

이학 석사학위 논문

RSK2 의 지속적 활성화에 따른  
유전체 불안정성 유도

아주대학교 대학원

의생명과학과/종양생물학전공

박채린

RSK2 의 지속적 활성화에 따른  
유전체 불안정성 유도

지도교수 이 재 호

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2013년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원

의생명과학과/종양생물학전공

박 채 린

박채린의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 재 호 인

심 사 위 원 조 혜 성 인

심 사 위 원 이 종 수 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2013년 6월 21일

## RSK2의 지속적인 활성화에 따른 유전체 불안정성 유도

Ras/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 체계는 세포 생존, 세포 증식, 세포 성장, 세포 이동 등의 세포 활동에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 신호전달체계의 활성화나 돌연변이는 암의 발생에 있어서 중요하게 연관이 되어 있다고 알려져 있다. 암세포는 염색체의 수를 비정상적으로 가지고 있으며 (aneuploidy), 염색체의 비정상적인 구조를 가지고 있는데, 이러한 비정상적인 염색체의 형태는 대부분의 암에서 나타나며, aneuploidy가 지속적으로 나타나는 현상을 유전체 불안정성 (chromosome instability, CIN) 이라고 한다.

본 연구에서는 Ras/MAP Kinase 신호전달체계 중 하류에 위치한 RSK2가 지속적인 활성화를 가지면 유전체 불안정성이 유도되는지, 그 기전은 무엇인지 확인하였다. 지속적인 활성화를 보이는 RSK2변이체 (RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 를 발현시킨 HeLa 세포에서는 anaphase동안 lagging chromosome, chromosome bridge 그리고 micro-nucleus가 증가되고, 유전체 불안정성 실험결과 유전체 불안정성 표현형을 갖게 됨을 관찰하였다. 유전체 불안정성을 유도하는 기전 중 RSK2가 지속적인 활성을 가지게 되면 spindle assembly checkpoint defects와 kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defect를 통하여 유전체 불안정성을 유도한다는 것을 관찰 할 수 있었다. Kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment의 변화 양상을 확인한 결과, RSK2의 지속적인 활성이 microtubule을 더 안정하게 만든다는 것을 cold stable assay와 nocodazole sensitivity assay를 통해 확인 할 수 있었다. 더불어 microtubule을 depolymerization시키는 MCAK을 함께 넣어주면 RSK2활성에 의한 유전체 불안정성 현상이 억제됨을 확인함으로써 RSK2가 kinetochore-microtubule을 안정화함으로써 유전체 불안정성을 유

발함을 확인 할 수 있었다.

이러한 결과들은 RSK2의 지속적인 활성이 암화의 특징인 유전체 불안정성을 유도한다는 것과 그 기전을 보여 줌으로써 RSK2의 활성의 조절이 암의 형성에 있어서 중요하다는 것을 보여 준다.

---

핵심어: RSK2, chromosomal instability (CIN), microtubule

# 차 례

|   |     |
|---|-----|
| 국문요약 .....  | i   |
| 차례 .....  | iii |
| 그림 차례 .....   | V   |
| I. 서론 .....   | 1   |
| II. 재료 및 방법(혹은 연구대상 및 방법) .....   | 5   |
| A. 세포주 배양 .....   | 5   |
| B. 항체 및 시약 .....  | 5   |
| C. Constitutively active-RSK2 (CA-RSK2 : RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) .....       | 5   |
| D. Chromosomal instability assay .....  | 6   |
| 가. Lagging chromosome 및 chromosome bridge 측정 .....                                      | 6   |
| 나. Micronuclei 측정 .....   | 6   |
| 다. Fluorescence in situ hybridization (FISH) .....                                      | 6   |
| E. Cold stable assay .....  | 7   |
| F. Giemsa staining .....  | 7   |
| G. Western blotting .....   | 8   |
| H. Immunocytochemistry .....  | 9   |
| I. Nocodazole sensitivity assay .....   | 9   |
| III. 결과 .....   | 10  |
| A. Constitutively-active RSK2 (RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 의 지속적인<br>활성 확인 ..... | 10  |
| B. RSK2의 지속적인 활성화에 의한 유전체 불안정성의 유도 .....  | 11  |
| C. 유전체 불안정성을 일으키는 원인별 확인 .....  | 12  |
| D. RSK2의 지속적 활성화에 의한 KT-MT attachment 안정성 강화와<br>유전체 불안정성 .....                         | 15  |
| IV. 고찰 .....  | 28  |

|                |    |
|----------------|----|
| V. 결론 .....    | 31 |
| 참고문헌 .....     | 32 |
| ABSTRACT ..... | 37 |

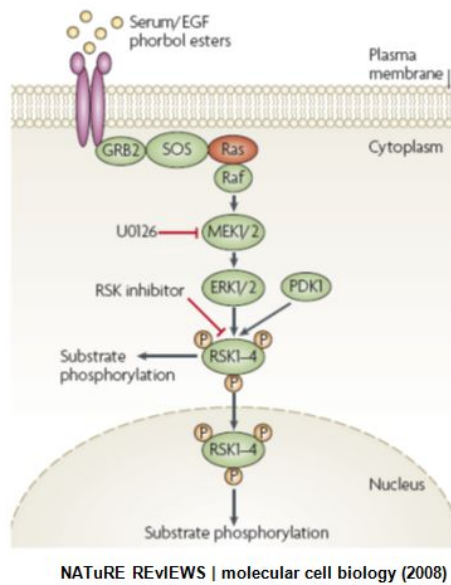
## 그림 차례

|   |    |
|---|----|
| Fig. 1. Checking the activity of constitutively active RSK2 .....   | 17 |
| Fig. 2. Constitutively active RSK2 induced chromosomal instability .....  | 18 |
| Fig. 3. Spindle assembly checkpoint activity is lowered in constitutively active RSK2-expressed cells .....       | 20 |
| Fig. 4. Constitutively active RSK2 induced kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects .....               | 22 |
| Fig. 5. Constitutively active RSK2 induced more stable microtubule .....  | 24 |
| Fig. 6. Hyperstabilization of kinetochore microtubule played a causal role in CA-RSK2 induced CIN phenotype ..... | 26 |



# I. 서 론

Ras/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달 체계는 성장인자, 호르몬, 신경전달 물질등 다양한 외부인자들에 의해 Ras/Raf/MEK/ERK 로 신호가 전달되며 (Pages G *et al.*, 1993), 세포 생존, 세포 증식, 세포 성장, 세포 이동 등의 세포 활동에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Lewis *et al.*, 1998).



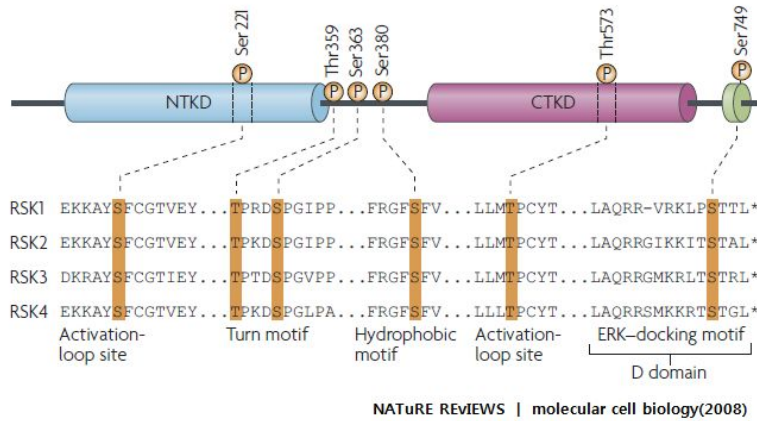
MAP Kinase 신호전달체계의 활성화나 돌연변이는 암의 발생에 있어서 중요하게 연관이 되어 있다고 알려져 있다 (AS Dillon *et al.*, 2007). 예를 들면, Raf와 MEK가 암의 진행과 성장에 있어서 중요하게 작용한다는 것이 알려져 있고 (Shields *et al.*, 2000), Raf와 MEK가 지속적으로 활성화 된 돌연변이가 여러 세포에서 형질변환 활성을 갖는다고 알려져 있다 (Davies *et al.*, 2002). 또 최근에는 생식 세포에서 H-Ras, K-Ras, B-Raf, MEK1, 그리고 MEK2의 돌연변이 활성이 환자에게서 발견이 되었고 이것이 ERK의 비정상적인 활성화를 초래해 암 발생에 기여한다고 보고된바 있다 (Aoki *et al.*, 2005; Niihori *et al.*, 2006;

Rodriguez-Viciano *et al.*, 2006; Schubbert *et al.*, 2006).

암세포는 염색체와 관련하여 두 가지 특징을 갖고 있는데 염색체의 수를 비정상적으로 가지고 있거나, 염색체의 비정상적인 구조를 가지고 있다 (Lengauer *et al.*, 1997). 이러한 비정상적인 염색체의 형태는 대부분의 암에서 나타나며, 염색체의 수가 지속적으로 증가하거나 감소하는 현상을 유전체 불안정성 (chromosome instability, CIN) 이라고 한다 (KuuKasjarvi *et al.*, 1997). 이전 보고에서 MAP Kinase 상위 체계인 Ras의 활성화에 의해서 고형종양의 특징으로 잘 알려져 있는 유전체 불안정성을 나타낸다는 보고가 있으며 (Harold I *et al.*, 1999) 최근에는 MAP Kinase가 유사분열기에 spindle assembly checkpoint (SAC) 조절을 방해하여 유전체 불안정성을 일으킨다고 보고되었다 (Rosner *et al.*, 2007).

MAP Kinase signaling pathway 중 ERK의 하위 신호전달자로서 p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) 가 있다. RSK는 1985년 *Xenopus* 난자에서 ribosomal S6 protein을 인산화 시키는 효소로 발견되었으며 이후 MAP Kinase에 의해 활성화 되는 것이 알려졌다 (Erickson *et al.*, 1985; Sturgill *et al.*, 1988). 현재까지 밝혀진 바에 따르면 RSK는 serine/threonine kinase로 구조적으로 유사한 4가지 isoform (RSK1-4) 이 있으며 (Rana Anjum and John Blenis *et al.*, 2008), 성장인자, 호르몬, 신경전달 물질등 다양한 외부인자들에 의해서 반응하여 세포질에 있던 p90 RSK가 핵으로 이동한다고 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2001). 좀 더 자세히 살펴보면 RSK1, RSK2, RSK3가 RSK4보다 전반적으로 조직에서 발현정도가 높게 나타났으며 RSK1은 콩팥, 췌장, 폐에서 RSK2와 RSK3는 골격근, 췌장, 심장에서 높게 발현되는 것으로 나타났다. 이에 반하여 다른 isoform에 비해 상대적으로 발현이 적은 RSK4는 콩팥과 심장에서 상대적으로 발현이 높게 되는 것으로 나타났다. 그리고 세포내에서 RSK1, RSK2, RSK3는 핵을 포함한 세포막과 세포질 등 세포에 전반적으로 위치하는 반면 RSK4는 주로 세포질에 위치한다고 알려져 있다 (Zeniou *et al.*, 2002). 암과 RSK의 관계를 살펴보면 RSK1과 RSK2는 유방암과 전립선암에서 발현이 증가되어 있고 RSK3

는 난소암에서 종양억제유전자로서 역할한다고 보고되어 있으며, RSK4는 p53에 의존적인 성장 억제에 관여하는 것으로 암의 증식에 부정적인 역할을 한다고 보고되어 있다 (Rana Anjum and John Blenis *et al.*, 2008).



RSK의 구조를 살펴보면 carboxyl-terminal kinase domain (CTKD) 과 amino-terminal kinase domain (NTKD) 이 linker에 의해 연결 되어 있으며 (Jones *et al.*, 1988), Erk에 의해 인산화 되는 Erk docking site와 CTKD와 Erk docking site사이에 autoinhibitory alpha-helix site가 존재하고 있다 (Frodin *et al.*, 2000). 지금까지 전사인자인 NFATc4, NFAT3, SRF, CREB, ER81등이 RSK의 기질로 알려져 있고 세포 증식과 관련해서는 GSK3 $\beta$ , NHE-1, LKB1, SOS, c-Fos, Mad1이, 세포 생존과 관련해서 Bad, C/EBP $\beta$ , DAPK가 그리고 세포 주기에 관련해서는 Emi2/Erp1, Myt1, Bub1등 이 알려져 있다 (Aujum R & Blenis J *et al.*, 2008). 이 외에도 많은 기질들이 알려져 있으나 각 isoform에 해당하는 기질로 어떠한 것들이 있는지는 아직 잘 알려지지 않았다. 하지만 최근 들어 RNA interference (RNAi) 를 이용하여 각 isoform에 해당하는 기질을 찾고자 활발한 연구가 진행되고 있다.

최근 RSK2가 mouse embryonic fibroblasts (MEFs) 에서 세포 형질전환에 관여한다고 알려졌다 (Cho *et al.*, 2007). 암세포에서는 RSK2가 전이와 침습에 관여한다고 보고되어 있으며 (Sumin Kang *et al.*, 2010), 특히 RSK2가 유방암과 전립선암에서 과발현 되어 있다고 알려져 있다 (Lobenhofer *et al.*, 2000 and

Clark *et al.*, 2005). 또한 최근 constitutively activation된 RSK2의 mutant인 RSK2-Y707A가 wild type RSK2보다 형질전환을 더 잘 유도한다고 보고된바 있다 (Sumin *et al.*, 2009). 그러나 RSK2가 과발현되어 있거나 지속적으로 활성을 나타낼 때 어떠한 기전으로 인하여 암화의 특징을 나타내는지 잘 알려져 있지 않다. 가능한 기전중 하나로 상기한 MAPK pathway의 상위 신호전달자들의 과발현, 돌연변이 등에 의한 유전체 불안정성 유도를 생각해 볼 수 있다. 그래서 본 연구실에서는 RSK2가 과발현되어 있거나 지속적인 활성을 나타내는 상태에 의해서 유전체 불안정성이 유도 될 수 있는지를 RSK2의 지속적으로 활성을 나타내는 돌연변이인 (RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 을 제작하여 (Celeste *et al.*, 1999) 확인하고자 하였으며 예측대로 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2에 의해 유전체 불안정성이 유도된다면 어떠한 기전에 의해서 유전체 불안정성이 유도되는지 알아보하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### A. 세포주 배양

사람의 자궁경부암 세포인 HeLa 세포주를, 55 °C 열처리를 하여 보체를 불활성화 시킨 10 % 우태아 혈청 (FBS) 과 1 % Antibiotic-Antimycotic (Gibco BRL) 을 첨가한 F12-Dulbecco's Modified Eagle Medium (F-12 DMEM, sigma, St. Louis, MO) 배양액에서 배양하였으며, 배양기의 상태는 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 으로 배양 하였다.

### B. 항체 및 시약

RSK2, HA-probe에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santacruz, CA) 에서 구입하였고, actin에 대한 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 에서 구입하였으며, ERK, p-ERK, p-S386은 Cell Signaling Technology (Berberly, MA) 에서 구입하였다. Horseradish peroxidase (HRP) 가 결합된 anti-mouse 항체는 Zymed Corporaion (Carlsbad, CA) 에서 구입하였고, horseradish peroxidase (HRP) 가 결합된 anti-rabbit 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다. Thymidine과 U0126은 Sigma-Aldrich에서, nocodazole은 Cell signaling Technology에서 monastrol은 Tocris Bioscience에서 구입하였다. Phosphatase inhibitor는 Cell Signaling Technology에서, protease inhibitor cocktail은 Roche Applied Science (Mannheim, Germany) 에서, FBS, Trypsin-EDTA는 Gibco BRL에서 구입하였다.

### C. Constitutively active-RSK2 (CA-RSK2 : RSK2-Δα, RSK2-Y707A)

Wild Type-RSK2는 John Blenis (Harvard University) 로부터 얻었다. WT-RSK2내에 존재 하고 있는 autoinhibitory α-helix부분 중 아미노산 697번부터 끝까지 제거하여 지속적으로 활성을 가지게 하는 RSK2-Δα와 autoinhibitory α-helix에서 아미노산 707번의 tyrosine(Y)을 alanine(A)으로 점 돌연변이 시켜

지속적인 활성을 갖도록 하는 두 가지 돌연변이를 제작하였다.

#### **D. Chromosomal instability assay**

##### **가. Lagging chromosome과 chromosome bridge 측정**

HeLa 세포주를 seeding하고 나서 14시간 후에 원하는 유전자를 주입하고, 이후 24시간에 1mM thymidine을 20시간 처리 후, PBS로 3번 세척해 주어 thymidine을 제거하였다. Thymidine제거 후 8시간 째에 유전체 불안정성의 확률을 높여주기 위하여 Eg5 inhibitor인 monastrol 100uM을 2시간 처리하고 이후 1시간 30분간 release하여 anaphase에 있는 세포를 얻었다. Aceto-orcein으로 염색하여 anaphase에 있는 세포들 중 lagging chromosome과 chromosome bridge를 가진 세포들을 세었다.

##### **나. Micronuclei 측정**

HeLa 세포주 seeding하고 나서 14시간 후에 원하는 유전자를 주입하고, 이후 24시간에 1mM thymidine을 20시간 처리 후, PBS로 3번 세척해 주어 thymidine을 제거하였다. Thymidine제거 후 8시간 째에 유전체 불안정성의 확률을 높여주기 위하여 Eg5 inhibitor인 monastrol 100uM을 2시간 처리하고 release하여 24시간이 흐른 후 interphase세포들을 얻어 현광 면역 염색법을 이용하여 세포 안에 micronuclei를 가지고 있는 세포들을 세었다.

##### **다. Fluorescence in situ hybridization (FISH)**

HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 주입하고 24시간 후 G1/S phase arrest시키는 thymidine처리하고 20시간 이후 8시간 release해준다. 그 후 Eg5 inhibitor인 monastrol 100uM을 2시간 처리하여 merotelic attachment의 기회를 높여 준 다음 다시 release하여 7일간 colony를 이루게 하였다. 특정 염색체를 확인 할 수 있는 형광 탐침를 이용하여 표본과 교잡하여 각 세포안의 특정 염색체의 수를 세어보았다. HeLa 세포의 특징은 염색

체 8번을 3개, 염색체 18번은 2개씩 가지고 있는 것이 특징이다. FISH assay는 slide glass에 키운 세포에 methanol과 acetic acid를 3:1 비율로 섞어 -20 °C에 미리 넣어둔 고정액 (methanol : acetic acid = 3 : 1) 을 처리하여 10분간 고정시킨 다음 PBS로 한번 세척 후 상온에서 말렸다. 다음날 chamber에 표본과 변성용액에 담아 73 °C water bath에서 5분간 변성시켜 주었다. 그리고 상온에서 5분간 말리고 70 % ethanol, 85 % ethanol, 100 % ethanol의 순서대로 1분씩 세척해 주었다. 5분간 상온에서 말린 후 표본에 CEP 8과 CEP 18을 각각 붙여주었다. 그리고 그 위에 cover glass로 덮어 주고 42 °C에서 24시간 반응 시켰다. 그 후 73 °C에서 2 X SSC 용액에 1분간 담궈 붙어있는 cover glass를 제거하고, 73 °C, 0.4 X SSC / 0.3 % NP - 40 용액에 2분간 처리하고 37 °C, 2 X SSC / 0.1% NP - 40 용액에 1분간 처리하고 암실에서 말렸다. 표본에 DAPI를 처리한 후 cover glass로 덮어 메니큐어를 처리하였다. (CEP8 SpectrumOrange Direct Label Fluorescent DNA Probe Kit-FDA Cleared 07J20-008, CEP18 (D18Z1) SpectrumOrange Probe 05J08-018, VYSIS FISH Abbott Molecular)

#### **E. Cold stable assay**

Cover glass에 깔린 세포를 20mM Hepes (pH7.3) 이 포함된 L-15 media가 들어 있는 상태로 얼음에서 10분간 incubation해주고, 3.7 % formaldehyde in 100mM pipes (pH6.8), 10mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 % Triton X-100로 10분간 고정시켰다. TBS with 0.1 % Triton X-100으로 세척 후 2 % BSA in TBS with 0.1 % Triton X-100으로 1시간 block해준 후 일차항체를 1:500으로 희석하여 24시간 반응시켰다. 그 다음날 PBS로 5분간 3번씩 세척하여 이차항체를 1시간 반응시키고 그 뒤 DAPI와 10분간 반응 시켜주고 레이저 공초점 현미경 (LSM710, Cal Zeiss) 을 이용하여 microtubule의 intensity를 측정했다 (Imaris analysis).

#### **F. Giemsa staining**

세포에 nocodazole (100ng/ml) 을 12시간 처리하여 prometaphase에 arrest한 세포만 shake-off하여 모았다. Micro-centrifuge를 이용하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액은 버리고 밑에 모인 세포들에 0.075 M KCl을 5ml 넣고 resuspending하여 37 °C water bath 에 15분 반응 시켰다. -20 °C에 보관되어 있는 고정액 (Methanol: Acetic acid = 3:1) 을 약하게 vortexing을 하며 하면서 1ml 떨어 뜨렸다. 다시 micro-centrifuge를 이용하여 1000 rpm, 10분간 원심분리 하였다. 상층액은 버리고 다시 고정액을 5ml 넣어 resuspending하여 원심분리 하였다. 상층액을 2ml 남기고 나머지는 버린 후 4 °C 에 미리 담가둔 slide glass를 45도 기울인 상태에서 표본을 흘뿌렸다. 50 °C에서 하루 동안 말린 후 giemsa염색용액 (Modified, 0.4 % w/v, in buffered methanol solution, pH 6.8, Sigma Aldrich) 으로 염색하고 PBS로 3분간 세척 후 상온에서 mounting용액을 처리하였다.

## G. Western blotting

세포를 얻어 PBS로 세척한 뒤 RIPA cell lysis buffer (10mM Tris-Cl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1ug/ml aprotinin, 1ug/ml leupeptin, 1mM NaF, 5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 로 10분에 한번씩 vortexing해 주면서 30분간 얼음위에서 용해 시켰다. 세포용액을 micro-centrifuge로 13,000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 얻어 단백질 정량 시약 kit (Bio-Rad, Hercules, CA) 으로 단백질의 농도를 측정하였다. 농도를 측정한 단백질과 RIPA buffer와 6 X sample buffer (2 % SDS, 10mM dithiothreitol, 60mM Tris, pH 6.8, 0.1 % bromophenol blue) 를 넣고 sample을 만들어 전기영동 (SDS-PAGE) 을 하여 단백질들을 분리하고 nitrocellulose membrane (S&S Inc., NH, Germany) 에 전기이동 (electrotransfer) 을 하였다. 5 % Non-fat milk가 들어 있는 PBST로 상온에서 1시간동안 blocking하였고 PBST로 5분간 세척 후 일차항체를 1:1000으로 blocking용액에 희석하여 4 °C에서 하루 동안 반응 시켰다. 반응 후 PBST로 10분씩 3번 세척하고 HRP가 붙어 있는 이차항체를 1:5000으로 blocking용액에 희



석하여 상온에서 2시간 반응 시켰다. PBST로 10분간 3번씩 세척해주고 Enhanced Chemiluminescence (ECL) (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 시약을 처리하여 발광시켜 X-ray film에 감광시켰다.

## H. Immunocytochemistry

Cover glass에서 키운 세포를 차가운 PBS로 한번 세척 후  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관된 acetone-methanol (1:1)로 고정 시켰다. 0.2 % Triton X-100이 들어 있는 PBS로 10분간 permeabilization시키고 난 후 3 % bovine serum albumin (BSA)이 들어 있는 PBS로 상온에서 1시간동안 blocking을 해주고 일차 항체를 항체의 종류에 따라 PBS에 1:200, 1:300 또는 1:500으로 각각 희석하여  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 반응 시켰다. 반응 후에 PBS로 5분씩 3회 세척 후 Fluorescein isothiocyanate (FITC)가 붙여진 이차항체를 1:300 또는 1:500으로 희석하여 상온에서 30분 반응 시켰다. PBS로 5분씩 4번 세척 후 DAPI로 핵 염색 후 slide glass위에 mounting 용액을 처리 후 메니큐어 처리하여 형광현미경 (Axioimager M1 Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 또는 레이저 공초점 현미경 (LSM710, Carl Zeiss)을 이용해 관찰했다.

## I. Nocodazole sensitivity assay

HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 주입하고 48시간 proteasome inhibitor MG132를 20uM/ml처리하고 3시간 후 microtubule depolymerization시키는 nocodazole을 100ng/ml처리하여 시간별로 microtubule의 intensity를 측정 하였다. Microtubule의 intensity측정은 해당 시간에 acetone-methanol (1 : 1)로 고정하고  $\alpha$ -tubulin을 이용하여 현광 면역 염색법을 이용하여 Imaris program을 통하여 microtubule의 intensity를 측정하였다.

### III. 결 과

#### A. Constitutively-active RSK2 (RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 의 지속적인 활성 확인

RSK2를 과발현 시키면 유전체 불안정성을 유발하는지 확인하기 위하여 앞서 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 wild type RSK2 (WT-RSK2) 보다 형질전환을 더 잘 발생시킨다고 보고되어 있는 지속적인 활성을 나타내는 돌연변이를 함께 관찰하기 위하여 WT-RSK2와 constitutively activation (CA) - RSK2를 사용하기로 하였다. 이를 위해 CA-RSK2 (RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 를 cloning 하였다 (Figure 1A). RSK2- $\Delta\alpha$ 는 아미노산 687번부터 deletion시켜 autoinhibitory  $\alpha$ -helix site를 없애 RSK2를 지속적인 활성을 나타내는 상태가 되도록 만든 돌연변이이며 RSK2-Y707A는 autoinhibitory  $\alpha$ -helix site에서 아미노산 707번의 tyrosine (Y) 을 alanine (A) 로 치환 시켜 지속적인 활성을 나타내는 상태가 되도록 만든 점 돌연변이다 (Celeste *et al.*, 1999). 우리가 만든 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A가 지속적으로 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 MEK inhibitor인 U0126을 사용하여 ERK의 상위에서 신호전달을 억제하였을 때 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A가 지속적인 활성을 나타내는지 확인하였다. 그 결과 U0126을 처리하여 MEK를 저해 하였을 경우 그 하위 체계인 ERK의 인산화가 감소하였음에도 불구하고 RSK2의 S386이 인산화 되어 있는 것을 확인 할 수 있었다 (left). 그리고 MAP Kinase를 활성화 시킬 수 있는 EGF를 처리하였을 때와 비교해 보면 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 넣어 주었을 때 P-S386이 더 많이 활성화가 되어 있는 것을 확인 할 수 있었다 (right). 오른쪽 데이터에서 RSK2- $\Delta\alpha$ 에서 RSK2의 양이 적게 나타나는 것은 우리가 사용한 RSK2항체 (Cell Signaling Technology) 가 RSK2의 autoinhibitory  $\alpha$ -helix를 잡는 항체이기 때문에 western blotting상에서 endogenous한 RSK2만 확인되었기 때문이다. 실험을 통해 우리는 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A가 항상 활성화 되어 있다는 것을 확인 할 수 있었다.

## B. RSK2의 지속적인 활성화에 의한 유전체 불안정성의 유도

RSK2와 유전체 불안정성의 관계에 대한 보고는 되어 있지 않으나 RSK2가 속해 있는 MAP Kinase가 암과 관련이 되어 있고 (AS Dillon *et al.*, 2007), Ras에 의해 유도되는 유전체 불안정성에 관여되어 있으며 Ras와 Raf에 의해 유전체 불안정성의 기전이 유발된다는 보고가 있었으며 이러한 유전체 불안정성이 암을 발생시키는데 있어 밀접한 관련이 있다고 보고되어 있다 (Harold I *et al.*, 1999; Rosner *et al.*, 2007). 그리고 MAP Kinase signaling pathway 중 ERK의 하위 신호전달자인 RSK2가 종양형성과 종양진행에 관여되어 있다는 사실을 알 수 있었다 (Cho *et al.*, 2007; Sumin Kang *et al.*, 2010). 또 RSK2가 여러 암에서 과발현되어 있다는 (Lobenhofer *et al.*, 2000 and Clark *et al.*, 2005) 사실을 알게 되었다. 그래서 우리는 wild type-RSK2 (WT-RSK2) 와 지속적인 활성을 나타내는 RSK2의 돌연변이 (CA-RSK2; RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A) 을 과발현 시키면 유전체 불안정성을 유도하는지 실험을 진행하였다. 먼저 RSK2와 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 넣어주면 유전체 불안정성을 일으켜 비정상적인 염색체 수를 만드는지 확인하기 위하여 HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 주입하고 재료와 방법에 기술한대로 FISH를 이용한 유전체 불안정성 실험을 시행하였다 (Figure 2 A). HeLa 세포주는 특징적으로 염색체 8번은 3개, 염색체 18번은 2개씩 가지고 있다. 그 결과 CEP 8 을 통해 pKH3 보다 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서 염색체 8번의 수가 비이상적으로 변해 있는 것을 관찰 할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=8.9768E-05, RSK2-Y707A; P=0.00055, left). CEP 18 역시 마찬가지로 pKH3보다 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서 염색체 18번의 수가 비이상적으로 변해 있는 것을 관찰 할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.00768, RSK2-Y707A; P=0.034374, right). 그러나 WT-RSK2에서는 염색체 8번, 18번의 비이상적인 염색체수를 관찰 할 수 없었다.

유전체 불안정성을 확인하는 다른 방법을 통하여 RSK2가 유전체 불안정성을 유도하는지 확인하고자 하였다. 유전체 불안정성은 하나의 kinetochore에 양 pole에서 뻗어져 나오는 microtubule이 붙게 되는 merotelic attachment가 일어났을

때 발생할 수 있다 (Sarah L *et al.*, 2010). 이는 kinetochore에 microtubule이 붙어있고, 양 쪽 pole에서 나오는 microtubule이 붙어 tension이 존재하기 때문에 spindle assembly checkpoint protein가 확인을 하지 못하고 교정되지 않은 채 anaphase로 넘어가게 되어 lagging chromosome이나 chromosome bridge를 유발하게 된다. RSK2의 과발현에 의해서 anaphase동안 lagging chromosome과 chromosome bridge가 얼마나 생기는지 aceto-orcein으로 염색체를 염색하여 측정해 보았다 (Figure 2B). 결과를 보면 pKH3에 비해서 RSK2- $\Delta\alpha$ 와 RSK2-Y707A에서 anaphase동안에 lagging chromosome과 chromosome bridge가 크게 증가해 있는 것을 확인 할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ;  $P=5.9333E-06$ , RSK2-Y707A;  $P=0.000391$ ). 그러나 WT-RSK2에서는 anaphase동안의 lagging chromosome과 chromosome bridge의 증가를 확인 할 수 없었다.

그리고 anaphase동안의 lagging chromosome과 chromosome bridge가 다시 G1 phase로 들어가게 되면 micronuclei를 형성 할 수 있다 (Cimini D *et al.*, 2002; Utani K *et al.*, 2010). 그래서 유전체 불안정성을 확인 할 수 있는 또 다른 방법으로 micronuclei를 측정하였다. HeLa 세포주에 각각의 DNA를 삽입하고 재료와 방법에 기술한대로 형광염색법을 통하여 각각의 시료에서 세포 안에 들어 있는 micronuclei를 측정하였다 (Figure 2C). pKH3과 비교하여 봤을 때 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서 micronuclei가 많이 증가한 것을 확인 할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ;  $P=0.000626$ , RSK2-Y707A;  $P=0.008336$ ). 그러나 역시 WT-RSK2에서는 micronuclei의 의미 있는 증가를 확인하기 어려웠다.

### C. 유전체 불안정성을 일으키는 원인별 확인

이전 보고들을 살펴보면 유전체 불안정성이 다핵형성을 한다는 보고들이 있다 (David G *et al.*, 2001; Saavedra H *et al.*, 1999). 그리고 우리는 앞의 실험에서 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 유전체 불안정성을 일으키는 것을 확인하였다. 그래서 우리는 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 다핵형성에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 하였다. HeLa 세포주에 pKH3,

WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 넣어 주고 재료와 방법에 기술한대로 형광면역염색법을 이용하여 다핵형성을 관찰하였다 (Figure 3A). 그 결과 모든 시료에서 다핵형성에 있어서 통계적으로 유의한 차이를 관찰 할 수 없었다. 따라서 유전체 불안정성이 다핵형성에 영향을 준다는 보고가 있지만 RSK2의 경우에 있어서는 다핵형성에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다.

유전체 불안정성을 일으키는 원인에는 supernumerary centrosomes, cohesion defects, spindle assembly checkpoint (SAC) defects, kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects로 크게 4가지로 보고되어 있다 (Sarah L. *et al.*, 2010; Thomas D. *et al.*, 2008; Minhas K. *et al.*, 2003; Ganem NJ *et al.*, 2009). 그래서 우리는 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 4가지 기전 중 어떤 기전을 통해 유전체 불안정성을 일으키는지 확인하고자 하였다. 먼저 RSK2의 지속적인 활성이 supernumerary centrosome형성에 관여하는지 알아보려고 실험하였다. HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A을 넣어준 후 재료와 방법에 기술한대로 형광면역염색법을 이용하여 centrosome을 구성하고 있는  $\gamma$ -tubulin을 형광염색 후 interphase동안의 centrosome을 관찰하였다 (Figure 3B). 그 결과 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A간의 centrosome의 수에 통계적으로 유의한 차이가 없는 것을 확인 할 수 있었다.

그 다음으로 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 cohesion defects를 통해 유전체 불안정성을 유도하는지 관찰하기 위해 다음 실험을 진행하였다. HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A을 각각 넣고 재료와 방법에 기술한대로 giemsa염색법을 이용하여 prometaphase와 metaphase를 구분하여 관찰하였다. 그 결과 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A 시료에서 cohesion defects를 관찰 할 수 없었다 (not shown).

유전체 불안정성을 일으키는 또 다른 방법인 spindle assembly checkpoint (SAC) defects를 알아보기 위하여 microtubule을 depolymerization시키는 nocodazole을 처리하여 microtubule을 없애 인위적으로 SAC protein을 활성화시킨 조건에서 세포주기의 지연이 제대로 일어나는지 확인하였다. HeLa 세포주

에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 넣어주고 재료와 방법에 기술한대로 aceto-orcein으로 염색 후 mitosis의 세포를 세어보았다 (Figure 3C). 그 결과 nocodazole release 후 8시간 까지 각 시료에서 mitosis세포의 차이가 없다가 12시간이 되면 pKH3, WT-RSK2는 SAC protein의 활성이 있어 mitosis 세포가 넘어가지 못하고 계속 머물러 있는 반면에 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서는 pKH3, WT-RSK2에 비하여 mitosis세포들이 의미있게 줄어들어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.032973, RSK2-Y707A; P=0.02284). 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 유전체 불안정성을 일으키는 원인에는 SAC defects에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

마지막으로 유전체 불안정성을 일으키는 원인으로 kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects가 있다. 이전 실험에서 RSK2의 지속적인 활성화가 anaphase동안에 lagging chromosome과 chromosome bridge를 유도하는 것을 관찰하였고 이전 보고에서 유전체 불안정성을 가지고 있는 암세포에서 kinetochore microtubule의 attachment가 정상세포 보다 더 강하며 이것이 mal-attachment를 만들었을 때, 교정되지 못하고 chromosome mis-segregation 되어 유전체 불안정성을 증가시킨다고 보고된 바 있다 (Semuel F *et al.*, 2009). 우리는 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 KT-MT attachment defects에 관여하여 유전체 불안정성을 일으키는지 확인하기 위하여 HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 넣어주고 재료와 방법에 기술한대로 cold stable assay를 이용하여 microtubule stability를 측정하였다. 각 시료를 metaphase에 놓고 cold shock을 주면 kinetochore에 강하게 붙은 microtubule은 남아있게 되고 상대적으로 약하게 붙은 microtubule은 depolymerization된다. Cold shock을 주고 고정된 후 형광면역염색법을 이용하여 microtubule을 염색하여 confocal 현미경을 이용하여 Z-stack을 이용하여 이미지촬영 후 Imaris software를 이용해 microtubule의 intensity를 측정하였다 (Figure 4). 그 결과 KT-MT attachment되어 있는 부분인 central region of spindle의 intensity가 pKH3에 비해 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서 더 강하게 남아 있는 것을 확인 할

수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ,  $P=6.29149E-05$ , RSK2-Y707A,  $P=1.48138E-05$ ). 이것을 통해 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 KT-MT attachment defects을 통해 유전체 불안정성을 일으킨다는 것을 알 수 있었다.

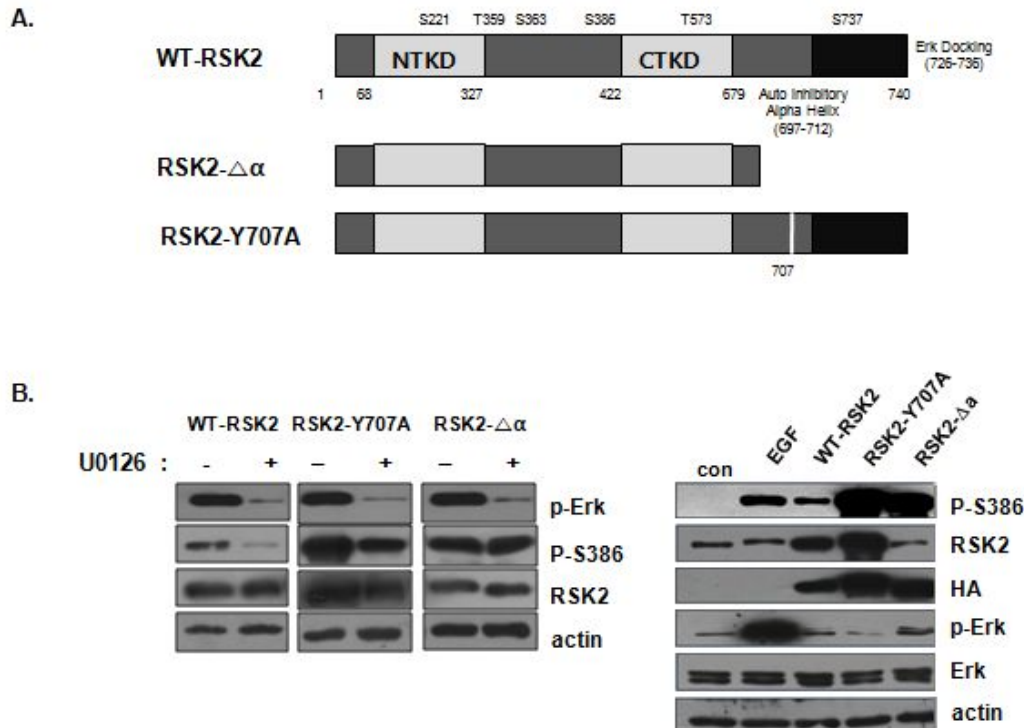
#### D. RSK2의 지속적 활성화에 의한 KT-MT attachment 안정성 강화와 유전체 불안정성

앞서 우리는 지속 적으로 활성을 나타내는 RSK2가 KT-MT attachment를 더 강하게 남아있게 하는 것을 관찰하고 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 microtubule의 stability에 관여 할지도 모른다고 생각이 되었다. 이것을 확인하기 위하여 HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 각각 넣어주고 재료와 방법에 기술한대로 nocodazole을 처리하여 kinetochore에 붙어 있는 microtubule을 depolymerization시켰을 때의 microtubule intensity의 변화를 측정하였다 (Figure 5). 그 결과 각 시료에 nocodazole을 처리하지 않은 시간에는 각 시료마다 intensity에 큰 차이가 없지만 nocodazole을 처리하고 3분, 6분에서 pKH3와 비교하여 RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에서는 pKH3보다 microtubule의 intensity가 천천히 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (3 min : RSK2- $\Delta\alpha$ ;  $P=1.05724E-10$ , RSK2-Y707A;  $P=1.03469E13$ , 6 min : WT-RSK2;  $P=0.01397$ , RSK2- $\Delta\alpha$ ;  $P=0.000442$ , RSK2-Y707A;  $P=0.002263$ ). 이것을 통해 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 microtubule의 stability를 조절하여 더 강하게 하는 것을 확인 할 수 있었다.

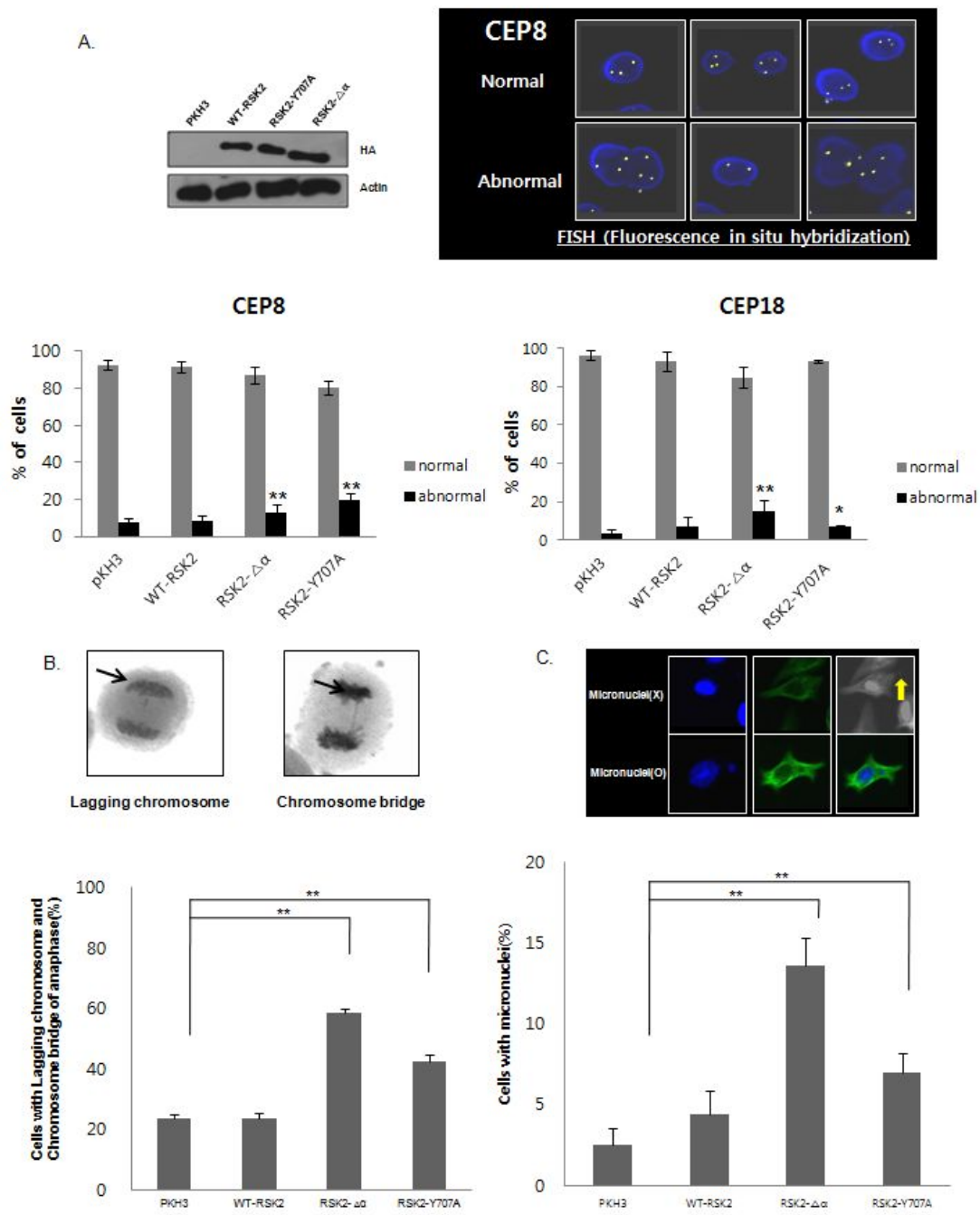
지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 microtubule의 안정화를 통해 kinetochore의 결합을 강화함으로써 유전체 불안정성을 유발 했다면 KT-MT의 결합을 약화시켰을 때 유전체 불안정성 현상을 억제 할 수 있을 것이다. 이를 확인하기 위해 microtubule을 de-polymerization시키는 MCAK을 넣어 주었을 경우 anaphase동안의 lagging chromosome과 chromosome bridge를 감소시킬 수 있는지 확인하였다. HeLa 세포주에 pKH3, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에 각각 GFP를 넣은 것과 pKH3, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A에 GFP-MCAK을 각각 넣어준 것으

로 나눈 후 재료와 방법에 기술한대로 anaphase동안의 lagging chromosome과 chromosome bridge를 aceto-orcein염색을 하여 관찰하였다 (Figure 6). 그 결과 MCAK을 넣어주게 되면 지속적인 활성을 나타내는 RSK2에 의해 증가했던 anaphase동안의 lagging chromosome과 chromosome bridge가 의미 있게 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다 (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.027346, RSK2-Y707A; P=0.015039). 이것을 통하여 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 kinetochore와 microtubule의 결합을 강화하여 유전체 불안정성을 유발함을 알 수 있었다.



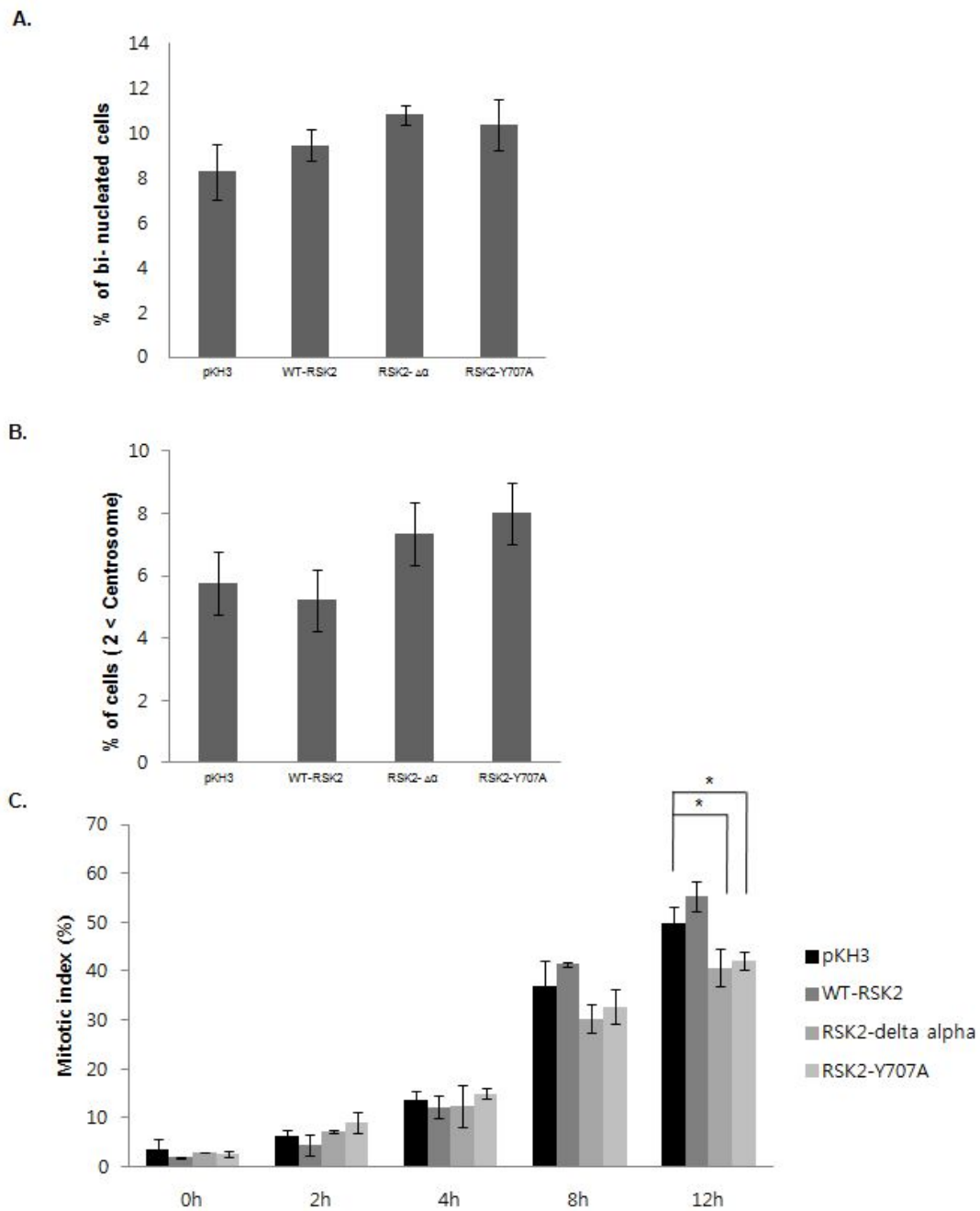


**Figure 1. Checking the activity of constitutively active RSK2.** (A) Schematic representation map of RSK2 constructs. RSK2 are characterized by the presence of autoinhibitory  $\alpha$ -helix and ERK docking site. (B) HeLa cells ( $2 \times 10^5$ ) were seeded in 60mm dishes and then cultured overnight, before transfecting these cells with WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$  and RSK2-Y707A. Cells were subsequently starved in 0.2 % FBS-F12 for 12h, and these serum starved cells were treated with 10uM U0126, MEK inhibitor (left panel). HeLa cells treated either with control or EGF (20 ng/ml) for 10 min. Then these cells were compared with WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$  and RSK2-Y707A for various protein expression change by western blot (right).



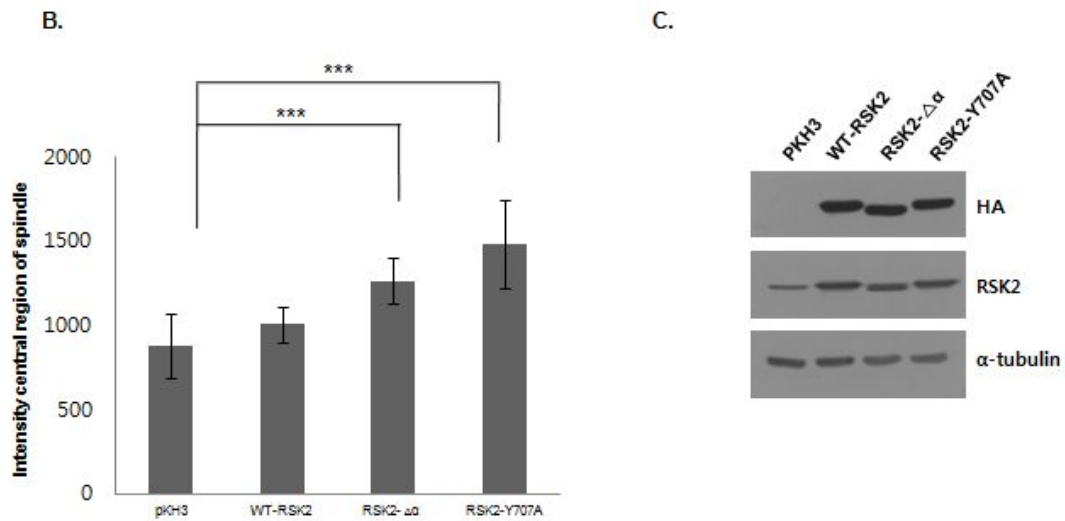
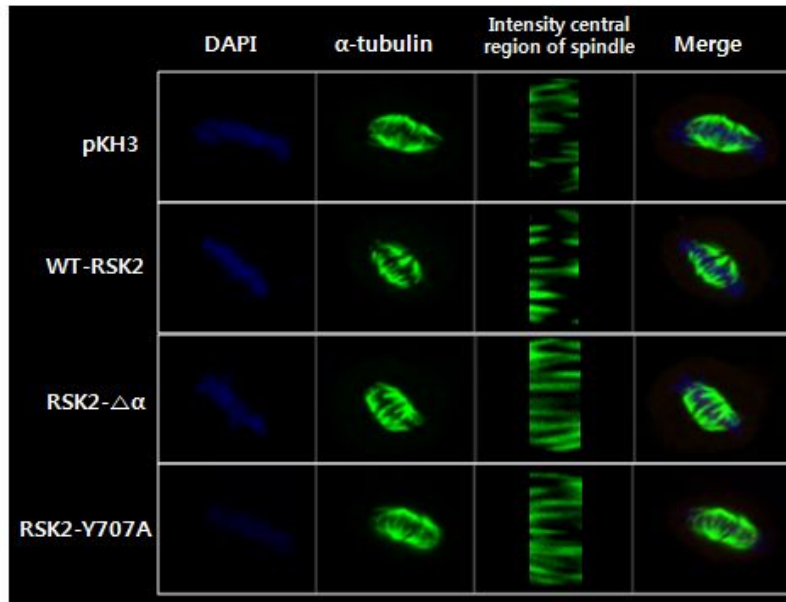
**Figure 2. Constitutively active RSK2 induced chromosomal instability.**

(A) Image analysis of FISH data from HeLa cell colonies treated with monastrol-induced CIN increase during 7 days of culture. Cells were fixed and stained with DAPI (blue) to visualize nuclei and with probes specific for chromosome 7 or chromosome 18 (Orange). Graphs were plotted from the modal chromosome number (CEP 8 : RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=8.9768E-05, RSK2-Y707A; P=0.00055, left, and CEP 18 : RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.00768, RSK2-Y707A; P=0.034374, right). (B) Lagging chromosome and chromosome bridge were visualized after transfection with various RSK2 constructs, pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A. Cells were synchronized by DTB and then treated with monastrol for 2h. After removal of monastrol, cells were harvested and stained with aceto-orcein (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=5.9333E-06, RSK2-Y707A; P=0.000391). (C) Micronuclei were visualized after transfection with RSK2 constructs, pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A, respectively HeLa cells. Cells were synchronized by DTB and treated with monastrol for 2h. Cells were released from synchronization and monastrol, and then harvested and stained with DAPI (blue) and  $\alpha$ -tubulin (green). (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.000626, RSK2-Y707A; P=0.008336)



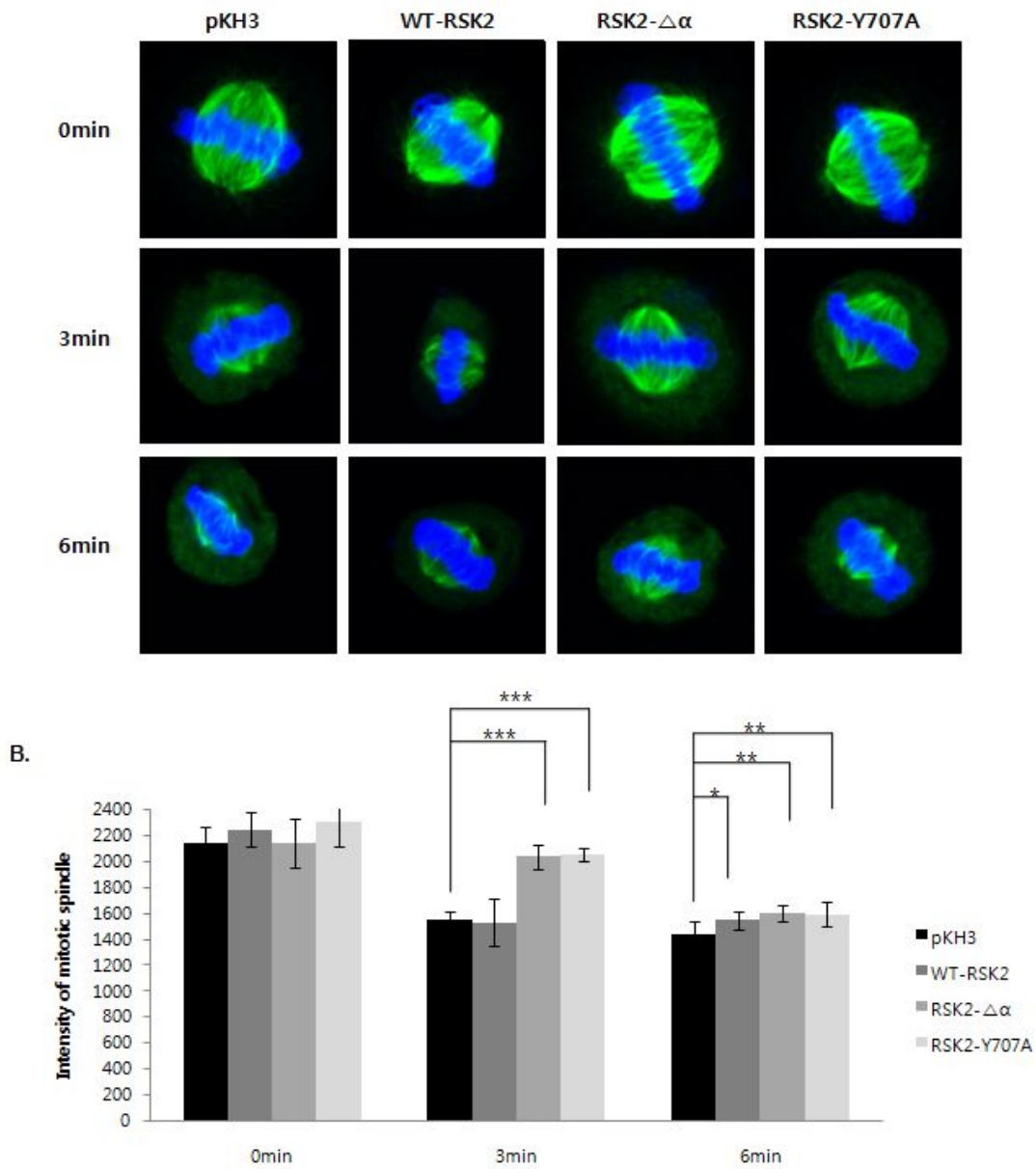
**Figure 3. Spindle assembly checkpoint activity is lowered in constitutively active RSK2-expressed cells.** (A) Bi-nucleated cells were counted after transfection of various RSK2 constructs, pKH3, WT-RSK2,

RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A, respectively. Cells were synchronized by DTB for 20h. After removal of DTB, cell were re-treated with monastrol for 2h. After removal of monastrol, cells were harvested and stained with DAPI (blue) and  $\alpha$ -tubulin (green). (B) Centrosomes were counted after transfection with various RSK2 constructs, pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A, respectively. Cells were synchronized by DTB and monastrol for 2h. After removal of monastrol, cells were harvested and stained with DAPI (blue) and  $\gamma$ -tubulin (centrosome, green). (C) HeLa cells were transfected with pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A and synchronized by treating with nocodazole for 12h. Mitotic cell numbers were measured from the sample harvested at the indicated time points and stained with aceto-orcein.



**Figure 4. Constitutively active RSK2 induced kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects.** Cold stable assay was performed after transfection with pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A, respectively. Cells were synchronized at metaphase by treatment with MG132. (A) Representative image of cold-treated cells stained with  $\alpha$ -tubulin (green) and

DAPI (blue). (B) Graphs show the spindle intensity of the central region of bipolar mitotic spindle (RSK2- $\Delta\alpha$ ;  $P=6.29149E-05$ , RSK2-Y707A;  $P=1.48138E-05$ ). (C) Confirmation of expression of various RSK2 constructs by western blotting.



**Figure 5. Constitutively active RSK2 induced more stable microtubule**  
 (A) Nocodazole sensitivity assay was performed after transfection with pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A, respectively. Cells were synchronized by MG132 for 3h. After 3h, nocodazole was treated to induce microtubule depolymerization. Cells were measured for microtubule intensity with the



samples harvested at the indicated time point after nocodazole treatment by confocal microscopy analysis. Representative image of cold-treated cells stained with  $\alpha$ -tubulin (green) and DAPI (blue). (B) Graphs show the intensity of mitotic spindle (3 min : RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=1.05724E-10, RSK2-Y707A; P=1.03469E13, 6 min : WT-RSK2; P=0.01397, RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.000442, RSK2-Y707A; P=0.002263). Representative image of cold-treated cells stained with  $\alpha$ -tubulin (green) and DAPI (blue).

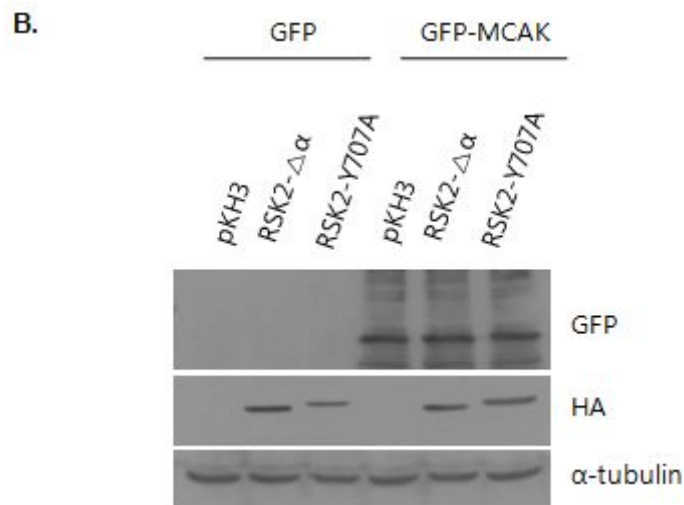
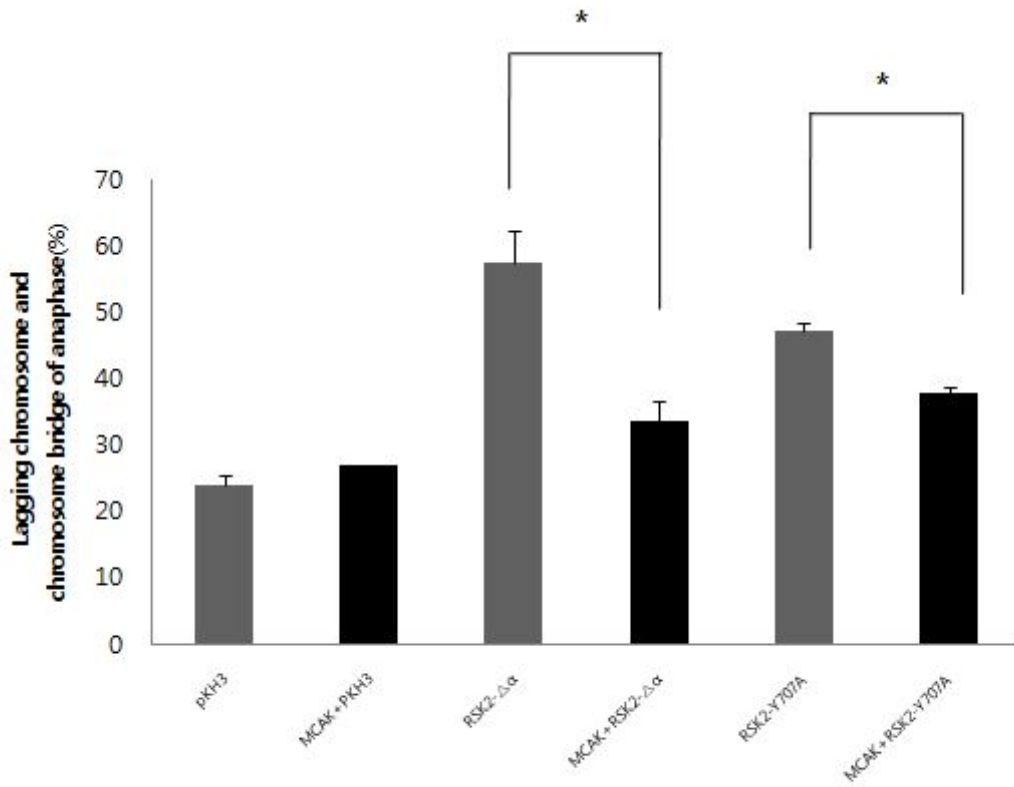


Figure 6. Hyperstabilization of kinetochore microtubule played a causal role in CA-RSK2 induced anaphase CIN phenotype. (A) Percentage of

cells at anaphase with lagging chromosome and chromosome bridge in cells transfected with indicated RSK2 and/or GFP-MCAK constructs. Cells were synchronized by DTB and monastrol for 2h. After removal of monastrol, cells were harvested and stained with aceto-orcein to observe anaphase lagging chromosome and chromosome bridge (RSK2- $\Delta\alpha$ ; P=0.027346, RSK2-Y707A; P=0.015039). (B) Confirmation of expression of transfected constructs by western blotting.

## IV. 고찰

유전체 불안정성은 고형종양의 특징으로 잘 알려져 있다. 1997년 KuuKasiarvi 등은 MAP Kinase 신호전달체계에서 활성화되어 있거나 돌연변이 발생시, 암을 발생시키며 그 과정에서 유전체 불안정성이 관여 한다 (KuuKasiarvi *et al.*, 1997). 그리고 MAP Kinase의 신호전달자인 RSK2가 형질전환, 전이와 침습에 관여한다는 보고와 유방암과 전립선암에서 발현이 증가되어 있다고 보고되어 있다 (Rana Anjum and Jhon Blenis *et al.*, 2008). 우리는 RSK2와 유전체 불안정성의 관계를 확인하기 위해 HeLa 세포주에 pKH3, WT-RSK2, RSK2- $\Delta\alpha$ , RSK2-Y707A를 과발현시켜 RSK2가 지속적인 활성을 가지게 되었을 때 유전체 불안정성을 유도하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Figure 2) 아직 RSK2와 유전체 불안정성의 관계에 대한보고는 없으나 우리의 결과를 통해 RSK2가 암 발생에 있어서 유전체 불안정성을 동반할 가능성을 제시해 볼 수 있다.

RSK2의 지속적인 활성이 유전체 불안정성을 유도한다는 것을 관찰하였는데 (Figure 2) 유전체 불안정성을 일으키는 원인으로는 크게 cohesion defects (Thomas D *et al.*, 2008), spindle assembly checkpoint (SAC) defects (Minhas K *et al.*, 2003), kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects (Sarah L *et al.*, 2010), supernumerary centrosomes (Ganem NJ *et al.*, 2009) 등이 보고되었다. 특히 우리의 연구에서 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 SAC defects (Figure 3C) 와 KT-MT attachment defects (Figure 4) 를 유발하여 유전체 불안정성을 유도하는 것으로 나타났다.

Anaphase로 진행하기 위해서는 metaphase동안 kinetochore와 microtubule이 제대로 attachment가 되어야 한다. Kinetochore에 microtubule이 attachment되지 않거나 자매염색분체 양쪽의 kinetochore 중 하나의 kinetochore에만 microtubule이 attachment되고 다른 한 쪽 kinetochore에는 attach되지 않으면 tension에 문제가 생겨 SAC이 작동하여 세포주기가 정지된다. 그러나 SAC이 제대로 활성화되지 못하면 이를 교정하지 못하고 anaphase로 넘어가 유전체 불안정성을 일으

키게 된다 (Minhas KM *et al.*, 2003). 또한 Samuel F 등은 KT-MT attachment가 더 강하게 되면 merotelic을 포함한 mal-attachment를 만들게 된다고 보고하였다 (Samuel F *et al.*, 2009). RSK2의 지속적인 활성화에 의해 SAC의 활성이 낮아지는 현상과 metaphase동안 KT-MT attachment가 강해지는 현상은 유전체 불안정성의 발생을 synergistic하게 증가시키게 된다. 그 이유는 metaphase동안 unattachment나 mal-attachment가 발생하면 SAC의 활성화가 높아져 세포주기의 지연이 일어나게 되고 이 시간 동안 unattachment나 mal-attachment가 교정되어야 한다. 그러나 지속적인 활성을 가지는 RSK2의 경우 SAC의 활성이 낮아져 unattachment나 mal-attachment가 교정될 시간이 줄어들어 교정되지 못하고 유전체 불안정성을 증가시키게 된다.

지속적인 활성을 가지는 RSK2에 microtubule depolymerization시키는 nocodazole을 처리하여 nocodazole sensitivity assay를 통해 KT-MT attachment가 강해진 것을 확인하였다. 실제로 microtubule을 depolymerization시키는 kinesin-13 family인 MCAK을 함께 주입하였을 때 증가했던 lagging chromosome이 줄어든다는 사실을 확인하였다. 이 두 가지 결과에서 RSK2가 microtubule의 stability와 관련성이 있다고 볼 수 있었다. 그리고 metaphase동안 RSK2의 위치가 microtubule에 존재한다는 보고를 (Willard *et al.*, 2003) 바탕으로 하여 RSK2가 metaphase동안 microtubule의 stability에 직, 간접적으로 영향을 줄 가능성을 생각해 볼 수 있다.

RSK2의 여러 기질들이 밝혀져 있지만 SAC에 관련하여 Vigneron S. 는 RSK2를 없애면 Mad1의 양이 줄어드는 것을 보고하였고 (Vigneron S. *et al.*, 2010), Zhu J. 는 RSK2의 하위체계인 Mad1이 세포증식의 촉진에 관여 한다고 보고하였다 (Zhu *et al.*, 2008). 하지만 RSK2를 지속적으로 활성화 시켰을 때 Mad1의 양적인 변화, 위치변화는 관찰 할 수 없었다 (data not shown). 알려진 RSK2의 기질 중 microtubule의 stability와 관련되어 알려진 단백질은 아직 없다. 그래서 우리는 RSK2가 아직 알려지지 않은 기질에 영향을 줄 것이라고 생각하고 그 기질을 찾는데 주력하고 있다.

향후 RSK2가 직접적으로 microtubule stability에 관여 하는지 아니면 RSK2의 알려지지 않은 다른 기질을 통해서 microtubule stability에 관여 하여 KT-MT attachment에 관여하는지 해당 관련 실험의 진행이 이에 대한 우리의 이해를 깊게 할 것이다.

## V. 결 론

본 연구는 Ras/MAP Kinase 신호전달계의 하위 매개체인 RSK2의 과발현에 의해 유전체 불안정성을 유도하는지 알고자 하였고, 유전체 불안정성이 일어난다면 그 원인이 무엇인지 알고자 하였다. 본 연구에서 지속적인 활성을 나타내는 RSK2가 유전체 불안정성을 일으키는 것을 확인 할 수 있었으며 지속적으로 활성을 나타내는 RSK2가 SAC defects와 kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects에 영향을 주어 유전체 불안정성을 유도하는 것으로 관찰 되었다. 구체적으로 RSK2의 과활성화에 따른 kinetochore-microtubule의 hyper-stability가 유전체 불안정성을 유발함을 확인하였다. 이 결과는 이미 보고된 Ras/Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 신호전달체계가 유전체 불안정성에 관계가 있다는 사실을 뒷받침하는 것이며, 특히 MAP Kinase신호전달체계에서 일어나는 암의 발생과 진행에 있어서 유전체 불안정성이 연관되어 있다는 보고들을 비추어 볼 때, RSK2와 고형종양의 특징인 유전체 불안정성의 관계에 대해 처음으로 밝혔다고 할 수 있다.

## VI. 참고문헌

1. Anjum, R, Blenis, J.: The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 747-758, 2008
2. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y.: Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37: 1038 - 1040, 2005
3. AS Dhillon, S Hagan, O Rath and W Kolch: MAP Kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* 26: 3279-3290, 2007
4. Celeste E. Poteet-Smith, Jeffrey A. Smith, Deborah A. Lannigan, Tiffany A Freed and Thomas W. Sturgill: Generation of Constitutively Active p90 Ribosomal S6 Kinase in Vivo. *J Biol Chem* 32: 22135-22138, 1999
5. Chen, Z, Gibson, T.B, Robinson, F, Silvestro, L, Pearson, G, Xu, B, Wright, A, Vanderbilt, C, Cobb, M.H: MAP kinases. *Chem Rev* 101: 2449-2476, 2001
6. Cimini D.: Detection and correction of merotelic kinetochores by Aurora B and its partners. *Cell cycle* 13: 1558-1564, 2007
7. Clark, D. E.: The serine/threonine protein kinase p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 65:3108 - 3116, 2005
8. Conger BA, Cruz MS: Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-faciocutaneous syndrome. *Science* 311: 1287 - 290, 2006
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949 - 954, 2002



10. Erikson, E. Maller, J.L: A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 742-746, 1985
11. Francis S. Willard, Michael F. Crouch: MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells A role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cellular Signalling* 13: 653 - 664, 2001
12. Frodin M, Jensen C.J, Merienne K, Gammeltoft S: A phosphoserine regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1.*EMBO J* 19: 2924 - 2934, 2000
13. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D: A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278 - 282, 2009
14. Jone SW, Erikson E, Blenis J, Maller JL, Erikson RL: A *Xenopus* ribosomal protein S6 kinase has two apparent kinase domains that are each similar to distinct protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3377-3381, 1988
15. Kuukasjarvi TR, Karhu M, Tanner M, Kahkonen A, Schaffer N, Nupponen S, Pennanen A, Kallioniemi OP, Kallioniemi J, Isola: Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57: 1597-1604, 1997
16. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386: 623 - 627. 1997
17. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG: signal transduction through MAP Kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49-139, 1998
18. Lobenhofer EK, Huper G, Iglehart JD, Marks JR: Inhibition of mitogen

- activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. *Cell Growth* 11: 99 - 110, 2000
19. Lobenhofer EK, Marks JR: Estrogen-induced mitogenesis of MCF-7 cells does not require the induction of mitogen-activated protein kinase activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 75: 11 - 20, 2000
  20. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A: Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38: 294 - 96, 2006
  21. Pages G, Lenormand PL, Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J: Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18: 8319 - 8323, 1993
  22. Rodriguez-Viciana P, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA: Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* 5765: 1287-1290, 2006
  23. Rosner R, Marsha: MAP kinase meets mitosis: A role for Raf Kinase Inhibitory Protein in spindle checkpoint regulation. *Cell Division* 15: 19-23, 2007
  24. Samuel F, Bakhom, Giulio Genovese, Duane A. Compton: Deviant Kinetochore Microtubule Dynamics Underlie Chromosomal Instability. *Current Biology* 19: 1937-1942, 2009
  25. Sarah L, Thompson, Samuel F. Bakhom, Duane A. Compton: Mechanisms of Chromosomal Instability. *Current Biology* 20: 285 - 295, 2010

26. Sarah L. Thompson, Duane A. Compton : Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *PNAS* 108: 17974-17978, 2011
27. Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G: Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 38: 331 - 36, 2006
28. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ: Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 10: 147 - 54. 2006
29. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL: Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*334: 715-718, 1988
30. Sumin Kang, Shannon Elf, Katherine Lythgoe, Taro Hitosugi, Jack Taunton, Wei Zhou, Li Xiong, Dongsheng Wang, Susan Muller, Songqing Fan, Shi-Yong Sun, Adam I. Marcus, Ting-Lei Gu, Roberto D. Polakiewicz, huo (Georgia) Chen, Fadlo R. Khuri, Dong M. Shin, and Jing Chen: p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *The Journal of Clinical Investigation* 120: 1165 - 1177, 2010
31. Sumin Kang, Shannon Elf, Shaozhong Dong, Taro Hitosugi, Katherine Lythgoe, Ailan Guo, Hong Ruan, Sagar Lonial, Hanna J. Khoury, Ifor R. Williams, Benjamin H. Lee, Johannes L. Roesel, Gerard Karsenty, André Hanauer, Jack Taunton, Titus J. Boggon, Ting-Lei Gu and Jing Chen: Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Associates with and Tyrosine Phosphorylates p90 RSK2, Leading to RSK2 Activation That Mediates Hematopoietic Transformation. *Mol Cell Biol* 29: 2105-2117, 2009
32. Thomas D. Barber, Kirk McManus, Karen WY, Yuen, Marcelo Reis,

Giovanni Parmigiani, Dong Shen, Irene Barrett, Yasaman Nouhi, Forrest Spencer, Sanford Markowitz, Victor E. Velculescu, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, Christoph Lengauer, and Philip Hieter: Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3443-3448, 2008

33. Vigneron S, Brioudes E, Burgess A, Labbe J-C, Lorca T and Castro A: RSK2 is a kinetochore-associated protein that participates in the spindle assembly checkpoint. *Oncogene* 29: 3566-3574, 2010
34. Yong-Yeon Cho, Ke Yao, Hong-Gyum Kim: Ribosomal S6 Kinase 2 Is a Key Regulator in Tumor Promoter-Induced Cell Transformation. *Cancer Res* 67: 8104-8112, 2007
35. Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A: Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutation in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential of cognitive function and learning. *Hum Mol Gen* 11: 2929-2940, 2002
36. Zhu J, Blenis J, Yuan J: Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *proc Natl Acad Sci* 105: 6584-6589, 2008

## Constitutively active-RSK2 induces chromosomal instability through diverse mechanisms

CHAE-RIN PARK

Department of Biomedical Sciences/Cancer Biology  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Jae-Ho Lee)

The Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway regulates various cellular processes including cell survival, cell proliferation, cell motility and cell cycle regulation. And mutation or activation of the signaling pathway has been related to cancer development. Cancer cell has a state in which the number of chromosomes in a cell deviates from multiples of the haploid number of chromosomes (aneuploidy). The accumulation of chromosome imbalances generated by the sequential loss and/or gain of single chromosomes through chromosomal instability may be the most common pathway to aneuploidy.

We observed that constitutively active RSK2 induced chromosomal instability such as lagging chromosome and chromosome bridge, micro-nucleus and abnormal number of chromosome. Mechanism study revealed that constitutively active RSK2 induced chromosomal instability

through spindle assembly checkpoint defects and kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment defects. Since RSK2 localizes in microtubule during mitosis, we focused on the relationship between RSK2 and microtubule. We analyzed kinetochore-microtubule (KT-MT) attachment dynamics through cold stable assay and nocodazole sensitivity assay. Interestingly, these results indicate that constitutively active RSK2 enhanced the stability of microtubules. In addition, we observed that the co-transfection of RSK2 and MCAK decreased lagging chromosome and chromosome bridge during anaphase, indicating that enhancement of kinetochore microtubule stability was indeed the cause of CIN in these cells. Taken together, constitutively active RSK2 induced chromosomal instability through increase in the stability of microtubules. Yet unidentified effect of RSK2 activation in SAC activity also seems to affect CIN. We hereby provide a possible new insight on the role of RSK2 activation in cancer formation as well as to cancer progression.

---

Key words: RSK2, chromosomal instability (CIN), microtubule