

## p53에 의한 HIV-1 Tat 활성억제와 인산화관련 가능성 연구

한남대학교 미생물학과

변희선 · 이상구 · 배용수\*

=Abstract=

### **p53-mediated Inhibitory Mechanism on HIV-1 Tat is Likely to be Associated with Tat-Phosphorylation**

**Hee-Sun Byune, Sang-Gu Lee and Yong-Soo Bae\***

*Hannam University, Department of Microbiology, Ojeong-dong 133, Daeduk-gu, Daejeon 300-791, Korea*

HIV-1 tat, a strong transactivator, is essential for the HIV-1 replication and AIDS progression. The Tat function is markedly inhibited by human anti-oncogene p53. This work was initiated to identify the p53-associated inhibitory mechanism on tat-mediated transactivation. Inhibitory function of p53 was confirmed by co-transfection of tat-expressing Jurkat cells with LTR-CAT plasmid, or H3T1 cells (LTR-CAT integrated HeLa cells) with different ratio of pSV-tat/pCDNA-p53 plasmids. Results from the direct protein-protein interaction between soluble p53 and tat, and yeast two-hybrid experiments showed that the co-suppression mechanism is unlikely to be due to the direct interaction. CAT activity was not affected by tat in Jurkat cells which were transfected with p53-promoter-CAT or p53-enhancer-CAT, suggesting that the tat-mediated p53 suppression is not directly associated with p53-promoter. Finally, we have tested protein kinase activity in p53-transfected Jurkat cells, which might phosphorylate HIV-1 tat, resulting in inhibition of tat function. Some of our data lead us to assume that the p53-mediated tat inhibition is likely to be associated with p53-associated, signaling-mediated phosphorylation of tat, resulting in the dysfunction of tat. This study is now under investigation.

**Key Words:** HIV-1 tat, p53, Direct interaction, Inhibition, Promoter, Phosphorylation

### 서 론

인체면역결핍 virus (HIV-1)의 Tat 단백질은 강력한 transactivator로서 HIV-1 provirus의 long terminal repeat (LTR)에 작용하여 HIV-1 전사를 유도하는 필수 단백질이다 [1, 2]. Tat은 HIV-1 감염세포에서 합성되면 핵속으로 이동하여 provirus의 전사에 중요하게 관여할 뿐 아니라 활성을 가진 상태

로 세포 밖으로 분비되면 주위 세포들의 신호전달에 작용하여 면역세포 성장에 다양한 영향을 미친다 [3, 4]. 이러한 연구와 함께 Tat의 발현이 조직이나 기관에 미치는 직접적인 영향을 알아보기 위해 Tat을 발현하는 transgenic mice를 생산하여 지속적으로 관찰한 결과 임파조직에 hyperplasia나 lymphoma 같은 암이 자주 발생하는 것이 발견되었다 [5, 6, 7]. 또한 Ensoli 등 (1994)은 tat이 fibroblast growth factor와 함께 작용하여 AIDS 환

\*To whom correspondent should be addressed: Yong-Soo Bae, Hannam University, Department of Microbiology, Ojeong-dong 133, Daeduk-gu, Daejeon 300-791, Korea

자 말기의 Kaposi's sarcoma를 일으킨다고 발표하였다 [8]. 이러한 연구결과는 Tat 단백질이 직접적으로 암 유발에 관여할 가능성을 시사해 준다. 그러나 최근 이와는 반대로 Tat이 1차 면역세포에서 apoptosis를 유도하기 때문에 AIDS 환자들에게서 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell이 계속적으로 감소하여 면역결핍이 일어난다는 연구결과도 많이 발표되고 있다 [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Li 등 (1995)에 의해 Tat 단백질이 primary mononuclear cell 뿐 아니라 cell line에서도 apoptosis에 의한 세포 사멸을 유도한다는 보고가 있는 후, tat의 apoptosis 기작을 밝히려는 연구가 활발히 진행되는 가운데 Tat이 bcl-2의 발현을 억제하여 apoptosis를 유도한다는 실험 결과가 발표되었는가 하면 [13], 어떤 경우는 Tat을 발현하는 세포는 apoptosis에 저항성을 나타내지만 이 세포들이 합성한 Tat을 분비하면 주위의 primary T 세포의 apoptosis를 유도한다는 Tat의 이중인 역할이 발표되기도 하였다 [11]. 또한 CD<sub>3</sub>에 의해 활성화된 T 세포만 제조한 Tat 단백질에 의해 apoptosis가 유도된다는 보고도 있으며 [14] 중추 신경계의 microglia 세포나 macrophage 및 몇몇 신경세포도 HIV-1에 감염되면 apoptosis가 일어나는데 이는 HIV-1 Tat 단백질의 toxic effect 때문이라는 연구결과도 발표되었다 [12]. Cottrez 등 (1997)은 HIV-1에 감염된 antigen presenting cell이 specific T cell line 이나 혹은 specific primary CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell과 반응하여 이를 재활성화 시킴으로 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell의 apoptosis를 유도하여 T 세포의 수가 감소함으로써 면역결핍현상을 일으킨다고 주장하였다.

그러나 이러한 HIV-1 tat이 apoptosis를 억제한다는 주장이나 혹은 그와는 반대로 apoptosis를 유도한다는 연구결과 중 어느 하나만이 사실이라면 HIV-1 감염 후 일정시간이 지나면 혈중 HIV-1 증식이 거의 나타나지 않는 장기간의 무증상감염기 상태나 AIDS 말기의 대량의 virus가 혈중에 나타나는 2차 viremia 상태, 그리고 말기 AIDS 환자에게 흔히 나타나는 Kaposi's 육종에 등 전체적인 AIDS 진전과정에서 대해서는 설명이 어려워진다.

이러한 가운데 최근 HIV-1 증식이 항암유전자인 p53에 의해 억제되며 248번째 아미노산 Arg을 Gly로 치환한 돌연변이 p53에서는 이러한 억제기능이 나타나지 않는 것으로 보아 p53이 HIV-1 증식을 억제하므로 감염 초기단계의 latency가 설명되기 시작하면서 [15] HIV-1 증식의 필수 단백질인 Tat과 p53의 상호 길항기작이 점진적인 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>

T 세포의 결핍으로 이어지는 AIDS 진전을 설명할 수 있을 것으로 추정되어 연구가 진행되었다. Li 등 (1995)은 p53이 tat의 transactivation 기능을 억제하고 tat은 p53의 promoter에 작용하여 p53의 발현을 억제한다는 상호억제기작을 발표하여 AIDS 발병기작을 설명하였다. 한편 이와는 달리 HIV-1 Tat도 기존의 Adenovirus E1B [16]나 SV40 T-antigen [17], Hepatitis B virus의 X protein [18], Papillomavirus의 E6 protein [13, 19], human herpesvirus ORF-1 [20] 같은 oncogene과 동일하게 p53과 직접 결합하여 Tat의 발암기능이 억제되거나 p53의 항암기능이 억제된다는 연구결과도 발표되었다 [21].

이외에도 Tat의 활성과 관련된 kinase에 대한 관심이 모아지고 있는 가운데 최근 HIV-1 Tat은 Tat-associated kinase (TAK)와 연관되어 있으며 이 TAK가 RNA polymerase II의 C-terminal을 인산화시켜 Tat의 transactivation 활성을 유도한다는 연구결과가 발표되었다 [22, 23, 24].

본 연구는 항암유전자 p53이 Tat의 transactivation 기능을 억제하는 것을 확인하고 이들의 상호억제기작이 tat과 p53의 직접적인 결합에 의한 것인지를 밝히고 만일 직접적인 결합에 의한 상호억제기작이 아니라면 과연 어떠한 기작에 의해 일어나는 것인지를 밝히고자 하였다. Tat 및 p53 발현 vector와 CAT-reporter gene을 발현하는 LTR construct, 그리고 이를 발현하는 cell line들을 이용하여 연구를 진행하였으며, 본 연구를 통해 HIV-1 Tat과 p53은 Longo 등 (1995)의 주장과는 달리 두 단백질이 직접 결합하지 않으며, p53이 Tat 활성억제기작은 세포내의 signaling pathway를 거쳐 Tat을 인산화시킴으로 일어날 가능성을 제시하였다. 이러한 연구결과는 세포에 interferon을 처리하면 ds-RNA-dependent protein kinase (PKR)가 활성화되고 활성화된 PKR이 tat의 인산화를 유도하여 Tat 활성을 억제 할 가능성을 제시한 연구결과 [25]와도 부분적으로 일치한다. 이와 함께 본 연구과정에서 interferon에 의한 Tat 활성억제는 p53이 정상적으로 작용할 때만 나타나며 이 경우 PKR inhibitor를 처리하면 이러한 억제 현상이 사라지는 것으로 보아 PKR이 이러한 신호전달에 직접적으로 관여하고 있음을 알게 되었다. 전체 연구결과를 요약하면 HIV-1의 증식에 필수적인 Tat 활성은 세포내의 항암유전자인 p53 작용에 의해 억제되며 이 억제과정은 세포신호전달에 관여

하는 단백질 중 하나에 의한 Tat의 인산화를 거쳐 진행될 가능성을 제시해 준다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양과 transient transfection

Jurkat cell을 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS: GIBCO/BRL)이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. Jurkat34-tat cell은 Jurkat cell에 HIV-1 tat gene이 영구적으로 발현되도록 만든 cell line으로 NIH AIDS Research and Reagent Program에서 분양받았다. Jurkat34-tat cell은 10% FCS와 400 $\mu$ g/ml G418이 첨가된 RPMI 1640에서 배양하였으며 H3T1 cell (HIV-1 LTR-CAT plasmid가 안정하게 transfection된 Hela cell)도 10% FCS와 G418 800 $\mu$ g/ml이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO/BRL)에서 배양하였다. Jurkat cell과 HeLa cell에 pSV2-tat, pCDNA-53, 및 LTR-CAT plasmid DNA를 필요에 따라 DNA의 양을 달리하여 DEAE-dextran method로 transfection 시켰으며 Tat 활성을 조사하기 위해 LTR-CAT과 함께 transfection된 세포는 48시간 후 수확하여 CAT activity를 조사하고 그 외 transfection된 세포나 정상 세포의 lysate를 얻어 Kinase assay를 수행하였다.

### 2. 재조합 plasmids와 CAT assay

LTR-CAT plasmid와 Pp53-CAT (p53 promoter에 CAT을 reporter gene이 연결된 plasmid)는 Basic CAT vector (Progema, Madison, WI, USA)의 *HindIII*/*XbaI* site에 HIV-1 (HXBc2)의 LTR 전체 (644bp)와 p53 promoter sequence (540bp)를 PCR로 증폭하여 cloning한 다음 실험에 사용하였다. pSV2-Tat 재조합 plasmid는 Dr. J. Sodroski (Dana-Farber Cancer Institute, MA, USA)로부터 그리고 pCDNA-p53 plasmid 및 pEnhancer-CAT plasmids는 신덕용박사님 (생명공학 연구소)으로부터 각각 공급받아 실험에 사용하였다. Transfection된 세포내의 CAT 활성을 측정하기 위해 먼저 PBS로 세포를 3번 씻은 후 TEN buffer (40mM Tris-cl, pH 7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl) 1ml로 실온에서 5분 동안 방치하였다. 세포를 침전시킨 후 침전상태의 세포에 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, 150 $\mu$ l를 넣어 dry ice-ethanol bath와 37 $^{\circ}$ C waterbath를 사용하여 3회 freeze-thawing을 통해 세포를 파쇄하였다. 깨어진 세포를 60 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 가열하여 endogenous acetyl-

transferase를 불활성화 시키고 상등액을 원심분리 후, acetyl coenzyme A (5mg/ml)의 존재 하에 [ $^{14}$ C]-chloramphenicol (0.025mCi/ml)을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 incubation한 다음 thin-layer chromatography (TLC)로 분리하여 autoradiogram으로 CAT activity를 결정하였다.

### 3. 재조합단백질 발현

p53 (318aa) 및 HIV-1 tat은 cDNA를 합성하여 open reading frame부분을 PCR로 증폭하고 pRSET-C vector (Invitrogen)에 cloning하였다 (pRSET-p53, pRSET-tat). 이를 *E. coli*에서 대량 발현시켜 얻은 재조합 p53 및 Tat 단백질로 immunoprecipitation 및 kinase assay를 실시하였다. 재조합 plasmid로 형질 전환된 *E. coli* BL21 (DE3)를 ampicillin (50 $\mu$ g/ $\mu$ l)이 포함된 LB broth 20ml에 o/n 배양한 다음 배양액을 250ml에 seeding하여 O.D값이 0.4가 될 때까지 진탕배양하였다. 0.1mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여, 4시간 동안 단백질 발현을 유도한 후, 4 $^{\circ}$ C, 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리했다. 침전물에 buffer B (8M urea, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris-cl, pH 8.0) 5ml를 넣고 초음파 분쇄기로 cell을 파쇄한 후, 세포 추출물 상등액에 50% slurry Ni<sup>2+</sup>-NTA resin 500 $\mu$ l를 첨가하고, 상온에서 45분 동안 결합시켰다. Resin에 결합된 침전물을 Buffer C(8M urea, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01M Tris-cl, pH 6.3)로 3번 씻은 후, 250mM imidazole이 포함되어 있는 Buffer C 1ml로 재조합단백을 추출하였다. Urea가 많이 포함되어 있는 추출물을 100% ethanol 2 volumn으로 침전시켜, 1X PBS에 녹여 12% SDS-PAGE gel로 단백질의 순도와 양을 확인하고, 실험에 사용하였다.

또한 kinase assay를 위해 full-length tat 유전자를 pGEX-2T vector (Pharmacia Biochem. Co.)에 cloning하여 GST-Tat plasmid를 합성하고 이를 *E. coli*에서 발현시켜 재조합 Tat protein을 얻었다. 재조합 plasmid로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 위와 동일조건에서 대량배양하고 IPTG를 첨가하여 1시간 30분 동안 발현을 유도한 후 원침하여 침전물에 5mM DTT, 2mg/ml lysozyme, 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 2 $\mu$ g/ml aprotinin, and 50 $\mu$ g/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 포함된 EBC buffer (50mM Tris, pH 8.0, 120mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) 4ml를 넣고 sonication으로 cell을 파쇄하였다. 4 $^{\circ}$ C 12,000rpm에서 15분 동안 원심분리하여

세포 추출물 상등액을 얻고 상등액 50 $\mu$ l에 EBC buffer 250 $\mu$ l를 첨가하여, glutathione S-Sepharose bead로 GST에 fusion 된 Tat 단백을 분리하였다. Protein은 12% SDS-PAGE gel로 확인하였다. Kinase assay를 위해 GST-Tat fusion 단백을 thrombin으로 절단하여 실험에 사용하였다. GST-Tat86 lysate 상등액 50 $\mu$ l에 EBC buffer 250 $\mu$ l를 넣고, Glutathione S-Sepharose bead를 20 $\mu$ l첨가한 후 Rocking platform에서 30분간 진탕반응시키고, bead를 EBC-DTT-SDS buffer (50mM Tris, pH 8.0, 120mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 5mM DTT, 0.075% SDS)로 2회 씻은 후 thrombin cleavage buffer (50mM Tris-cl, pH 7.6, 20mM KCl, 1mM DTT) 20ml로 다시 한번 씻어주고 침전물에 Human thrombin (NEB, MA, USA) 2unit를 처리하여 상온에서 3시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 sample을 원심분리하여 상등액을 모아 15% SDS-PAGE로 확인하였다.

#### 4. Immunization 및 항혈청 준비

Bacteria에서 발현시킨 recombinant p53과 Tat 단백을 50 $\mu$ g/mouse 씩 Freund's Complete Adjuvant (Sigma)와 동일 volume으로 섞어 BALB/c mouse에 1차 면역하였다. 3주 후, 2차 면역을 위해 30 $\mu$ g/mouse의 항원을 Freund's Incomplete Adjuvant와 섞어 mouse 피하에 주사하였다. 다시 3주 후, 동일 조건으로 3차 면역을 진행 한 다음, 5일 후, 면역이 확인된 mouse 안구정맥에서 혈액을 채취하여 항혈청을 분리하고 실험에 사용하였다.

#### 5. Immunoprecipitation 및 Western blot assay

Tat을 지속적으로 발현하는 Jurkat-tat 세포를 (5X10<sup>6</sup>/ml) PBS로 2회 washing하고 RIPA buffer (0.1%SDS, 150mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5%DOC, 150mM Tris-Cl, pH 8.0) 1ml로 lysis시켜 Tat source로 사용하였다. 또한 동일한 과정을 거쳐 pCDNA1-p53 plasmid로 transfection 된 HepG2 cell lysate를 준비하였다. 두 cell lysate를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 이 반응용액에 항혈청 anti-tat antisera (NIH AIDS program, Rabbit- $\alpha$ -tat pAb)와 anti-p53 antisera (Mouse  $\alpha$ -p53 pAb, generated in our Lab)를 각각 3시간 동안 처리하였다. 그리고, 각각의 반응용액에 proteinA/G-agarose bead (Pharmacia) 15 $\mu$ l를 첨가하여 항체를 모두 침전시켰다. 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시킨 bead complex

는 RIPA buffer로 3회 washing 후, 25 $\mu$ l의 sample buffer를 첨가하여 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer buffer (48mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 1.3mM SDS)에 soaking 한 다음 semi-dry gel blotter (Bio-Rad)를 사용하여 nitrocellulose membrane으로 옮기고 Blotto (5% non-fat dry milk w/v, 0.02% NaN<sub>3</sub> in PBS)에서 1시간 blocking시키고, PBS-T (1X PBS, 0.1% Tween20)로 washing 후, primary Ab, anti-tat과 anti-p53 antisera를 2시간 동안 반응시켰다. Secondary antibody로는 anti-mouse-IgG-HRP와 anti-rabbit-IgG-HRP를 1/5000 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마찬가지로 PBS-T로 washing 후, vender's manual (Ameraham Life Science)에 따라 ECL 반응을 실시하여 X-ray film에 나타난 결과로 co-immunoprecipitation 여부를 확인하였다. 이와 함께 co-immunoprecipitation의 양성 대조군으로 p53와 결합하여 p53의 항암기작을 억제하는 것으로 잘 알려진 SV40 T-antigen을 사용하여 동일한 실험을 실시하였다. 이 경우 SV40 T-antigen에 대한 항체가 없어 SV40로 감염된 세포를 동위원소로 표지하여 재조합 p53과 반응시킨 다음 p53에 대한 항혈청과 proteinA-bead를 사용하여 동일한 방법으로 immunoprecipitation시킨 다음 autoradiogram으로 결합여부를 확인하였다. 이 과정을 요약하면 다음과 같다. SV40 DNA (GIBCO/BRL)를 COS-1 세포에 (5X10<sup>5</sup>/ml) transfection하여 SV40 virus를 얻고 이를 다시 COS-1 세포에 감염시킨 다음 5시간 배양 후 methionine이 결여된 DMEM배지로 바꾸어 1시간 동안 starvation 하였다. 여기에 (L-<sup>35</sup>S) Methionine (Amersham: specific activity 1,000Ci/mmmole) 80 $\mu$ Ci/ml를 첨가하여 6시간 동안 표지한 다음 rubber policeman을 사용하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포는 methionine이 결여된 DMEM으로 2회 washing 한 후 radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer: 0.1%SDS, 150mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5%DOC, 150mM Tris-Cl, pH 8.0) 1ml를 첨가하여 얼음에서 30분간 lysis 시킨 다음 원심분리 (15,000rpm, 30분)하여 상등액을 immunoprecipitation 실험에 사용하였다.

#### 6. Yeast two-hybrid experiment

두 단백질의 직접적인 결합 가능성을 조사하기 위해 pGBT9 vector (Clontech Co.)의 BamHI/PstI site에 p53 유전자 (318 aa.)를 그리고 pGAD424 vec-

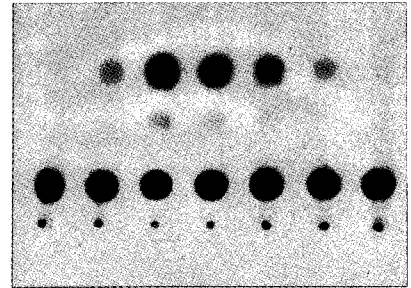
tor (Clontech Co.)의 *Bam*HI/*Pst*I site에 HIV-1 tat full length 유전자 (86 aa.)를 각각 cloning한 후 이를 yeast strain *S. cerevisiae* HF7c (Clontech Co.)에 co-transformation 시켜 영양요구배지에서 selection 하였다. pGBT9 vector는 *trp1*, pGAD424 vector는 *leu2* auxotrophic marker를 각각 가지고 있으며 yeast HF7c는 reporter gene으로 *his3*와 *LacZ*를 가지고 있으므로 만일 p53와 Tat이 서로 결합한다면 transformed yeast는 Trp-, Leu-, His- auxotrophic 배지에서도 성장하게 될 것이며 X-gal 조건에서 푸른 색깔을 띄게 될 것이다. pGBT9-p53과 pGAD-424-tat plasmid를 lithium acetate method로 transformation 하였으며 transformed cells은 yeast nitrogen base와 2% dextrose가 포함된 SD synthetic medium에서 탐색하였다. 또한 false positive가 나타날 가능성을 배제하기 위해 영양요구배지에서 positive로 나타난 colony는 모두  $\beta$ -galactose assay를 실시하여 실제 positive인지 여부를 재확인하였다.

### 7. Interferon effects on HIV-1 tat activity

Jurkat-tat cell에 5 $\mu$ g의 LTR-CAT plasmid를 transfection 한 후, interferon을 농도를 달리하여 처리하였다. 마찬가지로 LTR-CAT을 발현하는 HeLa cell (H3T1)에도 pSV2-tat을 transfection 후 interferon을 농도를 달리하여 처리하고 48시간 후 CAT activity를 조사하였다. p53가 존재하는 HepG2 cell에 LTR-CAT과 pSV2-tat을 co-transfection 한 후, interferon을 동일한 조건으로 처리하고 48시간 후 각 배양세포를 수확하여 CAT activity를 조사하였다.

### 8. Kinase assay

Jurkat34-tat cell을 Lysis buffer (50mM HEPES, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 0.5%NP-40, 1mM PMSF, 100 $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 $\mu$ g/ml Leupeptin, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 $\mu$ M Okadaic acid)에 녹여 상청액을 kinase reaction의 Tat source로 사용하였다. Kinase reaction을 위해 Tat을 specific antibody (rabbit  $\alpha$ -tat pAb)와 protein A/G sepharose를 이용하여 순수 분리하고 GST-Tat protein은 GST bead를 사용하여 순수 분리한 다음 이를 kinase buffer (200mM HEPES, pH 7.2, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml BSA)에 녹이고 여기에 1 $\mu$ M ATP, 5 $\mu$ Ci의 ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP 및 cell lysate를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 kinase reaction을 실시하였다. 이후 이를 다시 동일 ki-



pSV2-Tat 0 0.3 1.2 1.2 1.2 1.2 1.2  $\mu$ g  
pCDNA-p53 0 0 0 3 6 12 18  $\mu$ g

**Fig. 1.** Tat activity was suppressed by transfection of p53 in tat-expressing Jurkat cells (Jurkat-tat) Jurkat-tat cells were transiently transfected with 5 $\mu$ g of HIV-1 LTR-CAT reporter construct together with different amounts of an p53 expressing vector. Two days after transfection, cells were harvested and tested for their CAT activities.

nase lysis buffer로 씻어주고 2X sample buffer에 넣어 3분 동안 끓인 후, 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 X-ray film에서 감광정도로 kinase activity를 확인하였다.

## 결과 및 성적

### 1. p53 inhibits Tat activity

Tat을 지속적으로 발현하는 Jurkat-tat cell에 HIV-1 LTR-CAT 5 $\mu$ g과 여러 농도의 p53 plasmid를 co-transfection하여 transfection 이틀 후 cell을 수확하고 CAT activity를 조사하였다. 그림 1에서 보듯이 p53 농도가 점차 증가함에 따라 tat 기능이 감소함을 볼 수 있었다. 또한, LTR-CAT을 발현하는 HeLa cell (H3T1)에서 pSV2-tat과 pCDNA-p53을 농도를 달리하여 co-transfection한 다음 CAT activity를 조사 한 결과 그림 1에서와 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 2). 이 두 가지 실험결과를 통해 항암유전자 p53이 HIV-1 tat의 transactivation 기능을 억제함을 확인하였다.

2. p53-mediated tat suppression is not to be due to the direct protein-protein interaction

p53이 HIV-1 tat에 직접적으로 결합하여 tat의 기능을 억제하는 지를 조사하기 위해 p53 및 tat을 bacteria에서 발현시켜 이들을 p53에 대한 단클론항체와 tat에 대한 단클론항체로 co-immuno-

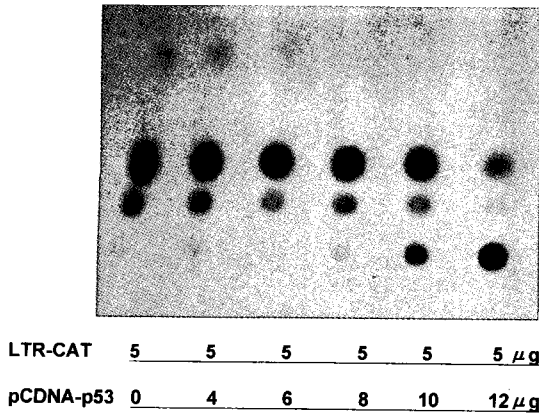


Fig. 2. p53 suppressed Tat effects on LTR-mediated CAT expression in H3T1 LTR-CAT cells (Hela cells permanently transfected with LTR-CAT gene) H3T1 LTR-CAT cells were cotransfected with different amounts of pSV2-tat and increasing amounts of pCDNA-p53 recombinant plasmids. Two days after transfection, cells were harvested and tested for their CAT activities.

precipitation 시켜 western blot 실험으로 protein-protein interaction 가능성을 조사하였다. 양성 대조군의 경우 <sup>35</sup>S-Met로 표지된 SV40 T 항원과 p53을 반응시키고 이를 p53에 대한 항체로 침전시켜 SDS-PAGE로 분리하여 autoradiogram 한 결과 그림 3A와 같이 본 연구실에서 제조한 p53 항원이 SV40의 T 항원과 잘 결합함이 관찰되었다. 그러나 실험군인 p53과 tat 단백질의 반응 후 이층 어느 한가지 항체만으로 침전시켰을 경우 co-immunoprecipitation이 일어나지 않고 해당 항체에 대한 단백질만이 western blot으로 관찰되었다 (Fig. 3B). 이 실험 결과는 p53이 tat과 직접 결합하여 작용할 가능성이 없음을 시사해 준다. 그러나 *in vitro*에서 얻은 결과만으로 두 단백질 사이에 직접적인 결합이 일어나지 않는다고 단정할 수 없어 yeast two-hybrid system을 이용하여 *in vivo* 상에서 이 두 단백질의 직접결합 가능성을 조사하였다. p53 유전자와 tat (full length) 유전자를 각각 GAL4 binding domain을 포함하는 pGBT9과 GAL4 activation domain을 포함하는 pGAD424의 BamHI/PstI site에 각각 cloning 하였다. 그리고, 이 두 recombinant plasmid (pGBT9-p53, pGAD424-tat)를 yeast HF7C strain에 Lithium acetate 방법으로 co-transformation 하고 그 transformant를 tryptophan과 leucine이 없는 SD 최소배지에서 selection 하였다. 그리고 여기서

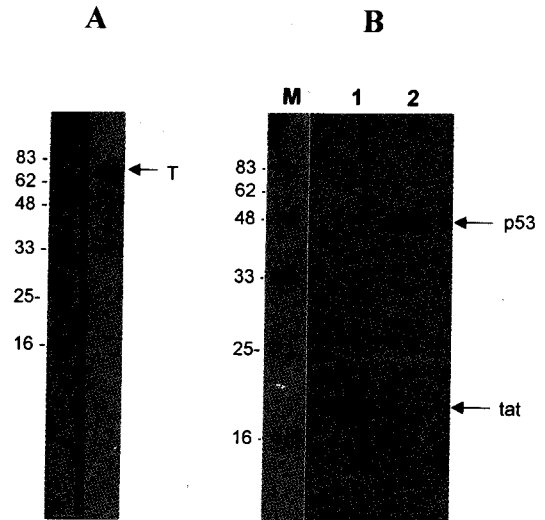
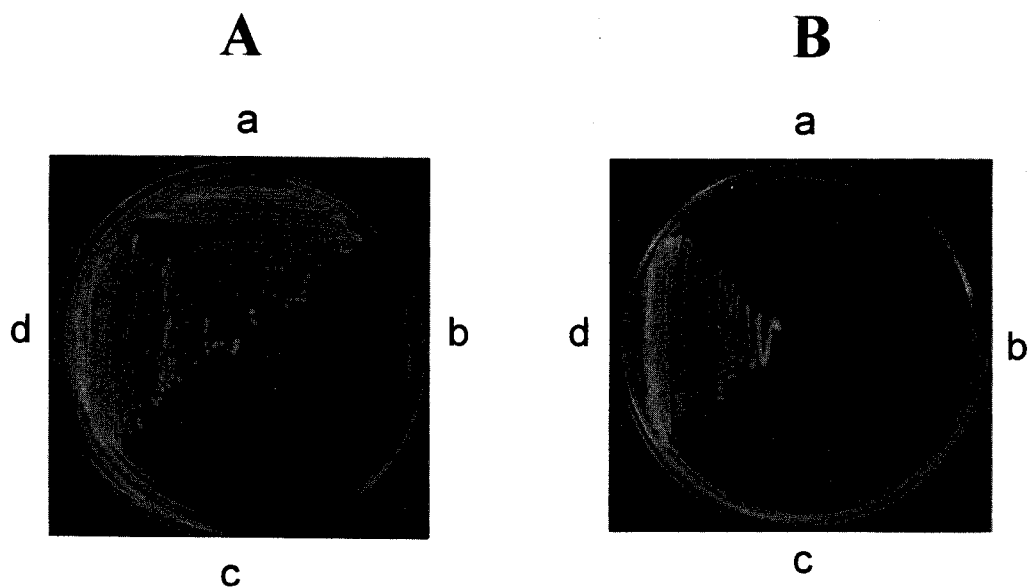


Fig. 3. Co-immunoprecipitation of HIV-1 tat and p53. (A) p53-transfected HepG2 cell lysates were mixed with <sup>35</sup>S-labeled SV40-infected COS-1 cell lysates in RIPA buffer. The mixtures were incubated with anti-p53 antisera at 4°C for 2 hrs, and then precipitated with protein A-agarose beads. Precipitants were separated on a SDS-PAGE, and then autoradiogrammed. Arrow indicates the band of large T antigen. (B) p53-transfected HepG2 cell lysates were mixed with unlabeled Jurkat-tat lysates in RIPA buffer. The mixtures were incubated with anti-tat antisera (1) and anti-p53 antisera (2) at 4°C for 2 hrs, and then precipitated with protein A-agarose beads. Precipitants were separated on a SDS-PAGE, western blotted to a nitrocellulose membrane, and then incubated with anti-tat and anti-p53 antisera. Band signal was detected by ECL reaction following the vendor's manual (Amersham Life Science). Arrows indicated the bands of p53 and tat proteins.

선택된 clone이 false positive일 가능성을 배제하기 위해 reporter gene인 his3와 LacZ의 발현여부를 위의 최소배지에서 histidine마저 제거된 auxotrophic 배지에서 배양하고 또한 두 단백질이 결합에 의해서만 발현되는 Lac Z (β-galactosidase)의 발현을 조사하였다. 두 단백질이 직접 결합할 가능성을 빠뜨리지 않기 위해 가능한 모든 조합으로 yeast two-hybrid을 실시하였으나 어떠한 조합에서도 두 단백질이 *in vivo* 상에서 결합 가능성을 찾아 볼 수 없었다 (Table 1). 그림 4에서는 양성 대조군과 실험에서 양성 가능성이 있는 two-hybrid clone을 최종 최소배지 (Trp/Leu/His auxotrophic medium)에서 확인해본 결과 역시 두 단백질이 직접 결합될 가능성이 없음을 확인하였다. 이러한 결과를 중



**Fig. 4.** HIV-1 tat does not directly interact with p53 in yeast two hybrid system. The gene encoding human p53 was cloned into a GAL4 DNA-binding domain vector, pGBT9, and HIV-1 tat gene (full-length) was cloned into a GAL4 activation-domain vector, pGAD424. Both recombinant plasmids were contrastransformed into the HF 7c yeast strain. Transformed colonies were replated on Trp/Leu-deficient SD synthetic medium (A), and Trp/Leu/His-deficient SD medium (B) to see whether protein-protein interaction occurs or not. Each section shows (a) pGBT9-p53/pGAD-tat, (b) pGBT9-p53, (c) pGAD-tat, and (d) pGBT9-p53/pGAD-Tag positive control.

**Table 1.** Yeast two-hybrid experiments with human p53 and HIV-1 tat

Recombinant Yeast Strains	Growth Capacity at each Medium <sup>1</sup>					Color Test <sup>2</sup>
	YPD	SD-W	SD-L	SD-W/L	SD-W/L/H	
HF7c	+	-	-	-	-	white
HF7c/pGBT9	+	+	-	-	-	white
HF7c/pGAD424	+	-	+	-	-	white
HF7c/pGBT9/pGAD424	+	+	+	+	-	white
HF7c/pGBT-p53II/pTD1 <sup>3</sup>	+	+	+	+	+	blue
HF7c/pGBT-p53I <sup>4</sup>	+	+	-	-	-	blue
HF7c/pGBT-p53II <sup>4</sup>	+	+	-	-	-	white
HF7c/pGBT-TatI <sup>4</sup>	+	+	-	-	-	blue
HF7c/pGBT-TatII <sup>4</sup>	+	+	-	-	-	white
HF7c/pGBT-p53II/pGAD-TatI	+	+	+	+	±	white
HF7c/pGBT-p53II/pGAD-TatII	+	+	+	+	-	white
HF7c/pGBT-TatII/pGAD-p53I	+	+	+	+	±	white
HF7c/pGBT-TatII/pGAD-p53II <sup>4</sup>	+	+	+	+	-	white

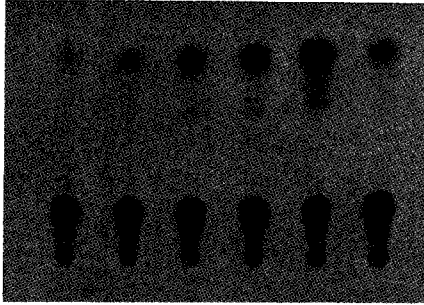
<sup>1</sup> Transformed cells were tested for their growth capacity on the autrophic SD-media without the amino acids Trp (W), Leu (L), both (W/L), or W/L/H (His)

<sup>2</sup> To rule out the possibility of false positive or false negative of the growth capacity of the transformed colonies, they were tested for their  $\beta$ -galactosidase expression which is associated with His-operon by colorreaction

<sup>3</sup> pTD1 plasmid (Clontech), which is pGBT9 expressing SV40 T-antigen, was used for positive control

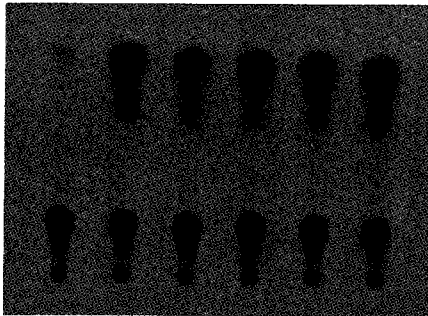
<sup>4</sup> p53I and p53II are full-length human p53 and activation domain-truncated human p53 (73-393 aa), respectively. TatI and TatII are first exon and full-length tat of HIV-1, respectively

(A)



Prp53-CAT	10	10	10	10	10	10	μg
pSV2-tat	0	1	2	4	8	0	μg
pCDNA	0	0	0	0	0	8	μg

(B)



pGJB-CAT	10	10	10	10	10	10	(μg)
pCDNA-p53	0	1	1	1	1	1	(μg)
pSV-tat	0	0	1	2	4	8	(μg)

**Fig. 5.** HIV-1 tat inhibitory function to p53 is not associated with p53 promoter. (A) Jurkat cells were co-transfected with Pp53-CAT [p53 promoter (-1 ~ -530)] followed by CAT reporter gene] and different amounts of HIV-1 tat. (B) Tat does not influence on the p53 enhancer promoter (pGJB). HepG2 cells were co-transfected with the plasmid mixtures as shown above. Two days after transfection cells were disrupted and measured for the CAT activity from each cell lysate.

합해 볼 때 p53와 tat은 직접적인 단백질 결합에 의한 상호억제작용이라기보다, 간접적인 세포 신호전달과정에 의한 억제현상임을 추측할 수 있다. β-galactosidase assay 결과를 data로 나타내지는 않았으나 양성일 가능성이 조금이라도 있는 clone들을 모두 조사한 바 모두 white color를 나타내었다.

### 3. HIV-1 Tat does not inhibit the function of p53 promoter

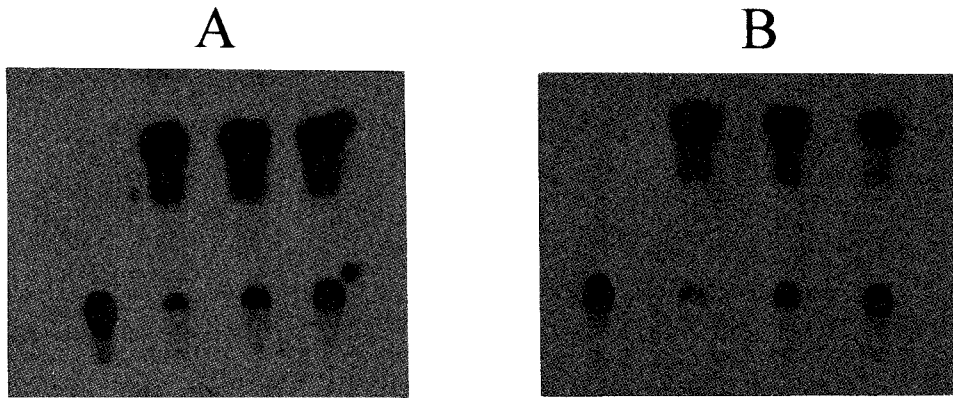
p53과 Tat 단백질간의 상호 길항작용에 대한 연

구 중에 tat이 p53의 promoter에 작용하여 p53 발현을 억제한다는 기작이 발표되었다 [26]. 이를 확인하기 위해 p53 promoter 부분을 pBasic-CAT에 cloning하여 Pp53-CAT plasmid를 만들고, p53 enhancer concatamer를 CAT reporter gene에 연결시킨 pGJB-CAT plasmid와 함께 pSV-tat의 양을 달리하며 HepG2 cell과 Jurkat cell 형질감염시킨다음 CAT activity를 조사하였다. 그 결과 p53 promoter-CAT은 pSV2-tat 양이 증가됨에 따라 Li 등 [26]의 결과와는 상반되게 오히려 promoter의 활성이 증가하였다 (Fig. 5A). 또한 p53 enhancer concatamer의 활성은 첨가한 p53에 의해 유도되나 tat에 의해서는 전혀 영향을 받지 않음을 발견하였다 (Fig. 5B). 이러한 결과는 Tat에 의한 p53의 발현 억제가 promoter와 직접적으로 관련되어 있지 않을 가능성을 잘 시사해 준다.

### 4. p53 effects on the interferon-related Tat function

Interferon은 virus 감염에 대한 숙주세포의 방어 물질로 잘 알려져 있으며 HIV-1도 다른 virus와 같이 interferon 처리시 증식력이 현저히 떨어지는 것이 이미 밝혀져 있다 [27, 28, 29]. 그러나 interferon의 HIV-1 증식 억제기작이 기존의 억제 기작과는 다를 것으로 간주되어 연구가 진행되던 중 최근 Brand 등 [25]이 밝힌 바에 따르면 HIV-1에 감염된 세포에 interferon 처리시 세포내 ds-RNA-dependent protein kinase (PKR)가 autophosphorylation되면서 HIV-1 tat protein을 phosphorylation시켜 tat의 dysfunction을 초래할 가능성을 보고하였다. 이러한 사실에 기초하여 본 연구실에서는 이러한 interferon의 tat dysfunction 작용이 p53에 의해 영향을 받는지 여부를 알아보고자 p53이 발현되지 않는 세포와 p53이 발현되는 세포에서 interferon의 tat 활성에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 활성이 없는 p53을 발현하는 Jurkat-tat cell과 전혀 p53을 발현하지 못하는 H3T1 세포에 LTR-CAT plasmid와 pSV2-tat을 각각 transfection 후 interferon을 농도를 달리하여 처리하였으나 interferon의 농도가 높을 때만 (1000unit/ml) tat 활성이 약하게 억제되는 것을 관찰하였다 (Fig. 6). 그러나 그림 7에서와 같이 p53을 발현하는 HepG2 cell에서는 interferon의 농도가 증가함에 따라 tat 활성이 현저히 억제되는 것을 발견하였다. 이는 아마도 interferon에 의한 HIV-1 증식 억제효과가 p53와

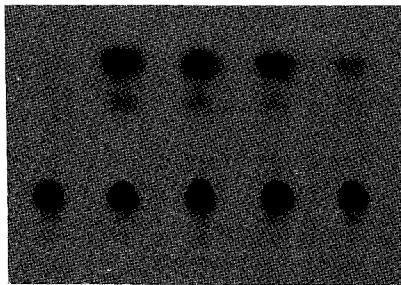




LTR-CAT	0	5	5	5 ug
IFN (units)	0	10	100	1000

pSV-tat	0	1	1	1 ug
IFN	0	10	100	1000 units

Fig. 6. Interferon effects on HIV-1 tat activity. Jurkat-tat cells (A) and H3T1 cells (B) were transfected with LTR-CAT or pSV-tat plasmid, respectively, and then treated with different amounts of interferon as shown above. CAT activities were measured 2 days after trasfection. Interferon effect was not so much dramatic as reported previously.



LTR-CAT	5	5	5	5	5 (ug)
pSV-tat	0	1	1	1	1 (ug)
r-IFN	0	0	10	100	1000 (units)

Fig. 7. Interferon effects on HIV-1 tat in the presence of p53. HepG2 cells were co-transfected with LTR-CAT and tat-expressing plasmids and then treated with different amounts of interferon. Two days after transfection, CAT activity was measured from each culture.

연계되어 있음을 시사해 주는 간접적인 증거라고 생각된다. 이러한 일련의 실험결과들은 p53에 의한 tat 기능 억제가 cell signaling pathway와 연관되어 있을 가능성을 강하게 시사해 준다. 즉 p53에 의한 tat 활성 억제는 일련의 인산화 과정에 의해 진행된다고 추측되며 이는 interferon에 의한 PKR activation과 이로 인한 tat 인산화와 무관하지 않을 것으로 보인다.

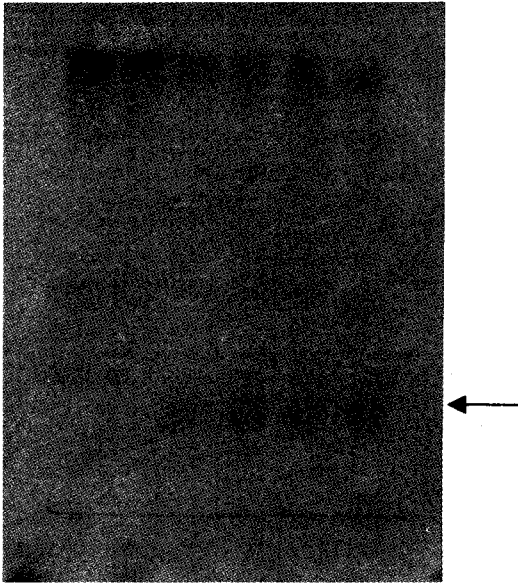
#### 5. p53 is likely to inactivate tat by phosphorylation

Jurkat cell에 p53을 농도를 달리하여 transfection하고 세포 추출물을 얻어 kinase reaction에 사용하였다. Jurkat-tat cell lysate를 tat source로 이용 Jurkat cell lysate와 섞어, kinase buffer에서 30℃에서 30분 동안 반응시켰다. Kinase reaction이 끝난 다음 rabbit α-tat antibody (NIH AIDS Research and Reagents program)로 2시간 동안 반응시키고 여기에 protein A/G sepharose (Pharmacia Biochem. Co.)를 첨가하여 4℃에서 2시간 동안 결합시킨 다음 lysis buffer로 2회 washing 후 Ag-Ab-bead 복합체를 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 X-ray film에 감광하였다. 그 결과 transfection 시킨 p53 농도의 증가에 따라 tat phosphorylation이 증가되는 현상을 볼 수 있었다 (Fig 8). 이러한 실험 결과와 상기 계속적인 실험결과를 종합하여 볼 때 p53에 의한 tat 활성억제는 p53이 cellular kinase를 activation시키고, 이렇게 활성화된 kinase가 tat을 phosphorylation시켜 tat의 활성을 억제시키는 것으로 생각된다.

#### 고 찰

HIV-1이 AIDS를 유발하는 과정 중에 Tat 단백

1 2 3 4 5 6



**Fig. 8.** HIV-1 tat is phosphorylated by p53-transfected cell lysates. Jurkat cells were transfected with different amounts of p53 expressing plasmids. Two days after transfection, cell lysates were incubated with tat-expressing Jurkat cell lysates at 30°C for 30min in the presence of 5 $\mu$ Ci of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. The reaction mixture was immunoprecipitated with prescreened rabbit anti-tat polyclonal antibodies (Intracel Co.) and protein A-Sepharose bead (Pharmacia Biochem. Co.) at 4°C for 3hrs. Sample-bound Sepharose beads were washed 3 times with RIPA buffer, applied to SDS-PAGE, and then autoradiographed. Each lane shows radioimmunoprecipitin bands from each reaction of Jurkat-tat lysates with 0 $\mu$ g (1), 2.5 $\mu$ g (2), 5 $\mu$ g (3), 7.5 $\mu$ g (4), 10 $\mu$ g (5), 12.5 $\mu$ g (6) of p53-transfected Jurkat cell lysates. Arrow indicates the <sup>32</sup>p-labeled tat protein bands in SDS-PAGE.

이 담당하고 있는 역할에 관해서는 현재까지 많은 논문이 발표되었다 [30, 31] (Fig. 1). 이중 많은 수의 논문들이 Tat 단백질이 AIDS 환자의 오랜 잠복기 동안 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell의 감소에 직접적으로 연관이 되어 있다는 것이다 [32, 33]. 잠복기 동안 HIV-1은 DC에 의해 lymph node로 들어가는 것으로 알려져 있다. 그후 감염된 DC이 주변의 resting T cell을 활성화시키고 이들의 감염을 유도하여 전체적으로 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cell의 숫자를 점차 감소시키는데 [32], 이때 T cell 감소의 주원인이 HIV-1의 직접적인 감염에 의한 direct killing 보다는 감염된

세포나 감염된 세포에서 발현되는 HIV-1 Tat의 분비로 인한 주위세포의 apoptosis 때문이라는 연구 결과가 계속 보고되고 있다 [11, 13, 34, 35, 36, 37]. 이중 외부로 분비되는 Tat과 세포내에 발현되는 Tat의 기능이 전혀 상반되어 분비되는 가용성 Tat은 비활성상태 T cell의 apoptosis를 유도하고 [5, 11, 13, 38] 감염된 세포내에서 작용하는 세포내의 Tat은 감염된 세포의 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다 [11, 35, 36].

그러나 정상세포에 HIV-1 감염시 초기 상태에는 이러한 apoptosis 현상이 관찰되지 않는다. 이는 아마도 감염초기 상태에서는 tat의 발현도 미약할 뿐 아니라 발현된 tat도 활성이 세포내의 방어기작에 의해 억제 되기 때문으로 생각되어진다. 이러한 세포내의 억제인자로 제시되는 것이 항암유전자로 apoptosis 유도에 중요하게 관계하는 p53일 것으로 예상되어 현재까지 몇 가지 연구 결과가 발표되었다 [10, 15, 21, 26, 39]. 그러나 이러한 연구결과들은 모두 p53이 tat의 기능을 억제한다는 사실만을 시사하던가 아니면 다른 유전자의 발현을 유도하여 tat의 기능에 영향을 미치는 것으로 발표되고 있어 아직 정확한 억제기작은 알려지지 않은 상태이다. 이러한 가운데 Brand 등 [25]이 최근 interferon에 의해 활성화된 PKR이 tat을 인산화시켜 tat의 기능을 불활성화한다는 연구결과를 발표하면서 tat의 활성억제가 세포 신호전달과 관련되어 있음을 시사하였다. 본 연구실에는 이러한 결과를 기초로 p53에 의한 tat 활성억제가 이와 유사한 과정을 거쳐 진행되는지를 조사하고자 하였다.

연구결과 그림 1과 2에서 보듯이 Tat의 활성이 p53의 발현에 의해 현저히 억제됨을 확인하였으며 이러한 억제 현상이 p53과 Tat 단백질의 직접적인 결합에 의한 것이 아님을 protein-protein-interaction (Fig. 3)과 yeast two-hybrid 실험을 통해 확인하였다 (Fig. 4, Table 1). 또한 p53 promoter study 실험 결과 Tat과 p53의 상호억제기작은 Tat이 p53의 promoter에 작용하여 p53의 발현을 억제한다는 기존의 보고 [26]와는 달리 Tat에 의해 p53의 활성이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 그러나 이러한 결과는 Li 등 [26]이 p53의 upstream 2400bp를 promoter로 사용한테 비해 본 실험실에서는 Tuck 등 [37]이 발표한 p53의 upstream 530bp를 promoter로 사용하였기 때문에 Tat 증가시 p53 promoter 활성이 Li 등 [26]의 결과와 다르게 나타났

을 가능성을 배제할 수 없다. 한편 interferon을 처리하면 HIV-1 증식이 현저히 억제된다는 것은 주지의 사실이다 [27, 28, 29]. 그러나 interferon이 어떻게 HIV-1의 증식을 억제하는지는 분명히 밝혀져 있지 않은 가운데 최근 Brand 등 [25]에 의해 interferon에 의해 활성화된 PKR이 Tat을 인산화시켜 tat의 활성을 억제함으로써 HIV-1 증식이 억제 될 가능성이 제시되었다. 이 결과를 기초로 p53을 발현하는 세포와 발현하지 않는 세포에 interferon을 처리하여 Tat의 활성을 조사한 결과 그림 6, 7에서 처럼 p53이 발현되는 세포에서만 Tat의 활성이 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 이는 interferon의 tat 활성 억제기전에 p53이 직접 혹은 간접적으로 작용하고 있음을 시사해 준다. 이러한 여러 연구 결과를 종합하여 볼 때 p53의 tat 활성억제는 세포의 신호전달과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있으며 이를 확인하기 위해 Jurkat-tat extract와 p53의 양을 늘려가며 transfection한 Jurkat cell extract를 사용하여 Tat 단백질의 인산화 여부를 확인해 보았다. 이 실험에서 그 Tat 단백질이 p53의 농도가 증가함에 따라 phosphorylation 되는 정도가 강해지고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 8). 따라서 이전에는 CAT assay를 통해 간접적으로 확인되던 p53에 의한 Tat 기능의 억제가 실제로 kinase들에 의해 Tat 단백질이 인산화됨으로써 일어날 가능성을 한층더 뒷받침 하여주고 있다.

현재까지 발표된 논문들을 보면 Tat은 TAR sequence에 binding함으로써 구조변화가 일어나 activation domain이 노출되어 인산화가 가능하게 되고 기능을 갖게되는 것으로 알려져 있다 [40, 41]. 그러나 본 실험은 LTR이 없는 상태에서 실시된 실험이기 때문에 그림 8의 결과가 실험상의 오차일 가능성을 완전히 배제하기는 어려운 실정이다. 만일 p53이 Tat의 기능을 억제하기 위해 인산화를 시키는 부위가 위에서 말한 것처럼 TAR RNA가 binding한 후 구조변화가 일어나 노출되는 부분이 아니라고 하면 위의 실험에서 인산화된 부분은 Tat의 구조변화와 무관하다고 할 수 있다. 그러나 p53에 의해 인산화되는 부분이 Tat의 구조변화 후의 사건이라면 CAT assay로 나타난 연구결과는 LTR (LTR-CAT)이 존재하는 상태에서 일어난 반응이므로 타당성이 있으나, kinase assays는 TAR sequence가 존재하지 않는 상태에서 일어난 반응이므로 앞으로 이에 대한 여러 가지 검증실험을 필요로 한다.

현재 GST-tat86을 *E. coli*에서 발현시켜 Jurkat cell lysate와 HepG2 cell lysate와 함께 kinase assay를 실시 중이다. 현재까지의 실험결과에 의하면 tat 단백질은 cell lysate에 따라 인산화정도가 달라지므로 어떤 cell lysate가 인산화와 관련되는지를 조사 중이며 이 경우 p53발현과의 관계를 분석하고자 한다. 또한 LTR 없이도 언제나 active site가 노출되어 있는 Tat 48 amino acid protein을 사용하여 동일한 실험을 실시하여 위의 결과에서 예상되는 false positive 가능성을 제거하고자 한다. 또한 LTR (LTR-CAT)이나 ds-RNA가 존재하는 상태에서 동일한 실험을 실시하여 과연 Tat의 인산화에 어떤 signaling factor가 관여하는지를 밝히고 나아가 여러 종류의 kinase inhibitor를 사용하여 관련 가능한 기작들을 알아보려 한다. 또한 인산화 가능성이 있는 부분에 돌연변이를 유도하여 이를 확인하는 실험도 함께 진행하고 있다.

## 결 론

인체면역결핍 바이러스(HIV-1)의 subgenome 중 tat은 transactivator로 HIV-1 증식에 필수적인 유전자이다. 그러나 동일한 HIV-1에 감염되어도 숙주 세포에 따라 바이러스 증식 양상이 다르게 나타나는데 이는 숙주세포의 단백질이 HIV-1 증식에 직 혹은 간접적으로 관여하고 있음을 시사해 준다. 이러한 숙주세포의 단백질 중 항암유전자 p53이 본 연구를 통해 p53에 의한 Tat 활성의 억제가 기존의 연구발표와는 달리 직접적인 단백질의 상호 결합에 의한 것이 아님을 밝혔으며 또한 Tat 단백질에 의한 p53의 발현 억제도 기존의 연구발표와는 달리 Tat이 직접 p53 promoter를 억제하여 나타나는 현상이 아님을 보였다. 한편 p53을 발현하는 세포와 발현하지 않는 세포에 interferon을 처리하여 Tat의 활성을 조사한 결과 p53이 발현되는 세포에서만 Tat의 활성이 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 이는 interferon의 tat 활성 억제기전에 p53이 직접 혹은 간접적으로 작용하고 있음을 시사해 준다. 이러한 여러 연구 결과를 종합하여 볼 때 p53의 tat 활성억제는 세포의 신호전달과 밀접한 관계가 있을 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위해 Jurkat-tat extract와 p53의 양을 늘려가며 transfection한 Jurkat cell extract를 사용하여 Tat protein의 인산화 여부를 in vitro에서

확인해 본 결과 p53의 농도가 증가함에 따라 Tat의 인산화 정도가 강해지는 것으로 보아 CAT assay를 통해 간접적으로 확인되던 p53에 의한 Tat기능의 억제가 실제로 세포신호전달과정에 작용하는 protein kinase에 의해 Tat이 인산화됨으로서 transactivation 활성을 잃어 나타나는 현상임을 강하게 시사해 준다.

사사

본 연구는 1996년 교육부 학술연구조성비 (유전공학 GE 96-254)와 과학재단의 연세대 BRC과제지원에 의하여 수행되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Cullen BR: Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell* 73: 417-20, 1993.
- Sodroski J, Rosen C, Wong-Staal F, Salahuddin SZ, Popovic M, Arya S, Gallo RC, Haseltine WA: Trans-acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science* 227: 171-3, 1985.
- Ensoli B, Barillari G, Salahuddin SZ, Gallo RC, Wong-Staal F: Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345: 84-6, 1990.
- Frankel AD, Pabo CO: Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55: 1189-93, 1988.
- Corallini A, Altavilla G, Pozzi L, Bignozzi F, Negrini M, Rimessi P, Gualandi F, Barbanti-Brodano G: Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res* 53: 5569-75, 1993.
- Vellutini C, Philippon V, Gambarelli D, Horschowski N, Nave KA, Navarro JM, Auphan M, Courcoul MA, Filippi P: The maedi-visna virus Tat protein induces multiorgan lymphoid hyperplasia in transgenic mice. *J Virol* 68: 4955-62, 1994.
- Vogel J, Hinrichs SH, Reynolds RK, Luciw PA, Jay G: The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* 335: 606-11, 1988.
- Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang HK, Brady JN, Gallo RC: Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 371: 674-80, 1994.
- Cottrez F, Manca F, Dalgleish AG, Arenzana-Seisdedos F, Capron A, Groux H: Priming of human CD4<sup>+</sup> antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest* 99: 257-66, 1997.
- Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB: Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268: 429-31, 1995.
- McCloskey TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, Paul MO, Pahwa S, Verdin E, Chirmule N: Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 158: 1014-9, 1997.
- New DR, Ma M, Epstein LG, Nath A, Gelbard HA: Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces death by apoptosis in primary human neuron cultures. *J Neurovirol* 3: 168-73, 1997.
- Sastry KJ, Marin MC, Nehete PN, McConnell K, el-Naggar AK, McDonnell TJ: Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* 13: 487-93, 1996.
- Zauli G, Gibellini D, Celeghini C, Mischiati C, Bassini A, La Placa M, Capitani S: Pleiotropic effects of immobilized versus soluble recombinant HIV-1 Tat protein on CD3-mediated activation, induction of apoptosis, and HIV-1 long terminal repeat transactivation in purified CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 157: 2216-24, 1996.
- Duan L, Ozaki I, Oakes JW, Taylor JP, Khalili K, Pomerantz RJ: The tumor suppressor protein p53 strongly alters human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 68: 4302-13, 1994.
- Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ: Ade-

- novirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28: 387-94, 1982.
17. Linzer DI, Levine AJ: Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52, 1979.
  18. Wang XW, Forrester K, Yeh H, Feitelson MA, Gu JR, Harris CC: Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2230-4, 1994.
  19. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-36, 1990.
  20. Kashanchi F, Araujo J, Doniger J, Muralidhar S, Hoch R, Khleif S, Mendelson E, Thompson J, Azumi N, Brady JN, Luppi M, Torelli G, Rosenthal LJ: Human herpesvirus 6 (HHV-6) ORF-1 transactivating gene exhibits malignant transforming activity and its protein binds to p53. *Oncogene* 14: 359-67, 1997.
  21. Longo F, Marchetti MA, Castagnoli L, Battaglia PA, Gigliani F: A novel approach to protein-protein interaction: complex formation between the p53 tumor suppressor and the HIV Tat proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 326-34, 1995.
  22. Herrmann CH, Rice AP: Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* 197: 601-8, 1993.
  23. Herrmann CH, Rice AP: Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxyl-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II: candidate for a Tat cofactor. *J Virol* 69: 1612-20, 1995.
  24. Yang X, Herrmann CH, Rice AP: The human immunodeficiency virus tat proteins specifically associate with TAK *in vivo* and require the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II for function. *J Virol* 70: 4576-84, 1996.
  25. Brand SR, Kobayashi R, Mathews MB: The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 272: 8388-95, 1997.
  26. Li CJ, Wang C, Friedman DJ, Pardee AB: Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5461-4, 1995.
  27. Agy MB, Acker RL, Sherbert CH, Katze MG: Interferon treatment inhibits virus replication in HIV-1- and SIV-infected CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T-cell lines by distinct mechanisms: evidence for decreased stability and aberrant processing of HIV-1 proteins. *Virology* 214: 379-86, 1995.
  28. Shirazi Y, Pitha PM: Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol* 66: 1321-8, 1992.
  29. Shirazi Y, Popik W, Pitha PM: Modulation of interferon-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat. *J Interferon Res* 14: 259-63, 1994.
  30. Bardos TJ, Schinazi RF, Ling KH, Heider AR: Structure-activity relationships and mode of action of 5-mercapto-substituted oligo- and polynucleotides as antitemplates inhibiting replication of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 108-14, 1992.
  31. Marshall WL, Diamond DC, Kowalski MM, Finberg RW: High level of surface CD4 prevents stable human immunodeficiency virus infection of T-cell transfectants. *J Virol* 66: 5492-9, 1992.
  32. McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A: Infection frequency of dendritic cells and CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* 69: 4737-45, 1995.
  33. Ruediger R, Brewis N, Ohst K, Walter G: Increasing the ratio of PP2A core enzyme to holoenzyme inhibits Tat-stimulated HIV-1 tran-

- scription and virus production. *Virology* 238: 432-43, 1997.
34. Ehret A, Westendorp MO, Herr I, Debatin KM, Heeney JL, Frank R, Krammer PH: Resistance of chimpanzee T cells to human immunodeficiency virus type 1. Tat-enhanced oxidative stress and apoptosis. *J Virol* 70: 6502-7, 1996.
  35. Gibellini D, Caputo A, Celeghini C, Bassini A, La Placa M, Capitani S, Zauli G: Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. *Br J Haematol* 89: 24-33, 1995.
  36. Patki AH, Lederman MM: HIV-1 Tat protein and its inhibitor Ro 24-7429 inhibit lymphocyte proliferation and induce apoptosis in peripheral blood mononuclear cells from healthy donors. *Cell Immunol* 169: 40-6, 1996.
  37. Tuck SP and Crawford L: Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol* 9: 2163-1136, 1989.
  38. Zauli G, Gibellini D, Caputo A, Bassini A, Negrini M, Monne M, Mazzoni M, Capitani S: The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 86: 3823-34, 1995.
  39. Garza HH Jr, Carr DJ: Interactions of human immunodeficiency virus type 1 transactivator of transcription protein with signal transduction pathways. *Adv Neuroimmunol* 5: 321-5, 1995.
  40. Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD: Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev* 5: 201-10, 1991.
  41. Kamine J, Subramanian T and Chinnadurai G: Sp1-dependent activation of a synthetic promoter by HIV type1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8510-8514, 1991.
-