

인체 유방암 세포에서 과다발현 시킨 Cyclin D2의 영향에 대한 연구

김현준 · 이근수 · 전상학¹ · 공 구*

한양대학교 의과대학 병리학교실

¹서울대학교 사범대학 생물교육과

*서울시 성동구 행당동 17번지 한양대학교 의과 대학 병리학교실

Effect of Cyclin D2 on Cell Proliferation in T-47D Breast Cancer Cells

Hyun Jun Kim, Geun Soo Lee, Sang Hak Jeon¹, and Gu Kong*

Departments of Pathology, College of Medicine, Hanyang University

¹Department of Biology Education, College of Education, Seoul Ntional University

(Received February 1, 2004 / Accepted March 14, 2004)

ABSTRACT: Three D-type cyclins (D1, D2, and D3) are expressed in G1 phase of the cell cycle and have been implicated in cell transformation and neoplasia in human and mouse. Cyclin D1 overexpression or amplification was described in various human cancers. However, there is controversy about the role of cyclin D2 in cell cycle progression and human carcinogenesis. Specially, loss of cyclin D2 is involved in a vital tumor suppressor function in normal breast tissue, and that its loss may be related to tumorigenesis. The author examined to effect overexpression of cyclin D2 on the cell proliferation, apoptosis, and cell cycle using cyclin D2 transfected stable T47D breast cancer cells to investigate whether cyclinD2 functions as a positive regulator or negative regulator in cell proliferation. Overexpression of cyclin D2 led to the suppression of cell growth in cyclin D2 transfected T47D in both in its expression level and a time dependent manner with up to 50% reduction of cell growth at 72 hours. Therefore, the authors performed the cell cycle phase analysis using the flow cytometry to investigate the effect of cyclin D2 on the cell cycle phase in cyclin D2 transfected stable T47D cells. The flow cytometry analysis revealed increased sub G0 phase in cyclin D2 transfeted cells up to 23% at 72 hours. To confirm these results induced by overexpression of cyclinD2, the apoptotic bodies were counted in control and cyclin D2 transfected T47 cells. There are markedly increases of apoptotic bodies in cyclin D2-transfected cells up to 18%. These results suggested that Cyclin D2 suppresses the cell proliferation in breast cancers cells via the induction of apoptosis.

Key words: cyclin D2, T47D breast cancer cells, apoptosis, cell cycle progression and human carcinogenesis

서 론

세포증식이 일어나기 위해서는 유전자를 포함한 DNA의 복제와 세포분열이 정확한 순서에 의해 수행되어야 하는데, 예를 들면 유전정보를 정확히 두 딸세포에 동일하게 전달하기 위해서는 염색체 분리 이전에 DNA 복제가 반드시 완료되어야만 한다. 세포분열이 일어나고, 다시 다음 세포분열이 일어나기까지의 일련의 과정을 세포주기(cell cycle)라고 하는데, 여기에는 G1, S, G2, M의 4가지 단계가 포함된다(Zhang

et al., 1999; Sherr et al., 1995; Steeg and Zhou 1998).

분열의 신호를 받아들이기 전의 세포들은 분화된 상태에서 각자의 역할을 수행하고 있는데 이 기간을 G0라고 한다. 일단 외부에서 분열을 유도하는 신호가 도달하면, 세포는 DNA 복제를 준비하는 G1단계로 들어간다. 대개 이 신호는 세포외부에서 도달하는 성장 호르몬 등인데, 이 외부신호는 세포막의 수용체에 선택적으로 결합하여 연속적인 세포내 신호전달계를 통해 정상시의 G0 상태에서 G1으로 전환을 유도한다. G1단계에서는 세포 분열에 필요한 각종 단백질의 합성이 일어나며, 충분한 영양분이 가용한지 혹은 DNA 유전자에 이상이 없는지 점검하는 단계로서, 모든 준비가 끝나

*To whom correspondence should be addressed

면 DNA합성이 일어나는 S단계로 이행한다. S단계에서는 DNA 중합효소, 헬리카제, topoisomerase 등의 효소들이 협동하여 DNA를 복제하며, G2/M 은 세포분열의 준비와 세포분열이 되는 단계이다(Kamb, 1995). G1 단계에서 세포주기의 시작 및 진행은 성장인자 등과 같은 외부의 환경과 내부의 조건이 충족되었을 때 시작되며, 이러한 조건을 인지하여 세포주기 진행을 결정하는 중요한 기점을 Restriction point (R-point)라고 명명하였다(Murray, 1992; Charles, 1996). R-point 는 G1 단계에서 S 단계로 진행되는 기점으로 S기로 가기 위한 충분한 세포내 인자들이 만들어지지 않으면 다음단계로 가지 못하게 조절하고 다음 세포주기가 시작될 수 있는지 조사하여 만일 세포가 준비되지 못하면 Cell Cycle 진행을 차단하여 세포가 G1기에서 멈추도록 조절한다. 일단 R-point를 지나가면 내부의 세포주기 단계에 의해 나머지 세포분열과정이 상대적으로 수월하게 진행된다(O' Connell and Nurse, 1994; Sherr 1994; Hartwell and Weinert. 1989).

R-point에 관련된 조절자로는 두 종류의 단백질 그룹인 Cyclins와 cyclin dependent kinases(cdk)가 있다(Kamb, 1995; Peter, 1994). 세포주기 G1 단계에서 Cyclins이 cdk2, -4 그리고 -6와 복합체를 이루어 활성화 되면(Sherr, 1994) R-point에서 중요한 Retinoblastoma Susceptibility 유전자인 Rb 단백질을 인산화시킨다. Rb 단백질은 초기 G1 단계에서 E2F 전사인자(Transcription factor)와 결합되어 있다가, Cyclin D1/ckd4 complex에 의해 인산화되어 결합되어 있던 E2F를 유리시키기 시작한다. G1 후기부터 Cyclin E/ckd2 complex에 의해 E2F를 완전 유리시키게 되며 이는 G1에서 S 단계의 진행에 필수적이다(Sherr 1994; Weinberg, 1995; Hunter and Pines, 1994; Grana and Reddy 1995).

D-type cyclins은 Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin D3 의 3가지의 종류로 되어있고 이들의 아미노산 염기 서열의 60%가 동일하며 특히 Cyclin box라고 불리는 지역에서 homology가 특별히 두드러진다. D-type cyclins는 공통된 3개의 구조적 특성을 가지고 있다. 즉 Rb와 상호작용에 관여하는 LXCXE motif와 cdk와 상호 작용하는 Cyclin box, 그리고 단백질의 불안정성을 유도하는 Carboxy terminus 주변의 PEST 염기서열(Sequences)이 존재한다(Zhang *et al.*, 1999; Sherr *et al.*, 1995; Steeg and Zhor, 1998).

D-type cyclins는 세포 주기 조절에서 중요한 역할을 하며 이들의 비정상적인 발현은 세포주기를 파괴시켜 암유전자로서 기능을 한다. 그중 Cyclin D1은 암유전자이며 림프암종, 유방암, 갑상선암을 포함한 많은 종류의 암 형태에서 과다발현된다(Zhang, 1999). 비정상적인 Cyclin D2의 발현은 난소 육아종(Sicinski *et al.*, 1996)과 고환의 생식세포의 종양 세포주 그리고 위암(Yosogawa *et al.*, 1991)에서 보였으며

Cyclin D2의 과다발현과 p27의 결핍이 위암의 예후를 더욱 나쁘게 만든다(Takano Y *et al.*, 2000). Cyclin D2가 유방 편평 상피세포에서 cdk4보다는 오히려 cdk2와 활성화되어 세포의 증식을 유도한다(Sweeney *et al.*, 1997). 골육종과 정상 유방 편평 상피세포에서 Cyclin D1과 Cyclin D2가 발현된다(Buckley *et al.*, 1993; Lukas *et al.*, 1995). Cyclin D3 유전자의 증가가 교모세포종에서 보고 되었으며(Hunter and Pines 1994; Wang *et al.*, 1995; Kichiki *et al.*, 2000) Cyclin D2, D3 그리고 E의 과다발현이 위암과 그 관련 질병에서 빈번하게 일어난다고 보고 되고 있다(YU *et al.*, 2002). 최근에 Cyclin D2가 Myc의 직접적인 대상이며 Cyclin D2의 축적이 세포 주기 억제제인 p27을 격리(sequestration) 시키므로 인해 S 단계로의 이동을 촉진시킨다고 보고하고 있다(Affrich R *et al.*, 1999; Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999). 더욱이 염색체 전이(chromosomal translocation)에 의한 c-Myc의 전사의 활성이 B-림프암에서 Cyclin D2, E 그리고 cdk4와 같은 세포 주기 활성화자(cell cycle activator)의 발현을 촉진시키므로 세포의 증식을 유도한다(Janz *et al.*, 1995; Pajic *et al.*, 2000).

D-type cyclins는 이렇게 증식을 촉진시키는 활성(proliferation-promoting activity)으로서 잘 알려져 있으나 반면 성장 억제 효과(growth-inhibitory effects)를 가지고 있다. Cyclin D1의 과다발현이 섬유아세포의 S단계로의 진입을 억제하며(Pagano *et al.*, 1994; Pestka *et al.*, 1987), 쥐의 유방 편평 상피에서 Cyclin D1의 과다발현으로 S 단계로의 진입을 억제하고 성장이 지연된다(Han *et al.*, 1995). 이것은 Cyclin D1에 의해 중재된 세포 조절 억제제인 p27^{kip}의 유도에 기인한 것이다(Han *et al.*, 1996). 세포 성장 억제와 분화를 유도하는 혼합 극성 물질인 Hexamethylen-bisacetamide(HMBA)가 쥐의 유방암 세포에서 Cyclin D2와 p27^{kip}의 과다발현과 동시에 G1 cell arrest를 일으킨다(Said and Medina, 1998). 또한 Cyclin D2 유전자 발현의 silencing이 Cyclin D2 프로모터의 과메틸화(hypermethylation)에 의해 인간의 유방암세포와 관련되어 있다고 보고 되고 있다(Evron *et al.*, 2001). Cyclin D3는 세포증식에서 세포 죽음을 초래하는 Caspase 2를 활성화시킨다고 보고 되고 있다(Mendelsohn AR *et al.*, 2002).

이렇듯 최근에 인간의 암세포에서 Cyclin D2 역할에 대해 기존의 D-type cyclin의 암유전자로서 기능과는 서로 상반된 의견을(Yasuo *et al.*, 2000; Evron *et al.*, 2001) 제시하고 있고 정상 유방 조직에서 Cyclin D2의 역할이 암 억제 기능과 관련이 있을 거리는 보고(Evron *et al.*, 2001)는 있지만 아직까지 미비하기에 본 논문에서는 인간의 유방암 세포 주에서 Cyclin D2 과다발현의 효과를 통해 그의

역할을 보다 더 규명하고자 한다.

재료 및 방법

세포배양

T-47D는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고 계대 배양시에는 1X Trypsin-EDTA(GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)에서 5분간 반응시켰다. T-47D는 10% FBS-MEM 배지(MEM(Minimum Essential Medium, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)), 100×Penicillin-Streptomycin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.), Fungizon (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 사용하여 계대 배양하였다.

Expression Vector와 Transfection

pD2-P39에서 human cyclin D2 EcoR I /BaII을 cloning에 의해 구성된 Constitutive expression vector pRcCMV Cyclin D2와 Corresponding empty vector는 Elizabeth Musthgrove(Sydney Australia)에게서 공급받았다. T-47D 유방암세포주에 neomycin에 저항이 있는 유전자를 가진 pRcCMV Cyclin D2 또는 pRcCMV를 lipofectamine (Invitrogen, U.S.A)을 사용하여 Transfection시켰으며 몇 주 동안 G418(neomycin, 700 µg/ml → 500 µg/ml)의 Colony resistant를 통해 Selection을 하여 T-47D RcCMV Cyclin D2와 T-47D RcCMV의 stable cell line을 얻었다.

역전사연쇄증폭반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

세포에서 total RNA 분리

세포에 RNAzol™ B(Biotech Lab, Houston, Texas, U.S.A.)를 넣고 얼음에 5분간 방치 후 chloroform(CHCl₃) (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A)를 0.1 volume으로 넣고 다시 얼음에 5분간 방치했다. 4°C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리 하고 상층액을 취하여 동량의 isopropyl alcohol(dimethylsulfoxide)을 가한 후 섞어 주었다. -20°C에 30분간 반응시키고 4°C에서 15분간 14,000rpm으로 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 75% ethanol로 세척한 후, pellet을 0.1% Diethyl pyrocarbonate(DEPC) 물에 녹여 자외선 분광계를 사용하여 RNA를 정량하였다.

Reverse Transcription(RT)

총 20 µl의 반응 용량에 1 µg RNA, 5 mM MgCl₂, 1x RNA PCR buffer, RNase Free 증류수, 1 mM dNTPs Mixture, 1 units/ml RNase inhibitor, 0.25 units/µl Reverse Transcriptase, 0.5 µl Random 9mer (TaKaRa, Tokyo,

JAPAN)를 섞은 후 30°C에서 10분, 42°C에서 30분, 99°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 만들고 이를 4°C에서 사용 전까지 보관하였다.

Polymerase chain reaction(PCR)

중합효소 반응은 위 과정에서 만들어진 cDNA를 2 µl, 1xPCR buffer(50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl(pH=8.0, 0.01% gelatin, 0.1% Triton x-100, 1.5 mM MgCl₂), 200 µM dNTPs, 1 unit의 Taq DNA 중합효소의 혼합액에 각각의 primer 20 pmol을 혼합하여 총 20 µl 용량을 맞춘 후 DNA thermal cycler를 이용하여 PCR 반응을 시켰다. PCR primer의 염기 서열은 표 1에 있으며 PCR 조건은 94°C에서 5분 후, 94°C에서 1분, 64°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 35회를 반복하고 나서 72°C 10분 반응하였다. PCR 산물은 EtBr이 들어있는 2% agarose gel에 전기영동하여 PCR반응 유무를 확인하였다.

Methylation Specific PCR (MSP)

DNA 추출

DNA 추출은 QIAamp tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)에 의해 시행하였다.

Bisulfate 처리

Herman 등이 제시한 방법에 의거하여 농도가 측정된 DNA를 50 µl에 1 µg이 함유되게 하여 NaOH(최종농도 0.2 M)를 넣어 37°C에서 10분 동안 변성시켰다. 신선하게 만들어진 10 mM hydroquinone(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 30 µl와 pH5.0인 3 M Sodium bisulfate(Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 520 µl를 넣고 섞은 후 상층에 mineral oil을 넣고 50°C에서 16시간 부양했다. 변화된 DNA를 Wizard DNA 정제기구(Promega, Madison, WI, U.S.A)를 사용하여 정제한 후 50 µl 증류수에 녹였다. NaOH(최종농도 0.3 M)를 처리하여 실온에서 5분 동안 둔 후 에탄올로 침전시켜 DNA를 모으고 다시 물에 녹여 즉시 사용하였다.

Methylation Specific PCR (MSP)

PCR primer의 염기 서열은 표 1에 있으며, MSP 반응을 위한 조건은 다음과 같다. PCR 반응은 1xPCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl(pH=8.0, 0.01% gelatin, 0.1% Triton x-100, 1.5 mM MgCl₂), 200 µM dNTPs, 1 unit의 Hotstar Taq 중합효소의 혼합액에 각각의 primer 100 pmol 및 0.1 µg의 template를 혼합하여 12.5 µl 용량을 맞춘 후 DNA thermal cycler를 이용하여 PCR 반응을 시켰다. PCR 반응 조건은 95°C에서 15분 후, 95°C에서 1분, 64°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 40회를 반복하고 나서 72°C에서 10분 반응시켰다. PCR 산물은 EtBr이 들어있는 2% agarose gel에 전기영동 하여 PCR반응 유무를 확인하였다.

Table 1.

Primer used RT-PCR

| Genes | Sequences | PCR Product(bp) |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Cyclin D1 | | 200 |
| Sense | 5'-AGC CAT GGA ACA CCA GCT C-3' | |
| Anti-sense | 5'-GCA CCT CCA GCA TCC AGG T-3' | |
| Cyclin D2-400 | | 497 |
| Sense | 5'-TAC TTC AAG TGC GTG CAG AAG GAC-3' | |
| Anti-sense | 5'-TCC CAC ACT TCC AGT TGC GAT CAT-3' | |
| 36B4 | | 180 |
| Sense | 5'-GAT TGG CTA CCC AAC TGT TGC A-3' | |
| Anti-sense | 5'-CAG GGG CAG CAG CCA CAA AGG C-3' | |

Primer used Methylation Specific PCR (Ella *et al.*, 2001)

| Genes | Sequences | PCR Product(bp) |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| Methylated Cyclin D2 | | 276 |
| Sense | 5'-TAC GTG TTA GGG TCG ATC G-3' | |
| Anti-sense | 5'-CGA AAT ATC TAC GCT AAA CG-3' | |
| Unmethylated Cyclin D2 | | 222 |
| Sense | 5'- GTT ATG TTA TGT TTG TTG TAT G-3' | |
| Anti-sense | 5'-TAA AAT CCA CCA ACA CAA TCA-3' | |

Western blot

단백질 추출 및 정량을 통해 얻은 단백질(25 µg)을 100°C에서 가열하여 변성시켜 10% SDS-PAGE(sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis)에 분리시킨 후 PVDF membrane에 transfer했다. Transfer한 membrane을 5% non-fat dried milk가 포함된 TBS-T buffer로 세척했다. 세포주기 조절에 관여하는 단백질, Cyclin D2의 항체(antibody)와 2nd Anti-rabbit를(Santa cruz, CA, USA) 이용하여 membrane에 부착시킨 후, 단백질들의 발현양상을 보기 위해 ECL-plus kit(Amersham, Buckinghamshire, UK)로 반응, X-ray film에 노출하여 관찰했다. 대조군 항체로 Actin(CHEMICON International, Inc., CA, USA)과 2nd Anti-mouse (Santa cruz, CA, USA)를 사용하였다.

세포주기 분석

다양한 시간별로 배양한 세포를 모아 PBS로 세척한 후 세포를 잘 현탁하였다. 70% 에탄올로 세포를 고정시켰다. 고정된 세포에 상층액을 제거하고 PBS로 세척했다. 1 mg/ml RNase를 넣어 37°C에서 부양후 50 µg/ml Propidium Iodide (PI)을 첨가하여 암실에서 상온으로 30분 반응시켰다. 이것으로 Flow cytometry(Becton Dickinson FACSCalibur)를 이용하여 세포주기 분석을 하였다.

Dimethyl thiazol diphenyl tetrazolium bromide(MTT)

96 well plate에 2×10³ cell/well의 세포수로 분주한 후 시간별로 배양했다. 세포의 성장을 측정하기 위해 각 well에 Dimethyl thiazol diphenyl tetrazolium bromide(MTT) dye(Promega U.S.A.)를 15 µl씩 분주 후, formazen 형성을 위해 37°C에서 3시간 동안 배양했다. formazen이 형성된 세포에 Solubilization/stop 용액(Promega U.S.A.)을 100 µl씩 분주하고 형성된 formazen이 잘 녹을 때까지 부양했다. 세포 성장 농도를 측정하기 위해서 파장 570 nm에서 ELISA reader(Bio-Red U.S.A.)를 사용하여 측정했다.

Diamidino phenylindol(DAPI) 염색

세포(1×10⁵ cell/ml)를 시간별로 배양했다. 배양 후 세포를 모으고 100% 메탄올에 고정시켰다. 고정된 세포를 잘 현탁한 후, 슬라이드 위에 도포했다. 세포가 도포된 슬라이드를 PBS로 세척하여 공기 중에 잘 말린 후 DNA-specific flurochrome Diamidino phenylindol(DAPI)로 염색했다. Diamidino phenylindol(DAPI)로 염색된 슬라이드를 형광 현미경으로 관찰했다.

결 과

암세포에서 Cyclin D2 mRNA 발현의 관찰과 원인

불멸 세포인 MCF10A와 여러 암세포(유방, 폐, 방광의

세포주에서 분리해낸 total RNA를 역전사 시킨 후 PCR을 통해 증폭시켰다.

그림 1에서 Cyclin D1은 모든 세포에서 발현이 확인되었으며 Cyclin D2는 불멸 세포인 MCF10A에서만 약간의 발현이 보일 뿐 암세포주에서는 전혀 보이지 않았다. Cyclin D2의 Methylation Specific PCR(MSP)는 Cyclin D2 프로모터의 CpG island에 메틸화로 인한 유전자의 silencing의 유무를 확인하는 실험이다. 그림 1에서 볼수 있듯이 모든 암세포 주에서 발현이 확인되어 Cyclin D2 프로모터에서 메틸화가 일어나 있음을 확인할 수 있었다.

그림 1의 실험을 통해 불멸 유방 세포와 달리 유방암 세포주에서 Cyclin D2의 유전자 발현이 없으며, CpG island에 메틸화로 인해 유전자의 silencing이 일어나 Cyclin D2 단백질 발현이 유방암종회에서 일어나지 않음을 제시하고 있다.

Cyclin D2의 Transfection과 Colony의 선택

DNA Expression Vector(RcCMV)를 통해 Cyclin D2를 T-47D 유방암세포주에 Transfection시켰으며 G418(neomycine)을 처리하여 6개의 Colony를 얻었으며 RT-PCR를 통해 Cyclin D2의 Transfection을 확인하였고(그림 2A) 최종적으로 western blot을 통해 T-47D 유방암세포주에서의 Cyclin D2의 단백질 발현을 확인하였다(그림 2B).

그림 2A와 그림 2B의 실험결과를 토대로 본 연구에서는 T-47D 유방암세포주에서 Cyclin D2의 과다발현에 대한 효과의 연구를 위해, Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2) 과 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)를 선택하였으며 대조군으로 Control 2를 선택하였다.

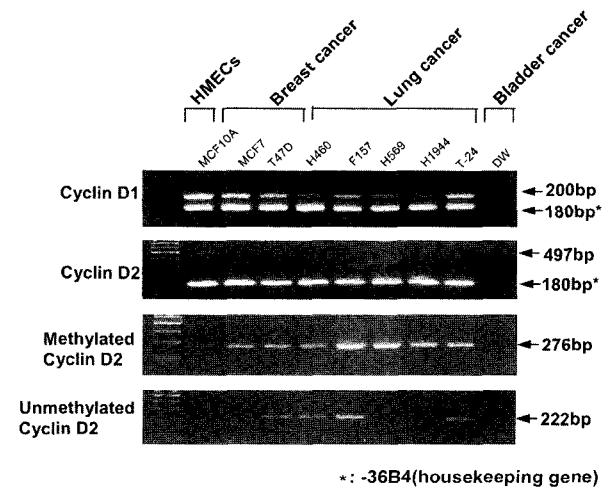


Fig. 1. Cyclin D2 mRNA expression and methylation of CpG island of Cyclin D2 promoter in various tumor cell lines.

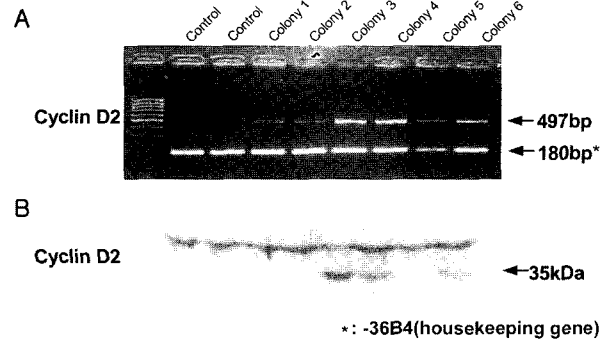


Fig. 2. Construction cyclin D2-transfected stable T47D Breast cancer cells. To verify the transfection of cyclin D2, individual colonies were screened by RT-PCR(A) and western blotting(B).

Cyclin D2의 과다발현이 T-47D 유방암세포주의 생존율에 미치는 효과

Cyclin D2의 과다발현으로 인한 T-47D 유방암세포주의 생존율에 미치는 효과를 보기위해, Cyclin D2와 빈 벡터를 Transfection시킨 T-47D 유방암세포주를 가지고 Dimethyl thiazol diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay 방법을 이용하여 각 시간별(0, 12, 24, 48, 72시간)로 상대적 세포 성장률을 측정하였다. 대조군은 0hr-0.9, 12hr-1.76, 24hr-2.24, 48hr-3.27, 72hr-3.69를 보였고 Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)는 0hr-0.9, 12hr-1.25, 24hr-2.05, 48hr-2.93, 72hr-3.33를 보였으며 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)은 0hr-0.9, 12hr-1.31, 24hr-1.59, 48hr-2.17, 72hr-2.48를 보였다. 즉 시간이 지남에 따라 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)에서 대조군보다 현저하게 세포의 증식이 억제됨을 보였으며 Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)는 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3) 보다는 크게 세포 증식이 되었지만 대조군보다는 조금은 세포 증식이 억제되었다(그림 3). 본 실험결과를 통해 Cyclin D2가 유방암세포주에서 암 억제 기능(Tumor Suppressor Function)을 하는 것을 알 수 있었다.

Flow cytometry를 통한 세포 주기의 변화 관찰

T-47D 유방암세포주에 과다발현시킨 Cyclin D2의 세포 성장 억제 효과가 세포주기 변화에 어떤 연관성이 있는지 알아보기 위하여 시간별로 Flow cytometry를 이용하여 각각에 대한 세포주기를 분석하였다. Sub G1, G1, S, G2/M 기로 나누어 백분율로 환산하여 나타냈다. 대조군은 0hr에서 SubG1-4.18, G1-58.13, S-10.15, 48hr에서 SubG1-3.01, G1-68.10, S-9.01, 72hr에서 SubG1-4.49, G1-72.97, S-

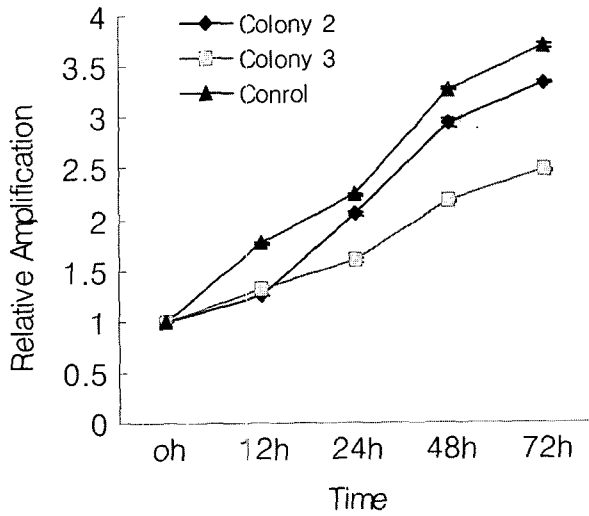


Fig. 3. Cell proliferation assay revealed that cyclin D2 overexpression suppresses cell proliferation. Colony2 and 3; cyclin D2 transfected stable T47D breast cancer cell line with low and high expression of cyclin D2, respectively.

6.26을 보였고 Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)에서 0hr은 SubG1-3.85, G1-60.63, S-10.09, 48hr은 SubG1-2.79, G1-66.87, S-10.98, 72hr은 SubG1-6.57, G1-64.85, S-7.98을 보였으며 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)는 0hr에서 SubG1-9.78, G1-50.28, S-9.62, 48hr에서 SubG1-8.76, G1-47.23, S-13.74, 72hr에서 SubG1-25.86, G1-44.41, S-8.15의 결과를 보였다. 즉 시간이 지남에 따라 Cyclin D2가 과다발현된 T-47D 유방암세포주에서 현저하게 apoptosis현상이 일어남으로 인해 세포의 성장이 현저하게 억제되는 것을 보여주었다(그림 4).

Cyclin D2의 과다발현에 의한 T-47D 유방암세포주에서 Cyclin D2 발현에 의한 apoptosis 유도 관찰

앞의 실험 결과를 통해서 Cyclin D2의 과다발현에 의한 T-47D 유방암세포주의 세포 성장 억제 효과(growth inhibitory effects)와 apoptosis 현상을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 시험에서는 과다발현시킨 Cyclin D2가 T-47D 유방암세포주에서 apoptosis를 유도하는지에 초점을 맞추어 Diamidino phenylindol(DAPI) 염색방법을 이용하여 시간별 (0, 12, 24, 48, 72시간)로 세포의 형태학적 변화에 대한 양상을 관찰하였다. Diamidino phenylindol(DAPI) 염색방법을 이용하여 본 대조군 세포(그림 5A)에서는 형태적으로 둥근 형태를 유지하고 있는 반면에, Cyclin D2를 과다발현 시켜 배양한 T-47D 세포에서는 apoptosis의 전형적인 nuclear fragmentation과 다양한 크기의 apoptotic cell 형태를 보였다(그림 5B). 또한 반복 염색한 후 각각의 슬라이드에 대해

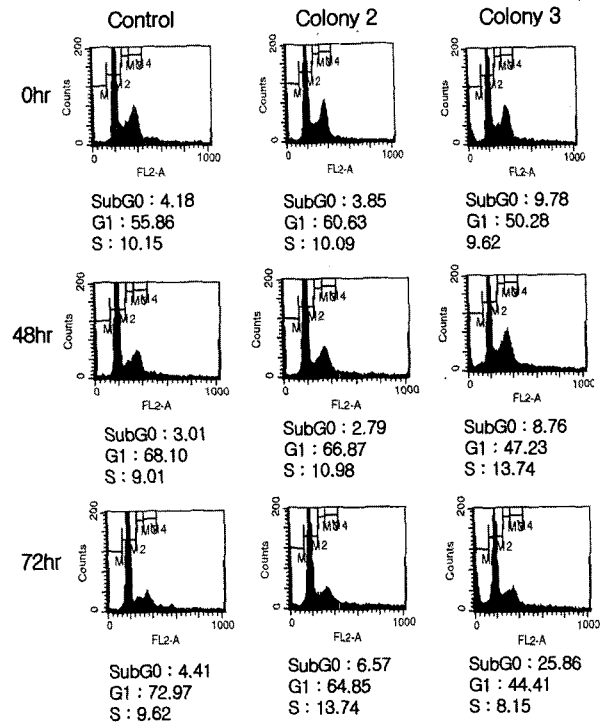


Fig. 4. Flow cytometry analysis demonstrated increase of apoptosis in cyclin D2 transfected stable T47D breast cancer cells. Colony 2 and 3; cyclin D2 transfected stable T47D breast cancer cell line with low and high expression of cyclin D2, respectively.

1000개의 세포를 세어서 그 비율을 나타내 보았다. 대조군은 0hr-0.6, 24hr-0.56, 48hr-1.23, 72hr-2.23를 보였고 Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)는 0hr-1.8, 24hr-1.93, 48hr-3.46, 72hr-5.96를 보였으며 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)은 0hr-2.73, 24hr-4.2, 48hr-7.13, 72hr-15.63를 보였다. 즉 시간이 지남에 따라 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)에서 대조군보다 apoptosis현상이 증가하였고, Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)에서는 Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3) 보다는 낮지만 대조군보다는 높은 apoptosis 현상을 관찰하였다(그림 5C).

고 찰

동물세포에서 세포의 증식(proliferation)은 Cyclins, Cyclin-dependent kinases(cdks)와 cdk inhibitor의 level-specific oscillation에 의해서 G1, S, G2/M 단계의 일정한 방식으로 조절되며 그중 Cyclin D1-3 단백질은 G1 단계에서 S 단계로의 이동(transition)에 관여한다(O' Connell and Nurse,

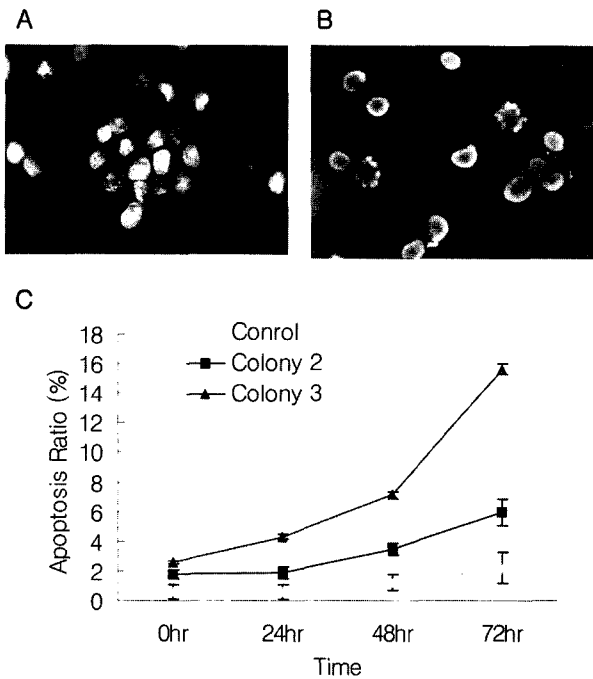


Fig. 5. Morphology features and Ratio (%) of Apoptosis induced by cyclin D2 in T47D Breast cancer cells. A: control, B: cyclin D2 transfected stable T47D, Colony 2, and Colony 3

1994; Sherr 1994; Hartwell and Weinert. 1989). D-type cyclins은 Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin D3의 3가지의 종류로 되어있고 이들의 아미노산 염기 서열의 60%가 동일하며 특히 Cyclin box라고 불리는 지역에서 homology가 특별히 두드러진다. D-type cyclins은 공통된 3개의 구조적 특성을 가지고 있다. 즉 Rb와 상호작용에 관여하는 LXCXE motif와 Cyclin-dependent kinases(cdk)와 상호작용 하는 Cyclin box, 그리고 단백질의 불안정성을 유도하는 Carboxy terminus 주변의 PEST 염기서열이(Sequences) 존재한다 (Zhang *et al.*, 1999; Sherr *et al.*, 1995; Steeg and Zhor, 1998). 그들의 주요 기능은 cdk4와 cdk6를 활성화시키고 Rb의 인산화를 이끌어내서 Rb에 의해 억제되어 있는 전사인자(Transcription factor)인 E2F를 자유롭게 해주고 Cyclin E의 활성화를 통해서 G1 단계에서 DNA 합성으로의 이동(transition)을 촉진시킨다. 이런 세포주기에서의 역할과 더불어서 D-type cyclins은 또한 암중화 과정과 세포분야에 있어 중요역할을 하는 것으로 알려져 있다(Sherr 1994; Weinberg, 1995; Hunter and Pines, 1994; Grana and Reddy 1995). 이렇듯 D-type cyclins이 세포 주기 조절에서 중요한 역할을 하지만 이들의 비정상적인 과발현은 세포주기 조절 능력의 상실로 인해서 암중화에 관여하는 암

유전자의 기능을 한다. Cyclin D1은 암유전자로써 림프암 중, 유방암, 갑상선암을 포함한 많은 종류의 암 형태에서 과다발현 된다(Zhang, 1999). 비정상적인 Cyclin D2의 발현은 난소 육아종(Sicinsk *et al.*, 1996)과 고환의 생식세포의 종양세포주 그리고 인간의 위암(Yosogawa *et al.*, 1991; Takano *et al.*, 2001)보고 되고 있다. Cyclin D3는 세포증식에서 세포 죽음을 초래하는 Caspase 2를 활성화시키며 (Mendelsohn AR *et al.*, 2002), Cyclin D3 유전자의 증가가 교모세포종에서 보고되어 있다(Hunter and Pines 1994; Wang *et al.*, 1995; Kichiki *et al.*, 2000). 반면에 유방암에서 Cyclin D2와 Cyclin D3는 아직 완벽하게 연구되어 있지 못하고 있다. Courjal 등은(Courjal *et al.*, 1996) 3개의 Cyclins mRNA의 발현을 132개의 유방암에서 분석했다. 그중 Cyclin D1이 암의 19%에서 과다발현 되었고 Cyclin D2와 D3의 과다발현은 전혀 발견되지 못했다. Cyclin D2가 정상 유방 조직에서 중요한 암 억제 기능을 하며 Cyclin D2의 발현소멸이 유방암중화와 관련이 있을거라 보고하고 있다. 또한 Cyclin D2 유전자 발현의 silencing이 Cyclin D2 프로모터의 과메틸화(hypermethylation)에 의해 Cyclin D2의 발현소실의 한 기전으로 보고되고 있다(Evron *et al.*, 2001).

본 연구에서는 Cyclin D2를 과다발현시킨 유방암 세포주의 생존율을 확인한 결과 시간이 지남에 따라 Cyclin D2 과 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)가 대조군보다 T-47D 유방암세포주의 증식이 현저하게 억제됨을 보였으며, Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)는 Cyclin D2 과 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3) 보다는 크게 세포 증식이 되었지만 대조군보다는 조금은 세포 증식이 억제됨을 알 수 있었다(그림 3). 결론적으로 Cyclin D2가 유방암에서 암 억제 기능(Tumor Suppressor Function)을 하는 것임을 알 수 있었으며, Cyclin D2의 Methylation Specific PCR(MSP) 방법을 이용하여 T-47D 유방암 세포주에서 Cyclin D2 프로모터의 CpG island에 메틸화로 인한 유전자의 silencing을 확인할 수 있었다(그림 1B). 이와 같은 결과로 인해 Cyclin D2가 G1 단계에서 S 단계로의 이동(transition)에 어떤 변화가 있을 거라 판단할 수 있게 되었다. 이를 알아보기 위해 Flow cytometry를 이용하여 각각에 대한 세포주기를 분석하였다. 시간이 지남에 따라 Cyclin D2 과다 발현 T-47D 유방암 세포주에서 현저하게 apoptosis현상이 일어남으로 인해 세포의 성장억제 기능을 보여줌을 알 수 있었으며(그림 4), 더나가 Diamidino phenylindol(DAPI) 염색방법을 이용하여 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. Diamidino phenylindol(DAPI) 염색방법을 이용하여 본 대조군 세포(그림 5A)에서는 형태적으로 등

근 형태를 유지하고 있는 반면에, Cyclin D2를 과다발현시킨 T-47D 유방암세포주에서는 apoptosis의 전형적인 nuclear fragmentation과 다양한 크기의 apoptotic cell 형태를 보였으며(그림 5B), 대조군에 비해 Cyclin D2 발현에 따라 Cyclin D2 저 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony2)는 5.96%, Cyclin D2 고 발현 T-47D 유방암세포주(예, Colony3)에서는 15.63%의 apoptosis 세포의 수가 유의있게 증가되었다.

세포의 성장과 죽음은 성장신호(growth signal)들의 균형에 의해 이루어진다(Sekiguchi and Hunter, 1998). p27^{kip}은 세포성장 억제와 세포사멸을 유도한다(Katayose *et al.*, 1997; Sekiguchi and Hunter, 1998). p27^{kip}의 과다발현은 세포사멸을 유도하고 PARP cleavage 와 Cyclin B1의 파멸(degradation)을 일으킨다(Katayose *et al.*, 1997). p27^{kip} 단백질은 휴지기(G0)와 G1 단계에서 최고조에 달하다가 G1-S phase transition에서 감소한다(Kato *et al.*, 1994). p27^{kip}은 Cyclin D-cdk4, Cyclin E-cdk2 복합체들과 결합하여 cdk의 활성을 억제시킨다. 즉 Cyclin D-cdk4 복합체가 p27^{kip}와 결합하여 세 개로 이루어지는 복합체가 되어서 p27^{kip}에 의해 억제되었던 Cyclin E-cdk2 복합체들을 자유롭게 유리시킨다(Sherr *et al.*, 1995; Polyak *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994; Kato *et al.*, 1994). 유리된 Cyclin E-cdk2 복합체들은 Rb를 인산화시키며(Hinds *et al.*, 1992; Mittnacht *et al.*, 1994), 또한 p27^{kip}을 인산화시켜 ubiquitin에 의해 중재되는 단백질 분해(ubiquitin-mediated degradation)를 유도한다(Pagnao *et al.*, 1995; Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997). 본 실험의 결과를 토대로 유방암 세포주에 과다발현 시킨 Cyclin D2에 의해 유도된 apoptosis는 여러 메커니즘에 의해 발생할 수 있지만 Cyclin D2와 가장 관련이 큰 p27^{kip}에 의해 야기될 것으로 추측될 수 있다. 따라서 유방암 세포에서 Cyclin D2를 과다발현 시킴으로써 야기된 apoptosis의 메커니즘을 밝히기 위해 앞으로 유방암 세포에서 Cyclin D2와 p27^{kip}의 관계를 규명해야 할 것이며 그 외에 어떤 다른 메커니즘에 의해 apoptosis가 야기되는지 연구되어야 할 것이다. 또한 더 나아가 *in vivo* 실험을 통하여 Cyclin D2의 기능과 그와 관련된 여러 유전자와의 메커니즘을 규명해야 할 것이다.

참고문헌

- Affrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansoorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999): Direct induction of Cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.*, **18**, 5321-5333.
- Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley, H.J., Ansoorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M. (1999): Direct induction of Cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *EMBO J.*, **18**, 5321-5333.
- Buckley, M.F., Sweeney, K.J.E., Hamilton, J.A., Sini, R.L., D.L., Nicholson, R.I., deFazio, A., Watts, C.K.W., Musgrove Manning, E.A. and Sutherland, R.L. (1993): Expression and amplification of Cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, **8**(8), 2127-33.
- Charles, J., Sherr. (1996): *Cancer Cell Cycles. Science*, **274**, 1672-1677.
- Courjal, F., Louason, G., Speiser, P., Katsaros, D., Zeillinger, R. and Theillet, C. (1996): Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of Cyclin D1 in breast and Cyclin E in ovarian tumors. *Int J Cancer*, **22**; **69**(4) 247-53.
- Evron, E., Umbricht, C.B., Korz, D., Raman, V., Loeb, D.M., Niranjani, B., Buluwela, L., Weitzman, S.A., Marks, J., and Sukumar, S. (2001): Loss of Cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res.*, **61**, 2782-2787.
- Grana, X. and Reddy, E. (1995): Cell cycle control in mammalian cells; role of Cyclins, Cyclin-dependent kinases(cdk), growth suppressor genes and Cyclin-dependent kinase inhibitors(CKIs). *Oncogene*, **11**, 211-219.
- Han, E.K., Begemann, M., Sgambato, A., Soh, J.W., Doki, Y., Xing, W.Q., Liu, W., and Weinstein, I.B. (1996): Deregulated expression of Cyclin D1 and other cell cycle-related genes in carcinogen-induced rat mammary tumors. *Cell Growth Differ.*, **7**, 699-710.
- Han, E.K., Sgambato, A., Jiang, W., Zhang, Y.J., Santella, R.M., Doki, Y., Cacace, A.M., Schieren, I. and Weinstein, I.B. (1995): Stable overexpression of Cyclin D1 in a human mammary epithelial cell line prolongs the S-phase and inhibits growth. *Oncogene*, **10**, 953-961.
- Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992): Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human Cyclins. *Cell*, **70**, 993-1006.
- Hunter, T. and Pines, J. (1994): Cyclin and cancer: Cyclin D and cdk inhibitors come of age. *Cell*, **79**, 573-582.
- Janz, S., Jones, G.M., Muller, J.R. and Potter, M. (1995): Illegitimate recombinations between c-myc and immunoglobulin loci are remodeled by deletions in mouse plasmacytomas but not in Burkitt's lymphomas. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **194**, 373-380.
- Kamb, A. (1995): Cell-cycle regulators and cancer. *Trends Genet.*, **11**(4), 136-140.
- Katayose, Y., Kim, M., Pakkar, A.N.S., Li, Z., Cowan, K.H. and Seth, P. (1997): Promoting apoptosis: a novel activity associated with the Cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer research*, **57**, 5441-5445.
- Kato, J., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. and Sherr, C.J. (1994): Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an

- inhibitor (p27kip1) of Cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell*, **79**, 487-496.
- Kichiki, H., Saino, M., Nobukuni, T., Yasuda, J., Maruyama, T., Kayama, T., Murakami, Y. and Sekiya, T. (2000): Detection of amplification of a chromosomal fragment at 6p21 including the Cyclin D3 gene in glioblastoma cell line by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer*, **85**, 113-116.
- Lukas, J., Bartkova, J., Welcker, M., Petersen, O.W., Peters, G., Strauss, M. and Bartek, J. (1995b): Cyclin D2 is a moderately oscillating nucleoprotein required for G1 phase progression in specific cell types. *Oncogene*, **10**, 2125-2134.
- Mendelsohn, A.R., Hamer, J.D., Wang, Z.B. and Brent, R. (2002): Cyclin D3 activates Caspase 2, connecting cell proliferation with cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, **14**, **99**(10), 6871-6.
- Mittnacht, S., Lees, J.A., Desai, D., Harlow, E., Morgan, D.O. and Weinberg, R.A. (1994): Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *EMBO J.*, **13**, 118-127.
- Murray, A.W. (1992): Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, **349**, 603-608.
- O'Connell, M.J. and Nurse, P. (1994): How cells know they are in G1 or G2. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**, 867-871.
- Pagano, M., Tam, S.W., Theodoras, A.M., Beer-Romano, P., Dal Sal, G., Chau, V., Yew, P.R., Draetta, G.F. and Rolfe, M. (1995): Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the Cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, **269**, 682-685.
- Pagano, M., Theodoras, A.M., Tam, S.W. and Draetta, G.F. (1994): Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev.*, **8**, 1639-1639.
- Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staeger, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., Polack, A. and Eick, D. (2000): Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *Int. J. Cancer*, **15**, **87**(6), 787-93.
- Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A. and Land, H. (1999): Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *EMBO J.* **18**, 5310-5320.
- Pestka, S., Langer, J.A., Zoon, K.C. and Samuel, C.E. (1987): Interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 727-777.
- Peter, M. and herkowitz, I. (1994): Joining the complex: Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell*, **79**, 181-184.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J. M. and Koff, A. (1994): p27Kip1, a Cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.*, **8**, 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. and Massague, J. (1994): Cloning of p27Kip1, a Cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- Said, T.K. and Medina, D. (1998): Interaction of retinoblastoma protein and D Cyclins during cell-growth inhibition by hexamethylenebisacetamide in TM2H mouse epithelial cells. *Mol. Carcinog.*, **22**, 128-143.
- Sheaff, R., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J. and Clurman, B. (1997): Cyclin E-cdk2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.*, **11**, 1464-1478.
- Sherr, C.J. (1994): G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*, **79**, 551-555.
- Sherr, C.J. (1995): D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 187-190.
- Scinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Parker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., Eppig, J.J., Bronson, R.T., Elledge, S.J. and Weinberg, R.A. (1996): Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature (Lond.)*, **384**, 470-474.
- Sekiguchi, T. and Hunter, T. (1998): Induction of growth arrest and cell death by overexpression of the Cyclin-cdk inhibitor p21 in hamster BHK21 cells. *Oncogene*, **16**, 369-380.
- Steeg, P.S. and Zhou, Q. (1998): Cyclins and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, **52**, 17-28.
- Sweeney, K.J., Sarcevic, B., Sutherland, R.L. and Musgrove, E.A. (1997): Cyclin D2 activates cdk2 in preference to Cdk4 in human breast epithelial cells. *Oncogene, Mar 20*; **14**(11), 1329-40.
- Takano, Y., Kato, Y., van Diest, P.J., Masuda, M., Mitomi, H. and Okayasu, I. (2000): Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and Cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am. J. Pathol.*, **156**(2), 585-94.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996): The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **93**, 2239-2244.
- Vlach, J., Hennecke, S. and Amati, B. (1997): Phosphorylation-dependent degradation of the Cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* **16**, 5334-5344.
- Wang, Z., Zhang, Y., Kaman, D., Lees, E. and Ravid, K. (1995): Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood*, **86**, 3783-3788.
- Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-330.
- Yosogawa, Y., Takamo, Y., Okayasu, I. and Kakita, A. (1998): *Pathol. Int.*, **48**, 717-722.
- Yu, J., Miehke, S., Ebert, M.P., Szokodi, D., Wehvnignh, B., Malfertheiner, P., Ehninger, G. and Bayerdoerffer, E. (2002): Expression of Cyclin genes in human gastric cancer and in first degree relatives. *Chin Med. J(Engl.)*, **115**(5), 710-5.
- Zhang, P. (1999): The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 655-662.