

Rodent에서의 핵인 단백질
rPinX1의 기능 분석

연 세 대 학 교 대 학 원
의 과 학
윤 소 미

Rodent에서의 핵인 단백질 rPinX1의 기능 분석

지도교수 박 영 년

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006년 12월

연 세 대 학 교 대 학 원

의 과 학

윤 소 미

윤소미의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원: _____인

_____인

_____인

연세대학교 대학원

2006년 12월

감사의 글

2년 전 실험실 생활을 시작하면서 이렇게 결실을 맺을 때가 오리라는 것은 생각지 못했습니다. 많은 분들의 관심과 격려덕분이며, 이에 사랑을 담아 감사의 말씀 전하고자 합니다. 먼저 연구 할 수 있도록 이끌어 주시고 가르침 주신 박영년 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 처음 들어선 의대 건물에서 제일 먼저 복도에서 마주친 후 지금까지 진정한 과학자의 mind에 대해 알려주신 오봉경 교수님, 본 논문을 위해 충고와 조언 주신 윤채옥 교수님께도 고개 숙여 감사 드립니다. 그리고 기꺼이 기계 사용을 허락해 주시고 편의를 봐주신 김응빈 교수님과 사용을 위해 배려하여 주신 환경미생물 유전체학교실 여러 선생님들께 감사의 말씀 전하고자 합니다. 또한 염색에 도움주신 송영민 과장님과 병리학교실내의 여러 선생님들, 무엇보다도 실험실 생활을 시작함에 있어 따뜻한 관심과 사랑으로 대해주신 김영주 선생님과 이찬희 선생님, 2년 동안 부족한 동생과 함께하며 힘주신 멋진 인생의 선배인 유정은 선생님과 낭만적인 과학자 이재은 선생님께 깊은 사랑 보냅니다. 타지생활 동안 귀한 안식처와 서현학사 가족을 허락해주신 서현교회, 위로자 되어준 31기 친구들에게도 진심으로 깊은 감사 드립니다. 무엇보다 부족한 딸을 믿어 주시고 늘 기도해주시는 우리 엄마, 아빠, 윤군, 상우오빠, 우리 가족들에게 정말 사랑한다 말하고 싶습니다. 마지막으로 힘과 위로자 되시는 나의 하나님. 당신 덕분에 지금의 제가 있다고 고백하며 이 논문을 바칩니다.

저자 씀.

차 례

국 문 요 약.....	1
I. 서 론.....	4
II. 실험 재료 및 방법.....	9
1. Northern blot analysis.....	9
2. 백서 PinX1 stable cell line 제작	1 0
가. pEGFP C1 rPinX1 클로닝	1 0
나. 백서 PinX1 stable cell line 제작	1 1
다. Western blot analysis	1 3
3. 3' overhang관찰 및 Telomere length측정. 1 4	
가. plug 준비 및 gel 전기영동	1 4
나. In-gel hybridization	1 5
다. Bal31 nuclease sensitivity assay.....	1 6

라. MTL (Mean telomeric length) 측정	1 7
5. Cell growth.....	1 8
6. Senescence associated-galactosidase (SA- β -gal) staining assay	1 9
7. Telomeric repeat amplification (TRAP) assay	1 9

Ⅲ. 결 과..... 2 1

1. 백서 PinX1 sequence alignment.....	2 1
2. 백서 tissue에서의 rPinX1 mRNA 발현.....	2 5
3. 백서 PinX1 과발현에 의한 세포노화 유도...	2 7
4. 백서 PinX1 과발현이 3' overhang과 telomere 길이 조절에 미치는 영향.....	3 0
5. 백서 PinX1 stable cell line의 telomerase 활성 도.....	3 5

IV. 고찰	3 7
V. 결론	4 0
V. 참고 문헌	4 1
Abstract	4 8

그 립 차 례

Fig 1. Proposed Structure, Formation, and Function of T Loops.....	8
Fig 2. Structure of rPinX1 stable cell line.....	11
Fig 3. GFP expression of rPinX1 transfected NIH-3T3	1 2
Fig 4. Measurement of mean telomeric length. 1	8
Fig 5. Structure of Rat PinX1	2 2
Fig 6. Multiple sequence alignment of PinX1s. 2	3
Fig 7. Expression of PinX1 in rat tissues.....	2 5
Fig 8. rPinX1 protein expression in NIH-3T3	2 7
Fig 9. Cell growth curves of stable cell line	28
Fig 10. Expression of SA- β -gal in stable cell line.....	2 9

Fig 11. G–strand overhangs and telomere length of rat PinX1 overexpressed cell	3 3
Fig 12. Telomerase activity of rat PinX1 stable cell.....	3 5

국 문 요 약

Rodent에서의 핵인 단백질 rPinX1의 기능 분석

이중 나사선과 3' overhang의 단일 가닥구조로 이루어진 사람의 telomere는 염색체 말단 부위에 위치하며, 여러 단백질들과 함께 염색체를 보존하는 역할을 한다. 정상세포의 경우 telomere의 길이가 critical point에 이르면 세포는 더 이상 분열하지 못하고 세포사멸이나 노화에 이르게 된다. 그러나 사람의 불멸의 세포 (immortal cell)이나 종양세포에서는 telomerase에 의해 telomere가 일정하게 유지된다. Telomerase는 활성요소인 TERT 단백질과 주형이 되는 RNA TR로 이루어져 있는 ribonucleoprotein 복합체이다.

PinX1은 telomere 결합단백질인 TRF1에 결합하는 단백질로서 염색체 8p23에 위치한다. PinX1의 카르복실 말단기에 있는 TID (telomerase inhibitory domain)이 hTERT와 결합하여 telomerase의 활성도를 저해하는 것으로 알려져 있다. 또 PinX1이 과발현된 세포에서는 세포 성장에 영향을 미치면서 telomere 길이 감소를 유발하는 것이 관찰되었다. 이와 같이 PinX1이 telomerase

억제자(inhibitor)로서 종양 억제유전자로서의 가능성이 제기되면서 암치료에 대한 이용 가능성이 부각되었다.

본 연구실에서는 rodent에서 PinX1기능 규명을 위해 PinX1을 백서의 간줄기세포인 WB-F344에서 클로닝 하였다. 아미노산 331개로 이루어진 rPinX1은 사람과 73%, 쥐와 91%의 유사성을 띄었다. 또 염색체 15p12에 위치하며 핵인 단백질 fibrillarin과 co-localization 하는 것을 확인하였다. 백서 PinX1 전사가 심장, 간과 고환에서 발현하고 있음을 확인하였다. 또 rPinX1의 stable cell line을 제작하여 세포의 성장 및 노화에 미치는 영향과 3' overhang과 telomere 길이의 변화를 살펴보았다. rPinX1 stable cell이 PDL(population doubling) 100이 넘어가면서 세포 모양이 납작하고 커지는 노화 형태를 띄면서 성장이 억제되었고 SA- β -gal assay를 통해 세포의 노화가 확인되었다. Stable cell line은 3' G-rich overhang 변화는 없었으나 후기 계대에서 telomere 길이 감소를 확인하였다. 대조군 세포주에 비해 stable cell에서 뚜렷한 telomerase 억제효과는 없었으나 PinX1 과발현은 백서에서도 telomere 길이 감소를 이끌었고 짧은 telomere는 궁극적으로 세포 노화를 유도한 것으로 추정된다. 본 연구는 PinX1의 telomere 길이조절 기능이 포유류에서 보존됨을 확인 하였고, 또한 향후 PinX1을 이용한 새로운 항암제 표적 단백질로서의 동물실험의

기초가 될 것이라 기대된다.

Key words: rPinX1, Pin2/TRF1 binding protein, telomere, 3' overhang,
telomerase activity, senescence, cell growth, NIH-3T3 cell

Rodent에서의 핵인 단백질 rPinX1의 기능 분석

<지도교수 박 영 년>

연세대학교 대학원 의과학과

윤 소 미

I. 서 론

사람의 telomere는 선형 염색체의 말단에 위치하며 5-15kb에 달하는 반복적인 TTAGGG 서열로 이루어져 있다^{1, 2, 3, 4}. Telomere에 특이적으로 결합하는 여러 단백질들과 더불어 염색체 말단을 보존하는 역할을 한다^{5, 6, 7}.

Telomerase는 telomere 합성 효소로 사람 telomerase reverse transcriptase (hTERT)와 주형인 hTR(hTERC)로 이루어져 있다^{8, 9}. Telomerase 활성도가 음성인 인체의 정상체세포에서 세포분열을 거치면서 “end-replication problem”으로 인해 그 길이가 짧아지고, critical point에 달하면 염색체 말단을 보호하는 역할을 상실하여 염색체 말단간의 융합, 염색체 분해 등이 발생한다

^{10, 11, 12}. 정상 세포에서 hTERT를 과발현시키면 수명이 증가되고, 노화가 지연된다¹³. 또 mTR knock out 쥐에서는 비정상적인 염색체 조성(aneuploidy), 염색체 말단 융합, 세포괴사 등이 관찰되기도 하였다^{14, 15}.

불멸의 세포나 암세포에서는 telomerase에 의해 짧지만 telomere가 안정적으로 유지된다^{16, 17}. 일부 암에서는 telomerase 활성도가 없음에도 불구하고 telomere의 길이를 유지하는데 이 기전을 ALT (Alternative Lengthening of Telomeres)이라 하며 재조합에 의해 길이 유지가 되는 것으로 알려져 있다^{18, 19}. Telomere에 결합하여 telomere 길이를 조절하는 여러 단백질이 있는데 이를 ‘Shelterin’이라 명명하고 TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, tankyrase 그리고 POT1^{20, 21}등에 이에 해당한다. 이 중 대표적인 TRF1 (Telomeric repeat binding factor 1)은 telomerase가 telomere에 결합하는 것을 방해함으로써 telomere길이가 짧아지게 하는 음성적 조절인자이다^{23, 24, 25}. TRF2 (Telomeric repeat binding factor 2)는 3’ overhang을 telomere duplex part로 삽입시켜 T-loop (Telomere-loop) 형성에 관여함으로써 염색체 말단을 융합이나 분해(degradation)으로부터 보호하는 역할 한다 (Fig1) ^{4, 25 26}. TRF2가 결여되면 이중나선 telomere DNA의 길이 변화와는 무관하게 3’ overhang이 줄어든다²⁵.

사람 PinX1은 telomeric 단백질 TRF1과 상호 결합하는 단백질로 hTERT와 hTR과 직접적으로 결합하여 telomerase 활성도를 억제한다고 in vitro assay를 통해 밝혀졌다^{27, 28}. Yeast homolog의 경우 PinX1는 rRNA와 snRNA processing에도 관여한다고 알려져 있는데 yPinX1 역시 과발현시 telomere 길이감소와 telomerase 활성도를 저해한다고 밝혀졌다^{29, 30}. PinX1의 아미노말단에는 glycine rich domain(G-patch)이 있는데 이는 RNA 결합 모티프로 알려져 있다. 카르복실기에는 TID (telomerase inhibitory domain)이 있는데 이 부분이 hTERT와 결합하여 telomerase 활성도를 저해하는 것으로 in vivo, in vitro상에서 밝혀졌다. 또한 PinX1이 과발현된 HT1080 (사람 fibrosaroma) 세포에서는 세포 성장에 영향을 미치면서 telomere 길이감소를 유발하는 것이 관찰되었고 반대로 내재성 PinX1을 제거 했을 때 telomerase 활성도가 다시 증가함을 보였다²⁷. 흥미롭게도 사람 PinX1은 microsatellite marker D8S277과 가까운 염색체 8p23에 위치하고 있는데 다양한 사람의 암에서 이 부분의 ‘loss of heterozygosity (LOH)’ 이 빈번하게 일어남이 관찰되었다. 예를 들어, 간세포암 (hepatocellular carcinoma)에서는 40-50%의 LOH가 marker D8S277근처에서 발견되었다³¹.

이와 같이 PinX1은 telomerase 억제자로서, 종양억제유전

자로서의 역할이 알려지면서 암치료 사용의 가능성이 부각되었다. 이와 관련하여 본 연구에서는 사람과 70%, 쥐와 90%의 sequence homology를 띄는 동물모델인 백서 PinX1를 WB-F344 cell line에서 클론하여 telomere 유지와의 연관성을 살펴봄을 통해 PinX1의 기능 이해를 돕고자 한다.

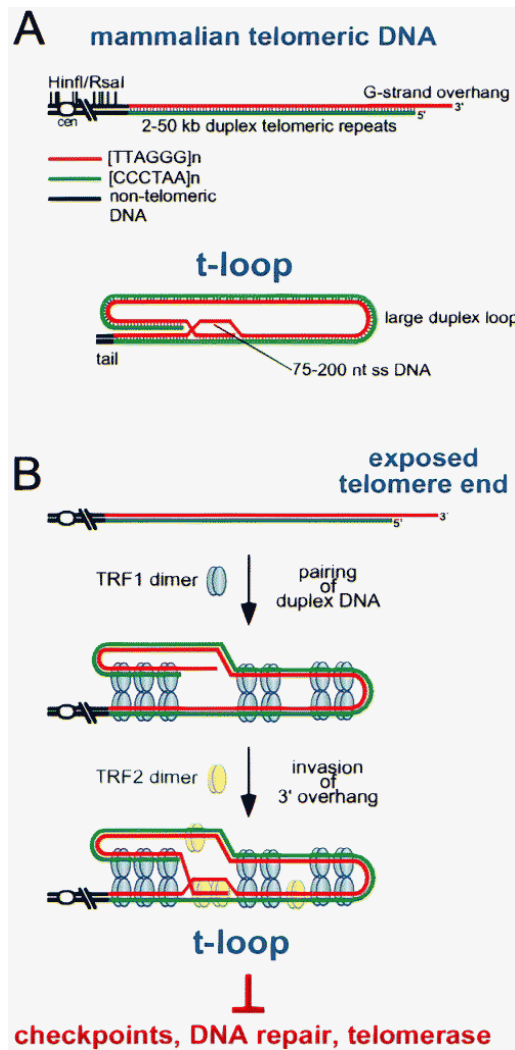


Fig 1. Proposed Structure, Formation, and Function of T Loops⁴

(A) The DNA structure at the ends of mammalian chromosomes and description of the proposed configuration of T-loops. (B) Speculative scheme depicting a possible mode of T-loop formation based on the in vitro biochemical activities of TRF1 and TRF2. T-loops are proposed to mask telomere termini from cellular activities that can act on DNA ends.

II. 실험 재료 및 방법

1. Northern blot analysis

백서의 다양한 조직에서 PinX1 mRNA 발현양상을 측정하기 위해 BD Bioscience로부터 구매한 Rat tissues Northern blots을 가지고 Northern blot을 실시하였다. Rat PinX1△C 50ng과 구매 시 제공된 β -actin을 0.1% DEPC (Sigma, Steinheim, Germany) water에 희석한 후 100℃에서 5분 동안 끓여 변성한 후 DNA를 37℃에서 한 시간동안 rediprimeTM II labeling system (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)을 이용하여 [α -³²P]dCTP labeling하였다. 이후 MicrospinTMG-50 column (Amersham)을 이용하여 동위원소 표지된 DNA를 분리한다. 준비된 blot을 가지고 ExpressHyb Hybridization solution (BD Bioscience, CA, USA)을 사용하여 65℃에서 한시간 동안 prehybridization을 수행하고 새 용액으로 교환한다. 95℃에서 5분 동안 끓여 변성시킨 probe를 넣고 12시간 이상 hybridization을 수행하였다. Hybridization 종료 후 2X SSC, 0.05% SDS의 세정완충용액으로 상온에서 10분씩 3 번, 65℃에서 0.1X SSC, 0.1% SDS 20분씩 2번 세정하였다. Membrane의 물기를 제거한 후 blot을 랩으로 말아 Medical X-ray film blue (AGFA, Belgium)을

-70℃에서 하루 노출하여 signal을 확인한다. Pinx1의 signal 확인 후 끓인 0.5% SDS buffer를 membrane에 붓고 10분 동안 probe를 제거한 후 2X SSC로 상온에서 10분 동안 rinse한 후 위와 동일한 방법으로 β -actin hybridization을 시행한다. TINA 2.10 software를 이용하여 방사능 강도(radioactive intensity)를 정량한다.

2. 백서 PinX1 stable cell line 제작

가. pEGFP C1 rPinX1 클로닝

pCMV-HA rat PinX1을 주형으로 1.25units의 Top-Pfu™ DNA polymerase (Bio-online, Seoul, Korea)와 다음의 Primer를 이용하여 (forward: 5' -GGA ATT CGT CGA CCC ATG TAC CCA TAC GAT GTT-3' , reverse: 5' - CGG ACT CAG ATC TAT GTC GAT GCT AGC GGA GCG-3') PCR 증폭한다 (94℃/30sec, 56℃/30sec and 72℃/2min, 30 cycles). PCR products와 pEGFP-C1 plasmid (BD Biosciences Clontech, San Jose, CA, USA)를 80 units의 Sal I과 Bgl II로 자른 후 phenol extraction과 에탄올 침전을 통해서 DNA를 정제한 후 ddH₂O에 농축 시켰다. 이렇게 얻은 vector와 insert를 가지고 Ligation (Takara)과 형질 전환을 통해 클로닝한 DNA는 sequencing (Macrogen, Seoul,

Korea)을 통해 확인한다.

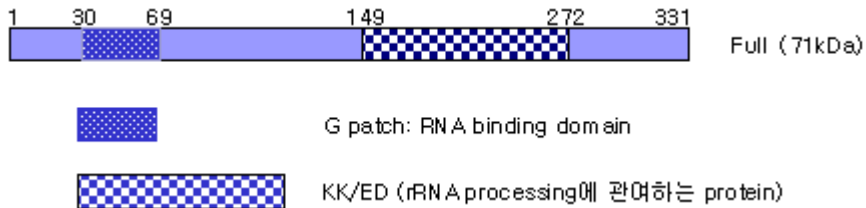


Fig 2. Structure of rPinX1 stable cell line

나. 백서 PinX1 stable cell line 제작

쥐 배아 섬유아세포(embryo fibroblast)인 NIH-3T3는 10%의 fetal bovine serum (GIBCO™, NY, USA)와 penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100ug/ml)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO™, NY, USA) 배지를 사용하여 배양하였다. 100mm tissue culture dish (NUNC™, Rochester, NY, USA)에 세포가 80-90% 자라게 되면 10ml의 PBS를 넣고 2번 세정한 후, 500ul의 trypsin (Invitrogen)을 넣고 상온에서 50초간 반응한다. Transfection에 필요한 Plasmid DNA는 Qiagen Maxi Kit (Qiagen, Gmbh, Germany)를 이용하여 분리한다. 6well에 NIH-3T3를 도포 하여 70% 세포가 자라도록 10% FBS가 함유된 DMEM culture media를 넣고 배양한다. Welfect-EX™ PLUS (Welgene, Korea)를 이용하여 클로닝된 pEGFP-C1 백서 PinX1

를 NIH-3T3 cell line에 transfection한다. Hygromycin selection을 위해 pHygro와 pEGFP C1를 0.4와 0.6의 비율로 DNA를 준비하고 DNA: enhancer Q: WelfectTM=1: 3: 5 비율로 하여 OPTI-MEM[®] (Invitrogen, MD, USA)에 희석하여 3시간 transfection한 후 media를 교체한 후 37℃의 5% CO₂ 세포 배양기에서 세포를 안정화 시킨다. 48시간 후 transfection효율을 형광 현미경 (Olympus CKK 41, Japan)으로 확인 후 (Fig2) cell을 1: 3000으로 희석하여 96well에 세포를 도포한다. 3-4일 간격으로 125ug/ul의 HygromycinB (A.G Scientific, CA, USA)가 함유된 media를 바꿔주면서 과발현 stable 세포주를 선별하였다. 형광을 띤 단일 군체를 selection하여 24well에 옮긴 후 다시 6well로 옮겨주고 10cm culture dish로 옮긴 후 1: 12로 희석하여 배양한다.

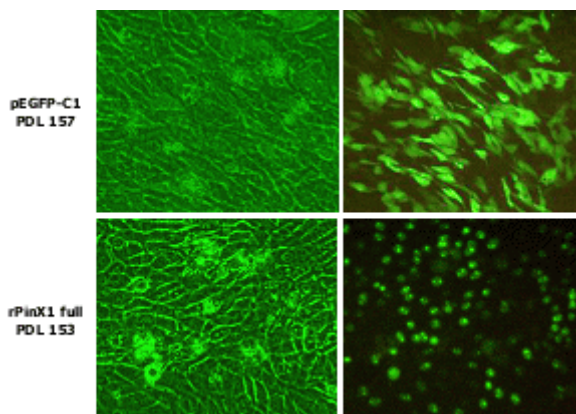


Fig 3. GFP expression of rPinX1 transfected NIH-3T3
NIH-3T3 cells transfected with pEGFP-C1 showed green fluorescence (left)

다. Western blot analysis

세포주의 rPinX1 발현양상을 확인하기 위하여 immunoblotting을 실시하였다. Transfection한 백서 PinX1의 발현을 형광확인과 동시에 western하여 본다. 세포주를 10ml PBS 완충액으로 2번 세정한 후 100ul의 Lysis buffer (50mM Tris-HCL [pH7.4], 200mM NaCl, 1mM EDTA, 1X protease inhibitor cocktail, 10% glycerol)를 10cm culture dish에 넣고 scraper (Coastar, Mexico)로 세포를 모은 후 얼음에서 30분 반응한다. 세포 파괴 후 13000rpm에서 원심분리하여 상등액만 판다. 2X SDS-loading buffer (100mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 0.2% Bromophenol Blue, 20% glycerol)를 동량 넣고 100℃에서 5분간 반응 후 12% SDS-PAGE gel에 전기영동한다. PVDF membrane에 20V로 1시간 transfer (240mM Tris-base, 1.92M glycine, 20% Methanol)한다. Transfer가 끝나면 membrane을 5% skim milk에서 담궈 1시간 동안 상온에서 blocking한다. 5분간 0.1% TBST에서 세정하여 일차항체 (mouse monoclonal anti-GFP, Santa-Cruz)를 1: 3000으로 희석하여 4℃에서 하루동안 반응시킨 후 1X TBST로 10분간 4번 세정하여 준다. HRP conjugated Anti-mouse IgG 이차항체를 1:7000으로 희석하여 상온에서 40분간 반응시킨다. 1X TBST에서 10분간 3번 세정 후 blot에 ECL⁺

(Amersham)뿌린 후 film 노출(Amersham)한다.

3. 3' overhang관찰 및 Telomere length측정

가. plug 준비 및 gel 전기영동

Stable cell 1×10^7 cells/ml 100ul을 동량의 PBS에 resuspension 후 2% low melting agarose (Bio-Rad, Hercules, USA)를 넣는다. 100ul의 혼합액을 plug molds (Bio-Rad, Hercules, USA)에 넣은 후 4℃에서 5분 동안 두어 굳힌다. Plugs가 준비되면 25ml의 LDS solution (1% LDS, 100mM EDTA pH 8.0, and 10mM Tris pH 8.0)에 넣고 37℃에서 55rpm의 항온수조에서 하루동안 처리한 후 다음날 plugs를 20% NDS (2mM Tris, 6.8mM N-laurylsarcosine and 127mM EDTA, pH 9.5)에 넣고 2시간 간격으로 2번 세척한다. Plugs는 4℃에 사용 전까지 보관하여 두었다가 TE buffer로 옮겨 한시간씩 2번 세정하여준다. 제한효소 완충액으로 한시간씩 두 번 상온에서 반응한 후 plugs를 반으로 잘라 반은 30units Hinf I으로 8시간 이상 반응시키고 나머지 반은 uncut 대조군으로 사용한다. 다음 날 20units의 Hinf I을 추가로 넣고 자른 후 1.2% pulse field electrophoresis gels (Bio-Rad, CA, USA)에 PFG marker (New England Biolabs)와 함께 0.5X TBE를 사용하여 전기 영동하여

준다. CEFF-DRRIII system (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용 6 V/cm, ramped pulse times from 1 to 15s, 14℃에서 16시간 running한다.

나. In-gel hybridization

전기영동 후 gel을 EtBr staining하여 Gel (Viber lourmat, France) 사진을 찍은 후 tif파일로 저장한다. Gel은 2X SSC에 상온에서 40분간 담군 후 gel을 건조한다. 3MM paper를 8장 깔고 윗면이 아래로 오게 놓은 다음 20분간 상온에서 건조한 후 뒤집어서 추가로 20분을 시행한다. 이때 gel이 충분히 얇아져야 하지만 건조 시간이 길어지면 작은 DNA들이 3MM paper로 옮겨갈 수 있으므로 시간을 주의 깊게 지키는 것이 필요하다. Gel이 준비되면 100ml의 hybridization solution (5X SSC, 5X Denhardt's, 10mM sodium phosphate)에 넣고 37℃에서 prehybridization한다. [γ - 32 P]ATP labeled d(TTAGGG)₄, d(CCCTAA)₄ 그리고 d(CA)₁₂ probe를 만들기 위해 oligonucleotide 30pmole과 [γ - 32 P]ATP 30pmole, 15units (TAKARA, Tokyo, Japan)의 T4 polynucleotide kinase를 넣고 total 30ul를 맞추어 37℃에서 1시간 kinasing한 후 20ul의 ddH₂O를 넣어 50ul의 반응액을 MicrospinTM G-50

column(Amersharm)에 넣고 3000rpm에서 2분간 원심분리한다. Hybridization buffer에 probe를 넣고 5분간 섞어준 후 gel을 넣고 하루동안 hybridization한다. Hybridization후 gels을 250ml의 0.25X SSC로 5분간 3번, 500ml의 0.25X SSC로 한 시간씩 3번 hybridization온도와 동일한 37℃에서 세정하여 준다. 이 후 비특이적 결합을 제거하기 위해 -70℃에서 30분간 얼린 후 0.25X SSC로 상온에서 한 시간 추가로 세정한다. X-ray film blue (AGFA, Belgium)에 -70℃에서 하루동안 노출하여 방사능 강도를 측정하여 3' overhang을 확인한다. Deprobing(probe 제거)과 동시에 gel을 변성하기 위해 500ml의 변성액 (0.6M NaCl, 0.5M NaOH)에 30분간 2번씩 담구어 상온에서 가볍게 흔들어 처리한 후 500ml의 중화액 (1.5M NaCl, 0.5M Tris, [pH 7.4])에서 30분간 2번씩 상온에서 처리한 후 앞서 언급한 방법과 동일하게 d(CCCTAA)₄ probe를 hybridization하여 telomere 길이를 측정한다.

다. Bal31 nuclease sensitivity assay

20% NDS에 보관 중인 stable cell line vector PDL 43 plug를 TE buffer로 옮겨 한시간씩 2번 세정한 후 반으로 잘라 Bal31 nuclease 완충액을 200ul 넣고 얼음에서 30분간 평형 시킨

후, 다시 새로운 완충액을 넣고 상온에서 10분, 30℃에서 10분 반응시킨다. Agarose에 제한효소가 효과적으로 침투할 수 있게 10unit의 Bal31 nuclease(NEB)를 넣은 후 얼음에서 한시간 반응한 후, 30℃에서 한시간, 두시간, 세시간 간격으로 처리한다. 이후 1ml의 TE buffer를 넣고 얼음에서 한시간 이상 두어 반응을 종료 시킨다. 준비된 plug를 Hinf I 처리 후 1.2% pulse field electrophoresis gels에 전기 영동한다. Gel을 건조 한 후, 변성 시켜 d(CCCTAA)₄ probe를 hybridization하여 telomere signal이 time course에 따라 사라지는 것을 확인한다.

라. MTL (Mean telomeric length) 측정

이미지 분석과 정량을 위해 GS-800 (Bio-Rad, Hercules, USA)로 필름을 스캔하여 Quantity one (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 densitometer를 측정, histogram을 그린다. MTL을 측정하기 위해 luminoscent image analysis system인 Las-1000 plus (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 필름을 스캔한 후 Image Gauge Version 3.12 (Fujifilm)를 이용하여 분석한다. 1 X 25 grids를 telomere lanes과 molecular size marker에 그어 MTL (Mean telomeric length)을 측정한다^{32, 33, 34, 35}. 각 레인의 optical density를 EXCEL (Microsoft)로 옮겨 분자 크기를 계산한다.

Marker를 가지고 25개의 grid에 해당되는 분자 크기를 $\log_{10}$ (분자크기)로 계산한다 (Fig 4). 각 샘플에 해당하는 MTL값을 다음의 공식을 이용하여 구한다. $MTL = \sum(MW_i \times OD_i) / \sum(OD_i)$, MW_i : i 구획에 해당하는 DNA length, OD_i : i 구획에 해당하는 optical density.

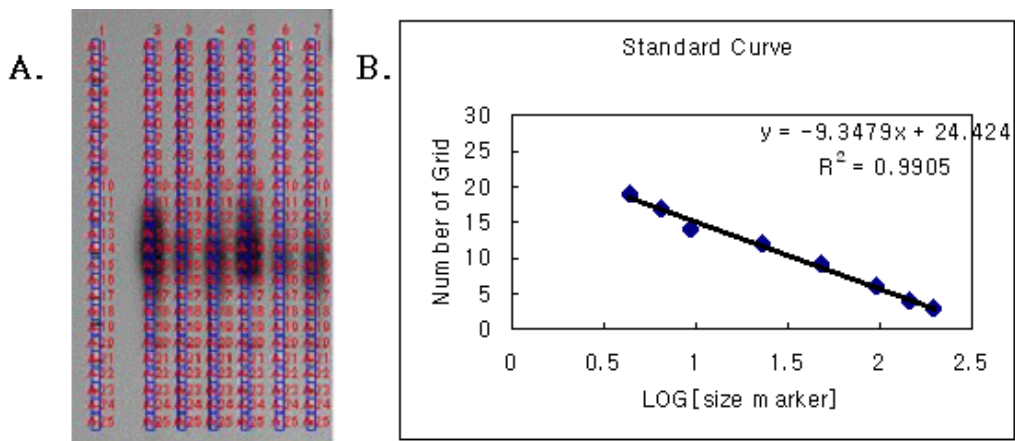


Fig 4. Measurement of mean telomeric length.

Profiles were read in a densitometer and collected into a grid. (A) Grid of boxes with molecular size standards (MW) overlaid. (B) Telomeric sizes are then calculated as described in the text.

5. Cell growth

세포를 5×10^3 cells/ml로 희석 후 6well에 1ml씩 도포한 후 37℃의 5% CO_2 세포 배양기에서 배양한다. 다음날(1day)부터 2일 간격으로 17일까지 hemacytometer (Superior, Germany)를

이용하여 현미경으로 100배 확대하여 세포 수를 측정하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum (GIBCO™, NY, USA)가 함유된 DMEM (GIBCO™, NY, USA)을 이틀마다 교체해 주었다.

6. Senescence associated-galactosidase (SA-β-gal) staining assay

멸균된 Cover glass에 5×10^3 의 세포를 도포한 후 37℃의 5% CO₂ 세포배양기에서 세포를 안정화 시킨다. 1X PBS로 2번 세정한 후 2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde로 3분간 고정한다. 1X PBS로 1분간 세정 후 1mg X-gal stain buffer (1mg X-gal, 40mM citric acid/sodium phosphate, 5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂) 1ml을 뿌린 후 37℃에서 하루 반응한다. 1X PBS로 2번 세정한 후 H & E 염색하여 mount한다. 200배 확대하여 현미경으로 blue 군체를 관찰한다³⁶.

7. Telomeric repeat amplification (TRAP) assay

TRAPeze® Detection kit (Chemicon, USA)을 이용하여 telomerase 활성도를 측정한다. Kit에서 제공되는 매뉴얼 순서를 따라 RNase inhibitor가 첨가된 1X CHAPS 200ul (lysis buffer)로 세포현탁액을 만든 후 얼음에서 30분간 반응시킨다. 이것을

4℃에서 12,000Xg 20분간 원심 분리 후 새 튜브에 상층액만을 얻는다. 단백질 농도를 측정하여 0.1ug, 0.5ug, 1.0ug의 세포 용해체(lysate)와 용해체가 들지 않은 음성 대조군, 제공되어진 양성 대조군을 이용하여 TRAP assay (telomeric repeat amplification protocol assay)를 실시 하였다. Telomerase reaction mixture를 다음과 같이 준비한다.

10X TRAP Reaction Buffer	5.0ul
50X dNTP MiX	1.0ul
TS primer (25uCi [γ - ³² P]ATP end-label)	1ul
TRAP primer mix	1.0ul
Taq DNA polymerase	0.4ul
ddH ₂ O	39.6ul
Cell Extract	2.0ul
Total Volume	50.0ul

이 Mixture를 30℃에서 30분 둔 후 PCR amplification (94℃ 30s, 55℃ for 30s, 28 cycles)을 수행한다. 결과물을 전기영동하여 13% nondenaturing polyacrylamide gels에 0.5X TBE buffer를 이용하여 running하여 80℃에서 gel이 찢어지지 않도록 주의하여 건조한다. 상온에서 X-ray film blue (AGFA, Belgium)에 3시간 노출하여 방사능 강도를 확인한다.

Ⅲ. 결 과

1. 백서 PinX1 sequence alignment

백서 PinX1은 G-patch domain³⁷과 lysine (*Saccharomyces cerevisiae*에서는 KK/ED domain으로 알려져 있음) repeat을 포함한 331개의 amino acid로 이루어져 있다 (Fig2). GenBank database로부터 얻은 *rattus norvegicus* (XP001065542), *mus musculus* (NP082504), *homo sapiens* (AAS19507), *Caenorhabditis elegans* (NP495955), *Saccharomyces cerevisiae* (AAM18461)의 sequence를 얻어 염기를 비교하였을 때 백서와 사람은 70%, 백서와 쥐는 90% 일치하였다. 아미노산 서열을 비교한 결과 (clustalW) 백서 PinX1는 쥐와 90%의 유사성을 띄었으며 사람과 70%의 유사성을 나타내었다 (Fig3). Internal region을 비교하였을 때 PinX1의 G-patch를 포함한 아미노기 말단쪽이 백서와 쥐에서 91% 일치, KK/ED domain을 포함한 region에서 98% 일치 하였고 카르복실기 말단 부분은 80% 일치하는 것으로 나타났다. 본 연구실에서 clone하여 확인한 백서 PinX1의 upstream 염기 113개를 사람 99개, 쥐의 65개와 비교해 본 결과 백서와 쥐가 89% 일치, 사람과는 24%의 homology를 띄었다.

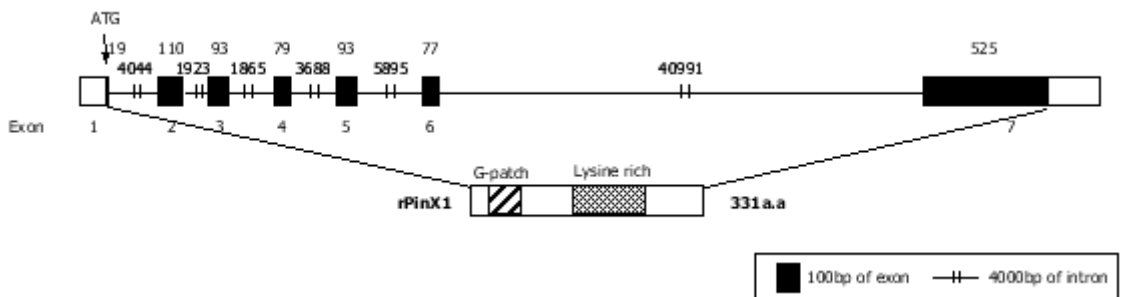


Fig 5. Structure of Rat PinX1

Rat PinX1 consisted of 331 amino acids containing the G-patch domain (RNA binding domain) at the amino terminus region and an internal region lysine rich KK/ED domain. Exons are shown as boxes and coding regions are in black. Blank boxes are transcribed but not translated region. Numbers represent the rPinX1 amino residues represented encoded by 7 exons.

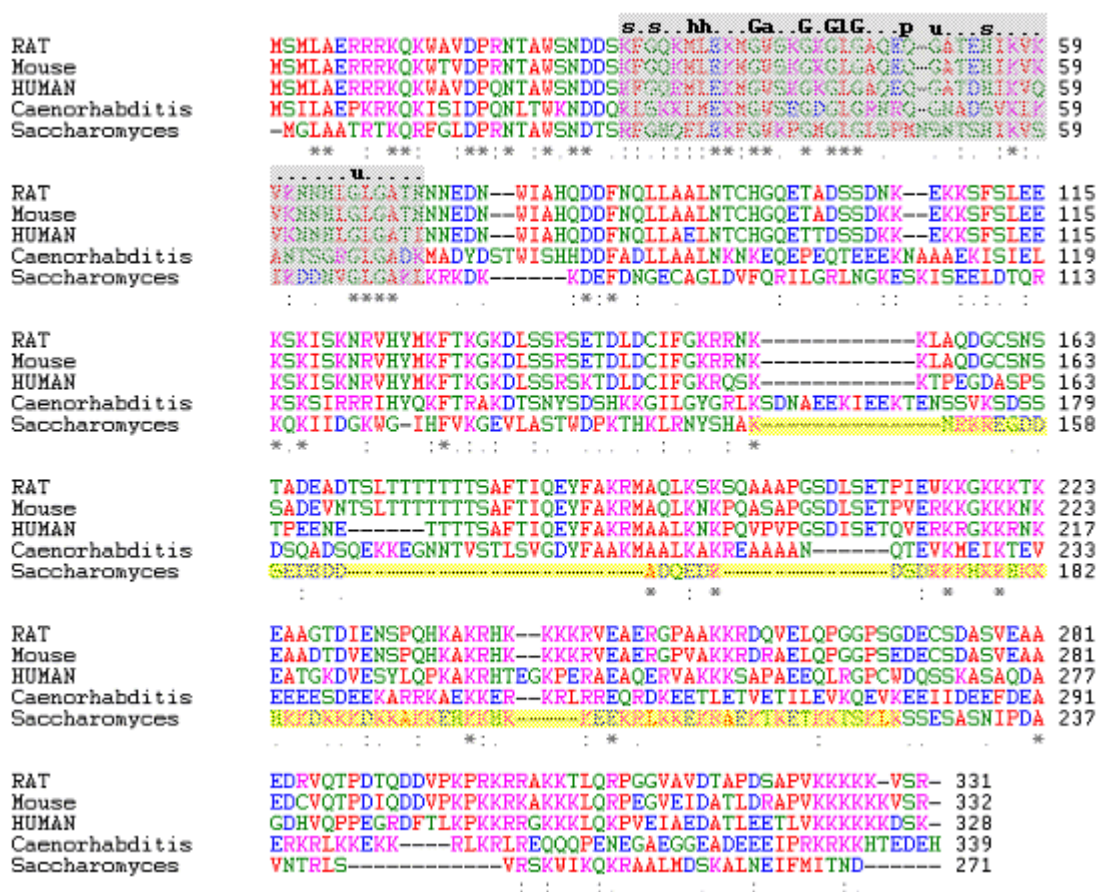


Fig 6. Multiple sequence alignment of PinX1s

The ClustalW program was used to align all the protein sequences. In the result of sequence alignment among human (*Homo sapiens*), rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*), rat encoded a protein about 70% identical to the human PinX1. In case of *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae*, 29% and 22% similarity was found, respectively. Gray boxes indicate the G-patch sequences and the KK(E/D) repeats of *S. cerevisiae* is indicated by yellow box. Residues that are either identical (*), strongly similar (:), or

weakly similar (.), respectively, are indicated.

2. 백서 tissue에서의 rPinX1 mRNA 발현

PinX1이 다양한 백서 장기들에서 발현되고 있는지 확인하기 위해 Rat MTNTM Blot을 이용하여 750bp의 ³²P-random priming PinX1△C를 표지하여 Northern blot을 실시하였다. 그 결과 심장, 뇌, spleen, 폐, 간, 근육, 신장, 고환에서 1.75kb의 rPinX1이 ubiquitous하게 발현되고 있음을 확인하였고, 4.8kb에서 약한 rPinX1 mRNA 발현이 관찰되었다 (Fig4). 특히 간과 고환에서 높게 발현 되고 있음을 알 수 있다.

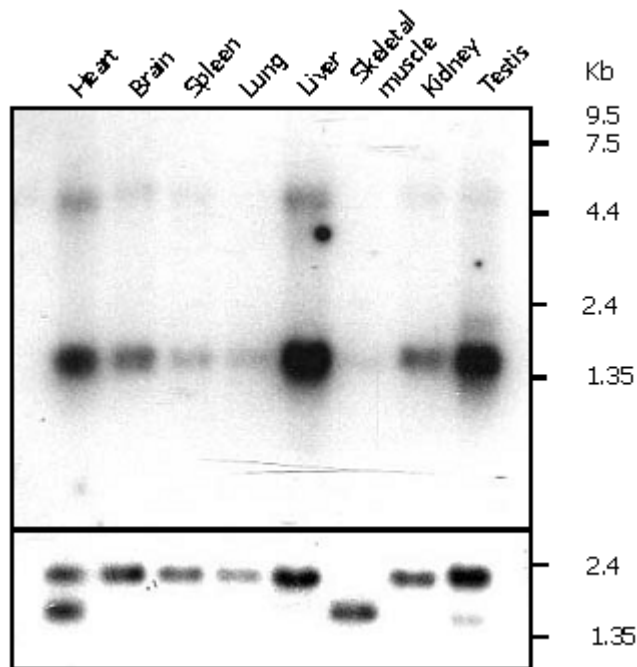


Fig 7. Expression of PinX1 in rat tissues

Northern blot membranes with Rat MTNTM Blot (BD Bioscience, CA, US) were hybridized with PinX1△C (top

panel), and re-hybridized with β -actin (low panel) which generated the two mRNA isoforms, 1.8kb and 2kb. Each lane contained 2ug of poly (A)+ RNA from the rat organs. The transcript of rat PinX1 was found at 1.75kb and 4.8kb.

3. 백서 PinX1 과발현에 의한 세포노화 유도

rPinX1의 과발현이 세포성장에 미치는 영향에 대해 알아보기 위하여 쥐인 NIH-3T3를 이용하여 백서 PinX1 과발현 stable 세포주를 제작하였다. rPinX1을 과발현시킨 stable cell line을 계속 subculture하는 중 백서 PinX1 stable cell line의 PDL이 100이 넘어가면서 대조군인 pEGFP C1 vector stable과는 다르게 cell의 성장 속도가 느려졌다 (Fig5). 뿐만 아니라 *in vitro* aging에 따라 크기가 커지고 납작해진 형태를 띄었다. Senescence associated-galactosidase (SA- β -gal) staining assay를 수행한 결과 NIH-3T3 cell이나 vector stable cell line과는 다르게 PinX1 stable의 late passage cell이 pH 6.0에서 SA- β -gal의 활성이 증가한 것을 확인, 세포 노화현상을 확인하였다 (Fig6).

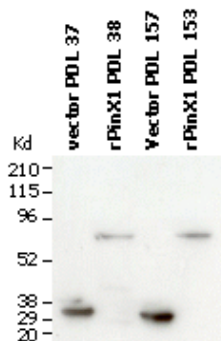


Fig 8. rPinX1 protein expression in NIH-3T3
Stable cell line checked for protein expression western analysis with anti-GFP antibodies.

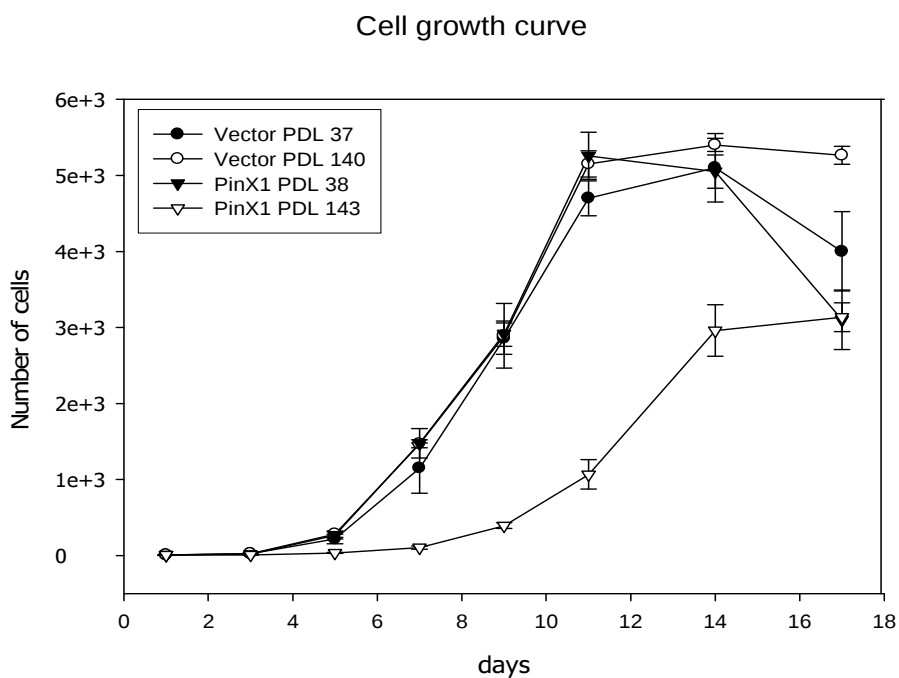


Fig 9. Growth curves of stable cell line

Cell suspension (6000cells/3ml) was incubated at 37° C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Culture medium was replaced in every two day. NIH-3T3 overexpressed PinX1 shows slower growth rate at 143 PDL.

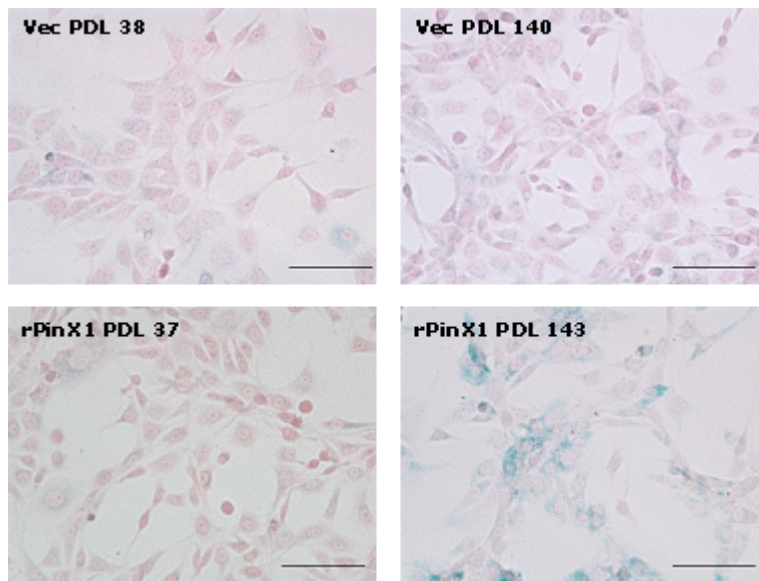


Fig 10. Expression of SA- β -gal in rPinX1 stable cell line

Stable cell line at early and late passage were subjected to *in situ* SA- β -gal staining at pH 6, and examined by bright field microscopy. rPinX1 stable cells at late passages show blue stain. Cells were observed at x 200 magnification.

4. 백서 PinX1 과발현이 3' overhang과 telomere 길이 조절에 미치는 영향

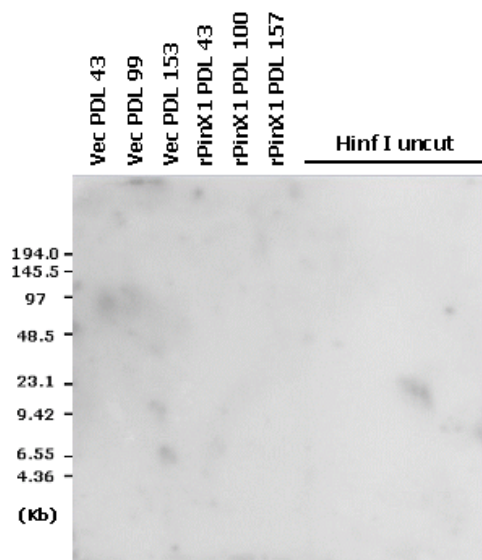
Telomerase 양성인 human fibrosarcoma cell line HT 1080에서 PinX1, tankyrase 그리고 Tin2가 telomere 길이를 조절한다는 보고가 있었고^{38, 39} 이와 유사하게 사람 PinX1의 여러 mutant construct를 HT-1080 cell line에 과발현 시켰을 때 PinX1 full construct와 C-terminal deletion (+254-328 amino acids)의 경우에서 telomere length가 짧아지는 것이 보고되었다²⁴. 또 사람의 경우 노화 시 3' overhang의 60~80%가 감소하였다⁴⁰. rPinX1 stable cell을 100PDL 이상으로 지속 배양했을 때 노화현상을 관찰하였다. 암세포 또는 불멸의 세포의 노화현상은 telomere 길이 감소와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 이를 바탕으로 백서 PinX1 stable 세포의 3' overhang과 telomere 길이를 in-gel hybridization을 통해 분석하였다.

rPinX1 Stable cell line으로부터 얻어진 DNA를 가지고 plug를 제작하여 pulsed field 전기영동 한 후 in-gel hybridization을 통해 signal을 확인하였다. 3' overhang을 확인하기 전 telomere의 단일 가닥인 3' overhang 염기와 동일한 염기인 d(TTAGGG)₄를 probe로 하여 hybridization해 본 결과 hybridization signal이 검출되지 않음을 확인하였다(Fig 11, A). 이 과정을 통해 DNA가 native한 상태인 것을 확인한 후 동일한 gel을

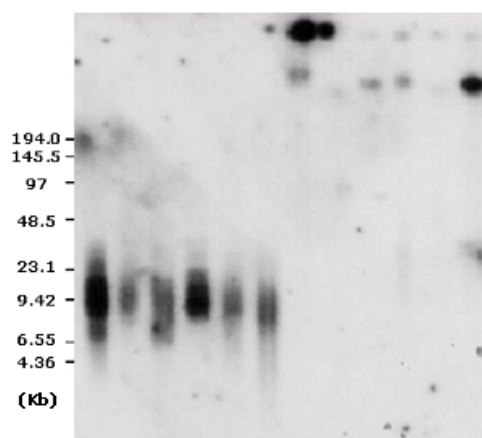
동일 조건에서 상보적인 염기인 d(CCCTAA)₄로 hybridization하였다(Fig 11, B). Telomere 길이 관찰을 위해 gel을 변성시켜 동일한 probe를 사용하여 hybridization을 수행하여 telomere 길이를 관찰하였다(Fig 11, C). PinX1 stable cell line PDL 43, 100, 157의 telomere 길이를 비교 결과 late passage에서 telomere 길이가 짧아져 밴드 signal이 smearing된 것을 관찰할 수 있었다. Vector 대조군 PDL 43, 99, 153의 telomere 측정 시 telomere의 길이가 5.5~25kb였으며 평균 TRF length는 16.2kb였다. Vector 대조군에서 telomere 밴드 윗부분의 단일 밴드가 PDL이 지남에 따라 변화 없이 일정하게 유지되었지만 PinX1 stable cell line에서 PDL이 뒤로 갈수록 단일 밴드가 사라졌으며 이는 histogram 분석을 통해서도 확인 할 수 있었다.

3' overhang을 측정 시 optical density를 gel EtBr 사진(Fig 11, D), telomere length internal control (Fig 11, C)과 d(CA)₁₂ probe (Fig 11, D)로 정량하여 비교 분석하여 보았다. 이를 통해 rPinX1 stable cell line의 PDL이 뒤로 갈수록 telomere 길이는 줄어들었지만 3' overhang은 변화 없이 일정하게 유지됨을 확인하였다. 따라서 PinX1의 과발현이 3' overhang의 유지와는 상관없이 telomere 길이 유지를 저해함을 알 수 있었다.

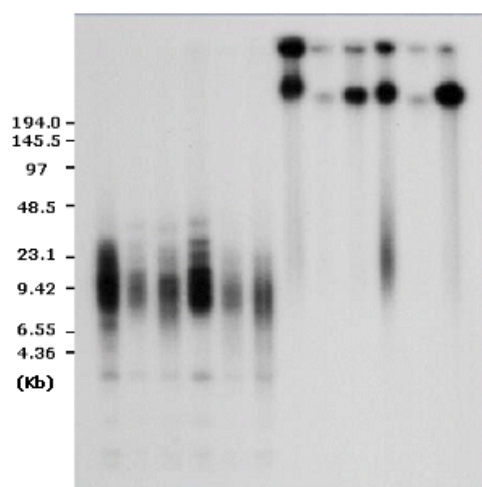
A. d(TTAGGG)₄



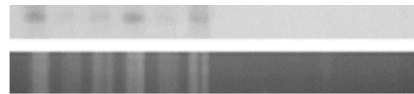
**B. (CCCTAA)₄
– 3'overhang**



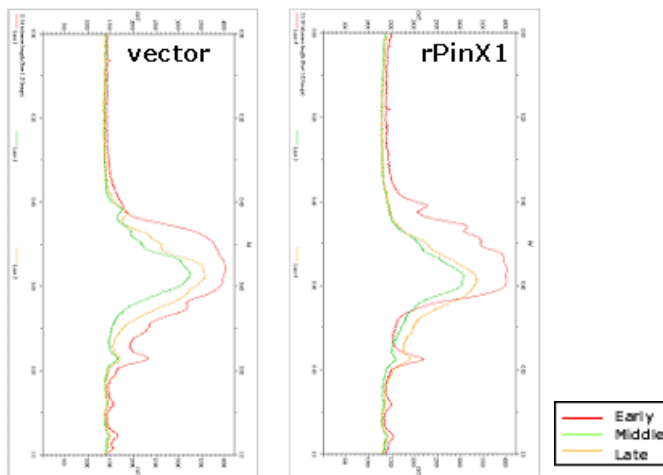
**C. d(CCCTAA)₄
– telomere length**



D. d(CA)₁₂ and EtBr



E. Telomere length histogram



F. Bal31 nuclease sensitivity assay

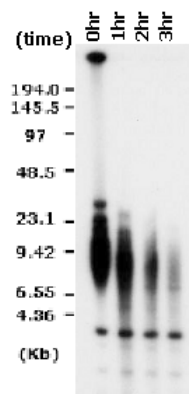


Fig 11. G-strand overhangs and telomere length of rPinX1 stable cell line

Stable cell lines were at various PDLs and end-labeled

oligonucleotide in-gel hybridization to Hinf I digests of agarose embedded genomic DNA. Prior to hybridization, the gels were stained with ethidium bromide to insure equal loading of genomic DNA. (a) Native gel probed with d(TTAGGG)₄. (b) Native gel probed with d(CCCTAA)₄. (C) Denatured DNA probed with d(CCCTAA)₄. (D) Denatured DNA probe with d(CA)₁₂ quantitation of relative intensity and EtBr staining. (E) histogram of telomere length. (F) Bal31 nuclease sensitivity of d(CCCTAA)₄.

5. 백서 PinX1 stable cell line의 telomerase 활성도

rPinX1 과발현에 의해 유도된 telomere 길이 감소가 telomerase 활성도 억제에 의한 것인지를 알아보기 위해 stable 세포의 telomerase 활성도를 telomeric repeat amplification (TRAP) assay를 통해 비교 분석하였다. PDL 130의 vector 대조군과 rPinX1 stable cell line으로부터 추출한 세포 현탁액을 3개의 농도(1.0ug, 0.3ug, 0.1ug)에서 TRAP assay를 수행하였다. 농도 희석에 따라 telomerase 활성도 감소는 확인되었으나 vector 대조군과 rPinX1 stable cell 간의 뚜렷한 telomerase 활성도의 차이를 확인할 수 없었다.

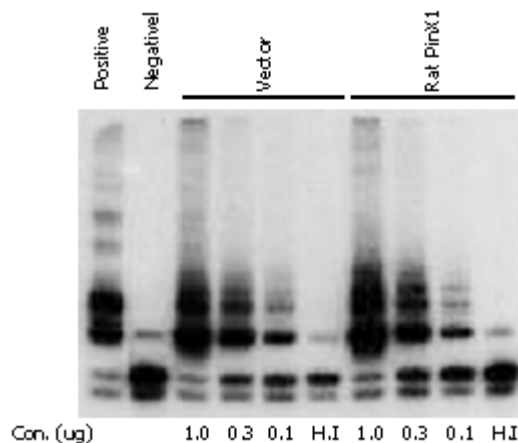


Fig10. Telomerase activity of rPinX1 stable cell line

The telomerase activity was examined by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP), using TRAPeze® telomerase detection kit (Chemicon). The TRAP assay was performed with 1.0ug, 0.3ug, 0.1ug cell lysates prepared from stable cell line

PDL 130. Band signal was analyzed by Quantity 1 (Bio–Rad). Telomerase activity in rat PinX1 stable cell line was not shown a decrease compared with that in the vector transfected cells.

IV. 고 찰

Telomere는 염색체 분해, end-to-end 융합을 방지하는 등의 기능을 갖는 염색체 말단부위로, 대부분의 종에서 단일 가닥의 3' overhang이 G-rich sequence로 보존되어있다. Telomere가 제 기능을 수행하기 위해서는 이곳에 결합되는 단백질의 역할이 중요하다. 따라서 여러 종에서 그 단백질의 동정과 특성에 대한 연구가 수행되었다. 본 연구에서는 WB-F344에서부터 얻은 rPinX1 cDNA를 가지고 특성을 연구 하였다.

Telomerase inhibitor로서 보고된 사람 PinX1는 과발현시 TID domain 부분에 hTERT, TFR1과 결합하여 telomerase 활성도를 저해한다. hPinX1 핵인에서 TRF1과 함께 위치하고 있다. 본 연구실의 선행연구에 의한 rPinX1의 다양한 기능적 region을 나누어 mutant를 제작하여 NIH-3T3에 transfection하여 면역염색을 통해 위치를 확인한 결과 핵인에 발현하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 G-patch region의 백서, 쥐와 사람간의 염기서열을 비교하였는데 높은 유사성을 띄고 있는 것을 알 수 있었다.

rPinX1의 기능연구를 위하여 pEGP-C1 rPinX1 stable cell을 제작하는 과정에서 여러 개의 균체를 얻었으나 stable cell을 배양하면서 rPinX1의 발현이 줄어들었고 하나의 cell line만이

rPinX1의 발현을 유지하였다. 이 stable cell line이 PDL100을 넘어가면서 표현형의 변화 및 telomere length의 길이 감소가 관찰되었다. PDL 100이상까지의 장기간 지속 배양 후에 telomere 길이감소가 관찰된 결과는 사람 (10-15Kb)과 다르게 rodent의 telomere length가 사람보다 상대적으로 길기 때문이라 추측된다. 길이 감소와 노화 현상의 시기가 PDL 100이상으로 비슷한 것으로 보아 노화 현상은 telomere길이 감소 현상에 의해 유도된 것으로 사료된다. Telomere 길이 감소와 더불어 3' overhang길어도 세포 노화와 밀접한 관계(사람의 노화세포에서는 60-80%의 3' overhang이 감소하였다.)가 있으나 rPinX1 과발현은 3' overhang에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인 되었다.

rPinX1에 의한 telomere 길이 감소가 telomerase 활성도 억제에 의한 것이지 알아 본 결과 stable 세포는 뚜렷한 활성도 억제를 보이지 않았다. 또 노화세포에서는 빈번하게 telomerase 활성도 억제가 관찰 되는데⁴¹ 노화 형태를 띄면서 SA- β gal assay의 positive 결과를 얻은 rPinX1 stable cell line에서 vector 대조군과 비슷한 활성도를 띤 것으로 봤을 때 rPinX1 단백질을 분리 정제하여 *in vitro* TRAP assay를 수행해야 할 것으로 사료되었다. 이에 rPinX1의 telomerase 저해 효과를 확인하기 위해 rPinX1-GST융합 단백질의 분리 정제를 시도하였으나 응집이 심해 분리하는 것에

실패하였다.

rPinX1의 과발현은 노화를 촉진하였다. 노화는 proliferation arrest를 유도하기 때문에 종양발생을 억제할 수 있고 활발한 증식세포 (proliferating cell)에서 세포 성장을 억제하거나 악성종양의 형질 전환을 줄이는 기작 중 하나로서 작용한다. 향후 노화 유발 인자로서의 rPinX1의 종양 억제자로서의 가능성이 부각될 것이다.

V. 결 론

백서 염색체 15p12 에 위치하며 331 아미노산으로 이루어진 핵인 단백질인 rPinX 의 sequence 유사성을 비교하였을 때 쥐와 91%가 일치하여 conserved 되어 있었다. 또한 백서 PinX1 mRNA 는 여러 체세포와 생식계의 조직에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

백서 PinX1을 과발현시킨 쥐 cell line NIH-3T3에서는 노화 형태를 띄면서 세포 성장이 느려짐을 알 수 있었다. 특히 rPinX1 과발현인 late passage에서 telomere 길이 감소가 점진적으로 서서히 일어남을 통해 rPinX1이 telomere 길이 유지와 세포 성장에 관여하는 단백질을 확인하였다.

V. 참 고 문 헌

1. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569–573.
2. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 85: 6622–6626.
3. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97: 503–514.
4. Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 2001; 20: 5532–5540.
5. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument–Bromage H, Hanish J, Tempst P, et al. A human telomeric protein. *Science* 1995; 270: 1663–1667.
6. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb–related proteins, TRF1

- and TRF2. *Nat. Genet.* 1997; 17: 231–235.
7. Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell. Biol.* 1999; 144: 589–601.
 8. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236–1241.
 9. Nakamura TM, Cech TR. Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 1998; 92: 587–590.
 10. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458–460.
 11. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992; 11: 1921–1929.
 12. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25–34.

13. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003; 114: 241–253.
14. Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25–34.
15. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998; 392: 569–574
16. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011–2015.
17. Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, et al. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 8191–8196.
18. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining

- telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 1997; 3: 1271-1274.
19. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 1995; 14: 4240–4248.
 20. Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature.* 2003; 424: 1013–1018.
 21. de L.T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomere. *Genes Dev.* 2005; 19: 2100–2110
 22. van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385: 740–743.
 23. Munoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet.* 2005; 37: 1063–71.
 24. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S,

- Schaefer MR, Schnapp G, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 20: 1659–1668.
25. van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92: 401–413.
26. Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve-Grez H, Jauch A, de Lange T. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr. Biol.* 2002; 12: 1635–1644.
27. Zhou XZ, Lu KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 2001; 107: 347–359.
28. Banik SS, Counter CM. Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 51745–51748.
29. Guglielmi B, Werner M. The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 35712–35719.
30. Blackburn EH, Lin J. Nucleolar protein PinX1p regulates

telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes. Dev.* 2004; 18: 387–396

31. Emi M, Fujiwara Y, Nakajima T, Tsuchiya E, Tsuda H, Hirohashi S, et al. Frequent loss of heterozygosity for loci on chromosome 8p in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer and lung cancer. *Cancer Res.* 1992; 52: 5368–5372
32. Hemann MT, Greider CW. G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 3964–9.
33. Oh BK, Lee CH, Park C, Park YN. Telomerase regulation and progressive telomere shortening of rat hepatic stem-like epithelial cells during in vitro aging. *Exp Cell Res.* 2004; 298:445–54
34. Kruk PA, Rampino NJ, Bohr VA. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:258–262
35. Chai W, Shay JW, Wright WE. Human telomeres maintain their overhang length at senescence. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 2158–2168.

36. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 9363–9367
37. Aravind, L, and Koonin, E.V (1999) G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins. *Trends Biochem. Sci.* 24, 342–344
38. Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 1999; 23: 405–412.
39. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998; 282: 1484–1487.
40. Stewart SA, Ben-Porath I, Carey VJ, O' Connor BF, Hahn WC, Weinberg RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang. *Nat. Genet.* 2003; 33: 492–496
41. Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F, Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 1864-1870.

Abstract

Characterization of nucleolar protein PinX1 function in Rodent

Yoon, So-Mi

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Young Nyun Park)

Telomere consists of the double strand and a single stranded 3' overhang. Human telomeres and various telomere binding protein complexes protect the ends of linear chromosomes. In somatic cells, telomeres shorten until they reach a critical length at which they are no longer able to be cell division and induce replicative senescence. However immortalized human cell and tumor cell maintains chromosomal stability by telomerase enzyme that is ribonucleoprotein complex. Telomerase identified as the catalytic subunit TERT

and RNA template, TR.

PinX1 is TRF1 binding nucleolus protein which locates to human chromosome 8p23. TID (telomerase inhibitory domain) of C-terminal directly inhibits cellular telomerase activity and leads to progressive telomere shortening. PinX1 overexpressed cell line has effect on cell growth which is being correlated with telomere shortening. The depletion of endogenous PinX1 increased telomerase activity. These results suggest that PinX1 is a putative tumor suppressor and might be useful for cancer therapy.

In our laboratory rat PinX1 gene was cloned from WB-F344 cell line which encodes a protein of 331 amino acids with 73% similarity to human PinX1 and 91% to mouse. rPinX1 locates to chromosome 15p12 and protein located to nucleolus which was assessed by co-localization with fibrillarin. In this study, northern analysis revealed that rPinX1 mRNA is abundant in heart, liver and testis. To examine the rPinX1 effect on cell and telomere maintenance, we established rPinX1 overexpressed NIH-3T3 cell lines. The growth of rPinX1 stable cells in NIH-3T3 slowed down after 100 population

doublings. Cells exhibited increased size and a flattened morphology and they were stained positive for the SA- β -gal assay. We found no detectable 3' G-rich overhang size and the telomerase inhibition in stable cell. However, the telomere length was progressively altered at the late passage of stable cell. The cellular senescence was induced as result of the shorten telomere. Given its ability to induce crisis, telomere shortening, PinX1 might be a new target of cancer therapy as rodent model.

Key words: rPinX1, Pin2/TRF1 binding protein, telomere, 3' overhang, telomerase activity, senescence, cell growth, NIH-3T3 cell,