

Tyrosine kinase를 경유한 ERK1/2의 활성화로 인한 TRAIL에 의해 유발된 HeLa 세포자멸사시 세포보호작용

노유현, 이명우, 김대성, 이도연, 김석원, 강용구,
손동섭, 박순철, 정윤희, 김경용, 김성수, 이원복
중앙대학교 의과대학 해부학 교실

간추림 : Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)는 암세포에서 세포자멸사를 유발시키는 세포의 신호전달을 가져오는 물질이다. TRAIL에 의한 세포자멸사 신호전달 체계를 규명하기 위하여 우리는 HeLa 세포를 사용해서 세포자멸사에서 ERK1/2의 역할을 알아보았다. 이 연구에서 우리는 TRAIL이 tyrosine kinase를 통해서 ERK1/2가 활성화 된다는 것을 밝혔다. 이것이 세포자멸사를 막아주는 Bcl-2 단백질의 양을 늘린다. Tyrosine kinase의 억제제인 genistein은 매우 극적으로 ERK1/2의 활성화정도를 막으며 또한 세포사멸도 증가시킨다. 더욱이 PD98059를 이용한 ERK1/2의 활성화를 억제한 결과 ERK1/2의 활성화와 Bcl-2 단백질의 양이 줄어들음을 통해서 세포자멸사가 증가되었다. 결과적으로 우리의 연구는 tyrosine kinase를 경유한 ERK1/2의 활성화가 TRAIL에 의한 세포자멸사 과정에서 Bcl-2의 양을 증가시킴으로써 세포내 방어 시스템의 세포보호 작용을 하게 된다는 것을 보여준 것이라 하겠다.

찾아보기 낱말 : TRAIL, ERK1/2, tyrosine kinase, Bcl-2 protein, 세포자멸사

서 론

Tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand(TRAIL)은 몇몇 세포주에서 세포자멸사를 일으킬 수 있는 TNF종류 중 하나이다(Wiley 등 1995, Pitti 등 1996). 그러나 TRAIL의 생리학적 기능은 아직 밝혀진 것이 없다. 이것은 일반 세포에서도 많이 발현되며 TNF 족의 다른 세포 독성 물질인 FasL과 높은 유사성을 가지고 있다(Wiley 등 1995, Pitti 등 1996). 또한 사람에서도 몇몇 TRAIL의 수용체가 관찰되었다. 이미 밝혀진 수용체로는 사멸 수용체 DR4 (TRAIL-R1)와 DR5 (TRAIL-R2) (Pan 등 1997a), 미끼 (decoy)수용체 DcR1 (TRAIL-R3)과

DcR2 (TRAIL-R4) (Pan 등 1997b) 그리고 osteo-protegerin (Emery 등, 1998)가 있다. 비록 TRAIL 분자적 신호전달 기작이 보고 된 것은 있지만 전반적인 신호 전달기작이 아직까지 많은 부분 밝혀지지 않았다.

MAP(Mitogen-activated protein) kinase는 포유동물세포에서 핵 효과기, tyrosine kinase 수용체 그리고 세포질에 G 단백질 연관 수용체에 의한 세포 외부 자극 신호를 변화시킨다(Schaeffer와 Weber 1999, Chang과 Karin 2001). 이런 내세포 중재자들은 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) 그리고 p38 MAP kinase 3종류로 나눌 수 있다. ERK1/2는 주로 세포 분열과 성장인자들과 관계가 있으며(Tsukada 등 2001), JNK와 p38 MAP kinase들은 스트레스와 사이토카인들에 의해 유발되며(Nagata와 Todokoro, 1999), 분화와 세포사와 관

*이 논문은 2004학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임

교신저자 : 이원복(중앙대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : whitefox@cau.ac.kr

련성 또한 보고 되었다. ERK1/2는 분명하게 다양한 세포 대사과정의 조절에 연관성이 있다. 예를 들어, ERK1/2는 UV에 의해 발생된 p53 인산화와 MPP⁺에 의해 유발된 신경 독성에서 중요한 역할을 나타내고 있다(She 등 2000). 또한 위의 결과와는 대조적으로 ERK1/2의 활성화는 신경성 P12 세포에서 세포 생존율을 높이며(Xia 등 1995), FGF-2에 의한 EKF1/2의 자극은 TNF-a에 의해 유발된 세포자멸사로부터 L929를 보호하는 것이 보고되었다(Gardner와 Johnson 1996). 또한 ERK1/2 활성화의 역할은 초기 세포자멸사를 유발하기에 충분하다고 보고되었다(Berra 등 1998). 비록 ERK1/2가 다양한 생리적 과정에서 관련이 있다는 보고들이 계속되고 있지만 TRAIL 신호전달 기작에서 그것의 생물학적 역할은 밝혀진 것이 없다.

ERK1/2의 하위 신호 전달 과정은 ribosomal S6 kinase (RSK)(Merienne 등 2000), ETS domain transcription factor Elk-1 (Tsai 등 2002) 그리고 anti-apoptotic Bcl-2 protein family (Desire 등 2000)을 경유한다. 선행된 연구에서는 ERK1/2 신호전달 과정이 Bcl-2, Bcl-XL의 발현을 유도하고 사람에서 이자 암세포의 생존율을 높인다(Boucher 등 2000). 증가된 Bcl-2 단백질의 양은 Bcl-2/Bax 이성결합과 관련이 있으며 Bax의 세포자멸사유도와 관련이 있다는 것을 드러내는 것이다. 더욱이, Bcl-2/Bcl-XL의 과발현은 방사선(Domen 등 1998), 세포독성 물질(Srivastava 등 1999), 성장억제 인자(Garland와 Halestrap 1997)와 p53(Park 등 2001) 등과 같은 다양한 인자들에서 세포를 보호할 수 있다. 또 다른 연구들은 Bcl-2 단백질 과발현이 TRAIL에 의해 유발된 세포자멸사 동안에 cytochrome c 분비억제를 경유해서 자멸사 보호 기능을 보고하고 있다(Sun 등 2001).

이번 연구에서 우리는 TRAIL에 의해 유도된 세포 사멸에서 ERK1/2의 역할을 밝히기 위해 실험을 진행했다. 우리의 결과는 tyrosine kinase에 의한 ERK1/2 활성화가 TRAIL을 처리한 HeLa 세포에서 Bcl-2 단백질 발현을 증가를 통해서 세포 보호 역할을 한다는 것을 밝혔다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

세포로는 사람의 자궁 암세포인 HeLa 세포를 사용하였다. 이 세포는 10% 가열 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 키웠다. 세포는 사람 TRAIL을 처리하기 2시간 전에 1% FBS가 첨가된 배양 배지로 옮겨 실험을 진행했다.

2. 세포 생존률

세포는 phenol red가 없는 10% FBS/DMEM배지 100 µL에 구역당 5 × 10⁴개로 96 well 배양접시에 24 시간동안 배양했다. 세포에 물질을 처리하기 두시간 전에 세포 배양 배지는 phenol red가 없는 1% FBS/DMEM 90 mL로 교체해주었다. TRAIL은 4 ng/µL로 처리하였으며 용액, Genistein (Calbiochem, San Diego, CA, USA), PD98059 (Calbiochem), G6976 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), or Calphostin C (Calbiochem)는 TRAIL을 처리하기 전에 두시간 전처리 하였다. TRAIL을 처리하기 2시간전에 10% Triton X-100의 10 µL은 대조군 세포에 처리되었다. 그리고 나서 세포들은 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT Sigma, St Louis, MO, USA) 10X solution (10 mg/mL)의 11 µL에서 4시간동안 처리되었다. 마지막으로 모든 배양액과 MTT용액은 제거되었고 세포와 결정화된 염료는 100% DMSO의 100 µL을 첨가해서 20분동안 흔들어서 완전히 용해 시켰다. 그리고 ELISA 측정기를 가지고 570 nm의 파장에서 측정했다. 10% Triton X-100을 가지고 대조군으로 사용하였다.

3. Western Blotting

Western blot 분석을 위해서 HeLa 세포는 phosphate-buffered saline을 가지고 씻어냈다. 그리고 세포를 모아서 저온 유지된 RIPA 완충액(1% Triton

X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 40 mM NaF, 5 mM EGTA, 0.2% SDS, 0.2 mM PMSF, 100 M Leupepsin)을 첨가해서 세포 용해를 진행했다. 세포 용해 물질은 10동안 4°C에서 15,800 g로 원심분리 되었다. 상층액을 얻어서 단백질을 정량법(Bio-Rad, CA, USA)을 사용하여 정량화했다. 전기영동을 위하여 단백질은 sample buffer (5% -mercaptoethanol, 15% glycerol, 3% SDS, 0.1 M Tris, pH 6.8)에 용해시키고 3분동안 끓여줬다. 그리고 나서 a 10% SDS gel에서 분리했다. 이렇게 분리된 단백질은 semidry trans-blot system (Schleicher & Schuell, Germany)를 사용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes로 옮겨줬다. 이렇게 옮겨진 단백질을 5% nonfat dry milk가 첨가된 Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl)로 차단했다. 그리고 TBS로 3회 수세후 3% nonfat dry milk가 첨가된 TBST (10 μM Tris, pH 7.5, 100

μM NaCl, 0.05% Tween 20)에 anti-ERK1/2, anti phospho-ERK1/2, anti-bcl2 protein, or anti-β-actin 항체 (1 : 1000 dilution) (Santa Cruz Biotech, CA, USA)를 첨가하여 실온에서 12시간 정도 반응 시켰다. 다음날 이것을 TBST에서 3회 수세한 후 다시 3% nonfat dry milk에 horseradish peroxidase-conjugated secondary 항체 (1 : 2000 dilution) (Santa Cruz Biotech)를 실온에서 2시간동안 반응 시켰다. 다시 TBST로 3회 수세후 단백질은 ECL 방법 (Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용해서 가시화했다. 이렇게 얻어진 결과로 단백질을 ensitometry (Vilber Lourmat, France)를 이용해서 ERK1/2 또는 β-actin의 띠를 분석해서 얻었다.

4. Hoechst 33258 Staining

HeLa 세포들은 20분동안 4% paraformaldehyde로

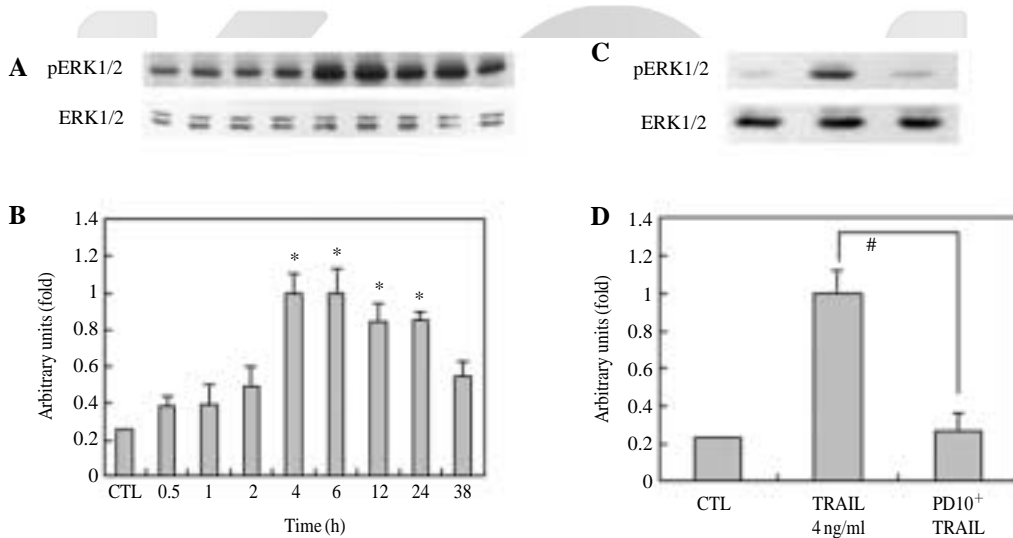


Fig. 1. Western blot analysis of ERK1/2 activation in TRAIL-treated HeLa cells. A, HeLa cells were untreated (CTL lane1) or treated with 4 ng/ml of TRAIL for 0.5 (lane2), 1 (lane3), 2 (lane4), 4 (lane5), 6 (lane6), 12 (lane7), 24 (lane8) and 36 h (lane9). B, Quantification of figure A results. C, HeLa cells were untreated (CTL lane1). Cells were left untreated (lane2) or incubated with either 10 M of PD98059 (lane3) for 2 h, followed by treatment with 4 ng/ml of TRAIL for 6 h. D, Quantification of figure C results. The phosphorylation state of ERK1/2 was detected by western blotting with a phospho-specific ERK1/2 antibody at indicated time points (pERK1/2). The same samples were probed with ERK1/2 antibody as a loading control (ERK1/2). Total levels of ERK1/2 were used as an internal standard in quantification of phosphorylated ERK1/2. The levels of ERK1/2 are expressed as arbitrary units of relative value. *, The difference from the cells incubated with vehicle alone was statistically significant ($p < 0.05$). #, The difference from the cells incubated with TRAIL alone or concurrent addition of PD98059 was statistically significant ($p < 0.05$).

고정하고 8 g/ml of Hoechst dye 33258 (Sigma, St Louis, MO, USA)로 5분동안 염색한다. 그리고 나서 PBS로 2회 수세후 형광 현미경 (Olympus IX 70, Tokyo, Japan)으로 관찰한다. 사멸한 세포와 자멸사한 세포는 핵의 응축이나 분절이 관찰된다.

5. 통계 분석

데이터는 평균과 표준편차로 나타냈다. 그룹간의 상관관계와 차이를 알아보기 위해서 *t* test를 이용하였다. $p < 0.05$ 이상일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다.

결 과

TRAIL은 HeLa 세포에서 세포 보호를 위한 신호 전달체로서의 ERK1/2를 활성화 시킨다.

TRAIL을 처리한 HeLa 세포에서 ERK1/2의 활성화를 확인하기 위하여 인산화된 ERK1/2의 발현정

도를 확인하였다. 그림 1A-B를 보면, TRAIL로 인해서 ERK1/2의 강한 활성화를 관찰했다. TRAIL을 처리한 HeLa 세포에서 ERK1/2의 활성화는 30분에서 증가되기 시작하였으며, 4~6시간에 가장 높은 활성화를 보였다. 그리고 6시간 이후에는 점차 감소하였다. 총 ERK1/2의 양은 TRAIL의 처리후 아무런 변화를 보이지 않았고 따라서 이것을 활성화된 ERK1/2를 정량화의 기준으로 사용하였다. MEK 억제자인 PD 98059 10 μ M을 처리했을 때, TRAIL에 의한 ERK1/2 활성화를 효과적으로 억제하였다(Fig 1C-D). 더욱이 TRAIL을 처리한 HeLa세포에서 ERK1/2가 어떤 역할을 하는지 알아보기 위해서 우리는 TRAIL에 의해 유발된 세포자멸사에서 ERK1/2의 효과를 억제한 실험을 진행했다. 그림 2-A에서 보는 것 처럼, PD98059 10 μ M을 처리했을 때 TRAIL만을 처리했을 때 보다 약 20% 정도 세포자멸사가 증가되었다. 게다가 PD98059를 처리해서 ERK1/2를 억제했을 때 TRAIL을 통한 핵응축과 세포 형태학적 변화가 더 뚜렷히 나타났다(Fig 2B-E). 이런 결과들은 TRAIL이 세포자멸사 과정에서

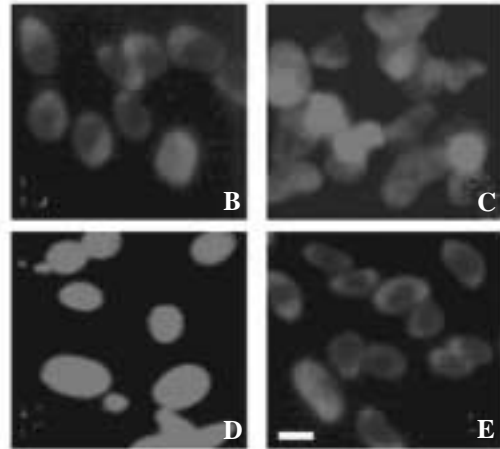
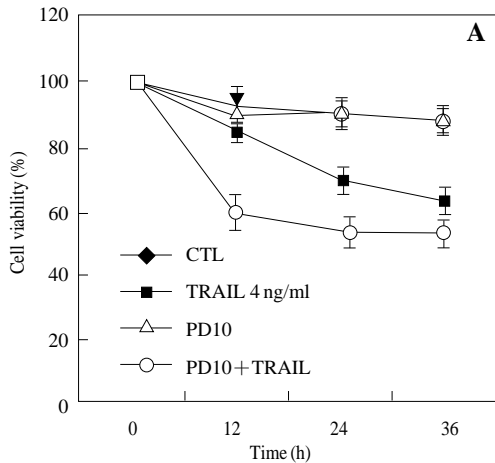


Fig. 2. Effect of PD98059 on TRAIL-induced apoptosis in HeLa cells. A, HeLa cells were pretreated with 10 mM of PD98059 for 2 h and then treated with 4 ng/ml of TRAIL. Cell viability was determined by MTT assay at indicated time points. Values, presented as percentage of control cells incubated with vehicle, are mean SEM of three separate experiments. CTL = control. HeLa cells were untreated (B) or treated (C) with 4 ng/ml of TRAIL for 24 h. Pretreatment of HeLa cells with 10 mM of PD98059 were treated (D) or either not treated (E) with 4 ng/ml of TRAIL for 24 h. The figures are shown that Hoechst 33258 stained nuclear morphology under inverted fluorescent microscope at a magnification of 200 (B, C, D, E). White scale bar = 5 mm. The figures are representative for four different experiments.

강하게 ERK1/2를 활성화하고 이것이 TRAIL과 같은 세포독성물질에 대한 보호작용을 하는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

TRAIL을 처리한 HeLa 세포에서 ERK1/2의 활성화는 tyrosine kinase에 의해서 조절되어진다.

ERK1.2의 활성화가 tyrosin kinase에 의해서 조절되어지는지 알아보기 위하여 우리는 tyrosine kinase 억제제를 사용하여 TRAIL에 의한 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다. 그림 3A-B에서 보는 것처럼 TRAIL에 의한 ERK1/2의 활성화는 tyrosine kinase 억제제인 Genistein (10 μM)의 처리에 의해서 약 40% 정도로 효과적으로 억제되었다. 더욱이 그림 2의 결과에서처럼 Genistein을 처리했을 때 TRAIL에 의한 세포자멸사 또한 효과적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 TRAIL에 의

해 유발된 세포자멸사는 G6976 또는 Calphostin C와 같은 Protein kinase C의 억제제의 전처리에 의해서는 아무런 영향이 없었다(Fig. 3C). 따라서 이 결과는 tyrosine kinase가 TRAIL에 의해 유발된 세포자멸사에서 ERK1/2를 활성화시킨다는 것을 제시하는 것이라 하겠다.

TRAIL의 신호전달 과정에서 ERK1/2의 활성화는 Bcl-2 단백질의 양을 조절한다.

TRAIL의 신호전달 기전에서 ERK1/2가 중요한 역할을 하고 있다는 것을 앞선 결과에서 보여주었다. 따라서 ERK1/2의 하위 신호전달 과정을 알아보기 위해서 우리는 Bcl-2 단백질 수준의 관련성을 알아보았다. 그림 4에서 보는 것처럼 12시간 이상 TRAIL을 처리했을 때 대조군과 비교했을 때 Bcl-2 단백질의 양이 약 30% 정도 증가했다. 또한 ERK1/2

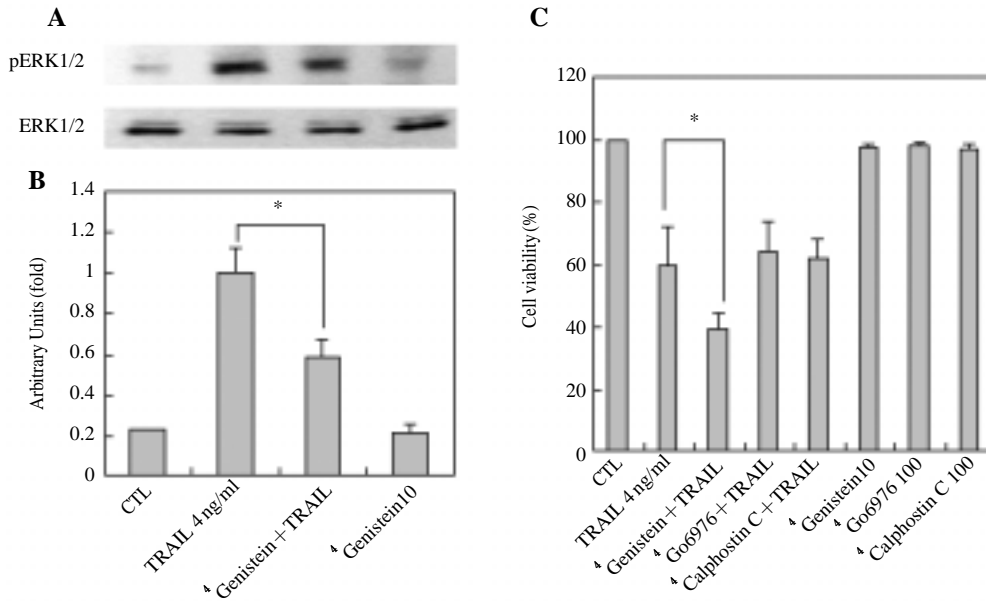


Fig. 3. ERK1/2 activation is mediated by tyrosine kinase in TRAIL signaling. A, HeLa cells were untreated (CTL lane1) or treated (lane2) with 4 ng/ml of TRAIL for 6 h. Cells were incubated with 10 M of Genistein for 2 h, followed by treatment with 4 ng/ml of TRAIL for 6 h (lane 3) or not treatment (lane 4). B, Quantification of figure A results. The phosphorylation state of ERK1/2 was detected by western blotting with a phospho-specific ERK1/2 antibody at 6 h (pERK1/2). The same samples were probed with ERK1/2 antibody as a loading control (ERK1/2). The levels of ERK1/2 are expressed as arbitrary units of relative value. C, HeLa cells were pretreated with 10 mM of Genistein, 100 nM of G6976, or 100 nM of Calphostin C for 2 h and then treated with 4 ng/ml of TRAIL for 24 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Values, presented as percentage of control cells incubated with vehicle, are mean SEM of three separate experiments. CTL = control. *: The difference from the cells incubated with TRAIL alone or concurrent addition of Genistein was statistically significant ($p < 0.05$).

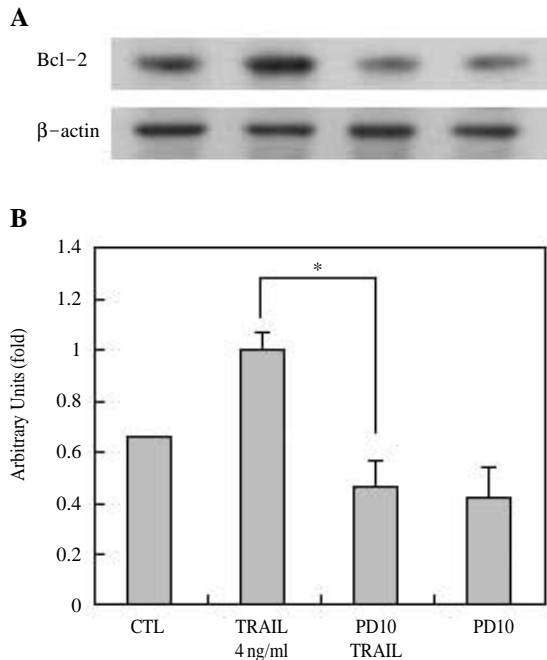


Fig. 4. Activated ERK1/2 regulates the levels of Bcl-2 protein in TRAIL signaling. A, HeLa cells were untreated (CTL lane1) or treated (lane2) with 4 ng/ml of TRAIL for 12 h. Cells were incubated with 10 M of PD98059 for 2 h, followed by treatment with 4 ng/ml of TRAIL for 12 h (lane3) or not treatment (lane4). The expression levels of Bcl-2 were detected by western blotting with a Bcl-2 antibody at 12 h (Bcl-2). The levels of b-actin were used as an internal standard in quantification of Bcl-2 (b-actin). B, Quantification of figure A results. The levels of Bcl-2 are expressed as arbitrary units of relative value. CTL = control. *, The difference from the cells incubated with TRAIL alone or concurrent addition of PD98059 was statistically significant ($p < 0.05$).

의 억제제인 PD98059를 처리했을 때 TRAIL에 의해 증가된 Bcl-2 단백질의 양이 감소하였다. 결과적으로 이것은 TRAIL의 신호전달 과정에서 ERK1/2의 활성화가 Bcl-2 단백질의 양을 증가시킨다는 것을 말해주는 것이다.

고찰

TRAIL은 정상세포가 아닌 암세포에서만 선택적

으로 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있기 때문에 유용한 암세포 치료제가 될 수 있는 잠재성을 보여준다(Walczak 등 1999). TRAIL 발견이후 생물학적 기능을 밝히기 위해 노력했지만 아직까지 분자수준의 작용에 대한 이해가 부족한 실정이다. 최근에 몇몇 보고에 따르면 TRAIL이 JNK (Muhlenbeck 등 1998)와 p38 MAP kinase (Lee 등 2002)와 같은 MAK kinase 경로를 활성화시킨다고 알려졌다. 이러한 경로는 스트레스 반응과 세포자멸사 같은 세포 활성화에 영향을 준다. 또한 다양한 요인에 의한 ERK1/2의 자극은 여러 세포의 생리작용의 조절에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Fas와 asbestos에 의해 유도되는 세포자멸사에서 ERK1/2가 세포자멸사를 유도하는 역할을 한다고 몇몇 보고 된바가 있으나(Goillot 등 1997, Jimenez 등 1997), 본 실험에서는 ERK1/2의 활성화가 TRAIL에 의해 유도된 세포독성 신호에 대해서 세포를 보호하는 것으로 나타났다. 본 실험결과와 마찬가지로 PC12세포에서 serum을 제거했을 때 유도되는 세포자멸사에서 ERK1/2가 세포보호효과의 기능을 나타냈다고 보고 된바 있고 (Kim 등 2000), Jurkat 세포에서 Fas에 의한 세포독성에서도 같은 결과가 보고 되었다(Wilson 등 1999). 더욱이, 본 실험 결과에서 TRAIL에 의해 유도된 ERK1/2의 활성화가 PD98059를 전처리 함으로써 억제되었는데 이는 TRAIL에 의해 유도된 세포자멸사의 증가와 관련이 있다. 따라서 이러한 결과는 HeLa 세포에서 TRAIL이 세포자멸사 과정에서 ERK1/2를 강하게 활성화시켰고, 이것은 TRAIL과 같은 세포독성 물질에 노출됨으로써 나타나는 방어 작용임을 보여주고 있다.

최근에 많은 연구에서 tyrosine kinase의 억제제가 여러 종류의 세포에서 세포자멸사를 유도한다고 보고 되고 있다. tyrosine kinase의 억제제가 자외선(Hiwasa 등 1999)이나 화학물질과 같은 자극에 의해서 시작되는 세포자멸사를 증가시킨다고 밝힌 바 있지만, 또한 growth-factor 의존 세포에서 단독으로 사용했을 경우에도 세포자멸사를 유도했다는 보고도 있다 (Otani 등 1993). 다른 연구에서는 genistein이 tyrosine kinase에 대해 강한 활성을 갖

는 천연 isoflavone 화합물이라고 밝히고 있고 (Papazisis 등 2000), tyrosine kinase가 G 단백질 결합 수용체와 ERK1/2간의 활성화 매개체로서 제시한 경우도 있다(Luttrell 등 1997). 이전 보고들과 마찬가지로 본 결과에서도 genistein을 갖는 tyrosine kinase를 억제했을 때 TRAIL에 의해 유도된 ERK1/2의 활성이 효과적으로 억제되었다. 또한, Genistein을 전처리했을때 HeLa세포에서 TRAIL에 의해 유도된 세포사멸이 상당히 증가되었다. 그러나, G6976나 calphostin 같은 ptein kinase C 억제제를 전처리했을 경우에는 TRAIL에 의한 세포사멸에 영향을 주지 못했다. 따라서 이러한 결과는 ERK1/2 활성화가 TRAIL에 의한 세포 독성 신호전달에서 상위단계 조절자로서 tyrosine kinase에 의해 조절 받고 있음을 보여주고 있다.

ERK1/2는 다양한 세포 상황에서 관련된 여러 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. ERK1/2가 작용하는 하위단계로 세포자멸사 억제성 Bcl-2 단백질군이라는 보고가 있고(Desire 등 2000) 또한, 이전 연구에 의하면 ERK1/2 신호 과정이 Bcl-2와 Bcl-XL의 발현을 조절하고 인간 이차 암세포의 생존을 증가시킨다고 알려져 있다(Boucher 등, 2000). 이전 보고와 마찬가지로 본 실험에서도 ERK1/2 활성을 억제했을 때 세포자멸사 억제성 Bcl-2 단백질군의 발현이 낮아지는 결과가 나타났다. Bcl-2와 Bcl-XL이 임파성 세포에서는 TRAIL에 의한 세포자멸사에 영향을 주지 않았지만 비임파성 암세포에서는 세포자멸사를 막거나 지연시킨다(Kasof 등 2001, Srivastava 2001). 또한 Bcl-2를 과발현시켰을 때 TRAIL에 의해서 사립체 관련 caspase 신호 변환 과정이 촉진되는 세포독성이 억제된다(Keogh 등 2000, Lee 등 2001). TRAIL에 의한 세포독성 신호는 사립체의 대사작용을 차단하고, 일련의 생화학적 과정의 균형을 깨뜨려서 결국에 세포자멸사를 유도한다. 그러나 TRAIL에 의한 세포독성 신호전달 과정에서 ERK1/2 활성화와 사립체와의 관계는 완전히 이해되는 것은 아니며 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

결과적으로 본 연구에서는 TRAIL에 의한 세포자멸사에서 tyrosine kinase신호 전달 과정을 경유하는

ERK1/2의 활성화가 Bcl-2 단백질의 과발현을 통해 세포 방어작용을 수행한다고 최초로 밝혔으며, TRAIL에 의한 세포자멸사의 과정중 세포내 방어기전을 이해함으로써 암세포 치료제의 가능성을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

- Berra E, Diaz-Meco MT, Moscat J : The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of Erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem.* 273 : 10792-10797, 1998.
- Boucher MJ, Morisset J, Vachon PH, Reed JC, Laine J, Rivard N : MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79 : 355-369, 2000.
- Chang L, Karin M : Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 : 37-40, 2001.
- Desire L, Courtois Y, Jeanny JC : Endogenous and exogenous fibroblast growth factor 2 support survival of chick retinal neurons by control of neuronal neuronal bcl-x(L) and bcl-2 expression through a fibroblast berowth factor receptor 1- and ERK-dependent pathway. *J Neurochem* 75 : 151-163, 2000.
- Domen J, Gandy KL, Weissman IL : Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* 91 : 2272-228, 1998.
- Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR : Osteoprotegerin is a receptor for the cyto-toxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273 : 14363-14367, 1998.
- Gardner AM, Johnson GL : Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271 : 14560-14566, 1996.
- Garland JM, Halestrap A : Energy metabolism during apoptosis, Bcl-2 promotes survival in hematopoietic cells induced to apoptose by growth factor withdrawal by

- stabilizing a form of metabolic arrest. *J Biol Chem* 272 : 4680-4688, 1997.
- Goillot E, Raingeaud J, Ranger A, Tepper RI, Davis RJ, Harlow E, Sanchez I : Mitogen-activated protein kinase-mediated Fas apoptotic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 3302-3307, 1997.
- Hiwasa T, Arase Y, Chen Z, Kita K, Umezawa K, Ito H, Suzuki N : Stimulation of ultraviolet-induced apoptosis of human fibroblast UVr-1 cells by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Lett* 444 : 173-176, 1999.
- Jimenez LA, Zanella C, Fung H, Janssen YM, Vacek P, Charland C, Goldberg J, Mossman BT : Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H₂O₂. *Am J Physiol* 273 : L1029-1035, 1997.
- Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, Gomes BC, Lorenzi MV : Tumor necrosis factor- α induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF- κ B. *Oncogene* 55 : 7965-7975, 2001.
- Keogh SA, Walczak H, Bouchier-Hayes L, Martin SJ : Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett* 471 : 93-98, 2000.
- Kim MS, So HS, Park JS, Lee KM, Moon BS, Lee HS, Kim TY, Moon SK, Park R : Hwansodan protects PC12 cells against serum-deprivation-induced apoptosis via a mechanism involving Ras and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway. *Gen Pharmacol* 34 : 227-235, 2000.
- Lee MW, Park SC, Yang YG, Yim SO, Chae HS, Bach JH, Lee HJ, Kim KY, Lee WB, Kim SS : The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett* 512 : 313-318, 2002.
- Lee YJ, Lee KH, Kim HR, Jessup JM, Seol DW, Kim TH, Billiar TR, Song YK : Sodium nitroprusside enhances TRAIL-induced apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in human colorectal carcinoma CX-1 cells. *Oncogene* 20 : 1476-1485, 2001.
- Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, Lefkowitz RJ : G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Src phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem* 272 : 31648-31656, 1997.
- Merienne K, Jacquot S, Zeniou M, Pannetier S, Sassone-Corsi P, Hanauer A : Activation of RSK by UV-light: phosphorylation dynamics and involvement of the MAPK pathway. *Oncogene* 19 : 4221-4229, 2000.
- Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P, Wajant H : TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 273 : 33091-33098, 1998.
- Nagata Y, Todokoro K : Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood* 94 : 853-863, 1999.
- Otani H, Erdos M, Leonard WJ : Tyrosine kinase(s) regulate apoptosis and bcl-2 expression in a growth factor-dependent cell line. *J Biol Chem* 268 : 22733-22736, 1993.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM : The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276 : 111-113, 1997a.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM : An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277 : 815-818, 1997b.
- Papazisis KT, Zambouli D, Kimoundri OT, Papadakis ES, Vala V, Geromichalos GD, Voyatzi S, Markala D, Des-touni E, Boutis L, Kortsaris AH : Protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, enhances apoptosis and cell cycle arrest in K562 cells treated with gamma-irradiation. *Cancer Lett* 160 : 107-113, 2000.
- Park SA, Park HJ, Lee BI, Ahn YH, Kim SU, Choi KS : Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated p53 accumulation in B104 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 93 : 18-26, 2001.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A : Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271 : 12687-12690, 1996.
- Schaeffer HJ, Weber MJ : Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19 : 2435-2444, 1999.
- She QB, Chen N, Dong Z : ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J Biol Chem* 275 : 20444-20449, 2000.
- Srivastava RK : TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and Clinical

- Applications in Cancer. *Neoplasia* 6 : 535-546, 2001.
- Srivastava RK, Sasaki CY, Hardwick JM, Longo DL : Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med* 190 : 253-265, 1999.
- Sun SY, Yue P, Zhou JY, Wang Y, Choi Kim HR, Lotan R, Wu GS : Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 280 : 788-797, 2001.
- Tsai EY, Falvo JV, Tsytsykova AV, Barczak AK, Reimold AM, Glimcher LH, Fenton MJ, Gordon DC, Dunn IF, Goldfeld AE : A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo. *Mol Cell Biol* 20 : 6084-6094, 2000.
- Tsukada Y, Miyazawa K, Kitamura N : High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biol Chem* 276 : 40968-40976, 2001.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH : Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5 : 157-163, 1999.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. : Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3 : 673-682, 1995.
- Wilson DJ, Alessandrini A, Budd RC : MEK1 activation rescues Jurkat T cells from Fas-induced apoptosis. *Cell. Immunol* 194 : 67-77, 1999.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME : Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270 : 1326-1331, 1995.

Abstract

The Activation of ERK1/2 Via Tyrosine Kinase Pathway Attenuates TRAIL-induced Apoptosis in HeLa cell

**Yoo-Hun Noh, Myoung-Woo Lee, Dea-Sung Kim, Do-Yeon Lee, Sug-Won Kim,
Yong-Koo Kang, Dong-Seup Sohn, Soon-Cheol Park, Yoon-Hee Chung,
Kyung-Yong Kim, Sung-Su Kim, Won-Bok Lee**

Department of Anatomy, College of Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) serves as an extracellular signal triggering apoptosis in tumor cells. To characterize the molecular events involved in TRAIL-induced apoptotic signaling, we investigated the role of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in the apoptosis using HeLa cells. Here we show that TRAIL pronounced ERK1/2 activation through a tyrosine kinase-dependent mechanism, subsequently elevated anti-apoptotic Bcl-2 protein levels. Pretreatment with Genistein, an inhibitor of tyrosine kinase, significantly attenuated ERK1/2 activation and enhanced cell death. Moreover, inhibition of ERK1/2 with PD98059 promoted apoptotic cell death through the down-regulation of ERK1/2 activity and Bcl-2 protein levels. Taken together, our results suggest that the activation of ERK1/2 via tyrosine kinase pathway plays a protective role as the mechanism of cellular defense through the up-regulation of Bcl-2 protein levels in TRAIL-induced apoptosis.

Key words : TRAIL, ERK1/2, Tyrosine kinase, Bcl-2 protein, Apoptosis.