

Hepatitis B Virus X Protein 과
Protein Phosphatase Type 2C의
상호작용과 그 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

노 보 영

Hepatitis B Virus X Protein 과
Protein Phosphatase Type 2C의
상호작용과 그 영향

지도 박 전 한 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

노 보 영

노보영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

연세캠퍼스에서의 생활을 시작한지도 벌써 8년이 지났습니다. 1994년 3월, 자신만만한 저에게 세상은 제 맘대로 되는 곳이었습니니다. 즐거웠던 대학시절과 졸업후의 방황, 그리고 버거웠지만 큰 공부가 되었던 대학원 생활과 함께 이제 조금은 두려워진 세상을 향해 발을 내딛으려 하는 저의 20대가 고스란히 이곳에 남아 있습니다. 벌써 몇 번을 쓰러졌을지 모를 부족한 사람을 지금까지 인도해주신 하나님께 감사와 영광을 돌립니다.

이 논문이 완성되기까지 공부하는 사람이 갖추어야 할 태도를 몸소 보여주시고 많은 기회와 아낌없는 지도를 제공해주신 박전한 교수님께 진심으로 존경과 감사를 드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문 지도를 맡아주시고 좋은 논문이 나올 수 있도록 많은 조언과 지도를 주신 김종선 교수님과 한광협 교수님께 감사드립니다. 학부때부터 면역학에 관심을 가질 수 있도록 지도해주시고 박전한 교수님과의 인연을 만들어주신 생명공학과 이상규 교수님과 부족한 후배를 항상 따뜻한 관심으로 지켜봐 주신 박현주 교수님께도 감사드립니다. 그리고 낮선 미생물학교실에서의 생활에 따뜻한 애정과 가르침을 주신 미생물학교실 여러 교수님들께 진심으로 감사를 드립니다.

대학원 생활 내내 든든한 선배로써 모범을 보여주신 김지수 선생님, 실험이나 공부를 하는 데 많은 조언과 도움을 주신 멋진 언니 최윤희 선생님, 항상 언니처럼 따뜻하게 대해주시고 물심양면으로 도움을 많이 주신 최유정 선생님, 지금은 유학준비로 자기와의 싸움을 하고 있을 착한 오빠 조성규 선생님, 세종대에서 HBx때문에 머리를 싸매고 있을 귀여운 유부남 유영건, 바쁜 와중에도 좋은 결과가 나올 수 있도록 많은 도움과 조언을 주신 정한영 선생님께 감사드립니다. 그 외 많은 도움을 주신 미생물학교실 모든 선생님들께도 감사드립니다.

대학시절 내내 함께 하고, 졸업 후 지금까지 제게 살아가는 힘이 되어준 나의 사랑하는 동기 생명공학과 94학번 김경희와 강민정에게 감사합니다. 이제는 사

회에서 자리를 잡아 어느덧 자랑스러운 친구들이 된 고등학교 동기 권지인, 길선영, 김연욱에게도 감사합니다. 힘든 대학원 시절의 짐을 나누어주고 항상 긍정적인 태도를 갖도록 힘을 준 동문친구이자 우리오빠, 기전공학부 96학번 백병준에게도 감사합니다. 제가 쓰러지고 지칠 때마다 기도로 후원해주고 가끔 맛있는 것도 사주고 문화생활도 시켜주었던 박재성오빠, 이성화, 황영미, 안승혜, 이철규, 그 외 한국중앙교회 12기 친구들에게 감사합니다. 대학원생활 내내 함께 고생했던 언제 만나도 즐거운 친구 울랄라 이현정과 귀여운 후배 생명공학과 95학번 송민정과 97학번 서민영에게도 감사합니다.

대학 졸업 후 저의 방향을 믿음으로 지켜봐 주시고 꿈을 잃어 가던 저에게 다시 공부할 수 있도록 용기와 후원을 주신 사랑하고 존경하는 부모님께 진심으로 감사드립니다. 저의 수족이 되어주신 부모님 곁을 이제는 제가 지켜드리겠습니다. 먼저 사회에 나가 자리를 잡고 부모님께도 누나에게도 잘하는 든든한 오빠 같은 나의 동생 지원이에게도 감사합니다.

이 논문은 여러분의 것입니다. 부족하지만 저에게 힘과 용기를 주신 여러분께 드리고 싶습니다. 이제 연세캠퍼스와 신촌에서의 긴 인연도 끝이 보이나 봅니다. 앞으로 어디에서 무엇을 하든지 이곳에서의 추억과 여러분의 사랑을 가슴속에 간직하고 살아가겠습니다. 감사합니다.

2002년 5월

노 보 영 드림

차 례

국문요약	1
I. 서 론	4
II. 재료 및 방법	9
1. 세포와 세포배양	9
2. Co-immunoprecipitation	9
3. Plasmids 제작	10
4. 재조합 단백질의 대장균 내 대량 발현	11
5. 대량발현된 rPP2C와 rHBx의 순수정제	12
6. <i>In vitro</i> phosphatase assay	13
III. 결 과	14

1. PP2C와 HBx의 결합	14
2. rHBX와 rPP2C의 대장균 내 대량발현과 정제	16
3. rPP2C의 농도에 따른 효소활성 측정	19
4. <i>In vitro</i> 에서 rHBx가 rPP2C의 활성화에 미치는 영향	19
IV. 고찰	22
V. 결론	27
참고문헌	28
영문요약	37

그림 차례

그림 1. PP2C와 HBx의 결합	15
그림 2. 유전자 재조합 단백질 rHBx와 rPP2C의 대장균 내 대량발현과 정제	17
그림 3. 정제한 rHBx와 rPP2C의 확인	18
그림 4. rPP2C의 농도에 따른 효소활성 측정	20
그림 5. rHBx가 rPP2C의 활성화에 미치는 영향	21
그림 6. 고찰도	24

국문요약

Hepatitis B Virus X Protein과 Protein Phosphatase Type 2C의 상호작용과 그 영향

Hepatitis B virus (HBV)의 감염은 급성 또는 만성 감염을 일으키는 물론 간암 (hepatocellular carcinoma: HCC)을 발병시키는 중요한 인자로 인식되어 왔고 대부분의 HBV와 관련된 지난 20여년간의 연구들은 특히, HBV의 간암발생 기전을 밝힘에 있어서 HBV X protein (HBx)의 생물학적인 기능과 영향에 주목하게 되었다. HBx에 관한 초기의 연구들은 HBx가 다양한 viral 그리고 cellular promoter/enhancer elements를 transcriptional transactivation한다는 것을 밝혔다. HBx가 직접 DNA에 결합하지 않음에도 불구하고, AP-1, AP-2, NF- κ B, SRF, c/EBP, Ets, ATF1, Egr-1, CREB 등의 binding sites를 포함하는 광범위한 *cis*-elements들이 HBx에 의해 활성화된다는 것이 보고되었다. 이에 관련된 많은 연구들은 이러한 HBx의 transcriptional transactivation의 기전을 세포질 내의 신호전달계를 활성화시킴으로써 이루어진다고 보고하였다. 그중에서도 특별히 AP-1, NF- κ B 같은 전사인자 활성화와 관계가 있는 Ras/Raf/ERK, MEKK-1/JNK, PI3K/Akt, Jak/STAT cascades를 활성화시키는 것에 관심을 가졌다. 이러한 HBx의 신호전달계 활성화는 DNA 손상복구, 세포주기 조절 및 세포고사에 영향을 미칠 수 있음이 밝혀졌다. 따라서 HBx의 이

러한 복합적인 활성화는 간암 발생에 밀접하게 관계한다는 것을 시사하나, HBx가 세포내에서 직접 상호작용하는 분자들에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 HBx가 세포내에서 직접 상호작용하는 분자들에 관심을 가지게 되었고, 그러한 분자에 대해 yeast two hybrid system을 이용한 실험에서 HBx가 protein phosphatase type 2C (PP2C)와 결합한다는 정보를 얻게 되었다. Protein phosphatase는 크게 PTP, PPP, PPM의 세 개의 family로 나눌 수 있다. 본 연구에서 관심을 갖는 PP2C는 PPM family에 속하는 주요 효소인데, 이러한 PP2C의 활성화는 metal cation인 Mn^{2+} 나 Mg^{2+} 를 절대적으로 요구하지만, 다른 PPP family의 억제제나 okadaic acid에는 sensitive하지 않다고 알려져 있다. 지금까지 가장 잘 알려진 기능은 stress에 의해 활성화되는 JNK/p38 신호전달계나 Wnt 신호전달계 같은 protein kinase cascades에 관계하는 kinase의 활성을 reversing하여 inhibition하거나 activation하는 것이다. 덧붙여 몇몇 보고들에선 PP2C가 세포주기 조절에도 관여한다는 보고들이 이어지고 있다.

본 연구에서는 우선적으로 앞서 보고된 HBx와 PP2C의 직접적인 상호작용을 재확인하고, HBx와 PP2C의 결합이 PP2C의 활성화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. Co-immunoprecipitation assay를 통해 Chang 세포주와 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag이 붙은 HBx가 유도발현되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주를 사용하여 항 PP2C 항체로 면역침전을 시행한 다음, 항 HA 항체로 western blotting을 시행하여 세포내 발현되고 있는 PP2C와 doxycycline으로 유도 발현된 HBx가 결합하고 있음을 확인하였다. 또한 이러한 결합이 PP2C의 탈인산화 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해, 대장균에서 대량발현시켜 순수 정제한 HBx와 PP2C의 재조합 단백질을 사용하여 pNPP을 기질로 하는 *in*

in vitro phosphatase assay를 시행하여 재조합 HBx가 재조합 PP2C의 탈인산화 활성에 저해효과를 나타냄을 확인하였다.

이러한 결과들을 바탕으로 HBx가 세포내에서 PP2C에 직접적으로 결합하고, PP2C의 탈인산화 활성을 저해함으로써 인해 PP2C가 저해조절하고 있는 SAPK pathway나 CDKs등의 인산화와 활성을 유도하고 나아가 세포고사와 세포주기 조절에 영향을 미치게 될 것이라고 기대하게 되었다.

핵심되는 말 : HBx, PP2C, 간암발생, 세포주기, 세포고사

Hepatitis B Virus X Protein과 Protein Phosphatase Type 2C의 상호작용과 그 영향

<지도교수 박 전 한>

연세대학교 대학원 의과학사업단

노 보 영

I. 서 론

B형 간염 virus (human hepatitis B virus; HBV)는 *Hepadnaviridae*의 원형(prototype)¹으로, 1960년대에 오스트레일리아 원주민의 혈청에서 바이러스 입자가 발견되면서 알려지게 되었다². HBV는 바이러스의 감염에 의해 발생하는 급성 또는 만성 간염을 일으키는 병원체 중의 하나로, 전세계 인구의 4-5%가 감염되어 있으며 만성간염 또는 간암(hepatocellular carcinoma: HCC)으로의 진행에 강력한 연관성을 가지고 있다³⁻⁵.

HBV의 유전체 구조는 4개의 open reading frames (ORFs)로 구성되어 있으며, 각 ORF는 surface antigen (preS-S), core antigen (preC-C),

polymerase, X protein (HBx)을 지령한다⁶. 이중에서 특히 HBx가 관심을 끌게 된 이유는 HBx-transgenic mice에서 간암이 발생하는 것이 보고되어졌고, 몇몇 실험에서 세포변형에 HBx가 관련되어 있음이 관찰되었기 때문이다⁷⁻¹⁰. HBx의 연구가 진행되면서 간암발생과 관련된 기능으로 다양한 viral 그리고 cellular promoter/enhancer elements를 transcriptional transactivation한다는 것이 밝혀졌다¹¹. HBx가 직접 DNA에 결합하지 않음에도 불구하고, AP-1, AP-2, NF- κ B, SRF, c/EBP, Ets, ATF1, Egr-1, CREB 등의 binding sites를 포함하는 광범위한 cis-elements들이 HBx에 의해 활성화된다는 것이 보고되었다¹²⁻¹⁷. 그러나 이러한 transactivation의 정확한 기전은 아직까지 밝혀지지 않고 있다. 초기의 연구자들은 HBx가 핵 내에서 세 개의 RNA polymerase의 subunit인 RPB5를 포함하는 다양한 transcriptional machinery의 구성 요소들 또는 몇몇 전사인자와 상호작용함으로써 coactivator와 같은 역할을 수행한다는 것으로, HBx의 transcriptional transactivation 기능을 설명하려 하였다¹⁸⁻²¹. HBx의 또 다른 작용 기전은 신호전달계의 활성화와 관련이 있다. HBx가 AP-1, NF- κ B 같은 전사인자 활성화와 관계가 있는 Ras/Raf/ERK, MEKK-1/JNK²²⁻²⁷, PI3K/Akt²⁸⁻³¹, Jak/STAT cascades²⁸를 활성화시키는 것이 밝혀졌다. 따라서 HBx는 두 가지 기능을 가지고 있을지도 모른다. 하나는 신호전달계의 활성을 매개하는 것이고, 다른 하나는 nuclear function에 관계하는 것으로 전사인자나 그와 관련된 다양한 인자들과의 상호작용으로 이러한 단백질들의 활성이나 DNA에의 결합을 더 향상시키는 것으로 생각되어지고 있다. Transcriptional transactivator로서의 역할로 인해 HBx는 DNA 손상복구^{32,33}, 세포주기^{34,35} 및 세포고사³⁶⁻³⁹ 조절에 관여하는 것으로 보고되었다.

따라서 HBx는 다양한 생물학적 기능을 발휘할 수 있으며, 이러한 다양한 기능이 간암 발생에 깊이 관여하고 있다는 것을 알게 되었다. 본 연구

에서는 특히 HBx의 신호전달계 활성화에 관련된 역할에 주목하면서 이에 대한 기전을 밝히기 위해, HBx와 직접 상호작용하는 분자들에서 신호전달계 활성화에 대한 실마리를 찾아보려 하였다. HBx와 상호작용하는 분자에 대해 yeast two hybrid system을 이용한 실험에서 HBx가 protein phosphatase type 2C (PP2C)와 결합한다는 [unpublished data] 것에 관심을 갖게 되었다.

Protein phosphatase는 크게 PTP, PPP, PPM의 세 개의 family로 나눌 수 있다⁴⁰. PTP는 tyrosine phosphatase이고, PPP와 PPM은 serine/threonine phosphatase이다. PPP family에는 PP1, PP2A, PP2B의 3가지 subtype이 속하는데, tumor promoter인 okadaic acid 등에 의해 활성이 저해되며, catalytic subunit과 regulatory 및 targeting subunit이 복합체를 이루어 holoenzyme을 형성하는 구조를 가지고 있다⁴¹. 마지막으로 PPM family는 eukaryote나 prokaryote에서 존재하는 PP2C로 정의될 수 있다. Molecular cloning으로 밝혀진 PP2C의 구조는 PPP family와는 다르게 monomeric enzymes이나, 유전자 염기서열에는 유사점이 없지만 3차 구조적으로 볼 때 매우 비슷한 모양을 하고 있다⁴⁰. Mammalian PP2C는 두 개의 domain으로 구성되어 있는데, N-terminal의 catalytic domain과 C-terminal domain이다. 특히 catalytic site는 네 개의 invariant Asp residues와 하나의 nonconserved Glu residue가 함께 Mg^{2+} , Mn^{2+} 같은 두 개의 metal cation을 포함하는 binuclear metal center를 구성한다⁴⁰. 따라서 PP2C의 활성화는 metal cation인 Mn^{2+} 나 Mg^{2+} 를 절대적으로 요구하지만, 다른 PPP family의 억제제나 okadaic acid에는 sensitive하지 않다고 알려졌다⁴². PP2C는 다양한 subtype을 갖는데, 사람에서 보고되어진 subtype으로도 PP2C α , PP2C β , PP2C γ , PP2C δ ⁴³를 비롯하여 WIP1⁴⁴⁻⁴⁶, FIN13⁴⁷, 최근에는 ILK와 관련된 ILKAP⁴⁸까지 다양한 영역에서 다양한 기능들이 밝

혀지고 있다. 지금까지 가장 잘 알려진 기능은 stress에 의해 활성화되는 JNK/p38 신호전달계⁴⁹⁻⁵³나, Wnt 신호전달계⁵⁴⁻⁵⁶같은 protein kinase cascades에 관계하는 kinase의 활성을 reversing하여 inhibition하거나 activation하는 것이다. 덧붙여 몇몇 보고들에선 PP2C가 세포주기 조절에도 관여한다는 보고들이 이어지고 있다^{57,58}.

위에서 제시한 HBx의 다양한 생물학적 기능과 간암발생의 깊은 연관성에 주목하면서 HBx의 신호전달계 활성화에 관련된 역할에 대한 기전을 밝힌다면, HBx의 간암발생 기전을 좀더 명확히 규명할 수 있으리라 생각하게 되었다. 앞에서 기술했듯이 HBx가 Ras/Raf/ERK, MEKK-1/JNK²²⁻²⁷, PI3K/Akt²⁸⁻³¹, Jak/STAT cascades²⁸ 같은 다양한 신호전달계를 활성화시키는 것이 밝혀져 왔고, 이러한 신호전달이 AP-1, NF- κ B 같은 전사인자 활성을 유도하는 것이 알려져 왔기 때문에, 과연 HBx가 이러한 신호전달계에 어떻게 작용하는지에 대해 관심을 갖게 되었다. 이를 해결하기 위해 먼저 HBx가 직접 상호 작용하는 분자들에서 실마리를 찾아보려 하였다. HBx와 상호 작용하는 분자들에 대해 yeast two hybrid system을 이용한 실험에서 HBx가 PP2C와 결합한다는[unpublished data]것이 눈길을 끌었는데, kinase는 substrates의 serine/tyrosine/threonine residues를 인산화시키고, 반대로 phosphatase는 탈인산화시키는 효소이기 때문에, HBx가 이러한 phosphatase와 상호작용하여 이들의 생물학적 활성화에 영향을 준다면, 지금까지 알려져 있는 많은 신호전달계에 관계된 기전에 접근할 수 있으리라 생각되어졌다. 더욱이 PP2C에 대하여 밝혀진 문헌에 의하면, PP2C가 stress에 의해 활성화되는 JNK/p38 신호전달계⁴⁹⁻⁵³나, Wnt 신호전달계⁵⁴⁻⁵⁶ 같은 protein kinase cascades에 영향을 미친다는 것이 알려졌기 때문에, 더욱 HBx와 PP2C의 연관성에 초점을 맞추어 연구방향을 정하게 되었다.

따라서 본 연구에서는 yeast two hybrid system을 이용하여 앞서 보고

된 HBx와 PP2C의 결합을 확인하고, 이러한 결합이 PP2C의 탈인산화효소 활성에 어떠한 영향을 주는지를 알아봄으로써 HBx가 신호전달계 또는 세포주기 조절에 매개하는 기전을 설명하는데 있어 새로운 관점을 제시하고자 하였다.

먼저 HBx와 PP2C의 결합을 확인하기 위해 co-immunoprecipitation (co-IP) 방법을 사용하였는데, endogeneous하게 발현되는 PP2C와 HBx의 결합여부를 알아보기 위해, 세포로는 Chang 세포주과 Chang cell에 Tet-on system으로 hemagglutinin (HA) tag이 붙은 HBx가 유도발현되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주를 사용하였다. 항 PP2C 항체로 면역침전을 시행한 다음 항 HA 항체로 western blotting을 시행하여 두 단백질간의 결합을 확인하였다.

HBx와 PP2C의 결합을 확인함에 따라 이러한 상호작용이 PP2C의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위해, HBx와의 결합이 PP2C의 탈인산화효소 활성에 어떤 영향을 미치는지를 *in vitro* phosphatase assay를 시행하여 확인하였다. 대장균에서 대량발현시킨 재조합 단백질 HBx (rHBx)와 PP2C (rPP2C)를 순수 정제하여 *in vitro*에서 탈인산화효소의 기질인 pNPP의 탈인산화 정도를 UV spectrometer로 측정하여 분석하였고, 분석 결과 HBx와 PP2C의 결합이 PP2C의 탈인산화 활성에 저해효과를 나타내는 것을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

I. 세포와 세포배양

Chang cells과 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag이 붙은 HBx가 유도발현되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 cells은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 0.1 mM non-essential amino acids를 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. Chang X 34 cells에서의 HBx 유도발현은 배지에 2 µg/ml이 되도록 doxycycline (Sigma)을 첨가하여 24시간 배양하였다.

2. Co-immunoprecipitation⁶⁰

HBx와 PP2C의 결합을 알아보기 위해 Chang cells와 doxycycline으로 HBx 발현을 유도시킨 Chang X 34 cells를 RIPA buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 1.8 µM aprotinin, 100 mM NaCl, 0.2% NP-40, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF)에 용해하여 Bradford assay로 단백질 농도를 결정하였다. 세포용해액 1 mg을 4 µg의 항 PP2C 항체로 4°C에서 밤새 반응시켰다. 미리 200 µl blocking solution (5 mg/ml BSA)으로 25°C에서 1시간 반응시키고 PBS로 3회 세척한 Protein G agarose를 첨가하여 4°C에서 2시간 반응시켜 형성된 면역복합체를 14,000 rpm에서 5

초동안 원심분리하여 agarose beads를 모아 aprotinin과 PMSF를 포함하지 않는 RIPA buffer로 6번 세척했다. 30 μ l의 SDS sample buffer로 섞어준 후, 10 분간 끓이고, 원심분리 후 상층액을 SDS-PAGE를 시행한 후 nitrocellulose (NC: Bio-rad) membrane에 전이하여, 항 HA 항체로 western blot⁶¹을 수행하였다.

3. Plasmids 제작

PP2C가 대장균에서 대량 발현되는 plasmid를 제작하기 위하여, Chang cells에서 total RNA를 추출하여 역전사로 cDNA를 얻어낸 후, full-length PP2C cDNA (1.15 kb)를 기저판으로 하여 restriction enzyme site (*Bam*H I/*Hind* III) hanger를 가진 primer로 PCR을 수행하였다. PP2C의 start codon을 가지고 있는 10 pmol의 5' primer (CGGATCCCTAATGGGAGCATTTTTAGACAAGC: 밑줄은 *Bam*H I site) 와 3' primer (CCCAAGCTTCCCACATATCATCTGTTGATGT: 밑줄은 *Hind* III site) 각 1 μ l와 10 \times reaction buffer 2 μ l, Taq 0.2 μ l (Takara), 10 mM dNTP 1 μ l, 5 \times Band Doctor 4 μ l, DW 8.8 μ l를 섞어서 95 $^{\circ}$ C 5분 가열한 후 94 $^{\circ}$ C 1분의 denaturation, 58 $^{\circ}$ C 1분의 annealing, 72 $^{\circ}$ C 1분의 polymerization으로 35 cycles을 돌린 후, 72 $^{\circ}$ C 10분 extension의 thermocycles를 수행하였다. 그 후 prokaryotic expression vector인 pRSET C (Invitrogen)를 PP2C PCR product와 함께 제한효소인 *Bam*H I 과 *Hind* III로 sequential digestion시키고, PCR purification kit (QIAGEN)로 정제한 후 ligation하였다⁶². HBx가 대장균에서 대량 발현

되는 plasmid는 위에서와 같은 방법으로 얻어진 cDNA를 기저판으로 하여 5' primer (CGGAATTCCGATGGCTGCTAGGAT: 밑줄은 *EcoR* I site) 와 3' primer (CCCCAAGCTTTTAGGCAGAGGTGAA: 밑줄은 *Hind* III site) 각 10 pmol로 역시 위와 같은 방법으로 증폭시켜 pRSET A와 함께 제한효소인 *EcoR* I과 *Hind* III로 digestion하여 ligation하였다. 이렇게 제작한 recombinant plasmid의 orientation 및 염기서열은 DNA sequencing으로 확인하였다.

4. 재조합 단백질의 대장균 내 대량 발현⁴²

rPP2C와 rHBx를 대장균 내에서 His-tag이 융합된 형태로 대량발현시키기 위해서, pRSET vector에 클로닝하여 제작한 각각의 plasmid를 대장균 균주 BL21에 형질도입시켰다. 형질 변환된 균주를 100 µg/ml ampicillin이 포함된 2 L의 LB배지로 37°C에서 OD₆₀₀가 0.8이 될 때까지 키운 후, 1 mM IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 4시간동안 더 배양함으로써 원하는 단백질의 대량발현을 유도한 뒤 원심분리 후 세균침전을 얻었다. 얻어진 세균침전을 SDS sample 용액으로 용해시키고, 12% SDS-PAGE를 시행한 뒤, Coomassie blue 염색으로 단백질의 발현정도를 분석하였다. 발현이 확인된 단백질이 대장균 내에서 soluble form으로 발현되는지 insoluble form (inclusion body)으로 발현되는지를 확인하기 위하여, PBS 용액에 용해된 세균침전을 초음파 분쇄기로 분쇄한 후 원심분리하였다. 상층액과 침전물을 각각 SDS sample buffer와 섞어 끓인 뒤, 12% SDS-PAGE를 시행하고 Coomassie blue 염색으로 단백질의 발현양상을 분석한 결과, rPP2C와 rHBx 모두 inclusion body 형태로 발현됨을 확인

하였다.

5. 대량발현된 rPP2C와 rHBx의 순수 정제⁴²

대장균 내에서 insoluble form으로 발현된 rPP2C와 rHBx를 분리해 내기 위해 세균을 용해시킨 후 원심분리하여 얻은 침전물을 buffer B 용액 (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 8.0) 50 ml에 충분히 녹인 후, 14,000 rpm에서 15°C, 30분 동안 원심분리하였다. 상층액을 시험관으로 옮긴 후 buffer B로 equilibration된 Ni-column (QIAGEN)에 부어 반응시켰다. 이 후 buffer C (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 6.3)로 수회 세척해 주고, buffer D (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 5.9)와 buffer E (8 M urea, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, pH 4.5)로 elution하였다. 이렇게 얻어진 용액을 Centicon (Vivascience)을 이용하여 1 ml로 농축시키고, glutathione redox buffer (0.1 M Tris, pH 8.0, 0.4 M L-Arginine, 2 mM EDTA, 5 mM reduced GSH, 0.5 M oxidized GSH, 0.5 mM PMSF) 500 ml에 희석시킨 뒤 4°C에서 24시간동안 반응시킴으로써 활성을 다시 띠게 하였다. Refolding과정을 거친 단백질을 다시 Centricon을 이용하여 1 ml로 농축시키고 Superdex 75 resin을 사용한 FPLC gel-filtration chromatography로 분리하여, 약 27kDa에 해당하는 rHBx와 약 45kDa에 해당하는 rPP2C 단백질을 모았다. 이렇게 정제한 재조합 단백질은 12% SDS-PAGE를 시행한 후, Coomassie blue 염색으로 순도를 확인하고 항 His 항체로 western blotting을 수행하여 단백질의 발현을 확인하였다.

6. *In vitro* phosphatase assay⁴²

HBx와 PP2C의 결합이 PP2C의 탈인산화효소로서의 기능에 영향을 미치는 지를 알아보기 위해, 위에서 순수 정제한 rPP2C와 rHBx를 반응용액 (50 mM Tris, pH 7.5, 2 mM DTT, 10 mM MnCl₂)에 농도별로 첨가하여 4°C에서 30분동안 반응시키고, 50 mM pNPP를 기질로 첨가하여 전체 반응부피를 200 μ l로 만들어 37°C에서 1시간 반응시킨 후 2N NaOH 0.1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 효소반응 결과 생성된 p-nitrophenol은 405 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

III. 결 과

1. PP2C와 HBx의 결합

먼저 선행된 보고를 바탕으로 HBx와 PP2C의 결합을 확인하기 위하여, 본 연구에서는 Chang 세포주와 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag 이 붙은 HBx가 유도발현되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주를 사용하였다. 이 세포주에서 endogenous하게 발현되는 PP2C에 doxycycline으로 유도발현된 HBx가 세포 내에서 결합하고 있는지를 알아보기 위해, co-IP법을 이용하였는데, 먼저 항 PP2C 항체로 IP를 시행한 다음, 항 HA 항체로 western blotting을 시행하여 두 단백질간의 결합을 확인하였다 (그림 1). HBx가 발현되지 않는 Chang cell에서는 PP2C와 HBx의 결합을 확인하지 못한 반면에, HBx를 doxycycline으로 유도발현시킨 Chang X 34 cell에서는 PP2C와 결합하는 HBx를 관찰할 수 있었다. 또한 Chang X 34 cell에서 doxycycline을 처리하지 않은 세포주에서도 약간의 결합이 관찰되었는데, 이는 leaky하게 발현된 HBx가 PP2C와 결합하는 것에 기인됨을 추측할 수 있었다. 여기에 Chang cell과 Chang X 34 cell에서 endogenous하게 발현되는 PP2C의 양을 항 PP2C 항체로 western blot하여 확인한 결과, 모든 세포주에서 같은 양의 PP2C가 발현되고 있음을 확인하였다. 따라서 세포 내에서 endogenous하게 발현되는 PP2C에 doxycycline으로 유도발현된 HBx가 결합하고 있다는 것을 확인하였고, 이러한 결합이 HBx의 발현되는 양에 비례하고 있음을 관찰하였다.

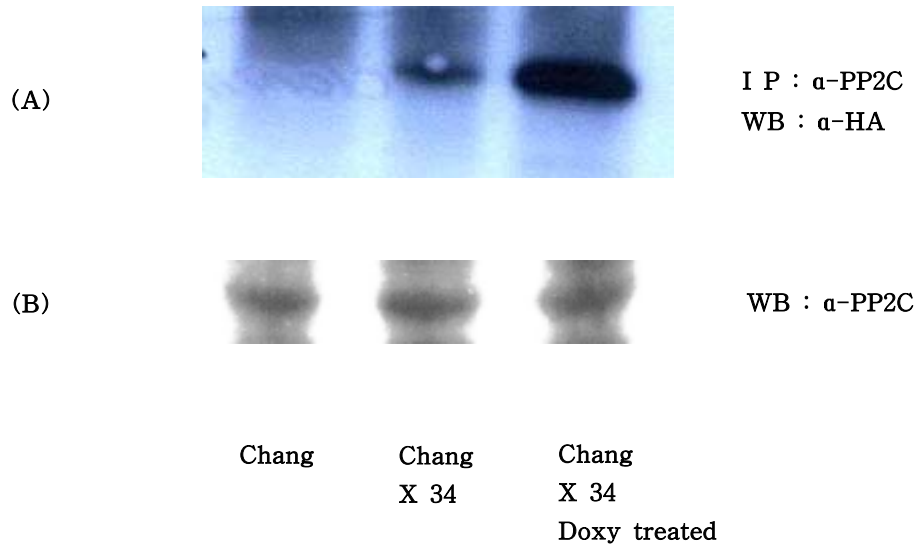


그림 1. PP2C와 HBx의 결합. (A) Chang 세포주와 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag이 붙은 HBx가 유도발현되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주와 37°C에서 24시간동안 doxycycline을 처리한 Chang X 34 세포주의 cell lysate 1 mg씩을 4 μ g의 항 PP2C 항체와 4°C에서 밤새 반응시킨 후, SDS-PAGE로 전기영동하여 NC membrane에 전이하고, 항 HA 항체로 western blot을 수행. (B) 세포용해액 100 μ g씩을 SDS-PAGE하고 NC membrane에 전이하여 항 PP2C 항체로 western blot을 수행하여 각 세포주에서 같은 양의 endogenous한 PP2C가 존재함을 확인. Doxy: doxycycline.

2. rHBx와 rPP2C의 대장균 내 대량발현과 정제

세포주 내 발현되는 PP2C와 HBx의 결합을 확인함에 따라, 이러한 결합이 PP2C의 탈인산화효소로서의 활성화에 어떠한 영향을 미칠 것인가를 알아볼 필요가 생겼다. 먼저 이러한 결합이 직접적으로 PP2C의 탈인산화 활성화에 미치는 영향을 *in vitro*에서 확인하기 위하여 rHBx와 rPP2C를 대장균 내 대량 발현시켰다.

먼저 HBx와 PP2C의 유전자 부위를 역전사 중합효소 연쇄반응법으로 증폭한 뒤, 대장균 내에서 6 × His가 붙은 재조합 단백질 발현을 위하여 pRSET A와 pRSET C vector를 이용하여 클로닝 하였다. 클로닝된 유전자를 대장균 내에 형질 도입한 뒤 IPTG의 첨가로 원하는 단백질인 HBx와 PP2C의 대량발현을 유도하였다. 발현된 rHBx와 rPP2C를 inclusion body로 분리해 낸 후 Ni-column을 사용하여 정제하였고, redox buffer에 희석시켜 refolding 과정을 거친 뒤 1 ml로 농축시키고 Superdex 75 resin을 사용한 FPLC gel-filtration chromatography로 분리하여, 약 27 kDa에 해당하는 rHBx와 약 45 kDa에 해당하는 rPP2C 단백질을 모았다 (그림 2). 이렇게 순수 정제된 rHBx와 rPP2C는 12% SDS-PAGE gel에서의 Coomassieblue 염색과 항 His 항체를 이용한 western blotting을 이용하여 다시 한번 확인하였다 (그림 3). Coomassie blue 염색 결과 약 45 kDa의 위치에 rPP2C와 약 27 kDa의 rHBx를 나타내는 밴드를 확인하였고 95% 이상의 순도를 보여주었다. 또한, western blotting 결과 역시 rPP2C와 rHBx의 위치에 하나의 주 밴드로 나타났다.

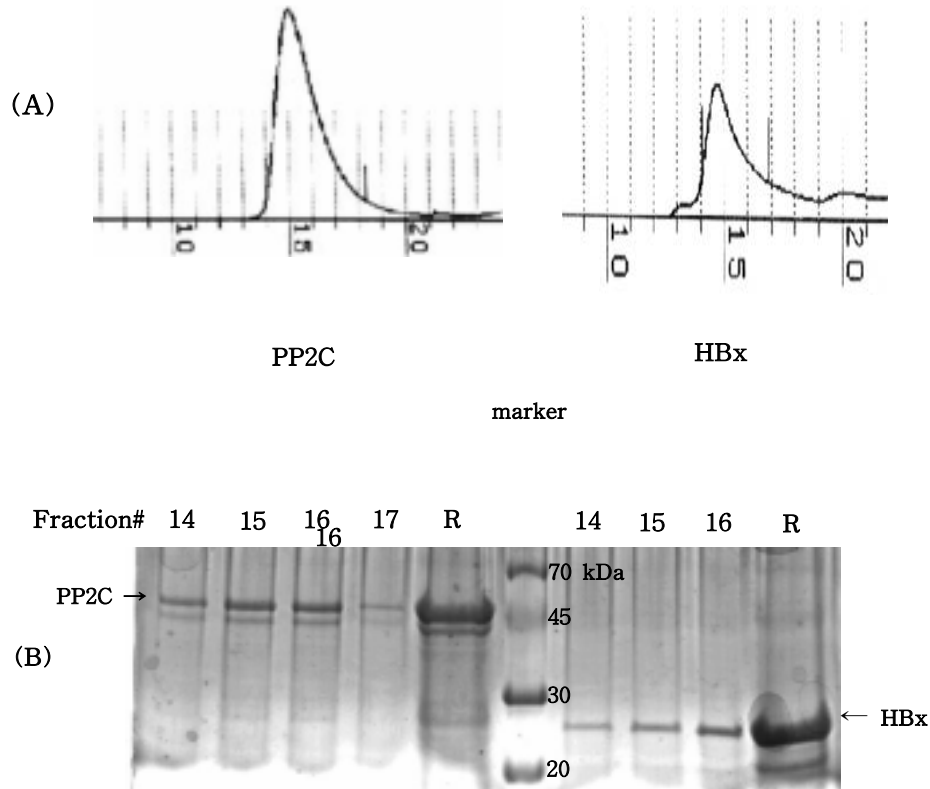


그림 2. 유전자 재조합 단백질 rHBx와 rPP2C의 대장균 내 대량발현과 정제. rPP2C와 rHBx를 대장균 내에서 대량발현하기 위해서, 제작한 plasmid를 대장균 균주 BL21에 형질도입시켜 형질변환된 균주를 1 mM IPTG로 단백질 발현을 유도한 후 세균침전을 얻어 8 M urea 용액에 녹이고 Ni-colum으로 순수정제하여, refolding과정을 거친 단백질을 1 ml로 농축한 후 Superdex 75 resin을 사용한 FPLC gel-filtration chromatography로 분리한 결과, (A) peak 부위에서 재조합 단백질이 용출됨을 확인하였고, (B) Peak를 나타내는 단백질을 모아 전기영동을 시행 후 Coomassie blue 염색으로 약 27 kDa에 해당하는 rHBx와 약 45 kDa에 해당하는 rPP2C 단백질을 확인하였다. 이때 Gel-filtration을 거치기 전의 redox 상태의 단백질도 같이 전기영동하여 확인하였다. R: redox status

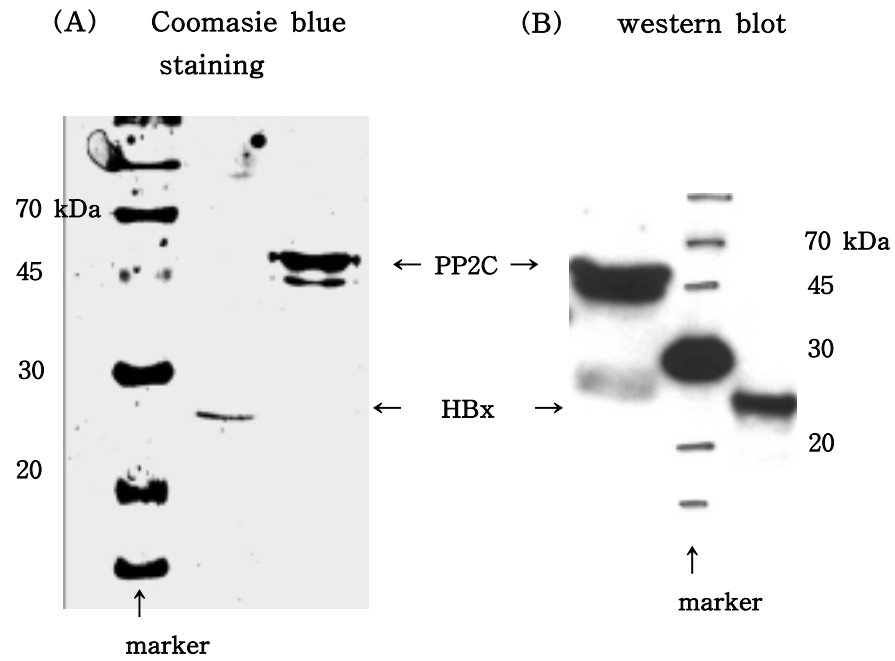


그림 3. 정제한 rHBx와 rPP2C의 확인. FPLC gel-filtration chromatography로 순수정제한 재조합 단백질 rPP2C와 rHBx를 Coomassie blue 염색으로 재조합 단백질의 순도를 확인하고 (A), 항 His 항체를 사용한 western blot으로 확인하였다 (B).

3. rPP2C의 농도에 따른 효소활성 측정

순수 정제한 rPP2C의 탈인산화효소로서의 활성을 측정하기 위하여, rPP2C의 농도를 증가시킴에 따른 활성 정도를 pNPP를 기질로 하는 탈인산화반응으로 확인하였다 (그림 4). PP2C에 대한 동역학적 활성 보고에서 PP2C의 활성이 pH 7.0 이상에서 최대치에 이르고 Mg^{2+} 이온보다는 Mn^{2+} 이온에 더 민감하다는 내용을 바탕으로⁴³ PP2C 반응용액 (50 mM Tris, pH 7.5, 2 mM DTT, 10 mM $MnCl_2$)에 50 mM의 pNPP를 기질로 하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그 결과 PP2C의 양이 증가함에 따라 pNPP의 탈인산화가 증가함을 확인하였다.

4. *In vitro*에서 rHBx가 rPP2C의 활성에 미치는 영향

rPP2C의 활성을 확인함에 따라 이러한 *in vitro*상의 순수 정제한 rPP2C의 활성에 rHBx와의 결합이 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대해 알아보기 위해, rPP2C의 양을 10 μ g으로 고정시키고 rHBx의 양을 20 μ g까지 늘리면서 두 개의 재조합 단백질을 4°C에서 10분간 Tris 용액 (50 mM Tris, pH 7.5)에서 전반응시킨 후, PP2C 반응용액에서 rPP2C의 활성 정도를 pNPP를 기질로 하는 탈인산화반응으로 확인한 결과 rHBx의 양에 비례하여 rPP2C의 활성이 저해되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 5). 이는 rHBx가 rPP2C와 결합하여 rPP2C의 활성을 방해하기 때문이라고 사료된다. 그에 반해 rHBx만 넣어준 군에서는 별다른 변화를 관찰하지 못했다.

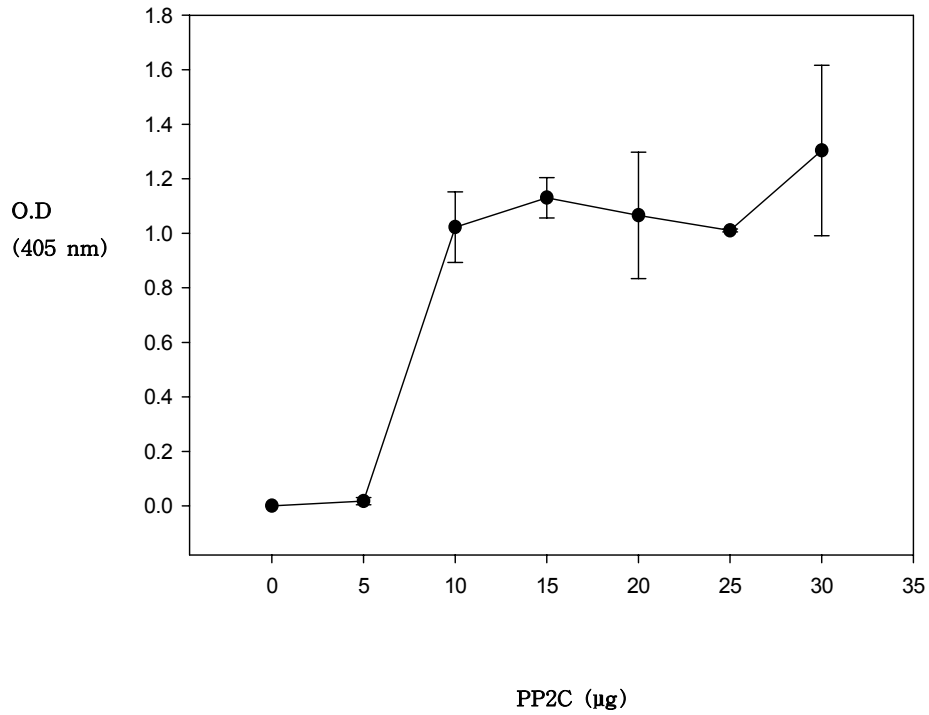


그림 4. rPP2C의 농도에 따른 효소활성 측정. rPP2C의 양을 늘려가면서 50 mM pNPP를 기질로 첨가하여 PP2C의 효소활성을 측정하였다. 2 N NaOH 0.1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 효소반응 결과 생성된 p-nitrophenol을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

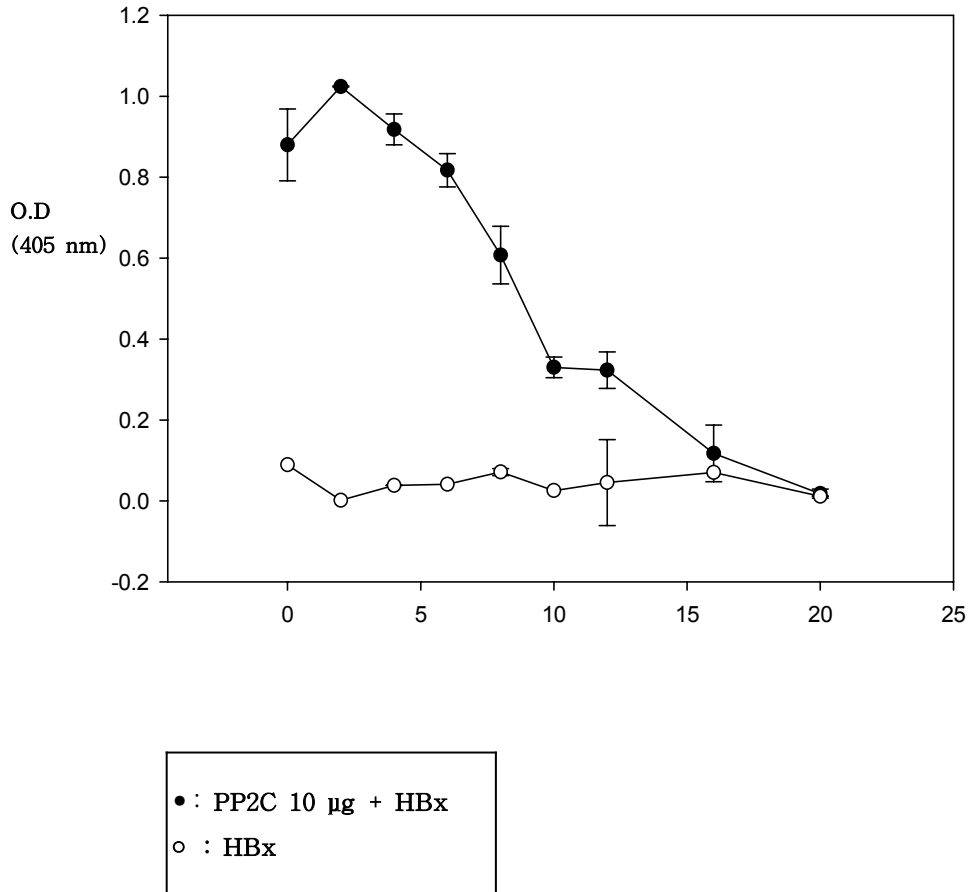


그림 5. rPP2C의 활성화에 rHBx가 미치는 영향. rPP2C의 양을 10 µg으로 고정시키고 HBx의 양을 늘려가면서 50 mM pNPP를 기질로 첨가하여 PP2C의 활성을 측정하였다. 여기에 대조실험으로 PP2C를 첨가하지 않은 반응용액에 HBx의 양을 같은 단위로 늘려가면서 반응하여 함께 측정하였다. 반응은 duplicate로 두 번 시행하였으며, 2 N NaOH 0.1 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 효소반응 결과 생성된 p-nitrophenol은 405 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

IV. 고 찰

본 연구의 첫 번째 목적은 우선 선행된 보고를 바탕으로 HBx가 정말 PP2C와 상호 작용하는 지를 밝혀내는 것이다. 지금까지 HBx가 다양한 신호전달계에 영향을 미치는 이유에 대한 연구들은 HBx가 세포내에서 위치하는 부위가 핵보다는 세포질에 더 우세하게 나타나는 것을 바탕으로, HBx가 세포전달체계에 직접적으로 영향을 줄 것이라고 예견하기도 하였다⁶. 하지만 HBx가 신호전달계의 어느 한 단계를 표적으로 하기 보다는 신호전달계 전 단계에 걸쳐 다양하게 영향을 미치는 경우가 많고, HBx의 표적분자에 대한 보고가 미약하기 때문에 정확한 기전을 설명하기엔 어려움이 있었다. 따라서 본 연구에서는 HBx가 이러한 신호전달계 전반에 걸쳐 관계한다고 알려진 PP2C와 상호작용한다는 것을 입증하여, HBx가 상호작용하고 그 기능에 영향을 미치는 분자에 대해 새로운 정보를 제공함과 동시에 HBx가 신호전달계에 영향을 미치는 기전을 설명하는 데 실마리를 주고자 하였다. 본 연구에서는 Chang 세포주와 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag이 붙은 HBx가 유도발현 되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주를 사용하여 endogenous하게 발현되는 PP2C에 유도 발현된 HBx가 결합하는 것을 co-immunoprecipitation으로 확인하게 되었다. 두 분자가 이렇게 결합하는 것은 상호간의 활성화에 어느 정도 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있기 때문에 그동안 HBx가 신호전달체계에 영향을 미치는 기전에 있어서 정확한 해결책을 제시하기 어려웠던 부분에 새로운 관점을 제시하게 되었다. 즉, JNK와 p38로 대표되는 stress activated MAPK pathway (SAPK pathway)와 세포주기 진행에 관련하는

cdk2, cdk6의 negative regulator로 알려진 PP2C에 HBx가 결합함으로써 인해 HBx가 지금까지 알려진 MAPK pathway, 또는 cdk를 활성화하는 데 더 근접한 기전을 설명할 수 있으리라 기대된다. 따라서 탈인산화효소인 PP2C에 HBx가 결합한다는 사실은 새로운 발견이면서 동시에 지금까지 설명하지 못했던 정확한 기전에 대한 실마리라고 할 수 있겠다.

HBx와 PP2C의 결합을 확인함에 따라 HBx가 PP2C와 직접적으로 상호작용함으로써 인해, PP2C의 탈인산화 활성화에 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대해 알아보기 위해 본 연구에서는 *in vitro*에서 rPP2C의 탈인산화 활성화에 rHBx와의 결합이 직접적으로 어떠한 영향을 주는지를 관찰하였다. rPP2C와 rHBx를 대장균내에서 대량발현시킨 후, 순수 정제하여 pNPP를 기질로 하는 phosphatase assay를 시행하여 이를 관찰하였다. 예상했던 대로 순수정제한 재조합 단백질인 rHBx는 rPP2C의 활성화에 저해효과를 나타내었고, 이는 세포 내에서도 HBx의 발현정도가 높아지면 세포내에 존재하는 PP2C의 활성화에 저해효과를 나타낼 것이라고 기대하게 되었다.

본 연구에서 HBx와 PP2C의 직접적인 결합과 이로 인한 PP2C의 활성화저해를 확인하였기 때문에 세포내에서도 HBx가 protein phosphatase 2C와 상호작용함으로써 인해, PP2C가 다양한 MAPK pathway나 Wnt pathway에 관계된 분자와 결합하거나, 탈인산화효소로써 표적분자를 탈인산화하는 데 영향을 줄 것이라 생각된다. 지금까지 밝혀진 보고들에 의하면 mammalian cells에서 PP2C가 environmental stress에 의해 유도된 p38과 JNK cascades의 활성을 저해하였고, *in vivo*와 *in vitro*에서 PP2C가 stress-responsive MAPKKs (MKK6, SEK1)과 MAPK (p38)을 탈인산화하여 불활성화시키는 것과, p38의 경우 PP2C가 직접 결합하여 p38의 활성을 억제하는 것이 관찰되었다⁵⁰. 뿐만 아니라 interleukin-1에 의해 유도되는 stress-activated protein kinase cascade에서 MKK3, MKK6, SEK1,

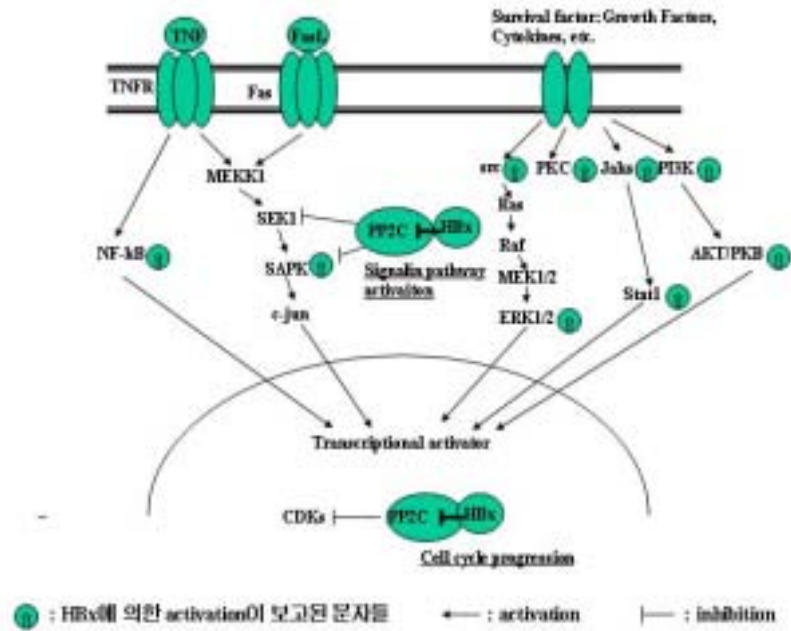


그림 6. 고찰도. HBx는 세포내에서 다양한 signal transduction pathway에 관계된 분자들의 활성화에 영향을 미친다. 수직화살표는 HBx가 존재할 때 그 활성이 증가한다고 알려진 분자들을 가리킨다. HBx가 JNK1, p38로 대표되는 SAPK 신호전달계와 cdk2, cdk6를 포함하는 CDKs를 활성화하는 기전으로, 이러한 분자들의 활성화에 negative regulator로써 알려진 PP2C에 HBx가 결합하고, 탈인산화 활성화에 저해작용을 하기 때문일 것이라고 기대한다.

MKK7을 활성화하는 TAK1을 PP2C β 1이 탈인산화하여 불활성화시키며, 이때 PP2C β 1이 TAK1의 central region에 결합한다는 것이 밝혀졌다⁵². 이에 덧붙여 HBx의 경우는 Fas-mediated apoptosis로부터 protect된 세포에서 HBx에 의한 SEK1-dependent SAPK/JNK pathway의 활성이 보고되었다⁶. 따라서 본 연구에서는 HBx와 PP2C의 상호작용이 PP2C의 기능에 영향을 미친다는 것을 보여줌으로써, HBx가 stress-activated MAPK pathway를 활성화시키는 기전을 MAPK signaling pathway에 억제인자로 작용하는 PP2C에 HBx가 직접 결합함으로써 PP2C가 MAPK pathway를 억제조절하는 것을 방해하기 때문(derepression)일 가능성을 제시하고자 한다. 또한 더 나아가 세포주기와 관련하여, HBx가 G₀/G₁과 G₂/M의 checkpoint를 이행하도록 acceleration하여 세포주기 진행을 촉진하는 가능성도 설명해 보고자 한다. HBx가 cyclin dependent kinase인 Cdk2와 Cdc2가 cyclins E, A와 연관하여 이들의 활성을 강하게 증가시키는 것이 보고되었으며⁵⁹, PP2C α 와 PP2C β 2가 Cdk2와 Cdk6를 탈인산화시키는 것이 관찰되었다⁵⁸. HBx가 PP2C와 결합함으로써 세포 내에 존재하는 PP2C의 cyclin dependent kinase 탈인산화와 관련된 기능에 영향을 주어 PP2C가 세포주기를 조절하는 데 HBx가 억제인자로 작용하여 세포주기 진행을 유도하게 된다고 볼 수 있기 때문이다.

결과적으로 본 연구에서는 이러한 내용들을 바탕으로 *in vitro*에서 보여 주었던 HBx의 저해효과가 세포내에서도 일어난다면, 지금까지 HBx가 JNK나 p38과 관련된 신호전달계를 활성화시켰던 기전과 CDKs를 활성화시켰던 기전에 대해서, HBx가 세포내에서 발현되고 있는 PP2C에 직접적으로 결합하고, PP2C의 탈인산화 활성을 저해함으로써 인해 PP2C가 저해조절하고 있는 SAPK pathway나 CDKs등의 인산화와 활성을 유도하고 나아가 세포고사와 세포주기 조절에 영향을 미치게 될 것이라는 제안을 하게

되었다 (그림 6). 이를 확인하기 위해서는 세포내에서 HBx가 PP2C가 저해조절하고 있는 JNK, p38, CDKs 등에 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 연구가 더 필요하리라 본다.

V. 결 론

본 연구에서는 앞서 보고된 HBx와 PP2C의 직접적인 상호작용을 재확인하고, HBx와 PP2C의 결합이 PP2C의 활성화에 미치는 영향을 확인하여 HBx가 세포질 내에서 신호전달계에 미치는 영향을 설명하고자 하였다.

1. Chang 세포주와 Chang cell에 Tet-on system으로 HA tag이 붙은 HBx가 유도발현 되도록 만든 stable cell line인 Chang X 34 세포주를 사용하여 항 PP2C 항체와 항 HA 항체로 Co-immunoprecipitation을 시행한 결과, 세포내 발현되고 있는 PP2C와 doxycycline으로 유도 발현된 HBx가 결합하고 있음을 확인하였다.
2. HBx와 PP2C의 결합을 확인함에 따라 이러한 결합이 PP2C의 탈인산화 활성화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해, 대장균에서 대량발현시켜 순수정제한 rHBx와 rPP2C를 사용하여 pNPP를 기질로 하는 *in vitro* phosphatase assay를 시행하여 rHBx의 양이 증가함에 따라 rPP2C의 탈인산화 활성화에 저해효과를 나타냄을 확인하였다.

이상의 결과로부터 HBx가 세포내에서 발현되고 있는 PP2C에 직접적으로 결합하고, PP2C의 탈인산화 활성을 저해함으로써 인해 PP2C가 저해조절하고 있는 SAPK pathway나 CDKs등의 인산화와 활성을 유도하고 나아가 세포고사와 세포주기 조절에 영향을 미치게 될 것이라고 생각된다.

참고 문헌

1. Feitelson MA, Millman I, Blumberg BS. Tree squirrel hepatitis B virus: antigenic and structural characterization. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83(9):2994-7
2. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. Landmark article Feb 15, 1965: a 'new' antigen in leukemia sera. By Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. JAMA 1984;252(2):252-7
3. Li J, Tang Z, Liu K. Application of radiolabeled anti-HBx monoclonal antibody for HCC targetting therapy. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih 1996;76(4):271-4
4. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chin CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. Lancet 1981;2(8256):1129-33
5. Tiollais P, Charnay P, Vyas GN. Biology of hepatitis B virus. Science 1981;213(4506):406-11
6. Jingyu D, Robert G, Christopher DR. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. Cyt Grow Fac Rev 12 2001:189-205
7. Kim CM, Kazuhiko K, Izumu S, Tatsuo M, Gilbert J. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. Nature 1991;351:317-20

8. Chen HS, Kaneko S, Girones R, Anderson RW, Hornbuckle WE, Tennant BC, et al. The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection on woodchucks. *J Virol* 1993;67:1218-26
9. Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol* 1994;68:2026-30
10. Shaul Y, Rutter WJ, Laub O. A human hepatitis B virus enhancer element. *EMBO J* 1985;4:427-30
11. Yen TSB. Hepadnaviral X protein: Review of recent progress. *J Biomed Sci* 1996;3:20-30
12. Zhang P, Raney AK, McLachlan A. Characterization of the hepatitis B virus X- and nucleocapsid gene transcriptional regulatory elements. *Virology* 1992;191:31-41
13. Murakami S, Cheong JH, Ohno S, Matsushimi K, Kaneko S. Transactivation of human hepatitis B virus X protein, HBx, operates through a mechanism distinct from protein kinase C and okadaic acid activation pathways. *Virology* 1994;199:243-6
14. Seto E, Mitchell PJ, Yen TS. Transactivation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. *Nature* 1990;344:72-4
15. Lin Y, Tang H, Nomura T, Hayashi N, Dorjsuren D, Ohta T, et al. The HBV X protein is a coactivator of activated transcription that modulates the transcription machinery and distal binding activators. *J Biol Chem* 1998;273:27097-103

16. Spandau DF, Lee CH. Transactivation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 1988;62:427-34
17. Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R. The HBV X-ORF encodes a transactivator: A potential factor in viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 1988;3:169-77
18. Aufiero B, Schneider RJ. The hepatitis B virus X-gene product trans-activates both RNA polymerase II and III promoters. *EMBO J* 1990;9:497-504
19. Kwee L, Lucito R, Aufiero B, Schneider RJ. Alternate translation initiation on hepatitis B virus mRNA produces multiple polypeptides that differentially transactivate class II and III promoters. *J Virol* 1992;66:4382-9
20. Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Hepatitis B virus X protein induces RNA polymerase III-dependent gene transcription and increases cellular TATA-binding protein by activating the Ras signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1997;17:6838-46
21. Wang HD, Trivedi A, Johnson DL. Regulation of RNA polymerase I-dependent promoters by the hepatitis B virus X protein via activated Ras and TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998;15:6720-8
22. Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(22):10350-4
23. Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, et al. Hepatitis B virus pX activates NF-kappa B-dependent

- transcription through a Raf-independent pathway. *J Virol* 1996;70(1):641-6
24. Menzo S, Clementi M, Alfani E, Bagnarelli P, Iacovacci S, Manzin A, et al. Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product. *Virology* 1993;196(2):878-82
 25. Wang C, Wang W, Lu H. Immunohistochemical study of hepatitis C virus core antigens and HBxAg in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma tissues. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1997;19(2):85-8
 26. Henkler F, Lopes AR, Jones M, Koshy R. Erk-independent partial activation of AP-1 sites by the hepatitis B virus HBx protein. *J Gen Virol* 1998;79(Pt11):2737-42
 27. Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, et al. X Protein of hepatitis B virus inhibits FAS-mediated apoptosis and is associated with upregulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276(11):8328-40
 28. Lee YH, Yun Y. HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling. *J Biol Chem* 1998;273(39):25510-5
 29. Kim SO, Park JG, Lee YI. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. *Cancer Res* 1996;56(16):3831-6
 30. Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B

- virus X protein inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275(33):25858-64
31. Lee YI, Kang PS, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-X protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *J Biol Chem* 2001;276(20):16969-77
 32. Sitterlin D, Lee TH, Prigent S, Tiollais P, Bitel JS, Transy C. Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants. *J Virol* 1997;71(8):6194-9
 33. Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slagle BL. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998;72(1):266-72
 34. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, et al. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995;55(24):6012-6
 35. Chirillo P, Pagano S, Natoli G, Puri PL, Burgio VL, Balsano C, et al. The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(15):8162-7
 36. Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(16):8744-9
 37. Kim H, Lee H, Yun Y. X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells. *J Biol Chem* 1998;273(1):381-5

38. Gottlob K, Fulco M, Levrero M, Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J Biol Chem* 1998;273(50):33347-53
39. Bergametti F, Prigent S, Lubet B, Benoit A, Tiollais P, Sarasin A, et al. The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines. *Oncogene* 1999;18(18):2860-71
40. David B, Amit KD, Marie PE. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998;27:133-64
41. Selke D, Anton H, Klumpp S. Serine/threonine protein phosphatase type 1, 2A and 2C in vertebrate retinae. *Acta Anat* 1998;162(2-3):151-6
42. Fjeld CC, Denu JM. Kinetic analysis of human serine/threonine protein phosphatase 2C alpha. *J Biol Chem* 1999;274(29):20336-43
43. Selko D, Klumpp S, Kaupp B, Baumann A. Molecular cloning of protein phosphatase type 2C isoforms from retinal cDNA. *Methods Mol Biol* 1998;93:243-50
44. Michele F, Hong LZ, Saijun F, Kazuyasu S, Songfa S, Mercer WE, et al. Wipl, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6048-6053
45. Jene C, Ettore A, Lawrence AD. The structure and expression of the murine wildtype p53-induced phosphatase 1 (Wipl) gene. *Genomics* 2000;64:298-306

46. Mutsuhiro T, Masaaki A, Atsuko N, Ichiro N, Fumio I, Hiroyuki T, et al. p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J* 2000;19(23):6517-26
47. Mark AG, Paola B, Nicola T, Claudio B. FIN13, a novel growth factor-inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5485-98
48. Chungyee LH, Ahalya M, Izabela N, Gregory EH. Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J* 2001;20(9):2160-70
49. Kazuhiro S, Paul R. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* 1998;14:492-502
50. Takekawa M, Maeda T, Saito H. Protein phosphatase 2C alpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J* 1998;17(16):4744-52
51. Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, Ikeda S, Wang H, Katsura K, et al. Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* 1998;437(3):172-6
52. Hanada M, Ninomiya TJ, Komaki K, Ohnishi M, Katsura K, Kanamaru R, et al. Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 2001;276(8):5753-9
53. Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D, Ota I. Ptc1, a type 2C

- Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 2001;21(1):51-60
54. Erin TS, Daniel JS. Transient overexpression of murine dishevelled genes results in apoptotic cell death. *Exp Cell Res* 1999;253:637-48
 55. Seok YN, Yi Z, Lai PY, Peng L, Sheng CL. Axin-induced apoptosis depends on the extent of its JNK activation and its ability to down-regulate β -catenin levels. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:144-50
 56. Erin TS, Dianqing W, Daniel JS. Protein phosphatase 2Ca dephosphorylates Axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J Biol Chem* 2000;275(4):2399-403
 57. Cheng A, Ross KE, Kaldis P, Solomon MJ. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev* 1999;13(22):2946-57
 58. Cheng A, Kaldis P, Solomon MJ. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem* 2000;275(44):34744-9
 59. Benn J, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11215-9
 60. Song L, Shen B, Li Y. Association and contribution of ERK to IL-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription in a human myeloma cell line. *Chin Med J*

2001;114(9):954-7

61. Eastwood SL, Harrison PJ. Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. 2001;55(5):569-78
62. Tong Y, Quirion R, Shen SH. Cloning and characterization of a novel mammalian PP2C isozyme. J Biol Chem 1998;273(52):35282-90

영문요약

**The Interaction of Hepatitis B Virus X Protein (HBx) and
Protein Phosphatase Type 2 C (PP2C)
and Its effect on the Phosphatase Activity of PP2C**

Bo Young Roh

*Brain Korea 21 Project for Medical Science, The Graduate School,
Yonsei University*

(Directed by Professor Jeon Han Park)

Human hepatitis B virus (HBV) induces acute and chronic hepatitis, and is closely associated with the development of human liver cancer. Virally encoded X protein (HBx) has been thought to be a major risk factor for the development of human hepatocellular carcinoma (HCC). In addition to stimulation of RNA polymerase, HBx also stimulates many type of transcription elements and factors. Transcription factors activated by HBx include AP-1, AP-2, NF- κ B, SRF, c/EBP, Ets, ATF1, Egr-1, CREB. Many of the reported activities of HBx have been shown to result from its ability to activate cytoplasmic signal transduction pathways, particularly the Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, the cell stress-induced MEKK1-p38-c-Jun N-terminal kinase (SAPK) pathway. HBx has been

reported to affect DNA repair, cell cycle control, and apoptosis. Therefore, the pleiotropic activities of HBx are potentially relevant to the development of HCC.

This study has been focused on the molecules which interact with HBx in the cell, and the information that HBx can interact with protein phosphatase type 2 C (PP2C) was derived through yeast 2 hybrid system.

Protein phosphatase can be structurally and functionally divided into three distinct families: PTP, PPP and PPM. PP2C relates to the main enzymes subtype of PPM, and the dephosphorylation activity of PP2C absolutely requires metal cation, Mn^{2+} or Mg^{2+} , but its activity is not sensitive to the tumor promotor okadaic acid or other inhibitors of the PPP family. It is now well established that certain members of PP2C play a role in reversing protein kinase cascades activated by stress, JNK and p38 signaling pathway. PP2C α and PP2C β 2 dephosphorylate cyclin-dependent kinase (CDK), and positively regulate Wnt signal transduction and mediate their effects through the dephosphorylation of Axin. Recent research further revealed that PP2C may be involved in cell apoptosis, gene expression, and other cellular function.

In this study, to confirm the preliminary information of the interaction of HBx and PP2C, Chang cell line and Chang X 34 cell line expressing HBx under the control of Tet-on system were used. Interaction of the endogenous PP2C with HBx in Chang X 34 cell line was observed by co-immunoprecipitation. Then, it was demonstrated that rHBx suppressed the dephosphorylation activity of rPP2C by *in vitro*

phosphatase assays. Therefore, these results indicate that HBx interacts with PP2C and suppresses its phosphatase activity. Thus, it might be speculative that HBx induces the phosphorylation and activation of JNK, p38 and cdk2 associated apoptosis and cell cycle control through the suppression of PP2C activity.

Key words : HBx, PP2C, HCC, cell cycle, apoptosis