

## 인간 Spt16 단백질 발현과 세포 증식 사이의 연관성에 관한 연구

곽정숙 · 조문주 · 류민정 · 오상택\*

인제대학교 약물유전체연구센터

Received December 20, 2006 / Accepted January 17, 2007

**The expression of human Spt16 is associated with cell proliferation.** Jungsug Gwak, Munju Cho, Min-jung Ryu and Sangtaek Oh\*. *PharmcoGenomics Research Center, Inje University, Busan 614-735, Korea* – Facilitates chromatin transcription (FACT) is a chromatin-specific elongation factor required for transcription of chromatin templates *in vivo* and *in vitro*. FACT consists of human homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* Spt16/Cdc68 protein (hSpt16) and the high mobility group-1-like protein structure-specific recognition protein-1 (SSRP-1). Here we show that the protein level of hSpt16 is massively down-regulated in quiescent T98G cells using both immunofluorescence and western blot analysis. In contrast, we observe high level of the hSpt16 expression in the proliferative T98G cells. Interestingly, the expression of SSRP-1 is not altered in both quiescent and proliferative states. Taken together, our findings implicate that the expression of hSpt16 is associated with the proliferative state and can be used as a proliferation marker.

**Key words** – FACT, hSpt16, cell cycle, T98G cell

### 서 론

진핵 세포 내의 DNA는 크로마틴 구조를 형성하고 있고 이러한 크로마틴의 기본 구조는 뉴클레오솜(nucleosome)으로서 146bp의 DNA가 히스톤 H2A, H2B, H3 그리고 H4가 각각 2분자로 되어 있는 히스톤 팔량체를 둘러싸고 있다[1]. 크로마틴 구조는 DNA 중합효소 혹은 RNA 중합효소와 같은 거대 단백질 복합체가 DNA로의 접근을 억제함으로써 유전자 전사, DNA 복제 및 복구를 조절 한다[2,3]. 유전자의 전사 및 DNA 복제가 진행되려면 우선 크로마틴의 구조의 변화가 수반되어야 하는데 이는 여러 종류의 크로마틴 리모델링 인자들에 의해 매개 된다[4-6].

FACT (facilitates chromatin transcription) 복합체는 크로마틴 주형을 기질로 사용한 *in vitro* 전사측정법을 통하여 HeLa 세포주의 핵 추출물로부터 처음 분리되었다. 분리된 FACT 복합체는 140 kDa과 80 kDa의 이중단백질 복합체로서 효모를 비롯해 초파리, *Xenopus*, 인간에 이르기까지 진핵생물에서 보편적으로 발현된다[6]. FACT 복합체중 140 kDa 단위체는 효모의 Spt16/Cdc68 단백질과 높은 유사성을 보이며[7,8] SSRP1(human structure-specific recognition protein-1)으로 불리는 80 kDa단위체는 효모의 Pob3 단백질과 유사성을 보인다[9,10]. *in vitro*에서 FACT 복합체는 하나의 H2A/H2B 이량체를 크로마틴 주형으로부터 제거함으로써 RNA 중합효소 II에 의한 전사진행을 도와주는 활성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다[11-13]. 최근에는 FACT 복합체가 전사

후 구조적으로 변형된 뉴클레오솜을 다시 원상태로 복구하는 활성도 가진 것으로 보고되었다[14]. FACT 복합체가 크로마틴 구조를 변화시키는 활성에는 ATP가 필요하지 않으며 이는 기존의 SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting), ISWI (imitation of switch) 그리고 CHD (chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein)등의 크로마틴 리모델링 인자와는 다른 기작을 통하여 크로마틴 구조를 변화시킴을 의미한다[4,6].

효모에서 Spt16/Cdc68은 중요한 핵 단백질로서 RNA 중합효소 II에 의해 매개되는 다양한 유전자의 전사에 필수적이라고 밝혀졌다[15-18]. 또한 Spt16 돌연변이에서는 세포 주기 진행에 필수적인 G1 cyclin들이 발현되지 않음으로써 효모 세포들이 세포주기 진행이 G1기에 멈추는 현상이 관찰되었다[1]. 이러한 결과들은 Spt16/Cdc68가 유전자 발현 조절뿐만 아니라 세포 주기 조절에도 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 하지만 현재까지 인간 세포에서 hSpt16을 포함하고 있는 FACT 복합체와 세포 주기 사이의 연관 관계에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 세포 주기에 따른 FACT 복합체의 단위체인 hSpt16 과 SSRP1 단백질의 발현 양상을 각각 분석하였다. hSpt16의 경우 휴지기 세포에서는 발현이 급격히 감소하였으며 세포 주기가 진행됨에 따라 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다. 이 결과로부터 우리는 hSpt16의 세포 증식에 대한 표지 단백질로서의 활용 가능성을 제시하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양에 사용한 시약

실험에 사용한 T98G세포주(CRL-1690)는 American Type

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-6438, Fax : +82-51-893-1232

E-mail : ohsa@inje.ac.kr

Culture Collection(Roville, MD, USA)로부터 분양 받아 사용하였다. 세포배양에 필요한 배지 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)과 배지에 첨가하는 항생제 (120 µg penicillin/ml, and 200 µg streptomycin/ml) 및 FBS(fetal bovine serum)은 Hyclone(Logan, UT) 제품을 사용하였다.

#### DNA flow cytometry에 의한 세포주기 분석

T98G cell을 24well plate에  $1.5 \times 10^5$ /ml로 분주한다. 10%의 FBS와 항생제가 첨가되어 있는 DMEM을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 24시간 후에 한 well은 항생제만 첨가된 DMEM으로 두 번 씻어준 후 DMEM으로 배지를 교환하고 asynchronous한 T98G 세포주는 10%의 FBS가 첨가된 DMEM배지로 교환한다. DMEM에서 72시간 동안 배양한 T98G 세포주와 10%의 FBS가 첨가된 DMEM에서 배양된 T98G 세포주를 원심분리 하여 모은다. PBS로 1회 씻어준 후 1ml의 nuclear isolation buffer(0.5% BSA, 0.1% NP40, 50ng/ml propidium iodide, 10mg/ml RNase, PBS)에 T98G 세포주를 현탁시키고 4°C 어두운 조건에서 20분간 반응시킨다. FACS buffer(1% BSA, 0.2% NaN<sub>3</sub>)로 두 번 씻어준 후 300µl의 FACS buffer에 현탁시킨 후 flow cytometer로 분석하였다.

#### Western blot 분석

FACS 분석과 동일한 조건으로 배양된 T98G cell을 PBS로 씻은 후 protease inhibitor cocktail(Sigma)이 첨가된 RIPA buffer(150mM NaCl, 1% Nonidet P-40(NP-40), 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl pH8.0)를 넣고 4°C에서 30분간 반응시켰다. 4°C에서 반응시키는 중간에 5분 간격으로 vortex해주었다. 4°C, 13000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층 액을 새 tube로 옮기고 이것을 이용하여 단백질을 정량 하였다. 단백질의 정량은 Bradford method를 이용하였고, 표준 단백 시료는 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다. 동일 량의 단백시료를 NuPAGE LDS sample buffer (4X, invitrogen)와 섞은 후 90°C에서 5분간 끓이고, NuPAGE gel (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 80V에서 전기영동을 하였다. 이것을 Bio-Rad kit를 이용하여 PVDF membrane으로 옮긴 후 5% skim milk로 실온에서 2시간 동안 blocking하였다. 일차 항체인 anti-FACT/cdc68 (Upstate, Lake Placid, NY)을 5% skim milk에 1:1000으로 희석하여 4°C에서 9시간 처리하였다. Cyclin D1(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 항체와 SSRP1(Santa Cruz Biotechnology) 항체는 1:200으로 Cyclin B1(Cell Signaling) 항체는 1:1000으로 희석하여 처리하였다. 일차 항체 처리 후 TBS-T로 5회 씻어내고 이차 항체를 1:2500으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 일차 항체를 anti-FACT/ cdc68 (upstate)를 처리한 경우에는 anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)를

이차 항체로 처리하였고, Cyclin D1 항체와 Cyclin B1 항체를 사용한 경우에는 anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)를 이차 항체로 사용하였으며, SSRP1 항체를 사용한 membrane은 anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. 이차 항체를 처리한지 1시간 후에 PVDF membrane을 TBS-T로 4~5회 씻어낸 후 ECL detection system (Santa Cruz Biotechnology)을 이용하여 Spt16의 양을 측정하였다. Western blot의 결과는 필름을 scan한 후 Multi-Gage 프로그램을 이용하여 정량 하였다.

#### 면역형광 분석법

T98G cell을 chamber slide(Nalge Nunc, Rochester, NY)에  $1.5 \times 10^5$ /ml로 분주한 후 PI staining과 동일한 조건으로 배양한다. FBS가 첨가되지 않은 DMEM에서 배양한지 72시간 후에 배지를 제거하고 PBS로 씻어준다. 4% paraformaldehyde를 20분간 처리하여 고정시키고 0.3% Triton X-100을 10분간 실온에서 처리하였다. 4% BSA를 처리하여 1시간 동안 blocking시켰다. 일차 항체인 anti-FACT/cdc68을 1:400으로 PBS에 희석하여 1시간 동안 실온에서 처리하고 이차 항체인 anti-rabbit IgG-fluorescence(Molecular Probes, Junction City, OR)를 PBS에 1:400으로 희석하여 어두운 조건에서 1시간 동안 처리하였다. PI를 50 ng/ml로 희석하여 1분간 어두운 상태에서 처리한 후 ProLong® Gold anti-fade reagent (Molecular Probes)를 떨어뜨리고 sealing한다. 사용된 모든 시약은 PBS에 녹였고 시약의 처리 후에는 항상 PBS로 5회 씻어주었다.

## 결과 및 고찰

인간 세포에서 세포 주기에 따른 FACT 복합체의 발현 양상을 분석하기 위하여 인간 뇌로부터 유래한 다형성 아교모세포종 세포주인 T98G 세포주를 FBS 없이 배양하여 세포 분열 주기를 휴지기(G<sub>0</sub>)에 정지시켰다. 이를 확인하기 위하여 propidium iodide(PI)으로 DNA를 염색한 후 세포주기를 flow cytometry 분석법을 수행하였다. Fig. 1의 결과에서 보듯이 FBS 없이 배양한 T89G 세포는 세포 주기가 G<sub>0</sub>기로 정지되어 세포분열이 일어나지 않음을 확인할 수 있었으며, 이와 대조적으로 10% FBS 첨가 하에서 배양한 T89G 세포는 G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M기의 다양한 주기에 세포가 분포되어 있음을 관찰하였다. 이를 다시 한번 확인하기 위하여 세포주기의 초기인 G<sub>1</sub>기에서 S기로 이전되는 과정에서 특이적으로 발현된다고 알려진 cyclin D1과 G<sub>2</sub>/M기로 진행되는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있는 cyclin B1의 단백질 수준을 Western blot을 이용하여 측정하였다. Fig. 2의 결과에서 보듯이 세포 주기가 G<sub>0</sub>기로 정지되어 있는 T98G 세포에서는 cyclin D1과 cyclin B1의 발현이 관찰되지 않는 반면 세포주기가 진행되

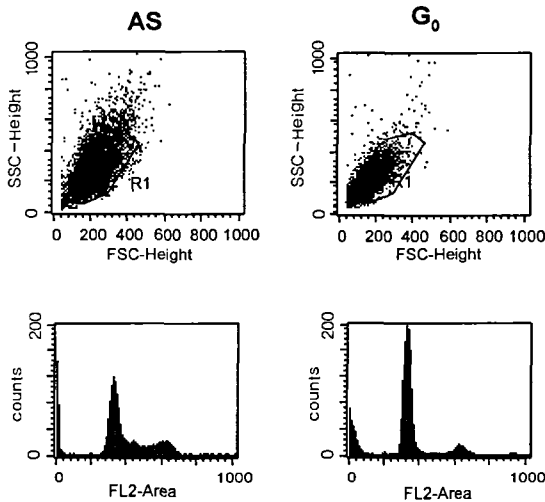


Fig. 1. Flow cytometry analysis of T98G cells. T98G cells were synchronized in G<sub>0</sub> phase by serum starvation. 72 h after serum starvation, cells were harvested and DNA content was determined by propidium iodide staining and flow cytometric analysis.

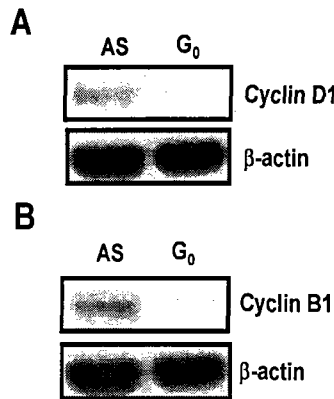


Fig. 2. The expression of cyclinD1 and cyclin B1. Proteins were prepared from G<sub>0</sub> arrested and asynchronized T98G cells, and then subjected to Western blotting with anit-cyclin D1 (A) and anti-cyclin B1 (B) antibodies. To confirm equal loading, the blot was reprobred with anti-actin antibody.

고 있는 T98G 세포에서는 cyclin D1과 cyclin B1의 발현이 관찰되었다. 위의 결과들로부터 FBS가 없는 조건하에서 T98G 세포를 배양할 경우 T98G 세포가 G<sub>0</sub>기에 세포주기가 정지함을 알 수 있었다.

이러한 세포주기의 변화가 FACT 복합체의 단위체중 하나인 hSpt16 단백질 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다. Fig. 3A의 결과에서 보듯이 세포주기가 G<sub>0</sub>기에 정지되어 있는 T98G 세포에서는 세포주기가 진행되고 있는 T98G 세포와 비교하여 볼 때 hSpt16 단백질의 발현 수준이 급격히 감소되어 있음을 관찰할 수 있다.

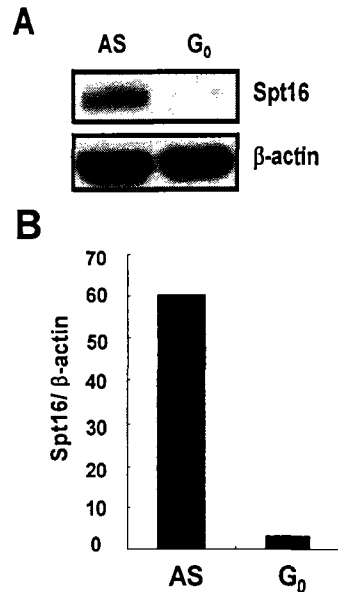


Fig. 3. The expression of hSpt16. (A) Proteins were prepared from G<sub>0</sub> arrested and asynchronized T98G cells, and then subjected to Western blotting with hSpt16/cdc68 antibody. To confirm equal loading, the blot was reprobred with anti-actin antibody. (B) Quantification of hSpt16 expression in G<sub>0</sub> arrested and asynchronized T98G cells.

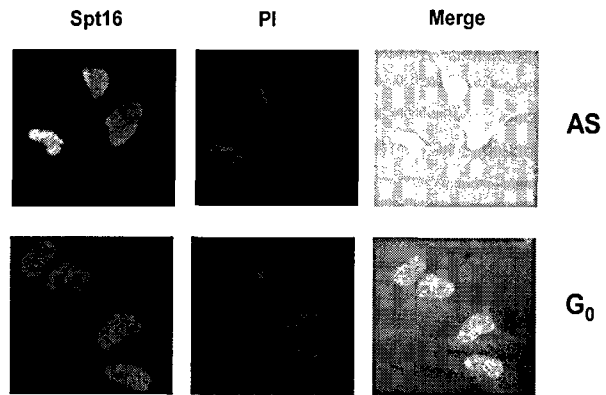


Fig. 4. Immunofluorescence analysis in T98G cells. After fixation, the cells were stained with anti-hSpt16/cdc68 antibody and propidium iodide. Magnification is 400X.

Fig.3A의 결과를 정량적으로 분석해보면 세포주기가 G<sub>0</sub>기에 정지되어 있는 T98G 세포에 비해 세포주기가 진행되고 있는 T98G 세포에서 hSpt16가 18.5배 많이 발현됨을 알 수 있었다 (Fig. 3B). 우리는 또한 면역형광 분석법을 이용하여 hSpt16이 발현되는 위치와 세포주기에 따른 발현 양의 변화를 관찰하였다. Fig. 4의 결과에서 보듯이 세포주기가 G<sub>0</sub>기에 정지되어 있는 T98G 세포에 비해 세포주기가 진행되고 있는 T98G 세포에서 FITC로 염색된 hSpt16 양이 감소함을 관찰할 수 있었다. 또한 PI를 이용하여 핵을 염색하고 hSpt16의 세포

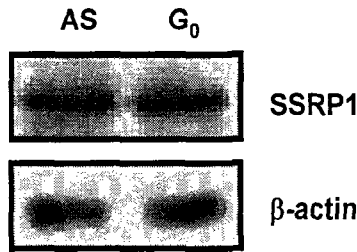


Fig. 5. The expression of SSRP-1. Proteins were prepared from G<sub>0</sub> arrested and asynchronous T98G cells, and then subjected to Western blotting with SSRP-1 antibody. To confirm equal loading, the blot was reprobed with anti-actin antibody.

내 위치를 측정한 결과 기존의 문헌에서 보고된 바와 같이 핵 속에 존재하고 있음이 관찰되었다 (Fig. 4)[6]. 위의 결과들로부터 FACT 단백질 복합체의 단위체인 hSpt16이 휴지기 상태의 세포에서 보다 증식이 일어나고 있는 세포에서 발현이 증가함을 알 수 있다.

세포주기의 변화가 FACT 복합체의 단위체중 하나인 SSRP1 단백질 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해 Western blot을 수행하였다. 다른 단위체인 hSpt16과는 달리 세포주기가 G<sub>0</sub>기에 정지되어 있는 T98G 세포와 세포주기가 진행되고 있는 T98G 세포에서 SSRP1 단백질 발현 수준이 변화가 없음을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

FACT 복합체는 *in vitro*와 *in vivo*에서 뉴클레오솜을 해체함으로써 전사 진행을 활성화 한다고 보고되었다[11-13]. 또한 FACT 복합체가 히스톤 단백질과 상호 작용 할 뿐 아니라 뉴클레오솜 형성을 촉진하는 활성을 가지고 있고 이러한 활성은 단위체인 hSpt16 단백질의 C-말단과 직접적인 연관이 있다는 연구 결과가 발표되었고 이로부터 히스톤 chaperone으로 작용할 것이라 제시되었다[13,14]. 본 연구에서는 FACT 복합체의 단위체인 hSpt16 단백질의 발현이 휴지기 세포에서 증식이 일어나고 있는 세포와 비교하여 급격히 감소되어 있음을 관찰하였다 (Fig. 3 and 4). 이러한 결과는 chromatin assembly factor-1 (CAF-1)이라는 히스톤 chaperone이 증식이 일어나고 있는 세포에서 과발현된다는 기존의 연구 결과와 일치하고 있다[20]. 본 연구 결과는 hSpt16 단백질이 세포 증식의 표지로 사용될 수 있음을 제시하였고 또한 다양한 암의 진단에 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 요 약

FACT(facilitates chromatin transcription)은 크로마틴을 주형으로 하는 전사에 필요한 크로마틴 특이적 전사 진행 인자이다. FACT는 *Saccharomyces Cerevisiae* Spt16/Cdc68의 인간 유사체와 high mobility froup-1-like protein structure-specific recognition protein-1(SSRP-1)의 이중단백질 복

합체이다. 본 논문에서는 FACT의 단위체인 hSpt16의 발현이 휴지기의 T98G 세포에서 급격히 감소됨을 면역형광 분석법과 Western blot 분석법을 이용하여 관찰하였다. 이와 반대로 증식기의 T98G 세포에서는 hSpt16이 높은 수준으로 발현되고 있는 것이 관찰되었다. FACT의 또 다른 단위체 SSRP-1의 발현은 휴지거나 증식기의 세포에서 변화가 없음을 관찰되었다. 이상의 결과로부터 hSpt16이 발현이 세포의 증식과 연관이 되어 있음을 알 수 있었고 세포 증식 표지 인자로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2005-015-C00269).

### 참 고 문 헌

- Hansen, J. C. 2002. Conformational Dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanism, and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361-369.
- Workman, J. L. and R. G. Roeder. 1987. Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* **51**, 613-622.
- Izban, M. G. and D. S. Luse 1992. Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates, *J. Biol. Chem.* **267**, 13647-13655.
- Cote, J., J. Quinn, J. L. Workman and C. L. Peterson 1994. Stimulation of GAL4 derivatives binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* **265**, 53-60.
- Steger, D. J., R. T. Utley, P. A. Grant, S. John, A. Eberharter, J. Cote, T. Oweren-Hughes, K. Ikeda and J. L. Workman. 1998. Regulation of transcription by multi-subunit complexes that alter nucleosome structure. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **63**, 483-491.
- Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse and D. Reinberg. 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosome. *Cell* **92**, 105-116.
- Malone, E. A., C. D. Clark, A. Chiang and F. Wnston. 1991. Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5710-5717.
- Rowley, A., R. A. Singer, G. C. Johnston. 1991. CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5718-5726.
- Bruhn, S. L., P. M. Pil, J. M. Essigmann, D. E. Housman and S. J. Lippard. 1992. Isolation and characterization human cDNA clones encoding a high mobility froup box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2307-2311.
10. Wittmeyer, J., T. Formosa. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interact with Cdc68/ Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG1-like protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4178-4190.
  11. Santisteban, M., G. Arents, E. N. Moudrianakis and M. M. Smith. 1997. Histone octamer function in vivo: mutations in the dimer-tetramer interfaces disrupt both gene activation and repression. *EMBO J.* 16, 2493-2506.
  12. Orphanides, G., W. H. Wu, W. S. Lan, M. Hampsey and D. Reinberg. 1999. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins, *Nature* 400, 284-288.
  13. Belosterkovskaya, R., S. Oh, V. A. Bondarenko, V. M. Studisky, G. Orphanides and D. Reinberg. 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* 301, 1090-1093.
  14. Formosa, T., S. Ruone, M. D. Adams, A. E. Olsen, P. Erikson, Y. Yu, A. R. Rhoades, P. K. Kaufman and D. J. Stillman. 2002. Defects in SPT16 or POB3 ( $\gamma$ FACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway. Polymerase passage may degraded chromatin structure. *Genetics* 162, 1557-1571.
  15. Lindstrom, D. L. and G. A. Hartzog. 2001. Genetic interactions of Spt4-Spt5 and TFIIS with the RNA polymerase II CTD and CTD modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159, 487-497.
  16. Krogan, N. J., M. Kim, S. H. Ahn, G. Zhong, M. S. Kobor, G. Cagney, A. Emili, A. Shilatifard, S. Buratowski and, J. F. Greenblatt. 2002. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*; a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6979-6992.
  17. Squazzo, S. L., P. J. Costa, D. L. Lindstrom, K. E. Kumer, R. Simic, J. L. Jennings, A. J. Link, K. M. Arndt and G. A. Hartzog. 2001. The paf1 complex physically and functionally associated with transcription elongation factors in vivo. *EMBO J.* 21, 1764-1774
  18. Lindstrom, D. L., S. L. Squazzo, N. Muster, T. A. Burckin, K. C. Wachter, C. A. Emigh, J. A. McCleery, J. R. Yates, G. A. Hartzog. 2003. Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1368-1378.
  19. Howe, L., D. Auston, P. Grant, S. John, R. G. Cook, J. L. Workman, L. Pilus. 2001. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* 15, 3144-3154
  20. Polo, S. E., S. E. Theocharis, J. Klijanienko, A. Savignoni, B. Asselain, P. Vielh and G. Almouzni. 2004. Chromatin assembly factor-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferating cells. *Cancer Res.* 64(7), 2371-2381.