

Tyrosine Kinase B (Trk B) 재조합단백질과 특이항체 생산

계명대학교 의과학연구소

한인숙 · 이영자

Productions of Recombinant Tyrosine Kinase B (Trk B) Protein and its Specific Antibody

In Sook Han, Ph.D. and Young Jae Lee, Ph.D.

*Institute for Medical Science, Keimyung University,
Taegu, Korea*

= Abstract =

Tyrosine kinase B (Trk B) is the intracellular receptor for the brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In order to study the relationship between the neurotrophin BDNF and its receptor Trk B, the productions of recombinant Trk B proteins were established and the following results were obtained. A partial Trk B gene of rat brain was cloned into E. coli expression vector under the control of T7 promoter. When these partial cDNAs were expressed as recombinant partial Trk B proteins by addition of IPTG, they were accounted for about 20% of total E. coli proteins, displaying a molecular size of 38KDa. Partial Trk B were purified and refolded by metal affinity chromatography and dialysis showing 38KDa as monomer and 76KDa as dimer, respectively. After three times immunizations of rabbit through six weeks, the polyclonal antisera were separated from the blood, and their specificities and titers were investigated by ELISA and immunohistology, respectively.

Key Words: Tyrosine kinase B (Trk B), recombinant protein, polyclonal antibody.

서 론

Neurotrophic factors는 주변 혹은 중추신경계에서 신경세포의 성장, 유지 그리고 재생에 중요한 역할을 하고 있다 (Davies *et al.*, 1986). Nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) 그리고 neurotrophin-4 / 5

(NT-4 / 5) 등이 neurotrophins으로 알려져 있다. 그들의 mRNA들은 뇌에 분포되어 있는 다양한 세포들에서 표현되고 있으며 특히 hippocampus에서 가장 높게 발현되고 있다 (Leibrock *et al.*, 1989; Ip *et al.*, 1993a, b). 그들에 해당하는 수용체들은 Trk A, Trk B, Trk C 그리고 Trk D 등이 있다 (Kaplan & Stephens, 1994; Lindsay, 1994). 비록 NGF 와 그것의 수용체, Trk A에 대한 연구는 비

교적 되어 있지만 BDNF와 NT-4/5 그리고 그것의 세포내 수용체 Trk B의 기능에 대해서는 잘 연구되어 있지 않다 (Klein *et al.*, 1991; Altar *et al.*, 1991). BDNF/Trk B계와 NGF/Trk A계는 많은 점이 닮았으나 크게 두가지 점이 다르다. 첫째, BDNF/Trk B 표현세포들은 주로 뉴론들이며 그 수가 가장 많고, 표현 분포가 다르며 (Altar *et al.*, 1994), 만성퇴행성 신경질환에서 유도 혹은 감소됨을 볼 수 있다 (Phillips *et al.*, 1991; Connor *et al.*, 1997). 둘째, BDNF는 NGF와 다르게 trophic 효과이외에 glutamate 수용체에 대한 특이한 synaptic transmission 증강작용이 있으며 (Levine *et al.*, 1995), 이 특성으로 말미암아 neurotoxic 효과를 발휘할 수도 있다 (Gosh *et al.*, 1994; Kang & Schuman, 1994, 1995). 따라서 BDNF/Trk B계에 대한 기초연구는 간질, 알쓰하이머병 및 파킨슨병 같은 만성퇴행성 신경질환을 이해하고 이에 대한 치료대책을 발견하는데 결정적인 역할을 할 것이다.

그리하여 본 연구자는 BDNF와 그것의 세포내 수용체로 알려진 Trk B의 재조합단백질을 *E. coli* system에서 대량생산하여 만성퇴행성 신경상해의 기전연구와 치료에 사용하고자 하였다. 이미 BDNF에 대해서는 그 생산과 분리가 완성되어 생체활성측정과 간질발작 후 오는 신경세포의 재생기전에 어떻게 작용하고 있는지를 연구하고 있다. BDNF 자체의 역할뿐 아니라 그것의 수용체 Trk B를 통한 기전연구도 필수적이므로 재조합 Trk B 단백질의 대량 생산과 분리, 그리고 이를 이용한 특이항체 생산이 요구되었다. 그리하여 T7 promoter하의 *E. coli* 표현벡터를 이용한 Trk B의 대량생산과 금속친화성 크로마토그라피를 이용한 간편한 분리방법으로 순수한 Trk B의 정제를 이루었다. 그리고 순수분리된 Trk B를 토키에 면역하여 친화도와 특이성이 뛰어난 그것의 특이항체를 생산하였다.

재료 및 방법

pET28a-Trk B plasmids 구축: 먼저 백쥐뇌를 취하여 균등분산기로 분쇄하고 RNazolB를 이용하여 백쥐뇌의 total RNA를 추출한다. Oligo-d(T)16을 이용하여 역전사증합 반응을 시키고 Trk B primers로 PCR하여 그것의 cDNA를 얻는다. 곧바로 pT7 베티로 cloning하고 그 플라즈미드를 추출한다. 추출한 pT7-Trk B plasmids와 pET28a 표현벡터를 제한효소 BamHI과 HindIII로 각각 37°C에서 3시간 처리하여 잘라진 부분을 분리하고, 16°C에서 12시간 서로 반응시킨다. 접합된 산물을 박테리아에 전이시키고, kanamycin으로 선택하여 pET28a-Trk B plasmids의 존재를 colony PCR과 제한효소법으로 확인한다. 전이된 플라즈미드의 염기배열을 확인하고, 최종적으로 *E. coli* 표현균주 BL21 (DE3)로 전이시킨다. 본 실험에 사용한 Trk B의 염기서열은 다음과 같다. Sense primer (2166-2186bp)는 5'-TCATTGGGATGACC-AAGATCC-3'이고 antisense primer (3111-3130bp)는 5'-CTAGCCTAGGATGTCCAG-GT-3'이다.

재조합 Trk B 표현: pET28a-Trk B plasmids를 포함하고 있는 표현용균을 kanamycin이 포함된 10ml의 LB 배지에서 OD₆₀₀이 0.6-0.8이 되게 배양한 다음 1ml aliquots를 꺼내고, 나머지 배양액에 IPTG를 최종농도 1 mM이 되게 넣어 단백질생산을 유도한다. 약 5시간동안 시간별로 1ml aliquots를 취하여 시료를 모은다. 박테리아를 원심한 뒤 pellets를 모으고 100μl SDS sample buffer [100mM tris-HCl (pH, 7.6), 4% SDS, 20% glycerol, 40mM mercaptoethanol]를 넣어 녹인다. 끓는 물에 5분 두었다가 식히고, 필요하면 sonication을 실시하여 얼음에 둔다.

연달아 15% SDS-PAGE에 시료를 loading하고 50-80 volt에서 3시간 영동하여 coomassie blue용액으로 염색하고 10%식초산/30%메탄올 용액으로 탈색한다.

제조합 Trk B 분리: 500 ml 배양액으로 위와 같은 방법으로 제조합 Trk B를 대량 생산한다. 원심하여 박테리아 pellets를 모으고 세척용액으로 [50 mM Tris-HCl (pH, 7.3), 100 mM NaCl] 1회 씻는다. 6M urea가 포함된 binding buffer [5 mM Imidazole, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH, 7.9)]를 넣고 얼음에 2시간 배양한 후 sonication한다. 추출된 용액을 수거하기 위해 20,000 rpm, 4°C에서 2시간 원심한다. 상층액을 준비된 histag resin이 들어있는 칼럼에 넣고 resin의 5부피의 세척용액 [30 mM Imidazole, 0.5M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH, 7.9)]으로 씻고, 마지막에 전개용액 [250 mM imidazole, 0.25M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH, 7.9)]을 넣어 제조합 Trk B를 순수분리한다. 전개용액은 분자량 12-14KD의 한계영역 투석봉지에 넣고 6M, 4M, 2M, 1M의 urea 및 PBS 용액 순으로 천천히 투석하여 refolding 시키고, aquacide (Calbiochem)나 centricon (Amicon)으로 농축한다. 분리된 단백질은 15% SDS-PAGE로 확인하고, 농도를 측정한다.

항체 생산과 특이성 검색: 순수분리된 제조합 Trk B는 특이항체를 얻기 위해 토끼에 50 µg/kg 용량으로 6주에 걸쳐 3회 주사를 한다. 첫번째 면역은 제조합 Trk B와 complete Freund's adjuvants를 1:1 부피비율로 섞고 sonication하여 물에 넣어 퍼지지 않을 정도의 micelle 상태를 만들어 사용한다. 두 번째는 3주 후에 incomplete Freund's adjuvants와 섞어 역시 micelle 상태로 만들어 주사하고, 세번째는 다시 3주 후 둘째와 같은 방법으로 주사한다. 마지막 면역 1주일 후 토

끼귀의 정맥으로 피를 수거하고, 50oC 수조에서 30분간 항혈청을 비활성화시켜 원심하여 특이항체를 분리한다. 분리된 anti-Trk B 다클론성 항체의 친화도와 특이성은 ELISA와 immunohistology 방법으로 검색한다.

ELISA: 2, 5 및 10 µg/ml의 제조합 Trk B를 96 well immunoplate (Dynatech)에 100 µl /well씩 넣고 하룻밤 냉장고에서 입힌다. 상층액을 제거하고 2% BSA용액으로 실온에서 2시간 blocking한다. 곧바로 분리된 일차 항체, anti-Trk B 다클론성 항체를 1000, 2000, 3000 그리고 5000배로 희석하여 실온에서 2시간 배양한다. TTBS용액으로 3회 씻고 3000배로 희석된 이차항체, goat anti-rabbit-IgG-POD conjugate를 1시간 배양하고 OPD 기질용액으로 발색하여 410 nm에서 흡광도를 측정한다.

Immunohistology: 파라핀으로 포매된 쥐의 뇌절편을 이용하여 위의 ELISA에 언급된 것과 같은 방법으로 면역검색을 실시한다. 간단히 살펴보면, 파라핀으로 포매된 쥐의 뇌절편을 xylene으로 파라핀을 제거하고, 에탄올로 다시 hydration하여 1% 과산화수소수에 30분간 방치한다. 5% BSA용액으로 blocking을 1시간 실시하고, PBS로 희석된 정상 토끼혈청과 rabbit anti-Trk B 다클론성 항체로 2시간 배양한다. TTBS용액으로 3회 씻고 3000배로 희석된 이차항체, goat anti-rabbit-IgG-POD conjugate를 1시간 배양하고 DAB 기질용액으로 발색하고 HCl용액으로 멎추어 대조군과 실험군을 비교한다.

결 과

제조합 Trk B의 발현과 분리: 백쥐의 Trk B cDNA의 CDS에 해당하는 총 핵산염기배열의 크기는 2466bp (665bp에서 3130bp까지)이다. 그 중 C-terminal쪽의 965bp (2166bp

에서 3130bp까지)의 partial Trk B cDNA를 백쥐뇌의 total RNA로 부터 증폭하여 pT7 벡터에 넣고, 이를 다시 E. coli 표현벡터인 pET28a에 접합시켰다. pET28a-Trk B plasmids를 포함하는 콜로니를 제한효소법으로 확인하고, 그 염기배열을 분석하여 open reading frame을 확인했다. 구축된 플라즈미드를 포함하고 있는 표현용 BL21 (DE3)균을 OD₆₀₀이 0.6-0.8이 되게 배양한 후, IPTG를 최종농도가 1.0 mM이 되게 첨가했다. 단백질의 시간별 표현결과가 Figure 1A에 나타나 있으며 시간이 지남에 따라 약 38KD에 해당하는 재조합 Trk B 단백질의 표현이 증가되었으며 약 4시간 후에는 전체단백질의 20%에 해당하는 재조합 Trk B를 발현했다. 이들의 대량생산을 위해 단백질 표현이 유도된 500 ml의 배양액으로부터 박테리아 pellets를 모은 뒤 6M urea를 포함하는 binding buffer으로 2시간 얼음에서 배양하고 30초씩 5번의 sonication을 실시하였다. 원심하여 추출액만 his-tag 칼럼에 싣고 세척용액으로 충분히 non-his-tagged 단백질들을 제거하고 마지막으로 전개용액으로 his-tagged 재조합 Trk B를 순수분리했다. 연이어 분자량 12-

14KD 제한 영역의 투석봉지에 넣고 6M, 4M, 2M, 1M의 urea 및 PBS순으로 투석하고 SDS-PAGE로 그 결과를 확인했다. 2M urea에서 1M로 투석할때부터 침전체가 생기기 시작했으며 PBS으로의 투석이 끝난 뒤 원심하여 80%의 침전체와 20%의 용액의 재조합 Trk B를 분리했다. 침전체에서는 95%이상의 순도로 약 5 mg의 재조합 Trk B가 얻어졌으며, 그 조성은 90%의 38KD 단위체와 10% 정도의 76KD와 114KD의 이중체와 삼중체로 이루어졌다 (Figure 1B). 용액에서는 다소 적은 양 (500 µg)의 재조합 Trk B가 얻어졌으며 그 조성은 침전체와 비슷했다.

항체 생산과 특이성 검색: 용액상태로 순수 분리된 재조합 Trk B (50 µg / kg)를 6주간에 걸쳐 3회의 토끼면역을 실시하였고, 그것의 항혈청을 추출하였다. 제조된 anti-Trk B 항체의 역가는 재조합 Trk B 단백질에 대한 ELISA 방법으로 검색하였고 (Figure 2), 특이성은 파라핀으로 포매된 백쥐 뇌 절편의 immunohistology를 통하여 검색하였다 (Figure 3).

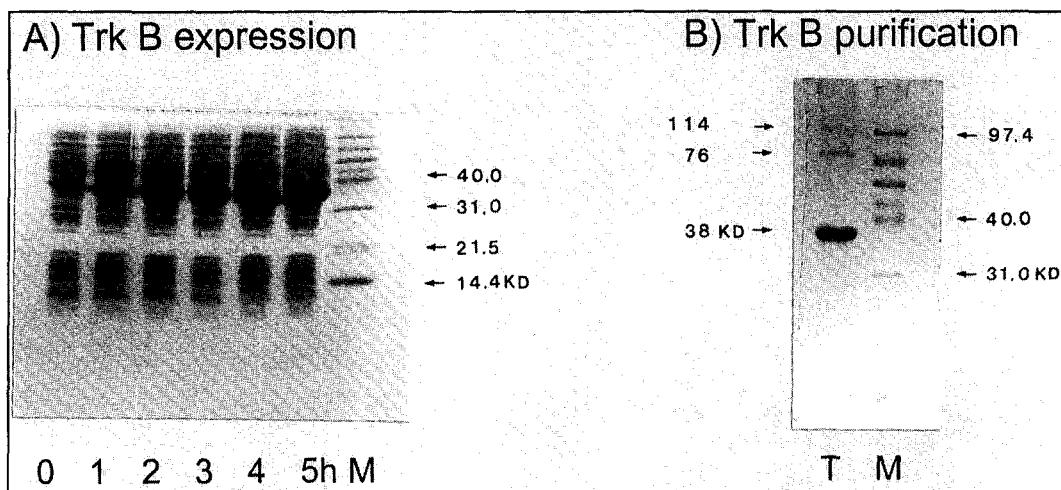


Figure 1. Expression and purification of recombinant Trk B proteins.

- A) Time course of recombinant Trk B expression of pET28a-Trk B plasmids. M: protein molecular weight marker (Bio-Rad V5231, Mid range).
- B) Purified Trk B proteins by his-tag column were analyzed by SDS-PAGE. T: purified Trk B proteins, M: protein molecular weight marker (Bio-Rad V5231, Mid range).

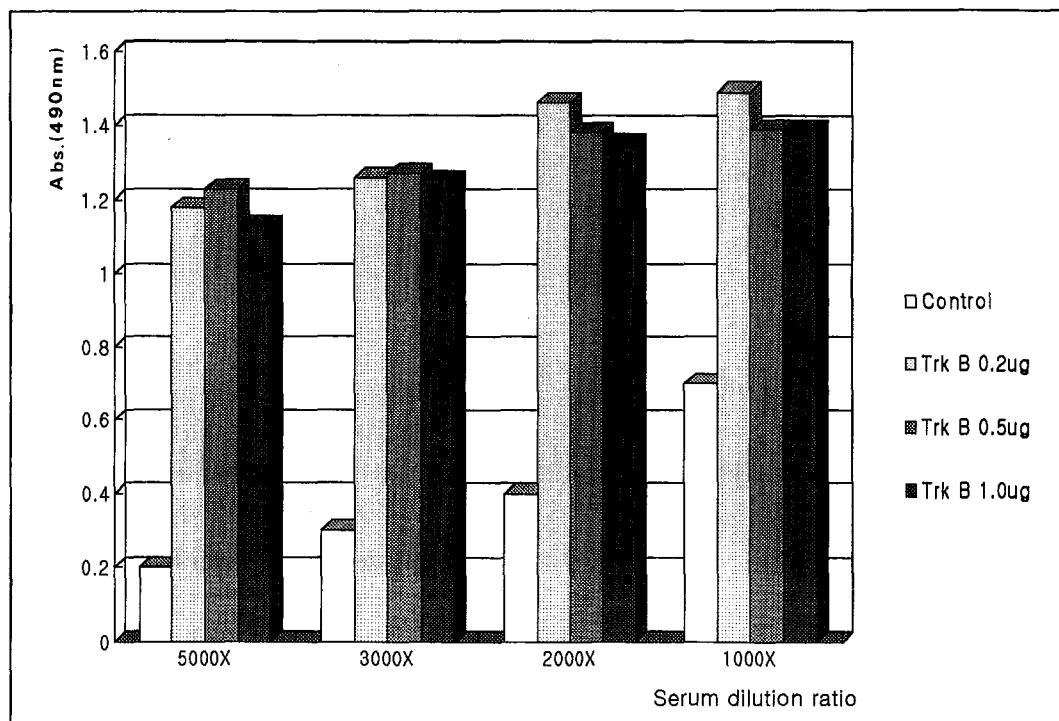


Figure 2. ELISA results of anti-TrkB polyclonal antibody.

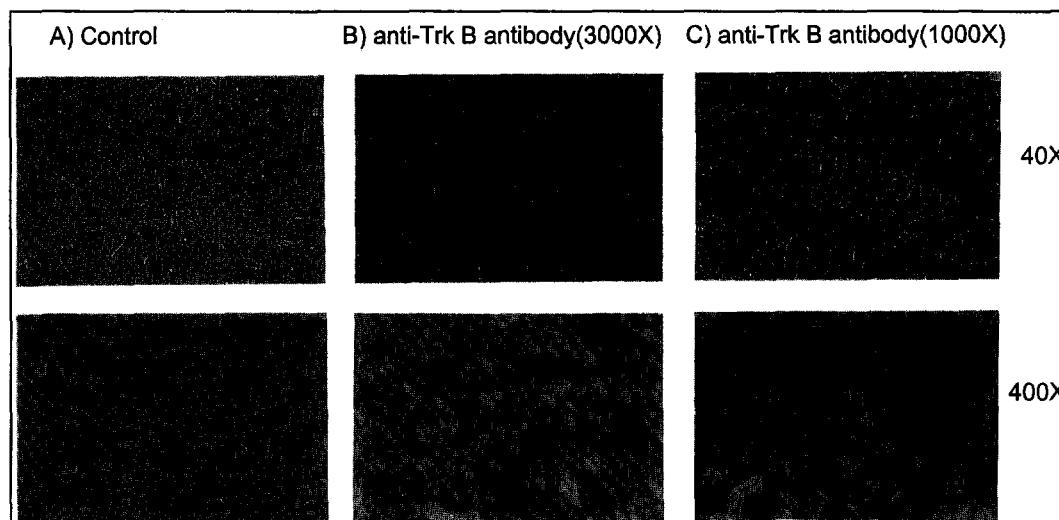


Figure 3. Immunohistology of rat brain with anti-TrkB polyclonal antibody.

항혈청의 ELISA 결과에서, anti-Trk B 단클론성 항체가 5000배로 희석되어도 대조군(normal rabbit serum)과 뚜렷한 차이를 보였으며, 입혀진 항원의 양이 0.2 µg/ml까지도 대조군과 현저히 구별되어 인지할 수 있는 역가가 높은 항체가 만들어졌음을 보여주었다. 아울러 이 항체를 이용한 백쥐 뇌절편의 면역검색에서도 Figure 3에서 보는 바와 같이 대조군과 확실한 차이를 나타내었으며 1000배와 3000배로 희석된 anti-Trk B 단클론성 항체를 이용한 면역검색에서는 해파 세포질의 염색차이를 잘 보여주는 특이성이 높은 항체임을 증명하였다.

고 찰

몇몇 연구진들이 생체활성도가 높은 NGF, BDNF, NT-3, 및 NT-4/5와 같은 neurotrophins에 대한 재조합단백질 생산을 보고하고 있으나 대부분 그 생산량이 적어 고가이다. 현재 간질, 알쓰하이머병 및 파킨슨병과 같은 만성퇴행성 신경질환의 증가추세로 이를 neurotrophins와 그것들의 수용체들을 이용한 신경세포 연구가 크게 증대되고 있다. 이에 이들 단백질 자체의 양으로는 크게 미흡하므로 이들에 대한 대량의 재조합단백질 생산이 필요하고, 그에 상응하는 특이항체가 요구된다. 본 과제를 통하여 T7 promoter하의 *E. coli* 표현ベ터 pET28a를 이용한 재조합 Trk B의 생산은 매우 간편하고 생산적인 시스템이었다. 아울러 신경세포의 초미세구조나 전자현미경을 이용한 기초연구에 반드시 필요한 높은 특이성을 가진 항체를 이 재조합 Trk B로 제조할 수 있었음은 더욱 고무적이었다.

이로써 앞으로 계속될 간질, 알쓰하이머병 및 파킨슨병과 같은 만성퇴행성 신경질환에서의 BDNF와 그의 수용체 Trk B의 역할연구에 있어 (Connor *et al*, 1997; Suen *et al*, 1997) 이 재조합 Trk B와 그의 특이항체 생

산은 의미가 있다 하겠다.

참 고 문 헌

- Altar CA, Siuciak JA, Wright P, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ: In situ hybridization of Trk B and Trk C receptor mRNA in rat forebrain and association with high-affinity binding of [¹²⁵I] B-DNF, [¹²⁵I] NT-4/5 and [¹²⁵I] NT-3. *Eur J Neurosci* 1994;6:1389-1405.
- Connor B, Young D, Yan W, Faull RLM, Synek B, Dragunow M: Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1997;49: 71-81.
- Davies AM, Thoenen H, Barde Y-A: Different factors from the central nervous system and periphery regulate the survival of sensory neurons. *Nature* 1986; 319:497-499.
- Gosh A, Carnahan J, Greenberg ME: Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 1994;263:1618-1623.
- Ip NY, Li Y, Yancopoulos GD, Lindsay RJ: Cultured hippocampal neurons show responses to BDNF, NT-3, and NT-4, but not NGF. *J Neurosci* 1993a;13:3394-3405.
- Ip NY, Stitt TN, Tapley P, *et al*: Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 1993b;10:137-149.
- Kang H, Schuman EM: Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 1995;267:1658-1662.
- Kang H, Schuman EM: A requirement

- for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 1996;273:1402-1406.
- Kaplan DR, Stephens RM: Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J Neurobiol* 1994;25:1404-1417.
- Klein R, Nanduri V, Jing S, et al: The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991;66:395-403.
- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, et al: Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature(Lond)* 1989;341:149-152.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR: Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8074-8077.
- Lindsay RM: Neurotrophins and receptors. *Prog Brain Res* 1994;103:3-13.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Lallamee GR, Johnson SA, Winslow JW: BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 1991;7:695-702.
- Suen P, Wu K, Levine ES, et al: Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8191-8195.