

p53 tumor suppressor에 의한 암세포 성장억제 유도 기작에 관한 연구

Study on the Mechanisms of p53 induced
Tumor Suppression

연구기관
한국과학기술연구원
생명공학연구소

1996. 2

과 학 기 술 처

제 출 문

한국과학기술연구원
생명공학연구소 소장 귀하

본 보고서를 “p53 tumor suppressor에 의한 암세포 성장억제
유도기작에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1996. 2. 29

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 생명공학연구소
연구책임자 : 박순희(생명공학연구소 책임연구원)
연구원 : 최인성(생명공학연구소 책임연구원)
권두한(생명공학연구소 선임연구원)
진승원(생명공학연구소 선임연구원)
정미경(생명공학연구소 선임연구원)

요 약 문

1. p53 단백질의 생산 및 분리

Wild type의 p53유전자를 대장균 발현 벡터에 클로닝하여 p53단백질을 대량생산하는 균주를 제조하였다.

2. p53 단백질에 대한 항체 생산

p53단백질을 분리하여 토끼에 면역화하여 p53단백질에 대한 항체를 생산하였으며 만들어진 항체는 p53단백질에 특이적 결합 반응을 보이는 것을 확인하였다.

3. 진핵세포 발현벡터에의 p53클로닝

p53 유전자를 inducible promotor가 있는 진핵세포 발현 벡터(pGRE/EBV)에 클로닝하여 pGRE/p53 플라스미드를 제조하였다.

4. 암세포주에서의 p53발현

앞서 제조한 진핵세포 발현벡터를 자궁암세포주 C3N 세포와 SiHa, 그외에 간암세포주인 HepG2, Hep3B와 Chang, 그리고 NIH 3T3세포에 각각 transfection시키고 p53발현의 조절가능성과 p53활성이 나타남에 따른 암세포주의 형태적 생리적 변화를 확인하였다. Inducer인 dexamethasone에 의해 pGRE/p53 플라스미드를 transfection 시킨 SiHa세포 내에서 p53단백질이 발현유도됨을 형광면역 검색법으로 확인하였다.

SUMMARY

1. Production of p53 protein

p53 gene isolated from human cDNA library was inserted into pET-3a expression vector for *E. coli*, and wild type p53 protein was produced in *E. coli* by IPTG induction.

2. Antibody production against p53 protein

p53 protein isolated was used to immunize rabbit, and antisera for p53 protein was obtained from immunized rabbit. Antibody isolated specifically reacted with p53 protein on the Western blot.

3. Construction of eukaryotic expression vector p53 gene

p53 gene was inserted into pGRE/EBV vector, a eukaryotic expression plasmid containing inducible promotor, and new expression vector named as pGRE/p53 plasmid and control vector, pGRE/EBV were transfected into several carcinoma cell lines, respectively.

4. Expression of p53 protein in eukayotic cells

After transfection, cells were cultured in a medium containing G418(1mg/ml) for 152 hr. Number of live cells

carrying pGRE/p53 plasmid decreased, but number of cells containing pGRE/EBV increased. It suggests that the apoptosis of carcinoma cells was induced by synthesis of p53.

CONTENTS

1. Introduction	7
2. Materials and Methods	
1) Preparation of p53 expression vector in <i>E. coli</i>	9
2) Production of p53 protein in <i>E. coli</i>	9
3) Preparation of p53 eukaryotic expression vector	10
4) Expression of p53 in carcinoma cells	11
3. Results and Discussion	
1) Preparation of p53 expression vector in <i>E. coli</i>	12
2) Production of p53 protein in <i>E. coli</i>	15
3) Preparation of p53 eukaryotic expression vector	20
4) Effect of expression of p53 in carcinoma cells	20
4. References	32

목 차

1. 서 론	7
2. 재료 및 방법	
1) p53 대장균 발현 vector의 제조	9
2) 대장균에서의 p53 단백질 생산	9
3) 진핵세포 p53 발현 vector의 제조	10
4) 암세포주에서의 p53 단백질 발현	11
3. 결과 및 고찰	
1) p53 대장균 발현 vector의 제조	12
2) 대장균에서의 p53 단백질 생산	15
3) 진핵세포 p53 발현 vector의 제조	20
4) 암세포주에서의 p53 단백질 발현	20
4. 참고문헌	32

제 1장 서론

1995년 WHO에서 발표한 사람의 사망원인 분석자료에 의하면 암에 의한 사망율이 단연 1위를 차지하고 있다. 그동안 암의 발생기작과 조기진단 및 치료기술 개발에 대한 많은 연구가 이루어져 왔는데 지금까지 여러 암종에 대한 분석결과에 의하면 암의 90% 이상이 상피세포에서 유래하는 것으로 밝혀졌다. 그 이유는 인체부위 중 가장 많은 면적을 차지하고 있고 각 장기의 외면을 형성하고 있는 것이 상피세포이므로 화학물질, 바이러스등 발암인자와 직접 접촉이 용이하게 일어나는 부위이기 때문이다. 그리고 암조직의 분석 결과 50% 이상의 암에서 p53 단백질의 변이가 발생하였음이 밝혀졌다. 이 단백질의 기능에 대한 연구가 최근에 활발하게 이루어져 왔다. 그 결과 p53의 야생형단백질이 tumor suppressor로 작용함이 밝혀지고 단백질의 구조가 조사되어 기능 domain들이 밝혀지고 있다. 한편 이 단백질의 tumor suppressor로서의 기능이 어떻게 이루어지는가에 대한 기작을 밝히게 되면 암의 진단, 억제 및 치료에 가장 중요한 자료와 재료를 제공할 수 있을 것이 확실하다. 한편 이 단백질은 여러가지 돌연변이에 의해 불활성화가 되거나 MDM2 같은 세포성암유전자와 SV40 T antigen, Adenovirus E1A 그리고 HPV E6와 같은 바이러스성 암유전자에 의해 불활성화되는 것이 밝혀지게 되었다. 이 단백질이 불활성화가되면 selective growth advantage를 갖게 되고 결국에는 암세포화되는 것이 보여졌다. 최근 이 단백질은 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3'가 약 13 bp 정도 떨어져서 2 copies가 존재하는 p53-specific DNA sequence에 결합하여 transcription activation factor로 작용하는 것이 밝혀졌다. 그리고 p53단백질의 주요기능의 하나가 방사선 등에 의해 세포에 유해한 DNA damage가 초래되었을 때 세포주기 G1에서 S phase로 transition을 억제하여 DNA의

repair가 될 수 있도록 함으로써 대처하는 세포주기조절과 관계가 있다는 것이 밝혀지게 되었다. 따라서 많은 연구자들이 p53에 의해 유도되는 단백질들이 정상적인 세포주기를 유지하게하는 인자들 즉 tumor suppressor로 작용할 것으로 보이므로 이들을 찾기 위해 다양한 방법으로 연구를 수행하고 있는데 p53에 의해 유도되거나 p53과 결합능이 있는 단백질을 찾음으로써 그 결과 muscle creatine kinase, GADD45, MDM2 그리고 GLN retroviral element, WAF1 등이 찾아지게 되었다. p53단백질에 의해 합성유도된 WAF1은 Cyclin/cdk complexes를 inhibition함으로써 손상을 입은 세포들의 증식을 억제하고 있다.

이러한 일련의 연구들이 수행되면서 p53에 의해 유도되는 단백질들이 cell type과 세포의 환경에 따라 다를 수 있을 것을 예측하는 연구결과들이 제시되고 있다. 즉 p53 관련 genetic program of cell growth arrest가 다양하여 several down stream effectors를 WAF1이 유도할 수 있을 것으로 보인다. 일반적으로 p53이 합성유도된 암세포주에서 보면 DNA fragmentation이 유도되고 있고 세포주기 조절인자 cyclin D1의 발현을 증가시키는 등의 영향이 밝혀지고 있으나 p53 단백질이 어떻게 growth suppression을 유도하는 지 그 자세한 기작은 밝혀지지 않았다.

한편 여성에 있어서 비교적 높은 빈도로 발생하는 암인 자궁경부암은 그 발병원인이 사람파피로마바이러스에 의한 것으로 알려져 있는데, 이 바이러스의 유전자중 E6 유전자와 E7유전자는 각각 p53단백질, Rb단백질을 불활성화시키는 것으로 보고되고 있다.

따라서 본 기본연구에서는 p53의 암화억제기작을 연구하기 위한 기반기술을 구축하기 위하여대장균에서 p53단백질을 생산하는 균주 제조 및 진핵세포주에서 p53발현연구를 수행할 수 있는 벡터 및 세포주를 제조하고 분석하고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

① p53 재조합단백질 발현용 벡터의 제조

p53유전자를 클로닝하기 위해 사용한 template 는 본 연구자들이 인체 태반 조직에서 분리한 mRNA로 제조한 cDNA library를 template로 사용하였다. p53유전자를 증폭하기위해 사용한 primer는 적절한 DNA 제한효소인지서열을 포함시켜 대장균발현벡터와 진핵세포발현벡터 모두에 클로닝할 수 있도록 primer를 고안하였다. PCR이 끝난후에는 phenol/chroloform으로 추출하고 agarose gel 전기영동을 실시하여 유전자의 증폭을 확인하였다.

증폭된 p53유전자를 포함한 DNA절편을 agarose gel로부터 추출하여 *Bam*HI과 *Nde*I 효소를 처리하였다. pET-3a 벡터도 역시 *Bam*HI과 *Nde*I효소로 처리하고 p53유전자 절편과 T4 ligase로 결합시킨뒤 BL21에 형질전환시키고 형질전환된 균주를 ampicillin이 잇는 배지에서 선별하였다.

② p53 재조합단백질의 생산

p53유전자를 포함하고 잇는 pETp53 플라스미드를 가지고 잇는 대장균 균주(BL21)를 LB배지에 16시간 배양하고 새로운 배지에 1/100으로 희석하여 접종하고 600 nm에서 흡광도가 0.4에 이를 때까지 배양한후 1 mM의 IPTG를 첨가하여 재조합단백질의 생산을 유도하였다. 대장균 배양액을 원심분리하여 균주를 회수하고 다시 완충용액(20 mM Tris-Cl, pH

7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluride)을 가하고 초음파 파쇄기로 파쇄하여 초원심분리한 다음 상등액과 침전물에서 p53단백질의 생산을 확인하였다.

생산된 단백질은 SDS-PAGE와 immunoblotting을 사용하여 분자량 53k dalton의 위치에서 확인하였다.

③ p53 재조합단백질에 대한 항체 생산

생후 8-10 주 사이의 토끼 세마리에 피하주사의 방법으로 p53단백질을 각각 면역화하였다. 한 마리당 1회에 350 μ g의 단백질을 4 차례 주사하였고 1차 주사시에는 Freund complete adjuvant를 사용하였으며, 2 번째 부터는 Freund incomplete adjuvant를 섞어 2 주간격으로 주사하였다. 매 주사후 5 일후에 혈청을 채취하여 항체가를 측정하였으며 4차 주사후에 전 혈액을 뽑아 항체를 분리하였다.

④ 진핵세포에서의 p53발현용 벡터의 제조

인체 cDNA library를 주형으로 하여 PCR을 실시하여 p53유전자를 증폭하였으며 증폭된 DNA절편을 *Bam*HI과 *Nde*I으로 제한효소처리하고 역시 진핵세포발현벡터인 pGRE/EBV를 *Bam*HI과 *Nde*I으로 제한효소처리한 다음 T₄ ligase로 접합하고 BL21에 형질전환시켰으며, TB배지에 16 시간 배양하고 플라스미드 DNA를 kit를 사용하여 정제하였다. 정제된 플라스미드를 electroporation방법에 의하여 여러 진핵세포에 형질전환시

켰다.

⑤ 진핵세포에서 p53재조합단백질의 발현

형질전환시킨 진핵세포주들을 geneticin 1 mg/ml의 농도에서 계속배양하여 transfectant를 선별하였다. 또한 p53유전자를 포함하고 있지 않은 플라스미드를 같은 방법으로 진핵세포에 형질변환시켜서 비교세포주로서 사용하였다. 자궁상피암세포주로서 파필로마바이러스에 감염되어 있는 세포주들인 C3, C3N, SiHa와 간암세포주인 Hep3B와 HepG2 세포주, 비암세포주인 NIH3T3세포주에서 p53단백질 발현현상을 유도하고자 하였다. 플라스미드가 없는 세포주, p53유전자가 없는 플라스미드를 갖고 있는 세포주, p53유전자가 들어있는 플라스미드를 갖고 있는 세포주들을 각각 G418의 존재하에서 계속배양하여 비교관찰하여 암세포주에 있어서의 특징인 p53발현에 의한 세포괴사현상을 관찰하였으며, pGRE/p53 플라스미드를 transfection시킨 SiHa세포에서 dexamethasone에 의한 p53 단백질의 발현을 간접 형광면역법으로 확인하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

① 인체 cDNA library로부터 p53유전자의 클로닝 및 발현벡터 제조

먼저 p53유전자를 특이적으로 증폭할 수 있을 뿐아니라 발현벡터에 손쉽게 클로닝할 수 있도록 PCR용 primers를 고안하여 Fig. 1A과 같이 제조하였다. 이 primers를 이용하여 인체 cDNA library로부터 PCR 방법에 의하여 p53유전자를 증폭하였으며 이를 agarose gel상에서 확인한 결과, 3 개의 library pool에서 예상되는 크기의 DNA절편이 증폭되었음을 확인하였다(Fig. 1B).

이 증폭된 DNA 절편을 agarose gel에서 분리하여 대장균에서 발현할 수 있도록 발현벡터에 클로닝하였으며 염기분석결과 변이가 유발되지 않은 플라스미드를 선별하였다(자료제시 없음). 이 플라스미드를 적절한 발현주인 BL21(lambda DE3)에 형질전환시켜서 BL21/pETp53 균주를 제조하였다(Fig. 2).

A p53a ; 5'-GGCCCGGGTCATATGGAGGAGCCGCAGTCAG

p53b ; 3'-CCGTTAACGGATCCTCAGTCTGAGTCAGGCC

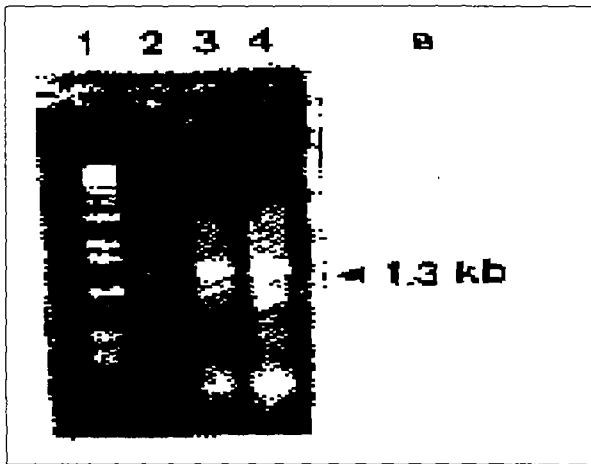


Fig. 1 PCR primers and amplification of p53 gene

A : PCR primer sequence corresponding to 5' and 3' end regions of p53

B : Amplification of p53 genes from cDNA library of human embryo.

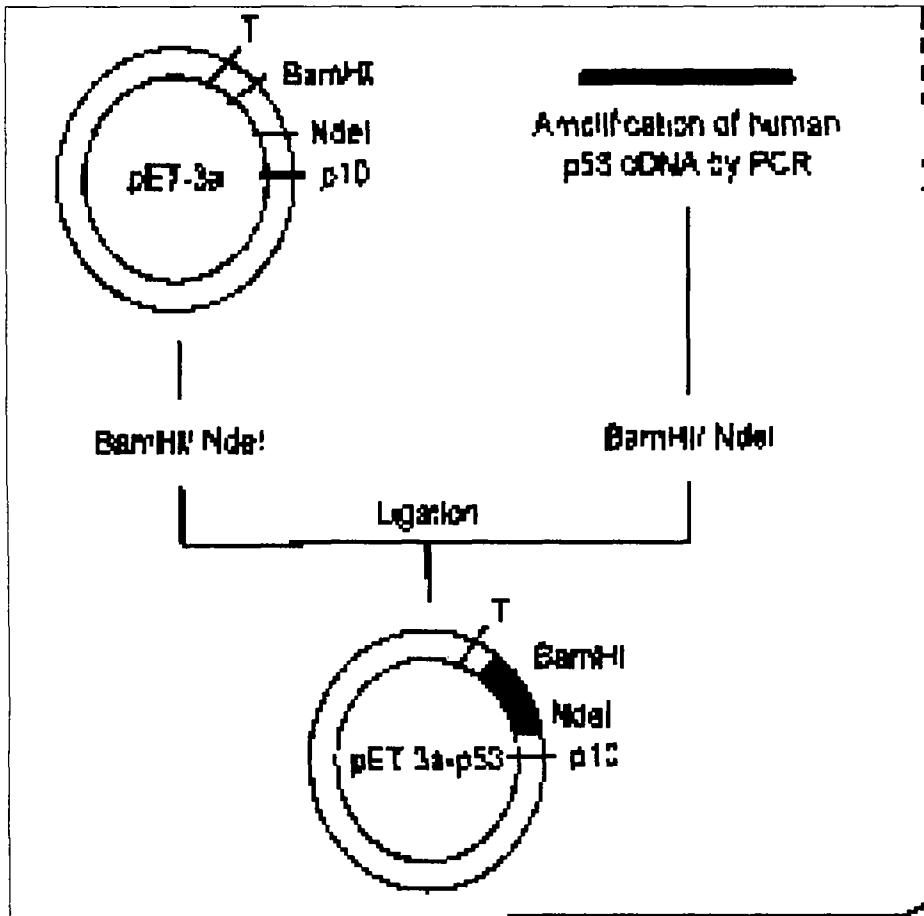


Fig. 2 Construction scheme of expression vector for p53 protein expression.

② 대장균에서 p53 비융합형 재조합 단백질의 발현검색

상기 균주 BL21/pETp53을 배양하여 ampicillin이 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 들어있는 LB배지 100 ml에 접종하여 37°C에서 배양하여 optical density가 600 nm에서 0.4에 이르렀을때 IPTG의 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 유전자의 발현을 유도하였다. 대장균에서 p53단백질이 생산되는 것을 확인하기 위하여 10% acrylamide gel electrophoresis를 수행한 결과 IPTG 첨가후 30분 후부터 p53단백질이 생산되기 시작하며 3시간이 지날때 생산량이 정점에 이르렀다(Fig. 3A). 발현된 단백질이 p53임을 확인하기 위해 Novocastra Labs사로부터 p53에 대한 단일클론항체를 구입하여 immunoblotting을 수행한 결과, 합성된 새로운 단백질이 p53재조합단백질임을 확인하였다(Fig. 3B).

생산되는 p53단백질이 불용성으로 생산되는지 가용성으로 생산되는지 확인하기 위하여 배양액에 IPTG를 가하고 3시간동안 배양후에 대장균 균체를 4°C에서 8,000 rpm로 10분간 원심분리하여 회수하고 균체의 pellet을 완충액(20 mM Tris-Cl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)에 균질화한 다음, 초음파파쇄기로 균체를 파쇄하고 초고속원심분리기에서 원심분리하여 침전물과 상등액을 분리하였다. 침전물과 상등액을 각각 sample lysis buffer로 용해시키고 10% polyacrylamide gel electrophoresis를 수행하여 생산된 p53단백질의 수용성을 조사하였다(Fig. 4). 제 1열은 표준분자량 단백질, 제 2열과 3열은 각각 벡터만 가진 균주에서 IPTG첨가후의 시료를 초음파로 파쇄한후 얻

은 침전물과 상등액이며, 제 4열과 5열은 p53발현용벡터를 가진 균주에 IPTG를 첨가하지 않고 얻은 침전물과 상등액이며, 제 6 열과 7 열은 각각 발현용 벡터를 가진 균주배양액에 IPTG를 처리하고 얻은 침전물과 상등액이다. 이 결과에서 보면 p53단백질은 IPTG로 발현을 유도해야만 생산되며 합성된 p53단백질은 가용성과 불용성 모두의 형태로 생산되고 있음을 알 수 있다. 또한 p53에 대한 항체와의 반응에서도 수용성 단백질과 불용성단백질 모두에 항원·항체 결합반응을 보이는 것을 알 수 있다 (Fig. 5).

③ p53 재조합단백질에 대한 항체 생산

p53 발현벡터를 가진 대장균을 그림 5와 같이 배양하여 10% polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 후 p53단백질의 band를 잘라내어 파쇄한 후 토끼에 4 차례 면역화하여 항체의 생산을 유도하였다.

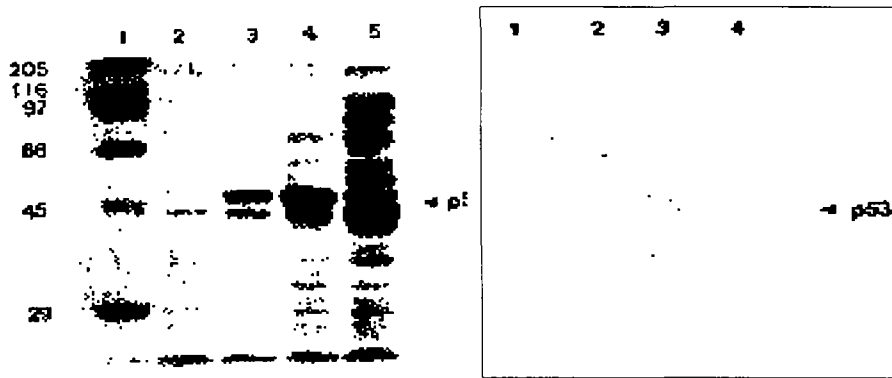


Fig. 3 Analysis of p53 recombinant protein expressed in *E. coli*.

A: Whole cell lysate was separated on SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue.

lane 1 ; Molecular wt. marker

lane 2 ; BL21/pETp53 induced with IPTG for 30 min

lane 3 ; " 1 hr

lane 4 ; " 3 hr

lane 5 ; BL21/pET-3a " 3 hr

B: Expression of the p53 proteins was visualized by Western blot analysis

lane 1 ; BL21/pETp53 induced with IPTG for 30 min

lane 2 ; " 1 hr

lane 3 ; " 3 hr

lane 4 ; BL21/pET-3a " 3 hr

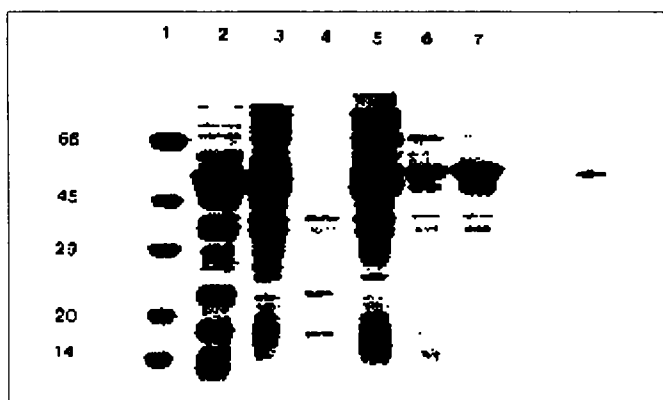


Fig. 4 Solubility of expressed p53 recombinant protein. Whole cell lysate containing p53 protein were sonicated and separated to soluble and insoluble fraction

lane 1 ; Molecular wt. marker

lane 2 ; Soluble fraction of BL21/pET-3a induced with IPTG

lane 3 ; Insoluble fraction of BL21/pET-3a induced with IPTG

lane 4 ; Soluble fraction of BL21/pETp53 uninduced with IPTG

lane 5 ; Insoluble fraction of BL21/pETp53 uninduced with IPTG

lane 6 ; Soluble fraction of BL21/pETp53 induced with IPTG

lane 7 ; Insoluble fraction of BL21/pETp53 induced with IPTG



Fig. 5 Immunodetection of nonfusion p53 protein by Western blotting

lane 1 ; Soluble fraction of BL21/pET-3a induced with IPTG

lane 2 ; Insoluble fraction of BL21/pET-3a induced with IPTG

lane 3 ; Soluble fraction of BL21/pETp53 induced with IPTG

lane 4 ; Insoluble fraction of BL21/pETp53 induced with IPTG

p53단백질로 면역화한 토끼의 혈청을 pET-3a 벡터만 갖고 있는 대장균의 세포용해액으로 전처리하고 p53단백질과의 반응성을 조사하였다 (Fig. 6). 이 결과에서 토끼의 항혈청과 반응하는 단백질이 53k dalton 위치에 있음을 확인하였다.

④ 진핵세포에서의 p53발현용 벡터의 제조

앞서 인체 cDNA library에서 p53유전자의 PCR증폭에 사용되었던 primer set를 사용하여 p53유전자를 증폭하고 증폭한 DNA 절편을 *Bam*HI과 *Hind*III 효소로 처리하고 진핵세포 발현 벡터인 pGRE/EBV에 클로닝하여 p53유전자를 포함하는 pGRE/p53플라스미드를 제조하였다 (Fig. 7). 클로닝의 확인은 대장균에서 pGRE/p53플라스미드를 분리한 후 위의 두 효소로 다시 처리하여 p53유전자를 함유하고 있음을 확인하였다(data not shown).

⑤ 진핵세포에서 p53재조합단백질의 발현

pGRE/p53플라스미드를 함유한 대장균을 40 ml의 TB배지 (Terrific broth)에 16시간 배양한후 Wizard DNA prep kit(Promega co., USA)를 사용하여 pGRE/p53플라스미드 DNA를 분리정제하였다. 그리고 p53발현을 유도할 진핵세포주로서는 파필로마바이러스에 감염되어 p53단백질이 불활성화되어 있을 것으로 생각되는 자궁상피암 세포주인 C3, C3N, C6, SiHa, 그리고 간암세포주인 HepG2, Hep3B, Chang, 암세포주가

아닌 세포주로서는 NIH3T3 세포를 실험대상으로 하였다. 각 세포주들을 T75 flask에서 각각 MEM배지(10% FBS포함)에 배양한 후, 1 x trypsin-EDTA액을 사용하여 flask에서부터 각 세포들을 떼어내어 HBSS 액으로 2 회 세척하였다. 세척이 끝난 세포들은 각각 5×10^4 cells/ml로 각 세포의 농도를 조절한 다음 electroporation용 cuvette에 각각 750 μ l 를 넣고 pGRE/p53 플라스미드 DNA 또는 p53유전자가 들어있지 않은 pGRE/EBV 플라스미드 DNA를 5 μ g를 넣어서 pipette으로 잘 섞은 다음 얼음에 10분간 담가두었다가 Bio-Rad사의 gene pulsor를 이용하여 electroporation을 실시하였다. Electroporation조건은 200 V, 500 μ FD으로 하였으며 시간은 0.7 초 또는 0.8 초간 실시하였다. 다시 얼음에 10 분간 두었다가, 5 ml의 MEM배지에 섞은후 40 mm(dia.) petridish에서 배양하였다. Transfectant의 선별은 geneticin(G418, Gibco co.)을 1 mg/ml의 조건하에서 배양하였다. G418에 의한 trasfectant선별은 2 주가 경과한 후에 pGRE/EBV 플라스미드를 갖고 있지 않은 세포, pGRE/EBV 플라스미드를 갖고 있는 세포, p53유전자가 있는 pGRE/p53 플라스미드를 포함하고 있는 세포의 성장을 관찰하였다. G418를 포함한 배지에서는 플라스미드를 갖고 있지 않은 세포들은 세포의 성장이 억제되거나 죽는데 비하여(Fig. 8A), pGRE/EBV 플라스미드를 함유한 세포에서는 세포의 성장이 억제되지 않았다(Fig. 8B). 반면 p53유전자가 들어있는 pGRE/p53 플라스미드를 함유한 세포에서는 세포괴사(apoptosis)현상이 일어나서 살아있는 세포의 수가 점차 감소하였다(Fig. 8C). 이는 아마도

세포내에 존재하는 극소량의 steroid화합물이 pGRE/p53 플라스미드에 inducer로 작용하여 p53이 생성유도됨에 따라 세포괴사현상이 일어나고 있는 것으로 생각된다. 또한 p53단백질의 발현유도로 인한 암세포괴사현상은 각 암세포주별로 세포들이 죽는 시간이 일치하지는 않았으나 본 실험에 사용된 암세포주들은 대부분 세포괴사현상을 일으켰으며, 비암세포주인 NIH3T3세포주에서는 p53단백질발현에 의한 세포괴사현상이 일어나지 않았다(Fig. 9). SiHa cell에 pGRE/EBV와 pGRE/p53플라스미드를 각각 transfection시킨후 chamber slide에서 24 시간 배양하고 dexamethasone(25 nM)을 medium에 첨가하고 다시 24 시간을 더 배양한 후에 methanol/acetone으로 세포를 고정하고 indirect immunofluorescent assay 를 실시하였다. 먼저 p53 단백질에 대한 단일 클론항체(DO-1, Calbiochem. co.)를 1시간 동안 37°C에서 반응시키고 slide들을 PBS로 3회 세척한 다음 anti-mouse IgG-FITC(Sigma co.)를 1시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응이 끝나고 PBS로 3회 세척한 후 mount solution(Tris-Glycine pH 8.6, 30% glycerol)을 세포들 위에 떨어뜨린 후에 cover glass를 덮고 형광현미경하에서 관찰하였다(그림 10). SiHa cell들에 각각 pGRE/EBV, pGRE/p53플라스미드를 transfection시키고 다시 dexamethasone을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 비교관찰하였다. pGRE/EBV 플라스미드를 transfection시킨 군에서는 dexamethasone에 의한 발현유도에 p53단백질이 생성되지 않았으며 pGRE/p53 플라스미드를 transfection시킨 군에서는 dexamethasone을 첨

가하지 않았을 때에는 p53이 생성되지 않았으나 dexamethasone을 첨가한 군에서는 p53단백질이 세포의 cytoplasm에서 생성되었다. 일반적인 p53 단백질의 위치는 세포의 핵에 위치하나 이 경우는 vector로 사용된 pGRE/p53이 chromosome에 integration된 형태보다도 episomal 한 형태로 존재하는 경우가 삽입된 유전자의 단백질 생산이 보다 많은 것으로 보고되어 있고, 따라서 본 실험에서도 세포내에 episomal한 형태의 플라스미드가 존재한 결과 p53단백질이 cytoplasm에서 생산되는 것으로 추정된다(그림 11). 그러나 dexamethasone을 처리한 SiHa세포에서, pGRE/EBV를 포함한 세포군과 pGRE/p53를 포함한 세포군의 extract를 SDS-PAGE를 실시하여 Western blotting(그림 12)을 한 결과에서는 p53 발현의 차이를 발견할 수 없었다(그림 13). 이는 외부에서 삽입한 p53유전자에 의한 p53단백질 생산이 SiHa세포 자체가 생산되는 p53단백질의 량보다 매우 적기 때문으로 생산된다. 또한 HPV 16형 바이러스 유전자를 갖고 있는 SiHa세포에서 p53 단백질의 존재는 p53 단백질 degradation factor로 알려진 HPV16 E6 단백질의 양이 p53생산량에 비해서 적거나 또는 약한 결합 반응 가능성으로 인할 것으로 생각된다.

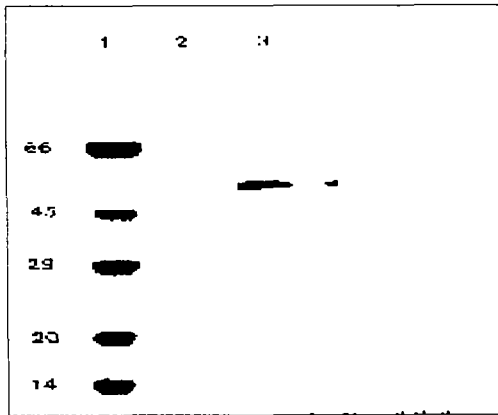


Fig. 6 Determination of the specificity of rabbit anti-p53 polyclonal antibody.

lane 1 ; Molecular wt. marker

lane 2 ; Whole cell lysate from IPTG induced BL21/pET-3a

lane 3 ; Whole cell lysate from IPTG induced BL21/pETp53

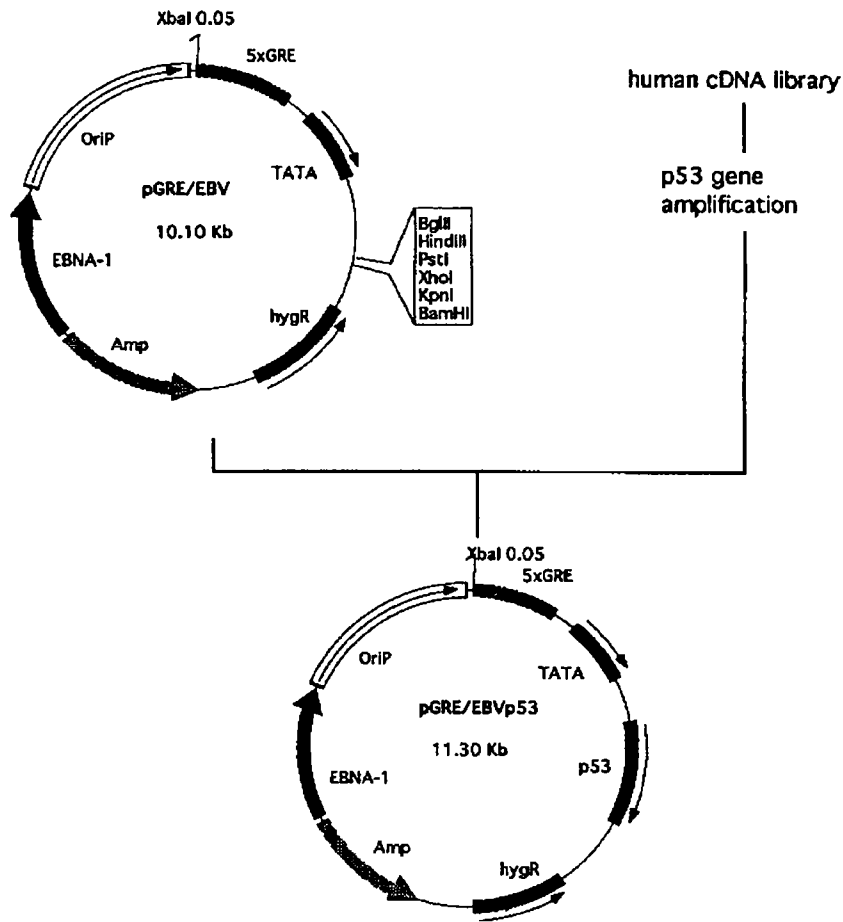


Fig. 7. Construction of p53 expression vector(pGRE/p53)

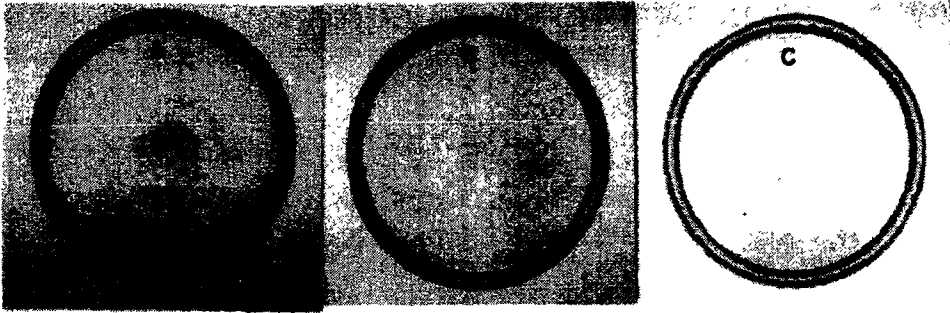


Fig. 8 Effect of expression of p53 protein in liver carcinoma cell line(HepG2). Cells were cultured for 2 weeks in MEM containing geneticin(1 mg/ml).

A : no vector, B : Vector (pGRE/EBV), C: pGRE/p53

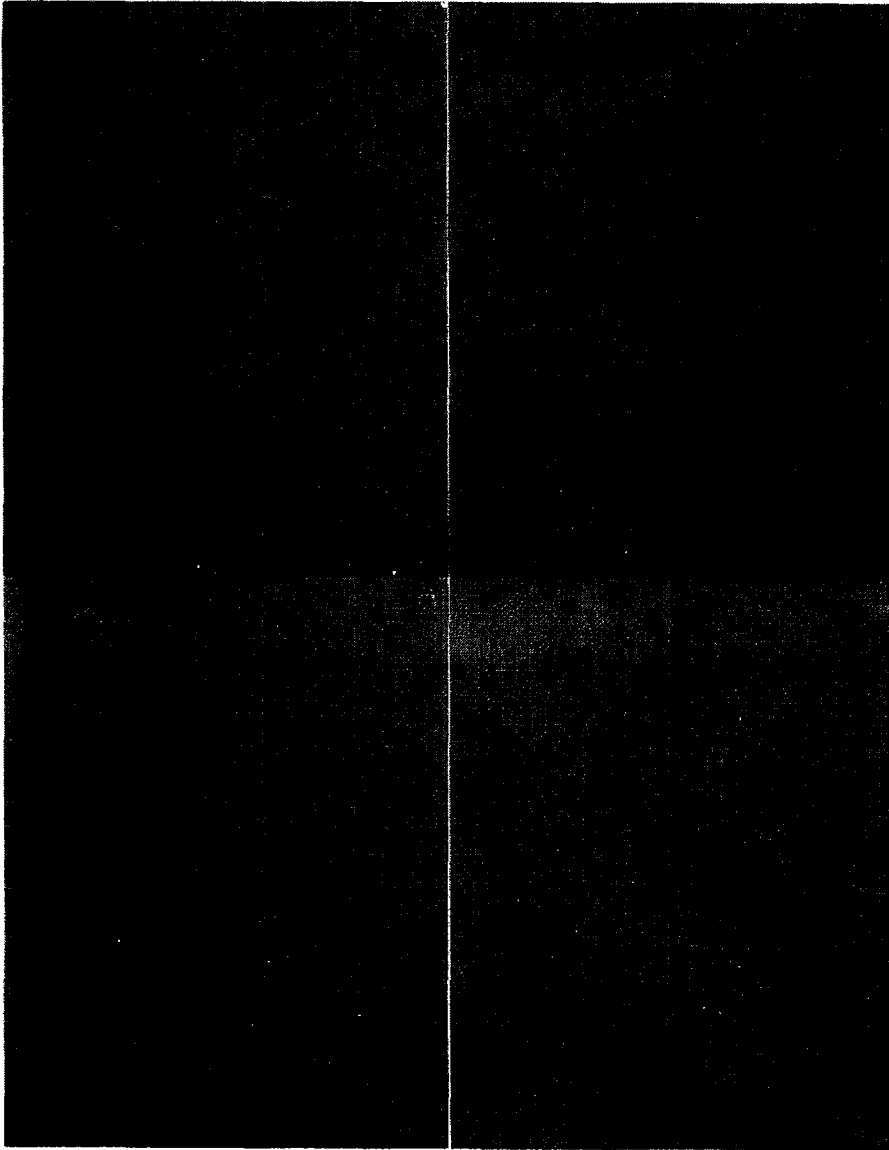


Fig. 9 Effect of expression of p53 protein in several cell lines.

A : C3N(cervical carcinoma), B : Chang, C : Hep3B, D
: NIH3T3

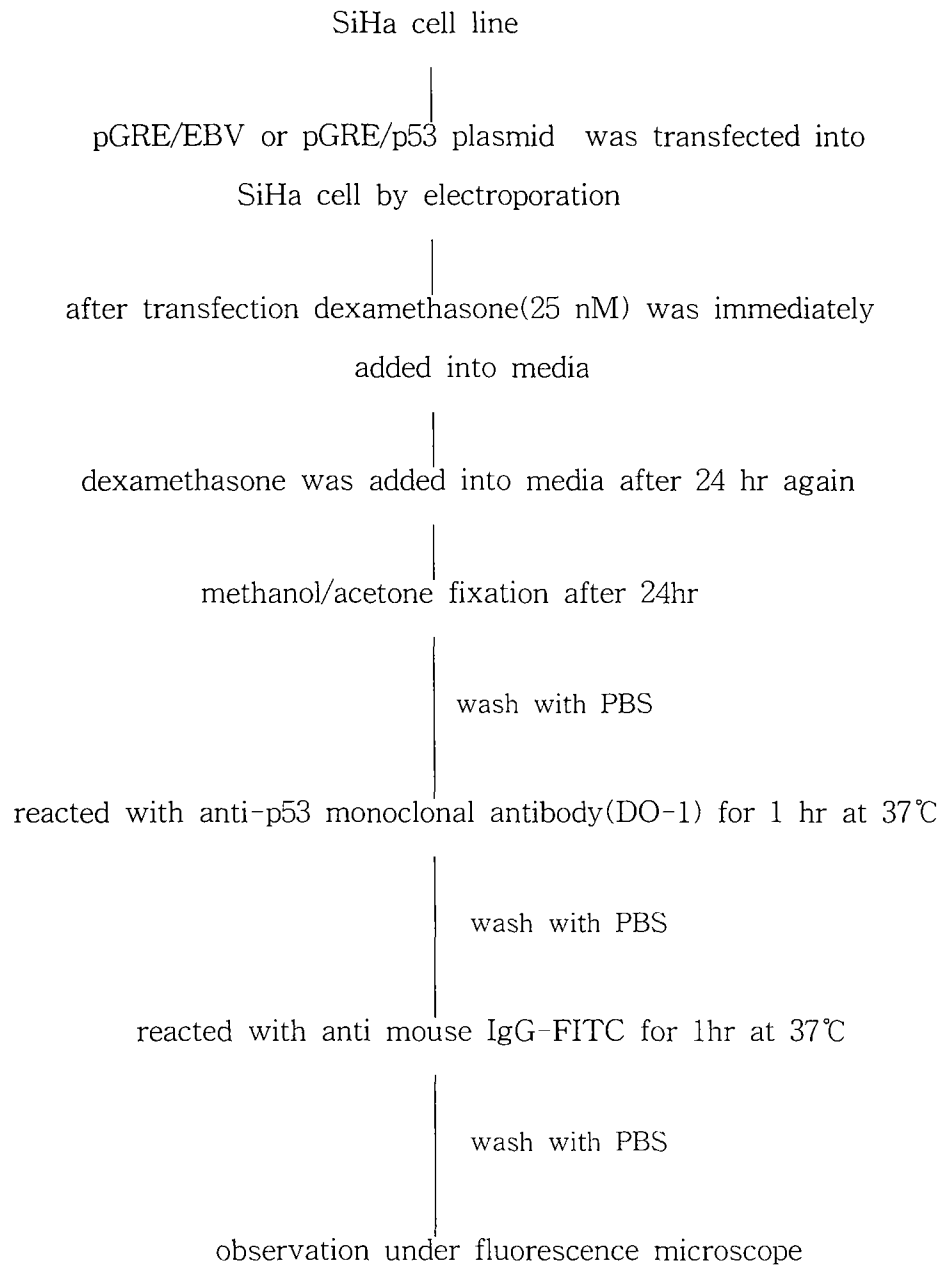


Fig. 10 Indirect immunofluorescent assay

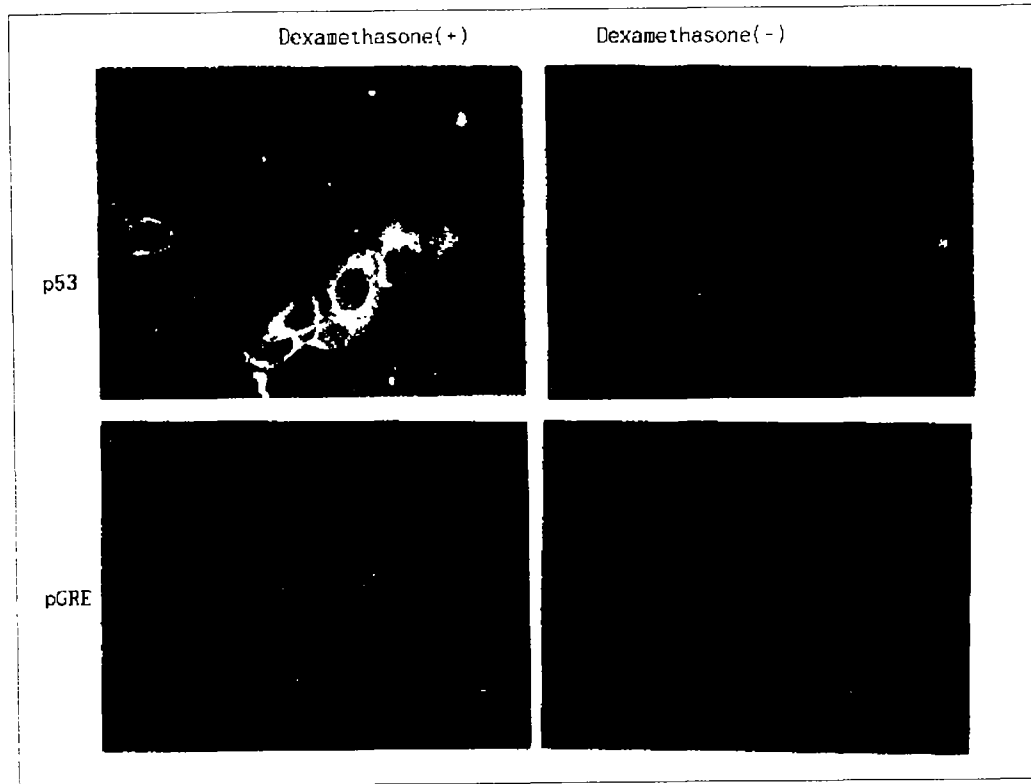


Fig. 11 Confirmation of p53 protein expression in cytoplasm of SiHa cells transfected with pGRE/p53 by the induction of dexamethasone. In A & C, cells were cultured in media containing dexamethasone, cells of B & D were cultured without dexamethasone. A & B cells were transfected with pGRE/p53 plasmid and C & D cells were transfected with pGRE/EBV.

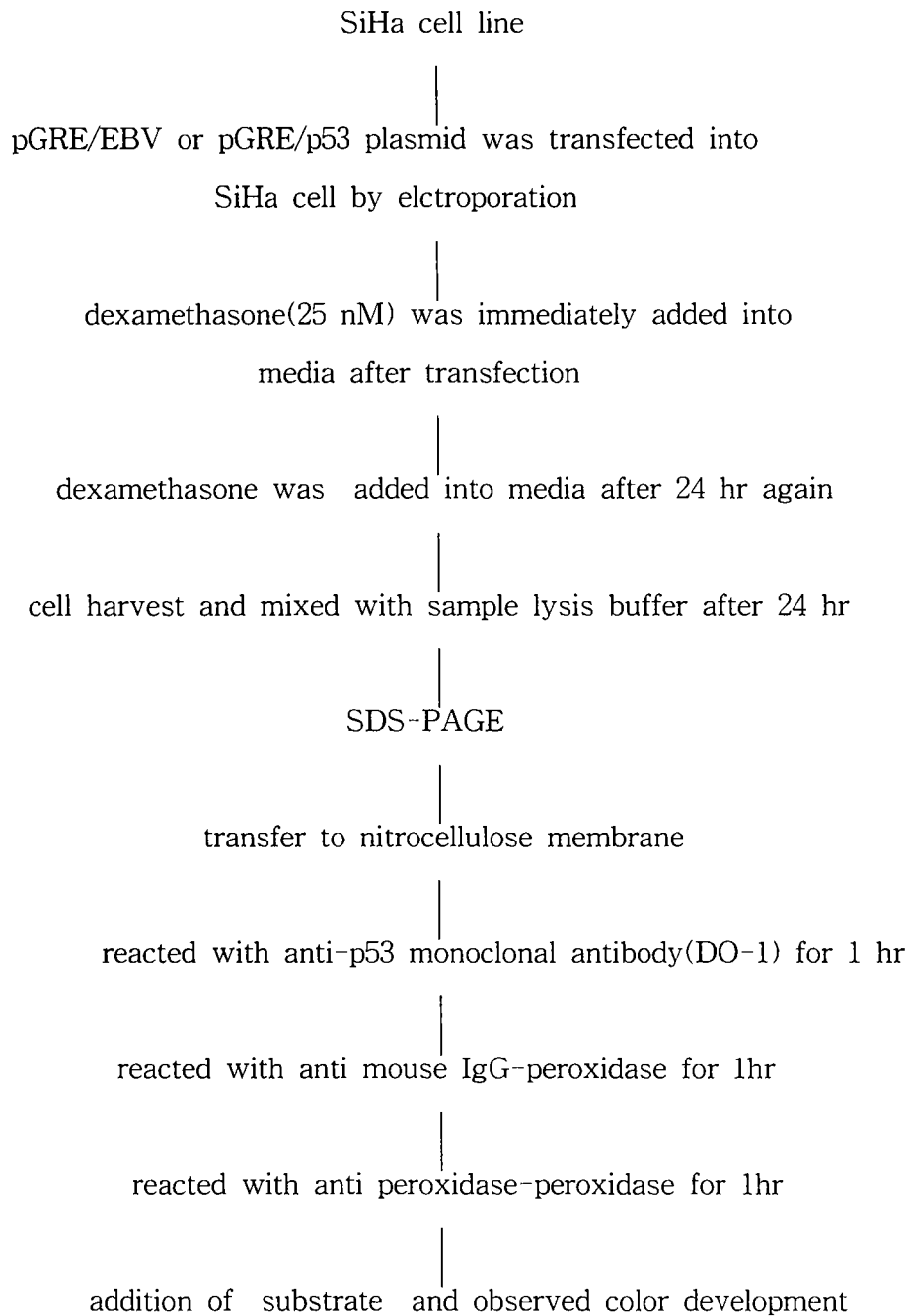


Fig. 12 Western blot analysis for detection of p53 in SiHa cells

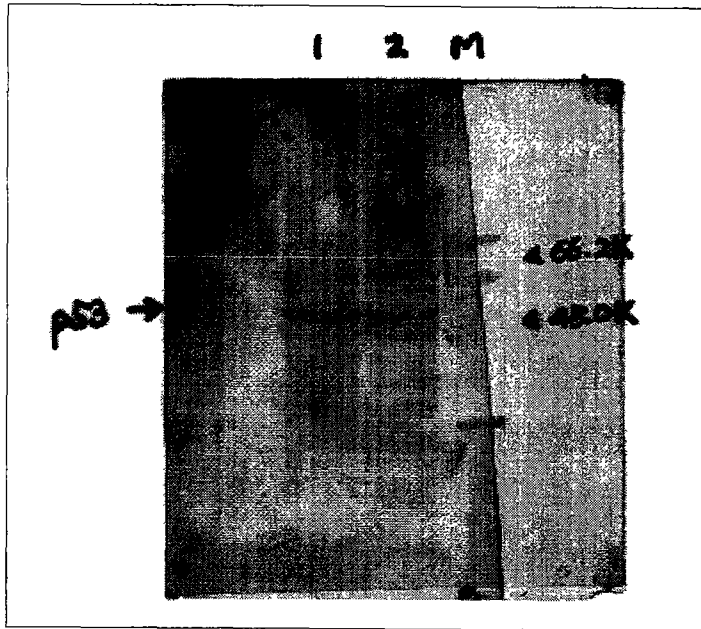


Fig. 13 Western blot analysis of lysate of SiHa cell after adding dexamethasone

Lane 1 : pGRE/p53, lane 2 : pGRE/EBV, lane 3 : standard MW. wt. marker

참고문헌

1. Ferland C. A. and associates Inc. (1991). Advanced in cancer chemotherapeutics. Spectrum (Decision Resources Inc), Sep. 24, 22/1-10.
2. Sannes, L. J. and associates, Inc. (1991). In vitro cancer diagnostics. Spectrum (Decision Resources Inc.), Nov. 1., 28/1-16.
3. Rainen L. (1991). Emerging cancer biotherapies. Spectrum (Decision Resources Inc.), Dec.6, 20/1-9.
4. Shah, H. K. and associate Inc. (1991). Bristol-Myers Squibb: Striking a balance, achieving an edge. Spectrum (Decision Resources Inc) Aug. 16, 28/1-7.
5. Hartmann, A., Blaszyk, H., McGovern, R. M., Schroeder, J. J., Cunningham, J., De Vries E. M. G., Kovach, J. S. and Sommer, S.S (1995). p53 Gene mutations inside and outside of exon 5-8: the patterns differ in breast and other cancers. Oncogene 10, 681-688.
6. Howes, K. A., Ransom, N., Papermaster, D. S., Lasudry, J. G. H., Albert, D. M. and Windle, J. J. (1994). Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presences or absence of p53. Genes & Develop. 8, 1300-1310.
7. Ueda, H., Ullrich, S. J., Gangemi, J. D., Kappel, C. A., Ngo, L., Feitelson, M. A. and Jay G. (1995). Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. Nature Genetics 9, 41-47.

8. Prives, C. and Mafredi, J. J. (1993). The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes & Develop.* 7, 529-534.
9. White, E. (1993). Death-defying acts: a meeying review on apoptosis. *Genes & Develop.* 7, 2277-2284.
10. Meeting Review (1995). *Oncogenes : 20 Year later.* *Genes & Develop.* 9, 1289-1301.
11. Oliner, J. D. (1994). The role of p53 in cancer development. *Scientific American (Science & Medicine)* Sep/Oct, 16-25.
12. Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Develop.* 9, 1149-1163.
13. Ewen, M. E., Oliver, C. J., Sluss, H. K., Miller, S. J. and Peeper, D. S. (1995). p53-Dependent repression od cdk4 translation in TGF- β -induced G₁ cell cycle arrest. *Genes & Develop.* 9, 204-217.
14. Kamb, A. (1995). Cell cycle regulators and cancer. *Trends In Genetics* 11(4), 136-141.
15. Arroyo, M., Bagchi S. and Raychaudhuri, P. (1993). Association of human papillomavirus type 16 E7 protein with S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mole and Cell. Biol.*, 13(1), 6537-6546.
16. Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni jr. J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Taisky, M. A. and Friend, S. H. (1990). Germ line p53 mutations in familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238.
17. Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79, 547-550.

18. Dimond P. F. (1995). Tumor suppressor breakdown inhibited in cell cultures. *Genetic Engin. News* May 1, 36.
19. Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J-M. Wang, Z., Friederg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., Bohr, V. A., Weeda, G., Hoeijmarkers, J. H. J., Forrester, K. and Harris, C. C. (1995). p53 Modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature Genetics* 10, 188-195.
20. Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995). p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & Develop.* 9, 935-944.
21. Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G₁ arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & Develop.* 8, 2540-2551.
22. Cavenee, W. K. and White R. L. (1995). The genetic basis of cancer. *Scientific American*. March, 72-79.
23. Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
24. Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. and Housman, D. E. (1993). p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* , 74, 957-967.
25. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Persons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, E, Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53

- tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825.
26. Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends in Biol. Sci.*, 20, 187-191.
 27. Jones, C. J. and Thomas, D. W. (1995). Is TFIIH an activator of the p53-mediated G1/S checkpoint. *Trends in Genetics* 11(5), 165-166.
 28. Müller, R. (1995). Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends in Genetics* 11(5), 173-178.
 29. Paquette, R. L., Lee, Y. Y., Wilczynski, S. P., Karmakar, A., Kizaki, M., Miller, C. W., Koeffler, H. P. (1993). Mutation of p53 and human papillomavirus infection in cervical carcinoma. *Cancer* 72(4), 1272-1280.
 30. Crook, T., Fisher, C., Masterson P. J. and Vousden, K. H. (1994). Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. *Oncogene* 9; 1225-1230.
 31. Kupryjczyk, J., Thor, A. D., Beauchamp, R., Merritt, V., Edgerton, S. M., Bell, D. A. and Yandell, D. W. (1993). p53 gene modulations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 90, 4961-4965.
 32. Sun, Y., Nakamura, K., Wendel E. and Colburn N. (1993). Progression toward tumor cell phenotype is enhanced by overexpression of a mutant-suppressor gene isolated from nasopharyngeal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2827-2831.
 33. Wei, Y.D., Jiafu, Z., Xi, Q. S., Yongjiang, M., Xiulong, Z., Daizong, L. and Jianren, G. (1993). p53 gene mutations in chenese human testicular seminoma. *J. Urology*, 150, 884-886.

34. Kesis, T. D., Slebos, R. J., Nelson, W. G., Kastan, M. B., Plunkett, B. S., Han, S. M., Lorincz, A. T., Hedrick, L. and Cho, K. R. (1993). Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3988-3992.
35. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
36. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526.
37. Tsongalis, G. J., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Friedman, K. J. and Silverman, L. M. (1994). Rapid screening for p53 mutations with sensitive heteroduplex detection technique. *Clin. Chem.* 40(3), 485-486.
38. Band, V., Dalal, S., Delmolino, L. and Androphy, E. J. (1993). Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *EMBO. J.*, 12(5), 1847-1852.
39. Murray, A. (1995). Cyclin ubiquitination : the destructive end of mitosis. *Cell*, 81, 149-152.