

## KGN(난소과립세포)에서 BCL2L10 단백질의 세포사멸 유도 기능 연구

김재홍<sup>1</sup> · 이경아<sup>2</sup> · 배지현<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>차의과학대학교 약학대학 약학과, <sup>2</sup>차의과학대학교 의생명과학대학 의생명과학과

### BCL2L10 Protein Induces Apoptosis in KGN-Human Granulosa Cells

Jae-Hong Kim<sup>1</sup>, Kyung-Ah Lee<sup>2</sup> and Jeehyeon Bae<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Pharmacy, College of Pharmacy, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Biomedical Science, College of Biomedical Science, CHA University, Seoul 135-081, Korea

**ABSTRACT** : BCL-2 family essential proteins to play a pivotal role to perform in apoptosis signaling pathways and essential proteins for the regulation of cell death. BCL2L10 protein is a member of BCL-2 family and it regulates both anti-apoptotic and pro-apoptotic function of specific tissue or cell line. BCL2L10 of function and expression is not reported in ovary cell lines. In this study we reported that BCL2L10 were significant expression of KGN cell line. Ectopic expression of BCL2L10 induced cell death, and its cells killing effect was blocked by pan-caspase inhibitor of the Z-VAD-fmk. Ectopic expression of BCL2L10 protein led to the activation of caspase 9 and caspase 3, suggesting apoptotic cell death, and confocal microscopic analyses showed that BCL2L10 was partially localized in mitochondria. Thus, we provide a novel function of BCL2L10 in KGN cells, which was involved in the intrinsic cell death pathway.

**Key words** : Apoptosis, BCL2 family, BCL2L10, Granulosa tumor cell (KGN)

**요 약** : BCL-2 family 단백질들은 세포사멸 신호전달 체계에서 중추적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있으며, BCL2L10 단백질은 그 중 하나로 세포의 사멸과 생존을 조절하는 것으로 알려져 있다. 특히하게도 BCL2L10 단백질은 세포 또는 조직 특이적으로 서로 상반되는 친 세포사멸 또는 항 세포사멸 효과가 각각 보고되어 있다. 현재까지 난소세포에서의 BCL2L10의 발현 여부 및 기능은 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서 인간 난소 과립세포주인 KGN 세포에서의 BCL2L10 단백질의 발현 여부를 확인한 결과, 상당한 양의 단백질이 발현함을 확인할 수 있었으며, 또한 세포사멸 효과를 확인하기 위해서 BCL2L10 단백질을 dose-dependent하게 과발현시킨 후 세포의 생존에 미치는 영향을 분석한 결과, BCL2L10은 KGN 세포에서 과발현 시 세포사멸을 유도함을 관찰하였다. BCL2L10 단백질을 과발현 시 Caspase 9와 3를 활성화 하였으며, 면역염색법을 통해서 BCL2L10 단백질이 미토콘드리아에 위치하는 것을 확인하였다. 또한 BCL2L10 단백질의 과발현에 의해 미토콘드리아에서 cytochrome *c*가 세포질로 분비되는 것을 확인하였다. 이상의 결과로서 본 연구는 BCL2L10의 과발현이 KGN 세포에서 세포사멸을 유도하고, 또한 미토콘드리아에 위치하여 세포질로 cytochrome *c*를 분비하여 Caspase 9와 3를 활성화 시키는 메커니즘으로 세포사멸을 유도함을 확인하였다. 이러한 연구결과는 BCL2L10 단백질이 인간 난소과립세포의 생존과 사멸을 조절하는 인자임을 최초로 규명한 것으로서, 추후 난소에서의 BCL2L10 단백질의 생리적인 기능 및 신호 조절 연구의 기반 데이터로서 그 의의가 있으며 활용될 수 있다.

## 서 론

그 동안 진행된 활발한 연구를 통해서 현재까지 사람에게서 약 20종이 넘는 BCL-2 패밀리 단백질 구성원이 클로닝되었다. 이러한 BCL-2 패밀리 단백질은 세포 apoptosis 신

호전달 체계에서 중추적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 이들 패밀리 구성원들은 모두 공통적으로 BH(BCL-2 homology) 도메인을 소유하고 있다. BCL2L10 단백질은 1998년 클로닝되었다(Song et al., 1999). Bcl-B, Diva 또는 Boo의 서로 다른 이름으로 알려져 있으며, Bcl-2 패밀리단백질중의 하나이고, 친 세포사멸 단백질(Inohara et al., 1998; Kang et al., 2007; Kim et al., 2009) 또는 항 세포사멸 단백질(Ke et al., 2001; Song et al., 1999; Zhang et al., 2001)의 세포

\* 교신저자: 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지 차의과학대학교 약학대학 약학과. (우) 463-836, (전) 031-725-8377, (팩) 031-725-8350, E-mail: jeehyeon@cha.ac.kr

마다 서로 다른 기능을 한다. 세포사멸을 유도하는 pathway는 크게 두 가지 extrinsic pathway와 intrinsic pathway 두 가지로 나누어지며, 미토콘드리아는 intrinsic pathway에 의한 세포사멸 신호전달에서 중요한 역할을 담당한다. 또한 BAX, BAK 단백질이 미토콘드리아에서 중합체를 형성하여 미토콘드리아의 membrane potential의 변화를 유도하여 세포질로 cytochrome c를 분비하여 caspase 9와 3을 활성화시켜 세포사멸을 유도한다.

Bcl-2 패밀리의 단백질의 난소 발달단계에서의 연구는 많이 진행되었으며, 이중 Mcl-1 mRNA와 단백질은 인간 난소에서 매우 높은 단계로 발현되는 것이 확인되었으며, 각각의 발현 단계별로 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다(Hartley et al., 2002; Jurisicova et al., 2003; Simmons et al., 2008). 본 연구에서는 또 다른 Bcl-2 패밀리의 단백질인 BCL2L10 단백질의 전사체 연구를 통해서 다른 기관에서 많이 발현하지 않으며, 특히 인간 또는 마우스의 난소에서 다량으로 발현하는 것으로 밝혀져 있으며(Assou et al., 2006; Grondahl et al., 2007; Hamatani et al., 2004; Ke et al., 2001), 또한 BCL2L10 단백질의 난소에서의 발현 양상이 진화적으로 척추동물에서 매우 보존적인 것을 관찰하였다(Hamamah et al., 2006). 이러한 BCL2L10 단백질을 마우스 난소에서 RNAi 방법을 사용하여 knock-down하였을 때 크로모솜과 대칭축의 비정상적 표현형을 관찰하였으며, cell cycle이 metaphase I 단계에서 멈추는 현상을 관찰할 수 있었다(Yoon et al., 2009).

본 연구자는 선행 연구를 통해서 BCL2L10 단백질이 endocytosis와 antin-assembly에 연관된 단백질인 HIP1R와 결합을 하며, 293T 세포에서 BCL2L10 단백질의 과발현은 세포사멸을 유도하는 것을 보고하였다(Kim et al., 2009). BCL2L10 단백질의 난소발달단계에서의 기능연구를 위해서 본 연구자는 human granulosa tumor cell-KGN(Nishi et al., 2001)에서의 BCL2L10 단백질의 세포사멸 기능연구를 진행하였다. 이번 연구를 통해서 우리는 BCL-2 패밀리의 단백질 중의 하나인 BCL2L10 단백질 세포사멸유도 메커니즘이 human granulosa tumor cell 미토콘드리아가 관여하는 intrinsic pathway라는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 플라스미드 제작 및 클로닝

KGN cDNA를 주형으로 하여 1 X PCR 반응액(2.5 mM

MgCl<sub>2</sub>, 250 μM dNTP, 2.5 U의 재조합 Taq 중합효소) 100 μl를 각각 1 μM의 pc Flag BCL2L10 정방향 프라이머(5'-CTAGGATCCATGGACTACAAAGACGACGACGACA AAGTTGACCAGTTGCGGGG-3') 및 BCL2L10 역방향 프라이머(5'-CTAGAATTCTCATAATAATCGT-GTCCA)를 이용하여 1 X PCR 반응액에서 95°C에서 3분간 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 30초간 30회 반응시킨 다음, 72°C에서 10분간 연장하는 조건으로 PCR을 수행하여 PCR 산물을 얻었다. 이렇게 얻어진 PCR 산물들을 주형으로 하여 재조합 PCR을 수행하여 최종적으로 PCR 산물을 얻었다. 이때, pcFlag-BCL2L10 정방향 프라이머와 pcBCL2L10 역방향 프라이머를 사용하였으며, PCR 조건은 상기 프라이머쌍과 주형을 95°C에서 3분간 변성시키고, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초 및 72°C에서 1분간 30회 반응시킨 다음, 72°C에서 10분간 연장시켜 반응을 종결하였다. pcDNA3(Invitrogen, Calsbad, CA, U.S.A.)의 다중 클로닝 부위를 제한효소 BamHI EcoRI으로 처리한 다음, 앞서 얻어진 PCR 산물을 클로닝하여 재조합 플라스미드 pc Flag-BCL2L10를 얻었다. 이후 Sanger 방법을 통해 서열분석을 수행한 결과, 재조합 플라스미드 pcBCL2L10 염기서열을 갖는 DNA를 포함하고 있음을 확인하였다.

### 2. 세포주 및 세포배양

본 실험에서는 Human granulosa 세포(KGN)를 사용하였다. 세포배양액은 Dulbecco's Modified Eagle's-F12 Medium와 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Welgene, Daegu, Korea)을 사용하였으며, 10% fetal bovine serum(Welgene)과 1% penicillin-streptomycin 첨가하여 37°C 5% CO<sub>2</sub>의 환경 하에서 배양하였다.

### 3. 면역 형광 염색(Immunofluorescence)

BCL2L10이 세포내에서 어느 위치에 존재하는지 알아보기 위해서 면역형광염색을 실시하였다. 24-well 배양접시에 각 well마다 cover slip을 깔고 세포의 부착을 위해 0.1% poly-L-lysine(Sigma, St, Louis, MO, U.S.A.) 300 μl 넣고 15분간 반응 후 phosphate-buffered saline(PBS)를 이용하여 3회 세척한다. 이후 KGN 세포를 2.0×10<sup>4</sup> 숫자로 분주하여 37°C 5% CO<sub>2</sub>의 환경 하에서 배양하였다. 배양 후 Lipofectamine2000 형질감염 키트(Invitrogen)를 이용하여 300 ng의 pc Flag BCL2L10

DNA를 형질감염 시켰다. 37°C 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양 후 4% paraformaldehyde를 넣고 실온에서 15분간 고정 후 PBS로 3회 세척 후 0.2% triton-X100을 넣은 PBS에 15분간 반응시킨다. 이후 2% FBS가 함유된 PBS에 1시간 반응하여 비 특이적 반응을 억제하였다. Anti-BCL2L10 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A, #8740) 와 MitoTracker(Invitrogen, Calsbad, CA, U.S.A.)을 1:100으로 PBS-Tween 20 용액에 희석하여 실온에서 1시간 반응하였다. PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 2차 항체인 anti-goat 488 IgG (Invitrogen)을 1:1000으로 희석하여 실온에서 30분간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3차례 세척 후 mounting gel로 슬라이드 글라스에 고정하여 Zeiss LSM 510 META confocal fluorescence microscopy(Carl Zeiss, Gottingen, Germany)를 이용하여 세포를 관찰하였다.

#### 4. Western Blot

KGN 세포를 60 mm 배양접시를 사용하여 well 당  $1 \times 10^6$  세포에 4  $\mu$ g의 pc Flag BCL2L10 플라스미드 DNA를 Micro Porator MP-100(Invitrogen)를 이용하여 transfection한 뒤, DMEM/F12 medium에 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. scraper를 이용해 세포를 모은 다음, 모아진 세포를 4°C 5,000 rpm 3분간 원심분리 후 PBS로 세척하여준다. 모아진 세포에 100  $\mu$ l NP-40 용해 완충액(50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1% NP-40; Sigma)을 이용하여 단백질을 샘플링한다. Bicinchoninic acid(BCA)<sup>TM</sup>protein assay(Pierce, Rockford, IL, U.S.A.)을 이용하여 각 샘플을 정량하였다. 총 단백질을 SDS sample buffer(Tris-Cl pH 6.8, 2% SDS, 50% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 14.4 mM 2-mercaptoethanol; Sigma)와 혼합하여 100°C에서 10분간 끓인 후, SDS-PAGE 전기 영동을 실시하였다.

전기영동 후 gel을 PVDF membrane(Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K)에서 100V 전압 하에서 90분간 transfer를 실시하였다. Transfer가 끝난 후 5% Skim milk PBS-Tween 20으로 2시간 blocking하였다. Blocking 후 3% Skim milk PBS-Tween 20에 anti-Caspase9(Cell signaling, Danvers, MA, USA, #9502), anti-Caspase3(Cell signaling, #9662)를 1:1000 비율로 처리 후 4°C에서 12시간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 2차 항체인 anti-goat-rabbit IgG-horseradish peroxidase(Santa Cruz Biotechnology)

로 6시간 반응 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척한 후 Luminescence image analyzer(Fujifilm Life Science, Stamford, CT, U.S.A.)에서 단백질 발현을 관찰하였다. 동량의 단백질 정량을 위해서 anti-GAPDH(Ab Frontier, Korea)를 사용하여 확인하였다.

#### 5. 세포생존을 검사

KGN 세포를  $2.0 \times 10^4$  세포량으로 24-well 배양접시에서 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, pc Flag-BCL2L10을 단독으로, 총 DNA가 100, 300 및 500 ng이 되도록 MicroPorator MP-100(Invitrogen, USA)를 이용하여 transfection한 뒤, DMEM/F12 medium에 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이때, 50 ng의 녹색형광 단백질(green fluorescent protein, GFP)을 발현하는 플라스미드(Clontech, Mountain View, CA, U.S.A.)를 함께 형질감염시켜 24시간 후 GFP를 발현하는 세포만 카운팅하여 세포의 사멸 정도를 측정하였다. 또한 Caspase의 의존적인 세포사멸인지 확인하기 위해서 Z-VAD-fmk(caspase inhibitor)를 10  $\mu$ M 처리하여 세포생존율을 같은 방법으로 측정하였다.

#### 6. Apoptosis 세포분석

Apoptotic 세포를 분석하기 위해서 BCL2L10 단백질을  $1 \times 10^6$  세포에 2, 4  $\mu$ g DNA를 MicroPorator MP-100(Invitrogen)를 이용하여 transfection한 뒤 세포를 T/E로 수거하여 Aposcan<sup>TM</sup>(BioBud, Korea)를 이용하여 kit의 protocol대로 실험을 실시하였다.

#### 7. Cytochrome Crelease분석

KGN 세포에서의 cytochrome *c*의 release를 분석하기 위해서  $1 \times 10^6$  세포에 4  $\mu$ g의 pc Flag BCL2L10 플라스미드 DNA를 MicroPorator MP-100(Invitrogen, USA)를 이용하여 transfection한 뒤 digitonin을 사용한 fractions 방법을 사용하여(Arnoult, 2008) cytosol과 membrane fraction을 분리하여 각각 cytochrome crelease을 확인하였다.

#### 8. 통계학적 분석(Statistical Analysis)

세포생존율(cell viability)의 변화는 각 실험 시 triplicate로 3회 반복 실시하여 평균값 및 표준 오차를 계산하였다. 각 실험에서 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 통해 분석

하였으며, *p*-value 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 해석하였다.

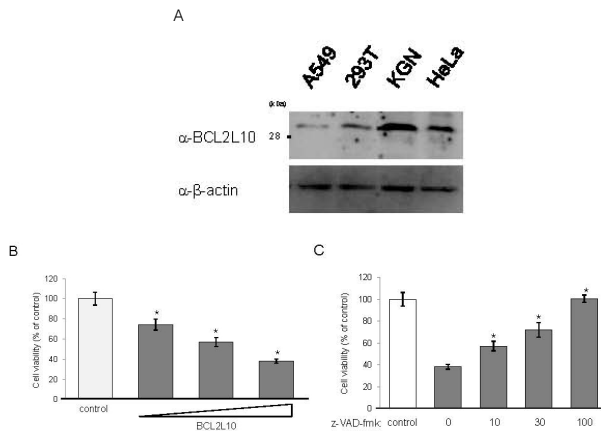
## 결 과

### 1. BCL2L10 단백질의 Granulosa Cells에서의 발현 패턴

BCL2L10 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해 Lung cancer cell(A549), Embryonic Kidney cell(293T), Granulosa cell tumor(KGN), Cervix cancer(HeLa)에서 웨스턴 블롯 실험을 진행하였으며, 실험결과 BCL2L10 단백질의 발현은 lung, kidney, cervix와 granulosa cell에서 발현하는 것을 확인할 수 있었으며, granulosa cell tumor(KGN)에서 다른 조직세포보다 더 많이 발현하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1A).

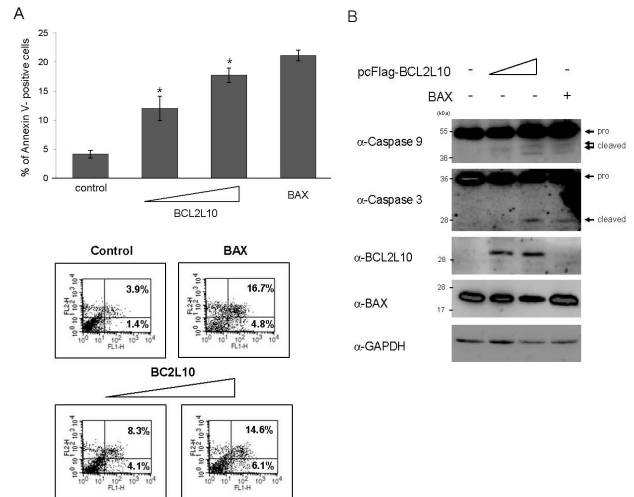
### 2. BCL2L10 단백질의 과발현에 따른 세포사멸 양상 확인

KGN 세포에서 BCL2L10 단백질의 세포사멸조절 기능을 확인하기 위해서 BCL2L10 플라스미드를 0, 100, 300, 500 ng 농도로 dose-dependent하게 electroporator로 transfection



**Fig. 1. BCL2L10 expressed in KGN cell and ectopic expression of BCL2L10 induced cell death.** (A) A549, KGN, 293T and HeLa cells were harvested in NP-40 lysis buffer and detection of endogenous BCL2L10 expression was assessed by immunoblot analyses with anti-BCL2L10 antibody. (B) KGN cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were transfected with 100 ng of BCL2L10 protein. After 24 hr incubation, the cell were harvested, counted with hemacytometer in GFP positive cells. (C) After transfected BCL2L10 plasmid, the cell were incubated Z-VAD-fmk (caspaseinhibitor) of 100  $\mu$ M concentration. 24 hr later, the cell were harvested, counted with hemacytometer in GFP positive cells.

하여 세포생존율을 측정하였다(Fig. 1B). BCL2L10 단백질의 발현량에 따라 KGN 세포가 사멸되는 효과를 확인하였다. BCL2L10의 발현에 의한 세포사멸이 Caspase 의존적인 세포사멸인지 확인하기 위해서 Caspase inhibitor인 Z-VAD-fmk를 BCL2L10이 발현하는 세포에 각각의 농도인 0, 10, 30, 100  $\mu$ M의 농도로 처리하여 세포생존율을 측정하였다(Fig. 1C). Z-VAD-fmk의 농도에 따라 세포사멸율이 감소하는 결과를 확인하였다. BCL2L10 과다 발현에 따른 생존율의 저하 현상이 세포예정사(apoptosis)에 의한 세포사멸인지를 확인하기 위하여 Annexin V-staining 방법을 통하여 확인하였다. BCL2L10 단백질을 4  $\mu$ g transfection한 실험군에서 동일한 양의 control 백터를 발현한 대조군에 비해서 3배 정도 많은 세포가 검출되었다(Fig. 2A). 또한 세포사멸단백질로 잘 알려진 BAX을 같은 농도로 transfection한 양에 비하여 절반 정도의 세포 수를 확인하였으며, 이는 BAX의 활성율이 절반 정도 되는 것을 확인할 수 있다.



**Fig. 2. BCL2L10 induced apoptosis through caspase dependent pathway.** (A) The cells ( $1.0 \times 10^6$ ) were transfected with total 4  $\mu$ g BCL2L10 plasmid DNA. Control cells were transfected with an empty vector. At 24hr post-transfection, cells were harvested and stained Annexin V for FACS analysis (B) KGN cells ( $1.0 \times 10^6$ ) were transfected with 4  $\mu$ g BCL2L10 plasmid DNA. After 24 hr incubation, the cell were harvested NP-40 lysis buffer and Activation of caspases was assessed by western blot analyses with anti-caspase 9 and anti-caspase 3. Expression of BCL2L10 proteins were determined by Western blotting with anti-BCL2L10 antibody.

**3. BCL2L10의 발현에 따른 KGN 세포에서의 Caspase 9, 3 활성 확인**

Caspase Inhibitor인 Z-VAD-fmk를 처리하였을 때 세포사멸 양상이 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 Caspase의 존적인 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다. 실질적인 Caspase의 활성을 확인하기 위해서 western blot 방법을 사용하여 Caspase 9과 Caspase 3의 활성을 확인하였다(Fig. 2B). BCL2L10 단백질을 농도 의존적으로 발현하였을 경우 Caspase 9와 3의 활성화 되어진 밴드를 확인할 수 있었다. 또한 BCL2L10의 발현에 따라 BAX 단백질의 양이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 Caspase의 활성은 세포괴사가 아닌 세포사멸(apoptosis)에 의한 pathway임을 확인하였다.

**4. BCL2L10 단백질의 위치 확인 및 Cytochrome c Release 측정**

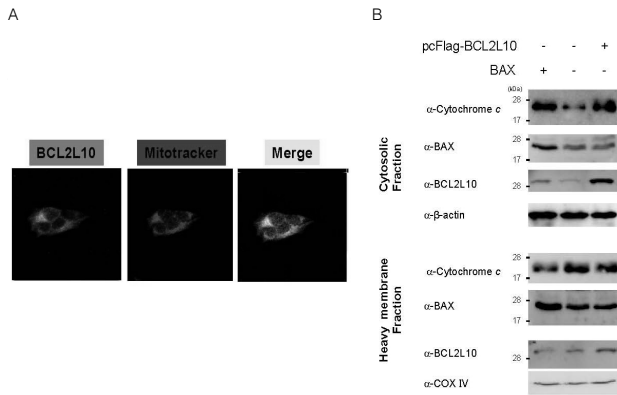
미토콘드리아의 기질막 전위의 차이에 의해서 기질막 파괴가 일어나며, 세포질로 cytochrome c의 분비가 촉진되고 caspase가 활성화 되는 것으로 보고되고 있다(Reers et al., 1995). 따라서 미토콘드리아는 세포사멸에서의 중요한 기관

으로 작용한다. 이러한 미토콘드리아와 BCL2L10의 세포에서 위치를 확인하기 위해서 세포면역염색실험을 진행하였다. BCL2L10를 293T 세포에서 과발현하였고, confocal fluorescent microscopy를 사용하여 BCL2L10의 위치를 확인하였으며 BCL2L10은 부분적으로 미토콘드리아에 존재하고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 또한 실질적으로 미토콘드리아에서 cytochrome c가 분비되는 것을 확인하기 위해서 digitonin을 사용하여 세포를 cytosolic fraction과 membrane fraction으로 나누어 cytochrome c가 세포질로 분비되는 것을 웨스턴 실험 방법으로 확인하였다(Fig. 3B).

**고 찰**

세포사멸(programmed cell death 또는 apoptosis)은 세포 교체, 조직 리모델링, 상해를 입은 세포의 제거에 있어 중요한 메커니즘이다(Thompson, 1995). BCL-2 패밀리는 세포사멸 억제와 촉진의 두 가지 효과로 나눌 수 있으며, 세포사멸 촉진 단백질(pro-apoptotic protein)로는 BAX, BAK, BIM, BID, HRK, NOXA이 있으며, 세포사멸을 억제하는 항-세포사멸 단백질(anti-apoptotic protein)로는 BCL-2, MCL-1L, BCL-W, Bfl-1이 있다. Bcl-2 패밀리는 BH3 도메인을 매개로 서로 이종 이합체(heterodimerization)를 형성함으로써 세포의 생존과 사멸을 조절하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2006). 특히, 친-세포사멸 Bcl-2 패밀리는 MCL-1L과 같은 항-세포사멸 Bcl-2 패밀리와 결합하여 항-세포사멸 단백질을 격리(sequester)시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Wang et al., 2007).

이번 연구를 통해서 human granulosa tumor cell line인 KGN 세포와 다른 조직세포에서의 BCL2L10 단백질 발현 양상(Fig. 1A)을 관찰하였으며, BCL2L10 단백질의 과발현이 세포 수 감소를 유도하는 것을 관찰하였다(Fig. 1B). 이러한 세포 수 감소의 원인이 세포사멸(apoptosis) 시그널 pathway 또는 세포괴사(necrosis)인지 확인하기 위해서 세포사멸의 실행자인 caspase inhibitor Z-VAD-fmk를 처리하여 세포생존을 측정하였고, 세포생존율이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 실질적인 세포사멸 마커인 Annexin V 염색방법을 사용하여 BCL2L10이 세포사멸을 유도하는지 다시 flow Cytometry 실험으로 확인하였다(Fig 2A). 또한 세



**Fig. 3. BCL2L10 released cytochrome c with localization in mitochondria and induced intrinsic apoptosis pathway in BAX, BAK protein.** (A) KGN cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were transfected 100 ng of BCL2L10. After 24 h of incubation, the cell were fixed, stained with anti-Flag antibody and Mito Tractor, and visualized using 488 rabbit anti-goat IgG. (B) The release of cytochrome c was assessed from KGN cells transfected with the same amount of the respective plasmids. The cytosolic and the heavy membrane fractions were separated and analyzed by western blotting with respective antibodies.

포사멸 양상이 caspase의 활성화에 인한 메커니즘인지 확인하기 위해서 웨스턴 방법을 사용하여 caspase 9, 3의 활성을 측정하였다(Fig 2B). 실험 결과 BCL2L10 단백질의 발현 양상에 따라서 caspase 9, 3의 활성화된 밴드를 확인할 수 있었다. SiRNA를 사용한 BCL2L10의 Gastric cancer cells에서 knock-down은 세포사멸을 유도하며, BAX의 발현량을 증가시킨다는 보고가 있으며(Guillemine et al., 2009), 이와 같이 Fig 2B의 KGN에서 BCL2L10 단백질 과발현에 따라서 BAX의 발현량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 BAX와 BCL2L10 단백질의 일방적인 상호작용이 아니라 서로 관여하는 상호작용을 하며, 이러한 현상을 이용 granulosa tumor 이상세포를 발견할 수 있는 biomarker로서 가능성이 있다. Caspase 9의 활성화는 미토콘드리아에서 분비된 cytochrome c가 caspase 9을 활성화한다(Li et al., 1997; Zou et al., 1999). 즉, BCL2L10이 미토콘드리아에 위치하며, cytochrome c를 분비하는지 확인하기 위해서 confocal microscope로 BCL2L10 단백질이 미토콘드리아에 위치하는지 확인하였으며(Fig. 3A), Digitonin을 사용한 세포분획방법을 사용 cytochrome c가 분비되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 세포사멸은 BAX, BAK 단백질 의존적으로 일어나며(Chipuk et al., 2006), 동종 이합체 또는 이종 이합체를 형성하여 세포사멸을 유도한다. 앞으로의 연구는 실질적으로 BCL2L10 단백질의 세포사멸 양상이 BAX, BAK의 이종이합체에 의해서 유도되는 것을 확인하여야 하며 난소의 발달에 미치는 영향을 확인하여야 한다.

BCL2L10 단백질은 MCF7세포에서 항 세포사멸 단백질로 연구가 되어 있으며, 과발현 시 세포사멸을 유도한다(Guillemine et al., 2009). 또한 Apaf-1과 결합하여 다른 단백질과 이종중합체를 형성 세포사멸을 조절한다고 연구되어 있다(Song et al., 1999). 그러나 본 연구자의 선행 연구에서는 BCL2L10 단백질의 과발현은 293T세포에서 Caspase 9, 3에 의한 세포사멸을 유도한다고 발표하였다(Kim et al., 2009). 이러한 서로 다른 세포사멸 양상을 가지는 이유는 BCL2L10 단백질을 발현하는 조직 또는 세포마다 단백질 구성요소가 다르기 때문이라고 생각되어진다. 또한 많이 발현한다고 알려진 인간 난소에서 연구에 어려움이 있어서 BCL2L10의 역할 또는 발현 연구가 인간 난소 세포에서는 활발하게 진행되어지지 않았다. 따라서 본 연구는 BCL2L10 단백질의 인간 난소 세포에서의 세포사멸 양상 패턴 및 메커니즘 확인을

위한 중요한 연구이다.

본 연구자는 이번 연구를 통해 KGN 세포에서 BCL2L10 단백질이 상대적으로 많이 발현하고 있었으며, 따라서 난소 발달단계에서 중요한 역할을 하는 granulosa cell에서의 BCL2L10의 세포사멸 연구를 수행하였으며, 본 연구자는 최초로 BCL2L10 단백질의 난소발달 과정에서의 역할을 규명하기 위한 human granulosa tumor cell line인 KGN 세포에서 BCL2L10이 미토콘드리아를 기반으로 하는 세포사멸 메커니즘 연구의 기초적 자료를 제시하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-314-E00120).

## 인용문헌

- Arnoult D (2008) Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. *Methods* 44:229-234.
- Assou S, Anahory T, Pantesco V, Le Carrouer T, Pellestor F, Klein B, Reyftmann L, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S (2006) The human cumulus-oocyte complex gene-expression profile. *Hum Reprod* 21:1705-1719.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR (2006) Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ* 13:1396-1402.
- de Moraes-Ruehsen M, Jones GS (1967) Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 18:440-461.
- Grondahl ML, Nielsen ME, Dal Canto MB, Fadini R, Rasmussen IA, Westergaard LG, Kristensen SG, Yding Andersen C (2007). Anti-Mullerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis. *Reprod Biomed Online*.
- Guillemine Y, Lalle P, Gillet G, François Guerin J, Hamamah S, Aouacheria A (2009) Oocytes and early embryos selectively express the survival factor BCL2L10.

- Mol Med 87:923-940.
- Hamamah S, Matha V, Berthenet C, Anahory T, Loup V, Dechaud H, Hedon B, Fernandez A, Lamb N (2006) Comparative protein expression profiling in human cumulus cells in relation to oocyte fertilization and ovarian stimulation protocol. *Reprod Biomed Online* 13:807-814.
- Hamatani T, Falco G, Carter MG, Akutsu H, Stagg CA, Sharov AA, Dudekula DB, VanBuren V, Ko MS (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 13:2263-2278.
- Hartley PS, Bayne RA, Robinson LL, Fulton N, Anderson RA (2002) Developmental changes in expression of myeloid cell leukemia-1 in human germ cells during oogenesis and early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3417-3427.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA (1997) Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 18:107-134.
- Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G (1998) Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem* 273:32479-32486.
- Juriscova A, Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF (2003) Expression of apoptosis-related genes during human preimplantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod* 9:133-141.
- Kang Y, et al (2007) NM23-H2 involves in negative regulation of Diva and Bcl2L10 in apoptosis signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 359:76-82.
- Ke N, Godzik A, Reed JC (2001) Bcl-B, a novel Bcl-2 family member that differentially binds and regulates Bax and Bak. *J Biol Chem* 276:12481-12484.
- Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8: 1348-1358.
- Kim JH, Yoon S, Won M, Sim SH, Ko JJ, Han S, Lee KA, Lee K, Bae J (2009) HIP1R interacts with a member of Bcl-2 family, BCL2L10, and induces BAK-dependent cell death. *Cell Physiol Biochem* 23:43-52.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17:525-535.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Melka M, Rings F, Holker M, Tholen E, Havlicek V, Besenfelder U, Schellander K, Tesfaye D (2010) Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of *In Vitro*-produced bovine pre-implantation embryos. *Reprod Domest Anim* 45(5):915-921.
- Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H (2001) Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 142: 437-445.
- Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, Chen LB (1995) Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol* 260:406-417.
- Shah SP, Kobel M, Senz J, Morin RD, Clarke BA, Wiegand KC, Leung G, Zayed A, Mehl E, Kalloger SE, Sun M, Giuliany R, Yorida E, Jones S, Varhol R, Swenerton KD, Miller D, Clement PB, Crane C, Madore J, Provencher D, Leung P, DeFazio A, Khattra J, Turashvili G, Zhao Y, Zeng T, Glover JN, Vanderrhyden B, Zhao C, Parkinson CA, Jimenez-Linan M, Bowtell DD, Mes-Masson AM, Brenton JD, Aparicio SA, Boyd N, Hirst M, Gilks CB, Marra M, Huntsman

- D (2009) Mutation of FOXL2 in granulosa-cell tumors of the ovary. *N Engl J Med* 360:2719-2729.
- Simmons MJ, Fan G, Zong WX, Degenhardt K, White E, Gelinas C (2008). Bfl-1/A1 functions, similar to Mcl-1, as a selective tBid and Bak antagonist. *Oncogene* 27: 1421-1428.
- Song Q, Kuang Y, Dixit VM, Vincenz C (1999) Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J* 18:167-178.
- Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Wang P, Yu J, Zhang L (2007) The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4054-4059.
- Yoon SJ, Kim EY, Kim YS, Lee HS, Kim KH, Bae J, Lee KA (2009) Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in Regulating Mouse Oocyte Maturation. *Biol Reprod* 81:497-506.
- Zhang H, Holzgreve W, De Geyter C (2001) Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 10:2329-2339.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X (1999) An APAF-1. cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556.
- 
- (Received 22 March 2011, Received in revised form 22 April 2011, Accepted 10 June 2011)