



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.

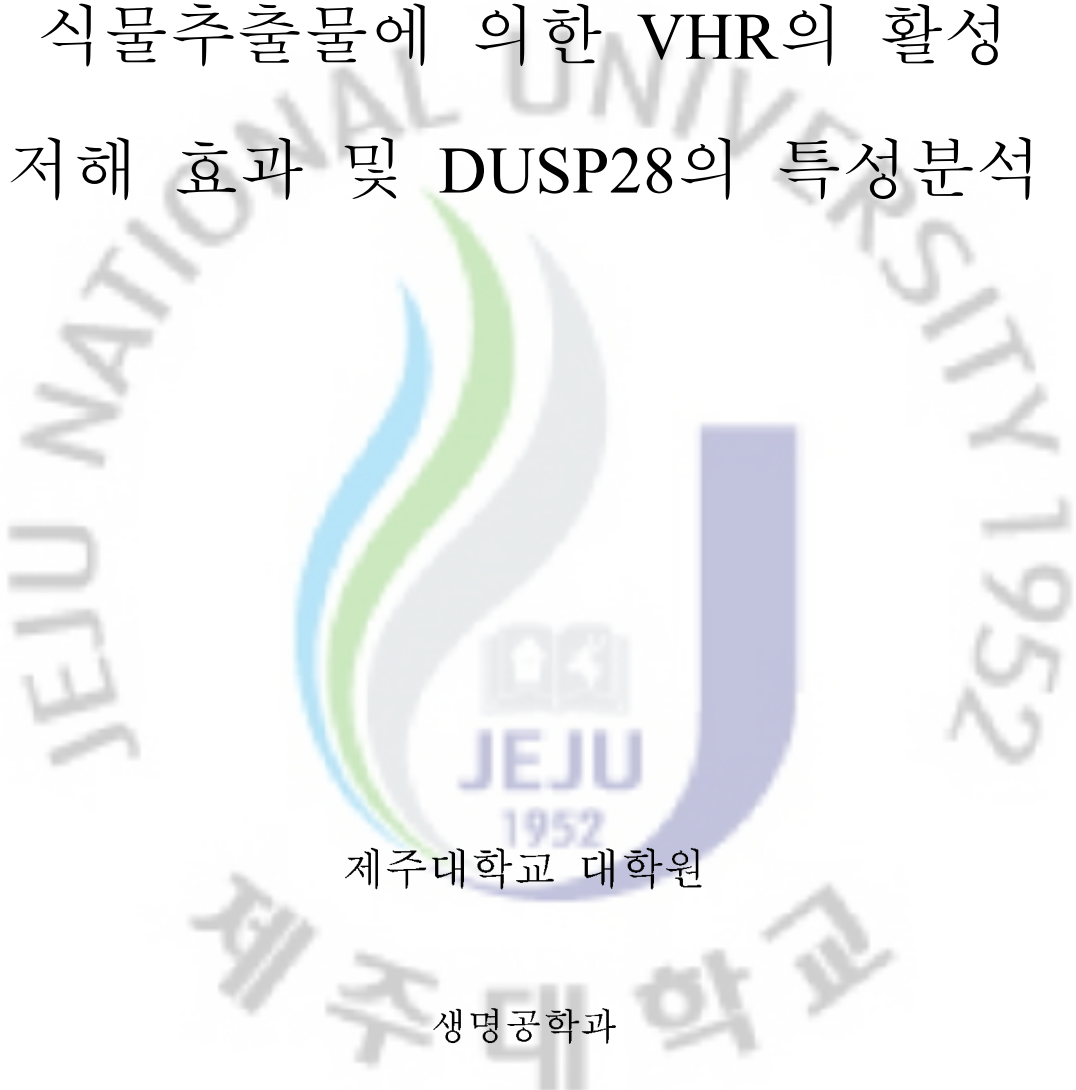
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

석사학위논문

식물추출물에 의한 VHR의 활성
저해 효과 및 DUSP28의 특성분석



제주대학교 대학원

생명공학과

윤 정 훈

2010년 12월

식물추출물에 의한 VHR의 활성 저해 효과 및 DUSP28의 특성분석

지도교수 김 재 훈

윤 정 훈

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 12월

윤정훈의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2010년 12월

Inhibitory Effect of Plant Extract on Vaccinia Virus phosphatase VH1-related (VHR) and characterization of Dual Specificity Protein Phosphatase 28

Jeong Hun Yun

(Supervised by Professor Jae Hoon Kim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
For the degree of Master of Biotechnology

December, 2010

This thesis has been examined and approved.

Chairperson of the supervising committee

Professor So Mi K. Cho, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Professor Dong Sun Lee Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Professor Jae Hoon Kim, Ph.D., College of Applied Life Sciences, Jeju National University

Department of Biotechnology
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

CONTENTS

CONTENTS	i
LIST OF FIGURES	iii
LIST OF TABLES	IV
Abstract	1
PART I. Inhibitory Effect of Plant Extract on Vaccinia Virus phosphatase VH1-related (VHR)	
1. Introduction	3
2. Materials and Methods	5
2-1. Plant extract	5
2.2. Vector construction and purification of VHR	5
2.3. Phosphatase activity assay	5
2.4. Western blotting	6
3. Result	7
3.1. Expression and purification of VHR	7
3.2. Phosphatase activity assay	9
3.3. Effects of plant extracts on ERK	11
5. CONCLUSION	13

PART II. Characterization of Dual Specificity Protein Phosphatase 28

1. Introduction	14
2. Materials and Methods	16
2.1. Cloning, Expression and Purification of DUSP28	16
2.2. Phosphatase assay	16
2.3. Substrate specificity phosphatase assay	17
2.4. <i>In vitro</i> dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28 ..	17
3. Results	19
3.1. Expression and purification of DUSP28	19
3.2. Enzymatic properties of DUSP28 and effect of pH on the activity	22
3.3. Effects of phosphatase inhibitors and divalent ion on DUSP28 activity	24
3.4. Substrate specificity of DUSP28	26
3.5. <i>In vitro</i> dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28 ..	28
4. CONCLUSION	31
REFERENCES	32
ACKNOWLEDGEMENTS	37

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Expression and purification of VHR.	8
Fig. 2. Effects of plant extracts on ERK.	12
Fig. 3. Expression and purification of DUSP28.	20
Fig. 4. Expression and purification of DUSP28.	21
Fig. 5. Enzymatic properties of DUSP28.	23
Fig. 6. Effect of pH on the activity of DUSP28.	23
Fig. 7. Effects of phosphatase inhibitors on DUSP28 activity.	25
Fig. 8. Effects of divalent ion on DUSP28 activity.	25
Fig. 9. Substrate specificity of DUSP28.	27
Fig. 10. <i>In vitro</i> dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28.	29
Fig. 11. <i>In vitro</i> dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28.	30

LIST OF TABLES

Table 1. Phosphatase activity assay. 10



Abstract

Dual-specificity protein phosphatases (DUSPs) constitutes a family of protein phosphatase characterized by the ability to dephosphorylate phospho-tyrosyl and phospho-seryl/threonyl residues. Most of DUSPs are involved in regulation of cell survival and differentiation. The full-length Vaccinia H1-related phosphatase (VHR) gene was amplified by PCR using the human cDNA. The amplified PCR product was subcloned into the *Nde*I - *Bam*HI site of the pET28a(+) vector. BL21(DE3) *E. coli* cells harboring the VHR gene were grown at 18°C, and the protein expression was induced with 0.1mM IPTG for 16 hour. The His-tagged VHR protein was purified by nickel-affinity chromatography. The inhibitory effects of the 82 plant extracts on the VHR activity were measured using the *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) as a substrate. *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch, *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*, *Halorrhagis micrantha* R. Br, *Oenothera biennis* L., and stems of *Platycarya strobilacea* Siebold et Zuccarini has strong inhibitory effects on the VHR activity.

The serum-starved 293T cells were incubated with the plant extracts (0.02mg/ml) such as *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch, *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*, *Halorrhagis micrantha* R. Br., *Oenothera biennis* L, and *Oenothera biennis* L for 1 hour and treated with the epidermal growth factor (EGF).The cell lysates were prepared, and the levels of phosphorylated ERKs were determined by Western blotting using antibodies against phospho-p42/p44 ERK and p42/p44 ERK. *Halorrhagis micrantha* R. Br showed little increase in the phosphorylation

of ERK in 293T cells, whereas *Empetrum nigrum* L. var. *japonicum* K. Koch, *Geranium nepalense* subsp. *thunbergii*, *Platycarya strobilacea* Siebold et Zuccarini, and *Oenothera biennis* L enhanced the phosphorylation of ERKs at 5 minute. Among the extracts tested, *Platycarya strobilacea* Siebold et Zuccarini showed the strongest accumulation of the phosphorylated ERKs at 5 minute, and a strong band of the phospho-p42/p44 ERK was detected after 1 hour, compared to those of the control and the other extracts. Although the extract of *Platycarya strobilacea* Siebold et Zuccarini has been used for various medicinal purposes, the inhibitory effect on phosphatase has not yet been reported. Our results demonstrate that No.56 is a potent candidate for the development of a VHR inhibitor.

Next, a human dual-specificity protein phosphatase, DUSP28, was isolated from a human kidney cDNA. The recombinant protein was successfully produced in *E. coli* and showed a sufficient phosphatase activity toward DiFMUP (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate). Various phosphatase inhibitors and divalent metals were tested for their effects on the DUSP28 phosphatase activity. As results, Zn^{2+} was found to strongly inhibit DUSP28 phosphatase activity, suggesting DUSP28 is involved Zn-related signal transduction pathway. Furthermore, the DUSP28 protein preferred phospho-tyrosyl residues to phosphor-threonyl residues, implying its physiological roles in cellular process.

제1장. 식물추출물에 의한 VHR의 활성화 저해 효과

1. Introduction

Dual specificity protein phosphatase (DUSP)는 Protein Tyrosine Phosphatase Superfamily에 속한 탈 인산화 효소로서, tyrosine 잔기에 붙은 인산기는 물론 serine/threonine 잔기에 붙어있는 인산기도 탈 인산화하는 특징을 가지고 있어 dual specificity라는 이름을 가지게 되었다[Alonso *et al.*, 2004]. DUSP들이 작용하는 기질로 mitogen-activated protein kinase(MAPK)가 존재하는데 이 MAPK들은 스트레스나 호르몬 등의 자극을 받아 전사인자들을 활성화시켜 유전자의 발현을 유도하는 역할을 한다[Denu *et al.*, 1995; Alonso *et al.*, 2001]. 일반적인 MAPK는 ERK (Extracellular signal-regulated kinases), JNK (c-Jun N-terminal kinases), p38이 존재한다. 일반적으로 ERK cascade의 활성화는 세포 증식, 분화, 또는 세포가 스트레스를 받았을 시 생존력을 높여주는데 관여를 하고, JNK, p38 cascade의 활성화는 주로 세포사멸에 관여를 한다고 알려져 있다. 이는 DUSP들과 MAPK들의 상호작용에 의하여 세포신호전달체계가 조절되어 다양한 세포 내 현상이 일어난다고 보고 되었다 [Marshall *et al.*, 1995]. Vaccinia H1-related phosphatase (VHR)는 DUSP의 한 종류로서 일반적인 DUSP들과는 다르게 오직 catalytic domain (DUSP domain)을 가진 작은 크기의 단백질이다 [Denu *et al.*, 1995; Alonso *et al.*, 2001]. 기능적으로 보았을 때 VHR은 ERK1/2, JNK의 인산기를 떼어내어 불활성화 시키는 능력을 가지고 있다. ERK1/2의 경우에는 EGF에 의한 인산화가 5분 안에 진행 되지만 VHR에 의해 20분 정도가 지나면 탈 인산화된 상태로 변하여 활성을 잃는다는 연구 결과가 있다 [Todd *et al.*, 1999]. 그리고 전립선암 세포에서 VHR의 과 발현이 발견 되었으며, 과 발현된 VHR이 JNK의 활성을 저해하여 세포사멸을 차단시킨다는 보고가 있다 [Arnoldussen *et al.*, 2008]. 이러한 보고가 있듯 VHR의 활성화에 의한 잘못된 MAPK들의 활성화는 다양한 질병의 원인이 될 수 있고, 세포 신호전달체계의 불균형을 일으킬 가능성이 있다. 따라서 본 연구는 VHR의 활성을 선택적으로 저해하는 천연 물질

을 찾아내어 여러 질병을 치료하는데 기초자료로 활용하기 위해 수행 하였다.



2. Materials and Methods

2-1. Plant extract

추출물을 만들기 위한 식물체는 모두 제주도 내에서 채집하였다. 채집한 식물체는 55℃에서 하루 동안 건조시킨 후 잘 갈아주었다. 분말상태의 식물체를 80% 메탄올에 넣어 추출한 후 감압 농축하고 동결건조를 수행하였다. 동결건조된 추출물은 농업기술원에서 연구를 위해 분양받아 사용하였다.

2-2. Vector construction and

VHR 유전자는 PCR 기법을 이용, human cDNA에서 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 pET28a(+) vector안에 존재하는 *NdeI*-*Bam*HI 위치에 cloning 하였다. 이 결과로 VHR 단백질의 N-말단에 His-Tag이 존재하게 된다. pET 28a-VHR을 BL21 (DE3)*E. coli*에 형질 전환하였고 0.1mM IPTG를 첨가하여 18℃에서 16시간동안 단백질 발현을 유도하였다. 단백질발현을 유도한 대장균은 원심 분리하여 수확하였고, 50mM Tris (pH7.5), 200mM NaCl, 0.5mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.04% 2-mercaptoethanol (v/v)이 들어있는 완충용액에 재 현탁 한 후 초음파 분쇄를 수행하였다. 초음파 분쇄한 시료를 원심 분리하여 상층액만을 이용, 단백질 정제를 수행하였다. 단백질 정제는 His-tag와 친화력이 높은 nickel-affinity chromatography를 이용하였다. 정제 과정이 끝난 후 thrombin을 처리하여 His-tag와 VHR 단백질을 분리하였고 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 VHR 단백질만을 정제하였다.

2-3. Phosphatase activity assay

탈 인산화효소의 활성을 측정하기위해 주로 사용되는 *p*-nitrophenyl phosphate를 기질로 사용하여 수행하였다[Denu *et al.*, 1995]. 100ul안에 40mM Tris-Cl (pH6.0), 150m NaCl, 2mM EDTA, 0.1mM *p*-nitrophenyl phosphate가 들어가게 만들었고, 효소를 첨가하여 30℃에서 10분간 반응을 시켰다. 2N NaOH 100ul를 첨가하여 반응을 종료 시킨 후 405nm에서 흡광도를

측정하였다. 효소를 넣은 것과 넣지 않은 것의 흡광도 차이를 가지고 추출물의 탈 인산화 억제효과를 측정하였다.

2-4. Western blotting

293T 세포를 혈청이 없는 상태로 만들어 준 후 18시간이 지나면 식물추출물 0.02mg/ml을 1시간동안 처리해 주고, EGF (epidermal growth factor, 5분, 60분)을 처리하여 ERK의 인산화를 유도하였다.

Lysis buffer을 이용하여 lysate를 만들고 원심분리 후 상층액만을 이용하여 western blotting을 수행하였다. Western blotting은 p42/p44 ERK, phospho-p42/p44 ERK antibody를 사용하여 ERK의 인산화정도를 확인하였다

3. Results and Discussion

3-1. Expression and purification of VHR

VHR 유전자는 PCR 기법을 이용, human cDNA에서 증폭시킨 후 pET-28a(+) vector에 클로닝 하였다. BL21 (DE3)*E. coli*에 형질 전환하였고 0.1mM IPTG를 첨가하여 18℃에서 16시간동안 단백질 발현을 유도하였다. 이 후 초음파 분쇄를 실시하여 상층액만을 이용 단백질 정제를 수행하였다. 단백질 정제를 His-tag과 친화력이 높은 Nickel을 이용한 Nickel-affinity chromatography를 사용하여 수행하였다. 그 후 thrombin을 처리 하여 His-tag과 VHR 단백질을 분리 하였다. 분리 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 확인하였다 (그림1).



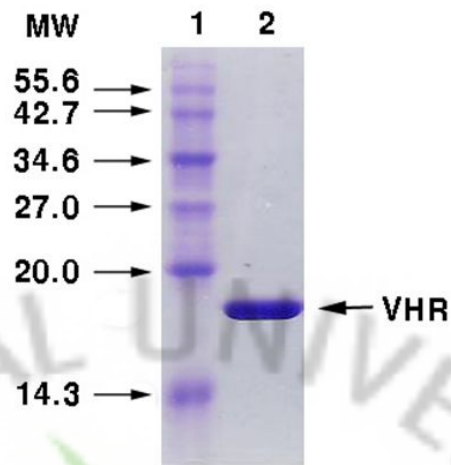


Fig. 1 Expression and purification of VHR. VHR was expressed in BL21 (DE3) *E. coli* and purified by chromatography. The purified protein (2 μ g) was analyzed by SDS-PAGE. Positions of the molecular mass markers (kDa) are shown on the left.

3-2. Phosphatase activity assay

VHR의 활성이 식물추출물에 의한 저해효과 여부를 확인하기 위하여 assay를 수행하였다. 탈 인산화효소의 탈 인산화능력을 보기위해 일반적으로 많이 사용되는 기질인 *p*-NPP (*p*-nitrophenyl phosphate)사용하여 실험을 하였다. 이 기질은 탈 인산화 되었을 시 노란색을 띄는 *p*-Nitrophenol을 생성하게 되고, 이때 405nm에서 흡광도를 측정하면 탈 인산화 된 정도를 쉽게 파악할 수 있는 방법이다. 이번 실험에서는 70%메탄올과 효소가 들어간 시료, 70%메탄올과 VHR 효소가 들어가지 않은 시료의 흡광도 차를 기준으로 하고, 각각의 추출물에 대하여 효소를 넣은 것과 넣지 않은 것의 흡광도 차를 비교하여 각 추출물의 활성 저해 정도를 %로 정리하였다.

총 82개의 추출물을 가지고 수행했던 분석 결과 중 VHR활성 저해효과가 있는 20가지 추출물에 대한 결과를 정리하였다 (Table 1). 문주란 잎, 사상자 뿌리 같은 경우에는 VHR의 탈 인산화 능력에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 그 외의 추출물에서는 VHR의 활성에 영향을 미치는 것을 확인 하였다. 그중에서도 시로미 지상부, 이질풀 지상부, 개미탑 지상부, 굴피나무 줄기, 달맞이꽃 지상부 추출물에서는 거의 90%가 넘는 저해효과를 볼 수 있었다 (Table 1). 이러한 결과는 이 5가지 식물 추출물이 VHR 활성의 저해제가 될 수 있다는 가능성을 제시해 주었다.

No	Sample name		Part used	Inhibition(%)
1	<i>Zanthoxylum planispinum</i> S. et Z.	개산초	Leaves	54±5.1
3	<i>Crius asiaticus</i> var. <i>japonicus</i> Baker	문주란	Leaves	1±4.6
4	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i> (Kom.) Ohwi	겨우살이	Aerial Part	70±9.2
16	<i>Viburnum awabuki</i> K. KOCH	아왜나무	Stem	41±3.4
20	<i>Lecocarpus sibiricus</i> L.	익모초	Root	34±7.2
24	<i>Portulaca oleracea</i> L.	쇠비름	Aerial Part	43±5.5
25	<i>Vicia Manchuensis</i> W.Becker	제비꽃	Aerial Part	27±2.9
28	<i>Erigeron aegyptius</i> L. var. <i>japonicus</i> K. Koch	시로미	Aerial Part	92±7.5
30	<i>Geranium nepalense</i> subsp. <i>thunbergii</i>	이질풀	Aerial Part	89±9.1
31	<i>Torilis japonicus</i> (Houttuyn) DC	사상자	Root	1±7.7
33	<i>Ligularia fischeri</i> (Ledeb.) Turcz	금취	Aerial Part	61±9.8
40	<i>Haloragis micrantha</i> R. Br.	개미타	Aerial Part	94±3.6
51	<i>Caesalpinia japonica</i> Siebold, et Zuccarini	살거리나무	Stem	48±7.5
52	<i>Calystegia seldanaella</i> Roem. et Schult	갯메꽃	Aerial Part	37±3.2
56	<i>Platycarya sibirica</i> Siebold et Zuccarini	골피나무	Stem	95±4.1
58	<i>Acerus esianus</i> Linne var. <i>angustatus</i>	석창포	Root	35±8.7
63	<i>Oenothera biennis</i> L.	달맞이꽃	Aerial Part	95±3.8
72	<i>Zingiber Miqg</i> (Thunb.) Roscoe	양하	Root	76±8.7
74	<i>Angelica japonica</i> A. Gray	갯강활	Aerial Part	46±8.6
81	<i>Glechais littoralis</i> Fr. Schm	갯방풍	Root	38±4.5

Table 1. Phosphatase activity assay

3-3. Effects of plant extracts on ERK

VHR 활성화에 큰 저해 효과를 보인 5가지 식물추출물이 세포 내에서도 탈 인산화효소의 활성 저해 여부를 조사하기 위해, VHR의 기질로 알려져 있는 ERK와 추출물간의 관계를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 배양중인 293T 세포를 혈청이 없는 배지로 갈아주어 혈청이나 다양한 인자들에 의한 단백질의 인산화 과정을 차단해 주었다. 18시간이 지난 후 식물추출물 0.02mg/ml을 1시간동안 처리하여 세포에 추출물이 잘 혼합되게 한 후, EGF (epidermal growth factor)를 시간별로 (5분, 60분)처리하여 ERK의 인산화를 유도하였다. EGF처리를 끝낸 시료는 Lysis buffer을 이용하여 lysate를 만들고 원심분리 후 상층액을 이용하여 western blotting을 수행하였다. Western blotting은 p42/p44 ERK, phospho-p42/p44 ERK antibody를 사용하여 ERK의 발현정도와 인산화정도를 확인하였다.

Western blotting 결과로 모든 lane에서 ERK의 발현을 확인 할 수 있었으며, 70% 메탄올을 처리한 2, 3, 4번 lane을 보았을 때 ERK의 인산화가 5분에 일어났다가 60분이 지난 후에는 탈 인산화 과정으로 접어드는 것을 확인 할 수 있었다. 각 각의 추출물을 처리해준 군들을 대조군과 비교해 보았을 시 40 (개미땀)의 경우에는 탈 인산화 저해 효과가 거의 없는 것을 확인 할 수 있었고, 다른 4가지 28 (시로미), 30 (이질풀), 56 (굴피나무), 63 (달맞이꽃) 같은 경우에는 EGF를 처리한 후 5분이 지난 뒤 인산화 된 ERK의 양이 증가하는 것을 확인할 수가 있었다. 특히 56 (굴피나무) 추출물의 경우에는 60분이 지난 후에도 많은 양의 인산화 된 ERK가 존재 하는 것을 확인 할 수가 있었다. 이는 굴피나무 추출물이 ERK를 탈 인산화 하는 효소의 활성을 억제했다는 의미로 해석이 될 수 있다(Fig. 2).

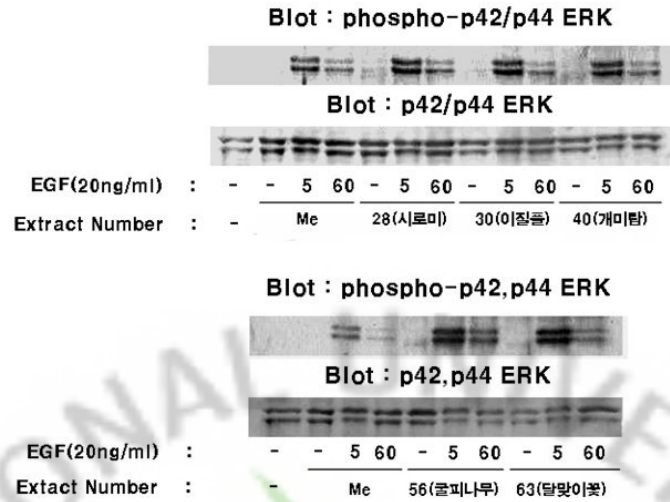


Fig. 2 Effects of plant extracts on ERK. Serum-starved 293T cells were incubated with 0.02mg/ml plant extracts for 1h at 37°C and stimulated with EGF for the indicated times (min). Me: Methanol. Cell lysates were analyzed with antibodies against the phospho-p42/p44 ERK and p42/p44 ERK.

4. CONCLUSION

제주도에서 자생하는 식물체를 이용하여 만든 식물추출물을 이용하여 VHR의 활성 억제효과를 보기위해, *p*-NPP를 기질로 사용하여 phosphatase activity assay를 수행한 결과에서는 여러 식물 추출물이 VHR의 활성을 70%이상 저해하는 것을 확인을 할 수가 있었고 VHR의 주요 target으로 알려져 있는 ERK와 식물추출물 간의 상호작용을 확인하기 위해 western blotting을 수행한 결과, 28 (시로미), 30 (이질풀), 56 (굴피나무), 63 (달맞이꽃) 추출물이 EGF를 처리한 후 5분이 지났을 시 ERK의 인산화정도가 증가되는 것을 확인하였다. 특히 56 (굴피나무) 추출물의 경우 60분이 지난 후에도 인산화 된 ERK의 양이 많은 것을 확인, 이 추출물이 VHR 활성의 저해제가 될 수 있는 가능성을 제시하였다. 이 식물체는 이미 한방에서 근육통, 복통, 치통, 습진, 종창 등의 치료에 사용되는 약용 식물로 다양한 질병을 치료하기 위한 기능성 물질이 포함 되어 있을 가능성이 충분히 존재한다 [Choi *et al.*, 2003]. 아직 추출물이 어떠한 기작으로 VHR의 탈 인산화 효과를 억제하는지에 대한 내용은 밝혀지지 않았지만, 더 많은 연구를 수행하여 56 (굴피나무) 추출물에서 VHR의 활성을 억제하는 물질을 찾아낸다면 그 물질을 이용하여 다양한 질병을 치료하는데 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

PART II. DUSP28의 특성 분석

1. Introduction

Dual specificity protein phosphatase (DSPs)들은 tyrosine과 threonine 잔기에 붙어있는 인산기를 둘 다 떼어낼 수 있는 탈 인산화효소의 능력을 가지고 있다 [Alonso *et al.*, 2004]. 이러한 능력으로 단백질들의 인산화정도를 조절하여 세포 내에서 일어나는 다양한 신호 전달체계에 의한 세포의 생존, 성장, 분화 등의 과정들을 조절할 수 있는 아주 중요한 역할을 하는 효소이다 [Treisman *et al.*, 1996]. 현재까지 24개의 human DUSP들이 미국 국립보건원 유전자은행인 Genbank에 등록이 되어있는데, 등록되어있는 DUSP들은 크게 두 가지 그룹으로 나눌 수 있다. 첫 번째 그룹은 전형적인 DUSP 그룹으로서 이들은 catalytic domain (DUSP domain)과 기질인 MAPK와 결합을 할 수 있게 해주는 MAPK binding domain을 가진 구조로 되어있다 [Farooq *et al.*, 2004]. 두 번째 그룹은 전형적인 DUSP들과는 다르게 오직 catalytic domain 만을 가지고 있는 구조로 되어있어 단백질의 분자량이 작은 것이 특징이다. 이러한 이례적인 DUSP의 원형이라고 할 수 있는 것이 바로 VHR (DUSP3)이며 이 단백질은 MAP kinase signaling pathway를 조절하는 것에 관련이 있다고 알려져 있다 [Todd *et al.*, 1999]. 모든 human DUSP들은 고유한 HCxxGxxR motif를 가지고 있는데, DUSP28은 고유한 motif에 존재하는 histidine이 tyrosine으로 바뀌어있는 형태를 띠고 있다. VHR (DUSP3)의 경우에는 고유한 motif에 존재하는 histidine이 활성부위에 존재하는 cysteine 잔기와 수소결합을 형성하여 서로 상호작용을 한다고 알려져 있다 [Yuvaniyama *et al.*, 1996]. 그리고 histidine이 다른 아미노산으로 치환되었을 시 K_{cat} 값이 10배나 감소하는 것을 볼 수 있다. 이렇듯 histidine과 활성부위에 존재하는 cysteine 간의 수소결합은 활성 부위 안에서 cysteine이 제대로 된 위치를 잡기위해 아주 중요한 역할을 한다고 할 수 있다 [Kim *et al.*, 2001]. 최근에 이루어진 gene expression profile 연구에서 DUSP28의 발현이 면역 세포내에서 감소되는 것으로 나타났고, 전사인자인 CHF1와 Hey2에 의하여 활성화 되는 것을 보여주었다 [Arimura *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010]. 이러한 연구결과들이 있지만 아직 DUSP28의 효소활성과 기

질에 관하여 기능학적인 분석을 한 보고된 사례는 없어서 본 연구에서는 DUSP28의 특징을 분석하는 실험을 수행하였다.



2. Materials and Methods

2-1. Cloning, Expression and Purification of DUSP28

DUSP28 유전자는 human kidney cDNA에서 PCR기법을 사용하여 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 pET28a(+) 벡터안에 존재하는 *NdeI*-*BamHI* 위치에 cloning 하였다. 이 결과로 DUSP28 단백질의 N-말단에 His-Tag이 존재하게 된다. DUSP28 c103s (dead mutation)은 PCR 기법을 이용한 site direct mutation을 수행하여 만들었다. pET 28a-DUSP28, DUSP28 c103s 이 두 vector를 BL21 (DE3) *E. coli*에 형질 전환하였고 0.1mM IPTG를 첨가하여 18°C에서 16시간동안 단백질 발현을 유도하였다. 단백질발현을 유도한 대장균은 원심 분리하여 수확하였고, 50mM Tris (pH7.5), 200mM NaCl, 0.5mM PMSF, 0.04% 2-mercaptoethanol (v/v)이 들어있는 완충용액에 재 현탁 한 후 초음파 분쇄를 수행하였으며 초음파 분쇄한 시료는 원심 분리하여 상층액만을 이용하여 단백질 정제를 수행하였다. 단백질 정제는 His-tag와 친화력이 높은 Nickel-affinity chromatography를 이용하였다.

2-2. Phosphatase assay

DUSP28 단백질의 탈 인산화 효소로서의 활성을 측정하기 위하여 기질로 DiFMUP (6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate, Molecular probe D6567)를 사용하였다. 정제한 DUSP28 단백질은 농도별로 5 μ M의 DiFMUP와 25°C에서 30분간 반응 시켰다. 그 후에 sodium vanadate (final concentration 2 mM)를 첨가하여 반응을 중지 시킨 후, 형광을 측정하여 탈 인산화 정도를 파악하였다. 흡광도는 Wallac Victor2 1420 multi label counter (PerkinElmer Wellesley, MA)를 이용하여 측정하였다.

최적의 pH를 확인하기 위해 다양한 조성의 pH의 완충용액을 가지고 수행하였다 (20mM sodium citrate pH4.5, sodium citrate pH5.0, Bis-Tris pH5.5, MES pH6.0, MES pH6.5, Hepes-NaOH pH7.0, Hepes-NaOH pH7.5, Tris-HCl pH8.0, Tris-HCl pH8.5, BICIN pH9.0).

탈 인산화효소 저해제와 DUSP28 단백질의 관계를 보기 위해서 5.4 μ M

DUSP28를 DiFMUP와 반응시킨 것과 1mM sodium orthovanadate, PMD (pentamidine), NaF도 함께 반응 시킨 것의 흡광도 차이를 이용하였다.

금속이온과 DUSP28 활성간의 관계를 보기위하여 1mM 각각의 금속이온을 첨가하여 반응 시켰다.

이 실험들은 공동연구를 진행한 한국생명공학연구소에서 수행하였다.

2-3. Substrate specificity phosphatase assay

탈 인산화효소의 기질특이성 분석을 하기 위해 들어가기에 앞서 ser/thr phosphopeptide는 1.33ml, Tyr Phosphopeptide-1는 895ul, Tyr Phosphopeptide-2는 753ul의 phosphate free water에 녹여서 1mM phosphopeptide를 제조하였다. Phosphopeptide 5ul (final concentration 100uM)와 100mM HEPES (pH 6.0) 10ul (final con 20mM)를 넣어 잘 섞은 다음 37°C에서 3분간 반응한다. Phosphatase를 농도 별로 넣고 phosphate free water를 첨가하여 총량을 50ul 로 맞추어주었다. 37°C에서 45분간 놓아 두어 효소가 기질을 탈 인산화 하는 시간을 충분히 주었고, Molybdate Dye/Additive 혼합물을 50ul 넣은 후 상온에서 15분간 방치하여 효소의 반응을 중지시킨다. 이때 반응시킨 효소의 양이 5μg이 넘을 시에는 30분 동안 방치해야 모든 효소의 반응을 중지시킬 수 있다. 각각의 혼합물을 595nm에서 흡광도를 측정하여 효소와 기질을 넣은 곳에 흡광도와 효소만 넣은 곳의 흡광도의 차를 이용하여 탈 인산화 정도를 측정하였다.

2-4. In vitro dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28

동물세포에서 DUSP28 유전자를 발현시키기 위해 DUSP28유전자를 PCR 기법을 사용하여 pET-28a-DUSP28에서 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 pcDNA의 *NheI-XhoI*사이에 집어넣어 pcDNA-DUSP28을 만들었으며, DUSP28 c103s도 같은 방법으로 pcDNA-DUSP28 c103s를 제작하였다.

293T 세포에 pcDNA-HA-JNK, pcDNA-HA-p38, pcDNA-Flag-DUSP28, pcDNA-Flag-DUSP28 c103s를 6μg 씩 구성에 맞게 형질전환을 시켰다.

형질전환 후 18시간이 지나면 DMEM-BSA 배지로 갈아 주어 혈청이 없는 상

태로 만들었다. 앞의 상태에서 18시간이 지난 후 EGF나 anisomycin을 처리하여 ERK, JNK, p38의 인산화를 유도 하였다. 그 후 ice-cold PBS (phosphate buffered saline, GIBCO)로 세포들을 한번 씻어 준 후 lysis buffer을 첨가하여 lysate을 만들고 원심분리한 후 상층액만을 이용하여 western blotting을 수행하였다. Western blotting은 HA, Flag-antibody를 사용하여 형질전환한 단백질들의 발현여부를 확인하고, phospho-ERK, JNK, p38 antibody를 사용하여 인산화 정도를 파악하였다. Western blotting을 통해 일차적으로 단백질 발현과 인산화가 확인된 시료는 HA-probe (agarose conjugated)를 사용한 면역침강 (Immunoprecipitation)을 수행하고, 면역침강 후 ERK, JNK, p38 antibody, phospho-ERK, JNK, p38 antibody를 사용하여 western blotting으로, 인산화 정도의 변화를 확인하였다.

3. Results and Discussion

3-1. Expression and purification of DUSP28

DUSP28의 유전자는 176개의 아미노산으로 구성되어있고, catalytic-domain이 (DUSP domain) 18번 아미노산부터 153아미노산 사이에 존재한다. Full-length DUSP28 유전자와 DUSP c103s 유전자를 대장균에서 단백질 발현을 유도 하였고 Nickel-affinity chromatography를 이용하여 정제 하였다(Fig. 1, 2).



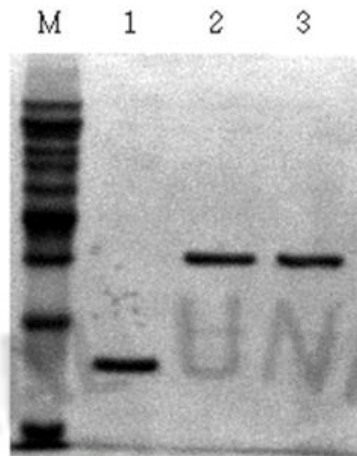


Fig. 1 Expression and purification of DUSP28. DUSP28 was expressed in BL21 (DE3) *E. coli* and purified by chromatography. The purified protein was analyzed by SDS-PAGE. M : molecular mass marker, 1 : pGEX 2 : pGEX-DUSP28, 3 : pGEX-DUSP28 c103s

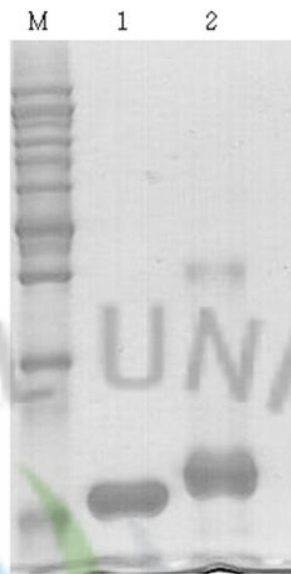


Fig. 2 Expression and purification of DUSP28. DUSP28 was expressed in BL21 (DE3) *E. coli* and purified by chromatography. The purified protein was analyzed by SDS-PAGE. M : molecular mass marker, 1 : DUSP28, 2 : DUSP28 c103s

3-2. Enzymatic properties of DUSP28 and effect of pH on the activity

DUSP28과 DUSP28 c103s의 탈 인산화 효소적인 활성을 보기 위해 DiFMDP를 기질로 사용하여 실험을 수행하였다. DUSP28의 탈 인산화 효과는 단백질양이 증가함에 따라 같이 증가하는 모습을 보여주었지만 (Fig. 3), DUSP c103s의 경우에는 단백질의 양이 증가해도 효소의 활성은 거의 보이지 않았다. 이는 DUSP28의 아미노산서열 중 103번째 cysteine이 효소활성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다. 그리고 DUSP28의 활성에 최적의 pH를 확인하기 위하여 다양한 조성의 pH 완충용액을 가지고 실험을 수행 하였으며, DUSP28는 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 보여주는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 4).



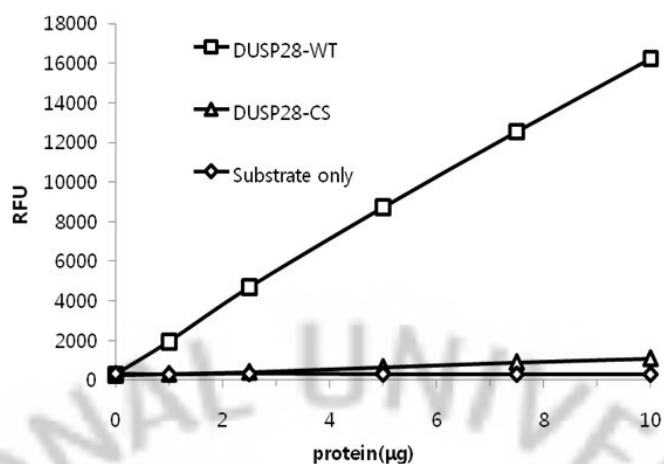


Fig. 3. Enzymatic properties of DUSP28. Purified recombinant DUSP28-WT and DUSP28-CS (C98S) were assayed for phosphatase activity using 5 μ M DiFMUP as substrate. Relative fluorescence of the reaction product, DiFMUP, was measured.

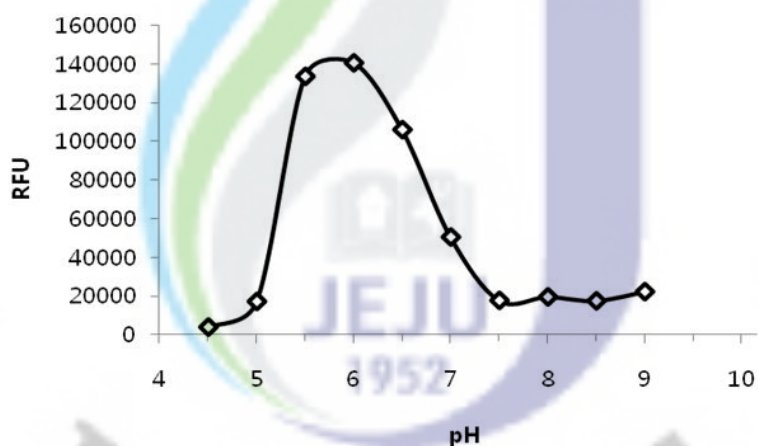


Fig. 4 Effect of pH on the activity of DUSP28. Reaction mixtures containing 5 μ M DiFMUP and 5.4 μ M DUSP28 were incubated at various pH buffer (20mM sodium citrate pH4.5, sodium citrate pH5.0, Bis-tris pH5.5, MES pH6.0, MES pH6.5, HEPES-NaOH pH7.0, HEPES-NaOH pH7.5, Tris-HCl pH8.0, Tris-HCl pH8.5, BICIN pH9.0)

3-3. Effects of phosphatase inhibitors and divalent ion on DUSP28 activity

탈 인산화효소 저해제를 처리하였을 시 DUSP28의 활성의 변화를 확인하였는데, Tyrosine phosphatases를 특이적으로 저해하는 sodium orthovanadate를 처리하였을 시에는 아주 강한 저해 효과를 확인 할 수 있었으며 (Fig. 5) serine/threonine phosphatase를 특이적으로 저해하는 Sodium fluoride (NaF)를 처리하였을 때에는 10%정도의 저해 효과를 보였다. PRL phosphatase의 저해제라고 알려져 있는 Pentamidine (PMD)을 처리하였을 때 20%의 저해효과를 볼 수 있었다 (Fig. 5). 금속이온을 처리하였을 시 DUSP28의 활성의 변화를 보기위한 실험을 수행하였다. DUSP28의 서열 정보에선 금속이온과 반응하는 어떠한 motif를 찾을 수 없음에도 불구하고 Zn^{2+} 을 처리 시 DUSP28의 활성이 확연히 감소하는 것을 확인 할 수 있었고, Co^{2+} 역시 활성 저해 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

Zn^{2+} 에 의한 탈 인산화효소의 활성 저해 효과는 탈 인산화효소의 활성부위에 존재하는 cysteine 잔기와 Zn^{2+} 간의 상호작용에 의하여 충분히 나타날 수 있는 현상이다 [Maret *et al.*, 1999]. 하지만 이 현상은 대부분의 DUSP에서는 나타나지 않고 LMW-DSP3 (DUSP19) [Cheng *et al.*, 2003], DUSP3(VHR) [Kim *et al.*, 2000]에서 나타난다는 연구 결과가 존재한다.

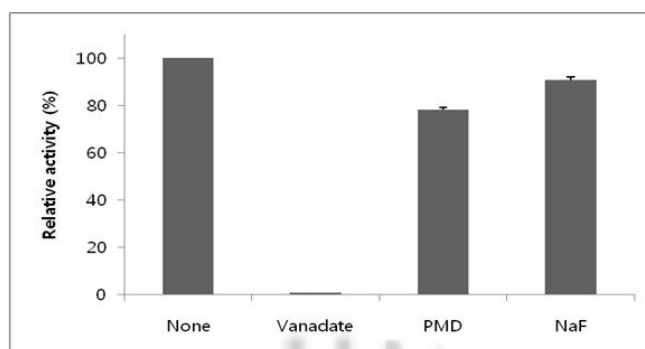


Fig. 5 Effects of phosphatase inhibitors on DUSP28 activity. Several known phosphatase inhibitors were tested for their effect on the ability of DUSP28 to dephosphorylate DiFMUP. 5.4 μ M of DUSP28 was incubated with DiFMUP in the absence or presence of 1mM sodium orthovanadate, PMD (pentamidine), NaF

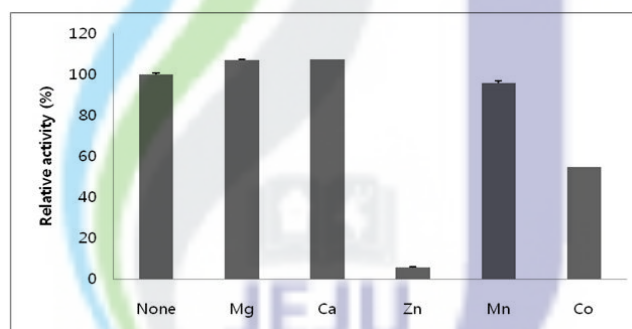


Fig. 6 Effects of divalent ion on DUSP28 activity. The reaction samples were incubated in the presence of 2mM each of the divalent metal ion

3-4. Substrate specificity of DUSP28.

DUSP28의 기질 특이성 (phospho-Tyrosine, phospho-Ser/Threonine)을 확인하기 위해 phosphatase assay system (Promega)를 사용하여 분석을 수행하였다. 이 기법은 합성된 phosphate를 기질로 사용하여, 탈 인산화 되었을 시 생성되는 인산기가 molybdate-malachite green과 복합체를 생성하여 색이 녹색으로 변하는 것을 이용한 방법으로, 595nm에서 흡광도를 측정하여 그 수치를 분석, 생성된 인산기의 양을 가늠하는 방법이다. 대조군으로 제공된 phosphate를 이용하여 standard curve를 만들어 차후에 분석을 수행한 후 나온 흡광도 수치를 생성된 phosphate 양으로 환산하는데 사용하였다. 그 이후 DUSP28와 DUSP28 c103s에 대하여 phosphatase activity 분석을 수행하였다. 이때 각 효소의 농도별로 분석을 하여 농도의 증가에 따른 인산기의 생산량을 분석하였다. 인산기의 생산량을 분석한 결과 일반적인 DUSP들처럼 두 기질모두에 활성이 있는 것과는 다르게 [Yuvaniyama *et al.*, 1996] DUSP28은 phospho-tyrosine에 대하여 탈 인산화 효과가 강하게 나타나는 것을 볼 수 있었고, phospho-threonine에는 탈 인산화가 거의 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

이렇게 하나의 기질에 대한 높은 특이성을 보이는 것은 이미 다른 DUSP에서도 보고가 된 적이 있는 것으로, phospho-threonine에 특이성을 가진 DUSP19, DSUP23 [Cheng, H *et al.*, 2003; Wu, Q *et al.*, 2004], phospho-tyrosine에 특이성을 가진 DUSP3(VHR) [Yuvaniyama *et al.*, 1996]들이 존재한다.

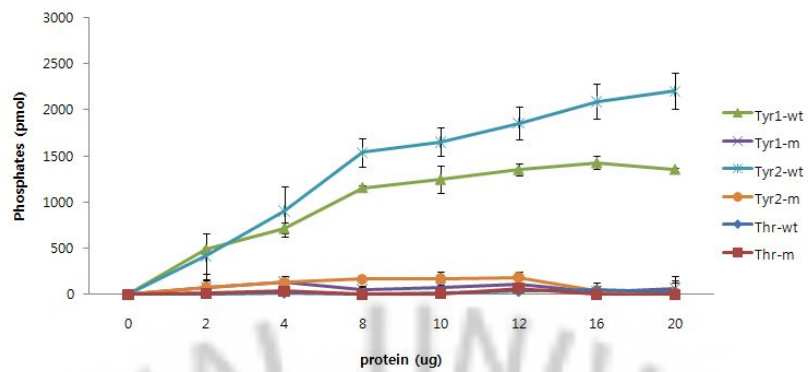


Fig. 7 Substrate specificity of DUSP28. 0.1mM each of Tyr phosphopeptide-1(ENDPYINASL), Tyr phosphopeptide-2(DADEpYLIPQQG), and Thr phosphopeptide(RRApTVA) were used as substrates. Indicated amounts of the DUSP28 were assayed (wt=DUSP28, m=DUSP28 c103s).



3-5. *In vitro* dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28

DUSP28은 phospho-tyrosine에 특이적인 탈인산화 효소라는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 특성을 가진 DUSP28가 세포내에서 DUSP들의 기질인 MAPK들의 인산화와 어떠한 관계가 있는지를 확인하기 위해 western blotting 기법을 이용한 실험을 수행하였다. 6 μ g의 DNA를 (Fig. 8)에 표시된 조성으로 형질전환을 실시하였다. EGF를 처리하여 ERK의 인산화를 유도하고, anisomycin을 처리하여 JNK와 p38의 인산화를 유도시켰다. 그 다음에 lysis buffer를 사용하여 lysate를 만들었으며, HA, Flag antibody를 이용한 western blotting을 수행하여 형질전환 시킨 유전자들의 발현을 확인하였다. 그리고 phospho-ERK, JNK, p38 antibody를 이용하여 EGF와 anisomycin에 의한 MAPK의 인산화가 잘 일어났는지에 대한 부분을 확인하였다. 앞에서 수행한 western blotting에서 형질전환 된 단백질의 발현과 인산화가 확인이 되었으면 HA-probe (agarose-conjugated)를 사용하여 면역침강을 실시, western blotting을 수행하여 형질전환 시켜 발현시킨 ERK, JNK, p38의 인산화 정도를 ERK, JNK, p38 antibody와 phospho-ERK, JNK, p38 antibody를 이용하여 분석하였다.

Western blotting을 수행한 결과 ERK, JNK, p38, DUSP28, DUSP28 c103s의 발현이 잘 된 것을 확인하였으며, EGF와 anisomycin에 의한 인산화도 잘 일어났음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 8-1). 면역침강을 수행한 lysate를 이용하여 실시한 western blotting 결과에서는 DUSP28을 같이 발현시킨 곳에서 JNK와 p38의 인산화가 증가하는 것을 확인을 할 수가 있었다 (Fig. 8-2).

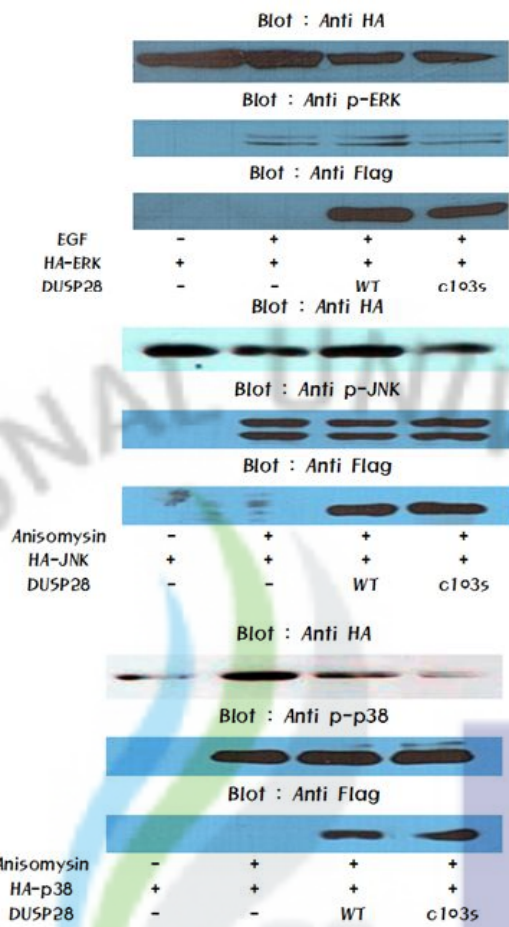


Fig. 8-1 *In vitro* dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28. 293T cells were transfected with expression plasmids for HA-ERK, HA-JNK or HA-p38 and stimulated with EGF or anisomysin. HA tagged MAPKs were immunoprecipitated, washed with lysis buffer, and then proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed with anti-HA, anti-Flag, anti-phospho-MAPKs antibody and anti-MAPKs antibody. WT: wild type; C103S: cysteine-103 to serine mutant.

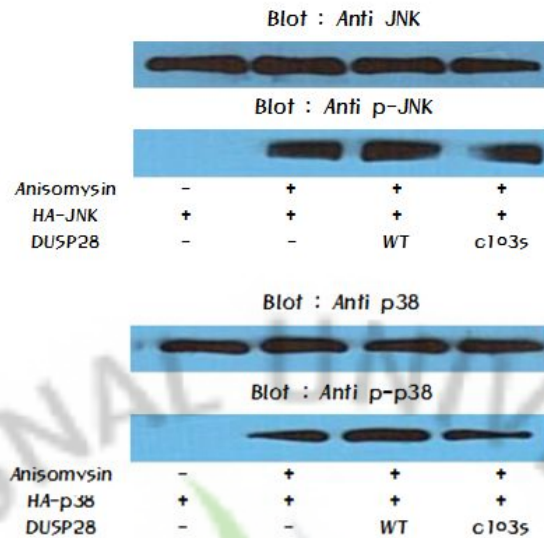


Fig. 8-2 *In vitro* dephosphorylation of MAPKs by recombinant DUSP28. 293T cells were transfected with expression plasmids for HA-ERK, HA-JNK or HA-p38 and stimulated with EGF or anisomycin. HA tagged MAPKs were immunoprecipitated, washed with lysis buffer, and then proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed with anti-HA, anti-Flag, anti-phospho-MAPKs antibody and anti-MAPKs antibody. WT: wild type; C103S: cysteine-103 to serine mutant

4. CONCLUSION

본 연구결과에서는 DUSP28의 활성이 pH 6.0에서 가장 좋았으며, 103번째에 존재하는 cysteine이 효소의 활성화에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 그리고 tyrosine phosphatases를 특이적으로 저해하는 sodium orthovanadate를 처리하였을 시 활성이 크게 저해되는 것을 확인 할 수 있었으며, Zn^{2+} 을 처리하였을 시에도 활성이 크게 저해되는 것을 확인 할 수 있었다. DUSP28의 기질 특이성을 살펴보았을 시에는 phospho-tyrosine을 특이적으로 탈 인산화 시키는 것으로 나타났고, 세포내에서 JNK와 p38의 인산화정도를 증가 시키는 것을 확인할 수 있었다.

DUSP28가 phospho-tyrosine phosphopeptide를 선택적으로 탈 인산화 하는 결과와 tyrosine phosphatases를 특이적으로 저해하는 sodium orthovanadate 처리 하였을 시 활성이 급격하게 감소하는 점으로 미루어 보았을 때, DUSP28은 tyrosine 특이적인 탈 인산화 효소라는 점을 명확하게 알 수 있게 해준다. 그리고 DUSP28의 서열상 금속이온과 반응하는 motif가 존재하지 않음에도 Zn^{2+} 에 의한 억제 효과가 보인다는 것은 Zn^{2+} 의하여 DUSP28의 활성이 조절을 받을 수 있음을 시사하며, DUSP28이 Zn^{2+} 와 관련 있는 신호전달체계에 포함될 수 있음을 보여줬다. 또한 Zn^{2+} 에 의한 활성 저해 효과 및 기질로서 phospho-tyrosine을 선호하는 것이 DUSP3(VHR)과 유사한 점을 미루어 보았을 때, DUSP28과 DUSP3의 활성 부위 구조가 비슷할 것이라는 예상을 할 수 있다.

REFERENCES

Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini N, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik , T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.

Alonso A, Saxena S, Williams S, and Mustelin T (2001) Inhibitory role for dual specificity phosphatase VHR in T cell antigen receptor and CD28-induced Erk and Jnk activation. *J Biol Chem.* 276, 4766-4771.

Alonso A, Rahmouni S, Williams S, van Stipdonk M, Jaroszewski L, Godzik A, Abraham RT, Schoenberger SP, Mustelin T (2003) Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70. *Nat Immunol.* 4, 44-48.

Arnoldussen YJ, Lorenzo PI, Pretorius ME, Waehre H, Risberg B, Maelandsmo GM, Danielsen HE, Saatcioglu F.(2008) The mitogen-activated protein kinase phosphatase vaccinia H1-related protein inhibits apoptosis in prostate cancer cells and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* Nov 15;68(22):9255-64.

Arimura, Y., and J. Yagi. 2010. Comprehensive Expression Profiles of Genes for Protein Tyrosine Phosphatases in Immune Cells. *Sci. Signal.* rs1

Bae EY, Oh H, Oh WK, Kim MS, Kim BS, Kim BY, Sohn CB, Osada H, and Ahn JS (2004) A new VHR dualspecificity protein tyrosine phosphatase inhibitor from *Dendrobium moniliforme*. *Planta Med* 70, 869-870.

Carlos, R. M., R. Pablo, T. Lydia, K. A. Teresa, and P. Rafael. A Novel Phosphatase Family, Structurally Related to Dual-specificity Phosphatases, that Displays Unique Amino Acid Sequence and Substrate Specificity. *J. Mol. Biol.* 374, 899–909

Cheng, H., Q. Gao, M. Jiang, Y. Ma, X. Ni, L. Guo, W. Jin, G. Cao, C. Ji, K. Ying, W. Xu, S. Gu, Y. Ma, Y. Xie, and Y. Mao. 2003. Molecular cloning and characterization of a novel human protein phosphatase, LMW-DSP3. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 226–234.

Choi YH, Chae SG, Kim JH, Kan SJ, Baek NI, and Han JT (2003) Isolation of an Antifungal Compound from Aerial Parts of *Platycarya strobilacea*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46, 268–270.

Claiborn, C. S., T. Larson, and L. Sheppard. 2002. Testing the metals hypothesis in Spokane, Washington. *Environ. Health Perspect.* 110, Suppl. 4: 547–552.

Denu JM, and Dixon JE (1995) A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5910–5914.

Denu JM, Zhou G, Wu L, Zhao R, Yuvaniyama J, Saper MA, and Dixon JE (1995) The purification and characterization of a human dual-specific protein tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 270, 3796–3803.

Farooq, A., and M. M. Zhou. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular Signal* 16, 769–779.

Gordon, T., L. C. Chen, J. M. Fine, R. B. Schlesinger, W. Y. Su, T. A.

Kimmel, and M. O. Amdur . 1992. Pulmonary effects of inhaled zinc oxide in human subjects, guinea pigs, rats, and rabbits. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 53, 503–509.

Kim, J. H., H. Cho, S. E. Ryu, and M. U. Choi. 2000. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 72–80.

Kim, J. H., D. Y. Shin, M. H. Han, and M. U. Choi. 2001. Mutational and kinetic evaluation of conserved His-123 in dual specificity protein-tyrosine phosphatase vaccinia H1-related phosphatase: participation of Tyr-78 and Thr-73 residues in tuning the orientation of His-123. *J. Biol. Chem.* 276, 27568–27574.

Kim, S. J., D. G. Jeong, T. S. Yoon, J. H. Son, S. Kim Cho, S. E. Ryu, and J. H. Kim. 2007. Crystal Structure of Human TMDP, a Testis-Specific Dual Specificity Protein Phosphatase: Implications for Substrate Specificity. *Proteins* 66, 239–245

Kim, Y. M., W. Reed, W. Wu, P. A. Bromberg, L. M. Graves, J. M. Samet. 2006. Zn^{2+} -induced IL-8 expression involves AP-1, JNK, and ERK activities in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290, 1028–1035.

Kodavanti, U. P., M. C. Schladweiler, A. D. Ledbetter, R. Hauser, D. C. Christiani, J. M. Samet, J. McGee, J. H. Richards, and D. L. Costa. 2002. Pulmonary and systemic effects of zinc-containing emission particles in three rat strains: multiple exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 70, 73–85.

Maret, W., C. Jacob, B. L. Vallee, and E. H. Fischer. 1999. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 1936-1940.

Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal regulated kinase activation. *Cell* 80, (2):179-185.

Nakamura, K., H. Shima, M. Watanabe, T. Haneji, and K. Kikuchi. 1999. Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis. *Biochem. J.* 344, 41404-41413.

Rahmouni S, Cerignoli F, Alonso A, Tsutji T, Henkens R, Zhu C, Louis-dit-Sully C, Moutschen M, Jiang W, and Mustelin T (2006) Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol* 8, 524-531.

Shi Z, Tabassum S, Jiang W, Zhang J, Mathur S, Wu J, and Shi Y (2007) Identification of a Potent Inhibitor of Human Dual-Specific Phosphatase, VHR, from Computer-Aided and NMR-Based Screening to Cellular Effects. *Chembiochem* 8, 2092-2099.

Todd JL, Tanner KG, and Denu JM (1999) Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway. *J Biol Chem* 274, 13271-80.

Treisman, R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. 1996. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.

Usui T, Kojima S, Kidokoro S, Ueda K, Osada H, and Sodeoka M (2001) Design and synthesis of a dimeric derivative of RK-682 with increased inhibitory activity against VHR, a dual-specificity ERK phosphatase: implications for the molecular mechanism of the inhibition. *Chem Biol* 12, 1209-1220.

Yu, M., F. Xiang, R. P. Beyer, F. M. Farin, T. K. Bammler, and M. T. Chin. 2010. Transcription Factor CHF1/Hey2 Regulates Specific Pathways in Serum Stimulated Primary Cardiac Myocytes: Implications for Cardiac Hypertrophy. *Current Genomics* 11, 287-296.

Wu, Q., Y. Li, S. Gu, N. Li, D. Zheng, D. Li, Z. Zheng, C. Ji, Y. Xie, Y. Mao. 2004. Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity phosphatase 23 gene from human fetal brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1542-1553

Yuvaniyama, J., J. M. Denu, J. E. Dixon, and M. A. Saper. 1996. Crystal structure of the dual specificity protein phosphatase VHR. *Science* 272, 1328-1331.

ACKNOWLEDGEMENTS

먼저, 지도교수이신 김재훈 교수님께 감사드립니다. 교수님으로부터 참된 연구자의 마음가짐과 삶에 대한 성실한 태도를 마음 깊이 새길 수 있었습니다. 학문과 삶에 대한 교수님의 진심 어린 말씀 하나 하나 새겨가며 최선을 다하겠습니다.

그리고 생명공학과와 모든 교수님들께 감사의 말씀을 드립니다. 이 분들에게서는 연구와 강의로 바쁘신 가운데에도 제 학위논문 심사를 흔쾌히 맡아주시고 많은 조언을 해주셨습니다.

실험 과정에서 마치 자신의 일처럼 도와주신 단백질공학 연구실 구성원들, 정성진 박사님, 진성범 박사님, 윤병준 박사님, 그리고 미국에 계신 박정원 박사님 감사합니다. Adnan, 송이누나, 이비 형, 한나, 보람이, 종현이 형, 유라에게도 감사의 말씀을 전하고, 앞으로 하고자 하는 분야에서 최고가 될 수 있도록 기원하겠습니다.

마지막으로, 제 모든 힘의 원천이며 살아가는 원동력인 사랑하는 부모님께 감사드립니다. 두 분의 헤아릴 수 없이 가득한 사랑과 관심, 인내가 없었다면 지금의 저는 결코 있을 수 없었을 것입니다. 그 무엇으로도 다 표현할 수 없을 만큼의 헌신적인 두 분의 사랑으로 이 자그마한 논문은 빛어졌습니다. 두 분의 사랑에 항상 감사하며 최선을 다해 열심히 살아가겠습니다.

이외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 이 외에 제가 미처 언급하지 못한 고마운 분들이 너무나 많습니다. 그 분들의 이름을 하나하나 되새기지 못함을 죄송하게 생각하며, 대신 제 깊은 감사의 말로 이 글을 마칠까 합니다.

“모두들 감사드립니다. 그리고 고맙다 JP 친구들”