

## Replicative Senescence of Periodontal Fibroblasts Induces the Changes in Gene Expression Pattern

Tac Ghee Yi<sup>1</sup>, Ji Hae Jun<sup>1</sup>, Byung-Moo Min<sup>2</sup>, Moonkyu Kim<sup>3</sup>, Gwan-Shik Kim<sup>1</sup>, and Jeong-Hwa Baek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell and Developmental Biology, <sup>2</sup>Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University;

<sup>3</sup>Department of Immunology, Kyungpook National University School of Medicine

(Received February 22, 2007 ; Accepted March 8, 2007)

Tooth loss in elderly is mainly caused by alveolar bone loss via severe periodontitis. Although the severity of periodontitis is known to be affected by age, the aging process or the genetic changes during the aging of periodontal tissue cells are not well characterized. In this study, we investigated the effect of in vitro aging on the change of gene expression pattern in periodontal fibroblasts. Gingival fibroblasts (GF) and periodontal ligament fibroblasts (PDL) were obtained from two young patients and replicative senescence was induced by sequential subcultivation. When more than 90% cells were positively stained with senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, those cells were regarded as aged cells. In aged GF and PDL, the level of phosphorylated retinoblastoma (RB) and p16<sup>INK4A</sup> protein was significantly decreased and increased, respectively. However, the protein level of p53 and p21, well known senescence-inducing genes, did not increase in aged GF and PDL. Although p27<sup>Kip1</sup> and p15<sup>INK4B</sup>, another cyclin-dependent kinase inhibitors, were reported to be involved in replicative senescence of human cells, they were decreased in aged GF and PDL. Because senescent cells showed flattened and enlarged cell shape and are known to have increased focal adhesion, we examined the protein level of several integrins. Aged GF and PDL showed increased protein level of integrin  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, and  $\beta$ 1. When the gene expression profiles of actively proliferating young cells and aged cells were compared by cDNA microarray of 3,063 genes and were confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction, 7 genes and 15 genes were significantly and commonly increased and decreased,

respectively, in aged GF and PDL. Among them, included are the genes that were known to be involved in the regulation of cell cycle, gene transcription, or integrin signaling. The change of gene expression pattern in GF and PDL was minimally similar to that of oral keratinocyte. These results suggest that p16<sup>INK4A</sup>/RB might be involved in replicative senescence of periodontal fibroblasts and the change of gene expression profile during aging process is cell type specific.

**Keywords:** replicative senescence, periodontal ligament fibroblasts, gingival fibroblasts, p16<sup>INK4A</sup>, retinoblastoma, integrin

### 서 론

노인의 치아상실의 주요한 원인은 세균감염에 따른 치주염으로 인한 치조골 소실이다. 노화와 치주염간의 관계에 대해 몇몇 보고들은 연령이 증가할수록 치주조직의 파괴성도가 증가하며(Haffajee 등, 1991; Papapanou 등, 1991), 노화된 치주인대섬유모세포는 세포성장이 감소하고, type I collagen, osteocalcin 생성, 알칼리성인산분해효소 활성 등이 감소된다고 하여(Goseki 등, 1996; Nishimura 등, 1997; Sawa 등, 2000), 치주조직의 노화가 노인에서 치주염 발생, 진행에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하고 있다. 노화된 치주인대섬유모세포에서 interleukin-8, RANTES 같은 chemokine과 Gram 양성 및 음성 세균에 대한 선천면역반응 유발에 관여하는 Toll-like receptor 2와 4의 발현 정도가 달라지고, lipopolysaccharide 처리에 따른 세포 염증반응이 세포 노화 정도에 따라 달라짐이 보고된 바 있으나(Jun 등, 2005), 노화의 진행 시 치주조직 세포에서 유전

\*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Cell and Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea, Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193, e-mail: baekjh@snu.ac.kr

자 발현에 어떤 변화가 일어나며 이러한 유전자 발현 변화가 노화된 치주조직에서 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직 미비한 상태이다.

대부분의 일차 배양 세포는 배양을 계속하면 세포 분열 속도가 감소하고 결국에는 세포 분열이 멈추며 세포 복제노화(replicative senescence) 상태에 도달한다. 복제노화가 진행된 세포는 세포주기 중 G0/G1기에서 멈추어 외부에서 세포 분열 자극을 가해도 더 이상 세포분열이 진행되지 않으며, 세포의 크기가 커지며 납작해지고, 특징적으로 senescence associated  $\beta$ -galactosidase(SA- $\beta$ -gal) 활성이 높아지는 특징을 보인다(Chen, 2000). 사람 세포의 복제노화 진행에 관여하는 것으로 알려진 유전자들로 종양억제유전자가 잘 알려져 있으며 이 중 p53/p21<sup>WAF1</sup>(p21) 경로와 p16<sup>INK4A</sup>(p16)/retinoblastoma(RB)경로가 다양한 세포에서 복제노화를 유도하는 것으로 보고된 바 있다(Duncan 등, 2000; Stein 등, 1999). 복제노화 유도 및 유지에서 이들 경로의 상대적 중요성 및 또 다른 유전자의 역할에 대해서는 세포의 종류와 세포노화 유도 방법에 따라 다양하게 보고되고 있어 치주조직 실험유모세포에서 어느 유전자가 복제노화에 관련되는 지에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

이러한 세포 복제노화가 실제로 생체 내에서 일어나는지에 대해 아직 이견이 있지만, 세포 복제노화에 도달하는데 걸리는 세포분열 횟수는 조직 공여자의 연령에 반비례하므로 시험관내 세포노화는 생체내 노화를 반영한다는 보고와(Hayflick, 1965), 변이된 telomerase로 인해 염색체(telomere)가 짧아진 생쥐를 이용하여 부분 간 절제를 시행하면 간 재생이 제한적으로만 일어나고 조직 노화가 진행되며(Satyanarayana 등, 2003), 림프종을 가진 생쥐에서 bcl-2를 과발현시켜 세포자멸사(apoptosis)를 차단한 후 항암제를 투여하면 림프종 세포의 노화가 진행된다는 보고는(Schmitt 등, 2002) 생체 내에서도 세포 노화가 일어나는 것을 시사하여 시험관내 복제노화 현상이 생체내 노화를 어느 정도 반영하는 실험 모델이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 치주조직이 건강한 환자에서 얻은 치주인대삼유모세포와 치은삼유모세포를 시험관내에서 지속적인 계대배양을 통해 복제노화된 세포를 얻고, 세포분열이 활발히 일어나는 단계의 세포와 복제노화된 세포에서 유전자 발현을 비교하여 노화된 세포에서 발현이 변화되는 유전자의 종류를 확인하며, 기존에 알려진 복제노화 유도 경로 중 어느 경로가 중요한 역할을 하는지 알아보고자 하였다.

bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, SUPERScript™ First-Strand Synthesis System 등은 Invitrogen life technologies(Carlsbad, CA, 미국)에서, easy-BLUE™는 iNtRON(서울, 대한민국)에서 구입하였다. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 사용된 primer와 TaKaRa Taq™은 TaKaRa (Otsu, 일본)에서에서 구입하였다. Western blot 분석을 위해 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 항체는 Oncogene Research Products(Cambridge, MA, 미국)에서 구입하였으며, RB에 대한 항체, cyclin dependant kinase inhibitors(CDKIs)인 p16, p21, p27<sup>kip1</sup>(p27)에 대한 항체와 integrin  $\beta$ 1,  $\beta$ 3,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ v에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, 미국)에서 구입하였고, CDKI p53 및 p15<sup>INK4B</sup>(p15)에 대한 항체와 vimentin에 대한 항체는 Calbiochem-Novobiochem (San Diego, CA, 미국)에서, 그리고 caveolin에 대한 항체는 BD Biosciences Pharmingen(San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase가 융합된 이차항체와 Supersignal West-pico는 Pierce(Rockford, IL, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

#### 치주인대삼유모세포 및 치은삼유모세포의 배양

교정치료를 위해 서울대병원에 내원한 치주조직이 건강한 10대 후반 환자 2명에서 받거된 제1소구치를 항생제가 함유된 DMEM에 3회 세척한 후, 치아에 부착된 치은조직을 분리하고 또한 치근의 중간 1/3 부위를 끊어 치주인대조직을 채취하였다. 치은조직과 치주인대 조직을 각각의 세포배양접시에 부착시켜 실험유모세포가 자라나도록 20% FBS가 함유된 DMEM에서 배양하여 치은삼유모세포와 치주인대삼유모세포를 준비하고, 각 환자에서 얻어진 치은삼유모세포 및 치주인대삼유모세포를 각기 GF-I, PDL-I 과 GF-II, PDL-II로 명명하였다. 단일세포 층이 형성된 후 세포를 분리하여 10% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하여 배양을 시작하였으며 이를 P1로 칭하였다. 그 후 노화된 세포를 얻기 위해 매 6일마다 1:3의 비율로 계대배양을 시행하였으며, 계대배양의 횟수가 증가함에 따라 세포의 성장속도가 둔화되었기 때문에 6일 간의 배양기간 동안 세포가 배양접시에 다 차지 못하는 상태가 3회 반복된 후부터는 매 12일 마다 계대배양을 시행하였다. 노화된 세포를 확인하기 위해 Dimri 등(1995)의 방법에 따라 SA- $\beta$ -gal 염색을 시행하였으며, 90% 이상의 세포가 SA- $\beta$ -gal 염색에 양성이고 세포 크기가 커진 상태를 노화된 세포군으로 결정하였다(Kim 등, 2002).

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

Dulbecco's modified essential medium(DMEM), fetal

### cDNA microarray 분석

노화관련 유전자를 검색하기 위해 세포분열이 왕성한 P4의 젊은 세포와 노화가 진행된 세포(PDL-I P17, PDL-II P28, GF-I P22, GF-II P30)에서 total RNA를 분리

하여 cDNA microarray 분석을 시행하였다. 사용한 cDNA array는 사람의 진피유두에서 얻어진 3,063 cDNA로 제작된 것으로 각 array마다  $\beta$ -actin과 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) cDNA를 이용하여 signal intensity를 정상화하였으며, Baek 등(2003)에 기술된 바와 같이 cDNA microarray hybridization, image analysis 및 data processing을 시행하였다.

#### Total RNA 추출 및 RT-PCR

cDNA microarray 결과 4종의 섬유모세포 중 3종 이상에서 동일하게 젊은 세포에 비해 노화된 세포에서 발현이 2배 이상 또는 1/2 이하로 감소된 유전자를 선별하고 그 결과를 RT-PCR로 확인하였다. 이를 위해 세포분열이 왕성한 시기의 세포와 세포노화가 이루어진 시기의 세포를 배양한 후 easy-BLUE<sup>TM</sup> RNA Extraction Reagent를 이용하여 total RNA를 분리하고, SUPERS<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System을 이용하여 total RNA 1  $\mu$ g으로부터 cDNA를 합성한 후 TaKaRa Taq<sup>TM</sup> polymerase를 이용하여 Table 1에 제시된 primer를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 관찰하였으며 image analyzer를 이용하여 band density 분석을 시행하였다.

#### Western blot 분석

세포분열이 왕성한 시기의 세포와 세포노화가 이루어진 시기의 passage 별 세포를 배양한 후 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 2회 세척하고 PBS-TDS lysis buffer(0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2; 0.9% NaCl; 1% Triton x-100; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% sodium dodecyl sulfate; 0.2% sodium azide; 0.04  $\mu$ g/ml sodium fluoride)에서 lysis시켰다. 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 supernatant를 모아서 BCA kit을 이용해서 단백질 농도를 측정하였다. 20  $\mu$ g의 단백질 샘플을 10-14% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 전기영동하고, PVDF membrane에 electrotransfer하였다. 상온에서 blocking buffer(5% w/v nonfat dry milk in TBST; 1×TBS/ 0.1% Tween-20)에서 60분간 blocking한 후 TBST에서 5분씩 6회 반복세척하고 1:1,000으로 희석한 일차항체와 4°C에서 반응시켰다. 다시 TBST에 5분씩 6회 세척을 한 후 1:5,000으로 희석된 horseradish peroxidase 융합된 이차항체와 상온에서 2시간 반응시켰다. TBST로 세척한 후 Supersignal West-pico를 넣어 반응시킨 후 전산화영상장치인 Las plus (Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 산물을 확인하였다.

**Table 1.** Primer sequences and PCR product size Gene.

Gene (product size)	Primer sequence	Gene (product size)	Primer sequence
KIAA0738 (806bp)	F: 5'-GCAGAGGTGCTATGCTTTCC-3' R: 5'-TCCTGCACTGACTCCAGATG-3'	SFRS3 (800bp)	F: 5'-GAGAGAGITGGITGGTGTG-3' R: 5'-CTTGGTATTACATGCCCTCGT-3'
Col8A1 (516bp)	F: 5'-CCAGCGAGCCTCTCTCCCTGATCTT-3' R: 5'-GGCGCCGGTTGAATTTCCCTT-3'	RBBP7 (985bp)	F: 5'-TGGGAGGCCGCGGGTTGAAAA-3' R: 5'-AATGACTCGTGCAGCAGGTGCCAG-3'
TXNIP (609bp)	F: 5'-GCTTAGTGTAACCAGCGGCG-3' R: 5'-CAAGAAAAGCCTTACCCAG-3'	DKC1 (808bp)	F: 5'-CACGCGGTGCAGGGTAACAT-3' R: 5'-GCATTGTCACCATGTGGTCC-3'
SAR1 (600bp)	F: 5'-CTAGTTCTAGATCCGGCGAG-3' R: 5'-CCTGTGGTCTGTCCATAAAG-3'	DC50 (277bp)	F: 5'-CTGCGGCGCTGCGTAGAAGTAT-3' R: 5'-GTTTGGGAAGTTTTGGCCT-3'
CCND1 (600bp)	F: 5'-CACACGGACTACAGGGGAGT-3' R: 5'-AGTTGTGGTGTAGATGCAC-3'	ggl1 (778bp)	F: 5'-CGCCCCGAGAGCTTTTTGAAA-3' R: 5'-TGGATGCCACTGGACACCAT-3'
CD81 (503bp)	F: 5'-AGTGGAGGGCTGCACCAAGT-3' R: 5'-GCACTGAGGTGGTCAAAGCA-3'	NID (842bp)	F: 5'-GGTTACATCCCCGCCTTCCT-3' R: 5'-CCCTGCTGCCAGAGTTACT-3'
GABARAP1 (817bp)	F: 5'-ACGCGCCACCCAGCTGTTTT-3' R: 5'-GGGCCGAGGAAGCAGCAAAA-3'	PTMA (503bp)	F: 5'-CCCCACTGGCTGCTCTGAAA-3' R: 5'-CGTCGGTCTTCTGCTTCTTG-3'
P311 (481bp)	F: 5'-TGTCCCAAAGGAAGTGAACC-3' R: 5'-AGCCTCTGCAAGAAGCAGTC-3'	Asn5 (808bp)	F: 5'-CCTTTCTGTCTGTTCCCT-3' R: 5'-GCTCAATTCCTCCTTTGTCA-3'
HNRPA1 (814bp)	F: 5'-AGAGGGCGAAGGTAGGCTGGCAGAT-3' R: 5'-ATATCCACCACCACCGGCTG-3'	HMG2 (514bp)	F: 5'-CCGTGGCCTAGCTCGTCAAGTT-3' R: 5'-GGGCGATGTTTACAGCAAAA-3'
MTHFD1 (603bp)	F: 5'-GCGGTCTATGGCTGCGACTT-3' R: 5'-GCCACAACCACATTCTTCCC-3'	PRC1 (801bp)	F: 5'-GTTTGGGGTGGTTGTTGCT-3' R: 5'-AGTACGCAGCCCCCTCACACA-3'
HAT1 (728bp)	F: 5'-GCGGTGATCGTAGCTCGGAAA-3' R: 5'-GGCCGGGTTTTGTCTGGGTA-3'	$\beta$ -actin (712bp)	F: 5'-CGGGAATCGTGCCTGACAT-3' R: 5'-GAACTTTGGGGGATGCTCGC-3'
HSPD1 (800bp)	F: 5'-CGCAGAAATGCTTCGGTTAC-3' R: 5'-TGGCAATTTCAAGAGCAGGT-3'	GAPDH (567bp)	F: 5'-ATGGGTGTGAACCATGAGAAG-3' R: 5'-GCTGTAGCCAAATTCGTTGTC-3'

## 실험 결과

치주인대섬유모세포와 치은섬유모세포를 지속적으로 매 6일마다 1:3의 비율로 계대배양하였을 때 계대배양 횟수가 증가할수록 세포성장 속도가 둔화되었으며, GF-I 및 PDL-I의 경우에는 그 정도가 더 빨리 나타났다. 계대배양 후반부에는 매 12일마다 계대배양을 시행했으며 계대배양을 진행할수록 세포들이 더 이상 confluent해지지 않았다. 세포 분열이 거의 관찰되지 않는 계대의 세포들에 SA- $\beta$ -gal염색을 시행한 결과 90% 이상의 세포들이 양성으로 염색되었으며, 세포크기도 커지는 노화된 세포의 특징적 양상을 보여주었다(Fig. 1). 이러한 결과를 바탕으로 세포분열이 왕성한 P4~5를 젊은 세포로, 세포분열이 더 이상 관찰되지 않고 SA- $\beta$ -gal염색에서 90% 이상 양성을 보여주는 계대의 세포(PDL-I P 17~18, PDL-II P 27~28, GF-I P 22~23, GF-II P 28~30)의 세포를 노화된 세포로 이용하여 다음 실험을 진행하였다.

기존의 보고에서 세포의 복제노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 p53/p21 경로와 p16/RB경로가 잘 알려져 있으나 이 두 경로 중 어느 것이 중요한 역할을 하는지는 세포의 종류에 따라서 서로 다르게 보고되었으므로, 치주인대섬유모세포와 치은섬유모세포의 노화에서는 어느 경로가 더 중요한지 알아보고자 이들 분자의 단백질 수준을 비교하여 보았다. 또한 이들 외에도 또 다른 CDKI인 p15와 p27, 그리고 세포 분열의 표지인자 중 하나인 PCNA의 단백질 수준을 western blot 분석으로 확인하였다. 그 결과 잘 알려진 대로 PCNA는 노화된 세포에서 그 양이 현격히 감소되었으며, RB의 경우 인산화된 RB 단백질은 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에서 그 양이 현격히 감소되었고, GF-II와 PDL-II의 경우 인산화되지 않은 RB의 양도 노화된 세포에서 감소되었다(Fig. 1A). p53 단백질은 노화된 세포에서 소량 증가되었으며,

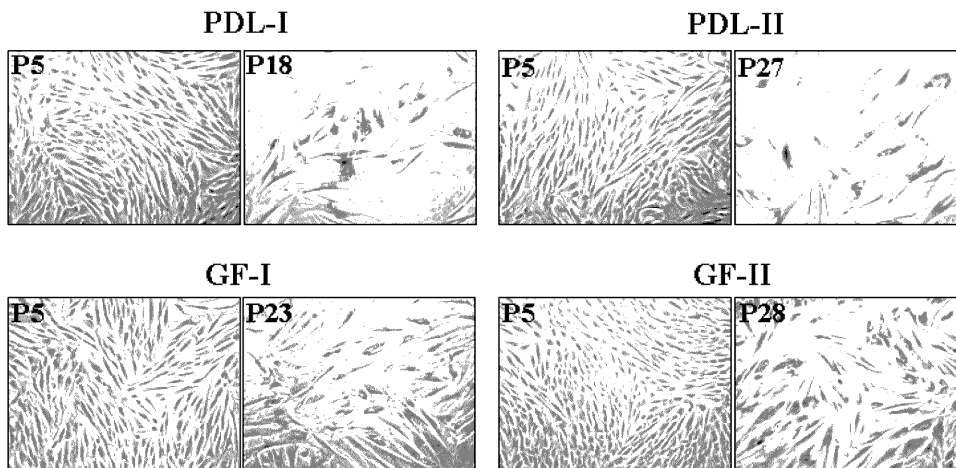
CDKI 중에서는 p16만이 노화된 세포에서 증가가 관찰되었고 p15, p21, p27은 노화된 세포에서 오히려 그 양이 감소하였고 그 감소정도는 p15에서 가장 뚜렷했다(Fig. 1A).

노화된 사람 섬유모세포는 특징적으로 세포가 커지며, actin stress fiber같은 cytoskeleton이 발달하고 focal adhesion이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이런 세포 모양 변화에 caveolin1의 증가가 관여한다는 보고가 있었으므로(Cho 등, 2004), 치주인대섬유모세포와 치은섬유모세포에서도 이런 현상이 나타나는지를 관찰하고자 intermediate filament인 vimentin과 caveolin1의 단백질 수준을 확인하였다. Fig. 1B에서와 같이 노화된 세포에서 vimentin과 caveolin-1의 증가가 뚜렷이 관찰되었다. Focal adhesion 증가와 관련하여 세포부착단백질인 integrin의 양적 변화가 일어나는지 확인하고자 integrin  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ v 및  $\beta$ 1,  $\beta$ 3의 발현정도를 확인하였다. Integrin  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5, 및  $\beta$ 3에서는 일관된 변화가 나타나지 않은 반면, integrin  $\alpha$ 2,  $\alpha$ v와  $\beta$ 1은 노화된 세포에서 발현이 증가되는 것으로 나타났다.

치주인대섬유모세포와 치은섬유모세포의 cDNA array 분석 결과 3종 이상의 노화된 세포에서 반복적으로 2배 이상 증가 또는 감소한 유전자는 총 57개였으며, 이를 RT-PCR로 확인한 결과 노화된 세포에서 발현이 증가된 유전자 7개, 발현이 감소된 유전자 15개가 확인되었다(Table 2, Fig. 3).

## 고 찰

세포를 시험관내에서 계속 계대배양하면 어느 정도의 분열이 지속된 후 복제노화 현상을 나타낸다. 이러한 모델이 생체 내에서 진행되는 노화과정과 완전히 일치하지는 않지만, 어느 정도는 비슷한 과정을 겪을 것으로 만

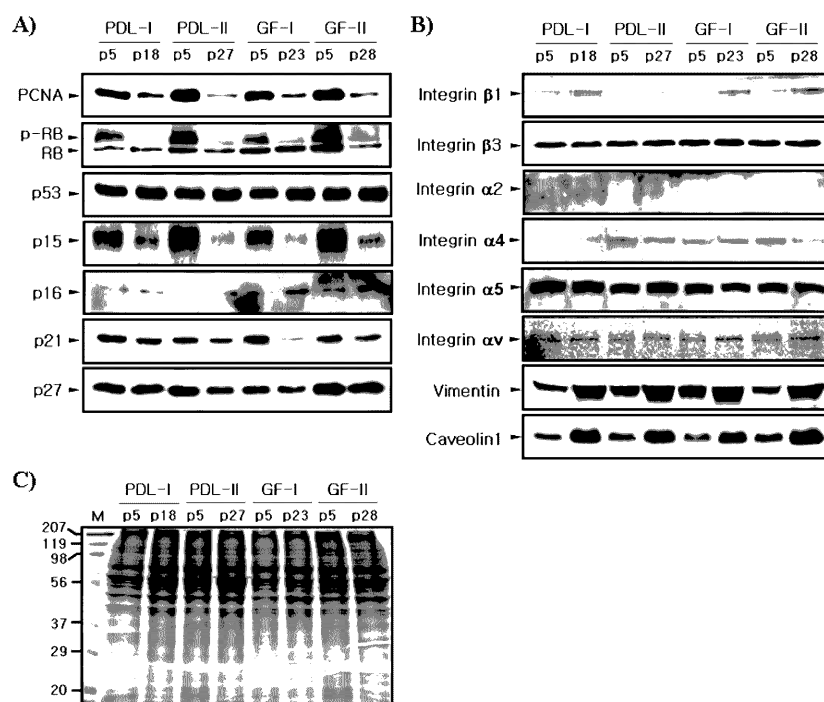


**Fig. 1.** Senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining. Senescent cells were larger than the actively proliferating cell and positively stained with SA- $\beta$ -gal. Numbers in figure represent passage number of cells. (X100)

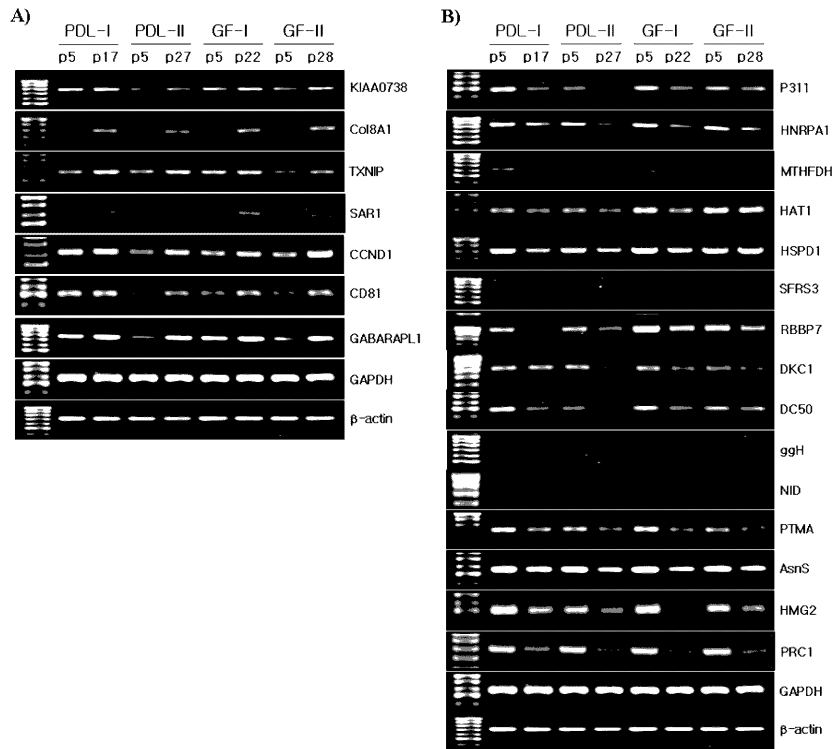
**Table 2.** Genes that were significantly increased or decreased in mRNA expression level during replicative senescence of human periodontal fibroblasts.

Genes	NCBI accession no.	cDNA array ratio (senescent/proliferating)				RT-PCR ratio (senescent/proliferating)			
		PDL-I	PDL-II	GF-I	GF-II	PDL-I	PDL-II	GF-I	GF-II
KIAA0738	NM_014719	2.16	3.20	1.97	5.06	1.14	1.31	1.25	1.63
Col8A1	NM_00088	2.24	3.04	1.30	4.16	3.03	3.69	3.22	4.25
TXNIP	NM_006472	1.43	5.46	2.36	3.58	1.60	1.49	1.13	1.6
SAR1	NM_020150	2.16	2.03	2.84	2.62	1.59	1.18	1.59	1.19
CCND1	NM_053056	2.17	2.26	2.05	2.23	1.03	1.2	1.17	1.45
CD81	NM_004356	2.18	2.36	1.58	2.06	1.01	14.73	1.72	4.27
GABARAPL1	NM_031412	2.14	2.06	2.38	1.19	1.38	3.86	1.27	2.93
P311	NM_004772	0.42	0.43	0.40	0.66	0.52	0.41	0.65	0.95
HNRPA1	NM_002136	0.47	0.48	0.45	0.58	0.72	0.5	0.47	0.63
MTHFDH	NM_006636	0.33	0.49	0.53	0.50	0.55	0.53	0.26	0.5
HAT1	NM_003642	0.48	0.48	0.90	0.44	0.87	0.79	0.68	0.98
HSPD1	BC067082	0.45	0.53	0.47	0.44	0.67	0.76	0.79	1.07
SFRS3	NM_003017	0.41	0.43	0.48	0.41	1.02	0.25	0.4	0.76
RBBP7	NM_002893	0.53	0.46	0.42	0.38	0.44	0.75	0.73	0.72
DKC1	NM_001363	0.45	0.56	0.45	0.30	0.96	0.4	0.59	0.52
DC50	AF271779	0.65	0.48	0.44	0.30	0.91	0.82	0.77	0.89
ggH	NM_003878	0.45	0.46	0.50	0.27	0.15	0.18	0.01	0.35
NID	NM_002508	0.37	0.33	0.98	0.24	0.75	0.89	0.73	0.79
PTMA	NM_002823	0.77	0.32	0.43	0.23	0.76	0.82	0.6	0.85
AsnS	NM_133436	0.34	0.27	0.36	0.23	0.81	0.63	0.63	0.75
HMG2	NM_002129	0.23	0.29	0.30	0.17	0.66	0.73	0.26	0.71
PRC1	NM_003981	0.30	0.19	0.33	0.07	0.24	0.14	0.10	0.18

\* Data represent the mean of duplicate experiments. The relative level of the transcripts was determined after normalization to the GAPDH and  $\beta$ -actin level.



**Fig. 2.** Senescent cells showed differential expression pattern of cell cycle regulating proteins (A) and integrins (B). Western blot analysis was performed using cell lysates of actively proliferating cells and senescent cells. (C) Relative level of loaded protein samples was shown by coomassie blue staining.



**Fig. 3.** RT-PCR was performed to confirm the cDNA microarray data. cDNA microarray data showed that the expression level of 57 genes was significantly changed by the progression of senescence in periodontal fibroblasts. Among those genes, the up-regulation of 7 genes (A) and the down-regulation of 15 genes (B) were confirmed by RT-PCR.

아들여지고 있다. 따라서 치주조직의 주요 구성세포인 치은섬유모세포와 치주인대섬유모세포에서 복제노화를 유도하고 노화관련 유전자를 검색하였다. 이 실험에서는 세포분열이 거의 일어나지 않아 지속적 계대배양이 불가능하고 SA- $\beta$ -gal염색을 시행한 결과 90% 이상의 세포들이 양성으로 염색되는 passage의 세포를 복제노화된 세포로 인정하였다. 두 명의 환자에게서 얻어진 세포가 각기 복제노화에 도달하는 시기를 비교하였을 때 GF-I, PDL-I의 경우 GF-II, PDL-II에 비해 적은 수의 계대배양 후에 복제노화가 진행되는 것으로 나타났다. 두 환자 간 나이 차이는 크지 않았고 조직에서 자라난 세포가 세포배양접시를 채우는 데 걸린 시간이 GF-I, PDL-I에서 더 오래 걸렸다는 점을 감안할 때, 이러한 차이는 처음 세포를 얻을 때 사용된 치주조직의 양적 차이로 인해 얻어진 결과로 생각된다.

복제노화는 비가역적 G0/G1세포주기 정지상태이며 이 과정에 p53/p21과 p16/RB 경로가 협력하여 작용한다고 보고된 바 있다(Stein 등, 1999). 본 연구에서 노화된 세포에서 p53이 약간 증가하기는 하였지만 p21은 오히려 감소하였으며, p16이 약간 증가하였고 인산화된 RB는 현저히 감소하였다. 비록 몇몇 연구에서 p21이 노화된 세포에서 발현이 증가됨을 보고하긴 하였지만(Johnson 등, 1994; Tahara 등, 1995), Hara 등(1996)과 Stein 등(1999)은 p21 발현 증가는 노화 전단계에서 일시적으로

나타나며 세포노화가 더 진행되면 오히려 발현이 감소하고 대신 p16이 관여하며, p21과 p16 단백질이 모두 Rb 인산화를 억제하여 세포성장을 정지시킨다고 하였다. 그러므로 본 연구결과에서 노화된 세포에서 p21이 감소되고 p16이 증가되며, RB인산화가 크게 감소된 것은 이들의 결과와 일치하는 것으로 생각된다. p15은 p16과 같이 INK4 family에 속한 CDKI로 CDK4/6가 cyclin D와 복합체를 형성하는 것을 억제하여 RB를 저인산화상태로 유지함으로써 G1정지를 유도하는 것으로 알려져 있다(Hall 등, 1995). p15와 세포 노화와의 연관성에 대한 보고는 많지 않으나, RB 경로가 정상적으로 존재하는 사람 신경아세포종 세포에 p15를 과발현시키면 p16 과발현의 경우와 유사하게 세포 복제노화를 유도하고 telomerase 활성을 억제한다는 보고가 있었다(Fuxe 등, 2000). 그러나 본 연구에서는 활발히 세포분열이 일어나고 있는 세포에서 p15의 발현이 높게 나타났으며 오히려 노화된 세포에서 발현이 크게 되는 양상을 보였다. 활발히 세포분열이 일어나고 있는 P5의 세포에서는 RB 인산화가 높게 나타났기 때문에 p15의 높은 발현이 RB 인산화를 충분히 억제하는 효과를 나타내고 있지 않은 것으로 보이며, 이 세포에서 p15가 CDK4/6 억제이외에 다른 어떤 기능을 수행하는지에 대해서는 분명하지 않다. p21과 같이 CIP/KIP family에 속하는 p27의 경우 골육종세포인 SAOS-2를 이용한 실험에서 RB 과발현에 의

한 세포노화 진행에 p27의 과발현이 필요한 것으로 보고된 바 있다(Alexander와 Hinds, 2001). 그러나 본 연구에서는 노화된 세포에서 오히려 p27의 발현은 약간 감소하였으며, 이런 결과는 사람 전립선 상피세포 노화의 경우와 유사하였다(Schwarze 등, 2001). 이러한 결과들은 CDKI가 세포 노화과정의 세포주기 정지 및 노화 표현형 발현에 관여하기는 하지만 세포의 종류에 따라 주로 관여하는 CDKI의 종류가 다를 수 있음을 시사하는 결과로 생각되며 사람 치주 상유모세포 복제노화의 경우에는 p16/RB 경로가 주로 관여하는 것으로 보인다.

세포주기조절과 관련된 유전자 외에, 노화된 피부상유모 세포에서 과발현되는 것으로 알려진 유전자로는 type I collagen, fibronectin과 같은 세포외기질 단백질과 collagenase-1, stromelysin-1, plasminogen activators와 같은 단백질분해효소가 있다(Chen, 2000). 이러한 세포외기질 단백질과 세포외기질을 조절하는 단백질효소의 발현이 세포노화에 따라 달라지므로 세포외기질을 통한 세포신호전달이 달라질 가능성이 있다. 또한 노화된 세포에서는 focal adhesion의 형성이 많아지고 그를 통한 FAK 신호전달이 높아지는 것으로 알려져 있으므로(Cho 등, 2004) 노화과정 또는 노화상태의 유지에 integrin의 발현 변화가 수반되며 그를 통한 신호전달이 중요하게 관여할 수 있을 것으로 생각된다. 치주인대상유모세포와 치은상유모세포에서 integrin의 발현을 조사한 결과 노화된 세포에서  $\alpha 2$ ,  $\alpha v$ 와  $\beta 1$  integrin 단백질양이 증가하였으나  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$  integrin은 별다른 차이를 보이지 않았다. 노화된 세포는 특징적으로 세포의 크기가 커지며, 이로 인해 세포기능효율이 제한될 수 있다. 노화된 세포에서는 caveolin-1 단백질의 수준이 크게 증가되어 있으며, 노화된 세포에서 caveolin-1의 발현을 억제하면 세포 모양이 젊은 세포 모양으로 회복되고 세포분열이 증가함이 보고된 바 있다(Cho 등, 2003). 본 연구에서도 노화된 세포는 크기가 커지며 더 납작한 양태를 나타내었고 그와 연관되어 vimentin과 caveolin-1 단백질 양도 증가되었음이 확인되었다. 최근 Cho 등(2004)은 노화된 세포에서  $\beta 1$  integrin 발현이 증가하며, caveolin-1이 많은 세포막분획에서 FAK활성이 높아지고 focal adhesion 형성이 증가됨을 보고하였으며, FAK을 불활성화시키면 세포모양이 젊은 세포와 비슷하게 회복된다고 하였다. 그러므로 치은상유모세포와 치주인대 상유모세포에서 발현이 증가된  $\alpha 2$ ,  $\alpha v$ 와  $\beta 1$  integrin도 노화된 세포모양의 유지에 관여할 것으로 생각되며, 노화된 상유모세포에서는 type I collagen이나 fibronectin의 분비도 증가된다는 보고와  $\alpha 2\beta 1$ 이 collagen 수용체로 작용함을 고려해볼 때 아마도 노화된 세포에서는 세포외기질을 통한 신호전달이 젊은 세포에서와 양적, 질적으로 다를 가능성이 있을 것으로 생각된다.

cDNA microarray 결과 중 RT-PCR로 확인된 유전자 중에서, 노화된 세포에서 발현이 가장 증가한 것으로 나

타난 유전자는 COL8A1(collagen, type VIII, alpha 1)이었다. 기존에 노화된 세포에서 COL8A1발현이 증가된다는 보고는 없었지만, type I collagen 같은 다른 발현 증가된 세포외기질 단백질과 더불어 노화된 세포의 신호전달에 관여할 것으로 생각된다. CD 81은 tetraspanin family의 일원으로,  $\alpha 4\beta 1$  integrin과 결합하여 integrin 신호를 조절하는 것으로 알려져 있으므로(Serru 등, 1999), 노화된 치은상유모세포나 치주인대상유모세포에서도 신호전달 조절에 관여할 가능성이 있다고 생각된다. 또한 노화된 세포에서 발현이 감소된 HSPD(heat shock 60 kDa protein 1)는  $\alpha 3\beta 1$  integrin과 결합하여 integrin을 통한 신호를 촉진하는 것으로 알려져 있어(Barazi 등, 2002), HSPD 발현감소는 integrin 신호전달에 shift를 가져와 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각된다.

CCND 1(cyclin D1)의 발현도 증가되었으며, 이는 노화된 상유모세포에서 cyclin D 1 발현이 증가되어 불활성 CDK 2와 결합된 채로 존재한다는 기존의 보고와 일치하였다(Dulic 등, 1993). Cyclin D 1 과발현은 세포분열을 촉진하는 효과를 나타내지만 노화된 세포에서는 과발현된 CDK inhibitor로 인하여 CDK활성이 억제되므로 세포주기 정지상태가 유지된다. TXNIP(thioredoxin interacting protein)은 세포내에서 thioredoxin과 결합하여 그 기능을 억제하는 단백질로 알려져 있다. TXNIP을 과발현시키면 세포주기가 G0/G1에서 정지한다는 보고(Han 등, 2003)로 미루어보아, 노화된 치은상유모세포와 치주인대세포에서 과발현된 TXNIP도 세포주기 정지에 기여할 가능성을 있을 것으로 생각된다.

노화된 치은상유모세포와 치주인대세포에서 발현이 저하된 유전자 중 HNRPA1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)은 pre-mRNA와 mRNA processing을 조절하는 기능을 하고 있는 것으로 알려져 있지만, 근래의 보고에 따르면 HNRPA1은 leukemia 세포에서 과발현되어 있으며(Iervolino 등, 2002). 이 유전자가 부족한 생쥐세포에서는 telomere 길이가 감소한다는 보고(Patry 등, 2003)로 미루어보아, 상유모세포의 노화과정에서 발현이 감소된 HNRPA1이 노화진행에 연관이 있을 것으로 생각된다. 노화된 세포에서 발현이 감소된 또다른 유전자인 HAT1(histone acetyltransferase 1)은 histone acetylation 조절을 통해 유전자 발현 조절에 관여한다. Histone acetylation과 노화와의 상관관계는 잘 알려져 있지 않으나, 최근 histone deacetylase inhibitor를 피부상유모세포에 처리하면 복제노화와 비슷한 상태를 유도하며(Mumro 등, 2004), nicotinamide를 노화된 피부상유모세포에 처리하면 HAT발현이 증가하고 세포분열이 촉진된다는 보고(Matuo 등, 2001)는 histone acetylation 조절을 통한 유전자 발현조절이 노화와 연계되어 있을 가능성을 시사한다. 본 실험에서, 노화된 세포에서는 RBBP7(retinoblastoma binding protein 7)의 발현이 감소되었는

데, RBBP7은 여러 histone deacetylase complexes의 구성성분의 하나인 것으로 알려져 있다(Zhang 등, 1999). 또한 노화된 세포에서 발현감소된 것으로 나타난 PTMA (prothymosin, alpha)도 histone acetyltransferase활성을 가진 p300과 결합하여 안정화시키고 transcriptional activity를 증가시키는 작용을 담당하는 것으로 알려져 있다(Subramanian 등, 2002). 따라서 치은과 치주인대삼유모세포의 노화과정에서 histone acetylation 조절이 중요한 역할을 담당할 것으로 생각된다.

치은각화세포와 치은삼유모세포의 노화관련 유전자를 비교하였을 때, 유전자 subtype은 다르지만 MTHFD (methyltetrahydrofolate dehydrogenase), ASNS (asparagine synthetase), HMG(high-mobility group)가 발현이 공통적으로 감소하였다. 이중 HMG는 핵내 편재하며 chromatin에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 또한 DNA double-strand break repair의 마지막 단계에 관여하는 것으로 보고되어(Nagaki 등, 1998). 이 유전자의 발현이 감소되면 DNA 수복 저해를 가져올 가능성이 있으며 이는 노화된 행과정에 수반되는 DNA 손상 회복을 더욱 억제하여 노화진행을 더 촉진할 가능성이 있을 것을 생각된다. ASNS가 세포주기 G1 진행에 필수적이라는 보고(Greco 등, 1989)는, 이 유전자의 발현저하도 노화된 세포의 세포주기 정지에 관여할 것을 시사하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 사람 치주조직 삼유모세포의 복제 노화에는 p16/RB 경로가 주로 관련되는 것으로 보이며, 노화된 치주조직 삼유모세포에서 발현 변화된 유전자의 상당수는 유전자 발현조절, 세포주기 조절, integrin 신호전달 조절에 관련된 유전자로 나타났다. 또한 치주조직의 또 다른 세포인 치은각화세포의 노화관련 유전자외도 유전자 발현 양상이 많이 달라 세포의 종류에 따라 세포 노화 진행에 따른 유전자 발현 변화가 서로 다름을 시사하였다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ5-PG1-01CH12-0002)

## 참고 문헌

Alexander, K. and Hinds, P.W.: Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol. Cell. Biol.* **21**:3616-3631, 2001.  
 Back, J.H., Lee, G., Kim, S.N., Kim, J.M., Kim, M., Chung, S.C. and Min, B.M.: Common genes responsible for differentiation and senescence of human mucosal and epidermal keratinocytes. *Int. J. Mol. Med.* **12**:319-325, 2003.

Barazi, H.O., Zhou, L., Templeton, N.S., Krutzsch, H.C. and Roberts, D.D.: Identification of heat shock protein 60 as a molecular mediator of alpha 3 beta 1 integrin activation. *Cancer Res.* **62**:1541-1548, 2002.  
 Chen, Q.M.: Replicative senescence and oxidant-induced premature senescence. Beyond the control of cell cycle checkpoints. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**:111-125, 2000.  
 Cho, K.A., Ryu, S.J., Park, J.S., Jang, I.S., Ahn, J.S., Kim, K.T. and Park, S.C.: Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J. Biol. Chem.* **278**:27789-27795, 2003.  
 Cho, K.A., Ryu, S.J., Oh, Y.S., Park, J.H., Lee, J.W., Kim, H.P., Kim, K.T., Jang, I.S. and Park, S.C.: Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J. Biol. Chem.* **279**:42270-42278, 2004.  
 Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, C., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:9363-9367, 1995.  
 Dulic, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I. and Stein, G.H.: Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:11034-11038, 1993.  
 Duncan, E.L., Wadhwa, R. and Kaul, S.C.: Senescence and immortalization of human cells. *Biogerontology* **1**:103-121, 2000.  
 Fuxe, J., Akusjarvi, G., Goike, H.M., Roos, G., Collins, V.P. and Pettersson, R.F.: Adenovirus-mediated overexpression of p15INK4B inhibits human glioma cell growth, induces replicative senescence, and inhibits telomerase activity similarly to p16INK4A. *Cell Growth Differ.* **11**:373-384, 2000.  
 Goseki, T., Shimizu, N., Iwasawa, T., Takiguchi, H. and Abiko, Y.: Effects of in vitro cellular aging on alkaline phosphatase, cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. *Mech. Ageing Dev.* **91**:171-183, 1996.  
 Greco, A., Gong, S.S., Itmann, M. and Basilio, C.: Organization and expression of the cell cycle gene, ts11, that encodes asparagine synthetase. *Mol. Cell Biol.* **9**:2350-2359, 1989.  
 Haffajee, A.D., Soeransky, S.S., Lindhe, J., Kent, R.L., Okamoto, H. and Yoneyama, T.: Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. *J. Clin. Periodontol.* **18**:117-125, 1991.  
 Hall, M., Bates, S. and Peters, G.: Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* **11**:1581-1588, 1995.  
 Han, S.H., Jeon, J.H., Ju, H.R., Jung, U., Kim, K.Y., Yoo, H.S., Lee, Y.H., Song, K.S., Hwang, H.M., Na, Y.S., Yang, Y., Lee, K.N. and Choi, I.: VDUP1 upregulated by TGF-beta1 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits tumor cell growth by blocking cell-cycle progression. *Oncogene* **22**:4035-4046, 2003.  
 Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S. and Peters,



- G.: Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell Biol.* **16**:859-867, 1996.
- Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **37**:614-636, 1965.
- Iervolino, A., Santilli, G., Trotta, R., Guerzoni, C., Cesi, V., Bergamaschi, A., Gambaorti-Passerini, C., Calabretta, B. and Perrotti, D.: hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling activity is required for normal myelopoiesis and BCR/ABL leukemogenesis. *Mol. Cell Biol.* **22**:2255-2266, 2002.
- Johnson, M., Dimitrov, D., Vojta, P.J., Barrett, J.C., Noda, A., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R.: Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SD11/CIP1/WAF1/p21RNA in human cells. *Mol. Carcinog.* **11**:59-64, 1994.
- Jun, J.H., Kim, G.S., Woo, K.M., Min, B.M. and Baek, J.H.: Responsiveness to lipopolysaccharide changes according to the aging of periodontal ligament fibroblasts. *Int. J. Oral Biol.* **30**:1-8, 2005.
- Kim, H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K. and Foster, D.N.: Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere- regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *Exp. Cell. Res.* **272**:199-208, 2002.
- Matuoka, K., Chen, K.Y. and Takenawa, T.: Rapid reversion of aging phenotypes by nicotinamide through possible modulation of histone acetylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:2108-2116, 2001.
- Munro, J., Barr, N.L., Ireland, H., Morrison, V. and Parkinson, E.K.: Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* **295**:525-538, 2004.
- Nagaki, S., Yamamoto, M., Yumoto, Y., Shirakawa, H., Yoshida, M. and Teraoka, H.: Non-histone chromosomal proteins HMG1 and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:137-141, 1998.
- Nishimura, F., Terranova, V.P., Braithwaite, M., Orman, R., Ohyama, H., Mineshima, J., Chou, H.H., Takashiba, S. and Murayama, Y.: Comparison of in vitro proliferative capacity of human periodontal ligament cells in juvenile and aged donors. *Oral Dis.* **3**:162-166, 1997.
- Papapanou, P.N., Lindhe, J., Sterrett, J.D. and Eneroth, L.: Considerations on the contribution of ageing to loss of periodontal tissue support. *J. Clin. Periodontol.* **18**:611-615, 1991.
- Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R. and Chabot, B.: Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. *Cancer Res.* **63**:7679-7688, 2003.
- Satyanarayana, A., Wiemann, S.U., Buer, J., Lauber, J., Dittmar, K.E., Wustefeld, T., Blasco, M.A., Manns, M.P. and Rudolph, K.L.: Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *EMBO J.* **22**:4003-4013, 2003.
- Sawa, Y., Phillips, A., Hollard, J., Yoshida, S. and Braithwaite, M.W.: Impairment of osteocalcin production in senescent periodontal ligament fibroblasts. *Tissue Cell* **32**:198-204, 2000.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Holliman, R.M. and Lowe, S.W.: A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**:335-346, 2002.
- Schwarze, S.R., Shi, Y., Fu, V.X., Watson, P.A. and Jarrard, D.F.: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* **20**:8184-8192, 2001.
- Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C. and Rubinstein, E.: Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem. J.* **340**:103-111, 1999.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Souland, A. and Dulie V.: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **19**:2109-2117, 1999.
- Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. and Robertson, E.S.: Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J. Virol.* **76**:4699-4708, 2002.
- Tahara, H., Sato, E., Noda, A. and Ide, T.: Increase in expression level of p21sdi1/cip1/waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene* **10**:835-840, 1995.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D.: Analysis of the NuRD subunit reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* **13**:1924-1935, 1999.