

간암세포주에서 지속적인 p16 단백질발현이 유도하는 유전자발현의 변화

전남대학교 ¹생명과학기술학부, ²생물학과, ³화학과, ⁴약학과

오 상 진¹ · 임 지 영² · 정 제 훈³ · 이 용 복⁴

Gene Expression Changes Associated with Sustained p16 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells

Sang-Jin Oh¹, Ji-Young Im², Che-Hun Jung³ and Yong-Bok Lee⁴

¹School of Biological Sciences and Technology, ²Department of Biology, ³Department of Chemistry, ⁴College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background: The normal functions of the cell cycle inhibitor p16INK4a are frequently inactivated in many human cancers. Over 80% of hepatocellular carcinoma (HCC) cases lack a functional p16/Rb pathway. p16/Rb pathway, as well as p53 pathway, is considered as one of key components of tumor suppression. **Methods:** To study the roles of p16INK4a in HCC, a stable cell line expressing exogenous p16 was generated from SNU-449 hepatocellular carcinoma cells lacking endogenous p16, and suppression subtractive hybridization (SSH) was performed in parallel with the control cells. **Results:** 1) SSH identifies fibronectin (FN1), crystallin α B (CRYAB), Rac1, WASP, RhoGEF, and CCT3 as differentially-expressed genes. 2) Among the selected genes, the up-regulation of FN1 and CRYAB was confirmed by Northern blot, RT-PCR and by proteomic methods. **Conclusion:** These genes are likely to be associated with the induction of stress fiber and stabilization of cytoskeleton. Further studies are required to clarify the possible role of p16 in the signal transduction pathway. (**Immune Network 2004;4(4):237-243**)

Key Words: Suppression subtractive hybridization, sustained p16 expression, hepatocellular carcinoma, differential gene expression

서 론

암(cancer)의 발생은 하나의 세포에 있어서 생명현상 유지에 관여하는 다양한 유전자들의 변화로부터 유래한다. 암의 발생기전에는 여러 종류의 암유전자(oncogene)와 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)가 관여하고 있음이 알려져 있다. 정상세포가 암세포로 전환될 때 불활성화 하는 유전자를 종양억제 유전자라 부르는데 여기에는 p53와 Rb (retinoblastoma gene), p16INK4a 등이 포함된다(1-5). Tumor suppressor gene은 세포의 무분별한

증식을 막는 역할을 담당하는데 상황에 따라서 세포주기를 정지시키거나, 세포사멸(apoptosis)을 유도하거나 세포노화를 유도할 수 있다. 간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)은 위암과 폐암과 더불어 우리나라 사람에게 가장 흔한 암 중의 하나이다. 간암조직이나 간암세포주를 사용한 연구에서 p16INK4a의 homozygous deletion, p16INK4a promoter methylation으로 인한 p16 단백질발현 소실이 자주 관찰되는데(6,7), 이것은 결국 p16INK4a가 간세포암의 발생기전에 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. p16INK4a 단백질은 cyclin-dependent kinase (CDK) 4와 6를 특이적으로 억제함으로써 세포주기의 진행을 억제하는 CDK 저해제(CDKI) 역할을 한다(8). 세포주기는 cyclin과 CDK 단백질들 간의 복합체에 의하여 각 단계마다 특이적인 조절이 이루어진다. 정상세포의 G1기에 cyclin D1와 CDK4/6는 결합하여 활성화되며 Rb의 인

책임저자 : 오상진, 전남대학교 생명과학기술학부
☎ 500-757, 광주광역시 북구 용봉동 300
Tel: 062-530-3413, Fax: 062-530-2199
E-mail: sjo@jnu.ac.kr

이 논문은 2002년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

산화를 일으킨다. Rb의 인산화는 Rb가 전사인자 E2F와 결합하지 못하도록 하며, E2F 전사인자는 G1에서 S phase로의 진행을 촉진시켜 증식하도록 한다. 그러나 p16INK4a이 CDK4/6와 결합하면 cyclin D와 CDK4/6가 복합체를 형성하여 활성화하는 것을 막아, Rb의 인산화는 억제되며 E2F와 결합한 상태로 남아있어 S phase로 진행하지 못한다(9,10). 유전자의 결실, 돌연변이, 프로모터의 methylation 등의 원인에 의해서 p16 단백질의 발현이 소실되면 암의 발생이 촉진된다는 사실은 p16INK4a 유전자발현이 암화과정(carcinogenesis)을 막는 강력한 방어막 역할을 하고 있음을 의미한다(1-7). p16INK4a는 Rb를 조절함으로써 세포주기를 조절하는 역할을 하지만, p16 단백질 발현을 통하여 다양한 세포생물학적인 변화도 함께 초래되기 때문에, p16INK4a/Rb pathway가 직접적으로 세포주기를 조절함과 함께 다양한 생물학적 기능을 하는 molecule들의 발현에도 간접적으로 영향을 미칠 가능성을 부인할 수 없다.

그러므로 본 연구에서는 p16INK4a 발현에 의하여 초래되는 변화에 대하여 분자수준의 차이를 연구하고자 계획하였으며, 이러한 목적을 감안하여 실험에 사용할 세포주로 p16 단백질을 발현하지 않으며 정상적인 Rb 기능을 포함하는 SNU-449 간암세포주를 선택하였다. SNU-449 세포에 empty vector (control)와 p16INK4a (sample)를 도입하고 선별을 통하여 안정적인 세포주를 수립하였고, p16 단백질을 발현하는 세포와 발현하지 않는 control 세포사이에 suppression subtractive hybridization (SSH)을 실시하였다. 공통으로 존재하는 housekeeping 유전자를 제거하여 발현에 차이가 나는 유전자를 cloning 하고 DNA sequencing과 homology search를 통하여 유전자를 동정하였다. 유전자발현의 차이를 관찰하기 위하여 Northern blot과 RT-PCR을 실시하여 Fibronectin (FN1)과 crystallin α B (CRYAB)의 증가를 확인하였고, CRYAB의 경우는 단백질 이차원 전기영동과 MALDI-TOF 분석에 의하여 단백질의 증가도 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양. SNU-449 세포주는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받았으며 SNU-449 세포는 p16INK4a와 p53 유전자에 동시에 변이를 가지고 있다(11). p16INK4a 유전자 부분은 homozygous하게 deletion 되어 p16 단백질의 발현이 일어나지 않으며 p53 단백질은 돌연변이형의 p53을 발현한다(12,13). SNU-449의 배양은 ACL4 배지에 5%의 fetal bovine serum을 첨가하여 만든 AR5 배지에 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. 이입을 위하여 SNU-449 세포를 6-well plate에 2×10⁴으로 plating 하고 하루 뒤에 pcDNA-p16과 pcDNA3 (Invitrogen) empty vector를 FuGene6 (Roche Molecular Biochemicals)를 사용하여 이입하였다.

Stable clone들은 G-418 (750 ug/ml)을 포함한 배지에서 2주간 선별하였다.

Immunoblot assay. 안정적인 세포주 clone들의 p16 단백질 발현의 검사를 위하여 배양세포를 lysis buffer [50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1 mM PMSF]에 의하여 단백질을 추출하고 총 단백질량을 Bradford assay (Bio-Rad)를 통하여 결정하여 동량의 단백질 분획을 14% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 이것을 Immobilon (Milipore) PVDF에 transfer하고 blocking buffer (1% skim milk, 0.05% Tween 20 in PBS)에 배양한 후 anti-p16 항원(Santa Cruz Biotechnology)을 반응하였다. 이차 항원으로는 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit IgG를 사용하고 ECL 방법(Amersham)에 의하여 signal을 관찰하였다.

생장곡선과 세포주기측정. 세포는 6-cm plate에 3×10⁴으로 plating 하고 7일째 까지 매일 세포수를 hemacytometer로 측정하였다. 세 번의 독립 실험을 실시하여 그 평균값을 취하였다. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) 분석은 5×10⁵ cell을 10 cm plate에 seed하고 5일 동안 배양한 후 2×10⁶ cell을 각각 수확하여 PBS로 두 번 wash하고 1 ml PBS로 resuspend한 후, 4 ml의 100% ethanol로 4°C에서 1시간 동안 고정하고 -20°C에서 보관하였다. 세포를 원심분리하여 수확하고 PBS로 2번 wash한 다음 0.2 ml의 PBS에 resuspend하고 여기에 0.5 ml의 RNaseA (100 μ g/ml)와 0.2 ml의 propidium iodide (1 mg/ml)를 넣어 4°C에서 30분간 염색하였다. 이렇게 준비된 sample은 FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometry system을 이용하여 측정하였다.

Suppression subtractive hybridization. Total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen)과 RNeasy kit (Qiagen)를 사용하여 추출하고 cDNA hybridization할 때까지 -80°C에서 보관하였다. Total RNA로부터 DNase I (Life Technologies)을 사용하여 chromosomal DNA를 제거하였으며 double-stranded cDNA의 합성은 SMART PCR cDNA synthesis kit (Clontech)를 사용하여 합성하였다. SSH는 SNU-449/pcDNA와 SNU-449/p16 사이에 다르게 발현되는 유전자를 찾기 위하여 CLONTECH PCR-SELECT cDNA subtraction kit (Clontech)를 사용하여 공급자의 manual에 따라서 실험하였다. 요약하면, 합성된 double-stranded cDNA를 RsaI 제한효소로 blunt end로 자르고 SNU-449/p16로부터 합성한 cDNA에 두 종류의 specific-adaptor를 양쪽 말단에 각각 붙이고 SNU-449/pcDNA로부터 합성한 cDNA와 68°C에서 hybridization하여 housekeeping gene들을 제거하였다. Subtraction이 끝난 후 adaptor-specific primer를 이용한 두 번에 걸친 PCR amplification으로 signal을 증폭하였다.

cDNA의 cloning과 sequencing. SSH에 의하여 만들어진

PCR 산물은 PCR2.1 vector (Invitrogen)를 사용하여 sub-cloning 하였다. DNA의 sequencing은 다카라코리아 바이오메디칼(주) 유전자해석센터에 의뢰하여 실시하였고 homology search는 NCBI-BLAST search program을 사용하여 수행하였다.

Northern blot과 RT-PCR. 각 세포로부터 Trizol (Invitrogen Inc.)을 이용하여 total RNA를 추출하였고 동량의 total RNA (20~25 μ g)를 RNA gel에서 전기영동하여 membrane으로 transfer 하였다. cDNA probe는 AlkPhos Direct labeling system (Amersham bioscience)을 이용하여 제조하였으며 blot과 hybridization한 후 detection은 Amersham ECL non-radioactive method를 사용하여 실시하였다.

유전자 발현 확인을 위한 RT-PCR에는 0.1 μ g의 total RNA를 oligo (dT)₁₅와 AMV 역전사효소(Promega)를 함유한 역전사반응액과 혼합하여 총 10 μ l로 만들어 42°C에서 30분간 배양하여 cDNA를 합성하였다. 여기서 1 μ l의 cDNA를 중합연쇄반응액과 혼합하고 Thermal Cycler (Core system)를 이용하여 95°C에서 30초, 52°C에서 30초, 72°C에서 30초(actin의 경우), 95°C에서 30초, 48°C에서 30초, 72°C에서 30초(CRYAB의 경우)로 27회 증폭한 다음 1.5% agarose gel에서 전기영동하였다. Actin과 CRYAB의 증폭을 위해 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다. Actin primer의 경우는, 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'과 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'이며, CRYAB primer는 5'-TTCTTCGGAGAGCACCTGTT-3'과 5'-TTTTCCATGCACCTCAATCA-3'이다.

Proteomic analysis. SNU-449/pcDNA와 SNU-449/p16 세포를 AR5 배지에서 배양하여 2 \times 10⁶ 세포를 각각 수확하고 PBS로 2번 세척하여 분석할 때까지 -70°C에서 보관하였다. 세포로부터 단백질추출은 아세톤 침전법을 사용하였고 이차원전기영동에서 2배 이상의 유의한 발현차이를 보이는 단백질 spot들을 선정하였다. MALDI-TOF mass spectrometry (MS) 분석은 제노마인(주)에 의뢰하여 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)를 사용하여 수행하였고 완료된 mass spectrum으로부터 단백질을 동정하기 위하여 ProFound 검색엔진(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)을 이용하였다.

결 과

유전자 이입에 의한 p16 단백질의 발현과 성장억제 효과. SNU-449세포는 p16INK4a 유전자 부분이 결실되어 p16INK4a 단백질이 발현되지 않으나 정상적인 Rb 기능을 가지며(12), 돌연변이 형태의 p53 유전자를 포함한다(13). 본 연구에서는 SNU-449 세포에 exogenous p16INK4a 발현으로 초래되는 변화를 연구하기 위하여 p16 expression vector (pcDNA-p16)와 empty vector를 이입

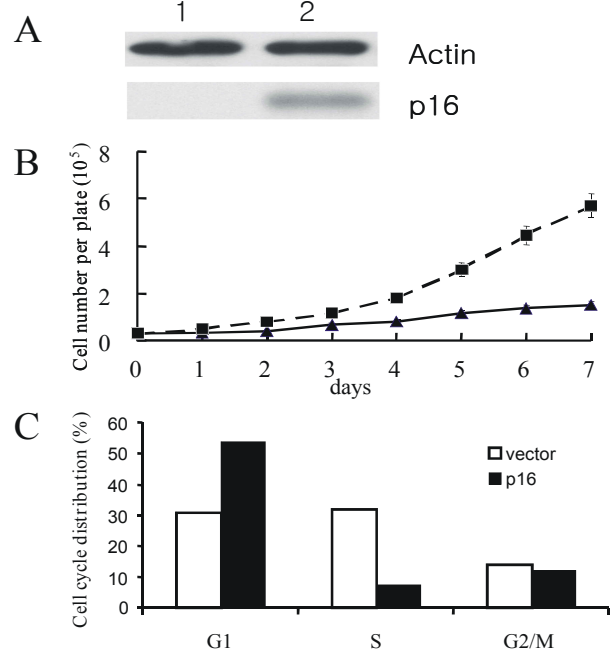


Figure 1. p16 expression in stably transfected SNU-449 and suppression of cell proliferation. (A) Western blot analysis. Cell lines were established by transfection of empty vector (1) and p16 expression vector (2). Cell extracts were collected and equal amounts of proteins were separated on a denaturing 14% polyacrylamide gel, blotted, and probed with anti-p16 antibody (Santa Cruz, C-20). (B) Growth rate comparison of the stably transfected cell lines. Cells were plated at a density of 3 \times 10⁴ per 60-mm plate and cell numbers were determined daily with a hemocytometer. The graph shows cell proliferation of vector control (broken line) and p16 (solid line) cell lines. Standard deviations were obtained by counting cells from three separate experiments. (C) FACS analysis. Percentages of G1, S, and G2/M phase cells were calculated by FACSORT program (Becton Dickinson).

하였으며 G-418 선별을 통하여 stable cell line을 수립하였다. 수립한 stable cell line에서 p16 단백질이 적절히 발현되는지를 확인하기 위하여 polyclonal rabbit anti-human p16 (Santa Cruz)을 사용하여 Western blot을 시행한 결과, empty vector를 이입한 SNU-449/pcDNA에서는 negative result가 나왔으나 SNU-449/p16에서는 positive signal이 확인되어 p16INK4a 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). p16INK4a 유전자 이입에 의한 세포증식억제 효과를 보고자 성장곡선을 측정하였다. 각 세포마다 각각 3 \times 10⁴ 밀도로 60 mm plate에 seed하고 매일 세포의 숫자를 hemocytometer를 이용하여 측정하였는데 그 결과 SNU-449/p16 세포의 경우 대조군과 비교하여 뚜렷하게 성장이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1B). Fig. 1C는 같은 조건으로 5일 배양한 세포의 세포주기를 측정하는 것인데 SNU-449/p16에서는 대조군과 비교하여 G1기에 많은 세포가 증가하였으나 S기에 있는 세포는

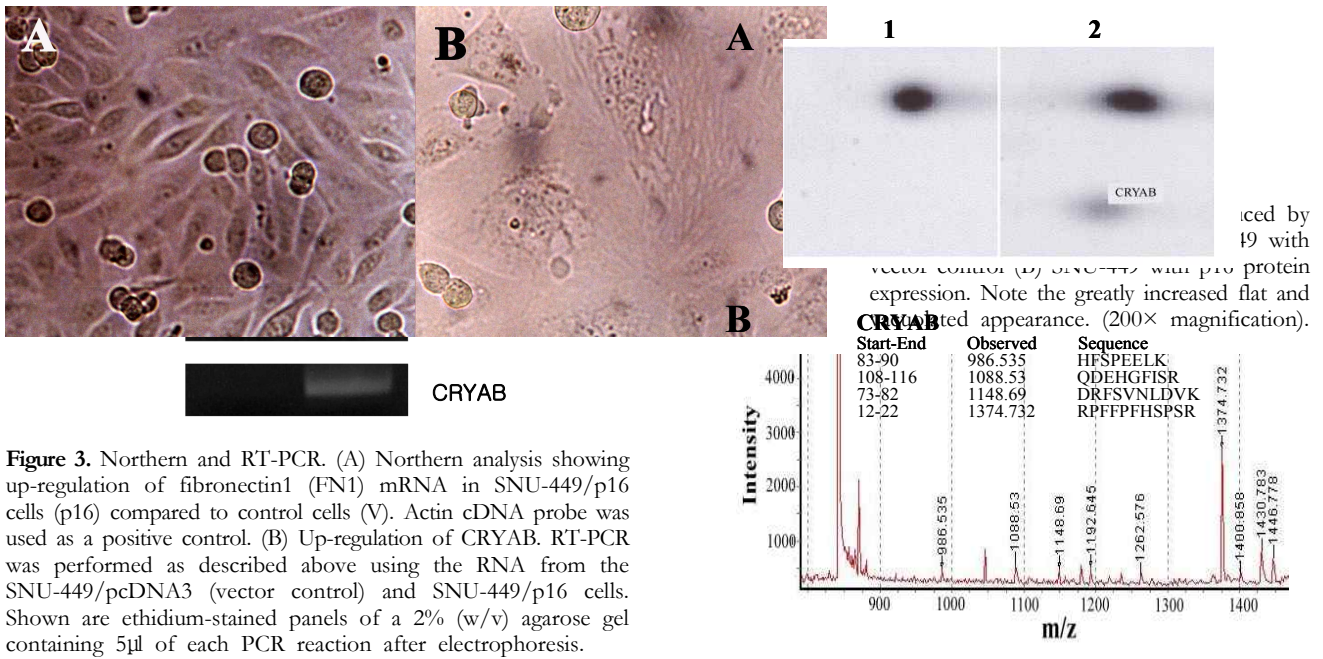


Figure 3. Northern and RT-PCR. (A) Northern analysis showing up-regulation of fibronectin1 (FN1) mRNA in SNU-449/p16 cells (p16) compared to control cells (V). Actin cDNA probe was used as a positive control. (B) Up-regulation of CRYAB. RT-PCR was performed as described above using the RNA from the SNU-449/pcDNA3 (vector control) and SNU-449/p16 cells. Shown are ethidium-stained panels of a 2% (w/v) agarose gel containing 5µl of each PCR reaction after electrophoresis.

31%에서 7%로 감소하였다(Fig. 1C). 세포사멸현상은 두 세포주 모두에서 관찰되지 않았다(data not shown). p16 단백질을 발현하는 세포주와 발현하지 않는 대조군은 세포성장속도의 차이뿐만 아니라 세포모양에 있어서도 차이를 나타냈는데, SNU-449/p16는 배양용기 바닥에 크고 납작하게 붙고 vacuole도 많이 관찰되었으며 세포의 바깥경계선의 관찰이 어려운 반면에, 대조군인 SNU-449/pcDNA는 작고 유선형 세포모양을 보였다(Fig. 2).

Suppression subtractive hybridization을 이용한 cloning 및 sequencing. p16 단백질은 Rb의 인산화를 조절할 수 있기 때문에 Rb를 통한 세포주기조절에 관여한다. p16 단백질발현이 초래하는 유전자발현의 변화를 알아보기 위하여 p16 단백질을 발현하는 세포와 발현하지 않는 세포 사이에 suppression subtractive hybridization (SSH)를 실시하였다. SNU-449/pcDNA와 SNU-449/p16 세포주에서 poly (A)⁺ RNA를 추출하고 reverse transcription하여 cDNA를 제조한 다음 SSH를 실시하여 대조군과 샘플 사이에 공통으로 존재하는 housekeeping 유전자를 제거하였다. Subtraction을 거친 cDNA는 nested PCR amplification을 통하여 증폭하여 PCR2.1 vector (Invitrogen)에 cloning 하였다. 삽입된 cDNA는 DNA sequencing을 통하여 염기서열을 얻고 blast program (NCBI)으로 분석하였다. Table I에서는 상동성 분석을 통하여 확인된 유전자를 제시하고 있는데 fibronectin (14)과 같은 ECM protein, WASP나 Rac1 (15), RhoGEF (16), CCT3 (17)과 같은 cytoskeleton을 조절하는 protein, SPARC (18)와 같이 세포와 ECM간의 interaction을 조절하는 protein 등의 molecular function을 담당하는 유전자들을 포함하고 있다.

Figure 4. Two-dimensional pattern and protein identification of CRYAB. (A) 2DE image showing the up-regulation of CRYAB in SNU-449/p16 (2) as compared to vector control (1). (B) Fingerprint mass spectrum corresponding to observed m/z value for CRYAB.

Up-regulated 유전자의 확인. SSH를 통하여 분리한 유전자는 Northern blot, RT-PCR, 프로테옴 분석실험을 통하여 유전자 발현의 차이를 확인하였다. FN1 cDNA를

Table I. Summary of cDNAs identified by SSH as being induced by sustain

Identified genes	Sequence ID
Fibronectin1	NM 002026
Glycoprotein nmb	NM 001005340
SPARC	AK126525
Rac1	NM 198829
Crystallin, alpha B	NM 001885
WAS protein, member1	NM 003931
RhoGEF	NM 005766
Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (CCT3)	X74801

probe로 SNU-449/p16과 SNU-449/pcDNA에서 추출한 total RNA의 Northern blot을 한 결과, actin은 양쪽모두에서 거의 동일하였으나 FN1은 SNU-449/p16 세포에서 대조군보다 많은 양 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). Crystallin, αB (CRYAB)발현의 확인을 위하여 PCR primer를 합성하여 RT-PCR을 실시하였다. Fig. 3B에서 SNU-449/p16 세포에서 SNU-449/pcDNA 대조군보다 많은 양의 mRNA가 발현되고 있음을 확인할 수 있다. 두 세포주

로부터 추출한 단백질을 이차원전기영동(2-DE)을 실시하고 발현의 차이를 나타내는 spot들을 MALD-TOF MS로 분석한 결과, CRYAB으로 밝혀진 단백질 spot이 SNU-449/p16에서 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

9번 염색체의 9p21에 위치한 INK4a-ARF (CDKN2A) locus는 두개의 종양억제유전자, 즉 p16과 ARF를 코딩하고 있는데, p16과 ARF는 각각 pRb와 p53 pathway의 upstream regulator로서 역할을 한다. Hepatocellular carcinoma (HCC)에서 9p21 locus의 결실 또는 메틸화를 포함한 전체적인 변이율은 78%에 이른다. 그러므로 HCC에 있어서 INK4a-ARF 유전자 산물의 silencing은 cell cycle 조절자로서의 기능에 이상을 초래하기 때문에 가장 빈번한 유전자 결함의 하나이다(1-7). 최근에는 세포노화가 tumor suppressor gene인 p53과 p16INK4a와 연관되어 있으며 세포노화가 암을 막아주는 방어기전으로 작용할 수 있다는 연구 결과들이 발표되었다(19-22). Tumor suppressor 역할을 하는 p16 단백질을 p16-null인 암세포에서 발현시켰을 때 이에 따라 발현의 변화가 초래되는 유전자들이 무엇인가 하는 것을 알아보는 것은 흥미가 있는 일이다. 이와 같은 연구를 하기 위하여, p16 단백질을 발현하지 않는 SNU-449 간암세포주를 p16INK4a 유전자를 이입할 세포주로 선택하여 유전자를 이입하고 선별을 거쳐 stable cell line을 수립하였다(SUN-449/p16). 대조군에는 empty pcDNA3 vector를 이입하여 세포주를 수립하였다(SNU-449/pcDNA). SNU-449/p16는 SNU-449/pcDNA에 비하여 성장속도가 현저하게 감소하였고, flow cytometry 분석을 해보면 SNU-449/p16는 G1기에 있는 세포가 SNU-449/pcDNA에 비하여 30%에서 53%로 증가했고, S기에 있는 세포는 31%에서 7%로 감소했다(Fig. 1C). Table I에서는 SSH 분석을 통해 분리된 유전자를 제시하였는데, 여기에는 fibronectin, CRYAB, RhoGEF, Rac1, WASP, SPARC, CCT3 등의 유전자가 포함되어있다. Northern blot, RT-PCR과 proteome analysis를 통하여 FN1과 CRYAB의 증가를 확인할 수 있었다. Fibronectin (FN)은 고분자량의 당단백질인데 혈액의 혈장에 존재하는 용해성의 plasma FN과 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)에 존재하는 불용성의 cellular FN으로 나눌 수 있다. 용해성의 FN은 세포외 기질에서 세포표면에 있는 특정부분과의 반응을 통하여 침전이 일어나고 multimer를 구성함으로써 불용성의 FN을 형성한다. 세포외 기질에 있는 FN은 fibronectin receptor로 작용하는 integrin family과 세포표면에서 결합하여 세포모양이나 세포이동 등의 여러가지 생리적 기능과 관련이 있다. Zhang *et al* (1997)은 actin microfilament와 fibronectin에 대한 형광항체를 사용한 실험에서 세포배양용기 바닥에 존재하는

fibronectin과 세포내부의 actin microfilament가 배열을 동일한 모양으로 하고 있음을 관찰하였는데, 이것은 세포외부의 fibronectin과 세포내부에 있는 actin microfilament와 연합하여 세포모양의 형성에 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다(23). 세포외 기질의 FN과 integrin과의 결합은 signal transduction pathway를 통하여 Rac, Cdc42를 상승시킴으로써 focal adhesion과 stress fiber 형성을 촉진할 수 있다(24). Fig. 2에서 SNU-449/p16 세포의 모양이 대조군과 달리 cell spreading 현상이 일어남을 볼 수 있는데, 세포의 형태학적 변화에는 plasma membrane receptor와 actin cytoskeleton 형성을 연결하는 signal transduction pathway가 관계하고 있으며, 이러한 것에는 Rho GTPase, focal adhesion kinase (FAK) 등이 있다(25). SSH에서 분리된 유전자중에 Rac, RhoGEF와 같은 small GTPase Rho family에 속하는 유전자가 발견되었는데, 이것은 p16 단백질이 Rho GTPase 신호전달기작의 활성화에 관여함으로써 세포의 형태학적 변화를 초래할 가능성을 암시한다. plasma FN의 경우에는 세포가 apoptosis 되는 것을 억제한다(26).

Fig. 3B의 RT-PCR 결과에서 CRYAB 유전자가 SNU-449/p16에서 발현이 증가한 것을 볼 수 있다. α -crystallin 단백질은 분자량이 20 kDa인 두 종류의 monomer (α A와 α B)가 multimer를 구성하여 800 kDa 가량의 complex 상태로 존재한다. CRYAB 단백질의 생성은 stress에 대한 세포의 반응기전으로 molecular chaperone 기능을 수행한다(27,28). CRYAB 단백질은 눈의 수정체를 구성하는 중요한 단백질이지만 눈이 아닌 non-lens 세포에서도 발현이 일어나고 있다(29). SNU-449/pcDNA와 SNU-449/p16의 이차원전기영동 image 비교에서, SNU-449/pcDNA에서는 CRYAB 단백질이 거의 보이지 않았지만, SNU-449/p16에서는 증가한 CRYAB 단백질의 spot을 명확히 볼 수 있다(Fig. 4A). CRYAB 단백질은 stress가 존재하는 상황에서 actin이나 tubulin 등의 cytoskeletal element들과 결합하여 molecular chaperone 역할을 함으로써 세포골격의 안정화를 돕는다(30-32). Iwaki 등 (1994)은 CRYAB의 antisense cDNA를 사용하여 CRYAB의 발현을 감소시켰을 때 microfilament network의 파괴를 관찰할 수 있었는데 이것은 CRYAB 단백질이 actin cytoskeleton의 안정화하는데 기여하고 있음을 보여주는 것이다(33). CRYAB 단백질은 stress들(온도, 삼투압, oxidative stress)에 대하여 세포의 저항성을 증가시키며 apoptosis를 억제하는 역할도 한다(34). 발현이 증가한 CRYAB 단백질이 actin이나 intermediate filament와 결합하여 세포골격의 안정화에 기여하는 것으로 추정되는데, SSH에서 분리된 유전자중에 actin과 tubulin의 folding을 돕는 WASP (15)와 CCT3 (17)도 morphological change와 관련이 있을 것으로 생각된다. FN과 CRYAB은 노화의 진행함에 따라 또는

노화와 관련된 질병에서 축적이 관찰된다는 점에서 공통점을 찾을 수 있다(35-38). 최근의 연구에 의하면 human cell이 세포노화 상태로 들어가기 위해서는 세포주기의 조절자인 p16/Rb pathway와 genomic stability를 유지하는데 필요한 p53 pathway를 함께 필요로 한다(22). 환경적이거나 intrinsic stress들은 p16/Rb pathway를 유도하며 telomere shortening 포함한 DNA damage에 관한 stress는 p53 pathway의 유도에 관여한다고 추정하고 있다. p53과 p16/Rb pathway의 어느 한쪽, 또는 양쪽 모두에 문제가 생긴다면 무분별한 세포주기의 진행으로 말미암아 암을 유발할 가능성이 훨씬 높아지게 된다.

p16 tumor suppressor가 Rb를 조절함으로써 무분별한 세포주기로의 진행을 억제하여 암의 발생을 막을 수 있다는 점은 잘 알려져 있지만, p16와 세포생리학적 변화를 유도할 수 있는 signal transduction pathway와의 상호 연관성에 관하여는 더 많은 연구를 필요로 한다.

참 고 문 헌

- Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA: Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368;753-756, 1994
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitjian SV, Stockert E, Day R, Johnson S, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264;436-440, 1994
- Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D: Frequency of homologous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 11;210-212, 1995
- Liggett WJ, Sidransky D: Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* 16;1197-1206, 1998
- Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA: Loss of p16^{Ink4a} with retention of p19^{Arf} predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413;86-91, 2001
- Liew CT, Li HM, Lo KW, Leow CK, Chan JY, Hin LY, Lau WY, Lai PB, Lim BK, Huang J, Leung WT, Wu S, Lee JC: High frequency of p16INK4a gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 18;789-795, 1999
- Matsuda Y, Ichida T, Matsuzawa J, Sugimura K, Asakura H: p16 (INK4) is inactivated by extensive CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 116;394-400, 1999
- Serrano M, Hannon GJ, Beach DA: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366;704-707, 1993
- Ruas M, Peters G: The p16^{Ink4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378;115-117, 1998
- Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13;1501-1512, 1999
- Park JG, Lee JH, Kang MS, Park KJ, Jeon YM, Lee HJ, Kwon HS, Park HS, Yeo KS, Lee KU, Kim ST, Chung JK, Hwang YJ, Lee HS, Kim CY, Lee YI, Chen TR, Hay RJ, Song SY, Kim WH, Kim CW: Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 62;276-282, 1995
- Park TK, Jung YJ: p16^{Ink4a} overexpression inhibited growth of HCC cell lines through either pRB dependent or independent pathway. *J Basic Sci* 24;33-40, 1999
- Kang MS, Lee HJ, Lee JH, Ku JL, Lee KP, Kelly MJ, Won YJ, Kim ST, Park JG: Mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma cell lines with HBX DNA. *Int J Cancer* 67;898-902, 1996
- Boyer B, Kern P, Fourtainer A, Labat-Robert P: Age-dependent variations of the biosyntheses of fibronectin and fibrous collagens in mouse skin. *Exp Gerontol* 26;375-383, 1991
- Miki H, Suetsugu S, Takenawa T: WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 17;6932-6941, 1998
- Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS: Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation. *JBC* 277;12463-12473, 2002
- Frydman J, Nimmesgern E, Erdjument-Bromage H, Wall JS, Tempst P, Hartl FU: Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J* 11;4767-4778, 1992
- Puolakkainen PA, Brekken RA, Muneer S, Sage EH: Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis. *Mol Cancer Res* 2;215-224, 2004
- McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Peters G: Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 8;351-354, 1998
- Dai CY, Enders GH: p16^{Ink4a} can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19;1613-1622, 2000
- Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, Cheong SC, Beach D, DePinho RA, Bennett DC: p16^{Ink4a} in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 94;446-454, 2002
- Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, Lee S, Baranov E, Hoffman RM, Lowe SW: A senescence program controlled by p53 and p16^{Ink4a} contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109;335-346, 2002
- Zhang Q, Magnusson MK, Mosher DF: Lysophosphatidic acid and microtubule-destablizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction. *Mol Biol Cell* 8;1415-1425, 1997
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA: Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18;578-585, 1999
- Nobes CD, Hall A: Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81;53-62, 1995
- Kwon AH, Qiu Z, Nagahama H, Kaibori M, Kamiyama Y: Fibronectin suppresses apoptosis and protects mice from endotoxic shock. *Trans Proc* 36;2432-2435, 2004
- Hendrick J, Hartl F: Molecular chaperone functions of heat-

- shock proteins. *Ann Rev Biochem* 62;349-384, 1994
28. Muchowski PJ, Bassik JA, Lubsen NH, Clark JI: Human α B-crystallin: small heat shock protein and molecular chaperone. *J Biol Chem* 272;2578-2582, 1997
 29. Bhat SP, Nagineni CN: Alpha B subunit of lens specific protein alpha-crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 158;319-325, 1989
 30. Wang K, Spector A: α -crystallin stabilizes actin filaments and prevents cytochalasin-induced depolymerization in a phosphorylation-dependent manner. *Eur J Biochem* 242;56-66, 1996
 31. Djabali K, De Nechaud B, Landon F, Portier MM: α B-crystallin interacts with intermediate filaments in response to stress. *J Cell Sci* 110;2759-2769, 1997
 32. Quinlan R: Cytoskeletal competence requires protein chaperones. *Prog Mol Subcell Biol* 28;219-233, 2002
 33. Iwaki T, Iwaki A, Tateishi J, Goldman JE: Sense and antisense modification of glial α B-crystallin production results in alterations of stress fiber formation and thermoresistance. *J Cell Biol* 125;1385-1393, 1994
 34. Kamradt MC, Chen F, Cryns VL: The small heat shock protein α B-crystallin negatively regulates cytochrome c- and caspase-8-dependent activation of caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem* 276;16059-16063, 2001
 35. Shevitz J, Jenkins CS, Hatcher VB: Fibronectin synthesis and degradation in human fibroblasts with aging. *Mech Ageing Dev* 35;221-232, 1986
 36. Rasoamanantena P, Thweatt R, Labat-Robert J, Goldstein S: Altered regulation of fibronectin gene expression in Werner syndrome fibroblasts. *Exp Cell Res* 213;247-259, 1994
 37. Iwaki T, Wisniewski T, Akiko I, Corbin E, Tomokane N, Tateishi J, Goldman JE: Accumulation of alpha B-crystallin in central nervous system glia and neurons in pathological conditions. *Am J Pathol* 140;345-356, 1992
 38. Lowe J, McDermott H, Pike I, Speudlove I, Landon M, Mayer R: Alpha B-crystallin expression in non-lenticular tissues and selective presence in ubiquitinated inclusion bodies in human disease. *J Pathol* 166;61-68, 1992