

Analysis of domain required for aggregates formation of ALS (Amyotrophic lateral sclerosis)/FTD (Frontotemporal dementia)-linked FUS in mammalian cells

Mi-Hee Jun and Jin-A Lee[★]

Department of Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University

(Received August 13, 2015; Revised August 27, 2015; Accepted August 27, 2015)

루게릭병 및 전측두엽성 치매 연관 단백질 Fused in Sarcoma (FUS)의 스트레스 응집체 형성에 관여하는 도메인 분석

전미희 · 이진아[★]

한남대학교 생명나노과학대학 생명시스템학과
(2015. 8. 13. 접수, 2015. 8. 27. 수정, 2015. 8. 27. 승인)

Abstract: Mutations in Fused in Sarcoma (FUS) have been identified in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) or Frontotemporal Dementia (FTD). Pathological FUS is mis-localized to cytosol and forms aggregates associated with stress granules (SG), while FUS is normally localized to nucleus. However, it is largely unknown how pathological FUS forms SG-aggregates and which domains are responsible for this process. In this study, we examined cellular localization and aggregation of ALS-linked FUS missense mutants (P525L, R521C, R521H, R521G), analyzed the domains responsible for cytosolic FUS aggregation in HEK293T cells, and confirmed this in cultured mouse neurons. To do this, we firstly generated missense mutants of FUS and then examined their cellular localization. We found that P525L was mostly mis-localized to cytosol and formed FUS-positive SG aggregates while R521C, R521H, or R521G was localized to both nucleus and cytosol. To further characterize the domains required for aggregate formation of cytosolic FUS, we generated different domain-deletion mutants using FUS-Δ17 which has a deletion of nuclear localization signal. Interestingly, cytosolic FUS without SYGQ and RGG1 domain or cytosolic FUS without RGG2-ZnF-RGG3 domain did not form FUS-positive SG aggregates, while cytosolic FUS without RRM domain generated more aggregates compared to FUS-Δ17. Taken together, these data suggest that SYGQ-RGG1 or RGG2-ZnF-RGG3 domain contributes to formation of cytosolic aggregate, while RRM domain might interfere with FUS aggregation. Therefore, our studies will provide important insight for understanding cellular pathogenesis of neurodegeneration associated with FUS aggregate as well as finding therapeutic targets for ALS or FTD.

요약: DNA/RNA결합 단백질로 다양한 기능을 한다고 알려진 Fused in Sarcoma (FUS)의 유전자 돌연

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)42-629-8785 Fax : +82-(0)42-629-8789

E-mail : leeja@hnu.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

변이가 루게릭병 및 전측두엽성 치매 환자에서 발견되었다. 정상적인 FUS는 핵에 위치하지만 병리상황에서 FUS는 세포질로 잘못 타기팅 되어 스트레스 응집체와 결합된 단백질 응집체를 형성하는 것으로 알려졌다. 그러나 이들에 의한 스트레스 응집체 형성 기전 및 응집체 형성에 관여하는 FUS의 도메인은 정확히 알려지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 루게릭병 연관 FUS 미스센스 돌연변이(P525L, R521C, R521H, R521G)의 세포내 위치 및 세포질 FUS의 응집체 형성에 관여하는 FUS내 도메인을 분석하고 동정하고자 하였다. 이를 위해 먼저, FUS 미스센스 돌연변이의 세포내 위치를 분석한 결과, P525L대부분은 세포질로 위치하여 스트레스 응집체를 형성하는 반면, R521C, R521H, R521G는 핵과 세포질에 위치하였다. 이를 통해 FUS의 핵으로의 이동에는 FUS의 마지막 2개의 아미노산이 매우 중요함을 확인할 수 있었다. 세포질로 빠져 나온 FUS의 응집체 형성에 관여하는 FUS도메인 분석을 위해서 핵 위치서열이 결손되어 대부분 세포질 응집체를 형성하는 FUS- Δ 17를 이용하여, 다양한 도메인 결손 돌연변이를 제작하고, 이들의 응집체 형성여부를 분석하였다. 그 결과, SYGQ-RGG1나 RGG2-ZnF-RGG3없는 세포질 FUS (FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17, FUS- Δ RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17)는 스트레스 응집체를 형성하지 않은 반면, RRM이 없는 FUS- Δ RRM- Δ 17은 FUS- Δ 17에 비해 많은 스트레스 응집체를 형성함을 알 수 있었다. 따라서, 도메인 분석결과 세포질의 FUS는 SYGQ-RGG1나 RGG2-ZnF-RGG3 도메인을 통해 FUS 스트레스 응집체 형성이 촉진되고, RRM도메인은 FUS 응집체 형성을 저해하고 있는 것으로 생각된다. 이러한 연구 결과는 FUS의 스트레스 응집체 형성과 연관된 다양한 퇴행성 뇌질환의 발병기전에 대한 이해뿐만 아니라 이들 질환 치료를 위한 치료 후보 타겟 물질 발굴에 중요한 단서를 제공할 수 있을 것이다.

Key words: FUS, Amyotrophic lateral sclerosis, Stress granule, Frontotemporal dementia, RNA-binding protein

1. 서 론

TLS (Translocated in Liposarcoma)로 알려진 FUS (Fused in Sarcoma)는 점액성 지방 육종(human myxoid liposarcoma)에서 융합 종양 유전자(fusion oncogene)로 처음 동정되었다.^{1,2} 이러한 종양에서는 FUS의 N-말단이 CHOP과 같은 전사인자에 융합하여 FUS가 융합 종양 유전자로 기능하게 하는 것으로 알려졌다.² 그 이후 FUS는 주로 종양 유전자로서의 기능에 초점을 맞추어 연구가 되었으나, 2009년 운동 퇴행성 뇌질환의 가장 흔한 형태인 루게릭병(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)에서 FUS의 돌연변이가 보고되고, 루게릭병을 가진 환자의 뇌에서 FUS를 포함하는 응집체 존재가 발견되면서 퇴행성 뇌질환에서 이들의 기능이 새롭게 연구되기 시작했다.^{3,4} 또한, 루게릭병 뿐 아니라 65세 이전에 발병하는 조기치매의 일종인 전측두엽성 치매(Frontotemporal Dementia)환자에게서도 드물지만 FUS의 돌연변이가 발견되었고, 흥미롭게도 FUS의 돌연변이가 없는 퇴행성 뇌질환의 신경세포에서도 FUS를 포함하는 세포질 응집체가 발견되어 퇴행성 뇌질환에서의 FUS의 기능 연구가 이들 질환의 병리기전 이해 및 치료제 발굴에 중요하게 생각되고 있다.⁵

FUS는 DNA/RNA결합 단백질로서 주로 핵에 위치하는 것으로 알려져 있으나, 퇴행성 뇌질환의 신경세포에서는 이들이 핵에서 세포질로 비정상적으로 빠져 나와 단백질 응집체에 축적되며, 이러한 응집체는 스트레스 상황에서 일시적으로 형성되는 스트레스 응집체 단백질들과 함께 존재하는 것으로 보고가 되었다.^{6,7} 스트레스 응집체는 세포가 산화 스트레스, 삼투 스트레스와 같은 다양한 스트레스 상황에 노출되었을 때, 비정상적인 세포 내 상황에서 단백질 합성을 일시적으로 멈추기 위하여 단백질 합성 구조체, RNA결합 단백질 및 RNA들이 뭉친 구조로서, 밀집된 형태의 세포질 응집체이다.⁷ 이들은 스트레스 상황에서는 급속히 형성되었다가 스트레스가 제거되면 급속히 분해되는 매우 가역적인 구조로 알려져 있다.⁷ 그러나 최근 다양한 세포 모델의 연구결과에 따르면 루게릭병 연관 FUS돌연변이 단백질들은 핵에서 빠져 나와 스트레스 응집체 단백질들과 비정상적인 스트레스 응집체를 형성하여 분해되지 않고, 세포질에 축적되는 것으로 보고가 되고 있다.⁸⁻¹¹ 또한 이러한 비정상적인 스트레스 응집체가 비가역적인 형태로 변환되면서 퇴행성 뇌질환 병리현상에 핵심인 단백질 응집체로서 변환되고, 이들이 환자 뇌에 비정상적으로 축적됨 것으로 생각되고 있다.⁷ 따라서, 스트레스 상황이나 생리학

적 상황에서 FUS의 적절한 세포 내 위치는 신경세포에서 이들의 정상기능에 매우 중요할 것으로 생각되고, FUS의 세포 내 위치를 결정하는데 중요한 도메인 분석은 필수적이라 할 수 있다.

FUS는 526개의 아미노산으로 구성되어 있으며 N-아미노 말단에 전사활성화 도메인, 다수의 핵산 결합 도메인, C-카르복시 말단에는 핵 위치서열 (nuclear localization signal)이 존재한다.¹² 특히, N-아미노 말단의 SYGQ-풍부 도메인 (SYGQ-rich domain)은 다른 전사인자의 DNA결합 부위와 융합되면 전사활성화 도메인 (transcriptional activation domain)으로 기능한다고 알려져 있으며, 또한 이 부위는 프리온 유사 (prion-like) 특성을 가져서 *in vitro*에서 사상형태의 FUS응집체 (filamentous form of FUS aggregates)형성에 관여한다고 알려졌다.^{12,13} 게다가, 핵산결합 도메인으로서 FUS내에는 3개의 arginine-glycine-glycine (RGG1-3) 부위, 1개의 RNA인식 모티프 (RNA recognition motif: RRM)와 zinc 핑거 (zinc finger: ZnF) 도메인이 존재한다.¹⁴ RGG2-ZnF-RGG3 도메인은 RNA결합에 중요한 역할을 하며, GU풍부 염기서열에 결합 선호도가 있는 것으로 알려져 있다.^{15,16} 그리고, C-카르복시 말단에는 비정상적 형태의 proline-tyrosine 핵위치서열 (PY-NLS)과 RGG3 도메인이 존재한다. 매우 흥미롭게도, 유전성의 루게릭병에서 발견되는 돌연변이의 대부분이 FUS의 C-카르복시 말단에 집중되어 있다.^{17,18} 세포질로의 FUS이동이 가장 심한 P525L돌연변이의 경우, 실제 질병의 비정상적인 조기 발병 및 급속한 진행이 보고되어^{19,20} FUS의 핵 위치 신호서열내의 돌연변이는 FUS의 세포질로의 이동 및 세포질 내 축적을 야기하며 루게릭병 발병에 핵심기전이 될 것으로 생각된다. 또한, FUS유전자에 돌연변이가 없는 루게릭병 및 전측두엽성 치매 환자의 신경세포에서 FUS가 핵 밖으로 빠져 나와 세포질에서의 응집체 및 스트레스 응집체에 축적됨이 보고되었다.

따라서, FUS 단백질의 세포내 정상적 타겟팅에 필요한 도메인 분석 및 세포질 응집체 및 스트레스 응집체 형성에 필요한 도메인 분석은 FUS의 정상적인 기능 및 이들이 관여하는 퇴행성 뇌질환의 병리기전 연구에 핵심이 될 것이다. 이를 위해, 본 연구에서는 루게릭병에서 발견된 FUS의 돌연변이 단백질의 세포 내 위치를 분석하고, 핵 위치신호서열 결여 FUS를 이용하여 다양한 도메인 결핍에 의한 FUS의 위치 분석을 통해, 세포질로 이동한 FUS의 응집체 형성에 관여하는 도메인을 동정하고자 하였다. 그 결과, 루게릭병

연관 FUS돌연변이 중 P525L은 대부분 핵 밖으로 나와 응집체를 많이 형성하였으며, R521C는 핵과 세포질에 위치했고, 세포질로 이동한 FUS의 대부분이 응집체를 형성하였다. 그러나, R521G나 R521H의 경우 핵과 세포질에 위치하였지만, R521C에 비해 세포질 응집체 형성은 적었다. 세포질로 이동하는 FUS제작을 위해 핵 신호서열을 포함하는 마지막 17개의 아미노산 결손 돌연변이(FUS-Δ17)를 제작하여, 이들의 세포질 이동과 세포질 내에서의 응집체를 형성을 검증하였다. 응집체 형성을 위해 필요한 도메인을 동정하기 위해서, FUS-Δ17을 이용하여, 다양한 도메인 결손 돌연변이 단백질 발현 벡터를 제작하고, 이들의 응집체 형성을 분석한 결과, 세포질로 빠져 나온 FUS의 응집체 형성을 위해서는 N-말단의 SYGQ-풍부 도메인 및 RGG1도메인과 C-말단의 RGG2-ZnF-RGG3도메인이 필수적임을 알 수 있었고, 매우 흥미롭게도 RRM도메인은 세포질 FUS 응집체 형성을 억제함을 확인할 수 있었다. 대부분의 세포질 FUS 응집체는 스트레스 응집체 마커 단백질인 PABP와 결합함을 확인하였다. 따라서, 병리상황에서 세포질로 빠져 나온 FUS는 RGG 도메인을 통해 스트레스 응집체 형성이 촉진되고, RRM은 응집체 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과는 향후 FUS의 스트레스 응집체 형성에 관련된 기전뿐 아니라 다양한 퇴행성 뇌질환에서 FUS의 병리학적 스트레스 응집체 형성 및 축적을 조절하는 기전 이해를 통해 이들과 연관된 질환의 치료 후보 발굴을 위한 단서를 제공할 수 있을 것이라 생각된다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. DNA 제작

실험에 사용한 human FUS WT와 결손 돌연변이들(FUS-Δ17, FUSΔGly-Δ17, FUS ΔRRM-Δ17, FUS ΔRGG-Δ17, FUS 135-Δ17, FUS 195-Δ17, FUS 255-Δ17)은 특정 PCR 프라이머 세트를 이용하여 PCR로 각각 증폭하였다(Table 1). 각각의 PCR 산물은 3xFLAG CMV 7.1 vector (sigma)의 HindIII/BamHI 사이에 넣어 3xFLAG 융합 발현 벡터로 최종 제작하였다.

2.2. 세포 배양 및 DNA transfection

인간 배아 신장 세포(HEK 293)는 10% FBS, Penicillin/streptomycin, DMEM 배양액에서 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양기를 이용해 배양하였다. 면역세포화학법을

Table 1. Primer list for FUS deletion constructs

| Construct | Use | Orientation | Sequence |
|----------------------------|-------------|-------------|--|
| FUS WT | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAATACGGCCTCTCCCT-3' |
| FUS Δ17 | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |
| FUS-ΔRGG1-Δ17 | Recombinant | Forward | 5'-AACAGCAGCAGTCCTCGGGACCAAGGATCA-3' |
| | Recombinant | Reverse | 5'-TTGGTCCCGAGGACTGCTGCTGTTGACTG-3' |
| | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |
| FUS-ΔRRM-Δ17 | Recombinant | Forward | 5'-CCGATTAAGTCTGCCCGTTGTTGTCTGAATTATC-3' |
| | Recombinant | Reverse | 5'-AAAGTCTGCCCGTTGTTGTCTGAATTATC-3' |
| | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |
| FUS-ΔRGG2- ZnF-RGG3-Δ17 | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGCCTCAAACGATTATAC-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCGAGTAGCAAATGAGAC-3' |
| FUS-ΔI35-Δ17 | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATG AGCTATGGTGGACAGCAG-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |
| FUS ΔSYGQ-Δ17 | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGGCAATCAAGACCAGAGT-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |
| FUS ΔSYGQ- RGG1-Δ17 | FLAG | Forward | 5'-CGCCCAAGCTTATGGGCGGAAGTGACCGTGGT-3' |
| | FLAG | Reverse | 5'-CGCGGATCCTTAGCCAGGGCCAAAGCCACC-3' |

하기 위해서 세포를 poly-L-lysine 코팅된 cover glass 위에 세포를 배양하였으며 유전자 도입 방법으로 CalPhos™ Mammalian Transfection kit (Clontech)를 제조회사의 지시에 따라 세포 내에 유전자를 도입하였다.

마우스 일차배양 대뇌피질 신경세포는 임신한지 16 일 된 ICR(Imprinting Control Region) 쥐의 태아의 신경세포를 배양하여 사용하였다. 적출한 태아의 대뇌피질을 2.5% 트립신을 이용하여 세포수준으로 분해한 후 신경세포부착배양액(10% FBS, 0.45% glucose, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin, MEM)에서 3

시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 세포 배양기를 이용해 배양한 후, 신경세포유지배양액(B-27, 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin, Neurobasal medium)으로 바꾸어 배양하였다.

2.3. 면역세포화학법

Cover glass 위에서 자란 유전자 도입된 세포를 4% paraformaldehyde에 10분간 상온에서 고정시킨 후, 1X PBS로 5분씩 상온에서 2 회 씻어내었다. 0.1% triton X-100을 상온에서 5분동안 대기하여 투과성 있는 세포상태로 만든 후, 1.5% bovine serum albumin 으로

30분동안 상온에서 블락킹 하였다. 1차 항체 (anti-flag(Sigma, F1804), anti-PABP(Abcam, ab21060)는 1:100으로 사용하였고 2차 항체((Cy3 and Alexa488 conjugated secondary antibody: Jackson Immuno Reserch, 715-165-150)는 1:200으로 희석하여 사용하였다. 형광 이미지는 공초점 주사 현미경(Confocal microscope, Carl Zeiss)을 이용하여 획득하여 Image J프로그램을 이용하여 이미지를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 루게릭병 연관 FUS 미스센스 돌연변이 단백질들의 세포 내 위치 분석

루게릭병에서는 30여종 이상의 FUS의 돌연변이가 발굴되었으며, 이들의 대부분은 C-말단에 위치한다고 알려져 있다. FUS돌연변이의 세포 내 위치 및 응집체 형성을 알아보기 위해서, 먼저, 이들 중 루게릭병 환자의 뇌에서 FUS의 응집체가 뚜렷하고 비교적 흔히

발견되는 4가지 미스센스 돌연변이(P525L, R521C, R521H, R521G)의 세포 내 위치 및 응집체 형성을 분석 하였다(Fig. 1A, B). 이를 위해, 미스센스 돌연변이는 각각의 특정 미스센스 돌연변이를 포함하는 염기 서열 프라이머를 이용하여 재조합 PCR방법으로 제작 되었으며, flag 융합 FUS 돌연변이 발현 벡터를 제작 하여 이들을 HEK293T 세포주에 도입하였다. 유전자 도입 후 24시간후에 flag항체를 이용하여 세포면역학적 염색법으로 FUS 미스센스 돌연변이의 세포 내 위치 및 응집체 형성 여부를 공초점 주사 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 야생형 FUS 단백질(FUS wild-type: FUS(WT))은 핵에서만 주로 위치하는 반면, C-말단의 끝 쪽에 있는 525번째 아미노산 프롤린 (proline, P)이 루신(leucine, L)으로 치환된 P525L 돌연변이 단백질은 거의 대부분이 핵에서 빠져 나와 세포질에 FUS응집체를 형성하였다(Fig. 1A, B). 그러나, 521번째 아미노산 아르기닌(arginine, R)이 시스테인 (cysteine, C)으로 치환된 R521C 돌연변이 단백질은

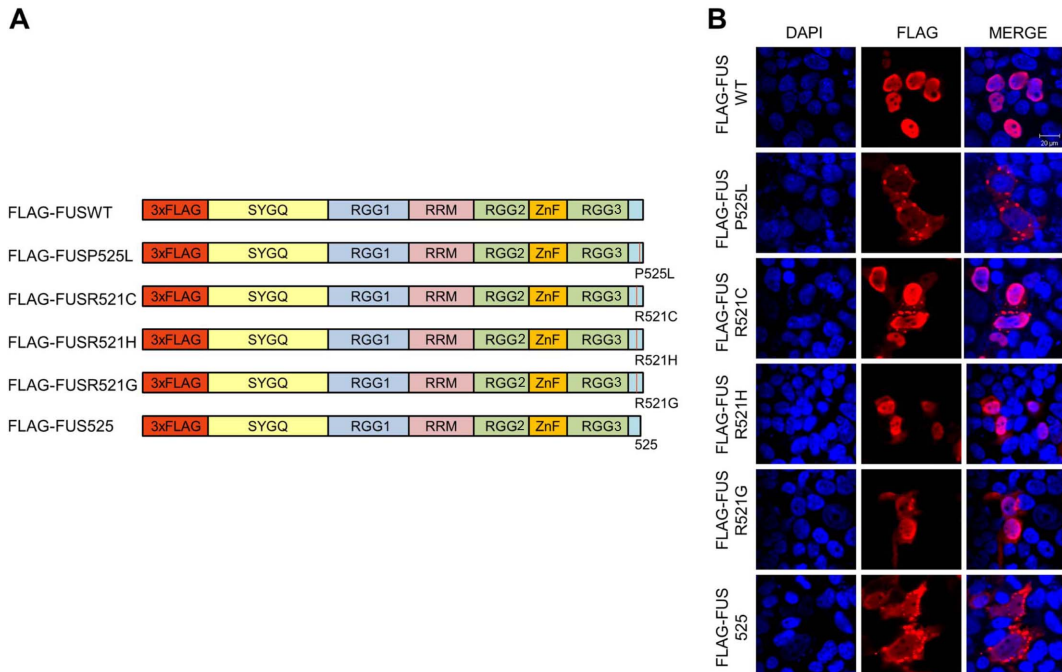


Fig. 1. Cellular localization of FUS and formation of FUS-positive aggregate in HEK293T cells expressing FUS missense mutants (P525L, R521C, R521H, R521G). (A) Schematic domain structure of FUS (wild-type: WT), missense mutants (P525L, R521C, R521H, R521G). SYGQ; Ser-Tyr-Gly-Gln, RGG; Arg-Gly-Gly-rich motif, RRM; RNA-recognition motif, ZnF; zinc-finger motif. Missense mutations are indicated by red lines. Flag-FUS (WT), flag-FUS (P525L), flag-FUS(R521C), flag-FUS(R521G), flag-FUS(R521H) was transfected into HEK293T cells. Cells were fixed and immunostained with anti-flag antibody. (B) Confocal images showing cellular localization of FUS and FUS-positive aggregates in cells expressing each FUS construct. Scale bar: 20 μ m, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) was used for nuclear staining.

핵과 세포질에 위치하였고, 세포질에 위치한 FUS는 세포질 응집체를 형성하였다. 매우 흥미롭게도 같은 위치, 521번째 아미노산이 히스티딘(histidine, H)이나 글리신(glycine, G)으로 치환된 R521H, R521G 돌연변이 단백질의 경우에는 R521C와 마찬가지로 핵과 세포질에 위치 하였으나 세포질에서의 응집체 형성은 R521C의 경우에 비해 적었다. 이는 아르기닌이 시스테인으로 변하면 단백질 특성 혹은 구조 변형이 일어날 수 있고, 이로 인해 기존 단백질들과의 결합이나 신호 변화를 일으켜 세포질에서의 응집체 형성에 영향을 줄 수 있을 것이라 생각된다. 그리고, P525L 돌연변이와 FUS의 제일 마지막 526번째 아미노산 결손

돌연변이(FUS 525)가 모두 세포질로 빠져 나와, 세포질 응집체를 형성하고 축척되는 것으로 보아 핵으로 위치하게 하는 핵 위치서열 중 핵심 아미노산은 FUS의 C-말단 2개 525-526번째 아미노산(525:프롤린proline (P), 526:타이로신tyrosine (Y))임을 확인할 수 있었다. FUS의 핵으로부터 세포질로의 비정상적인 이동 및 응집체 형성은 핵에서 FUS의 기능 결여를 유발하고, 또한 세포질에 비정상적인 응집체를 형성함으로써 세포질에서의 세포기능에 문제를 유발할 수 있는데, 이는 FUS 연관 퇴행성 뇌질환의 핵심 기전이 될 수 있다. 실제로 FUS의 핵 밖 세포질 이동 및 응집체 축척의 정도는 질병의 심각도와 비례하는 것으로 보고되고

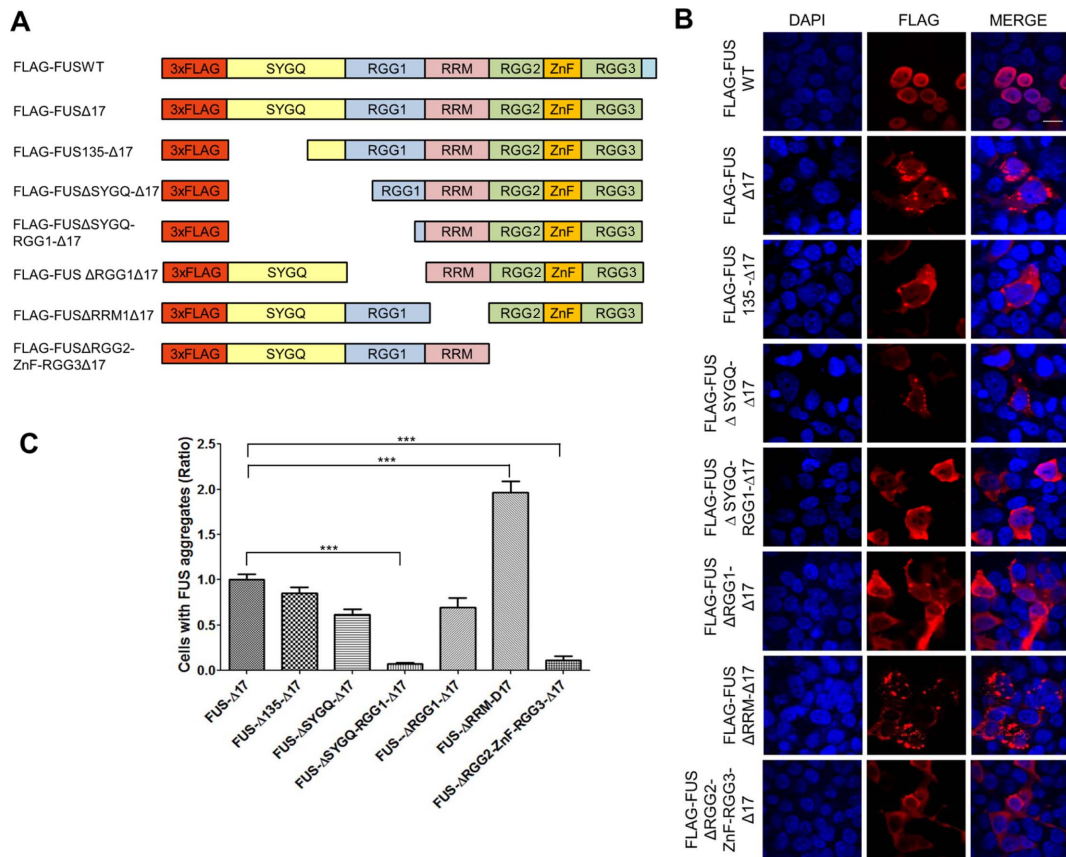


Fig. 2. Cellular localization of FUS and formation of FUS-positive aggregate in HEK293T cells expressing FUS deletion mutants with NLS deletion (Δ 17). (A) Schematic domain structure of FUS deletion mutants with NLS deletion (Δ 17) (FUS Δ 17, FUS- Δ 135- Δ 17, FUS- Δ SYGQ- Δ 17, FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17, FUS- Δ RGG1- Δ 17, FUS- Δ RRM- Δ 17, FUS-RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17). Each flag-tagged deletion mutant construct of FUS- Δ 17 was transfected into HEK293T cells. Cells were fixed and immunostained with anti-flag antibody. (B) Confocal images showing cellular localization of FUS and FUS-positive aggregates in cells expressing each FUS mutant construct. Scale bar: 20 μ m, DAPI was used for nuclear staining. (C) Bar graph representing ratio of cells with FUS-positive aggregate in cells expressing each FUS-mutant expressing cells. Values are the means \pm SEM of three independent replicates. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparisons test; ***, $p < 0.001$.

있다.¹⁵ 그러나, 세포질로 빠져 나온 FUS가 어떻게 응집체를 형성하는지, 또한 이러한 응집체의 형성 및 축적이 병리기전에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다. 세포질의 FUS 응집체 형성에 관여하는 FUS 도메인에 대한 분석은 여러 세포모델에서 시도되었지만, 지금까지 명확히 밝혀지지 않았다. 이를 위해서는 핵으로는 위치하지 않고, 세포질에서만 위치하는 FUS를 이용하여 다양한 도메인 결손 돌연변이를 통해 분석하는 것이 필수적이다.

3.2. 세포질 FUS의 응집체 형성에 관여하는 도메인 분석

세포질로 이동하는 FUS를 제작하기 위해, FUS도메인 중에서 C-말단의 핵심 NLS 마지막 17개의 아미노산(KMDSRGEHRQDRRERPY)을 결손시킨 돌연변이(FUS Δ 17)를 제작하고, flag 융합 발현 벡터에 옮겼다. 이러한 flag-FUS Δ 17을 HEK293T 세포 주에 발현시키고 24시간 후, 이들의 세포 내 위치를 관찰한 결과, Fig. 2에서 볼 수 있듯이 FUS Δ 17은 모두 세포질에 위치하였고, 세포질에 많은 응집체를 형성하였다. 세포질로 빠져 나온 FUS는 우선적으로 응집체를 형성하는 것으로 생각된다. 그렇다면, 응집체 형성을 하게 하는 기전은 무엇일까? FUS는 앞서 서론에서 언급하였듯이 다양한 도메인이 존재하는데,^{7,15} 이들 도메인 중 FUS가 급속도로 강하게 응집되게 하는 FUS내의 도메인 및 아미노산 영역은 어디일까?

이를 연구하기 위해, FUS Δ 17를 이용하여 세포질로 위치한 FUS가 응집체를 형성하는데 필요한 도메인 분석을 수행하였다. Fig. 2A에서는 다양한 도메인 결손 돌연변이의 모식도를 볼 수 있다. 먼저, FUS의 N-아미노 말단에서 시작하는 결손 돌연변이로, SYGQ 앞쪽 일부(시작서열1-135아미노산)가 결손된 FUS- Δ 135- Δ 17, SYGQ 전체가 결손된(1-194 아미노산) FUS- Δ SYGQ- Δ 17, 그리고, SYGQ 및 RGG1도메인이 결손된(1-254 아미노산) FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17을 제작하였다. 또한, RGG1도메인만을 결손시킨(166-267 아미노산) FUS- Δ RGG1- Δ 17, RRM도메인만을 결손시킨(286-371 아미노산) FUS- Δ RRM- Δ 17, 그리고, 뒤쪽 RGG2-ZnF-RGG3를 결손시킨(372-526 아미노산) FUS-RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17를 제작하였다. 각각의 세포질 FUS의 결손 돌연변이들을 HEK293T 세포주에 24시간 동안 발현시켜 이들의 세포 내 위치를 분석하고, FUS Δ 17와 비교하여 각각의 결손 돌연변이를 발현시키는 세포에서 응집체를 보이는 세포의 비율

(ratio)을 정량화 하였다(Fig. 2C). 그 결과, Fig. 2B-C에서 볼 수 있듯이, SYGQ 도메인이 결손된 경우 세포질의 FUS 응집체 형성이 감소되었지만 완전히 감소되지는 않았다(Cells with FUS aggregates (ratio): FUS Δ 17; 1.00 \pm 0.06, FUS- Δ SYGQ- Δ 17; 0.61 \pm 0.06. 그러나, SYGQ와 RGG1모두 결손된 돌연변이 단백질은 세포 내 응집체가 거의 형성되지 않았다(FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17; 0.08 \pm 0.01). 그러나, RGG1만 결손된 돌연변이(FUS- Δ RGG1- Δ 17)는 세포 내 응집체 형성이 억제되지 않는 것으로 보아, RGG1은 SYGQ와 함께 FUS 응집체 형성을 촉진시킬 것으로 생각된다(FUS- Δ RGG1- Δ 17; 0.70 \pm 0.10). 매우 흥미롭게도, 최근 퇴행성 뇌 질환에서 발견되는 RNA결합 단백질인 TDP-43나 다른 질병 연관 RNA결합 단백질은 프리온 유사 특성을 가지면서 단백질 응집체 형성을 가속화시키는 것으로 알려지고 있고, FUS의 SYGQ도메인 또한 프리온 유사 특성을 가지고 응집체 형성에도 관여할 것으로 보고되고 있어^{21,22} SYGQ 도메인이 FUS의 응집체 형성에 핵심이 되는 역할을 할 것으로 생각된다. 그리고, FUS의 RGG1도메인은 글리신(glycine, G)이 풍부하게 존재하는데, 주로 글리신 풍부 영역은 다양한 단백질 결합에 중요하다고 알려져 있다.⁷ RGG1도메인과 다양한 단백질과의 결합이 세포질 FUS의 응집체 형성을 가속화시킬 가능성이 클 것으로 생각된다. 실제로 FUS는 다양한 RNA결합 단백질 및 스트레스 응집체 형성 단백질과 결합하여 세포 내 스트레스 상황에서 급속한 스트레스 응집체를 형성할 것으로 예측된다.⁷ 향후, RGG1도메인을 통해서 이러한 단백질간의 결합이 일어나는지, 이들의 결합을 통해 응집체 형성이 가속화되는지 연구하는 일은 응집체 형성 기전 이해에 핵심이 될 것으로 생각된다.

그리고, 다양한 세포질 FUS 결손 돌연변이 중 RRM결손 돌연변이(FUS- Δ RRM- Δ 17)는 세포 내 응집체 형성을 더 증가시키는 흥미로운 결과를 얻을 수 있었다(FUS- Δ RRM- Δ 17; 1.97 \pm 1.12). 즉, 세포질 FUS는 RRM도메인에 의해서 일반적으로 응집체 형성이 저해되고 있을 것으로 예측된다. 최근 보고에 의하면 FUS의 RRM도메인은 RNA/DNA 결합에 직접 관여하나 이들의 핵산과의 결합력 및 결합에 관여하는 핵산 서열 특이성은 다소 약하다고 알려져 있다.²³ 또한, 다른 RNA결합 단백질과는 달리 FUS-RRM은 예외적으로 매우 강한 양성 전하를 띠는 아미노산 루프를 이루고 있다고 알려져 있다.²³ 이들이 주로 세포질과 핵으로의 위치이동에 관여할 것으로 보고되어 왔으나,^{7,15}

본 실험 결과(Fig. 2B-C)에 의하면 FUS-RRM은 세포질에서 FUS 응집체 형성을 촉진하는데도 관여할 것으로 생각되는데 향후, RGG1도메인이 어떻게 응집체 형성을 촉진시키는지에 대한 기전연구는 매우 흥미로운 것이다.

세포질 FUS의 결손 돌연변이 중 C-말단의 RGG2-ZnF-RGG3도메인 결손 돌연변이 FUS-RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17도 거의 응집체를 형성하지 않고, 세포질에 퍼져 위치하는 것으로 보았을 때, RGG2-ZnF-RGG3 또한 세포질 FUS 응집체 형성에 필수적인 도메인임을 확인할 수 있었다(FUS-RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17; 0.12 \pm 0.04) (Fig. 2B-C). RGG2-ZnF-RGG3는 FUS의 RNA결합에 필수적인 영역으로 보고되었고,¹⁵ 최근에는 FUS의 RNA결합이 FUS에 의해 매개되는 세포독성에 매우 중요하다는 결과가 보고되었다.²⁴ RGG2-ZnF-RGG3도메인내 RNA결합부위 돌연변이를 가지는 FUS단백질을 발현하는 초파리는 세포독성이 감소한다는 결과를 보고하였다.²⁴ 게다가, 최근 연구에 따르면 RNA가 FUS 응집체 형성의 시드(seed)로 작용한다고 알려져 FUS와 RNA결합이 응집체 형성에 중요할 것으로 생각되며, RNA결합에 중요한 핵심 도메인 결여가 응집체 형성을 감소시킨다는 본 연구 결과를 뒷받침해 주

고 있다.²⁵

따라서, 도메인 분석결과, 세포질로 빠져나온 FUS의 응집체 형성에는 FUS의 N-말단 SYGQ-RGG1, C-말단 RGG2-ZnF-RGG3도메인이 필수적인 역할을 하며, RRM도메인은 세포질내의 FUS가 응집체로 형성되는 것을 다소 저해할 것으로 생각된다.

3.3. FUS세포질 응집체의 스트레스 응집체 여부 분석

앞서 서론에서 언급했듯이 루게릭병이나 전측두엽성 치매 환자의 질환 뇌에서는 FUS를 포함하는 응집체에 스트레스 응집체에 존재하는 단백질이 함께 존재한다고 보고가 되었고, 최근 많은 연구결과들이 세포질 내의 FUS와 스트레스 응집체 형성 및 축적과의 관련성에 대해 보고 하고 있다.²⁶ 따라서, 앞선 결과에서 관찰하였던 FUS 단백질 응집체가 스트레스 응집체와 연관 있는지 알아보기 위해서 세포질 FUS의 도메인 결손 돌연변이들이 형성하는 세포질 응집체를 스트레스 응집체 마커 단백질인 PABP1로 세포면역법을 통해 염색하여 공초점 주사 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, Fig. 3에서 보는 것과 같이 FUS의 세포질 응집체 모두 스트레스 응집체 마커 단백질인

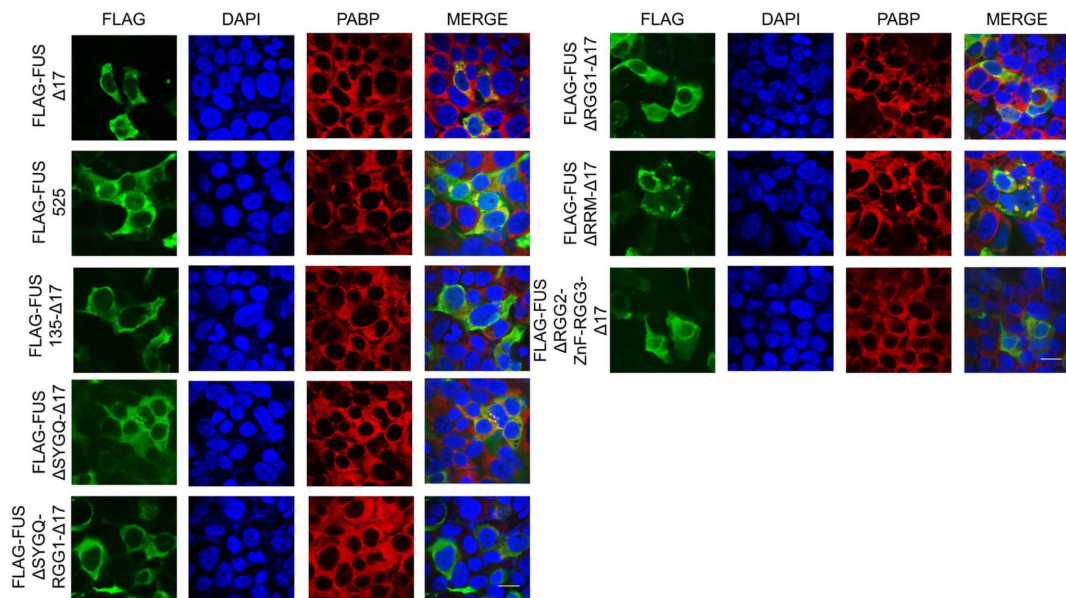


Fig. 3. Colocalization of FUS with PABP-positive stress granule (SG) in cells expressing each FUS mutant in HEK293T cells. Each flag-tagged FUS construct was transfected into HEK293T cells. Cells were fixed and immunostained with anti-flag or anti-PABP antibody. Confocal images showing cellular localization of FUS and FUS-positive aggregates in cells expressing each deletion mutant of FUS- Δ 17. Scale bar: 20 μ m, DAPI was used for nuclear staining. PABP: a stress granule marker protein.

PABP1과 공동으로 위치하였다. 따라서, 세포질로 빠져나온 FUS는 HEK293T 세포에서 산화 스트레스, 열 충격 스트레스, 삼투스트레스와 같은 외부 스트레스가 주어지지 않는 상황에서, 이들의 과발현만으로 스트레스 응집체 형성을 촉진함을 알 수 있었다.

3.4. 마우스 일차배양신경세포에서 FUS스트레스 응집체 형성 연관 도메인 검증

FUS의 돌연변이는 질병을 가지는 환자의 모든 종류의 세포에 존재하지만 분열을 하지 않은 신경세포는 빠른 분열을 하는 다른 종류의 세포에 비해서 FUS 세포질 응집체 형성 및 축적이 다양한 뇌세포의 기능 및 생존에 더 취약할 것이다. 따라서, 포유류 세포 모델에서 동정된 FUS응집체 형성에 필요한 도메인 분석 결과를 마우스 일차배양신경세포에서 검증하고자 하였다. 이를 위해 배양된 대뇌피질신경세포에 Flag-FUS(WT), Flag-FUS- Δ 17, Flag-FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17, Flag-FUS- Δ RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17를 발현시키고, 24 시간 이후 이들의 세포 내 위치 및 스트레스 응집체 여부를 관찰하였다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이

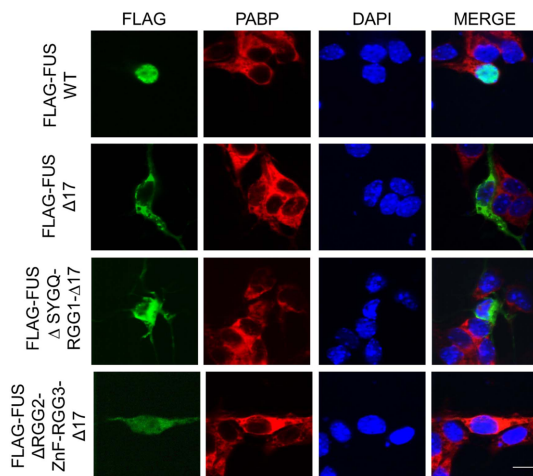


Fig. 4. Cellular localization of FUS and formation of FUS-positive aggregate in mouse cultured cortical neurons expressing FUS (WT) or cytosolic FUS with domain deletion (FUS Δ 17, FUS- Δ SYGQ-RGG1- Δ 17, or FUS-RGG2-ZnF-RGG3- Δ 17). Each flag-tagged FUS construct was transfected into mouse cultured cortical neurons (at DIV(days *in vitro*)3-5). Neurons were fixed and immunostained with anti-flag or anti-PABP antibody. Confocal images showing cellular localization of FUS and FUS-positive aggregates in neurons expressing FUS (WT) or deletion mutants of FUS- Δ 17. Scale bar: 10 μ m, DAPI was used for nuclear staining. PABP: a stress granule marker protein.

FUS (WT)는 신경세포의 핵에 위치하는 반면, FUS- Δ 17은 모두 핵으로 빠져 나와 세포질에서 PABP로 표지 되는 스트레스 응집체를 형성하였다. 그러나, 앞선 실험에서 HEK293T 세포주 모델에서 스트레스 응집체 형성에 필수적인 도메인으로 검증된 SYGQ-RGG1나 RGG2-ZnF-RGG3를 결손시킨 돌연변이 FUS는 신경세포의 세포질에는 위치하지만, 스트레스 응집체를 형성하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 일차배양신경세포에서도 스트레스가 없는 상황에서도 FUS- Δ 17은 세포질로 위치하여 스트레스 응집체 형성을 유도하였으며, 이들이 스트레스 응집체를 형성하는데는 SYGQ-RGG1나 RGG2-ZnF-RGG3도메인이 필수적인 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

4. 결론

본 연구에서는 루게릭병 및 전측두엽성 치매 연관 DNA/RNA결합 단백질 FUS가 세포질에서 스트레스 응집체를 형성하는데 필요한 FUS내 도메인을 분석하고, SYGQ-RGG1 및 RGG2-ZnF-RGG3 도메인을 동정하여 이들의 역할을 일차배양신경세포에서 검증하였다. 다양한 퇴행성 뇌 질환에서 보이는 FUS 스트레스 응집체 형성 및 축적은 질병의 병리기전에 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 본 연구를 통한 FUS의 스트레스 응집체 형성에 관여하는 도메인 분석은 FUS 응집체와 연관된 다양한 퇴행성 뇌 질환의 병리기전의 이해뿐만 아니라 질병 치료의 타겟 발굴에 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 주관하는 질병 중심 중개 연구 사업(Korea Health Technology R&D Project (HI14C1891))과 NRF의 일반연구지원사업(NRF (2014R1A1A4A01003859))에 의해서 지원되었습니다.

References

1. A. Crozat, P. Aman, N. Mandahl and D. Ron, *Nature*, **363**(6430), 640-644 (1993).
2. T. H. Rabbitts, A. Forster, R. Larson and P. Nathan, *Nat Genet*, **4**(2), 175-180 (1993).
3. T. J. Kwiatkowski, Jr., D. A. Bosco, A. L. Leclerc, E. Tamrazian, C. R. Vanderburg, C. Russ, A. Davis, J. Gil-

- christ, E. J. Kasarskis, T. Munsat, P. Valdmanis, G. A. Rouleau, B. A. Hosler, P. Cortelli, P. J. de Jong, Y. Yoshinaga, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, J. Yan, N. Ticozzi, T. Siddique, D. McKenna-Yasek, P. C. Sapp, H. R. Horvitz, J. E. Landers and R. H. Brown, Jr., *Science*, **323**(5918), 1205-1208 (2009).
4. C. Vance, B. Rogelj, T. Hortobagyi, K. J. De Vos, A. L. Nishimura, J. Sreedharan, X. Hu, B. Smith, D. Ruddy, P. Wright, J. Ganesalingam, K. L. Williams, V. Tripathi, S. Al-Saraj, A. Al-Chalabi, P. N. Leigh, I. P. Blair, G. Nicholson, J. de Belleruche, J. M. Gallo, C. C. Miller and C. E. Shaw, *Science*, **323**(5918), 1208-1211 (2009).
 5. M. Neumann, R. Rademakers, S. Roeber, M. Baker, H. A. Kretzschmar and I. R. Mackenzie, *Brain*, **132**(Pt 11), 2922-2931 (2009).
 6. D. Dormann and C. Haass, *Mol. Cell Neurosci.*, **56**, 475-486 (2013).
 7. E. Bentmann, C. Haass and D. Dormann, *FEBS J*, **280**(18), 4348-4370 (2013).
 8. T. A. Shelkovernikova, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**(6), 1613-1617 (2013).
 9. H. H. Ryu, M. H. Jun, K. J. Min, D. J. Jang, Y. S. Lee, H. K. Kim and J. A. Lee, *Neurobiol. Aging.*, **35**(12), 2822-2831 (2014).
 10. D. M. Baron, L. J. Kaushansky, C. L. Ward, R. R. Sama, R. J. Chian, K. J. Boggio, A. J. Quaresma, J. A. Nickerson and D. A. Bosco, *Mol. Neurodegener.*, **8**(1), 30 (2013).
 11. T. A. Shelkovernikova, H. K. Robinson, N. Connor-Robson and V. L. Buchman, *Cell Cycle*, **12**(19), 3194-3202 (2013).
 12. D. Dormann and C. Haass, *Mol. Cell Neurosci.*, **56**, 475-486 (2013).
 13. T. W. Han, M. Kato, S. Xie, L. C. Wu, H. Mirzaei, J. Pei, M. Chen, Y. Xie, J. Allen, G. Xiao and S. L. McKnight, *Cell*, **149**(4), 768-779 (2012).
 14. C. G. Burd and G. Dreyfuss, *Science*, **265**(5172), 615-621 (1994).
 15. E. Bentmann, M. Neumann, S. Tahirovic, R. Rodde, D. Dormann and C. Haass, *J. Biol. Chem.*, **287**(27), 23079-23094 (2012).
 16. Y. Iko, T. S. Kodama, N. Kasai, T. Oyama, E. H. Morita, T. Muto, M. Okumura, R. Fujii, T. Takumi, S. Tate and K. Morikawa, *J. Biol. Chem.*, **279**(43), 44834-44840 (2004).
 17. D. Dormann, R. Rodde, D. Edbauer, E. Bentmann, I. Fischer, A. Hruscha, M. E. Than, I. R. Mackenzie, A. Capell, B. Schmid, M. Neumann and C. Haass, *EMBO J*, **29**(16), 2841-2857 (2010).
 18. D. A. Bosco, N. Lemay, H. K. Ko, H. Zhou, C. Burke, T. J. Kwiatkowski, Jr., P. Sapp, D. McKenna-Yasek, R. H. Brown, Jr. and L. J. Hayward, *Hum. Mol. Genet.*, **19**(21), 4160-4175 (2010).
 19. D. Dormann and C. Haass, *Trends Neurosci.*, **34**(7), 339-348 (2011).
 20. Z. C. Zhang and Y. M. Chook, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**(30), 12017-12021 (2012).
 21. Z. Maniecka and M. Polymenidou, *Virus Res*, **207**, 94-105 (2015).
 22. O. D. King, A. D. Gitler and J. Shorter, *Brain Res.*, **1462**, 61-80 (2012).
 23. X. Liu, C. Niu, J. Ren, J. Zhang, X. Xie, H. Zhu, W. Feng, and W. Gong, *Biochim. Biophys. Acta*, **1832**(2), 375-385 (2013).
 24. J. G. Daigle, N. A. Lanson, Jr., R. B. Smith, I. Casci, A. Maltare, J. Monaghan, C. D. Nichols, D. Kryndushkin, F. Shewmaker and U. B. Pandey, *Hum. Mol. Genet.*, **22**(6), 1193-1205 (2013).
 25. J. C. Schwartz, X. Wang, E. R. Podell and T. R. Cech, *Cell Rep.*, **5**(4), 918-925 (2013).
 26. Y. R. Li, O. D. King, J. Shorter and A. D. Gitler, *J. Cell Biol.*, **201**(3), 361-372 (2013).