

제 2005년도
기관고유사업
보 고 서

Bio-Infra 구축 및 지원사업

**면역세포 세포사멸에 따른 신호전달 경로와 단백질체 분석에
관한 연구**

**Signal transduction pathway and proteome
analysis in the apoptosis of immune cells**

2006. 4.

한국생명공학연구원

제 출 문

한국생명공학연구원장 귀하

본 보고서를 “Bio-Infra 구축 및 지원사업” 과제(세부과제 “면역세포 세포사멸에 따른 신호 전달 경로와 단백질 분석에 관한 연구”)의 기관고유 사업보고서로 제출합니다.

2006. 04. 14.

연구부서명 : 경북대학교

중과제책임자 : 최용경

세부과제책임자 : 김환묵

겸임연구원 : 이영섭, 김국희, 이세경

07006584

기관고유사업보고서초록

계 정 번 호	KBS0240513	당해년도 연구기간	2005. 01. ~ 2005. 12.
연구과제명	중과제명	바이오인프라 및 정책지원사업	
	세부과제명	바이오평가기반구축사업	
	세부과제명-1	면역세포 세포사멸에 따른 신호전달 경로와 단백질 분석에 관한 연구	
연구책임자	김환목 (이영섭)	총 참여 연구원수	총 : 3 명 내부 : 1 명 외부 : 2 명
연 구 비	20,000,000원		
위 탁 연 구	연구기관명 : 연 구 비 :	연구책임자 : 연구기간 :	
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)		면수	24
<p>1. PKC에 의한 doxorubicin-유도성 세포사멸 억제</p> <ul style="list-style-type: none"> - Protein kinase C delta transfectant cell에서 doxorubicin 유도성 세포사멸 억제 - PKCδ가 과발현된 세포에서는 PKCδ가 인산화되어 세포막으로 translocation됨 - PKCδ가 과발현된 세포에 PKCδ specific inhibitor인 rottlerin를 처리하면 세포 내 활성산소종의 생성 증가로 인해 세포사멸 - PKCδ의 활성화는 ERK의 활성을 유도하여 doxorubicin에 의한 세포사멸을 조절 <p>2. 다약제 내성 억제제 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 결장암세포와 다약제내성(multidrug-resistant) 세포에서의 Proteomics 분석 - 결장암세포에서는 PKC-α, -β I, -ζ가 발현되어 있었고, 내성 세포주에서는 PKC-β I 과 aPKC-ζ의 발현에는 변화가 없었으나 cPKC-α가 증가 - 내성세포주에 cPKC 저해제인 Go6976을 처리하면 MDR1이 mRNA level과 protein level에서 감소 - HCT15/ADR 세포에 PKC-α의 활성을 저해 시 doxorubicin에 의해 apoptosis가 일어남 			
색인어 (각 5개 이상)	한 글	면역세포, 세포사멸, 활성산소종, 신호전달, 단백질, 단백질 키나제	
	영 어	Immune cell, Apoptosis, Reactive oxygen species, Signal transduction, Proteomics, Protein kinase	

요 약 문

I. 제 목

면역세포 세포사멸에 따른 신호전달 경로와 단백질 분석

II. 사업(연구개발)의 목적 및 필요성

생체 면역체계의 연구는 면역 기능의 조절기작 또는 면역 기능상의 결함을 규명할 수 있게 할 뿐 아니라 면역 기능의 노화 회복의 기술 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있으며, 건강의 유지 및 질병의 치료에 요구되는 면역 기능의 인위적 조절에도 활용될 수 있으리라 본다. T 임파구는 생체 내의 병원성 인자의 감염 및 등장에 의해 유도되는 특이적 면역 반응의 발현 및 조절에 있어서 중심적인 역할을 담당하는 중요한 면역세포이다. 따라서 T 임파구의 세포사멸에 대한 연구로서, 산화적 스트레스로 apoptosis를 유도하고 세포 내에서의 신호 전달 경로와 억제 효과 및 세포 내 단백질들의 변화를 다각도로 알아봄으로서 면역계 세포의 기능을 규명함이 우선적으로 요구된다.

III. 사업(연구개발)의 내용 및 범위

- 활성산소종에 의한 면역계 세포사멸 신호전달 경로
Prostaglandin E2의 EP2 receptor 확인
Ras 신호전달 경로 관련성 확인
- 세포사멸에 따른 세포 내 단백질 발현 변화 분석
Phosphoprotein들의 proteome 분석
다약제내성 세포주에서 단백질 분석
- 항암제 유도성 세포사멸에서의 신호전달 경로와 과 약제 내성 억제물질 개발
PKC δ 억제제 효과 분석
약제내성단백질 억제물질 타당성 확인
- Data 분석에 따른 면역세포 사멸 연관 단백질 분석

IV. 사업수행(연구개발)결과

(1) PKC에 의한 doxorubicin-유도성 세포사멸 억제

- ① Protein kinase C delta transfectant cell에서 doxorubicin 유도성 세포사멸을 억제함을 확인하

고 PKC downstream 신호 전달 경로를 조사하였다. PKCδ가 과발현되어 있는 세포에서는 PKCδ의 단백질 발현 정도와 인산화 정도가 정상 세포에 비해 높은 수준으로 존재하며 막으로의 translocation되어 있음을 확인하였다.

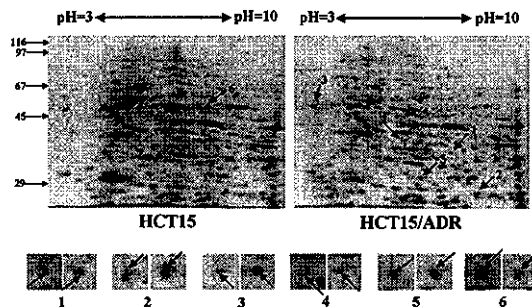
② PKCδ가 과발현된 세포에 doxorubicin과 PKCδ specific inhibitor인 rottlerin를 함께 처리한 후 세포 내 활성산소종의 생성을 확인한 결과 세포 내 활성산소종의 생성이 증가하는 결과를 얻었다. 또한 PKCδ가 과발현된 세포에서 rottlerin에 의한 PKCδ의 저해는 caspase-3의 기질인 PARP의 p85 절편을 증가시켰다. 이러한 결과는 doxorubicin에 의한 세포사멸에 PKCδ가 특이적으로 억제하는 기능을 가지는 것으로 사료된다.

③ PKCδ의 활성화는 다음 신호전달 경로인 ERK1/2의 활성을 유도하는 것으로 확인되었고, 그 upstream인 MEK kinase의 저해제인 PD98059를 처리하면 PKCδ가 과발현된 세포에서 ERK의 활성을 저해시켰다. 이러한 결과로 PKCδ의 과발현에 의해 유도된 ERK1/2의 인산화가 doxorubicin에 의해 유도되는 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 생각되어진다.



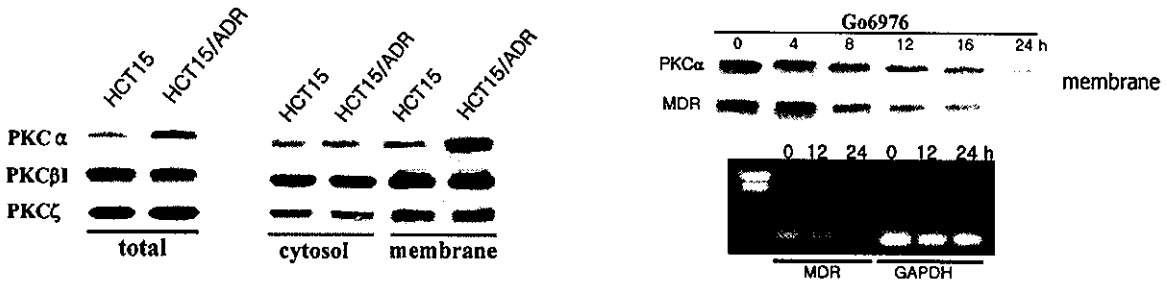
(2) 다약제 내성 억제제 개발

① 항암제 장기 투여 시 발생하는 약제내성에 새로운 억제제 개발 및 치료방법을 모색하고자, 먼저 결장암세포와 다약제내성(multidrug-resistant) 세포에서의 Proteomics를 통해 360개 단백질 동정하였다. 그중 특이적으로 10배 이상의 증감을 나타내는 단백질에 대한 기능적 연구를 수행 중에 있다.

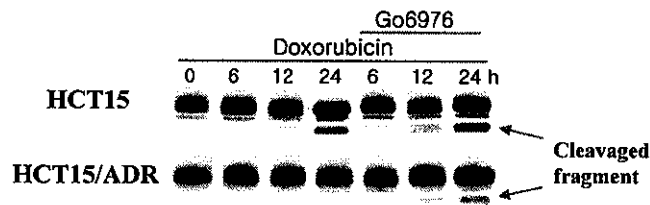


② HCT15(결장암) 세포와 HCT15/ADR 내성세포에서의 PKC 동위효소의 발현 양상을 알아본 결과, HCT15 세포주에서는 PKC- α , - β I, - β 3가 발현되어 있었고, 내성 세포주에서는 cPKC- β I 과 aPKC- β 3의 발현에는 변화가 없었으나 cPKC- α 가 증가한 것을 확인하였고 세포의 막 분획에 현저히 높게 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 PKC- α 가 다약제 내성과 어떤 연관성이 있는지 알아보기 위하여 cPKC 저

해제인 Go6976을 처리해 보았다. HCT15/ADR 세포에 Go6976을 시간별로 처리하여 PKC- α 를 저해시킨 경우 MDR1의 변화를 알아보았다. RT-PCR과 western blot을 수행한 결과, Go6976의 처리 후 MDR1이 시간이 지남에 따라 mRNA level과 protein level에서 모두 감소하였다



③ HCT15/ADR 세포에 PKC- α 의 활성을 저해시켰을 때 doxorubicin-induced apoptosis에 어떤 영향을 주는 지 알아보기 위해 Go6976을 1시간동안 전 처리한 후, doxorubicin을 처리해 보았다. 그 결과, 내성세포에서 PARP의 절단이 일어나는 것을 확인하였다. 또한, flow cytometry 분석을 통해 apoptosis 비율을 확인한 결과에서도 PKC- α 저해시 doxorubicin에 의해 apoptosis가 일어나는 것을 확인할 수 있었다



V. 사업수행(연구개발)결과의 활용계획

세포에서 활성산소종에 매개된 신호전달 경로와 세포사멸의 변환과 항산화물질의 세포사멸에 있어서의 조절기능을 규명함으로써 암, 노화에 따른 퇴행성질병들의 병인을 밝히는 기초적인 자료를 제공하여 궁극적으로 질병의 방지 및 치료법과 치료제의 개발을 유도할 수 있다. 또한 세포사멸과 활성산소종과의 연계성을 규명함으로써 관련연구의 유용한 model을 제시할 수 있다.

면역 세포에 의한 면역기능의 발현 및 조절기작의 이해 증대와 면역체계의 노화 기전 규명할 수 있다. 또한 면역체계의 노화방지 또는 노화된 면역체계의 노화 회복에 요구되는 새로운 의료기술 개발의 기초 정보 확립할 수 있을 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

The phenomenon of apoptosis, which is morphologically distinct from that of necrotic cell death, was first described in 1972. In the cell undergoing apoptosis, extracellular stimuli induce nuclear condensation and cellular shrinkage reserving the cell membrane. Apoptosis is therefore known as programmed cell death and follows the activation of cellular signal transduction. Recent reports showed that reactive oxygen species involve signal transduction pathway and apoptosis during normal process of development and abnormal proliferation. Apoptosis is an important phenomenon in cancer chemotherapy, because anticancer drugs exert their antitumor effect against cancer cells by inducing apoptosis. Further investigations are needed to clarify the detailed mechanisms involved in combination with molecular-targeting drugs. It will be important to understand the roles of signaling mediators for the identification of target proteins involved in apoptosis of immune cells.

Thus, our goal of this project is development of new drugs and effective regimens targeting apoptosis-related proteins and signal transduction pathways. In the apoptotic pathway, various signals activate kinases and transcription factors cascades, and changes of intracellular calcium level. Proteomic analyses in apoptotic pathway will be an important focus of further research in anticancer drug-induced cell death. Our improved understanding of the antitumor effects of natural product at the molecular level suggests the possibility of chemotherapy to the immune cell patient. This study will give very useful informations regarding the pathogenesis, treatment and prevention of the aging-related diseases such as cancer.

CONTENTS

(영문목차)

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. Status of technology development

Chapter 3. Contents and Results

Chapter 4. Achivement and Contribution

Chapter 5. Application

Chapter 6. Other Information

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 3 장 사업(연구개발)수행 내용 및 결과

제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

제 1 장 서론

진핵세포는 외부의 여러 요인으로 인한 심각한 손상을 입었을 경우 세포에 내재된 자살기작에 의하여 세포자신을 제거할 수 있는 능력을 가지고 있는데 이 현상을 **programmed cell death** 혹은 **apoptosis**라고 한다. Apoptosis는 우리 몸의 정상적인 발생 및 항상성을 유지하기 위하여 요구되어지는 과정으로서 정상적인 세포 수의 조절이나 손상된 세포의 제거는 생체에 있어서 필수적인 과정이라고 할 수 있다 (Ellis et al., 1991). 최근 보고에 의하면 부적절한 apoptosis가 자가면역이나 AIDS에 있어서의 T cell depletion, 그리고 신경퇴행성 질환과 같은 질병에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. Apoptosis는 여러 가지 형태학적 변화와 생화학적 변화를 수반하는데 세포막의 blebbing, 핵막의 구조단백질인 lamin-B의 분해에 의한 염색체의 응축, mitochondria에서의 cytochrome c의 방출, 그리고 핵 속의 DNA가 분해되어 oligonucleosomal fragmentation이 되는 변화를 수반하며 최종적으로 세포가 다양한 크기의 작은 세포 체로 떨어져 나가는데 이것을 'apoptotic body'라고 한다 (Shimizu et al., 1998; Green and Kroemer, 1998; Tanaka et al., 1994). 또한 최근의 보고에 의하면 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 하는 단백질들이 apoptosis 중에 절단되는 것으로 알려졌는데, 대표적인 것이 protein kinase C 중의 δ isoform과 DNA repair 효소인 PARP (poly-ADP ribose polymerase) 역시 절단되는 것으로 보고되었다 (Brodie and Blumberg, 2003). Apoptosis는 이러한 변화들을 수반함으로써 necrosis라는 또 다른 현상과 확연히 구별되어진다. 최근 apoptosis의 연구를 위하여 여러 방법으로 세포사멸을 유도하고 있는데 자외선이나 방사선 조사에 의한 유도, 단백질 합성 저해제 처리에 의한 유도, 항암제와 heat shock에 의한 유도, 성장인자의 제거에 의한 유도와 활성산소종 (reactive oxygen species)에 의한 방법이 그것이다. 그 중 활성산소종은 산소를 대사에 이용하는 생물체에게서 생성되어 생체 내의 지질, 단백질, 핵산에 큰 해를 입히며 이것이 여러 질병의 유발원인이 된다는 보고가 늘어가고 있다. 이러한 활성산소종에 의한 스트레스는 세포 내에서 serine/threonine kinase의 일종인 MAP kinase mitogen-activated protein kinase를 활성화 시켜 복잡한 신호전달 경로를 자극하는 것으로 보고되고 있다 (Robinson and Cobb, 1997; Yang et al., 2003). MAP kinase에는 세포의 분화와 성장에 관여하는 것으로 알려진 ERK-1,2 (extracellular signal regulated kinase)가 있으며 스트레스와 apoptosis에 관련되어 p38 MAP kinase와 JNK (c-Jun N-terminal kinase)가 발견되어 연구되어지고 있다 (Kyriakis et al., 1994; Nebreda and Porras, 2000). 생체 면역체계의 연구는 면역 기능의 조절 기작 또는 면역 기능상의 결함을 규명할 수 있게 할 뿐 아니라 면역 기능의 노화 회복의 기술 개발을 위한 기초 자료로 활용될 수 있으며, 건강의 유지 및 질병의 치료에 요구되는 면역 기능의 인위적 조절에도 활용될 수 있으리라 본다. T 임파구는 생체 내의 병원성 인자의 감염 및 등장에 의해 유도되는 특이적 면역 반응의 발현 및 조절에 있어서 중심적인 역할을 담당하는 중요한 면역세포이다. 따라서 T 임파구의 세포사멸에 대한 연구로서, T cells의 apoptosis에 관련된 신호전달계의 새로운 해석을 시도되고 있다. T cells의 activation-induced apoptosis는 Fas와 FasL 간의 interaction으로 유도되는 Fas-death signaling에 의해 이루어진다 (Green et al., 2003; Hildeman et al., 2003). T 임파구의 activation-induced apoptosis는 Bcl-2의 발현에 의해 저해를 받는 것으로 알려져 있었으나, Bcl-2와 무관하게 apoptosis를 유도하는 신호 전달 경로도 알려져 이에 대한 규명이 요구된다.

노화에 따른 T cells의 proliferation의 저하와 관련된 기작으로서 activation-induced T cell apoptosis를 제시한 바 있다. 즉, young T cells에 비해 old T cells의 경우 T cell activation에 의해 유도되는 Fas/FasL system에 의한 apoptosis가 더 쉽게 유도되므로 면역기능의 노화와 관련된 T cells의 기능 감퇴 현상의 요인으로서 activation-induced apoptosis의 규명을 시도하고 있다 (Newton and Strasser, 2003). 단핵구 (monocyte) 및 중성구 (neutrophil)의 식균작용에서도 superoxide anion이 우선적으로 발생하고, 이는 반응성이 큰 활성산소종의 하나인 hydroxyl radical의 주요 생성원이 될 수 있으므로, 세포 내부에서는 세포 사멸에 대한 자체적인 방어기작의 일환으로 항산화계 효소들의 활성이 조절된다 (Fadeel and Kagan, 2003). 단핵구의 항산화계 효소로는 superoxide anion을 H_2O_2 로 전환시키는 superoxide dismutase (SOD)와 생성된 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 바꿔주는 catalase 등이 있는 것으로 알려져 있다. Napthoquinone 유도체인 menadione 및 hydrogen peroxide을 oxidant로써 작용하도록 면역계 세포주들 즉 Jurkat T cell, Jurkat T (Bcl-2 transfectant) cell, human leukemia cell line인 HL-60, U937 cell, K562 및 K562 (multidrug-resistant) cell에 처리하여 apoptosis를 유도한다. Menadione은 reducing equivalent 흐름을 촉매하는 redox cycling agent로써 체내에서 superoxide와 같은 활성산소종을 만들어 내는데 그 생성 기작은 NADPH나 NADH를 이용하여 one-electron reduction이 일어나고 O_2 에서 O_2^- 를 생성시킨다 (Thor et al., 1982). O_2^- 는 다시 항산화 효소에 의해서 H_2O_2 로 전환되면서 hydroxyl radical로 바뀌게 되는데 이들은 강력한 oxidant로 세포 구성 물질에 손상을 주게 된다. 따라서 산화적 스트레스로 apoptosis를 유도하고 세포 내에서의 신호 전달 경로와 억제 효과 및 세포 내 단백질들의 변화를 다각도로 알아봄으로서 면역계 세포의 기능을 규명함이 우선적으로 요구된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

활성산소종들과 여러 가지 세포 외부의 자극에 따라 세포의 반응은 매우 다양하다. 그 중간 매개체로서 많이 알려진 것으로는 먼저 MAP kinase를 들 수 있다. MAP kinase family는 세포의 증식, 분화 및 세포사멸에 영향을 미치는데, ERK는 증식과 분화에 관여하고, p38 MAP kinase와 JNK/SAP kinase는 주로 세포사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또 다른 신호 전달자로는 receptor를 매개로 한 tyrosine kinase의 활성화, 그리고 2차 전달자인 cAMP, G protein-related pathway, phospholipid metabolism에 따른 protein kinase A (PKA), protein kinase B (Akt), 및 protein kinase C (PKC) 등의 신호 전달 경로가 존재한다 (Suzuki et al., 1997; Chen et al., 2001). 또한 여러 가지 세포 내 신호 전달 경로는 서로 cross-talk를 함으로써 세포의 세포사멸과 survival에 다양한 신호를 전달하게 된다. PKC의 여러 isoform은 각기 다른 경로를 가지는데 delta의 경우 caspase에 의해 잘려지면 활성화되기도 하고, iota의 경우 drug에 의한 세포사멸을 저해하기도 하며, alpha의 경우 mitochondrial form이 Bcl-2를 인산화하여 세포사멸을 저해하기도 한다. 특히 활성산소종에 의해 p38 MAP kinase, caspase 활성화에 의한 세포사멸을 유도하기도 하지만, survival signal로 알려진 ERK를 활성화시키기도 한다. 활성산소종은 superoxide anion (O_2^-)과 hydroxyl radical (OH) 등의 산소라디칼과 반응성이 큰 hydrogen peroxide, hydroperoxides, singlet oxygen 등을 통칭하는 것으로 주로 세포 내 산소의 90% 이상을 소비하는 미토콘드리아의 정상대사와 다양한 환경적인 스트레스에 의해 생성된다 (Nordberg and Arner, 2001). 또한 정상적인 세포의 기능인 phagocytosis, 발아, fertilization, differentiation 과정에서도 폭발적인 산소소비량의 증가에 수반되는 산소라디칼의 대량생성도 보고되고 있다 (Babior, 1992).

세포사멸을 유도하는 요인으로 리간드에 의한 경로도 포함하고 있는데 그중 하나가 TNF related apoptosis induced ligand (TRAIL)이다. TRAIL/APO-2L는 transmembrane receptors TRAIL-R1/DR4와 TRAIL-R2/DR5에 붙어 세포사멸을 진행하는 TNF family 중의 하나이다 (Goodwin and Smith, 1998; Wang and El-Deiry, 2003). 이 TRAIL에 의한 세포 사멸은 여러 가지 경로로 세포 사멸을 유도하고 있으며 아직까지 많은 연구가 행해지고 있다. TRAIL에 의한 세포사멸의 신호전달 과정은 death receptor-induced signaling complex (DISC) 형성을 통한 과정과 caspase 8의 활성화를 통한 과정으로 나눌 수 있다. 그래서 이 두 가지의 과정은 미토콘드리아 비의존적 활성화를 통한 caspase 3의 활성화에 의해 전달되는 세포사멸과 caspase 8에 의해 잘려진 BID에 의한 미토콘드리아 의존적 세포사멸로 나누어진다. 특히 후자는 apoptosomes을 형성하여 caspase 9을 활성화시키는 과정으로 apoptosomes을 형성하기 위해서는 미토콘드리아의 cytochrome c와 Apaf-1이 필요하다.

면역체계의 노화 (immunosenescence)가 노인인구의 질병 발생을 및 사망률에 큰 영향을 미치며 궁극적으로 인간의 수명 결정에 매우 중요한 요인이 될 것으로 믿어지고 있으나 노화에 수반되어 나타나는 면역 기능의 변화 또는 면역기능상의 결점 그리고 이에 대한 임상적 대처 방안에 대한 연구는 매우 부족할 뿐만 아니라 현재까지 보고된 몇몇 연구들은 서로 상반된 결과를 제시하고 있는 경우가 많으므로, 면역체계의 노화에 대한 연구는 아직 개념 정립의 초기 단계에서 진행되고 있다고 할 수 있다 (Weyand et al., 2003). 현재까지 알려진 생체의 노화에 수반되는 면역기능 감퇴의 대표적 요인으로는 thymus involution과 같은 T cell

development 관련 immune tissue의 퇴화, 그리고 TCR activation에 의해 유도되는 T cell proliferation의 저하, IL-2 생성의 감소, CD8⁺T cells 및 CD4⁺CD8⁺ T cells의 증가, activation후 apoptotic T cells의 증가 등과 같은 주로 T cells의 abnormality 뿐만 아니라 naive T cells에 대한 memory T cells의 비율증가와 T_H1 cells에 대한 T_H2 cells의 비율증가 등과 같은 T cells의 세포특성의 변화가 주로 알려지고 있다. T cells의 activation-induced apoptosis에 있어서 Fas death signaling에 대한 연구보고는 많으나 T cells에 있어서 FasL의 발현유도 관련 신호전달계는 그 조사가 여전히 미비하다. 또한 T cell activation 신호전달계와의 차이점에 대해서도 명확히 규명되지 않고 있으며, 더구나 T cells의 노화에 따른 apoptosis의 증가에 대한 기전의 규명은 시도된 바가 없다.

Proteomics의 급속한 발전은 2-D gel 전기영동 기술과 MALDI-mass 분석기술의 발달에 기초를 하고 있다. 2-D gel 전기영동은 수천 개의 단백질을 한꺼번에 분리할 수 있는 방법으로 단백질의 확인 및 동정이 가능하여 proteomics를 위한 효과적인 방법으로 사용되고 있다. 또한 2-D gel 전기영동으로 분리한 단백질을 동정하는 방법으로는 Mass spectrometry 방법이 가장 우수한데, 현재 MALDI-TOF MS, Q-TOF, ESI MS 등의 다양한 기기들을 조합한 분석방법이 사용되고 있다. 암세포, 노화에 따른 단백질의 변화를 빠른 속도로 동정하여 생물정보학 (bioinformatics) 또한 proteome 연구에 있어서 중요한 역할을 한다.

제 3 장 사업(연구개발)수행 내용 및 결과

제 1 절 실험적 접근 방법

1. Hoechst staining: 세포(5×10^5)을 1000 rpm에서 원심 분리하여 5분간 모은 다음 4°C PBS로 두 번 수세 한 후 세포 수가 약 3×10^3 개 되도록 PBS로 희석하여 cytospin으로 cover glass에 고정 한 후 4% formalin/PBS로 5분간 다시 고정 시킨다. PBS로 세 번 수세 한 후, 0.15% Triton X-100/PBS로 세포막 투과성을 높인 후, 다시 PBS로 세 번 수세하고, Hoechst 33258 dye/PBS(1:200)로 10분간 염색하는 순서로 하여 형광 현미경으로 세포핵을 관찰하였다.

2. DNA fragmentation assay: 배양 세포로 부터 genomic DNA의 분리는 apoptosis가 유도된 세포를 수확하여 PBS에 수세한 후 원심분리 하여 pellet을 얻은 후 lysis buffer (1% NP-40 in 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, PH 7.5)에서 세포 추출물을 얻는다. 16000×g에서 원심분리 후 상등액을 얻어 추출을 반복하고 이 상등액에 1% SDS와 RNase에서 2시간 동안 56°C에서 반응시킨 후 proteinase K를 넣고 다시 37°C에서 반응 시킨다. 여기에 1/2 vol.의 10 M ammonium acetate와 2.5 vol.의 ethanol을 넣고 DNA를 침전시킨다. 침전된 DNA를 gel loading buffer에 녹인 후 1.5% agarose에서 전기영동하고 EtBr에 염색한 후 관찰하였다

3. Western blot analysis: 세포의 apoptosis에 따른 여러 가지 단백질의 양상을 알아보기 위해 각 시기에 따라 세포 추출물을 얻어, SDS가 함유된 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 실시한다. 전기영동 후 nitrocellulose filter에 90 V에서 1 시간 동안 transfer하고, 3% non-fat milk를 함유한 TBS로 blocking한 후, primary antibody와 secondary antibody를 각각 반응시키고 0.05% tween 20이 함유된 TBS로 세척한 후 ECL detection kit를 이용하여 X-ray film에 감광시킨다. 이때 사용한 primary antibody는 1:1,000, secondary antibody는 1:1,000 - 1:2,500 정도로 희석해서 사용하였다.

4. Flow cytometry 분석: 세포 (5×10^5 cells)을 1,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 모아 4°C의 PBS로 세 번 수세한 후 70% ethanol로 30 분간 고정 한 다음, 10 분간 1,000 rpm 에서 원심 분리한다. 다시 상층액을 버린 후 0.05 mg/ml의 propidium iodide/PBS로 염색하여 Flow Cytometer (FACS Cliber)로 20,000 개 세포의 염색된 DNA를 분석하였다.

5. 형광 현미경을 이용한 ROS의 측정: 세포 내 활성산소종의 농도는 oxidant-sensitive fluorescent probe인 DCFHDA를 이용해서 역상 현미경으로 측정하였다. 세포는 (1×10^6 cells/ml) 35 mm 배양조에서 배양액과 함께 배양하였다. 세포는 1% FBS/RPMI 1640 배지에서 16시간 동안 starvation을 실시한 후 각각의 시약을 처리하여 일정시간이 지난 후 5mM DCFHDA를 37°C에서 30분간 처리하였다. 그 후 PBS로 3번 수세하고 cytospin (Cytospin 3, Shandon, UK)을 이용하여 slide glass에 부착시킨 다음 역상 형광 현미경 (excitation, 488 nm; emission, 520 nm)을 이용하여 확인하였다.

6. Immunoprecipitation: 35 mm dish 당 100 μ l의 ice-cold RIPA buffer (50 mM Tris, pH8.0, 137 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, 15 μ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate)을 가하여 10 분간 반응시킨 후 세포층을 용해한다. 그 용액을 10,000 x g에서 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액과 50% Sepharose CL-4B/PBS, 50% protein A-sepharose CL-4B를 10:2:1의 비로 혼합하여 흔들며 주면서 30 분동안 반응시킨다. 다시 원심분리하여 비특이적으로 결합된 단백질을 제거해낸 후, 그 상층액에 최종농도가 100 μ g/ml 되도록 primary antibody를 가한 다음 1 시간 동안 흔들면서 반응시킨다. 다시 50% Protein A-Sepharose CL-4B를 넣고 30 분간 반응시킨 다음 원심분리한다. 이어서 면역침전물을 RIPA buffer로 수세하고 SDS-sample buffer를 넣어, 100 $^{\circ}$ C에서 가열한 다음 전기영동을 실시한다. 그리고 Western blotting하여 ECL detection kit로 해당 단백질을 확인하였다.

7. Immunocomplex kinase assay: 앞에서 언급한 immunoprecipitation 방법으로 면역침전물을 얻은 다음 RIPA buffer로 수세하고, kinase buffer (5 μ Ci [γ - 32 P]ATP, 50 μ M ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM Tris, pH 8.0)를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 20 분간 반응한다. 이때 첨가할 기질로는 MAP kinase일 경우는 0.3 mg/ml의 myelin basic protein을, Raf-1일 경우는 10 μ g의 HI histone을 넣어 반응한다. 반응 중단후 전기영동하고 autoradiography로 확인하거나 기질 band를 잘라 그 방사능을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

8. Ras activity assay: 먼저 배양된 세포를 PBS (pH 7.4)로 씻고 100 mm culture plate당 0.4-0.8ml정도의 Magnesium-containing Lysis Buffer (MLB) (25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5% Igepal CA-630, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin)을 넣어 cell을 lysis 시켰다. centrifugation후 protein을 얻어 정량한 후, 동일 volume의 lysate에 Raf-1 RBD를 첨가한다. 4 $^{\circ}$ C에서 30 min정도 반응시킨 후 14000xg에서 약 5초간 원심분리시킨 후 agarose bead를 모았다. 그리고 agarose bead를 MLB로 3번 정도 wash하여 준다. 여기에 2X Laemmli sample buffer를 첨가한 후 5분정도 boiling 시켰다. 모아진 beads의 supernatant를 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, nitrocellulose에 transfer시킨 다음, 3% nonfat dry milk로 1시간동안 반응시킨 후, anti-Ras를 가하여 1~2시간동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBST용액으로 10분씩 3차례 수세한 다음, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG를 secondary antibody로 반응시켰다. 이어서 ECL system으로 반응시킨 후 X-ray film상에서 단백질을 검증하였다.

9. Nuclear extract 제조 및 gel mobility shift assay : 배양 세포로부터 핵 분획의 제조는 먼저 세포를 수확한 다음 PBS로 씻고 10 mM Hepes (pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 300 mM sucrose, 0.1% NP-40 용액에 현탁하여 얼음에 5 분간 방치한다. Crude nuclear pellet을 원심분리한 다음 같은 완충용액에 100 mM KCl, 100 mM NaCl이 함유된 용액을 첨가하여 초음파 파쇄한 후, 다시 원심분리하여 nuclear extract를 얻는다. 여러 전사 조절 인자의 consensus double-stranded DNA를 방사능으로 표지하고, 0.5 μ g의 poly dI-dC와 5 μ g의 nuclear extract를 첨가하여 실온에서 20 분간 반응한다. 반응 시 transcriptional activator-consensus nucleotide나 monoclonal antibody를 첨가한 super-shift 방법으로 특이 반

응성의 유무를 확인한다. 반응 후 4% nondenaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하고 auto-radiography로 확인하였다.

10. 이차원 전기영동: 세포 침전물에 lysis buffer (9.5 M Urea, 0.2% CHAPS, 0.8% Ampholyte, protease inhibitor)를 넣자마자 바로 sonication한 다음 원심분리(15 min, 18-20°C, 14,000 g)하여 상등액을 취한다. IEF cell에 정량 값이 계산된 sample을 넣고 IPG strip을 얹은 다음 mineral oil을 넣는다. 12 시간 동안 rehydration한 다음 4,000 V 또는 8,000 V로 2시간 동안 전기영동한다. 전 step이 끝나면 strip을 equilibration buffer (1.5 M Tris-Cl (pH 8.8), 75% (W/W) glycerol, urea 288.28 g, SDS 16.0 g/1,000 ml)와 DTT (0.1 g/10 ml), IAA (0.25 g/10 ml)에 각각 차례대로 넣고 각각 30 분 동안 흔들어준다. 10-13% gel을 먼저 굳힌 다음 agarose (0.05 g agarose + bromophenol blue)를 넣고 strip을 얹는다. Running이 끝나면 gel을 silver staining 또는 Coomassie blue staining을 하여 spot을 확인하였다.

11. In-gel digestion and MALDI-TOF 분석: Coomassie blue로 염색된 gel을 2차 증류수에서 수세한 다음 Tip으로 spot을 올려내고 E-tube에 옮긴다. 50% (v/v) acetonitrile을 gel 조각들의 2배 부피가 되도록 넣고 15 분간 방치해 둔 다음 모든 liquid를 제거하고 gel pieces을 충분히 덮게 100% acetonitrile을 넣는다. 바로 gel 조각들이 흰색으로 변하면서 끈적끈적하게 되는데 이때 acetonitrile을 제거하고 0.1 M NH_4HCO_3 에서 5 분 동안 rehydration 한다. 같은 부피의 acetonitrile을 1:1이 되게 넣고 15 분 동안 incubation 한 다음 모든 liquid를 제거하고 Speedvac.에서 30 분 동안 말린다. Gel 조각들을 trypsin (50 ng/ μl)이 포함된 digestion buffer (5 mM CaCl_2 , 50 mM NH_4HCO_3)를 넣고 4°C에서 45 분 동안 incubation 한 다음 digestion buffer (trypsin이 없는 buffer)를 넣고 37°C에서 12 시간 동안 반응시킨다. Gel로부터 펩타이드의 추출하여 Speedvac.에서 완전히 말려진 펩타이드를 0.5% TFA 용액에 적당한 pipeting으로 녹인 다음 원심분리기로 spin down하고 이것과 50% acetonitrile, 0.5% TFA (500 μl)에 Matrix를 5 mg을 넣고 vortexing하고 1 분간 spin down 시킨 것을 새 tube에 넣고 적당히 섞어준다. Plate에 spotting한 다음 spot이 완전히 건조되면 분석하였다. 단백질 서열 homology는 ExPaSy(<http://www.expasy.ch>) site에서 pI와 분자량을 이용해 유사한 단백질들을 조사하였다.

제 2 절 연구내용 및 결과

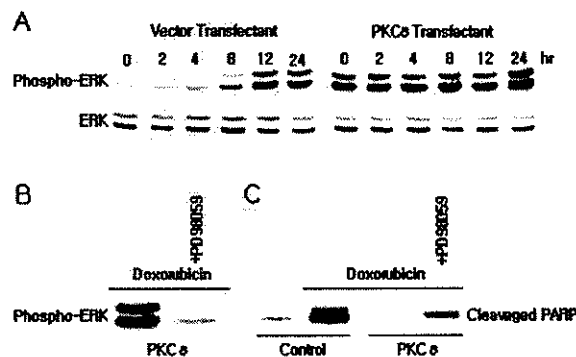
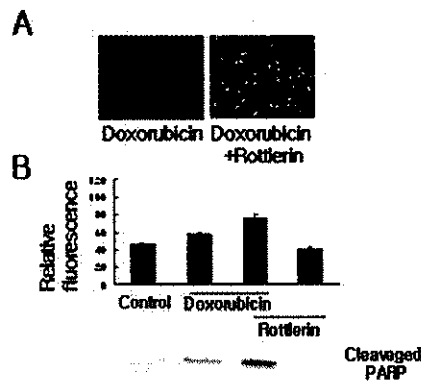
1. PKC에 의한 doxorubicin-유도성 세포사멸 억제

가. Protein kinase C delta transfectant cell에서 doxorubicin 유도성 세포사멸을 억제함을 확인하고 PKC downstream 신호 전달 경로를 조사하였다. PKC δ 가 과발현되어 있는 세포에서는 PKC δ 의 단백질 발현 정도와 인산화 정도가 정상 세포에 비해 높은 수준으로 존재하며 막으로의 translocation되어 있음을 확인하였다.

나. PKC δ 가 과발현된 세포에 doxorubicin과 PKC δ specific inhibitor인 rottlerin를 함께 처리한 후 세포 내 활성산소종의 생성을 확인한 결과 세포 내 활성산소종의 생성이 증가하는 결과를 얻었다. 또한 PKC δ 가 과발현된 세포에서 rottlerin에 의한 PKC δ 의 저해는 caspase-3의 기

질인 PARP의 p85 절편을 증가시켰다. 이러한 결과는 doxorubicin에 의한 세포사멸에 PKC δ 가 특이적으로 억제하는 기능을 가지는 것으로 사료된다.

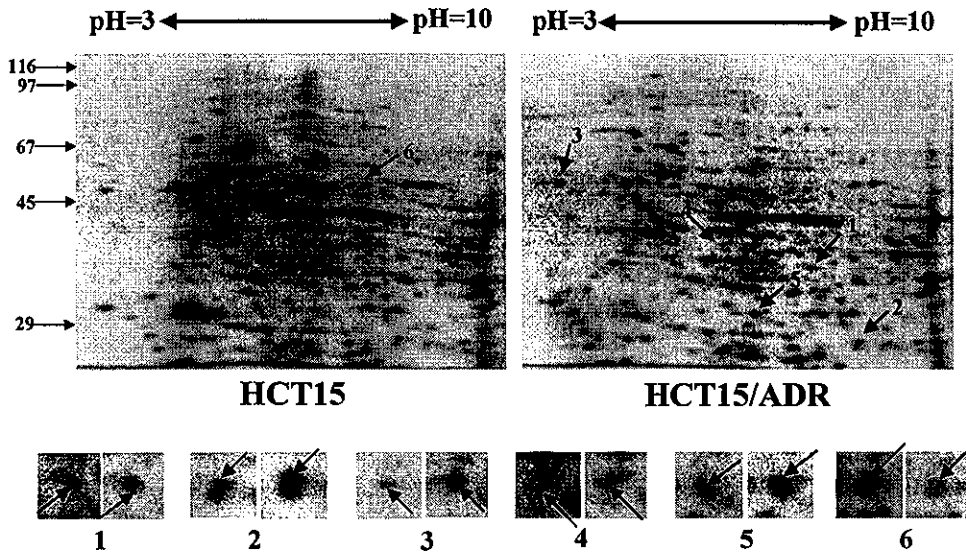
다. PKC δ 의 활성화는 다음 신호전달 경로인 ERK1/2의 활성을 유도하는 것으로 확인되었고, 그 upstream인 MEK kinase의 저해제인 PD98059를 처리하면 PKC δ 가 과발현된 세포에서 ERK의 활성을 저해시켰다. 이러한 결과로 PKC δ 의 과발현에 의해 유도된 ERK1/2의 인산화가 doxorubicin에 의해 유도되는 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 생각되어진다.



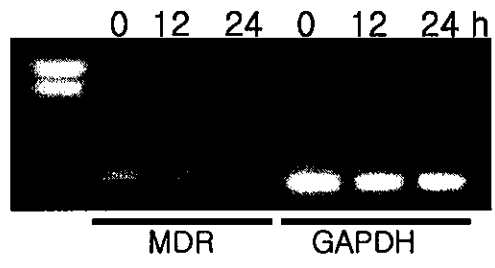
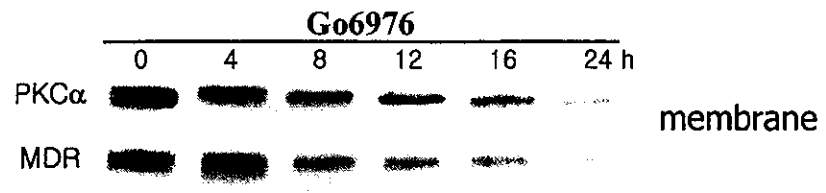
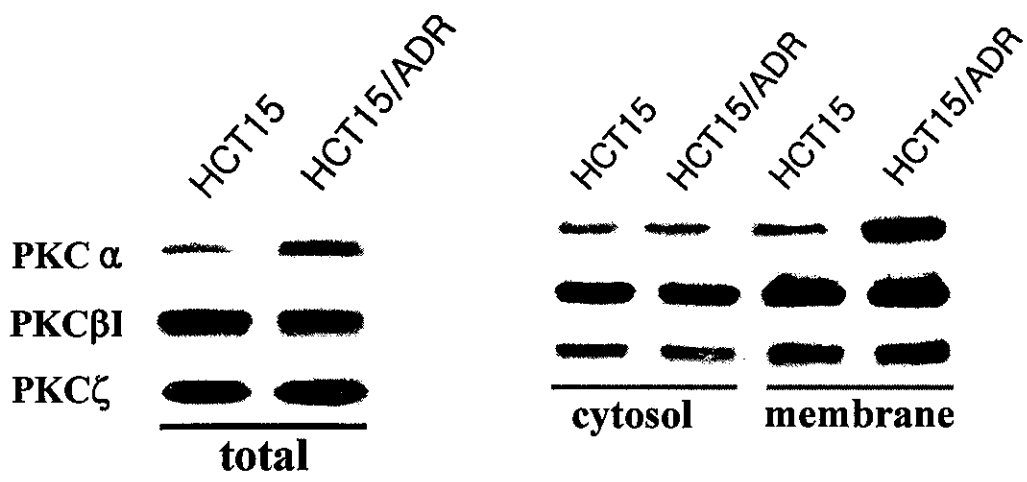
2. 다약제 내성 억제제 개발

가. 항암제 장기 투여 시 발생하는 약제내성에 새로운 억제제 개발 및 치료방법을 모색하고

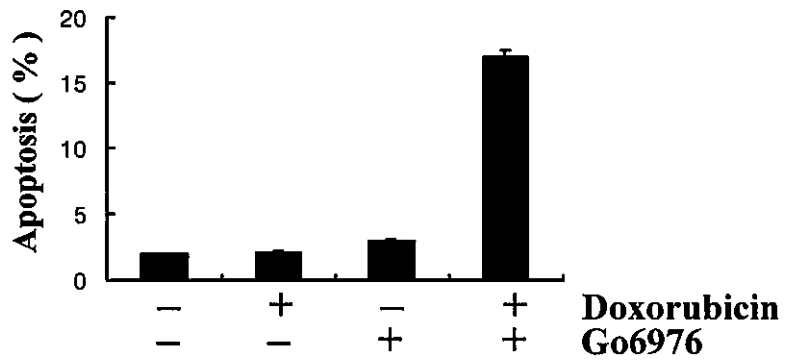
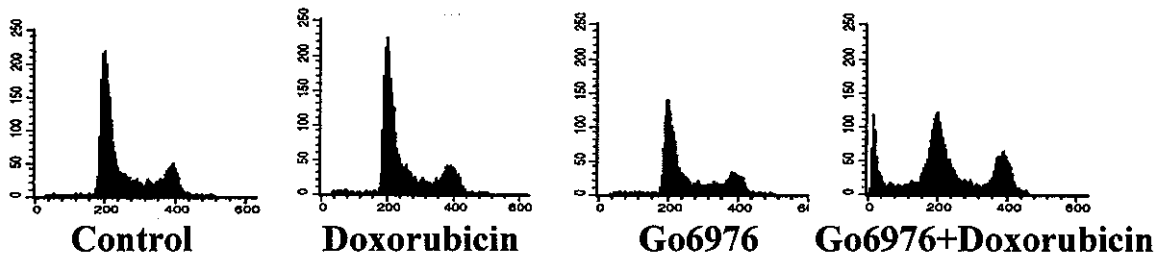
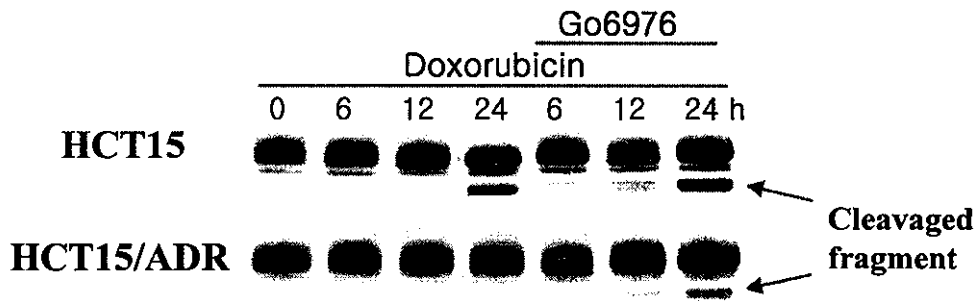
자, 먼저 결장암세포와 다약제내성(multidrug-resistant) 세포에서의 Proteomics를 통해 360개 단백질 동정하였다. 그중 특이적으로 10배 이상의 증감을 나타내는 단백질에 대한 기능적 연구를 수행 중에 있다.



나. HCT15(결장암) 세포와 HCT15/ADR 내성세포에서의 PKC 동위효소의 발현 양상을 알아본 결과, HCT15 세포주에서는 PKC- α , - β I, - ζ 가 발현되어 있었고, 내성 세포주에서는 PKC- β I 과 α PKC- ζ 의 발현에는 변화가 없었으나 cPKC- α 가 증가한 것을 확인하였고 세포의 막 분획에 현저히 높게 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 PKC- α 가 다약제 내성과 어떤 연관성이 있는지 알아보기 위하여 cPKC 저해제인 Go6976을 처리해 보았다. HCT15/ADR 세포에 Go6976을 시간별로 처리하여 PKC- α 를 저해시킨 경우 MDR1의 변화를 알아보았다. RT-PCR과 western blot을 수행한 결과, Go6976의 처리 후 MDR1이 시간이 지남에 따라 mRNA level과 protein level에서 모두 감소하였다



다. HCT15/ADR 세포에 PKC- α 의 활성을 저해시켰을 때 doxorubicin-induced apoptosis에 어떤 영향을 주는 지 알아보기 위해 Go6976을 1시간동안 전 처리한 후, doxorubicin을 처리해 보았다. 그 결과, 내성세포에서 PARP의 절단이 일어나는 것을 확인하였다. 또한, flow cytometry분석을 통해 apoptosis 비율을 확인한 결과에서도 PKC- α 저해시 doxorubicin에 의해 apoptosis가 일어나는 것을 확인할 수 있었다



제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여도

당해연구 연구목표	세부연구목표 (Activity/Task)	달성도 (%)
1. PGE2 억제제 처리에 따른 세포 사멸 유도 및 억제물질 가능성 검증	1. PGE2 inhibitor에 의한 세포사멸 억제 효과	100
	2. 다른 세포에 적용 가능성 타진 및 분석	
2. Phosphoprotein들의 proteome 분석 및 다약제내성 세포주에서 단백질체 분석	1. 발현변화 단백질들의 동정과 기능 분석	95
	2. 정상 및 약제내성세포간의 다른 단백질 동정	
3. PKCδ 억제제 효과 분석 및 약제내성단백질 억제물질 타당성 확인	1. Inhibitor에 의한 항암 효과 가능성 검증	100
	2. 약제내성 차단 후보물질 발굴 및 기능 분석	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

면역세포에서 활성산소종에 매개된 신호전달 경로와 세포사멸의 변환과 항산화물질의 세포사멸에 있어서의 조절기능을 규명함으로써 인류가 해결하고 있지 못하는 암, 노화에 따른 퇴행성질환들의 병인을 밝히는 기초적인 자료를 제공하여 궁극적으로 질병의 방지 및 치료법과 치료제의 개발을 유도할 수 있다.

T 세포에 의한 면역기능의 발현 및 조절기작의 이해 증대와 면역체계의 노화 기전 규명할 수 있다. 또한 면역체계의 노화방지 또는 노화된 면역체계의 노화 회복에 요구되는 새로운 의료기술 개발의 기초 정보 확립할 수 있을 것이다. T cells의 기능조절을 통한 면역제어 기술 및 T cells의 apoptosis 억제기술의 개발에 활용하며, 노인 인구의 vaccination 효과를 증진시킬 수 있는 방안을 모색함으로써 감염성 질환의 발병을 억제하고 건강유지를 위한 적극적 수단으로 활용한다.

궁극적으로 암, 노화 등 다양한 생명현상과 활성산소종에 의한 세포사멸 및 신호전달의 조절과 항산화물질의 역할을 규명함으로써 현대 인류의 최대 관심사인 암, 노화의 기작을 규명하는 기반연구로서 기여할 가능성이 높기에 지속적인 연구가 요망된다.

활용 유형	활용 내용
○ 타 연구과제에 연계	활성산소종이 세포사멸 및 노화의 한 요인으로서의 연관성을 확인하였고, proteomics 분석으로 세포 내 새로운 후보단백질을 동정하여 그 활용 여부를 검토할 수 있게 됨
○ 사업화 또는 기술이전	겸임연구원으로서 기초적인 연구를 바탕으로 연구원과 협조하여 특허 출원 및 기술이전 등 응용적인 활용 여부를 적극 추진 중

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생체대사는 산화환원과정의 연속이며 이 과정 중 산소를 필수적으로 요구하는 생물체에서는 superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen 등 활성산소종 (reactive oxygen species: ROS)의 발생이 필연적이다. 활성산소종은 정상대사 과정 중 산소의 90% 이상을 소비하는 미토콘드리아의 전자전달계에서 주로 발생되며 이러한 활성산소종은 세포사멸 (apoptosis) 뿐만 아니라, 암, 당뇨병, 관절염, 폐기종, 백내장, 동맥경화증 등 퇴행성 질병의 원인으로 알려져 노화와의 연관성도 대두되고 있다. 따라서 활성산소종에 대한 연구가 생명현상 전반에 걸쳐 연구가 이루어지고 있다.

제 7 장 참고문헌

- Babior BM (1992) The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 65:49-95.
- Brodie C, and Blumberg PM (2003) Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ . *Apoptosis* 8:19-27.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, and Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem. Rev.* 101:2449-2476.
- Ellis RE, Yuan J, and Horivitz HR (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663-698.
- Fadeel B, and Kagan VE (2003) Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species. *Redox Rep.* 8:143-150.
- Goodwin RG, and Smith CA (1998) The TRAIL of death. *Apoptosis* 3:83-88.
- Green DR, Droin N, and Pinkosk M (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* 193:70-81
- Green D, and Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: caspase or mitochondria? *Trends in Cell Biol.* 8:267-271.
- Hildeman DA, Mitchell T, Kappler J, and Marrack P (2003) T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* 111:575-587.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, and Woodgett JR (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
- Nebreda AR, and Porras A (2000) p38 kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem. Sci.* 25:257-260.
- Newton K, and Strasser A (2003) Caspase signal not only apoptosis but also antigen-induced activation in cells of the immune system. *Genes Dev.* 17:819-825.
- Nordberg J, and Arner ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.* 31:1287-1312.
- Robinson MJ, and Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:180-186.
- Shimizu T, Cao CX, Sho RG, and Pommier Y (1998) Lamin B phosphorylation by protein kinase C alpha and proteolysis during apoptosis in human leukemia HL60 cells. *J. Biol. Chem.* 273:8669-8674.
- Suzuki YJ, Forman HJ, and Sevenian A (1997) Oxidants as stimulator of signal transduction. *Free Rad. Biol. Med.* 22:269-285.
- Tanaka Y, Yoshihara K, Tsuyuki M, and Kamiya T (1994) Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL60 cells. *Exp. Cell Res.* 213:242-252.
- Thor H, Smith MT, Hartzell P, Bellomo G, Jewell SA, and Orrenius S (1982) The metabolism of menadione (2-methy-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study

of the implications of oxidative stress in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257:12419-12425.

Wang S, and El-Deiry WS (2003) TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22:8628-8633.

Wayand CM, Fulbright JW, and Goronzy JJ (2003) Immunosenescence, autoimmunity, and rheumatis arthritis. *Exp. Gerontol.* 38:833-841.

Yang SH, Sharrocks AD, and Whitmarsh AJ (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascade. *Gene.* 320:3-21.