

제 51차 KIST-KITA 협동공개강좌

진보된 안전성 평가와 환경호르몬 검출기법

2000. 5.

주최 한국과학기술연구원
 한국산업기술진흥협회

Estrogen receptor binding assay

류재천, 박효정

한국과학기술연구원
독성연구팀

Tel: 958-5080, 507

Fax: 958-5059

E-mail: 류재천 ryujc@kist.re.kr

박효정 phjdream@kist.re.kr

1. 서론

Estrogen receptor binding assay는 미국 EPA의 EDSTAC의 Tier 1 Screening in vitro method에서 권장하는 방법으로서 estrogenic effects의 molecular mechanism을 밝히는데 필요한 방법이며 간편하고 빠르게 screening 할 수 있는 장점을 가지고 있다. Endocrine disrupting chemicals (EDCs)는 estrogen receptor (ER) nuclear protein에 specific하게 결합하여 natural estrogens의 활성을 증가시키거나 차단 할 수 있다. ER는 tissue growth와 differentiation에 관련된 gene expression 을 조절하는 66 kDa의 transcription factor이며 reproductive, skeletal, cardiovascular 그리고 mammary tumor를 포함한 다양한 target tissue에서 작용한다 (1-2). ER 과 다른 steroid hormone-receptor들은 receptor의 carboxy-terminal hormone binding domain에 high affinity를 나타내며 하나 또는 그 이상의 endogenous ligands에 의해 활성화된다. Ligand binding은 receptor의 conformation의 변화나 dimerization 그리고 다른 protein과의 interaction의 변화 등을 포함하는 많은 receptor의 변화를 가져올 수 있다. Hormone-receptor complex는 다른 transcriptional accessory protein과 함께 또는 단독으로 receptor의 DNA binding domain을 통해 DNA response elements에 결합하여 target gene의 transcription을 유도 또는 억제시킨다 (4-6). ER의 competitive inhibitor (antiestrogen; e.g., tamoxifen)은 target tissue의 ER 작용을 block 함으로써 유방암 치료제로 개발되기도 하였다 (7-8). 최근에는 ER이 cloning 되었으며 이는 ER와는 다른 estrogen에 대한 affinity를 가지며 ligand binding 방식도 다른 것으로 밝혀지고 있다 (9). Hormone, DNA 그리고 ER 상호작용의 복잡성이 밝혀지고 있으며 조직에 따라 estrogen에 대해 다양하게 반응한다는 것을 알 수 있게 되었다 (10). 따라서 EDCs가 ER에 결합하거나 ER-mediated gene regulation events에 영향을 주는 지를 구별해낼 수 있는 in vitro screening 방법이 필요하다. 따라서 test compound가 radioactive 17β -estradiol을 치환하는 원리를 이용한 competitive estrogen receptor binding assay를 정립하였으며, cell이나 tissue로 부터 crude receptor preparation을 만드는 대신 ER의 cDNA를 PCR-amplification하여 얻어진 recombinant human ER를 이용하여 간편하고 신속하게 실험이 가능하도록 만들어졌다.

2. 실험재료 및 방법

(1) 실험재료

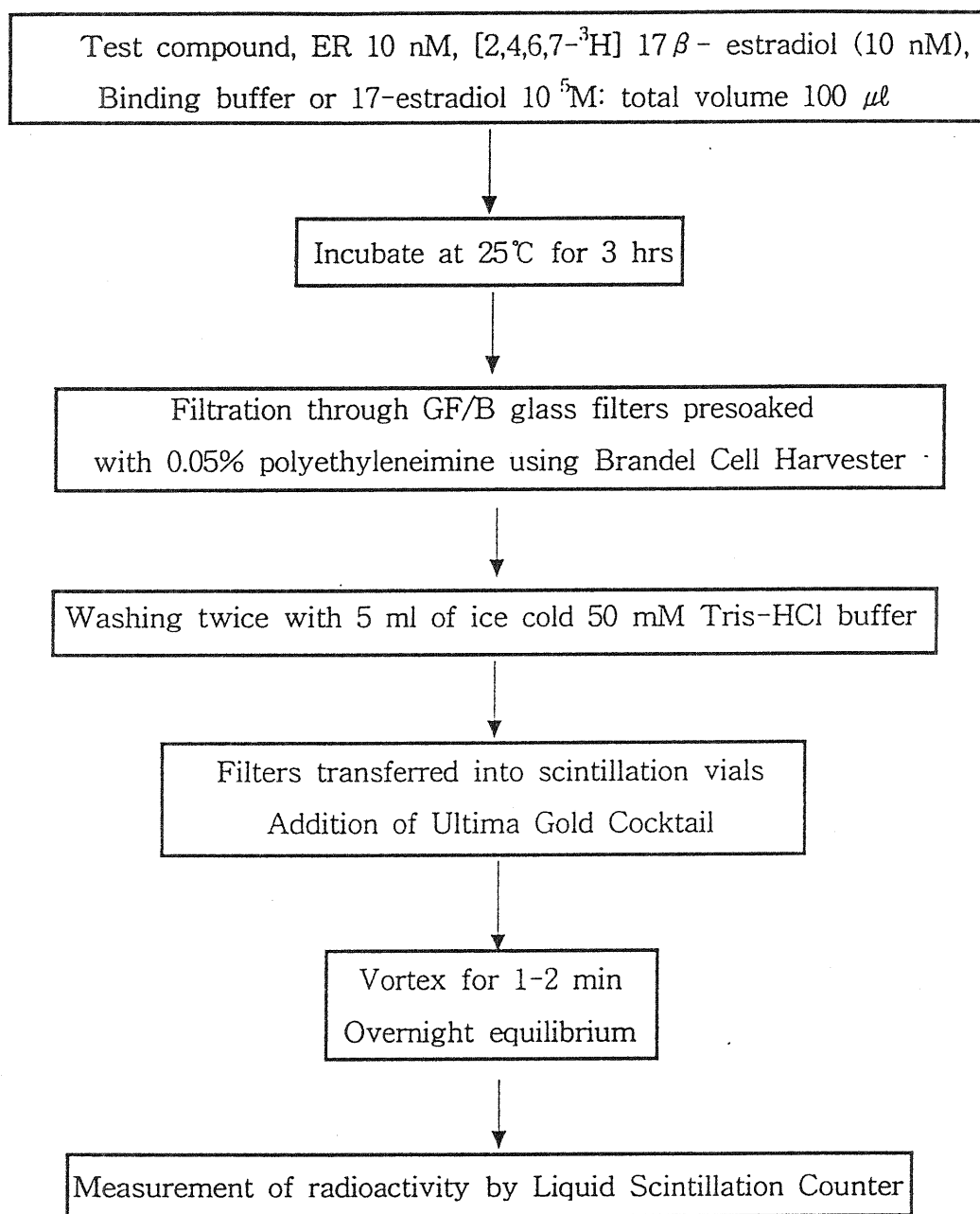
Recombinant human ER는 PanVera에서 입수하여 사용하였으며 실험전까지 -70°C 에서 보관하였다. Radioactive 17β -estradiol을 $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ estradiol (88.0 Ci/mmol)을 Amersham (Buckinghamshire, England)에서 구입하였으며 이외에 charcoal, dithiothreitol, bovine serum albumin은 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. Ultima Gold scintillation cocktail은 Packard BioScience Company에서 구입하여 사용하였다.

(2) 기기

Table top centrifuge (GR-6R, Beckman, USA)과 liquid scintillation counter (2000CA, Packard Instrumental International Switzerland)를 사용하였다.

(3) 실험방법

Estrogen receptor (ER)은 ER의 cDNA를 PCR-amplification 하여 얻어진 recombinant human ER를 PanVera에서 구입하여 사용하였으며 Binding buffer의 조성은 10 mM Tris (pH 7.5), 10% glycerol, 1 mM DTT 그리고 1 mg/ml BSA이다. Estrogen receptor, $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ estradiol (10 nM), 농도별 test compound를 microcentrifuge tube에 넣고 최종 반응용량이 200 μl 가 되도록 하였다. 25°C 에서 3시간 동안 incubation시킨 후, GF/B glass filter로 filtration하여 free $[2,4,6,7-^3\text{H}]$ estradiol은 제거하고 filter paper를 scintillation vial에 옮긴 후 Ultima Gold scintillation cocktail 4 ml을 가하고 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다. Nonspecific binding을 위해서는 10^{-5}M 17β -estradiol을 사용하였다. Competitive receptor binding assay를 위한 양성 대조약물로는 17β -estradiol 과 diethylstilbestrol (DES) 를 사용하였다.



Scheme 1. Procedure of estrogen receptor (ER) binding assay.

실제 위와같은 방법을 통하여 17β -Estradiol과 diethylstilbestrol (DES)를 대조물질로 사용하기 위한 조건 설정을 위한 실험을 하였다. Estrogen receptor (ER)와 $[2,4,6,7-^3\text{H}]17\beta$ -estradiol의 specific binding에 미치는 영향을 competitive radioactive ligand receptor binding assay를 이용하여 실험하였다. 대조약물로 사용되어진 17β -estradiol 과 diethylstilbestrol (DES)은 $[2,4,6,7-^3\text{H}]17\beta$ -estradiol의 ER에 대한 결합을 농도 의존적으로 억제하였으며 IC_{50} 값은 각각 1.14 nM 과 1.35 nM이었다.

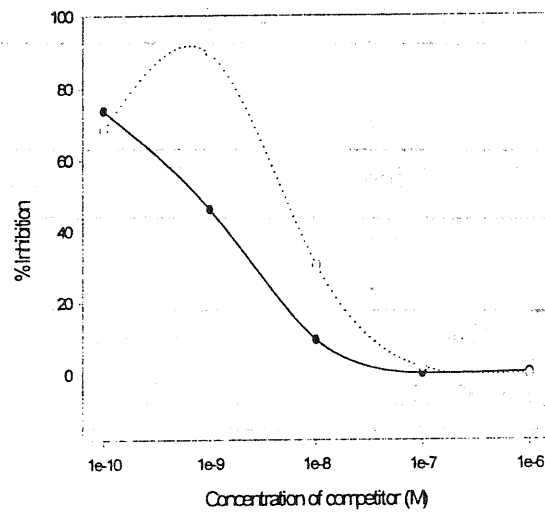


Fig. 1. Competitive inhibition of $[^3\text{H}]17\beta$ -estradiol binding to a human recombinant estrogen receptor α by 17β -estradiol (●) and diethylstilbestrol (○).

3. 참고문헌

1. Green S, Chambon P. The estrogen receptor: from perception to mechanism. In: Nuclear hormone receptors: molecular mechanisms, cellular functions, clinical abnormalities (Parker MG, ed). London: Academic Press, 1991; pp 15-38.
2. Parker MG, Arbuckle N, Dauvois S, Danielian P, White R. Structure and function of the estrogen receptor. Ann. NY. Acad. Sci. 1993; 684:119-126.
3. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Ann. Rev. Biochem. 1994, 63: 451-486.
4. Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. Mol. Endocrinol. 1993, 7: 4-11.
5. Landel CC, Kushner PJ, Greene G. Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. Environ. Health. Perspect. 1995; 103 (Suppl 7): 23-8.
6. Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. Mol. Endocrinol. 1993, 7:1266-74.
7. Jordan VC. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 1994, 31:41-52.
8. Grainger DJ, Metcalfe JC. Tamoxifen: teaching an old drug new tricks? Nat. Med. 1996, 2: 381-5.
9. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. Science, 1997, 277: 1508-10.
10. Stancel GM, Boettger-Tong HL, Chiappetta C, Hyder SM, Kirkland JL, Murthy L, Loose-Mitchell DS. Toxicity of endogenous and environmental estrogens: what is the role of elemental interactions? Environ. Health. Perspect. 1995, 103 (Suppl 7): 29-33.

11. Barnes S. Kim H. Darley-Usmar V. Patel R. Xu J. Boersma B. Luo M. Beyond ER alpha and ER beta: Estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *Journal of Nutrition*. 130(3):656S-657S, 2000
12. Hutz RJ. Wimpee BAB. Dasmahapatra A. Weber DN. Heimler I. Chaffin CL. Differential modulation by aromatic hydrocarbon receptor agonist of circulating estradiol-17 beta and estrogen-receptor DNA-binding capability in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). [Article] *Zoological Science*. 16(1):161-166, 1999