단분자 디엔에이 커튼 기술을 이용한 단백질과 디엔에이의 상호작용 연구에 관한 고찰

DOI: 10.3938/PhiT.25.024

이 자 일

Investigation of Protein-DNA Interactions by Using Single-molecule DNA Curtain Techniques

Ja Yil LEE

Biological processes are accomplished by bio-molecular interactions. In particular, protein-DNA interactions are fundamental and essential for numerous biological phenomena. The study of protein-DNA interactions is very important for understanding the molecular mechanisms underlying diverse cellular activities. One of best ways to examine the interplay between proteins and DNA is directly viewing the biomolecules in real time. Such a direct observation seems not to be feasible when using traditional approaches in which numerous bio-molecules are simultaneously examined in bulk; hence, only the averaged propensity of the molecules is measured. However, single-molecule techniques, which overcome the ensemble-average effect in bulk assays, allow us to detect individual biomolecules and their reactions. Among the many single-molecule methods developed until now, the DNA curtain assay provides the most straightforward platform for the protein-DNA interaction. Here, the principles of operating the DNA curtain, as well as some biological issues to which this novel assay can be applied are introduced. The DNA curtain allows us to examine how proteins function on nucleic acid substrates by integrating lipid fluidity, microfluidics, nanofabrication, and fluorescence microscopy. Using the technique, we can examine 1) specific bindings of proteins, 2) protein

movements such as diffusion or active translocation, and 3) collisions between proteins on double-stranded DNA substrates. Furthermore, the single-stranded DNA curtain facilitates studies on biological processes that are mediated by single-stranded DNA.

서 론

단일분자에서 흡수와 형광을 측정할 수 있는 기술이 개발된 이후, 단일분자 측정법(single-molecule spectroscopy)은 다양한 생명현상을 연구하기 위한 방법으로 급속도로 발전하고 있으며 널리 이용되고 있다. 전통적인 생물학적 측정법은 시험관에서 높은 농도의 생체분자시료(1~100 mM 농도)를 측정하기 때문에 분자들이 가지는 평균적인 효과(ensemble average)를 관찰하였다. 반면 단일분자 측정법은 개개의 생체분자들의 특성을 관찰함으로써, 생체분자들의 상태와 그 변화를 보다 정확하게 측정할 수 있다. 또한 단일 생체분자에 힘이나 토크 등을 가할 수 있으며, 생체분자들의 물리적인 혹은 기계적인 (mechanical) 특성을 파악할 수 있다. 나아가 개개의 생체분자들이 다른 생체분자와 어떤 기작으로 상호작용을 하는가를 실시간으로 관찰할 수 있다.^[1]

현재까지 단일분자 FRET, 광학 집게(optical tweezers), 자성 집게(magnetic tweezers) 등의 다양한 단일분자 측정법들이 개발되어 왔으며 생물학, 생화학 및 생물물리 연구에 광범위하게 응용되고 있다. 여기서는 생체분자들 사이의 상호작용을 보다 직접적으로 관찰할 수 있는 'DNA curtain'이라는 기술과 'DNA curtain'이 어떻게 생명현상의 비밀을 밝혀낼 수 있는가를 소개한다.

DNA curtain의 기본적인 작동 원리

DNA curtain은 나노제작기술, 나노형광입자기술, 마이크로

저자약력

이지일 박사는 서울대학교 물리학과에서 학사 (1997)를 마치고, 동대학원에서 펌토초레이저를 이용한 반도체분광학으로 석사(1999)학위를 받은 후, 삼성 SDI(1999-2001), Biomedlab(2001-2003)을 거친 후, 서울대 물리학과에서 단분자생물물리학으로 박사(2006)를 받았다. 이후, 고려대학교에서 연구교수(2006-2008)를 거쳐, 현재 미국 콜럼비아 대학교(2008-2016)에서 Associate Research Scientist로 재직 중이다. (biojayil@gmail.com)

REFERENCES

- [1] I. Tinoco and R. L. Gonzalez, Genes & Development 25, 1205 (2011).

Fig. 1. (A) Schematic of DNA curtain assay. Each double-stranded DNA molecule is attached to a single lipid molecule on lipid bilayer through biotin-streptavidin linkage. When buffer is continuously flowed into the micro-chamber, hydrodynamic force is exerted to individual DNA molecules, which slide on the bilayer along the buffer flow due to lipid fluidity. DNA molecules stopping at the chromium nano-barrier are stretched under the continuous flow and well-aligned along the barrier. (B) DNA molecules are stained with an intercalating dye, YOYO-1 (green), and the motor protein (FtsK) is labeled with a fluorescent nano-particle (red). In the absence of ATP, FtsK locates a special DNA sequence (KOPS). The specific binding of FtsK on KOPS sites is manifested as two lines of red dots on the DNA curtain. (Two arrows in the left represent KOPS sites)

Fig. 2. Total internal reflection fluorescence microscopy and fluidic apparatus for the DNA curtain assay. Solutions are injected into the micro-chamber using syringe and syringe pump. Protein samples are introduced to DNA curtains via an injection valve. Fluorophores such as organic dyes or fluorescent nano-particles are excited by laser illumination. The laser beam through a prism is incident on the micro-chamber with an angle greater than the critical angle and then is totally reflected at the glass-water interface. The total internal reflection generates an evanescent field and limits the excitation area just above the slide surface (~ 200 nm). The fluorescence from fluorophores tagged on DNA or proteins is measured by the fluorescence microscope equipped with EM-CCD.

플루이드릭스 기술, lipid의 유동성, 그리고 형광측정기술을 융합하여, 단백질과 DNA의 상호작용을 실시간으로 이미징할 수 있는 단일분자분광학 기술이다.^[2] DNA curtain을 만들기 위해서, 우선 슬라이드유리 위에 크로뮴(chromium)으로 25 nm 높이와 200 nm의 폭을 가진 zig-zag 형태의 나노구조물을 제작한다.(그림 1(A)) 나노구조물을 가진 슬라이드유리에 양면테이프를 이용하여 커버유리를 결합하여 마이크로 챔버를 만든 후, 마이크로 챔버 표면에 lipid bilayer(이중 지질막)를 코팅한다. Lipid bilayer는 세포막을 형성하고 있으므로, DNA curtain 기술은 다른 단일분자분광학 기술들에 비해 보다 생체친화적인

환경을 제공한다. Bilayer에 있는 lipid 분자들 중 몇몇(대략 100개 중 1개) 분자들은 biotin으로 표지되어 있으며, biotin-lipid는 streptavidin을 통해 biotin이 달려있는 긴 이중나선 DNA(lambda phage DNA: $\sim 16.5 \mu\text{m}$)와 결합한다. 이후, 용액(buffer)이 그림 2에서 보는 바와 같이 syringe pump를 통해서 마이크로 챔버 안으로 일정한 속도로 주입되고, DNA 분자들은 유체에 의한 힘을 받게 된다. Bilayer에서 lipid 분자들의 유동성으로 DNA 분자들은 나노구조물 방향으로 움직이다가 나노구조물에서 걸려서 잘 배열되고, DNA는 유체에 의해서 흐름의 방향으로 펼쳐지게 된다.(그림 1(A)) 이때 zig-zag 형태의 나노구조물은 DNA가 lipid의 유동성에 의해서 유체흐름의 수직방향으로 확산(diffusion)되는 것을 방지한다.

DNA는 형광체인 YOYO-1에 의해서 염색되고, 단백질 분자들은 DNA 형광체와 다른 발광파장을 가진 형광나노입자로 표지한 후, 각각의 형광을 이미징함으로써 DNA와 단백질을 실시간으로 관찰한다. DNA curtain에서는 형광측정을 위해서 레이저를 이용한 전반사형광측정법(total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM)을 사용한다. 레이저는 슬라이드유리 위에

REFERENCES

- [2] M-L. Visnapuu, T. Fazio, S. Wind and E. C. Greene, *Langmuir* **24**, 11293 (2008).

Fig. 3. (A) Schematic of double-tethered DNA curtain assay. One end of DNA molecules is anchored on the lipid bilayer, and the other is tethered to the pentagon barrier via antigen-antibody interaction. In this configuration DNA molecules remain stretched without flow. (B) FtsK translocation in double-tethered DNA curtain. In the presence of ATP, FtsK moves along DNA. (Top) FtsK is labeled with a fluorescent nano-particle and moving on single DNA molecule. (Bottom) A trajectory of single FtsK on single DNA is visualized by particle tracking analysis.

놓인 프리즘을 통해서 임계각 이상으로 입사하며, 슬라이드유리와 마이크로 챔버 내부의 용액 사이에서 전반사를 일으킨다. 이때 슬라이드유리 표면에 생기는 evanescent wave는 슬라이드유리 표면에서 대략 200 nm 정도로 형성된다. 레이저에 의해서 형광을 여기시키는 영역이 표면 근처로 제한되기 때문에, 챔버 내의 모든 생체분자들이 가지는 형광이 아닌 단지 슬라이드유리 표면 근처에(< 200 nm) 있는 DNA와 단백질들의 형광신호만을 측정한다. 형광신호는 형광현미경을 통하여 EM-CCD(electron-multiplying CCD)에서 이미징된다.(그림 1(B)) DNA curtain 기술이 가지는 또 다른 장점은 한 번의 측정으로 수많은 실험결과를 얻을 수 있다는 점이다. 그림 1(B)에서 처럼 수백 개 이상의 DNA 분자들과 이와 상호작용하는 여러 단백질들을 한 번의 측정으로 관찰할 수 있다. 단일분자측정법은 하나하나의 분자를 관찰하기에 통계적인 유효성을 확보하기 위해서 다수의 실험을 반복해야 하는 단점이 있다. 하지만, DNA curtain은 한 번의 측정으로 통계적인 유효성을 손쉽게 확보할 수 있다.

DNA curtain 기술을 이용하여 가장 쉽게 관찰할 수 있는 생체반응은 단백질들과 특정 염기서열의 상호작용이다.(그림 1(B)) 많은 단백질들은 DNA의 특정한 염기서열과 결합하여 그 기능을 수행한다. 따라서 단백질들이 특정한 염기서열에 얼마나 정확하게 그리고 얼마나 안정적으로 결합하는지는 단백질과 DNA의 상호작용에 있어서 상당히 중요한 문제이다. DNA

curtain은 직접적으로 특정 염기서열과 단백질의 결합을 이미징할 수 있으므로, DNA 염기서열에 대한 단백질의 결합 특이성(binding specificity), 해리도(dissociation rate), 평형상수(dissociation equilibrium constant) 등을 측정할 수 있다.

양끝이 고정된 DNA curtain과 그 응용

그림 1에서의 방식은 DNA와 단백질의 상호작용을 관찰하기 위해서 지속적으로 유체를 흘려주어야 하며, 유체에 의해서 DNA 혹은 단백질에 지속적으로 힘(hydrodynamic force)이 가해진다. 외력이 없는 경우에 단백질과 DNA의 상호작용을 연구하기 위해서, 그림 3(A)에서 보는 바와 같이 zig-zag 구조와 동일한 높이를 가지는 오각형 형태의 또 다른 나노구조물을 추가로 제작하고, 그 위에 항체(antibody)를 흡착시킨다. 이중나선 DNA의 다른 끝에 항원을 표지하여, 항원-항체반응을 이용하여 DNA의 다른 한쪽을 오각형구조물에 붙인다.^[3] 이 경우, DNA의 양쪽 끝이 나노구조물들에 고정되어 있으므로 유체를 흘려주지 않아도 DNA는 lipid bilayer 위에 펼쳐지고, 외력이 없는 상황에서 단백질과 DNA의 상호작용을 측정할 수 있다.

그림 3(B)는 형광나노입자로 표지된 DNA motor 단백질인 FtsK가 이중나선 DNA 위를 움직이는 것을 보여준다. 형광나노입자의 움직임을 'particle tracking' 기법으로 분석하여 시간에 따른 FtsK의 움직임을 측정할 수 있다. 이를 통해서 FtsK가 어떤 속도로 어떠한 방향으로 어느 정도의 거리를 움직이는가 하는 물리적인 특성을 파악할 수 있다.

비단 FtsK뿐만 아니라, DNA 위를 움직이는 어떠한 단백질에 대해서도 형광나노입자(혹은 형광체)를 표지할 수 있으면 그 단백질의 움직임을 DNA curtain을 이용하여 관찰할 수 있다. 따라서 DNA curtain은 DNA와 상호작용하는 거의 모든 단백질을 연구할 수 있는 보편적인 플랫폼(platform)을 제공한다. 한 걸음 더 나아가, 여러 단백질들을 각기 다른 파장의 형광나노입자로 표지하여, 각각의 단백질들이 다른 단백질과 충돌하였을 경우, 어떠한 반응을 보이는가를 관찰할 수 있다.(그림 4(A)) 실제 세포 내의 DNA에는 엄청나게 많은 단백질들이 결합하여 각자의 기능을 수행하고 있다. 예를 들어, 진핵세포 내의 DNA는 histone이라는 단백질을 감아서 nucleosome 구조를 형성하고 있고, RNA 중합효소(RNA polymerase)는 모든 세포주기(cell cycle) 동안 메신저 RNA(mRNA)를 전사하여 단

REFERENCES

- [3] J. Y. Lee, I. J. Finkelstein, E. Croizat, D. J. Sherratt and E. C. Greene, Proceedings of National Academy of Sciences of USA 109, 6531 (2012).

Fig. 4. (A) Collision between two proteins. In this trajectory, FtsK (green) collides with EcoRI-E111Q (magenta). FtsK responds to the collision with three distinct types of behavior: reversal, bypass, and pushing. (B) Search mechanism of mismatch repair proteins. Eukaryotic mismatch repair proteins search for the mismatched basepair. (Top) A trajectory showing one dimensional diffusion of the mismatch repair protein. (Bottom left) Enlarged view of the area showing one dimensional diffusion. (Bottom right) A tracked trajectory for the diffusion of the mismatch repair proteins.

백질을 생산하고 있으며, 전사조절인자(transcription factor)는 DNA의 특정 염기서열에 결합하여 유전자의 발현을 세포주기 및 외부 요인에 따라 조절하고 있다. 따라서 어떤 단백질이 DNA 위를 움직일 때, 다른 단백질과의 충돌은 피할 수 없다. 그림 4(A)에서 관찰된 단백질들 사이의 충돌 실험은 단백질들이 충돌할 경우에 어떠한 반응을 보이는지, 단백질들이 어떠한 기작으로 복잡한 DNA의 환경을 헤쳐 나가는지, 그리고 이를 통해서 단백질들이 자신의 DNA에서 자신의 생물학적인 임무를 어떻게 수행하는가를 밝혀낼 수 있다.^[4]

일반적으로 단백질들이 DNA와 상호작용할 때, 비특이적(random)으로 상호작용하는 것이 아니라, 특정한 염기서열과 상호작용하며, 이 특정 염기서열을 target site라고 부른다. Target site는 대략 수십 혹은 수백 개의 염기서열로 이루어져 있다. 이에 반해, 세포 내 DNA는 수백만에서 수십억 개의 염기서열로 이루어져 있다. 정상적인 세포의 활동을 위해서는 단백질들이 수많은 염기서열 속에서 자기가 작용해야 하는 아주 작은 크기의 특정 염기서열을 빠르고 정확하게 찾아가야 한다. 따라서 단백질들이 target site를 어떻게 찾아가는가는 생물학뿐만 아니라 물리학적으로 상당히 흥미로우며 중요한 문제이다. Target site를 찾는 기작으로 화학반응과 같은 3차원 충돌, DNA 위를 random walk으로 움직이는 1차원 확산, 이 두 경우가 결합된 facilitated diffusion, 또한 두 개의 이중나선 DNA와 동시에 결합하여 타잔과 같이 하나의 DNA에서 다른 DNA로 이

Fig. 5. Single-stranded DNA curtain assay. Like the double-stranded DNA curtain, the single-stranded DNA curtain uses the same framework combining lipid bilayer, nano-structures, microfluidics, and total internal reflection fluorescence microscopy except that it uses single-stranded DNA molecules instead of double-stranded DNA. In general, single-stranded DNA molecules form secondary structures. To unfold the secondary structures, single-stranded DNA binding proteins (RPA) are needed. RPA-coated single-stranded DNA molecules nonspecifically bind the pentagon nano-structure. The RPA is labeled with green fluorescent protein (GFP), and single-stranded DNA molecules coated with RPA-GFPs are visualized by fluorescence.

동하는 intersegmental transfer, 그리고 앞의 FtsK와 같이 화학에너지를 이용하여 DNA 위를 빠르게 이동하는 active translocation 등이 알려져 있다. 위에서 언급한 바와 같이 DNA curtain은 실시간으로 DNA 위에서 단백질의 움직임을 실시간으로 관찰할 수 있으므로, 한 단백질이 자신이 작용할 target site를 찾는 기작을 정확하게 파악할 수 있으며, 확산상수(diffusion constant)를 계산할 수 있다. 그림 4(B)는 단백질이 1차원 확산(diffusion)을 이용하여 target site를 찾는 과정을 보여준다.^[5]

REFERENCES

- [4] J. Y. Lee, I. J. Finkelstein, L. K. Arciszewska, D. J. Sherratt and E. C. Greene, *Molecular Cell* **54**, 832 (2014).
- [5] J. Gorman, F. Wang, S. Redding, A. J. Plys, T. Fazio, S. Wind, E. E. Alani and E. C. Greene, *Proceedings of National Academy of Sciences of USA* **109**, E3074 (2012).

우선 단백질은 DNA 위의 비특정한 염기서열(random sequence)에 결합한다. 그리고 DNA 위를 확산을 통해서 움직이다가 target site를 찾으면 그곳에 안정적으로 멈춰서 오랜 시간 머무른다. 이러한 단백질의 움직임은 particle tracking을 이용하여 단백질의 DNA 위에서 확산 속도를 정량적으로 구할 수 있게 한다.^[5]

단일나선 DNA curtain

일반적으로 DNA가 안정적으로 보존되기 위해서 이중나선의 형태로 존재하고, 대부분의 경우 단백질들은 이러한 이중나선 DNA와 상호작용을 한다. 하지만 몇몇 중요한 분자생물학적인 반응들은 단일나선 DNA와 단백질의 상호작용으로 이루어진다. 예를 들어 DNA 복제(replication), 복구(repair), 그리고 재조합(recombination) 과정에서는 단일나선 DNA가 요구된다. 단일나선 DNA와 관련된 생체현상을 연구하기 위해서 단일나선 DNA curtain(single-stranded DNA curtain)을 사용한다.(그림 5) 단일나선 DNA curtain은 기본 플랫폼에서는 이중나선 DNA curtain과 동일하지만 이중나선 DNA 대신 단일나선 DNA를 사용하여 curtain을 만든다. 단일나선 DNA의 염기들은 자체적으로 수소결합을 형성하고 2차구조(secondary structure)를 형성한다. 이런 이차 구조를 풀어주기 위해서 단일나선 DNA에만 특이적으로 결합하는 RPA(Replication Protein A)가 사용된다. 이 RPA는 오각형구조물에 비특이적으로 결합하여 단일나선 DNA를 펼쳐진 채로 표면 위에 고정시킨다. 또한 eGFP(enhanced Green Fluorescent Protein)가 RPA에 결합되

어 있어 단일나선 DNA가 형광을 통해 관찰된다.^[6] 이 단일나선 DNA curtain을 이용하여 현재 상동재조합(homologous recombination)에서 가장 핵심적인 역할을 수행하는 Rad51 혹은 RecA 단백질들에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.^[7]

결론

DNA curtain은 나노기술, lipid의 유동성, 형광측정기술 등의 기술을 융합하여 생체분자들 사이의 상호작용을 단일분자 수준에서 실시간으로 이미징할 수 있는 기술이다. 이 기술은 특정 단백질에만 국한되지 않고 수많은 단백질의 연구에 적용할 수 있는 보편적인 기술이다. 앞에서 기술한 바와 같이 DNA curtain은 다양한 단백질들이 이중나선 DNA 위에서 어떻게 움직이며, 이중나선 DNA와 어떻게 상호작용하는가를 직접적으로 보여준다. 나아가 단일나선 DNA와 상호작용하는 단백질들의 기능과 기작에 대해서도 연구할 수 있다. 앞으로 DNA curtain 기술은 더 많은 생체분자들의 역할과 기능 그리고 다른 생체분자와의 상호작용을 연구하는데 커다란 기여를 할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- [6] B. Gibb, T. D. Silverstein, I. J. Finkelstein and E. C. Greene, *Analytical Chemistry* **84**, 7607 (2012).
- [7] J. Y. Lee, T. Terakawa, Z. Qi, J. B. Steinfeld, S. Redding, Y. Kwon, W. A. Gaines, W. Zhao, P. Sung and E. C. Greene, *Science* **349**, 977 (2015).