

Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 at the Promoter Regions of Oncogenic SETDB1 and FosB Genes

Hyeon Ji Yun, Han-Heom Na and Keun-Cheol Kim*

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Received August 12, 2020 / Revised September 17, 2020 / Accepted September 22, 2020

Treatment with anticancer drugs changes the expression of multiple genes related to cell proliferation, migration, and drug resistance. These changes in gene expression may be connected to regulatory networks for each other. This study showed that doxorubicin treatment induces the expression of oncogenic FosB and decreases the expression of oncogenic SETDB1 in A549 and H1299 human lung cancer cells, which are different in tumor suppressor p53 status. However, a small difference was detected in the quantitative expression of those proteins in the two kinds of cells. To examine the potential regulation of SETDB1 and FosB by p53, we predicted putative p53 binding sites on the genomic DNA of SETDB1 and FosB using a TF motif binding search program. These putative p53 binding sites were identified as 18 sites in the promoter regions of SETDB1 and 21 sites in the genomic DNA of FosB. A luciferase assay confirmed that p53 negatively regulated the promoter activities of SETDB1 and FosB. Furthermore, the results of RT-PCR, western blot, qPCR, and immunostaining experiments indicated that the transfection of exogenous p53 decreases the expression of SETDB1 and FosB in H1299 cells. This indicates that p53 negatively regulates the expression of SETDB1 and FosB at the transcriptional level. Collectively, the downregulation of SETDB1 and FosB by p53 may provide functional networks for apoptosis and for the survival of cancer cells during anticancer drug treatment.

Key words : FosB, negative regulation, p53, promoter, SETDB1

서 론

p53 단백질은 암에서 나타나는 유전체 불안정성 등을 해결하고, 암세포의 사멸을 유도함으로써, 종양 억제 기능을 담당한다[29]. 정상세포에서 p53 유전자의 돌연변이가 생기게 되면 암 발병이 높아질 수 있으며, 많은 종류의 암에서 p53 돌연변이 빈도가 매우 높다고 보고되고 있다[30]. UV에 의해 DNA 손상을 발생하면, p53 단백질의 양적인 증가가 나타나며, 암세포에 항암제 화학요법을 적용할 때에도 활성화 되어, 세포 사멸을 일으킨다[1, 7, 9, 31]. p53은 세포 주기 정지를 유도 하는 중요 단백질로 알려져 있는데, p53은 세포주기 조절 단백질인 p21을 활성화하여, G1기 정지(G1 arrest)를 유도한다[5]. 한편, p53 단백질이 Mouse double minute 2 homolog(Mdm2)과 결합하게 되면, E3 ligase 활성화를 통해 유비퀴틴화 현상으로 분해된다고 알려져 있다[13, 20].

Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1 (SETDB1) 단백질은 히스톤 H3의 라이신 9번잔기의 메틸화를 조절하는 효

소이며, 많은 암에서 SETDB1 유전자의 발현의 증폭 되어 있다고 보고된다[4, 17]. SETDB1은 Wnt/ β -catenin 신호전달 기작을 통해 암세포의 성장을 촉진시키는 종양유전자로서의 기능이 알려져 있다[27]. 또한 SETDB1에 의한 Akt 140, 142 번째 lysine 잔기의 메틸화는 Akt의 카이네이즈(kinase) 활성을 증가시켜 암세포 성장을 증진시킨다[8]. 따라서 폐암 세포에 탁솔(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin) 등 항암제 처리시 SETDB1의 발현이 감소하는 것은 세포사멸 또는 내성 유발에 대한 조절 때문일 것이라고 추정하고 있다[10]. SETDB1은 p53 단백질의 370번째의 lysine 잔기의 메틸화를 유도하여 음성적 조절 기작을 통해 암세포의 성장을 유도한다고 알려져 있으며, 또한 항암제 처리과정에서 p53과 SUV39H1의 조절 기작에 의해 SETDB1의 발현이 감소한다고 알려져 있다[6, 22].

Fos family의 FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B (FosB) 단백질은 Jun family 단백질들과 결합하여 Activator Protein-1 (AP-1) 전사 인자를 형성한다[26]. FosB 발현은 암세포의 성장과 전이와 관련이 있으며, TGF- β 에 의해 발현이 매개되는 FosB는 전립선 암의 전이성, 침윤성을 증가시킨다[3, 25]. miR-144-3p에 의해 FosB의 발현이 증가하고, 이는 췌장암세포의 전이 능력을 증가시킬 수 있다[12]. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) 발현 감소 및 EZH2 inhibitor 처리에 의한 FosB의 발현 증가는 암의 유방암의 악성화에 영향이 있을 것으로 보고되었다[34]. 또한 erk2 활성화에 의해 조절되는 SETDB1은 FosB 프로모터에 직접적으로 결

*Corresponding author

Tel : +82-33-250-8532, Fax : +82-33-259-5665

E-mail : kckim@kangwon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

합하여 FosB 전사 활성을 조절한다고 알려져 있다[16].

p53, SETDB1, FosB 유전자의 발현의 기능적 의미에 대한 연구들이 각각 진행되어 온 것은 주지의 사실이다. SETDB1을 매개로 p53단백질간의 조절 작용에 대한 연구가 진행되어 왔으며, FosB 전사 활성에 대한 조절기작들이 보고되어 있다. 암세포를 대상으로 항암제 처리과정에서 3종의 유전자들의 발현이 급격하게 변화한다고 잘 알려져 있다[10, 17]. 그러나 3종 단백질 간의 조절 기작에 대한 보고는 아직 없지만, 상호 조절 기작에 대한 가능성을 예측할 수 있으며, 본 연구를 통해 조사하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양

인간 폐암 세포주인 A549와 H1299 세포는 한국 세포주 은행으로부터 구입하였으며, 10%의 소 태아 혈청과 1X 페니실린/스트렙토마이신을 포함한 RPMI-1640 (Welgene, Gyeongsan, Korea) 배지에서 배양하였다.

Western blot

배양중인 세포에 독소루비신(SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) 처리 또는 형질전환 후 RIPA 용액(Biosolution, Suwon, Korea)을 넣어 세포를 파쇄하여, 12,500 rpm으로 30분간 원심 분리 하여 단백질 상층액을 얻어 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) 분석에 사용하였다. 단백질 농도 측정은 브래드포드 방법을 이용하여 정량 하였으며, 단백질 분리를 위해 아크릴아마이드가 포함된 젤을 준비하여 전기영동을 수행 하였다. 전기영동으로 분리된 단백질은 Polyvinylidene fluoride (PVDF) Membrane (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 으로 이동하여, 5% Skim milk가 포함된 1X TBST buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0, 0.5% Tween 20)에서 blocking을 수행하였다. FosB (ab11959, Abcam, Cambridge, UK), 또는 SETDB1 (ab107225, Abcam, Cambridge, UK), p53 (sc-126, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 항체를 이용하여 1차 반응을 수행한 후, 1X TBST buffer로 washing을 거쳐, 2차 항체에 반응시켰다. 최종적으로, membrane 을 ECL 용액(GenDEPOT, Texas, USA)으로 감광 시켜, 단백질 발현을 분석하였다.

RT-PCR과 qPCR

배양 세포에 TRI Reagent solution (Ambion, Middlesex County, MA, USA) 을 넣고, 세포를 파쇄한 후, 클로로포름 (Daejung, Shiheung, Korea)를 넣어, 12,000 rpm에서 원심 분리 하였다. 상층액을 옮겨, Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리한 증류수(Biosolution, Suwon, Korea)를 이용하여 RNA를 녹인 후 정량 하였다. Random hexamer 프라이머, 역전사효소

(Enzynomics, Seoul, Korea), 2 mM dNTP (Enzynomics, Seoul, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하여 PCR을 수행하였다. p53, SETDB1, FosB 증폭을 위해 제작된 프라이머를 이용하여 PCR반응을 수행한 후, 1.5% 아가로즈 겔에서 PCR 반응물을 확인하였다. 또한 Power SYBR Green qPCR Master Mix (Applied Biosystems, Fisher Scientific, Cambridge, UK) 를 이용하여 유전자 발현을 정량화 하였다. qPCR결과는 Rotor-Gene Q 2.3.5 프로그램을 이용하여 각 유전자에 대해 역치주기(Ct)를 계산 하였으며, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)를 대조군으로 사용하였다. 유전자 발현은 역치주기(Ct)에서 정의하고 상대 발현 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

면역 염색

커버슬립위에 배양중인 H1299 세포에 p53 과발현 플라스미드를 이입한 후, 100% 메탄올을 이용해 고정하였다. 일정시간 Skim milk를 이용하여 비특이적 항체 결합을 차단하였고, SETDB1 (1:100), FosB (1:100), p53 (1:100)를 이용하여 1차 항체 반응을 진행하였다. 2차 형광 염색은 Alexa 555 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, Middlesex County, MA, USA)와 Alexa 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, Middlesex County, MA, USA)를 사용하였다. DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 세포 핵을 염색한 후, Imm-mount (Fisher Scientific, Cambridge, UK) 시약을 이용해 슬라이드글라스를 준비하여 강원 연계형 융합 이미징 특화센터가 보유한 공초점 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다.

Transient transfection 및 프로모터 활성도 분석

배양중인 H1299 세포에 lipofectamine2000 (Invitrogen, Middlesex County, MA, USA) 과 클로닝된 pGL3-Luc 플라스미드, pCDNA-p53 등을, 혼합하여 이입시킨 후 luciferase 분석을 통해 프로모터 활성도를 분석하였다. Luciferase 분석은 reporter lysis buffer (Promega, Madison, Wisconsin, USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였으며, luciferase assay 기질과 반응시켜, luminometer로 측정하였다. 평균 활성도는 3번의 실험 결과로부터 평균과 표준편차 값으로부터 분석하였으며, β -galactosidase를 이용하여 luciferase 활성 수치를 보정하여 사용하였다.

프로모터 subcloning

pGL3-SETDB1-P1-Luc와 pGL3-FosB-P1-Luc의 경우에, 이전에 클로닝된 플라스미드를 사용하였다[16, 21]. SETDB1-P2 (-1862 ~ -1293), SETDB1-P3 (-1292 ~ +33) 플라스미드는 SETDB1-P1로부터 subcloning 하여 사용하였다. FosB-P1로부터 FosB-P2 (-530 ~ -300), FosB-P3 (-300 ~ +73)를 subcloning 하였

으며, FosB-D (-1555 ~ -530)은 IMR90 세포의 genomic DNA 를 주형으로 한 PCR 증폭을 통하여 클로닝하였다. PCR 증폭 산물을 TA 벡터로 클로닝한 후, 다시 제한 효소를 이용하여 pGL3-Luc에 sub-cloning을 진행하였다.

통계 분석 방법

모든 실험은 3회 이상 반복 진행하였으며, Excel 프로그램 으로 평균 및 표준오차(Mean ± SEM)를 계산하였다. Prism 5.0 프로그램을 이용하여 unpaired student's t test로 통계적 유의 성을 검정하였고, p-values를 사용하여 표기하였다(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

결 과

p53 유무에 따른 SETDB1과 FosB의 발현

p53 유전자와 SETDB1, FosB의 발현 조절의 상관 관계를 조사하고자, p53이 발현되는 A549 폐암 세포와 p53유전자가 돌연변이 되어 발현이 되지 않는 H1299세포를 대상으로 독소 루비신을 처리하였다. 두 종의 세포에 2 μM 독소루비신을 처 리 한 후 Western blot을 수행하였다. A549 세포에서는 p53 단백질이 급격히 증가하였으며, SETDB1 유전자 발현은 감소 하고, FosB의 발현은 증가하는 현상을 확인하였다(Fig. 1A). 그러나, p53 발현이 없는 H1299 세포는 독소루비신 처리에 의해 p53 단백질의 발현이 나타나지 않았으며, FosB 단백질의 발현이 크게 증가하였음을 확인하였다. 그러나 독소루비신 을 처리한 H1299 세포에서 SETDB1의 발현에는 큰 변화가 없 음을 알 수 있었다(Fig. 1B). 즉 p53의 존재 유무에 따라 항암제 처리에 따른 SETDB1과 FosB 발현의 양적인 차이가 발생하는

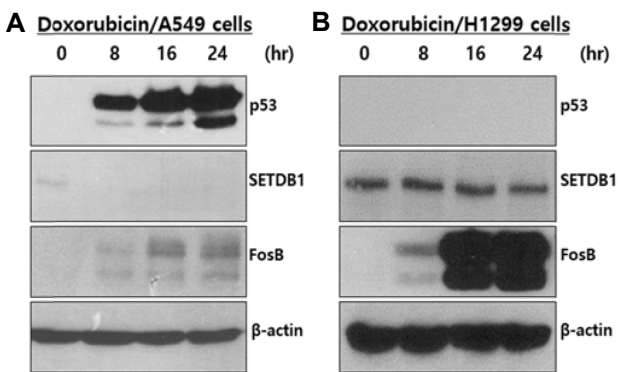


Fig. 1. Expression of SETDB1 and FosB by doxorubicin treatment in p53 positive or negative human lung cancer cells. (A) p53 positive A549 cells were treated with 2 μM doxorubicin in time-dependent manner. Expression of SETDB1 and FosB were examined using Western blot analysis. (B) p53 negative H1299 cells were treated with doxorubicin and subjected to western blot analysis for expression of SETDB1 and FosB.

것으로 보아, p53 단백질과 SETDB1, FosB 발현에는 상관관계 가 있을 것으로 추측할 수 있다.

p53에 의한 SETDB1유전자 발현 조절

p53발현이 SETDB1 유전자 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여, TF motif binding search (http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 프 로그램을 이용하여 SETDB1의 프로모터 부위(-1426 ~ +1)를 대 상으로 p53 단백질의 결합가능성을 분석하였다. p53 결합 보 존 서열인 5'-GGGCGAT-3', 5'-GGGCTCA-3', 5'-GTTGCC- 3'등이 SETDB1 프로모터 지역에 총 18부위가 존재함을 확인 하였다(Fig. 2A). H1299세포에 pGL3-SETDB1-P1-Luc를 이입 시켜, p53에 의한 SETDB1 프로모터 활성 조절을 분석 한 결과, p53 과발현에 의해 SETDB1 프로모터 활성도가 현저하게 감소 하는 현상을 확인하였다(Fig. 2B). 이러한 현상은 p53 단백질 이 SETDB1 프로모터 활성을 감소시키는 역할을 하고 있음을 의미한다. 한편, SETDB1-P1 프로모터를 SETDB1-P2 (-1862 ~ -1293), SETDB1-P3 (-1292 ~ +33)로 subcloning하여 H1299 세 포에 이입시켜, 프로모터 활성도를 측정하였다. 그 결과, P2, P3의 경우에는 p53의 존재 유무와 상관없이 프로모터 활성도 에서는 큰 변화가 없었다(Fig. 2C). 이러한 결과는 p53 단백질 은 SETDB1 프로모터 부위의 광범위한 범위에 결합하여 SETDB1의 발현을 음성적으로 조절하고 있을 것으로 사료된다.

p53에 의한 FosB 유전자 발현 조절

한편, p53에 의한 FosB 유전자 발현 조절기작을 분석하고 자, FosB 프로모터부위에 대한 p53 단백질 결합부위를 분석하 였다. FosB 프로모터 -1,500 ~ +1 부위를 대상으로 약 21 개의 p53 예상 결합 부위가 동정되었으며, 특히 -530 ~ +1 부근에 집중되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 3A). H1299 세포에 pcDNA p53과 pGL3-FosB-P1-Luc 를 이입하여 프로모터 활성도를 측 정한 결과, p53 과발현에 의하여 FosB 프로모터 활성도가 감 소한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 또한 FosB-D(-1555~ -530), FosB-P2 (-530 ~ -300), FosB-P3 (-300 ~ +73) 등의 sub-cloning 된 플라스미드를 이용하여 각 부위별로 p53 단백질에 의한 조절 기작을 분석하였다. 전사 개시점 근처(proximal) 부 위에 해당하는 FosB-P1, FosB-P2의 경우 p53 과발현에 의해 활성도가 감소하였으며, 특히 FosB-P2의 활성도 감소는 FosB-P1 활성도 감소와 동등한 감소 현상을 나타내었다. 그러 나, p53 과발현에 의한 FosB-D1 활성도 변화는 전혀 없었다 (Fig. 3C). 따라서, p53 과발현에 의해 FosB 유전자 발현은 음 성적으로 조절되고 있으며, 이때, FosB 프로모터의 전사 개시점 근처 부위가 활성도 조절에 중요하다고 생각된다.

p53 과발현에 의한 SETDB1과 FosB 발현 변화

p53의 과발현이 SETDB1과 FosB 발현에 어떠한 영향을 미

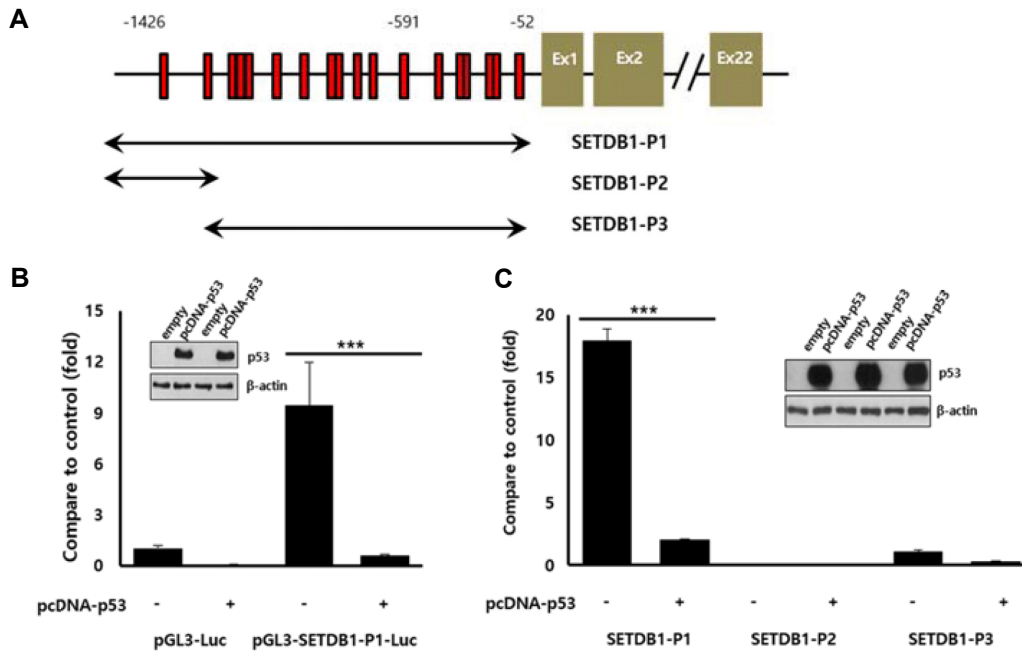


Fig. 2. Changes of SETDB1 promoter activity by p53 (A) Putative p53 binding sites in SETDB1 promoter region were identified using TF motif binding search program. Partial P2 and P3 were prepared from SETDB1-P1 plasmid. (B) H1299 cells was transfected with p53 overexpression vector and SETDB1-P1 plasmid. SETDB1 promoter activity was measured using luciferase assay. Inset; p53 overexpression was confirmed using Western blot analysis. (C) H1299 cells were transfected with p53 overexpression vector and three plasmids including P1, P2, and P3. Inset; p53 overexpression was confirmed using Western blot analysis (p-values: *** $p < 0.001$).

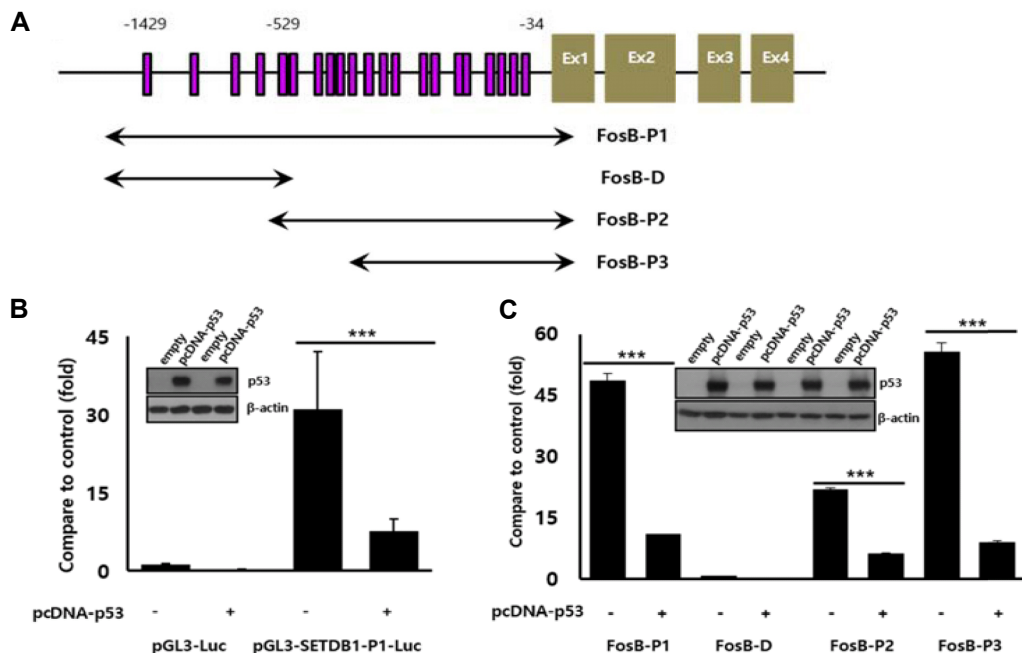


Fig. 3. Changes of FosB promoter activity by p53 (A) Putative p53 binding sites in FosB promoter region were identified using TF motif binding search program. Partial D, P2 and P3 were prepared from FosB-P1 plasmid. (B) H1299 cells was transfected with p53 overexpression vector and FosB-P1 plasmid. FosB promoter activity was measured using luciferase assay. Inset; p53 overexpression was confirmed using Western blot analysis. (C) H1299 cells were transfected with p53 overexpression vector and four plasmids including P1, P2, P3 and D. Inset; p53 overexpression was confirmed using Western blot analysis (p-values: *** $p < 0.001$).

치는지를 조사하고자 RT-PCR과 Western blot 실험을 수행하였다. H1299 세포에 p53을 과발현 시켰을 때, 한 후 SETDB1과 FosB의 mRNA 발현은 감소하였다(Fig. 4A). 또한 western blot 을 수행한 결과 p53 과발현에 의해 SETDB1과 FosB의 단백질 발현 역시 감소 됨을 확인할 수 있었다. SETDB1과 FosB의 mRNA발현의 감소를 정량화 하기 위해 qPCR을 진행하였다. 그 결과 p53 과발현에 의해 SETDB1유전자의 경우 약 45%, FosB 유전자 발현은 30% 정도 mRNA 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 4B). immunostaining 실험을 통해 p53 과발현에 의해 세포에서 SETDB1과 FosB 의 발현이 감소되는 현상도 확인하였다(Fig. 4C, Fig. 4D). 그러므로, p53은 SETDB1과 FosB의 발현에 대해 음성적 조절 기작이 있다고 사료된다.

고 찰

종양억제유전자p53은 암세포의 세포사멸을 조절하거나 세포 주기를 조절하여 암세포의 사멸을 유도하는 반면, 암종양 유전자로 기능하는SETDB1은 암세포의 성장, 전이, 침윤성을 증가시킨다고 보고되고 있다[11, 33]. 한편, FosB는 신경계통 관련 약물들 코카인, 도파민 등 약물에 의해 발현이 증가된다고 알려져 있으며, 또한 이러한 신경계에 관여하는 알코올, 아세틸콜린 같은 콜린성 약물, 아트로핀, 에피네프린 같은 약물에 만성적으로 중독되었을 때 뇌에서 FosB의 발현이 증가하

며, 여러 암에서 항암제 처리에 의해 과발현 된다고 보고 되고 있다[11, 18, 19, 23]. p53에 의한 SETDB1 의 음성적 조절 기작에 대한 연구가 알려져 있으며, 항암제 처리과정에서 SETDB1에 의한 FosB발현의 하향 조절 기작에 대해 보고된 바 있다[17, 22]. 하지만 p53에 의해 FosB가 조절된다는 이전 연구는 없었지만, p53, SETDB1, FosB의 발현 조절은 상호 네트워크를 이루고 있을 가능성이 높다고 추측되고 있다. 따라서 본 연구는 p53 를 매개로 하는 SETDB1, FosB 유전자들의 발현 조절 기작에 대해 조사하고자 하였다. p53, SETDB1, FosB 유전자들은 독소루비신 항암제에 의해 발현 증가 또는 감소 된다. 흥미로운 사실은 p53 null H1299세포에서 독소루비신에 의한 FosB 발현이 A549세포에 비해 크게 증가했다. 이러한 결과는 p53 단백질에 존재 유무에 따라 FosB 발현의 양적이 차이가 나는 것으로 추정되며, FosB 의 발현이 p53 단백질에 의존적인 발현 양상과 함께, 비의존적인 발현 조절 기작 모두 존재하고 있음을 예상할 수 있다. 또한 SETDB1은 A549 세포에 비해 H1299세포에서 발현 감소 경향이 없어진 것을 확인하였다. 즉 p53 존재여부에 따라 SETDB1과 FosB의 발현의 양적인 변화가 발생하는 현상은 p53단백질에 의해 직접 또는 간접적으로 의존하는 조절 기작이 있음을 예상할 수 있다. SETDB1과 FosB 프로모터 부위에 p53 단백질 결합가능성을 분석해 본 결과, SETDB1 프로모터 지역에는 약 18개 부위의 p53결합 가능성이 분석된 반면, FosB 프로모터 지역에는 21개 부위가 존

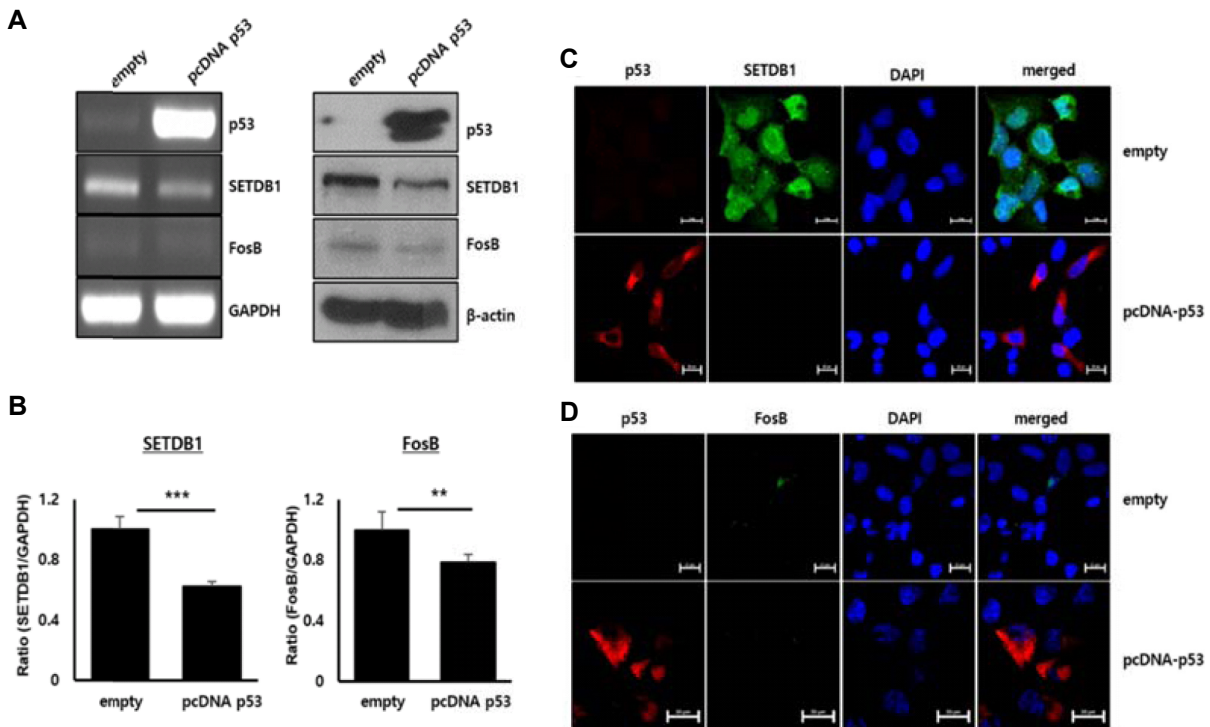


Fig. 4. Expression of SETDB1 and FosB by p53 transfection. H1299 cells were transfected with empty vector or pCDNA3-p53 over-expression vector. Expression of SETDB1 and FosB were confirmed by RT-PCR, and Western blot (A), qPCR (B), and immunostaining (C, D). (p-values: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), Scale bar; 20 μ m.

제하는 것으로 예상되었다. 그 예측 부위를 포함한 SETDB1과 FosB 유전자의 프로모터 부분을 클로닝하고 luciferase assay를 수행한 결과, p53단백질이 SETDB1, FosB 두 유전자의 프로모터에 대해 하향 조절을 확인할 수 있었다. 또한 p53에 의한 SETDB1 프로모터 활성조절기작은 약 2kb 전체 프로모터 지역에서 p53 단백질의 결합이 중요하다는 사실을 확인하였다. 그러나, p53에 의한 FosB프로모터 활성조절에는 FosB 전사의 시작점 (+1) 부위 근처에서 p53단백질 결합이 중요하다는 사실도 알 수 있었다.

A549 폐암세포에서 p53 단백질은 SETDB1의 발현을 하향 조절하며, SETDB1 단백질은 FosB 발현을 조절한다[17]. 한편 FosB가 제거된 MDA-MB-231 유방암세포에서 p53 발현도 영향을 받는다고 보고된 바 있다[34]. 이러한 연구들은 p53, SETDB1, FosB 간의 상호 조절 기작에 대한 가능성을 예측할 수 있을 것이다. 종양 억제 유전자인 p53유전자는 항암제 처리 과정 동안 전사인자로서 기능하면서, Bcl2와 Bax유전자들을 통해 세포사멸을 조절하고, p21과 CDK 등의 세포주기관련 유전자 발현을 조절한다고 잘 알려져 왔다[14, 24]. p53은 CD95 (APO-1/Fas)를 활성화 시켜 DNA damage를 조절한다[15]. p53단백질은 여러 표적 유전자들의 발현을 통해서 세포 성장, 사멸, DNA damage 등에 대한 조절 기작을 나타내는 것으로 보이며, 반응하는 항암제 처리과정에서 조절되는 SETDB1, FosB 에 대한 p53조절기작도 역시 세포의 사멸을 촉진하는 양성적 방향으로 진행하거나, 또는 항암제내성을 일으키기 위한 음성적 전사 조절기작으로 추측할 수 있다. SETDB1은 히스톤 메틸화 등과 같은 후성학적 조절 기작을 통해 간암 세포, 전립선암세포등에서 암세포 성장을 조절한다[28]. 또한 흑색종에서도 SETDB1의 발현이 증폭되어 있으며, 이로 인해 암의 악성화를 가속화시킨다[4]. p53에 의한 SETDB1의 발현 조절 기작은 세포 사멸 등을 유도하기 위한, 항암효과를 높이기 위한 조절기작으로 진행되는 것으로 사료된다. 그러므로 항암 치료과정에서 p53 발현을 높이고, SETDB1의 발현을 낮추는 전략으로 치료제를 개발하는 것도 중요할 것이다. 원종양유전자로 알려진 FosB의 아미노산 41번~73번 위치의 서열이 transforming activity를 증진시킨다고 보고되었으며, 유방암 환자에게서 FosB 발현은 암의 진행 상태에 따라 발현이 증가되는 양상을 보인다고 알려져 있다[2, 32]. 본 연구를 통하여 독소루비신 처리에 의해 p53 발현이 나타나는 A549 세포에서는 FosB 발현이 나타났지만, p53 발현이 나타나지 않은 H1299 세포에서 FosB 발현이 급격하게 나타남을 알 수 있었다. 즉 FosB 유전자는 p53 단백질에 의해 음성적으로 조절 되기 때문에 나타나는 현상일 것이라 예상하며, p53에 의한 FosB 발현 조절 기작은 세포 사멸 진행을 조절하는 음성적 조절 기작일 것으로 사료된다. 하지만, 이전 연구에 의해 보고된 항암제 처리과정 동안 SETDB1 감소에 의해 나타나는 FosB 발현 증가는 항암제에 의한 세포 사멸에 대한

반작용으로 나타나는 현상으로 예상될 수도 있다.

항암제 처리과정에서 유전자 발현에 대한 연구들이 진행되어온 것이 사실이다. 본 연구는 항암제에 의해 발현이 증가하는 p53 단백질은 SETDB1, FosB를 하향 조절 할 수 있는 기능적 연관성이 있다는 결과를 제시하며, 연관성의 기능적 의미는 추후 연구들을 통해 좀더 규명될 필요가 있으며, 항암 치료를 위한 효율적인 표적 네트워크 단백질에 대한 새로운 전략들이 수립되기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 지역대학우수과학자 지원사업(2016R1D1A3B02006754)으로 수행되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J. and Strasser, A. 2018. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* **25**, 104-113.
2. Bamberger, A., Methner, C., Lisboa, B. W., Städtler, C. H., Schulte, M., Löning, T. and Milde Langosch, K. 1999. Expression pattern of the AP 1 family in breast cancer: Association of fosB expression with a well differentiated, receptor positive tumor phenotype. *Int. J. Cancer* **84**, 533-538.
3. Barrett, C. S., Millena, A. C. and Khan, S. A. 2017. TGF- β effects on prostate cancer cell migration and invasion require FosB. *Prostate* **77**, 72-81.
4. Ceol, C. J., Houvras, Y., Jane-Valbuena, J., Bilodeau, S., Orlando, D. A., Battisti, V., Fritsch, L., Lin, W. M., Hollmann, T. J. and Ferré, F. 2011. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. *Nature* **471**, 513-517.
5. Donehower, L. A. 2014. Phosphatases reverse p53-mediated cell cycle checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 7172-7173.
6. Fei, Q., Shang, K., Zhang, J., Chuai, S., Kong, D., Zhou, T., Fu, S., Liang, Y., Li, C. and Chen, Z. 2015. Histone methyltransferase SETDB1 regulates liver cancer cell growth through methylation of p53. *Nat. Commun.* **6**, 1-12.
7. Fridman, J. S. and Lowe, S. W. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-9040.
8. Guo, J., Dai, X., Laurent, B., Zheng, N., Gan, W., Zhang, J., Guo, A., Yuan, M., Liu, P. and Asara, J. M. 2019. AKT methylation by SETDB1 promotes AKT kinase activity and oncogenic functions. *Nat. Cell Biol.* **21**, 226-237.

9. Han, E. S., Muller, F. L., Pérez, V. I., Qi, W., Liang, H., Xi, L., Fu, C., Doyle, E., Hickey, M., Cornell, J., Epstein, C. J., Roberts, L. J., Van Remmen, H. and Richardson, A. 2008. The *in vivo* gene expression signature of oxidative stress. *Physiol. Genomics* **34**, 112-126.
10. Lee, J. and Kim, K. 2013. DZNep, inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase, down-regulates expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 647-652.
11. Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R. and Gu, W. 2012. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* **149**, 1269-1283.
12. Liu, S., Luan, J. and Ding, Y. 2018. miR-144-3p Targets FosB Proto-oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit (FOSB) to suppress proliferation, migration, and invasion of PANC-1 pancreatic cancer cells. *Oncol. Res.* **26**, 683-690.
13. Michael, D. and Oren, M. 2003. The p53 - Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 49-58.
14. Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H., Liebermann, D. A., Hoffman, B. and Reed, J. C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **9**, 1799-1805.
15. Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P. H. 1998. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.* **188**, 2033-2045.
16. Na, H. H., Kang, Y. S. and Kim, K. C. 2017. Cloning and activity analysis of the FosB promoter region from human genomic DNA. *J. Life Sci.* **27**, 857-863.
17. Na, H. H., Noh, H. J., Cheong, H. M., Kang, Y. S. and Kim, K. C. 2016. SETDB1 mediated FosB expression increases the cell proliferation rate during anticancer drug therapy. *BMB. Rep.* **49**, 238-243.
18. Nestler, E. J. 2004. Molecular mechanisms of drug addiction. *J. Neurosci.* **47**, 24-32.
19. Nestler, E. J. and Malenka, R. C. 2004. The addicted brain. *Sci. Am.* **290**, 78-85.
20. Nihira, N. T., Ogura, K., Shimizu, K., North, B. J., Zhang, J., Gao, D., Inuzuka, H. and Wei, W. 2017. Acetylation-dependent regulation of MDM2 E3 ligase activity dictates its oncogenic function. *Sci. Signal.* **10**, 1126.
21. Noh, H., Kim, K., Cho, H., Chang, Y., Jang, W. H., Seog, D., Kim, J., Kim, B., Kwon, H. and Kim, Y. 2014. Promoter cloning of human SETDB1 gene utilizing bioinformatic programs. *J. Life Sci.* **24**, 1-7.
22. Noh, H. J., Kim, K. A. and Kim, K. C. 2014. p53 down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 43-48.
23. Ruffle, J. K. 2014. Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ) FosB about? *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **40**, 428-437.
24. Seoane, J., Le, H. and Massagué, J. 2002. Myc suppression of the p21 Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**, 729-734.
25. Shahzad, M. M., Arevalo, J. M., Armaiz-Pena, G. N., Lu, C., Stone, R. L., Moreno-Smith, M., Nishimura, M., Lee, J. W., Jennings, N. B., Bottsford-Miller, J., Vivas-Mejia, P., Lutgendorf, S. K., Lopez-Berestein, G., Bar-Eli, M., Cole, S. W. and Sood, A. K. 2010. Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* **285**, 35462-35470.
26. Siderovski, D. P., Blum, S., Forsdyke, R. E. and Forsdyke, D. R. 1990. A set of human putative lymphocyte G0/G1 switch genes includes genes homologous to rodent cytokine and zinc finger protein-encoding genes. *DNA Cell Biol.* **9**, 579-587.
27. Sun, Q., Ding, L., Xiao, J., Chien, W., Lim, S., Hattori, N., Goodglick, L., Chia, D., Mah, V. and Alavi, M. 2015. SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signaling pathway. *J. Pathol.* **235**, 559-570.
28. Sun, Y., Wei, M., Ren, S. C., Chen, R., Xu, W. D., Wang, F. B., Lu, J., Shen, J., Yu, W. J., Hou, G., Xu, C. L., Huang, J. T. and Sun, Y. H. 2014. Histone methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion. *Asian J. Androl.* **16**, 319-324.
29. Surget, S., Khoury, M. P. and Bourdon, J. C. 2013. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther.* **7**, 57-68.
30. Toufekhtchan, E. and Toledo, F. 2018. The guardian of the genome revisited: p53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel)* **10**, 135.
31. Williams, A. B. and Schumacher, B. 2016. p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, 10.
32. Wisdom, R. and Verma, I. M. 1993. Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2635-2643.
33. Wu, P. C., Lu, J. W., Yang, J. Y., Lin, I. H., Ou, D. L., Lin, Y. H., Chou, K. H., Huang, W. F., Wang, W. P., Huang, Y. L., Hsu, C., Lin, L. I., Lin, Y. M., Shen, C. K. and Tzeng, T. Y. 2014. H3K9 histone methyltransferase, KMT1E/SETDB1, cooperates with the SMAD2/3 pathway to suppress lung cancer metastasis. *Cancer Res.* **74**, 7333-7343.
34. Xu, H., Zhang, R., Li, X., Liu, Z., Wang, Y. and Zhang, H. 2020. EZH2 inhibitors-mediated epigenetic reactivation of FOSB inhibits triple-negative breast cancer progress. *Cancer Cell Int.* **20**, 175.

초록 : 암종양유전자 SETDB1과 FosB 발현에 대한 p53의 음성 조절기작

윤현지 · 나한흠 · 김근철*

(강원대학교 자연과학대학 생명과학과)

암세포에 항암제를 처리하게 되면, 세포증식, 이동성 또는 약물 내성과 관련된 많은 유전자들의 발현 변화가 발생하며, 유전자 발현 변화는 상호간의 조절 네트워크에 의해 밀접하게 연결될 수도 있다고 추측된다. 본 연구에서 p53 유전자 유무가 다른 A549와 H1299 인간 폐암세포에 독소루비신을 처리하면, 원종양유전자인 FosB의 발현은 증가하지만, 원종양유전자인 SETDB1의 발현은 감소하지만, 단백질 발현의 양적인 차이가 발생한다는 사실을 알 수 있었다. TF motif binding 분석 프로그램을 이용하여 SETDB1과 FosB 프로모터지역에서의 p53단백질의 결합가능성을 분석한 결과, SETDB1의 경우 18부위, FosB의 경우 21 부위의 p53 결합부위를 예측할 수 있었다. SETDB1과 FosB 프로모터의 subcloning하여 luciferase 분석을 수행한 결과, p53은 SETDB1과 FosB를 음성적으로 조절한다는 사실을 알 수 있었다. 또한, H1299 세포에 p53의 과발현은 SETDB1 과 FosB의 발현을 감소시킬 수 있음을 RT-PCR, western blot, qPCR, 면역염색 실험을 통해 확인하였다. 이러한 결과를 종합하여 본다면, p53에 의한 SETDB1과 FosB 유전자 발현 조절은 항암제 처리과정에서 나타나는 암세포의 사멸과 생존에 대한 기능적 조절 네트워크로 사료된다.