[UCI]I804:24011-200000233856

2007년 2월
석사학위논문

Lysosome 파괴에 의한 세포사멸에서 PIG3의 기능에 대한 연구

조선대학교 대학원

생물신소재학과

박 아 연

Lysosome 파괴에 의한 세포사멸에서 PIG3의 기능에 대한 연구

Biological role of PIG3 in lysosome-mediated apoptosis

2007년 2 월 일

조선대학교 대학원

생물신소재학과

박 아 연

Lysosome 파괴에 의한 세포사멸에서 PIG3의 기능에 대한 연구

지도교수 유 호 진

이 논문을 이학석사 학위신청논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

생물신소재학과

박 아 연

박 아 연의 석사학위논문을 인준함

위원장　조선 대학교　교수　　인

위　원　조선 대학교　교수　　인

위　원　조선 대학교　교수　　인

2006 년 11 월　일

조선대학교 대학원

CONTENTS

국문 초록 ---------- 1

ABSTRACT ---------- 3

I. 서론 ---------- 5

II. 실험재료 및 방법 ---------- 9

세포배양조건 ---------- 9

시약 ---------- 9

PIG3와 CTSB 유전자의 클로닝 ---------- 9

PIG3와 CTSB 유전자의 형질도입 ---------- 10

Yeast two-hybrid ---------- 11

RNA추출, cDNA합성과 PCR ---------- 12

단백질 준비 및 Western blot ---------- 13

Co-immunoprecipitation ---------- 15

siRNA의 설계 및 합성 ---------- 16

siRNA의 transfection ---------- 18

세포 독성 측정 ---------- 18

세포의 생존능력 측정 (Cell Viability Assay) ---------- 19

Ⅲ. 결 론 ----------20

Yeast two-hybrid screening ----------20

PIG3 와 CTSB 의 발현 확인 ----------20

PIG3 와 CTSB 의 결합 ----------21

Lysosome이 관여 하는 세포사멸에서 PIG3의 역할 ----------23

Ⅳ. 고 찰 - 39

Ⅴ. 참 고 문 헌 - 43

CONTENTS OF FIGURES

Figure. 1. Confirmation of interaction between PIG3 and CTSB in yeast two hybrid system.

Figure. 2. Primary structure of Cathepsin B

Figure. 3. Expression level of PIG3 and CTSB in various cell lines.

Figure. 4.Co-immunoprecipitation of PIG3 with CTSB in UV damaged HCT116 p53+/+ cell line and MCF7 cell line.

Figure. 5. Sensitivity of human prostate cancer cell line PC3 to TNF-α, ActinomycinD treatment.

Figure. 6. Sensitivity of human colon cancer cell lines to TNF treatment.

Figure .7. Interaction of PIG3 with CTSB in apoptotic PC3 cell line.

Figure. 8. Down-regulation of the PIG3, CTSB expression.

Figure. 9. Cell viability assay apoptosis can be altered in the absence PIG3.

Figure 10. The effect of silencing of PIG3 on lysosome-mediated apoptosis.

<국문초록>

Lysosome 파괴에 의한 세포사멸에서 PIG3 의 기능에 대한 연구

박 아 연

(지도교수: 유 호 진)

조선대학교 대학원 생물신소재학과

PIG3 (p53-inducible gene3)는 ROS 에 의해 유도되는, p53 경로를 통한 세포사멸에 관여한다고 알려져 있다. 본 논문에서는 Yeast two-hybrid 기법을 통해 PIG3 와 결합하는 단백질 중에서 lysosomal cysteine protease 의 일종인 Cathepsin B (CTSB)의 부분적인 염기서열을 human liver cDNA library 로부터 확인 할 수 있었다. 또한 human prostate cancer cell line, PC3 에서 PIG3 와 CTSB 의 상호작용을 PIG3 와 CTSB 각각의 항체를 사용하여 Co-immunoprecipitation 기법으로 확인 하였다. CTSB 는 lysosome 파괴를 통한 세포사멸에서 파괴된 lysosome 으로부터 방출되어 mitochondria 파괴를 유도 하므로 PIG3 와 CTSB 의 상호 작용이 그 세포사멸에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. TNF-α(10 ㎍/ml)와 ActinomycinD(0.2 ㎍/ml) 를 처리하여 lysosome 파괴를 통한 세포사멸을 유도 한 후, PIG3 유전자 발현을 감소시키는 PIG3-siRNA 를 transient transfection 한 PC3 세포와 음성대조군 세포에 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 기법으로 세포 생존율을 분석한 결과, siRNA 음성 대조군에 비해 생존율이 20% 정도 감소된 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 활성화된 caspase-8 이 lysosome 의 파괴를 유도하는 것으로 보고되어 있으므로, PIG3 와 CTSB 의 상호작용과 caspase-8 활성화의 연관관계를 알아보고자 하였다. PIG3-siRNA transient transfection 한 PC3 세포에 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리하여 lysosome 파괴를 통한 세포사멸을 유도하였을 경우 caspase-8 의 활성화가 siRNA 음성 대조군에 비해 4 시간 정도 빠르게 진행되는 것을 관찰 하였다. 이들 결과를 종합해 볼 때

PIG3 와 CTSB 의 상호작용이 caspase-8 의 활성화를 지연시킴으로써 lysosome 파괴를 통한 세포사멸을 초기단계부터 조절하는 것으로 판단된다.

ABSTRACT

Biological role of PIG3 in lysosome-mediated apoptosis.

Park, Ah Yeon

Advisor: Prof. You, Ho Jin, Ph. D.

Department of Bio-material Engineering,

Graduate school of Chosun University.

The p53-inducible gene 3 (PIG3) is known to be a transcriptional target of p53 tumor suppress or protein, which involved in p53-mediated apoptosis induced by reactive oxygen repair (ROS). To determine the exact role of PIG3 during apoptosis, we partially cloned the Cathepsin B (CTSB), a lysosomal cysteine protease, from human cDNA library using the Yeast two hybrid technique. The PIG3 was interacted with the CTSB in human prostate cancer cell line PC3, which was verified by co-immunoprecipitation analysis using specific anti-PIG3 polyclonal antibodies and anti-CTSB monoclonal antibodies. Since the released CTSB from the destabilized lysosomes induced the mitochondrial disruption during lysosome-mediated apoptotic responses, we investigated the role of interaction between PIG3 and CTSB in the apoptosis. When we examined the cell viability of PC3 cells by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after induction of lysosome-mediated apoptosis by TNF-α(10μg/ml)와 ActinomycinD(0.2μg/ml), the apoptotic responses were observed 8 hours after the treatment. The PIG3 silencing PC3 cells by transient siRNA transfection show the 20% less cell viability compared to that of the control-siRNA transfected cells 24hours after the treatment with TNF-α and actinomycinD. In the previous report, caspase-8 activation was closely related with lysosome destabilization during the apoptosis. Thus, we next investigated the relationships between the interaction of PIG3-CTSB and caspase-8 cleavage. The cleaved caspase-8 was detected 4 hours ealier in the PIG3-knock down PC3 cells in comparision with

that in the control cells during lysosome-mediated apoptosis. Taken together, the PIG3 interaction with CTSB may play an important role in regulating the early step of lysosome-mediated apoptosis through the delayed caspase-8 activation.

I. 서 론

Apoptosis 는 예정된 세포의 죽음으로 원치 않는 세포와 손상 받은 세포를 제거함으로써 세포의 생존에 필수적인 발생, 항상성 유지, 암을 방지하는 역할을 하는 세포죽음의 활성화된 형태이다. Apoptosis 가 일어나는 cell 에서는 cell 의 수축, membrane blebbing, 염색체 응축 같은 형태적인 변화를 관찰 할 수 있고, 두 가지의 주된 신호 전달에 의해 유도된다(1,2). 첫번째로 transmemebrane 의 death receptor 에 특정 단백질 리간드의 결합을 통한 extrinsic pathway 가 있다. 대표적인 death receptor 에는 Tumor necrosis factor receptor, Fas receptor, TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 등이 있다. 두번째 는 이중막 구조로 되어있고 에너지를 생산하는 세포 내에 중요기관인 mitochondria 와 관련된 intrinsic pathway 가 있다. Proapoptotic 단백질인 Bcl-2 가 mitochondria 의 외막을 자극하면 대표적으로 cytochrome-C 가 cytosol 로 방출되어 caspase 들의 분할을 유도하여 세포사멸로 가게 된다. extrinsic pathway 와 intrinsic pathway 모두 최종적으로 cascade of caspase 들이 활성화되는 공통의 경로로 모이게 된다. 활성화된 caspase 들은 핵심조절분자와 구조분자를 절단 함으로써 세포죽음에 최고점을 이루게 된다(3,4,5).

Tumor necrosis factor (TNF)는 pleiotropic cytokine 으로 세포 내 에서 일어나는 복잡하고 다양한 세포사멸, 세포성장, proinflammatory 에 관여하는 유전자 조절 등을

유도한다(6,7). TNF 는 TNF receptor1 (TNFR1) 와 삼중체 결합하고 TNFR1-associated death domain protein (TRADD), TNF receptor associated factor 2 (TRAF2), death domain kinase RIP 와 순차적으로 plasma membrane 결합하여 세포 사멸을 유도한다 (복합체 1) (8). TNFR1 이 해리된 후 TRADD, TRAF2, RIP 와 연합된 Fas associated death domain protein (FADD) 와 caspase 8 이 세포질에서 복합체를 형성한다 (복합체 2)(9). 그리고 나서 복합체 2 에서 caspase 8 이 활성화 되면서 downstream caspase 들이 활성화 되어 결국 세포 사멸로 가게 된다(10). 또 TNF 는 transcription factor 인 NF-κB 와도 관련하여 일부 세포의 전사나 번역 과정을 조절하기도 한다 (7). Apoptosis 에 관여 하여 기능을 조절하는 요소를 찾기 위해 연구되어있는 자료를 보면 caspase 이외에도 cathepsins, calpains, and serine proteases 같은 단백질 분해효소들도 apoptosis 의 여러 가지 유형에서 핵심적인 역할을 하게 된다 (11). 그 중에서 관심 있는 Cathepsin B(CTSB)는 lysosomal cysteine protease 로 acidic vesicle 로부터 유래된 세포사멸의 중재자의 후보 중에 하나이다. Cathepsin B 는 38kDa 의 효소원으로부터 순차적으로 proteolytic cleavage 에 의해 활성화된 30kDa 으로 분리 된다(12). 또 NH_2 말단 propeptide 와 COOH 말단 6 개의 잔기도 분리되고 127 번과 128 번째 잔기가 잘려 27kDa 인 heavy chain 과 4-5kDa 인 light chain 이 분리 되어 disulfide 결합으로 연결된 효소가 된다(13,27). 최근 연구에서 Cathepsin B 가 제거된 쥐에서 세포사멸을 유도함을 통해 Cathepsin B 가 세포사멸의

유력한 중재자 임을 확인하였다(14). 다른 여러 가지 보고에 따르면 어떤 세포에 TNF 를 처리하면 lysosome 이 터지면서 Cathepsin B 가 cytosol 로 방출되어 caspase 에 독립적이거나 혹은 의존적인 경로로 세포사멸로 진행된다는 여러 가지의 보고가 있었다(14,15,16,17,18).

PIG3 는 p53-inducible gene 3 로써 종양억제 단백질인 p53 의 전사적 목표 이고 세포사멸에서 어떤 역할을 하지 않을까 생각된다. PIG3 는 처음에 p53 이 유도하는 세포사멸의 시작 단계에서 여러 유전자들의 발현 수준을 조사 하던 중 발견 하였다(19). PIG3 는 첫번째, ROS(reactive oxygen species)의 발생과(19) p53 의한 세포사멸에 관여 한다고 연구 되었다(20,21). 두번째, ROS 의 잠재적인 유도자로써 수많은 NAD(P)H quinone oxidoreductases 와 유사한 염기서열을 갖고 있다(19). 세번째, 어떤 p53 돌연변이들은 세포주기를 조절할 수 있으나 세포사멸은 조절할 수 없으며 p21 같은 목표 유전자의 활성을 시킬 수 있지만 PIG3 의 활성은 조절할 수 없다(22,23). 그러나, PIG3 유전자가 단독으로 세포사멸을 유도하기는 불충분하고 ROS 가 유도하는 세포사멸에는 다른 인자들이 상호작용을 함으로써 일어날것이라고 추측 했다(24).

본 논문에서는 PIG3 가 세포사멸에서 p53 에 의존적인 기능 외에 다른 기능이 있다고 가정하고 상호작용을 하는 다른 단백질을 찾기 위해 Yeast two-hybrid

실험을 통해 Cathepsin B 와 결합한다는 것을 알았고 PIG3 와 CathepsinB 가 결합하여 어떤 기능을 하는지 연구하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

세포배양조건

전립선암세포인 PC3 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 ㎍/mL)이 포함된 RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) medium 에서, 결장암 세포인 HCT116 p53+/+ 세포주는 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) medium 에서 37℃, 5% CO_2 가 있는 조건으로 배양 하였다.

시약

Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 SIGMA 에서 ActinomycinD 는 USB 에서 구입하였다.

PIG3 와 CTSB 유전자의 클로닝

사람의 섬유아종세포인 GM00637 세포의 cDNA 로부터 PIG3 와 CathepsinB 유전자를 PCR 방법으로 증폭시켰다.(PIG3 F-5′ GAA TTC ATG TTA GC GTG CAC TTT GAC A-3′ PIG3 R-5′ GTC GAC TCA CTG GGG CAG TTC CAG-3′ CTSB F-5′ GAT ATC ATG TGG CAG CTC TGG GCC TCC-3′ CTSB R-5′ GCG GCC

GCT TAG ATC TTT TCC CAG TAC TGA TC-3′) pGEM-T-easy vector (Promega)에 각각의 유전자를 삽입하여 클로닝한 후 그 염기서열을 확인했다. PIG3 유전자는 제한효소 EcoRⅠ,SalⅠ(New England Biolab)을 이용하여 절단한 후, 해당하는 제한효소로 미리 절단해 둔 pGBT9 (Clontech) vector 와 pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen)에 각각 cloning 했다. Cathepsin B 유전자는 제한효소 EcoRⅤ, NotⅠ(New England Biolab)을 이용하여 절단한 후, 해당하는 제한효소로 미리 절단해 둔 pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) 와 pACT2AD (Clontech) vector 에 cloning 했다..

PIG3 와 CTSB 유전자의 형질도입

클로닝된 유전자는 FuGENE 6 (Roche) 를 사용하여 제조회사의 안내서에 따라 세포에 형질도입 하였다. 간단히 설명하면, 형질도입하기 하루 전 세포를 준비하여 다음 날, 형질전환을 할 때는 배양된 세포 수가 배양접시의 약 60% 정도를 차지하도록 하였다. 소 혈청을 포함하지 않은 세포 배양액에 DNA 를 넣고 실온에서 5 분간 방치한 후, 소 혈청을 포함하지 않은 세포 배양액에 FuGENE 6 (Roche) 을 넣어 희석해 둔 용액을 혼합하여 실온에서 15 분간 두어 DNA 와 FuGENE 6 를 반응 시켰다. 4 시간 후에 10%의 소 혈청을 포함한 세포 배양액을 넣어 24 시간 동안 추가로 배양시켰다.

Yeast two-hybrid

MATCHMAKER Two-Hybrid 3 (Clontech)을 사용했다. PIG3 유전자 전체를 pGBT9 vector 에 cloning 한 plasmid 를 yeast strain AH109 에 transformation 한 후 Trp 가 없는 SD 배지를 이용하여 pGBT9-PIG3 벡터가 도입된 효모를 선별했다. 선별된 효모에 Matchmaker™ liver cDNA library (Clontech)를 다시 transformation 하여 pGBT9-PIG3 벡터와 pACT2 벡터가 도입된 효모를 transformation 효율을 확인하기 위해 Trp 와 Leu 가 없는 SD 배지에 도포하고 효모균을 Trp, Leu, His 가 없는 SD 배지에 X-α-gal (Clontech, 4mg/ml) 100μl 를 도포한 평판 배지에서 최종 선별했다. 선별된 효모에서 YeastBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen, 71186)를 이용하여 plasmid 를 분리하고 PCR 방법으로 pACT2 벡터에 삽입된 유전자 부분을 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 그 염기서열을 가지고 pACT2AD 에 cloning 하여 다시 Yeast two-hybrid 를 통해 재확인 하였다. Homology search 는 NCBI web site 에 있는 BLAST 알고리즘을 이용하였다. http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

RNA 추출, cDNA 합성과 PCR

60 ㎜에 dish 에 충분히 배양된 세포 (90% confluency)에서 배양액을 제거하고 1X PBS (pH 7.4)로 한번 씻어주었다. 1 ㎖의 TRIzol (Invitrogen)을 넣고 시약과 세포가

골고루 잘 반응하도록 한 후 pipette 을 이용하여 용해된 세포 추출물을 모두 회수하고 1.5 ml microcentrifuge tube 에 옮겨 chloroform 을 200 ㎕을 넣어주고 잘 혼합한다. 4℃, 13000 rpm, 15 분 원심분리 한 후 투명한 상층액을 조심히 pipette 를 이용해 분리하여 동량의 isopropanol 을 넣고 실온에서 5 분 방치한 후 4℃, 13000 rpm, 15 분 원심분리 하여 RNA 를 침전 시킨다. 침전된 RNA 를 70% Ethanol 로 pellet 을 2 번 씻어 염분을 제거 하여 주고 Ethanol 성분을 공기중에서 가볍게 날린다. pellet 의 양에 따라 DEPC water 10~20 ㎕를 넣어 녹이고 정량한 후 전체 RNA 의 5 ㎍을 M-MLV RT 역전사 효소(Invitrogen)를 이용하여 역전사 하였다. 반응조건으로는 RNA 의 5 ㎍과 1 ㎕의 oligo (dT) (500 ㎍/ ㎖) 그리고 1 ㎕ 10 mM dNTP Mix (10mM each dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 를 distilled water 12 ㎕에 용해 시킨 것을 5 분 동안 65℃에서 열처리를 하였다. 그 다음 그 열처리한 sample 안에 5X First-Strand Buffer 4 ㎕와 0.1 M DTT 2 ㎕ 를 넣어주고 섞어준 다음 1 ㎕의 (200 units) M-MLV RT 를 넣어주고 섞어준 다음 37℃에서 1 시간 30 분 반응시키고 70℃에서 10 분 동안 반응 시킨다.

반응 시켜 나온 50 ng 의 RNA 에 해당하는 cDNA 를 주형으로 하고 PIG3 와 CTSB 유전자를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법으로 증폭하였다. 반응조건은 distilled water 12.9 ㎕에 10X buffer 2 ㎕ 10mM dNTP 1 ㎕ forward primer 1 ㎕ reverse primer 1 ㎕ template 2 ㎕ Taq polymerase 0.1 ㎕ 를 사용 하였고(Academic Top Taq

DNA polymerase (ACTT-2500), CoreBioSystem) 증폭 반응은 eppendorf 의 MasterCycler 을 사용하여 실시하여, 94℃에서 30 초, 56℃에서 30 초, 72℃에서 1 분으로 하였으며 반응이 25 회 반복되도록 하였다. 각각의 반응에서 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 대조구로 이용하였다. (GAPDH, F 5`- ATT TGG TCG TAT TGG GCG CC -3` R 5`- CTG ATG ATC TTG AGG CTG TTG TCA TAC -3`) PCR 에서 얻은 생성물은 EtBr (Ethidium-Bromide)을 포함하고 있는 1.2% 의 argarose gel 에서 확인하였다.

단백질 준비 및 Western blot

Western blot 에 사용한 단백질은 M-PER (PIERCE) buffer 를 사용하여 준비하였다. 세포의 배양액을 제거하고 PBS 로 세척한 후 세포 용해를 위해 Protease Inhibitor (Complete, Roche) 를 포함한 M-PER (PIERCE) buffer 를 세포 양에 따라 넣고 단백질 용액을 얻어낸다. 분리된 단백질 용액을 정량 하기 위해 Bradford 방법으로 Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) 시약을 멸균된 물에 1:5 로 희석한 후 희석된 용액 1ml 과 단백질 용액 1 $\mu\ell$ 를 넣고 vortex 하여 595 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 정량을 위한 표준물질로는 bovine serum albumin (BSA, 1 mg/ml, AMRESCO)를 사용하였다.

PIG3 와 CTSB 의 검출을 위해서는 12%의 polyacrylamide gel 에 20 μg 의 단백질 용액을 사용하였으며 p53 와 ß-actin 의 검출을 위해서는 10%의 polyacrylamide gel 에 10 μg 의 단백질 용액을 사용하였으며 1Xelectrode buffer (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1%SDS)에서 전기영동을 하였다. PageRuler Prestained Protein ladder (Fermentas)에 따라 size 를 확인 하고 전기영동이 끝난 gel 은 4℃, 100 V 에서 2 시간 동안 1 X transfer buffer (25mM Tris, 0.2M Glycine, 20% MeOH, pH8.5)를 이용하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) membrane (PALL corporation)에 transfer 하였다. Transfer 가 끝난 memebrane 은 실온에서 2 시간 동안 5% skim milk 가 들어있는 1 X TBS-T buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6)에서 blocking 시켰다. 각각 해당하는 antibody 를 적당히 1 X TBS-T buffer 용액에 희석한 antibody 용액 8ml 을 membrane 위에 도포하고 4℃, rocking platform 에서 12 시간 정도 반응시켰다. 사용한 antibody 의 종류와 희석배수는 다음과 같다. anti-PIG3 antibody(1:2000, N-20, sc-16325, Santa Cruz Biotechnology), anti-actin antibody (1:2000,sc-1615,Santa Cruz Biotechnology), anti-CathepsinB antibody,(1:3000,IM27L,Calbiochem), anti-cleaved caspase-8(Asp374)antibody (1:3000,Cell Signaling Technology), anti-cleaved caspase3(1:3000, 9661,Cell Signaling Technology), cleaved caspase7(1:3000, 9491,Cell Signaling Technology), cleaved caspase9(1:3000, 9501,Cell Signaling Technology), cleaved PARP(1:2000, 9541,Cell Signaling Technology) 반응이 끝난 antibody 용액을 제거한 후

1XTBS-T buffer 로 각각 10 분간 3 번 세척하고 발색반응을 위해 각각 해당하는 2 차 antibody 를 5% skim milk 가 들어있는 1XTBS-T buffer 로 희석한 용액을 membrane 에 도포하여 실온에서 2 시간 반응시켰다. 반응하지 않은 과량의 2 차 항체 용액을 제거하기 위해 1 X TBS-T buffer 로 각각 10 분간 6 번 세척한 후 ECL (enhanced chemiluminescence) solution (iNtRON Biotech)으로 발광시켜 X-ray film 으로 현상하였다.

Co-immunoprecipitation

100mm dish 에서 배양한 세포를 변형된 RIPA buffer (25 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 5% glycerol, Protease Inhibitor (Complete, Roche)) 1ml/dish 를 이용해 단백질을 추출한 후 20 ㎕의 protein A/G–agarose (Santa Cruz Biotechnology)를 넣고 4℃, rocking platform 에서 3 시간 동안 반응시켜 pre-clearing 하고 Bradford 방법을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 단백질 1mg 에 anti-PIG3 antibody (PC268, Calbiochem) 와 anti-CathepsinB antibody (IM27L, Calbiochem) 를 각각 1 ㎍ 씩 넣어 4℃, rocking platform 에서 12 시간 동안 반응 시키고 30 ㎕의 protein A/G–agarose 혹은 30 ㎕의 protein A/A–agarose (Santa Cruz Biotechnology)를 넣어 다시 4℃, rocking platform 에서 3 시간 동안 반응 시킨 후 원심분리 하여

protein A/G-agarose 혹은 protein A/A-agarose (Santa Cruz Biotechnology)를 침전시키고 회수하였다. 회수된 agarose 를 RIPA buffer (25 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP-40, 1 mM DTT, 5% glycerol) 로 3 번 세척해주고 5X SDS-PAGE gel loading buffer (62.5mm Tris, pH6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% ß-Mercaptoethanol) 30 ㎕ 를 첨가하여 100℃ 에서 5 분간 끓인다. 얼음에서 차갑게 식힌 후 4℃, 13000 rpm, 5 분 원심분리하고 antibody 와 결합한 상층액을 취하여 12% SDS-PAGE gel 에서 전기영동 한 후 anti-PIG3 antibody(1:2000, N-20, sc-16325, Santa Cruz Biotechnology) 와 anti-Cathepsin B antibody (1:3000,IM27L, Calbiochem) 를 이용하여 PIG3 와 Cathepsin B 가 Co-immunoprecipitation 되는 지를 확인 하였다.

siRNA 의 설계 및 합성

PIG3(GenBank Accession No. NM_004881)의 발현 정도를 감소시키기 위한 siRNA:

PIG3 의 특정한 염기서열을 NCBI Blast 를 통해 찾은 후 web site (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html) 에서 4 가지 종류의 siRNA 를 설계했다. 각각의 siRNA 를 (BIONEER)에 의뢰하여 합성했다. PIG3 가 과발현되는 세포주에 각각의 siRNA 를 transfection 시켜 PIG3 mRNA 와 protein 의 발현양이 감소했는지 확인하고 그 감소가 확실한 4 번째 siRNA 염기서열을 가지고 실험을

하였다 (PIG3-siRNA 5’-AAA UGU UCA GGC AGA CUA-3’ (sense) 5’-UAG UCU CCA GCC UGA ACA UUU-3’ (antisense)).

Cathepsin B(GenBank Accession No. NM_001908) 의 발현 정도를 감소시키기 위한 siRNA:

Cathepsin B 의 특정한 염기서열을 NCBI Blast 를 통해 찾은 후 web site (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_design.html) 를 통해 2 가지 종류의 siRNA 를 설계했다. 각각의 target sequence 에 해당하는 oligonucleotide 를 의뢰하여(Genotech) 합성하고 Silencer siRNA construction kit (Ambion, Austin, TX)를 이용하여 siRNA 로 합성했다. Cathepsin B 가 과발현되는 cell 에 각각의 siRNA 를 transfection 시켜 Cathepsin B mRNA 와 protein 의 발현 양이 감소했는지 확인하고 그 감소가 확실한 94 siRNA 염기서열을 가지고 실험을 진행하였다. CathepsinB 94-siRNA 5’- AAA TTC CGT TTG TTG ACA TAG CCT GTC TC-3’ (sense) 5’- AAC TAT GTC AAC AAA CGG AAT CCT GTC TC-3’ (antisense)

siRNA 의 transfection

siRNA 를 transfection 하기 위해서 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) reagent 를 사용하여 제조회사의 안내서에 따라 DNA 양과 시약의 양을 조절하였다. 먼저 전날

cell 을 dish 에 맞게 seeding 한다. 다음날, Opti-MEM 에 siRNA 를 알맞은 양을 넣고 5 분 실온에서 방치한 후 시약을 희석한 Opti-MEM 을 넣어 섞어주고 실온에서 20 분 방치한다. New media 로 바꿔준 cell 에 넣어주고 24 시간 후에 처리 하였다.

세포 독성 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 를 이용한다. 전날 12 well 에 각 well 당 1X 10^4 개의 cell 을 seeding 하고 24 시간 후에 transfection 한다. 다음날 TNF-α(10 ㎍/ml)와 actinomycinD(0.2 ㎍/ml) 를 같은 농도로 시간대별로 약물을 처리 한다. 약물 처리 후 빛이 없는 곳에서 각 well 에 MTT(10mg/ml)시약을 100 ㎕ 넣어주고 37℃ 5% CO_2 incubator 에서 3 시간 방치 한다. MTT 시약이 들어있는 media 를 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 500 ㎕ 넣어 plate shaker 에 실온에서 15 분 흔들어 cell 을 깨준다. Scanning elisa reader 인 MULTISKAN SPECTRUM (Thermo) 를 이용해 570nm 에서 흡광을 측정한다.

세포의 생존능력 측정 (Cell Viability Assay)

PC3 cell 을 100mm culture dish 에 $10x10^5$/dish 만큼 seeding 하여 24 시간 동안 37℃, 5% CO_2 incubator 에서 배양하였다. 그 후 siPIG3 oligo 를 transfection 하고 다시 24 시간 동안 37℃ incubator 에 배양하고 cell 에 시간대별로 TNF-α (10 ㎍/ml)와 ActinomycinD (0.2 ㎍/ml)를 treat 하여 harvest 시간을 동일하게 맞추었다. 1XTrypsin-EDTA 를 처리하여 harvest 한 세포들은 5 분 동안 2000rpm 으로 원심분리 하였고 상층액을 버린 후 PBS 1mL 로 washing 하고 PBS 1mL 로 suspension 하였다. 세포의 생존능력(Cell Viability)는 Cedex As520 (INNOVATIS)로 분석하였다. Cedex 는 PBS 1ml 에 부유된 세포 상태에서 0.2% Trypan Blue 로 죽어있는 세포를 염색한 후, 염색되지 않은 살아있는 세포를 counting 함으로써 세포의 생존능력을 수치화 나타내어주는 장비이다.

III. 결 론

Yeast two-hybrid screening.

PIG3 와 상호작용 하는 단백질을 찾아내기 위해 사람의 간 cDNA library 를 이용하여 yeast two-hybrid assay 를 수행 하였다 (Fig. 1(A)). Yeast two-hybrid assay 는 효모의 전사 기작을 이용하는 방법으로써 PIG3 유전자를 유인벡터에 클로닝 하여 효모에 형질전환 시키고 형질전환 된 효모에 다시 사람의 간 cDNA library 를 형질전환 시켜 몇 개의 양성 반응을 보이는 군락들을 확인하였다. 이들의 염기서열을 분석한 결과, 그 중에 하나 CTSB 유전자의 일부 염기서열이 PIG3 와 반응한 것으로 확인되었다. (Fig. 1.(B))

PIG3 와 CTSB 의 발현 확인

PIG3 와 CTSB 에 대한 관계를 알아보기 위한 모델을 선정하기 위하여 몇 가지 cell line 에서 PIG3 와 CTSB 의 발현 정도를 RT-PCR 과 Western blot 방법을 이용하여 알아보았다. 대부분의 cell line 에서 두 유전자는 잘 발현되고 있어서 RT PCR 의 방법으로는 발현 정도의 차이를 크게 볼 수 없었지만, Western blot 에서는 각 cell line 마다 발현 정도의 차이를 볼 수 있었다. (Fig. 3)

PIG3 와 CTSB 의 결합

두 단백질의 결합을 위해서는 두 단백질 모두 발현 수준이 높은 상태여야 적합한 조건이라 볼 수 있는데 CTSB 는 housekeeping enzyme 이므로 PIG3 가 많이 발현되는 cell line 을 찾아야 했다. 그래서 PIG3 유전자가 p53 에 의해 유도되는 유전자로 알려졌기 때문에 우선 p53 이 과발현 되는 HCT116 p53+/+ cell line 을 선택 하였다. 또한 대조군으로써 p53 이 없는 HCT116 p53-/- cell line 에 .UVC damage 를 같이 주고 UVC damage 후 PIG3 와 CTSB 의 단백질 발현 수준을 확인 하였는데 HCT116 p53+/+ cell line 에서는 시간이 지남에 따라 증가하였고 HCT116 p53-/- cell line 에서는 정상발현 수준도 낮고 증가폭도 적었다. PIG3 가 기본적으로 발현되는 수준 보다는 세포에 UVC damage 주고 48 시간 후에 PIG3 단백질의 발현 수준이 가장 높다는 것을 확인 했기 때문에 (Fig. 4(A))그 시간대를 골라 유방암세포주인 MCF7 도 함께 Co-immunoprecipitation 실험을 수행 하였다. (Fig. 4(B))그 결과 UVC damage 를 주고 54 시간 후에 두 단백질이 결합하는 것을 확인 하였다. 세포가 UVC damage 를 과도하게 받으면 세포사멸의 경로를 따르게 되는데 이것을 알아보기 위해 caspase-3,7,8,9,PARP 의 분할된 형태를 Western blot 으로 조사 하였다. (Fig. 4(C)) 그 결과 caspase-3,7,8,9,PARP 모두 분할된 형태를 보여 세포사멸 과정에서 PIG3 와 CTSB 가 결합 하여 어떤 기능을 하지 않을까 생각했다. 그러나

MCF7 cell line 은 어떤 damage 도 주지 않은 정상상태 일 때도 결합하는 것으로 확인 되었다. (Fig. 4(B))

한편, CTSB 가 PC3 cell line 에서 TNF-α 와 actinomycinD 에 의해 유도되는 세포사멸에 관여한다고 밝힌 연구 결과를 참조로 세포사멸 과정에서 PIG3 와 어떤 기능을 하는지 알아보기 위해 p53 이 돌연변이 되어있는 PC3 cell line 을 가지고 실험을 진행하였다. 우선, TNF-α 와 actinomycinD 를 처리 하였을 때 어느 시간대에 죽어가는지 알아보기 위해 MTT 분석을 하였다. (Fig.5) TNF-α만 처리 하였을 때는 세포가 죽지 않았고, actinomycinD 만 처리했을 때는 12 시간 후부터 죽어 가기 시작했다. 또, 함께 처리했을 때는 actinomycinD 만 처리했을 때보다 약 1.75 배 정도 더 많이 죽어가기 시작했다.

TNF-α 와 actinomycinD 에 의해 유도되는 세포사멸은 lysosome 이 파괴된 후에 mitochondria 로 신호전달이 진행되는데 lysosome 이 파괴되는 단계 에서 CTSB 가 방출되어 cytosol 로 나오게 된다. PIG3 는 lysosome 에 존재 하지 않고 cytosol 에 주로 존재하게 되는데 두 단백질이 만나기 위해서는 CTSB 가 cytosol 로 방출되어야 한다고 가정하여 TNF-α 와 actinomycinD 에 의해 유도되는 세포사멸 과정 중 이른 단계에서 관여한다고 가정하고 어느 시간대에 결합하는지를 알아보기 위해 4 시간, 8 시간, 12 시간 별로 Co-immunoprecipitation 실험을 수행 하였다. (Fig.7)

anti-PIG3 의 Western blot 의 결과를 보면 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리하고 4 시간 후부터 band 가 나오기 시작하는데 그 이후 시간은 band 가 약하지만 관찰할 수 있었다. 또 anti-CTSB 의 Western blot 의 결과를 보면 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리하고 시간이 지남에 따라 결합하는 양이 점차 증가 했다. 1-4 번 시료는 10 ㎕ loading 하였고 5-8 번 시료는 20 ㎕ loading 하였다. 이로써 PIG3 와 CTSB 는 UVC 손상 받은 HCT116 p53+/+ cell line 와 TNF-α 손상 받은 PC3 cell line 에서 co-immunoprecipitation 이 된다는 것을 확인할 수 있었다.

Lysosome 이 관여 하는 세포사멸에서 PIG3 의 역할

PIG3 와 CTSB 는 Yeast 상에서 양성으로 결과가 나왔고, in vivo 에서도 co-immunoprecipitation 이 되었기 때문에 Lysosome 을 통해 유도되는 세포사멸에서 PIG3 가 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 TNF-α 와 actinomycinD 을 처리 하여 lysosome 에 의해 일어나는 세포사멸을 유도 한 후 세포사멸 정도를 확인 해 보았다. Fig. 6 에서는 이미 확립된 stable cell line 인 HCT116 p53+/+, HCT116 p53+/+/siPIG3, HCT116 p53-/-, HCT116 p53-/-/PIG3 cell line 에서 TNF-α 처리에 의한 세포사멸 정도를 MTT 로 측정해 보았다. 이때 HCT116 p53+/+ cell line 은 48 시간이 되어서야 세포들이 15%정도 죽는 것에 비해 HCT116 p53+/+/siPIG3 cell line 은 60%

가까이 세포가 죽어나가는 것을 알 수 있었다. 그러나 p53 이 없는 cell line 들은 PIG3 가 과발현이 된 cell line 에서도 세포생존의 차이를 볼 수 없었다. 따라서 TNF-α 에 의해 유도되는 세포사멸에서 p53 이 과발현된 cell line 에서 PIG3 의 발현이 억제 된 경우 세포사멸에 영향을 미치지 않을까 사료된다.

PC3 cell line 에서도 PIG3 의 발현 수준에 따른 세포사멸 정도의 차이를 알아보기 위해 PIG3 의 si oligo 를 4 가지 종류로 제작하여 HCT116 p53+/+에 transfection 하여 RT-PCR 방법을 통해 확인 하였는데 1 번과 2 번에서는 오히려 PIG3 의 발현양이 증가 하였고 3 번은 발현수준의 억제가 되지 않았으며 4 번 oligo 에서 발현수준이 억제 되어 효과가 가장 높은 4 번 oligo 를 선정 하였다. 또 같은 방법으로 CTSB 의 si oligo 를 제작 하였는데 HCT116 p53+/+에 transfection 하여 RT-PCR 상에서는 발현억제의 효과를 확실하게 보지 못했기 때문에 HCT116 p53+/+에 transfection 하여 Western blot 으로 siCTSB 94 의 발현 억제의 효과를 확인 하였다. (Fig.8)

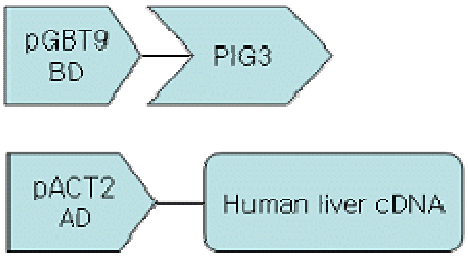
Fig.9(A) 에서는 PC3 cell line 에 효율이 확인된 4 번 siPIG3 oligo 를 transfection 하고 시간대별로 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리한 후 MTT 분석을 하였는데 약물을 처리하고 5 시간에서 10 시간 사이에 세포의 생존수가 PIG3 발현이 억제된 PC3 cell line 에서 정상세포보다 20% 정도 감소한다는 것을 알 수 있었다.

Fig.9(B)(C) 에서는 Cedex 를 이용 하여 lysosome 을 통해 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리하여 세포사멸을 일으켜 세포사멸 정도의 차이를 측정하였는데 마찬가지로 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리한 후 12 시간 이후부터 PIG3 발현이 억제된 PC3 cell line 에서 세포의 생존수가 정상세포보다 20% 정도 감소한다는 것을 알 수 있었다.

마지막으로 Fig.10 에서 lysosome 을 통해 TNF-α 와 actinomycinD 에 의해 유도되는 세포사멸에서 PIG3 의 기능을 재확인 하기 위해 Western blot 을 수행 하였다. Anti-PIG3 antibody 로 transfection 효율을 확인 할 수 있었고 anti-CTSB antibody 를 사용하여 PIG3 의 발현 억제 상태에 따라 같이 발현수준이 감소 하는 것을 알 수 있었다. 중요한 것은 caspase-8 의 분할 시점이 정상세포는 TNF-α 와 actinomycinD 를 처리한 후 8 시간부터 분할 되기 시작 했지만 PIG3 발현이 억제된 cell line 에서는 4 시간부터 분할된 형태가 보임을 알 수 있었다는 것이다. 따라서 PC3 cell line 에서 lysosome 에 의해 유도되는 세포사멸에서는 PIG3 가 없을 때 caspase-8 의 활성이 빨라진다는 것을 확인했다.

Figure and Figure Legends

(A)



(B)

pACT2 vector sequence

AAAAAGAGATCTCTATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGGGTGGTCATATGGCCATGGAGGCCCCGGGGATCCGAAT

TCGCGGCCGCGTCGACCTGAAGCTGCCTGCAAGCTTCGATGCACGGGAACAATGGCCACAGTGTCCCACCATCAAAGAGATCAGAGACCAG

GGCTCCTGTGGCTCCTGCTGGGCCTTCGGGGCTGTGGAAGCCATCTCTGACCGGATCTGCATCCACACCAATGCGCACGTCAGCGTGGAGG

TGTCGGCGGAGGACCTGCTCACATGCTGTGGCAGCATGTGTGGGGACGGCTGTAATGGTGGCTATCCTGCTGAAGCTTGGAACTTCTGGAC

AAGAAAAGGCCTGGTTTCTGGTGGCCTCTATGAATCCCATGTAGGGTGCAGACCGTACTCCATCCCTCCCTGTGAGCACCACGTCAACGGC

TCCCGGCCCCCATGCACGGGGGAGGGAGATACCCCCAAGTGTAGCAAGATCTGTGAGCCTGGCTACAGCCCGACCTACAAACAGGACAAGC

ACTACGGATACAATTCCTACAGCGTCTCCAATAGCGAGAAGGACATCATGGCCGAGATCTACAAAAACGGCCCCGTGGAGGGAGCTTTCTC

TGTGTATTCGGACTTCCTGCTCTACAAGTCAGGAGTGTACCAACACGTCACCGGAGAGATGATGGGTGGCCATGCCATCCGCATCCTGG

gi|63102436|gb|BC095408.1| Homo sapiens cathepsin B, transcript variant 1, mRNA (cDNA clone MGC:110901 IMAGE:30334082), complete cds

(C)

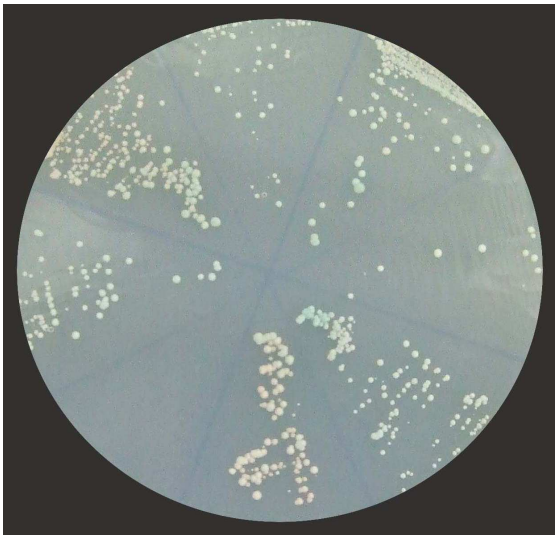


Fig. 1. Confirmation of interaction between PIG3 and CTSB in yeast two hybrid system.

(A) Human liver cDNA library cloned into pACT2 vector (Clontech) was screened using PIG3 cloned into pGBT9 vector (Clontech) for yeast two hybrid, so-called pGBT9-PIG3.

(B) One of positive clones containing a partial cDNA was identified by sequencing.

(C) Yeast diploid that contain the incubated bait (pGBT9-PIG3) and prey (pACT2AD-CTSB) plasmids were inoculated in SD/-Trp/-Leu/-His. PIG3 and CTSB were confirmed by re-Yeast two hybrid. Plate is incubated for 3 days at 30℃

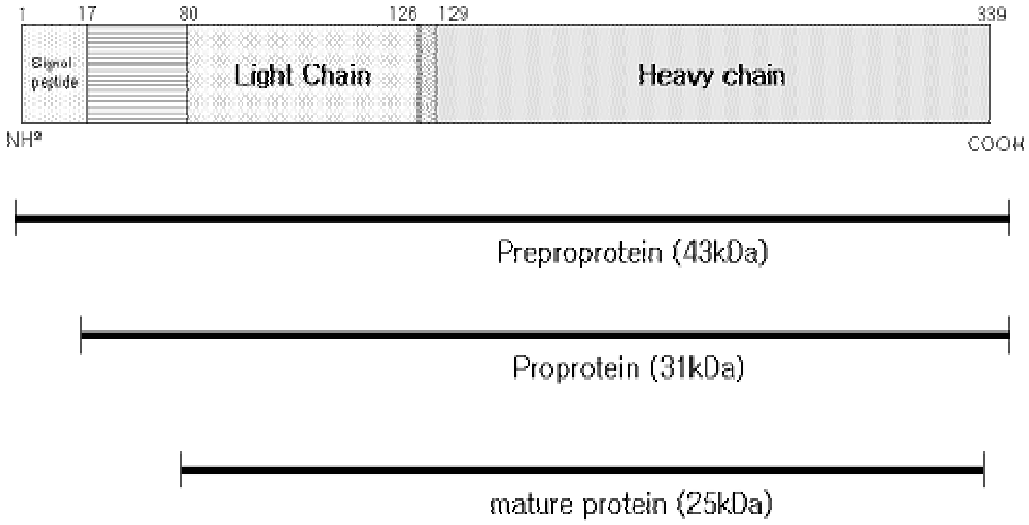


Figure. 2. Primary structure of Cathepsin B

The nucleotide sequences predict the primary structure of preprocathepsin B contains 339 amino acids organized as follows: a 17-residue of NH2-terminal prepeptide sequence followed by a 62-residue propeptide region, 254 residues in mature (single chain) cathepsin B and a 6-residue extension at the COOH terminus.

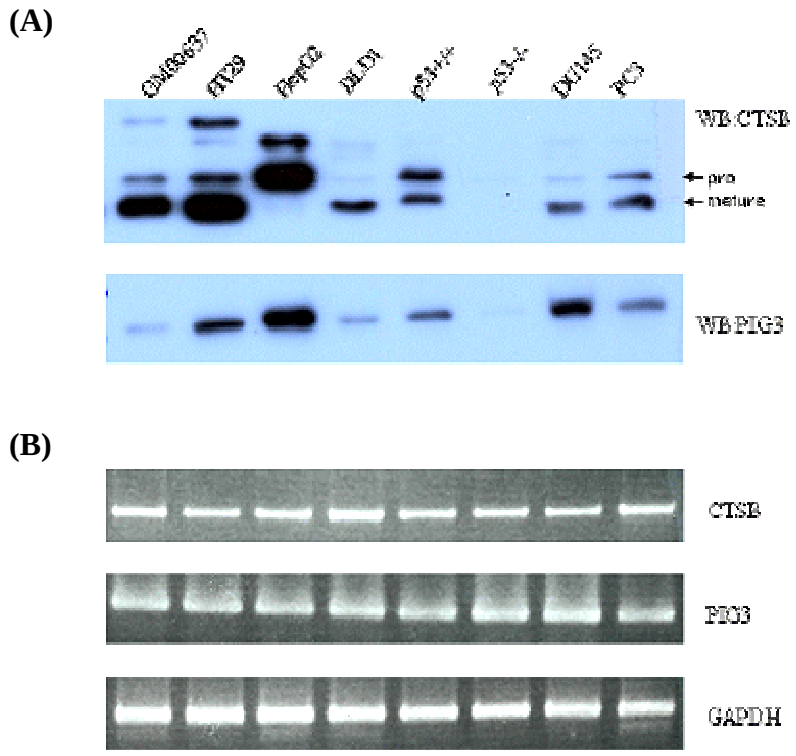
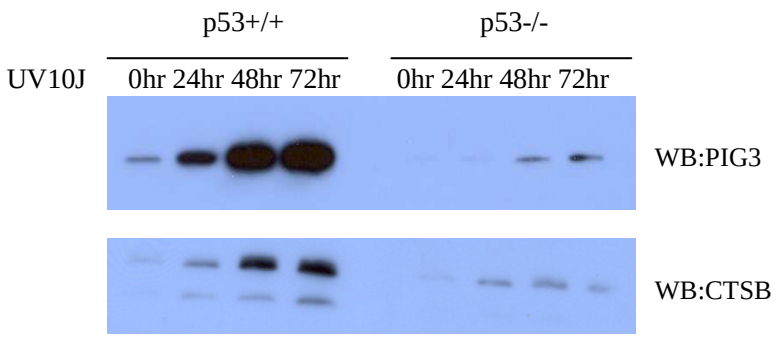


Figure. 3. Expression level of PIG3 and CathepsinB in various cell lines.

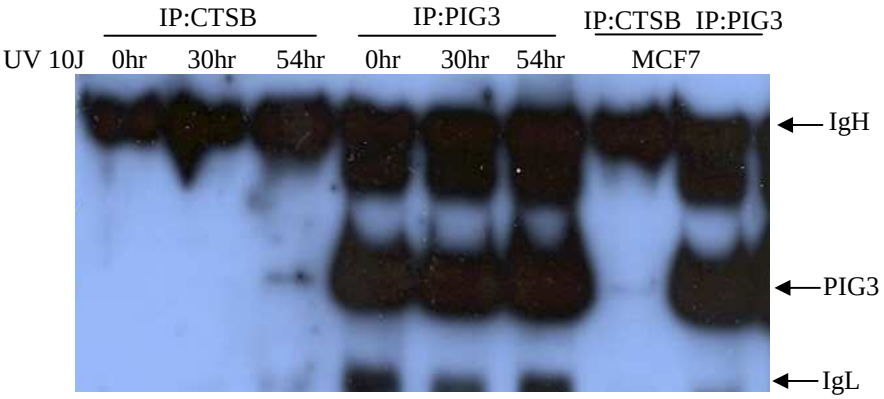
(A) Whole cell lysates corresponding to 30 ㎍ of protein were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and analyzed by Western blot using anti-CTSB (IM27L) and anti-PIG3(sc-16325) as described in Method.

(B) The mRNA expression of CTSB or PIG3 were analyzed by RT-PCR using CTSB or PIG3 specific primers, respectively. As an internal control, GAPDH was amplified.

(A)


p53+/+
p53-/-
UV10J
0hr 24hr 48hr 72hr
0hr 24hr 48hr 72hr
WB:PIG3
WB:CTSB

(B)


IP:CTSB
IP:PIG3
IP:CTSB IP:PIG3
UV 10J
0hr 30hr 54hr 0hr 30hr 54hr MCF7
IgH
PIG3
IgL

WB:PIG3

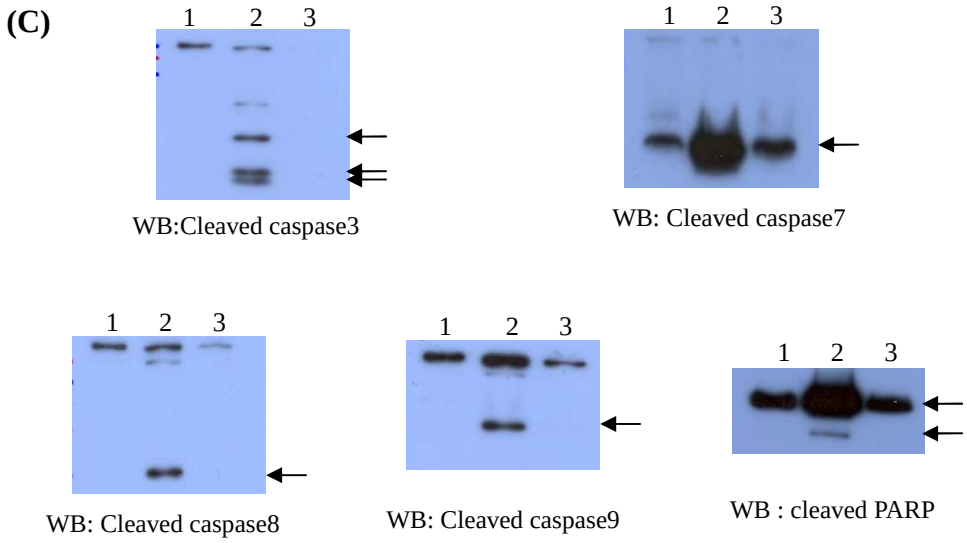


Figure 4. Co-immunoprecipitation of PIG3 with CathepsinB in UV damaged HCT116 p53+/+ cell line and MCF7 cell line.

(A) Co-immunoprecipitation experiments were performed using 1mg of cell lysates and anti-PIG3(PC268) or anti-CTSB antibody (IM27L). PIG3 or CTSB was detected by Western blot using anti-PIG3 antibody (sc-16325) or anti-CTSB antibody (IM27L), respectively.

(B) The expression level of PIG3 or CTSB in HCT116 p53+/+ cells was detected by Western blot. $10x10^5$ cells plated onto 100mm dish and cultured for two days in 10% FBS-containing IMDM. Cells were irradiated with 10J of UVC and cultured for 24 to 72 hours additionally. After harvesting the cell lysates, 20 μg of protein was loaded and transferred onto PVDF membrane. For immunoblot, anti-PIG3 antibody (sc-16325) was used.

(C) Cells were irradiated with 10J of UVC and cultured for 24 to 72 hours additionally, respectively ; 1: Unirradiated cell lysates, 2: irradiated with 10J of UVC cultured for 30hrs, 3: irradiated with 10J of UVC cultured for 54hrs. Cleaved caspases and PARP was detected by Western blot using anti-cleaved caspase3(#9661), Cleaved caspase7(#9491), Cleaved caspase8(#9646), Cleaved caspase9(#9501), cleaved PARP(#9541).

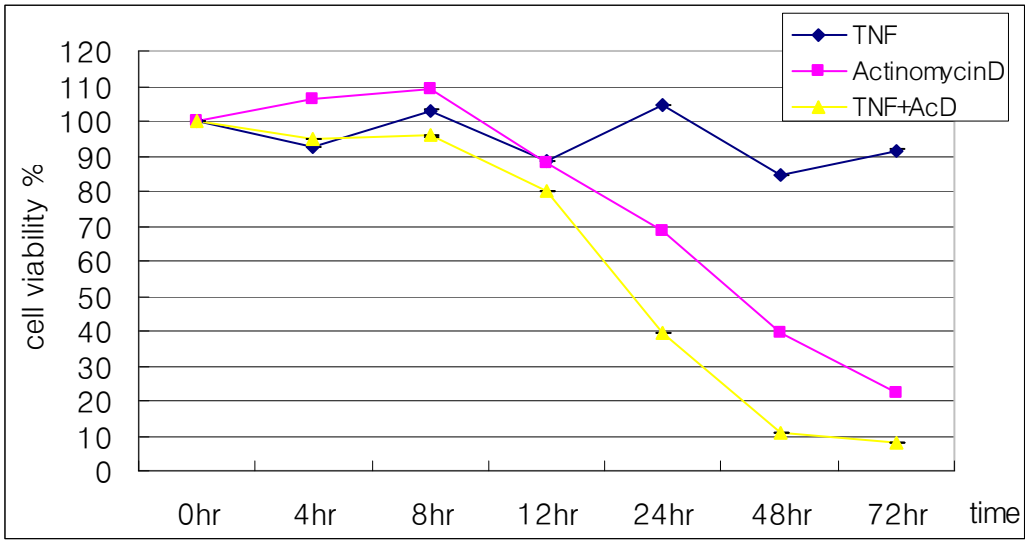


Figure. 5. Sensitivity of human prostate cancer cell line PC3 to TNF-α, ActinomycinD treatment.

PC3 cell line were seeded $2X10^4$ per well in 24well. After one day TNF (10 ㎍/ml), ActinomycinD(0.2 ㎍/ml) treated triplicate time-dependent. The survival of cells was analyzed by the MTT assay.

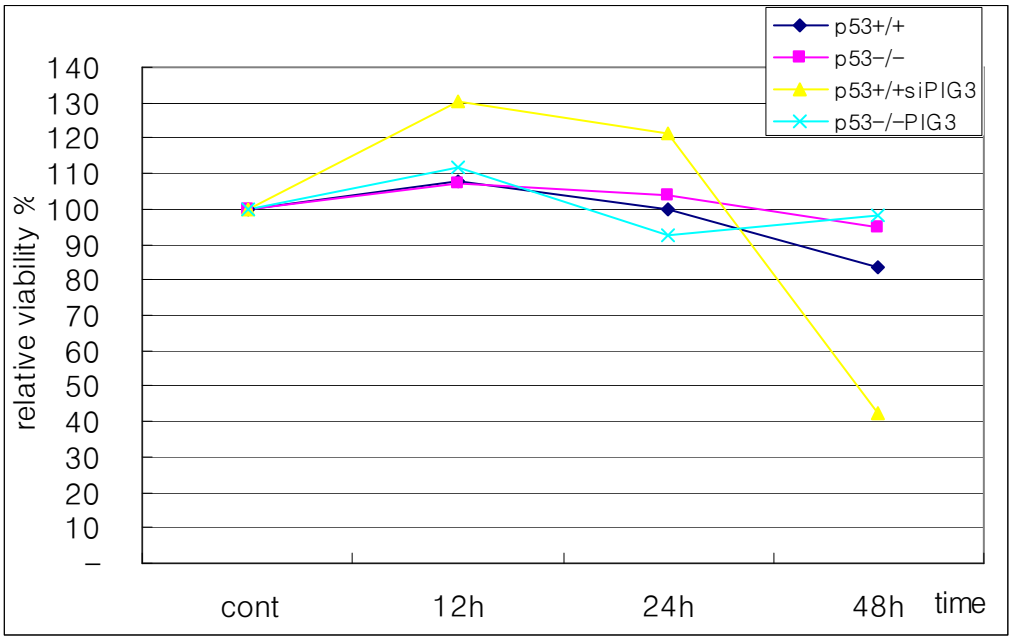


Figure. 6. Sensitivity of human colon cancer cell lines to TNF treatment

HCT116 p53+/+, HCT116 p53+/+/siPIG3, HCT116 p53-/-, HCT116 p53-/- PIG3 were seeded $2X10^4$ per well in 24well. After one day TNF (20 μg/ml) treated duplicate time-dependent. The survival of cells was analyzed by the MTT assay.

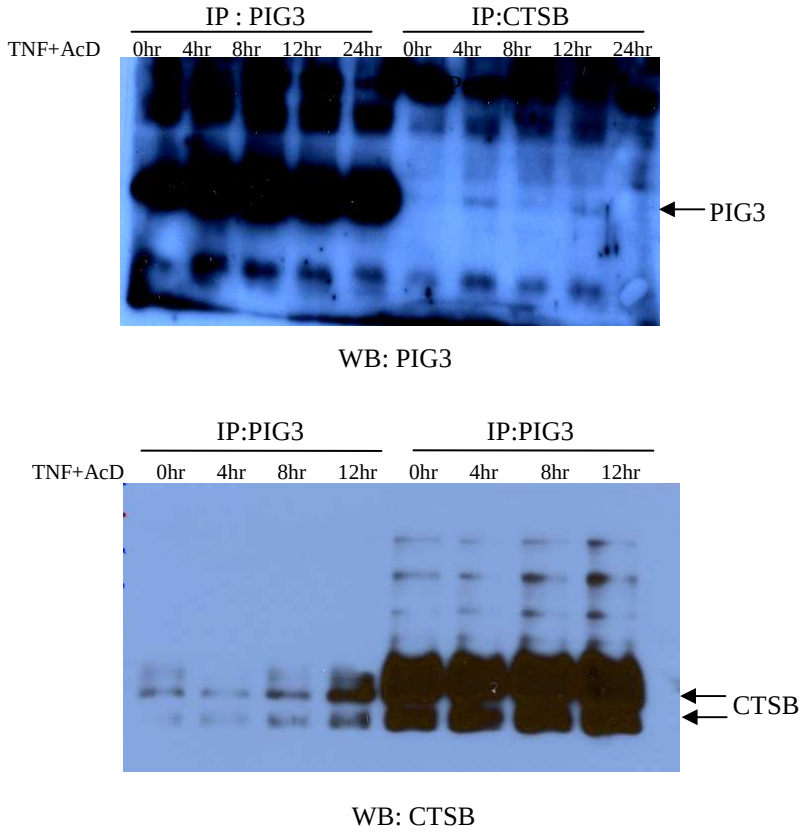


Figure 7. Interaction of PIG3 with CTSB in apoptotic PC3 cell line

PC3 cells 80% confluence in 100mm dish were treated TNF-α(10 μg/ml)and ActinomycinD(0.2 μg/ml). Cells lysates were immunoprecipitated with anti-PIG3, anti-CTSB by protein A/A agarose, protein A/G agarose . Protein samples were analysed by 12% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and then detected PIG3, CTSB by Western blotting of anti-PIG3 ,anti-CTSB antibody.

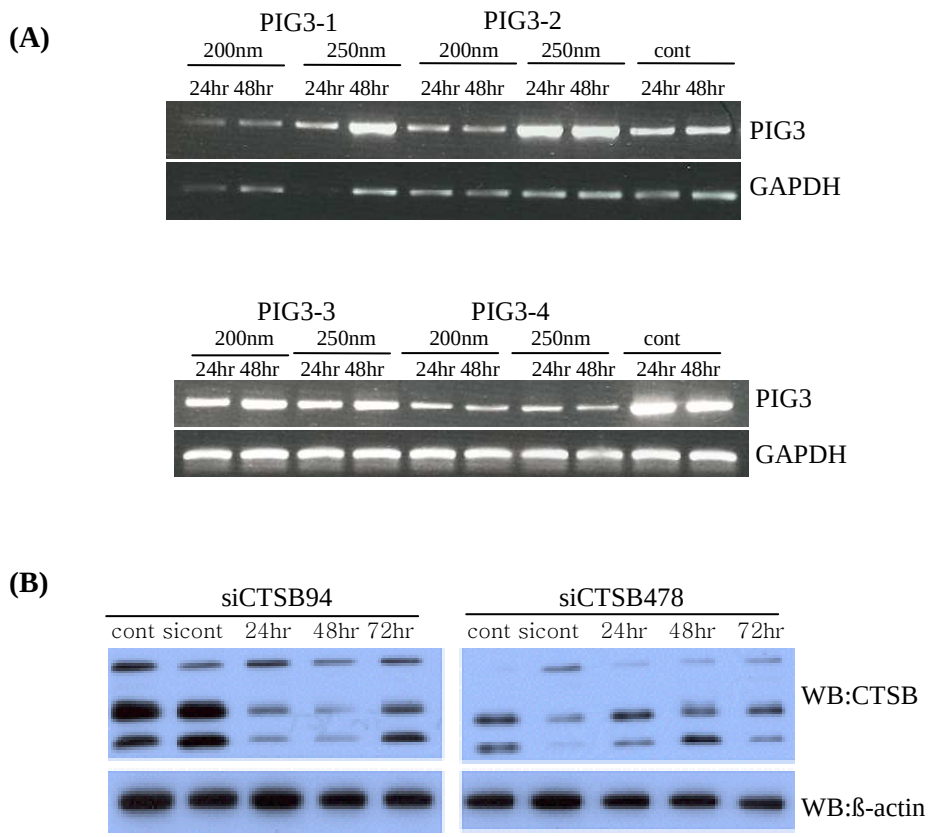
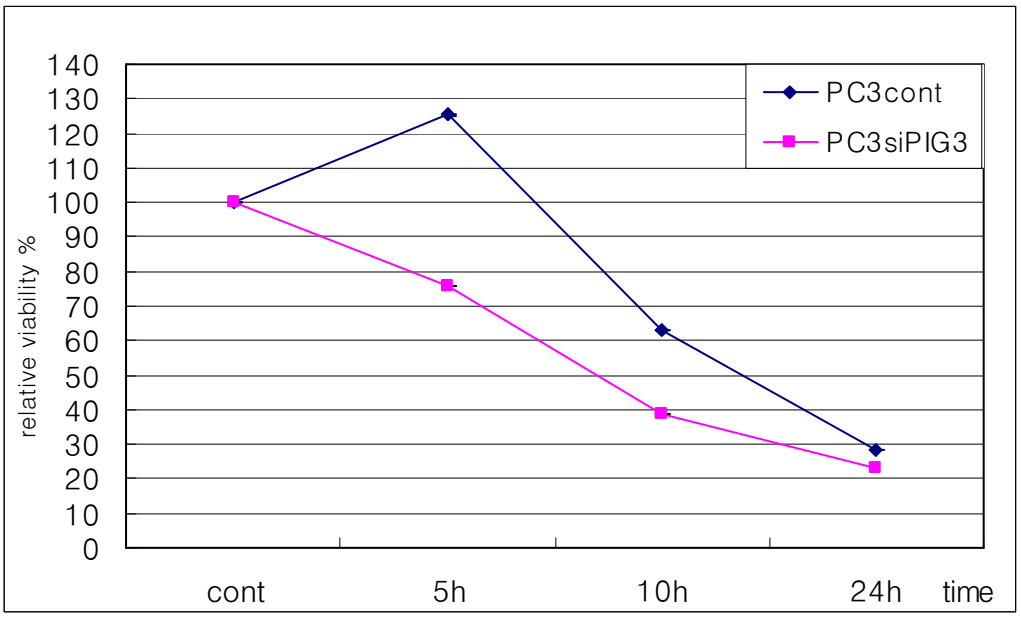


Figure. 8. Down-regulation of the PIG3, Cathepsin B expression.

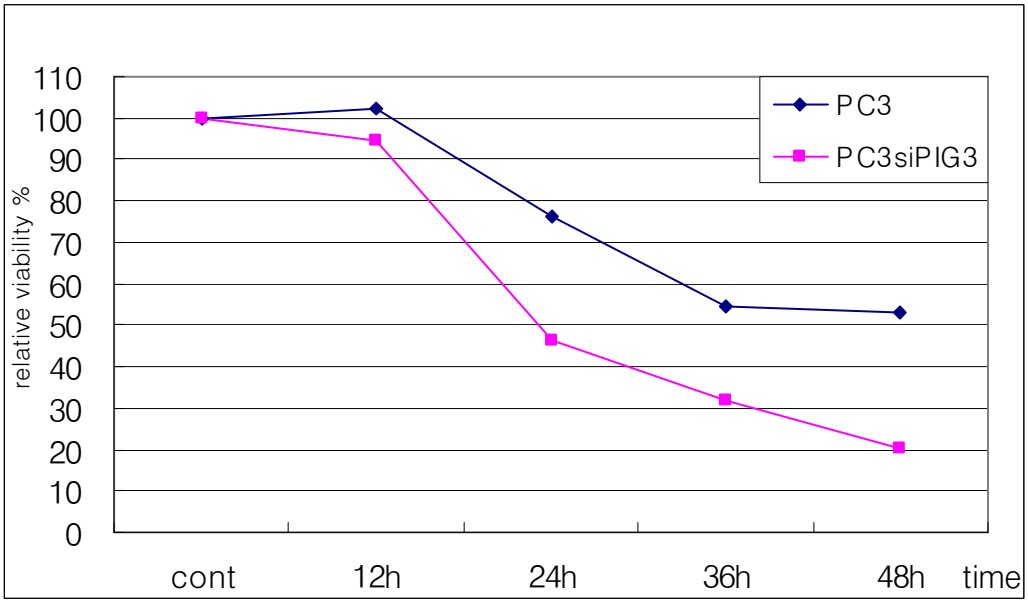
(A) HCT116 p53+/+ cells transfected with 200nm,250nm each for four different PIG3 siRNAs. In order to obtain the quantitative PIG3 values, quantitative RT-PCR experiments were performed 24h,48h after treating the cells with PIG3 siRNAs.

(B) HCT116 p53+/+ cells transfected with 200nm for the two different CTSB siRNAs. Whole cell lysates 20 μg protein were subjected to SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane and analyzed by Western blot using anti-CTSB, ß-actin as described in Method.

(A)


140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
relative viability %
PC3cont
PC3siPIG3
cont
5h
10h
24h
time

(B)


110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
relative viability %
PC3
PC3siPIG3
cont
12h
24h
36h
48h
time

(C)

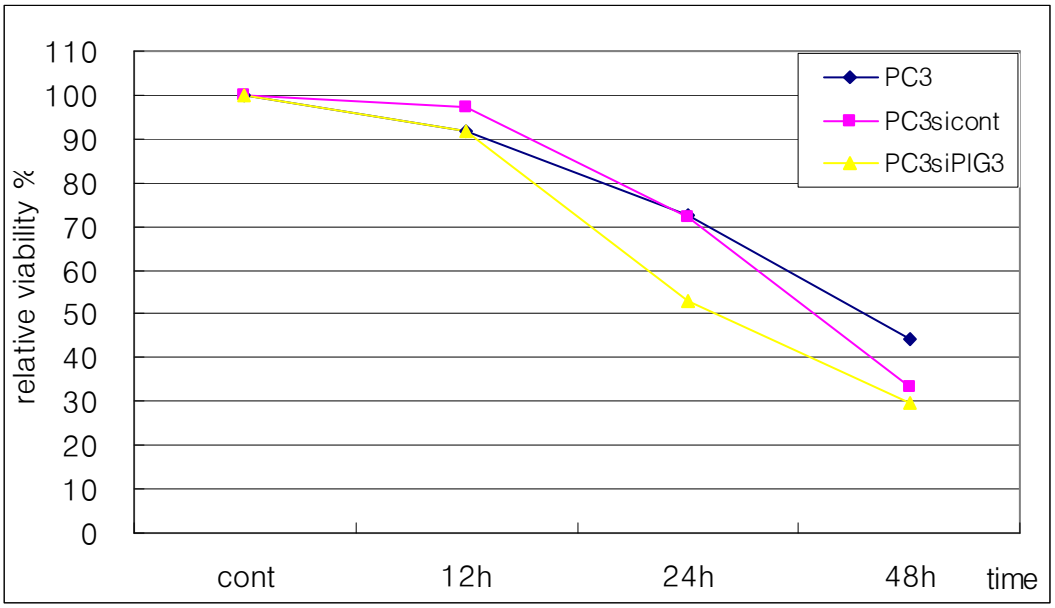


Figure. 9. Cell viability assay apoptosis can be altered in the absence PIG3.

(A) PC3 cell line were seeded $2X10^4$ per well in 12well. After one day TNF (10 ㎍/ml), ActinomycinD(0.2 ㎍/ml) treated triplicate time-dependent. The survival of cells was analyzed by the MTT assay.

(B)(C) CEDEX. PC3 cell line in 100mm dish($1X10^{6)}$) were transfected with siPIG3 oligo. After a day TNF (10 ㎍/ml), ActinomycinD(0.2 ㎍/ml)treated time dependent in transfected cell line. Cells were harvested at the same time.

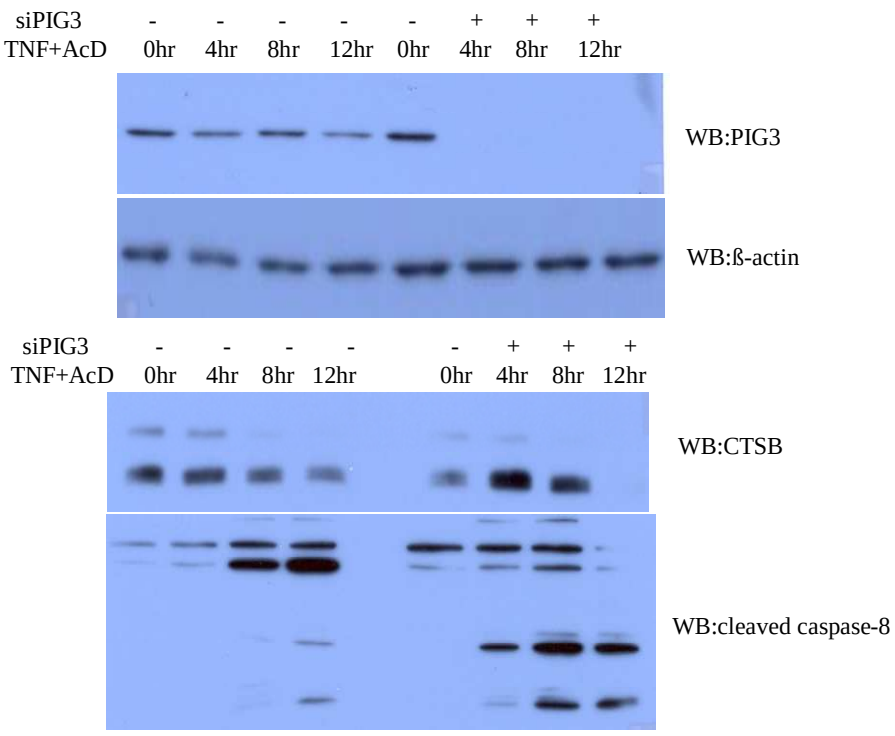


Figure 10. The effect of silencing of PIG3 on lysosome-mediated apoptosis.

PC3 cells in 100mm dish ($1X10^6$) were transfected with siPIG3 oligo using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). TNF-α (10 ㎍/ml) and actinomycinD(0.2 ㎍/ml) were treated in transfected cells one day after the transfection. Twenty ㎍ of proteins were used for CTSB, PIG3 or cleaved caspase-8 by Western blot; anti-PIG3 antibody (sc-16325) or anti-CTSB antibody (IM27L), cleaved caspase-8(9646), anti-ß-actin(sc-1615) were used.

Ⅳ. 고 찰

PIG3 는 아직 연구가 많이 되지 않은 유전자로 zinc binding domain 을 포함한 alcohol dehydrogenase, oxidoreductase 기능을 하는 domain 을 갖고 있으며 p53 에 의해 조절되는 유전자로 주로 ROS 에 의한 세포사멸에 다른 인자들과 작용한다 (19-24). 지금까지 PIG3 는 p53 의 기능에 의존적으로 관여한다는 보고뿐 구체적인 PIG3 의 역할에 대해서는 밝혀지지 않고 있고 또 p53 에 대해 의존적인 기능도 독립적인 기능도 할 수 있을 거라는 것 때문에 우리는 Yeast-two-Hybrid 실험을 통해 PIG3 와 관련된다고 생각되는 단백질들은 몇 가지 찾아 내었다. 여러 가지 후보들 중에서 Cathepsin B(CTSB)와 관련 있다는 것을 찾아내었고 PIG3 와 CTSB 가 결합하여 어떤 기능을 하는지 연구해왔다.

CTSB 는 lysosome 에 존재하는 cysteine protease 로써 disulfide bond 로 연결된 heavy chain and light chain 구조를 갖고 주로 세포내의 단백질 분해에 관계하는 housekeeping enzyme 이다. Cathepsin B,C,H,F,K,L,O,S,V,W,X/Z 의 종류가 있고 endopeptidase 로 세포 내 단백질 대사에 관여한다 (11). 처음에 amyloid precursor protein (APP) 의 단백질 분해에 관여 하는 효소로 알려졌으며 CTSB 는 주로 TNF-α 에 의한 간 손상에 대한 연구에서 *in vivo, in vitro* 실험을 통해 CTSB 가 없을 때 TNF-α 에 의한 세포사멸에 저항성을 가진다는 것을 연구 했고 (13,14), CTSB 가

세포사멸의 신호 전달 과정에 참여 하여 caspase 의 upstream 이나 downstream 에서 어떠한 기능을 할 것이라 연구된 결과도 있다 (11,13-17). 중요한 것은 CTSB 가 존재하는 lysosome 에 의한 세포사멸의 경로가 있다는 것이다. 예전에 lysosome 은 세포가 손상을 받고 necrosis 과정을 겪을 때 가수분해 효소를 방출하여 세포막을 분해 시켜 결과적으로는 세포의 생존을 막는다고 알려졌다. 이 lysosome 에 존재하는 Cathepsin 들은 활발하게 연구 되어 각 종류마다 세포사멸에 관련되어 여러 기능을 하는데 특히 CTSB 는 간세포에서 TNF-α 에 의해 일어난 세포 사멸에서 mitochondria 에 존재하는 cytochromeC 의 방출을 촉진하는 역할을 한다. 또, TNF 와 actinomycinD 를 처리 하여 세포사멸이 일어나는 반응에서 caspase-8 이 TNF-α에 의해 영향을 받아 lysosome 의 파괴를 일으키게 되고 CTSD, CTSL, CTSB 들이 방출되어 그 중 CTSB 가 cytosol 로 방출되어 Bid 를 자극시켜 그 신호가 mitochondria 로 내려가 세포사멸이 진행되게 된다는 보고가 있다 (13,17,18,30). 이 경로에서 lysosome 의 파괴는 세포사멸과정에서 윗 단계로 작용하며 이때 CTSB 가 중요한 역할을 한다.

PIG3 와 CTSB 가 결합하여 어떤 기능을 하는지 알아보기 위해 우선 CTSB 가 관련된 TNF 와 actinomycinD 에 의한 lysosome 의 파괴 후 세포사멸에 (18) 초점을 맞추어 실험을 진행하여 두 단백질이 결합한다는 것을 확인 하였고 (Fig. 7) PIG3 유전자 발현을 억제 시킨 후 MTT 분석을 통해 TNF 와 actinomycinD 에 의한

lysosome 의 파괴 후 세포사멸에서 PIG3 발현이 억제 되었을 때 세포사멸이 더 빨리 일어난다는 것을 확인 했다 (Fig. 7-8) 이는 p53 의 기능이 없는 cell line 에서 lysosome 을 통해 TNF-α 와 actinomycinD 에 의해 유도되는 세포사멸에서 PIG3 의 기능은 p53 과 독립적으로 작용할 수 있다는 것을 설명할 수 있는 것이다. 또, PIG3 의 발현억제로 인해 caspase-8 의 분할양상이 음성 대조군 세포보다 빨라짐을 확인하였기 때문에 (Fig. 10) PIG3 와 CTSB 의 상호작용이 caspase-8 의 활성화를 지연시킴으로써 lysosome 파괴를 통한 세포사멸을 초기단계부터 조절하는 것으로 판단된다. 이 실험자료를 가지고 관련된 여러 caspase 들의 신호 전달과정을 나누어 확인 하는 실험을 수행해야 할 것이다. 한편 lysosome 의 destabilization 이 lysosome 에서 mitochondria 로 가는 p53 에 의한 세포사멸 시작단계에 관여한다는 연구도 있다 (28). 이렇듯이 CTSB 가 유도하는 세포사멸은 아주 다양한 관점으로 연구 되고 있어 (29,30) 더 확실한 증거를 위해 PIG3 와 CTSB 가 각각의 정확한 어느 site 에서 결합하는지 알아보는 실험을 수행해야 하며 또, CTSB 가 세포사멸 외에도 암세포의 migration 이나 invasion 에 관계한다는 연구도 많이 되고 있다 (25,26). 주요 암세포에서 Cathepsin B 의 발현수준이 높게 나타나고 cysteine protease 로써 extracellular matrix 에 존재하는 collagenⅣ나 lamin 같은 단백질들을 분해 시키는 역할을 함으로써 암세포의 이동과 침윤을 촉진시킨다 (31). 또 사람의 glioma cell line 인 SNB19 cell line 에서 CTSB 와 urokinase plasminogen activator(uPA) 의

유전자 발현을 억제 시켰더니 glioma tumor 의 성장이나 침윤을 억제 했다는 연구보고가 있었다(32).

주목할 것은 PIG3 도 p53 이 유도하는 세포주기 정지에서 발현수준이 높다는 것이 연구 되었다. 이는 PIG3 가 세포주기에 관여 하며 tumorigenesis 에도 어떠한 역할을 할 수 있다는 예측을 가능하게 한다(34). 우리가 실험한 cell line 인 PC3 에서도 Cathepsin B 의 세포의 이동과 침윤을 연구한 보고가 있기 때문에 (33) 이 cell line 에서 PIG3 와 CathepsinB 의 암세포의 이동과 침윤을 조절 하는 기능과 관련한 실험을 할 수 있을 것이다

Ⅴ. 참고 문헌

1. F C Kischkel, S Hellbardt, I Behrmann, M Germer, M Pawlita, P H Krammer, and M E Peter Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995 November 15; 14(22): 5579–5588.

2. Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U, Schulte-Hermann R.(2000) Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci*. 926:1-12.

3. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001 Oct;92(1):57-70.

4. Zimmermann KC, Green DR. (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 108:S99-103.

5. Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. and Adjei, A.A. (2005) Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J. Clin*. 55,178–194.

6. Micheaul, O. and Tschopp, J. (2003) Induction of TNF receptorI-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114, 181–190.

7. Varfolomeev, E.E. and Ashkenazi, A. (2004) Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?. *Cell* 116, 491–497.

8. Barnhart BC, Peter ME. (2003) The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell.* 114(2):148-50.

9. Yin XM. Bid, a critical mediator for apoptosis induced by the activation of Fas/TNF-R1 death receptors in hepatocytes. *J Mol Med.* 2000;78(4):203-11.

10. Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. (2003) Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 278(28):25534-41.

11. Turk V, Turk B, Turk D. (2001)Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*. 20(17):4629-33

12. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS(1992) Rat Procathepsin B PROTEOLYTIC PROCESSING TO THE MATURE FORM IN VITRO *J Biol Chem*.Aug 5;267(22):15993-9.

13. Guicciardi, M.E., Deussing, J. and Miyoshi, H., et al. (2000)Cathepsin B contributes to TNF-a-mediated hepatocyte apoptosisby promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin.Invest*. 106, 1127-1137

14. Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F. and Gores, G.J.(2001) Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosisfactor-a-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury. *Am. J.Pathol.* 159, 2045–2054.

15. Turk, B., Stoka, V., Rozman-Pungercar, J., Cirman, T., Droga-Mazovec, G., Oresic, K. and Turk, V. (2002) Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol. Chem*. 383, 1035–1044.

16. Werneburg, N., Guicciardi, M.E., Yin, X.M. and Gores, G.J.(2004) TNF-a-mediated lysosomal permeabilization is FAN andcaspase 8/Bid dependent. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 287, G436–G443.

17. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 153, 999–1009

18. Jianping Liu, Qian Guo, Buxin Chen, Yao Yu, Hong Lu, Yu-Yang Li(2006) Cathepsin B and its interacting proteins, bikunin and TSRC1,correlate with TNF-induced apoptosis of ovarian cancer cells OV-90. *FEBS Letters* 580 245–250

19. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389**,** 300–305

20. Johnson, T. M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Lowenstein, R. A., and Finkel, T.(1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93**,** 11848–11852

21. Li, P. F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. (1999) p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis

blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 18**,** 6027–6036

22. Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., and Debussche,L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression**.** *EMBO J.* 17, 4668–4679

23. Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold,B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M. A., Iggo, R., and Fronza, G. (2001) p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* 20**,** 3573–3579

24. Chris D. Nicholls, Michael A. Shields, Patrick W. K. Lee, Stephen M. Robbins,and Tara L. Beattie (2004)UV-dependent Alternative Splicing Uncouples p53 Activity and PIG3 Gene Function through Rapid Proteolytic Degradation. *J Biol Chem*. Jun 4;279(23):24171-8.

25. Podgorski, I. and Sloane, B.F. (2003) Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem. Soc. Symp*. 70, 263–276.

26. Berdowska, I. (2004) Cysteine proteases as disease markers. *Clin.Chim. Acta* 342, 41–69.

27.Chan SJ, San Segundo B, McCormick MB, Steiner DF.(1986) Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc Natl .Acad Sci* U S A.83(20):7721-5.

28. Yuan XM, Li W, Dalen H, Lotem J, Kama R, Sachs L, Brunk UT. (2002) Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. Apr 30;99(9):6286-91.

29. M Leist, M Jaattela. (2001) Triggering of apoptosis by cathepsins.*Cell Death and Differentiation.* 8,324-326.

30. Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*. 8:569-581.

31. Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J,Cavallo-Medved D, Sameni M, Dosescu J, Moin K.(2005) Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 15(2):149-57.

32. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS.RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene.* 2004 Nov 4;23(52):8486-96.

33. Colella R, Jackson T, Goodwyn E.(2004) Matrigel invasion by the prostate cancer cell lines, PC3 and DU145, and cathepsin L+B activity. *Biotech Histochem*. 79(3-4):121-7.

34. Flatt PM, Polyak K, Tang LJ, Scatena CD, Westfall MD, Rubinstein LA, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B, Hill DE, Pietenpol JA.(2000) p53-dependent expression of PIG3 during proliferation, genotoxic stress, and reversible growth arrest. *Cancer Lett.*156(1):63-72.

저작물 이용 허락서

학 과	생물신소재학과	학 번	20057252	과 정	석 사
성 명	한글 : 박 아 연 한문 : 朴 雅 然 영문 : Park Ah Yeon				
주 소	광주광역시 남구 양림동 24-26 리버힐빌딩 5층				
연락처	E-MAIL : zn2000@hanmail.net				
논문제목	한글:Lysosome 파괴에 의한 세포사멸에 관여하는 PIG3 의 기능에 관한 연구 영문:The study of PIG3 function in lysosome-mediated apoptosis				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2006년 12 월 11일

저작자: 박 아 연(서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하