

BH3 도메인이 없는 새로운 Bcl-2 단백질, Bak-like의 세포사멸의 유도

포천중문대학교 의과대학 신경외과학교실,¹ 생명과학대학원,² 연세대학교 의과대학 신경외과학교실³
안정용¹ · 김진경² · 정영선¹ · 정상섭¹ · 주진양³ · 이규성³

Induction of Apoptosis by a Novel Bcl-2 Protein, Bak-like without a BH3 Domain

Jung Yong Ahn, M.D.,¹ Jin Kyeoung Kim, Ph.D.,² Young Sun Chung, M.D.,¹
Sang Sup Chung, M.D.,¹ Jin Yang Joo, M.D.,³ Kyu Sung Lee, M.D.³

Department of Neurosurgery,¹ Bundang CHA Hospital, Pochon CHA Medical University, Seongnam, Korea
Graduate School of Life Science and Biotechnology,² College of Medicine,
Pochon CHA University, Seoul, Korea

Department of Neurosurgery,³ Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective : In a variety of physiologic settings, cells are eliminated by apoptosis, a genetically encoded process of cellular suicide. Bak, a member of the Bcl-2 protein family, accelerates apoptosis by an unknown mechanism. Here, we describe the identification and characterization of a complementary DNA that encodes a previously unknown Bcl-2 homologue designated Bak-like.

Methods : We identified a splicing variant of Bak with a lacked BH3 domain from human full-length cDNA bank. The expression of Bak-like was examined by northern blot analysis and polymerase chain reaction. To investigate whether Bak-like might arise from alternative splicing of mRNA of Bak, Southern blot analysis was executed. Apoptosis in transfected HeLa cells was analyzed by direct counting of viable cells. We examined the location of Bak-like in individual living cells by using EGFP fusion constructs and confocal microscope.

Results : Bak-like cDNA coded a protein consisting of 101 amino acid, and conserved BH1 and BH2 domains like Bak but not BH3 domain. Bak-like mRNA was about 2.4kb similar to bak. Bak-like was assumed to be an alternative splicing variant of Bak and to concern with promotion of apoptosis. GFP-bak-like markedly changed its intracellular distribution, relocating within cells during apoptosis from a diffuse to a punctate pattern.

Conclusion : Our results define a novel splicing form of the bak gene and demonstrate that this variant without a conserved BH3 domain appears to contain the BH1 and BH2 domains and the transmembrane sequence for apoptosis induction by channel-forming Bcl-2 proteins. Like Bak, Bak-like gene product primarily enhanced apoptotic cell death following an appropriate stimulus.

KEY WORDS : Apoptosis · Bcl-2 genes · Genetic variants.

서 론

개체는 자신을 구성하는 세포의 생존과 사멸의 균형을 통하여 건강한 상태를 유지하게 된다. 이러한 세포사멸(apoptosis)은 조직의 항상성(homeostasis), 태아 발생 및 면역 반응 등 정상

생리적 반응에 관여할 뿐 아니라 세포에 유해한 여러 자극(사망 신호, death signal)에 대한 반응으로도 나타난다²³⁾. 세포사멸을 유도하는 신호들은 많은 종류가 있으며, 사망 수용체(death receptor : Fas, TNF 수용체 등)의 자극, 성장인자 배제, 방사선 조사, 기타 유해한 화합물에의 노출 등이 대표적인 신호들이다.

역사적으로 Horvitz 등⁵⁾에 의해서 꼬마선충(C.elegance)의 세포사멸에 관여하는 유전자 연구가 진행되었고, 포유동물의 세포사멸을 조절하는데는 B cell lymphoma-2(Bcl-2)가 가장 먼저 발견되었다^{3,24)}. Bcl-2는 사람의 림프종의 발생과 밀접하게 관련된 유전자로서 단백질의 분자량은 26 kDa이며 미토콘드리아의 외막, 소포체나 핵막에 위치해 있다. Bcl-2가 발견된 이후에 최근 Bcl-2

• Received : July 28, 2003 • Accepted : September 16, 2003
• Address for reprints : Jung Yong Ahn, M.D., Department of Neurosurgery, Bundang CHA Hospital, Pochon CHA Medical University, 351 Yatap-dong, Bundang-gu, Seongnam 463-712, Korea
Tel : 031) 780-5263, Fax : 031) 780-5269
E-mail : jyahn@cha.ac.kr

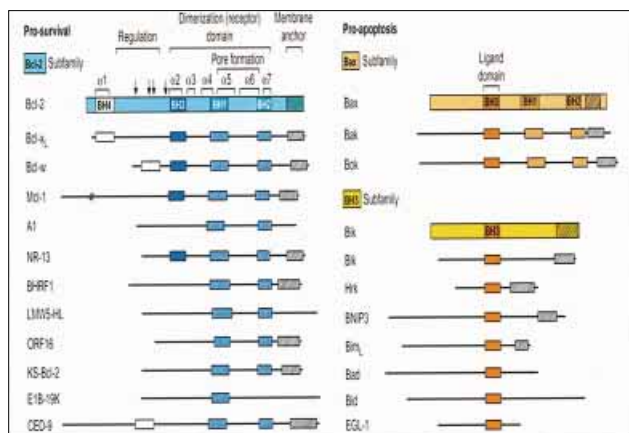


Fig. 1. Structure and function of Bcl-2 family members.

와 구조적으로 유사한 또 다른 많은 단백질들이 밝혀져 이제는 거대한 Bcl-2 가족을 구성해 가고 있다. Bcl-2 가족은 기능적인 면에서 크게 세포사멸을 억제하는 단백질과 세포사멸을 촉진하는 것으로 대별될 수 있다(Fig. 1). 세포사멸을 억제하는 단백질로는 Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, BHRF-1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2, E1B-19K, 및 CED 9 등이 알려져 있으며, 세포사멸을 촉진하는 단백질로는 Bax 가족과 BH3 가족으로 다시 나눌 수 있다^{2,7,11,16,18,27}. Bax 가족은 최초로 세포사멸 촉진 기능이 밝혀진 Bax를 비롯하여 Bak, Bok 등이 대표적이다. BH3 가족은 Bik, Blk, Hrk, BNIP3, BimL, Bad, Bid, 및 EGL-1 등으로 구성된다. 세포나 조직의 특이성 및 생명계 현상의 다양성을 고려해 볼 때에 앞으로 Bcl-2 가족을 구성하는 단백질의 수는 더욱 증가할 것으로 전망이 된다.

한편 1990년대에 들어와 파킨슨 병과 알츠하이머 병(Alzheimer's disease)을 비롯한 퇴행성 신경계 질환이나 허혈성 뇌졸중, 간질 등 많은 신경병리 상황에서 세포사멸이 기여한다는 것이 보고되기 시작하였다. 또한 암화 과정에서 증식과 세포사멸이 동시에 증가된 종양세포들 중에서 돌연변이로 인하여 세포사멸을 유발하는 신호가 사라지면 세포수의 증가는 기하급수적으로 늘어나게 된다. 즉 세포사멸을 억제시키는 유전자인 Bcl-2는 세포사멸의 빈도를 조절하여 암화 과정에 관여한다고 알려져 있다.

세포사멸의 기전을 연구 및 이해하는 것은 향후 이러한 병리 기전의 이해뿐만 아니라, 나아가서 유전자 치료, 새로운 암 치료제 개발에 많은 정보를 제공할 수 있다.

최근 신경 교종에서의 Bcl-2 가족 단백질의 발현과 종양 세포내 국재화에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다¹². 이러한 연구들은 암세포에 대한 화학요법 및 방사선 치료의 민감성을 극대화하여 암세포의 세포사멸을 최대화하는 바탕이 될 수 있다.

이에 저자들은 세포사멸을 촉진하는 역할을 하는 단백질 중 대표적인 Bak과 상동성(homology)을 보이는 Bak-like를 human full-length cDNA bank에서 동정하여, Bak-like가 세포사멸에 관여하는 역할과 세포하 국소화(subcellular localization)을 알아 보고자 한다.

대상 및 방법

염기 배열 결정

Bak과 상동성을 보이는 Bak-like의 플라스미드(plasmid) DNA를 primer cycle sequence kit(Perkin-Elmer, USA)로 반응시켰다. 반응물은 DNA sequencer(Perkin-Elmer Biosystems, model 377)를 이용하여 염기 배열을 결정하였다.

Northern blot 분석

Multiple Tissue Northern Blot filters(Clontech, USA)에 random primer labeling kit(Takara, Japan)으로 Bak-like를 ³²P로 표지하여 QuickHyb완충액(Clontech, USA)으로 50°C에서 하이브리드화하였다. 0.1×SSC, 0.05% SDS로 50°C에서 세척하여 X-ray필름으로 -80°C에서 12시간 처리하여 현상하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR의 주형은 대장, 난소, 말초혈액의 백혈구, 전립선, 소장, 비장, 고환, 흉선, 유방암(GI-101), 폐암(LX-1), 대장암(CX-1), 폐암(GI-117), 전립선암(PC3), 대장암(GI-112), 난소암(GI-102), 췌장암(GI-103)의 mRNA로 합성한 cDNAs(Clontech, USA)를 사용하였다. Bak-like의 시동체(primer)는 Bak과 상동성을 보이는 부위는 sense strand로 5'-TTTCGAGGACTTTTCT-3', antisense strand로 5'-GAGGGATTGCACAG-3'를 사용하였으며, 상동성을 보이는 않는 부위는 5'-GAGTATCCAAGGACT-3' 5'-GGAGAAACAAGGTGG-3'를 각각 사용하였다. 또한 Bak의 시동체는 ORF(open reading frame) 부위를 사용하였다. PCR은 PCR Reagent System(GIBCO BRL, USA)을 사용하여 94°C에서 45초, 55°C에서 30초, 72°C에서 90초간 30cycles로 반응시켰다.

Southern blot 분석

전혈의 게놈 DNA(Promega, USA) 유래의 게놈 DNA 10μg을 *SacI*, *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI*로 분해하고, 0.8% 아가로스겔 전기영동으로 분리한 다음, 나일론 막(Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech, Japan)상으로 전이시켰다. ³²P로 표지된

Induction of Apoptosis

210bp 단편(Bak의 뉴클레오티드 위치 335에서 544에 대응)과 267bp 단편(Bak-like의 뉴클레오티드 위치 91에서 375에 대응)을 사용하여 QuickHyb완충액(Clontech, USA)으로 60°C에서 하이브리드화하였다. 0.1×SSC, 0.05% SDS로 50°C에서 세척하여 X-ray필름으로 -80°C에서 24시간 처리하여 현상하였다.

세포의 생존율

10% 태내 송아지 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 돌베코 변형 이글 배지에 HeLa 세포(2×10^5 cells/well)를 준비하였다. Gene-PORTERTM(Gene Therapy Systems, USA)를 사용하여 각각의 유전자와 EGFP(enhanced green fluorescent protein)를 융합한 EGFP-융합유전자와 pCMV- β -gal 플라스미드를 형질 감염시켜 24시간 배양 후, β -galactosidase expression kit(Promega, USA)으로 측정하였다⁶⁾.

Confocal microscope

세포들을 5 μ g/ml poly-L-lysine으로 전처리한 1.5 μ m-thickness glass coverslips 위에서 상기와 같은 방법으로 감염시켰다. 24~48시간 후, 세포들을 30분 동안 20ng/ml of a mitochondrion-specific dye(Mitotracker Red CMXRos; Molecular Probes Inc., Eugene, OR)를 첨가, 배양한 후 현미경으로 관찰하였다. 전처리의 관찰이 끝난 후, 세포들은 1~3 μ M staurosporine(STS)를 첨가한 배지와 함께 sealed mounting chamber로 옮겼다. 영상은 현미경(model LSM 410 with a 40 \times 1.2NA Apochro-mat objective; Carl Zeiss, Thornwood, NY)로 관찰

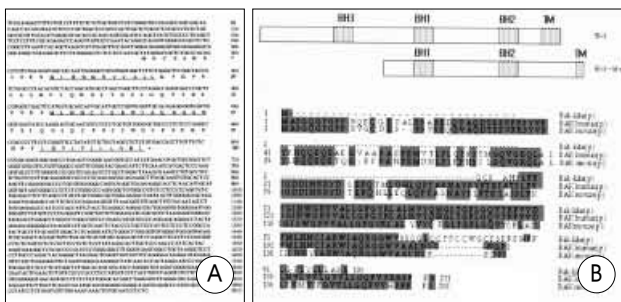


Fig. 2. Primary structure of Bak-like(A), and sequence comparisons with human and mouse Bak(for Bcl-2 homologous antagonist/killer) (B). Bak-like exhibits marked structural similarity to Bak, particularly in the BH1 and BH2 domains. Bak-like has 2022 mRNA coding 101 amino acids. The 358–544 bp region of Bak-like is Bak homologue. In amino-acid sequence, N-terminal consisting with 10 amino acids and C-terminal with 33 amino acids of Bak-like was Bak non-homologue, and BH1(12–22 amino acids), BH2(52–67 amino acids), and TM(91–101 amino acids) domains were found(Fig. 2A, underlined). There was no BH3 domain that might be necessary to induce an apoptosis in Bak-like.

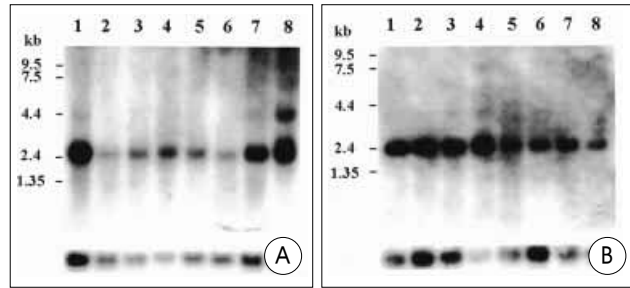


Fig. 3. Northern blot analysis of bak-like expression. A, Multiple tissue Northern blot (human cell line). Lanes: 1, promyelocytic leukemia HL-60; 2, HeLa cell S3; 3, chronic myelogenous leukaemia K562; 4, lymphoblastic leukemia MOLT-4; 5, Burkitt's lymphoma Raji; 6, colorectal adenocarcinoma SW480; 7, lung carcinoma A549; 8, melanoma G361. B, Multiple tissue Northern blot (human tissues). lanes: 1, spleen; 2, thymus; 3, prostate; 4, testis; 5, ovary; 6, small intestine; 7, colon; 8, peripheral blood leukocytes.

하였다. EGFP와 Mitotracker Red CMXRos의 형광은 각각 488- and 568-nm 크립톤/아르곤 레이저를 사용하였다. 표본의 온도는 air stream배양기에서 37°C로 유지하였다.

결 과

Bak-like의 염기 배열

인간의 cDNA 은행에서 Bak과 상동성을 보이는 새로운 클론을 발견하여 Bak-like로 명명하였다. Bak-like의 염기 배열을 결정 한 결과, 2022개의 염기들로 이루어진 mRNA로 구성되며, 101개의 아미노산을 부호화하였다(Fig. 2A).

또한 아미노산 배열에는 BH1(아미노산 12번에서 21번까지), BH2(아미노산 52번에서 67번까지), transmembrane region(TM: 아미노산 91번에서 101번까지) 영역이 존재하였다(Fig. 2B). BH3 영역은 관찰되지 않았다.

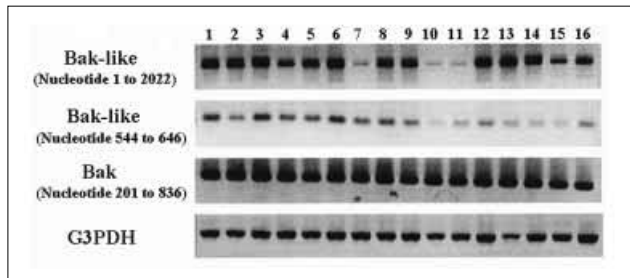


Fig. 4. Expression of bak-like and bak on a transcriptional level. Template cDNA libraries for PCR derived from: 1, colon; 2, ovary; 3, peripheral blood leukocytes; 4, prostate; 5, small intestine; 6, spleen; 7, testis; 8, thymus; 9, breast carcinoma(GI-101); 10, lung carcinoma(LX-1); 11, colon adenocarcinoma (CX-1); 12, lung carcinoma(GI-117); 13, prostatic adenocarcinoma(PC3); 14, colon Adenocarcinoma(GI-112); 15, ovarian carcinoma(GI-102); 16, pancreatic aden-ocarcinoma(GI-103).

Bak 유전자와의 상동성을 비교한 결과, Bak-like 유전자를 기준으로 358번에서 544번까지의 염기배열에는 상동성을 보였다. 그러나 N말단의 10개의 아미노산과 C말단의 33개의 아미노산은 Bak과 상동성을 보이지 않았다.

세포 내에서의 mRNA의 발현

Bak-like의 발현 양상을 규명하기 위하여, 정상 세포와 암 세포의 조직에서 추출한 mRNA를 전이시킨 나일론 막을 사용하여 Northern blot 분석을 시행하였다.

Bak-like는 Bak과 거의 동일한 mRNA의 길이(약 2.4kb)를 가지며, 거의 모든 정상 세포와 암 세포의 조직에서 발현되었다(Fig. 3). Bak-like가 cDNA library를 제작할 때 생긴 인공물이라는 추정을 배제하기 위하여, 정상 세포와 암 세포의 조직에서 추출한 mRNA로 제작한 cDNA library를 주형으로 사용하여 PCR을 시행하였다. Bak-like는 모든 정상 조직과 암 세포에서 발현되고 있었으며, Bak과는 약간 다른 발현의 차이를 보였다. 이러한 결과로부터 Bak-like는 cDNA library를 제작할 때 생긴 인공물이 아니라 세포 내에 발현하고 있다는 결론을 내릴 수 있다 (Fig. 4).

선택적 접목 변형체(alternative splicing variants)

Bak-like가 cDNA library를 제작할 때 생긴 인공물이 아니라는 사실로부터, Bak의 선택적 접목 변형체일 가능성이 대두되었다. 따라서 전혈의 게놈 DNA를 각각의 제한효소로 처리하여, Bak과 상동성을 보이는 뉴클레오티드 335번에서 544번까지 (Fig. 5A)와 Bak과 상동성을 보이지 않는 뉴클레오티드 91번에서 357번까지 (Fig. 5B)의 cDNA를 탐침으로 Southern blot 분석을 실시

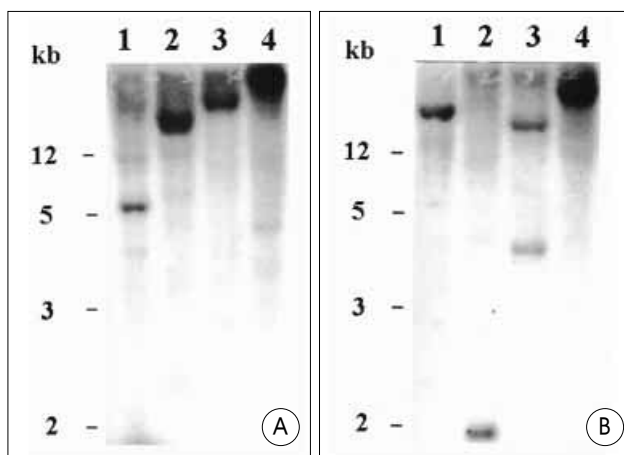


Fig. 5. Southern blot analysis. Human genomic DNA(10 μ g) was digested with the indicated restriction enzymes (lane 1 : Sac I, lane 2 : Hind III, lane 3 : Xba I, lane 4 : EcoR I) and probed with the 210bp cDNA fragment (bak nucleotide 335 to 544) (A) or a 267bp cDNA fragment (bak-like nucleotide 91 to 357) (B).

하였다. 두 분석에서 서로 다른 발현을 보이므로 Bak-like는 Bak의 선택적 접목 변형체일 것으로 추정되었다.

세포의 생존율

Bak-like는 Bak과 상동성을 보이며, 또한 선택적 접목 변형체이므로 세포사멸을 촉진시킬 것으로 예상되었다. 반면, 세포사멸의 촉진에 필수적이라고 알려진 BH3 영역이 존재하지 않기 때문에 그 역할을 단정할 수는 없었다. 세포사멸의 촉진 여부를 알기 위해 HeLa 세포를 사용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 그 결과, Bak-like는 BH3 영역이 존재하지 않음에도 불구하고, Bak 보다는 덜하지만, 세포사멸을 촉진한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 6).

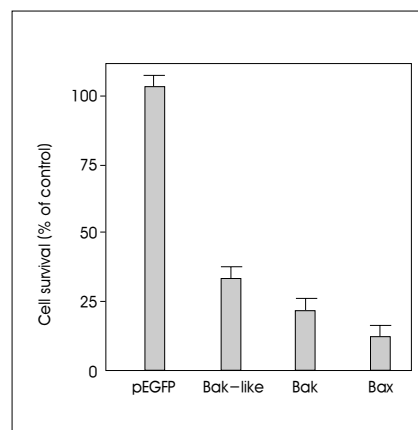


Fig. 6. Comparison between Bak, Bak-like, pEGFP, and Bax in apoptosis induction. Bak-like enhances apoptosis but less than the Bak despite the loss of the BH3 sequence.

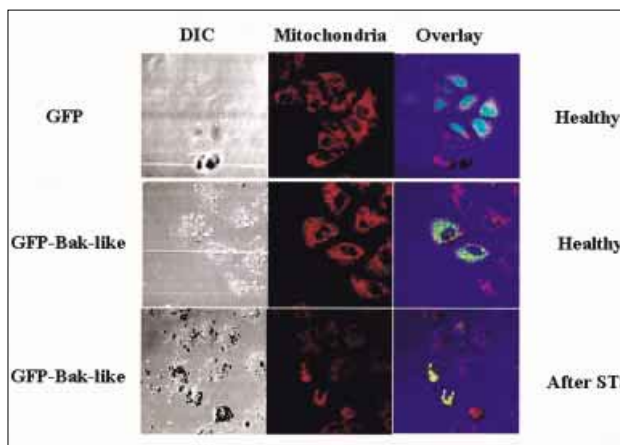


Fig. 7. Distribution of GFP-fusion proteins expressed in living HeLa cells, before and after STS treatment. At 24–48h after transfection, cells were examined by confocal microscopy. Each field was visualized by laser fluorescence to detect GFP and by DIC (differential interference contrast) to illustrate cell morphology. Native GFP distributes throughout healthy cells. EGFP-Bak-like displays a diffuse distribution throughout the cytosol in HeLa cells. However, upon induction of apoptosis with STS, EGFP-Bak-like redistribute into a punctate pattern colocalizing with mitochondria. STS-treated cells undergo cell shrinkage and blebbing of the cell membrane, a morphology indicative of apoptosis. EGFP-bak-like undergoes a change in its intracellular distribution, relocating within cells during apoptosis from a diffuse to a punctate pattern.

세포고사 동안 Bak-like의 세포내 이동

HeLa 세포에서 EGFP는 세포내를 꼭 채우며 광범위한 분포를 보였다.

반면, EGFP-Bak-like 융합체는 세포내의 세포질에만 광범위한 분포 양상을 보였다. STS로 세포고사를 유도시에, EGFP-Bak-like 융합체는 미토콘드리아 내에 점상 양상으로 재배치되었다(Fig. 7). 이러한 변화는 EGFP만 표지된 세포에서는 관찰되지 않았다. STS로 처리된 세포는 세포질의 용적이 줄어들면서 세포막에 돌기가 형성되어 형태적으로 세포사멸의 진행을 확인할 수 있었다.

고찰

Bcl-2 단백질들은 세포사멸에서 중추적인 조절 역할을 한다. 이들은 구성원 간이나 다른 종류의 단백질과의 물리적 결합이 다양하게 일어나고 있으며, 이와 같은 결합의 종류나 특성에 따라서 세포사멸 진행의 방향성이 조절된다. Bcl-2 가족간의 보존 부위인 Bcl-2 상동성 영역(homology domain) 1과 2(BH1, BH2)를 통해 결합(homo- 또는 heterodimerization)하여 세포의 생존이나 사멸을 최종적으로 결정한다고 알려져 있다^{13,18}. 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2나 Bcl-XL은 BH1과 BH2 부위를 통하여 Bax와 결합하며, 잉여의 Bcl-2간의 동형중합체(homodimer)를 형성하여 세포가 살아난다고 한다^{1,21,29}. 이들 단백질에 존재하는 상동성 영역은 현재까지 4개가 알려져 있으며(BH1, BH2, BH3 및 BH4), 상호간의 결합에 관여할 뿐만 아니라 소속 단백질의 기능을 결정하는 데에도 중요한 역할을 하고 있다 (Fig. 1)^{10,12,14,15,20,28}. 예를 들면, 세포사멸 억제 기능이 있는 모든 Bcl-2 가족 단백질은 BH4 부위가 있는 반면에 세포사멸을 촉진하는 단백질에는 이 부위가 존재하고 있지 않아, 이들이 다른 부류의 세포사멸 조절 단백질들과 반응함으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 보고 있다. 또한 세포사멸을 촉진시키는 Bcl-2 가족 단백질들에서는 BH-3 부위가 매우 중요하여, 이 부위를 세포사멸 억제 단백질의 부위와 교환할 경우에 세포사멸 억제 단백질은 정반대의 기능을 수행하는 것으로 밝혀져 있다. 세포사멸을 촉진하는 Bid나 Bad등 BH3 가족들은 BH1, BH2 및 BH4 영역은 존재하지 않고 BH3 영역만을 가지고 있어 이 부위가 세포사멸을 촉진하는 데에 매우 중요한 곳임을 알 수 있다. Bad는 BH3 영역을 통하여 Bcl-xL과 결합하여 세포사멸을 촉진시킨다^{9,30}. 그러나 항상 BH3 영역을 통하여 다른 Bcl-2 가족 단백질과 결합하여 세포사멸을 촉진하는 것은 아니다. BH3 돌연변이를 가진 Bid는 Bcl-2와 결합하는 능력은 없어도, Bax와 결합하여 세포사멸을 촉진하는 역할을 보유하고 있는 것으로 밝혀

졌다²⁵. 이러한 관찰들은 세포사멸을 유발하는 BH3 영역이 다른 여러 Bcl-2 가족 단백질들과 결합하여 다양한 경로로 최종적인 세포사멸을 유도하는 것을 암시한다.

Bak은 세 그룹에 의해 각각 다른 방법으로 동정되었다^{2,4,11}. Farrow 등⁴은 adenovirus의 유전자 산물로서 세포사멸을 억제시키는 E1B-19K 단백질과 결합하는 유전자를 분리하여 Bak이라 명명하였다. 다른 두 그룹은 Bcl-2 가족 유전자에 존재하는 BH1과 BH2에 대응하는 시동체를 이용하여 PCR로 증폭시켜 Bcl-2와 상동성을 보이는 클론을 선택하여 Bak을 동정하였다^{2,11}. Bak은 BH3 영역을 통하여 Bcl-2와 Bcl-xL가 결합하여 세포사멸을 촉진시키며, 대부분의 조직에서 발현한다^{16,21}. 본 연구에서는 human full-length cDNA bank⁸에서 Bak과 상동성을 보이는 Bak-like를 동정하였다. Bak의 선택적 접목 변형체인 Bak-like는 BH3 영역이 없으나, Bak과 마찬가지로 세포사멸을 촉진시키는 역할을 확인하였다. 또한 본 논문에서는 제시하지 않았지만, Yeast-two hybrid법을 이용하여 Bak과 Bak-like의 이량체 형성을 확인하였다. 그 결과, Bak-like는 BH1, BH2 영역이 존재하지만, Bak과 이량체를 형성하지 않았다. 그러므로 Bak-like는 세포사멸에 관여하는 기존의 유전자와 다른 기작으로 세포사멸을 촉진할 것으로 추정할 수 있다. Membrane anchor로 작용하는 소수성 C말단 TM 영역을 가지고 있기 때문에 미토콘드리아 외막에 직접적으로 작용할 가능성도 있다. 이러한 Bak-like의 세포사멸에 대한 작용 기전을 밝히기 위해서는 Bak-like와 결합하는 단백질 및 그 신호 전달체계에 대한 연구가 향후 필요하다.

본 연구에서는 정상세포에서 Bak-like의 존재 부위와 세포사멸 시의 Bak-like의 이동을 관찰하기 위하여 EGFP-Bak-like의 융합체를 사용하였다. 이러한 EGFP를 포함한 융합체는 단백질의 세포하 국소화를 연구하기 위해서 많이 사용되어져 왔다^{17,19,22,26}. 본 연구에서 Bak-like는 주로 세포질에 광범위하게 분포되어 있다가, 세포사멸이 진행되는 동안 매우 짧은 시간에 미토콘드리아로 점상 분포로 재배치되는 것을 관찰할 수 있었다. 세포사멸이 진행되는 동안 EGFP-Bak-like 융합체의 미토콘드리아내 염색은 EGFP-Bak-like 융합체가 미토콘드리아내 혹은 미토콘드리아 막에 부착된다는 것을 간접적으로 암시한다.

결론

본 연구에서 human full-length cDNA bank에서 Bak과 상동성을 보이는 Bak-like를 동정하였다. Bak-like는 BH1, BH2 영역을 가지고 있으며, BH3 영역이 없었다. BH3 영역이 없음에도 불구하고, Bak과 마찬가지로 세포사멸을 촉진시키는 역할

을 하였다. Bak-like는 세포 내에 광범위하게 분포하고 있었으며, 세포사멸시에 세포질에서 미토콘드리아로 재배치되었다. 향후 Bak-like와 결합하는 Bcl-2 가족 단백질 또는 기타 단백질에 대한 연구 및 그 신호 전달체계에 대한 연구가 필요하다.

본 연구는 뇌종양 및 퇴행성 신경질환의 발생 기전에 대한 이해를 증대시키고, 기존의 치료 및 새로운 치료에 대한 목표물이 될 수 있으리라 생각한다.

• Acknowledgement

이 논문 연구비는 과학기술부의 21세기 프론티어 연구 개발 사업의 연구비(grant SC 12010 from Stem Cell Research Center) 지원으로 이루어졌음.

References

- Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, et al : A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **EMBO J** **14** : 5589-5596, 1995
- Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, et al : Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. **Nature** **374** : 733-736, 1995
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J : Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14; 18) translocation. **Cell** **47** : 19-28, 1986
- Farrow SN, White JH, Martinou I, Raven T, Pun KT, Grinham CJ, et al : Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. **Nature** **374** : 731-733, 1995
- Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO : The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** **59** : 377-385, 1994
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ : Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. **Proc Natl Acad Sci USA** **94** : 12401-12406, 1997
- Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G : Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). **EMBO J** **16** : 1686-1694, 1997
- Kato S, Sekine S, Oh SW, Kim NS, Umezawa Y, Abe N, et al : Construction of a human full-length cDNA bank. **Gene** **150** : 243-250, 1994
- Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB : Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. **Mol Cell Biol** **17** : 7040-7046, 1997
- Kelekar A, Thompson CB : Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends Cell Biol** **8** : 324-330, 1998
- Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, et al : Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. **Nature** **374** : 736-739, 1995
- Kim MS, Kim TY, Park RK : Brain tumor and apoptosis. **J Korean Brain Tumor Soc** **1** : 7-15, 2002
- Knudson CM, Korsmeyer SJ : Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death. **Nat Genet** **16** : 358-363, 1997
- Kroemer G : The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Nat Med** **6** : 614-620, 1997
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA : Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today** **18** : 44-51, 1997
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al : Bim : a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. **EMBO J** **17** : 384-395, 1998
- Olson KR, McIntosh JR, Olmsted JB : Analysis of MAP 4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. **J Cell Biol** **130** : 639-650, 1995
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell** **74** : 609-619, 1993
- Pines J : GFP in mammalian cells. **Trends Genet** **11** : 326-327, 1995
- Reed JC : Double identity for proteins of the Bcl-2 family. **Nature** **387** : 773-776, 1997
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, et al : Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. **Proc Natl Acad Sci USA** **92** : 7834-7838, 1995
- Stauber R, Gaitanaris GA, Pavlakakis GN : Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions : Transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. **Virology** **213** : 439-449, 1995
- Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** **267** : 1456-1462, 1995
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM : Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science** **228** : 1440-1443, 1985
- Wang K, Yian XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ : BID : a novel BH3 domain-only death agonist. **Genes Dev** **10** : 2859-2869, 1996
- Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ : Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. **J Cell Biol** **139** : 1281-1292, 1997
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ : Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. **Cell** **80** : 285-291, 1995
- Yang E, Korsmeyer SJ : Molecular thanatopsis : a discourse on the BCL2 family and cell death. **Blood** **88** : 386-401, 1996
- Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ : BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature** **369** : 321-323, 1994
- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ : BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with Bcl-XL and pro-apoptotic activity. **J Biol Chem** **272** : 24101-24104, 1997