

MIC2 유전자 산물인 CD99 발현과 세포주기와의 상관관계

서울대학교 의과대학 외과학교실

유 창 식 · 장 명 철 · 오 승 근

The Correlation between the Expression of CD99 and the Cell Cycle

Chang Sik Yu, M.D., Myung Chul Chang, M.D. and Seung Keun Oh, M.D.

Purpose: The cell cycle control system is necessary for the normal growth and differentiation of cells. The purposes of this study were to compare CD99 expression with a known intracellular marker of a specific cell cycle and to evaluate the potential of CD99 as surface marker for this cell cycle.

Methods: We induced arrest of the cell cycle in fetal lung fibroblast by contact inhibition or serum deprivation from culture media. We activated peripheral blood lymphocytes with the treatment of phytohemagglutinin (PHA) and interleukin-2 (IL-2). Next, we synchronized the cell cycle of peripheral blood lymphocytes to the late G1 phase with rapamycin. According to their CD99 expression, the peripheral blood lymphocytes were separated by magnetic bead and analyzed by Western blotting.

Results: CD99 expression in fetal lung fibroblast rapidly decreased in cell cycle arrest and recovered soon after G1 activation of the cell cycle. By analyzing chronologic changes of CD99 expression and PI-histogram, we found CD99 expression decreased after passing the G1 checkpoint. G1/S transition was interrupted by potent immunosuppressant, rapamycin. IL-2 receptor remained high after rapamycin treatment in the activated lymphocytes, whereas CD99 expression and propidium iodide decreased as compared with the same condition without rapamycin. This suggested that CD99 expression was decreased in the late G1 phase. Retinoblastoma gene (Rb) and CDK-2 are necessary for G1/S transition. We found both of these in CD99+ lymphocyte through Western blotting only. Cyclin B, which has an important role in S/G2/M transition, was only found in CD99-

activated lymphocytes.

Conclusion: CD99 may be a G1 phase specific surface marker. (J Korean Surg Soc 2001;61:347-356)

Key Words: CD99, Cell cycle, Marker

중심 단어: CD99, 세포주기, 표지자

Department of Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

세포주기의 정상적 조절은 개체 및 세포의 정상 발달과 분화에 있어서 필수적이며, 이러한 조절기전의 이상은 병적인 조직과괴와 암의 발생 등에 있어서 중요한 원인으로 작용한다. 특히, 세포주기의 각 단계에 해당하는 세포의 특성을 규명하고, 각각의 세포들에 있어서의 각 세포주기 단계에서의 특징을 알 수 있다면 종양세포를 포함한 각종의 세포들의 성장양식을 이해할 수 있고, 이를 이용하여 종양의 치료 및 예후를 예측하는 데에도 이용할 수 있을 것으로 기대된다.(1) 현재까지 세포주기에 대한 연구는 주로 초기에 발현되는 전사인자(transcription factor)들의 mRNA가 발현되는지의 여부와, cyclin dependent protein kinase (CDK)의 활성화 및 인산화 여부, 각종 cyclin의 양적 변화, 그리고 retinoblastoma gene (Rb)의 인산화 등을 지표로 각 단계에 대한 연구가 진행되어 왔다. 하지만 세포주기의 특정단계에 특이하게 표현정도가 변하는 세포표면 물질은 아직까지 알려져 있지 않다.

세포주기 조절장치는 매우 공통적인데, 섬유모세포 및 조혈세포를 통하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 세포분열 주기는 분열기(M phase)와 간기(interphase)로 구분되며, 세포는 분열기에는 핵분열(mitosis)과 세포질분열(cytokinesis)이 1시간 이내에 신속하게 일어나고 대부분의 시간을 간기에서 보내게 된다. 간기는 다시 제 1간기(G1 phase), 제 2간기(G2 phase) 및 DNA 증식이 일어나는 합성기(S phase)로 구분된다. 이렇게 표준세포분열주기는 제 1간기, 합성기, 제 2간기, 분열기를 순차적으로 반복하여 일어나며 이를

책임저자 : 오승근, 서울시 종로구 연건동 28번지
☎ 110-744, 서울대학병원 일반외과
Tel: 02-760-2325, Fax: 02-766-3975
E-mail: osk@snu.ac.kr

접수일 : 2001년 9월 20일, 게재승인일 : 2001년 9월 26일

통제하는 중앙 조절장치가 존재하고 특히 다음 단계로 넘어가기 전 검문소(checkpoint) 역할을 하는 지점이 있다.(2)

제 1간기 검문소(G1 check point; "Start")에서는 DNA 증식을 시작해도 좋은가를 판정하게 되고, 제 2간기 검문소(G2 check point)에서는 분열기가 시작되어도 좋을 것인가를, 중기 검문소(metaphase check point)에서는 분열기를 끝내도 좋을 것인가를 판정하게 된다.(3) 이러한 세포주기의 검문소는 세포가 손상된 경우에도 작동하여 세포주기정지를 유발하여 손상된 DNA의 복원에 필요한 시간적 여유를 제공하고 이를 가속화할 수 있는 유전자를 작동시켜 정상적인 세포주기를 진행할 수 있게 한다. 이런 세포주기 검문소의 기능이 상실될 경우 정상세포는 암세포로 이환될 수 있다.(4) 생체내에서 많은 세포들은 분열하지 않고 정지된 상태에서 장시간동안 있는데, 이를 G0기라 한다. G0 단계의 세포는 단백질과 RNA 분자가 분해되고 재빨리 합성되지 않으며, 리보솜은 monosome 상태로 주로 존재하며, 효소나 transmembrane transport 정도는 상당 부분 억제된다.(5) 그러나 G0/G1기 전이에 관하여는 거의 알려진 바가 없다.

이러한 세포주기 조절장치는 두 종류의 단백질에 의하여 작동된다. 첫째, CDK로서 특정 단백질을 인산화하여 세포주기를 조절한다. 둘째, Cyclin이라는 활성단백질로 세포주기의 각 단계에 특이적으로 발현과 파괴가 조절되며, 각각의 cyclin은 특정 CDK와 결합하여 CDK의 인산화 기능을 활성화시킨다. G0기 단계에서는 어떤 cyclin도 발현되지 않으며, 세포가 G0기에서 벗어나 G1기로 들어서면 한 가지 이상의 D-type cyclins (D1, D2, D3)이 유도되며, 이러한 합성 및 CDK4, CDK6 등과의 복합체는 분열 유발자극(mitogenic stimuli)에 의존하여 cyclin D는 성장인자 감지기(growth factor sensor)로 간주된다. 활성화된 CDK는 G1/S기 전이에 필수적인 Rb인산화를 유도하여 S기 진입에 중요한 각종 유전자의 전사를 활성화시키는 E2Fs를 조절하게 한다. Cyclin E는 G1/S 전이시기에 발현되며 cyclin E-CDK2 복합체는 Rb 인산화 및 E2Fs 활성화에 관여하여 positive feedback을 이룬다. Cyclin A와 cyclin B는 S/G2/M기에 만들어져, cyclin A는 S기에는 CDK-2와 S기말과 G2기에는 Cdc2 (CDK-1)와 각각 복합체를 이루고 cyclin B는 Cdc2와 복합체를 이루어 mitosis-promoting factor (MPF)를 형성하고 M기에서 활성을 갖는다. 이 MPF는 세포주기 내내 그 활성도가 변화하며 M기때 활성도가 급격히 증가하여 핵분열을 유도한다.(6) Cyclin A와 cyclin B에 의해 활성화된 CDK는 세포주기가 진행되는 동안에도 Rb 인산화가 유지되도록 한다.(1,7,8)

세포주기의 단계별 진행은 여러 세포외적 및 내적 요소에 의하여 영향을 받는다. 이 중 특정 세포주기를 억제하는 세포내 단백질에 대한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있는데 이는 특히 발암과정을 이해하는데 많은 도움을 주

기 때문이다. 세포주기 조절기전 중 가장 잘 알려진 단백질은 p53이다. p53 단백질은 DNA 손상에 의하여 활성화되며, 활성화된 p53 단백질은 전사인자로 작용하여 여러 유전자의 발현을 유도하는데, 이중 특히 p21^{CIP1/waf1}, GADD45, Bax의 발현이 중요하다. p21은 거의 모든 단계의 CDK의 작용을 억제하여 세포주기의 진행을 막고, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)에 결합하여 DNA 복제를 억제한다.(9) 이러한 세포주기의 억제는 G1 단계에서 세포가 손상된 DNA를 복구할 시간적 여유를 주기 위함이며 GADD45는 PCNA에 결합하여 손상된 DNA의 복구를 촉진한다. 그러나, DNA 복구가 실패하면 Bax의 작용으로 세포는 사멸화과정(apoptosis)에 의해 제거된다. 이 p53 단백질의 이상은 인체 종양세포의 약 반수에서 관찰되며, 특히 p53 단백질의 이상여부가 암세포의 항암제 혹은 방사선 치료에 대한 저항성과 연관이 있다고 보고되고 있다.(8)

그러나 이상의 세포주기에 관련된 단백질들은 모두 세포내 물질들이므로 세포주기의 단계를 판별하기 위한 이 물질들의 존재여부 확인은 세포분해질을 만들어 Western blot을 수행하여야 한다는 단점을 가지고 있다. 그러므로 세포주기 단계를 확인할 수 있는 세포표면 물질을 확보한다는 것은 세포주기 연구 뿐아니라 더 나아가 암의 치료와 연구에 매우 귀중한 자료가 되리라 생각된다.

림프구에서 세포주기에 대한 연구는 주로 T세포에서 진행되었다. 말초 T림프구는 주로 G0 상태에 있으나 T세포가 특이 항원을 인지하면 세포는 G1 상태로 진행하며 이 때, IL-2를 비롯한 각종 cytokine을 분비하게되고 이러한 cytokine에 고친화력을 나타내는 수용체를 세포표면에 발현시킨다. IL-2 수용체도 그 중 하나로서 T림프구의 활성화 정도를 나타낸다.(10) 분비된 IL-2가 IL-2 수용체에 작용하는 과정은 세포가 S기로 이행하는데 있어서 필수적이며 IL-2 수용체의 활성화는 p27 단백질의 작용을 억제함으로써 S기로의 이행을 가능하게 한다.

한편 MIC2 유전자의 산물인 CD99는 185개의 아미노산을 갖는 분자량 32K-Da의 transmembrane 당단백질이다. 'E2분자'라고도 불리우며 X, Y염색체의 단완에 존재하는 pseudoautosomal gene으로,(11) O662, L129 단클론항체는 모든 T세포에 광범위하게 분포하는 epitope을 인지할 수 있고 D44와 12E7의 단클론항체는 특정 T세포에만 분포하는 epitope을 인지한다.(12) 1979년 Levy 등(13)은 CD99를 12E7 단클론항체로 인지된 인간의 흉선백혈병 항원(thymus leukemia antigen)으로 기술하면서 T-cell leukemia나 lymphoblastic lymphoma, 일부의 Null cell leukemia, 그리고 피질흉선세포 등에서 강하게 발현되는 물질이라 보고하였다. T세포 이외에도 섬유모세포나 각종의 암세포주에서도 확인이 가능하며 특히 Ewing tumor나 peripheral neuroectodermal tumors (pPNET)에서 강하게 발현되고 적혈구

및 단핵구에서도 관찰되며 궤도세포, 난소의 granulosa cell, 고환의 Leydig, Sertoli cell, 중추신경계의 Ependyma에서도 확인할 수 있다고 알려져 있다.(14) 이 물질의 기능은 아직 많이 알려지지 않았으나 CD4+, CD8+ 림프구의 동질적 유착(homotypic aggregation) 및 미성숙 흉선세포의 사멸화에 관여하는 것으로 알려졌다. Hahn 등(15)은 CD99의 세포질부분이 일부 결합된 새로운 CD99의 isoform을 발견하였고 이 새로운 분자는 LFA-1 발현을 억제함으로써 CD99에 의한 림프구의 동질성 유착을 저해하는 것을 밝혔다. 최근 Kim 등(16,17)은 Hodgkin's lymphoma의 Reed-Sternberg 세포에서 CD99의 발현이 감소되어 있으며 CD99의 발현을 감소시켰을 때 Reed-Sternberg 세포와 같은 표현형이 발현됨을 발견하여 Reed-Sternberg 세포와의 연관성을 보고하였다.

본 연구는 몇 가지 방법으로 특정 세포주기에서 CD99의 발현 정도를 측정, 분석하고 기존에 알려진 세포내의 세포주기 표지자와 CD99의 발현을 비교하여 CD99가 세포표면에 존재하는 특정 세포주기의 표지자가 될 수 있는가를 규명하고자 한다.

방 법

1) 실험에 쓰인 시약 및 항체

실험에 쓰인 물질들은 다음 회사들로부터 구입하였다. 분말형태의 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), RPMI-1640 배양액, 우태혈청 등은 Gibco (NY, USA)에서, fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 염소 항-마우스 IgG 항체는 Zymed (CA, USA)로부터 구입하였다. 항 cyclin B, CDK2, Rb 항체들은 Upstate Biotechnology Co.(Lake Placid, NY)에서 구입하였다. CD99 항체(DN16)는 서울대학교 의과대학 면역병리 실험실에서 생산하여 사용하였다.(18)

2) 인체 정상 말초 림프구의 분리

정상 인체에서 채취한 혈액을 RPMI 용액과 10% fetal bovine serum (FBS)으로 2배 희석한 뒤 단핵세포만을 채취하기 위하여 5.7% Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Upsala, Sweden) 용액 상층에 얹어 1,500 rpm (900 g)에서 30분간 원심 분리하였다. 그 후 상층액은 버리고 RPMI 용액과 Ficoll-Hypaque 용액 사이의 경계부에서 세포를 취하여 RPMI 용액과 10% FBS으로 세 번 세척하였다. 최종적으로 세포농도가 $10^6/ml$ 가 되도록 RPMI 용액과 10% FBS으로 희석하였다.

3) 말초 림프구의 자극

분리한 림프구를 RPMI 용액과 10% FBS에 세포농도가 $10^6/ml$ 가 되도록 부유시킨 뒤 PHA (Gibco, NY, USA)을

1 : 100의 농도로 처리하고 37°C CO₂ incubator에서 하루 배양하였다. 1일 뒤 배양액의 반을 새로운 배양액으로 대체하고 IL-2를 50 unit/ml 첨가하였다. 세포배양 3일 뒤 세포를 채취하여 PBS로 세척하고 다음 실험에 사용하였다.

4) CD99 발현에 따른 말초 림프구의 분리

활성화된 말초혈액 림프구를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3번 세척한 뒤 세포를 시험관당 10^7 개의 세포로 나누어 PBS-5% bovine serum albumin (BSA) 용액에 부유시켰다. 세포부유액에 항 CD99 세포배양 상층액 1ml를 처리하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 뒤 PBS-5% BSA로 3번 세척하고 magnetic bead가 결합된 goat anti-mouse Ig (Miltenyi Biotec inc, Sunnyvale, CA) 20 μ l를 첨가하고 4°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 뒤 PBS-5% BSA로 3번 세척하고 500 μ l PBS-5% BSA 용액을 첨가하였다. 세포를 magnetic plate에 설치된 MiniMACS column (Miltenyi Biotec inc, Sunnyvale, CA)을 통과시켜 column에 결합되지 않은 세포를 취하였다. Column을 3 ml PBS-5% BSA로 세척하고 magnetic plate를 제거한 뒤 1 ml PBS-5% BSA로 세척하여 column에 결합된 세포를 취하였다.

5) 태아 폐 섬유모세포

태아 폐 섬유모세포를 직경 100 mm culture Petridish에 분주하고 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액에서 배양하였다. 37°C CO₂ 배양기에서 세포배양 중 매일 관찰하여 세포들이 Petridish 전체에 단층으로 형성되어 접촉억제(contact inhibition)를 받는 시간을 택하였다. 그 후 24시간 간격으로 CD99의 발현 및 DNA ploidy를 유세포 측정기로 측정하였다.

세포의 자극은 접촉억제에 의해 세포주기 정지가 유도된 세포를 37°C에서 5분간 trypsin 처리하여 Petridish에서 분리시킨 뒤 DMEM 배양액으로 세척하고 새로운 Petridish에 원래의 1/4 농도로 다시 깔아주어 세포의 성장을 유도하였다.

6) 유세포 측정기를 이용한 면역형광검사(Flowcytometric analysis)

CD99 등의 표면단백의 발현 정도를 확인하기 위하여 유세포 측정기를 이용한 면역형광검사를 수행하였다. 10^6 개의 세포를 취하여 Falcon tube에 넣고 1,000 rpm (600 g)에서 3분간 원심분리하여 침전된 세포를 취하여 적당량의 PBS에 부유하여 부유액을 시험관에 분주하고 1차 항체용액(DN16) 100 μ l를 넣어주고 혼합하였다. 혼합액을 4°C에서 30분간 반응시킨 후 1,000 rpm (600 g)에서 5분간 원심분리하여 침전된 세포만을 취하여 2~3회 PBS로 세척하여 반응시키지 않은 항체를 제거하였다. 세척, 원심분리 후 얻어진 세포를 희석된 2차 항체(FITC-conjugated goat

anti-mouse Ig, Dako) 50 μ l에 부유시킨 후 4°C에서 30분간 암실에서 반응시켰다. 반응 후 150 μ l의 PBS를 첨가하여 원심하고 2~3회 PBS로 세척하였다. 마지막 원심 후 남은 세포에 200 μ l의 PBS를 넣은 후 부유하여 유세포 측정기 (FACS: Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 이용하여 형광염색 양성세포 비율 및 염색강도를 검사하였다. 같은 방법으로 수차례 검사한 결과중 대표적인 것을 취하여 결과분석에 이용하였다.

7) Western blotting

5×10^7 의 세포를 준비하여 PBS로 1회 세척하고 1 ml의 lysis buffer (Tris 50 mM, pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF)로 세포를 파쇄하고 15,000 rpm (9,000 g)에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후 검체(4x)를 넣고 10분간 끓여 SDS-PAGE를 수행하였다. Running 후 NC paper에 25 mV로 18시간 transfer 하고 skim milk (5%)로 1시간 blocking 한 후 검색하고자 하는 단백질에 대한 1차 항체용액을 넣었다. 1시간 배양 하고 TBST 완충용액으로 10분간 3회 세척한 후 2차 항체 용액(goat anti-mouse Ig conjugated with HRP)을 넣고 45분간 반응시키고 ECL (enhanced chemiluminescence) 시약으로 1분 처리 후에 autoradiogram을 얻었다.

8) Magnetic beads를 이용한 세포의 분리

검사당 10^7 개의 세포를 사용하는데 충분한 수의 세포를 취하여 적당량의 PBS에 부유하여 100 μ l당 10^6 개의 세포가 있도록 하였다. 이 세포 부유액을 eppendorf tube에 100 μ l씩 분주하고 1차 항체용액(DN16) 100 μ l씩을 넣어주고 혼합하였다. 혼합한 용액을 4°C에서 30분간 반응시킨 후 table centrifuge에서 15초간 원심하여 침전된 세포만을 취하여 2~3회 PBS로 세척하여 반응하지 않은 항체를 제거

하였다. 원심 후 얻어진 세포침전물을 희석된 2차 항체 (magnetic bead-conjugated goat anti-mouse Ig) 10 μ l에 부유시킨 후 4°C에서 30분간 암실에서 반응시켰다. 마지막 원심 후 남은 세포에 200 μ l의 PBS를 넣은 후 부유하였다.

MiniMACS separation column을 separation unit에 붙인 후 500 μ l PBS로 세척한 후, 세포부유액을 column에 통과시킨 후 500 μ l PBS를 넣어 주었다. 이 때 받은 fraction은 negative fraction이다. 500 μ l PBS로 column을 2~3회 씻은 후 column을 unit에서 분리한 후 시험관에 넣고 1 ml PBS를 넣고 plunger로 세포를 씻어내려 이를 positive fraction으로 사용하였다.

결 과

1) 태아 폐 섬유모세포에서의 세포주기와 CD99 발현

CD99는 낮은 세포밀도에서 배양된 태아 폐 섬유모세포 표면에 높게 발현되는 반면 높은 세포밀도로 배양하여 접촉억제를 유도하면 CD99가 거의 발현되지 않았다(Fig. 1A, 1B).

이 성장이 정지된 세포를 trypsin을 처리하여 분리시켜 낮은 밀도로 다시 배양하여 성장을 재유도하면, 30분 후에 CD99의 발현을 유세포 분석으로 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 이러한 접촉억제에 의한 세포주기 정지효과를 시간 경과별로 살펴보면 Petridish에서 배양중인 세포의 CD99 발현은 배양 3일째 16.5%로 급격히 감소하여 5일째 1.4%로 거의 소실되었다(Fig. 2A). 이를 trypsin 처리하여 세포주기를 활성화 한 2시간 후에 유세포 측정해 보면 56.4%로 신속히 발현율이 증가하여 4시간 후에는 88.1% 까지 회복되는 것을 관찰하였다(Fig. 2B). 또한 배양액에서 fetal bovine serum을 제거하여 세포들의 성장억제를 유도해 보았더니 99.1%의 CD99 발현율이 1일 후 53.7%, 2일

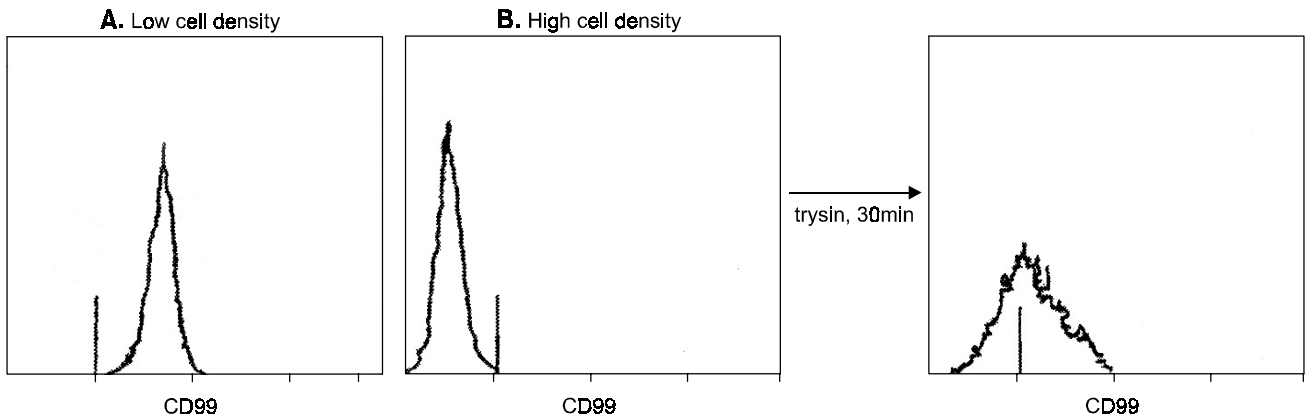


Fig. 1. The effect of contact inhibition on CD99 expression in fetal lung fibroblast. CD99 expression disappeared in high cell density and recovered after releasing from contact inhibition.

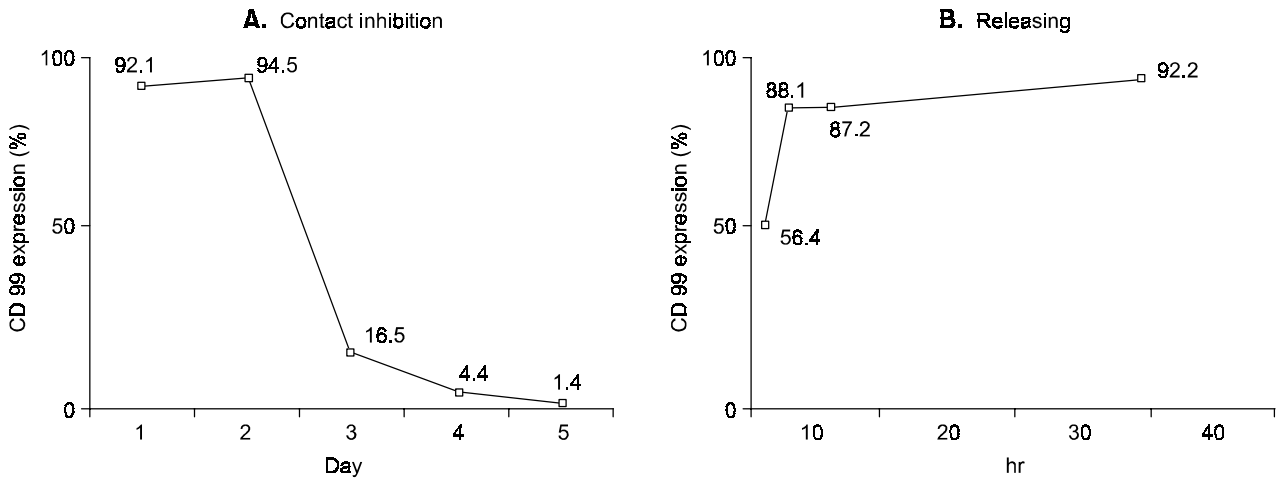


Fig. 2. Changes of CD99 expression in fetal lung fibroblast. A. CD99 expression decreased rapidly after 2nd day and almost disappeared at 5th day. B. CD99 expression recovered within several hours after trypsin treatment.

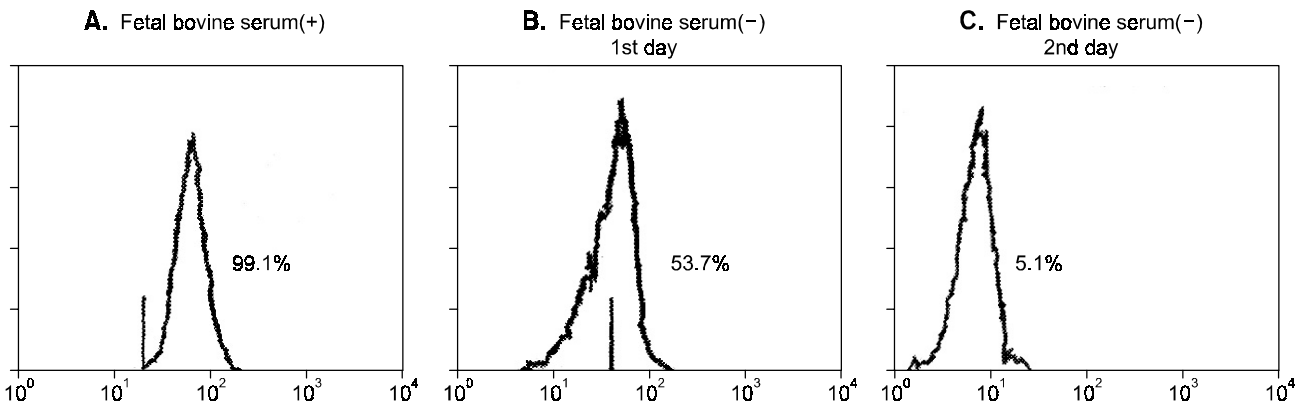


Fig. 3. The effect of serum deprivation on CD99 expression in fetal lung fibroblast. CD99 expression was down-regulated by serum deprivation.

후 5.1%까지 감소하여 성장억제가 일어나 세포주기가 정지되면 CD99 발현이 소실되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

2) 말초혈액 림프구에서의 세포주기와 CD99 발현

(1) 활성화된 림프구에서의 CD99 발현과 PI 측정: PHA와 IL-2를 이용하여 말초혈액 림프구를 활성화하면 G0/G1 전이가 일어나고, IL-2 수용체의 발현율은 15.3%에서 76.0%로 현저히 증가하고 PI 측정치는 S/G2/M기가 1.9%에서 16.9%로 증가하여 세포주기가 활성화된 것을 확인할 수 있었다. 반면, CD99는 발현율이 46.7%에서 30.2%로 줄어들었다(Fig. 4). 비록 개체에 따라서 또는 한 개체의 상태에 따라서 활성화 전 말초혈액 림프구내 CD99가 발현되는 정도는 매우 다르다 할지라도, PI와 CD99의 2-color 유세포분석에서 CD99가 발현된 활성화된 림프구들이 S/G2/M기로 진행되면서 CD99의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

(2) 활성화된 림프구에서 CD99 발현의 시간별 변화: 같은 방법으로 림프구를 활성화하여 2시간, 6시간, 24시간, 48시간 후에 CD99의 발현을 측정하였더니 활성화 전 65.5%의 발현율이 6시간 후에는 90.6%로 최고치에 도달하고 24시간까지 86.5% 정도를 유지하다가 48시간 후 20.3%로 급격히 감소하였다(Fig. 5). 이를 24시간, 48시간에 측정된 PI-주도표(histogram)와 비교해 보면 활성화 후 24시간에는 96.6%가 G1기에 속하고 불과 3.4%가 S/G2/M기인 반면에 48시간 후에는 80%가 G1기, 20% S/G2/M기로 G1기에서 S, G2, M기로 세포주기가 진행되면서 CD99의 발현이 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

(3) Rapamycin을 이용한 G1/S기 전이억제 효과: Rapamycin으로 G1/S기 전이를 억제시켰을 때 CD99의 변화를 살펴보면 활성화시키지 않은 림프구에서는 활성화 정도를 나타내는 IL-2 receptor의 발현율이 13.8%로 억제 전의 15.3%에 비해 변화가 없고 CD99과 propidium iodide의

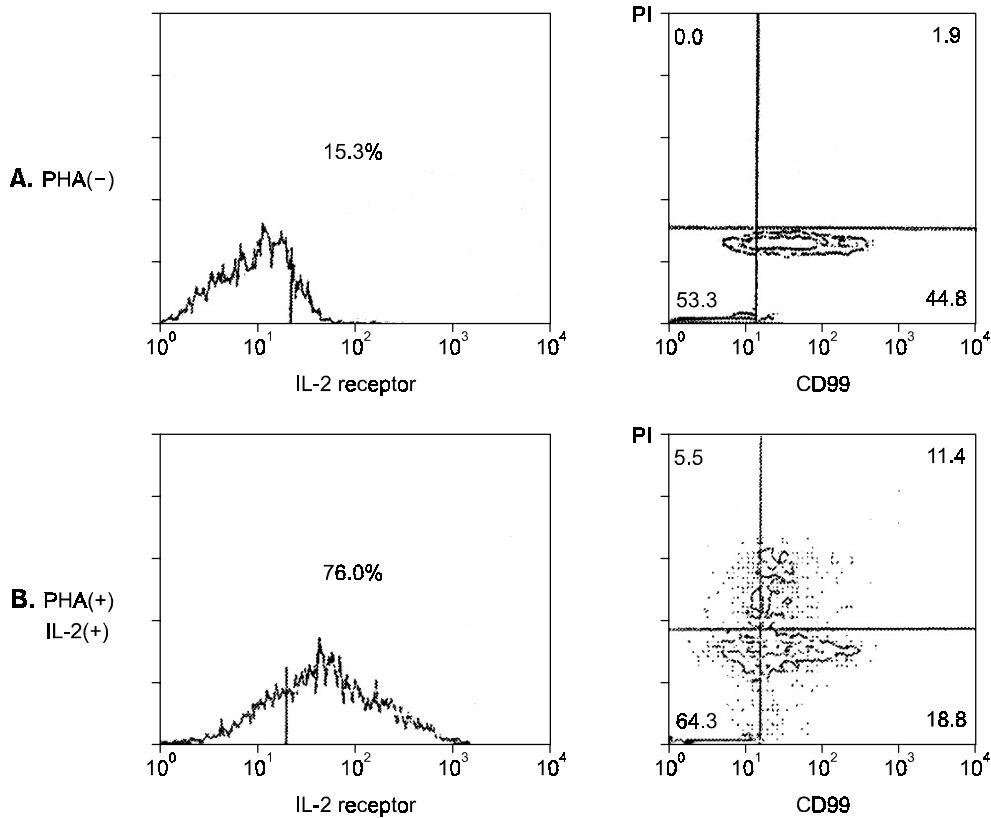


Fig. 4. Expression of interleukin-2(IL-2) receptor & CD99/propidium iodide (PI) on the peripheral blood lymphocyte activated with phytohemagglutinin (PHA) and IL-2. Expression of IL-2 receptor was markedly increased after activation. In 2-color FACS, PI was increased, while CD99 expression was decreased after activation.

2-color 유세포분석에도 CD99/PI의 발현양상에 차이가 없다. 그러나 PHA로 활성화한 경우 rapamycin 처리를 해도 IL-2 receptor의 발현은 85.7%로 억제 전의 76.0%와 큰 변화 없이 계속 높게 유지되지만, 2-color 유세포분석에서 S/G2/M기로의 전이는 10.9%로 rapamycin을 처리하기 전 16.9%에 비하여 감소하였으나 완전한 G1/S 전이억제효과를 관찰하기 어려웠다. 그러나 CD99의 발현은 8.4%로 현저하게 감소하였다(Fig. 7).

(4) 말초 림프구의 CD99 발현 유무에 따른 분리 실험: Magnetic bead를 이용하여 CD99 발현 유무에 따라 림프구를 분리하고 G1/S 전이에 필수요소로 알려진 Rb와 CDK-2의 존재를 Western blot으로 확인한 결과 CD99 발현이 되지 않는 림프구에서는 Rb와 CDK-2가 전혀 관찰되지 않은 반면 CD99가 발현된 림프구에서는 Rb가 소량, CDK-2는 다량으로 관찰되었다(Fig. 8).

다음으로 앞서 기술한 방법으로 림프구를 활성화시킨 후 CD99 발현 유무에 따라 분류하고 S/G2/M기에 관여하는 cyclin B와 CD99의 존재유무를 다시 Western blot으로 확인해 보면 활성화 림프구 중 CD99 발현이 없는 것에서는 cyclin B가 존재하고 CD99는 확인되지 않아 S/G2/M기로 넘어온 활성화 림프구에서는 CD99의 발현이 없어지는

것을 확인할 수 있으며 활성화 림프구중 CD99 발현이 되는 림프구는 cyclin B가 존재하지 않아 G1기의 활성화 림프구는 CD99 발현이 현저한 것을 알 수 있다. 활성화하지 않은 림프구는 대개 G0/G1에 있으므로 CD99는 일부 발현되면서 cyclin B는 존재하지 않고, 이를 CD99가 발현되지 않는 림프구를 다시 분리하여 Western blot을 시행하였더니 cyclin B는 여전히 없었으나 희미하게 CD99의 존재가 확인이 되었다(Fig. 9).

고 찰

세포배양시 주기적인 배지와 배양액의 교환은 세포증식에 필수적인 사항이며 이는 세포가 지속적인 증식을 하기 위해서는 적절한 공간과 세포주기를 계속 활성화시킬 수 있는 여러 가지 성장인자를 함유한 혈청이 필요하다는 것이다. 배지에서 분열을 계속하던 세포는 증식을 계속하다가 완전히 배지를 뒤덮게 되면 소위 '접촉억제(contact inhibition)'가 일어나 더 이상의 성장을 멈추게 된다. 이러한 실험은 주로 섬유모세포를 대상으로 많이 진행되었는데(19) 인접한 세포들은 안정된 미소한 성장인자들을 취하기 위해 경쟁하게 되고 결국 주어진 환경에서 일정한

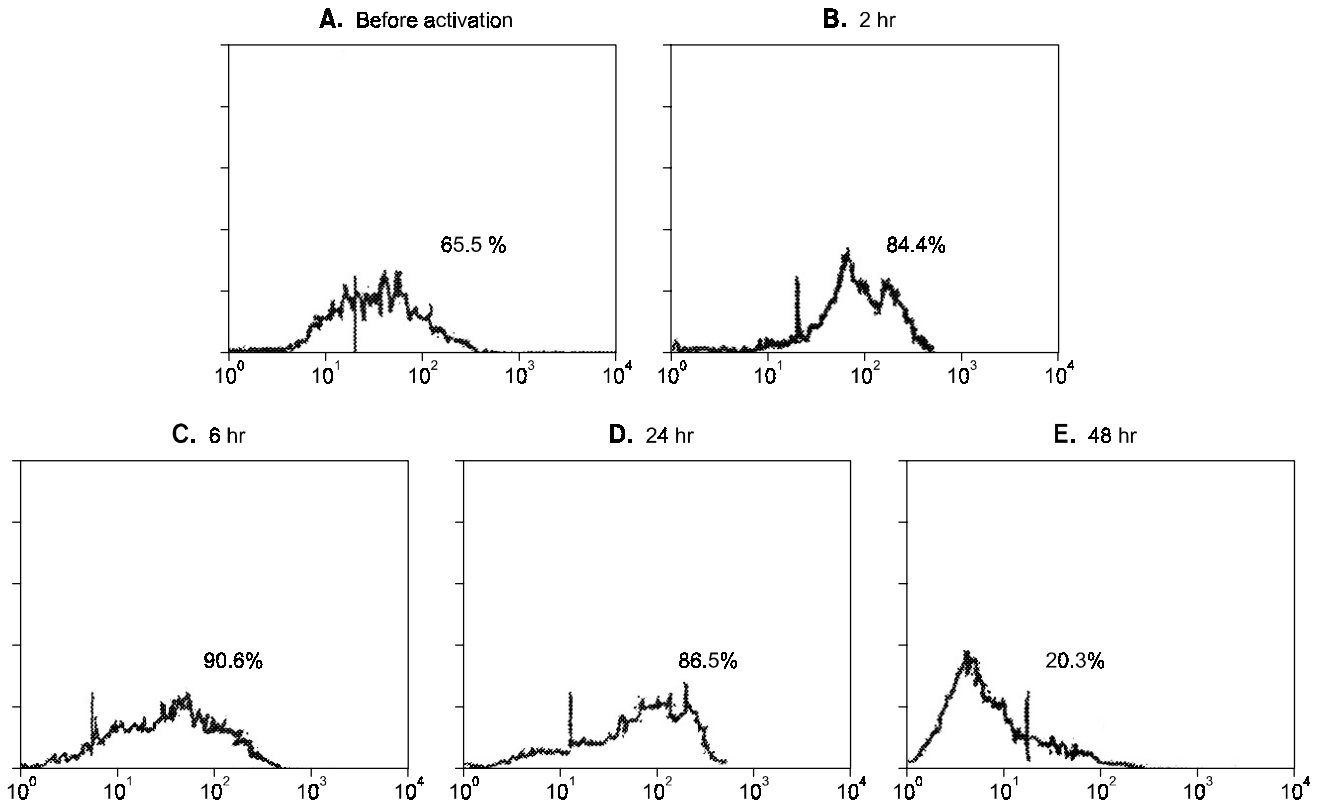


Fig. 5. Chronologic changes of CD99 expression after activation of peripheral lymphocyte with PHA and IL-2. CD99 expression was highest level at 6hr and rapidly reduced after 24 hr.

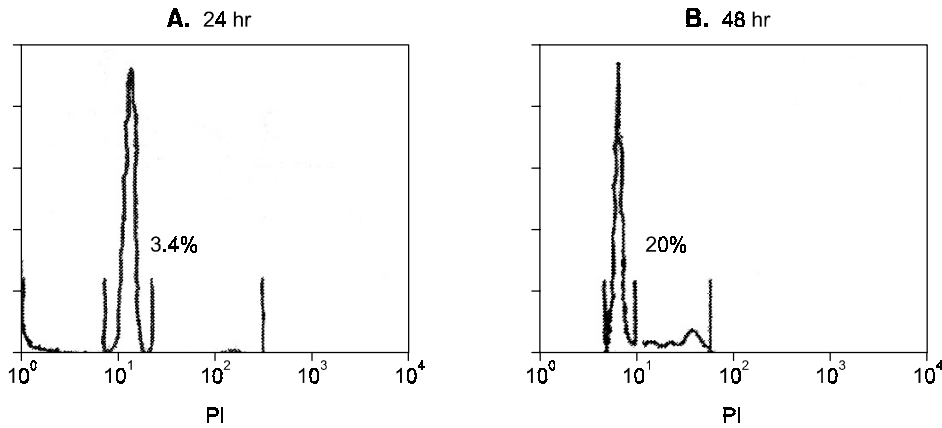


Fig. 6. Chronologic changes of propidium iodide (PI) histogram in activated peripheral lymphocyte. Proportion of S/G2/M phase increased from 3.4% (24 hr) to 20% (48 hr).

수준의 증식 밖에는 일어날 수 없으며, 이러한 기전은 세포배양뿐 아니라 암세포를 제외한 정상 생체조직에서도 세포의 과도한 증식을 막는 기전으로 작용하고 있다. 실험적으로 접촉억제가 일어나서 더 이상의 증식을 멈추고 G0기의 세포주기 상태를 유지하고 있는 배지에 여러 가지 방법으로 접촉억제를 풀어주면 또 다시 세포주기는 활

성화되어 분열을 계속하게 된다.(20)

MIC2 유전자의 산물인 CD99가 세포주기와 어떤 연관이 있을 것이라는 가정하에 태아 폐 섬유모세포를 이용하여 접촉억제를 일으키고 이를 trypsin 처리하여 세포주기 정지효과와 이때 CD99의 발현을 보았더니 세포밀도가 낮을 때 높게 발현되던 CD99가 세포주기 정지가 일어난 후

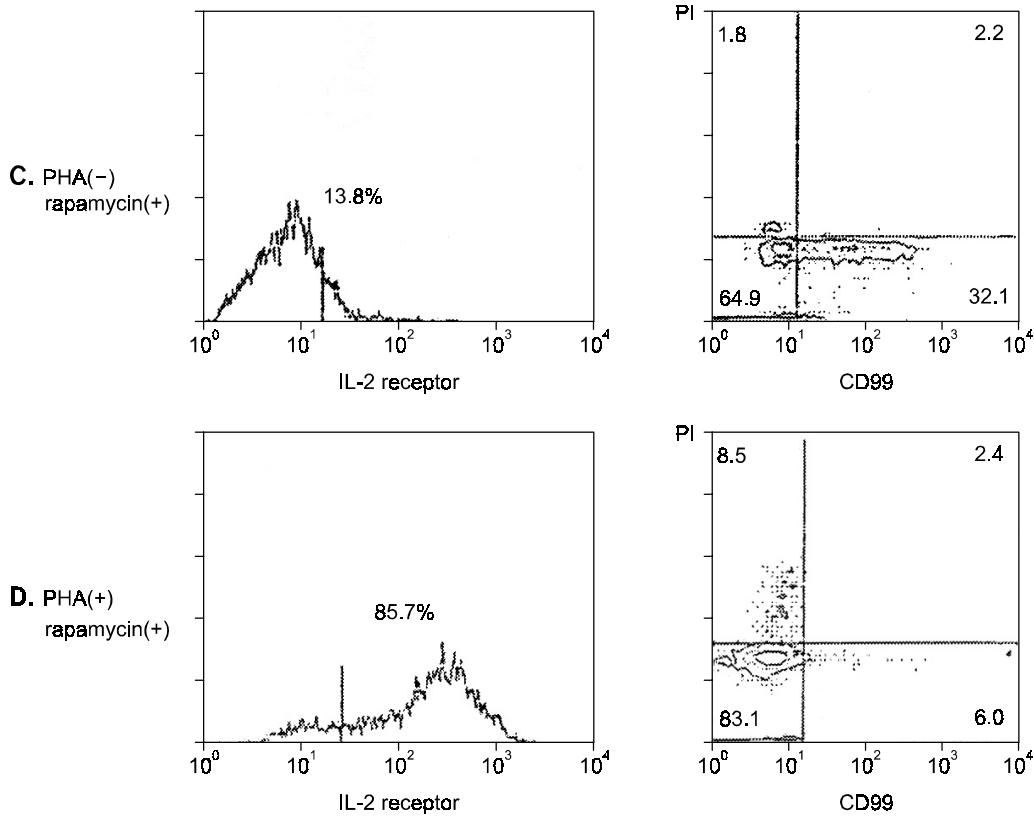


Fig. 7. Expression of IL-2 receptor and CD99/PI on the peripheral blood lymphocyte treated with rapamycin to block G1/S transition. Expression of IL-2 receptor was increased after activation even with rapamycin. In 2-color FACS, CD99 expression markedly decreased, while PI slightly increased due to incomplete G1/S blocking.

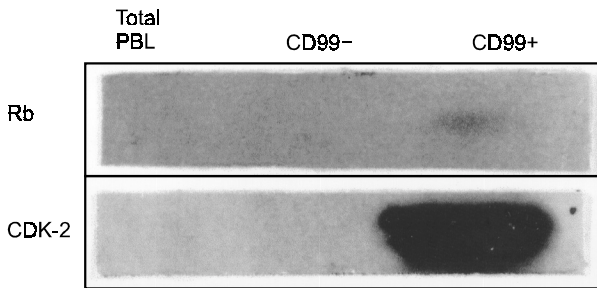


Fig. 8. Western blotting of peripheral blood lymphocyte separated by CD99 expression to detect retinoblastoma gene (Rb) and CDK-2. Rb and CDK-2 could be identified in CD99+ lymphocyte only.

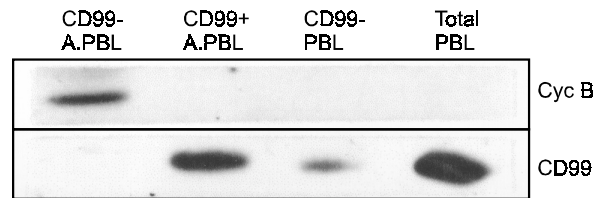


Fig. 9. Western blotting of activated peripheral blood lymphocyte (A.PBL) separated by CD99 expression to detect cyclin B and CD99 protein. In activated lymphocyte, cyclin B was identified in CD99- lymphocyte only.

발현되지 않고 이를 다시 trypsin 처리하여 접착억제를 풀어주면 30분만에 다시 발현되는 것을 관찰하였다(Fig. 1).

이를 시간별로 관찰한 결과를 보면 접착억제에 의한 CD99 발현을 감소는 2일 후 급격히 일어나고 5일이면 거의 소실되었고 접착억제를 풀어주면 곧바로 회복되어 24 시간 후에는 90%를 상회하게 된다(Fig. 2). 한편 배양액에서 fetal bovine serum을 제거하여도 세포증식이 억제되어 세포주기 정지효과를 얻을 수 있으며,(21) 본 연구에서도

fetal bovine serum을 제거하고 배양한 2일 후 5.1%까지 CD99 발현이 감소되었다(Fig. 3).

이러한 초기 연구결과를 바탕으로 CD99가 세포분열이 억제된 세포주기 정지 시에는 발현하지 않다가 세포주기가 다시 활성화되면 급격히 세포표면에 발현된다는 사실을 인지하고, 과연 CD99의 발현이 G1기에 특이적으로 나타나는 것인가를 검증하기 위하여 말초혈액 림프구를 이용하여 2단계 연구를 진행하였다.

말초혈액에 존재하는 림프구는 대개 G0기의 상태로 존재하다가 어떠한 자극에 의하여 G1기로 활성화되게 된다.

실험적으로는 이를 혈구응집소인 PHA와 T림프구 성장인자인 IL-2로 유도할 수 있다. 본 연구에서는 PHA를 넣어 1일, IL-2를 첨가하여 2일 배양한 후 세포주기가 활성화된 림프구에서 활성화 전후의 CD99 발현 정도와 PI의 양을 2-color 유세포분석을 시행하였더니 PI의 양이 증가한 S, G2, M기의 세포들이 늘어나면서 CD99의 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 세포주기가 활성화되어 제 1간기 검문소(G1 check point)를 통과하여 S, G2, M기로 진행되면 G1전기에 발현되던 CD99가 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이러한 사실을 검증하기 위해서는 세포주기를 G1/S 전이단계에서 정지시키는 세포주기 억제제들을 이용하면 유용한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

강력한 면역억제제인 rapamycin은 T림프구의 활성화와 성장에 필요한 signal transduction 경로를 차단하는 것으로 알려져 있으며,(22) 특히 IL-2로 활성화된 T림프구에서 G1/S기 전이를 방해하는 것으로 보고되고 있다.(23) 이러한 현상은 DNA 중합효소제의 억제제인 aphidicolin이나 식물성 아미노산인 mimosine의 작용에서도 관찰되는 바, p21과 p53의 상승을 유도하여 G1/S 전이를 억제한다고 알려져 있으며 생체나 세포배양에서 세포주기를 제 1간기 후기에 동기화하는 방법으로 유용하게 사용되고 있다.(24)

또한 세포성장 억제제인 transforming growth factor β (TGF β)는 cyclin-CDK 복합체에 대한 억제제를 유도하여 Rb의 인산화 전 단계에서 세포주기를 정지시켜 G1 후기에 세포주기를 동기화한다.(25)

T림프구가 G0기에서 G1기로 활성화되면 IL-2를 비롯한 각종 cytokine을 분비하게 되고 이러한 cytokine에 고친화력을 나타내는 수용체를 세포표면에 발현시킨다. IL-2 수용체도 그 중 하나로서 T림프구의 활성화 정도를 나타낸다.(10)

한편, 세포주기 조절장치는 cyclin과 CDK 두 종류의 단백질에 의하여 주로 작동되는데 제 1간기에 작용하는 G1 cyclin은 효모에서 G1/S기 전이에 중요한 역할을 한다는 것이 입증되었고(26) 인체에서도 cyclin C, D1, E 등이 제 1간기 cyclin으로 알려져 있다. 반면, cyclin A는 합성기 초기에 활성을 나타내며 cyclin B는 p34^{cdc2}와 결합하여 G2/M기 전이에 중요한 역할을 하며(7,27) Cdc2와 복합체를 이루어 mitosis에 중요한 역할을 하는 mitosis-promoting factor (MPF)를 형성한다.(28)

Cyclin은 CDK와 결합하여 세포주기의 진행에 결정적인 역할을 하며 G1/S기 전이단계에서는 종양억제 유전자인 Rb의 인산화에 관여하는 것으로 알려져 있다.(29) 대표적인 종양억제 유전자인 Rb는 인체의 발암과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 세포주기의 진행과 세포분화를 촉진하는 이중역할을 한다고 보고되고 있다.(30) 한편, CDK-2는 cyclin D, E와 결합하여 G1/S기 전이에 필수적인 역할을 하며 합성기 초기에는 cyclin A와 결합하여 세

포주기 조절작용을 한다.(7)

이렇듯 세포주기는 특정 세포주기마다 cyclin과 CDK의 변화에 의해 조절되는데 Cdc34와 cyclosome이 관여하는 단백질 분해(proteolysis)가 이를 조절하여 이 단백질 분해는 각 세포주기마다 염색체와 spindle dynamic에도 직접 관여한다.

이러한 특정 단백질들은 세포주기 각 단계에 활성을 나타내는 물질들로서 세포질내에 존재하게 되어 Western blot analysis를 해야 확인을 할 수 있게 된다. 본 연구에서는 CD99의 발현을 세포질내에 존재하는 특정 단백질과 연관시켜 특정 세포주기에서의 CD99 발현을 검증하기 위해 magnetic bead를 이용하여 림프구를 CD99 발현유무에 따라 분리하고 G1/S기 전이에 필수적인 Rb와 CDK-2의 존재를 Western blot으로 확인한 결과, CD99 발현이 있는 림프구에서만 Rb와 CDK 존재를 확인하여 역시 제 1간기에 CD99 발현이 나타난다는 것을 확인하게 되었다(Fig. 8).

다음 단계로 림프구를 활성화시킨 후 G2/M기 전이에 중요한 역할을 하는 cyclin B와 CD99의 존재유무를 Western blotting으로 확인한 결과 활성화 림프구 중 CD99 발현이 없는 것에서만 cyclin B가 존재하고 CD99 발현이 있는 것은 존재하지 않아 S/G2/M기에는 CD99의 발현이 없는 것을 확인하였다. 활성화하지 않은 말초혈액 림프구는 일부가 G1기에 있을 수 있으므로 Western blotting시에 CD99의 존재를 쉽게 확인할 수 있었으며 세포표면에 CD99 발현이 없는 활성화 전의 G0기 림프구에서는 미약하게 CD99가 검출이 되었다. 이는 magnetic bead를 이용한 림프구 분리과정에서 오염이 되었을 가능성도 있으나 G0기에 세포질내에 CD99가 존재하다가 G1기에 접어들어 세포표면에 이를 발현하고 S/G2/M기로 진행하면서 존재가 사라지는 가능성도 생각해 볼 수 있겠다.

결론

인체세포에 광범위하게 분포하는 MIC2 유전자의 산물인 CD99와 세포주기와의 상관관계를 규명하기 위하여 태아 폐 섬유모세포와 말초혈액 림프구를 사용하여 세포주기를 분석하고 각 단계에서 CD99의 발현을 유세포 측정기로 분석하여 아래의 결과를 얻었다.

태아 폐 섬유모세포는 접촉억제와 배양액의 혈청 제거 방법으로 세포주기 정지 시에 CD99 발현이 사라지고 세포주기를 다시 활성화시키면 CD99가 신속하게 재발현되는 것을 관찰하였다. 다음 단계로 말초혈액 림프구를 PHA와 IL-2로 활성화시키고 CD99 발현을 PI와 2-color 유세포 측정을 하고 시간적 변화와 PI 주도표를 분석하였다.

Rapamycin으로 G1/S 전이를 억제시킨 후 같은 방법으로 실험한 결과 CD99의 발현은 초기 G1기에 나타났다가 후기 G1기에 급속히 감소하여 S/G2/M기에는 사라지는 것을

관찰하였다.

Magnetic bead를 이용하여 CD99 발현 유무에 따라 림프구를 분리하고 세포주기 조절단백질을 Western blotting으로 측정 한 결과 CD99가 발현된 림프구에서만 Rb와 CDK-2가 확인이 되었고 활성화 림프구 중 CD99의 발현이 없는 림프구에서만 cyclin B의 존재를 확인할 수 있었다.

결론적으로 CD99는 세포주기가 G0기인 상태에서 G1기로 활성화되면서 세포표면에 발현하였다가 제 1간기 검문소를 거쳐 후기 G1기부터 급격히 사라지는 제 1간기에 특이적인 표지자라 할 수 있겠다.

REFERENCES

- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.
- Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 1996;274:1643-5.
- Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989;246:629-34.
- Elledge SJ. Cell cycle check points: preventing and identity crisis. *Science* 1996;274:1664-72.
- Pardee A. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1994;246:603-8.
- Murray AW, Kirschner MW. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 1989;246:614-21.
- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73:1059-65.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-7.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor directly controls DNA replication via interaction with PCNA. *Nature* 1994;369:574-8.
- Cantrell DA, Izquierdo M, Rief K, Woodrow M. Regulation of PtdIns-3-Kinase and the guanine nucleotide binding proteins p21ras during signal transduction by the T cell antigen receptor and the interleukin-2 receptor. *Semin Immunol* 1993;5:319-26.
- Petit D, Leveilliers J, Wessenbach J. Physical mapping of the human pseudo-autosomal region; comparison with genetic linkage map. *EMBO J* 1988;7:2369-76.
- Bernard G, Zoccola D, Deckert M, Breitmayer J, Aussel C, Bernard A. The E2 molecules (CD99) specifically triggers homotypic aggregation of CD4+, CD8+ thymocytes. *J Immunol* 1995;154:26-32.
- Levy R, Dilley J, Fox RI, Warnk R. A human thymus-leukemia antigen defined by hybridoma monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:6552-6.
- Dworzak M, Fritsch G, Buchinger P, Fleischer C, Printz D, Zellner A, et al. Flow cytometric assessment of human MIC2 expression in bone marrow, thymus, and peripheral blood. *Blood* 1994;83:415-25.
- Hahn JH, Kim MK, Choi EY, Kim SH, Sohn HW, Han DI, et al. CD99 (MIC2) regulates the LFA-1/ICAM-1 mediated adhesion of lymphocytes, and its gene encodes both positive and negative regulators of cellular adhesion. *J Immunol* 1997;159:2250-8.
- Kim SH, Choi EY, Shin YK, Kim TJ, Chung DH, Chang SI, et al. Generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype through downregulation of CD99 (MIC2). *Blood* 1998;92:4287-95.
- Kim SH, Shin YK, Lee IS, Bae YM, Sohn HW, Suh YH, et al. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype. *Blood* 2000;95:294-300.
- Park SH, Bae YM, Kim TJ, Ha IS, Kim SY, Chi JG, et al. HLA-DR expression in human fetal thymocytes. *Human Immunol* 1992;33:294-8.
- Holly RW, Kiernan JA. "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. *Biochemistry* 1968;60:300-4.
- Stocker MGP. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. *Nature* 1973;246:200-3.
- Brooks RF. Regulation of the fibroblast cell cycle by serum. *Nature* 1976;260:248-50.
- Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Ann Rev Immunol* 1996;14:483-510.
- Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sciences* 1996;58:373-95.
- Spadari S, Focher F, Sala F, Ciarocchi G, Koch G, Falaschi A, et al. Control of cell division by aphidicolin without adverse effect upon resting cells. *Arzneimittel-Forschung* 1985;35:1108-16.
- Howe PH, Draetta G, Leof EB. Transforming growth factor β 1 inhibition of p34^{cdc2} phosphorylation and histone H1 kinase activity is associated with G1/S-phase growth arrest. *Mol Cell Biol* 1991;11:1185-94.
- Reed SI. G1 specific cyclin in search of an S-phase promoting factor. *Trends Genet* 1991;7:95-9.
- Nurse P. Ordering S phase and phase in the cell cycle. *Cell* 1994;79:547-50.
- King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. *Cell* 1994;79:563-71.
- Dirks PB, Rutka JT. Current concept in neuro-oncology: the cell cycle. *Neurosurg* 1997;40:1000-13.
- Giordano A, Kaiser HE. The retinoblastoma gene: its role in cell cycle and cancer. *In Vivo* 1996;10:223-7.