부인종양 제16권 제3호 2005
Vol. 16, No. 3, September, 2005

자궁경부암 세포주에서 Paclitaxel 항암 치료와 관련된 새로운 표적 단백질 TACC3 (Transforming Acidic Coiled-Coil 3)의 동정

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 가톨릭대학교 의과대학 병리학교실[2], 세종대학교 생명공학과[3]
임은경[1]·이근호[1]·이희정[2]·김찬주[1]·박태철[1]·엄수종[3]·박종섭[1,2]

목적 : Paclitaxel은 난소암, 유방암, 위암, 대장암, 폐암 및 재발성 자궁경부 암에서도 광범위하게 사용되고 있는 항암제로서 세포 내 microtubule의 polymerization/depolymerization에 의한 역동적 움직임을 방해하여 세포의 분열과 증식을 억제함으로써 세포자멸사(apoptosis)를 유도한다고 알려져 있으나, 암 세포에서 paclitaxel 처리에 반응하여 초기 단계에서 작용하는 표적 단백질들과 작용 기전에 대한 이해는 매우 부족한 실정이다. 따라서, 자궁경부암 세포주에서 paclitaxel에 반응하여 조절되는 단백질을 동정하고, 그 기능을 규명함으로써 paclitaxel의 새로운 항암작용 기전을 제시하고자 한다.

연구 방법 : 본 연구에서는 paclitaxel의 작용 기전을 밝힐 목적으로 자궁경부암 세포주에서 20 nM paclitaxel을 24시간 동안 투여한 후 단백체 분석을 수행하여 paclitaxel의 새로운 표적 단백질로서 TACC3 (transforming acidic coiled-coil 3)를 동정하였으며, 유전자 이입을 통한 유전자 과발현과 RNA interference (RNAi) 현상을 적용한 유전자 기능 소실 방법으로 TACC3의 기능을 규명하고자 하였다.

결과 : 자궁경부암 세포주에서 Paclitaxel의 투여는 세포 성장을 억제하고, 세포 주기상의 sub-G1 및 G2/M phase의 증가를 나타냈으며, 세포 형태에서도 전형적인 apoptosis의 특징인 chromatin condensation, apoptotic body의 형성, 핵의 분절을 나타냈다. 또한, Paclitaxel 투여 시 TACC3는 시간과 농도에 의존적으로 mRNA 및 단백질의 발현이 억제되었다.

TACC3 siRNA 처리는 Paclitaxel 투여 후 나타나는 결과와 동일하게 TACC3 발현 및 자궁경부암 세포주의 성장 억제를 유도하였고, 세포 형태에서 전형적인 apoptosis의 소견을 나타냈다. FACS 분석 결과에서도 G2/M phase를 가진 세포가 4배 이상 증가하였다. 세포주기 G2/M에서 microtubule의 파괴를 유도하는 Paclitaxel의 역할처럼 TACC3의 기능 저하는 α-tubulin assembly를 유도하는 동일한 효과를 보였다. 또한, TACC3는 암세포 및 자궁경부암, 난소암과 자궁 내막암 조직에서도 발현이 증가되었다.

결론 : 이러한 결과로 미루어 TACC3는 세포 분열 시 microtubule 생성에 중요한 역할을 수행하는 암 유발 단백질이면서, Paclitaxel의 특이한 표적 단백질임을 처음으로 규명할 수 있었으며, 추후 항암제 개발의 새로운 표적이 될 수 있을 것으로 사료된다.

중심단어 : Paclitaxel, 자궁경부암, TACC3, RNAi

서 론

Paclitaxel은 주목과 나무인 Taxus brevifolia에서 분리된 천연물질로서 유방암, 난소암과 악성 폐종양을 비롯한 인체 모든 고형암에서 탁월한 치료 효능을 나타내는 항암제로서, 어떤 종류의 치료에도 반응이 없는 재발성 자궁경부암에서도 40% 이상의 치료 효과를 보이고 있다.[1] Paclitaxel은 microtubule network의 안정화를 유도하고, microtubule의 활성을 억제하는 anti-microtubular agent로 알려져 있다.[2] Paclitaxel은 microtubule에 직접 결합하여 microtubule의 분해를 억제하고, 안정화시킴으로써 세포주기 중 G2/M 시기에서 세포분열을 정지시킨다.[3-5] 또한 microtubule을 안정화시키는 작용 외에도 신혈관생성(angiogenesis)을 억제하는 작용이 있는 것으로 밝혀졌으며,[6] 세포 내 microtubule에 결합하여 방사능에 대한 감수성이 높은 G2/M 시기에 세포주기를 머물게 함

논문접수일 : 2005년 8월 29일
교신저자 : 박종섭, 137-040 서울시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 산부인과
전화 : 02) 590-2596·전송 : 02) 595-8774
E-mail : jspark@catholic.ac.kr

으로써 방사선 감작제(radiosensitizer)로도 작용하므로 방사선 치료와 병행하여 paclitaxel을 투여하면 치료 효과가 증대되는 것으로 보고되었다.[7,8] Paclitaxel의 항암 작용은 다양한 signal transduction을 통한 apoptosis 기전과 연관이 있다. Paclitaxel은 미토콘드리아를 통한 apoptosis 기전에도 관여하는데, 대장암에서는 caspase-8과 caspase-3가 활성화됨에 따라 membrane potential이 감소하는 것으로 나타났다.[10] 또한, paclitaxel이 직접적으로 cytochrome c의 방출을 유도하여 neuroblastoma 세포로부터 미토콘드리아의 분리에 작용하는 것을 확인하였다.[9]

Paclitaxel의 초기 단계 작용 기전은 microtubule의 기능을 억제하고 비정상적 방추체를 형성하여 세포 분열을 억제하며, 세포 표면 수용체에서 핵으로 proliferative signal의 전달을 방해하고, 세포의 이동과 수축 및 세포 내 물질 이동을 억제한다고 알려져 있다. 결과적으로 세포 주기를 조절하고, apoptosis를 유도하여 항암 효과를 나타내는 현상에 대하여는 많이 알려져 있으나, paclitaxel에 반응하여 microtubule의 기능을 억제시키는 초기 단계에서 항암 효과를 나타내게 하는 paclitaxel 표적 단백질에 대한 이해는 매우 부족한 상태이다.

자궁경부암 세포에서 paclitaxel의 항암 작용 기전을 알아보기 위하여 수행한 단백체 분석(Proteomic analysis)으로 발굴한 TACC3 (transforming acidic coiled-coil 3) 단백질의 변화는 염색체를 통한 세포 분열을 정지한다고 알려진 paclitaxel의 초기 단계 작용 기전을 설명할 수 있는 중요한 표적 종양 단백질로 예상된다. 현재까지 알려진 TACC 단백질 그룹은 human TACC1, TACC2, TACC3이며,[11,12] 이들 단백질은 C-terminal에 coiled-coil domain을 공통적으로 갖고 있다. 기능면에서 TACC1은 유방암에서 처음으로 발견된 유전자로서 암화과정(carcinogenesis)에 관여한다고 추정되며, TACC2의 splice variant는 종양억제유전자(tumor suppressor)로서 작용한다고 알려져 있다.[13] 암과 연관되지 않은 연구 결과로는 TACC3가 생식 기능인 정자와 난자 형성에 관여하여 발생학적으로 세포 성장 발달에 관여하고, 혈액 세포의 분화 과정에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.[14,15]

본 연구에서는 자궁경부암 세포에 paclitaxel을 투여한 후 단백체 분석을 수행하여 변화되는 단백질들을 기능별로 분류하고, apoptosis 기전을 규명하고자 하였다. 특히, paclitaxel에 특이한 표적 유전자로 발굴된 TACC3 유전자를 RNA interference 현상을 적용한 유전자 기능 소실 방법으로 TACC3의 기능을 규명하고, paclitaxel에 의하여 나타나는 초기 단계의 항암 작용 기전을 분자생물학적 실험과 자궁경부암 세포 및 조직 연구로서 규명하여 암 진단과 치료 물질로서 사용 가능성을 검토하여 항암 신약 선도물질을 개발하는데 필요한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 세포주 배양과 세포 증식 분석

세포의 배양과 세포 증식 분석을 위하여 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포(HPV-18)를 FBS (Gibco BRL, MD) 10%가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지(Gibco BRL)에 유지하였다. 96-well에 103 cells/mL이 되도록 희석한 후에 37℃의 5% CO_2 항온?항습 조건의 배양기에서 증식시켰다. Paclitaxel 투여 농도는 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM로 3일 동안 배양 후, 50 μl의 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma, St. Louis, MO)를 well에 첨가하고 4시간 반응시킨 후 흡입하여 배지를 완전히 제거하였다. 배양된 세포를 PBS buffer로 세척 후 100 μl의 DMSO를 각 well에 분주하여 formazan이 잘 용해되도록 하였고, ELISA reader를 이용하여 550 nm 파장에서 cell viability를 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도를 % survival로 환산하여 세포의 증식을 50% 억제할 수 있는 농도(IC50 value)를 기준으로 하였다.

2. 유세포 분석(Flow cytometry)에 의한 세포 주기 분석

Paclitaxel의 IC50 값인 20 nM 농도로 HeLa 세포에 처리한 후 세포를 수거하여 100% ethanol로 고정하고 분석 전까지 ?20℃에 보관하였다. 분석을 위해 보관했던 세포를 PBS buffer로 2회 세척한 후 최종 세포수가 104 cells/mL되도록 조정한 세포 부유액을 취하여 12.5 μg RNAse가 첨가된 5 mM EDTA (pH 8.0) 500 μl와 혼합하여 상온에서 30분 방치하였다. 세포 DNA의 염색을 위해 100 μl/mL의 Propidium Iodide (PI) (Sigma) 500 μl를 첨가하

여 염색하였다. 세포 주기는 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하여 세포 주기를 분석하였다.

3. 세포의 형태학적 관찰

Paclitaxel에 의한 HeLa 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 20 nM paclitaxel을 처리하고 48시간 후 세포를 수거하여 70% ethanol로 고정한 다음, DAPI (4', 6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (Sigma) 염색하여 자외선 하에서 형광 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다.

4. 단백체 분석(Proteome analysis)

HeLa 세포를 100 mm dish에서 20 nM paclitaxel로 처리한 후 48시간 후에 수거하여 lysis solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS [3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulphonate]을 가하여 세포를 용해시킨다. 용해된 세포를 sonication 시킨 후, 12,000 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 취하고, 적당한 양으로 분주하여 -80℃ deep freezer에 보관하였다.

1) Rehydration of IPG gel strip

단백질 70 μg과 rehydration solution (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 45 mM DTT, 0.5% IPG buffer, 400 mM Tris)을 섞은 후, IPG holder (Amersham Bioscience, Arlington Heights, IL)에 시료를 loading하고 strip gel (Amersham Bioscience) 부분이 아래로 향하게 하고, mineral oil로 덮어 주었다. Rehydration은 20℃에서 16시간 수행하였다.

2) Isoelectric focusing (IEF)

1차 전기영동은 IPG strip을 사용하고, Ettan IPGphor (Amersham Bioscience)를 이용하여 수행하였다. pH 3-11 (linear) 13 cm gel strip을 사용하여 100 V, 50 VH; 300 V, 150 VH; 600 V, 300 VH; 1,000 V, 500 VH; 3,000 V, 1,500 VH; 7,000 V, 49, 000 VH로 20℃에서 실시하였다.

3) Equilibration

Isoelectric focusing이 끝난 후, strip을 test tube로 옮겨 10 mL equilibration buffer I (50 mM Tris-Cl, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 1% DTT)에서 10분 반응시킨 후 buffer를 제거하고, equilibration buffer Ⅱ [50 mM Tris-Cl, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% BPB, 2.5% IAA (iodoacetamide)]로 다시 10분 반응시켰다.

4) SDS-PAGE

Equilibration이 끝난 IPG gel strip을 SDS slab gel에 끼워 넣고 0.5% agarose 용액을 overlay하여 10-15 mA/gel로 4℃에서 전기영동 하였다.

5) Silver staining

전기영동이 끝난 polyacrylamide gel을 fixing solution (40% ethanol, 10% acetic acid)에서 1시간, sensitizing solution (0.02% sodium thiosulfate)에서 1분 반응시킨 후 3차 증류수로 5분간 3번 세척한다. Silver reaction solution (0.2% silver nitrate, 0.04% formaldehyde)에 20분 반응시킨 후, 3차 증류수로 1분간 2번 세척하고, developing solution (2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)에 반응시켜 단백질 spot이 나타나는 것을 보면서 stopping solution (50% ethanol, 12% acetic acid)으로 발색을 정지시킨다.

6) Image analysis

염색이 끝난 gel들을 GS-800 (BIO-RAD, Philadelphia, PA)으로 scan하여 PDQuest (BIO-RAD)로 분석하였으며, 위의 실험은 재현성을 위해 최소한 세 번 이상 반복하였다.

7) Protein identification

Silver staining한 gel을 3차 증류수로 10분씩 2번 세척한 후 분석하고자 하는 spot를 잘라내어 3차 증류수와 acetonitrile (ACN) (Sigma) 1:1 (v/v)로 15분 2회 세척하였다. 용액을 제거한 후 100% acetonitrile 용액에 5분 반응시키고, 0.1 M NH_4CO_3 용액에 5분 넣어 rehydration시켰다. 동량 100% acetonitrile을 첨가하여 15분 반응시키고 용액을 제거한 후 vacuum centrifuge를 이용하여 gel을 건조시켰다. 건조된 gel에 10 mM DTT/0.1 M NH_4CO_3을 넣고 56℃에서 45분 반응시킨 후 실온에서 55 mM iodoacetamide (IAA) (Sigma)/0.1 M NH_4CO_3을 넣

고 어두운 곳에서 30분 반응시킨 다음 용액을 제거하였다. Gel을 0.1 M NH_4CO_3 용액에서 5분 세척한 후 동량의 100% acetonitrile을 넣고 15분 반응시키는 과정을 2회 반복하였다. Gel을 세척한 후 vacuum centrifuge로 건조시키고 trypsin digestion buffer (50 mM NH_4CO_3, 5 mM $CaCl_2$, 12.5 ng/μl trypsin)를 처리하여 45분 얼음에 반응시킨 후, 37℃에서 16시간 반응시켜 단백질을 가수분해시켰다. 그 다음 25 mM NH_4CO_3가 포함된 50% acetonitrile을 넣고 30분 두었다가 5% formic acid와 acetonitrile 1:1 (v/v)로 넣고 30분 반응 후 peptide를 추출하였고 peptide 추출 용액은 vacuum centrifuge로 완전히 건조하였다. Trypsin 분해에 의하여 얻어진 각 peptide는 증류수, acetonitrile, trifluoroacetic acid (93:5:2 volume)의 용액에 용해 후 solution phase nitrocellulose 방법에 의하여 처리하였다. α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (40 mg/mL)와 nitrocellulose solution (20 mg/mL) 및 2-propanol을 2:1:1로 섞은 후 internal calibration을 위하여 standard solution을 sample과 함께 분석용 plate에 올려 건조한다. 5% formic acid와 증류수로 세척하고 MALDI-TOF mass spectrometry (Voyager-DE STR, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)로 질량 값을 분석하였다. 이렇게 얻어진 질량 값은 보정한 후 MS-FIT와 ProFound의 탐색 도구를 이용하여 SWISS-PROT이나 NCBI database를 이용하여 peptide mass fingerprinting법에 의하여 단백질을 동정하였다.

5. TACC3의 발현 분석

1) Western blotting

Paclitaxel로 처리된 HeLa 세포를 수거하여 PBS buffer로 세척한 후 RIPA buffer (0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 2% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량 후 30 μg의 단백질을 8% SDS-PAGE를 시행한 후 ECL nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience)에 90 V의 전압으로 1시간 동안 옮겼다. Transfer된 membrane을 blocking solution (5% skimmed milk in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 125 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 1시간 blocking 한 뒤, TBS-Tween 20 용액으로 세척하고 1차 항체는 goat anti-rabbit TACC3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 1시간 반응시킨 다음 TBS-Tween 20으로 10 분간 3회 세척하였다. 2차 항체는 Goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 1시간 반응시키고 TBS-Tween 20 용액으로 15분간 3회 세척한 후, ECL Hyperfilm (Amersham Bioscience)으로 노출하여 확인하였다. β-actin은 대조군으로 사용하였다.

TACC3의 발현을 확인하기 위해 자궁경부암 세포주인 HeLa (HPV-18), CaSki (HPV-16), C33A (HPV-negative), SiHa (HPV-16) 및 각종 암 세포 HCT 116 (colorectal cancer), MCF-7 (breast cancer), U2OS (osteosarcoma), OVCAR3 (ovarian cancer)와 정상 세포인 CRL-2510 (skin fibroblast)에서 TACC3 발현을 western blotting으로 확인하였다.

2) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

Paclitaxel로 처리한 HeLa 세포와 환자의 정상 및 자궁경부암 조직에서 TACC3의 발현을 분석하기 위하여 RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 Titan™ One Tube RT-PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 이용하여 TACC3 specific primer로 역전사 중합 반응을 시행하여 TACC3 유전자의 발현 양상을 확인하였다. GAPDH는 사용한 총 RNA양에 대한 정상 대조군으로 사용하였다. 실험 조건은 역전사 반응을 50℃에서 30분간 시행하였고, 얻어진 cDNA는 94℃에서 30초 변성(denaturation), 56℃에서 30초 결합(annealing), 68℃에서 1분간 신장(extension)을 35회 반복시킨 후, 68℃에서 7분간 최종 신장(final extension) 하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 50 V로 전기영동하여 ethidium bromide (EtBr) 염색 후 UV 하에서 관찰하였다.

3) 면역조직화학 염색(Immunohistochemical staining)

자궁경부암과 난소암 조직에서 TACC3 발현을 확인하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. 파라핀 조직을 5 μm 절편으로 aminoprophyltriethoxysilane; APEAS (Sigma)이 도포된 슬라이드에 부착시키고 60℃에서 1시간 동안 파라핀을 녹인 후 100% xylene에서 10분간 2회 deparaffinization, 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50% ethanol로 10분간 함수 과정을 거친 후 증류수로 세척하였다. 항원성 회복을 위하여 1% zinc sulfate (Sigma)가

포함된 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에 슬라이드를 넣고 microwave oven을 이용하여 5분간 3회 가열하였다. 비특이적 항체 반응을 억제하기 위하여 0.5% normal horse serum (Vector laboratories, Burlingame, CA)을 함유한 TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.2)에 30분간 상온에서 반응시켰다. 0.5% hydrogen peroxidase로 10분 처리하여 endogenous peroxidase를 차단한 후 3회 세척하였다. 이후 과정은 LSAB (labeled streptavidine biotin) kit (DAKO, Carpinteria, CA)를 이용하여 시행하였다. 15분간 normal goat serum을 처리 후 TACC3 (Santa Cruz Biotechnology)에 대한 일차 항체를 1:100으로 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS로 10분 3회 세척한 후 2차 항체인 horse biotinylated anti-rabbit IgG (DAKO)를 1:50으로 희석하여 상온에서 30분 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후 peroxidase-conjugated streptavidin (1:500 in TBS, DAKO)과 상온에서 30분 반응시킨 후 TBS로 세척한 후 AEC (amino-ethyl-carbazole)로 10-20분 발색시켰다. TBS로 3회 세척한 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색하고 crystal mount를 사용하여 봉입한 후 검경하였다.

6. TACC3 RNAi (RNA interference)

1) TACC3 siRNA 제조

TACC3 siRNA oligonucleotide와 대조실험을 위한 TACC3 scrambled siRNA oligonucleotide를 다음과 같이 제작하였다 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

TACC3 siRNA

Sense: 5'-GCCCAGGAAGUUCUGAGAACCAAAU-3'

Anti-sense: 5'-AUUUGGUUCUCAGAACUUCCUGGGC-3'

TACC3 Scrambled siRNA:

Sense: 5'-GCCAGGUGAUCUGAGCAAACCAAAU-3'

Anti-sense: 5'-AUUUGGUUUGCUCAGAUCACCUGC-3'

2) TACC3 siRNA transfection, 유전자 및 단백질 발현 분석

HeLa 세포를 transfection 당일에 30-50% confluence가 되도록 6 well plate에 넣고, 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에서 24시간 배양시킨다. 이튿날 OPTI-MEM (Gibcol BRL) 배양액으로 교체한 후 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 TACC3 siRNA와 control siRNA를 HeLa 세포에 transfection시켰다. 4시간 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액으로 교체한 후, 시간 별(0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h)로 세포를 수거하였다. TACC3 siRNA와 control siRNA를 transfection한 HeLa 세포에서 RNA와 단백질을 추출하여 RT-PCR, western blot을 수행하였다.

3) TACC3 siRNA에 의한 세포 증식 및 세포주기 분석

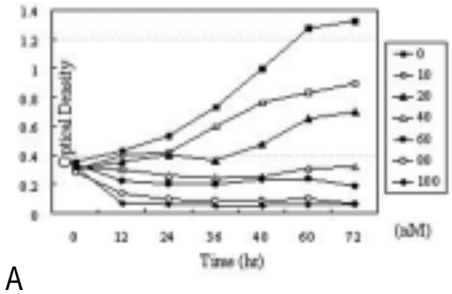
TACC3 siRNA에 의한 세포 증식, 형태 변화 및 세포주기 분석을 위하여 HeLa 세포에 100 pM 농도로 TACC3 siRNA를 처리하고 시간 별(0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h)로 MTT assay를 수행하여 세포의 증식 양상을 관찰하였으며, 세포의 주기를 분석하기 위해 FACS 분석을 수행하였다. 대조 실험으로 control siRNA를 사용하였다.

4) 면역형광분석(Immunofluorescence analysis)

Paclitaxel과 TACC3 siRNA에 의한 TACC3, α- 및 γ- tubulin의 변화를 관찰하고자 면역형광분석을 시행하였다. Chamber slide에 104개의 HeLa 세포를 하루 동안 배양하여 부착시키고, 20 nM의 paclitaxel과 100 pM TACC3 siRNA를 각각 처리한 세포와 paclitaxel을 처리하지 않은 세포와 control siRNA를 처리한 세포를 48시간 배양한 후에 4% paraformaldehyde로 slide에 고정하였다. 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS buffer로 permeabilization시킨 후, 3% BSA로 blocking하였다. 1차 항체로 goat anti-rabbit TACC3 (Santa Cruz Biotechnology), DM1A anti--tubulin (, GTU-88 anti-γ-tubulin (Sigma)을 1:50으로 희석하여 4℃에서 12시간 반응시켰고, 2차 항체로는 FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma)를 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, 봉입하여 Confocal Multiphoton Microscopy System (Bio-RAD)으로 분석하였다.

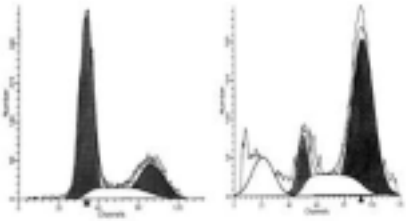
결 과

1. Paclitaxel에 의한 세포 성장 억제와 apoptosis 유도

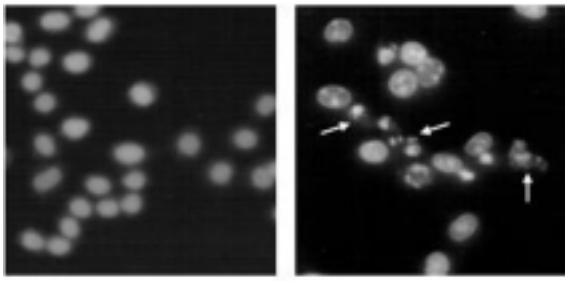


A

Cell cycle	Untreated (%)	Paclitaxel (%)
G0-G1	61.4	13.0
G2-M	23.0	66.8
Total S	15.5	20.6
Apoptosis	0.13	3.73



B



C

Fig. 1. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis in HeLa cells by paclitaxel treatment. (A) MTT assays. Following overnight seeding, cells were treated with various concentration of paclitaxel (0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 nM) for various lengths of time. Dose- and time-dependent anti-proliferative effect of paclitaxel on growth of cervical carcinoma cells was measured by MTT assay. (B) FACS analysis. Cells were treated with 20 nM of paclitaxel and then cells were fixed in ethanol and stained with propidium iodide, as described in Materials and Methods. Cell-cycle analysis was performed by flow cytometry utilizing a commercially available software program. (C) DAPI stain. Cells were treated with 20 nM paclitaxel and stained with DAPI. Apoptotic cells rounded up, and the inset shows DAPI-stained condensed chromatin in clear focus (arrow). Stained nuclei were visualized under a fluorescence microscope ×200).

HeLa 세포에 paclitaxel을 농도 별로 투여하여 3일 배양한 후 세포 성장을 관찰하여 paclitaxel의 농도와 시간에 의존적으로 세포 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 세포에 대한 약제의 독성 결과는 IC50 값으로 표시하는데, HeLa 세포에 대한 paclitaxel의 IC50 값은 20 nM의 농도에서 나타났다.

HeLa 세포에서 paclitaxel의 처리가 세포의 성장과 분화에 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 flow cytometry로 세포 주기를 분석한 결과는 다음과 같다. 20 nM paclitaxel을 처리한 세포에서 G0/G1 phase는 61.4%에서 13%로 감소하였으며, G2/M phase는 23.0%에서 66.8%로 3배 증가하였다. Total S phase는 15.5%에서 20.6%로, apoptosis를 나타내는 Sub-G1 phase는 0.13%에서 3.73%로 증가하였다(Fig. 1B).

Paclitaxel에 의한 세포의 형태 변화를 관찰하기 위해 DAPI 염색을 시행한 결과, paclitaxel 처리한 세포의 핵에서는 chromatin condensation, apoptotic body 형성, fragmentation 등 apoptosis의 전형적인 특징을 관찰할 수 있었으나, paclitaxel을 처리하지 않은 세포에서는 특이한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1C).

2. 자궁경부암 세포주에서 paclitaxel에 의한 프로테옴 변화 분석과 TACC3 동정

Paclitaxel의 작용 기전을 알아보기 위해 자궁경부암 세포에 paclitaxel 처리 후 프로테옴 분석을 실시하였다. 2-DE (two-dimensional gel electrophoresis)를 시행한 후, HeLa 세포에서 단백질의 발현 양상을 약제를 투여하지 않은 세포에서의 전체 단백 현황과 비교하여 보았다. 약제에 의한 apoptosis의 실제적인 상위 부분의 기전을 알아보기 위하여 이에 관계되는 중요한 단백질들을 동정하고 기능을 규명하고자 실시하였다. 그 결과 각 gel에서 700개 이상의 spot이 발견되었으며, 이 중 47개의 단백질이 paclitaxel 투여 후에 대조군에 비하여 유의한 변화를(≥2-fold) 보였다. 단백질 spot 크기로 비교한 결과, 이 중 23개의 단백은 증가된 상태였고, 24개는 감소된 상태였다($P<0.05$). 이들 단백질은 MALDI-TOF 결과를 database와 비교하여 동정하였으며(Table 1, 2), 그 결과 paclitaxel의 새로운 표적 단백질이라 추정되는 TACC3를 동정하였다(Fig. 2A). Paclitaxel을 투여한 HeLa 세포

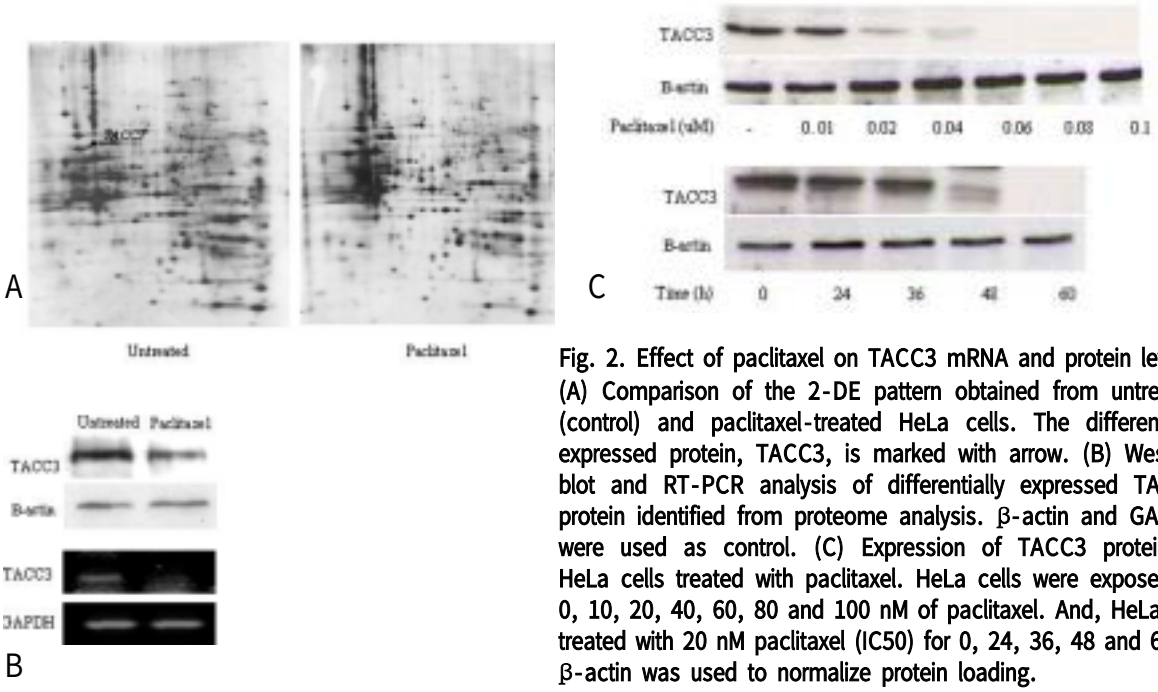


Fig. 2. Effect of paclitaxel on TACC3 mRNA and protein levels. (A) Comparison of the 2-DE pattern obtained from untreated (control) and paclitaxel-treated HeLa cells. The differentially expressed protein, TACC3, is marked with arrow. (B) Western blot and RT-PCR analysis of differentially expressed TACC3 protein identified from proteome analysis. β-actin and GAPDH were used as control. (C) Expression of TACC3 protein in HeLa cells treated with paclitaxel. HeLa cells were exposed to 0, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 nM of paclitaxel. And, HeLa cell treated with 20 nM paclitaxel (IC50) for 0, 24, 36, 48 and 60 h. β-actin was used to normalize protein loading.

Table 1. MS identification of the up-regulated protein spot in paclitaxel-treated HeLa cells

Accession NO.	Protein identified	Mr (kDa)	pI
Q96BJ8	Engulfment and cell motility protein 3	58.941	5.7
P50591	Tumor necrosis factor ligand Super-family member (TRAIL protein)	32.509	0.
NP203520	Caspase-8	20.836	11.0
P51878	Caspase-5 precursor	47.815	9.2
Q13094	Lymphocyte cytosolic protein 2	50.189	5.9
P35236	Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	30.530	3.8
Q9H2D6	TRIO and F-actin binding protein	68.042	5.8
Q13368	MAGUK p55 subfamily	66.169	6.3
P51946	Cyclin H (MO15-associated protein)	37.644	6.7
Q9NYZ3	G2 and S phase expressed protein 1	76.615	9.5
O43684	Mitotic check point protein BUB3	37.155	6.4
Q14201	BTG3 protein	29.117	9.1
Q92565	Guanine nucleotide exchange factor for Rap 1	67.734	5.9
O76031	ATP-dependent-CLP protease ATP-binding subunit cipx-like, motichondrial precursor	69.224	5
P49189	Aldehyde dehydrogenase, E3 isozyme	53.533	6.0
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1	62.64	6.4
P48741	Heat shock 70kDa protein 7	26.907	7.0
Q12988	Heat shock 17kDa protein (HSP70)	16.966	5.7
Q9Y584	Mitochondrial import inner membrane translocalase subunit TIM22	20.031	5.
O15527	N-glycosyl DNA lyase	39.783	8.9
O15264	Mitogen-activated protein kinase 13	42.090	8.5
O14649	Potassium channel subfamily k member 3	43.518	9.1
Q13507	Short transient receptor potential channel 3	97.356	6.4

Table 2. MS identification of the down-regulated protein spot in paclitaxel-treated HeLa cells

Accession NO.	Protein identified	Mr (kDa)	pI
P10415	Apoptosis regulator Bcl-2	23.4	7.9
O00273	DNA fragmentation factor alpha subunit	36.522	4.7
P35354	Prostagladin G/H synthase 2 precursor	68.997	7.0
P14778	Inerleukin-1 receptor, type 1 precursor	65.403	8.0
Q99547	M-phase phosphoprotein 6	18.996	5.2
P05165	Propionyl-coA carboxylase α chain	77.354	6.6
Q9Y2J8	Protein-arginine deiminase type II	75.565	5.4
P30520	Adenylosuccinate synthetase	50.098	6.1
P28330	Acyl-coA dehydrogenase, long-chain specific, mitochndrial precursor	47.670	37
O00746	Nucleoside diphosphate kinase1	20.659	10.3
P40937	Activator 1 36 kDa subunit	38.497	6.7
P04765	Eukaryotic initiation factor 4	46.154	5.3
Q9Y230	Ruv B-like 2	51.157	5.5
P16422	Tumor-associated calcium signal transducer 1 precursor	43.921	74
P01106	Myc proto-oncogene protein (c-myc)	48.804	5.3
Q14247	Src substrate cortatin (oncogene EMS1)	42.995	9.5
Q9Y6A5	Transforming acidic coiled-coil containing protein 3	0.360	50
P78314	SH 3 domain-binding protein 2	62.244	7.7
Q9NQYO	Bridging integrator 3	29.665	6.9
P53999	Activated RNA pol II transcriptional coactivator p15	14.395	96
O95218	Zinc finger protein 265	38.223	9.0
Q9UKN5	PR-domain zinc finger protein 4	87.921	5.9
O75330	Hyaluronan mediated motility receptor	84.032	5.6
Q9Y676	28S ribosomal protein S18b, mitochondrial precursor	29.396	95

에서 TACC3 발현의 양적 변화를 관찰하고자 western blot과 RT-PCR을 수행하여 단백질 및 mRNA 수준에서 TACC3 발현의 감소를 확인하였다(Fig. 2B). 또한, paclitaxel의 처리 농도와 TACC3 발현과의 관계를 알아보기 위해 paclitaxel의 농도를 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nM로 처리하여 western blot을 수행하였고, 그 결과 paclitaxel 농도에 비례하여 TACC3 단백질 수준이 점차적으로 감소되는 것을 관찰하였다. 뿐만 아니라, HeLa 세포에 paclitaxel의 IC50 농도인 20 nM을 처리하였을 때 TACC3 단백질 수준이 시간에 비례하여 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 2C).

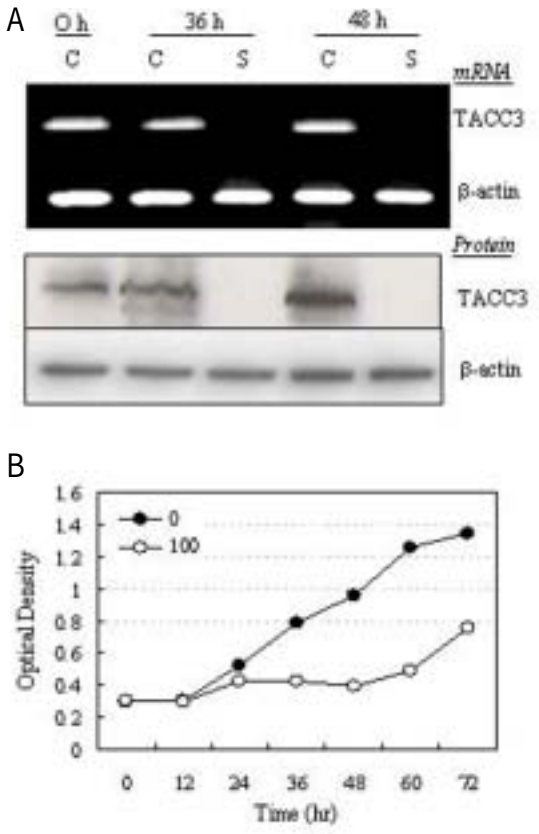
3. TACC3 RNA interference의 효과

1) TACC3 siRNA에 의한 TACC3 발현 억제

Synthesized TACC3 siRNA를 이용하여 HeLa 세포에 transfection한 결과 transfection 후 36시간 이상이 지난 세포에서 control siRNA를 처리한 대조군에 비해 TACC3의 mRNA와 단백질 발현이 현저하게 감소하였다(Fig. 3A).

2) TACC3 siRNA에 의한 세포 성장 억제 및 apoptosis 유도

TACC3 siRNA가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 HeLa 세포에 100 pM TACC3 siRNA를 처리하여 3 일 간 배양한 결과, 대조군과 비교하여 세포의 성장이 현저하게 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). TACC3 siRNA에 의한 TACC3 발현 억제가 세포의 성장과 분화의 억제에 영향을 나타내는지 알아보기 위하여 flow cytometry를 이용하여 세포 주기를 분석하였다. TACC3 siRNA를 처리한 후 각각 36, 48시간 동안 배양한 세포의 경우 대조군과 비교하였을 때 시간의 경과에 비례하여 G2/M phase가 9.8%에서 40.1%로 4배 이상 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 paclitaxel을 처리한 세포에서 관찰한 세포 주기 변화와 유사한 결과를 나타냈다(Fig. 3C). 또한, TACC3의 발현 억제는 apoptosis의



C

Cell cycle	Untreated (%)	TACC3 siRNA (%)		
		0	36	48 hr
G0-G1	70.2	68.2	68.9	59.9
G2-M	7.3	9.8	14.4	40.1
Total S	22.7	23.8	16.7	0.0
Apoptosis	2.8	2.2	11.9	17.4

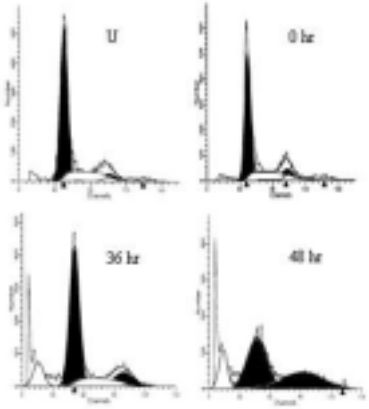


Fig. 3. Effect of TACC3 small interfering RNA (siRNA) in HeLa cells.
(A) TACC3 mRNA and protein were subjected to RT-PCR and western blot analysis 0, 36, and 48 h after the beginning of transfection of HeLa cells with 100 pM of TACC3 siRNA. Control siRNA (a scrambled version of TACC3 siRNA) was used to comparison with TACC3 siRNA. (B) MTT assays. Following overnight seeding, cells were treated with 100 pM of TACC3 siRNA for various lengths of time. Time-dependent anti-proliferative effect of TACC3 siRNA on growth of cervical carcinoma cells was measured by MTT assay. (C) FACS analysis. Cells were treated with 100 pM of TACC3 siRNA and then cells were fixed in ethanol and stained with propidium iodide, as described in Materials and Methods. Cell-cycle analysis was performed by flow cytometry utilizing a commercially available software program. (D) DAPI staining. HeLa cells were treated with 100 pM of TACC3 siRNA and stained with DAPI. Apoptotic cells rounded up, and the inset shows DAPI-stained condensed chromatin in clear focus (arrow). Stained nuclei were visualized under a fluorescence microscope ×200). (E) Immunofluorescence analysis. Cells were transfected with control siRNA and TACC3 siRNA and analyzed for α-tubulin and γ-tubulin by immunostaining. To compare with microtubules network by TACC3 siRNA, paclitaxel-treated HeLa cells were analyzed for α-tubulin and γ-tubulin. Microtubules were stabilized by treatment of TACC3 siRNA or paclitaxel.

전형적인 특징인 chromatin condensation, apoptotic body 형성, fragmentation을 나타냈다(Fig. 3D).

3) TACC3 siRNA에 의한 microtubule polymerization 유도

TACC3 siRNA 처리가 microtubule network에 미치는 영향을 알아보기 위해 TACC3 siRNA를 transfection한 세포에서 α-tubulin과 γ-tubulin에 대한 항체를 이용하여 immunofluorescence analysis를 수행하였다. TACC3 siRNA가 transfection된 세포에서 α-tubulin, γ-tubulin polymerization의 증가를 관찰할 수 있었으며, 세포 주기 G2/M에서 microtubule의 파괴를 유도하는 paclitaxel 처리에 의한 결과와 유사하게 TACC3의 발현 억제는 α-tubulin, γ-tubulin polymerization을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3E).

4. 암세포주와 자궁경부암 조직에서 TACC3 과발현

암세포에서 TACC3의 발현 양상을 알아보기 위해 자궁경부암 세포주인 HeLa (HPV-18), CaSki (HPV-16), C33A (HPV negative), SiHa (HPV-16)와 그 외 HCT 116 (colorectal cancer), MCF-7 (breast cancer), U2OS (osteosarcoma), OVCAR3 (ovarian cancer)와 CRL-2510 (normal skin fibroblast)을 대상으로 TACC3의 발현을 western blot로 관찰한 결과, 정상 피부 섬유세포인 CRL-2510을 제외한 모든 세포주에서 TACC3의 과발현을 확인하였다(Fig. 4A).

각 8명의 자궁경부암 환자의 조직과 정상 조직에서 시행한 TACC3의 RT-PCR 결과 TACC3는 정상조직에 비해 자궁경부암 조직에서 뚜렷하게 발현이 증가되었다(Fig. 4B).

자궁경부암조직의 면역조직 화학염색 결과, 정상 자궁세포에서는 TACC3의 발현이 검출되지 않았으나 자궁경부암, 난소암 및 자궁내막암 조직에서 TACC3의 과발현이 관찰되었다(Fig. 4C).

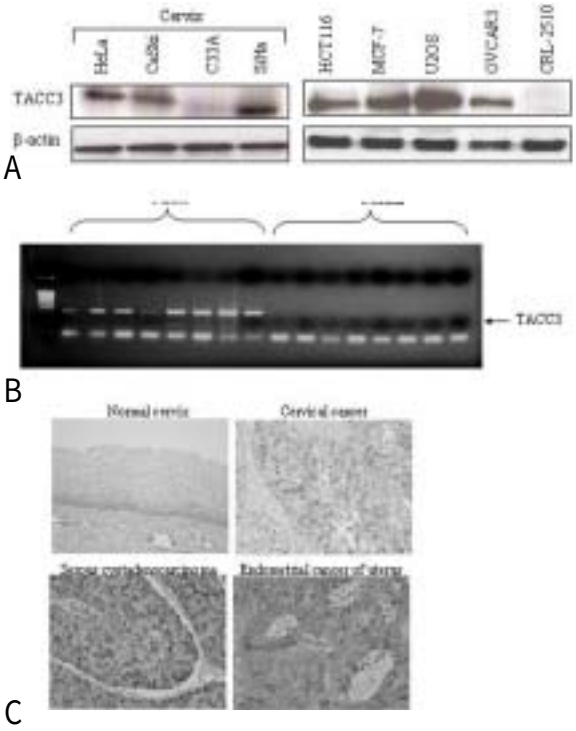


Fig. 4. TACC3 expression in various cancer cell lines, cervical and ovarian tumor tissues. (A) TACC3 was detected by western blot analysis in HeLa, CaSki, C33A, SiHa (cervical cancer), HCT-116 (colorectal cancer), MCF-7 (breast cancer), U2OS (0steosarcoma) and OVCAR3 (ovarian cancer) cell lines except CRL-2510 (normal skin fibroblast). (B) RT-PCR analysis of TACC3 in normal cervix and cervical cancer tissues. The increased expression of TACC3 was mainly detected in cervical cancer tissues. (C) TACC3 stain was not detectable in normal cervix. In contrast, TACC3 was detected in cervical, ovarian and endometrial tumor tissues.

고 찰

Paclitaxel은 난소암, 유방암, 폐암 및 전이 단계의 자궁경부암과 환자치료에 많이 사용되는 항암제로서 세포 내 microtubule을 안정화시켜서 polymerization/depolymerization의 역동적 움직임을 방해함으로써 세포주기에서 G2/M phase 세포의 분포가 현저하게 증가하는 세포주기 arrest 현상을 나타내며, 세포의 분열과 증식을 억제하여 apoptosis를 유발시킨다고 알려져 있다.[16,17] Paclitaxel을 LNCaP 세포와 H460, RKO 세포에 처리하여 세포 주기가 G2/M phase에 정지되는 동안 cdc2 kinase의 활성과 bcl-2의 인산화가 증가되는 것이 보고되었다.[18] G1/S check point 작용을 하는 p21 단백질과 p53 단백질의 기능이 결여된 세포에서는 paclitaxel에 의해 더욱 민감하게 apoptosis가 유도되었다.[19] 다른 기전으로는 metaphase에서 anaphase로 전환을 방해하여 apoptosis

를 유도하는데, 이는 bcl-2 phosphorylation과 caspase-3와 polymerase 절단을 유도하기 때문이라고 설명하였다.[20] Paclitaxel이 세포 주기를 조절하고, apoptosis를 유발하여 암 세포 증식을 억제하는 작용을 규명하는 연구는 이와 같이 활성화되었지만, paclitaxel에 의하여 microtubule을 안정화시키는 작용에 대하여는 아직까지 밝혀진 바가 없다.

프로테옴 분석 결과로서 paclitaxel을 처리한 암 세포에서 다양한 단백질들의 감소와 증가가 관찰되는 현상은 microtubule이 paclitaxel의 분자적 표적에 의한 결과라는 것 외에도 다른 복합적인 기전에 의한 결과라는 것이 예측되고 있다.

본 연구에서는 자궁경부암 세포에 paclitaxel을 처리하여 TACC3의 발현이 감소되며, paclitaxel의 양과 시간에 의존적으로 mRNA와 단백질 표현이 억제된다는 것을 확인할 수 있었다. Paclitaxel의 microtubule에 대한 특이 표적 유전자로서 TACC3 (Transforming Acidic Coiled-Coil containing family 3)를 동정하였으며, RNA interference (RNAi) 기법을 적용하여 paclitaxel이 microtubules의 기능을 억제하고, 비정상적 방추체를 형성하여 세포분열을 저해하는 것이 TACC3 발현 억제에 의한 작용임을 규명하였다. TACC 단백질은 microtubule의 안정성을 조절하는 centrosome 근처에 밀집되어 있으며, 세 종류의 human TACC (TACC1, TACC2, TACC3)가 알려져 있다. 골수 조직, 비장, 흉선, 태아 간장 조직을 포함하는 조혈 조직과 난자와 정자의 분화 과정에도 관여하여 발생학적 세포 성장에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.[14,15,21,22] 암과 연관된 TACC 기전은 미약하게 알려져 있으며, TACC1은 유방암 환자에서 처음으로 검출되었고 chromosome 8p11에 위치하고,[11,12] TACC2는 유방암 세포에서 증폭되는 fibroblast growth factor receptor 2가 위치하는 염색체 10q26에 있으며,[23] TACC2 splice variant가 종양 억제 유전자로서 역할을 하면서 유방암 세포주와 암 조직에서 감소되며,[24] TACC3는 다양한 암세포 및 조직에서 발현된다고 보고된 바 있다.[12,25] 세포 주기에서 TACC3의 발현은 M-phase 상에서 관찰되고,[26] mitotic cell에서 TACC3는 centrosome 부위에 위치하여 spindle apparatus에 관여한다.

이외에도 TACC3의 과발현은 저산소반응(hypoxic reponse)에 관여하는 전사인자인 ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)의 localization을 변형시켜 세포 분열 시 관여하는 조절 유전자들의 불활성화 기전을 유도한다고 보고되었다.[21] 또한, 혈액세포 분화과정에 필요한 전사인자인 FOG-1 (Friend of GATA-1)의 localization에 관여하며, TACC3가 과발현되는 세포에서 FOG-1의 nuclear localization을 변화시켜 GATA-1과 FOG-1 사이의 Interaction을 방해함으로써 GATA-1의 전사보조인자로써의 FOG-1의 기능을 방해하여, 적혈구세포의 성숙 및 multipotential progenitor의 expansion 사이의 transition이 조절한다고 알려져 있다.[15] 세포 분열 동안, 다수의 조절 단백질들은 중심체 및 방추사와 연계되어 전사 조절, 염색질 응축 및 세포 분열의 불활성화 기전을 유도한다. 따라서 TACC3는 중심체 부위의 특정 유전자를 target으로 하여 세포 분열 동안 전사 인자의 불활성을 유도한다고 추정된다.

RNAi 기법은 특정 mRNA 발현을 선택적으로 억제할 수 있는 기술로서 특정 transcript에 염기서열을 인식할 수 있는 작은 크기의 서열 선택적 transcript를 발현시켜 이로부터 형성된 double strand RNA가 dicer와 RISC (RNA induced silencing complex)라는 RNA 분해효소와 결합함으로써 발현되는 mRNA를 불활성화시킬 수 있다.[27] 본 연구에서는 프로테옴 분석으로 동정된 TACC3를 RNAi (RNA interference) 현상을 적용하여 paclitaxel 처리에 의한 효과처럼 TACC3의 발현과 세포의 성장이 억제되었음을 확인할 수 있었다. TACC3 siRNA 처리에 의해 세포의 형태가 변화하여 apoptosis의 전형적인 특징인 chromatin condensation, apoptotic body가 형성되고, 핵의 분절이 증가되었으며, FACS 분석 결과 apoptosis를 나타내는 Sub-G1 phase가 증가되며, G2/M phase가 4배 이상 증가함을 관찰할 수 있었다.

Paclitaxel은 암세포의 microtubule assembly를 증진시키고, microtubule을 안정화시켜 polymerization 상태로 남아있게 한다. 즉, paclitaxel은 microtubule의 disassembly를 저해하여 유사분열에 필요한 방추사의 형성을 억제하므로 암 세포가 G2/M phase에 머무르게 되어 세포가 사망하게 된다. 면역형광분석 결과 세포주기 G2/M에서 microtubule의 파괴를 유도하는 paclitaxel의 작용 기전과 유사하게 TACC3 siRNA의 처리는 α-tubulin의 assembly를 증진시키고 disintegration을 유도하였다. TACC3 발현 억제에 의한 apoptosis와 G2/M phase

arrest 현상은 microtubule polymerization에 의한 결과로 생각되며, TACC3는 paclitaxel에 의하여 초기에 작용하는 새로운 항암 표적 유전자로서 결정적인 역할을 수행한다고 예상된다.

본 연구 결과에서 대장암, 유방암, 골육종, 난소암 세포에서 TACC3의 과발현이 관찰되었으나, 정상 피부 섬유아세포에서는 TACC3의 발현을 관찰할 수 없었다. 또한, 정상 자궁경부 상피 세포에서는 TACC3의 발현을 관찰할 수 없었으나, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암 조직에서 TACC3의 과발현을 확인할 수 있었다.

위의 결과로서 TACC가 암 세포 분열 시 microtubule 생성에 중요한 암 유발 단백질이며, paclitaxel이 microtubules polymerization을 유도하여 비정상적 방추체를 형성하여 세포분열을 방해하는 초기 단계 현상이 특이 표적 단백질인 TACC3 억제에 의한 작용일 것이라는 가능성을 제시할 수 있었다. 뿐만 아니라 TACC3는 암 유전자 단백질로서 진단적 가치가 있으며 아직까지 밝혀내지 못하였던 paclitaxel의 새로운 작용 기전을 규명하여 추후 항암제 개발에 필요한 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. PanJo Kim, HyunChul Lim, DaeWon Kim, YoonSoon Lee. *In Vitro* Interaction of Taxol with Other Antitumor Drugs in the Established Choriocarcinoma Cell Lines. Korean J Obstet Gynecol 2004; 47: 76-82.
2. Goncalves A, Braguer D, Kamath K, Martello L, Briand C, Horwit S, et al. Resistance to Paclitaxel in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. Proc Natl Acad Sci 2001; 98: 11737-41.
3. Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, Wilson I. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Paclitaxel at low concentrations. Proc Natl Acad Sci 1993; 90: 9552-6.
4. Long MH, Fairchild CR. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G1 phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. Cancer Res 1994; 54: 4355-61.
5. Lopes NM, Adams EG, Pitts Tw, Bhuyan BK. Cell kill kinetics and cell cycle effects of Paclitaxel on human and hamster ovarian cell line. Pharmacol 1993; 32: 235-42.
6. Klabber N, Parangi S, Flynn E, Hamel E, D'Amato RJ. Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and Paclitaxel. Cancer Res 1997; 57: 81-6.
7. Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with paclitaxel (Paclitaxel) and docetaxel (Taxotere) in HeLa and SQ20B cells. Cancer Res 1996; 56: 1842-50.
8. Pulkkinen JO, Pekkola-Heino K, Greman R. Paclitaqxel and irradiation induce apoptosis in squamous cell carcinoma cell lines in an additive way. Anticancer Res 1996; 16: 2923-9.
9. Andre N, Braguer D, Brasseur G, Goncalves A, Lemesle-Meunier D, Guise S, et al. Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. Cancer Res 2000; 60: 5349-53.
10. Goncalves A, Braguer D, Carles G, Andre N, Prevot C. Capase-8 activation independnt of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel induced apoptosis in human clon cancer cells (HT29-D4). Biochem Pharmacol 2000; 60: 1579-84.
11. Still IH, Vince P, Cowell JK. The third member of the transforming acidic coiled coil-containing gene family, TACC3, maps in 4p16, close to translocation breakpoints in multiple myeloma, and is upregulated in various cancer cell lines. Genomics 1999a; 51: 165-70.
12. Still IH, Hamilton M, Vince P, Wolfman A, Cowell JK. Cloning of TACC1, an embryonically expressed, potentially transforming coiled coil containing gene, from the 8p11 breast cancer amplicon. Oncogene 1999b; 8: 4032-8.
13. Chen HM, Schmeichel KL, Mian IS, Lelievre S, Petersen OW, Bissell MJ. AZU-1: a candidate breast tumor suppressor and biomarker for tumor progression. Mol Biol Cell 2000; 11: 1357-67.
14. Garriga-Canut M, Orkin SH. Transforming acidic coiled-coil protein 3 (TACC3) controls friend of GATA-1 (FOG-1) subcellular localization and regulates the association between GATA-1 and FOG-1 during hematopoiesis. J Biol Chem 2004; 279: 23597-605.
15. Simpson RJ, Yi Lee SH, Bartle N, Sum EY, Visvader JE, Matthews JM, et al. A classic zinc finger from friend of GATA mediates an interaction with the coiled-coil of transforming acidic coiled-coil 3. J Biol Chem 2004; 279: 39789-97.
16. Rieder C, Schuitz A, Cote R, Sluder G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells in controlled by a checkpoint that monitor sister kinetochore attachment to the spindle. J Cell Bio 1994; 124: 1304-10.
17. Derry WB, Wilson L, Jordan MA. Stoichiometric binding of Paclitaxel suppresses microtubule dynamics. Biochemistry 1995; 34: 2203-11.
18. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. Nature 1996; 380: 75-9.
19. Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. Cancer Chemother Pharmmacol 1999; 44: 335-61.
20. Bourgarel-Rey V, Vallee S, Rimet O, Champion S, Braguer D, Desobry A, et al. Involvement of nuclear factor kB in

c-Myc induction by tubulin polymerization inhibitors. Mol Pharmacol 2001; 59: 1165-76.
21. Sadek CM, Jalaguier S, Feeney EP, Aitola M, Damdimopoulos AE, Pelto-Huikko M, et al. Isolation and characterization of AINT: a novel ARNT interacting protein expressed during murine embryonic development. Mech Dev 2000; 97: 13-26.
22. Sadek CM, Pelto-Huikko M, Tujague M, Steffensen KR, Wennerholm M, Gustafsson JA. TACC3 expression is tightly regulated during early differentiation. Gene Expr Patterns 2003; 3: 203-11.
23. Schuler GD, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, et al. A gene map of the human genome. Science 1996; 274: 540-6.
24. Pu JJ, Li C, Rodriguez M, Banerjee D. Cloning and structural characterization of ECTACC, a new member of the transforming acidic coiled coil (TACC) gene family: cDNA sequence and expression analysis in human microvascular endothelial cells. Cytokine 2001; 13: 129-37.
25. McKeveney PJ, Hodges VM, Mullan RN, Maxwell P, Simpson D, Thompson A, et al. Characterization and localization of expression of an erythropoietin-induced gene, ERIC-1/TACC3, identified in erythroid precursor cells. Br J Haematol 2001; 112: 1016-24.
26. Gergely F, Draviam VM, Raff JW. The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells. Genes Dev 2003; 17: 336-41.
27. Cheng JC, Moore TB, Sakamoto KM. RNA interference and human disease. Mol Genet Metab 2003; 80: 121-8.

Identification of TACC3 (Transforming Acidic Coiled-Coil 3) as a novel target of paclitaxel-mediated tumor therapy in cervical cancer cells

Eun-Kyoung Yim[1], Keun-Ho Lee[1], Hee-Jung Lee[2], Chan-Joo Kim[1], Tae-Chul Park[1], Soo-Jong Um[3], Jong-Sup Park[1,2]

Division of Gynecologic Oncology, Department of Obstetrics and Gynecology[1], Department of Pathology[2], Graduate School of Catholic University, Seoul, Korea, Department of Biotechnology[3], The Sejong University, Kwangjin-gu, Seoul, Korea

Objective : Paclitaxel is currently used in the treatment of ovarian, breast, gastric, colorectal, lung and recurrent cervical cancer. Initial studies on the mechanism of action of paclitaxel have demonstrated that this drug alters microtubule assembly, by inhibiting microtubule depolymerization and changing microtubule dynamics. Although treatment of various tumor cells with paclitaxel induces apoptosis, but early paclitaxel-targeted proteins is not yet known. We tried to search paclitaxel-targeted proteins and to investigate its functions.

Methods : The effects of paclitaxel on HeLa cervical cancer cell growth were evaluated by cell proliferation assay, DAPI stain, and FACS analysis. We performed proteome analysis including 2-DE and MALDI-TOF-MS in nontreated- and paclitaxel-treated HeLa cells, as a result, we identified TACC3 protein that is down-regulated with paclitaxel treatment. We tried to characterize TACC3 functions through *in vitro* treatment of paclitaxel or RNAi technique.

Results : Paclitaxel- and TACC3 siRNA-treated cells are unable to proceed normally through the cell cycle and are arrested in G2/M phase and reveal apoptotic morphology. TACC3 levels after paclitaxel treatment decreased as a time- and dose-dependent manner both mRNA and protein levels. We confirmed that the role of TACC3 down-regulation for microtubule stabilization was similar to that of paclitaxel. Also, TACC3 is expressed at high levels in various cancer cells and tumor tissues.

Conclusion : This study is proposed that the TACC3 protein may be participated in microtubule formation as an oncoprotein during mitosis and be regulated by paclitaxel as a novel target.

Key Words **:** Paclitaxel, Cervical cancer, TACC3, RNAi