

Calpain Protease-dependent Post-translational Regulation of Cyclin D3

Won Deok Hwang¹ and Yung Hyun Choi^{2,3*}

¹Department of Internal Medicine, Donggeui University College of Korean Medicine, Busan 614-052, Korea

²Anti-Aging Research Center, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

³Department of Biochemistry, Donggeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, Korea

Received October 7, 2014 / Revised December 15, 2014 / Accepted January 10, 2015

Cyclin D is a member of the cyclin protein family, which plays a critical role as a core member of the mammalian cell cycle machinery. D-type cyclins (D1, D2, and D3) bind to and activate the cyclin-dependent kinases 4 and 6, which can then phosphorylate the retinoblastoma tumor suppressor gene products. This phosphorylation in turn leads to release or derepression of E2F transcription factors that promote progression from the G1 to S phase of the cell cycle. Among the D-type cyclins, cyclin D3 encoded by the *CCND3* gene is one of the least well studied. In the present study, we have investigated the biochemistry of the proteolytic mechanism that leads to loss of cyclin D3 protein. Treatment of human prostate carcinoma PC-3-M cells with lovastatin and actinomycin D resulted in a loss of cyclin D3 protein that was completely reversible by the peptide aldehyde calpain inhibitor, LLnL. Additionally, using inhibitors for various proteolytic systems, we show that degradation of cyclin D3 protein involves the Ca²⁺-activated neutral protease calpain. Moreover, the half-life of cyclin D3 protein half-life increased by at least 10-fold in PC-3M cells in response to the calpain inhibitor. We have also demonstrated that the transient expression of the calpain inhibitor calpastatin increased cyclin D3 protein in serum-starved NIH 3T3 cells. These data suggested that the function of cyclin D3 is regulated by Ca²⁺-dependent protease calpain.

Key words : Calpain, calpastatin, cyclin D3, proteolysis

서 론

진핵세포에서 세포주기의 진행은 다양한 cyclin-dependent kinase (Cdk)의 활성화와 비활성의 연속적 조절에 의하여 이루어진다. Cdks의 활성화는 세포주기 진행 동안 세포주기 특이적 cyclin 및 Cdk inhibitor들과의 복합체 형성을 통하여 조절된다[6, 14]. 진핵세포에서 대표적인 G1 cyclin은 cyclin D type (cyclin D1, D2 및 D3)과 cyclin E가 알려져 있다. D-type cyclin들은 G1 초기에 합성이 증가되거나 S기로의 전이를 촉진하는 인자들에 의하여 발현이 증가되어 Cdk4 또는 Cdk6와 복합체를 형성한다. 그들은 또한 retinoblastoma protein (pRB)의 인산화를 촉진시켜 G1기의 전이를 촉진한다. Cyclin 단백질들은 세포주기 의존적으로 축적되거나 분해되는데, 이러한 조절 기전은 다양한 전사조절인자에 의한 전사 및 번역 수준에서 조절된다[5, 9].

세포증식조절에 관여하는 단백질들이 세포 내 다양한 단백

질 분해효소에 의하여 번역수준에서 조절됨이 알려져 왔으나 그들의 발현 조절은 세포가 처한 환경 조건에 따라 선택적인 조절 수단을 가진다. 이런 측면에서 ubiquitin-proteasome pathway 및 calpain system으로 알려진 두 가지 단백질 분해 경로가 주목을 받아왔는데, ubiquitin 경로는 주로 세포 내 짧은 시간 동안 존재했다가 사라지는 단백질들의 주요 분해계로 알려져 있다. Ubiquitin 경로에 의한 단백질의 분해 과정은 ubiquitin이 표적 단백질에 conjugation 됨에 따라 이를 26S proteasome이 인식하여 분해한다[12, 21]. 최근의 연구 결과들에 따르면 세포주기 조절 단백질, 중앙 단백질, 중앙억제 인자 및 전사조절 단백질 등을 포함한 많은 세포 내 단백질들이 ubiquitin 경로의 기질 단백질임이 밝혀져 왔다[15, 21]. 한편 대표적인 비라이소좀 단백질 분해 효소인 cysteine 단백질 분해효소(neutral cysteine protease)인 calpain (EC 3.4.22.17)은 칼슘 의존적 효소(Ca²⁺-dependent protease) 활성을 가진다. 생리적 조건에서 뿐만 아니라 병리적 상태에서 calpain의 활성을 위해서는 칼슘의 동원이 요구되어야 하며, calpain은 세포 내 골격 및 막 단백질과 인산화효소 및 인산 가수분해효소와 특정 전사인자들을 포함하는 제한된 기질의 분해에 관여하는 생체조절자로 인식되고 있다[1, 8, 23].

최근 연구에 하면 D-type cyclin 중 cyclin D1은 세포 내 환경에 따라 ubiquitin 경로를 통하여 분해되기도 하지만, 칼슘 의존적 calpain system에 의해서도 번역 후 조절을 받는

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

것으로 알려져 있다[3, 4, 18, 23]. Cyclin D2 및 D3 역시 ubiquitin 경로가 주요 단백질 분해 과정으로 인식되어지고 있으나 [2, 17], 구체적인 기전은 아직 확실하지 않은 실정이다. 본 연구는 세포주기 조절 인자들의 번역 후 조절 기전 연구의 일환으로 cyclin D3이 현재까지 알려진 ubiquitin 경로가 아닌 calpain system에 의해서도 조절될 수 있음을 확인하기 위하여 실시되었다. 이를 위하여 다양한 단백질 분해효소 억제제와 calpain system 억제 인자를 활용하여 cyclin D3이 칼슘 의존적 calpain system에 의해 조절됨을 제시하였다.

재료 및 방법

시약 및 단백질 분해효소 억제제

본 연구를 위하여 사용된 actinomycin D와 cycloheximide, calpain과 proteasome 동시 억제제인 LLnL (calpains inhibitor I, N acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal), serine 단백질 분해효소 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 라이소좀 단백질 분해효소 억제제인 ammonium chloride과 chloroquine 및 순수 분리된 calpain은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 26S proteasome 선택적 억제제인 lactacystin은 Oncogene Research Products (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. Cystein 단백질 분해효소 억제제 E64 ((2S,3S)-3-Carboxyoxirane-2-carbonyl]-L-leucine (4-guanidinobutyl) amide hemihydrate) 및 E64d ((2S,3S)-trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-3-methylbutane ethyl ester)는 Taisho Pharmaceutical Co., Ltd. (Saitama, Japan)에서 구입하였다. Caspase 억제제들(ZVAD FMK, BD-FMK and ZFA-FMK)은 Enzyme Systems Products (Dublin, CA, USA)에서 구입하였다. 그 외 사용된 대부분의 시약들은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

세포배양

본 연구에 사용된 PC-3-M 전립선 암세포 및 NIH 3T3 섬유아세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 penicillin 및 streptomycin이 함유된 RPMI 1640 배지(Biofluids, Rockville, MD, USA)를 이용하여 36°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

단백질의 분리 및 Western blot analysis

단백질 발현 변화 분석을 위한 총 단백질은 25 mM Tris - Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetra acetic acid, 1% nonidet P-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 µg/ml leupeptin 및 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유된 lysis buffer를 이용하여 분리하였다. 분리된 단백질들의 농도를 측정 후, Western blot analysis를 위해 동량의

단백질들을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)으로 전이시켰다. 각각의 membrane을 적정 항체 및 Amersham Corp. (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입한 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 이용하여 단백질들의 발현 변화를 조사하였다. 본 실험에 사용된 1차 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) 및 Calbiochem (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며, 2차 항체들은 Amersham Corp.에서 구입하였다.

Calpain에 의한 cyclin D3의 *in vitro* 분해 조건

Cyclin D3이 calpain에 의하여 분해될 수 있는지의 확인을 위하여 정상 조건에서 배양된 PC-3-M의 총 단백질을 분리하여 30°C에서 순수 분리된 calpain과 반응시켰다. 1시간 반응 후 SDS sample buffer를 혼합하고 가열한 후 western blot analysis를 실시하였다.

Calpastatin 과발현 세포주의 작성

Calpastatin 과발현 세포주 제작을 위하여 PC-3-M 세포에 Lipofectamine (GIBCO/BRL, Grand Island, IL, USA)을 이용하여 calpastatin 발현 벡터(calpastatin plasmid in pC DNA 3 vector) 및 대조군 벡터(pC DNA 3 vector)를 transfection 시켰다[4]. Calpastatin-positive clone의 heterogeneous population을 얻기 위하여 G418이 함유된 배지에서 2개월간 배양하였다. 아울러 NIH-3T3 세포에도 동일 조건으로 calpastatin을 과발현시켰으며, green fluorescence protein (GFP) 발현 벡터(Clontech, Palo Alto, CA, USA)를 calpastatin 발현 벡터가 transfection된 NIH-3T3 세포에 다시 transfection 시켰다. 이들 세포에서 calpastatin의 발현 여부를 western blotting으로 확인한 후 실험에 사용하였다.

Immunocytochemistry

Calpastatin 및 GFP의 발현을 면역 형광법으로 확인하기 위하여 준비된 NIH-3T3 세포를 coverslip 위에 부착시켜 FBS가 정상적으로 존재하는 배지에 배양하거나, cyclin D3의 발현을 감소시키기 위하여 FBS가 없는 배지에 적정시간 동안 배양하였다. 이들 세포를 PBS로 3회 수세 후 3.7% formaldehyde를 이용하여 10분 동안 고정하고 polyclonal cyclin D3 항체 (1:500, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 및 Texas Red conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:100, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 염색하였다[4].

결과 및 고찰

PC-3-M 세포에서 lovastatin과 actinomycin D 처리에

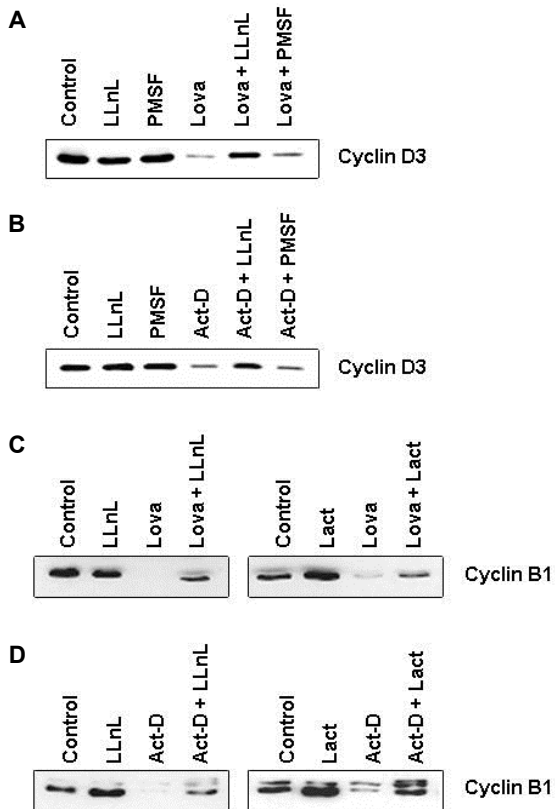


Fig. 1. Effect of calpain inhibitor (LLnL), proteasome inhibitor (lactacystin) and serine protease inhibitor (PMSF) on the levels of cyclin D3 protein in lovastatin and actinomycin D-treated PC-3-M cells. Cells were treated with LLnL (100 μ M), PMSF (1 mM), lovastatin (10 μ M) or actinomycin D (Act-D, 500 ng/ml) for 24 hr in the presence or absence of LLnL, PMSF or lovastatin for the final 12 hr. Total cellular proteins (30 μ g) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gels followed by western blotting using anti-cyclin D3 (A and B) and anti-cyclin B1 (C and D) antibodies, and an ECL detection system.

의한 cyclin D3 단백질의 소실에 미치는 calpain 및 proteasome 억제제의 영향

본 연구 수행을 위한 PC-3-M 세포에서 cyclin D3 단백질의 발현을 저해하는 수단으로 lovastatin과 actinomycin D를 사용하였다. Lovastatin은 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase의 억제제로서 콜레스테롤 합성과정에서 HMG-CoA에서 mevalonic acid로의 전환을 억제한다[7, 16]. 선행 연구들에서 lovastatin은 다양한 암세포의 증식을 세포주기 G1기에서 차단하는 효과를 가지는 것으로 알려져 있으며, 이는 D-type cyclin 단백질의 발현 차단과 연관성이 있다 [11, 13, 20]. Fig. 1A의 결과에서 알 수 있듯이 10 μ M의 lovastatin을 PC-3-M 세포에 처리했을 경우, cyclin D3의 발현은 36시간 후 거의 사라지게 된다. 아울러 PC-3-M 세포에서 500 ng/ml의 RNA 합성 억제제인 actinomycin D 처리에 의하여

cyclin D3의 발현 또한 유의적으로 감소되었다(Fig. 1B). 이러한 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3단백질의 분해가 단백질 분해효소 억제제에 의하여 차단될 수 있는지의 여부를 조사하기 위하여 peptide aldehyde calpain 및 프로테아좀 억제제인 LLnL과 serine 단백질 분해효소 억제제인 PMSF의 영향을 먼저 조사하였다. Fig. 1A 및 B의 결과에서 알 수 있듯이 LLnL은 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3 단백질의 분해를 효과적으로 차단하였지만 PMSF은 큰 영향을 미치지 못하였다.

다음은 lovastatin과 actinomycin D가 처리된 동일 조건에서 cyclin B1 단백질의 분해에 미치는 LLnL과 26S proteasome 억제제인 lactacystin의 영향을 조사하였다. Fig. 1C 및 D에서 알 수 있듯이 lovastatin과 actinomycin D가 처리된 PC-3-M 세포의 cyclin B1 발현은 거의 검출이 불가능하였으나, LLnL과 lactacystin은 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin B1 단백질의 분해를 효과적으로 차단하였다. 이러한 결과는 cyclin B1 단백질의 분해가 ubiquitin-proteasome pathway를 통하여 이루어지고 있다는 선행 결과들[10, 19]을 재확인함과 동시에 cyclin D3은 ubiquitin-proteasome pathway 뿐만 아니라 calpain system에 의해서도 조절 받을 수 있을 가능성을 보여주는 것이다.

Lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3단백질 분해에 미치는 cystein 단백질 분해효소 억제제, caspase 억제제 및 라이소좀 단백질 분해효소 억제제의 영향

다음은 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3 단백질의 소실이 다른 단백질 분해효소에 의하여 이루어지는지의 가능성을 조사하기 위하여 cystein 단백질 분해효소 억제제의 효과를 먼저 조사하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이, lovastatin이 처리된 PC-3-M 세포에서의 cyclin D1 소실이 LLnL 처리에 의하여 차단된 반면, cystein 단백질 분해효소 억제제인 E64 및 E64d의 처리에 의해서는 분해 억제 효과가 관찰되지 않았으며, 이는 actinomycin D 처리 조건에서도 유사하였다(Fig. 2B). 이는 PC-3-M 세포에서 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3 단백질의 소실에는 cystein 단백질 분해효소가 관여하고 있지 않음을 간접적으로 보여주는 결과이다.

한편 actinomycin D에 의한 암세포 증식억제는 caspase 효소 활성 의존적 apoptosis가 관여하는 것으로 잘 알려져 있으며, caspase 억제제를 처리할 경우 actinomycin D에 의한 apoptosis가 차단[22, 26]되기 때문에, actinomycin D에 의한 cyclin D3 단백질의 분해가 caspase 억제제에 의해서도 차단될 수 있는지의 여부를 조사하였다. Fig. 2C의 결과에서 알 수 있듯이 caspase의 활성 저해가 actinomycin D에 의한 cyclin D3의 소실은 차단하지 못하였다. 또한 그에 대한 상세한 기전은 아직 알려져 있지 않으나 최근 연구에 의하면 lovastatin에

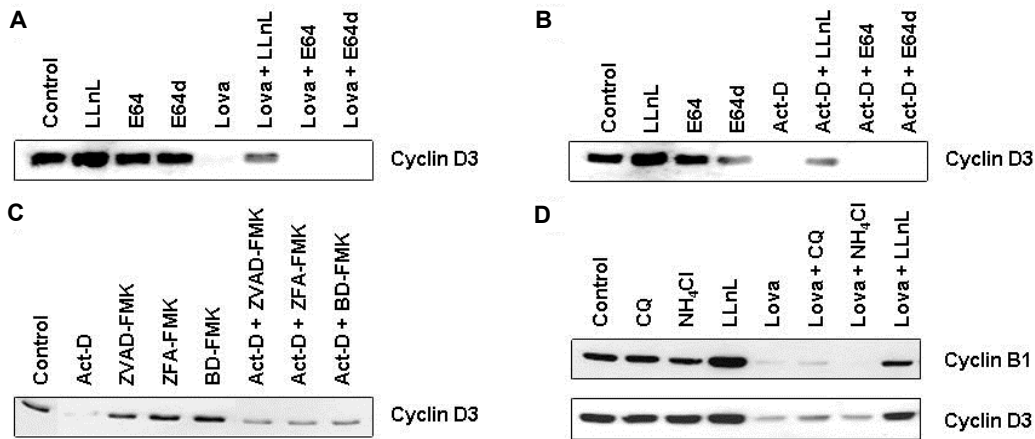


Fig. 2. Effect of calpain inhibitor (LLnL), cysteine protease inhibitors (E64 and E64d), caspase inhibitors (ZVAD-FMK, ZFA-FMK and BD-FMK) and lysosomal inhibitors (chloroquine and ammonium chloride) on the levels of cyclin D3 protein in lovastatin and actinomycin D-treated PC-3-M cells. Cells were treated with LLnL (100 μ M), E64 (10 μ M), E64d (10 μ M), ZVAD-FMK (100 μ M), ZFA-FMK (100 μ M), BD-FMK (100 μ M), chloroquine (CQ, 100 μ M) and ammonium chloride (NH₄Cl, 2.5 mM) for 24 hr in the presence or absence of LLnL, E64, E64d, ZVAD-FMK, ZFA-FMK, BD-FMK, chloroquine or ammonium chloride. Total cellular proteins (30 μ g) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gels followed by western blotting using anti-cyclin D3 (A-D) and anti-cyclin B1 (D) antibodies, and an ECL detection system.

의한 apoptosis에는 autophagy가 동반됨이 확인이 된 바 있다 [24, 25]. 따라서 lovastatin에 의한 autophagy의 억제가 cyclin D3 단백질의 분해 또한 차단시킬 수 있을 지의 가능성을 조사하기 위하여 동일 조건에서 라이소좀 활성 억제제인 ammonium chloride와 chloroquine을 적용시킨 결과, lovastatin에 의한 cyclin D3의 소실뿐 만 아니라 cyclin B1 분해도 차단하지 못하였다(Fig. 2D). 이상의 결과는 PC-3-M 세포에서 cyclin D3의 분해가 caspase의 효소적 활성화 및 autophagy 유도 경로와는 연관성이 없음을 보여주는 것이다.

Calpain에 의한 PC-3-M 세포 cyclin D3 단백질의 분해

이상의 결과에서 cyclin D3 단백질의 내재적 조절인자로서 calpain이 관여할 가능성이 높았기 때문에 cyclin D3단백질이 세포 내 라이소좀 비의존적이면서 칼슘 의존적 endopeptidase인 calpain의 직접적인 기질 단백질로 작용할 수 있는지를 조사하였다. 이를 위하여 PC-3-M 세포의 단백질을 분리하여 칼슘이 있는 조건과 없는 조건을 설정하여 calpain과 반응을 시켰다. Fig. 3A의 결과에서 알 수 있듯이, 칼슘(CaCl₂)이 존재하지 않을 경우 calpain과 반응시킨 단백질에서 cyclin D3 단백질의 발현은 대조군에 비하여 큰 차이를 보이지 않았으나, 칼슘의 농도 증가에 따라 cyclin D3 단백질의 발현이 점차 감소하여 6.0 mM의 CaCl₂이 존재하는 조건에서 반응시킨 단백질에서는 cyclin D3의 발현을 검출하기 어려워 calpain의 최고 활성화 CaCl₂의 농도를 6.0 mM로 선정하였다. 다음은 cyclin D3 단백질의 분해가 칼슘 의존적으로 이루어지는지를 재확인하기 위하여 6.0 mM CaCl₂ 조건에서 칼슘 침착제(calcium chelator)인 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)가 존재할 경

우 calpain에 의한 cyclin D3이 분해될 수 있는지의 여부를 확인하였다. 본 연구의 결과에 의하면, 칼슘이 존재하는 조건에서 EGTA가 처리될 경우, cyclin D3 단백질의 발현은 대조군 수준으로 유지되어 calpain에 의한 cyclin D3 단백질의 분해가 칼슘 의존적으로 이루어지고 있음을 보여주었다(Fig. 3B). 아울러 칼슘이 존재하더라도 열처리에 의하여 불활성화된 calpain을 첨가할 경우 cyclin D3의 분해는 나타나지 않았으며, EGTA가 존재하지만 칼슘이 없는 조건에서도 cyclin D3의 발현은 그대로 유지되었다. 이러한 결과는 cyclin D3 단백질이 칼슘 의존적 calpain 매개 단백질 가수분해(Ca²⁺-dependence calpain-mediated proteolysis)의 기질로 작용하고 있음을 의미한다.

PC-3-M 세포에서 cyclin D3의 안정성에 미치는 LLnL의 영향

만약 cyclin D3 단백질이 *in vivo* 수준에서 calpain에 의하여 분해가 일어난다면 calpain의 활성을 억제할 경우 cyclin D3 단백질의 안정성이 감소될 것으로 기대될 것이다. 이를 확인하기 위하여 LLnL이 처리된 조건에서 배양된 PC-3-M 세포의 cyclin D3 단백질 반감기(half-life)를 대조군과 비교하였다. Fig. 4A는 LLnL을 처리하거나 처리되지 않은 조건에서 12시간 배양된 PC-3-M 세포에 단백질 합성 억제제인 cycloheximide를 처리하지 일정 시간 배양하여 얻은 단백질을 분리하여 cyclin D3 단백질의 반감기를 비교한 결과로서, LLnL이 존재하지 않을 경우 cyclin D3 단백질의 발현이 cycloheximide처리 6시간 이후부터 급격하게 감소하기 시작하였다. 그러나 LLnL을 선처리하였을 경우, cyclin D3 단백질의

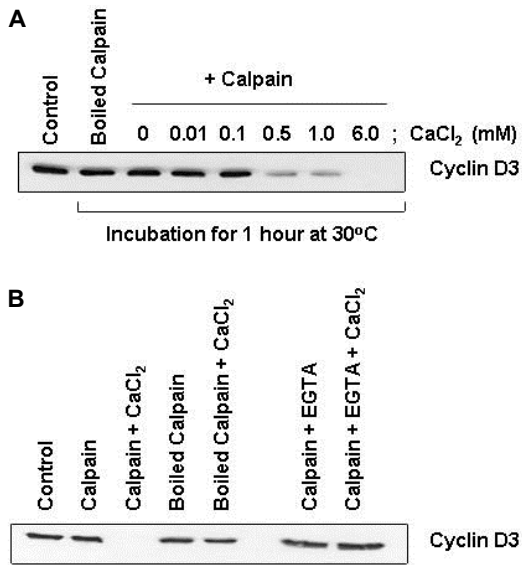


Fig. 3. *In vitro* degradation of cyclin D3 by purified calpain in PC-3-M cells. Cell lysates isolated from PC-3-M cells were incubated for 1 hr at 30°C with purified calpain or boiled-calpain in the presence or absence of 6 mM CaCl₂ (A) or 10 mM calcium chelator, EGTA, with or without CaCl₂ (B). For determination of cyclin D3 protein levels, equal amounts of cell lysate were used for Western blot analysis using anti-cyclin D3 antibody and an ECL detection system.

발현은 48시간 이후부터 다소 감소되기 시작하여 cyclin D3의 반감기가 최소한 10배 이상 증가하였음을 알 수 있었다. 아울러 동일 조건에서 cyclin D1 및 D2의 반감기도 LLnL 선처리에 의한 매우 증가되어 D-type cyclin 단백질들이 calpain의 활성 억제에 의하여 안정성이 매우 증가됨을 알 수 있었으며, 이는 D-type cyclin 단백질들의 분해에 calpain system이 동시에 작용할 가능성을 보여주는 것이다.

Cyclin D3의 안정성에 미치는 calpastatin의 영향

Calpastatin은 세포 내 calpain의 대표적인 내인성 억제자 [27, 28]로 잘 알려져 있다. 따라서 cyclin D3이 calpain의 기질로서 작용한다면 calpastatin을 인위적으로 과발현 시켰을 경우 cyclin D3의 반감기가 증대될 것으로 추측할 수 있다. 이를 확인하기 위하여 calpastatin이 과발현된 PC-3-M 세포주를 작성하였으며, calpastatin이 정상적으로 transfection되었음을 확인(Fig. 5A)한 후, calpastatin이 과발현되거나 control vector가 삽입된 세포에 cycloheximide를 처리하여 cyclin D3 단백질의 반감기를 조사하였다. Fig. 5A의 결과에서 알 수 있듯이 calpastatin이 과발현된 세포에서 cyclin D3 단백질의 반감기는 약 3배 이상 증가되었다. 이는 cyclin D3 단백질이 calpain system에 의하여 번역 후 수준에서 조절받고 있음을 보여주는 추가적인 증거로 제시될 수 있는 결과이다.

이상의 결과들은 cyclin D3 단백질이 calpain의 기질로서 작용하고 있다는 구체적인 증거가 될 수 있으나, PC-3-M 세포라는 전립선 암세포에서 국한적으로 나타난 결과이다. 아울러 lovastatin이나 actinomycin D와 같은 인위적인 세포증식 억제제 처리에 의한 cyclin D3 발현의 억제를 보여주는 결과를 전반부에 제시하였다. 따라서 이러한 현상이 특정 화학물질의 처리가 아닌 생리적인 조건의 변화에 의한 cyclin D3 단백질의 분해에서도 유사하게 나타나는 현상인지의 여부를 NIH 3T3 섬유아세포를 대상으로 조사하였다. 이를 위하여 NIH 3T3 세포에 calpastatin cDNA 발현 벡터와 GFP 발현 벡터가 동시에 transfection 시킨 후 FBS가 첨가되지 않은 조건에서 24시간 배양 후 cyclin D3 단백질의 발현을 10% FBS가 첨가된 정상 조건에서 배양된 세포와 면역 형광법으로 비교하였다. Fig. 5C의 결과에서 알 수 있듯이, FBS가 첨가되지 않은 조건에서 배양된 NIH 3T3 세포에서 cyclin D3 단백질의 발현은 매우 감소되었으나 calpastatin이 과발현된 NIH 3T3 세포에서는 여전히 cyclin D3 단백질이 발현되고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 FBS가 존재하지 않은 경우 cyclin D3 단백질의 발현 감소가

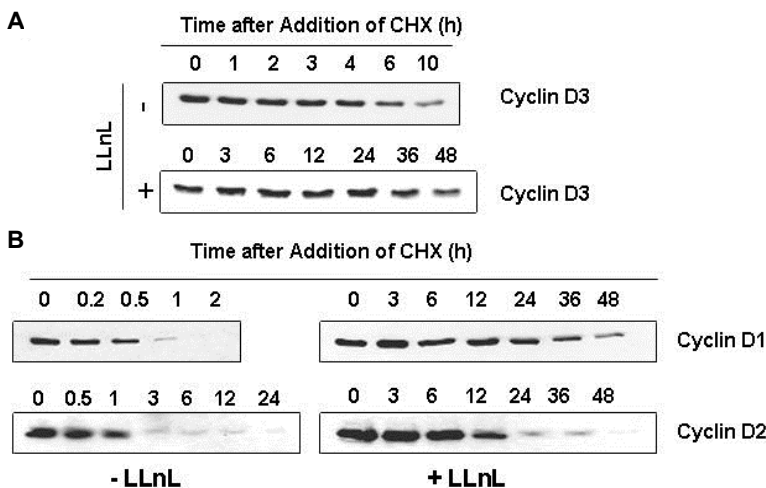


Fig. 4. Calpain inhibitor leads to stabilization of cyclin D3 protein in PC-3-M cells. Cells were grown in the absence or presence of LLnL for 12 hr and then cycloheximide (CHX, 100 µg/ml) was added for the times indicated, and the levels of cyclin D3 protein (A) or cyclin D1 and D2 (B) were determined by western blot analysis.

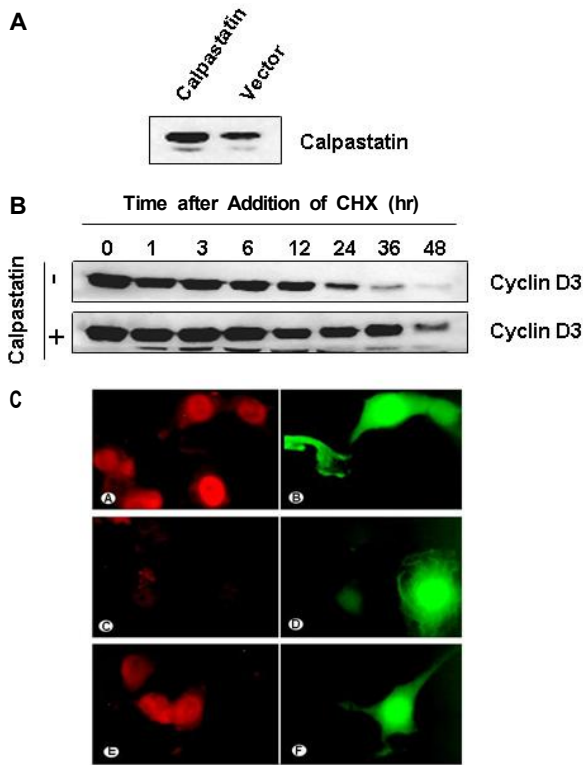


Fig. 5. Effect of calpastatin on loss of cyclin D3 protein. (A) PC-3-M cells were transfected with calpastatin cDNA expression vector or with the expression vector alone. Total cellular proteins (30 μ g) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gels followed by western blotting using anti-calpastatin antibody and an ECL detection system. (B) The cells were grown in the absence or presence of cycloheximide (CHX, 100 μ g/ml), and the levels of cyclin D3 protein were determined by Western blot analysis. (C) The level of cyclin D3 protein was also analyzed by immunocytochemistry in NIH 3T3 cells grown in serum containing medium (a and b) and compared with serum-starved cells (c and d), and serum-starved cells transfected with a calpastatin expression vector (e and f). The transfected cells were co-transfected with GFP.

calpastatin에 의하여 차단되었음을 보여주는 것으로 cyclin D3 단백질이 칼슘에 의해 활성화 되는 단백질 분해효소 calpain에 의해 조절됨을 보여주는 추가적으로 자료이다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 학술지원비(2014AA059)에 의하여 수행되었음.

References

1. Bertipaglia, I. and Carafoli, E. 2007. Calpains and human

disease. *Subcell. Biochem.* **45**, 29-53.

2. Bogner, C., Schneller, F., Hipp, S., Ringshausen, I., Peschel, C. and Decker, T. 2003. Cycling B-CLL cells are highly susceptible to inhibition of the proteasome: involvement of p27, early D-type cyclins, Bax, and caspase-dependent and -independent pathways. *Exp. Hematol.* **31**, 218-225.

3. Chen, F. Z. and Zhao, X. K. 2013. Ubiquitin-proteasome pathway and prostate cancer. *Onkologie* **36**, 592-596.

4. Choi, Y. H., Lee, S. J., Nguyen, P., Jang, J. S., Lee, J., Wu, M. L., Takano, E., Maki, M., Henkart, P. A. and Trepel, J. B. 1997. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 28479-28484.

5. Diaz-Padilla, I., Siu, L. L. and Duran, I. 2009. Cyclin-dependent kinase inhibitors as potential targeted anticancer agents. *Invest. New Drugs.* **27**, 586-594.

6. Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A. and Hunt, T. 2010. Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Adv. Enzyme Regul.* **50**, 375-399.

7. Farmer, J. A. and Torre-Amione, G. 2000. Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug. Saf.* **23**, 197-213.

8. Friedrich, P. 2004. The intriguing Ca^{2+} requirement of calpain activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 1131-1133.

9. Graf, F., Mosch, B., Koehler, L., Bergmann, R., Wuest, F. and Pietzsch, J. 2010. Cyclin-dependent kinase 4/6 (cdk4/6) inhibitors: perspectives in cancer therapy and imaging. *Mini. Rev. Med. Chem.* **10**, 527-539.

10. Huo, L. J., Fan, H. Y., Zhong, Z. S., Chen, D. Y., Schatten, H. and Sun, Q. Y. 2004. Ubiquitin-proteasome pathway modulates mouse oocyte meiotic maturation and fertilization via regulation of MAPK cascade and cyclin B1 degradation. *Mech. Dev.* **121**, 1275-1287.

11. Kim, J. S., Pirnia, F., Choi, Y. H., Nguyen, P. M., Knepper, B., Tsokos, M., Schulte, T. W., Birrer, M. J., Blagosklonny, M. V., Schaefer, O., Mushinski, J. F. and Trepel, J. B. 2000. Lovastatin induces apoptosis in a primitive neuroectodermal tumor cell line in association with RB down-regulation and loss of the G1 checkpoint. *Oncogene* **19**, 6082-6090.

12. Konstantinova, I. M., Tsimokha, A. S. and Mittenberg, A. G. 2008. Role of proteasomes in cellular regulation. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **267**, 59-124.

13. Lee, S. J., Ha, M. J., Lee, J., Nguyen, P., Choi, Y. H., Pirnia, F., Kang, W. K., Wang, X. F., Kim, S. J. and Trepel, J. B. 1998. Inhibition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53-independent transcriptional regulation of p21(WAF1/CIP1) in human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 10618-10623.

14. Lim, S. and Kaldis, P. 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* **140**, 3079-3093.

15. Mani, A. and Gelmann, E. P. 2005. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 4776-4789.

16. McKenney, J. M. 1998. Lovastatin: a new cholesterol-lowering agent. *Clin. Pharm.* **7**, 21-36.

17. Meinel, F. G., Mandl-Weber, S., Baumann, P., Leban, J. and Schmidmaier, R. 2010. The novel, proteasome-independent NF-kappaB inhibitor V1810 induces apoptosis and cell cycle arrest in multiple myeloma and overcomes NF-kappaB-mediated drug resistance. *Mol. Cancer. Ther.* **9**, 300-310.
18. Muşat, M., Vax, V. V., Borboli, N., Gueorguiev, M., Bonner, S., Korbonits, M. and Grossman, A. B. 2004. Cell cycle dysregulation in pituitary oncogenesis. *Front. Horm. Res.* **32**, 34-62.
19. Pomerantz, Y. and Dekel, N. 2013. Molecular participants in regulation of the meiotic cell cycle in mammalian oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* **25**, 484-494.
20. Rao, S., Lowe, M., Herliczek, T. W. and Keyomarsi, K. 1998. Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene* **17**, 2393-2402.
21. Roos-Mattjus, P. and Sistonen, L. 2004. The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann. Med.* **36**, 285-295.
22. Roulston, A., Reinhard, C., Amiri, P. and Williams, L. T. 1998. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 10232-10239.
23. Santella, L., Kyojuka, K., De Riso, L. and Carafoli, E. 1998. Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium.* **23**, 123-130.
24. Wasko, B. M., Dudakovic, A. and Hohl, R. J. 2011. Bisphosphonates induce autophagy by depleting geranylgeranyl diphosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**, 540-546.
25. Wojtkowiak, J. W., Sane, K. M., Kleinman, M., Sloane, B. F., Reiners, J. J. Jr. and Mattingly, R. R. 2011. Aborted autophagy and nonapoptotic death induced by farnesyl transferase inhibitor and lovastatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **337**, 65-74.
26. Yamada, M., Banno, Y., Takuwa, Y., Koda, M., Hara, A. and Nozawa, Y. 2004. Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.* **378**, 649-656.
27. Yoshida, H., Murachi, T. and Tsukahara, I. 1985. Distribution of calpain I, calpain II, and calpastatin in bovine lens. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**, 953-956.
28. Yoshimura, N., Tsukahara, I. and Murachi, T. 1984. Calpain and calpastatin in porcine retina. Identification and action on microtubule-associated proteins. *Biochem. J.* **223**, 47-51.

초록 : Calpain protease에 의한 cyclin D3의 post-translation조절

황원덕¹ · 최영현^{2,3*}

(¹동의대학교 내과학교실, ²동의대학교 항노화연구소, ³동의대학교 한의과대학 생화학교실)

칼슘 의존적으로 활성화되는 neutral protease calpain에 의한 단백질 분해는 세포의 성장을 조절하는데 중요한 단백질들의 역할에 매우 중요한 역할을 한다. Cyclin의 분해는 세포주기의 진행을 위한 필연적인 과정이다. D-type cyclins는 외부자극이나 신호에 의하여 세포주기의 G1 초기에 합성이 된 후 cyclin-dependent kinases (cdk4 및 cdk6)와의 결합하여 세포주기 S기 진입을 촉진하는 역할을 한다. 본 연구에서는 cyclin D3 단백질이 calpain protease에 의하여 번역 후 수준에서 조절 받고 있음을 제시하였다. 본 실험의 조건에서 lovastatin과 actinomycin D가 처리된 PC-3-M 전립선 암세포에서 cyclin D3 단백질의 발현이 완전히 사라졌지만, calpain inhibitor인 LLnL의 처리에 의하여 정상 수준으로 회복되었음을 알 수 있었다. 그러나 26S proteasome의 선택적 억제제인 lactacystin, lysosome 억제제인 ammonium chloride 및 chloroquine, serine protease 억제제인 PMSF는 동일 조건에서 lovastatin과 actinomycin D 처리에 의한 cyclin D3 단백질의 발현저하를 억제하지는 못하였다. *In vitro* 조건에서 순수 분리된 calpain은 cyclin D3 단백질을 칼슘 농도 의존적으로 분해하였으며, cyclin D3 단백질의 반감기는 LLnL 처리에 의하여 매우 유의적으로 증가되었다. 또한 calpain 저해인자인 calpastatin의 과발현은 PC-3-M 세포에서 뿐만 아니라 NIH 3T3 섬유아세포에서도 cyclin D3 단백질의 반감기 및 안전성을 증대시켰다. 이러한 결과는 cyclin D3 단백질이 칼슘에 의해 활성화 되는 protease calpain에 의해 조절됨을 보여주는 것이다.