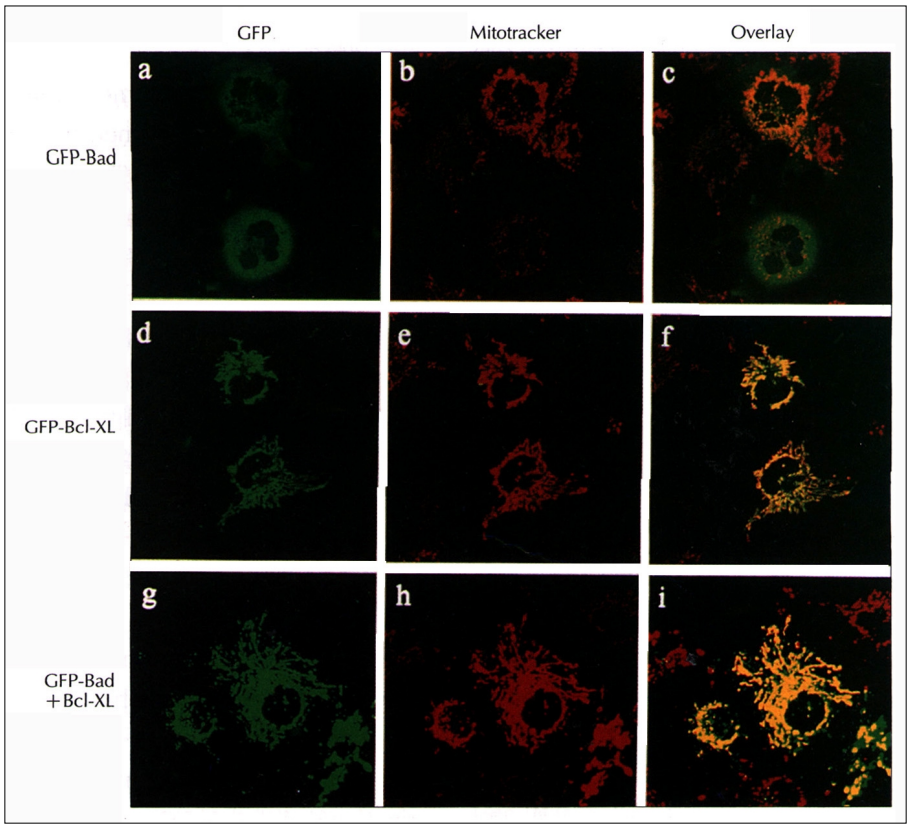

Fig. 1. Bcl-XL alters Bad location in Cos-7 cells. Transiently transfected Cos-7 cells were treated with 20ng/ml Mitotracker Red CMXRos to stain mitochondria and then examined with laser fluorescence confocal microscopy. Each field was independently observed at 480 nm wavelength for GFP(A, D, and G) and at 560 nm for Mitotracker Red CMXRos(B, E, and H) and the two images were overlaid(C, F, and I). GFP-Bad translocates to the mitochondria when cotransfected with Bcl-XL.

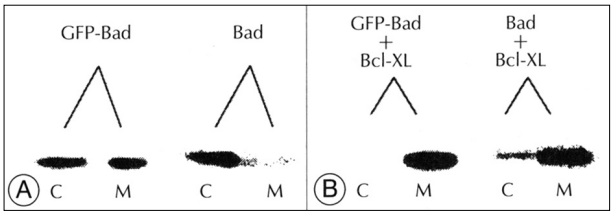

Fig. 2. Comparison of Bad with GFP-Bad in the subcellular location in Cos-7 cells. A : GFP-Bad shows more in the supernatant than pcDNA3-Bad does. B : Upon cotransfection with Bcl-XL(1 : 4 ratio) both GFP-Bad and Bad move into the membrane pellet(C : cytosolic fraction, M : membrane fraction).

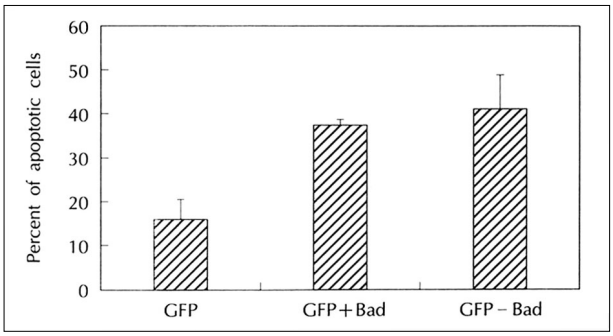

Fig. 3. Comparison of Bad with GFP-Bad bioactivity. Both GFP-Bad and Bad show the same degree of cell death stimulation after 24hours exposure to 0.1uM staurosporine comparing to control(GFP only) L929 cells.

3. pcDNA3-Bcl-XL과 동시에 transfection된 GFP-Bad의 세포 내 위치

Bcl-XL에는 pcDNA3를, Bad에는 C3-EGFP를 vector로 하여 동시에 transfection하였을 경우에 confocal microscopy에서 GFP-Bcl-XL이 Mitotracker가 보여주는 mitochondria 위치에 분포하였듯이 GFP-Bad도 Mitotracker가 보여주는 mitochondria 위치와 동일하게 분포하였다(Fig. 1G, H, I).

4. GFP-Bad와 pcDNA3-Bad의 western blotting과 생존율

GFP construct에 의한 Bad의 생물학적 성질변화를 검증하기 위해서 GFP-Bad와 pcDNA3-Bad 각각에서 pcDNA3 vector를 cotransfection한 경우에 western blotting하여 비교하였는데 pcDNA3-Bad는 대부분이 세포질에 분포하며 아주 적은 일부에서 막성 부분으로 분포하였지만, GFP-Bad는 pcDNA3-Bad보다 mitochondria에 위치한 양이 많아서 세포질 부분과 막성 부분의 양이 거의 비슷함을 보였다(Fig. 2A). 그러나 GFP-Bad와 pcDNA3-Bad 각각에서 Bcl-XL을 cotransfection한 경우에는 GFP-Bad와 pcDNA3-Bad 모두에서 거의 대부분이 막성 부분으로 이동하였다(Fig. 2B).

또한 세포생존율에서 GFP vector만을 transfection한 경우보다 GFP vector와 pcDNA3-Bad를 transfection한 경우에서 생존율이 낮았으며, GFP-Bad만을 transfection한 경우에도 비슷한 결과를 보였다(Fig. 3).

따라서 GFP construct를 Bad에 붙여도 세포내 위치변화 관점과 세포생존율에서 별다른 차이가 없어 GFP에 의한 세포내 Bad의 위치 추적은 실제 Bad 위치와 동일할 것으로 추측한다.

고 찰

Bcl-2 family는 BH1-4까지의 4개의 domain을 가질 수 있는데, domain의 조합에 따라 Bcl-2, Bcl-XL, E1b-19k 등의 anti-apoptotic 군, Bax, Bok 등의 pro-apoptotic 군, 그리고 Bad, Bid, Bik 등의 BH3 군으로 나눌 수 있다[1]. 이들의 작용기전으로는 Bax-Bcl-2, Bax-Bcl-XL, Bad-Bcl-XL, Bim-Bcl-2, 그리고, Bik-Bcl-XL등과 같이 Bcl-2 family 내에서 hetero-dimerization을 형성하여 Bax, Bcl-2, 또는 Bcl-XL의 homo-dimerization에 의한 작용을 방해할 수 있으며, Bcl-2-calcineurin[14], Bcl-2-NFAT (Nuclear factor of activated T cells)[13], 그리고 Bcl-XL-Apaf-1[12]과 같이 Bcl-2 family외의 다른 단백질과 hetero-dimerization하여 단백질의 기능을 억제할 수도 있다. Bax, Bcl-2, 그리고 Bcl-XL처럼 transmembrane domain을 가지고 있는 경우에는 직접 mitochondria의 rerecptor 해당부분에 docking하여 작용할 것으로 추측되고 있는데, 정확한 docking 위치에 대해서는 아직 확인된 보고가 없다. 다만, 이러한 docking에 의해서 mitochondria의 외막에 존재하는 voltage-dependent anion channel (VDAC)과 관련되어 water channel을 개방하여 mitochondria의 변성과 cytochome C의 방출을 야기할 것으로 추측되고 있다[6].

이러한 dimerization therory는 in-vitro에서 immunoprecipitation이나 yeast hybridization assay를 이용하여 이루어졌는데, Hsun 등[9]이 NP-40나 triton X-100, 또는 W-1 등의 다양한 detergent의 선택에 따라서 dimerization의 결과가 달라지며, 이러한 detergent를 사용하지 않으면 hetero-dimerization이 일어나지 않는다고 보고하여 지금까지 알려져 있는 dimerization에 대해서 전반적인 재검토가 필요하게 되었다. 이에 저자는 in-vivo에서 Bad-Bcl-XL의 hetero-dimerization에 대해서 in-vivo에서 확인하고자 하였다. 이에 대한 방법론으로 PCR에 의해서 GFP를 Bad의 N-terminal에 붙인 후 lipofectamine을 이용하여 세포에 transfection하여 과표현시키고 살아있는 세포 내에서

confocal microscope를 이용하여 확인하였으며 이를 세포의 막성 부분과 세포질 부분을 분리하여 western blot을 시행하여 확인하였다[7)16)].

GFP를 Bad DNA에 붙인 후 과발현시켜서 Bad의 위치를 확인하였는데, GFP - Bad만을 transfection했을 때는 cytoplasm에 위치했고, Bcl - XL과 GFP - Bad를 동시에 transfection한 후에는 mitochondria로 옮겨져 있었으며, fractional western에서 역시 재확인할 수 있었다. Hsu YT 등[7)]이 보고한 바에 의하면 western에서 Bcl - XL의 세포내 위치는 약 50%가 mitochondria에, 그리고 나머지 50%정도가 세포질에 위치하였다고 하였다. 그러나, 본 실험에서는 GFP - Bcl - XL의 위치가 confocal microscopy에서 Cos - 7 세포의 mitochondria에 주로 위치하는 것으로 보였는데, 이는 GFP에 의해서 Bcl - XL의 3차원적 구조 변화가 이루어져 Bcl - XL이 mitochondria로 이동하여 docking한 결과로 추측된다. Bad와 Bcl - XL을 동시에 transfection했을 경우에 Bad가 mitochondria로 이동한 현상은 Bad가 mitochondria에 있는 Bcl - XL과 결합한 것은 물론이며, 세포질에 있는 Bcl - XL과 결합한 경우에도 mitochondria로 이동한 결과로 추측할 수 있다.

물론 Bcl - XL에 의해서 다른 분자가 Bad와 결합하여 mitochondria로 이동하고 docking하였을 가능성을 완전히 배제하기는 여전히 어렵다. 그러나 Bcl - XL의 transmembrane domain을 잘라낸 변종 Bcl - XL을 Bad와 같이 세포에서 동시에 과표현한 경우에는 Bad가 mitochondria로 이동하지 않는다는 사실(미발표 자료)을 감안하면 Bad가 Bcl - XL과 dimerization하여 mitochondria에 docking할 것으로 추측할 수밖에 없다. 결국, Bad와 Bcl - XL을 동시에 transfection하였을 때 Bad의 위치 변화는 Bcl - XL에 의해서 이루어진 것으로 dimerization을 이루고 mitochondria에 docking할 것으로 보인다.

그러나 아직도 Bad와 Bcl - XL의 binding과 mitochondria로의 이동 및 docking의 의미에 대해서는 명확히 알려져 있지 않다. 다만 세포생존율 결과에서 Bad의 pro - apoptotic 작용이 Bcl - XL과 dimerization하고 mitochondria에 docking함으로서 억제될 것으로 추측할 뿐이며 앞으로 이에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

• 논문접수일 : 1999년 12월 18일
• 심사완료일 : 2000년 3월 7일
• 책임저자 : 윤 수 한
442 - 749 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5
아주대학교 의과대학 신경외과학교실
전화 : 031) 219 - 5662, 전송 : 031) 219 - 5238
E - mail : ee80@madang.Ajou.ac.kr

References

1) Adams JM, Cory S : *The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. Science 281 : 1322-1326, 1998*
2) Chao DT, Korsmeyer SJ : *BCL-2 family : regulators of cell death. Annu Rev Immunol 16 : 395-419, 1998*
3) Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al : *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. Cell 91 : 231-241, 1997*
4) Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR : *Baxinduced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. J Biol Chem 274 : 2225-2233, 1999*
5) Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ : *Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. Embo J 17 : 3878-3885, 1998*
6) Green DR, Reed JC : *Mitochondria and apoptosis. Science 28 : 281 : 1309-1312, 1998*
7) Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ : *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 94 : 3668-3672, 1997*
8) Hsu YT, Youle RJ : *Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. J Biol Chem 272 : 13829-13834, 1997*
9) Hsu YT, Youle RJ : *Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. J Biol Chem 273 : 10777-10783, 1998*
10) Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G : *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 4386-4391, 1998*
11) Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB : *Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. Mol Cell Biol 17 : 7040-7046, 1997*
12) Pan G, O'Rourke K, Dixit VM : *Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. J Biol Chem 273 : 5841-5845, 1998*
13) Srivastava RK, Sasaki CY, Hardwick JM, Longo DL : Bcl-2-mediated Drug Resistance : *Inhibition of Apoptosis by Blocking Nuclear Factor of Activated T Lymphocytes (NFAT)-induced Fas Ligand Transcription. J Exp Med 190(2) : 253-265, July 19, 1999*
14) Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al : *Ca^{2+}-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. Science 284 : 339-343, 1999*
15) Wang K, Gross A, Waksman G, Korsmeyer SJ : *Mutagenesis of the BH3 domain of BAX identifies residues critical for dimerization and killing. Mol Cell Biol 18 : 6083-6089, 1998*
16) Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ : *Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol 139 : 1281-1292, 1997*
17) Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer

SJ : *Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. Cell 80 : 285-291, 1995*

18) Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ : *BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. J Biol Chem 272 : 24101-24104, 1997*

19) Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ : *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). Cell 87 : 619-628, 1996*