





-3

2004 6

---

---

---

---

---

가

Wang, Weiguo Wu, Shihua Sun

Dr. Mao,

Luo

가

가

가

가

.....	1
. .....	3
II. ....	6
1. NSCLC cell lines and culture .....	6
2. Western blot and northern blot analysis. ....	6
3. Plasmid preparation and <i>in vitro</i> DNA methylation .....	8
4. Luciferase assay and -Gal assay.....	9
5. Bisulfite-PCR for restriction analysis and sequencing .....	9
6. Methylation-specific PCR .....	10
7. Electrophoretic mobility-shift assay .....	11
8. Chromatin immunoprecipitation analysis .....	12
III. ....	14
1. IGFBP-3 expression in NSCLC cell lines .....	14
2. Expression of IGFBP-3 reduced in NSCLC cell lines and restored by 5'-aza- dC .....	15
3. Sp-1/Sp-3 binding site as an important regulatory element of IGFBP-3 promoter .....	16
4. Detection of hypermethylation of the IGFBP-3 promoter in NSCLC cell lines .....	18

5. Transcription factor Sp1-/Sp-3 binding altered according to methylation status .....	20
6. Sp-1/Sp-3 consensus sequence binding factors in H1299 cells and effect of demethylation agent 5'-aza-dC .....	22
7. Luciferase activity decreased in SssI methylase catalyzed IGFBP-3 promoter, and coexpression of human MeCP2 cDNA provides additional repression .....	23
IV. ....	27
V. ....	31
.....	33
.....	41

## List of figures

Fig. 1. Analysis of the IGFBP-3 promoter. ....	7
Fig. 2. IGFBP-3 expression in NSCLC cell lines .....	14
Fig. 3. Effect of 5'-aza-dC on IGFBP-3 expression .....	15
Fig. 4. IGFBP-3 promoter activity in various NSCLC cell lines .....	17
Fig. 5. Bisulfite-PCR/restriction, sequencing, and MSP in various NSCLC cell lines .....	19
Fig. 6. Binding of transcription factors Sp-1/Sp-3 alters according to methylation status.....	21
Fig. 7. Sp-1/Sp-3 binding status of Sp-1, MeCP2, and HDAC and the effect of demethylating agent 5'-aza-dC .....	23
Fig. 8. Expression level of MeCP2 in NSCLC cell lines and effect on <i>in vitro</i> methylated pGL2- $\Delta$ 1708 luciferase report plasmid .....	25



## 국문 요약

### 비소세포성 폐암에서 인슐린 양 성장 인자 결합 단백질-3 발현 조절 기전

인슐린 양 성장 인자 (IGF) 결합 단백질-3 (IGFBP-3)은 IGF와 결합하여 IGF의 세포분열촉진 및 항세포고사 기전을 억제할 뿐 아니라 IGF와는 독립적으로 세포고사를 유도함으로써 비소세포성 폐암 세포주의 성장을 억제한다. 이 연구에서는 비소세포성 폐암 세포주를 이용하여 IGFBP-3 promoter 내 CpG islands의 hypermethylation이 IGFBP-3 유전자의 발현에 어떠한 역할을 하는가와 유전자 발현을 억제하는 기전을 연구하였다. 15종의 비소세포성 폐암 세포주 중 7종 (46.7%)에서 IGFBP-3 promoter 내 CpG islands의 hypermethylation이 관찰되었다. 비소세포성 폐암 세포주에서 promoter 내 CpG islands의 methylation 상태는 IGFBP-3 유전자의 단백질 및 mRNA 발현 양상과 잘 일치하였으며, IGFBP-3의 발현이 억제되었던 비소세포성 폐암 세포주들 중 일부에서 demethylating 약제인 5'-aza-2-deoxycytidine (5'-aza-dC) 처리 후 그 발현이 회복되었다. IGFBP-3의 promoter 활성도에 중요한 역할을 하는 Sp-1/Sp-3 결합 요소 부위의 CpG islands는 IGFBP-3 단백질 발현이 억제된 비소세포성 폐암 세포주에서 hypermethylation 되어 있었으며, 이는 Sp-1 전사 인자의 결합을 억제하였다. ChIP assay에서 IGFBP-3

promoter내 CpG islands의 hypermethylation은 Sp-1/Sp-3 결합 요소에 Sp-1, methyl-CpG binding protein-2 (MeCP2), 그리고 histone deacetylase (HDAC)의 결합에 영향을 주었으며, 이는 5'-aza-dC 처리에 의하여 역전되었다. Sp-1/Sp-3 결합 요소를 포함하고 있는 IGFBP-3 promoter의 *in vitro* methylation은 promoter 활성도를 현저히 감소시켰으며 이는 MeCP2를 동시에 발현시켰을 때 더욱 억제되며 5'-aza-dC 처리 시 회복되었다. 이러한 결과들은 비소세포성 폐암에서 IGFBP-3 promoter의 hypermethylation이 IGFBP-3 발현을 억제하는 하나의 기전이며, HDAC과 MeCP2의 모집이 유도됨으로서 Sp-1의 결합이 억제되고 나아가 IGFBP-3 유전자의 발현이 억제됨을 보이는 것이다. 마지막으로 임상 시험중인 demethylation 약제로서 IGFBP-3의 발현을 유도할 수 있다는 것은 IGFBP-3의 세포의 성장과 고사에 미치는 중요한 역할을 고려해 볼 때 이들이 비소세포성 폐암의 치료에 사용될 수 있음을 시사하는 것으로 생각된다.

-----

핵심되는 말: 인슐린양 성장 인자, 인슐린 양 성장 인자 결합 단백질-3, CpG islands의 methylation, methyl-CpG 결합 단백질-2 (MeCP2), 비소세포성 폐암

# 비소세포성 폐암에서 인슐린 양 성장 인자 결합 단백질-3 발현 조절 기전

지도 교수 김세규

연세대학교 대학원 의과학과

장 윤 수

## I. 서론

폐암은 수술적 절제, 방사선 치료 및 항암 화학약물요법을 포함하여 사망률을 줄이기 위한 다양한 노력에도 불구하고 국내 및 미국을 비롯한 서구 남녀의 암 사망률 1위를 차지하고 있는 질환이다<sup>1</sup>. 5년-생존율은 1970년대의 7%에서 2000년에 14%로 향상되었으나 만족할 만한 수준에 도달하지 못하고 있으며, 또한 매년 1,000,000 예의 새로운 폐암 환자가 전세계적으로 생겨나고 있는 실정이다<sup>2</sup>. 국내에서도 약 5년 전부터는 위암 다음의 2 위 발생 빈도를 보이고 있으나 치료 성적은 크게 호전되지 않은 상태이다. 이러한 암울한 통계적 수치는 폐암 발생 기전의 규명, 암 예방 및 조기 진단 방법의 개발이 시급하게 필요함을 시사하는 것이다.

인슐린 양 성장 인자들 (insulin like growth factors; IGFs)은 사람의 비소세포성 폐암 세포주를 포함하여 대부분의 신생물성 세포와 기관지 상피

세포들의 성장에 중요한 세포분열촉진 인자로서 세포고사를 억제할 뿐 아니라 정상 세포의 신생물성 변화와 전이에도 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>3-5</sup>. 또한 세포분열을 유도하는 다른 성장 인자들 또는 스테로이드계 약물과는 상보적으로 작용하며 암의 성장을 억제하는 물질들에 대해서는 길항적으로 작용한다. 인슐린 양 성장 인자 결합 단백질-3 (IGF binding protein-3; IGFBP-3)은 IGFs가 세포 외부의 환경에서 수용체와 결합하는 것을 방해함으로써 이들의 세포분열촉진 및 세포고사를 억제하는 생물학적 활성에 길항하는 IGF-I 의존적 기능뿐 아니라<sup>5,6</sup>, IGFBP-3의 세포 표면 수용체가 관여될 것으로 생각되는 IGF-I 비의존적인 항증식성/세포 고사 촉진 기능을 가지고 있다<sup>7-9</sup>. 또한 IGFBP-3는 transforming growth factor- $\beta$ , retinoic acid, tumor necrosis factor- $\alpha$ , p53, anti-estrogens, flavonoid antioxidant silibinin, paclitaxel, 그리고 histone deacetylase (HDAC) 억제물인 trichostatin A와 같은 주요 물질들의 성장 억제 신호를 매개하는 것으로 밝혀져 있다<sup>9-16</sup>. 체내에 순환하는 IGF-I과 IGFBP-3의 혈장 및 혈청 농도는 정상인 사이에도 많은 차이를 보이고 있으며 대규모의 전향적 역학 연구 결과 IGF-I과 IGFBP-3은 개체간의 차이가 있어서 높은 IGF-I과 낮은 IGFBP-3의 농도가 폐암, 유방암, 대장 직장암, 전립선암 등을 비롯한 몇몇 주요 암 발생 위험과도 관련이 있는 것으로 알려지면서<sup>17-20</sup> 정상 범주의 개체간 농도 차이를 일으키는 기전에 대하여 관심이 증가하고

있다<sup>21</sup>. 따라서 IGF-I의 생물학적 기능을 조절하는 IGFBP-3의 발현 조절 기전을 밝히는 것이 중요하며, 비소세포성 폐암의 발생 및 성장 기전을 규명하고 나아가 폐암 치료에 응용될 수 있는 가를 확인할 수 있는 기초가 될 수 있다.

이 연구에서는 비소세포성 폐암에서 세포의 성장과 고사에 관여하고 IGF-I의 생물학적 활성을 조절하는 IGFBP-3의 발현 양상과 그 조절 기전 중의 하나인 상유전자적 변화를 비소세포성 폐암 세포주를 이용하여 관찰하였으며 나아가 상유전자적 변화를 통한 유전자 발현 억제 기전을 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

**1. NSCLC cell lines and culture.** NCI-H1299, H661, H596, A549, H460, H441, H358, H322, H1944, H292, H226B, SK-MES-1, Calu-6, Calu-1, H157 등 사람의 비소 세포성 폐암 세포주는 American Type Tissue Collection (Manassas, VA, USA)으로 부터 구입하였다. 이들은 10% fetal calf serum (FCS) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)이 첨가된 RPMI-1640 medium을 사용하여 배양하였다.

**2. Western blot and northern blot analysis.** IGFBP-3의 감지를 위해 30 µg의 단백질질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 상에서 전기 영동 분획하였다. Polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 으로 분획된 단백질을 옮긴 뒤 5% 탈지유를 포함하고 있는 TBS-T (Tris-buffered saline-Tween (20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl; 0.1% Tween-20))로 비특이 반응을 차단하였다. Membrane들은 goat polyclonal anti-IGFBP-3 (DSL, Webster, TX, USA) 로 4°C 에서 16시간 동안 incubation한 다음 horseradish peroxidase-conjugation된 2차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santacruz, CA, USA)로 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 면역 반응 단백질은 enhanced chemiluminescence (ECL) kit와 Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 감지하였다. RNA의 분리는 약제 처리 전후의 세포를 1X PBS로 2 차례 세척 후, 4 M guanidinium isothiocyanate를

첨가하여 용해시킨 뒤 타 문헌에 기술되어 있는 대로 RNA를 분리하였다<sup>22</sup>. 20  $\mu$ g의 RNA를 전기영동 한 후 Zeta-Probe membrane (Bio-Rad Laboratories) 옮긴 다음, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표지된 IGFBP-3 또는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 cDNA 를 함유하고 있는 교잡 용액과 함께 처리하였다. 탐침은 Prime-It<sup>®</sup> II Random Primer Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 표지한 뒤 MicroSpin<sup>™</sup> S-300 HR Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)을 이용하여 정제하였다. Membrane은 2회 세척 후 Hyperfilm ECL을 이용하여 감지하였다.

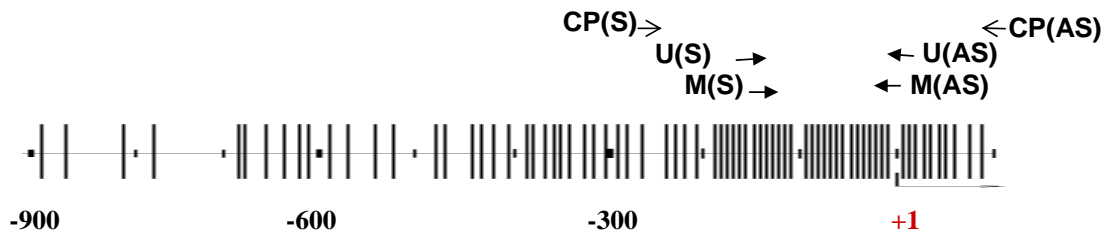
## A

```

ggagcaggtg ccCGggCGag tctCGagctg caCGccccCG agctCGgccc CGgctgctca
                AP2                                AP2
gggCGaagca CGggcccCGc agcCGtgctt gCGcCGaccC Gccccctcc caacccccac
                Sp-1/Sp-3
tcctgggCGC GCGttcCGgg gCGtgtcctg ggccaccCG gcttctatat aCGggcCGgC
                HhaI                                TATA                                HhaI
GCGccCGggc CGcccagatg CGgagcactgc (Acc. No. M35878)
                ↳ +1

```

## B



**Fig. 1. Analysis of the IGFBP-3 promoter.** A. Genomic sequence analysis of IGFBP-3 promoter (Accession number, M35878); note the two putative AP-2 binding sites, Sp-1/Sp-3 binding site, TATA box, and two bisulfite PCR-*HhaI* restriction sites. B. Schematic diagram of the IGFBP-3 promoter showing CpG islands (M, methylated; U, Unmethylated) and the location of primers used in bisulfite-PCR for restriction analysis, bisulfite sequencing, and MSP. Arabic

numbers indicate locations of nucleotides relative to the mRNA cap site. Vertical lines, position of CpG dinucleotides.

**3. Plasmid preparation and in vitro DNA methylation.** 1.9-kb IGFBP-3 promoter 가 luciferase reporter vector 의 일종인 pGL2-basic (Promega Corp., Madison, WI, USA)에 삽입된 pGL2-IGFBP-3 및 이의 삭제 변종인 pGL2-Δ1600, Δ1675, -Δ1708, -Δ1755, 및 -Δ1795 는 Oregon Health Sciences University (Portland, OR, USA) 의 오영만 교수로부터 제공 받았다<sup>23</sup>. IGFBP-3 promoter 의 염기 서열은 Fig. 1A 와 같으며 이들의 성격을 간략하면 pGL2-Δ1600 는 10 개의 p53 consensus 결합 부위와 2 개의 consensus AP-2 결합 부위를 포함하고 있으며, pGL2-Δ1675 는 5 개의 p53 결합 부위와 하나의 consensus AP-2 결합 부위를 가지고 있다. 이 두 AP-2 결합 부위는 pGL2-Δ1708 에서는 모두 삭제되어 있으며, pGL2-Δ1755 에서는 Sp-1/Sp-3 결합 요소가 삭제되어 있다. MeCP2 (Accession No. AF158180)의 전체를 포함하는 cDNA 는 사람의 정상 폐 조직에서 얻은 cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA, USA)로부터 다음의 시발체를 이용 PCR 로 증폭하였다; sense primer 5'-GGGATCCATGGTAGCTGGGATG-3', antisense primer 5'-GGAATTCAGCTAACTCTCTC-3'. 증폭된 PCR 산물은 TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 pCR-II<sup>®</sup> plasmid 에 삽입, T7 및 M13R 시발체로 염기서열을 확인한 뒤, EcoRI (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Switzerland)로 절단하고 DNA polymerase I Klenow fragment (Roche Molecular Biochemicals)로 blunt 말단을 만들어 pCMX-



mammalian expression vector 에 삽입하였다. *In vitro* DNA methylation 은 pGL2- $\Delta$ 1708 plasmid 를 5 mM S-adenosylmethionine (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)을 포함한 반응액 하에서 (methylation) 또는 포함하지 않은 반응액에서 (unmethylation) SssI methylase (New England Biolab)로 처리한 뒤 정제하여 얻었다. 이러한 plasmid 의 methylation 여부는 *Hha*I 제한 효소 (New England Biolabs)로 처리한 뒤 전기영동 하여 확인하였다.

**4. Luciferase assay and  $\beta$ -Gal assay.** NCI-H1299 세포들을 포함한 비소세포성 폐암 세포주를 24 well plate 에  $5 \times 10^4$  cells/well 로 분주한 뒤 70% confluency 에 도달하였을 때 200 ng 의 reporter plasmid DNA 와 30 ng 의 CMV- $\beta$  gal control vector (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)를 serum-free 상태의 조건에서 lipofectamine (GibcoBRL)을 이용하여 transfection 을 시행하였다. 6 시간 뒤 10% FCS 의 RPMI-1640 배지로 교환한 뒤 및 48 시간 더 배양 후 luciferase assay kit (Promega)를 이용하여 luciferase 활성도를 측정하였다. 측정값은 동일 회사의  $\beta$ -gal assay system 을 이용하여 측정된 CMV- $\beta$  gal control vector 의 활성도로서 보정하였다.

**5. Bisulfite-PCR for restriction analysis and sequencing.** Herman 등에 의해 기술된 방법에 따라 DNA를 화학적 변성시킨 후 PCR 증폭을 시행하면 5'-

methylation된 cytosine을 확인할 수 있다<sup>24</sup>. PCR에 사용된 시발체의 선택은 luciferase assay에서 확인된 promoter 활성도에 중요한 역할을 하는 부분인 Sp-1/Sp-3 결합 요소 부위로 IGFBP-3 promoter상의 위치는 Fig. 1B와 같다. Sense primer 5'-TCGGGTATATTTTGGTTTTTGTAG-3', antisense primer 5'-AAACATATAAAATCCAAACAAAA-3'. 매 반응 시 SssI methylase로서 완전히 methylation 된 DNA를 positive control로 사용하였으며 annealing 온도는 60°C로 하였다. 25  $\mu$ l의 PCR 산물 중 절반은 HhaI 제한 효소를 이용하여 절단한 뒤 2.5% acrylamide gel에서 전기 영동 후 UV 하에서 확인하였으며 나머지 12.5  $\mu$ l의 PCR 산물은 효소 반응 없이 2.5% acrylamide gel에서 전기 영동 하여 확인 뒤 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 를 이용 분리, 정제하여 염기 서열 확인에 사용하였다.

**6. Methylation-specific PCR.** 1  $\mu$ g의 DNA를 동량의 salmon sperm DNA (Life Technologies, Inc.)와 혼합한 뒤 Herman 등이 기술한 대로 DNA 화학 변성을 시행하였다<sup>24</sup>. 간략하면 DNA를 2 M NaOH로 denature 한 뒤 10 mM hydroquinone과 3 M sodium bisulfite (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 처리하였다. 다음날 Wizard SV Plus kit column (Promega)으로 분리 정제한 뒤 3 M NaOH로 처리하고 3배 부피의 100% ethanol과 1배 부피의 10 M NH<sub>4</sub>OAc로 상온에서 침전시켰다. 침전된 DNA는 70%의 ethanol로 세척한 뒤 20  $\mu$ l의 증류수로 용해시킨 후 다음의 시발체 조합을 이용

하여 증폭하였다. Methylation된 DNA의 증폭을 위해서는 Sense 5'-CGAAGTACGGGTTTCGTAGTCG-3', 및 antisense 5'-CGACCCGAACGCGCCGACC-3'를 사용하였고 unmethylation된 DNA의 증폭을 위해서는 Sense 5'-TTGGTTGTTTAGGGTGAAGTATGGGT-3' 및 antisense 5'-CACCCAACCACAATACTCACATC-3'를 사용하였다. Bisulfite-PCR/제한 효소 분석 [CP(S) 그리고 CP(AS)] 및 MSP [M(S), M(AS), U(S), 그리고 U(AS)]에 사용된 시발체 조합은 Fig. 1B에 나와 있다. 매 반응시에는 DNA를 첨가하지 않은 negative control과 정상인의 림프구에서 얻은 DNA를 SssI methylase 처리 후 bisulfite 화학 변성을 시행한 positive control을 포함시켰으며 반응물은 ethidium bromide로 염색된 2.5% agarose gel에서 전기 영동 후 감지하였다.

**7. Electrophoretic mobility-shift assay.** 아래와 같이 methylation 되어 있지 않거나 (W.T.), oligomer 내 1개의 CpG island가 methylation (P.M.), 또는 3개의 CpG island가 모두 methylation 되어 있는 (C.M.) 3 쌍의 double-stranded 25-mer oligonucleotide (Operon Technology Inc. Alameda, CA, USA)를 이용하였으며 그 염기서열은 다음과 같다. W.T.는 5'- TGCGCCGACCCGCCCCCTCCCAAC-3' 및 그 상보적 순서를 가진 oligomer이며, P.M. 및 C.M.은 각각 5'- TGCGCCGACCC<sup>M</sup>GCCCCCTCCCAAC-3' 와 5'- TGC<sup>M</sup>GCC<sup>M</sup>GACCC<sup>M</sup>GCCCCCTCCCAAC-3' 및 그 상보적 순서를 가진 oligomer를 사용하였다. 이러한 oligomer는 T4 polynucleotide kinase (Promega)를 이용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP로 말단부를 표지하였다. 정제된 핵 단백질 추출물은 50 ng/ml poly

[d(A-T)] (Roche Molecular Biochemicals); 20 mM HEPES (pH 7.6); 1 mM EDTA; 1 mM dithiothreitol; 0.2% Tween-20<sup>®</sup>; 30 mM KCl 을 포함한 20  $\mu$ l의 반응액 하에서 표지된 oligomer와 함께 상온에서 15 분간 반응시켰다. 경쟁 반응에는 wild type 또는 mutant type Sp-1 consensus oligomer (Promega)를 추가하였다. 각 반응물들은 0.5 X TBE buffer system을 이용하여 전기영동 한 뒤 gels을 건조하여 Hyperfilm ECL에 감광시켜 감지하였다.

**8. Chromatin immunoprecipitation analysis.** ChIP 분석은 Chen 등이 기술한 방법을 이용하여 시행하였다<sup>25</sup>. 간략하면 비소세포성 폐암 세포는 2% FCS을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 5'-aza-dC로 5일간 처리하였다. 이후 세포들은 37 °C에서 10분간 formaldehyde (1% final concentration)로 처리한 뒤 단백질 분해 효소 억제제를 포함하고 있는 완충액 (25 mM Tris, pH 8.1; 10 mM EDTA; 1% SDS)으로 용해하였다. 동일한 수의 세포들을 anti-Sp-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-MeCP2, 또는 anti-HDAC (Upstate Biotechnology Inc. Charlottesville, VA, USA) 항체로 처리하고 salmon sperm DNA/Protein A agarose slurry (Upstate Biotechnology Inc.)로 면역 침전을 시행하였다. 단백질과 결합하여 침전된 DNA는 LiCl wash buffer 와 Tris-EDTA로 세척한 뒤 elution buffer (1% SDS, 0.1 N NaHCO<sub>3</sub>)를 추가하여 elution을 시행하였다. Cross-links는 20 mM NaCl과 1% SDS를 포함한 용액으로 분리 복원시킨 뒤, phenol/chloroform 추출 및

ethanol 침전법으로 DNA를 추출하고서 다음과 같은 시발체를 사용하여 증폭 후 [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP로 표지된 IGFBP-3 promoter 탐침으로 southern blotting을 시행하여 분석하였다. (Sense: 5'-CGTGAGCACGAGGAGCAGGTG-3': antisense: 5'-CAGGAGTGGGGTTGGGAG-3'). 전체 세포 단백질-DNA 복합체 중 면역 침강된 양의 2%는 input을 위한 control로 사용하였다.

### III. 결과

1. *IGFBP-3 expression in NSCLC cell lines.* 비소세포성 폐암세포주에서 IGFBP-3 발현 정도를 관찰하기 위해 IGFBP-3 항체와  $\alpha$ -<sup>32</sup>P로 표지된 IGFBP-3 탐침을 이용하여 Western 및 Northern blot 을 시행하였다. IGFBP-3의 mRNA는 NCI-H1299, H661, H441, H322, H226Br, 그리고 Calu-6 세포주에서는 관찰되지 않았으며 H226B, SK-MES-1 및 H358 세포주에서는 약하게 관찰되었다. 반면 H596, A549, H460, 그리고 H1944 세포주에서는 강하게 발현되었다. IGFBP-3 유전자의 단백질 발현 정도는 사용된 비소세포성 폐암 세포주에서 mRNA의 발현 정도와 잘 일치하였다 (Fig. 2A, B).

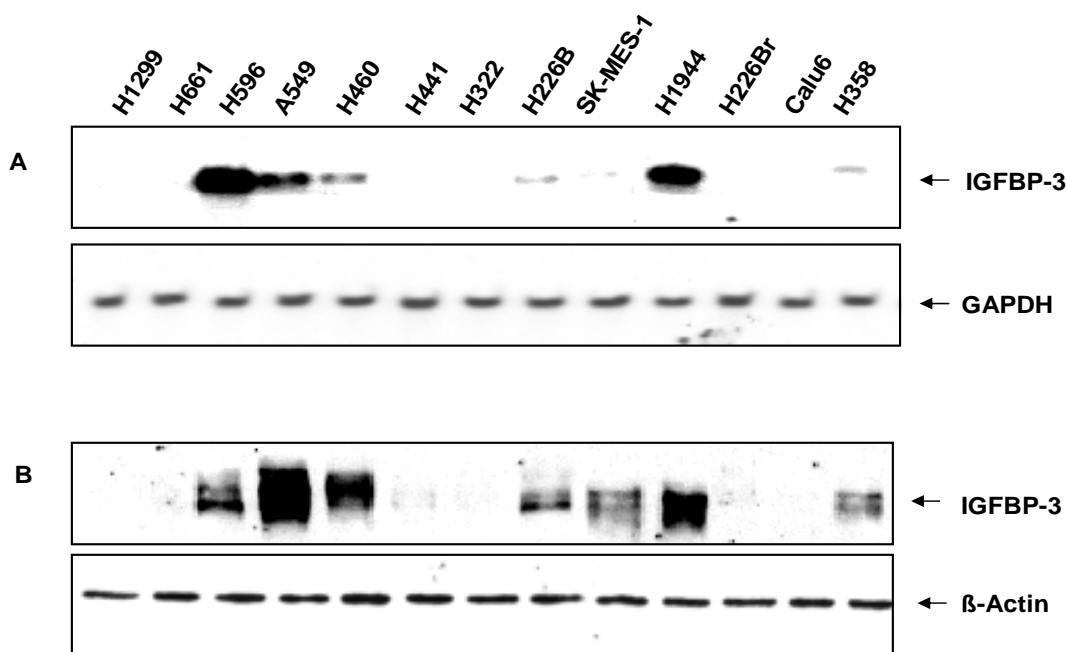
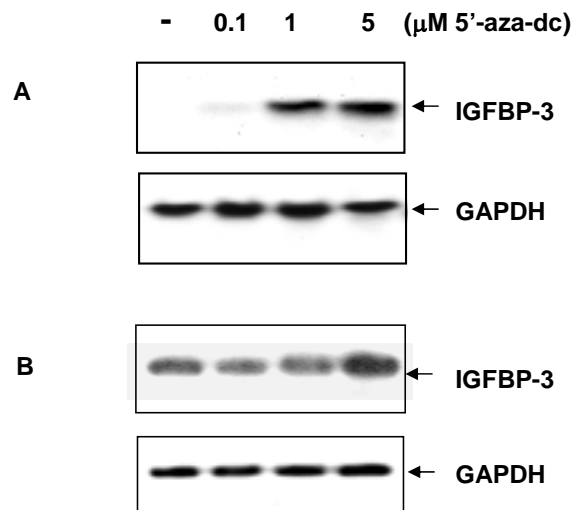


Fig. 2. IGFBP-3 expression in NSCLC cell lines. The expression of IGFBP-3 in a panel of NSCLC cell lines was examined by A, Northern blot analysis

using full-length IGFBP-3, or GAPDH cDNA probe as a control; and by B, Western analysis using anti-human IGFBP-3 antibody, with expression of  $\beta$ -actin examined as a loading control.

*2. Expression of IGFBP-3 Reduced in NSCLC cell lines and restored by 5-aza-dC.*

IGFBP-3의 발현이 관찰되지 않는 비소세포성 폐암 세포주들을 demethylating 약제인 5'-aza-dC 처리 후 Northern blot을 시행하여 IGFBP-3의 발현 양상의 변화를 관찰하였다. 5'-aza-dC를 1  $\mu$ M 또는 그 이상을 처리한 경우 대부분 IGFBP-3의 발현이 복원되었다 (Fig. 3A, B).



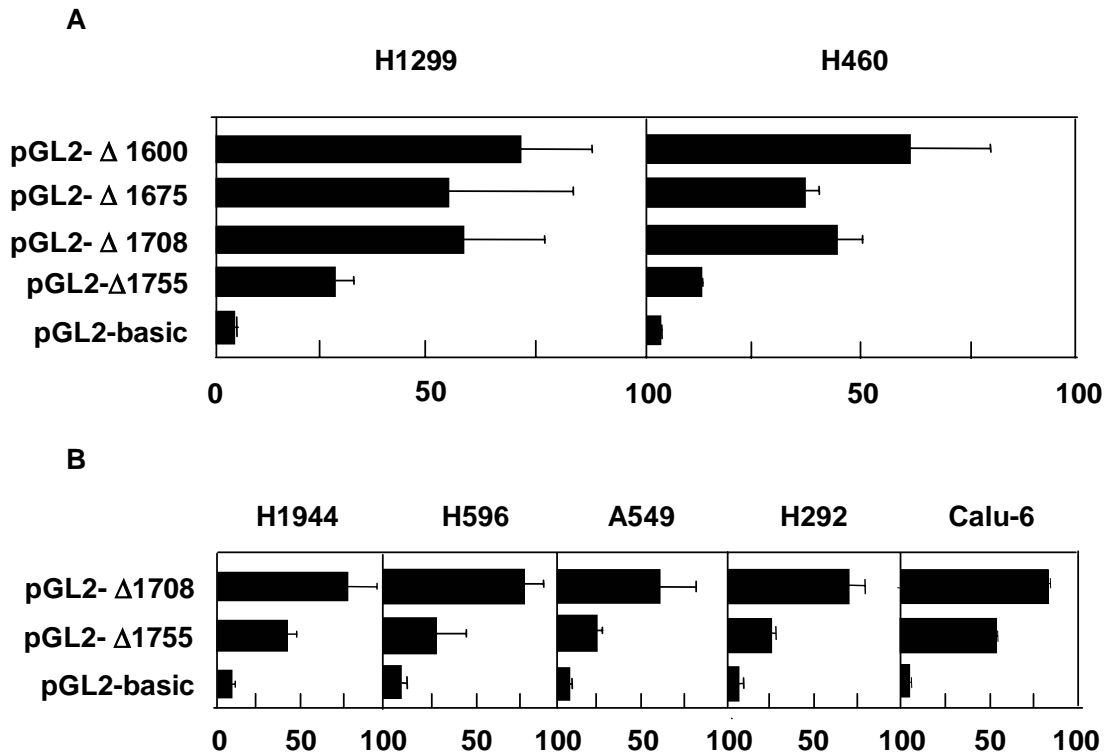
**Fig. 3. Effect of 5'-aza-dC on IGFBP-3 expression.** Effect of 5'-aza-dC on IGFBP-3 expression was studied by Northern blot analysis in H1299 NSCLC cells and H226B treated with 5'-aza-dc at concentrations of 0, 0.1, 1, and 5  $\mu$ M for

5 days in RPMI 1640 medium supplemented with 2% FCS. The expression of GAPDH was analyzed as a control.

### *3. Sp-1/Sp-3 binding site as an important regulatory element of IGFBP-3*

*promoter.* IGFBP-3 promoter의 활성도를 조절하는 주요 전사 인자 결합 부위를 규명하기 위하여 pGL2- $\Delta$ 1600, - $\Delta$ 1675 - $\Delta$ 1708, 및 - $\Delta$ 1755 등의 IGFBP-3 promoter의 절단 변이를 H1299, H460, H1944, H596, A549, H292, 및 Calu-6 세포주에 임시 transfection 시킨 후 48 시간 뒤 luciferase 활성도를 측정하였다. H1299 및 H460 세포주에서 pGL2- $\Delta$ 1675 또는 - $\Delta$ 1708을 transfection 시킨 후 측정된 luciferase 활성도는 pGL2- $\Delta$ 1600을 이용하여 얻은 값과 비교 시 같거나 약간 낮았다. 반면 pGL2- $\Delta$ 1755를 transfection 시킨 후 얻은 luciferase 활성도는 pGL2- $\Delta$ 1600를 transfection 시켜 얻은 값보다 67~75% 정도 낮았다 (Fig. 4A, B).





**Fig. 4. IGFBP-3 promoter activity in various NSCLC cell lines.** A. H1299 cells, which have methylated IGFBP-3 promoter, and H460 cells, which have unmethylated IGFBP-3 promoter, were transiently transfected with pGL2-basic,  $\Delta 1600$ ,  $-\Delta 1675$   $-\Delta 1708$ , or  $-\Delta 1755$  luciferase reporter plasmids. B. H1944, H596, and A549 cells, which have unmethylated IGFBP-3 promoter, and H292 and Calu-6 cells, which have methylated IGFBP-3 promoter, were transiently transfected with pGL2-basic,  $-\Delta 1708$ , and  $-\Delta 1755$  luciferase reporter plasmids. Luciferase activity was measured following incubation for 48 h. There was no difference in luciferase activity according to endogenous IGFBP-3 promoter methylation status. Data are shown as means ( $\pm$ S.D.) values of six different wells relative to cells transfected with pGL2-basic vector. The luciferase values were measured for at least three separate experiments.

#### 4. Detection of Hypermethylation of the IGFBP-3 Promoter in NSCLC Cell Lines.

H1299, H661, H441, H322, H226Br, H226B, 및 Calu-6 세포주와 같이 낮은 IGFBP-3 발현을 보이는 비소세포성 폐암 세포에서 bisulfite-PCR 및 *HhaI*을 제한 효소 절단법은 mRNA cap site로부터 -66 및 -16 번째의 cytosine이 methylation 되어 있을 때 관찰되는 237 bp, 188 bp 또는 78 bp 크기의 2개 이상의 절단 bands를 보였다. 188 bp 및 78 bp 크기의 bands의 경우 mRNA cap site로부터 -66 및 -16 번째 cytosine이 methylation 된 경우 관찰될 수 있으며 188 bp 및 315 bp 크기의 bands 는 각각 부분적으로 절단되었거나 절단되지 않은 경우 관찰될 수 있었다. 49 bp의 bands는 절단된 조각이 작아 시발체 및 시발체 이분자체와 구분되지 않아 확인이 어려웠다 (Fig. 5A). 이러한 부위의 methylation 상태를 확인하기 위하여 염기서열 분석을 H1299, Calu-6, 그리고 H661 세포주에서 얻어진 bisulfite-PCR 산물을 이용하여 시행하였다 (Fig. 5B). 2개의 putative AP2 결합 위치 (-183 및 -145 번째 cytosine), Sp-1/Sp-3 결합 위치 (-96 번째 cytosine), 그리고 2개의 *HhaI* 절단 위치를 포함하여 promoter 활성도에 주요 역할을 하는 부위 내 대부분의 CpG islands는 methylation되어 있었다. IGFBP-3 promoter의 methylation 상태를 다량의 검체에서 확인할 수 있도록 MSP를 시행하였다. 129 bp 및 158 bp 크기의 PCR 산물은 methylation 및 unmethylation된 DNA가 증폭되었을 때 각각 관찰되었다. IGFBP-3 mRNA transcripts가 관찰되지 않거나 매우 약하게 관찰되었던 H1299, H661, H441, H322, 및 H226B 세포주의 경우에는 129 bp 크기의 methylation bands가 관찰되었다 (Fig. 5C).

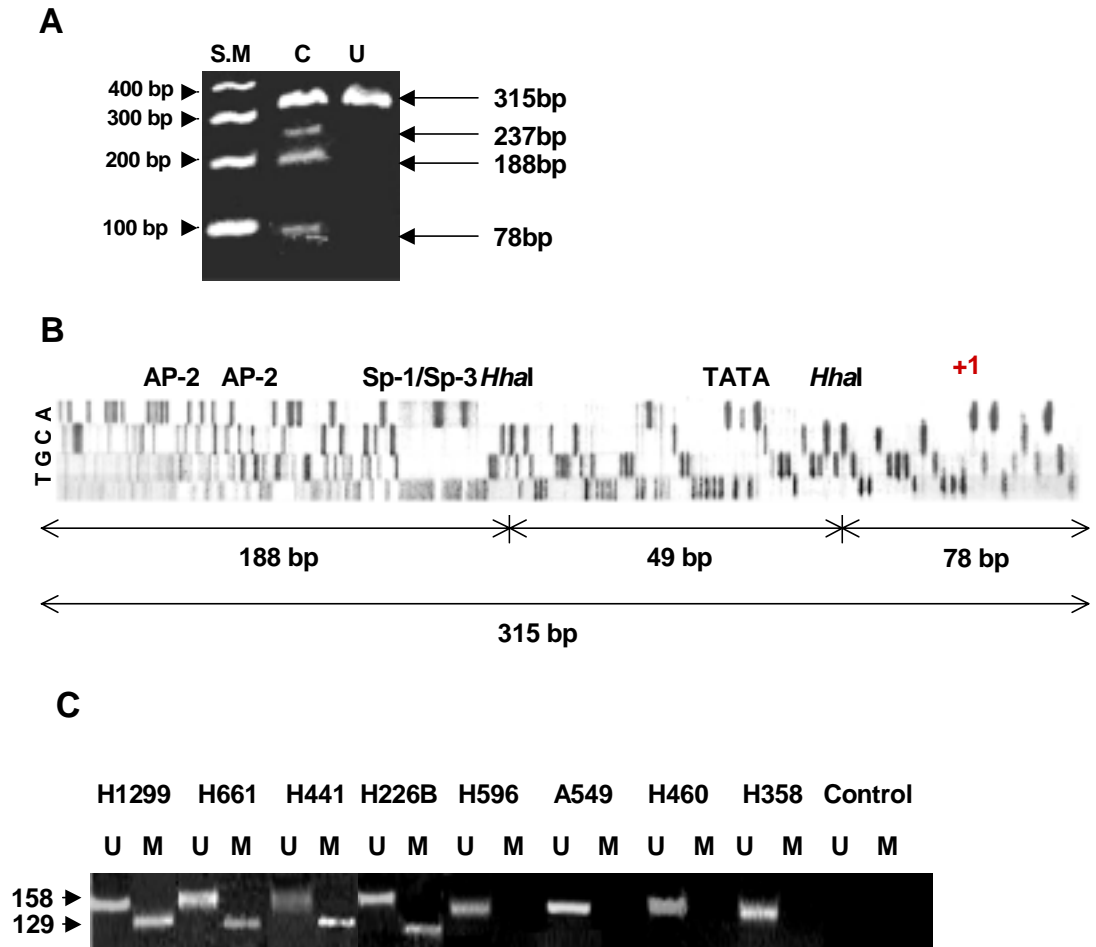


Fig. 5. Bisulfite-PCR/restriction, sequencing, and MSP in various NSCLC cell lines. A. Bisulfite-PCR for *HhaI* restriction analysis of H1299 cells. When the methylated DNA was modified by bisulfite, two *HhaI* restriction sites were generated in the middle of the 315 bp PCR product. SM = DNA size marker; C = DNA digested with *HhaI*; U = undigested DNA. B. Sequence analysis of bisulfite-treated genomic DNA from H1299 cells. The PCR products were generated with outer primers CP (S) and CP (AS) and then sequenced with inner primer M (AS) that is specific for hypermethylated sequence. All the cytosines in the CpG islands remained as cytosine. C. MSP analysis of IGFBP-3

promoter methylation status in NSCLC cell lines. U = PCR products using primer set specific for unmethylated promoter; M = PCR products using primer set specific for hypermethylated promoter. SM = DNA size marker.

##### *5. Transcription factor Sp1-/Sp-3 binding altered according to methylation status.*

IGFBP-3 promoter 내 Sp-1/Sp-3 결합 요소의 methylation이 전사 인자의 결합에 미치는 영향을 관찰하기 위해 IGFBP-3 promoter의 Sp-1/Sp-3 결합 부위를 포함하는 mRNA cap site로 부터 -108에서 -83까지를 CpG islands의 cytosine의 methylation 상태를 달리하여 3쌍의 25 bp oligomer를 제작하였다. W.T.는 5'-methylated cytosine이 CpG islands에 포함되어 있지 않으며, P.M은 Sp-1/Sp-3 결합 요소 내 하나의 CpG island가 5'-methylated cytosine을 포함하고 있으며, C.M.의 경우 내부의 모든 CpG islands 내 cytosine이 methylation 되게 제작하였다 (Fig. 6B). H1299 세포주의 핵 추출물과 W.T.를 사용한 경우 2개의 DNA-단백질 복합체가 관찰되었다. 그러나 이런 결합 양상은 CpG islands를 methylation 시킨 oligomer를 사용한 경우에는 변화되어 Sp-1/Sp-3 결합 요소 내부의 모든 cytosine을 methylation 시킨 C.M.의 경우 두 DNA-단백질 복합체가 모두 형성되지 않았으며, 중심부의 하나의 CpG island 내 cytosine을 methylation 시킨 P.M.의 경우 Sp-3 DNA-단백질 복합체의 형성에는 영향을 미치지 않는 반면 Sp-1/Sp-3 DNA-단백질 복합체의 형성이 억제 되었다. DNA-단백질 결합의 특이도를 확인하기 위해 표지 되지 않은 wild-type Sp-1 consensus oligonucleotides를 사용한 경우 이의 농도를 증가시켰을 때 각



wild-type 25-mer oligonucleotide from -105 to -82 of the IGFBP-3 promoter containing the consensus binding sequences for Sp-1/Sp-3. Wild-type and 5'-methylated deoxy-cytosine modified probes were used in gel-shift assays.

*6. Sp-1/Sp-3 consensus sequence binding factors in H1299 cells and effect of demethylation agent 5-aza-dC.* IGFBP-3 promoter의 methylation이 Sp-1, MeCP2, 그리고 HDAC의 결합에 미치는 영향과 demethylation 약제인 5'-aza-dC의 역할을 알아보기 위해 methylation된 IGFBP-3 promoter를 가지고 있는 H1299 세포주를 이용하여 chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay를 시행하였다. methyl-CpG 결합 단백질의 하나인 MeCP2는 Sp-1에 의해 활성화되는 leukosialin 유전자의 전사를 promoter가 methylation<sup>16</sup> 되면 HDAC와 같은 다른 억제인자들을 모집함으로써 전사 억제를 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>26</sup>. MeCP2 와 HDAC은 동시에 Methylation된 IGFBP-3 promoter에 결합하며 gel-shift assay에서의 결과처럼 Sp-1의 결합은 억제되었다. 1  $\mu$ M 의 5'-aza-dC 로 5 일간 처리한 경우 IGFBP-3 promoter에 Sp-1의 결합력은 다시 유도된 반면 MeCP2 과 HDAC 의 결합은 억제되었다 (Fig. 7).

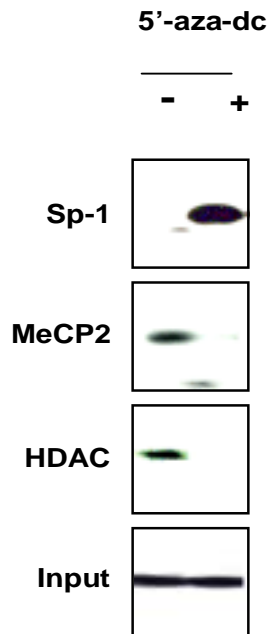


Fig. 7. Sp-1/Sp-3 binding status of Sp-1, MeCP2, and HDAC and the effect of demethylating agent 5'-aza-dC. ChIP analysis was performed to examine whether methylation status and treatment with demethylating agent 5'-aza-dC affected Sp-1, MeCP2, and HDAC binding on the IGFBP-3 promoter in H1299 NSCLC cells, which have methylated IGFBP-3 promoter. Methylated promoter containing the Sp-1/Sp-3 binding element did not recruit Sp-1, while MeCP2 and HDAC were recruited concurrently. After 5 days of treatment with 1  $\mu$ M of 5'-aza-dC in 2% of fetal bovine serum, the binding affinity of Sp-1 on the IGFBP-3 promoter was increased, whereas the binding of MeCP2 and HDAC was significantly decreased.

*7. Luciferase activity decreased in SssI methylase catalyzed IGFBP-3 promoter and coexpression of human MeCP2 cDNA provides additional repression.*

IGFBP-3 promoter의 methylation이 promoter의 활성도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Sp-1/Sp-3 결합 요소를 포함하고 있는 pGL2- $\Delta$ 1708를 in vitro methylation 시킨 후 luciferase 활성도를 H1299 세포주에서 측정하였다. pGL2- $\Delta$ 1708 plasmid 내 CpG islands의 methylation은 전사 활성도를 유의하게 감소시켰다 (data not shown). Methylation 되어 있는 plasmid로 transfection된 세포주에 5'-aza-dC를 처리하였을 때 약물 처리 농도에 비례하여 전사 활성도가 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 1  $\mu$ M 및 5  $\mu$ M의 5'-aza-dC를 처리하였을 때, CpG methylated promoter의 전사 활성도는 약물 처리 전에 비하여 약 1.7 및 2.3 배 증가함을 확인할 수 있었다. MeCP2와 같이 내인적 methyl-결합 단백질들은 methylation된 주형에서 구조적인 전사의 억제를 하는 것으로 알려져 있다<sup>16</sup>. Methylation된 promoter에서 전사 활성도의 조절에 대한 methyl-CpG 결합 단백질의 역할을 확인하기 위하여 비소세포성 폐암에서 내인성 methyl-CpG 결합 단백질 중의 하나인 MeCP2의 발현 양상을 확인하였다. 세포주 중 강한 IGFBP-3의 발현을 보이는 세포주는 IGFBP-3 promoter가 methylation된 세포주에 비하여 상대적으로 낮은 MeCP2 발현 양상을 보였다 (Fig. 8A). SssI 처리된 pGL2- $\Delta$ 1708과 pCMX mammalian expression vector에 삽입된 MeCP2 cDNA로 cotransfection을 시행하였다. MeCP2 발현의 유도는 pCMX-MeCP2 vector를 COS 세포주에 transiently transfection을 시행하여 확인하였다 (Fig. 8B). Luciferase 분석에 따르면 methylation되지 않은 pGL2- $\Delta$ 1708를 pCMX-MeCP2과 cotransfection 시킨 경우에는 전사 활성도에 영향을 미치지 못하는 반면 SssI 처리된



pGL2- $\Delta$ 1708 에서는 pCMX-MeCP2의 cotransfection이 전사 활성도를 약 37.4% 정도 감소하였다 (Fig. 8C).

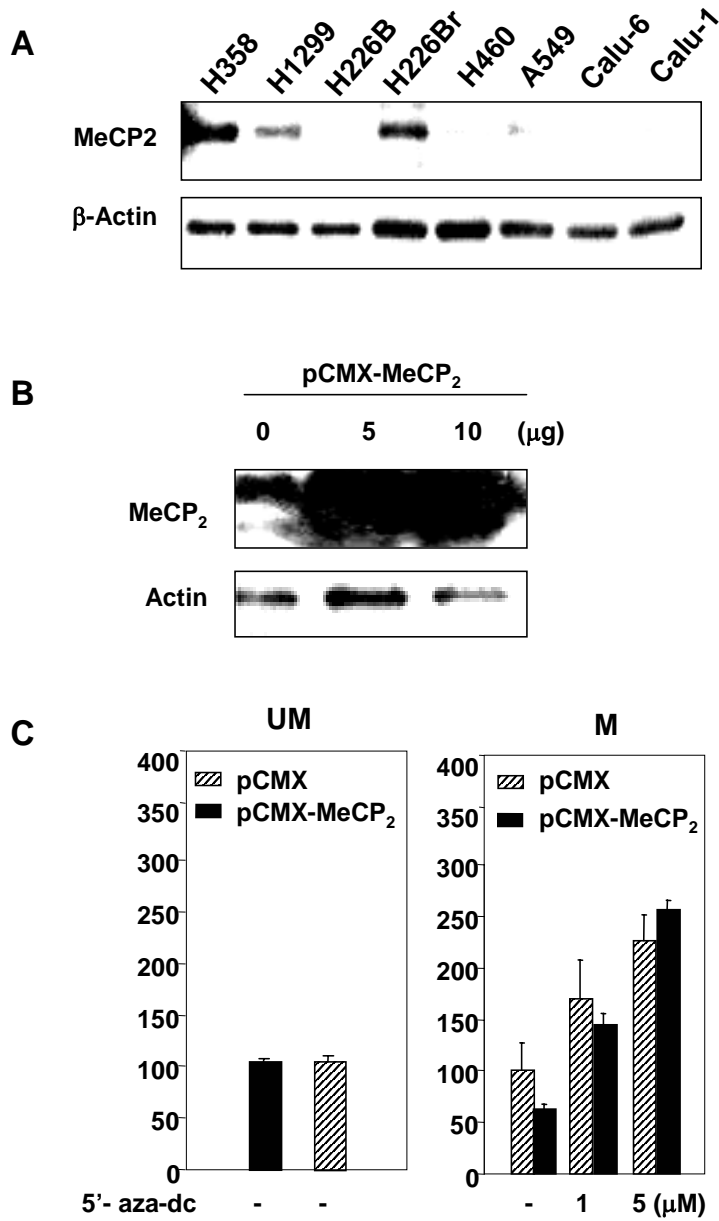


Fig. 8. Expression level of MeCP2 in NSCLC cell lines and effect on *in vitro* methylated pGL2- $\Delta$ 1708 luciferase report plasmid. A. Expression levels of MeCP2 vary in human NSCLC cell lines. Cell lines that have high IGFBP-3 expression level with unmethylated IGFBP-3 promoter, expressed lower level of

MeCP2, compared to NSCLC cell lines that have hypermethylated IGFBP-3 promoter. B. 1.4-kb full-length MeCP2 cDNA was cloned in mammalian expression vector pCMX and transfected into the COS cell line. Note the strong expression of a 75-kD band in pCMX-MeCP2-transfected cells. C. H1299 NSCLC cells, which have methylated IGFBP-3 promoter, were transiently transfected with *SssI* methylase-catalyzed pGL2- $\Delta$ 1708 luciferase reporter plasmid. pCMX-MeCP2 (100  $\mu$ g) was co-transfected with pCMX empty vector as a control. The cells were treated twice with 5'-aza-dC on the day of transfection, and 24 h later at the indicated doses. Luciferase activity was measured following incubation for 48 h. In unmethylated pGL2- $\Delta$ 1708 there was no difference with co-transfection of pCMX-MeCP2 (left). Methylation of all CpG islands of the IGFBP-3 promoter with *SssI* methylase had shut down reporter vector activity, with greater decreases in those cells co-transfected with pCMX-MeCP2. This suppression of luciferase activity was partially restored by demethylating agent 5'-aza-dC in the methylated reporter gene plasmid. This restoration partially interfered, however, with co-transfection with the MeCP2 expression vector.

#### IV. 고찰

이번 연구의 몇몇 결과들은 IGFBP-3 promoter내 CpG islands의 methylation이 비소세포성 폐암 세포주에서 IGFBP-3 발현을 억제하는 한 기전임을 보이고 있다. 실험에서 사용된 비소세포성 폐암 세포주의 절반 가까이에서 IGFBP-3 발현이 소실되어 있으며, IGFBP-3의 발현이 소실된 비소세포성 폐암 세포주에서 얻어진 DNA의 bisulfite 화학 변성 후 염기서열 분석 및 제한 효소 절단 분석, MSP의 결과는 promoter 활성도에 중요한 역할을 하는 Sp-1/Sp-3 결합 요소 및 주변의 CpG islands가 methylation 되어 있음을 보이고 있다. H226B, H1299, H661, H441, H322, H226Br, 및 Calu-6 세포주 등 IGFBP-3의 발현이 억제되어 있는 세포에서 단백질 발현 양상이 promoter 내 CpG islands의 methylation 상태와 잘 일치하였다. 이전의 보고에서처럼 DNA의 methylation이 인식 염기서열에 전사 인자들의 결합을 억제한다는 보고와 같이 Sp-1/Sp-3 결합 요소와 주변 부위 CpG islands의 hypermethylation은 Sp-1 전사 인자의 결합을 억제하였다<sup>27-30</sup>. 과거 보고 중 Sp-1은 인식 염기 서열의 methylation 상태와는 상관없이 결합한다는 보고가 있으나<sup>31</sup>,<sup>32</sup>, anti-sense strand 내 두 개의 cytosine이 methylation되면 Sp-1의 결합을 억제한다는 보고와 같이 Sp-1/Sp-3 결합 요소 내부 및 주변 부위의 CpG islands의 methylation에 의해 Sp-1의 IGFBP-3 promoter 에 대한 결합이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다<sup>33</sup>. 또한 Sp-1/Sp-3 결합 요소를 포함하고 있는 IGFBP-3 promoter의 in

in vitro methylation은 promoter 활성도를 감소시켰다. 더욱이 IGFBP-3 promoter의 활성도는 methylation 된 IGFBP-3 promoter를 가진 비소세포성 폐암 세포주에서, demethylation 약제인 5'-aza-dC를 처리함으로써 복원되었다. 그러나 이러한 5'-aza-dC 처리는 실험에 사용된 promoter의 methylation 이 확인된 7 종의 비소세포성 폐암 세포주 중 4 가지 세포주에서만 IGFBP-3의 발현이 회복되어, IGFBP-3 단백질 발현의 소실에 promoter hypermethylation 이외의 다른 기전이 작용할 것으로 생각되고 있다. 예로서 혈청 IGFBP-3 농도와 유전학적 다형성과의 연관성을 조사한 임상 연구에서처럼, mRNA cap site로부터 -202 site의 다형성이 IGFBP-3 promoter 활성도를 조절하는 또 다른 요소로 생각되고 있다<sup>34</sup>. 이러한 소견들은 IGFBP-3의 발현을 조절하는 기전들이 다양하고 복잡함을 의미하는 것이다. IGFBP-3 promoter에는 최소한 4개의 대칭적으로 배열된 methylation된 CpG dinucleotide로 이루어진 MeCP2 결합 염기 서열로 여겨지는 요소가 Sp-1/Sp-3 결합 요소 인접한 곳에 위치하고 있으며, MeCP2는 promoter 활성을 갖는 부위에서 멀리 떨어진 곳에서도 유전자 발현을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>35</sup>. MeCP2와 같은 methyl-CpG 결합 단백질들이 methylation된 유전자의 발현 억제와 chromatin의 구조에 영향을 준다는 근거가 증가하고 있어<sup>36-38</sup> MeCP2가 methylation된 IGFBP-3 promoter의 활성도를 억제하는 데 주요한 역할을 할 것으로 가정하고서, methylation된 promoter를 가진 세포에서 IGFBP-3 발현의 억제에 있어 MeCP2의 역할을 연구하였다. MeCP2는

MBD 단백질들 중 처음으로 발견된 것으로, methyl-CpG-binding domain (MBD)을 가지고 있는 single polypeptide와 transcription repression domain (TRD)으로 구성되어 있다<sup>39</sup>. MeCP2의 TRD는 전사 억제인자인 Sin-3와 HDAC co-repressor 복합체와 결합하는 것으로 알려져 있다<sup>40-41</sup>. 이는 MeCP2와 HDAC이 methylation된 IGFBP-3 promoter에 모집된다는 결과와 잘 일치하며 나아가 MeCP2와 methylation된 DNA에 의한 유전자 발현의 소실은 5'-aza-dC와 HDAC 억제제인 sodium butyrate에 의해 회복되었다. HDAC 억제제인 trichostatin A 또는 sodium butyrate에 의한 IGFBP-3 promoter의 활성화 증가는 Sp-1 결합의 증가에 의한다는 것이 사람 유방암 세포주와 간암 세포주에서 증명되었다<sup>23,42</sup>. 이는 MeCP2가 methylation된 promoter가 전사 억제 기구를 모집하는데 주요한 역할을 하며 나아가 IGFBP-3의 전사 활성도를 억제하는 것으로 시사되는 소견이다.

결론적으로, 상당수의 비소세포성 폐암 세포주에서 IGFBP-3 promoter의 주요 활성을 갖는 부위의 CpG islands가 methylation되어 있음을 확인하였다. 이들 비소세포성 세포주에서 IGFBP-3 promoter의 methylation이 IGFBP-3의 전사를 억제하는 중요한 기전임을 관찰할 수 있었다. 또한 IGFBP-3 promoter 활성화에 주요한 역할을 하는 Sp-1/Sp-3 결합 요소가 methylation되어 있으며 이 부위의 methylation이 MeCP2와 HDAC의 결합을 유도하고 Sp-1 전사 인자의 결합을 억제함으로써 methylation된 IGFBP-3 promoter의 활성을 억제하였다. 그러나 MeCP2의 발현과 IGFBP-3의 발현

양상과는 잘 일치하지 않으며 이는 다른 MBD를 가지고 있는 단백질이 methylation 된 promoter를 가지고 있는 비소세포성 폐암 세포주에서 IGFBP-3 발현 억제에 영향을 줄 수 있기 때문이라 생각된다. 마지막으로 임상 시험중인 demethylation 약제로서 IGFBP-3의 발현을 유도할 수 있다는 것은 IGFBP-3의 세포의 성장과 고사에 미치는 중요한 역할을 고려해 볼 때 이들이 비소세포성 폐암의 치료에 중요한 약제로 사용될 수 있음을 시사하는 소견으로 생각된다.

## V. 결론

1. 인슐린 양 성장 인자 결합 단백질-3 (IGFBP-3)의 promoter는 상당수의 비소세포성 폐암 세포주에서 주요 조절 인자 결합 부위 중 하나인 Sp-1/Sp-3 consensus sequence 및 주변부의 CpG islands가 hypermethylation 되어 있다.

2. IGFBP-3의 promoter 내 Sp-1/Sp-3 결합 요소 및 주변부의 CpG islands가 hypermethylation되어 있으면, 이 부위에 methyl CpG binding protein-2 (MeCP2)와 histone deacetylase (HDAC)가 모집되어 결합되는 반면, Sp-1의 결합은 억제되었으며, demethylating 약제인 5'-aza-2-deoxycytidine (5'-aza-dC) 처리시 이러한 현상은 역전되어 promoter 내 CpG islands의 hypermethylation이 IGFBP-3 발현을 억제하는 기전 중의 하나로 추정된다.

3. SssI CpG methylase를 이용하여 *in vitro* methylation을 유도하였을 때 IGFBP-3 promoter의 CpG islands의 hypermethylation은 유의하게 promoter activity를 감소시켰으며, 이는 동일 조건에서 MeCP2를 coexpression 시켰을 때 더욱 감소하여, promoter 내 CpG islands가 hypermethylation되면 methyl-CpG 결합 단백질의 결합이 유도되면서 다른 전사 억제 인자가 모집되어 전사 억제 기구가 활성화되는 것으로 생각된다.

4. 이상의 결론을 종합하면 5'-aza-dC와 같은 demethylation 약제가 IGFBP-3의 발현을 유도할 수 있다는 것은 IGFBP-3의 세포의 성장과 고사에 미치는 중요한 역할을 고려해 볼 때 이들이 비소세포성 폐암의 치료 약제로 사용될 수도 있음을 시사하는 것으로 생각된다.



## VI. 참고문헌

1. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin 2001;51:15-36.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int J Cancer 1999;80:827-41.
3. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endocr Rev 1995;16:3-34.
4. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barrett JC. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL 100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. Cancer Res 1997;57:2687-93.
5. Stewart CE, Rotwein P. Growth, differentiation and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. Physiol Rev 1996;76:1005-26.
6. Baxter RC. Signaling pathways involved in antiproliferative effects of insulin-like growth factor binding protein-3. a review. Mol Pathol

2001;54:145-8.

7. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J Biol Chem* 1997;272:12181-8.

8. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999;20:761-87.

9. Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J Biol Chem* 1993;268:14964-71.

10. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. *Mol Endocrinol* 1995;9:361-7.

11. Gucev ZS, Oh Y, Kelley KM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid- and transforming growth factor  $\beta$ 2-

induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996;56:1545-50.

12. Martin JL, Coverley JA, Pattison ST, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 production by MCF-7 breast cancer cells: stimulation by retinoic acid and cyclic adenosine monophosphate and differential effects of estradiol. *Endocrinology* 1995;136:1219-26.

13. Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, et al. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein-3 by p53. *Nature* 1995;377:646-8.

14. Zi X, Zhang J, Agarwal R, Pollak M. Silibinin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:5617-20.

15. Fowler CA, Perks CM, Newcomb PV, Savage PB, Farndon JR, Holly JM. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Int J Cancer* 2000;88:448-53.

16. Gray SG, Kytola S, Lui WO, Larsson C, Ekstrom TJ. Modulating IGFBP-3

expression by trichostatin A: potential therapeutic role in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* 2000;5:33-41.

17. Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X. Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:151-6.

18. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Deroo B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998;351:1393-6.

19. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Gann PH, Ma J, Wilkinson P, et al. Plasma insulin-like growth factor-I and prostate cancer risk: a prospective study. *Science* 1998;279:563-6.

20. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:620-5.

21. Burroughs KD, Dunn SE, Barrett JC, Taylor JE. Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk? *J Natl Cancer Inst* 1999;91:579-81.

22. Kim YH, Dohi DF, Han GR, Zou CP, Oridate N, Walsh GL, et al. Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. *Cancer Res* 1995;55:5603-10.
23. Walker GE, Wilson EM, Powell D, Oh Y. Butyrate, a histone deacetylase inhibitor, activates the human IGF binding protein-3 promoter in breast cancer cells: molecular mechanism involves a Sp1/Sp3 multiprotein complex. *Endocrinology* 2001;142:3817-27.
24. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR. A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
25. Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 1999;98:675-86.
26. Kudo S. Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol* 1998;18:5492-9.
27. Iguchi-Ariga SM, Schaffner W. CpG methylation of the cAMP-responsive

enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 1989;3:612-9.

28. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* 1990;18:3975-82.

29. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-31.

30. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2180-4.

31. Samson SL, Wong NC. Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J Mol Endocrinol* 2002;29:265-79.

32. Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 1994;8:2282-92.

33. Clark SJ, Harrison J, Molloy PL. Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 1997;195:67-71.

34. Deal C, Ma J, Wilkin F, Paquette J, Rozen F, Ge B, Hudson T, et al. Novel promoter polymorphism in insulin-like growth factor-binding protein-3: correlation with serum levels and interaction with known regulators. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1274-80.
35. Nan X, Meehan RR, Bird A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4886-92.
36. Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444-9.
37. Ng HH, Bird A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:158-63.
38. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J* 1998;17:4905-8.
39. Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, et al. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 1992;69:905-14.
40. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a

histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-9.

41. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-91.

42. Choi HS, Lee JH, Park JG, Lee YI. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, activates the IGFBP-3 promoter by upregulating Sp1 activity in hepatoma cells: alteration of the Sp1/Sp3/HDAC1 multiprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:1005-12.



## Abstract

### Regulatory mechanism of insulin-like growth factor binding protein-3 in non-small cell lung cancer

Chang, Yoon Soo

*Department of Medical Science*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kim, Se Kyu)

Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by inducing apoptosis. We investigated whether hypermethylation of CpG islands in IGFBP-3 promoter play an important role in the loss of IGFBP-3 expression and regulatory mechanism that mediate the silencing of IGFBP-3 expression in the NSCLC cell lines. The IGFBP-3 promoter has CpG islands hypermethylation in 7 of 15 (46.7%) NSCLC cell lines. The methylation status correlated with the level of expression of protein and mRNA in NSCLC cell lines and reduced expression of IGFBP-3 was restored by the demethylating agent 5'-aza-2'-deoxycytidine (5'-aza-dC) in a subset of NSCLC cell lines. The Sp-1/Sp-3

binding element in the IGFBP-3 promoter, important for promoter activity, was methylated in a subset of NSCLC cell lines and the methylation of this element suppressed the binding of the Sp-1 transcription factor. A ChIP assay showed that the methylation status of the IGFBP-3 promoter influenced the binding of Sp-1, methyl-CpG binding protein-2 (MeCP2), and histone deacetylase (HDAC) to Sp-1/Sp-3 binding element, which were reversed by 5'-aza-dC. *In vitro* methylation of the IGFBP-3 promoter containing the Sp-1/Sp-3 binding element significantly reduced promoter activity, which was further suppressed by the overexpression of MeCP2 and, however, this reduction in activity was rescued by 5'-aza-dC. These findings indicate that hypermethylation of the IGFBP-3 promoter is one of the possible mechanisms by which IGFBP-3 expression is silenced and MeCP2, with recruitment of HDAC, may play a role in silencing of IGFBP-3 expression. Considering critical biologic activities of IGFBP-3 on cell growth and apoptosis, demethylation agents, which recovered repressed IGFBP-3 expression, could be used as a new therapeutic modality in NSCLC.

---

Key Words: Insulin-like growth factor (IGF), insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), methylation of CpG islands, methyl CpG binding protein-2 (MeCP2), non-small cell lung cancer (NSCLC).