

재조합 synuclein 단백질이
중양세포의 증식, 전이 및 세포사에
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학과

구민경

재조합 synuclein 단백질이
중양세포의 증식, 전이 및 세포사에
미치는 영향

지도교수 김 종 선

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의 과 학 과

구 민 경

구민경의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2009년 12월

감사의 글

우선 제게 공부할 수 있는 여건을 허락하신 하나님께 감사 드립니다. 학위과정을 하는 동안 부족한 저에게 연구를 할 수 있도록 기회를 주시고 지도해주신 김종선 교수님께 지면으로 먼저 감사를 드립니다. 저의 연구를 관심 있게 지켜봐 주시고 조언을 아끼지 않으신 정광철 교수님과 이재면 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 김세종 교수님, 이봉기 교수님, 조상래 교수님, 박전환 교수님, 신전수 교수님 그리고 윤상선 교수님께도 감사 드립니다.

실험실의 만언니로서 실험실 생활을 할 수 있도록 도와준 형란언니, 비록 나이는 어리지만 선배로서 많은 것을 가르쳐준 셋별이, 동기인 현주 그리고 지금은 다른 곳에서 꿈을 향해 열심히 연구중인 소영이에게 감사 합니다. 학위 논문을 함께 쓰며 짧은 기간이지만 동고동락했던 연정언니, 미국에서 열심히 공부하고 있을 영주, 자기 개발 중인 상은이, 농담을 던지며 웃게 해준 진원이, 속상한 일이 있어도 항상 웃어주던 정신언니와 미진씨, 밝은 웃음으로 대해주시고 조언과 격려를 해 주신 은숙언니, 어려운 일이 있을 때 마다 도와준 은정언니, 힘이 되는 말을 해 주신 정보영 선생님 그리고 윤주호 선생님, 뒤늦게 저의 스승이자 친구가 되어준 용진 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 실험실 밖에서도 언제나 제가 꿈을 잊지 않게 버팀목이 되어준 최고의 선물 원재와 희정이, 그리고 같은 길을 걸으며 저의 모든 푸념을 들어주고 조언과 격려를 아끼지 않은 세훈오빠, 태현이, 혜진이 그리고 애희에게도 감사 드립니다. 마지막으로 저의 영원한 후원자이시고 제 꿈을 위해 함께 걸어주시는 엄마, 아빠 그리고 이모, 또 공부한다는 핑계로 잘 챙겨주지 못하는 하나밖에 없는 동생 자홍이 너무 사랑하고 감사 드립니다.

꿈을 향해 한 걸음씩 더 나아가기 위해 선택한 이 길을 걸으며 많은 것을 배웠습니다. 좋은 결과물을 내는 것도 중요하지만 무엇보다 올바르게 그리고 열심히 연구하고 공부하는 과학자가 되기 위해 노력하겠습니다.

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	
1. 세균배양 및 형질전환	8
2. 재조합 synuclein 단백질의 정제.....	8
3. 세포주 배양	9
4. Cell Proliferation assay	10
5. Synuclein family 단백질이 항암제에 대한 감수성에 미치는 영향	11
6. Cell Death Assay(Annexin-V FITC Assay).....	11
7. Cell Motility assay	
가. Cell migration assay	12
나. Wound Healing Assay	13

III. 결과

- 1. 재조합 synuclein family 단백질이 종양세포의 증식과 세포사에 미치는 현상 14
- 2. 종양세포에 재조합 synuclein 단백질을 처리했을 때 항암제에 대한 감수성 사이의 상관관계..... 18
- 3. 재조합 synuclein 단백질이 종양세포의 이동 및 침투 에 미치는 영향.....23

IV. 고찰 29

V. 결론 32

참고문헌 33

영문요약 36

그림 및 표 차례

그림 1. α -syn 처리시 종양세포주에서 세포의 증식 여부 관찰	16
그림 2. β -syn을 종양세포주에 처리 후 세포의 증식여부 관찰	16
그림 3. γ -syn 처리시 종양세포주에서의 세포증식 여부 관찰....	17
그림 4. Synuclein 단백질이 종양세포주의 apoptosis에 관여 하는지 여부 관찰	19
그림 5. Cis-platin과 synuclein 단백질을 함께 각각의 세포주에 처리했을 때 항암제에 대한 감수성 사이의 상관관계	21
그림 6. Doxorubicin을 각각의 세포주에 synuclein 단백질과 함께 처리했을 때 항암제에 대한 감수성 사이의 상관관계 분석	22
그림 7. 종양세포에 각각 1 μ M씩의 α , γ -syn을 처리 후 그들의 migration을 관찰	23
그림 8. MCF7 종양세포주에 synuclein 단백질을 처리하였 을 때 세포의 이동 관찰	26
그림 9. T-47D 세포주에 synuclein 단백질군을 처리하였을 때 세포의 이동능 관찰	27
그림 10. OVCAR-3 세포주에 각각의 synuclein 단백질군을 처리하였을 때 세포의 이동 관찰.....	28
표 1. 종양세포의 전이능과 이동능에 관여한 synuclein family 단백질.....	25

<국문요약>

재조합 synuclein 단백질이

종양세포의 증식, 전이 및 세포사에 미치는 영향

여러 장기에서 발견되는 snuclein family 단백질들은 유사성이 매우 높아 조직의 기능 수행에 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다. 본 연구는 α -, β -, γ -synuclein이 종양의 증식, 전이 및 세포사에 어떠한 영향을 미치는지 규명하고 그들의 역할을 알아보려고 하였다. 이를 위하여 유방암 세포주인 MCF7과 T-47D 세포주 그리고 난소암 세포주인 OVCAR-3를 사용하여 각각의 재조합 synuclein 단백질을 세포 밖에서 처리 해 주었을 때 이들 synuclein 단백질이 암세포주의 증식, 전이 그리고 세포사에 미치는 영향을 조사하였다.

첫 번째로, synuclein 단백질이 위의 세 종류의 세포주의 증식에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 실험 결과, 재조합 α -, β -, γ -synuclein를 처리해 주었을 때 유방암 세포주와 난소암 세포주의 세포증식에는 별다른 영향도 미치지 않는 것을 관찰 할 수 있었으며 또한 세포주의 세포사멸에도 아무런 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다. 두 번째로, 종양세포주에 이들 synuclein 단백질군과 항암제를 함께 처리 해 주었을 때 종양세포의 항암제에 대한 감수성에 어떠한 변화가 있는지 분석하였다. 특히 항암제에 의해 유도된 종양세포의 세포사를 synuclein

단백질이 억제할 수 있는지 알아보았다. 실험 결과 synuclein 단백질은 cis-platin과 doxorubicin에 의해 유도된 세포사에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 세 번째로, γ -syn이 유방암 세포주의 전이를 돕는다는 문헌을 배경으로 재조합 γ -syn과 다른 재조합 synuclein 단백질들이 암 세포주의 전이나 혹은 이들의 이동능에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 세포의 이동능을 확인하기 위해 wound healing assay를 한 결과 MCF7 세포주에서 β -syn이 이동능에 도움을 주는 단백질임을 확인할 수 있었고 세포의 전이를 확인하기 위해 세포의 migration assay를 통해 γ -syn이 MCF7 세포주의 전이에 영향을 미치는 synuclein 단백질군임을 확인하였다. T-47D 세포주는 α -와 γ -syn이 종양세포의 전이와 이동에 모두 영향을 주는 단백질임을 실험을 통해 확인되었다. 그리고 OVCAR-3 세포주에서는 β -와 γ -syn을 처리해 주었을 때 세포의 wound region을 α -syn과 비교해 보았을 때 가장 빠르게 복원함을 확인할 수 있었다.

본 실험을 통하여 우리는 synuclein 단백질이 종양세포의 증식 및 세포사에는 별다른 영향을 미치지 않으나 종양세포의 이동 및 침투에는 긍정적인 영향을 미치는 사실을 관찰하였다. 이는 synuclein 단백질이 암세포의 전이과정에 일정부분 기여 할 수 있다는 것을 시사해 주는 결과로 향후 그 구체적인 작용기전을 규명할 필요가 있다.

핵심 되는 말: Synuclein 단백질, α -, β -, γ -synuclein, 세포의 이동, 침투.

재조합 synuclein 단백질이
종양세포의 증식, 전이 및 세포사에 미치는 영향

<지도교수 김 종 선>

연세대학교 대학원 의과학과

구 민 경

I. 서론

약 20년 전부터 꾸준히 연구 되어 온 synuclein 단백질은 그 크기가 작고, 수용성이며 파킨슨씨병을 비롯한 퇴행성신경질환 뿐만 아니라 암 질환과도 관련이 있는 신경 단백질이다.¹ Synuclein family로는 파킨슨병과 알츠하이머병에 연관성이 있는 것으로 알려진 α -synuclein(α -syn)과 β -synuclein(β -syn) 그리고 γ -synuclein(γ -syn)이 있다. α -syn은 중추신경계에 널리 분포하고 있으며 특히 신피질(neocortex), 해마(hippocampus), 선조체(striatum), 시신경상(thalamus) 그리고 소뇌(cerebellum)에 존재한다. 비록 중추신경계에서 보다는 적은 양으로 발현되지만 췌장(pancreas), 신장(kidney), 골격근(skeletal muscle), 폐(lung), 태반(placenta), 심장(heart), 혈액(blood) 등에도 존재 하고 있다.² 신경세포 외에도 astrocyte이나 testis의

sertoli cell에서 발현이 되어지고,³⁻⁴ 뇌에서 α -syn과 비슷한 양상으로 발현되고 비슷한 위치를 공유하는 β -syn이 있고⁵, 신경 세포에서뿐만 아니라 종양세포에서도 발현되고 특히 여성의 암 질환과 관련되어있는 γ -syn이 있다.

α -syn과는 달리 γ -syn은 정상적인 유방조직에서는 발현되지 않으나 전이가 많이 일어난 유방암(breast cancer) 세포에서 과발현되는 유전자로 발견이 되어 처음에는 BCSG-1(Breast cancer specific gene-1)으로 불렸다. 유방암 세포와 난소암 세포에서 과발현되는 γ -syn은⁶ 이들 암세포의 증식과 전이를 조절하고 chemotherapy로부터 tumor를 보호하는 역할을 할 것으로 생각된다.⁷⁻⁸ 여러 가지 연구결과에 의하면 γ -syn은 유방암의 증식(proliferation)과 전이(metastasis)를 조절할 뿐만 아니라, 과발현되었을 경우 vinblastine이나 paclitaxel에 저항성을 갖게 함으로써 tumor의 진행뿐만 아니라, chemotherapy로부터도 tumor를 보호하는 역할을 할 것으로 여겨지고 있다.⁷⁻⁹ 최근의 연구 결과를 살펴보면 γ -syn은 유방암과 난소암에서 뿐 아니라 간(liver), 식도(esophagus), 위(stomach), 경부(cervix), 장(colon), 폐, 전립선(prostate)등 다른 여러 장기에서 생긴 암 질환에서도 높게 과발현되는 것으로 나타나고 있다.⁹

Synuclein family에 속해 있는 단백질들은 서로 상당히 높은 유사성을 가지고 있으며, 종(種)간에도 보존이 잘 되어 있어 세포 내에서 중요한 역할을 할 것이라는 생각을 할 수 있다.¹⁰ 그러나 아직 정상적인

기능에 대해서는 명확한 연구가 되어 있지 않다. 이 단백질들은 일부의 연구결과에서 서로 공통되는 기능을 하는 것으로 생각되는 것도 있고, 또 일부에서는 서로 상반되는 기능을 하는 것으로 관찰되었다. 단지 분포적인 면에서 보자면, 이 단백질들은 모두 신경세포에서 과발현되지만, α -, β -synuclein은 주로 presynaptic terminal에 분포하고, γ -syn은 cell body에 주로 분포하는 차이가 관찰되고 있으며, 이런 분포하는 지역의 차이 외에도 sequence 상에도 각각의 단백질들의 N-terminal 부분은 상호유사성이 매우 높은 반면, C-terminal 부분은 그 유사성이 감소하는 것을 확인 할 수 있다.¹⁰ 이는 이 단백질의 어느 부분이 어떤 기능을 하느냐에 따라 그 기능이 중복될 수도 또 서로 방해할 수도 있다는 것을 예측해 볼 수 있다. 최근의 연구결과에 의하면 공통적으로 chaperone activity를 가지고 있으며¹¹⁻¹³, platelet에서의 granule release에도 공통적으로 작용을 한다는 보고가 있으며¹⁴, 또한 α -syn의 가운데 NAC 부분의 주요부위 차이로 α -syn 만이 aggregation 되는 현상이 관찰되고 있다¹⁰. 반면에 α -syn을 과발현시킨 쥐에 β -syn을 과발현시킬 경우, α -syn의 과발현으로 일어난 파킨슨씨병과 비슷한 양상을 보이는 유전자가 감소함을 확인함으로써 서로가 세포 내에서 길항작용을 한다는 보고도 있다¹⁵⁻¹⁶.

종양의 발생에 있어서는 synuclein family 단백질들 중 주로 γ -syn의 연구가 대다수를 차지하고 있으나 최근의 연구결과에 의하면 α -syn의 경우, neuronal origin의 brain tumor에서 과 발현되는 것이

확인되었다¹⁷⁻¹⁸. 따라서 γ -syn 뿐만 아니라 이 family에 속하는 단백질들이 종양의 병인에도 일정한 역할을 할 것이라는 것을 추론해 볼 수 있다.

Synuclein family 에 속해있는 단백질들은 유사성이 매우 높아 여러 장기에서 중요한 역할을 할 것이라고 생각되지만 아직 정확한 기능에 대해서는 명확한 연구가 되지 않았다. 또한 높은 유사성을 가지고 있는 이들 단백질 간의 상호 연관성에 대해서도 연구가 되어있지 않다. Synuclein family 단백질들의 상호 연관성이 높은 것으로 보아, γ -syn 뿐만 아니라 α -syn과 β -syn도 일부 종양세포에서 과발현되어 있고 종양과 관련되어 있으며 일정한 역할을 할 가능성이 높다. 이에 본 연구에서는 재조합 synuclein 단백질이 종양의 증식, 전이 및 세포사에 어떠한 영향을 미치는 지 규명하고 여러 종류의 종양에서 synuclein 의 역할을 규명해 보고자 하였다. γ -syn 의 경우 종양과의 연관성이 비교적 잘 밝혀진 편이므로 γ -syn 이 유방암이나 난소암 이외에도 전반적인 암 발생이나 전이에 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다. 또한 γ -syn 과 마찬가지로 α -syn 이나 β -syn도 종양세포의 증식, 전이, 세포 사에 중요한 역할을 할 가능성이 있어 이를 연구하였다. γ -syn 이 과발현된 암세포에 α -, 혹은 β -syn을 처리해주면 암세포의 증식 및 전이에 항진작용을 하거나 길항작용을 할 가능성이 있다고 보았다. 따라서 여러 장기에서 발생한 종양에서 synuclein family 단백질들의 발현양상을 비교하고 항암제에 대한 저항성을 비교하는 연구 등을 통하여 여러 가지

현상을 관찰함으로써 중양의 병인론에 synuclein의 역할을 규명해 보고자
본 연구를 시작하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세균배양 및 형질전환

Synuclein 재조합 DNA로 형질 전환된 *E. coli*를 얻기 위해 *E. coli* BL21의 적격세포 200 μ l에 α , β , γ -synuclein plasmid를 첨가한 후 4°C에서 30 분간 처리하였다. 그 후 42°C에서 1 분 30 초간 열을 가한 후 다시 4°C에서 3 분간 처리했다. LB broth를 800 μ l을 추가하여 37°C shaking incubator에서 45 분간 배양 한 후 100 μ g/ml ampicillin이 포함되어 있는 LB plate에 도말하여 colony를 확인하였다.

Synuclein 단백질의 대량 발현을 위하여 synuclein 재조합 DNA로 형질전환된 *E. coli*를 배양하였다. 세균 집락 하나를 취해 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 LB broth 10 ml에 하룻밤 배양한 후 100 μ g/ml의 ampicillin과 1%의 젓당이 첨가된 1 l의 LB 배양액에 넣어 하룻밤 동안 배양했다.

2. 재조합 synuclein 단백질 획득

1 L의 LB 배지에 배양한 *E. coli*를 Sorvall RC 5C plus(rotor; GSA)를 이용하여 6,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 모은 후, 세균침전물을 pH6.0인 MES buffer 60 ml에 풀어 ultra sonicator를 이용하여 용해한 후, 원심분리 하여 상층액을 획득한 후 synuclein

단백질들이 열에 대한 내성을 갖는 성질을 이용하여 100℃에서 15 분간 처리하고 다시 원심분리 하여, 상층액을 취하였다. 열 처리 후 얻은 상층액을 DEAE column을 이용하여 이온교환 크로마토그래피 방법으로 1차 정제를 하였다. 정제된 단백질을 순서대로 튜브에 받아 SDS-PAGE상에서 내렸다. 그리고 원하는 단백질 fraction만을 골라 모은 후 FPLC gel filtration 크로마토그래피를 사용하여 단백질의 분자량에 따라서 2차 정제를 하여 SDS-PAGE상에서 확인 한 후 원하는 단백질 fraction만을 모아 사용하였다.

3. 세포주 배양

인간 유방암 세포주(human breast carcinoma cell line)인 MCF7(ATCC HTB-22)과 T-47D(ATCC HTB-133) 세포주는 American Type Culture Collection에서 분양 받았다. 그리고 난소암 세포주(ovarian cancer cell line)인 OVCAR-3(KCLB 30161)은 한국 세포주 은행에서 분양 받아 배양하였다. MCF7 cell line과 T-47D cell line은 10% 우 태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 minimum Eagle's medium(MEM)을 사용해 배양하였고 OVCAR-3 cell line은 10% 우 태아혈청과 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 insulin을 첨가한 RPMI 1640 배지에 배양하였다. 세포주들은 모두 37℃, 5% CO₂에서 배양하였다.

4. Cell Proliferation assay

MCF7 세포주를 0.05% Trypsin-0.53 mM EDTA용액으로 처리하여 날개의 세포를 수확한 다음 96-well micro plate에 MCF7 세포주를 각각의 well에 5×10^3 개로 최종 부피가 100 μ l가 되게 접종 한 후 37°C, 5% CO₂에서 overnight 배양하였다. 다음날 남아있던 배지를 버리고 실험 조건에 맞게 다음과 같이 시료를 제작해 바꿔주었다. 시료는 α , β , γ 각각의 synuclein을 농도 별로 100 nM, 500 nM 그리고 1 μ M 로 처리한 well의 최종 부피가 100 μ l가 되게 한 후 18 시간을 배양하였다. Negative control은 해당 배지인 MEM만을 같은 부피로 사용하였다. 그 후 원심분리를 하여 cell을 침전시키고 Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(Sigma, M2128 -1G) 를 well당 1 mg/ml이 되게 첨가 한 후 3~4 시간 동안 반응시켰다. 상층액을 모두 제거한 후 DMSO 100 μ l로 세포를 모두 녹인 후 iso-prophanol(Merck, Darmstadt, Germany)을 100 μ l추가하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포주와 해당 배지만을 배양한 well을 기준 값 1로 놓고 그에 따른 비율을 계산하였다.

T-47D 세포주 역시 위와 같은 방법으로 접종 후 synuclein의 농도는 위와 같이 처리한 후 18 시간 동안 배양하고 MTT assay를 수행하고 같은 과정으로 흡광도를 측정하였다.

OVCAR-3 세포주의 경우 세포 수확 후 각 well 당 1×10^4 개로 96-well plate에 배양 후 위의 세포주들과 같은 방법으로 흡광도를 측정해 세포의 증식을 확인하였다. 모든 실험은 triplicate로 세 번씩 진행되었다.

5. Synuclein family 단백질이 항암제에 대한 감수성에 미치는 영향

'Cell proliferation' 에서 기술한 바와 같이 MCF7 세포주와 같은 방법으로 세포를 접종한 후 위의 농도 별 synuclein과 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cis-platin을 함께 처리한 well의 최종 부피가 100 μl 가 되게 한 후 18 시간을 배양하였다. Negative control은 해당 배지인 MEM만을 같은 부피로 하였다. 18 시간 후 원심분리를 하여 세포를 침전시키고 MTT assay를 통해 synuclein에 대한 세포의 감수성을 확인해 보았다.

T-47D 세포주는 synuclein의 농도는 위와 같으나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cis-platin을 함께 처리한 후 18 시간 동안 배양하고 MTT assay를 수행한 후 같은 과장으로 흡광도를 측정하였다.

OVCAR-3 세포주의 경우 세포 수확 후 각 well 당 1×10^4 개로 96-well plate에 배양 후 MCF7 세포주와 같은 방법으로 흡광도를 측정해 synuclein에 대한 세포의 감수성을 확인하였다.

Doxorubicin의 경우 모든 세포주에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 각각의 synuclein family 단백질과 함께 처리해 주었다. 처리 시간과 방법은 cis-platin과 동일하게 하였다. 모든 실험은 triplicate로 세 번씩 진행되었다.

6. Cell Death Assay (Annexin-V FITC Assay)

본 연구에서 사용된 세 종류의 종양세포주 각각을 1×10^6 개의 세포들을 10 mm dish에 접종한 후 overnight 배양하였다. Control dish

그리고 각각의 synuclein 단백질을 1 μM 으로 처리한 dish를 5% CO_2 , 37°C에서 18 시간 동안 배양하였다. Annexin-V FITC assay kit(Bio source, Seoul, Korea)를 본 연구에 사용하였다. 각각의 sample들을 모아 1000 rpm에서 약 5 분간 원심분리를 하여 세포를 가라앉히고 2 번 1X PBS로 세포를 헹군 후 $2\sim 3 \times 10^6$ cells/ml만을 1X binding buffer에 풀었다. 이중 100 μl 만 남겨주었다. 여기에 5 μl 의 Annexin-V FITC와 10 μl 의 Propidium Iodine buffer를 섞고 어두운 곳에서 15 분간 배양하였다. 이후 400 μl 의 binding buffer를 첨가 해 FACS(Flow cytometric analysis)를 통해 결과를 분석하였다.

7. Cell Motility assay

가. Cell migration assay

1×10^5 개의 MCF7 세포주를 6-well plate에 접종 후 하룻밤 배양하였다. 그리고 α -와 γ -syn을 각각 1 μM 의 농도로 처리하고 배지에는 FBS를 첨가하지 않고 18 시간 동안 배양하였다. 배양 시간이 끝나고 나서 각 well에서 세포를 수확한 후 PBS로 2번씩 씻고 Cell Migration Assay kit(Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 이용해 세포들의 이동능을 관찰하였다.

T-47D 세포주는 1×10^5 개의 세포를 접종하였고 OVCAR-3는 5×10^4 개의 세포를 접종하여 위와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

나. Wound Healing Assay

MCF7과 T-47D 세포주는 각각 8×10^4 cells/ml의 세포를 24-well microplate에 단층으로 접종한 후 overnight 배양했다. 각각의 α -, β -, γ -syn 을 100 nM과 1 μ M의 농도로 처리한 well과 모든 실험군을 yellow pipet tip 의 끝을 이용해 직선으로 scratch를 내어 PBS로 천천히 두 번 씻어낸 후 1% FBS가 포함되어있는 알맞은 배지에 5% CO₂, 37°C에서 배양 하면서 0 시간을 기점으로 4 시간 간격으로 48 시간 동안 wound region을 도립현미경(inverted microscope)으로 사진을 찍어 관찰하였다.

OVCAR-3 cell line은 세포의 면적이 넓으므로 약 1×10^4 cells/ml의 세포주를 접종해 같은 방법으로 관찰하였다.

III. 결과

1. 재조합 synuclein family 단백질이 종양세포의 증식과 세포사에 미치는 영향

지금까지 synuclein 단백질의 질병관련성에 관한 연구는 파킨슨씨병이나 알츠하이머병에 관한 연구가 대부분이었다. Synuclein 유전자는 처음에 신경계 조직에서 주로 발현을 한다고 보고 되었었지만 최근에는 여러 암 질병에서 γ -syn의 발현 및 역할을 규명한 문헌들이 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 α , β , γ 각각의 재조합 synuclein 단백질이 종양세포주에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 여성 암 질병과 연관이 많은 γ -syn의 연구를 위해 유방암 세포주인 MCF7 그리고 T-47D와 난소암 세포주인 OVCAR-3을 이용하여 γ -syn이 이들 세포들에 어떠한 영향을 끼치는지 알아 보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. γ -syn 이외에도 같은 family에 속하는 α , β -syn이 여성 암 세포주들에는 어떠한 양상을 보이는지 연구했다. 대부분의 연구가 이러한 단백질들과 함께 발현되는 종양세포주들과의 transfection 시킨 후 실험을 한데에 비해 본 연구에서는 exogenous하게 cell membrane 바깥쪽에서 synuclein 단백질을 세포에 처리 해 주는 방법을 택했다. 이들 단백질은 크기가 비교적 작은 단백질 군이기에 충분히 cell membrane을 통과할 수 있고 이들은 종양세포로 penetration 할 수 있고 또 세포로부터 secretion 할 수 있기 때문이다.

우선 synuclein 단백질들이 MCF7, T-47D 세포주에서 발견되고 있다면 이들 암 세포들의 증식에 영향을 미칠지도 모른다는 가설을 세우고 세포증식을 확인하였다. 많은 유방암 세포주들 중에서도 MCF7 세포주는 γ -syn 음성 세포주로 알려져 있고 T-47D는 양성이지만 그 발현 정도가 매우 미미한 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구에서는 세포 내에서 발현하는 정도가 아닌 세포 밖에서 일정량의 synuclein 단백질을 처리하였을 경우 각 세포주의 증식을 알고자 하였다. 세포의 증식은 MTT assay를 통해 살아있는 세포 수를 측정하여 세포사와 증식 정도를 확인하였다.

α -syn을 각각의 세포주에 농도별로 처리 해 주었을 때 MCF7(그림 1A)에서는 대조군에 비해 별다른 세포의 증식을 관찰 할 수 없었다. 오히려 미미하게나마 α -syn이 MCF7 세포의 증식을 농도 의존적으로 저해하고 있어 보이는 경향을 확인할 수 있었다. T-47D 세포주에서는 대조군에 비해 별다른 세포의 증식을 살펴 볼 수 없었으며(그림 1B), OVCAR-3 세포주에서도 역시 α -syn이 이들 세포주의 증식에는 별 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (그림 1C).

다음으로 β -syn을 이들 세포주에 처리했을 때 어떠한 양상을 보이는지 연구했다. MCF7 세포주(그림 2A)에서는 β -syn 역시 세포증식과는 관련 없는 단백질임을 확인했고 T-47D(그림 2B)에서는 세포의 증식 수준이 기준치 보다는 약간 낮게 나왔지만 그 차이가 5% 미만이므로 아무런 변화가 없다고 판단하였다. 그리고 OVCAR-3 세포주(그림 2C)에서도 마찬가지로 β -syn이 세포의 증식에는 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인했다.

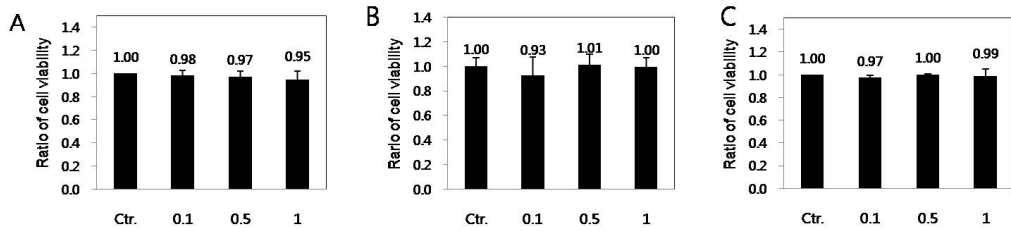


그림 1. α -syn 처리시 종양세포주에서 세포의 증식 여부 관찰. (A)MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3에 각각의 synuclein 단백질을 0.1, 0.5, 1 μ M 의 농도로 18 시간 동안 처리해 MTT assay을 통해 세포의 증식을 확인하였다. 기준 값 보다 평균 ± 0.05 정도의 실험군은 변화가 없다고 판단하였다.

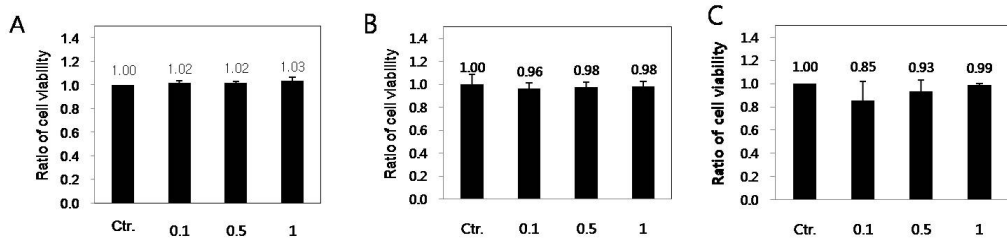


그림 2. β -syn을 종양세포주에 처리 후 세포증식 여부 관찰. (A)MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3에 각각의 synuclein 단백질을 0.1, 0.5, 1 μ M 의 농도로 18 시간 동안 처리해 MTT assay을 통해 세포의 증식을 확인하였다. 기준 값 보다 평균 ± 0.05 정도의 실험군은 변화가 없다고 판단하였다.

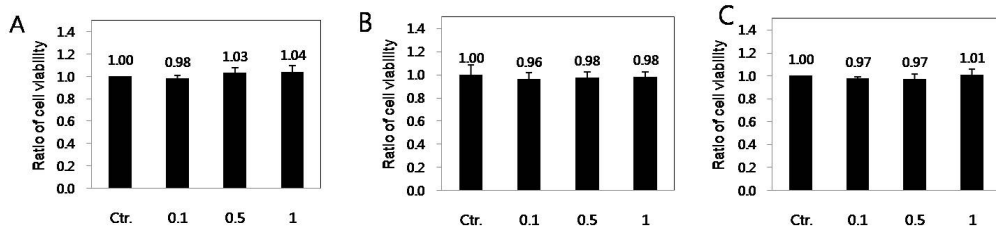


그림 3. γ -syn 처리시 종양세포주에서 세포증식 여부 관찰. (A)MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3에 각각의 synuclein 단백질을 0.1, 0.5, 1 μ M 의 농도로 18 시간 동안 처리해 MTT assay를 통해 세포의 증식을 확인하였다. 기준 값 보다 평균 ± 0.05 정도의 실험군은 변화가 없다고 판단하였다.

그림 3에서 보는 것과 같이 γ -syn 역시 MCF7(그림 3A), T-47D(그림 3B)와 OVCAR-3(그림 3C), 세 종류의 여성관련 종양세포의 증식에는 어떠한 영향도 끼치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. γ -syn의 농도를 더 높게 처리를 해 주어도 세포의 증식에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고 처리 시간을 γ -syn이 세포 내로 침투했다고 생각되는 충분한 시간인 4 시간에서부터 세포주들의 배가시간 전인 24 시간까지의 시간 별 시험에서도 세포주의 증식에는 별다른 영향을 주지 않는 것으로 밝혀졌다(데이터 제시 안 함).

2. 종양세포에 synuclein 단백질을 처리했을 때 항암제에 대한 감수성

사이의 상관관계

다음으로 synuclein 단백질을 종양세포주에 처리해 주었을 때 apoptosis가 증가하는지 여부를 관찰하였다. 프로그램 된 세포사멸이라고 불리는 apoptosis는 세포가 결함이 생기거나 손상되었을 때 또는 수명이 다 했을 때 세포 스스로가 죽는 과정을 말한다. 또한 apoptosis는 세포가 자신의 죽음에 있어 능동적인 참여가 요구되는 단일세포 결손의 한 과정으로 Kerr등이 보고한 바 있다.¹⁹ 본 연구에서는 Annexin-V FITC assay를 통해 세포의 apoptosis 여부를 FACS(Flow cytometric analysis)로 결과를 분석하였다. 1 μ M씩의 α -syn을 MCF7(그림 4A) 세포주에 처리해 주고 Annexin-V FITC assay를 한 결과 대조군에 비해 약 2% 정도의 세포가 apoptosis 된 것을 확인할 수 있었다. 그리고 β -syn의 경우는 1.5%, γ -syn의 경우에는 1.3%만이 apoptosis 됐음을 확인했다. 너무 적은 수의 세포가 apoptosis 되었기 때문에 이들이 synuclein 단백질군에 의한 세포사라고는 말할 수 없었다. T-47D(그림 4B)에서 α -syn은 0.5%, β -syn은 1%, γ -syn은 1.7%의 세포가 apoptosis 되었다. 그리고 OVCAR-3(그림 4C) 세포주에서는 각각의 synuclein 단백질 군에서 1.3%, 1.3%, 1.1%의 미미한 차이로 역시 apoptosis와 synuclein 단백질의 관계가 없음을 확인하였다.

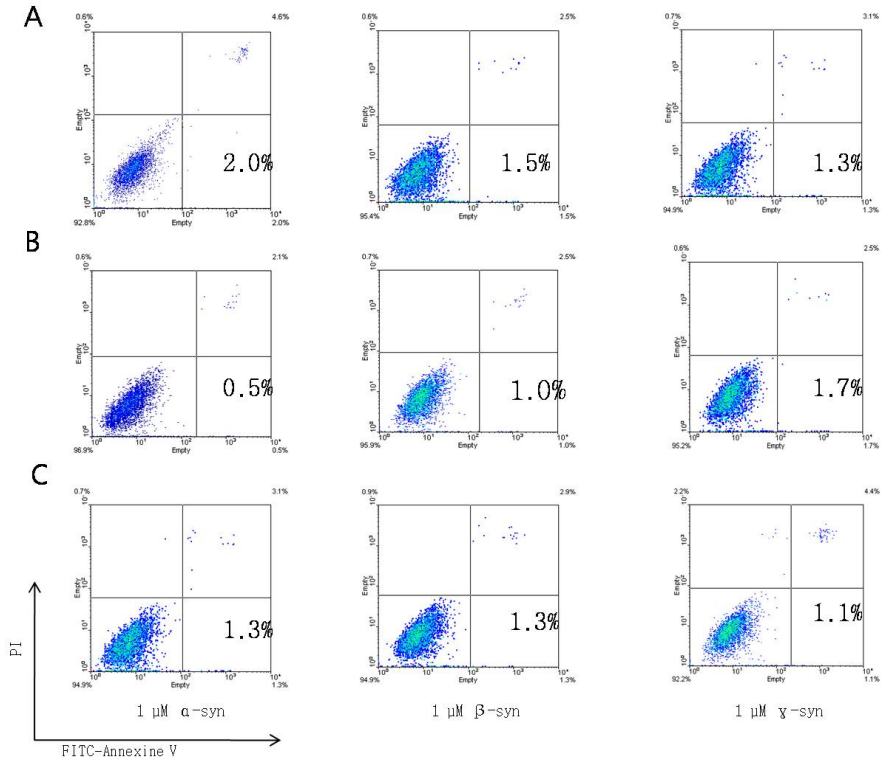


그림 4. Synuclein 단백질이 종양세포주의 apoptosis에 관여하는지 여부 관찰. α, β, γ-syn을 각각 1 μM씩을 (A)MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3 종양세포주들과 함께 18 시간 동안 배양한 후 Annexin-V staining을 통해 FACS로 데이터를 분석하였다.

이상의 기초실험을 바탕으로 이번에는 synuclein 단백질이 cis-platin이나 doxorubicin과 같은 항암제에 의해 유도되는 apoptosis에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 많은 수의 세포에서 DNA 화합물에 의한 세포사를 유도하는 것으로 알려져 있는 anticancer drug 인 cis-

platin²⁰ 이나 reverse transcriptase 와 RNA polymerase의 저항물질인 doxorubicin²¹ 을 각각의 α -, β -, γ -syn과 함께 일정 농도를 처리 한 후 그들의 상관 관계를 MTT assay를 통해 알아 보았다. 항암제에 대한 치사량을 50% 정도까지 낮추려 했으나 OVCAR-3 세포주의 경우 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cis-platin을 처리해도 약 20% 만의 세포만이 죽는 것을 확인하였다(그림 5C). MCF7 세포주는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 cis-platin에 의해서 약 50%의 종양세포가 사멸하였다. 하지만 각각의 synuclein 단백질군들과 함께 cis-platin을 처리하여도 cis-platin에 의해 유도되는 세포사가 줄어들지 않는 것이 나타났다(그림 5A). T-47D 세포주(그림 5B)와 OVCAR-3 세포주(그림 5C)에서도 마찬가지로 cis-platin에는 민감하나 synuclein 단백질군과 함께 처리 되었을 때에는 세포의 회복에는 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다. 결론적으로 이들 종양세포주들은 본 연구에서 사용한 항암제, cis-platin에 대한 감수성은 확인되었지만, synuclein 단백질 군은 이들 항암제에 대한 종양세포의 회복을 돕지 않는 단백질임을 관찰하였다.

Doxorubicin의 경우, 사용한 세포주 모두를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 시료로 같은 농도를 처리해 주었다. 그림 6A, B, C에서 볼 수 있듯이 α -, β -, γ -syn 모두 이들 종양세포의 doxorubicin에 의해 유도되는 세포사에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이 항암제에 대한 감수성은 확인되었으나 synuclein 단백질과 함께 처리해 주었을 때 synuclein 단백질에 의한 세포의 회복은 나타나지 않았다.

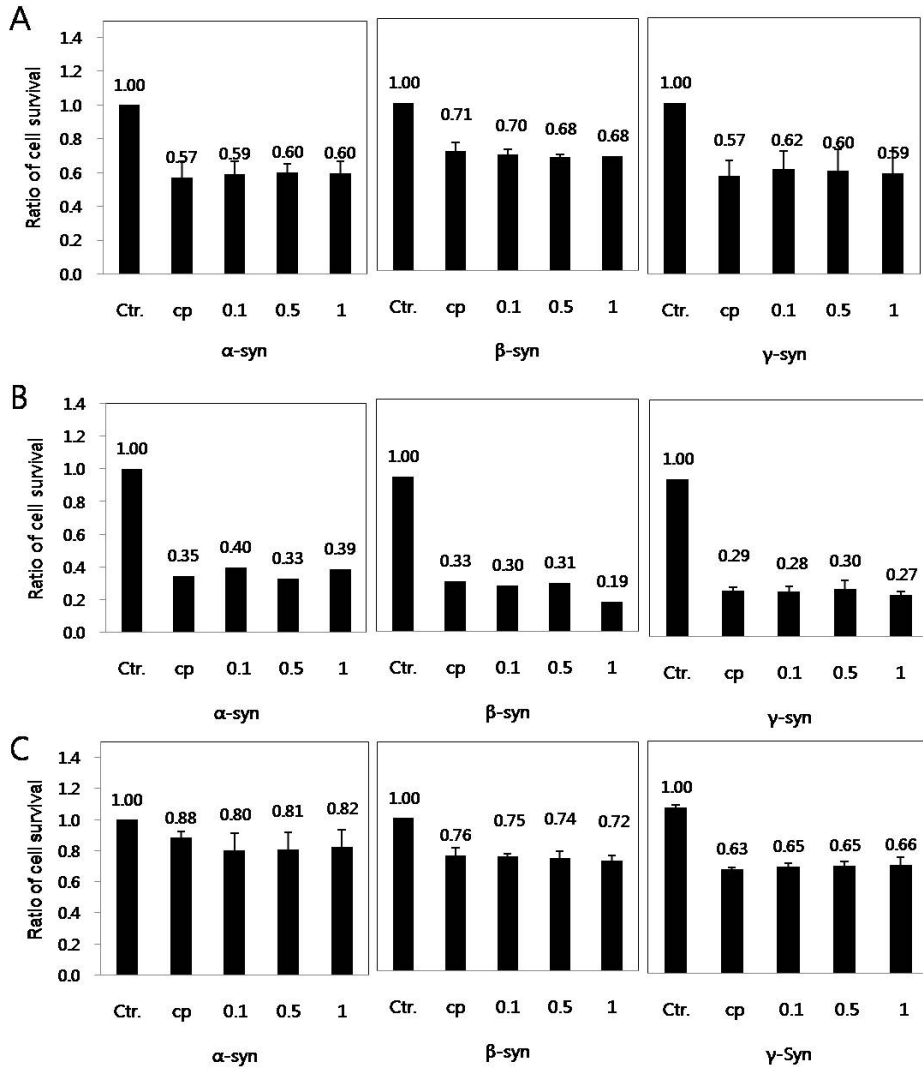


그림 5. Cis-platin과 synuclein 단백질을 함께 각각의 종양세포주에 처리했을 때 항암제에 대한 감수성 사이의 상관관계. (A)MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3 세포주를 96-well plate에 접종 후 앞서 제시한 방법으로 cis-platin을 함께 처리해 18 시간 동안 배양 후 MTT assay을 통해 세포의 증식을 확인하였다.

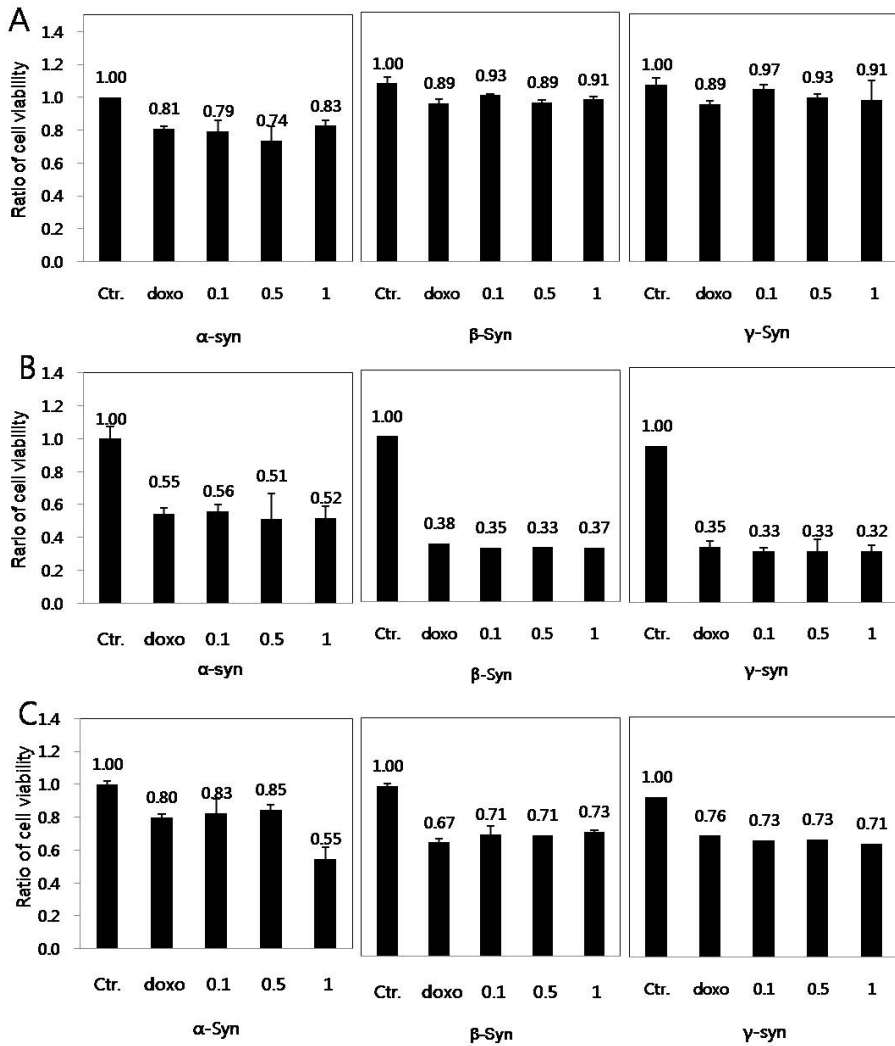


그림 6. Doxorubicin을 각각의 종양세포주에 synuclein 단백질과 함께 처리했을 때 항암제에 대한 감수성 사이의 상관관계 분석. (A) MCF7, (B)T-47D, (C)OVCAR-3 각각의 세포주에 모두 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 같은 양의 doxorubicin을 처리해 MTT assay를 통해 세포의 증식을 확인하였다.

3. Synuclein 단백질이 종양세포의 침투 및 전이에 미치는 영향

암세포의 전이는 그 세포들의 이동능을 촉진하므로 본 연구에서는 암세포의 이동을 관찰하기 위해 암세포주들의 migration의 정도를 측정하였다. 세포의 이동은 암세포의 전이 능력을 알아보기 위해 측정되며 이 연구에서는 kit를 사용한 ‘migration assay’가 수행되었다(그림 7). 그리고 ‘wound healing assay’를 통해서도 세포의 이동능을 관찰하였다(그림 8-10). 본 연구에서 사용되었던 3 종류의 세포주들의 배가시간(doubling time)은 약 30 시간 정도로 알려져 있어 최소한의 영양분(1% FBS가 첨가된 배지 사용)을 주어 최대 48 시간까지 세포들의 움직임을 관찰하였다.

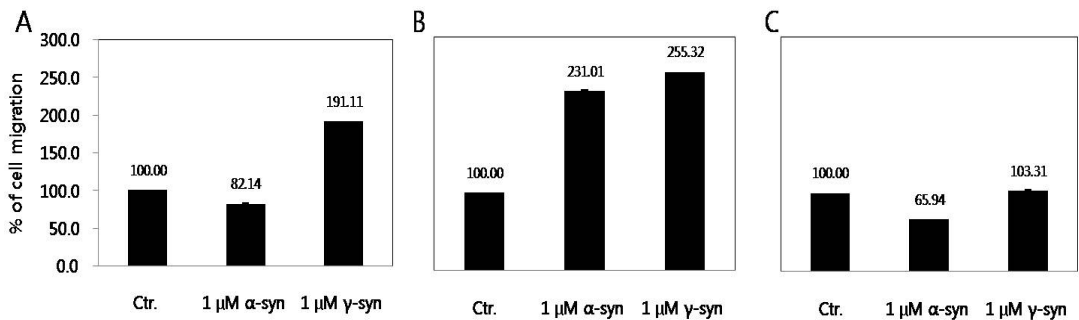


그림 7. 종양세포에 각각 1 μM씩의 α, γ-syn을 처리 후 그들의 migration을 관찰. 각각의 세포주를 단층으로 접종 후 Migration assay kit를 이용해 실험한 결과이다. (A)MCF7 세포주에서는 γ-syn이, (B)T-47D에서는 α, γ-syn 모두에서

세포의 이동능 관찰. (C) α , γ -syn 모두에서 OVCAR-3 세포주의 아무런 이동능도 관찰 할 수 없었다.

Migration assay를 통해 MCF7 세포주는 γ -syn에서 약 90% 정도의 세포들이 이동한 것을 확인할 수 있었다(그림 7A). 즉, 이 세포주에서는 γ -syn이 세포의 바깥쪽에서 처리가 되더라도 세포의 이동능에 도움을 주는 사실을 확인하였다. 그리고 wound healing assay의 결과에서는 β -syn 1 μ M의 농도에서 wound region을 가장 빠른 시간에 채우는 것을 관찰하였다(그림 8). 이상의 실험 결과로 γ -syn과 β -syn이 MCF7 세포주의 이동능에 도움을 주는 단백질임을 확인할 수 있었다.

T-47D 세포주는 α , γ -syn 모두에서 각각 130% 그리고 155% 정도의 세포들이 migration 됨으로 이들 단백질이 T-47D 세포주의 이동능에 영향을 주는 단백질임을 확인했다(그림 7B). 자라는 속도가 다른 세포주에 비해 약간 빨라 wound region을 많은 세포들이 채우는 것을 확인할 수 있었다. 그림 9에서 보는 바와 같이 T-47D 세포주는 α -와 γ -syn에서 확연한 차이를 확인했다. 이 결과로 인해 α -syn 와 γ -syn이 T-47D 세포의 이동능에 관련이 있는 단백질임을 확인하였다.

OVCAR-3 세포주는 α -와 γ -syn이 모두 migration에는 영향을 주는 단백질이 아님을 확인했고(그림 7C), wound healing assay 에서는 세포의 면적이 넓으므로 다른 세포주에 비해 적은 수, 약 1×10^4 cells/ml의 세포주를 접종해 같은 방법으로 관찰하였다. 이 세포주는 β -와 γ -

syn에서 세포의 가장 빠른 이동능을 관찰하였다(그림 10).

이 연구를 통해 각각의 세포주들에 synuclein 단백질군이 종양세포의 전이와 이동능에 미치는 영향을 확인할 수 있었다. 다음 표를 통해 위의 결과를 정리해 보았다.

세포주	Cell migration assay (세포의 전이능력)	Wound healing assay (세포의 이동능력)
MCF7	γ -syn	β -syn
T-47D	α -syn, γ -syn	
OVCAR-3	.	β -syn, γ -syn

표 1. 종양세포의 전이능과 이동능에 관여한 synuclein family 단백질. MCF7, T-47D 그리고 OVCAR-3 세포주에서 이들 세포의 전이능력과 이동능에 영향이 있는 synuclein 단백질을 정리한 표이다.

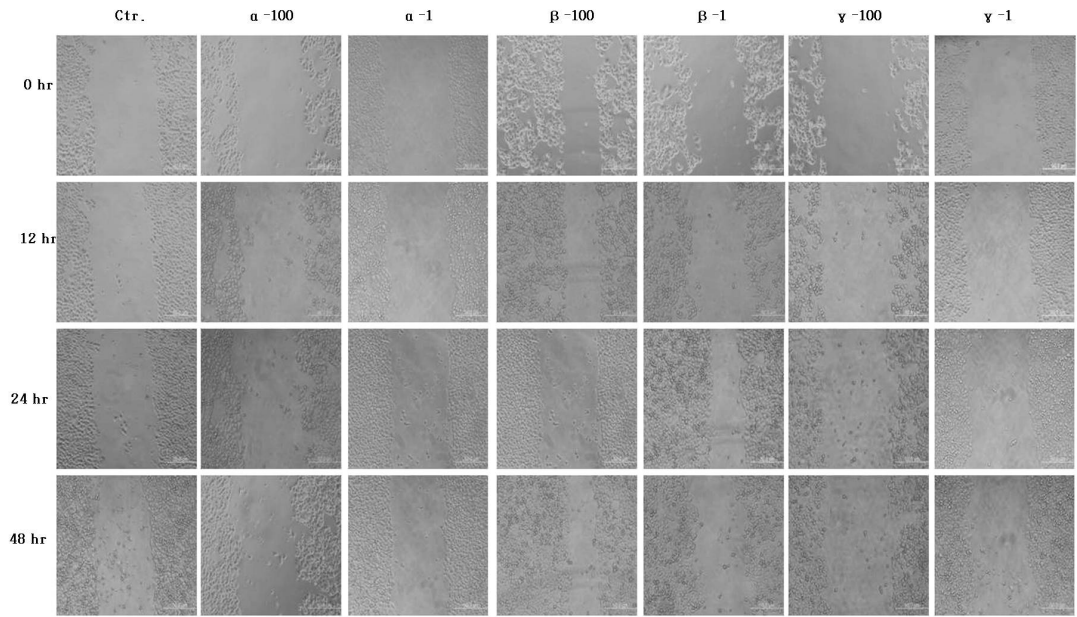


그림 8. MCF7 종양세포주에 synuclein 단백질을 처리하였을 때 세포의 이동 관찰. 세포주를 100 nM과 1 μ M의 농도로 각각의 α -, β -, γ -syn을 제시한 바와 같이 처리 후 48 시간 동안 관찰하였다.

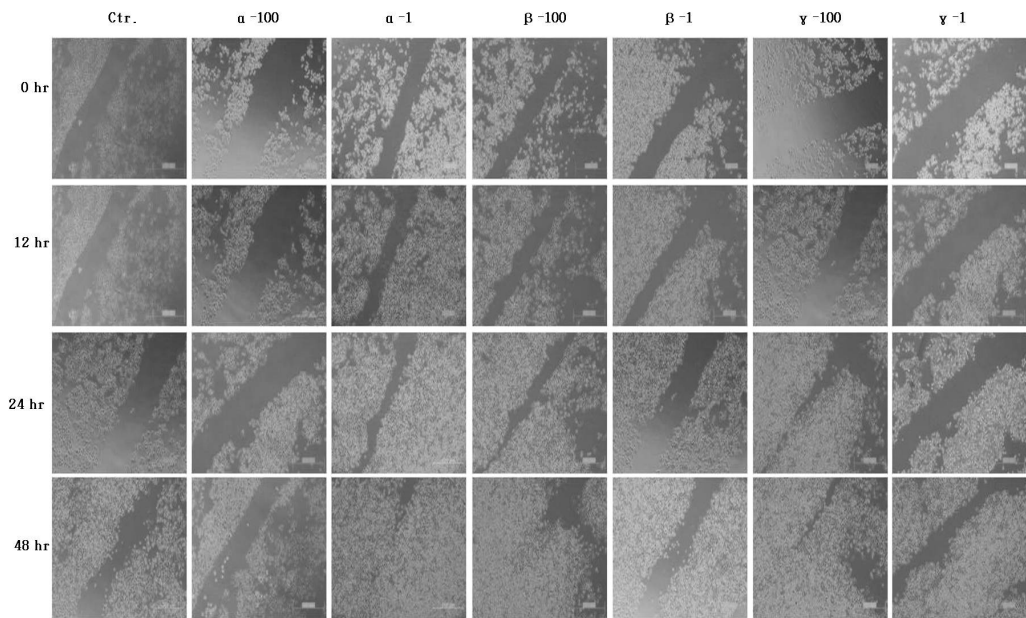


그림 9. T-47D 종양세포주에 synuclein 단백질군을 처리하였을 때 세포의 이동능 관찰. 세포주를 100 nM과 1 μ M의 농도로 각각의 α -, β -, γ -syn을 제시한 바와 같이 처리 후 48 시간 동안 도립현미경을 통해 관찰하였다.

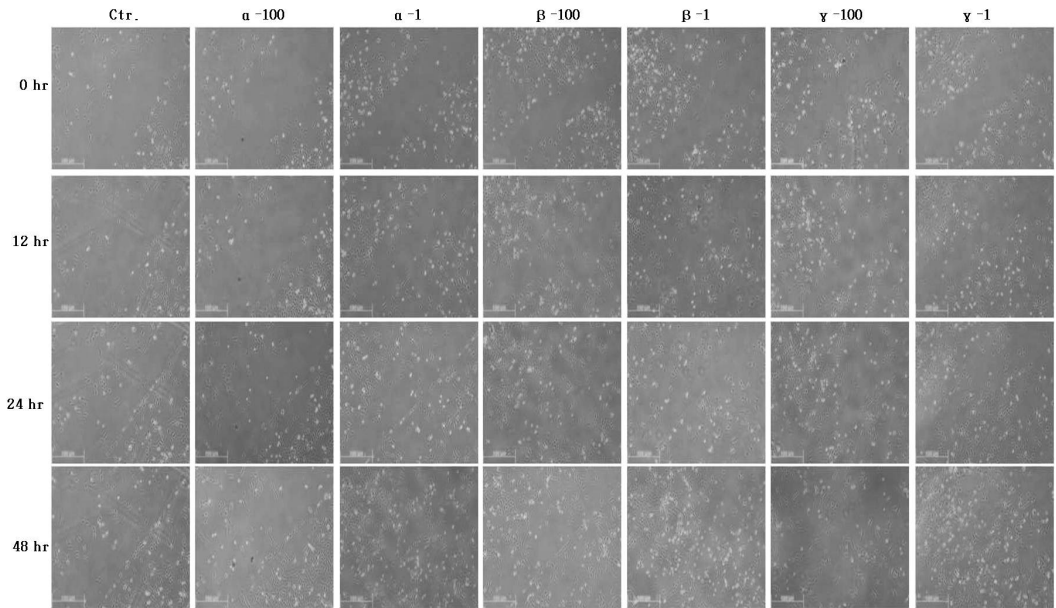


그림 10. OVCAR-3 종양세포주에 각각의 synuclein 단백질군을 처리하였을 때 세포의 이동 관찰. 세포주를 100 nM과 1 μ M의 농도로 각각의 α -, β -, γ -syn을 제시한 바와 같이 처리 후 48 시간 동안 도립현미경을 통해 관찰하였다.

IV. 고찰

파킨슨씨병과 같은 퇴행성 신경질환과 관련된 α -syn의 연구를 시작으로 많은 연구자들이 synuclein 단백질을 연구하였다. 최근에는 종양과 이들 단백질의 관계에 관한 연구도 간헐적으로 보고되고 있다. 특히 γ -syn의 경우 여성관련 암 질병에서 생물학적인 지표로 알려지면서 많이 연구되고 있다. 이에 본 연구에서는 상호 연관이 많은 synuclein 단백질군과 종양세포주의 관계를 체계적으로 살펴보았다. 본 연구에서는 synuclein 단백질이 종양세포의 증식 및 세포사에는 영향이 없으나 종양세포의 이동 및 침투에는 영향이 있음을 확인하였다. 이를 통해 synuclein 단백질이 암세포의 전이과정에 연관되어 있는 것을 관찰하였다.

Synuclein 단백질 군을 가지고 연구한 많은 문헌에서는 synuclein 유전자를 제작해 endogenous하게 세포 안으로 삽입해 그 세포를 가지고 실험을 하였다. 하지만 본 연구에서는 α -syn 단백질은 세포 안으로 penetration 할 수 있고, 또 세포로부터 secretion 할 수 있다고²² 보고된 문헌을 배경으로 세포배양액에 α -syn과 또 다른 synuclein family의 단백질을 처리해 실험을 수행하였다. 이들 단백질군은 'KTKEGV'의 반복되는 아미노산 motif가 α -syn와 γ -syn는 6개, β -syn는 5개를 가지고 있어 이들 모두 비슷한 세포막 투과 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 하지만 본 연구에서는 세포 안으로 얼마만큼(백분율)의 synuclein 단백질들이 penetration 했는지에 대한 확인 실험이 수행되지 않았다.

그리고 세포주 선택에서의 문제점도 발견할 수 있었다. 본 연구에서 사용된 유방암 세포주인 MCF7이나 T-47D 세포주의 경우 γ -syn negative 세포주로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 본 연구에서 쓰인 이유는 충분히 synuclein 단백질 들이 세포 안에서 작용할 것이라고 여겨졌기 때문이다. 만약 γ -syn이 과발현될 가능성이 많고 malignancy가 높은 유방암 세포주의 하나인 MDA-MB231을 연구에 사용하였다면 synuclein이 세포의 증식이나 이동 등에도 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 종양의 조직이나 종양세포에서 그들의 발달과 증식에 γ -syn의 역할을 확인할 수 있을 것이라고 생각된다. 또한 최근 보고에 의하면 γ -syn은 ERK1/2를 활성화시키고 유방암이나 난소암 세포의 생존과 증식에 관여하는 HSP(heat shock protein) 매개 multiprotein complex를 통해 ER- α transcriptional 활성을 증가시킨다고 보고한다.²³⁻²⁴ 그러나 본 실험 결과와 마찬가지로 종양세포의 증식을 관찰하던 중 α -syn이 세포의 증식과 분화에서는 중요하지 않다고 가설을 내세운 문헌을 확인할 수 있었다.²⁵

흔히 난소암 이나 유방암의 치료제로 백금기반 화학치료를 한다. Cis-platin과 synuclein을 농도 별로 처리한 그래프(그림 5)를 확인하면 세포의 사멸 수준이 각각의 synuclein 단백질에서 다름을 확인할 수 있다. 같은 농도의 세포와 단백질들을 처리하였음에도 이 같은 결과를 얻은 것은 혹시 synuclein 단백질의 aggregation 때문은 아닌지 생각된다. Synuclein 단백질을 고농도로 처리해 주었음에도 불구하고 우리가 사용한 재조합 단백질에 aggregation이 일어난 상태에서는 자연상태에서의 synuclein

단백질들과 달리 종양세포로 penetration되지 않았다고 생각할 수 있다. 최근에는 만약 그림 1, 2, 3 에서 synuclein 단백질이 세포의 증식을 유도한다면, 그림 5에서와 같이 항암제 처리 후에도 synuclein 단백질에 의해 세포가 다시 회복되고 항암제에 대한 저항을 하지는 않을까 생각된다. 그래서 위에서 제시한 synuclein이 과발현 될 수 있는 세포주에서 같은 실험을 하면 synuclein 단백질과 종양세포와의 관계를 확인 할 수 있을 것이라고 생각된다. 그림 4에서는 α , β , γ -syn을 각각 1 μ M씩을 세포들과 함께 처리해 주었는데 약 5배 이상의 농도로 단백질을 처리 해주었다면 더 정확한 실험 결과를 얻을 수 있었을 것으로 예상된다.

Wound healing assay 수행 시 각각의 세포주들의 배가시간을 염두에 두어 1%의 낮은 영양분을 첨가한 배지를 사용하였다. 하지만 T-47D 세포의 경우 그림 9에서 control의 마지막 사진을 보면 세포가 많이 자라 있는 것을 확인 할 수 있다. 다른 문헌의 wound healing assay 과정을 살펴보면 세포의 배가시간 전에 시료를 새로 제작해 바꾸어 줌으로 그림 9의 48 시간이 경과된 100 nM β -syn에서처럼 죽어서 떠 다니는 세포들이 사진에 찍힐 염려는 하지 않았을 수도 있을 것 같다. 이와 같이 여러 오차의 범위를 줄인다면, 아직까지는 보고되지 않은 침윤성 종양의 종류인 T-47D와 또 다른 여성관련 암 질병에서 synuclein 단백질과의 관계에 대한 연구도 의미 있을 것 같다.

V. 결론

1. Synuclein 단백질군이 종양세포의 증식에 미치는 영향을 분석함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다. Synuclein 단백질군은 유방암 세포주인 MCF7과 T-47D 그리고 난소암 세포주인 OVCAR-3 세포주의 증식에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 synuclein 단백질군은 암세포주들의 세포사멸에도 직접적인 영향을 주지는 않는 것으로 나타났다.
2. 종양세포에 synuclein 단백질과 항암제를 함께 처리 해 주었을 때 항암제에 의해 세포의 사멸은 있었지만 synuclein 단백질군은 종양세포의 항암제에 의한 세포사를 억제하지 못하는 것으로 나타났다.
3. Synuclein 단백질이 종양세포의 침투 및 전이에 미치는 영향을 분석한 결과 MCF7 세포주에서는 β -syn과 γ -syn이 1 μ M의 농도에서 이동능에 도움을 주는 단백질임을 확인할 수 있었다. T-47D 세포주는 α -와 γ -syn에서 그리고 OVCAR-3 세포주에서는 β -와 γ -syn에서 세포의 가장 빠른 이동능을 확인하였다. 이 결과를 미루어 보아 synuclein 단백질군은 여성관련 암 질병에서 세포주의 전이에 영향을 미치는 것으로 나타나 향후 이에 대한 구체적인 연구가 필요하다고 생각된다.

참고 문헌

1. Ahmad M, Attoub S, Singh MN, Martin FL, El-Agnaf OM. Gamma-synuclein and the progression of cancer. *FASEB J* 2007;21:3419-30.
2. Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res* 1998;8:871-80.
3. Nakajo S, Shioda S, Nakai Y, Nakaya K. Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;27:81-6.
4. Tanji K, Mori F, Nakajo S, Imaizumi T, Yoshida H, Hirabayashi T, et al. Expression of beta-synuclein in normal human astrocytes. *Neuroreport* 2001;12:2845-8.
5. Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, et al. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha -synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci* 2000;20:6365-73.
6. Bruening W, Giasson BI, Klein-Szanto AJ, Lee VM, Trojanowski JQ, Godwin AK. Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 2000;88:2154-63.
7. Jia T, Liu YE, Liu J, Shi YE. Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma. *Cancer Res* 1999;59:742-7.
8. Liu J, Spence MJ, Zhang YL, Jiang Y, Liu YE, Shi YE. Transcriptional suppression of synuclein gamma (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62:99-107.
9. Liu H, Liu W, Wu Y, Zhou Y, Xue R, Luo C, et al. Loss of epigenetic control of synuclein-gamma gene as a molecular indicator of metastasis in a wide range of human cancers. *Cancer Res* 2005;65:7635-43.
10. Norris EH, Giasson BI, Lee VM. Alpha-synuclein: normal function and

- role in neurodegenerative diseases. *Curr Top Dev Biol* 2004;60:17-54.
11. Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J. Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein Sci* 2000;9:2489-96.
 12. Souza JM, Giasson BI, Lee VM, Ischiropoulos H. Chaperone-like activity of synucleins. *FEBS Lett* 2000;474:116-9.
 13. Lee D, Paik SR, Choi KY. Beta-synuclein exhibits chaperone activity more efficiently than alpha-synuclein. *FEBS Lett* 2004;576:256-60.
 14. Park SM, Jung HY, Kim HO, Rhim H, Paik SR, Chung KC, et al. Evidence that alpha-synuclein functions as a negative regulator of Ca(++)-dependent alpha-granule release from human platelets. *Blood* 2002;100:2506-14.
 15. Hashimoto M, Rockenstein E, Mante M, Mallory M, Masliah E. beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron* 2001;32:213-23.
 16. Snyder H, Mensah K, Hsu C, Hashimoto M, Surgucheva IG, Festoff B, et al. beta-Synuclein reduces proteasomal inhibition by alpha-synuclein but not gamma-synuclein. *J Biol Chem* 2005;280:7562-9.
 17. Kawashima M, Suzuki SO, Doh-ura K, Iwaki T. alpha-Synuclein is expressed in a variety of brain tumors showing neuronal differentiation. *Acta Neuropathol* 2000;99:154-60.
 18. Fung KM, Rorke LB, Giasson B, Lee VM, Trojanowski JQ. Expression of alpha-, beta-, and gamma-synuclein in glial tumors and medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2003;106:167-75.
 19. Kerr JF, Cooksley WG, Searle J, Halliday JW, Halliday WJ, Holder L, et al. The nature of piecemeal necrosis in chronic active hepatitis. *Lancet* 1979;2:827-8.
 20. Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1013-23.
 21. Ellis CN, Ellis MB, Blakemore WS. Effect of adriamycin on heart

- mitochondrial DNA. *Biochem J* 1987;245:309-12.
22. Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC. Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2001;276:27441-8.
 23. Liu YE, Pu W, Jiang Y, Shi D, Dackour R, Shi YE. Chaperoning of estrogen receptor and induction of mammary gland proliferation by neuronal protein synuclein gamma. *Oncogene* 2007;26:2115-25.
 24. Pan ZZ, Bruening W, Godwin AK. Involvement of RHO GTPases and ERK in synuclein-gamma enhanced cancer cell motility. *Int J Oncol* 2006;29:1201-5.
 25. Jiang Y, Liu YE, Lu A, Gupta A, Goldberg ID, Liu J, et al. Stimulation of estrogen receptor signaling by gamma synuclein. *Cancer Res* 2003;63:3899-903.

Abstract

The effect of recombinant synuclein proteins on cancer cell proliferation, metastasis and death

Minkyung Koo

Department of Medicine or Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jongsun Kim)

Synuclein family members, α -synuclein(α -syn), β -synuclein(β -syn), γ -synuclein(γ -syn), are highly conserved, small and soluble proteins. As neuronal proteins, proteins in this group have been implicated in both neurodegenerative diseases and cancer. Unlike α -syn and β -syn, γ -syn is up-regulated in late-stage of breast and ovarian cancer cells. Recently, elevated levels of γ -syn have also been detected in various types of cancer, especially in advanced stages of the disease. Furthermore, studies to date indicate that overexpression of γ -syn compromises normal mitotic checkpoint controls, resulting in multinucleation as well as faster cell growth. However, whether other synuclein family members play any role on the cancer cell growth or death is not well known yet.

In this study, we used breast cancer cell lines, MCF7 and T-47D, and ovarian cancer cell line, OVCAR-3, to investigate whether the synuclein proteins could affect the cancer cell proliferation and the cell survival in drugs (cis-platin or doxorubicin)-induced cell death.

As a result, α -, β - and γ -syn did not appear to affect the proliferation of cancer cell lines, MCF7, T-47D and OVCAR-3. We also thought about the possibility of recovery function of the synuclein proteins to the anti-cancer drug treated cancer cells. However, the synuclein protein family members could not inhibit the cell death induced by cis-platin and doxorubicin. Next, we investigated whether synuclein proteins are involved in the migration or invasion of cancer cells by migration assay and wound healing assay. In MCF7 cell lines, β -syn helped the cells to migrate, and in the wound healing assay, γ -syn was the only synuclein family protein that helped the recovery of the wound region. We found that α -syn and γ -syn in T-47D cell lines were migrated and healed the wound regions. For OVCAR-3 cells, β -syn and γ -syn were the proteins that have effects on migrated cells. These results suggest that synuclein proteins may have a role in the migration and invasion of cancer cells.

In conclusion, we have demonstrated that synuclein family members had specific effects on the cell migration in the women-related cancer, but it needs more systematic study to precisely uncover the roles of synuclein proteins. Understanding the role of synuclein proteins in cancer cells would be helpful to develop a new cancer treatment method.

Key Words: α -, β - and γ -synuclein proteins, cell proliferation, cell metastasis and invasion