H19-7 세포주에서 etoposide에 의한 세포사멸시 immediate early gene cyr61의 발현경로

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 경 하

H19-7 세포주에서 etoposide에 의한 세포사멸시 immediate early gene cyr61의 발현경로

지도교수 백 자 현

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 5월 27일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 경 하

김경하의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 5월 27일

감사의 글

멋모르고 공부의 세계에 뛰어 들은 지 벌써 2년이 다되어 갑니다. 그 세월동안 서툴었지만 나름대로 했던 결과들이 작은 완성품이 되어 나가게 되었습니다.

진리 탐구가 어떠한 것인지를 잘 알게 해주셨고, 제가 앞으로 가야 할 길을 깨닫게 해주신 정광철 교수님께 감사 드립니다. 이 논문이 나가기까지 많은 조언과 충고를 해주셨던 안영수 교수님과 지도 교수님으로서 큰 힘이 되어주신 백자현 교수님께 감사 드립니다.

힘든 나날동안 저와 함께 고민해주고 격려 해 주었던 은진언니, 지영언니, 세정이, 정범오빠, 영규오빠, 재은이에게 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 또한 저의 많은 고민을 들어주고 힘이 되어 준 저의 친구들 혜경, 유진, 희, 종미, 승연이, 그리고 인숙 언니와 약리학 교실에 계신 모든 선생님들께도 고마운 마음 전하고 싶습니다.

마지막으로, 지금까지 저를 지켜봐 주시고 믿어주셨던 사랑하는 부모님과 동생 상훈이 그리고 외할머니께 이 논문을 바칩니다.

이곳에서 배운 가르침을 잊지 않고 열번 넘어져도 열두번은 일어설 수 있는 오뚝이가 되어 더 큰 세상으로의 한 발을 내딛겠습니다.

2002. 5.

목차

그림 차례

국문요약

H19-7 세포주에서 etoposide에 의한 세포사멸시 immediate early gene cyr61의 발현경로

cyr61은 serum, bFGF, 또는 PDGF 같은 여러 성장 인자들에 의해서 수분 내에 일시적으로 발현되는 immediate early gene (IEG) 중의 하나이다. Cyr61 단백은 세포 밖으로 분비되어 extracellular matrix와 결합하며, 세포 부착, 이동, 그리고 혈관형성에 관여한다고 알려져 있다. cyr61 promoter의 –2 kb 위쪽에는 전사 조절 인자인 Serum Response Factor (SRF)가 결합하는 Serum Response Element (SRE) motif가 존재하는데 여러 mitogen에 의한 cyr61 전사에 SRE 부위가 중추적인 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. cyr61과 유사하게 mitogen 자극에 의해 빠르고 일시적으로 전사되는 c-fos의 경우 그것의 promoter에 SRE가 존재하고 여기에 결합하는 SRF는 MAP kinase superfamily 중 세포 생존 및 사멸 신호를 매개하는 것으로 알려진 p38 kinase의 하위에 존재하는 MAPKAP kinase 2에 의해 인산화 되는 것이 최근 알려졌다. 세포 사멸 유도는 JNK나 p38 kinase의 활성화에 상관없이 이루어 진다는 몇몇 보고가 있지만, JNK나 p38 kinase의 활성화가 세포 사멸 시 활성화되는 것으로 많이 보고 되었다. 이러한 사실들을 바탕으로 하여 IEG cyr61이 etoposide, NMDA, glutamate의 독성으로 인하여 세포 사멸 유도 시 발현되는지를 관찰했으며, 이러한 독성 물질들을 처리했을 때 cyr61 발현에 관여하는 하위 신호전달 경로를 알아보았다. 먼저 위의 여러 독성 물질들을 처리하였을 때 흰쥐 해마세포에서 유래된 신경선조 세포주 (H19-7)에서 cyr61이 발현됨을 확인했다. 이를 더 자세히 분석하기 위해 etoposide를 H19-7 세포주에 처리하여 세포 사멸을 일으켰고, 이 때 cyr61의 mRNA 수준, promoter의 CAT 활성도, Cyr61 단백 발현 정도가 모두 증가함을 관찰 하였다. 이러한 cyr61의 발현 경로는 p38 kinase나 ERK가 아닌 JNK

활성을 통해 이루어짐을 RT-PCR과 Northern blot으로 관찰하였다. 4가지의 cyr61 deletion promoter construct (p1763cyr61/CAT, pΔBglⅡcyr61/CAT, p529cyr61/CAT, p529CArGcyr61/CAT)의 CAT 활성도 측정을 통해서 etoposide에 의한 세포 사멸시 cyr61의 발현이 SRE에 의해서 매개된다는 것을 알았다. 또한 SRE에 결합하는 것으로 알려진 SRF는 etoposide를 처리 했을 때 활성화되는 JNK에 의해 직접적으로 인산화 됨을 *in vitro* kinase assay를 통해서 확인할 수 있었다.

이상의 결과에서 immediate early gene cyr61이 세포 사멸과정에서 JNK 경로를 통하여 발현이 되며, cyr61 promoter 부위에 위치한 SRE가 발현에 중요한 역할을 할 뿐만이 아니라, 합성된 Cyr61 단백이 세포 밖으로 분비됨을 확인하였다.

핵심되는 말: cyr61, IEG, JNK, SRE, SRF, secreted protein

H19-7 세포주에서 etoposide에 의한 세포 사멸시 immediate early gene cyr61의 발현경로

<지도교수 백자현>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 경 하

Ⅰ. 서 론

Immediate early gene (IEG)은 serum, bFGF, PDGF, TGF-β 등의 외부자극에 의해 빠르고 일시적으로 활성화되는 특징을 나타내는 유전자이다.[1] IEG 중에서 섬유아세포에서 성장 및 분화를 조절하는 여러 유전자들이 발견되었다.[1] 이들 중 일부는 cysteine이 많이 존재하며, 세포 밖으로 분비되는 성장 조절 단백으로서 extracellular matrix (ECM)와 세포 표면에 결합하는 특성을 가지며 세포 부착, 이동, 증식, 분화 같은 복잡한 생물학적 과정에 관여한다.[2] 이러한 유전자 집합체를 CCN 유전자 집합체라고 하며 Cyr61 (cysteine-rich protein 61), CTGF (connective tissue growth factor), Nov (nephroblastoma overexpressed)가 현재 가장 많이 연구되고 있는 것들이며, 그밖에 Elm-1, rCOP-1 그리고 WISP-3 등이 있다.[3,4,5,6] 이들 단백의 특징은 IGF binding

module, von Willebrand Factor type C repeat, thrombospondin type 1 repeat 그리고 C-terminal cysteine knot motif 같은 부위를 공통적으로 포함하고 있다.[2,6,7,8] 사람의 CTGF는 transforming growth factor beta (TGF-β)에 의해 섬유아세포에서 분비되며, 결합 조직 세포의 분화와 extracellular matrix 합성을 향상시킨다. Nov는 바이러스에 의해 유도된 조류의 신아세포종에서 처음으로 발견되었다.[6]

본 과제에서 연구하고자 하는 cyr61은 쥐의 3T3 섬유아세포에서 성장 인자에 의해서 유도되며,[1,3,9] mRNA 수준은 혈청과 성장 인자에 의해 수분 내에 증가된다.[6,10] Cyr61 단백은 세포 밖으로 분비되어 ECM, 세포 표면,[11,12] 및 heparin과 결합하며[3,6,8] 379 개의 아미노산 중[11] N 말단의 24 아미노산이 분비에 관여하는 signal peptide라고 추정하고 있다.[3] 최근 mouse와 91%의 상동성을 갖는 human Cyr61이 밝혀졌는데 mouse Cyr61처럼 bFGF에 의해 분화 효과를 나타내며, 혈관형성을 촉진하고 종양 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다.[6] Cyr61은 세포 부착, 화학 주성, DNA 합성, 세포 생존에 관여하며 in vivo에서 혈관형성을 유도한다고 알려져 있다.[6,13] Cyr61의 세포 부착 기전은 최근 integrin $\alpha_v\beta_3$와의 결합을 통해 이루어진다는 것이 보고되었다.[6] 혈관형성은 기존의 혈관에서 새로운 혈관을 형성하는 것으로서 최근에는 Cyr61의 혈관형성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 혈관형성을 억제하게 되면 종양의 성장이 눈에 띄게 억제되므로 종양 치료에서도 주목 받고 있다.[13]

cyr61의 promoter에 존재하는 Serum Response Element (SRE)는 IEG인 c-fos의 promoter에서 최초로 발견되었는데, 성장 인자, cytokine 혹은 MAP kinase 경로를 활성화하는 세포 외부 자극에 의해서 c-fos를 유도하는 데에 관여한다.[9,14] c-fos의 SRE는 CArG로 알려져 있는 핵심 부위와 그 앞부분에 Ets 부분으로 구성되어 있으며 CArG의 배열은 $CC(A/T)_6GG$로 되어있다.[9,15] SRE에는 Serum Response Factor (SRF)와 Ternary Complex Factor (TCF)가 결합하는데 CArG 부위에는 SRF가 dimmer를 형성하여 결합하게 되고 이것은 앞부분에 존재하는 Ets 부위에 TCF가 결합 할 수 있도록 한다.[16,17,18] c-fos의 SRF는 여러

kinase들에 의해서 인산화 되는 것이 밝혀졌다. Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ, Ⅳ (CaM kinase Ⅱ, Ⅳ)는 SRF의 Ser-103을 인산화하고,[15,19] 그 중 CaM kinaseⅡ는 또한 Thr-160을 인산화 시키며,[19] p38 kinase의 하부에 존재하는 MAPKAP kinase2 (MK2)는 SRF의 Ser-103번을 인산화 하는 것이 최근 알려졌다.[15]

cyr61에 존재하는 SRE는 c-fos와 달리 Ets가 없고 CArG 부위만이 존재한다. 여기에 결합하는 SRF를 인산화 할 수 있는 kinase로서 p38 kinase의 하위에 존재하는 MK2가 있는데 p38 kinase나 JNK는 세포 사멸 유도시 이들의 활성화에 상관없이 나타난다는 몇몇 보고도 있으나,[27,28] JNK나 p38 활성화가 높은 수준에서는 많은 예에서 apoptosis를 유발하는데 관여한다고 알려져 있다.[18,29-32] 이러한 점들을 고려해 볼 때 cyr61 유전자가 독성 자극에 의한 세포 사멸 시 발현되며, 스트레스 자극에 의해서 활성화되는 p38 kinase가 SRF를 인산화 하여 cyr61 유전자 발현에 관여할 가능성을 추정할 수 있다. 현재까지 cyr61이 세포 사멸에 관여한다는 보고는 없지만, 이러한 선행 보고들을 바탕으로 하여 본 연구에서는 H19-7 세포에서 cyr61이 발현되는 것을 확인하였으며, 세포 독성을 유발하는 물질들에 의한 신경 세포 사멸 유도 시 cyr61의 발현 경로를 분석해 보았다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), Fetal bovine serum (FBS), LipofectAMINE reagents, Trizol reagent, SuperScript^{TM}Ⅱ ReverseTranscriptase, random hexa primer, methionine-free DMEM 들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Etoposide, NMDA, glutamate 들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. U0126과 phospho-JNK 항체, phospho-ERK 항체는 New England Biolabs (Beverly, MA, USA), phospho-p38 항체는 Santa Cruz (Delaware, CA, USA), SB203580은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 각각 구입하였다. Protein A-Sepharose, glutathione-Sepharose 4B, nylon membranes (Hybond-N^{+}), rediprime^{TM}Ⅱ kit, [α-^{32}P]dCTP, enhanced chemiluminescence (ECL) kit는 Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA)에서 구입했다. cyr61 promoter에 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene이 결합된 construct (p1700cyr61/CAT, pΔBglⅡcyr61/CAT, p529cyr61/CAT, p529CarGcyr61/CAT)들은 L.F. Lau (University of Illinois College of Medicine, Chicago, Illinois, USA)에게 받았다. Reporter gene CAT의 활성도는 enzyme-linked immunosorbent CAT assay kit을 Roche (Basel, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다. SRF를 glutathione-S-transferase를 발현시킬 수 있는 pGEX vector에 결합시킨 3가지 construct는 SRF 아미노산 1번부터 508번까지의 full length를 결합시킨 것, 아미노기 부분인 1번부터 140번까지 결합시킨 것, 그리고 카르복실기인 198번부터 508번까지 결합시킨 것 (pGST-SRF1-508,

pGST - SRF1 - 140, pGST - SRF198 - 508)들이며, K. Sobue (Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan)에게 공급 받았다.

2. 세포 배양과 transfection

H19 - 7 세포는 흰쥐 태아의 해마 신경 세포에서 유래되었으며 배양온도에 따라 성장과 분화가 특이적으로 발생하게끔 되어있는 세포로서 33℃에서 EGF에 의해 성장이 유도되며, 39℃에서 FGF에 의해 분화가 유도된다. 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM에서 배양하였다. Transient transfection은 LipofectAMINE reagent를 이용하여 수행하였다. pCAT - Basic vector에 결합되어있는 여러 종류의 mutant cyr61 promoter DNA들을 transfection 하였고, 각 MAP kinase 경로를 억제하기 위해 etoposide를 처리하기 전에 p38 kinase 억제제인 SB203580을 30 M, ERK 억제제인 U0126을 10 M로 1시간 동안 전처리 하였다. JNK 경로를 억제 시키기 위해 인산화 활성도를 없앤 MEKK를 발현하는 expression vector를 transfection 하였다.

3. RNA 추출과 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT - PCR)

Total RNA는 Trizol reagent를 이용하여 H19 - 7 세포에서 뽑았으며, - 70℃에서 보관하였다. Spectrophotometer로 정량하여 2 μg의 total RNA로부터 random hexa primer와 SuperScript™ II ReverseTranscriptase를 사용하여 cDNA를 만든 뒤에 cyr61 primer를 이용하여 증폭하였다. 94℃에서 3분간 초기 변성을 하고, 증폭 반응은 94℃ 30초, 68℃ 1분, 72℃ 2분으로 25 cycle을 수행하였으며, 최종 안정화 반응은 72℃ 10분으로 하였다. 동량의 조건은 β - actin으로 확인하였다. 사용한 cyr61 5'primer는 AGA GTG CCG CCT GGT GAA AGA GAC이며, 3' primer는 GTT GGG ATG CGG GCA GTT GTA GTT이고 PCR 결과물의 크기는 322 bp이다.

4. Northern Blot

5-10 μg의 total RNA는 formaldehyde를 포함한 1% agarose gel에서 2시간 전기영동 한 뒤에 nylon membranes으로 전이하였다. Hybridization probe로 사용할 cyr61 cDNA probe는 rediprime™II kit의 방법을 따라서 만들었고, [α-^{32}P]dCTP로 표지 하였다. Prehybridization과 hybridization은 hybridization 용액 (50% formamide, 5X Denhardt's reagent, 6X SSPE, 0.5% SDS)을 사용하여 42℃에서 overnight 실험하였다. Hybridization 후에 nylon membrane을 1X washing 용액 (1X SSPE, 0.1% SDS)으로 42℃에서 20분씩 2번 씻어준 뒤에 autoradiography로 확인하였다.

5. 시약처리 및 Trypan blue 염색법을 통한 세포 사멸 비율 측정

24 well에 세포를 배양한 뒤에 etoposide를 다양한 농도로 처리하여 24시간 배양 후 0.25% trypsin으로 세포를 배양 용기에서 떼어내고 trypan blue dye를 이용하여 세포 수를 세었다. 전체 세포 수를 세고서, trypan blue dye로 염색된 세포, 즉 죽은 세포를 세어서 그것의 백분율로 나타내었다.

6. Western blot

혈청이 함유된 배지에서 85 M etoposide를 처리한 후 24시간이 지난 다음 단백질을 추출하였다. Phosphate-buffered saline (PBS) 용액으로 두 번 씻은 후 lysis buffer (20 mM Tris pH 7.9, 137 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1.0% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM β-glycerophosphate (pH 7.4), p-nitrophenylphosphate, 1 mM EGTA, 200 μM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/μl aprotinin, 1 μg/μl leupeptin)를 넣고 얼음 위에서 10분간 반응시켰다. 세포를 13000 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 액을 분리한 후에 Bio-Rad assay kit를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 70 μg의 단백질을 10% acrylamide

gel로 전기 영동 하여 분리하고, nitrocellulose membrane으로 전이하였다. 이렇게 전이된 membrane을 5% non-fat milk 용액으로 실온에서 1시간 동안 blocking 한 뒤, primary antibody로서 phospho-JNK, phospho-p38, 그리고 phospho-ERK 항체를 4℃에서 overnight 반응시켰다. Secondary antibody를 반응시킨 뒤에, ECL solution kit를 사용하여 확인하였다.

7. CAT assay

CAT assay는 enzyme-linked immunosorbent CAT assay의 방법을 따랐다.

8. *In vitro* kinase assay

JNK가 SRF를 인산화 시키는지를 알아보기 위해 세포를 lysis buffer로 용해 시켜 세포 추출물을 얻는다. cell lysate를 13000 rpm으로 15분 동안 4℃에서 원심분리하고, 상층 액을 JNK 항체와 4℃에서 overnight 반응시켰다. protein A-agarose bead를 반응 액에 첨가해 준 뒤에 이 반응 혼합물을 4℃에서 1시간 더 반응시킨 후, lysis buffer로 2번, kinase buffer (20 mM HEPES (pH 7.3), 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $MnCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM PMSF, 2.5 μg/μl aprotinin, 2.5 μg/μl leupeptin, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 20 M ATP)로 2번 씻어 주었다. SRF를 glutathione-S-transferase를 발현시킬 수 있는 pGEX vector에 결합시킨 3가지 construct는 SRF 아미노산 1번부터 508번까지의 full length를 결합시킨 것, 아미노기 부분인 1번부터 140번까지 결합시킨 것, 그리고 카르복실기인 198번부터 508번까지 결합시킨 것 (pGST-SRF508, pGST-SRF140, pGST-SRF198/508)이며, 각 sample에 이 SRF 기질 7-11 μg, 20 μl의 kinase buffer 그리고 5 C_i[γ-^{32}P]ATP 동위원소를 첨가하고 30℃에서 1시간 동안 반응시켰다. SDS-PAGE sample loading buffer를 첨가하여 8% acrylamide gel에서 전기 영동 하여 단백을 분리하였고, 인산화된 기질 단백은

autoradiography에 의해서 확인하였다.

9. Metabolic labeling

H19-7 세포에서 Cyr61 단백이 세포 밖으로 분비되는지 아닌지를 알아보기 위해 10% FBS/DMEM 배지를 methionine이 없는 DMEM으로 바꿔주고 2시간 동안 배양한 뒤에, 50 μCi/ml[^{35}S] 동위원소와 etoposide를 일정 시간동안 처리하였다. 이후 세포 배양 배지에 분비된 42 kDa의 Cyr61 단백을 고농도로 얻기 위해서 Centricon YM-30 (molecular mass cut-off 30 kDa)을 사용하여 농축 시켰으며, 세포는 cold PBS로 2번 씻어 준 뒤 lysis buffer를 사용하여 세포 추출물을 얻었으며 etoposide 자극 후 세포 내에 새롭게 합성된 단백 200 μg과 Cyr61 항체 2 μg를 4℃에서 overnight 반응시켰다. 여기에 protein-A agarose bead를 넣고 다시 4℃에서 2시간동안 반응시켰다. 8% acrylamide gel에서 전기영동 하여 단백을 분리하였고, [^{35}S]-Methionine이 labeling된 Cyr61 단백의 양을 autoradiography로 확인하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 독성 물질에 의한 immediate early gene cyr61의 발현

여러 가지의 독성 물질에 의한 세포 사멸에서 cyr61 mRNA 유도를 알아보기 위해 세포 사멸을 유도하는 약물로서 DNA 복제 시에 관여하는 topoisomerase Ⅱ의 기능을 억제하여 apoptosis를 유도하여 c-jun N-terminal kinase (JNK)를 활성화시키는 etoposide를 85 μM, glutamate 수용체에 agonist로 작용하여 세포를 계속적인 흥분상태로 유지시켜서 apoptosis를 유도하는 NMDA와 glutamate를 각각 200 μM로 2시간 동안 처리하였다. mRNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응과 (그림 1.A) Northern blot 분석을(그림 1.B) 수행한 결과, etoposide, NMDA, glutamate에 있어서 모두 cyr61 mRNA가 발현됨을 관찰할 수 있었다. FGF 처리는 cyr61 발현에 대한 positive control이다. 이 결과로부터 신경세포에서 세포사멸을 유도하는 것으로 알려진 etoposide, NMDA, glutamate의 처리 시에 cyr61이 유도됨을 관찰하였다.

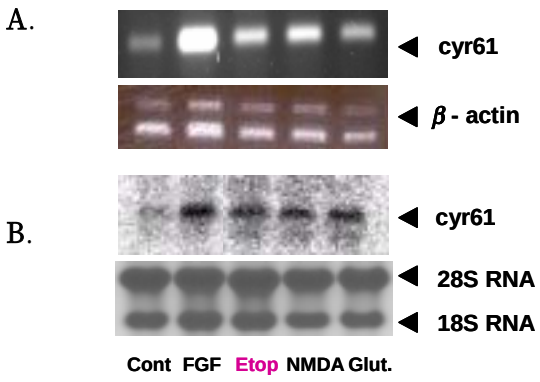


그림 1. RT-PCR과 Northern blot을 사용한 cyr61 확인. (A) H19-7 세포에 85 μM etoposide,

200 μM NMDA와 glutamate를 처리하였다. Total RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였을 때 361 bp의 cyr61이 발현됨을 볼 수 있다. β-actin으로서 동량의 조건임을 나타내었다. (B) 10 μg의 total RNA를 준비하여 361 bp의 cyr61 DNA fragment를 ^{32}P 동위원소로 표지하여 Northern blot을 시행하였다. ^{32}P로 표지된 cyr61 cDNA probe는 rediprime™Ⅱkit을 사용하여 만들었으며, 동량의 RNA임을 보여주기 위해 total RNA는 ethidium bromide로 염색하여 UV를 통해 확인하였다.

2. H19-7 세포주에서 etoposide에 의한 세포 사멸 효과.

Etoposide가 세포에 미치는 독성 효과를 알아보기 위해 10 μM부터 200 μM까지 다양한 농도의 etoposide를 serum이 있는 배지에서 H19-7 세포에 24시간 동안 처리한 뒤에 trypan blue 염색법을 이용하여 세포 사멸율을 측정하였다. 전체 세포 수를 세고, 그 중 죽은 세포 즉, trypan blue로 염색된 세포들을 세어서 백분율로 나타내 보았을 때 50 μM에서 약 40%의 세포 사멸율을 보였고, 85 μM에서 50%의 비율을 보이면서 그 이후의 농도에서도 약 50%의 사멸 비율을 보였다. 이 실험을 바탕으로 etoposide는 85 μM까지 농도 의존적으로 세포 사멸이 유도됨을 알 수 있다.

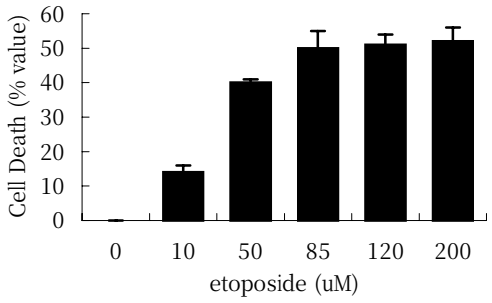


그림 2. etoposide에 의한 신경 세포 독성 효과. H19-7 세포에 지시된 농도의 etoposide를 처리하고 24시간 동안 반응시켰다. 세포 사멸율은 trypan blue 염색법을 이용하였다. 그 결과를 etoposide를 처리하지 않은 세포 사멸율을 0% 기준으로 하여 나타내었다.

3. Etoposide에 의한 JNK 활성화.

Etoposide에 의한 MAP kinase의 활성을 알아보기 위해 H19-7 세포에 85 μM의 etoposide를 처리하고, 주어진 시간동안 반응시켰다. 그 뒤에 각각의 활성화된 항체들을 이용하여 Western blot을 수행한 결과 (그림 3), JNK1과 JNK2는 5분에서 15분 사이에 일시적으로 활성화되는 것을 볼 수 있으나, p38이나 ERK의 경우에는 활성화가 일어나지 않음을 관찰했다. 이 결과에서 etoposide에 의해 JNK 경로가 활성화됨을 관찰했으며, 이는 etoposide 처리 시에 여러 세포에서 JNK가 활성화된다는 보고와[23] 일치하는 결과를 나타내었다.

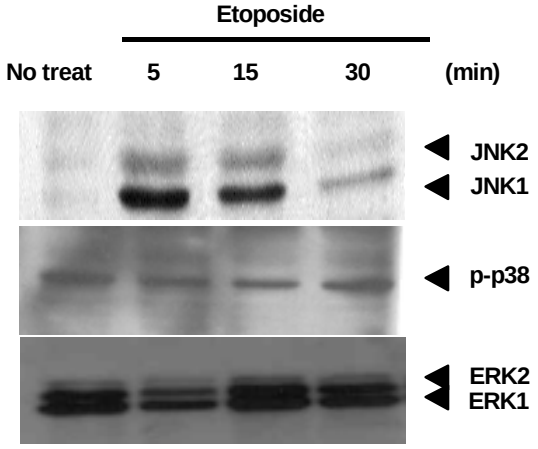


그림 3. MAP kinase를 통해 살펴 본 etoposide의 경로. H19-7 세포에 85 μM의 etoposide를

주어진 시간만큼 처리한 뒤, 50 μg의 세포 추출 단백들을 10%의 SDS/PAGE로 분리해 내고 nitrocellulose membrane으로 전이하였다. Blocking을 한 뒤에, phospho-JNK, phohpho-p38, phospho-ERK 항체들로 반응시키고, 이차 항체로 반응시켜 enhanced chemiluminescence (ECL)로 확인하였다.

4. JNK 경로를 통한 immediate early gene cyr61의 발현.

Etoposide에 의한 cyr61 발현 시 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려진 MAP kinase의 관여 여부를 확인하기 위하여, JNK의 상부에 존재하는 MEKK를 변형시킨 kinase-deficient MEKK를 세포 내에 transient transfection 방법에 의해 과발현 시켜서 JNK 활성화를 봉쇄하였고, p38 kinase 활성화를 억제 시키기 위해 SB203580을 30 μM로 1시간 전처리 하였다. total RNA를 추출하여 RT-PCR (A)과 Northern blot (B)으로 관찰해 본 결과 p38 kinase 억제 시에는 cyr61 발현 정도가 etoposide만을 처리했을 때와 차이가 없었으나 JNK 활성화의 억제에서는 cyr61 발현이 현저하게 감소한 것으로 나타났다. 이로서 etoposide에 의한 cyr61 발현에 JNK 활성화가 관여함을 알 수 있었다.

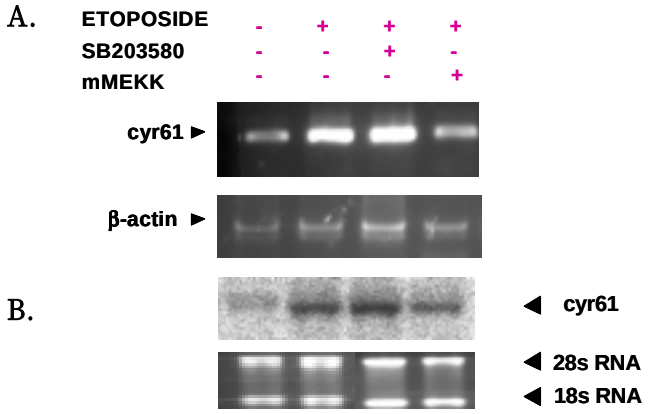
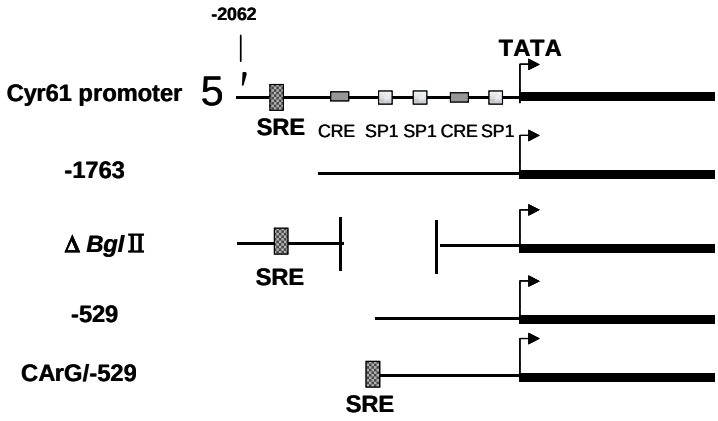


그림 4. cyr61의 발현 경로. (A) p38 kinase 억제제인 SB203580 30 μM를 1시간 동안 전처리

하였으며 JNK 활성화를 억제하기 위해서 인산화 활성도를 없앤 mutant MEKK (mMEKK)를 발현하는 플라스미드 6 μg을 transfection 하였다. 85 μM etoposide를 1시간 동안 처리하고서 total RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 동량의 조건임을 보여주기 위해 β-actin으로 중합효소 연쇄반응을 실행하였다. (B) 10 μg의 total RNA를 뽑아서 ^{32}P로 표지한 cyr61 cDNA fragment로 hybridization하였다. [^{32}P]로 labeling한 cyr61 probe는 rediprime™Ⅱkit를 사용하여 만들었으며, 동량의 28S RNA와 18S RNA가 전기영동 되었음을 보여주기 위해 ethidium bromide로 염색하여 UV로 확인하였다.

5. cyr61 promoter 대한 분석.

Etoposide에 의한 cyr61 발현에서 promoter의 역할을 알아보기 위해 H19-7 세포에 아래의 모식도에 있는 4개의 deletion promoter를 transfection하였다. 이 plasmid들은 CAT이 발현될 수 있는 expression vector에 cyr61 promoter의 여러 부위들을 fusion 시킨 것이다. 85 μM의 etoposide를 3시간 동안 처리한 뒤 측정한 CAT 활성도는 SRE가 존재하는 pΔBglⅡcyr61/CAT과 p529CArGcyr61/CAT에서 현저히 증가한 반면, SRE를 제거한 p1763cyr61/CAT과 p529cyr61/CAT에서는 낮은 CAT 활성도를 관찰하였다. 이 결과에서 etoposide에 의한 cyr61 발현에 SRE가 중요하다는 것을 알았다. 여러 mitogen에 의한 cyr61 전사에 중추적인 역할을 하는 SRE는 pΔBglⅡcyr61/CAT과 p529CArGcyr61/CAT에 둘 다 존재함에도 불구하고 CAT 활성도가 차이가 이유는 pΔBglⅡcyr61/CAT의 잘려진 부위인 –1285부터 –335에 SRE 발현을 억제하는 sequence가 존재하기 때문으로 추측된다. 이 결과로서 etoposide에 의한 cyr61 발현에 promoter에 존재하는 SRE가 관여함을 알았다.



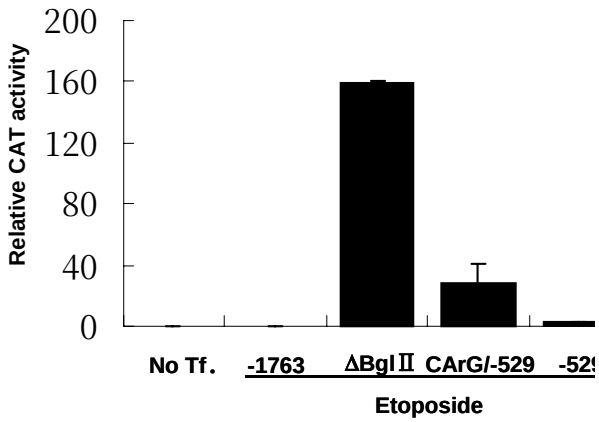
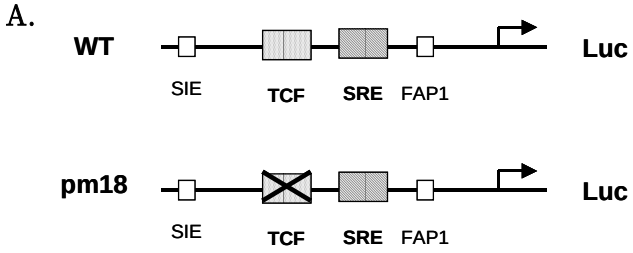


그림 5. cyr61 promoter에 존재하는 SRE의 역할. H19-7 세포에 3 μg의 cyr61 deletion promoter들을 (p–1763cyr61/CAT, pΔBglⅡcyr61/CAT, p–529cyr61/CAT, p529CArGcyr61/CAT) 각각 transient transfection하고 85 μM etoposide를 3시간 동안 처리하여 CAT 활성도를 측정하였다. enzyme-linked immunosorbent CAT assay kit를 사용하여 측정하였다.

6. c-fos SRE의 etoposide에 의한 효과.

Etoposide에 의한 cyr61 발현 유도에 관여하는 SRE의 역할이 다른 IEG에서도 유사하게 나타나는지를 분석해 보기 위해서 heterologous c-fos/Luc promoter construct를 사용하여 실험하였다 (그림 6.A). wild type은 TCF와 SRF가 luciferase reporter gene이 존재하는 pGL3 vector에 결합되어 있으며 (pWTGL3) mutant는 TCF 부위를 변형시켜 TCF의 결합을 봉쇄한 것이다 (ppm18GL3). 2가지의 DNA plasmid를 각각 transfection한 후 85 μM의 etoposide를 3시간 동안 처리하여 luciferase 활성도를 측정하였다. Etoposide를 처리하지 않았을 시에는 pWTGL3와 ppm18GL3가 유사한 값을 보이지만, etoposide를 처리하면 약 3배 정도 증가했음을 관찰하였다. 또한 etoposide를 처리했을 때 ppm18GL3이 pWTGL3보다 약 1.3배 정도 더 증가함을 보였다 (그림 6.B). 지금까지의 결과에서 etoposide에 의해 c-fos 역시 활성도가 증가하며 SRE가 중요하다는 것을 알 수 있었다.



B.

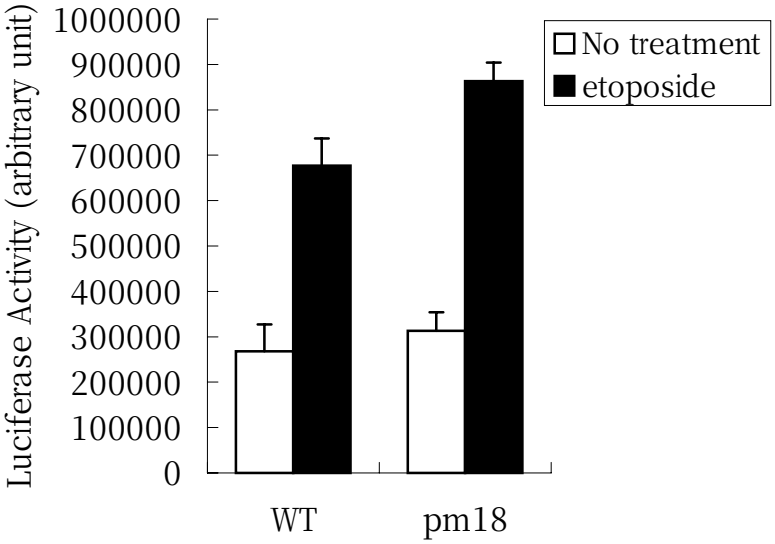


그림 6. c-fos SRE의 Luciferase activity. (A) Luciferase reporter gene에 쥐의 c-fos promoter 부위인 –355부터 –285를 사람 c-fos의 –53부위에 접합하였다. 변형시킨 부위는 'X'로 표시하였다. (B) c-fos 의 wild type과 mutant를 각각 3 μg transfection하고, etoposide를 3시간 동안 처리하여 세포 추출물을 가지고 luciferase 활성도를 수행하였다.

7. JNK 경로의 억제를 통해 관찰한 cyr61 발현.

선행 실험에서 etoposide에 의한 cyr61 발현이 JNK 경로를 통해 나타난다는 것을 확인하였고, cyr61의 promoter에 존재하는 SRE가 중요한 역할을 함을 알았다. SRE 부위가 있는 pcyr61/CAT plasmid DNA중에서 가장 높은 CAT activity를 보인 pΔBglⅡcyr61/CAT을 transfection하고, 각 MAP kinase 경로를 억제할 수 있는 억제제 및 kinase inactive mutant expression vector를 사용하였다. JNK 활성화를 억제하기 위해 mMEKK를 transfection하였고, p38 kinase의 신호전달 억제 효과를 보기위해 SB203580 30 μM를 etoposide 처리하기 1시간 전에 전처리 하였다. ERK를 억제할 수 있는 U0126 10 μM를

역시 1시간 전처리 하여 CAT 활성을 분석하였다. mMEKK를 transfection 하였을 때 CAT 활성도가 대조군과 거의 유사한 정도로까지 감소하는 효과를 보인 반면, p38 kinase나 ERK 억제에서는 별다른 변화가 없었다. 이상의 결과로부터 etoposide 처리 시 cyr61 발현 유도에 JNK 활성화가 필요함을 SRE 전사 조절 자리를 통해 매개되는 결과로서 알 수 있었다.

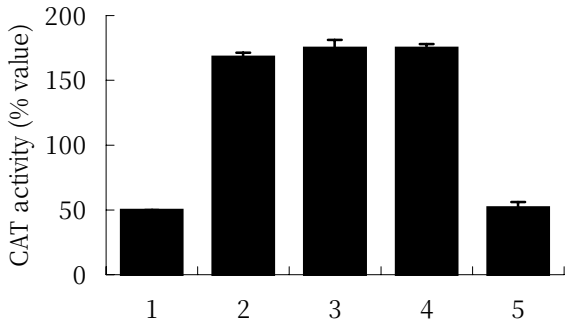
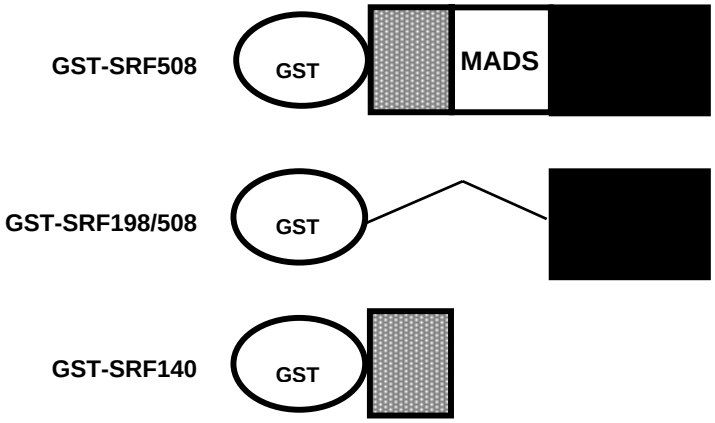


그림 7. CAT activity를 사용한 MAP kinase 억제 효과. 2.5 μg의 ΔBglII cyr61/CAT plasmid DNA를 mutant MEKK (mMEKK)와 같이 transfection하였고, SB203580은 30 μM, U0126은 10 μM로 1시간 동안 전처리 하였다. 그리고 85 μM의 etoposide를 3시간 동안 처리하여 CAT 활성도를 측정하였다. 1: No treatment 2: Etoposide (E) 3: SB203580+E 4: U0126+E 5: mMEKK+E

8. JNK의 SRF 인산화 효과.

Etoposide에 활성화 되는 JNK가 SRF를 직접적으로 인산화 하는지를 알아보기 위해 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. 85 μM etoposide를 주어진 시간만큼 처리한 뒤, 세포 추출물을 JNK 항체와 반응시켰다. 여기에 protein-A-bead를 넣어서 면역 침전하였다. SRF를 glutathione-S-transferase를 발현시킬 수 있는 pGEX vector에 결합시킨 3가지 construct는 SRF 아미노산 1번부터 508번까지의

full length를 결합시킨 것, 아미노기 부분인 1번부터 140번까지 결합시킨 것, 그리고 카르복실기인 198번부터 508번까지 결합시킨 것 (pGST-SRF508, pGST-SRF140, pGST-SRF198/508)에서 GST가 붙어 있는 SRF 단백을 분리하여 이를 bead가 있는 반응 혼합물에 첨가하였다. ^{32}P 동위원소를 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 10% SDS/PAGE로 단백들을 분리하여 gel을 건조 시켜서 autoradiography를 하였다. pGST-SRF508과 pGST-SRF198/508에서 5분에 SRF 인산화가 높게 증가하였음을 볼 수 있으며, pGST-SRF140에서는 시간에 따른 변화가 나타나지 않았다. 따라서, JNK가 SRF를 인산화하며 그 위치는 SRF의 198부터 508사이에서 이루어진다는 것을 확인하였다.



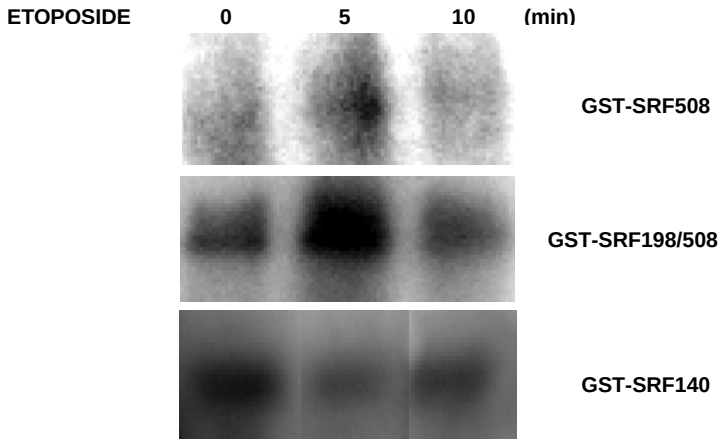


그림 8. *in vitro* kinase assay를 이용한 SRF 인산화 확인. pGST-SRF508은 full length이고, pGST-SRF140은 아미노기 부위이며, pGST-SRF198/508은 카르복실기 부위이다. 주어진 시간만큼 etoposide를 처리하고 200 μg의 단백과 1 μg의 JNK 항체를 4℃에서 overnight 반응시켰다. 이 단백 혼합물에 protein-A agarose bead를 30 μl 첨가하고 ^{32}P를 사용하여 kinase assay를 하였다. 10% SDS/PAGE로 단백들을 분리하고, autoradiography를 통하여 확인하였다.

9. Cyr61 단백의 세포 밖 분비 확인.

Etoposide에 의한 cyr61 mRNA 유도와 전사 활성도 증가 외에 Cyr61 단백이 합성되어 세포 밖으로 분비되는지를 알아보기 위해서 85 μM etoposide의 자극을 준 뒤 [^{35}S]-methionine 동위원소를 처리하여 대사적 표지를 수행하였다. 5, 10, 24, 48시간 반응시킨 뒤, 세포 추출물은 lysis buffer를 사용하여 준비하였고, 세포 배양 배지의 농축은 Centricon YM-30 (molecular mass cut-off 30 kDa)을 이용하여 시행하였다. Cyr61 항체를 사용하여 면역침전을 수행한 뒤 면역침전물을 전기 영동 하여 분리하고 autoradiography로 세포 밖으로 분비된 단백과 세포 내 축적 단백을 확인하였다. 24시간부터 세포 배지에서 42 kDa(화살표)의 Cyr61 단백이 분비됨을 알 수 있었던 반면, 세포 추출물에서는 시간에 따라

분비되는 현상을 관찰할 수 없었다. 이 결과로서 etoposide에 의해서 Cyr61 단백이 합성된 후 24시간 이후부터 세포 밖으로 바로 분비됨을 알 수 있었다.

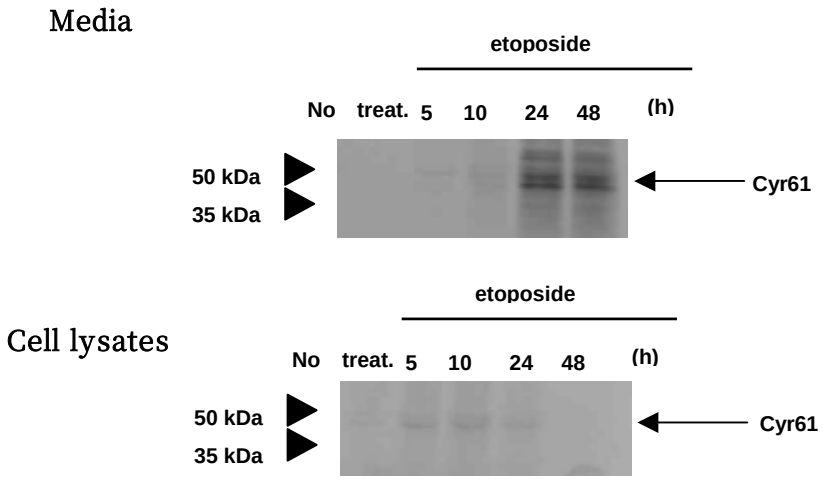


그림 9. 세포 밖으로 분비되는 Cyr61 단백. ^{35}S 동위원소와 etoposide를 같이 처리하여 주어진 시간동안 반응을 시켰다. 그런 뒤에 농축 시킨 세포 배양 배지와 세포 추출물을 분리하여 얻어서 cyr61 항체로 면역침전 시킨 뒤, 10% SDS/PAGE를 사용하여 단백들을 분리하고 gel을 건조 시켜 autoradiography로 확인하였다.

Ⅳ. 고 찰

지금까지 연구에서, 세포 생존에 관여한다고 알려져 있던 immediate early gene cyr61이 해마 신경 세포주인 H19-7에서 (1) etoposide, NMDA, glutamate에 의한 세포 사멸 시에 발현됨을 조사하였고, (2) 세포 사멸을 유도하는 약물 처리 시에 cyr61 유전자의 mRNA level 증가, promoter 활성도 증가 및 (3) Cyr61 단백질이 합성되어 세포 밖으로 분비됨을 확인하였다. 그리고 (4) 세포 사멸을 유도하는 etoposide에 의해 어떤 MAP kinase가 활성화되는지의 여부를 확인해 본 결과 ERK와 p38을 제외한 JNK 경로를 통해 발현되는 것으로 보아, 세포 사멸 시에도 cyr61이 발현된다는 것을 알 수 있었다.

CTGF는 Cyr61과 마찬가지로 immediate early gene으로 알려져 있으며, 섬유아세포에서 serum, bFGF, platelet에서 유도된 성장 인자들에 의해 발현된다.[8] 이들은 아미노산 배열이 ~45%가 동일하며, 단백은 heparin과 결합하고 ECM과 결합하는 특징을 갖고 있다.[8] Cyr61과 CTGF의 차이는 CTGF는 사람의 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 TGF-β에 의한 apoptosis 유발 시에 발현된다.[20] Cyr61의 경우에는 아직까지 세포 사멸에 관여한다는 보고가 없다. 하지만 종양 성장에 관여하는 cyr61을 non-small cell lung cancer (NSCLC)에 transfection하고서 cyr61 mRNA 발현을 조사한 결과 mRNA level이 4배에서 5배정도 감소하는 것을 발견하였고, 종양 colony 형성도 더 작게 형성됨을 관찰하였다. 또한 p53의 발현이 up-regulation 되고, 이러한 결과들로 Cyr61이 NSCLC에서 종양 억제제로 작용한다는 보고가 최근에 발표되었다.[5] 세포 독성을 갖는 물질인 etoposide, NMDA, glutamate를 처리 했을 때 cyr61이 발현 되는

지를 mRNA level에서 측정 한 결과 증가함을 확인하였고, 그 중 etoposide에 의해서 세포 사멸이 일어나는지를 농도별로 확인하여보니 85 μM까지 약 50%의 세포 사멸율을 확인하였다 (그림 1, 그림 2). 또한 etoposide가 여러 MAP kinase 중에서 JNK를 활성화시킨다는 것을 확인하였으며 (그림 3), 이것은 human monoblastic leukemia 세포주인 U937에서 etoposide를 처리하였을 때 JNK의 활성화가 일어나는 결과와 일치하였다.[23]

실제로 JNK나 p38 kinase가 cyr61 발현에 관여하는지를 알아보기 위해, 각각의 MAP kinase 활성을 억제하여 살펴 보았다. 그 결과 p38 kinase 억제제인 SB203580을 30 μM 처리하였을 때는 단순히 etoposide만을 처리하여 발현된 cyr61의 농도와 유사하게 관찰되었다. JNK 활성도를 억제할 수 있는 chemical inhibitor가 없기 때문에 JNK의 상위에 존재하는 MEKK에서 인산화 활성도를 없앤 MEKK DNA를 세포 내에 transfection하여 과발현 시킨 뒤에 etoposide를 처리하여 확인한 결과 cyr61 유전자의 현저한 mRNA 감소를 볼 수 있었다 (그림 4). 따라서 etoposide에 의한 cyr61 유전자의 발현이 p38 kinase가 아닌 JNK 활성화를 통하여 유도된다는 것을 관찰하였다.

Etoposide에 의한 cyr61 유전자 발현에 관여하는 promoter 부위를 조사해 보기 위해 4가지의 deletion cyr61 promoter/CAT reporter fusion plasmid (그림 5)를 transfection하여 CAT 활성도를 비교해본 결과, SRE가 존재하는 pΔBglⅡcyr61/CAT과 p529CArGcyr61/CAT에서 현저한 증가를 관찰하였다. 또한 SRE 부위가 없는 p1763cyr61/CAT과 p529cyr61/CAT에서는 낮은 활성도를 보이는 것으로 보아 SRE가 etoposide에 의한 cyr61 발현에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다 (그림 5). pΔBglⅡcyr61/CAT과

p529CArGcyr61/CAT에서 둘 다 SRE가 존재함에도 CAT 활성도가 차이가 나는 이유는 pΔBglⅡcyr61/CAT의 잘려진 부위인 –1285 bp부터 –335 bp에 SRE 발현을 억제하는 sequence가 제거되었기 때문이라고 생각하며, promoter 분석상 이 부위에 존재하는 CRE 혹은 다른 알려져 있지 않은 부위가 etoposide에 의한 cyr61 발현을 억제할 것이라고 추측한다. 이러한 결과는 serum을 이용하여 cyr61 발현을 연구했던 선행 실험에서도 유사하게 관찰되었다.[9] 또한 heterologous c-fos/Luc reporter fusion plamid (그림 6-A)를 사용하여 etoposide에 의한 SRE와 TCF의 관계를 알아본 결과 TCF를 억제 시켜도 c-fos 발현에는 별다른 영향을 미치지 않았다 (그림 6-B). 이 결과에서 etoposide에 의해 c-fos 역시 활성도가 증가하며 여기에 SRE가 관여할 수 있음을 암시하고 있다. cyr61 발현에 영향을 주는 promoter가 존재하는 pΔBglⅡcyr61/CAT을 transfection하고 각 MAP kinase 경로를 억제 시킬 수 있는 억제제와 kinase-inactive MEKK를 사용하여 CAT 활성도를 측정해본 결과, JNK의 봉쇄에 있어서 큰 감소를 보인 반면 ERK나 p38 kinase의 억제에서는 별다른 억제 효과가 나타나지 않았다 (그림 7).

SRE는 성장 인자나 스트레스에 의해 조절되는 전사 시작 부위 배열로서, c-fos와 egr-1 같은 immediate early gene 발현에 필수적이다.[15,18] SRE에는 SRF가 결합하며, 이때 SRE의 앞 쪽에 있는 TCF 부위에는 Ets 집합체에 속하는 Ternary Complex Factor (TCF)가 결합하게 된다. SRF의 MADS 부분이 homodimer로 $C_2(A/T)_6G_2$ 염기 배열을 갖는 CArG 부위에 결합하고, TCF는 SRF가 결합했을 때만 GGAT 배열을 갖는 Ets 부분에 결합하여 c-fos SRE에 결합할 수 있다.[15] TCF에는 Elk-1, Sap-1, Net-1등이 있다.[21] Elk-1은

일반적으로 FGF에 의한 자극에서 신경 세포 분화를 유도했을 때 ERK에 의해 인산화 되고, anisomycin에 의한 섬유아세포의 사멸 시에는 JNK와 p38에 의해서도 인산화 된다.[18] SRF를 포함한 복합체들은 세포 내 신호 전달과 유전자 활성도 사이에서 핵으로의 연결자로서 중요한 역할을 하며, 직·간접적으로 신호전달체계에 관여한다. 이러한 SRF는 여러 개의 인산화 부위를 내포하는데, 주로 Ser-103이 주요 인산화 자리로 알려져 있다. Ser-103의 인산화는 이미 성장 인자나 칼슘 수준에 의해 조절된다고 알려져 있으며, *in vitro* 상에서 SRF의 인산화 기질로서 CaMKⅡ, CaMKⅣ, 그리고 MK2가 알려져 있다.[15,21] 대부분의 SRF 인산화 부위는 아미노기 부분에 위치하고 있다. JNK의 기질로는 TCF 부위에 결합하는 Elk-1, Sap-1, Net-1 등이 있으며, SRF를 인산화 한다는 보고는 아직까지 없다. 본 논문에서는 SRF를 glutathione-S-transferase를 발현시킬 수 있는 pGEX vector에 SRF 아미노산 1번부터 508번까지의 full length를 결합시킨 것, 아미노기 부분인 1번부터 140번까지 결합시킨 것, 그리고 카르복실기인 198번부터 508번까지 결합시킨 (pGST-SRF508, pGST-SRF140, pGST-SRF198/508) 이들 3가지 construct를 가지고 SRF에 GST가 fusion된 박테리아 단백을 얻어 놓고, H19-7 세포에 etoposide를 처리하여 Cyr61 항체로 면역침전 시켰다. [^{32}P] 동위원소로 표지 하여 확인한 결과, 기존의 SRF 인산화 위치로 알려져 있던 부위인 Ser-103과는 전혀 다른 198부터 508까지의 SRF 부위에서 인산화가 이루어진다는 것을 알았고, JNK가 SRF를 직접적으로 인산화 한다는 새로운 결과를 얻게 되었다 (그림 8).

cyr61과 유사하게 세포 밖으로 분비되는 단백들 중 apoptosis에 관여하는 것으로 알려진 단백으로 SARPs (secreted apoptosis-related protein)가 있다.

이들의 특징은 (1) 분비 단백이며 (2) 조직 특이적으로 반응하고 (3) 세포의 물리적 상태에 의존적으로 발현된다.[22] 모든 SARP 단백 집합체들은 cysteine이 풍부한 부위 (CRD)가 있으며 이것은 7개의 transmembrane 수용체 (frizzled 단백)의 CRD와 같다.[22] Cyr61 역시 cysteine이 풍부한 분비 단백으로서, 세포 사멸 시에 합성되어 분비되는지를 알아보았다 (그림 9). 세포 추출물과 농축 시킨 세포 배양 배지를 분리하여 얻은 뒤에 [^{35}S] 동위원소로 labeling 되어 있을 Cyr61 단백을 autoradiography로 확인한 결과 세포 추출물에서는 보이지 않던 Cyr61 단백이 세포 배양 배지에서 42 kDa으로 24시간부터 선명하게 나타난 것을 확인하였다 (그림 9). 앞으로 분비 단백인 Cyr61과 SARP 사이에 세포 사멸에 있어서 어떠한 연관성이 있는지 살펴보는 것도 중요할 것이다.

지금까지의 실험 결과들을 다시 종합해 보면, 세포 사멸을 일으키는 etoposide에 의해 JNK가 활성화되었고, JNK가 SRF를 인산화 함으로써 cyr61 promoter 부위에 존재하는 CArG 부위에 결합한다. 이러한 과정이 세포 사멸 시에 cyr61의 발현을 유도하게 한 것으로 보여진다. (그림 10).

결론적으로, 본 논문에서는 cyr61이 세포 사멸에서 발현되며, 그것의 발현에는 전사 시작 부위에 있는 SRE가 필요하다는 것을 알았다. 또한 JNK가 SRE에 결합하는 SRF를 직접적으로 인산화 하여 cyr61 발현에 영향을 주었으며, 세포 사멸시의 cyr61 유전자가 mRNA와 promoter 활성도 증가 뿐만 아니라 Cyr61 단백이 합성되어 세포 밖으로 분비되는 새로운 결과들을 얻었다. 앞으로 cyr61의 sense와 antisense expression construct를 만들어서 세포 사멸 시에 cyr61 발현 억제 혹은 과발현시 세포사멸에 미치는 효과를 확인해 볼 예정이다.

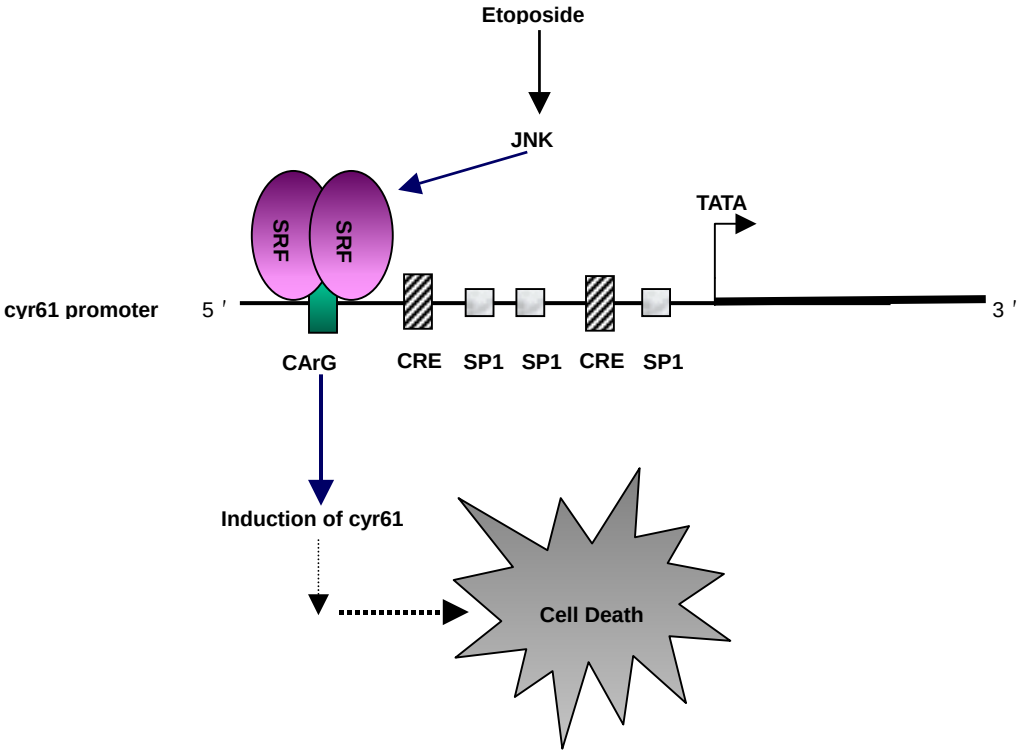


그림 10. etoposide에 의한 cyr61 발현 모식도. 85 μM의 etoposide를 처리하여 JNK 활성화를 Northern blot과 역전사 중합효소 연쇄 반응실험을 이용하여 확인하였다. JNK가 SRF에 대해 작용하는지 알아보기 위해 kinase assay를 수행하였고, cyr61의 SRE 유사 배열이 발현에 중요한 역할을 한다는 것을 CAT assay를 통하여 알 수 있었으며, 신경 세포에서 세포 사멸 시에 분비된다는 것을 확인하였다.

Ⅴ. 결 론

섬유아세포에서 세포 생존에 관여한다고 알려져 있던 cyr61이 신경 세포의 사멸에서도 발현되는지를 알아보았으며 결과는 다음과 같다.

1. 여러 독성 자극에 의한 세포 사멸시에 cyr61의 발현됨을 역전사 중합효소 연쇄반응과 Northern blot으로 확인하였다.
2. etoposide에 의한 세포 사멸이 JNK 활성화를 통해 이루어짐을 알았고, cyr61의 발현 역시 JNK 경로를 통하여 이루어진다는 것을 확인하였다.
3. JNK가 SRF를 직접적으로 인산화 함으로써 cyr61 promoter의 SRE motif에 SRF 결합을 촉진 시킴으로서 cyr61의 전사를 촉진 시킨다는 것을 알 수 있었다.
4. 분비 단백인 Cyr61이 신경 세포에서도 세포 밖으로 분비 됨을 metabolic labeling을 이용하여 확인하였다.

이상의 결과들을 바탕으로 하여, 세포 사멸 시에 Cyr61 단백이 세포의 생물학적 기능에 어떠한 영향을 미치는가를 앞으로 확인 해 봐야 할 것이다.

참고문헌

1. Hirasaki S, Koide N, Ujike K, Shinji T, Tsuji T. Expression of Nov, CYR61, and CTGF genes in hyman hepatocellular carcinoma. Hepatol Res 2001;19:294 - 305.
2. Tamura I, Rosenbloom J, Macarak E, Chaqour B. Regulation of Cyr61 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. Am J Physiol Cell Physiol 2001;281:1524 - 1532.
3. O'Brien TP, Lau LF. Expression of the Growth Factor - inducible immediate early gene cyr61 correlates with chondrogenesis during mouse embryonic development. Cell Growth & Differ 1992;3:645 - 654.
4. Grotendorst GR, Lau LF, Perbal B. CCN proteins are distinct from and should not be considered members of the insulin - like growth factor - binding protein superfamily. Endocrinology 2000;141:2254 - 2255.
5. Tong X, Xie D, O Kelly J, Miller CW, Muller - Tidow C, Koeffler HP. Cyr61, a member of CCN family, is a tumor suppressor in non - small cell lung cancer. J Biol Chem 2001;276:47709 - 47714.
6. Lechner A, Schütze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F. The immediate erly gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. Bone 2000;27:53 - 60.
7. Grzeszkiewicz TM, Kirschling DJ, Chen N, Lau LF. CYR61 stimulates human skin fibroblast migration through integrin $\alpha_v\beta_5$ and enhances mitogenesis through integrin $\alpha_v\beta_3$, independent of its carboxyl - terminal domain. J Biol Chem 2001;276:21943 - 21950.
8. Chen C - C, Mo F - E, Lau LF. The angiogenic factor cyr61 activates a genetic program for wound hialing in hyman skin fibrolasdts. J Biol Chem 2001;276:47329 - 47337.

9. Latinkic BV, O'Brien TP, Lau LF. Promoter function and structure of the growth factor-inducible immediate early gene cyr61. Nucl Acids Res 1991;19:3261-3267.
10. O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF. Expression of cyr61, a growth factor-inducible immediate –early gene. Mol Cell Biol 1990;10:3569-3577.
11. Yang GP, Lau LF. Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. Cell Growth Differ 1991;2:351-357.
12. Xie D, Miller CW, O'Kelly J, Nakachi K, Sakashita A, Said JW et al. Breast Cancer-cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and associated with more advanced disease. J Biol Chem 2001;276:14187-14194.
13. Tsai M-S, Hornby AE, Lakins J, Lupu R. Expression and function of cyr61, an angiogenic factor, in breast cancer cell lines and tumor biopsies. Cancer Res 2000;60:5603-5607.
14. Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. Science 1995;269:403-407.
15. Heidenreich O, Neininger A, Schratt G, Zinck R, Cahill MA, Engel K et al. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. J Biol Chem 1999;274:14434-14443.
16. Treisman R, Alberts AS, Sahai E. Regulation of SRF activity by Rho family GTPases. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1998;643-651.
17. Wang Y, Prywes R. Activation of the c-fos enhancer by the Erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and $p62^{TCF}$ sites. Oncogene 2000;19:1379-1385.
18. Chung KC, Kim SM, Rhang S, Lau LF, Gomes I, Ahn YS. Expression of immediate early gene pip92 during anisomycin-induced cell death is mediated by the JNK- and p38-dependent activation of Elk-1. Eur J Biochem 2000;267:4676-4684.
19. Flück M, Booth FW, Waxham MN. Skeletal muscle CaMKII enriches in nuclei and

phosphorylates myogenic factor SRF at multiple sites. Biochem Biophys Res Commun 2000;270:488 - 494.

20. Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakaki T, Lüscher TF, Fujii T. Connective tissue growth factor induces apoptosis in hyman breast cancer cell line MCF - 7. J Biol Chem 1999;274:37461 - 37466.
21. Thuerauf DJ, Arnold ND, Zechner D, Hanford DS, DeMartin KM, McDonough PM et al. p38 mitogen - activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. J Biol Chem 1998;273:20636 - 20643.
22. Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC et al. SARPs: a family of secreted apoptosis - related proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:13636 - 13641.
23. Jarvis WD, Johnson CR, Fornari FA, Park JS, Dent P, Grant S. Evidence that the apoptosis actions of etoposide are independent of c - Jun/Activating Protein - 1 - Mediated transregulation. J Pharmacol Exp Ther 1999;290:1384 - 1392.
24. Schütze N, Lechner A, Groll C, Siggelkow H, Hüfner M, Köhrle J et al. The human analog of murine cystein rich protein 61 is a 1α,25 - dihydrozyvitamin D_3 responsive immediate early gene in human fetal osteoblasts: regulation by cytokines, growth factors, and serum. Endocrinology 1998;139:1761 - 1770.
25. Jedsadayanmata A, Chen C - C, Kireeva MS, Lau LF, Lam SC - T. Activation - dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp 12/Mouse Connective tissue growth factor is mediated through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. J Biol Chem 1999;274:24321 - 24327.
26. Nakamura M, Nishida W, Mori S, Hiwada K, Hayashi K, Sobue K. Transcriptional activation of β - Tropomyosin mediated by serum response factor and a novel Barx homologue, Barx1b, in smooth muscle cells. J Biol Chem 2001;276:18313 - 18320.
27. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector

functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell 1996;87:565-576.

28. Lenczowski JM, Dominguez L, Eder AM, King LB, Zacharchuk CM, Ashwell JD. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced aopotosis. Mol Cell Biol 1997;17:70-81.
29. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995;270:1326-1331.
30. Chen YR, Meyer CF, Tan TH. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. J Biol Chem 1996;271:631-634.
31. Graves JD, Draves KE, Craxton A, Saklatvala J, Krebs EG, Clark EA. Involvement of stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in mIgM-induced apopotosis of human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:13184-13818.
32. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. Nature 1996;380:75-79.

Abstract

The expression pathway of immediate early gene cyr61 during etoposide - induced cell death in H19 - 7 cells

Kyoung Ha Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The graduate school, Yonsei University

(Directed by Professor Ja Hyun Baik)

Immediate early gene (IEG) cyr61, a cysteine - rich and heparin - binding protein, belongs to the CCN family [cysteine - rich 61/connective tissue growth factor (CTGF)/nephroblastoma overexpressed]. This emerging new family of proteins is characterized by a high degree of amino acid sequence homology and includes Cyr61, CTGF, Nov, elm - 1, cop - 1, and wisp - 3. These proteins are organized into conserved modular domains that share similarities with insulin - like growth factor binding proteins, von Willebrand factor type C repeat, thrombospondin type I repeat, and growth factor cysteine knots. In addition, each of these proteins possesses an amino - terminal signal peptide, indicating that they are secreted proteins.

cyr61 is transcriptionally activated within minutes by serum, bFGF, or PDGF. The encoded Cyr61 protein is secreted into extracellular matrix, and promotes cell adhesion and migration. The cyr61 promoter has been shown to respond to induction by serum via a serum response element (SRE). The SRE is occupied by a dimer of serum response factor (SRF) and ternary complex factor (TCF). In the present study, we examined whether cyr61 is expressed during neuronal cell death induced by various toxic-stimuli. Northern blot and RT-PCR analysis showed that cyr61 is expressed during neuronal cell death induced by many toxic agents, including etoposide in CNS hippocampal cells (H19-7). To clarify the downstream signaling cascades for the induction of cyr61, the blocking effect of JNK or p38 kinase signaling pathway on the induction of cyr61 was tested in response to etoposide. Transfection of kinase-deficient mutant MEKK into H19-7 cells significantly decreased cyr61 expression induced by etoposide, whereas the levels of cyr61 induction did not change by pretreatment with p38 kinase inhibitor, SB203580, compared to the control cells. We also investigated the induction of the cyr61 promoter and deletion analysis of the cyr61 promoter indicated that cyr61 activation occurs primarily within the region containing a CArG box. Our results also indicate that SRF, which binds to the CArG site, was phosphorylated by the JNK. Using metabolic labeling that the secretion of Cyr61 into the extracellular space occurs in response to etoposide also identified. Taken together, we conclude that 1) cyr61 is expressed during

neuronal cell deth, 2) JNK activation mediated the expression of cyr61 and JNK phosphorylated to SRF which binds SRE motif in cyr61 promoter, 3) Cyr61 protein is secreted into the extracellular space during apoptosis.

Key Words : cyr61, IEG, JNK, SRE, SRF, secreted protein