

p53에 의한 HIV-1 Tat 활성억제와 ds-RNA-dependent Protein Kinase (PKR) 관련 가능성 연구

한남대학교 미생물학과
김정환 · 변희선 · 배용수*

=Abstract=

p53-mediated HIV-1 Tat Suppression is Likely to be Associated with double-stranded RNA-dependent Protein Kinase, PKR

Jung-Whan Kim, Hee-Sun Byune 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 p53 anti-oncogene. However, the detail mechanism has not yet been clearly revealed. In our previous report, we have addressed that p53 is unlikely to interact directly with HIV-1 Tat. In the consecutive experiments, Tat-phosphorylation was found to increase in proportional to the amounts of transfected p53. This work was initiated to identify the signaling factor that is involved in the p53-mediated Tat suppression. Several protein kinases were tested for the phosphorylation of Tat, and we found that PKR is likely to be involved in the p53-mediated Tat suppression. PKR was co-immunoprecipitated by anti-Tat antibody in the Tat-expressing Jurkat cell lysates only when the cells were transfected by p53, indicating that PKR-Tat interaction depends on the p53 activity. The interaction seems to result in PKR-mediated Tat-phosphorylation. Tat function was not blocked by p53 when co-transfected transiently with antisense-PKR. We have generated PKR-knock out Jurkat cell clone. The PKR-defective Jurkat cells didn't show the p53-mediated Tat suppression. These data indicate that p53-mediated Tat suppression is strongly associated with PKR. PKR-mediated Tat phosphorylation experiments are now under investigation by kinase assay and co-immunoprecipitation in the presence or absence of p53.

Key Words: HIV-1 Tat, p53, PKR, Phosphorylation

서 론

인체 면역결핍 virus (HIV-1)의 Tat 단백질은 강력한 transactivator으로써 HIV-1 증식에 필수적인 단백질

절이다 [7,33]. HIV-1이 감염된 세포에서 Tat이 발현되면 핵 속으로 이동하여 HIV-1 provirus의 전사에 중요하게 관여할 뿐 아니라 세포의 전사활성 및 신호전달에도 큰 영향을 미쳐 AIDS 환자 말기에 주로 발생하는 Kaposi's 육종 등 감염된 면역체

접수 : 1999년 10월 23일, 논문게재확정 : 1999년 12월 22일

*책임저자: 배용수, 대전시 대덕구 오정동 133, 한남대학교 미생물학과 Tel: (042) 629-7528, Fax: (042) 633-6608, E-mail: ysbae@eve.hannam.ac.kr

포의 형질전환을 초래하거나 [3,10,11,35], 세포 밖으로 분비되면 주위 CD4⁺ T세포의 apoptosis를 유발하여 [4,12,18,31] 면역결핍을 초래하는 것으로 알려졌다. 그러나 이러한 Tat의 강력한 전사기전에도 불구하고 HIV-1 감염자들 대부분이 1차 viremia 후 초기단계에는 virus 증식이 매우 미약한 latent infection 현상을 보이며 상기한 바와 같은 암 발생이나 강력한 apoptosis 현상들도 나타나지 않는다.

이러한 가운데 Duan 등 [8]에 의해 항암유전자인 p53이 HIV-1의 증식을 억제한다는 사실이 밝혀지면서 HIV-1 감염 초기단계의 latency에 대한 실마리가 풀리기 시작하였다. 그러나 p53에 의한 HIV-1 증식억제 기작에 대해서는 아직도 분명하게 밝혀지지 않은채 다음과 같은 두 가지 주장들이 엇갈리고 있다. p53이 HIV-1 LTR의 Sp1 site나 TATA box에 직접 결합하여 전사억제를 일으킬 가능성을 제시한 보고가 있는가 하면 [8] p53이 HIV-1 Tat의 활성을 막아 HIV-1 증식을 억제한다는 연구결과도 제시되었다 [19]. 전자의 경우 p53-binding site를 가지고 있지 않은 promoter도 p53에 의해 발현이 억제된다는 연구결과로 [38] 일단 가능성이 보류되고 있으며, 후자의 경우도 가능성은 높으나 세부적인 기작에 대해서는 아직 거의 밝혀지지 않은 실정이다. Longo 등 [21]이 HIV-1 Tat도 기존의 Adenovirus E1B [30]나 SV40 T-antigen [20], Hepatitis B virus의 X protein [36], Papillomavirus의 E6 protein [32], human herpesvirus ORF-1 [17] 같은 oncogene과 동일하게 p53과 직접 결합하여 Tat의 활성이 억제되거나 p53의 항암기능이 억제된다는 연구결과를 발표하였으나 Byune 등 [2]의 yeast-two hybrid 실험과 co-immunoprecipitation 실험에 따르면 p53과 HIV-1 Tat은 어떤 경우에도 직접 결합하지 않는 것으로 나타났다. 또한 Byune 등 [2]의 연구결과에 따르면 p53에 의한 Tat 활성의 억제는 p53에 의해 활성화되는 일련의 인산화 과정을 통해 일어날 가능성이 있는 것으로 나타났다.

본 연구는 p53에 의한 Tat 활성억제가 세포내 인산화 과정과 관련이 있을 가능성에 근거하여 p53에 의해 활성이 유도되어 Tat을 인산화 하는 인산화 효소를 찾고 이의 기작을 확인하고자 진행되었다. 실험결과 p53에 의한 Tat 활성억제에 double-stranded RNA-dependent protein kinase인 PKR이 관여할 가능성을 밝혔으며 transfection, co-

immunoprecipitation 실험 및 PKR-knock out cell을 만들고 이를 이용한 실험 등을 통해 PKR이 작용하지 않을 경우 p53에 의한 억제현상이 나타나지 않는 것을 확인함으로써 PKR이 p53-mediated tat suppression에 직접적으로 작용한다는 사실을 밝혔다.

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 µg/ml G418 (GIBCO/BRL)이 첨가된 RPMI 1640에서 배양하였으며, H3T1 cell (HIV-1 LTR-CAT plasmid로 형질전환된 HeLa cell)도 10% FCS와 G418 600 µg/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 형질감염 (transfection) 시켰으며 Tat 활성을 조사하기 위해 LTR-CAT과 함께 transfection된 세포는 48시간 후 수확하여 CAT activity를 조사하였다.

2. 재조합 plasmids와 CAT assay

LTR-CAT 및 pCAT-Basic/CMV plasmid (CMV promoter에 CAT gene이 연결된 plasmid)는 Basic CAT vector (Progema, Madison, WI, USA)의 Hind III/Xba I site에 HIV-1 (HXBc2)의 LTR 전체 (644 bp)를 PCR로 증폭한 것과 pSLX vector로부터 얻은 CMV promoter (650 bp)를 subcloning하여 제작하였다. pSV2-Tat 재조합 plasmid는 Dr. J. Sodroski (Dana-Farber Cancer Institute, MA, USA)로부터 그리고 pCDNA-p53 plasmid는 신득용 박사님 (생명공학연구소)으로부터 각각 공급받아 실험에 사용하였다. SV40 promoter를 가지는 pCAT-control plasmid는 상품화된 것을 이용하였다 (Promega, Madison, WI, USA). 형질감염된 세포의 CAT 활성을 측정하기 위해 먼저 PBS로 세포를 3차례 씻은 후 TEN buffer (40 mM Tris-cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) 1 ml로 실온에서 5분 동안 방치하

였다. 세포를 침전시킨 후 침전상태의 세포에 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0 150 μ l를 넣어 dry ice-ethanol bath와 37°C water bath를 사용하여 3회 freeze-thawing을 통해 세포를 파쇄하였다. 깨어진 세포를 60°C에서 10분 동안 가열하여 endogenous acetyltransferase를 불활성화 시키고 상등액을 원심분리 후, acetyl coenzyme A (5 mg/ml)의 존재 하에 [¹⁴C]-chloramphenicol (0.025 mCi/ml)을 넣고 37°C에서 방치한 다음 thin-layer chromatography (TLC)로 분리하여 autoradiogram으로 CAT 활성을 결정하였다.

3. Antisense PKR plasmid construction

Antisense PKR construct를 제작하기 위하여 다음과 같은 primer를 사용하였다. PKR-*Xho* I/s (620-601) 5'-GTT GGA TCC CCA ATA CTA TAT TCT TTC TG-3', PKR-*Bam*H I/as (181-200) 5'-GTT CTC GAG GAA GAA ATG GCT GGT GAT CT-3' (Bio-ner). Jurkat cell에서 total RNA를 분리하고 PKR antisense primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 440 bp의 PCR product를 정제하여 *Bam*H I, *Xho* I 제한효소로 처리한 후 pSLX vector (서민호 박사님 제공; 계명대학교 의과대학 미생물학교실)의 동일한 제한효소 site에 antisense orientation으로 cloning 하였다.

4. Selection of PKR-knock-out Jurkat cell line

Antisense PKR cDNA가 cloning된 pSLX/anti-PKR plasmid 5 μ g을 DEAE-dextran methods (Pharmacia Biochem. Co.)로 Jurkat cell에 형질감염 시키고 10% FCS가 든 RPMI 배지에서 48시간 배양한 다 배지에 G418 (GIBCO/BRL)을 800 μ g/ml이 되도록 첨가해주고 매 3일마다 동일한 첨가물이 든 새 배지로 갈아주면서 10~15일 동안 관찰하였다. Neomycin marker가 없는 control Jurkat이 약 80~90% 가량 사멸되었다고 판정되었을 때 형질감염된 cell을 96-well plate에서 single cell이 되도록 희석하고 배지에 G418의 농도를 400 μ g/ml로 낮추어 계속 배양하였다. single cell로 분주된 각 clone들이 충분히 자랐을 때 대량으로 증폭하여 genomic DNA를 추출하고, antisense PKR primer와 pCMV primer (5'-GGG CGG TAG GCG TGT ACG GT-3')를 사용하여 PCR을 수행하였으며 CMV promoter의 3'에서부터 antisense PKR의 3'을 포함하는 약 560 bp의 PCR product로 형질감염 여부를 확인하였다. anti-sense PKR이 형질감염된 cell에서 PKR의 발현

여부를 western blot 실험으로 조사하였으며, selection된 Jurkat/antisense-PKR clone을 p53 형질감염 실험에 사용하였다.

5. Immunoprecipitation 및 Western blot assay

Tat을 지속적으로 발현하는 Jurkat-34tat 세포를 (5 X 10⁶/ml) PBS로 2회 washing 하고 RIPA buffer (0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% DOC, 150 mM Tris-Cl, pH 8.0) 1 ml로 lysis 시켜 Tat source로 사용하였다. 또한 동일한 방법으로 pCDNA 1-p53 plasmid로 형질감염된 Jurkat cell lysate를 준비하였다. 두 cell lysate를 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 이 반응용액에 항혈청 rabbit anti-PKR antisera (Santa Cruz)와 rabbit anti-Tat antisera (Intracell Co)을 각각 3시간 동안 처리하였다. 그리고, 각각의 반응용액에 proteinA/G-agarose bead (Pharmacia) 15 μ l를 첨가하여 항체를 모두 침전시켰다. 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 bead complex는 RIPA buffer로 3회 washing 후, 25 μ l의 sample buffer를 첨가하여 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 transfer buffer (48 mM Tris-HCl, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 1.3 mM 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% NaN₃ in PBS)에서 1시간 blocking 시키고, PBS-T (1X PBS, 0.1% Tween 20)로 washing 후, primary Ab, anti-PKR과 anti-Tat antisera를 2시간 동안 반응시켰다. Secondary antibody로는 anti-rabbit-IgG-HRP를 1/5000 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마찬가지로 PBS-T로 washing 후, vender's manual (Amersham Life Science)에 따라 ECL 반응을 실시하여 X-ray film에 나타난 결과로 co-immunoprecipitation 여부를 확인하였다.

결 과

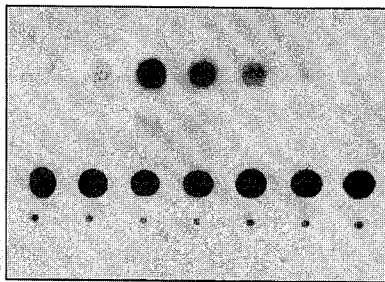
1. p53 inhibits Tat activity

Jurkat cell에 HIV-1 LTR-CAT 5 μ g과 pSV2-Tat plasmid 1.2 μ g 및 여러 농도의 p53 plasmid를 DEAE-dextran 방법으로 동시 형질감염 (co-transfection) 하고 형질감염 이틀 후 cell을 수확하여 CAT 활성을 조사하였다. Figure 1에서 보듯이 p53 농도가 점차 증가함에 따라 Tat 활성이 감소함을 CAT activity의 감소를 통해 확인할 수 있었다 (Fi-

Figure 1).

2. p53-mediated Tat suppression is specific to HIV-1 LTR promoter

Figure 1의 p53에 의한 Tat 활성억제가 p53의 세포주기 억제기작 때문에 나타나는 일반적인 promoter 억제현상인지 알아보기 위해 SV40 promoter (Figure 2A)와 CMV promoter (Figure 2B)에 CAT reporter gene을 부착한 plasmid를 LTR-CAT plas-



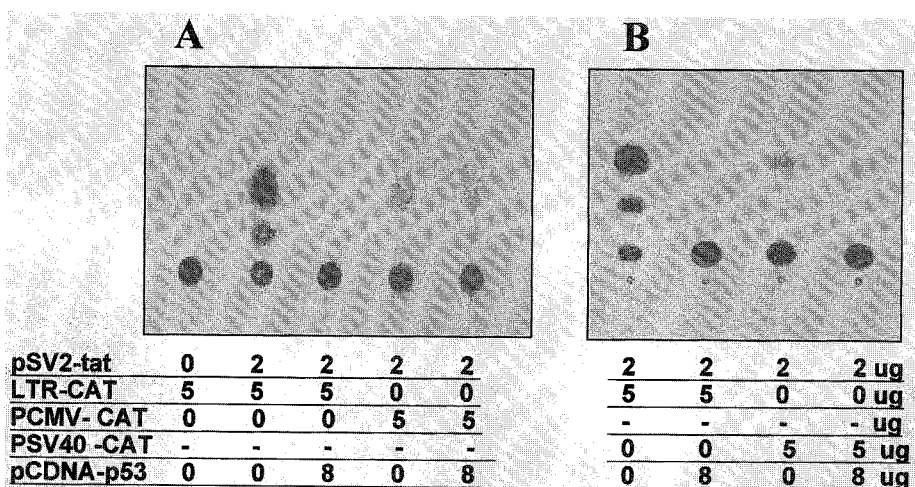
LTR-CAT	5	5	5	5	5	5	5	μg
pSV2-Tat	0	0.3	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	μg
pCDNA-p53	0	0	0	2	4	6	8	μg

Figure 1. p53 suppresses HIV-1 Tat/LTR-mediated transcription in Jurkat cells. Jurkat cells were co-transfected with different amounts of LTR-CAT, pSV2-tat and increasing amounts of pCDNA-p53 recombinant plasmids. Two days after transfection, cells were harvested and tested for the CAT activities expressed in cytoplasm.

mid 대신 형질감염에 사용하여 p53 plasmid의 농도를 달리하면서 나타나는 CAT 활성을 조사한 바 이들 promoter는 형질감염시 사용된 p53 plasmid의 농도 변화와는 상관없이 CAT 활성이 일정하게 유지되었다 (Figure 2). 이는 p53에 의한 Tat의 활성억제가 HIV-1 LTR promoter에 특이적이라는 사실을 말해주는 실험결과이다.

3. p53-mediated inhibitory effect on Tat activity was completely blocked by PKR inhibitor

Byune 등 [2]의 실험결과 p53에 의한 Tat 활성억제에 일련의 인산화 과정이 관여할 가능성이 제시됨에 따라 여러 종류의 인산화 효소들에 특이하게 작용하는 인산화 효소억제제를 처리하면서 p53에 의한 Tat 활성억제 정도를 조사하였다. 본 실험을 위해 protein kinase PKR, PTK, PKC, 및 PKA/PKC inhibitor인 2-aminopurin, Genestein, H-7, Tyrphostin-25을 각각 사용하였으며 이들을 사용하여 p53에 의한 Tat 활성을 조사한 바 Figure 3과 같이 나타났다. Genestein, H-7, Tyrphostin의 경우 p53에 의한 활성억제 현상이 더욱 강하게 나타난 반면, 2-aminopurine을 처리한 경우 p53에 의한 Tat 활성억제 현상이 완전하게 사라짐을 확인하였다 (Figure 3). 이 결과는 p53에 의한 Tat 활성억제에 PKR이 관여할 가능성을 간접적으로 시사해 준다.



pSV2-tat	0	2	2	2	2
LTR-CAT	5	5	5	0	0
PCMV-CAT	0	0	0	5	5
PSV40-CAT	-	-	-	-	-
pCDNA-p53	0	0	8	0	8

	2	2	2	2	μg
	5	5	0	0	μg
	-	-	-	-	μg
	0	0	5	5	μg
	0	8	0	8	μg

Figure 2. p53 effects on general promoters together with HIV-1 LTR. CMV (A) and SV40 (B) promoters conjugated to CAT reporter gene were transfected into Jurkat cells together with HIV-1 LTR and other recombinant plasmid mixtures as shown above. Cells were harvested 2 days after transfection, and tested for the CAT activity from each cell lysate.

4. p53-mediated Tat suppression was blocked by transfection of antisense-PKR

p53에 의한 Tat 활성억제에 PKR이 관여하고 있다는 직접적인 증거를 얻기 위해 antisense-PKR을 p53와 함께 형질감염 시키면서 Tat 활성을 조사하였다. 형질감염시 p53 plasmid의 양을 8 µg으로 일정하게 유지하면서 antisense-PKR의 양을 0부터 10 µg까지 일정 비율로 증가시킬 경우 2 µg부터 Tat의 활성이 점차 되살아남을 발견하였으며 (Fi-

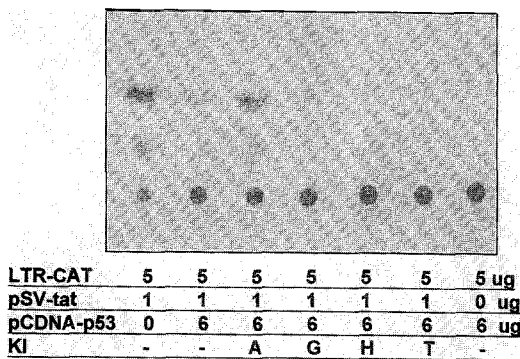


Figure 3. p53 inhibitory effects on HIV-1 Tat in the presence of several protein kinase inhibitors. Jurkat cells were co-transfected with the plasmids mixtures as shown above, and then cultured additional 24 hrs in the presence of indicated protein kinase inhibitors, A (2-aminopurine, 5 mM), G (Genestein, 5 µM), H (H-7, 5 µM), T (Tyrphostin, 50 µM). Each cells were tested for the intracellular CAT activity from each cell lysate.

gure 4A), antisense-PKR의 양을 8 µg으로 일정하게 유지하면서 p53 plasmid의 양을 0에서 12 µg까지 증가시킬 경우 Tat의 활성이 4 µg부터 점차 감소하다가 12 µg에서는 거의 사라짐을 확인하였다 (Figure 4B). 이러한 결과는 PKR이 p53에 의한 Tat 활성억제에 직간접적으로 중요하게 관여하고 있음을 시사한다.

5. p53 effects on Tat in the PKR-knock out Jurkat cells

Antisense-PKR을 이용한 일시적 형질감염 (transient transfectin)으로 PKR이 p53에 의한 Tat 활성억제에 관여한다는 사실을 확인하였으나 이러한 일련의 연구결과들이 여러 plasmid들을 동시에 형질감염 시키면서 나타나는 일시적인 비특이 작용 때문일 가능성을 배제하기 위해 PKR을 knock-out 시킨 Jurkat cell을 생산하였다. Figure 5A와 같은 방법으로 유전자 조작한 pSLX/anti-PKR plasmid를 Jurkat cell에 형질감염하여 Neomycin에 저항성을 가진 Jurkat cell을 selection 하고 이들 cell에서 antisense-PKR sequence가 존재함을 확인하였으며 (Figure 5B), selection 한 cell에서 PKR 단백질의 발현이 억제됨을 확인하였다 (Figure 5C). 이러한 PKR 유전자 발현이 knock-out된 Jurkat cell에 p53와 Tat 발현 plasmid를 형질감염 시키면서 p53에 의한 Tat 활성을 조사한 바 정상적인 Jurkat cell에서 나타나던 p53에 의한 Tat 활성억제가 전혀 나타나지 않음을 확인하였다 (Figure 6). 이는 PKR이 p53에 의한 Tat 활성억제에 핵심적으로 관여하고 있

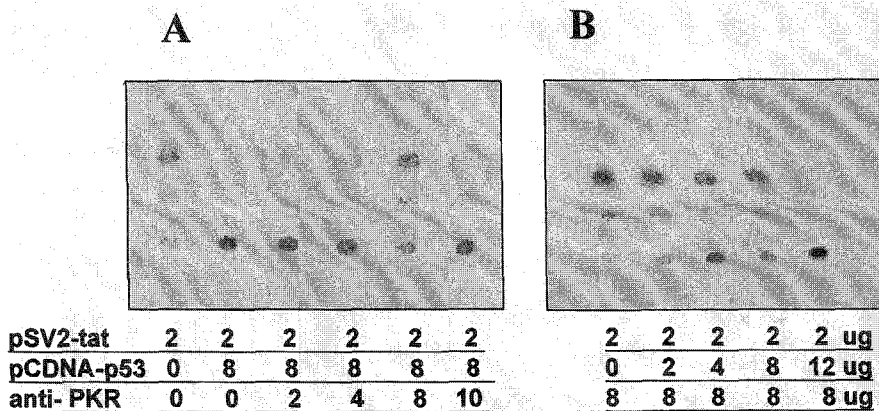


Figure 4. p53-mediated Tat suppression is blocked by antisense PKR. H3T1 HeLa cells were co-transfected with the plasmid mixtures as shown above. Cells, harvested 2 days later, were tested for the intracellular CAT activity from each cell lysate.

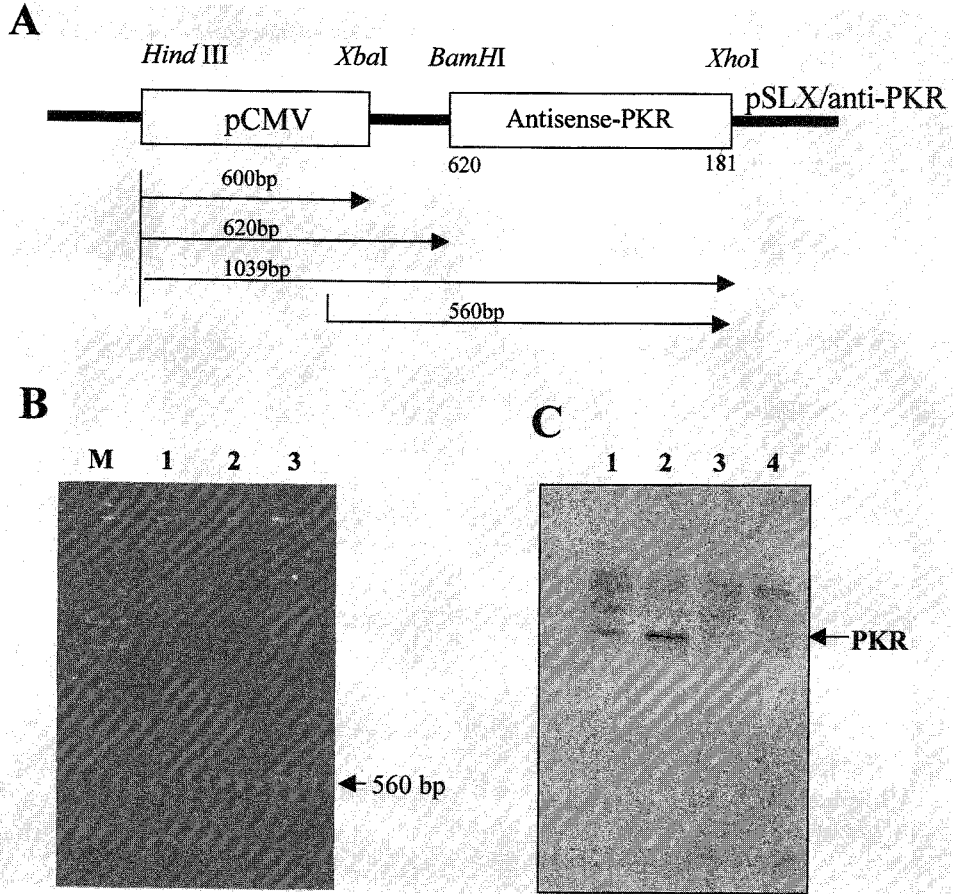


Figure 5. Preparation of PKR-knocked out Jurkat cells by transfection of antisense-PKR permanently. pSLX/anti-PKR, antisense-PKR cDNA-containing plasmid, was schematically illustrated (A). Jurkat cells were transfected permanently with the recombinant plasmid. The cells survived in 800 μ g/ml of geneticin (G418) were selected and the genomic DNA extracted from the cells was analyzed by PCR with primers covering the 3'-end of the CMV promoter and *Xho* I sites, respectively (B) and tested for the PKR expression with antiserum in Western blot experiment (C). Panel B shows PCR fragments amplified from the genomic DNA of JK cell (1), JK/anti-PKR (2), and pSLX/anti-PKR plasmid. Panel C shows PKR expression in Jurkat cells (1), Jurkat cells treated with interferon (2), PKR-knock out Jurkat cells (3), and PKR-knock out JK cells treated with interferon.

음을 다시 한번 확인시켜주는 실험결과라 하겠다.

6. Direct interaction between PKR and Tat

p53에 의한 Tat 활성억제가 PKR과 Tat의 직접적인 결합에 의해 나타나는 것인지 여부를 확인하기 위해 Jurkat34-tat lysate와 p53을 형질감염시킨 Jurkat cell lysate를 섞어 rabbit anti-PKR polyclonal antibody로 co-immunoprecipitation 시키고 이를 SDS-PAGE와 Tat 및 PKR에 대한 항체를 사용한 Western blot 실험을 실시하였다. Figure 7A와 7B에서 보듯이 PKR에 대한 항혈청으로 Jurkat cell lysate에서 PKR을 효과적으로 immunoprecipitation

할 수 있었으며 Tat에 대한 항혈청으로 co-immunoprecipitation 한 것을 Tat과 PKR에 대한 항혈청으로 동시에 Western blot 한 결과 68 kDa과 14 kDa에서 각각 band가 나타나는 것으로 보아 Tat과 PKR이 직접 interaction 하고 있음을 알 수 있다.

한편 이러한 Tat-PKR interaction이 p53와 관련이 있는지 여부를 알아보기 위해 Jurkat-34tat cell에 형질감염 시키는 p53 plasmid의 양을 달리하면서 Tat에 대한 항혈청으로 co-immunoprecipitation을 실시하여 Tat과 interaction 하는 PKR의 양을 조사하였다. 그 결과 p53의 양의 증가에 비례하여 co-immunoprecipitation 되는 PKR의 양이 증가함을

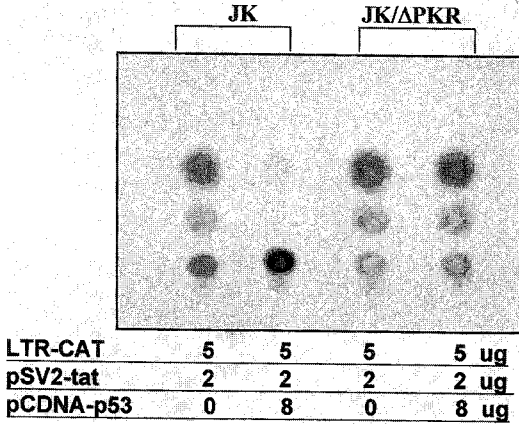


Figure 6. P53 effects on the Tat activity in the PKR-knock out Jurkat cells. JK and PKR-knock out JK cells were transfected with the plasmid mixtures shown above. Cells were harvested 2 days after transfection, and tested for the CAT activity from each cell lysate.

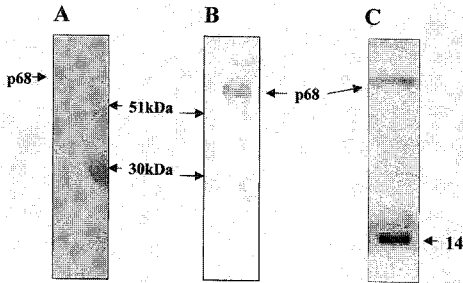


Figure 7. Immunoprecipitation and co-immunoprecipitation of PKR expressed in Jurkat-34tat. p53-transfected JK cell extracts (A) or p53-transfected JK cell extracts/Jurkat-34tat extract mixtures (B and C) were incubated with rabbit anti-PKR antisera (Santa Cruz) and then immunoprecipitated with protein A/G-sepharose (Pharmacia Biochem. Co.) at 4°C overnight. Bead-bound samples were washed twice with RIPA buffer, separated on a SDS-PAGE (A), western transferred, and then screened with rabbit-anti-PKR antibody (B) or ECL-western blot screened with mouse anti-Tat/anti-PKR mAb mixture. Arrows indicate 68 kDa of PKR bands and 14 kDa of Tat72 on the PAGE and western blot.

관찰하였다 (Figure 8). 이는 Tat과 직접 반응하는 PKR이 p53에 의해 영향을 받는다는 사실을 말하며, 이러한 결과들을 종합하여 볼 때 p53가 PKR을 활성화시키고 활성화된 PKR이 Tat과 결합하여 Tat을 인산화 시키고 최종적으로 Tat의 활성을 억제하는 것으로 추측된다.

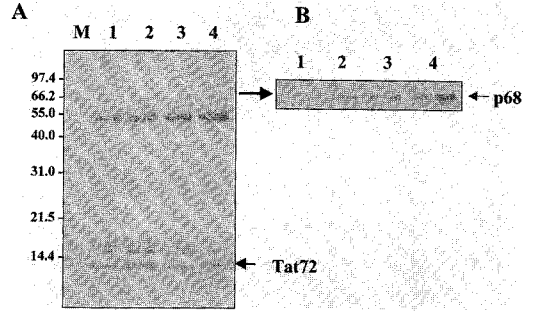


Figure 8. Co-immunoprecipitation of PKR with anti-Tat antibody when the cells were transfected with a different amounts of p53. Jurkat-34tat cells were transfected with p53 plasmid by increasing the amounts, 0 μg (1), 4 μg (2), 8 μg (3) and 12 μg (4). Two days after transfection, cell lysates were immunoprecipitated with rabbit anti-Tat antibody (Intracell Co.) and protein A-sepharose (Pharmacia Biochem Co.). Precipitants were separated on SDS-PAGE (A) and then screened by ECL-western blot hybridization with anti-PKR antibody (Santa Cruz) (B).

고 찰

HIV-1이 감염되어 AIDS로 진전되기까지 HIV-1의 활성전사인자인 Tat 단백질이 핵심적으로 작용한다는 사실에 대해서는 현재까지 수많은 논문들이 발표되었다. 이 중 많은 수의 논문들이 Tat protein이 AIDS 환자의 오랜 잠복기 동안 CD4⁺ T cell의 감소에 직접적으로 관여한다고 발표하였다 [24, 29]. 잠복기 동안 HIV-1은 dendritic cell (DC)에 의해 lymph node로 들어가는 것으로 알려져 있으며 [26] 그 후 감염된 DC이 주변의 resting T cell을 활성화시키고 이들의 감염을 유도하여 전체적으로 CD4⁺ T cell의 숫자를 점차 감소시키는데 [24], 이때 T cell 감소의 주원인이 HIV-1의 직접적인 감염에 의한 direct killing 보다는 감염된 세포나 감염된 세포에서 발현되는 HIV-1 Tat의 분비로 인한 주위 세포의 apoptosis 때문이라는 연구결과가 계속 보고되고 있다 [9,14,23,27,31,34,39]. 이 중 외부로 분비되는 Tat과 intracellular 상태에서의 Tat 기능이 전혀 상반되어 soluble한 extracellular Tat은 native T cell의 apoptosis를 유도하고 [3,23,31,39] 감염된 세포내에서 작용하는 intracellular Tat은 감염된 세포의 apoptosis를 억제하는 것으로 알려져 있다 [14, 23,27].

그러나 정상세포에 HIV-1 감염시 초기상태에

는 이러한 apoptosis 현상이 관찰되지 않는다. 이는 아마도 감염 초기상태에서는 Tat의 발현도 미약할 뿐 아니라 발현된 Tat도 활성이 세포내의 방어기작에 의해 억제받기 때문으로 생각되어진다. 이러한 세포내의 억제인자로 제시되는 것이 항암 유전자로 apoptosis 유도에 중요하게 관계하는 p53 일 것으로 예상되어 현재까지 겨우 몇 편의 연구결과가 발표되었다 [8,13,18,19,21]. 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 [1]이 최근 interferon에 의해 활성화되는 PKR이 Tat과 결합하여 Tat을 인산화 시킨다는 연구결과를 발표하면서 Tat의 활성억제가 세포 신호전달과 관련되어 있음을 시사하였다. 또한 본 연구실의 결과도 p53에 의한 Tat 활성억제가 Tat의 인산화와 관련이 있을 가능성을 보여주고 있어 [2] 이와 관련된 기작을 밝히고자 본 연구를 진행하였다.

연구결과 Figure 1과 같이 p53이 HIV-1 Tat에 의해 진행되는 LTR promoter의 활성을 억제한다는 사실이 다시 한번 확인되었다. 그리고 이러한 억제현상이 p53의 세포주기 조절과 관련된 promoter의 활성을 억제하는 일반적인 기작인지 여부를 알아보기 위해 SV40 promoter와 CMV promoter에 각각 CAT reporter 유전자를 붙여 상기와 동일 조건으로 형질감염 시키고 CAT 활성을 조사하였다. 그 결과 p53이 SV40 promoter나 CMV promoter에는 전혀 억제현상을 보이지 않음을 발견하였으며 (Figure 2) 이는 p53에 의한 LTR promoter 억제현상이 LTR promoter 전사에만 특이적으로 나타난다는 사실을 시사해 준다. 이러한 p53의 LTR promoter 억제기전이 p53과 LTR의 직접적인 결합에 의한 것보다는 세포 신호전달과정의 인산화에 의한 Tat 활성과 관련이 있을 가능성이 보여짐에 따라 [2] 신호전달에 관여하는 protein kinase의 활성을 억제하는 여러 가지 inhibitor들을 처리하면서 LTR 전사에 미치는 p53의 영향을 조사해 보았다. Jurkat cell에 p53, Tat, LTR-CAT plasmid를 일정량 동시 형질감염 시키고 여기에 PKA, PKC, PTK 및 PKR inhibitor를 각각 처리하여 전사에 의한 CAT 활성을 조사한 결과 PKA, PKC, PTK에 대한 inhibitor를 처리할 경우는 전사억제현상이 p53만을 처리한 것보다 더욱 강하게 나타남을 확인

하였다. 이는 아마도 p53에 의한 영향이라기보다 Tat이 전사활성을 가지기 위해 필요한 초기 인산화 과정이 억제되기 때문인 것으로 해석된다. 반면 2-aminopurine 처리시 p53에 의한 억제현상이 완전히 사라진 점으로 보아 (Figure 3) PKR이 p53에 의한 Tat 활성억제에 정보전달 매체로 관여할 가능성을 추측할 수 있게 되었다. PKR의 관련 가능성을 다시 한번 확인하기 위해 antisense PKR plasmid를 사용하여 PKR 발현을 일시적으로 억제시키면서 p53에 의한 Tat의 전사억제를 조사한 바 역시 억제현상이 나타나지 않음을 확인하였다 (Figure 4). 또한 이러한 억제현상이 사라지는 것이 일시적인 형질감염시 나타나는 비특이 반응일 가능성을 배제하기 위해 PKR을 knock out 시킨 Jurkat cell을 생산하고 (Figure 5) 동일한 실험을 실시한 바 Tat의 전사활성이 p53에 의해서 억제되지 않음을 다시 한번 확인하였다 (Figure 6). 이러한 연구결과들은 p53에 의한 HIV-1의 LTR promoter의 활성억제가 p53의 DNA-binding domain이 LTR의 Sp-1이나 TATA box에 결합하여 Tat에 의한 전사활성을 억제하기 때문이라는 기존의 보고 [8]와는 상반되는 것으로, 만일 이들의 결과가 사실이라면 PKR을 knock out 시킨 Jurkat cell에서도 p53에 의한 전사억제현상을 보여야 할 것이다. 본 실험결과에 따르면 p53에 의한 HIV-1 전사억제는 p53의 직접적인 LTR-binding 때문이라기보다는 p53와 double-strand RNA source로 작용하는 LTR에 의해 PKR이 활성화되고 이것이 Tat의 또 다른 부위에 인산화를 초래하여 Tat의 전사활성을 억제하기 때문인 것으로 추정된다. 이미 PKR이 Tat과 직접 결합하여 인산화 시킨다는 보고가 발표되었으며 [1,25] 본 연구결과에서도 PKR이 Tat과 직접 결합하는 것을 확인하였다 (Figure 7). 뿐만 아니라 Tat과 결합하는 PKR의 양이 p53의 증가에 비례하는 것으로 보아 (Figure 8) p53에 의해 Tat과 결합할 수 있는 활성화된 PKR의 양이 증가되는 것으로 생각된다. Tat이 PKR과 결합하여 인산화 될 경우 Tat 전사활성에 크게 영향을 미칠 것으로 기대하고 있다. 그러나 아직 Tat의 인산화가 전사활성에 미치는 영향에 대해서는 발표된 바가 없다. 그러나 최근 Africa에서 분리된 여러 종의 HIV-1를 분석한 바 독성이 높은 종일수록 PKR에 의해 인산화 되지 않는 Tat을 가지고 있으며 PKR에 의해 인산화 되는 Tat을 가진 clone의 경우 독성이 약하거나 독성이 없는 것으로 나타

났다 [28]. 이는 본 연구결과와 일치하는 것으로 HIV-1 감염초기 p53의 발현이 증가되고 이와 연계되어 PKR의 합성이 증가되며 전사가 시작될 경우 LTR에 의해 활성화된 PKR이 Tat을 인산화시켜 Tat의 전사활성을 억제하기 때문에 HIV-1 증식이 억제되어 나타나는 현상으로 사료된다.

현재까지 interferon과 관련하여 PKR이 Tat의 활성억제에 관여할 가능성을 제시한 논문들이 수편 발표되었으며 [1,15,22,25,28], p53와 PKR의 상호작용에 대해서는 HIV-1과는 전혀 별개의 관점에서 이제까지 총 3편의 논문이 발표되었을 뿐이다 [5,6,37]. 그와 함께 이제까지 p53에 의한 Tat의 활성억제에 PKR이 관여한다는 사실에 대해서는 어떠한 논문도 발표된 적이 없다. 본 연구를 통해 처음으로 항암유전자인 p53가 HIV-1의 증식을 억제하는 기작에 PKR이 핵심적으로 관여한다는 사실을 밝혔으며 이는 HIV-1 감염초기에 나타나는 latency 현상이 바로 정상세포의 p53가 PKR을 활성화시켜 provirus 발현초기에 합성되는 Tat을 인산화 시킴으로써 Tat 활성을 제거하기 때문일 가능성을 시사해 준다. Tat은 phosphoprotein이며 활성을 갖기 위해서는 N-terminal의 인산화가 필수적이다 [16]. 반면 현재까지의 실험결과로 미루어보면 C-terminal쪽이 PKR에 의해 인산화 되면 Tat의 전사활성이 사라질 것으로 기대된다. 이를 밝히기 위해 앞으로 본 연구실에서는 Tat sequence 중 PKR에 의해 인산화 가능 부위를 다른 아미노산으로 치환한 돌연변이 Tat을 만들고 이러한 돌연변이 Tat이 p53에 의한 전사활성억제에 영향을 받는지 여부를 조사하여 최종적으로 PKR의 관련 여부를 확인하고자 한다.

결 론

인체 면역결핍 바이러스 (HIV-1)의 감염 초기단계에 나타나는 latency는 숙주세포에서 발현되는 여러 단백질이 HIV-1 증식에 다각적으로 영향을 미치기 때문일 것으로 추측되며 이중 항암유전자인 p53가 중요하게 작용할 것으로 기대되고 있다. 이와 관련하여 최근 p53가 HIV-1의 핵심 전사활성인자인 Tat의 활성을 억제한다는 사실이 발표되었다. 그러나 p53에 의한 Tat의 전사활성 억제 기작에 대해서는 전혀 밝혀진 바가 없다. 본 연구실에서는 p53 처리시 Tat의 인산화가 증가된다는 실험결과와 α -interferon 처리시 HIV-1 증식이

억제되며 이때 활성화되는 PKR이 Tat을 인산화시킨다는 보고를 바탕으로 p53에 의한 Tat의 전사활성억제가 세포 신호전달과정과 연관이 있을 것으로 판단하여 여러 protein kinase inhibitor를 사용하여 p53에 의한 Tat의 전사활성을 조사하였으며 그 결과 p53에 의한 Tat 활성억제에 PKR이 관여할 가능성을 밝혔다. antisense PKR 및 PKR knock out cell에서의 transfection 실험을 통해 PKR이 p53에 의한 Tat 활성억제에 핵심적으로 관여하고 있음을 확인하였으며 immunoprecipitation 및 co-immunoprecipitation 실험을 통해 PKR이 Tat과 직접 결합하며 transfection한 p53의 양에 비례하여 Tat과 결합하는 PKR의 양이 증가함도 확인하였다. 이러한 연구결과를 종합하여 보면 궁극적으로 HIV-1 감염시 유도되는 p53에 의해 PKR의 합성이 증가되고 증가된 PKR이 전사초기 ds-RNA source인 LTR에 의해 활성화되어 Tat과 결합하여 Tat을 인산화 시킴으로써 Tat의 전사활성을 억제하는 것으로 분석된다. 앞으로 Tat의 돌연변이 실험을 통해 PKR이 p53에 의한 Tat의 전사활성에 관여함을 최종적으로 증명하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (유전공학 GE 97-279) 지원에 의하여 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) 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**: 8388-8395, 1997.
- 2) Byune HS, Lee SG, Bae YS: p53-mediated inhibitory mechanism on HIV-1 Tat is likely to be associated with Tat-phosphorylation. *J Kor Soc Virol* **28**: 39-52, 1998.
- 3) 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**: 5569-5575, 1993.
- 4) Cottrez F, Manca F, Dalglish AG, Arenzana-Seisdedos F, Capron A, Groux H: Priming of human CD4+ antigen-specific T cells to undergo

- apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest* **99**: 257-266, 1997.
- 5) **Cuddihy AR, Li S, Tam NW, Wong AH, Taya Y, Abraham N, Bell JC, Koromilas AE**: Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* **19**: 2475-2484, 1999.
 - 6) **Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, Li S, Koromilas AE**: The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene* **18**: 2690-2702, 1999.
 - 7) **Cullen BR**: Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell* **73**: 417-420, 1993.
 - 8) **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**: 4302-4313, 1994.
 - 9) **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**: 6502-6507, 1996.
 - 10) **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**: 84-86, 1990.
 - 11) **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**: 674-680, 1994.
 - 12) **Frankel AD, Pabo CO**: Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**: 1189-1193, 1988.
 - 13) **Garza HH Jr, Carr DJ**: Interactions of human immunodeficiency virus type 1 transactivator of transcription protein with signal transduction pathways. *Adv Neuroimmunol* **5**: 321-325, 1995.
 - 14) **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.
 - 15) **Gunnery S, Mathews MB**: RNA binding and modulation of PKR activity. *Methods* **15**: 189-198, 1998.
 - 16) **Herrmann CH, Rice AP**: Specific interaction of the human immunodeficiency virus Tat proteins with a cellular protein kinase. *Virology* **197**: 601-608, 1993.
 - 17) **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**: 359-367, 1997.
 - 18) **Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Metelev V, Pardee AB**: Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**: 429-431, 1995.
 - 19) **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**: 5461-5464, 1995.
 - 20) **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.
 - 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**: 326-334, 1995.
 - 22) **Maitra RK, McMillan NA, Desai S, McSwigen J, Hovanessian AG, Sen G, Williams BR, Silverman RH**: HIV-1 TAR RNA has an intrinsic ability to activate interferon-inducible enzymes. *Virology* **204**: 823-827, 1994.
 - 23) **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**: 1014-1019, 1997.
- 24) **McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A:** Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J Virol* **69**: 4737-4745, 1995.
- 25) **McMillan NA, Chun RF, Siderovski DP, Galabru J, Toone WM, Samuel CE, Mak TW, Hovanessian AG, Jeang KT, Williams BR:** HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* **213**: 413-424, 1995.
- 26) **Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS:** HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**: 355-358, 1993.
- 27) **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**: 40-46, 1996.
- 28) **Peloponese JM Jr, Collette Y, Gregoire C, Bailly C, Campese D, Meurs EF, Olive D, Loret EP:** Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents. *J Biol Chem* **274**: 11473-11478, 1999.
- 29) **Ruediger R, Brewis N, Ohst K, Walter G:** Increasing the ratio of PP2A core enzyme to holoenzyme inhibits Tat-stimulated HIV-1 transcription and virus production. *Virology* **238**: 432-443, 1997.
- 30) **Sarnow P, Ho YS, Williams J, Levine AJ:** Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**: 387-394, 1982.
- 31) **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**: 487-493, 1996.
- 32) **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**: 1129-1136, 1990.
- 33) **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**: 171-173, 1985.
- 34) **Tuck SP, Crawford L:** Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol* **9**: 2163-2166, 1989.
- 35) **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**: 606-611, 1988.
- 36) **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**: 2230-2234, 1994.
- 37) **Yeung MC, Lau AS:** Tumor suppressor p53 as a component of the tumor necrosis factor-induced, protein kinase PKR-mediated apoptotic pathway in human promonocytic U937 cells. *J Biol Chem* **273**: 25198-25202, 1998.
- 38) **Zambetti GP, Levine AJ:** A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* **7(10)**: 855-865, 1993.
- 39) **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**: 3823-3834, 1995.