

폐 세포의 분화에 필수적인 tRNA 합성물의 공동인자인 p38에 의한 FUSE-binding protein과 c-myc의 downregulation

신혜승

한국과학기술연구원 생체대사 기능연구센터

p38은 고분자인 tRNA 합성복합체와 결합한다¹. 그것은 복합체로 된 골격과 p38의 유전학적 분열에서 신생 쥐의 치사율에 중요한 부분을 담당한다². 여기에서 p38-돌연변이 쥐들의 치사율에 기인하는 분자의 구조들을 연구하였다. p38이 결합된 쥐들은 폐의 분화에서의 결합과 호흡곤란 증상이 나타났다. p38은 FUSE-binding protein(FBP)과 c-myc의 전사(轉寫)촉매체가 서로 영향을 주면서 생겨난다. p38의 결합은 기능상의 폐포 유형 II 세포들의 분화가 필수적인 c-myc의 하향조절(downregulation)을 도출해내는 ubiquitination 과 FBP의 저하를 자극하였다³. 성장변화 요인-β(Transforming growth factor-β: TGF-β)는 p38의 발현을 야기 시키며 FBP과 c-myc의 제어를 위한 세포핵으로 전위된 속 진시켰다. 사실상 이 과정은 TGF-β 신호의 중계자로서의 p38의 새로운 활동과 폐의 분화 동안에 c-myc의 조절에 있어서 기능상의 중요성을 확인하였다.

폐포 유형 II 세포들은 폐포 표면의 수면 긴장을 감소시키는 계면활성제를 분비하기 때문에 폐호흡 작용에 중요하다. 아마도 이 세포들의 불완전한 분화는 호흡곤란 증상을 일으킨다. 이 증상은 조산 아들에게 빈번히 나타나고 그들의 죽음과 연결된 중요한 부분이다. 여기서 우리는 제2 형태의 세포조직 돌인 FBP과 c-myc의 하향조절에 의해 폐포 유형 II 세포들의 분화에서 중요한 역할을 한다고 보고하였다. p38은 몇몇 다른 아미노산기-tRNA 합성물로 구성된 거대분자 단백질 복합체와 결합하는 요인

으로 확인되었고 JIV-1 단백질로도 독립적으로 알려져 있다⁴. 우리는 p38이 골격에는 다중-tRNA 합성복합체의 안정성과 조합에 필수적인 기반이라는 것을 사전에 알 수 있다.

명백하게, *Abaal* 내에서의 돌연변이에 관해서는 비록 표준적인 분리 비에 의해 태어났다 하더라도 이형집합체의 쥐들뿐만 아니라 동형집합체의 쥐들도 신생 쥐의 치사율을 보여준다. 이러한 일에서 돌연변이 쥐들의 치사율과 관계가 있는 p38의 활동을 확인하기 위해 몇 가지 실험들을 실

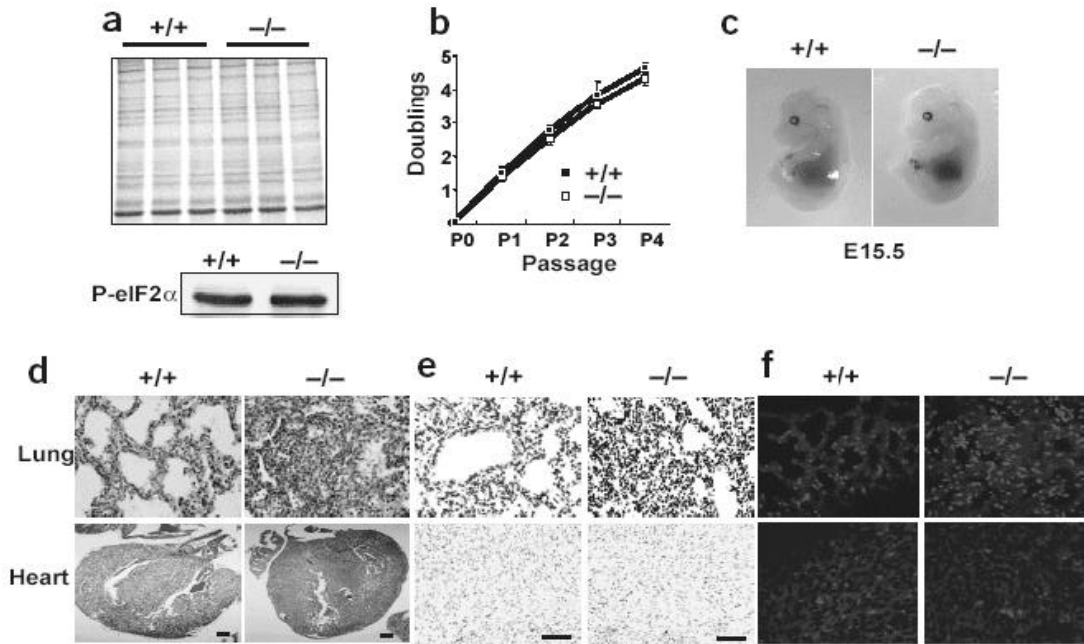


Fig. 1. Protein synthesis, cell growth and histological characteristics of p38-deficient mice.

(a) We compared overall protein synthesis in wild type and p38⁻ deficient MEFs by autoradiography of the (³⁵S)-methionine incorporated into nascent proteins (upper) and also by the phosphorylation of eIF2^α (P-Eif2^α; lower).
 (b) We compared growth rates of wild-type and p38-deficient MEFs (n = 3 for each genotype).
 (c) Gross morphology of E15.5 wild-type and p38-deficient embryos.
 (d) Hematoxylin and eosin staining of lung and heart tissues isolated from neonatal mice.
 (e) Immunohistochemical staining of lung and heart sections with anti body to PCNA (darkbrown). The sections were counterstained with 50% dilution of Harry's hematoxylin (blue).
 (f) Immune-fluorescence staining of lung and heart sections with antibody to Ki67. The Ki67 positive cells were detected by confocal laser scanning microscopy (green). Scale bars = 12.5 μm, except scale bar in hematoxylin and eosin staining of heart = 25 μm.

행하였다.

먼저 p38의 결핍이 전체적인 단백질 합성과 어린 쥐의 섬유 모 세포(MEFs)의 세포 성장에 영향을 미치는지 아닌지 조사하였다. 우리는 전이의 시점을 조절하는 eIF2^α의 인산화와 발생기에 있는 폴리펩타이드(아미노산의 다중 결합물)의 방사선 사진촬영에 의해 단백질 합성을 관찰하였고 또 MEFs의 일련의 분화에 의한 세포성장을 관찰하였다⁵. p38이 결핍된 세포는 단백질 합성에 있어서 약간의 차이를 보여주었고(Fig. 1a) 세포 성장률도 일반 세포들과

비교되었다(Fig. 1b). 게다가, 돌연변이의 배(胚)는 크기나 성장 형태에 있어서 뚜렷한 특징은 없었다(Fig. 1c). 그러나 조직학적 분석 뼈, 장 그리고 간을 포함한 p38이 결핍된 쥐들의 다양한 기관에서 뚜렷한 괴형성을 보여준다(Fig. 1d 데이터는 보이지 않음). 이 같은 관찰을 입증하기 위해 우리는 세포 확산의 표지인 PCNA(확산중인 세포핵 항원)과 Ki67(ref. 6)에 대항하는 항원에 의해 뼈의 조직을 면역화학(immunostain) 하였다. 돌연변이 쥐의 뼈는 이 항체들에 의해 심하게 얼룩졌고, 이에 반해

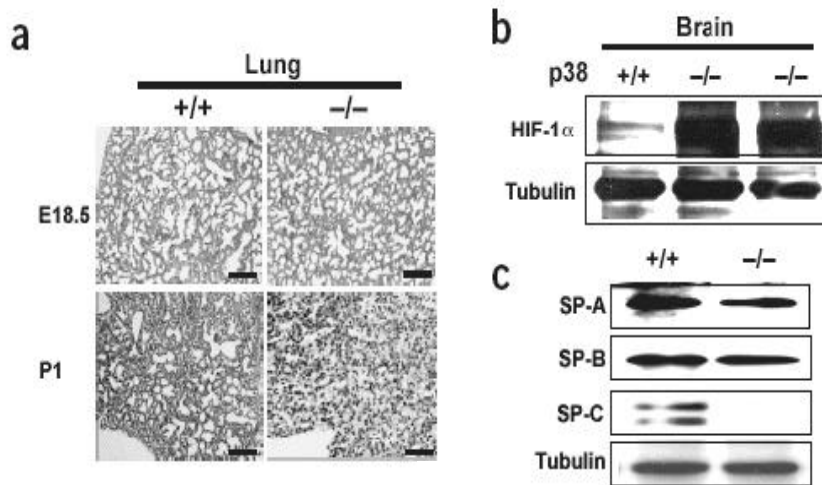


Fig. 2 Defect in the differentiation of alveolar type II cells and surfactant production in lungs of p38-deficient mice

- (a) Lung morphology of wild-type and p38-deficient mice at E18.5 and P1. Scale bar = 50μm.
- (b) Level of HIF-1α in brains of P1 mice. Tubulin was used as a loading control.
- (c) We determined the production of the lung surfactant proteins (SP-A, SP-B and SP-C) in the proteins extracted from the neonatal lungs by western blotting.

돌연변이 쥐들의 심장은 야생형의 쥐들의 조직들과 관련해 외형적 차이를 보여주진 않았다(Fig. 1e,f).

폐의 기능상실이 신생 쥐들의 치사율에 직접적인 원인이 될 수 있기 때문에 돌연변이 쥐들의 폐를 더 조사하였다. 야생형 쥐들의 폐는 출생전과 출생 후의 상태 모두에서 표준적인 폐포 구조를 가지고 있었으나 출생 후의 돌연변이 쥐들의 폐는 허탈 상태가 되었고(Fig. 2a) 폐의 기능장애에 영향을 주는 저산소혈증을 유발하는 요인인 1α(HIF-1α)의 높이가 돌연변이 쥐의 뇌에서 높게 올라가 있었다(Fig. 2b)⁷. 폐의 허탈은 종종 폐포 표면에서 계면활성제의 결핍에 의해 발생된다⁸. 폐의 계면활성제중에서, SP-B와 SP-C는 폐포 표면에서 표면 긴장을 조절하고⁹, SP-A와 SP-D는 면역 반응과 관계가 있다¹⁰. 웨스턴 블로팅에 의해 보통 쥐들과 p38이 결핍된 쥐들의 폐에서 서로 다른 계면활성제의 높이를 비교해보았다. 특히 폐포 유형 II 세포로부터 생성

되는 SP-C는 돌연변이 쥐의 폐에서는 발견되지 않았지만¹¹ 다른 폐 세포에서 만들어진 SP-A와 SP-B는 야생형과 관련하여 대략 적은 양이 발견되었다(Fig. 2c)¹². 면역 형광 검사에 의한 착색은 돌연변이 쥐들의 폐포 표면에서 현저하게 적은 양의 SP-B와 SP-C가 보여 졌지만(Fig. 2d,e) 기능성 유형 II 세포의 분화에서는 결함을 보여주고 있다. 따라서 폐부전은 돌연변이 쥐의 치사율에 직접적인 원인으로 결론을 내렸다.

p38의 작용 기구의 결정에서, p38명어리 단백질이 효모의 두 혼합물의 분석표의 사용으로 나타난다. 그 화면은 p38로 확인되는데, Iyeyl-tRNA synthetase (KRS)와 FBA(데이터에서는 보여주지 않음), 그리고 전신의 폴리펩티드를 사용하는 p38과 그들의 상호작용에 대해 확인했다. (Fig. 3a) FBA는 또한 글루타티온 S-transferase(GST)가 함께 불순물을 제거한다- p38 용해 단백질은 쥐 뇌

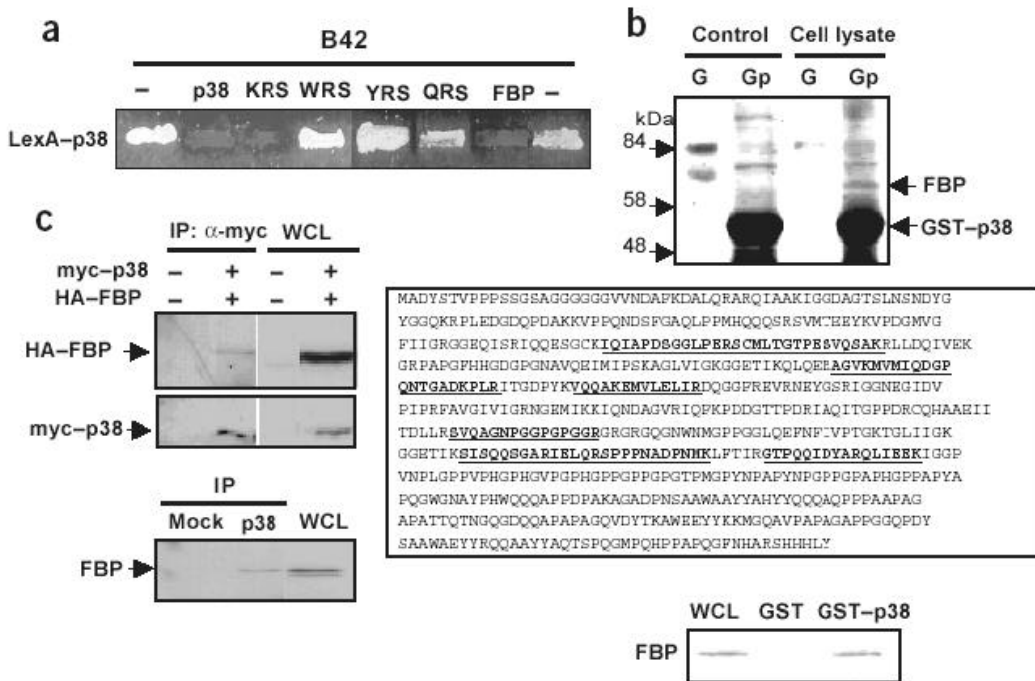


Fig. 3. Interaction of p38 with FBP.

- (a) We determined the interaction of p38 with the indicated proteins by yeast two-hybrid assay. KRS, WRS, VRS and QRS stand for lysyl-, tryptophanyl-, tyrosyl- and glutaminyl-tRNA synthetase, respectively. Positive interactions are indicated by the formation of blue colonies on YPD medium containing 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside.
- (b) Top: The proteins that were copurified with GST (G) or GST-p38 (Gp) were separated by SDS-PAGE. A protein of about 68 kDa was specifically detected from the proteins copurified with GST-p38. Middle: We identified this protein by peptide fingerprinting using MALDI-TOF analysis. The peptides that match with parts of mouse FDP (GI15928578) are underlined. Bottom: The copurification of FBP with GST-p38 was confirmed by western-blot analysis with antibody to FBP. WCL, whole-cell lysate.
- (c) Top: Coimmunoprecipitation of myc-p38 and HA-FBP in 293 cells. IP, immunoprecipitation; WCL, whole-cell lysate; Bottom: Coimmunoprecipitation of endogenous p38 and FBP in 293 cells.

의 높은 농도의 FBP 합성으로부터 추출된 단백질로부터 나온다¹³⁾(Fig. 3b). 두 단백질의 세포 상호 작용은 또한 외인성의 침투된 myc-tagged p38 (myc-p38)과 hemagglutinin-tagged FBP (HA-FBP) 사이 만큼 내인성의 단백질간의 공동

면역체계에 의해 보여 진다.(Fig.3c). FBP의 삭제 부분과 그것의 이성체와 함께 *In vitro*에 묶인 분석 표에서 p38은 FBP의 C-terminal 부위에 확합시킴을 보여준다. 그것은, 변환 화학 활성화 활동에¹⁴ 원인이 되지만, 443 아미노산의 N-terminal 부위

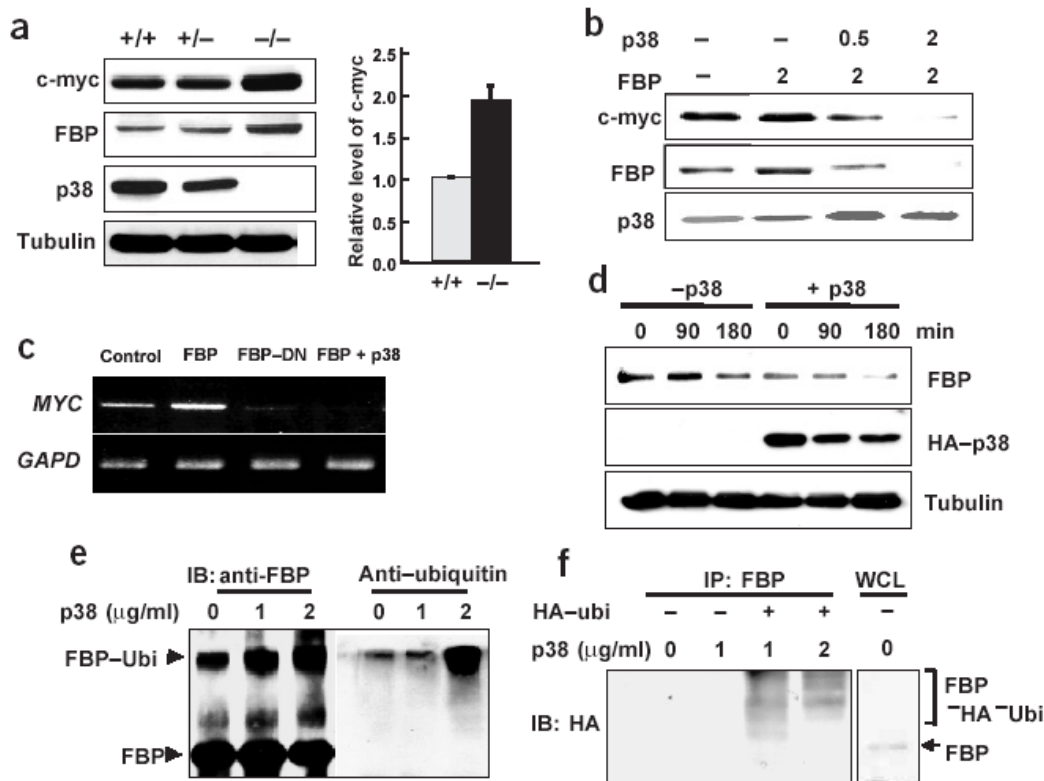


Fig. 4. p38-dependent ubiquitination and degradation of FBP.

- (a) Levels of c-myc, FBP and p38 in the lungs of neonatal littermates. The bar graph indicates the relative levels of c-myc in the lungs of wild-type and p38-deficient mice ($n = 7$ each).
- (b) The increase of the p38 level by transient transfection (0, 0.5 and 2 μ g of the p38 plasmid) decreased the levels of FBP and c-myc in 293 cells.
- (c) We determined the effect of FBP and p38 on the expression of *Myc* by RT-PCR. *Gapd* was used as a loading control.
- (d) The p38-stimulated degradation of FBP in 293 cells treated with cycloheximide. The FBP level was monitored by western blotting at the indicated times after the cycloheximide treatment.
- (e) The p38-dependent ubiquitination of FBP in 293 cells treated with ALLN (26S proteasome inhibitor). We introduced the indicated amounts of the p38 plasmid into the cells, immunoprecipitated (IP) the proteins extracted from the cells with antibody to FBP and immunoblotted (IB) them with antibodies to FBP and ubiquitin (Ubi).
- (f) We also determined the ubiquitination of FBP by the coexpression of HA-ubiquitin with different amounts of the p38 plasmid in 293 cells. Ubiquitinated FBP was detected by western blotting with the antibody to hemagglutinin (HA). WCL, whole-cell lysate.

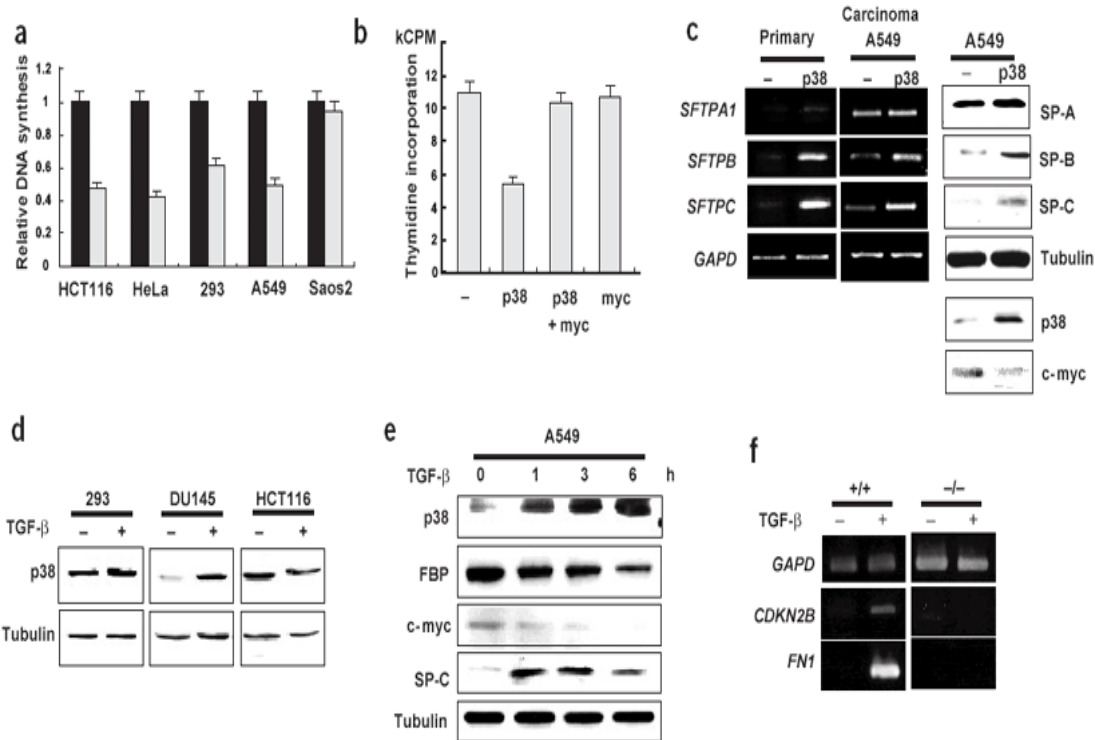


Fig. 5. The effect of p38 on cell proliferation and differentiation and its role in the TGF- β signaling pathway.

- (a) The effect of p38 on proliferation of the indicated cell lines. We monitored cell proliferation by the incorporation of radioactive thymidine.
- (b) To see whether the anti-proliferative effect of p38 was relieved by the coexpression of c-myc, we transfected 293 cells with the indicated plasmids and determined cell proliferation.
- (c) The effect of p38 on generation of lung surfactants in the epithelial primary cells and carcinoma A549 cells. We compared production of the surfactants and of p38 and c-myc by RT-PCR (left) and western blotting (right). *GAPD* was used as a loading control for RT-PCR and tubulin as a loading control for western blotting.
- (d) The effect of TGF- β 2 on the level of p38 in different cell lines. TGF- β 2 did not increase the level of p38 in HCT116 cells, which lack the type II TGF- β receptor. Tubulin was used as a loading control.
- (e) The time course of the TGF- β -dependent increase of p38 in A549 cells. The TGF- β -dependent increase of p38 decreased the levels of FBP and c-myc and restored the production of SP-C. Tubulin was used as a loading control.
- (f) The functional importance of p38 in TGF- β signaling. We compared the expression of the TGF- β target genes, *Cdkn2b*(encoding p15) and *Fn1* (encoding fibronectin), by RT-PCR in normal and p38-deficient MEFs that were treated with TGF- β 2. *Gapd* was used as a loading control.

와 그것의 이성체, FBP2와 FBP3는 제외한다(ref. 15; Supplementary Fig. 1 online).

p38과 FBP 사이의 상호작용의 기능 이해를 위해 신생아의 한배의 새끼의 폐에서 FBP와 c-myc의 농도를 비교했다. FBP와 c-myc의 농도가 야행성과 잠중성의 한배의 새끼들 보다 동질 접합체의 돌연변이 쥐의 폐에서 더 높게 나타났다 (Fig. 4a). FBP의 전사(轉寫)한 농도는 p38의 결핍에 의해서 변화될 수 없지만, 그러나, p38은 FBP의 전사(轉寫)의 영향은 받지 않음을 가리킨다(데이터에서는 보여주지 않음). p38의 일시적 트랜스펙션은 FBP와 c-myc의 농도 감소로 야기된다(Fig. 4b). c-myc의 발현에 대한 p38의 영향은 RT-PCR에 의해 또한 감시되어진다. c-myc의 발현은 FBP의 우성에 반하는 모양의 막과 FBP¹⁴에 의해 강화된다. p38의 공동 발현은 c-myc의 FBP-dependent 유발을 막는다(Fig. 4c). p38은 원형의 293세포를 취급하는 FBP의 전복을 촉진한다.(Fig. 4d).

그래서 유비퀴테이션이 N-아세틸-Leu-norleucinal (ALLN), 26S 프로테아아제¹⁵ 막의 사용으로 FBP의 p38-dependent 감소에 야기하는지 아닌지를 시험해 보았다. ALLN을 다루는 293세포에서, FBP의 농도는 p38에 의해서 감소되지 않았다 (Fig. 4e). 게다가, FBP의 더 높은 분자의 무게 묶음에서 p38의 더 많은 양을 찾았고, 이러한 묶음은 유비퀴틴에 함께 재 반응 한다(Fig. 4e). 그것들은 유비퀴테이션된 FBP로 나타남을 가리킨다. FBP의 유비퀴테이션은 hemagglutinin-tagged 유비퀴틴과 함께 p38의 공동의 발현에 의해 강화된다(Fig. 4f). FBP의 삭제 부분을 사용하는 실험은 FBP 묶음에 p38의 능력이 c-myc의 발현을 억압하고 FBP의 유비퀴테이션을 위해 필수적임을 보여 준다(Supplementary Fig. 2).

그리고 p38의 영향으로 세포가 증식하는지 아닌지를 알아보기 위해 일시적 트랜스펙션을 사용하였다^{17,18}. 사실상 p38은 다양한 상피 암세포 줄기의 증식을 감소시킨다. 인간 췌의 암인 Saos2세포는

예외이다(Fig. 5a). p38의 반 증식 활동은 p38과 함께 c-myc의 공동 발현에 의해 막는데(Fig. 5b), 그것은 c-myc을 통한 p38제어 세포 증식이 중요하게 적용됨에 의해서이다. 폐에 상피에 중요한 세포와 암세포에서, p38은 계면 활성제인 Sp-B와 Sp-c의 발현을 감소시키고 c-myc의 발현도 억제한다(Fig. 5c).

변환성장 요소는 폐암과, 출생 후의 치사율과 폐 부전을 일으키는 TGF-β2또는 β3의 유전자의 파괴를 포함하게 된다. 게다가, p38을 통해서 상피 암세포의 증식을 억제하게 되고, 그것은 췌암 세포는 아니지만, TGF-β-induced 성장억제를 방해한다 (Fig. 5a). 이것이 TGF-β에 의해 영향 받은 p38의 농도인지 아닌지를 결정하기 위한 TGF-β과 p38 표시 사이의 기능적 연관을 조사하였다. TGF-β2를 처리는 293과 DU145에서 p38의 농도의 증가가 있다. 그러나 타입 II TGF-β 수용체 결핍인 HCT116 세포는 아니다¹⁹(Fig. 5d). p38의 증가 TGF-β-dependent는 FBP와 c-myc에 의해 억제되고 Sp-c의 생산에 의해 복원된다(Fig. 5e). TGF-β 표시에서 실제적으로 포함된 것에서 p38을 볼 수 있는지 아닌지를, 우리는 정상세포와 TGF-β가 포함한 p38-deficient 세포 처리후에 표적 단백질 p15(ref.20)과 파이버로베탌²¹의 유발 실험을 통해 알아보았다. 이러한 단백질의 유전 암호화는 돌연변이 세포에서 TGF-β에서 전달을 하지 못했다(Fig. 5f) 이것은 TGF-β 신호 통로에서 p38의 기능적 중요성을 보여준다.

p38은 유전적 요소 FBP를 결속하기 위해 세포 핵상에서 표시 될 것이다. TGF-β는 세포 분류법 (Fig. 6a)과 면역형광 검사법에 의해 결정되므로 A549 세포 내에서 p38의 핵전위를 유발시킨다. (Fig. 6b) 우리는 HELA 와 DU145 세포들에서도 마찬가지로 유사한 결과를 관찰했다. (데이터는 제시되지 않음) 그리고 나서 p38과 그것의 목표단백질 사이의 역학관계를 밝혀냈다. 혼합된 효모들 간의 분석결과는 p38의 다른 펩티드 영역들이 그것들과 KRS와 FBP와의 상호작용 내에 깊이 관련되

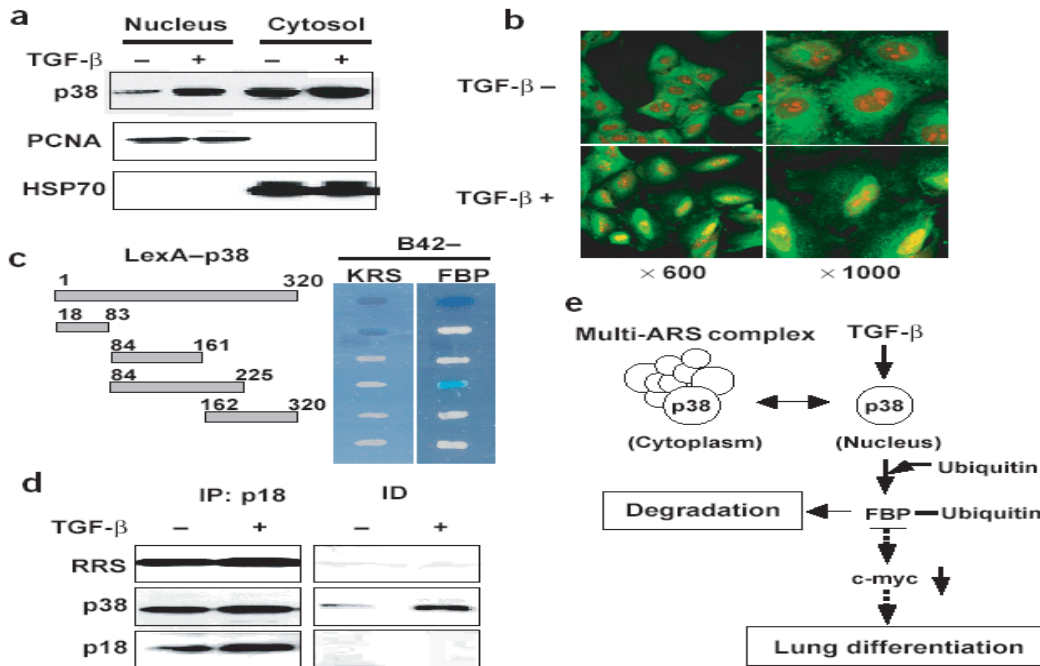


Fig. 6. TGF-β induced nuclear translocation of p38.

- (a) Comparison of the p38 level in nuclear and cytoplasmic fractions of A549 cells that were untreated or treated with TGF-β2. PCNA and heat shock protein (HSP) 70 were used as nuclear and cytoplasmic markers, respectively.
- (b) Immunofluorescence staining of p38 in A549 cells with monoclonal antibody to p38. p38 and nuclear DNA were visualized with secondary antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (green) and propidium iodide (red), respectively.
- (c) Identification of the peptide region of p38 that is responsible for interaction with FBP or KRS. Positive interaction was determined by the blue colonies in yeast two-hybrid analysis.
- (d) The effect of TGF-β on formation of the multi-tRNA synthetase complex. We immunoprecipitated (IP) the complex with antibody to p18 from the TGF-β-treated and untreated 293 cells and determined the coprecipitation of p38 and the complex-forming enzyme arginyl-tRNA synthetase (RRS). We then checked the amounts of p18, p38 and arginyl-tRNA synthetase in the immunodepleted (ID) supernatants, which represent the portion of the respective proteins that were not bound to the multi-tRNA synthetase complex.
- (e) Schematic representation of the TGF-β signal pathway including p38, FBP and c-myc required for alveolar type II cell differentiation in lung. p38 is increased and translocated to the nucleus by TGF-β and mediates ubiquitination of FBP, which is a transcriptional activator of c-myc. The ubiquitinated FBP is then subjected to 26S proteasome-mediated degradation, leading to the downregulation of c-myc that is required for lung differentiation. ARS, aminoacyl-tRNA synthetase.

어 있다는 것을 보여준다. (Fig. 6c)

p38은 유전적 요소 FBP를 결속하기 위해 세포 TGF- β 는 다수의-tRNA 합성효소복합체의 구성에 영향을 미치지 않고, 다수의-tRNA 합성효소복합체의 범위 내에 있지 않는 p38의 일부를 증가시킨다. (Fig. 6d) 이러한 결과들은 p38이 세포질내의 tRNA 합성효소 그리고 세포핵내의 FBP로의 결합이 독자적으로 발생할 수 있음을 의미하는 것이다. p38을 통한 c-myc의 the TGF- β -dependent regulation 그리고 그것들과 다수의-tRNA 합성효소복합체 간의 관계가 Figure 6e에 요약되어 있다. FBP는 FBP²²와 함께 억제된 복합체를 형성하는 FIR(FBP-상호작용 억제체)에 의해 음성적으로 제어될 수 있다.

여기서 우리는 P38이 자신의 ubiquitination으로 FBP의 전환을 관리한다는 것을 명시했다. (Fig. 4) p38은 부가적인 억제효과를 취할수도 있다. 왜냐하면 p38은 c-terminal trans activation domain of FBP (Supplementary fig. 1 online) 결속되어 있기 때문이다. 이 규정된 고리는 c-myc의 변칙적인 발현으로부터 기인된 세포과다증식(hyperproliferation)을 감시하는데 필요할 것이다.

c-myc의 과다표출은 폐를 포함한 다양한 조직과 기관내의 암종과 종종 관련이 있고, 그것의 표출은 폐 분화기(lung differentiation) 동안에 억제되어진다. 그러므로 c-myc 표출의 제어라는 점에 있어서 p38의 역할은 폐의 기능상의 분화와 어찌면 다른 기관들 내에서까지 중요한 위치를 지니게 될 것이다. 이러한 관계로 볼때, 흉성세포들(thymocytes)의 일반적인 분화와 증식이 p38이 결핍된 쥐들 내에서 실질적인 방해를 받는다는 것은 무의미한 사실이다. (Supplementary fig. 3 and Supplementary Methods online)

다른 체계들이 발전하는 가운데 p38기능의 중요성은 한층 더 깊은 연구를 보장한다는 점이다. 이 연구에서, 우리는 음성적인 감시자로서의 p38의 새로운 활동과 TGF- β 에 의해 유인된 경로에서 신호를 보내는 c-myc를 확인하였다.

METHODS

단백질 합성과 세포성장. 세포의 단백질 합성을 비교하기 위해, 우리는 E14.5 쥐의 태아로부터 추출한 1×10^5 섬유아세포들을 여섯 개의 플레이트에 12시간동안 배양한 후에, 무(無)메티오닌 들베코(methionine-free dulbecco)의 수정된 eagle medium (DMEM: Sigma)에 30분 동안 배양했다.

그리고 나서, 세포들을 중간 함유량의 $2\mu\text{Ci ml}$ of (^{35}S)-메티오닌(Amersham)으로 이동시키고, 1시간동안 배양했다. 인산완충염수(PBS)를 이용해 세포들을 세척한 후에, 세포들로부터 단백질을 추출해서, SDS-PAGE로 그것들을 분리한 후, 방사능 사진을 이용해 방사성 메티오닌의 합성을 관찰했다. 사람의 eIF2 α 의 인산화된 형태에 종속된 다중 복제된 토끼들의 항체와 추출되어진 단백질을 면역 불꽃하였다.

세포증식을 관찰하기 위해, 10%의 fetal bovine serum(세포배양을 위한 혈청)을 함유한 DMEM내에 MEFs를 배양했고, 3T3 프로토콜에 준하여 순차적인 관으로 전도시켰다.

간단히 말해, 10-cm 접시들 위에 1×10^5 세포들 평판 배양했고, 3 d 후에 세포들의 수를 측정했다. 그 후에, 다음 배양실험에 같은 수의 세포들을 새로운 매질로 이동시켰다.

우리는 각각 첫 번째 세포와 마지막 세포의 숫자들을 상징하는 n_0 과 n_t 가 존재하는 공식인 $PDL = \log(n_t/n_0) / \log 2$ 를 사용하여 두 배로 늘어난 개체수를 산출하였다.

조직 분석(Tissue analysis). 새로 태어난 강아지로부터 다양한 기관을 추출한 후 그것을 10%의 포름알데히드에 고정시켜 탈수하고 파라핀에 끼워 넣는다. 마이크로톰(Lucia)에 끼워 넣어진 조직을 얇게 자른다. silane이 덮인 슬라이드 위에 묻힌 후초를 제거하고 재수화해서 헤마토크실린과 예오신으로 착색한다. 그리고 현미경(Nikon TE300)으로 관찰한다. PCNA(Zymed) 항체를 가진 얇게 자

큰 조각부분들을 배양하고 PCNA-양성 세포들을 추출하기 위한 biotin-streptavidin-peroxidase 시스템(Zymed)을 기초로 한 Histomouse-SP 키트를 사용했다. 또한 Ki67(Santa Cruz)에 항체를 가진 세포의 조직들을 착색하는 간접적인 면역형광 검사법을 사용했다. HIF-1 α 의 유도를 측정하기 위해, 새로 태어난 쥐의 두뇌를 떼어내서, 단백질을 추출하고 HIF-1 α (한국 서울대학교 J. W. Park가 제공)에 항체를 가진 그것들을 면역 블롯(immunoblot) 했다. 표면 활성제의 생산을 측정하기 위해, 출생 전 혹은 출생 후의 뇌에서 단백질을 추출했고 특별히 표면 활성제 SP-A, SP-B, 그리고 SP-C(Santa Cruz)에 항체를 가진 그것들을 면역 블롯 했다. 또한 밤 동안 4도에서 4% 파라포름알데히드로 떼어낸 뇌들을 고정하고 PBS로 그것을 씻은 후, 4시간 동안 30% 수크로오스에서 배양했다 그리고 최상의 절단 온도(OCT) 합성물에서 -70°C에서 얼리고 얼린 부분을 silane으로 코팅된 슬라이드에 붙인 후, 100% 메탄올에서 3% 과산화수소로 처리했다. 0.1% Tween 20과 1% 탈지유를 포함한 PBS로 막고 면역형광검사법 착색을 위한 SP-B와 SP-C항체를 가지고 반응시켰다. 핵은 프로피디움과산화물로 착색되었다.

표도 두개의 혼성 분석. LexA-human p38용해 단백질을 만들어 인간 치명적인 뇌 cDNA library로부터 B42 용해 단백질이라 표현되는 결합(binding) 단백질을 막기 위해 미끼처럼 사용되었다. cDNA로 인코딩된 전체 길이의 인간 FBP는 D.Levens(US National Institutes of Health)가 제공했다. 대응하는 cDNA²⁶을 포함하는 pLexA 담체의 EcoRI와 XhoI소화물로부터 cDNA로 인코딩된 인간 lysyl-, tryptophanyl-, tyrosyl-그리고 글루타민-tRNA 합성물(각각 KRS, WRS, YRS, 그리고 QRS라 불리는)을 얻었고 pB42의 EcoRI와 XhoI 위치에 그것들을 절찰했다. 5-브롬-4-염소-3-인돌-b-D-갈락토사이드를 포함하는 매개체인 LexA-p38과 함께 그들의 상호작용을 시험했다²⁹.

고유한 도화선을 사용한 PCR에 의해 DNAs로 인코딩된 p38의 다른 삭제된 조각들을 준비하여 LexA 용해 단백질로 표현하고 B42를 녹인 FBP와 KRS를 가지고 그들의 상호작용을 시험했다.

p38-binding protein 의 affinity purification. 먼저 대장균에 GST-p38 fusion protein을 발현시키기 위해 cDNA encoding p38을 pGEX-4T-1(Amersham)의 EcoRI 위치에 결합시키고 GST와 GST-38을 정제하였다. 10mM 염화나트륨, 0.5mM EDTA그리고 0.5mM phenylmethylsulfonyl 플로오르화물을 포함하는 20mM Tris 완충제(pH7.5)에서 polytron 균질기를 사용하여 쥐 뇌를 균질화하고, 1시간 동안 100,000g에 homogenate를 원심 분리시켰다. 글루타민-세파로스에 GST 또는 GST-p38을 고정하고 12시간동안 4°C에서 추출한 뇌 단백질의 10mg을 섞어 침전시키고 원심분리기에 의해 beads를 씻었다. Bead에 고정된 GST 혹은 GST-p38에 묶인 단백질을 추출했고 SDS-PAGE로 분리했다. GST-p38로 특별히 정제된 하나의 단백질 밴드를 잘라내어 6시간동안 37°C에서 트립신(Roche Molecular Biochemicals)으로 그것을 침지했다. Voyager DE time-of-flight mass 분광계(Perceptive Biosystems)를 사용해서 침지된 펩티드 조각들의 질량을 측정했다. 단백질에 맞는 아미노산의 sequence와 triptic peptide의 질량수를 알아보기 위해 Swiss-Prot 데이터베이스를 조사했다. 또한 *in vitro*에서 FBP isoform과 p38의 상호작용도 테스트하였다.

상호면역침전 EcoRI와 XhoI을 가진 pLexA-p38로부터 cDNA로 인코딩된 인간 p38을 떼어놓고 프라스미드로 인코딩된 myc-붙인 p38을 생성하기 위해 사용했다. 프라스미드로 인코딩된 myc-p38과 293세포들 안에 HA-FBP을 세포로 감염시켰다. myc에 항체를 가진 p38을 면역 침전시키고, SDS-PAGE에 의한 침전물을 용해했고

적혈구 용집소에 항체를 가지고 면역 불렀 했다. 내 생적인 p38과 FBP사이의 상호작용을 측정하기 위해, 우리는 그들의 특별한 항체를 가진 293세포들의 단백질 추출물로부터 두 단백질을 상호 면역 침전시켰다. 다중 tRNA 합성복합체의 집합을 측정하기 위해, p18에 항체를 가진 복합체를 면역 침전시켰고 그들의 각각 항체를 가진 침전물의 western blotting에 의해, p38의 상호 면역 침전물과 복합 형태 tRNA 합성물, arginyl-tRNA 합성물을 추출했다.

RT-PCR. *c-myc*의 유전자 단백질 합성에 대한 p38의 효과를 보기 위해, 정량 RT-PCR을 실행했다. 프라스미드로 인코딩 된 FBP, FBP의 우성의 음성 돌연변이(FBP-DN)그리고 p38+FBP의 각각 1 μ g을 293세포들과 함께 세포로 감염시켰다. 그리고 나서 세포로 감염된 세포들로부터 총 RNA를 분리하고 *c-myc* cDNA에 종의 도화선을 가진 RT-PCR을 실행했다. 우리는 또한 TGF- β 2(2ng ml⁻¹)로 처리하지 않거나 처리한 유전자로 인코딩 된 p15와 wild-type의 파이브로베타인과 p38의 결합 MEFs의 유전자 단백질 합성을 분석하기 위해 RT-PCR을 실행했다.

FBP의 degradation과 ubiquitination. FBP의 안정성에 대한 p38의 효과를 측정하기 위해, 프라스미드로 인코딩 된 p38을 가진 293세포들을 세포 감염시켰다. 16시간동안 그것을 배양했고, 처음부터 cycloheximide(10 μ g ml⁻¹)을 가진 치료법에 의한 단백질 합성물을 막았다. 그다음 징후가 보이는 시간에 세포들을 수확하여 단백질을 추출하고 FBP에 대한 항체를 가지고 그것들을 면역 불렀 했다. FBP의 p38-의존적 ubiquitination을 측정하기 위해, 우리는 26S proteasome을 금하기 위해 3시간동안 ALLN의 15 μ g ml⁻¹으로 293세포들을 처리했고 그리고 나서 p38 프라스미드의 indicator에 표시된 양을 가지고 이 세포들을 세포로 감염시켰다. 그런 다음 단백질을 추출했다. FBP

에 대한 항체를 가지고 그것들을 면역 침전시켰고 FBP에 대한 항체와 ubiquitin에 대한 단일 세포에 유래하는 세포 안에서 만들어진 항체(Santa Cruz)를 가지고 침전물을 면역 불렀 했다. 우리는 또한 프라스미드로 인코딩 된 HA-ubiquitin(한국 포스테크에서 S. H. Park으로부터 준 것)과 293세포들 안의 p38의 징후가 보이는 양을 세포로 감염시켰고 16시간동안 배양한 후 RIPA완충제를 가진 세포로 감염된 세포들에서 단백질을 추출했다. FBP항체에 대한 항체를 가진 FBP를 면역 침전시켰고 적혈구 용집소(Santa Cruz)에 대한 항체를 가진 웨스턴 블로팅에 의해 ubiquitinated FBP를 추출했다. p38의 삭제된 조각들은 FBP의 degradation과 ubiquitination안에서 그들의 능력을 위해 테스트 되어졌다.

면역세포화학. p38의 세포질의 분배를 측정하기 위해, A549세포들을 배양했고 6시간동안 TGF- β 2의 2ng ml⁻¹로 처리한 후 4% 파라포름알데히드에서 30분 동안 37°C에서 세포들을 고정하고 PBS로 세척했다. 0.1% bovine serum albumin과 0.5% Triton X-100을 포함하는 PBS 블록 용해제 안에서 4°C에서 1시간 동안 배양했고 4°C에서 밤 동안 p38에 대한 단일 세포에 유래하는 세포 안에서 만들어진 항체를 가지고 반응시켰다. 혼합물을 세척한 후, 90분 동안 fluorescein isothiocyanate와 함께 결합된 쥐에게 항체와 함께 세포들을 배양한 후 propidium iodide로 핵 DNA를 착색했다.

<출처 : *Nature Genetics*, 34(3), 330, 2003>

참고문헌

1. Quevillon, S., Robinson, J.C., Berthonneau, E., Siatecka, M. & Mirande, M. Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and

- characterization of a core protein. *J. Mol. Biol.* 285:183-195 (1999)
2. Kim, J.Y. *et al.* p38 is essential for the assembly and stability of macromolecular tRNA synthetase complex: implications for its physiological significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:7912-7916 (2002)
 3. Duncan, Q. *et al.* A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* 8:465-480 (1994)
 4. Nicolaidis, N.C., Kirzler, K.W. & Vogelstein, B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene. *Genomics* 29:329-334 (1995)
 5. Harding, H.P. *et al.* Regulated translation in initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. cell* 6: 1099-1108 (2000)
 6. Ben-izhak, O. *et al.* Ki67 antigen and PCNA proliferation markers predict survival in anorectal malignant melanoma. *Histopathology* 41:519-525 (2002)
 7. Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64: 993-998 (2002)
 8. Griese, M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur. Respir. J.* 13:1455-1476 (1999)
 9. Weaver, T.E. & Conkright, J.J. Function of surfactant proteins B and C. *Annu. Rev. physiol.* 63:555-578 (2001)
 10. Lawson, P.R. & Reid, K.B. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173:66-78 (2000)
 11. Kallna, M., Mason, R.J. & Shannon, J. M. Surfactant protein C is expressed in alveolar type II cells but not in Clara cells of rat lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 594-600 (1992)
 12. Sugarara, K., Iyama, K., & Morioka, T. Differential expressions of surfactant protein SP-A, SP-B, and SP-C mRNA in rats with streptozotocin-induced diabetes demonstrated by in situ hybridization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11:397-404 (1994)
 13. Wang, X., Avigan, M. & Norgren, R.B. Jr. FUSE-binding protein is developmentally regulated and is highly expressed in mouse and chicken embryonic brain. *Neural. Lett.* 252: 191-194 (1998)
 14. Duncan, R., Collins, I., Tomonaga, T., Zhang, T. & Levens, D. A unique transactivation sequence motif is found in the carboxyl-terminal domain of the single-strand-binding protein FEF. *Mol. Cell. Biol.* 16:2274-2282 (1996)
 15. Davis-Smyth, T., Duncan, R.C., Zheng, T., & Levens, D. The far upstream element-binding proteins comprise an ancient family of single strand DNA - binding transactivators. *J. Biol. Chem.* 271:31679-31687 (1996)
 16. Zhou, M., Wu, X. & Ginsberg, H.N. Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 271:24769-24775 (1996)
 17. Sanford, L.P. *et al.* TGF β 2 knockout

- mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other $TGF\beta$ knockout phenotypes. *Development* 124:2659-2670 (1997)
18. Kaartinen, V. *et al.* Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking $TGF\beta 3$ indicates defects of epithelial- mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 11: 415-421 (1995)
 19. Markowitz, S. *et al.* Inactivation of the type II $TGF-\beta$ receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1335-1333 (1995)
 20. Hannon, G.J. & Beach, D. p15INK4B is a potential effector of $TGF-\beta$ -induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261 (1994)
 21. Hocevar, B.A., Brown, T.L. & Howe, P.H. $TGF-\beta$ -induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J.* 18: 1345-1356 (1999)
 22. Liu, J. *et al.* The FBP interacting repressor targets TFIIF to inhibit activated transcription. *Mol. Cell* 5:331-341 (2000)
 23. Guo, Q.M. *et al.* Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res.* 60:5922-5928 (2000)
 24. Schuhmacher, M. *et al.* The transcriptional program of a human B cell line in response to *Myc*. *Nucleic Acid Res.* 29:397-406 (2001)
 25. Ehrhardt, A. *et al.* Development of pulmonary bronchiolo-alveolar adenocarcinomas in transgenic mice overexpressing murine c-myc and epidermal growth factor in alveolar type II pneumocytes. *Br. J. Cancer* 84:813-818 (2001)
 26. Chinoy, M.R., Chi, X. & Cilley, R.E. Down-regulation of regulatory proteins for differentiation and proliferation in murine fetal hypoplastic lungs. *pediatr. Pulmonol.* 32, 129-141 (2001)
 27. Todaro, G.J. & Green, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. cell Biol.* 17:299-313 (1963)
 28. Kang, J. *et al.* Heat shock protein 90 mediates protein-protein interactions between human aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 275:31682-31688 (2000)
 29. Rho, S.B. *et al.* Genetic dissection of protein- protein interactions in multi-tRNA synthetase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4488-4493 (1999)