



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

Doxorubicin 유도 조기세포노화
모델에서 TIS21 유전자 발현이
세포골격 단백질 actin 변형에
미치는 영향

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

김 빛 나

Doxorubicin 유도 조기세포노화
모델에서 TIS21 유전자 발현이
세포골격 단백질 actin 변형에
미치는 영향

지도교수 임인경

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2014년 2월

아주대학교 대학원
의생명과학과/분자의학전공

김빛나

김빛나의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 임 인 경 인

심사위원 강 엽 인

심사위원 박 태 준 인

아주대학교 대학원

2013년 12월 13일

Doxorubicin 유도 조기세포노화 모델에서 TIS21 유전자 발현이 세포골격 단백질 actin 변형에 미치는 영향

일반적으로 세포노화(Cellular Senescence)란 자연적으로 시간이 흐르며 세포 증식이 억제되어 이전의 모습으로 되돌릴 수 없는 현상을 지칭한다. 이러한 세포노화는 자연노화(Replicative Senescence)와 조기노화(Premature senescence)로 크게 구분되며 조기노화는 여러 세포 외부의 인위적인 자극에 의해서 유도할 수 있다. 본 연구에서 사용한 유전자인 Human BTG2(B-cell translocation gene 2)는 APRO 상동 범위인 Box-A (Tyr49-Asn71)와 Box-B(Leu96-Glu115)를 가진 APRO (antiproliferative) 단백질 집단에 속한다. BTG2와 상동유전자인 mouse에서 밝혀진 TIS21 (TPA inducible sequences 21) 유전자는 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)를 SW3T3 세포에 처리하여 얻어졌고, PC3 는 rat PC12 세포에서 밝혀졌다. BTG2는 세포내의 전자 공동 조절자, 신경조직 분화에 관여하는 인자, 신경 상피세포를 분화시키며, 흥선세포의 특정 분화단계에 맞게 증식하는 매개자와 조혈모세포의 증식억제 조절자의 역할을 한다. 또한 SV40T 생쥐에서 흥선암, 신장세포암과 전립선암의 종양억제 유전자로서 기능을 하고 유방암 노화현상을 조절한다. 그리고 세포주기 조절자로서 세포를 정지시키거나 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 Human Fibroblast에 자연노화를 유도하였을 때 BTG2의 발현이 증가되어 있는 문헌을 바탕으로 조기노화를 유도하였을 때 BTG2의 발현 양상과 조절 기작을 규명하고자 하였다. 조기노화 유도 모델은 DNA 염기서열에 직접적으로 삽입 되어 α -helix 구조 변형으로 DNA damage를 일으키는 대표적인 anti-cancer drug인 Doxorubicin을 저농도로 처리하여 유도하였다. 현재까지 Doxorubicin의 노화기전은 정확히 규명되지 않았고 Doxorubicin을 처리하여 정상 human HDF 세포의 조기노화현상에

anti-proliferative gene BTG2의 관련성을 확인하고자 하였다. HDF 세포에 Ad-TIS21으로 세포내에 과발현 시키고 doxorubicin으로 노화를 유도한 경우 doxorubicin에 의한 노화가 억제되는 현상을 관찰하였으며, 반대로 siBTG2를 사용하여 세포내의 BTG2 발현을 억제시킨 경우에는 노화가 증가하는 현상을 여러 노화 표지들을 사용하여 확인하였다. 본 연구에서 주목한 점은 노화세포의 대표적인 표현형(phenotype)인 세포의 크기가 커지고 세포질이 퍼지는 현상과 및 세포가 가늘고 길어지는 현상도 같이 관찰 되었는데, 이는 세포에 여러 가지 stress가 있을 경우 Actin의 위치와 모양이 변화된다는 보고 및 노화된 세포에서 actin filament가 가늘어지고 끊어지는 현상이 일어난다는 보고를 통해 Actin filament 와 노화와의 관련성에 주목할 수 있었다. HDF 세포에 TIS21이 단독으로 발현할 경우 actin filament의 변화는 정상 대조군과 비교하여 별 차이가 없었지만 doxorubicin으로 노화를 유도한 세포에서는 정상 대조군에 비해 TIS21이 과발현 된 세포에서는 Actin filament의 위치가 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 유추해 볼 때 TIS21은 정상 HDF 세포에서 Doxorubicin에 의한 조기세포 노화의 감소가 actin filament와 연관되어 어떤 기전을 통해 노화억제를 조절한다고 생각되며 이 결과를 바탕으로 BTG2와 세포 조기노화와의 연관성 및 분자생물학 기전을 알아보하고자 하였다.

핵심어: 세포노화, BTG2, TIS21, Doxorubicin

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	v
I. 서론	1
A. 세포노화	1
B. BTG2/TIS21/PC3	3
II. 재료 및 방법	5
A. 사람 포피 세포 분리, Human Diploid Fibroblast (HDF) 세포	5
B. 세포 수 집계 (Cell number counting)	5
C. TIS21 Adenovirus (Ad-TIS21)	5
D. Doxorubicin 유도 세포노화 (Doxorubicin-induced senescence)	6
E. Senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) staining	6
F. 면역형광세포염색(Immunocytochemistry)	6
G. RNA 분리 및 cDNA 합성	7
H. Real-time PCR	7
I. 세포 내 활성산소 (ROS) 양 측정	8
J. siRNA Transfection	8
K. Western blot analysis	9
L. Small G-protein 활성 측정(Small G-protein activity assay)	10
III. 결과	11
A. Doxorubicin에 의한 젊은 HDF 세포의 조기세포노화 유도	11
B. Doxorubicin에 의한 조기세포노화에서 TIS21의 역할	12
C. TIS21 유전자에 의한 조기세포노화시 발생한 세포 내 활성산소 (ROS)	

억제	13
D. 세포 내 BTG2 유전자 발현억제에 의한 조기세포노화 변화	14
E. 조기세포노화 모델에서 TIS21 과발현에 의한 세포골격 단백질 F-actin의 형태변화	15
F. 세포 부착성 신호기전(Focal Adhesion signaling)과 조기세포노화간의 연관성	16
G. Doxorubicin 유도 조기세포노화 모델에서의 TIS21의 역할 가설도	17
IV. 고찰	31
V. 결론	34
참고문헌	35
ABSTRACT	45

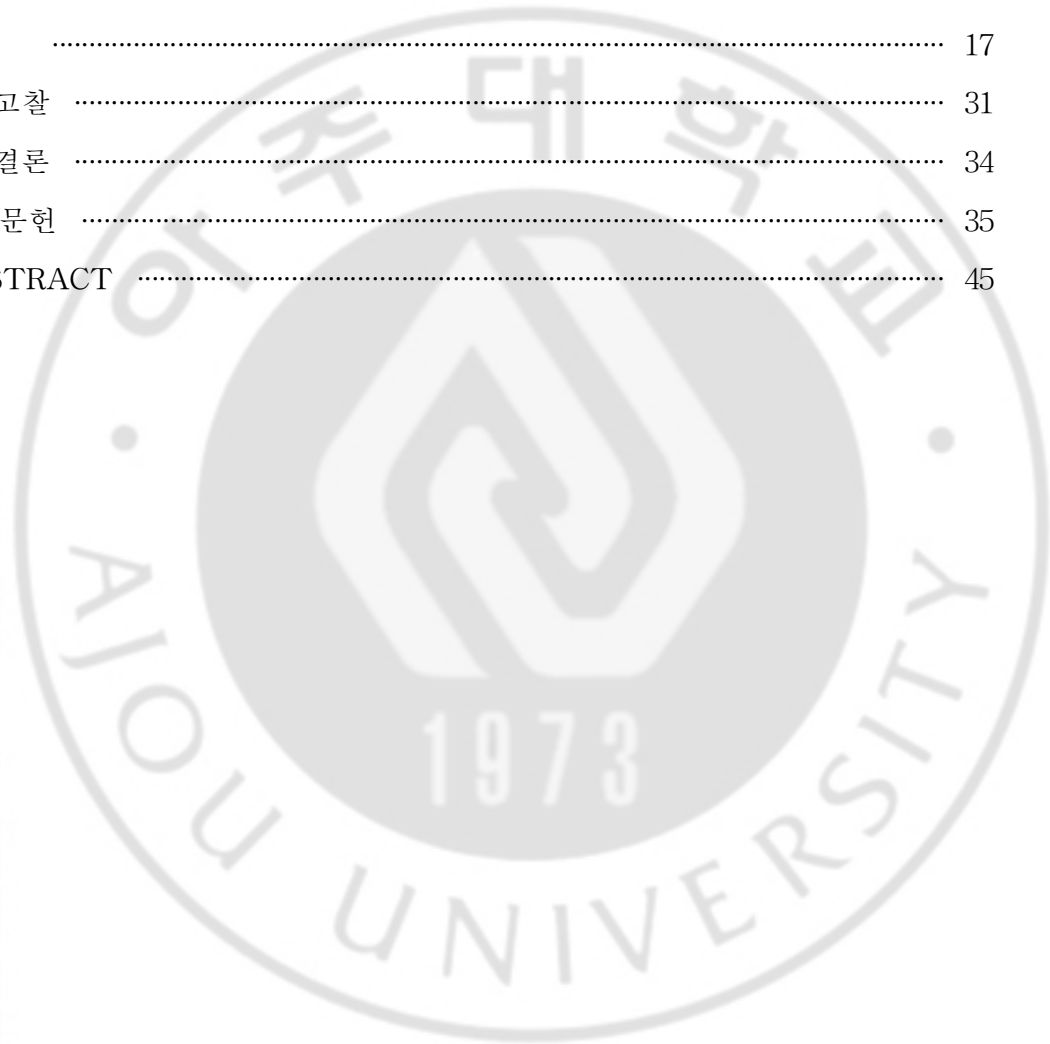


그림 차례

Fig. 1. Doxorubicin-induced senescent phenotypes observed in human diploid fibroblast.	18
Fig. 2. Inhibition of doxorubicin-induced senescent phenotypes after transduction of adenovirus carrying TIS21-HA gene in HDF cells	20
Fig. 3. Inhibition of ROS generation by transduction of AdTIS21 virus into HDF cells.	22
Fig. 4. Transfection of HDF cells with siRNAs to BTG2 upregulated SA- β -galactosidase expression.	23
Fig. 5. Various findings of the F-actin distribution in the young and the replicatively old HDF cells	24
Fig. 6. F-actin changes in the HDF cells after treatment with doxorubicin.	25
Fig. 7. Confocal microscope findings of HDF cells treated with doxorubicin for 48 hours.	26
Fig. 8. No effect of doxorubicin on Rac1 and Cdc42 activity examined by immunoblot analysis.	27
Fig. 9. Immunoblot analyses showing the no changes of cofilin activities in HDF cells.	28
Fig. 10. No effect of doxorubicin treatment and TIS21 expression on focal adhesion regulating protein. Treated with doxorubicin.	29
Fig. 11. Schema showing the possible signal transduction pathway	

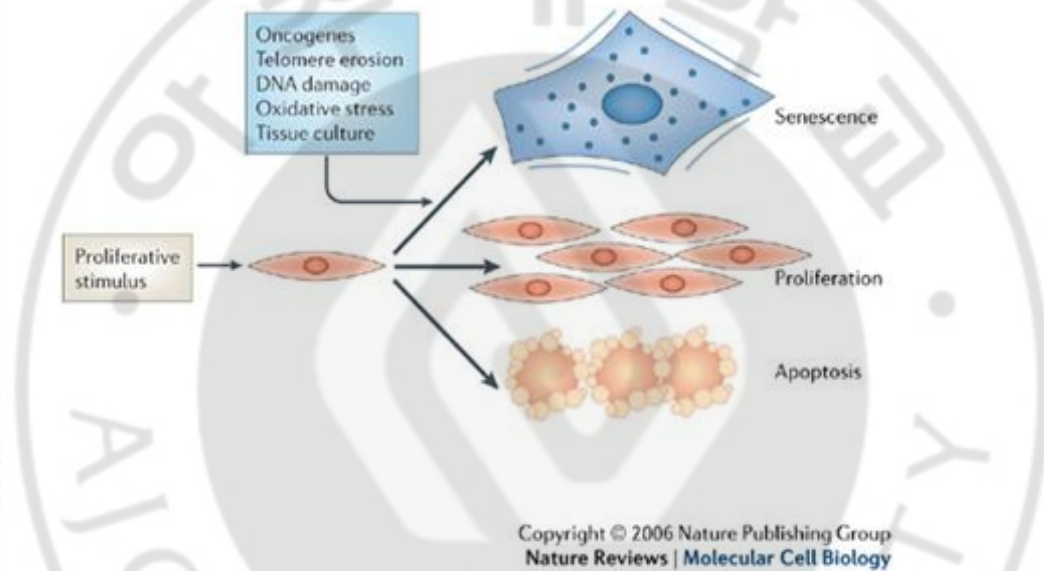
regulating doxorubicin-induced cellular senescence by TIS21
expression. 30



I. 서 론

A. 세포노화 (Cellular Senescence)

정상세포는 체외 배양상태에서 신진대사 활동에 손상 받지 않더라도 일정한 시간이 지나면 더 이상 증식(proliferation)을 할 수 없는 상태에 빠지게 되는데 이 현상을 세포노화 (cellular senescence)라 정의한다 (Hayflick, 1965). 세포노화는 자연노화(Replicative Senescence)와 조기노화 (Premature senescence 또는 Stress induced premature senescence (SIPS)) (Serrano 와 Blasco, 2001) 2가지 종류(type)으로 구분한다고 알려져 있다.



Senescence as a response to cellular stress (Nature Reviews Molecular Cell Biology 7, 667-677)

자연노화는 자연적 세포복제가 일어날 때 산화환원스트레스 (redox stress)나 어떠한 발단에 의해 텔로미어 (telomere)의 길이가 점점 짧아지며 노화가 유도된다고 대표적으로 알려져 있다 (Chiu 와 Harley, 1997; Furumono 등, 1998; Naderi 등, 2006; Passos 와 Von Zglinicki, 2005; Passos 와 Von Zglinicki, 2006). 이와 달리 조기노화의 경우 여러 세포 외부의 인위적인 자극에 의해 유도된 정상 shghk보다 이른 노화현상을 통틀어 정의한다. 자외선, 약물 또는 생물활성인자

(cytokine) 등에 의한 세포 외부의 자극에 의한 스트레스 (Chen 와 Ames, 1994; Duan 등, 2005)와 DNA 손상 (Robles 와 Adami, 1998) 등에 오랫동안 노출 될 때 세포 내 활성산소 (ROS)등이 증가하여 조기노화를 매개한다고 알려져 있다. 이 외에, oncogene 활성화도 조기노화를 유도한다고 보고 되어있다 (Mooi 와 Peeper, 2006; Serrano 등, 1997). 자연노화와 조기노화가 유도되는 경로로 DNA damage checkpoint kinase인 ataxia telactasia-mutated (ATM)와 Chk (checkpoint kinase)를 통해서 노화가 유발된다고 보고되었다 (d'Adda di Fagagna 등, 2005). 이들 노화의 매개체로는 tumor suppressor p53과 retinoblastoma protein/p16이 속하는데 (Chen 등 2005; Narita 등, 2003; Serrano 등, 1997), 형질 변환된 세포에서 노화 프로그램이 이뤄지지 않는 경우는 대부분 tumor suppressor 유전자가 비활성화 되어 있기 때문이라 알려져 있다. 현재까지 알려진 노화세포는 여러 특징은 가장 대표적으로 세포의 크기가 커지며 세포질이 납작해지고 평평해 진다. 또한, filopodia, lamellipodia와 actin stress fiber가 많아지고 길이가 길어지는 특이한 형태변화가 생긴다 (Chang 등, 1999; Lim 등, 2000). 또한 성장을 촉진하는 인자에 의한 반응으로 세포분열주기 중에서 S기로 들어가는 것이 불가능해지고 (Campisi, 2001), G1기에 정지되어있어 더 이상 세포가 성장하지 않는다 (Stein 와 Dulic, 1995). 이는 노화세포들이 G1에서 S 주기로의 진행하는데 관여하는 세포주기 조절인자들의 발현 또는 기능에 결함이 있는 것으로 밝혀졌는데, cyclin A, B, cdc2는 노화세포에서 발현이 감소되어 있는 반면(Richter 등, 1991; Stein 등, 1991), cyclin-dependent kinase inhibitors인 p21^{WAF1/CIP1}과 p16^{INK4a}은 발현이 증가되어 있다 (Stein 등, 1999). 또한 retinoblastoma 단백질은 저인산화 되어 있는 것이 보고되어있다 (Futreal 와 Barrett, 1991). 노화된 세포는 SA-β-galactosidase 활성이 pH 6.0에서 증가되어 있고(Dimri 등, 1995; Shelton 등, 1999), 젊은 HDF에서의 발현보다 늙은 human diploid fibroblast (HDF) 세포에서 Erk1/2의 인산화 발현이 세포질에 유지 및 증가되어 있고 (Kim 등, 2003; Lim 등, 2000), 세포핵에 G-actin의 발현이 축적 되어 있음을 보고한 바 있다 (Kwak 등, 2004). 현재 위에서 열거한 것들을 노화

의 표지로서 사용하고 있다. 그리고 세포노화와 종양간의 연관성에 대해서는 세포가 계속 분열하면서 악성종양으로 변할 수 있는데, 이런 세포를 노화과정으로 진행하도록 하면 암이 생성되는 것을 예방하거나 방해하는 방법이 될 수도 있다 (Campisi, 2001). 또한 세포노화는 종양세포에서도 일어나는데 이 현상은 종양생성억제 (Tumor-suppression)로도 작용하지만 종양생성증대 (Tumour-promotion)로도 작용된다고 알려져 있다 (Rodier 와 Campisi, 2011).

B. BTG2/TIS21/PC3

BTG2/TIS21/PC3 는 APRO 상동 범위인 Box-A (Tyr49-Asn71)와 Box-B(Leu96-Glu115)를 가진 APRO (antiproliferative) 단백질 집단에 속한다. (Matsuda 등, 2001). TIS21 (TPA inducible sequences 21) 유전자는 초기의 성장 반응 유전자 (Sukhatme 등, 1987)로 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)를 SW3T3 세포에 처리해서 분리되었다 (Fletcher 등, 1991). TIS21 과 상동유전자인 PC3 는 rat PC12 세포에서 (Bradbury 등, 1991), BTG2 (B-cell translocation gene 2)는 human 에서 밝혀졌다 (Rouault 등, 1996). BTG2의 기능에 대한 연구는 아직 광범위하게 이뤄지지 않았지만, 잠재적인 역할로는 (1) 전사 공동 조절자 (transcriptional co-regulator)로 BTG2^{TIS21}와 상호작용을 하는 단백질의 활성을 조절하는데 관여한다 (Duriez 등, 2004; Morel 등, 2003; Prevot 등, 2001; Rouault 등, 1998). (2) 신경조직의 분화에 관여하는 인자로 신경세포의 증식을 저해하고 (Canzoniere 등, 2004; Corrente 등, 2002; el-Ghissassi 등, 2002; Iacopetti 등, 1999), PC12 세포에서는 생존인자로서 신경돌기를 성장시키고, 신경상피세포를 분화시키는데 관여한다 (Calegari 등, 2002; Calegari 등, 2005; Canzoniere 등, 2004; el-Ghissassi 등, 2002; Haubensak 등, 2004; Kosodo 등, 2004; Wang 등, 1997). (3) 흉선세포가 특정한 분화단계에 맞게 증식하도록 하는데 중요한 매개자와 조혈모세포의 증식을 억제하는 조절자로서 역할을 한다. (Konrad 와 Zuniga-Pflucker, 2005; Oswald 등, 2006). (4) SV40T 생쥐에서 흉선암, 신장세포암과 전립선암에서 종양억제유전자로서 기능 및 생쥐와 사람에게

서 생긴 유방암의 노화가 되는 현상을 조절한다 (Elmore 등, 2005; Ficazzola 등, 2001; Kawakubo 등, 2004; Lim 등, 1995; Ryo 등, 2005; Struckmann 등, 2004). (5) 세포주기 조절자로 pRB 에 의존적인 방법과 비 의존적인 방법으로 세포를 G1/S 주기에 정지시키거나 p53 유전자가 존재하지 않는 U937 세포에서는 G2/M 주기에 세포를 정지시키거나 세포사멸을 일으킨다 (Guardavaccaro 등, 2000; Hong 등, 2005; Lim 등, 1998; Ryu 등, 2004). (6) TIS21^{-/-} 생쥐에서 척추동물의 발달 양식 (patterning) 조절자이고, 제브라피시 (zebrafish)의 축옆중배엽 (paraxial mesoderm) 발달과정과 아프리카발톱개구리 (Xenopus)의 척색 (notochord:척수의 아래로 뻗어있는 연골로 된 줄모양의 물질) 발달과정 조절자로서 기능을 한다고 보고된 바 있다 (Park 등, 2004; Sakaguchi 등, 2001; Sugimoto 등, 2005). 이번 연구에서 본 연구자는 여러 가지 BTG2^{TIS21} 유전자의 잠재적인 기능 중 세포노화와 관련된 부분에 관심을 가지게 되었다. BTG2^{TIS21}가 정규장소 밖에서 발현이 되면 유방암세포를 G1 기에 정지시켜 세포성장을 저해시키고, 이러한 효과는 cyclin D 에 의해서 전환되게 된다 (Kawakubo 등, 2004). 또한 본 연구실에서 293 세포에 TIS21^{BTG2} 유전자를 지속적으로 발현시켰을 때 세포의 크기가 커지며 세포성장 감소 및 cyclin E 와 CDK4 의 합성이 지연, 그리고 cyclin E 와 관련된 CDK 의 활성이 감소되면서 G1-S 시기의 전환이 저해되는 것을 보고하였다 (Lim 등, 1998). 그러므로, TIS21^{BTG2} 은 cyclin D1 과 cyclin E 두 가지 경로를 통해서 세포 주기 정지를 유도하고 이 현상을 바탕으로 TIS21^{BTG2} 유전자와 노화현상간의 상관관계가 있을 것이라고 생각할 수 있었다.

현재 세포노화와 BTG2^{TIS21}와 상관관계에 대하여 자연노화가 일어난 Human fibroblast Hs68 세포에서 BTG2의 level이 증가되어 있는 것으로 보아 세포노화와 BTG2간의 연관성이 있는 것을 시사한다 (Keith W 등, 2010). 이를 보고를 기반으로 하여 본 연구에서는 조기세포노화 (stress induced premature senescence)유도모델에서 BTG2와 세포노화간의 상관관계를 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 사람 포피 세포 분리, Human Diploid Fibroblast (HDF) 세포

본 실험에서 이용한 사람 포피 세포는 아주대학병원에서 수술 한 4세 소년의 포피를 동의 받아 사용하였다. 포피를 살균한 가위와 핀셋으로 1 x 5 mm 로 잘게 자르고 저민 후, 저민 조직을 Dulbecco's phosphate-buffer saline (D-PBS) 행구고, 5 ml의 0.25 % collagenase 를 1.5 시간 동안 처리한 후, 1000g 에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 침전물에 0.0125 % trypsin이 포함 된 10 ml 의 D-PBS를 처리한 후 5 % CO₂ 가 있는 37 °C 세포배양기에서 5 분 동안 배양하였다. 배양 후, Trypsin을 불활성화 시키기 위해 fetal bovine serum(FBS, GibcoBRL, Life Technologies, NY) 을 1ml 첨가한 후 각각의 세포로 분리하기 위해 10 분 동안 vortex하였다. 1,000g 에서 3분 동안 원심분리 한 후, 침전물을 10ml 의 D-PBS에 두 번 행켰다. 마지막으로, 침전물을 10% FBS 와 0.5% antibiotics (GibcoBRL, Life Technologies, NY) 가 첨가 된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, GibcoBRL, Life Technologies, NY) 배지 10 ml 에 섞어 배양하였다. 다음 날, 배양 용기에 붙은 세포를 제외하고 배지에 떠 있는 세포를 제거한 후, 다시 새로운 배지로 교환하였다. 세포가 배양 용기에 가득 찼을 때를 기준으로 population doubling (PD)의 수를 다음 실험을 위해 모니터링 하였다.

B. 세포 수 집계 (Cell number counting)

세포를 6well plate 에 well 당 1×10^5 으로 분주한 다음, 각 시간대 별로 trypsin을 처리하여 세포를 떼어낸 후 trypan blue solution(trypsin blue stain 0.4%, Gibco, Life Technologies, NY) 로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 세포수를 계산하였다.

C. TIS21 Adenovirus (Ad-TIS21)

TIS21 cDNA를 cytomegalovirus (CMV) enhancer and chicken β -actin

promoter 를 가진 replication-defective E1- and E3-adenoviral vectors 에 삽입 하였다. TIS21 adenovirus를 293 사람 신장 상피세포에서 증폭시켰고, virus 침 전 입자는 $0.45\mu\text{m}$ 로 여과하여 정제한 뒤, -70°C 에 보관하였다. 대조표준으로 사 용하기 위하여 bacterial β -galactosidase(LacZ) adenovirus, Green Fluorescent Protein(GFP) adenovirus 도 같은 방법으로 준비하였다. Virus의 농도 확인을 위 해 QIAamp DNA mini kit(QIAGEN, Cat. No. 51304)를 사용하여 Virus의 DNA 를 분리한 뒤 Real-time PCR을 이용하여 Virus의 농도를 확인한 뒤 사용하였다.

D. Doxorubicin 유도 세포노화 (Doxorubicin-induced senescence)

Doxorubicin을 실험조건에 맞춰 세포를 분주한 세포 배양접시 또는 plate에 Ad-TIS21을 감염시키고 그 이후 doxorubicin 100 ng/ml로 처리하여 (Il-dong Pharmaceuticals Co, Seoul, KOREA)을 처리하였다.

E. Senescence associated- β -galactosidase (SA- β -gal) staining

HDF 세포를 6 well plate에 5×10^4 으로 분주 한 후, 실험을 마친 plate를 PBS로 두 번 세척한 후 4% paraformaldehyde (in phosphate buffered saline(PBS)) 용액으로 상온에서 빛을 차단 한 뒤 15분 고정하였다. PBS로 두 번 세척한 뒤 X-gal 염색 용액 (1 mg/ml X-gal (in dimethylformamide; DMF), BIO Basic CANADA INC.), 40mM citric acid/sodium phosphate buffer, pH 6.0, 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM sodium chloride, 2mM magnesium chloride)을 가하여 37°C humidified chamber 에서 15-20 시간 동안 반응시킨 후 SA- β -gal 활성 여부를 광학 현미경으로 관찰한 뒤 사진 촬영하였다.

F. 면역형광세포염색(Immunocytochemistry)

HDF 세포를 화염 소독한 18 x 18 mm coverslip을 깔아 높은 6well plate에 $5/10^4$ 으로 분주 한 후, 실험을 마친 coverslip을 꺼내서 1X PBS로 세척한 뒤 차

가운 4 % paraformaldehyde (in phosphate buffered saline (PBS)) 용액으로 상온에서 15분간 고정하였다. 고정을 마친 coverslip은 PBS로 두 번 세척 후 0.05% Triton X-100이 함유된 1X PBS 용액으로 15분간 세포를 투과 (permeabilization)을 시킨 뒤 3% BSA가 든 0.05% Triton X-100 in PBS 용액에서 1시간 blocking 한 뒤 0.2 U/ml Phalloidin을 1X PBS에 풀어 30분간 F-actin을 염색하였다. DAPI 1 ug/ml(4', 6-diamidino-2-phenylindole, Sigma, St. Louis)로 핵을 5분간 염색한 뒤 15분간 1X PBS로 2번 세척하고 증류수로 5분간 세척 뒤 mounting solution(Bioneda corp. Foster City. CA.)으로 slide glass 위에 고정 한 뒤 형광 현미경 (Carl Zeiss, Axioimager M1. AxioVision 4.5 software, Germany)과 레이저 공초점 현미경 (LSM710, Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였다.

G. RNA 분리 및 cDNA 합성

세포를 60 mm 배양접시에 3×10^5 으로 분주하여 실험을 마친 배양접시에 RNA iso solution (TaKaRa Bio inc., cat. No. 9109, Japan)을 이용하여 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위해 1 ug의 RNA를 Superscript™ II Reverse Transcriptase (invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 oligo dT 18mer primer를 이용하였다.

H. Real-time PCR

합성된 1 ug의 cDNA를 RealHelix™ qPCR Kit(nanohelix, Cat. No. QPCR-S500)와 BTG2, Actin real-time primer를 이용하여 SYBR Green 증폭산물의 형광생성물의 강도를 BioRad CFX96™ real time system C1000을 이용하여 검출하였다.

BTG2 forward primer, 5'-GAAAAGCCGTCCAAGGGC-3', reverse primer 5'-CTTGTGGTTGATGCGAATGC-3', Actin forward primer, 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3', Reverse primer

5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'를 이용하였다. 증폭조건은 95°C 15분, 95°C 20초, 60°C 40초, 94.5°C 0.05초를 49 cycle 반응하였다.

I. 세포 내 활성산소 (ROS) 양 측정

세포 내 활성산소 양을 측정을 위해 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA, invitrogen) 형광 probe를 사용하였다. H₂DCFDA 는 세포 안에서 diacetylation 될 수 있고 세포 안의 radical, 주로 H₂O₂와 반응해서 형광 물질인 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)로 바뀐다. 그러므로 세포 내 활성산소(ROS)의 양을 측정할 수 있는 지표로 사용하였다. 세포에 adenovirus 를 단독으로 감염시키거나 virus를 감염시킨 후 doxorubicin을 처리하고 지시된 시간에 ROS 양을 측정하고자 하는 세포에 H₂DCFDA (20 μM) 를 넣어주고 37 °C에서 15 분 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포에 trypsin 을 처리하여 배양용기에서 떼어낸 후 원심분리기를 이용하여 세포를 침전시켰다. 침전된 세포를 PBS 에 섞어서 fluorescence activated cell sorter (FACS, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 DCF 형광 변화를 측정하였다.

J. siRNA Transfection

hBTG2 Knockdown sequence를 합성의뢰(Genolution Pharmaceuticals inc.)하여 siRNA를 20 uM 농도로 제조한 다음 5개씩 섞어서 구분하여 사용하였다. #1~5을 Mix1, #6~10을 Mix2 사용하였으며 10 nM씩 HDF 세포에 처리하였다. Lipofectamin 2000 reagent(Invitrogen)을 각각 Opti-MEM media(Gibco)을 넣고 5min 반응시키고 siBTG2를 Opti-MEM media에 5분 반응시킨 뒤 Lipofectamin 2000 reagent와 siRNA를 섞은 뒤 15min incubation 시킨 후, Opti-MEM media로 배지를 갈아준 HDF 세포에 transfection하여 48시간 뒤에 관찰하였다.

hBTG2 #1 Sense 5'-GAACCGACAUGCUCGCGGAUU-3', Antisense 5'-UCCGGGAGCAUGUCGGUUCUU-3', hBTG2 #2 Sense 5'-GCAUUCGCAUCAACCACAAUU-3', Antisense

5'-UUGUGGUUGAUGCGAAUGCUU-3',	hBTG2	#3	Sense
5'-GGUCAUAGAGCUACCGUAUUU-3',			Antisense
5'-AUACGGUAGCUCUAUGACCUU-3',	hBTG2	#4	Sense
5'-AGACAAAGGUUACUAAUUGUU-3',			Antisense
5'-CAAUUAGUAACCUUUGUCUUU-3',	hBTG2	#5	Sense
5'-GAGCUAUUUUAUUAUUAUU-3',			Antisense
5'-UAAUAUUAUAAAUAGCUCUU-3',	hBTG2	#6	Sense
5'-CUUAAACAAUACUAUGUUAUU-3',			Antisense
5'-UAACAUAGUAUUGUUUAAGUU-3',	hBTG2	#7	Sense
5'-GUAUGUGUGGCAAUAAUUUU-3',			Antisense
5'-AAUUAUUUGCCACACAUACUU-3',	hBTG2	#8	Sense
5'-GUAGACUUGUGCAAUAUUAUU-3',			Antisense
5'-AUUAUUGCACAAGUCUACUU-3',	hBTG2	#9	Sense
5'-GACUCAAGGUGCUAUUUAUU-3',			Antisense
5'-UAAAUAGCACCUUUGAGUCUU-3',	hBTG2	#10	Sense
5'-CAGCUUAUGGACAAAUGUAUU-3',			Antisense
5'-UACAUUUGUCCAUAAGCUGUU-3',			

siRNA의 control로 siGFP sense 5'-GUUCAGCGUGUCCGGCGAGUU-3', antisense 5'-CUCGCCGGACACGCUGAACUU-3'을 사용하였다.

K. Western blot analysis

HDF 세포에 Ad-TIS21 과 doxorubicin을 단독 또는 함께 처리한 후 세포들을 수거하여 RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0.5 % deoxycholic acid, 0.1 % SDS)에 단백질 분해효소 저해제를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 12,000 rpm 에서 약 10-15 분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 상층액의 단백질 농도는 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA)으로 정량한 후 100 °C에서 7 분간 끓여주었다. 준비된 sample 을 SDS-polyacrylamide gel 에서 전기영동한 후 polyvinylidenedifluoride membrane

(PVDF, MILLIPORE, Bedford, MA)에 transfer 한 다음 blocking buffer (5% Skim milk TBST)로 1 시간 동안 상온에서 blocking 하였고, blocking buffer 에 희석한 각 일차 특이 항체를 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 TBST (0.02% Tween-20 이 포함되어 있는 TBS)로 10 분씩 3 회 씻어준 후, HRP (horseradish peroxidase)가 붙어있는 이차항체 (Amersham Bioscience, UK)를 1:5,000 으로 희석하여 상온에서 반응시킨 후 TBST 로 10 분씩 3 회 씻어주고 ECL system (Amersham Bioscience, UK)시약을 처리하여 발광시키고 X-ray film 에 감광시켰다. Actin은 Sigma(Sigma-Aldrich, USA) 항체를, HA는 Santa cruz(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 항체를 이용하였다. 그 외의 다른 항체는 Cell signaling(Cell Signaling Technology, Inc.) 항체를 이용하였다.

L. Small G-protein 활성 측정(Small G-protein activity assay)

Rac1/Cdc42 activity assay kit(Cat No. 17-441, Milipore, USA)를 사용하여 실험하였다.

III. 결 과

A. Doxorubicin에 의한 젊은 HDF 세포의 조기세포노화 유도

Doxorubicin은 암세포에 DNA damage를 유도하여 항암효과를 나타내는 항암제로 잘 알려져 있으며 저농도의 doxorubicin은 일반세포에서 조기노화를 유도할 수 있는 것으로 보고되어있다 (Ewald JA 등, 2010). 본 실험에 사용된 조기세포노화모델 역시 저농도의 doxorubicin으로 유도하고자 하였다. 젊은 HDF 세포에 100 ng/ml doxorubicin을 처리한 후 96시간 배양한 다음 세포 노화표지자로 사용되는 SA- β -gal (SA- β -galactosidase) 염색을 통해 세포노화를 관찰하고자 하였다. 세포노화가 유도되어 염색된 세포의 개수를 세어 전체 세포 수 대비 percentage (%)로 나타내어 본 바 정상 대조군에 비해 염색된 세포가 약 20% 가량 통계적으로 유의하게 증가된 것을 관찰하였다 (Fig. 1A). Doxorubicin 처리 후 세포 개수의 변화 및 세포 성장 지연 여부를 관찰하기 위해 24시간 단위로 72시간까지 세포 개수를 집계 하였다. 그 결과 대조군은 72시간까지 세포 개수가 계속적으로 증가하지만 doxorubicin이 처리된 실험군은 세포의 개수가 그대로 유지됨을 관찰하였다 (Fig. 1B). 다음으로 doxorubicin 처리 후 단위 시간 당 세포노화 단백질 표지자의 발현 변화를 관찰하기 위해 immunoblot을 시행하였다. 대표적인 노화 단백질 표지자인 p53의 serine 15번 잔기의 인산화 (p-p53 ser15) 증가 및 p53 단백질의 발현양이 증가하였고, 마찬가지로 p21 단백질 발현양이 증가함을 관찰하였다. 또한 본 연구실에서 보고한 (Lim 등, 2000) 노화 단백질 표지자인 Erk1/2의 인산화 (p-Erk1/2)가 증가하는 것을 확인함으로써 저농도의 doxorubicin을 처리한 군에서 조기세포노화가 유도된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1C). 그리고 저농도의 doxorubicin에 의해 유도되는 DNA damage를 관찰하기 위해 immunoblot을 실시하여, 대표적인 DNA damage 신호 표지자인 Chk2의 인산화 (p-chk2(Thr68)) 증가 및 γ H2AX 단백질의 발현양이 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig 1D). 위의 결과를 종합하여 볼 때, 젊은 HDF 세포에 처리된 낮은 농도의 doxorubicin은 시간이 경과함에 따라 DNA damage와 더불어 여러

세포노화 표지자들의 증가를 통해 조기세포노화가 유도되는 것을 관찰할 수 있었다.

B. Doxorubicin에 의한 조기세포노화에서 TIS21의 역할

Doxorubicin으로 유도한 조기세포노화에서 본 연구의 핵심유전자인 TIS21^{BTG2}의 역할을 규명하고자 하였다. TIS21 유전자가 과발현 될 때 조기세포노화에 어떤 영향을 미치는지를 관찰하기 위해 다음 실험을 진행하였다. 젊은 HDF 세포에 HA가 부착된 TIS21 (Ad-TIS21 HA)을 adenovirus (1000 MOI)를 통해 감염시킨 후 4시간 뒤에 새로운 배지로 갈아주었고 20시간 뒤 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리하였다. 그 후 24시간 동안 더 배양하여 우선 세포 내 TIS21 단백질의 과발현 정도를 immunoblot으로 관찰하여 대조군인 Ad-LacZ에 비교하여 발현이 증가된 것을 관찰하였고 (Fig. 2A), 세포 모양 및 증식정도를 doxorubicin 처리 48시간 후 광학현미경으로 관찰하였을 때 세포의 크기가 실험군인 Ad-TIS21의 크기가 대조군 Ad-LacZ에 비교하여 작아진 것을 관찰하였다 (Fig. 2B). 또한, 정량화를 위해 세포의 개수는 총 72 시간 동안 매 24시간 세어보았다. Doxorubicin이 처리된 대조군 Ad-LacZ와 실험군 Ad-TIS21 둘 다 virus만 처리된 군과 비교하여 세포 수의 증식이 억제됨을 관찰함으로써 doxorubicin에 의한 세포 증식 억제를 확인할 수 있었지만 (Fig. 2C), 두 군에서 TIS21에 의한 세포증식 억제 저해와 같은 효과는 관찰할 수 없었다. 계속해서 TIS21과 doxorubicin에 의한 조기세포노화와의 연관성을 연구하기 위해 여러 가지 노화세포 표지인자를 관찰하였다. HDF세포에 Ad-TIS21 (1000 MOI)을 감염시키고 4시간 뒤에 새로운 배지를 갈아 준 뒤, 20시간 뒤 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리하였다. 그리고 96시간 동안 배양한 후 SA- β -gal 염색을 하여 세포노화를 광학현미경 관찰 및 전체 개수 대비 염색된 세포수를 percentage (%)로 나타내어 정량화 하였다. Ad-GFP 대조군에 doxorubicin을 처리하면 SA- β -gal 활성도가 약 30%로 증가하였지만, Ad-TIS21을 과발현 시킨 실험군에 doxorubicin을 처리하면 SA- β -gal 염색된 세포가 대조군에 비해 약 50% 이상

감소하는 것을 관찰하였고 두 군간 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 2D, E). 그리고 위 결과를 보충하기 위해 세포노화표지 단백질 발현을 Ad-TIS21을 감염시켜 20시간 후 doxorubicin (100 ng/ml)을 시간 별로 처리 한 후 세포를 수확하여 immunoblot을 실시하여 p53의 ser15번의 인산화 여부와 p21의 단백질 변화양을 관찰하였다. 관찰한 결과 Ad-TIS21에 doxorubicin이 처리된 실험군이 Ad-LacZ 에 doxorubicin이 처리된 대조군에 비해 p53 ser15번의 인산화 및 p21 단백질의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 2F). 이 결과들로 미루어 볼 때 doxorubicin에 의해 유도된 조기세포노화를 TIS21유전자가 억제하는 것으로 생각할 수 있었다.

C. TIS21 유전자에 의한 조기세포노화시 발생한 세포 내 활성산소 (ROS) 억제

앞서 기술한 HDF 세포에 doxorubicin을 저농도로 처리 하여 조기세포노화가 유도되고 TIS21의 과발현이 그 현상을 억제하는 기전을 연구하고자 앞선 실험과 마찬가지로 HDF 세포에 Ad-TIS21 (1000 MOI)을 감염시키고 4시간 뒤 새로운 배지를 갈아준 후 20시간 뒤 doxorubicin을 (100 ng/ml) 처리하였다. 그리고 96시간 더 배양하여 세포 내 활성산소 (ROS)를 측정하기 위해 세포 수확 15분 전에 H₂DCFDA (20 μ M)를 처리 하여 Flow cytometry로 측정하였다. 그 결과 Ad-TIS21과 doxorubicin을 함께 처리한 실험군에서 Ad-LacZ에 doxorubicin을 처리한 대조군 보다 세포 내 활성산소가 감소한 것을 관찰하였다 (Fig. 3A). 이 결과를 바탕으로 생각할 때 doxorubicin은 세포의 DNA damage 이외에도 활성산소를 증가시켜 조기세포노화를 유도하는 것으로 생각된다. 이 현상을 더 확인하고자 세포 내 활성산소를 제거하는 약물인 N-acetyl-L-cysteine (NAC) 을 전처리한 후 doxorubicin을 처리하여 젊은 HDF 세포 내 생성되는 활성산소를 제거시켜주고자 하였다. 젊은 HDF 세포에 NAC (2.5 mM)을 전처리 후 30분 뒤 새로운 배지를 갈아주며 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리하였다. 그 후 72시간을 더 배양 한 뒤 SA- β -gal 염색을 하여 염색 된 세포를 광학현미경으로 관찰하였

을 때 NAC을 처리한 군의 SA- β -gal 염색된 세포 수가 약 80% 이상 감소된 것을 관찰하였다 (Fig. 3B). 이 결과들을 종합하여 볼 때 doxorubicin은 세포 내 활성산소를 증가시켜 조기세포노화를 유도하며 TIS21은 doxorubicin에 의해 발생되는 과량의 활성산소를 제거하여 조기세포노화를 감소 또는 지연시킨다고 생각된다.

D. 세포 내 BTG2 유전자 발현억제에 의한 조기세포노화 변화

선행된 실험들은 TIS21^{BTG2} Adenovirus를 사용하여 TIS21을 세포 내부로 유입하여 과발현 후 여러 현상을 관찰하였고 이 현상을 증명하기 위해 세포 내 자체 BTG2 발현양을 억제 (Knockdown) 하는 siRNA를 제작, 사용하여 앞서 관찰된 현상의 저해, 억제 혹은 역전 여부를 관찰하고자 하였다. HDF 세포에 siBTG2를 목표로 하는 siRNA 서열 10개를 5개씩 구분하여 서열 1부터 5까지를 Mix I, 6부터 10까지를 Mix II로 구분하고 10 nM, 20 nM 농도별로 비교하여 발현 억제여부를 Real-time PCR을 통해 관찰하였다. 그 결과 siRNA 10 nM의 적은 농도에서 siBTG2 Mix II의 발현억제가 Mix I에 비교할 때 더욱 효과적인 것을 관찰할 수 있었으며 (Fig. 4A), 이 농도로 고정하여 다음 실험을 실시하였다. Doxorubicin에 의한 세포조기노화 과정 중 siRNA에 의한 세포노화 현상의 변화 여부를 관찰하기 위해 siBTG2를 4시간 도입 (transfection) 시킨 세포에 20시간 후 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리하여, 96시간 더 배양한 뒤 세포 내 SA- β -gal 염색을 실시하였다. 염색된 세포 수를 계산하여 전체 세포 수 대비 percentage (%)로 나타내어 관찰한 결과, siBTG2에 의해 세포 내 BTG2 발현이 억제 되면 SA- β -gal 염색된 세포가 대조군에 비해 siBTG2와 doxorubicin을 처리한 HDF 세포는 통계적으로 의미있게 세포 노화가 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig 4B). 위 결과로 미루어보아 세포 내 자체의 BTG2 발현이 억제될 때, doxorubicin에 의한 세포노화가 더욱 증가한다고 생각된다.

E. 조기세포노화 모델에서 TIS21 과발현에 의한 세포골격 단백질 F-actin의 형태변화

앞서 HDF 세포에 doxorubicin을 처리하여 조기세포노화를 유도한 경우와 TIS21을 세포 내에 과발현시켜 조기세포노화가 감소된 세포들을 각각 광학현미경으로 관찰 할 때 세포의 모양 및 크기에 차이가 있음을 보았다. 세포의 모양 및 크기 결정에 중요한 역할을 하는 F-actin이 노화가 일어난 세포와 젊은 세포 간에서 차이를 보인다는 (Davis T 등, 2005) 문헌을 바탕으로 우선 젊은 HDF 세포 와 자연노화 (Replicative senescence) 된 세포의 F-actin의 구조형태의 차이를 관찰하고자 하였다. 젊은 HDF 세포 및 자연노화된 HDF 세포를 각각 Phalloidin을 사용하여 F-actin을 면역형광염색한 뒤 형광 현미경(Fluorescence Microscopy) 및 공초점 현미경 (Confocal microscopy)으로 관찰하였다. 관찰결과 젊은 HDF 세포 내에선 F-actin이 고르게 세포골격을 유지하는 것과 다르게 자연노화된 HDF 세포의 경우 세포의 국소 부위 또는 세포 끝부분에 F-actin이 모여 있는 형태를 관찰하였다 (Fig. 5). 위 결과로 F-actin의 구조형태가 변하는 것과 세포노화와 상관관계가 있다는 생각을 갖게 되었다. 그리하여 Doxorubicin으로 조기세포노화를 유도하는 경우 세포 내 actin filament의 형태가 plasma membrane의 국소부위에 특이적으로 모인다는 연구결과 (Paolo Spallarossa 등, 2010) 를 참고하여 doxorubicin (100 ng/ml)을 시간 별로 처리한 조기세포노화 모델에서 F-actin 구조 및 형태 변화를 면역형광염색을 한 뒤 공초점 현미경으로 관찰하였다. 관찰 결과 doxorubicin 처리 후 9시간 이후부터 F-actin의 분포 (distribution) 가 변하는 세포가 현미경상 약 20~30% 정도 관찰되었고 12시간 이후에서는 약 40%이상 교차결합 (cross-link) 현상 및 F-actin의 분포 위치 변화가 있음을 관찰하였다 (Fig. 6). 위 결과들로 미루어볼 때 doxorubicin에 의한 조기세포노화에서 F-actin의 변화가 중요할 것으로 생각되었고 앞에서 열거한 TIS21에 의해 조기세포노화가 억제되는 현상과 F-actin간의 연관성을 연구하기 위해 다음 실험을 시행하였다. HDF 세포에 Ad-TIS21를 4시간 감염시키고 새로운 배지를 갈아준 뒤 20시간 후 doxorubicin (100ng/ml)을 처리하였다. 이후 48

시간 더 배양하여 F-actin의 변화를 면역형광염색을 실시하여 공초점 현미경으로 관찰하였다. 관찰결과 정상 HDF에서 관찰되던 굵은 다발 (bundle) 형태의 F-actin이 대조군인 Ad-Laz에 doxorubicin을 처리한 군에서는 다발이 많이 풀린 현상을 관찰한 반면 Ad-TIS21에 doxorubicin을 처리한 실험군에선 F-actin의 굵은 다발이 유지된 것을 관찰하였다 (Fig, 7, 확대). 위 결과로 볼 때 doxorubicin에 의한 조기세포노화모델에서 TIS21은 F-actin을 조절하여 세포노화의 특징 중 하나인 세포의 모양 조절에 관여하는 것으로 생각할 수 있었다.

F. 세포 부착성 신호기전(Focal Adhesion signaling)과 조기세포노화간의 연관성

조기세포노화 모델에서 F-actin과 세포노화의 연관성에 관한 연구를 더 진행하기 위해 GTPase Small G-protein(Rac1/Cdc42/RhoA)이 조기세포노화 모델에서 세포모양의 결정을 짓는데 관련이 있을 것이라고 제시한 본 연구실 (Lim 등, 2000) 논문을 근거하여 Rac1/Cdc42 Small G-protein 활성 측정 (activity assay)을 진행하였다. 젊은 HDF 세포에 Ad-TIS21을 사용하여 TIS21을 과발현 시킨 뒤 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리 후 시간 별로 세포 내의 Rac1/Cdc42 small G-protein 활성을 관찰하였다. 그 결과 세포 내의 Rac1/Cdc42 활성 변화는 관찰하지 못하였다 (Fig. 8). 그래서 그 상위 기전을 조사하고자 현재까지 보고된 세포 골격 단백질을 조절하는 상위 기전인 세포 부착성 신호기전 (Focal adhesion signaling)을 관찰하였다 (Taylor MP 등, 2011). HDF 세포에 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리한 조기세포노화 모델 및 Ad-TIS21 감염시킨 후 doxorubicin (100 ng/ml)을 처리하여 시간 별로 세포를 수확하여 immunoblot을 시행하였다. 우선 Small G-protein(Rac1/Cdc42/RhoA)을 조절하는 대표적인 세포 부착성 신호기전 조절 단백질중의 하나인 cofilin의 인산화를 관찰하였으나 인산화의 변화가 나타내지 않았다 (Fig. 9). 이와 더불어 Cofilin 및 small G-protein을 조절하는 상위조절의 대표적인 단백질인 Focal Adhesion Kinase (FAK)와 paxilin 또한 그 발현양이 별다른 차이를 나타내지 않았다(Fig. 10). 이 결과들로 미루어 보아

조기세포노화 유도모델에서 Small G-protein을 통한 F-actin의 조절은 또다른 조절기전에 의한 것이라 생각된다.

G. Doxorubicin 유도 조기세포노화 모델에서의 TIS21의 역할 가설도

본 연구자는 지금까지의 결과들을 바탕으로 저농도의 doxorubicin 유도 조기 세포노화 모델에서 TIS21의 기능에 대한 가설을 세워보았다 (Fig. 11). 저농도의 doxorubicin은 세포 내 활성산소를 증가시켜 세포골격 단백질의 재배열 (Actin rearrangement)을 통해 조기세포노화를 유도한다고 생각된다. 이 때 TIS21은 세포 내 활성산소를 제거하는 기능을 하여 조기세포노화를 감소 또는 지연시키는 역할을 한다고 생각된다. 그리고, 조기세포노화는 세포골격 단백질 재배열과 관련된다고 생각하여 세포 부착성 단백질(Focal Adhesion protein) 및 Small G-protein이 관여하는 신호기전을 관찰하였으나, 세포노화와는 연관성이 없다는 결론을 얻었다. 그래서 다른 조절기작에 대한 연구가 이루어져야 한다고 생각되며 이는 앞에서 제시한 Actin 다발을 묶게 만드는 현상을 조절하는 다발 연결 (bundle linker) 단백질인 α -actinin에 관한 연구가 뒷받침 되어야 한다고 생각된다.

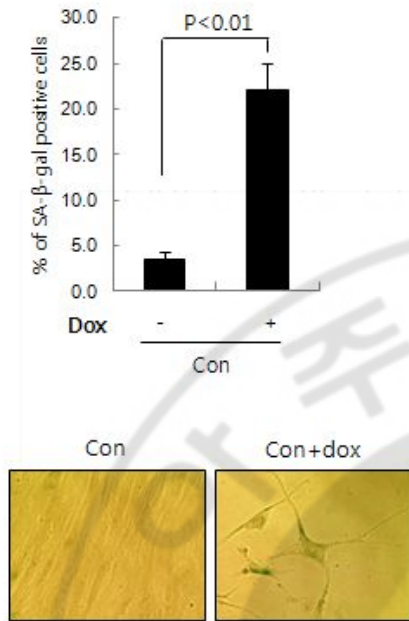
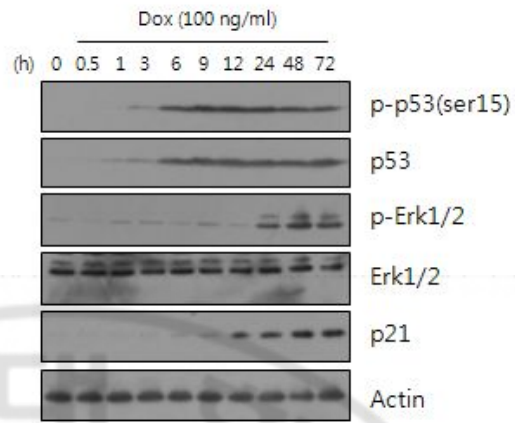
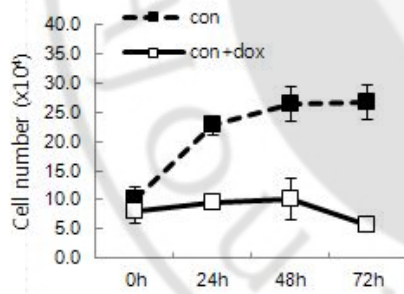
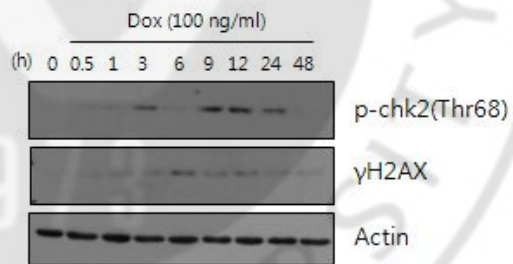
A**C****B****D**

Fig. 1: Doxorubicin-induced senescent phenotypes observed in human diploid fibroblast. (A) HDF cells were treated with doxorubicin (100 ng/ml) for 96 hours and then senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining was performed. Control (con) cells were treated with DMSO for 96 hour. The positive cells were counted under microscope. (B) Inhibition of cell proliferation of HDF cells after doxorubicin treatment for 72 hour. (C) Western blot analyses showing the time dependent inductions of p53 and p21WAF1 and followed by Erk1/2 phosphorylations. Expression of actin was employed as the loading control. (D) Immunoblot analysis showing the p-Chk2 and activating of γ H2AX, the signals of DNA double strand damage, after doxorubicin treatment.



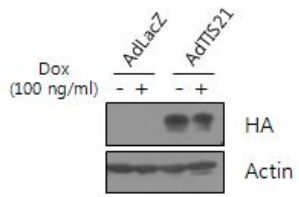
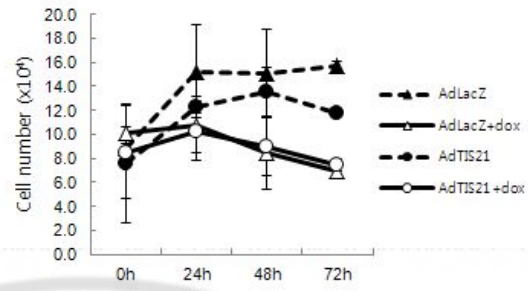
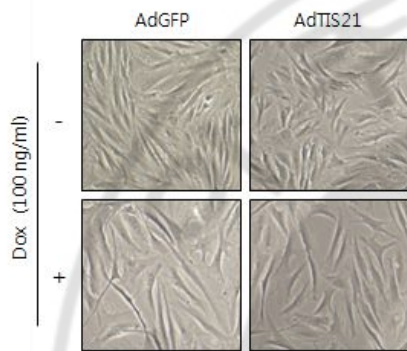
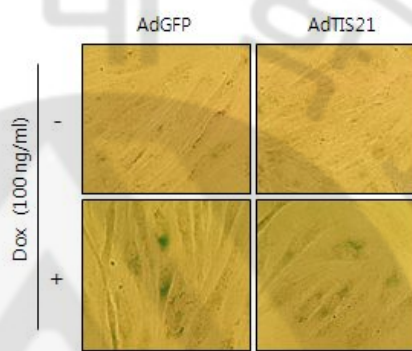
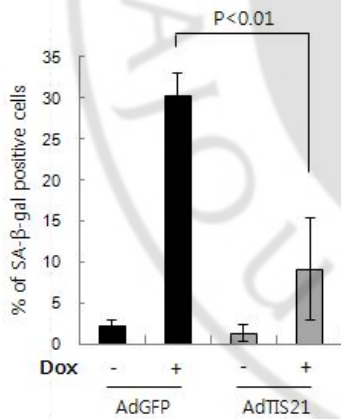
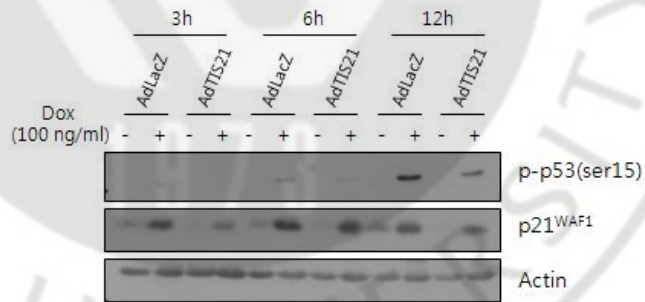
A**B****C****D****E****F**

Fig. 2: Inhibition of doxorubicin-induced senescent phenotypes after transduction of adenovirus carrying TIS21-HA gene in HDF cells. (A) Western blot findings showing the overexpression of TIS21-HA using anti-HA antibody. Actin indicates the loading control. (B) Transduction of TIS21 gene reduced cell proliferation in HDF cells as compared with LacZ vector expression. As expected, doxorubicin treatment significantly reduced cell proliferation both in the TIS21 and LacZ transduced cells. (C) Microscopic findings of HDF cells after treatment with doxorubicin for 48 hours. Note inhibition of cell growth after doxorubicin treatment both in the control and TIS21 infected cells. TIS21 overexpressers show the relatively slender shape than the Ad-GFP transduction. (D) SA- β -galactosidase staining of the cells. (E) The percentage of SA- β -galactosidase (+) cells. Note the significant reduction of SA- β -galactosidase (+) in the TIS21 overexpressers in response to doxorubicin treatment. (F) Western blot analysis. TIS21 overexpresser shows slight attenuation of p53 and p21WAF1 expressions after doxorubicin treatment.

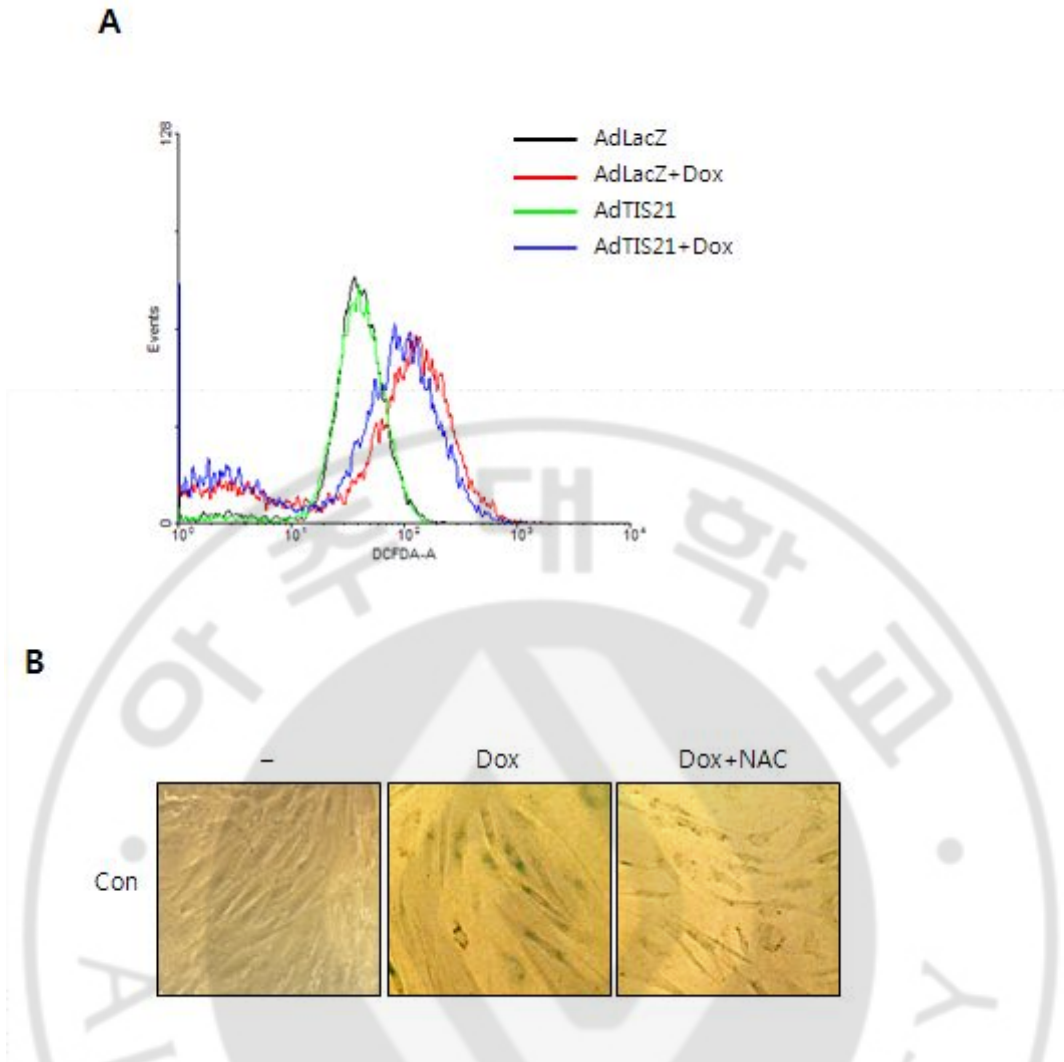


Fig. 3: Inhibition of ROS generation by transduction of AdTIS21 virus into HDF cells. HDF cells were treated with doxorubicin (100 ng/ml) for 96 hours and ROS generation was measured by FACS analysis after treatment with DCFDA. (A) FACS profiles and the quantification of DCF fluorescence observed in the control and the TIS21 overexpressers. Note significant reduction of ROS level in the TIS21 expresser treated with doxorubicin. (B) Treatment of HDF cells with N-acetyl-L-cysteine (NAC) (2.5 mM) reduced SA-b-gal expression induced by doxorubicin treatment.

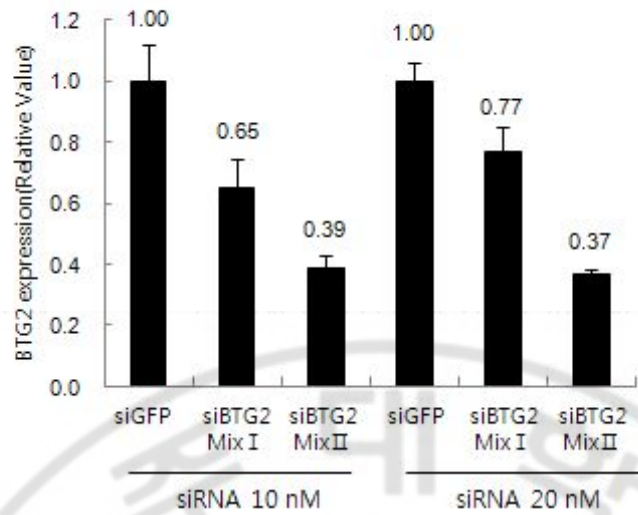
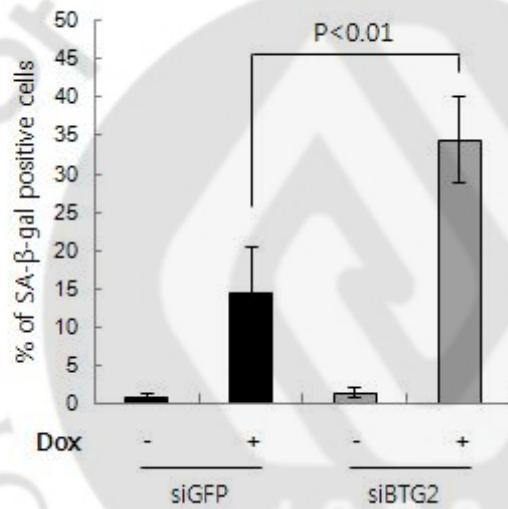
A**B**

Fig. 4: Transfection of HDF cells with siRNAs to BTG2 upregulated SA-β-galactosidase expression. (A) Short interfering RNAs against BTG2 gene was prepared and 5 siRNAs mixed as the Mix I and the other 5 siRNAs were named with Mix II. Note inhibition of BTG2 expression by 10 nM siRNAs both in the Mix I and Mix II transfected cells. (B) Transfection of siBTG2 significantly upregulated doxorubicin-induced SA-β-gal expression.

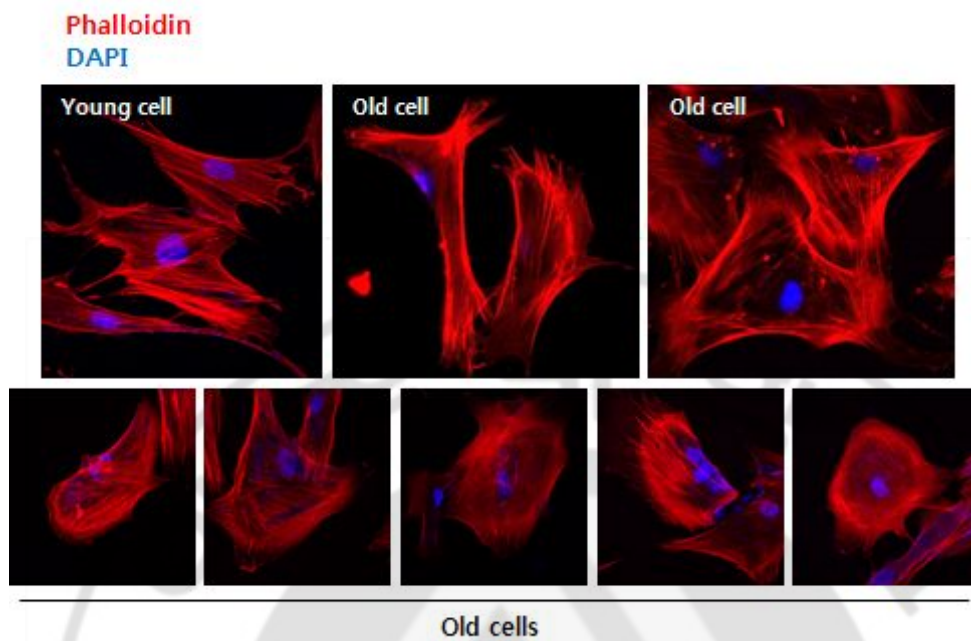


Fig 5. Various findings of the F-actin distribution in the young and the replicatively old HDF cells. Young cells indicate doubling time 26 hours, and old cells were used with doubling time over 2 weeks.

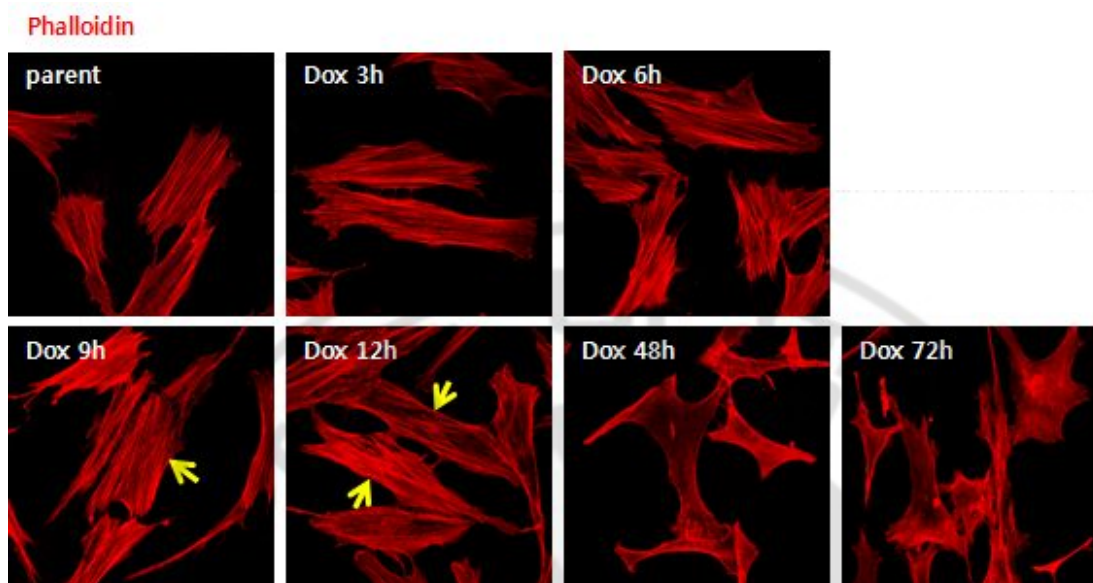


Fig. 6: F-actin changes in the HDF cells after treatment with doxorubicin. Doxorubicin induced stress fibers became rearranged in 9 hours via abnormal cross link between the fibers. After that the cross links became resolved in 48 hours.

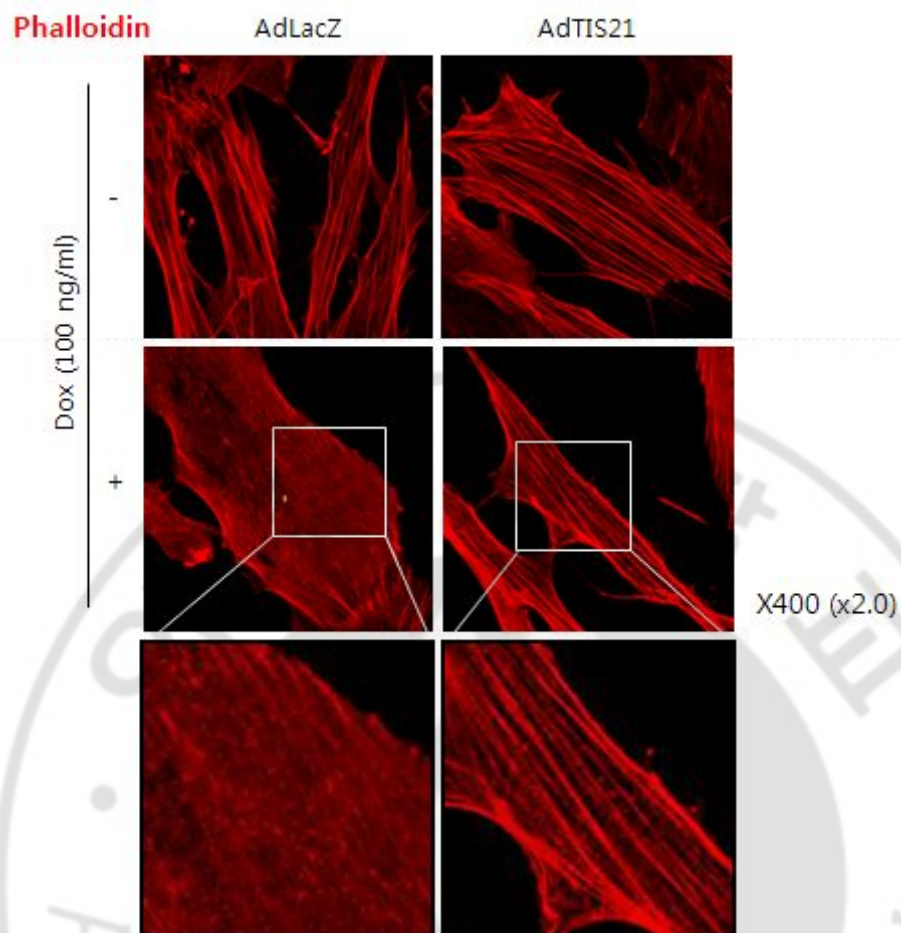


Fig. 7: Confocal microscope findings of HDF cells treated with doxorubicin for 48 hours. Doxorubicin-induced F-actin changes became regulated by TIS21 overexpression via thickening of stress fibers.

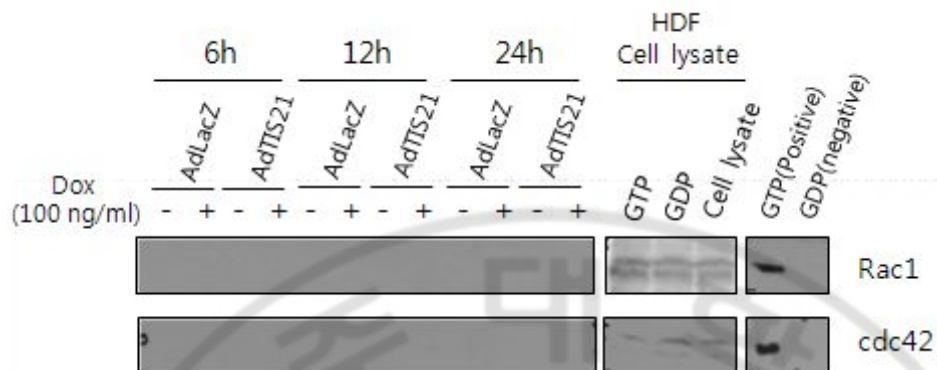
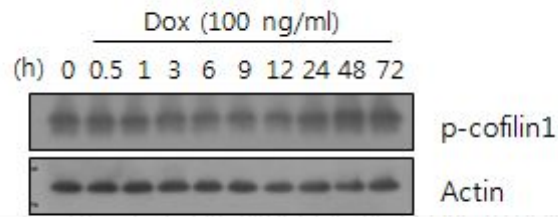


Fig. 8: No effect of doxorubicin on Rac1 and Cdc42 activity examined by immunoblot analysis. Although the positive and negative activities are detected by the assay system, we failed to examine the activities by TIS21 overexpression.

A



B

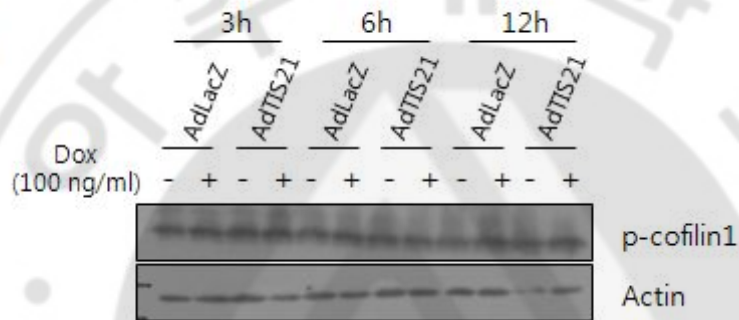


Fig. 9. Immunoblot analyses showing the no changes of cofilin activities in HDF cells. Treated with doxorubicin (A) and the overexpression of TIS21 (B).

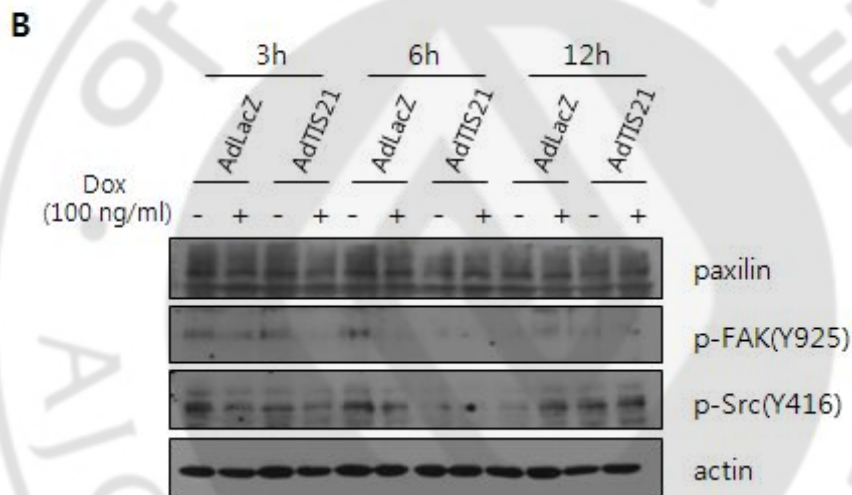
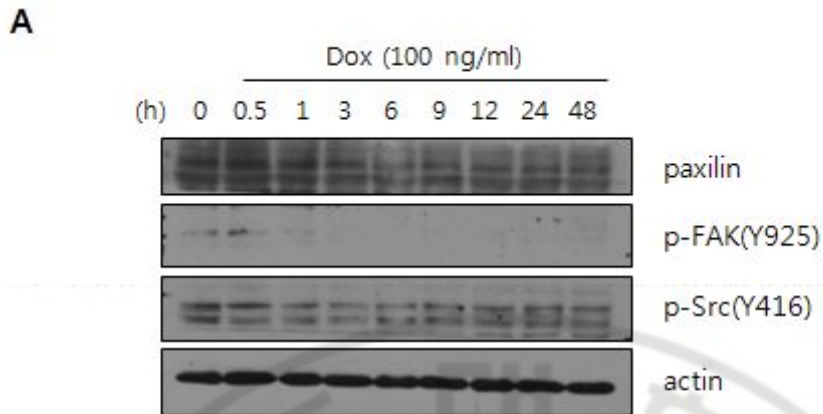


Fig. 10. No effect of doxorubicin treatment and TIS21 expression on focal adhesion regulating protein. Treated with doxorubicin. (A) and the overexpression of TIS21 (B).

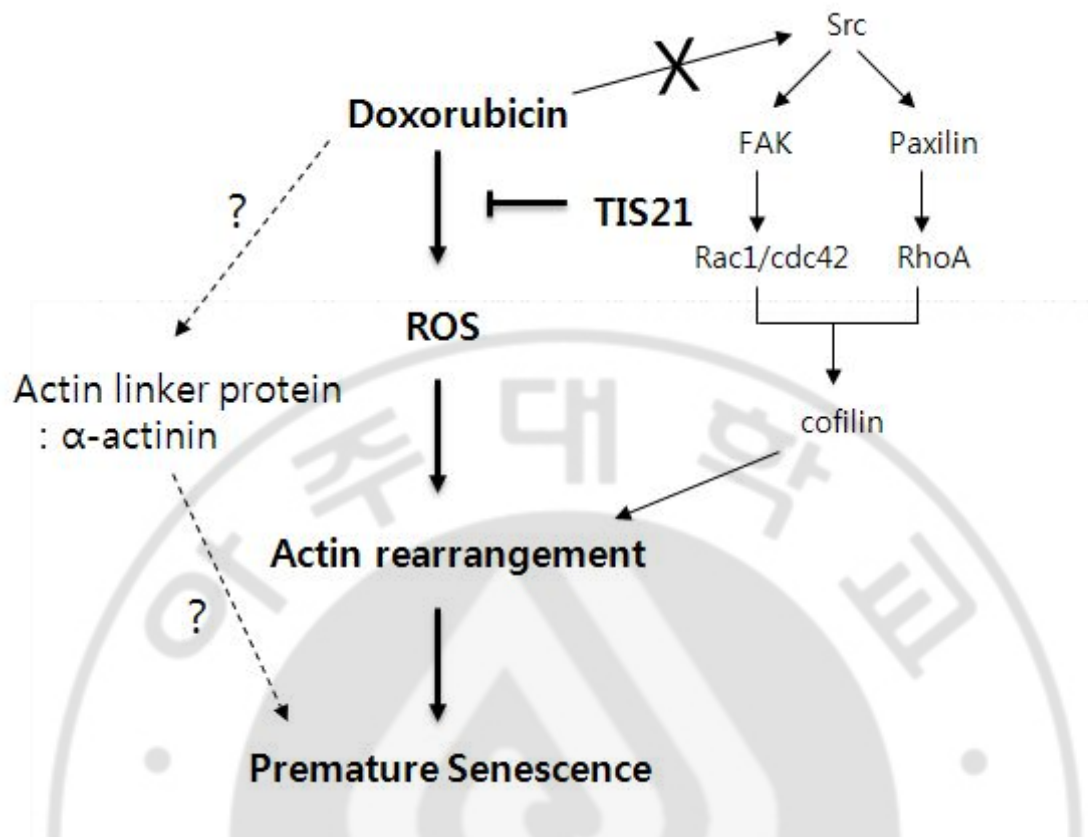


Fig 11. Schema showing the possible signal transduction pathway regulating doxorubicin-induced cellular senescence by TIS21 expression. Transduction of TIS21 gene by adenoviral infection reduced ROS generation in the doxorubicin-induced senescence process, and the doxorubicin-induced ROS rearranged actin cytoskeletons which show premature senescence in HDF cells.

IV. 고 찰

Anti-proliferative Gene 인 BTG2는 전사 공동 조절자 (Transcriptional co-regulator), 신경조직의 분화에 관여하는 인자, 흉선세포가 특정한 분화단계에 맞게 증식하도록 하는데 중요한 매개자와 조혈모세포의 증식을 억제하는 조절자, 종양억제유전자, 세포주기 조절자, 척추동물의 발달양식 (patterning) 조절자 등 여러 가지 잠재적인 역할을 한다고 알려져 있다 (Lim, 2006). 본 연구에서는 자연세포노화가 일어난 Human fibroblast Hs68 세포에서 BTG2^{TIS21}의 발현이 증가되어 있다 (Wheaton K 등, 2010)는 보고를 기반으로 하여 조기세포노화 유도 모델에서 BTG2의 역할에 대해 규명하고자 하였다. 하여 본 연구자는 정상 젊은 HDF 세포에 조기세포노화를 유도하기 위해 항암제(Anti-cancer drug)의 일종인 Doxorubicin을 사용하여 조기세포노화를 유도하였다. Doxorubicin은 *Streptomyces peucetius*로부터 추출한 물질로서 DNA 내 삽입되어 DNA 및 RNA 합성을 억제하는 항암제로 현재까지 광범위하게 사용되는 약물로 알려져 있다. Doxorubicin은 HDF 세포에서 높은 농도로 세포에 처리할 경우 세포사멸이 일어나고, 낮은 농도로 처리한 경우 노화가 일어난다고 보고되었다 (Alexia C 등, 2004; Eom YW 등, 2005; Haraguchi N 등, 2005). 이를 바탕으로 저농도의 doxorubicin (100 ng/ml)을 사용하여 세포노화를 유도하였다. 세포노화의 유도정도를 대표적인 노화 표지자인 SA- β -gal 염색이 증가되어 세포 관찰 및 세포 개수를 셈하여 percentage (%)로 나타내어 확인하였을 때 doxorubicin이 처리된 실험군에서 통계적으로 의미 있게 세포노화가 유도된 것을 관찰하였다 (Fig. 1A). 세포노화가 일어나는 세포증식이 저하 현상 (Qian D 등; 2011) 또한 관찰하였고 (Fig. 1B), 현재까지 보고된 세포노화 표지 단백질 발현양의 변화 및 차이를 확인하였을 때 doxorubicin에 유도된 조기세포노화가 일어난 세포에서 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1C). 위의 결과들을 종합하였을 때, 저농도의 doxorubicin은 조기세포노화를 충분히 유도한다고 생각된다. 이후, 본 연구의 핵심유전자인 TIS21^{BTG2}의 역할을 규명하기 위해 세포 내에 TIS21을 adenovirus를 이용하여

과발현시킨 후 실험을 진행하였다. Ad-LacZ에 doxorubicin을 처리한 대조군에 비교하여 Ad-TIS21에 doxorubicin이 처리된 실험군의 세포의 수는 virus 단독 처리군에 비교하여 세포 수 증식 억제 및 SA- β -gal 염색 정도 및 세포 수를 집계하여 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 노화세포가 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C, D, E). 또한 추가적으로 세포노화 표지 단백질의 발현을 관찰하였을 때 그 양이 감소된 것을 관찰하였고 (Fig 2F). 이 결과들로 종합하여 볼 때 doxorubicin에 의한 조기세포노화를 TIS21이 억제하고 있는 것을 생각할 수 있었다. Doxorubicin에 의한 조기세포노화 기전은 세포 내의 활성산소를 증가시켜 노화를 유도하는 것이라는 결과를 관찰하였고 (Fig 3A), TIS21은 doxorubicin에 의해 발생하는 과량의 활성산소를 제거하는 역할을 한다고 생각되는데, 앞서 실험한 Ad-TIS21만 처리된 실험군과 대조군인 Ad-LacZ 군 간의 세포 수 증식에 약 30% 정도 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 2B). 위의 결과들로 미루어 볼 때 TIS21 단독으로는 세포증식을 억제하는데 영향을 미친다고 생각되지만 이는 세포 내부의 레벨에 영향을 주지 않지만 TIS21을 과발현 시킬 때 주변효과 (side effect)의 일환으로 약간의 세포 증식을 떨어뜨린다고 생각되며, 결과적으로 doxorubicin에 의한 과량의 세포 내 활성산소를 TIS21이 줄여주어 조기세포노화를 억제한다고 생각된다. 그 다음으로 세포 내부의 BTG2^{TIS21} 유전자의 발현을 억제하는 siRNA를 이용하여 doxorubicin에 의한 조기세포노화 현상의 저해나 억제 또는 역전을 관찰하고자 하였다. 관찰결과 siBTG2를 사용하여 세포 내의 BTG2 유전자 발현이 억제 될 때 세포 노화를 통계적으로 의미있게 증가시키는 결과로 미루어 보아 BTG2 유전자가 억제 되면 조기세포노화를 더욱 촉진시킨다는 결과를 얻었다. 관찰결과 도중 노화세포의 대표적인 특징 중 하나인 세포의 크기가 커지는 현상과 세포질의 퍼지는 현상이 세포골격 단백질과 연관이 있을 것이라는 생각을 갖게 되었는데, 세포에 여러 가지 스트레스가 오게 되면 세포골격 단백질인 Actin의 위치와 모양이 변화된다는 보고 (Yoshihiro Hayashi 등, 2011; Joon-II Jun 등, 2010)와 추가적으로 노화된 세포에서 세포 골격 (actin filament)이 가늘어지고 끊어지는 현상이 일어난다고 보고 되어 있다(Koji Nishio

와 Akira Inoue: 2005). 이 보고들을 바탕으로 세포골격 단백질인 F-Actin 와 노화와의 연관성을 두고 실험을 진행하였다. 우선 자연노화세포모델과 조기노화세포 모델을 비교하여 phalloidin을 통한 세포 골격 단백질 F-actin을 면역형광염색을 실시하였을 때 F-actin의 분포가 젊은 세포에서는 고르게 F-actin이 분포된 반면 노화세포는 국소부위 및 세포의 끝 부분에 F-actin이 모여있는 형태를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5, 6) 그리하여 본 연구의 핵심 단백질 TIS21이 노화를 억제하는 역할을 위에서 본 바를 확인하고자 젊은 HDF 세포에 Ad-TIS21을 통해 과발현 시켰을 때 F-actin의 분포변화를 관찰하였다. 관찰결과 Ad-LacZ과 doxorubicin을 처리한 대조군은 젊은 HDF 세포에서 관찰되던 굵은 다발형태의 F-actin이 풀어져 세포 내에 퍼져있는 현상을 관찰한 반면 Ad-TIS21과 doxorubicin이 처리된 실험군에서는 젊은 HDF 세포에서 관찰된 굵은 다발형태의 F-actin이 관찰 되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig 7). 이 결과로 미루어 보아 doxorubicin에 의해 조기세포노화가 유도된 세포에서 TIS21이 세포노화를 억제할 때 세포 골격 actin 다발의 재배열을 일으킨다고 생각된다. 조기세포노화를 조절하는데 세포 골격 단백질이 연관이 있다면 가설을 확인하기 위해 본 연구실에서 제시한 (Lim 등, 2000) 논문을 근거하여 Rac1/Cdc42 Small G-protein의 활성을 측정하였으나 관찰하지 못하였으며, 이 small G-protein을 조절하는 세포 부착성 신호기전 조절 단백질인 Cofilin의 인산화 또한 변화가 없었다. 그리고 이와 더불어 cofilin 및 Small G-protein을 조절하는 상위조절 대표 단백질인 FAK (Focal Adhesion Kinase)의 인산화 및 paxilin의 발현양을 측정하였으나 의미있는 결과를 얻지 못하였다. 그리하여 조기세포노화 유도모델에서 small G-protein을 통한 F-actin은 다른 조절 기전이 관여할 것이라 생각되며 이후 어떤 조절 기전이 관련되는지 후속 연구가 진행되어야 한다. 본 연구에서 결론적으로 젊은 HDF 세포에서 doxorubicin에 의한 조기세포노화를 TIS21이 감소시킨다고 생각할 수 있으며, F-actin 조절 기작이 세포노화와의 연관이 있음을 제시하였다.

V. 결 론

본 연구에서는 TIS21^{BTG2}이 정상 젊은 HDF 세포의 노화를 조절한다는 연구를 진행하였다. 저농도의 Doxorubicin을 처리하여 조기세포노화를 유도하였을 때 TIS21^{BTG2}이 과발현되면 HDF 세포에서 SA- β -galactosidase 활성도 감소 및 세포증식 억제 그리고 세포 내 활성산소를 억제하는데 주된 역할로는 부족하지만 노화를 억제 또는 지연하는데 도움을 주는 것을 관찰하였다. 그리고 조기세포노화가 일어날 때 세포골격 단백질인 F-actin의 분포위치 변화가 일어나는 것 관찰할 수 있었으며 이 현상을 통하여 TIS21이 과발현 되면 경우 노화를 억제 또는 지연시키는 것과 같은 현상이 관찰되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 세포골격 단백질의 분포변화가 어떤 대사과정 및 신호기전을 거쳐 HDF 세포의 노화 현상과정을 조절하는지는 결과를 얻지 못하였으며, 다른 분자생물학적 기전을 통하여 유도되는 것을 규명하는 것이 과제로 남아 있다. 후속 연구가 진행되었을 때 이 연구를 통해 조기세포노화에서 어떤 세포 조절기전을 통하여 세포노화가 조절되는지 규명될 때 현재 활발히 진행되고 있는 역노화 (Reverse senescence) 연구에 도움이 될 거라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Alexia C, Lasfer M, Groyer A. : Role of constitutively activated and insulin-like growth factor-stimulated ERK1/2 signaling in human hepatoma cell proliferation and apoptosis: evidence for heterogeneity of tumor cell lines. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1030:219-29.
2. Bradbury A, Possenti R, Shooter EM and Tirone F: Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 3353-3357. 1991
3. Campisi J: Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11: S27-31. 2001
4. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y, Kandel ES, Lausch E, Christov K and Roninson IB: A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 59: 3761-3767. 1999
5. Chen Q and Ames BN: Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 4130-4134. 1994
6. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C and Pandolfi PP: Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature.* 436: 725-730. 2005

7. Chiu CP and Harley CB: Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med.* 214: 99–106. 1997
8. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP and Jackson SP: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 426: 194–198. 2003
9. Davis T, Baird DM, Haughton MF, Jones CJ, Kipling D: Prevention of accelerated cell aging in Werner syndrome using a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Nov;60(11):1386–93.
10. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O and et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 9363–9367. 1995
11. Duan J, Duan J, Zhang Z and Tong T: Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 1407–1420. 2005
12. Duriez C, Moyret-Lalle C, Falette N, El-Ghissassi F and Puisieux A: BTG2, its family and its tutor. *Bull Cancer.* 91: E242–253. 2004
13. Elmore LW, Di X, Dumur C, Holt SE and Gewirtz DA: Evasion of a singlestep, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells:

- implications for treatment response. Clin Cancer Res. 11: 2637-2643. 2005
14. Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS. : Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. Oncogene. 2005 Jul 14;24(30):4765-77.
 15. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF: Therapy-induced senescence in cancer. J Natl Cancer Inst. 2010 Oct 20;102(20):1536-46.
 16. Ficazzola MA, Fraiman M, Gitlin J, Woo K, Melamed J, Rubin MA and Walden PD: Antiproliferative B cell translocation gene 2 protein is down-regulated post-transcriptionally as an early event in prostate carcinogenesis. Carcinogenesis. 22: 1271-1279. 2001
 17. Fletcher BS, Lim RW, Varnum BC, Kujubu DA, Koski RA and Herschman HR: Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters. J Biol Chem. 266: 14511-14518. 1991
 18. Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E and Miwa N: Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. Life Sci. 63: 935-948. 1998
 19. Futreal PA and Barrett JC: Failure of senescent cells to phosphorylate the RB protein. Oncogene. 6: 1109-1113. 1991
 20. Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G,

Caruso M and Tirone F: Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol.* 20: 1797-1815. 2000

21. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF, Mori M. : Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells.* 2006 Mar;24(3):506-13. Epub 2005 Oct 20.

22. Hayflick L: The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res.* 37: 614-636. 1965

23. Hong JW, Ryu MS and Lim IK: Phosphorylation of serine 147 of p21/BTG2/pc3 by p-Erk1/2 induces Pin-1 binding in cytoplasm and cell death. *J Biol Chem.* 280: 21256-21263. 2005

24. Kawakubo H, Carey JL, Brachtel E, Gupta V, Green JE, Walden PD and Maheswaran S: Expression of the NF-kappaB-responsive gene BTG2 is aberrantly regulated in breast cancer. *Oncogene.* 23: 8310-8319. 2004

25. Keith wheaton, Jennifer Muir, Weili Ma and Samuel Benchimol: BTG2 antagonizes Pin1 in response to mitogens and telomere disruption during replicative senescence. *Aging Cell.* 2010 Oct;9(5):747-60.

26. Kim HS, Song MC, Kwak IH, Park TJ and Lim IK: Constitutive induction of p-Erk1/2 accompanied by reduced activities of protein phosphatases 1 and 2A and MKP3 due to reactive oxygen species during cellular senescence. *J*

Biol Chem. 278: 37497-37510. 2003

27. Konrad MA and Zuniga-Pflucker JC: The BTG/TOB family protein TIS21 regulates stage-specific proliferation of developing thymocytes. *Eur J Immunol.* 35: 3030-3042. 2005
28. Kwak IH, Kim HS, Choi OR, Ryu MS and Lim IK: Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res.* 64: 572-580. 2004
29. Lim IK, Lee MS, Lee SH, Kim NK, Jou I, Seo JS and Park SC: Differential expression of TIS21 and TIS1 genes in the various organs of Balb/c mice, thymic carcinoma tissues and human cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 121: 279-284. 1995
30. Lim IK, Lee MS, Ryu MS, Park TJ, Fujiki H, Eguchi H and Paik WK: Induction of growth inhibition of 293 cells by downregulation of the cyclin E and cyclin-dependent kinase 4 proteins due to overexpression of TIS21. *Mol Carcinog.* 23: 25-35. 1998
31. Lim IK, Won Hong K, Kwak IH, Yoon G and Park SC: Cytoplasmic retention of p-Erk1/2 and nuclear accumulation of actin proteins during cellular senescence in human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev.* 119: 113-130. 2000
32. Matsuda S, Rouault J, Magaud J and Berthet C: In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett.* 497: 67-72. 2001

33. Mooi WJ and Peeper DS: Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 355: 1037–1046. 2006
34. Morel AP, Sentis S, Bianchin C, Le Romancer M, Jonard L, Rostan MC, Rimokh R and Corbo L: BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms. *J Cell Sci.* 116: 2929–2936. 2003
35. Naderi J, Lopez C and Pandey S: Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* 127: 25–35. 2006
36. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ and Lowe SW: Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113: 703–716. 2003
37. Oswald J, Steudel C, Salchert K, Joergensen B, Thiede C, Ehninger G, Werner C and Bornhauser M: Gene-expression profiling of CD34+ hematopoietic cells expanded in a collagen I matrix. *Stem Cells.* 24: 494–500. 2006
38. Park S, Lee YJ, Lee HJ, Seki T, Hong KH, Park J, Beppu H, Lim IK, Yoon JW, Li E, Kim SJ and Oh SP: B-cell translocation gene 2 (Btg2) regulates vertebral patterning by modulating bone morphogenetic protein/smad signaling. *Mol Cell Biol.* 24: 10256–10262. 2004

39. Passos JF and von Zglinicki T: Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp Gerontol.* 40: 466-472. 2005
40. Passos JF and Von Zglinicki T: Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free Radic Res.* 40: 1277-1283. 2006
41. Prevot D, Morel AP, Voeltzel T, Rostan MC, Rimokh R, Magaud JP and Corbo L: Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway. *J Biol Chem.* 276: 9640-9648. 2001
42. Richter KH, Afshari CA, Annab LA, Burkhart BA, Owen RD, Boyd J and Barrett JC: Down-regulation of cdc2 in senescent human and hamster cells. *Cancer Res.* 51: 6010-6013. 1991
43. Robles SJ and Adami GR: Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene.* 16: 1113-1123. 1998
44. Rodier F, Campisi J. : Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011 Feb 21;192(4):547-56
45. Rouault JP, Falette N, Guehenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C and Puisieux A: Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular

- response pathway. *Nat Genet.* 14: 482-486. 1996
46. Rouault JP, Prevot D, Berthet C, Birot AM, Billaud M, Magaud JP and Corbo L: Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex. *J Biol Chem.* 273: 22563-22569. 1998
47. Ryo A, Uemura H, Ishiguro H, Saitoh T, Yamaguchi A, Perrem K, Kubota Y, Lu KP and Aoki I: Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 11: 7523-7531. 2005
48. Ryu MS, Lee MS, Hong JW, Hahn TR, Moon E and Lim IK: TIS21/BTG2/PC3 is expressed through PKC-delta pathway and inhibits binding of cyclin B1-Cdc2 and its activity, independent of p53 expression. *Exp Cell Res.* 299: 159-170. 2004
49. Sakaguchi T, Kuroiwa A and Takeda H: Expression of zebrafish btg-b, an anti-proliferative cofactor, during early embryogenesis. *Mech Dev.* 104: 113-115. 2001
50. Serrano M and Blasco MA: Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol.* 13: 748-753. 2001
51. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D and Lowe SW: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88: 593-602. 1997

52. Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D and Funk WD: Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol.* 9: 939–945. 1999
53. Spallarossa P, Altieri P, Barisione C, Passalacqua M, Aloï C, Fugazza G, Frassoni F, Podestà M, Canepa M, Ghigliotti G, Brunelli C. : p38 MAPK and JNK Antagonistically Control Senescence and Cytoplasmic p16INK4A Expression in Doxorubicin-Treated Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One.* 2010; 5(12): e15583.
54. Stein GH and Dulic V: Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays.* 17: 537–543. 1995
55. Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM and Smith JR: Senescent cells fail to express *cdc2*, *cycA*, and *cycB* in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 11012–11016. 1991
56. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A and Dulic V: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 19: 2109–2117. 1999
57. Struckmann K, Schraml P, Simon R, Elmenhorst K, Mirlacher M, Kononen J and Moch H: Impaired expression of the cell cycle regulator BTG2 is common in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 64: 1632–1638. 2004
58. Sugimoto K, Hayata T and Asashima M: XBTg2 is required for notochord differentiation during early *Xenopus* development. *Dev Growth Differ.* 47:

435-443. 2005

59. Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG and Tsai-Morris CH: A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res.* 1: 343-355. 1987
60. Taylor MP, Koyuncu OO, Enquist LW: Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jun;9(6):427-39.



**Regulation of actin cytoskeleton by TIS21 via
downregulating reactive oxygen species (ROS)
in the doxorubicin-induced premature senescence**

Bit Na Kim

Department of Molecular Medicine

The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor In Kyoung Lim)

BTG2 (B-cell translocation gene 2) is a member of the BTG/Tob family of anti-proliferative genes and has been implicated in various cellular processes including cell cycle progression, differentiation and apoptosis. Cellular senescence is an irreversible arrest of proliferation, which is induced by replicative cell division (replicative senescence) or stress (stress induced premature senescence; SIPS). Cellular senescence is induced by DNA damage, telomere shortening or oncogene activation. During cellular senescence BTG2 is stabilized in response to telomere dysfunction. Doxorubicin is an effective anticancer drug that belongs to a class of anthracyclines and a commonly used inducer of DNA damage. Here, we show the role of BTG2 in doxorubicin induced senescence in human diploid fibroblast. We observed increase in SA- β -gal staining, change in cellular morphology, an increase in

BTG2 expression and ROS level in response to doxorubicin treatment along with F-actin distribution in HDF cells, suggesting doxorubicin induced senescence phenotypes. However, TIS21 overexpression reduced the phenotypes characterized by the morphological change, SA- β -gal staining, F-actin re-distribution and ROS generations after doxorubicin treatment. The effect of TIS21 on the doxorubicin induced senescence phenotypes was further confirmed by knockingdown of endogenous BTG2 expression. However, the underlying mechanism of BTG2 effect on stress induced senescence needs further studies.

Key word : BTG2, Doxorubicin, HDF, Stress induced senescence

