



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

PKCK2에 의하여 조절되는 PKCK2  
특이 기질 동정

연세대학교 대학원  
의과학과  
김 한 슬

PKCK2에 의하여 조절되는 PKCK2  
특이 기질 동정

지도교수 김 건 흥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2016년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

김 한 슬

# 김한슬의 석사 학위논문을 인준함

심사위원           김건홍           인

심사위원           육종인           인

심사위원           김종선           인

연세대학교 대학원

2015년 12월

## 감사의 글

이 논문을 쓰기까지 정성으로 지도해 주신 김건홍 교수님과 바쁘신 와중에 조언을 해주신 육종인 교수님, 그리고 김종인 교수님께 감사 드립니다. 생화학 분자생물학 교실에서 많은 가르침을 주신 안용호 교수님, 김경섭 교수님, 허만욱 교수님, 박상욱 교수님, 윤호근 교수님, 김재우 교수님, 전경희 교수님께 진심으로 감사드립니다.

뭐든지 척척 해결해 주시던 양경미 선생님, 가장 가까이에서 도와주던 성락 오빠, 비타민 은정 언니, 친구 같은 선배 선영이, 짧은 시간 같이 했지만 지금은 의지할 수 있는 친구가 되어준 혜지에게 감사의 말을 전합니다.

학위 과정 동안 저의 제 2 의 고향이었던 YHG 의 정신적 지주 효경언니, 항상 잘 챙겨주시던 수연언니, 친구 같은 혜정 언니, 이마 반짝 은정 언니, 아들 셋 아빠 승현 오빠, 장난꾸러기 재성 오빠, 속 깊은 미현 언니 감사합니다. 그리고 저의 석사 동기인 엄마 같은 수빈이랑 예슬이, 구박하지만 잘 챙겨주는

현우 오빠, 상남자 혁구 오빠 더불어 생화학  
분자생물학 교실원들께도 감사 드립니다.

6 년이라는 시간 동안 변하지 않고 제 옆에서  
멘토가 되어주시고 누구 보다 걱정해 주신 곽쌤,  
고쌤, 숙영쌤, 그리고 내 친구들 아름이, 경주에게  
감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 학위를 하면서 제가 많이 힘들 때  
든든한 버팀목으로 저를 지탱해주며 격려와 사랑을  
아낌없이 주었던 우리 할머니, 할아버지, 엄마, 아빠,  
오빠, 우리 이모들 그리고 언제나 저의 편에서 저를  
응원해 주는 제 남자친구 택이에게 너무 감사하고  
사랑합니다.

저자 씬

## 차례

국문요약.....	1
I. 서론 .....	5
II. 재료 및 방법	
1. 세포 배양과 시약.....	9
2. Western blot analysis.....	10
3. <i>In vitro</i> kinase assay.....	11
4. 안정세포주 제작 .....	12
III. 결과	
1. 전이가 빈번한 장기에서 유래한 암 세포 주들의 PKCK 활성 및 catalytic subunit인 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수 준 확인 .....	13
2. PKCK2 활성화에 따른 EMT 표지자 발현 확인.....	17
3. PKCK2 특이 기질 단백질로서의 ZEB1 .....	19
4. PKCK2 인산화 기질 단백질 CDC37 의 진단 marker 로서의 가능성 확인.....	22

IV. 고찰 .....	27
V. 결론 .....	30
참고문헌 .....	31
Abstract .....	35



## 그림 차례

그림 1. 전이가 빈번한 장기에서 유래한 암 세포 주들의 PKCK2 활성화 및 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준 확인 .....	15
그림 2. PKCK2 활성화에 따른 EMT 표지자 스크리닝 .....	18
그림 3. PKCK2 특이 기질 단백질로서의 ZEB1 .....	20
그림 4. PKCK2 활성화에 따른 CDC37 및 Phosho-CDC37 발현 양 확인 .....	24

## 국문요약

### PKCK2에 의하여 조절되는 PKCK2 특이 기질 동정

암전이란 암세포가 원발 암이 발생한 장기에서 다른 장기로 이동하는 현상을 말하며 이러한 암전이 과정에서 암세포는 침윤성과 운동성을 갖게 된다. 이때 발생하는 현상이 Epithelial mesenchymal - transition (EMT)라 하며, E-to N-switching은 EMT가 발생할 때 중요한 전제 조건이다.

Protein kinase casein kinase 2 (PKCK2)는 세포 내에서 여러 다른 기질 단백질들을 인산화 함으로써 세포성장, 증식, 자멸사, 노화 등 많은 생리기전에 관여한다고 알려져있다. 또한 최근 보고에 따르면 PKCK2는 EMT에도 관여하여 암전기와 침윤현상을 조절한다고 알려져있다. 이러한 PKCK2는 특히 사람의 암 조직이나 암 세포 주에서 그 활성이 증가되어 있다. 따라서 본 연구팀에서는 PKCK2를 표적으로 하는 항전이 분자 표적 치료제를 개발 중에 있다. 분자표적치료제 개발은 개발 약물 투여 대상 환자 군을 선별 가능하게 하는 predictive biomarker의 발굴 (companion diagnostics의 개발)과 병행되어야 한다. 그러므로 PKCK2를 표적으로 하는 분자표적 치료를

시행하기 위해서는 전이의 위험성을 가지는, 즉 PKCK2의 활성이 높은 환자 군을 선별할 수 있는 PKCK2 특이 기질을 발굴하여 진단 marker로써 개발하여야 한다. 하지만 여러 암 세포주에서 기본적인 PKCK2활성과 catalytic subunit인 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준을 확인한 결과 PKCK2활성과 비례하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 PKCK2활성 증가에 따라 그 발현 양의 차이를 보이며, 그 활성을 대변해 줄 수 있는 기질을 발굴하여 임상에서 원발 암 조직의 PKCK2활성을 간접적으로 제시해 줄 임상 진단 marker를 개발하여야 한다. 그러므로 본 연구에서는 여러 PKCK2 기질 단백질들을 스크리닝 하여 PKCK2활성에 따라 변화하며 그 활성을 대변해 줄 수 있는 기질 단백질을 제시 함으로써 임상에서 고 위험 환자 군을 선별 할 수 있는 biomarker로 사용되어질 가능성을 제시하고자 한다.

우선, 세포 내에서 가장 직접적으로 PKCK2 활성을 측정할 수 있는 *in vitro* kinase assay를 수행하여 각 세포의 PKCK2 활성을 측정 하였다. 하지만 *in vitro* kinase assay는 세포의 추출물을 사용하며  $\gamma$ -<sup>32</sup>P 를 사용하는 실험이므로 임상에서 진단 도구로 사용하기에는 한계가 있다고 판단되었다.

다음으로 여러 암 세포 주 내의 epithelial marker인 E-cadherin과 mesenchymal marker인 N-cadherin의 발현 수준을

확인하였다. PKCK2의 활성화에 따른 N-cadherin은 발현 수준은 큰 연관성이 없었으나, PKCK2활성과 E-cadherin의 발현감소가 높은 연관성이 있음을 확인할 수 있었다.

다음으로 본 연구팀의 선행연구 결과 PKCK2의 기질임을 밝힌 ZEB1의 발현수준을 여러 세포 주 내에서 확인해 보았다. 그 결과 유방암과 폐암 세포 주에서 ZEB1이 상대적으로 높은 발현 수준을 가지나, 대장암과 위암 세포 주에서는 낮은 발현 수준을 보였다. 이러한 ZEB1의 발현 차이가 PKCK2활성에 의한 것인지 또는 기본적인 ZEB1의 발현 수준이 다양한 조직 유래 세포 내에서 다양하게 존재 하기 때문인지 확인할 수 없었다. 그러므로 기본적인 발현 수준이 다른 ZEB1을 PKCK2 활성을 대변해주는 marker로 사용할 수 있을 지는 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

마지막으로 PKCK2 활성을 간접적으로 측정 할 수 있는 후보 기질 단백질로써 CDC37에 대한 검증을 진행하였다. PKCK2의 인산화 기질로 알려진 CDC37의 인산화 정도를 확인해 본 결과 본 연구에서 PKCK2는 CDC37을 인산화하여 그 안정성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 이와 상응하게 PKCK2활성에 따라 12개의 세포주중 10개의 세포에서 CDC37 및 phospho-CDC37의 발현 수준이 연관성이 있음을 확인하였다.

위의 연구 결과들을 종합 하여 볼 때 전이가 빈발하는 대장암, 위암, 유방암, 직장암의 여러 세포 주에서 E-cadherin과 CDC37, phospho-CDC37이 PKCK2활성과 높은 수준의 연관성을 가지며, PKCK2 활성을 대변할 수 있음을 확인 할 수 있었다. 결과적으로 임상에서 E-cadherin, CDC37 그리고 phospho-CDC37에 대한 immuno-histochemistry를 통하여 전이 고 위험 환자 군을 보다 신속하고 정확히 진단 할 수 있는 marker로 사용되어질 수 있는 가능성을 제시할 수 있었다.

---

핵심되는 말: PKCK2, EMT, companion diagnostics, predictive marker

## PKCK2에 의하여 조절되는 PKCK2 특이 기질 동정

<지도교수 김 건 홍>

연세대학교 대학원 의과학과

김한슬

### I. 서론

암 전이는 암으로 인한 사망의 원인 중 90% 이상을 차지하는 것으로 보고되고 있다.<sup>1</sup> 항암 약물 치료가 전이 암 치료에 표준요법으로 사용되고 있으나, 기존 항암제는 대부분 세포독성 약물에 해당하여 정상 세포에도 영향을 끼침으로써 면역저하, 세균감염, 자발적 출혈, 탈모, 메스꺼움 및 구토 등의 부작용을 가진다. 따라서 최근에는 이러한 부작용은 줄이면서 유효성은 증가되어 삶의 질을 유지하고 동시에 수명 연장을 도모할 수 있는 치료제 개발이 요구되고 있고 암 발생의 분자생물학적 기전 규명을 바탕으로 암 발생 과정에 관여하는 신호전달 경로상의 특정물질을 표적으로 하는

molecular targeted therapy (MTT, 표적 치료법)가 대세를 이루고 있다.

Classical cadherin 의 종류로는 E-cadherin, N-cadherin 및 P-cadherin이 있으며, 이러한 cadherin들은 특정 세포, 조직 그리고 발달과정에서 발현된다. 이중 E-cadherin은 polarized epithelial cell에서 높게 발현되는 반면 N-cadherin은 mesenchymal cell에서 주도적으로 발현된다.<sup>2</sup> Epithelial-mesenchymal transition (EMT)은 여러 가지 생화학적 변화 과정을 통해 세포가 상피세포의 특성을 소실하고 간엽세포의 특성을 획득하게 되는 것을 의미한다.<sup>3</sup> EMT과정을 거친 세포들은 polarity를 소실하고, cell-cell junction이 분리되며 운동성이 증가된다.<sup>4,5</sup> EMT는 implantation, embryogenesis, organ development, wound healing, tissue regeneration, organ fibrosis, 그리고 tumor progression등과 같은 많은 정상 및 질병 상태의 다양한 생물학적 현상에서 발생한다.<sup>6</sup>

EMT는 암 전이가 발생하는데 중요한 기전으로 알려져 있다. 이러한 EMT가 일어나는 과정에서 E- to N- cadherin switching이 흔하게 동반된다.<sup>1,7-10</sup> Cadherin switching이 진행되는 동안 E-cadherin 발현 감소의 주요한 기전은 E-cadherin의 전사 억제이다.<sup>11</sup> Zinc finger transcriptional repressor인 Snail superfamily로써 Snail1,<sup>12,13</sup> Snail2 (Slug);<sup>14,15</sup> ZEB family에 속하는 ZEB1 (TCF8 또는 dEF1), ZEB2 [ZFXH1B 또는 SMAD interacting protein(SIP1)];<sup>16,17</sup>

bHLH factor인 E47 (TCF3); 그리고 TCF4 (E2-2)<sup>18,19</sup> 와 같은 E-cadherin 전사 억제자들에 대한 연구가 광범위하게 이루어져 왔다. 뿐만 아니라 cadherin switching동안 증가된 N-cadherin의 발현은 EMT의 또 다른 표지자로 여겨진다.<sup>11</sup>

Protein kinase casein kinase 2 (CK2)는 진화적으로 잘 보존되어 있는 serine/threonine kinase 로써, cell proliferation, transformation, apoptosis, senescence등의 pathway를 조절한다고 알려져있다.<sup>20</sup> CK2는 constitutively active한 2개의 catalytic subunit ( $\alpha$ 와  $\alpha'$ ) 과 2개의 regulatory subunit 으로 구성되어 있다. CK2는 특히 사람의 암세포 및 암세포 주에서 그 활성이 증가되어 있으며,<sup>21-24</sup> 암 세포의 전이에 있어서 Wnt signaling pathway를 positive하게 조절함으로써 E-cadherin의 발현을 억제시키고,<sup>25</sup> Snail의 92번째 serine을 인산화함으로써 단백질의 안정성을 증가시켜 E-cadherin의 발현을 억제시키며, 세포가 detachment-induced apoptosis인 anoikis에 대한 저항성을 갖게 함으로써 암 세포의 전이 성공 가능성을 높여준다.<sup>26</sup>

이렇듯 EMT를 유도하며 암 전이에 있어서는 마스터 조절 물질로 작용할 것으로 추정되는 CK2 효소활성을 억제하는 항 전이제 개발을 위해서는 투여 대상이 될 환자 군을 선별 할 수 있는 predictive biomarker의 발굴 (companion diagnostics의 개발)이



병행 되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 암 전이가 빈발하는 조직인 대장암, 위암, 유방암, 폐암 세포 주를 대상으로 암세포주의 PKCK2활성을 세포 추출물을 이용한 *in vitro* kinase assay를 통해 직접적으로 확인하고, 이 결과와 상관성을 가지면서 임상환경에서 암 조직의 PKCK2 활성을 예측할 수 있는 (예, 면역화학 염색 등) surrogate marker를 선정하고자 하였다. Marker의 후보들로서는 여러 기존 연구를 통해서 PKCK2의 기질로서 확인되어 그 단백질의 안정성이 증가하거나 (Snail 및 ZEB1), PKCK2에 의한 인산화 부위를 인식할 수 있는 인산화 특이적 항체 (Phospho-CDC37) 또는 PKCK2의 활성화에 의해 EMT가 유발될 수 있기에 상피세포와 간엽세포에서 서로 배타적으로 발현하는 단백질 (E-cadherin 및 N-cadherin)을 대상으로 하여 특이적으로 PKCK2활성을 대변해 주며, 임상적으로 전이 고 위험 환자 군을 선별 할 수 있는 biomarker를 검증하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포 배양과 시약

인간 대장암 세포주인 HT-29, HCT116, SW620, 위암세포주인 SNU-16, AGS, SNU-719, 유방암 세포주인 MDA-MB231, MDA-MB 435, 폐암 세포주인 NCI-H1299, NCI-H460 는 RPMI-1640 MEDIUM (1X) (Hyclone, Logan, UT, USA), 인간 식도암 세포주인 TE2 세포, 유방암 세포주인 MCF7 세포는 DMEM/High glucose (Hyclone), 폐암 세포주인 Calu-3 는 Minimum Essential Medium (MEM 1X) (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA) 로 배양하였다. 각 배양액에 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL)과 100 mg/ml streptomycin (Gibco-BRL), 100 units/ml penicillin (Gibco-BRL) 을 첨가하여 사용하였다.

### 2. Western blot analysis

세포 추출물은 50 mM Tris (PH 7.5), 150 mM EGTA, 0.25% sodium deoxycholicacid, 150 mM NaCl, 1% NP-40 2 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (USB, Cleveland, OH, USA), Protease inhibitor cocktail (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)가 들어있는

RIPA buffer 또는 20 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 2 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail, 1 mM sodium orthovanadate 가 포함된 CLB (cell lysis buffer)를 사용하여 각각 용해 시켰다. 용해된 세포들은 4 °C 에서 13,200 rpm으로 10분 간 원심 분리한 후, 상등액을 취하고 Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였고 polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 transfer하였다. Membrane은 0.1% (v/v) tween 20 (Sigma-Aldrich)이 포함된 Tris-buffer (pH 7.4)와 5% non fat Difco™ skim milk (BD biosciences, Sparks, MD, USA)을 이용하여 blocking 한 후 1차 항체를 붙였다. 사용한 1차 항체는 PKCK2 $\alpha$  (Millipore, CA, USA), E-cadherin (Invitrogen, Camarillo, California, USA), N-cadherin (Invitrogen), GAPDH (Millipore),  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich), pro-caspase-2 (BD Transduction Laboratories, Sparks, MD, USA), CDC37 (Sigma-Aldrich), phospho-CDC37 (Sigma-Aldrich) 이다. 결과 분석은 Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Indianapolis, IN, USA)을 사용하였다.

### 3. *In vitro* kinase assay

세포 추출물을 얻기 위해 세포를 CLB (cell lysis buffer)를 사용하여 용해시켰다. 용해된 세포들은 4 °C에서 13,200 rpm 으로 15 분 간 원심 분리했다. 상등액을 취하고 Bradford assay (Bio-Rad)를 이용하여 단백질을 정량하고 인산화 반응에는 100 µg 의 단백질을 사용하였다. 반응조건을 간략하게 기술하면 다음과 같다.

3 µg의 GST-CS (GST tagged CK2 Substrate) 단백질을 glutathione Sepharose 4B bead와 4 °C 에서 1시간 동안 반응시키고 1x kinase 완충액 (4 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM β-glycerolphosphate, 1 mM EGTA, 200 µM sodium orthovanadate, 200 µM DTT)를 이용하여 두 번 세척 하였다. 100 µg의 단백질을 포함한 세포 추출액을 총 50 µl의 kinase reaction 완충액 [5X kinase 완충액 10 µl, magnesium/ATP cocktail solution 10 µl [75 mM MgCl<sub>2</sub>/500 mM ATP 90 µl와 (γ-<sup>32</sup>P)-ATP 10 µl (100 µCi)]와 30 °C 에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 1X kinase 완충액을 이용하여 4번 세척하고 1X SDS sample loading 완충액 20 µl를 넣고 12% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 하였다. 동일한 양의 GST-CS가 사용되었는지를 확인하기 위하여 coomassie brilliant blue (CBB) 염색을 하여 GST-CS band를 확인한 후, gel을 말려 autoradiography를 시행 하였다.

#### 4. 안정세포주 제작

3가지 벡터인 Envelope glycoprotein 발현 벡터 (pMD2.G), gag-pol 발현 벡터 (pMDLg/pRRE), 그리고 발현 벡터 (pRSV-Rev)를 packaging 벡터로 사용하였다. HEK293T 세포에 각각 1:1:1의 비율로 polyexpress™ (Excellgen, USA)이용하여 PKCK2 $\alpha$  와 같이 transfection하였다. 48시간 후에 viral 벡터 입자가 포함된 세포 배양액을 건어 0.45  $\mu$ m membrane filter (Milipore)로 걸러 7  $\mu$ g/ml polybren (Sigma-Aldrich)을 첨가하여 표적 세포에 감염시켰다.

### III. 결과

#### 1. 전이가 빈번한 장기에서 유래한 암 세포 주들의 PKCK2 활성 및 catalytic subunit인 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준 확인

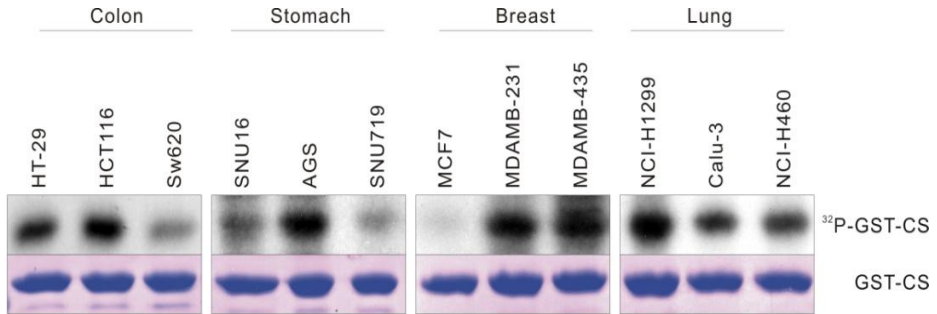
PKCK2의 활성을 대변할 수 있는 가장 직접적인 marker중 하나로써 전이가 빈발하는 대장, 위, 유방, 폐 이렇게 4개의 조직을 선별한 후 각 조직의 상피세포 기원의 세포 주들을 선정하였다. 다음으로 실험실 수준에서 세포 내 PKCK2의 활성을 측정하는 가장 직접적으로 측정할 수 있는 방법인 *in vitro* kinase assay를 통해 각 세포 내 PKCK2활성을 측정하였다. 그 결과 12개의 세포 주중 8개의 세포 주 (HT-29, HCT116, AGS, MD-AMB-231, MD-AMB-435, NCI-H460, NCI-H1299)가 상대적으로 높은 PKCK2활성을 보였고, 4개의 세포 주 (MCF7, Calu-3, SW620, SNU719)가 낮은 PKCK2활성을 보였다 (그림 1-가).

PKCK2의 활성을 대변할 수 있는 또 다른 직접적인 marker중 하나로서 PKCK2의 catalytic subunit인 CK2 $\alpha$ 가 PKCK2 활성과 비례하는지를 확인하고자 여러 암 세포 주에서 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준을 western blot analysis를 통하여 확인한 후 PKCK2 활성과 비교 분석 하였다. 그 결과 여러 암 세포 주 내의 PKCK2활성과 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준이 일치 하지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다

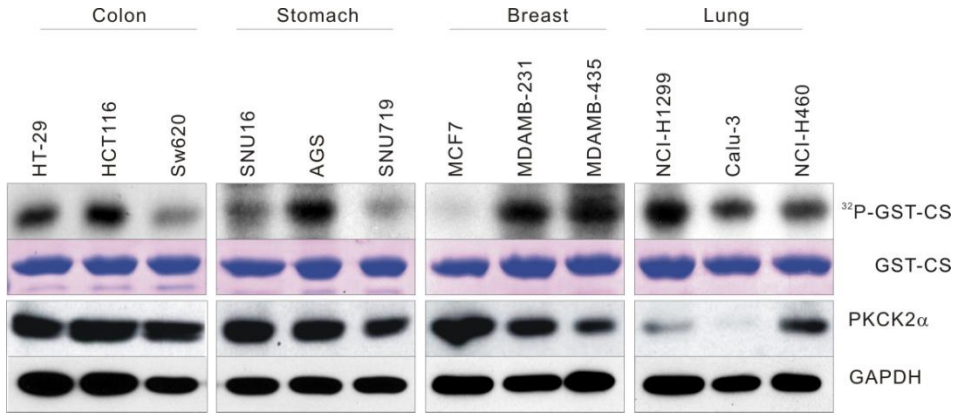
(그림 1-나).

따라서 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준을 PKCK2활성을 대변해 줄 수 있는 biomarker로 개발하기에는 부적합 하다고 사료된다. 그러므로 추가적으로 PKCK2활성을 대변해 줄 수 있는 기질 단백질 검증이 필요하다고 판단하였다.

(가)



(나)





**그림1.** 전이가 빈번한 장기에서 유래한 암 세포 주들의 PKCK2 활성 및 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준 확인. (가) 대장암, 위암, 유방암, 폐암 세포 주들을 이용하여 *In vitro* kinase assay를 수행 하였음.  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP를 이용하여 수행 하였음. 세포 추출액은 CLB를 이용하여 제작하였고 150  $\mu$ g의 단백질을 사용하였음. 세포 추출액을 GST-CS와 30  $^{\circ}$ C 에서 20분간 반응 시킨 후 20  $\mu$ l 의 SDS sample loading 완충액을 첨가하고 5분간 끓인 후 SDS PAGE를 수행 하였고, CBB를 이용하여 염색한 후 GST-CS의 양을 확인하고 gel을 말린 후 autoradiography를 시행하였음. (나) 대장암, 위암, 유방암, 폐암 세포 주들을 이용하여 western blot analysis 을 수행하였음. 세포 추출액은 RIPA buffer를 이용하여 제작하였고 PKCK2 $\alpha$  는 총 40 $\mu$ g GAPDH는 총 20  $\mu$ g의 단백질을 사용하였음. 오른쪽에 표시되어 있는 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인 하였으며, GAPDH를 loading control로 사용하였음.

## 2. PKCK2 활성화에 따른 EMT 표지자 발현 확인

암세포 전이에 중요한 EMT 라는 기전에서 PKCK2 가 작용하여 전이 성공 가능성을 높인다는 선행 연구결과를 토대로 PKCK2 활성화와 암 전이와의 상관관계를 여러 암 세포 주에서 확인하고자 하였다.

PKCK2 활성화의 연관성을 비교 분석 한 결과, N-cadherin 의 발현 수준이 PKCK2 활성화가 높은 MDAMB-43, NCI-H1299 세포에서 특이적으로 높게 발현하고 있는 것을 확인 하였으나 나머지 세포 주에서는 PKCK2 활성화와 N-cadherin 발현간의 상관관계를 확인 할 수 없었다. 그러나 PKCK2 활성화가 낮은 HT-29, SNU16, SNU719, MCF7, Calu-3 에서 E-cadherin 의 발현이 높았고, 반면 PKCK2 활성화가 높은 HCT116, AGS, MDAMB-231, MDAMB-435, NCI-H1299 에서는 E-cadherin 의 발현이 낮게 나타남을 확인 함으로써 PKCK2 활성화와 E-cadherin 의 발현 감소가 높은 수준으로 연관성을 가짐을 확인하였다 (그림 2-가).

이러한 결과들을 토대로 PKCK2 활성화와 높은 연관성을 나타내는 E-cadherin 발현 감소가 PKCK2 활성을 대변해 줄 수 있는 biomarker 로써 적합함을 확인 할 수 있었다.

(가)

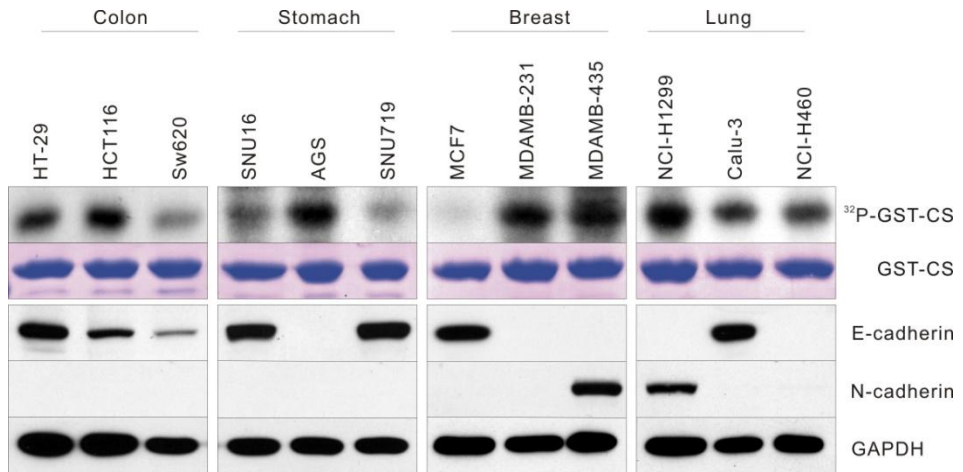
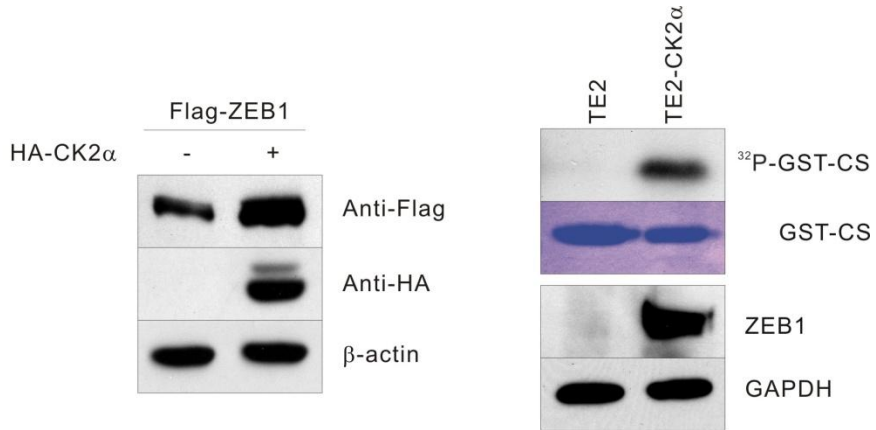


그림2. PKCK2활성에 따른 EMT표지자 스크리닝. (가) 대장암, 위암, 유방암, 폐암 세포 주들을 이용하여 western blot analysis을 수행하였음. 세포 추출액은 RIPA buffer를 이용하여 제작하였고 20  $\mu$ g의 단백질을 사용하였음. 오른쪽에 표시되어 있는 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인 하였으며 GAPDH 를 loading control로 사용하였음.

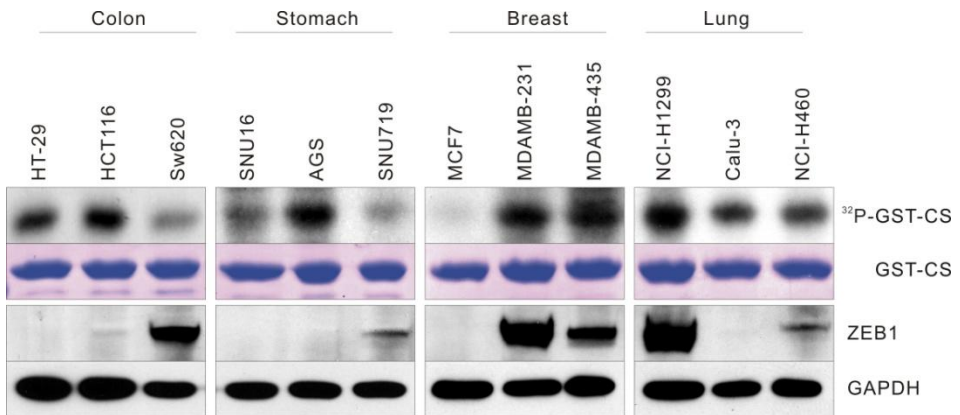
### 3. PKCK2 특이 기질 단백질로써의 ZEB1

또 다른 PKCK2의 기질 단백질인 ZEB1은 EMT과정에서 E-cadherin 억제자로 작용하며 PKCK2에 의해 인산화되어 그 안정성이 증가된다. 이러한 사실과 상응하게 HEK293T 세포에 인위적으로 CK2 $\alpha$ 를 증가 시켰을 때 ZEB1의 안정성이 증가하였으며, PKCK2활성이 증가된 TE2-CK2 $\alpha$  세포에서 대조군인 TE2 세포에 비해 ZEB1의 발현 수준이 현저하게 증가되어 있었다 (그림 3-가). 그렇다면 ZEB1이 여러 세포 주에서 PKCK2 활성을 대변해 줄 수 있는 marker로 사용될 수 있는지 확인해 보고자 western blot analysis를 수행하였다. 그 결과 *in vitro* kinase assay상의 PKCK2 활성과 ZEB1의 발현 수준이 유방암과 폐암 세포 주에서 상대적으로 높은 발현을 가지나, 위암, 대장암 세포 주에서는 대체로 발현이 되지 않는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-나). 이러한 ZEB1은 여러 장기에서 다양한 발현 차이를 가진다고 알려져 있으므로, 이러한 발현의 차이는 다양한 조직 유래 세포마다 기본적인 발현 정도가 다르기 때문일 것으로 생각된다. 그러므로 각각의 세포 내 기본적인 발현 수준이 다른 ZEB1을 PKCK2 활성을 대변해주는 marker로써 사용이 가능한지에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(가)



(나)



**그림3.** PKCK2 특이 기질 단백질로써의 ZEB1. (가) PSG5-flag ZEB1, 그리고 PCMV-HA CK2 $\alpha$ 를 HEK293T 세포에 각각 transfection한 후 western blot analysis을 수행하였음. 세포 추출액은 RIPA buffer를 이용하여 제작하였고 총 20  $\mu$ g의 단백질을 사용하였음. 오른쪽에 표시되어 있는 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였으며  $\beta$ -actin을 loading control로 사용하였음. Lenti 바이러스를 이용하여 TE2세포가 CK2 $\alpha$ 를 과 발현 할 수 있는 안정세포주인 TE2-CK2 $\alpha$ 를 제작한 후 western blot analysis 과  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP를 이용하여 *in vitro* kinase assay를 수행하였음. 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였으며 GAPDH을 loading control로 사용하였음. (나) 대장암, 위암, 유방암, 폐암 세포주들을 이용하여 western blot analysis을 수행하였음. 세포 추출액은 RIPA buffer를 이용하여 제작하였고 총 20  $\mu$ g의 단백질을 사용하였음. 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였으며 GAPDH을 loading control로 사용하였음.

#### 4. PKCK2 인산화 기질 단백질 CDC37 의 진단 marker 로써의 가능성 확인

PKCK2 기질 단백질인 CDC37 은 PKCK2 에 의해 인산화된다고 알려져 있다. 이러한 CDC37 의 인산화 정도가 PKCK2 활성을 대변할 수 있는지 확인해 보고자 하였다. PKCK2 활성이 낮게 존재 하는 TE2 세포에 Lenti 바이러스를 이용하여 PKCK2 $\alpha$ 를 과발현하는 안정 세포 주를 제작 하였다. 그 결과 PKCK2 활성이 증가한 TE2-CK2 $\alpha$  세포에서 TE2 세포에 비해 CDC37 및 phospho-37 의 발현 수준이 증가 하였음을 확인하였다 (그림 4-가). 또한 PKCK2 활성이 낮은 MCF7 세포를 사용하여 PKCK2 $\alpha$ 의 양을 인위적으로 증가시켰을 때 PKCK2 활성이 점차 증가함에 따라 CDC37 의 안정성이 증가하며 phospho-CDC37 의 발현 수준 또한 증가되어 짐을 확인하였다 (그림 4-나).

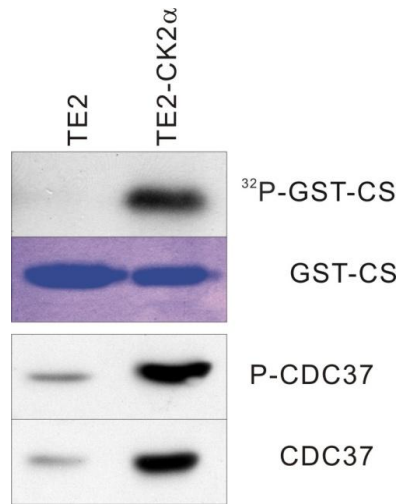
이러한 결과를 토대로 CDC37 과 phospho-CDC37 이 다른 여러 암 조직의 세포 주에서도 PKCK2 의 활성을 특이적으로 대변해 줄 수 있는 단백질로써 적합한지 검증해 보고자 하였다. 여러 암 조직 세포 추출물을 이용하여 western blot analysis 를 진행하였다. 그 결과 PKCK2 활성이 낮은 HT-29, SW620, SNU-16, SNU-719, Calu-3, NCI-H460 에서는 CDC37, phospho-CDC37 의 발현 수준도 낮게 나타났으며, 반면 PKCK2 활성이 높은 HCT116, MDAMB-231, MDAMB-435,

NCI-H1299 에서는 CDC37, phospho-CDC37 의 발현 수준도 상대적으로 높게 나타남을 확인 할 수 있었다 (그림 4-다).

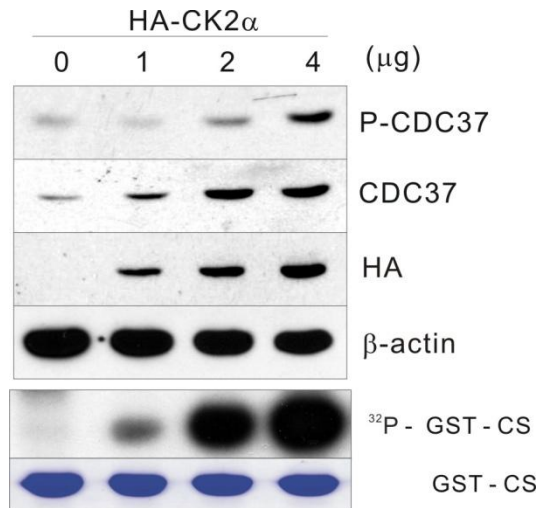
이러한 결과들을 토대로 PKCK2 는 CDC37 의 안정화를 유도하고 이에 따라 phospho-CDC37 의 발현 수준 또한 증가되어 짐을 확인할 수 있었다. 따라서 CDC37 및 phospho-CDC37 은 PKCK2 활성을 대변해 줄 수 있는 biomarker 로 적합할 것으로 사료된다.



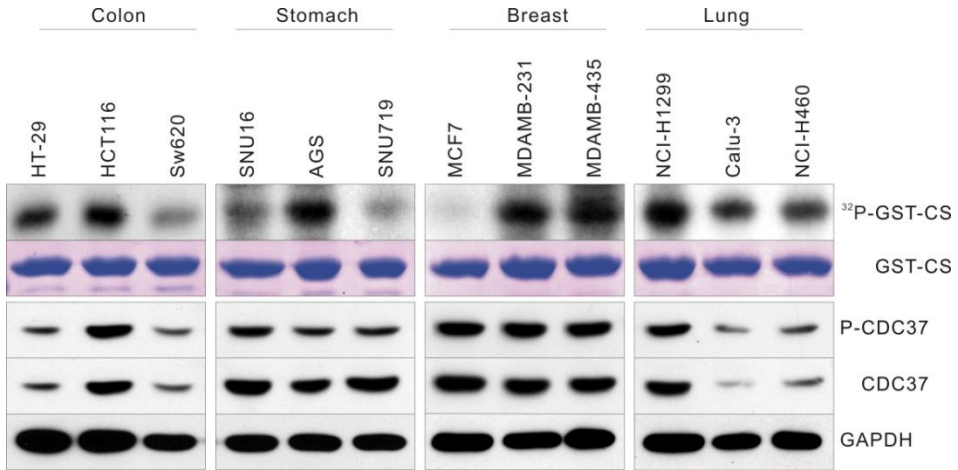
(가)



(나)



(다)



**그림4.** PKCK2 활성화에 따른 CDC37 및 Phospho-CDC37 발현 양 확인.

(가) Lenti 바이러스를 이용하여 TE2세포가 PKCK2 $\alpha$ 를 과 발현 할 수 있는 안정세포주를 제작 한 후 western blot analysis와  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP를 이용하여 *in vitro* kinase assay를 수행하였음. 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였으며 GAPDH를 loading control로 사용하였음. (나) MCF7 cell에 pCMV-HA-CK2 $\alpha$ 를 0, 1, 2, 4  $\mu\text{g}$ 을 각각 transfection 한 후 western blot analysis 진행함. 세포 추출액은 RIPA buffer 를 이용하여 제작하였고 총 20  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 western blot analysis에 사용하였음. 오른쪽에 표시되어 있는 각각의 항체를 이용하여 목적 단백질의 발현량을 확인하였으며  $\beta$ -actin을 loading control로 사용하였음 (다) 대장암,

위암, 유방암, 폐암 세포 주들을 이용하여 western blot analysis  
을 수행하였음. 세포 추출액은 RIPA buffer를 이용하여 제작하였  
고 총 30  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 사용하였음. 각각의 항체를 이용하여 목적  
단백질의 발현량을 확인하였으며 GAPDH을 loading control로 사  
용하였음.

#### IV. 고찰

암세포 전이 과정 동안 발생하는 E to N-cadherin switching 은 암세포의 이동과 침윤을 유도함으로써 암 전이에 중요한 역할을 한다. 현재 암 전이로 인한 사망률은 크지만,<sup>1</sup> 기존의 항암 약물은 암세포의 성장을 억제하는 목적으로 개발되었으므로, 암 사망의 주요한 원인이 되는 암 전이를 효과적으로 차단하여 사망률을 감소시키는 작용에는 한계점을 가지고 있다.

PKCK2 는 진화적으로 잘 보존되어 있으며 세포 내 다양한 생리기전에 관여한다고 알려져 있으며 인간 암세포에서 활성이 빈번하게 증가 되어져 있다. 이러한 PKCK2 는 암세포 전이에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 본 연구팀의 누드마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서 PKCK2 활성이 증가된 세포주인 TE2 세포를 주입하였을 경우 대조 군에 비해 간으로의 전이가 현저하게 증가 됨을 확인한바 있다. 이러한 논문과 연구 결과들을 토대로 본 연구 팀은 PKCK2 가 EMT 를 조절하는 중요한 단백질이며, 이러한 PKCK2 를 표적으로 하는 항 전이제 개발을 위한 전 단계 연구로 PKCK2 활성을 대변해 줄 수 있는 marker 를 선별하여 항 전이제 표적 치료 환자군 선별에 도움을 주고자 하였다. 우선 암 전이가 빈발하는 조직인 대장암, 위암, 유방암, 폐암의 여러 세포주 내의 직접적인 PKCK2 활성을 *in vitro* kinase assay 를 통해

확인 하였다. 우선, 이러한 세포 내 직접적인 PKCK2 활성화와 PKCK2 의 catalytic subunit 인 CK2 $\alpha$ 를 비교 분석 하였으나 CK2 $\alpha$ 의 단백질 발현 수준과 PKCK2 활성화와의 연관성을 확인 할 수 없었다 (그림 1-가, 나). 다음으로 여러 암 조직 세포 추출물을 이용한 EMT 표지자 스크리닝 실험에서 PKCK2 활성화에 비례하여 E-cadherin 발현량 감소가 높은 수준의 연관성을 가짐을 확인 할 수 있었다 (그림 2-가, 나). 이를 통해 EMT 과정에서 동반되는 E-cadherin 발현의 감소가 PKCK2 활성을 특이적으로 대변해 줄 수 있음을 확인하였다.

마지막으로 CDC37 은 PKCK2 에 의해 인산화되어 안정화가 되고 이렇게 안정화가 된 CDC37 은 PKCK2 활성을 유지시켜주는데 중요한 역할을 한다고 보고되었다.<sup>26,27</sup> 이러한 보고와 상응하게 본 연구에서 CDC37 은 PKCK2 의 활성화에 비례하여 안정화되고 인산화됨을 확인 하였다 (그림 4-가, 나). 또한 여러 암세포 주에서 CDC37 과 phospho-CDC37 의 발현 수준을 확인 해본 결과 PKCK2 의 활성화와 CDC37 과 인산화된 양이 높은 수준으로 연관성을 가짐을 확인 하였다 (그림 4-다). 따라서 CDC37 과 phospho-CDC37 의 발현 수준은 PKCK2 활성이 증가된 암 환자의 전이 가능성을 예측할 수 있게 해주는 진단 marker 로써 적합할 것으로 판단하였다.

PKCK2 의 기질로는 300 개 이상의 단백질들이 보고 되어 있지만, PKCK2 활성화와 EMT와의 관계 규명에 대한 연구는 많이 이루어지고

있지 않다. 하지만, 여러 문헌들과 본 팀의 선행 연구를 통해 PKCK2 는 EMT 와 관계된 Snail 이나, ZEB1 등의 단백질을 조절함으로써 EMT 를 유도할 수 있는 마스터 물질로 생각된다. 본 연구에서는 이러한 PKCK2 의 활성을 간접적으로 예측할 수 있는 marker 를 제시함으로써 임상에서 PKCK2 활성이 높은 전이 고위험군 환자를 선별할 수 있는 진단의 기반이 될 것이라고 사료된다.

## V. 결론

여러 암 세포 내 PKCK2 활성을 직접적으로 측정 할 수 있는 *in vitro* kinase assay 는 세포추출물과 동위원소를 이용하는 실험이므로 임상에서 진단도구로 사용되기에는 적합하지 않을 것으로 판단하였다. 따라서 PKCK2 활성이 높은 환자군 선별을 위한 진단 marker 로써의 여러 후보 단백질들에 대한 검증을 진행 하였다. 우선, EMT 표지자 와 PKCK2 활성을 비교 분석하였을 때, E-cadherin 발현 감소와 CDC37, phospho-CDC37 과 PKCK2 활성간의 높은 연관성 확인 하였다. 반면 PKCK2 의 catalytic subunit 인 CK2 $\alpha$ 는 PKCK2 활성과 연관성을 나타내지 않았다. 따라서 CK2 $\alpha$ 는 PKCK2 활성을 대변 해 줄 수 있는 후보 군으로써 적합하지 않을 것이라고 판단하였다.

이를 통해 본 연구에서는 임상에서 E-cadherin, CDC37, phospho-CDC37 의 발현 수준을 immunohistochemistry 와 같은 방법을 통해 확인 한다면 PKCK2 활성을 예측하여 보다 신속하고 정확하게 전이 고위험 환자 군을 진단할 수 있는 biomarker 로써 가능성이 있을 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

1. Christofori G. Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *EMBO J* 2003;22:2318-23.
2. Vleminckx K, Kemler R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays* 1999;21:211-20.
3. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776-84.
4. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005;307:1603-9.
5. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci* 2003;116:1959-67.
6. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-8.
7. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett* 2002;176:123-8.
8. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996;1:188-94.
9. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 1999;147:631-44.
10. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular



- phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003;19:207-35.
11. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131-42.
  12. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000;2:84-9.
  13. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000;2:76-83.
  14. Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci* 2003;116:499-511.
  15. Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62:1613-8.
  16. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, et al. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001;7:1267-78.
  17. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, et al. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24:2375-85.
  18. Perez-Moreno MA, Locascio A, Rodrigo I, Dhondt G, Portillo F, Nieto MA, et al. A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J*

- Biol Chem 2001;276:27424-31.
19. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
  20. Litchfield DW. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* 2003;369:1-15.
  21. Landesman-Bollag E, Romieu-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, Seldin DC. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* 2001;20:3247-57.
  22. Kim JS, Eom JI, Cheong JW, Choi AJ, Lee JK, Yang WI, et al. Protein kinase CK2alpha as an unfavorable prognostic marker and novel therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2007;13:1019-28.
  23. Scaglioni PP, Yung TM, Cai LF, Erdjument-Bromage H, Kaufman AJ, Singh B, et al. A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* 2006;126:269-83.
  24. Seldin DC, Landesman-Bollag E, Farago M, Currier N, Lou D, Dominguez I. CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis. *Mol Cell Biochem* 2005;274:63-7.
  25. Ko H, Kim S, Jin CH, Lee E, Ham S, Yook JI, et al. Protein kinase casein kinase 2-mediated upregulation of N-cadherin confers anoikis resistance on esophageal carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2012;10:1032-8.
  26. Miyata Y, Nishida E. CK2 controls multiple protein kinases by phosphorylating a kinase-targeting molecular chaperone, Cdc37. *Mol Cell Biol* 2004;24:4065-74.
  27. Bandhakavi S, McCann RO, Hanna DE, Glover CV. A positive feedback loop between protein kinase CKII and Cdc37 promotes

the activity of multiple protein kinases. J Biol Chem  
2003;278:2829-36.

## ABSTRACT

Identifying PKCK2-specific substrate regulated by PKCK2.

Hanseul Kim

*Department of Medical science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by professor Kunhong Kim)

Cancer metastasis is a phenomenon that a cancer cell immigrates from its organ of origin to another organ, and through this process a cancer cell acquires invasiveness and mobility. A phenomenon called epithelial - mesenchymal transition (EMT) occurs in cancer metastasis, and E-to-N switching is an important precondition in the occurrence of EMT.

Protein kinase casein kinase 2 (PKCK2) is known to be involved in many physiologic mechanisms, e.g. cell growth, proliferation, apoptosis, aging, by phosphorylating many other substrate proteins. Furthermore, recent reports indicate PKCK2 is also involved in EMT, regulating cancer metastasis and invasion. The activity of PKCK2 is increased especially in human cancer tissue or cancer cell line. Therefore we are under development of an anti-metastasis molecular target drug which targets PKCK2. Development of molecular target drug should be undergone simultaneously with excavation of predictive biomarkers (developing companion diagnostics) that enables screening of target patient population. Thus, to apply molecular target therapy that targets PKCK2, we should excavate PKCK2-specific substrates and develop those as diagnostic markers. However, we acknowledged that the basal PKCK2 activity and the expression level of CK2 $\alpha$  protein, a catalytic subunit, are not correlated in many cancer cell lines. So, we have to develop a

indirect clinical marker to represent and be correlated with PKCK2 activity in primary cancer tissue by finding representative substrate of PKCK2 in clinical field. Therefore in this research, we present substrate proteins that can represent PKCK2 activity by screening many PKCK2 substrate proteins, showing possibility of using those proteins as biomarkers for screening high-risk population for metastasis in clinical field.

First, we measured PKCK2 $\alpha$  activity by *in vitro* kinase assay that is method to directly measure PKCK2 activity in cell. However, *in vitro* kinase assay is a procedure using  $\gamma$ -<sup>32</sup>P with cell extract, limiting its use in clinical diagnostic tool, so we tried to figure out another method measuring PKCK2 activity. And there are any correlation between CK2 $\alpha$ , PKCK2 catalytic subunit, and PKCK2 activity.

Second, we confirm the expression level of E-cadherin, an intracellular epithelial marker, and N-cadherin, a mesenchymal marker, in the cell lines of colon, stomach, lung and breast cancer, which frequently metastasizes. N-cadherin does not have a correlation with PKCK2 activity, but the down-regulation of E-cadherin has a strong interconnection with PKCK2 activity.

Third, we measured the expression levels of ZEB1, confirmed as a substrate of PKCK2 by our previous research. As a result, we found there are high expression level of ZEB1 in breast and lung cancer cell lines, but not in colon and stomach cancer cell lines. ZEB1 has a diverse expression level in many tissues. Thus, the different ZEB1 level in this research is due to different basal level of each cell lines originated different organ. Therefore, It is necessary to research the possibility to using ZEB1 for biomarker to represent PKCK2 activity.

Finally, we measured the expression level of CDC37, a substrate for phosphorylation by PKCK2. As a result, we find that PKCK2 up-regulates the stabilization of CDC37 by phosphorylation. Corresponding this, CDC37 and phospho-CDC37 level has a correlation with PKCK2 activity in 10 cell lines of 12 cell lines.

In summary, E-cadherin and CDC37, phospho-CDC37 have a strong

correlation with PKCK2 activity in many cancer cell lines, so they can directly represent the PKCK2 activity. As a result, in this research, we can present the possibility that E-cadherin, CDC37 and phospho-CDC37 can be used for a biomarker to accurately diagnose high-risk population for metastasis as a clinical diagnostic tool, like immuno-histochemistry.

---

Key Words: PKCK2, EMT, companion diagnostics, predictive marker