

Repression of p21 Expression by Hepatitis B Virus X Protein via a p53-Independent Pathway

안지영 · 장경립

부산대학교 자연과학대학 생명과학부

요 약

HBV는 인체에 감염하여 간염, 간경변 및 간암을 유발하는 hepadnaviruses의 일종으로써 임상적으로 매우 중요한 바이러스이다. 그러나 이 바이러스에 의한 간암(HCC)의 발생 메커니즘은 아직 불확실하다. 최근에는 HBV의 X 단백질(HBx)이 간암 발생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다. HBx 단백질은 전사활성인자(transcriptional activator)로써 숙주세포의 유전자발현에 영향을 미치어 세포증식 및 분화에 영향을 줄 수 있다. 본 연구에서는 HBx 단백질이 NIH 3T3 cell의 증식 및 형질전환에 미치는 영향을 조사하였다. HBx 단백질을 발현하는 세포주는 정상세포에 비하여 증식 속도가 2배 정도 빠르며, soft agar assay 결과에 의하면 대조군과 비교하여 더 많은 수의 colony를 형성하였다. 또한, 이들 HBx 발현 세포들은 접촉 저해 능력을 상실하여 HBx가 세포 형질 전환 능력을 가짐을 알 수 있다. 또한 HBx 발현 세포주에 있어서 p21의 RNA 및 protein 수준이 정상세포에 비하여 낮으므로 HBx에 의한 증식 촉진 및 세포 형질 전환이 p21을 매개하여 이루어 짐을 알 수 있었다. HBx에 의한 p21 유전자의 발현 감소는 p21의 전사 수준에서 이루어지며 이는 p53-비의존적 경로에 의하여 이루어졌다.

서 론

HBV는 인체에 감염, 간경변 및 간암을 유발할 수 있는 임상적으로 매우 중요한 병원체이다. 그러나 아직까지 HBV에 의한 간암유발의 분자적 메커니즘은 불확실하며 다양한 가설들이 제시되고 있다. Woodchuck에서는 hepadnal genome에 의한 N-myc proto-oncogene의 insertional inactivation이 HCC 발생에 중요함이 보고된 바 있다. 그러나 HBV의 경우에는 게놈이 인간 염색체의 특정부위에 삽입된다는 증거가 아직 제시되지 못하여 이 메커니즘이 간암 발생의 주요 메커니즘으로 작용하는 것 같지는 않다. 최근에는 X protein이 HBV의 발암인자로써 간주되어 많은 연구가 진행되고 있다. 전사활성인자로써 HBx 단백질은 숙주세포의 유전자 발현에 영향을 미치어 세포증식 및 분화에 영향을 줄 수 있다. 또한 X 단백질을

과발현하는 형질전환 생쥐에서 HCC가 발생함이 보고되기도 하였다. 그러나 HBx 단독으로는 HCC를 유도하는데 충분하지는 않은 것 같으며 host response, 환경 요인 등의 다양한 cofactors를 요구하는 것 같다.

HBx 단백질이 숙주세포의 증식에 미치는 영향에는 두가지 서로 상반되는 견해가 보고되고 있다. HBx 단백질을 휴지기의 mouse fibroblast에 발현시키면 세포주기의 진행이 유도됨이 관찰되어 세포분열을 촉진시키는 역할을 수행하는 것으로 보고되었다[3]. HBx는 세포의 p53을 전사수준에서 감소시키는 것으로 밝혀졌다[4]. 또한 HBx 단백질은 p53 tumor suppressor와 상호작용함으로써 apoptosis를 저해하는 것으로도 보고되었다[2].

이와는 반대로 반면에 HBx 단백질이 세포예정사를 유도하고[1,2], primary rat embryo fibroblasts의 oncogenic transformatio를 억제한다는 보고가 제시되었다[6]. 또한 HBx는 p-53 비의존적 경로로써 p21의 발현을 증가시켜 G1→S 진행을 지연시킴이 밝혀졌다[5].

본 연구에서는 HBx의 상반된 역할을 설명하고 HBx에 의한 간암 유발 메커니즘을 규명하고자 mouse fibroblast인 NIH3T3 cells에 HBx 유전자를 발현시키어 이들의 성장특성, p21 유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

실험 결과 및 토의

본 연구에서는 HBx 단백질의 세포 증식 및 형질 전환능력을 조사하기 위하여 mouse fibroblast cell인 NIH 3T3 cell에 HBx 유전자를 stable 혹은 transient transfection을 실시하여 이들 세포의 특성을 조사하였다. NIH3T3 cells에 HBx 유전자를 도입시켜 안정하게 발현하는 여러 개의 세포주를 확보할 수 있었다. 이들 가운데에서 성장속도에 있어서 뚜렷한 차이를 보이는 두개의 clone(X1과 X4)을 택하여 이들의 성장속도를 원래의 NIH3T3 세포와 비교하였다(그림 1A). 두개의 HBx 발현 clone들은 모두 대조군인 NIH3T3 cell보다 빠른 증식 속도를 나타내었으며 X4의 경우에는 4일이 지난 후에 대조군과 비교하여 2배 이상의 세포수를 나타내었다. 또한 HBx의 세포형질 전환능력을 조사하기 위하여 HBx 발현 세포주를 이용하여 soft agar assay를 실시하였다(그림 1B). 2주일이 지난 후에 대조군인 NIH3 3T3 cell에서는 극소수의 colony가 형성되었지만 HBx 발현세포주에서는 이보다 훨씬 많은 20여개의 conony가 형성되었다. 특히, 세포성장 속도가 가장 빨랐던 X4 clone에서 가장 많은 수의 conony가 검출되어 HBx가 세포의 성장 속도 뿐만 아니라 형질전환에도 관여함을 알 수 있었다.

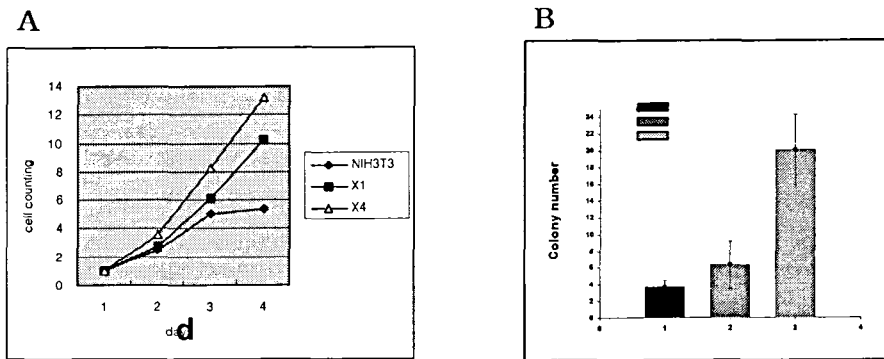


그림 1. HBx에 의한 NIH 3T3 세포의 증식 촉진 및 형질전환

A. 3×10^3 개의 세포를 10mm dish에서 키우기 시작하여 1, 2, 3 및 4일 후에 세포의 수를 계산하여 세포의 증폭 배수를 표시함; B. 3×10^3 개의 세포를 0.3% soft agar에 심은 후 2주 후에 지름이 0.1 mm 이상인 colony의 수를 세어 통계 처리한 결과.

또한 colony formation assay에서도 X4는 NIH3T3 cell과는 달리 세포들이 쌓여 colony를 형성함을 알 수 있었다(그림 2). 이는 HBx 발현세포가 암세포의 전형적인 특징인 contact inhibition능력의 상실을 보여줌을 의미한다.

세포분열의 억제에 매우 중요한 p21의 수준을 살펴보기 위하여 HBx 발현 세포주의 p21의 mRNA 및 protein level을 각각 quantitative RT-PCR assay와 Western blotting assay를 통하여 조사하였다. 대조군과 비교하여 HBx 발현 세포주에서 p21 RNA 및 protein level이 감소하였다. 반면에 이들 세포내 G3PDH의 RNA 수준에는 변화가 없었다.

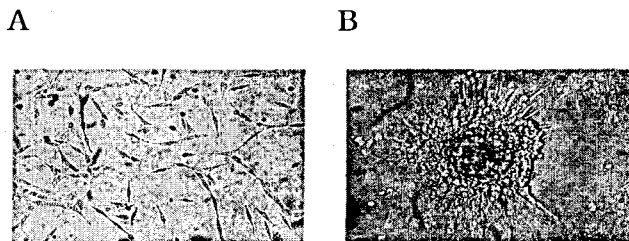


그림 2. HBx 발현 세포주의 성장 특성.

A. 정상 NIH 3T3 cells; B. HBx 발현 NIH3T3 cells (X4)

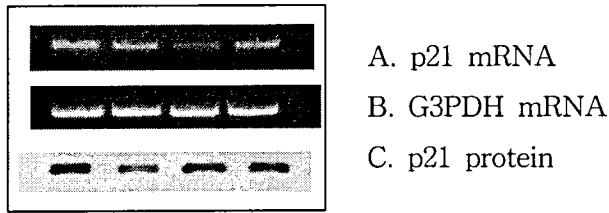


그림 3. HBx 발현 세포주에서의 p21 발현 수준의 비교.

HBx 발현 세포주내에서 p21 mRNA 및 protein 수준의 감소가 전사수준에서 일어나는 지를 조사하기 위하여 HBx단백질이 p21 promoter에 미치는 영향을 CAT assay를 통하여 조사하였다(그림 4). CAT assay 결과 원래 세포 성장 및 colony 형성 능력이 높았던 HBx 발현 주에서 CAT activity가 크게 감소하여 HBx가 p21의 발현을 전사 수준에서 억제함을 알 수 있었다.

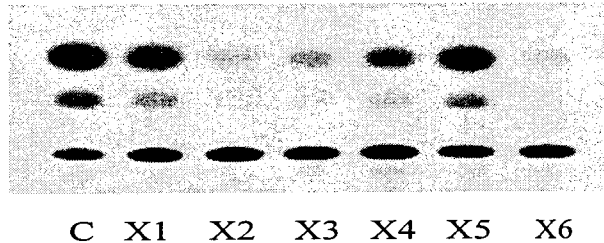


그림 4. HBx가 p21의 promoter 활성화에 미치는 영향

참고문헌

1. Bergametti, F., Prigent, S., Lubet, B., Benoit, A., Tiollais, P., Sarasin, A., and Transy (1999) The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene*, 18; 2860-2871
2. Elmore, L. W., Hancock, A. R., Chang, S. F., Wang, X. W., Chang, S., Callahan, C. P., Celler, D. A., Will, H., and Harris, C. C. (1997) Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94; 14707-14712
3. Koike, K., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Iino, S., and Kurokawa, K. (1994) Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression

- in quiescent mouse fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, 94; 44-49
4. Lee, S. G., and Rho, H. M. (2000) Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B virus X protein. *Oncogene*, 20; 468-471
 5. Park, U. S., Park, S. K., Lee, Y. I., Park, J. G. and Lee, Y. I. (2000) Hepatitis B virus- X protein upregulates the expression of p21waf/cip1 and prolongs G1→S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene*, 19; 3384-3394
 6. Schuster, R., Gerlich, W. H. and Schaefer, S. (2000) Induction of apoptosis by the transactivating domains of hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene*, 19; 1173-1180
 7. Shih, W. L., Kuo, M. L., Chuang, S. E., Cheng, A. L., and Doong, S. L. (2000) Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 18; 25858-25864