Staurosporine으로 유도된 세포고사에서 세포내 칼슘이온의 증가기전

연세대학교 대학원

치 의 학 과

정 상 훈

Staurosporine으로 유도된 세포고사에서 세포내 칼슘이온의 증가기전

지도교수 서정택

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

정 상 훈

정상훈의 박사학위 논문을 인준함

지도교수 서 정 택

심사위원 이 승 일 ㊞

심사위원 김 진 ㊞

심사위원 강 정 완 ㊞

심사위원 신 동 민 ㊞

심사위원 서 정 택 ㊞

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 글

지난 3년을 돌이켜보면 아쉬운 점도 있지만 홀가분한 마음도 들어 기쁩니다.

늦깍이 공부하느라 어려운 점도 많았지만 학교에 계신 선후배님들과 교실 교수님들과 조교 선생님들의 따뜻한 도움으로 과정을 이수하게 돼 큰 신세를 졌습니다.

대학원에 다니는 동안 병원을 잘 지켜준 병원 직원들과 백준혜 선생님께도 감사 드립니다.

항상 곁에서 격려를 아끼지 않은 아내 백정혜와 사랑하는 딸 지윤이에도 정말 감사드립니다.

박사과정중 병석에 있다 타계한 사랑하는 동생 희석과 함께 하늘에 계실 어머님께도 이 기쁨을 전하고 싶습니다.

같은 동기 동창생이 학생으로 있어 여러 가지로 불편했겠지만 내색 전혀 안하고 따뜻하게 지도해주신 서정택 교수님의 노고에 감사드립니다.

항상 격려를 아끼지 않고 지도해 주신 이승일 교수님, 유윤정 교수님, 박광균 교수님, 김희진 교수님께 감사 드립니다.

이대 치과학교실 김명래 교수님이하 의국원의 격려도 제게 많이 도움을 줘서 감사드립니다.

앞으로 구강생물학 교실원으로서 조그마한 도움이 되도록 노력하겠습니다

2002년 6월

저자 올림

목 차

논문개요 ····· iii

제1장 서 론 ····· 1

제2장 연구 방법 ····· 7

제3장 연구 결과 ····· 11

제4장 총괄 및 고찰 ····· 23

제5장 결 론 ····· 29

참고문헌 ····· 32

Abstract ····· 38

그림 목차

Fig. 1 The effect of staurosporine on cell death in differentiated PC12 cells. / 13

Fig. 2 Staurosporine induced apoptosis in differentiated PC12 cells. / 14

Fig. 3 Effect of staurosporine on $[Ca^{2+}]_i$ in differentiated PC12 cells. / 15

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} chelation on cell death in differentiated PC12 cells. / 18

Fig. 5 Release of Ca^{2+} from non-ER, non-mitochondrial subcellular compartment in differentiated PC12 cells. / 19

Fig. 6 Effect of staurosporine on intra-mitochondrial Ca^{2+} concentration in differentiated PC12 cells. / 21

Fig. 7 Involvement of subcellular acidic compartment in staurosporine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in differentiated PC12 cells. / 22

논 문 개 요

세포의 발생과 분화 및 노화 과정에서 많은 세포들이 세포고사(Apoptosis)라는 자연적인 세포사멸과정에 의해 제거된다. 세포고사는 포유동물의 세포발생과정에서 필수적으로 나타나는 현상 중의 하나로서 세포질의 축소와 핵질의 응축, 그리고 DNA 분절의 특징을 보이며 caspase의 활성화, 미토콘드리아 기능의 비정상화라는 생화학적인 현상을 수반한다. 그러나, 세포의 분화 및 발생과정에서 뿐만 아니라 질병이나 방사선 조사, 화학물질 등에 의해서도 세포고사의 특징적인 현상들이 나타나는 것으로 밝혀져 세포고사의 원인 및 발생기전 나아가 세포고사를 방지할 수 있는 약물의 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

세포고사에 관여하는 세포내 신호전달과정에는 여러 가지 신호전달 물질 및 효소들이 관여하는 것으로 알려져 있다. c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 그리고 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 같은 MAPK family 및 caspase family 등이 세포고사 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 그 역할이 비교적 잘 알려져 있으나, 근래에는 칼슘 항상성의 상실도 세포 고사를 유발하는 요인으로 생각하고 있다.

세포내 유리 칼슘 (ionized calcium, Ca^{2+})은 세포내 기능을 다양하게

조절하는 신호전달체계의 매개체로서 세포의 발생, 분화, 성장 뿐 아니라 근육의 수축, 분비선으로부터의 분비, 배움과 기억 등에 관여하는 중요한 세포내 신호전달물질이지만 세포내 칼슘이 오랫동안 고농도로 유지되면 세포에 손상을 주며 세포고사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 세포고사를 유발하는 대표적인 약물인 staurosporine을 사용하여 신경세포의 세포고사 과정에서 세포내 칼슘증가가 중요한 역할을 할 것이라는 가정 하에 실험을 진행하였다.

Nerve growth factor (NGF)를 이용하여 신경세포로 분화시킨 PC12 세포에 200 nM staurosporine을 투여하면 농도와 시간에 비례하여 세포 생존율이 감소하였는데 이 때 DNA의 분절현상과 caspase-3의 활성화가 관찰됨에 따라 이러한 세포 생존율 감소가 세포고사에 의한 것임을 확인하였다. 분화된 PC12 세포에 fura-2를 축적시키고 200 nM staurosporine을 투여하면서 세포내 칼슘농도를 측정한 결과 세포내 칼슘농도가 140 ± 24 nM 증가하였는데 세포외부에 칼슘을 제거한 경우 세포내 칼슘의 증가 속도와 양이 감소하였으나 아직도 칼슘이 74 ± 16 nM 증가하여 staurosporine이 세포 외부와 내부에서 칼슘을 동원하는 것을 확인하였다. 또한 세포외부의 칼슘을 제거하면 세포생존율이 26%에서 42%로 증가하였고 세포내부의 칼슘을 제거한 후에는 세포생존율이 54%로 증가하여 세포 외부로부터 유입되는 칼슘과 내부에서 유리되는 칼슘 모두 세포고사에 관여함을 확인하였다. 세포내부에서 유리되는 칼슘이 소포체에서 유리되는지 또는 다른 소기관에서 유리되는지 확인하기 위해 우선 세

포외부의 칼슘을 제거하고 ionomycin을 이용해 소포체 및 미토콘드리아에서 칼슘을 제거한 후 staurosporine을 투여하여도 세포내 칼슘이 증가되고, ionomycin과 monensin을 동시에 투여한 후에 staurosporine을 투여하면 칼슘이 증가되지 않아 staurosporine이 내부가 산성인 소기관, 즉 분비과립에서 칼슘을 유리함을 확인하였다. Confocal laser scanning microscope을 이용하여 미토콘드리아 내부의 칼슘이 staurosporine에 의해 증가함을 확인하여 staurosporine이 미토콘드리아에서 칼슘을 유리 하는 것이 아니라 세포질 내 증가한 칼슘이 미토콘드리아 내부로 유입되는 것을 확인하였다.

이상의 실험을 통해 신경세포로 분화된 PC12 세포에서 staurosporine에 의해 세포고사가 일어날 때 세포내 칼슘증가가 관여하며 이때 칼슘의 일부는 세포외부에서 유입되며 나머지는 세포내부 특히 분비과립에서 유리됨을 확인하였다.

★ 핵심되는 말 : 세포고사(Apoptosis), 유리 칼슘(ionized calcium, Ca^{2+}), staurosporine, PC12 세포

Staurosporine으로 유도된 세포고사에서

칼슘이온의 증가기전

〈지도 서 정 택 교수〉

연세대학교 대학원 치의학과

정 상 훈

제 1 장 서 론

세포고사 (apoptosis)는 원래 전자현미경으로 관찰했을 때 나타나는 특징에 의해 ‘괴사 (necrosis)’와는 구별되는 세포사로서 명명된 것이며, ‘apoptosis’는 고대 그리스어로 ‘dropping off or falling off petals from flowers, or leaves from tree’란 뜻을 갖고 있다 (Kerr 등, 1972). 그런데 세포고사를 특징으로 하는 세포사는 정상 발생 과정이나 성인 조직의 개편 (turnover)에 흔히 나타나기 때문에 병적인 세포사와 대비시켜 생리적 세포사 (physiological cell death)로 부르기도 한다. 또한 발생 과정 중의 세포사는 이미 예정되어 있는 것으로 간주하고 예정 세포사 (programmed cell death)라 부르기도 한다.

예정 세포사는 발생중인 모든 조직에서 관찰되기 때문에, 모든 세포는 인접 세포로부터 특수 신호를 받지 못하면 죽도록 프로그램 되어 있다는 가설도 제시되고 있다 (Raff, 1992).

세포고사가 일어나는 세포의 형태적 변화는 세포의 형에 따라 다소 변이가 있을 수 있지만, 다음과 같이 세 기로 나누어 생각할 수 있다 (Kerr 등, 1972). 제1기에는 축합 (condensation)이 특징이다. 핵에서는 염색질 (chromatin)이 축합되어 핵 주변부에 놓인 초생달 모양의 모자 형태로 관찰된다. 축합된 염색질 속에는 DNA 세사가 더 밀집되어 있다. 동시에 핵의 표면이 대개 비정상적으로 울퉁불퉁하다. 세포질은 용적이 줄어들면서 세포막이 당겨져 많은 돌기들이 형성된다. 이때쯤 세포는 인접 세포와 분리되며, 미세융모나 세포연접 등이 이어진다 (Wyllie 등, 1980). 세포 소기관은 평활내형질망 (smooth endoplasmic reticulum)이 팽창하는 것을 제외하고는 특별한 변화가 나타나지 않는 것으로 알려져 있다. 사립체는 팽창되지 않으며, 세포막의 투과성도 변하지 않는다. 조직 속의 세포고사가 진행되는 세포는 급성 염증 반응을 유발시키지 않는다. 제2기는 분절화 (fragmentation)가 특징이다. 때로 제1기와 다소 중복되기도 하며, 세포막이 당겨져 형성된 많은 세포질 돌기들이 뚜렷해진다. 이 돌기의 근위부가 더욱 잘룩해지면서 세포로부터 떨어져 나와 다양한 크기의 세포고사소체 (apoptotic body)를 형성한다. 제3기는 식세포작용 (phagocytosis)이 특징이다. 핵 및 세포질 조각들이 점진적으로 퇴행된다. 배양중인 세포의 경우 막이 파열되어 vital dye를 투과시키는데, 이를 이차 괴사 (secondary

necrosis)라 부르기도 한다. 이러한 현상은 실제 조직에서는 phagosome 내에서 일어난다. 결국 막이 없어지며 세포소기관이 구별되지 않고 용해소체 잔유체 (lysosomal residual body)를 이룬다.

세포고사는 조직의 항상성, 태아 발생 및 면역반응 등 정상 생리적 반응에 관여할 뿐 아니라 세포에 유해한 여러 자극 (사망 신호, death signal)에 대한 반응으로도 나타난다. 세포고사를 유도하는 신호들은 많은 종류가 있으며, 사망 수용체 (death receptor: Fas, TNF 수용체 등)의 자극, 성장인자 배제, 방사선 조사, 기타 유해한 화합물에의 노출 등이 세포고사를 유발한다.

세포내 이온화 칼슘 (ionized calcium, Ca^{2+})은 세균에서 고등동물의 신경세포에 이르기까지 가장 일반적인 이차 전령체로서 (Carafoli, 1992; Berridge, 1993; Clapham과 Neer, 1993; Pozzan 등, 1994) 세포의 수정, 성장, 분비, 평활근 및 심근 수축, 지각 감지 등에 이르는 다양한 기능을 수행한다. 또한 세포내 칼슘농도는 10-100 nM로, 세포 외부의 칼슘농도가 1-2 mM인 것에 비해 매우 낮은 농도로 유지되어야 하므로 세포내 칼슘농도의 항상성 유지를 위해서는 매우 정확한 조절 기전을 필요로 한다.

세포내 칼슘농도의 증가는 세포내 칼슘 저장고 (intracellular Ca^{2+} pool)로부터의 칼슘 유리와 세포막의 칼슘 통로를 통한 세포 외부로부터의 칼슘 유입에 의하며 (Berridge, 1991; Putney 등, 2001), 그 기전은 자극 또는 세포의 종류에 따라 다르다. 신경 세포, 크롬친화성 세포, 근육세포와 같은 흥분성 세포 (excitable cell)에서는 주로 막

전압 의존성 칼슘 통로 (voltage-dependent Ca^{2+} channel)를 통한 세포 외부로부터의 칼슘 유입이 중요한 역할을 하지만 ryanodine 수용체를 가진 칼슘 저장고로부터 Ca^{2+}에 의한 Ca^{2+} 유리 (Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release) 기전에 의해서도 세포질 내로 칼슘이 유리된다 (Miller, 1992; Clapham, 1995). 혈액세포, 외분비 세포와 같은 비흥분성 세포에서도 세포막을 통한 칼슘 유입과 세포내부 칼슘 저장고로부터의 칼슘 유리가 세포내 칼슘증가에 관여하지만 세포내 칼슘 저장고로부터의 칼슘 유출이 더 중요한 역할을 한다. 즉, 세포막 수용체에 호르몬이나 신경전달 물질이 결합하면 G-protein과 phospholipase C (PLC)가 순차적으로 활성화되어 세포막 인지질인 phosphatidy- linositol 4,5-bisphosphate (PIP_2)로부터 diacylglycerol (DAG)과 inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3)이 생성되면 IP_3가 세포내 IP_3 수용체를 가지는 칼슘 저장고에 결합하여 칼슘 저장고 막의 칼슘 통로를 통해 칼슘이 세포질 내로 유리된다 (Berridge, 1993). 이렇게 세포내 칼슘 저장고가 고갈되면 이로 인해 세포막 칼슘 통로가 활성화되어 칼슘이 유입된다 (Putny, 1990; Putney와 Bird, 1993).

세포내 칼슘 저장고로는 IP_3 수용체를 가지고 매우 빠른 속도로 칼슘을 유출입시키는 소포체 (endoplasmic reticulum)가 알려져 있다 (Beridge, 1993). 소포체는 소포체 막의 칼슘 펌프 (Ca^{2+} ATPase)를 이용하여 내부에 칼슘을 축적시키고, 칼슘과 결합하는 단백질인 calsequestrin과 calreticulin 등을 지니고 있어 고농도의 칼슘을 포함하는 능력을 가지고 있다. 그러나 소포체 외에도 세포내에 칼슘을 고농

도로 포함할 수 있는 소기관으로 미토콘드리아와 분비과립 (granule) 또는 소포 (vesicle) 등이 있다 (Martinez 등, 1996; Zhu 등, 1999). 미토콘드리아는 막전압을 -180 mV 정도로 유지하고 있으며 막에 칼슘을 유입시키는 Ca^{2+} uniporter가 있어서 미토콘드리아 내에 칼슘을 축적시키는 능력을 갖는다. 분비과립과 소포에도 칼슘이 많이 들어 있는 것으로 밝혀져 있으며 과립 막에 IP_3 수용체가 있어서 세포내 칼슘농도 조절에 직접적으로 관여할 가능성도 제시되었다 (Gerasimenko 등, 1996).

한편, 세포내 칼슘증가가 세포의 고유한 기능을 위해 필수적인 과정임에도 불구하고, 높은 농도로 지속될 경우에는 세포에 치명적인 독작용을 유발한다 (Bootman과 Berridge, 1995). 그러므로 세포내 칼슘을 감소시키는 기전은 칼슘을 증가시키는 기전 못지 않게 중요하다. 세포내 칼슘농도를 감소시키는 데에는 세포 밖으로의 유출, 칼슘 저장고로의 이동 그리고 세포내 IP_3 생성 억제 등을 들 수 있고, 이 과정에 칼슘 의존성 인산화 단백질인 protein kinase C(PKC)가 관여할 것으로 생각하고 있다 (Nishizuka, 1986). PKC는 DAG에 의해 활성화되지만 IP_3에 의한 칼슘증가 기전과 동시에 작용함으로써 세포내 칼슘농도를 효율적으로 조절하고 있다 (Yule 등, 1991; Willems 등, 1993). PKC에 의한 세포내 칼슘 동원 억제는 PKC가 세포막의 칼슘 펌프를 인산화시켜 세포 외부로의 칼슘 방출량을 늘려 나타난다는 보고가 있으며 (McCarthy와 Janet, 1989). 이와는 다른 기전으로 PKC가 PLC의 기능을 억제하여 IP_3에 민감한 칼슘 저

장고의 칼슘 유리를 억제한다는 견해도 있다 (Murray 등, 1989; Yang 등, 1994).

Staurosporine은 PKC의 매우 강력한 억제제 중 하나로서, PKC를 활성화시켜 세포내 칼슘증가를 억제하는 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 함께 세포내 신호전달과정에서 PKC의 역할을 연구하기 위해 널리 이용되고 있는 약물이다 (Tamaoki 등, 1986; Willems 등, 1993). 그러나 staurosporine은 PKC 억제작용과는 별도로 세포고사를 유발하는 대표적인 약물로 사용되고 있다. Staurosporine은 많은 세포에서 미토콘드리아로부터 cytochrome c를 유리하고 caspase-3를 활성화시켜서 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Green, 2000). 그런데 근래 staurosporine이 세포고사를 일으킬 때 세포내 칼슘증가가 유발되며 이러한 칼슘증가가 세포고사를 일으키는 한 가지 요인이라는 보고가 있다 (Prehn 등, 1997; Kruman 등, 1998). 그러나 칼슘의 증가가 어느 정도로 세포고사에 관여하는지 그리고 staurosporine에 의해 세포내 칼슘이 증가될 때 칼슘이 어느 부위에서 동원되는지는 아직도 밝혀지지 않았다.

따라서 본 실험에서는 nerve growth factor (NGF)에 의해 신경세포로 분화한 PC12 세포를 이용하여 staurosporine이 세포고사를 일으킬 때 세포내 칼슘농도가 증가하는지 그리고 만약 세포내 칼슘이 증가한다면 이러한 칼슘증가가 세포고사를 유발하는지 확인하고 칼슘 동원 부위가 어디인지 확인하고자 하였다.

제 2 장 연구 방법

1. PC12 세포의 배양

분화되지 않은 PC12 세포의 경우 5% fetal bovine serum (FBS)과 10% horse serum (HS)이 든 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양했다. Staurosporine 처리 전에 1% FBS와 2% HS가 든 배지로 교환한 후 처리했다. PC12 세포를 신경세포로 분화시키기 위하여 collagen이 coating 되어 있는 배양용기 위에 NGF (50 ng/ml) 및 1% FBS와 2% HS가 든 DMEM 배지에서 7일간 처리했다.

2. MTT assay를 이용한 세포 생존율 측정

분화하지 않은 세포와 신경세포로 분화시킨 세포를 48 well 배양용기 안에서 staurosporine으로 처리하였다. 처리 후에 20 μl의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, 5 mg/ml in sterile phosphate-buffered saline) 용액을 넣은 후 37 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. 200 μl의 solubilizing solution (50% dimethylformamide and 20% sodium dodecyl sulfate, pH 4.8)을 넣고 overnight 반응시킨 후, 570 nm에서 상대적인 흡광도 정도를 비

교했다. 세포의 생존율은 staurosporine을 처리하지 않은 대조군 세포에 배지와 MTT 용액을 넣은 흡광도 값을 100으로 했을 때, staurosporine 처리군에서의 상대적인 생존율 값을 %로 산정했다.

3. Western blot

세포를 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 μg leupeptin and 1 μg aprotinin per ml)에서 반응시킨 다음, 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 전체 단백질을 5% non-fat dried milk에서 1시간 동안 반응시킨 다음 anti-poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) antibody에서 overnight 반응시켰다. Washing buffer에서 3 회 씻은 다음 1:2000으로 희석된 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody와 반응시킨 후 ECL detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, Braunschweig, Germany)으로 반응 정도를 확인했다.

4. 세포내 칼슘농도 및 미토콘드리아내 칼슘농도의 측정

세포내의 Ca^{2+} 농도의 변화는 Ca^{2+}에 결합하는 형광염료인 fura-2를 이용하여 측정했다. 분화되지 않은 세포와 분화된 세포에 각각 4

μM fura-2 AM를 넣어 37°C에서 20분간 반응시킨 후 HCO_3^--buffered 용액 [(in mM): 110 NaCl, 4.5 KCl, 1 NaH_2PO_4, 1 $MgSO_4$, 1.5 $CaCl_2$, 5 HEPES-Na, 5 HEPES free acid, 25 $NaHCO_3$,10 D-glucose (pH 7.4)]을 분당 2 ml의 속도로 흘려주면서 세포내의 Ca^{2+}의 변화를 측정했다.

세포내 칼슘농도의 측정은 excitation wavelength 340 nm과 380 nm을 반복하고 emission fluorescence 510 nm에서 형광강도의 변화값을 Grynkiewicz 식에 따라 다음과 같이 산정했다 (Grynkiewicz 등, 1985).

$$[Ca^{2+}]i = K_d.SF_2/Sb_2\ [(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$$

이때 K_d는 형광물질 (fura-2)의 측정이온에 대한 해리상수 (effective dissociation constant)로 fura-2는 칼슘에 대해 224 nm의 값을 갖는다. R은 세포에서 측정된 340 nm/380 nm fluorescence 비율이고 R_{min} 은 2.5 mM EGTA에 반응해서 칼슘이 완전히 없을 때 PC12 세포의 340/380 fluorescence 비율 값이고 R_{max}는 칼슘을 포화시키기 위해 25 μM ionomycin에 반응한 340/380 fluorescence 비율 값이다. SF_2 는 R_{min}때 380 nm의 형광강도 값, Sb_2 : R_{max} 때 380 nm의 형광강도 값을 나타냈다.

미토콘드리아내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]m$)는 rhod 2-AM을 이용하여 측정했다. 분화하지 않은 세포와 분화한 세포를 4 μM rhod-2 AM에서 60분 동안 처리한 후 HBSS 용액에서 씻어냈다. Rhod-2 AM이 미토콘드리아에서만 남아있도록 하기 위하여 세포질에 남아있는 형

광염료를 CO_2 incubator에서 최소 6시간 이상 방치한 후 측정했다. 미토콘드리아내 Ca^{2+}의 변화는 confocal laser scanning microscope을 이용하여 excitation 514 nm와 emisson 535 nm에서 측정했다.

5. DNA 분절 확인

Collagen으로 도포한 plate에 5 X 10^5개 세포를 깔고 7일간 세포 분화를 유도한 후 staurosporine을 처리하고 0.5% Triton X-100, 5 mM Tris-HCl(pH 7.4), 20 mM EDTA를 포함한 lysis buffer로 4°C에서 30분간 lysis 시켰다. 원심분리 후 phenol-choloroform-isoamyl alcohol (25:24:1)로 상층액을 얻어 ethanol을 이용해 -20°C에서 DNA를 추출하였다. 0.5 mg/ml ethidium bromide (EtBr)를 포함한 1.2% agarose gel electrophoresis로 분리하고 UV light로 확인하였다.

제 3 장 연구결과

1. PC12 세포에서 Staurosporine에 의한 세포고사

PC12 세포를 NGF로 분화시킨 후 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 μM, 2 μM, 5 μM의 staurosporine을 투여하고 12시간 후 MTT 방법으로 세포의 생존율을 측정한 결과 staurosporine을 투여하지 않은 경우를 100%로 했을 때 각각 72.0 ± 5.5%, 66.1 ± 1.8%, 43.7 ± 3.4%, 26.2 ± 3.6%, 18.2 ± 1.3%, 13.5 ± 0.78%로 감소하였다 (n=5; Fig. 1A). Staurosporine 농도가 200 nM일 때 본 실험을 수행하기에 적당한 속도로 세포사를 유발하는 것으로 판단되어 이후의 모든 실험은 200 nM의 staurosporine을 사용하여 수행하였다. 분화한 PC12 세포에 200 nM의 staurosporine을 투여한 후 시간에 따른 세포의 생존율의 변화를 측정한 결과 Fig. 1B에서와 같이 시간이 증가함에 따라 세포의 생존율이 3시간 후 93.8 ± 3.1%, 6시간 후 86.2 ± 4.3%, 12시간 후 69.4 ± 4.4% 그리고 24시간 후 47.9 ± 4.5%로 감소됨을 확인하였다 (n=5). Staurosporine에 의한 세포의 죽음은 전형적인 세포고사의 특징을 보이는 것으로 알려져 있는데 본 실험에서도 staurosporine 처치로 인해 PC12 세포의 DNA 분절현상과 (n=3; Fig. 2A) caspase-3의 활성화에 의한 PARP의 절단을 확인하

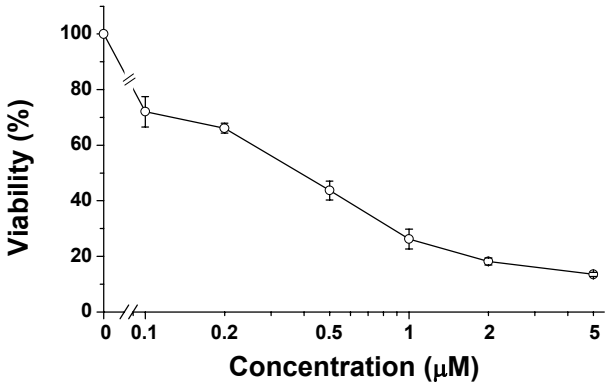
여 (n=4; Fig. 2B) staurosporine이 PC12 세포에서 세포고사를 유발함을 확인하였다.

2. Staurosporine에 의한 세포고사에 칼슘이 미치는 영향

세포고사 과정에 세포내 칼슘증가가 관여한다는 보고가 있으므로 PC12 세포에서 staurosporine에 의해 세포고사가 일어날 때 칼슘이 관여하는지 확인하기 위해 우선 staurosporine에 의해 PC12 세포내 칼슘농도가 증가하는지 확인하였다. Fig. 3에서와 같이 세포 외부에 칼슘을 포함하고 있는 경우에는 200 nM staurosporine에 의해 세포내 칼슘농도가 50분 후에는 140 ± 24 nM (n=4)이 증가하였다. 세포 외부의 칼슘을 제거한 후 200 nM staurosporine으로 세포를 자극한 경우에도 칼슘농도가 증가하였으나 이 경우 증가속도가 세포외부에 칼슘이 있는 경우에 비해 현저히 감소하여 50분 후에는 칼슘농도가 74 ± 16 nM (n=4) 증가하였다.

위의 실험을 통해 확인한 세포내 칼슘증가가 staurosporine에 의한 세포고사 유발에 실제로 기여하는지 아니면 세포고사 과정에 부가적으로 나타나는 현상인지 확인하기 위하여 세포 외부 혹은 세포 내부의 칼슘증가를 EGTA 또는 EGTA-AM으로 봉쇄한 후 staurosporine에 의한 세포고사 유발정도를 비교하였다.

A.



B.

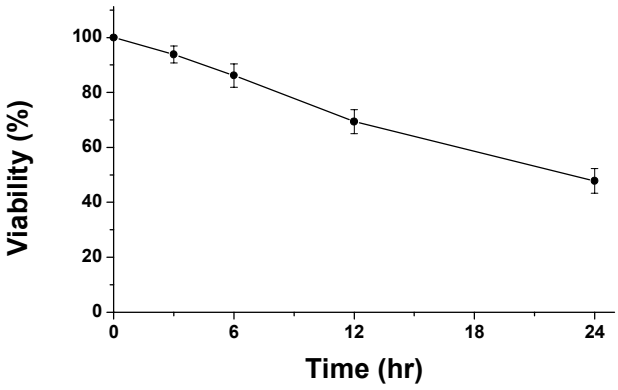
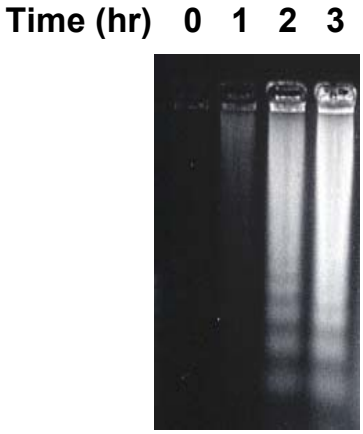


Fig. 1. The effect of staurosporine on cell death in differentiated PC12 cells. Staurosporine induces cell death in dose-dependent (A) and time-dependent (B) manner. Viable cells were assessed by MTT assay. Data are means ± S.E.M.s of five independent experiments.

A.



B.

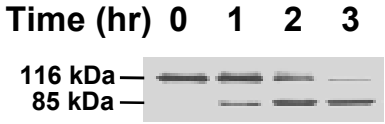


Fig. 2. Staurosporine induced apoptosis in differentiated PC12 cells. A. Staurosporind induced DNA fragmentation (n=3). B. Staurosporine induced PARP cleavage (n=4). Cells were analyzed by Western blot with an anti-PARP monoclonal antibody. Cells were incubated with 200 nM staurosporine for the indicated times.

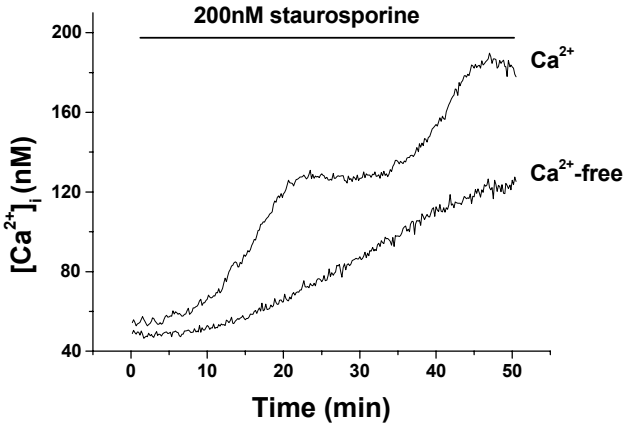


Fig. 3. Effect of staurosporine on $[Ca^{2+}]_i$ in differentiated PC12 cells. Application of 200 nM staurosporine induced $[Ca^{2+}]_i$ increases in the presence and absence of extracellular Ca^{2+}. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ were measured in differentiated PC12 cells using ratiometric fluorescence recording techniques. Fura-2 loaded cells were exposed to staurosporine for indicated times. The result is representative of four independent experiments.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 200 nM staurosporine을 48시간 처리한 후 세포생존율이 100%에서 26.1 ± 5.8% (n=4)로 감소하였으나 EGTA를 이용하여 세포외부의 칼슘을 제거한 후 staurosporine에 의한 세포생존율은 82.8 ± 5.3%에서 42.2 ± 3.7% (n=4)로 감소하였으며 EGTA-AM을 이용하여 세포내 칼슘증가를 억제한 후 staurosporine에 의한 세포생존율은 78.2 ± 2.1%에서 53.7 ± 2.0% (n=4)로 감소하여 세포내 칼슘증가가 세포고사에 관여함을 확인하였다.

3. 소포체 및 미토콘드리아가 세포내 칼슘증가에 미치는 영향

위의 실험을 통해 칼슘의 일부는 세포 외부에서 유입되고 일부는 세포내부에 저장되어 있는 칼슘이 세포질로 유리됨을 알 수 있다. 따라서 staurosporine에 의해 세포질 내로 칼슘을 유리시키는 세포내 소기관이 무엇인지를 확인하였다. 우선 소포체가 대표적인 세포 내 칼슘 저장고이므로 staurosporine이 소포체에서 칼슘을 유리하는지 아니면 다른 소기관이 관여하는지 확인하였다. Fig. 5A에서와 같이 세포 외부에 칼슘을 제거한 상태에서 1 μM ionomycin을 투여하면 세포내 칼슘이 53 ± 10.2 nM에서 77.2 ± 12.4 nM (n=5)로 증가하였다가 곧 감소했다. 이는 ionomycin이 세포내 소포체에 포함되어 있는 칼슘을 유리시키고 세포질내 칼슘은 세포막 칼슘 펌프 (plasma membrane Ca^{2+} ATPase)에 의해 세포 밖으로 유출되기 때문이다. 이와 같은 상태에서 200 nM staurosporine을 투여했을 때 세포질내 칼슘이 27 ± 11.4 nM (n=5) 증가하여 소포체 외에도 다른 세포내

소기관이 staurosporine에 의해 칼슘을 유리시키는 데 관여함을 확인할 수 있었다. Fig. 5B에서 ionomycin을 투여하여 칼슘이 증가하였다가 감소한 후 소포체에 있는 칼슘 펌프인 SERCA (sarco- endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase)를 봉쇄하여 소포체에서 칼슘을 유리하는 약물인 thapsigargin (1 μM)과 미토콘드리아에서 칼슘을 유리시키는 약물인 4 μM carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazone (FCCP)을 투여하여도 칼슘증가가 전혀 나타나지 않았다 (n=3). 따라서 ionomycin이 소포체와 미토콘드리아에서 칼슘을 유리시켰다는 것과 staurosporine에 의한 칼슘증가가 소포체는 물론 미토콘드리아와 관계가 없는 다른 소기관에서도 유리되고 있음을 확인할 수 있었다.

미토콘드리아는 세포의 사멸에 밀접하게 관계가 있으며 미토콘드리아내 칼슘농도의 감소 또는 증가가 사멸을 유발한다는 보고가 있으므로 (Kruman 등, 1998; Kruman과 Mattson, 1999). 미토콘드리아 내부의 칼슘 변화를 좀더 자세하게 살펴보았다. 미토콘드리아 내부에 칼슘의 변화를 측정할 수 있는 rhod-2를 축적시키고 staurosporine을 투여하여 칼슘농도가 어떻게 변하는지 confocal microscopy를 이용하여 관찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 분화된 PC12 세포의 미토콘드리아 내부 칼슘농도가 200 nM staurosporine 투여로 증가하는 것이 관찰되어 (n=3), staurosporine은 미토콘드리아에서 칼슘을 유리시키는 것이 아니라 오히려 미토콘드리아 내부에 칼슘을 증가시키는 것을 확인하였다.

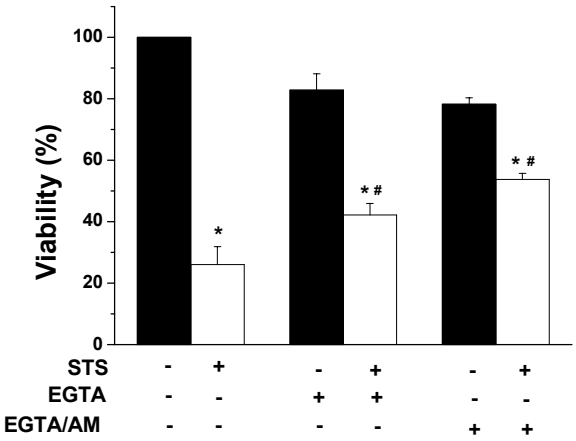
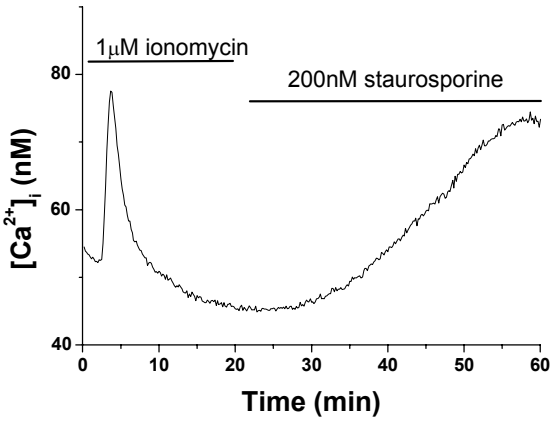


Fig. 4. Effect of Ca^{2+} chelation on cell death in differentiated PC12 cells. PC12 cells were incubated with (+) or without (-) 200 nM staurosporine for 48 hours. Cells were pretreated with (+) or not with (-) EGTA or EGTA/AM. Viable cells were detected with MTT assay. Data are means ± S.E.M.s of four independent experiments. * and # indicate the differences from control group and from staurosporine-treated (without EGTA or EGTA/AM) group, respectively. The statistical significance of differences was assessed using unpaired Student's *t* test. ($p<0.05$)
STS: staurosporine

A.



B.

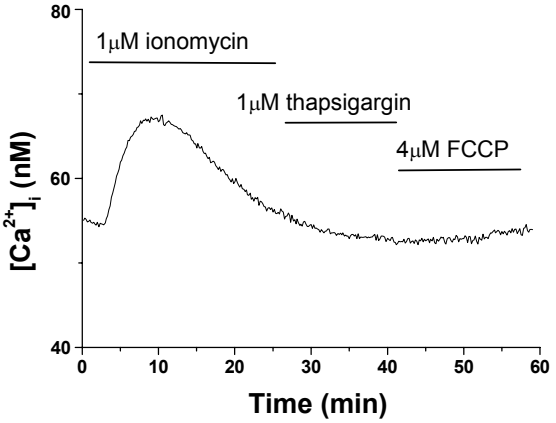


Fig. 5. Release of Ca^{2+} from non-ER, non-mitochondrial subcellular compartment in differentiated PC12 cells. A. After 20 min application of 1 μM ionomycin, 200 nM staurosporine was added (n=5). B. After 25 min application of 1 μM ionomycin, 1 μM thapsigargin and 4 μM FCCP were subsequently added (n=3).
FCCP : carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone
Experiments were performed in the absence of extracellular Ca^{2+}.

4. 산성 분비과립 또는 소포가 세포내 칼슘증가에 미치는 영향

신경 세포 또는 분비 세포에는 내부가 산성인 과립이 존재하며 이곳에 많은 양의 칼슘이 포함되어 있다고 알려져 있다. 그런데 이러한 산성 과립에서는 ionomycin에 의해 칼슘이 유리되지 않고 내부 pH를 외부 pH와 같도록 해주어야만 ionomycin에 의해 칼슘이 유리된다 (Martinez 등, 1996). 그러므로 위의 실험을 통해서는 이들 산성 과립에서 칼슘이 유리되는지를 확인할 수 없다. 따라서 이 실험에 사용한 PC12 세포의 산성 과립에 충분한 칼슘이 있는지 그리고 있다면 이 칼슘이 staurosporine에 의해 유리되는지를 다음과 같은 실험을 통해 확인하고자 하였다.

먼저 산성 과립 내에 칼슘이 충분히 포함되어 있는지 확인하기 위해 우선 세포외부에 칼슘이 없는 상황에서 1 μM ionomycin으로 소포체와 미토콘드리아 내부의 칼슘을 제거한 후 과립 내부와 외부의 pH를 동일하도록 만드는 20 μM monensin을 투여한 경우 칼슘이 15 ± 8.8 nM (n=4) 증가하여 산성 과립에 충분한 양의 칼슘이 포함되어 있음을 확인하였다 (Fig. 7A).

다음으로 이 산성 과립내 칼슘이 staurosporine에 의해 유리되는지 확인하기 위하여 1 μM ionomycin과 20 μM monensin을 사용하여 과립내 칼슘을 제거한 후 200 nM staurosporine을 투여한 경우 세포내 칼슘증가가 관찰되지 않아 (n=3) staurosporine이 산성 과립에서 칼슘을 유리함을 확인하였다 (Fig. 7B).

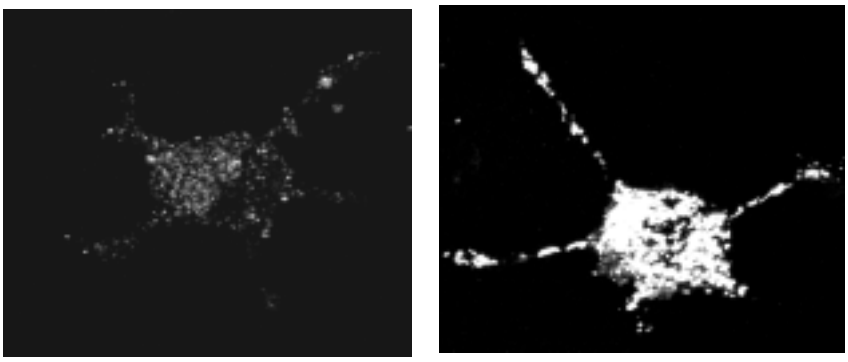
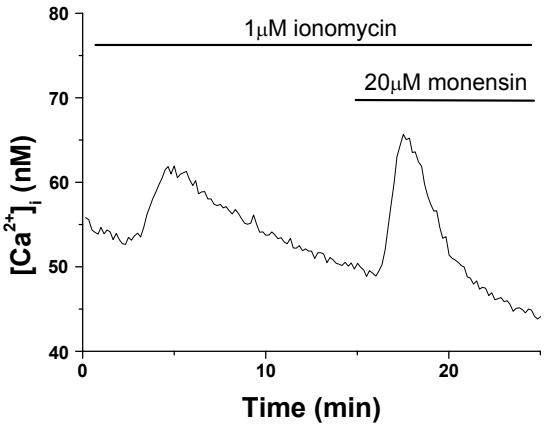


Fig. 6. Effect of staurosporine on intra-mitochondrial Ca^{2+} concentration in differentiated PC12 cells. Neuronally differentiated PC12 cells were loaded with rhod-2 for 40 min and then incubated without (left) and with (right) 200 nM staurosporine for 1 hour. Intra-mitochondrial Ca^{2+} concentration was detected with confocal microscopy. Similar results were observed in three independent experiments.

A.



B.

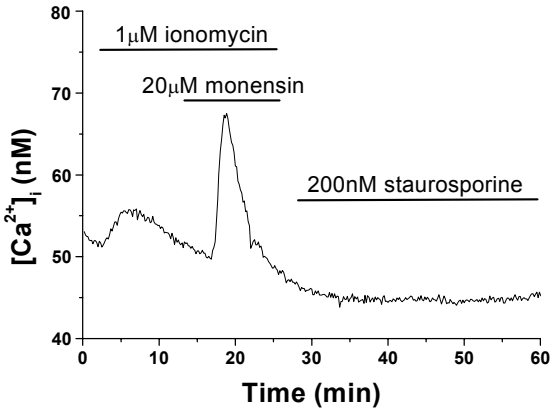


Fig. 7. Involvement of subcellular acidic compartment in staurosporine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in differentiated PC12 cells. A. Monensin(20 μM) induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of 1 μM ionomycin (n=4). B. Staurosporine (200 nM) did not increase in $[Ca^{2+}]_i$ when cells were pretreated with ionomycin+monensin (n=3). Experiments were performed in the absence of extracellular Ca^{2+}.

제 4 장 총괄 및 고찰

세포고사는 조직, 장기의 분화 및 노화 과정에서 손상되었거나 불필요한 세포를 제거하는 기전으로서 이는 정상적인 발생과정에서 필수적으로 나타나는 현상이다 (Hengartner, 2000). 그러나 이와 같은 현상이 생리적인 상황에서 뿐 아니라 병리적인 자극에 의해서도 일어나기 때문에 세포고사는 정상적인 발생과 생명유지에 필수적인 과정인 동시에 병적인 세포사를 유발하는 이중적인 면을 지니고 있다. 즉, 세포고사의 촉진과 억제라는 비정상적인 세포고사과정에 의해서 퇴행성 뇌질환 또는 암 발생이 유발된다 (Marsman과 Barrett, 1994; Bredesen, 1995; Yuan과 Yankner, 2000). 세포고사는 세포질의 축소와 핵질의 응축, 그리고 DNA 분절이라는 특징을 나타내며 caspase family의 활성화, 미토콘드리아 기능의 비정상화와 같은 생화학적인 현상을 수반한다 (Miller, 1997; Zamzami와 Kroemer, 2001).

세포고사의 유발에 세포내 칼슘의 증가가 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 칼슘 ionophore인 A23187과 소포체의 Ca^{2+} ATPase 억제제인 thapsigargin에 의해 증가된 칼슘이 세포의 apoptosis를 유도한다는 보고는 칼슘 평형의 상실이 세포의 사멸을 유도함을 입증하는 것이다 (Joseph 등, 1993; Takei와 Endo, 1994). 칼슘은 endonuclease의 활성을 유도하며 많은 protease를 활성화시

킬 뿐 아니라 (Gaido와 Cidlowski, 1991) 미토콘드리아 내로 대량의 칼슘이 유입됨으로 인해 미토콘드리아의 대사장애를 유발하여 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Berridge 등, 1998).

본 실험은 신경세포에서 세포고사가 일어날 때 세포내 칼슘증가가 중요한 역할을 담당하는지 확인할 목적으로 NGF로 분화시킨 PC12 세포를 사용하였으며 PC12 세포의 세포고사를 유발할 목적으로 staurosporine을 사용하였다. Staurosporine은 세포고사를 유발하는 대표적인 약물로서 많은 세포에서 DNA 분절 및 caspase-3 활성화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 실험결과 PC12 세포에서 200 nM의 staurosporine이 세포생존율을 시간에 따라 감소시키고 이 때 DNA 분절을 야기하는 것으로 보아 분화한 PC12 세포에서 staurosporine을 사용하는 것이 세포고사 과정에서 칼슘의 역할을 실험하기에 적절한 것으로 판단되었다.

따라서 다음으로 staurosporine이 세포내 칼슘을 증가시키는지 확인하는 실험을 실시하였다. 분화시킨 PC12 세포에 fura-2를 축적시키고 200 nM staurosporine을 투여하여 세포내 칼슘농도의 변화를 측정한 결과 세포내 칼슘농도가 지속적으로 증가하였다. 이러한 칼슘의 증가가 세포 외부의 칼슘이 유입되어 나타나는지 아니면 세포내에 저장되어 있는 칼슘이 유리되어 나타나는지 확인하기 위해 세포외부의 칼슘을 제거한 후 같은 실험을 실시한 결과 증가 속도와 증가 양은 줄었지만 상당량의 칼슘이 증가하여 stuarosporine은 세포외부와 내부에서 칼슘을 동원한다는 것을 확인하였다. 이러한 칼슘

농도의 증가가 DNA의 분절이 뚜렷하게 나타나기 전에 관찰되는 것으로 보아 세포내 칼슘농도의 증가가 DNA 분절을 야기했을 가능성이 있다. 따라서 세포 외부로부터의 칼슘 유입 및 세포내부의 칼슘 저장고로부터의 칼슘유리가 세포고사유발에 어느 정도 관여하는지 확인하기 위해 세포외부의 칼슘을 칼슘 chelator인 EGTA를 처리하거나 세포내 칼슘을 제거하는 EGTA-AM을 처리한 후 staurosporine을 투여한 결과 세포외부 칼슘제거로 세포고사가 줄었고 세포내부의 칼슘제거로 더 크게 세포고사를 방지하여 세포내 칼슘증가가 세포고사에 중요한 역할을 함을 확인하였다. 그러나 세포내 칼슘을 제거한 후에도 어느 정도의 세포고사는 계속 일어나므로 칼슘증가 외에도 세포고사에 관여하는 요인이 있음을 알 수 있었다.

신경세포의 경우 세포막에 존재하는 전압의존성 칼슘 통로 (voltage-dependent Ca^{2+} channel) 및 수용체 작동성 칼슘 통로 (receptor-operated Ca^{2+} channel) 등과 같은 칼슘 통로를 통한 칼슘의 유입이 세포내 칼슘증가에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Berridge, 1998). 그러나 신경세포에도 소포체에 고농도의 칼슘이 존재하며 소포체 막의 IP_3 수용체와 ryanodine 수용체를 통해 세포질 칼슘농도를 조절하고 있다. 뿐만 아니라 이 외에도 미토콘드리아 및 분비 과립 등에 칼슘이 상당량 포함되어 있다. 따라서 staurosporine이 세포질내 칼슘농도를 증가시킬 때 세포내 어떤 소기관에서 칼슘이 유리되는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여 세포막과 세포내 소기관에 칼슘 운반체를 만들어 주는 ionomycin을 사용하였다. ionomycin은

내부가 산성인 세포내 소기관을 제외한 모든 막에 칼슘 운반체를 형성하기 때문에 세포외부에 칼슘이 없는 상태에서는 소포체 및 미토콘드리아 내에 포함되어 있는 칼슘을 모두 유리시켜 세포 밖으로 퍼낸다. 이는 세포 외부에 칼슘이 없는 상황에서 ionomycin 투여 후 thapsigargin이나 FCCP를 투여하여도 세포내 칼슘의 증가가 없는 것을 보아도 확인할 수 있다.

그런데 staurosporine이 소포체, 미토콘드리아 등에 칼슘이 없는 상태에서도 세포질내 칼슘을 증가시켰으며 이는 이들 소기관 외에 다른 세포내 소기관에서 칼슘을 유리시켰음을 보여준다. 그러나 이 결과가 소포체나 미토콘드리아에서 칼슘이 전혀 유리되지 않음을 나타내지는 않는다. 특히 미토콘드리아는 세포고사와 관련하여 미토콘드리아내 칼슘의 증가가 중요한 역할을 한다는 보고와 반대로 칼슘의 감소가 중요하다는 상반된 견해가 존재하므로 본 실험에서도 미토콘드리아 내의 칼슘농도 변화를 좀 더 확실하게 밝힐 필요가 있었다. 따라서 미토콘드리아 내부의 칼슘농도를 직접 측정할 수 있는 rhod-2를 사용하여 미토콘드리아내 칼슘농도의 변화를 측정한 결과 칼슘농도가 증가하는 것으로 밝혀져 세포질내 칼슘농도가 증가할 때 미토콘드리아에서 칼슘이 유출되는 것이 아니라 오히려 다른 곳에서 유래되어 세포질내 증가한 칼슘이 미토콘드리아내로 들어감을 보여주었다. 본 실험에서 미토콘드리아내 증가한 칼슘이 세포고사를 유발하는데 관여한다는 증거는 없지만 미토콘드리아에 고농도의 칼슘이 축적되면 미토콘드리아의 대사기능에 장애가 오고 미토콘드리아

막에서 cytochrome c가 유리되어 세포고사를 유발한다는 보고가 있으므로(Berridge 등, 1998) 이러한 결과가 세포고사 유발에 어느 정도 관여할 것으로 추측된다.

소포체와 미토콘드리아 외에 staurosporine에 의한 세포질 내 칼슘 농도 증가에 관여하는 소기관이 있음이 확인되었으므로 ionomycin에 의해 칼슘이 유리되지 않는 내부가 산성인 소기관이 staurosporine에 의해 칼슘을 유리하는지 확인하였다. 내부가 산성인 이러한 소기관에서 칼슘을 유리하기 위해서는 소기관 내부의 pH를 외부의 pH와 같도록 해주면 ionomycin의 작용이 나타나게 된다. 소기관 내부의 pH를 외부의 pH와 같도록 해주기 위하여 Na^+/H^+ exchanger를 막에 형성하여 소기관 내부와 외부의 수소 이온 농도차를 없애주는 monensin을 사용하였다. Ionomycin과 monensin 투여에 의해 세포질내 칼슘이 증가하였는데 이 때 칼슘증가 양이 ionomycin 단독 투여에 의한 칼슘증가 양에 비해 오히려 많은데 이는 내부가 산성인 세포내 소기관내에 소포체, 미토콘드리아에 비해 더 많은 칼슘이 포함되어 있음을 보여준다. 뿐만 아니라 ionomycin과 monensin을 사용하여 세포내 산성 소기관으로부터 칼슘을 제거한 후에는 staurosporine이 칼슘을 증가시키지 못하여 staurosporine이 산성인 소기관에서 칼슘을 유리시키는 것을 확인하였다. 위의 실험 결과를 통하여 내부가 산성인 소기관이 정확하게 무엇인지는 알 수 없었다. 다만, 이러한 소기관으로서 분비과립, lysosome 그리고 골지체 등이 알려져 있는데 외분비선 세포인 타액선 세포의 경우 lysosome이나 골지체에

비해 분비과립에 대량의 칼슘이 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며 (Martinez 등, 1996) 신경세포에서도 과립내에 고농도의 칼슘이 들어 있어, NGF에 의해 신경세포로 분화한 PC12 세포에서도 분비과립이 staurosporine에 의해 칼슘을 유리하는 산성 소기관인 것으로 추측된다.

이상의 실험결과로 신경세포로 분화한 PC12 세포에서 staurosporine에 의해 세포고사가 유발될 때 세포내 칼슘증가가 세포고사 유발에 관여하며 칼슘은 세포외부에서 유입되기도 하지만 세포내부의 칼슘저장부위, 특히 내부가 산성인 분비과립에서도 많은 양이 유출되어 세포질내 칼슘농도를 증가시킨다는 것을 확인하였다.

제 5 장 결 론

NGF를 이용하여 신경세포로 분화시킨 PC12 세포에서 staurosporine에 의한 세포고사 과정에 세포내 칼슘이 관여하는지 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Staurosporine 투여 후 PC12 세포의 세포생존율을 측정한 결과 staurosporine의 농도 및 투여 시간에 비례하여 생존율이 감소함을 확인하였다.
2. 200 nM Staurosporine에 의한 세포사 과정에서 DNA의 분절현상과 caspase-3의 활성화가 유발되므로 staurosporine은 PC12 세포에서 세포고사를 유발함을 확인하였다.
3. 200 nM staurosporine 투여로 세포내 칼슘농도가 증가하였는데 세포외부의 칼슘이 존재하는 경우 140 ± 24 nM, 세포외부의 칼슘을 제거한 경우에는 74 ± 16 nM이 증가하여 세포내부와 외부에서 칼슘을 동원함을 확인하였다.
4. Staurosporine 200 nM 24 시간 투여로 인해 세포생존율이 100%에서 26%로 감소하였으나 세포외부의 칼슘을 제거한 경우에는 세포생존율이 83%에서 42%로 감소하였으며 세포내 칼슘을 제거한 경우에는 78%에서 54%로 감소하여 칼슘의 증가가 세포고사를 유발하는 요인임을 확인하였다.

5. 세포 외부의 칼슘을 제거하고 ionomycin을 이용하여 세포내 소포체와 미토콘드리아로부터 칼슘을 제거한 후에도 200 nM staurosporine이 세포내 칼슘을 증가시켜 소포체나 미토콘드리아 외에 다른 세포내 소기관에서 칼슘을 동원하는 것을 확인하였다.
6. 미토콘드리아내 칼슘변화를 측정한 결과 200 nM의 staurosporine이 미토콘드리아로부터 칼슘을 유리시키는 것이 아니라 미토콘드리아 내로 칼슘을 축적시킴을 확인하였다.
7. Ionomycin 투여로 소포체와 미토콘드리아내 칼슘을 제거한 후에 monensin을 투여하면 세포내 칼슘이 증가하여, 분비과립이나 소포와 같은 내부가 산성인 세포내 소기관에 상당량의 칼슘이 포함되어 있음을 확인하였다.
8. Ionomycin과 monensin을 이용하여 소포체, 미토콘드리아 및 내부가 산성인 소기관에서 칼슘을 제거한 후에는 200 nM staurosporine이 세포내 칼슘을 증가시키지 못하는 것을 확인하여 분비과립이나 소포와 같은 내부가 산성인 세포내 소기관이 staurosporine에 의한 세포내 칼슘증가에 중요한 동원부위임을 확인하였다.

이상의 실험결과로 신경세포로 분화한 PC12 세포에서 staurosporine이 세포고사를 유발하며 이때 세포내 칼슘증가가 세포고사 유발에 관여함을 확인하였고 세포질 내 증가하는 칼슘은 세포외부에서 유입되기도 하지만 세포내부의 칼슘저장부위, 특히 내부가 산성인 분비과립에서 많은 양이 유출됨을 확인하였다. 이상의 실험 결과를 바탕으로

약물이나 유해 화합물에 의한 세포고사를 억제하는 방법으로 분비과립 등으로부터의 칼슘 동원을 막는 방법을 연구, 개발할 필요가 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

Berridge, M.J.(1991) Cytoplasmic calcium oscilliation : A two pool model. Cell Calcium 12: 63-72

Berridge, M.J.(1993) Inositol triphosphate calcium signalling. Nature 361: 315-325

Berridge, M.J.(1998) Neuronal calcium signaling. Neuron 21: 13-26

Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P.(1998) Calcium - a life and death signal. Nature 395: 645-648

Bootman, M.D. and Berridge, M.J.(1995) The elemental principles of calcium signaling. Cell 83: 675-678

Bredesen DE(1995) Neural apoptosis. Ann. Neurol. 38: 839-851

Carafoil E.(1992) The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. J. Biol. Chem. 267: 2115-2118

Clapham D.E.(1995) Calcium signalling. Cell 80: 259-268.

Clapham D.E. and Neer E.J.(1993) New roles for G-protein βγ -dimers in transmembrane signalling. Nature 365: 403-406

Gaido ML and Cidlowski JA(1991) Identification, purification and characterization of a calcium-dependent endonuclease

(NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. J. Biol. Chem. 266: 18580-18585.

Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV, Petersen OH(1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca2+ from single isolated pancreatic zymogen granules. Cell 84: 473-480.

Green D.R.(2000) Apoptotic pathways: Paper wraps stone blunts scissors. Cell 102: 1-4

Grynkiewicz G., Poenie M. and Tsien R.Y.(1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 269: 3440-3450

Hengartner MO(2000) The biochemistry of apoptosis. Nature 407: 770-776

Joseph R, Li W and Han E.(1993) Neuronal death, cytoplasmic calcium and internucleosomal DNA fragmentation: evidence for DNA fragments being released from cells. Brain Res Mol Brain Res. 17: 70-76.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.(1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257.

Kruman I, Guo Q, Mattson MP.(1998) Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial

dysfunction and apoptosis in PC12 cells. J. Neurosci. Res. 51: 293-308.

Kruman II., Mattson MP.(1999) Pivotal Role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. J. Neurochem. 72: 529-540

Marsman DS and Barrett JC(1994) Apoptosis and chemical carcinogenesis. Risk Anal. 14: 321-326

Martinez JR, Willis S, Puente S, Wells J, Helmke R, Zhang GH(1996). Evidence for a Ca2+ pool associated with secretory granules in rat submandibular acinar cells. Biochem J 320: 627-634.

McCarthy TJH and Janet EM(1989) Activation of protein kinase C in human neutrophils attenuates agonist-stimulated rises in cytosolic free Ca release in addition to stimulating Ca efflux. Biochem. J. 264: 357-364

Miller DK(1997) The role of the caspase family of cysteine proteases in apoptosis. Semin Immunol. 9: 35-49

Miller RJ(1992) Voltage-sensitive Ca channels. J. Biol. Chem. 267: 1403-1406

Murray RK, Bennett CF, Fluharty SJ and Kotikoff MI(1989) Mechanism of phorbol ester inhibition of histamine-induced IP3 in cultured airway smooth muscle. Am. J.

Physiol. 257: L209-L216

Nishizuka Y(1986) Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233: 305-312

Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J.(1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiol Rev. 74: 595-636.

Prehn JHM, Jordan J, Ghadge GD, Galindo MF, Roos RP(1997) Ca^{2+} and Reactive oxygen species in staurosporine-induced neuronal apoptosis. J. Neurochem. 68: 1679-1685

Putney JW(1990) Capacitative calcium entry revisited. Cell Calcium 11: 611-624

Putney JW and Bird GS(1993) The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. Endo. Soc. 14: 610-663.

Putney JW, Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP, and Bird GS. Mechanisms of capacitative calcium entry. J Cell Sci. 114: 2223-9., 2001.

Raff MC.(1992) Social controls on cell survival and cell death. Nature(London) 356: 397-400

Takei N and Endo Y(1994) Ca2+ ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons. 652: 65-70

Tamaoki T, Nomoto H, Isami T, Kato Y, Morimoto M and

Tomita F(1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca dependent protein kinase. Biochem. Biophy. Res. Commu. 135: 397-402.

Willems PHGM, Hoof HJMV, Mackelenbergh MGHV and Hoenderop JGJ(1993) Receptor-evoked Ca mobilization in pancreatic acinar cells : Evidence for a regulatory role of protein kinase C by a mechanism involving the transition of high-affinity receptors to a low-affinity state. Eur. J. Physiol. 424: 171-182

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.(1980) Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 68: 251-306.

Yang CM, Sung TC, Ong R, Heish JT and Luo SF(1994) Effects of phorbol ester on phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in cultured canine tracheal smooth muscle cells. N-S's Arch Pharmacol. 350: 77-83

Yuan J. and Yankner BA(2000) Apoptosis in the nervous system. Nature 407: 802-809

Yule DI, Laweiw AM. and Gallacher DV(1991) Acetylcholine and cholecystokinin induce different pattern of oscillation calcium signals in pancreatic cells. Cell Calcium 12: 145-151

Zamzami N and Kroemer G.(2001) The mitochondrion in

apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol 2: 67-71

Zhu L, Ling S, Yu XD, Venkatesh LK, Subramanian T, Chinnadurai G, Kuo TH(1999). Modulation of mitochondrial Ca2+ homeostasis by Bcl-2. J Biol Chem 274: 33267-33273

Abstract

Mechanism of intracellular Ca^{2+} increase during staurosporine-induced apoptosis

Sang Hoon Jung

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by professor Jeong Taeg Seo)

Apoptosis is an intrinsic cellular suicidal program activated during normal physiological process involved in the development of the nervous system. It is characterized by cell shrinkage, membrane blebbing and nuclear DNA condensation and fragmentation, and is accompanied by an activation of caspase family and an abnormal mitochondrial function. However, apoptotic pathways are also known to be activated by various neurodegenerative diseases, chemicals and irradiation.

Many signaling components and enzymes, such as MAPK

family and caspases, are known to be involved in the process of apoptosis. Recently, disruption of cellular Ca^{2+} homeostasis has been proposed to be a critical event in apoptosis. Ca^{2+} plays a pivotal role in the regulation of a diverse range of cellular functions such as muscle contraction, secretion, synaptic plasticity, cell proliferation, but it also causes cell death if its increase is sustained. Therefore, in this study, I investigated the role of intracellular Ca^{2+} increase ($[Ca^{2+}]_i$) in neuronal cell death using staurosporine in neuronally differenctiated PC12 cells induced by nerve growth factor (NGF).

Exposure of differentiated PC12 cells to 200 nM staurosporine caused cell death in concentration- and time-dependent manner. It resulted in DNA fragmentation and an activation of caspase-3, suggesting that staurosporine caused apoptosis. Addition of 200 nM staurosporine to the fura-2 loaded PC12 cells induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ by 140 ± 24 nM. Removal of extracellular Ca^{2+} decreased the size of staurosporine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase but it still caused $[Ca^{2+}]_i$ to increase by 74 ± 16 nM, indicating that staurosporine mobilized Ca^{2+} from both extracellular space and intracellular Ca^{2+} stores. The chelation of extracellular and intracellular Ca^{2+} increased the cell survival from 26% to 42% and to 54%, respectively, which suggested that Ca^{2+} mobilized from both sources was involved in cell death. To identify which

subcellular compartments were responsible for the staurosporine-induced Ca^{2+} release, cells were stimulated with staurosporine after ER and mitochondrial Ca^{2+} was depleted by ionomycin in the absence of extracellular Ca^{2+}. Even after the depletion of ER and mitochondria, staurosporine still induced $[Ca^{2+}]_i$ increase suggesting that the Ca^{2+} source was ionomycin-insensitive acidic compartment in the cells. This was supported by the next experiment in which monensin, a Na^+/H^+ exchanger, increased $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of ionomycin. In addition to this, stuarosporine did not increase $[Ca^{2+}]_i$ after Ca^{2+} was removed from the acidic compartment by the pretreatment with ionomycin and monensin. Direct measurement of intra-mitochondrial Ca^{2+} concentration in rhod-2 loaded PC12 cells using confocal laser scanning microscope revealed that staurosporine increased Ca^{2+} concentration in mitochondria probably due to the passive uptake of Ca^{2+} from cytosol.

In conclusion, $[Ca^{2+}]_i$ increase plays an important role in staurosporine-induced apoptosis in neuronally differentiated PC12 cells and the main sources of Ca^{2+} are Ca^{2+} influx from extracellular space and Ca^{2+} release from intracellular acidic compartments such as secretory granules and vesicles.

Key Words : Apoptosis, intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), Staurosporine, PC12 cell