

Cyclin-dependent Kinase 저해 단백질 p16^{INK4A}의 인체 암세포에서의 세포사멸 유도 활성

김민경 · 이철훈*

한양대학교 의과대학 유전학교실

A Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, p16^{INK4A}, Induces Apoptosis in The Human Cancer Cells. Kim, Min-Kyoung and Chul-Hoon Lee*. *Department of Medical Genetics, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea* – Previously, we synthesized a novel Cyclin-dependent kinase inhibitor, MCS-5A. Also, we investigated the involvement of cell cycle regulatory events during MCS-5A-mediated apoptosis in HL-60(+p16/-p53) cells with up-regulation of p16 protein expression. In contrast, apoptosis was not observed in A549(-p16/+p53) cells. Therefore we propose that p16^{INK4A} is a key enzyme for inducing apoptosis. In the present studies, we have explored the mechanism of p16^{INK4A}-mediated cytotoxicity and the role of p16^{INK4A} overexpression in the induction of apoptosis in human tumor cells. The tumor suppressor gene p16^{INK4A} is known as a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) and cell cycle regulator. We expressed wild type p16^{INK4A} in pcDNA3.1 vector and then transfected into non-small cell lung cancer (NSCLC) cell expressing different statue of p16^{INK4A}, p53 gene[A549(-p16/+p53), H1299(-p16/-p53) and HeLa (+p16/+p53) cell line]. TUNEL assay (including propidium iodide staining following transfection of these cell line with pcDNA3.1-p16) indicate that p16^{INK4A}-mediated cytotoxicity was associated with apoptosis. This is supported by studies demonstrating an induction of caspase 3 cleavage due to the transfection of A549, H1299 and HeLa cells with pcDNA3.1-p16. These results suggest that p16^{INK4A} has a new function of inducing apoptosis which is not related with the function of tumor suppressor gene p53.

Key words: p16^{INK4A}, Apoptosis, Cell cycle arrest

세포사멸(Apoptosis)은 생물체에서 DNA 손상 또는 저산소증, 스트레스 등의 자극이나 세포의 이상 증식 등이 발생했을 때, 세포 스스로 자살하는 기전이다[13]. 세포사멸은 자극(Stimulus), 신호의 인식(detection)과 전도(Transduction), 효과기(Effector phase), 사후기(Post-mortem phase) 등 4개의 phase로 분류할 수 있다[24]. 세포사멸 과정을 phase 별로 살펴보면, 먼저 표면의 수용체로부터 외부의 자극을 받거나, 또는 약물이나 독소(toxin), 방사능(radiation) 등에 의해 자극을 받는 과정으로 개시한다. 이러한 자극 신호는 effector에 의한 신호전달체계를 전달되며, effector는 촉진, 억제 조절자와 단백질 가수분해 효소 등을 활성화시키게 된다. 결국, 사후기로 들어가면 chromatin condensation과 DNA fragmentation이 일어난 후, 작은 세포 체로 나뉘어져 주변세포에 의해 흡수된다.

세포사멸 과정에는 몇몇의 발암 억제 단백질(tumor suppressor protein)이 관여를 하게 되는데, 특히 p53은 대표적인 발암 억제 단백질로써 DNA 손상, hypoxia, nucleotide

depletion, 발암 유전자의 활성화 등에 대응하여 세포 증식 억제, 노화, 세포사멸 등을 유도하게 된다. 특히 p53은 G₁, G₂ phase에서 세포주기 억제와 성장인자의 자극 억제, 모세혈관 생성, 노화 촉진 및 세포사멸 등의 여러 기전을 유도한다. DNA 손상이 발생했을 때 p53의 세포사멸 유도 기전은 세포마다 매우 다양하게 나타난다[4,11]. Target gene의 transactivation을 통해서 caspase 의존적인 형태로 세포사멸을 유도하거나, Fas/APO1, KILLER/DR5, Bax, PIG를 유도하고 Bcl-2를 억제하며, 여러 pro-caspase activation을 통해 세포사멸을 유도하게 된다[15].

p16^{INK4A}은 INK4 family의 하나이며 CDK4, CDK6의 inhibitor로서, 진핵생물의 세포 주기와 세포 성장을 조절하는 중요한 발암 억제 유전자로 알려져 있다. p16^{INK4A}유전자는 염색체상의 9p21에 위치하며, 대부분의 종양세포에서 결실되거나 돌연변이된 것이 규명되었다[25]. 일반적으로 INK4 단백질은 CDK subunit과 결합하는 D-type cyclin과 경쟁적으로 결합하게 된다[14]. 이런 특이성 때문에 INK4 단백질의 억제능은 세포 내 pRb의 존재 유무에 크게 영향을 받는다. pRb가 존재하지 않으면 cyclin E의 발현이 증가하고, cyclin D-CDK4 complex의 활성이 억제되어도 S phase로의 진입을 억제하지 못하게 된다[10]. 또한 이들

*Corresponding author

Tel: +82-2-2290-0673, Fax: +82-2-2298-5737

E-mail: chhlee@hanyang.ac.kr

INK4 단백질은 세포 형태에 특이적으로 발현을 하며, 아직까지도 이들 단백질들의 작용 기전은 확실하게 밝혀지지 않고 있다. 사실 CKI(INK4와 Cip/Kip1) 중에서 오직 p16^{INK4A}만이 유전학적 기준으로 발암 억제 물질로 분류되고 있다 [17].

본 연구에서는 p16^{INK4A}가 세포주기 조절 억제뿐 아니라, 세포 사멸을 유도할 수 있는 기능도 가지고 있다는 가정 하에, p16^{INK4A} 결핍 세포주인 A549와 H1299 세포 주에 p16^{INK4A} 유전자를 외부로부터 도입시키고 세포사멸 과정이 나타나는지를 확인하였다. 또한 p16^{INK4A}가 유도하는 세포 사멸과정이 p53과는 어떤 연관성이 있는지를 알아보기 위하여, p53 결핍 세포주인 H1299에 p16^{INK4A} 유전자를 도입시켜 그 연관성을 확인하고자 하였다. 본 실험에서 p16^{INK4A} 유전자를 도입시키는 방법으로는 cationic lipid인 liposome을 이용하는 X-treamGENE Q2 transfection reagent(Roche pharmaceuticals, U.S.A.)를 사용하였다.

재료 및 방법

사용한 세포주 및 배양 조건

본 연구에 사용한 HeLa(CCL-2), A549(CCL-185), H1299 (CRL-5803) 세포주는 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, NY, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 배양액은 FBS 10%가 첨가된 부영양배지(rich media), RPMI1640(GibcoBRL, U.S.A.), 또는 최소배지(minimal essential media, MEM, GibcoBRL, U.S.A.)를 사용하였으며, 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양 하였다.

RNA 추출 및 역 전사 반응

p16^{INK4A}를 가진 HeLa 세포를 이용하여 총 RNA를 RNeasy Mini Kit(QIAGEN, U.S.A.)를 사용하여 추출하였다. 추출한 mRNA를 주형으로 cDNA를 합성한 후 p16^{INK4A} 유전자부위를 합성하기 위해 PCR을 시행하였다. PCR에 사용한 primer는 제한효소의 절단부위가 포함되도록 설계하였으며, GenBank를 통하여 human origin의 p16^{INK4A} 염기서열을 확인한 후(Fig. 2) 그것을 기초로 하여 합성하였다. Primer는 모두 Bionex사에 합성을 의뢰하였으며, 사용한 primer의 서열은 다음과 같다.

Forward : 5'-ATG GAT CCA TGG AGC CGG CGG CGG GGA G- 3'

Reverse : 5'-AAC CCT CGA GTC AAT CGG GGA TGT CTG AGG G-3'

HeLa cell line의 RNA로부터 합성된 cDNA를 주형으로 하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Pre-denaturation(95°C, 15분)시킨 후, denature(94°C, 50초), annealing(65°C, 50초), extension(72°C, 1분10초) 단계를 35 회 반복하였다.

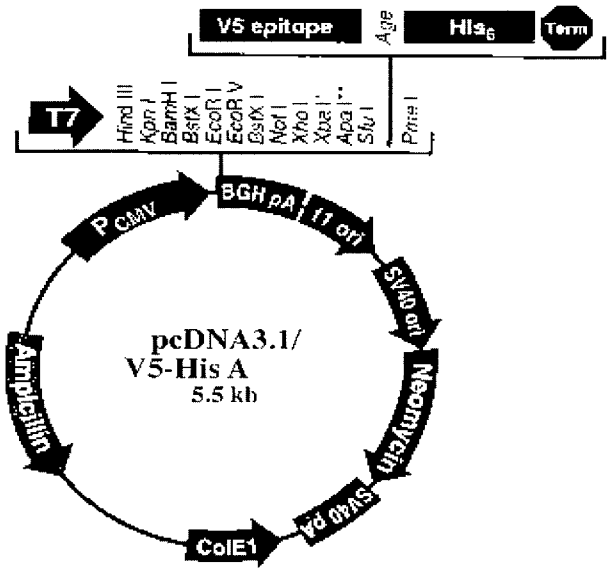


Fig. 1. Feature of the pcDNA3.1/V5-His A vector.

p16^{INK4A} 유전자의 Cloning

Cloning을 위한 vector로는 3개의 reading frame에 multiple cloning site를 가지고 있으며 mammalian cell에서 높은 발현율을 갖는 pcDNA3.1(Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.)를 사용하였다(Fig. 1). 합성된 p16^{INK4A}과 pcDNA3.1 벡터를 BamH1(10 units/μl, Promega)과 Xho I(10 units/μl, Promega)으로 처리하였다. 반응이 끝난 후 vector 와 insert 모두 정제하여 순도를 높인 후, T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 30분 반응시키고, 65°C에서 10분간 반응시켰다. 이것을 E. coli XL-1 blue 에 형질전환시켜 50 μg/ml의 ampicillin이 포함된 LB고체 배지 상에 도말 하였다. 37°C 배양기에서 petri-dish를 뒤집어서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 colony 하나를 따서 LB broth 5 ml에 넣고 5시간 동안 배양하였다.

Plasmid 분리 및 형질전환 확인

플라스미드 DNA 추출은 Concert Rapid Plasmid Purification Systems(GibcoBRL, U.S.A.)을 사용하여 분리한 후 다시 BamH1과 Xho1을 처리하여 PCR 산물의 형질전환을 확인하였고, 확인된 plasmid 만을 transfection에 이용하였다.

Transfection

Transfection은 X-tremeGENE Q2 transfection reagent를 이용하여 시행하였다[18]. Transfection 대상 세포주는 24시간 이전에 각 well 당 2×10⁵ cells/ml을 6-well culture plate에 배양하였으며, 세포주 내로 도입시킬 플라스미드 DNA는 농도별(1 μg/μl, 5 μg/μl, 10 μg/μl)로 준비하였다. XQ2 reagent를 도입시킬 플라스미드 DNA와 동량 준비하고 serum

```

1  cggagagggg gagaacagac aacgggcggc ggggagcagc atggagccgg cggcggggag
61  cagcatggag ccttcggctg actggctggc cacggcccg gcccggggtc gggtagagga
121 ggtgcgggcg ctgctggagg cgggggcgct gcccaacgca ccgaatagtt acggtcggag
181 gccgatccag gtcatgatga tgggcagcgc ccgagtggcg gagctgctgc tgctccacgg
241 cgcggagccc aactgcgccg accccgccac tctaccga cccgtgcacg acgtgcccc
301 ggagggttc ctggacacgc tgggtgtgt gcaccgggccc ggggcgcggc tggacgtgcb
361 cgatgcctgg ggccgtctgc ccgtggacct ggctgaggag ctgggccatc gcatgtcgc
421 acggtacctg cgcgcggctg cggggggcac cagaggcagt aacctgccc gcatagatgc
481 cgcggaaggt ccctcagaca tccccgattg aaagaaccag agaggctctg agaaacctcg
541 ggaaacttag atcatcagtc accgaagtc ctacagggcc acaactgccc cggccacaac
601 ccaccccgct ttcgtagttt tcatttagaa aatagagctt ttaaaaatgt cctgcctttt
661 aacgtagata taagccttcc ccaactaccg taaatgtcca tttatatcat tttttatata
721 ttctataaaa aatgtaaaaa agaaaaacac cgcttctgcc ttttactgt gttggagttt
781 tctggagtga gcactcacgc ctaagcgca cattcatgtg ggcatttctt gcgagcctcg
841 cagcctccgg aagctgtcga ctcatgaca agcattttgt gaactagga agctcagggg
901 ggttactggc ttctcttgag tcacactgct agcaaatggc agaaccaaag ctcaaataaa
961 aataaataa ttttcattca ttcactc

```

Fig. 2. Complete coding sequence of p16^{INK4A} gene.

이 없는 배양액 (serum-free media, SFM)에 넣어 총 160 μ l가 되도록 하여 5분간 상온에서 방치하였다. 플라스미드 DNA와 XQ2 reagent를 각각 160 μ l씩 혼합하고 SFM를 680 μ l 넣어 총 부피를 1 ml로 하였으며, 배양된 세포가 성장하고 있는 6-well culture plate의 각 well에 넣고 37°C에서 4시간 동안 더 배양하였다. 4시간이 지난 후, 20% FBS가 들어있는 배양액 2 ml를 각 well에 첨가하여 12시간 동안 배양한 다음 관찰하였다.

TUNEL 분석

세포사멸의 특징인 DNA 절편화를 확인하기 위해 TUNEL 분석법 (Promega, U.S.A.)을 시행하였다. 분석을 위한 세포 (3~5 \times 10⁶ cells/ml)를 PBS로 2번 세척한 후, 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 TdT 배양 용액을 넣어 빛을 차단하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 20 mM EDTA 용액 1 ml를 첨가하여 반응을 종료 시킨 후, propidium iodide (P.I.) 용액 (5 μ g/ml, P.I., 250 μ g/ml DNase-free RNase A in PBS)을 넣고 잘 혼합하여 염색 반응을 시행하였으며, 그 결과는 FASTAR flow cytometry (Becton Dickinson, U.S.A.)로 측정하였다.

단백질 추출, 정량 및 Western blot

세포를 수집하고, PBS로 세척하였다. 단백질 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 \times Protease inhibitor tablet)

를 넣고 액화질소로 급속냉각 시킨 후, 37°C 온수조에서 급속 해동한다. 이 작업을 3회 반복한 후 용해된 세포를 4°C, 15,000 rpm, 30분 동안 원심 분리한다. 추출한 단백질의 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Pierce, U.S.A.)로 실시하여 ELISA reader를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin (Sigma, U.S.A.)을 표준 단백질로 사용하였다.

Western blot은 세포를 수집하여 D-PBS로 세척한 다음, cell lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1 \times Protease inhibitor tablet)로 총 단백질을 추출하였다. 단백질 (15 μ g)을 10-15% SDS-PAGE에 분리시킨 후 PVDF 막으로 이동시켰다. 이동시킨 PVDF 막에 5% 탈지 분유가 포함된 TBS-T buffer를 처리하여 non-specific binding site를 억제 시킨 후 TBS-T buffer로 세척하였다. 세포주기 조절에 관여하는 단백질과 특이적인 항체 (SantaCruz, U.S.A.)를 이용하여 PVDF 막에 부착시킨 후, 단백질들의 발현양상을 보기 위해 ECL-plus reagent (Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜, X-ray film에 노출하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

p16^{INK4A} 유전자의 외부로부터 도입에 의한 세포 내 단백질 변화

HeLa, A549, H1299 세포주에 p16^{INK4A} 유전자를

transfection하고, 12시간 배양 후에 Western blot을 시행하여 p16^{INK4A}과 caspase 3의 단백질의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 transfected 된 p16^{INK4A}의 농도에 따라 p16 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 그러나 실험에 사용된 3 종류의 세포주에서 p16 단백질의 발현은 조금씩 차이를 보였다. HeLa 세포주의 경우 대조군과 비교하여 p16^{INK4A} 농도 1 µg과 5 µg에서 p16 단백질의 현명한 증가를 확인하였고, 10 µg에서는 오히려 1, 5 µg에서 보다 약한 발현을 관찰하였다. 이는, p16^{INK4A}의 삽입 농도에 따라 transfection의 효율이 달라질 수 있으며, 10 µg에서 보다 1, 5 µg에서 효율이 높은 것으로 나타났다. H1299와 A549 세포주의 경우는, 두 세포주 모두 p16^{INK4A} 유전자를 가지고 있지 않은 세포주이므로, 대조군과 비교하여 p16^{INK4A} 유전자의 뚜렷한 발현의 증가 양상을 확인할 수 있었다. 특히 H1299 세포주는 아주 현명한 p16 단백질의 발현이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 p16^{INK4A}의 transfection 후, 12시간이 지나면 p16 단백질의 발현이 이미 진행되고 있다는 것을 시사하며, 각각 세포마다 적절한 p16^{INK4A} 유전자의 농도에서 가장 큰 발현이 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 여기서 확인된 농도를 기준으로 transfection의 기준을 설정하여 실험을 진행하였다.

Caspase 3의 활성화는 Fas ligand가 Fas 수용체에 결합되어, 이 신호가 FADD를 거쳐 caspase 8을 활성화시키고, 이어서 caspase 3가 활성화된다. 결국 caspase 3는 세포사멸의 신호가 전달되는 경로에서 중심적인 역할을 담당하고 있다 [5]. 따라서 caspase 3의 활성을 관찰함으로써 세포사멸의 진

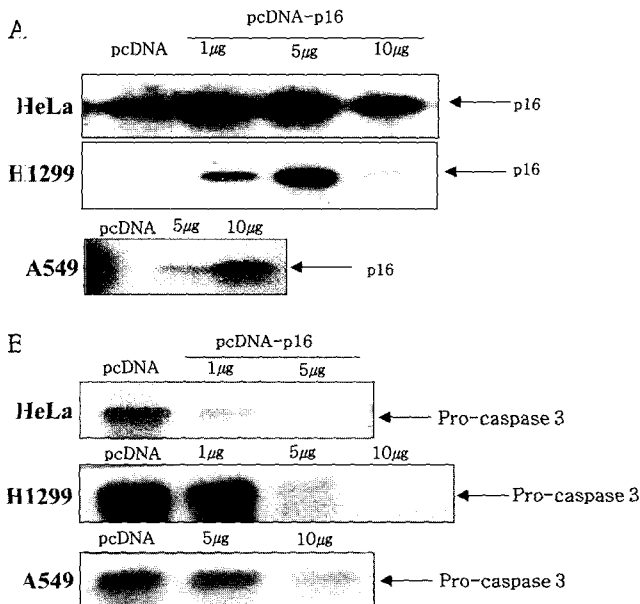


Fig. 3. Transfection of pcDNA-p16^{INK4A} induced p16^{INK4A} and pro-caspase3 protein expression in several cell lines. Western blot of total protein from transfected with pcDNA-p16^{INK4A} cells that were harvested in 12 hours after transfection.

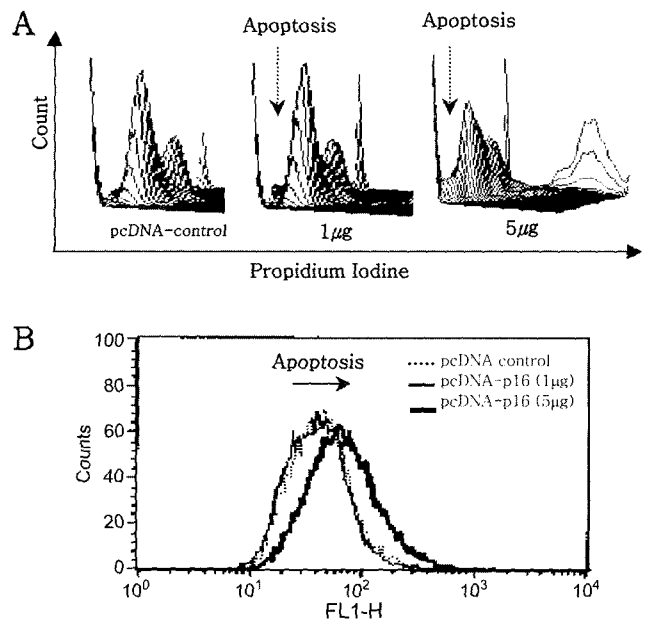


Fig. 4. Quantification of apoptosis by flow cytometry on HeLa cell line. HeLa cells were transfected with pcDNA-p16^{INK4A} in each concentration. (A) Cells were then stained with propidium iodine, and (B) DNA fragments were labeled with fluorescein-12-dUTP. Nuclei were analyzed for DNA content by flow cytometry using Cell Quest software. A total of 10,000 nuclei were analyzed from each sample.

행 여부를 확인할 수 있다. 이는 pro-caspase 3가 감소하면서 caspase 3로 활성화 되는 것을 시사한다. Fig. 3B에서 HeLa cell의 경우 transfection 한 p16^{INK4A} 유전자 1 µg의 농도에서부터 pro-caspase 3의 감소가 나타났고, H1299 cell에서는 5 µg에서부터 현명히 pro-caspase 3의 감소를 확인할 수 있었다. 또한 A549 cell에서도 10 µg에서 pro-caspase 3의 감소를 확인하였다. 위와 같은 결과로 세 종류의 세포주 모두 p16^{INK4A}의 발현이 증가되면서, pro-caspase 3가 caspase 3로 활성화되어 감소하는 것으로 세포사멸 발생을 확인하였다.

p16^{INK4A} 유전자의 transfection으로 유도된 세포사멸 분석

p16^{INK4A} 유전자의 transfection의 영향을 알아보기 위해, TUNEL 분석과 함께 P.I. 염색을 하여 flow cytometry 분석을 통해 cell cycle의 변화를 관찰하였다. Fig. 4A는 HeLa cell의 P.I. 염색 결과이다. 그림에서 볼 수 있듯이 pcDNA-p16^{INK4A} 1 µg에서부터 세포사멸 현상을 관찰할 수 있다. Fig. 5A는 A549 cell의 P.I. 염색 결과이며, 역시 pcDNA-p16^{INK4A} 5 µg 농도에서 현명하게 세포사멸 현상을 관찰할 수 있다. 좀 더 정확한 세포사멸 발생을 확인하기 위해 TUNEL 분석을 시행하였다. 핵산 감염 후 세포를 12시간 배양하고 TUNEL 분석 결과 Fig. 4B에서 HeLa 세포주는 그림과 같이 대조군과 비교하여 p16^{INK4A}을 농도 1 µg, 5 µg

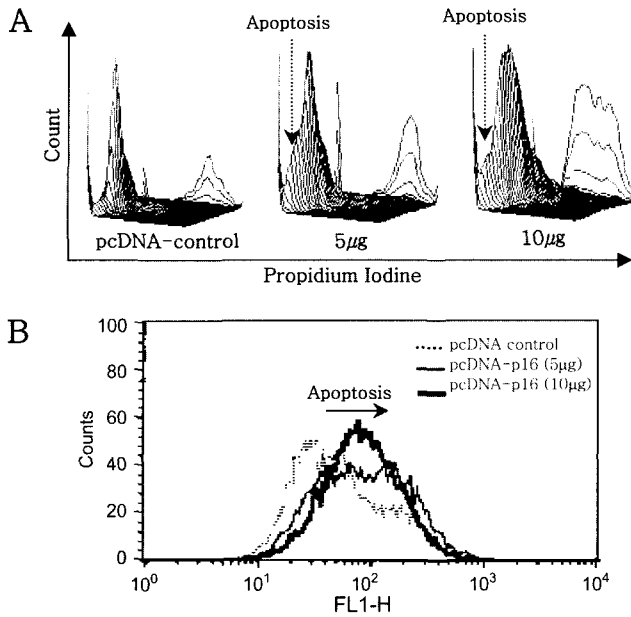


Fig. 5. Quantification of apoptosis by flow cytometry on A549 cell line. A549 cells were transfected with pcDNA-p16^{INK4A} in each concentration. (A) Cells were then stained with propidium iodine, and (B) DNA fragments were labeled with fluorescein-12-dUTP. Nuclei were analyzed for DNA content by flow cytometry using Cell Quest software. A total of 10,000 nuclei were analyzed from each sample.

transfection 시켰을 때 세포사멸의 증가를 관찰하였다. 또한 A549 세포주에서도 세포사멸이 발생하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5B). 그러나 H1299 세포 주는 TUNEL assay를 통해서도 세포사멸 양상을 정확히 확인할 수는 없었다(data not shown). 결론적으로 TUNEL 방법을 통한 HeLa, A549 세포 주에서의 p16^{INK4A} 유전자의 transfection 결과에서 볼 수 있듯이, 확실하게 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다. 또한 p16^{INK4A}의 유도로 인하여, H1299 세포에서 caspase 3 단백질의 활성화를 통한 세포사멸이 발생하였고, 이것은 p16^{INK4A}의 유도에 의한 세포사멸이 p53 유전자의 존재 여부와는 독립적인 기전으로 진행된다는 사실도 확인하였다.

요 약

본 연구진은 토양미생물의 배양액으로부터 cyclin-dependent kinase 저해활성의 Toyocamycin을 분리하였으며[16], 화학적 전합성을 통하여 활성이 개선된 유도체인 신물질 MCS-5A를 합성하였다[3]. 이 MCS-5A를 이용한 항암 기전 규명을 위한 연구를 통하여, human promyelocytic leukemia cell(HL-60)에서 MCS-5A에 의해 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p16^{INK4A} 단백질의 발현증가가 암세포의 세포주기 억제와 동시에 HL-60 cell의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다(data not shown). 그러나 HL-60 cell의 경우와는 달리 non small cell lung cancer cell(NSCLC)인 A549

cell(p16^{INK4A} 결핍 세포주)에 MCS-5A를 처리할 경우에는 전혀 세포사멸이 유도되지 않았다. 따라서 MCS-5A에 의한 HL-60 cell에서의 세포사멸 유도는 발암억제 유전자인 p16^{INK4A}의 세포 내 발현 및 존재 여부에 의해 좌우되는 것으로 판단되었다. 이러한 배경에서 본 연구는 p16^{INK4A}의 기존에 알려진 세포주기 억제를 유발하는 cyclin-dependent kinase inhibitor(CKI)로서의 역할 뿐 아니라, p16^{INK4A} 유전자가 세포사멸을 유도할 수 있다는 새로운 기능을 규명하기 위하여 다음의 연구를 시도하였다. 즉 p16^{INK4A} 결핍 세포주인 A549(-p16/+p53)와 H1299(-p16/-p53) 그리고 p16^{INK4A} 함유 세포주인 HeLa(+p16/+p53) 세포에 외부로부터 p16^{INK4A} 유전자를 도입시켜, 각 세포주에서의 세포사멸 유도 여부를 비교하고자 하였다. 우선 wild-type p16^{INK4A} 유전자를 가진 HeLa cell에서 총 RNA를 추출하여, 역전사 반응으로 cDNA를 만들고, PCR을 통해 p16^{INK4A} 유전자를 증폭하였다. pcDNA3.1/His A vector에 p16^{INK4A} 유전자를 끼워 넣고 competent cell (XL1-Blue)에 형질 전환하여 cloning한 후, p16^{INK4A} clone을 다량으로 추출하였다. 위에 언급한 각각의 cell line에 p16^{INK4A} 유전자를 농도(0, 1, 5, 10ug)별로 transfection 시킨 후, p16 단백질을 일정 시간 동안(12시간) 발현시킨 뒤, TUNEL 등의 분석을 통해 세포사멸이 유도되는지를 확인하였으며, 또한 Western blot 분석을 통하여 p16 단백질과 세포사멸 유도 인자인 caspase 3의 발현 양상을 확인하였다. 연구 결과, Western blot을 통해 transfection 시킨 p16^{INK4A} 유전자의 농도에 따라 각각의 cell line에서 pro-caspase 3의 감소함을 관찰할 수 있었고, TUNEL 분석을 통해 A549 및 HeLa cell에서 세포사멸이 유도됨을 확인할 수 있었다. 특히 A549(-p16/+p53)와 HeLa cell(+p16/+p53)에서는 TUNEL 분석 및 Western blot을 통한 pro-caspase 3의 caspase 3로의 전환 등을 통해 세포사멸이 발생하였음을 확연하게 확인할 수 있었으나, 반면 H1299(-p16/-p53) cell에서는 단지 Western blot을 통한 pro-caspase 3의 활성화만을 통해 간접적으로 세포사멸을 확인할 수 있었다. 또한 p53이 결핍된 H1299(-p16/-p53) 세포주에서의 p16^{INK4A}에 의한 세포사멸 유도는 p53 비의존적으로 작용한다는 사실을 확인할 수 있었다. 결론적으로 발암억제 유전자인 p16^{INK4A}는 CKI로서의 기능뿐 아니라, 세포사멸 유도에도 밀접하게 관련되어 있으며, 이 기능은 발암억제 유전자인 p53과는 독립적으로 작용한다는 사실을 확인하였다. 세포사멸 유도 기전연구에서 p16^{INK4A}가 세포사멸을 유도하는 기전에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 바는 없으며, 현재 본 연구실에서 다양한 실험을 통해 연구가 진행 중이다.

감사의 말

이 논문은 2001년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

REFERENCE

1. Burns, Timothy F. and Wafik S. El-deiry. 1999. The p53 Pathway and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **181**: 231-239.
2. Chin, Lynda, Jason P., and Ronald A. DePinho. 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene-two products- two pathways. *Trends. Biochem. Sci.* **23**: 291-296.
3. Chun, M. W., D. H. Shin, S. Y. Song, Y. H. Lee, C. H. Lee, L. S. Jeong and S. K. Lee, 1999. Synthesis of L-Sangivamycin and Toyocamycin analogues and their inhibitory activities of Ser/Thr protein kinases. *Nucleosides Nucleotides* **18**: 617-618.
4. Clarke, A. R., C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper and A. H. Wyllie. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathway. *Nature* **362**: 849-852.
5. Gey, G. O., W. D. Coffman, and M. T. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265.
6. Kamb, A., N. A. Gruis, J. Weaver-Feidhaus, Q. Liu, K. Harshman, S. V. Tavtigian, E. Stockert, R. S. III Day, B. E. Johnson, and M. H. Skolnick. 1994. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**: 436-440.
7. Kamesaki, H. 1998. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implication in cancer chemotherapy. *Int. J. Hematol.* **68**(1): 29-43.
8. Kataoka, M., S. Wiehle, F. Spitz, G. Schumacher, J. A. Roth and R. J. Cristiano 2000. Down-regulation of bcl-2 is associated with p16^{INK4A}-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* **19**: 1580-1595.
9. Kim, M., Y. Katayose, L. Rojanala, S. Shah, and M. Sgagias. 2000. Induction of apoptosis in p16^{INK4A} mutant cell line by adenovirus-mediated overexpression of p16^{INK4A} protein. *Cell Death. Differ.* **7**: 706-711.
10. Koh, J., G. H. Enders, B. D. Dynlacht, and E. Harlow. 1995. Tumour derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* **375**: 506-510.
11. Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne, and T. Jacks. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-852.
12. Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, D. J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters, and J. Bartek. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**: 503-506.
13. Macleod, Kay. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**: 81-93.
14. McConnell, B. B., F. J. Gregory, F. J. Stott, E. Hara, and G. Peters. 1999. Induced expression of p16(INK4A) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1981-1989.
15. Miyashita, T. and J. C. Reed. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299.
16. Park, S., J. Cheon, Y. Lee, J. Park, K. Lee, C.-H. Lee and S. Lee. 1996. A Specific Inhibitor of Cyclin-Dependent Protein Kinases, CDC2 and CDK2. *Mol. Cells* **6**: 679-683.
17. Ruas, M. and G. Peters. 1998. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim, Biophys. Acta.* **1378**: F115-117.
18. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory manual* , pp 16.47-16.57. 3th ed. CSHL Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
19. Scheffner, M. 1991. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5523-5527.
20. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**: 704-707.
21. Sharpless, Norman E., and Ronald A. DePinho. 1999. The INK4a/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 22-30.
22. Takahashi, T. 1989. p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**: 491-494.
23. Tang, Kit S., Benjamin J. Guralnick, Wooi Koon Wang, Alan R. Fersht, and Laura S. Itzhaki. 1999. Stability and Folding of the Tumor Suppressor Protein p16. *J. Mol. Biol.* **285**: 1869-1886.
24. Vaux, D. L. and A. Strasser. 1996. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 2239-2244.
25. Vidal, A. and K. Andrew. 2000. Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* **247**: 1-15.

(Received Dec. 5, 2003/Accepted Mar. 10, 2004)