

Immortalization of Rabbit Corneal Fibroblasts by Overexpression of Simian Virus 40 Large T antigen

Seung Ju Cho¹, Yuk Pheel Park¹, Heon Man Lim², Jae Chan Kim³, Eun Kyung Yang⁴,
Jung Keug Park⁵, Do Young Yoon¹ and Hee Gu Lee^{1†}

¹Laboratory of Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Daejeon 305-333, Korea, ²Department of Biology, Chungnam National University, College of National Sciences, #220, Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea, ³Department of Ophthalmology, Yongsan Hospital, Chung-Ang University, College of Medicine, #65-207 Hangangro-3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea, ⁴Bioland Ltd. #39-4, Songjeong, Byongchon, Chonan, Chungnam 330-863, Korea, ⁵Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, College of Engineering, #26, 3-ga, Pil-dong, Chung-gu, Seoul 100-715, Korea

Immortalization of primary corneal cells has influence on pharmacy, medical and biological fields. Especially, investigation of immortalization mechanism using viral oncoproteins is useful for medical treatments, and these cell lines will be useful materials for toxic test of medical supplies and cell biological experiments. Rabbit corneal fibroblasts in culture undergo a finite number of divisions before they reach a terminally non-proliferating state known as replicative senescence. Therefore, we attempted to induce immortalization of rabbit corneal fibroblasts with SV40 large T antigen. As a result of experiment, expression of SV40 large T antigen was confirmed, and expression of proteins related to cell cycle repressor was decreased in the transfection group compared with non-transfection group. According to the results of cell cycle phase distribution test, SV40 large T antigen-transfected cells had obtained higher proliferation rate than primary cells. It was confirmed that during induction of immortalization, SV40 large T antigen was not able to increase telomerase activity. In conclusion, we made a rabbit corneal fibroblast cell line with SV40 large T antigen. This cell line will be useful for further studies of mammalian fibroblast biology, particularly with regard to angiogenesis and malignant transformation. In addition, this cell line offers opportunity for testing potential therapeutics and can be used for toxicity tests of materials or cosmetics. In the future, our cell line can potentially be utilized in a wide range of biology related fields.

Key Words: Immortalization, SV40 large T antigen, Telomerase

서 론

각막은 눈의 가장 바깥쪽에 있는 투명한 무혈관 조직으로, 안구를 보호하는 방어막의 역할과 광선을 굴절시켜 망막으로 도달시키는 창 역할, 즉 눈으로 들어오는 빛의 양을 조절한다. 하지만 각막 세포는 제한적인 세포 분열을 하므로, 각막의 손상은 결국 복제 노화 (replicative senescence) 단계에

이르게 된다¹⁾. 특히 토끼의 일차 각막 섬유아 세포 (primary rabbit corneal fibroblast cells)는 복제 노화로 가기 전 20~25 계대의 세포 분열을 하게 되고, 이러한 세포 분열의 계대 수는 기원이 되는 동물의 수명과 비례적인 관계가 있다^{10,14)}.

일반적인 동물 일차 세포에서는 계대가 많이 증가할 수록 세포의 복제 노화나 성장 억류 (cell growth-arrest)를 일으킨다^{2,17)}. 따라서 일차 세포의 불멸화 (immortalization)는 세포 복제 노화나 성장 억류에 관한 유전자의 발현 감소를 야기 하는데, 이러한 세포의 불멸화 수단으로써 Simian virus 40 (SV40)과 같은 DNA 종양 바이러스 (tumor virus)가 많이 이용된다. 특히 바이러스 유전자 중 SV40 large T antigen (SV-40T)은 다양한 세포들의 형질 전환을 야기하는 강력한 종양 형성 단백질이다.

SV40T는 708개의 아미노산으로 구성되어 있고, 크게 두

*논문 접수: 2004년 4월 26일

수정재접수: 2004년 5월 17일

†별책 요청 지자: Hee Gu Lee, Ph.D., Cell Biology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Daejeon 305-333, Korea
Tel: 82-42-860-4182, Fax: 82-42-860-4593
e-mail: hglee@kribb.re.kr

부분으로 나누어 N-말단의 Rb 결합 부위와 C-말단의 p53 결합 부위로 이루어져 있다. Rb와 p53은 세포 내에서 중앙 억제 단백질 (tumor suppressor protein)로 알려져 있다. SV40T는 이러한 Rb와 p53과의 결합을 통해 Rb와 p53을 매개로 하는 세포 성장의 억류를 막는다. 또한 SV40T는 세포 내에서 DNA helicase로서의 기능이나 여러 유전자의 전사 활성화 또는 억제자로서의 기능을 하게 된다¹²⁾.

세포의 성장 활성화, 억류 및 세포사 (apoptosis) 등은 세포 내의 telomere 길이와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 동물 일차 세포들은 telomere의 길이를 유지시키는 telomerase의 catalytic subunit (telomerase reverse transcriptase, TERT) 발현이 극히 드물게 일어난다. 세포가 노화로 갈수록 telomere의 길이가 짧아지는 현상에 관한 telomere 단축 이론 (telomere shortening theory)은 세포의 복제 노화에 대한 설명에서 많이 적용된다^{3,6)}. 세포의 telomere 단축은 DNA 손상을 야기하고 결과적으로 세포 성장 억류나 노화를 일으킨다²⁰⁾. 하지만 telomere 단축 이론은 세포 종류에 따라 제한적으로 적용된다. 즉 telomerase의 활성이 낮음에도 불구하고 세포의 성장이 활발한 경우도 있다^{4,9)}.

세포의 불멸화는 의학적, 약학적 그리고 생물학적 분야에 많은 영향을 미친다. 특히 바이러스 유전자를 이용한 불멸화의 기작에 관한 연구는 그 바이러스에 관련된 질병 치료 연구에 많은 영향을 미칠 뿐만 아니라, 이러한 방법으로 제작된 세포는 새로운 의약품들이 개발되고 있는 현 시대에 많은 용도로 쓰일 수 있다. 새로운 의약품 후보 물질들을 위해서는 인간 안구 자극 테스트가 필수적이며, 특히 각막에 손상을 주는 정도를 파악하기 위해 각막 세포주의 *in vitro* 독성 실험이 기본적으로 수행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 토끼 각막 섬유아 세포를 대상으로 SV40T 유전자를 이용하여 불멸화를 유도하였고, 그것을 통한 형질 분석 과정으로써 세포의 성장 곡선 및 형태의 변화, 중앙 억제 단백질인 Rb와 세포 주기 관련 단백질들의 발현 변화, telomerase의 활성도 변화를 알아보았다. 그 결과 유도한 세포가 일차 세포와 비교하여 SV40T에 의해 세포 주기의 활성을 야기한 세포주임을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양 및 플라스미드

토끼의 일차 각막 섬유아 세포 (primary rabbit corneal fibroblast cell, 중앙대학교 의과대학) 및 SV40T를 이용하여 형질 전환시킨 토끼 각막 섬유아 세포를 DMEM (Sigma, USA) 배지에 10% FBS (Hyclone, USA)을 넣어서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 또한 SV40T 유전자를 포함하고 있는 pSV3-neo 플라스미드를 형질 전환에 사용하였다.

2. 형질 전환 및 세포주 확립

100 mm 배양용기에 1×10⁶ 세포를 깔아두고, 다음날 배양 용기에 부착된 세포가 70% 차지하였을 때 PBS로 3번 세척하였다. DNA (pSV3-neo) 10 µg에 무혈청 배지 (Serum free media)를 첨가하여 500 µl가 되도록 하고, Lipofectamine (GIBCO BRL, USA) 30 µl에 475 µl의 무혈청 배지를 첨가하여 상온에서 15분간 반응시켰다. 15분 후 DNA를 첨가한 배지와 Lipofectamine을 첨가한 배지를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이 때 세척한 세포를 다시 무혈청 배지로 세척하고, 30분 후 DNA와 Lipofectamine이 섞인 배지에 5 ml의 무혈청 배지를 첨가하여 총 6 ml을 잘 혼합한 후 세척한 세포에 혼합하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 동안 배양 후 일반적인 배양 배지로 교체하였고, 48시간 후부터 0.8 mg/ml의 G418 (Sigma, USA)로 형질 전환된 세포들을 선별하였다.

3. 중합효소 연쇄반응 (PCR)

토끼의 일차 각막 섬유아 세포와 형질 전환된 세포에서 genomic DNA를 추출하여 주형 (template)으로 사용하였고, 각각 1 pmol의 SV40T 특이적 primer, 1 µl의 dNTP 혼합물 및 Taq polymerase (Solgent, Korea)를 첨가하여 전체 볼륨을 20 µl로 맞춘 후 반응시켰다. SV40T의 특이적 primer로써, first fragment primer pairs: 5'-AAA GGG AAT AAG GGC GAC AC-3' (sense) and 5'-GCA AAA CAG GAG GCA CAT TT-3' (antisense); second fragment primer pairs: 5'-GGG AGG TGT GGG AGG TTT T-3' (sense) and 5'-CTT TGG TCC CGG ATC TTT GT-3' (antisense); third fragment primer pairs: 5'-GCT CCC ATT CAT CAG TTC CA-3' (sense) and 5'-GGA TGA TCT GGA CGA AGA GC-3' (antisense)로 제작하였다. PCR을 위해 혼합물을 95°C에서 5분간 반응시킨 후 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 1분 반응을 30회 반복하였으며, 72°C에서 7분간 반응시켰다. 반응 후 agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr 염색을 통해 확인하였다.

4. Southern Hybridization

SV40T에 대한 probe를 제조하기 위해 SV40T의 두 번째 단편 primer를 이용하여 RCR을 수행하였고 동위원소를 이용하여 표지하였다. 토끼의 일차 각막 섬유아 세포 및 형질 전환된 세포에서 genomic DNA를 추출 하였다. 이 genomic DNA는 제한 효소인 Xho I의 단일 처리 및 Cla I과 Sal I의 혼합 처리를 병행하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰고, 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr 염색을 통해 확인하였다. 확인 후 gel은 물로 탈색하였고, depurination 용액 (0.2 N HCl)을 15분간 처리하였다. 다시 denaturation 용액

(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)을 15분간 처리하고, 물로 세척 후 15분간 neutralization 용액 (0.5 M Tris-Cl, pH 8.0, 1.5 M NaCl)을 처리하였다. Capillary transfer 방법으로 DNA를 nitrocellulose filter에 이동시킨 후, 그 filter와 SV40T probe를 hybridization 시켰으며, autoradiography를 통해 감광하였다.

5. Western blot analysis

배양하던 토끼의 일차 각막 섬유아 세포와 형질 전환 세포를 수집하여 PBS로 세척하고, protease inhibitors (5 mg/ml의 aprotinin, 5 mg/ml의 leupeptin)를 첨가한 lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton-100)로 세포를 용해시켰다. 세포의 lysate를 획득하여 단백질 농도를 정량하고, SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) gel에서 전기영동 하였다. 전기영동을 통해 분리된 단백질을 gel로부터 PVDF (polyvinylidene difluoride, Amersham Biosciences, UK) membrane으로 이동시켰으며, 이 membrane에 5% blocking 용액 [nonfat powdered milk (DIFCO, USA) in TBS (Tris-buffered saline)]을 1시간 동안 처리하였다. 그 후 일차 항체를 실온에서 1시간 30분간 처리 후 TBST [0.05% Tween-20 (usb, USA) in TBS]를 이용하여 membrane을 세척하고, peroxidase가 결합된 이차 항체를 실온에서 30분간 처리한 뒤 ECL (Amersham Biosciences, UK)로 발색시켰다.

6. 세포 주기 분석

배양하던 토끼의 일차 각막 섬유아 세포와 형질 전환 세포의 confluency가 70~80% 되었을 때 수집하여 PBS로 세척하고, 70% EtOH로 -20°C에서 16~18시간 동안 고정시켰다. PBS로 세척한 후 RNase (100 µg/ml in PBS)가 첨가된 propidium iodide (20 µg/ml in DMSO)를 이용하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 유세포 분석기 (Flow cytometry)로 세포 주기를 분석하였다.

7. TRAP assay

Telomerase 활성은 TRAPeze Detection Kit (Intergen, USA)를 사용하여 PCR-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP)에 의해 분석되었다. 토끼의 일차 각막 섬유아 세포와 형질 전환 세포를 수집하여 PBS로 세척하였다. $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 세포에 $1 \times$ CHAPS lysis Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM Benzamidine, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% Glycerol) 200 µl씩 첨가하여 혼합한 후 4°C에서 30분 동안 반응시켜서 세포의 lysate를 획득하였다. 동위원소를 이용한 TS primer (Substrate oligonucleotide, in TRAPeze Detection Kit)의 end-labeling은 10 mCi/ml γ -³²P-ATP, TS Primer, 10 × Kinase Buffer, T4 Polynucleotide Kinase, dH₂O를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응하고 85°C

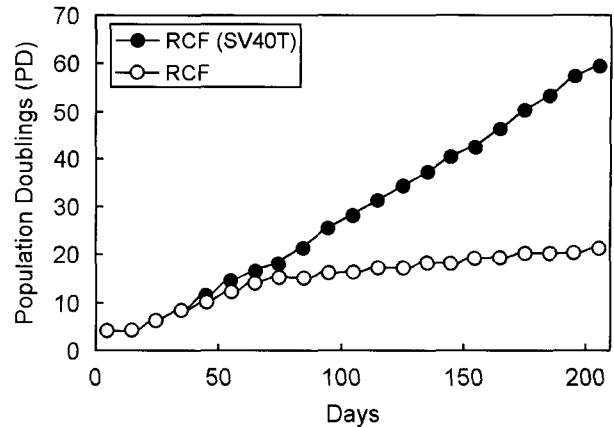


Fig. 1. Growth curves of primary and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts. Primary normal rabbit corneal fibroblasts were stably transfected with SV40 large T antigen (SV40T). The transfected cells were selected in medium containing G418. Population doublings (PD) were measured as a serial cultivation with split ratio 1:4. The growth of the rabbit corneal fibroblasts (RCF) slowed down around 14~15 PD and ceased at 22~23 PD. SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF(SV40T)] were still growing, in contrast with primary rabbit corneal fibroblasts (RCF).

에서 5분 동안 반응시켜 수행하였다. 10 × TRAP Reaction Buffer, 50 × dNTP Mix, ³²P-TS Primer, TRAP primer Mix, Taq polymerase, dH₂O를 첨가하여 Master Mix를 준비하고 RNase-free PCR tube에 분주하였으며 세포의 lysate 및 heat-inactivated extracts를 첨가하였다. PCR tube를 30°C에서 30분간 둔 후 94°C 30초, 59°C 30초 반응을 27~30회 반복하였다. 반응된 각 혼합물은 10~12.5% non-denaturing PAGE gel에서 전기영동하고, autoradiography를 통해 감광하였다.

결 과

1. 세포의 형질 전환 및 확인

토끼의 일차 각막 섬유아 세포를 형질 전환시키고 세포의 선별 과정을 거친 후 형질 분석을 수행하였다. 형질 분석 과정에서 일차 세포와 형질 전환 세포의 세포 성장 곡선을 비교한 결과, 일차 세포는 20~22 세대 정도로 분열되는 반면 형질 전환 세포는 계속적인 분열이 일어남을 확인하였다 (Fig. 1). 세포의 형태에서는 섬유아 세포의 형태가 형질 전환 후 짧아진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 또한 PCR 및 southern hybridization을 통해 SV40T를 이용한 형질 전환 세포에서의 SV40T 유전자를 확인하였다 (Fig. 3). 이를 통해 제작한 세포가 SV40T를 함유하고 있음을 알 수 있었다.

2. 세포의 성장 관련 단백질 발현의 비교

형질 분석은 세포 내에 임의로 도입한 SV40T 유전자의

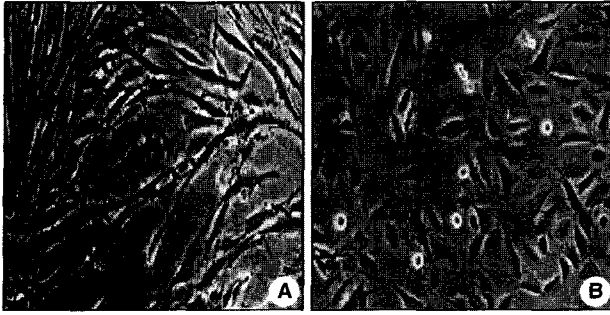


Fig. 2. Morphology of primary and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts. Phase-contrast photomicrographs of primary normal cultures of rabbit corneal fibroblasts (A) and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts (B). An extended life span and the development of a more *in vivo*-like morphology compared to primary rabbit corneal fibroblasts were also observed in SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts. Morphological change at senescent fibroblast cells through microscopic observation was similar to the result observed in other known fibroblast cell lines. Primary rabbit corneal fibroblasts (A): passage 19, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts (B): passage 61.

확인 및 그 유전자에 대한 발현을 알아보고, 세포 내에 있는 SV40T의 목표 물질이자, 동시에 세포 주기에 관여하는 단백질인 Rb의 인산화 및 cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs)의 발현을 확인하는 것으로 진행되었다. 세포에 도입된 SV40T DNA를 확인하였으며, 그 DNA에 대한 단백질의 발현을 western blotting으로 확인하였다. SV40T 발현에 대한 양성 대조군 (positive control)으로서 SV40T가 세포 내부에서 발현되는 COS-7 세포의 lysate를 이용하였고, 실험 결과 일차 세포와는 달리 형질 전환된 세포에서만 SV40T가 발현됨을 확인하였다 (Fig. 4A). 이전의 보고에 의하면 Rb의 인산화 (phosphorylation)는 SV40T에 의한 세포의 불멸화에서 중요한 역할을 한다. 그러므로 SV40T의 세포 내 목표 물질인 Rb의 발현과 SV40T를 통한 Rb의 인산화 정도 및 Rb의 upstream에서 세포 주기 관련 단백질인 p16(INK4a), p21 (WAF1) 및 p27(KIP1)의 발현을 확인하였다 (Fig. 4). 실험 결과, 일차 세포와는 달리 형질 전환된 세포에서 SV40T에 의한 Rb의 인산화를 확인하였다. p16(INK4a)의 경우 SV40T가 세포 내로 삽입되었을 때 발현이 증가하는 것으로 알려져

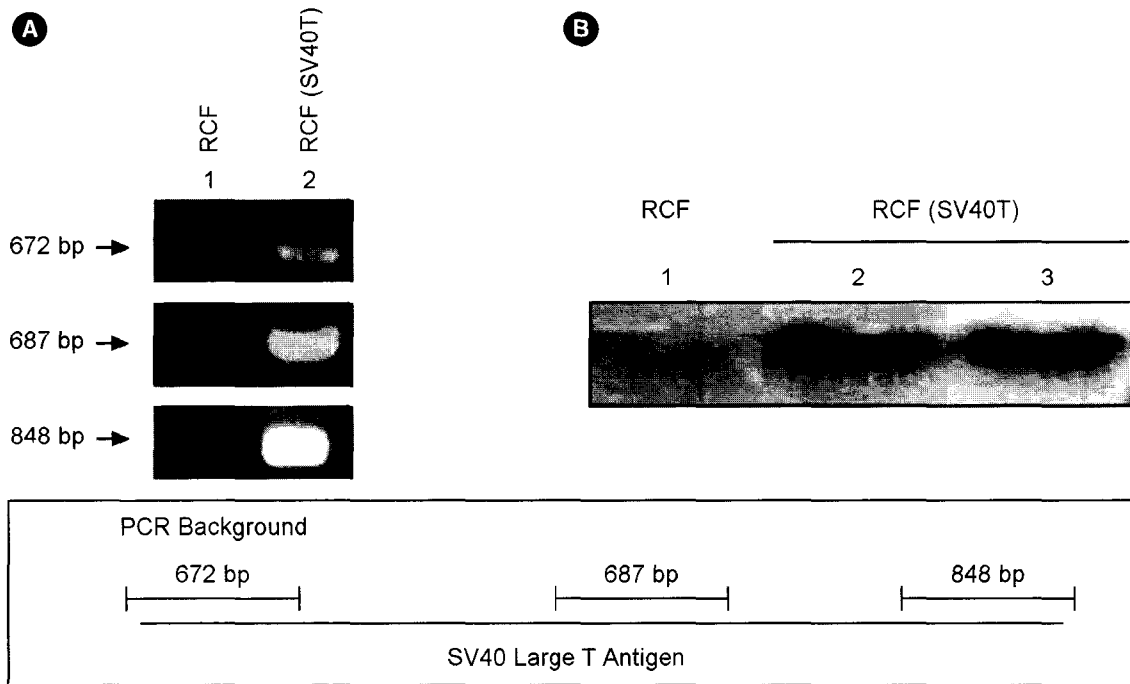


Fig. 3. Confirmation of SV40 large T antigen gene in primary and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts by PCR and Southern Hybridization. It was confirmed that one candidate expresses SV40 large T antigen by using genomic DNA PCR (A) and southern hybridization (B). PCR was performed with genomic DNA isolated from the primary rabbit corneal fibroblasts and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts using specific primers for SV40 large T antigen. Southern probe for SV40 large T antigen was used DNA fragment (687 bp) synthesized by PCR. SV40 large T antigen DNA fragment was labeled with random priming. The genomic DNA were treated with restriction enzyme (*Xho* I, or *Cla* I and *Sal* I). A, SV40 large T antigen partial product by PCR; lane 1, primary rabbit corneal fibroblasts (RCF); lane 2, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF (SV40T)]. B, Southern hybridization; lane 1, primary rabbit corneal fibroblasts (RCF); lane 2, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF (SV40T)]/*Xho* I; lane 3, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF(SV40T)]/*Cla* I and *Sal* I.

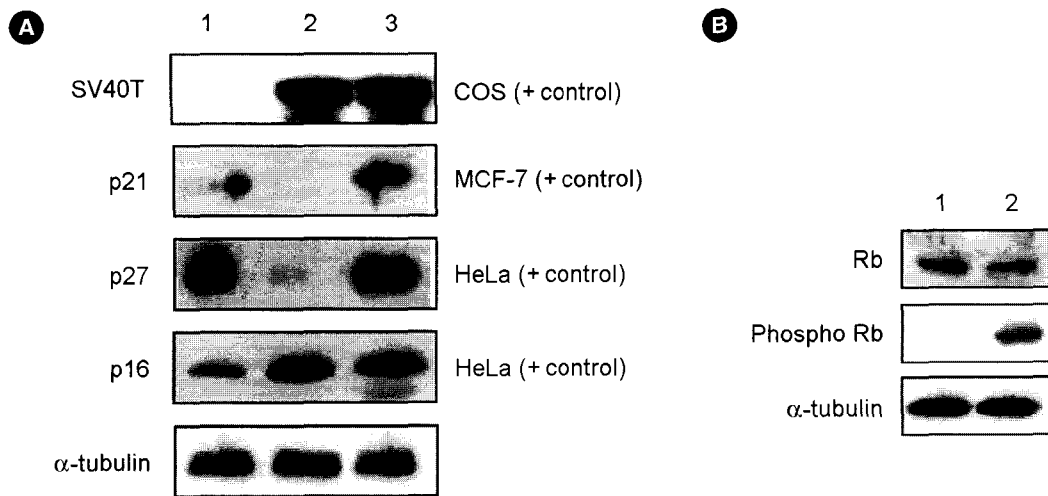


Fig. 4. Expressions of SV40 large T antigen and cell-cycle related proteins. Each expression was measured by western blot analysis. SV40 large T antigen was expressed highly in the SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts as expected (A). To address the molecular mechanism of immortalization, expressions of markers like p21(WAF1), p27(KIP1), and p16(INK4a) were examined. In the SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts, expressions of the p21(WAF1) and p27(KIP1) proteins were undetectable (A). Interestingly, expression of the p16(INK4a) was elevated highly whenever SV40 large T antigen is expressed (A). Unlike primary cells, increase in phosphorylated Rb was observed because of the inhibition effect on Rb by SV40 large T antigen (B). α -tubulin was used for standardization of protein concentration. lane 1, primary rabbit corneal fibroblasts (RCF); lane 2, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF (SV40T)]; lane 3, COS-7 cell lysate (SV40 large T antigen positive control), MCF-7 cell lysate [p21(WAF1) positive control], HeLa cell lysate [p27(KIP1) and p16(INK4a) positive control].

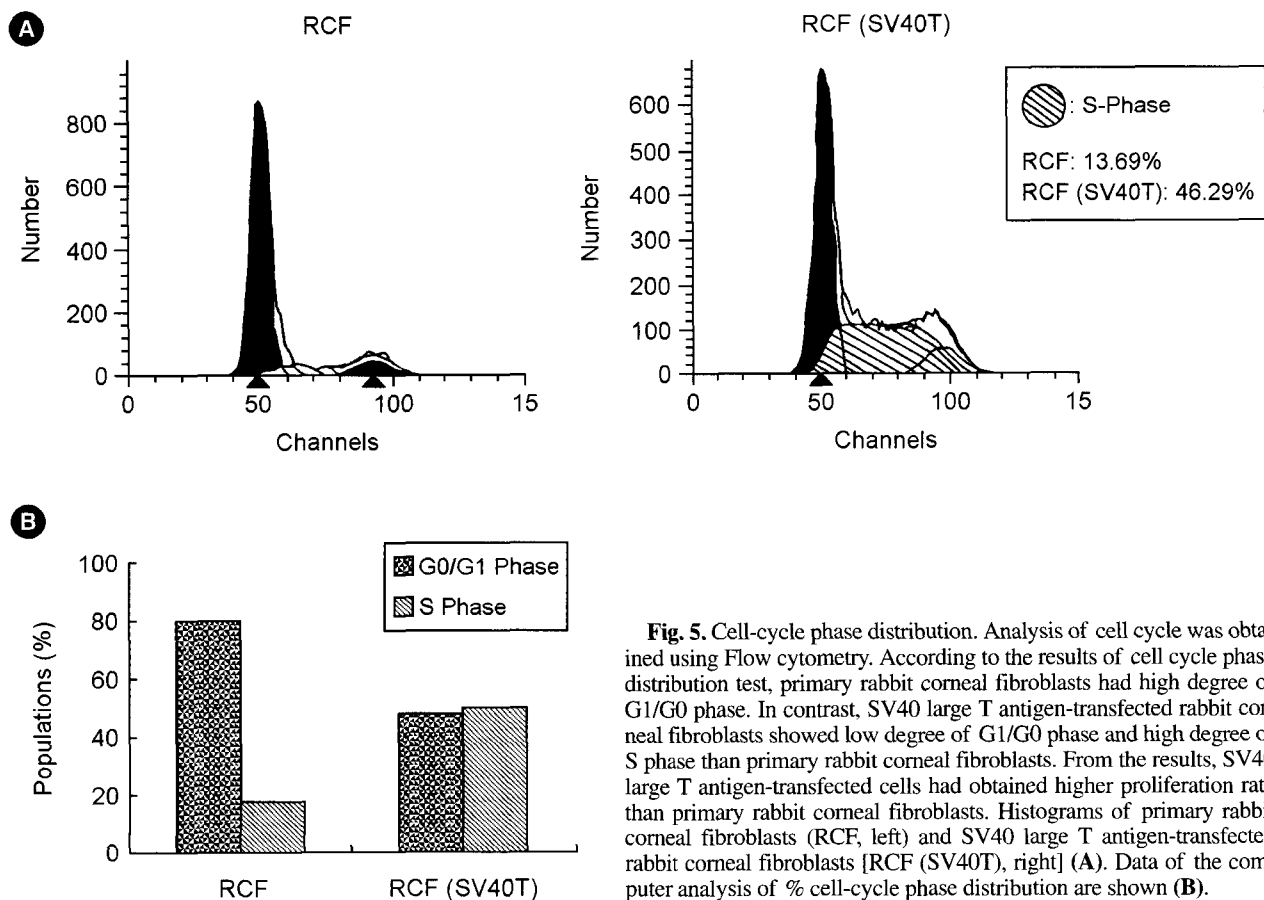


Fig. 5. Cell-cycle phase distribution. Analysis of cell cycle was obtained using Flow cytometry. According to the results of cell cycle phase distribution test, primary rabbit corneal fibroblasts had high degree of G1/G0 phase. In contrast, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts showed low degree of G1/G0 phase and high degree of S phase than primary rabbit corneal fibroblasts. From the results, SV40 large T antigen-transfected cells had obtained higher proliferation rate than primary rabbit corneal fibroblasts. Histograms of primary rabbit corneal fibroblasts (RCF, left) and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts [RCF (SV40T), right] (A). Data of the computer analysis of % cell-cycle phase distribution are shown (B).

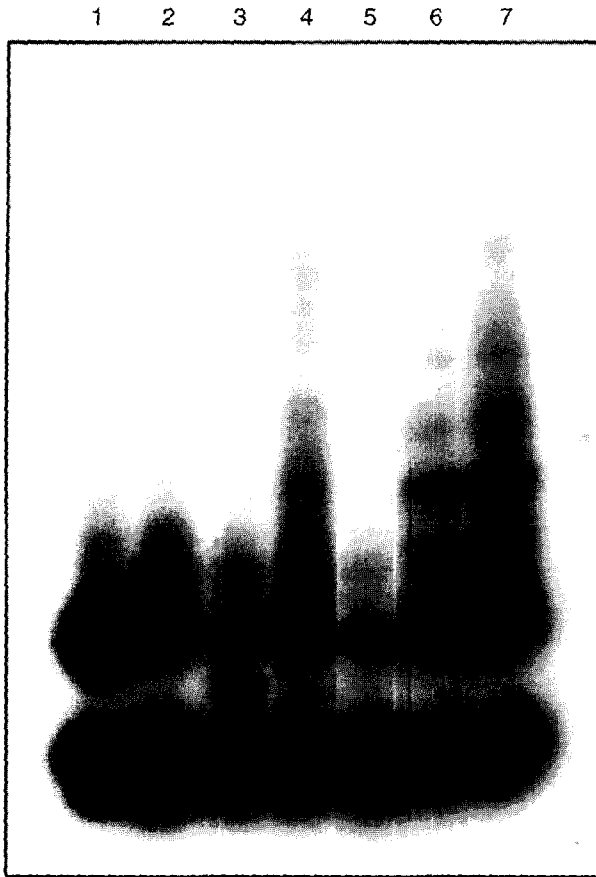


Fig. 6. Analysis of telomerase activity. The activity of telomerase was analyzed with primary rabbit corneal fibroblasts and SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts by using the TRAPeze telomerase detection kit. In telomerase activity assay, the SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts, unexpectedly, shown no significant differences with primary cells. So we assumed that SV40 large T antigen was not able to increase telomerase activity in rabbit corneal fibroblasts. lane 1, primary rabbit corneal fibroblasts (control); lane 2, primary rabbit corneal fibroblasts (heat-inactivated negative control); lane 3, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts; lane 4, SV40 large T antigen-transfected rabbit corneal fibroblasts (heat-inactivated negative control); lane 5, lysis buffer only (negative control); lane 6-7, quantitation controls (lane 6, 1 µg; lane 7, 2 µg).

있고, 결국 SV40T를 이용한 형질 전환 세포에서의 발현 증가를 확인하였다. p21(WAF1)과 p27(KIP1)의 경우 일차 세포와 달리 형질 전환된 세포에서 발현의 감소를 확인하였다. p21(WAF1)의 발현에 대한 양성 대조군으로 MCF-7 세포의 lysate를 이용하였고, p16(INK4a) 및 p27(KIP1)에 대한 양성 대조군으로는 HeLa 세포의 lysate를 이용하였다. 이 결과, 형질 전환된 세포의 세포 주기가 활성화 되었음을 의미하였다. 따라서 세포의 성장 관련 단백질 발현에 관련된 실험의 결과, 일차 세포와는 달리 SV40T에 의해 형질 전환된 세포에서의 세포 주기 활성이 더 큰 것으로 나타났으며, 이것은 세포의 불멸화를 의미하는 것이다.

3. 세포 주기 및 telomerase 활성 비교

형질 분석 과정에서 유세포 분석기를 이용한 일차 세포와 형질 전환된 세포들의 세포 주기를 비교한 결과, 형질 전환 세포에서 G0/G1 기 (phase) 상태가 상대적으로 낮게 나오고 S 기 상태가 높게 나오는 것을 확인하였다 (Fig. 5). 이 결과, 형질 전환된 세포들의 세포 주기 활성이 일차 세포보다 더 크다는 것을 알 수 있었다. 또한 TRAP assay를 통해 telomerase 활성을 측정된 결과 일차 세포와 형질 전환된 세포에서의 차이가 거의 없음을 확인하였다 (Fig. 6). 이것은 SV40T를 이용한 토끼 각막 섬유아 세포의 불멸화에 있어서, 불멸화가 telomerase의 활성에는 영향을 미치지 못하는 것으로 예상하였다.

고 찰

일차 세포의 불멸화는 많은 다양한 방법으로 수행되어 왔다. 세포 성장 관련 신호를 자극하는 방법이나, SV40T 혹은 E6/E7과 같은 DNA 종양 바이러스의 유전자를 도입하는 방법 등이 그것이다^{21,22}. 세포 치료학 분야에서 세포 증식의 활성을 변화시키는 세포의 불멸화 기작에 대하여 연구하는 것이 필수적이기 때문에, 본 연구에서는 토끼의 일차 각막 섬유아 세포에 SV40T를 도입하여 불멸화를 유도하였고, 그 불멸화된 세포의 형질 분석 과정에서 토끼의 일차 각막 섬유아 세포와 형질 전환된 세포 사이에서의 세포 주기 조절 기전의 변화를 비교 분석하였다. SV40T의 세포 내 목표 물질로서 Rb의 발현 변화 및 upstream에서의 관련 물질인 CDKIs의 발현 변화를 비교하였으며, 일차 세포의 형질 전환에 따른 telomerase의 활성도를 측정하였다.

Rb는 세포 내에서 전사 인자인 E2F와 결합하여 E2F의 역할을 통제한다. 이러한 Rb는 세포 주기의 G1에서 S 기로 진행할 때 cyclin/cdk 복합체 [주로 cyclin D1/cdk4 (or cdk6)와 cyclinE/cdk2]에 의해 인산화 되고, 그로 인해, 세포 주기의 S 기에 필요한 유전자의 전사를 유도하는 E2F의 기능이 활성화 된다⁶. SV40T는 세포 내에서 Rb family들과 함께 결합하여 세포 성장의 억류를 막는다. 즉, SV40T에 의해 Rb로부터 E2F가 격리되면 세포 주기에서 S 기로 진행하기 위한 특정 유전자가 발현된다^{13,18}.

세포 내에서 SV40T는 Rb와 직접적인 결합이 이루어지므로 Rb에 관련된 CDKIs를 분석한 결과 일차 세포와 달리 형질 전환된 세포에서 p21(WAF1)과 p27(KIP1)의 발현이 감소된 것을 확인하였다. 따라서 토끼 각막 섬유아 세포의 SV40T에 의한 세포의 불멸화에서, p21(WAF1)과 p27(KIP1)의 발현이 억제되고 그것에 따른 Cyclin/cdk 복합체가 활성화 되어 Rb family들의 인산화가 유도될 것으로 예상하였고, 그것

을 western blotting 결과로써 확인할 수 있었다. 일반적으로 인간의 암세포에서는 p16(INK4a)에 변이가 생기거나 혹은 메틸화 되면 p16(INK4a)의 활성이 억제될 뿐만 아니라 발현도 억제되는데, 그럼에도 불구하고 SV40T에 의해 형질 전환된 세포에서는 p16(INK4a)의 발현이 높게 측정될 수 있다^{7,15,16}. 이 현상은 토끼 각막 섬유아 세포에서도 나타났는데 그 정확한 기작은 아직 밝혀진 바 없다. 결과적으로 SV40T는 토끼 각막 섬유아 세포에서 Rb의 인산화를 통해 세포 주기의 S 기로의 전환을 유도하였고, 그로 인해 SV40T에 의한 세포의 불멸화에서 Rb의 인산화는 그 기작에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

전형적인 세포 배양 조건에서 SV40T를 통한 세포의 불멸화는 한 가지 중요한 특성을 내포한다. 그것은 세포의 colony 형성을 촉진한다는 것이다. 즉 세포의 부착 관련 분자 (adhesion molecules)들의 발현이 조절됨으로써 세포의 모양이 colony 형태로 전환되고, 세포의 부착과는 독립적으로 세포가 성장하게 된다⁵. 토끼 각막 섬유아 세포에서도 형질 전환 후 확인한 세포의 모양에서 일차 세포와는 달리 세포의 크기가 작아지고 형태가 짧아지는 현상을 확인하였다. 이는 일차 세포에 유전자 도입 후 항생제를 이용한 세포 선별 과정에서, 항생제가 세포에 미치는 영향을 배제할 순 없지만, SV40T에 의한 colony 형태의 유도가 더 큰 원인일 것으로 예상된다.

불멸화가 유도된 세포의 telomerase 활성은 높게 측정되는 것이 일반적이거나, SV40T를 통해 유도된 토끼 각막 섬유아 세포는 낮게 측정되었다. 이러한 현상은 세포의 종류마다 차이가 나타날 수 있고, 현재까지 알려진 원인으로는 telomere의 확장을 유도하는데 중요한 역할을 하는 telomerase에 있어서, 특정 종류의 세포에서는 그 주요 요소가 TERT가 아닌 다른 인자가 telomerase의 능력을 조절할 수 있기 때문이다. 그 인자에는 TRF1, TIN2, 그리고 POT1 혹은 그 외 telomerase 전체 효소를 구성하는 다른 구성인자가 포함 될 수 있다^{1,8,19}.

본 연구에서는 SV40T를 이용하여 토끼 각막 섬유아 세포의 불멸화를 유도하였고, 이것은 세포 성장과 관련하여 Rb를 매개로 하는 세포 성장 억류를 차단하는 기작을 통해 이루어짐을 확인하였다. 이러한 각막 섬유아 세포의 불멸화를 유도하여 제작된 세포는 새롭게 개발되는 의약품 독성 검사에 이용될 수 있을 것이고, 현재 발생하는 바이러스에 의한 질병에 관한 연구 및 다른 세포 생물학적 실험에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부 제품화 연구 지원 (01-PJ1-PG4-01PT02-0002) 사업의 지원에 의하여 이루어 졌음.

참 고 문 헌

- 1) Baumann P and Cech TR (2001): Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, **292(5519)**: 1171-1175.
- 2) Brown JP, Wei W and Sedivy JM (1997): Bypass of senescence after disruption of p21(CIP1/WAF1) gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, **277(5327)**: 831-834.
- 3) Campisi J (1997): The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*, **33(5)**: 703-709.
- 4) Dickson MA, Hahn WC, Ino Y, Ronfard V, Wu JY, Weinberg RA, Louis DN, Li FP and Rheinwald JG (2000): Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16 (INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol Cell Biol*, **20(4)**: 1436-1447.
- 5) Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimoniac DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC and Weinberg RA (2001): Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, **15(1)**: 50-65.
- 6) Harley CB, Futcher AB and Greider CW (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345(6274)**: 458-460.
- 7) Huschtscha LI and Reddel RR (1999): p16(INK4a) and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis*, **20(6)**: 921-926.
- 8) Kim S, Kaminker P and Campisi J (1999): TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet*, **23(4)**: 405-412.
- 9) Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA and Klingelutz AJ (1998): Both Rb/p16(INK4a) inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, **396(6706)**: 84-88.
- 10) Martin GM, Sprague CA and Epstein CJ (1970): Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest*, **23(1)**: 86-92.
- 11) Medrano EE, Yang F, Boissy R, Farooqui J, Shah V, Matsumoto K, Nordlund JJ and Park HY (1994): Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes. *Mol Biol Cell*, **5(4)**: 497-509.
- 12) Pipas JM and Levine AJ (2001): Role of T antigen interact-

- tions with p53 in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, **11(1)**: 23-30.
- 13) Saenz-Robles MT, Sullivan CS and Pipas JM (2001): Transforming functions of simian virus 40. *Oncogene*, **20(54)**: 7899-7907.
 - 14) Schneider EL and Mitsui Y (1976): The relationship between *in vitro* cellular aging and *in vivo* human age. *Proc Natl Acad Sci USA*, **73(10)**: 3584-3588.
 - 15) Semczuk A and Jakowicki JA (2004): Alterations of pRb1-cyclin D1-cdk4/6-p16(INK4A) pathway in endometrial carcinogenesis. *Cancer Lett*, **203(1)**: 1-12. Review.
 - 16) Serrano M, Hannon GJ and Beach D (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366(6456)**: 704-707.
 - 17) Stein FH, Drullinger LF, Soulard A and Dulic V (1999): Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **19(3)**: 2109-2117.
 - 18) Tao Y, Kassatly RF, Cress WD and Horowitz JM (1997): Subunit composition determines E2F DNA-binding site specificity. *Mol Cell Biol*, **17(12)**: 6994-7007.
 - 19) van Steensel B and de Lange T (1997): Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, **385(6618)**: 740-743.
 - 20) Vaziri H and Benchimol S (1996): From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol*, **31(1-2)**: 295-301.
 - 21) Wilson SE, Lloyd SA, He YG and McCash CS (1993): Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **34(6)**: 2112-2123.
 - 22) Wilson SE, Weng J, Blair S, He YG and Lloyd S (1995): Expression of E6/E7 or SV40 large T antigen-coding oncogenes in human corneal endothelial cells indicates regulated high-proliferative capacity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36(1)**: 32-40.