

폐암 상피 세포주 A549에서
Sp1과 Sp3에 의한 ABCG2
유전자의 전사 조절 기전 연구

연세대학교 대학원

의과학과

양욱진

폐암 상피 세포주 A549에서
Sp1과 Sp3에 의한 ABCG2
유전자의 전사 조절 기전 연구

연세대학교 대학원

의과학과

양욱진

폐암 상피 세포주 A549에서
Sp1과 Sp3에 의한 ABCG2
유전자의 전사 조절 기전 연구

지도교수 김 형 표

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2012 년 6 월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

양 욱 진

양육진의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 형 표 인

심사위원 송 시 영 인

심사위원 김 철 훈 인

연세대학교 대학원

2012 년 6 월

감사의 글

어느덧 대학을 졸업하고 대학원에 진학한 지도 벌써 2년이 지났습니다. 처음 대학원에 진학했을 때는 앞으로 무엇을 할 것인지 막막하기만 했지만, 막상 졸업을 앞두고 되어 감회가 새롭습니다. 대학을 갓 졸업한 실수투성이의 부족한 저를 가르쳐 주시고 학위 과정 동안 면역학과 후성 유전학, 생물 정보학 등의 보다 심도 있는 학문 탐색의 길을 접할 수 있게 지도해 주신 김형표 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 아울러 바쁘신 중에도 심사위원을 맡아 주셔서 제 부족한 논문에 아낌없는 조언을 주셨던 송시영 교수님과 김철훈 교수님께도 감사드립니다.

의과학과에 입학해서 대학원 진학에 많은 정보를 주고 알아봐 준 대학 후배 대건이와 대학원 생활동안 많은 도움을 주었던 동기 원석이 에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 또한 많은 실험들을 가르쳐 주었던 주경돈 박사님과 박주홍 박사님께 감사의 말씀 드립니다. 우리 팀의 살림꾼 근희와 바쁜 FACS 일에도 내 실험들을 도와준 민지, 같이 교수님을 찾아 대학원에 진학한 내 동기 종주에게는 항상 미안하고 고맙다는 말을 전합니다. 아울러 가족같이 따뜻하게 대해 주신 용태순 교수님, 박순정 교수님, 신명현 교수님과 다른 교실원분들께도 덕분에 많은 것을 배우고 졸업하게 되어 감사의 말씀 올립니다.

항상 혼자라고 생각했지만 힘들 땐 언제나 옆에서 위로가 되었던 친구인 주호, 언제나 유쾌한 학업이와 민재, 넘치는 자신감과 유머센스를 가진 한결이, 대학 동기 이상으로 친한 영수, 대학 졸업하고 더 친해진 철환이와 연희, 먼저 일찍 졸업해서 아쉬웠던 상훈이형, 그

리고 고등학교 선배이자 대학 동기인 학수형. 비록 이제는 자주 보진 못하지만 덕분에 대학 때처럼 즐겁게 대학원 생활을 할 수 있었던 것 같습니다.

우리 동기들의 모범인 KIST에 계신 경석이형, 이제는 졸업하고 예쁜 딸을 둔 동혁이형, 진학 상담을 언제나 진지하게 들어주셨던 동용이형과 준우형, 형들의 조언 덕분에 무사히 잘 졸업할 수 있게 된 것 같습니다.

석사과정 중에 친해진 나라, 한나, 창훈이. 짧은 인연이 아쉽지만 때로는 서로 모르는 것을 같이 의논하고, 술도 한잔 기울이며 고민을 나눌 수 있어 힘이 되었습니다.

마지막으로 무엇보다도 배움의 기회가 있을 때를 인정해 주시고 독려해 주신 아버지와 말없이 아들의 편이 되어 묵묵히 뒷바라지 해주신 어머니께 너무나도 감사하다는 말씀을 드리며, 이 논문을 부모님께 바칩니다.

차례

국문 요약	1
-------	---

I. 서론

1. ABC transporter subfamily G2 (ABCG2)	
가. ABCG2의 구조와 기능	3
나. Normal tissue에서의 ABCG2 발현	5
다. Stem cell에서의 ABCG2 발현	5
라. 암 줄기 세포에서의 ABCG2의 발현	6
2. Specificity protein 1 (Sp1)과 Specificity protein 3 (Sp3)	
가. Sp1과 Sp3의 구조와 발현	6
나. Sp1과 Sp3에 의한 gene expression 조절	7
3. 연구 목적	8

II. 재료 및 방법

1. Cell lines	9
2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)	9
3. Cloning luciferase constructs	10
4. Luciferase assay	11
5. Electrophoretic mobility shift assays	11
6. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)	13
7. Lentiviral transduction	13
8. Western blotting	14
9. Flow cytometry analysis	14
10. Side population assay	15
11. Apoptosis assay	15

III. 결과

1. Sp1 and Sp3 bind to the ABCG2 promoter region in A549
 - 가. 생물 정보학적 분석에 의한 human ABCG2 gene에서 Sp1 binding site 확인·····17
 - 나. in vitro에서 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3 binding 확인·····19
 - 다. in vivo에서 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3 binding 확인·····21

2. Sp1 and Sp3 elevate promoter activity of ABCG2 gene in A549
 - 가. ABCG2 promoter상의 Sp1 binding site를 mutation 했을 때 ABCG2 promoter 활성 변화 확인·····23
 - 나. Sp1과 Sp3의 과다발현에 의한 ABCG2 유전자 promoter 활성 변화 확인·····25

3. Knockdown of Sp1 and Sp3 decrease ABCG2 gene expression and its function in A549
 - 가. Sp1과 Sp3의 knockdown system 확립·····27
 - 나. Sp1과 Sp3의 knockdown시 ABCG2의 발현 변화 확인··29
 - 다. Sp1과 Sp3의 knockdown시 side population 변화 확인··31

4. Mithramycin A, a Sp1 inhibitor, decreases expression of ABCG2 and its function in A549
 - 가. Mithramycin A에 의한 ABCG2 유전자의 발현 변화 확인·····33
 - 나. Mithramycin A에 의한 side population 변화 확인···35

5. Down-regulation of Sp1 or Sp3 increases the chemotherapeutic

efficiency of cisplatin in A549	
가. Sp1과 Sp3의 knockdown시 cisplatin 처리에 따른 apoptosis 증가 확인	37
나. Mithramycin A와 cisplatin 처리 시 apoptosis 증가 확인	39
IV. 고찰	41
V. 결론	44
참고문헌	46
영문요약	53

그림 차례

그림 1. Structure of the ABCG2 protein·····	4
그림 2. Identification of Sp1 binding sites at human ABCG2 promoter region·····	18
그림 3. Sp1 and Sp3 bind to ABCG2 promoter in A549 <i>in vitro</i> ·····	20
그림 4. Sp1 and Sp3 bind to ABCG2 promoter in A549 <i>in vivo</i> ·····	22
그림 5. The effect of mutation of Sp1 binding sites on the ABCG2 promoter activity·····	24
그림 6. ABCG2 promoter activity is increased by over-expression of Sp1 and Sp3·····	26
그림 7. Knockdown of Sp1 and Sp3 expression in A549·····	28
그림 8. ABCG2 expression is decreased in A549 expressing Sp1 and Sp3 shRNA·····	30
그림 9. Knockdown of Sp1 and Sp3 repress side population phenotype in A549·····	32
그림 10. Mithramycin A reduces ABCG2 expression	

	in A549	34
그림 11.	Mithramycin A reduces the function of ABCG2	36
그림 12.	Knockdown of Sp1 and Sp3 enhance the efficiency of cisplatin in A549	38
그림 13.	Mithramycin A enhances the efficiency of cisplatin in A549	40

표 차례

표 1. A list of ABCG2 substrates·····	5
--------------------------------------	---

국문 요약

폐암 상피 세포주 A549에서 Sp1과 Sp3에 의한 ABCG2 유전자의 전사 조절 기전 연구

ABCG2는 포유류 세포막에 존재하는 ATP binding cassette (ABC) transporter 단백질 군 중 하나로, 세포 내에 유입된 각종 대사산물이나 염색 시료, 항암제와 같은 화합물들을 ATP를 소모하여 세포 밖으로 유출시키는 기능을 가지는 단백질로 알려져 있다. 사람의 ABCG2 단백질은 일반적으로 여러 조직에서 발현되며, 특히 줄기 세포의 일부 세포군 (sub population)에서 매우 높게 발현한다. ABCG2는 cancer chemotherapy에 사용되는 많은 항암제들을 기질로 하는 가장 중요한 multi-drug resistance transporter로 인식되고 있으며, 이는 self renewal, proliferation capacity, chemoresistance와 같은 특징을 가지는 암 줄기 세포(cancer stem cell)에서도 발현한다고 보고되었다.

최근에 Sp1은 다양한 cancer cell type에서 다른 transcription factor들과 함께 작용하여 ABCG2의 발현을 조절한다고 알려졌다. 하지만 cell type에 따라 Sp1이 ABCG2의 발현에 있어 activator로 작용하는지, 반대로 repressor로 작용하는지에 대해서로 다른 결과들이 보고된 바 있다.

이 논문에서는 폐암 상피세포주인 A549 cell을 이용하여 Sp1이 ABCG2의 전사조절에 미치는 영향을 탐색하며, Sp1과 유사한 구조와 기능을 할 것이라 보고된 Sp3에 의한 전사조절의 변화를 확인하였다. 나아가 두 전사 인자의 발현을 조절함으로써, ABCG2의 발현이 변화할 수 있는지를 확인하는 동시에, 이를 통한 ABCG2의 발현 억제가 A549에서 항암제 처리시의 효과에 영향을 미치는지 분자 생물학적 실험방법을 통해 알아보았다.

생물정보학적 분석을 통해 ABCG2 유전자의 promoter에 Sp1

결합부위가 존재함을 확인하였고, 이 부위들에 Sp1과 Sp3가 A549 세포에서 in vitro 조건과 in vivo 조건에서 결합하고 있음을 Electrophoretic mobility shift assay와 Chromatin immunoprecipitation assay를 통해 확인하였다.

실험 결과 Sp1과 Sp3는 각각 ABCG2의 promoter region에 binding하며, 이들이 작용하여 ABCG2의 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 또한 이들의 발현을 억제하였을 때 ABCG2의 발현이 감소한다는 것을 side population assay를 통해 확인할 수 있었다. 마지막으로, Sp1과 Sp3의 조절을 통해 ABCG2의 발현을 억제 시킨 후 anti-cancer drug인 cisplatin을 사용하였을 때, cell death가 더 많이 유도됨을 확인하였다.

따라서 우리는 이번 연구를 통해, Sp1과 Sp3가 ABCG2의 전사 조절에 직접적인 영향을 미치며, 이들 전사 인자의 발현을 억제 시킴으로써 ABCG2의 발현이 감소되고, 나아가 cancer치료에 있어 chemotherapy의 효율을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

핵심되는 말 : abcg2, side population, transcription, cancer stem cell, sp1, sp3

폐암 상피 세포주 A549에서 Sp1과 Sp3에 의한
ABCG2 유전자의 전사 조절 기전 연구

<지도교수 김 형 표>

연세대학교 대학원 의과학과

양 옥 진

I. 서론

1. ABC transporter subfamily G2 (ABCG2)

가. ABCG2의 구조와 기능

ABCG2는 ATP binding cassette (ABC) transporter의 subfamily에 속하는 protein으로, human에 존재하는 7가지의 ABC transporter family 중 G type subfamily의 하나이다. 사람의 ABC transporter 종류는 다양한 mammalian cell로부터 약 50여 가지가 있다고 밝혀졌다.¹ 그 중 ABCG2는 최초로 anti-cancer drug인 doxorubicin에 저항성을 가지게 된 breast cancer cell인 MCF-7으로부터 cloning되어 알려졌다. 때문에 처음에는 breast cancer resistance protein (BCRP)이라 명명되었다.² 이후 다른 두 연구팀에서 ABCG2와 거의 동일한 유전자인 placental ABC protein (ABCP)와 mitoxantrone resistance protein (MXR)을 보고하였다.^{3,4} 이후 human genome nomenclature committee에서는 이들을 ABCG2로 재 명명하였다.⁵

사람의 ABCG2 유전자는 chromosome 4q22에 위치하며, 16개의 exon과 15개의 intron을 가진다. 알려진 ABCG2 promoter는 반복적인 TATA-less promoter로써, upstream쪽에 반복적인 CpG island와 downstream쪽에 반복적인 Sp1, AP1, AP2와 같은 전사인자 결합부위가 존재한다.⁶

발현된 ABCG2는 655 amino acid로 이루어져 있으며, protein은 72kDa의 분자량을 가진다. ABCG2의 protein구조는 한 개의 nucleotide binding domain (NBD)과 6개의 transmembrane segment로 이루어져 있다. 다른 transporter family protein들과 달리, ABCG2의 NBD는 polypeptide의 amino terminal에 위치한다(그림 1).

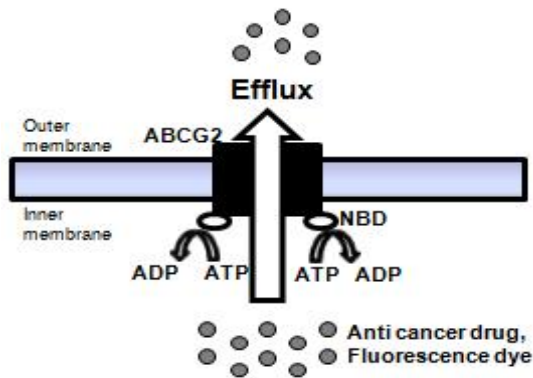


그림 1. Structure of the ABCG2 protein

ABCG2는 half transporter protein으로, 두 ABCG2 protein분자가 하나의 homodimer로 세포 표면에 발현되어 기능하게 된다. 세포 표면에 발현된 ABCG2 protein은 여러 anti-cancer drug들과 다양한 종류의 fluorescence dye를 기질로 인식한다(표 1).⁷ ABCG2는 이들을 ATP를 소모하여 세포 밖으로 배출하는 기능을 한다고 알려져 있어 multi-drug resistance protein이라 불린다(그림 1).⁸

표 1. A list of ABCG2 substrates

Chemotherapeutic agents	Fluorescence dyes	Other agents
Mitoxantrone	Hoechst 33342	antivirals
Topotecan	Rhodamine 123	antibiotics
Doxorubicin	Lyso-Tracker Green	Flavonoids
Daunorubicin	BODIPY-prazosin	
Irinotecan		
Imatinib		
Methotrexate		
Gefitinib		

나. Normal tissue에서의 ABCG2 발현

Normal tissue에서 ABCG2는 주로 placental tissue에서 발현되며, brain, prostate, small intestine, testis, ovary, colon, liver에서도 발현된다고 알려졌다.² 하지만, normal tissue에서 ABCG2가 발현되는 정도는 조직마다 차이가 있다고 알려져 있다.

Normal tissue에서의 ABCG2의 기능은 아직까지 잘 알려지지 않았으나, 최근에 *ABCG2*^{-/-} mouse 실험을 통해 normal tissue에서 ABCG2는 다양한 종류의 xenobiotics로부터 여러 기관들을 보호한다고 알려졌다.⁹

다. Stem cell에서의 ABCG2 발현

ABCG2는 다양한 종류의 stem cell에서도 발현된다고 알려져 있다. ABCG2는 stem cell의 survival capacity와 proliferation potential을 증가시킴으로써, 결과적으로 stem cell들을 보호하는 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹⁴ ABCG2는 stem cell이 differentiation을 시작하게 되면, 그 발현정도가 down-regulation되며 성숙된 세포에서는 매우 적은 양이 발현된다고 알려져 있다.

ABCG2가 작용하는 여러 fluorescence dye들 중, hoechst 33342는

ABCG2에 의하여 세포 바깥으로 efflux되는 잘 알려진 fluorescence dye로 알려져 있다. 이러한 hoechst 33342를 transport하는 세포들을 side population phenotype이라 부르며, ABCG2는 stem cell에 많이 발현된다고 알려졌기 때문에, stem cell들의 특징 중 하나로 인식되고 있다.¹⁴

라. 암 줄기 세포에서의 ABCG2의 발현

Cancer stem cells (CSCs)은 cancer에서 stem cell과 같은 기능을 가지는 cell들을 말한다. CSCs은 cancer cell population에서 적은 population을 차지하는 세포로써, 이는 proliferation이나 self-renewal capacity가 있는 세포로 알려져 있다.^{15,16} 최근에 이러한 CSCs은 human leukemia¹⁶와 breast¹⁷, brain¹⁸, retinoblastoma¹⁹, melanoma²⁰, liver²¹, pancreas²², colon²³, nasopharynx²⁴, lung cancer²⁵와 같은 다양한 solid tumor들에서 발견된다고 알려졌다. 이러한 cancer stem cells 들은 chemotherapy와 radiotherapy에 대해 high resistance ability를 가진다.

CSCs의 특징 중 하나인 CSCs가 chemorherapy에 저항성을 가지게 하는 것은 CSCs에 발현되는 ABCG2 때문일 것이라고 보고되어 있다.⁹

또한 CSCs는 주로 side population phenotype에서 발견되기 때문에, ABCG2는 CSCs에 발현된다고 알려진 CD24, CD44, CD133 등과 더불어 CSCs의 marker로 사용되고 있다.^{22,26}

2. Specificity protein 1 (Sp1)과 Specificity protein 3 (Sp3)

가. Sp1과 Sp3의 구조와 발현

Sp1과 Sp3는 모든 포유류 세포에서 발현되는 transcription factor로서, 정상적인 tissue보다 breast carcinoma, thyroid cancer, hepatocellular carcinomas, pancreatic cancer, colorectal cancer,

gastric cancer, lung cancer와 같은 암 세포에서 더 많이 발현된다고 알려져 있다.²⁷⁻²⁹ Sp1, Sp3의 binding site는 human genome에서 적어도 12,000개가 존재한다고 알려져 있는데, 주로 cell differentiation, cell cycle progression, oncogenesis에 관련된 유전자의 promoter activity가 이들에 의해서 enhance하거나 repress한다고 알려져 있다.^{30,31}

Sp1은 두 개의 isoform을 가지며, Sp3는 두 개의 long form과 두 개의 short form을 가진다고 알려져 있다. Sp3의 두 long form은 Sp1과 유사한 amino acid residue를 가진다. 또한 Sp1과 Sp3는 각각 세 개의 Cys2His2-type zinc finger들로 이루어진 DNA binding domain을 가지고 있으며 90%이상 유사한 구조를 가지고 있다. 따라서 Sp1과 Sp3는 동일한 DNA element에 binding이 가능하며,^{28,32,33} Sp1과 Sp3는 DNA에 직접적으로 binding한다. 또한 Sp1 binding site에 CpG island의 존재 유무와 관계없이 binding이 가능하다고 알려져 있으며, lysine acetyltransferases (KATs)나 histone deacetylases (HDACs)와 같은 chromatin remodeling에 관련된 protein과 결합하여 gene expression을 조절 할 수 있다고 알려졌다.³⁴

나. Sp1과 Sp3에 의한 gene expression 조절

과거 Sp1과 Sp3의 연구에서는 일반적으로 Sp1은 activator로 작용하며, Sp3는 repressor로 작용하거나 대부분 약한 activator로 작용한다고 보고되었다.³⁵ 하지만 최근에는 Sp1과 Sp3는 같은 promoter 상의 다른 Sp1/3 site에 선택적으로 binding할 수 있다는 것이 알려졌다.³⁶⁻³⁹ 또한 gene의 종류에 따라, promoter 상에 존재하는 Sp1/3 site들 중 어느 것이 특정 site에 binding 하느냐에 따라 Sp1과 Sp3가 activator로 작용할 수도 있고, repressor로 작용할 수도 있다고 알려졌다.⁴⁰⁻⁴⁵ 또한 어떤 protein과 결합하여 작용 하는가 따라 gene expression에 있어 activator로써 작용하거나 repressor로 작용할 수 있다고 알려졌다.

한 예로, Sp1이 p21 proximal promoter region에서 HDAC4와 함께 p21의 repressor로 작용한다는 것을 siRNA 실험을 통해 보고되었다.⁴⁵ 반면 다른 연구들을 통해 Sp3는 p21 promoter에서 Sp1보다 강한 trans-activator라는 것이 알려졌다.^{47,48}

Sp1과 Sp3은 synergic하게 작용해서 gene promoter를 enhance할 수 있다고도 알려졌다. Lee들은 RAS association domain family 1A gene expression에 있어서 Sp1과 Sp3가 상호협력적으로 유전자 발현을 증가 시킨다는 것을 발견하였다.⁴⁰

3. 연구 목적

Lung cancer와 관련된 연구에서, hoechst 33342를 이용한 side population assay를 통해 폐암 상피 세포주인 A549 중 ABCG2가 발현되는 side population phenotype이 있다는 것이 확인 되었다.^{49,50}

Chen 들은 RNA interference approach를 통해, 폐암 상피 세포주인 A549에서 ABCG2의 발현이 억제되면 세포의 증식이 억제된다고 발표하였다.⁵¹ 이들은 폐암 상피세포주인 A549에서 ABCG2의 발현 조절에 따른 세포 증식에 관한 연구를 발표하였지만, lung cancer에서 ABCG2의 발현을 조절하는 분자 기전에 대해서는 밝혀지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 폐암 상피 세포주인 A549에서 ABCG2의 발현 조절을 하는 전사조절 인자를 규명하고, 이 전사조절 인자들에 의한 A549의 항암제 내성과의 연관성을 조사하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. Cell lines

A549와 293T 세포를 10% fetal bovine serum과 100 U/ml의 penicillin/streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media 으로 배양하였으며, 5% CO₂ incubator에서 37 °C의 온도를 유지한 상태로 배양하였다.

2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

A549에서 Sp1과 Sp3, ABCG2의 mRNA의 발현 정도를 알아보기 위해 2 x 10⁵개의 세포를 TRIzol (Invitrogen, Madison, WI, USA, Madison, WI, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 다음으로 500 ng의 RNA를 PrimeScript RT kit (Takara Bio Inc, Japan)을 이용하여 complement DNA로 합성하였다. 이후 SYBR premix EX Taq™II (Takara Bio Inc, Japan)을 사용하여 Applied Biosystems사의 StepOne™ Real-Time PCR system 장비로 Quantitative real-time PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C에서 30초 이후 95 °C에서 5초, 60 °C에서 34초로 40 cycle을 수행하였다. Melting curve stage는 95 °C에서 15초, 60 °C 1분, 95 °C에서 15초로 설정하였다.

사용한 SYBR green primer는 다음과 같다.

human ABCG2,	5'- ATGGATTTACGGCTTTGCAG -3'
	5'- TCTTCGCCAGTACATGTTGC -3'
human Sp1,	5'- GCGAGAGGCCATTTATGTGT -3'
	5'- GGCTCCCTTCTTATTCTGG -3'
human Sp3,	5'- ATTCTGGAGAACGCCCTTTT -3'
	5'- TATGTTTGGCAAGGTGGTCA -3'
18s rRNA,	5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA -3'
	5'- GCTGGAATTACCGCGGCT -3'

3. Cloning luciferase constructs

293T 세포로부터 분리한 genomic DNA를 template로 사용하고 nPfu DNA polymerase (Enzymomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 ABCG2 gene의 transcription starting site로부터 -1086bp 에서 +260bp 사이의 DNA 절편을 PCR을 통해 증폭하였다. PCR은 95 °C 에서 2분 동안 denaturing 한 후, 95 °C 30초, 60 °C 30초, 72 °C 90초 의 조건에서 35 cycle을 진행 한 뒤, 72 °C에서 5분으로 반응을 완료 하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

ABCG2 WT,

5'- TTCTCGAGATGGGCCTTTAAGGGTCTTG -3'

5'- TTAAAGCTTCCTACCCAGTTCCTCCACAG -3'

이후 Xho I 과 HindIII (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, USA) 제한효소를 이용하여 pGL3-BASIC (Promega, Madison, WI, USA)에 PCR product를 삽입하여 ABCG2 promoter를 포함하는 luciferase construct를 cloning하였고, 이를 pABCG2-WT로 명명하였다.

pABCG2-WT의 Sp1 binding site에 mutation을 도입하기 위하여 Quikchange kit (Stratagene, Santaclara ,CA, USA)를 이용하였다.

PCR 조건은 95 °C 30초 후, 95 °C 30초, 65 °C 1분, 68 °C 6분으로 18 cycle을 진행하였고, 68 °C에서 10분으로 반응을 완료하였다. 이후 Dpn I (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, USA)를 37 °C에서 1시간동안 반응시켜 template로 사용한 pABCG2-WT를 제거하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

ABCG2 Sp1 1 mutant,

5'- TGACCCTAGCCCCGAGGGAGTTAGGTGGTACCAGTCCCTGCTGG -3'

5'- CCAGCAGGACTGGTACCACCTAACTCCCTCGGGGCTAGGGTCA -3'

ABCG2 Sp1 2 mutant,

5'- GGCCCGCAGTCGGGGCCACTAATCACCCCTGTCGCGAACCCCGACCTGGGGA -3'

5'- TCCCCAGGTCGGGGTTCGCGACAGGGGGTGATTAGTGGCCCGACTGCCGGGCC -3'

ABCG2 Sp1 3 mutant,
5'- TGGGGAAACCCGGGGCGCTGAAAAGGGGCCACTGCGTTCAGCT -3'
5'- AGCTGAACGCAGTGGCCCCTTTTCAGCGCCCCGGGTTTCCCCA -3'
Sp1과 Sp3를 과다발현하기 위하여 Addgene에서 제공받은
pCMV-Sp1과 pN3-Sp3FL을 각각 사용하였다.

4. Luciferase assay

Luciferase assay를 수행하기 위해 먼저 8×10^4 개의 293T 세포를 24-well plate에 계대하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 다음날 luciferase reporter construct를 phRL-SV40 renilla vector와 함께 Effectene (Qiagen, Duesseldorf, Germany)으로 transient transfection을 수행하였다. 24시간을 더 배양한 뒤, 세포를 harvest하고 1x passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 세포를 lysis하였다. 이후 dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 TD 20/20 Luminometer (Turner Designs Inc, Sunnyvale, CA, USA) 장비로 luciferase activity를 측정하였다.

5. Electrophoretic mobility shift assay

생물정보학적 연구를 통해 전사조절인자의 결합부위를 탐색한 후, 전사조절인자 결합 element를 포함하는 결합부위의 oligonucleotide를 합성한 뒤 이를 γ -ATP를 이용하여 P³²로 labeling하였다.

A549의 nuclear extract는 이전에 기술한 실험방법으로 얻어내었다.⁵² A549의 nucleat extract와 label된 probe는 1x binding buffer (12 mM HEPES (pH7.9), 12% Glycerol, 60 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA)), 1 mg/ml BSA (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, USA), 0.1 mg/ml poly dI-dC (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)와 함께 20분 동안 4 °C에서 binding시키고 5% PAGE gel에

loading하였다. Competition assay를 위해 radio-label되지 않은 wild-type probe와 binding element가 mutation된 probe를 제작해 실험에 사용하였으며, Sp1 (Millipore, Billerica, MA, USA)과 Sp3 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) antibody를 사용하여 실험을 진행하였다.

사용한 Oligonucleotide는 다음과 같다.

WT Sp1 site-1

5'- CGAGGGAGGGCGGTGGTACCAG -3'

5'- CTGGTACCACCGCCCTCCCTCG -3'

Mutant Sp1 site-1

5'- CGAGGGAGGTTAGGTGGTACCAG -3'

5'- CTGGTACCACCTAACTCCCTCG -3'

WT Sp1 site-2

5'- GTCGGGGCCACGCCTCACCCCCGCCCCGCGAACCC -3'

5'- GGGTTCGCGGGCGGGGGTGAGGCGTGGCCCCGAC -3'

Mutant Sp1 site-2

5'- GTCGGGGCCACTAATCACCCCCTGTTCGCGAACCC -3'

5'- GGGTTCGCGACAGGGGGTGATTAGTGGCCCCGAC -3'

WT Sp1 site-3

5'- GGCGCTGGGGAGGGGCCACTGC -3'

5'- GCAGTGGCCCCTCCCCAGCGCC -3'

Mutant Sp1 site-3

5'- GGCGCTGAAAAGGGGCCACTGC -3'

5'- GCAGTGGCCCCTTTTCAGCGCC -3'

WT Sp1 site-4 (consensus sequence of Sp1)

5'- GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT -3'

5'- ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC -3'

MT Sp1 site-4 (consensus sequence of Sp1)

5'- GCTCGCCCCGTTCCGATCGAAT -3'

5'- ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC -3'

6. Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

DNA와 protein의 *in vivo* interaction을 확인하기 위해 100 mm dish에 배양한 A549에 1%의 formaldehyde를 처리하여 chromatin상태가 유지되도록 cross-linking 하였다. 이후 Bioruptor (Cosmo Bio Inc, Tokyo, Japan)를 이용해 30초 on/off로 총 60번을 sonication하여 DNA의 크기가 100 ~ 500 bp의 크기로 잘려지도록 하였다.

Sp1 (Millipore, Billerica, MA, USA)과 Sp3 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) antibody를 chromatin과 4 °C에서 16시간동안 incubation하였다. 이후 Protein A/G Dynabeads (Invitrogen, Madison, WI, USA)를 이용하여 Sp1과 Sp3가 결합된 chromatin 만을 얻어낸 후, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 proteinase K (Invitrogen, Madison, WI, USA)를 이용하여 남아있는 DNA를 elution하였다. 이후 얻어낸 DNA를 주형으로 하여, SYBR premix Ex Taq™ (2x) GC (Takara Bio Inc, Japan)를 이용해 real-time PCR을 수행하였다.

사용한 SYBR primer는 다음과 같다.

distal promoter, 5'- TTTCGTGTGTGTTTTCTCCA -3'
5'- GCTCACCCAGATAAGTGAAAAGA -3'
proximal promoter, 5'- TTCAGCCGGGTCGCAGGGCGCTTAT -3'
5'- TGGACCGCCAGAGCTGAACGCAGTG -3'

7. Lentiviral transduction

Sp1과 Sp3의 shRNA construct는 이전 실험을 위해 제작했던 construct를 사용하였다.⁵³ Lentivirus를 얻기 위해 2 x 10⁶개의 293T 세포를 100 mm culture dish에 배양한 뒤 1 μg 의 lentiviral shRNA vector를 3 μg 의 packaging vector (Invitrogen, Madison, WI, USA)와 함께 Effectene (Qiagen, Duesseldorf, German)으로 transfection하였다. transfection 48시간 후에 viral supernatant를 취해 6-well plate에 2 x 10⁵씩 배양되어 있는 A549에 넣어주었다. Infection을 유도하기 위해 polybrene (Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA)

을 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 viral supernatant와 같이 넣어주었다. 24 시간 뒤에 Sp1 shRNA infected cell들은 puromycin (Duchefa, Haarlem, Netherlands)을 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 넣었고, Sp3 shRNA infected cell들은 G418 (Duchefa, Haarlem, Netherlands)을 1 mg/ml 의 농도로 처리하여 infection이 되지 않은 세포들을 selection하였다.

8. Western blotting

Sp1과 Sp3의 protein expression을 확인하기 위해서 Western blotting을 수행하였다. 먼저 A549로부터 whole cell lysate를 얻기 위해 lysis buffer (50 mM Tris - HCl (pH7.4), 0.15 M NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5 mM dithiothreitol, protease inhibitor cocktail)를 사용하여 4 °C에서 세포가 lysis되도록 하였다. 추출한 protein농도를 정량하기 위해 BSA를 이용한 Bradford's assay를 수행한 후, 정량한 protein을 20 μg 또는 40 μg 씩 사용했다. 이후 protein들을 8% sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 분자량에 따라 분리 하였고, transfer를 위해 nitrocellulose membranes (Whatman, Dassel, Germany)을 이용하여 110 V에서 한 시간 동안 SDS-PAGE gel로부터 protein을 membrane으로 transfer하였다.

Immunoblotting을 위해 1st antibody로 Sp1 (Millipore, Billerica, MA, USA), Sp3, β -actin (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, California, USA)을 사용하여 5% skim milk와 함께 밤새 배양하였다. 다음날 2nd antibody를 2시간 동안 배양한 뒤, ECL buffer (Thermo, Rockford, IL, USA)를 처리하여 ImageQuant™LAS 4000 (B&B Co., Ltd. Daejoen, Korea)으로 protein 발현을 측정하였다.

9. Flow cytometry analysis

ABCG2의 protein expression을 보기 위해서 human ABCG2-PE FACS antibody (eBioscience Inc, San Diego, CA, USA)를 사용하였다.

1 x 10⁶개의 세포를 0.05% trypsin-EDTA를 이용하여 harvest한 후, 200 μ l의 FACS buffer로 resuspend하여 FACS tube에 들로 나누어 넣었다. 이것을 한 쪽에만 0.5 μ g의 ABCG2-PE antibody를 넣어 4 °C에서 30분 동안 배양하였다. 이후 400 μ l의 FACS buffer를 넣고 BD FACS AriaII (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 protein expression을 관찰하였다.

10. Side population assay

A549 세포에 존재하는 side population을 확인하기 위해 Goodell의 protocol을 기본으로 하여 실험했다.⁵⁴ 먼저 1 x 10⁶의 A549를 1 μ M의 fumitremorgin C (Enzo life science Inc, NY, USA)를 포함시킨 샘플과 넣지 않은 샘플 두 가지로 준비한다. 37 °C 수조에서 30분 간 배양한 뒤 5 μ g/ml의 hoechst 33342 (Invitrogen, Madison, WI, USA)를 37 °C 수조에서 90분 더 배양하였다. 이후 2% FBS와 10 mM HEPES가 포함된 HBSS buffer로 washing한 후 500 μ l로 resuspend하여 FACS tube에 옮기고, 측정하기 전 2 μ g/ml propidium iodide (Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA Aldrich)을 넣고 vortex한다. PI를 넣은 직후 BD LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)를 사용하여 샘플을 측정하였다.

11. Apoptosis assay

Sp1이나 Sp3의 발현이 knockdown된 A549와 mithramycin A를 처리한 A549에서 cisplatin을 처리하였을 시 apoptosis의 변화를 확인하기 위해 3 x 10⁵개의 A549를 6-well plate에 24 시간 배양한 뒤, 다음 날 cisplatin을 7 μ M과 17.5 μ M의 농도로 48 시간 처리하였다.

이후 세포들을 95 μ l의 1 x Annexin V binding buffer[10 mM HEPES/NaOH (pH7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂]로 resuspending하였다. 여기에 5 μ l의 Annexin V-APC (eBioscience Inc, San Diego, CA, USA)를 넣어준 뒤, 10분 동안 처리하였다. 이후

1x Annexin V binding buffer를 400 μl 더 넣어준 뒤, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 propidium iodide (Sigma Aldrich Corporation, St.Louis, MO, USA) 을 처리하여 BD LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 로 apoptosis rate를 측정하였다.

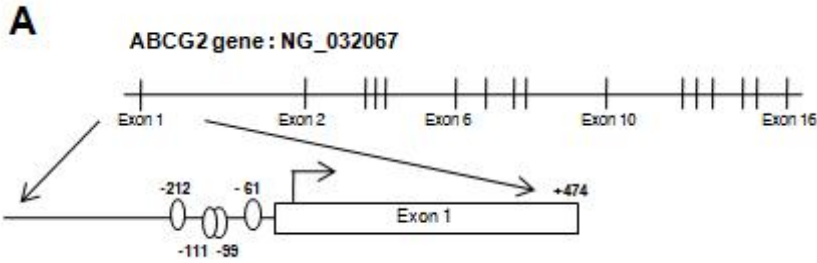
III. 결과

1. Sp1 and Sp3 bind to the ABCG2 promoter region in A549

가. 생물 정보학적 분석에 의한 human ABCG2 gene에서 Sp1 binding site 확인

Cancer cell에서 Sp1이 ABCG2의 발현에 영향을 준다는 것은 다른 논문들을 통해 알려져 있지만, cancer type마다 ABCG2의 발현에 미치는 결과가 다를 수 있음을 확인하였다.³⁴ 또한 small lung cancer cell인 A549에서의 ABCG2의 발현에 대한 Sp1의 연구는 아직까지 밝혀지지 않은 실정이며, Sp1과 유사한 구조와 기능을 가지는 Sp3에 대한 연구는 lung cancer를 포함한 다른 cancer cell type에서도 잘 알려지지 않았다.

정확한 Sp1 binding site를 염기서열 수준에서 찾기 위해 기존에 알려진 논문들을 바탕으로 Vista와 MatInspector를 이용하여 ABCG2 promoter region을 확인하였다.⁵⁴ Human ABCG2 gene은 16개의 exon과 15개의 intron으로 구성되어 있으며, 첫 번째 exon 1에서 upstream 쪽 promoter region에서 -212bp와 -61bp 사이에 네 개의 Sp1 binding site가 존재함을 확인했다(그림 2A). 정확한 Sp1 binding site의 sequence와 위치를 확인한 결과, 근접한 네 개의 Sp1 binding site는 exon 1으로부터 각각 -212bp, -111bp, -99bp, -61bp에 위치했고, 그 sequence들을 확인하였다. 이 중 두 번째와 세 번째 Sp1 binding site는 다른 두 개와 반대 방향으로 binding 할 수 있으며, 두 Sp1 binding element가 중첩되어 있는 것을 확인하였다(그림 2B).



B

-1180	TATGACTAAC	ATGTATTCT	ATATGGGCCT	TTAAGGGTCT	TGAAACTGAC	AGAAATTAAT
-1120	TCAAAAAGAA	AATTTTACCC	AAATGTTTGG	GCGCATCATG	AATATATACC	TTAAAATTCT
-960	TTTAAAAAGC	ATGCGGTATG	GTATAITTTAA	AATTCITTTT	AAAAAATTAT	GTATAGTCAA
-900	TTTTCTTATC	TAGGCTTCT	AGCTAAAAC	TTCTGCATT	GGGTGAACCA	TTAATAGTTA
-840	TTCTAGTGT	TGATTTAAAC	AACCTAAATG	ATACTATGAT	TTTTGTTTGT	AAATGCAAAC
-780	CAGAAAATAT	CTGCATGCAG	GTAATAATTT	CCTAGGGTAG	ATGCAGCAGG	TAGATGTTGG
-720	GATGGCTACA	CTCACAAAGC	CTGATGGCCC	GTTTCCTGAA	CATGCGCAAT	CACTTCTAG
-660	CCTTTCCACA	CCATCGGAAT	ATTGCACAGA	AGTATGTCAG	TCACAGGAG	GTAAAGAATA
-600	ACATTTAAAC	TATGGTAATA	TTTTCAITTC	GTAAGTTTCT	CCCCTTTCCT	TCCTTGGGTT
-540	AGATTCAGTG	CCTGATTTTT	TTAGGCCCTG	GGGCGCAAGC	ATCCACTTTC	TCAGAATCCC
-480	ATTCACCAGA	AACCACCCAT	TTAAGTTGCT	CTGGTGCGA	GCAGCGCTTG	TGACTGGGCA
-420	ACCTGTGCGT	CAGCGTCCCC	GGTGCTTCGG	CGCTCCGGCC	AGTGACGGCG	ACCAAACCCA
-360	GCTAGGTCAG	ACGAGGTACT	GATCAGCCCA	ATGAGCGCCT	GGTGATTCTC	GTAGTTAATC
-300	ACTCTGGTTC	ATCCGTTTCG	ATCCCGGAGG	CGGGAGTGTT	TGGCTTGTC	CTGCGTGTCA
-240	CGGCAGGGTG	ACCCTAGCCC	CGAGGGAGGG	CGGTGGTACC	AGTCTGCTG	GCGGCTCAGC
			Sp1			
-180	GCGGCAGGAC	ACGTGTGCGC	TTTCAGCCGG	GTCGCAGGGC	GCTTATCGCG	GCCCGGCAGT
-120	CGGGGCCACG	CCTCACCCCC	GCCCGCAAC	CCCGACCTGG	GGAAACCCGG	GGCGTGGGG
		Sp1	Sp1			
-60	AGGGGCCACT	GCGTTCAGCT	CTGGCGGTCC	ACAGCCCGAA	GCGCGGCTTA	GGAAGTTCGT
	Sp1					
+1	GTCAGCGCTG	CCTGAGCTCG	TCCCCTGGAT	GTCCGGGTCT	CCCCAGGCGG	CCACCCGCGG
	Start Exon 1		TSS			
+61	GCTCCCATCG	TGACCTCCAG	CCGCAGCGCC	TCCCACGCCG	GCCGCCCGCG	GAGGGGAGCG
+121	CTCGGGCGCG	CCGGGTGTGG	TTGGGGGAAG	GGTTGTGCC	GCGCGCGGGC	TGCGTGCTGT
+181	GCCCACTCAA	AAGTTTCCGG	GCGCGCAGGA	GGGAAGAGGC	AGTGCCCGCC	ACTCCCACTG
+241	AGATTGAGAG	ACGCGGCAAG	GAGGCAGCCT	GTGGAGGAAC	TGGGTAGGAT	TTAGGAACGC
+301	ACCGTGCACA	TGCTTGTTGG	TCCTGTTAAG	TGGAAACTGC	TGCTTTAGAG	TTTGTTTGGA
+361	AGGTCCGGGT	GACTCATCCC	AACATTTACA	TCCTTAATTG	TTAAAGCGCT	GCCTCCGAGC
+421	GCACGCATCC	TGAGATCCTG	AGCCTTGTGT	TAAGACCGAG	CTCTATTAAG	CTGA
					End of exon 1	

그림 2. Identification of Sp1 binding sites in human ABCG2 promoter region. A, ABCG2 has 16 exons and 15 introns and spans over 66kb. Four Sp1 sites are located in front of exon 1. B, Four Sp1 binding sites are located in -212bp, -111bp, -99bp and -61bp.

나. in vitro에서 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3 binding 확인

다음으로 in vitro에서 Sp1과 Sp3가 찾아낸 binding site에 결합하는 지 알아보기 위한 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 실험을 수행하였다.

먼저 ABCG2의 proximal promoter region에 존재하는 네 개의 Sp1 binding site를 포함하는 세 가지 probe를 제작하고, 이를 P³²로 labeling한 hot probe와 label하지 않은 cold probe, Sp1이 binding하는 중요 염기서열 부위를 mutation한 mutant probe를 각각 제작하였다(그림 3A). 이후 제작한 probe들과 A549의 nuclear extract를 이용해 gel shift assay를 수행하였다. 제작한 WT probe 1, 2, 3를 통해 네 번째 Sp1 binding site (-61bp)에서 Sp1이 가장 강하게 결합함을 확인할 수 있었다(그림 3B).

세 개의 WT probe들은 모두 공통적인 두 개의 complex를 가지는 것을 확인하였다(그림 3B). 이 두 complex가 의미하는 것이 무엇인지를 알아보기 위하여 각 WT1, 2, 3 probe에 Sp1과 Sp3 antibody를 이용하거나 WT cold probe, mutant cold probe를 이용하여 competition assay를 수행하였다. 각각의 WT cold probe 1, 2, 3을 사용하여 competition하였을 때는 두 complex가 모두 사라지는 것을 확인하였다. 반면에 mutant probe를 사용하였을 때는 두 complex들이 그대로 남아있는 것을 확인하였다. 또한 Sp1과 Sp3의 antibody를 사용하여 supershift assay를 수행한 결과, Sp1 antibody를 사용하였을 때는 C1의 신호가 약해진 것을 확인하였고, Sp3를 사용했을 때는 C2의 신호가 약해진 것을 확인하였다. 따라서 complex 1 (C1)이 Sp1, complex 2 (C2)가 Sp3가 결합한 것임을 확인하였다. 이 실험 결과를 통해 네 개의 Sp1 binding site에서 Sp1과 Sp3가 각각 binding함을 확인하였다. 또한 Sp1과 Sp3의 결합 모두 WT3에서 가장 높은 것을 확인하였다.

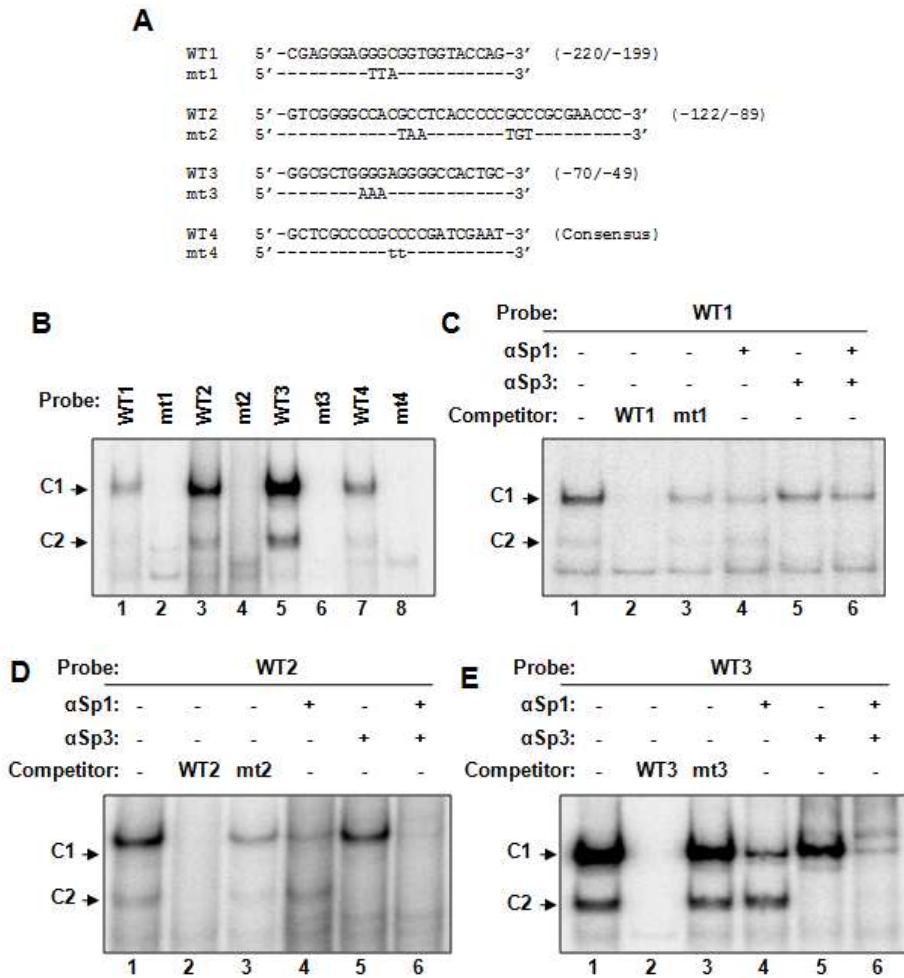


그림 3. Sp1 and Sp3 bind to ABCG2 promoter in A549 *in vitro*.
 A, Sequences of the wild-type (WT) and mutant (mt) (spanning -220/-199, -122/-89, and -70/-49, respectively), and consensus Sp1 probes used in (B-E) are shown. Mutated nucleotides are shown, and hyphens indicate identity to the WT sequence.. B, EMSA using labeled probes shown in (A) and A549 nuclear extract. Competition assay and supershift assay with WT1 probe (C), WT2 probe (B) and WT3 probe (E).

다. *in vivo*에서 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3 binding 확인

다음으로, *in vivo* 상에서도 Sp1이나 Sp3가 ABCG2의 promoter region에 binding하는지를 알아보기 위하여 Sp1과 Sp3 antibody를 이용하여 chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay를 수행하였다 (그림 4A). 실험결과 A549에서 ABCG2 promoter region의 Sp1 binding site가 있는 proximal region에서 Sp1은 input 대비 1.87%, Sp3는 input 대비 5.53%로 각각 binding하였다(그림 4B, C).

EMSA의 결과와 마찬가지로, Sp1과 Sp3는 A549에서 모두 ABCG2 promoter의 proximal region에 위치한 Sp1 binding site에 결합함을 확인하였다.

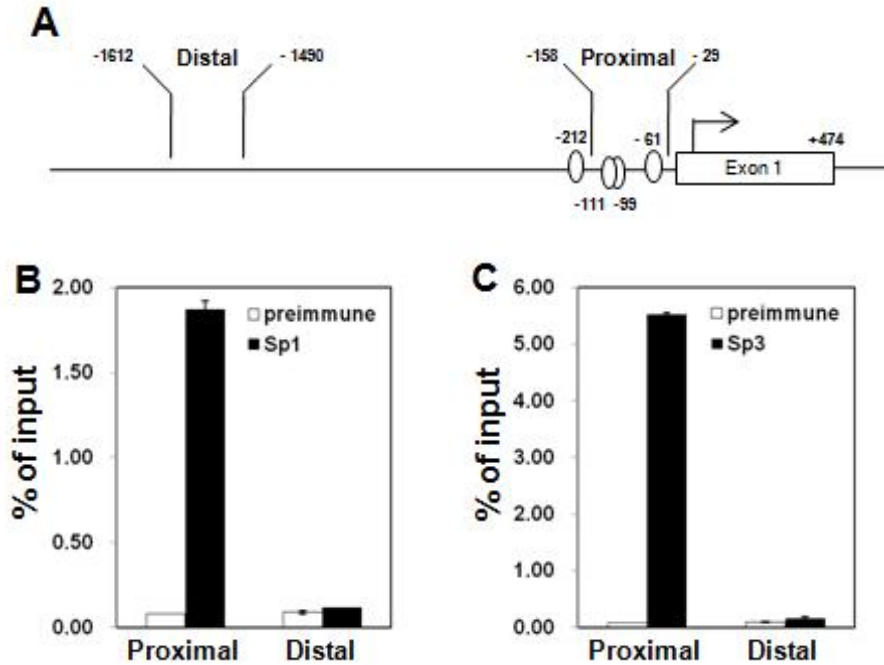


그림 4. Sp1 and Sp3 bind to ABCG2 promoter in A549 *in vivo*.

A, Locations of proximal and distal regions at ABCG2 promoter. Proximal primer was designed -158bp to -29bp and distal primer was designed -1612bp to -1490bp.

B, Sp1 binds to proximal region at ABCG2 promoter in A549 (1.87% of input). C, Sp3 also binds to proximal region at ABCG2 promoter in A549 (5.53% of input).

2. Sp1 and Sp3 elevate promoter activity of ABCG2 gene in A549

가. ABCG2 promoter상의 Sp1 binding site를 mutation 했을 때 ABCG2 promoter 활성 변화 확인

ABCG2 유전자의 promoter에 존재하는 Sp1 binding site들 중, 어느 Sp1 binding site가 A549에서의 ABCG2의 expression에 있어서 중요한지 알아보기 위해 luciferase activity assay를 진행하였다. 먼저, ABCG2의 promoter region을 293T genomic DNA로부터 pABCG2-WT (WT)를 cloning하였다. 이후 각 Sp1 binding site가 point mutation된 mutant series를 제작하였다(그림 5A).

다음으로 완성된 mutation series를 이용하여 dual luciferase assay를 수행 하였다(그림 5B). 실험 결과 WT에 비교하여 mt1은 6.6%, mt2는 70.7%, mt3는 81.4%, mt4는 4.4%, mt5는 47.6%, mt6는 18.3% mt7은 12.0%로 activity가 감소한 것을 확인하였다. 이들 중 activity의 차이가 큰 것은 mt1, mt4, mt6, mt7인 것을 확인하였으며, 이들은 공통적으로 첫 번째 Sp1 binding site가 mutation된 것임을 확인하였다. 이를 통해, A549에서 첫 번째 Sp1 binding site (-211bp)가 ABCG2의 발현에 중요하다는 것을 알 수 있었다(그림 5B).

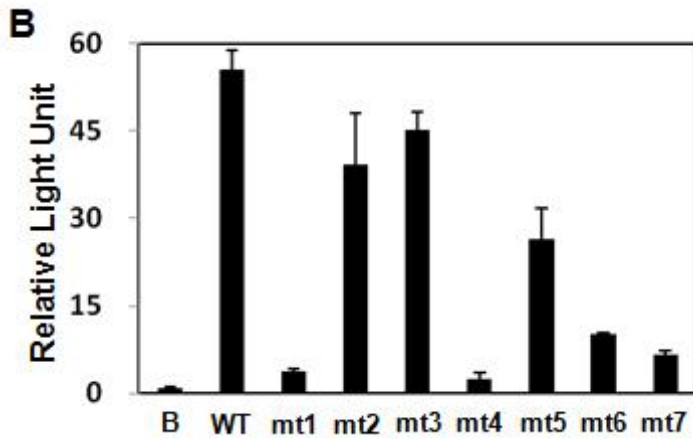
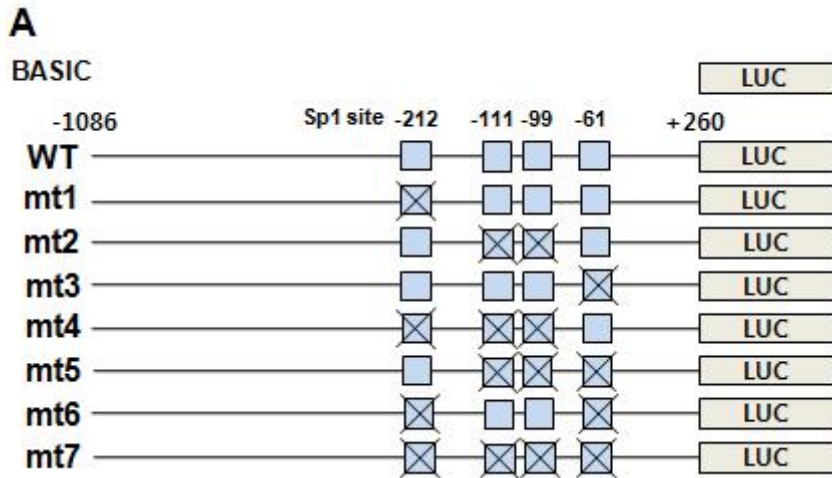


그림 5. The effect of mutation of Sp1 binding sites on the ABCG2 promoter activity. A, Cloning mutation series of ABCG2 promoter region from WT construct for luciferase activity assay, B. The results of Sp1 binding sites mutation assay. Luciferase activities are critically decreased in mt1, mt4, mt6 and mt7.

나. Sp1과 Sp3의 과다발현에 의한 ABCG2 유전자 promoter 활성 변화 확인

ABCG2의 발현이 Sp1과 Sp3에 의해 전사 수준에서 직접 조절되는지를 알아보기 위하여 Sp1과 Sp3를 과발현시키는 over-expression vector와 pABCG2-WT를 293T에 co-transfection시켜 luciferase assay를 수행하였다.

실험 결과 Sp1의 over-expression vector인 pCMV-Sp1의 농도를 100, 200, 400 ng 으로 점차 증가시킬 때, over-expression vector의 농도에 dose-dependant하게 ABCG2 promoter의 활성이 증가함을 확인 할 수 있었다(그림 6A). 마찬가지로 Sp3의 over-expression vector인 pN3-Sp3FL을 사용하여 동일한 방법으로 실험하였을 때도 ABCG2 promoter의 활성이 점차 증가함을 확인하였다(그림 6B).

Sp1과 Sp3의 over-expression assay의 결과를 통해 ABCG2의 발현에 있어 Sp1과 Sp3는 ABCG2의 발현을 직접 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 Sp1 뿐만 아니라 Sp3도 ABCG2 gene expression에서 activator로써 작용할 수 있음을 확인하였다.

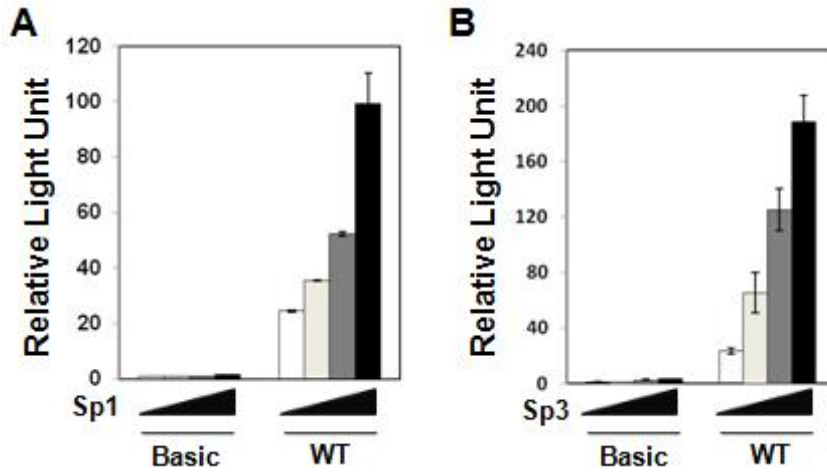


그림 6. ABCG2 promoter activity is increased by over-expression of Sp1 and Sp3. Different amounts of Sp1 vector (A) or Sp3 vector (B) were transfected into 293T cells together with pABCG2-WT construct.

3. Knockdown of Sp1 and Sp3 decrease ABCG2 gene expression and its function in A549

가. Sp1와 Sp3의 knockdown system 확립

우리는 Sp1과 Sp3가 실제로 A549 내에서 ABCG2 발현에 영향을 주는지 확인함과 동시에 side population phenotype의 변화가 있는지 알아보기 위한 knockdown 실험을 진행하였다. 먼저 Sp1과 Sp3의 expression을 knockdown 할 수 있는 shRNA lentiviral construct를 이용하여 293T에 transfection하여 lentivirus를 만들었다. 이를 A549 세포에 infection시켜 Sp1과 Sp3의 발현이 감소하였을 때의 ABCG2의 발현 변화를 알아보았다.

Quantitative real-time PCR을 통해 control과 비교하여 Sp1에 대한 shRNA를 발현시킨 A549에서 Sp1 mRNA expression이 19% 감소되었음을 확인했다. 마찬가지로 방법으로 Sp3에 대한 shRNA를 발현시킨 A549에서 Sp3의 mRNA expression이 14% 감소함을 확인하였다. 따라서 Sp1이나 Sp3의 발현이 독립적으로 감소하는 knockdown A549 cell line을 확립하였다.(그림 7A, B)

Quantitative RT-PCR을 통한 RNA level 변화를 확인한 이후 protein level에도 변화가 있는지를 확인하기 위해 whole cell lysate를 추출하여 Western blot으로 확인하였다. 이를 통해 실제로 Sp1과 Sp3의 protein expression이 감소됨을 확인하였다(그림 7C, D).

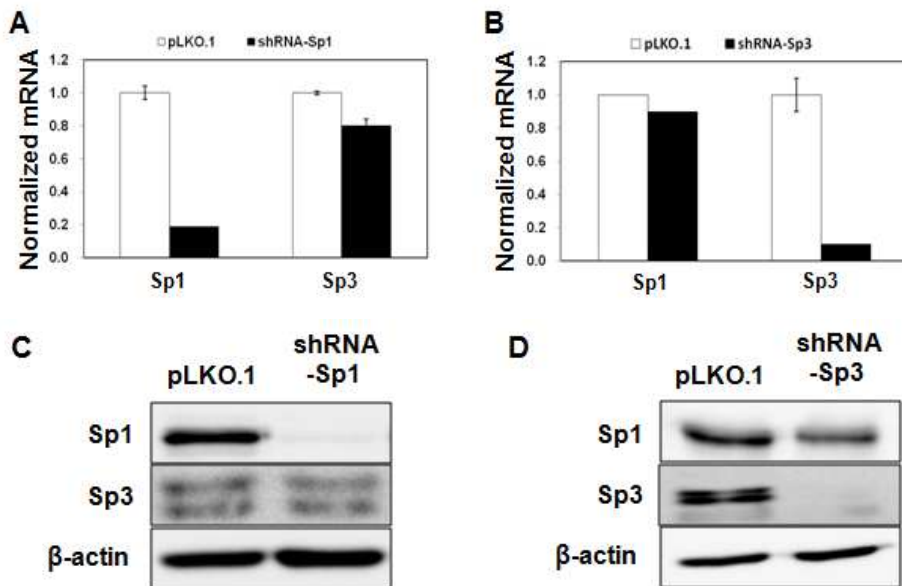


그림 7. Knockdown of Sp1 and Sp3 expression in A549. A549 cells are infected with lentiviruses expressing shRNA against Sp1 or Sp3, and cells are selected by puromycin ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) or G418 ($1 \text{ mg}/\text{ml}$).

A and B. Real-time PCR is performed to analyze mRNA levels of Sp1, Sp3 and normalized against 18S rRNA levels. Data are presented as fold changes calculated against gene expression levels in pLKO.1 shRNA cells.

C and D. Whole cell lysate are separated by SDS - PAGE and subjected to western blotting using antibodies for Sp1, Sp3 and β -actin.

나. Sp1과 Sp3의 knockdown시 ABCG2의 발현 변화 확인

Sp1과 Sp3를 lentivirus를 이용하여 각각 knockdown시킨 A549에서 ABCG2의 mRNA level을 먼저 확인하였다. Sp1이 19%로 knockdown 되었을 때, ABCG2의 mRNA expression도 19% 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 Sp3의 발현이 14%를 감소하였을 때에도 ABCG2의 mRNA expression이 31% 감소한 것을 확인할 수 있었다.(그림 8A, B)

다음으로, A549세포 표면에 ABCG2 protein expression이 변화하는 지 알아보기 위해 human ABCG2 FACS antibody를 이용하여 flow cytometry로 확인하였다.

실험 결과 Sp1이 knockdown 된 A549에서 ABCG2 antibody와 결합한 cell population의 5.25%에서 1.32%로 감소해 ABCG2의 protein 발현이 25.1% 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한 Sp3이 knockdown 되었을 때에도, ABCG2 antibody에 의한 cell population의 4.88%에서 1.55%로 감소함을 확인하여, ABCG2의 protein의 발현이 31.8% 감소함을 확인할 수 있었다(그림 8C, D). 이러한 결과는 앞선 실험에서 mRNA level을 확인했을 때와 같은 패턴을 보이며, Sp1이나 Sp3의 발현이 감소되면 ABCG2의 발현도 감소한다는 것을 확인할 수 있었다.

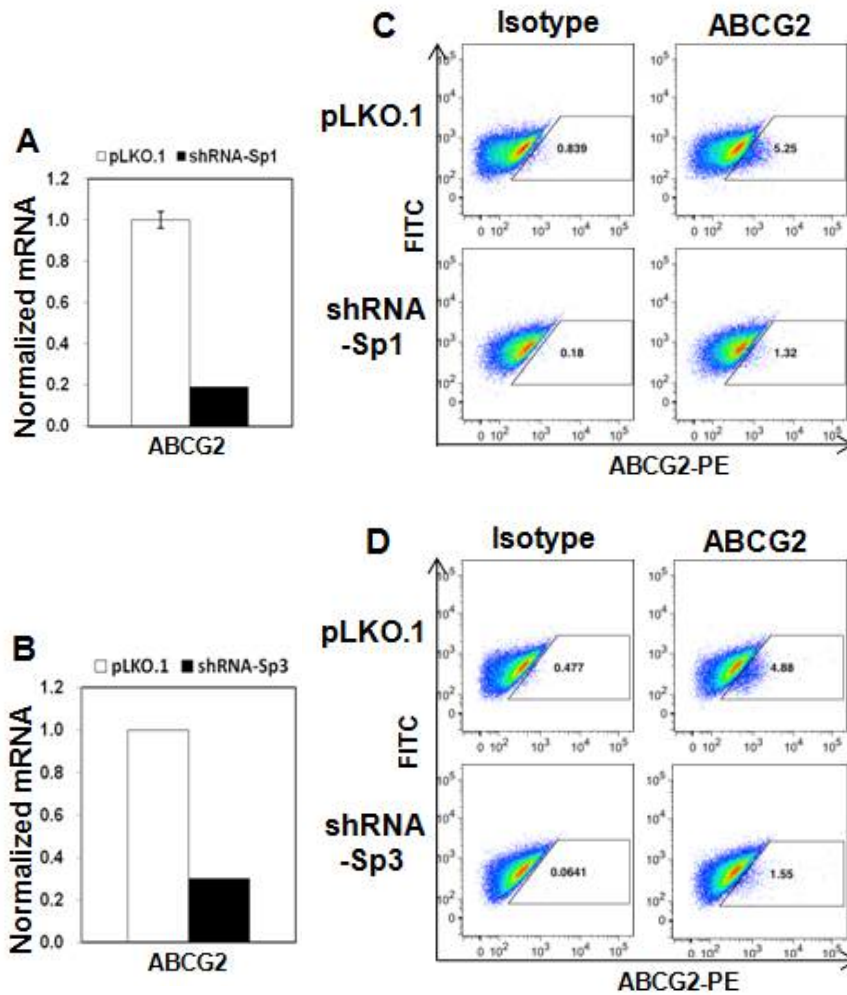


그림 8. ABCG2 expression is decreased in A549 expressing Sp1 and Sp3 shRNA. A and B, ABCG2 mRNA level reduces in Sp1 or Sp3 knockdown A549. C and D, ABCG2 protein expression decreases in Sp1 or Sp3 knockdown A549. The ABCG2 protein level were analyzed by flow cytometry with PE-conjugated ABCG2 antibody.

다. Sp1과 Sp3의 knockdown시 side population 변화 확인

우리는 또한 Sp1과 Sp3이 발현이 감소됨에 따라 ABCG2의 발현 감소로 인한 side population phenotype이 감소되는지를 hoechst 33342 dye를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 staining하여 확인하였다. 또한 ABCG2의 inhibitor로 알려진 fumitremorgin C (FTC)를 1 μM 의 농도로 처리한 A549와 비교하여 보았다. 실험결과 control과 비교하여 Sp1이 knockdown된 A549에서 side population 비율이 3.56%에서 1.03%로 감소해 SP phenotype이 28.9% 감소함을 확인할 수 있었다(그림 9A). 마찬가지로 Sp3가 knockdown된 A549에서도 3.6%에서 0.195%로 감소해 SP phenotype이 5.56% 감소한 것을 확인할 수 있었다(그림 9B).

이 결과들을 통해, Sp1과 Sp3는 ABCG2의 expression에 직접적으로 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었으며, ABCG2 protein expression이 감소함에 따라 side population비율이 감소함을 보았다.

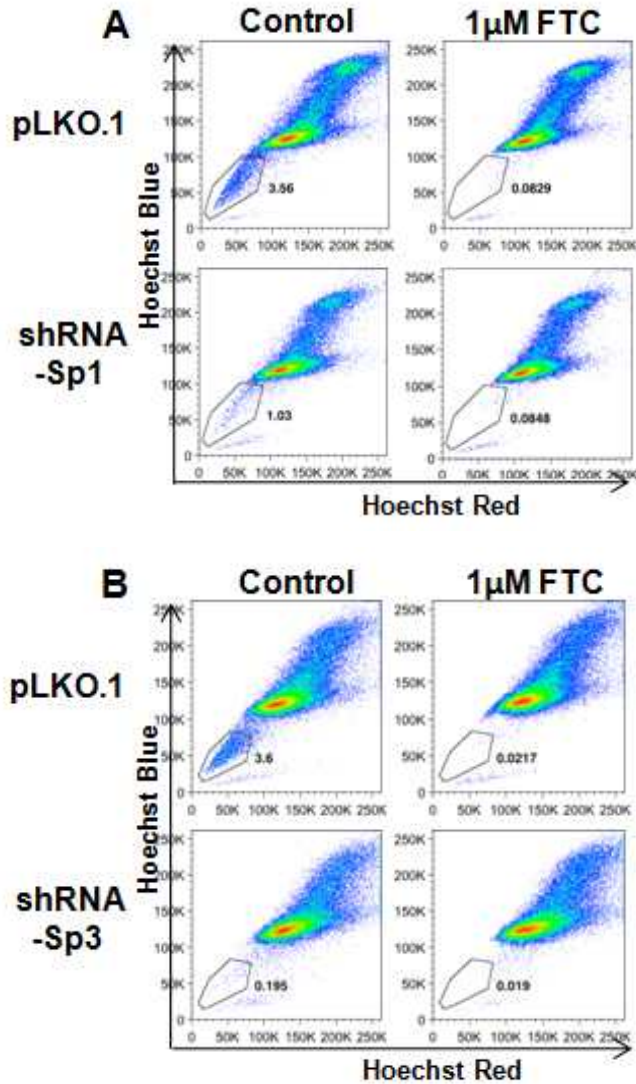


그림 9. Knockdown of Sp1 and Sp3 repress side population phenotype in A549. Flow cytometry analysis of SP phenotype in Sp1- or Sp3-depleted A549. To show assay specificity, cells were pre-incubated with 5 μ g/ml hoechst 33342 dye in the presence of fumitremorgin C (1 μ M FTC). FTC is an ABCG2 inhibitor and used to a negative control.

4. Mithramycin A, a Sp1 inhibitor, decreases expression of ABCG2 and its function in A549

가. Mithramycin A에 의한 ABCG2 유전자의 발현 변화 확인

우리는 이전 연구를 통해 A549 cell에서 Sp1과 Sp3가 Sp1의 inhibitor인 mithramycin A (MMA)에 의해 mRNA level과 protein level이 감소함을 확인했었다.⁵⁴ 따라서 Sp1의 inhibitor로 알려진 MMA를 정상적인 A549에 처리하였을 때에 Sp1과 Sp3의 감소에 따른 ABCG2의 mRNA level과 protein level이 변화 하는지를 확인해보았다. 정상적인 A549에 mithramycin A의 농도를 50, 100, 200 nM로 48시간 동안 처리하였다. 실험 결과 MMA의 농도가 증가하면 ABCG2의 mRNA level은 감소함을 확인하였다(그림 10A). 또한, A549의 세포 표면에 발현되는 ABCG2 protein level 또한 flow cytometric analysis로 확인하였다.

실험 결과, PE-conjugated ABCG2 antibody에 의한 mean fluorescence intensity (MFI)가 MMA의 농도가 높을수록 감소함을 확인하였다. 따라서 Sp1의 inhibitor로 알려진 MMA를 A549에 처리하면, MMA의 농도에 반비례하여 ABCG2의 발현이 감소함을 확인하였다(그림 10B).

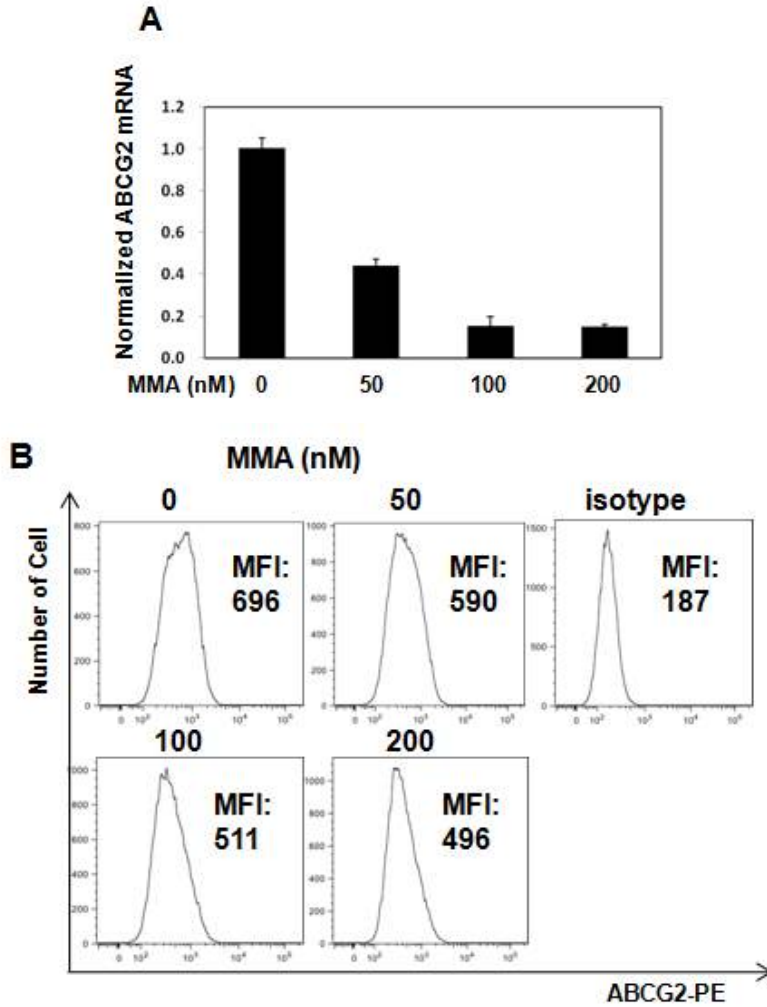


그림 10. Mithramycin A reduces ABCG2 expression in A549. A, RT-PCR is performed to analyze ABCG2 mRNA level. B, Flow cytometry assay by using PE-conjugated human ABCG2 antibody for checking ABCG2 protein level. The higher mean fluorescence intensity (MFI) means the more expression of ABCG2 protein in the cells. Isotype control is used to a negative control.

나. Mithramycin A에 의한 side population 변화 확인

ABCG2에 의한 side population 비율이 mithramycin A (MMA)의 농도에 따라 점차적으로 감소하는지, 정상적인 A549에 MMA를 48시간 처리한 후, hoechst 33342 dye를 이용해 staining하여 보았다(그림 11). MMA를 처리한 조건은 ABCG2의 mRNA와 protein level 변화를 확인한 실험과 동일한 조건으로 진행하였다.

실험 결과 MMA를 50, 100, 200 nM로 처리한 A549에서의 side population 비율이 5.29%, 3.91%, 2.01%인 것을 확인하였다.

50 nM의 조건에서는 control A549에서의 side population과 비슷한 percentage를 가졌지만, MMA의 농도가 증가됨에 따라 side population이 점차 감소함을 확인하였다. 따라서, 정상적인 A549에 Sp1 inhibitor인 MMA를 처리하였을 때에도 ABCG2의 발현과 그 기능이 감소함을 알 수 있었으며, 이를 통해 Sp1이 ABCG2의 발현에 직접적으로 영향을 준다는 것을 확인하였다.

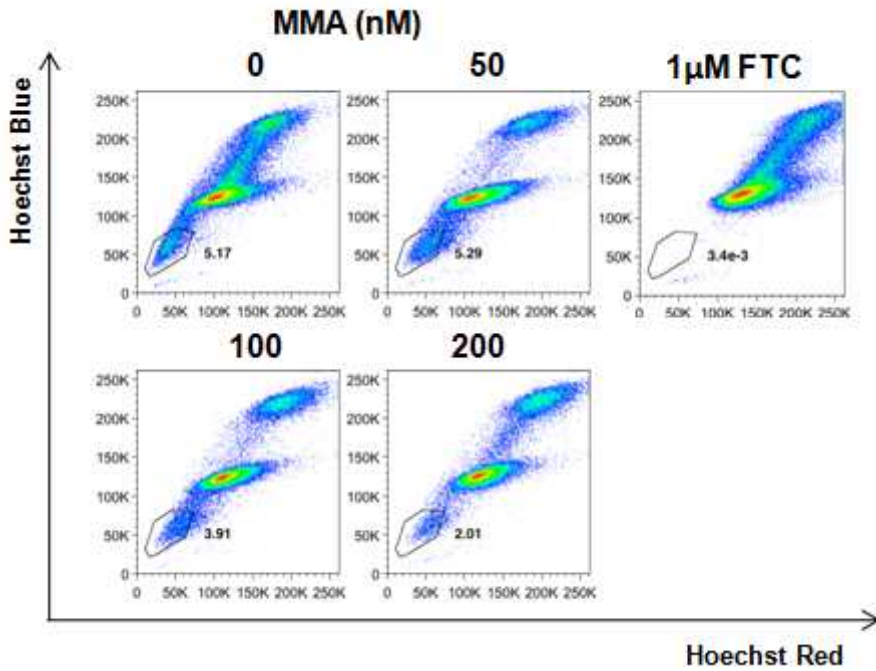


그림 11. Mithramycin A reduces the function of ABCG2. Hoechst 33342 dye staining is performed on MMA-treated A549 (0 to 200 nM). In these data, the function of ABCG2 was decreased by MMA.

5. Down-regulation of Sp1 or Sp3 increases chemotherapeutic efficiency of cisplatin in A549

가. Sp1과 Sp3의 knockdown시 cisplatin치리에 따른 apoptosis rate 증가 확인

Drug-resistant protein으로 알려진 ABCG2의 expression 감소에 따른 drug sensitivity의 변화가 있는지 apoptosis assay를 통해 알아보았다. Sp1이나 Sp3가 knockdown된 A549를 이용하여 anticancer drug로 알려진 cisplatin (Cis)을 처리하였을 때, 정상적인 A549와 비교하여 apoptosis rate가 증가하는지 확인하였다. Sp1과 Sp3가 knockdown된 A549에 cisplatin을 7, 17.5 μ M의 농도로 48시간 동안 처리하였다. 이후 apoptosis와 necrosis rate 변화를 5 μ l의 AnnexinV-APC와 2 μ g/ml의 propidium iodide (PI)로 staining하여 확인하였다.

Cisplatin을 처리하지 않은 Sp1 knockdown A549를 pLKO.1-shRNA가 infection된 세포와 비교하였을 때, apoptosis rate가 10.3% 증가된 것을 확인하였다. 또한 cisplatin을 7, 17.5 μ M로 처리하였을 때, control과 비교하여 3.3%, 7.7% 증가하였다. PI staining을 통한 necrosis rate를 비교하여 보았을 때는 cisplatin을 처리하지 않았을 때 control에 비하여 Sp1 knockdown cell이 9.1%로 증가하였다. 여기에 7, 17.5 μ M의 농도에서는 각각 0.6%, 0.61%가 증가하여 necrosis는 큰 변화가 없는 것을 확인하였다(그림 12A).

마찬가지로 Sp3이 knockdown되었을 때에도 apoptosis의 비율이 control과 비교하여 증가된 것을 확인하였다. Cisplatin을 처리하지 않았을 때는 5.2%가 증가한 상태에서, 처리 시 각각 7.5%, 9.2%로 증가한 것을 확인하였다. 그러나 necrosis rate는 cisplatin을 처리하지 않은 조건에서 오히려 Sp3 knockdown된 세포가 control에 비해 5.9% 감소하였다. Cisplatin을 7 μ M 처리한 세포에서 1.08% 감소하였고, 17.5 μ M 처리했을 때는 3.05% 증가된 것을 확인하였다(그림 12B). 이 두 실험에서 공통적으로 necrosis에는 큰 영향을 주지 못하나, total cell death는 cisplatin을 처리함에 따라 증가한 것을 확인하였다.

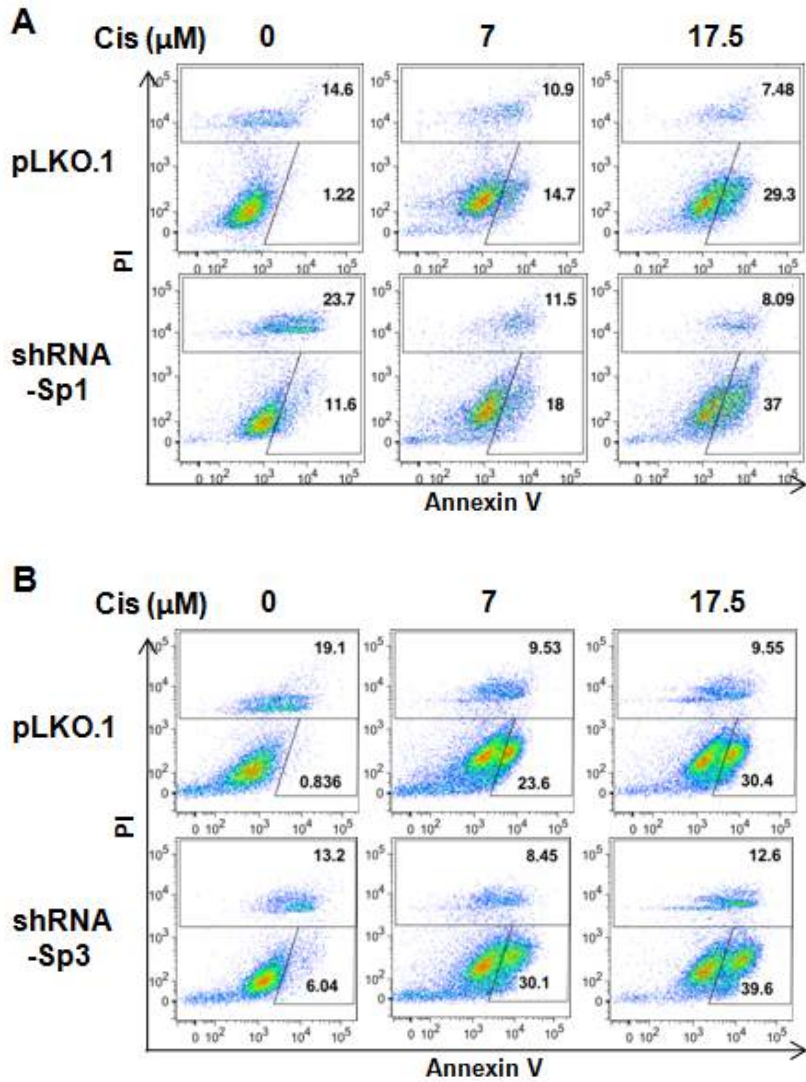


그림 12. Knockdown of Sp1 and Sp3 enhance the efficiency of cisplatin in A549. Flow cytometric analysis of apoptotic cells induced by cisplatin using A549 cells expressing shRNA against Sp1 (A) or Sp3 (B).

나. Mithramycin A와 cisplatin 처리 시 apoptosis 증가 확인

이전 실험에서는 Sp1과 Sp3의 발현이 knockdown된 A549 세포에 cisplatin을 처리하였을 때, apoptosis와 necrosis가 더 많이 유도되는지를 확인하였다. 다음으로 Sp1 inhibitor인 mithramycin A를 A549 세포에 처리하였을 때에도 cisplatin에 의하여 apoptosis와 necrosis가 더 많이 유도되는지 알아보기 위해 mithramycin을 200 nM의 농도로 48시간 처리한 A549를 이용하여 apoptosis assay를 수행하였다.

실험 결과, mithramycin을 200 nM로, cisplatin을 7, 17.5 μ M의 농도로 48시간 처리한 정상적인 A549에서도 apoptosis의 비율이 점차 높아짐을 확인할 수 있었다. mithramycin A를 200 nM로 처리하였을 때 apoptosis가 12.5% 증가하며, cisplatin을 7, 17.5 μ M로 처리하면 16.8%, 23.9%로 증가한 것을 확인했다. PI staining을 통한 necrosis의 비율을 확인하였을 때, cisplatin의 농도가 높아짐에 따라 두 조건에서의 A549 모두 necrosis가 증가한 것을 확인할 수 있었다.(그림 13).

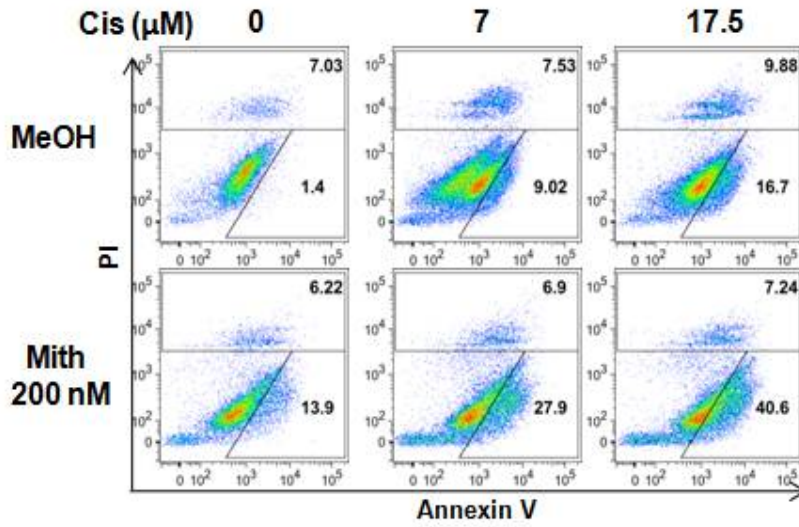


그림 13. Mithramycin A enhances the efficiency of cisplatin in A549. Flow cytometric analysis of apoptotic cells induced by cisplatin using A549 cells treated with mithramycin.

IV. 고찰

대부분의 세포에서 발현된다고 알려진 transcription factor인 Sp1은 이미 그 역할에 대해서 많은 연구가 있었다. Sp1과 Sp3는 normal tissue보다는 cancer tissue에서 protein expression이 높게 나타난다고 보고되었다.³¹

Kenneth K. W. To의 연구에 따르면, cancer cell에서 Sp1이 HDAC1과 complex를 이루어 ABCG2 promoter에서 repressor로 작용할 수 있다고 보고하였다. 이들은 colon cancer, breast cancer, large lung cancer line인 S1, H460, MCF-7, SF295, SW620과 함께 flavopiridol, mitoxantrone에 저항성을 가지는 이들의 sub cell line을 가지고 실험하였다. 여기에 chromatin remodeling complex에 따른 ABCG2의 gene expression 변화를 알아보기 위해 HDAC inhibitor인 romidepsin을 처리한 후 ChIP assay를 통해 histone modification을 관찰하였다.

이들은 HAT과 HDAC, Pol II, Sp1, Brg-1과 같은 transcription factor의 binding 정도를 ChIP assay를 통해 확인하였다. 결론적으로 transcription starting site와 가까운 ABCG2 proximal promoter region에서 Sp1과 HDAC1이 결합하여 chromatin이 응축되어 heterochromatin 상태가 되면, DNA polymerase II와 Brg-1과 같은 transcription factor가 ABCG2 promoter에 binding 하지 못해 ABCG2의 발현이 감소한다고 보고하였다. 또한 HDAC1의 감소에 의해 Sp1과 H460에서 Sp1의 binding이 감소하나, MCF-7, SF295, SW620에서는 romidepsin을 처리함에 따라 ABCG2의 발현이 감소하는 대신 다른 drug resistance protein인 MDR1의 발현이 증가한다고 보고했다. 이들은 cancer type마다 ABCG2의 발현이 다르며, HDAC1은 Sp1과 함께 ABCG2의 expression을 억제한다고 보고하였다.⁵⁵

반면에 Hamada 들의 연구에서, Sp1이 pancreatic cancer cell의 ABCG2 발현증가에 관련이 있다는 것을 확인하였다. human ABCG2의 promoter region에는 세 개의 Sp1 binding site가 존재하며, 이들은 promoter assay와 ChIP을 통해 homeobox gene인 MSX2와 Sp1이 ABCG2의 발현에 영향을 미치는지 알아보았다. 정상적인 pancreatic

cell인 HPDE와 cancer cell인 Panc-1의 ABCG2 promoter에서의 luciferase activity가 다른 것을 확인하였으며, MSX2는 luciferase activity에 영향을 미치지만 DNA에 직접적으로 interaction하지 않는다는 것을 ChIP assay를 통해 확인하였다. 결론적으로 transcription starting site와 가장 가까운 Sp1 binding site이 ABCG2의 발현에 중요하며, ABCG2의 promoter에 Sp1이 binding하는 것에 MSX2가 inducer로 작용한다고 보고하였다.⁵⁴

이러한 논문들을 통해, cancer cell에서 Sp1은 ABCG2의 gene expression과 연관이 있다는 것을 알 수 있었다. 이들은 공통적으로 Sp1이 ABCG2의 promoter region에 직접적으로 binding함을 보였지만, cancer type에 따라 Sp1의 작용이 다를 수 있으며, 함께 작용하는 factor들에 따라 ABCG2의 gene expression에 미치는 결과는 서로 다를 수 있음을 보여주었다.

이번 연구에서는 우리는 기존에 밝혀진 Sp1에 더하여 Sp3에 의한 ABCG2의 발현패턴 변화를 non-small cell lung adenocarcinoma cell인 A549 cell에서 확인해 보았다. EMSA와 ChIP assay 실험에서 A549의 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3가 결합함을 in vitro와 in vivo에서 확인하였다. Sp1과 Sp3는 직접적으로 ABCG2의 promoter에 binding하는 것을 확인하였다. 그러나 이 두 전사인자가 chromatin구조의 변화에 있어 어떠한 영향을 미치는지는 확인하지 못하였다. 따라서 다른 논문들에서 알려진 것처럼 A549에서도 Sp1과 Sp3가 다른 전사인자들과의 interaction, 특히 histone modification에 관련된 전사인자들과의 작용이 있는지 추가적인 실험들을 통해 확인해야 할 것으로 보인다.

Promoter assay를 통해 Sp1이나 Sp3의 발현에 비례하여 A549에서 ABCG2의 발현이 증가됨을 확인하였다. 반대로 Sp1과 Sp3의 감소에 따른 ABCG2의 발현과 그 기능이 감소함을 knockdown 실험과 Sp1 inhibitor를 사용하여 확인하였다. 또한 이 실험으로 인한 ABCG2의 발현 감소로 cisplatin의 효율을 증가되어 drug sensitivity가 증가함을 확인할 수 있었다.

이 실험을 통해 우리는 Sp1뿐만 아니라 Sp3도 ABCG2의 발현에 영

향이 있음을 A549 cell을 이용하여 확인하였다. 하지만 다양한 cancer cell model에서의 Sp1에 의한 ABCG2의 발현패턴이 다를 수 있음을 확인하였듯이, 다른 cancer cell line들에서도 Sp3가 ABCG2의 발현에 있어서 activator로 작용하는지에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

Small population인 cancer stem cell에 발현되는 stem cell marker 들 중, cancer stem cell specific한 marker를 찾기 위한 많은 다른 candidate들이 제시되고 있다. ABCG2는 알려진 다양한 stem cell marker와 함께 cancer stem cell 에서도 발현된다고 알려져 있다. 하지만 ABCG2는 다양한 stem cell, cancer cell, cancer stem cell들에서도 발현된다고 알려졌기 때문에 cancer stem cell specific marker라고 보기는 어렵다. 따라서 ABCG2의 발현 억제로 인한 drug sensitivity가 증가됨을 확인한 실험만으로 cancer stem cell의 apoptosis를 유도하기 때문이라 단정하기는 어려울 것으로 보인다. 이를 위해 먼저 A549에서 Sp1과 Sp3의 억제에 따른 proliferation에 변화가 있는지를 추가적인 실험을 통해 확인하는 한편, Sp1과 Sp3의 감소로 인한 ABCG2의 발현감소가 cancer stem cell들에서도 적용되어 이들에 의한 metastasis가 억제 될 수 있는지를 확인해야 할 것으로 보인다.

하지만 cancer stem cell이 drug resistance ability를 가지는 이유가 ABC transporter에 의한 것이라 알려져 있기 때문에, ABCG2의 발현 조절을 통한 항암제 내성 억제가 cancer chemotherapy에 더 효과적인 결과를 줄 수 있을 것으로 보인다. 앞으로도 더 많은 연구를 통해 ABCG2의 발현과 작용기전을 밝혀내는 동시에 실제 chemotherapy에서 암 치료에 효과적으로 이용하기 위한 방안들과 반복적인 임상적 실험결과들을 얻어야 할 것으로 보인다.

V. 결론

ABCG2는 cisplatin이나 doxorubicin과 같은 기존에 개발된 anti-cancer drug를 efflux시키기 때문에, cancer의 chemotherapy의 효율을 떨어뜨리는 원인으로 생각되었다.

이번 실험들을 통해, Sp1이 A549의 ABCG2 발현에 영향을 미치는지 확인해 보는 한편, Sp3 또한 Sp1처럼 ABCG2의 발현에 영향을 미칠 수 있는지 확인하였다. EMSA 실험을 통해 ABCG2 promoter에 Sp1과 Sp3가 binding한다는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 ABCG2 promoter에 존재하는 네 군데의 Sp1 binding site에 Sp1이나 Sp3가 모두 binding 한다는 것을 알 수 있었으며, 네 번째 Sp1 binding site에 가장 강한 결합을 한다는 것을 알 수 있었다. 또한 ChIP assay를 통해 Sp1과 Sp3가 실제 in vivo에서도 binding한다는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로, ABCG2의 promoter region에 binding하는 Sp1과 Sp3에 의하여 ABCG2의 발현이 변화하는지를 promoter activity assay를 통해 확인하였다. ABCG2의 binding sites의 mutation series를 통해 proximal region에 존재하는 Sp1 binding site 중 첫 번째 Sp1 binding site가 ABCG2의 발현에 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 Sp1과 Sp3의 over-expression을 통한 ABCG2의 발현 증가를 확인하여, 첫 번째 Sp1 binding site에서 Sp1과 Sp3의 발현이 증가됨에 따라 ABCG2의 발현 역시 dose-dependant하게 증가 할 수 있음을 확인하였다. 따라서 Sp1과 Sp3는 ABCG2 promoter의 첫 번째 Sp1 binding site에 직접적으로 binding하여 ABCG2의 발현에 영향이 있음을 알 수 있었다. 또한 첫 번째 Sp1 binding site가 아닌 다른 Sp1 binding site들에서도 Sp1나 Sp3가 결합하여 미약하게 ABCG2의 발현에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이는 앞선 EMSA 실험에서의 결과와는 다른 것으로, 실제 A549세포내에서는 Sp1이 binding하는 부위가 in vitro와 다를 수 있음을 확인하였다.

다음으로 lentiviral construct를 사용한 Sp1과 Sp3의 knockdown system을 확립한 뒤 ABCG2의 발현과 기능을 RNA level과 protein

level, side population assay를 통해 확인하였다. 또한 Sp1의 inhibitor로 알려진 mithramycin A를 처리하였을 때에도 ABCG2의 발현에 영향을 있는지를 확인하여, knockdown실험과 같은 결과를 확인하였다. 이 실험들을 통하여, 비록 ABCG2의 inhibitor인 fumitremorgin C를 처리하였을 때보다 그 효율은 낮았지만, Sp1과 Sp3를 억제하는 것이 ABCG2의 발현과 그 기능을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

또한 knockdown 실험을 통해 Sp1과 Sp3에 의하여 ABCG2의 발현이 감소됨에 따라 anti-cancer drug인 cisplatin에 의한 cancer cell의 cell death가 더 많이 유도됨을 확인할 수 있었다. Sp1과 Sp3가 발현 억제된 A549세포와 mithramycin A를 처리한 A549세포에도 cisplatin을 처리하였을 때 정상적인 A549에 비하여 apoptosis가 더 많이 증가함을 확인하였다.

이러한 결과들을 통해, 실제로 A549에서 Sp1과 Sp3는 ABCG2의 발현과 기능함에 있어 직접적, 독립적으로 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 또한 Sp1과 Sp3의 억제에 따른 ABCG2의 발현 억제로 인해 A549에서의 drug sensitivity가 감소함을 확인하였다.

참고문헌

1. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced drug delivery review* 55, 2003;3-29.
2. Doyle LA, Yang WD, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao YM, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26), 1998; 15665 - 70.
3. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placentaspecific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Research* 58 (23), 1998; 5337 - 9.
4. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan ZR, Robey R, Cristensen B, et al. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Research* 59 (1), 1999; 8 - 13.
5. Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* 24;86(17-18) 2010; 631-7.
6. Rocchi E, Khodjakov A, Volk EL, Yang CH, Litman T, Bates SE, et al. The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271(1), 2000; 42 - 6.
7. Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 26 (1), 2007; 39 - 57.
8. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is

- expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the sidepopulation phenotype. *Nature Medicine* 7 (9), 2001;1028 - 34.
9. Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (1), 2009; 14 - 25.
 10. Zhou S, Morris JJ, Barnes YX, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. *Bcrp1* gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), 2002; 12339 - 44.
 11. Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, et al. The stem cell marker *Bcrp/ABCG2* enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *The Journal of Biological Chemistry* 279(23), 2004;24218 - 25.
 12. Susanto J, Lin YH, Chen YN, Shen CR, Yan YT, Tsai ST, et al. Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *PLoS One* 3 (12), 2008; e4023.
 13. Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, Humphries C, Sadek H, Caprioli A, et al. Hypoxia-inducible factor-2 alpha transactivates *Abcg2* and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circulation Research* 102(9), 2008;1075 - 81.
 14. Ahmed F, Arseni N, Glimm H, Hiddemann W, Buske C, Feuring-Buske M. Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 26 (3),2008; 810 - 8.
 15. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (6859), 2001;

105 - 11.

16. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine* 3 (7), 1997;730 - 7.
17. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7), 2003;3983 - 8.
18. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015), 2004;396 - 401.
19. Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Molecular Vision* 11 (86 - .87), 2005;729 - 37.
20. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Research* 65(20), 2005, 9328 - 37.
21. Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 44 (1), 2006; 240 - 51.
22. Li CW, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang LJ, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* 67 (3), 2007;1030 - 7.
23. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445 (7123), 2007; 106 - 10.
24. Wang J, Guo UP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human

- nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Research* 67 (8), 2007;3716 - 24.
25. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Research* 67 (10), 2007;4827 - 33.
 26. Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132 (7), 2007;2542 - 56.
 27. Davie JR, He S, Li L, Sekhavat A, Espino P, Drohic B, et al. Nuclear organization and chromatin dynamics – Sp1, Sp3 and histone deacetylases. *Adv. Enzyme Regul.* 48, 2008; 189 - 208.
 28. Chuang JY, Wu CH, Lai MD, Chang WC, Hung JJ, Overexpression of Sp1 leads to p53-dependent apoptosis in cancer cells. *Int. J. Cancer* 125, 2009; 2066 - 76.
 29. Kong LM, Liao CG, Fei F, Guo X, Xing JL, Chen ZN, Transcription factor Sp1 regulates expression of cancer-associated molecule CD147 in human lung cancer. *Cancer Sci.* 101, 2010;1463 - 70.
 30. Cawley, S, Bekiranov, S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D, et al. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116, 2004; 499 - 509.
 31. Li L, Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Annals of Anatomy.* 2010;192(5):275-83
 32. Suske G, Bruford E, Philipsen S, Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85, 2005; 551 - 6.
 33. Li L, Sun J-M, Davie JR, Gene regulation by Sp1 and Sp3.

- Biochem. Cell Biology. 82, 2004;460 - 71.
34. To KW, Polgar O, Huff LM et al, Histone modifications at the *ABCG2* promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells. *Molecular cancer research*. 6, 2008; 151-64.
 35. Suske G, The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 1999;291 - 300.
 36. Kimura N, Takamatsu N, Yaoita Y, Osamura RY, Kimura N, Identification of transcriptional regulatory elements in the human somatostatin receptor *sst2* promoter and regions including estrogen response element half-site for estrogen activation. *J. Mol. Endocrinol.* 2008; 40, 75 - 91.
 37. Williams AO, Isaacs RJ, Stowell KM, Down-regulation of human topoisomerase II alpha expression correlates with relative amounts of specificity factors Sp1 and Sp3 bound at proximal and distal promoter regions. *BMC Mol. Biol.* 8, 2007; 36.
 38. Rui X, Tsao J, Scheys JO, Hammer GD, Schimmer BP, Contributions of specificity protein-1 and steroidogenic factor 1 to *Adcy4* expression in Y1 mouse adrenal cells. *Endocrinology* 149, 2008; 3668 - 78.
 39. Ou XM, Chen K, Shih JC, Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (*TIEG*)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (*MAO*) B gene. *J. Biol. Chem.* 279, 2004; 21021 - 28.
 40. Lee VH, Chow BK, Lo KW, Chow LS, Man C, Tsao SW et al, Regulation of *RASSF1A* in nasopharyngeal cells and its response to UV irradiation. *Gene* 443, 2009; 55 - 63.
 41. Shin T, Sumiyoshi H, Matsuo N, Satoh F, Nomura Y,

- Mimata H, et al. Sp1 and Sp3 transcription factors upregulate the proximal promoter of the human prostate-specific antigen gene in prostate cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 2005; 291 - 302.
42. Niimi T, Hayashi Y, Sekiguchi K, Kitagawa Y. The Sp family of transcription factors regulates the human laminin alpha1 gene in JAR choriocarcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1759, 2006; 573 - 9.
43. Hantusch B, Kalt R, Krieger S, Puri C, Kerjaschki D, Sp1/Sp3 and DNA methylation contribute to basal transcriptional activation of human podoplanin in MG63 versus Saos-2 osteoblastic cells. *BMC Mol. Biol.* 8, 2007; 20.
44. He S, Sun JM, Li L, Davie JR, Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol. Biol. Cell* 16, 2005; 4073 - 83.
45. Li L, Davie JR, Association of Sp3 and estrogen receptor alpha with the transcriptionally active trefoil factor 1 promoter in MCF-7 breast cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 105, 2008; 365 - 9.
46. Mottet D, Pirotte S, Lamour V, Hagedorn M, Javerzat S, Bikfalvi A, et al. HDAC4 represses p21(WAF1/Cip1) expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism. *Oncogene* 28, 2009; 243 - 56.
47. Gartel AL, Goufman E, Najmabadi F, Tyner AL. Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene* 19, 2000; 5182 - 8.
48. Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res.* 59,

1999;4266 - 70.

49. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 15;99(2), 2002;507-12.
50. Sung JM, Cho HJ, Yi H, Lee CH, Kim HS, Kim DK, et al. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008;163-7
51. Chen Z, Liu F, Ren Q, Zhao Q, Ren H, Lu S, et al. Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *International Journal of Cancer* 126 (4), 2010;841 - 51.
52. Kim HP, Kelly J, Leonard WJ, The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements, *Immunity* 15. 2001; 159 - 172
53. Lee JJ, Park KH, Shin MH, Yang WJ, Song MJ, Kim HP et al, Accessible chromatin structure permits factors Sp1 and Sp3 to regulate human TGFBI gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409. 2011;222-8.
54. Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kanno A, Umino J, Ito H, et al. The homeobox gene MSX2 determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene ABCG2. *Journal of cellular physiology*. 2011; DOI: 10.1002/jcp.22781
55. To KW, Zhan Z, Bates SE. Aberrant promoter methylation of the ABCG2 gene in renal carcinoma. *Molecular cancer research*. 2006;26(22):8572-85.

ABSTRACT

Transcriptional regulation of ABCG2 gene by Sp1 and Sp3
in human lung adenocarcinoma A549 cell

Wook-Jin, Yang

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyoung-Pyo, Kim)

ABCG2 is a member of the ATP binding cassette (ABC) transporter protein families, which use cellular ATP to drive the transport of various substrates across cell membranes including drugs, fluorescence dyes, and other compounds. ABCG2 is one of the most important multi-drug resistance transporters and its substrates include many commonly used drugs in cancer chemotherapy. Human ABCG2 protein is generally expressed in a wide range of tissues, especially in stem cells. It is also known to be expressed in cancer stem cells, which has a self-renewal ability, proliferation capacity, and chemoresistance.

Through recent studies, transcription factor, Sp1, regulates expression of ABCG2 and co-relates with other transcription factors such as HATs and HDACs. However, it is unclear that neither Sp1 acts as an activator nor as a repressor in ABCG2 expression of various cancer cell type.

In this study, we use lung epithelial cancer cell line, A549, to characterize transcriptional regulation of ABCG2 gene. We have shown that both Sp1 and Sp3 bind to the ABCG2 promoter region in vitro and in vivo revealed by EMSA and ChIP assay. Through knockdown studies and luciferase assays, we confirmed the expression of ABCG2 gene is directly regulated by Sp1 and Sp3. We also identified that repression of ABCG2 either by knockdown of Sp1 or Sp3 or by treatment of Sp1 inhibitor, mithramycin increases the efficiency of chemotherapeutic activity of cisplatin.

Thus, our data demonstrated that factors Sp1 and Sp3 are the primary determinants for the control of constitutive expression of ABCG2 gene, and that ABCG2 activity for drug resistance in cancer cells can be modulated by perturbation of Sp1 and Sp3.

Key Words : abcg2, side population, transcription, cancer stem cell, sp1, sp3