

체외 배양된 SNU-1 세포주에서 transglutaminase C antisense inhibition이 일으키는 세포핵질 변화

장재현 · 이석근* · 박영욱

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강병리학교실*

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2003;29:86-94)

NUCLEAR MATRIX CHANGES BY THE ANTISENSE INHIBITION OF TRANSGLUTAMINASE C IN *IN VITRO* CULTURE OF SNU-1 CELLS

Jae-Hyun Jang, Suk-Keun Lee*, Young-Wook Park

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Pathology,
College of Dentistry, Kangnung National University*

It has been known that transglutaminase C (TGase C, TGase II) is directly participated in the DNA organization of chromosome, and affects the cellular processes such as proliferation, differentiation, and apoptosis of cells, but still not known what mechanism is working on. In this study, the cytogenetic and the immunohistochemical methods were used to observe the TGase C expression in the nuclear chromosome of the proliferating cells, especially in mitotic stage. The human gastric adenocarcinoma (SNU-1) cell line was used for immunohistochemistry and antisense inhibition study *in vitro*. The present study was also aimed to disclose the efficiency of antisense inhibition by using antisense oligonucleotide DNA labeled with fluorescence, and found that anti-TGase C probe was diffusely infiltrated into the cytoplasm and the nucleus of the cell. By the antisense inhibition the nuclei of SNU-1 cells became rough nuclear shape, as they were greatly reduced in TGase C immunoreactivity both for the normal and apoptotic SNU-1 cells. However, it is clearly presumed that the TGase C directly interacts with the chromosome of SNU-1 cells and it may play an important role in the division and organization of the chromosome during the mitotic stage.

Key words : Transglutaminase C, Antisense inhibition

I. 서 론

Transglutaminase C (TGase C, tissue transglutaminase)는 주로 세포질 내에서 발현되는 효소로 알려져 있으며, ε-(γ-glutamyl)lysine 가교결합 (cross-links)의 형성과 diamine과 polyamines 그리고 histamine의 공유결합 과정에서의 Ca²⁺-의존성 반응을 촉매하는 효소로서 세포내, 외에 존재하는 것으로 알려져 있다. 많은 경우에서 이러한 공유 가교결합은 단백질의 중합과 단백질 생산 후 변형 (posttranslational modification)에 기여한다. 최종의 단백질 중합체는 화학적 파괴 등에 저항성을 가지며, 단백질 분해 과정에 의해

서 폴리펩타이드를 유리할 수 있게 된다^{1,3)}.

지금까지 알려진 TGase family에는 TGase 1 (TGase K), TGase 2 (TGase C), TGase 3 (TGase E), TGase X, coagulation factor VIII, band 4.2, prostate TGase 등 7개의 서로 다른 TGase의 유형이 있다. 이들 중 4개의 TGases (TGases 1, 2, 3, X)들은 사람 상피 각화 세포의 최종 분화와 세포능동사망현상 시에 합성되고 발현되는 것들이고, 이들은 각화외피 (cornified envelope)를 만드는 데 기여한다^{4,5)}.

TGase C는 세포의 증식·분화·노화 및 세포능동사망현상 등에 밀접하게 관여하는 효소로서 일반적으로 기질의 가교결합에 필수적이며 노화의 과정은 TGase C의 증가와 함께 일어난다. 즉 가교결합이 노화 과정에 포함되는 기전들 중의 하나라고 알려져 있으며, 많은 수의 효소매개 가교결합 반응이 일어나는 중에, 세포의 증식, 분화, 암종의 형성과정, 세포능동사망현상, 노화 등에서 TGase를 촉매로 하는 가교결합 활성도가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 tissue TGase는 태생기의 다양한 조직과 기관에서 형태 형성, 분화, 다양한 조직과 기관의 발생과정 중

박 영 욱

210-702, 강원도 강릉시 지변동 123

강릉대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Young-Wook Park, D.D.S, M.S.D., Ph.D.

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kangnung National University

123, Chibyun-Dong, Kangnung, Kangwon-Do, 210-702, Korea.

Tel. 82-33-640-3183 Fax. 82-33-640-3113

E-mail: ywpark@knusun.kangnung.ac.kr

의 세포내 과정에서 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{6,9}. 또 다른 보고에서 TGase C의 유전자는 발생과정과 성인조직에서 모두 일정하게 발현되며, 세포능동사망현상의 발생과 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있다^{8,9}. 또한 세포능동사망현상을 겪는 세포에서는 TGase C 효소의 활성이 증가되는 것으로 보고되었다^{2,10-13}. 또한 많은 수의 구조적으로 서로 다른 단백질들에서 TGase 활성도에 대한 최근의 발견들은 TGase에 대한 이해를 더욱 흥미롭고 어렵게 만든다. 실제로 세포능동사망현상이 일어나는 동안에는 TGase C의 전사가 retinoic acid, prostaglandin E2, interleukin 6, 그리고 TGF- β 등과 같은 요인들에 의해서 유도되고, 이러한 전사의 조절 외에도 세포능동사망현상 동안에 TGase C는 또한 단백질 생산 후 변형 (posttranslational modification)을 유도할 수 있다고 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶.

TGase C가 활성화되면 세포 내에 가교 결합이 된 단백질 중합체의 집합이 만들어지고, 이 단백질 중합체들은 비가역적으로 세포의 구조를 변형시키며, 세포의 초구조적 변화 (ultrastructural changes)를 야기하여 세포는 세포능동사망현상을 겪게 된다^{11,17,18}. 이러한 광범위의 TGase C-의존성 단백질 중합과정은 세포능동사망현상 중에 있는 세포를 안정화하여 식세포 활동 (phagocytosis)이 일어나지 않도록 도와주기 때문에, 주변 조직에서 염증반응이 일어나지 않도록 해준다¹⁹.

그동안 TGase C가 가교결합을 하는 과정이 세포질 내에서만 일어난다고 알려져 있었으나, 최근에 일부학자들에 의해서 TGase C가 염색체 DNA에 직접 관여하여 세포의 증식과 분화 및 세포능동사망현상에 영향을 미친다는 것이 발견되었다. 이 과정에서 TGase C가 DNA에 직접 결합하고, TGase C는 DNA 결합 단백질을 DNA에 붙여주는 가교결합효소인 것으로 알려졌다^{19,20}.

Rittmaster (1999) 등은 전립선암종의 치료 동안에 세포증식과 세포능동사망현상의 정도를 알아보기 위한 연구를 시행하여 전립선암종의 치료와 진행시에 tissue TGase를 세포능동사망현상의 유용한 표지자로서 이용할 수 있다고 하였다²⁴.

이전의 연구에서 타액선 기관배양을 실시한 결과 TGase C antisense inhibition에서 다수의 세포들이 세포능동사망현상과는 다른 양상으로 비정상적으로 폭발하면서 분해되는 양상을 관찰하였다 (Fig. 1 - a, b). 따라서 본 연구에서는 TGase C가 세포능동사망현상에 어떻게 관여하는지를 알아보기 위하여 TGase C antisense inhibition을 시행하였다.

이와 같이 TGase C는 아직도 정확한 기능이 밝혀지지 않고 있으며 TGase C의 knockout mouse에서의 결과도 모호한 실정으므로 세포주 배양을 통한 antisense inhibition연구가 필요하다. 본 연구의 목적은 첫째로 antisense inhibition 연구를 통하여 TGase C가 활발하게 분열하고 있는 세포들에 어떤 영향을 미치는가를 알아차 한 것이고, 둘째로 TGase C에 대한 antisense probe를 제작하여 위암 세포주 (SNU-1, Seoul National University, Korea)에서의 효과를 알아보고, anticancer therapy의 개발을 위한 TGase C의 유용성을 알아보고자 하였다.

II. 연구재료 및 연구방법

1. 생쥐 악하선 배양에서 antisense inhibition

태생 14일의 생쥐 악하선을 적출하여 Millipore filter (AABP tupe, Millipore, Bedford, Massachusetts)에 얹어서 steel grid에서 배양하였다. Serumless BGJb 배양액 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 ascorbic acid (0.2 mg/ml)과 penicillin/streptomycin/amphotericin (100 units)을 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2주간 배양하였다. 악하선 장기배양 중에 sense 또는 antisense oligonucleotide probe를 사용하였는데 이들은 Genbank 검색에서 유사성이 거의 없는 부분의 cDNA sequence를 선택하였다. Oligonucleotide probe는 cDNA에서 open reading frame(ORF)의 전방 및 중간부위, 그리고 3'의 non-ORF 부위에서 선택하여 DNA synthesizer (ABI 394, PE, Branchburg, NJ)로 제작하였으며 PD-10 column (Sephadex G-25M, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 통하여 여과한 후 diethyl ether로 소독하였고, lyophilizer (Hanil Co., Seoul, Korea)에서 완전히 동결 건조시킨 후 악하선 장기배양에 사용하였는데, 실험적으로 동일한 유전인자에서 sense probe의 배양 결과가 특이하게 나타나는 oligonucleotide probe를 최종 선택하여 실험을 진행하였다. Oligonucleotide probe는 배양액에 30 μ M의 농도로 투여하였으며 이를 간격으로 배양액과 oligonucleotide probe를 교환하였다. 각각의 악하선 배양조직은 제8일과 제14일에 10% 중성 포르말린에 고정하였으며 stereomicroscope로 저배율 표본관찰을 하였고, 통법에 의하여 4 μ m 두께의 과라핀 절편을 제작한 후 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2. 사람의 위암세포주 (SNU-1)의 배양

사람의 위암세포주 (SNU-1, Seoul National University, Korea)를 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM)에 넣고 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양시 bottle의 뚜껑을 약간 풀어서 CO₂가 소통될 수 있게 해주고, 하루에 2회씩 bottle을 흔들어주었다.

3. Antisense inhibition

DNA synthesizer (ABI, USA)를 이용하여 형광표지자 (fluorescein β -cyanoethylphosphoramidite, Proligo, M010131)를 부착한 antisense primer (5' - ACACCTCTCTAAGAC - 3', Genbank, accession No. M55153)를 제작하였으며, 배양 중인 실험군의 culture bottle에 10 μ M의 농도로 넣고 4일간 배양하였다.

4. 배양된 세포의 추출 및 슬라이드 제작

사람의 위암세포주 (SNU-1, Seoul National University, Korea)는 정상 배양으로 세포가 거의 포화 상태까지 자란 것을 암시야현미경을 이용하여 확인하고 15ml conical tube에 배지와 세포를 함께 담았다. 다음으로 1, 200 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액

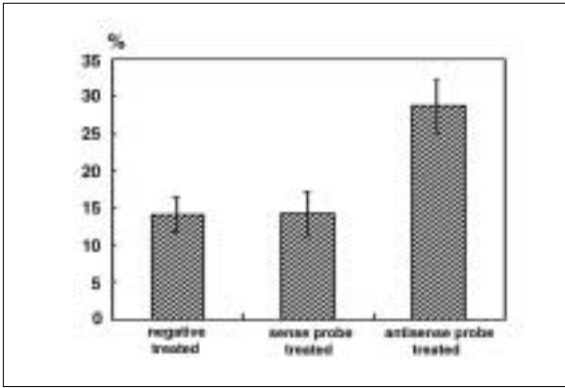


Fig. 3. It showed that the rate of apoptosis compared among the negative treated group, sense probe treated group and antisense probe treated group.

을 제거한 후 고정액을 세포의 양에 따라서 3-10ml 정도 채웠다. 배양된 사람의 위암세포주 (SNU-1, Seoul National University, Korea)를 위한 슬라이드의 제작과정은 간단히 도말하는 것으로 된다.

5. 면역조직화학적 염색

일차항체로 mouse monoclonal antibody인 transglutaminase C (TGase C, Neomarkers, Fremont, CA, USA)에 대한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 이차항체로는 단일클론성항체로 anti-mouse 와 anti-rabbit이 혼합된 이차항체 IgG를 사용하여 streptavidin-peroxidase 방법을 사용하였다 (Dako, LSAB K0681, Copenhagen, Denmark).

SNU-1 세포주에서 TGase C의 발현 부위 및 발현 양상을 관찰하였고, 역시 antisense primer를 넣고 배양한 위암세포 (SNU-1, Seoul National University, Korea)에서도 TGase C의 발현 부위 및 발현 양상을 관찰하였다.

6. 세포능동사망현상의 관찰

사람의 위암세포주 (SNU-1, Seoul National University, Korea) 배양에서 대조군, sense probe 처치군, antisense probe 처치군 각각에서 ×400 배율의 현미경 관찰로 군별 54개의 화상을 모아 Image Pro-4.0 (Media Cybernetics, MA, USA)의 Image analyzer 영상 처리를 통하여 전체 세포수에 대한 세포능동사망현상 중에 있는 세포수의 비율 (%)로 분석하였다 (Fig. 3).

III. 연구결과

생쥐 악하선 배양의 TGase C antisense inhibition

생쥐 악하선 배양에서 TGase C에 대한 antisense inhibition의 결과 다수의 세포들이 세포능동사망현상을 일으키는 것이 발견되

었는데 핵질의 변성과정은 기존에 알려진 세포능동사망현상에서의 핵질의 condensation이 아니라 핵질이 분해되면서 세포핵이 비정상적으로 폭발하는 특이한 세포능동사망현상의 양상을 관찰하였다 (Fig. 1 - a, b).

사람 위암세포주 (SNU-1)의 체외 배양시 antisense inhibition

사람 위암세포주 (SNU-1)의 배양중 대조군에서 분열 중에 있는 세포와 세포능동사망현상 중에 있는 세포에서 transglutaminase C의 발현이 세포질과 세포핵에 미만성으로 나타났다 (Fig. 1 - c~k). 한편 antisense probe 처치군에서는 sense probe 처치군에 비하여 SNU-1 세포내에 핵의 모양이 비정상적으로 거칠은 형태를 보였고 (Fig. 2 - b~i), 이 때 transglutaminase C의 면역화학적 발현의 양이 현저하게 감소되었으며, 다수의 apoptotic cell들이 관찰되었다 (Fig. 2 - k, l). 또한 형광표지자를 부착한 antisense probe를 이용하여 배양해 본 결과 암시야현미경을 이용한 형광방법의 관찰에서는 TGase C antisense probe가 세포내에 충분히 침투되어 있음이 확인되어 antisense inhibition이 성공적으로 이루어 졌음을 알 수 있었다 (Fig. 2 - j).

TGase C에 대한 antisense inhibition을 행한 세포에서 핵질의 분절 현상이 뚜렷하고 pyknotic heterochromatin의 형성이 빈번하였다 (Fig. 2 - b~l). TGase C에 대한 antisense inhibition을 행한 세포에서 정상 세포 및 sense probe 처치군에 비하여 특이하게 세포능동사망현상이 일어나 소멸되는 세포의 수가 현저하게 증가되었다 (Fig. 1 - c~k, Fig. 2 and Fig. 3).

IV. 총괄 및 고안

지금까지 TGase C의 기능을 평가하기 위해 TGase C antisense inhibition 방법을 이용하여 세포능동사망현상에 미치는 영향에 대하여 성공하였다는 연구결과가 보고된 적이 없다. 이 효소는 분열하지 않는 정상세포에서 세포능동사망현상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 분열이 왕성한 세포에서는 세포의 증식 및 분화와 관련이 되어 있다.

Oliverio (1999) 등은 조직 TGase에 대한 억제가 세포능동사망현상을 막는 역할을 통하여 세포가 살아남는 능력을 증가시킬 수 있다고 하였으며, 세포능동사망현상과 관련된 프로그램은 retinoic acid에 의하여 엄격히 조절되고 있고, 세포내 Ca²⁺가 중요한 역할을 한다고 하였다^{25, 26}. 이와 관련하여 retinoic acid가 사람의 구강각화세포의 노화와 세포능동사망현상에 미치는 영향에 대한 연구에서 이 물질의 투여가 p16과 p110의 발현을 억제하고 telomerase 활성을 증가시키는 기전에 의하여 노화와 세포능동사망현상을 억제시킨다는 연구가 있다²⁷.

본 연구에서는 분열이 왕성한 위암세포인 SNU-1 세포주를 배양하여, TGase C가 유사분열세포에서 작용을 나타내는 것을 antisense inhibition을 이용하여 비특이적인 세포능동사망현상이 증가하는 것을 관찰하였다. 이는 역으로 생각할 때 유사분열 세포

에 꼭 필요한 TGase C에 antisense inhibition을 시행하면 세포가 사망할 것으로 추측된다. 따라서 TGase C를 항암요법을 위한 유전자 표적으로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 세포주를 배양하여 antisense inhibition 연구를 통하여 분열이 왕성한 세포에서 TGase C의 세포 내 기능을 알고, anticancer therapy의 개발을 위한 유전자 표적으로서 TGase C의 유용성을 알아보려고 하였다. 이전의 연구에서 기관 배양을 통하여 antisense inhibition 연구를 한 경우에서 주목할 만한 현상을 발견하고 세포 내에서 일어나는 "핵폭발 (nuclear explosion)"이라고 명명하였다 (Fig. 1 - a, b). 본 연구에서는 이 현상을 확인하기 위해 일차적으로 세포주를 배양하고 배양된 세포주가 TGase C 항체를 이용한 면역조직화학적 염색에서 세포핵내의 염색체에 결합되는 것을 확인하고자 하였으며, 결과로 TGase C가 염색체에 결합하는 것을 확인하였다 (Fig. 1 - c~k). 그 다음으로 세포주 배양을 통한 antisense inhibition 연구를 통하여 이전의 생쥐 악성 선 기관배양 연구에서 나타난 세포의 핵폭발 현상이 일어나는가를 확인해보고자 하였으며, 명백히 일어난다는 것을 확인하였다 (Fig. 2 - b~l). 이러한 핵폭발 현상은, 세포가 완전히 고형화되어 생물체 내에서 무해한 상태로 파괴되어 식세포에 의해 없어지는 세포능동사망현상과는 다른 것으로, 에너지 수준의 불균형으로 인해 파괴가 일어나기 때문에 핵폭발 시에 세포질내로 핵내 구성성분들이 흩어지는 일종의 비특이적인 세포능동사망현상 현상이다.

본 연구의 또 하나의 목적은 항암요법의 개발을 위한 TGase C의 유용성을 알아보려고 하는 것이다. 이전의 연구에서 De Laurenzi (2001) 등은 TGase C가 없는 knockout mouse를 이용하여 이 효소의 효과를 연구하였으며, 이 효소를 파괴하기 위하여 exon 5와 exon 6 및 intron 5를 삭제하였다. 이렇게 만들어진 knockout mouse의 간과 흉선에서 TGase 활성이 부분적으로 남아있는 것을 관찰하였고, 결과적으로 활성이 남아 있는 knockout mouse는 살아남는 것을 확인하였다. 그 결과로서 TGase 2는 세포능동사망현상 프로그램의 주요경로에서 결정적 구성요소가 아니며, TGase 1이나 다른 종류의 아직 밝혀지지 않은 TGase 같은 효소에 의한 잔존 효소 활성이 이러한 TGase 2의 결함을 보상할 수 있다고 보고하였다²⁾. 그렇지만 다른 효소들이 TGase C의 역할을 할 수 있을 만큼의 준비기간을 주지 않고 TGase C를 급성으로 억제시키면 그 세포를 죽일 수 있을 것이다. 이와 같이 세포능동사망현상에 미치는 TGase C의 영향에 대하여 서로 다른 견해가 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 TGase C에 대한 antisense probe를 제작하여 위암 세포인 SNU-1 세포주에서 효과를 알아보려고 하였으며, 정상적인 세포에서 세포능동사망현상에도 영향을 미치지만, 본 연구에서는 활발하게 분열하는 SNU-1 세포주의 TGase C antisense inhibition에 의해서 앞서 언급된 핵폭발 현상을 통한 광범위의 비특이적인 세포능동사망현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 지금까지 antisense inhibition의 동물연구에서 나타나 있는 부작용을 막기위하여 어느 정도의 완충작용을 할 수 있는 방법이 개발되어 TGase C를 급성으로 억제시키는 방법을 개발한다면 인간의 몸 안에서 핵폭발현상을 통하여 분열하

고 있는 암 세포를 선택적으로 파괴할 수 있을 것이다.

본 연구의 결과를 통하여 분열이 활발하지 않은 정상세포와 비교시, 활발하게 분열하고 있는 위암세포의 TGase C에 대한 antisense inhibition은 비특이적으로 세포능동사망현상이 일어나 소멸되는 세포의 수를 현저하게 증가시키는 것을 알았다. 따라서 TGase C에 대한 antisense inhibition은 지금까지의 비특이적 항암요법에서와는 달리 암세포와 같은 분열활성이 높아진 세포에 대하여 더 특이성이 있는 접근이 가능할 것으로 생각된다. 그러므로 항암요법의 한 방법을 개발하기 위해서 현재 많이 이용되고 있는 TGase C라는 효소를 유전자 표적으로 만드는 데 이용할 수 있을 것이다.

Rittmaster (1999) 등은 전립선암종의 치료 동안에 세포증식과 세포능동사망현상의 정도를 알아보기 위한 연구를 시행하여 전립선암종의 치료와 진행시에 tissue TGase를 세포능동사망현상의 유용한 표지자로서 이용할 수 있다고 하였다²⁴⁾. 본 연구에서의 결과를 통하여 추론해보면 TGase C가 분열이 활발하지 않은 정상적인 세포의 세포능동사망현상에도 영향을 미치지만, 분열이 왕성한 SNU-1 세포주의 TGase C antisense inhibition에 의해서는 오히려 앞서 언급된 핵폭발 현상을 통한 광범위의 비특이적인 세포능동사망현상을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 또한 antisense probe가 세포내로 얼마나 침투되고 어느부위에 부착되었는지를 확인하기 위하여 antisense probe에 형광표지자를 부착하여 배양 후 암시야현미경에서 관찰하였다. 이 때 TGase C의 발현도 세포질과 세포핵에 미만성으로 나타나고 있었다. 이는 SNU-1 세포주처럼 증식성이 매우 높은 세포에서 TGase C가 어떤 역할을 하고 있을 것이라는 것을 보여주는 것이다. 반면에 TGase C antisense inhibition에서는 세포내 핵의 모양이 매우 거칠게 나타났고, TGase C의 발현의 양이 현저하게 감소되어 나타났고, 다수의 비특이적인 세포능동사망현상을 겪는 세포들이 보였다. 따라서 분열이 왕성한 세포에서 TGase C는 또한 세포핵질의 구조화에 영향을 미친다는 것을 알았으며, 이 효소가 없을 때는 핵질의 구조화가 이루어지지 않아 핵폭발 현상 즉 비특이적인 세포능동사망현상을 겪게 되는 것으로 보인다.

이와 같이 TGase C가 SNU-1 세포주의 세포증식시에 염색체에 직접 반응하여 염색체의 분열 및 구조화 과정에 발현이 되는 것을 관찰하였다 (Table 1). 특히 TGase C antisense inhibition에 의한 세포능동사망현상은 핵질이 일시에 분해되는 특이한 양상임을 관찰하였다. 또한 TGase C라는 효소를 유전자 표적으로 만들어 항암요법의 한 방법으로서 개발이 가능하다는 것을 제시하는 바이다.

향후 본 연구의 결과를 토대로 하여 in situ hybridization이나 painting probe를 사용하는 fluorescence in situ hybridization (FISH) 기술을 이용한 TGase C antisense inhibition이 세포핵 및 염색체에 미치는 영향에 대한 더 세밀한 연구와 함께 새로운 단계의 항암요법 개발을 위해 동물에서 TGase C antisense inhibition을 위한 vector를 개발하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Table 1. Summary of the changes in the nuclear chromatin

Subject	Types of treatment	IHC of TGase C in nuclear chromatin	Signs of apoptosis	Nuclear chromatin degradation
SNU-1	Normal control	+	++	+
	Sense control	+	++	+
	Antisense inhibition	±	+++	+++

± : rare, + : slight, ++ : moderate, +++ : strong

IHC : immunohistochemical staining

V. 결 론

사람 위암 세포인 SNU-1 세포주 배양을 통하여 TGase C antisense inhibition이 활발하게 분열하고 있는 세포에서 어떤 영향을 미치는가를 알아보고, 항암요법의 개발을 위한 TGase C의 유용성을 알아보기 위하여 연구를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 면역조직화학적 염색에서 TGase C가 대조군인 SNU-1 세포주의 세포증식시에 염색체에 직접 반응하여 염색체의 분열 및 구조화에 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.
2. SNU-1 세포주에서 시행한 TGase C에 대한 antisense inhibition 연구에서 TGase C antisense probe가 충분히 세포 내에 침투되어 있음이 형광방법에서 확인되었다.
3. SNU-1 세포가 TGase C에 대한 antisense inhibition에 의하여 염색사가 분해되면서 특이한 세포능동사망현상이 관찰되었으며 sense probe 투여군에 비하여 세포 능동사망 현상이 증가되었다.

이와 같은 결과를 통하여 TGase C가 분열활성이 높은 세포에서 세포핵의 구조화에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났으며, TGase C라는 효소가 antisense inhibition에 의하여 기능이 결여되었을 때에는 구조화가 되지 않은 핵질이 매우 급속하게 분해되어 분산되므로 오히려 비정상적인 세포능동사망현상이 증가되었다.

참고문헌

1. De Laurenzi V, Melino G : Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol* 21:148-155, 2001.
2. Melino G, Piacentini M : Tissue transglutaminase in apoptosis : a downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett* 430:59-63, 1998.
3. Melino G, Candi E, Steinert PM : Assay for transglutaminases in cell death. *Methods Enzymol* 322:433-472, 2000.
4. Steinert PM : A model for the hierarchical structure of the human epidermal cornified cell envelope. *Cell Death Differ* 2:33-40, 1995.
5. Steinert PM, et al : Transglutaminase crosslinking and structural studies of the human small proline rich 3 protein. *Cell Death Differ* 6:916-930, 1999.

6. Glozak MA, et al : BMP4- and RA-induced apoptosis is mediated through the activation of retinoic acid receptor and in P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 242:165-173, 1998.
7. Lee SK, Chi JG, Park SC, Chung SI : Transient expression of transglutaminase C during prenatal development of human muscles. *J Histochem Cytochem* 48:1565-1574, 2000.
8. Nagy L, et al : The promoter of mouse tissue transglutaminase gene directs tissue-specific, retinoid-regulated and apoptosis-linked expression. *Cell Death Differ* 4:534-547, 1997.
9. Thomazy VA, Davies PJ : Expression of tissue transglutaminase in the developing chicken limb is associated both with apoptosis and endochondral ossification. *Cell Death Differ* 6:146-154, 1999.
10. Amendola A, et al : Induction of "tissue transglutaminase in HIV-pathogenesis : evidence for high rate of apoptosis of CD4+ T lymphocytes and accessory cells in lymphoid tissues. *Proc Natl Acad Sci* 93:11057-11062, 1996.
11. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M : Apoptosis : molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 56:170-177, 1991.
12. Piacentini M, et al : The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol* 54:246-254, 1991.
13. Piredda L, et al : Identification of 'tissue' transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J* 13:355-364, 1999.
14. Melino G, et al : Retinoic acid receptors a and g mediate tissue-transglutaminase induction in human neuroblastoma cells undergoing apoptosis. *Exp Cell Res* 255:55-61, 1997.
15. Nagy L, et al : Identification and characterization of a versatile retinoid response element (RARE/RXRE) in the promoter of the mouse tissue transglutaminase gene. *J Biol Chem* 271:4355-4365, 1996.
16. Ritter SJ, Davies PJ : Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter. *J Biol Chem* 273:12798-12806, 1998.
17. Fesus L, et al : Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a results of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245:150-154, 1989.
18. Piredda L, et al : Lack of "tissue" transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macro molecules from dying cells. *Cell Death Differ* 4:463-472, 1997.
19. Han JA, Park SC : Transglutaminase-dependent modulation of transcription factor Sp1 activity. *Mol Cells* 10:612-618, 2000.
20. Nanda N, et al : Organization and chromosomal mapping of mouse Gh/tissue transglutaminase gene (Tgm2). *Arch Biochem Biophys* 366:151-156, 1999.
21. Oliverio S, Amendola A, Di Sano F, et al : Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. *Mol Cell Biol*

- 17:6040-6048, 1997.
22. Ou H, et al : Retinoic acid-induced tissue transglutaminase and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 87:881-887, 2000.
 23. Park SC, Yeo EJ, Han JA, et al : Aging process is accompanied by increase of transglutaminase C. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:B78-83, 1999.
 24. Rittmaster RS, Thomas LN, Wright AS, et al : The utility of tissue transglutaminase as a marker of apoptosis during treatment and progression of prostate cancer. *J Urol* 162:2165-2169, 1999.
 25. Casadio R, Polverini E, Mariani P, et al : The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions. *Eur J Biochem* 262:672-679, 1999.
 26. Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, et al : Inhibition of tissue transglutaminase increase cell survival by preventing apoptosis. *J Biol Chem* 274:34123-34128, 1999.
 27. You YO, Min SK, Kim KJ, et al : Effects of retinoic acid on replicative senescence and apoptosis of normal human oral keratinocytes. *J Kr Maxillofac Reconstr Surg* 23:481-492, 2002.

사진부도 설명

- Fig. 1. a. salivary gland organ culture, TGase C antisense probe treated, H&E staining, separation of chromosome (arrows)(1000×)
b. salivary gland organ culture, TGase C antisense probe treated, H&E staining, dissolution of chromosome (arrows)(1000×)
c. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining, prophase of the mitosis (1000×)
d. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining, metaphase of the mitosis (1000×)
e. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining, anaphase of the mitosis (1000×)
f. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining, telophase of the mitosis (1000×)
g. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining (1000×)
h. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining (1000×)
i. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining (1000×)
j. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining (1000×)
k. SNU-1 cells, negative control, TGase C immunohistochemical staining (1000×)
(c~f : proliferating cells of the control, g~k : apoptotic cells of the control)
- Fig. 2. a. SNU-1 cells, sense probe treated, H&E staining, round nuclear shape (1000×)
b. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining, pyknotic rough nuclei (arrows)(1000×)
c. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining (1000×)
d. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining (1000×)
e. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining (1000×)
f. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining (1000×)
g. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining (1000×)
h. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining, pyknotic and condensed nuclei (arrow)(1000×)
i. SNU-1 cells, antisense probe treated, H&E staining, pyknotic and condensed nuclei (arrow)(1000×)
j. SNU-1 cells, antisense probe treated, fluorescent microscopic image, positive in the cytoplasm and nuclei (arrows)(400×)
k. SNU-1 cells, antisense probe treated, TGase C immunohistochemical staining, conspicuous positive reaction (arrows)(400×)
l. SNU-1 cells, antisense probe treated, TGase C immunohistochemical staining, entirely negative reaction (100×)
(c~i : cells showed various pyknotic rough nuclei)

Fig. 1

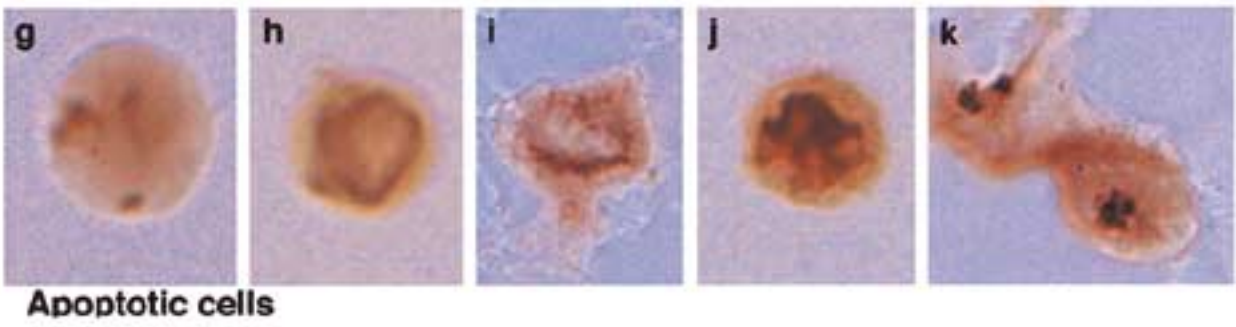
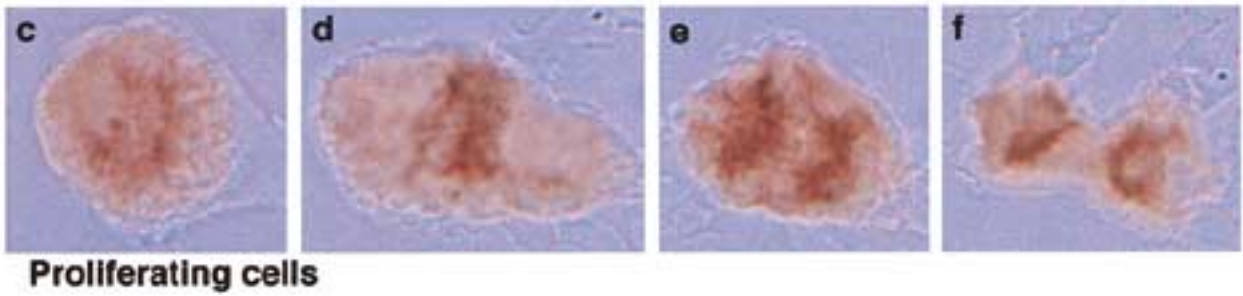
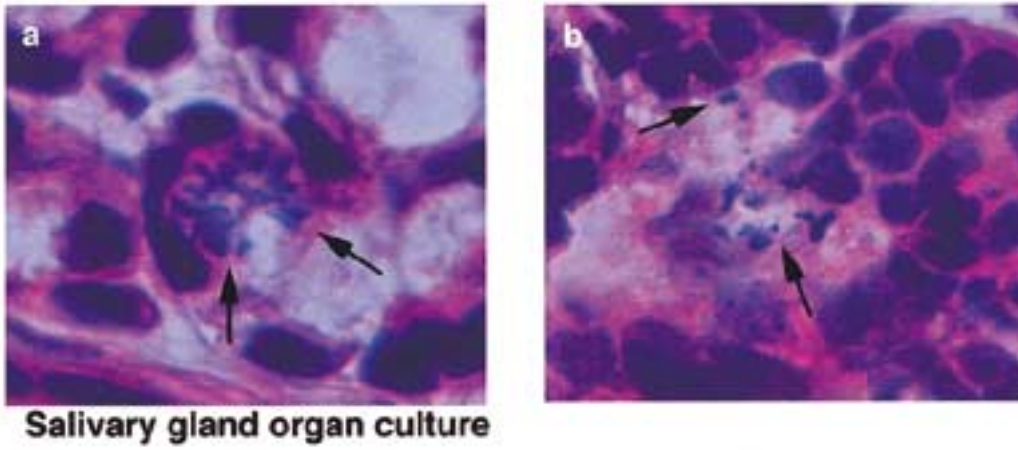


Fig. 2

