

사람의 유방암 세포주인 MDA MB-231 세포에서 CpG 메틸화에 의한 Disabled-2 유전자의 발현억제

고명현 · 오유미 · 박준호 · 전병훈¹ · 한동민 · 김원신*

원광대학교 자연대학 생명과학부, ¹원광대학교 한의과대학 병리학교실

Received August 20, 2005 / Accepted October 10, 2005

Silencing of Disabled-2 Gene by CpG Methylation in Human Breast Cancer Cell Line, MDA MB-231 Cells. Myung Hyun Ko, Yu Mi Oh, Jun Ho Park, Byung Hoon Jeon¹, Dong Min Han and Won Sin Kim*. *Division of Biological Science, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk, ¹College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk* – Human Disabled-2 (Dab2) is a candidate tumor suppressor gene that regulates cell growth by c-Fos suppression in normal cells. In many cancer cells, Dab2 expression is lost or greatly diminished in ~85% of the breast and ovarian cancers. In this study, we have examined the methylation status of CpG island on Dab2 gene promoter using bisulfite-assisted genomic sequencing and methylation specific PCR (MSP) method in human breast cancer cell line, MDA MB-231 cells. In normal human uterus endometrial cells, Dab2 was completely unmethylated. In contrast, Dab2 was methylated on CpG dinucleotides near the TATA box in MDA MB-231 cells. Following MDA MB-231 cells by treatment with 5-azacytidine, Dab2 gene were demethylated and reexpressed. Result of this study suggested that silencing of Dab2 gene is correlated to CpG island methylation in human breast cancer cell line, MDA MB-231 cells.

Key words – Dab2, CpG island, DNA methylation

DNA methylation은 포유동물 세포 내의 유전자 발현을 조절하는 후천적인 기작(epigenetic mechanism)이다[27]. 인간을 비롯한 대부분의 포유동물에서 methylation은 CpG의 cytosine에서만 관찰된다. DNA methylation은 세포의 분화, genomic imprinting, X-염색체불활성화(X-chromosome inactivation), 노화(aging) 그리고 발암과정(carcinogenesis)과 같은 다양한 세포 기능의 조절에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다[24]. 암세포에서는 DNA의 CpG의 methylation은 methyl-CpG binding protein (MeCP)과 histone deacetylase (HDAC) 그리고 공동억제자인 mSin3A를 그 부위로 끌어들이 복합체를 형성하여 전사인자(transcription factor)의 복합체의 형성을 차단하게 함으로서 유전자의 전사(gene transcription)를 억제시키는 것으로 알려져 있다[4].

유전자의 promoter 영역 내에는 CpG의 빈도가 정상적인 빈도(~6%)보다 현저하게 높게 관찰되는 CpG island가 존재하고 인간의 유전자의 60% 이상이 CpG island를 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 CpG island가 methylation되면 그 유전자는 영구적으로 불활성화되고 이 불활성화 상태는 유사분열을 통하여 딸세포로 전달되게 된다[4].

인간의 CpG site의 70~80%는 methylation이 되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 이런 methylation의 대부분은 CpG의 빈도가 낮은 부위나 Alu element와 같은 반복서열이

존재하는 부위에서 일어나고 대부분의 CpG island는 methylation되어 있지 않다. 그러나 암세포주에서는 다양한 암억제 유전자(tumour suppressor genes)의 promoter 영역내의 CpG island가 hypermethylation되어 있고 이들 유전자의 전사가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 이런 유전자들의 CpG island의 methylation이 발암과정(carcinogenesis)에 깊게 연관되어 있는 것으로 추정되고 있다[3,10,20,23,24].

포유류의 Disabled-2 (Dab2)는 mitogen에 의해서 인산화되는 단백질(phosphoprotein)이다[26]. Dab2는 유방과 난소의 정상세포에서는 발현이 되지만, 약 85%의 유방과 난소의 종양세포에서는 발현이 줄어들거나, 발현이 완전히 억제되는 것으로 알려져 있다[8].

최근 연구에서 Dab2는 adaptor protein인 Grb2의 proline-rich domain (SH3 domain)과 결합하는 것으로 알려져 있으며, Dab2는 Grb2와 결합하기 위해 Sos와 경쟁하여 Grb2-Dab2 복합체를 형성한 후, growth factor/Ras 신호전달경로를 조절하는 것으로 추정되고 있다[24]. Extracellular signal-regulated kinases (Erk)로 알려진 mitogen-activated kinases (MAPK)는 Ras의 신호전달 경로에 있어서 중요한 하류의 표적이다. MAPK 전달경로는 세포 성장, 분화 그리고 발생 및 신경전달 경로에서 이용되고 있는 중요한 신호전달 체계중 하나이다. Ras와 MAPK는 혈청(serum)과 성장인자(growth factor)에 의해 활성화되고 이들 MAP kinase의 인산화에 의해서 c-Fos가 발현된다. 암세포에서 Dab2의 발현은 c-Fos의 발현을 억제하여 세포성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그렇

*Corresponding author

Tel : +82-63-850-6578, Fax : +82-63-857-8837

E-mail : wsnkim@wonkwang.ac.kr

지만 놀랍게도 Dab2는 MAPK의 활성을 억제하지는 않는 것으로 나타나 Ras/MAPK 신호전달체계에 의해서 c-Fos가 발현되는 경로와는 다른 경로를 통하여 c-Fos의 발현을 억제하여 세포성장을 조절하는 것으로 보인다[12,15,22]. 따라서, Dab2는 유방암과 난소암 세포에서 암 억제 유전자로 추정되어지고 있다. 이미 알려진 Rb, p15, p16, p53, p73, VHL, maspin과 같은 암억제 유전자는 여러 종류의 세포주에서 모두 promoter부위의 많은 CpG에 methylation이 되어있음이 이미 보고되어 있다[9,13,16,21].

따라서, 본 연구에서는 인간의 유방암 세포주에서 암억제 유전자로 추정되는 human Dab2유전자의 promoter부위를 bisulfite 반응에 의한 염기서열분석법과 methylation-specific PCR (MSP) 방법 등을 이용하여 유방암세포주인 MDA MB-231 세포에서 분석하여 암세포에서 Dab2의 발현이 억제되는 현상이 promoter의 CpG의 methylation과 관련되어 있는지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 세포주

RPMI, FBS, antibiotic-antimycotic solution, 세포배양 dish, 제한효소는 GIBCO BRL사, RT-PCR Ready, To, Go Kit는 Amersham-Pharmacia사, T-vector와 Wizard Genomic DNA Purification Kit는 Promega사, ligation Kit는 TAKARA사, RNeasy mini-prep Kit는 Qiagen사로부터 각각 구입하였다. 실험에서 사용한 사람의 유방암 세포주인 MDA MB-231세포를 한국세포주 은행(KCLB)에서 구입하였고, 사람의 정상 자궁내막조직은 미즈베베 산부인과에서 자궁 외 임신환자로부터 환자의 동의를 구하고 채취하여 사용하였다. PCR primer는 Bioneer사로부터 제작하여 사용하였다. DNA 염기분석은 MACROGEN사에 의뢰하여 분석하였다. 그 외에 5-azacytidine, sodium bisulfite 등의 일반 시약류는 SIGMA-ALDRICH사로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양 및 5-azacytidine 처리

MDA MB-231은 10% FBS, 1×antibiotic-antimycotic solution이 포함되어 있는 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포는 100 mm plate에 1 ml당 4×10⁵세포를 분주하고 최종 농도가 2 uM이 되게 5-azacytidine을 처리하여 4일 동안 배양하였다. 1 mM EDTA를 이용하여 세포를 떼어내어 genomic DNA와 RNA를 준비하였다.

Bisulfite 반응과 염기서열분석

Dab2의 promoter 부위의 methylation status를 분석하기 위하여 Grigg 등이 개발한 bisulfite method를 Hajkova 등에 의하여 변형한 "Bisulfate-Assisted Genomic Sequencing Me-

thod"를 이용하였다[11,14]. 간단히 요약하면, 적절한 조건에서 추출한 genomic DNA (700 ug)은 Xho I으로 처리하여 절단하고, 5분간 끓여서 단일가닥으로 만들어 즉시 얼음 위로 옮긴다. 최종농도가 0.3 M이 되도록 NaOH를 넣어주고 50°C에서 15분간 반응하였다. 60°C에서 녹인 2%의 LMP (low melting point) agarose (SealPlaque agarose, FMC)를 2 volume 넣어서 DNA 단편과 agarose가 섞이도록 하였다. 2 ml의 eppendorf tube에 1 ml의 2.5 M bisulfate 용액(pH 5.0)을 넣고 750 µl의 heavy mineral oil을 첨가하여 얼음 위에서 30분간 방치하였다. 준비된 DNA-agarose 혼합액을 10 µl 넣어서 30분간 방치하였다. 얼음에 의해 차가워진 mineral oil내에서 agarose beads가 형성되도록 하였다. 계속하여 50°C에서 8시간 동안 incubation하고 상등액을 완전히 제거하고 1×TE (pH 8.0)로 세척해 낸다. 0.2 M NaOH를 500 µl를 가하여 15분간 2회 세척을 반복하였다. NaOH를 제거하기 위해 1×TE (pH 8.0) 1 ml로 10 분간 3회 세척한 후 DNA 증폭을 위해 H₂O로 15 분간 2회 세척하였다. 얻어진 agarose beads는 PCR 반응에 이용하였다. primer는 + strand; 5'TAGTGGTAATTTAGGGAA, -strand; 5'AAAACCTCCCCAAAATATACC를 제작하여 사용하였다. 반응조건은 처음 1 cycle은 95°C에서 5분간 50°C에서 1분 30초 72°C에서 1분간 반응하였고, 95°C에서 1분 50°C에서 1분 72°C에서 1분간 30 cycle을 증폭하였다. 마지막으로 DNA가닥의 신장(extension)을 위해 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 증폭이 끝난 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색해 UV transilluminator에서 band를 확인하였다. 얻어진 PCR 산물은 T-vector (Promega)에 subcloning하여 염기서열을 결정하였다.

RNA purification과 RT-PCR

Total RNA는 Qiagen RNeasy Mini Kit를 이용하여 Quagen사에서 제공되는 protocol에 따라 정제하였다. RT-PCR은 Amersham-Pharmacia사의 RT-PCR Ready · To · Go Kit를 사용하였다. Primer는 + strand; 5'-AGGCAGGCCCATGGCCCTTTTCAAGTTCGCAAAC, -strand; 5'-CTAGACCCACCAGGGGCCCCACTGGGGCAGGAGC를 제작하여 사용하였다. 주형 RNA는 1 µg 사용하였으며, 총 50 µl volume으로 반응하였다. 처음 1 cycle은 42°C에서 30분간, 95°C에서 5분간 반응하였고, 95°C에서 1분, 65°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30 cycle을 증폭하였다. 마지막으로 DNA가닥의 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색해 UV transilluminator에서 band를 확인하였다.

Methylation-specific PCR (MSP)

사람 자궁내막세포와 MDA MB-231세포의 genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 이

용하여 Promegat사에서 제공되는 protocol에 따라 정제하였다. MSP를 위하여 50 ng의 genomic DNA를 *Hap II*와 *Msp I*으로 각각 37°C에서 20시간 이상 절단하였다. 각각의 제한효소로 절단한 genomic DNA중 10 ng을 PCR에 이용하였다. PCR에 이용한 primers는 Table 1과 같다. 반응 조건은 94°C에서 45초, 65°C에서 60초, 72°C에서 45초로 1 cycle반응하였고, 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 30초로 30 cycle반응하였다. DNA가닥의 신장을 위해 72°C에서 7분간 반응하였다. PCR 증폭이 끝난 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색해 UV transilluminator에서 band를 확인하였다.

결 과

자궁 내막세포와 MDA MB-231 세포에서의 Dab2 유전자의 발현

정상세포인 자궁내막조직 세포와 유방암세포주인 MDA MB-231에서 Dab2 유전자의 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Genomic DNA의 오염에 의한 비특이적 band의 출현을 방지하기 위하여 + strand의 primer는 exon 10에서 - strand의 primer는 exon 11에서 각각 제작하였다. 이 primers를 이용하면 366 bp크기의 PCR 산물이 얻어진다. 그림 2에서 보는바와 같이 정상조직인 인간 자궁내막조직 세포에서는 366 bp의 band가 검출되지만 암 세포인 MDA MB-231에서는 검출되지 않는 것으로 보아 Dab2 유전자의 발현이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Bisulfite-assisted genomic sequencing

본 연구에서는 CpG methylation의 상태를 분석하기 위하여 Hajkova 등에 의해서 수정된 sodium bisulfite의 처리에 의한 염기서열 결정법을 이용하였다[14]. Sodium bisulfite의 처리에 의하여 DNA상의 모든 cytosines은 deamination이 되어 uracil로 변하게 되지만, 5'-methyl cytosine은 cytosine으로 남아 있게 된다. 이렇게 수식된 DNA가닥에 특이적인 primer를 이용하여 증폭시켜 염기서열을 결정하게되면 methylation이 되지 않은 cytosine은 adenine으로 변하여 methylation 상

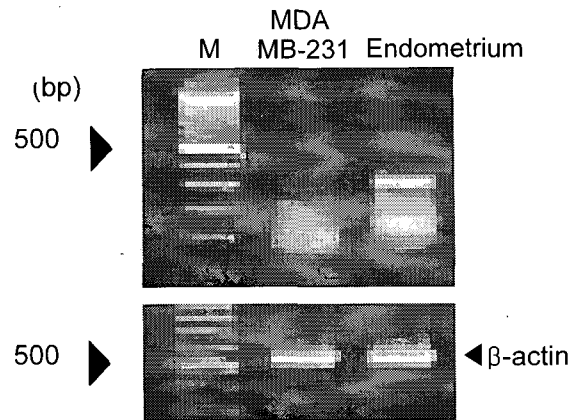


Fig. 1. RT-PCR-based Dab2 expression analysis. Total RNA was isolated from MDA MB-231 and human uterus endometrium. cDNA was amplified with primers specific for human Dab2 or β -actin.

태를 확인할 수 있다. Dab2 promoter 영역 내에는 모두 41개의 CpG가 존재한다. 5' 상류 쪽에서부터 118~198번째의 80개의 염기가 결손된 promoter가 luciferase assay에서 그 활성이 급격하게 저하되는 것으로 확인되어[25] 먼저 이 부위의 CpG의 methylation pattern을 bisulfite 반응을 이용하여 분석하였다. 이 부위에는 CpG가 5개(9~13번)가 존재한다. PCR을 위한 primers는 이 5개의 CpG와 그 하류의 8개의 CpG를 포함하도록 제작하여 bisulfite 반응을 하고 PCR로 증폭하여 총 13개의 CpG의 methylation상태를 분석한 결과 MDA MB-231 세포로부터 추출된 genomic DNA의 methylation상태는 정상조직의 자궁내막조직 세포의 methylation상태와 마찬가지로 한군데도 methylation이 되어있지 않는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 luciferase 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 부위의 CpG의 methylation은 Dab2 유전자의 발현억제와는 관련이 없는 것으로 보인다.

Methylation-specific PCR (MSP)

Interferon γ (INF- γ)의 경우에는 TATA box 주변의 CpG가 methylation이 되면 그 promoter의 활성이 억제되는 것이 보고되어 있다[28]. MDA MB-231 세포에서 luciferase 활

Table 1. MSP Specific Primers

primer name	5'→3'oligonucleotide sequence	Strand	Product Size (bp)
CpG23	CAGTGGCAATCCAGGGAACGGATCT	+	400
	CGGGAGCTTCGGAGCCCGG	-	
CpG28	CAGTGGCAATCCAGGGAACGGATCT	+	455
	CGGTCCAGGCTACAGCGCAGCG	-	
CpG35	CAGTGGCAATCCAGGGAACGGATCT	+	498
	GCTATTGCCTCCGTGAAGCG	-	
CpG40	CAGTGGCAATCCAGGGAACGGATCT	+	531
	GGAAGAAGGGTTTCGAAGC	-	

성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 부위의 CpG가 전혀 methylation되어 있지 않았기 때문에 TATA box 부근의 CpG의 methylation이 Dab2 gene의 발현억제와 관련이 되어있을 가능성이 시사되었다. Dab2 유전자의 TATA box 부위(420~426번째의 nucleotides)에는 methylation에 민감하지 않은 효소(unsensitive enzyme)인 *Msp* I과 민감한 효소(sensitive enzyme)인 *Hap* II에 의해서 인식되어지는 부위인 CCGG서열이 TATA box 상류 쪽에 2군데(379번째와 412번째의 nucleotide, 23번째와 28번째의 CpG)와 TATA box의 하류 쪽에 2군데(467번째와 512번째의 nucleotide, 35번째와 40번째의 CpG)가 각각 존재한다. 이들 각 부위의 methylation의 상태를 분석하기 위하여 PCR용 primers를 Table 1과 같이 제작하였고, 각각의 primer는 23, 28, 35 그리고 40번째의 CpG의 methylation 상태를 분석할 수 있기 때문에 그 이름을 각각 CpG23, CpG28, CpG35 그리고 CpG40으로 명명하였다.

Genomic DNA를 *Hap* II와 *Msp* I으로 각각 처리한 다음 각각의 primer를 이용하여 DNA를 증폭한 결과 MDA MB-231세포에서 추출한 DNA를 methylation에 민감하지 않은 효소인 *Msp* I으로 처리하였을 때에는 CpG28, CpG35 그리고 CpG40에 상응하는 PCR 산물은 나타나지 않았고, CpG23에 상응하는 PCR 산물은 대조군에 비교하여 약 10배정도 약하게 증폭되었다(Fig. 2A). 그러나 이 CpG23의 PCR 산물은 정상조직인 자궁내막세포에서도 대략 같은 정도로 나타나는 것으로 보아 제한효소에 의한 genomic DNA의 부분적인 절단인 것으로 보인다(Fig. 2B). 한편, methylation에 민감한 효소인 *Hap* II로 처리를 하였을 때에는 4개의 PCR 산물이 대조군과 동일하게 검출되었다. 그러나 이들 4개의 PCR 산물은 정상 자궁내막세포에서는 검출되지 않았다(Fig. 2). 따라서, TATA box의 주변의 상류부위인 23번째와 28번째, 그리고 하류 부위인 35번째와 40번째의 4개의 CpG는 MDA MB-231세포에서 methylation이 되어 있는 것으로 나타났다.

5-azacytidine처리에 의한 demethylation 분석

MDA MB-231세포에서 Dab2 유전자의 hypermethylation을 보다 확실하게 알아보기 위해서 MDA MB-231세포는 DNA methyltransferase (DNMT)의 저해제인 5-azacytidine을 4일 동안 처리하였다. 처리한 세포에서 추출한 genomic DNA를 *Hap* II로 처리하여 4개의 primers; CpG23, CpG28, CpG35 그리고 CpG40, 로 MSP를 한 결과 4개 모두 효소를 처리한 DNA주형에서는 각각의 primer에 상응하는 PCR 산물이 검출되지 않았다. 따라서 5-azacytidine의 처리에 의하여 methylation되어 있었던 4곳의 CpG가 demethylation된 것으로 추정된다(Fig. 3).

5-azacytidine처리에 의한 Dab2 유전자의 발현

Dab2 유전자는 정상조직인 자궁내막세포에서는 발현되지 않던 유방암세포주인 MDA MB-231 세포에서는 발현되지 않

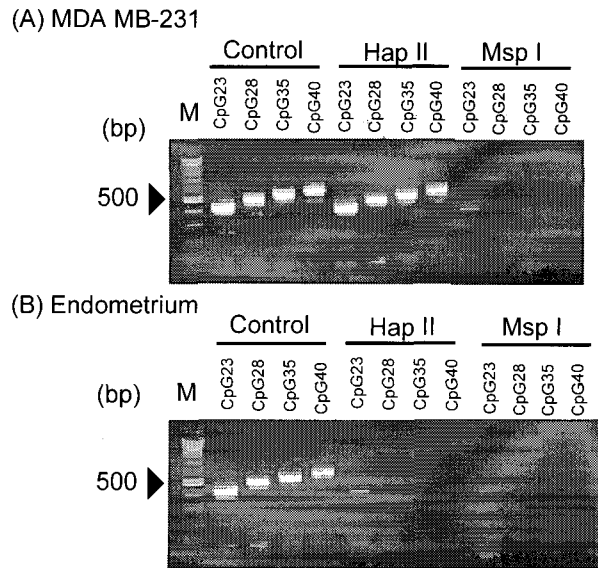


Fig. 2. Methylation specific PCR (MSP) analysis of human breast cancer cell line, MDA MB-231 cells and human uterus endometrium cells. Genomic DNA was PCR-amplified using four primer sets; CpG23, CpG28, CpG35 and CpG40 after digesting with methylation sensitive enzyme; *Hpa* II or methylation insensitive enzyme; *Msp* I for overnight. The PCR products were detectable by size with 400, 420, 450 and 470 bp bands, respectively.

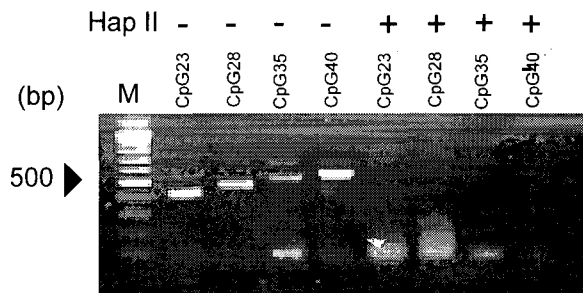


Fig. 3. MSP analysis of MDA MB-231 cells after treatment with 5-azacytidine. MDA MB-231 cells were treated with 2 uM 5-azacytidine for 5 days. Genomic DNA was PCR-amplified using four primer sets; CpG23, CpG28, CpG35 and CpG40 after digesting with methylation sensitive enzyme; *Hpa* II for overnight.

았다(Fig. 1). 이와 같이 암세포에서 Dab2 유전자의 발현이 promoter의 TATA box부근의 CpG의 methylation과 직접적으로 연관되어 있는지를 알아보기 위하여 5-azacytidine처리를 한 MDA MB-231세포로부터 전체 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 5-azacytidine처리를 한 MDA MB-231세포는 대조군으로 이용한 자궁내막세포에서 나타난 것과 동일하게 366 bp의 RT-PCR의 산물이 검출되었다(Fig. 4). 따라서, MDA MB-231세포는 5-azacytidine처리에 의해서 Dab2 유전자의 발현이 회복되는 것으로 나타났다.

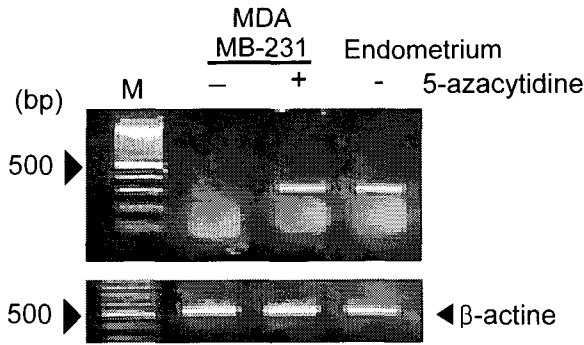


Fig. 4. RT-PCR-based Dab2 expression analysis. Total RNA was isolated from MDA MB-231 after treatment with 2 μ M 5-azacytidine for 5 days. cDNA was amplified with primers specific for human Dab2 or β -actin.

고찰

대부분의 생물체의 DNA는 복제가 이루어진 후에 cytosine의 5번 탄소에 methyl기가 부가되어 변형된다. 비록 원핵생물에서 methylation은 cytosine의 4번 질소(N4)나 adenine의 6번 질소(N6)에서 일어나지만, 포유동물에서의 DNA methylation은 cytosine의 5번 탄소에 제한되어 있다. 그리고 대부분이 CpG에서 methylation이 일어난다. 모든 포유동물에서 CpG의 약 80%는 methylation되어 있고, 전체적인 CpG의 빈도는 기대되는 cytosine과 guanine의 빈도보다도 약 5배정도가 낮다. 그 이유는 진화과정에서 5-methylcytosine이 자발적인 가수분해에 의한 탈아미노화(hydrolytic deamination)로 thymine으로 변화되기 때문인 것으로 여겨지고 있다. 일반적으로 methylation이 잘 일어나지 않아 탈아미노화로부터 보호를 받고 있는 지역이 genome내에 존재하는데 이런 부위를 CpG islands라고 하며, 모든 유전자의 절반이상의 promoter 부위에 상당한다. 5-methylcytosine의 가수분해적인 탈아미노화에 의한 thymine으로 전환은 발암과정과 밀접한 관련이 있다. 실제로 5-methylcytosine이 thymine으로의 전환은 지금까지 암에서 발견되는 가장 일반적인 돌연변이 형태로 p53 유전자의 돌연변이 중 약 30%가 해당이 된다[7]. Promoter 부위에 존재하는 CpG islands의 대부분은 그 유전자의 발현과 관계없이 일반적으로 unmethylation되어 있다[5]. 따라서 조직 특이적으로 발현되는 유전자라고 하더라도 CpG island를 가지고 있는 대부분의 유전자는 promoter부위에 methylation이 일어나지 않는 것이 정상적인 조절 기작인 것으로 보인다. 일반적으로 CpG island가 없는 promoter를 갖는 유전자는 promoter부위의 methylation과 유전자의 발현의 억제와 밀접한 관계가 있는 것으로 보인다. 그러나 imprint된 유전자나 불활성형인 X 염색체 상에 존재하는 유전자의 methylation은 전사조절에 보다 직접적으로 관여되어 있는 것으로 보인다[2,19]. 이 두 경우에는 아버지의 대립인자 중 단지 한

쪽의 대립인자만이 활성화되고 그 대립인자들 중에 하나가 methylation이 되게 된다. 불활성형의 대립인자의 CpG island promoter의 methylation은 아마도 전사인자의 접근을 방해할 수 있도록 염색체의 구조를 변화시키는 것으로 추정되고 있다[6].

암세포에서 DNA methylation의 조절기작이 실질적으로 붕괴되는 것으로 나타났다. 많은 종양세포에서 광범위한 hypomethylation이 많은 연구자들에 의해서 보고되고 있지만 이런 현상은 암세포에 공통적인 현상은 아닌 것으로 보인다 [1,18]. 또한, 암세포에서 CpG island promoter의 hypermethylation에 대해서도 보고되어 있다[17]. DNA methylation은 암세포에서 종양억제유전자의 기능이 상실되는 후천적인 기작을 설명하는 것 중의 하나이다. 따라서 이들 유전자의 기능손실을 위해서는 2개의 대립인자가 모두 methylation되거나, 2개의 대립인자가 돌연변이가 일어나거나, 또는 각각의 대립인자가 methylation과 돌연변이가 복합적으로 일어나는 경우에 일어날 수 있다.

본 연구에서는 전사인자의 하나인 c-Fos의 발현을 조절하여 세포의 증식을 조절하는 것으로 알려져 암억제 유전자의 하나일 것으로 추정되는 인간의 Dab2 유전자가 많은 암세포에서 그 발현이 억제되는 것에 주목하였다. 그 발현의 억제가 TATA box 주변의 CpG의 methylation과 관련이 있을 것으로 추정하고 Dab2 유전자의 발현이 되지 않는 유방암 세포주인 MDA MB-231세포를 선택하여 분석한 결과, Dab2 유전자의 TATA box의 상류 쪽에 2개, 하류 쪽에 2개의 CpG가 CpG가 methylation이 되어 있는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이 methylation 된 CpG는 5-azacytidine의 처리에 의하여 demethylation 되었고, 그 유전자의 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4).

이상의 결과로부터 MDA MB-231 세포에서 Dab2 유전자는 promoter부위의 CpG의 hypermethylation에 의하여 그 발현이 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 본 연구에서는 TATA box의 상류 쪽의 8개의 CpG중에서 단지 2개(23번과 28번)만이 분석이 되었고 하류 쪽의 12개 중에서 단지 2개(35번과 40번)만이 methylation 상태를 확인할 수 있었다. 따라서 다른 CpG도 methylation되어 있을 가능성은 충분히 남아있다. 따라서 아직 얼마나 많은 CpG의 methylation이 Dab2의 발현에 영향을 미치는지는 알 수 없었다. 따라서 promoter 주변의 CpG중에서 어떤 CpG의 methylation이 Dab2의 발현억제에 중요한 역할을 하는지를 확인하기 위해서는 5-azacytidine을 처리한 세포에서 다양한 CpG 부위에서 demethylation이 이루어진 PCR 산물의 clone을 확보하여 bisulfite 반응에 의한 정확한 염기분석법으로 확인되어야 할 것이다. 본 연구에서 Dab2 유전자가 그 promoter의 hypermethylation에 의하여 발현이 억제되기 때문에 MDA MB-231세포는 c-Fos의 발현을 조절하지 못해서 세포가 암화된 것으로 추정할 수도 있

겠지만, 이것이 세포를 암화시킨다는 직접적인 증거라고는 볼 수 없다. Dab2 유전자의 promoter 부위의 hypermethylation이 세포를 암화시키는지 아니면 암화되어서 methylation 조절기작이 교란되어 Dab2가 hypermethylation 되었는지를 규명하는 일은 대단히 중요하다고 볼 수 있다. 따라서 methyltransferase의 활성을 조절하는 신호전달과 세포의 암화과정 에 관여하는 신호전달기작의 상호 비교연구가 수반된다면 그 해결의 실마리가 얻어 질 수 있을 것으로 보인다.

요 약

사람의 Disabled-2 (Dab2)는 정상세포에서 c-Fos의 발현을 억제하여 세포 성장을 조절하는 암억제 유전자로 추정되어 지고 있다. 많은 암세포에서 Dab2는 유방과 난소의 정상세포에서는 발현이 되지만, 약 85%의 유방과 난소의 종양세포에서는 발현이 줄어들거나, 발현이 억제되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 bisulfite 반응에 의한 염기서열 분석법과 MSP방법 등을 이용하여 유방암 세포주인 MDA MB-231세포에서 Dab2 유전자의 promoter상에 존재하는 CpG island의 methylation된 상태를 분석하였다. 그 결과, 사람의 정상 자궁내막세포에서는 Dab2 promoter 부위가 완전하게 methylation되어 있지 않았다. 그러나 MDA MB-231세포에서는 TATA box 근처의 CpG dinucleotide에서 비정상적으로 methylation되어 있었다. 이런 비정상적인 CpG dinucleotide의 methylation은 MDA MB-231세포를 5-azacytidine으로 처리 하였을 때 methylation이 풀리고, Dab2의 발현이 회복되는 것으로 나타났다. 따라서 인간 유방암 세포주인 MDA MB-231 세포에서 Dab2의 발현억제는 Dab2 유전자의 promoter부위의 CpG island의 비정상적인 methylation과 관련이 있는 것으로 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참 고 문 헌

1. Antequera, F., J. Boyes and A. Bird. 1990. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503-514.
2. Beard, C., E. Li and R. Jaenisch. 1995. Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* **9**, 2325-2334.
3. Becker, P. B., S. Ruppert and G. Schutz. 1987. Genomic footprinting. reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. *Cell* **51**, 435-443.
4. Berger, J. and G. Daxenbichler. 2002. DNA methylation of

- nuclear receptor genes-possible role in malignancy. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **80**, 1-11.
5. Bird, A. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* **70**, 5-8.
6. Clemson, C. M., J. A. McNeil, H. F. Willard and J. B. Lawrence. 1996. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* **132**, 259-275.
7. Cooper, D. N. and M. Krawczak. 1990. The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions. *Hum. Genet.* **85**, 55-74.
8. Fazili, Z., W. Sun, S. Mittelstaedt, C. Cohen and X. X. Xu. 1999. Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene* **18**, 3104-3113.
9. Fulop, V., S. C. Mok, D. R. Genest, I. Gati, J. Doszpod and R. S. Berkowitz. 1998. p53, p21, Rb and mdm2 oncoproteins expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J. Reprod. Med.* **43**, 119-127.
10. Gebara, M. M. and J. R. McCarrey. 1992. Protein-DNA interactions associated with the onset of testis-specific expression of the mammalian Pcg-2 gene. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1422-1431.
11. Grigg, G. and S. Clark, 1994. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays* **16**, 431-436.
12. Gertler, F. B., K. K. Hill, M. J. Clark and F. M. Hoffmann. 1993. Dosage-sensitive modifiers of Drosophila abl tyrosine kinase function: prospero, a regulator of axonal outgrowth, and disabled, a novel tyrosine kinase substrate. *Genes Dev.* **7**, 441-453.
13. Guo, S. X., T. Taki, H. Ohnishi, H. Y. Piao, K. Tabuchi, F. Bessho, R. Hanada, M. Yanagisawa and Y. Hayashi. 2000. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk. Res.* **24**, 39-46.
14. Hajkova, P., O. el-Maarri, S. Engemann, J. Oswald, A. Olek and J. Walter. 2002. DNA-methylation analysis by the bisulfite-assisted genomic sequencing method. *Methods Mol. Biol.* **200**, 143-154.
15. He, J., E. R. Smith and X. X. Xu. 2001. Disabled-2 exerts its tumor suppressor activity by uncoupling c-Fos expression and MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 26814-26818.
16. Herman, J. G. 1999. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol.* **9**, 359-367. Review.
17. Issa, J. P., S. B. Baylin and S. A. Belinsky. 1996. Methylation of the estrogen receptor CpG island in lung tumors is related to the specific type of carcinogen exposure. *Cancer Res.* **56**, 3655-3658.
18. Jones, P.A. and P. W. Laird. 1999. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* **21**, 163-167.
19. Li, E., C. Beard and R. Jaenisch. 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365.
20. Lichtenstein, M., G. Keini, H. Cedar and Y. Bergman. 1994. B cell-specific demethylation: a novel role for the intronic chain enhancer sequences. *Cell* **76**, 913-923.
21. Maass, N., M. Biallek, F. Rosel, C. Schem, N. Ohike, M. Zhang, W. Jonat and K. Nagasaki. 2002. Hypermethylation

- and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. *Biochem Biophys Res. Commun.* **297**, 125-128.
22. Mok, S. C., W. Y. Chan, K. K. Wong, K. K. Cheung, C. C. Lau, S. W. Ng, A. Baldini, C. V. Colitti, C. O. Rock and R. S. Berkowitz. 1998. DOC-2, a candidate tumor suppressor gene in human epithelial ovarian cancer. *Oncogene* **16**, 2381-2387.
23. Razin, A. and H. Cedar. 1991. DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.* **55**, 451-458.
24. Richardson, B. and R. Yung. 1999. Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J. Lab Clin. Med.* **134**, 333-340.
25. Tseng, C. P., C. H. Huang, C. C. Tseng, M. H. Lin, J. T. Hsieh and C. H. Tseng. 2001. Induction of disabled-2 gene during megakaryocyte differentiation of k562 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**, 129-135.
26. Xu, X. X., T. Yi, B. Tang and J. D. Lambeth. 1998. Disabled-2 (Dab2) is an SH3 domain-binding partner of Grb2. *Oncogene* **16**, 1561-1569.
27. Yeivin, A. and A. Razin. 1993. Gene methylation patterns and expression, p. 523-568. In J. P. Host and H. P. Saluz (ed.), DNA methylation: molecular biology and biological significance. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
28. Young, H. A. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 563-568.