



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

박테리아 공동발현 및 즉각적 이황화
결합에 의한 단백질 자가조립체의
안정성 증가



2023 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

화 학 융 합 공 학 부

화 학 공 학 전 공

양 이 지

공 학 석 사 학 위 논 문

박테리아 공동발현 및 즉각적 이황화
결합에 의한 단백질 자가조립체의
안정성 증가

지도교수 임 성 인

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2023 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

화 학 융 합 공 학 부

화 학 공 학 전 공

양 이 지

양이지의 공학석사 학위논문을 인준함.

2023년 02월 17일



위 원 장	공학박사	권 혁 택 (인)
위 원	공학박사	임 성 인 (인)
위 원	공학박사	이 재 경 (인)

목 차

목 차.....	i
List of Figures.....	iii
List of Tables.....	v
Abstract	vi
I. 서 론	1
II. 이 론	10
1. 자가 결합 코일 (Self-assembling coiled coil).....	10
2. 단백질 내 이황화 결합을 위한 시스테인 도입	16
3. 박테리아 내 단백질 공동발현 시스템 구축	19
4. 실험법	24
4.1 SDS-PAGE & Native PAGE	24
4.2 Isothermal Titration Calorimetry (ITC).....	25
4.3 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).....	27
III. 실 험	29
1. 실험 재료.....	29
2. 실험 방법.....	30
2.1 Plasmid Construction and Bacterial Strains.....	30
2.2 Protein Expression and Purification	31
2.3 SDS-PAGE and Native PAGE.....	32
2.4 ITC Assay.....	33

2.5 Size Exclusion Chromatography (HPLC)	33
2.6 FRET Assay	33
IV. 결과 및 고찰	35
1. 야생형 코일-형광단백질 구조 설계	35
2. 야생형 코일-형광단백질 발현 및 정제.....	38
3. 야생형 코일-형광단백질의 자가결합 능력 평가.....	42
4. 코일의 시스테인 돌연변이 부위 지정 및 시스테인 커플링 코일- 형광단백질의 공동발현 및 정제	46
5. 시스테인 돌연변이-형광단백질 복합체 후보 선정	57
6. 시스테인 돌연변이에 따른 결합안정성 향상 평가.....	52
V. 결 론	61
VI. 참고문헌	63

List of Figures

Figure 1. 스캐폴드 단백질의 여러 가지 기능	2
Figure 2. PROTAC 기술의 모식도	4
Figure 3. 생체 재료로써 자가 결합 코일의 다양한 응용분야.....	5
Figure 4. 향상된 효능의 항미생물 펩타이드의 작용 모식도	6
Figure 5. 자가 결합 코일을 이용한 거대분자 약물의 개요	7
Figure 6. <i>E.coli</i> SHuffle®내에서의 단백질 공동 발현 및 즉각적인 이황화 결합 형성 전략 개요	9
Figure 7. 자가 결합 코일의 구조	11
Figure 8. p66 α -MBD2 유래 코일의 구조 및 주요 잔기	14
Figure 9. p66 α 와 MBD2 유래 자가 결합 코일의 빠른 해리를 나타내는 SPR 결과	15
Figure 10. 단백질 내 이황화 결합 형성 경로	17
Figure 11. <i>E.coli</i> SHuffle®에서 이황화 결합을 가지는 단백질의 발현	20
Figure 12. Isothermal titration calorimetry (ITC) 분석의 원리	26
Figure 13. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 분석의 원리	28
Figure 14. Alphafold2 로 예측한 코일-형광단백질 구조. a) C'-GFP 및 b) C- mCherry	36
Figure 15. C'-GFP 와 C-mCherry 의 자가 결합 및 해리 모식도	37
Figure 16. pET21a-C'-GFP 및 pET21a-C-mCherry 발현 벡터 설계	40
Figure 17. 발현 및 정제 후 C'-GFP, C-mCherry 의 SDS-PAGE 결과	41

Figure 18. C'-GFP 및 C-mCherry 단독 및 자가 결합 Native PAGE 결과....	44
Figure 19. C'-GFP 및 C-mCherry 간 결합 시 등온 적정 열량 측정 결과....	45
Figure 20. C'-C 의 시스테인 돌연변이 아미노산 위치를 나타낸 wheel diagram	48
Figure 21. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 시스테인 위치	49
Figure 22. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 공동발현 및 정제 후 SDS- PAGE 결과.....	51
Figure 23. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 공동발현 후 수율 비교.....	54
Figure 24. 공동발현된 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 Native PAGE 결과	55
Figure 25. 최종 선택된 공동발현된 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 DTT 유무에 따른 Non-boiling 조건에서 SDS-PAGE 결과	56
Figure 26. 시스테인 커플링 자가 결합 코일 및 야생형 코일의 크기 배제 크로마토그래피 결과	59
Figure 27. 시스테인 커플링 자가 결합 코일 및 코일-형광단백질의 형광 공명 에너지 전달 효율 측정 결과	60

List of Tables

Table 1. 플라스미드 복제 수 및 플라스미드 비호환성 그룹..... 22

Table 2. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 아미노산 서열..... 50



Improved Binding Stability of Self-assembled Proteins that Form in situ Disulfide Bonds through Bacterial Co-expression

Iji Yang

Department of Chemical Engineering, the Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Research on the utilization and application of biomolecular tools is being actively conducted. Currently, there is a demand for excellent molecular tools that require greater biocompatibility and stability than existing molecular tools. The self-assembled coiled coil, which can be one of the candidates, is one of the motifs that are very abundant in nature and has the characteristic that complementary coils are specifically assembled with each other. However, self-assembled coiled coils can sometimes become unstable in harsh biological environments, and rapid dissociation by dilution becomes a fatal problem. Formation of disulfide bonds by cysteine is often used as a strategy to increase structural stability by artificially inserting into proteins. However, due to the non-specific binding of thiol groups, a complicated post-processing process is required compared to conventional protein purification. Here we report a cysteine-coupled self-coupling coiled coil that introduces cysteine to form a disulfide bond to overcome the rapid dissociation of self-assembled coiled coil and is co-expressed in bacteria to overcome the defect of non-specific coupling between cysteines. This scaffold, co-expressed in *E.coli* SHuffle[®], formed heterodimers by self-assembly and then coupled with disulfide bonds, showed improved bonding stability in vitro compared to wild-type coiled coils. These results suggest that engineered self-assembled coiled coil-based scaffolds can be promising tools in various biotechnology fields in the future.

I. 서 론

유용한 기능을 가지는 외부의 단백질을 유전적으로 융합하여 새로운 분자체로 만든 융합 단백질은 생명공학 분야에 큰 혁명을 일으켰으며 그 응용분야가 다양해 여전히 성장가치와 잠재력을 가지고 있다. 특히 단일클론항체(mAb), 재조합 백신 및 호르몬을 포함해 다양한 단백질 약물이 성과를 이루어 생물제약분야에서 중요한 역할을 하고 있다[1]. 대부분의 재조합 단백질은 경제적인 대장균 발현시스템으로 얻을 수 있으며 효율적인 생산이 가능하다는 장점이 있지만 숙주의 대사 스트레스 유발이나 번역 후 수정(PMT)의 문제, 봉입체(IE) 형성 등의 이유로 인해 모든 재조합 단백질이 높은 수율로 얻어지는 것은 아니다[2,3].

생체분자에서 유래되거나 조작된 스캐폴드 분자는 시험관 내에서 조직화된 키메라 단백질을 구성할 수 있으며 이는 위와 같은 한계를 극복할 수 있는 유망한 도구로써 약물 전달, 바이오센서, 합성 생물학 등에서 광범위한 적용이 가능하다. 스캐폴드 분자는 여러 가지 기능성 분자나 신호 분자를 하나로 조립될 수 있는 플랫폼이 되거나 특정 분자를 작용지점에 고정할 수 있으며 연쇄적인 반응을 하는 기능성 분자들의 양성 및 음성 피드백 신호를 조절하여 경로를 수정할 수 있고 활성화된 분자가 불활성화 되지 않도록 보호하는 등의 쓰임새로 사용될 수 있다[4,5](Figure 1).

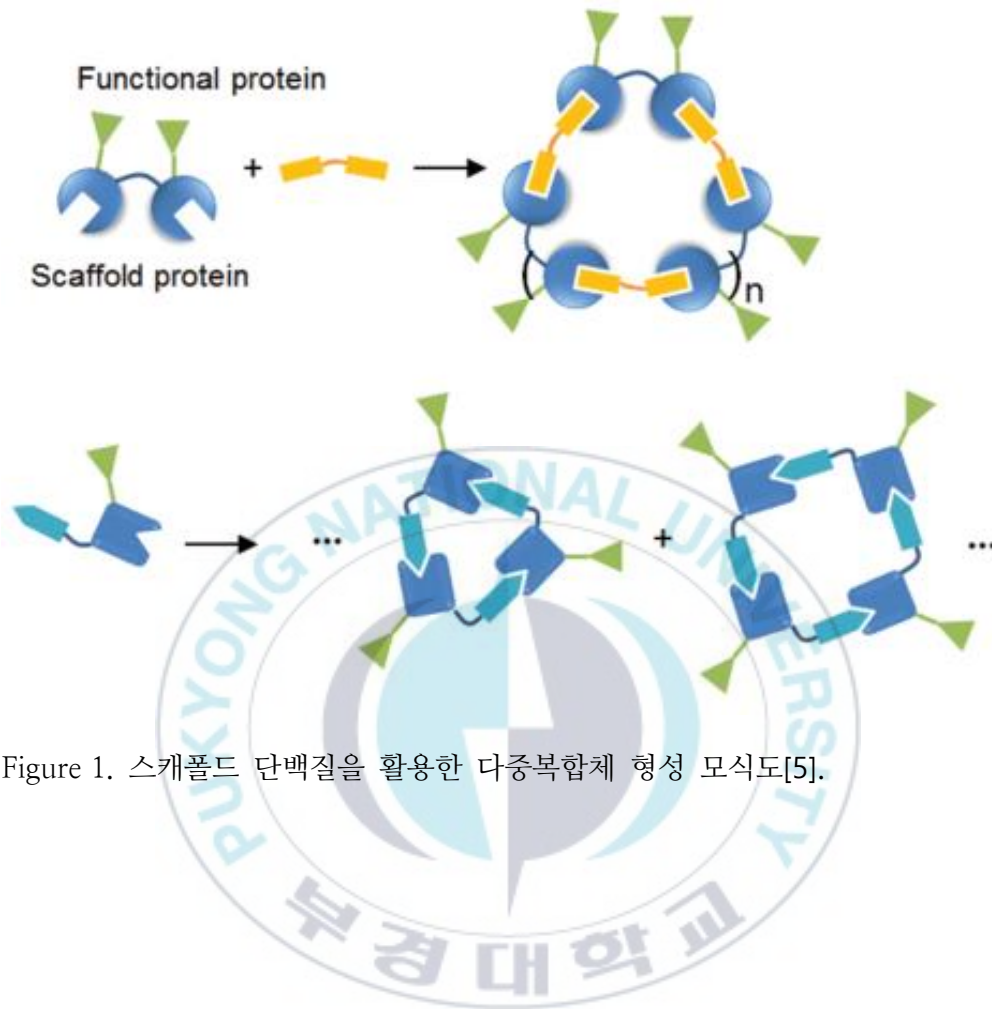


Figure 1. 스캐폴드 단백질을 활용한 다중복합체 형성 모식도[5].

예를 들어 PROTAC 기술은 특정 단백질에 결합하는 리간드와 단백질의 분해를 유도하는 E3 ubiquitin ligase 가 링커로 연결되어있는 형태로 특정 단백질을 파괴하기 위해 유비퀴틴-프로테아솜 시스템을 유도할 수 있도록 설계된 분자체이다[6]. 3 가지의 구성요소가 하나의 스캐폴드이며 표적단백질에 결합하는 리간드에 따라 다양한 질병유발단백질이 표적이 될 수 있어 효율적인 전략 및 잠재력을 가지는 기술이라 할 수 있다[7,8] (Figure 2).

특히 가장 유망한 자가 결합 스캐폴드 중 하나인 자가 결합 코일은 동종 또는 이종의 2 개 이상의 알파 나선이 서로 소수성 및 이온 상호작용을 하여 수퍼 코일을 이루는 형태이다. 자가 결합 코일은 크기가 작고 구조가 단순해 유전적 융합이 비교적 쉬우며 잘 알려진 디자인 규칙 및 다양한 종류와 구조, 생체 적합성을 가져 단백질뿐만 아니라 다른 재료의 조합까지 가능하게 한다는 장점이 있다 [9](Figure 3).

우수한 생체 적합성과 낮은 세포 독성 및 높은 수용성을 가지는 자가 결합 코일을 나노 차원의 스캐폴드로써 사용한 예시로 항생제의 효능을 강화시키기 위해 다중 양이온 항미생물 펩타이드의 지지대 역할로 자가 결합 코일을 사용한 연구가 보고되었다[10](Figure 4). 또한 악성세포의 자멸사를 유도하기 위해 세포 표면에서 발현되는 CD20 을 표적으로 하는 항원의 단편을 코일에 융합한 후 N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide(HPMA)고분자에 상보적인 코일을 다중으로 융합해 두 분자의 가교를 가능하게 하여 기존의 분자량이 적은 약물의 부재를 극복한 거대 분자 치료제가 보고되기도 하였다[10](Figure 5). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 자가 결합 코일 사이의 상호작용은 희석에 의한 빠른 해리, pH, 온도, 이온 강도 및 금속이온의 유무와 같은

환경변화에 민감하기 때문에 실제 응용을 위해서는 보다 안정성이 높은 자가결합 코일이 요구되는 실정이다.

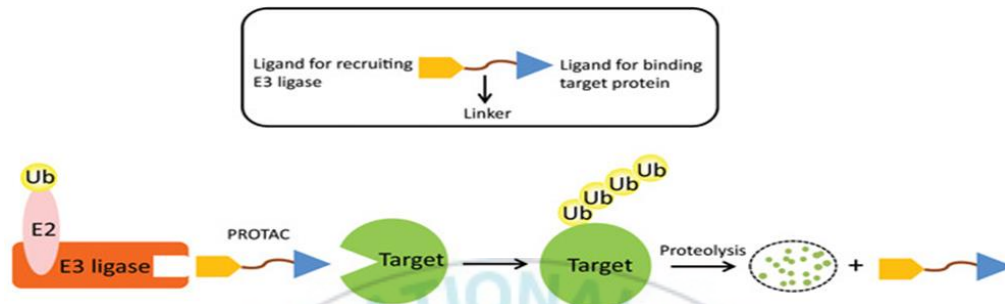


Figure 2. PROTAC 기술의 모식도.[8]

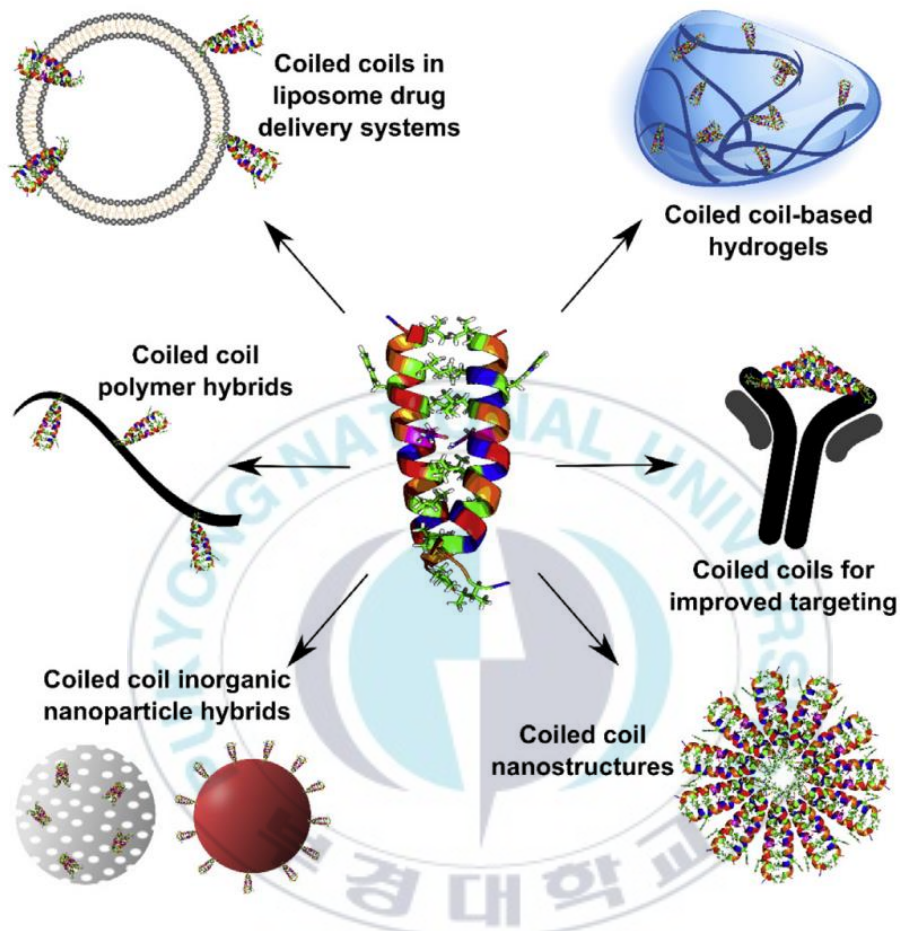


Figure 3. 생체 재료로써 자가 결합 코일의 다양한 응용분야[9].

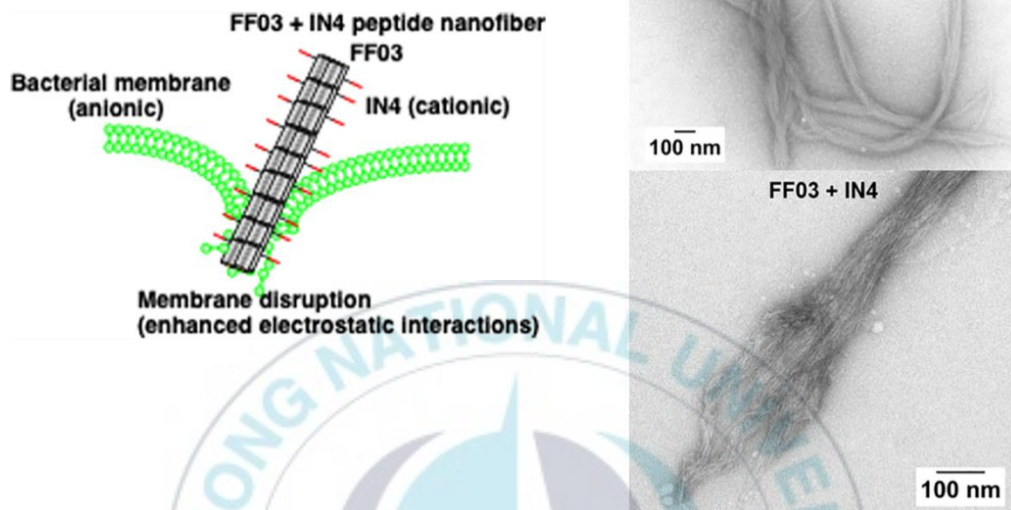


Figure 4. 향상된 효능의 항미생물 펩타이드의 작용 모식도 및 코일복합체(FF03)와 항미생물 펩타이드가 코팅된 코일 복합체(FF03+IN4)의 투과전자현미경 사진[10][10].

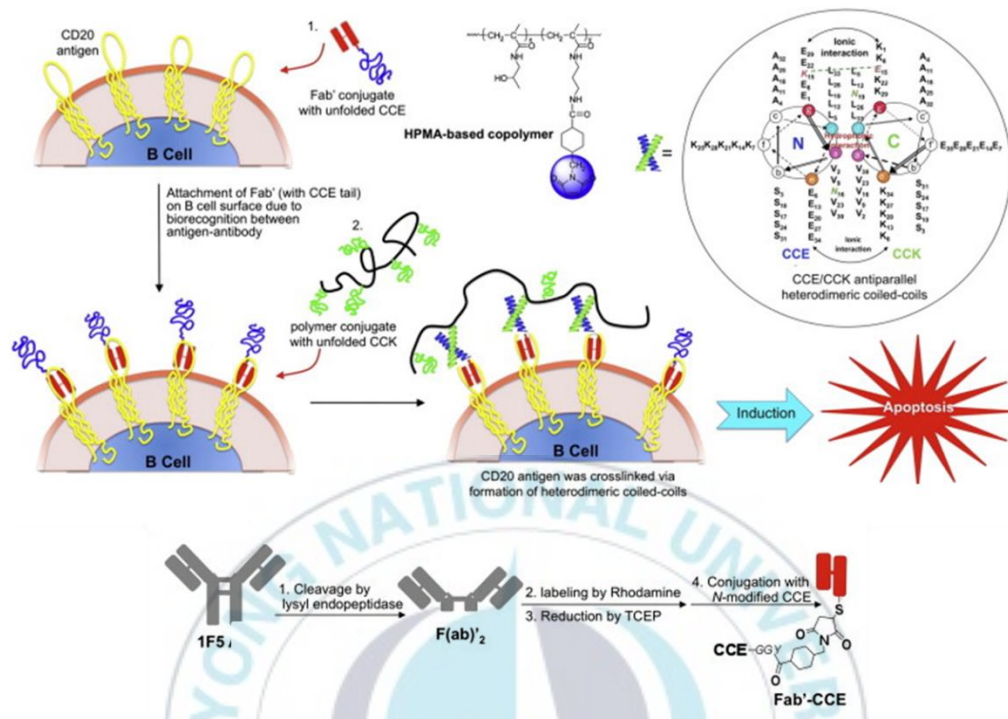


Figure 5. 자가 결합 코일을 이용한 거대분자 약물의 개요[11]

자가 결합 코일의 유용한 특성을 유지하면서 더 높은 결합 안정성을 부여하기 위해 각 코일의 사이에 염다리를 도입하거나 코일의 측쇄를 스테이플링하여 단량체 코일자체의 나선형 성향을 높이는 등의 여러 시도가 있었다[12]. 그 중 기존 생체 접합의 일종인 시스테인에 의한 이황화 결합 형성은 쌍을 이루는 코일의 특정 아미노산을 시스테인으로 치환하여 코일간의 이황화 결합을 유도해 결합 안정성을 향상시킬 수 있는 전략이다. 이황화 결합 형성은 조작이 간단하고 쉽게 접근할 수 있다는 장점이 있어 생명공학분야에서 이미 널리 사용되고 있는 방법이다. 그러나 시스테인에 의한 이황화 결합은 시스테인 황원자간에서 비특이적으로 일어나는 결합이며 코일이 융합된 관심 단백질의 발현 및 정제 과정에서 동종 이량체 형성 및 단백질 간의 스크램블링, 복잡한 후처리를 수반한다는 단점이 있다. 이는 상보적인 코일간의 자가 결합이 우선이 되는 자가 결합 코일 스캐폴드에 치명적일 수 있다.

이 연구에서는 자가 결합 코일을 사용하여 결합안정성이 향상된 비천연 키메라 단백질 복합체를 설계하고 검증하였다. 자가 결합 코일의 빠른 해리를 시스테인에 의한 이황화 결합 형성으로 방지하고 상보적인 코일 융합 단백질을 박테리아 시스템에서 공동발현하여 시스테인간의 비특이적 결합문제를 해결하였다. 코일의 양 말단에 형광단백질을 유전적으로 융합하여 코일-형광단백질의 발현 및 결합의 여부를 추적가능하게 하였으며 최적의 시스테인 돌연변이 부위를 선택하기 위해 여러 후보를 구성하여 공동발현 및 정제를 거친 후 자가 결합 스캐폴드로써의 기능을 확인하기 위해 물리화학적 특성 분석을 진행하였다(Figure 6).

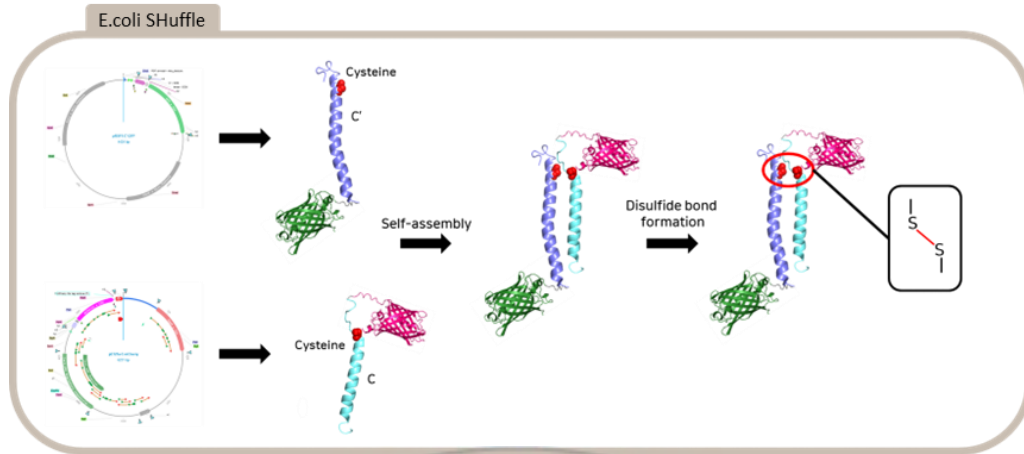


Figure 6. *E. coli* SHuffle® 내에서의 단백질 공동 발현 및 즉각적인 이황화 결합 형성 전략 개요.



Ⅱ. 이 론

1. 자가 결합 코일 (Self-assembling coiled coil)

자가 결합 코일은 2 개 이상의 α -나선형 단량체 도메인이 서로 상호작용하여 수퍼코일을 형성한 형태이며 모든 단백질 서열 중 약 10%에서 발견되는 일반적이고 가장 풍부한 구조적 모티프이다[13-15]. 자가 결합 코일은 수퍼코일을 형성하는 단량체의 종류 및 배열방식 등에 따라 동종(homo) 및 이종(hetero), 평행(parallel) 또는 역평행(anti-parallel), 왼손감김형(left-handed) 및 오른손감기형(right-handed)로 나뉠 수 있다. 특히 가장 흔한 구조인 왼손감김형은 코일의 회전이 두 번 반복될 때 마다 소수성(a, d) 또는 극성 잔기(e, g)가 서로 상호작용할 수 있도록 7 개의 아미노산이 규칙적으로 반복(헵타드, heptad)된다는 특징을 가진다[16]figure 7). 이는 (abcdefg) x 로 표현되며 x 는 반복되는 헵타드의 수를 나타낸다. 또한 자가 결합 코일은 상호작용 계면에서 소수성 잔기들이 Knobs into hole 이라는 형태로 소수성 코어를 형성한다는 특징을 가진다[17][17].

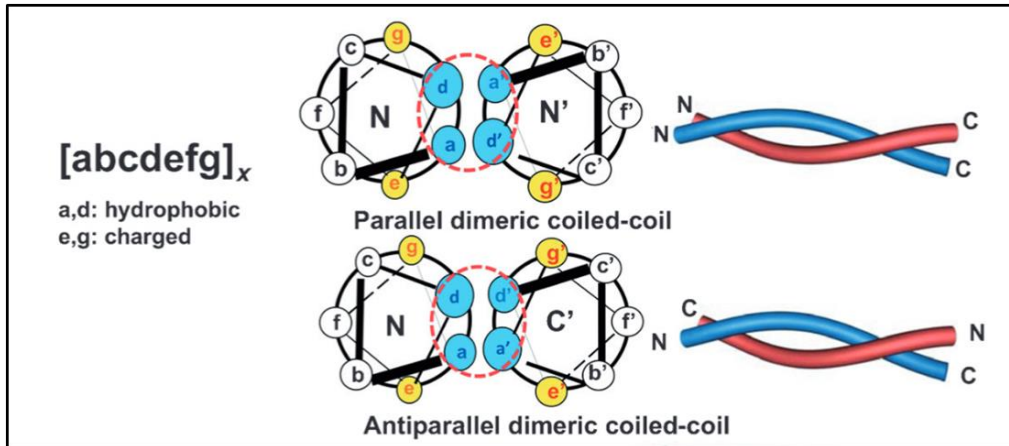


Figure 7. 자가 결합 코일의 구조[16].



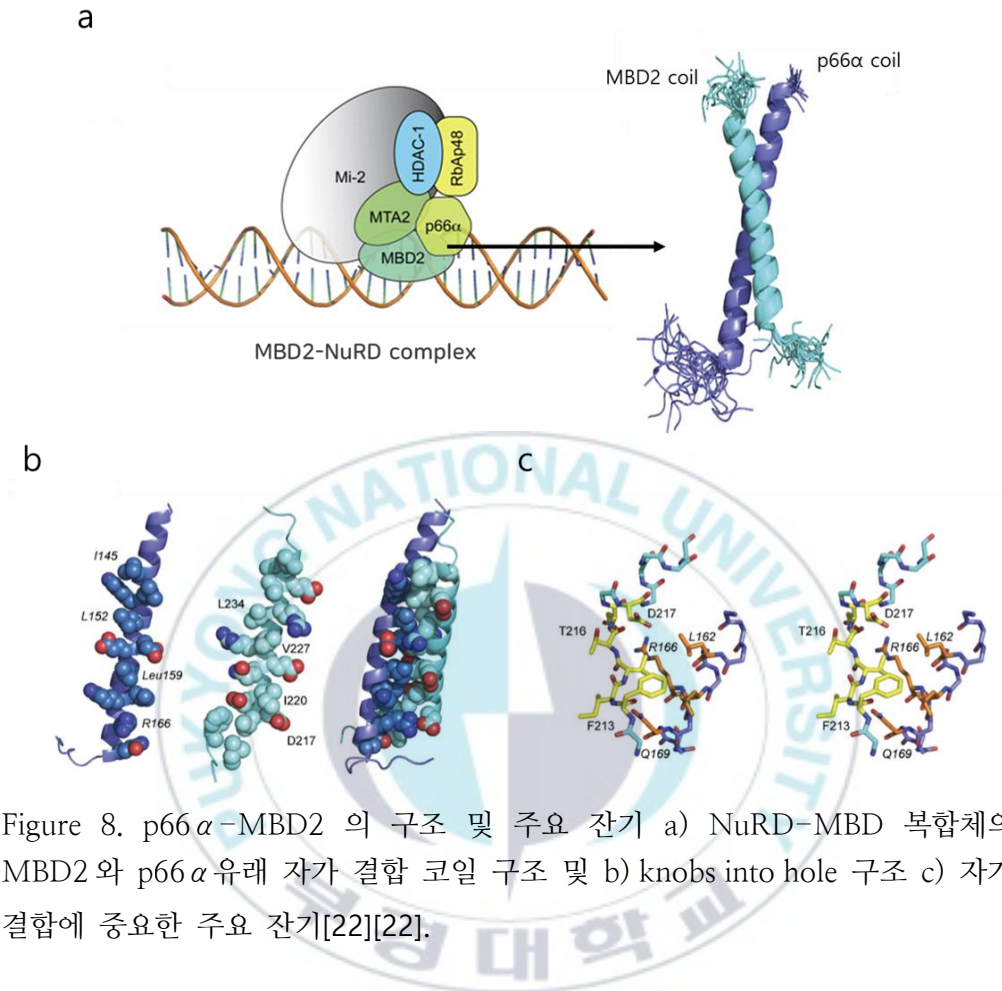
이러한 자가 결합 코일은 많은 섬유질 단백질이나 전사인자 등에서 발견되며 여러 단백질의 올리고머화를 통해 고차 단백질 조립, 유전자 전사 조절, 세포 분열, 막 융합 등의 다양한 생화학 작용을 촉진한다. 이러한 특징을 지니는 자가 결합 코일을 특정 단백질 구조에 도입하여 조직화된(organized) 단백질 자가결합체를 제조하는 응용전략들이 많이 등장하였지만 특정 이온의 존재 및 이온의 강도, 온도, pH, 및 엔지니어링 되는 생체분자와의 상호작용 등 외부요인에 의한 안정성의 문제는 여전히 해결해야 하는 문제로 여겨지고 있다[18,19].

p66 α -MBD2 의 상호작용 도메인은 인체 내에 존재하는 자가 결합 코일 중 하나로 DNA 메틸화에 관여하는 뉴클레오솜 리모델링 및 탈아세틸화 단백질과 메틸 결합 도메인 복합체의 중요한 구성요소이다. DNA 메틸화는 사이토신-구아노신 이중가닥에서 사이토신의 C5 위치에 메틸기가 추가되는 현상이며 이 현상은 유전자의 전사를 조절하는 기능을 한다[20,21]. 이 때 p66 α -MBD2 사이의 코일-코일 상호작용이 구조적 및 생물물리학적으로 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 복합체 내의 자가 결합 코일은 수용액 내에서 단량체로 존재하다 혼합되었을 때 역평행 이중 이량체를 형성한다[22].

이 때 knobs 에 해당하는 p66 α 코일의 Ile145, Leu152, Leu159 및 MBD2 코일의 Ile220, Val227, Leu234 와 holes 에 해당하는 p66 α 코일의 Leu148-Lys149 사이, Glu155- Glu156 사이, Leu162-Lys163 사이 및 MBD2 의 Gln223-Glu224 사이, Val230-Arg231 사이, Ala237-Leu238 사이에서의 소수성 상호작용과 이온성 상호작용이 중요한 역할을 한다(Figure 8). 각 코일의 분자량은 약 5 kDa, 4 kDa 이며 65.1 °C 의 용융온도(T_m)를 가지고

결합친화도(KD)는 약 12.4 nM, 결합속도상수(k_a)는 약 $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 해리속도상수(k_d)는 약 0.031 s^{-1} 로 보고되었다[22] 이는 코일이 매우 빠른 속도로 자가 결합을 형성하지만 결합의 해리 또한 매우 빠른 속도로 일어남을 시사한다(Figure 9). p66 α -MBD 을 안정적인 단백질 자가결합체 제조를 위한 모티프로 응용하기 위해서는, 단백질 공학적 접근을 통해 빠른 해리를 극복하는 연구가 필요할 것으로 보인다.





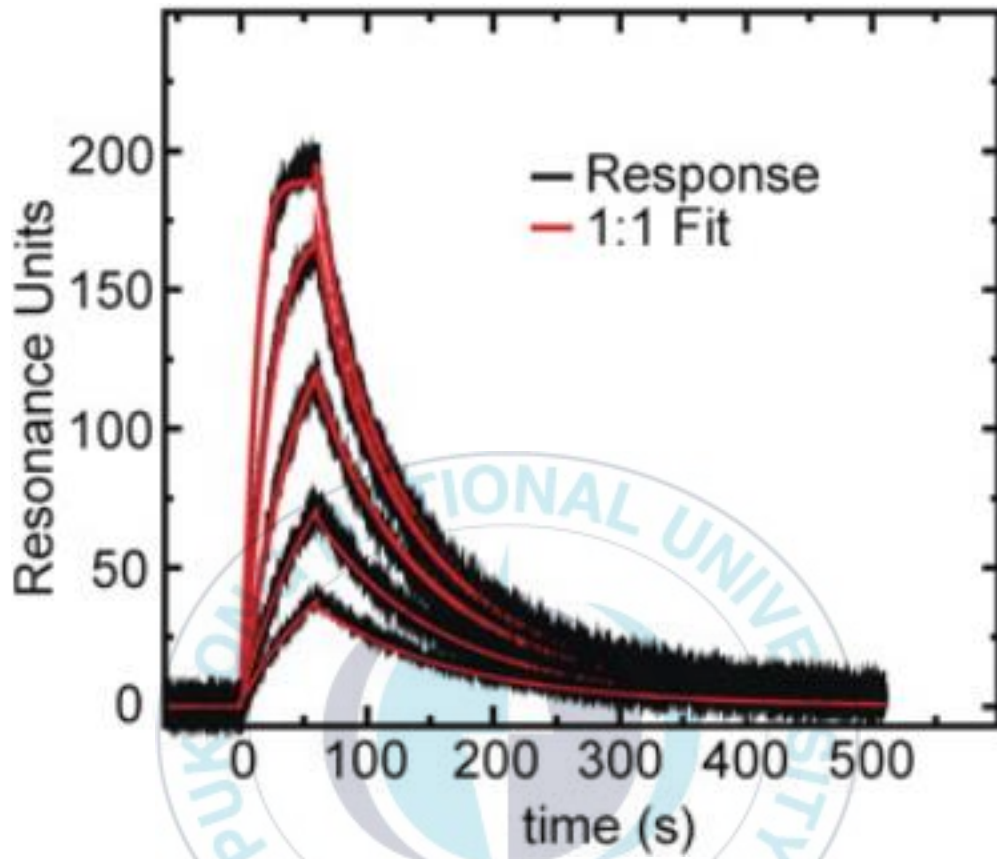
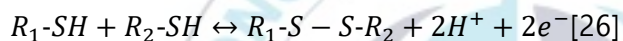


Figure 9. MBD2 와 $p66\alpha$ 유래 자가 결합 코일의 빠른 해리를 나타내는 SPR 결과[22].

2. 단백질 내 이황화 결합을 위한 시스테인 도입

티올(thiol, -SH) 잔기를 지닌 시스테인은 20 개의 표준 아미노산 중 하나로 주로 분비 단백질과 막 단백질의 세포 외 영역에 존재하며 근접한 두 개의 시스테인은 티올 잔기가 산화되며 이황화 공유결합을 형성하는 특징을 보인다. 이는 공간적으로 근접한 두 개의 시스테인 잔기인 티올기(SH)가 시스틴(S-S)으로 산화되는 과정이며 디티오프레이톨(Dithiothreitol)과 같은 환원제를 사용하는 등의 환원반응에 의해 파괴될 수 있다[23-25](Figure 10).



시스테인은 산화환원효소의 활성부위와 관련하여 전자를 제공하거나 받아 기질단백질에서 이황화 결합의 산화 또는 환원을 촉매할 수 있어 생리화학적 활성을 나타내는 중요한 요소이며 이황화 결합은 단백질의 접힘에 중요한 구조적 역할을 한다[27-29].

특히 일부 단백질에서 이황화 결합은 접힐 수 있는 단백질의 3차 구조의 수를 감소시켜 엔트로피를 감소시키고 열안정성을 증가시킨다. 단백질의 안정성에 대한 이황화 결합의 기여는 하나 이상의 천연 이황화 결합 제거 시 단백질 안정성의 변화를 측정한 초기 실험에서 조사되었다. 리보핵산가수분해효소 T1 에 존재하는 이황화 결합 2 개를 제거한 후 비교한 결과 하나의 이황화 결합이 ~3.5 kcal/mol 의 열역학적 안정성에 기여한다는 결과가 보고되었으며 이는 다른 연구에서 보고된 2.3-5.2 kcal/mol 범위와 일치하였다[30].

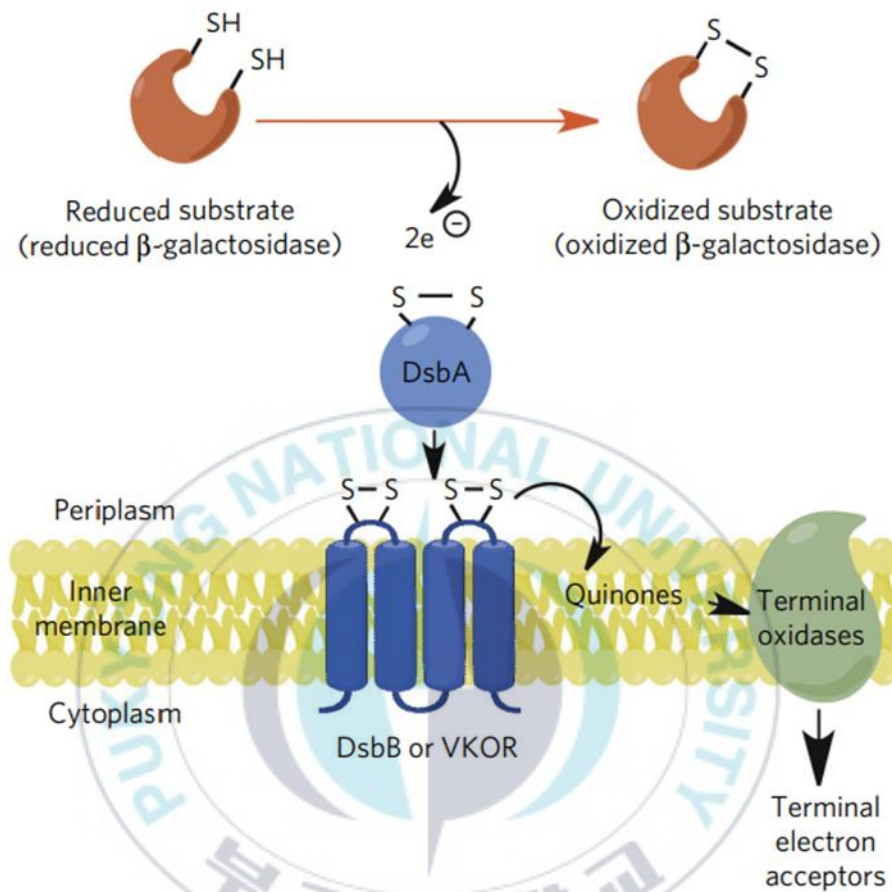


Figure 10. 이황화 결합 형성 경로[31].

단백질의 안정성을 개선하는 것은 많은 생물의학 및 산업응용분야에서 중요한 과제이며 자연상태에서 존재하는 이황화 결합이 단백질에 안정성을 부여한다는 점을 감안하였을 때 새로운 이황화 결합의 도입은 중요한 해결책이 되었다. 하지만 모든 이황화 결합의 도입이 안정성을 증가시키는 것은 아니며 조작된 이황화 결합은 단백질의 접힘이나 전개 속도를 방해하고 황원자간의 비특이적 반응이라는 점이 의도하지 않은 단백질 복합체를 형성할 수 있다는 단점이 있다[32].



3. 박테리아 내 단백질 공동발현 시스템 구축

미생물 시스템에서 재조합 단백질을 생산하는 기술은 저렴한 비용, 높은 생산성 및 비교적 빠른 처리시간 등의 장점을 가져 의료, 학술 및 산업 응용의 분야에서 여전히 가장 매력적인 기술이다[33–35]. 특히 그람음성균인 *Escherichia coli* (*E.coli*), 즉 대장균은 그 이해가 가장 잘 확립되어 있는 유기체이다. 대장균은 높은 밀도의 배양이 가능하고 배양 배지의 구성이 단순하고 저렴하며 외인성 DNA 를 이용한 형질전환이 빠르고 쉽기 때문에 연구나 산업에서 재조합 단백질을 생산하는 가장 일반적인 발현 시스템으로 사용된다[36–39]. 재조합 단백질을 효율적으로 발현하기 위해 *E. coli* BL21, K12, DH5 α 등 다양한 종류의 개량된 대장균 중 발현하고자 하는 단백질의 특성에 가장 적합한 균주를 선택하는 것이 중요하다. 예를 들어 *E.coli* SHuffle[®]이라는 균주는 이황화 결합을 포함하는 단백질을 발현하기에 최적화되도록 설계된 균주이며 실제로 이황화 결합을 가지는 단백질을 발현하는데 활발하게 사용되고 있다[40](Figure 11). 미생물을 이용한 재조합 단백질의 발현은 배양 온도나 진탕의 정도, 프로모터의 강도 또는 사용된 발현벡터의 복제수와 같은 물리적 및 전사적 조건 모두에 의해 영향을 받는다[41–43].

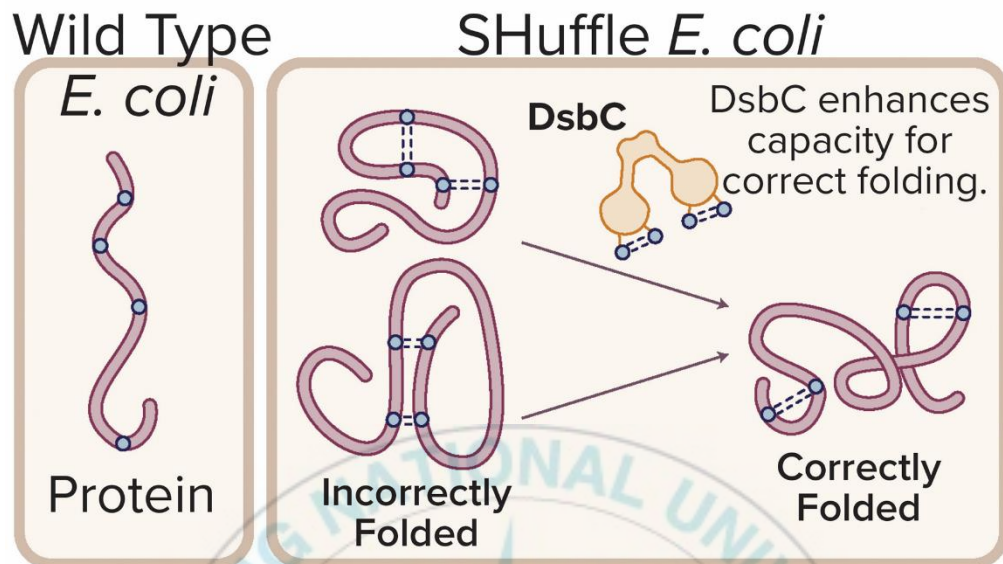


Figure 11. *E.coli* SHuffle®에서 이황화 결합을 가지는 단백질의 발현[44].

미생물을 이용한 재조합 단백질의 발현 과정은 단백질을 발현하기 위해 사용할 발현 플라스미드의 선택에서부터 시작된다. 발현 플라스미드는 다양한 프로모터, 선택 마커, 다중 클로닝 사이트, 레플리콘 등의 조합으로 이루어져 있어 최적의 단백질 발현을 위해서는 가장 적합한 발현 플라스미드를 선택해야한다(Table 1). 예를 들어 각각의 플라스미드는 그 크기나 유전자의 독성에 따라 다른 복제수를 가지며 플라스미드의 복제에는 세포의 자원을 사용하기 때문에 높은 복제수를 가지는 플라스미드는 숙주세포의 성장 속도와 그 생성물에 영향을 미친다. 이러한 선택 과정을 거친 후 발현하고자 하는 단백질의 유전자 서열을 발현 플라스미드에 클로닝하고 형질전환한하게 되면 발현 균주가 제작된다. 최종적으로 물리적인 배양 조건의 최적화를 거쳐 가장 효율적인 배양 조건을 탐색한 후 정제의 과정으로 이어지게 된다.

Table 1. 플라스미드 복제 수 및 플라스미드 비호환성 그룹[50].

Plasmid	Replicon	Copy number*	Reference
ColE1	ColE1	15-20	Schmidt & Inselburg (1982); Shizuya <i>et al.</i> (1992)
pBR322	pMB1	15-20	Balbás <i>et al.</i> (2013); Lin-Chao <i>et al.</i> (1992); Sternberg (1990)
pBR3722	pMB1	30-40†	Hakkaart <i>et al.</i> (1985); Kool & Nijkamp (1974); Lin-Chao <i>et al.</i> (1992)
pUC	pMB1	>200†	Figurski <i>et al.</i> (1979); Lin-Chao <i>et al.</i> (1992)
pACYC	p15A	18-22	Chang & Cohen (1978); Hasunuma & Sekiguchi (1979)
F1	F1	1-2	Peterson & Phillips (2008); Shizuya <i>et al.</i> (1992)
pNS358	P1 lytic <i>ori</i>	1->25	Peterson & Phillips (2008); Sternberg (1990)
pCDF	CloDF13	10-90	Hakkaart <i>et al.</i> (1985); Kool & Nijkamp (1974); Kües & Stahl (1989)
RK2	RK2	4-7	Figurski <i>et al.</i> (1979); Kittleson <i>et al.</i> (2011)
pSC101	pSC101	~5	Hasunuma & Sekiguchi (1979); Kittleson <i>et al.</i> (2011)
pJPA12	pSC101	27	Deuschle <i>et al.</i> (1986); Gruber & Gross (2003); Peterson & Phillips (2008)
pJPA13	pSC101	~240	Becker & Hengge-Aronis (2001); Peterson & Phillips (2008)
pRSF	RSF1030	10-60	Grossman <i>et al.</i> (1987); Kües & Stahl (1989); Wang & deHaseth (2003)
pBjk2992-jtk2541	ColE2	1-60	Bernardo <i>et al.</i> (2009); Buck <i>et al.</i> (2000); Kittleson <i>et al.</i> (2011)
pBjk2993-jtk2541	R6K	5-250	Kittleson <i>et al.</i> (2011); Schleif (2000)

이러한 미생물 내 단백질 발현은 다양한 연구와 개발을 거쳐왔으며 그러한 발전 중 하나로 하나의 발현 균주에서 하나 이상의 단백질을 발현할 수 있도록 설계될 수 있다. 일반적으로 동일한 레플리콘을 가지는 플라스미드는 복제 제어 서열이 동일하기 때문에 음성 조절 시스템이 서로 다른 플라스미드를 구별할 수 없어 동일한 균주 내에서 호환될 수 없다[45,46]. 따라서 숙주세포가 분열할수록 각 플라스미드의 경쟁으로 인해 효율이 줄거나 비대칭적으로 하나의 플라스미드가 손실되는 문제점이 생긴다. 반대로 호환가능한 플라스미드의 경우 다른 음성조절시스템이 교유한 복제 제어 서열을 인식해 각 플라스미드의 복제를 제어할 수 있게 되어 위의 문제점을 해결할 수 있다. 호환가능한 플라스미드에 대한 여러가지 조합들이 보고되었으며 공동발현을 위해 개량된 플라스미드 또한 활발하게 사용되고 있다[47]. 동일한 균주 내에서 두가지 이상의 단백질을 발현하는 전략은 단백질의 세포 외 분비를 도울 수 있는 기능단백질을 공동발현해 목표단백질의 정제를 용이하게 하거나 별도로 발현된 후 시험관 내에서 복합체를 형성할 때 보다 안정적인 복합체 형성을 할 수 있다는 장점을 가져 바이오산업의 다양한 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

4. 실험법

4.1 SDS-PAGE & Native PAGE

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 SDS 에 의해 음전하를 띠는 선형으로 풀어진 단백질을 전기영동을 통해 고분자 gel 에 통과시킬 때 단백질의 분자량 순서에 따라 분리할 수 있는 실험기법이며 Native PAGE 는 SDS 에 의한 denature 가 없이 올바른 입체 구조로 접혀있는 단백질 고분자의 전하를 이용하는 실험 기법이다. 전기영동을 하기 위해서는 단백질의 크기를 분리할 수 있는 적정의 농도를 포함한 polyacrylamide gel 을 만드는 단계가 필요하며 단백질 전체를 일렬로 배열할 수 있도록 낮은 농도의 gel 을 영동의 시작부분에 첨가하며 이후 단백질이 크기에 따라 분리될 수 있도록 높은 농도의 gel 을 첨가하여 원하는 결과를 얻을 수 있다. Native PAGE 의 경우에는 형광 표지된 단백질 고유의 성질을 이용해 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있으며 SDS-PAGE 의 경우에는 영동을 진행한 후 단백질을 확인할 수 있도록 염색하는 단계와 세척 단계를 각각 거친 후 마무리된 결과를 얻게 된다.

4.2 등온 적정 열량측정법(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

등온 적정 열량계는 단백질에 대한 리간드의 결합 친화성을 특성화하는 데 사용되는 가장 일반적인 방법으로 이종의 분자간 화학반응이 일어날 때 방출되거나 소모되는 열의 양을 측정해 결합 친화도, 결합 특이성, 결합 비율(화학양론)을 계산하는데 사용하는 실험 방법이다. 반응물간의 반응은 반응물의 상대적인 에너지 안정성에 따라 발열 또는 흡열의 형태로 나타날 수 있다. 등온 적정 열량계는 단열 재질로 둘러싸인 고효율의 열 전도물질로 이루어진 두개의 cell 로 이루어져있다. 민감한 열전대 회로는 기준 cell 과 분석물질이 담긴 cell 사이의 온도 차이를 감지하는 데 사용된다(Figure 12). 실험이 진행되면 리간드는 정확하게 정해진 양으로 분석 물질이 담긴 cell 에 적정되어 열을 흡수하거나 방출한다. 시간에 대해 동일한 온도에서 기준 cell 과 분석물질이 담긴 cell 을 유지하는데 필요한 전력이 관찰되어 표시되고 이를 통해 열역학적 매개변수가 도출된다[48].

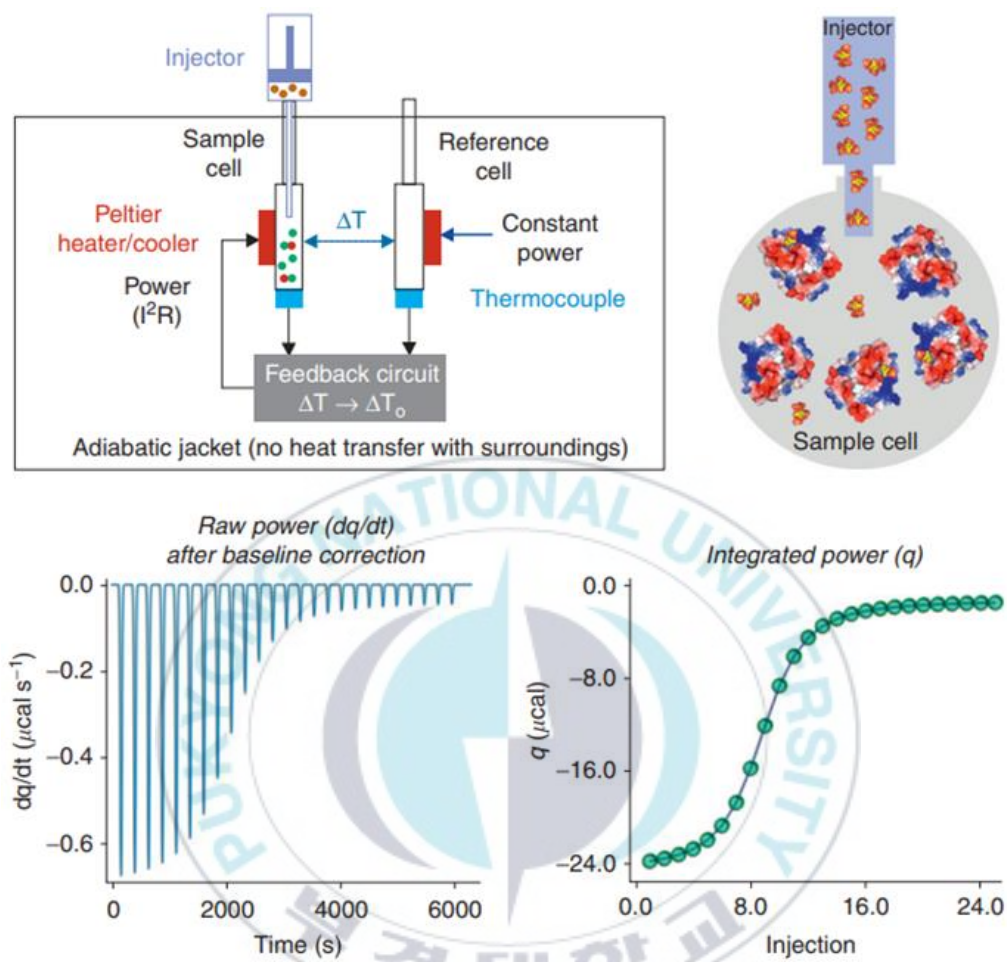


Figure 12. Isothermal titration calorimetry (ITC) 분석의 원리[48].

4.3 형광공명에너지전달(Fluorescence Resonance Energy Transfer, (FRET))

형광공명에너지전달은 떨어져 있는 거리가 8~10 나노미터 이하일 때 여기된 기증자 형광단의 방출 에너지를 쌍극자-쌍극자 상호작용을 통해 인근 수용자 형광단을 여기시키는 과정을 이용한 분석법이다(Figure 13). 형광공명에너지전달 신호는 형광단이 10 nm 미만으로 떨어져 있을 때만 생성되어 상호작용하는 단백질에 대한 정보를 제공하므로 단백질이 물리적으로 상호작용 하는지의 여부를 확인하는 데에 이상적인 분석법이다. 형광단의 밝기나 기증자 또는 수용자 단백질의 화학양론, 형광단의 정렬상태 등의 요소는 형광공명에너지전달에 영향을 줄 수 있으므로 고려되어야 하는 사항이다[49].

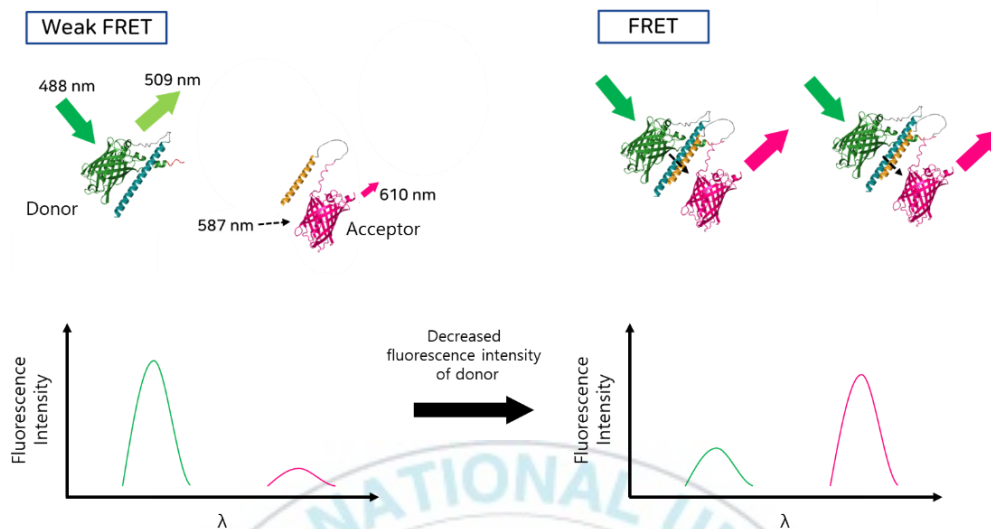


Figure 13. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 분석의 원리

Ⅲ. 실험

1. 실험 재료

E. coli BL21 DE3 competent 세포는 엔지노믹스 (Enzynomics, Daejeon, Korea)에서 구매하였다. Cloning 에 AccuPower® Pfu PCR PreMix 를 사용하였고 바이오니아 (Bioneer, Daejeon, Korea)에서 구매하였다. Ni-NTA agarose 와 polypropylene gravity-flow 컬럼은 Qiagen (Hilden, Germany)에서 구매하였다. PD-10 desalting column 은 GE Healthcare (Chicago, IL)에서 구매하였다. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaOH, imidazole, SDS-PAGE loading buffer, 그리고 Coomassie Brilliant Blue 는 바이오세상 (Biosesang Inc, Seongnam, Korea)에서 구매하였다. NaCl 는 삼천 (SAMCHUN, Seoul, Korea)에서 구매하였고 Agar powder 와 yeast extract 는 대정 (Daejung, Siheung, Korea)에서 구매하였다. Bacto Tryptone 는 BD (Seoul, Korea)에서 구매하였다. Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)는 웰진 (WELGENE, Gyeongsan, Korea)에서 구매하였고 30% acrylamide-bis solution 은 다인바이오 (DYNEBIO, Seongnam, Korea)에서 구매하였다. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)는 GenDEPOT (Hanam, Korea)에서 구매하였다. TRIS-glycine-SDS buffer 는 Bioland Scientific LLC (Paramount, CA)에서 구매하였다.

2. 실험 방법

2.1 Plasmid Construction and Bacterial Strains

야생형 MBD2(아미노산 211-244)또는 야생형 p66 α (아미노산 138-178)의(Table 2) 코일드 코일 영역에 해당하는 유전자 서열을 암호화된 저항성과 T7 promoter 를 가지는 pET21a 에 삽입했다. pET21a-p66 α -GFP 는 pET21a 의 NdeI 와 XhoI 사이에 GFP-p66 α 를 삽입하여 생성되었으며 pET21a-C'-GFP 로 명명하였으며, mCherry-MBD2 또한 pET21a 의 NdeI 와 XhoI 사이에 삽입되었고 pET21a-C-mCherry(BIONICS)로 명명하였다. 각 코일과 형광단백질 사이에는 GGGGSGGGGSGGGGS 아미노산 서열을 linker 로 추가하였고 GFP 및 mCherry 의 C 말단에 6 $\times$ His tag 을 삽입하여 발현 후 정제과정을 용이하게 하였다. 박테리아 시스템에서 공동발현을 하기위해 polymerase chain reaction 및 infusion cloning 을 이용하여 C'-GFP 를 pRSF1 에 삽입하였고 pRSF1-C'-GFP 로 명명하였다. 그 후 pRSF1-C'-GFP 와 pET21a-C-mCherry 를 주형으로 하여 Site-directed mutagenesis 를 사용해 C'의 8 번, 11 번, 18 번, 29 번 및 C 의 8 번, 18 번, 22 번, 29 번 아미노산을 시스테인으로 각각 치환하여 총 4 쌍의 코일드 코일을 발현하는 벡터를 구축하였다. 야생형 코일-형광단백질을 발현하는 벡터에 적합한 *E.coli* BL21 (DE3) competent 세포에 형질전환을 하여 각 벡터를 삽입하여 발현 균주를 제작하였다. 시스테인 돌연변이 코일-형광단백질을 발현하는 벡터를 상보적인 발현벡터와 함께 *E.coli* SHuffle[®] competent 세포에 공동형질전환하여 발현균주를 제작하였다.

2.2 Protein Expression and Purification

형질전환 된 BL21 (DE3) 대장균 세포를 암피실린 농도를 0.1 mg/mL 로 조절된 고체 LB 배지에서 12 시간 배양한다. 이후 벡터의 삽입이 확인된 균주를 2xYT 배지 (암피실린 0.1 mg/mL, 이하 동일)에 접종하여 37°C에서 12 시간 배양시킨 후 다시 2xYT 배지에 1:100 으로 희석시켜 접종하고 200 rpm 조건으로 교반하며 30°C에서 배양한다. 흡광도 600 nm 값이 0.4-0.5 가 되었을 때 단백질 발현 유도를 위해 IPTG 를 최종 농도 1.0 mM 이 되도록 첨가한 후 밤새 배양 후 4000 g 조건으로 10 분 동안 원심분리하여 세포 펠렛으로 수거하여 -20°C에 냉동 보관한다.

세포에서 단백질을 정제하기 위해 lysis buffer (50 mM sodium phosphate (pH8.0), 0.3 M NaCl, 그리고 10 mM imidazole) 40 mL 를 펠렛에 첨가하여 세포를 재부유 시켜준다. Lysozyme 을 최종 농도 1 mg/mL 로 첨가한 후 4°C에서 30 분 정도 회전시키며 혼합 과정을 진행한다. 그 후 8 분 동안 10 초 간격으로 초음파 분해를 진행하고 다시 10,000 g 조건에서 30 분 동안 원심 분리를 진행하여 단백질과 세포 잔유물을 분리하였다. 단백질이 포함된 상등액을 따로 옮겨 Ni-NTA agarose beads 를 1.5 mL 첨가한 후 4°C에서 30 분간 회전시키며 혼합한다. Gravity-flow 컬럼을 고정시킨 후 Ni-NTA 를 혼합시킨 상등액을 컬럼으로 내려주며 beads 와 flow through 를 분리한다. Flow through 는 제거한 후 beads 세척을 위해 wash buffer (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 0.3 M NaCl, 그리고 20 mM imidazole)를 충분히 흘려 내려주며 flow through 로 흘러나오는 용액의 흡광도 280nm 가 0.00 이 될 때까지 beads 에 접착된 불순물을 제거한다. Beads 와 결합된 단백질을 따로 분리하기 위해 elution buffer (50 mM sodium phosphate (pH 8.0), 0.3 M NaCl,

그리고 250 mM imidazole)를 500 uL 씩 흘려주며 flow through 를 micro tube 에 분주한다. 그 후 elution buffer 를 인산완충용액(PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM)로 교체하기 위하여 PD10 컬럼을 PBS 로 채운 후 단백질이 들어있는 용액 2.5 mL 를 넣어주고 PBS 3 mL 를 넣어 buffer 를 변경하였다. Biodrop 을 이용하여 흡광도 280 nm 에서 분주 된 용액의 농도를 각각 측정하고 -20°C에서 냉동 보관한다.

PBS 로 평형화 된 ProteoSEC Dynamic 11/30 3-70 HR(Protein Ark, UK) SEC 컬럼을 ÄKTAprime plus 장치에 연결한다. 단백질이 포함된 용액을 0.22 μ m 의 시린지 필터로 여과하여 최대 1 mL 용량으로 컬럼에 주입한다. 유속 0.5 mg/mL 조건으로 PBS 를 주입하면서 크기 순서에 따라 분리되는 단백질 flow through 를 분주하여 보관한다.

2.3 SDS-PAGE and Native PAGE

SDS-PAGE 의 Stacking gel 은 4%로 separating gel 은 12%로 제조하여 전개하였다. 샘플 당 micro tube 에 단백질 3 ug 을 분주하여 준 후 증류수를 첨가하여 10 uL 또는 15 uL 또는 20 uL 용량으로 맞춘다. 5x SDS-PAGE loading dye 를 용량에 맞게 첨가한 후 heating block 을 이용해 95°C에서 10 분 동안 가열한다. Gel 의 홈에 각각 샘플을 주입한 후 150 V 에서 1 시간 30 분 동안 전개시킨다. 이후 Coomassie brilliant blue G-250 0.1%, Methanol 50%, Water 50%가 포함된 staining buffer 를 이용해 염색한 후 Methanol 20%, Acetic acid 10%, Water 70% 가 포함된 destaining buffer 를 이용하여 gel 을 세척한다. 염색 시간은 20 분이며 세척 시간은 1 시간, 1 시간 총 2 번 진행한다. Native PAGE 는 최대 125V 의 전압에서 2 시간 동안 12% gel 에서 전개되었다. 그 후, UV 를 조사하여 단백질의 형광을 관찰하였다.

2.4 ITC Assay

ITC 분석은 한국기초과학연구원(한국, 오창)에서 MicroCal Auto-iTC200(Malvern Panalytical)을 사용하여 수행되었다. 결합 친화도는 PBS 에서 40 uL 의 C'-GFP 및 200 uL 의 C-mCherry 를 사용하여 측정되었다. 적정 실험을 위해 2 uL 의 C'-GFP 를 25°C에서 150 초 간격으로 4 초 동안 C-mCherry 에 19 회 주입하고 MicroCal Origin 7.0 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다. N 은 화학양론적 수, K_D 는 결합 친화도, ΔH , ΔS 는 각각 엔탈피 및 결합 엔트로피의 변화를 의미한다.

2.5 Size Exclusion Chromatography (HPLC)

Superdex 200 Increase 10/300 GL (사이티바코리아, Seoul, Korea) 컬럼을 YL HPLC System (YL9100S HPLC) 장치에 연결한다. PBS 로 컬럼을 평형상태로 채워준 후 등물로 혼합되거나 이황화 결합체로 존재하는 단백질이 포함된 buffer 를 0.22 μ m 의 시린지 필터로 여과하여 최대 1 mL 용량으로 컬럼에 주입한다. 유속 0.7 mg/mL 조건으로 PBS 를 주입하면서 280 nm 에서 흡광도를 검출하여 크기 순서에 따라 분리되는 단백질을 모니터링했다.

2.6 FRET Assay

등물로 혼합되거나 이황화 결합체로 존재하는 단백질의 최종 부피가 200 μ L 가 되도록 PBS 에 희석하고 농도는 4 μ M 이 되도록 하였다. 각 샘플을 96-well plate 로 옮긴 후 여기 파장을 488 nm 로 고정하고 510 nm 에서의 형광을 측정하였다. 야생형 코일-GFP 의 단위 흡광도 당 발광도(A)와 각 샘플의 단위 흡광도 당 발광도(B)를 산출한 후 아래의 식을 이용해 형광 공명 에너지 전달 효율을 계산하였다.

$$\text{형광 공명 에너지 전달 효율(FRET efficiency, \%)} = 100 \times \left(1 - \frac{B}{A}\right)$$

IV. 결과 및 고찰

1. 야생형 코일-형광단백질 구조 설계

자가 결합 코일 모티프를 단백질에 도입하여 사용하여 비천연 이중이량체 단백질 복합체를 만들기 위해 서로 상보적으로 자가 결합하는 p66 α 의 아미노산 서열 138-178 및 MBD2의 211-244 부분인 코일도메인을 사용하고 각각 C', C 라 명명하였다. 그 후 녹색 형광 단백질(GFP)와 적색 형광 단백질(mCherry)을 Linker 를 이용해 각 코일의 C 말단에 도입하기로 하고 정제의 용이성을 위해 각 형광단백질의 C 말단에 His tag 를 도입하고자 하였다. Figure 14 는 딥러닝 시스템을 통해 단백질 구조를 예측할 수 있는 인공지능 프로그램인 AlphaFold2 를 이용하여 구현한 구조이다. Turquoise 는 코일 C', yellow 는 코일 C, green 은 GFP, pink 는 mCherry, gray 는 Linker, red 는 His tag 으로 구분하였다.

두 이중 단백질은 Figure 15 와 같이 각 코일간의 상보적 자가 결합으로 인해 이중 이량체를 형성할 것이라는 가설을 바탕으로 역평행 방향으로 자가 결합하는 코일의 양 끝에 형광단백질이 오도록 설계하여 입체효과(steric hindrance)에 의한 영향을 최소화하고자 하였다. AlphaFold2 를 통해 재조합 단백질의 구조를 예측하였을 때 성공적으로 이중 이량체를 형성함을 확인할 수 있었으며 이를 바탕으로 박테리아 시스템에서 발현을 진행하였다.

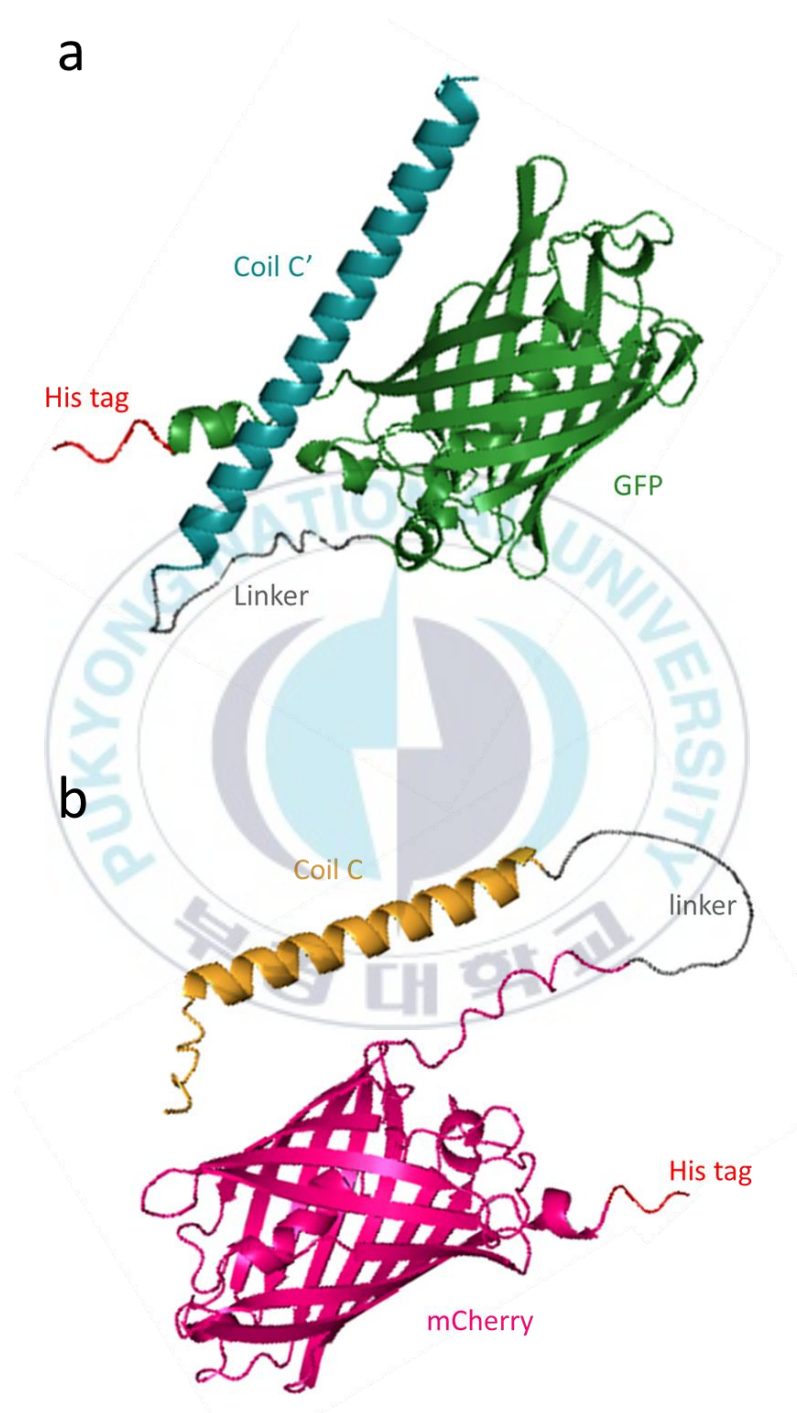


Figure 14. Alphafold2 로 예측한 코일-형광단백질 구조. a) C'-GFP 및 b) C-mCherry.

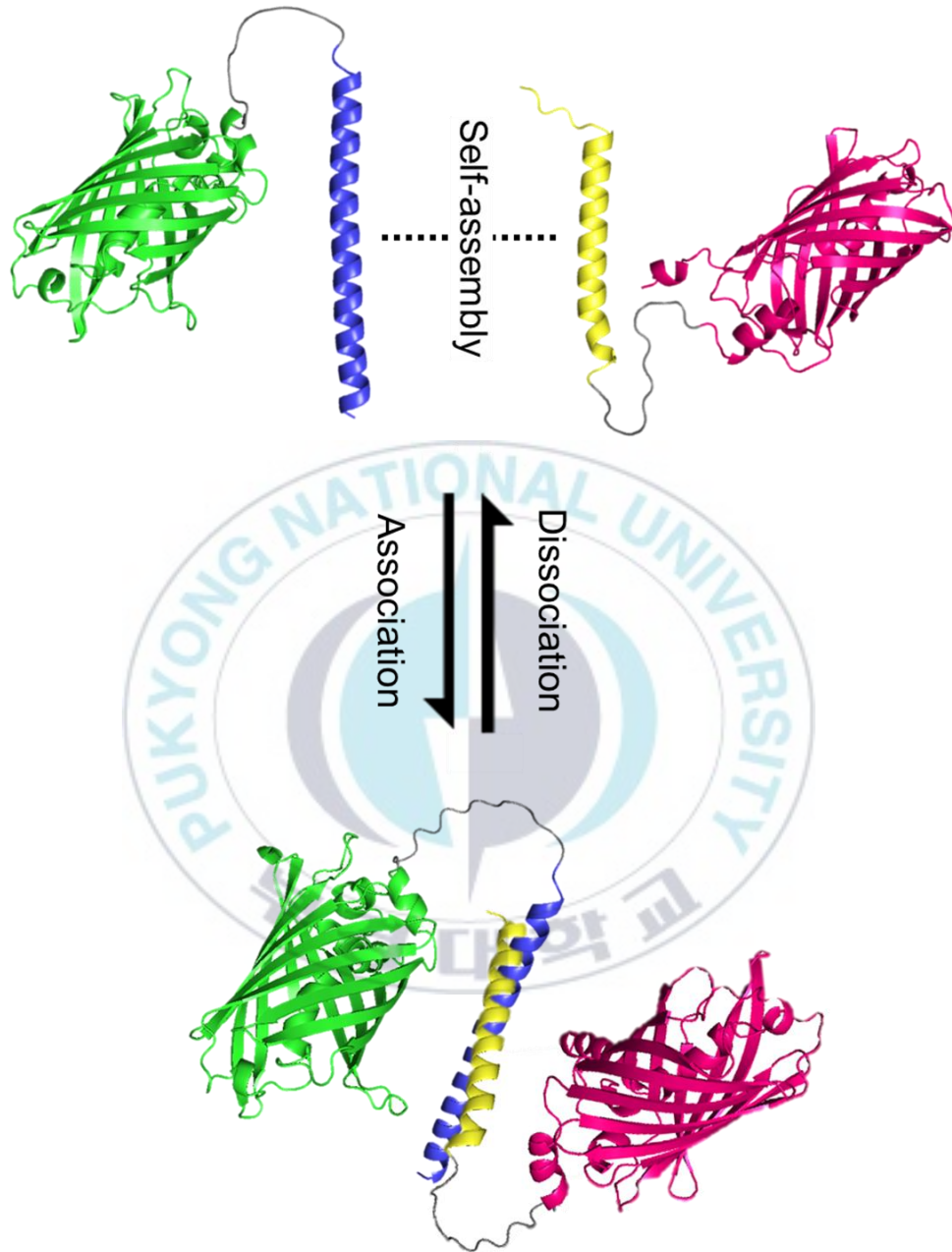


Figure 15. C'-GFP 와 C-mCherry 의 자가 결합 및 해리 모식도.

2. 코일-형광단백질 발현 및 정제

각 단백질은 *E.coli* BL21(DE3)에서 발현되었다. *E.coli* BL21(DE3)는 T7 promoter 를 통해 재조합 단백질의 효율적인 발현을 가능하게 하며 실제로 재조합 단백질을 생산하기 위해 가장 널리 사용되는 발현 숙주이다. BL21(DE3)는 C'-GFP 및 C-mCherry 가 유전적으로 융합된 pET21a-C'-GFP 및 pET21a-C-mCherry 플라스미드로 형질전환 되었다. Figure 16 과 같이 사용된 pET21a 는 암피실린 저항성을 가지며 두가지 발현 플라스미드 모두 다중 클로닝 사이트의 NdeI 과 XhoI 사이에 발현하고자 하는 재조합 단백질의 유전자 서열이 삽입되었다. 각 코일의 서열 뒤인 C 말단에는 Linker 인 (GGGGS)₄ 가 추가되었으며 그 뒤로 형광단백질의 서열과 His tag 이 차례로 삽입되었다.

BL21(DE3)에서 발현된 C'-GFP 및 C-mCherry 는 C 말단에 존재하는 His tag 과 니켈 bead 를 사이의 결합력을 이용한 친화성 크로마토그래피로 1 차 정제하였다. 단백질정제에 일반적으로 사용되는 용액을 사용하여 우선적으로 불순물을 제거하였으며 이 용액은 단백질의 접힘과 안정성에 영향을 미치지 않도록 염과 pH 를 조절한 완충용액이다. 그 후 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)를 통해 추가적인 정제를 진행하고 인산완충용액으로 교체한 결과 세포 배양 1L 당 약 10mg 이상의 고순도의 단백질 수율을 확인하였다. 그 후 발현된 단백질이 C'-GFP 및 C-mCherry 의 예상 분자량인 33.64 kDa 및 32.65 kDa 에 해당하는지 확인하기 위하여 Figure 17 과 같이 SDS-PAGE 를 진행하였다. 그 결과 C'-GFP 및 C-mCherry 모두 35 kDa 의 마커 부근에서 근사한 추정치를 나타냄을 확인하였다.

최종적으로 암피실린 저항성을 가지는 pET21a 에 유전적으로 융합된 코일-형광단백질은 T7 promoter 를 통해 *E.coli* BL21(DE3)에서 성공적으로 발현되었으며 말단에 융합된 His tag 과 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)로 성공적으로 정제되었다.



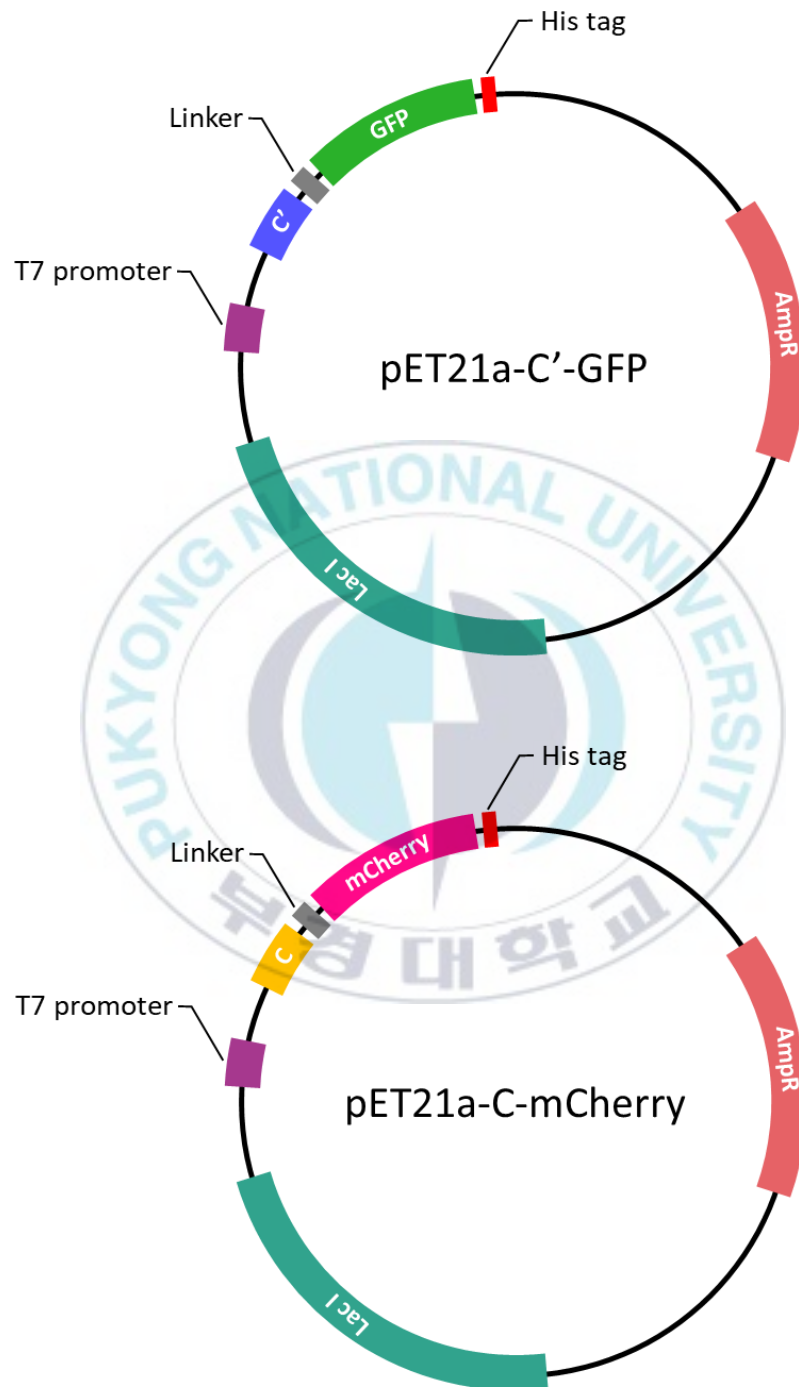


Figure 16. pET21a-C'-GFP 및 pET21a-C-mCherry 발현 벡터 설계.

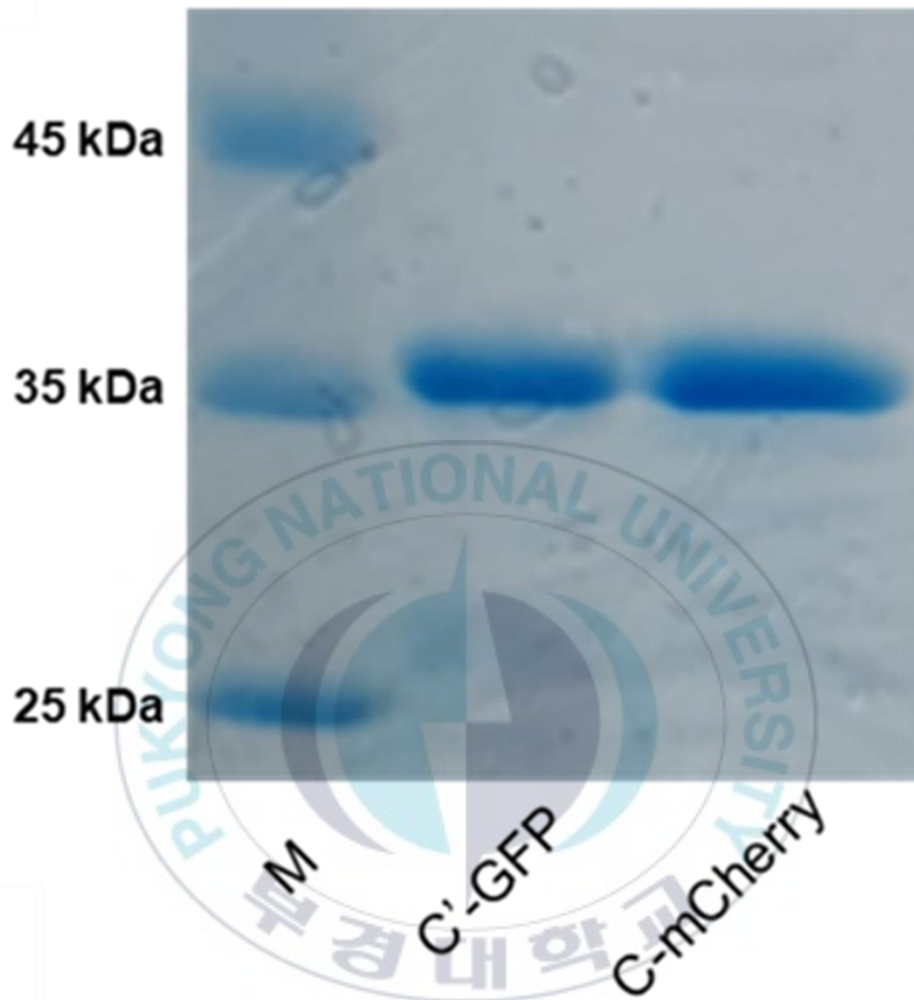


Figure 17. 발현 및 정제 후 C'-GFP, C-mCherry 의 SDS-PAGE 결과.

3. 야생형 코일-형광단백질의 자가결합 능력 평가

정제 후 C'-GFP 및 C-mCherry 의 성공적인 접합 여부를 확인하기 위하여 단백질 고유의 성질을 겔상에서 확인할 수 있는 Native PAGE 를 진행하였다. 우선 각 단백질 단독으로 Native PAGE 를 진행한 결과 Figure 18 에서 볼 수 있듯이 1 번과 3 번에서 C'-GFP 단독과 C-mCherry 단독의 경우 녹색 및 적색의 형광이 관찰되었으며 겔상의 밴드 또한 서로 다른 위치에 나타남을 확인하였다. 각 단백질이 성공적으로 접했기 때문에 보고된 바와 같이 GFP 와 mCherry 에서 녹색 및 적색의 형광이 나타났고 해당 겔에서 C'-GFP 와 C-mCherry 의 전하량이 서로 다르기 때문에 동일한 pH 의 겔에서 서로 다른 위치의 밴드가 관찰되었다고 판단하였다.

다음으로, C'-GFP와 C-mCherry 간의 자가 결합 유효성을 판단하기 위해 C'-GFP 와 C-mCherry 등몰 혼합액, 코일이 없는 천연형 GFP 와 C-mCherry 등몰 혼합액을 Native PAGE 로 분석하였다. C'-GFP 와 C-mCherry 등몰 혼합액(Figure 18, lane 2)의 경우 GFP 와 mCherry 의 녹색, 적색의 혼합색인 황색 형광 단일 밴드가 관찰되었다. 반면, 천연형 GFP 와 C-mCherry 등몰 혼합액(Figure 18, lane 4)의 경우 GFP 와 mCherry 각각의 녹색, 적색 형광 이중 밴드가 관찰되었다. 이러한 결과는, 자연적으로 상호결합력이 전무한 두 형광 단백질 GFP 와 mCherry 에 도입된 자가결합 코일 도메인이 단백질 간의 자가결합 복합체 형성을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 또한 자가결합 코일 도메인이 모 단백질(parental protein)인 p66 α , MBD2 구조의 일부에 속하지 않더라도 독립적으로 기능할 수 있다는 것을 의미한다.

그 후 등은 적정 열량계를 사용하여 Native PAGE 에서 자가결합이 확인된 C'-GFP 와 C-mCherry 사이의 열역학적 특성을 조사하고 이를 기반으로

결합해리상수(K_D) 또는 결합친화도를 수치적으로 환산하였다(Figure 19). 두 단백질 사이에서 측정된 수치는 $K_D = 10.7$ nM, $\Delta H = -2.6$ kcal/mol, $\Delta S = -52.4$ cal/mol/deg, $N = 0.7$ 으로 확인되었다. C'-GFP 와 C-mCherry 사이의 자가 결합은 자발적인 반응이며 높은 결합 친화도를 가진다. 또한 두 단백질의 이론적 화학양론값은 1:1 이지만 측정결과 0.7 로 확인되었는데 이는 코일 사이의 동종 이량체 형성 또는 실제 단백질의 농도와 등온선에 맞추기 위해 사용된 농도의 차이로 발생하는 오류라고 판단하였다. 결론적으로, 유전자 융합법을 통해 자가결합 코일 도메인을 관심 단백질인 GFP 와 mCherry 에 성공적으로 도입하여 상호 이종 이량체를 형성할 수 있는 C'-GFP 와 C-mCherry 를 제조획득하였다. Native PAGE 와 ITC 를 통해 C'-GFP 와 C-mCherry 의 결합특성특성을 정성, 정량적으로 확인하였다.

	1	2	3	4	5
C'-GFP	+	+	-	-	-
C-mCherry	-	+	+	+	-
GFP(WT)	-	-	-	+	+

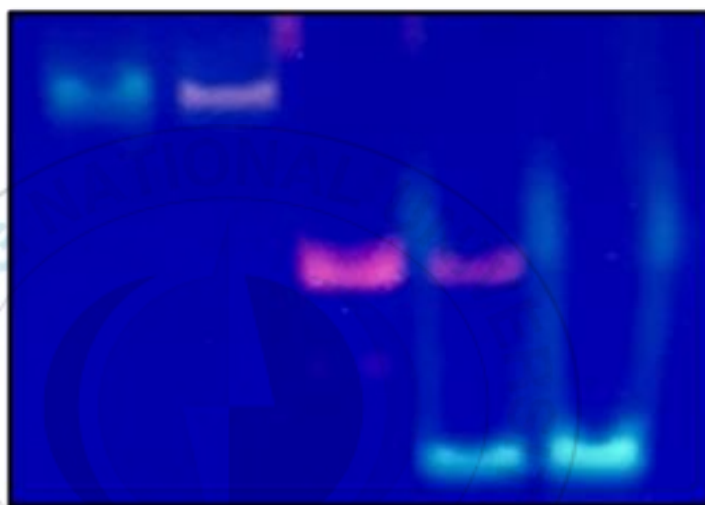


Figure 18. C'-GFP 및 C-mCherry 단독 및 자가 결합 Native PAGE 결과.

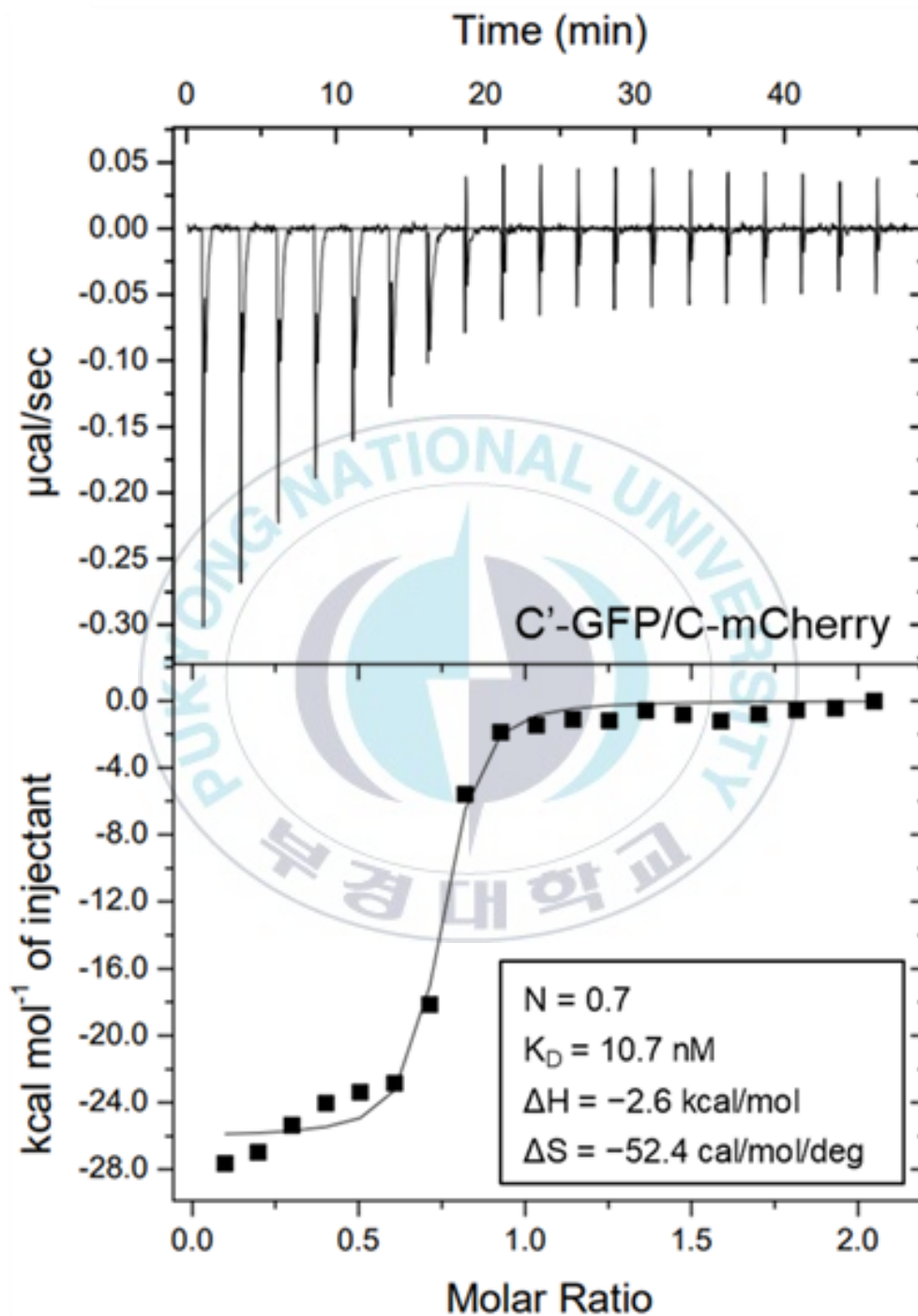


Figure 19. C'-GFP 및 C-mCherry 간 결합 시 등온 적정 열량 측정 결과.

4. 코일의 시스테인 돌연변이 부위 지정 및 시스테인 커플링 코일-

형광단백질의 공동발현 및 정제

야생형 코일-형광단백질을 통해 코일의 자가 결합 능력을 확인한 후 여전히 남아 있는 문제점인 빠른 해리를 극복하기 위하여 시스테인을 각 코일에 도입하고자 하였다. 우선 시스테인으로의 돌연변이가 코일-코일의 상호작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Figure 20 과 같이 여러 쌍의 돌연변이 후보를 각 코일의 다양한 위치로 지정하였다. 각각의 시스테인은 이황화 결합의 순조로운 형성을 위해 코일-코일 상호작용의 경계면에 위치하도록 하였으며 총 4 개의 후보군이 설정되었다. 그 후 Figure 21 과 같이 각각의 돌연변이가 코일-코일 상호작용면에 존재하는지 확인하기 위하여 Table 2 와 같이 변경된 아미노산 서열을 통해 구조를 예측하여 시스테인 잔기의 위치를 확인하였다. 여기서 E18C-R18C 의 경우 C'의 18 번째 아미노산 E(글루탐산)를 C(시스테인)으로 치환함을 뜻하고 C 의 18 번째 아미노산 R(아르기닌)을 C(시스테인)으로 치환함을 뜻하며 두 가지 코일이 서로 쌍을 이룸을 나타낸다. 코일-코일의 중앙부분을 돌연변이 시킨 E18C-R18C 및 L11C-V22C 는 I8C-A29C 및 R29C-T8C 보다 자가 결합 코일의 형성이나 발현측면에서 해로운 영향을 줄 것이라 예상하였으며 최종적으로 I8C-A29C 및 R29C-T8C 를 Term_1, Term_2 로 명명하였으며 E18C-R18C 및 L11C-V22C 를 Mid_1, Mid_2 로 명명하였다.

구조 예측을 마친 후 총 4 쌍의 단백질을 각각 공동발현하기 위하여 pET21a 와 호환가능한 pRSF1 플라스미드에 C'-GPF 를 클로닝 하였으며 최종적으로 pRSF1-C'-GPF, pET21a-C-mCherry 를 사용하여 부위 지정 돌연변이를 통해 원하는 부위를 시스테인으로 치환하였다. 상보적인 코일을

이황화 결합을 가지는 단백질을 발현하는데 최적화 되어있는 *E.coli* SHuffle® 균주에서 공동발현하게 된다면 우선적으로 코일-코일간의 빠른 자가결합으로 인해 이종 이량체가 형성이 되고 그 후 성공적인 이황화 결합을 형성할 수 있을거라 예측하였다. 따라서 *E.coli* SHuffle® 균주를 각 플라스미드로 공동형질전환 한 후 발현을 진행하였다.

공동발현 및 정제 후 SDS-PAGE 결과 Figure 22 와 같이 4 쌍의 복합체 모두에서 예상 분자량인 65.31 kDa 에 가까운 밴드가 관찰되었지만 Mid_1, Mid_2 의 경우 Term_1 및 Term_2 에서는 관찰되지 않은 큰 분자량의 밴드가 관찰되거나 순도가 매우 낮았다. 이는 예측했던 결과이며 분자량이 큰 밴드의 관찰은 비특이적인 이황화 결합에 의한 스크램블링된 단백질로 판단되고 코일-코일 상호작용에 중요한 영향을 끼치는 중간부분의 주요 잔기의 변형으로 인해 발현과 복합체 형성이 방해된 것으로 보인다.

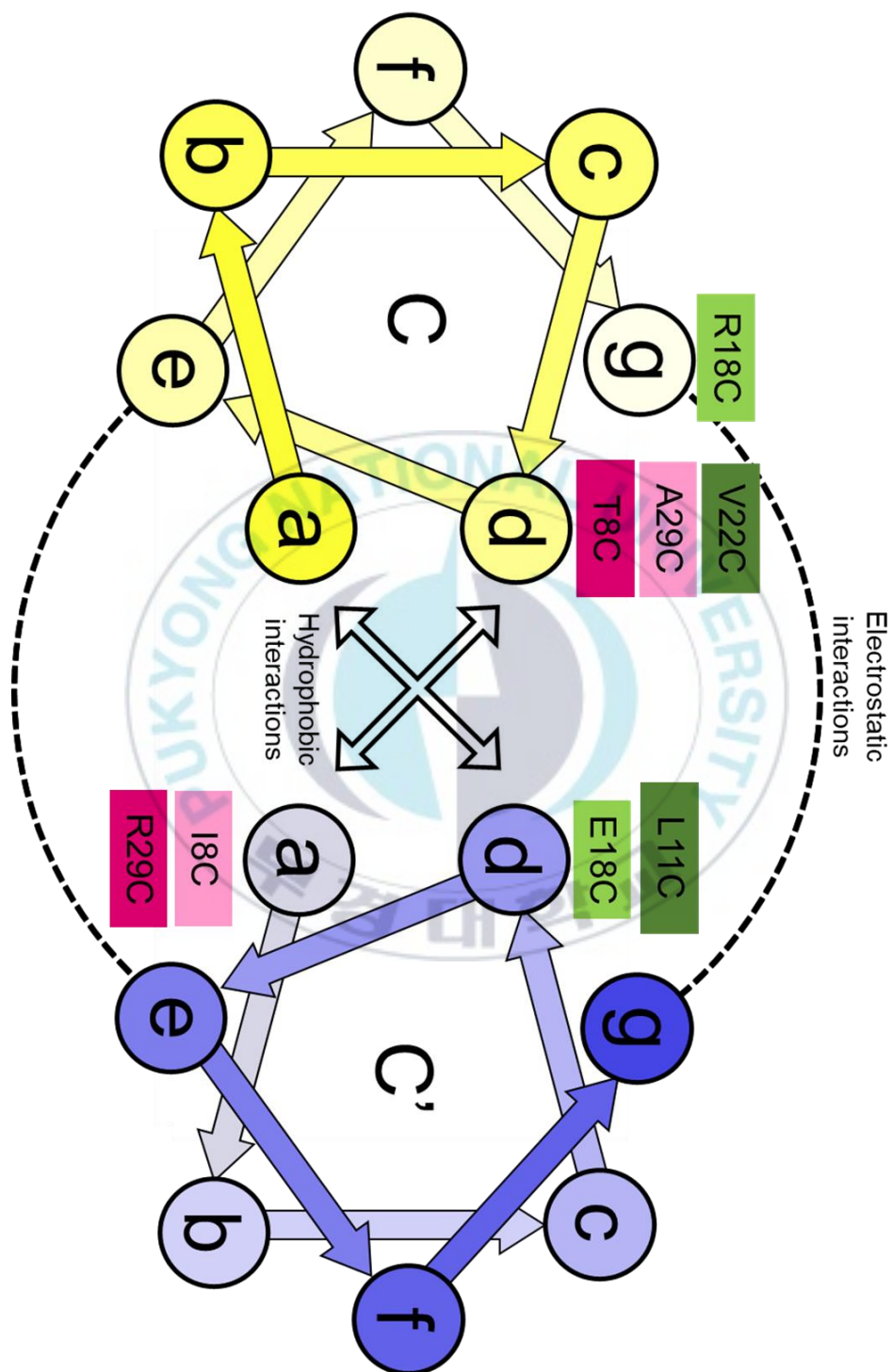


Figure 20. C'-C 의 시스테인 돌연변이 아미노산 위치를 나타낸 wheel diagram.

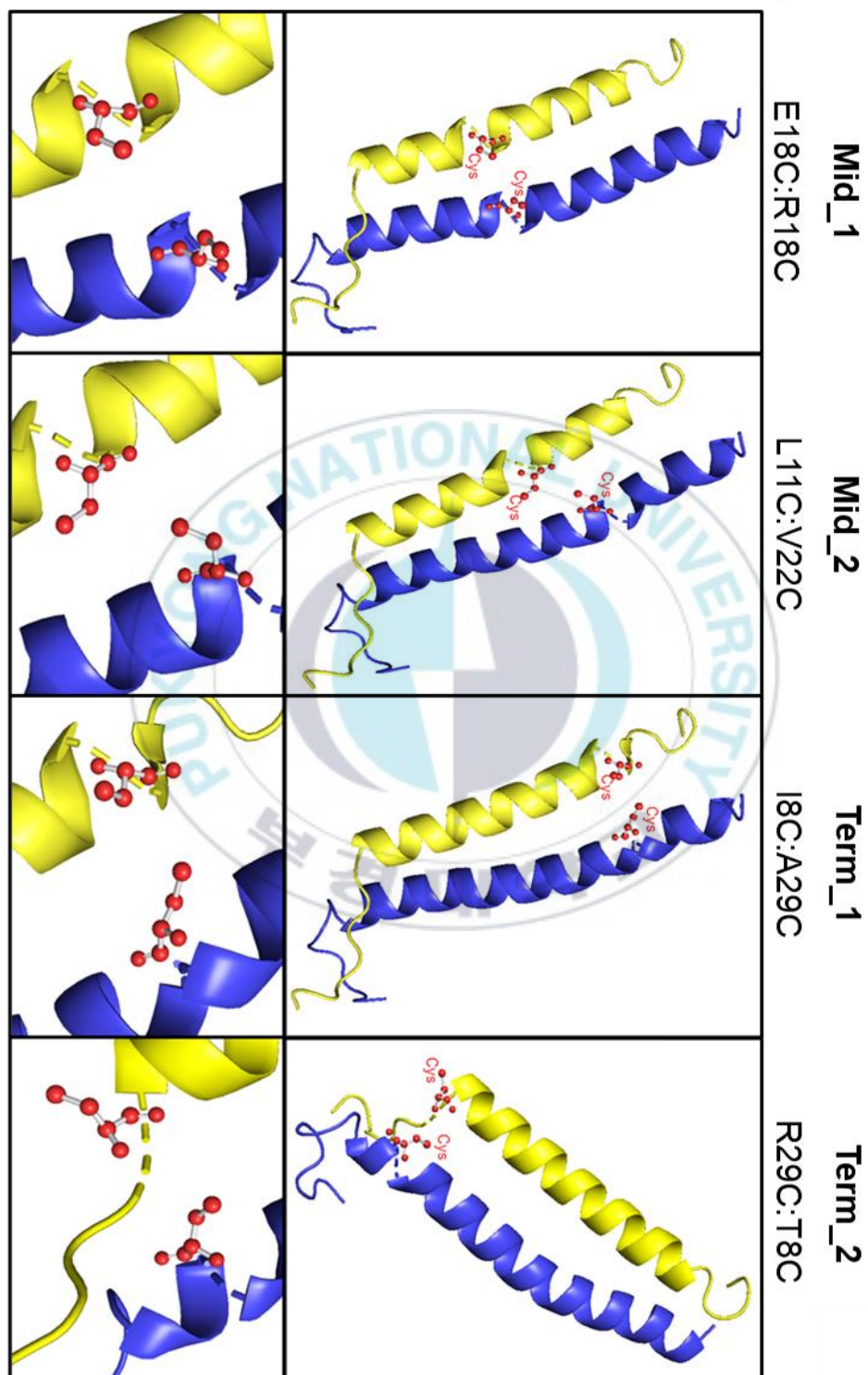


Figure 21. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 시스테인 위치.

Table 2. 시스템인 커플링 자가 결합 코일의 아미노산 서열.

Mutations(coil C': coil C)	Sequence
E18C:R18C	PEERERMIKQLKEELRLCEAKLVLLKKLRQSQIQKEATAQK GSKAFIVTDEDIRKQEECVQQVRKKLLEEALMADILS
L11C:V22C	PEERERMIKQCKEELRLEEAKLVLLKKLRQSQIQKEATAQK GSKAFIVTDEDIRKQEERVQQCRKKLLEEALMADILS
I8C:A29C	PEERERMCKQLKEELRLEEAKLVLLKKLRQSQIQKEATAQK GSKAFIVTDEDIRKQEERVQQVRKKLEECLMADILS
R29C:T8C	PEERERMIKQLKEELRLEEAKLVLLKKLCQSQIQKEATAQK GSKAFIVCDEDIRKQEERVQQVRKKLLEEALMADILS

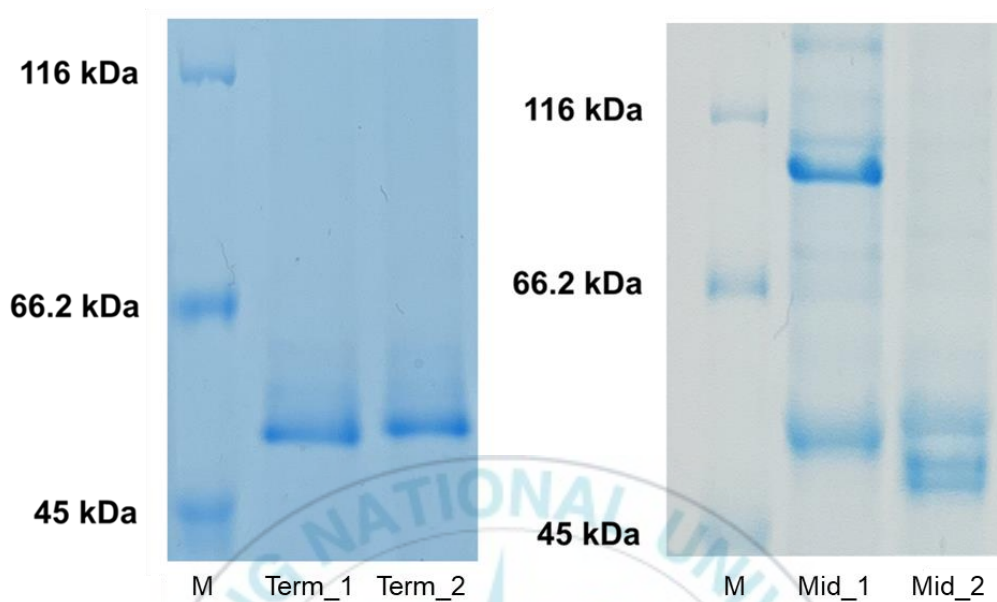


Figure 22. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 공동발현 및 정제 후 SDS-PAGE 결과.

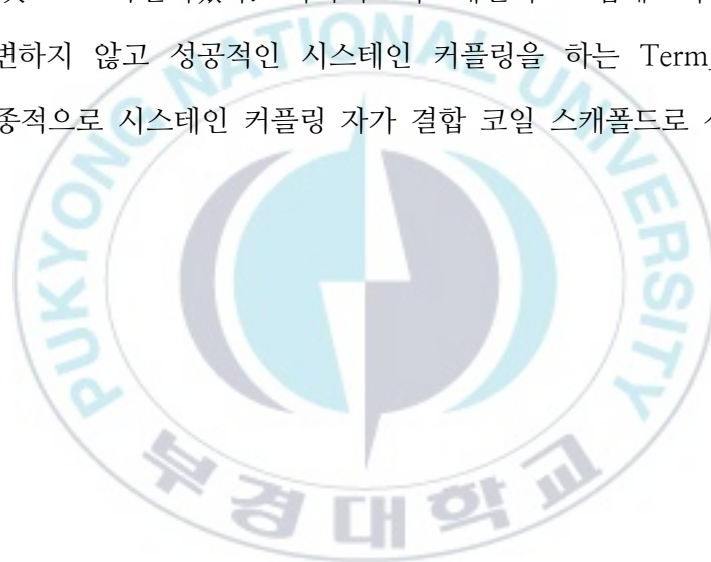
5. 시스테인 커플링 코일-형광단백질 복합체 후보 선정

발현 및 정제를 마친 4 쌍의 시스테인 커플링 코일-형광단백질 중에서 최종적으로 스캐폴드로 사용될 수 있는 후보를 선정하기 위해 각각의 시스테인 커플링 코일-형광단백질 복합체를 비교하였다. 우선 *E.coli* SHuffle® 내에서 동일한 조건으로 발현을 하고 정제를 마친 후 최종적으로 얻어지는 수율을 비교한 결과 그림 Figure 23 과 같이 Term_1 및 Term_2 는 1 L 배양액당 10 mg 이상의 높은 수율을 확인할 수 있었지만 Mid_1, Mid_2 의 경우 앞의 두 복합체에 비해 절반에 못 미치는 수율을 나타내었다.

또한 Native PAGE 결과 Figure 24 에서 확인할 수 있듯이 얻어진 단백질 복합체도 Mid_1, Mid_2 의 경우 야생형 및 Term_1, Term_2 에 비해 안정된 복합체를 형성하지 못하였다. 환원제인 DTT 가 첨가되지 않은 위의 겔에서는 이황화 결합이 유지되어 단백질간 이황화 결합을 확인할 수 있으며 환원제를 첨가한 아래에서는 이황화 결합이 끊어져 오직 코일과 코일간의 자가 결합 능력에 의해 복합체의 구조가 유지될 수 있는지의 여부를 확인할 수 있다. 야생형 C'-GFP 와 C-mCherry 를 혼합하였을 경우 두 단백질의 복합체와 적은 양의 C-mCherry 의 형광이 관찰되었다. Term_1, Term_2 에서는 환원제의 유무와 상관없이 복합체에 해당하는 노란색의 형광 밴드만이 관찰되었지만 환원제가 첨가되었을 때 Mid_1 의 경우 기존의 복합체 밴드보다 위에 존재하는 밴드가 관찰되어 다른 거동을 보였으며 Mid_2 에서도 다른 코일쌍에서 관찰되지 않은 녹색의 밴드가 관찰되었다. 환원제가 첨가되었을 때 Mid_1 의 경우 가장 위에 존재하던 밴드는 두 밴드로 나뉘어졌으며 Mid_2 의 경우 녹색의 밴드가 사라짐을 확인하였다. 이는 시스테인 간의 비특이적 이황화 결합의 형성으로 인한 원하지 않는 복합체의 형성 및 중요 잔기의

소실에 의한 단백질 안정성의 저해로 보이며 이는 위에서도 언급했듯이 복합체의 발현 수율과 순도에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다.

그 후 Term_1 및 I9C-T8C 복합체가 이황화 결합을 통해 커플링 되어 있음을 확인하기 위하여 Figure 25 와 같이 Non-boiling 상태로 비환원, 환원 조건에서 SDS-PAGE 를 진행하였다. 그 결과 두 복합체 모두 비환원 조건에서 노란색 형광의 복합체로 존재하였다가 환원조건일 때 C'-GFP 및 C-mCherry 로 분리되는 것으로 확인되었다. 따라서 시스테인의 도입에 의해 단백질의 안정성이 변하지 않고 성공적인 시스테인 커플링을 하는 Term_1 및 I9C-T8C 가 최종적으로 시스테인 커플링 자가 결합 코일 스캐폴드로 선정되었다.



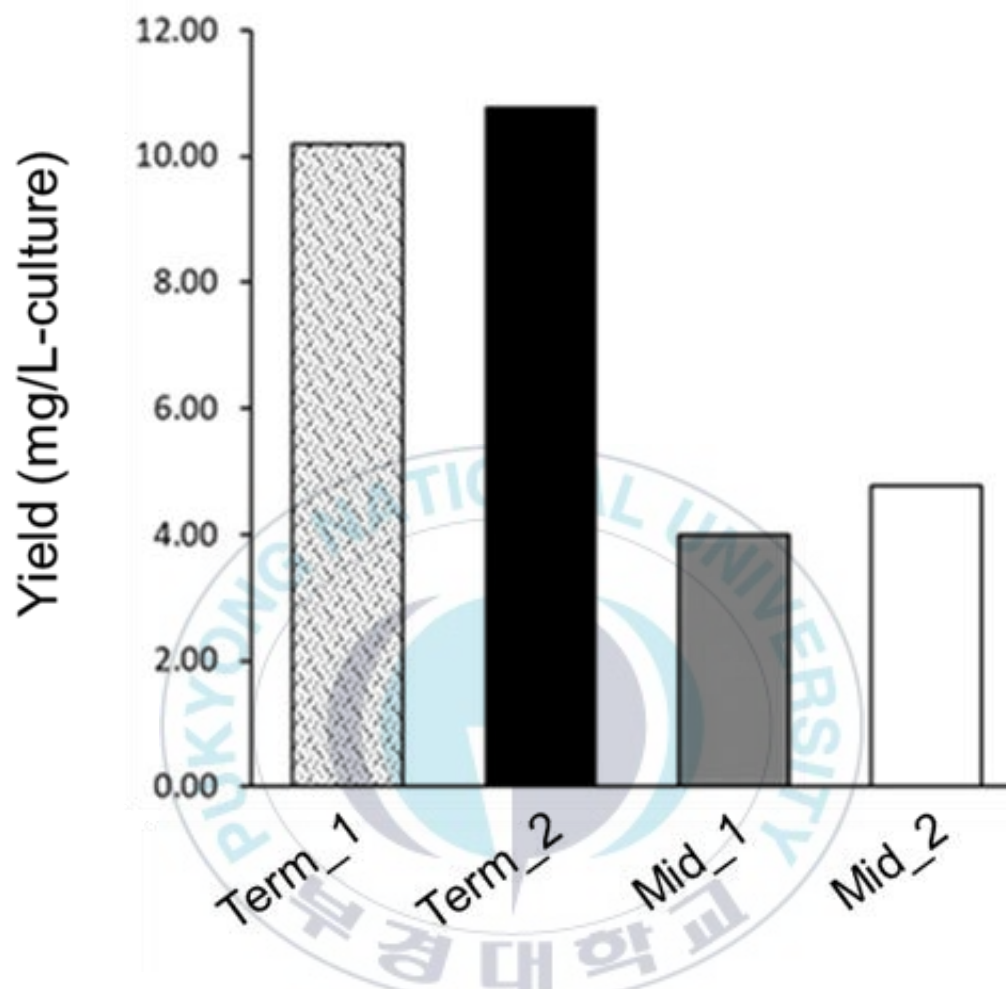


Figure 23. 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 공동발현 후 정제 수율 비교.

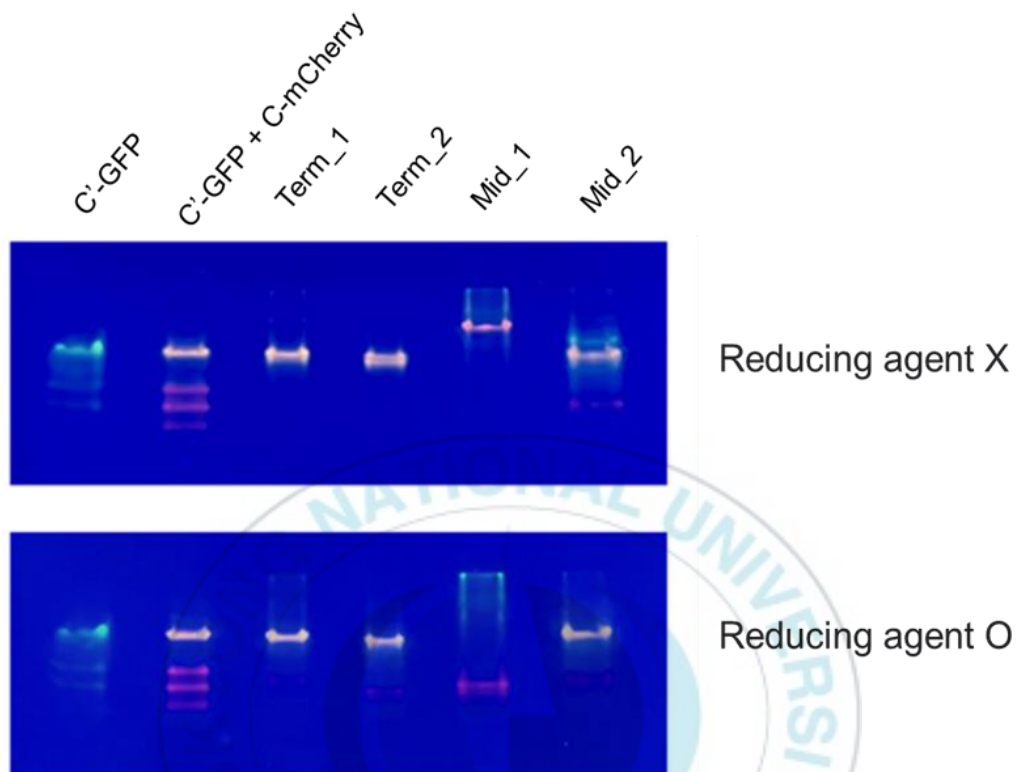


Figure 24. 공동발현된 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 Native PAGE 결과.

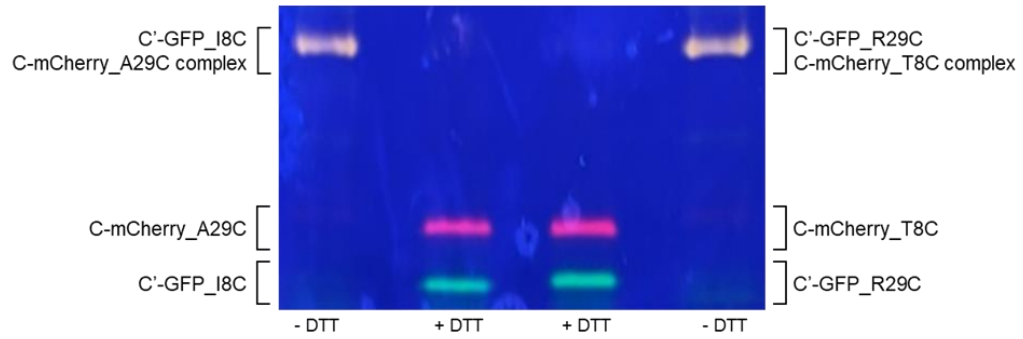


Figure 25. 최종 선택된 공동발현된 시스테인 커플링 자가 결합 코일의 DTT 유무에 따른 Non-boiling 조건에서 SDS-PAGE 결과.



6. 시스테인 커플링에 따른 결합안정성 향상 평가

선정된 시스테인 커플링 자가 결합 스캐폴드의 결합안정성 향상을 평가하기 위하여 단독 및 등물로 혼합된 C'-GFP 및 C-mCherry 와 Term_1 및 I9C-T8C 를 크기 배제 크로마토그래피로 분석하였다. 분석을 진행하기 전 복합체와 단량체는 분자량이 두 배 정도의 차이가나기 때문에 동일한 유속과 압력하에서 크기 배제 크로마토그래피를 진행하였을 경우 복합체의 용출이 단량체의 용출보다 빠르게 일어나 나타나는 피크의 차이가 거라 예측하였다. 야생형 C'-GFP 및 야생형 C-mCherry 단독의 경우 단일피크를 나타낼 것이며 등물로 혼합되었을 때에는 복합체의 피크에 해당하는 피크와 단량체에 해당하는 피크가 동시에 확인될 거라 예측하였다. 또한 시스테인 커플링 자가 결합 코일 복합체의 경우 복합체에 해당하는 피크만 나타날 것이라 예측을 하며 실험을 진행하였다.

실험진행결과 Figure 26 과 같이 야생형 C'-GFP 및 야생형 C-mCherry 단독의 경우 분자량이 비슷하기 때문에 거의 동일한 시간에 용출되었으며 복합체의 용출속도보다는 느린 속도로 용출되었다. C'-GFP 의 경우 크기가 큰 분자량이 약간 검출되었지만 이는 동종 이량체 형태의 복합체로 예측되며 C'과 C 는 결합친화도가 높아 상보적 코일의 존재 시 동종 이량체의 형성은 거의 일어나지 않으므로 무시할 수 있는 결과라고 판단할 수 있다. 등물로 혼합된 야생형 C'-GFP 및 C-mCherry 의 경우 거의 비슷한 비율로 복합체와 단량체의 피크가 검출되었으며 이는 각각의 단백질이 가역적으로 자가 결합과 빠른 해리를 하기 때문이라 판단하였다. 마지막으로 두 가지의 시스테인 커플링 자가 결합 코일 복합체의 경우 거의 대부분이 복합체의 형태로

검출되었으며 이를 통해 희석에 의한 해리의 문제점이 야생형 코일에 비해 확연히 증가됨을 확인할 수 있다.

마지막으로 시스테인 커플링 자가 결합 코일이 상보적으로 결합되었음을 각 코일에 융합된 형광단백질을 이용해서 확인하기 위해 형광 공명 에너지 전달 분석을 진행하였다. 이 분석법은 여기 및 방출 파장이 다른 두 형광 단백질을 이용해 두 분자가 얼마나 근접하는지 상대적인 수치로 나타낼 수 있다. 488 nm 에서 여기 되는 GFP 가 509 nm 의 파장을 방출하고 mCherry 가 인접해 있을 때 GFP 에서 방출된 509 nm 의 파장으로 인해 여기 된다면 610 nm 의 파장을 방출하게 될 것이다. 따라서 두 분자가 코일-코일로 복합체를 형성한 상태이라고 생각할 수 있으며 야생형의 C'-GFP 및 C-mCherry 를 혼합한 것과 비교해 형광 공명 에너지 전달 효율이 높을 경우 코일-코일간의 결합안정성이 향상된 것이라 판단할 수 있다.

우선 시스테인 커플링 자가 결합 코일 복합체의 GFP 와 야생형 C'-GFP 의 흡광도를 측정해 단위 흡광도 당 발광도를 산출한 후 형광 공명 에너지 전달 효율을 계산하였다. 그 결과 Term_1 의 형광 공명 에너지 전달 효율을 100%라 계산하였을 때 I9C-T8C 는 약 90%이상의 비슷한 수준을 나타냈지만 야생형 C'-GFP 및 C-mCherry 를 단순히 혼합하였을 경우 약 50%밖에 되지 않는 에너지 전달 효율이 산출되었다(Figure 27). 이는 자가 결합 능력만을 가지는 코일-코일 복합체보다 시스테인으로 커플링되어 복합체로 존재하는 코일-코일복합체가 우수한 결합 안정성을 가진 채로 존재함을 시사하고 최종적으로 안정적인 형태로 야생형 코일의 빠른 해리를 극복하고 유전적으로 융합된 단백질의 기능까지 유지할 수 있음을 확인하였다.

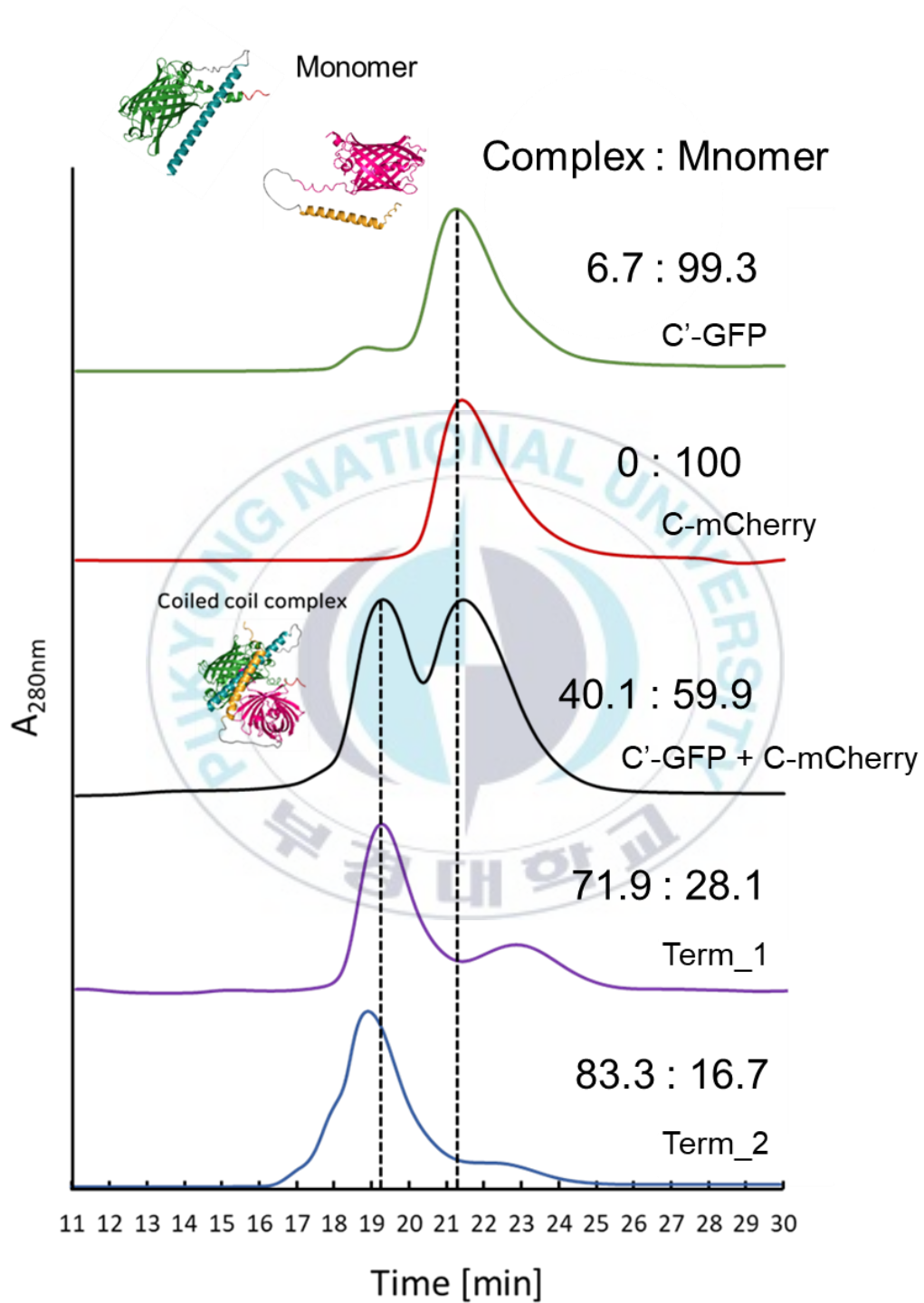


Figure 26. 시스테인 커플링 자가 결합 코일 및 야생형 코일의 크기 배제 크로마토그래피 결과.

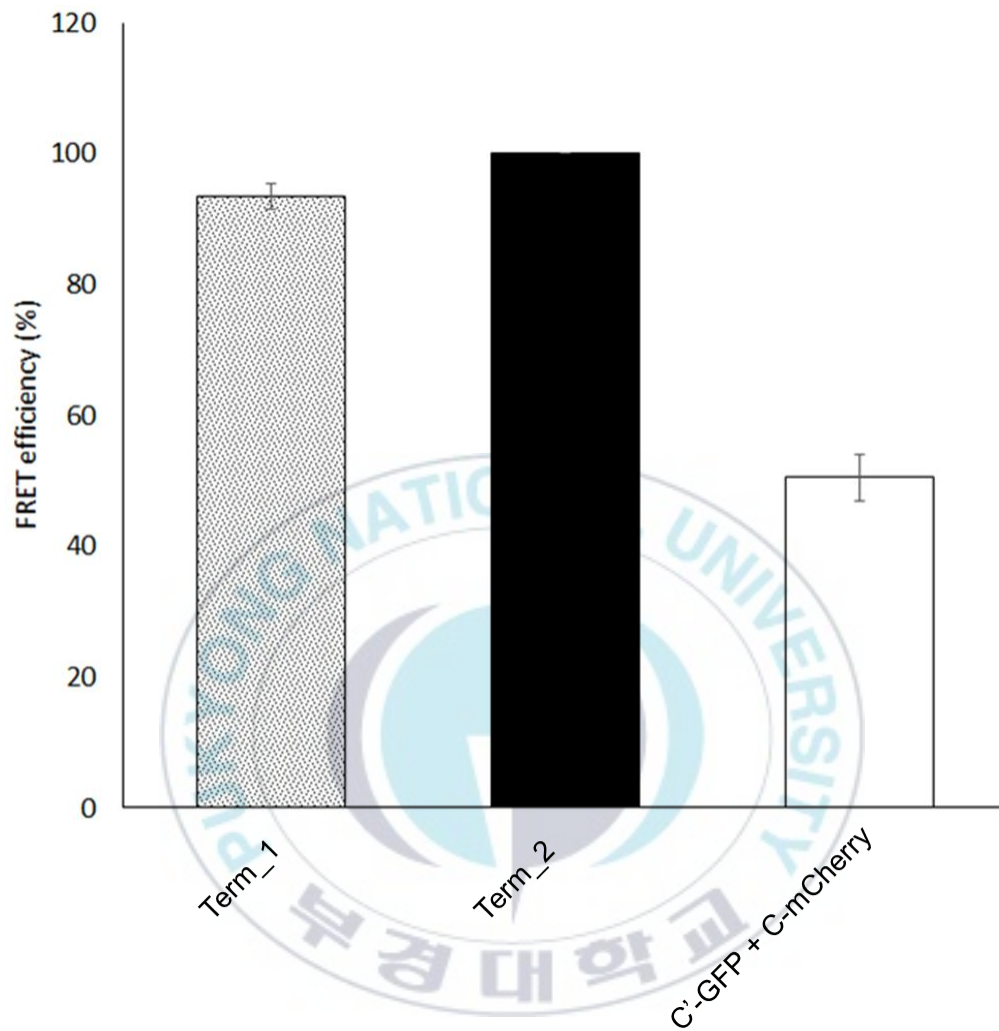


Figure 27. 시스테인 커플링 자가 결합 코일 및 코일-형광단백질의 형광 공명 에너지 전달 효율 측정 결과.

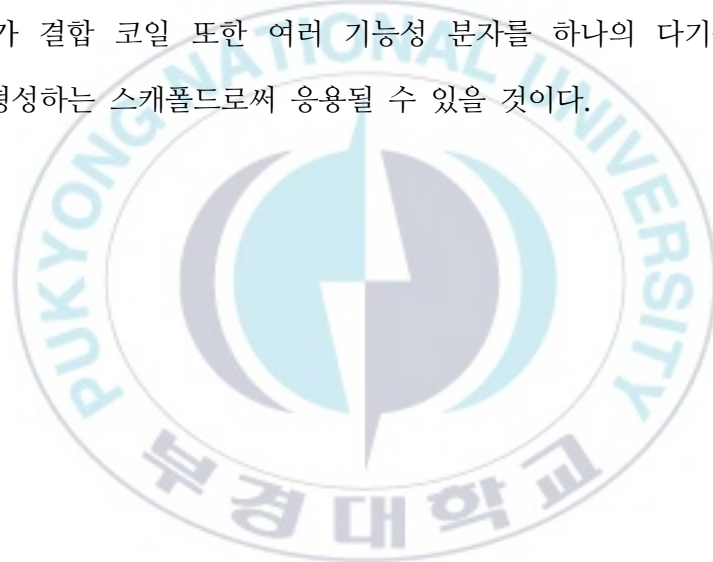
V. 결 론

본 연구에서는 높은 결합친화도로 자가 결합을 형성하지만 희석에 의해 빠른 해리를 하는 자가 결합 코일의 단점을 극복하는 전략으로 시스테인을 도입해 이황화 결합을 유도하였다. 시스테인의 도입으로 인해 수반되는 복잡한 후처리와 비특이적인 이황화 결합을 방지하기 위해 *E.coli* SHuffle® 균주내에서 공동발현하여 한번의 단백질 발현 & 정제 과정으로 비천연 키메라 단백질 복합체를 형성하는 시스템을 구축하였다.

코일의 말단에 서로 다른 형광단백질을 유전적으로 융합하여 발현 플라스미드를 구축하였다. 그 후 최적화된 단백질 발현 조건에서 단백질을 발현하여 친화성 크로마토그래피와 고속 단백질 액체 크로마토그래피를 이용하여 정제한 후 SDS-PAGE 로 확인하였다. 그 후 Native PAGE 를 통해 야생형 코일의 자가 결합 능력을 확인하고 ITC 로 수치적인 결합매개변수를 측정하여 기존에 보고된 결합친화도와 근사한 수치의 결과값을 도출하였다. 공동발현을 가능하게 하기 위해 호환 가능한 플라스미드로 상보적인 코일-형광단백질을 클로닝한 후 최적의 시스테인 도입 부위를 찾기 위해 4 쌍의 돌연변이 부위를 지정하여 부위 지정 돌연변이를 진행하였다. 공동발현 및 정제 후 SDS-PAGE 로 복합체의 형성 및 순도를 확인한 후 최종 수율을 비교하였다. Native PAGE 를 통해 환원 및 비환원조건에서의 복합체 형성 안정성을 확인한 후 최종적으로 2 쌍의 시스테인 커플링 자가 결합 코일 스캐폴드를 선정하였다. 선정된 자가 결합 코일이 이황화 결합을 통해 커플링 되어있는지 확인하기 위해 환원제인 DTT 의 유무에 따라 Non-boiling 조건에서 SDS-PAGE 를 진행하였다. 마지막으로 이황화 결합을 통해

자가 결합 코일의 결합안정성이 향상되었음을 확인하기 위해 크기 배제 크로마토그래피를 진행하고 형광 공명 에너지 전달 효율을 계산하여 야생형 코일과 비교하여 시스템인 커플링을 통해 희석에 의한 빠른 해리가 극복되었음을 확인하였다.

복잡하거나 극한의 환경에서 자가 결합 코일의 결합안정성을 향상시키는 다양한 전략의 개발은 여러 생명공학분야에서 자가 결합 코일이 스캐폴드로써 응용될 수 있도록 하는 잠재력을 부여한다. 본 연구에서 제안한 시스템인 커플링 자가 결합 코일 또한 여러 기능성 분자를 하나의 다기능성 단백질 복합체를 형성하는 스캐폴드로써 응용될 수 있을 것이다.



참고문헌

1. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*. 2019.
2. Walsh, G. , "Biopharmaceutical Benchmarks 2018," *Nat Biotechnol*, **36**(12), 1136–1145(2018).
3. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development . *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* . 2019.
4. Shaw, A. S., Filbert, E. L. , "Scaffold Proteins and Immune-Cell Signalling," *Nat Rev Immunol*, **9**(1), 47–56(2009).
5. Kim, Y., Jung, Y. , "Artificial Supramolecular Protein Assemblies as Functional High-Order Protein Scaffolds," *Org Biomol Chem*, **14**(24), 5352–5356(2016).
6. Buckley, D. L., Crews, C. M. , "Small-Molecule Control of Intracellular Protein Levels through Modulation of the Ubiquitin Proteasome System," *Angewandte Chemie International Edition*, **53**(9), 2312–2330(2014).
7. Sakamoto, K. M., Kim, K. B., Kumagai, A., Mercurio, F., Crews, C. M., Deshaies, R. J. , "Protacs: Chimeric Molecules That Target Proteins to the Skp1-Cullin-F Box Complex for Ubiquitination and Degradation.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(15), 8554–8559(2001).
8. Gu, S., Cui, D., Chen, X., Xiong, X., Zhao, Y. , "PROTACs: An Emerging Targeting Technique for Protein Degradation in Drug Discovery," *BioEssays*, **40**(4), 1700247(2018).

9. Utterström, J., Naeimipour, S., Selegård, R., Aili, D. , "Coiled Coil-Based Therapeutics and Drug Delivery Systems," *Adv Drug Deliv Rev*, **170**, 26–43(2021).
10. Thota, C. K., Mikolajczak, D. J., Roth, C., Kokscha, B. , "Enhancing Antimicrobial Peptide Potency through Multivalent Presentation on Coiled-Coil Nanofibrils," *ACS Med Chem Lett*, **12**(1), 67–73(2021).
11. Wu, K., Yang, J., Liu, J., Kopeček, J. , "Coiled-Coil Based Drug-Free Macromolecular Therapeutics: In Vivo Efficacy," *J Control Release*, **157**(1), 126–131(2012).
12. Wu, M. G., Mahon, A. B., Arora, P. S. , "An Effective Strategy for Stabilizing Minimal Coiled Coil Mimetics," *J Am Chem Soc*, **137**(36), 11618–11621(2015).
13. Lupas, A. N., Gruber, M. , "The Structure of α -Helical Coiled Coils," *Adv Protein Chem*, **70**, 37–38(2005).
14. Parry, D. A. D., Fraser, R. D. B., Squire, J. M. , "Fifty Years of Coiled-Coils and α -Helical Bundles: A Close Relationship between Sequence and Structure," *J Struct Biol*, **163**(3), 258–269(2008).
15. Moutevelis, E., Woolfson, D. N. , "A Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures," *J Mol Biol*, **385**(3), 726–732(2009).
16. Kopeček, J., Yang, J. , "Smart Self-Assembled Hybrid Hydrogel Biomaterials," *Angewandte Chemie International Edition*, **51**(30), 7396–7417(2012).
17. Mondal, S., Basavalingappa, V., Jacoby, G., Shimon, L. J. W., Beck, R., Gazit, E. , "Functional Coiled-Coil-like Assembly by Knob-into-Hole

- Packing of Single Heptad Repeat," *ACS Nano*, **13**(11), 12630–12637(2019).
18. Hill, L. K., Meleties, M., Katyal, P., Xie, X., Delgado-Fukushima, E., Jihad, T., Liu, C.-F., O'Neill, S., Tu, R. S., Renfrew, P. D. , "Thermoresponsive Protein-Engineered Coiled-Coil Hydrogel for Sustained Small Molecule Release," *Biomacromolecules*, **20**(9), 3340–3351(2019).
 19. Tunn, I., de Léon, A. S., Blank, K. G., Harrington, M. J. , "Tuning Coiled Coil Stability with Histidine-Metal Coordination," *Nanoscale*, **10**(48), 22725–22729(2018).
 20. Illingworth, R. S., Bird, A. P. , "CpG Islands—'a Rough Guide,'" *FEBS Lett*, **583**(11), 1713–1720(2009).
 21. Straussman, R., Nejman, D., Roberts, D., Steinfeld, I., Blum, B., Benvenisty, N., Simon, I., Yakhini, Z., Cedar, H. , "Developmental Programming of CpG Island Methylation Profiles in the Human Genome," *Nat Struct Mol Biol*, **16**(5), 564–571(2009).
 22. Gnanapragasam, M. N., Scarsdale, J. N., Amaya, M. L., Webb, H. D., Desai, M. A., Walavalkar, N. M., Wang, S. Z., Zu Zhu, S., Ginder, G. D., Williams, D. C. , "P66 α -MBD2 Coiled-Coil Interaction and Recruitment of Mi-2 Are Critical for Globin Gene Silencing by the MBD2–NuRD Complex," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(18), 7487(2011).
 23. Wiedemann, C., Kumar, A., Lang, A., Ohlenschläger, O. , "Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR," *Front Chem*, **8**(2020).

24. Wong, J. W. H., Ho, S. Y. W., Hogg, P. J. , "Disulfide Bond Acquisition through Eukaryotic Protein Evolution," *Mol Biol Evol*, **28**(1), 327–334(2011).
25. Carugo, O., Čemažar, M., Zahariev, S., Hudáky, I., Gáspári, Z., Perczel, A., Pongor, S. , "Vicinal Disulfide Turns," *Protein Eng*, **16**(9), 637–639(2003).
26. Dombkowski, A. A., Sultana, K. Z., Craig, D. B. , "Protein Disulfide Engineering," *FEBS Lett*, **588**(2), 206–212(2014).
27. Berkmen, M. , "Production of Disulfide-Bonded Proteins in Escherichia Coli," *Protein Expr Purif*, **82**(1), 240–251(2012).
28. Laminet, A. A., Plückthun, A. , "The Precursor of Beta-lactamase: Purification, Properties and Folding Kinetics.," *EMBO J*, **8**(5), 1469–1477(1989).
29. Elksne, L. E., Rasmussen, B. A. , "Dsb-Insensitive Expression of CcrA, a Metallo-Beta-Lactamase from *Bacteroides Fragilis*, in *Escherichia Coli* after Amino Acid Substitution at Two Cysteine Residues within CcrA," *J Bacteriol*, **178**(14), 4306–4309(1996).
30. Johnson, R. E., Adams, P., Rupley, J. A. , "Thermodynamics of Protein Cross-Links," *Biochemistry*, **17**(8), 1479–1484(1978).
31. Landeta, C., Blazyk, J. L., Hatahet, F., Meehan, B. M., Eser, M., Myrick, A., Bronstain, L., Minami, S., Arnold, H., Ke, N., Rubin, E. J., Furie, B. C., Furie, B., Beckwith, J., Dutton, R., Boyd, D. , "Compounds Targeting Disulfide Bond Forming Enzyme DsbB of Gram-Negative Bacteria," *Nat Chem Biol*, **11**(4), 292–298(2015).

32. Kosuri, P., Alegre-Cebollada, J., Feng, J., Kaplan, A., Inglés-Prieto, A., Badilla, C. L., Stockwell, B. R., Sanchez-Ruiz, J. M., Holmgren, A., Fernández, J. M. , "Protein Folding Drives Disulfide Formation," *Cell*, **151**(4), 794–806(2012).
33. Badenhorst, C. P. S., Bornscheuer, U. T. , "Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology," *Trends Biochem Sci*, **43**(3), 180–198(2018).
34. McCarty, N. S., Ledesma-Amaro, R. , "Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology," *Trends Biotechnol*, **37**(2), 181–197(2019).
35. Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangues, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., Villaverde, A. , "Recombinant Pharmaceuticals from Microbial Cells: A 2015 Update," *Microb Cell Fact*, **15**(1), 33(2016).
36. Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., de Diego Puente, T. , "Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in Escherichia Coli BL21," *Front Microbiol*, **12**(2021).
37. Huang, C.-J., Lin, H., Yang, X. , "Industrial Production of Recombinant Therapeutics in Escherichia Coli and Its Recent Advancements," *J Ind Microbiol Biotechnol*, **39**(3), 383–399(2012).
38. Blount, Z. D. , "The Natural History of Model Organisms: The Unexhausted Potential of E. Coli," *Elife*, **4**, e05826(2015).
39. Xu, W., Klumbys, E., Ang, E. L., Zhao, H. , "Emerging Molecular Biology Tools and Strategies for Engineering Natural Product Biosynthesis," *Metab Eng Commun*, **10**, e00108(2020).

40. Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., Berkmen, M. , "SHuffle, a Novel Escherichia Coli Protein Expression Strain Capable of Correctly Folding Disulfide Bonded Proteins in Its Cytoplasm," *Microb Cell Fact*, **11**(1), 753(2012).
41. Blount, Z. D. , "The Natural History of Model Organisms: The Unexhausted Potential of E. Coli," *Elife*, **4**, e05826(2015).
42. Lee, S. K., Keasling, J. D. , "A Propionate-Inducible Expression System for Enteric Bacteria," *Appl Environ Microbiol*, **71**(11), 6856–6862(2005).
43. Wu, J., Cheng, S., Cao, J., Qiao, J., Zhao, G.-R. , "Systematic Optimization of Limonene Production in Engineered Escherichia Coli," *J Agric Food Chem*, **67**(25), 7087–7097(2019).
44. Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges . *Frontiers in Microbiology* . 2014.
45. Novick, R. P. , "Plasmid Incompatibility," *Microbiol Rev*, **51**(4), 381–395(1987).
46. Iredell, J., Kamruzzaman, M., Partridge, S., Shoma, S., Thomas, C. , "Plasmid Interference for Curing Antibiotic Resistance Plasmids in Vivo," (2017).
47. Liu, X., Wang, D., Wang, H., Feng, E., Zhu, L., Wang, H. , "Curing of Plasmid PXO1 from Bacillus Anthracis Using Plasmid Incompatibility," *PLoS One*, **7**(1), e29875(2012).
48. 5.11 Membrane Recruitment of Signaling Domains; Egelman, E. H. B. T.-C. B., Ed.; Elsevier: Amsterdam, (2012); pp 223–244.

49. Xu, F., Wei, L., Chen, Z., Min, W. , "Frustrated FRET for High-Contrast High-Resolution Two-Photon Imaging," *Opt Express*, **21**(12), 14097–14108(2013).
50. Arpino, J. A. J., Hancock, E. J., Anderson, J., Barahona, M., Stan, G.-B. v, Papachristodoulou, A., Polizzi, K. , "Tuning the Dials of Synthetic Biology.," *Microbiology (Reading)*, **159**(Pt 7), 1236–1253(2013).

