

TGIF에 의한 Human cervical cancer oncogene (HCCR) 발현 조절

조 광 원*

한양대학교 의과대학 의생명과학연구원

Received June 15, 2009 / Accepted July 6, 2009

TGIF Site is Involved in Expression of Human Cervical Cancer Oncogene (HCCR). Goang-Won Cho*. *Institute of Biomedical Science, College of Medicine, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul, 133-791, Korea* - Proto-oncogene human cervical cancer oncogene (HCCR) functions as a negative regulator of p53 and contributes to tumorigenesis in various human tissues. However, it is unknown how HCCR contributes to the cellular and biochemical mechanisms of human tumorigenesis. In this study, we showed how the expression of HCCR is modulated. The luciferase activity assay indicated that the HCCR 5'-flanking region at positions -370 to -406 plays an important role in the promoter activity. Computational analysis of this region identified one consensus sequence for the TG-interacting factor (TGIF) located at -390 to -366 (TG). Mobility shift assays (EMSA) revealed that nuclear proteins from K562 bind to the TG site, but not to the mutated TG site. The reporter activity assay with promoter constructs carrying mutated TGIF sequences pGL3-mTGIF significantly increased reporter activities compared to wild type constructs pGL3-406~+30. In this study, we characterized the HCCR promoter and found that HCCR expression was partially regulated by the transcription repressor TGIF, which bound the promoter at positions -390 to -366.

Key words : HCCR, TGIF, transcription repressor

서 론

원암유전자(Proto-oncogene)는 정상세포에서는 세포성장 및 분화의 신호전달계를 조절하여 그 세포의 성장과 분화를 조절한다[2,14,15]. 그러나, 원암유전자의 돌연변이나 생체환경요인에 의한 과발현 유도는 발암유전자(oncogene)로 전환하여[9], 암(cancer)의 전형적인 특성인 연속적인 증식과 전위활성을 보인다[13,15]. 많은 연구자들은 이러한 암의 특성을 이해하고 치료법을 찾기 위하여 수십년 동안 발암 혹은 원암유전자의 유전자 발현 기전을 연구해 왔으나, 암유발에서 유도 가능한 수많은 세포증식 신호전달매체들이 존재하여 이로부터 치료적 단서를 도출하는데 어려움을 겪고 있다.

TG-interacting factor (TGIF)는 Three amino acid loop extension (TALE) 계열의 단백질로 homeodomain을 포함하고 있는 전사억제인자이다[1,17]. 이 homeobox 단백질은 발생과정에서 배아와 성체세포와 조직에서 선택적으로 활성화되어 특정유전자 군집의 발현을 조절하는 중요한 역할을 담당한다[10]. TGIF는 Smad 단백질과 직접적으로 관계하여 Smad가 매개하는 전사활성을 억제한다[16]. 즉, Transforming growth factor-b (TGF-b) [12]에 의해 활성화된 Smad 복합체가 TGIF와 histone deacetylases (HDACs)를 모집하여 Smad target promoter의 활성을 억제한다[5,18].

HCCR은 인간의 자궁경부암세포에서 발암 유전자로 분리하였고[11], 발암원인으로는 발암억제 단백질인 p53 [3,8]의 발암억제기능을 방해하는 것으로 알려져 있다[11]. 또한, HCCR 단백질에 대한 세포내 분포 실험에서 미토콘드리아사립체(mitochondria)의 내막(inner membrane)에 위치한다[7].

본 연구에서는 HCCR의 발현기전을 이해하기 위하여 promoter 영역을 분리하여 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

세포 배양

Human embryonic kidney (HEK)293 (ATCC CRK-1573), K562 chronic myelogenous leukemia (ATCC CCL-243), A549 lung cancer (ATCC CCL-185) 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HEK293는 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 K562와 A549세포는 RPMI에 각각 10% FBS와 1% penstrep (Gibco)를 추가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

Promoter 합성 및 분리

Pfu DNA polymerase (MBI Fermentas, MD, USA)를 이용하여 4개의 다른 HCCR promoter 영역을 합성하였다(Fig. 1). 분리한 promoter 영역을 주형으로 Table 1에 제시한 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였다(Fig. 1). 증폭된 산물은 pGL3-Basic vector의 *Xho*I과 *Kpn*I 사이에 cloning하여 sequencing (GenoTech, Daejeon, Korea)을 통해 염기서열을 확인하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-2-2296-8370, Fax : +82-2-2296-8370

E-mail : gwcho7@hanyang.ac.kr

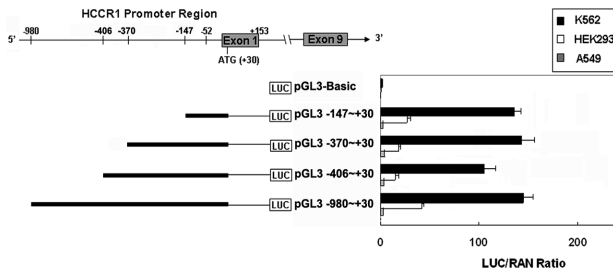


Fig. 1. Expression of the truncated *HCCR* promoter in K562, HEK293, or A549 cells. The DNA constructs containing various lengths of the promoter region were cloned into upstream of the firefly luciferase (LUC) reporter gene. Each luciferase reporter construct shown in the diagram was co-transfected in K562 (filled bars), HEK293 (open bars), and A549 (shadow bars) cells with the pRL-CMV normalizing reporter plasmid encoding with the *renilla* luciferase (RL) gene. The horizontal axis shows the ratio of luciferase to *renilla* activity normalized by LUC/REN displayed by cells co-transfected with pRL-CMV. We designated each recombinant vector as pGL3X~Y, where X is the first base and Y the last base of each truncated promoter ($n > 5$ per construct).

Luciferase (LUC) 정량

K562, HEK293, A549 세포주는 각각의 promoter를 포함하는 200 ng의 pGL3-baseic vector와 internal standard로 40 ng의 pCMV-RL 혼합하여 3 μ l의 Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 함께 co-transfection하였다. 30 hr이 지난 후에 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 각 promoter의 활성을 측정하였다.

돌연변이생성(Mutagenesis)

Mutant plasmid는 pGL3-406~+30을 주형으로 QuikChange

site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)와 mutant oligonucleotides (GenoTech, Table 1)을 이용하여 제공된 매뉴얼에 따라 합성하였다.

핵단백질 추출(Nuclear protein extraction)

Nuclear extraction kit (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 매뉴얼에 따라 각 세포로부터 핵단백질을 추출하였다. 먼저, 1×10^7 세포를 수거하여 500 μ l의 hypotonic lysis buffer에서 4°C에서 15 min 반응하여 세포를 파쇄하였다. 이를 10,000 \times g에서 20 min 4°C에서 원심 분리하여 침전물을 extraction buffer (60 mM HEPES [pH 7.9], 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail)를 이용하여 추출하였다.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

3 μ g의 K562에서 추출한 nuclear extracts를 이용하였고, Double-strand oligonucleotide probes (G36, TG, mTG, Table 1)를 [*r*-32P]ATP (3,000 Ci/mmol [10 mCi/ml]; NEN Life Science products)와 T4 polynucleotide kinase (Invitrogen)로 표지하였다. Probe와 핵단백질 결합은 Gel shift Assay kit (Promega)를 제작사의 매뉴얼에 따라 진행하였다.

결과 및 고찰

암세포주에서 HCCR promoter의 활성분석

앞선 연구에서 *HCCR* 유전자에 대한 promoter 영역을 분리하여 전사시작부위를 확인하였고[6], computational analysis를 이용하여 이 promoter가 TATA box, CAAT box와 다양한 전사인자(transcriptional factor)들이 결합 가능한 자리가 있음을 관찰하였다[4,6]. 본 연구에서는 *HCCR*발현에 중요한 역할

Table 1. Oligonucleotides for promoter cloning and RT-PCR.

Experiments	Oligo name	Sequences 5' → 3'	Positions
Promoter cloning	G3-F	<u>GGGGTACCCCCCTCCTCCGCACTTAGTC</u>	-147 to -128
	G4-F	<u>GGGGTACCCCTACCTAACAGTCGAGGCTCC</u>	-370 to -351
	G5-F	<u>GGGGTACCCCCCTCCTAGCCCCAGGCACTG</u>	-406 to -387
	G6-F	<u>GGGGTACCCCTTTGGGAGGCCAAGGCTGG</u>	-980 to -961
	G1-R	<u>CCCTCGAGGCTTCACAGCGAGAGAAGCGG</u>	+30 to +10
Mutagenesis & EMSA	Mu-F	GGCACTGGCAAACGTCCATCTGCTACCTA	-393 to -365
	Mu-R	TAGGATGCAGATGGACGTTTGCCAGTGCC	-365 to -393
	P36-F	CCTCCTAGCCCCAGGCACTGGCAAACGTGACATCTGC	-406 to -371
	P36-R	GCAGATGTGAGTTTGCCAGTGCCTGGGGCTAGGAGG	-371 to -406
	TG-F	ACTGGCAAACGTGACATCTGCTACCT	-390 to -366
	TG-R	AGGAT GCAGATGTCAGTTTGCCAGT	-366 to -390
	Ery-F	AGGAATCGCGGAGGGTCACTGGG	-294 to -272
Ery-R	CCCAGTGACCCCTCCGCAATTCCT	-272 to -294	

The single or double underlines denote the *Xho*I or *Kpn*I restriction enzyme sites, respectively.

을 담당하는 부위를 검색하기 위하여 promoter 영역의 단백질 합성 시작점 +30에서 5' 쪽 -147, -370, -406, -980까지 각각 합성하여 Firefly luciferase (LUC)를 reporter gene으로 포함하는 pGL3-basic vector에 cloning하였고, 이를 K562, HEK293, A549 세포주에 각각 transfection하여 각각의 reporter의 활성을 측정하였다(Fig. 1). *Renilla luciferase* (RL)를 포함하는 pCMV-RL은 internal standard로 함께 co-transfection하여 LUC값을 RL값으로 normalization하여 결과값을 환산하였다. 측정된 모든 promoter fragment의 활성은 K562에서 가장 높은 활성을 보였지만, HEK293에서는 낮은 활성을, A549에서는 거의 활성이 없음을 관찰하였다(Fig. 1). 실제로, 이들 세포주를 이용한 northern blot결과에서도 일치하는 결과를 얻었다 [11]. 또한, pGL3-406~+30과 pGL3-370~+30의 활성을 비교해보면, 단지 36 bp의 추가로 의미 있는 활성의 감소를 관찰하였다.

여기서 두 가지 결과를 얻을 수 있었다. 첫 번째, 동일한 promoter가 세포주에 따라 전사활성이 크게 차이를 보인다. 이것은 특정 전사인자가 세포에 따라 다르게 발현하거나, 각각의 세포에서 각기 다른 전사인자가 작용하여 전사활성을 조절할 수 있음을 의미한다. 두 번째, promoter 내의 -370~-406사이에 어떤 중요한 전사억제인자를 위한 부위가 존재할 수 있다. 실제로 전사인자가 결합하는지 확인하기 위하여, 합성한 36 bp의 double strand oligo를 probe (P36)로 K562 핵단백질을 이용한 EMSA 분석을 하였다. Fig. 2에 나타난 것처럼, 핵단백질이 결합함을 관찰하였다. 반면, 표기하지 않은 10배

농도의 probe P36를 첨가하면 핵단백질 결합이 방해되고, TGIF에 대한 특이적이 없는 probe Ery (erythroid krueppel like factor; -294~-272)을 첨가한 경우 그 결합이 정상적으로 일어남을 관하였다(Fig. 2).

TIGF site에 핵단백질의 결합

Gene2Promoter (Genomatix)를 이용한 분석에서 36 bp 내에 TG-interacting factor (TGIF)를 위한 transcription consensus motif가 존재함을 확인하였다[4]. 이를 근거로 TGIF에 대한 consensus sequence를 포함하는 oligo probe (TG)를 합성하여 K562 핵단백질을 대상으로 EMSA를 수행하였다. Fig. 3A에서 나타난 것처럼 TG probe에 핵단백질이 결합함을 관찰하였다. 반면, 표기하지 않은 10배 농도의 TG probe (TG)와 함께 반응한 EMSA에서는 관찰되지 않았고, 미표지의 2배의 TG probe (2TG)에서는 일부 결합이 방해됨을 관찰하였다(Fig. 3A).

TGIF 핵단백질의 결합을 확인하기 위해 TG probe의 TGIF에 대한 consensus sequence를 치환한(TGA를 GTC로 치환함) mutant TG probe (mTG)를 제작하여 TGIF와의 결합여부를 관찰하였다. Fig. 3B에서 보여지는 것처럼 정상 서열을 포함하는 probe에서는 정상적인 결합이 일어나지만, 돌연변이를 유도한 mTG에서는 핵단백질의 결합이 일어나지 않음을 관찰하였다(Fig. 3B). 이 결과는 TGIF site에 그것의 consensus sequence를 인식하는 한 개의 단백질이 결합하고, 그 서열의 치환은 TGIF와 같은 전사인자의 결합을 방해함을 의미한다.

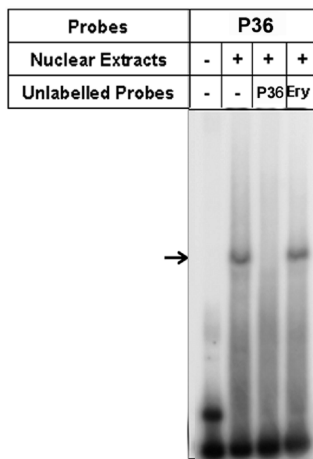


Fig. 2. DNA-binding activity from -370 to -406 region. EMSA were performed using K562 nuclear extracts and double-stranded oligonucleotide carrying from -370 to -406 region (P36). To show the specificity of the bands, 10 times molar excess of cold double-stranded oligonucleotide P36 was used for competition or Ery for non-competition. Arrow indicates the DNA-protein complex with probe P36. The presence or absence of a component in the assay is indicated by a "+" or "-", respectively.

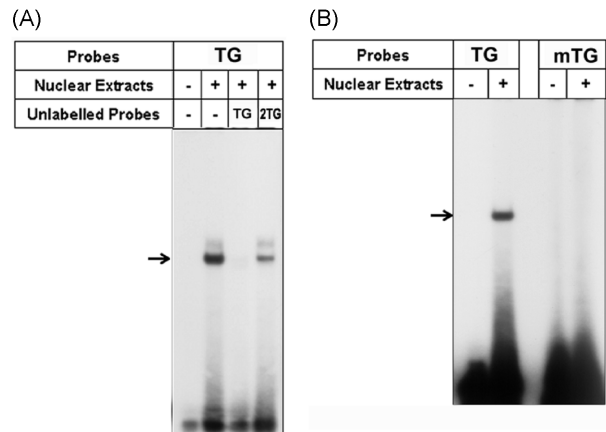


Fig. 3. DNA-binding activity at the TGIF site. EMSA were performed using K562 nuclear extracts and dsDNA harboring a consensus site for HCCR wild-type TGIF (TG) element (A), and a mutated sequence mTG (B). To show the specificity of the bands, 10 or 2 times (indicated as TG or 2TG) molar excess of cold double-stranded oligonucleotide carrying the consensus TG sites was used for competition. Arrow indicates the DNA-protein complex with probe TG. The presence or absence of a component in the assay is indicated by a "+" or "-", respectively.

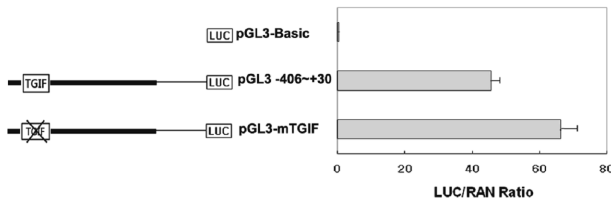


Fig. 4. Mutational analysis of the HCCR promoter. The diagrams depict locations of the predicted transcriptional elements in the HCCR promoter. When mutated, the diagrams are indicated by a cross. "TGIF" indicate the consensus sequences for the TGIF elements. Each luciferase reporter construct was cotransfected in K562 cells with pRL-CMV. The horizontal axis shows the ratio of luciferase (LUC) to renilla (REN) activity normalized by LUC/REN displayed by cells cotransfected with pRL-CMV ($n > 4$ per construct).

TGIF 단백질의 결합과 HCCR promoter의 활성 억제.

앞선 reporter assay에서 TGIF자리가 그 promoter 활성을 억제함을 관찰하였다(Fig. 1). 여기서는, 반대로 TGIF 자리에 핵단백질 결합의 방해가 promoter 활성을 회복 시킬 수 있는지 그 연관성을 확인하였다. 이를 위해, pGL3-406~+30 내에 포함된 TGIF에 대한 consensus sequence 자리를 치환한(TGA를 GTC로 치환함) mutant 돌연변이(pGL3-mTGIF)를 제작하였다(Fig. 4). 이들 promoter 영역을 포함하는 reporter 벡터를 이용하여 K562 세포에서 luciferase reporter assay를 수행하였다. pGL3-mTGIF에서 의미 있는 전사활성의 회복을 관찰하였다(Fig. 4). 이 결과를 종합해 보면, HCCR의 promoter에 TGIF 전사인자가 결합하여 그 유전자 발현을 부분적으로 억제하고, TGIF의 결합을 방해하면 그 활성이 의미 있게 회복됨을 알 수 있다. 하지만, Fig. 1과 4의 결과에서 TGIF자리를 존재 유무에 따라 의미 있게 활성이 변화 하지만 그 차이가 크지 않음을 고려한다면 HCCR 발현 조절에서 TGIF의 역할이 TGIF 단독의 효과라기보다는 또 다른 전사인자가 존재할 수 있으며, 이 자리가 특정 환경에서 이 proto-oncogene을 발현을 조절하는데 관여할 수 있음을 암시한다.

본 연구에서는 HCCR promoter의 특성을 분석하였다. 이 과정에서 -390에서 -366 사이에 TGIF 전사인자 결합하여 전사 활성을 조절함을 관찰하였다.

요 약

원암단백질로 알려진 Human cervical cancer oncogene (HCCR)은 발암억제 단백질인 p53과 작용하여 다양한 암조직에서 암의 유발을 촉진한다. 그러나, 아직 정확한 발암 유도 기전이 알려져 있지 않다. 이러한 의문을 해소하기 위한 일환으로 본 연구에서는 HCCR의 발현이 어떻게 조절되는지를 조사하였다. 이를 위해 먼저 HCCR 5' 쪽의 promoter 영역을 분

리하여 Luciferase assay법을 이용하여 K562, HEK293, A549 세포에서 분석하였고, Promoter의 -370에서 -406사이 36bp의 첨가로 promoter활성이 의미 있게 억제됨을 관찰하였다. 또한, 36 bp만을 포함하는 probe를 이용한 mobility shift assays (EMSA)에서 핵단백질이 결합함을 관찰하였고, 컴퓨터를 이용한 분석에서 TG-interacting factor (TGIF)에 대한 consensus sequences 존재함을 관찰하였다. TGIF 만을 포함하는 probe (TG)와 돌연변이를 유발한 probe (mTG)를 이용한 EMSA에서 이 자리에 TGIF가 결합함을 보였다. 또한, TGIF 자리에 돌연변이를 유발하면(pGL3-mTGIF) 발현의 억제가 회복됨을 관찰하였다. 본 연구에서는 HCCR promoter의 특성을 분석하였고, 이 과정에서 -390에서 -366 사이에 TGIF 전사인자가 결합하여 전사활성을 조절함을 증명하였다.

감사의 글

이 논문은 2005년 교육인적자원부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-206-E00004).

References

- Bertolino, E., B. Reimund, D. Wildt-Perinic, and R. G. Clerc. 1995. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J. Biol. Chem.* **270**, 31178-31188.
- Bishop, J. M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**, 235-248.
- Busby-Earle, R. M., C. M. Steel, A. R. Williams, B. Cohen, and C. C. Bird. 1994. p53 mutations in cervical carcinoma: low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *Br. J. Cancer* **69**, 732-737.
- Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, and A. Klingenhoff. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933-2942.
- Chen, F., K. Ogawa, R. P. Nagarajan, M. Zhang, C. Kuang, and Y. Chen. 2003. Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem. J.* **371**, 257-263.
- Cho, G. W., S. M. Shin, H. Namkoong, H. K. Kim, S. A. Ha, and S. Y. Hur. 2006. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates the HCCR-1 oncogene expression. *Gene* **384**, 18-26.
- Cho, G. W., S. M. Shin, H. K. Kim, S. A. Ha, J. H. Yoon, and J. W. Kim. 2007. HCCR-1, a novel oncogene, encodes a mitochondrial outer membrane protein and suppresses the UVC-induced apoptosis. *BMC Cell Biol.* **8**, 50.
- Crook, T., D. Wrede, J. A. Tidy, W. P. Mason, D. J. Evans, and K. H. Vousden. 1992. Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human-papillomavirus-negative tumours. *Lancet.* **339**, 1070-1073.
- Fearon, E. R. 1992. Genetic alterations underlying colorectal

- tumorigenesis. *Cancer Surv.* **12**, 119-136.
10. Gehring, W. J., M. Affolter, and T. Burglin. 1994. Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 487-526.
 11. Ko, J., Y. H. Lee, S. Y. Hwang, Y. S. Lee, S. M. Shin, J. H. Hwang, and J. W. Kim. 2003. Identification and differential expression of novel human cervical cancer oncogene HCCR-2 in human cancers and its involvement in p53 stabilization. *Oncogene* **22**, 4679-4689.
 12. Massague, J. 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 597-641.
 13. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
 14. Sebastian, T. and P. F. Johnson. 2006. Stop and go: anti-proliferative and mitogenic functions of the transcription factor C/EBPbeta. *Cell Cycle* **5**, 953-957.
 15. Todd, R. and D. T. Wong. 1999. Oncogenes. *Anticancer Res.* **19**, 4729-4746.
 16. Wotton, D., P. S. Knoepfler, C. D. Laherty, R. N. Eisenman, and J. Massague. 2001. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ.* **12**, 457-463.
 17. Wotton, D., R. S. Lo, L.A. Swaby, and J. Massague. 1999. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J. Biol. Chem.* **274**, 37105-37110.
 18. Wotton, D., R. S. Lo, S. Lee, and J. Massague. 1999. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* **97**, 29-39.